

200500726A

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

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能な
C型肝炎ウイルス株を利用したワクチン開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 脇田 隆字

平成18(2006)年 3月

目次

I. 総括研究報告

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を 利用したワクチン開発	1
脇田 隆宇	

II. 分担研究報告

1. HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、 ワクチン免疫	12
脇田 隆宇	

2. ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリクターによる ウイルス粒子産生細胞の培養	19
石井 孝司	

3. ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発	24
曽根 三郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	31
-----------------	----

I. 総括研究報告

総括研究報告書

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を利用したワクチン開発

主任研究者（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 副参事研究員 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。我々が分離した JFH-1 株により初めて HCV のウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子発生系やウイルス様中空粒子発生系によるワクチン開発を試みる。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

分担研究者 石井 孝司

国立感染症研究所

主任研究官

分担研究者 曾根 三郎

東レ株式会社医薬研究所

主任研究員

染増殖できなかったためである。Lohmannらが Con1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかった。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

そこで本研究では、JFH-1株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1株によるリコンビナントウイルス粒子発生系によるワクチン開発を試みる。これは世界で初めてのnative HCV粒子を用いたワクチン開発である。

JFH-1株による実験系は、VSVやレトロウイルスのシュードタイプウイルスと異なり、HCVのnativeなウイルス粒子を用いる。さらにJFH-1株の構造遺伝子領域を他のウイルス株と組み換え

A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCVのワクチン開発が望まれている。

これまでにHCVのワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感

ることにより、他のウイルス株の構造蛋白をもつ感染性キメラウイルス粒子の産生が可能である。JFH-1株およびキメラウイルス粒子によりウイルス感染中和アッセイ系を樹立する。このシステムにより様々なHCV株による交差中和活性を検討することができる。また、これまでに開発されたHCV遺伝子を挿入した組み換えウイルス（組み換えワクチニア、組み換えアデノなど）やDNAワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

さらに本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域をほ乳細胞で発現させると、培養液中にウイルス様中空ウイルス粒子を分泌する。ウイルス様中空粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

培養細胞におけるウイルス感染系

感染性のウイルス粒子を作成できる実験系を用いてウイルス培養系の樹立を目指した。全長の合成ウイルスRNAを培養細胞中に導入してウイルス粒子を回収した。培養液を濃縮して感染用ウイルス液とした。HCV RNA コピー数、HCV コア蛋白量、および感染力価を測定した。感染価は Huh7 細胞にウイルス液の段階希釈液を感染させて、感染細胞数と感染スポット数を免疫染色により定量した。

感染中和活性測定系

Luciferase 遺伝子をレポーターにもつレプリコンを作製した。このレポーターウイルス感染系に HCV 感染系に感染中和活性を持つと考えられる材料を添加して感染効率の変化を観察した。さらにウイルス感染系の実験で確立したウイルス感染力価測定系を用いて同様に中和活性を定量的に測定した。

JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

JFH-1 株の構造遺伝子領域を PCR 法により増幅し、ワクチニアウイルストランスファーベクターに挿入した。高度弱毒ワクチニアウイルス DI_s 株が唯一増殖できる細胞株であるニワトリ胎児線維芽細胞に、構築したトランスファーベクターを導入し、その後 DI_s 株を導入細胞に感染させて細胞内で homologous recombination をおこさせた。選択し、取得した組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。本ウイルスをヒト肝臓由来細胞株である Huh7 に感染させ、培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、Huh7 細胞に導入し、HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、培養上清中の HCV 構造蛋白を調べた。

インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

Huh7 細胞に IRF-3 ドミナントネガティブ発現ベクターを導入し、ハイグロマイシン耐性クローンを選択した。樹立したドミナントネガティブ型 IRF-3 発現 Huh7 細胞株の IFN- β および IFN- γ の反応性はそれぞれ、pISRE-Luc および pGAS-Luc をレポーター遺伝子として使用して解析した。

突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

4X10⁵個の Huh7 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM (以下、D-MEM+10F と略す) にて培養し、フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR-191 を含む D-MEM+10F に置換後、2 時間培養した。細胞を洗浄後、D-MEM+10F にて培養を続けた。その後細胞を 1 個/well となるように 96well プレートに播種し、独立した 70 個のクローンを得た。

ICR191 にて処理して得られたクローンに HCV レプリコン RNA を導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの

遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。動物実験は各施設の取り扱い規約を遵守して、実験計画を提出して承認を得た後に実施される。

また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究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、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. HCV のウイルス感染実験系

JFH-1 の全長 RNA を導入した細胞から分泌されたウイルス粒子は Huh7 細胞に感染性があった。その感染効率を向上させるために感染の標的細胞に Huh7 細胞の亜細胞群を用いた。Huh7.5.1 細胞および米国スクリプス研究所から導入された Huh7 細胞 (Huh7S) を用いた。両細胞株共に当研究室由来の Huh7 細胞よりもはるかに感染効率が良いことが判明した。ウイルス感染細胞を継代培養することが可能で、ほぼ 100% 感染した状態で 1 ヶ月以上細胞を維持することが可能であった。

Huh7.5.1 細胞あるいは Huh7S 細胞を用いてウイルス感染力価の測定が可能となった。顕微鏡

下に infectious focus を計測して、感染力価を定量化した。培養上清中のウイルス粒子は4度あるいは-70度において一定の期間安定であることが判明した。

培養上清中の HCV をチンパンジーに感染させた。チンパンジーに対する感染力価を同定するために最大希釈（1万倍希釈液）から段階的に濃いウイルス液を接種したところ、1000倍希釈のウイルス液接種により、一過性のウイルス血症を発症したが、肝炎は発症しなかった。また、持続感染化はなく、抗体反応も検出できなかった。これは JFH-1 株の病原性の問題やあるいは感染時のウイルス量の問題があると考えられた。

また、最近開発されたヒト肝細胞を移植したキメラマウスに培養上清中の JFH-1 ウイルスを感染させたところ感染が成立した。マウス血清中のウイルスタイターは 10^4 - 10^5 copies/ml 程度であった。このマウスに感染したウイルスの遺伝子配列などについて解析を進めている。

2. 感染中和活性測定系

レポーターウイルスによる中和実験で HCV に持続感染している患者血清中に感染中和活性が存在することを確認した。遺伝子型 1 および 2 の血清がともに遺伝子型 2a のウイルスである JFH-1 株のウイルス感染を中和することが判明した。さらに感染力価測定系を用いて、抗 E2 モノクローナル抗体に感染中和活性があることを証明できた。

3. JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

組換え DIs を哺乳動物細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。発現した構造蛋白が粒子様構造を形成している可能性が示唆された。

4. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

JFH-1 株の構造領域遺伝子を pEF4 の EF プロモーターの下流に挿入し、genotype 1b の subgenomic replicon を持つ Huh7 細胞に導入した。subgenomic replicon を持つ HCV の粒子様構造物が形成されている可能性が示唆された。

4. インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

IFN 遺伝子転写誘導誘導に関与する IRF-3 を不活化するために、恒常的にドミナントネガティブ型 IRF-3 を発現する細胞株を作製した。

ドミナントネガティブ型 IRF-3 恒常発現細胞では HCV レプリコンの複製が持続し、複製能の向上が示唆された。これらのクローンの中には IFN- β に対する反応性の変化が認められた。

5. 突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR191 にて処理した細胞からクローン化した細胞に HCV レプリコン RNA を導入し、その複製能をルシフェラーゼ活性で検出した。その結果、親株と比較して、複製能が 4~6 倍高いクローンを得た。

D. 考察

HCVのワクチン開発が進んでこなかった理由はHCVのウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。本研究はこの実験系を用いてHCVワクチン開発を目的としている。研究班としての1年目の17年度は基礎的研究が中心となった。

まずウイルス感染実験系を実用的なものとするための研究が行われた。ウイルス側の因子として、キメラウイルスを用いることによりより培養上清に分泌されやすいタイプのウイルスを見いだすことができた。さらに細胞側の因子として、cured細胞などを用いることにより、感染感受性の非常に高い細胞を見いだすことができた。このキメラウイルスと培養細胞を用いることによって、ウイルスの培養系がほぼ完全に樹立できた。このウイルス培養系はHCVのウイルス学的解析に十分耐えうるものであり、これまでのHCV研究とは異なる次元の研究が可能となった。

さらに、感染中和活性を測定するための実験系として感染効率のあまり高くなかった、実験開始当初はレポーター遺伝子を利用することにより、より感染効率を感度良く測定することに成功した。このレポーターウイルス感染実験系で慢性肝炎患者血清中に感染中和抗体が存在することを明らかにできた。さらに、より感染感受性の高い培養細胞を利用して、感染 focus を算定することにより感染力価を正確に定量できるようになった。この感染力価測定法を用いて、HCVのエンベロープ蛋白 E2 に対するモノクロー

ナル抗体が感染中和活性を持つことを証明できた。この実験結果によってHCVの感染を中和できる抗体の存在が証明できた。ワクチン開発において重要な所見と考えられる。

また、本研究では、HCVの subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしないHCVの virus-like particles の作成を最終的な目標としている。HCVの構造蛋白を供給する方法として、組換えウイルスを用いる方法と薬剤耐性プラスミドを用いる方法の2つを検討したが、いずれの場合も構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認された。また、この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心で native な HCV 粒子と類似の比重の画分に集積していることが見出された。また、同じ画分から subgenomic replicon RNA も検出された。このことから、いずれの方法で構造蛋白を供給した場合も発現蛋白は HCV 粒子様構造を取っていることが示唆され、また、ウイルス様粒子中には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。この推定構造が正しければ、感受性細胞に一過性に感染し、細胞内で増殖しないウイルス様粒子である可能性が高く、目的とする粒子が取得できたことになる。今後は、粒子様構造を正しく取っているかどうかのさらに詳細な解析を行い、証明できれば感染性を有するかどうかの検討を行う。本粒子は感染性は有するが増殖せず、HCV 蛋白をすべて感染細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチンとして用いることができると考えられる。また、構造蛋白や replicon RNA に変異を入れ、粒子形成に重要な部分の解析を行う

ことも検討している。

ウイルス感染後、IFN- α/β 遺伝子が発現する経路には RIG-I をはじめ IRF-3 などの分子が関与していることが明らかになっている。我々はインターフェロンシステムに着目し、細胞培養系での HCV レプリコン複製能を向上させる方法について検討した。

IFN- α/β 遺伝子転写誘導誘導に関与する IRF-3 の活性をドミナントネガティブ型の IRF-3 で抑制することにより、HCV レプリコンの複製を向上させることができた。興味深いことに、IRF-3 の機能阻害によるレプリコン複製能の向上は、一時的に複製活性が高くなることではなく、HCV レプリコン RNA の導入後、72 時間経過しても、複製活性が維持されることであることが示唆された。最近 Sumpter らにより、HCV 産生能が高い Huh7 細胞のクローンである Huh7.5 には IFN- α/β 遺伝子転写誘導誘導経路の IRF-3 の上流に位置する RIG-I の変異があることが報告されていることから、IFN- α/β 遺伝子転写誘導誘導経路の阻害は HCV レプリコン複製能を向上させるための条件の一つと考えることができる。

また、HCV レプリコン複製能が高いクローンは、IFN 応答性が高い傾向にあり、今後 IFN シグナル伝達系である Jak-Stat 経路を負に制御する SOCS 1 の HCV レプリコン複製能に及ぼす作用について検討する必要がある。

一方、フレームシフト型突然変異剤 ICR191 で処理した細胞から、親株より HCV レプリコンの複製能が 4~6 倍向上したクローンが得られた。このクローンを詳細に解析することにより、HCV レプリコン複製能に関与する新たな分

子の発見につながる可能性があるとし唆される。以上の結果は、HCV レプリコン複製能に焦点を当てた解析である。今後、本研究で得られた HCV レプリコン複製能の高いクローンを用いて、HCV 粒子の産生について検討していく必要がある。

E. 結論

今年度の研究により JFH-1 株による実験系がウイルス培養系として確立できた。感染力価を定量的に測定することにより感染中和活性を持つ抗体の存在を証明できた。ワクチン開発に重要な結果と考えられた。さらに、HCV レプリコン細胞に HCV の構造蛋白をトランスに供給することにより、HCV 様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。本ウイルス様粒子は、推定通りの構造を取っていれば一過性に感染するのみで増殖能のない HCV-like particle であり、HCV の粒子形成や細胞への吸着、侵入過程の解析に好適であり、また優れたワクチン候補であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of Virology*, 2006. in press.
- 2) N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 2006. in press.

- 3) Y Rouillé, F Helle, D Delgrange, P Roingeard, C Voisset, E Blanchard, S Belouzard, J McKeating, A Patel, G Maertens, T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 2006. 80. 2832-41.
- 4) Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2310-5, 2006.
- 5) M Miyamoto, T Kato, T Date, M Mizokami, T Wakita. Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon. *Intervirology*, 49:37-43, 2006.
- 6) T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84
- 7) Cai Z, Zhang C, Chang K-Y, Jiang J, Ahn B-C, Wakita T, Liang, JT, Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 79: 13963-13973, 2005.
- 8) J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9299.
- 9) T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-796.
- 10) Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, Wakita T. Characterisation of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol*. 2005, 86:2209-20.
- 11) 脇田隆字 培養細胞で効率よく複製するC型肝炎ウイルス株 *BIO Clinica*、2006, 21(4)366-371
- 12) 脇田隆字 HCVレプリコン 肝臓、2005, 46(12)691-702
- 13) 加藤孝宣、脇田隆字 C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立 *ウイルス*、2005, 55(2)287-296
- 14) 脇田隆字 HCV粒子形成システム 肝疾患レビュー、2006, in press
- 15) 脇田隆字 感染性C型肝炎ウイルス粒子の培養細胞における作製 *医学のあゆみ*、2005, 215(11)920-1
- 16) 脇田隆字 宿主の新たな抗ウイルス活性によるB型肝炎ウイルス複製の抑制 *Hepatoday*、2005, (9)6-7
- 17) 脇田隆字 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) 由来の RNA レプリコン *バイオテクノロジージャーナル*、2005, 5(3)300-2
- 18) Ishii K, Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T., and Tsunetsugu-

Yokota Y. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* in press.

19) Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* in press.

20) Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)

21) Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* in press. (2006)

22) Ohnishi K., Sakaguchi M., Kaji T., Akagawa K., Taniyama T., Kasai M., Tsunetsugu-okota Y., Ohshima M., Yamamoto K., Takasuka N., Hashimoto S., Ato M., Fujii H., Takahashi Y., Morikawa S., Ishii K., Sata T., Takagi H., Itamura S., Odagiri T., Miyamura T., Kurane I., Tashiro M., Kurata T., Yoshikura H. and Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal

antibodies. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 58: 88-94 (2005)

23) 石井孝司、李 天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用。感染・炎症・免疫 印刷中 (2006)

2. 学会発表

1) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染複製系の開発、第41回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション「ウイルス肝炎治療戦略の今後の展望」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)

2) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、武田嘉恵、関根裕子、田坂めぐみ、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCVレプリコンシステムを用いた多種細胞株でのウイルス増殖動態の解析、第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ6「ウイルス性肝炎の最近の進歩」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)

3) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、関根裕子、柿沼晴、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCV repliconを用いたウイルス増殖動態の多種細胞株での検討、第9回日本肝臓学会大会、神戸 (2005, 10.5)

4) 森川賢一、趙子江、田邊純一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス粒子のHuh7細胞への感染におけるheparin様分子の関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)

5) 田邊純一、森川賢一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、培養細胞から分泌されたC型肝炎ウイルス粒子の生化学的特徴化、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横

浜 (2005, 11.20)

6) T. Wakita. Lessons learned from in vitro cultivation of hepatitis C. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver CO, USA (2006, 2.6).

7) T Date, J Tanabe, T Kato, M Miyamoto, I. Wakita. A full-length hepatitis C virus replicon infectious for cultured cells. IUMS 2005. 7.25, San Francisco CA, USA

8) K Morikawa, Z Zhao, J Tanabe, T Date, M Miyamoto, A Murayama, T. Wakita. Binding of hepatitis C virus to glycosaminoglycan does not cause productive infection. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

9) J Tanabe, K Morikawa, T Date, M Miyamoto, A Murayama, S. Sone, T. Wakita. Purification and biological characterization of JFH-1 HCV particles produced in tissue culture, 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

10) J Zhong, G Cheng, P Gastaminza, T. Wakita, F Chisari. Acute cytopathic and persistent noncytopathic HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

11) S Kapadia, T. Wakita, F Chisari. Differential regulation of HCV genotype 1b and 2a RNA replication by the cholesterol and fatty acid biosynthetic pathways. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

12) T Kato, T. Wakita, T Heller, S Saito, T

Matsumura, R Sapp, K Murthy, J Liang. Production of infectious hepatitis C virus in cell culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

13) P Gastaminza, S Kapadia, M Wood, I. Wakita, F Chisari. Morphological aspects of HCV infection in vitro. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

14) S Uprichard, F Chisari, T. Wakita. Replication of hepatitis C virus genotype 2a replicons in mouse cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

15) G Cheng, J Zhong, J Bukh, R Purcell, I. Wakita, F Chisari. HuH-7 and HuH-7.5.1 cells produce hepatitis C virus after transfection by the JFH-1 molecular clone but not by H77c or J4L6S. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

16) Pietschmann T, Kaul A, Koutsoundakis G, Kallis S, Steinmann E, Kato T, Negro F, Fong S, Wakita T, Bartenschlager R. Chimeric Hepatitis C Virus Infectious in Cell Culture., 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

17) M Joyce, K Walters, T Pietschmann, LF Zhu, TJ Gao, N Kneteman, M Katze, T. Wakita, R Bartenschlager, L Tyrrell. Infection of the SCID/BG alb-UPA transgenic human chimeric mouse with both full-length positive strand RNA

from hepatitis C virus, and virus derived from tissue culture. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

18) G Cheng, J Zhong, T Wakita, F Chisari. Inhibition of HCV infection by structural region synthetic peptides. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

19) G Luo, Z Cai, C Zhang, K-S Chang, J Jiang, B-C Ahn, T Wakita, TJ Liang. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005

20) Ishii K., Iijima S., Kimura N., Iwata N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B is a pleiotropic virus *in vivo*. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal Canada, October 2-6, 2005.

21) Murakami K., Ishihara Y., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Tanaka K., Kohara M., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Miyamura T. and Suzuki T. Thermoreversible gelation polymer-based three-dimensional culture system to produce HCV particles from cells harboring the genome-length dicistronic RNA. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal Canada, October 2-6, 2005.

22) Ishii K., Yokota Y., Takemori T., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F. and Miyamura T. Highly

attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Xth International Nidovirus Symposium, Colorado Springs, USA, June 25-30. 2005.

23) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 5 3 回日本ウイルス学会、平成 1 7 年 1 1 月、横浜。

24) 石井孝司、飯島沙幸、山口健次郎、榎 昇、八木慎太郎、森 健一、吉崎佐矢香、李 永仲、木村展之、揚山直英、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：タマリンを用いた C 型肝炎のサロゲートモデル：tissue tropism に関する解析、第 5 3 回日本ウイルス学会、平成 1 7 年 1 1 月、横浜。

25) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、小原道法、勝二郁夫、佐多徹太郎、宮村達男、鈴木哲朗：三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成とその応用、第 5 3 回日本ウイルス学会、平成 1 7 年 1 1 月、横浜。

26) 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、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、揚山直英、寺尾恵治、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：サル類を用いた C 型肝炎の新規感染病態モデルの樹立、第 1 4 0 回日本獣医学会、平成 1 7 年 1 0 月、鹿児島

27) 石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え

SARS ワクチンとしての検討、第 9 回日本ワクチン学会、平成 17 年 10 月、大阪。

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

- 1) 2005-300350・石井孝司他 4 名・新規 RNA 結合ペプチド・2005 年 9 月 6 日出願
- 2) 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 DI_s 株。・2004 年 8 月 23 日出願、同海外出願
- 3) 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 DI_s 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

II. 分担研究報告

分担研究報告書

HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、 ワクチン免疫

主任研究者（財）東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 副参事研究員 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。我々が分離した JFH-1 株により初めて HCV のウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子産生系やウイルス様中空粒子産生系によるワクチン開発を試みる。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

A. 研究目的

未だに多くの C型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV 感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCV のワクチン開発が望まれている。

これまでに HCV のワクチン開発が進まなかった大きな理由の 1 つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったためである。Lohmann らが Con1 株の HCV レプリコンを開発して以来、培養細胞で HCV 複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1 株の HCV 全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかった。一方、我々が劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株は、これまでの HCV 株と比較して培養細胞における複

製能力が非常に高く、この JFH-1 株の合成全長 RNA を培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

そこで本研究では、JFH-1 株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1 株によるリコンビナントウイルス粒子産生系によるワクチン開発を試みる。これは世界で初めての native HCV 粒子を用いたワクチン開発である。

JFH-1 株による実験系は、VSV やレトロウイルスのシュードタイプウイルスと異なり、HCV の native なウイルス粒子を用いる。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域を他のウイルス株と組み換えることにより、他のウイルス株の構造蛋白をもつ感染性キメラウイルス粒子の産生が可能である。JFH-1 株およびキメラウイルス粒子によりウイルス感染中和アッセイ系を樹立する。このシステムにより様々な HCV 株による交差中和活性を検討することができる。また、これまでに開発された HCV 遺伝子を挿入した組み換えウイルス（

組み換えワクチニア、組み換えアデノなど)やDNAワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

さらに本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域をほ乳細胞で発現させると、培養液中にウイルス様中空ウイルス粒子を分泌する。ウイルス様中空粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

培養細胞におけるウイルス感染系

感染性のウイルス粒子を作成できる実験系を用いてウイルス培養系の樹立を目指した。全長の合成ウイルスRNAを培養細胞中に導入してウイルス粒子を回収した。培養液を濃縮して感染用ウイルス液とした。HCV RNA コピー数、HCV コア蛋白量、および感染力価を測定した。感染価は Huh7 細胞にウイルス液の段階希釈液を感染させて、感染細胞数と感染スポット数を免疫染色により定量した。

感染中和活性測定系

Luciferase 遺伝子をレポーターにもつレプリコンを作製した。このレポーターウイルス感染系に HCV 感染系に感染中和活性を持つと考えられる材料を添加して感染効率の変化を観察した。さらにウイルス感染系の実験で確立したウイルス感染力価測定系を用いて同様に中和活性を定量的に測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物(感染性のウイルスを含む)に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。動物実験は共同研究先で行われ、東京都神経科学総合研究所では実施しない。動物実験は各施設の取り扱い規約を遵守して、実験計画を提出して承認を得た後に実施された。

C. 研究結果

1. HCV のウイルス感染実験系

昨年度の研究において、JFH-1 の全長 RNA を導入した細胞からウイルス粒子が分泌されることを確認した。また、そのウイルス粒子は Huh7 細胞に感染性があった。しかし、その感染効率は低く、全細胞の約 0.5%に感染を確認できた。感染効率を向上させるために感染の標的細胞に Huh7 細胞の亜細胞群を用いた。レプリコン細胞からインターフェロンで Cure された Huh7.5.1 細胞および米国スクリプス研究所から導入された Huh7 細胞(Huh7S)を用いた。両細胞株共に当研究室由来の Huh7 細胞よりもはるかに感染効率が良いことが判明した。ウイルス感染後 1 週間

から2週間でほぼ100%の細胞が感染した。さらにウイルス感染細胞を継代培養することが可能で、ほぼ100%感染した状態で1ヶ月以上細胞を維持することが可能であった。

Huh7.5.1細胞あるいはHuh7S細胞を用いてウイルス感染力価の測定が可能となった。段階希釈したウイルス液を96ウェルプレートに撒いた細胞に感染させて72時間後に固定し、HCVの抗原染色を行う。顕微鏡下にinfectious focusを計測して、感染力価を定量化した。培養上清中のウイルス粒子は4度あるいは70度において一定の期間安定であることが判明した。

培養上清中のHCVをチンパンジーに感染させた。チンパンジーに対する感染力価を同定するために最大希釈(1万倍希釈液)から段階的に濃いウイルス液を接種したところ、1000倍希釈のウイルス液接種により、一過性のウイルス血症を発症したが、肝炎は発症しなかった。また、持続感染化はなく、抗体反応も検出できなかった。これはJFH-1株の病原性の問題やあるいは感染時のウイルス量の問題があると考えられた。

また、最近開発されたヒト肝細胞を移植したキメラマウスに培養上清中のJFH-1ウイルスを感染させたところ感染が成立した。マウス血清中のウイルスタイターは 10^4 - 10^5 copies/ml程度であった。このマウスに感染したウイルスの遺伝子配列などについて解析を進めている。

2. 感染中和活性測定系

レポーターウイルスによる中和実験でHCVに持続感染している患者血清中に感染中和活性が存在することを確認した。遺伝子型1および

2の血清がともに遺伝子型2aのウイルスであるJFH-1株のウイルス感染を中和することが判明した。さらに感染力価測定系を用いて、抗E2モノクローナル抗体に感染中和活性があることを証明できた。

D. 考察

HCVのワクチン開発が進んでこなかった理由はHCVのウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。

まずウイルス感染実験系を実用的なものとするための研究が行われた。ウイルス側の因子として、キメラウイルスを用いることによりより培養上清に分泌されやすいタイプのウイルスを見いだすことができた。さらに細胞側の因子として、cured細胞などを用いることにより、感染感受性の非常に高い細胞を見いだすことができた。このキメラウイルスと培養細胞を用いることによって、ウイルスの培養系がほぼ完全に樹立できた。このウイルス培養系はHCVのウイルス学的解析に十分耐えうるものであり、これまでのHCV研究とは異なる次元の研究が可能となった。

さらに、感染中和活性を測定するための実験系として感染効率のあまり高くなかった、実験開始当初はレポーター遺伝子を利用することにより、より感染効率を感度良く測定することに成功した。このレポーターウイルス感染実験系で慢性肝炎患者血清中に感染中和抗体が存在することを明らかにできた。さらに、より感染感受性の高い培養細胞を利用して、感染focusを算定することにより感染力価を正確に定量でき

るようになった。この感染力価測定法を用いて、HCVのエンベロープ蛋白E2に対するモノクローナル抗体が感染中和活性を持つことを証明できた。この実験結果によってHCVの感染を中和できる抗体の存在が証明できた。ワクチン開発において重要な所見と考えられる。

E. 結論

今年度の研究により JFH-1 株による実験系がウイルス培養系として確立できた。感染力価を定量的に測定することにより感染中和活性を持つ抗体の存在を証明できた。ワクチン開発に重要な結果と考えられた

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of Virology*, 2006. in press.
- 2) N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 2006. in press.
- 3) Y Rouillé, F Helle, D Delgrange, P Roingeard, C Voisset, E Blanchard, S Belouzard, J McKeating, A Patel, G Maertens, T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 2006. 80. 2832-41.
- 4) Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2310-5, 2006.
- 5) M Miyamoto, T Kato, T Date, M Mizokami, I Wakita. Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon. *Intervirology*, 49:37-43, 2006.
- 6) T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84
- 7) Cai Z, Zhang C, Chang K-Y, Jiang J, Ahn B-C, Wakita T, Liang, JT, Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 79: 13963-13973, 2005.
- 8) J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, I Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9299.
- 9) T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-796.
- 10) Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, Wakita T. Characterisation of the E-138

(Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol.* 2005, 86:2209-20.

- 11) 脇田隆宇 培養細胞で効率よく複製するC型肝炎ウイルス株 *BIO Clinica*、2006, 21(4)366-371
- 12) 脇田隆宇 HCVレプリコン 肝臓、2005, 46(12)691-702
- 13) 加藤孝宣、脇田隆宇 C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立 *ウイルス*、2005, 55(2)287-296
- 14) 脇田隆宇 HCV粒子形成システム 肝疾患レビュー、2006, in press
- 15) 脇田隆宇 感染性C型肝炎ウイルス粒子の培養細胞における複製 *医学のあゆみ*、2005, 215(11)920-1
- 16) 脇田隆宇 宿主の新たな抗ウイルス活性によるB型肝炎ウイルス複製の抑制 *Hepatoday*、2005, (9)6-7
- 17) 脇田隆宇 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) 由来の RNA レプリコン *バイオテクノロジージャーナル*、2005, 5(3)300-2

2. 学会発表

- 1) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染複製系の開発、第41回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション「ウイルス肝炎治療戦略の今後の展望」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)
- 2) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、武田嘉恵、関根裕子、田坂めぐみ、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCVレプリコンシステム

を用いた多種細胞株でのウイルス増殖動態の解析、第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ6「ウイルス性肝炎の最近の進歩」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)

- 3) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、関根裕子、柿沼晴、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCV repliconを用いたウイルス増殖動態の多種細胞株での検討、第9回日本肝臓学会大会、神戸 (2005, 10.5)
- 4) 森川賢一、趙子江、田邊純一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス粒子のHuh7細胞への感染におけるheparin様分子の関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)
- 5) 田邊純一、森川賢一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、培養細胞から分泌されたC型肝炎ウイルス粒子の生化学的特徴化、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)
- 6) T Wakita. Lessons learned from in vitro cultivation of hepatitis C. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver CO, USA (2006, 2.6).
- 7) T Date, J Tanabe, T Kato, M Miyamoto, T Wakita. A full-length hepatitis C virus replicon infectious for cultured cells. IUMS 2005. 7.25, San Francisco CA, USA
- 8) K Morikawa, Z Zhao, J Tanabe, T Date, M Miyamoto, A Murayama, T Wakita. Binding of hepatitis C virus to glycosaminoglycan does not cause productive infection. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, Canada 2005