

褥瘡洗浄液としての海洋深層水の有用性について 赤津裕康、伊苺弘之、小橋

Low activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) is a risk factor for onset of Alzheimer's disease. Hiroyasu Akatsu, Zenjiro Matsuyama, Noriyuki, Matsukawa, Akira Hori, Takayuki Yamamoto, and Makoto Michikawa, 7月11～16日～国際アルツハイマー学会 ウィーン

褥瘡洗浄液およびスキンケア(褥瘡予防)としての海洋深層水の有用性について 赤津裕康、溝口訓弘、小橋修、山本孝之、藤井 侃、常山幸一 9月4～5日 第11回日本ジヨクソウ学会 大阪

富山湾海洋深層水から調整した等張液による創傷治癒促進効果: in vitro study

常山幸一、赤津裕康、溝口訓弘、藤井 侃 9月4～5日 第11回日本ジヨクソウ学会 大阪 物忘れで発症、全経過26年のLewy variant アルツハイマー病の1例 赤津裕康、三室マヤ、吉田眞理、橋詰良夫 10月2日 神経病理学会東海北陸地方会 金沢

The copper trafficking would be trigger of neurodegeneration. Hiroyasu Akatsu, Znjiro Matsuyama, Akira Hori, Takayuki Yamamoto, Mari Yoshida, Yoshio Hashizume, Eric Yezdimer, Ikuo Tooyama. 12月11～14日 First International

修、山本孝之、藤井 侃、常山幸一 6月18～20日 日本老年学会 横浜
Conference On Metal Chelation in Biology & Medicine Bath UK

特許申請

1. 発明の名称:アルツハイマー病の予防及び治療薬並びにアルツハイマー病の予防及び治療薬のスクリーニング方法
発明者:道川 誠、西辻和親

出願者:財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願日:平成21年12月21日

出願番号:特願2009-289487

2. 発明の名称:アルカディンを用いたAlzheimer病血液診断法の開発

発明者:鈴木 利治、今野 禎子、羽田沙緒里、清藤 勉、赤津 裕康

申請:2009年11月19日

3. 発明の名称:インフルエンザへの感染防御能を有する栄養組成物

発明者:高見正雄、永渕真也、高杉諭、赤津裕康:

出願番号 2009-28056:

申請日 2009年12月10日

4. 発明の名称:海洋深層を原料とする外用剤:出願番号 2008-202451:公開番号 2010-037275:整理番号 JY3-899:

出願人 五洲薬品株式会社、公立大学人と歌山県立医科大学、国立大学法人富山大学、富山市、医療法人さわらび会

高分化型三次元細胞培養系を用いたヒト血漿蛋白及び ウイルス粒子の大量産生法の開発

所 属 国立感染症研究所

研究者 相崎 英樹

研究要旨：本研究の目的は、ヒト肝細胞を三次元培養装置(RFB)で培養することで効率良く安定的に血漿蛋白(アルブミン(HAS)、フィブリノーゲン)、ウイルス(HCV)を大量生産する技術を開発することと、そして、生産した血漿蛋白、ウイルスを精製する方法の確立にある。本年度は、まず研究に用いるヒト肝細胞について、血漿蛋白、ウイルスの産生効率の高い細胞株の樹立を目指し、オリジナルの細胞株に比べて約50倍のHSA量を培養上清中に分泌する細胞株、JFH1-RNAを一過性に導入した後のHCV感染細胞よりも遺伝子の変異率が約1桁少ないHCV粒子を安定的に産生する細胞株を樹立した。RFBに関しては、HSA等の血漿蛋白生産に寄与できることを確認するとともに、HSA量の増加のため、培養条件の最適化が必要であると考えられた。RFBを用いたFLC-4細胞培養上清中の蛋白質をLC-MS/MS分析に進め、約30前後の蛋白が同定され、そのうち14種類の蛋白質が全ての培養上清において検出され、HAS精製のための基礎的な情報が収集できた。また、無血清培地馴化FLC7細胞株は10ml単層培養でも3~5 μ g/ml/3日濃度でフィブリノーゲンの産生が確認でき、肝由来微量生体活性物質の産生系としても有望であることが示唆された。

研究分担者

- | | |
|--------------------|------|
| (1) 東京慈恵会医科大学 | 大川清 |
| (2) 東京慈恵会医科大学 | 松浦知和 |
| (3) 東京慈恵会医科大学 | 高田耕司 |
| (4) 早稲田大学 | 加藤尚志 |
| (5) エーシーバイオテクノロジーズ | 石塚保行 |

A. 研究目的

本研究の第一の目的は、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤をヒト細胞で安定的に大量生産する技術を開発することである。非加熱血液凝固第VIII因子製剤によるHIV感染やフィブリノーゲン製剤によるHCV感染の経験から、ウイルス混入のない安全な組み換え血漿蛋白製剤の開発が望まれている。代表的な血漿蛋白であるヒトアルブミン(HSA)はヒト全血漿蛋白の約50-60%を占め、膠質浸透圧の維持や脂質・ホルモン・薬剤の輸送に深く関わっている。HSA製剤は、種々の病態における循環血漿量の確保と浮腫の治療に用いられているが、日本における消

費量が世界の25%に達するにもかかわらず、献血による国内自給率は34%に過ぎない(2001年)。1980年代より、遺伝子組み換えヒトアルブミン(rHSA)の開発が試みられてきたが、一回の投与に必要なHSA量がグラム単位と大量であることから、コスト面、採算面に問題があり実現していない。一方、組み換え酵母でrHSAを量産する技術が開発され実用化される見通しがたっているものの、酵母蛋白の夾雑による副作用(アレルギー反応)が治験段階で発生したことから酵母アレルギーの患者への投与は禁忌である。遺伝子発現ベクターの最適化、高密度三次元培養系を利用することにより、HAS、フィブリノーゲンの効率の良い産生法の確立を目指す。

本研究の第二の目的はヒト肝細胞の三次元培養系を用いた肝炎ウイルス粒子の大量生産法の確立である。肝炎ウイルスの中ではC型肝炎ウイルス(HCV)に対するワクチンが確立されていない。HCV感染は高率に持続化し、肝硬変、肝臓癌に至る重篤な感染症である。医療従事者

などハイリスクグループに予防的なワクチンが必要とされており、また治療用ワクチンとしても期待されている。高い抗原性が期待できるウイルス本来の粒子構造を保った抗原の産生を目指す。

B. 研究方法

本研究の特徴は、ヒト肝細胞を三次元培養装置で培養することで効率良く安定的に血漿蛋白、ウイルスを大量生産する技術を開発し、生産した血漿蛋白、ウイルスを精製する方法の確立にある。本年度は、まず研究に用いるヒト細胞について、血漿蛋白、ウイルスの産生効率の高い細胞株の樹立を目指した。三次元培養装置に関しては、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)の培養法の改良だけでなく、新たな三次元培養装置の開発を行った。血漿蛋白の精製法に関しては、基礎的な検討を行った。

1. 血漿蛋白、ウイルスの産生効率の高い細胞株の樹立

(1) HAS を恒常的に発現する細胞株の樹立
CAG プロモーターの下流に HSA 遺伝子を挿入し、さらに薬剤耐性遺伝子を持つ発現ベクターを作製する。FLC-4 細胞へ導入し、培養上清中の HSA 量を測定する。十分な産生レベルが確認できれば、薬剤耐性細胞の単離、高産生細胞クローンの選択を行う。

(2) HCV 粒子産生細胞の樹立

HCV 粒子の DNA 導入による産生系を樹立するため、HCV JFH-1 株等の全長 cDNA を RNA ポリメラーゼ I のプロモーター/ターミネーター支配下で発現させ、ウイルス粒子の形成、細胞外への放出を確認する。さらに、薬剤耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、HCV を持続産生する Huh-7 細胞株を樹立する。

2. RFB での細胞産生蛋白 HSA 生産法の開発

RFB は多孔質ハイドロキシアパタイトビーズ (HOYA-PENTAX) を充填し、培養細胞は HSA 恒常的発現細胞のオリジナルである、高い肝機能を保持するヒト肝細胞癌株 FLC-4 を用いた。培養液は、ASF-104N (味の素), E-RDF (極東), Is-RPMI (自己調整) の 3 種類の無血清培養液

を用いた。RFB 内の細胞増殖の経過および viability は、¹³C-glucose 呼吸試験での ¹³CO₂ 排出量の推移で観察した。培養液中の FLC-4 の内因性 HSA は、ELISA 法で測定した。対照として、FLC-4 細胞を各種培養液で単層培養した。

3. 新規三次元培養装置の開発

RFB に詰める担体としてこれまで空隙率 50% 以上のガラス担体がいわれてきたが、最近ガラス担体の供給が不安定的になっている。そこで、より効率的な三次元培養装置の開発を目指し、不織布を担体とした細胞培養を試みた。担体の不織布に各種細胞外マトリックス等を塗布して、細胞の増殖性、密度、接着性について、生細胞数測定試薬 SF (WST-8)、顕微鏡下での形態観察、アルブミン産生量を指標に検討した。

4. 細胞産生蛋白の性状解析

ヒト肝癌由来 FLC-4 細胞を RFB (リアクター内培地量 15 ml, リザーバー培地量 100 ml, 流速 0.7 L/時間, 閉鎖系) で 5 時間培養した培養上清を調製した。また、細胞培養しない培地を対照培地とした。RFB より回収した培養上清を限外濾過フィルター (分画分子量 10 KDa) により約 10 μL にまで濃縮し、解析に用いた。試料をトリプシン消化し、減圧濃縮後、ギ酸含有 2% アセトニトリル溶液に溶解し、試料溶液とした。試料を液体クロマトグラフ質量分析装置 LC/MS (NanoFrontier eLD, 日立ハイテクノロジーズ) にインジェクションし、ギ酸含有アセトニトリル勾配で展開した。カラムには、スプレー一体型カラム NTCC-360/75-3-103 (日京テクノス) あるいは Monocap for Fast-flow (GLサイエンス) を用いた。得られた質量測定値は、質量分析蛋白質同定システム MASCOT MS/MS Ions Search (Matrix Science Ltd.) で検索し、個々の蛋白質を同定した。

5. 細胞産生フィブリノーゲンの解析

無血清培地で馴化した肝細胞癌 FLC7 の培地中産生蛋白質は培地アガロース免疫電気泳動で定性的に解析した。培地中のヒトフィブリノーゲンの定量は限外濾過による濃縮培地を用いた一次免疫拡散法 (Mancini 法) により定量した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は各大学、研究所のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1. 血漿蛋白、ウイルスの産生効率の高い細胞株の樹立

(1) HAS を恒常的に発現する細胞株の樹立

薬剤耐性遺伝子を含む発現ベクターに CAG プロモーターを載せ、その下流に HSA 遺伝子を挿入し、HSA を恒常的に高発現する細胞株の樹立を行い、オリジナルの FLC4 細胞に比べ約 50 倍の HSA 量を培養上清中に分泌する細胞株を選択できた。

(2) HCV 粒子産生細胞の樹立

薬剤耐性遺伝子を含む発現ベクターに、RNA ポリメラーゼ I のプロモーター/ターミネーター支配下で HCV 全長の遺伝子を発現させた Pol I システムを用いた感染性 HCV 粒子持続産生細胞株を樹立した。この細胞株は、Huh7 細胞に HCV を感染させた場合と同等のウイルス粒子産生能を示すだけでなく、Huh7 細胞に HCV を感染させた場合には感染後 HCV 増殖に伴う細胞障害で長期の培養が不可能だが、Pol I システムでは長期安定的にウイルス産生が認められた。また、この細胞株から分泌された HCV のゲノム変異率を解析してみると、JFH1-RNA を一過性に導入した後の維持細胞よりも変異率が約 1 桁少なかった。

2. RFB での細胞産生蛋白 HSA 生産法の開発

電子顕微鏡での形態観察で、FLC-4 細胞は、アパタイト表面を覆うように立体的に、また極性をもって培養された。FLC-4 細胞の培養には 15ml 容量の RFB を用いた。培養液は、ASF-104N (味の素), E-RDF (極東), Is-RPMI (自己調整) の 3 種類の無血清培養液を用い、還流速度は 10ml/min, 20ml/min, 40ml/min で比較した。5ml 容量の RFB では、E-RDF 培養液で還流速度が 20ml/min の条件で、HAS 産生量は 11.9

mg/15ml RFB/24hr と最高値を示した。

3. 新規三次元培養装置の開発

不織布担体に、高濃度の細胞けん濁液を滴下するように播種した。翌日、培地を 1ml/well で添加して培養した。3 日後に不織布担体を新しい 24 well plate に移動し、培地を 2ml/well で添加し、培養した。1 週間後には、顕微鏡下で細胞塊が認識でき、滴下したところを中心に細胞が増殖した。生細胞数測定試薬 SF の測定は、細胞数に比例した吸光度は、2 週間後でハイドロキシアパタイト塗布担体の吸光度が最も大きくなった。

4. 細胞産生蛋白の性状解析

FLC-4 細胞培養上清中の蛋白質を LC-MS/MS 分析に進め解析、同定した。同定された蛋白質数は試料によっても異なるが、約 30 前後であり、そのうち 14 種類の蛋白質が全ての培養上清において検出された。

5. 細胞産生フィブリノーゲンの解析

無血清培地で馴化した肝細胞癌 FLC7 は週 2 回の培地交換 (10ml) で親株の FLC7 と同様に無血清培地 ISRPMI chemically defined medium 中で良好に増殖をした。得られた培養液を 100 倍に濃縮しその 10 μ l をヒト血清 1 μ l を対照サンプルとして免疫電気泳動すると、アルブミンをはじめ α 、 β 、 γ 位易動の多種の血漿蛋白質が産生され培地中に放出されていることが判明した。同時に FLC7-CS 細胞のヒトフィブリノーゲンの産生が γ 位易動蛋白として免疫電気泳動により同定確認された。0.5% 抗ヒトフィブリノーゲン抗体含有アガロースによる Mancini 法より CM 中に 3~5 μ g/ml のフィブリノーゲンの産生が確認された。

D. 考察

本研究グループでは、ヒト肝細胞を三次元培養装置で培養することで効率良く安定的に血漿蛋白 (HAS、フィブリノーゲン)、ウイルスを大量生産する技術を開発し、そして、生産した血漿蛋白、ウイルスを精製する方法の確立を、分担研究者間でサンプル、情報を共有しながら

総合的に推進している。

1. 血漿蛋白、ウイルスの産生効率の高い細胞株の樹立

(1) HAS を恒常的に発現する細胞株の樹立

FLC4 細胞は HAS 高産生細胞として知られている。本研究でゼオシン耐性遺伝子とともに HSA 遺伝子発現プラスミドを導入することで、更に約 50 倍の HSA 量を培養上清中に分泌する細胞株を樹立することができた。本手法はフィブリノーゲン遺伝子等にも応用可能であり、安全で安価な組み換え血漿蛋白製剤をヒト細胞で安定的に大量生産する技術開発の基礎になるものと期待できる。

(2) HCV 粒子産生細胞の樹立

Po1 I システムを用いた感染性 HCV 粒子持続産生細胞株は変異しやすい RNA ウイルスである HCV の問題点を克服でき、長期に安定的に変異のない HCV 粒子を培養上清中に得ることができた。この細胞株をラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) 等の高密度大量細胞培養装置で三次元培養することにより、大量のウイルス粒子の産生ができるものと期待できる。

2. RFB での細胞産生蛋白 HSA 生産法の開発

FLC-4 細胞の HSA 放出・生産量は、現時点において、目標値 (1 g/L/day) の約 1/20 であり、飛躍的な産生能の向上が求められる。過去 40 年の論文から、肝細胞培養系を用いたアルブミン産生の研究を検索したところ、この要求に効果的と思われる各種薬剤や培養基材の情報が得られた。その中には、“100 mg/day/10⁹ 細胞”レベルの生産に成功している例もあり注目される。実際、FLC-4 細胞の単層培養系において、これらの薬剤の作用を検証したところ、合成副腎皮質ホルモン剤デキサメタゾンに明確な効果が認められた。特に添加後、19 時間とそれに続く 22 時間を比較すると、後者において 2 倍近く放出量が増加しており、より長時間の刺激で産生が高まるものと期待される。また、ASF104N から E-RDF への基礎培地の変更やデキサメタゾンとノルアドレナリンの併用添加も

効果的であるため、これらを組み合わせて最適な条件を見出すことが重要である。この他に有望と思われる、培地中アミノ酸比の改善、細胞外マトリックス基材、酸素キャリアの導入などに関しては、次年度の検討課題としたい。現在、本プロジェクトでは、FLC-4 細胞に導入した組換え遺伝子による HSA 生産系の構築も進行中である。アルブミンの安定性や放出に関与する細胞内システムは、細胞内で強制発現させたアルブミン分子に対しても同様に作用する可能性が高いので、内在性アルブミンの効率的生産に資する技術基盤は、組換え HSA 生産系の開発においても重要と考えている。

3. 新規三次元培養装置の開発

不織布担体をバイオリアクターで利用する際は、高速で培地が移動することを考えると接着力の強さ、更に流速の安定と均一性を考えると細胞密度の均一性も重要である。この点からハイドロキシアパタイトの担体が最適と考えられた。

4. 細胞産生蛋白の性状解析

第 1 年度となる今年度では、分析条件の検討範囲を見極めるために、定性的分析に限ってまず進めた。我々の実験系では諸条件を整えば相対的比較定量的解析、つまり培養条件の違いによって変動する分泌蛋白質の特定や、標準化を行うことによって、絶対定量的解析に進めることが可能となる。このために今後の LC-MS/MS 分析では、

- (1) 試料調製法、酵素処理条件の最適化、
 - (2) LC-MS/MS 法の分離条件の最適化、
 - (3) 分析の再現性の検証法の確立、
 - (4) LC-MS/MS 出力データ解析手順の確立
- の 4 点について注力していく方針を固めた。

5. 細胞産生フィブリノーゲンの解析

無血清培地馴化 FLC7 はヒト血清蛋白産生系として適していることが判明した。産生目的のフィブリノーゲンは 10ml 単層培養でも 3~5 μg/ml/3 日濃度での産生があった。今回本系は単層培地での成績であるが、多種の肝細胞由来蛋白質が培地中に存在することが判明し、こ

の結果は肝由来血漿蛋白のみならず肝由来微量生体活性物質の産生系としても有望であることが示唆された。

フィブリノーゲンはA α 、B β 、 γ の3つのポリペプチド鎖のジスルフィド結合サブユニット(A α -B β - γ)が2個ジスルフィド結合した(A α -B β - γ)₂分子でありB β 、 γ に各2本(計4本)のN型糖鎖を有していることが知られている。N型糖鎖の腫瘍性格に由来するmicroheterogeneityの存在の有無はヒトへの投与を最終目的とする本研究においては物質性格の根幹をなす大切な検証部分であり、次年度以降、
(1)単層培養に比較し三次元培養での血漿蛋白質産生の優位性を立証する、
(2)フィブリノーゲンのCMより精製法の確立と糖鎖の解析、
を中心にすすめる。

E. 結論

本年度、以下の研究成果を得た。

(1) HASを恒常的に発現する細胞株を樹立したところ、オリジナルの細胞株に比べて約50倍のHSA量を培養上清中に分泌していた。

(2) JFH1-RNAを一過性に導入した後のHCV感染細胞よりも遺伝子の変異率が約1桁少ないHCV粒子を安定的に産生する細胞株を樹立した。

(3) RFBを利用した3次元高密度還流培養システムは、HSA等の血漿蛋白生産に寄与できることを確認した。今後、HSA量の増加のため、培養条件の最適化が必要であると考えられた。

(4) 不織布担体を用いた単層培養の結果では、細胞数、細胞密度、その均一性や経済性から平面培養容器で使用していたハイドロキシアパタイトの担体サンプルが適していた。

(5) FLC-4細胞培養上清中の蛋白質をLC-MS/MS分析に進め、約30前後の蛋白が同定され、そのうち14種類の蛋白質が全ての培養上清において検出された。

(6) 無血清培地馴化FLC7細胞株はヒト血清蛋白産生系として適していることが判明した。産生目的のフィブリノーゲンは10ml単層培養

でも3~5 μ g/ml/3日濃度での産生があり、肝由来微量生体活性物質の産生系としても有望であることが示唆された。

F. 研究発表(研究代表者分)

1. 論文発表

1) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. J Virol in press.

2) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res. 2010;85:520-4.

3) Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. J Clin Microbiol. 2009;47:4141-3.

4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. Hepatology 2009;50:378-86.

5) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J Virol. 2009;83:5137-47.

6) Liu HM, Aizaki H, Choi KS, Machida K, Ou JJ, Lai MM. SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a

host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009;386:249-56.

2. 学会発表

1) Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.

2) Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.

3) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T. HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.

4) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.

5) 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野先生、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.

6) 渡辺則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト肝星細胞株の樹立、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.

7) 相崎英樹、脇田隆宇、感染性 HCV 粒子形成における宿主生体膜の役割、第 4 5 回日本肝臓学会総会、シンポジウム、神戸、2009.

8) 相崎英樹、生体膜脂質の C 型肝炎ウイルス生活環における役割、第 31 回日本膜学会、シンポジウム、東京、2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療を目標としたヘルパーT細胞の分化に関わる因子の探索

所属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部
研究者 浅原 弘嗣

研究要旨

アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に重要な役割を果たしている Th17 の分化に重要な IL-17 の発現制御に関わる因子をポストゲノム的アプローチである、ハイスループット遺伝子導入アッセイにより網羅的に探索し、141 個の候補遺伝子を見出した。

研究分担者

- (1) 国立成育医療センター研究所
高田 修治、伊藤 義晃
- (2) 慶応義塾大学
吉村 昭彦
- (3) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
鈴木 忍、佐藤 弥生、尾崎 修子

A.研究目的

喘息、アレルギー鼻炎やアトピー性皮膚炎などに代表されるアレルギー疾患は、現在約 3 人に 1 人が罹患している、「国民病」といわれるほどの疾患である。この疾患は、花粉やハウスダスト等の外部の様々な抗原（アレルゲン）に対し、生体内で過剰に免疫反応が起こることが原因で発症する。免疫反応は外来の異物を排除するために働く、生体にとって不可欠な生体反応であるが、疾患の原因となるアレルゲンは、多くの場合、通常生活でさらされる量では無害なことが多く、患者にとっては生体内での不要な免疫応答で苦しむことになる。同じように過剰な免疫反応により引き起こされる疾患としては、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患があげられる。この疾患は自己を構成する内部の物質を間違えてアレルゲンとして認識されて引き起こされる。アレルギー疾患と自己免疫疾患は、アレルゲンが外部か内部かという点では異なるが、発症原因が過剰な免疫反応という点で同一である。これらの病気はいくつかの治療法が実施／試行されているが、完治させることが困難であり、長

期化し、改善どころか悪化する症例が少なくない。

ナイーブT細胞が抗原提示を受けて分化するヘルパーT細胞のサブセットで、IL-12 や IFN- γ などの刺激により分化誘導される Th1 細胞、IL-4 などにより分化誘導される Th2 細胞は獲得性免疫応答に重要な役割を担っている。Th1 細胞は主に IFN- γ を Th2 細胞は IL-4 を発現し、それらのサイトカインの作用を通して、相互に分化や機能を抑制し合っている。この両者のバランス (Th1/Th2 バランス) が免疫応答を制御する上で重要であり、バランスが崩れると、アレルギー疾患、自己免疫疾患の発症につながると考えられてきた。近年、IL-17 を発現する新たな T 細胞サブセットである Th17 細胞が同定され、アレルギー疾患、自己免疫疾患の発症や病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この発見により、Th1/Th2 バランスでは説明できなかった病態や現象に新たな展開を与えるとともに、これまで Th1/Th2 バランスでのみ説明されてきた免疫応答の分子メカニズムに大きな変更点が増えられることになった。

近年の遺伝子改変技術と疾患モデル動物技術による解析で、*IL-17* 欠損マウスは接触型過敏症や遅延型過敏症、気道過敏症などのアレルギー応答 (Nakae S *et al*, 2002, *Immunity*) や、コラーゲン誘導関節炎や実験的自己免疫性脳脊髄炎が強く抑制されることが示されている (Nakae S *et al*, 2003, *J Immunol*)。このことは、アレルギー疾患、自己免疫疾患の治療開発において IL-17 の発現制御、作用制御および Th17 の分化制御が有

用であることを示している。現在までに、IL-17の発現がIL-6とTGF- β の刺激により誘導される転写因子ROR γ tにより直接制御をうけること、また、ROR γ tの発現がTh17細胞への分化に必須であることが報告されている(Ivanov II *et al.*, 2006, *Cell*, Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*)。しかしながら、IL-17の発現制御メカニズム、Th17細胞の分化メカニズムはその多くが未解明であり、全貌解明には至っていない。IL-17の発現調節に関わる全遺伝子が解明されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用であると考えられる。

これらのことより、本研究ではアレルギー疾患、自己免疫疾患の新たな創薬ターゲット遺伝子を同定することを目的とし、IL-17の発現を制御する因子をゲノムワイドに探索する。

B.研究方法

IL-17の制御因子のスクリーニングのため、Mammalian Gene Collection (MGC)より入手した約6千種類のヒト遺伝子の全長cDNAが哺乳類細胞で発現するようなベクターに入っているプラスミドのライブラリ(MGCライブラリ)と、IL-17の発現制御領域(プロモーター)の下流にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。

1) ハイスループット遺伝子導入アッセイ、アッセイ・プレートの作製

MGCライブラリはそれぞれのプラスミドが大腸菌に導入された状態で、96ウェルプレート上で-80℃の超低温冷凍庫で凍結保存している。その一部を別の96ウェルプレート上の液体培地に移し、37℃で振盪培養して増殖させた後、遠心してペレット状にし、96ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップでプラスミドを精製した。それぞれのプラスミド濃度をプレート・リーダーで測定後、濃度調整装置により50ng/wellとなるように希釈し、自動分注機を用いて384ウェルプレートにライブラリを高密度に配置したアッセイ・プレートを作製した。作製したアッセイ・プレートは密閉後、-20℃で凍結保存し、室温で融解した後に使用した。

2) ハイスループット遺伝子導入アッセイ

アッセイ・プレートにレポーター・プラスミド、遺伝子導入試薬及び細胞を自動分注機で加える

ことで遺伝子導入(リバース・トランスフェクション)した。一定時間37℃のCO $_2$ インキュベーター内で培養した後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した(図1)。384ウェルプレート1枚では全てのプラスミドの遺伝子導入は物理的に不可能であり、多数の384ウェルプレートを使用することになった。このことにより、アッセイ条件が各プレートで若干異なることになり、プレート間でバックグラウンドの数値が変動する可能性が考えられた。そのため、それぞれの384ウェルプレートにMGCライブラリのプラスミドを配置させていないウェルを用意し、そのウェルをコントロールとすることにより、各プレートで数値を補正する作業を加えて、より確実に正確なデータ解析を行った。

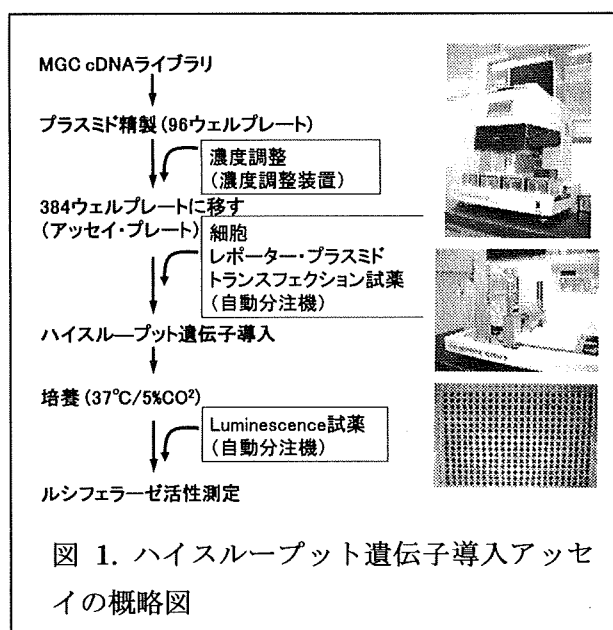


図 1. ハイスループット遺伝子導入アッセイの概略図

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、国立成育医療センターの規約に則り、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号、平成16年2月19日より施行)を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

本研究においては、ヒト由来細胞を使用しているが、患者サンプルなどの特定の個人の細胞ではなく、広く研究に使用されている株化細胞を使用しており、倫理的に問題はない。

今後も必要な場面では、国立成育医療センターにおいて機関の外部委員を含めた倫理審査委員

会による生命倫理、安全管理の厳重な審査を受け、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。また、マウス等の動物実験は国立成育医療センターの動物実験委員会の承認を得て遂行する。

C. 研究結果

MGC ライブラリより約 6 千種類の遺伝子の発現プラスミドを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-17 の発現制御に関わる因子をゲノムワイドに探索した。

このスクリーニングには研究分担者である慶応大学、吉村教授のグループによって作製された IL-17 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミド (pIL-17A: Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*) を使用することにした。まず、pIL-17A プラスミドとこのレポーター活性を増加させることが明らかとなっている ROR γ t の発現プラスミドを用いて、384 ウェルプレートで細胞数、プラスミド量、遺伝子導入試薬の濃度、培養時間などの条件検討を行った。細胞は遺伝子導入効率がよい 293FT 細胞を用いることにした。この細胞で条件検討を行ったところ、細胞数が 4,000、pIL-17A プラスミドが 12ng、遺伝子導入試薬である FuGENE®6 Transfection Reagent (Roche) は 0.1 μ l で遺伝子導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したとき、ROR γ t の発現プラスミドの有無で 3~4 倍のルシフェラーゼ活性の増加が見られ、数値も良好な結果が得られた (図 2)。

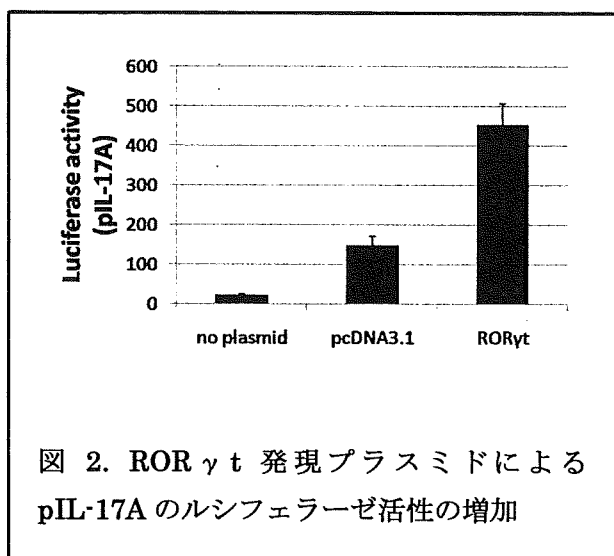


図 2. ROR γ t 発現プラスミドによる pIL-17A のルシフェラーゼ活性の増加

しかし、pIL-17A 単独でのルシフェラーゼ活性

は数値として 100 程度と低く、pIL-17A のルシフェラーゼ活性を抑制するような因子、すなわち IL-17 の発現抑制因子を見出すことが難しいと考えられた。そこで、pIL-17A と共に ROR γ t の発現プラスミドを加えた状態でハイスループット遺伝子導入アッセイを行うことでベースとなる数値を大きくし、このルシフェラーゼ活性を増減させるものを IL-17 の発現制御因子候補とすることを考えた。これまでに転写因子 Gfi-1 が ROR γ t による IL-17 の転写促進を抑制する因子として報告されていた (Ichiyama *et al.*, 2009, *Int Immunol.*)。そこで、ROR γ t 発現プラスミドと Gfi-1 発現プラスミドの有無で条件検討を行ったところ、Gfi-1 の発現により 50~90%程度のルシフェラーゼ活性の減少が検出できた (図 3)。

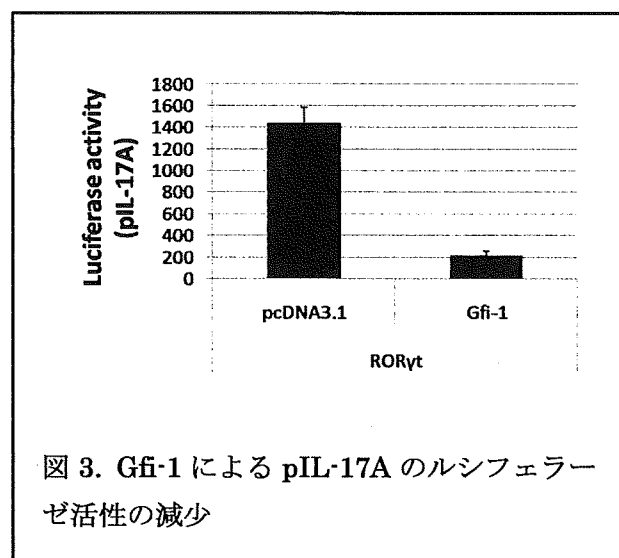
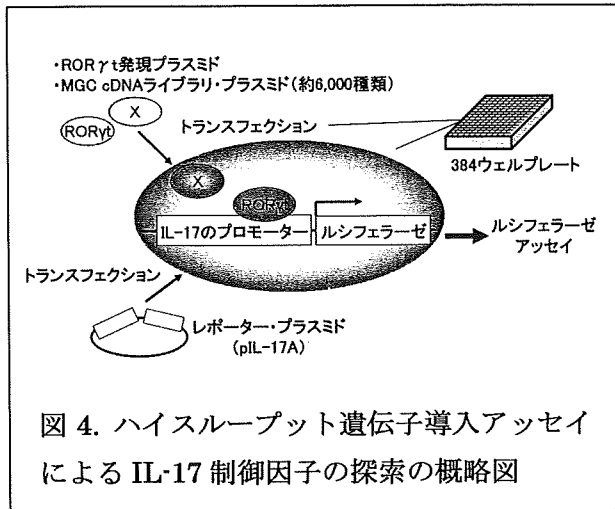


図 3. Gfi-1 による pIL-17A のルシフェラーゼ活性の減少

これらの条件検討より、本研究においては 4000 個の 293FT 細胞を用いて遺伝子導入試薬 FuGENE®6 Transfection Reagent は 0.1 μ l、プラスミドは(1)pIL-17A (12ng)、(2)ROR γ t (12ng)、(3)MGC ライブラリ (50ng) でリバース・トランスフェクションを行い、24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することにした (図 4)。

上記の条件で、2 度繰り返しハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、解析データとした。解析の結果、pIL-17A のルシフェラーゼ活性を 3 倍以上増加させた 53 個の因子を IL-17 制御因子候補 (候補因子群-1) とした。また、本スクリーニング・システムは制御因子を効率よく同定する解析法ではあるが、それぞれの因子を強制発現させているため、実際に Th17 細胞で発現して IL-17 の発現制御を行っているかどうかはわからない。

そこで、本スクリーニング・システムでルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上増加させた因子で、さらにマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルで、他のヘルパーT細胞サブセットである Th2 細胞に比べ Th17 細胞でシグナルが 2 倍以上であった 98 個の因子も制御因子候補（候補因子群-2）とすることにした。これらの異なる 2 つのパラメーターで合計 141 個の IL-17 の発現制御因子候補を見出した。また、それぞれの候補因子群で、5 因子が共通して含まれていた（図 5）。

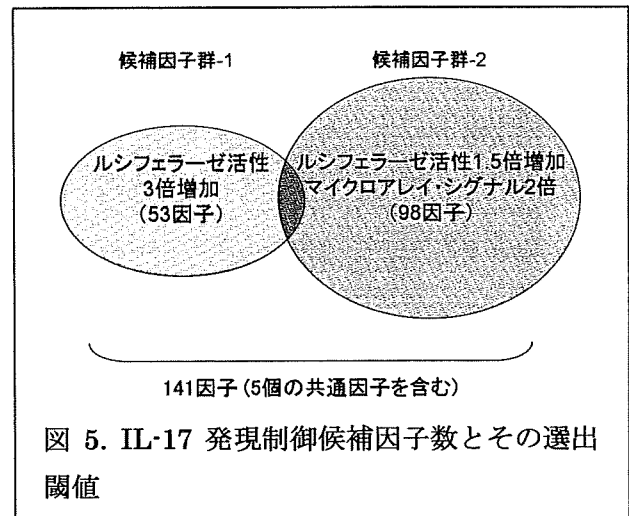


D. 考察

本研究では、IL-17 の発現制御因子の 1 次スクリーニングとしてハイスループット遺伝子導入スクリーニングとマイクロアレイによる Th2 細胞と Th17 細胞の遺伝子発現プロファイル比較という 2 つのデータを用いて、2 つの異なるパラメーターで解析して、それぞれで候補遺伝子群を見出した。これにより、合計 141 因子を IL-17 制御因子候補として見出し、そのうち、2 つのパラメーターで共通に抽出される 5 因子を見出した。この 5 因子は現時点で有力な IL-17 制御因子候補であり、注目して解析を進める。この 5 因子に限らず、141 の候補因子に対しては、再現性の確認を含め、更なる解析により IL-17 制御因子を同定する。また、IL-17 の発現を増加させる候補因子について解析を進めているが、発現を抑制する候補因子に関しても同様に解析を行い、同定を試みる。

本研究で行ったスクリーニングでは MGC ライブラリのプラスミドに加え、これまでの研究で IL-17 の発現制御に重要と考えられている転写因子 ROR γ t の発現プラスミドも同時に遺伝子導入を行ったため、候補因子の機能としては、ROR γ t

の活性の調整により IL-17 の発現制御に関わるか、それとは独立に IL-17 の発現制御に関わる可能性が考えられる。このような観点を含め、IL-17 の発現制御因子候補は更なる詳細な機能解析を行い、IL-17 の発現制御にどのように関わるか明らかにする。また、アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に候補因子が関わるか、またどのように関わるか調べる。これらの解析により新たなアレルギー疾患、自己免疫疾患の病態メカニズムを明らかにすることを試みる。解析の上で病態に密接に関係することが確認できた因子については創薬ターゲットとし、化合物スクリーニングや、疾患モデルマウスを使用した治療効果を検討することにより、新規治療法や診断法の開発を試みる。



本研究で使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングは、目的とする遺伝子の発現調節に関わる因子について、網羅的な情報を得るための効率的なシステムであり、これまでの手法では困難であった重要な疾患責任遺伝子などの発現を制御する全因子を効率的にかつスピーディーにスクリーニングすることが出来る。このシステムはレポーター・プラスミドを変更するのみで様々な遺伝子の発現制御因子の網羅的な情報が得られるため、今後の継続的かつ多分野での運営／活用は多くの疾患メカニズムの解明につながる事が期待できる。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA 遺伝子導入による機能的スクリーニングのシステムであるハイスループット遺伝子導入アッセイを用いて、IL-17 の発現制御

に関わる因子をスクリーニングした。自動分注装置などを使用したこのシステムにより、短時間で効率よく、網羅的な情報が得られるスクリーニングを行うことができた。このスクリーニングにより得られたデータと、Th2細胞とTh17細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの比較解析のデータを組み合わせて解析して、141個のIL-17発現制御因子候補を見出した。

近年の報告によりIL-17の発現はアレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に大きく関わるということが明らかになっていることから、これらの因子はIL-17の発現制御を介してアレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に関わる可能性が考えられる。これらの候補因子は、更なる解析を行うことでアレルギー疾患、自己免疫疾患の創薬ターゲットを特定し、新規治療法、診断法の開発を試みる。

F.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性及び生産性に関する研究

所 属 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部
研究者 大隈 邦夫

研究要旨:

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 は危機管理対策として国家備蓄されており、非特定の国民への緊急及び予防的使用が想定される。そこで、本研究では安全性、有効性の検証のために動物を用いた評価系、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築しデータを取得した。また、ワクチンの備蓄保存は長期になることが予想され、保存安定性データを取得するとともに、長期保存における安全性、有効性を確認するための動物試験又は物理化学的試験の評価系を構築しデータを取得した。加えて、遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のための基礎的データを取得した。

研究分担者:

- (1) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 倉根一郎
- (2) 国立感染症研究所 感染病理部 永田典代
- (3) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 森川茂
- (4) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 西條政幸
- (5) 自衛隊中央病院 健康管理センター 藤井達也
- (6) 慶應義塾大学 医学部 齋藤智也
- (7) 化学及血清療法研究所 医薬開発部 横手公幸

A. 研究目的

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 は、天然痘テロに対する危機管理対策として国内備蓄されており、緊急及び予防的に非特定の国民に使用されることが予想される。開発時の特性解析、動物を用いた安全性、有効性の基礎的研究により、過去天然痘流行時に実際に用いられたワクチンと比較し、有効性は同等で安全性は高いこと、また種痘研究班による小児を対象とした臨床研究においても安全性が優れたワクチンであることが明らかにされた。しかしながら、実際に広く使用された実績は少なく、また製造、研究も中断されたため、臨床データ及び基礎データも充分ではないと考えられる。そこで本研究では、非特定の国民へのワクチン接種を想定し、安全性及び有効性の評価系を構築しデータを蓄積すること、備蓄品が長期に保存される可能性があるため長期保存時の安定性の評価系を構築しデータを蓄積すること、遺伝子解析による温度感受性又は病原性などの弱毒化に関する特性データ取得、原材料、製造工程での品質又は生物学的製剤基準における品質試験を見直し又は開発すること、及び製造施設の共用化により施設の稼働率を高め生産性向上を達成することを

目的とした。

B. 研究方法

- a) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性、安定性に関する研究及びウイルス特性解析、試験法の精度向上に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究—

天然痘の原因ウイルスである痘そうウイルスがバイオテロリズム病原体として用いられる危険性が指摘されていることから、天然痘が根絶された今日においても、安全で効果的な痘そうワクチン開発とその評価が重要である。本研究では、約 8 年間保管されていた細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防効果および抗体誘導能をサル痘皮下接種感染モデルを用いて解析した。

- b) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究—サル痘ウイルス感染サルにおける重症例と回復例の病理学的比較—

サル痘ウイルスはポックスウイルス科オルソポックスウイルスに属し、天然痘の病態モデルとしても有用である。本研究では、サル痘の発症病理を明らかにする目的で、カニクイザルを用いたサル痘感染モデルを用いてコンゴ盆地型と西アフリカ型の 2 つのサル痘ウイルスの病原性を比較しそれぞれの病態について検討を行っている。そこで今年度は、サル痘ウイルス増殖部における感染病理について明らかにする目的で、西アフリカ型のサル痘ウイルスを接種したカニクイザルの病理組織標本を用いて組織学的検索を行った。

- c) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析)、品質試験法に関する研究—細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究—

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された株である。Lister 株では 41℃ 以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し、LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃ ではプラークを形成しない(増殖温度感受性)。増殖温度感受性に関与する遺伝子を明らかにするため、Lister 株 DNA 断片をクローニングした Bacmid による LC16mO 株の温度感受性相補試験を行った。更に、LC16mO 又は LC16m8 株と Lister 株由来クローンのウイルスゲノムの塩基配列の比較解析を行った。

- d) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究—鼻腔内サル痘ウイルス Zr-599 株感染霊長類モデルにおける LC16m8 暴露後接種のサル痘発症予防効果—

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 株暴露後接種のサル痘ウイルス感染症発症予防効果を評価するために、天然痘(痘そうウイルス感染症)の感染経路である気道感染経路でサル痘を霊長類において発症させる動物モデル(鼻腔内接種感染モデル)を用いて解析した。ワクチン非接種群(コントロール群:4 頭)、サル痘ウイルス感染(10⁷pfu)後 15 分後に LC16m8 接種を行った群(D0-ワクチン接種群:4 頭)、及びサル痘ウイルス感染後 24 時間後に LC16m8 接種を行った群(D1-ワクチン接種群:4 頭)の臨床症状、予後、ウイルス血症レベル、抗体応答を調べた。

- e) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

バイオテロ対策の観点から乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種(種痘)を実施された健康成人(初回接種者及び再接種者含む)を対象として、疫学的な有効性及び安全性評価成績(268 例分)を本ワクチンの市販後調査(使用実績調査)としてまとめた。なお、本市販後調査は、医薬品医療機器総合機構への届出を行い、その承認の下に実施した。

- f) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 接種によりヒトに誘導される抗体のプロファイルを明らかにし、過去に使用されたワクチンとの抗原の同一性や、そ

の免疫効果を明らかにすることを目的とした。また、網羅的解析により中和抗体の誘導において主要な抗原を示すことを目的とした。ワクチニアウイルス WR 株の抗原を用いたワクチニアプロテオミックチップを利用し、痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者及び過去に Lister 株により1回接種を受け、LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において惹起される抗ポックスウイルス抗体の抗原評価を網羅的に行った。

- g) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性、安定性に関する研究及びウイルス特性解析、試験法の精度向上に関する研究—長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討—

平成 18 年度から平成 20 年度まで継続した政策創薬総合研究で実施していた長期保管における痘そうワクチンの安定性評価を継続して行うと共に、有効成分以外の添加剤等の長期保管安定性や動物を用いた安全性の評価データを取得した。更に、生ウイルスの主要な検査項目についての検討、及び初代ウサギ腎細胞由来不純物に関する基礎的データを取得した。

- h) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、生産性に関する研究—動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究—

国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、非特定の国民へ痘そうワクチン LC16m8 を緊急的又は予防的に使用する状況を想定し、その安全性並びに有効性の検証のために、動物評価モデルを構築しデータ取得を行った。安全性評価については、特異抗体投与により人為的に作出した免疫不全サルモデルにおける検討を実施した。有効性評価については、マウスを用いたワクチン接種回数と免疫賦活効果に関する調査を実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え体の作製は、文部科学省の承認を得た上で行った。動物実験は、国立感染症研究所実験動物委員会及びバイオリスク管理委員会、又は化学及血清療法研究所の実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。臨床調査研究は、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

- a) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性、安定性に関する研究及びウイルス特性解析、

試験法の精度向上に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究-

製造されてから長期(約7年9ヵ月)保管されていた細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を霊長類に接種し、その後の抗体価の推移を解析した。また、サル痘ウイルス Zr-599 株(10⁶pfu)を皮下接種し、サル痘発症予防効果を、Lister 株接種個体と比較して評価した。LC16m8 接種個体におけるワクチニアウイルス全粒子抗原を用いた ELISA 法による抗体反応は、Lister 株接種個体のそれと比較して低いものの、長期間持続し、サル痘発症予防効果も十分であった。これまでの研究で、少なくとも7年9ヵ月間保管されていた LC16m8 のウイルス感染価は低下していないことが確認されていたが、本研究により、霊長類におけるサル痘発症予防効果を有することも確認された。

b) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究-サル痘ウイルス感染サルにおける重症例と回復例の病理学的比較-

サル痘感染カニクイザルを用いて、サル痘ウイルスの増殖部位における感染病理について組織学的に明らかにすることを目的とし、サル痘ウイルスを皮下接種後に発症したサルの組織材料を用いてウイルス抗原の局在について病理組織学的に検討した。その結果、重症例の瀕死期においてはリンパ節のマクロファージにウイルス粒子が存在すること、皮膚のサイトケラチン陽性細胞が主要なウイルス増殖部位であることが組織学的に明らかとなった。

c) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析)、品質試験法に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究-

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された株である。Lister 株では 41℃以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し、LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃ではプラークを形成しない。この増殖温度感受性に関与する遺伝子を明らかにするため、Lister 株 DNA 断片をクローニングした Bacmid による LC16mO 株の温度感受性相補試験を実施した結果、B5R 遺伝子以外にウイルス DNA の HindIII-A 断片にある複数の遺伝子に関与することが明らかとなった。さらに LC16mO/LC16m8 株と Lister 株由来クローンのウイルスゲノムの塩基配列の比較解析から、温度感受性に関与する可能性のある遺伝子として、HindIII-A 断片に含まれる A8R、A33R、A36R、A53R、A55R、A56R 遺伝子の 6 遺伝子が見出された。このうち、

LC16mO/LC16m8 株の A56R 遺伝子の 15 塩基欠失は、部分的に温度感受性に関与し、さらに A56R 遺伝子の部分欠失以外にも候補遺伝子に見られる変異のいずれかが関与することが明らかとなった。

d) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究-鼻腔内サル痘ウイルス Zr-599 株感染霊長類モデルにおける LC16m8 暴露後接種のサル痘発症予防効果-

天然痘の感染経路である気道感染経路でサル痘を霊長類において発症させる動物モデル(鼻腔内接種感染モデル)を用いて、LC16m8 株暴露後接種のサル痘ウイルス感染症発症予防効果を検討した。コントロール群、D0-ワクチン群、D1-ワクチン群では、それぞれ 1 頭、2 頭、1 頭が致死感染を呈した。臨床症状や血液からのウイルス分離検査、病理学的解析結果から、LC16m8 の暴露後ワクチン接種による霊長類におけるサル痘発症予防効果を確認することはできなかった。

e) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

バイオテロ対処の観点から健康成人に対して乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種(種痘)を実施した。うち、種痘の前後における詳細な臨床情報及び血清学的調査が可能であった 268 症例分の成績を市販後調査(使用実績調査)としてまとめた。胸部 X 線の異常や脳炎、副痘・種痘疹などの重篤な有害事象の報告はなく、血圧及び臨床検査においても接種前後で有意な変動は認めなかった。種痘後の局所所見では、水疱 32 例(64%)、潰瘍 5 例(10%)、痂皮 18 例(36%)、腫脹 4 例(8%)、発赤径は 30mm 未満が 90%であった。副反応の発現率は、初回接種群では 26.9%、再接種群では 5.7%と前者で有意に高かったが、逆に善感率は、初回接種群で 93.9%、再接種群で 82.9%と初回接種群で有意に高かった。副反応の種類としては、リンパ節腫脹(19.4%)、発熱(5.2%)、接種部紅斑(5.2%)の報告が比較的高頻度にみられ、その他倦怠感(0.7%)、発疹(0.4%)、接種部腫脹(0.4%)、自家接種(0.4%)などが報告された。中和抗体に関する調査では、初回接種群が再接種群と比較して抗体上昇がより顕著であった。善感反応と中和抗体陽転率には強い相関を認めた。

f) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究

痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者、及び過去に Lister 株により1回接種を受け、LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において、接種前

後血清の抗体プロファイルの網羅的解析を行った。中和・防御に関係する抗原群 (D8L、A27L、A17L、H3L、A33R) について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。

- g) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性、安定性に関する研究及びウイルス特性解析、試験法の精度向上に関する研究—長期保管に伴う検討及び品質向上に寄与する評価系の検討—

乾燥細胞培養痘そうワクチンの長期保管における安定性評価を行い、49 ヶ月目まで力価を保持していることを確認した。また、評価項目にマウス神経毒力試験を追加し、長期保管後の安全性の確認を行った。添加剤についても、81 ヶ月間冷蔵保管した検体で毒性発現等の変化は認められず、安定であることが確認された。また、細胞基材由来不純物である宿主由来蛋白及び核酸量の分析を行い、製造ロット間に大きな変動がないことを確認した。

- h) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、生産性に関する研究—動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究—

バイオテロ対抗医薬品として国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、人為的に作出した免疫不全サルモデルで評価した結果、副反応の出現が無く、安全に使用可能なワクチンであることが確認された。

痘そうワクチンの接種回数と免疫賦活効果の関連性を調査した結果、中和抗体産生を指標とすると最も効果的な接種回数は 2 回であった。また、痘そうワクチンを 2 回接種する場合、Lister や NYCBH 株の痘そうワクチンに対して LC16m8 を事前接種すると、中和抗体の誘導に悪影響を与えることなく、Lister や NYCBH 株接種局所のサイズを減少できることが確認された。

D. 考察

本研究では、危機管理対策の一環としてわが国でテロ対抗医薬品として製造、国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 について、非特定の国民への緊急的又は予防的使用を想定し、その安全性並びに有効性の検証のために、国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、動物モデル又は臨床での使用実績調査においてデータ取得を行った。また、備蓄品が長期に保存される可能性があるため長期保存時の安定

性の評価系を構築しデータを取得した。更に、遺伝子解析による温度感受性又は病原性などの弱毒性に関する特性データ取得、原材料、製造工程での品質試験又は生物学的製剤基準における品質試験を見直し、必要に応じて新規試験法を開発した。

まず、動物モデルを用いた安全性評価については、人為的に作出した免疫不全サルモデルで評価した結果、痘そうワクチン LC16m8 は、以前の米国備蓄痘そうワクチン Dryvax (2008 年以降は ACAM2000 が備蓄ワクチンとなる) と比較して、細胞性又は液性免疫不全状態下においても副反応を示さず、無処置の健康状態での使用と同様に、安全に使用可能なワクチンであることが確認された。

健康成人への使用実績においても、重篤な有害事象は発生しておらず、過去小児で行われた臨床研究の結果を良く再現する痘そうワクチン LC16m8 の高い安全性を示す成績が得られている。

有効性評価については、霊長類を用いた発症予防効果評価実験 (皮下接種感染モデル) が実施され、適切に長期 (約 8 年) にわたり保管されていた痘そうワクチン LC16m8 においても霊長類におけるサル痘発症予防効果は低下せず、抗体誘導能も維持されていることが示された。一方、天然痘の感染経路である気道感染経路でサル痘を霊長類において発症させる動物モデルにおいて、サル痘ウイルス暴露後に LC16m8 を接種しサル痘感染症発症抑制効果を検討したが、その効果は確認されなかった。より正確に暴露後ワクチン効果を評価するには、ヒトにおける天然痘感染病態を適切に反映させるために、霊長類におけるサル痘チャレンジウイルス量の最適化などの対策を講じる必要があると考える。そこで、我々は、サル痘発症モデルの最適化のための基礎データ取得の一つとして、サル痘の発症病理を明らかにするために病理組織学的研究を進めている。痘そうワクチンの接種回数についてはこれまで詳細な研究がほとんどなされていなかったが、マウスを用いた検討において、2 回接種することで最も効果的に中和抗体が誘導されることが示唆された。今後もより大型の動物を用いた詳細な検討が期待される。

次に、健康成人への使用実績においても、再製造した乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 では善感反応と中和抗体陽転率との間に強い相関を認められ、加えて、過去小児で行われた臨床研究結果を良く再現する高い抗体陽転率を示した。更に、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 による初回接種者、および過去に Lister 株により 1 回接種を受け、LC16m8 によるブースター接種を行った再接種者において、接種前後血清の抗体プロファイルの網羅的解析を行った。

中和・防御に関係する抗原群 (D8L、A27L、A17L、H3L、A33R) について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L、H3L の抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でも D8L が中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆されたほか、これまでに明らかにされていない抗原 (D13L、A10L、WR148) が中和と関係している可能性が示された。また、長期に残存している抗体の多くが IMV 膜蛋白抗体である可能性が示唆された。

LC16m8 株の特性解析については、ワクチニアウイルス *Lister* 株の Bacmid ライブラリーを用いた LC16mO 株の温度感受性相補試験法から、温度感受性に関連のある領域がウイルスゲノム DNA の *HindIII*-A 断片に複数存在することが明らかとなった。さらに、*Lister* 株、LC16mO、LC16m8 株及び他のワクチニアウイルス株のゲノム DNA の塩基配列の比較解析から、温度感受性候補遺伝子として、*A8R*、*A33R*、*A36R*、*A53R*、*A55R*、*A56R* 遺伝子の 6 遺伝子が見出された。このうち、組換えウイルスを用いた解析によって LC16mO 株の *A56R* 遺伝子の変異 (15 塩基欠失) が部分的に温度感受性に関与していることが明らかとなった。更に、*A56R* 遺伝子の部分欠失以外にも候補遺伝子に見られる変異のいずれかが関与することが強く示唆された。

製造・品質管理関連における研究では、生物学的製剤基準に示されている現行のマーカー試験である増殖温度感受性試験や力価測定試験法について、最近の科学水準での再解析・評価が実施され、代替試験法の提案がなされた。特に、細胞培養痘そうワクチンの力価試験法等の代替試験法検討では、本研究で得られた成績をもとに、生物学的製剤基準の力価試験、安定性試験、表示確認試験について、ポック法に加えてプラーク法が平成 21 年 3 月 31 日付で追加された。更に、マーカー試験のポックサイズを測定する試験法でも、発育鶏卵を使用するため、マーカー試験の代替法も早期に結論を出して生物学的製剤基準の改正に関する提案をする必要がある。また、工程評価及び評価ツール開発検討のために、細胞培養痘そうワクチンの培養基材である初代ウサギ腎細胞由来の蛋白質量並びに核酸量の測定法を構築した。宿主由来不純物の分析を行い、製造ロット間に大きな変動がないことを確認した。従って、通常の製造において初代ウサギ腎細胞由来の不純物をモニターする必要はないと考えられるが、製造工程の変更時などに工程の一貫性確認のために本評価ツールやデータを活用することが期待される。

製剤の保存安定性評価については、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、生物学的製剤基準に

規定されている -20°C 以下で保存した場合、規格試験に関しては 84 ヶ月までは安定であることが示された。また、添加剤については、 10°C 以下の冷蔵保存でも少なくとも 81 ヶ月間は毒性発現等の変化がないことが確認された。一方、備蓄品としてさらに長期にわたる保管を行う場合、ワクチンの品質を担保するためには、安全性を評価するための追加試験法の構築検討や力価試験法及びマーカー試験等の試験方法の更なる向上が望まれる。また、容器・施栓系の評価についても、さらに検討する必要がある。

最後に、有事の際における生産施設の有効活用に向け、薬事規制の観点から、協議を実施した。痘そうワクチン製造施設は薬局等構造設備規則の一部を改正する省令 (厚生労働省令第 180 号 平成 16 年 12 月 24 日改正) 第 8 条第 1 項第 1 号チ、並びに医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 (厚生労働省令第 179 号 平成 16 年 12 月 24 日改正) 第 27 条第 1 項第 10 号によって専用であることが規定されている。薬局等構造設備規則は昭和 36 年に施行された。当時使用されていたワクチンは、脳炎や進行性種痘疹等の重篤な副反応を起こす可能性がある池田株又は大連株の痘そうワクチン (乾燥痘苗) である。一方、現在の細胞培養痘そうワクチン株である LC16m8 株は弱毒株であり、これまでに取得された臨床研究成績により高い安全性が確認されている。また、現在のワクチン製造では、医薬品 GMP 管理並びに高度な空調システム等製造設備やバリデーションにより、ウイルスの確実な封じ込めが可能である。以上の科学的根拠及びデータをもとに、平成 20 年 5 月より厚生労働省 監視指導・麻薬対策課、医薬品医療機器総合機構及び化血研の 3 者で協議を行い、同年 12 月 24 日付で LC16m8 株に限定して製造施設の専用化の適用が解除された。この結果、痘そうワクチン生産施設は、天然痘テロや新型インフルエンザ等の発生等の有事の際に、生産施設を他の生産施設と共有することが可能となり、将来的に柔軟な対応が期待される。合わせて、LC16m8 株に限定して、バイオセーフティレベル (BSL) を BSL-2 から BSL-1 へ引き下げるための評価・検討がなされている。

E. 結論

(財)化血研で製造され生物テロ対抗薬として国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、近年、健康成人へ接種されているが、過去の小児での臨床研究成績と同様に、種痘後脳炎・脳症、皮膚合併症や心筋心膜炎などの重篤な有害事象は発生しておらず、高い安全性が再確認されている。更に、本研究で実施された人為的免疫不全サルモ

デルにおいても、健常状態と同様に、安全に使用可能であることが確認され、米国備蓄ワクチンと比較して、接種可能対象者の範囲が広い可能性が期待される。

有効性については、適切に長期にわたり保管されている痘そうワクチン LC16m8 では、霊長類におけるサル痘発症予防効果は低下せず、抗体誘導能も維持されていることが確認された。一方、サル痘気道感染モデルを用いて、サル痘暴露後ワクチン効果を検討したが、期待される結果は得られなかった。但し、この結果は暴露後ワクチン効果を完全に否定するものではなく、現在の評価モデルがワクチン効果を十分に反映・評価できているかを検証する必要があり、ヒトにおける天然痘感染症をより適切に再現可能なサル痘感染モデルの最適化検討が今後必要であると考えられる。また、健康成人への使用実績においても高い中和抗体獲得率を示し、抗体による抗原認識においても中和・防御に関係する抗原群について高い割合で陽転しており、痘そうワクチン LC16m8 の天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。

製造・品質管理関連における研究では、本研究で得られた成績をもとに、生物学的製剤基準の力価試験、安定性試験、表示確認試験について、ポック法に加えてプラーク法が平成 21 年 3 月 31 日付で追加された。

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は長期保存しても力価及び霊長類におけるサル痘発症予防効果は安定であることが示されたが、長期保管後のワクチン品質の担保に関しては、今後も品質確認に重要な試験法の精度向上や安全性及び有効性を担保するために必要な追加試験法の確立等の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80:1102-1108, 2009
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S.,

Mizitani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90:2266-2271, 2009

- 3) Saito T. Research on Preparedness for Bioterrorism-Associated Events in Japan: Smallpox Vaccine Preparedness (Review). *Journal of Disaster Research* 4(5):329-336, 2009

2. 学会発表

国内学会

- 1) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第 13 回日本ワクチン学会学術総会, 札幌 (2009.09)
- 2) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 株の温度感受性に関する解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 3) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 4) 永井千草, 新村靖彦, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 横手公幸, 志垣隆通, 千北一興, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯. 動物モデルを用いた細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の接種回数に関する検討. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会, 札幌 (2009.09)
- 5) 新村靖彦, 永井千草, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 横手公幸, 千北一興, 大隈邦夫, 宮本誠二, 橋爪壯. ワクチニアウイルス感染により誘導される生体防御機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)

国際学会

- 1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T.,

- Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
- 2) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Matsui, H., Chigita, K., Ohkuma, K., Miyamoto, S., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine will become an effective countermeasure against bio-terrorism with smallpox virus throughout the world. 38th Congress on Military Medicine. KUALA LUMPUR, Malaysia (2009.10)
- 3) Yokote, H., Shinmura, Y., Kanehara, T., Satou, A., Nagai, C., Matsui, H., Ohkuma, K., Chigita, K., Miyamoto, S., Funatsu, A., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: Pre vaccination of LC16m8 Alleviated the Skin Lesions Caused by Conventional Smallpox Vaccines without Any Interference with Vaccine-elicited Immune Responses. 2010 ASM Biodefense Research Meeting, Baltimore, USA (2010.02)
- 4) Kanehara, T., Shinmura, Y., Satou, A., Nagai, C., Matsui, H., Yokote, H., Ohkuma, K., Chigita, K., Miyamoto, S., Funatsu, A., Saito, T., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Hashizume, S.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine will be a useful countermeasure against bio-terrorism with smallpox. 2010 ASM Biodefense Research Meeting, Baltimore, USA (2010.02)

H. 知的財産の出願・登録状況
特に無し。

以上

臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ

所属 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 ①臍帯血より高純度の活性化CD4細胞を調製する培養法を確立した。②安全管理法として、ウイルス、細菌、真菌、およびマイコプラズマの迅速検出法を開発・導入した。③Th17細胞が少なく、制御性T細胞が多いため、GVHDリスクの低下が期待される点など臍帯血活性化T細胞の特長が示された。④臍帯血より制御性T細胞(Treg)を増幅培養する方法を確立し、TregによるGVHD治療の動物実験に成功した。⑤細胞治療製剤の規格化を行うために、標準作業手順書等の作成を進めた。⑥臍帯DLIの前臨床試験に使用するEBV感染モデルマウスの作成と解析を完了した。⑦厚生労働科学研究・加藤班との共同作業により、臍帯血DLI第I相臨床試験のプロトコールコンセプトを策定した。

研究分担者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水則夫
- (2) 東京医科歯科大学医学部 森尾友宏
- (3) 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 清河信敬
- (4) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (5) 株式会社リンフォテック 関根暉彬
- (6) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (7) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也
- (8) 東京大学医科学研究所 長村登紀子 (平成21年度のみ)
- (9) 国立成育医療センター腫瘍科 熊谷昌明 (平成19年度のみ)

A. 研究目的

臍帯血移植では、ドナーから得られる細胞数が少ないため通常のドナーリンパ球輸注療法(DLI)は不可能である。このため、移植後の感染症や悪性腫瘍再発に対して治療手段が限られており、新規治療法の実用化が急務である。我々は少量の臍帯血からT細胞を活性化増幅させたのちレシピエントに投与する

治療法(臍帯血DLI)を考案し(培養法の特許取得済み)、基礎研究および臨床パイロット研究を進めてきた。本研究は、臍帯血DLIの実用化をさらに進めるために、第I/II相臨床試験を実施しその安全性と効果を評価することを主目的とし、同時に培養加工細胞製剤を安全かつ一定の規格に均一化しGMPに基づいた製品に仕上げるための基盤整備を行なう。

B. 研究方法

1. T前駆細胞定量法
ストローマ細胞Tst-4/D111を作成し、臍帯血Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞と共培養した。
2. T細胞活性化培養法
臍帯血は東京臍帯血バンクより供給を受けた。5%ヒト血清(時に10%牛胎児血清)およびIL-2を添加したRPMI1640+7培地(日研生物医学研究所)とOKT-3抗体固相化フラスコを用いて培養した。
3. 活性化臍帯血T細胞の遺伝子発現解析
GeneChip(Affymetrix社)により網羅的遺伝子発現解析を行い、GeneSpring(Agilent社)を用いてデータを解析した。RT-PCR法および