The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Occludin抗体の創製とウイルス性疾患治療薬への応用に向けた基盤研究
Author(s)	清水, 芳実
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56172
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　清　水　芳　実　）	
論文題名	Occludin抗体の創製とウイルス性疾患治療薬への応用に向けた基盤研究

論文内容の要旨

C型肝炎ウイルス（以下、HCV）は、全世界で約2億人、本邦に関しても100-200万人が感染していると推定されている。HCVは、10種類以上のGenotypeが存在し、本邦におけるC型肝炎患者のおよそ7割はGenotype 1b型、残り2割がGenotype 2a型である。HCVに感染（血液・体液を介する感染経路）すると3割は生体の免疫系により体内から排除されるが、残りの約7割は持続感染者となる。持続感染患者の20-30%は20-30年後に肝臓の線維化を経て肝硬変となる。そして肝硬変患者は年率7%の割合で肝細胞ガンへと移行する。肝細胞ガン患者での約7割がHCV感染陽性であることから、HCVの感染防御及び生体内からのHCVの排除は非常に重要である。

C型肝炎の治療法としては、ペグインターフェロン（以下、Peg-IFN）とリバビリン（以下、RBV）の併用療法が広く用いられてきた。しかしながら、本療法はHCVのGenotype 1b型に対して著効率が低いこと、また間質性肺炎や溶血性貧血などの重篤な副作用を起こすことが知られている。近年、HCVのウイルス蛋白質に直接作用する薬剤（DAA：direct acting antiviral agent）が開発された。DAAの標的としては、プロテアーゼ活性を有するNS3/4A、ウイルス複製と粒子形成に関与するNS5A、RNAポリメラーゼ活性を有しウイルスの複製に関わるNS5Bがあげられる。本邦におけるGenotype 1b型に対するインターフェロンフリー療法については、NS5AとNS3/4AまたはNS5Bの組み合わせのDAA剤が経口薬として承認されている。DAAは非常に高い臨床効果をあげている。しかしながら、ウイルスを標的にした治療法であるために耐性ウイルスの出現が懸念されており、実際、DAA治療患者についてDAA耐性変異を有するウイルスが検出されている。

我々の研究室では、ウイルスに対して高い遺伝子障壁を有する宿主因子に着目した創薬研究を行っている。HCVの侵入に関与する宿主因子として、SR-BI、CD81、Claudin-1（CLDN1）、Occludin（OCLN）が知られている。SR-BI、CD81、CLDN１については、特異的に結合する分子（抗体や低分子化合物を含む）が知られており、単独でHCVの感染を阻害することが報告されている。しかしながら、これらの因子に関しては、HCV感染阻害活性の低さ、結合分子に対する回避株の問題や副作用の問題から医薬品の開発は立ち遅れている。一方、HCV感染阻害活性を有するOCLNに対する結合分子に関する報告は存在しない。

OCLNは、1993年にTsukita Sh等により細胞間接着機構Tight junction（以下、TJ）の接着分子として報告された。OCLNは、四回膜貫通型蛋白質であり、分子量は約58kDaである。OCLNの発現の低い血管内皮細胞やSertori細胞でもTJの形成が認められること、OCLNをノックアウトマウスでもTJの形成が確認されているから、OCLN以外にもTJを構成する因子があることが示唆された。OCLNノックアウトマウスは重篤なフェノタイプを示さずに正常に発育することから、OCLNは生命活動の維持に必須な因子でないことが考えられる。1998年Tsukita Sh等により、遂にTJの接着分子としてCLDNが同定された。CLDNもOCLNと同様に四回膜貫通型タンパク質であり、分子量は約23kDaと小さな蛋白質である。CLDNノックアウトマウスでは、TJの形成が認められないことから、TJ接着分子の本体として現在は考えられている。先に述べたように、OCLNはCLDNといった代替の蛋白質が存在する為かノックアウトマウスでも重篤な副作用は現れない。私はこの点に着目し、OCLN特異的な結合分子は、副作用の少ないHCV感染における宿主側侵入因子を標的とした新たな創薬標的となると考えた。本研究では、HCVの宿主側の侵入因子と知られるTJ接着分子OCLNについて、新たなHCVの標的分子としての有用性を検証するために、OCLNの細胞外領域を認識する新規抗体の樹立、OCLN抗体によるHCV感染阻害活性の評価を試みた。

その結果、免疫方法とスクリーニング方法を工夫することでOCLN抗体を4クローン樹立することに成功した。いずれの抗体も異なるVH、VL配列を有していた。抗体のエピトープとしては、第一細胞外領域を認識する抗体が3クローン、第二細胞外領域を認識する抗体が1クローンであった。また第一細胞外領域を認識する3クローンに関してはそれぞれ別々のエピトープを有していることが分かった。次に結合力についてCell ELISAで評価したところ、ヒトOCLNに対し

て高い親和性（Kd<1nM）を有していることが分かった。抗体の種間交差性に関する評価を行ったところ、第一細胞外領域を認識するクローンはヒトとカニクイザルに、第二細胞外領域を認識するクローンはヒトとカニクイザル以外にも動物実験モデルで汎用されるマウス及びラットにも交差することを確認した。また、OCLN抗体は、バリア機構や細胞毒性を有していなかった。更に、樹立抗体は解析ツールとしても広く応用できることを確認した。*In vitro* HCV感染モデルを用いた評価では、いずれも抗体濃度依存的にHCV感染が阻害され、特に第二細胞外領域を認識するクローンが最も強い感染阻害活性を示した。また抗体はGenotype 1a、1b、2a型のHCVppに対して感染阻害活性を示した。樹立抗体は様々なGenotypeのHCVの感染阻止に非常に有用であることを確認した。また、DAAの耐性ウイルス株として、NS5A阻害剤耐性変異を有するウイルス株においても強い感染阻害活性を示した。更に持続感染状態の維持に必須な感染経路として知られるCell-to- cell感染についてもOCLN抗体が阻害できることが示唆された。以上の結果より、OCLN結合分子によるHCV感染阻害のPOCを確立した。また樹立したOCLN抗体はOCLNを標的としたHCV感染阻害薬開発に有用なツールとなることが示唆された。現在までにHCVの侵入を阻害する薬剤は承認されておらず、多くはウイルスの複製あるいは複製過程を阻害する薬剤である。既存のこれらの治療法と組み合わせることにより薬剤耐性ウイルスの出現を抑えることができると考えられる。また肝移植後のHCV再感染の防御にも有用であることが示唆された。

また、未だ不明な点の多い上皮バリアの形成機構やOCLNを標的として侵入するウイルス（たとえばコクサッキーウイルスやノロウイルス）の解析にも有用であることが期待される。本研究の結果が、ウイルスの生活環の理解や上皮バリア形成機構の解明における有用なツールとなり、新たな治療薬開発の一助となることを願う。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　清水　芳実　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	八木　清仁
	副 査　教授	辻川　和丈
	副 査　教授	水口　裕之

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（以下、HCV）は、全世界で約2億人、わが国でも100-200万人が感染していると推定されている。近年、HCVのウイルス蛋白質に直接作用する薬剤（DAA : direct acting antiviral agent）が開発され、非常に高い奏効率を示している。しかしウイルスを標的としているために耐性ウイルスの出現は必至であること、DAAを用いた治療は高額となり保健行政を圧迫することとなり他の治療法の開発が課題となっている。そこで学位申請者の清水は耐性変異の可能性が低い宿主側因子を標的とした抗HCV薬の創製を目的としてタイトジャンクション構成分子occludin(OCLN)抗体の作製に着手した。

OCLNはHCVの宿主側の侵入因子として知られている四回膜貫通型蛋白質であるが細胞外領域を認識する抗体は得られていなかった。本研究ではOCLN特異的抗体の樹立に当たり免疫方法とスクリーニング方法を工夫することで、未だ報告のないインタクトなOCLNの細胞外領域を認識する抗体の樹立を試みた。免疫方法としては、免疫原を調製する必要がなく動物体内でインタクトな状態の抗原を免疫することができるDNA免疫法を選択した。

まずスクリーニングに用いることを目的として、HCV感受性の細胞株からゲノム編集技術CRISPR/Cas9を利用しOCLNノックアウト細胞樹立を試みた。得られた細胞はHCVの感染感受性は消失し、かつOCLN遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入すると感染感受性が復帰することを確認した。
Wistar ラットに、ヒトOCLN遺伝子をコードしたプラスミドをラットに皮下投与して免疫し、抗体価が上昇した個体の脾臓より形質細胞を単離、マウスミエローマ由来細胞株を用いてハイブリドーマを作製した。OCLNノックアウト細胞を用いてスクリーニングを行い、OCLNのインタクトな細胞外領域を認識する抗体を4クローン樹立することに成功した。OCLN抗体はOCLNに高い特異性を有しており、それぞれ別々のエピトープを認識することを確認した。本抗体はヒトOCLNに対して高い親和性を有しHCVに対して感染阻害活性を有することを明らかとした。

OCLNの細胞外領域を認識する抗体の作製は世界初の成果であり、HCV感染の宿主側因子を標的とする抗HCV薬として様々な応用が期待できる。またOCLNを受容体として感染するロタウイルスやコクサッキーB群ウイルスを含めウイルスの生活環を解析するうえで有用なツールとなりうる。以上の成果から本研究が博士論文として大変価値のあるものと判断した。