

- 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, T 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, T 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

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリアクターによる ウイルス粒子産生細胞の培養

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 石井 孝司

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、本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に JFH-1 株の構造蛋白を 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。

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

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エレクトロポレーション法により導入し、その後に 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。トランスファーベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子を用いて組換えウイルスを選択し、増幅した。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

pEF ベクターは、EF プロモーターと Zeocin 耐性遺伝子を持ち、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成することができる。本ベクターの 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、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして 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、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。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、遺伝子解析研究に関する倫理指針」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、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 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 DI_s 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。培養上清から DI_s 粒子を除いた後に濃縮し、シヨ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 前後の画分にコア蛋白が存在したことから、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。また、HCV のレプリコンを保持する Huh7 細胞に同様に組換え DI_s を感染させ、同様に培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配で分画すると、コア蛋白の存在する画分にレプリコン RNA が存在していることが判明した。この RNA は RNase 処理で抵抗性を示し、粒子様構造の中に含まれている可能性が示唆された。レプリコン細胞は genotype 1b のものを用いたが、構造蛋白領域は genotype 1a、1b、2a を用いた。現在のところ蛋白分泌量では 2a(JFH-1)が最も良好である。

2. 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。目的蛋白を発現している細胞株を選択したところ、培養上清にも HCV 構造蛋白が分泌されていることが確認された。また、培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 付近にコア蛋白が存在していることが確認された。また、同じ密度の画分に subgenomic replicon の RNA が存在していることも確認できた。以上から、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。

D. 考察

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、この構造蛋白はシヨ糖密度勾配遠心で 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。

E. 結論

HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans 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) 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.
- 2) 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., Bartenschlager 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.
- 3) Matsuyama S., Ujiike 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)

- 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) 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) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 5) 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 永伸、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 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 6) 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 53 回日本ウイルス学会、平成 17 年 11 月、横浜。
- 7) 飯島沙幸、石井孝司、李 永伸、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 140 回日本獣医学会、平成 17 年 10 月、鹿児島
- 8) 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 DIs 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 DIs 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

分担研究報告書

ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発

東レ株式会社医薬研究所 曾根 三郎

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つたことであるが、JFH-1 株の発見により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、JFH-1 株のレプリコン複製系を用いてウイルス産生能の高い細胞を見出し、ウイルス粒子の大量調整法と精製法の開発を目指す。

A. 研究目的

肝炎ワクチン開発のためには、HCV 高産生細胞培養系の開発が必須要件である。HCV 産生細胞培養系は、①細胞の中で HCV ゲノムの複製能が起こり、②感染する粒子として組み立てられてウイルスとして産生される2つの要件から成っている。最近の研究から、HCV レプリコンの複製可能な細胞についての理解が進んでいる。そこで、第一に、インターフェロンシステムとの関連から、ウイルスの感染防御を担う IRF-3 に焦点を当て、第二に HCV 産生用の細胞株である Huh7 細胞を突然変異誘発剤で処理し、ランダムに変異を導入することにより、HCV レプリコンの複製が高い細胞の樹立を試みたので報告する。

B. 研究方法

1. 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

1) HCV レプリコン複製能の検出

複製能検出用 HCV レプリコンは、劇症肝炎患者の急性期血清から分離された JFH-1 株のウイルス完全長遺伝子の cDNA から構造領

域遺伝子と NS2 遺伝子を欠失させ、その部位にルシフェラーゼ遺伝子と EMCV の IRES 遺伝子を挿入した pSGR-JFH1-Luc および pSGR-JFH1-Luc/GND（複製能欠失型）を鋳型として、T7RNA ポリメラーゼにて試験管内で RNA を合成した。次に、合成した RNA を Huh7 細胞に Lipofectamin2000 にて導入し、42 時間後にルシフェラーゼの活性を検出した。ルシフェラーゼの活性がレプリコン RNA の複製によるものか、導入したレプリコン RNA から直接翻訳された結果によるものかを判断するために、複製能を欠失したレプリコン RNA である JFH1-Luc/GND と比較した。

2) IRF3 ドミナントネガティブ恒常的発現細胞の取得

Huh7 細胞に IRF-3 ドミナントネガティブ発現ベクター（藤田尚志博士より分与）を Lipofectamin2000 にて導入し、ハイグロマイシン耐性クローンを選択した。各クローンから RNA を調製し、RT-PCR にてドミナントネガティブ型 IRF-3 が発現していることを確認

後、実験に使用した。各クローンの HCV レプリコン複製能の検出は上述の方法で行った。

3) IFN の反応性の解析

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。各細胞株に FuGENE6 にて導入し、48 時間後、1000 単位/ml の IFN- β または 10ng/ml の IFN- γ で 6 時間刺激してルシフェラーゼの活性を測定した。

2. 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

1) 突然変異剤処理細胞の取得

4×10^5 個の Huh7 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM (以下、D-MEM+10F と略す) にて 10 cm² ディッシュに培養し、16 時間後、2 μ g/ml のフレームシフト型突然変異誘発剤である ICR-191 を含む 10ml の D-MEM+10F に置換後、2 時間培養した。細胞を D-MEM にて 2 回洗浄し、D-MEM+10F にてコンフルエントになるまで培養を続けた。次に細胞をトリプシン/EDTA で処理後、細胞数をカウントし、 4×10^5 個の細胞について上記の操作を行った。この操作を計 3 回行い、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。

2) 突然変異剤処理クローン細胞のレプリコン複製能の解析

ICR191 にて処理して得られたクローンに HCV レプリコン RNA を Lipofectamin2000 に

て導入し、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。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. 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 細胞にレプリコン RNA、JFH1-Luc および JFH1-Luc/GND を導入し、時間を追ってルシフェラーゼの活性を測定した。JFH1-Luc を導入した場合、ルシフェラーゼ活性は導入 48 時間で最大になり、少なくとも 72 時間続くが、複製欠失型のレプリコンである JFH1-Luc/GND を導入した場合、全時間においてルシフェラーゼ活性は認められないことから、本評価系は HCV レプリコン複製能検出することができることが示された。

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。樹立した各クローンのドミナントネガティブ型 IRF-3 の発現を RT-PCR にて調べた。その結果、5 クローンのドミナントネガティブ型 IRF-3 恒常発現細胞を得た。

ドミナントネガティブ型 IRF-3 恒常発現細

胞 # 1, # 3, # 6 の 3 つのクローンについて、HCV レプリコンの複製能をレポーターアッセイにて測定した。その結果、親株でのレプリコン複製能は、48 時間後に最大になり、72 時間後に減少するのに対し、クローン # 6 は 72 時間でも HCV レプリコンの複製が続き、複製能の向上が示唆された。また、同一分子が導入されてもレプリコン複製能はクローン間で差がみられた。

次に、これらのクローンの IFN 反応性をレポーターアッセイにて評価した。その結果、HCV レプリコンの複製能が亢進しているクローン 6 は IFN- β の反応性が高いこと、IFN- γ の反応性はレプリコン複製能と関連は認められなことが分かった。

2. 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 70 株の内 28 株について細胞に 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 4 株得た。

D. 考察

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のではなく、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て示唆される。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

培養細胞での HCV レプリコンの複製能を向上させるために、インターフェロンシステムとの関連性に焦点を当てて、ドミナントネガティブ型 IRF-3 細胞を作製した。ドミナントネガティブ型 IRF-3 の発現細胞は HCV レプリコンの複製能を向上させた。また、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を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) T Kanda. (脇田)	Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes.	Journal of Virology	in press		2006
2) N Ishii. (脇田)	Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus.	Journal of Virology	in press		2006
3) Y Rouillé (脇田)	Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus.	Journal of Virology	80.	2832-41	2006
4) Yi M. (脇田)	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. (脇田)	Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon.	Intervirology	49	37-43	2006
6) T Kato. (脇田)	Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System.	Journal of Clinical Microbiology	43	5679-84	2005

7) Cai Z. (脇田)	Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells.	Journal of Virology.	79	13963-73	2005
8) J Zhong. (脇田)	Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro.	Proc Natl Acad Sci U S A.	102	9294-99	2005
9) T Wakita. (脇田)	Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome.	Nature Medicine	11	791-796	2005
10) Zhao Z. (脇田)	Characterisation of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone.	Journal of General Virology	86	2209-20	2005
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	21(4)	366-371	2006
12) 脇田隆字	HCVレプリコン	肝臓	46(12)	691-702	2005
13) 加藤孝宣 (脇田)	C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立	ウイルス	55(2)	287-296	2005
14) 脇田隆字	HCV粒子形成システム	肝疾患レビュー	in press		2006
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	215(11)	920-1	2005
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	(9)	6-7	2005

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	5(3)	300-2	2005
18) Ishii K. (石井)	Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs.	Virology	in press		2006
19) Murakami K. (石井)	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		2006
20) Matsuyama S. (石井)	Enhancement of SARS-CoV infection by proteases.	Adv. Exp. Med. Biol.	in press		2006
21) Ishii K. (石井)	Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine.	Adv. Exp. Med. Biol.	in press		2006
22) Ohnishi K. (石井)	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	肝炎ウイルス VLP の作成と応用	感染・炎症・免疫	in press		2006

IV. 研究成果の刊行物・別冊

REVISED

2/10/06

**GENERATION OF INFECTIOUS HEPATITIS C VIRUS IN IMMORTALIZED
HUMAN HEPATOCYTES**

Tatsuo Kanda^{1@}, Arnab Basu^{2@}, Robert Steele¹, Takaji Wakita³, Jan S. Ryerse¹, Ranjit Ray^{2,4*},
and Ratna B. Ray^{1,2*}

Departments of Pathology¹, Internal Medicine², and Molecular Microbiology and
Immunology⁴, Saint Louis University, St. Louis, MO 63110, and Department of
Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo 183-8526, Japan⁴.

@T.K and A.B equally contributed in this study.

*Correspondence to: Saint Louis University, 3635 Vista Avenue, St. Louis, MO 63110. Phone:
(314) 577-8648, Fax: (314) 771-3816. e-mail: rayr@slu.edu or rayrb@slu.edu

ABSTRACT

The progress in understanding hepatitis C virus (HCV) biology has remained challenging due to the lack of an efficient cell culture system for virus growth. In this study, we examined HCV core protein mediated immortalized human hepatocytes (IHH) for HCV growth. *In vitro* transcribed HCV full-length RNA from genotype 1a (clone H77) was electroporated into IHH. RT-PCR of cellular RNA isolated from HCV genome-transfected IHH suggested viral RNA replication. HCV full-length genome transfected IHH also displayed viral protein expression by indirect immunofluorescence. In contrast, cells transfected with polymerase-defective HCV (H77/GND) RNA as a negative control did not exhibit expression of viral genome. Immunogold labeling demonstrated localization of E1 protein in the rough endoplasmic reticulum of RNA transfected IHH. Virus-like particles of ~50 nm in the cytoplasm were observed. Inoculation of naïve IHH with culture medium from HCV full-length genome transfected cells displayed NS5a protein expression in a dilution dependent manner, which was inhibited upon prior incubation with HCV infected patient serum. Based on NS5a positive immunofluorescence, we determined $\sim 4.5 \times 10^4$ - 1×10^5 fluorescent focus unit (ffu)/ml of cell culture medium from IHH transfected with H77 full-length RNA. A similar level of virus growth was observed by transfection of RNA from HCV genotype 2a (JFH1) into IHH. Taken together, our results suggest that IHH support HCV genome replication and virus assembly.

HCV is an important cause of morbidity and mortality worldwide. The most important feature of HCV infection is the development of chronic hepatitis in a significant number of infected individuals and the potential for disease progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (6, 7, 11, 27). At present, the only approved therapies for chronic HCV infection are interferon (IFN)- α with or without ribavirin (9, 21), but these fail to clear HCV from a significant number of patients (22). A number of HCV genomes have been cloned, and sequence divergence indicates several genotypes and a series of subtypes for this virus (28). In the United States, HCV genotypes 1a and 1b are predominant in patients with chronic hepatitis C (31). The progress in understanding HCV biology has remained challenging due to the lack of an efficient cell culture system for virus growth. Establishment of self-replicating HCV full-length genomic replicons from genotypes 1a and 1b in human hepatoma (Huh-7) cells has provided an important tool for the study of HCV replication mechanisms (3, 10, 23). Recently, different groups have reported the generation of infectious virus from transfection of genomic RNA of HCV genotype 2a into Huh-7 cells or its derivatives (5, 15, 29, 32). However, generation of infectious HCV genotype 1a has not been successful to date.

We and others have shown that HCV core protein transcriptionally regulates a number of cellular genes (26). We previously described the generation of immortalized human hepatocytes (IHH) by transfection of HCV core genomic region from genotype 1a (2, 25). IHH exhibited a weak level of HCV core protein expression, albumin secretion, glucose phosphatase activity, and absence of smooth muscle actin. IHH also displayed focal cytoplasmic and membrane staining for carcinoembryonic antigen (CEA), biliary glycoprotein (BGP1/CEACAM1) and nonspecific cross-reacting antigen (NCA/CEACAM6), and expression of hepato-biliary transport marker

genes (MRP, LST1 and NTCP) (unpublished observations). Together, these results suggested that IHH are well differentiated. HCV core protein selectively degrades STAT1, reduces phosphorylated STAT1 (P-STAT1) accumulation in the nucleus in a proteasome-dependent manner, and impairs IFN- α -induced signal transduction via suppressor of cytokine signaling-3 expression (1, 4, 16). HCV core protein is competent to partially rescue growth of a genetically engineered influenza A virus lacking its own IFN antagonist (4). The core protein can modulate interferon regulatory factor (IRF), Jak-STAT and inducible nitric oxide synthetase (iNOS) pathways, and suggest mechanisms by which core could affect HCV persistence and pathogenesis (20). Since HCV core protein transcriptionally regulates several cellular genes involved in cell growth, apoptosis and defense mechanism, we hypothesize that IHH may set the stage for HCV genome replication and assembly. (Part of this study was presented at the International Congress of Virology, IUMS, San Fransisco, 2005 & 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, 2005).

Replication of HCV genome and virus protein expression. We investigated whether IHH confer HCV genome replication and generation of infectious virus particles. For this purpose, full-length RNAs from HCV genotype 1a (clone H77) (13) was used. The clone H77 contains 5'untranslated region (5'UTR), coding sequence and 3' UTR, which is suggested to be necessary for replication (14, 30). *In vitro* transcribed full-length HCV RNA from clone H77 was used for transfection of IHH by electroporation. H77/GND (polymerase defective) RNA was used similarly as a negative control. Briefly, H77 cDNA was linearized by digestion with Xba I, and gel purified DNA was used for *in vitro* transcription by T7 RNA polymerase (Promega, Madison, WI). *In vitro* transcribed RNA (1-2 μ g) was introduced by electroporation (950 μ F and