

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07075

研究課題名(和文) 機能性モノクローナル抗体を用いた抗ウイルス戦略に向けた創薬基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for antiviral strategies using functional monoclonal antibodies

研究代表者

深澤 征義 (Fukasawa, Masayoshi)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：20291130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスの感染に必須である13回膜貫通タンパク質NPC1分子の立体構造認識モノクローナル抗体の取得を目指した研究である。免疫はDNA免疫法を用い、ハイブリドーマのスクリーニングは、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により樹立したNPC1 KO細胞株と親株とのdifferential screeningにより行うことで、多数の抗NPC1モノクローナル抗体の樹立に成功した。樹立した機能性抗NPC1モノクローナル抗体の性状解析を行い、複数の抗体において、エボラシュードウイルスの感染を阻止できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数膜貫通型タンパク質のインタクトの構造を認識する抗体の取得は難しいとされている。本研究において我々は、免疫法とスクリーニング法を工夫することで、13回膜貫通タンパク質NPC1分子の立体構造認識モノクローナル抗体を多数取得することに成功した。本手法は、機能性抗体の樹立法として非常に有用と考えられた。また、これら抗体のいくつかのクローンはエボラシュードウイルスの感染を有意に阻止できたことから、抗エボラウイルス薬の候補として有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The multi-membrane-spanning Niemann-Pick type C1 (NPC1) protein in host human cells is involved in Ebola virus infection. Using DNA immunization method and unique cell differential screening, we successfully generated many mouse anti-NPC1 monoclonal antibodies, recognizing intact NPC1 protein in cells. These monoclonal antibodies were characterized, and we found that some anti-NPC1 monoclonal antibodies can inhibit Ebola pseudo-type virus infection. These antibodies may be promising probes as novel anti-Ebola virus agents.

研究分野：ウイルス学

キーワード：モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分子の機能を制御・解析する上で、タンパク質の立体構造を特異的に認識するプローブ(抗体等)は非常に有用であり、創薬等への応用範囲も広い。しかし、複数膜貫通タンパク質の立体構造(特に細胞外ドメイン)を認識する抗体の取得は、一般的に非常に難しい。我々はDNA免疫法と独自のスクリーニング法を駆使することで、4回膜貫通型のタイトジャンクションタンパク質(CLDNファミリー、OCLN)に対する効率的なモノクローナル抗体の樹立を多数成功させてきた。実際に感染症分野では、樹立したCLDN1抗体、OCLN抗体が個体レベルでC型肝炎ウイルス(HCV)の感染を阻止できる機能性抗体であることを示し、創薬プローブとなることを証明した(J.Virol. 2015、2018)。本研究申請では、この方法をさらに広範に適用・展開させることを考えた。

2. 研究の目的

治療法が強く求められている感染症として致死率が極めて高いエボラウイルス感染症がある。エボラウイルス・マールブルグウイルス感染に必須の宿主受容体NPC1分子(13回膜貫通タンパク質)の立体構造認識抗体の取得、および効率的な当該抗体樹立法の確立を目指したい。特に、ウイルス感染を強力に阻止できる機能性抗体(創薬プローブ)の樹立に取り組みたい。

我々はこれまでに、DNA免疫法と抗原ノックアウト細胞を用いた独自のスクリーニング法を用いることで、4回膜貫通タンパク質に対する多数の機能性モノクローナル抗体の効率的な取得に成功してきた。自己免疫疾患マウスの使用等を含めた、これまでの独自のノウハウを活かし、さらなる条件検討(免疫法、スクリーニング法)を重ねることで、より広範なタンパク質に対して適用できる機能性抗体樹立法の確立を視野に入れている。今回対象とするNPC1分子の場合は、より高分子量(~140kDa)かつ多数(13回)の膜貫通ドメインを持つこと、細胞膜表面よりも後期エンドソーム(リソソーム)での局在が多い分子でもあり、このような分子に対しても可能な方法論であることが示されれば、適用範囲がさらに広がり、学術的にも大きな進歩になると考えている。

また、抗原遺伝子ノックアウト細胞は、ゲノム編集技術の進歩により、比較的簡便に樹立することが可能になったことから、当該抗体作製方法は広く普及可能な方法になりうると考えている。

3. 研究の方法

1) ゲノム編集技術を用いたNPC1ノックアウト細胞の樹立(抗体スクリーニング系の準備)

抗体スクリーニングでは、1) インタクトNPC1を発現する親細胞、および、2) 親細胞由来のNPC1分子のみを特異的にノックアウトした細胞株を用いる。そこで、ヒト由来株化細胞より、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、NPC1ノックアウト細胞を複数樹立する。細胞接着能やNPC1発現量の高いヒト子宮頸がん由来HeLa細胞、EV侵入活性の高いヒト肝がん細胞由来HepG2細胞からノックアウト細胞を作成する。樹立したNPC1ノックアウト細胞については、NPC1遺伝子欠損部位の同定を行い、NPC1遺伝子を戻した細胞(レトロウイルスベクターによる)も樹立する。

2) 細胞ELISAを用いた抗体スクリーニング系の確立(モノクローナル抗体樹立への準備)

インタクトNPC1の立体構造を認識できる抗体を得るためには、その目的に合致した抗体スクリーニング系を確立することが極めて重要である。インタクトNPC1を発現する親細胞(A)および、上記で作成した親細胞由来のNPC1ノックアウト細胞(B)を用いて、(A)には結合するが、(B)には結合しない抗体クローンを検出できるCell ELISA系を確立する。細胞固定条件、細胞洗浄条件、細胞透過処理条件等を様々検討し、インタクトNPC1に対する特異的な結合シグナルを検出できる系を確立する。市販のNPC1抗体(細胞質側C末端認識)や免疫後のタイターチェック用の血清を用いて条件検討を行う。また、必要に応じてNPC1過剰発現細胞なども利用する。

3) インタクトのNPC1構造を認識する機能性モノクローナル抗体の作製

これまでの経験を踏まえ、DNA免疫法、およびNPC1ノックアウト細胞を用いた独自のスクリーニング法により、これまで非常に難しいとされたインタクトNPC1分子(13回膜貫通タンパク質)を認識する機能性モノクローナル抗体の効率的な分離を試みる。具体的には、BALB/cマウスあるいはBXSb自己免疫疾患マウスにNPC1発現ベクターをDNA免疫し、NPC1発現細胞(正常細胞)および同種細胞由来NPC1ノックアウト細胞を用いたCell ELISAを行い、免疫タイター(IgGクラス)が上がるかを確認する。NPC1に対する特異的な結合が見られた場合には、常法によりミエロマ細胞とプラズマ細胞を融合させハイブリドーマを作製し、上述のスクリーニングに供する。2回のクローニング後に、抗体産生ハイブリドーマ株として樹立・保存する。

4) インタクトのNPC1立体構造を認識する機能性モノクローナル抗体の性状解析

抗体のスクリーニングを継続して進めつつ、樹立したハイブリドーマの産生する各モノクローナル抗体について、その性状解析を進める。まずサブクラスを同定する。次に、正常細胞、NPC1 ノックアウト細胞、NPC1 戻し細胞を用いた、1)FACS 解析(各種条件;非固定、各種固定法、各種透過処理法等)、2)細胞免疫染色(各種条件)、3)イムノプロット解析、などを試み、抗体の性状・適用を検討する。各抗体について、生物種間 NPC1 認識能の検討、エピトープ解析も進める。以上の結果から、多数樹立された抗体の分類を行う。代表的な抗体の CDR 配列の決定も行う。さらに、機能性抗体として働くかを検討するため、細胞の各モノクローナル抗体処理により NPC 病様の表現系(リソソームへのコレステロール蓄積等)が再現されるか、についても検討する。

5) エボラウイルス感染に対する抗 NPC1 モノクローナル抗体の阻害効果の検討

上記検討と並行して、エボラシュードウイルス感染に対して、各モノクローナル抗体が阻害能を示すかも培養細胞レベルで検討する。エボラシュードウイルス感染実験系(ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた検出系)については既に導入済みであり、系の最適化を進めた上で行う。

4. 研究成果

1) ゲノム編集技術を用いた NPC1 ノックアウト細胞の樹立

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、HeLa 細胞および HepG2 細胞より、NPC1 ノックアウト(KO)細胞を複数樹立することに成功した。それぞれの細胞の NPC1 遺伝子欠損部位の同定も行った。各 KO 細胞に NPC1 遺伝子を戻した細胞も樹立した。

2) 細胞 ELISA を用いた抗体スクリーニング系の確立

市販の NPC1 抗体(細胞質側 C 末端認識)や免疫後のタイターチェック用の血清を用いて条件検討を行い、インタクト NPC1 を発現する親細胞(A)および、親細胞由来の NPC1 ノックアウト細胞(B)を用いた Cell ELISA 系を確立した。同時に NPC1 過剰発現細胞を用いた ELISA 系も作成した。タイターチェック用の血清を用い、(A)には結合するが、(B)には結合しない条件(インタクト NPC1 に対する特異的な結合シグナルを検出できる条件)が設定できていることを確認した。

3) インタクト NPC1 構造を認識できる機能性モノクローナル抗体の作製

DNA 免疫法により、BALB/c マウスおよび BXSb 自己免疫疾患マウス双方から、上記スクリーニング系により、親細胞のみに結合する抗体を産生するハイブリドーマ株が多数樹立できた。これらの抗体は、細胞上のインタクトな NPC1 構造を認識しているものと考えられた。

4) インタクトの NPC1 立体構造を認識する機能性モノクローナル抗体の性状解析

樹立した各モノクローナル抗体のサブクラスをラテラルフローアッセイにより決定した。正常細胞、NPC1 ノックアウト細胞、NPC1 戻し細胞を用いて、各モノクローナル抗体の、1)FACS 解析、2)細胞免疫染色、3)イムノプロット解析、を行い、その性状を解析した。各抗体について、各動物種由来リコンビナント NPC1 オルソログタンパク質・部分欠損タンパク質・変異導入タンパク質・キメラタンパク質などを用いてエピトープ解析を進め認識に重要な NPC1 の領域を検討した。N 末端領域、第一ループ領域など様々な領域を認識するモノクローナル抗体が含まれることが明らかとなった。各産生ハイブリドーマより抗体遺伝子を増幅し、H 鎖、L 鎖抗体可変領域の核酸配列を取得し、アミノ酸配列を決定した。さらに、細胞の各モノクローナル抗体処理により NPC 病様の表現系(リソソームへのコレステロール蓄積等)が再現されるか、についても検討し、多くの抗体が活性を有していることが示され、機能性抗体として働くことが確認された。

5) エボラウイルス感染に対する抗 NPC1 モノクローナル抗体の阻害効果

エボラシュードウイルス感染に対して、各モノクローナル抗体が阻害能を示すかについて培養細胞レベルで検討した。その結果、いくつかのクローンで、エボラシュードウイルス感染を用量依存的に阻害することがわかった。以上の結果を総合的に比較検討すると、各モノクローナル抗体のアミノ酸配列とその認識部位、エボラウイルス感染阻害活性の間に明らかな相関がみられることもわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Yoshimi, Shinoda Takehiro, Shirasago Yoshitaka, Kondoh Masuo, Shinya Naoko, Hanada Kentaro, Yagi Kiyohito, Suzuki Tetsuro, Wakita Takaji, Kimura Someya Tomomi, Shirouzu Mikako, Fukasawa Masayoshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Occludin binding single chain variable fragment and antigen binding fragment antibodies prevent hepatitis C virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 220 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirasago Yoshitaka, Inamori Yoko, Suzuki Takeru, Tanida Isei, Suzuki Tetsuro, Sugiyama Kazuo, Wakita Takaji, Hanada Kentaro, Fukasawa Masayoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Inhibition Mechanisms of Hepatitis C Virus Infection by Caffeic Acid and Tannic Acid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 770 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yoshimi, Yoneda Kohei, Shirasago Yoshitaka, Suzuki Takeru, Tada Minoru, Ishii-Watabe Akiko, Sugiyama Kazuo, Suzuki Tetsuro, Wakita Takaji, Yagi Kiyohito, Kondoh Masuo, Fukasawa Masayoshi	4. 巻 514
2. 論文標題 Human-rat chimeric anti-occludin monoclonal antibodies inhibit hepatitis C virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 785 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yoshimi, Shirasago Yoshitaka, Suzuki Takeru, Hata Tomoyuki, Kondoh Masuo, Hanada Kentaro, Yagi Kiyohito, Fukasawa Masayoshi	4. 巻 166
2. 論文標題 Characterization of monoclonal antibodies recognizing each extracellular loop domain of occludin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 297 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤征義
2. 発表標題 ウイルスの侵入過程を標的とした抗ウイルス戦略
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木建、酒井祥太、白砂圭崇、鈴木咲帆、小林哲幸、花田賢太郎、深澤征義
2. 発表標題 各種ヒト臓器由来NPC1ノックアウト細胞株の樹立と主要脂質の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------