

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 17 日現在

機関番号： 21601
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011 ～ 2013
 課題番号： 23659187
 研究課題名（和文）
 タイト結合膜貫通分子オクルディンを標的とした C 型肝炎の新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of a novel therapy targeting tight-junction protein occludin against hepatitis C
 研究代表者
 千葉 英樹（CHIBA HIDEKI）
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 00295346

研究成果の概要（和文）： C型肝炎ウイルス（HCV）感染の新たな予防・治療法の開発を目指して、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。精製抗体 15 クローンはいずれも、ヒト肝がん細胞株 Huh7.5.1 に対して毒性作用を示さなかった。Huh7.5.1 細胞の単層培養では、精製抗体による HCV 感染阻害作用は明らかではなかった。しかし、蛍光ラベルした抗ヒトオクルディン単クローン精製抗体をダブルチャンバーの下部チャンバーに加えたところ、Huh7.5.1 細胞の細胞境界にシグナルが検出され、新規抗体が生細胞のオクルディンに結合できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To prevent and treat Hepatitis C virus (HCV) infection, we generated a novel monoclonal antibody against human occludin. 15 clones of the purified antibodies showed no toxicity in the human hepatocellular carcinoma cell line Huh7.5.1. These antibodies did not inhibit HCV infection in Huh7.5.1 monolayer culture. However, when the fluorescent labeling antibody was applied to the lower chamber, the signal was detected along cell borders of Huh7.5.1 cells cultured in the upper chamber, suggesting that the novel antibody binds to occludin in living cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：タイト結合、C型肝炎ウイルス、感染症、肝臓、トランスレショナルサーチ、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は世界で1億7千万人、我が国では200万人を超えると推定される。C型慢性肝炎の治療としては現在、インターフェロンと抗ウイルス薬リバビリンの併用療法が行われている

が、著効率は約50%で、副作用の面からも満足できるものではない。したがって、HCVの持続感染による肝硬変・肝臓への移行を防ぐためには、新たな予防・治療法の開発が急務である。

我々は、細胞間接着装置タイト結合の膜

貫通分子であるオクルディンやクロードインファミリーについて、各種 cDNA の単離や特異抗体の作成を進め、上皮や血管内皮における機能と制御機構、ヒト疾患との関連を明らかにしてきた。一方で、ヒトオクルディン (OCLN) が HCV の受容体の一つであること、その第二細胞外ドメイン (OCLN-EC2) が HCV の宿主細胞 (ヒト肝細胞) への侵入・感染成立に必須であることが明らかになった。そこで本研究では、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製し、HCV の感染防御に対する有効性を明らかにし、新規治療薬として臨床応用するための研究基盤を確立しようと考えた。

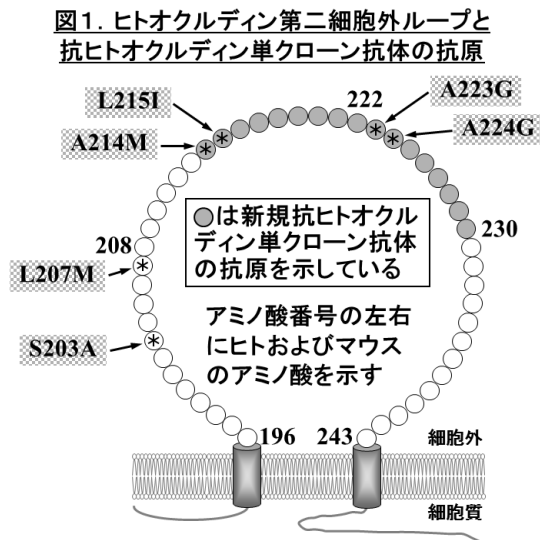
2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の研究目的は、以下の4点であった。

- (1) HCV の結合に必要な OCLN-EC2 のヒト特異的アミノ酸の同定
- (2) 新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体の作製
- (3) 抗ヒトオクルディン単クローン抗体の HCV 感染に対する有効性の評価
- (4) 抗ヒトオクルディン単クローン抗体の正常ヒト細胞に及ぼす影響の検証

3. 研究の方法

- (1) ヒト OCLN-EC2 のアミノ酸残基 48 個のうち、HCV 結合部位と推定される 17 アミノ酸配列に相当する合成ペプチドを抗原として、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。



- (2) HCV に対する感受性の高いヒト肝がん細胞株 Huh7.5.1 を新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体 31 種類のハイブリドーマ存在下・非存在下で培養して、免疫染色、ウェスタンブロット、HCV 感染阻害実験 (シュードタイプウイルス HCVpv および HCVcc) を行い、抗体をスクリーニングした。
- (3) 候補となった抗ヒトオクルディン単クローン抗体 5 種類から 15 クロンを精製し、毒性試験、感染阻害実験、蛍光ダイレクトラベリングによる生細胞蛍光イメージングを行った。

4. 研究成果

- (1) 新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体 31 種類のハイブリドーマをスクリーニングして 5 種類を選択し、15 クロンの精製抗体を得た。

図2. 新規抗ヒトオクルディン抗体による免疫染色像

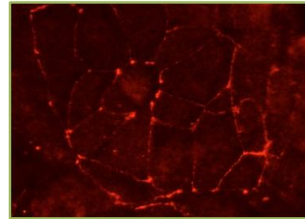
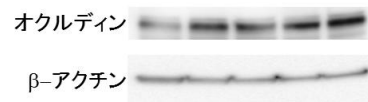


図3. 新規抗ヒトオクルディン抗体によるウェスタンブロット像



- (2) 精製抗体によるヒト肝がん細胞株 Huh7.5.1 に対する毒性作用は認められなかった。
- (3) Huh7.5.1 の単層培養では、精製抗体は HCV 感染阻害作用を示さなかった。
- (4) 蛍光ラベルした抗ヒトオクルディン単クローン精製抗体を下部チャンバーに加えて、上部チャンバーに培養した Huh7.5.1 細胞を観察したところ、細胞境界にシグナルが検出された。この結果は、新規抗体が生細胞のオクルディンに結合できることを示唆した。
- (5) 他の研究グループによって同定された

「HCVの結合に必要な OCLN-EC2 のヒト特異的アミノ酸」は、抗原とした合成ペプチドに含まれていた。

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 10 件)

- ① Woeckel VJ, Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. Evidence of vitamin D and interferon- β cross-talk in human osteoblasts with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and rosiglitazone synergistically osteoblast-mediated mineralization. *Gene*, 512: 438-443, 2013.
- ② 富川 (市川) 直樹, 千葉英樹. Stereotaxic injection の手法と応用. *Surgery Frontier*, 19: 445-450, 2012.
- ③ 富川 (市川) 直樹, 千葉英樹. 蛍光ダイレクトラベリングによる生細胞蛍光イメージング. *Surgery Frontier*, 19: 335-340, 2012.
- ④ Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium Perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *Prostate*, 72: 351-360, 2012.
- ⑤ Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xu Z, Kamikubo Y, Sakurai T, Kohsaka S, Chiba H, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. Laminin $\alpha 1$ is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biol*, 31: 17-28, 2012.
- ⑥ Woeckel VJ, Eijken M, van de Peppel J, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. Evidence of vitamin D and interferon- β cross-talk in human osteoblasts with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 being dominant over interferon- β in stimulating mineralization. *J Cell Physiol*, 227: 3258-3266, 2012.
- ⑦ Woeckel VJ, Eijken M, van de Peppel J, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. IFN β impairs extracellular matrix formation leading to inhibition of mineralization by effects in the early stage of human osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*, 227: 2668-2676, 2012.
- ⑧ van der Eerden BC, Weissgerber P, Fratzi-Zelman N, Olausson J, Hoenderop JG, Schreuders-Koedam M, Eijken M, Roschger P, de Vries TJ, Chiba H, Klaushofer K, Flockerzi V, Bindels RJ, Freichel M, van

Leeuwen JP. The transient potential channel TRPV6 is dynamically expressed in bone cells but is not crucial for bone mineralization in mice. *J Cell Physiol*, 227: 1951-1959, 2012.

- ⑨ Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 253048, 2011.
- ⑩ Bruedigam C, Eijken M, Koedam M, Chiba H, van Leeuwen JP. Opposing actions of rosiglitazone and resveratrol on mineralization in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 51: 862-871, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kotaro Sugimoto, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Risa Kanai, Satoshi Tanaka, Norimasa Sawada, Hideki Chiba. Tight-junction protein claudin-6 provokes epithelial polarization and cell-cell junction formation in F9 stem cells. In: Tight junction symposium 2012, 2012 Nov 1-4, Merida, Mexico.
- ② Naoki Tomikawa-Ichikawa, Kotaro Sugimoto, Risa Kanai, Hideki Chiba. Src family kinase involves in the differentiation of stem cells to epithelial cells. In: Tight junction symposium 2012, 2012 Nov 1-4, Merida, Mexico.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 英樹 (CHIBA HIDEKI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00295346

(2) 研究分担者

富川 直樹 (TOMIKAWA NAOKI)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80468587