

## 《和 文》

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	盛根 信也
題 目	<p>ハブ (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) 毒出血性メタロプロテアーゼ中和ヒトモノクローナル抗体の開発            (Development of human monoclonal antibody to neutralize hemorrhagic metalloproteinase from <i>Protobothrops flavoviridis</i> venom.)</p>
<p>出血はハブ (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) 咬傷の主な症状であり、ハブ毒によって血管基底膜が損傷されることによって引き起こされる。この出血症状はハブ毒に存在する蛇毒メタロプロテアーゼファミリーに属するエンドペプチダーゼが主因とされる。</p> <p>これまで、沖縄県及び奄美諸島に生息するハブ咬傷の治療は「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されてきた。はぶウマ抗毒素は効果の高い治療薬ではあるが、原料がウマ由来の血清であることから血清病やアナフィラキシーショック等の副作用を起こすことがある。このため、副作用のないヒト抗体の開発が強く望まれてきた。そこで、本研究においてはハブ毒の主因であるメタロプロテアーゼ組成を明らかにするとともに、安全なヒトモノクローナル中和抗体の開発とその分子レベルでの反応様式の解明を試みた。</p> <p>ハブ毒については、同一種でも生息域によりタンパク質組成が異なることが知られている。これまでの研究において、出血性メタロプロテアーゼ4種類のうち沖縄県に生息するハブには HR1b のみが存在しないとされていた。しかしながら、これは不十分な分離精製が原因であることが考えられた。そこで、沖縄産ハブ毒のメタロプロテアーゼ組成をより明確にするため及びより純度の高い抗原を得るために、精度の高いクロマト法を用いてHR1bの精製を試みた。その結果、沖縄産ハブ毒から HR1b の精製に成功し、少量ながら沖縄産ハブ毒にも HR1b が存在することが初めて明らかになった。このことは、分離精製した HR1b のメタロプロテアーゼとしての基質特異性が明らかに HR1a とは異なっていたことから支持された。次いで、ハブ毒腺から HR1b の cDNA のクローニングを行い、沖縄県に生息するハブの毒にも HR1b が存在する事を追認した。</p> <p>続いて、出血の主因メタロプロテアーゼである HR1a に対するヒトモノクローナル中和抗体の作製を試みた。まず、精製した HR1a を抗原にしてヒト抗体を産生するKMマウスを免疫した。HR1a を免疫したKMマウスの脾臓細胞とミエローマ SP2/0-Ag14 を融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマ (ヒト抗体産生細胞) の作製を行った。その結果 300 株のハイブリドーマ細胞から80株の HR1a 結合ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞が得られた。これら80株の産生するヒト抗体について、in vitro における HR1a のプロテアーゼ活性阻害及び in vivo における出血阻害を評価し、両者を抑制する抗体 No. 7 と No. 18 を得た。</p> <p>次に両中和ヒト抗体の抗原 HR1a の結合部位の特定 (エピトープマッピング) を行った。HR1a タンパクのアミノ酸配列を基に、3アミノ酸残基ずつフレームシフトさせた連続的なペプチド断片を合成し、No. 7 と No. 18 の中和抗体と各ペプチドとの反応を ELISA で測定した。その結果、両中和抗体は HR1a 分子表面上の2領域 (EQQRYLNNFRFIELV 及び IVNTLNETYRYL) に結合することが明らかになった。立体構造が既知の類似タンパク質を鋳型にした HR1a の立体構造モデリングにより、両結合部位は分子表面上に隣接して配置されていることが示唆され、中和抗体はこれらの空間的立体配位をエピトープとして認識しているものと考えられた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Nobuya Morine
題 目	Development of human monoclonal antibody to neutralize hemorrhagic metalloproteinase from <i>Protobothrops flavoviridis</i> venom. (ハブ ( <i>Protobothrops flavoviridis</i> ) 毒出血性メタロプロテアーゼ中和ヒトモノクローナル抗体の開発)

Hemorrhage is a major complication resulting from envenomation by the snakebite, and is the bleeding symptom caused by the disruption of the basement membrane of blood vessel. The primary component responsible for this bleeding has been shown to be endopeptidase belonging to the family of snake venom metalloproteinase (SVMP).

The horse anti-venom has been effectively used for the treatment of the habu (*Protobothrops flavoviridis*) bites in Okinawa and Amami islands region. However, the use of anti-venom of animal origin is far less preferable, because a risk of serum sickness such as the anaphylactic shock still exists. Thus, there has been a potential need for the development of more safe and effective antiserum, which prompted us to produce the human monoclonal antibodies against venom of *P. flavoviridis* that essentially have no side effect. This study therefore describes the production and molecular characterization of the human monoclonal antibody that neutralize the hemorrhagic activity of SVMP.

It has been shown that the composition of venom protein shows regional variation even in the same snake species. We thus first attempted identification and characterization for the SVMPs in the snake venom of *P. flavoviridis*. Two closely related metalloproteinases, HR1a and HR1b, were purified from the venom of *P. flavoviridis* (Amami habu). However, it has been reported that the venom of Okinawan *P. flavoviridis* (Okinawa habu) lacks HR1b. Advanced purification technology used in our study enabled us to purify HR1b from the snake venom of Okinawa habu for the first time. It was also found that the concentration of HR1b in the venom of Okinawa habu was much lower than that for Amami habu. The substrate specificity of HR1b differed from that of HR1a, and distinguished this SVMP from HR1a. Furthermore, cDNA of HR1b has been successfully cloned in support of the occurrence of this protein in the snake venom of Okinawa habu.

In the next step, we attempted the production of human monoclonal antibody against HR1a that was the largest SVMP and mainly responsible for hemorrhage activity of Okinawa habu. The human monoclonal antibodies (HuMAbs) against HR1a were obtained by the fusion of SP2/0-Ag14 myeloma cells and spleen cells from KM mice immunized with purified HR1a. The ability of HuMAbs to neutralize the HR1a was determined by in vitro neutralization assay and by neutralization of the hemorrhagic activity. The initial screening of over 300 hybridoma fusion wells resulted in establishment of 80 HR1a-reactive hybridomas. Of the reactive clones, HuMAb HR1a-7 and HR1a-18 neutralized both proteolytic and hemorrhagic activity of HR1a. Mapping of epitope recognized by the reactive clones was performed by using an ELISA that measured antibody binding to overlapping peptides (15 amino acid peptide offset frameshifted by three residue) covering the metalloproteinase domain sequence of HR1a. HuMAbs HR1a-7 and HR1a-18 neutralized HR1a by reacting with peptides of EQQRYLNNFRFIELV and IVNTLNETYRYL. The three-dimensional structure of HR1a based on a homology modeling predicted that these two epitopes are surface exposed.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	盛根 信也
審査委員	主査 琉球 大学・教授 屋 宏 典
	副査 琉球 大学・准教授 福田 雅一
	副査 宮崎 大学・教授 水光 正仁
	副査 佐賀 大学・教授 渡邊 啓一
	副査 琉球 大学・教授 外山 博英
審査協力者	
題 目	<p>ハブ (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) 毒出血性メタロプロテアーゼ中和 ヒトモノクローナル抗体の開発 (Development of human monoclonal antibody to neutralize hemorrhagic metalloproteinase from <i>Protobothrops flavoviridis</i> venom.)</p>
<p>ハブ (<i>Protobothrops flavoviridis</i>) 咬傷の主な症状は出血であり、ハブ毒によって血管基底膜が損傷されることによって引き起こされる。この出血症状はハブ毒に存在する蛇毒メタロプロテアーゼファミリーに属するエンドペプチダーゼが主因とされる。</p> <p>これまで、沖縄県及び奄美諸島に生息するハブ咬傷の治療は「乾燥ハブ-ウマ抗毒素」が使用されてきた。ハブ-ウマ抗毒素は効果の高い治療薬ではあるが、原料がウマ由来の血清であることから血清病やアナフィラキシーショック等の副作用を起こすことがある。このため、副作用のないヒト抗体の開発が強く望まれてきた。そこで、本研究においてはハブ毒の主因であるメタロプロテアーゼ組成を明らかにするとともに、安全なヒト型モノクローナル中和抗体の開発とその分子レベルでの反応様式の解明を試みた。</p> <p>ハブ毒については、同一種でも生息域によりタンパク質組成が異なることが知られている。これまでの研究において、出血性メタロプロテアーゼ4種類のうち沖縄県に生息するハブには HR1b のみが存在しないとされていた。しかしながら、これは不十分な分離精製が原因であることが考えられた。そこで、沖縄産ハブ毒のメタロプロテアーゼ組成をより明確にするため及びより純度の高い</p>	

抗原を得るために、精度の高いクロマト法を用いて HR1b の精製を試みた。その結果、沖縄産ハブ毒から HR1b の純化に成功し、少量ながら沖縄産ハブ毒にも HR1b が存在することが初めて明らかになった。このことは、分離精製された HR1b のメタロプロテアーゼとしての基質特異性が明らかに HR1a とは異なっていたことから支持された。次いで、ハブ毒腺から HR1b の cDNA のクローニングを行い、沖縄県に生息するハブの毒にも HR1b が存在する事を追認した。

続いて、出血の主因メタロプロテアーゼである HR1a に対するヒト型モノクローナル中和抗体の作製を試みた。まず、精製した HR1a を抗原にしてヒト抗体を産生する KM マウスを免役した。HR1a で免疫した KM マウスの脾臓細胞とミエローマ SP2/0-Ag14 を融合し、ヒト型抗体を産生するハイブリドーマ細胞 (ヒト抗体産生細胞) の作製を行った。その結果 300 株のハイブリドーマ細胞から HR1a 反応性のヒト抗体を産生する 80 株のハイブリドーマ細胞が得られた。これら 80 株が産生するヒト抗体について、*in vitro* における HR1a のプロテアーゼ活性阻害及び *in vivo* における出血阻害を評価し、両者を抑制する抗体 No. 7 と No. 18 を得た。

次に両中和ヒト抗体の抗原 HR1a の結合部位の特定 (エピトープマッピング) を行った。HR1a タンパク質のアミノ酸配列を基に、3 アミノ酸残基ずつフレームシフトさせた連続的なペプチド断片を合成し、No. 7 と No. 18 の中和抗体と各ペプチドとの反応を ELISA で測定した。その結果、両中和抗体は HR1a 分子表面上の 2 領域 (EQQRYLNNFRFIELV 及び IVNTLNETYRYL) に結合することが明らかになった。立体構造が既知の類似タンパク質を鋳型にした HR1a の立体構造モデリングにより、両結合部位は分子表面上に隣接して配置されていることが示唆され、中和抗体はこれらの空間的立体配位をエピトープとして認識しているものと考えられた。

以上、本論文は沖縄産ハブ毒組成についての新知見のみならず、副作用のないハブ毒中和ヒトモノクローナル抗体の産生に道を開く優れた基礎的知見を提供していることから、博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有すると判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	盛根 信也
審査委員	主査 琉球 大学・教授 屋 宏 典
	副査 琉球 大学・准教授 福田 雅一
	副査 宮崎 大学・教授 水光 正仁
	副査 佐賀 大学・教授 渡邊 啓一
	副査 琉球 大学・教授 外山 博英
審査協力者	
実施年月日	平成20年1月18日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成20年1月18日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	盛根信也
<p>〔質問 1〕 HR1bの方が毒性が強いことからすると、ハブ毒を中和するために全てのプロテアーゼに対するモノクローナル抗体を開発する必要があると考えられるが、今回の実験においてHR1aを選択してモノクローナル抗体を作製したのは量的に多いものを用いた方が実験に有利であるとの判断と考えて宜しいでしょうか？</p> <p>〔回答 1〕 そうです。まずは主要な成分からとの考えからです。</p> <p>〔質問 2〕 ハブの毒の強さは食餌によりことなるとされていますが、奄美ハブと沖縄ハブの毒の強さは同程度でしょうか？</p> <p>〔回答 2〕 ヒトの症状から判断するとほぼ同程度と言えそうです。研究者によっては奄美ハブには毒性の強い成分がふくまれており、その分だけ毒性が強いとの見解がございますが、現場ではそう大差は無いとの結論が出ております。</p> <p>〔質問 3〕 出血活性を追跡しているが論文ではトロンビンについても触れられている。ハブ毒はトロンビンにも作用するのか？</p> <p>〔回答 3〕 ハブ毒は血液凝固を阻害するとされています。</p> <p>〔質問 4〕 ただ、論文の中では、ハブ毒には血液凝固をさせるものもあると述べられているがこれはどういうことか？</p> <p>〔回答 4〕 ハブに咬まれた場合、最初は出血が止まらず、これは血液凝固を抑制する成分のためだと考えられます。しかしながら、26成分の中には血液凝固を促進する成分もあり、ただ量的に少ないために活性が見かけ上は発現されていない。つまり、成分としてはあるが全体の出血症状には影響しないということだと考えています。</p> <p>〔質問 5〕 ハブ毒抗体を作るのであれば26成分に対するすべての抗体をつくらなければ毒性をおさえることはできないのでは？</p> <p>〔回答 5〕 単純に考えればそうですが、ただ我々はこれまでの経験からメタロプロテアーゼを抑制すればハブ咬傷による症状を抑えることができると判断しています。実際に4つの主要なプロテアーゼで免役したウマから調製した血清は充分ハブ毒による咬傷を抑えることが解っております。</p> <p>〔質問 6〕 キリンビールのKMマウスはトランスジェニックマウスで、ヒト型抗体を作るがこれに対する自己抗体が作られることはないのか？</p> <p>〔回答 6〕 胎児の時点で自己抗原に対する抗体はつくられないシステムとなっているので、ヒト型抗体に対する抗原が作られることはありません。</p> <p>〔質問 7〕 出血作用を起こす原因がプロテアーゼであるとする実験はあるのか？</p> <p>〔回答 7〕 プロテアーゼはコラーゲンを分解するとされこれにより血管壁が傷害される。出血性メタロプロテアーゼはEDTAで失活いたします。EDTAで失活させたメタロプロテアーゼを皮膚内に投与しても失血は起こりません。このことからプロテアーゼが原因であることが解るかと思えます。</p> <p>〔質問 8〕 他にも同様な例つまりプロテアーゼを抑制すると出血活性が無くなるというものがあるか？</p> <p>〔回答 8〕 EDTA以外のプロテアーゼ阻害物質の例はないようです。</p> <p>〔質問 9〕 プロテアーゼ阻害活性と出血阻害活性には相関がないが、これはどう考えるか。</p> <p>〔回答 9〕 生体内での基質はコラーゲンであるのに対し、試験管内での評価に用いた基質はカゼインであることから、基質特異性の違いにより相関が得られなかった可能性が考えられる。</p>	

〔質問 10〕 出血阻害活性をスクリーニングするのに必ずしもプロテアーゼ活性を指標にする必要はないのでは？

〔回答 10〕 本来はウサギ皮膚を用いた検定が一番確実ではあるが、実験動物の使用を最小限に抑えるためには一次スクリーニングにプロテアーゼ活性を指標にせざるを得なかったという事情がございます。今後は、スクリーニング法及び基質については検討したいと考えている。

〔質問 11〕 プロテアーゼ阻害活性がない抗体について出血阻害活性を調べてみる必要性はないか？

〔回答 11〕 治療薬の開発が目的であるため、今回の研究では実際に出血阻害活性が確認できる抗体についての検討を優先させました。

〔質問 12〕 プロテアーゼ阻害活性と出血阻害活性が相関していない原因を基質特異性の違いで考察しているが、これは正しいか？

〔回答 12〕 カゼインは球状であるのに対しコラーゲンは棒状のタンパク質であるため、活性中心へのアクセスのしやすさに差があるのではないかと考えている。

〔質問 13〕 エピトープ領域は全部表面に露出しているのか？リボンモデルで表現されているのでよく解らないが全部表面に露出しているようには見えないのだが？

〔回答 13〕 そこまでは解析していないので解らない。今後検討したい。

〔質問 14〕 抗体が結合した時の活性阻害を基質の触媒部位への立体障害と他の部位との相互作用で説明しているが、小さい合成基質の場合についての抗体による活性阻害についてはどうか？

〔回答 14〕 小さい基質の場合は抗体による阻害は小さい。従って、基質が小さい場合には抗体の結合による立体障害を回避できるのではないかと考えている。

〔質問 15〕 そうであれば、抗体が触媒活性にアロステリックに影響するとする考察があるが、立体障害が活性阻害の主因ではないのか？

〔回答 15〕 おそらく、そうであろうと考えます。その点を考察に追加したいと思います。

〔質問 16〕 モノクローナルよりポリクローナル抗体が中和活性が強いのではないかとされるか？

〔回答 16〕 製品化する際のコスト面からモノクローナルを選択いたしました。

〔質問 17〕 モノクローナル抗体を混ぜるとより効果が高まるのでは？

〔回答 17〕 ハブ毒について調べてはいないが、他の炭疽菌の毒についてモノクローナル抗体を混ぜて使用した場合、毒性の中和効果が何倍にもなったとの報告がございます。

〔質問 18〕 奄美ハブ毒についても同様な研究があるのか？

〔回答 18〕 モノクローナル抗体に関する同様な研究はありません。

〔質問 19〕 他の毒素蛋白についても同様なエピトープ領域を使用してモノクローナル抗体を作ろうと予定しているのか？

〔回答 19〕 この領域をそのまま使う方法、また他のタンパク質の類似のエピトープ領域を使う方法或いは検出法として今回得られた抗体を利用することも可能かと考えている。