

別紙 2

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業
臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成 14 (2002) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	
臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究	1
松浦 善治	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の作製と性状解析に関する研究	5
森石 恆司	
2. HCV-1a 型エンベロープ蛋白質の細胞表面発現系の構築	8
鈴木 哲朗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究

主任研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)の組換えエンベロップ蛋白を用いた細胞融合アッセイ系とシュードタイプウイルスを構築し、HCVの感染初期過程をリポーター遺伝子の活性化を指標にして解析してきた。これらのアッセイ系を用いて、1)慢性C型肝炎から自然治癒した症例のリンパ球から、あるいは、ゼノマウスを免疫して得られたヒト型抗HCVエンベロップ中和抗体の大量培養と安全性評価を開始し、*in vivo*での活性評価の目処が付いた。2)HCVの細胞融合活性を中和できる、ヒト肝癌細胞膜画分に対するモノクローナル抗体を4クローン得た。この抗体を用いてHCVの感染に重要な細胞表面因子の検索を開始した。また、HCV Type1a型由来のエンベロップ蛋白を表面に持つシュードタイプウイルスを作製するため、Type1a型E1、E2遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、293T細胞での一過性発現系により32-35kDaのE1蛋白、及び62-64kDaのE2蛋白の産生を確認した。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
鈴木哲朗 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

我が国には二百万人以上ものHCVのキャリアーが存在すると推定され、HCV感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。しかしながら、HCVを増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでにファージディスプレイ法、ならびに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを免疫して、HCVのエンベロップ蛋白による細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得しており、HCVに持続感染しているチンパンジーを用いて、*in vivo*での活性評価を進める。また、HCVの感染機構解析の手始めとして、HCVの細胞膜受容体の解析を進めることを目的とする。また、HCV Type1b型は日本国内では多くみられるものの、より患者数の多いアメリカではType1a型の割合が多い事が知られている。E1蛋白およびE2蛋白は1a型と1b型の間でアミノ酸レベルで約80%の相同性を持っているが、糖鎖修飾様式に違いがあることなどが知られており、ウイルス粒

子が形成される時に、細胞への親和性、感染性などにどのような違いが生じるのかについては、未だ明らかにされていない。そこでType1b型の発現系に加え、1a型由来のE1およびE2蛋白を被ったシュードタイプウイルスの作製するため、Type1a型由来のHCV E1、E2蛋白の細胞表面発現系の構築を目的とした。

B. 研究方法

1) ヒト型抗体のチンパンジーでの評価へ向けた準備

慢性C型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取して得られた抗HCVエンベロップヒト型抗体、ならびに、ヒト抗体を作る事が可能なトランスジェニックマウス（ゼノマウス）を組換えエンベロップ蛋白で免疫して得られた抗HCVエンベロップヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始した。

2) HCVのエンベロップ蛋白を粒子表面に被ったシュードタイプウイルス及びレポーター遺伝子の活性を指標とする高感度な細胞融合検出系を構築した。これまでの成績から、HepG2細胞にHCVのエンベロップ蛋白による細胞融合ならびにエンベロップ蛋白を持ったシュードタイプウイルスの感染を担うヒトCD81分子以外の蛋白因子の存在が示唆される。そこで、HepG2細胞の膜画分を抗原

としてマウスを免疫し、細胞融合を中和できるヒト型モノクローナル抗体を作製し、これをプローブとしてHCVの細胞膜受容体の解析を進める。

3) Type 1a型のHCV遺伝子として、感染性クローンであるH77c株を用いた。H77c株のE1、E2遺伝子を鋳型としてPCRを行ない、各C末端の膜貫通領域を除いた親水性領域(E1: aa191-340, E2: aa383-711)のみを増幅させた。これらの断片の5'-末端にVSV-G蛋白のシグナル配列を、3'-末端にG蛋白の膜貫通領域と細胞質内領域の遺伝子をそれぞれ結合させた。それらをpCAGベクターのプロモーターの下流に挿入し、発現プラスミド(pCAGv340v/H77c、pCAGv711v/H77c)を構築した。得られたプラスミドをヒト腎由来293T細胞へトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。その一部をスライドグラスに固定して蛍光抗体染色を行ない、また残りのサンプルについてウエスタンブロット法を行なった。

(倫理面への配慮)

一人の慢性C型肝炎から自然治癒された方に、本研究の趣旨を説明し、本人から既にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) 慢性C型肝炎から自然治癒した症例から得られた抗HCVエンベロープヒト型抗体、ならびに、ゼノマウスを免疫して得られた抗HCVエンベロープヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始し、今年の夏には精製抗体をチンパンジーを用いた*in vivo*での活性評価の目処が付いた。

2) HepG2細胞の膜画分を免疫し、HCVの細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を4クローン得た。この抗体を用いて細胞表面因子の精製を進めている。

3) HCV Type 1a型E2蛋白に対する抗体の作製

現在、当研究室で保有している抗E2抗体及び市販されているものは、いずれも1a型のE2蛋白を認識しない。そこで、エピトープ予測を行いE2蛋白の合成ペプチドを抗原としてウサギ抗血清を作製した。エピトープとしてH77c株E2蛋白のアミノ酸配列から#5157TA: TTDRSGAPTYSWGA (aa518-531)および#5158RE: RGERCDLEDRDRSE (aa648-661)を選択した。#5157TAは親水性

でCharge Densityも高く、合成ペプチドが溶解しやすいことが予想された。また強固な二次構造をとる可能性は低く、セリン残基が存在するためFlexibleなペプチドであると考えられた。#5158REも非常に親水性が高く、Charge Densityがあり、Flexibility、Surface probabilityを有しTurn構造も存在することが予測された。#5157TAにはC末端にシステイン残基を付加し、これを介してMBS法によりKLHとconjugationした。#5158REは配列中のシステイン残基を利用して、同様にKLHとconjugationした。両ペプチドとも2羽のウサギに対して各3回免疫を行ない、合成ペプチドに対する反応性をELISA法によって確認した。

4) HCV Type 1a型E1、E2蛋白の発現

発現プラスミドpCAGv340v/H77c、pCAGv711v/H77cを293T細胞にトランスフェクションし、蛍光抗体染色及びウエスタンブロット法によりE1及びE2蛋白を検出した。蛍光抗体染色では、pCAGv340v/H77cをトランスフェクションした細胞では、抗E1抗体(Austral社)および抗VSV G-TM抗体により、pCAGv711v/H77cをトランスフェクションした細胞では、抗5157TA抗ウサギ血清および抗VSV G-TM抗体によりそれぞれ発現蛋白を確認した。抗5158RE抗血清は特異的な反応を示さなかった。ウエスタンブロット法では、pCAGv340v/H77cをトランスフェクションした細胞で、抗E1抗体により32-35kDaのバンドが、pCAGv711v/H77cをトランスフェクションした細胞では、抗5157TA抗血清により62-64kDaのバンドがそれぞれ検出された。抗5158RE抗血清では、特異的なバンドは検出できなかった。

D. 考察

HCV研究の最重要課題は、信頼できる細胞培養系の開発である。これまでに多くのグループからHCVに感受性を示す細胞培養系が報告されているが、いずれも高感度ではあるが信頼性に欠ける遺伝子増幅法でウイルスの複製を検出したものばかりである。我々はこれまでに、HCVの組換えエンベロープ蛋白を用いた細胞融合アッセイ系とシュードタイプウイルスを構築し、HCVの感染初期過程をリポーター遺伝子の活性化を指標にして解析してきた。今後、得られた中和抗体をプローブとして、HCVの感染に重要な宿主因子の解析を進めていきたい。また、HCVの

細胞融合活性を *in vitro* で中和できるヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の活性を *in vivo* でも証明できれば、慢性 C 型肝炎に対する治療薬としての可能性も期待できると思われる。さらに、このような中和抗体と反応できる抗原をデザインすることにより、慢性 C 型肝炎に対する治療用ワクチンの開発も可能になると考えられる。

また、HCV-1a 型由来の E1、E2 蛋白を細胞表面に発現するプラスミドを用いて E1 および E2 蛋白質を VSV G 蛋白との融合蛋白として発現することに成功した。これにより 1a 型の E1、E2 蛋白を被ったシュードタイプウイルスの作製が可能となった。今後これらのシュードタイプウイルスを用いて、HCV の遺伝子型、strain の違いにより細胞への吸着および感染性に違いが認められるかどうかを検討する予定である。またルシフェラーゼ活性を指標とした高感度細胞融合アッセイ法を用いることにより、HCV 遺伝子型が細胞融合活性へ及ぼす影響について解析できるものと期待される。さらに効率よくシュードタイプウイルスの作製を行なうために、恒常的に E1 および E2 キメラ蛋白質を発現する細胞株を樹立する事も有効であると考えられる。

E. 結論

- 1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒した症例から得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体、ならびに、ゼノマウスを免疫して得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始した。
- 2) HCV の細胞融合活性を中和できるモノクローナル抗体を 4 クローン得、この抗体を用いて HCV の感染に重要な細胞因子の検索を開始した。
- 3) HCV Type1a 型由来の E1、E2 蛋白を細胞表面に発現するコンストラクトを作製した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X

receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).

Moriishi K., Koura M., and Matsuura Y. Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology*, 292, 258-271(2002).

Matsuura Y., Tani H., Suzuki K., Someya T., Suzuki R., Hideki A., Ishii K., Moriishi K., Robison C.S., Whitt M.A., and Miyamura T. Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. *Virology*, 286, 263-275 (2001).

Urbani S., Uggeri J., Matsuura Y., Miyamura T., Penna A., Boni C., and Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology*, 33, 1533-1543, (2001).

Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*, 279, 343-353 (2001).

Suzuki R., Tamura K., Li J., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology*, 280, 301-309 (2001).

Okuma K., Matsuura Y., Tatsuo H., Inagaki Y., Nakamura M., Yamamoto N., and Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 82, 821-830 (2001).

2. 学会発表

Suzuki, R., Sakamoto, S., Negishi, H., Li, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T. Degradation Signal in the HCV core protein. 8th International Symposium

on Hepatitis C and Related Viruses,
Paris, September 2001.
Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi,
T., Otsuka, M., Matsuda, M., Seki, N.,
Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T.
The tightly regulated inducible
expression system of HCV proteins:
The core protein modulates fas- and
TNF alpha-mediated apoptosis in
human liver cells. *ibid.*
Aizaki, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Li, Y-
W., Harada, T., Otsuka, M., Seki N.,
Matsuura, Y., Miyamura, T.
Characterization of an human
hepatoma cell line carrying entire open
reading frame of the HCV genome.
ibid.
Shimoike, T., Suzuki, T., Rikimaru, A.,
Matsuura, Y., Totsuka, A., Miyamura, T.
Identification of the key determinants
in HCV 5'UTR for the translational
repression by the viral core protein.

ibid.

Suzuki, T., and Li, J. Regulation of TT
virus gene expression. The 22nd Joint
Meeting of the United States-Japan
Hepatitis Panels, Kobe, 2001.

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称 C型肝炎治療薬

(日)発明者 松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、
渋谷達郎、関 誠、四井能尚

(月)出願日 平成13年2月13日 国際出願番
号 PCT/JP01/00967

(火)共同出願者 三菱東京製薬

(水)発明内容の概略

HCVのエンベロープ蛋白に結合する種々の物質に関し、詳細にはHCVエンベロープ蛋白と結合することによりHCVの感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する、抗体などの蛋白質、硫酸化多糖類、低分子化合物に存する。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

ヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の作製と性状解析に関する研究

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
森石 恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授

研究要旨

HCV の組換えエンベロープ蛋白を用いた細胞融合アッセイ系とシュードタイプウイルスを構築し、HCV の感染初期過程をリポーター遺伝子の活性化を指標にして解析してきた。これらのアッセイ系を用いて、1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒した症例のリンパ球から、あるいは、ゼノマウスを免疫して得られた抗 HCV エンベロープヒト型中和抗体の大量培養と安全性評価を開始し、in vivo での活性評価の目処が付いた。2) HCV の細胞融合活性を中和できる、ヒト肝癌細胞に対するモノクローナル抗体を 4 クローン得た。この抗体を用いて HCV の感染に重要な細胞表面因子の検索を開始した。

A. 研究目的

我が国には二百万人以上もの HCV のキャリアーが存在すると推定され、HCV 感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。しかしながら、HCV を増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでにファージディスプレイ法、ならびに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを免疫して、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得しており、HCV に持続感染しているチンパンジーを用いて、in vivo での活性評価を進める。また、HCV の感染機構解析の手始めとして、HCV の細胞膜受容体の解析を進めることを目的とする。

B. 研究方法

1) ヒト型抗体のチンパンジーでの評価へ向けた準備

慢性 C 型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取して得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体、ならびに、ヒト抗体を作るトランスジェニックマウス（ゼノマウス）を組換えエンベロープ蛋白で免疫して得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始した。

2) HCV のエンベロープ蛋白を粒子表面に被ったシュードタイプウイルス及びレポーター

遺伝子の活性を指標とする高感度な細胞融合検出系を構築した。これまでの成績から、HepG2 細胞に HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合ならびにエンベロープ蛋白を持ったシュードタイプウイルスの感染を担うヒト CD81 分子以外の蛋白因子の存在が示唆される。そこで、HepG2 細胞の膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を作製し、これをプローブとして HCV の細胞膜受容体の解析を進める。

（倫理面への配慮）

一人の慢性 C 型肝炎から自然治癒された方に、本研究の趣旨を説明し、本人から既にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒した症例から得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体、ならびに、ゼノマウスを免疫して得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始し、今年の夏には精製評品が得られる目処が付いた。

2) HepG2 細胞の膜画分を免疫し、HCV の細胞融合を中和できるモノクローナル抗体を 4 クローン得た。この抗体を用いて細胞表面因子の精製を進めている。

D. 考察

HCV 研究の最重要課題は、信頼できる細胞培養系の開発である。これまでに多くのグ

ループから HCV に感受性を示す細胞培養系が報告されているが、いずれも高感度ではあるが信頼性に欠ける遺伝子増幅法でウイルスの複製を検出したものばかりである。我々はこれまでに、HCV の組換えエンベロープ蛋白を用いた細胞融合アッセイ系とシュードタイプウイルスを構築し、HCV の感染初期過程をリポーター遺伝子の活性化を指標にして解析してきた。今後、得られた中和抗体をプローブとして、HCV の感染に重要な宿主因子の解析を進めていきたい。また、HCV の細胞融合活性を *in vitro* で中和できるヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の活性を *in vivo* でも証明できれば、慢性 C 型肝炎に対する治療薬としての可能性も期待できると思われる。さらに、このような中和抗体と反応できる抗原をデザインすることにより、慢性 C 型肝炎に対する治療用ワクチンの開発も可能になると考えられる。

E. 結論

- 1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒した症例から得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体、ならびに、ゼノマウスを免疫して得られた抗 HCV エンベロープヒト型抗体の大量培養と安全性評価を開始した。
- 2) HCV の細胞融合活性を中和できるモノクローナル抗体を 4 クローン得、この抗体を用いて HCV の感染に重要な細胞因子の検索を開始した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).
- Moriishi K., Koura M., and Matsuura Y. Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology*, 292, 258-271(2002).

Matsuura Y., Tani H., Suzuki K., Someya T., Suzuki R., Hideki A., Ishii K., Moriishi K., Robison C.S., Whitt M.A., and Miyamura T. Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. *Virology*, 286, 263-275 (2001).

Urbani S., Uggeri J., Matsuura Y., Miyamura T., Penna A., Boni C., and Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology*, 33, 1533-1543, (2001).

Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*, 279, 343-353 (2001).

Suzuki R., Tamura K., Li J., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology*, 280, 301-309 (2001).

Okuma K., Matsuura Y., Tatsuo H., Inagaki Y., Nakamura M., Yamamoto N., and Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 82, 821-830 (2001).

2. 学会発表

- Suzuki, R., Sakamoto, S., Negishi, H., Li, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T. Degradation Signal in the HCV core protein. 8th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Paris, September 2001.
- Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Otsuka, M., Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. The tightly regulated inducible expression system of HCV proteins:

The core protein modulates fas- and TNF alpha-mediated apoptosis in human liver cells. *ibid.*

Aizaki, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Li, Y-W., Harada, T., Otsuka, M., Seki N., Matsuura, Y., Miyamura, T. Characterization of an human hepatoma cell line carrying entire open reading frame of the HCV genome. *ibid.*

Shimoike, T., Suzuki, T., Rikimaru, A., Matsuura, Y., Totsuka, A., Miyamura, T. Identification of the key determinants in HCV 5'UTR for the translational repression by the viral core protein. *ibid.*

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称 C型肝炎治療薬

(日)発明者 松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、
渋谷達郎、関 誠、四井能尚

(月)出願日 平成 13 年 2 月 13 日 国際出願番号 PCT/JP01/00967

(火)共同出願者 三菱東京製薬

(水)発明内容の概略

HCV のエンベロープ蛋白に結合する種々の物質に関し、詳細には HCV エンベロープ蛋白と結合することにより HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する、抗体などの蛋白質、硫酸化多糖類、低分子化合物に存する。

HCV-1a 型エンベロープ蛋白質の細胞表面発現系の構築

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究協力者 鈴木 亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部 研究員

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）1a型由来のE1およびE2蛋白を粒子表面に持つ水泡性口内炎ウイルス（VSV）シュードタイプウイルスを作製するため、1a型由来のHCV E1、E2蛋白の細胞表面発現系の構築を試みた。1a型E1、E2遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、293T細胞での一過性発現系により32-35kDaのE1蛋白、及び62-64kDaのE2蛋白の産生を確認した。イムノプローブとして、既存の抗E1、抗VSV G抗体の他に、今回新たに調製した抗E2ウサギ抗血清が有用であった。

A. 研究目的

これまでにHCV遺伝子型1bのE1およびE2蛋白を哺乳動物細胞表面に発現させる事により、E1、E2蛋白を粒子表面に持つVSVシュードタイプウイルスの作製に成功し、このシュードタイプウイルスを用いて細胞への結合、感染について解析する事が可能となった。1b型は日本国内では多くみられるものの、より患者数の多いアメリカでは1a型の割合が多い事が知られている。E1蛋白およびE2蛋白は1a型と1b型の間でアミノ酸レベルで約80%の相同性を持っているが、糖鎖修飾様式に違いがあることなどが知られており、ウイルス粒子が形成される時に、細胞への親和性、感染性などにどのような違いが生じるのかについては、未だ明らかにされていない。そこで1b型の発現系に加え、1a型由来のE1およびE2蛋白を被ったVSVシュードタイプウイルスの作製するため、1a型由来のHCV E1、E2蛋白の細胞表面発

現系の構築を試みた。

B. 研究方法

1a型のHCV遺伝子として感染性クローンであるH77c株を用いた。H77c株のE1、E2遺伝子を鋳型としてPCRを行ない、各C末端の膜貫通領域を除いた親水性領域（E1: aa191-340, E2: aa383-711）のみを増幅させた。これらの断片の5'-末端にVSV-G蛋白のシグナル配列を、3'-末端にG蛋白の膜貫通領域と細胞質内領域の遺伝子をそれぞれ結合させた。それらをpCAGベクターのプロモーターの下流に挿入し、発現プラスミド（pCAGv340v/H77c、pCAGv711v/H77c）を構築した（図1）。得られたプラスミドをヒト腎由来293T細胞へトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。その一部をスライドグラスに固定して蛍光抗体染色を行ない、また残りのサンプルについてウエスタンブロット法を行なった。

C. 研究結果

1. HCV-1a 型 E2 蛋白に対する抗体の作製

現在、当研究室で保有している抗 E2 抗体及び市販されているものは、いずれも 1a 型の E2 蛋白を認識しない。そこで、エピトープ予測を行い E2 蛋白の合成ペプチドを抗原としてウサギ抗血清を作製した。エピトープとして H77c 株 E2 蛋白のアミノ酸配列から #5157TA: TTDRSGAPTYSWGA (aa518-531) および #5158RE: RGERCDLEDRDRSE (aa648-661) を選択した。#5157TA は親水性で Charge Density も高く、合成ペプチドが溶解しやすいことが予想された。また強固な二次構造をとる可能性は低く、セリン残基が存在するため Flexible なペプチドであると考えられた。#5158RE も非常に親水性が高く、Charge Density があり、Flexibility、Surface probability を有し Turn 構造も存在することが予測された。#5157TA には C 末端にシステイン残基を付加し、これを介して MBS 法により KLH と conjugation した。#5158RE は配列中のシステイン残基を利用して、同様に KLH と conjugation した。両ペプチドとも 2 羽のウサギに対して各 3 回免疫を行ない、合成ペプチドに対する反応性を ELISA 法によって確認した。

2. HCV-1a 型 E1、E2 蛋白の発現

発現プラスミド pCAGv340v/H77c、pCAGv711v/H77c を 293T 細胞にトランスフェクションし、蛍光抗体染色及びウエスタンブロット法により E1 及び E2 蛋白を検出した。蛍光抗体染色では、pCAGv340v/H77c をトランスフェクションした細胞では、抗 E1 抗体(Austral 社)および抗 VSV G-TM 抗体により、pCAGv711v/H77c をトランスフェクションした細胞では、抗 5157TA 抗ウサギ血清および抗 VSV G-TM 抗体によりそれぞれ

発現蛋白を確認した。抗 5158RE 抗血清は特異的な反応を示さなかった。

ウエスタンブロット法では、pCAGv340v/H77c をトランスフェクションした細胞で、抗 E1 抗体により 32-35kDa のバンドが、pCAGv711v/H77c をトランスフェクションした細胞では、抗 5157TA 抗血清により 62-64kDa のバンドがそれぞれ検出された。抗 5158RE 抗血清では、特異的なバンドは検出できなかった (図 2)。

D. 考察

以上のように、HCV-1a 型由来の E1、E2 蛋白を細胞表面に発現するプラスミドを用いて E1 および E2 蛋白質を VSV G 蛋白との融合蛋白として発現することに成功した。これにより 1a 型の E1、E2 蛋白を被った VSV シュードタイプウイルスの作製が可能となった。今後これらのシュードタイプウイルスを用いて、HCV の遺伝子型、strain の違いにより細胞への吸着および感染性に違いが認められるかどうかを検討する予定である。またルシフェラーゼ活性を指標とした高感度細胞融合アッセイ法を用いることにより、HCV 遺伝子型が細胞融合活性へ及ぼす影響について解析できるものと期待される。さらに効率よく VSV シュードタイプウイルスの作製を行なうために、恒常的に E1 および E2 キメラ蛋白質を発現する細胞株を樹立する事も有効であると考えられる。

今回作製した抗 E2 ペプチド抗体のうち、aa518-531 の TTDRSGAPTYSWGA 配列を抗原としたものが、293T 細胞で発現させた 1a-E2 蛋白を認識した。この領域は 1b 型との相同性が約 80% である (図 3)。この抗 E2 抗体が 1b 型その他の遺伝子型の E2 蛋白を認識するか否かについても明らかにしたいと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).
2. Suzuki, R., Tamura, K., Li, J., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* (2001) 280, 301-309.

2. 学会発表 (国際)

1. Suzuki, R., Sakamoto, S., Negishi, H., Li, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T. Degradation Signal in the HCV core protein. 8th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Paris, September 2001.
2. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Tomobe, K., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the liver of hepatitis C virus core

gene transgenic mice. *ibid.*

3. Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Otsuka, M., Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. The tightly regulated inducible expression system of HCV proteins: The core protein modulates fas- and TNF alpha-mediated apoptosis in human liver cells. *ibid.*
4. Aizaki, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Li, Y-W., Harada, T., Otsuka, M., Seki, N., Matsuura, Y., Miyamura, T. Characterization of an human hepatoma cell line carrying entire open reading frame of the HCV genome. *ibid.*
5. Shimoike, T., Suzuki, T., Rikimaru, A., Matsuura, Y., Totsuka, A., Miyamura, T. Identification of the key determinants in HCV 5'UTR for the translational repression by the viral core protein. *ibid.*
6. Suzuki, T., and Li, J. Regulation of TT virus gene expression. The 22nd Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels, Kobe, 2001.

図1 E1-および E2-VSV G キメラ蛋白質発現プラスミドの構築

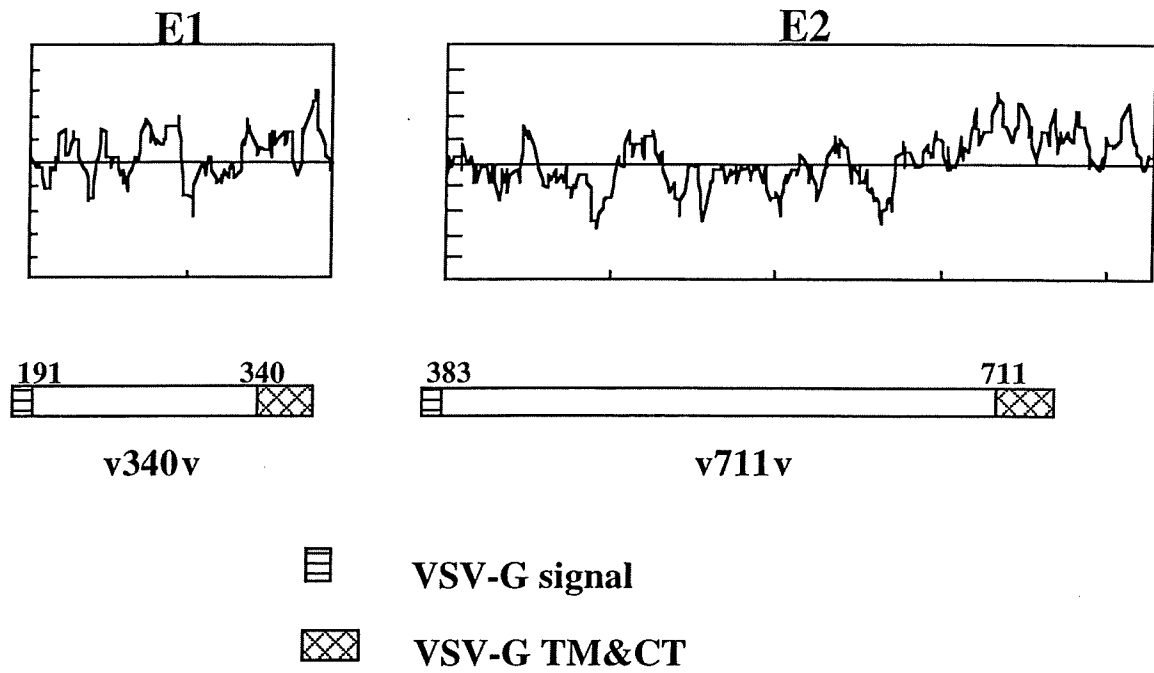


図2 E1 および E2 キメラ蛋白質のウエスタンブロット

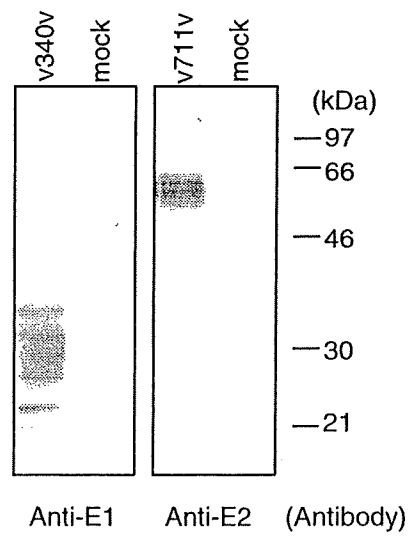


図3 HCV 1a型と1b型のE2領域のアミノ酸配列の比較

```

Type1a (H77c) 1 : ETHVTGGNAG RTTAGLVGLL TPGAKQNIQL INTNGSWHIN STALNCNESL NTGWLAGLFY
                * **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Type1b (HCVJ1) 1 : HTRVTGGVQG HVTSTLTSLF RPGASQKIQL VNTNGSWHIN RTALNCNDSL KTGFLAALFY

61 : QHKFNSSGCP ERLASCRRLT D-FAQGWP I SYA---NGSG LDERPYCWHY PPRPCGIVPA
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
61 : THKFNASGCP ERMASC-RSI DKFDQGWPI TYAQPDN-S- -DQRPYCWHY APRQCGIVPA

117 : KS-VCGPVYC FTPSPVVVGT TDRSGAPTYS WGANDTDV FV LNNTRPPLGN WFGCTWMNST
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
117 : -SQVCGPVYC FTPSPVVVGT TDRFGAPTYN WGDNETDVLL LNNTRPPHGN WFGCTWMNST

176 : GFTKVCGAPP CVIGGVGNNT LLCPTDCFRK HPEATYSRCG SGPWITPRCM VDYPYRLWHY
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
176 : GFTKTCGGPP CNIRGVGNNT LTCPTDCFRK HPDATYTKCG SGPWLTPRCL VDYPYRLWHY

236 : PCTINYTIFK VRMYVGGVEH RLEAACNWTR GERCDLEDRD RSELSPLLLS TTQWQVLPCS
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
236 : PCTVNFTIFK VRMYVGGVEH RLDAACNWTR GERCDLEDRD RAELSPLLLS TTEWQILPCS

296 : FTTLPALSTG LIHLHQNIVD VQYLYGVGSS IASWAIKWEY VVLLFLLLAD ARVCSCLWMM
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
296 : YTTLPALSTG LIHLHQNIVD IQYLYGIGSA VVSIAIKWEY VVLLFLLLAD ARVCACLWMM

356 : LLISQAEA
    * * * * *
356 : LLIAQAEA
    
```

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Tsutsumi T.	. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a	Hepatology		印刷中	2002
Moriishi K	Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2	Virology	292	258-271	2002
Matsuura Y.	Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins.	Virology	286	263-275	2001
Urbani S.	Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV	Hepatology	33	1533-1543	2001

20010675 .

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P13 をご参照ください。

