

別紙2

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	
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. HCV のヒト型中和抗体の作製と感染成熟機構の解析	6
松浦 善治・森石 恆司	
2. 高度弱毒化ワクチニアウイルス D1s 株を用いたC型肝炎組換えワクチンの研究	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

## 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** HCVの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中和活性を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、肝機能の改善傾向が認められたが、ウイルスを排除することは出来なかった。HCVのシュードタイプウイルスの感染に、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。また、HCVコア蛋白質のSPPによるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域を同定し、さらに、小胞体から遊離したコア蛋白質が核内でPA28 $\gamma$ 依存的に分解されることを明らかにした。高度弱毒化ワクチニアウイルスDIs株に外来遺伝子を組み込む手法を確立し、HCV蛋白質領域を組み込んだ組換えウイルスを作成した。これらの組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させたところ、各目的蛋白の強い発現が確認された。また、これらのウイルスをマウスに投与したところHCV蛋白質に対する抗体価の上昇が見られ、目的蛋白に対する液性免疫を誘導できていることが確認された。

### 分担研究者

森石恒司 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

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。

### 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抗HCVエンベロープヒト型抗体の*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思われる。一方、HCVコア蛋白質はウイルス粒子を構成するだけでなく、宿主細胞の機能を多様に調節して、脂肪肝や肝細胞癌の発症にも深く関与している。コア蛋白質は小胞体に局在し、C末端の疎水性領域が解裂されると核へ移行して分解される。我々はこれまでに、コア蛋白質がプロテアソームアクチベーターの一つである、PA28 $\gamma$ と特異的に結合することにより、核内で分解されることを報告している。しかしながら、HCVコア蛋白質のプロセッシング機構に関しては不明な点が多い。そこで、コア蛋白質の成熟機構を詳細に解析し、プロセスされたコア蛋白質の細胞内局在と、その安定性を解析する。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

### B. 研究方法

#### 1) ヒト型抗体のHCV持続感染チンパンジーでの活性評価

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、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(NOB)活性を保持した抗E2ヒト型モノクローナル抗体を得た。また、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを用いて、HCVエンベロープ蛋白質による膜融合を中和できる抗E1/E2ヒト型モノクローナル抗体を作製した。これらのヒト型抗体を大量に培養し精製後、安全性を確認し、HCVに持続感染しているチンパンジーの静脈内にInfusion pumpを用いて投与した。抗体投与後のウイルス価、肝機能、抗体の動態、抗ヒト抗体の有無について検討した。

#### 2) HCVのエントリーリセプターの解析

これまでの成績から、ヒト肝癌由来のHepG2細胞表面にHCVシュードタイプウイルスの感染を許容する何らかの蛋白質性のエントリーリセプター分子が存在することが推測される。そこで、HepG2細胞からリセプター分子の発現クローニングを進める。

#### 3) HCVコア蛋白質の成熟機構の解析

HCVのコア蛋白質は、前駆体蛋白質からシグナルペプチダーゼ(SP)により切り出され、さらにそのC末端膜貫通領域が切断されて、成熟型のコア蛋白質にプロセスされると考えられてい

る。最近、蛋白質のシグナル配列がSPによって切断された後、そのシグナルペプチドをさらに小胞体の膜内で切断する膜内蛋白質分解酵素、シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) の存在が明らかにされた。HCV コア蛋白質のC末端膜貫通領域の切断にもSPPが関与しているものと考えられており、SPPとHCV コア蛋白質の相互作用とSPPによるコア蛋白質のC末端膜貫通領域のプロセスに必須な領域を解析した。また、コア蛋白質と結合する宿主因子として、プロテアソーム調節蛋白質PA28 $\gamma$ を単離したが、哺乳動物細胞内での局在の一致ならびに正常な発現レベルでの相互作用を検証する。

4) ワクチン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、目的蛋白質の発現の確認を行った。また、これらの組換えDIsの液性及び細胞性誘導能の検討を行った。液性免疫は組換えバキュロウイルスを用いて発現させたHCV蛋白質を抗原としてELISA法により、細胞性免疫は、ウイルスが発現するHCVの蛋白質に対応するoverlapping peptidesを用いてマウス脾臓細胞を刺激し、ELISPOT assayによるIFN- $\gamma$ 分泌細胞数の測定及びMTT assayによる細胞増殖能を測定した。

#### (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する。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

抗E2ヒト型抗体を3mg/kgと10mg/kg投与したHCV持続感染チンパンジーの抗ウイルス活性ならびに肝炎改善に有意な差は認められなかった。抗体投与により一過性にウイルス価の減少

が認められたが、1週間後には元に戻る傾向が全例に認められ、4頭中2例に於いて、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、膜融合を中和する抗E1および抗E2抗体を大量に培養・精製し、同様にHCV持続感染チンパンジーに投与したところ、一過性にウイルス価の減少が認められた。

#### 2) HCVのエントリーリセプターの解析

HCVシュードタイプウイルス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た。このことは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た。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、ヒト血清がシュードタイプウイルスの感染性を特異的に増強することが示された。

#### 3) HCV コア蛋白質の成熟機構の解析

ヒト肝臓よりSPP遺伝子をクローニングし、活性中心を失活させた変異体(SPPD219A)を作製した。また、エピトープタグを付加したHCVコア蛋白質とその変異体を準備した。これらを培養細胞に発現させ、イムノブロット法と免疫沈降法により、コア蛋白質のプロセッシングならびに両者の相互作用を解析した。また、コア蛋白質とE1蛋白質をシスに発現させ、E1蛋白質の糖鎖付加の有無によって、コア蛋白質C末端膜貫通領域のシグナル活性を評価した。培養細胞にSPPとHCVコア蛋白質を発現させたところ、SPPとコア蛋白質は共沈し、さらに、SPPD219Aはコア蛋白質のプロセッシングを抑制したことから、コア蛋白質はSPPと結合してプロセスを受けることを確認した。コア蛋白質の変異体を用いた解析から、SPPの切断に必須な領域は既報の成績と異なっており、コア蛋白質のC末端膜貫通領域のみならず、その上流の少なくとも3つのアミノ酸が重要であることが示された。また、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。さらに、SPPでプロセスされないコア蛋白質の変異体でも、E1蛋白質のシグナル活性を保持していたことから、SPPによるプロセスとシグナル活性に必須な領域は異なることが示された。HCVコア蛋白質は前駆蛋白質として発現された後、上述のごとくSPPによって切断され、成熟蛋白質として小胞体に留まり、一部は核へ移行する。HCVコア蛋白質の宿主内標的蛋白質候補としてプロテアソームの活性化蛋白質であるPA28 $\gamma$ を同

定し、PA28 $\gamma$  が HCV コア蛋白質の安定性と細胞内局在を調節していることを明らかにした。

4) DIIs 株に HCV の 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 DIIs を作成し、それぞれの組換え DIIs を哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が発現されることを確認した。core-E1-E2 領域を発現する組換え DIIs をマウスに投与した場合、core、E2 いずれの蛋白に対する抗体も検出され、NS3、NS5A を発現するウイルスでもそれぞれに対する抗体が検出されたことから、組換え DIIs の投与により目的の組換え蛋白に対する液性免疫を誘導できることが確認された。また、いずれの組換え DIIs を投与した場合も、ELISPOT assay 及び MTT assay により目的蛋白に対する細胞性免疫が誘導されることを確認することができた。

#### D. 考察

NOB 活性を持った抗 E2 ヒト型モノクローナル抗体、および、細胞融合阻止活性を持った抗 E1 および抗 E2 ヒト抗体の 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ことは出来なかった。いずれのヒト型抗体もシュードタイプウイルスの感染を中和出来なかったことから、シュードタイプウイルスの感染を中和できるヒト型抗体の作製が必要と思われる。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は充分考えられる。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。

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 コア蛋白質の SPP によるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域が同定された。また、小胞体から遊離したコア蛋白質は核内で PA28 $\gamma$  依存的に分解されることが示された。また、組換え DIIs をマウスに投与することにより、HCV 蛋白に対する液性及び細胞性免疫を誘導することができるという結果が得られた。弱毒化ワクチニアウイルスは、親株

のワクチニアウイルスと異なりヒト生体内で増殖しないため、安全な組換えワクチンとして有望であると考えられている。今後は、DNA や BCG ベクターとの組み合わせによる prime-boost 系の検討を行い、最良の組み合わせを選択して霊長類での免疫誘導能を調べる予定である。

#### E. 結論

- 1) HCV の抗 E1 および E2 ヒト型モノクローナル抗体の中和活性を 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 週間後には元のウイルス力価に戻った。肝機能の改善傾向が認められた。
- 2) HCV の感染に硫酸多糖類、成長因子ならびにヒト血清成分の関与が示唆された。
- 3) コア蛋白質の成熟・分解機構を解析した。
- 4) HCV 蛋白を発現する組換え DIIs の取得に成功した。この組換えウイルスをマウスに投与したところ、液性及び細胞性免疫の誘導が確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Moriishi K, and Matsuura Y. Mechanism of hepatitis C virus infection. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 14, 285-297 (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. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J. Virol.*, 77, 10237-10249 (2003).

Uno-Furuta S., Matsuo K., Tamaki S., Takamura S., Kamei A., Kuromatsu I., Kaito M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 21, 3149-3156 (2003).

Watanabe H., Saito T., Shinzawa H., Okumoto K., Hattori E., Adachi T., Takeda T., Sugahara K., Ito JI., Saito K., Togashi H., Suzuki R., Hayashi M., Miyamura T., Matsuura Y., and Kawata S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A

- population-based cohort study. *J. Med. Virol.*, 71, 56-61 (2003).
- Aizaki H., Nagamori S., Matsuda M., Kawakami H., Hashimoto O., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*, 314, 16-25 (2003).
- Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Hepatitis C Virus Core Protein Activates ERK and p38 MAPK in Cooperation with Ethanol in Transgenic Mice. *Hepatology*, 34, 820-828 (2003).
- Sacco R., Tsutsumi T., Suzuki R., Otsuka M., Aizaki H., Sakamoto S., Matsuda M., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through upregulation of inhibitor of caspase-activated Dnase. *Virology*, 317, 24-35 (2003).
- Yamamoto H., Ihara M., Matsuura Y., and Kikuchi A. Sumoylation is involved in  $\beta$ -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).
- 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).
- 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).
2. 学会発表
- Nishimura Y., Moriishi K., and Matsuura Y. Interaction of HCV NSSA protein with amphiphysin 2. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society for Virology, Davis, USA, July 12-16, 2003.
- Mori Y., Okabayashi T., Moriishi K., and Matsuura Y. Nuclear Localization of Flavivirus core proteins. 同上
- Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. 同上
- Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Induction of innate immune response in mouse by Baculovirus. 同上
- Matsuura Y. Gene delivery by pseudotyped baculoviral vectors. Fourth International Virus Assembly Symposium. Sardegna, Italy, Sept. 20-24, 2003.
- Okamoto K., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. 10th International Meeting on HCV and Related Viruses, Kyoto, Japan, December 2-6, 2003.
- Mori Y., Moriishi K., and Matsuura Y. Characterization of JEV mutant lacking NLS of core protein. 同上
- Nishimura Y., Okamoto T., Moriishi K., and Matsuura Y. Interaction of amphiphysin II with HCV NS5A protein. 同上
- Moriishi K., Moriya K., Koike K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. 同上
- Murakami K., Inoue Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Suzuki T., and Miyamura T. Dynamics of HCV Replication in the Three-dimensional Radial Flow Bioreactor System. 同上
- Machida S., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Akatsuka T., and Miyamura T. HCV Core Protein Preferentially Down-regulates CD48 Expression on Human B Cells. 同上
- 谷 英樹、林 昌宏、葉 真珠、大西正剛、野崎正美、西宗義武、岡橋暢夫、北川善紀、宮本大伸、渡辺理恵、望月理加、森石恆司、松浦善治：バキュロウイルスベクターによる *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、平成 15 年 10 月 27-29 日
- 岡本貴世子、森石恆司、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシング、同上
- 森石恆司、岡本貴世子、望月理加、鈴木亮介、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟・分解の分子機構 同上

西村順裕、岡本 徹、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 amphiphysin II splicing variants. 同  
上

森 嘉生、岡林環樹、森石恆司、趙 子江、  
脇田隆宇、保井孝太郎、長谷部 太、只野  
昌之、小西英二、松浦善治：コア蛋白質の  
核移行シグナルを変異させた日本脳炎ウイ  
ルスの生物学的性状 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：C型肝炎ウイルス Core  
蛋白質による B 細胞表面分子の発現変化 同  
上

村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、井上 寧、  
小俣和彦、Su Su Hmwe、相崎英樹、鈴木哲  
朗、宮村達男：三次元培養肝細胞を用いた  
感染 HCV クロンの経時的変化の解析 同  
上。

石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、吉崎佐矢香  
り、鈴木哲朗、赤塚俊隆、宮村達男：高度  
弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株のウイル  
スベクターとしての応用 同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

## HCV のヒト型中和抗体の作製と感染成熟機構の解析

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中和活性を 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、肝機能の改善傾向が認められたが、ウイルスを排除することは出来なかった。HCV のシュードタイプウイルスの感染に、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。また、HCV コア蛋白質の SPP によるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域を同定し、さらに、小胞体から遊離したコア蛋白質が核内で PA28 $\gamma$  依存的に分解されることを明らかにした。

### 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 感染と肝癌発症の関連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抗 HCV エンベロープヒト型抗体の *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思われる。一方、HCV コア蛋白質はウイルス粒子を構成するだけでなく、宿主細胞の機能を多様に調節して、脂肪肝や肝細胞癌の発症にも深く関与している。コア蛋白質は小胞体に局在し、C 末端の疎水性領域が解裂されると核へ移行して分解される。我々はこれまでに、コア蛋白質がプロテアソームアクチベーターの一つである、PA28 $\gamma$  と特異的に結合することにより、核内で分解されることを報告している。しかしながら、HCV コア蛋白質のプロセッシング機構に関しては不明な点が多い。そこで、コア蛋白質の成熟機構を詳細に解析し、プロセスされたコア蛋白質の細胞内局在と、その安定性を解析する。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) ヒト型抗体の HCV 持続感染チンパンジーでの活性評価

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、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 (NOB) 活性を保持した抗 E2 ヒト型モノクローナル抗体を得た。また、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを用いて、HCV エンベロープ蛋白質による膜融合を中和できる抗 E1/E2 ヒト型モノクローナル抗体を作製した。これらのヒト型抗体を大量に培養し精製後、安全性を確認し、HCV に持続感染しているチンパンジーの静脈内に Infusion pump を用いて投与した。抗体投与後のウイルス価、肝機能、抗体の動態、抗ヒト抗体の有無について検討した。

#### 2) HCV のエントリーリセプターの解析

これまでの成績から、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞表面に HCV シュードタイプウイルスの感染を許容する何らかの蛋白質性のエントリーリセプター分子が存在することが推測される。そこで、HepG2 細胞からリセプター分子の発現クローニングを進める。

#### 3) HCV コア蛋白質の成熟機構の解析

HCV のコア蛋白質は、前駆体蛋白質からシグナルペプチダーゼ (SP) により切り出され、さらにその C 末端膜貫通領域が切断されて、成熟型のコア蛋白質にプロセスされると考えられている。最近、蛋白質のシグナル配列が SP によって切断された後、そのシグナルペプチドをさらに小胞体の膜内で切断する膜内蛋白質分解酵素、シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) の存在が明らかにされた。HCV コア蛋白質の C 末端膜貫通領域の切断にも SPP が関与しているものと考えられており、SPP と HCV コア蛋白質の相互作用と SPP によるコア蛋白質の C 末端膜貫通領域のプロ



セスに必須な領域を解析した。また、コア蛋白質と結合する宿主因子として、プロテアソーム調節蛋白質 PA28 $\gamma$  を単離したが、哺乳動物細胞内での局在の一致ならびに正常な発現レベルでの相互作用を検証する。

#### (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する。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での抗ウイルス活性の評価

抗 E2 ヒト型抗体を 3mg/kg と 10mg/kg 投与した HCV 持続感染チンパンジーの抗ウイルス活性ならびに肝炎改善に有意な差は認められなかった。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が、1週間後には元に戻る傾向が全例に認められ、4頭中2例に於いて、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、膜融合を中和する抗 E1 および抗 E2 抗体を大量に培養・精製し、同様に HCV 持続感染チンパンジーに投与したところ、一過性にウイルス価の減少が認められた。

#### 2) HCV の エントリーレセプターの解析

HCV シュードタイプウイルス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た。このことは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た。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、ヒト血清がシュードタイプウイルスの感染性を特異的に増強することが示された。

#### 3) HCV コア蛋白質の成熟機構の解析

ヒト肝臓より SPP 遺伝子をクローニングし、活性中心を失活させた変異体 (SPPD219A) を作製した。また、エピトープタグを付加した HCV コア蛋白質とその変異体を準備した。これらを培養細胞に発現させ、イムノプロット法と免疫沈降法により、コア蛋白質のプロセッシングならびに両者の相互作用を解析した。また、コア蛋白質と E1 蛋白質をシスに発現させ、E1 蛋白質の糖鎖付加の有無によって、コア蛋白質 C 末端膜貫通領域のシグナル活性を評価した。培養細胞に SPP と HCV コア蛋白質を発現させたところ、SPP とコア蛋白質は共沈し、さらに、SPPD219A はコア蛋白質のプロセッシングを抑制したことから、コア蛋白質は SPP と結合してプロセスを受けることを確認した。コア蛋白質の変異体を用いた解析から、SPP の切断に必須な領域は既報の成綴と異なっており、コア蛋白質の C 末端膜貫通領域のみならず、その上流の少なくとも3つのアミノ酸が重要であることが示された。また、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。さらに、SPP でプロセスされないコア蛋白質の変異体でも、E1 蛋白質のシグナル活性を保持していたことから、SPP によるプロセスとシグナル活性に必須な領域は異なることが示された。HCV コア蛋白質は前駆蛋白質として発現された後、上述のごとく SPP によって切断され、成熟蛋白質として小胞体に留まり、一部は核へ移行する。HCV コア蛋白質の宿主内標的蛋白質候補としてプロテアソームの活性化蛋白質である PA28 $\gamma$  を同定し、PA28 $\gamma$  が HCV コア蛋白質の安定性と細胞内局在を調節していることを明らかにした。

### D. 考察

NOB 活性を持った抗 E2 ヒト型モノクローナル抗体、および、細胞融合阻止活性を持った抗 E1 および抗 E2 ヒト抗体の 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ことは出来なかった。いずれのヒト型抗体もシュードタイプウイルスの感染を中和出来なかったことから、シュードタイプウイルスの感染を中和できるヒト型抗体の作製が必要と思われる。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は充分考えられる。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。

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 コア蛋白質の SPP によるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域が同定された。また、小胞体から遊離したコア蛋白質は核内で PA28 $\gamma$  依存的に分解されることが示された。

#### E. 結論

- 1) HCV の抗 E1 および E2 ヒト型モノクローナル抗体の中和活性を 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 週間後には元のウイルス力価に戻った。肝機能の改善傾向が認められた。
- 2) HCV の感染に硫酸多糖類、成長因子ならびにヒト血清成分の関与が示唆された。
- 3) コア蛋白質の成熟・分解機構を解析した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Moriishi K, and Matsuura Y. Mechanism of hepatitis C virus infection. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 14, 285-297 (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. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J. Virol.*, 77, 10237-10249 (2003).

Uno-Furuta S., Matsuo K., Tamaki S., Takamura S., Kamei A., Kuromatsu I., Kaito M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 21, 3149-3156 (2003).

Watanabe H., Saito T., Shinzawa H., Okumoto

K., Hattori E., Adachi T., Takeda T., Sugahara K., Ito JI., Saito K., Togashi H., Suzuki R., Hayashi M., Miyamura T., Matsuura Y., and Kawata S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J. Med. Virol.*, 71, 56-61 (2003).

Aizaki H., Nagamori S., Matsuda M., Kawakami H., Hashimoto O., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*, 314, 16-25 (2003).

Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Hepatitis C Virus Core Protein Activates ERK and p38 MAPK in Cooperation with Ethanol in Transgenic Mice. *Hepatology*, 34, 820-828 (2003).

Sacco R., Tsutsumi T., Suzuki R., Otsuka M., Aizaki H., Sakamoto S., Matsuda M., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through upregulation of inhibitor of caspase-activated Dnase. *Virology*, 317, 24-35 (2003).

Yamamoto H., Ihara M., Matsuura Y., and Kikuchi A. Sumoylation is involved in  $\beta$ -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).

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).

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).

## 2. 学会発表

Nishimura Y., Moriishi K., and Matsuura Y., Interaction of HCV NS5A protein with amphiphysin 2. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society for Virology, Davis, USA, July 12-16, 2003.

Mori Y., Okabayashi T., Moriishi K., and Matsuura Y., Nuclear Localization of Flavivirus core proteins. 同上

Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura, T., and Matsuura Y. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. 同上

Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Induction of innate immune response in mouse by Baculovirus. 同上

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

Okamoto K., Moriishi K., and Matsuura Y., Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. 10th International Meeting on HCV and Related Viruses, Kyoto, Japan, December 2-6, 2003.

Mori Y., Moriishi K., and Matsuura Y., Characterization of JEV mutant lacking NLS of core protein. 同上

Nishimura Y., Okamoto T., Moriishi K., and Matsuura Y. Interaction of amphiphysin II with HCV NS5A protein. 同上

Moriishi K., Moriya K., Koike K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and

Matsuura Y. PA28 $\gamma$ -dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. 同上

谷 英樹、林 昌宏、葉 真珠、大西正剛、野崎正美、西宗義武、岡橋暢夫、北川善紀、宮本大伸、渡辺理恵、望月理加、森石恆司、松浦善治：バキュロウイルスベクターによる *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、平成 15 年 10 月 27-29 日

岡本貴世子、森石恆司、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシング、同上

森石恆司、岡本貴世子、望月理加、鈴木亮介、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟・分解の分子機構 同上

西村順裕、岡本 徹、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 amphiphysin II splicing variants. 同上

森 嘉生、岡林環樹、森石恆司、趙 子江、脇田隆宇、保井孝太郎、長谷部 太、只野昌之、小西英二、松浦善治：コア蛋白質の核移行シグナルを変異させた日本脳炎ウイルスの生物学的性状 同上

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

## 高度弱毒化ワクチニアウイルス DI<sub>s</sub> 株を用いた C型肝炎組換えワクチンの研究

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** 国立予研において 1960 年代に開発された高度弱毒化ワクチニアウイルス DI<sub>s</sub> 株は、種痘後脳炎などの重篤な副作用回避の目的で樹立された弱毒株で、親株である DI 株（ワクチン株）とは異なり、孵化鶏卵やニワトリ胎児繊維芽細胞では増殖するが、他のほとんどの哺乳類細胞には感染はするが細胞内で増殖しないというユニークな性質を示す。我々はこの株に外来遺伝子を組み込む手法を確立し、HCV 蛋白領域を組み込んだ組換えウイルスを作成した。これらの組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させたところ、各目的蛋白の強い発現が確認された。また、これらのウイルスをマウスに投与したところ HCV 蛋白に対する抗体価の上昇が見られ、目的蛋白に対する液性免疫を誘導できていることが確認された。

### A. 研究目的

高度に弱毒化されたワクチニアウイルスである DI<sub>s</sub> 株は、ニワトリ胎児初代培養細胞でのみ増殖し、ヒト細胞などの哺乳類細胞では感染は成立するが細胞内ではほとんど増殖しないことが知られている。ワクチニアウイルスを用いた組換え生ワクチンは、特にその強力な細胞性免疫誘導能から、HCV 感染細胞を生体から効果的に排除することができると考えられ、C型肝炎に対する効果的な生ワクチンとなる可能性を持つと考えられる。本研究では、弱毒ワクチニア DI<sub>s</sub> に HCV 遺伝子を組み込み、生ワクチンとしての可能性を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

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クターを作成し、homologous recombination の手法を用いて DI<sub>s</sub> 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 DI<sub>s</sub> の液性及び細胞性誘導能の検討を行った。液性免疫は組換えバキュロウイルスを用いて発現させた HCV 蛋白を抗原として ELISA 法により、細胞性免疫は、ウイルスが発現する HCV の蛋白に対応する overlapping peptides を用いてマウス脾臓細胞を刺激し、ELISPOT assay による IFN- $\gamma$  分泌細胞数の測定及び MTT assay による細胞増殖能を測定した。

### C. 研究結果

DI<sub>s</sub> 株に HCV の 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 DI<sub>s</sub> を作成し、それぞれの組換え DI<sub>s</sub> を哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が発現されることを確

認した。core-E1-E2 領域を発現する組換え DI<sub>s</sub> をマウスに投与した場合、core、E2 いずれの蛋白に対する抗体も検出され、NS3、NS5A を発現するウイルスでもそれぞれに対する抗体が検出されたことから、組換え DI<sub>s</sub> の投与により目的の組換え蛋白に対する液性免疫を誘導できることが確認された。また、いずれの組換え DI<sub>s</sub> を投与した場合も、ELISPOT assay 及び MTT assay により目的蛋白に対する細胞性免疫が誘導されることを確認することができた。

### D. 考察

本研究により、組換えウイルスをマウスに投与することにより、HCV 蛋白に対する液性及び細胞性免疫を誘導することができるという結果が得られた。弱毒化ワクチニアウイルスは、親株のワクチニアウイルスと異なりヒト生体内で増殖しないため、安全な組換えワクチンとして有望であると考えられている。今後は、DNA や BCG ベクターとの組み合わせによる prime-boost 系の検討を行い、最良の組み合わせを選択して霊長類での免疫誘導能を調べる予定である。また、GBV-B は HCV とよく似た遺伝子構造を持つフラビウイルスで、タマリンなど小型霊長類に感染して慢性肝炎を発症させることから、ヒトでの HCV 感染による病態を実験動物でモニターできるモデル系になり得ると考えられている。そのため、GBV-B 遺伝子を組み込んだ組換え DI<sub>s</sub> をタマリンに投与し、GBV-B ウイルスのチャレンジから防御できるかについて検討し、組換え DI<sub>s</sub> の C型肝炎治療用のワクチンとしての応用を検討したい。

### E. 結論

HCV 蛋白を発現する組換え DI<sub>s</sub> の取得に成功した。

この組換えウイルスをマウスに投与したところ、液性及び細胞性免疫の誘導が確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsuo K., Minamitani M., Kitamura T., Izumi Y., Ami Y., Someya K., Hamano T., Ohsu T., Ishii K., Kato K., Ueda Y., Miyamura T., Yamazaki S., Yamamoto N. and Honda M. A recombinant vaccine based on the replication-deficient vaccinia strain DIs and expressing HIV clade B *gag* induces high levels of CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice and monkeys. *Journal of Immunology*, in press.

##### 2. 学会発表

Murakami K., Inoue Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Suzuki T., and Miyamura T. Dynamics of HCV Replication in the Three-dimensional Radial Flow Bioreactor

System. 10th International Meeting on HCV and Related Viruses, December, 2003, Kyoto, Japan.

Machida S., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Akatsuka T., and Miyamura T. HCV Core Protein Preferentially Down-regulates CD48 Expression on Human B Cells. 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：C型肝炎ウイルス Core 蛋白によるB細胞表面分子の発現変化 第51回日本ウイルス学会、平成15年10月、京都。

村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、井上 寧、小俣和彦、Su Su Hmwe、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男：三次元培養肝細胞を用いた感染HCVクローンの経時的変化の解析 同上。

石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、赤塚俊隆、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株のウイルスベクターとしての応用 同上。

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moriishi K., and Matsuura Y.	Mechanism of hepatitis C virus infection.	Antiviral Chemistry and Chemotherapy	14	285-297	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.	PA28γ-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein.	J. Virol.	77	10237-10249	2003
Uno-Furuta S., Matsuo K., Tamaki S., Takamura S., Kamei A., Kuromatsu I., Kaito M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y.	Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice.	Vaccine	21	3149-3156	2003
Watanabe H., Saito T., Shinzawa H., Okumoto K., Hattori E., Adachi T., Takeda T., Sugahara K., Ito JI., Saito K., Togashi H., Suzuki R., Hayashi M., Miyamura T., Matsuura Y., and Kawata S.	Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study.	J. Med. Virol.	71	56-61	2003
Aizaki H., Nagamori S., Matsuda M., Kawakami H., Hashimoto O., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T.	Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor.	Virology	314	16-25	2003

Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T.	Hepatitis C Virus Core Protein Activates ERK and p38 MAPK in Cooperation with Ethanol in Transgenic Mice.	Hepatology	34	820- 828	2003
Sacco R., Tsutsumi T., Suzuki R., Otsuka M., Aizaki H., Sakamoto S., Matsuda M., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T.	Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through upregulation of inhibitor of caspase-activated Dnase.	Virology	317	24-35	2003
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
Yamamoto H., Ihara M., Matsuura Y., and Kikuchi A.	Sumoylation is involved in $\beta$ - catenin-dependent activation of Tef-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

20031133

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。