

- 93) Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* 2005 ; 79 : 2346—55
- 94) Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, et al. Combined interferon alpha 2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C : controlled trial. *J Gastroenterol* 2003 ; 38 : 567—72
- 95) Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, et al. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003 ; 38 : 1282—8
- 96) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 313 : 42—7
- 97) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005 ; 19 : 111—22
- 98) Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, et al. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 2005 ; 129 : 1031—41
- 99) Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, et al. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 15865—70
- 100) Naka K, Ikeda M, Abe K, et al. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication : effect of combination with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 330 : 871—9
- 101) Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003 ; 426 : 186—9
- 102) Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 235—40
- 103) Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 ; 4 : 602—8
- 104) Kronke J, Kittler R, Buchholz F, et al. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004 ; 78 : 3436—46
- 105) Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005 ; 309 : 1577—81
- 106) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005 ; 102 : 9294—9
- 107) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791—6
-

1. C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立

加藤 孝宣^{1,2,3}, 脇田 隆宇¹

¹ 東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門

² 名古屋市立大学大学院・臨床分子情報医学

³ 現所属; Liver Diseases Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

C型肝炎ウイルス(HCV)は、1989年カイロン社の研究グループにより発見された。日本では200万人、世界中で17000万人にのぼる感染者が存在し、インターフェロンを中心とした治療が行われているがその効果は未だ不十分である。これまでHCVには良いウイルス培養系と実験用の感染小動物が存在しないことがHCVの基礎研究の妨げになってきた。我々はHCVによる劇症肝炎患者からHCV株を分離し、その株が他の慢性肝炎患者由来の株に比べ、効率的に増殖できることを明らかにしてきた。さらにこの株を用いることにより培養細胞中での感染性HCV粒子生成に成功した。この感染性HCV粒子は培養細胞だけでなくチンパンジーにも感染可能であった。この系を用いることにより、HCVの感染から分泌まですべてのステップが培養細胞内で観察可能であり、ウイルスの複製機構の解明や抗ウイルス薬の開発に有用であると考えられる。

1. はじめに

1989年、カイロン社のグループにより長らく不明であった非A非B型ウイルス性肝炎の原因ウイルスとしてC型肝炎ウイルス(HCV)が同定された¹⁾。しかしその方法は培養細胞や実験動物から直接ウイルスを分離するこれまでのオーソドックスなウイルス学的手法ではなく、ウイルスが存在すると思われるチンパンジー血漿からウイルスの遺伝子断片をクローニングした、というものであった。この遺伝子断片を手がかりにほぼ全長の遺伝子配列が明らかになり、その遺伝子構成の類似からフラビウイルス科に属するウイルスであることが判明した^{2,3)}。その後1994年に金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によりその形態が⁴⁾、1995年の3'末端の発見によりその全遺伝子配列が明らかとなった⁵⁾。そして1997年には試験管内で合成されたHCV

の全遺伝子のRNAがチンパンジーに感染可能であることが示された⁶⁾。しかし、このウイルス発見のエピソードに象徴されるかのようにHCVの培養細胞での感染増殖系の確立は依然不可能のままであった。1999年のHCVレプリコンシステムの報告から⁷⁾、HCVの細胞内での複製機構の解析が可能となり、HCV株による増殖能力の違い、またHCVの増殖に影響を与える宿主側の因子が次々と明らかにされた。我々はHCVによる劇症肝炎患者の急性期血清よりHCV株を分離し、この株が他のHCV株とは異なり、培養細胞中で適応変異を持たず強い増殖能を示すことをレプリコンシステムを用い明らかにした。そしてこの株を用いることで、長らく不可能であったHCVの感染増殖系の樹立に成功した⁸⁾。

2. チンパンジーでのHCV感染系

チンパンジーはHCV感染が認められる唯一の動物モデルである。患者血清の接種により急性肝炎から持続感染化し、慢性肝炎を発症する場合があることが知られている。しかし、HCVの全遺伝子を持つcDNAから試験管内で合成したRNAを感染させることは成功していなかった。Kolykhalovらは患者血清を接種したチンパンジーのプール血清からRT-PCRにより得られた多くのHCV遺伝子の塩基配列を決定し、そのコンセンサス配列をもつcDNAをつ

連絡先

〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6
東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門
TEL: 042-325-3881 内線4605
FAX: 042-321-8678
E-mail: wakita@tmin.ac.jp

なぎ合わせ遺伝子型 1a の感染可能な HCV -cDNA 配列を合成した⁶⁾。その合成された RNA をチンパンジーの肝臓に直接接種することにより、HCV の増殖と肝障害を認めている。その後、同様の手法を用い、遺伝子系 1b, 2a の HCV 株でも感染性クローンが報告されている^{9, 10)}。しかし、この方法の問題点はチンパンジーを使用するためには莫大な費用とこの動物を維持するための施設が必要であり、簡単には使用できないことである。チンパンジーで感染が確認された感染性クローンを培養細胞に遺伝子導入し感染性粒子を産生させる試みも行われているが、残念ながら HCV の増殖、感染は報告されていない¹¹⁾。

3. HCV 細胞培養系の試み

一方、培養細胞を用い患者血清を感染させることで HCV の細胞培養系を構築する試みも多くなされている¹²⁾。ヒトの初代培養肝細胞や肝癌細胞¹³⁻¹⁷⁾、もしくはその両者を融合させた細胞¹⁸⁾、チンパンジーやツパイの初代培養肝細胞で HCV の感染、増殖が報告されているが^{19, 20)}、いずれも複製レベルが低く、高感度な RT-PCR を用いなければウイルスゲノムの検出は困難であり、HCV の感染複製過程の解析は難しいと考えられる。しかし、チンパンジーやヒトでは HCV 感染が容易に成立することから、培養細胞での感染が困難なのは培養過程で個体では認められた何らかの宿主側因子が失われている可能性が考えられた。Aizaki らはラジアルフロー型バイオリアクターという肝細胞を三次元的に培養できる装置を用い、ヒトの肝臓に近い状態で HCV の感染増殖の観察を試みた²¹⁾。その結果、HCV の感染複製をしめす培養液中での HCV RNA の再上昇が確認され、電子顕微鏡でウイルス粒子の放出も検出されたが、やはり依然として HCV の増殖は高いレベルでは観察されなかった。これらの結果から、HCV はむしろそれ自身が持続感染を成立させるため増殖を抑え、低いレベルで複製するように調整しているのではないかと考えさせられた。そして、HCV は急性感染時に高ウイルス量を示すことがあるため、この HCV の増殖を抑える性質はその分離される症例や時期、分離された株によって違うのではないかと、という仮説を持つに至った。

4. HCV レプリコンシステムの確立

1997 年、Khromykh らは HCV と同じフラビウイルス科に属する Kunjin ウイルスのレプリコンシステムを報告した²²⁾。このシステムは Kunjin ウイルスの構造領域を取り除き、3'utr を EMCV の IRES とネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたものであり、この遺伝子構築から作られた RNA を培養細胞に導入しネオマイシンで選択培養することにより、Kunjin ウイルス RNA の持続的な複製と蛋白発現が観察されるという実験系であった。そして、1999 年、Lohmann らにより HCV のレプリコンシステムが報告された⁷⁾。このシ

ステムは HCV の構造領域と非構造領域の一部 (NS2) を取り除き、その部分に EMCV の IRES とネオマイシン耐性遺伝子を挿入したもので、この構造物を鋳型として試験管内で RNA を合成し、Huh7 細胞内に導入した後にネオマイシンで選択培養を行う。すると複製した HCV レプリコン RNA からネオマイシン耐性遺伝子が発現され、その遺伝子の働きでレプリコンが複製している細胞のみが生存可能となり増殖しコロニーを形成する。レプリコン複製細胞では HCV レプリコン RNA が非常に高レベルで複製しており、複製している RNA や発現している HCV 蛋白が持続的に安定して検出できる。このシステムを用いることで、HCV の培養細胞内での増殖複製が簡単に観察可能であり、また特殊な設備を必要としないことから、急速に世界中に普及し利用されるようになった。

このレプリコンシステムは容易に培養細胞内での HCV の増殖を再現でき、HCV に対する薬剤感受性や、このウイルスの複製に関与するウイルス側、宿主側因子の同定に非常に力を発揮したが、その一方でいくつかの制約があることが知られている。その制約の一つはレプリコンが増殖できる培養細胞の問題であり、当初 Huh7 細胞でしか増殖は認められなかった。その後いくつかの非肝細胞由来の細胞やマウスの肝癌細胞でもその増殖が報告されたが^{23, 24)}、いずれもその増殖レベルは十分なものではなかった。またもう一つの問題点は、レプリコンとして増殖が報告された HCV 株はすべて遺伝子型 1 の株であった。さらにこれらの株は培養細胞内での増殖時にその複製効率を増強する適応変異を持ち、その適応変異の多くは患者血清から分離された HCV 株では認められない変異であった²⁵⁾。またその適応変異を感染性クローンに導入し、その RNA をチンパンジーの肝臓に接種したところ、感染性が失われていることが明らかになった²⁶⁾。このようなことからレプリコンの培養細胞内での増殖がどの程度生体でのウイルス感染を反映しているかを疑問視する声もあった。

5. HCV 劇症肝炎患者由来株

HCV レプリコンシステムが報告された当時、我々は効率の良い HCV 増殖系構築のために増殖能力の高い HCV 株を探していた。通常 HCV の研究に用いられている株やデータベースに登録されている株は圧倒的に慢性肝炎患者から分離されたものであることが多く、それらの株を使用しても増殖能力の高い HCV 株は得られないのではないかと考えていた。その時期に慈恵会医大第三病院の肝臓研究グループから HCV による劇症肝炎症例の急性期血清が持ち込まれ、この血清中に含まれる HCV 株の検討を開始した。この症例は 31 歳の男性で、強い肝障害とプロトロンビン値の低下、脳症から劇症肝炎と診断された²⁷⁾。HAV, HBV, GBV-C の関連マーカーはすべて陰性であったが、HCV-RNA が検出され HCV による劇症肝炎と考えられた。感染

経路は不明であった。急性期血清中の HCV ウイルス量は 10 の 5 乗と非常に高値であった。この HCV 遺伝子の一部を RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定し既報の配列と比較した結果、この患者血清中の HCV 株は遺伝子型 2a であることがわかった。そこで、遺伝子型 2a の HC-J6 株の遺伝子配列を参考に HCV の全長を 14 のオーバーラップするフラグメントにわけプライマーを設定し、RT-PCR 法により全長のカバーする cDNA 断片をクローニングした。後に感染性のクローンを構築することを考え、各フラグメントのそれぞれ 5 クローンの塩基配列をシーケンスし、コンセンサス配列を決定した。さらにこの株の特徴を明らかにするために、同じ遺伝子型 2a の HCV 株に感染している 6 人の慢性肝炎患者から同様に HCV 株を分離し全塩基配列を決定した。分子系統樹による解析の結果、この劇症肝炎患者から分離された HCV 株 (JFH-1 株) は遺伝子型 2a に属するものの、他の慢性肝炎患者分離株や遺伝子型 2a のプロトタイプ株である HC-J6 株²⁸⁾ のクラスターとやや離れたところに位置することが判明した (図 1)。そこでさらに、この JFH-1 株のどの領域が他の株からの変異が強いかを、平均遺伝子距離の比から推定した。その結果、塩基配列の検討からは 5'utr が、アミノ酸配列の検討からはコア、NS3、NS5a が最も変異の強い部分として同定された²⁷⁾。

6. JFH-1 株のコア領域の検討

JFH-1 株の変異の強い部分として同定された領域の中で、我々はまず最初にコア領域に着目した。コア領域はウイルスの RNA ゲノムを包むキャプシドを形成する蛋白をコードする領域である。このコア蛋白は翻訳されたポリプロテインから E1 領域との接合部での切断により p23 が生成され、さらに 179 番目もしくは 182 番目のアミノ酸でさらに切断を受け p21 生成されることが知られている²⁹⁻³²⁾。そこでこの切断の効率を劇症肝炎由来の JFH-1 株と慢性肝炎由来株で比較してみた。コア領域から E1 領域まで含む発現ベクターとコア領域のみを含む発現ベクターを JFH-1 株と慢性肝炎由来株でそれぞれ作成し、p21 の生成効率を検討した³³⁾。その結果、JFH-1 株では慢性肝炎由来株に比べ効率的に p21 が生成されることが判明した。さらに、JFH-1 株と慢性肝炎由来株のキメラ発現ベクターによる検討の結果、JFH-1 株コア領域の C 末端の 4 つのアミノ酸がこの効率的な p21 の生成に関与していることが明らかになった。患者血清中の HCV に含まれるコア蛋白は主に p21 であることが解っており³⁴⁾、この p21 の効率的な生成はウイルス粒子生成に有利に働くと考えられる。従ってこれらの結果から、劇症肝炎由来の JFH-1 株は他の慢性肝炎患者由来株

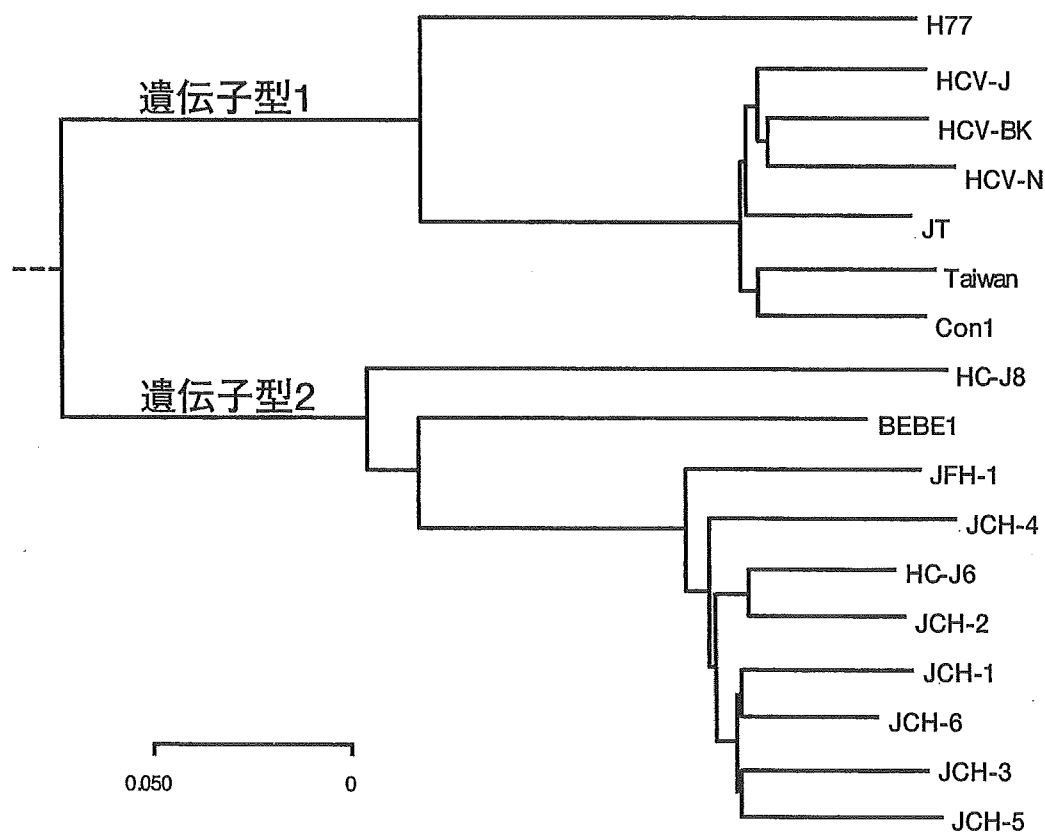


図 1 JFH-1 株の分子系統樹

に比べ効率的なウイルス粒子生成が期待された。

7. 遺伝子型 2a の HCV レプリコンシステムの開発

JFH-1 株の変異の強い部分として同定された領域の中で、残る部分は 5'utr, NS3, NS5a である。これらの領域はいずれもウイルスの増殖や薬剤感受性に関わる部分である。そこで我々はレプリコンシステムを用い、この JFH-1 株の増殖能を検討してみた³⁵⁾。既に報告されていたレプリコンの構造にならぬ JFH-1 株の 5'utr の下流にネオマイシン耐性遺伝子を、そして EMCV の IRES の下流に JFH-1 株の非構造領域を持つレプリコンを作成し、最初に報告された遺伝子型 1b のレプリコンである Con1 株の野生型のもの (Con1/wt), および Con1 株が Huh7 細胞の中でよく増えるよう NS3-NS5a 領域に合計 3 つの適応変異を持った NK5.1 株 (Con1/NK5.1) と比較し、その増殖能力について検討してみた。遺伝子型 1b のレプリコンでは、1 μ g の RNA を導入することで、Con1/wt 株では約 100 個のコロニーを作り、適応変異を持つ Con1/NK5.1 株ではその約 10 倍のコロニーを作る。ところが、驚くべきことに遺伝子型 2a の JFH-1 株では、Con1/NK5.1 株のさらに 50 倍強いコロニー生成効率を示した。さらに、この JFH-1 株のレプリコンを持つ細胞をクローニングし、そのレプリコン細胞中に含まれるレプリコンの塩基配列を解析したところ、6 つのクローン中 5 つでは、それぞれ HCV 由来領域にいくつかの変異を認めたもの、それらの変異の中に共通な変異は認められなかった。また 1 つのクローンは、アミノ酸の変異が起こらないような変異を認めたのみであった。従ってこの JFH-1 株は、Huh7 細胞の中で、適応変異が無くとも増殖可能な株であると考えられた³⁵⁾。

Huh7 細胞での解析の結果から JFH-1 株のレプリコンは強い増殖能を持つと考えられたため、他の細胞での増殖についても検討してみた。肝細胞由来の HepG2 細胞と IMY-N9 細胞 (HepG2 とヒト初代培養肝細胞とのフュージョン細胞)³⁶⁾、非肝細胞由来の HeLa 細胞 (子宮頸癌由来) と 293 細胞 (胎児腎細胞由来)³⁷⁾ を用いて検討したところ、いずれの細胞でも Huh7 細胞ほど効率は高くないもののコロニー生成が認められた。Huh7 細胞と同様に、これらのコロニーから細胞を樹立し適応変異の有無を検討したところ、HepG2 細胞では NS5b に比較的多くの変異が集中していたが、9 つのクローン中 2 つで変異を持たない株、あるいはアミノ酸の変化しない変異を 1 つ持つ株を認めた。IMY-N9 細胞では 9 つ中 3 つの株で、HeLa 細胞では 2 つの株で、293 細胞では驚くべきことにほとんどのクローンで変異を持たないことが判明した。以上のように、劇症肝炎由来の JFH-1 株を用いることで、我々は遺伝子型 2a のレプリコンを樹立すると同時に、これまで不可能であった Huh7 細胞以外の多くの細胞で増殖可能な、さらにそれらの培養細胞に特異的な適応変異が無くとも複製能の高いレプリコンを

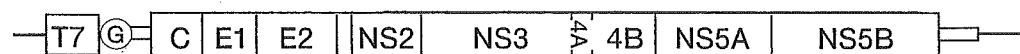
手に入れたのである。

さらに詳しい解析により、この JFH-1 株レプリコンの様々な特徴が明らかとなった。臨床症例の検討では遺伝子型 2a の HCV 株は遺伝子型 1b の株に比しインターフェロン感受性が高いことが知られている。しかし遺伝子型 2a の JFH-1 株レプリコンは遺伝子型 1b の Con1 株レプリコンに比しインターフェロン抵抗性であることがわかった³⁸⁾。これはおそらく培養細胞内での増殖能力の差を反映していると考えられる。さらにこの JFH-1 株レプリコンの特徴として、一過性の細胞内複製能が高いことが解った。レプリコンのネオマイシン耐性遺伝子をルシフェラーゼの遺伝子に置換したレプリコンを作成し、ルシフェラーゼ活性を測定することで一過性のレプリコンの増殖を簡便に高感度に評価する系を構築し、Huh7 細胞内でのレプリコンの増殖を遺伝子導入後経時的に観察した³⁹⁾。その結果、遺伝子導入後 3 日目までルシフェラーゼ活性の強い増殖を認め、この JFH-1 株レプリコンはネオマイシン選択に依存しない高い複製能力を持つと考えられた。当時、既に遺伝子型 1b の株で HCV の全遺伝子領域を持つレプリコンが報告され、これらのレプリコンでは非構造領域のみのレプリコンに比べ増殖能が低いこと、また感染性の粒子が形成されないことなどが解っていたが、JFH-1 株レプリコンで観察された強い増殖能力は、全遺伝子領域を持つレプリコンもしくは感染性クローンをを用いることで自立的な増殖と感染性粒子の産生する系の構築が可能なのではないかという期待を抱かせるのに十分であった。

8. HCV 複製の感受性が高い細胞

レプリコンを用いた研究の大きな成果の一つが HCV 複製の感受性が高い細胞が樹立されたことである。Blight らはレプリコンを遺伝子導入した後に樹立されたレプリコン細胞を、インターフェロン処理でレプリコンを排除することにより HCV 複製の感受性が高い細胞が作製されることを報告した (cured cell)⁴⁰⁾。これらの細胞ではレプリコンを遺伝子導入した後のコロニー生成効率が高くなり、Huh7 細胞に比し早期にレプリコン RNA の増殖や HCV 蛋白の発現が認められることが報告されている。またこれらの細胞を使用することにより、それまで難しかった遺伝子型 1a の H77 株でレプリコンを作製することが可能となった⁴¹⁾。この cured cell で HCV 複製の感受性が高くなる理由については、以下のように考えられている。そもそも Huh7 細胞は均一な細胞ではなく、HCV 複製の感受性が低い細胞から高い細胞まで様々な細胞が混在している。その細胞集団にレプリコン RNA を遺伝子導入することにより樹立されるレプリコン細胞は、多くの細胞集団の中から HCV 複製の感受性が高い細胞が選択されている可能性がある。実際、このようにして作製された cured cell の中で、HCV 複製の感受性が非常に高い細胞 (Huh7.5 細胞) の中で増殖して

JFH-1株感染性クローン構築



JFH-1株感染性クローンRNA

試験管内RNA合成



RNAトランスフェクション

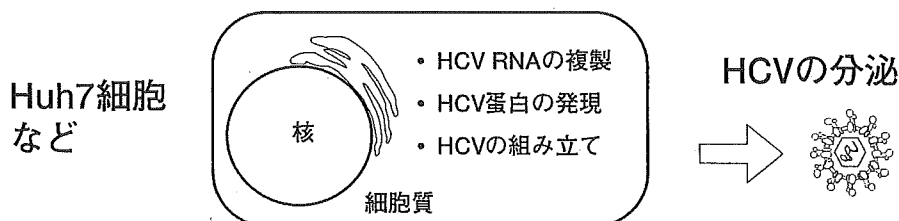


図2 HCV 感染実験系の概略

いた Con1 株のレプリコンは適応変異を持っていなかったことが報告されている⁴⁰⁾。すなわち Con1 株に適応変異が無くても増殖可能な細胞が、Huh7 細胞の細胞集団の中から選択されてきたと考えられている。また最近、この Huh7.5 細胞は細胞質内の二重鎖 RNA を検知して IRF (interferon regulatory factor)-3 と NF- κ B を活性化し IFN を誘導する RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) に変異があり、そのため HCV 複製の感受性が高くなっていることが明らかにされている⁴²⁾。この HCV が非常に増殖しやすくなっている細胞が、レプリコンを用いた研究により同定されたことが、後の HCV 感染培養系の樹立において重要な意味を持つてくる。

9. HCV 感染培養系の樹立

JFH-1 株を用いた HCV 感染培養系の樹立に向け、JFH-1 株の全長 cDNA クローンを準備した。その時に気をつけたのは以下の二つである。一つ目は、患者血清中で増殖していた HCV のコンセンサス配列を用いることである。前述のように、この JFH-1 株の全塩基配列を決定したときに、全体を 14 のフラグメントにわけ RT-PCR を行い、各フラグメントそれぞれを 5 クローンずつシークエンスし、コンセンサス配列を決定しているが、さらに正確を期すため異なるプライマーセットを用い再度 RT-PCR を行い、ダイレクトシークエンスによりコンセンサス配列を確認している。もう一つは遺伝子型 2a の HCV 株は 1b と異なり 5'utr の末端がグアニン (G) ではなくアデニン (A) から始まっている。感染性クローンの RNA は T7 RNA ポリメラーゼ

を用い合成するが、T7 プロモータの下流が G から始まる方が RNA の収量が良いことが知られている。そこで JFH-1 株の 5'utr 末端に余剰の G を一塩基挿入した。準備した JFH-1 株の感染性クローンをコードする cDNA コンストラクトは、3'utr 末端を制限酵素 *Xba*I で切断し Mung beanヌクレアーゼで平滑化した後、T7 RNA ポリメラーゼで全長 RNA を合成した⁸⁾。HCV 感染実験系の概略を図 2 に示す。

合成された JFH-1 株の全長 RNA を Huh7 細胞に導入し、HCV の増殖を観察した。HCV RNA はノザンプロットとリアルタイム RT-PCR 法で、培養細胞内の HCV 蛋白の発現はサザンプロットと免疫蛍光染色法で、培養上清中への HCV コア抗原の分泌を高感度コア ELISA 法でそれぞれ確認した。遺伝子導入後、培養細胞内では HCV RNA の増加と HCV 蛋白の持続的な発現を認め、免疫蛍光染色法では HCV のコア、NS3 蛋白の細胞質への局在が認められた。また、培養上清中には遺伝子導入後約 10 日目をピークに HCV RNA 及びコア抗原の分泌が継続的に認められた。感染性粒子の確認のため培養上清をショ糖密度勾配遠心法にて分画し、それぞれの分画で HCV RNA 量及びコア抗原量を定量したところ、比重が 1.17 g/mL の分画に両者の一致したピークを認め、これは過去に報告されている患者血清中のウイルス粒子を含む分画の比重と一致していた。さらにこの HCV RNA 及びコア抗原のピークは RNase には抵抗性であり、NP-40 の様な界面活性剤で処理することにより比重の重い方の分画 (1.25 g/mL) にシフトした。これはウイルスの外被を形成する軽いエンベロープが、界面

活性剤の働きで除去されたためと考えられる。また、界面活性剤処理をしていない検体のピークの分画中では免疫電子顕微鏡にてウイルス様粒子の存在が確認された⁸⁾。

以上のように、JFH-1株の全長RNAをHuh7細胞に導入することで、培養上清中へのウイルス粒子の分泌が期待されたため、この培養上清を用いた新たなHuh7細胞への感染実験を行った。JFH-1株の全長RNAを遺伝子導入したHuh7細胞の培養上清を0.45 μmのフィルターで残渣を取り除き、新たなHuh7細胞に接種した。遺伝子導入したHuh7細胞の培養上清をUV処理したもの、またJFH-1株の全長RNAを混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかったHuh7細胞の培養上清を同様に準備し、感染実験を行った。培養上清接種後三時間で培養液を交換し、さらに48時間培養後anti-コア抗体、anti-NS5a抗体を用いた免疫蛍光染色法でHCV感染細胞を検出した。その結果、JFH-1株の全長RNAを遺伝子導入したHuh7細胞の培養上清を感染させたHuh7細胞では感染細胞が検出され(394.0 ± 26.5/coverslip)、その感染細胞数はUV処理により著明に減少した(13.3 ± 3.8/coverslip)。JFH-1株の全長RNAを混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかった培養上清では感染細胞が検出されなかった。また、JFH-1株の全長RNAを遺伝子導入したHuh7細胞の培養上清の感染を、JFH-1株の複製がレプリコンで確認されているHepG2細胞、IMY-N9、HeLa細胞で試みたが、感染細胞は認めなかった。(表1)。以上のような結果から、JFH-1株の全長RNAをHuh7細胞に遺伝子導入することにより、感染性のHCV粒子が生成されることが確認された。さらにHCVレセプター候補の一つであるCD81に対する抗体やC型慢性肝炎患者の血清でこの感染がブロックされるかどうかを確認した。感染させるHuh7細胞をあらかじめanti-CD81抗体(JS81)もしくはC型慢性肝炎患者血清で処理し、PBSで洗浄した後に感染性HCV粒子を含む培養上清を感染させてみたところ、感染細胞数の低下が認められた。従って、anti-CD81抗体やC型慢性肝炎患者血清は培養細胞中で作られたHCVの感染をある程度阻止することが可能と考えられた。

これらの培養細胞中で観察されるHCVの感染が、はたしてヒトでの感染と同じ事象を見ているのか? 培養細胞中で生成された感染性HCV粒子ははたしてヒトにも感染可能であるのか? これらの疑問に答えるべく、JFH-1株の感染性HCV粒子を含む培養上清を用いたチンパンジーへの感染実験を行った⁸⁾。感染に用いた培養上清ストックは約 8×10^6 コピー/mLのRNA量であり、このストックを希釈しチンパンジーに接種することとした。まず、培養細胞での感染実験と同様にコントロールとして、JFH-1株の全長RNAを混ぜたのみで遺伝子導入を行わなかったHuh7細胞の培養上清を接種したが、当然のごとく感染は認められなかった。次に 10^4 倍に希釈した培養上清ストックを接種したが、こちらも感染は認められなかった。さらに 10^3 倍に希釈したストックを接種したところ、接種二週間後にチンパンジー血清中でHCV RNAが陽性となり接種後五週目までウイルス血症が持続した。しかし血中のHCV RNA量は 2×10^3 コピー/mLとさほど高くなく、また肝障害も認められなかった。JFH-1株の感染が起こっていることを確認するため、血中のHCV RNAをRT-PCR法で分離し5'utr, E2, NS5bの各領域で塩基配列を確認したが、得られた配列はHuh7細胞への遺伝子導入に用いたJFH-1株と全く同じ配列であった。レプリコンで得られた適応変異を持つ感染性クローンがチンパンジーには感染できなかった結果とは異なり、適応変異を持たずに強い増殖能力を示すJFH-1株から生成された感染性HCV粒子は、はたしてチンパンジーにも感染可能であった⁸⁾。

10. HCV複製の感受性が高い細胞を用いた感染系

この様にJFH-1株を用いることで培養細胞にも、またチンパンジーにも感染可能なHCVの生成が可能になったのであるが、この方法の大きな問題点は感染力価が著しく低いことであった。しかしLindenbachらはレプリコンを用いた研究により同定されたHCV複製の感受性が高い細胞、Huh7.5細胞を用いることで高い感染力価を可能にした⁴³⁾。彼らは遺伝子型2aのJ6株の構造領域とJFH-1株の非構造

表1 JFH-1株全長RNAの遺伝子導入による感染性HCV粒子生成の確認⁸⁾

| 感染性 クローン | 遺伝子 導入 | 紫外線 照射 | 被感染 細胞 | 感染細胞数 (No./coverslip) |
|-------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|
| JFH-1 | + | - | Huh7 | 394.0 ± 26.5 |
| 〃 | + | + | 〃 | 13.3 ± 3.8 |
| 〃 | - | - | 〃 | 0 |
| 〃 | + | - | HepG2 | 0 |
| 〃 | + | - | IMY-N9 | 0 |
| 〃 | + | - | HeLa | 0 |

領域をもつキメラ感染性クローンを用い、Huh7.5細胞に遺伝子導入することで、 $10^4 \sim 10^5$ 感染力価を示す培養上清を手に入れたのである。ほぼ同時期に Zhong らも、Huh7.5細胞から作成されたレプリコン細胞をさらにインターフェロンガンマで処理しレプリコンを排除することにより得られた Huh7.5.1 細胞を用い、効率の良いウイルス培養系を確立した⁴⁴⁾。この細胞に JFH-1 株の全長 RNA を導入することにより、培養 24 日目にはほぼ 100% の細胞が HCV 陽性となり、その培養上清は $10^4 \sim 10^5$ の感染力価を示すことを見いだした。これらの効率の良いウイルス培養系の登場により HCV の感染から増殖複製までのこのウイルスのライフサイクルの観察がより容易になった。

11. おわりに

HCV のレプリコンシステムの確立は HCV 研究にとって画期的な出来事であった。このレプリコンシステムを足がかりに、HCV の増殖に関与する多くのウイルス側の因子、宿主側の因子が明らかとなり、さらに JFH-1 株を手に入れたことで我々は HCV を解析し撲滅するための大きな武器を得た。しかし、その一方で JFH 株に関する大きな謎がいくつか残されている。なぜ JFH-1 株は適応変異も持たずに強い増殖が可能なのか？他の HCV 株とどこが違うのだろうか？また劇症肝炎患者から分離された株がなぜチンパンジーで強い肝障害を起こさないのか？これらの問題を明らかにすることで、今のところ JFH-1 株でしか観察されない培養細胞内での感染性ウイルス粒子の生成や感染過程の観察が他の HCV 株でも可能になると期待される。そして、この感染増殖が可能なシステムを用いることで、増殖過程のみでなくウイルスの感染から分泌までのすべてのステップをターゲットとした抗ウイルス薬の探索が可能となり、いずれ HCV を完全に排除しうる薬剤が開発されるかもしれない。また、長い間謎であった HCV のレセプターが同定されるのもそう遠い日の事ではないであろう

文 献

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 244: 359-62, 1989.
- 2) Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 2451-5, 1991.
- 3) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 9524-8, 1990.
- 4) Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M: Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 75: 1755-60, 1994.
- 5) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K: A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*. 215: 744-9, 1995.
- 6) Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM: Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 277: 570-4, 1997.
- 7) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285: 110-3, 1999.
- 8) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 11: 791-6, 2005.
- 9) Beard MR, Abell G, Honda M, Carroll A, Gartland M, Clarke B, Suzuki K, Lanford R, Sangar DV, Lemon SM: An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology*. 30: 316-24, 1999.
- 10) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J: Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology*. 262: 250-63, 1999.
- 11) Bartenschlager R, Lohmann V: Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 52: 1-17, 2001.
- 12) Bartenschlager R, Lohmann V: Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 81: 1631-48, 2000.
- 13) Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M: Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol Suppl*. 8: 31-9, 1993.
- 14) Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G: Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology*. 26: 1328-37, 1997.
- 15) Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P: In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 79: 2367-74, 1998.
- 16) Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Traubaud MA, Bizollon T, Gouillat C, Gripon P, Gugen-Guillouzo C, Inchauspe G, Trepo C: Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol*. 80: 3007-18, 1999.
- 17) Seipp S, Mueller HM, Pfaff E, Stremmel W, Theilmann L, Goeser T: Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol*. 78: 2467-76, 1997.
- 18) Ito T, Yasui K, Mukaigawa J, Katsume A, Kohara M, Mitamura K: Acquisition of susceptibility to hepatitis

- C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes: establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system. *Hepatology*. 34: 566-72, 2001.
- 19) Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR: Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*. 202: 606-14, 1994.
 - 20) Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF: Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest*. 109: 221-32, 2002.
 - 21) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, 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.
 - 22) Khromykh AA, Westaway EG: Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol*. 71: 1497-505, 1997.
 - 23) Zhu Q, Guo JT, Seeger C: Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol*. 77: 9204-10, 2003.
 - 24) Ali S, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G: Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol*. 78: 491-501, 2004.
 - 25) Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R: Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol*. 75: 4614-24, 2001.
 - 26) Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, Krieger N, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, Shapiro M, St Claire M, Bartenschlager R: Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 14416-21, 2002.
 - 27) Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*. 64: 334-9, 2001.
 - 28) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol*. 72: 2697-704, 1991.
 - 29) Hussy P, Langen H, Mous J, Jacobsen H: Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology*. 224: 93-104, 1996.
 - 30) Buratti E, Baralle FE, Tisminetzky SG: Localization of the different hepatitis C virus core gene products expressed in COS-1 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 44: 505-12, 1998.
 - 31) Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P: Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol*. 71: 657-62, 1997.
 - 32) McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B: Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 21: 3980-8, 2002.
 - 33) Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T: Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol*. 69: 357-66, 2003.
 - 34) Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M: The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 72: 6048-55, 1998.
 - 35) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T: Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 125: 1808-17, 2003.
 - 36) Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T: Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY N9 cells. *J Biol Chem*. 279: 22371-6, 2004.
 - 37) Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Mizokami M, Wakita T: Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol*. 79: 592-6, 2005.
 - 38) Miyamoto M, Kato T, Date T, Mizokami M, Wakita T: Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology*. 49: 37-43, 2006.
 - 39) Kato T, Date T, Miyamoto M, Sugiyama M, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Sugihara K, Hasegawa I, Fujiwara K, Ito K, Ozasa A, Mizokami M, Wakita T: Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *J Clin Microbiol*. in press.
 - 40) Blight KJ, McKeating JA, Rice CM: Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 76: 13001-14, 2002.
 - 41) Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM: Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*. 77: 3181-90, 2003.
 - 42) Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr: Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*. 79: 2689-99, 2005.
 - 43) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 309: 623-6, 2005.
 - 44) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 9294-9, 2005.

Production of infectious hepatitis C virus in cell culture

Takanobu KATO^{1, 2, 3} and Takaji WAKITA¹

¹Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo,

²Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya

(³ Current address ; Liver Diseases Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

Hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem, infecting an estimated 170 million people worldwide. Current therapy for HCV-related chronic hepatitis is based on the use of interferon. However, virus clearance rates are insufficient. Investigations to develop the anti-viral therapy or to understand the life cycle of this virus have been hampered by the lack of viral culture systems. We isolated the JFH-1 strain from a patient with fulminant hepatitis, and the JFH-1 subgenomic replicon could replicate efficiently in culture cell without adaptive mutation. Recently, we developed the HCV infection system in culture cells with this JFH-1 strain. The full-length JFH-1 RNA was transfected into Huh7 cells. Subsequently, viral RNA efficiently replicated in transfected cells and viral particles were secreted. Furthermore, secreted virus displayed infectivity for naive Huh7 cells. This system provides a powerful tool for studying the viral life cycle and constructing anti-viral strategies.

ける重要な因子は過去にさまざまなものが報告されており、BMP (骨形成誘導因子)、Wnt、FGF (線維芽細胞増殖因子)、IGF-I (インスリン様細胞増殖因子-1) などがあがるが、これらを胚性幹細胞に添加しても心筋細胞への分化誘導効率の上昇を確認しえなかった。

心筋細胞分化誘導におけるBMPとノギン

BMP2 遺伝子をノックアウトすると心臓形成ができないことより BMP2 は心臓形成に重要な因子であるとされている¹⁾。しかし、著者らは心筋細胞発生にもっとも重要な因子と考えられている BMP を添加した際に、胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘導効率が若干低下することを確認した。著者らは、まず心筋細胞の発生過程を見直す必要があると考え、過去に報告されている因子とは別のさまざまな因子の発現状態を調べることとした。この結果、心筋細胞の発生領域において BMP アンタゴニストのノギンが一過性であるが、非常に強く発現していることを見出した²⁾ (図 1)。この現象は種を超えて観察される現象であることから、一過性のノギンの発現が心筋誘導の鍵であると推測した³⁾。ノギンはこれまで三胚形成後に脊索に発現し、神経誘導の重要な因子と働くことが知られている^{4,5)}。これに対し心臓予定領域におけるノギンは短時間一過性に発現することが特徴であり、神経形成におけるノギンが長時間継続して発現していることと対照的である。

これは心筋細胞の発生自体に BMP を阻害するノギンが必要であるが、発生後の心筋細胞の成熟と維持にはノギンの存在は不都合であると考えられる。心筋予定領域の発生過程におけるノギンの発現状況を参考に、胚性幹細胞から心筋(前駆)細胞への分化誘導条件について種々検討を重ねた結果、

胚様体形成以前の時期にノギンを添加することにより自律拍動能を有する心筋細胞が選択的かつ高率に産生されることを見出した。過去の BMP シグナルの心筋細胞発生における重要性の検討から、当初ノギンは BMP シグナルをブロックする以外の機能があるのではないかと考えた。しかし、胚性幹細胞の分化過程ではノギン存在下において BMP を添加すると心筋細胞の発生は著明に抑制され、またノギン以外の BMP をブロックする物質(コーディン、可溶性 BMP 受容体)を胚性幹細胞に添加した際にもノギンと同様に心筋細胞を高率に分化誘導しうることがわかった。これよりノギンによる心筋発生促進作用は BMP を阻害することによると考えられた。また、免疫染色、RT-PCR、Western blot などの手法を用い、本方法により胚性幹細胞から作製された拍動性細胞は典型的な心筋細胞の特徴を有する細胞であることが確認された。これらの結果より、胚性幹細胞を用いた心筋再生療法が躍

進的に進歩することが期待される。

おわりに

胚性幹細胞を用いた再生医療は核移植技術の急速な進歩とともに現実味をおびた治療法となりうる可能性が大きくなってきた。しかし、これには目的の細胞に選択的に分化誘導する技術は必要不可欠であり、心筋誘導におけるノギンの発見は今後の再生医療を大きく前進させるものと考えられる。

文献

- 1) Zhang, H. and Bradley, A. : *Development*, **122** : 2977-2986, 1996.
- 2) Yuasa, S. et al. : *Nat. Biotech.*, **23** : 607-611, 2005.
- 3) Faure, S. : *Dev. Biol.*, **244** : 44-65, 2002.
- 4) Smith, W. C. and Harland, R. M. : *Cell*, **70** : 829-840, 1992.
- 5) McMahon, J. A. et al. : *Genes Dev.*, **12** : 1438-1452, 1998.

福田恵一 / Keiichi FUKUDA
慶應義塾大学医学部再生医学教室

細菌学・ウイルス学

感染性C型肝炎ウイルス粒子の培養細胞における作製

Infectious HCV particle produced in cultured cells

C型肝炎ウイルス(HCV)は日本では200万人、世界中で1億7,000万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症のひとつである。このため、わが国ではHCV感染者のスクリーニングなどの事業が開始されている。しかし、HCV感染症の治療はインターフェロンおよびリビリン以外にない、その効果はいまだ不十分である。あらたな治療法の開発が望まれているが、HCVにはよいウイルス培養系と実験用の感

染小動物が存在しないことがHCVの基礎研究の妨げになってきた。最近、著者らはHCVによる劇症肝炎患者から分離したJFH-1株を用いて、HCVの新規感染増殖系を確立した^{1,2)}。本稿ではこの感染性HCV粒子の実験系について概説する。

劇症肝炎HCV株

東京慈恵医科大学第3病院の永山和男教授のグループとの共同研究で、劇症肝炎患者症例の血清からHCVの全長ウイルスゲノムを分離した。分離したウイルス株

を JFH-1 株と命名し、その塩基配列を解析すると JFH-1 株は遺伝子型 2a に属し、慢性肝炎から分離したウイルス株の遺伝子配列と比較して、とくに、5'UTR コア、NS3、NS5a 領域に変異が多いことが判明した³⁾。さらに、コア領域のプロセッシングを解析すると慢性肝炎から分離したウイルス株と効率異なることが判明し、慢性肝炎のウイルス株とは異なる性質をもつことが考えられた。

HCVRレプリコン

HCV は 1989 年にアメリカカイロン社のグループによりウイルス遺伝子の cDNA がクローニングされたことにより発見された。このウイルスの発見以降、ウイルスの培養を実験室内で確立しようと世界中で試みられてきた。しかし、HCV は培養細胞において増殖能力が低く、ウイルスの培養は非常に困難であった。1999 年にドイツの Bartenschlager 博士らのグループにより HCV レプリコンシステムが開発された。HCV のゲノム cDNA の構造領域遺伝子を取り除き、ネオマイシン耐性遺伝子を挿入することにより肝癌細胞である Huh7 細胞内で HCV 遺伝子の持続的な複製が可能となった。この系により HCV の細胞内での RNA 複製機構の研究が可能となり、HCV に対する抗ウイルス薬のスクリーニングや評価ができるようになった。しかし、特定の細胞 (Huh7 細胞) でのみ、また特定の遺伝子型 (遺伝子型 1) の株でしか十分な RNA の複製が確認されなかった。そこで、JFH-1 株をこの HCV レプリコンシステムにより解析したところ、JFH-1 株はこれまでに報告された株と比べると、Huh7 細胞内で効率よく複製することが判明した⁴⁾。

HCV 全長遺伝子複製系による感染性ウイルス粒子の産生

レプリコンシステムにより、JFH-1 株が Huh7 細胞で効率よく複製することが判明したので、JFH-1 株の全ウイルス遺伝子を Huh7 細胞に導入してその複製を解析した。JFH-1 株のウイルス遺伝子は Huh7 細胞で効率よく複製して培養細胞中にウイルス粒子を分泌した。培養液中に分泌されたウイルス粒子を解析すると、これまでに報告されてきた感染患者血液中のウイルス粒子とその性質が非常によく似ていた。さらに、培養液中に分泌されたウイルス粒子はあらたな Huh7 細胞に感染できることがわかり培養細胞にウイルスを感染させて効率よく増やすことが可能となった。また、産生されたウイルス粒子はチンパンジーに感染することを確認した¹⁾。さらに、Huh7 細胞の垂種細胞株を使用することにより感染力価を非常に高くすることができた²⁾。

HCV 培養系による展望

JFH-1 株を用いることにより HCV の感染性粒子の産生がはじめて可能になった。これまで HCV の研究はウイルスの遺伝子解析が中心であったが、この実験系により HCV をウイルス学的に研究す

ることが可能となった。したがって、これまで不明な点が多かった HCV の生活環 (標的細胞に感染して複製する過程) を解析することができるようになった。ウイルスがどのようにして感染し、細胞内で複製増殖し、ウイルス粒子を形成して細胞外へ分泌されているかが明らかになれば、その過程はすべて抗ウイルス薬開発のターゲットとなりうる。さらに、人工的にウイルス粒子を産生することが可能となったことから、予防的さらに治療的ワクチンの開発にも道が開けることを期待している。

- 1) Wakita, T. et al.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.*, **11**: 791-796, 2005.
- 2) Zhong, J. et al.: Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 9294-9299, 2005.
- 3) Kato, T. et al.: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.*, **64**: 334-339, 2001.
- 4) Kato, T. et al.: Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**: 1808-1817, 2003.

協田隆宇 / Takaji WAKITA
東京都神経科学総合研究所

臨床検査医学

包括医療 (DPC) における臨床検査ガイドライン

Guideline for laboratory medicine in DPC system

包括医療における臨床検査の現状

現行の診療報酬体系は、昭和 33 年に新医療費体系として構築された。基本的特徴は、診療行為ごとの出来高払い方式である。この出来高払い方式における問題点と、昨今の国民医療費が増大する

なか、医療の経済効率が叫ばれるようになり、40 年間続いてきた出来高払い方式は見直しせざるをえなくなってきた。このようななか、臨床検査の分野はいち早く包括化の対象となってきた。外来診療における生化学 I 検査の総量規制からはじまり、生化学 II 検査、内分

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

脇田 隆字 財団法人東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

APOBEC 遺伝子ファミリーに属するAPOBEC3GにB型肝炎ウイルス (HBV) に対する抗ウイルス作用が報告され、cytidine 脱アミノ酵素であるAPOBECが注目されている。APOBEC3GはHBVのpregenomic RNAのウイルス粒子へのパッケージングを阻害するとともにHBVゲノムのG → A変異を誘導する。

ウイルス粒子への pregenomic RNAの パッケージング阻害

APOBECはapolipoprotein B (apoB)-editing catalytic subunitの略称であり、核酸の修飾酵素である。APOBEC3Gは、最初にヒト免疫不全ウイルス(HIV)の一鎖ゲノムDNAのCytidineをUridineに変異させることでウイルス複製を抑制することが報告された。興味深いことにHIVはこのAPOBEC3Gの抗ウイルス作用に拮抗するvifという遺伝子をウイルスゲノム上に有しているのである。

このAPOBEC3GがHBVの複製を培養細胞で抑制することが、Turelliらによって2004年にScience誌に報告された¹⁾。HBVはレトロウイルスと同様に

逆転写酵素をウイルスゲノム上にコードしており、HBVのタンデムゲノムを持つプラスミドDNAをトランスフェクションすることにより、培養細胞中でウイルスゲノムが複製されてウイルス粒子が培養液中に分泌される。Turelliらは、HBVのプラスミドDNAとAPOBEC3G発現プラスミドを同時にHuh7細胞にトランスフェクションすることによりHBV複製に対するAPOBEC3Gの作用を解析した。サザンブロット法および蛋白の検出によりHBV複製の抑制が観察されたが(表1)、細胞内のコア粒子内HBVゲノムには、有意なG → Aの変異(一鎖DNAのC → Uにより+鎖DNAのG → Aの変異が誘導される)の増加を検出できなかった。TurelliらはAPOBEC3Gがpregenomic RNAのウイルス粒子へのパッケージングを阻害する機構を想定した。

表1 APOBEC3GによるHBV複製抑制

| | | | | |
|----------|---|---|---|----|
| HBVプラスミド | - | + | + | + |
| APOBEC3G | - | - | + | ++ |
| HBV複製 | - | + | ± | - |

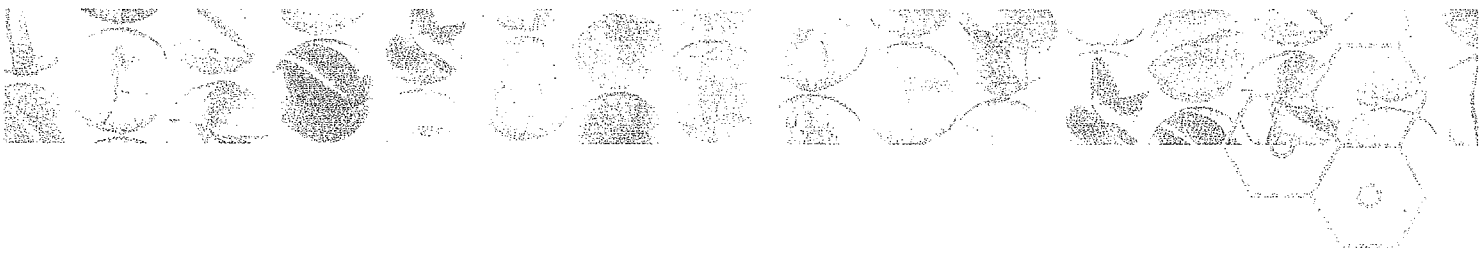
HepG2細胞でG → A変異を 誘導するが Huh7細胞では変異はない

これに対してRöslerらは、同様の実験をHuh7細胞とHepG2細胞で実施し、やはりAPOBEC3G発現に伴うHBV複製の抑制を観察した²⁾。さらにウイルスゲノムの遺伝子配列を解析し、Huh7細胞ではG → Aの変異の増加はなかったが、HepG2細胞ではG → Aの変異の増加を観察した(表2)。この結果からRöslerらはAPOBEC3GによるHBVの複製抑制の機構は、ウイルスゲノムDNAのG → Aの変異誘導とpregenomic RNAのウイルス粒子へのパッケージング阻害の両方があり、Huh7細胞では変異誘導に参与する宿主因子が欠損している可能性を示唆した。

APOBECは生体が持つ 自然免疫の機構の1つである

NoguchiらはHepG2細胞と患者血清を用いて、HBVにはG → Aのhypermutation(高頻度突然変異)があることをpeptide nucleic acid (PNA) clampingによるPCR法で証明した³⁾。Noguchiらのグループは以前この方法で、野生型ウイルス存在下にラミブジン耐性の非常に微量なYMDD変異株(1/10,000)の検出に成功している。PNA clamping PCR法に

文献1をもとに改変



より急性B型肝炎患者8名中1名と慢性B型肝炎患者10名中4名において、血清中HBVゲノムにG → Aの高頻度突然変異があることを証明した。慢性肝炎でHBe抗体陽性患者では高頻度突然変異を検出したのは5名中4名であったが、HBe抗体陰性(全員HBe抗原陽性)患者では5名全員とも高頻度突然変異は検出できなかった。

さらにNoguchiらは、HepG2細胞にHBVゲノムをトランスフェクションして持続的にHBV粒子を産生するcell lineを樹立した。3つのcell lineの培養上清中のHBVゲノムをPNA clamping PCR法により増幅し、増幅したDNAをクローン化後シーケンス解析すると、3つのcell lineのうちの1つでウイルスゲノムにG → Aの高頻度突然変異を検出した。感染患者および培養細胞からHBVゲノムのG → Aの高頻度突然変異が検出できたことから、生体が持つHBVに対する自然免疫の機構の1つとしてCytidine 脱アミノ酵素であるAPOBECの関与が考えられると結論した。

**RNAウイルスへの
抗ウイルス作用?**

Cytidine 脱アミノ酵素であるAPOBECが、HIVの複製抑制に関与していることが報告されてからわずかの間にHBVへの関与も報告された。そもそもAPOBECはゲノム上に存在する遺伝子情報を「edit」する酵素である。ワトソン、クリックによる二本鎖DNAのらせん構造から遺伝情報のセントラルドグマが提唱され、ゲノム上の遺伝子情報は安定であり、子々孫々へDNAとして伝えられると考えられた。このドグマに例外があることを証明したのがテミン、ボルチモアの逆転写酵素の発見であり、利根川進による抗体遺伝子の再編成の発見であった。Cytidine 脱アミノ酵素は抗体遺伝子の再編成にも関与していると報告されている。

生体の持つウイルスに対する自然免疫で最も重要なのはインターフェロンであるが、今後はさまざまな生体の抗ウイルス機構が解明されてゆくであろう。

なにせ生体とウイルスは数万年以上のつきあいなのだから。ヒトのAPOBEC遺伝子ファミリーは齧歯類よりも多いことがわかっている。これはヒトゲノム上にレトロウイルスが組み込まれレトロトランスポゾンとして多く存在していることと関連しているらしい。レトロトランスポゾンの活動によりゲノムが混乱するのでそれに対する対抗策としてAPOBEC遺伝子が発達したのかもしれない。APOBECの抗ウイルス作用はレトロウイルスだけでなく、RNAウイルスへの作用も考えられる。そうであればC型肝炎ウイルスに対してはどのようなであろうか? また、APOBEC遺伝子による遺伝子治療の可能性もある。今後も注目する必要があるだろう。

表2 APOBEC3GによるG → A変異の誘導

| | G → A変異クローン数 | 総クローン数 |
|------------------|--------------|--------|
| HepG2細胞 | 2 | 111 |
| HepG2細胞+APOBEC3G | 10 | 112 |
| Huh7細胞 | 1 | 102 |
| Huh7細胞+APOBEC3G | 3 | 105 |

文献

1. APOBEC3GによるB型肝炎ウイルスの複製阻害
Turelli P et al: Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303 (5665): 1829, 2004
2. 「APOBEC3GによるB型肝炎ウイルスの複製阻害」へのコメント
Rösler C et al: Comment on "Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G". *Science* 305 (5689): 1403a, 2004
3. B型肝炎ウイルスのG→Aの高頻度突然変異
Noguchi C et al: G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 41 (3): 626-633, 2005

文献2をもとに改変

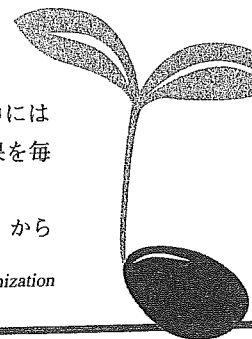
TLO推薦の バイオシーズ & 技術集

| | |
|---|-----|
| 遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルス (HCV) 由来の RNA レプリコン | 300 |
| 分子イメージングによる分子間相互作用解析法の開発 | 303 |
| 薬剤キャリアやナノカプセルに“使える” ナノサイズベシクル | 306 |

大学や研究機関などの研究成果は、TLO*が積極的にライセンスを行い技術移転を進めているが、その中にはまだまだ利用可能な有望な新テクノロジーやシーズがあふれている。本コーナーでは、TLO イチ押しの研究成果を毎回数本ずつご紹介していき、また読者の皆様には技術交流の場として活用していただきたい。

今回は、(財)東京都医学研究機構の知的財産活用推進室から2つ、(株)テクノネットワーク四国(四国 TLO)から1つのバイオシーズをご紹介します。

*: TLO Technology Licensing Organization



バイオシーズ ①

遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルス (HCV) 由来の RNA レプリコン

脇田隆宇

■遺伝子 2a 型の C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞

特願 2003-148242, PCTJP03/15038 平成 15 年 5 月 26 日出願 その他 3 件

脇田らは、遺伝子型 2a の HCV レプリコンを開発し、これまで困難であった多様な細胞における HCV レプリコンの複製系を実現した。さらに、HCV ウイルス粒子の *in vitro* 再構築にも成功しており、国内外の製薬企業にライセンスを開始している。〔(財)東京都医学研究機構 知的財産活用推進室〕

はじめに

わが国には C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染者が 200 万人程度存在すると考えられている。HCV は血液を介して主に肝臓に感染する。HCV 感染症は持続化して慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へ至る。輸血用血液のスクリーニングが可能となり、新たな感染者は激減したが、未だに多くのウイルスキャリアーが治療を必要としている。HCV 感染症の治療法はインターフェロンおよびリパビリンが使用されているが、その効果は十分とはいえず、新たな治療法の開発が望まれている。HCV はウイルスそのものではなく、ウイルスゲノムの遺伝子クローニングにより同定された。ウイルスゲノムの遺伝子構造の解析からフラビウイルス科に属することが判明し、そのウイルスゲノムのさまざまな機能も明らかとなってきた。しかし、小型の感染用実験動物と HCV の良い培

養系がないため、HCV のウイルス学的研究は必ずしも進んでこなかった。特に、HCV は培養細胞に感染させることができず、ウイルスの標的細胞への感染、ウイルスの複製、そしてウイルス粒子の生成および分泌過程の解析が進まなかった。

1. HCV 感染増殖過程

HCV の感染増殖過程の概略を図 1 に示す。HCV は標的細胞 (主に肝細胞と考えられている) にレセプターを介して吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる。エンドゾーム内の pH 変化によりウイルス粒子内のキャプシドとゲノム RNA が細胞質内へ放出される。ウイルス RNA ゲノムはまずメッセンジャー RNA として機能し、ウイルスタンパク質翻訳のための鋳型となる。翻訳されたウイルスの非構造領域タンパク質 (NS2-5B) はウイルスゲノムを複製して

く、複製したウイルスゲノムはウイルスの構造領域タンパク質にパッケージングされて完成されたウイルス粒子となり、細胞外へ放出される。

2. HCV レプリコン

培養細胞内で HCV のウイルスゲノム複製過程を解析することのできるシステムが RNA レプリコンであり、1999 年に Bartenschlager 博士（現ハイデルベルグ大学）のグループが初めて開発に成功したり、長年望まれていた HCV ウイルスゲノムの細胞内でのウイルスゲノム複製実験系であり、画期的であった。HCV の全長 cDNA は約 9,600 塩基長あるが、5' 側に存在する構造領域遺伝子と NS2 遺伝子を欠失させ、その部位に薬剤耐性遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子とその下流に EMCV の IRES 遺伝子を挿入した。HCV レプリコン実験系の概略を図2に示す。レプリコン構築を鋳型として試験管内でレプリコン RNA を合成した。合成レプリコン RNA を導入した Huh7 細胞を G418 存在下に、2~4 週間培養する。HCV レプリコン RNA が自律複製するとネオマイシン耐性遺伝子が発現するため、細胞は生存することができ、コロニーを形成し増殖する。レプリコンが複製していない細胞は G418 の作用により死滅する。培養終了後細胞を固定してクリスタルバイオレットなどの色素で染色するとコロニーが容易に可視化できる。また、コロニーを形成したレプリコン複製細胞をクローニングして増殖させることが可能である。レプリコン複製細胞では HCV RNA が効率よく複製しており、複製している RNA やウイルスタンパク質を容易に検出できる。さらにレプリコン構築の薬剤耐性遺伝子をルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子と交換したり、融合

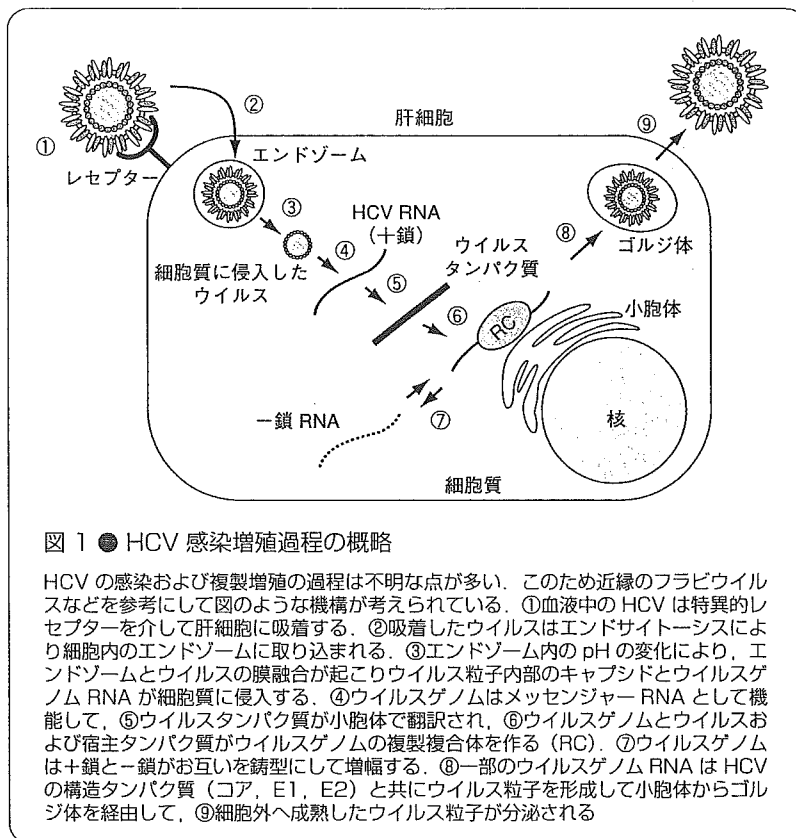


図1 ● HCV 感染増殖過程の概略

HCV の感染および複製増殖の過程は不明な点が多い。このため近縁のフラビウイルスなどを参考にして図のような機構が考えられている。①血液中の HCV は特異的レセプターを介して肝細胞に吸着する。②吸着したウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内のエンドソームに取り込まれる。③エンドソーム内の pH の変化により、エンドソームとウイルスの膜融合が起こりウイルス粒子内部のキャプシドとウイルスゲノム RNA が細胞質に侵入する。④ウイルスゲノムはメッセンジャー RNA として機能して、⑤ウイルスタンパク質が小胞体で翻訳され、⑥ウイルスゲノムとウイルスおよび宿主タンパク質がウイルスゲノムの複製複合体を作る (RC)。⑦ウイルスゲノムは+鎖と-鎖がお互いを鋳型にして増幅する。⑧一部のウイルスゲノム RNA は HCV の構造タンパク質 (コア、E1、E2) と共にウイルス粒子を形成して小胞体からゴルジ体を経由して、⑨細胞外へ成熟したウイルス粒子が分泌される

入した Huh7 細胞を G418 存在下に、2~4 週間培養する。HCV レプリコン RNA が自律複製するとネオマイシン耐性遺伝子が発現するため、細胞は生存することができ、コロニーを形成し増殖する。レプリコンが複製していない細胞は G418 の作用により死滅する。培養終了後細胞を固定してクリスタルバイオレットなどの色素で染色するとコロニーが容易に可視化できる。また、コロニーを形成したレプリコン複製細胞をクローニングして増殖させることが可能である。レプリコン複製細胞では HCV RNA が効率よく複製しており、複製している RNA やウイルスタンパク質を容易に検出できる。さらにレプリコン構築の薬剤耐性遺伝子をルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子と交換したり、融合

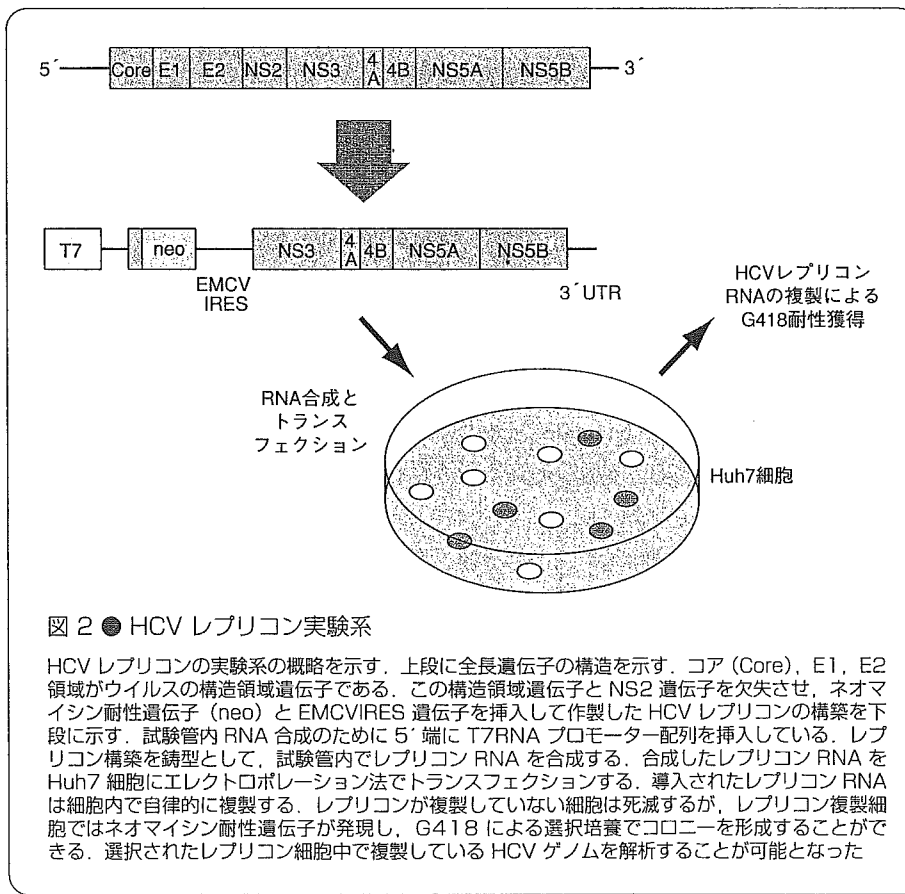


図2 ● HCV レプリコン実験系

HCV レプリコンの実験系の概略を示す。上段に全長遺伝子の構造を示す。コア (Core)、E1、E2 領域がウイルスの構造領域遺伝子である。この構造領域遺伝子と NS2 遺伝子を欠失させ、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) と EMCV IRES 遺伝子を挿入して作製した HCV レプリコンの構築を下段に示す。試験管内 RNA 合成のために 5' 端に T7 RNA プロモーター配列を挿入している。レプリコン構築を鋳型として、試験管内でレプリコン RNA を合成する。合成したレプリコン RNA を Huh7 細胞にエレクトロポレーション法でトランスフェクションする。導入されたレプリコン RNA は細胞内で自律的に複製する。レプリコンが複製していない細胞は死滅するが、レプリコン複製細胞ではネオマイシン耐性遺伝子が発現し、G418 による選択培養でコロニーを形成することができる。選択されたレプリコン細胞中で複製している HCV ゲノムを解析することが可能となった

させたりすることにより、より簡便にレプリコン複製をモニターできる実験系も開発されている。このレプリコン実験系によりすでに抗 HCV 薬の開発が進んでいる。NS3 プロテアーゼ阻害薬、NS5B RNA ポリメラーゼ阻害薬などによるデータが明らかになりつつある。

3. 遺伝子型 2a の HCV レプリコンの開発

しかし HCV レプリコンの問題点は、特定の遺伝子型 (1 型) の特定のウイルス株 (Con1, N など) が特定の細胞 (Huh7 細胞) でのみしか増殖できないことであった。さらに培養細胞でレプリコンが効率よく複製するためにはウイルスゲノム上に適合変異が必要である。この適合変異は患者血清中のウイルスには見られない変異であり、適合変異を導入したレプリコンの複製が HCV 本来の複製過程を反映しているかどうか疑問も生じた。本特許出願において、われわれは HCV 感染による劇症肝炎患者からクローニングした遺伝子型 2a の JFH-1 株を用いてレプリコンを作製した²⁾。JFH-1 のレプリコンは Huh7 細胞において遺伝子型 1b の Con1 よりもはるかに効率よく複製することが明らかとなった。さらに、JFH-1 は HepG2 細胞、IMY 細胞、さらに非肝臓系細胞などのこれまでレプリコンが複製できなかった細胞でも複製が可能である³⁾⁴⁾。この JFH-1 によるレプリコンの特徴は、培養細胞での効率の良いウイルスゲノム複製に適合変異を必要としないことである。したがって、これまでの HCV レプリコンと比較することにより適合変異が HCV 複製にもたらす意義を解析することができる。また、JFH-1 株のどの遺伝子領域がその効率の良い複製に重要であるかを同定する必要がある。この解析によりウイルス複製効率に関与する領域が同定できれば新たな抗ウイルス薬の標的となる。さらに、これまで限られた遺伝子型の HCV レプリコンでしか抗ウイルス薬のスクリーニングができなかったが、JFH-1 株のレプリ

コンを用いることにより、より多くの HCV 株に効果のある薬剤を同定することが可能となる。また、慢性肝炎から分離されるほとんどの株がレプリコンとしての活性がない、この複製能力の低さが宿主の免疫反応から逃れるために重要なのかも知れない。

4. 今後の課題

最初の HCV レプリコンはウイルスの構造遺伝子を欠かさせたためウイルス粒子は形成できなかった。ウイルス粒子を形成させるため、全長のウイルス遺伝子を用いたレプリコンも開発されたが、未だにウイルス粒子は確認されていない。今後はウイルス遺伝子複製だけでなく、ウイルス感染、複製増殖、粒子放出が解析できる実験系の開発が望まれている。

参考文献

- 1) Lohmann, V. et al.: Science, 285: 110-113, 1999
- 2) Kato, T. et al.: Gastroenterology, 125: 1808-1817, 2003
- 3) Date, T. et al.: J. Biol. Chem., 279: 22371-22376, 2004
- 4) Kato, T. et al.: J. Virol., 79: 592-596, 2005

脇田隆宇 (Takaji Wakita)

東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門・副参事研究員。
1983 年名古屋大学医学部卒、1992 年名古屋大学大学院医学研究科修了および医学博士、同年ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センターに留学、1995 年東京都臨床医学総合研究所・主任研究員、1998 年東京都神経科学総合研究所・主任研究員、2000 年より現職。

この技術に関する問い合わせ先

(財)東京都医学研究機構 知的財産活用推進室

担当 : 青木一正
電話 : 03-4463-7578
e-mail : kaoki@rinshoken.or.jp

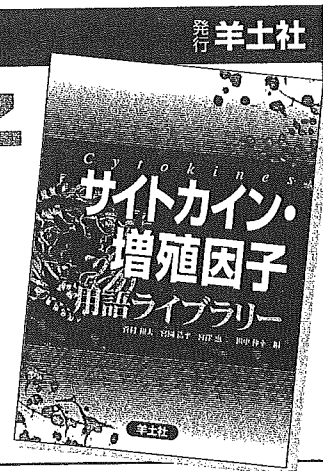
知りたい因子がすぐ引けて、知りたい情報がすぐわかる!

サイトカイン・増殖因子 用語ライブラリー

菅村和夫, 宮園浩平, 宮澤恵二, 田中伸幸/編

定価6,300円(本体6,000円+税5%) B5判 309頁 ISBN4-89706-477-5

- 頻出因子を網羅!!
- 辞書としてもテキストとしても役立つ一冊!!
- 歴史・機能・構造・因子間の関連性が一目瞭然!!



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

Koji Ishii^a, Hideki Hasegawa^b, Noriyo Nagata^b, Tetsuya Mizutani^c, Shigeru Morikawa^c, Tetsuro Suzuki^a, Fumihiko Taguchi^d, Masato Tashiro^d, Toshitada Takemori^e, Tatsuo Miyamura^a and Yasuko Tsunetsugu-Yokota^{*e}

^aDepartment of Virology II, ^bPathology, ^cVirology I, ^dVirology III, ^eImmunology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

*Address correspondence to: Yasuko Tsunetsugu-Yokota

Department of Immunology,

National Institute of Infectious Diseases,

Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Phone: +81-3-5285-1111 ext.2133

FAX.: +81-3-5285-1150

Email: yyokota@nih.go.jp

Running Title: Replication-deficient vaccinia DIs as a vector for SARS vaccine

Abstract

SARS-coronavirus (SARS-CoV) has recently been identified as the causative agent of SARS. We constructed a series of recombinant DIs (rDIs), a highly attenuated vaccinia strain, expressing a gene encoding four structural proteins (E, M, N and S) of SARS-CoV individually or simultaneously. These rDIs elicited SARS-CoV-specific serum IgG antibody and T-cell responses in vaccinated mice following intranasal or subcutaneous administration. Mice that were subcutaneously vaccinated with rDIs expressing S protein with or without other structural proteins induced a high level of serum neutralizing IgG antibodies and demonstrated marked protective immunity against SARS-CoV challenge in the absence of a mucosal IgA response. These results indicate that the potent immune response elicited by subcutaneous injection of rDIs containing S is able to control mucosal infection by SARS-CoV. Thus, replication-deficient DIs constructs hold promise for the development of a safe and potent SARS vaccine.

(141 words)

Key Words: Vaccinia virus, vaccine, SARS

Introduction

Severe acute respiratory syndrome (SARS) has become a priority for healthcare agencies around the world given its communicability, associated mortality, and the potential for pandemic spread. As of 31 July 2003, 8,098 SARS cases had been identified worldwide, resulting in 774 deaths and a mortality rate of about 9.6% (World Health Organization statistics). SARS is now known to result from infection with a novel coronavirus (SARS-CoV) (Drosten et al., 2003) (Ksiazek et al., 2003) (Peiris et al., 2003). Evidence that SARS-CoV is the etiologic agent of SARS follows an experimental infection of macaques (*Macaca fascicularis*), fulfilling Koch's postulates (Fouchier et al., 2003). The clinical manifestations of SARS are hardly distinct from other common respiratory viral infections, including influenza. Because influenza epidemics might occur simultaneously with the eventual re-emergence of SARS, an effective SARS vaccine is urgently required, as well as more sensitive diagnostic tests specific for SARS.

Structural characterization of SARS-CoV and characterization of its complete RNA genome (Marra et al., 2003) (Rota et al., 2003) (Ruan et al., 2003) have provided us with the opportunity to develop a SARS vaccine. Like other coronaviruses, SARS-CoV is a plus-stranded RNA virus with a 30-kb genome encoding replicase gene products and the 4 structural proteins; i.e., spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) (Marra et al., 2003) (Rota et al., 2003). The S protein is thought to be involved in receptor binding, while the E protein has a role in viral assembly, the M protein is important for virus budding, and the N protein has a role in viral RNA packaging (for review, see reference (Holmes, 2003)). Recently, angiotensin-converting