

Fig. 1. ヒト膵癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

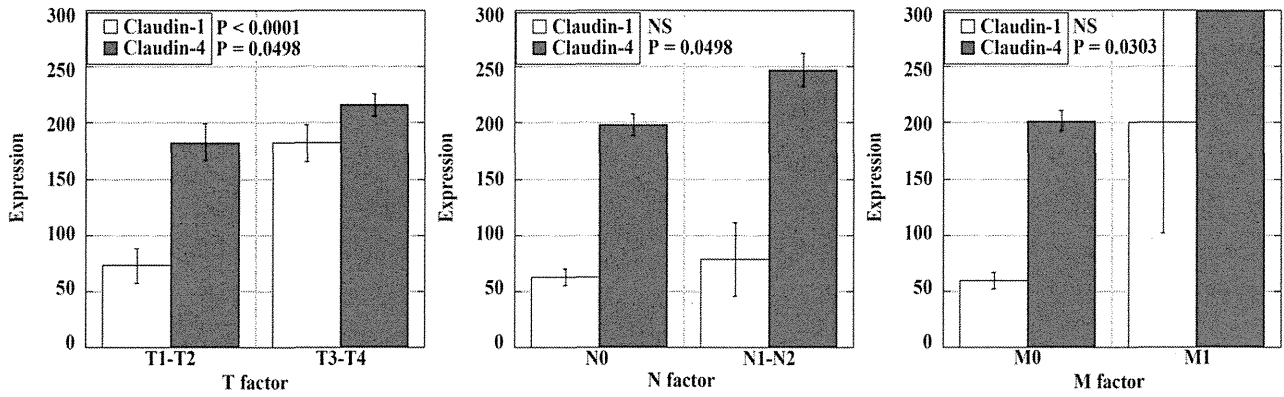


Fig. 2. ヒト膵癌 MIA-CaPa 細胞における抗 claudin-4 抗体 4D3 の5FU 抗腫瘍作用増強効果

および抗 claudin-4 抗体 4D3 による5FU 癌細胞内移行の促進

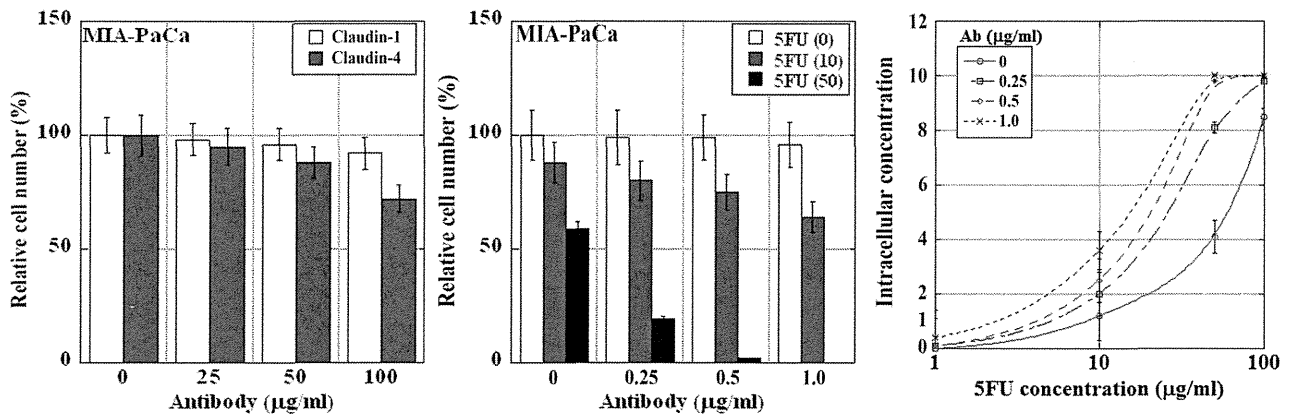


Fig. 3. ヒト膵癌細胞 MIA-CaPa のヌードマウス皮下腫瘍における抗 claudin-4 抗体 4D3 の

5FU 抗腫瘍作用の増強効果

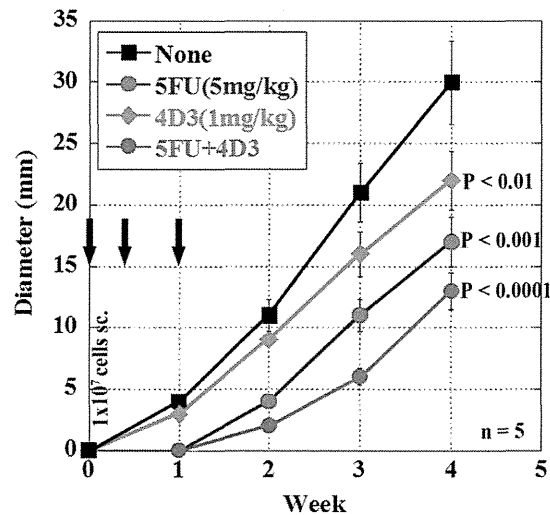


Fig. 4. ヒト膀胱癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

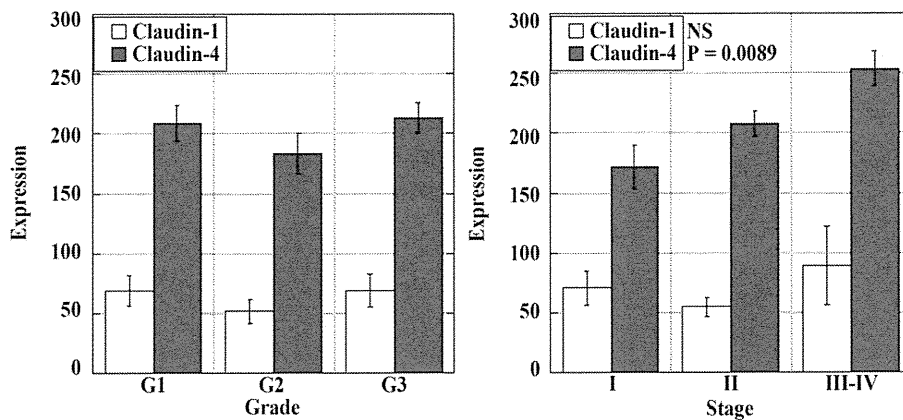


Fig. 5. ヒト膀胱癌 T24 細胞における抗 claudin-4 抗体 4D3 の CDDP 抗腫瘍作用増強効果および抗 claudin-4 抗体 4D3 による CDDP 癌細胞内移行の促進

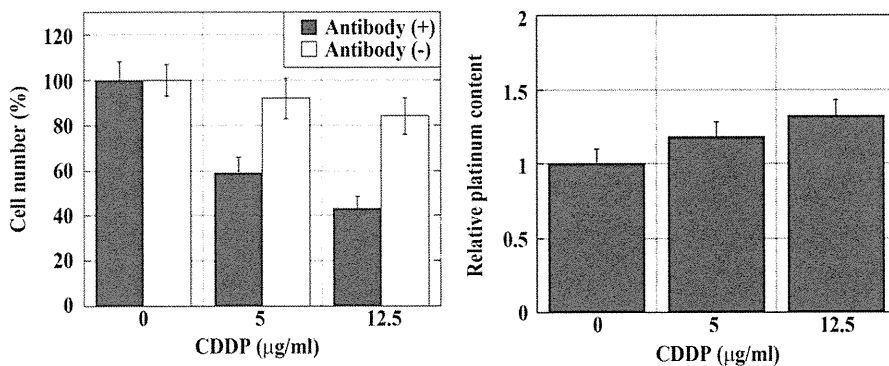


Fig. 6. ヒト膀胱癌における抗 claudin-1 抗体 2C1 の TGF-β 誘導 EMT に対する阻害作用

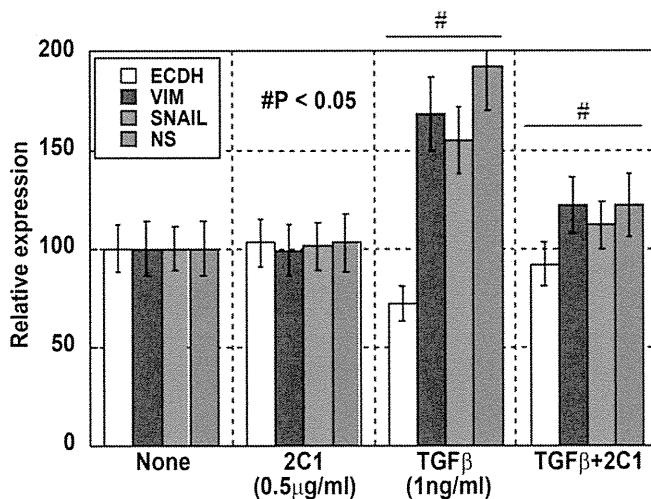


Fig. 7. ヒト腎癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

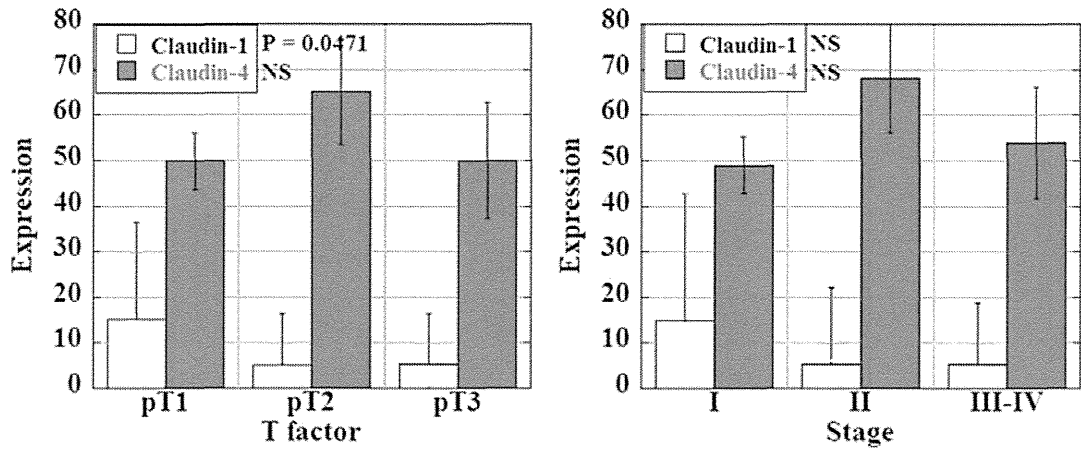


Fig. 8. ヒト腎癌における claudin-4 核内染色像と臨床病理学的因子との相関

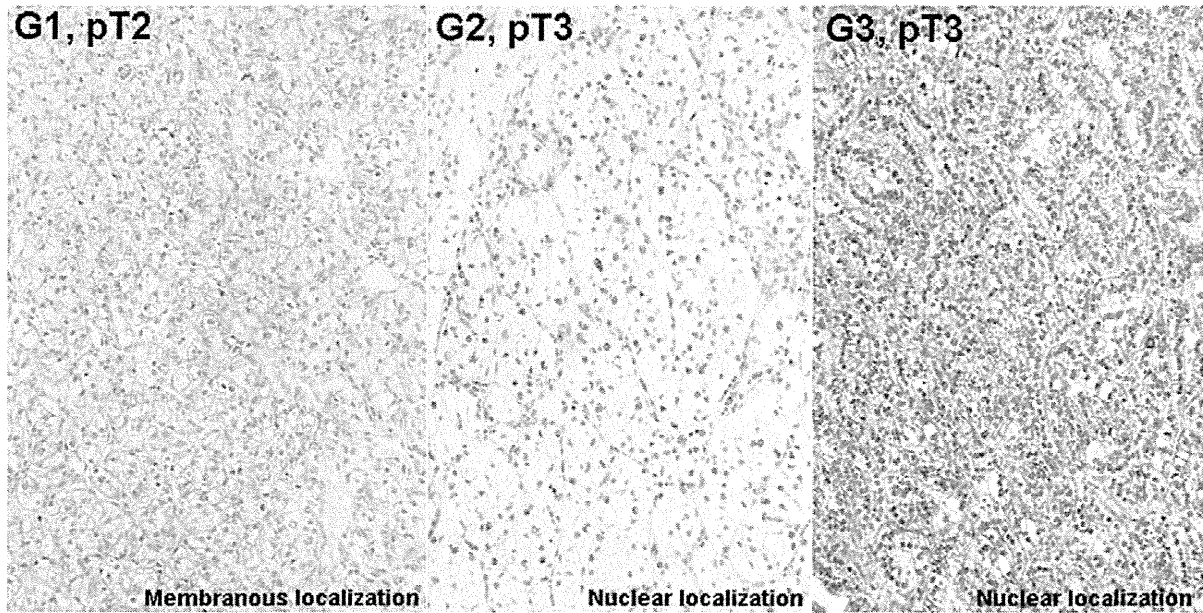


Table. 1. ヒト腎癌における claudin-4 核内染色像と臨床病理学的因子との相関

	n	pT3-4	
Nuclear		5	5 (100%)
Non-nuclear	198	6 (3%)	P<0.0001

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

「Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発」

H24 年度 分担研究報告書

Claudin-1 binder の性状解析と C 型肝炎ウイルス感染阻害活性解析

国立感染症研究所細胞化学部 室長 深澤征義

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、我が国における肝がん発症の主要な原因であり、その対策が強く求められている。タイトジャンクション分子である Claudin-1（CL-1）は HCV 感染時の肝細胞への侵入過程に必須の宿主因子である。CL-1 を標的とした抗 HCV 創薬基盤の確立を目指し、昨年度に引き続き、本年度は以下の検討を行った。まず、CL-1 の細胞外ドメインを認識する CL-1 結合分子（CL-1 binder）の樹立を目指し、DNA 免疫法によるモノクローナル抗体の作製を試みた。抗体の選別には、昨年度確立したスクリーニング系（CL-1 欠損株と親株（Huh7.5.1 細胞）への結合の差（有無）を指標とする系）を用いた。その結果、ヒト CL-1 の細胞外ドメインに特異的に結合する 4 クローンのマウスモノクローナル抗体が樹立できた。そこでさらに、昨年度確立した *in vitro* HCV 感染阻害評価系を用い抗体の評価を行ったところ、これらモノクローナル抗体が HCV 感染阻害能を示すことが明らかとなった。特に 3 クローンは非常に強い HCV 感染阻害活性を示したことから、創薬シーズとして非常に有用と考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、我が国における肝がん発症の主要な原因と考えられており、その感染治療に向けた対策が強く求められている。HCV が肝細胞に侵入する過程にはタイトジャンクション分子である Claudin-1（CL-1）が必須であることが明らかとなり、宿主因子である CL-1 を標的とした HCV 感染阻害法の可能性が考えられる。本分担研究では CL-1 を標的とした抗 HCV 創薬基盤の確立を最終目標とする。昨年度、より簡便・高感度な HCV 感染阻害評価系を確立し、さらに、創薬プローブとなりうる CL-1 binder の取得に有用なスクリーニング系も確立することができた。そこで本年度は、これらのシステムを利用して CL-1 binder を樹立するこ

と、そして、得られた CL-1 binder の HCV 感染への影響を *in vitro* で検討することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 CL-1 binder の樹立・性状解析

本年度は CL-1 binder の樹立を目指し、2つの方法を試みた。1つは、抗 CL-1 マウスモノクローナル抗体の作製であり、もう一つは特殊環状ペプチドライブラリーから CL-1 binder をスクリーニングする方法である。

マウスモノクローナル抗体の作製については、インタクトの CL-1 細胞外ドメインを認識する抗体の樹立に適する方法として DNA 免疫法を用いた。抗体のスクリーニングは、昨年度

樹立した CL-1 欠損株と親株 (Huh7.5.1 細胞) に対する各抗体の結合の差(有無)を細胞 ELISA により測定することで行った(図 1)。その他の方法は、常法に従った。

特殊環状ペプチドライブラリーは東京大学菅裕明先生の確立したシステムを用いた。スクリーニングは、上記と同様に、CL-1 欠損株には結合せず、親株には結合するペプチドプールを繰り返し濃縮することで行った。

B-2 HCV 感染阻害活性の解析

抗 CL-1 抗体の HCV 感染阻害活性の解析には、昨年度樹立した簡便・高感度な HCV 感染阻害評価系を用いた。具体的には、以下のように行った。コラーゲンタイプ I コート 48 穴プレート(コーニング)に Huh7.5.1-8 細胞を 5×10^4 cells/well ($500 \mu\text{l}$) でまいた。培地は、以下すべて 10% Fetal Bovine Serum (Cell Culture Bioscience) - 非必須アミノ酸 (Hyclone) - penicillin/ streptomycin (Wako) 含有 D-MEM (Wako) を用いた。37°C、1 日間、CO₂ インキュベータ中で培養した。培地を除き、4 種の Claudin-1 精製抗体を 0.1~5 μg 含む培地 ($200 \mu\text{l}$) に交換後、室温 (25°C) で 1 時間インキュベートした。

その後、HCV (JFH1 由来適応変異株) (HCV core タンパク質濃度として 1.56 pmol/L, MOI: ~0.5 に相当) を含む培地 ($200 \mu\text{l}$) を加え、室温 (25°C) で 2 時間感染させた。HCV を含む培地を除き、 $500 \mu\text{l}$ の培地で 3 回細胞を洗浄後、各 Claudin-1 精製抗体を 0.1~5 μg 含む $400 \mu\text{l}$ の培地下で 4 日間培養を行った。各サンプルの HCV 量については以下の方法で測定し、感染の評価を行った。

培養上清中の HCV 濃度については、HCV core タンパク質濃度を ELISA 法 (オース) により測

定した。方法はマニュアルに従った。

感染細胞中の HCV タンパク質 (Core タンパク質、NS3 タンパク質) については、イムノブロット法により検出した。方法は、Novex NuPAGE Gel Electrophoresis-XCell II Blot Module (Invitrogen) システム及び SNAP i.d. 吸引式免疫反応システム (Millipore) を用いて行った。細胞を $500 \mu\text{l}$ の PBS で洗浄後、 $100 \mu\text{l}$ の NuPAGE LDS Sample Buffer (4×) に溶解し、13 μl を NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 17 well にて分離した。Invitrogen 社マニュアルに従い PVDF 膜に転写後、Millipore 社マニュアルに従い免疫反応を行った。抗 HCV core 抗体 (ANOGEN) を 2,000 倍希釈、抗 HCV NS3 抗体 (Abcam) を 1,000 倍希釈、抗 GAPDH 抗体 (Abcam) を 20,000 倍希釈、二次抗体 (HRP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson Immuno Research) を 2,000 倍希釈で用いた。シグナルの検出は、ECL 試薬 (GE Healthcare) を用いて、マニュアルに従い行った。

感染細胞中の HCV ゲノム RNA 量の測定は、以下のように行った。細胞を $500 \mu\text{l}$ の PBS で洗浄後、NucleoSpin RNA II (Takara Bio) を用い、マニュアルに従い全 RNA を精製した。100~200 ng の全 RNA を用い、qRT-PCR 法 (LightCycler RNA Master SYBR Green I, Roche, 方法はマニュアルに従う) にて、HCV ゲノム RNA の定量を行った。HCV ゲノム RNA 検出用の DNA プライマーは、AGGAAGACTTCCGAGCG 及び GGGTGACAGGAGCCATC を合成し用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、現段階ではヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

C-1 CL-1 binder の樹立・性状解析

DNA 免疫法、CL-1 欠損株を用いた独自のスクリーニング法を用いることで、4 クローン (2C1, 3A2, 5F2, 7A5) のマウス抗ヒト CL-1 モノクローナル抗体が樹立された。これらの抗体は、CL-1 を発現する Huh7.5.1 細胞の細胞表面には結合し、CL-1 を欠損した Huh7.5.1 由来細胞である S7-A (S7d6) 細胞には結合しないことが FACS 解析から確認された (図 2)。さらに、CL-1、Claudin-4 (CL-4) を発現していない HEK293T 細胞を用いて、一過的に CL-1 あるいは CL-4 を発現させ、コントロール抗体あるいは各抗 CL-1 モノクローナル抗体で染色を行った。その結果、CL-1 を一過的に発現した HEK293T 細胞でのみ、各抗体で染色される細胞群が認められた (図 3)。このことから、各モノクローナル抗体はヒト CL-1 の細胞外ドメインを特異的に認識しているものと考えられた。

次に、各抗体がイムノブロットに利用できるかについても検討した。その結果、クローン 7A5 のみでバンドが検出され、7A5 は変性 CL-1 も認識できることがわかった (図 4)。

次に、各抗体を用いて培養細胞の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下、観察を行った。その結果、CL-1 を発現する Huh7.5.1 細胞では各モノクローナル抗体により細胞-細胞接着部位が染色されたのに対して、CL-1 欠損細胞では染色が見られなかった。

特殊環状ペプチドライブラリーを用いた検討では、CL-1 binder のスクリーニングを複数回行ったが、各サイクルを繰り返しても、特定の配列を有するペプチドが濃縮されてこなかった。7-10 ラウンド後に得られた特定の配列を用い

て Huh7.5.1 細胞および CL-1 欠損細胞への結合を調べた結果、CL-1 発現細胞に対して結合性が強いペプチドが複数見られた。しかし、その結合能 (結合ペプチドの回収量) は非常に弱かった。そのため、その後の HCV 阻害能の検討は現段階では行わなかった。

C-2 抗 CL-1 抗体の HCV 感染阻害活性の解析

研究方法に示したように、各モノクローナル抗体を前処理した Huh7.5.1 細胞を用いて、HCV 感染への影響を検討した。培養上清中のウイルス量について図 6 に示す。モノクローナル抗体 (7A5) では抗体量に比例して HCV 感染阻害効果が見られ、0.1 μ g で 50%以上のウイルス量の低下がみられ、0.5 μ g 以上で飽和状態となり、強いウイルス産生阻害が見られた。また、モノクローナル抗体 (2C1, 3A2) では 0.1 μ g 以上で飽和状態となり極めて強いウイルス産生阻害が見られた。モノクローナル抗体 (5F2) では、他の抗体に比べ作用は弱いものの、抗体量に比例して HCV 感染阻害効果見られ、2.5 μ g で 50%以上のウイルス量の低下がみられた。図 7 には、培養細胞内のウイルス蛋白質 (HCV core 及び NS3) 量のイムノブロットによる解析結果を示した。培養上清中へのウイルス放出量の結果 (図 6) と相関するように、各モノクローナル抗体処理によりウイルス蛋白質産生が阻害された。さらに、図 8 には培養細胞内のウイルスゲノム産生量について示した。図 6, 図 7 の結果と相関するように、ウイルス RNA ゲノム産生が各抗体により阻害された。

本研究で用いた HCV 株は genotype 2a の JFH1 株のみであり、感染実験に用いることのできる汎用株は非常に限られている。そこで、侵入過程の検討が可能な HCV 偽ウイルス感染系を用い

て抗 CL-1 抗体の効果の検討も行った。ウイルスは genotype 2a と 1b について行った。その結果、HCV に対して感染阻害能が非常に強かったモノクローナル抗体 (2C1、3A2) では、2a 及び 1b の HCV 偽ウイルスの侵入も強く阻害した。一方、モノクローナル抗体 (5F2、7A5) では、用量依存的に HCV 偽ウイルスの侵入は阻害されたが、その阻害の程度は、2C1、3A2 に比べ弱めであった。

D. 考察

今回、ヒト CL-1 の細胞外ドメインを認識する 4 クローンのマウスモノクローナル抗体の作製に成功した。同様の抗 CL-1 抗体としては、これまでにラットモノクローナル抗体が報告されている (HEPATOLOGY 2010; 51:1144-1157)。これらラット抗 CL-1 抗体は、HCV 感染阻害活性を示すものの、5 μ g/ml で約 20%阻害、50 μ g/ml で約 70%阻害、100 μ g/ml で約 95%阻害、と非常に高濃度の抗体量が必要である。それに対して我々のマウスモノクローナル抗体は約 1/50-1/500 量で同様の HCV 阻害活性を示すことから、創薬シーズとしてもより有用な CL-1 binder であると考えている。今後は、in vivo での本抗体の効果を検討するため、ヒト肝臓キメラマウスを用いた HCV 感染系を導入する予定である。

特殊環状ペプチドライブラリーを用いた検討については、スクリーニング系に細胞を用いた初めての試みであり、現状では特異性が高く結合能の強い CL-1 binder は得られるに至っていない。細胞を用いる系では非特異的結合が大きいことやライブラリーの RNA 部分の安定性に影響が出ている可能性が考えられる。そこで、よりシンプルなシステムである CL-1 提示バキュロウイルスをスクリーニングに用いる系を今後検討

していく予定である。

E. 結論

DNA 免疫法、CL-1 欠損細胞を用いた独自のスクリーニング法により、ヒト CL-1 の細胞外ドメインに特異的に結合する 4 クローンのマウスモノクローナル抗体を樹立できた。さらに、これらモノクローナル抗体は in vitro 培養細胞系において HCV 感染阻害能を示すことが明らかとなった。特に 3 クローンは非常に強い HCV 感染阻害活性を示したことから、創薬シーズとして非常に有用と考えられた。そのため、特許も申請した。以上のように、本年度の目標は十分達成され、当初考えていた次年度の計画も前倒しに行うことができたと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, Y.; Fukasawa, M.; Kaneko, Y.; Suzuki, T.; Wakita, T.; and Fukazawa, H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus lifecycle. *Microbes and Infection*, 2013, 15, 45-55

2. 学会発表

- 1) 深澤征義、Claudin 1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013. 3. 27-30
- 2) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤 秀輔、鈴木 哲朗、脇田 隆字、花田 賢太郎、千葉丈、安部 良、深澤 征義、高感染能を有する HCV JFH-1 適応変異株の性状解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012. 11. 13-15
- 3) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami,

Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada., Isolation and characterization of a mutant hepatitis C virus adapted to mouse CD81, The 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses , Venice, Italy , 2012. 10. 5-9

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- 1) (発明者) 深澤征義、花田賢太郎「培養細胞、及び、細胞構築方法」(特願 2012-154982) 出願中
- 2) (発明者) 近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩「抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤」(特願 2013-38059) 出願中
- 3) (発明者) 近藤昌夫、國安弘基、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁「抗体、フラグメント、医薬組成物、分子及び腫瘍マーカー」(特願 2013- 40211) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1

スクリーニングの方法論

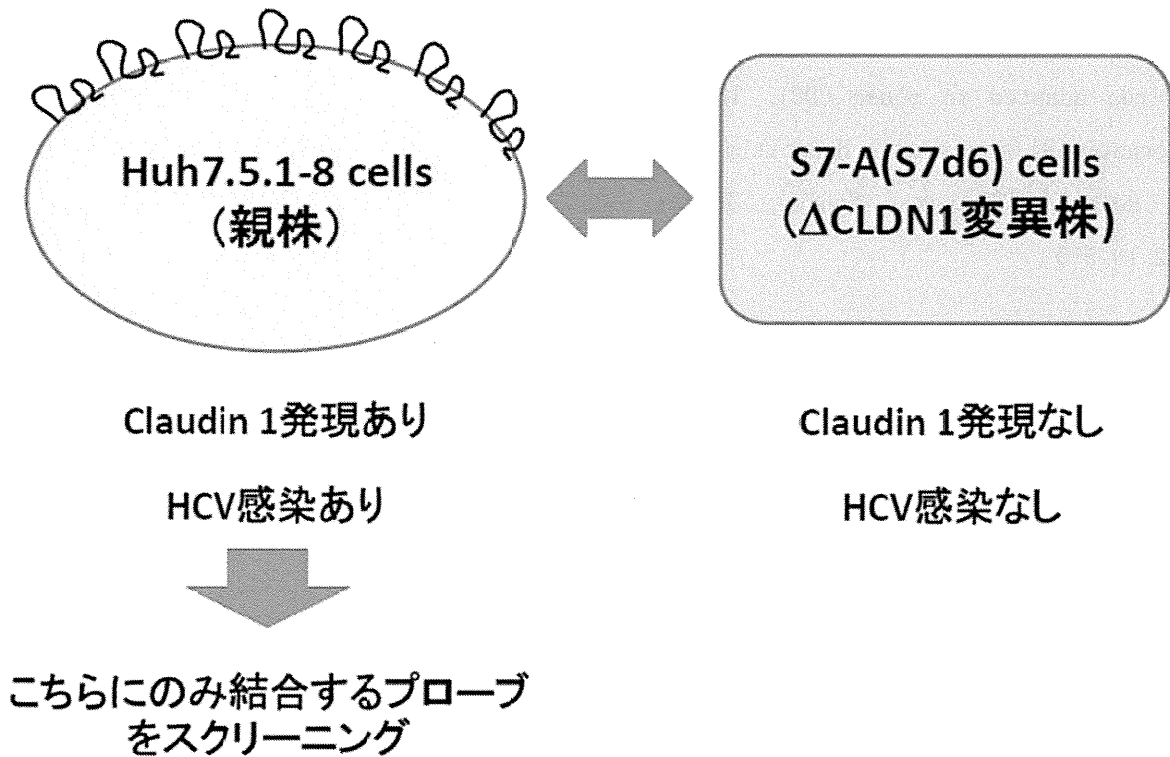
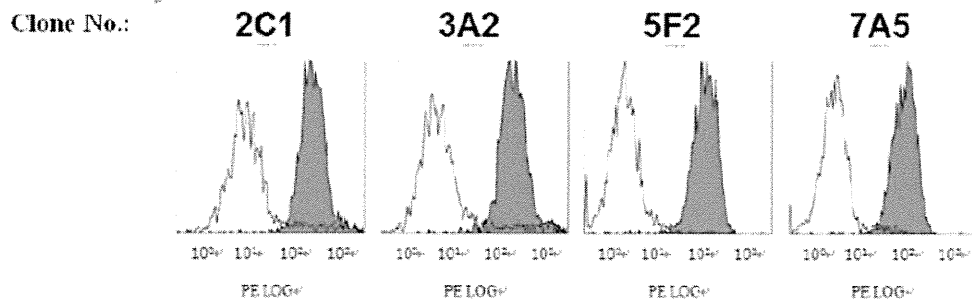


図2

マウスモノクローン化抗体の細胞表面CLDN1への結合能の検討(1)



Immunoglobulin isotyping:

赤: Huh7.5.1細胞
白: S7d6(ΔCLDN1)細胞

Project	Clone No.	Isotype
human CLDN-1	2C1	IgG2b
	3A2	IgG2b
	5F2	IgG2a
	7A5	IgG1

図3 マウスモノクローン化抗体の細胞表面CL-1への結合能の検討(2)

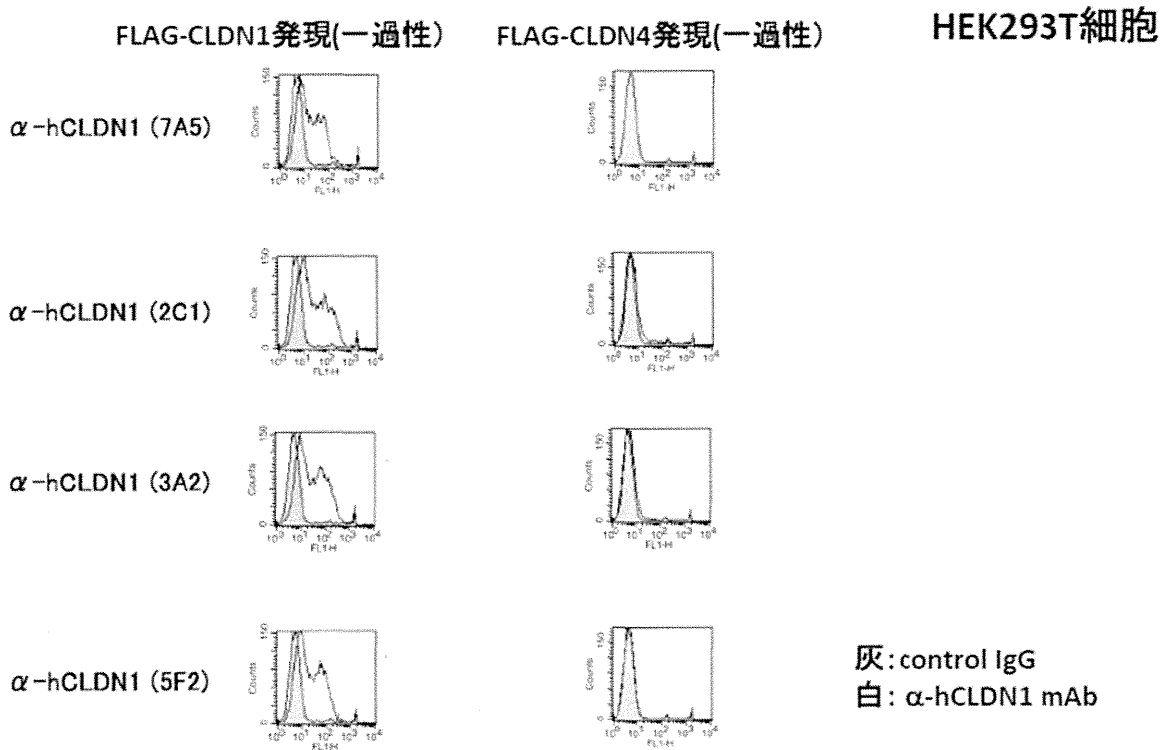


図4

Immunoblot analysis

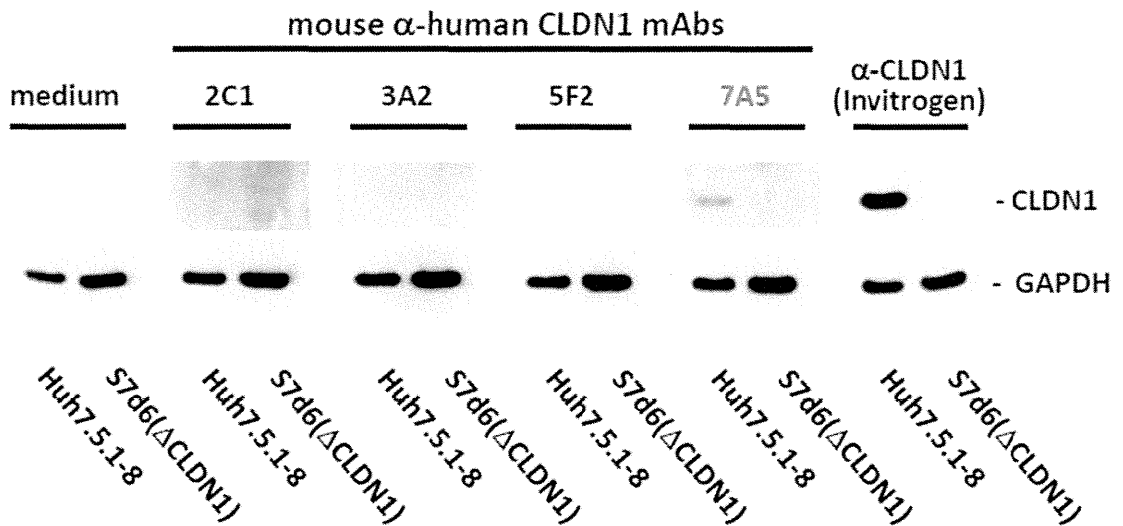


図5

Mouse Anti-Claudin1 mAbを用いた細胞染色
(non-permeabilized cells)

Green:Alexa488

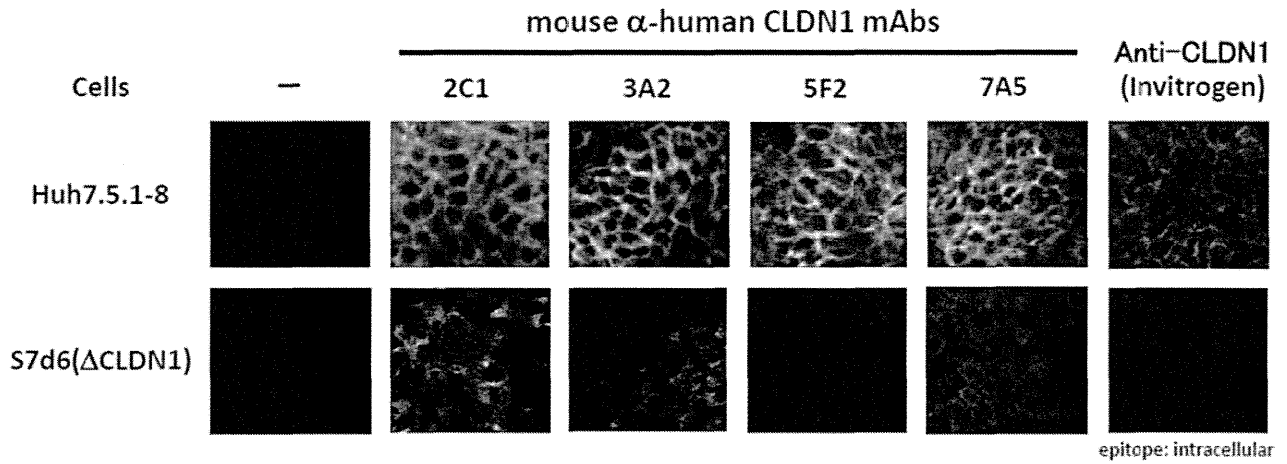


図6

Mouse Anti-Claudin1 mAbによるHCV産生阻害(培養上清中のウイルス)

HCV core protein in culture supernatant

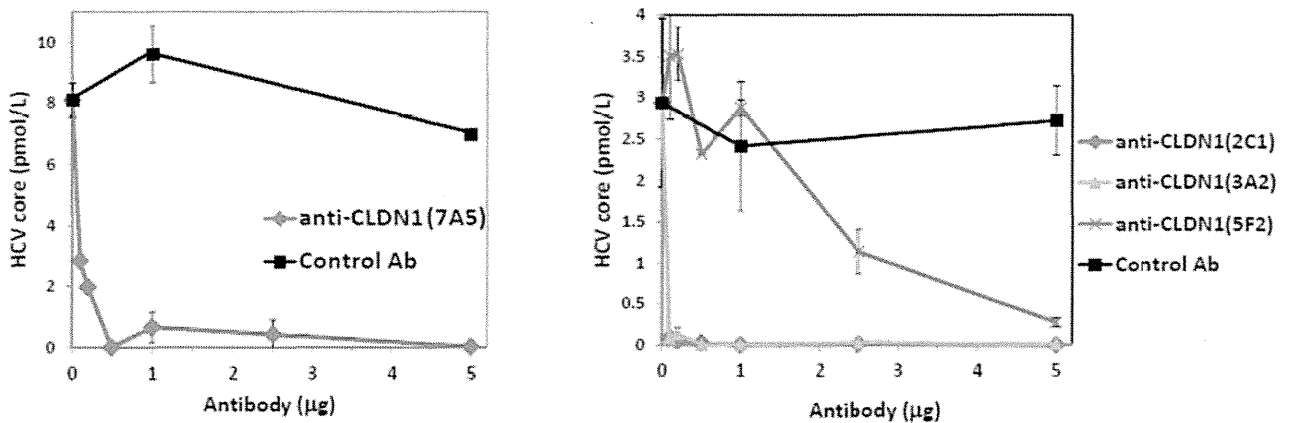


図7

Mouse Anti-Claudin1 mAbによるHCV産生阻害(細胞内のウイルス蛋白質)

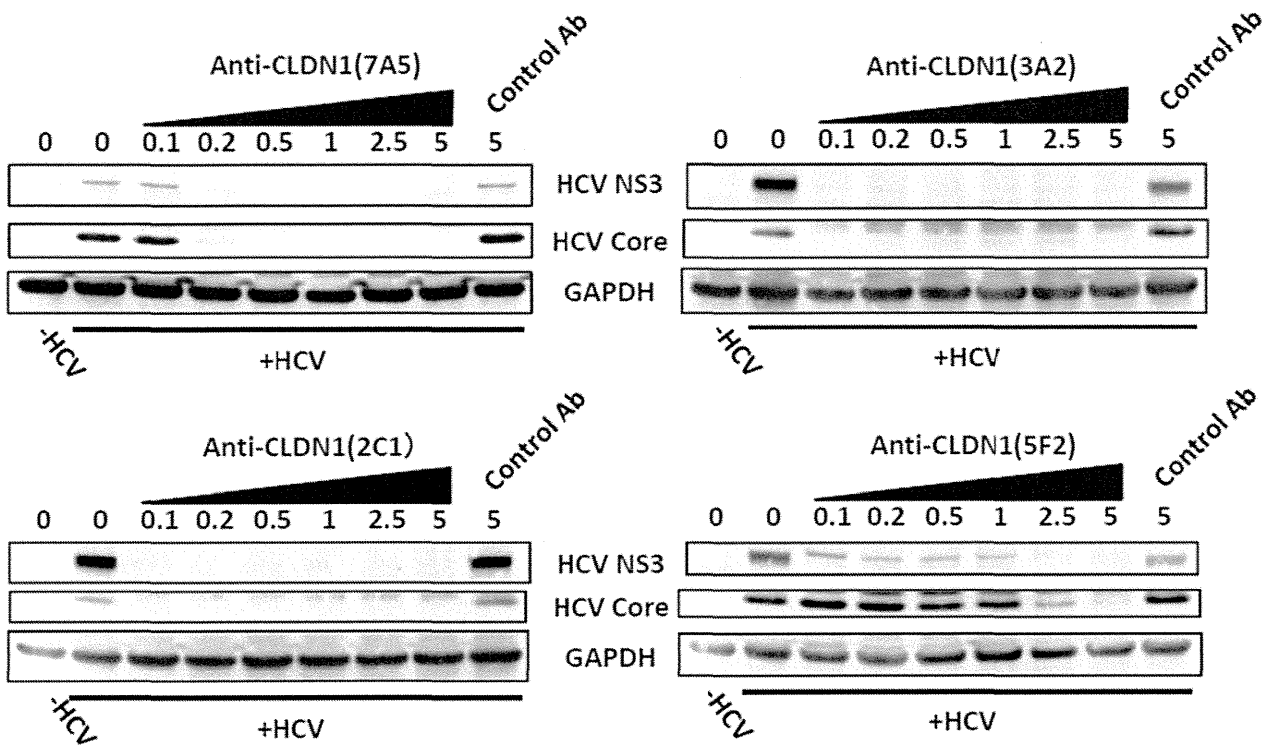


図8

Mouse Anti-Claudin1 mAbによるHCV産生阻害(細胞内のウイルスゲノム)

Cellular HCV genomic RNA

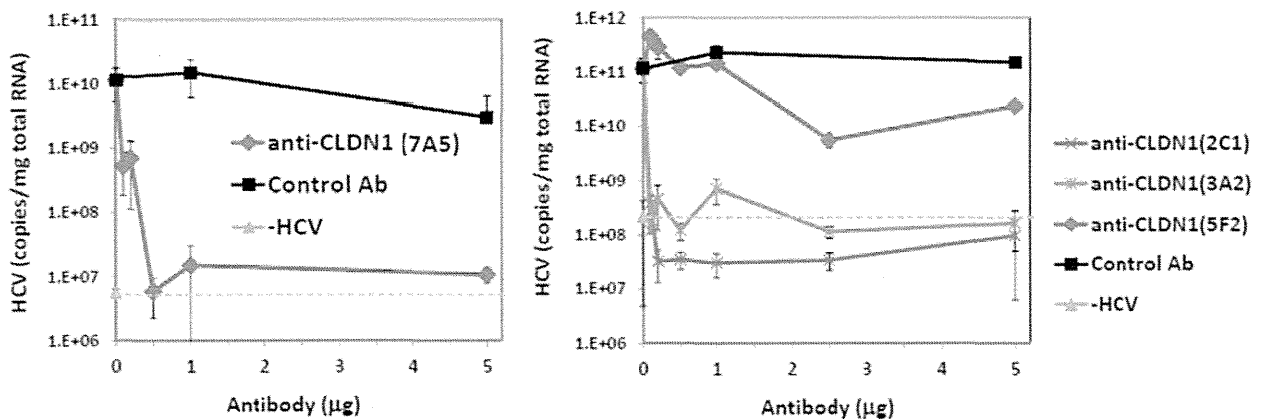
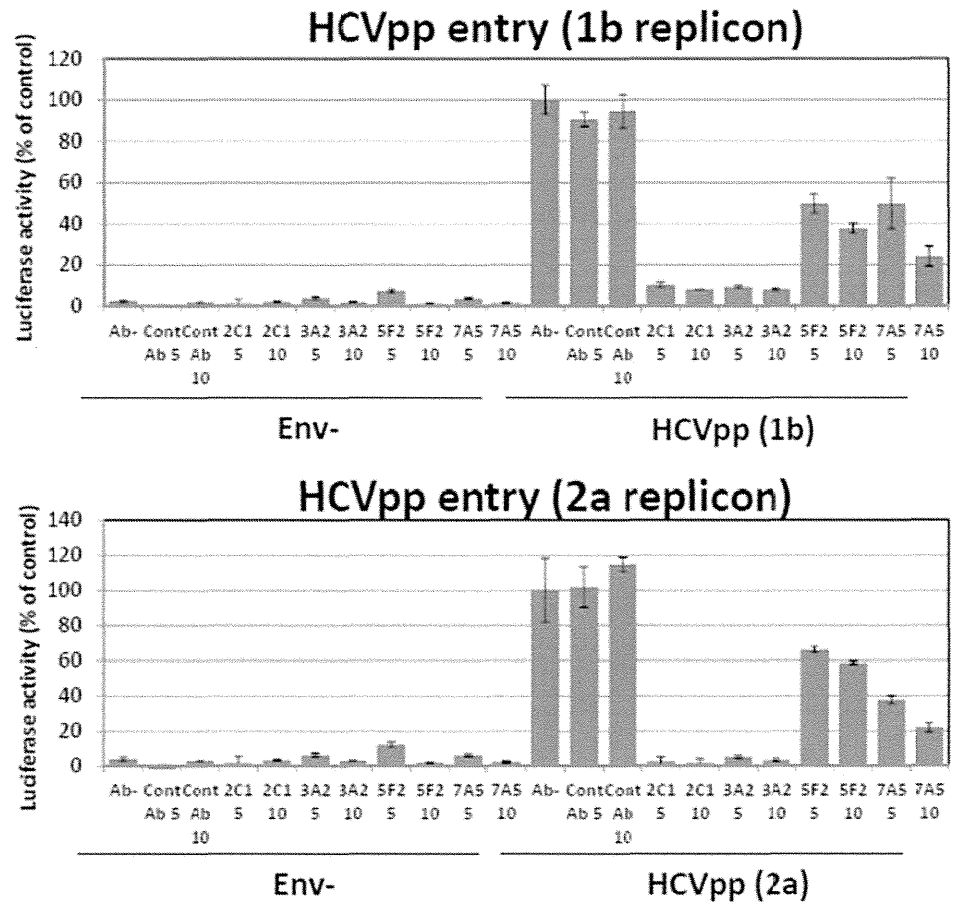


図9

Mouse Anti-Claudin1 mAbによるHCVpp侵入阻害



Claudin 標的型粘膜ワクチンの開発に向けた粘膜免疫

応答システムの解析

研究分担者 國澤 純

(独)医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

東京大学医科学研究所 客員教授

研究要旨

抗原を“吸わせる・飲ませる”といった方法で免疫することで特異的免疫応答を誘導しようとする粘膜ワクチンが実用化のステージとなってきた。一方で、これら粘膜ワクチンを多くの感染症に対して汎用していくためには、ワクチン抗原のデザインやアジュバントの開発に加え、抗原送達技術の開発が必要不可欠である。本研究では、粘膜組織の上皮細胞層における物理的バリアを形成する Claudin を標的とした粘膜ワクチンの開発を目指した研究を展開する。本事業の2年目にあたる平成 24 年度は上記目的達成に向け、Claudin 4 結合分子である C-CPE (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin)の粘膜ワクチンの有効性評価として、C-CPE に肺炎球菌の共通抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA)を融合させ、経鼻免疫に用いた際の免疫応答を解析した。その結果、C-CPE を用いることで優れた PspA 特異的免疫応答が誘導できることを示した。さらにこれら C-CPE の経鼻肺炎球菌ワクチンとしての有効性を評価するための非侵襲性肺炎球菌イメージングシステムを確立した。また Claudin 4 標的型ワクチンの送達部位となる粘膜リンパ組織における免疫応答に関する研究を遂行し、代表的粘膜リンパ組織であるパイエル板に依存的に誘導される新規 IgA 抗体高産生サブセットを同定した。

C. 研究目的

消化器や呼吸器に代表される粘膜組織は多くの病原微生物の侵入門戸となっている。生体は粘膜組織に粘膜免疫システムと呼ばれる精密かつダイナミックな免疫制御システムを備えることで、粘膜組織を介し侵入してくる病原体に対する生体防御を行っている。

これら粘膜免疫システムの有する生体防御機能を応用した粘膜ワクチンが注目されている。粘膜ワクチンは、“吸わせる、飲ませる”といった方法により抗原を投与するワクチン接種で、すでに日本国内においても、本年度からロタウイルスに対する2種類のワクチンが経口ワクチンとして使用されている。全身免疫系にのみ免疫応答を誘導でき

る従来の注射によるワクチン接種とは異なり、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身系免疫の両部位に免疫応答を誘導できることから、粘膜組織を初発感染部位とする病原体に対する優れたワクチンとして絶大な効果を発揮すると期待される。

このように徐々に実用化のステージに入ってきた粘膜ワクチンであるが、粘膜ワクチンを普遍的なワクチンとして汎用性を高めていくためにはいくつか克服すべき課題があり、その一つが抗原送達である。すなわち異物を排除する組織としての機能を発達させている粘膜組織を標的としたワクチン開発においては、投与したワクチン抗原が上皮細胞によるバリアをくぐり抜け、その下層に存在する免疫系に認識される必要がある。

本事業においては上皮細胞層でのバリア形成を担う Claudin に着目した粘膜ワクチンの開発を目指した研究を展開する。本事業の2年目となる平成 24 年度は、研究代表者の近藤が開発した Claudin 4 結合分子であるウエルシュ菌下痢毒素断片 C-CPE (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin) の感染症用経鼻ワクチンの有効性評価を行うことを第一の目的とする。そのために C-CPE に肺炎球菌の共通抗原である PspA (Pneumococcal surface protein A) を融合させた組換えワクチンを作製し、経鼻免疫に用いた際の免疫応答を解析した。さらにこれら C-CPE の経鼻肺炎球菌ワクチンとしての有効性を評価するための非侵襲性肺炎球菌イメージングシステムを確立した。加えて宿主側の免疫システムの解析として、Claudin 4 標的型ワクチンの送達部位となる粘膜リンパ組織における免疫応答に関する研究を遂行した。

D. 研究方法

B-1. PspA-C-CPE 融合タンパク質の調整

PspA および PspA-C-CPE 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し一晚培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晚振盪培養し翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37 °C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., Japan) を終濃度 0、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 20 秒 \times 3 回行

い大腸菌を破碎した。4 °C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 100°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

PspA および PspA-C-CPE 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し一晚培養した。大腸菌 1 コロニーを LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した後、10,000 rpm で 2 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 3 ml を可溶化条件の検討に用い、497 ml は精製条件の検討に用いた。3 ml culture の大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) 300 μ l に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 300 μ l 加え超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A を 300 μ l 加え超音波処理をしたそれぞれの溶液画分 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l を加え、100°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いての可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、

40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm , 15 分間遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA , MilliQ , NiSO₄ , buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、PspA および PspA-C-CPE タンパク質を吸着させた。100 mM の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、500 mM の imidazol 溶液 10 ml で PspA および PspA-C-CPE タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl , 2.68 mM KCl , 8.14 mM Na₂HPO₄ , 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS (-) を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、PspA および PspA-C-CPE 融合タンパク質の濃度を算出した。

B-3. PspA-C-CPE 融合タンパク質の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した PspA-C-CPE 融合タンパク質を 1 μg/13.4 μl に調整した。その溶液 13.4 μl に 4×SDS を 6.6 μl を加え、100°C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μl (タンパク質量として 1 μg) アプライした。10% polyacrylamide gel を用いて 20 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪し

ロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、Canget 1 (TOYOBO) により 2000 倍に希釈した一次抗体: Mouse anti His-tag antibody と 1 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、Canget 2 により 2000 倍に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 3 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、LAS により PspA-C-CPE 融合タンパク質の検出を行った。

B-3. PspA-C-CPE 融合タンパク質の Claudin 4 結合性

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に Claudin 4-budded baculovirus (BV) (ネガティブコントロールとして mock BV および Claudin 5-BV) を 0.5 μg/well の条件で、4°C で一晚インキュベーションすることで固相化した。翌日、PBS (-) で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS (-) で 3 回洗浄した。続いて、C-CPE タンパク質量として 0.02 μg/well の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS (-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 2,000 倍に希釈した Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigrohill, Co., Cork, Ireland) を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。5 分間インキュベート後、2 M 硫酸を 100 μl/well 加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

B-4. PspA-C-CPE を用いた経鼻免疫と免疫誘導

能評価

6週令の雌性、BALB/c マウスに PspA-C-CPE を PspA 量として $5 \mu\text{g}/20 \mu\text{L mouse/time}$ となるように調整し、週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫を行った。最終免疫の 1 週間後、鼻腔洗浄液を回収し、鼻腔洗浄液中の PspA 特異的 IgA 抗体価を ELISA 法にて測定した。

B-5. 発光イメージングシステムを用いた肺炎球菌感染評価システムの構築

ルシフェラーゼ発現肺炎球菌 (Xen10) を Caliper Life Sciences 社から購入し、BHI 培地を用いて培養した。対数増殖期に集菌し、イソフルランによる麻酔下で $2 \times 10^5 \text{ CFU}/50 \mu\text{L}$ となるように呼吸器感染させ、経時的に感染状態を Xenogen 社の IVIS CCD camera で撮影した。ワクチン接種群として PspA と粘膜アジュバントであるコレラトキシンを $1 \mu\text{g}$ 混合したものを週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫したマウスを、非ワクチン接種群として PBS 投与のマウスを用いた。

B-6. 腸管 IgA 産生細胞の解析

胎生 14 日目に抗 IL-7 受容体抗体を $500 \mu\text{g}$ 投与することでパイエル板欠損マウスを作製した。パイエル板欠損マウス、ならびにコントロール抗体を投与したマウスの腸管から単核球を回収し、FACS 法にて解析を行った。さらに Cell sorter により、CD11b 陽性 IgA 陽性細胞と CD11b 陰性 IgA 陽性細胞を分取して、その遺伝子レベルでの違いを Microarray 法で解析した。また単離細胞をそれぞれ 3 日間培養し、培養液中に産生された IgA 量を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

C-1. PspA-C-CPE の経鼻ワクチン効果

C-CPE の感染症用経鼻ワクチンとしての有効性を検証する目的で、肺炎球菌の共通抗原の一つである PspA との融合タンパク質 (PspA-C-CPE) を作製した。PspA-C-CPE は約 54 kDa の分子量のタンパク質であり (図 1A)、

Claudin 4 には結合性を示すが、Claudin 5 には全く結合せず、Claudin 4 指向性を有していた (図 1B)。またコントロールとして、C-CPE の Claudin 4 結合領域の活性中心に変異を加えた C-CPE Y306A/L315A と PspA の融合タンパク質 (PspA-C-CPE Y306A/L315A) も作製した。PspA-C-CPE Y306A/L315A は Claudin 4 結合性を有していなかった (図 1A, B)。

PspA-C-CPE の経鼻ワクチンとしての有効性を検証する目的で、PspA 量として $5 \mu\text{g}$ の抗原を週 1 回の頻度で計 3 回経鼻免疫した。最終免疫の 1 週間後に鼻腔洗浄液を回収し、PspA 特異的 IgA 産生を測定したところ、PspA-C-CPE では PspA 単独免疫に比べ、約 6 倍の抗体価の増強が認められた (図 1C)。一方で、Claudin 4 との結合活性を有さない PspA-C-CPE Y306A/L315A は PspA 単独免疫とほぼ同程度であったことから (図 1C)、C-CPE の持つ Claudin 4 結合活性がワクチン効果において重要であることが示された。

C-2. 非侵襲性肺炎球菌感染イメージングシステムの確立

次に肺炎球菌を実際に感染させた際の生体防御機能を解析する必要があると考えた。従来の感染評価は体重減少と生死判定が主に行われる経時的な解析であり、ある一定期間後に解剖し、各回収組織の病原体数を測定するのが一般的であった。感染後、連続的に病原体の分布と増殖を解析するシステムが必要であると考え、ルシフェラーゼを恒常的に発現することで発光標識されている肺炎球菌を導入した。本肺炎球菌を発光検出器で解析することで、菌の分布と増殖を非侵襲的、かつ連続的に検出することが可能になると予想された。ワクチン効果を評価する目的で、非免疫マウスと粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に PspA を免疫したマウスにそれぞれ 2LD_{50} に相当する $2 \times 10^5 \text{ CFU}$ の肺炎球菌を感染させたところ、非免疫マウスにおいては経時的な菌数の増加に伴う発光シグナルが肺で検出されたのに対し、免疫したマウスにおいてはシグナルが検出されな

った(図 2)。これと相関し、非免疫マウスでは体重減少、ならびに個体死が観察されたのに対し、免疫マウスではこれらの症状は認められなかった。

C-3. パイエル板依存的 IgA 抗体高産生細胞の同定

C-CPE による免疫誘導の作用機序を解明する上で必要となる粘膜リンパ組織依存的なワクチン免疫応答に関する基礎的な検討を行った。その目的のために代表的な腸管リンパ組織であるパイエル板欠損マウスを作製し、腸管での IgA 産生細胞の解析を行った。その結果、腸管の IgA 陽性細胞は CD11b の発現の有無により二つのサブセットに分類されること、そのうち CD11b 陽性細胞がパイエル板欠損マウスで減少することが判明した(図 3A)。形態や細胞表面マーカーは CD11b の発現に関わらず同一でどちらも抗体産生形質細胞としての表現型を示したことから、マイクロアレイ解析により遺伝子レベルでの機能的差異の検討を行った。その結果、CD11b 陽性 IgA 産生細胞は CD11b 陰性細胞に比べ、cdc ファミリーを始めとする細胞周期、増殖に関わる分子を強く発現していることが判明した(図 3B)。さらに CD11b 陽性 IgA 産生細胞と CD11b 陰性細胞をそれぞれ単離、精製した後、*in vitro* での抗体産生能を比較したところ、CD11b 陽性細胞は陰性細胞に比べ IgA 産生能力が高いことが判明した(図 3C)。

D. 考察

今回の検討において、C-CPE が肺炎球菌に対するワクチンとしても有効であることが示されて。これまで研究代表者である近藤が中心となり、OVA をモデル抗原として用いた結果は示されていたが、今回、実際の病原体に対する抗原に対しても同様の結果が得られたことは大きな前進であると考えられる。さらに C-CPE の Claudin 結合能力を欠損させた変異体ではワクチン効果が消失したことから、これまでに観察されていた C-CPE のワクチン効果が実際に Claudin4 結合活性によることを実証することが出来た。

これらの知見をもとに、今後は実際に肺炎球菌の感染実験を行い、誘導された免疫応答が感染防御に十分な機能を有しているか検証する必要がある。これらについては古典的な方法として、病原株を感染させ、体重減少と生死判定で評価する方法が用いられてきたが、この方法は最終的なアウトプットを評価するだけであったため、感染防御が認められたとしても、作用機序の考察が難しかった。今回、それらの問題を克服する目的で発光標識した肺炎球菌を用いた非侵襲性感染評価システムを確立した。本方法を用いることにより、同一マウスにおける肺炎球菌の増殖が観察できるようになった。2LD50 である 2×10^5 CFU の肺炎球菌を感染させたところ、感染直後には発光が検出されないが、感染後、徐々に肺においてシグナルが増強し、感染 72 時間後には強いシグナルが検出され、翌日には死亡が確認された。一方、粘膜アジュバントであるコレラトキシンを用い PspA を経鼻免疫したマウスにおいては、感染初期においてもシグナルが検出されなかったことから、肺炎球菌の増殖後に殺菌作用を示しているのではなく、感染初期の段階から防御していることが示された。今後は本非侵襲性イメージングシステムを用いることで、PspA-C-CPE の肺炎球菌ワクチンに対する効果が評価できるものと期待される。

さらに宿主側の因子として、代表的粘膜関連リンパ組織であるパイエル板依存的に誘導される IgA 産生細胞として CD11b 陽性 IgA 細胞を同定した。この細胞はパイエル板欠損マウスで消失することから、パイエル板依存的であることが示されたが、さらに興味深いことに、一般にはあまり増殖しないと言われている抗体産生細胞の中で増殖活性が高いこと、また IgA 産生能力が高いことが判明した。すなわち、粘膜ワクチンの開発においては、単に粘膜関連リンパ組織を介して IgA 産生細胞を誘導するという戦略だけではなく、IgA を高産生する CD11b 陽性 IgA 細胞へ分化誘導することも重要な戦略の一つになると期待され、その機能を今後どのように C-CPE と融合させていくのかも重要な課題であると考えられる。

E. 結論

C-CPE の経鼻肺炎球菌ワクチンとしての有効性を示すことが出来た。また肺炎球菌の感染を非侵襲的かつ経時的に検証する感染イメージングシステムを確立した。一方、宿主免疫系の解析としては、C-CPE の標的組織である粘膜関連リンパ組織の一つであるパイエル板依存的に誘導される IgA 抗体を高産生する新しいサブセットを同定し、粘膜ワクチンにおける標的の一つであることを提唱することが出来た。

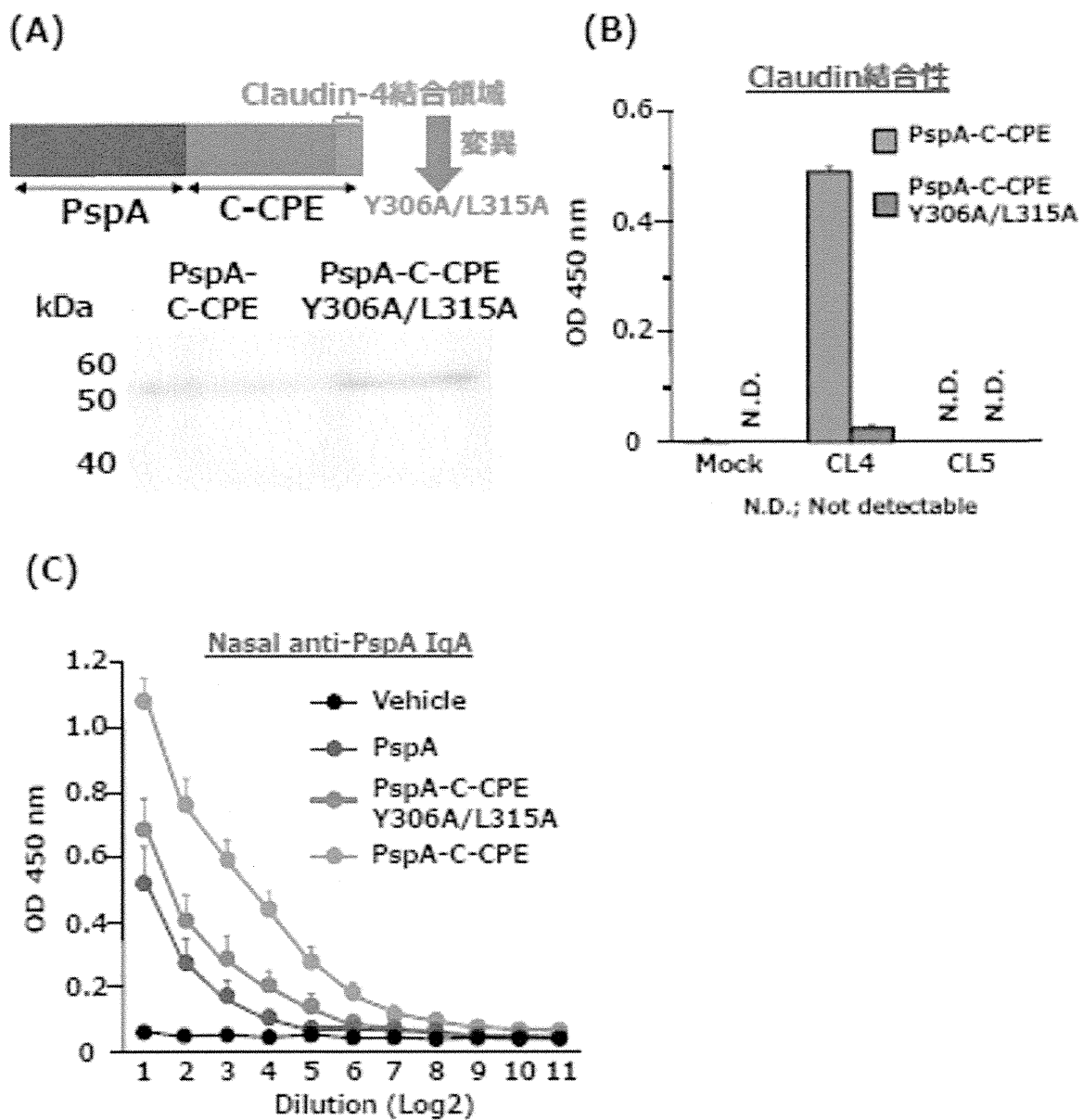


図1 (A) PspAとC-CPEおよびClaudin 4結合活性を消失させたC-CPE Y306A/L315Aとの融合タンパク質を作製した。(B) 作製したPspA-C-CPEはClaudin-4結合性を保持しており、PspA-C-CPE Y306A/L315Aは消失していた。(C) 各種融合タンパク質による免疫誘導を検討したところ、Claudin-4を介したPspAに対する免疫誘導が認められた。