

## 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

研究要旨： HCV のエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(VSV-pp)や、昆虫細胞で作製した HCV 様粒子(HCV-LP)を用いて HCV 感染に重要な宿主因子を探索した。VSV-pp は HepG2 細胞に特異的に感染し、HCV-LP の添加により濃度依存的に感染が阻害された。また、ヒト繊維芽細胞成長因子(hFGF)が VSV-pp の感染を特異的に阻害し、その受容体である hFGFR を恒常的に発現する CHO 細胞が HCV-LP や患者血清中の HCV と特異的に結合、および HCV-pp の感染を許容した。各種ウイルス蛋白を発現する高度弱毒化ワクチニアウイルスをマウスに投与したところ、目的蛋白に対する抗体価の上昇、細胞性免疫の誘導が見られた。Cyclosporine A と類似化合物の抗 HCV 作用をスクリーニングするため、NFAT 阻害活性を評価するアッセイ系を構築し 47 個のヒット化合物を得た。それらの化合物の抗 HCV 活性を HCV レプリコンの系で評価したが、抗 HCV 活性を示す化合物はなかった。

### 分担研究者名

- (1) 大阪大学微生物病研究所 森石恆司
- (2) 国立感染症研究所 鈴木哲朗
- (3) 三菱ウェルファーマ株式会社 伊丹清馬

### A. 研究目的

輸血による感染症の最も大きな原因の一つである C 型肝炎ウイルス(HCV)は、その遺伝子構造の解析からベスティウイルスやフラビウイルスに近縁なプラス鎖 RNA ウイルスであることが明らかにされている。高感度な HCV 抗体アッセイ系の導入により、先進国では輸血による HCV 感染は激減した。しかしながら、本邦だけでも 200 万人以上、全世界では 2 億人もの HCV キャリアーが既に存在するものと推定されており、感染予防ばかりでなく既感染者の発症予防やウイルスの排除法の確立が強く望まれている。HCV 感染の最も深刻な問題点は、惹起される肝炎の多くが慢性化し、その大部分は持続感染したまま肝硬変、肝癌へ移行する点である。しかしながら、効率のよい HCV の *in vitro* での複製系や細胞培養系が存在しないため、HCV による肝炎及び肝癌発症機構の解析はあまり進んでいない。さらに、HCV の感染過程の知見も極めて乏しく、リセプターに関する研究もあまり進んでいない。本研究事業では、HCV の感染複製過程を解析し、その成績を基にした抗ウイルス剤や治療用ワクチンの開発を目的とする。

### B. 研究方法

(1) キメラのエンベロープ蛋白質を被った VSV-pp だけでなく、レトロウイルスで報告されたように、authentic な HCV エンベロープ蛋白質を被った VSV-pp の作製を試みた。さらに、組換えバキュロウイルスを用いて作製した HCV-LP、および、ウインドウ期の患者血清中の HCV 粒子の各種細胞への感染および結合をリポーター遺伝子の発現、定量 ELISA、ならびに定量 PCR で解析した。

(2) HCV 及び GBV-B の構造領域、2つの非構造領域(NS3、NS5A)をコードする遺伝子、SARS-CoV の各構造蛋白遺伝子を、高度弱毒化ワクチニアウイルス DI<sub>s</sub> 株へ外来遺伝子を挿入するためのトランスファーベクターに組み込み、DI<sub>s</sub> を感染させたニワトリ胎児繊維芽細胞 (CEF) 中で相同組換えを起こさせることにより各種組換えウイルスを取得した。これらの組換え DI<sub>s</sub> を哺乳類細胞に感染させ、目的蛋白の発現を確認した後、純化したウイルスをマウスに皮下あるいは経鼻投与し、目的蛋白に対する液性、細胞性及び粘膜免疫誘導能の検討を行った。SARS-CoV ではマウス血清のウイルス中和能を調べた。また、前もってこれらの組換え DI<sub>s</sub> で免疫したマウスへの SARS-CoV 感染実験を行い、組換えウイルス接種により感染防御効果があるかどうかを検討した。

(3) Cyclosporine A の抗 HCV 活性に関する作用点は T 細胞活性化後 NFAT が活性化されるまでの細胞内シグナル伝達の一部に関与する因子であると推定される。そこで、まず T 細胞刺激条件下で NFAT を阻害する物質をスクリーニングし、その中から抗 HCV 活性を有する化合物のスクリーニングを行った。

### (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、保存する。

### C. 研究結果

(1) VSV-pp は HepG2 細胞に特異的に感染し、HCV-LP の添加により濃度依存的に感染が阻害された。また、 $\alpha$ パリンが VSV-pp の感染を阻害することから、 $\alpha$ パリンとの結合が活性発現に重要な各種成長因子による VSV-pp

の感染阻止活性を調べたところ、hFGF、特にhFGF2とhFGF7がVSV-ppの感染を特異的に阻害した。また、その可溶性型の受容体の中で、hFGFR4とhFGFR5がVSV-ppの感染を特異的に阻害し、HCV-LPやC型肝炎患者血清中のHCV粒子とも結合した。また、セファロースに固着化したhFGFR4とhFGFR5はHCV-LPのみならず、ウインドウ期血清中のHCVを特異的に沈降した。さらに、hFGFR4あるいはhFGFR5を恒常的に発現するCHO細胞はHCV-LPや患者血清中のHCVと特異的に結合した。特にhFGFR5を発現するCHO細胞株はVSV-ppの感染を許容できるようになり、siRNAによってhFGFR5をHepG2細胞からノックダウンさせると感受性の低下が観察されたことから、hFGFR5がVSV-ppの侵入受容体である可能性が示唆された。一方、HepG2細胞から、siRNAによってhFGFR4をノックダウンさせても、VSV-ppに対する感受性の低下は観察されなかった。

(2) HCVの構造蛋白質領域を発現する組換えDIIsをマウスに接種した場合、Core、E2いずれの蛋白質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質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により目的蛋白質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。GBV-Bの蛋白質を発現する組換えDIIsでも、マウスに接種した場合HCVと同様の結果が得られた。SARS-CoVの構造蛋白質の全部または一部を発現する合計9種の組換えDIIsを作製し、哺乳類細胞に感染させると目的蛋白質が効率よく発現されることを確認した。これらの組換えDIIsをマウスに皮下接種したところ、目的のSARS-CoV構造蛋白質に対する液性、細胞性免疫がともに誘導されることを確認した。また、スパイク蛋白質Sを発現する組換えDIIsを接種されたマウスの血清中には、SARS-CoVのVero E6細胞への感染を阻害する活性が存在した。一方、組換えDIIsを鼻腔から接種した場合、鼻腔洗浄液中に目的蛋白質に対するIgA抗体が誘導された。また、SARS-CoV構造蛋白質のうち、E/M/SまたはE/M/M/Sを発現するDIIsを接種されたマウスでは、SARS-CoVを経鼻感染させた3日後の肺洗浄液中からSARS-CoVは検出されず、同組換えDIIsの接種により強いワクチン効果があることが実証された。

(3) NFATレポーターアッセイにより、75%以上阻害活性を有する化合物を取得し、さらにそれらの化合物について細胞増殖抑制作用を解析し、細胞生存率が75%以上である化合物47検体を得た。それらの化合物は構造活性相関を評価した結果、8つのグループに分けられた。47化合物についてすべてsubgenomic replicon細胞を用いて抗HCV活性を評価したが、抗HCV活性を有する化合物を取得することはできなかった。

#### D. 考察

(1) hFGFR4とhFGFR5がHCVの新しい受容体候補分子であることが示唆された。

(2) DIIsは約40年前に副作用のない種痘の候補としてヒトへの投与実験も行われており、安全性の高さはすでに確認されている。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。今後は、GBV-B遺伝子を組み込んだ組換えDIIs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DIIs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。

(3)今回調べたすべての化合物が、抗HCV活性を有さなかったことから、NFAT阻害作用は抗HCV活性と関連がないと考えられる。またT細胞活性化シグナル内におけるcyclosporine Aの作用点も抗HCV活性とは関連性がないものと推定された。

#### E. 結論

- 1) hFGFR4はHCVの結合受容体候補分子である。
- 2) hFGFR5はHCVの侵入受容体候補分子である。
- 3) 組換えDIIsは効率よく、液性、細胞性及び粘膜免疫を誘導できるベクターであることが示された。
- 4) Cyclosporine A類似化合物のNFAT阻害作用と抗HCV活性は関連がないことが示された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  1. Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380 (2004).
  2. Kaimori A., Kanto T., Limn C-K., Komoda Y., Oki C., Inoue M., Miyatake H., Itoe I., Sakakibara M., Yakushiji T., Takehara T., Matsuura Y., and Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324, 74-83 (2004).
  3. Migliaccio C.T., Follis K.E., Matsuura Y., and Nunberg J.H. Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 105, 47-57 (2004).
2. 学会発表
  1. Matsuo E., Limn C.K., Komoda Y., Kitagawa Y., Miyamoto H., Yagi S., Moriishi K., and Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 2-7, 2004.
  2. Limn C.K., Komoda Y., Suzuki K., Otsubaki T., Tani H., Matsuo E., Tsuda Y., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Human fibroblast growth factor receptor 4 is a novel binding receptor for HCV. 同上
  3. Okamoto T., Kimura-Someya T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytropic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 同上
  4. Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 同上
  5. 松尾栄子、林昌宏、菰田泰正、森石恆司1、八木慎太郎、松浦善治: ヒト肝癌由来細胞で作製したHCV様粒子の性状、第52回日本ウイルス学会総会、横浜、平成16年11月21-23日

6. 林 昌宏、菰田泰正、鈴木健介、谷 英樹、大椿朋子、松尾栄子、津田祥美、森石恆司、宮村達男、松浦善治：HCV 感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の役割、同上
7. 谷 英樹、Michael A. Whitt、森石恆司、松浦善治：HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV の作製、同上
8. 森 嘉生、脇田隆宇、小西英二、山下哲生、森石恆司、松浦善治：コア蛋白質が核に移行しない変異日本脳炎ウイルスの性状、同上
9. 阿部隆之、森石恆司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治：バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、同上
10. 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文、C 型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発、同上
11. 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆、HCV envelope E1 (signal

peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導 同上

12. 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男、高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の SARS 生ワクチンとしての応用、同上

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

##### 特許出願

- 1) 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DIs 株。・2004 年 8 月 23 日出願
- 2) 2004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願