

C型肝炎ウイルス感染防止が可能なヒト型感染中和抗体の開発

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 脇田 隆字

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のスクリーニングが可能となり新規感染は激減したが、医療関係者や感染者の家族などのハイリスクグループに対する有効なワクチンはない。HCVの基盤的研究が進み、HCVに対する感染中和抗体が存在することが明らかとなった。免疫グロブリンは受動免疫による感染予防の有効な手段である。本研究では感染中和活性の高い抗体によりヒト型の感染中和抗体を作成し、免疫グロブリンによるHCV感染防御を目指す。

分担研究者

- (1) 東レ株式会社医薬研究所
中村 紀子
- (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
- (5) 株式会社医学生物学研究所
久原基樹
- (6) 株式会社抗体研究所
篠原みどり

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染はほとんどの場合持続感染化し、慢性肝炎となり、10-30年後に肝硬変・肝臓癌に至る重大な感染症である。現在インターフェロン及びリバビリンによる治療が行われているが、その治療効果は不十分である。輸血用血液および血液製剤のスクリーニングが可能となって、HCVの新規感染者数は減少したが、医療従事者やウイルスキャリアの家族などハイリスクグループは潜在的な感染リスクがある。また、近年HIV感染者の予後が向上し、エイズ発症前の死亡原因は主として肝炎ウイルス感染による肝不全死であることから、HIVおよびHCVの二重感染が問題となっている。さらに、HCV感染による肝不全に対する肝移植は患者に経済的、肉体的に大きな負担となるが、常に再感染のリスクがある。しかし、肝移植時に感染中和抗体を投与することにより再感染のリスクの軽減が期待できる。

HCVにはウイルス培養系が存在しなかったため、感染中和抗体の解析が進んでこなかった。しかし、2005年に申請者の研究グループが世界に先駆けてHCVのウイルス培養系を樹立したことにより、HCVの基盤的研究が飛躍的に進んだ。HCVキャリアの血液中に中和抗体が存在すること、ウイルスのE2蛋白質に対するモノクローナル抗体の中に感染中和活性を持つものがあること。さらにヒト肝細胞キメラマウスに対するHCV感染を防御することが可能であることが明らかとなってきた。そこで、本研究ではHCVに対する中和活性の高い抗体を用いて、ヒト型の感染中和抗体を作成し、受動免疫によるHCV感染防御を目指す。

B. 研究方法

1. リコンビナントHCV E2タンパク質の解析

分泌型 E2 タンパク質発現プラスミドを 293GnTI(-)細胞および 293T 細胞に遺伝子導入し E2 タンパク質を作製した。精製後、分子量、精製度について銀染色で確認した。それぞれの精製 E2 タンパク質から糖鎖のみを精製し質量解析でその糖鎖を確認した。2 種類の E2 タンパク質について CD81 分子との結合能、E2 抗体との結合能を解析した。マウスに免疫投与し中和抗体の誘導についても検討を行った。

2. HCV 粒子免疫完全ヒト抗体産生マウスにおける血清中の抗体価の測定

Huh7 細胞に感染性 HCV (J6/JFH-1) 濃縮液を接種し継代培養し、培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μm フィルター濾過を行い、使用まで -80°C で保存した。感染性 HCV を含む培養上清はホローファイバーで 40 倍濃縮後、ダイアフィルトレーションにてバッファー置換した。次に、10-60% (w/v) ショ糖密度勾配遠心で精

製した。

各分画液から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により HCV-RNA を定量した。また、HCV コア定量キットにより HCV-core タンパク質を定量した。感染力価は、各分画液を DMEM-10%FCS で希釈して測定した。E1、E2 タンパク質をコードする遺伝子にシグナルペプチドをコードする配列を付加した。さらに、N 末端に FLAG ペプチドを付加させたベクター、あるいは C 末端にヒト IgG Fc ポリペプチドを付加したベクターを作製した。

HCV のエンベロープタンパク質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。

エンベロープタンパク質を EIA プレートに固相化し、ブロッキング後、各種モノクローナル抗体を加え、エンベロープタンパク質に結合するモノクローナル抗体を選定した。

3. 抗 HCV ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

完全ヒト抗体産生マウス (8wk) に、①Saline、②J6E2/Fc 100 μ g/head、③精製 HCV (HCV-core 8.4 pmol/head) を各 n=5 で投与した。精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。上記投与群に 2 週間置きに 6 回、MPL+TDM (Sigma Adjuvant System, Sigma) をアジュバントとして各抗原を腹腔内投与した。

最終免疫 3 日後に脾臓を摘出して作成したハイブリドーマの培養上清中の抗エンベロープタンパク質抗体価および感染阻害活性を測定した。

感染阻害実験は HCVpp を用いて行った。

4. 自然免疫系を不活性化し不活化肝細胞 HuS-E/2 細胞の作成。

IRF7 のドミナントネガティブ体を恒常的に発現する細胞あるいは shRNA 発現プラスミドを導入した細胞の作成をおこなった。RIG-I については shRNA 発現ベクターを導入した。

5. 患者血由来 HCV の感染を特異的にそして高感度で検出するレポーター系の構築。

患者血由来 HCV の感染増殖を検出するレポーターシステムの開発を試みた。HCV セリンプロテアーゼ活性を利用したレポーター系の構築をおこなった。

6. HCV の B 細胞感染と EBV 再活性化との関連

C 型慢性肝炎患者 (52 例)、B 型慢性肝炎患者 (17 例) その他の肝疾患患者 (19 例)、非肝疾患患者 (43 例) について末梢単核球中もしくは B 細胞中の EBV 再活性化マーカー (BZLF1、LMP1) の mRNA 発現、並びに持続感染マーカーである EBER 遺伝子の発現の有無を RT-PCR で解析した。更に患者 LPD 関連マーカー異常と B 細胞中 HCV との関連について解析した。

7. 各 B 細胞サブセットの細胞中 HCV RNA 定量

C 型慢性肝炎患者の全血 30ml や瀉血療法で採取され

た 100-200 ml から末梢単核球 (PBMC) を分離した。

(1) Naïve B 細胞を Negative selection し、(2) Naïve B 細胞分画と非 Naïve B 細胞分画に分け、それぞれから細胞中の HCV RNA 量を real time RT-PCR 法で定量した。また (3) Total B 細胞分画と (4) 非 B 細胞分画に分け、HCV RNA 量を定量した。更に B 細胞サブセット特異的表面マーカー抗体を固相化した Affinity Beads を用いた Positive selection で (A) Plasma 細胞、(B) 活性化 B 細胞、(C) メモリー B 細胞、(D) Naïve B 細胞及び休止期 B 細胞に 4 分画し、それぞれ HCV RNA 量を定量した。

8. HCV 感染者における B 細胞 Clonality の解析

B 細胞中免疫グロブリン重鎖遺伝子 CDR3 の mRNA を RT-PCR で増幅し、4% アガロース電気泳動法で単クローン増殖 (clonality) の有無を解析した。また IgM、IgG、IgA クラス特異的 PCR 用プライマーを CDR3 領域下流に設定し、それぞれのクラスの Clonality 解析を行った。

9. Naïve B 細胞における宿主細胞 mRNA 発現解析

HCV 感染者および健常者から PBMC を採取し、Naïve B 細胞、非 Naïve B 細胞に分画し、それぞれの分画から total RNA を抽出、リンパ腫関連遺伝子 AID、自己免疫減少抑制遺伝子 PD-1、リンパ球活性化関連遺伝子 CD80、CD86 などの mRNA 発現レベルを real-time PCR 法で解析した。

10. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着抑制分子の探索

JFH-1 株の NS5AC 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

11. 血清中の HCV に対する中和活性の高い検体を選択し、末梢単核球 (PBMC) を分離し、SPYMEG 細胞と融合した。ヒト抗体産生コロニーに対し、限界希釈法、ELISA による活性確認を経て、抗 HCV ヒト抗体産生細胞株の樹立に至る。

12. 血清中の HCV に対する中和活性の高い検体と HCV 罹患肝癌患者血液の 2 種類をもちいた。血中の末梢単核球 (PBMC) を分離し、Total RNA を抽出、cDNA 化を行い、抗体遺伝子の可変領域 (V_H 、 V_L) に合わせて設計した Primer と PCR 法で抗体遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子をファージに発現させてスクリーニングを行った。スクリーニングにおいては、目的である中和抗体樹立のために、ウイルス粒子上の立体構造を保持した E2 タンパク質が必要である。そこで、感染性ウイルス粒子に対して、その感染を拮抗的に阻害する E2 タンパク質を、昆虫細胞発現系を用いて構築し、ファージでのスクリーニングを 3 回行った。スクリーニングによ

り得られた Single Chain Fv (scFV) 抗体は E2 に対する ELISA により、その活性を確認した後、HCVcc と抗 HCV コアタンパク質抗体による免疫染色法を用いてその HCV 感染中和能を測定した。

(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. リコンビナント HCV E2 タンパク質の解析

精製 E2 タンパク質は、マンノース型では 60 kDa の単一の分子量、複合型では 75 kDa を中心に広い分子量を示した。付加された糖鎖を酵素処理で切断後、精製を行い質量解析で解析したところ、複合型では主に 3 種類の複合型の糖鎖が、マンノース型では 1 種類のマンノース型糖鎖のみが修飾付加されていた。これら 2 種類の精製 E2 タンパク質は E2 抗体で認識され、CD81 との結合もみられ、糖鎖の違いによる結合の差はなかった。マウスに免疫し中和抗体誘導能について比較検討したところ、どちらの投与群の血清についても最大で 70% の感染阻害活性を示した。

2. HCV 粒子免疫完全ヒト抗体産生マウスにおける血清中の抗体価の測定

J6E2/FLAG タンパク質で固相化した EIA プレートを使用し、血清中の抗体価を測定した。その結果、J6E2/Fc で免疫したマウスでは抗 HCV E2 抗体価は誘導されなかった。それに対し、HCV 粒子で免疫したマウスでは、抗 HCV E2 抗体価は誘導された。

HCVpp を用いた感染阻害活性測定の結果、No. 3 マウスが最も感染阻害活性が高かった。そこで、No. 3 マウスをハイブリドーマの作製に使用した。

3. 抗 HCV ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

最終免疫を行い、3 日後に脾臓と摘出し、脾細胞とミエローマ細胞を PEG にて融合した。融合細胞を 96 プレート 15 枚 (1440 ウェル) に播種し、HAT 培地で選択後、組換え J6E1/FLAG および J6E2/FLAG タンパク質を各々 50 ng/well で固相化したプレートにて培養上清の

EIA を行った。EIA ポジティブとして選択した 11 クローンを再クローニングした。再度 EIA を行い、ポジティブであった 5 クローンのうち、最も EIA での反応が良好だったウェルの細胞クローンを再クローニングした。最終的に得られた最も EIA での反応の良好な細胞クローン、4 種類をヒト抗 HCV 抗体産生ハイブリドーマとした。アイソタイピングの結果 IgM であることが判明した。

4. 自然免疫系を不活性化し不活化肝細胞 HuS-E/2 細胞の作成。

HuS-E/2 細胞に IRF7 のドミナントネガティブ体(以降 7DN と省略する)発現プラスミドを導入し、恒常的に 7DN を発現し、内在性 IRF7 の機能が低下している HuS-E/2 細胞の樹立を試みた。数回にわたる試行をおこなった結果、目的とする細胞は得られなかった。そこで多くの細胞において RNA ウイルス感染の検出に主要な役割を有する事が知られる RIG-I を抑制した HuS-E/2 細胞の作成を試みた。RIG-I mRNA に対する shRNA の発現用レンチウイルスベクターを作成し、これを HuS-E/2 細胞に導入した。センダイウイルスを用いてその感染に対するインターフェロン遺伝子群の誘導を検証したところ、それらの遺伝子発現誘導は著しく抑制されていることが確認できた。

5. 患者血由来 HCV の感染を特異的にそして高感度で検出することが可能なレポーター系の構築。

HTLV-I の転写活性化因子である Tax を小胞体膜に局在化する HCV タンパク質である NS2 の C 末端側にリンカー配列を介して融合した分子を構築した。リンカー配列には HCV のセリンプロテアーゼの切断部位である IPS-1 の部位を挿入してある。レポーターには Tax 応答配列を有する HTLV-I LTR をプロモーターに持ち、レポーター遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子をもちいたものを作成した。HCV が感染し、HCV プロテアーゼが産生されれば、小胞体表面に NS2 を介して局在化した Tax 融合タンパク質のリンカー部位が切断され、切り離された Tax は核内に輸送されレポーター遺伝子の発現誘導をおこなうことが期待された。現在、NS3/4a タンパク質発現プラスミドを用いた一過性の実験系では予想される反応が確認できたため、恒常的に Tax 融合タンパク質が発現し、レポータープラスミドが維持されている細胞の作成をおこなっている。

6. HCV 感染者における EBV 再活性化

HCV 感染者 52 例の PBMC 中 12 例 (23%) から BZLF1 mRNA が検出された。非肝疾患群では 43 例中 3 例 (9%) で有意差を認めた ($p = 0.0179$)。B 細胞分画を用いた解析でも HCV 群で 42 例中 10 例 (23.8%) が BZLF1 陽性と PBMC での解析とほぼ同様の結果で、リンパ球サブセット別の解析を BZLF1 陽性だった 10 例で行っても T 細胞など

B細胞以外の分画での再活性化は1例のみだった。

7. Naïve B細胞におけるHCV感染・吸着

HCV感染者33例のPBMCを(1)Naïve B細胞、(2)非Naïve B細胞、また77例のPBMCを(3)B細胞、(4)非B細胞で細胞中HCV RNA量を測定すると(1) 2.03 ± 0.25 log copies/100ng (陽性率78.8%)、(2) 1.33 ± 0.20 (69.7%)、(3) 1.91 ± 0.21 (60.5%)、(4) 0.84 ± 0.14 (39.5%)だった。このことからB細胞へのHCV感染・吸着は主にNaïve B細胞への感染・吸着であることが明らかとなった。Positive selectionで(A)Plasma細胞、(B)活性化B細胞、(C)メモリーB細胞、(D)Naïve B細胞及び休止期B細胞に4分画した5例の検討では平均HCV RNA量が(A) 3.4 ± 0.25 log copies/100ng、(B) 2.3 ± 0.93 、(C) 3.4 ± 0.34 、(D) 3.9 ± 0.34 であった。活性化B細胞では5例中2例がHCV RNA陰性を示したが、他の分画は全例で陽性、かつHCV RNA量に有意な差はなかった。

8. 単クローン増殖はNaïve B細胞に確認されないHCV感染者28例、健常者13例のNaïve B細胞、非Naïve B細胞についてCDR3領域Clonality解析を行うと非Naïve B細胞ではIgMクラスで5例(17.9%)に単クローン増殖を示すMono-clonality、4例(14.3%)に複数のClonality bandが検出されるOligo-clonalityが確認された。またIgGクラスでもMono-clonality 2例(7.1%)、Oligo-clonality 5例(17.8%)が確認され、IgAクラスではOligo-clonalityのみ3例(10.7%)に確認された。いずれかのクラスのMono-あるいはOligo-Clonalityが確認された患者は50.0%だった。一方、Naïve B細胞では全クラスにおいてClonalityは検出されなかった。更に健常人ではNaïve、非Naïve B細胞ともにClonalityは全例陰性だった。

(A)Plasma細胞、(B)活性化B細胞、(C)メモリーB細胞、(D)Naïve B細胞及び休止期B細胞に4分画した5症例についてのClonality解析でもNaïve B細胞分画にClonalityはなく、Plasma細胞、活性化B細胞分画からのみMono-clonality、Oligo-clonalityが検出された。

9. IgM Mono-clonality 陽性B細胞患者におけるNaïve B細胞の宿主因子の変化

Naïve B細胞中の宿主因子mRNA発現解析結果からNon-Naïve B細胞でIgM Mono-clonalityが確認された患者が他の患者群、また健常者と比較してAID発現が上昇していることが確認された。

10. 蛍光タグ付加HCVを用いた細胞吸着抑制分子の探索

High content analysisでは、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗CD81抗体を用いたエントリ

一障害試験では、70%以上の感染障害を示した。400個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35個が50%以上の感染障害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗HCV活性を認めたものは1個で、残りの34個はエントリ過程を阻害している可能性が示唆された。

11. SPYMEGによるヒト型抗体の作成

健常人でのSPYMEG融合法と比べ、ヒト抗体産生細胞の樹立割合は著しく低かった。そこで、患者PBMCとSPYMEGの割合や融合時のポリエチレングリコールの量について検討を行い、融合効率を改善した。選択培地に対して耐性を持つ細胞群については、その培養皿への接着性を利用し、大部分を除去することが可能であった。最終的にHCVに対し反応性のあるヒト抗体が4クローン樹立された。しかし、中和能は確認されなかった。

12. ファージディスプレイ法によるヒト型抗体の作成

今回用いた検体から、それぞれ約 2×10^7 サイズのライブラリを構築できた。ファージスクリーニングの結果、TH株-E2タンパク質にELISAで反応するscFv抗体が得られた。二つのライブラリから、それぞれ10クローンと3クローンの異なる遺伝子配列を持つ抗体を選択し、TH-HCVcc、JFH1-HCVcc両方の株に対して中和能を確認したところ、強い感染障害能を持つ抗体が複数確認できた。抗体のHCV中和による感染障害率は最大で95%に達した。

D. 考察

今年度はヒト型中和抗体の作成に向けた基礎的な実験を中心とした研究が実施された。その研究内容は報告書に詳細に記載されている。以下に簡単に内容をまとめる。

JFH-1株とHuh7細胞によるHCV感染実験系を用いて、瀉血患者の血清中の感染中和抗体活性をスクリーニングした。高い中和活性を持つ患者リンパ球をヒトモノクローナル抗体作成に供した。また、患者由来HCVの感染を阻害する中和抗体の評価をおこなう培養細胞実験系を構築するために、不死化肝細胞株を用いて感染効率を上昇させるために自然免疫系の抑制に最適な分子の検討をおこないIRF7とRIG-Iを含むいくつかの分子の発現を恒常的に抑制する細胞の構築を始めている。また新たな不死化肝細胞の樹立ならびに培養方法にもいくつかの立体培養法を応用し、より簡便な系の構築をおこなっている。また同時にHCV感染を簡便に検出する高感度レポーターの構築を進めている。

E2タンパク質を抗原として、マウスを免疫している。また、KMマウスを不活化J6/JFH1キメラウイルスで免疫し、ハイブリドーマを作製した。現在4クローンの

ヒトモノクローナル抗体を解析中である。

上記のスクリーニングにより選抜した感染中和活性の高いキャリアの末梢B細胞とSPYMEGを融合することで、HCVに対する中和活性を持つヒト抗体を樹立した。同様に感染中和活性の高いキャリアの末梢B細胞を用いて抗体ファージライブラリを作製した。HCVの感染に重要と考えられているE2リコンビナント蛋白質を調製し、E2に反応する複数のヒト抗体候補をスクリーニングにより得た。

感染中和抗体が存在するHCV感染者において、感染防御機構の破綻はHCVのB細胞感染・吸着によるB細胞機能異常と関連する可能性がある。HCV感染者（現時点で19例）のB細胞を各サブクラスに分画しHCV RNA量、HCV関連レセプター、B細胞活性化マーカー（CD86など）やAID発現、B細胞単クローン増殖の有無、免疫グロブリンクラススイッチ異常の有無などについて解析している。またHCV感染とB細胞内でのEBV再活性化についても解析した。

HCVの細胞吸着を抑制する低分子化合物の探索

2種の蛍光タグ（YFP, AsRdd）付き感染性粒子をそれぞれ分泌するHCVクローンを用いて、予備実験としてinterferon- α 、プロテアーゼ阻害薬BILN2061、CD81による感染増殖能の検討を行い、抗ウイルス効果をモニターできることを確認した。感染培養液の至適濃縮度、ウイルス・薬剤添加条件を設定し、現在、約5,000化合物のスクリーニングを終了した。

平成23年度は各研究分担者の研究を進めて、ヒト型中和抗体の確立を目指す。

E. 結論

1. 精製したマンノース型、複合型のE2タンパク質の性状について大きな違いは見られなかった。リコンビナントE2タンパク質の免疫により中和抗体が誘導された。
2. 細胞培養系で作製・精製した不活化HCV粒子を完全ヒト抗体産生マウスに免疫し、その脾臓細胞とミエロマ細胞を融合し、抗HCVヒト抗体産ハイブリドーマを作製し、4クローンのモノクローナル抗体を取得した。
3. RIG-IのshRNA発現ベクターを用いる事により不死化肝細胞をより効率的に患者血液由来HCVが感染増殖することが可能な細胞へ改変する可能性を見出し、多様な患者由来HCVに対するワクチンの効果を評価するために有用な細胞となる可能性が考えられた。
4. 蛍光蛋白発現HCV培養系を用いたHigh content screening assayを樹立し、エンター阻害剤としての可能性を有する低分子化合物を同定した。この新たなアッセイシステムは、HCV生活環のあらゆるステップに対する阻害剤

探索や薬効評価への応用が期待される。

5. HCVキャリアーにおいてHCVのNaive B細胞への感染・結合が非特異的活性化を惹起し、B細胞単クローン増殖に関与する可能性が示唆された。またHCVキャリアーにおいてEBV再活性化がB細胞内で確認された。
6. 患者末梢血単核球から抗HCVヒト抗体を樹立した。しかし中和能は確認できなかった。
7. 患者末梢血単核球から抗HCVヒト抗体を樹立した。その中には既存の抗体と比較して、強いHCV感染中和能を持つ抗体が複数含まれていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y Kushima, T Wakita, M Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J.Virol.*, 84(18), 9118-9127, 2010

1)Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, and M.Imawari. Reactivation of Epstein-Barr Virus in B Cells of Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82 : 2064-70, 2010.

2. Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T and Imawari M. Strong CD8⁺ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 45: 451-8, 2010.

3. Funaoka Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Suda S, Watanabe T, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, and Watanabe M: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011; *in press*.

4. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, and Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Serum interleukin-6 levels can predict resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 2011; *in press*.

5. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. The inhibitory effect on hepatitis C virus infection of a triterpenoid compound, with

or without interferon-alpha. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; *EPub*.

6. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Res* 2011;41:258-269.

7. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90.

8. Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima K, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Azuma S, Sekine-Osajima Y, Kakinuma S, Tsuchiya K, Enomoto N, Tanaka H, Watanabe M. Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 2010;45:523-536.

9. Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010;45:656-665.

10. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-369.

11. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3179-3186.

2. 学会発表および講演など

1. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita. Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

2. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita. The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

3. Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

4. Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

5. Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

6. Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. B cell-infected or –associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2010.11.1)

7. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Nozawa H, Hiroishi K and Imawari M. B cell-infected or –associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010.9.13)

8. Shimozuma Y, Ito T, Uchikoshi M, Inokuchi M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Reactivation of Epstein-barr virus in patients with chronic hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010.9.13)

9. Naoya Sakamoto, Goki Suda, Yusuke Funaoka, Mamoru Watanabe: Molecular analyses of interferon resistance by using HCV cell culture systems. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) The 7th Single Topic Conference, Dec-17-2010, Chiba, Japan.

10. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Osajima, Megumi Fujita, Yuki Sakurai, Goki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Yusuke Funaoka, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Tsunehito Yauchi, and Mamoru Watanabe: Antiviral effects and molecular mechanisms of interferon-induced proteins GBP-1 against Hepatitis C virus. 61th. Annual Meeting of American

Association for the Study of Liver Diseases, Oct-29-2010, Boston, MA.

11. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Gouki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Takako Watanabe, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Tsunehito Yauchi and Mamoru Watanabe: Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.

12. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Seishin Azuma, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Yukiko Okuno, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Identification of Novel Small Molecules Inhibitors of Hepatitis C Virus Replication Using a Cell-Based High-Throughput Screen. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.

13. Takako Watanabe, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuki Nishimura-Sakurai, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Sekine-Osajima, and Mamoru Watanabe: The inhibitory effect of triterpenoid compound with or without interferon α on Hepatitis C virus infection. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.

14. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Onuki-Karakama, Gouki Suda, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. J Hepatol 2010; 52:S258. 45th. Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr-14-2010, Wien, Austria.

16. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCV エンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)

17. 久島透嘉、脇田隆字、土方誠：CoreによるS-S結合型二量体はC型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第58回日本ウイルス学会学術総会、平成22年11月7-9日、徳島 2010

18. 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、斉月、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠：シンポジウム06 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離HCV株の培養と性状、第58回日本ウイルス学会学術総会、平成22年11月7-9日、徳島 2010

19. 伊藤敬義 HCV感染と肝外病変 第49回臨床肝臓懇話会特別講演(東京、2010.9)

20. 下間祐、伊藤敬義、井口桃子、打越学、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫 HCV感染が惹起するB細胞におけるEBV再活性化。第45回日本肝臓学会総会(山形、2010.5)

21. 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫.C型慢性肝炎患者におけるB細胞異常関連マーカーと抗ウイルス療法反応性との関連 第45回日本肝臓学会総会(山形、2010.5)

22. 伊藤敬義、井口桃子、井廻道夫.HCV感染とB細胞異常。第94回日本消化器病学会総会シンポジウム8「C型肝炎」：ウイルス感染の分子免疫機構。(新潟2010.4)

23. 下間祐、伊藤敬義、打越学、井口桃子、宮下みゆき、野沢妃佐子、広石和正、井廻道夫 HCV感染者におけるEpstein-Barrウイルス再活性化。第94回日本消化器病学会総会(新潟、2010.4)

G. 知的所有権の出願・登録状況

1)) 発明の名称：C型肝炎ウイルス(HCV)に対して感染阻害活性を有する抗体及びその用途

出願日：2010.10.30(PCT出願)

発明者：脇田隆字、西村和美、中村紀子、赤澤大輔

ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部
研究代表者 高橋 秀宗

研究要旨 温暖化で再流行が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV)、侵入の警戒が必要なウエストナイルウイルス (WNV) 及び東南アジアの大流行で輸入症例が急激に増加しているデングウイルス (DENV) について、我々の新技術 [特開 2004-65118] で開発し、「感染性ウイルスを用いず/特殊な封じ込め施設も不要な」安全/安価な製造を担保する VLP ワクチン開発研究を継続して実施、あるいは新規に開始した。

本年度は、次世代 VLP ワクチンを目指し、フラビウイルス VLP 抗原の安定化・アジュバント効果・誘導抗体のアイソタイプ活性、フラビウイルスに対する蛋白ワクチン開発等の検討を行った。その結果、1) VLP 抗原保存安定化剤に蔗糖が有効であること、2) 免疫マウス血清の IgG2a 画分にウイルス特異抗体価が高く誘導されること、3) アラムアジュバントの添加で IgG1 アイソタイプの特異抗体価が増強されること、4) ヨトウガ由来の expresSF+細胞を用いた連続発現細胞から、現行の JE ワクチン 20 ドーズ分の E 抗原が 30 継代の期間産生され、JEV 抗原をアラムアジュバントと共にマウスに免疫した結果、10 µg の投与により致死量の感染性ウイルスから防御され、expresSF+細胞由来 JEV 抗原がヒト用ワクチンとして有用であることを示した。

研究分担者

- | | |
|--------------------|----------------------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島朝人
田中道子
飛梅 実 |
| (2) 神戸大学大学院保健学研究科 | 小西英二 |
| (3) (財) 阪大微生物研究会 | 五味康行 |
| (4) (株) チツソ | 戸所正美 |

A. 研究目的

致死的な脳炎を引起す日本脳炎ウイルス (JEV) やウエストナイルウイルス (WNV) は中間増幅動物 (ブタ:野鳥) を吸血した感染蚊が媒介する同一 JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスである。しかし、ヒトからヒトへの伝播はない。一方、4つの血清型を持つデングウイルス (DENV) は感染者を吸血した蚊によりヒトからヒトへと伝播し、以前と異なる型の DENV に再感染したヒトは致死性のデング出血熱を発症する。従って、DENV は都市 (人口密集地) 型の、フラビウイルス最大の疾病を引き起こしており、WHO は警戒を強めている。

東アジアでの JE 対策成功経験から、JEV, WNV は各々単価ワクチンで予防・制圧が可能である。しかし、DENV は 1 型~4 型の 4 価ワクチンが必須である。JE 流行制圧に成功した我国といえ、地球温暖化でこれらの脅威に曝される危険が増している。疫学研究では、媒介蚊が流行地より頻繁に飛来して国内で越冬していることが示され、2010 年海外帰国者の輸入デング症例は昨年 の 2.5 倍以上の 243 例が報告されている。

JE 制圧に貢献し世界で唯一認可された我国発マウス脳由来不活化 JE ワクチンは積極的接種勧奨が控えられたものの、Vero 細胞培養不活化新ワクチンの認可・販売開始で再流行防止に展望が開けた。WNV に対するヒト用ワクチンは無いものの、委託企業・微研会等は新 JE ワクチンと同様の工程で不活化 WN ワクチン開発を進めており、有効性に関する成績が蓄積されつつある。DEN ワクチンは欧米中心に開発中で、未だワクチンは無い。

我々は、委託企業・微研会と官民型共同研究において、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイル

スゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle) 産生技術開発に成功し、この VLP 発現技術を用いて「感染性ウイルス大量培養不要で安全/特殊封じ込め施設不要で安価」な、JE 及び WN VLP 次世代ワクチン開発に継続して取り組んできた〔官民共同出願：特開 2004-65118「日本脳炎抗原及びその製造方法」、特願 2007-290169「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法」、特願 2007-330151「フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント」、等〕。

本年度は、研究事業 7 月開始の決定を踏まえて神戸大・阪大微研会・チッソ (株) との連携/共同研究強化で効率化を図り、DEN VLP ワクチンを主目標に JE, WN VLP ワクチンにも共通する、フラビウイルス VLP 抗原の安定化・アジュバント効果・誘導抗体のアイソタイプ活性、フラビウイルス蛋白ワクチン等の検討を進めた。

B. 研究方法

VLP 抗原の安定化剤に関する検討：前期樹立した CHO-WN12 接着性細胞株 (クローン#22.6) の培養上清から、Centricon-Plus を用いた限外濾過濃縮と Sephacryl S-300 クロマトグラフィーで粗精製 VLP を調製した。分注した VLP に等量の安定化剤を混合し、4℃又は 37℃で静置した。経時的 (1~27 日後) に抗原価を ELISA で、蛋白量を Lowry 法で測定し、抗原安定性を評価した。また、保存抗原の粒子形態を電子顕微鏡で観察した。安定化剤としては、ヒトへの使用例のある多糖類ポリマー及び単糖類・二糖類、を検討した。マウス免疫実験：粗精製 VLP 抗原をリン酸緩衝液 (PBS) に置換し、精製不活化 WNV (蛋白量 100 µg/ml) を標準抗原とした ELISA で 1 µg 当量の VLP 蛋白に対して 1:1~1:30 (µg) 量のアラムアジュバントを混合し吸着させた。これを 4 週齢雌 C3H/HeN マウス腹腔内に 1 週間間隔で 2 回投与した。2 回目免疫の 1 週間後に麻酔条件下で全採血し、血清を分離後非動化した。各マウス血清中の IgG 抗体価は、精製不活化 WNV でコートした ELISA プレートに結合した IgG を標識抗-マウス IgG 抗体を用いて測定した。IgG1 及び IgG2a 抗体価についても同様に、標識抗-マウス IgG1, IgG2a 抗体を用いて測定した。また、血清の段階希釈系列を調整し、WNV-NY99 株の Vero 細胞を用いたプラーク法で中和抗体価 (PRNT₅₀) を測定した。免疫マウス IgG1, IgG2a 画分の抗体価：不活化 WNV 抗原あるいは WN VLP 抗原で免

疫したマウス血清から 50%硫酸アンモニウムで沈殿・濃縮した粗 IgG を調製した。ここから Protein-A 及び Protein-G カラムを用いて IgG1 及び IgG2a 画分をアフィニティー精製した。各画分の IgG 量は抗-マウス IgG をコートした市販の ELISA プレートをを用いて定量した。一方、WNV 特異的抗体価は、上記血清抗体価と同様に、精製不活化 WNV でコートした ELISA プレートをを用いて IgG, IgG1 及び IgG2a 抗体価を測定した。

細胞：昆虫細胞として、(1)カイコ (*Spodoptera flugiperda*) 由来の Sf9 細胞から得られたクローンであり、ヒト用ワクチン製造に使用できるようにするために米国 FDA が開発に関与した expresSF+細胞 (Protein Sciences 社)、(2) 2009 年に認可されたヒトパピローマウイルスワクチン製造に用いられている、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) 細胞、(3) 山地秀樹博士 (神戸大学大学院工学研究科准教授) に JEV の prM/E 遺伝子を分与して作製いただいた、JEV 抗原を連続発現する High Five 細胞 (G1 細胞; 未発表) を用いた。培養液は expresSF+細胞には BacVector (Novagen 社)、High Five 細胞には ExpressFive SFM (Invitrogen 社) を用い、28℃で培養した。JEV 抗原を連続発現する細胞は、10~30 µg/ml のプラスチジンを添加した BacVecor または ExpressFive SFM を用いた。対照として JEV の prM/E 遺伝子を安定的に発現する CHO 細胞として、すでに構築した F 細胞 (Konishi et al., *Journal of Virology* 75, 2204-12, 2001) を用いた。F 細胞は、10%FBS 添加イーグル MEM 培地を用いて 37℃で培養した。ウイルス：JEV 中山株を感染させた C6/36 細胞培養液を、生化学的解析また中和試験の抗原として用いた。プラスミド：ベクターは、expresSF+細胞には昆虫細胞発現用の pIB/V5-His ベクター (Invitrogen 社)、High Five 細胞には *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) IE-1 トランスアクチベータ、BmNPV HR3 エンハンサー、*B. mori* アクチンプロモーターを含む pIHAb1a ベクター (Yamaji et al., *Biochemical Engineering Journal* 41, 203-9, 2008) を用いた。両ベクターに JEV の prM/E 遺伝子を挿入したものをそれぞれ pIBJEEP、pIHJEEP とした。ただし、prM の開裂に伴う E の配置転換による融合活性の獲得が安定発現細胞株の樹立に障害をもたらすため、細胞内酵素フリリンによる prM 上の切断部分に存在するアミノ酸モチーフ RSRR を TSRR に改変し、開裂を抑制するようにしている。JEV 抗原

を安定発現する expresSF+細胞(exJE 細胞)の樹立: pIBJEEP を expresSF+細胞に FuGENE (Roche 社) を用いて導入し、24 時間後にプラスチジンを 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。導入 72 時間後に直径 100 mm の培養シャーレに 5×10^5 細胞を移し、コロニーが目視できるまで培養を行った。形成されたコロニーを 96 穴培養プレートに継代し、順次培養面積を増やし、25 cm^2 フラスコまで増殖させた後、継代毎に培養上清中の E 抗原量を測定した。なお、導入 24 時間以後は常にプラスチジンを 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加培地を用いた。EP の精製 (exJE 細胞由来抗原): exJE 細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ となるように 75 cm^2 フラスコに播種し、3 日後にほぼ 100%コンフルエントとなったことを確認し、培養液を BacVector から正常マウス血清を 1%添加したサプリメント不含グレース培地へ置き換えた。培地交換から 2 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。すなわち、培養液に 10%PEG、1.9%NaCl を添加し、4°C で 2 時間保温して沈澱させた。この沈澱を TN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM NaCl) に溶解し、10-40%ショ糖密度勾配により分画した。抗原量測定のスンドイッチ ELISA: JEV に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、JEV の E 特異的 JE-10B4 抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。E 抗原スタンダードから、未知試料の抗原量を計算した。E 抗原スタンダードの蛋白量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準蛋白として、電気泳動後の銀染色により E 蛋白バンドの色調と比較することにより求めた。マウス実験 (exJE 細胞由来抗原): 精製 EP (1-10 μg) とアラム (Alu-Gel-S: SERVA 社) と混合し、液量を 100 μl に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 5 匹) に 2 週間隔で 3 回、右大腿部に筋肉内投与した。アラムアジュバントは EP の 1 μg に対し 1 μl の比率で混合し、室温で 1 時間攪拌し吸着させた。初回免疫後 5 週目に眼窩静脈叢から採血し、個々の中和抗体価を測定した。さらに、初回免疫後 6 週目に致死量の JEV Beijing P3 株を接種し、接種後 21 日間の観察を行った。High Five 細胞の培養条件の検討: 125 ml の細胞培養用三角フラスコを用いて、ExpressFive SFM 培養液 30 ml に 2.0×10^5 cells/ml の濃度で細胞を播種し、25°C、100 rpm または 26°C、80 rpm で振とう培養を行い、経時的な生細胞数および死細胞数を求めた。密度勾配遠心: 10-40%の蔗糖密度

勾配液上に重層して超遠心後、20 分画を得た。ウエストンプロット: G1 細胞の培養上清から、PEG 沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により精製したウイルス蛋白を SDS-PAGE の後、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。転写された蛋白を、JE-10B4、J2-2F1 または JEV 過剰免疫マウス腹水で染色した。EP の精製 (G1 細胞由来抗原): G1 細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ となるように 125 ml の細胞培養用三角フラスコに 30 ml 播種し、26°C、80 rpm の条件で振とう培養を行った。5 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。マウス実験 (G1 細胞): 精製 EP (1-10 μg) を単独、あるいはアジュバントである CpG モチーフを含む pcDNA3 (100 μg) またはアラムと混合し、液量を 100 μl に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 5 匹) に 2 週間隔で 2 回、右大腿部に筋肉内投与した。アラムアジュバントは EP の 1 μg に対し 1 μl の比率で混合し、室温で 1 時間攪拌し吸着させた。初回免疫後 3 週目に眼窩静脈叢から採血し、プール血清を用いて中和抗体価を測定した。中和試験: Vero 細胞を用い、70%フォーカス減少法で抗体価を求めた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物免疫実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づき、動物愛護倫理規程に則り申請・承認を受けて実施した。

C. 研究結果

VLP 抗原の安定化剤に関する検討: マウス免疫実験用に粗精製した VLP 抗原を調製時と接種時に ELISA で測定したところ、ELISA 価が大幅に低下していることが判明した。そこで、①Sephacryl S-300 クロマトグラフィー、②平衡蔗糖密度勾配遠心法、③上記①と②の組合せ、及び④Sephacryl S-300 クロマトグラフィー後 Cellufine アフィニティークロマトグラフィー法、で調製した VLP 画分を PBS 中で 27 日間 4°C 又は 37°C で保存した。抗原価を ELISA で調査した結果、いずれの方法で調製した VLP 抗原でも保存 6 日以内に 4°C では 1/3 に、37°C では 1/4 に減少し、以降 27 日まではそのまま減少値が維持されていた。他方、蛋白量は変わらずに維持されていた。

そこで、上記①の方法で新たに調製した VLP 抗原

に多糖類ポリマー；コンドロイチン硫酸 A 又は B を 1%あるいは 5%の濃度で、食品添加剤のペクチン又はグアーガムを終濃度 0.5%あるいは 2.5%で添加し 4℃で保存した。1, 3, 7 日後の ELISA 抗原価を測定したところ、無添加 PBS 中での保存に比べて抗原価は安定に維持されたものの、保存開始 1 日以内に開始時の 1/2 以下まで急速に ELISA 価が低下していた。

次に、ソルビトール(2%)、イノシトール(4%)、ラクトース(4%)、スクロース(10%)及びこれらを組合せて VLP 抗原に添加した。その結果、1 日以内の急激な抗原価の低下が阻止され、保存 8 日目でも開始時の 70%~90%の ELISA 抗原価が、いずれの糖の添加条件でも維持されていた。特に、スクロースでは 8 日目にも 90%以上の ELISA 価が保持されていた。また、これら単糖・二糖類添加保存した VLP 抗原の形態を電子顕微鏡で観察したところ、ELISA の結果と一致して、インタクトな小型球形粒子が多数保存されていた。

これらの結果から、以降の実験においては 10%スクロースを VLP 抗原の安定化剤として用いた。

免疫マウス IgG1, IgG2a 画分の抗体価：WNV 感染から回復・生存したマウス、不活化ワクチン試作品で免疫したマウス、VLP で免疫したマウスの何れにおいても IgG1 に比べて IgG2a 優位の抗体免疫応答が誘導されていた。そこで、不活化ワクチン免疫あるいは VLP 免疫マウス血清から IgG1, IgG2a 画分を Protein-A 及び Protein-G カラムを用いて部分精製し、ウイルス特異的抗体価を検索した。その結果、1 ng 当りの抗体価は IgG1 画分に比べて IgG2a 画分により高い ELISA タイターが認められた。このことより、より精製度の高い画分を調整して、感染防御の主体となる中和抗体価を検討することの重要性が示唆された。

VLP 抗原に対するアラムアジュバントの影響：300 ng の精製不活化 WNV 相当の VLP 抗原に対して 1:1 ~1:30 のアラムアジュバントを添加してマウスを免疫しても、誘導される中和抗体価に有意の増強は認められなかった。また、total IgG-ELISA 価においても 1:10, 1:30 添加群において抗体価の上昇傾向がみられたものの有意ではなかった。これに対して、IgG アイソタイプ ELISA 価は、無添加群で IgG1 タイター = 1:200 に対して IgG2a タイター = 1:800 と IgG2a 優位であった応答が、アラムアジュバント添加により IgG2a 抗体価は変化せず、IgG1 抗体価のみが 1:10, 1:30 添加群において 1:800 に上昇し、IgG1 と IgG2a の抗体価は 1:1 の等価を示した。

express+細胞の発現安定性：コロニーから増殖させた細胞が安定的に E 抗原を発現し続けるかを、30 継代まで調べた。10 µg/ml のプラスチジン添加により、ワクチン当量として 100 µg/ml 前後の E 抗原が安定して得られた (図 1)。図 1 で示したコロニーの中で、最も高い E 抗原産生量が得られたコロニー #10-4 を exJE 細胞と呼ぶ。

マウス実験 (exJE 細胞由来抗原)：グレース培地を用いて得た精製 EP の免疫原性、及びアジュバントの有用性を、マウスを用いて評価した。アジュバントとして、ヒト用ワクチンの製造で認可されているアラムを用い、2 週間隔で 3 回投与した。初回免疫後 5 週目の中和抗体価を図 2A に示す。E 抗原投与量に依存して中和抗体価の上昇がみられた。さらに、初回免疫後 6 週目に致死量の感染性ウイルス ($5 \times 10^5 \text{LD}_{50}$) で攻撃を行った結果、こちらも投与量依存的に生存率が上昇し、10 および 30 µg 投与群においては全てのマウスが防御された (図 2B)。

抗原産生量の比較：exJE 細胞の培養上清中に放出された E 抗原産生量を、哺乳類細胞を用いて樹立した JEV 抗原連続発現細胞 (F 細胞)、JEV 感染 Vero 細胞から放出される E 抗原量と比較した。exJE 細胞、F 細胞は 6 ウェル培養プレートの 4 ウェルに 5.0×10^5 cells/well で細胞を播種した。Vero 細胞は、 5.0×10^5 cells/well で細胞を播種した翌日に multiplicity of infection (moi) = 5.0 で JEV 中山株を感染させた。継代あるいは感染後 5 日目まで培養上清を回収し、上清中の E 抗原量を ELISA により測定した (図 3)。exJE 細胞から産生された E 抗原は経時的に上昇し、継代後 4 日目には 10 µg/ml を超えた。5 日目の抗原産生量を比較すると、exJE 細胞の抗原産生量は、哺乳類細胞で樹立した連続発現細胞のおよそ 10 倍であり、JEV 感染 Vero 細胞から放出されたウイルス抗原よりも 4 倍高い値であった。さらに、市販ワクチンに含まれる E 抗原量と比較すると、20 倍高い値であった。

High Five 細胞の培養条件の検討：High Five 細胞は、振とう培養により容易に高密度での培養が可能となる。まずは非発現細胞を用いて、振とう培養条件の検討を行った。ExpressFive SFM 培養液 30 ml に 2.0×10^5 cells/ml の濃度で細胞を播種し、25℃、100 rpm の条件で培養を行った。その結果、培養開始後 2 日目は細胞の増殖曲線が緩やかになり、5 日目に最高密度 (4.3×10^6 cells/ml) に達し、翌日の 6 日目には死細胞数が急増した (図 4A)。次に、26℃、80 rpm で培養した結果、培養開始後 3 日目に

最高密度となる 5.4×10^6 cells/ml に達するまで、対数増殖が見られた (図 4B)。さらに、6 日目に死細胞数が急増するまで、高い細胞密度が維持された。以上の結果より、JEV 抗原を連続発現する High Five 細胞 (G1 細胞) は、26°C、80 rpm で培養を行った。

G1 細胞由来 JEV 抗原の生化学的解析: G1 細胞の培養液を蔗糖密度勾配遠心法で分画した結果を図 5 に示す。E 抗原のピークは、JEV 感染 C6/36 細胞培養液で示された SHA (Slowly sedimenting hemagglutinin) 粒子のピークと同等の密度を示した。さらに、G1 細胞培養液をポリエチレングリコール沈殿法により濃縮後、蔗糖密度勾配遠心法で得られた分画をウエスタンブロット法で解析した結果を図 6 に示す。E に対する抗体 (JE-10B4)、M に対する抗体 (J2-2F1) あるいは過剰免疫マウス腹水により、推定される位置に E 蛋白、prM/M 蛋白のバンドが検出された。これらの結果は、G1 細胞からは本来の JEV 感染細胞から放出される SHA 粒子と同様に、E および M 抗原が粒子状で放出されたことを示唆する。

G1 細胞由来 JEV 抗原の産生量: G1 細胞を ExpressFive SFM 培養液 30 ml に 2.0×10^5 cells/ml の濃度で播種し、26°C、80 rpm の条件で培養を行った。継代後 7 日目までの生細胞数、死細胞数および培養上清中の E 抗原量を測定した結果を図 7 に示した。振とう培養により、静置培養での 1.0×10^6 cells/ml よりも 5 倍高い細胞密度で培養が可能であり、継代後 6 日目には 20 µg/ml の E 抗原が得られた。

マウス免疫実験: G1 細胞から産生された EP の免疫原性、及びアジュバントの有用性を、マウスを用いて評価した。アジュバントとして pcDNA3 プラスミド (遺伝子アジュバントである CpG モチーフを含む) または アラム を用い、2 週間隔で 2 回投与した。初回免疫後 3 週目の中和抗体価を表 1 に示す。全ての群において、1 µg の少量投与でも中和抗体が誘導された。10 µg 投与群では、蛋白単独では 1:320、アジュバントとして pcDNA3 を添加した群では 1:80、アラム を添加した群では 1:640 の中和抗体価が認められた。

D. 考察

JE ワクチンは細胞培養不活化新ワクチンの販売が平成 21 年から開始され、JE 再流行阻止への目処が立った。JEV と近縁な WNV についても新 JE ワクチンと同様の工程で不活化 WN ワクチン開発が微研

会等で進められ、高い有効性が示されつつある。一方、ヒトからヒトへ伝播する DENV はフラビウイルス最大の疾病をもたらし、感染者数は増加の一途を辿っている。欧米を中心にワクチン開発が進められているものの、未だにヒト用ワクチンは無い。我々は以前より継続して「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性 VLP」を我々の新技術で JE、WN 次世代ワクチン抗原に開発することを追求してきた。従って、本課題では JE-VLP、WN-VLP に加え、新たに DEN-VLP も目標に据えて、フラビウイルス VLP ワクチン研究に取り組んだ。

これまでの VLP 研究で明らかになった問題点の 1 つは、調製した VLP 抗原の抗原価が 4°C に保存中に低下することであった。そこで、添加剤として食品等に用いられている多糖類ポリマー、単糖類・二糖類を VLP 抗原に添加してその安定化剤としての効果を判定した。その結果、蔗糖という極めて平凡な二糖類に安定化作用のあることを見出した。更なる改良を目指し、糖誘導体で抗酸化作用のあるアスコルビン酸 (ビタミン C) 等も検討に値しよう。また、不活化ワクチンと同様に、低濃度のホルマリン長期処理で抗原性を固定する方策も検討の必要があるう。

フラビウイルス感染においては、中和抗体が感染防御に主要な役割を果たす。しかもその抗体応答は IgG2a 優位であることがいくつか報告されている。我々も、WNV 感染からの回復マウス、不活化ワクチン免疫マウス、VLP 免疫マウスで IgG2a 優位な抗体応答が誘導されることを報告してきた。そこで、免疫マウス血清から IgG1、IgG2a 画分を調製し、両画分のウイルス特異的抗体価を比較したところ、IgG2a 画分により高い抗体価が観察された。これまでに報告されている高い中和活性の単クローン抗体には IgG2a 抗体が多いことを考え合わせると、フラビウイルスの感染防御における IgG アイソタイプの役割は着目すべき観点といえよう。また、ワクチン効果を判定する上で有用な指標になる可能性も秘めている。

そこで、ワクチン効果の増強を視野に、免疫増強剤に汎用されているアラムアジュバントの効果を検討した。一定の VLP 抗原量に対して添加するアラムアジュバントの量を順次増加させたところ、IgG2a 抗体価の上昇は観察されず、IgG1 アイソタイプの特異的抗体価のみが増強されていた。フラビウイルス感染においては特に、中和活性の無い、あるいは、低い抗体が感染増強 (ADE: antibody-

dependent enhancement of infection)をもたらすことが知られている。DENV 感染における重篤なデング出血熱/デングショックシンドロームは、この ADE が原因であることが示唆されている。高い有効性を持つ DEN ワクチンの開発には、IgG アイソタイプごとの中和活性・ADE 活性を含めた総合的な検討が必要となろう。

昆虫細胞は、有用蛋白の大量製造に適するために、近年注目されている。昆虫細胞は哺乳類細胞に比べ生物学的分類上大きく異なるため、ヒトに対して病原性を有する微生物等が混入する可能性が極めて低いこと、高密度培養が一般的に容易であり、蛋白の大量製造が可能であることが挙げられる。こうした理由から、昆虫細胞を用いて製造されたワクチン蛋白は、世界的に臨床試験が進められ、2009 年には昆虫細胞由来ヒトパピローマウイルスワクチンが日本でも認可された。

本事業では、DENV に対するワクチン製造への昆虫細胞の利用について検討を行う。1 年目となる本年度は、これまで昆虫細胞で検討を行ってきた、JEV に対するワクチン蛋白のさらなる解析を行った。具体的には、抗原産生量の高い細胞株の樹立、EP の抗原性、免疫原性、およびアジュバントの効果について検討を行った。

exJE細胞由来JEV抗原の解析：薬剤選択により安定的にE抗原を発現する細胞を得ることができた。細胞株を樹立する際に一般的に用いられる限界希釈法がexpresSF+細胞には適さなかったため、コロニー選択によりexJE細胞を得た。exJE細胞から産生された蛋白が本来のウイルスと同等の抗原性を持つことは、昨年度までの事業で報告してきた。本年度は、免疫原性をさらに解析するため、1-30 µgのE抗原をアラムアジュバントと共にマウスに投与した。中和抗体価、攻撃後の生存率ともに、E抗原投与量に依存して上昇がみられた。現行のJEワクチンは、JEV感染Vero細胞を用いて製造されている。そこで、exJE細胞から産生されるE抗原量を、JEV感染Vero細胞由来のE抗原量と比較した結果、およそ4倍高い値が得られた。これらの結果から、昆虫細胞由来JEV抗原はワクチンとして有用であり、exJE細胞からは実用化に十分な抗原が得られると考えられる。また、expresSF+細胞由来のインフルエンザウイルスワクチンの臨床試験が日本でも進められており、exJE細胞はヒト用ワクチンの開発に有用であると考えられる。

High Five細胞由来EPの免疫原性とアジュバント

の効果：expresSF+細胞を用いた検討により、昆虫細胞がワクチン製造に有用であることが示された。そこで、さらなる改良として、昆虫細胞の種類および遺伝子を導入するベクターを検討した。分泌蛋白の産生に適した昆虫細胞であるHigh Five細胞に、エンハンサーおよびプロモーターを昆虫細胞に最適化したpIHAb1aベクターを用いてJEVの遺伝子を導入することにより、exJE細胞よりも抗原産生量の高いG1細胞が樹立された。生化学的性状解析により、G1細胞由来抗原はE蛋白、M蛋白を含み、培養上清中に粒子状で放出されることが明らかとなった。さらに、G1細胞由来抗原は蛋白単独でもマウスに中和抗体を誘導し、高い免疫原性を有することが示唆された。アジュバントを比較すると、アラムでは遺伝子アジュバントよりも高い効果を示し、1 µgという少量のE抗原の投与でも1:40の中和抗体価が誘導された。High Five細胞由来蛋白はすでにヒト用ワクチンとして認可されていること、アラムはヒト用ワクチンへの使用が認可されている唯一のアジュバントであることから、G1細胞由来抗原は安全かつ安価なワクチン蛋白であると考えられる。

以上の考察から、デング蛋白ワクチンの作製にはHigh Five細胞およびpIHAb1aベクターの使用が適すると考えられた。これまでの哺乳類細胞を用いた研究から、感染細胞やprM/E遺伝子発現細胞からのウイルス抗原産生量は、DENVはJEVの10分の1から100分の1以下であることが示されている。したがって、今後のデングウイルス抗原安定発現細胞を樹立した場合に、その産生量が低いことが想定されるため、High Five細胞とpIHAb1aベクターの組み合わせのような高発現系を用いて検討する必要がある。

E. 結論

1) VLP抗原の保存安定化剤に蔗糖が有効であることを示した。2) 免疫マウス血清ではIgG2a画分にウイルス特異抗体価がより高く誘導されることを示した。3) VLP抗原にアラムアジュバントを添加すると、IgG1アイソタイプの特異抗体価が増強されることを示した。4) High Five細胞を用いて樹立したJEV抗原安定発現細胞は高い産生量を示し、得られた抗原蛋白はアラムアジュバントにより低ドーズでもマウスに高いレベルの中和抗体を誘導することが明らかにされた。High Five細胞およびpIHAb1aベクターは、安全かつ安価なDENVワクチンの製造に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohtaki, N., Takahashi, H., Kaneko, K., Gomi, Y., Ishikawa, T., Higashi, Y., Kurata, T., Sata, T. and Kojima, A.: Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine* 28: 6588-6596, 2010.

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine*. 28, 2664-2670, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo, Eiji Konishi.: Complement-dependent cytotoxicity assay for differentiating West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in horses. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 875-878, 2010

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Antibodies to bovine serum albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections. *Jpn J Infect Dis.* 63, 296-298, 2010

Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 1560-1566, 2010

Jun-ichi Imoto, Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka, Misako Konishi, Kenji Murakami, Tomoyuki Shibahara, Masanori Kubo, Chang Kweng Lim, Masataka Hamano, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Haruhide Udagawa, Yoshihiro Mukuta, Eiji Konishi: Needle-free jet injection of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies

in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine*. 28, 7373-7380, 2010

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Combating Japanese encephalitis: Vero-cell derived inactivated vaccines and the situation in Japan. *Future Virol.* 5, 785-799, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: Effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine. *J Virol Meth.* 171, 123-128, 2011

Yoko Kitai, Hiroaki Shirafuji, Katsushi Kanehira, Tsugihiko Kamio, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Specific Antibody Responses to West Nile Virus Infections in Horses Preimmunized with Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine: Evaluation of Blocking ELISA and Complement-Dependent Cytotoxicity Assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* in press 2011 (Jan 22. [Epub ahead of print])

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* 1, 1000102, 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health.* in press 2011

2. 学会発表

石川知弘、小西英二: ベネズエラウマ脳炎ウイルスレプリコン発現システムを用いた日本脳炎ウイルスNS1タンパクの作成およびその性状解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会（東京）2010年5月

瀧澤山人、小西英二: ジャカルタで1988年に患者から分離された Dengue 1 型および 3 型ウイルスの遺伝子系統樹解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究

会（東京）2010年5月

武田祥子、田淵裕子、小西英二：感染増強活性あるいは中和活性のみを示すデングモノクローナル抗体の性状解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会（東京）2010年5月

田淵裕子、小西英二：インドネシアとフィリピン住民におけるデングウイルス感染増強抗体の保有率。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会（東京）2010年5月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Correlation between complement component levels and disease severity in dengue patients in Indonesia. The 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Sapporo, Japan, 2010年6月

Eiji Konishi: Dengue DNA Vaccine Research under Indonesia-Japan Collaboration. International Seminar on Viral Diseases: Control and Management, 2010. Jakarta, Indonesia, 2010年9月

Eiji Konishi: ELISA to detect antibodies against Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in subclinically infected humans. The U. S. -Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP). 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Pulau Pinang, Malaysia, 2010年10月

瀧澤 山人、小西 英二：インドネシア流行株およびプロトタイプに基づくデングワクチンの中和抗体誘導能の比較。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）2010年11月

田淵 裕子、山中 敦史、小西 英二：インドネシア住民におけるデングウイルス感染増強抗体の血清疫学。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）2010年11月

山中敦史、小西英二：2008年にインドネシア国スラバヤ市で起きたデング2型から1型への流行型シフト。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）2010年11月

武田 祥子、田淵 裕子、小西 英二：デング1型ウイルス感染増強活性あるいは中和活性のみを示すモノクローナル抗体の性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）2010年11月

石川 知弘、小西 英二：ベネズエラウマ脳炎ウイルスレプリコン発現システムを用いた日本脳炎ウイルスNS1発現系の構築およびその性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）2010年11月

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. Sapporo, Japan, 2010年12月

小瀧将裕、瀧澤山人、小西英二：数株のデング1型および3型ウイルスに対して数種のモノクローナル抗体が示す感染増強活性の比較。第17回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）2010年12月

桑原 三和、小西 英二：日本脳炎ウイルス抗原を連続発現する昆虫細胞由来蛋白のワクチンおよび診断用抗原への適用。第14回日本ワクチン学会学術集会（東京）2010年12月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案特許

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の 医薬品化に関する研究

所属 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦

研究要旨 臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞など、臍帯血リンパ球を主成分とする細胞治療製剤の医薬品化に向けて、GMP に則った培養法の確立、制御性 T 細胞調製法の改良、臍帯血 DLI の前臨床試験、臍帯血 DLI 臨床第 I/II 相試験プロトコールの策定を行った。

分担研究者

- (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) 国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部 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 茅野真一
- (6) 虎ノ門病院 谷口修一
- (7) 神鋼病院 伊藤仁也
- (8) 東京大学医科学研究所 長村登紀子

A. 研究目的

私たちはこれまで、臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注療法を実現するために、ごく少量の臍帯血から、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を添加した培養により、2 週間で 10^9 オーダーの活性化 T 細胞を調整しうる方法を確立してきた。マウスを用いた前臨床試験を行った上、探索的臨床研究に臨み、この細胞を臍帯血移植のレシピエントに投与すると、サイトメガロウイルス日和見感染、コクサッキーウイルス腸炎、混合キメラ状態などの治療に有効であることを示唆する結果を得てきた。また、移植片対宿主病 (GVHD) の治療を目的として、末梢血及び臍帯血より高純度の制御性 T 細胞 (Treg) を調整するプロトコールを確立し、マウスにおける前臨床試験によりその有効性を確認している。さらに、ウイルス特異的 T 細胞を調製し、これを治療に用いる

ための基礎研究を行ってきた。本研究では、これらの研究をさらに進め、臍帯血リンパ球から、臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞、GVHD 治療に用いる Treg 細胞、感染症の治療に用いるウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞などを Good Manufacturing Practice (GMP) 基準に則ったプロトコールにより調製するシステムの確立を図る。また、臍帯血 DLI に関しては、マウスを用いた前臨床試験を再度行った上で、第 I/II 相臨床試験を行い、安全性と有効性を検証する。本年度は、主に臍帯血 DLI に焦点を当て、GMP 基準に則した培養プロトコールの確立、無血清培養液を用いた培養法の検討、マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現の解析、臍帯血からの Treg 細胞調製法の改良、ヒト化マウスを用いた前臨床試験、第 I/II 相臨床試験プロトコールの策定を行った。

B. 研究方法

1. 骨髄ストローマ細胞の機能に対する放射線照射の影響の解析

臍帯血由来 CD34+細胞を、放射線照射したマウス骨髄由来ストローマ細胞 HESS-5 と共培養し増殖させた後 CD34+CD38-細胞数をフローサイトメトリーにより測定し、ストローマ細胞の造血幹細胞増殖維持能を調べた。また、ストローマ細胞が発現する造血幹細胞維持関連分子として、Ang-1, N-cad, SDF-1, Jag-1 の発現量を定量 RT-PCR 法などにより測定し

た。

2. 臍帯血移植および非血縁者間骨髄移植後中後期におけるウイルス感染症の検討

2002年1月～2010年3月に虎ノ門病院で臍帯血移植(CBT)又は非血縁者間骨髄移植(uBMT)を施行後100日以上生存し、50日を越えて経過観察可能であった280例(CBT群163例、uBMT群117例)を後方視的に解析した。

3. 安全性を重視した臍帯血 T 細胞活性化培養法の改良

臍帯血は、東京臍帯血バンクから移植に使用できなかったものの提供を受けて研究に用いた。臍帯血から単核細胞を比重遠心法により分離し、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を添加し約 2 週間培養する基本プロトコールに従い、以下の 3 項目を検討した。

1) 細胞洗浄液及び希釈液の改良

これまで臍帯血の希釈や細胞の洗浄に用いていた RPMI-1640 培養液は医薬品ではないため、医薬品である生理食塩水(1%アルブミン添加)での代用を検討した。

2) ヒト血清から牛胎児血清への変更

「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」では、ヒトに投与する細胞の培養に際してヒト血清の使用は推奨されていない。そこで、牛胎児血清による代用を検討した。

3) 細胞凍結保存法の改良

従来の方法では、細胞を凍結保存する時に浮遊させる溶液に RPMI-1640 培養液が含まれていたが、RPMI-1640 の代わりに生理食塩水(1%アルブミン添加)を含む溶液の使用を検討した。

4. 市販の無血清培養液による活性化臍帯血 T 細胞の調製

固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を添加し約 2 週間培養する基本プロトコールに従い、① OpTimizer T Cell Expansion SFM 培地 (invitrogen)、② AIM-5 培地 (invitrogen)、③ KBM540 培地 (コージンバイオ)、④ ALyS505 培地 (細胞科学研究所)、⑤ ALyS705 培地 (細胞科学研究所)、⑥ SKY-2 培地 (スカイセルサイエンス) の 6 種類の市販無血清培養液を用いた。

5. マルチカラーフローサイトメトリーによ

る活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現解析

FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、APC-Alexa-700 (Alexa-700)、APC-Alexa-750 (APC-Cy7)、Pacific-Blue、KromeOrange (Cascade-Yellow) の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる蛍光染色を行い、Digital flow cytometry Galios (Beckman-Coulter 社) を用いて 3 レザー10 カラー解析を行った。

6. 臍帯血制御性 T 細胞 (Treg) の体外増幅法の改良

これまでに、固相化抗 CD3/CD28 抗体および TGF- β を用いた基本的培養系は完成しているが、今年度は Treg 細胞の純度向上と安定化を目指し、mammalian Target of Rapamycin (mTOR) を標的とする新規免疫抑制剤 Rapamycin (RAP) あるいは Everolimus (EVE) を添加する方法を検討した。

7. EB ウイルス感染モデルマウスにおける臍帯血 DLI の前臨床試験

NOD/Shi-*scid* / γ c^{null} マウス (NOG マウス) に臍帯血造血幹細胞を移植し、免疫ヒト化マウスを作成した。このマウスに Akata 株の EB ウイルス (EBV) を尾静脈より接種した。DLI に用いた活性化 T 細胞はマウスをヒト化するために用いたのと同じの臍帯血の一部から活性化培養したものを一旦凍結保存したのち、DLI 実験の時期に合わせ再度活性化培養した。活性化 T 細胞を得るために、臍帯血からリンフォセパールを用いた比重遠心法により単核細胞を分離し、RPMI-1640 培養液(10%ヒト血清・rIL-2 700 IU 添加)に浮遊させ、抗 CD3 抗体を固相化したフラスコを用い、CO₂ インキュベーターで静置培養した。その間、培養液の追加は適宜行い、倍量ずつ追加した。CD4 陽性 T 細胞の分離は、培養 5~7 日目に磁気ビーズを用いて行った。

ヒト化マウスに EBV を接種後 real-time PCR により感染を確認してから、体重 (kg) あたり約 5.0×10^6 cells の活性化臍帯血 T 細胞を、1 回或いは 2 週間隔で 2 回、尾静脈から投与した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移

植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化されるため、個人情報の保護は徹底されている。探索的臨床研究における治療に際しては、十分な説明を行った上で同意を得た。今後施設共同臨床研究を行う際には、各種臨床研究指針に則り、全施設での倫理審査委員会の承認を得た後研究を開始する。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 骨髄ストローマ細胞の機能に対する放射線照射の影響の解析

10 および 20 Gy の照射では、HESS-5 細胞の造血幹細胞増殖維持能に変化は認められなかった。一方、この細胞の造血幹細胞維持関連遺伝子発現に関しては、照射により SDF-1 と Jag-1 発現の低下が認められた。SDF-1 に関しては培養上清中に含まれる量も低下した。これに一致して HESS-5 培養上清による臍帯血単核細胞の遊走も低下した。SDF-1 を培養上清に添加すると遊走は改善された (図 1)。

臍帯血移植では骨髄ストローマ細胞が移植されない。一方で放射線照射や抗がん剤などによる移植前処置のためレシピエントの骨髄は障害を受けていると考えられ、これが臍帯血移植後に生着不全が多いことの原因の一つとして想定されている。今回の結果から、照射によるストローマ細胞からの SDF-1 発現低下が CD34+細胞の骨髄への遊走の阻害につながり、生着不全の原因の一つとなることが示唆された。このことから SDF-1 を発現する細胞を臍帯血細胞とともに移植することにより生着不全を回避できる可能性が示された。

2. 臍帯血移植および非血縁者間骨髄移植後中後期におけるウイルス感染症の検討

移植後 50 日以降 5 年までに 114 例でウイルス感染症を発症し、5 年累積発症率は 52%、

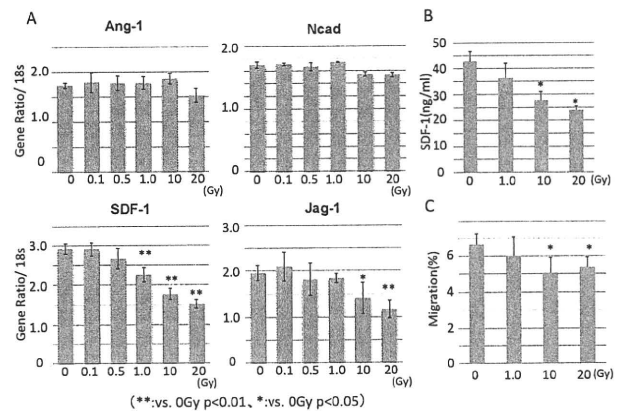


図 1. 放射線照射 48 時間後の HESS-5 における mRNA・蛋白発現及び細胞遊走能。定量的 RT-PCR 法(A)、培養上清中濃度(B)、細胞遊走能(C)を示す。

発症までの期間の中央値は 146 日で、発症率は CBT 群で有意に高かった(P=0.018)。計 152 エピソード中 VZV 感染症が最も多く、また VZV 感染症の発症率のみが CBT 群で有意に高かった(P=0.021)。両群共に重篤な GVHD の合併又は高用量ステロイドの使用が危険因子であった。uBMT 群でのみウイルス感染症による全生存への影響が認められたが(P=0.032)、ウイルス感染症関連死亡率は両群で差がなかった(P=0.47)。以上より、移植後中後期のウイルス感染症の発症率は CBT 群で高いが、致死的状态へ進展の可能性は両群でほぼ同等であり、移植ソースにかかわらず重篤な GVHD 合併例や高用量ステロイド使用例で綿密なモニター及び十分な予防対策が必要と考えられた。

3. 安全性を重視した臍帯血 T 細胞活性化培養法の改良

1) 細胞洗浄液及び希釈液の改良

RPMI-1640 培養液の代わりに生理食塩水(1%アルブミン添加)を用いて臍帯血の希釈や細胞の洗浄を行った場合も、質的・量的に同レベルの活性化 T 細胞を得ることができた。

2) ヒト血清から牛胎児血清への変更

3 ロットの臍帯血を用いて、ヒト血清と牛胎児血清を比較したところ、後者でも前者と変わらない細胞増殖が認められ、得られた細胞の表面マーカー発現にも違いが認められなかった(図 2)。また牛胎児血清を用いて培養しても T 細胞抗原受容体のレパトワ発現に偏りは認められなかった。

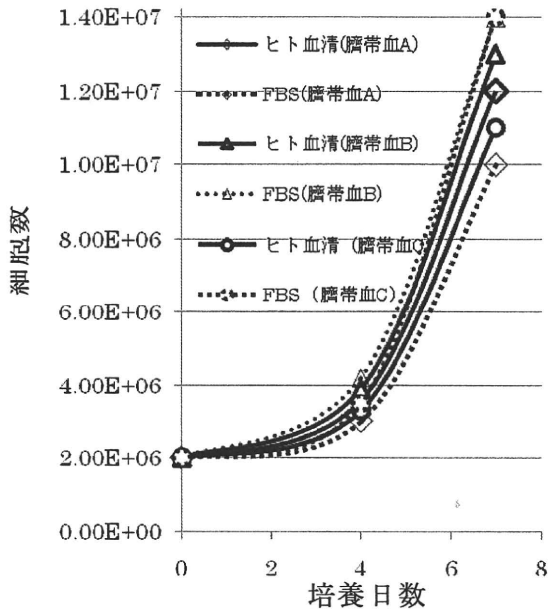


図 2. ヒト血清、FBS 添加培養液での細胞増殖曲線。ヒト血清、FBS ともに T 細胞の増殖は良好で、添加血清による差は認められない

3) 細胞凍結保存法の改良

RPMI-1640 培養液、生理食塩水 (1%アルブミン添加)、或いは HES と CP-1 (20%アルブミン添加)、の 1 対 1 混合物を用いて細胞の凍結保存を行ったところ、全ての場合で同等の良好な結果が得られた。

4. 市販の無血清培養液による活性化臍帯血 T 細胞の調製

無血清培養の結果、KBM540, ALyS705 による培養では一過性の増殖が認められるが、早い段階で増殖が停止すること、AIM-5 では全く増殖しないこと、SKY-2, ALyS505, OpTimizer を使用した培養では良好な増殖が得られる事が示された (図 3)。これらの培養液を用いて得られた細胞の表面マーカー発現を解析しところ、OpTimezer, KBM540, Sky-2 を使用して得られた細胞はほとんど CD3 陽性の T リンパ球だったが、ALyS505 を使用して得られた細胞のうち CD3 陽性の T リンパ球は 6%程度であり、残りの約 94%は CD3 陰性細胞であった (図 4)。

5. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現の解析

マルチカラーフローサイトメトリーを用いることにより、T 細胞機能制御にかかわる転写因子やサイトカインの発現解析、T 細胞サ

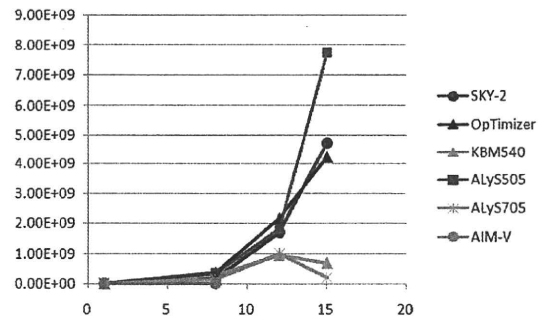


図 3. 6 種類の市販の無血清培養液による臍帯血 T 細胞の増殖曲線。

無血清培地	CD3+DR+	CD3+DR-	CD3-DR+	CD3-DR-
OpTimizer	10.1	89.6	0.2	0.1
SKY-2	5.5	94.2	0.2	0.1
ALyS-505	2.2	3.9	92.7	1.2
KBM540	3.7	95.1	0.5	0.7

図 4. 4 種類の無血清培地で調製した臍帯血細胞の表面マーカー発現。

ブセットの同定を、同時にかつ詳細に解析することが可能であることが示された。しかし、カラー数が増える程、蛍光補正が複雑になり、測定条件の設定が難しくなるため、抗体の標識蛍光の選択が非常に重要であると考えられた。

6. 臍帯血 Treg 細胞の体外増幅法の改良

既に CD4⁺細胞から固相化抗 CD3/CD28 抗体および TGF- β を用いて Treg 細胞を調製する基本的培養系は完成していたが、臨床に用いるには FOXP3⁺発現のユニット差が大きいという難点があった。この点を改善するために、mTOR 阻害剤である Everolimus(EVE)と Rapamycin(RAP)の効果を検討した。その結果、RAP では濃度依存性に FOXP3 陽性率は増加するも増殖抑制が強く、増幅効率の点で臨床応用は困難と思われた。一方、EVE では増殖抑制を認めず、比較的安定した FOXP3 の発現が認められた (図 5)。得られた細胞は、in vitro で Allo-MLR による細胞増殖を抑制した。さらに誘導増幅した Treg 細胞では CD26 の発現が活性化 T 細胞に比し低下しており、最終産物の品質評価の指標として有意義と考えられた。

7. EB ウイルス感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果

同一の臍帯血に由来する CD34⁺細胞によりヒト化したマウス 4 頭を用意し、マウス①

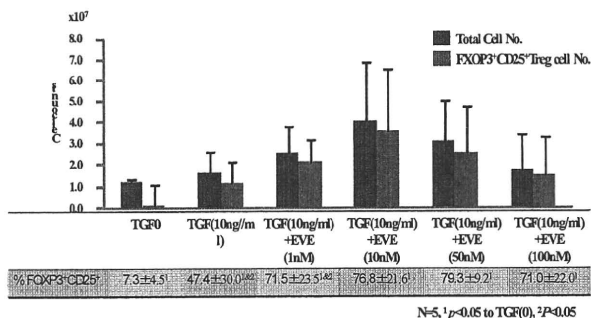


図5. mTOR 阻害剤 Everolimus による Treg 調製法の改良。固相化抗 CD3/CD28 抗体および TGF- β を用いる基本培養系に Everolimus (EVE) を添加し、全細胞数と FOXP3+CD25+ の Treg 数をカウントした。

には対照として EBV を含まない培養上清を接種し DLI を行わなかった (EBV(-)DLI(-))。マウス②には EBV (10^3 TD₅₀) を接種し T 細胞分画全体による DLI を行った (EBV(+))DLI(+)(whole T)。マウス③には EBV (10^3 TD₅₀) を接種し CD4 陽性 T 細胞分画による DLI を行った (EBV(+))DLI(+)(CD4+T)。マウス④には EBV (10^3 TD₅₀) を接種し DLI を行わなかった (EBV(+))DLI(-)。4 頭の体重変化を追跡したところ (図 6)、マウス①及び②は著大な体重の変化を示さず、60 日間の観察期間中一般状態も変化しなかった。一方マウス③及び④は EBV 感染後約 40 日から著大な体重減少を示し、一般状態が急激に悪化したため安楽死させた。マウス② (EBV 感染 60 日後に実験を打ち切り安楽死) ③及び④の剖検時に摘出した肝臓、骨髄、脾臓、腎臓、小腸における EBV DNA 量を図 7 に示す。CD4 陽性細胞のみで DLI を行ったマウスと DLI を行わなかったマウスの間には consistent な差が認められなかったが、T 細胞全体で DLI を行ったマウスではこれら全ての臓器において、明らかに EBV DNA 量が低かった (図 7)。

8. 臍帯血 DLI 第 I 相臨床試験のプロトコールの策定

今回の臨床試験は第 I 相試験として行い、有害事象の検討を主体とし、CD4 細胞に分けずに全 T 細胞として投与すること、凍結細胞を用意して有事に投与することなどをプロトコール委員会による協議で決定し、詳細のプロトコールを策定した。培養に用いる抗 CD3 抗体についての問題や、施設間搬送の問題は解決したが、培養時の問題として、血清の問題が残っている。現時点で保有する血清や、

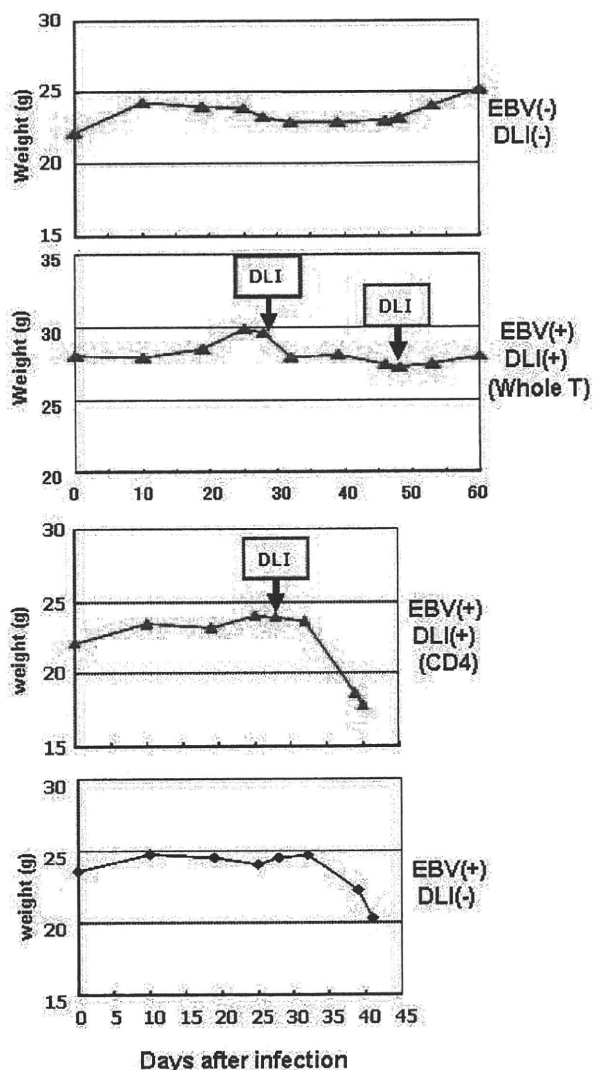


図 6. 臍帯血 DLI を受けた EBV 感染モデルマウスの体重の変化。

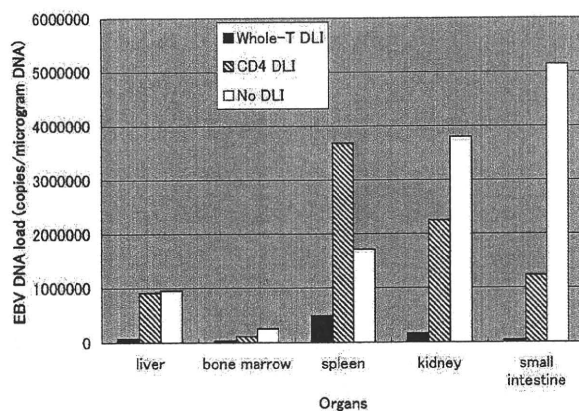


図 7. EBV 感染モデルマウスの各臓器における EBV DNA 量に対する臍帯血 DLI の効果

今後確保するものについて検討を行った。その結果、現時点での指針に従い、牛胎児血清