

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 肝炎等克服実用化研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業

(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) 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
(英語) Development of new prevention and therapy for the infection of hepatitis C virus by targeting host cell-cell adhesion molecule.

研究開発担当者 (日本語) 医学部 講師 富川直樹

所属 役職 氏名：(英語) School of Medicine, Lecture, Naoki Tomikawa

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) C型肝炎患者血清におけるヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体のHCV
感染阻害効果の検討

開発課題名：(英語) The investigation of inhibitory effect on HCV infection by humanized anti-occludin antibody in the serum from patients with hepatitis C.

研究開発分担者 (日本語) 医学部 助教 岡井研

所属 役職 氏名：(英語) School of Medicine, Assistant Professor, Ken Okai

分担研究 (日本語) C型肝炎患者血清におけるヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体のHCV
感染阻害効果の検討

開発課題名：(英語) The investigation of inhibitory effect on HCV infection by humanized anti-occludin antibody in the serum from patients with hepatitis C.

研究開発分担者 (日本語) 医学部 教授 大平弘正

所属 役職 氏名：(英語) School of Medicine, Professor, Hiromasa Ohhira

分担研究 (日本語) 肝炎ウイルスモデルマウスにおけるヒト化抗ヒトオクルディン単クローン
抗体の副作用の検討

開発課題名：（英語） Investigation of side effect of humanized anti-occludin antibody in hepatitis C model mice.

研究開発分担者 （日本語） 医学部 教授 千葉英樹

所属 役職 氏名：（英語） School of Medicine, Professor, Hideki Chiba

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

研究開発代表者は、代表者らが開発した HCV 感染阻害効果を有するマウス抗ヒトオクルディン抗体のサブクラスを同定後、相同性決定領域(Complementary determining regions; CDRs)を解析し、ヒト抗体の変換領域に移植 (CDR-grafting)したプラスミドを作製した。CHO-K1 細胞にプラスミドを遺伝子導入し、ヒト化抗ヒトオクルディン抗体を産生する培養細胞株を得た。培養上清から抗体を精製するにあたり、本抗体は精製過程において失活することが判明したため、活性を保持させた精製方法を開発した。次に、研究分担者である岡井研（本学 助教）と大平弘正（本学 教授）と共に、マトリゲルと Huh7.5.1 細胞を用いた生体に近い培養環境である 3次元培養法において、HCVpp(genotype 2a と genotype 1b)、HCVpv (genotype 1b)、HCVcc(genotype 2a)に対する感染阻害効果を検討した結果、本抗体はいずれにおいても顕著な感染阻害効果を示した。また、同条件において、本抗体の有意な細胞傷害性は認められなかった。

次に、代表者は本抗体の HCV 感染阻害メカニズムの解明を検討した。Huh7.5.1 細胞株のマトリゲル 3次元培養法において、マウス及びヒト化オクルディン単クローン抗体は、オクルディンを細胞膜から細胞質内に移行することを明らかにした。また、この際他のタイト結合分子である ZO-1 は細胞間に局在し、変化は認められなかった。これらの結果から、本抗体の HCV 感染阻害メカニズムは、細胞膜上に存在するオクルディンのエンドサイトーシスの促進であること、また、他タイト結合分子の局在性に影響しないことが示唆された。

更に、代表者はマウス抗オクルディン単クローン抗体、及び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、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、マウス抗体、及び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 の部位であることを明らかにした。

最後に、千葉英樹（本学 教授）と共に、本抗体の生体における作用と副作用の有無について検討した。マウス腹腔内にマウス抗ヒトオクルディン単クローン抗体を投与し、3時間後、6時間後、24時間後の肝組織におけるオクルディン局在性を解析した。その結果、6時間後において、抗体投与群では毛細胆管側細胞膜に局在するオクルディンが顕著に減少することが分かった。この現象は投与3時間後、24時間後では認められなかった。また、マウス腹腔内にマウス抗体、及びヒト化抗ヒトオクルディン単クローン抗体を投与し、1ヶ月に渡り観察を行ったが、症状は呈さず、諸臓器においても異常は見られなかった。これらの結果から、本抗体は生体においてもオクルディンに作用するが、重篤な副作用はないことが示唆された。

英文

Principal investigator identified the subclass of our developing mouse anti-human occludin antibody which inhibits HCV infection and analysed the complementary determining regions (CDRs). The expression plasmid fused of the CDRs was generated and the variable region in human IgG. CHO-K1 cells were transfected with the plasmid, and the established cell line producing humanized anti-human occludin antibody was obtained. Because this antibody lose the ability to inhibit HCV infection during the purification step, the newly purification method of antibody retained the activity was developed. Next, principal investigator revealed that this antibody prevent HCVpp (genotype 2a and genotype 1b), HCVpv (genotype 1b), and HCVcc (genotype 2a) infection using matrigel-embedded 3D culture system of a well-differentiated human hepatic carcinoma-derived cell line, Huh7.5.1 together with member of this project (Dr. Ken Okai and Dr. Hiromasa Ohira). In addition, the toxicity of the antibody was not observed in the same condition.

Secondly, principal investigator evaluated the mechanism of inhibition HCV infection by this antibody. The localization of occludin changed from tight junctions to the inside of the cytoplasm after treatment with this antibody. In contrast, localization of ZO-1, other tight junction membrane protein, was not changed by administration of this antibody. These findings suggest that this antibody selectively induces endocytosis of occluding and inhibits HCV infection.

Moreover, epitope of mouse or humanized anti-human occludin antibody were studied. The analysis of epitope was performed by ELISA method using Ocln 1 (ALCNQFYTPA), Ocln 2 (TPAATGLYVD), and Ocln 3 (QFYTPAATGL) peptide which are based on the antigenic peptide (ALCNQFYTPAATGLYVD). Both antibodies significantly bound to Ocln 1 peptide, but did not interact with Ocln 2 and Ocln 3 peptide, which suggests that the epitope of these antibodies involve ALCN site.

Finally, principal investigator examined whether this antibody effect on in vivo together with member of this project (Dr. Hideki Chiba). We performed intraperitoneal injection of mouse anti-human occludin antibody into 8-weeks C57BL6 mice. At 3h, 6h and 24h after treatment with this antibody, we observed localization change of occludin in the liver tissue by immunofluorescence staining. Occludin normally localizes at the bile canaliculus side of cell membrane, but at 6h after treatment with this antibody, the localization of occludin was markedly decreased. On the other hand, at 3h or 24h after treatment with this antibody, the localization of occludin was not changed. Moreover, aberrant phenotype was not observed at one month after intraperitoneal injection of mouse or humanized anti-human occludin antibody into mice. These results indicate that this antibodies operate in in vivo and are free from severe side effect.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

該当無し。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体はHCV感染を防ぐ, ポスター, 吉田祐樹, 富川直樹, 千葉英樹, 第105回日本病理学会, 2016/5/14, 国内.
2. HCV感染を阻害する新規マウスモノクローナル抗体の開発, ポスター, 藤田大貴, 富川直樹, 千葉英樹, 第105回日本病理学会, 2016/5/14, 国内.
3. HCV感染を防ぐ抗オクルディン抗体の開発, 口頭, 岡井研, 富川直樹, 大平弘正, 千葉英樹, 第68回日本細胞生物学会, 2016/6/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し。

(4) 特許出願

希望しない。