

C. 研究結果

1) mCherry 発現 ATL 細胞株の樹立

ATL 細胞株 MT-2, MT4 に mCherry 発現ベクターを遺伝子導入し、更に赤色の強い細胞をフローサイトメトリーを用いて分取し、mCherry を強く発現する MT-2, MT4 細胞株を樹立した。

2) 高度免疫不全マウスへの ATL 細胞株移植系の樹立

MT-2 mCherry を高度免疫不全マウスである NOD/Scid/Jak3 欠損マウス (NOJ マウス) 腹腔内に移植したところ、マウス腹腔内での生着が認められた。蛍光イメージングを用いることで腹腔内の腫瘍量を定量的に解析することが可能であった (図 1)。本マウスに NF-kappaB 阻害薬である cepharanthine (CEP) を投与したところ腫瘍量の減少が認められた。本マウスは ATL に対する新規治療薬候補の有効性と副作用を評価するのに有用な系であると考えられる。

D. 考察

赤色蛍光を遺伝子導入した ATL 細胞株 (MT-2, MT-4) を高度免疫不全マウスに移植し、蛍光イメージング装置により腫瘍量を定量的に解析する事に成功した。

ヒトの様々な疾患の解析には、マウス等の小動物を使ったモデルが有用である。そのため、様々な免疫不全マウスにヒトの正常細胞や腫瘍細胞を移植する試みがなされてきた。近年、遺伝子改変マウスを用いることで高度免疫不全マウスの樹立が可能となり、ヒト細胞が生着可能なマウスが樹立されている。今回、私達が樹立した高度免疫不全マウス (NOJ マウス) に ATL 細胞株が生着可能であることが示された。しかしながら、今回使用した MT-2,

MT-4 細胞株は腹腔内で増殖するのみでリンパ臓器や末梢血への浸潤は認められず、ATL のモデルとしては不完全なものであった。今後、他の ATL 細胞株を用いて、よりヒト ATL に近いマウスモデルを樹立しようと考えている。また、新鮮な ATL 細胞の移植によりオーダーメイド医療に応用可能なマウスモデルの樹立を視野に入れている。

近年、蛍光イメージング技術の発達により、動物が生きたままで体内の蛍光を検知することが可能になった。しかし、マウスの場合には体毛により蛍光が減弱するため、蛍光の検出は困難である。そこで蛍光イメージングには Nude マウスのような体毛が欠如したマウスが使用されているが、これらのマウスはある程度の免疫機能が保たれているため、ヒト細胞の生着には限度がある。そこで、体毛のない高度免疫不全マウスの樹立を試みている。

本年度の研究で、赤色蛍光を遺伝子導入した成人 T 細胞性白血病株 (MT-2, MT-4) を高度免疫不全マウスに移植し、蛍光イメージング装置により腫瘍量を定量的に解析する、ATL マウスモデルの樹立に成功した。今後、更に改良を加えて、蛍光イメージング装置等により腫瘍量を経時的・定量的に解析する事で治療効果を評価する系を確立する予定である。ATL マウスモデルは、研究班の目指す HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素を潜伏感染細胞に送達してウイルスを不可逆的に不活化することによる ATL 治療の検証に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

赤色蛍光色素 mCherry を発現する ATL 細胞株を樹立し、高度免疫不全マウスへの生着を

確認した。本マウスモデルは、ATL に対する新規治療薬候補の有効性と副作用を評価するのに有用な系である。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, and *Okada S. The antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- κ B pathway. *Cancer Sci* in press
 2. Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S, and *Sakaguchi N. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis* in press
 3. Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, and *Suzu S. The Identification of a Small Molecule Compound that Reduces HIV-1 Nef-mediated Viral Infectivity Enhancement. *ProS ONE* in press
 4. Matsuno T, Kariya R, Yano S, Morino-Koga S, Taura M, Suico MA, Shimauchi Y, Matsuyama S, Okamoto Y, Shuto T, *Kai H, and *Okada S. Diethylthiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- κ B pathway. *Int J Oncol* 40(4):1071-1078, 2012
 5. Komizu Y, Yukihara M, Kariya R, Goto K, *Okada S and *Ueoka R. Selective accumulation of hybrid liposomes into adult T-cell leukemia cells along with induction of apoptosis. *Bioorg Med Chem Lett* 21(13):3962-3965, 2011
 6. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S, and *Okada S. Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into Balb/c and C57BL/6 strain of Rag-2/Jak3 double-deficient mice. *J Biomed Biotechnol* 2011;539748, 2011
2. 学会発表 (国際学会)
 1. Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Shinichiro Hattori, Kouki Matsuda, Manabu Taura, Shinya Suzu, Hirofumi Kai, and Seiji Okada. HIV protease inhibitors inhibits the growth of primary effusion lymphoma and induces apoptosis. 40th Annual Scientific Meeting of the Society for Hematology and Stem Cells. 25-28 Aug. 2011. Vancouver, Canada.
 2. Shotaro Hagiwara, Mihoko Yotsumoto, and Seiji Okada. Non-AIDS-Defining Hematologic Malignancies in HIV-Infected Patients: A Nationwide Epidemiologic Study in Japan. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; **118**: 2183.
 3. Hiromichi Yuki, Shikiko Ueno, Hiroaki Niuro, Hiro Tatetsu, Hiroyuki Hata, Toshiki Watanabe, Seiji Okada, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno. PU.1-Induced Growth Arrest and Apoptosis in Classical Hodgkin Lymphoma Cells. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; **118**: 2628.
 4. Hideyuki Yamamoto, Shotaro Hagiwara, Yuki

- Kojima, Asako Uehira, Atsushi Ajisawa, Akira Kitanaka, Junko Tanuma, Seiji Okada, and Hirokazu Nagai. Rituxiamb Did Not Improve Clinical Outcomes In AIDS-Related Burkitt Lymphoma. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; **118**: 1629.
5. Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Shinichiro Hattori, Kouki Matsuda, Manabu Taura, Shinya Suzu, Hirofumi Kai, Harutaka Katano and Seiji Okada. HIV protease inhibitors inhibits the growth of primary effusion lymphoma and induces apoptosis. Mahidol International Conference on Infections and Cancers 2012. 6-8 Feb., 2012. The Landmark Bangkok Hotel, Bangkok, Thailand.
 6. Masako Shimamoto, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Manabu Taura, Koichi Hamada, and Seiji Okada. Inhibition of cell lycle pregression by proton pump inhibitor in primary effusion lymphoma. Mahidol International Conference on Infections and Cancers 2012. 6-8 Feb., 2012. The Landmark Bangkok Hotel, Bangkok, Thailand.
- (国内学会)
1. 服部真一朗、淵上典子、刈谷龍昇、鈴伸也、岡田誠治. HIV-1 感染における CD4+Foxp3+T 細胞の動態および感染性の検討. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会、京都市国際交流会館、京都、2011 年 6 月 25-26 日.
 2. 松田幸樹、服部真一朗、刈谷龍昇、嶋本雅子、濱田浩一、岡田誠治. Cepharanthine は HIV の侵入を阻害することで、感染を抑制する. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会、京都市国際交流会館、京都、2011 年 6 月 25-26 日.
 3. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Eriko Kudo, Koki Matsuda, Shinichiro Hattori, Manabu Taura, Koichi Hamada, Harutaka Katano, and Seiji Okada. The antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB. 第 73 回日本血液学会、名古屋国際会議場、名古屋、2011 年 10 月 14-16 日.
 4. Shotaro Hagiwara and Seiji Okada. Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV-infected patients: an epidemiological study. 第 73 回日本血液学会、名古屋国際会議場、名古屋、2011 年 10 月 14-16 日.
 5. 岡田誠治. HIV 感染症と血液悪性腫瘍. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 6. 服部真一朗、刈谷龍昇、Pattaravadee Srikoon、松田幸樹、岡田誠治. NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスを用いたヒト NK 細胞モデルマウスの構築及び HIV-1 感染. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 7. 青木宏美、鯨田伸好、服部真一朗、林宏典、青木学、岡田誠治、満屋裕明. mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミックスと抗 HIV-1 剤によるその変容の検討-1. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日

8. 鍬田伸好、青木宏美、服部真一郎、林宏典、
青木学、中村太平、岡田誠治、満屋裕明。
mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内
播種早期ダイナミックスと抗 HIV-1 剤によ
るその変容の検討-2. 第 25 回日本エイズ
学会学術集会・総会、ハイアットリージェ
ンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12
月 2 日
9. 四本美保子、味澤篤、萩原將太郎、田沼順
子、上平朝子、永井宏和、藤川裕子、北野
喜良、有馬靖佳、宇野健司、岩井俊樹、本
郷偉元、岡田誠治. 本邦におけるエイズ関連
ホジキンリンパ腫 19 例の実態. 第 25 回日
本エイズ学会学術集会・総会、ハイアット
リージェンシー東京、東京、2011 年 11 月
30 日-12 月 2 日
10. 工藤恵理子、谷本周穂、田浦学、高橋大介、
戸嶋一敦、岡田誠治. フラーレン誘導体によ
る HIV-1 増殖抑制効果. 第 25 回日本エイ
ズ学会学術集会・総会、ハイアットリー
ジェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30
日-12 月 2 日
11. 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕
也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田
(恒次) 恭子. R5 及び X4 HIV-1 同時感染
ヒト化マウスモデルによる感染早期のウィ
ルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学
会学術集会・総会、ハイアットリージェン
シー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月
2 日

特記すべきことなし

3. その他
特記すべきことなし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録

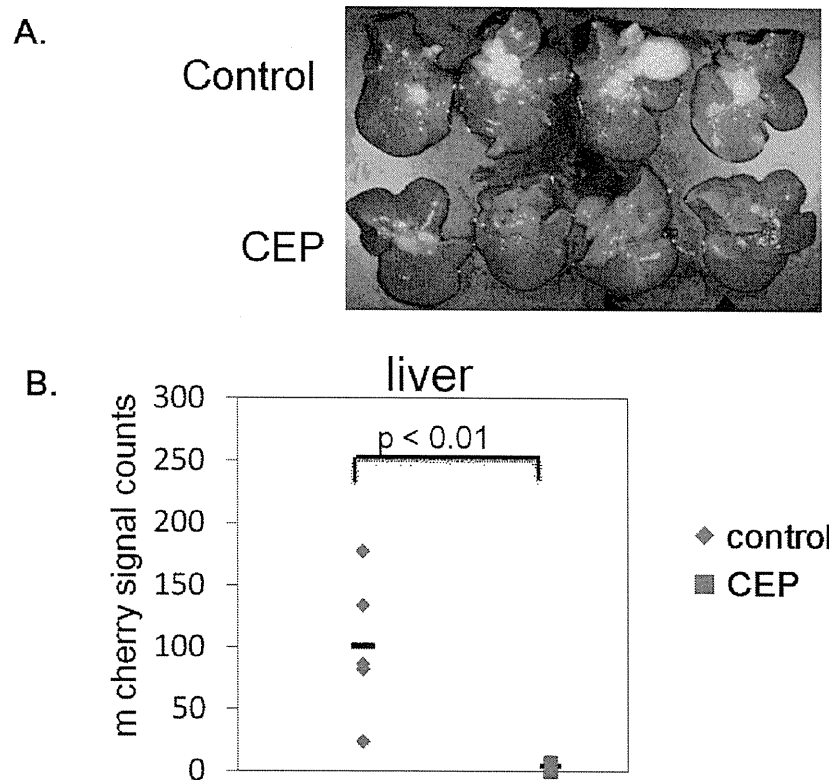


図1. 蛍光標識した ATL 細胞の定量的検出とセファランチン(CEP)の抗 ATL 効果の検討

高度免疫不全マウス (NOJ マウス) 腹腔内に ATL 細胞株(MT-2)を移植した。移植後1週間後からセファランチン(20 mg/kg/day)を4週間連日腹腔内投与後、肝臓に生着したATL細胞を蛍光イメージング装置(Maestro)により定量的解析を行った。A. 肝臓に生着したATL細胞、B. 肝臓に生着したATL細胞の蛍光シグナルを定量したところ、CEP投与群では明らかな蛍光シグナルの減量が認められた。

分担研究課題：In silico maturation 法に基づく scFv の改良

研究分担者 星野 忠次 千葉大学・大学院薬学研究院 准教授

研究要旨 HTLV-1 関連疾患発症遅延法では、抗体により細胞種指向性を向上させたタンパク質送達技術により、ウイルスゲノム機能不全を誘導する特異的酵素を、ウイルス潜伏感染細胞に送り込む。HTLV-1 の主な感染標的である CD4 陽性 T 細胞を目標抗原として、これに特異的な抗体を利用して治療分子送達を行う。本分担研究では、送達技術の要となる CD4 特異的抗体に関して、抗原認識能の向上を効率的に実現する手法の開発を行った。抗体の改良には、独自の計算機プログラムにより、計算機内で抗体を成熟させる技法を用いる。今年度は、スーパーコンピュータなど多数の CPU を有する大規模な計算機システムでの抗体成熟計算の実行を可能にするために、必要となるプログラムを作成した。さらに抗体成熟プログラムの鍵となる抗原と抗体の結合親和性算出プログラム (Orientation) に、周辺の水分子の分布を最適化するためのルーチン (separatetop.c) を組み込むことで、計算による結合親和性の評価精度の向上を果たした。これにより抗体成熟設計の準備が整った。

A. 研究目的

HIV に関するウイルス学的研究と治療方法の開発が進む一方で、同じレトロウイルスである HTLV-1 感染症に関しては、有効な治療方法の研究開発が十分とは言えない状況にある。本研究班では、HTLV-1 陽性未発症者における HTLV-1 関連疾患の発症遅延を目的に、新規治療技術の開発を進めている。具体的な実現方法として、①HTLV-1 LTR を破壊してプロウイルスゲノム機能不全を誘導する特異的酵素を、②細胞種指向性を向上させた新規タンパク質送達技術またはレンチウイルスベクターにて潜伏感染細胞に送達し、③ウイルス遺伝子発現を不可逆的に阻止する、ことを提案している。①の治療分子には HTLV-1 LTR を特異的に結合して損傷させ

る遺伝的改変型亜鉛フィンガータンパク質と二本鎖 DNA を分断する酵素の融合タンパク質 (ZFN) が用いられる。②の治療酵素分子の送達には、研究代表者の駒野によって開発されたタンパク質直接導入系 LENA を応用する。この導入法を用いて、HTLV-1 の主な感染標的と考えられる CD4 陽性 T 細胞を標的として治療分子送達を行う。③では潜伏感染するプロウイルスゲノムを物理的に傷害して病原性を欠落させたことで、治療効果を得られるものと見込んでおり、将来的に有効な HTLV-1 感染症技術の一つになると期待できる。

上記の②における治療酵素分子送達時における細胞腫選択性を高めるために、scFv 化膜アンカー型抗 CD4 抗体によるベクター被覆をする方

法を計画している。本分担研究では、細胞選択性を向上させるために、抗 CD4 抗体の CD4 認識能を高めるための技術の開発を行っている。具体的には、研究分担者の一人である竹腰（東海大学）らによって見出された抗 CD4 抗体を、計算機による分子計算に基づいて改変する。改変により、高い CD4 認識能を持つ一本鎖 Fv を作出し、これを分子送達の鍵となる機能部品として利用する。計算機による抗体分子設計は、研究分担者の独自の技術であり、本研究で開発される分子送達技術は、HTLV-1 感染症治療以外にも応用可能な基盤医療技術になると期待される。本年度は、高速演算サーバでの実行のためのソフトウェア開発と抗体分子計算機設計技術の精度向上を行った。

B. 研究方法

標的タンパク質である抗原に対して、抗体の成熟を計算機上で自動的に実行する *in silico* maturation プログラムを、独自開発している。図 1 に示すように、特定の抗原構造に対して、抗体分子の相補性決定領域 (Complimentarity Determining Region: CDR) のアミノ酸が変化することで、抗体は多様な抗原を認識できる。さらに生体内ではアミノ酸変化が進化的に起こることで、時間が経つにつれて、より高い親和性で抗原を捕捉できるように産生抗体が成熟していく。この抗体の成熟を計算機で実現するために、出発となる試行抗体に対し計算機上でアミノ酸変異を導入し、アミノ酸変異を導入した抗体と標的抗原との結合親和性を評価して、より親和性が向上した場合に、アミノ酸変異を導入した抗体を次のステップの試行抗体に採用する。このステップを繰り返していくことで、抗体の成熟を仮想的に実現する。

分担研究では、このソフトウェアの汎用性を

高めるための改良を行う。具体的には、導入するアミノ酸変異のパターンを何種類も用意して、同時に並行して計算し、最も良いものを選択する。この際に大型計算機センターで使われるような、演算性能の高い高速演算システムでソフトウェアが実行できるように、並列計算のためのプログラミングを行う。

効率的に医薬品開発を行うために、コンピュータ上で活性分子の探索を行う *in silico* 創薬が、昨今、注目されている。*in silico* 創薬においては、ドッキングシミュレーションと呼ばれる手法により、標的タンパク質と候補分子をコンピュータ上で結合させる。ドッキングシミュレーションは、標的タンパク質とそれに作用する分子との結合親和性評価を行うための手段として非常に有力な方法の一つである。ドッキングシミュレーションの目的は大きく 2 つあり、1 つは活性分子の結合様式を予測し、標的タンパク質に活性分子が、どのような配座で結合するかを知ることである。もう 1 つは標的タンパク質に結合した活性分子の結合親和性を評価することである。

分担研究では、抗原を標的タンパク質に、抗体を活性分子に見立てて、抗原-抗体認識を分子レベルで理解し、計算機上で解析できるようにする。特に、分担者は、*in silico* 創薬における創薬支援ソフトウェア (orientation) を独自に開発している。研究の一端として、このプログラム Orientation の改良を行い、計算精度の向上を図る。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

抗体を進化的に成熟させるには、多数のパターンのアミノ酸変異を導入して、その中より最

も抗原との結合親和性が高いものを選び出し、選び出されたものについて、さらに別のアミノ酸変異を導入して、再評価してゆくというアプローチは有効である。このとき①導入するアミノ酸のパターンが多様であればあるほど、また②再評価の繰り返し回数が多ければ多いほど、より高度に成熟した抗体へと進化すると期待される。このために計算機では、①多くのパターンを並列に計算できること、および②短時間で1回の繰り返しが完了して多数回の繰り返しができることが望ましい。従って、現在の高速演算サーバの主流であるマルチコア計算システムを利用することが有効な手段である。研究分担者が開発してきたプログラムでは、並列計算を python モジュールによって実現していた。Python モジュールは、パーソナルユースのコンピュータでは標準的にインストールされている。一方で、複数ユーザーの利用する大規模な計算機システムでは、バッチジョブが一般的であり、必ずしも python が正常に起動しない、あるいは、そもそも python 自体がインストールされていない場合がある。そこで並列化ルーチンを C 言語によってコーディングした。これにより、現在、科学技術計算に使用されるほぼ全ての計算機システムにおいて、抗体を成熟させるための独自のソフトウェアが動くようになった。

標的タンパク質-活性分子間の結合親和性を見積もるための手法として、これまでにいくつかのスコア関数が報告されている。スコア関数は力場に基づいたスコア関数、経験的スコア関数、知識に基づいたスコア関数の3つのグループに分けられる。力場に基づいたスコア関数では、特定の標的タンパク質に関する活性評価データがない時にもシミュレーションができ

るという長所がある。独自開発の orientation プログラムでは、標的タンパク質と候補活性分子を結合させ、複合体のエネルギー安定性を計算し、結合親和性の算出を行うことができる。orientation では、特に水素結合と疎水性相互作用に着目して結合親和性を評価し、OrientScore と呼ばれるスコアによりスコアリングを行っている。

スコア関数の評価を行うために、表1に示すように、結合阻害定数 K_i 値が既知であるタンパク質-リガンド複合体の X 線結晶構造データを PDBbind データベースより、8例が選択した。水素結合による結合親和性への寄与について改良を行い、各タンパク質とリガンドの OrientScore と K_i 値をグラフにしたのが、図2である。さらに結合前と結合後の周辺の水分子の分布を最適化するためのルーチン (separatetop.c) を組み込んで再計算した結果を図3に示す。半数の標的タンパク質に対しては、計算予測値が実験における活性値と極めて良い相関を示し、他の市販ソフトウェアに比べて、高い親和性予測を与えることができた。

D. 考察

大型計算機で並列計算を可能にするプログラム (MatureUp) を作成したことで、世の中でスーパーコンピュータと呼ばれるほぼ全ての計算機で、抗体成熟計算を実行することが可能になった。例えば、研究分担者の所属する千葉大学内では、総合メディア基盤センターに高速演算サーバが設置されている。この高速演算サーバを利用した場合、最大 64 変異パターンまでを同時に探索することができる。東京大学情報基盤センターの HA8000 システム利用の場合も、64 変異パターンまでを同時に探索することができる。また自然科学研究機構計算科学研究セ

ンターのサーバシステムを利用の場合は、128 変異パターンまでを探索することができる。来年度以降、各計算機センターで新規の計算機システムが導入される計画が進んでおり、一度に探索できる変異パターンの数は格段に増加する予定である。従って、in silico 抗体成熟計算にとっては、有効な研究環境が整いつつある。

標的タンパク質-活性分子間の結合親和性を見積もるための技法の研究開発において、水素結合による結合親和性への寄与による改良を行った計算では、実験で得られる活性値と計算の予測値が、4種類のタンパク質で良好な値を示した。一方で、3種類のタンパク質では、不十分な値となった。但し、市販のソフトウェアである Gold ならびに Glide によって同様の計算を行った結果は、本研究で開発のプログラムに匹敵する相関値を与えることはできなかった。従って、改良の余地は残されているものの、本ソフトウェアは比較的信頼できる数値を算出できるプログラムに仕上がっていると判断できる。

周辺の水分子の分布を最適化するためのルーチンプログラム (separatetop.c) を用いて相関の向上を試みたところ (図 3)、相関の向上が6種類のタンパク質に対して見られた。また、元々十分な相関がとれていたタンパク質に対しては、そのまま十分な相関が保たれた。HIV-1 protease については、計算による算出値と実験値の相関が不十分でかつ、プログラムの修正によっても相関は向上しなかった。一般にプロテアーゼの場合には、活性部位に多くの水分子を含むために、水分子の配置が活性分子の配向にも影響するので、結合構造予測ならびに、これに基づく結合親和性予測が難しくなる傾向がある。

プログラム separatetop.c を組み込むことにより相関が向上しなかったタンパク質については、水の関与している水素結合と、タンパク質-リガンド間における水素結合を区別して、重み付けして扱うことで、よりよい相関が取れると見込んでいる。また、 $\pi-\pi$ 相互作用を考慮に入れることで更なる相関の向上が図れると考えている。

E. 結論

抗体成熟プログラムに特化した汎用的な並列計算ルーチン (MatureUp) を作成した。これによりスーパーコンピュータで、抗体成熟計算を実行することが可能になった。抗体成熟プログラムの鍵となる抗原と抗体の結合親和性算出プログラム (Orientation) に、周辺の水分子の分布を最適化するためのルーチン (separatetop.c) を組み込むことで、計算による結合親和性の評価精度を向上することができた。以上により、抗体成熟予測精度の向上が見込まれる。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

- W. Li, J. Shen, Y. Tang, T. Hoshino : Exploring coumarin egress channels in human cytochrome P450 2A6 by random acceleration and steered molecular dynamics simulations, *Proteins*, 79, 271-281 (2011)
- MD Iqbal Mahmood, Yuri Matsuo, Saburo Neya, Tyuji Hoshino : Computational Analysis on the Binding of Epitope Peptide to Human Leukocyte Antigen Class I Molecule A*2402 Subtype, *Chem. Pharm. Bull.* 59, 1254-1262 (2011)
- Hitomi Yuki, Teruki Honma, Masayuki Hata,

Tyuji Hoshino :

Prediction of sites of metabolism in a substrate molecule, instanced by carbamazepine oxidation by CYP3A4,

Bioorg. Med. Chem. 20, 775-783 (2012)

2. 学会発表

(国際学会)

実績なし

(国内学会)

- ムハマド イクバル, 松尾 佑里, 根矢 三郎, 星野 忠次:

ヒト白血球抗原によるエピトープの認識に関する計算化学的解析.

第 21 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、千葉(2011.5.30)

- 星野 忠次:

タンパク質と脂質膜の吸着過程の計算機解析.

CRESTシンポジウム「トップダウンとボトムアップの融合によるナノ構造の作製と新機能発現」、東京(2011.10.18)

- 幸瞳、本間光貴、畑晶之、星野忠次:

分子動力学計算を用いた化合物の代謝部位予測:CYP3A4 と carbamazepine への適用.

第 39 回構造活性相関シンポジウム、野田(2011.11.28)

- MD Iqbal Mahmood, Saburo Neya, Tyuji Hoshino :

Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor,

スーパーコンピューターワークショップ 2012、岡崎(2012.1.25)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

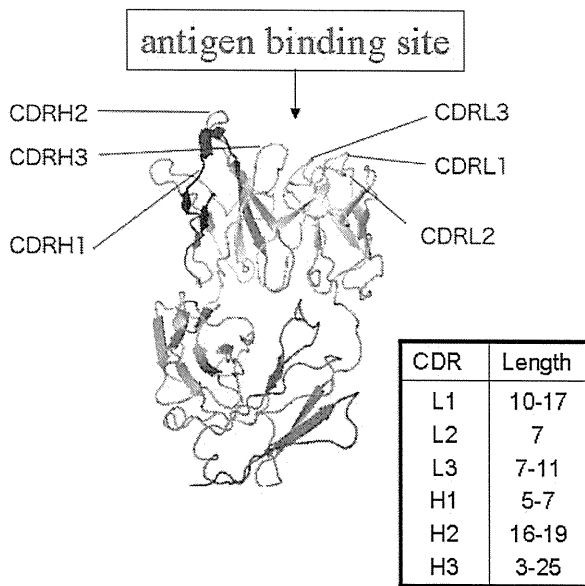


図1：抗体の Fab 領域と相補性決定領域。相補性決定領域は6つの領域からなり、右下表のようにアミノ酸数も変化し得る。

表1：スコア関数の評価に用いたタンパク質

protein	category	Number of structures*
Acetylcholin-esterase	Carboxy-ester-hydrolase	8
Cyclin-dependent kinase 2	Protein-serine/threonin kinase	16
FK506 binding protein	cis-trans-Isomerase	5
HIV-1 protease	Aspartic endopeptidase	45
Neuraminidase	Glycosidase	6
Penisillopepsin	Hydro-lyase	10
Plasmepsin	Aspartic endopeptidase	4
Purine nucleoside phosphorylase	Pentyltransferase	10

* Number of crystal structures registered in PDB.

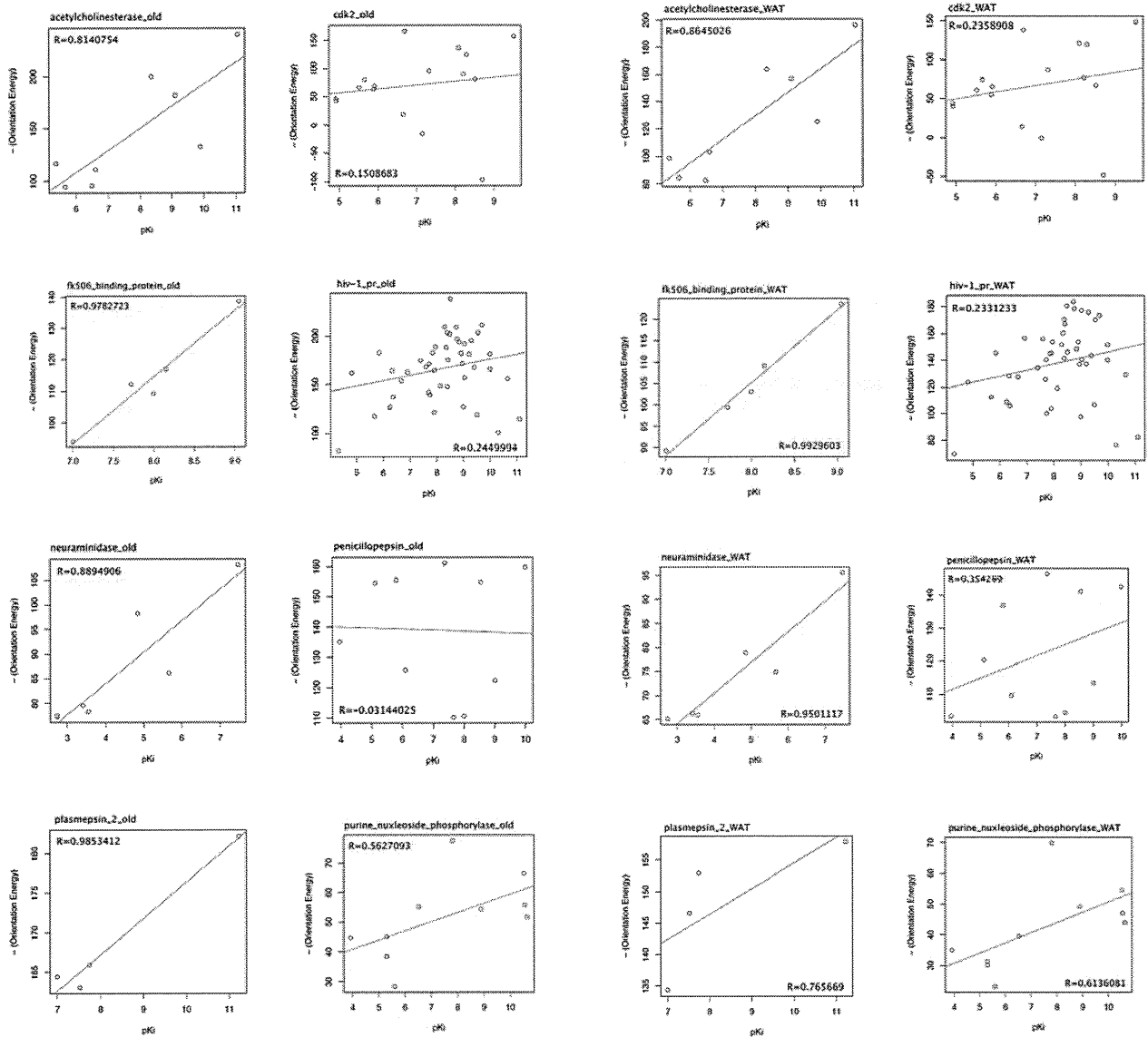


図2：水素結合による結合親和性への寄与について改良を行った OrientScore と pKi の相関

図3：水分子の分布を最適化するためのルーチン(separatetop.c)を組み込んで再計算を行った OrientScore と pKi の相関

分担研究課題：ScFv の遺伝的改変と抗原親和性に関する研究

研究分担者 竹腰 正隆 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学・抗体工学 講師

研究要旨 HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター被覆に必要な分子の設計開発を行った。今年度は我々が独自に樹立した健常人由来 CD4 反応性 IgM 抗体クローンに由来する HO538-213 遺伝子の L 鎖と H 鎖の可変領域を鋳型として 2 ステップの PCR にて scFv 化を施した。第一段階の PCR において、L 鎖の 3'末端と H 鎖の 5'末端に合成リンカーをコードするオリゴヌクレオチドを互いにオーバーラップするように配置した。第 2 段階の PCR で L 鎖の 5'末端と H 鎖の 3'末端にプライマーを設定し、かつ HA タグを 3'末端に付加した。得られた PCR 産物を電気泳動して目的のサイズのバンドを切り出し、制限酵素で切断後発現ベクターにクローニングした。この時、HA タグの 3'側にベクター由来の His タグが付加されるように導入した。得られた抗体遺伝子の塩基配列を確認し、大腸菌に導入し IPTG で誘導をかけて scFv を産生させた。ヒト可溶性 CD4 を抗原として HA タグを介して ELISA を行ったところ CD4 に対する反応性が検出された。以上より HO538-213 の scFv の構築に成功した。並行して抗原エピトープ検索に必要な CD4 細胞外ドメインの精製系も樹立した。当初の予定に従っておもな項目は達成できたと考える。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター開発は本研究の重要な要素である。送達標的細胞は HTLV-1 が主に感染する CD4 陽性 T 細胞と思われる。高い送達特異性と汎用性を達成するため、我々はベクター被覆を 2 種類の分子で行う技術開発を行う。標的細胞を特異的に認識する分子とベクターと細胞の膜融合を惹起する分子の 2 種類である。本研究では前者に関する分子開発に焦点を絞る。我々は CD4 陽性 T 細胞を特異的に認識する分子として抗 CD4 抗体を利用する。クローン HO538-213 は健康なヒトボランティアから得られた CD4 を認識する IgM に由来する Fab 抗体である(Hamatake et al. EJI 2010)。本抗体をベ

クター被覆に供するためには 2 段階の遺伝的改変プロセスが必要となる。第一段階は scFv 化、第 2 段階は膜アンカー型分子への改変である。本年度は第一段階の改変を行った。ScFv は H 鎖と L 鎖がつながった構造であるため、抗体工学に基づきリンカーを用いた 2 本鎖の結合を行う。scFv 化にはしばしば抗原に対する親和性の減弱が伴う事が知られている。本研究では scFv 化された HO538-213 がヒト CD4 に対する反応性を維持しているについても検討を行う。

B. 研究方法

・抗体の遺伝的改変：健常人由来 CD4 反応性 IgM 抗体クローンに由来する HO538-213 遺伝子

のL鎖とH鎖の可変領域を鋳型として2ステップのPCRを行った。第一段階のPCRでH鎖とL鎖の可変領域をPCRで増幅する。第一段階のPCRプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを利用する。

H鎖5'プライマー

GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT
GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG
CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG

H鎖3'プライマー

CCT GCG GCC GCA GAA GCG TAG TCC GGA
ACG TCG TAC GGG TAA AGG GTT GGG GCG
GAT GCA CTC CC

L鎖5'プライマー

CCT GCT AGC GAA ATT GTG ATG ACG CAG
TCT CC

L鎖3'プライマー

GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TCG TTT
GAT CTC CAG CTT GGT CCC

リンカーとして以下のアミノ酸配列を用いる。

Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly-
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly

得られたPCR産物をアガロース電気泳動して分離精製後両者を同濃度で混ぜたものを鋳型として第二段階のPCRを行う。第二段階のPCRプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを利用する。

5'プライマー

GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GCT
AGC GAA ATT GTG

3'プライマー

GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GCG
GCC GCA GAA GC

得られたPCR産物をアガロース電気泳動して分離精製後NheIとNotIで切断する。スピнкаラ

ムで精製後、pFab1ベクターのNheI-NotI領域にクローニングする。クローニング後、いくつかの独立したクローンについてシークエンシングを行い増幅した核酸断片が目的の配列であるかどうかの確認を行う。正しい配列のクローンを用いて大腸菌でscFvの生産を行う。タンパク質の精製はHisタグを用いて行う。

・抗原抗体反応の検証：ELISAでの反応性の確認は以下の手順で行う。ヒト可溶性CD4 (sCD4, 2µg/mL) をELISAプレートに加えて4℃1晩置くことにより固相化する。スキムミルクで37℃一時間ブロック後、緩衝液で洗浄し、scFvの濃度を変えて37℃で反応させる。緩衝液で洗浄後、2次抗体としてHRP結合抗HA抗体を37℃一時間反応させる。TMBを発色試薬として用い吸光度を測定する。

・抗原の調整：抗原反応性とエピトープ解析のため細胞外CD4のドメイン1のみとドメイン1+2を発現するベクターpComb3XmD1.1とpSecTagBD1D2を用いて産生を行う(Chen W et al., J Virol 2011)。精製抗原の質を評価するために、上記の方法と同様に精製標品を50µg/mの濃度でELISAプレートに固相化してCD4反応性のマウスモノクローナル抗体 (mAb) Leu-3a (1:100希釈) を検出プローブとしてELISAを行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

HO538-213 遺伝子の遺伝的改変にて得られた複数の独立した scFv 候補クローンについてシークエンシングを行ったところ高効率で計画通りの配列が得られていることが確かめられた。全体の構造は NheI (制限酵素) - L 鎖可変領域 - リンカー - H 鎖可変領域 - HA タグ

- NotI (制限酵素) -His タグ (ベクター側) であることを確認した。

次に大腸菌で scFv 化 HO538-213 を生産し ELISA でヒト sCD4 に対する反応性を検証した。塩基配列が同じ 3 個の独立したクローンについて大腸菌培養液から B-PER を用いて得た抽出液について ELISA を行った。陽性コントロールとしてヒト陽性血清を用いた。

	OD650
コロニー 1	0.465
コロニー 2	0.387
コロニー 3	0.373
陽性コントロール	0.327

3 クローンとも同様の OD 値が得られ、ELISA で陽性と判断した。従って scFv 化 HO538-213 はヒト CD4 に対する反応性を維持していることが示された。

次に His-tag 精製カラムを用いた精製の検討を行った。精製プロセスにおける各フラクションが含有する scFv 化 HO538-213 の濃度をヒト CD4 に対する ELISA で測定した。

	OD650
抽出液	0.366
カラムのフロースルー液	0.364
カラムからの溶出液	0.074

大部分の scFv がカラムに吸着せずに流出しているため、効果的な濃縮が得られていないことが示唆された。精製条件の改良と His-tag の設計についての詳細な検討が必要と思われる。

HO538-213 のエピトープ同定と親和性評価およびその改善のため、ヒト CD4 細胞外ドメイン 1 または 1 + 2 の精製を試みた。このため、ドメイン 1 については大腸菌発現ベクター pComb3XmD1.1 を用いて大腸菌でのタンパク質発現精製を行った。ドメイン 1 + 2 につ

いては発現ベクター pSecTagBD1D2 を用いて 293F 細胞を用いた一過性発現の系で生産を行った。どちらも His-tag 精製カラムを用いて大腸菌体粗抽出液または細胞培養上清から精製を行った。精製されたタンパク質を 50µg/ml の濃度で ELISA プレートに固相化して CD4 反応性のマウス mAb Leu-3a をプローブとして ELISA を行った。

	OD650
mD1.1	0.143
D1D2	0.650

mD1.1 の産生量は少ないか質的に良好ではない可能性があることが示唆されたが、D1D2 については十分な抗原量が得られた。良好に作動したシステムを利用する事により問題解決が得られると考え mD1.1 は pSecTagBmD1.1 を用い培養細胞での生産を検討している。

D. 考察

当初の予定に従っておもな項目は達成できたと考える。抗体の scFv 化によって抗体本来の活性が失われる可能性もあるが、scFv 化 HO538-213 において sCD4 反応性は維持されておりこの問題はなかった。HA タグを介した ELISA による精製 scFv 化 HO538-213 検出も予定通りに進んだ。scFv の精製に関しても方法に改善を加えて、現在大量精製を進めている。近いうちに共同研究者に配送できると考えている。大腸菌での生産が不十分だった CD4 ドメイン 1 の mD1.1 についても培養細胞での生産が進みつつある。HTLV-1 の画期的な治療の第 1 歩を順調に踏み出したと自負している。今後は scFv を細胞膜アンカー型発現が可能になるよう遺伝的改変を加えていくことによって HTLV-1 感染症の治療分子送達にかかるベクター被覆に共したい。また、Fab と scFv の抗

原に対する親和性を定量し、厳密に反応性が影響を受けているかを評価すると同時に、精製した CD4 抗原を用いてエピトープの同定と抗原抗体反応性の向上を達成したい。

CD4 陽性 T 細胞に対する特異的治療分子送達には、本研究で開発する抗体を基盤とした標的認識分子と細胞の膜融合を惹起する分子が必要である。後者に関しては MLV の Ecotropic Envelop または Influenza virus HA 分子の応用を念頭において開発を進めている。後者においては 1992 年に Vey et al が報告した avian pathogenic influenza A/H7 subtype/fowl plague virus/Rostock/34(FPV)に由来する HA(Vey M et al. Virology 1992)を P. Cannon らの研究グループが改変して得たクローン HAmt(Y106F, E199Q, G237K)である(Lin AH and PM Cannon. Virus Res 2002)。両者共にヒト細胞が発現する表面抗原に対する認識に極めて乏しいが、低い PH 環境において膜融合を誘導するという優れた活性を持っているうえ、レトロウイルスベクター被覆が可能である事が示されている(Lin AM et al. Hum Gene Ther 2001)。これらの発現システムを導入して本抗体と共被覆した際に得られる高い特異的治療分子送達について今後検討を進めたい。ベクター被覆分子としてはこの他に HTLV-1 のエンベロープを用いる方法や HIV のエンベロープを用いた方法も考えられる。しかし、送達の制御をより確実にするためには抗体の使用がより優れていると思われる。既感染者における抗体の存在を考えると HTLV-1 のエンベロープを用いる方法は季節感染者に対する治療的使用には不利かもしれない。しかし、ベクターの全身投与を反復する治療を念頭に置くと、免疫学的に交差反応が少ない HIV のエンベロープを用いた方法は有利か

もしれない。以上の点において、過去の influenza virus 感染既往と FPV の HA に対する抗体の獲得に関する関連性を含めた抗原性についての解析を行い、必要に応じて FPV HA の改良を行うべきかもしれない。

E. 結論

HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター被覆に必要な抗体分子の scFv 化に成功した。本研究の鍵となる技術の 1 つを達成できた。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表 無し
2. 学会発表
(国際学会) 無し
(国内学会) 無し

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録
特記すべきことなし
3. その他
特記すべきことなし

分担研究課題：治療分子の送達効率と細胞選択性の評価に関する研究

研究分担者 武田 哲 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨 HTLV-1 感染症に対して根本的な治療法は存在しない。プロウイルスウイルスを不可逆的に不活化する方法があれば新たな治療法の基盤を提供できると考えられる。そのため HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素 ZFN を開発しその性能評価を行う。この治療分子の一次機能評価を行うため、LTR 標的配列内の最小標的配列を利用してヒト細胞に一過性発現させた治療分子によって導入される核酸改変の効率と改変配列決定にかかる評価系のデザインと構築を試みた。ほ乳類細胞における直截評価は困難が予想されるため、大腸菌による選択を効果的に利用した一次評価系を導入した。今後、一次評価系の構築を進め、治療分子による活性を実際に評価する予定である。

A. 研究目的

現在日本の HTLV-1 感染者数は増加していると危惧されている。これに対し、治療法としては対症療法が存在するが予防法や根治療法は存在しない。医療経済学的見地からは、治療より発症を防止する方が負担は少ない上、感染者に対する身体的負担も小さいことから総合的にみて優れていると思われる。予防するためにはワクチンによる発症予防や感染予防がある。これに対して、一度感染したウイルスを取り除く事ができれば上記手法のみでは治療効果が得られない場合に非常に有用であると考えられる。我々は HTLV-1 の潜伏感染に介入して発症を遅延させる方法の確立を目指す。これを達成するためには HTLV-1 のプロウイルスを除去するか、不可逆的に不活性化してしまう方法が望ましい。特に後者におい

てはエピジェネティックな遺伝子発現抑制ではなく、プロモーターの機能破壊による不活性がより望ましい。ZFN はこの目的に非常に適していると考えられる。

本研究においては酵母系にて選択された候補 ZFN について、ほ乳類細胞系で治療分子としての機能を評価するための実験系を構築する。ZFN の効果をプロウイルス除去として直接評価するためにはその感染細胞に対する遺伝子導入という技術的障壁がある。また、感染細胞が細胞増殖に HTLV-1 遺伝子発現を要求するかという点についても不透明な点がある。また、実験系としては評価のための実験サイクルが十分に短い必要がある。それは治療分子の改良や機能発現のための条件を十分に検討するためである。以上の目的を同時に達成するために、本年度は一次機能評価実験系と

して、ZFN のエフェクター活性を検出するためのプラスミドの設計および 293T 細胞へのトランスフェクション系について実験系の構築を行った。

B. 研究方法

基本概念としてはLTRを使用する前に最小標的配列minimal target(mt)を用い、293T細胞を用いた一過性発現系にて評価を試みる。治療分子と2つの標的配列を持つプラスミドを同時に293T細胞に導入し、導入後48-72時間目にエフェクター活性の検出を行う(図1)。

エフェクター活性を検出するためのプラスミドpcDNA3mt2LacZaを構築する。これは二つの最小標的配列によって大腸菌におけるLacZa発現ユニットを挟む構造を有する構造を持つプラスミドであり、そのままでは大腸菌においてX-Gal存在下の寒天プレートでコロニー形成させると青色コロニーとなる。一方、治療分子がLacZaを除去すると白色コロニーとなる。

pcDNA3mt2LacZaは以下のように構築する。pcDNA3のXmaIサイトに標的配列をオリゴクローニング法にて導入する(図2)。これをpcDNA3mt1とする。大腸菌でLacZaを発現するユニットを挟むNdeIとMfeIサイトでえられるpBK-CMVに由来するDNA断片をpcDNA3mt1のNdeI-EcoRIサイトに導入する。これをpcDNA3mt1LacZaとする。このプラスミドのBglIIIサイトとに標的配列をオリゴクローニング法にて導入することにより作出する。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

治療分子発現ベクターと pcDNA3mt2LacZa を様々な比率で 293T 細胞に導入し、導入後

48-72時間目に細胞から Hirt DNA を回収する。

これを electroporation にて大腸菌 Stbl4 または DH5aにプラスミドを導入する。治療分子が2つの標的配列に DSB を導入し、LacZa発現ユニットを欠落させることができれば青白選択基質を含んだ寒天培地に大腸菌を植菌すれば白コロニーが出現するはずである。この青白頻度にて ZFN の機能を評価する。ZFN が作用しなかったプラスミド、標的配列の一方にしか ZFN が作用しなかったプラスミドとあわせて、ZFN が導入できなかったがレポータープラスミドだけが導入された細胞からもプラスミドが回収されるため、一定の青色コロニー頻度が予想される。これを細小にするために ZFN とレポータープラスミド比率は 1:10 またはそれよりも大きな比率とする。また、プラスミドの安定性が悪い場合、自然に白コロニーが出現する場合も想定される。そのため対象に必ず単一 ZFN しか使用しないものと、精製プラスミドをつかった形質転換を行う。治療分子発現ベクターは KM 耐性であるため、大腸菌のコロニーを生じさせないためコロニー形成によるシグナル攪乱への影響はない。白コロニーが出現した場合、そのコロニーから大腸菌を増殖させてプラスミドを増幅精製し、独立した 20 クローン程度を回収して破壊された標的配列の核酸配列を決定する。これによって物理的な遺伝子配列改変、つまりプロウイルスの除去効率を評価する。

D. 考察

本実験系ではほ乳類細胞にプラスミドを導入してから4日後に治療分子による効果を評価する事が出来る。これにより、治療分子の発現効率、作用効率向上のための条件検討、作用 kinetics 解析に非常に大きく貢献すると期

待される。ZFN による provirus 破壊評価系をはじめから provirus を持つプラスミドで行うと、目的のプラスミドを大腸菌で選択出来ないために作用効率の評価を迅速かつ確実に行うにはリスクが高い。本実験系である程度の ZFN 機能効率を評価した上で、作用効率を最大限に引き出す条件を導き出して、その条件を用いてウイルスが潜伏感染したヒト細胞で引き続き provirus 破壊に関する研究を推進すれば良いと思われる。

E. 結論

ZFN を用いた不可逆的な HTLV-1 プロウイルス破壊に関するほ乳類細胞で迅速且つ確実に機能評価を実施できる実験系のデザインを行った。ZFN の候補分子選定後、速やかな評価を可能にすると思われる。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
(国際学会)
なし
(国内学会)
なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録
特記すべきことなし
3. その他
特記すべきことなし

図1. ヒト細胞における治療分子機能評価系

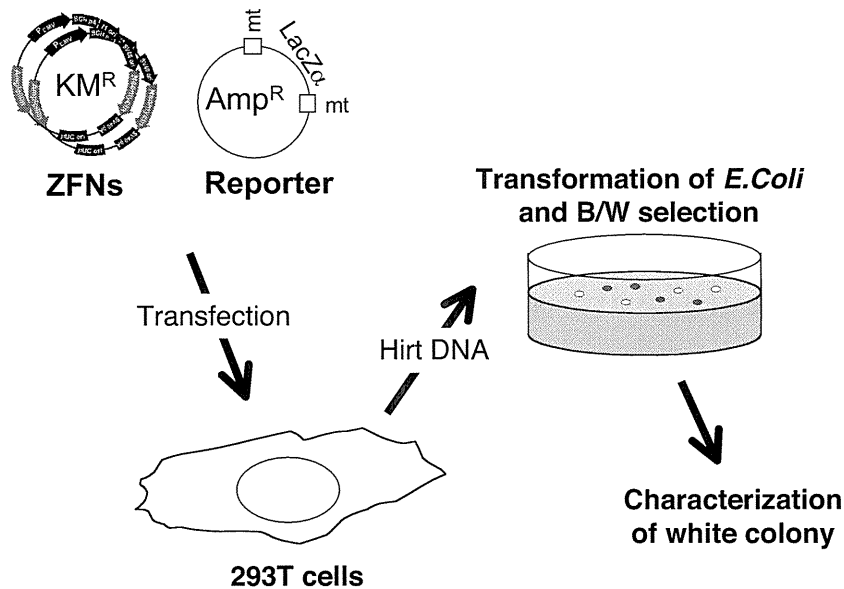


図2. クローニングに使用する合成核酸

1 組目の治療分子用

Xma Iサイトへのクローニング

5'-ccggGCCTACCTAGACTCAGCCGGctctcCACGCTTTGCCTGActcgag-3'
5'-gatcaagcttGTCAGGCAAAGCGTGgagagCCGGCTGAGTCTAGGTAGGCa-3'

Bgl IIサイトへのクローニング

5'-gatctGCCTACCTAGACTCAGCCGGctctcCACGCTTTGCCTGACaagctt-3'
5'-gatcaagcttGTCAGGCAAAGCGTGgagagCCGGCTGAGTCTAGGTAGGCa-3'

2 組目の治療分子用

Xma Iサイトへのクローニング

5'-gatcTCCACCCCTTTCCCTtttcattCACGACTGACTGCCGGCTaagctt-3'
5'-gatcaagcttAGCCGGCAGTCAGTCGTGaatgaaAGGGAAAGGGGTGGA-3'

Bgl IIサイトへのクローニング

5'-gatcTCCACCCCTTTCCCTtttcattCACGACTGACTGCCGGCTaagctt-3'
5'-gatcaagcttAGCCGGCAGTCAGTCGTGaatgaaAGGGAAAGGGGTGGA-3'