

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業
慢性C型肝炎に対する治療用ヒト型抗体の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成15(2003)年4月

目次

| | |
|--------------------------------|----|
| I. 総括研究報告書 | |
| 慢性C型肝炎に対する治療用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. 慢性C型肝炎に対する治療用ヒト型抗体の開発に関する研究 | 6 |
| 松浦 善治・森石 恆司 | |
| 2. C型肝炎ウイルス E1 蛋白質のトポロジーに関する研究 | 10 |
| 石井 孝司 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 12 |
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 | 別添 |

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

慢性C型肝炎に対する治療用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E2エンベロープ蛋白質に対するヒト型モノクローナル抗体の抗ウイルス活性を、HCV持続感染チンパンジーを用いて評価した。本抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められ、4頭中2頭に於いては肝機能の改善傾向が認められた。また、これまでに作製したHCVのエンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染に、ヘパリン、FGFそしてヒト血液成分が重要な役割を演じていることが示された。さらに、HepG2細胞の細胞膜面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、これらの抗体が認識する分子がいくつか同定された。HCVのE1蛋白質には7カ所の糖鎖結合配列(NX(S/T))があるが、これらのAsn残基をGlnへ置換し、Western解析で分子量変化の有無を調べた。また、任意の位置に糖鎖結合配列を導入した。その結果、N-末端から250位付近までに糖鎖が結合していることからこの領域がERルーメン側にあると推定された。一方305位から356位付近には糖鎖が結合しないことから、この領域が細胞質側に存在すると考えられ、E1蛋白質は膜を2回貫通することが示唆された。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
石井孝司 国立感染症研究所 主任研究官

A. 研究目的

我が国には二百万人以上ものHCVのキャリア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。本研究事業では、これまでに得られたHCVエンベロープ蛋白質に対するヒト型モノクローナル抗体の*in vivo*でのウイルス排除活性をHCVに持続感染しているチンパンジーを用いて検討する。チンパンジーで良好な成績が得られれば、これらのヒト型抗体の慢性C型肝炎に対する抗体医薬としての道が開けるばかりでなく、この中和抗体をプローブとして治療用ワクチンの開発も可能となる。さらに、これまでに開発した手法と抗体を駆使すれば、HCVリセプターの同定も夢ではなく、悲願であった信頼できるHCVの細胞培養系や小型実験動物の開発、そしてワクチンや治療薬の開発が急展開することが期待でき、社会的貢献度も極めて高いものと思われる。

B. 研究方法

1) 抗E2ヒト型抗体のHCV持続感染チン

パンジーでの活性評価

精製E2蛋白質が細胞表面のCD81分子に結合するのを阻止できる抗体(NO B抗体)を保持し、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、血液を採取した。この末梢リンパ球から抗体遺伝子のcDNAライブラリーを作製し、フェージディスプレイ法を用いて、NO B活性を持ったヒト型モノクローナル抗体を得た。このヒト型抗体を精製し、安全性が担保された抗体をHCVに持続感染しているチンパンジーに3mg/kgと10mg/kgの用量で各2頭ずつ、計4頭に1週間隔で9回、静脈内にInfusion pumpを用いて投与した。抗体投与後のウイルス価と肝機能の動き、抗体の半減期、さらに、抗ヒト抗体の産生の有無について検討した。

2) シュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染様式とHCVレセプターの解析

これまでの成績から、HepG2細胞にHCVのエンベロープ蛋白質による細胞融合ならびにエンベロープ蛋白質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、シュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染様式を詳細に検討するとともに、HepG2

細胞膜上に存在すると思われる HCV レセプターの同定を進めた。

3) E1 及び E2 蛋白質を ER に発現させるために tissue plasminogen activator のシグナル配列との融合蛋白質としてそれぞれ発現するプラスミドを構築した。7カ所の糖鎖結合配列に部位特異的変異を導入した7種の変異体を作製し、変異体の電気泳動度の変化を観察した。元の結合配列以外に糖鎖結合配列を新たに導入する glycosylation-scanning mutagenesis を行い、同様に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和55年総理府告示第6号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第141号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また、本研究に関しては、平成14年7月3日にチンパンジー実験審査委員会において承諾を得ている。

C. 研究結果

1) ヒト型抗体の HCV 持続感染チンパンジーでの抗ウイルス活性の評価

3mg/kg と 10mg/kg 投与群での抗ウイルス活性ならびに肝機能の改善に有意な差は認められなかった。HCV 持続感染チンパンジーでは抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められたが、1週間後には元に戻る傾向が全例に認められた。また、4頭中2頭に於いて、肝機能の改善傾向が認められた。抗 E2 ヒト型抗体の体内動態はこれまでのヒト抗体と同様のものであり、3mg/kg の方が 10mg/kg より半減期が長かった。また、全てのチンパンジーに於いてヒト抗体に対する抗体の産生は認められなかった。

また、ヒト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作製した、抗 E1 および E2 ヒト型抗体を大量に培養・精製し、

チンパンジー投与に向けた安全性試験が終了した。

2) シュードタイプウイルスの HepG2 細胞への感染様式と HCV レセプターの解析。

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。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。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。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、候補分子の同定を進めている。

3) E1 には 196、209、233、234、250、305、325 位と、アミノ酸配列上では合計7カ所の糖鎖結合配列 (NX(S/T)) がある。まずこれらの Asn 残基の Gln への置換を行い、Western 解析で分子量変化の有無を調べた。250位までは233位を除いて全ての配列に糖鎖が結合し、C端側の305位、325位には結合しないことがわかった。次に、任意の位置に糖鎖結合配列を導入する glycosylation-scanning mutagenesis を行った。その結果、222位、243位には糖鎖修飾が起こるが、312位、329位、333位、342位、356位には起こらないことがわかった。これらの結果を総合し、N-末端から250位付近までが ER ルーメン側、305位から356位付近が細胞質側に存在し、2回膜を貫通するトポロジーモデルが考えられた。また、E1 のハイドロパシー解析結果も上記のモデルを支持した。

D. 考察

NOB 活性を持ったヒト型モノクローナル抗体の HCV 持続感染チンパンジーでの抗ウイルス活性は、一過性なものであり、ウイルスを生体から排除するのは難しいと思われる。NOB 活性は精製した E2 蛋白質が細胞表面の CD81 分子に結合するのを阻止するものであり、HCV 感染における関与は依然として否定的な意見が多い。しかし、精製 E2 蛋白質と強いアフィニティーを示すことから、ウイルスの侵入には直接関与しなくても、結合によりシグナルを細胞に入れて、HCV の感染に必須な分子の誘導や肝炎病態に関与している可能性も充分考えられる。今後、本抗体による E2 と CD81 の結合阻害による肝炎病態の改善の可能性も検討してゆきたい。また、細胞融合阻止活性を持った抗 E1 および抗 E2 ヒト抗体の抗ウイルス活性のチンパンジーでの活性評価を続き進めて行きたい。

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。今後これらの領域を詳細に検討してゆきたい。また、HCV 受容体がクローニングされれば、発現細胞株を樹立し、細胞融合やシュードタイプウイルスで活性を評価する。もしも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、今回用いたヒト肝細胞に対するモノクローナル抗体は、細胞融合活性を中和するが HCV シュードタイプウイルスを中和できなかった。今後さらに HCV シュードタイプウイルスを中和できるモノクローナル抗体を準備し、HCV リセプターのクローニングを根気強く続けたい。

E1 蛋白質のトポロジーモデルは以前にフランスのグループによって提案され、他の研究者もそのモデルを基に研究を進めている。しかし、そのモデルでは細胞質側領域がほとんど存在せず、コア蛋白質や E2 蛋白質と相互作用し得ない。一方で、E1 がコアや E2 と相互作用するという証拠は蓄積してきている。本研究で詳細に証明したトポロジーモデルでは、比較的大きな細胞質ループがある。このループ領域がコア蛋白質と相互作用して

いるとのデータも出ている。従って、本研究で新たに提出したモデルは多くの知見と合致しており、他の HCV 研究者にも有用な情報を提供できるであろうと期待される。

ウイルス粒子の形成過程は、いずれのウイルスについても全容が明らかになっていない。HCV に関しては、細胞培養による効率の良い増殖系がないこともあり、更に立ち後れている。構造蛋白質の構造情報は、ウイルス粒子の形成過程を考える上で必須である。コア蛋白質や E2 蛋白質については次第に情報が集まりつつあるが、E1 蛋白質の構造情報はほとんどない。本研究結果は、HCV の粒子形成を探る上で重要な知見となるばかりでなく、HCV ワクチンや治療薬開発につながると考えられる。

E. 結論

- 1) 抗 E2 ヒト型モノクローナル抗体の抗ウイルス活性を HCV に持続感染しているチンパンジーを用いて評価した。抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められたものの、1 週間後には元ウイルス価に戻った。4 頭中 2 例に於いて、肝機能の改善傾向が認められた。
- 2) 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。これらの抗体が認識する分子がいくつか同定された。
- 3) 新たに E1 蛋白質のトポロジーモデルを提出した。このモデルは、HCV のコア蛋白質が E1 蛋白質と相互作用するという事実とも合致する。しかし、別の研究グループは細胞質ループ領域が無いトポロジーモデルを提唱しており、我々の研究結果とは異なっている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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^{waf1} down-regulation; effect of transforming growth factor β . *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).
- 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).
- ## 2. 学会発表
- Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T., Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.
- Kimura-Someya T., Ishii K., Miyamura T., and Matsuura Y., Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum. Ibid.
- Okabayashi T., Moriishi K., and Matsuura Y., Nuclear localization of flavivirus core proteins. Ibid.
- Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., T.,Miyamura T., and Matsuura Y., Nuclear localization of HCV core protein through PA28 γ -dependent pathway. Ibid.
- Ishii K. and Moss B., Mapping Interaction Sites of the A20R Protein, a Component of the Vaccinia Virus DNA Replication Complex. 14th International Poxvirus and Iridovirus Symposium, September, 2002, Lake Placid, USA.
- Matsuura Y., Infection mechanisms of hepatitis C virus. 2nd Symposium of

High Technology Research Center,
Chiba, Japan, Jan 28-29, 2003.

林 昌宏、谷 英樹、鈴木健介、菰田泰正、
森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝
司、宮村達男、松浦善治、HCV エンペ
ロープ蛋白質を持ったシュードタイプ VSV、
第 50 回日本ウイルス学会、平成 14 年
10 月、札幌。

染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治、
C 型肝炎ウイルス E1 エンペロープ蛋白質
の小胞体における膜トポロジー 同上。

中井康介、森石恆司、染谷友美、石井孝司、
宮村達男、松浦善治、C 型肝炎ウイルス
E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解
析 同上。

西村順裕、浜本いつき、森石恆司、松浦善治、
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 同上。

鈴木亮介、坂本真一郎、堤武也、下池貴志、
松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗、C 型肝
炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規
定するシグナルの解析 同上。

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、フラビ
ウイルスコア蛋白質の核内移行の解析
同上。

森石恆司、岡林環樹、中井康介、鈴木亮介、
宮村達男、松浦善治、HCV コア蛋白質の
新しい核内移行・局在化機構 同上。

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、森石恆司、
松浦善治、新規シュードタイプバキュロ
ウイルス作製系の開発 同上。

阿部隆之、北川善紀、辺見弘明、森石恆司、
高久 洋、審良静男、松浦善治、バキュ
ロウイルスエンペロープ蛋白質による自
然免疫誘導機構の解析 同上。

山岸潤也、伴戸久徳、松浦善治、DNA マイ
クロアレイを用いたバキュロウイルス遺
伝子発現の解析 同上。

石井孝司、Bernard Moss, Clustered
charge-to-alanine mutagenesis を用い
たワクチニアウイルス蛋白 A20R の機能
解析 同上。

町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、赤塚俊隆、
鈴木哲朗、宮村達男、弱毒ワクチニアウ
イルス DIs を用いた C 型肝炎ウイルス構
造蛋白の発現 同上。

村上恭子、染谷友美、根岸英雄、石井孝司、
岩堀 徹、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達
男、HCV レプリコン活性に関与する宿主
因子の探索 同上。

石井孝司、上田良昭、松浦善治、宮村達男、
松尾和浩、大洲竹晃、本多三男、高度弱
毒化ワクチニアウイルス DIs の解析とウ
イルスベクターとしての応用 第 12 回
抗ウイルス化学療法研究会、平成 14 年
3 月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

2000-207140・本多三男、石井孝司他 5
名・科学技術振興事業団他 1 名・遺伝子組換
えワクチニアウイルスワクチン・2000 年 7
月 7 日出願、2002 年 1 月 22 日公開

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

慢性C型肝炎に対する治療用ヒト型抗体の開発に関する研究

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

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)のE2エンベロップ蛋白質に対するヒト型モノクローナル抗体の抗ウイルス活性を、HCV持続感染チンパンジーを用いて評価した。本抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められ、4頭中2頭に於いては肝機能の改善傾向が認められた。また、これまでに作製したHCVのエンベロップ蛋白質を持ったシュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染に、ヘパリン、FGFそしてヒト血液成分が重要な役割を演じていることが示された。HepG2細胞の細胞膜成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、これらの抗体が認識する分子がいくつか同定された。

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。本研究事業では、これまでに得られたHCVエンベロップ蛋白質に対するヒト型モノクローナル抗体の*in vivo*でのウイルス排除活性をHCVに持続感染しているチンパンジーを用いて検討する。チンパンジーで良好な成績が得られれば、これらのヒト型抗体の慢性C型肝炎に対する抗体医薬としての道が開けるばかりでなく、この中和抗体をプローブとして治療用ワクチンの開発も可能となる。さらに、これまでに開発した手法と抗体を駆使すれば、HCVレセプターの同定も夢ではなく、悲願であった信頼できるHCVの細胞培養系や小型実験動物の開発、そしてワクチンや治療薬の開発が急展開することが期待でき、社会的貢献度も極めて高いものと思われる。

B. 研究方法

1) 抗E2ヒト型抗体のHCV持続感染チンパンジーでの活性評価

精製E2蛋白質が細胞表面のCD81分子に結合するのを阻止できる抗体(NO B抗体)を保持し、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、血液を採取した。この末梢リンパ球から抗体遺伝子のcDNAライブラリーを作製し、ファージディスプレイ法を用いて、NOB

活性を持ったヒト型モノクローナル抗体を得た。このヒト型抗体を精製し、安全性が担保された抗体をHCVに持続感染しているチンパンジーに3mg/kgと10mg/kgの用量で各2頭ずつ、計4頭に1週間隔で9回、静脈内にInfusion pumpを用いて投与した。抗体投与後のウイルス価と肝機能の動き、抗体の半減期、さらに、抗ヒト抗体の産生の有無について検討した。

2) シュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染様式とHCVレセプターの同定

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、シュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染様式を詳細に検討するとともに、HepG2細胞膜上に存在すると思われるHCVレセプターの同定を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存した。実験動

物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和55年総理府公示第6号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第141号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また、本研究に関しては、平成14年7月3日にチンパンジー実験審査委員会において承諾を得ている。

C. 研究結果

1) ヒト型抗体のHCV持続感染チンパンジーにおける抗ウイルス活性の評価

3mg/kgと10mg/kg投与群での抗ウイルス活性ならびに肝機能改善に有意な差は認められなかった。HCV持続感染チンパンジーでは抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められたが、1週間後には元に戻る傾向が全例に認められた。また、4頭中2頭に於いて、肝機能の改善傾向が認められた。抗E2ヒト型抗体の体内動態はこれまでのヒト抗体と同様のものであり、3mg/kgの方が10mg/kgより半減期が長かった。また、全てのチンパンジーに於いてヒト抗体に対する抗体の産生は認められなかった。

また、ヒト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作製した、抗E1およびE2ヒト型抗体を大量に培養・精製し、チンパンジー投与に向けた安全性試験が終了した。

2) シュードタイプウイルスのHepG2細胞への感染様式とHCVレセプターの解析。

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。

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。

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。

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、候補分子の同定を進めている。

D. 考察

NOB活性を持ったヒト型モノクローナル抗体のHCV持続感染チンパンジーでの抗ウイルス活性は、一過性なものであり、ウイルスを生体から排除するのは難しいと思われる。NOB活性は精製したE2蛋白質が細胞表面のCD81分子に結合するのを阻止するものであり、HCV感染における関与は依然として否定的な意見が多い。しかし、精製E2蛋白質と強いアフィニティーを示すことから、ウイルスの侵入には直接関与しなくても、結合によりシグナルを細胞に入れて、HCVの感染に必須な分子の誘導や肝炎病態に関与している可能性も充分考えられる。今後、本抗体によるE2とCD81の結合阻害による肝炎病態の改善の可能性も検討してゆきたい。また、細胞融合阻止活性を持った抗E1および抗E2ヒト抗体の抗ウイルス活性のチンパンジーでの活性評価を続き進めて行きたい。

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。今後これらの領域を詳細に検討してゆきたい。また、HCV受容体がクローニングされれば、発現細胞株を樹立し、細胞融合やシュードタイプウイル

スで活性を評価する。もしも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、今回用いたヒト肝細胞に対するモノクローナル抗体は、細胞融合活性を中和するがHCVシールドタイプウイルスを中和できなかった。今後さらにHCVシールドタイプウイルスを中和できるモノクローナル抗体を準備し、HCVリセプターのクローニングを根気強く続けたい。

E. 結論

1) 抗E2ヒト型モノクローナル抗体の抗ウイルス活性をHCVに持続感染しているチンパンジーを用いて評価した。抗体投与により一過性にウイルス価の減少が認められたものの、1週間後には元ウイルス価に戻った。4頭中2例に於いて、肝機能の改善傾向が認められた。

2) HepG2細胞の細胞膜画分を抗原としてマウスを免疫し、細胞融合やシール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。これらの抗体が認識する分子がいくつか同定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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^{waf1} down-regulation; effect of transforming growth factor β . *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).

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).

2. 学会発表

Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M.,
Murakami K., Ishii K., Nagamori S.,
Kawakami H., Ishiko H., Kawada
M., Matsuura T., Hasumura S.,
Matsuura Y., and Miyamura T.,
Production and release of infectious
HCV particles from persistently
infected human liver cell cultures
transfected with full length-HCV
RNA. 9th International Meeting on
HCV and Related Viruses, San Diego,
USA, July 7-11, 2002.

Kimura-Someya T., Ishii K.,
Miyamura T., and Matsuura Y.,
Membrane topology of E1
glycoprotein of HCV on the
endoplasmic reticulum. Ibid.

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

Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K.,
Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba
T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T.,
T., Miyamura T., and Matsuura Y.,
Nuclear localization of HCV core
protein through PA28 γ -dependent
pathway. Ibid.

Matsuura Y., Infection mechanisms of
hepatitis C virus. 2nd Symposium of
High Technology Research Center,
Chiba, Japan, Jan 28-29, 2003.

林 昌宏、谷 英樹、鈴木健介、菰田泰正、
森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝
司、宮村達男、松浦善治、HCV エンベ
ロープ蛋白質を持ったシールドタイプ
VSV、第50回日本ウイルス学会、平
成14年10月、札幌。

染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治、
C型肝炎ウイルス E1 エンベロープ蛋白
質の小胞体における膜トポロジー 同上。

中井康介、森石恆司、染谷友美、石井孝司、
宮村達男、松浦善治、C型肝炎ウイルス
E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の

解析 同上。

西村順裕、浜本いつき、森石恆司、松浦善
治、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 同上。

鈴木亮介、坂本真一郎、堤武也、下池貴志、
松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗、C型肝
炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規
定するシグナルの解析 同上。

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、フ
ラビウイルスコア蛋白質の核内移行の解
析 同上。

森石恆司、岡林環樹、中井康介、鈴木亮介、
宮村達男、松浦善治、HCV コア蛋白質
の新しい核内移行・局在化機構 同上。

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、森石恆司、
松浦善治、新規シールドタイプバキュロ
ウイルス作製系の開発 同上。

阿部隆之、北川善紀、辺見弘明、森石恆司、
高久 洋、審良静男、松浦善治、バキュ
ロウイルスエンベロープ蛋白質による自
然免疫誘導機構の解析 同上。

山岸潤也、伴戸久徳、松浦善治、DNA マ
イクロアレイを用いたバキュロウイルス
遺伝子発現の解析 同上。

石井孝司、上田良昭、松浦善治、宮村達男、
松尾和浩、大洲竹晃、本多三男、高度弱
毒化ワクチニアウイルス DIs の解析と
ウイルスベクターとしての応用 第12
回 抗ウイルス化学療法研究会、平成1
4年3月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

C型肝炎ウイルス E1 蛋白質のトポロジーに関する研究

分担研究者 石井孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)の構造蛋白質に注目し、その解析を進めた。HCV の E1 蛋白質には7カ所の糖鎖結合配列 (NX(S/T))がある。これらの Asn 残基を Gln へ置換し、Western 解析で分子量変化の有無を調べた。また、任意の位置に糖鎖結合配列を導入する glycosylation-scanning mutagenesis も行った。その結果、N-末端から 250 位付近までに糖鎖が結合していることからこの領域が ER ルーメン側にあると推定された。一方 305 位から 356 位付近には糖鎖が結合しないことから細胞質側に存在すると考えられ、E1 蛋白質が膜を 2 回貫通するトポロジーモデルが考えられた。E1 蛋白質のハイドロパシー解析結果も上記のモデルを支持した。このトポロジーモデルは、HCV のコア蛋白質が E1 蛋白質と相互作用するという事実とも合致した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は、慢性肝炎の主要な原因ウイルスであり、HCV 感染と肝癌との関係も血清疫学的研究により証明され、臨床医学上きわめて重要なヒト発癌ウイルスである。しかし、培養細胞を用いた効率のよい HCV 複製系が確立されていないため、HCV の感染・複製・発癌機構の研究は困難を極め、C型肝炎治療薬の開発も進展が見られない。本研究では、HCV のエンベロープ蛋白質による感染機構の解析を進めることを目的とした。2つのエンベロープ蛋白質のうち、E2 は HCV ワクチン開発のターゲットとなるなどの理由から多くの研究がされているが、E1 に関するものは少ない。しかし、E1 はコア及び E2 と相互作用するなど、ウイルス構造を研究する上では E1 の構造情報は必須であると思われる。本研究では、E1 の二次構造を調べるために、E1 の糖鎖結合部位について詳細に調べ、E1 の膜上でのトポロジーの解析を行った。

B. 研究方法

E1 及び E2 蛋白質を ER に発現させるために tissue plasminogen activator のシグナル配列との融合蛋白質としてそれぞれ発現するプラスミドを構築した。7カ所の糖鎖結合配列に部位特異的変異を導入した7種の変異体を作製し、変異体の電気泳動度の変化を観察した。元の結合配列以外に糖鎖結合配列を新たに導入する glycosylation-scanning mutagenesis を行い、同様に解析した。

C. 研究結果

E1 には 196、209、233、234、250、305、

325 位と、アミノ酸配列上では合計 7カ所の糖鎖結合配列 (NX(S/T))がある。まずこれらの Asn 残基の Gln への置換を行い、Western 解析で分子量変化の有無を調べた。250 位までは 233 位を除いて全ての配列に糖鎖が結合し、C 端側の 305 位、325 位には結合しないことがわかった。次に、任意の位置に糖鎖結合配列を導入する glycosylation-scanning mutagenesis を行った。その結果、222 位、243 位には糖鎖修飾が起こるが、312 位、329 位、333 位、342 位、356 位には起こらないことがわかった。これらの結果を総合し、N-末端から 250 位付近までが ER ルーメン側、305 位から 356 位付近が細胞質側に存在し、2 回膜を貫通するトポロジーモデルが考えられた。また、E1 のハイドロパシー解析結果も上記のモデルを支持した。

D. 考察

E1 のトポロジーモデルは以前にフランスのグループによって提案され、他の研究者もそのモデルを基に研究を進めている。しかし、そのモデルでは細胞質側領域がほとんど存在せず、コア蛋白質や E2 蛋白質と相互作用し得ない。一方で、E1 がコアや E2 と相互作用するという証拠は蓄積してきている。本研究で詳細に証明したトポロジーモデルでは、比較的大きな細胞質ループがある。このループ領域がコア蛋白質と相互作用しているとのデータも出ている。従って、本研究で新たに提出したモデルは多くの知見と合致しており、他の HCV 研究者にも有用な情報を提供できると期待される。

ウイルス粒子の形成過程は、いずれのウイルスについても全容が明らかになっていない。

HCV に関しては、細胞培養による効率の良い増殖系がないこともあり、更に立ち後れている。構造蛋白質の構造情報は、ウイルス粒子の形成過程を考える上で必須である。コア蛋白質や E2 蛋白質については次第に情報が集まりつつあるが、E1 の構造情報はほとんどない。本研究結果は、HCV の粒子形成を探る上で重要な知見となるばかりでなく、HCV ワクチンや治療薬開発につながると思われる。

E. 結論

今回、新たに E1 のトポロジーモデルを提出した。このモデルは、HCV のコア蛋白質が E1 と相互作用するという事実とも合致する。しかし、別の研究グループは細胞質ループ領域が無いトポロジーモデルを提唱しており、我々の研究結果とは異なっている。今後、この相違点を明らかにする必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

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)

2. 学会発表

Ishii K. and Moss B., Mapping Interaction Sites of the A20R Protein, a Component of the Vaccinia Virus DNA Replication Complex. 14th International Poxvirus and Iridovirus Symposium, September, 2002, Lake Placid, USA.

Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T., Production and release of infectious HCV particles

from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.

Kimura-Someya T., Ishii K., Miyamura T., and Matsuura Y., Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum. *Ibid.*

町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、赤塚俊隆、鈴木哲朗、宮村達男、弱毒ワクチニアウイルス DIs を用いた C 型肝炎ウイルス構造蛋白質の発現 第 50 回日本ウイルス学会、平成 14 年 10 月、札幌。

村上恭子、染谷友美、根岸英雄、石井孝司、岩堀 徹、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男、HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の探索 同上。

林 昌宏、谷 英樹、鈴木健介、菰田泰正、森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治、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 同上。

染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治：C 型肝炎ウイルス E1 エンベロープ蛋白質の小胞体における膜トポロジー 同上。

中井康介、森石恆司、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治、C 型肝炎ウイルス E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析 同上。

石井孝司、Bernard Moss, Clustered charge-to-alanine mutagenesis を用いたワクチニアウイルス蛋白 A20R の機能解析 同上。

石井孝司、上田良昭、松浦善治、宮村達男、松尾和浩、大洲竹晃、本多三男、高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の解析とウイルスベクターとしての応用 第 12 回抗ウイルス化学療法研究会、平成 14 年 3 月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2000-207140・本多三男、石井孝司他 5 名・科学技術振興事業団他 1 名・遺伝子組換えワクチニアウイルスワクチン・2000 年 7 月 7 日出願、2002 年 1 月 22 日公開

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---------------|---|-----------------------------------|----------------------------|-------------|------|
| Burioni R. | 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. of Virol. | 76 | 11775-11779 | 2002 |
| Aizaki H. | Expression profiling of liver cell lines expressing entire- or parts of hepatitis C virus open reading frame. Family. | Hepatology | 36 | 1431-1438 | 2002 |
| Dubourdeau M. | Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21waf1 down-regulation; effect of transforming growth factor b. | J. of Hepatol. | 37 | 486-492 | 2002 |
| Ishii K. | Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. | Virology | 302 | 433-444 | 2002 |
| Tsutsumi T. | Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C core protein. | Virology | 304 | 415-4 | 2002 |
| Matsui M. | Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective. | Vaccine | 21 | 211-2 | 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 |
| Fukuta M. | Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. | Cell | 109 | 837-885 | 2002 |
| Miyamura T. | Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. | Viral Hepatitis and Liver Disease | International Medical Pres | 289-29 | 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 |

20021386

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.12の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。