

## バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術 の開発

所 属 大阪大学微生物病研究所

研究者 松浦 善治

### 分担研究者

- |                          |       |
|--------------------------|-------|
| (1) 国立感染症研究所ウイルス第二部      | 鈴木 哲朗 |
| (2) 大阪大学微生物病研究所          | 森石 恆司 |
| (3) 三菱ウェルファーマ株式会社創薬第四研究所 | 新井 正明 |

### 要旨

HCV の感染機構を解析し、ヘパリン、成長因子、そして、ヒト血清成分が感染に関与することが示された。また、HCV 蛋白質を発現する高度弱毒化ワクチニアウイルスの免疫誘導能を評価するとともに、ポリメラーゼ阻害剤のスクリーニングを行った。

### 1. 研究目的

C型肝炎は我が国の国民病であり、キャリアの発症予防やウイルスの生体からの積極的な排除法の確立が強く望まれている。我々はこれまでに、細胞培養系のないC型肝炎ウイルス(HCV)の感染の初期過程を解析するため、HCV のエンベロープ蛋白質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膜融合検出系を構築した。これにより HCV のエンベロープ蛋白質が宿主細胞表面の蛋白質リセプターを認識し、エンドサイトーシスによって細胞内へ侵入することを明らかにした。また、HCV のリセプターではないかと考えられていたヒト CD81 以外の蛋白質リセプターの存在が示唆された。本研究はこれらのアッセイ系を用いて、感染の第一段階である宿主細胞への吸着侵入に関与する受容体を解明し、HCV 感染の初期過程を分子レベルで明らかにするとともに、その成績を基にした治療用ワクチンの開発と、HCV の増殖を阻害する薬剤の検索を目的とする。

### 2. 研究方法

#### HCV 感染機構の解析

HepG2 細胞の膜画分でマウスを免疫し、細胞融合やシュードタイプウイルスの感染を中和できるモノクローナル抗体を作製する。それらの抗体を担体に固定し、結合する分子をアフィニティークロマトグラフィーと通常のカラムクロマトグラフィーを組み合わせる。精製標品の N 末端のアミノ酸配列を解析し、その成績をもとにして目的遺伝子のクローニングを試みる。

#### HCV 遺伝子を組み込んだ弱毒ワクチニア DIs ベクターの作製

通常ワクチニアウイルスに外来性遺伝子を組み込む場合にはチミジンキナーゼ遺伝子をコードする領域に挿入する。これはチミジンキナーゼを欠損している細胞株中で組換えウイルスを作らせ、プロモデオキシウリジン存在下で培養すると、チミジンキナーゼを発現しないウイルスだけが選択的に増殖してくるためである。(チミジンキナーゼを持つウイルスはプロモデオキシウリジンをDNA中に取り込んでしまうためにウイルス複製が阻害される) しかしながら、DIs株の場合には唯一増殖できるニワトリ胎児培養細胞ではチミジンキナーゼ欠損細胞が存在しないためにこの方法を用いることができない。そのためまずDIs株特異的な欠損部位に $\beta$ -Galactosidase 遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作製し、次いでhomologous recombinationの手法で目的の外来遺伝子を $\beta$ -Galactosidaseと置換した組換えウイルスを作製し、透明なプラックを拾うことにより目的の組換えウイルスを選別する。このように2段階の選別を行うことで目的とする組換えウイルスの取得が可能となる。ワクチニアウイルスのプロモーターmH5の下流にHCV遺伝子の全部又は一部が挿入されたトランスファーベクターを作成し、homologous recombinationの手法を用いてDIsに導入し、目的蛋白の発現の確認を行った。また、これらの組換えDIsの細胞性誘導能について検討した。

#### ポリメラーゼ阻害剤の探索

NS5bポリメラーゼを発現するバキュロウイルス感染細胞を2% TritonX-100及び20% glycerolを含むlysis bufferで破碎後、ヘパリンセファロースカラム及びpoly(U)セファロースカラムでNS5bポリメラーゼを精製した。精製ポリメラーゼを、HCVゲノム5'非翻訳領域の(-)鎖他のRNAを鋳型として、4NTPs(アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジンの各3リン酸体)及び $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を基質として含む溶液中で30℃、2時間反応させた。反応後の溶液から2-プロパノール沈殿でRNAを回収後し定量した。また、精製ポリメラーゼを、鋳型としてpoly(A)RNAを、primerとしてoligo(U) (15mer)を、基質としてUTP(ウリジンの3リン酸体)及び $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を含む溶液中で30℃、20分反応させた。反応後の溶液から2-プロパノール沈殿でRNAを回収し定量した。スクリーニングは化学的に3リン酸化したヌクレオチドアナログをRNA合成反応溶液中に添加し、各ヌクレオチドアナログの阻害活性を決定した。

### 3. 研究成果

#### HCVリセプターの解析

HepG2細胞の細胞膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合やシュードタイプウイルスの感染を中和できるモノクローナル抗体を作製したが、これらの抗体が認識する分子を精製し、質量分析の結果いくつかの候補分子が同定された。これらの遺伝子を発現の認められない細胞に導入し、細胞融合活性ならびにシュードタイプウイルスの感染性を検討している。また、HCVシュードタイプウイルスのHepG2細胞への吸着はヘパリンによって阻害されたが、逆に感染は増強されることが明らかとなった。このことはHCVシュードタイプウイルスの吸着には硫酸多糖類が重要であるため、ヘパリン添加によって結合阻害が観察されるが、それ以降の膜融合や侵入過程でHCV

シュードタイプウイルスのエンベロープ蛋白質の活性発現をヘパリンが増強している可能性が示唆される。この様に、ヘパリン処理で感染の増強が観察されたことから、活性発現にヘパリンを要求する線維芽細胞成長因子(FGF)、上皮細胞成長因子、および肝細胞成長因子等の各種成長因子の HCV シュードタイプウイルスの感染への影響を調べた。その結果、FGF 添加でのみ有意に HCV シュードタイプウイルスの感染抑制が観察された。また、HCV は血液媒介ウイルスであるため、感染の場にヒト血液成分が必要ではないかと考えた。そこで各種動物血清のシュードタイプウイルスの感染における影響を調べたところ、ヒト血清が濃度依存的に HCV シュードタイプウイルスの感染性を増強することが示された。

#### HCV 遺伝子を発現する組換え DIs の作製

DIs 株に外来遺伝子を組み込む手法を確立し、HCV の Core 領域、Core-E1-E2 領域、NS3 領域、NS5A 領域及び全長に相当する遺伝子領域を組み込んだ組換えウイルスを作成し、現在までに Core、Core-E-E2、NS5A を組み込んだ組換えウイルスの目的蛋白の発現を確認した。Core 領域を発現する組換えウイルスをマウスに投与し、細胞性免疫を誘導できることを確認した。

#### ポリメラーゼ阻害剤の探索

新たに構築した HCV ポリメラーゼ阻害剤スクリーニング系で、ヌクレオチドアナログ 31 化合物をアッセイした。そのうち、IC<sub>50</sub> が 100mcM 以下の化合物は 2 化合物であった。阻害活性を示した 2 化合物ともウリジン誘導体であり、chain terminator 作用を有する化合物であった。上記の知見を基に約 30 化合物の周辺化合物を合成し、阻害活性の高い 1 化合物 (compound No.3-3) を得た。また、選択毒性の向上を目指してその L 体 (compound No.3-4) の合成に成功した。今後、この系統の化合物からの合成展開による活性・選択毒性の向上に期待が持たれた。

#### 4. 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。我々が開発した HCV シュードタイプウイルスは、これまでの精製エンベロープ蛋白質を用いた結合アッセイや PCR でようやくウイルスの複製が検出できる細胞培養系に比べ、吸着ならびに侵入のステップを定量的に解析できる点で優れている。今回、ヘパリン、FGF そしてヒト血液成分が HCV シュードタイプウイルスの感染に重要な役割を演じていることが示された。HCV 受容体の同定に関しては、候補分子のクローニングおよび発現細胞株の樹立がほぼ終わり、取得分子の活性の最終評価の段階にある。もしも細胞融合やシュードタイプウイルスで活性が認められれば、“生” の HCV 感染 (信頼できる系は未だに無いが・・・) を調べてゆきたい。また、高度弱毒化ワクチニアウイルス株である DIs に HCV 遺伝子を組み込み、細胞性免疫を誘導できることが確認されたことは、将来の弱毒生ワクチンとしての応用に期待ができる成果だと思われる。HCV ポリメラーゼ阻害剤スクリーニング系で、ヌクレオチドアナログ 31 化合物をアッセイした。そのうち、IC<sub>50</sub> が 100mcM 以下の化合物は 2 化合物であった。阻害活性を示した 2 化合物ともウリジン誘導体であり、chain terminator 作用を有する化合物であった。今後、この系統の化合物からの合成展開による活性向上に期待が

持たれた。

## 5. まとめ

- 1) HCV シュードタイプウイルスの吸着はヘパリン添加によって結合阻害が観察されるが、それ以降の膜融合や侵入過程で HCV シュードタイプウイルスのエンベロープ蛋白質の活性発現をヘパリンが増強している可能性が示唆される。
- 2) FGF 添加で HCV シュードタイプウイルスの感染抑制が観察された。また、ヒト血清が濃度依存的に HCV シュードタイプウイルスの感染性を増強することが示された。
- 3) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs に HCV 遺伝子を組み込み、この組換えウイルスをマウスに投与したところ、細胞性免疫の誘導が確認された。
- 4) 新たに構築した HCV ポリメラーゼ阻害剤スクリーニング系で、ヌクレオチドアナログをアッセイし、阻害活性を示した chain terminator 作用を有するウリジン誘導体が得られた。

## 6. 研究発表

(誌上発表)

- Miyamura T., and Matsuura Y. Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. (Margolis H.S., Alter M.J., Liang T. J., and Dienstag J.L. ed.) International Medical Press, Atlanta, 289-293 (2002).
- Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y., Someya K., Ohsu T., Honda M., and Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. *Virology*, **302**, 433-444 (2002).
- Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimura S., Koike K., and Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C core protein. *Virology*, **304**, 415-424 (2002).
- Burioni R., Matsuura Y., Mancini N., Tani H., Miyamura T., Varaldo P.E., and Clementi M. Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J. Virol*, **76**, 11775-11779 (2002).
- Aizaki H., Harada T., Otsuka M., Seki N., Matsuda M., Li Y-W., Kawakami H., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire- or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology*, **36**, 1431-1438 (2002).
- Dubourdeau M., Miyamura T., Matsuura Y., Alric L., Pipy B., and Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21<sup>waf1</sup> down-regulation; effect of transforming growth factor  $\beta$ . *J of Hepatology*, **37**,

486-492 (2002).

Matsui M., Moriya O., Abdel-Aziz N., Matsuura Y., Miyamura T., and Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine*, **21**, 211-220 (2002).

Fukuta M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., and Kaibuchi K. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*, **109**, 837-885 (2002).

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).

Ishii K., and Moss B. Mapping Interaction Sites of the A20R Protein, a Component of the Vaccinia Virus DNA Replication Complex. *Virology*, **303**, 232-239 (2002).

松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染機構、ウイルス、**52**,185-190 (2002).

松浦善治、C型肝炎ワクチンの開発、総合臨床、**51**,1919-1923 (2002).

(口頭発表)

Nuclear localization of flavivirus core proteins., T. Okabayashi, K. Moriishi, and Y. Matsuura,

第9回国際HCV学会(サンディエゴ)2002年7月

Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum., T. Kimura-

Someya, K. Ishii, T. Miyamura, and Y. Matsuura, 同上

Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein., R. Suzuki, S.

Sakamoto, T. Tsutsumi, A. Rikimaru, T. Shimoike, S. Machida, Y. Matsuura, T.

Miyamura, and T. Suzuki, 同上

HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構、森石恆司、岡林環樹、中井康介、鈴木亮介、宮

村達男、松浦善治、第50回日本ウイルス学会総会(札幌)2002年10月

C型肝炎ウイルスE1エンベロープタンパク質の小胞体における膜トポロジー、染谷友美、石井孝

司、宮村達男、松浦善治、同上

フラビウイルスコア蛋白質の核内移行の解析、岡林環樹、森 嘉生、長谷部 太、小西英二、只

野昌之、森石恆司、松浦善治、同上

HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプVSVの感染初期過程の解析、林 昌宏、谷 英

樹、鈴木健介、薦田泰正、森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治、

同上

C型肝炎ウイルスNS5A蛋白質と相互作用する宿主細胞蛋白質、西村順裕、浜本いつき、森石恆

司、松浦善治、同上

7. 知的所有権の取得状況

工業所有権の名称 C型肝炎治療薬  
発明者 松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、洪井達郎、関 誠、四井能尚  
権利者 国立感染症研究所・三菱東京製薬  
工業所有権の種類、番号 国際出願番号 PCT/JP01/00967  
出願年月日 平成13年2月13日

工業所有権の名称 遺伝子組換えワクチニアウイルスワクチン  
発明者 本多三男、松尾和浩、大洲竹晃、宮村達男、松浦善治、石井孝司、  
加藤賢三  
工業所有権の種類、番号 国内出願番号 特願2000-207140号  
現在 PTC ルートにより外国特許出願中