

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293134

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス糖ペプチドを用いた中和抗体作製と、新規診断技術への応用

研究課題名(英文) Research of neutralizing antibody recognizing glycopeptides onto hepatitis C virus and basic studies for new diagnoses

研究代表者

清水 弘樹 (Shimizu, Hiroki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30344716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：E2糖タンパクのアミノ酸配列は、C型肝炎ウイルス(HCV)株間で保存性が小さく多様性に富んでいるため、この部分を抗原とする抗体ができれば、株間に依存しないHCV迅速検出系の開発や有用なHCV中和抗体の創出が期待できる。本研究では、E2の中でもアミノ酸配列の保存性が高い糖鎖付加領域に着目し、糖ペプチド部を認識する抗体の開発を目指した。

我々の有する糖鎖を抗原とした免疫法用いた抗原キャリアを導入した5糖10残基ペプチド体の合成を進めたところ非常に困難をみたが、最終的にはマイクロ波利用固相法により達成できた。そして、この抗原を使って免疫を進め、抗体の取得研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was research of neutralizing antibody recognizing glycopeptides onto hepatitis C virus (HCV) and basic studies for new diagnoses.

We tried to produce a neutralizing antibody which recognize glycopeptide in E2 glycoprotein onto HCV. The first stage, to synthesize glycopeptide antigen having developed (by Okuda et al) immunization tag, faced many difficulties, but finally, we achieved to synthesize the designed glycopeptide antigen with aid of new microwave techniques which Shimizu et al developed. Then, immunization was performed and currently produced antibodies are evaluated.

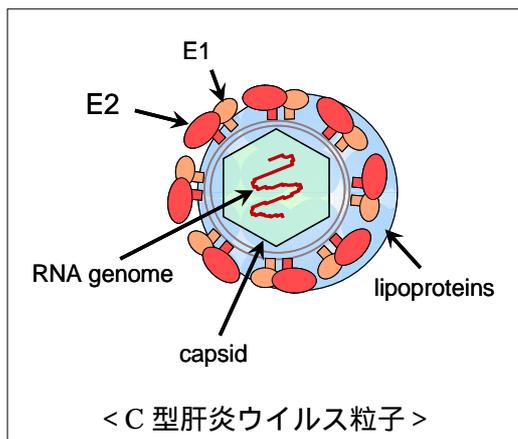
研究分野：有機合成化学

キーワード：C型肝炎 糖ペプチド 糖鎖 抗体

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓病の主要な原因ウイルスであり、感染者数は、我が国で約200万人、世界的には1億7000万人にのぼると推定されている。特徴の一つとして、感染後は高頻度に持続感染へ移行し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌へと病態が進展する。一方で急性肝炎発症後、自然治癒するケースも2割程度報告されており、これらの治癒患者には、感染後の免疫応答によってHCV感染を阻止する中和抗体が誘導されていると考えられる。しかし、血中の抗HCV中和抗体を測定、評価する臨床診断法は未だ確立されておらず、そのためHCV感染者における中和抗体の誘導と感染ウイルスレベル、病態との関連など詳細は未だ不明である。

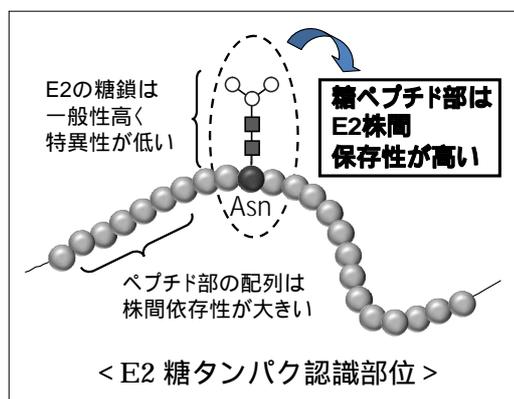
HCVの粒子表面には、2種類のN型糖タンパク(E1,E2)が存在する。培養細胞でのHCV感染実験の成績から,E2がHCVウイルス感染や中和エピトープとして重要であることが知られているが,E2のアミノ酸配列はHCV株間で多様性に富んでおり、多くのHCV株のE2糖タンパクを共通して認識する抗体は獲得されておらず,E2抗原診断法は確立されていない。一方,E2糖タンパクは11カ所の糖鎖付加アスパラギンを有しており、その中でHCV感染、レセプター結合に関わるアスパラギン残基は概ね明らかにされている。加えて,E2糖タンパクの糖鎖付加部位、レセプター結合領域のアミノ酸配列は,HCV株間での保存性が比較的高い。我々は、この糖鎖付加部位を含む糖ペプチド部が中和エピトープになりうると考えた。ちなみに、質量分析法によりE2結合N型糖鎖の大部分はハイマンノース型で、一部がコンプレックス型であることが知られている。



E2糖タンパクのアミノ酸保存領域は数残基程度しかなく、抗体の認識エピトープとして十分でない。申請者らは、この領域に結合する糖鎖構造までをエピトープとすることで、抗原として十分に特異性を高めることができると考えた。奥田らは、長鎖炭化水素鎖をキャリアとした免疫誘導により糖鎖に対する抗体の作製に最適化した抗体作製法を確立しており(奥田・清水,特第6143240号),この新技术を糖ペプチド抗原にも応用する

と、作製される抗体は糖とペプチド鎖の両方を認識するものとなるのではないかと考えた。

清水らは、マイクロ波を利用した生理活性物質の精密合成研究を進めており,(糖)ペプチド合成に特化したマイクロ波利用合成装置を開発した。松尾は、糖鎖合成研究、特に複雑なハイマンノース型やコンプレックス型などの糖アミノ酸合成に成果を挙げている。そこで、まず、ハイマンノース型糖鎖付加アスパラギンを合成し、これを利用して長鎖炭化水素鎖を有する糖ペプチドを合成する。そして、この糖鎖とその近隣アミノ酸を複合的に認識する抗体の作製を行うと、これまで成し遂げられていない「HCVを株間に因らずに認識する機能や、中和抗体能を有する」抗体が得られることが多いに期待される。



一方、鈴木らは、HCVの分子ウイルス学研究に従事し、HCVのゲノム複製、HCV E1,E2タンパク質のプロセッシング、アセンブリーを含む粒子形成過程などHCVライフサイクルの分子機構を解明した。また松岡は、金微粒子上の糖鎖被覆技術を開発し、検出デバイスへの応用技術確立を目指した研究を行っている。この両者により、作製する糖ペプチドの抗体を利用した新しい開発研究を展開する。つまり、鈴木は抗体の感染阻害能やE2検出能の検定と、抗体の中和抗体としての機能の検証、創薬への展開研究を、また松岡は被覆化合物を糖鎖から抗体へ置換することにより、新しい抗体被覆粒子の開発と、株間によらない広くHCVを検出するデバイスの開発研究を計画した。現在、HCVのアミノ酸配列の保存性の低さもあり、表面分子を直接認識した検出法というものは存在せず、これらが達成されれば、信頼性がより高い肝炎ウイルス診断法の確立が望める。

2. 研究の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の表層糖タンパクE2由来の糖ペプチドをエピトープとし、HCV株間を越えて広く反応するモノクローナル抗体を開発する。得られた抗体を用いたHCV中和抗体の創出とその作用機序の解明研究を行い、さらにHCV診断法の確立を指向した基盤研究展開を計る。

E2のアミノ酸配列はHCV株間で保存性が小

さく多様性に富んでいるため、汎用的な E2 検出抗体は確立されていない。しかし、表層抗原のため抗体検出が容易であること、更には HCV 中和抗体の主要なエピトープを含むことから、目的抗体が開発できれば株間に依存しない HCV 迅速検出系の開発や、有用な HCV 中和抗体の創出が期待できる。本研究では、E2 の中でもアミノ酸配列の保存性が高い糖鎖付加領域に着目し、当領域のペプチド及び糖鎖部分構造を含む糖ペプチド抗原をデザインすることで、目的を満たす特異性の高い抗体の開発を目指す。

3. 研究の方法

まず、鍵となる糖ペプチドを選定した。HCV の E2 糖タンパクの中で N 型糖鎖付加部位を含み、糖鎖付加が感染に重要であることがわかっている糖ペプチドの中で 3 部位を選抜した。その中で一番配列保存性が高いと思われる候補 1 の糖ペプチドをターゲットとし、これを酵素 化学複合法により合成した。合成の際、ペプチド両末端に長鎖炭化水素を導入し、これをキャリアとした免疫誘導をおこなう独自手法により合成した糖ペプチドの抗体を作製した。この方法により、株間の保存性の高い糖鎖と近隣アミノ酸を認識した抗体が取得できると考えられる。

その後、得られた抗体が HCV 粒子の E2 糖タンパクを認識・結合するかの検証、C 型肝炎患者の血中 E2 タンパク質の検出能力の検証、さらに中和抗体検出能の評価と展開し、さらに本抗体を利用した株間によらない C 型肝炎ウイルスを直接検出するデバイス開発への基礎研究を展開するなど、さらなる研究展開を計る。

候補 1 : aa412-**QLINTNGSWHIN**
(下線部 : 糖鎖付加部位)
< ターゲット糖ペプチド配列 >

4. 研究成果

(1) 抗原の合成

抗原の作製は、a) 単糖ペプチドの合成、b) 糖鎖の伸長、c) 抗原キャリアの導入の 3 ステップで完成する。当初は、酵素による糖鎖伸長にコスト的及び収量的な制限が生じると予想したことから、a)c)b) の順で糖鎖ペプチド抗原の合成を検討した。

まず、糖鎖ペプチド合成の重要なシントンである糖アミノ酸の合成をおこなった。当初は、汎用の N-グリカン単糖アミノ酸 (GlcNAc-beta-Asp) を基質として酵素法によりハイマンノース型 5 糖を構築する計画を立て、研究を進めた。清水らによって単糖ペプチド体を合成し、免疫に必要なキャリアを導入、これを基質として Endo-M 酵素によって 5 糖ペプチド抗原へ変換を試みたが、合成した抗原キャリアを導入した単糖ペプチド基質は水に溶けず、物性の問題で糖鎖伸長酵

素反応が全く進行しなかった。そこで、脂溶性の基質に対する酵素反応で清水らが報告した、有機溶媒混在系やシクロデキストリン混在系、マイクロ波利用など様々な条件下での酵素反応の検討を進めた。その結果、様々な知見を得ることに成功したが、目的とする糖鎖ペプチド抗原の合成には至らなかった。

次に、抗原作製の順番を b)a)c) とする研究を進めた。すなわち、まず糖アミノ酸に糖鎖伸長反応を施し、これを合成シントンとして糖鎖ペプチドを合成、引き続き抗原キャリアを導入するというものである。この糖鎖ペプチド抗原の合成ルートの変更に伴い、大量スケールでの糖鎖導入が必要となったため、松尾らによって化学合成法にて 5 糖 N-グリカンを合成した。引き続き、マイクロ波利用ペプチド合成機を利用して糖鎖ペプチドを固相上で合成し、さらに抗原キャリアの導入を行った。その後、固相担体から切り出して、目的とする糖鎖ペプチド抗原を現在約 40mg 得ることに成功した。ただし、得られた糖鎖ペプチド抗原の精製を試みたが、同一分子内に脂溶性部と水溶性部が共存しているため大変困難であり、通常の HPLC 精製では大幅な収量ロスが生じた。しかしマイクロ波を利用したアミノ酸伸長を行っているため、合成純度が高い糖鎖ペプチドが得られたため、粗精製物でも免疫に十分な純度が得られていると考えられた。

(2) 免疫

調製が進んだ糖ペプチド抗原 1 種を用いて、奥田らにより抗体価の評価に必要な ELISA の確立について検討した。作製した糖ペプチド抗原は独特な性質から一般的な条件では固相化が困難であったが、固相化量の調整等により抗体価の評価が可能な水準の ELISA を確立した。次に免疫複合体の作製について検討を実施したところ、一般的な条件ではアジュバントと十分に混合できなかったため、成分比率を調整して最適な条件を決定した。そして得られた免疫複合体をマウスに免疫したところ、抗原に反応する抗体の誘導を確認したが、血清抗体価の上昇までの時間や誘導されるサブクラスの種類に独特なパターンが見られた。そこで血清調製時期やマウスの系統差による免疫誘導能について再度検討し、当該糖ペプチド抗原による良好な免疫条件を確立した。しかしながら、この方法では目標とする株間を超えて反応する抗体の誘導は判定できなかったため、当初計画の 3 種のアミノ酸多型からなる糖ペプチドを用いた評価法に加え、E2 タンパク質が conformational epitope として抗体に認識されることから E2 のリコンビナントタンパク質を用いた評価法の確立が必要となった。

一方、清水・鈴木らは別途、糖ペプチド体を抗原とする免疫法の開発研究をスタートさせたが、本事業中で結果を得るところまでには至っていない。

(3) 抗体の評価と利用研究

現時点では、実際に E2 糖タンパクを認識するモノクローナル抗体を化合物としては得ていない。そのため、鈴木らによって抗体が HCV 粒子の E2 糖タンパクを認識・結合するかの検証、C 型肝炎患者の血中 E2 タンパク質の検出能力の検証、さらに中和抗体検出能の評価などにつながる基盤研究を進めた。また、松岡らによって株間によらない C 型肝炎ウイルスを直接検出する診断法開発の基盤研究として、糖鎖多価センサーの合成実験や、それらの機能性の検証研究を進めた。以下にその成果のいくつかを紹介する。

レポーター含 C 型肝炎ウイルス粒子 (HCV) の作製

抗ウイルス抗体等の抗原との反応性やウイルス感染阻害作用を評価するため、種々の HCV 遺伝子型由来株の粒子が必要となる。遺伝子型 2a は JFH-1 株のゲノミック cDNA から感染性粒子を作製することが可能であるが、それ以外の HCV 株では感染性粒子作製技術は確立していない。そこで、内部に JFH-1 株を基盤とするレポーター含サブゲノム RNA を有し、種々の遺伝子型株の構造タンパク質で粒子を構成するレポーター-HCV 粒子の構築を行った。すなわち、ルシフェラーゼ遺伝子と HCV JFH-1 NS3~NS5B 遺伝子の間に IRES 配列を配したレポーターサブゲノムコンストラクト及び種々の HCV 株由来の Core~NS2 発現ベクターをヒト肝がん細胞 HuH-7 へコトランスフェクションすることによりレポーターサブゲノムを内包した粒子を産生させ、培養上清から回収する手法を確立した。構造タンパク質遺伝子として遺伝子型 1a の H77c 株はかならずしも本技術に適さなかったが、1b 型の THpa 株、2a 型の J6 株では効率のいい粒子形成が可能であることを示すことができた。

抗体による HCV レポーター粒子の感染阻害
作製したレポーター粒子が HCV 本来の感染・細胞侵入様式を示すかを調べるため、HCV 感染に必要な宿主因子に対する抗体を用いて細胞侵入阻害実験を行った。感染受容体として最も重要な CD81 に対する抗体、また受容体ではないものの HCV 感染における重要性が知られる Apolipoprotein E に対する抗体を感染前処理することによりレポーター粒子の細胞侵入は顕著に阻害されることを確認した。比較のために行った HCV シュードタイプ粒子 (レンチウイルスベクターを利用して作製。エンベロープとして HCV E1/E2 を有する) の場合、抗 CD81 抗体では感染阻害が見られるが抗 Apolipoprotein E 抗体では阻害されなかった。作製したレポーター粒子は、HCV 研究にこれまで汎用されてきたシュードタイプ粒子に比べ、より本来の HCV 粒子の感染・細胞侵入様式を反映していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Kumari, A.; Koyama, T.; Hatano, K.;

Matsuoka, K. "Synthetic assembly of novel avidin-biotin-GlcNAc (ABG) complex as an attractive bio-probe and its interaction with wheat germ agglutinin (WGA)", Bioorg. Chem., 査読有, Vol. 68, 2016, pp 219-225.

Suzuki, R.; Saito, K.; Matsuda, M.; Sato, M.; Kanegae, Y.; Shi, G.; Watashi, K.; Aizaki, H.; Chiba, J.; Saito, I.; Wakita, T.; Suzuki, T. "Single-domain intrabodies against hepatitis C virus core inhibit viral propagation and core-induced NF- κ B activation", J. Gen. Virol., 査読有, Vol. 97, 2015, pp 887-892.

Nagashima, I.; Sugiyama, J.; Sakuta, T.; Sasaki, M.; Shimizu, H. "Efficiency of 2.45 and 5.80 GHz microwave irradiation for a hydrolysis reaction by thermostable α -Glucosidase HT1", Biosci. Biotech. Biochem., 査読有, Vol. 78, 2014, pp 758-760.

〔学会発表〕(計 10 件)

清水弘樹、化学反応におけるマイクロ波特性とマイクロ波効果の活用、化学工学会第 47 回秋季大会、2015 年 9 月 9 日、北海道大学工学部 (北海道札幌市) (招待講演)

石井希美、岩本将吾、熊田純一、松崎裕二、松尾一郎、分岐型 4 糖オキサゾリン誘導体を用いた endo-M の基質特異性解析、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 6 日、大阪国際センター (大阪府大阪市)

〔図書〕(計 3 件)

長島生、清水弘樹、(株)産業技術サービスセンター、最新マイクロ波エネルギーと応用技術 第 5 章 5-3 生体高分子合成 (糖鎖、ペプチド、糖ペプチド) 2014、7 (543-549)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 弘樹 (SHIMIZU, Hiroki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 30344716

(2) 研究分担者

鈴木 哲郎 (SUZUKI, Tetsuro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00250184

松尾 一郎 (MATSUO, Ichiro)
群馬大学・理工学府・教授
研究者番号：40342852

松岡 浩司 (MATSUOKA, Kouji)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：40272281

奥田 徹哉 (OKUDA, Tetsuya)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：20443179

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし