

別紙 2

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業
バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| I. 総括研究報告書 | |
| バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発 | 1 |
| 松浦 善治 | |
| II. 分担研究報告書 | |
| 1. バキュロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの開発 | 7 |
| 松浦 善治・森石 恆司 | |
| 2. E 型肝炎ウイルス中空粒子を用いた経口ワクチンの開発 | 11 |
| 武田 直和 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 14 |
| 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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

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

昆虫ウイルスであるバキュロウイルスの粒子表面に、目的のリガンド分子を自在に提示できるシュードタイプウイルスの作製系を構築した。これにより広範な動物細胞に、あるいは、標的細胞だけに遺伝子導入できるベクターの作製が可能となった。また、バキュロウイルスが自然免疫を誘導できることを明らかにした。さらに、哺乳動物細胞内でのウイルス遺伝子の発現をバキュロウイルスゲノムマイクロアレイで網羅的に解析し、ウイルスベクターとしての安全性を確認した。また、組換えバキュロウイルスで発現したE型肝炎中空粒子をカククイザルに経口投与したところ、マウスの同様の抗体産生が誘導され、チャレンジに対する感染防御と発症阻止が観察された。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
武田直和 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

遺伝子治療は細胞医療や再生医療とともに、現行療法の限界を超える画期的な治療法として期待され、欧米を中心に活発な研究開発が行われている。外来遺伝子の導入方法としてはウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターがあるが、効率的にはウイルスベクターに勝るものはない。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが開発され、一部の遺伝子治療の臨床試験で使用されている。レトロウイルスは遺伝子を染色体内に導入する為、宿主遺伝子の挿入部位によっては細胞を癌化させる欠点が指摘されており、フランスでの臨床試験で白血病の発症が報告されている。アデノウイルスはほとんどのヒトが既に中和抗体を持っており、投与量が多くなる欠点が指摘されている。また、他のヒト病原ウイルスは弱毒化や無毒化が施されているとはいえ、安全性の問題が皆無とは言えない。さらに、現行のベクター技術では目的の遺伝子を目的の細胞にいかにして効率的よく導入するかという点に多くの問題点が残されている。このような問題点を克服するには新しいウイルスベクターの開発が必須である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスに注目している。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を

遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) ウイルス遺伝子は 130kbp もあり、大きな (< 15kbp) 外来遺伝子を挿入できる、2) ウイルスの遺伝子は全く哺乳動物細胞では発現しないため、細胞傷害性がほとんどなく有害な免疫応答の誘導もない、3) 組換えウイルスを短時間で作製できる、4) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない、5) 各種ウイルスの構造蛋白を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現すると、中空なウイルス様粒子を大量に産生できる等の利点が考えられる。一方、欠点としては、バキュロウイルスは生体の補体系で不活化され易いことが指摘されている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、目的のリガンドを被ったターゲッティングベクターや昆虫細胞で産生させたウイルス様粒子を利用した新しいベクター系の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) *In vivo* での遺伝子導入

バキュロウイルスの *in vivo* における遺伝

子導入は、血液中の補体成分によってウイルスが不活化されるため、それをなんとか克服する必要がある。これまでに補体の活性化を阻害する蛇毒因子や可溶性補体レセプター因子を用いてウイルスの不活化を抑制したり、補体制御因子である DAF と融合させた組換え gp64 蛋白質を持ったバキュロウイルスの作製等が試みられているが、動物個体への遺伝子導入は満足の行くものではなかった。そこで、様々な動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を再検討すると共に、補体経路の活性化を抑制できる薬剤である FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl 4

guanidinobenzoate, フサン) の活性を評価した。さらに、組換えウイルスを用いてマウスへの遺伝子導入を試みた。

(2) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発

他のウイルス蛋白質を組み込むことによって広範な細胞に高率よく遺伝子導入できるバキュロウイルスの開発と平行して、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発を試みた。gp64 蛋白質は動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して侵入するため、このままでは遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで、バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示できるベクター系を構築した。

(3) バキュロウイルスによる宿主応答

初代ラット培養細胞にバキュロウイルスを接種すると TNF- α , IL-1 α , IL-1 β の誘導が惹起されることが報告されており、さらに、バキュロウイルスの感染細胞のエンベロップ蛋白質画分をマウスの腹腔内に投与することによりインターフェロンの誘導が見られ、脳心筋炎ウイルスの致死感染からマウスが防御されることが報告されている。そこで、バキュロウイルスの自然免疫誘導活性を詳細に解析した。また、バキュロウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての安全性を評価するため、哺乳動物細胞にバキュロウイルスを感染させた際に転写されるウイルス由来 mRNA を全バキュロウイルス遺伝子をカバーするマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

(4) ウイルス様粒子の作製

1) 組換え HEV: VLPHEV はエンベロップを持たない直径約 30nm の小型の球形ウイル

スである。ゲノムは約 7.2kb のプラス一本鎖 RNA で、5'末端に Cap を、3'末端にポリアデニル酸をもつ。HEV 感染カニクイザルの胆汁から RNA を抽出し、RT-PCR 法で構造蛋白領域をコードする ORF2 全領域を増幅した。ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファーベクター pVL1393 にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。ブランククローニングで純化後、昆虫細胞 Tn5 細胞を感染させた。およそ 7 日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度 1.285g/cm³、直径約 23-24nm のウイルス様中空粒子 (Virus-like particles, VLP) を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。

2) VLP を経口投与したカククイザルの免疫応答: HEV の ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントを pVL1393 にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞 Tn5 細胞に感染させた。培養上清から、浮上密度 1.285g/cm³、直径約 23-24nm のウイルス様中空粒子が大量に得られた。7 日目の培養上清を 1000 xg で遠心して、組換えバキュロウイルスを除き、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で純度の高い粒子を得た。カニクイザルに精製した HEV VLP を経口投与し、マウス同様血中 IgM, IgG および腸管 IgA の産生を ELISA 法で測定した。

3) HEV 構造蛋白を産生する形質転換植物の作製: 組換えバキュロウイルスの作製に用いたアミノ末端 111 アミノ酸を欠失させた ORF2 (Δ N101)、およびアミノ末端のほかにカルボキシ末端 52 アミノ酸を欠失させた ORF2 (Δ N101 Δ C52) をカセットベクター pIBT210 の Sma I 部位にクローン化した。さらにこのプラスミドからカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、タバコエッチウイルス 5'-UTR、目的とする遺伝子、及び 3' Soybean vegetative storage protein を含む Hind III-Eco RI fragment を binary vector pGPTV-Kan にクローン化し、Disarmed Ti plasmid をもつアグロバクテリアを形質転換した。ポテトの若葉にこのアグロバクテリアを感染させ、定法にしたがって形質転換体を抗生物質で選択し、幼植物体を得た。発現効率の高い植物体を選択し形質転換ポテトを作製した。

4) 発現蛋白の解析: 幼植物体の葉を採取し、プロテアーゼ阻害剤を含む PBS(-)を加えてダウンスホモジナイザーで破碎して 10% ホモジ

ネートを調製した。蛋白を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。常法に従ってウエスタンブロット法で発現蛋白を検出した。一次抗体には HEV VLP をウサギに免疫して作製した高力価血清を用いた。また抗原 ELISA でホモジネート中の発現蛋白を検出した。

(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。

C. 研究結果

(1) *In vivo* での遺伝子導入

様々な動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を調べてみたところ、マウス以外の非働化していない動物血清はバキュロウイルスを不活化させたが、VSVG を被った組換えバキュロウイルスでは対照ウイルスに比べて血清成分に対して抵抗性を示した。また、補体経路の活性化を抑制できる薬剤である FUT-175 は、濃度依存的に血清成分によるバキュロウイルスの不活化を阻害したことから、組換えバキュロウイルスと FUT-175 のような薬剤との併用による方法により、動物個体への遺伝子導入も可能になるものと思われる。組換えウイルスを用いてマウスの脳組織および精巣のセルトリ細胞での外来遺伝子の発現が認められた。

(2) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発

バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、VSVG を被ったウイルスの遺伝子導入は、抗 gp64 抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設

計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。また、ウイルスのエンベロープ蛋白質だけでなく、逆にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけにチミジンキナーゼ等の自殺遺伝子を導入し、プロドラッグとの併用によって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。

(3) バキュロウイルスによる宿主応答

バキュロウイルスを 24 時間前に鼻腔内投与したマウスは、A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることが明らかとなった。これまで多くのウイルスエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導できることが報告されており、これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導することを支持するものであった。しかしながら、バキュロウイルスによる自然免疫の誘導はエンベロープ蛋白質よりも、細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) を介してシグナルを核に伝達していることが示唆された。免疫担当細胞においてはエンベロープ蛋白質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは、主に分解経路に輸送され、分解されたゲノム DNA が、細胞内に局在する TLR9 にシグナルを伝達しているものと思われる。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。バキュロウイルスを接種しても細胞傷害性が低いことは、バキュロウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての有利な特徴のひとつであると考えられる。そこで、遺伝子治療用ベクターとしての安全性を評価するため、哺乳動物細胞にバキュロウイルスを感染させた際に転写される、バキュロウイルスゲノムを網羅的に解析した。バキュロウイルスを HepG2 細胞に接種したところ、150 個の全バキュロウイルス遺伝子のうち 3 種の遺伝子の発現が転写レベルで僅かに検出されるのみであった。この成績から、哺乳動物細胞においてはバキュロウイルス自身のゲノムの発現がほとんどなく、これが細胞傷害性が低いことの一因であると推測される。

(4) ウイルス様粒子の作製

1) HEV VLP を経口投与したカクイザル

の免疫応答：マウスにおける至適量を基礎にマウスとカニクイザルの体重比から一頭当たり 10mg の VLP をミカン果実 (2-3 房) に注入し、予め絶食しておいたサル 2 頭に与えた。この方法でサルは確実に摂食することは確認済みである。初回免疫日を 0 日とし、これを確実にこなうために 1 日目に同量の VLP を再度経口投与した。その後 14、28、42 日に追加免疫を行なった。毎週採血と採便を行い、血中 IgM、IgG および便中の IgA 抗体を ELISA で検出した。血中 IgM 抗体はマウスでみられたような顕著な上昇は観察されなかった。IgG 抗体は 2 頭とも 3 週目には上昇し始めたが、抗体価はマウスに比べ低かった。80 日を経過した時点で、腸管 IgA 抗体の検出はできなかったため、84 日に追加免疫をおこなった。その結果、2 頭とも程度の差はあるものの、血中 IgG 抗体の急激な上昇がみられた。そこで IgG 抗体がピークに達した直後の 100 日目に 10000MID50 の感染性 HEV でチャレンジを行い感染防御あるいは発症阻止の有無を観察した。抗体陰性対照として用いたサルでは 2 頭ともチャレンジ後、一週間目には血清中にウイルス抗原が検出され、ウイルス血症を呈していた。抗原量は 2 週間目にピークに達し、4 週間目には抗原が検出されなくなった。抗体陽性対照としてもちいた 2 頭では全くウイルス血症は起こらず再感染に対して抵抗性を示した。一方、VLP を経口投与した 2 頭では、抗体陽性対照同様、血中からは全くウイルス抗原が検出されずチャレンジに対して抵抗性を示した。

2) HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトの作製：アミノ末端 111 アミノ酸を欠失させた $\Delta N101$ 、およびアミノ末端のほかにカルボキシ末端 52 アミノ酸を欠失させた $\Delta N101\Delta C52$ をバイナリーベクターにクローン化し、アグロバクテリアを形質転換した。ポテトの葉に感染後、形質転換体を抗生物質で選択し、幼植物体を得た。葉をすりつぶし、発現量を抗原 ELISA で測定したところ、水溶性蛋白のおよそ 0.33% が目的とする HEV 構造蛋白であった。 $\Delta N110$ と $\Delta N101\Delta C52$ で発現量に差はみられなかった。 $\Delta N110$ で 10、 $\Delta N101\Delta C52$ で 6 の形質転換植物を選択し、通常の温室で生育してポテトの tuber (塊茎) を回収した。ウエスタンブロットおよび ELISA で発現量を測定したところ、5-30 $\mu\text{g/g}$ の構造蛋白が発現していた。

D. 考察

バキュロウイルスが哺乳動物細胞に遺伝子を導入できることが明らかとなり、これまでに多くのグループによって効果的な利用法が検討されてきた。本研究により、自在にバキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンドだけを提示できる系が開発された。また、バキュロウイルスの鼻腔内接種によって、感染防御可能な自然免疫も誘導できることが明らかとなり、遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、呼吸器感染症に対するワクチンベクターとしても応用も期待できる。

以前にマウスを用いた実験から、HEV VLP は経口投与によって血中 IgM 抗体、IgG 抗体のみならず、腹腔内注射では誘導できない腸管 IgA 抗体を誘導できること、したがって、腸管特異的な粘膜ワクチンとしての可能性があることを示した。本年度は同様な実験を HEV に対して感受性があるカニクイザルで行なったところ、経口投与によってネイティブな感染性 HEV のチャレンジに対して感染防御、もしくは発症を阻止できる抗体が産生されることが明らかになった。したがって、HEV VLP は「食べるワクチン」としての機能を有する分子である。今後、サルから定期的に採取した血清、糞便等を詳細に解析することによってこの VLP が誘導した抗体が感染防御に効果があるのか、あるいは発症阻止だけに効果があるのかを明らかにしたい。

HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトが得られた。マウスやサルに投与した抗原量をヒトに当てはめると、組換えバキュロの系で VLP を産生する限り極めて高価なワクチンになってしまう。形質転換植物はこの問題を解決するための手段の一つである。ポテト塊茎における HEV 構造蛋白の発現量は以前に行なわれたノロウイルス構造蛋白のそれと同等である。ノロウイルスではボランティアによる実験で、粘膜アジュバントを用いてはいるが、形質転換ポテトでノロウイルスに対する特異的抗体を誘導することに成功している。ノロウイルスの場合は形質転換ポテト塊茎で全てではないが、発現蛋白は VLP の形態をとっている。したがって、HEV の場合も VLP としてポテト塊茎内で発現している場合には「食べるワクチン」としての可能性が一層高まる。今後、発現蛋白を詳細に解析する必要がある。

E. 結論

バキュロウイルスの粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、in vivoで遺伝子導入可能なベクター、やターゲッティング可能なベクター系を開発した。また、宿主応答を解析した。組換えバキュロウイルスで発現した HEV VLP を用い腸管免疫誘導能をカニクイザルで試験した結果、マウス同様の免疫反応が誘導されることが明らかになった。HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトが得られた。

185-193 (2003)

F. 健康危険情報

これまで E 型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、わが国にも少なからず存在することが明らかになってきている。海外渡航歴の全くない人が E 型肝炎と診断される例がわが国でも確認されるようになってきた。非 A 非 B 非 C 型急性肝炎と診断された場合、原因のひとつとして E 型肝炎を疑うべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tani H., Limn C.-K., Yap C.-C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., and Matsuura Y. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.*, 77, 9799-9808 (2003).
- Abe T., Takahashi H., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., and Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J. Immunol.*, 171, 1133-1139 (2003).
- Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28g-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J. Virol.*, 77, 10237-10249 (2003).
- Yamamoto H., Ihara M., Matsuura Y., and Kikuchi A. Sumoylation is involved in B-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J.*, 22, 2047-2059 (2003).
- Nishimura T., Fukata Y., Kato K., Yamaguchi T., Matsuura Y., Kamiguchi H., and Kaibuchi K. CRMP-2 regulates polarized Munb-mediated endocytosis for axon growth. *Nature Cell Biology*, 5, 819-826 (2003).
- Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread

infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.*, 27, 1-5 (2003).

- Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infec. Dis.*, 56, 8-11 (2003).
- Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatol. Res.*, 27, 169-173 (2003).
- Shrestha S, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J. Med. Virol.*, 69, 207-214 (2003).
- 谷 英樹、阿部隆之、林 昌宏、望月理加、山岸潤也、北川善紀、渡辺理恵、宮本大伸、森石恆司、松浦善治、バキュロウイルスベクター、ウイルス、53, 185-193 (2003)

2. 学会発表

- Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Induction of innate immune response in mouse by Baculovirus. 22nd Annual Meeting of American Society for Virology, Davis, USA, July 12-16, 2003.
- Matsuura Y. Gene delivery by pseudotyped baculoviral vectors. Fourth International Virus Assembly Symposium. Sardegna, Italy, Sept. 20-24, 2003.
- Takeda N, Suzuki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. PLANT-DERIVED VACCINES AND ANTIBODIES: POTENTIAL AND LIMITATIONS, Veyrier du Lac, France, 2004 March 21-24.
- Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan 11-13.
- Yatsuhashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan: National hospital report. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan 11-13.
- 李 天成、落合 晋、石古博昭、武田直和、宮村達男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、2003 年 10 月、京都

李 天成、落合 晋、永田典子、石古博昭、
武田直和、宮村達男。HEV Genotype IV
の構造蛋白の発現および抗原性の解析。日
本ウイルス学会、第 51 回学術集会、2003
年 10 月、京都

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称：バキュロウイルスベクター、該
バキュロウイルスベクターの製造方法及び該
バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導
入方法

発明者：松浦善治

出願人：大阪 TLO

発明機関：大阪大学微生物病研究所

出願番号：PCT/JP03/12275

出願日：平成 15 年 9 月 25 日

発明内容の概略：昆虫を宿主とするバキュ
ロウイルスは、約 130kbp の環状 2 本鎖 DNA
をゲノムとして持っている。近年、バキュロ
ウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳
動物細胞にも複製することなく、効率よく外
来遺伝子を導入できることが判明し、新しい
遺伝子導入ベクターとして、一躍注目を浴び
る事となった。しかしながら、バキュロウイ
ルスはその外被蛋白質 (gp64) が動物細胞に
普遍的に存在するリン脂質を認識して感染す
るため、遺伝子導入に特異性を持たせること
は困難であった。本発明はバキュロウイルス
の gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表
面に任意の蛋白質を自在に提示させること
によって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導
入することを可能にする新技術である。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

バキュロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの開発

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

昆虫ウイルスであるバキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンド分子を自在に提示できるシュードタイプウイルスの作製系を構築し、広範な動物細胞に、あるいは、標的細胞だけに遺伝子導入できるベクター系を構築した。また、バキュロウイルスが自然免疫を誘導できることを明らかにした。さらに、哺乳動物細胞内でのウイルス遺伝子の発現をバキュロウイルスゲノムマイクロアレイで網羅的に解析し、ウイルスベクターとしての安全性を確認した。

A. 研究目的

遺伝子治療は細胞医療や再生医療とともに、現行療法の限界を超える画期的な治療法として期待され、欧米を中心に活発な研究開発が行われている。外来遺伝子の導入方法としてはウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターがあるが、効率的にはウイルスベクターに勝るものはない。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが開発され、一部の遺伝子治療の臨床試験で使用されている。レトロウイルスは遺伝子を染色体内に導入する為、宿主遺伝子の挿入部位によっては細胞を癌化させる欠点が指摘されており、フランスでの臨床試験で白血病の発症が報告されている。アデノウイルスはほとんどのヒトが既に中和抗体を持っており、投与量が多くなる欠点が指摘されている。また、他のヒト病原ウイルスは弱毒化や無毒化が施されているとはいえ、安全性の問題が皆無とは言えない。さらに、現行のベクター技術では目的の遺伝子を目的の細胞にいかにして効率的よく導入するかという点に多くの問題点が残されている。このような問題点を克服するには新しいウイルスベクターの開発が必須である。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、

遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、バキュロウイルスによる哺乳動物細胞への遺伝子導入と宿主応答を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

バキュロウイルスの *in vivo* における遺伝子導入は、血液中の補体成分によってウイルスが不活化されるため、それをなんとか克服する必要がある。これまでに補体の活性化を阻害する蛇毒因子や可溶性補体レセプター因子を用いてウイルスの不活化を抑制したり、補体制御因子である DAF と融合させた組換え gp64 蛋白質を持ったバキュロウイルスの作製等が試みられているが、動物個体への遺伝子導入は満足の行くものではなかった。そこで、様々な動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を再検討すると共に、補体経路の活性化を抑制できる薬剤である FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl 4 guanidinobenzoate、フサン) の活性を評価した。さらに、組換えウイルスを用いてマウスへの遺伝子導入を試みた。

他のウイルス蛋白質を組み込むことによって広範な細胞に高率よく遺伝子導入できるバキュロウイルスの開発と平行して、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発を試みた。gp64 蛋白質は動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して侵入するため、この

ままでは遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで、バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示できるベクター系を構築した。

初代ラット培養細胞にバキュロウイルスを接種すると TNF- α , IL-1 α , IL-1 β の誘導が惹起されることが報告されており、さらに、バキュロウイルスの感染細胞のエンベロープ蛋白質画分をマウスの腹腔内に投与することによりインターフェロンの誘導が見られ、脳心筋炎ウイルスの致死感染からマウスが防御されることが報告されている。そこで、バキュロウイルスの自然免疫誘導活性を詳細に解析した。また、バキュロウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての安全性を評価するため、哺乳動物細胞にバキュロウイルスを感染させた際に転写されるウイルス由来 mRNA を全バキュロウイルス遺伝子をカバーするマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

(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。

C. 研究結果

(1) *In vivo* での遺伝子導入

様々な動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を調べてみたところ、マウス以外の非働化していない動物血清はバキュロウイルスを不活性化させたが、VSVG を被った組換えバキュロウイルスでは対照ウイルスに比べて血清成分に対して抵抗性を示した。また、補体経路の活性化を抑制できる薬剤である FUT-175 は、濃度依存的に血清成分による

バキュロウイルスの不活化を阻害したことから、組換えバキュロウイルスと FUT-175 のような薬剤との併用による方法により、動物個体への遺伝子導入も可能になるものと思われる。組換えウイルスを用いてマウスの脳組織および精巣のセルトリ細胞での外来遺伝子の発現が認められた。

(2) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発

バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、VSVG を被ったウイルスの遺伝子導入は、抗 gp64 抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。また、ウイルスのエンベロープ蛋白質だけでなく、逆にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけにチミジンキナーゼ等の自殺遺伝子を導入し、プロドラッグとの併用によって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。

(3) バキュロウイルスによる宿主応答

バキュロウイルスを 2 4 時間前に鼻腔内投与したマウスは、A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることが明らかとなった。これまで多くのウイルスエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導できることが報告されており、これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導することを支持するものであった。しかしながら、バキュロウイルスによる自然免疫の誘導はエンベロープ蛋白質よりも、細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) を介してシグナルを核に伝達していることが示唆された。免疫担当細胞においてはエンベロープ蛋白質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは、主に分解経路に輸送され、分解されたゲノム DNA が、細胞内に局在する TLR9 にシグナルを伝達しているものと思われる。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。バキュロウイルスを接種しても細胞傷害性が低いことは、バキュロウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての有利な特徴のひとつであると考えられる。

そこで、遺伝子治療用ベクターとしての安全性を評価するため、哺乳動物細胞にバキュロウイルスを感染させた際に転写される、バキュロウイルスゲノムを網羅的に解析した。バキュロウイルスを HepG2 細胞に接種したところ、150 個の全バキュロウイルス遺伝子のうち 3 種の遺伝子の発現が転写レベルで僅かに検出されるのみであった。この成績から、哺乳動物細胞においてはバキュロウイルス自身のゲノムの発現がほとんどなく、これが細胞傷害性が低いことの一因であると推測される。

D. 考察

バキュロウイルスが哺乳動物細胞に遺伝子を導入できることが明らかとなり、これまでに多くのグループによって効果的な利用法が検討されてきた。本研究により、自在にバキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンドだけを提示できる系が開発された。また、バキュロウイルスの鼻腔内接種によって、感染防御可能な自然免疫も誘導できることが明らかとなり、遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、呼吸器感染症に対するワクチンベクターとしても応用も期待できる。

E. 結論

バキュロウイルスの粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、in vivo で遺伝子導入可能なベクター、やターゲティング可能なベクター系を開発した。また、宿主応答を解析した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tani H., Limn C.-K., Yap C.-C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., and Matsuura Y. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.*, 77, 9799-9808 (2003).
- Abe T., Takahashi H., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., and Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J. Immunol.*, 171, 1133-1139 (2003).
- Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28g-dependent nuclear retention

and degradation of HCV core protein. *J. Virol.*, 77, 10237-10249 (2003).

Yamamoto H., Ihara M., Matsuura Y., and Kikuchi A. Sumoylation is involved in β -catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J.*, 22, 2047-2059 (2003).

Nishimura T., Fukata Y., Kato K., Yamaguchi T., Matsuura Y., Kamiguchi H., and Kaibuchi K. CRMP-2 regulates polarized Munb-mediated endocytosis for axon growth. *Nature Cell Biology*, 5, 819-826 (2003).

谷 英樹、阿部隆之、林 昌宏、望月理加、山岸潤也、北川善紀、渡辺理恵、宮本大伸、森石恆司、松浦善治、バキュロウイルスベクター、ウイルス、53, 185-193 (2003)

2. 学会発表

Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Induction of innate immune response in mouse by Baculovirus. 22nd Annual Meeting of American Society for Virology, Davis, USA, July 12-16, 2003.

Matsuura Y. Gene delivery by pseudotyped baculoviral vectors. Fourth International Virus Assembly Symposium. Sardegna, Italy, Sept. 20-24, 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称：バキュロウイルスベクター、該バキュロウイルスベクターの製造方法及び該バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

発明者：松浦善治

出願人：大阪 TLO

発明機関：大阪大学微生物病研究所

出願番号：PCT/JP03/12275

出願日：平成 15 年 9 月 25 日

発明内容の概略：昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、約 130kbp の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとして持っている。近年、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入できることが判明し、新しい遺伝子導入ベクターとして、一躍注目を浴びる事となった。しかしながら、バキュロウイルスはその外被蛋白質 (gp64) が動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して感染するため、遺伝子導入に特異性を持たせることは困難であった。本発明はバキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入

することを可能にする新技術である。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

E型肝炎ウイルス中空粒子を用いた経口ワクチンの開発

分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

研究要旨

組換えバキュロウイルスで発現した E 型肝炎ウイルス中空粒子をカククイザルに経口投与したところ、マウスの同様の抗体産生が誘導され、チャレンジに対する感染防御と発症阻止が観察された。そこで食べるウイルスワクチンの開発を目的として、E 型肝炎ウイルス構造蛋白を産生する形質転換ポテトを作製した。

協力研究者

李 天成：国立感染症研 主任研究官
網 康至：国立感染症研 主任研究官
須崎百合子：国立感染症研 主任研究官
Hugh S. Mason：アリゾナ大学 準教授

A. 研究目的

E型肝炎はE型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus；HEV）の感染によって引き起こされる急性肝炎である。E型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生している疾患であるが、ときとして飲料水などを介し大規模な流行を引き起こすことが知られている。先進国において、E型肝炎は輸入感染症と思われていたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されており、日本にでもすでに土着している可能性が高い。また、養豚からもヒトのHEVと遺伝学的に近縁のウイルスが検出され、人獣共通感染症の可能性が指摘されている。

我々は先に、組換えバキュロウイルスで構造蛋白を発現するとE型肝炎ウイルス様の中空粒子（Virus-like particles；VLP）が産生されることを見出した。また、マウスにこのVLPを経口投与することによってHEV特異抗体が誘導できるかを評価したところ、粘膜免疫のみならず全身的な免疫反応を誘導できることが明らかとなり、消化器粘膜を経由した食べるワクチンとして有効である可能性がでてきた。尚、VLP単独での免疫誘導能を評価するため、経口投与にはアジュバントは一切用いなかった。

本実験では、VLPの食用ワクチンとしての有効性を評価するための抗原を大量に準備することを目的として、構造蛋白を発現する形質転換植物を作製することを目的とした。

B. 研究方法

1) 組換え HEV VLP

HEVはエンベロープを持たない直径約30nmの小型の球形ウイルスである。ゲノムは約7.2kbのプラス一本鎖RNAで、5'末端にCapを、3'末端にポリアデニル酸をもつ。HEV感染カククイザルの胆汁からRNAを抽出し、RT-PCR法で構造蛋白領域をコードするORF2全領域を増幅した。ORF2のN末端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファクターpVL1393にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。ブラーククローニングで純化後、昆虫細胞Tn5細胞を感染させた。およそ7日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度1.285g/cm³、直径約23-24nmのウイルス様中空粒子（Virus-like particles, VLP）を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。

2) VLPを経口投与したカククイザルの免疫応答

HEVのORF2のN末端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントをpVL1393にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞Tn5細胞に感染させた。培養上清から、浮上密度1.285g/cm³、直径約23-24nmのウイルス様中空粒子が大量に得られた。7日目の培養上清を1000xgで遠心して、組換えバキュロウイルスを除き、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で純度の高い粒子を得た。カククイザルに精製したHEV VLPを経口投与し、マウス同様血中IgM、IgGおよび腸管IgAの産生をELISA法で測定した。

3) HEV構造蛋白を産生する形質転換植物の作製

組換えバキュロウイルスの作製に用いたアミノ末端111アミノ酸を欠失させたORF2（ΔN101）、およびアミノ末端のほかにカルボキ

シ末端52アミノ酸を欠失させたORF2(Δ N101 Δ C52)ををカセットベクター pIBT210のSma I 部位にクローン化した。さらにこのプラスミドからカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、タバコエッチウイルス 5'-UTR、目的とする遺伝子、及び3' Soybean vegetative storage protein を含む Hind III-Eco RI fragment を binary vector pGPTV-Kan にクローン化し、Disarmed Ti plasmid をもつアグロバクテリアを形質転換した。ポテトの若葉にこのアグロバクテリアを感染させ、定法にしたがって形質転換体を抗生物質で選択し、幼植物体を得た。発現効率の高い植物体を選択し形質転換ポテトを作製した。

4) 発現蛋白の解析

幼植物体の葉を採取し、プロテアーゼ阻害剤を含むPBS(-)を加えてダウンスホモジナイザーで破碎して10%ホモジネートを調製した。蛋白をSDS-PAGEで分離後、ニトロセルロース膜に転写した。常法に従ってウエスタンブロット法で発現蛋白を検出した。一次抗体にはHEV VLPをウサギに免疫して作製した高力価血清を用いた。また抗原ELISAでホモジネート中の発現蛋白を検出した。

C. 研究結果

1) HEV VLP を経口投与したカククイザルの免疫応答

マウスにおける至適量を基礎にマウスとカククイザルの体重比から一頭当たり10mgのVLPをミカン果実(2-3房)に注入し、予め絶食しておいたサル2頭に与えた。この方法でサルは確実に摂食することは確認済みである。初回免疫日を0日とし、これを確実にこなうために1日目に同量のVLPを再度経口投与した。その後14、28、42日に追加免疫を行なった。毎週採血と採便を行い、血中IgM、IgGおよび便中のIgA抗体をELISAで検出した。血中IgM抗体はマウスでみられたような顕著な上昇は観察されなかった。IgG抗体は2頭とも3週目には上昇し始めたが、抗体価はマウスに比べ低かった。80日を経過した時点で、腸管IgA抗体の検出はできなかったため、84日に追加免疫をおこなった。その結果、2頭とも程度の差はあるものの、血中IgG抗体の急激な上昇がみられた。そこでIgG抗体がピークに達した直後の100日目に10000MID50の感染性HEVでチャレンジを行い感染防御あるいは発症阻止の有無を観察した。抗体陰性対照として用いたサルでは2頭ともチャレンジ後、一週間目には血清

中にウイルス抗原が検出され、ウイルス血症を呈していた。抗原量は2週間目にピークに達し、4週間目には抗原が検出されなくなった。抗体陽性対照としてもちいた2頭では全くウイルス血症は起こらず再感染に対して抵抗性を示した。一方、VLPを経口投与した2頭では、抗体陽性対照同様、血中からは全くウイルス抗原が検出されずチャレンジに対して抵抗性を示した。

2) HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトの作製

アミノ末端111アミノ酸を欠失させた Δ N101、およびアミノ末端のほかにカルボキシ末端52アミノ酸を欠失させた Δ N101 Δ C52をバイナリーベクターにクローン化し、アグロバクテリアを形質転換した。ポテトの葉に感染後、形質転換体を抗生物質で選択し、幼植物体を得た。葉をすりつぶし、発現量を抗原ELISAで測定したところ、水溶性蛋白のおよそ0.33%が目的とするHEV構造蛋白であった。 Δ N110と Δ N101 Δ C52で発現量に差はみられなかった。 Δ N110で10、 Δ N101 Δ C52で6の形質転換植物を選択し、通常の温室で生育してポテトのtuber(塊茎)を回収した。ウエスタンブロットおよびELISAで発現量を測定したところ、5-30 ug/gの構造蛋白が発現していた。

D. 考察

以前にマウスを用いた実験から、HEV VLPは経口投与によって血中IgM抗体、IgG抗体のみならず、腹腔内注射では誘導できない腸管IgA抗体を誘導できること、したがって、腸管特異的な粘膜ワクチンとしての可能性があることを示した。本年度は同様な実験をHEVに対して感受性があるカククイザルで行なったところ、経口投与によってネイティブな感染性HEVのチャレンジに対して感染防御、もしくは発症を阻止できる抗体が産生されることが明らかになった。したがって、HEV VLPは「食べるワクチン」としての機能を有する分子である。今後、サルから定期的に採取した血清、糞便等を詳細に解析することによってこのVLPが誘導した抗体が感染防御に効果があるのか、あるいは発症阻止だけに効果があるのかを明らかにしたい。

HEV構造蛋白を産生する形質転換ポテトが得られた。マウスやサルに投与した抗原量をヒトに当てはめると、組換えバキュロの系でVLPを産生する限り極めて高価なワクチンになってしまう。形質転換植物はこの問題を解決するための手段の一つである。ポテト塊茎における

HEV 構造蛋白の発現量は以前に行なわれたノロウイルス構造蛋白のそれと同等である。ノロウイルスではボランティアによる実験で、粘膜アジュバントを用いてはいるが、形質転換ポテトでノロウイルスに対する特異的抗体を誘導することに成功している。ノロウイルスの場合は形質転換ポテト塊茎で全てではないが、発現蛋白は VLP の形態をとっている。したがって、HEV の場合も VLP としてポテト塊茎内で発現している場合には「食べるワクチン」としての可能性が一層高まる。今後、発現蛋白を詳細に解析する必要がある。

E. 結論

組換えバキュロウイルスで発現した HEV VLP を用い腸管免疫誘導能をカニクイザルで試験した結果、マウス同様の免疫反応が誘導されることが明らかになった。HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトが得られた

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.*, 27, 1-5 (2003).

Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, RSata T, Nakamura S, Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infec. Dis.*, 56, 8-11 (2003).

Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatol. Res.*, 27, 169-173 (2003).

Shrestha S, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J. Med. Virol.*, 69, 207-214 (2003).

2. 学会発表

Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. PLANT-DERIVED VACCINES AND ANTIBODIES: POTENTIAL AND LIMITATIONS, Veyrier du Lac, France, 2004 March 21-24.

Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis

E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan 11-13.

Yatsuhashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan : National hospital report. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan11-13.

李 天成、落合 晋、石古博昭、武田直和、宮村達男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、2003 年 10 月、京都

李 天成、落合 晋、永田典子、石古博昭、武田直和、宮村達男。HEV Genotype IV の構造蛋白の発現および抗原性の解析。日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、2003 年 10 月、京都

G. 知的所有権の取得状況

特許申請：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--------------|---|---------------------|-----|-------------|------|
| Tani H. | In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. | J. of Virol. | 77 | 9799-9808 | 2003 |
| Abe T. | Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza | J. of Immunol. | 171 | 1133-1139 | 2003 |
| Moriishi K. | PA28 ₂ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. | J. of Virol. | 77 | 10237-10249 | 2003 |
| Yamamoto H. | Sumoylation is involved in 7-catenin-dependent activation of Tcf-4. | EMBO J. | 22 | 2047-2059 | 2003 |
| Nishimura T. | CRMP-2 regulates polarized Munb-mediated endocytosis for axon growth. | Nature Cell Biology | 5 | 819-826 | 2003 |
| Hirano M. | Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. recombinant adenovirus. | Hepatol. Res. | 27 | 1~5 | 2003 |
| Hirano M. | Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: Evidence of widespread | Jpn. J. Infec. Dis. | 56 | 8~11 | 2003 |
| Ding X. | Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. | Hepatol. Res. | 27 | 169-173 | 2003 |
| Shrestha S. | Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. | J. Med. Virol., | 69 | 207-214 | 2003 |
| 谷 英樹 | バキュロウイルスベクター、 | ウイルス | 53 | 185-193 | 2003 |

20030358

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