

表 2. 多価ボツリヌストキソイドの安定性試験結果

試験	品質試験項目	製造7年目(今回実施した試験)	製造直後実施(2006年)
一般試験	たん白質 (mg/mL)	96.2	117.8
	pH	6.69	6.52
	アルミニウム (mg/mL)	0.19	0.2
	ホルムアルデヒド (%)	0.0003	0.0006
	チメロサル (ppm)	0.7	8.8
	無菌試験(直接法)	—	菌の発育を認めず
安全性試験	無菌試験(MF法)	菌の発育を認めず	—
	異常毒性否定試験	適合	適合
	無毒化試験(非加熱)	適合	適合
	無毒化試験(加熱)	適合	適合
有効性試験	力価試験(モルモット、血中抗毒素価定量法)	A型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 B型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 E型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 F型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上	A型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 B型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 E型:(1~2倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 (4倍希釈+キソイド免疫) 0.1 IU/mL以上 F型:(1~2倍希釈+キソイド免疫) 0.5 IU/mL以上 (4倍希釈+キソイド免疫) 0.1 IU/mL以上
	力価試験(モルモット、毒素攻撃法) 10 ¹ 、10 ² 、10 ³ LD ₅₀ の毒素攻撃	—	A型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 B型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 E型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 F型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過
	力価試験(モルモット、毒素攻撃法) 10 ² 、10 ³ 、10 ⁴ LD ₅₀ の毒素攻撃	A型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 B型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 E型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過 F型:(1~4倍希釈+キソイド免疫) 耐過	—
	力価試験(マウス) 10 ² LD ₅₀ の毒素攻撃で半数死亡する トキソイドの用量	A型: 0.020 B型: 0.007 E型: 0.043 F型: 0.016	A型: 0.016 B型: 0.006 E型: 0.039 F型: 0.011

高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発とその解析

国立感染症研究所ウイルス第二部
脇田 隆字

研究要旨 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感染リスクがある。従って、針刺し事故などの際に免疫グロブリンによる感染予防が望まれている。また、HCV感染による肝不全に対する肝移植時にも感染中和活性の高い免疫グロブリン投与により再感染のリスクの軽減が期待できる。本研究ではHCVに対する中和活性の高い抗体を取得する。さらに、得られた抗体の感染中和阻止機構を解析することにより、感染初期過程を詳細に解明することが可能となる。

研究組織

- (1) 国立感染症研究所
脇田 隆字
- (2) 東レ株式会社医薬研究所
中村 紀子
- (3) 東レ株式会社医薬研究所
成見 英樹
- (4) 昭和大学医学部
伊藤 敬義
- (5) 東京医科歯科大学
朝比奈 靖浩
- (6) 株式会社抗体研究所
篠原みどり
- (7) 国立感染症研究所
Hussein Hassan Aly

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染者の多くが持続感染化し、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、最近プロテアーゼ阻害剤が製造承認され、治療効果の改善が期待されている。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、一方で、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。従って、針刺し事故などの際に免疫グロブリンによる感染予防が望まれている。また、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り、再感染時には肝病変が急速に進行し重症化する場合がある。肝移植時にも感染中和活性の高い免疫グロブリン投与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。また、平成 22-23 年度の政策創薬総合研究において HCV に対するヒト型感染中和抗体を開発した。本研究ではこれまでの研究を発展させて、HCV に対するさらに中和活性の高い抗体を取得する。ファージライブラリー、リンパ節移植法、KM マウス、ウサギモノクローナル抗体などにより、複数の感染中和抗体を樹立することを目標とする。さらに、得られた抗体の感染中和阻止機構を解析することにより、感染初期過程を詳細に解明することが可能となる。

感染中和抗体の有効性および感染阻止機構の解析は培養細胞系でおこなう。生体での有効性については、HCV 感染感受性のあるヒト肝細胞移植キメラマウスにより検証可能である。

B. 研究方法

1. 抗体ファージライブラリーからの HCV 中和抗体の単離

HCV 罹患肝癌患者由来のリンパ球よりファージディスプレイ法によって HCV の感染を阻止する抗体を 3 種取得した。これら 3 種類の IgG 抗体の高発現株を樹立し、感染中和試験に使用した。さらに scFv 抗体の大腸菌発現ベクターを改変し、従来の 10 倍以上の発現効率の発現ベクターを構築した。この発現ベクターを使用し、感染中和評価用の scFv 抗体を大量に調製した。また、今年度新たに HCV 罹患患者由来のリンパ球から新規の抗体断片 (Single Chain Fv (scFv)) ファージライブラリーを作製した。昨年度までの中和抗体の取得実績から、中和抗体のスクリーニング用抗原には昆虫細胞発現系で調製しウイルス粒子上の立体構造

を保持した E2 リコンビナントタンパク質を使用した。

2. ウサギモノクローナル抗体の取得

マウスの中和抗体が作製できたことから、同免疫方法によるウサギの中和抗体作製にも着手した。ウサギモノクローナル抗体は、通常のハイブリドーマ法による作製が困難であるため、ヒト抗体の作製で使用したファージディスプレイ技術を利用して実施した。免疫原にはヒト中和抗体のスクリーニングに使用した抗原と同じ E2 リコンビナント抗原、およびマウスで中和抗体産生能が認められた E2 リコンビナント抗原という 2 種類の E2 リコンビナント抗原を使用した。2 種類の抗原を各 2 羽のウサギに免疫し、各免疫ウサギの脾臓から抗体遺伝子を抽出し、ファージディスプレイ法で E2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を取得した。取得したモノクローナル抗体 (scFv) を感染研に送付し、感染研で HCV の感染中和能を測定した。scFv で感染中和が確認できたクローンについては IgG 産生細胞 (CHO 細胞) を構築し、IgG の感染中和試験も実施した。

3. HCV 中和抗体に対する耐性ウイルスの取得

ファージディスプレイで取得した感染中和抗体や既報の抗 E2 抗体と JFH-1 ウイルスを混合してから感染を繰り返すことにより感染中和抗体の取得を試みた。

4. HCV 感染中和活性をもつモノクローナル抗体のエピトープ解析

HCV TH 株 E2 タンパク質とヒト IgG Fc とのキメラタンパク質、THE2Fc を 2% SDS、5% 2ME を含有する 50mM Tris-HCl (pH7.0) で 95℃、3 分加熱した後、PBS で 0.5 μ g/mL となるように希釈後、

50 μ L/well で固相化し、ビオチン化モノクローナル抗体がこの変性抗原に結合するかを解析した。さらに HCV TH 株の E2 タンパク質配列をカバーするオーバーラップペプチドライブラリーを用いてエピトープ解析を行った。ペプチド鎖長は 10 アミノ酸残基、オフセット値(ペプチド配列がタンパク質配列に従って移動した残基数)は 3 とし、N 末端がビオチン化されたペプチドを合成して用いた (JPT Peptide Technologies 社)。なお、C 末端に glycine が付加されている。各ペプチドを DMSO にて 1nmol/ μ L となるように溶解し、PBS で 50 倍希釈液した溶液を 50 μ L/well にてアビジンプレート (Nunc 社) にコートして使用した。Blocking-One(ナカライ)にてブロッキング後、1 μ g/mL のモノクローナル抗体を 50 μ L/well 加え、1hr 反応させ、洗浄後、ペプチドに結合した抗体を HRP 化抗マウス IgG ヤギ抗体にて検出した。

5. HCV 抗体断片の PEG 化による安定化
ファージライブラリーから得た感染阻害活性の高いクローンについて、①単鎖可変領域構造: scFv (CL-)、②単鎖可変領域に続き軽鎖定常領域を含む構造: scFv (CL+) の 2 種の断片抗体を、スクシンイミド基により活性化した分子量 20K の分岐構造 PEG (SUNBRIGHT GL2-200GS2、NOF) と種々の条件で反応させ、PEG 導入の進行度を解析した。断片抗体と PEG の反応産物から、1 分子の PEG が結合した抗体断片を分離するためのクロマト条件を探索した。各種イオン交換担体、疎水クロマト担体をバッチ法にてテストし、断片抗体 scFv (CL-)、scFv (CL+) が吸着する陽イオン交換担体を選抜した。選抜した担体の中で、塩濃度あるいは pH の勾配により、PEG 1 分子が結合した抗体断片とその他の反応副生成物・未反応物の分離が

可能な担体を最終選定し、溶出条件を定めた。抗原として E2 タンパク質 (S2 細胞由来) を固層化したプレートに、1 分子の PEG が導入された断片抗体である PEG-scFv (CL-)、PEG-scFv (CL+)、コントロールとして未反応の断片抗体である scFv (CL-)、scFv (CL+)、抗体クローンの IgG 構造抗体、マウス IgG 抗体である SLT8 をアプライし、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄バッファによる洗浄後、HRP 標識された検出抗体をアプライし、室温で 1 時間のインキュベートおよび洗浄後、TMB を加え、450nm における吸光度を測定した。検出抗体として、PEG-scFv および未反応 scFv には anti ProteinA-HRP、IgG 抗体には anti human IgG-HRP、SLT8 には anti mouse IgG-HRP を使用した。

6. TPV 3 剤併用療法中 CH-C 患者における B 細胞活性化と抗ウイルス状態の解析

1 型高ウイルス量の CH-C 患者で TPV 3 剤併用療法を行った 30 例を対象とした。治療経過中の LPD マーカーとして IgG、IgA、IgM、クリオグロブリン血症、リウマチ因子、補体 (C3、C4、CH50)、B 細胞活性化サイトカイン (BAFF/BLyS、APRIL) をモニタリングした。更に治療開始前、治療開始 1 週、治療開始 16 週、治療終了後 12 週の各時期の患者 B 細胞を auto-MACS で分離し、B 細胞 HCV RNA 量、B 細胞活性化関連遺伝子群 (CD69, CD71, CD80, CD86) 及びリンパ腫関連遺伝子 (CXCR3, AID) の発現、B 細胞 Clonality の変化、またインターフェロン誘導遺伝子 (ISG) である OAS1、OAS2、MX1、ISGF3、IFITM の mRNA 発現の推移を同様に解析した。

7. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着分子の探索

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。さらに、高効率のスクリーニングシステムの構築をめざして J6/JFH1-EYPF 株を作成した。これらの蛍光蛋白発現 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、エントリー阻害剤として抽出した

(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. 抗体ファージライブラリーからの HCV 中和抗体の単離

高い感染中和能を持つ 3 種類の抗体の IgG

と scFv の感染中和の結果、1 クローンは GT2a HCVcc の IC50 が scFv 抗体が $0.02 \mu\text{g/mL}$ 、IgG が $0.17 \mu\text{g/mL}$ であり、1 価の scFv が 2 価の IgG の約 10 倍の中和活性を示した。他のクローンに関しては IgG 抗体の感染中和活性が高い結果となったが、scFv 抗体の安定性が悪く、scFv 抗体の失活の可能性があった。そこで、東レでこれら 3 クローンの IgG および scFv を PEG 化して、安定性、活性の向上を目指すこととなった。

2. ウサギモノクローナル抗体の取得

E2 リコンビナント抗原を免疫した 4 羽のウサギのうち、マウスで中和抗体産生能が認められた E2 リコンビナント抗原を免疫したウサギ 1 羽から高い感染中和能をもつモノクローナル抗体が取得でき、IgG 抗体発現細胞も樹立した。IgG 抗体の感染中和試験も実施した結果、IgG でも高い感染中和能が確認できた。

3. HCV 中和抗体に対する耐性ウイルスの取得

MBL-HCV1 抗体に対する耐性ウイルスは容易に樹立され、E2 配列の 417 番に変異を認めた。しかし、ファージディスプレイで取得した感染中和抗体に対する耐性ウイルスの取得は困難で、取得できたウイルスの変異部位は MBL-HCV1 抗体に対する耐性ウイルスの変異部位とは異なっていた。

4. HCV 感染中和活性をもつモノクローナル抗体のエピトープ解析

モノクローナル抗体 A および C が立体構造に依存したエピトープか、線状に並んだ一次構造から形成されるエピトープのいずれを認識するかについて、ビオチン化抗体を用いて検討した。その結果、モノクローナル抗体 MBL-HCV およびモノク

ローナル抗体 A、C は変性及び未変性の TH 株 E2 抗原に結合するのに対し、ARA3 は未変性の E2 抗原のみに結合した。この結果から、モノクローナル抗体 A および C は線状エпитープを認識する抗体であることが示唆された。次に、モノクローナル抗体 A、C の線状エпитープを決定するために、HCV TH 株の E2 タンパク質の 10 個の連続するアミノ酸からなるペプチドを 3 アミノ酸残基ずつずらして合成したペプチドに対するモノクローナル抗体 A および C の反応性を検討した。その結果、モノクローナル抗体 A、C は、411I-420W(IQLINTNGSW)を認識することが分かった。

5. HCV 抗体断片の PEG 化による安定化

抗体クローンの 2 種の抗体断片、ScFv(CL-)、scFv(CL+)を、SUNBRIGHT GL2-200GS2 と、pH 6.5 のリン酸緩衝液中で 25℃で 17 時間反応させることで、PEG が 1 分子導入された結合体比率が最も高い反応が得られた。断片抗体への PEG 導入反応液から、1 分子の PEG が結合した抗体断片を精製するためのクロマト条件を探索した結果、陽イオン交換担体 (CM-5PW、東ソー) による弱酸性での塩濃度勾配溶出により、未反応の抗体断片、2 分子以上の PEG が結合した副生成物と目的物を分離することが可能となった。抗体断片 scFv(CL-)に PEG を 1 分子導入した分子 (PEG-scFv(CL-)) は、PEG 導入前の抗体断片と比較して、抗原結合性が 1/10 以下に低減した (図 5)。一方、抗体断片 scFv(CL+)に PEG を 1 分子導入した分子 (PEG-scFv(CL+)) は、導入前の 1/3 程度の抗原結合性を維持していた。

6. TPV 3 剤併用療法中 CH-C 患者における B 細胞活性化と抗ウイルス状態の解析

3 剤療法開始 1 週後、30 例中全例で HCV RNA は血清中に残存していたが、B 細胞中 HCV RNA は 27 例 (90%) で消失していた。LPD 関連マーカーでは治療前に観察された高 IgG、高 IgM 血症、低補体血症は治療経過中に改善傾向を示し、治療終了後も維持された。一方で BAFF/BlyS、APRIL は治療中著しく上昇したが、治療終了後改善した。B 細胞内遺伝子発現では ISG 群の治療 1 週での上昇が確認され、一方で B 細胞活性化マーカーである CD69、CD71 と CD86 上昇が顕著だった。CXCR3 と AID は 4 例で発現上昇が確認された。これらの事実から、TPV 併用 3 剤療法中の B 細胞内は治療開始早期から強い抗ウイルス状態にあることが示唆された。治療経過中の LPD マーカーは改善傾向だったが、B 細胞活性化サイトカインは上昇傾向で、かつ B 細胞活性化マーカーの遺伝子発現は高い状態にあり、自己免疫異常などが発症しやすい状態であると推察された。

7. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着分子の探索

抗 CD81 抗体を用いたエントリー阻害試験では、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 個はエントリー過程を阻害している可能性が示唆された。

また、さらに高効率なスクリーニング系を構築するために J6/JFH1 株に蛍光標識した感染培養系を構築した。J6/JFH1-EYFP 株のウイルス産生能は JFH1-EYFP 株に比し低率であるため、adaptive mutation の導入も含めて改良中である。

D. 考察

今年度の各分担研究内容は報告書に詳細に記載されている。以下に簡単に内容をまとめる。

ファージディスプレイ法により取得した 3 種類の抗体はいずれも GT2a HCVcc の IC50 は 1 μ g/mL 以下であり高い感染中和能を持っていることがわかった。さらに耐性ウイルスの取得によりこれらの抗体の感染中和エピトープは構造エピトープと考えられまた、耐性が得られにくいことも明らかとなった。また、ウサギモノクローナル抗体の取得にも成功したので、解析を進めている。

線状エピトープを認識する抗体では連続ペプチドを用いたエピトープ解析も進んだ。リンパ節を採取し、SCID マウスにおいて作製したハイブリドーマの中から、遺伝子型 1b および 2a の HCV の感染を中和する活性を持つ 2 種類のクローン (A, C) を得た。これらのモノクローナル抗体は、アミノ酸残基 412-423 番 (epitope I と呼ばれている) を認識した。このエピトープを認識する抗体として、PA33、3/11 および MBL-HCV1 抗体が知られている。

Naïve B 細胞の段階で CD69、CD71、AID が異常高値を示しており、この Naïve B 細胞が異常活性化 B 細胞となり、単一クローン増殖として検出されていることが推察された。

蛍光タグ付き HCV の感染性を確認し、イメージアナライザーで蛍光発現ウイルス感染細胞の核周囲の蛍光蛋白量をデジタル化して定量的に評価することにより、感染細胞数を定量的かつ高効率に検出する測定系を構築した。さらにランダム化合物ライブラリーを用いた感染阻害化合物の一

次スクリーニングにより侵入特異的阻害剤としての可能性を有する化合物を同定した。

E. 結論

1. 抗体ファージライブラリーから単離したHCV中和抗体は強い感染中和活性を示した。
2. E2 リコンビナント抗原を免疫したウサギからモノクローナル抗体を取得し、感染中和活性を有する抗体があった。
3. HCV中和抗体に対する耐性ウイルスを取得した。耐性変異を同定した。
4. HCVE2 に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析を実施した。
5. 単鎖抗体を PEG 化することにより、安定化を試みた。
6. TPV 3 剤併用療法中 CH-C 患者における B 細胞活性化と抗ウイルス状態を解析した。TPV 併用 3 剤療法中の B 細胞内は治療開始早期から強い抗ウイルス状態にあることが示唆された。
7. 蛍光タグ付加HCVを用いて細胞吸着分子を探索した。侵入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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 1;440(4):515-20
- 2) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N,

Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. Gastroenterology. 2013 145(2):447-455.e4.

- 3) Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T., Bukh J, Jones CT, Rice CM, Abrignani S, Tyrrell DL, Houghton M. A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. PLoS One. 2013;8(3):e59776.
- 4) Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. Hepatology 57: 46-58, 2013.
- 5) Toyota J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. J Viral Hepat 20: 167-173, 2013.

2. 学会発表および講演など

- 1) Uchikoshi M, Ito T., Arai J, Shimozuma Y, Miyashita M, Morikawa K, Eguchi J, Nozawa H, Tomoe S, Yoshida H and Imawari M. The combination therapy with telaprevir, pegylated interferon-alpha-2b and ribavirin causes high serum levels of B cell activation factors and results in abnormal activation of B cells in patients with chronic hepatitis C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Washington DC 2013.11.5)
- 2) Arai J, Ito T., Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Morikawa K, Eguchi J, Nozawa H, Tomoe S, Yoshida H and Imawari M. Rapid disappearance of HCV from B cells by the combination therapy with telaprevir, pegylated interferon-alpha-2b and ribavirin is associated with high levels of interferon stimulating genes expression in B cells of patients with chronic hepatitis C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Washington DC 2013.11.5)
- 3) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
- 4) Asahina Y., Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFNλ4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013. (Tentative)
- 5) 宮下みゆき、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、荒井 潤、森川 賢一、江口 潤一、吉田 仁、井廻 道夫 Telaprevir/PegIFN/RBV3 剤併用療法中の C 型肝炎患者における B 細胞単一ク

ローン増殖及びB細胞免疫異常の変化 第17
回日本肝臓学会大会（東京 2013. 10. 9）

- 6) 伊藤敬義、打越 学、井廻道夫 テラプレビル
3 剤併用療法中の C 型慢性肝炎患者におけ
る B 細胞系免疫反応と抗ウイルス状態 第 49
回日本肝臓学会総会（東京 2013. 6. 6）シンポ
ジウム 1 C 型肝炎の治療最先端

- 7) 荒井 潤、伊藤敬義、宮下みゆき、打越 学、
下間 祐、森川賢一、江口潤一、吉田仁、井
廻道夫 テラプレビル 3 剤併用療法による C
型慢性肝炎患者 B 細胞中 HCV 動態と治療開始
早期 ISG 上昇との関連 第 49 回日本肝臓学会
総会（東京 2013. 6. 7）

- 8) 宮下みゆき、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、
荒井 潤、森川賢一、江口潤一、吉田仁、井
廻道夫 C 型慢性肝炎患者におけるナイーブ
B 細胞異常活性化と B 細胞 Clonality 発現及
びインターフェロン抵抗性との関連 第 49
回日本肝臓学会総会（東京 2013. 6. 7）

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

なし

メタボロミクスを活用した統合失調症と気分障害の

バイオマーカー開発

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第三部
功刀 浩

研究要旨 血液、脳脊髄液、死後脳のメタボロミクス解析を行い、統合失調症のバイオマーカーとして血中ベタイン濃度、脳内のジペプチド分子 A、糖鎖修飾分子 B が有力であり、うつ病では脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C、細胞保護分子 S、ジペプチドの分子 H、血漿中トリプトファンが有力であることを明らかにした。統合失調症で血中ベタインが DNA メチル化と関連することを示した。

研究組織

- (1) 東京大学大学院医学系研究科分子精神医学講座 岩本和也
- (2) ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 大橋 由明

A. 研究目的

本研究の目的は、メタボロミクスの技術を活用して、うつ病や統合失調症のバイオマーカーを開発することである。平成 23 年 7 月より精神疾患は 5 大疾病の 1 つに位置づけられたが、うつ病や統合失調症において実用化されている生物学的指標（バイオマーカー）は殆どない。客観的な診断や早期発見を可能にするためには、臨床や健診で役立つバイオマーカーを開発することは厚生労働行政上急務である。

国内外の他の研究では、ゲノムやトランスクリプトーム、プロテオーム解析によるバイオマーカー探索が本格化している。しかし、メタボローム解析による探索は未だに少ない。委託申請者／分担研究者のヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社は、独自開発した技術による

CE-MS 法によるメタボローム解析により、うつ病、糖尿病性腎症、非アルコール性肝炎、インフルエンザ脳症、大腸がん等の血液バイオマーカーの発見に成功している。うつ病に関しては、エタノールアミンリン酸(EAP)が有力なバイオマーカーであることを世界で初めて見出した。また、分担研究者の岩本ら（東京大学）も、HMT 社と共同で統合失調症の血漿試料のメタボローム解析を行い、ホモシステイン酸代謝経路の異常を検出し特許を申請している。そこで、本研究はこれらの独創的な知見についてさらに多数のサンプルで検証し、臨床での有用性について詳細な検討を行い実用化をめざす。また、これらのほかに、網羅的メタボローム解析を行い、統合失調症やうつ病の新たなバイオマーカーを見出す。

B. 研究方法

①サンプル収集

国立精神・神経医療研究センターでは、既に非常に多数の血液検体、脳脊髄液検体が収集されているが、drug free の患者の検体が少ないという問題があったこともあり、さらに検体収集を行った。

②精神疾患死後脳のメタボロミクス解析

米国スタンレー財団の死後脳（統合失調症、大うつ病、双極性障害、健常者それぞれ 15 人）の海馬、大脳皮質（固定した脳切片）を用いて CE-MS 法によるメタボロミクス解析を行った。

③ 脳脊髄液のメタボロミクス解析

下表のように、年齢・性がマッチした統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名（これらの患者のうち、drug free 患者は、統合失調症 8 名、大うつ病 5 名、双極性障害 2 名）、健常者 30 名、合計 106 名に対して、CE-MS 法によるメタボロミクス解析を行った。なお、4 例のうつ病患者については通電療法前後の検体を解析した。また、うつ病患者はハミルトンうつ病評価尺度(HAM-D21)による症状スコア、統合失調症患者は PANSS による症状評価を行い、メタボライトとの相関を検討した。

解析検体

	N	DF	性 (M/F)	年齢
Schizo	30	8	14/16	39.4±12.4
Dep	30	5	15/15	40.2±11.3
Bipolar	16	2	8/8	38.9±8.9
Control	30		15/15	38.3±13.9

＋ECT治療後4例 合計110検体

④カンナビノイド関連分子の検討

25 年度は、新たに 216 検体について測定を追加したほか、採血後処理条件を厳密に統制した独立のサンプル（統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名、健常者 30 名＝③と同じサンプル）を用いて EAP を測定した。血漿を限外ろ過法により除タンパク質処理し、陰イオン交換カ

ラムによるイオンクロマトグラフィー蛍光検出法（IC-FLD 法）にて濃度を測定した。

上記③で用いたサンプルで脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C についても、HPLC を用いて測定した。

⑤うつ病患者の血漿中トリプトファン

アミノ酸は、メタボライトのうち、神経伝達物質の原料になることもあり、精神疾患のバイオマーカーとなる可能性が指摘されている。そこでわれわれは、66 名のうつ病患者と 82 名の健常者を対象として必須アミノ酸の 1 つトリプトファン（セロトニンの原料となり、キヌレニン経路に参与する）に注目した解析を行った。さらに、うつ病でのトリプトファン低下に関して、先行研究のメタアナリシスも行った。

⑥統合失調症末梢血のベタイン関連分子の解析

分担研究者の岩本らは、統合失調症の血液においてベタインなどの分子について CE-MS 法によるメタボローム解析を行っている。25 年度には、ベタインが DNA メチル化経路に位置することに着目し、ベタイン量低下と DNA メチル化との関係を調べた。昨年度までにメタボローム解析を行った合計 25 サンプルの初発統合失調症患者、43 サンプルの健常者血液から抽出した DNA を対象とし、Pyrosequencing 法による総 DNA メチル化量の定量を行った。また、4 組の統合失調症患者一卵性双生児不一致例の血漿を用い、CE-MS 法によるメタボローム解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、精神疾患患者、健常対照群を対象とした臨床研究を行った。生体内分子に関するデータや臨床情報を用いた研究は、個人情報の漏えいなどの危険性があるため、臨床研究に関する倫

理指針を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行った。遺伝子解析研究は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行った。文書を用いた試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理（匿名化）などを徹底している。

C.研究結果

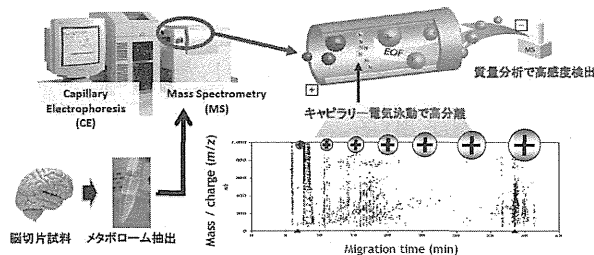
①サンプル収集

25 年度には統合失調症 18 例、双極性障害 22 例、うつ病 46 名、健常者 74 名、その他 9 名（計 169 名）血液サンプルを収集した。そのうち、向精神薬の投与を受けていない drug free の患者は、統合失調症 3 名、うつ病 2 名、双極性障害 2 名（計 7 名）収集することができた。

②死後脳メタボロミクス解析

固定した脳切片からもメタボロミクス解析が可能であることを明らかにした（下図）。

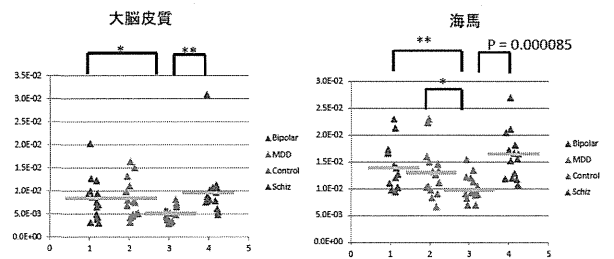
固定された脳プレパレート試料のメタボローム解析



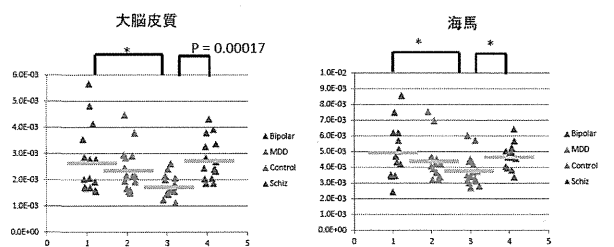
統合失調症の海馬と前頭葉で共通に変化しているメタボライトとして、ジペプチドの分子 A と糖鎖修飾分子 N が有力であることを見出した。分子 A は海馬において多重比較を補正しても統合失調症で有意に上昇しており (p=0.00009)、前頭葉でも有意に上昇していた (p=0.0045) (図参照)。分子 N は、海馬 (p=0.01)、前頭葉 (p=0.00016) で

共に上昇していた (図参照)。特許出願の可能性があるので、これらの分子名を本報告書においては明示しなかった。分子 A,B 以外にも有意差をもつ (ただし、多重比較で補正すると有意差は消失) 分子を多数見出した。

Dipeptide 分子A



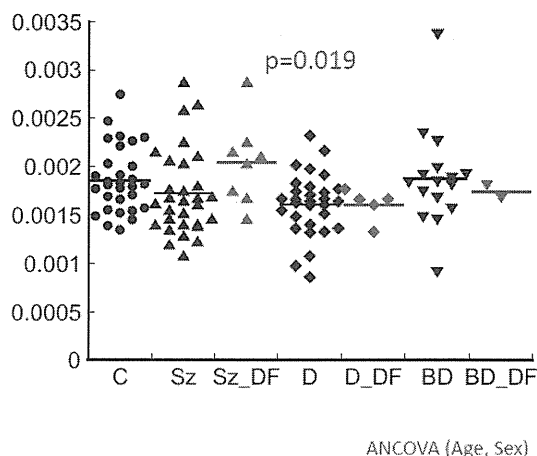
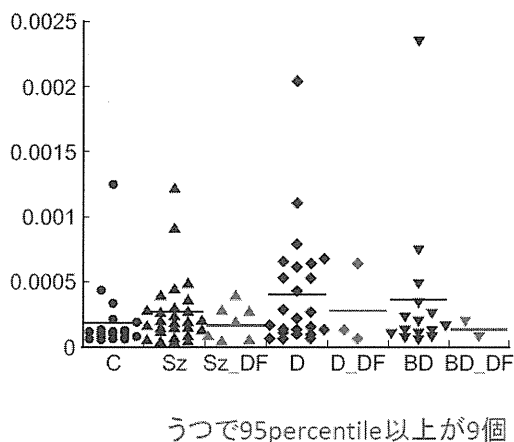
糖鎖修飾関連分子N



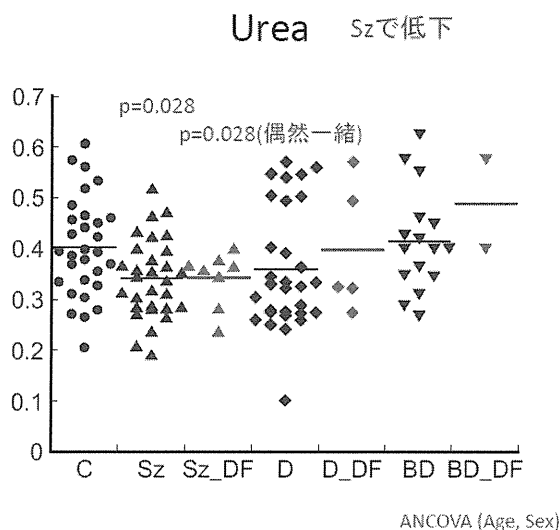
③脳脊髄液のメタボロミクス解析

脳脊髄液中のメタボロミクス解析を行った結果、89 分子が測定され、全例測定できていたもの 53 分子、半数以上 73 分子、10 例以下のもの 11 分子であった。そのうち、診断間で有意差のあったものとして 5 分子、うつ病重症度と有意な相関を示したものの 4 分子、統合失調症重症度と有意な相関を示したものの 6 分子を同定した。

特に、細胞保護作用をもつ分子 S は、うつ病の一部で突出して増加を示した (下図)。すなわち、30 例中 9 例は、健常者の 95 パーセンタイル以上の上昇を示した。

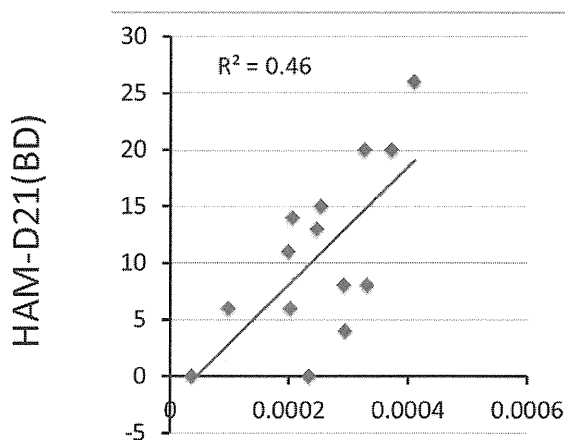


また、統合失調症の CSF 中で尿素(urea)が有意に低下していた($p=0.028$)。Drug free の患者でも低下しており($p=0.028$ 、偶然同じ p 値を得た)、薬物の影響とは考えにくい、健康者と顕著な差は見られなかった (下図)。



また、EAP に近縁の分子であるカンナビノイド関連分子 C がうつ病で有意に低下していた($p=0.019$)。 (下図)

また、ジペプチドの分子 H は、うつ病重症度 (HAMD-21 で評価) と比較的強い相関を示した (下図)。



④カンナビノイド関連分子の検討

採血後処理条件を厳密に統制した独立のサンプル (統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名、健康者 30 名=③と同じサンプル) を用いて測定を行った結果、診断間で有意差は認められなかった。なお、EAP 濃度は、健康者、患者ともに濃度範囲が広く、個人差が大きかった。上記③で用いたサンプルで脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C について、HPLC を用いて測定したところ、CE-MS 法とほぼ同じ結果が得られ、うつ病患者では健康者と比較して有意に低下していた($p=0.016$)。

⑤うつ病患者の血漿中トリプトファン

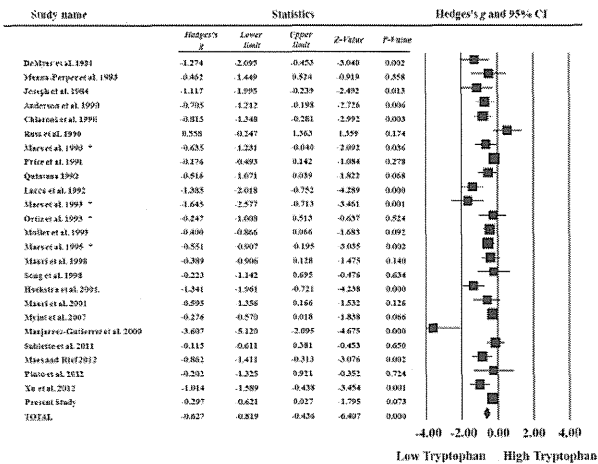
うつ病患者では、健常者に比べて血漿トリプトファン濃度が有意に低かった(p=0.03)。トリプトファン濃度が 50μmol/L の頻度もうつ病患者が健常者と比較して有意に多かった(p<0.05) (下表参照)。

	うつ病	コントロール	p
N (F / M)	66 (F 31/ M 35)	82 (F 54/ M 28)	p=0.021
	mean ± SD	mean ± SD	
Age (years)	44.0 ± 12.9	43.9 ± 13.9	p=0.95
BMI	22.9 ± 4.8	22.1 ± 3.5	p=0.24
HAMD-17 score	14.3 ± 5.0	N/A	N/A
Tryptophan (μmol/L)	53.9 ± 10.9	57.2 ± 11.3	p=0.030 ^a

^a based on analysis of covariance (ANCOVA) controlling for age, sex, and BMI

先行研究のメタアナリシスを行ったところ、血漿総トリプトファン値は、健常者と比較してうつ病で有意に低下していた(p<0.00000001) (下図)。

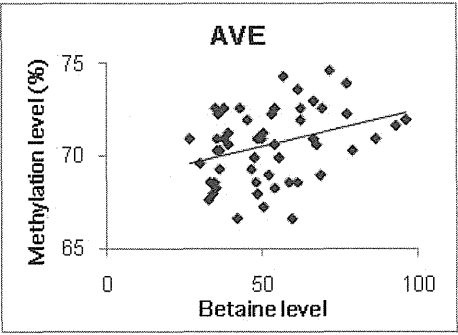
メタアナリシス



p<0.00000001

⑥統合失調症末梢血のベタイン関連分子の解析

総 DNA メチル化量の定量を行った結果、ベタイン量との有意な相関を認めた (下図)。一方、4組の統合失調症患者一卵性双生児血漿における測定では、4組中2組の患者で健常者と比較しベタイン量の低下が認められたが、全体として統計的な有意差は認められなかった。



D. 考察

サンプル収集は比較的順調に進み、169 人の被験者のサンプル (うち drug free 患者 7 名) を収集できたことは大きな収穫であり、今後、貴重な試料となる。

死後脳のメタボロミクス解析では、海馬と前頭葉で共に同じ方向に変化しており、多重比較で補正しても有意な変化を示した分子が見出され、病態の鍵分子、バイオマーカー候補であることが示唆された。分子 A、B 以外にも多数の候補分子を同定しており、統合失調症の病態解明や、バイオマーカーを開発する上で貴重なデータベースを構築したと考える。

脳脊髄液のメタボロミクス解析では、診断間で有意差のあったものとして 5 分子、うつ病重症度と有意な相関を示したものの 4 分子、統合失調症重症度と有意な相関を示したものの 6 分子を同定した。これらは、バイオマーカー候補として有力である。特に、細胞保護効果が知られている分子 S は、うつ病の一部で突出して増加しており、バイオマーカー候補として最有力である。今後、サンプル数を増やして検討する価値がある。Urea は、統合失調症で低下していたが、脳脊髄液中への排出低下が病態と関連している可能性もあり、興味深い。しかし、平均値は低いものの、健常者と重なっており、バイオマーカーとして活用できるかどうか疑問である。また、ジペプチドである分子 H のよ

うにうつ病症状とよく相関する分子も見出され、これは state marker として有望である。

内因性カンナビノイド（大麻様物質）は、気分や情動の調節に深く関わっている。EAP については、うつ病での低下を支持する結果が得られなかったが、健常者、患者共に濃度範囲が広く、個人差を考慮した基準作りが必要であるかもしれない。今後、症状に基づいた類型との関連について解析する価値がある。一方、EAP と極めて近縁の分子である分子 C は、うつ病の脳脊髄液中で有意に低下していることを CE-MS 法と HPLC 法で一致して見出した。今後、極めて有望なバイオマーカー候補としてサンプルを増やして検討する価値がある。

うつ病患者においてトリプトファンの濃度が低く、メタアナリシスでも確認した($p < 0.000001$)。以上から、血漿中トリプトファンはうつ病のバイオマーカーとなる。ただし、感受性や特異性はそれほど高くないため、その臨床的意義（状態依存性指標なのか素因指標なのか）についてさらに検討していく必要がある。

統合失調症の血液メタボライトに関する解析では、24 年度までにベタイン濃度の減少が再現性をもって示されている。ベタイン量と総 DNA メチル化量との有意な相関が認められたことから、ベタインは細胞内エピジェネティクス環境の制御に関わっている可能性が支持された。また、ベタイン量の低下は 4 組の一卵性双生児不一致例のうち、2 組の患者側で認められたため、環境要因の影響により生じている可能性が考えられた。しかし、全体として有意差は認められなかった。これは現段階では測定症例数が少ないためである可能性が考えられ、今後サンプル数を追加し検討を行う必要がある。

本研究によってうつ病や統合失調症のバイオマーカーが実用化されれば、客観的診断が可能と

なるうえ、プライマリケア医や健康診断による早期発見も可能になる。早期治療によって、重症化を防ぐことができれば、休職や失業、入院患者数、自殺者の減少につながることを期待される。また、バイオマーカーの開発はコンパニオン診断薬としての活用が期待され、創薬にも大きく貢献することが期待できる。

E. 結論

統合失調症、うつ病の血液、死後脳、脳脊髄液のメタボライトの解析から、統合失調症のバイオマーカーとして、ジペプチド分子 A（上昇）、糖鎖修飾分子 B（上昇）などが有用であること見出した。昨年度までに統合失調症のマーカーとして再現性のある所見が得られたベタインは、DNA のメチル化を制御している可能性が示唆された。うつ病では、脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C（低下）や細胞保護作用のある分子 S（上昇）、ジペプチドである分子 H、血漿中のトリプトファン（低下）がバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。EAP については、うつ病のサブタイプとの関連についてさらに検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M, Kuwabara H, Ohashi Y, Shinoda K, Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K: A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: A capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry

study. *Translational Psychiatry* (in press)

結果⑤については論文投稿中(in revision)。

2. 学会発表

功刀浩：うつ病の診断マーカー. シンポジウム「未病社会の診断技術開発について」（オーガナイザー松原謙一）第36回 日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日

岩本和也：精神疾患患者末梢血試料を用いたエピゲノム解析, 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会(2013/10/24-26 沖縄)

H. 知的財産研の出願・登録状況

1. 特許取得

脳脊髄液中の分子について特許申請予定（準備中）

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

フラビウイルス粒子様ワクチンの開発

国立感染症研究所 感染病理部
長谷川 秀樹

研究要旨 東南アジアの大流行で輸入症例が急激に増加し我国への侵入が危惧されるデングウイルス (DENV) についても、「表面はウイルス粒子と同等の抗原性で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性 VLP (Virus-Like Particle)」を、日本脳炎ウイルス (JEV)・ウエストナイルウイルス (WNV) VLP 研究で培ってきた我々の独自技術[特許第 4268384 号、特許第 5027106 号、特許第 5448836 号]で構築し、「感染性ウイルスを用いず/特殊な封じ込め施設も不要な」安全/安価な製造を担保するフラビウイルス粒子様ワクチン抗原に開発することを、官民共同研究で継続した。

初年度には、DENV の感染価を定量できる plaque/ focus assay 法、DENV の prM, E 蛋白質の抗原 ELISA 法などを確立/樹立し、種々にデザインし合成した DENV 中和 domain 発現の prM/E cDNA ベクターを用いて、新たに興味深い成績を得た。

そこで本年度は、(1) 前年度予試験的に得たその成果を基に、発現・分泌されるキメラ DENV prM-E 抗原の性状を E/E, prM/E, prM/prM サンドイッチ ELISA 及び蔗糖密度勾配遠心法も加え解析した。その結果、①DENV の E は prM と相互に連携して沈降速度の異なる 2 種の複合抗原を形成でき、②E と M の相互作用で形成される複合抗原は沈降速度が遅く、③DENV の主要中和ドメインを WNV の prM-E をベースに発現すると沈降速度の遅いキメラ複合抗原が形成される、こと等を新たに見出した。また、(2) DENV/WNV キメラ prM-E 発現抗原の精製法を詳細に検討し、Cellufine Sulfate アフィニティーカラム法が有効な濃縮・精製法であることを示した。

研究組織

- | | |
|--------------------|--------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 長谷川秀樹、 |
| (2) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島朝人 |
| (3) (一財) 阪大微生物病研究会 | 五味康行 |
| (4) JNC 株式会社 | 畠山昌和 |

A. 研究目的

我国侵襲の恐れがあるウエストナイルウイルス (WNV) も、温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV) も、JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスで、中間増幅動物 (トリ、ブタ等) を吸血した感染蚊が媒介して最終宿主のヒトに重篤な疾病を引き起こす。しかし、何れもワクチンによる予防が可能である。この点では、研究組織の微研会により新不活化 JE ワクチンが世界に先駆けて開発 (2009 年 2 月認可) され、次いで細胞培養不活化 WN ワクチンも開発されつつある。

一方、フラビウイルス最大の疾病を引き起こすデング

ウイルス (DENV) はヒトを自然宿主とするウイルスで、4 つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊がヒトからヒトへウイルスを媒介する。異なる血清型の DENV に再感染した場合致死性のデング出血熱を発症する。東南アジアの人口密集地 (都市部) で大流行を起こしており、2009 年以降は海外帰国者の輸入デング症例が毎年 200 例以上にのぼり、我国侵入の可能性も危惧されている。しかし、DENV 1~4 型何れにも有効な 4 価ワクチンが必須なため、DENV ワクチンは欧米を中心に開発中であるものの、未だ有効なワクチンが無い。

我々は委託企業・微研会との官民型共同研究で、「表面はウイルス粒子と同等の抗原性で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子 (VLP: Virus-Like Particle)」産生技術の開発に、JEV [官民共同: 特許第 4268384 号 (2009. 2. 27)、特許第 5027106 号 (2012. 6. 29)]、及び、WNV [官民共同: 特許第 5448836 号 (2014. 1. 10)] 等について成

功を収めてきた。

そこで、DEN-VLP ワクチンについても我々独自の本技術を用いて官民共同で開始した開発研究を本年度も引続き推進した。また、DEN-VLP に限らず全てのフラビウイルス粒子様ワクチン開発に必須となる粒子抗原精製法の検討も研究組織 JNC と連携して継続した。

B. 研究方法

微研会及び JNC との連携/共同研究体制の強化を基に開始していた DEN-VLP 開発研究を継続して推進した。

(1) キメラ DENV/WNV prM-E 抗原の性状解析と発現・分泌条件の検索

感染性 DENV 1~4、不活化 DENV 抗原、単クローン・ポリクローナル抗体、DEN-VLP 発現ベクター：これら研究基盤となる実験素材については、供与材料、市販品、共同研究で独自に樹立した抗体・構築したベクター等で、既に報告したものをを用いた。他方、更なる検出抗体を求めて市販抗体等のサーベイを継続的に実施している。

プロモーターの異なる発現ベクターの構築：効率的なキメラ prM-E 蛋白質の発現・分泌条件を検索するため、CMV プロモーターに加えて CAG プロモーターを発現ユニットとするベクター、及びこれらに薬剤耐性遺伝子を付加したベクターを新たに構築して比較検討した。

DENV のウイルス価、DENV 抗原検出サンドイッチ ELISA 法：DENV 1~4 のウイルス感染価定量法、フラビウイルス E 蛋白質及び DENV prM 蛋白質の定量サンドイッチ ELISA 法は、昨年度確立/樹立し報告した方法を共有して実施した。

キメラ prM/E VLP ベクターの一過性発現：発現細胞には、Vero 細胞、293T 細胞及び市販の浮遊性 293F 細胞を用いた。これらの細胞の培養には、各細胞の性状に合致した市販プラスチック培養器具（非処理、培養用処理、コラーゲン処理）を用いた。遺伝子導入には市販の幾つかのトランスフェクション試薬を用いて推奨されている方法で行い、発現を比較した。トランスフェクトされたこれらの細胞から培養上清中に放出された DENV 特異的 E 蛋白質或いは prM 蛋白質を上記 ELISA 法で測定した。

発現キメラ prM-E 蛋白質の性状解析：細胞外に放出された抗原蛋白質を含む細胞培養上清を、5-30% の連続蔗糖密度勾配遠心法で分画した。チューブ底より 14~15 フラクションを採取して比重を測定後、上記 ELISA 法を用いて各フラクションの E と prM 蛋

白質量を測定した。また、WNV 抗原価も 402 単クローン抗体を用いた WNV 抗原 ELISA（微研会）で測定した。

(2) キメラ DENV/WNV prM-E 抗原精製法の検討

DENV 及び DENV/WNV キメラ prM-E 抗原の調製：prM-E 抗原の発現には 293T 細胞に FuGENE 6 を用いてプラスミド DNA 約 260 ng/cm² をトランスフェクションした。3 日間培養後培養上清を回収し、0.2µm メンブレンフィルターにて濾過したものを精製検討用サンプルとした。

タンパク質不純物の評価：精製画分の夾雑タンパク質は SDS-PAGE および Western Blot により評価した。SDS-PAGE は Laemmli 法に準じて行った。各評価サンプルを還元剤不含のサンプルバッファーに懸濁し、Bio-Rad 社製ミニプロテイン TGX ゲル 4-20% 中で泳動し、ゲルをクーマシー染色した。また、PVDF 膜に転写し、4% ブロックエース（雪印）でブロッキングした後、抗 JEV 兎抗体および AP 標識抗兎ヤギ抗体で組換えタンパク質由来と思われるバンドを可視化した。

精製画分の分子量測定：各精製画分についてサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析によりタンパク質の分子量分布を測定した。HPLC システムは Agilent 社製 1100 シリーズ、分離カラムは東ソー社製 TSK-gel G6000PWXL を用い、移動相 PBS、アプライ量 50µl、流速 0.5 ml/min、分析時間 40 分間、検出 Abs. 215 nm の条件で室温 (25°C) にて分析を行った。各フラクションの総タンパク質量は Pierce 社製 BCA アッセイキットにて測定した。

Cellufine Sulfate による精製：DENV/WNV キメラ抗原を発現した細胞の培養上清は直接 JNC 社製 Cellufine Sulfate カラム Φ16 x 50 mm (10 ml) にアプライした。FPLC システムは GE 社製 AKTA explorer 10S を用い、流速 0.25 ml/min にて抗原を吸着させ、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、2M NaCl を含んだ 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を流速 0.5 ml/min で溶出した。DENV prM-E 抗原では 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して MWCO 14,000 の透析膜で透析した後に精製を行った。

Cellufine GCL-2000 による精製：Cellufine Sulfate より溶出された抗原サンプルは MWCO 10,000 の限外ろ過膜で濃縮後、ゲル濾過担体である JNC 社製 Cellufine GCL-2000 カラム Φ11 x 500 mm (50 ml) にアプライした。FPLC システムは GE 社製 AKTA explorer 10S を用い、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を流速 0.15 ml/min で分離を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に基づき、各機関における動物実験委員会の承認を受けて行うこととする。

C. 研究結果

(1) キメラ DENV/WNV 抗原の性状解析と発現・分泌条件の検索

キメラ DENV ベクターにより細胞外に放出される抗原の詳細な ELISA 解析：昨年度報告した 4G2:HRP-4G2(フラビウイルス E 蛋白質多量体検出)、4G2:HRP-2H2(露出している E 蛋白質と DENV prM 蛋白質の複合体検出)、4G2:HRP-402(露出している E 蛋白質とヘテロ多量体を形成する WNV E 蛋白質検出；阪大微研会)ELISA に加えて、2H2:HRP-4G2(露出している DENV prM 蛋白質と E 蛋白質の複合体検出)と 2H2:HRP-2H2(露出している DENV prM 蛋白質の複合体検出) ELISA 系を駆使して、発現ベクターを導入された 293T 細胞から放出されるウイルス抗原の性状を詳細に調査した。

その結果、対照の DEN-VLP ベクターもバックグラウンドの WN-VLP ベクター(以前報告)も、其々の蛋白質間で多量体を形成し、且つ、両蛋白質でヘテロ複合体を構成する抗原を培地中に放出していた。このような複合体抗原の放出は、シグナル配列或いは膜貫通領域の両部位共に WNV 由来部位に置換しても影響を受けなかった。しかし、一部位が WNV 由来に置換されたベクターにおいては、培地中の E 蛋白質多量体抗原量が著しく減少し、更に置換すると培地中にウイルス抗原が検出できなくなった。一方、全て WNV の領域からなるベクターにおいては、蛋白質多量体抗原を分泌していた。

キメラベクターにより細胞外に放出される抗原の蔗糖密度勾配遠心解析：対照の DEN-VLP ベクターを導入した 293T 細胞培養上清中のウイルス抗原を蔗糖密度勾配遠心法で解析したところ、比重 $d=1.085 \sim 1.090$ と $d=1.055 \sim 1.060$ の画分に E/prM 複合体抗原が観察された。また、WNV 由来部位に置換しても影響を受けなかったキメラベクターの分泌する複合体抗原も同様の比重画分に 2 つのピークを形成した。一方、バックグラウンドの WN-VLP ベクターの場合には、 $d \approx 1.060$ に蛋白質多量体抗原のピークが観察された。これに一致して、主要中和エпитープ領域以外は全て WNV の領域からなるベクターにおいて、比重の軽い画分に単一のピークとして

キメラウイルス抗原が分画された。さらには、一部位を WNV 由来に置換して細胞外放出が低下したキメラベクターについても、放出された蛋白質多量体抗原は軽い方の比重画分に単一のピークを形成した。

効率的なキメラ蛋白質の発現・分泌条件の検索：本課題でデザインされたキメラ DENV/WNV ベクターは CMV プロモーターで発現されている。しかし、種々のドメインを WNV の相当部位と置換したキメラベクターは、程度の差があるものの細胞外への抗原分泌量が低下していた。一方、WN-VLP ベクターは既に報告した通り CAG プロモーターで高効率発現ベクターに構築されている。そこで、キメラベクターにおける発現効率を高める検討を行った。

まず、全てのキメラベクターについて CAG プロモーターに変換した発現ベクターを新たに構築した。また、ピューロマイシン耐性遺伝子を追加したキメラベクターも構築した。これらの新旧ベクターを用いて、①発現細胞(Vero 細胞と 293T 細胞)、②導入試薬(FuGENE 6 と FuGENE HD)、③培地(10% FBS 添加 DMEM と 293 Exp 無血清培地)、④導入するプラスミド DNA 量(2~0.25 μg)、を種々に組み合わせて培地中へのキメラ抗原放出量が増加する条件を調査した。しかしながら、これまで実施してきた 6 穴 plate でのトランスフェクション条件(293T 細胞に、CMV プロモーターベクタープラスミドの、DNA 1 μg を、FuGENE 6 で導入し、10% FBS 添加 DMEM で培養する)が至適条件であった。

(2) キメラ DENV/WNV 抗原精製法の検討

Cellufine Sulfate による精製：DENV 発現抗原約 2700 μg を含んだ培養上清を透析したサンプル 90 ml を Cellufine Sulfate で精製した結果、その塩溶出画分には 870 μg (約 33%)の抗原が回収された。総タンパク質量あたりの抗原量で示される比活性は精製前の 7.5 倍に改善され、SDS-PAGE の結果からも培養液由来の夾雑タンパク質が多量に除去されていることが判明した。

同様に、約 1300 μg の DENV/WNV キメラ抗原を含んだ培養上清 750 ml を Cellufine Sulfate で精製した場合には、塩溶出画分に約 1050 μg (約 82%)の抗原が回収された。比活性は精製前の約 100 倍にまで改善されたことから、夾雑タンパク質が極めて効果的に除かれていることが示された。

Cellufine GCL-2000 による精製：DENV 発現抗原の Cellufine Sulfate 精製画分を限外ろ過膜で濃縮後、抗原約 520 μg を含んだサンプル液 1 ml を 50 ml

の Cellufine GCL-2000 でゲル濾過を行った。高分子側のフラクションに抗原の多くが溶出し、約 30% が回収され、比活性は培養上清の 68 倍まで高くなった。SDS-PAGE と Wesertn Blot の結果からも培養液由来タンパク質はほぼ除去されていると考えられた。SEC 分析による標準タンパク質との比較から、得られた抗原は数千～数万 kDa の巨大分子を形成していることが示唆された。

DENV/WNV キメラ抗原の Cellufine Sulfate 精製画分についても、限外ろ過膜で濃縮後抗原約 740 µg を含んだサンプル 1 ml を 50 ml の Cellufine GCL-2000 でゲル濾過を行った。抗原は DENV に比べると広範囲に溶出され、高分子側のフラクションから回収した不純物の少ない抗原は約 25%であった。この画分での比活性は培養上清の 250 倍にまで濃縮されていたが、出発材料中の発現抗原量が少ないことが影響し、SDS-PAGE と Wesertn Blot の解析では不純物と思われるタンパク質が残存していた。SEC による分析では、ここで得られた抗原も数千～数万 kDa の巨大分子を形成していた。

D. 考察

(1) キメラ DENV/WNV 抗原の性状解析と発現・分泌条件の検索

昨年度における最大の成果は、DENV 主要中和エピトープ domain がフラビウイルスキメラ抗原として細胞外に分泌・放出されることが強く示唆された点にあった。本年度の最重要事項はこの点を明確に証明することである。そこで、サンドイッチ ELISA システムも新たに導入し、蔗糖密度勾配遠心法による解析も加えて細胞外に分泌される抗原の性状を詳細に検討した。その結果、DENV 自身では相互に連携して沈降速度の異なる 2 種の複合体を形成することを見出した。しかも、この複合抗原は DENV 主要中和ドメイン以外が WNV のに由来する場合は、2 種形成されるのではなく、沈降速度の遅い 1 種のみのキメラ抗原であることも示された。

我々が本課題で試みている抗原デザインのコンセプトは、「①DENV 1～4 型交叉反応性の感染増強抗体を誘導せず(誘導活性は低く)、②DENV 1～4 型特異的中和抗体は誘導でき、③感染性の無いフラビウイルス様粒子抗原」を開発することである。致死性デング出血熱の原因と考えられる DENV 交叉反応性感染増強抗体は、あるタンパクに対する抗体が主役と報告されている。しかし、DENV グループとは別のフラビウイルスグループである JEV のそれに対する抗体は DENV のタンパクと反応せず、従って、

感染増強を引起さないであろうと報告されている。即ち、本研究でバックグラウンドに用いた WNV は JEV と極めて近縁の JE 血清型群のウイルスであることから、その抗原は DENV の感染増強を引起す抗体を誘導しない/低レベルであることが期待される。

しかし、WNV が DENV との主要中和ドメインと、相互に連携してフラビウイルス粒子状の形態を形成し、且つ、WN-VLP で報告したように細胞の分泌経路を巧みに利用して細胞外に放出する作用を示すか否かは不明であった。本年度の結果は、WNV のは DENV と複合抗原を形成する連携作用は示さないものの、領域内に DENV の主要中和ドメインを保持して細胞外に「蔗糖密度勾配遠心でピークを形成する＝浮力を持ち一定の比重の画分に沈降する」キメラ抗原を産生できることを示している。ただ、発現・分泌量は低下するため電子顕微鏡で抗原形態を観察するのに十分な抗原量が得られていない。

そこで、発現効率の増強・分泌量増加を目指してプロモーターを始めとする種々の発現条件の検討を行った。結果の項に記載したように、現在実施しているトランスフェクション・発現細胞・培養条件が至適で、改良点は見出せなかった。しかしながら、高い細胞濃度を維持しつつ無血清培地で培養できる浮遊細胞培養システムで良好な成績が得られつつある。接着細胞と浮遊細胞では細胞外分泌活性等種々の活性が基本的に異なると考えられるため、現在この浮遊細胞無血清培養系での発現と細胞外抗原の性状について接着細胞の場合と比較しつつ解析を進めている。

(2) キメラ DENV/WNV 抗原精製法の検討

Cellufine Sulfate はヘパリン様の擬似アフィニティー担体として、ウイルスや血液製剤などの精製に広く用いられている担体である。ワクチン製造を目的とした不活性化ウィルスの精製などにおいて、本担体はウィルスの外膜を構成するタンパク質と相互作用すると考えられており、今回の検討では血清を含んだ培地中に放出された VLP と思われる抗原を吸着することが示された。DENV および DENV/WNV キメラの両抗原が共に担体に吸着し、塩により溶出液に濃縮して回収された。この溶出液では培養液中に含まれる夾雑タンパク質が効果的に除去されており、無血清培地の使用などにより、吸着容量や精製度はさらに改善することが期待できる。一方、今回の検討では DENV の回収率が 30%程度と低かった。通過液に抗原の活性が見られないことから、残りの抗原は担体に強く吸着して溶出されなかった