

自己免疫疾患に対する蛋白性医薬品の創出戦略とその応用に関する研究

所属 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
研究者 堤 康央

研究要旨

本研究は、リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の克服を目指し、TNF の2種類の異なるレセプターの一方のみに結合する受容体指向性構造変異体の創製と治療効果の検討を通じて、画期的自己免疫疾患治療薬の開発に有用な知見を集積した。

分担研究者

- (1) 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
角田 慎一
- (2) 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
鎌田 春彦
- (3) 株式会社林原生物化学研究所
谷合 まどか
- (4) 株式会社林原生物化学研究所
有安 利夫

A. 研究目的

近年の疾患プロテオミクス研究の進展に伴い、疾患の発症や悪化に関連して発現挙動に変化が認められる蛋白質（疾患関連蛋白質）群が数多く同定され、疾患のマーカーとして、また創薬ターゲットとして注目されている。特に現在、関節リウマチ、多発性硬化症といった難治性の自己免疫疾患においては、疾患の発症や悪化のメカニズムの解明、さらにそのメカニズムに応じた治療薬・治療方法の開発が厚生労働行政の面からも待望されている。このような背景のもと、昨今の国内外の研究から、自己免疫疾患をはじめとする広範な炎症の惹起・悪化における疾患関連蛋白質として、TNF が key molecule として認識されつつあり、TNF を創薬ターゲットとした医薬品開発が進められている。TNF は、生体内では可溶型/膜結合型 TNF として存在しており、全身性の広範な炎症に加えて、局所的な炎症反応に対しても、その発症や悪化に関与することが明らかになっている。さらに、TNF が結合するレセプターには TNFR1 と TNFR2 が存在し、各レセプターが可溶型/膜結合型 TNF と相互に作用しつつ、非常に複雑

かつ巧妙にその生体内反応が制御されており、どちらか一方のレセプターが自己免疫疾患の治癒に寄与することが示唆されている。

本研究は、これまで我々が独自に開発してきたフェージ表面提示法を駆使し、TNFR1 および TNFR2 指向性の TNF 変異体（アゴニストおよびアンタゴニスト）を創出し、可溶型/膜結合型 TNF の TNFR1/TNFR2 を介した機能と作用を追求することを通じて、炎症の惹起・悪化あるいは生体防御機構の維持・形成における TNF / TNFR の役割を解析し、炎症性疾患に対する画期的な治療薬の開発に資することを目的としている。特にレセプター特異的なアンタゴニスト（TNF 変異体）は、宿主の生体防御機構を保持させながら、抗炎症作用を発揮できる既存の抗 TNF 阻害薬とは異なる画期的な医薬品となりうる。本年度は、昨年度に我々が独自に創出した TNFR1 指向性アンタゴニスト（T2）の多発性硬化症の動物モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）における抗炎症効果を検討するとともに、TNF/TNFR2 の機能解析に有効なツールとなり得ることが期待される TNFR2 指向性アゴニストの創製を試みた。

B. 研究方法

B-1

PEG-T2 (monoPEG 化 T2) の作製

T2 の PEG 化には mPEG-SPA, MW 5,000 (the succinimidyl ester of methoxy poly (ethylene glycol) propionic acid, molecular weight 5,000, shearwater corporation) を用いた。mPEG-SPA, MW5,000 は T2 に対して、10 倍モル量の PEG を添加し、37℃、15 分間反応させた。ε-アミノカブ

ロン酸 (Sigma-Aldrich, Inc) を PEG の 10 倍量添加することにより、反応を競合停止させた。得られた PEG-T2 は PBS で平衡化した Superose 12 カラムを用い、PEG 鎖が一分子結合したフラクションをモノ PEG 化体として分取精製し、以降の実験に供した。

実験的自己免疫性脳脊髄炎感作

C57BL/6 マウス (雌 7 ~ 8 週齢、日本 SLC) を用いた。MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 株式会社バイオロジカ) を等量の CFA と混合し、エマルジョンとした。これを MOG 量として 100 µg/mouse となるようにマウス両大腿外側に皮下投与した。さらに、免疫直後及び 48 時間後に 400 ng/mouse となるように百日咳毒素 (和光純薬株式会社) を腹腔内投与した。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の評価

クリニカルスコアは免疫後 day 1 より毎日観察し、以下のようにスコア化した。

- 0.0 : 変化なし
- 0.5 : 尾の反射が低下
- 1.0 : 尾の麻痺
- 1.5 : 歩行異常
- 2.0 : 1 本の後肢の不全麻痺
- 2.5 : 後肢の不全麻痺
- 3.0 : 1 本の後肢の完全麻痺
- 3.5 : 後肢の完全麻痺
- 4.0 : 後肢の完全麻痺かつ前肢の反射が低下
- 4.5 : 後肢の完全麻痺かつ前肢の不全麻痺
- 5.0 : 後肢の完全麻痺かつ前肢の完全麻痺
- 5.5 : ひん死状態
- 6.0 : 死亡

なお、統計学的なサンプル間の比較は、Mann-Whitney *U* test により解析した。

PEG-T2 及び Etanercept の投与

PEG-T2 投与量は 1, 10 µg/mouse で、1 日 2 回、Etanercept の投与量は 50 µg/mouse で、週 2 回腹腔内投与した。投与期間は 3 週間とした。発症予防効果の検討プロトコルは免疫後 day 1 より投与開始した。

B-2

コンペティティブバンニングによる TNFR2 指向性 TNF 変異体の濃縮

昨年度構築した構造変異 TNF 発現ファージライブラリの中から TNFR2 指向性 TNF 変異体を濃縮するため、TNFR2 に対するコンペティティブバンニングを行った。TNF 変異体発現ファージライブラリ溶液をランニング緩衝液 HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20; GE Healthcare) で 1.0×10^{11} CFU/mL になるように希釈し、インプットライブラリとした。ファージ溶液 100 µL に対して、種々濃度に調整したヒト TNFR1 Fc キメラ (hTNFR1:Fc; R&D systems) を 100 µL 添加し、4°C で 2 時間反応させた。その後、各混合溶液を TNFR2:Fc を固相化したセンサーチップ CM3 (GE Healthcare) に流速 3 µL/min で 100 µL インジェクションした。リンスコマンドにより洗浄後、流速 20 µL/min で 2 回再生液 20 µL をインジェクションし、回収したファージ溶出液に 1mM Tris-HCl pH 8.0 を 40 µL、2% グルコース含有 2YT 培地を 420 µL 添加し、その 50 µL を用いてタイターチェックを行った。残りのファージを再度 TG1 に感染させ、増幅させてプラスミドを回収した。精製したプラスミドを TG1 ヘエレクトロポレーションにより導入した後、ファージを産出し、再度同様のバンニング操作を行ったものを 2nd バンニングとした。

TNF 変異体を含む培養上清の作製

バンニングで溶出したファージを TG1 に感染させ、得られたコロニーを 96well plate (NUNC) に回収し、一晩培養した。2% グルコース、50 µg/mL アンピシリン含有 2YT 培地 100 µL を新たに添加した plate に、一晩培養した培養液 10 µL を添加し OD600 = 0.4~0.5 まで培養した。3,000 rpm 20 分間遠心した後、上清を捨て 1mM IPTG、50 µg/mL アンピシリン含有 2YT 培地 100 µL を添加し、37°C 8 時間培養した。再び 3,000 rpm 20 分間遠心し、上清を回収して ヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA にて検討した。

BIAcore を用いた各 TNF 変異体の各 TNF レセプターに対する結合力の測定

BIAcore biosensor (BIAcore 2000, GE Healthcare) を用いて各変異体の hTNFR1 および hTNFR2 に対す

る親和性を測定した。各 TNF サンプルは、タンパク質濃度として 4 µg/mL から、4.9 ng/mL にランニング緩衝液 HBS-EP で適宜希釈し、60 µL (3min) インジェクション後、180 秒ランニング緩衝液を流すことで結合反応と解離反応における相互作用を計測した。各速度パラメーターの算出は BIA evaluation 3.0 program を用いて行った。

TNFR1 を介した生物活性の評価 (HEp-2 細胞に対する細胞傷害性試験)

HEp-2 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質 (1% Antibiotic - Antimycotic (100×), liquid (GIBCO BRL)) を含む RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Inc.) にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 4×10^4 cells の HEp-2 細胞を播種し、37°C、飽蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 2 時間培養を行った後、予め、100 µg/mL シクロヘキシミド (和光純薬株式会社) 含有 10% FCS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 µL を加えた。18 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、plate を洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。標準品には、recombinant human TNF (peprotech, Inc.) を用いた。

TNFR2 を介した生物活性の評価 (TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性試験)

TNFR2/Fas preadipocyte は、10%FCS、抗生物質および、Blasticidin HCl (Invitrogen, Inc.) を 5 µg/mL を含む D-MEM (Sigma-Aldrich, Inc.) にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 1.5×10^4 cells/50 µL の TNFR2/Fas preadipocyte を播種し、1 µg/mL シクロヘキシミド (和光純薬株式会社) 含有培養液にて段階希釈したサンプルを 50 µL 添加した。37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 48 時間培養を行った後、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque) 10µL/well を加え、37°C で 1 時間培養し、吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 650nm) を測定することで、細胞傷害活性を評価した。

B-3

T2 特異的マウスモノクローナル抗体の作成

スクリーニングによって選択された TNFR1 指向性アンタゴニスト (T2) を組換えタンパク質として調製した。このタンパク質標品を抗原として、BALB/c マウスを免疫し、その脾細胞とマウス骨髄由来細胞株ミエローマ SP-2/o を細胞融合させた。スクリーニングを繰り返した後、抗 T2 抗体産生ハイブリドーマクローンを樹立した。

樹立したハイブリドーマのうち、ヒトおよびマウス TNF との交差反応性が認められないクローンをを用いて、抗体を調製し、各抗体の組み合わせにより、T2 特異的な高感度サンドイッチ ELISA 系を構築した。この ELISA 系を用いて、T2 のマウス血中動態を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得ないが、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ行うものであり、動物実験に関しては、(独) 医薬基盤研究所、大阪大学および大阪大学薬学研究科の動物実験規程に則り行った。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠して行った。

C. 研究結果

B-1

N 末端部位特異的パイオコンジュゲーションにより、血中滞留性が向上した PEG-T2 (昨年度報告済み) を用いて、EAE の発症予防効果を検討した。免疫後 day 1 から PEG-T2 を 1 日 2 回で 1、10 µg/mouse の 2 点を取り、Etanercept は PEG-T2 の投与モル量と同程度のモル量になるように合わせた 50 µg/mouse を週に 2 回とした。

EAE 症状の指標であるクリニカルスコアを比較した結果、PBS 投与群においては、免疫後 day 13 前後から尾の麻痺や歩行異常が認められ、その後急激なクリニカルスコアが上昇し、day 17 前後から観察終了時まで後肢の麻痺が観察されたのに対して、PEG-T2 投与群は PBS 投与群と比較して有意なスコアの低下が認められた。また、PBS 投

与群の最大クリニカルスコアは 3.7 であるのに対して、1、10 µg PEG-T2 投与群では 2.2、2.3 と約 1.5 低く、PEG-T2 を投与することで EAE の症状が緩和することが判明した。PEG-T2 投与群では、いずれの投与量においても PBS 投与群と比べて発症時期の遅延が認められた (図 1)。

一方、比較対照とした Etanercept 投与群では 3、5、6 回目投与の翌日に 5、1、1 匹ずつ、合計 10 匹中 7 匹の死亡が認められた。また、興味深いことに Etanercept と同量のラット抗 mTNF 抗体を EAE モデルに投与したところ、4 回目投与の翌日に 4 匹中 3 匹の死亡が認められた (data not shown)。以上の結果を踏まえると、Etanercept 投与による突然死の誘導メカニズムとして以下に示した可能性が考えられる。① EAE の病態寛解に関与する TNFR2 の作用も阻害したことによって、急激な EAE の病態形成・悪化した可能性、あるいは ② Etanercept の構成蛋白質がヒト由来のため、マウスに投与した際に外来異物と認識され、アナフィラキシーショックを起こした可能性などが考えられる。これらの仮説を実証すべく、今後は、EAE 病変部位である脊髄における脱髄の有無・炎症性細胞の浸潤等を評価するとともに、血中サイトカインや抗 IgE 抗体、ヒスタミンなどの血中ケミカルメディエーターの測定などを行っていく予定である。

また、EAE の特徴的な症状の 1 つである体重減少について評価したところ、day 13 前後から PBS 投与群においてクリニカルスコアの上昇に伴い、顕著な体重減少が認められたのに対して、PEG-T2 投与群の体重減少は比較的軽度であった (図 2)。以上の結果より、PEG-T2 を投与することで EAE の症状を緩和可能であることが判明し、PEG-T2 が多発性硬化症の再発防止に繋がる可能性が示唆された。

B-2

昨年度に作製した構造変異 TNF 発現ファージライブラリの中から TNFR2 指向性 TNF 変異体をスクリーニングするため、コンペティティブパンニングを行った。パンニング後に得られた個々のファージクローンから、可溶性 TNF をそれぞれ作製し、ヒト TNFR1 及びヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA により評価した (図 3)。その結果、通常の

パンニングでは TNFR2 だけでなく、TNFR1 にも強い親和性を示すクローンが数多く回収されていたのに対して、コンペティティブパンニングを行うことで、TNFR2 選択的に結合するクローンが効率良く濃縮されていることを確認した。特に黒色で示したクローンは、TNFR2 への結合親和性が wtTNF と比較して同程度であり、かつ TNFR1 への結合性が著しく低下しており、TNFR2 指向性が飛躍的に向上していた。以上の結果より、構造変異 TNF 発現ファージライブラリを最適条件で TNFR1:Fc と複合体形成させ、TNFR2 に対してコンペティティブパンニングを行うことで、ライブラリの中から効率良く TNFR1 へ強く結合するクローンを除くことができることが判明した。

スクリーニングにより最終的に得られた 8 種類の候補クローンのアミノ酸配列と各レセプターに対する結合力を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) にて評価した結果を表 1 に示した。TNFR1 に対する結合特性を比較すると、全ての変異体において解離定数 KD 値の大幅な増大が確認され、TNFR2 に対しては、wtTNF と同等以上の結合力を保持していることが判明した。また、いずれの変異体も R31、R32 が wtTNF と同じ配列であり、L29 も保存される傾向にあった。また非常に興味深いことに、A145、E146、S147 は、アスパラギン酸に富む配列を含む傾向にあった。以上の事実は、これらアミノ酸残基が TNFR1 への結合親和性低下のみならず、逆に TNFR2 への結合力維持・増強に重要であることを具体的に示したものである。

続いて、TNFR2 指向性変異体の候補タンパク質のヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 を介した生物活性を HEp-2 細胞、TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性を指標に評価した (表 2)。その結果、これら変異体はヒト TNFR1 を介した生物活性をほとんど示さなかったのに対して、ヒト TNFR2 を介した生物活性は wtTNF とほぼ同程度の活性を保持していることが判明した。中でもクローン R2-9 は、TNFR2 への作用選択性が wtTNF と比較して 18 万倍も増強しており、優れた TNFR2 指向性アゴニストであることが判明した。現在、R2-9 を活用した TNF/TNFR2 の機能解析を推進するとともに、構造活性相関情報の集積を目指して、R2-9 の X 線立体構造解析を試みているところである。

B-3

T2 (抗原) とアジュバントを 2 回 BALB/c マウスの腹腔内へ投与し、血中抗体価の上昇を確認した上で、抗原を静脈内投与した。このマウスから脾細胞を回収し、定法に従い、SP-2/o と細胞融合させハイブリドーマを作製し、HAT 選択性培地で培養し限界希釈操作とスクリーニングを繰り返すことにより、抗 T2 抗体産生クローンを 45 株樹立した。そのうち、マウス TNF に反応せず、T2 特異的に反応する抗体産生ハイブリドーマは、43 クローンだった。さらに、ヒト TNF にも反応しないクローンを 26 クローン得られた。これらのモノクローナル抗体は、PEG-T2 に対してもほぼ同等の反応性を示した。また、SDS-PAGE/Western blotting に使用可能なクローンは 30 クローン、このうち、ヒト TNF に反応しないものは 17 クローン得られた (表 3)。

T2 特異的ハイブリドーマクローン 7 種類 (sT2-1、sT2-4、sT2-5、sT2-9、sT2-10、sT2-13、sT2-18) を無血清培地にて培養し、Protein G により IgG 画分を精製し ELISA 検討用に用いた。固相として T2 特異的モノクローナル抗体 7 種類、標識抗体として T2 特異的モノクローナル抗体 7 種類を用いて、それらの組み合わせによってサンドイッチ ELISA を実施した (表 4)。

表 4 に示したように、固相抗体として sT2-13、標識抗体として sT2-18 を使用するのが最適であった。sT2-18 を HRP0 標識した結果、測定範囲 20 ~ 3000 pg/mL で良好な回帰直線が得られた (図 4)。プレート内変動・プレート間変動とも、ほぼ 10% 以内に収まっていた。なお、ヒトおよびマウス TNF (1 µg/mL) を ELISA 系に添加しても、系に影響を与えなかった。

BALB/c マウス 5 匹に、T2 を、タンパク量として 5 µg/body 静脈内投与し、経時的に採血し、得られた血漿中の T2 量を ELISA にて測定した。今回作製した ELISA 系は、血漿を 5 倍以上希釈すれば血清干渉を回避できることが判った。測定の結果、T2 のマウス血中半減期は 20 分程度であった (図 5、表 5)。今回構築した TNF レセプター指向性アンタゴニスト (T2) 特異的 ELISA 系は、血漿を 5 倍希釈以上すれば血清干渉を回避可能であり、特異性・測定感度ともに高く、T2 投与時のマウス

の血中動態をモニタリングする上で、有効なツールになると判断された。TNF レセプター指向性アンタゴニスト、T2 特異的な高感度 ELISA 系が構築できた。TNF レセプター指向性アンタゴニストを各種バイオアッセイ系を用いて定量しようとする、その系はかなり複雑化する。その点、今回構築した ELISA 系は、特異性、定量性とも高く、実験操作も容易である。今後は、簡便なモニタリング方法として、*in vivo*、*in vitro* 実験において、ELISA を有効活用する。

D. 考 察

C. 研究結果の覽に記載

E. 結論

本検討では、我々が独自に創出した TNFR1 指向性アンタゴニスト T2 を用いて、TNFR1 が病態形成や悪化に、TNFR2 が病態の寛解に関与すると示唆されている多発性硬化症の動物モデル EAE モデルにおける PEG-T2 の有効性を評価した。その結果、PEG-T2 は EAE の病態を悪化させることもなく、EAE の発症を予防できることが判明した。以上の結果より、TNFR1 指向性アンタゴニスト T2 が自己免疫疾患に対して、安全かつ有効な新規治療薬になり得る可能性が示された。

また、最適条件で TNFR2 に対するコンペティティブパンニングを行うことで、効率良く TNFR2 指向性アンタゴニストを創出することに成功した。これら TNF 変異体により得られた両レセプターに対する結合力・結合様式に関する知見は、今後さらに蓄積されることで「一次配列-生物活性-結合力・結合様式」の連関を評価する上での基盤情報となり、作製した TNF 変異体の立体構造解析から得られる情報と相俟って、バイオインフォマティクスのシステムアップに貢献できるものと期待している。今後、本研究で得られた TNF レセプター指向性変異体を駆使することで、生命現象や病態における TNF やレセプターの機能を解明していく予定である。さらに、各疾患におけるレセプターの役割が明らかとなれば、これらレセプター指向性アゴニスト・アンタゴニストが目的治療のみを選択的に引き出し得る、医薬価値に優れた機能性人工 TNF となる可能性も秘めており、TNF の臨床応用への道を切り拓くものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., *J. Immunol. Methods.*, 335 (1-2):71-8, 2008.
2. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniyai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsutsumi Y. : The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- α in murine hepatitis models., *Cytokine*, 44 (2):229-233, 2008.
3. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniyai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009.
4. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta Crystallogr. Sect. F.*, in press.
5. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniyai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists., *J. Biochem.*, in press.
- の基盤技術開発～., 神戸学院大学薬学部特別講演会, 神戸, 2008年6月.
2. 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究の推進に向けた DDS., 第45回薬剤学懇談会研究討論会, 静岡, 2008年6月.
3. 堤 康央: プロテオーム情報を有効活用した創薬とその基盤技術開発., 富山大学和漢研講演会, 富山, 2008年7月.
4. 堤 康央: プロテオーム解析論., DDS型治療システム NEDO 特別講座, 京都, 2008年9月.
5. 堤 康央: 薬学への招待: 安全かつ有効な医薬品等の開発を目指して., 2008年度群馬県立前橋高等学校講演会, 大阪, 2008年10月.
6. 堤 康央: 抗 TNF 医薬の創製および創薬プロテオミクスによるリウマチ治療薬の開発に向けて., 臨床医・製薬企業研究者, それぞれの立場から見た関節リウマチにおける治療のパラダイムシフトと今後治療薬に求められる治療コンセプト, 東京, 2008年12月.

【国内学会発表】

1. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第24回 DDS 学会, 東京, 2008年6月.
2. 阿部康弘, 野村鉄也, 柴田寛子, 吉岡靖雄, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価., 第58回日本薬学会近畿支部総会・大会, 神戸, 2008年10月.
3. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 新規自己免疫疾患治療薬の開発を目指した TNFR1 指向性アンタゴニストの創出., ファーマバイオフォーラム 2008, 東京, 2008年11月.
4. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬の開発を目指した TNFR1 指向性変異体の創出., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月. (大学院生シンポジウム)

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 堤 康央: 創薬プロテオミクスの現状と今後～プロテオーム情報を有効活用した創薬とそ

【国際学会発表】

1. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Mukai Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive-subtractive panning., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008
2. Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Mukai Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of mutant TNF- α with TNF receptor-1 selective antagonistic activity for the development of a novel autoimmune disease drug., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.
3. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.: Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.
4. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Evaluation of safety and efficacy of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF as a novel anti-inflammatory drug., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U. S. A.), 15-19 March, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ①生理活性複合体：特許 第4177604号
- ②TNF アンタゴニスト及びそれを有効成分とする TNF 阻害剤：PCT/JP2005/32 公開番号：WO 2005/066206

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

PDB への登録

1. Mukai Y., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : TNFR1 selective TNF mutant; R1-6, 2008 (PDB ID 2ZJC and RCSB ID RCSB028044)
2. Mukai Y., T. Nakamura, Yamagata Y., Tsutsumi Y. : TNF Receptor Subtype One-selective TNF Mutant with Antagonistic Activity; R1antTNF-T8, 2008 (PDB ID 2ZPX and RCSB ID RCSB028277)
3. Mukai Y., T. Nakamura, Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystal structure of TNF-TNFR2 complex, 2008 (PDB ID 2ZQW RCSB ID RCSB028312)

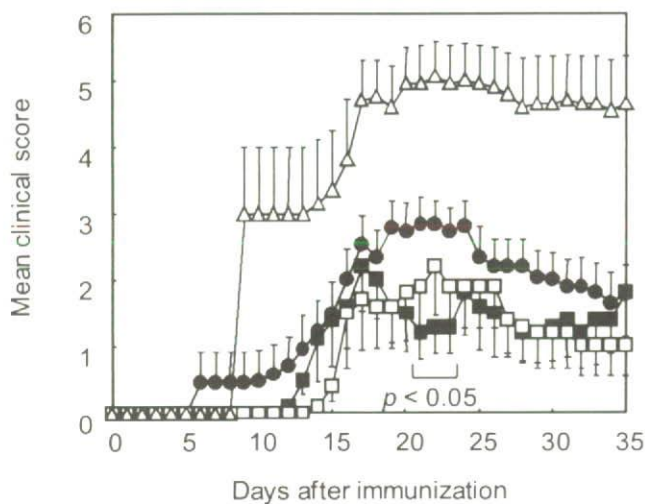


図 1 EAE モデルにおける臨床スコアの挙動.

●, PBS; ■, 1 μg PEG-T2; □, 10 μg PEG-T2; △, Etanercept. $p < 0.05$ versus PBS group.

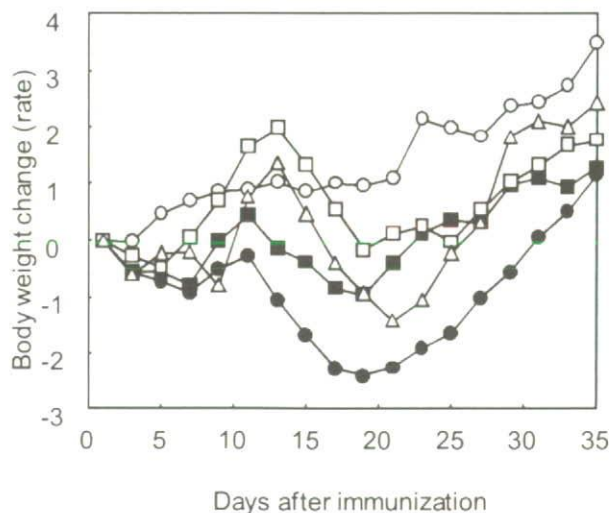
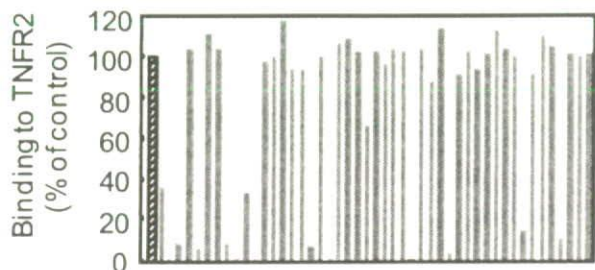
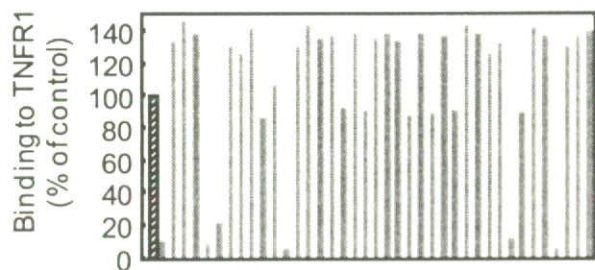


図 2 EAE モデルにおけるマウスの体重変化.

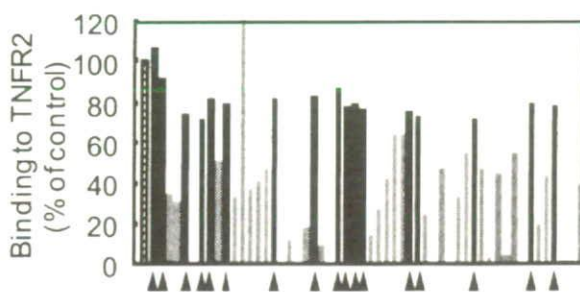
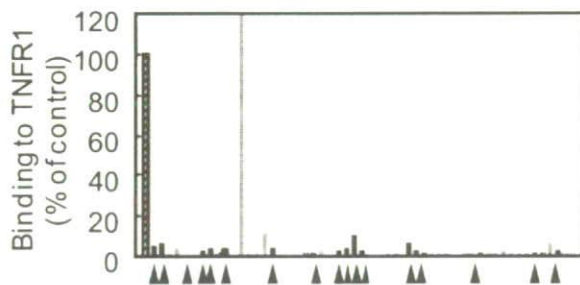
●, PBS; ■, 1 μg PEG-T2; □, 10 μg PEG-T2; △, Etanercept. $p < 0.05$ versus PBS group.

(A) 通常パンニング



0/54 (0%)

(B) コンペティティブパンニング



17/54 (31%)

図 3 ELISA による TNFR2 指向性 TNF 変異体のスクリーニング.

表1 TNFR2指向性変異体候補のアミノ酸配列と各TNFレセプターに対する結合特性の評価。

(A) TNFR1に対する結合特性

	Residue Position						k_{on} ¹⁾	k_{off} ²⁾	K_D ³⁾	Relative ⁴⁾
	29	31	32	145	146	147	($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	($\times 10^{-4} s^{-1}$)	($\times 10^{-10} M$)	affinity (%)
wtTNF	L	R	R	A	E	S	0.45	1.3	2.9	100.0
R2-6	L	R	R	H	E	D	0.79	54.5	68.8	4.2
R2-7	L	R	R	T	S	D	1.19	50.1	42.3	6.9
R2-8	L	R	R	N	D	D	1.22	50.3	41.1	7.1
R2-9	V	R	R	D	D	D	0.44	116.0	262.0	1.1
R2-10	L	R	R	Q	D	D	0.67	43.9	63.7	4.6
R2-11	L	R	R	T	D	D	0.81	87.5	108.0	2.7
R2-12	L	R	R	D	G	D	1.36	98.8	72.6	4.0
R2-13	L	R	R	D	E	D	0.97	104.0	107.0	2.7

(B) TNFR2に対する結合特性

	Residue Position						k_{on} ¹⁾	k_{off} ²⁾	K_D ³⁾	Relative ⁴⁾
	29	31	32	145	146	147	($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	($\times 10^{-4} s^{-1}$)	($\times 10^{-10} M$)	affinity (%)
wtTNF	L	R	R	A	E	S	1.98	12.1	6.11	100.0
R2-6	L	R	R	H	E	D	3.24	7.9	2.43	251.4
R2-7	L	R	R	T	S	D	3.83	12.6	3.30	185.2
R2-8	L	R	R	N	D	D	3.13	6.6	2.10	291.0
R2-9	V	R	R	D	D	D	2.06	7.4	3.60	169.7
R2-10	L	R	R	Q	D	D	2.22	5.3	2.41	253.5
R2-11	L	R	R	T	D	D	2.33	5.4	2.31	264.5
R2-12	L	R	R	D	G	D	4.06	10.6	2.60	235.0
R2-13	L	R	R	D	E	D	2.85	8.2	2.88	212.2

¹⁾ k_{on} ; 結合速度定数 ²⁾ k_{off} ; 解離速度定数 ³⁾ K_D ; 解離平衡速度定数 ($K_D = k_{off} / k_{on}$)

⁴⁾ Relative affinity = K_D (wtTNF) / K_D (TNF variants) $\times 100$

表2 TNFR1およびTNFR2を介した生物活性の評価。

	HEp-2 Assay		TNFR2/Fas Assay		
	EC50 ¹⁾ (ng/ml)	Relative activity ²⁾	EC50 ¹⁾ (ng/ml)	Relative activity ²⁾	TNFR2/TNFR1 ³⁾
wtTNF	0.6	1.0	0.56	1.00	1.0
R2-6	8.1×10^3	7.3×10^{-5}	0.39	1.44	2.0×10^4
R2-7	2.1×10^3	2.8×10^{-4}	0.21	2.67	9.5×10^3
R2-8	4.6×10^3	1.2×10^{-4}	0.67	0.84	7.0×10^3
R2-9	$>1.0 \times 10^5$	$<6.0 \times 10^{-6}$	0.51	1.10	1.8×10^5
R2-10	1.1×10^4	5.4×10^{-5}	0.72	0.78	1.4×10^4
R2-11	6.7×10^4	8.9×10^{-6}	0.95	0.59	6.6×10^4
R2-12	2.6×10^4	2.2×10^{-5}	0.23	2.43	1.1×10^5
R2-13	$>1.0 \times 10^5$	$<6.0 \times 10^{-6}$	0.63	0.89	1.5×10^5

¹⁾ 50%効果濃度 (EC50) をロジスティック回帰法により算出した。

²⁾ Relative activities = EC50 (wtTNF) / EC50 (TNF variants).

³⁾ TNFR2-selectivities = Relative activity (via TNFR1) / Relative activity (via TNFR2).

表3 各クローンのT2及びPEG-T2のヒトTNF (nhTNF)、マウスTNF (wmTNF)への反応性

Clone No.	Stock No.	Isotype	ELISA反応性(OD490-650)				Western 反応性	
			T2	PEG-T2	nhTNF	wmTNF	T2	nhTNF
sT2-1	2-A1-3-5	IgG1(κ)	4.000	3.730	0.077	0.047	++	-
sT2-2	2-A1-3-6	IgG1(κ)	4.000	3.653	0.074	0.043	++	-
sT2-3	2-A1-5-4	IgG1(κ)	4.000	3.850	0.103	0.044	++	-
sT2-4	2-A1-5-5	IgG1(κ)	4.000	4.000	0.141	0.033	++	-
sT2-5	8-F9-1-1	IgG1(κ)	2.905	1.266	0.103	0.042	-	-
sT2-6	8-F9-1-6	IgG1(κ)	2.568	1.140	0.109	0.035	-	-
sT2-7	8-F9-4-1	IgG1(κ)	3.215	1.415	0.128	0.040	-	-
sT2-8	8-F9-4-2	IgG1(κ)	3.182	2.503	0.101	0.029	-	-
sT2-9	5-C7-2-4	IgG1(κ)	4.000	3.811	0.076	0.036	+	-
sT2-10	5-C7-2-5	IgG1(κ)	4.000	3.937	0.087	0.033	+	-
sT2-11	5-C7-3-3	IgG1(κ)	4.000	3.782	0.086	0.028	+	-
sT2-12	5-C7-3-6	IgG1(κ)	3.914	3.749	0.068	0.030	+	-
sT2-13	8-E9-4-3	IgG1(κ)	3.854	3.399	0.074	0.030	++	-
sT2-14	8-E9-4-6	IgG1(κ)	4.000	3.239	0.063	0.031	++	-
sT2-15	8-E9-5-1	IgG1(κ)	4.000	3.921	0.076	0.027	++	-
sT2-16	8-E9-5-6	IgG1(κ)	4.000	2.953	0.087	0.026	++	-
sT2-17	10-B6-3-1	IgG1(κ)	4.000	4.000	0.093	0.026	+	-
sT2-18	10-B6-3-4	IgG1(κ)	4.000	3.929	0.083	0.031	+	-
sT2-19	10-B6-4-1	IgG1(κ)	4.015	3.616	0.14	0.028	+	-
sT2-20	10-B6-4-3	IgG1(κ)	4.000	1.970	0.111	0.026	+	-
sT2-21	10-B7-2-1	IgM(κ)	0.269	0.073	0.03	0.025	N.A.*	N.A.
sT2-22	10-B7-4-1	IgM(κ)	0.189	0.143	0.033	0.024	N.A.	N.A.
sT2-23	f1-8-A5	IgG2a(κ)	0.369	N.A.*	0.025	0.04	-	-
sT2-24	f1-11-D12	IgG1(κ)	0.585	N.A.	0.036	0.035	+	-
sT2-25	f2-8-A9-1	IgG1(κ)	1.105	N.A.	0.035	0.030	-	-
sT2-26	f2-8-A9-2	IgG1(κ)	0.977	N.A.	0.02	0.030	-	-
gT2-1	5-C1-1-3	IgG1(κ)	4.000	4.000	3.925	0.029	++	+
gT2-2	5-C1-1-4	IgG1(κ)	4.000	4.000	4.052	0.025	++	+
gT2-3	5-C11-6-5	IgG2a(κ)	3.927	4.000	4.104	0.036	+	+
gT2-4	5-C11-6-6	IgG2a(κ)	4.000	4.000	4.049	0.031	+	+
gT2-5	1-5A-1-2	IgG1(κ)	3.994	3.792	3.745	0.027	-	-
gT2-6	1-5A-1-3	IgG1(κ)	3.893	4.000	3.893	0.023	-	-
gT2-7	1-5A-4-3	IgG1(κ)	4.000	4.000	4.054	0.026	+	+
gT2-8	1-5A-4-6	IgG1(κ)	4.000	4.000	4.053	0.024	+	+
gT2-9	1-8D-1-1	IgG1(κ)	4.000	3.807	3.815	0.026	+	+
gT2-10	1-8D-1-5	IgG1(κ)	4.000	3.844	3.973	0.026	+	+
gT2-11	1-8D-4-5	IgG1(κ)	4.000	3.846	4.000	0.023	+	+
gT2-12	1-8D-4-6	IgG1(κ)	3.819	4.000	4.101	0.024	+	+
gT2-13	5-C1-2-1	IgG1(κ)	1.972	1.525	1.282	0.028	++	+
gT2-14	5-C11-3-3	IgG2a(κ)	4.000	4.000	4.00	0.028	+	+
gT2-15	5-C11-3-6	IgG2a(κ)	4.000	4.000	4.00	0.038	+	+
gT2-16	12-F1-3-1	IgM(κ)	3.843	3.787	3.286	3.241	N.A.	N.A.
gT2-17	12-F1-6-1	IgM(κ)	3.347	3.121	3.492	3.129	N.A.	N.A.
gT2-18	f2-5-H6-1	IgG1(κ)	4.000	N.A.	4.000	0.031	N.A.	N.A.
gT2-19	f2-5-H6-2	IgG1(κ)	4.000	N.A.	4.000	0.027	N.A.	N.A.

* N.A.: 測定未実施

ELISA反応性  T2固相時: OD490-650(培養上清/blank) ≥ 10

 T2及びnhTNF固相時: OD490-650(培養上清/blank) ≥ 10




Western反応性  ++ 強陽性 (T2 特異的)  ++ 強陽性 (nhTNF にクロス)
 + 弱陽性 (T2 特異的)  + 弱陽性 (nhTNF にクロス)
 - 陰性

表4 T2のELISA用ペア抗体スクリーニング結果

		固相抗体						
		sT2-1	sT2-4	sT2-13	sT2-18	sT2-5	sT2-9	sT2-10
ビオチン化抗体	sT2-1	+	+	+	+++	-	-	-
	sT2-4	++	++	++	+++	+	-	-
	sT2-13	++	++	++	+++	-	-	-
	sT2-18	+++	+++	+++	++	+	++	++
	sT2-5	-	-	-	+++	-	+	-
	sT2-9	+	+	+	+++	-	-	-
	sT2-10	-	-	-	+++	-	-	-

* 感度 -:>120ng/ml, +:12~120ng/ml, ++:1.2~12ng/ml, +++:<1.2ng/ml

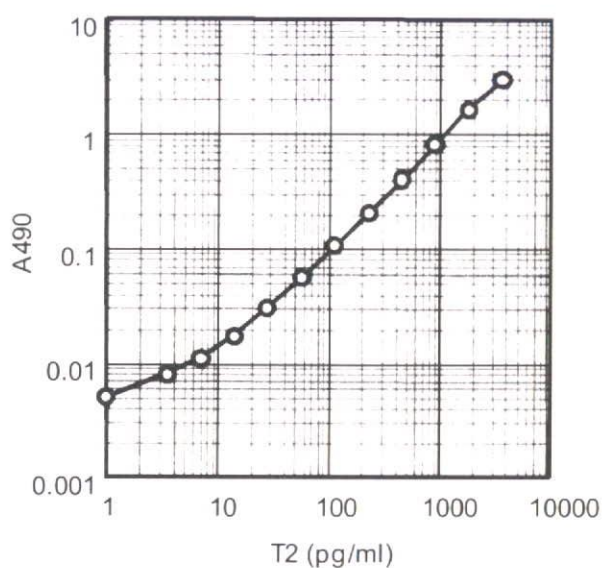


図4 T2 ELISA 検量線

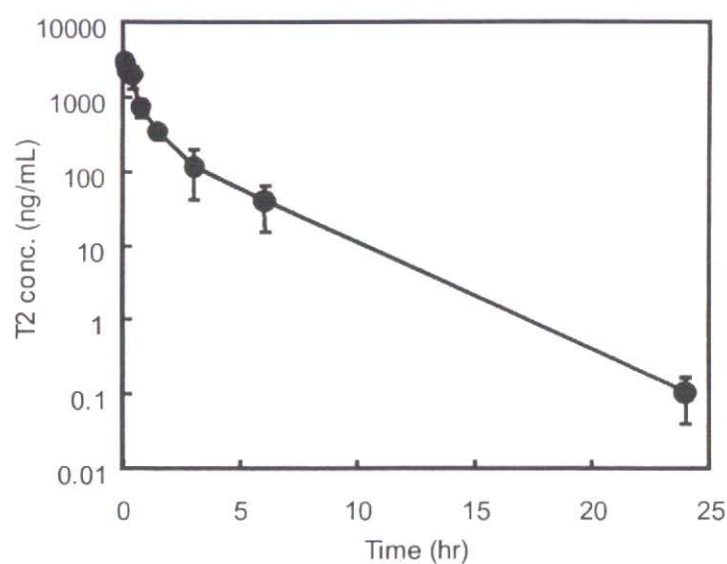


図5 T2静脈内投与後の血中動態 (BALB/cマウス, 各n=5)

表5 T2のマウス血中動態解析結果

	Dose	Tmax	Cmax	MRT	T1/2	AUC	EBA
	($\mu\text{g}/\text{body}$)	(hr)	(ng/mL)	(hr)	(hr)	(hr \times ng/mL)	(%)
T2	5.0	0.08	2970	1.73	0.34	2596	51.8

感染性C型肝炎ウイルス株および感受性培養細胞ライブラリーの構築

所属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）HCV感染症に対する治療法は不十分であり、新たな抗ウイルス療法の開発が望まれる。我々はHCVのウイルス培養系を開発したが、さらに多くのウイルス株の培養を可能にして研究を進める必要がある。本研究では新たなウイルス株の分離と感染感受性のある培養細胞株を開発して、そのライブラリーを構築する。本研究により、抗ウイルス薬の開発が進行することが期待でき、我が国における肝炎対策に大きく寄与することができる。

分担研究者

- (1) 東レ株式会社医薬研究所
望月 英典
- (2) 京都大学ウイルス研究所
土方 誠
- (3) 昭和大学医学部第二内科
伊藤 敬義
- (4) 東京医科歯科大学医歯学総合研究科
坂本 直哉

妨げになってきたが、主任研究者の研究によりHCVのウイルス培養が可能となった（平成16-18年度HS研究 課題番号：KH51041、Wakita T et al. Nat Med 2005）。しかし、このウイルス培養系は未だ十分ではなく、さらなる開発が望まれる。本研究により、培養可能なHCV株と感染感受性のある培養細胞のライブラリーが構築されて、HCVの新たな治療法が開発が進めば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。

A. 研究目的

HCVは日本では200万人、世界中で17000万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症の一つである。このため、HCV感染者のスクリーニングなどの事業が開始されている。しかし、その治療はインターフェロンおよびリバビリン以外に無く、その効果はいまだ不十分である。多数のキャリアーがウイルス排除できなければ、長期間の療養による医療保険へのコストは莫大になる。HCVの良いウイルス培養系が無いことが新たな治療法の開発の

B. 研究方法

1. 新規HCV株によるレプリコンの解析および全長コンストラクト作製

劇症肝炎患者および重症肝炎患者血清から分離した新規HCV株の配列により作製したサブジェノミックレプリコン細胞のレプリコンゲノムの遺伝子配列を解析する。同定した変異をレプリコンゲノムに組換えて、変異導入レプリコンを作製して適合変位を同定する。さらに、新規HCV株の全長cDNAを構築する。全長ウイルスRNAを合成して培養細胞に導入することによりそのウ

ウイルス複製および粒子分泌効率を解析する。

2. 遺伝子型 1b の構造領域をもつキメラウイルスの作製

CoreからNS2の一部が遺伝子型1bのTH株由来の遺伝子となるpTH/JFH1キメラコンストラクトを作製した。試験管内で合成したTH/JFH1-RNAをHuh7細胞に導入し、継代培養を行った。pTH/JFH1を鋳型として、変異を導入したい箇所でプライマーを設計しPCRで変異を入れると同時に該断片を増幅して、この断片をpTH/JFH1中の相同な断片とを組換えることにより変異導入プラスミドを作製した。

3. 中空糸ホローファイバーを用いた HuS-E/2 細胞の立体培養系の確立

ホローファイバーを用いた細胞培養系をHuS-E/2細胞への応用し、患者血液由来HCVの感染実験をおこない、これまでの培養系との比較をおこなう。さらに中空糸立体培養HuS-E/2細胞と様々な患者血液由来のHCVとの相互作用を解析することで感染増殖効率を上昇させるための情報を得る。

4. C型慢性肝炎患者 B 細胞に感染している HCV の解析

インフォームドコンセントを得たC型慢性肝炎患者 75 例の全血 30ml から末梢血単核球 (PBMC) を分離した。Affinity beads を用いて CD4、CD8、CD19 陽性細胞にそれぞれ分離し、CD19 陽性細胞分画を B 細胞分画とした。また C 型慢性肝炎患者で瀉血療法を行っている患者から 100-400ml の全血から PBMC を分離し、さらに B

細胞を分離した。得られた B 細胞中、また CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞中の HCV RNA 量を real time RT-PCR 法で定量した。同時にマイナス鎖 HCV RNA も測定した。

患者 B 細胞中 HCV RNA 陽性の患者 9 例、陰性患者 2 例の血清から全長 HCV RNA を 4 領域に分けて RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定した。

患者 75 例について B 細胞中免疫グロブリン重鎖遺伝子の超可変領域と、個々の B 細胞で塩基長の異なることが報告されている CDR3 を含む領域の mRNA を RT-PCR で増幅し、この PCR 産物を P32 で末端ラベルした primer と Taq polymerase を用いて伸長反応した。伸長産物を電気泳動し、オートラジオグラフィーで泳動距離を解析した。同様に健常者 28 例についても解析した。LPD マーカーとしてクリオグロブリン血症 (Cg)、リウマチ因子 (RF)、C4、CH50 を測定した。

HCV感染者95例[慢性肝炎(CH) 46、肝癌のない肝硬変(LC without HCC) 11、肝癌(HCC) 25、非ホジキンリンパ腫(NHL) 13例]の血清BAFF、APRILをELISA法で測定した。更にIFN治療後SVR患者12例の血清BAFF、APRILの推移を解析した。B型慢性肝炎36例、自己免疫性肝炎41例、原発性胆汁性肝硬変症72例、健常者19例についての血清APRILも同様に検討した。

5. HCV-JFH1 感染細胞に対するプラークアッセイ法の確立と HCV の細胞傷害機構の解析、高増殖性 HCV-JFH1 株の構築

HCV-JFH1 を Huh-7. 5. 1 細胞に感染後、アガロース寒天包埋培地を用いて培養後、テトラゾリウム塩にて染色し、プラーク形成能 (PFU: plaque forming unit) の定量を行う。また、

HCV-JFH1 感染細胞をメチルセルロース含有培地にて培養後、HCV コア蛋白による免疫蛍光染色を行い感染性 (FFU: focus forming unit) を観察する。

HCV-JFH1 感染増殖による細胞障害効果へのアポトーシスによる細胞死の関与を解析するため、JFH1 感染細胞に対するブラークアッセイ後、ブラーク形成部位アネキシン V-FITC 及びヨウ化プロピジウムによる二重染色を施行する。さらに、HCV-JFH1 感染増殖と ER ストレスの関与を解析するため、HCV-JFH1 感染細胞内から経時的に蛋白を抽出し、Western Blotting により、GRP78、eIF2 α 、リン酸化 eIF2 α 抗体を用いて ER ストレス関連蛋白の検出を行う。また、ブラーク形成部位での、HCV コア蛋白及び ER ストレス関連蛋白である GRP78 による二重免疫蛍光染色を行い、HCV-JFH1 感染増殖による細胞障害効果と ER ストレスの関与の解析を試みる。

ブラーク形成 HCV-JFH1 感染細胞を回収後、非感染 Huh-7.5.1 細胞に再感染し、その RNA を回収しブラーク形成クローンの単離を試みる。単離されたクローンより RT-PCR を行い、遺伝子解析を行う。アミノ酸変異を伴う遺伝子変異を検索し、遺伝子レベルでのウイルスゲノムのクローニングを試みる。さらに、非感染 Huh-7.5.1 細胞に導入し、その増殖性及び細胞障害性を比較し、それらを規定するドメインの特定や機能解析を進める。

6. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

ゲノタイプ 1b, 2a および 2b 急性重症型 C 型肝炎血清より HCV-RNA を抽出、自律増殖する

subgenomic replicon 及び全長ウイルス cDNA を構築し、培養細胞での増殖性を確認する。樹立された HCV 培養・増殖系の機能解析、及びウイルス遺伝子改変により高効率増殖系を作成する。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. 新規 HCV 株によるレプリコンの解析

遺伝子型 2a の劇症肝炎由来の JFH-2 株によるレプリコンのコロニー形成効率は 6.7 CFU/ μ g RNA と JFH-1 (5.32 \times 10⁴ CFU/ μ g RNA) の 1 万分の 1 程度であった。また、遺伝子型 1b の重症急性肝炎由来の AHC-1b 株によるレプリコンのコロニー形成効率は 2.13 CFU/ μ g RNA であった。レプリコン細胞を樹立して、レプリコンゲノム RNA をリアルタイム RT-PCR で定量するとともにノーザンブロット法で検出した。レプリコン細胞中のレプリコン RNA は 10⁷-10⁸ copy HCV RNA/ μ g total RNA 程度であった。ノーザンブロット解析では約 8kb 長の HCV RNA を特異的に検出した。JFH-2 のレプ

リコンでは13クローンを解析して12クローンにアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を検出した。変異は主としてNS3およびNS5Aに存在した。複数のクローンに共通するものが見られた。

JFH-2株のレプリコンで同定した変異を野生株のレプリコンに組換えて変異導入レプリコンを作製した。その合成RNAをHuh7細胞に導入してコロニー形成効率を検討したところ、FL, CW, TN, AS, HQ, QR変異が適合変異であることを確認した。

JFH-2株およびAHC-1b株の全長cDNA構築を作製した。これらの全長構築から試験管内で全長ウイルスRNAを合成した。合成RNAをHuh7細胞に導入してそのウイルスゲノム複製とウイルス粒子産生を細胞および培養液中のウイルスRNAおよびコア蛋白質の定量により解析したが、ゲノム複製およびウイルス粒子産生ともに検出できなかった。

2. 遺伝子型1bの構造領域をもつキメラウイルスの作製

TH/JFH-1 RNAをHuh7細胞に導入し、継代培養を重ねてウイルス産生量をモニターしたところ、23日目までは徐々に減少したが、その後上昇し34日経過時点で一定の高い産生量を示した。この時の培養上清をnaïve Huh7に接種したところ高い感染が認められ、遺伝子型1bであるTH株のエンベロープを有する感染性HCVが作製できることが確認された。適応変異を解析するために、RNA導入後34日目の培養上清からRNAを抽出し、cDNAを作製してシークエンシングを行った。その結果、THのCoreタンパク質の最初のメチオニンを1としたときに、328番目に相当するプロリ

ンがアラニンまたはトレオニンに、2326番目に相当するアルギニンがグリシンに、2875番目に相当するグルタミンがアルギニンに変化する変異が認められた。328番目のプロリンはTHのE1に、2326番目のアルギニンはJFH-1のNS5Aに、2875番目のグルタミンはJFH-1のNS5Bに各々位置する。これらの変異を野生型pTH/JFH1に導入し、P328Aの変異を有するpTH/JFH1(PA)、P328Tの変異を有するpTH/JFH1(PT)、R2326Gの変異を有するpTH/JFH1(RG)、Q2875Rの変異を有するpTH/JFH1(QR)、P328A : R2326G : Q2875Rの変異を有するpTH/JFH1(AGR)およびP328T : R2326G : Q2875Rの変異を有するpTH/JFH1(TGR)の6種類のベクターを作製した。各々RNAを合成後、Huh7細胞にトランスフェクションして培養上清中のHCV Coreタンパク質濃度をELISAで測定した。その結果、P328A、P328T、Q2875Rの各々1点変異を導入しても野生型とほぼ同一であったが、R2326Gの変異導入では総じて野生型と比較して大きく減少していた。さらに導入後、後継代培養を行い、経時的に培養上清中のHCV Coreタンパク質量をELISAで測定して比較したところ、野生型と比較して、P328AおよびP328Tの変異ではウイルス産生量が高くよって、JFH-1のNS5Aの変異であるR2326Gの変異は、ウイルス複製を減少させることが示唆された。

3. ホローファイバーを用いた新しい立体培養系で培養したHuS-E/2細胞への天然型HCVの感染増殖

ホローファイバーを用いた新しい立体培養系を用いてHuS-E/2細胞を培養し、種々の患者血清中の天然HCVの感染増殖を検討した。患者血液由

来の HCV は従来法で認められた感染増殖に比較して約 100 倍の効率で立体培養された HuS-E/2 細胞に感染し増殖した。感染増殖のパターンは血液の種類によって多様であった。遺伝子型 1b の HCV では感染増殖性の高いものと感染増殖性の穏やかなものが認められた。感染増殖性の高いものは増殖後、その増殖が抑制される傾向があった。また遺伝子型 2a の HCV は感染増殖性が高いものが多いが、増殖後、その増殖が抑制される傾向があった。感染後 HCV-RNA が培地中に検出され、一部の HCV では二次感染が観察された。この培地の浮遊密度 1.12 の画分に感染性と HCV-RNA とウイルスコアタンパク質が存在することがわかり、酢酸ウラニウムによるネガティブ染色による電子顕微鏡観察によってウイルス様粒子が確認された。

遺伝子型 1b の HCV で感染増殖性の高いものは、その後増殖が抑制される傾向があったが、その時、培養上清にはインターフェロン α の分泌が確認された。しかしながら感染増殖性の穏やかなものや遺伝子型 2a の HCV に関しては全くインターフェロン α の産生は認められなかった。遺伝子型 2a の HCV はやはり増殖後、その増殖が抑制されたが、その前例において培養上清には肝細胞内にあるはずの乳酸脱水素酵素 (LDH) が漏出していることが確認された。またこの LDH の漏出は Caspase 阻害剤の培地への添加によって効率良く抑制された。これは遺伝子型 2a に属する組換え体 JFH1 を感染させた場合にも認められた。

4. C 型慢性肝炎患者 B 細胞に感染している HCV の解析

C 型慢性肝炎患者 75 例を検討し、B 細胞中 HCV RNA 陽性率は 48 例 (64.0%) と他のリンパ球分画 (CD4⁺, 11.5%; CD8⁺ T 細胞, 13.5%) と比較して優位に高頻度であり、かつウイルス量も有意に高値だった。またこの 75 例で LPD マーカー及び B 細胞 clonality など何らかの異常を示す患者は C 型肝炎患者の約 70% と高頻度だった。これらの異常と関連する因子の探索として、単変量及び多変量解析を用い、B 細胞中 HCV RNA 陽性が独立した寄与因子として抽出された。HCV の B 細胞感染、あるいは HCV と B 細胞との association が LPD 発症に関与することが示唆された。

B 細胞中 HCV 陽性患者と陰性患者の血清中 HCV RNA 全塩基配列を比較してみると、両者に大きな差異は認めなかった。

C 型慢性肝炎患者の血清 BAFF、APRIL 濃度
血清 BAFF レベルは HCV 感染者でコントロール群に比較して有意に高値を示した (HCV 感染者群 $1,560.5 \pm 153.1$ vs 健常者群 891.4 ± 55.6 pg/ml, $P=0.0006$)。この BAFF レベルは B 細胞中 HCV RNA 陽性とは相関しなかった。また他の LPD マーカー、B 細胞 clonality とも相関せず、独立した異常であることが示された。血清 BAFF との関連因子として血小板数の低値 (15 万/ μ l 以下) が単変量解析で有意に相関した。また CH 群より LC 群で高値を示し、肝病変の進展との関連が示唆された。他の慢性肝疾患での検討では同じウイルス型肝炎の B 型慢性肝炎では健常者群と差がなかったが、自己免疫性肝炎 (AIH) や原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) では高値を示した (AIH: $1,084.8 \pm 77.6$, $P=0.04$, PBC: $1,970.3 \pm 202.6$ pg/ml, $P<0.0001$)。血清 APRIL は HCV 感染者群と健常者群に有意差はなかった。病態別に見ても CH 群、LC 群、HCC 群、

NHL 群で血清 APRIL に有意差はなかった。IFN 治療後ウイルス学的持続陰性化 (SVR) 患者 12 例では IFN 投与直後より血清 BAFF が高値になり治療終了後は前値より低下する傾向が見られた。血清 APRIL は対照的に IFN 中、治療前と比べ有意に低下した。非 HCV 慢性肝疾患患者においても血清 BAFF は健常者群に比べ有意に高値を示した。APRIL はどの疾患群も健常者群と差がなかった。

5. HCV-JFH1 感染細胞に対するプラークアッセイ法の確立と HCV の細胞傷害機構の解析、高増殖性 HCV-JFH1 株の構築

HCV-JFH1 株を Huh-7.5.1 細胞に感染後に観察される細胞傷害性プラークの形成を応用して、感染増殖能の高い HCV サブクローンの単離を試みた。免疫蛍光染色での感染細胞フォーカスとの比較により、プラーク形成フォーカスは感染フォーカスのごく一部に起こることが明らかとなった。プラークアッセイ法により 6 箇所より感染細胞を回収し上清を再感染させたところ、1 個のクローン (#1) で高レベルの増殖と著明な細胞死が観察された。単離クローン (#1) および単離前のクローンの plaque forming unit (PFU/ml) 及び focus forming unit (FFU/ml) の比 (PFU/FFU) を算出すると、JFH1: 0.028 に対し JFH1-P1:0.14 と、親株 JFH1 に比べ 50-100 倍増殖能・細胞傷害性が上昇していた。単離されたプラーク (#1) の遺伝子解析を行ったところ、9 個のアミノ酸変異を認め、そのうち 5 個が NS5B C 末端側に集中していた。同定された 5 個の変異を HCV-JFH1 plasmid に個々に導入し、合成 RNA を細胞にトランスフェクションしウイルス増殖粒子形成能を解析したところ、3 箇所の変位クロー

ンで親株 JFH1 より著明に高レベルの粒子産生が観察された。以上より、HCV の特定の遺伝子構造がウイルスの増殖・感染能を規定していることが示された。

6. 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

散発性急性 C 型肝炎 genotype 2b 型 2 例、1b 型 1 例の血中ウイルス遺伝子配列を解析し、ウイルスゲノム全体に標準配列 (HCV-J4, J8) に比べ約 20-40 箇所のアミノ酸変異が存在することを確認した。さらにこれらの配列から全長 HCV ゲノム cDNA および subgenomic replicon plasmid を構築、2b 型全長 HCV-cDNA、replicon を構築した。JFH-1 とのキメラウイルスは electroporation 後 JFH-1 株に比してコア蛋白、ウイルス粒子分泌が著明に高く、再感染力価も有意に高値であった。組み替え部位の検討では、NS2 内に接合部を設定したものが最も強力な増殖を認めた。またその培養上清を新たな Huh751 細胞に接種する事により再感染が確認された。IFN による増殖抑制試験では用量依存性にウイルス増殖抑制が確認され、CD81 抗体を使用した侵入阻害試験においても用量依存性にウイルス増殖抑制が確認された。一方、Huh751 に electroporation したレプリコンは解析可能なレベルでの増殖は認められず、現在既報の適応変異を導入し増殖能の解析を継続中である。

D. 考察

主任研究者はは劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株を用いて、HCV のウイルス培養系を世界に先駆けて報告し、さらに HCV レプリコン、全長ウイルス遺伝子、キメラウイルス遺伝子など HCV のウイルス感染増殖複製実験に必要な材

料の開発と、それらを用いたHCVに関する研究を推進してきた。初めてウイルス培養が可能となったJFH-1株が劇症肝炎から分離されたことから、HCVによる劇症肝炎からは複製効率の高いウイルス株が分離できる可能性を考慮して、さらに劇症肝炎および重症急性肝炎患者からウイルス遺伝子をクローニングして解析を行った。遺伝子型2aおよび1bのレプリコンおよび全長遺伝子を構築して解析している。JFH-1株以外の培養細胞で複製増殖可能なウイルス株を樹立することでHCV研究はさらに進行することが期待できる。また、JFH-1株の非構造領域遺伝子により他のHCV株の構造領域遺伝子をもつキメラウイルスを作成することができる。この実験系により様々なHCV株の抗原性や感染性の解析が可能となった。

C型慢性肝炎患者において、リンパ球系細胞の中でB細胞に高頻度の高ウイルス量のHCVが検出された。約70%の患者でLPDマーカー異常あるいはB細胞clonalityが確認された。LPDマーカー異常の独立寄与因子にB細胞中HCV RNA陽性が抽出されたことから、B細胞トロピズムを持つHCVがLPDを惹起する可能性ある。B細胞活性化因子であるBAFF、APRILの血清レベルをみると、血清BAFFはHCV感染者で高値を示し、LPDを惹起するtrans-acting factorである可能性が示唆された。B細胞トロピズムを持つHCV RNAの全塩基配列の解析では特徴的配列は現時点で確認されていない。

ホローファイバーを用いた立体培養細胞系は多様な患者血液由来HCVの感染増殖が可能であった。効率の良い感染増殖を示すHCVは一定時間を経過した後に増殖が抑制される傾向があるこ

とがわかったが、遺伝子型1bの場合はインターフェロン系を誘導し、遺伝子型2aではアポトーシスを誘導することで増殖が抑制されていると考えられた。遺伝子型2aのHCV感染による細胞傷害性は感染早期から観察であるため、遺伝子型2aのHCVの感染増殖を検出する良い指標となることが考えられた。

ウイルスの細胞障害効果を利用したプラークアッセイの解析より、HCV-JFH1感染細胞には細胞障害性の異なるクローンが混在している可能性が考えられた。単離されたプラーク形成クローンでは、単離前のクローンに比較し増殖能・細胞障害性の著明に上昇していた。細胞障害性クローンの遺伝子解析により同定された9個のアミノ酸変異のうち6個がRNA依存性RNAポリメラーゼであるNS5Bに集中していたことから、遺伝子構造の変化がウイルスの増殖能及び細胞障害性に関与していると考えられた。

E. 結論

1. C型肝炎患者血清由来HCV株のレプリコンおよび全長HCV構築を解析した。
2. 遺伝子型の異なるHCV株によるキメラウイルスを作製した。
3. ホローファイバーによる立体細胞培養により患者由来HCVの感染増殖に成功した。
4. B細胞指向性HCV株を解析した。
5. 細胞障害性の強いHCV株を確立し解析した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C

Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28(γ)-Dependent Mechanism. *J Virol.* 2009 83(5):2389-2392.

2. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol.* 2009;510:305-27.

3. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 377(3):747-51.

4. Lan L, Gorke S, Rau SJ, Zeisel MB, Hildt E, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Huber R, Wakita T, Schmitt-Graeff A, Royer C, Blum HE, Fischer R, Baumert TF. Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol.* 2008 181(7):4926-35.

5. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology.* 2008 48(3):732-40.

6. Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol.* 2008 89(7):1587-92.

7. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 2008 82(16):7964-76.

8. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology.* 2008 376(2):397-407.

9. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 371(3):446-50.

10. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2008 82(12):5715-24.

11. Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi T, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T and M.Imawari. Evaluation of Serum B Cell Activating Factor (BAFF/BlyS) as an Immunological Marker for Lymphoproliferative Disorders Associated with Chronic Hepatitis C. *The Showa University Journal of Medical Sciences*, 2009 in press.

12. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y,

Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, et al. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. *J Med Virol*.81:619-627,2009

13. AW. Tai, Y Benita, LF. Peng, S-S Kim, N Sakamoto, RJ. Xavier, RT. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host & Microbe*, in press.

14. S Toma, T Yamashiro, S Arakaki, J Shiroma, T Maeshiro, K Hibiya, N Sakamoto, F Kinjo, M Tateyama, J Fujita: Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and interferon- α . *Journal of Viral Hepatitis*, in press.

15. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, *Glycyrrhizae radix*, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. *Hepatology Res* 2009; 39(1):60-69.

16. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2008; 23 (9) :1437-1447.

17. Nanmoku K, Imaizumi R, Tojimbara T,

Nakajima I, Fuchinoue S, Sakamoto N, Watanabe M, Teraoka S: Effects of immunosuppressants on the progression of hepatitis C in hepatitis C virus-positive renal transplantation and the usefulness of interferon therapy. *Transplant Proc* 2008; 40 (7):2382-2385.

18. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatology Res*, in press.

19. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, in press.

2. 学会発表および講演など

1) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス研究の進展：ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本医師会館、(2008, 7. 17)

2) 脇田隆宇, C型肝炎ウイルス研究の最先端、第12回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、(2008, 10.1)、シンポジウム1「肝炎ウイルス研究のカッティングエッジ：基礎から臨床への贈り物」

3) 脇田隆宇, ウイルス培養系を用いたC型肝炎