

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術 の開発

所属 大阪大学微生物病研究所
研究者 松浦 善治

分担研究者

国立感染症研究所	ウイルス第二部	鈴木哲朗
大阪大学	微生物病研究所	森石恆司
三菱ウェルファーマ株式会社	創薬第四研究所	湯浅 聡

要旨

これまでの成績から、ヒト肝癌由来のHepG2細胞にHCVのエンベロープ蛋白による細胞融合ならびにエンベロープ蛋白を持ったシュードタイプウイルスの感染を担うヒトCD81分子以外の蛋白因子の存在が示唆された。そこで、HepG2細胞の膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を作製した。また、慢性C型肝炎からの自然治癒例、あるいは、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えHCVエンベロープ蛋白で免疫し、HCVの細胞融合を中和できるヒト型抗HCVエンベロープ抗体を作製した。将来の生ワクチンベクターの候補として、高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsに外来遺伝子を組み込む系を確立した。また、HCVのポリメラーゼ活性を阻害する薬剤の候補を得た。

1. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は輸血後感染症の最も大きな問題であったが、高感度抗体検出系の開発によりその感染者は激減した。しかしながら、我が国には既に二百万人以上ものキャリアが存在し、さらにHCV感染と肝癌発症の相関が血清疫学的に証明されている。この様にHCVは今や重要なヒト発癌ウイルスであることは明白であり、HCVの感染防御ばかりでなく、既感染者の発症予防やウイルスの排除法の確立が強く望まれている。今のところHCVを効率よく増殖させる培養細胞系は見つかっておらず、HCVのワクチン開発は困難を極めている。本研究はHCVの感染の初期過程、特に肝細胞への吸着、侵入機構を明らかにし、その成績を基にした治療用ワクチンの開発と、HCVの増殖を阻害する薬剤の検索を目的とする。

2. 研究方法

中和抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによるリセプターの同定

HepG2細胞の膜画分でマウスを免疫し、細胞融合やシュードタイプウイルスの感染を中和できるモノクローナル抗体を作製する。それらの抗体を担体に固定し、結合する分子をアフィニティークロマトグラフィーと通常のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製する。精製標品のN末端のアミノ酸配列を解析し、その成績をもとにして目的遺伝子のクローニングを試みる。

ヒト型中和抗体の作成

慢性C型肝炎からの自然治癒例からファージディスプレイ法を用いて、あるいは、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えHCVエンベロープ蛋白で免疫し、HCVの細胞融合を中和できるヒト型抗HCVエンベロープ抗体の作製を試みる。

弱毒ワクチニアDIsベクターの確立

弱毒ワクチニアDIsに外来遺伝子を組み込む方法の確立と、この方法を用いてHCV遺伝子をDIsへ組み込み、生ワクチンとしての可能性を検討する。通常ワクチニアウイルスに外来性遺伝子を組み込む場合にはチミジンキナーゼ遺伝子をコードする領域に挿入する。これはチミジンキナーゼを欠損している細胞株

中で組換えウイルスを作らせ、プロモデオキシウリジン存在下で培養すると、チミジンキナーゼを発現しないウイルスだけが選択的に増殖してくるためである。(チミジンキナーゼを持つウイルスはプロモデオキシウリジンをDNA中に取り込んでしまうためにウイルス複製が阻害される)しかしながら、DIs株の場合には唯一増殖できるニワトリ胎児培養細胞ではチミジンキナーゼ欠損細胞が存在しないためにこの方法を用いることができない。そのためまずDIs株特異的な欠損部位にb-Galactosidase遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作製する。このウイルスが作るブラックはX-Galを用いて染色すると青く染まるために容易に識別できる。次いでhomologous recombinationの手法で目的の外来遺伝子をb-Galactosidaseと置換した組換えウイルスを作製し、透明なブラックを捨てることにより目的の組換えウイルスを選別する。このように2段階の選別を行うことで目的とする組換えウイルスの取得が可能となる。

ポリメラーゼ阻害剤の探索

HCVゲノムのC末端側に位置し、ウイルスゲノムの複製に必須な、NS5bポリメラーゼ (RNA依存RNAポリメラーゼ) をターゲットとして阻害剤を探索する。

3. 研究成果

HCVの細胞融合を中和する抗体

HCVのキメラエンベロップ蛋白を恒常的に細胞表面に発現するCHO細胞株を作製し、効率よく、しかも安定してシュードタイプVSVを作製できる系を樹立した。シュードタイプウイルスの感染にはE1とE2の両方のエンベロップ蛋白を粒子に持っていることが必須であり、調べた細胞の中でもっとも高い感受性を示したHepG2細胞を蛋白分解酵素で処理すると感受性は大きく低下した。これまでの成績から、HepG2細胞にHCVのエンベロップ蛋白による細胞融合ならびにエンベロップ蛋白を持ったシュードタイプウイルスの感染を担うヒトCD81分子以外の蛋白因子の存在が示唆される。そこで、HepG2細胞の膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を得た。

ヒト型中和抗体

慢性C型肝炎からの自然治癒例からファージディスプレイ法を用いて、あるいは、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えHCVエンベロップ蛋白で免疫し、HCVの細胞融合を中和できるヒト型抗HCVエンベロップ抗体を作製した。

弱毒ワクチニアDIsに外来遺伝子を組み込む方法の確立

DIs株に外来遺伝子を組み込む手法を確立し、まずこの方法を用いてT7 polymeraseを発現するDIsを作成し、ウイルスの複製による細胞変性がなく、遺伝子発現が長期にわたって観察可能な発現系を構築することが可能となった。また、この系を用いてHCVの全長および構造蛋白部分を組み込んだ組換えDIsの作成を行っている。

ポリメラーゼ阻害剤の探索

スクリーニングの結果より、HCVポリメラーゼの阻害に必要な化合物構造上の条件として、(1)塩基部に置換基を導入した化合物がほとんど阻害活性を示さないことより、塩基部の認識はかなり厳格に行われている。(2)糖の代わりにアシクロ側鎖を導入したものがほとんど阻害活性を示さないことより、糖部構造は必須である。(3)糖部の2'位にOH基を持たないdeoxy体がほとんど阻害活性を示さないことより、RNAポリメラーゼであるため、デオキシリボヌクレオチドは基質として認識しない。(4)糖部構造を固定したとき、ウリジン誘導体が選択的に阻害活性が高かった。ただしこれは[α -32P]UTPを取りこみ用RIとして用いているからである可能性も考えられた。

4. 考察

HCV研究の最重要課題は、信頼できる細胞培養系の開発である。これまでに多くのグループからHCVに感受性を示す細胞培養系が報告されているが、いずれも高感度ではあるが信頼性に欠ける遺伝子増幅法でウイルスの複製を検出したものばかりである。我々はこれまでに、HCVの組換えエンベロップ蛋白を用いた細胞融合アッセイ系とシュードタイプウイルスを構築し、HCVの感染初期過程をリポーター遺伝子の活性化を指標にして解析してきた。今後、得られた中和抗体をプローブとして、HCVの感染に重要な宿主因子の解析を進めていきたい。また、HCVの細胞融合活性を*in vitro*で中和できるヒト型抗

HCVエンベロープ抗体の活性を*in vivo*でも証明できれば、慢性C型肝炎に対する治療薬としての可能性も期待できると思われる。さらに、このような中和抗体と反応できる抗原をデザインすることにより、慢性C型肝炎に対する治療用ワクチンの開発も可能になると考えられる。また、高度弱毒化ワクチニアウイルス株であるDIsに目的とする外来遺伝子を組み込み発現させる系が確立された。この組換えウイルスの取得方法は比較的容易であり、種々の外来遺伝子の発現に応用可能である。また、組換えDIsを感染させることによる細胞変性はほとんど観察されず、遺伝子発現は長期にわたって観察可能であることも証明された。今後は、動物に投与することにより、組み込まれた外来遺伝子に対する細胞性免疫が誘導できるかどうかの検討を行う。HCVポリメラーゼ阻害剤スクリーニング系で、ヌクレオチドアナログ31化合物をアッセイした。そのうち、IC50が100mcM以下の化合物は2化合物であった。阻害活性を示した2化合物ともウリジン誘導体であり、chain terminator作用を有する化合物であった。今後、この系統の化合物からの合成展開による活性向上に期待が持たれた。

5. まとめ

HCVの感染にはE1とE2の両者が必須であり、感受性細胞表面の蛋白分子や硫酸多糖が重要であることが示唆された。両アッセイ系で最も高い感受性を示したHepG2細胞の膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を作製した。

ファージディスプレイ法、あるいは、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを免疫し、HCVの細胞融合を中和できるヒト型抗HCVエンベロープ抗体を作製した。

高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsに外来遺伝子を組み込み、発現させる系を確立した。このウイルスの感染による細胞変性はほとんど観察されず、従来の組換えワクチニアウイルスを用いた系と異なり長期の観察も可能な系であることが示された。

HCVポリメラーゼ阻害剤スクリーニング系で、阻害活性を示したchain terminator作用を有するウリジン誘導体が得られた。

6. 研究発表

Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. Moriishi K., Koura M., and Matsuura Y. *Virology*, **292**, 258-271(2002).

Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. Matsuura Y., Tani H., Suzuki K., Someya T., Suzuki R., Hideki A., Ishii K., Moriishi K., Robison C.S., Whitt M.A., and Miyamura T. *Virology*, **286**, 263-275 (2001).

Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. Suzuki R., Tamura K., Li J., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. *Virology*, **280**, 301-309 (2001).

Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. *Virology*, **279**, 343-353 (2001).

Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. Okuma K., Matsuura Y., Tatsuo H., Inagaki Y., Nakamura M., Yamamoto N., and Yanagi Y. *J.Gen. Virol.*, **82**, 821-830 (2001).

Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. Urbani S., Uggeri J., Matsura Y., Miyamura T., Penna A., Boni C., and Ferrari C. *Hepatology*, **33**, 1533-1543 (2001).

Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: Construction and characterization of temperature-sensitive mutants. Ishii K., and Moss B. *J. Virol.* **75**, 1656-1663 (2001)

C型肝炎ワクチンの開発状況と今後, 松浦善治, *Current Therapy*, 19, 977-981(2001).

C型肝炎ウイルス感染症, 松浦善治, *Current Concepts in Infectious Diseases*, 20, 6-9(2001).

C型肝炎ウイルスのヒト型中和抗体の開発, 松浦善治, 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌, 15, 71-75(2001).

C型肝炎ワクチンの開発:分子生物学の創薬への応用, 松浦善治, 臨床消化器内科,16, 186-191(2001).

7. 知的所有権の取得状況

工業所有権の名称「C型肝炎治療薬」

発明者 松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、渋谷達郎、関誠、四井能尚

権利者 国立感染症研究所・三菱東京製薬

工業所有権の種類、番号 国際出願番号 PCT/JP01/00967

出願年月日 平成13年2月13日

工業所有権の名称「遺伝子組換えワクチニアウイルスワクチン」

発明者 本多三男、松尾和浩、大洲竹晃、宮村達男、松浦善治、石井孝司、加藤賢三

工業所有権の種類、番号 国内出願番号 特願2000-207140号

現在PTCルートにより外国特許出願中

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社