

研 究 報 告 書

「腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機構の解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 新藏 礼子

1. 研究のねらい

腸管内には多種多様な細菌が常に生息し、宿主と平和的な共生関係を築いている。この共生関係が崩れると、炎症性腸疾患や肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病、大腸ガンなど各種疾患の発症に繋がるため、腸内環境を恒常的に維持することは健康維持に重要である。腸は宿主と腸内細菌による共生の重要な場であり、恒常性維持のために多くの免疫細胞や分子が働いているが、IgA は粘膜面の病原菌防御だけでなく腸内常在細菌の制御にも重要であり、このような共生関係の維持にも極めて重要であると考えられている。腸管に分泌される IgA は腸内細菌に対して poly-reactive に反応し粘膜面の第一線防御に重要と考えられてきた。最近の研究では腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されているが、具体的に腸内細菌の何をどのように認識し制御するかは明らかではない。

抗体のクラススイッチは正常に起こるが体細胞突然変異が障害されているマウス (AID^{G23S} マウス) の病態解析から、細菌に強く結合する IgA を産生できないと腸内細菌の異常増殖や腸炎が発症することが明らかとなった。この病態の治療には野生型マウス由来の多種類の腸内細菌に強い結合力を持つ IgA 抗体を経口で補充することが有効ではないかと考えた。この仮説を証明するために以下の実験を行った。

1、野生型マウスの腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを作製し、多種類の細菌に強く結合する IgA モノクローナル抗体を得る。

2、得られた IgA モノクローナル抗体を AID^{G23S} マウスや腸炎モデルマウスに経口投与して、腸炎の抑制効果を調べる。

3、得られた IgA モノクローナル抗体が細菌の何を認識するのかを明らかにする。この解析により、今まで推測の域でしか理解されていなかった「腸管内で分泌型 IgA が腸内細菌叢をどのように認識し制御しているか」を明らかにする。

4、以上の成果をもとに IgA 抗体経口投与による炎症性腸疾患の治療への応用を目指す。腸内細菌は種類が多く、外的要因により容易に変化するため、全貌を解析することは難しく、また炎症の原因菌を特定することはきわめて難しい。上記の仮説が正しくマウスでの腸炎抑制効果が見られた場合、IgA モノクローナル抗体の細菌特異性が広いので、原因菌を同定する必要はなく、腸内細菌叢制御による炎症性腸疾患の治療薬として使用できると考える。

2. 研究成果

(1) 概要

私たちは野生型マウスの腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製した。その

中から多くの腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択した。W27 抗体は大腸菌や *Pseudomonas fulva* には強く結合したが、*Lactobacillus casei* や *Bifidobacterium bifidum* のようないわゆる善玉菌には弱くもしくはほとんど結合しなかった。つまり、W27 抗体は善玉菌には結合しないように細菌を識別する抗体であることがわかった。マス解析により私たちは W27 が認識する大腸菌の抗原分子が Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) という代謝酵素であること、またその分子内エピトープも同定した。W27 抗体はこのエピトープ部分のアミノ酸の違いを識別して、各細菌への結合力が異なることも明らかにした。さらに W27 抗体は強く結合する大腸菌の増殖を抑制したが、ほとんど結合しない *Lactobacillus casei* の増殖は抑制しなかった。すなわち、悪玉菌を識別して結合しその増殖を抑え、一方で善玉菌には結合しないため善玉菌の増殖を阻害しないことがわかった。W27 抗体をマウスに経口投与することで、腸内細菌叢のバランスが変化し、腸管の B 細胞の過剰増殖を抑制することを示した。さらに W27 抗体を腸炎治療用抗体の候補とし経口投与を行い、マウス腸炎モデル（DSS 誘導性腸炎、および T 細胞移入腸炎）で W27 抗体の腸炎抑制効果も確認した。

以上から、W27 IgA 抗体は腸内細菌制御に有効な経口治療薬候補であることを明らかにした。今後は W27 IgA 抗体の臨床応用を目指し、抗体投与量設定や製剤化を検討する。

(2) 詳細

テーマ1) 腸内細菌制御に有効な IgA モノクローナル抗体候補 W27 の獲得

野生型マウスの小腸粘膜固有層の IgA 産生細胞由来ハイブリドーマを作成した。数多くのハイブリドーマの中で、多種類の細菌に強く結合する IgA 抗体を産生する W27 を選択した。結果の一部を図1左に示した。示した細菌以外にも調べた12種の腸内細菌に対して W27 は他の IgA 抗体より強く結合することが各細菌をコーティングした ELISA より確認できた。しかし、W27 抗体は *Bifidobacterium bifidum* に対しては弱く、また *Lactobacillus casei* に対してはほとんど結合しなかった。すなわち、W27 抗体は多種類の細菌にランダムに結合するのではなく、選択的に細菌を認識して結合することがわかった。W27 は細菌に結合するだけでなく共培養することで強く結合する大腸菌の増殖を抑制し(図1右)、一方でほとんど結合しない *Lactobacillus casei* の増殖は抑制しなかった(図1右)。これらの結果から、W27 IgA 抗体は善玉菌には結合せず増殖を阻害することなく、腸炎などを惹起する可能性のある細菌には強く結合してその増殖を抑制することで、結果的に腸内細菌叢全体のバランスを整える効果があると考えられた。

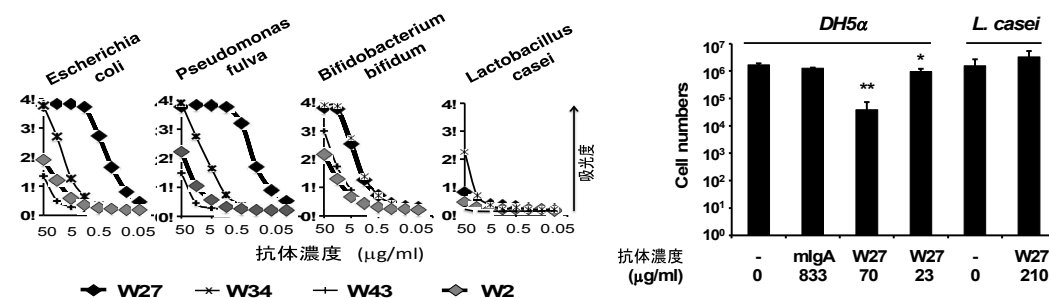


図1 (左)各種細菌に対するモノクローナル IgA 抗体(4種)の結合力の測定(ELISA 法)

(右)大腸菌と *Lactobacillus casei* 菌と W27 抗体、コントロール IgA 抗体 (mIgA) を共培養したときの細菌数を qPCR により測定して抗体の増殖抑制効果を検討した。

テーマ 2) W27 抗体が認識する分子とそのエピトープの同定

W27 抗体が認識する分子は代謝酵素 serine hydroxymethyltransferase (SHMT) であることを大腸菌の抽出タンパク質を用いたマス解析により明らかにした。さらに大腸菌 SHMT 分子のエピトープがアミノ酸 25-45 番目の領域であることを確定した。

テーマ 3) W27 抗体経口投与による AID^{G23S} マウスの小腸パイエル板胚中心 B 細胞の減少 (免疫系過剰刺激の改善)

AID^{G23S} マウスに W27 抗体 (25 µg/ml、給水瓶に添加) を 4 週間投与して、小腸パイエル板胚中心 B 細胞数と大腸組織を観察した。図 2 左に示すように W27 抗体経口投与により有意に胚中心 B 細胞数が低下し、すなわち免疫系の過剰刺激が改善された。コントロール抗体として結合力の弱い W2 抗体を同時に投与したが有意な効果は見られなかった。

W27 抗体投与により、図 2 右に示すように大腸クリプト損傷も改善された。

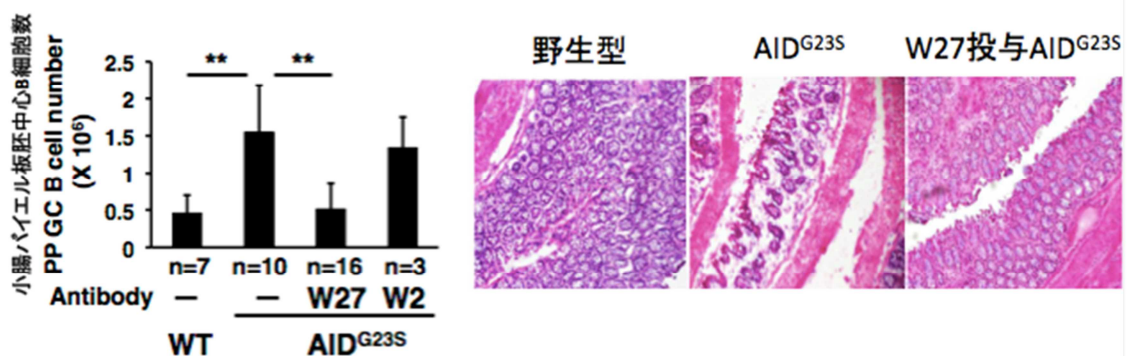


図 2 W27 抗体経口投与後のパイエル板胚中心 B 細胞数の減少と大腸組織像の改善

テーマ 4) DSS 腸炎モデルと T 細胞移入腸炎モデルに対する W27 抗体の腸炎抑制効果

上記と同様に W27 抗体 (25 µg/ml、給水瓶に添加) を 4 週間投与して、2 つの腸炎モデルにおいて体重減少率を腸炎抑制効果として評価した。図 3 に示すように 2 つのモデルにおいて W27 抗体経口投与により、有意にマウスの体重減少が抑制された。大腸組織の損傷も軽度であった。

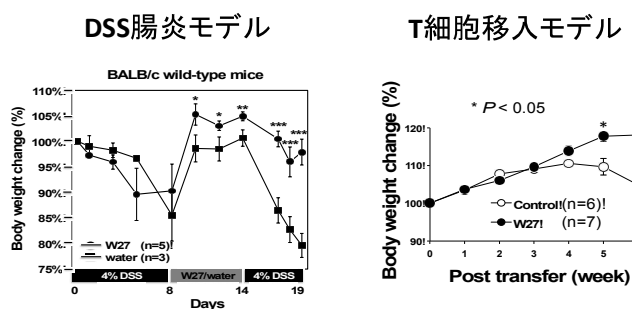


図3 DSS 腸炎とT細胞移入腸炎モデルにおけるW27抗体経口投与の体重減少抑制効果

3. 今後の展開

リコンビナントヒトキメラW27IgA抗体の一量体、二量体、分泌型IgA、Fab断片、さらにIgG型を作成して、細菌増殖抑制効果とマウス腸炎抑制効果を比較して治療効果の最も高い最適な剤形を決定する。

ヒト便サンプルから抽出したIgA抗体を用いて、炎症性腸疾患患者の大腸菌に対する結合力が健常人に比べて弱いというデータを得た。種々の細菌に対する反応性を調べて、W27抗体のような高い結合力を持つ抗体を患者の腸管内に補充する合理性を得る。

マウス腸管内容物中の腸内細菌をW27抗体が結合する細菌と結合しない細菌にセルソーターで分離し、細菌種に違いがあることを見つけた。宿主の腸内環境にとってこの細菌群の違いがどのような生理学的意味を持つかをメタボローム解析結果から考察する。これにより何をゴールにIgA抗体が腸内細菌を制御しているのか、を明らかにする。

以上の研究成果を抗体医薬の実用化への根拠としたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- ・ 研究のねらいの達成度

- 1. 研究のねらいに記載した4項目について、ほぼ達成した。

- ・ 研究成果の公表

- 研究成果を広く世に知らしめるためには論文を発表しなければならなかったが、1月中旬現在、まだ投稿中でありとても残念である。一日も早く世に出せるようさらに努力する。

- ・ 特許出願

- 特許出願は長浜バイオ大学の知財部門(研究推進機構事務室)のご協力を得て適時に実施できた。日、米、欧、中国に大学経費で移行(出願)した。今後は日本国だけでなく、外国での特許成立を目指し製薬企業への導出を加速したい。

- ・ 科学技術および社会・経済への波及効果

- 腸管IgAが細菌の何を認識してどのような効果を及ぼすのか、について世界的に見ても非常に新しい知見を得たと自負する。IgA抗体が治療薬として活用できることもマウスの実験ではあるが示すことができた。宿主にとって良い細菌は殺さずに腸内細菌をコントロールできる新しい発想の治療薬を日本から発信したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

腸内細菌叢のバランスの崩れが多く疾患の原因になることが最近明らかにされてきた。すな

わち、腸内細菌叢は生体の恒常性維持・変容に大きく関与している。また、最近の研究では腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されている。

本研究者は腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製し、多くの腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択し、その抗原分子、分子内エピトープも同定し、この抗体がエピトープ部分のアミノ酸の違いを識別して、各腸内細菌への結合力が異なることも明らかにした。すなわち、W27 抗体は腸内細菌の悪玉菌を識別して結合し、その増殖を抑え、一方で善玉菌には結合しないため、その増殖を阻害しないことが明らかになった。さらに腸炎モデル（DSS 誘導性腸炎、および T 細胞移入腸炎）マウスに W27 抗体を投与し、その腸炎抑制効果も確認した。以上から、W27IgA 抗体は腸内細菌制御に有効な経口治療薬候補であることを明らかにした。今後は W27 IgA 抗体の臨床応用が期待される。

研究費は、論文投稿のための治療実験に用いる抗体作成費用として 332 万円、抗体によりどのような腸管細菌が増減するのかを確認するためのメタボローム解析費用として 240 万円の増額、総額 572 万円の増額を行うことにより、より詳細な研究を実施し、臨床開発に近づけることができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国内学会ではあるが、招待講演もいくつか行っており、原著論文も投稿中で、今後の活躍が十分に期待される。また、本抗体が医薬品として臨床開発される日も近いと期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

論文投稿中

(2)特許出願

研究期間累積件数:4 件

1.

発 明 者: 新藏 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法 原案: 炎症性腸疾患治療用の経口投与用モノクローナル IgA 抗体医薬の開発

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 2013/3/11

出 願 番 号: 特願 2013-048365

2.

発 明 者: 新藏 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 2013/8/9

出 願 番 号: 特願 2013-167120

注) 特願 2013-048365 を先の出願とする優先権出願である。共に、JST 特許出願支援制度

(国際出願)に採択された(2013/9/10)。JST 整理番号:S2013-0229

3.

発 明 者: 新蔵 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 日本 2015/8/31)

出 願 番 号: 日本 PCT/JP2014/056216

出 願 日: 米国 2015/09/09

出 願 番 号: 米国 14/773923

出 願 日: 欧州 2015/10/09

出 願 番 号: 欧州 14762432.4

出 願 日: 中国 2015/11/10

出 願 番 号: 中国 201480026684.0

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. IgA 抗体による腸内細菌制御ー炎症性腸疾患新規治療薬候補としてー
新蔵礼子
第8回鹿児島FD・IBS研究会(鹿児島)2015年7月(特別講演)
2. Oral administration of dimeric monoclonal IgA antibody as a candidate
therapeutic approach for spontaneous colitis in mice. 新蔵礼子
JDDW2014(神戸)
2014年10月(シンポジウム)
3. 腸内細菌制御における腸管 IgA 抗体体細胞突然変異の役割 新蔵礼子
第18回腸内細菌学会(東京)2014年6月(ワークショップ)

論文(総説)

1. IgA 抗体による腸内細菌の制御機構. 新蔵礼子
医学のあゆみ 5月号(土曜増刊), 375-380, 2015.
2. 腸管免疫の恒常性における免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異の重要性.
新蔵礼子
臨床免疫・アレルギー科(58巻・4号) 361-367, 2012.