

平成23年 6月23日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590117

研究課題名（和文）HCV 感染制御のための人工ガンマグロブリンの作成とその評価系の開発

研究課題名（英文）Construction of artificial poly-clonal gamma globulin to control HCV infection and development of assay system

研究代表者

亀岡 洋祐（KAMEOKA YOUSUKE）

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・難病資源研究室

研究者番号：00224692

研究成果の概要：(和文)

ヒト末梢血リンパ球よりガンマグロブリンをコードする cDNA の一部、VH-CH1-hinge 部位をクローニングし発現可能な有効 178 クローンを得た。これらのクローンを大腸菌により組み換えタンパクを発現させ、精製組み換えタンパクをミリグラム単位で回収することができた。直接の C 型肝炎モデル系ではないが、炎症性モデルマウス SCJK/J を用い、組み換えタンパクによる治療実験を行った。投与後、採血し炎症状態を解析した結果、末梢血リンパ球の低下、炎症性サイトカインの低下、抑制性サイトカインの上昇が観察され、ここで得られた組み換えタンパクの肝炎治療への応用の可能性が示された。

研究成果の概要：(英文)

178 clones of artificial poly-clonal gamma globulin, which consist of VH, CH1 and hinge region, was constructed from cDNA originated from peripheral blood. The expressed recombinant proteins in *E. coli*, were extracted, purified and recovered in milligram order. SCJK/J mouse, which is an inflammatory disease model, although the strain is not a model of hepatic disease, were examined for therapeutic treatment with the recombinant poly-clonal gamma globulin. After the therapeutic treatment in some dose of recombinant protein, hemogram and some cytokines were assayed. The level of peripheral blood lymphocyte and some inflammatory cytokines were decreased in dose dependent manner, and some suppressive cytokines were increased. It was suggested that the recombinant poly-clonal gamma globulin, constructed in this study, would be possible to apply to the therapy for hepatic inflammatory disease.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,780,000	900,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬、人体抗体、C型肝炎、HCV、感染制御

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスの感染に起因する肝炎、また疾患の進行による肝硬変や肝細胞がんに対する根本的な治療や対応策がなく、感染者数が多いことから社会的にも問題となっていた。本研究ではC型肝炎ウイルス感染患者の中に無症候性キャリアが存在することに着目し、生体内の免疫機能によってC型肝炎ウイルスの感染制御や肝炎進行抑制に関与する生体機能分子の存在を考え、中でも150万種類を超える多様性を持つ免疫グロブリンに着目した。疾患患者の生体内で疾患や炎症制御に関わる免疫グロブリンのクローンを選択できれば、C型肝炎ウイルスの持続的な感染の制御や、感染による肝炎、肝硬変、肝がんの進行という、疾患の増悪化を抑制する機能分子として疾患の治療薬としての応用が期待できるものと考えられた。C型肝炎の進行を制御する機能を持つ抗体種の存在が予想されることに基づき、感染患者の体内で作用している抗体クローンをバルクでクローニングした人工ポリクローナルガンマグロブリンを作成し、HCV感染制御・肝炎進行制御をすることにより、HCV感染に起因する肝炎、肝硬変、肝癌に対する治療薬開発に寄与することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究においては、C型肝炎ウイルスに対する特定のモノクローナル抗体を選抜する方法ではなく、バッチ化したポリクローナルガンマグロブリンをクローニングし組み換えタンパクを作成することによって、ガンマグロブリン分子疑似的な人工ポリクローナルガンマグロブリンの多数のクローンを含むバッチ得、それによりC型肝炎ウイルス感染や感染に伴う炎症の制御の可能性を試行する。加えて有効性評価のための*in vitro*での評価系を構築し、作成したポリクローナルガンマグロブリンバッチの有効性を評価することを目的とする。本研究ではC型肝炎ウイルス感染患者（無症候性）のボランティアのご協力を頂き、その末梢血よりガンマグロブリンをコードしているRNAをバッチでクローニングしポリクローナルガンマグロブリンとして使用し、その有効性を評価する評価系を構築することを特徴としている。本邦においては脇田らがHCV genotype 2aを用いた*in vitro*持続感染系を確立しており、この系をHCV感染制御評価のための標準系として用いることが可能である。この系を用いることによって、*in vitro*でのC型肝炎ウイルスの感染制御、肝炎制御の効果評価を行える可能性があり抗HCVポリクローナルガンマグロブリンバッチの効果に適合した評価系の確立を試行する。

3. 研究の方法

本研究は、以下の2点で構成されている。

(1) HCV感染患者の中の無症候性キャリアの生体内にHCVの感染制御や肝炎進行抑制に効果のある抗体種（関連タンパク質に対して弱い親和性を持つ多数のレパトアを含む）をクローニングし、大腸菌により組み換えタンパクを発現させ、多数のクローンを含む人工ポリクローナルガンマグロブリンを作成してウイルス感染制御や肝炎進行抑制に効果のあるクローンバッチを作成する。

(2) 作成した人工ポリクローナルガンマグロブリンのC型肝炎ウイルス感染制御および炎症制御の活性評価系を構築する。

人工ポリクローナルガンマグロブリンのバッチ作成はC型肝炎ウイルス患者末梢血の単球からガンマグロブリンコード領域から初期pET23aベクター系にはVL、VHを別々にRT-PCRによりcDNA増幅をおこない、ランダムなVL-VH複合体を作成しpET23aベクターへ組み込みライブラリーを作成し、約14,000個のcDNAクローンを得た。その後の発現制御系のpBADベクターにはVH-CH1-hinge領域の末端のコンセンサス配列を利用してRT-PCRによりcDNA断片を得、クローンライブラリーを作成した。初期pET23aによるライブラリーから無作為に選択した384クローンの塩基配列解析を行い多様性の保持とタンパク発現可能なクローンの選択を行い、タンパク発現可能なクローンを混合して、バッチ培養し、タンパク発現を誘導した。大腸菌からタンパク抽出、ニッケルカラムによる精製を行いその性状をSDSPAGEおよびウエスタンブロットにより解析した。前期のVL-VH複合体では、精製した組み換えタンパクが難溶性を示し、生理食塩水系では使用できないことが判明したため、後期のVH-CH1-hingeコンストラクトを考案し、発現ベクターも大腸菌体内で発現が制御できるpBADベクターを用いて、前期と同様にライブラリーよりタンパク発現可能なクローンバッチを作成し、発現誘導、タンパク抽出、精製を行った。

組み換えタンパクの機能評価系の構築に関しては、HepG2細胞を用いたC型肝炎ウイルス発現系の利用を目指していたが、HCV genotype 2aを用いた*in vitro*持続感染系の利用ができなかった。炎症性疾患モデルマウスであるSCGK/Jマウスが炎症制御の評価系として利用できることになったので評価を*in vivo*での評価に切り替え、組み換えタンパクの投与実験による炎症制御活性の解析に切り替えて実験を行った。

4. 研究成果

初期に作成したVL-VH複合体組み換えタンパクは水溶液系での不溶性の問題が克服で

きなかったため、VH-CH1-hinge コンストラクトの作成に切り替え、pBAD ベクター系により作成したガンマグロブリン VH-CH1-hinge 組み換え体クローンライブラリーを作成した。ランダムに抽出した 1000 クローンの解析結果は図 1 に示すように、1000 クローン中、約 4 分の 1 の 245 クローンが His タグが付加されたタンパクを発現できるものであり、その内の 224 クローンがガンマグロブリン VH-CH1-hinge をコードしていた。さらに 46 クローンが重複していたので、ユニーククローンとしては最終的に 178 クローンのガンマグロブリン VH-CH1-hinge クローンを得た。

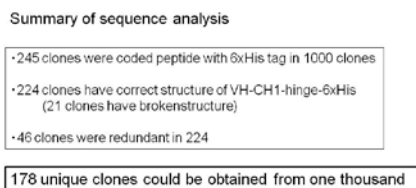


図 1 クローンの配列解析結果

得られた 178 クローンのミックスバッチ培養を行い菌体タンパクを 8M 尿素により抽出して、ニッケルカラムによるアフィニティカラムクロマトグラフィーを 2 回行いタンパク精製を行った。精製した hScFv の SDS PAGE 染色とウエスタンブロットによる性状解析結果を示す。

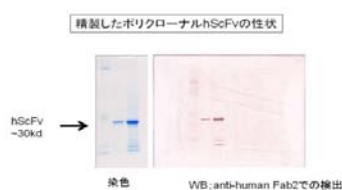


図 2 精製 hScFv の性状

染色及び抗体による検出のパターンがほぼ一致しており、一部分解したてい分子を含んではいるが 90%以上の純度で精製できていると考えられる。培養当たりのタンパク回収率は、1 L 培養から最終票品で 0.3 から 0.4mg と回収率はよいとは言えない。

精製組み換えタンパクからのエンドトキシンの除去については、アルカリ処理による分解で行い最終的なエンドトキシン濃度は、組み換えタンパク 1mg/ml 当たり 56EU が混入していることになる。このエンドトキシン混入レベルでもマウスへの投与実験は可能と考え、SCG/kj マウスへの投与実験を行った。



図 3 投与実験プロトコール

SCG/kj マウスへの投与実験は図 3 に示すように、10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与をタンパク量 0mg/kg/day、10mg/kg/day、20mg/kg/day、40mg/kg/day の 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与し、3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液を採取し、血液成分分析を行った。

現在までに実験に投入できたマウスの数が 22 匹と少ないために結果の傾向を示す。

白血球および末梢血リンパ球数の変化を図 4 に示した。組み換え人工ポリクローナルガンマグロブリンの投入量に比例して白血球、リンパ球ともに減少している傾向がみられ、炎症抑制効果を示しており、血液製剤グロブリンの効果に比べて 20 分の 1 から 40 分の 1 量で製剤ガンマグロブリンと同等の効果を示している。

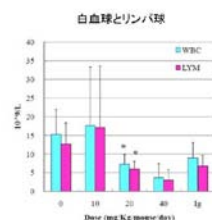


図 4 白血球およびリンパ球

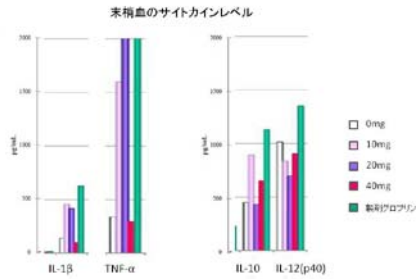


図5 末梢血のサイトカイン

サイトカイン測定に関しては各投与量におけるマウス数が少ないため有意な差とはなっていないが、炎症性サイトカインであるIL-1 β 、TNF- α などでは投与により減少していることが観察され、また炎症抑制性のサイトカインと考えられているIL-10、IL-12p40等では投与による増加がみられる。これらのことから、投与した組み換え人工ポリクローナルガンマグロブリンは、in vivoの炎症モデルマウスにおいて、炎症反応を抑制する活性を持つことが示された。

研究立案当初においてはC型肝炎ウイルスの感染患者の末梢血からのガンマグロブリン分子の収集をすることを目指したが、結果的には感染患者からのガンマグロブリンクローンによるライブラリー構築はできなかった。しかしながら、健常者の末梢血に含まれるガンマグロブリン分子種は健常者の健康維持の恒常性に関与しており、そのグロブリンクローンライブラリーのバッチを作成することができ、それによる組み換えタンパクを精製し等おじっけに用いることのできる組み換えタンパクを得ることができた。この人工ポリクローナルガンマグロブリンは炎症性疾患モデルマウスを用いた評価系において、炎症反応を抑制する効果が認められ、現在臨床で使用されている血液製剤によるガンマグロブリンの10分の1から20分の1量で同様の効果が期待できることが示された。今回得られた人工ガンマグロブリンVH-CH1-hingeの構成のクローンバッチが炎症性疾患に抑制的に働く薬剤となる可能性が示され、肝炎治療への応用の可能性を開くことができるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

Osada N, Uno Y, Mineta K, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K., Ancient genome-wide admixture extends beyond the current hybrid zone between *Macaca fascicularis* and *M. mulatta*., *Mol Ecol.*, 19(14), 2010, 884-95.

Osada N, Hirata M, Tanuma R, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Kameoka Y, Hashimoto K, Takahashi I. Collection of *Macaca fascicularis* cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus. *BMC Res Notes*. 2:199, 2009

Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. *The Journal of Immunology*, 183, 2009, 3417-3424

Higashino A, Osada N, Suto Y, Hirata M, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K. Development of an integrative database with 499 novel microsatellite markers for *Macaca fascicularis*. *BMC Genet.* 26(6), 2008.

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics*, 92, 2008, 90-

Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K., Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo., *J Urban Health.*, 85, 2008, 619-635.

T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, K. Suzuki, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies

available in Japan and Europe., Clin. Exp. Rheumatol., 26(6), 2008, 1027-33.

Ayako Mabuchi, Tomokazu Nagao, Osamu Koshio, Toshiyuki Ishiwata, Akihiko Yano, Kazuo Suzuki, Kozo Yokomuro and Antony M Wheatley., Role of F4/80+Mac-1high adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice., Hepatology Res., 38, 2008, 1040-1049.

Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner., J. Autoimmunity, 31, 2008, 79-89.

〔学会発表〕(計 10 件)

東濃篤徳、長田直樹、坂手龍一、平田誠、亀岡洋祐、保富康弘、高橋一朗、世代シークエンサーを用いたカニクイザルにおける遺伝子発現解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月, 神戸

竹内昌男、東濃篤徳、竹内喜久子、牧野 初音、田沼玲子、平田誠、高橋 一朗、梅澤 明弘、亀岡洋祐, 培養により形質転換したヒト間葉系幹細胞のトランスクリプトーム解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸

亀岡洋祐、小浦美奈子、内田敬子、竹内喜久子、松田潤一郎、長尾朋和、宇野賀津子、大野尚仁、鈴木和男, ヒト monovalent-hScFv の評価検討, MPO 研究会, 2011 年 1 月 仙台

Yosuke Kameoka, Tsuyoshi Kasama, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso and Kazuo, Possible role for the leader peptide of myeloperoxidase.

the 6th International Human Peroxidase meeting April 2009, Chapel Hill, NC, USA

亀岡洋祐、内田敬子、田中早苗、平田誠、田沼玲子、竹内昌男、竹内喜久子、長田直樹、高橋一朗、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男、モノバレント VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの多様性と結合性の検討, 第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 下野市 自治医大

亀岡洋祐、内田敬子、田中早苗、平田誠、田

沼玲子、竹内昌男、竹内喜久子、長田直樹、高橋一朗、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男, 改良型人工ガンマグロブリンの多様性と結合性の検討, 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜

竹内昌男、竹内喜久子、亀岡洋祐、小原有弘、長田直樹、高橋一朗、牧野初音、梅澤明弘 ヒト間葉系幹細胞の長期培養による形質転換, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 横浜

長田直樹、亀岡洋祐、平田誠、田沼玲子、鈴木穰、菅野純夫、高橋一朗 カニクイザル骨髄、脾臓、膵臓由来 cDNA ライブラリーの解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸

亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田 誠、田沼玲子、長田直樹、高橋一朗、鈴木和男, 人工ガンマグロブリンの多様性の検討, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008 年 12 月 神戸

亀岡洋祐、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男, MPO リーダーペプチドは活性制御に関与するか II, MPO 研究会, 2008 年 10 月 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀岡 洋祐 (KAMEOKA YOUSUKE)
独立行政法人医薬基盤研究所・
難病・疾患資源研究部・難病資源研究室
研究者番号: 00224692

(2) 研究分担者

大島 正道 (OOSHIMA MASAMITI)
国立感染症研究所・免疫部・室長
研究者番号: 10272428
(22 年度: 連携協力者)

鈴木 和男 (SUZUKI KAZUO)
千葉大学・医学研究科・特任教授
研究者番号: 20192130
(22 年度連携協力者)

(3) 連携研究者