

Yamaguchi A, and Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. **Science** 323: 524-527, 2009

(6) Akira Murakami, Hiroshi Takasugi, Shinya Ohnuma, Yuuki Koide, Atsuko Sakurai, Satoshi Takeda, Takeshi Hasegawa, Jun Sasamori, Takashi Konno, Kenji Hayashi, Yoshiaki Watanabe, Koji Mori, Yoshimichi Sato, Atsuo Takahashi, Naoki Mochizuki, and Nobuyuki Takakura : Sphingosine 1-Phosphate Regulates Vascular Contraction via S1P3 Receptor: Investigation Based on a New S1P3 Receptor Antagonist. **Mol Pharmacol** in press, 2010.

2. 学会発表

1) Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H : Viroprotein activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, June 2-6, 2009, Florida, USA

2) Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiro K: Gold nanoparticle array based on the surface structure of virus. International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics, Oct. 9-10, Tokyo, Japan

3) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Mikuni S, Matsuo Y, Nagakawa K, Kinjo M, Sawa H, Ijiro K: Preparation of functionalized virus-like particles enabling pH-mediated release of target molecules, March 25-26, 2010, Tomakomai, Japan

4) 福井 一. Seryl-tRNA synthetase (SARS) contributes to the vascular development in zebrafish. 第 61 回日本細胞生物学会 名古屋(2009) 6 月 2-4 日

5) Fukuhara S. ANGIOSTASIS AND ANGIOGENESIS REGULATED BY ANGIOPOIETIN-1/TIE2 RECEPTOR SYSTEM. The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. Ewha Womans University, Seoul, Korea, 2009.8.20-21

6) Fukuhara S. ANGIOSTASIS AND ANGIOGENESIS REGULATED BY ANGIOPOIETIN-1/TIE2 RECEPTOR SYSTEM. Japan-Mexico Workshop. Mexico city, 2009.2.25-27

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨

本研究では、自己免疫疾患の克服を目指し、2種類のTNFレセプターの一方のみに結合するレセプター指向性構造変異体の創出と動物モデルを用いた検討を通じて、有効性と安全性を兼ね備えた画期的自己免疫疾患治療薬の開発を試みた。

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)独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
阿部 康弘
- (4)株式会社林原生物化学研究所
谷合 まどか
- (5)株式会社林原生物化学研究所
有安 利夫

A. 研究目的

疾患プロテオミクス研究の進展に伴い、自己免疫疾患などの難治性疾患の発症や悪化、治癒に関与する疾患関連蛋白質が数多く同定され、疾患関連蛋白質の機能制御、特に蛋白質間相互作用を標的としたドラッグデザインに期待が寄せられている。しかし、蛋白質を医薬品として利用する場合、1種類の医薬品候補蛋白質が複数のレセプターを介して多様な生理作用を発揮するため、この中から、目的とする薬理的な作用のみを抽出するためには、標的レセプターに対して選択的に結合するアゴニストやアンタゴニストを、治療目的に応じて迅速に創出できる創薬技術(DDSなど)が必要不可欠となる。例えば、関節リウマチをはじめする自己免疫疾患において、腫瘍壊死因子

(TNF)の過剰発現が病態形成の主因となることが明らかになり、TNFに対する中和抗体や可溶性レセプターを用いた抗TNF療法が臨床で優れた治療成績を示すことが知られている。しかし、これら抗TNF療法では、宿主の生体防御機構に重要な役割を担うTNFの2種類のレセプター(TNFR1及びTNFR2)を介した作用を同時に阻害するため、易感染性といった重大な副作用を示す原因となっている。このように、各種難治性の自己免疫疾患においては、疾患の発症・悪化のメカニズム解明、さらにその情報に基づいた有効かつ安全な治療法の開発が期待される。

そこで本研究では、ファージ表面提示法による独自の機能性蛋白質構造変異体創製技術を駆使することで、TNFR1およびTNFR2に対して指向性を有する、アゴニストあるいはアンタゴニストといった新規TNF変異体を創出し、それらを活用することによって、これまで困難であったTNF/TNFレセプターの病態における機能解析と、自己免疫疾患の画期的治療薬の開発を試みた。

B. 研究方法

B-1. レセプター指向性TNF変異体の創製 TNF発現ファージライブラリの作製

レセプター指向性TNF変異体を創出するため、下記に示す方法で、TNF中のレセプター結合領域に位置するアミノ酸を網羅的に置換したファージライブラリを作製した。Library Iでは、「L29、

R31、R32、A145、E146、S147」の6アミノ酸を、Library II では「A84、V85、S86、Y87、Q88、T89」の6アミノ酸を他の20種類のアミノ酸に置換するため、NNS 配列を含む変異プライマーを用いて2段階のPCRを行った。得られたPCR産物は、*Hind* III 及び *Not* I (TOYOBO Co. Ltd.) で制限酵素処理し、pCANTAB5E を改変した pY03' phagemid vector へとライゲーションし、遺伝子ライブラリを作製した。この遺伝子ライブラリを大腸菌 TG1 株 (Stratagene Inc.) に形質転換後、OD₆₀₀=0.3-0.6 になるまで振盪培養し、M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen Corporation) を感染させることでファージを産生させた。

TNF レセプター指向性変異体のスクリーニング
レセプター指向性を有するファージクローンを濃縮するため、BIAcore (GE Healthcare Bioscience) を用いて TNFR1 及び TNFR2 指向性を対するパンニングを行った。TNF 変異体発現ファージライブラリ溶液を HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Tween20) で2倍希釈し、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 で再生液 20 µL を2回インジェクションし、ファージ溶液を回収した。ファージを再度 TG1 に感染させ、上記の方法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニングを繰り返した。パンニング後に回収したファージの培養上清を用いて、各レセプターに対する結合力、生物活性を指標にスクリーニングすることで、各 TNF レセプター指向性アゴニスト・アンタゴニスト候補を得た。

B-2. TNFR1 指向性アンタゴニストの有用性評価 PEG-T2 (monoPEG 化 T2) の作製

体内安定性の向上を目指し、N 末端アミノ基への部位特異的 PEG 化を行った。T2 に対して、分子量 5000 の mPEG-SPA (Shearwater corporation) を10倍モル量添加し、37°C、15 分間反応させた。ε-アミノカプロン酸を PEG の10倍モル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。

コラーゲン関節炎 (CIA) モデルの作製および評価
DBA/1J マウス (雄性、6~7 週齢) を用いた。ウシ由来 II 型コラーゲン (Chondrex) を等量の CFA (Chondrex) と氷冷下で高速ホモジナイザー (IKA) を用いて混合し、エマルジョンとした。これをコラーゲン量として 100 µg/mouse となるように、マウス尾根部皮内に数か所に分けて投与した (1 次免疫)。3 週間後 (day 21) にフロイント不完全アジュバント (IFA; Chondrex) とウシ由来 II 型コラーゲンを用いて、同様の方法で、エマルジョンを作製し、100 µg/mouse となるようにマウス尾皮下に追加免疫を行った (2 次免疫)。

実験的自己免疫的脳脊髄炎 (EAE) モデルの作製 および評価

C57BL/6 (雄性、6~8 週齢) マウスに対してミエリン構成蛋白質由来ペプチド Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG ペプチド) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) を PBS に溶解後、5 mg/mL となるように結核菌の死菌 (Difco Lab.) を加えた IFA と等量を混合し、エマルジョンとした。これを MOG ペプチド量として 200 µg/mouse となるようにマウス両脚のそ頸部および背部の3箇所皮下に投与した。さらに、免疫直後および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。

TNFR1 指向性アンタゴニストの安全性評価

従来の抗 TNF 療法の問題点は、免疫力の低下に伴う感染症の発症である。そこで、TNFR1 指向性アンタゴニスト投与時のウイルス感染防御能に及ぼす影響を、既存の TNF 阻害薬 (Etanercept) と比較検討した。C57BL/6 (雌性、6 週齢) にルシフェラーゼ搭載アデノウイルス (AdRGD-Luc) を 5×10^9 PFU/mouse で静脈内投与し、投与1週間後に肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、PEG-T2 及び Etanercept は AdRGD-Luc 投与前日から CIA モデルと同様の投与方法 (PEG-T2 : 1 µg/mouse 1日2回, Etanercept : 25 µg/mouse 1週間に2回) で投与を開始した。

B-3. TNFR 指向性変異体を用いた機能解析

TNF 変異体の結晶化

T2 を、ゲルろ過 HPLC で 20 mM Tris-HCl pH 7.4 にバッファー交換し、限外ろ過カラム (Amicon Ultra-4, MILLIPORE) で 10 mg/mL まで濃縮した。結晶化条件の一次スクリーニングは、Hampton Index kit、Screen kit 1, 2 を用いた。結晶化は、調製した結晶化溶液 1 μ L に対して T2 10 mg/mL を 1 μ L 混合し、20 °C にて hanging drops による蒸気拡散法で結晶化した。なお最適な結晶化条件は、0.05 M HEPES pH 7.5, 1.5% W/V 1, 2, 3-Heptanetriol and 12.5% PEG 3350 であった。

X 線結晶構造解析

X 線回折データは、大規模放射光施設 SPring-8 BL41XU にて収集した。なお、ビーム照射は放射線障害を軽減するため、100 K の冷却条件にて行った。回折データの変換には DENZO と SCALEPACK を用いた。野生型 TNF の結晶構造 (1TNF) データをサーチモデルとして、ccp4i Molrep を用いて分子置換を行った。構造精密化は、CNS により行い、ccp4i Procheck による構造評価の後に、それを最終構造とした。なお、構造の描写は、Pymol を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物は、「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」に準じ、所属機関の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

TNF レセプター指向性変異体の創製

独自の機能性人工蛋白質創製技術を駆使することで各レセプター指向性を示すアゴニストおよびアンタゴニストを創製し、中でも TNFR1 指向性を有する新規蛋白質性アンタゴニスト T2 を得ることに成功した。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。

TNFR1 指向性アンタゴニストの新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価

T2 に対して、N 末端部位特異的 PEG 化を適用することにより、活性を損なうことなく、体内安定性に優れた PEG-T2 を創製できた。PEG-T2 の CIA モデルにおける有効性を検討したところ、PEG-T2 投与群では顕著な関節炎抑制効果を発揮し、既存の抗 TNF 阻害薬 Etanercept と同等の効果が認められた。また、生体防御機構に与える影響を検討したところ、Etanercept 投与ではウイルス排除能が低下したのに対し、PEG-T2 はウイルス免疫に対して全く影響を与えないことが判明した。

さらに既存の TNF 阻害剤が病態を悪化させることが知られている多発性硬化症への適用を目指し、そのモデルである EAE マウスでの治療効果を検討したところ、PEG-T2 は、EAE の病態を悪化させることなく、発症を予防できることが判明した。以上の結果から、T2 は主に自己免疫疾患の病態形成や悪化に関与する TNFR1 を介した作用のみを選択的に阻害することで、生体防御機構の破綻招くことなく、治療効果を発揮できることから、安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬となり得ることが示された。

TNFR 指向性変異体を用いた機能解析

T2 がアンタゴニスト活性を発揮する分子メカニズムの解明を目的に、各レセプター指向性 TNF 変異体の X 線立体構造解析を行った。その結果、T2 は野生型 TNF とは異なる様式でレセプターへ結合することで、アンタゴニスト活性を発揮していることが判明した。

D. 考察

C. 研究結果の覽に記載

E. 結論

本研究では、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を行い、以下の結論を得た。

- ・ファージ表面提示法を駆使した独自の機能性蛋白質構造変異体創製システムを応用することで、世界に先駆けて、特定レセプター指向性を有した「蛋白性アンタゴニスト」の作製に成功した。
- ・ TNFR1 指向性アンタゴニスト T2 は、急性・慢性炎症性疾患に対して優れた抗炎症効果を発揮するとともに、従来までの抗 TNF 阻害薬の問題点を克服可能であることを明らかとした。
- ・種々のレセプター指向性アゴニスト、アンタゴニスト TNF 変異体を創製するとともに、それらの X 線結晶構造情報を取得し、TNF/TNFR の機能解析や医薬品開発に有用なツールを構築した。

本研究で得られた成果は、現在、実用化に向けた取組へと発展しており、さらには、自己免疫疾患の分子病態解明を通じて医学研究に貢献するとともに、有効で安全な次世代の治療薬開発に寄与することで、国民の健康と福祉に大きく貢献するものと期待している。

F. 研究発表

【総発表件数】

原著論文	30 件
総説・書籍等	6 件
国内学会発表	32 件
国際学会発表	17 件

その主なものを以下に示す

【原著論文】

1. Shibata H., Abe Y., Tani M., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007,

2008.

2. Shibata H., Abe Y., Tani M., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- α in murine hepatitis models., *Cytokine*, 44:229-33, 2008.
3. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388:667-71, 2009.
4. Shibata H., Abe Y., Tani M., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., *Biomaterials.*, 30:6638-47, 2009.
5. Shibata H., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine.*, 50: 75-83, 2010.

【総説・書籍等】

1. 堤 康央, ほか: 第6節 機能性人工タンパク質, バイオ医薬品の品質・安全性評価, (株)エル・アイ・シー, p. 369-378, 2007.
2. Abe Y.: Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity., *Yakugaku Zasshi*, 129:933-39, 2009.

【国内学会発表】

1. 野村鉄也, 角田慎一, 堤 康央, ほか: 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.
2. 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬.,

- CphI Japan 2009, 東京, 2009年4月.
- 堤 康央: 蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価, 第25回日本DDS学会学術集会, 東京, 2009年7月.
 - 阿部康弘, 堤 康央, ほか: 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59回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009年10月.

【国際学会発表】

- Tsunoda S., Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Shibata H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis with a novel TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
- Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity., HUP0 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Toronto (Canada), 26-30 September, 2009.
- Nomura T., Abe Y., Taniai M., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.: TNFR1-selectivity improvement of mutant TNF with antagonistic activity., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.

【受賞等】

- 堤 康央, 第25回日本DDS学会永井賞「蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価」
- 野村鉄也, ファーマバイオフォーラム 2008 優秀発表者賞「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」

- 阿部康弘, 第59回日本薬学会近畿支部奨励賞「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」
- 野村鉄也, 第25回 DDS学会ベストポスター賞「自己免疫疾患に対する有効性および安全性の向上を目指した TNFR1 指向性アンタゴニストの改変」

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ①堤 康央ほか, 生理活性複合体: 特許 第4177604号、平成20年8月29日

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

Protein Data Bank への登録

- TNFR1 selective TNF mutant; R1-6, 2008 (PDB ID 2ZJC and RCSB ID RCSB028044)
- TNF Receptor Subtype One-selective TNF Mutant with Antagonistic Activity; R1antTNF-T8, 2008 (PDB ID 2ZPX and RCSB ID RCSB028277)
- Crystal structure of TNF-TNFR2 complex, 2008 (PDB ID 2ZQW RCSB ID RCSB028312)

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、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レセプター指向性構造変異体の創出と動物モデルを用いた検討を通じて、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
阿部 康弘
- (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（MS）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る。しかし、TNF が結合するレセプターには TNFR1 と TNFR2 の二つのサブタイプが存在し、各レセプターが可溶性/膜結合型 TNF と相互に作用しつつ、複雑かつ巧妙にその生体内反応が制御されており、それらの機能の違いは十分明らかに

されていない。例えば TNFR2 によるシグナルは、感染防御に重要と考えられている一方で、多発性硬化症では病態寛解に寄与することも示唆されており、TNF を標的とした治療の制限要因にもなっている。

上記観点から本研究では、フェージ表面提示法を用いた独自の機能性蛋白質構造変異体創製技術を駆使することで、TNFR1 および TNFR2 に対して指向性を有する、アゴニストあるいはアンタゴニストといった新規 TNF 変異体を創出し、それらを活用することによって、これまで困難であった TNF/TNF レセプターの病態における機能解析と、自己免疫疾患の画期的治療薬開発の開発を試みてきた。中でも、昨年度までに創出した TNFR1 指向性アンタゴニスト(T2)は、宿主の生体防御機構を保持しつつ、抗炎症作用を選択的に発揮できると期待される。そこで本年度は、T2 の安全性評価を目的に既存の TNF 阻害薬で致命的な問題点であった易感染性に関して、TNFR1 指向性アンタゴニストと既存の TNF 阻害薬 (Etanercept) が及ぼす影響を比較検討した。さらに、T2 の新規 MS 治療薬としての有用性を免疫学的観点からより詳細に検証するため、T2 による MS 症状抑制効果の誘導機序の解析を試みた。

B. 研究方法

PEG-T2 (monoPEG 化 T2) の作製

T2 の PEG 化には、分子量 5,000 の mPEG-SPA

(succinimidyl ester of methoxy poly (ethylene glycol) propionic acid, molecular weight 5,000, Shearwater corporation)を用いた。T2に対して、10倍モル量のmPEG-SPAを添加し、37°C、15分間反応させた。ε-アミノカプロン酸 (Sigma-Aldrich, Inc) をPEGの10倍モル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。

TNFR1 指向性アンタゴニストの安全性評価

従来の抗TNF療法の問題点は、免疫力の低下に伴う感染症の発症である。そこで、TNFR1指向性アンタゴニスト投与時のウイルス感染防御能に及ぼす影響を、既存のTNF阻害薬 (Etanercept) と比較検討した。C57BL/6 (メス、6週齢、日本SLC) にルシフェラーゼ搭載アデノウイルス (AdRGD-Luc) を 5×10^9 PFU/mouse で静脈内投与し、投与1週間後に肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、PEG-T2及びEtanerceptはAdRGD-Luc投与前日から昨年度に報告したコラーゲン関節炎モデルと同様の投与方法 (PEG-T2: 1 µg/mouse 1日2回, Etanercept: 25 µg/mouse 1週間に2回) で投与を開始した。

肝臓中ルシフェラーゼ活性の測定

摘出した肝臓は氷冷下にて組織溶解液中 (TritonX-100 0.05%, EDTA 2 mM, Tris-HCl pH7.8 0.1 M) にてホモジネイトした。ホモジネイト液を21,255 g (14,000 rpm) にて10分間遠心し、上清のルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン PGL5500、東洋インキ) を用い、蛍光プレートリーダー (1420 ARVO、PerkinElmer) で測定した。

実験的自己免疫的脳脊髄炎 (EAE) モデルの作製および評価

C57BL/6 (雄性、6~8週齢) マウスに対してミエリン構成蛋白質由来ペプチド Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG ペプチド) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 株式会社バイオロジカ) をPBSに溶解後、5 mg/mL となるよう

に結核菌の死菌 (Difco Lab.) を加えた Incomplete Freund Adjuvant (IFA; Difco Lab.) と等量を混合し、エマルジョンとした。これをMOGペプチド量として200 µg/mouse となるようにマウス両脚の頸部および背部の3箇所皮下投与した。さらに、免疫直後および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。なおクリニカルスコアは免疫後1日目より毎日観察し、以下のようにスコア化した。また図表にあるスコアは、マウス全10例の経日的なクリニカルスコアの値を平均化し、プロットした。

- 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

EAEの発症率評価に関しては、各群それぞれ全10例の内、クリニカルスコア ≥ 0.5 のマウスをEAE発症マウスとして評価した。経日的に評価した結果をもとに、各群の発症率を算出してプロットした。なお発症率は、以下に示す式にて算出した。

$$\text{発症率 (\%)} = (\text{スコア} \geq 0.5 \text{ のマウスの例数}) / (\text{各群の全例数} 10) \times 100$$

PEG-T2 の投与

PEG-T2は、1次免疫後2日目より28日目まで、1あるいは10 µg/mouse にて1日2回腹腔内投与を行った。またコントロール群としてPBSを投与した。

2次リンパ組織中のMOGペプチド特異的なヘルパーT細胞のポピュレーション解析と脾細胞からのサイトカイン産生の測定

免疫後11日目に回収した頸部リンパ節由来あるいは脾細胞を、 2.5×10^6 cells/500 µL/well の条件で、24穴プレートにそれぞれ播種した。さ

らに PBS を用いて 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した MOG ペプチド溶液を 125 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 72 時間培養した。表面抗原染色および細胞内サイトカイン染色は、頸部由来の全細胞を回収した後、50 ng/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; Calbiochem Corp) と 750 ng/mL ionomycin (Calbiochem Corp) 37°C にて 4 時間、最後の 2 時間は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Inc.) を加えて刺激を行った。抗 mouse CD4、抗 mouse CD45 抗体 (30-F11 ; Biolegend) による表面抗原染色および抗 mouse インターフェロン- γ (interferon-gamma ; IFN- γ) 抗体 (XMG1.2 ; Biolegend) と抗 mouse IL-17 抗体 (BD TC11-18H10 ; Biosciences)、抗 mouse インターロイキン-4 (IL-4) 抗体 (11B11 ; eBiosciences) を用いて細胞内サイトカイン染色を行った。その後、各ヘルパー T 細胞サブセットのポピュレーションを FACSCanto (Beckton Dickinson) によって解析した。なお、データの解析には FlowJo (Tree Star) を使用した。また培養脾細胞の上清を回収して、MOG ペプチド特異的細胞が産生する mouse IFN- γ (BD OptEIA kit) および mouse IL-17 (Quantikine ELISA kit) のを ELISA にて定量した

脊髄組織切片の作製および免疫染色

1 次免疫後 20 日目のマウスに対して麻酔を行い、冷却した PBS を用いて還流を行い、脊髄を摘出した。その後、4%中性ホルマリン緩衝液 (ナカライテスク株式会社) にて組織を固定し、EDTA にて脱灰後、パラフィンブロックへの包埋を行い、脊髄の組織スライドを作製した。炎症性細胞の浸潤を観察するために hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った。また脊髄における脱髄症状を評価するために、ルクソールファストブルー染色を行った。なお組織スライドの作製ならびに各染色は、アプライドメディカルリサーチ株式会社に委託した。

脊髄組織中のヘルパー T 細胞のポピュレーション解析

1 次免疫後 20 日目のマウスに対して麻酔を行い、冷却した PBS を用いて還流を行った。マウスの脊髄を摘出し、ピンセットにて脊髄中の髄鞘を取り出した。2.5 mg/mL のコラゲナーゼ D (Roche Diagnostics 株式会社) 溶液と 1 mg/mL の deoxyribonuclease (DNase) I (Roche Diagnostics 株式会社) を加えて 37°C にて 30 分間インキュベーションした。その後、70 μm のセルストレーナー (BD Biosciences) を通して単離細胞浮遊液を調製した。細胞を RPMI-1640 により洗浄後、Percoll PLUS (GE Healthcare) を用いて単核球を単離した。回収したリンパ球中の各ヘルパー T 細胞サブセットのポピュレーションを、上記の「2 次リンパ組織中の MOG ペプチド特異的ヘルパー T 細胞のポピュレーション解析」に準じて解析した。ただし、脊髄組織中のリンパ球に対して 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MOG ペプチド抗原溶液による刺激は行わなかった。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物は、「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」に準じ、所属機関の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

TNFR1 指向性アンタゴニストの安全性評価

AdRGD-Luc を用いて PEG-T2 と Etanercept のウイルスに対する生体防御機構に与える影響を比較した。Etanercept 投与群では、PBS 群と比較して顕著に肝臓中のルシフェラーゼ活性が高く、Etanercept の投与によってウイルスに対する免疫反応が抑制され、ウイルスの排除が遅れていることが示唆された (図 1)。一方、PEG-T2 投与群におけるルシフェラーゼ活性は PBS 群とほぼ同じ値を示していた。即ち、Etanercept と異なり、PEG-T2 の投与では免疫反応が抑制されず、ウイルスに対する生体防御機構に与える影響が極めて少ないことが予想された。

EAE モデルに対する PEG-T2 の予防的効果

N 末端部位特異的バ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（昨年度までに報告済み）を用いて、EAE の発症予防効果を検討した。1 次免疫 2 日後より PEG-T2 を 1 日 2 回で 1、10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を週に 2 回とした。まず、EAE の発症率についてみてみると、PBS を投与したマウスにおいては 1 次免疫 19 日後には全例 (10 匹) で EAE の発症が確認された。一方で、PEG-T2 投与群では、発症率が有意に減少し、中でも 10 μg 投与群では顕著に発症が抑制されていた (図 2A)。またクリニカルスコアは、PBS 投与群で、免疫 13 日目以降、急激な上昇が認められたのに対して、1 μg あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で PEG-T2 を投与したマウスでは、投与量依存的に症状が抑えられていた (図 2B、2C)。本結果から、TNFR1 指向性アンタゴニストとしての PEG-T2 は、予防的投与により、EAE モデルの発症を抑制するとともに、発症が認められた場合においても、その症状を抑制することが明らかとなった。

2 次リンパ組織における抗原特異的炎症性 T 細胞の分布評価

これまで EAE モデルの病態形成には、ミエリンの構成蛋白質由来の MOG ペプチドを貪食した抗原提示細胞 (樹状細胞やマクロファージ) が、2 次リンパ組織などで抗原特異的なヘルパー T 細胞の増殖を促すことが何らかの関係があるものと考えられてきた。そこで、2 次リンパ組織にて増殖した抗原特異的ヘルパー T 細胞中の Th1 および Th17 のポピュレーションを解析するために、細胞内染色を行った (図 3)。その結果、PBS 投与群では intact 群と比較して CD4 陽性、CD45 陽性画分であるヘルパー T 細胞中に、Th1 や Th17 細胞の割合が顕著に増大していた。一方で特に Th1 細胞に関しては、PEG-T2 を投与することによって、その割合が顕著に減少していた。さらに Th17 細胞に関しても、有意な差は認められないものの、投与量依存的に抑制されている傾向にあった。次に、MOG ペプチド刺激 72 時間後に脾臓中の細胞培養上清を用いて、IFN- γ と IL-17 のサイトカイン量を測

定した (図 4)。その結果、PBS 投与群では、intact 群と比較して、Th1 産生サイトカインである IFN- γ 、Th17 産生サイトカインである IL-17 が共に著しく上昇していた。その一方で PEG-T2 を投与したマウスでは、フローサイトメトリー解析の結果と相関するように、投与量依存的に産生が抑制されていた。即ち、この結果は TNFR1 指向性アンタゴニストが、2 次リンパ組織における抗原特異的ヘルパー T 細胞の増殖あるいは集積を抑えている可能性を示唆するものである。

EAE モデルにおける脊髄の組織病理学的解析

脊髄組織における炎症性細胞浸潤と脱髄の程度を、MS 様 (EAE) 症状が最も重篤である免疫 20 日目 (スコアピーク時) に回収し、病理組織染色にて評価した。まず、HE 染色によって脊髄における炎症性細胞の浸潤を観察した結果、PBS 投与群においては intact 群と比較して、脊髄の側索側に著しい炎症性細胞の浸潤が確認された (図 4A)。一方、PEG-T2 投与マウスにおいてそのような傾向は観察されず、炎症性細胞の浸潤が抑制されていることが示唆された。さらに、ルクソールファストブルー染色により、EAE の病態に特徴的な脊髄組織における脱髄症状を観察した結果、PBS 投与群で認められる脱髄症状 (矢印) が、PEG-T2 投与により抑制されていることが確認された (図 5B)。これまでの検討から、EAE の病態において、神経組織に過剰産生した TNF が、神経組織の髄鞘を構成するオリゴデンドロサイト上の TNFR1 を介してアポトーシスを誘導し、組織を破壊することが報告されている。従って、TNFR1 指向性アンタゴニスト (PEG-T2) の投与による脱髄症状の軽減は、この作用を抑制したことによるものと示唆された。

ヘルパー T 細胞の脊髄組織への浸潤解析

EAE モデルにおいて増殖する血中の Th1 細胞や Th17 細胞は、血液脳関門や脊髄血液関門を透過して、疾患局所である脳・脊髄へと移行することで疾患を悪化させることが知られている。そこでクリニカルスコアのピーク時である免疫後 20 日目に脊髄を回収し、組織中に含まれるヘルパー T 細胞中の Th1、Th17 のポピュレーションを解析した (図 6)。その結果、PBS 群では CD4 陽性、CD45

陽性画分である成熟化ヘルパーT細胞の中に、IFN- γ 産生細胞であるTh1およびIL-17産生細胞であるTh17細胞の移行が観察された。一方、PEG-T2を投与することで、intact群と同程度にまで組織への細胞移行が抑制されていることが示された。

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の新規自己免疫疾患治療薬としての可能性を検証するため、安全性・有効性を評価した。その結果、T2はTNFR1を介した作用を選択的に阻害することで、既存のTNF阻害薬で致命的問題点であった生体防御機構の破綻を回避可能であることが明らかとなった。さらに、既存のTNF阻害薬では禁忌に指定されている多発性硬化症においても、目立った副作用を示すことなく、優れた発症予防効果を発揮することから、T2は安全性と有効性を兼ね備えた新規自己免疫疾患治療薬となり得ることが示された。本研究で得られた成果は、現在、実用化に向けた取組へと発展しており、また、自己免疫疾患の分子病態解明を通じて医学研究に貢献するとともに、有効で安全な次世代の治療薬開発に寄与することで、国民の健康と福祉に大きく貢献するものと期待される。

D. 考察

C. 研究結果の覽に記載

F. 研究発表

論文発表

1. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388(4):667-71, 2009.
2. Shibata H., Yoshioka Y., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Tsunoda S., Kamada H.,

Tsutsumi Y. : The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., *Biomaterials.*, 30(34):6638-6647, 2009.

3. Shibata H., Abe Y., Yoshioka Y., Nomura T., Sato M., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine.*, 50(1): 75-83, 2010.
4. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology., *Pharmazie.*, in press.
5. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Shibata H., Kayamuro H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Serada S., Naka T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice., *J. Control. Release.*, in press.

学会発表

【シンポジウム等】

1. 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬., *CphI Japan 2009*, 東京, 2009年4月.
2. 堤 康央: 創薬を志向したプロテオーム研究とその有効活用., *東北大学薬学研究科講演会.*, 宮城(仙台), 2009年6月.
3. 堤 康央: 蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価., *第25回日本DDS学会学術集*

会., 東京, 2009年7月.

【国内学会発表】

1. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 萱室 裕之, 向洋平, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央: 自己免疫疾患に対する有効性および安全性の向上を目指した TNFR1 指向性アンタゴニストの改変., 第 25 回 DDS 学会, 文京区 (東京), 2009年7月.
2. 阿部康弘, 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 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 東大阪 (大阪), 2009年10月

【国際学会発表】

1. Tsunoda S., Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Shibata H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis with a novel TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
2. Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Kayamuro H., Shibata H., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of novel technology to produce mutant TNF with improved receptor selectivity using phage display technique with gene shuffling methods., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009 .
3. Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity., HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Toronto (Canada), 26-30 September, 2009.
4. Nomura T., Abe Y., Inoue M., Yoshioka Y., Kayamuro H., Mukai Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : TNFR1-selectivity improvement of mutant TNF with antagonistic activity., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology,

International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

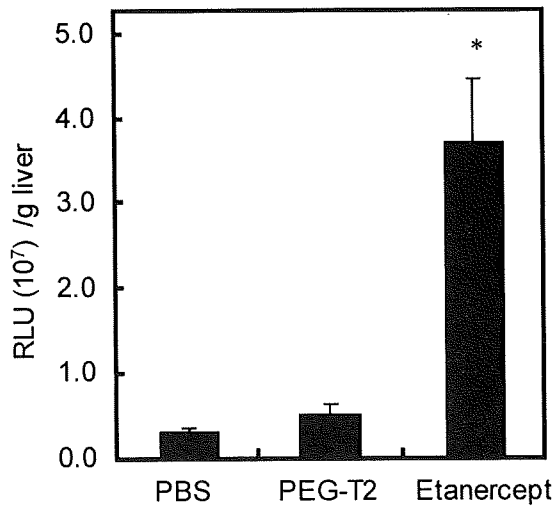


図1. ウイルス感染防御能に与える影響の比較.
C57BL/6(メス, 6週齢)に 5×10^9 PFU/mouseでルシフェラーゼ搭載アデノウイルスを静脈内投与し、投与後1週間後に肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した. なお、PEG-T2 及び Etanercept は、ウイルス投与前日から腹腔内投与した. * $p < 0.05$ versus PBS group.

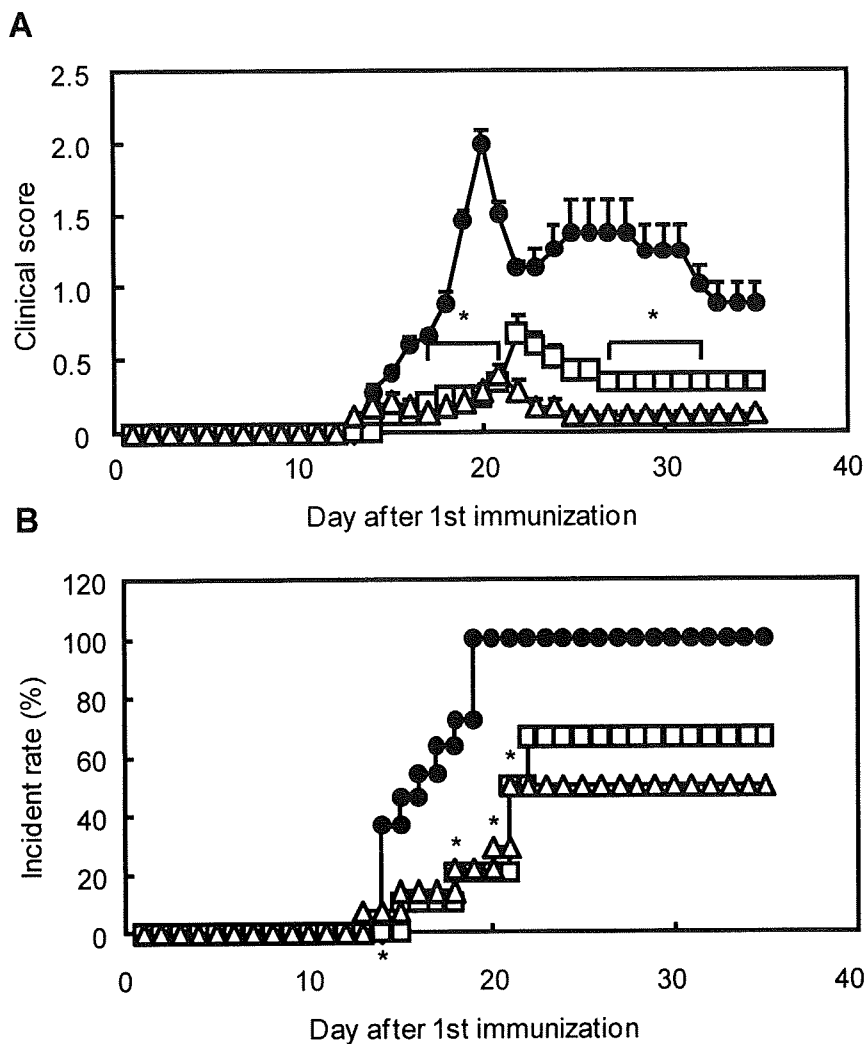


図2. EAEモデルにおけるクリニカルスコアおよび発症率.
1次免疫後2日目よりEAEマウス($n=10$)に、PBS、PEG-T2(1 µg, 10 µg; 2回/日)、を腹腔内投与し、(A)クリニカルスコアおよび、(B)発症率を評価した. ●, PBS; □, 1 µg PEG-T2; △, 10 µg PEG-T2; * $p < 0.05$ versus PBS group.

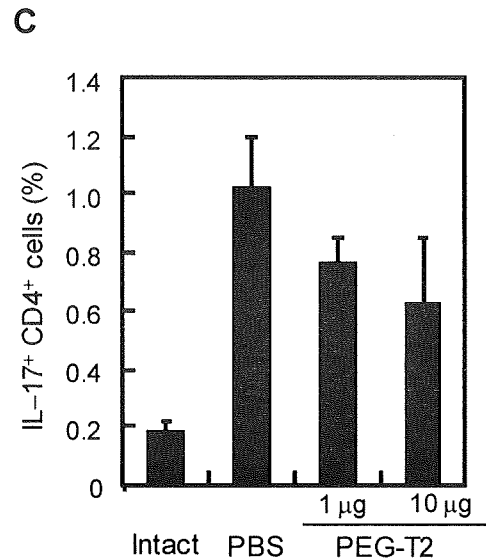
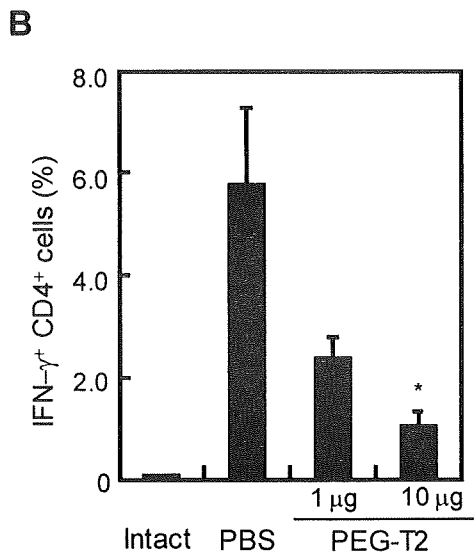
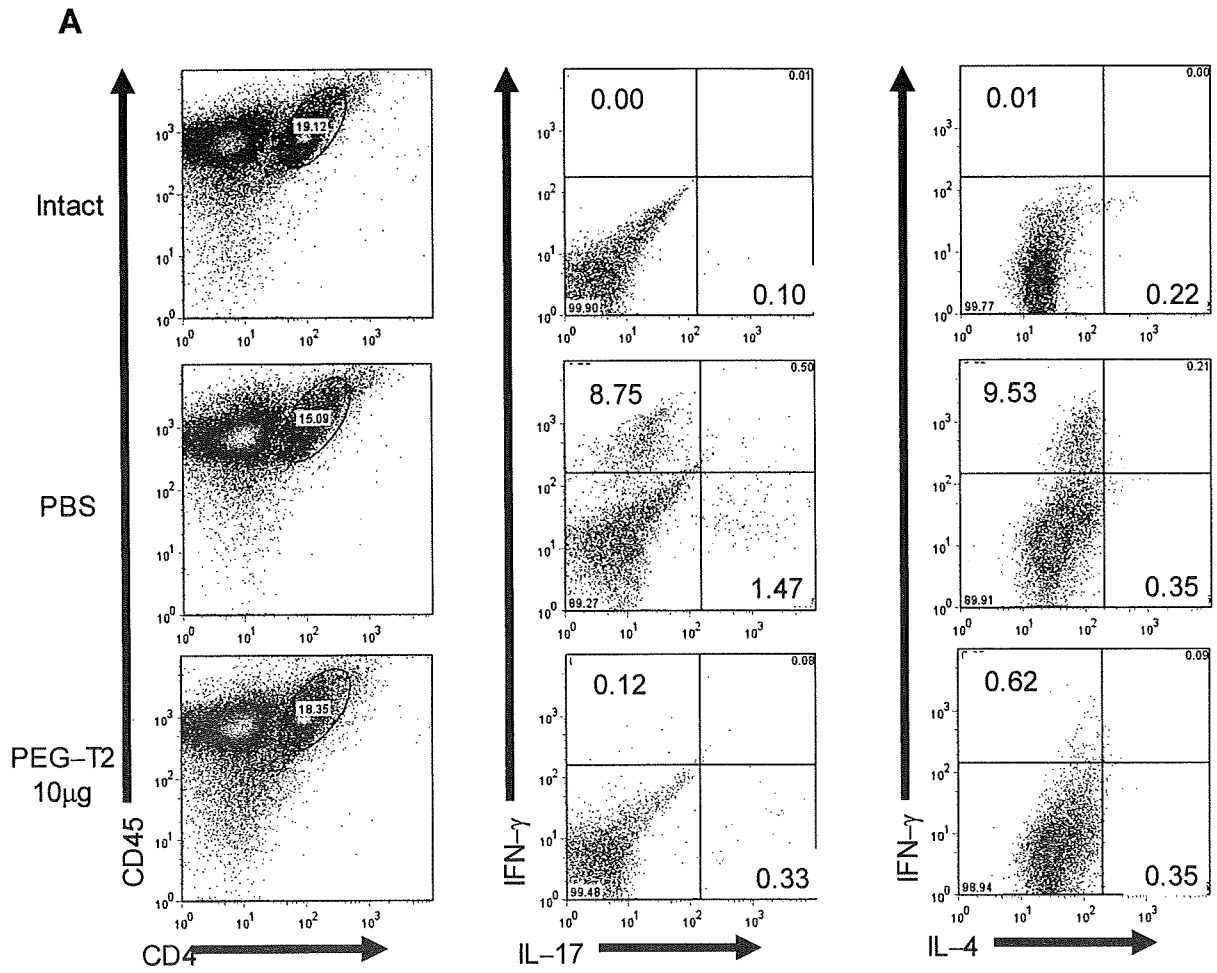


図3. 2次リンパ組織における抗原特異的T細胞のポピュレーション解析.

(A)免疫後11日目に回収したそ頸部リンパ節由来の細胞をMOGペプチドで刺激し、72時間後に増殖した抗原特異的ヘルパーT細胞中の(B)Th1および(C)Th17のポピュレーションをフローサイトメトリーにて解析した。(* *p* < 0.05 versus PBS group)

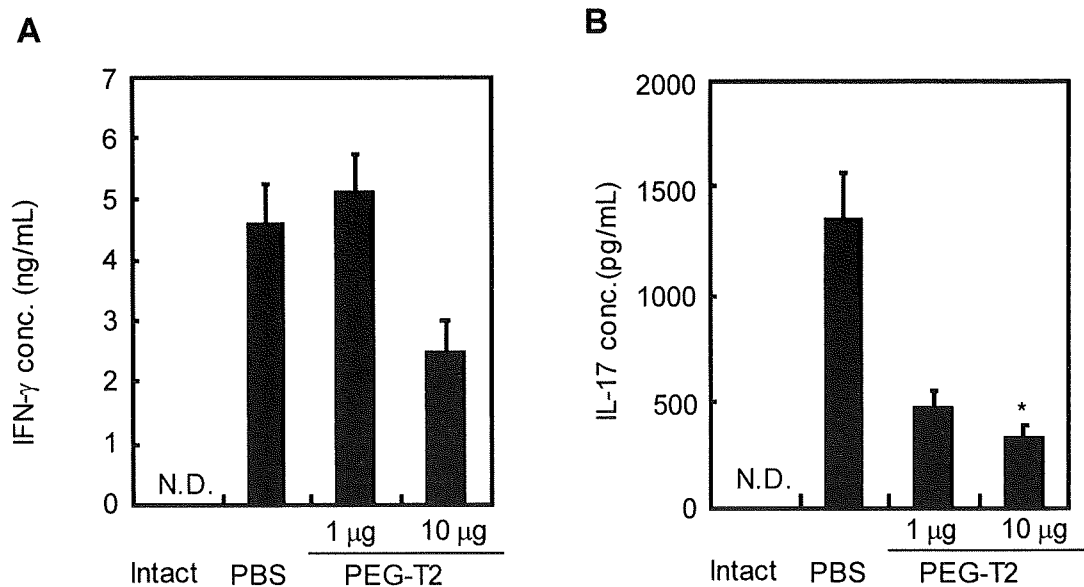


図4. 2次リンパ組織におけるMOG特異的サイトカイン産生の評価。免疫後11日目に回収した脾細胞をMOGペプチドで刺激し、72時間後に(A)IFN- γ および、(B)IL-17の産生量を測定した。

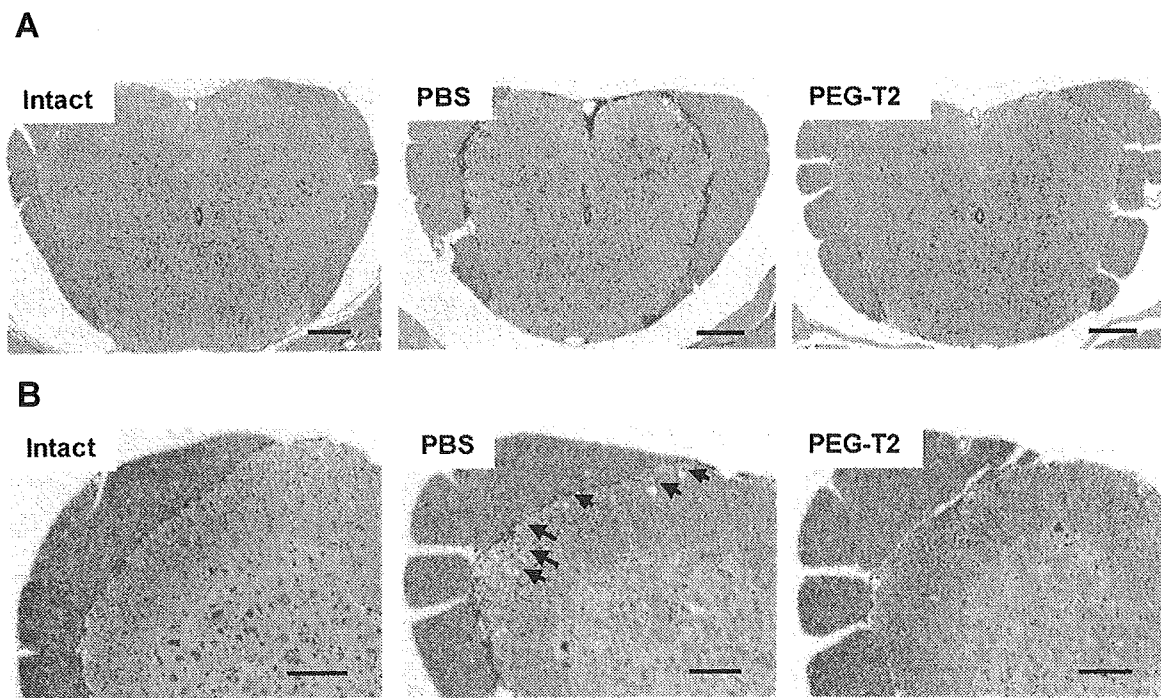


図5. EAEモデルにおける脊髄の組織病理学的解析。EAE症状が最も重篤である免疫後20日目に脊髄を回収し、(A)HE染色にて炎症性細胞の浸潤を、(B)ルクソールファストブルー染色にて脱髄症状を観察した。

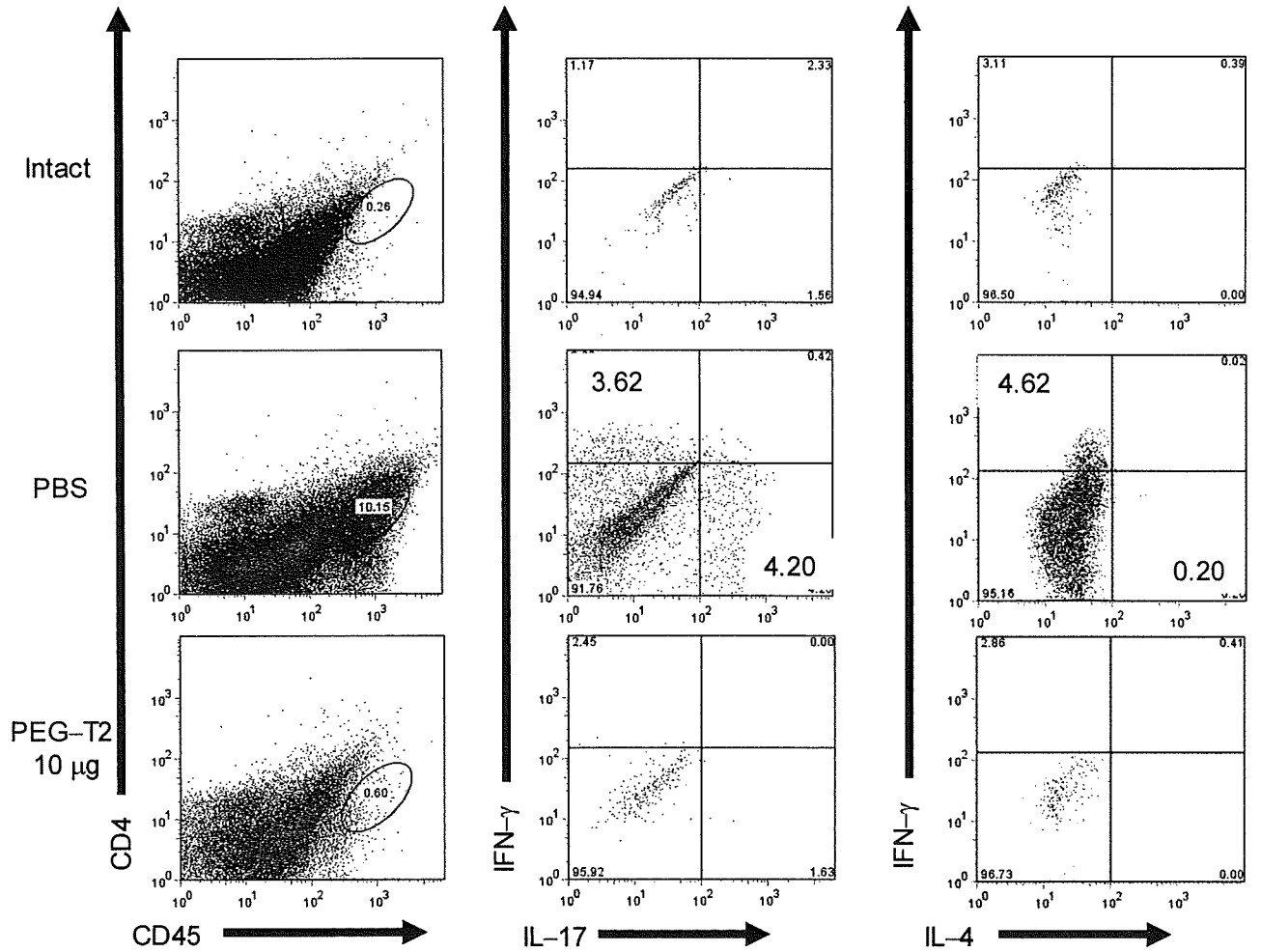


図6. EAEモデルにおける脊髄浸潤ヘルパーT細胞のポピュレーション解析。
 クリニカルスコアがピークである免疫後20日目に脊髄を回収し、脊髄に浸潤しているヘルパーT細胞中のTh1、Th17のポピュレーション解析を行った。

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 隆字
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

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てきた。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、感染感受性のある培養細胞株を開発、およびそのライブラリーを構築した。本研究により、抗ウイルス薬の開発が進行させ、我が国における肝炎対策に大きく寄与することが期待できる。

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

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てきた。本研究では、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を構築した。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。

B. 研究方法

- 1) 新規HCV株によるレプリコンの解析。適合変

異を導入した全長コンストラクトの作製。

- 2) 急性肝炎血清から新たなHCV株の単離。
- 3) HCV-JFH1感染によ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。
- 4) 遺伝子型1bの構造領域をもつキメラウイルスの作製。
- 5) より感受性の高い培養細胞の開発。中空糸ホローファイバーによるHuS-E/2細胞の立体培養系の確立、患者由来HCV感染培養。
- 6) B細胞トロピズムを持つHCVの探索と解析。（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株を用いたHCV増殖系の構築：劇症肝炎患者から分離したJFH2株を用いてウイルス粒子産生の検討を行った。JFH2 RNAを導入した細胞はウイルスを産生しなかったが、JFH2レプリコンの複製を向上させるNS5A変異をJFH2に導入すると、感染性ウイルスを産生した。この変異は、ISDRに含まれており、HCVの複製、IFN感受性との関連が示唆される。また、本ウイルスはJFH1以外のウイルス産生可能なウイルスであ

る。

HVR1 内に FLAG タグを挿入した J6/JFH1 ウイルスを作製し、ウイルス産生が向上した適応変異体を分離した。その結果、E2 タンパク質内の 6 番目の糖鎖結合部位のアスパラギン (N6) のコドンに変異が入り、リジンに置換され、糖鎖修飾が起こらなくなり高産生性を獲得した適応変異体を見出した。

2) 急性肝炎血清からの新たな HCV 株の単離

重症急性肝炎から分離した遺伝子型 1b の HCV 株を用いてレプリコンを作製してウイルス複製、適応変異を検出した。この HCV 株の全長遺伝子構築を作製してウイルス複製およびウイルス粒子産生が可能となった。

遺伝子型 2b 急性肝炎血清から新規ウイルスゲノムを構築し、JFH-1 株の非構造領域と遺伝子型 2b ウイルスの構造領域を用いたキメラウイルスによる感染培養系により遺伝子型 2b 株の性質を検討した。新規ウイルス遺伝子配列は HCV-J4 株や J8 株に較べ約 20-40 箇所のアミノ酸変異が存在することを確認した。新規遺伝子型 2b 全長ウイルスの細胞内増殖は検出されなかったがキメラマウスでの持続感染が確認された。HCV-2b/JFH1 キメラウイルスは JFH1 に較べインターフェロン感受性が高く、細胞内のインターフェロン誘導遺伝子発現レベルが高く、SOCS 発現は有意に低値であった。

3) HCV-JFH1 感染によ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 細胞に感染後には細胞傷害性プラークが形成される。このプラークより感染細胞を回収し上清を再感染させたところ、再感染細胞で高レベルのウイルス増殖と著明な細胞死が観察された。このクローン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 個の変異によるウイルス増殖粒子形成能を解析したところ、このうち 3 箇所の変異がウイルスの増殖・粒子系性能に直接関連していることが示された。

4) 遺伝子型 1b の構造タンパク質を発現するキメラウイルス：

我が国で患者数の多い遺伝子型 1b の感染性 HCV を作製するために、遺伝子型 1b の TH 株と JFH-1 株のキメラである TH/JFH1 ウイルスを作製した。継代培養を重ねて、ウイルス産生量が向上した適応変異体を単離し、変異体のゲノムを解析した結果、E1 および NS5A、NS5B にそれぞれ、P328A/T、R2326G および Q2875R の変異を見出した。その中で P328A は細胞外の分泌を促進する変

異であることが示唆された。

5) より感受性の高い培養細胞の開発。中空糸ローファイバーによる HuS-E/2 細胞の立体培養系の確立、患者由来 HCV 感染培養

Huh7 細胞以外の HCV 粒子産生細胞として、HepG2 細胞、IMY-N9 細胞を見出している。Huh7 細胞と IMY-N9 細胞で産生する HCV の性状の異同について検討した。それぞれの細胞で作製したウイルス粒子のショ糖密度勾配解析を行い各分画のコアタンパク質、感染性を評価した。その結果、IMY-N9 細胞で作製したウイルスサンプルには、Huh7 細胞由来のウイルスサンプルにはない感染性は示さないがコアタンパク質と HCV RNA が一致する比重の小さいピークが見られた。Huh7 細胞の場合とは異なる性質のウイルスが産生された。

HuS-E/2 細胞を立体培養すると、患者由来 HCV の感染増殖は通常の 2 次元培養した細胞に比較して、感染後 5 日のピーク時で数十倍程度上昇した。この培養系では患者由来 HCV の生活環が再現されていると考えられた。この系は種々の患者由来 HCV の感染増殖を再現することが可能であるため、今後様々な血清から感染増殖効率が著しく高い HCV 株の検出や感染増殖が可能なウイルスライブラリーの作成に非常に重要な役割を果たすことが期待できる。さらに、IRF7 の活性を抑制することが可能なドミナントネガティブ IRF7 を恒常的に発現するように改変した HuS-E/2 細胞を作成し、これを中空糸立体培養すると患者由来 HCV 感染増殖の効率が上昇したことから、HC 増殖効率を向上させることが可能である。

6) B 細胞トロピズムを持つ HCV の探索と解析

HCV 感染者 75 例から分離された B 細胞中 HCV RNA 陽性率は 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。また全体の約 5% にマイナス鎖 HCV RNA を検出し、B 細胞トロピズムを持つ HCV の存在が示唆された。瀉血療法を行った患者の血液 100-400 ml から PBMC を分離し、その後、B 細胞を回収した。B 細胞中 HCV RNA 量を検討すると 4.0 log copies/10⁵ cells だった。B 細胞特異的 HCV が検出されたが塩基配列に特異性はなかった。

D. 考察

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た。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したことで HCV 研究はさらに進行することが期待できる。

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 の長期にわたる感染増殖の検討したところ、この培養細胞系は HCV の感染増殖の動態を長期にわたり観察、解析することが可能であるため、今後様々な血清から感染増殖効率が著しく高い HCV 株の検出や感染増殖が可能なウイルスライブラリーの開発にも応用できる可能性が考えられた。

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。B 細胞への HCV 感染・吸着が惹起する免疫異常として、IFN 抵抗性と EBV 再活性化について検討した。IFN 抵抗性については既知の IFN 治療効果に対するパラメーター、LPD 関連マーカーなどと多変量解析し、IFN 療法の NVR と B 細胞中 HCV RNA 量が関連することが示された。B 細胞中の HCV が宿主細胞の自然免疫力を示すのか、ウイルス側の IFN 抵抗性を反映しているのかが今後の課題である。

精製 HCV 粒子はエンベロープタンパク質より高いワクチン効果を持つことが示唆されたが、今後は *in vivo* でのワクチン効果を示していく必要がある。作製された HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量は比較的 low、抗原としてはさらにエンベロープ量を増加させた粒子を用いることでワクチン効果を増強させることができるかもしれない。エンベロープタンパク質をトランスで発現させた細胞で HCV 粒子を作製することでエンベロープ量の多い粒子を作製する方法を試みることが挙げられる。もうひとつは、ウイルスベクターと Huh7 以外の培養細胞を用いた HCV 様粒子の作製を試みることも手段として考えられる。後者であれば、上記問題点を克服できる可能性がある。

HCV を含むフラビウイルス属のウイルスゲノム増殖・蛋白合成の場合は小胞体 (ER) であり、日本脳炎ウイルス (JEV) や Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 及び DEN ウイルスではウイルスの誘導する ER ストレスによりアポトーシスを生じることが報告されている。今回我々は HCV-JFH1 培養細胞系を用い、HCV 感染増殖も同様に宿主細胞に対し細胞障害効果を示し、ER ストレス誘導性アポトーシスがその機構の一部であることを明らかにした。

急性肝炎患者より単離した genotype 2b ウイルス株が *in-vivo* で感染増殖能を有することを示した。ウイルス構造遺伝子の差異によりインターフェロン感受性に違いが生じ、その機構が細胞内インターフェロン誘導遺伝子などを介したインターフェロン応答性にあることが明らかとなっ

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. 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。
3. B 細胞指向性 HCV 株を解析した。
4. HCV の培養系を応用して HCV 粒子の免疫原性を解析した。
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. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.
2. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):961-9.
3. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.
4. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.
5. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M and Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver disease and chronic viral hepatitis. *Hepatology Research* 38: 354-361. 2008
6. 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* 2007; Epub.

7. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis* 2008; 197(3):361-370.
8. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL and Chung RT: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication . . a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10):3756-3759.
9. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N and Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008;371:71-85.
10. Tasaka M, Sakamoto N (equal contribution), Itakura Y, Nakagawa M, Itusi Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007; 88:3323-3333.
11. Sakamoto N, Yoshimura M, Kimura T, Toyama K, Sekine-Osajima Y, Watanabe M, Muramatsu M: Suppression of hepatitis C virus replication by bone morphogenetic protein-7 and synergistic action with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:467-473.
12. Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Schreiber SL, Ikeda M, Kato N, Chung RT: A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of HCV replication, *Gastroenterology* 2007; 132:311-320.
13. 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(gamma)-Dependent Mechanism. *J Virol*. 2009 83(5):2389-2392.
14. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol*. 2009;510:305-27.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, et al.