

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4675017号
(P4675017)

(45) 発行日 平成23年4月20日(2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年2月4日(2011.2.4)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 7/02	(2006.01) C 12 N 7/02
C 12 P 19/34	(2006.01) C 12 P 19/34 A
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 A
C 12 Q 1/68	(2006.01) C 12 Q 1/68 A
C 12 Q 1/70	(2006.01) C 12 Q 1/70

請求項の数 12 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-538480 (P2001-538480)
(86) (22) 出願日	平成12年11月20日 (2000.11.20)
(65) 公表番号	特表2003-514523 (P2003-514523A)
(43) 公表日	平成15年4月22日 (2003.4.22)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2000/001801
(87) 國際公開番号	W02001/036601
(87) 國際公開日	平成13年5月25日 (2001.5.25)
審査請求日	平成19年10月1日 (2007.10.1)
(31) 優先権主張番号	9927320.3
(32) 優先日	平成11年11月18日 (1999.11.18)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	592243793 カイロン ソチエタ ア レスponsa リミタータ イタリア国 イ-53100 シエナ, ピ ア フィオレンティーナ 1
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	アブリニューニ, セルジョ イタリア国 イ-53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイ ロン エセ, ピー, ア-

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エキソソーム分離によって精製HCV RNAを調製するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製 HCV RNA を調製するための方法であって、
HCV に感染した細胞培養物の上清からエキソソーム粒子を分離する工程、および
該エキソソーム粒子から RNA を抽出する工程
を包含する、方法。

【請求項 2】

前記エキソソーム粒子が、C型肝炎ウイルスに感染した個体の血漿から分離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記エキソソーム粒子が、分画遠心分離によって前記細胞培養上清から調製される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞培養上清を、抗体でコートしたビーズと共にインキュベートする工程をさらに包含し、該抗体が、抗 CD81 抗体または抗 CD82 抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記エキソソーム粒子が、前記細胞培養上清を、抗体でコートしたビーズと共にインキュベートすることによって、前記細胞培養上清から調製され、該抗体が、抗 CD81 抗体または抗 CD82 抗体である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記ビーズが、磁気ビーズである、請求項 4 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ビーズが、ポリスチレンビーズである、請求項 4 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 H C V R N A が、ウイルス抽出キットを使用して、前記エキソソーム粒子から抽出される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記エキソソーム粒子が、C D 8 1 タンパク質に富む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 10】

前記細胞培養物が、ヒト細胞培養物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

個体 から得たサンプル中の H C V を検出するための方法であって、
該個体由来の細胞の調製物の細胞上清からエキソソーム粒子を調製する工程、および
該エキソソーム粒子を H C V R N A および H C V タンパク質の存在について試験する工程
を包含する、方法。

【請求項 12】

前記細胞の調製物が、血漿調製物である、請求項 1 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、C 型肝炎ウイルスを単離するための方法に関する。この方法は、C 型肝炎ウイルス (H C V) に感染した個体の血漿からエキソソーム (e x o s o m e) と呼ばれる粒子を分離する工程、およびこれらのエキソソーム粒子から R N A を抽出する工程を包含する。

【0002】

本明細書中に引用される全ての刊行物、マニュアル、特許および特許出願は、参考として完全に援用される。 30

【0003】

H C V (非 A ・ 非 B 型肝炎 - N A N B V として以前に公知である) は、約 3 0 0 0 アミノ酸のポリタンパク質をコードする単一のオーブンリーディングフレームを有する、約 1 0 0 0 0 ヌクレオチドの陽性センス R N A ウイルスである。このウイルスの構造は、組換え D N A 技術によって解明されているが (欧州特許出願 E P - A - 0 3 1 8 2 1 6 および欧州特許出願 E P - A - 0 3 8 8 2 3 2) 、このウイルス自体は、単離されておらず、そしてこのポリタンパク質のタンパク質分解によって生じた種々のウイルスタンパク質の機能のみが、同様のゲノム構造の他の同様のウイルスとの類似性によって推測されている (C h o o ら、 P N A S U S A (1 9 9 1) 8 8 : 2 4 5 1 - 2 4 5 5) 。

【0004】

これらのウイルスタンパク質は、種々の細胞および細胞型 (酵母、細菌、昆虫、植物および哺乳動物細胞) において発現される、組換え形態で全て入手可能である (C h i e n , D . Y . ら、 P N A S U S A (1 9 9 2) 8 9 : 1 0 0 1 1 - 1 0 0 1 5 および S p a e t c , R . R . ら V i r o l o g y (1 9 9 2) 1 8 8 : 8 1 9 - 8 3 0) 。

【0005】

E 1 および E 2 と名付けられた (それぞれ、H C V - 1 単離物に対して番号付けた、H C V ポリタンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 8 3 および 3 8 4 ~ 7 5 0 に対応する) 2 つのタンパク質が、標的細胞へのウイルスの結合を担う、ウイルスエンベロープの外側のタンパク質であることが示唆されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

H C V 研究は、ウイルスの制限された宿主範囲によって、かなり相当に妨げられる。H C V 感染についてのただ 1 つの信頼性のある動物モデルは、チンパンジーである。H C V 生活環の研究は、有効な細胞培養系を欠いていることによって制限されてきた。さらに、血漿および肝臓のような生物学的材料からH C V を精製するための試みは、失敗されてきた。

【 0 0 0 7 】

本出願人らの同時係属国際特許出願 P C T / I B 9 5 / 0 0 6 9 2 (W O 9 6 / 0 5 5 1 3)において、本出願人らは、H C V レセプターを保持する細胞を同定するためにフローサイトメトリーを使用する方法を記載する。本出願人らは、組換え E 2 エンベロープタンパク質で細胞を標識することによって、フローサイトメトリーを使用して、E 2 に特異的に結合し得、そして従って、H C V レセプターを潜在的に保持し得る細胞を単離することによって、細胞を選別することが可能であることを示した。

10

【 0 0 0 8 】

本出願人らの同時係属国際特許出願 P C T / I B 9 6 / 0 0 9 4 3 (W O 9 7 / 0 9 3 4 9)において、本出願人らは、H C V の E 2 エンベロープタンパク質に結合し得るタンパク質を同定した。

【 0 0 0 9 】

本出願人らの同時係属国際特許出願 P C T / I B 9 8 / 0 1 6 2 8 (W O 9 9 / 1 8 1 9 8)において、本出願人らは、H C V に対するレセプターをコードする D N A のクローニングを報告した。この D N A は、公知の細胞タンパク質 C D 8 1 をコードする遺伝子に対応する。

20

【 0 0 1 0 】

しかし、H C V に対するこのレセプターの同定にもかかわらず、H C V の R N A ゲノムの簡単な調製を可能にする方法について、高い必要性が存続する。これは、このウイルスの生物学への研究の進行を非常に促進し、そして C 型肝炎感染に関連する疾患の処置および予防において効果的な治療薬および診断薬の設計を加速する。

【 0 0 1 1 】**(発明の要旨)**

本発明に従って、H C V に感染した細胞培養物の上清からエキソソーム粒子を分離する工程およびこのエキソソーム粒子から R N A を抽出する工程を包含する、H C V の調製のための方法を提供する。好ましくは、このエキソソーム粒子は、H C V に感染した個体の血漿から分離される。

30

【 0 0 1 2 】

H C V に感染した個体において、このウイルスは、血漿中のエキソソーム粒子に結合し、そしてこれらの粒子において富化されることが発見された。従って、これらの粒子の精製は、複雑な精製手順も高価な精製手順も必要とすることなく、H C V R N A の有意な量を簡単に調製することを可能にする。

【 0 0 1 3 】

エキソソームは、M I I C (M H C クラス I I 富化区画) と呼ばれるエンドサイトーシスの (e n d o c y t i c) 区画の、形質膜との融合から生じる細胞内オルガネラである。これらの区画は、抗原提示細胞 (A P C) に存在し、そして細胞内 M H C クラス I I 分子の大部分の局在性についての部位を形成することが示された (N e e f j e s ら、 1 9 9 0)。M I I C は、内部膜小胞およびシートを有するエンドサイトーシス小胞であり、そして M H C クラス I I 分子がペプチドを結合する細胞内部位を示すと考えられる (H a r d i n g ら、 1 9 9 3)。M I I C は、おそらくその制限されている膜の内側小胞形成から生じる内部小胞 (エキソソーム) を含む。M I I C が形質膜と融合し、M H C クラス I I 分子をこの構造へ挿入する場合、エキソソームは、細胞外空間へと放出される。

40

【 0 0 1 4 】

エキソソーム粒子は、現在、種々の A P C (例えば、樹状細胞、扁桃 B 細胞、単球および

50

マクロファージ)に由来する細胞培養培地中に見出されている (Raposoら、1996)。これらのエキソソームは、Geuzeおよび共同研究者らにより特徴付けられ (Escola、1998)、そしていくつかの表面分子 (特定の4回貫通膜タンパク質 (tetraspanin membrane protein) を含む) において選択的に富化されることが見出された。

【0015】

用語「細胞培養物の上清」により、HCVに感染した細胞が増殖された上清または任意の液体が意味される。適切な液体としては、血液のような体液、および細胞がインビトロで培養された増殖培地が挙げられる。

【0016】

1つの実施形態において、エキソソームは、HCVに感染した粒子に由来する細胞株の細胞培養上清から調製され得る。このような細胞株は、HCVに感染した患者から単離され、そしてインビトロで増殖された個々の細胞から増殖され得る。

【0017】

代替的実施形態において、エキソソームは、HCVに感染した個体の血漿画分から単離され得る。血液から血漿を分離するための技術は、当業者に明らかである。

【0018】

血漿がエキソソームの調製のために採取される個体は、HCVによる感染にかかりやすい任意の動物であり得る。適切な動物としては、靈長類、好ましくは高等靈長類 (例えば、チンパンジーおよびヒト) が挙げられる。もっとも好ましくは、エキソソームは、ヒト患者から調製される。

【0019】

エキソソーム粒子は、当業者に明らかな任意の適切な技術を用いて細胞培養上清から調製され得る。例としては、分画遠心分離 (differential centrifugation) による調製、および以下で議論される免疫化学の技術を用いる調製が挙げられる。好ましくは、エキソソームは、Raposoら (1996) の技術に従って、分画遠心分離により調製される。

【0020】

本発明の実施形態に従って、HCVに感染した個体から得られた血漿を遠心分離して、エキソソームが富化されたペレットを与える工程、およびこのエキソソームからRNAを単離する工程の一連の工程を包含する、HCV RNAの調製のための方法を提供する。

【0021】

好ましくは、この遠心分離は、反復工程において連続的に行われる。これらの工程は、約 $200 \times g$ での最初の遠心分離、次いで、約 $500 \times g$ 、約 $2000 \times g$ 、約 $10000 \times g$ 、そして約 $70000 \times g$ の遠心分離を伴う。

【0022】

各々の遠心分離工程において得られたペレットのサンプルは、エキソソーム含有量の程度を評価し、従って、エキソソーム調製物の純度を測定するために分析され得る。この調製プロセスは、このようにして最適化され得る。エキソソーム含有量を分析するために適切な1つの技術は、SDS-PAGEおよびエキソソーム粒子に特異的なマーカーであるタンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングによるものである。CD81および/またはCD82に対する抗体は、この点において特に適切である。これらの一次抗体のエキソソームへの結合は、例えば、この一次抗体に結合する標識した二次抗体を用いて評価され得る。例えば、抗CD81モノクローナル抗体が一次抗体として用いられ得、その一方で、標識した抗マウスIgGは、二次抗体として用いられ得る。

【0023】

本発明のこの局面の好ましい実施形態において、エキソソームは、以下のように調製され得る。細胞培養物を最初に $200 \times g$ で10分間遠心分離し、そして細胞を回収し、ペレットP1とする。除去した上清を $500 \times g$ で10分間2回遠心分離する；この2つのペレットをプールし、そしてペレットP2とする。上清を、 $2000 \times g$ で2回、15分間

10

20

30

40

50

連続的に遠心分離し(プールしたペレットをペレットP3とする)、10000×gで30分間1回遠心分離し(回収したペレットをP4とする)、70000×gで60分間遠心分離する(ペレットP5を得る)。次いで、各ペレットのサンプルを、SDS-PAGEおよび抗CD81モノクローナル抗体、続いてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを用いたウエスタンプロットにより分析する。

【0024】

上記のように、免疫化学の技術は、分画遠心分離の技術の代わりとして用いられ得る。これらの技術はまた、分画遠心分離とともに、エキソソームのより純粋な調製物を与えるために用いられ得る。

【0025】

例えば、細胞培養上清は、エキソソーム粒子の表面上のマーカーパク質を認識する抗体でコーティングしたビーズとともにインキュベートされ得る。例えば、抗CD81および/または抗CD82抗体は、この点で用いられ得る。当業者に明らかなように、磁性ビーズ(例えば、Dynabeads, Dynal, Oslo, Norwayにより製造される磁性ビーズ)またはポリスチレンビーズ(例えば、Pierceにより作製されるポリスチレンビーズ)は、本発明のこの実施形態において特に適切である。エキソソームの精製のための他の代替方法としては、スクロース密度勾配の使用またはオルガネラ電気泳動が挙げられる(Tulipら、1994)。

【0026】

エンベロープ関連HCV RNAからなる「真正の(Bona fide)」HCV粒子は、エキソソームと会合し得るか、またはエキソソーム中に含まれる。RNAは、当業者に明らかなように、任意の適切な技術によりエキソソームから調製され得る。RNA抽出のための適切な方法は、当該分野で周知である(例えば、Sambrookら(1989) Molecular Cloning: a laboratory manual; Cold Spring Harbor Pressを参照のこと)。Qiagenにより販売されるウイルス抽出キットのような市販のRNA抽出キット(このウイルス抽出キットは、細胞非含有体液からウイルス核酸の精製を可能にするシリカゲルベースのスピンドラムを用いる)は、便宜上用いられ得る。

【0027】

本発明のなおさらなる局面に従って、精製したHCV粒子の調製物を提供する。好ましくは、このHCV粒子は、上記の方法のいずれか1つに従って調製される。HCV粒子の調製に伴う技術的困難性に起因して、精製したHCV粒子の組成物は、未だに生成されていない。従って、本発明の方法は、精製したHCV粒子の調製を初めて可能にする。従って、本発明の方法は、HCV粒子およびタンパク質の生化学的および生物物理学的特徴付けを初めて可能にする。

【0028】

本発明に従って調製した精製HCV粒子は、当業者に明らかなように、多くの適用において用いられ得る。このような適用としては、HCVに感染した個体の診断、予防および処置、ならびに治療において有用な薬剤の開発および設計、この疾患およびその進行の予防および診断が挙げられる。

【0029】

本発明のさらなる局面に従って、HCVに感染していると個体を診断する方法が提供され、この方法は、この個体から細胞の調製物を得る工程、その細胞上清からエキソソーム粒子を調製する工程、およびHCV RNAおよびタンパク質の存在についてこのエキソソーム粒子を試験する工程を包含する。好ましくは、その個体から得られた細胞の調製物は、血漿調製物である。

【0030】

本発明の種々の局面および実施形態が、分画遠心分離および免疫分離の技術を使用するエキソソームの分離に特に關して、ここで例示のためにより詳細に記載される。詳細の改変が、本発明の範囲から逸脱することなくなされ得ることが、理解される。

10

20

30

40

50

【0031】

(実施例1：エキソソームの調製)

最初に、エキソソームを、いくつかの細胞株（肝細胞癌細胞株（HepG2およびHuH7）およびEBV形質転換B細胞株を含む）から単離した。まず、細胞培養物を200×gで10分間遠心分離した。そして回収した細胞はペレットP1を示す。除去した上清を500×gで10分間2回遠心分離し；この2つのペレットをプールした。これはペレットP2を示す。上清を2回2000×gで15分間（プールしたペレットをP3と呼ぶ）、1回10000×gで30分間（回収したペレットはペレットP4を示す）、そして1回70000×gで60分間（ペレットP5を生じる）、連続して遠心分離した。

【0032】

10

次いで、各ペレットのサンプルをSDS-PAGEにおいて、そして抗CD81モノクローナル抗体を使用し、続いてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを使用するウエスタンプロットにおいて、分析した。ペレットP5が、エキソソームが富化された画分であることが見出された（図1を参照のこと）。本発明者らは、いくつかの細胞株（肝細胞癌細胞株（HepG2およびHuH7）およびEBV形質転換B細胞株を含む）からエキソソームを単離した。

【0033】

続いて、正常なヒト血漿を、エキソソームの存在について評価した。Ficoll勾配上の血液分離後に回収した希釈血漿を、上記の分画遠心分離プロトコルに従って処理し、そしてエキソソームを、抗CD81モノクローナル抗体（mAb）または抗CD82モノクローナル抗体を使用しそしてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを使用するウエスタンプロットによって可視化した。健常個体の血漿中にエキソソームが存在することが、見出された（図2を参照のこと）。

20

【0034】

本発明者らはまた、以前に抗CD81または抗CD82でコートした磁気ビーズとの一晩インキュベーションによって、70000×gでの遠心分離工程の前に上清からエキソソームを単離することにも成功した。抗CD81コートビーズにより捕捉したエキソソーム（図3を参照のこと）または抗CD82コートビーズにより捕捉したエキソソーム（図4を参照のこと）を、Lammli緩衝液を用いて2回抽出し、そしてSDS-PAGEおよびウエスタンプロッティングによって検出した。

30

【0035】

(実施例2：HCV RNAの調製)

上記に示される結果を考慮して、ここで、エキソソームを、HCV RNAが富化されたHCV感染患者の血漿から単離し得る。この実験アプローチは以下の通りである。

【0036】

Ficoll分離後に収集したHCV感染ヒト血液からの血漿を、上記の分画遠心分離プロトコルに従って処理する。10000×gでの遠心分離工程から回収したエキソソーム富化上清を、抗CD81コート磁気ビーズとともに一晩インキュベートする。あるいは、2つの清澄（clearing）工程の後、HCV感染血漿を、抗CD81コート磁気ビーズとの一晩インキュベーションの前に、20000×gで遠心分離し得る。次いで、磁気ビーズを、50mM Tris-HCl（pH 8.0）、1mM EDTA、および100mM NaCl（TEN）緩衝液中の1% BSAにおいて磁気分離によって3回洗浄し、そしてウイルスRNAを、Viral Extraction Kit（Qiagene）を用いて抽出する。HCV RNAについての定量的RT-PCRを、以前（Pilleriら、1998）に記載されたように実施する。

40

【0037】

HCV感染血漿からエキソソームを捕捉するための別の方法（以前（Pilleriら、1998）に記載されたようなポリスチレンビーズ（1/4インチ直径）の使用を含む）を試験し得る。

【0038】

50

ヒト血漿中のエキソソームは、HCV RNAおよび/または構造タンパク質に富む。

【0039】

(実施例3: HCV感染患者の血液からのエキソソームの単離)

ここで、本発明者らは、正常なヒト血漿について上記で使用したプロトコル採用する、反復遠心分離工程あるいはヒトCD81またはCD82分子に対するモノクローナル抗体での免疫選択のいずれかによる、HCV感染患者の血液からのエキソソームの首尾よい単離を確認する。次いで、エキソソームを、Laemmli緩衝液に抽出し、そしてCD81(エキソソーム中に富むマーカー)を、SDS-PAGEおよびウエスタンプロットティングによって可視化した(図5を参照のこと)。この作業は、HCV患者の血液からのエキソソーム調製物中のCD81タンパク質の存在を確認する。

10

【0040】

さらに、感染患者から調製したエキソソームにおいて、HCV RNAは、定量的RT-PCRを使用して検出された(以下の表を参照のこと)。

【0041】

Ficoll分離後に回収したHCV感染ヒト血液由来の血漿を、上記の分画遠心分離プロトコルに従って処理した。10000×gでのこの遠心分離工程から収集したエキソソーム富化上清を、抗CD81または抗CD82でコートした磁気ビーズ(20μgの精製モノクローナル抗体/2.5×10⁷の磁気ビーズ(Dynal))と共に一晩インキュベートした。次いで、磁気ビーズを、磁気分離によってリン酸緩衝液中1%BSAで3回洗浄し、そしてウイルスRNAを、Trizol試薬(Life Technology)を用いて抽出した。

20

【0042】

HCV RNAについての定量的RT-PCRを、以前に記載のように行った(Pille里ら、1998)。

【0043】

表: 感染患者由来のエキソソームからのHCVのRT-PCR

【0044】

【表1】

患者コード	P4ビーズ 抗CD81	P4ビーズ のみ	P5
TORT	1.25e4	5e3	3.2e5
BREG	6e2	1e2	6e4

30

(参考文献)

Escola J. - M. ら(1998) J. Biol. Chem. 273: 20121 - 20127.

Harding C. V. および Geuze H. J. (1993) J. Immunol. 151: 3988 - 3998.

40

Neefjes J. J. ら(1990) Cell 61: 171 - 183. Pille里 P. ら(1998) Science 282: 938 - 941.

Raposo G. ら(1996) J. Exp. Med. 183: 1161 - 1172. Tulp A. ら(1994) Nature 369: 120 - 126.

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、分画遠心分離工程によるHepG2細胞培養培地からのエキソソーム精製を示す、ウエスタンプロットを示す。

【図2】 図2は、分画遠心分離工程によるヒト血漿からのエキソソーム精製を示す、ウエスタンプロットを示す。

【図3】 図3は、抗CD81コート磁気ビーズによるエキソソーム捕捉および選別を示す。

50

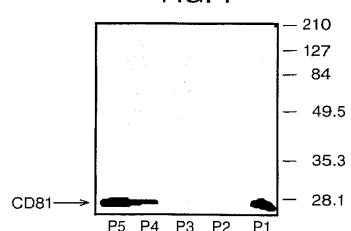
す、ウエスタンプロットを示す。

【図4】 図4は、抗CD82コート磁気ビーズによるエキソソーム捕捉および選別を示す、ウエスタンプロットを示す。

【図5】 図5は、HCV感染患者からのエキソソーム捕捉を示す、ウエスタンプロットを示す。

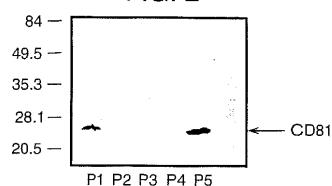
【図1】

FIG. 1



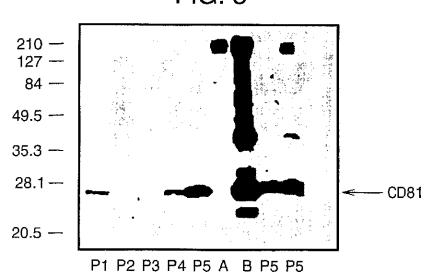
【図2】

FIG. 2



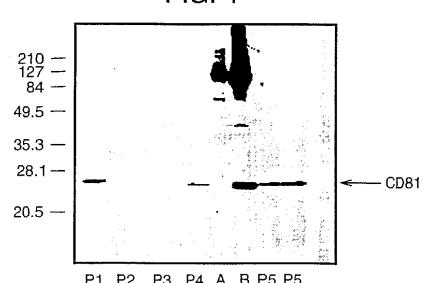
【図3】

FIG. 3



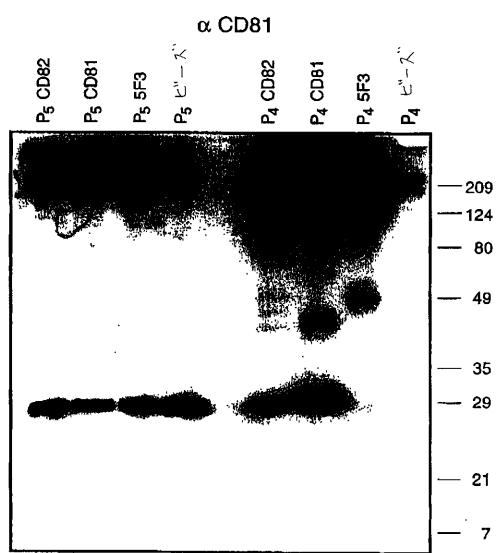
【図4】

FIG. 4



【図5】

FIG. 5



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/93 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 R 1:93

(72)発明者 ピレリ, ピエロ
イタリア国 イー-53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロン エセ.
ピー.ア-

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第99/018198 (WO, A1)
特開平07-145194 (JP, A)
国際公開第99/024054 (WO, A1)
Science, 1998年, Vol.282, P.938-941
J. Biol. Chem., 1998年, Vol.273, No.32, P.20121-20127

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/02
C12N 15/09
C12P 19/34
C12Q 1/68
C12Q 1/70
C12R 1/93
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
WPI