

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：宿主細胞間接着分子を標的としたC型肝炎の新規予防・治療法の開発
2. 研究開発代表者：富川 直樹（福島県立医科大学医学部基礎病理学講座 講師）
3. 研究開発の成果

昨年度に作製したヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体について、発現する CHO-K1 細胞株の大量培養を行った。次に、マトリゲル3次元培養法にてHCV感染阻害実験を行った結果、ヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体を含む培養上清では、有意なHCV感染阻害が認められた。そこで、得られた培養上清から、protein Aを用いたIgG精製法により、ヒト化抗体の精製を行った。約1Lの培養上清から、最終的に約100 mgの抗体を得ることが出来たが、HCV感染阻害効果を、マトリゲル3次元培養法にて検討した結果、精製ヒト化抗体では、顕著な阻害効果は認められなかった。

次に、マウス抗ヒトオクルディン単クローン抗体とヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体のエピトープを解析するため、抗原ペプチドのアミノ酸配 (ALCNQFYTPAATGLYVD) をもとに、末端側から7残基を削ったN末端 (ALCNQFYTPA)、C末端 (TPAATGLYVD) ペプチドと両端側から3～4残基を削った中心 (QFYTPAATGL) ペプチドを作製し、ELISA法により検討を行った。その結果、両方の抗体は共に、N末端ペプチドのみに有意に結合することが分かった。この結果から、ヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体のエピトープは、ALCNの部位であることが示唆される。

また、HCV感染阻害効果を示すマウス抗オクルディン単クローン抗体並びに、ヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体の細胞への傷害性を、Huh7.5.1細胞株を用いて、XTT法により検討した。結果として、両方の抗体は、有意な細胞傷害性を示さないことを明らかにした。

タンパクレベルにおいて、マウス抗オクルディン単クローン抗体がHCV感染を阻害することを明らかにするために、抗NS5A抗体を用いて免疫染色法により解析した。結果、抗体投与群ではHCVタンパクの発現は認められず、本抗体がHCV感染を阻害することがタンパクレベルで証明された。更に、本抗体がオクルディン以外のタイト結合分子に影響を与えるかについて、免疫染色法により検討した。その結果、本抗体によりオクルディンはエンドサイトーシスされ細胞間から消失するが、他のタイト結合分子であるClon1やZO-1は細胞間に局在し、変化は認められなかった。以上により、本抗体は他タイト結合分子の局在性に影響しないことが分かった。

様々な genotype の HCV に対する本抗体の HCV 感染阻害効果を検討するため、福島県立医科大学の倫理委員会の承認を得て、インフォームドコンセントにより本研究への参加同意が得られた C 型肝炎患者の内、高力価の HCV 感染血清を選び、マトリゲル3次元培養法にて行った。しかしながら、Huh7.5.1細胞への感染率が非常に低く、本抗体の阻害効果の検証は行えなかった。