

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の制圧を目指したヒト中和単クローン抗体の作成

松下修三

熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 臨床レトロウイルス学分野

【研究の背景】

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、様々な変異株の蔓延という新しい段階に入っている。SARS-CoV-2 に感染し、重症化後に回復した症例には中和抗体が検出され、回復期血漿を用いた治療法が模索されている。我々は、HIV-1 に対する中和抗体を開発してきた実績に基づき、COVID-19 回復期症例の B 細胞から抗体遺伝子を単離し、組み換え抗体として用いる「中和抗体療法」の開発を計画した。

【目 的】

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)回復期症例の B 細胞から、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を強力に中和するヒト単クローン抗体を樹立する。組み換え中和抗体を用いた COVID-19 治療法開発を目指す。

【方 法】

- 1) **中和単クローン抗体のスクリーニング**;本研究計画は、熊本大学大学院生命科学研究部及び熊本市民病院での倫理審査済である(倫理第2013号)。同意の取得、血液検体の採取は、熊本市民病院の担当医師(岩越 一部長ら)が行う。該当症例の末梢血から IgG/CD27 陽性の B 細胞を single cell sorting (FACS Aria III, BD) で分離し、各細胞から重鎖と軽鎖をクローニング後、組み換え抗体の SARS-CoV-2 の S 蛋白発現細胞に対する結合活性によりスクリーニングした。
- 2) **中和抗体の機能評価、中和エピトープの同定**;スクリーニング陽性抗体について (1) 臨床分離株を用いた中和試験(ブランク試験、CPE 試験)、(2) 肺がん細胞(Calu3)を用いた細胞融合阻止試験 (3) pseudovirus 中和試験の 3 つの測定法で中和活性を評価した。中和能が確認された抗体の反応エピトープを S1 の断片や RBD (receptor binding domain) を含む複数の組み換え体を用いて同定する。さらに詳細なエピトープ同定や中和機序の解明を目指し、Fab と RBD 複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析を行う。
- 3) **治療用抗体の選定・最適化、及び前臨床試験用抗体の作成**;in vitro の評価で治療用抗体として臨床試験に用いる候補抗体を選定する。候補抗体の重鎖と軽鎖の最適化を図り、前臨床試験候補抗体を決定した。

【結 果】

(1) 中和単クローン抗体の分離同定

我々は SARS-CoV-2 に感染し、重症化後に回復した症例の末梢血単核球から、CD19⁺, CD27⁺, IgG⁺, IgM⁻ の B 細胞を FACS single cell sorting にて分離、重鎖と軽鎖をそれぞれクローニングして、HEK-293T 細胞に co-transfection して抗体を産生させ、spike 蛋白への結合活性をスクリーニングした。総数 1102 クローン进行分析し、88 個の陽性クローンを同定した。これらの 88 クローンに関して、pseudovirus を用いて中和活性をスクリーニングしたところ、5 クローンが有意な活性を示した。また、組み換え RBD 蛋白を用いて RBD に結合するかどうか評価したところ、9 クローンに RBD 結合活性を認めた。

(2) 分離したクローンの中和活性及び結合活性の評価

スクリーニング陽性のクローンについて、pseudovirus 中和試験、細胞融合阻止試験を行った。どの中和試験の結果も同

様に、9-105 に強力な中和活性を認めた (IC_{50} : 0.9~3.5ng/mL)。10-121 も 8-92 もこれまで報告された強力な中和抗体に匹敵する活性を示した。SARS-CoV-2 の spike 発現細胞に対する FACS 解析では、5 抗体のどれもが細胞表面に発現した spike 蛋白に結合したが、特に 9-105 抗体は、低濃度で強力な結合活性を示した。組み換え RBD に対する結合活性をビアコア分析にて測定すると、9-105 抗体が K_D : $2.03 \times 10^{-12} M$ という桁外れの強力な結合活性を持つことが明らかとなった。これらのデータに基づき特許申請を行った²⁾。

(3) SARS-CoV-2 変異株に対する中和活性の評価

COVID-19 パンデミックは変異株の感染拡大という新たな局面に入っている。これらの変異株は、現在用いられているワクチンが誘導する抗体や米国で緊急承認された中和抗体に対する抵抗性が報告されている。アルファ株 (B.1.1.7)、ベータ株 (B.1.351)、ガンマ株 (P.1)、デルタ株 (B.1.617.2)、ミンク株 (mink cluster 5) の pseudovirus を作成し、交差中和活性を検討した。アルファ株とミンク株は 9-105、10-121、8-92 によって野生型とほぼ同程度の濃度で中和された。一方、ガンマ株、デルタ株、ベータ株には中和抵抗性がみられた。南アフリカ由来の B1.351 とブラジル由来の P.1 は特に B1.351 に対しては、全ての抗体に 3 倍以上の IC_{50} 値の上昇がみられたが、9-105 と 10-121 は低濃度で中和活性を持つことが観察された³⁾。

(4) authentic SARS-CoV-2 (プロトタイプと変異株) を用いたプラーク中和試験

また、authentic virus を用い、Vero 細胞を標的としたプラーク試験での評価も行った。9-105 抗体は、 IC_{50} : $0.0073 \mu g/mL$ と低濃度で有効であり、 $0.08 \mu g/mL$ の濃度で 100% の感染抑制効果が得られている。一方、感染症例の血漿中の中和活性は、症状出現後 2 か月くらいまでは保たれるが、6 か月以上になると低下する。authentic SARS-CoV-2 を用いた検討で、9-105 抗体も 10-121 抗体も交差中和活性を確認できた。特記すべきは、9-105 の中和活性で、アルファ株の IC_{50} : $0.0042 \mu g/mL$ 、中和抵抗性のベータ株の IC_{50} : $0.032 \mu g/mL$ 、ガンマ株の IC_{50} : $0.022 \mu g/mL$ という、低濃度で強力な中和活性を示した。これらのデータをまとめて Cell Report 誌に発表した¹⁾。

(5) 9-105 抗体の結合エпитオプの探索と結合様式のシミュレーション

中和抗体のエピトープ同定のために、カイコーバキュロウイルス発現系を用いて RBD の野生型及びエスケープ変異を持つ 8 種の変異体組換えタンパク質を用いた結合試験及び既存のデータを用いたシミュレーションから、9-105 抗体は RBD とレセプターである ACE の相互作用を広範囲にわたって抑制する可能性が考えられた。

(6) オミクロン株の出現と対応する中和抗体の作成

2021 年 11 月に南アフリカで検出されたオミクロン株は、既存のワクチンの効果が弱く、瞬く間に世界各地に拡大した。9-105 抗体は、オミクロンにも有効とされたソトロビマブと同等の効果を示したもののソトロビマブと同様に BA.5 に対する効果の減弱を認めた。我々は、ワクチン接種後にデルタ株に感染した症例でオミクロン株に対しても強力な交差中和活性を持つ症例を同定し、該当症例の B 細胞のソーティングによって、オミクロン株の派生株を中和する抗体を樹立した。いくつかのグループが交差中和抗体を発表しているが、結合活性の側面から、抗体パネルでなければ in vivo で強力な活性が期待できないと考えられる。

【考 察】

COVID-19 に対する中和抗体は、世界各地で開発され、一部は臨床試験まで進んでいる。これらの先行研究の抗体は、in vitro の中和能や動物モデルでの有効性など、目覚ましい効果が認められている。しかしながら、臨床試験の結果は予想に反し限定的なものであった^{4,5)}。即ち、先行抗体を用いた研究では、最も重要な、諸症状が出現し入院が必要な症例には十分な効果が示されていない。先行抗体は強い中和能を示すもの、RBD に対する結合活性 (K_D 値) が十分でなかった可能性がある。RBD と ACE2 の結合活性は $7 \times 10^{-9} M$ と報告され⁶⁾、 K_D 値が $10^{-9} M$ レベルの抗体は、実験の過程で pre-incubation が行われる中和試験や暴露前投与が行われる動物モデルでは有効性が認められても、生体内でウイルスが増殖している感染症例での有効性は期待できないと考えられる。また、感染者に出現する非中和抗体の中には強い結合活性をもつものが存在するため、結合活性が強い抗体は、実際の臨床では効果が得られない可能性がある。一方、9-105 抗体は K_D 値: $2.03 \times 10^{-12} M$ という桁外れの高親和性を持ち、すでに Spike に結合している非中和抗体に入れ替わって中和する可能性が考えられる。先行抗体は、70-100mg/kg で投与され、コストが問題であるのに対し、本抗体は強力な中和活性から、50~100 分の 1 の投与量 (0.5-1 mg/kg) で効果が期待できる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

「中和抗体療法」に期待される効果には、軽症例の重症化の阻止、重症例の状態の改善に加えて、医療崩壊の引き金になる医療従事者への感染を阻止する予防投与も視野に入る。治療や予防の効果が観察されれば、COVID-19 パンデミックを終わらせる切り札となる。

【参考・引用文献】

- [1] Kaku Y. et al., Cell Rep. 2021 Jul 13;36(2):109385.
- [2] 発明者：松下修三、郭 悠、桑田岳夫、出願人：熊本大学、「コロナウイルススパイク蛋白に対するヒト抗体」、出願番号：特願 2020-143055、出願日：2020年8月26日
- [3] 発明者：松下修三、郭 悠、桑田岳夫、出願人：熊本大学、「コロナウイルススパイク蛋白に対するヒト抗体」出願番号：特願 2021-54387、出願日：2021年3月26日
- [4] Gottlieb RL., et al., JAMA. 2021; 325(7):632-644.
- [5] Weinreich DM., et al., N Engl J Med 2021; 384:238-51
- [6] Yuan M. et al., Science. 2021; 373(6556):818-823