



HCV感染を防ぐ新規阻害抗体の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-10-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡井, 研 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000143

HCV 感染を防ぐ新規阻害抗体の開発

分子細胞病理学分野

岡井 研

要旨

【背景と目的】

Hepatitis C virus (HCV) 感染は高率に慢性化して肝硬変や肝癌に至る難治性疾患であり、本邦における感染者数は約 200 万人と推定されている。最近 direct-acting antivirals (DAAs) が新規 HCV 治療薬として導入されているが、DAA 抵抗性 HCV 変異体の出現が報告されている。また、既存の HCV 治療薬は全て HCV 持続感染後の増殖抑制を目的としたものであり、HCV の感染予防法は未だ確立されていない。一方 HCV は、各遺伝子型共通の侵入過程を経て宿主である肝細胞に感染すると考えられていることから、HCV 侵入に関わる宿主因子は有望な予防・治療標的である。そこで今回私は、HCV の感染成立に必須であるタイト結合分子オクルディンに着目し、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。本研究では、本抗体が HCV 感染を防ぐ予防薬として有用かを *in vitro* で検討するとともに、その感染阻害メカニズムの解明を目指した。

【方法】

オクルディンのヒト特異的 HCV 感染感受性を担う第 2 細胞外ドメインのうち、アミノ酸配列 214-230 部位を抗原とし、マウス抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。抗体の抗原ペプチドへの結合性は、ELISA 法でスクリーニングした。抗オクルディン抗体による HCV 感染阻害効果は、高分化型ヒト肝癌由来細胞株 Huh7.5.1 の単層培養系、ダブルチャンバー培養系、マトリゲル 3 次元培養系を用いて評価した。また HCV 感染には、HCV エンベロープタンパク質を被った HCVpv と、実験室 HCV 株である HCVcc を用いた。本抗体の細胞傷害の有無については XTT 細胞増殖アッセイ法にて検討した。さらに本抗体の構造や作用機序を明らかにするために、アイソタイプ及びエピトープ解析を行い、蛍光免疫染色にて抗オクルディン抗体投与による内在性オクルディンの局在変化を観察した。

【結果と考察】

抗オクルディン抗体のサブクローン 15 種類はいずれも明らかな抗原結合能を有していたが、単層培養系では HCV 感染阻害効果を示さなかった。しかし、生体における肝細胞環境や HCV 感染ルートをより再現したダブルチャンバー培養系やマトリゲル 3 次元培養系では、新規抗オクルディン抗体が HCV 感染を有意に阻害した。また本抗体は、細胞毒性を示さなかった。抗体のアイソタイプは IgG1/λ であり、エピトープは 2 つのヒト特異的アミノ酸 (A214, L215) を含む 214-217 部位 (ALCN) であることが示唆された。さらに新規抗体は HCV の存在の有無に関わらず、オクルディンの局在をタイト結合領域から細胞質内に変化させた。このことから、本抗体はオクルディンのエンドサイトーシスを誘導して HCV や他の宿主因子との会合を回避させ、HCV 感染成立を防ぐと考えられた。

【結論】

本研究では、*in vitro* で HCV 感染阻害効果を有する抗ヒトオクルディン抗体を開発した。本抗体は、想定される作用機序からウイルスの遺伝的背景に無関係に作用すると考えられる。本抗体は将来、母子感染や針刺し事故、肝移植に際して HCV 感染予防薬として用いられることが強く期待される。

学位論文審査結果

申請者 岡井 研
学位論文題名 HCV感染を防ぐ新規阻害抗体の開発

C型肝炎ウイルスのレセプターとしてSR-B1, CD81, Claudin-1, Occludinが同定されており、この4つの分子いずれもがウイルスの吸着や侵入に必要な分子であると考えられている。この中でOccludinについての役割は未だ明らかにはされていないことから、申請者らはこの分子をターゲットに、抗体によってウイルス感染が防げるか否かの検討を行った。4回膜貫通型の分子Occludinの細胞外ドメインの1つ、アミノ酸214-230のポリペプチドを合成し、キャリアタンパクと結合させた後、マウスに免疫してモノクローナル抗体を作成した。この抗体は単層培養した肝細胞へのHCV感染を防御しなかったが、ダブルチャンネルで培養した肝細胞や3次元培養した肝細胞ではHCV感染を有意に阻害した。また、抗体を処理した細胞ではOccludinがエンドサイトーシスによって取り込まれ、細胞表面から消失した。この結果から、この抗体は細胞表面のOccludinを消失させることによってHCVの感染を阻止するものと考察された。

本研究はHCVが細胞表面に吸着してからエンドサイトーシスによって細胞内に侵入する過程を明らかにした研究で、得られた抗体はHCVの感染防御抗体として臨床応用の可能性がある。また、質問に対する回答から、申請者が本研究の意義を深く理解し、将来に繋がる展望を明確に持っていることが窺えた。以上のように、本研究は博士論文にふさわしい、オリジナリティーの高い、優れた論文である。

学位論文審査委員

主査

錫谷 達夫

副査

関根 英治

副査

金 光 敬二