

## 免疫調整作用に基づく医薬品探索とその安全性評価技術の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所  
研究者 手島 玲子

研究要旨 食品素材等から骨免疫、粘膜免疫、神経免疫系に有効な成分の探索と評価技術開発を行った。プロポリスに破骨細胞分化抑制のあること、培養樹状細胞と培養腸管上皮細胞の機能に影響を及ぼすもの、神経変性疾患のための *in vitro* 評価法が見いだされた。

### 研究分担者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 穂山浩
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 近藤一成
- (3) 千葉大学大学院薬学研究院 戸井田敏彦
- (4) 東京大学大学院農学研究科 戸塚護
- (5) 愛知学院大学薬学部 中西守
- (6) アサヒグループホールディングス株式会社  
舛田晋
- (7) カゴメ株式会社総合研究所 相澤宏一
- (8) アピ株式会社長良センター 市原賢二
- (9) 三栄源エフ・エフ・アイ 中川誠

### A. 研究目的

近年、社会構造の高度化に伴い、食生活の欧米化が関連していると思われる食物アレルギーや炎症性腸疾患等の粘膜免疫異常疾病、過剰ストレスから起こる多発性硬化症、パーキンソン関連疾患等の神経免疫疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の骨免疫異常疾病等の現代社会に特徴的な疾病が増加傾向にあり、社会問題になりつつある。これら疾病の発症原因は、粘膜免疫系、神経免疫系、骨免疫系が複雑に関連している。本研究はそれらの疾病を予防・治療する医薬品の開発を目的とし、食品素材等から有用な成分の探索を行う。また、動物実験および細胞培養等によるそれらの有効性及び安全性を評価する技術を開発し、医薬品への開発を目指す。具体的には、食品成分中のアレルギー疾患、神経変性疾患、炎症性腸疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の予防・治療を対象とした有用な有効性活性をもつ素材について、活性成分の探索並びにその機構の解明を行い、併せて有効成分の安全性

評価技術の開発を検討する。

本研究班の構成は、レギュラトリーサイエンスとしての食品、医薬品にかかる問題をよく知る国立研究機関の研究者(手島、穂山、近藤)と、品質が高い食品素材の供給ができる食品関連企業の研究者(舛田、相澤、市原、中川)と、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者(戸井田、戸塚、中西)からなり、共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざしている。

### B. 研究方法

#### [1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

(i) 試料: アピ株式会社にて調製したブラジル産グリーン及び赤プロポリス抽出物及びその分画成分を用いた。動物の混餌資料の作成法は以下のとおりである。

プロポリスのエタノール抽出液(固形分55.08%)とCRF-1粉末飼料を直接混合し(エタノール抽出液中の固形分重量:CRF-1重量=1:6)、均一化した。室温で一夜風乾した後、さらに50℃で3時間乾燥させた。この混合粉末にCRF-1粉末飼料を加えて攪拌・均一化し、プロポリスエタノール抽出物(固形分)の最終濃度が1%、2%のプロポリス混餌を調製した。

(ii) 活性の測定法: a) 抗アレルギー活性 -- ラット培養マスト(RBL-2H3)細胞からの脱顆粒はβ-hexosaminidaseの放出を指標とし、プロポリス成分共存による上記マスト細胞活性化への影響を評価した。

b) 骨免疫系への影響

In vivoでの骨代謝系への影響として、RANKL

### 投与骨粗鬆症モデルマウスを用いた、骨密度低下後の回復に対する影響

C57BL/6 マウス(雌性、7 週齢)を 2 匹×2 群、6 匹×8 群の計 52 匹用意し、表 1 のように群分けした。①群は試験前骨密度測定群として血清及び大腿骨を採取した。②群には破骨細胞分化誘導サイトカインである RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand、オリエンタル酵母工業(株)社製)を 1 mg/kg にて 24 時間ごとに 3 回腹腔内投与し、骨密度の低下を誘導した(RANKL 投与骨粗鬆症モデルマウス)後、血清及び大腿骨を採取した。③-⑧群については、RANKL を投与した後、2 週間あるいは 4 週間、プロポリス混餌あるいは CRF-1 飼料を自由摂取させた。⑨及び⑩群は RANKL を投与しないコントロール群とし、CRF-1 を摂取させた。全てのマウスについて試験期間終了後に血清及び大腿骨を採取した。大腿骨はエタノール固定した後 pQCT (peripheral Quantitative Computed Tomography: 末梢骨用定量的 CT)法による骨密度測定を行った。血清については、カルシウム濃度、及び骨芽細胞分化マーカーである ALP 濃度の測定(日立自動分析装置 7180 を使用)、破骨細胞分化マーカーである TRAP の濃度測定(Mouse TRAP Assay, Immunodiagnostic Systems 社製を使用)、骨形成マーカーであるオステオカルシンの濃度測定(Mouse Osteocalcin EIA Kit, Biomedical Technologies 社製を使用)を行った。

### III 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

(i) 試料: リンゴのポリフェノールであるリンゴ縮合型タンニン (ACT) については、アサヒビール株式会社より調製されたものを用い、多糖類として、グアーガム由来ガラクトマンナン (GUA) は三栄源より調整されたものを用い、その他、多糖類のコンドロイチン硫酸 (CS)、アルギン酸ナトリウム、フコイダンも使用した。また、上皮細胞への影響を調べる目的では、ジペプチドであるカルノシン(N- $\beta$ -Ala-L-His)を用いた。

(ii) 活性の測定法: a) 樹状細胞へ分化させた THP-1 細胞への影響 -- ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/ml) および interleukin-4 (IL-4, 20 ng/ml) を添加し 4 日間培養することによって、THP-1 由来樹状細胞 (TDDCs) への分化誘導を行った。形態変化およびフローサイトメ

トリーを用いた細胞表面抗原解析(樹状細胞の特異マーカー: CD11c, DC-SIGN)によって確認した。得られた TDDCs に対して、鶏卵の主要アレルゲン Ovalbumin (OVA) またはソバの主要アレルゲン Fag e1 を用いて 3 日間抗原刺激を行った。抗原提示能の指標として、抗原提示分子 MHC クラス II の構成分子である HLA-DR および共刺激分子である CD86 分子の発現量の変化を測定した。被検試料にはリンゴポリフェノール (AP)、および AP をプロシアニジンの重合度ごとに HPLC で分画した 1~9 量体画分を使用した。

OVA の取り込み能は、FITC 標識 OVA を添加して 30 分間培養した後、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。MARCH1, 2, 8 遺伝子の発現解析は、リアルタイム PCR 法により mRNA レベルを半定量した。内在性コントロール遺伝子として  $\beta$ -actin を使用した。TDDCs のサイトカイン産生量は、培養上清を用いてバイオラッド社製 ELISA キットにより測定した。

自己免疫性関節炎モデル動物である DBA1/J マウスに ACT 及び GUA を経口摂取させ、関節炎スコアと関節炎発症率の評価、および脾臓細胞の *in vitro* 再感作により産生する各種サイトカイン発現量をリアルタイム PCR 及び ELISA で測定した。

### b) マウス小腸由来上皮細胞株への影響 --

マウス小腸由来上皮細胞株 MoS13 の培養には 10% ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用い、60 mm ディッシュを用いて、37°C、10% CO<sub>2</sub> を含むインキュベーター内で行った。2~3 日間培養し、細胞がコンフルエントに達しただい継代操作を行った。また、実験に使用する際には、MoS13 細胞を  $4 \times 10^4$  個/ml になるように希釈し、各 well に 1 ml (24 well プレート) あるいは 0.5 ml (48well プレート) ずつ播種し、24 時間後に使用した。

カルノシンが MoS13 細胞のサイトカイン産生に与える影響を解析するため、MoS13 細胞をカルノシンとともに 24 時間培養した後、TLR の各種リガンドを添加してさらに 24 時間培養し、培養上清中のサイトカイン産生量 (IL-6 産生量) を ELISA 法により調べた。TLR リガンドとして、TLR1/2 の合成リガンドである Pam3CSK4、TLR3 のリガンドである Poly (I:C)、TLR4 のリガンドであるリポ多糖 (LPS) を用いた。また、上記のような培養を行った細胞から RNA 抽出を行い、これを鋳型として cDNA を合

成した後、定量的 PCR 法を用いて、サイトカインの mRNA 発現量を調べた。

マウス IL-6 プロモーター下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を結合したプラスミドを作製し、リポフェクション法により MoS13 細胞に導入した。この細胞にカルノシンを添加して 24 時間培養した後、Pam3CSK4 を加えてさらに 5 時間培養し、発現したルシフェラーゼの活性を測定した。

### 【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

(i) 試料：カロテノイド類として $\beta$ -カロテン、リコペンを用いた。ロイヤルゼリー由来の中鎖脂肪酸として、10-hydroxy-2-decanoic acid, 10-hydroxy decanoic acid, 2-decanoic acid, decanoic acid を用いた。培地中での溶解性が極めて悪いカロテノイド類はあらかじめ大豆由来のフォスファチジルコリン (soybean PC) を用いてリポソームとする方法を検討した。また、化合物として、食品素材の他に 160 合成化合物を用いた。

(ii) 細胞、試薬、遺伝子導入用プラスミド

培養神経細胞として、ラット副腎髄質由来 PC12HS 細胞、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を通常の培養条件で増殖させ、必要に応じて NGF、レチノイン酸 RA で分化誘導して実験に用いた。また、オリゴデンドロサイト細胞として、FBD-102b 細胞を用いた。タンパク発現用プラスミドとして、EGFP- $\alpha$ -syn cDNA,  $\alpha$ -syn,  $\alpha$ -syn-A53T は Dr. Sang Myun Park (Ajou University School of Medicine, Korea) より供与頂いた。Htt- $\Delta$ N 7-Q23, Htt- $\Delta$ N 7-Q74 は David Rubinsztein (Univ. Cambridge) より、Htt-exon1-Q16, Htt-exon1-Q60, Htt-exon1-Q150 は Tanaka Motomasa (RIKEN Brain Science Institute) より、Htt-171-Q17, Htt-171-Q138, Htt-171-Q142 S13AS16A は Ray Trunt (McMaster Univ.) より、EYFP-Tau は Mark Diamond (Washington Univ.) より供与頂いた。

(iii) 神経分化誘導

SH-SY5Y および PC12 細胞は、10% FBS 存在下 DMEM/F-12 または 10% 馬血清+5% FBS 存在下 DMEM 培養した。また、分化は SH-SY5Y 細胞は 2.5% FBS+レチノイン酸 (RA, 10 $\mu$ M) で、PC12 は 0.5% FBS+NGF (50 ng/ml) の条件で 3-7 日誘導した。オリゴデンドロサイト前駆細胞である FBD-102b 細胞は、0.5% FCS 条件下でリジンコートディッシュ上で培養することにより成熟細胞

へ分化させた。

(iii) トランスフェクション (遺伝子導入)

SH-SY5Y (1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/cuvette) は、エレクトロポレーション法 (amaxa) により、PC12 (1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well) は、リポフェクション法 (lipofectamin 2000) によりプロトコールに従って行った。

iv)  $\alpha$ -syn, Htt タンパクの発現、局在の解析  
EGFP- $\alpha$ -syn や Htt-GFP の凝集や局在は蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) を用いて解析した。必要に応じてミトコンドリア標識に TOM20 抗体を用いた。Cell viability は WST-8 法により測定した。で解析した。

(v) 安定細胞株の作成

Tet-off advanced システムを用いて PC12 の安定細胞株を作成した。

vi) 組換えタンパク質の調製

$\alpha$ -syn をコードする配列を、 $\alpha$ -syn-F(Nc) (5'-CCATGGATGTATTCATGAAAGGAC-3', NcoI 切断サイトを下線、開始コドン<sup>を斜字体で示す</sup>) および  $\alpha$ -syn-R(Xh) (5'-CTCGAGTTAGGCTTCAGGTTTCGTAGT C-3', XhoI 切断サイトを下線、終始コドン<sup>を斜字体で示す</sup>) をプライマーとして用い、PCR にて増幅した。増幅産物は Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing (invitrogen) を用いてサブクローニングし、PCR エラーの有無の確認を行った。得られたプラスミドから目的配列断片を NcoI と XhoI を用いて切断し、同制限酵素で処理したベクター pET-41a(+) とライゲートさせ、発現プラスミド pET- $\alpha$ -syn を得た。pET- $\alpha$ -syn を用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、50  $\mu$ g/mL カナマイシンを含む LB 培地で培養し、IPTG で誘導後、菌を溶解し、HisTrapHP カラム、GSTrapHP カラムで精製し、enterokinase で GST を切断し、再度 HisTrapHP カラムを用いて精製した。

## C. 研究結果及び考察

### 【1】プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

(i) 抗アレルギー作用

今年度は、ブラジル産赤プロポリスエタノール抽出物及び、逆相クロマトグラフィーでの分画後の画分につき、抗アレルギー活性の測定を行った。細胞活性の指標には、抗原暴露に伴いマスト細胞からヒスタミンと同様に脱顆粒により放出される  $\beta$ -hexosaminidase の放出量を用いた。プロポリス抽出物の前処理時間は、0.5

時間に設定した。

ブラジル産赤プロポリス分画物の抗アレルギー活性評価を行ったところ、Fr. A1-b および Fr. A3 に 30 $\mu$ g/ml の Fr. A1-b をさらに6つの画分に分画し、脱顆粒抑制活性を検討したところ、主成分である Fr. A1b-6 において、3 $\mu$ g/ml の濃度から脱顆粒抑制活性がみられ、30 $\mu$ g/ml では脱顆粒がほとんど抑制された。もう1つの主成分である Fr. A1b-4 にも 30 $\mu$ g/ml で脱顆粒抑制活性が確認された。Fr. A1b-4 と Fr. A1b-6 に含まれる主成分はそれぞれ、medicarpin および 7-O-methylvestitol のイソフラバンであることがアピ株式会社にて同定された。なお、精製 medicarpin の市販品および、アピ株式会社にて精製された 7-O-methylvestitol を用いた抗アレルギー活性評価では、30 $\mu$ g/ml で 50%程度の脱顆粒抑制作用がみられた。

Fr. A3 についても、さらに8画分に分画して抗アレルギー活性評価を行ったところ、Fr. A3-d, e, f に 30  $\mu$ g/ml で抑制作用がみられ、この画分の主成分は vestitol と同定された。

#### (ii) 骨免疫系への影響

--骨粗鬆症モデルマウスの骨密度低下後の回復に対するプロポリスの影響

表1に示すようにマウスを群分けし、実験を行った。①群は実験開始時の骨密度を測定する群、②群は RANKL 投与後の骨密度減少を確認する群である。③-⑥群は2週間混餌摂取に関するグループで、③、④、⑤群はそれぞれ RANKL 投与後に通常の CRF-1C 飼料、プロポリス 1% 混餌、プロポリス 2% 混餌を摂取する群である。また、⑥群は RANKL を投与しない正常コントロール群である。⑦-⑩群は4週間混餌摂取に関するグループで、⑦、⑧、⑨群はそれぞれ RANKL 投与後に通常の CRF-1 飼料、プロポリス 1% 混餌、プロポリス 2% 混餌を摂取する群である。また、⑩群は RANKL を投与しない正常コントロール群である。

大腿骨骨幹部の皮質骨密度、骨幹部部の海綿骨密度、及び血中のカルシウム濃度の測定結果から、①、⑥、⑩群を比較すると、徐々に皮質骨密度が増大していることが分かるが、これは成長・骨の成熟に伴う正常な増大である。また①、②群間の比較から、RANKL 投与により皮質骨密度に大きな変化はないことが示された。一方、海綿骨密度に関しては、①②群の比較から、RANKL 投与により海綿骨密度が約 16%減少したことが示された。また、①、⑥、⑩群の

比較より、成長・骨の成熟に伴う海綿骨密度の減少が見られた。②、③、⑦群の比較から、RANKL 投与により減少した海綿骨密度が徐々に回復していることが示された（コントロールに対する相対値はそれぞれ約 84%、88%、93%）。この時、③群と④群、⑦群と⑧群の比較から、プロポリス 1% 混餌摂取により骨密度回復が促進される傾向が見られた。また、⑦群と⑨群間には有意差があり、プロポリス 2% 混餌を4週間摂取することにより骨密度回復が促進されたことが示され、かつ、⑨/⑩値が 100% を上回り 114% となっていることから、正常コントロールマウスよりも骨密度が高くなっていることが示された。血中カルシウム濃度に関しては、①、⑥、⑩群の比較より、成長に伴って徐々に低下していることが示され、①②群間、③-⑥群間、⑦-⑩群間の比較、及び③-⑤群間、⑦-⑨群間の比較より、RANKL 投与により血中カルシウム濃度が若干増大すること、及びこの増大は4週間後まで維持されていること、プロポリス摂取は血中カルシウム濃度に影響しないことが示された。

図1には血中のアルカリフォスファターゼ（骨芽細胞の分化マーカー）、TRAP（破骨細胞分化マーカー）、オステオカルシン（骨形成マーカー）の濃度測定結果を示す。図1Aの①、⑥、⑩群の比較から成長に伴い血中 ALP 濃度が減少することが示された。また、図1A, Bの③-⑥群ではプロポリス投与により血中 ALP 濃度の低下が見られ、⑦-⑩群においても同様の傾向が見られた。図1Cから、RANKL 投与による血中 TRAP 濃度の増大が見られた。図1C, Dの③-⑥群、⑦-⑩群の結果から、プロポリス摂取により血中 TRAP 濃度が増大することが示された。図1Eの①、⑥、⑩群の比較から成長に伴い血中オステオカルシン濃度が減少することが示された。また、図1E, Fの③-⑥群、⑦-⑩群の結果から、プロポリス摂取により血中オステオカルシン濃度が低下する傾向が見られた。

#### [II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

a) 樹状細胞へ分化後の THP-1 細胞への影響  
THP-1 細胞は 20 ng/ml PMA および 20 ng/ml IL-4 を添加し培養することで培養フラスコに接着し、樹状細胞様の形態を示した。また、樹状細胞様の表現型 (CD11c+, DC-SIGN+) が発現誘導することがフローサイトメトリーによって確認した。

得られた TDDCs を OVA および Fag e 1 で刺激することによって HLA-DR および CD86 の発現量が上昇した。このとき、OVA とともに AP を添加して培養したところ、TDDCs 上の HLA-DR の発現量が顕著に抑制された。一方、CD86 の発現には影響を及ぼさなかった。さらに、AP をプロシアニジンの重合度ごとに分画した 1~9 画分を用いて抗原提示抑制能を評価したところ、いずれの画分においても HLA-DR の発現抑制が認められた。このとき、1, 3, 5, 6, 8, 9 量体において有意な抑制効果が示された。一方、CD86 の発現にはいずれの画分においても変化は認められなかった。AP の抗原提示抑制能の作用機序として、抗原である OVA の取り込み自体が抑制される可能性について検討した。FITC 標識した OVA を用いて取り込み能を測定したところ、AP 添加に関わらず細胞内の蛍光強度に変化はなかった。このことから、AP は OVA の取り込み能に影響を及ぼさず、AP 添加時も OVA は TDDCs によって取り込まれていることが明らかとなった。そこで次に、HLA-DR がユビキチン化により分解を受けている可能性について検討した。その結果、ユビキチンリガーゼ MARCH1 の発現上昇が AP 添加によって誘導されることが示された。このとき、MARCH2, MARCH8 の発現には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、リンゴポリフェノールの抗原提示抑制作用にはユビキチン化酵素の活性化が深く関与することが示された。樹状細胞はサイトカインを産生することにより、ナイーブ Th 細胞を Th1 や Th2 細胞へ分化させることが知られている。そこで、OVA 刺激下で AP および AP 画分を添加した際の TDDCs によるサイトカイン産生能を検討した。その結果、IL-12 および TNF- $\gamma$  の産生増加、IL-10 の産生減少が示された。一方、IL-1 $\beta$  については、影響を及ぼさなかった。以上の結果は、AP の 3 量体画分において顕著な結果が示された。以上の結果から、リンゴポリフェノールが Th1/Th2 バランス改善において優れた免疫調節作用を有することが示唆された。

また、動物モデルでは、コラーゲン誘発性自己免疫性関節炎モデルである DBA1/J マウスにおいて、ACT の経口摂取が、コラーゲン誘発性関節炎の発症を遅延させる可能性が示唆され、脾臓の *in vitro* 再刺激で、IL-17 発現量の顕著な抑制が観察された。

#### b) マウス小腸由来上皮細胞株への影響

カルノシンは 50 mM の濃度までは MoS13 細

胞に対する細胞毒性が認められなかったが、100 mM では放出 LDH の割合が増加したことから、何らかの細胞毒性があることが示された。次に、カルノシンが TLR リガンド刺激を受けた MoS13 細胞の IL-6 産生に与える影響を調べた。MoS13 細胞を TLR1/2 リガンドである Pam3CSK4 および TLR3 リガンドである Poly(I:C) で刺激した場合に、IL-6 の産生が認められた。一方、TLR4 リガンドである LPS で刺激した際には IL-6 の産生誘導は認められなかった。50 mM のカルノシンとともに 24 時間培養した後、同様の TLR 刺激を加えた場合、いずれの刺激の場合にも IL-6 産生量の増加が認められた。特に Pam3CSK4 および Poly(I:C) による刺激で誘導された IL-6 産生に対する増強効果は顕著であった。一方、TLR 刺激を加えていない場合にはカルノシンを添加しても IL-6 産生は検出されなかった。TLR 刺激共存時のカルノシンの IL-6 産生増強効果は、mRNA 発現のレベルでも確認された。さらに、Pam3CSK4 で刺激した場合には、カルノシンの添加濃度依存的に IL-6 プロモーター活性の増強が認められた。

#### 【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

まず、最初に PC12, SH-SY5Y, FBD-102b 細胞を用いて、一過性に変異型 Htt を過剰発現させて、細胞内での凝集性、細胞に与える影響を比較検討した。

変異型 Htt 発現には、N 末 7 残基を欠く eGFP- $\Delta$ N 7-Q23, eGFP- $\Delta$ N 7-Q74, exon1 をコードする Htt-exon1-Q16-eGFP, Htt-exon1-Q60-eGFP, Htt-exon1-Q150-eGFP、および N 末 171 アミノ酸をコードする Htt-171-Q17-eGFP, Htt-171-Q138-eGFP を用いた。

エレクトロポレーション法により細胞に過剰発現させ、48 時間後に観察したところ凝集体を形成した細胞が見られた。細胞により凝集性には大きな差が見られた。SH-SY5Y や FBD-102b 細胞では、Q60 で凝集形成が明確ではない。また、SH-SY5Y 細胞では、eGFP- $\Delta$ N 7-Q74 で他の細胞に見られた顕著な核内凝集体が見られなかった。さらに 5 日間以上の培養においても変わらなかった。以上の結果から、PC12HS 細胞が最もグルタミンリピート数に応じた凝集形成を細胞質および一部核内に認められたことから、この細胞を用いて評価系に用いる安定細胞株を作成することにした (図 2)。PC12HS 細胞に、tet-off system を構築するために最初に

Tet-off advanced ベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイを繰り返し用いて選抜し、Tet-off

advanced PC12HS 細胞を構築した。今後は、これに、 $\alpha$ -syn や Htt 変異型を導入し、凝集形成過程を制御する成分を検索するためのテトラサイクリン誘導型安定細胞株を用いた評価系を構築する予定である。

一方、凝集体の分解促進を誘導する成分を検索するために、一過性発現系を用いた評価系を用いて有効成分の検索を行った。凝集体形成には Htt-exon1-Q150-eGFP を PC12HS 細胞に、化合物と同時に導入し、凝集体の減少が見られるかを 160 合成化合物を用いて予備スクリーニングを行い、明らかに効果が見られないものを除いた 65 化合物について詳しく検討した。顕微鏡観察より少しでも効果があると考えられる 36 化合物について細胞毒性試験 WST-8 アッセイを行い、cell viability を比較検討したところ、1 化合物だけが有意な差が認められた(図 3)。今後さらに、 $\alpha$ -syn 凝集体分解についても検討する予定である。

また、細胞内での内在性 $\alpha$ -syn 凝集体誘導を行うために用いる $\alpha$ -syn 野生型リコンビナントタンパク質を発現、精製を行った。最終的に大腸菌培養液 1 L あたり 5 mg の精製 $\alpha$ -syn タンパク質が得られた。リコンビナント $\alpha$ -syn は、試験管内で凝集誘導過程の解析、安定化因子の検索等の実験にも用いる予定であり、今後、この in vitro 培養系で生成する凝集体形成を抑制または分解を誘導するような成分の検索も行う。

## E. 結論

### [1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

赤プロポリス抽出液の、イソフラバンである Medicarpin および 7-O-methylvestitol が含まれる画分が脱顆粒抑制活性をもつことが明らかとなった。

骨芽細胞に関しては、22 年度の動物試験における、RANKL 投与による骨粗鬆症モデルマウス系においてプロポリス混餌を予め摂取させることにより骨密度低下が抑制されるという結果について、骨吸収マーカーである CTX-I の血中濃度を測定することにより検証した。その結果、RANKL 投与によって誘導される血中 CTX-I 濃度の増大が、プロポリス混餌の摂取により阻害されるという結果が得られ、プロポリスが破骨

細胞による骨吸収を抑制することが示された。23 年度は、RANKL 投与により骨密度を低下させたマウスを用いて、骨密度回復期にプロポリス混餌を摂取させ、その影響を検討する動物試験を実施した。その結果、プロポリス混餌の摂取により、骨密度回復が顕著に促進されること、その効果は骨粗鬆症治療薬である SERM や PTH に匹敵するものであることが示された。

### [II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

THP-1 由来樹状細胞を用いた in vitro 評価系を確立し、これを用いて抗原提示抑制物質の探索が可能となった。リンゴポリフェノールの抗原提示作用は、ユビキチン化リガーゼの活性化が関与していることが示された。

マウス小腸上皮細胞株 MoS13 細胞を用いて、カルノシンは TLR1/2 リガンドである Pam3CSK4 刺激を受けた MoS13 細胞の培養上清中に IgA 産生を促進する因子の存在が認められた。

その他、天然由来ウロン酸含有多糖類に含まれるウロン酸(酸性糖)の蛍光ポストカラム HPLC 法を用いる分離定量法を新たに開発し、天然物由来ウロン酸含有多糖類、すなわち植物由来ペクチン、海藻由来アルギン酸、動物由来グリコサミノグリカンに含まれるウロン酸の分析に応用し、確立した方法が再現性の高い、高感度定量法であることが明らかになった。

### [III] 神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

神経変性疾患の病理学的特徴である凝集体形成を in vitro 培養系で再現するアッセイ系について検討した。昨年は、パーキンソン病関連分子で Lewy 小体中のシヌクレイン(syn)凝集体形成が SH-SY5Y 細胞中で LRRK2 存在下では促進されること、またシヌクレインタンパクの発現細胞から非発現細胞への移動を促進することが明らかにできた。今年度は、syn タンパク質の大腸菌での発現、精製を行うとともに、同じ、凝集体形成を伴うハンチントン病の原因物質とされている変異型 Htt の一過性発現系を用いた評価法を検討し、凝集体を制御する in vitro 評価系について検討した結果、合成化合物から、変異型 Htt を分解促進する化合物の一つを見出した。このような in vitro 評価系は、今後さらに、凝集体形成を抑制する成分の検索も行うことで、

疾患の予防や治療に結びつく可能性があり有用であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) A. Nakamura, R. Adachi, S. Ohta, K. Ichihara, S. Mishima, R. Teshima: Effect of propolis components in propolis on differentiation of osteoblastic cell, submitted
- 2) K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima:  $\alpha$ -Synuclein transmission is enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Pharm. Bull.* **34**, 1078-1084 (2011)
- 3) Furuno, T., Nakanishi, M.: Analysis of neuro-immune interactions by an in vitro co-culture approach. In "Neuropeptide: Methods and Protocol" (Ed. Walker, J.) in "Methods in Molecular Biology" vol 789, Springer, p171-180 (2011)
- 4) Hagiwara M., Furuno T., Hosokawa Y., Lino T., Ito T., Inoue T., Nakanishi M., Murakami Y., Ito A.: Enhanced nerve-mast cell interaction by a neuronal short isoform of adhesion molecule-1, CADM1. *J. Immunol.*, **186**, 5983-5992 (2011)
- 5) Inoh Y., Furuno T., Hirashima N., Kitamoto D., Nakanishi M.: Rapid delivery of small interfering RNA by biosurfactant MEL-A-containing liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 635-640 (2011) series, Springer, in press.
- 6) T. Iwamoto, K. Yamada, M. Shimizu, and M. Totsuka, Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**(5), 925-929 (2011)
- 7) Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M: Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**(7), 1283-1289 (2011)
- 8) Masuko S., Higashi K., Wang Z., Bhaskar U., A. M., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., "Ozonolysis of the double bond of the unsaturated uronate residue in low-molecular-weight heparin and K5 heparosan.", *Carbohydr. Res.*, **346**(13):1962-1966 (2011).
- 9) Higashi K., Ly M., Wang Z., Masuko S., Bhaskar U., Sterner E., Zhang F., Toida T.,

Dordick J. S., Linhardt R. J., "Controlled Photochemical Depolymerization of K5 Heparosan, a Bioengineered Heparin Precursor.", *Carbohydr. Polym.*, **86**(3):1365-1370 (2011).

10) Ly M., Leach F. E. 3rd, Laremore T. N., Toida T., Amster I. J., Linhardt R. J., "The proteoglycan bikunin has a defined sequence.", *Nat. Chem. Biol.*, **7**(11):827-833 (2011).

11) Higashi K., Hosoyama S., Ohno A., Masuko S., Yang B., Sterner E., Wang Z., Linhardt R. J., Toida T.: "Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin." *Carbohydr. Polym.* **87**(2):1737-1743 (2012).

### 2. 学会発表

- 1) 安達玲子、中村厚、太田象三、市原賢二、手島玲子 "プロポリスの破骨細胞分化及び骨密度低下に対する抑制効果"、日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 2) 近藤一成、小櫃冨未、手島玲子: エレオステアリン酸が誘導するネクロプトーシス第 84 回日本生化学大会合同大会 (2011, 9)
- 3) 小櫃冨未、近藤一成、手島玲子: Eleostearic acid induces necroptosis via Erk1/2 and Ripk1, which is blocked by U0126, necrostatin-1 and Ripk1 knockdown, 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011, 12)
- 4) 近藤一成、小櫃冨未、手島玲子: エレオステアリン酸による RIP1 を介したネクロプトーシス 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3)
- 5) 石川えり、片山茂、穠山浩、手島玲子、中村宗一郎、マンナン多糖修飾 ovalbumin の抗原提示能抑制効果, 日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011, 3)
- 6) 久木田卓弥、片山茂、石川えり、中島翔平、舛田晋、神田智正、穠山浩、手島玲子、中村宗一郎: 樹状細胞様 THP-1 細胞を用いた抗原提示能抑制物質の探索, 第 4 回食品薬学シンポジウム (2011, 10)
- 7) 久木田卓弥、片山茂、中島翔平、舛田晋、神田智正、穠山浩、手島玲子、中村宗一郎: リンゴ由来プロシアニジンの抗原提示抑制効果, 日本農芸化学大会, 2012 年 3 月 23 日 (京都)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許  
なし
2. 実用新案登録  
なし



表 1. 試験に用いた動物群

群	動物数	RANKL 投与	RANKL 投与後 試験期間	試験期間摂取飼料 (粉末)
①	2	なし	-	-
②	2	有り	-	-
③	6	有り	2 週間	CRF-1
④	6	有り	2 週間	プロポリス 1% 混餌
⑤	6	有り	2 週間	プロポリス 2% 混餌
⑥	6	なし	2 週間	CRF-1
⑦	6	有り	4 週間	CRF-1
⑧	6	有り	4 週間	プロポリス 1% 混餌
⑨	6	有り	4 週間	プロポリス 2% 混餌
⑩	6	なし	4 週間	CRF-1

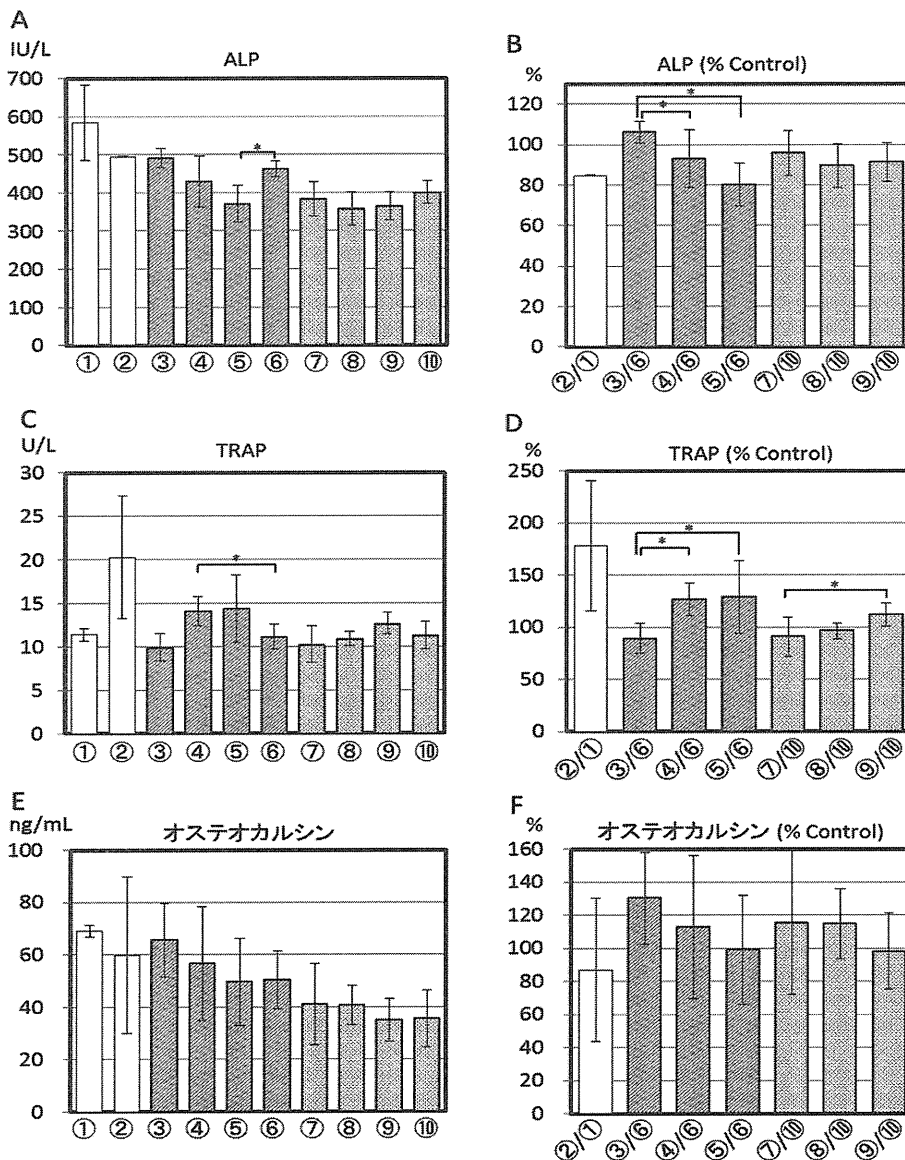


図 1 RANKL投与後にプロポリス混餌を2週間あるいは4週間摂取した骨粗鬆症モデルマウスの血中ALP, TRAP, 及びオステオカルシン濃度. ①-⑩は表1の群番号を示す. A, C, E: 全群の測定結果, B, D, F: ②, ③-⑤, ⑦-⑨群のコントロール群 (それぞれ①, ⑥, ⑩群) に対する相対値. \* $p < 0.05$  Dunnett's test.



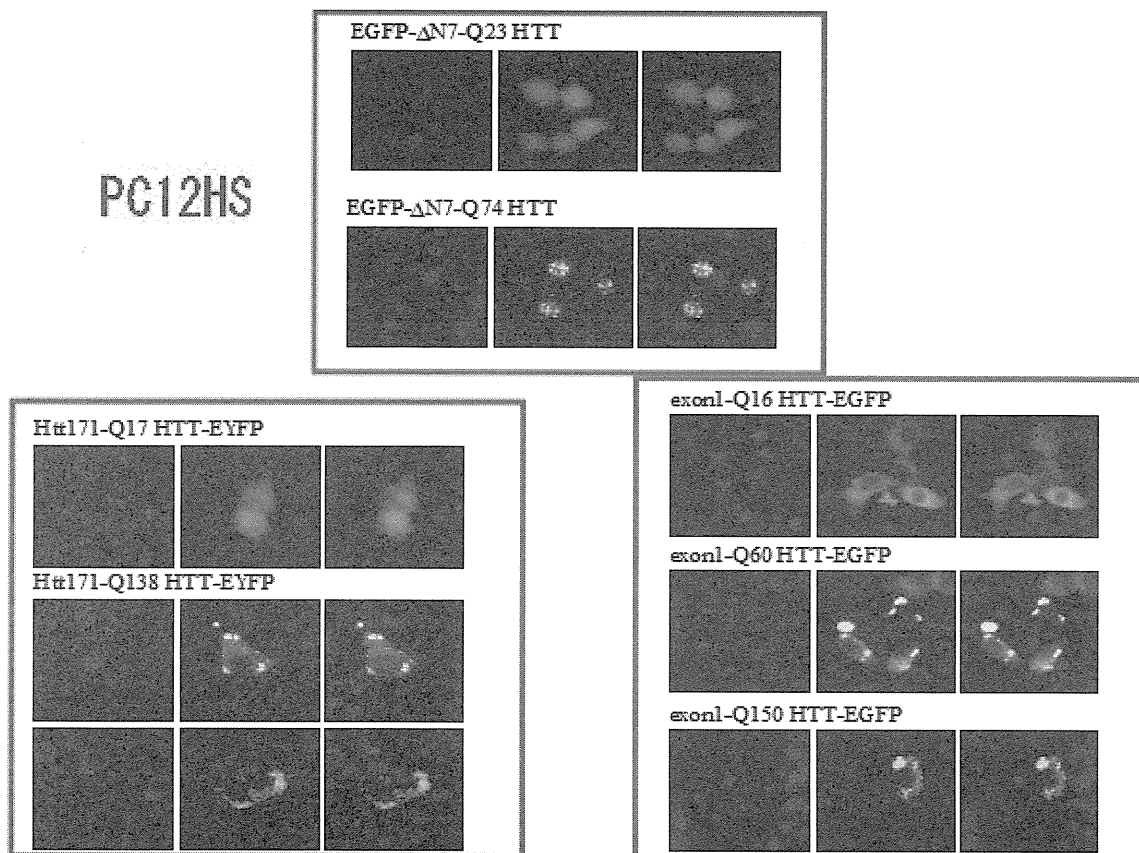
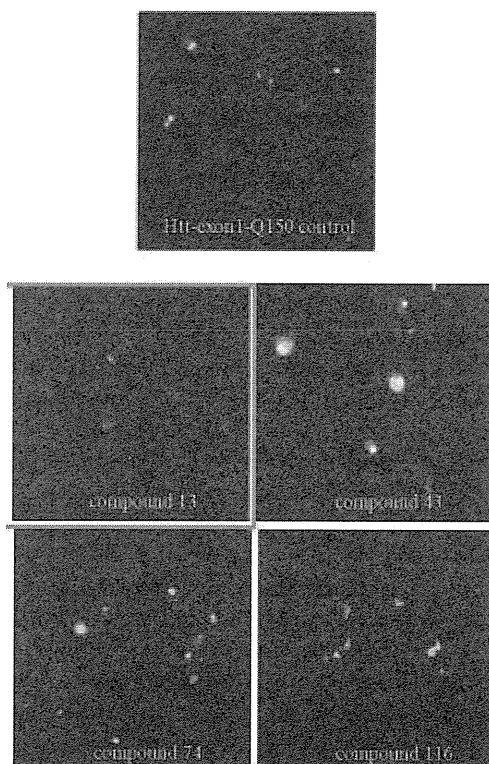


図2 PC12HS 細胞での変異型 Htt 凝集体の比較



有機化合物ライブラリーを用いたアッセイ  
160合成化合物より65化合物について、予備スクリーニング



Htt-GFP凝集の低下に効果が認められたものについて、再度試験を行い、合わせてWSTアッセイにより細胞毒性を測定した (PC12HS cells)

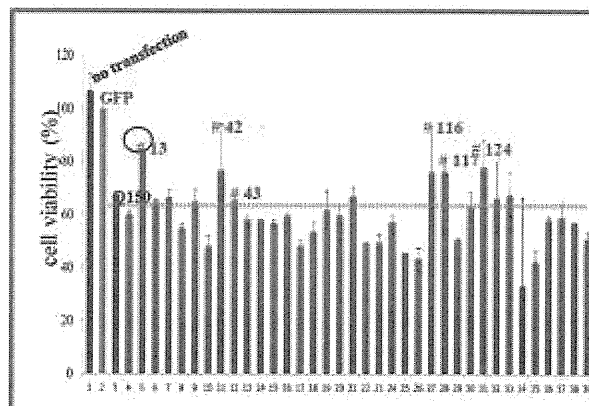


図3 合成化合物の変異型 Htt 凝集体の分解活性

## 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  
研究代表者 脇田 隆宇  
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

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することにより、免疫グロブリンによるHCV感染防御を目指した。

### 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) 東京医科歯科大学歯学総合研究科  
坂本 直哉
- (5) 株式会社疫学生物学研究所  
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。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することにより、受動免疫によるHCV感染防御を目指した。

### B. 研究方法

#### 1. リコンビナントHCV E2タンパク質の解析

膜貫通領域を欠失した分泌型のE2(384-714)の発現プラスミドを293GnTI(-)細胞、293T細胞の2種類の細胞株に遺伝子導入し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。さらに、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。さらに、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。また、ハエ由来S2細胞でE2蛋白質を同様に発現精製した。E2蛋白質による感染阻害活性およびマウスへの免疫による中和抗体誘導を検討した。

#### 2. 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、J6E2/Fc100  $\mu\text{g}/\text{head}$ 、精製HCV(HCV-core 8.4 pmol/head)を、MPL+TDM(Sigma Adjuvant System, Sigma)をアジュバント投与した。精製HCV粒子は5分間のUV照射によって不活化させた。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ップタンパク質抗体価および感染阻害活性を測定した。

#### 3. リンパ節移植SCIDマウスでの抗HCV抗体産生

ストレプトアビジンタグ化E2タンパク質とImjectAlamを等量混和した抗原溶液を、8週齢

の雌性 Balb/c マウス腹腔内に抗原量 10  $\mu$  g/head を 2 週間おきに 2 回投与した。2 回目の免疫の 2 週間後にリンパ節を採取し、得られた各リンパ節組織を 8 週齢の雌性 SCID マウスの腎皮膜下に挿入した。片腎につき 2 個、計 4 個の組織片を移植した。リンパ組織移植後、2 週間おきに 4 回、10  $\mu$  g/head の E2 タンパク質溶液を投与した。最終免疫の 4 日後に、SCID マウスより脾細胞を採取・調製し、SP2/0 細胞と融合しハイブリドーマを作製した。EIA により抗体価を、HCVpp により感染中和活性を測定した。

#### 4. 自然免疫系を不活性化した不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の作成

IRF7 に関してはそ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。また HCV タンパク質の中で RIG-I 下流の IPS1 の切断をおこない IFN $\beta$  の発現を抑制することが知られる NS3/4a タンパク質を恒常的に発現する細胞についても作成した。

#### 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

簡便な方法で患者血由来 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. ナイーブ B 細胞への HCV 感染・吸着と B 細胞単クローン増殖発症との関連

33 例の HCV キャリアから分離した PBMC を AutoMACS system を用いて 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。同様に 77 例の患者について (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 5 例については 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 を用いて (A) 形質細胞、(B) 活性化 B 細胞、(C) メモリー B 細胞、(D) ナイーブ 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。

#### 7. 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。この蛍光蛋白発現 HCV 感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plate に Huh7.5.1 細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その 2 時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5 日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。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、エンター阻害剤として抽出した。

#### 8. SPYMEG によるヒト型抗体の作成

血清中の HCV に対する中和活性の高い検体を選択し、末梢単核球と SPYMEG 細胞と融合した。抗 HCV ヒト抗体産生細胞株を得た。EIA により抗体価を、HCVpp により感染中和活性を測定した

#### 9. ファージディスプレイ法によるヒト型抗体の作成

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、抗体ファージの選択に使用した。用いた HCV-E2 タンパク質は、本邦の背景を鑑みて遺伝子型 1b に属する HCV-TH 株由来のリコンビナントタンパク質をメインに、比較として遺伝子型 2a に属する HCV-JFH1 株の E2 タンパク質も使用した。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、培養細胞で増殖が可能な JFH-HCV cell culture (HCVcc) および、1b 型の TH-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。今年度は、この scFv 抗体にヒト抗体の定常領域を付加し、完全ヒト IgG 抗体を作製した。

#### (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。

S2 細胞で発現させた精製 E2 蛋白質も高マンノース型の糖鎖付加が中心だが、約 50kDa の単一分子量を示した。この E2 蛋白質は CD81 に結合した。293 細胞で発現させた E2 蛋白質では HCVpp およ

びHCVccによるHCV感染阻害活性が見られなかったが、S2細胞由来E2蛋白質はHCVppでもHCVccでも感染阻害を示した。しかし、マウスへの免疫において抗E2抗体は誘導されるものの、感染中和抗体は誘導されなかった。また、遺伝子型1a, 1b, 2a, 2bのE2蛋白質をS2細胞で発現して、E2蛋白質によるHCV感染阻害活性を解析したが、遺伝子型に関わりなく、ほぼ同程度の感染阻害活性を認めた。

## 2. HCV粒子免疫完全ヒト抗体産生マウスによる抗HCVヒトモノクローナル抗体の作製

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。最も感染阻害活性が高かったNo. 3マウスをハイブリドーマの作製に使用した。脾細胞とミエロマ細胞の融合細胞を播種し、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。

## 3. リンパ節移植SCIDマウスでの抗HCV抗体産生

TH E2タンパク質で免疫したリンパ節を腎皮膜下に移植し、さらにTHE2タンパク質で免疫したSCIDマウスと通常のプロトコールで免疫したBalb/cマウスの血清中のTH E2タンパク質に対する抗体価をTH E2/Fcタンパク質を固相化したEIAで測定した結果、リンパ節移植SCIDマウス由来の血清の方が2.5倍強い値であった。これらのマウス脾細胞からハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマ培養上清中のTHE2タンパク質に対する抗体価を測定した結果、リンパ節移植SCIDマウス由来のほぼ全てのクローンが、強い陽性反応を示した。通常法により免疫したマウスと比較すると、その違いは顕著であった。EIAスクリーニングで特に強い値を示したwellから9クローンを単クローン化した。これらのクローンは、いずれもIgGタイプであった。通常免疫法では、IgMの割合が多かった。これは、クラススイッチと親和性の成熟がおきたリンパ節が移植されたSCIDマウスで、抗原に対して強い結合能を示す抗原特異的なIgGクラスの抗体が産生されるためと考えられる。9種類のハイブリドーマを無血清培養し、培養上清から精製した抗体およびマウス血清を用いて、HCVppの感染価を測定した。その結果、

マウス血清では、通常のプロトコールで免疫したマウスと比較して、リンパ節移植SCIDマウスにより高い感染中和活性が認められた。しかし、9種類のモノクローナル抗体は中和活性を持たなかった。

## 4. 自然免疫系を不活性化した不死化肝細胞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が、目的とする細胞は得られなかった。RNAウイルス感染の検出のためのセンサー分子であるRIG-IをRIG-I mRNAに対するshRNA発現レンチウイルスベクターを用いて抑制したHuS-E/2細胞を作成した。センダイウイルスを用いてその細胞のIFN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。さらにHCVのNS3/4aタンパク質を恒常的に発現するHuS-E/2細胞についても作成し、いくつかの細胞株を得た。上記同様にセンダイウイルスを用いてその感染に対するIFN $\beta$ 遺伝子転写プロモーターの活性化を検証したところ、この細胞では活性化が効率良く抑制されていることがわかった。

## 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

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分泌型のGaussia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。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、この系を導入した細胞に組換え体HCV JFH1を感染させ、培地中にGaussiaルシフェラーゼが産生され、培地中のルシフェラーゼ活性を測定することでJFH1の感染効率を検出できることがわかった。

## 6. ナイーブB細胞へのHCV感染・吸着とB細胞単クローン増殖発症との関連

HCV感染者のB細胞サブセットの解析からすべてのB細胞にHCV感染・吸着が確認された。特定の対応抗原の決定していないナイーブB細胞の段階で多くのHCV感染・吸着が確認され、非ナイーブB細胞を含むPBMCよりもナイーブB細胞へのHCV感染・吸着量が高値であることが示された。

末梢血中において多数を占めるナイーブ B 細胞に HCV が主に感染・吸着していることが示された。非ナイーブ B 細胞での解析では HCV 感染者にのみ IgM 及び IgG クラスの Mono-clonality が確認され、すべてのクラスに Oligo-clonality が検出された。Oligo-clonality は健常者からも検出されたがその頻度は有意に低かった。この事実より HCV 感染に伴う B 細胞単クローン増殖機序は HCV 感染に伴う B 細胞の抗アポトーシス、腫瘍化などに起因するものではなく、B 細胞の異常活性化に起因していることが示唆された。

#### 7. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着抑制分子の探索

JFH1-EYFPmut、-AsRedmut 導入後、培養上清中のコア抗原は親株 JFH1 と同等で最高値 1.35x10<sup>4</sup> fmol/l に達したが、T4290A, C7653T 変異を持たない wild type では経時的に減衰・消失した。HCV-RNA 導入細胞、上清の再感染ともに mutant type はウイルス陽性細胞数が指数関数的に増加し最大速度は 10<sup>2.5</sup>/日だった。抗 CD81 抗体を使用した侵入阻害試験では 80%以上の感染が阻害された。以上より、蛍光タグ付き HCV はウイルス粒子産生能を保持しつつ継代が可能で、flowcytometry などを用いることにより感染細胞を定量的に検出することが可能であることが示された。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تری阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。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%以上の感染阻害効果を示した。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تری過程を阻害している可能性が示唆された。

#### 8. 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。

#### 9. ファージディスプレイ法によるヒト型抗体の作成

樹立した 2 クローンは、TH (ジェノタイプ 1b) HCVpp を用いた感染中和試験の結果、IC<sub>50</sub> が 1 μg/ml 以下の高い感染中和活性を示した。感染中和活性は、HCV の受容体である CD81 分子に対する中和抗体と同程度の感染中和活性を示した。これらの抗体の J6 (ジェノタイプ 2a) HCVpp の中和活性は、TH HCVpp よりも 10 倍程度低かった。

#### D. 考察

HCV に対するヒト型感染中和抗体の開発を目指して 2 年間の研究を進めた。多くの成果を得たが、特にファージディスプレイ法により作成した抗体が強い感染中和活性を示した。この方法を中心にして、ヒト型感染中和抗体の樹立に向けて研究を進めていきたい。

293 細胞由来 E2 蛋白質はそれ自体による HCV 感染阻害活性はないが、マウスへの免疫により感染中和抗体を誘導した。ところが、S2 細胞由来 E2 蛋白質ではそれ自体による HCV 感染阻害活性があるものの、マウスへの免疫による感染中和抗体誘導は見られなかった。この 2 種類の細胞由来の E2 蛋白質の性質の違いは興味深い。

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が、感染中和活性のあるモノクローナル抗体は得られなかった。E2 タンパク質であらかじめ免疫したマウスからリンパ節を採取し、これを SCID マウスの腎皮膜下に移植し、移植後 2 度ブーストをかけることによって、SCID マウスにおいて抗 E2 抗体誘導が認められた。さらに、リンパ節移植マウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製し、それらが産生する抗 E2 抗体を EIA 法にて定量すると、通常の方法と比較して、約 100 倍高い効率で抗体産生ハイブリドーマが作製できることが判明した。これは、移植リンパ節由来の免疫細胞は SCID マウスの脾臓や骨髄へ移動し、これらの組織で、抗体産生細胞へと分化、増殖し、免疫能力をさらに高めていることによると考えられる。

患者血液由来の HCV の感染増殖がこれまでに観察できているヒト不死化肝細胞を用いて、その自然免疫を抑制した細胞を作成することに成功した。分泌型のルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いた感染検出モデル実験系も JFH1 と HuH7.5 細胞では想定したような感染増殖の検出が可能であったため、今後はさらに検出の感度を高め、バックグラウンドのシグナルを低下させる必要があるものの、上記自然免疫系を抑制した不死化肝細胞と組み合わせることで感度良く患者血液由来の HCV 感染を定量化することが可能な実験系を構築することが期待された。

HCV 感染は多彩な免疫異常を惹起している。本研究では HCV キャリアの B 細胞異常発症機序を明らかにする目的で、B 細胞の成熟段階のどのレベルで HCV 感染による機能障害が惹起されているかを解析した。HCV の宿主レセプターとして CD81 を発見した Abrignani らは、HCV E2 蛋白が Naïve B 細胞に結合（吸着）後に非特異的活性化を惹起することを報告している。この非特異的活性化が B 細胞機能異常や HCV 由来の自己免疫異常、リンパ球増殖性疾患に関連する可能性がある。

薬剤スクリーニングでは HCV の感染・吸着、粒子分泌を阻害する抗ウイルス薬の得るリード化合物を同定することが可能であった。さらに今回構築した大規模薬剤スクリーニングは他の感染体を対象とした

研究にも応用可能である。今後、構築した抗ウイルス薬剤スクリーニング系を用いて、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を展開していく。

ファージディスプレイ法により高い中和活性を有する抗体の樹立に成功した。今後の研究ではこの中和抗体の作用機序の解析を進めるとともに、さらに多様な抗体の樹立をめざす。これによって、C型肝炎感染を阻止する免疫グロブリンの樹立が可能になると考えられた。

#### E. 結論

1. 293 細胞で作成したマンノース型、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。しかし、293 細胞由来 E2 蛋白質と S2 細胞由来 E2 蛋白質でその性質に大きな違いが認められた。HCV の初期感染機構および感染中和機構の解明につながる。

2. 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たが、感染中和活性のある抗体は得られなかった。

3. HCV E2 タンパク質で免疫したリンパ節を SCID マウスの腎皮膜下に移植し、追加免疫後、SCID マウス由来脾細胞を用いてハイブリドーマを作製すると、E2 タンパク質に対する IgG クラスのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが従来の方法と比較して、約 100 倍高い効率で作製できた。

4. 自然免疫系を抑制したヒト不死化肝細胞が樹立された。また組換え体 HCV の感染を分泌型ルシフェラーゼの活性で検出することが可能な感染検出系のモデル実験系の構築に成功した。

5. HCV キャリアーにおいて HCV の Naïve B 細胞への感染・結合が非特異的活性化を惹起し、B 細胞単一クローン増殖に関与する可能性が示唆された。

6. 蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いた High content screening assay を樹立し、エントリ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。

7. ファージディスプレイ法によって HCV 持続感染者から高い感染中和活性を持つヒト IgG 抗体を作製することができた。

#### 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<sup>+</sup> 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.
  12. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 86(4):2143-52.
  13. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
  14. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 Aug;54(2):425-33.
  15. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 407(1):135-40
  16. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
  17. Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* 19 : 254-262, 2012.
  18. 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.
  19. 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<sup>+</sup> 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.
  20. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka Y, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology Int* 2012; in press.
  21. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother*; 2012; 56 (3):1315-1323.
  22. 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, Watanabe M, Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin. *Antivir Ther* ,16(7):1081-1091, 2011.
  23. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* ,85(12):5986-5994, 2011.
  24. 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. Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on



hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6):2537-2545, 2011.

25. 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. *Hepatol Res*, 41:258-269, 2011.

26. 【新時代のウイルス性肝炎学-基礎・臨床研究の進歩-】 II C型肝炎 13. C型肝炎ウイルス感染関連の肝外病変とその対応 伊藤敬義、井口桃子、下間 祐、井廻道夫 日本臨床増刊号 Page302-308(2011. 05. 20)

27. 【慢性ウイルス肝炎 治療の新たな展開】 Key words C型肝炎ウイルス感染とB細胞異常 伊藤敬義 カレントセラピー 28巻8号 Page68(2010. 08)

## 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 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.
15. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
16. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
17. Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi M, Miyashita M, Arai J, Hiroishi K and Imawari M. Fluctuation pattern of serum complement levels during pegylated interferon and ribavirin therapy is closely associated with the outcome in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011.11.8)
18. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011.11.8)
19. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (Berlin 2011.4.2)
20. 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)
21. 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)
22. 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)
23. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #1016)
24. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)
25. Itsui Y, Sakamoto N, Yauchi T, Watanabe M: Antiviral effect of a novel interferon-inducible protein, IFI-27, against hepatitis C virus replication. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2086)
26. 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. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2040)
27. T Yoshida, F Satoh, W Akihiro, M Kondoh, H Mizuguchi, N Sakamoto, K Yagi: Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
28. N Sakamoto, Y Funaoka, G Suda, M Nakagawa, S Kakinuma, M Watanabe: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with

substitutions of core amino acids 70 and 91. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.

29. S Nitta, N Sakamoto, M Tasaka-Fujita, K Kiyohashi, A Kusano-Kitazume, M Murakawa, K Yoshino, K Mishima, S Kakinuma, M Nakagawa, M Watanabe: HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon- dependent innate immune response. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.

30. 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))

31. 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

32. 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、齊月、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠:シンプジウム 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

33. 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)

34. 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)

35. 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)

36. 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)

37. 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)

38. 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、荒井潤、井廻道夫 1型C型慢性肝炎患者における治療前・治療開始1ヶ月血清C3値比(Response C3 ratio)を用いたPEG-IFN、リバビリン併用療法早期効果予測 第53回日本消化器病学会大会(福岡 2011. 10. 21)

39. 下間祐、伊藤敬義、柳川達郎、井口桃子、打越学、宮下みゆき、荒井潤、井廻道夫 HCV陽性肝細胞癌患者におけるB細胞中Epstein-Barr

ウイルス再活性化 第53回日本消化器病学会大会(福岡 2011. 10. 21)

40. 宮下みゆき、伊藤敬義、井口桃子、打越学、下間祐、荒井潤、井廻道夫Naïve B細胞へのHCV感染・吸着とB細胞単一クローン増殖発症との関連 第53回日本消化器病学会大会(福岡 2011. 10. 19)

41. 伊藤敬義 治療前宿主B細胞へのHCV感染・吸着状態とPEG IFN/リバビリン併用療法の治療反応性との関連 第5回東京肝疾患研究会(PERFECT)(東京 2011. 7. 2)

42. 宮下みゆき、伊藤敬義、坂木理、梶原敦、広石和正、小林万里子、熊田博光、井廻道夫 C型慢性肝炎活動性及び線維化へのCOX-2プロモーター領域(-1195G>A)遺伝子多型の関与 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011. 6. 4)

43. 井口桃子、伊藤敬義、井廻道夫 IFN治療効果予測におけるB細胞中HCV RNA測定の有用性 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011. 6. 4)

44. 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 PEG-IFN、リバビリン療法中の治療前血清補体値および治療中補体値動態による治療効果予測 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011. 6. 4)

45. 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)

46. 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)

47. 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)

48. 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)

49. 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
2. 上皮性体性肝細胞の製造方法、発明者 土方誠、アリ ハッサン フセイン、山口達哉、出願日2011年3月25日、出願番号 特願2011-67112
3. 出願番号:特願2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する  
医薬組成物  
発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏  
、奥野友紀子  
特許出願人：東京医科歯科大学  
提出日：平成23年9月6日

## 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  
膜貫通領域を欠失した分泌型のE2(384-714)の発現プラスミドを293GnTI(-)細胞、293T細胞の2種類の細胞株に遺伝子導入し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。さらに、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。さらに、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。また、ハエ由来S2細胞でE2蛋白質を同様に発現精製した。E2蛋白質による感染阻害活性およびマウスへの免疫による中和抗体誘導を検討した。

2. リンパ節移植 SCID マウスでの抗HCV抗体産生

ストレプトアビジンタグ化E2タンパク質とImjectAlamを等量混和した抗原溶液を、8週齢の雌性Balb/cマウス腹腔内に抗原量10 $\mu$ g/headを2週間おきに2回投与した。2回目の免疫の2週間後にリンパ節を採取し、得られた各リンパ節組織を8週齢の雌性SCIDマウスの腎皮膜下に挿入した。片腎につき2個、計4個の組織片を移植した。リンパ組織移植後、2週間おきに4回、10 $\mu$ g/headのE2タンパク質溶液を投与した。最終免疫の4日後に、SCID