

200707019 A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業  
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成20(2008)年4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発	1
松浦 善治	
II. 分担研究報告書	
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発	6
松浦 善治	
組換え E 型肝炎ウイルス粒子の作製と応用に関する研究	9
武田 直和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

主任研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく切断される最適配列を決定した。恒常的活性化型の IFN 調節因子遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築し、HCV ゲノムが自立複製しているレプリコン細胞に感染させることにより、容量依存的に HCV RNA の複製抑制が観察された。経粘膜遺伝子導入ベクターの開発を目指して、遺伝子型 III の HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠損させた VLP の結晶化に成功し、その立体構造を解析した。遺伝子型 III の HEV-LP は 3 つの機能ドメインより構成され、T=1 の粒子を構成していた。遺伝子型 I の組換え HEV-LP 形成に必須な最小アミノ酸配列は、これまでの 111~608 からさらに絞り込んだ 125~601 残基であった。HEV-LP を基礎に、HEV ORF3 蛋白あるいは 2 型ブタサーコウイルス (PCV2) 構造蛋白を同時に発現するキメラ HEV-LP を作製した。キメラ HEV-LP の抗原性および免疫原性の解析から ORF3 蛋白はキメラ HEV-LP の表面に配置していることが明らかになった。一方、PCV2 構造蛋白を併せ持つキメラ HEV-LP の免疫原性は弱かった。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授  
武田直和 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そして RNA ウィルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細

胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入できる。2) ウィルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な免疫応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4) 他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウィルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウィルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 感染症に対する遺伝子治療用ベクターの開発:C型肝炎ウイルス(HCV)は巧みに宿主の免疫機構から逃避して、持続感染を成立させ、最終的には肝細胞癌を発症させる。そこで、バキュロウイルスベクターを用いて、HCV に感染した細胞特異的にインターフェロンを誘導させてウィルスの排除を試みる。また、ウィルスの排除が難しいならば、肝細胞癌の発症に関与するコア蛋白質と核内プロテアソームの活性化因子 PA28 $\gamma$  の相互作用による SREBP-1c の活性化を制御して、肝癌の発症の遷延化を試みる。

2) E 型肝炎ウイルス様粒子(HEV-LP)を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発:バキュ

ロウイルスを利用して HEV の構造蛋白を発現させると、大量の HEV-LP が産生される。HEV-LP を改変して目的蛋白質を粒子の表面あるいは内部に発現させてキメラ粒子の作製が試みられてきたが、生産性の低下が大きな問題となっている。そこで、外来蛋白質の挿入部位と容量を効率よく設計できるように、遺伝子型 III の HEV-LP の結晶構造を解析した。

3) 組換えバキュロウイルスの作製と発現蛋白の解析：遺伝子型 I の HEV ORF2 蛋白の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させ、外来性蛋白領域を担う遺伝子を同じ向きに連結したクローンを作製した。遺伝子型 III の HEV では ORF2 全長の遺伝子も用いた。定法どおり組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞に MOI:10 で感染後、培養上清および細胞からそれぞれ発現蛋白を回収した。ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。抗 HEV-LP 抗体、E 型肝炎患者血清、および外来性蛋白に対する抗体を用い、電子顕微鏡、ELISA 法、ウェスタンブロット等で粒子の形成、抗原性、免疫原性等を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

### C. 研究結果

1) HCV 感染症に対する遺伝子治療用ベクターの開発：HCV に感染した細胞ではウイルス由来のプロテアーゼが発現し、自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく切断される配列を検索し、最適配列を決定した。IFN の発現による HCV 排除を確認するため、恒常的に活性化された IFN 調節因子(IRF)7 遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築し、HCV ゲノムが自立複製しているレプリコン細胞に感染させると、容量依存的に HCV RNA の複製抑制が観察された。

2) HEV-LP の結晶構造解析：HEV ORF2 の N 末

端から 111 アミノ酸を欠損させた VLP の結晶化に成功し、その構造を解析した。HEV-LP は 3 つの機能ドメインより構成され、T=1 の粒子を構成していた。Calicivirus に属する San Miguel sea lion virus (SMSV) や Norovirus (NV) の VLP(NV-LP)と比較して、HEV-LP のみが異なるトポロジーを保持していた。SMSV や NV-LP は P1, P2 そして S ドメインが重なるようにタイトな構造を取るのに対して、HEV-LP は P1 と P2 ドメインの間に非常に長いリンカー構造が存在し、フレキシブルな構造を持っていた。HEV-LP の P1 ドメインはアミノ酸残基 320-457 で構成されているが、NV-LP の P1 ドメインはアミノ酸残基 226-278 とアミノ酸残基 406-520 の二つの領域で構成されていた。粒子表面の突起は HEV-LP では二量体で形成されるが、Nodavirus や Reovirus では三量体で形成されていた。突起の数は Calicivirus や Hepevirus と、Nodavirus や Reovirus は同じで 20 個で同じであるが、構成様式は異なっていた。T289 を Ala に置換すると VLP が産生されなくなり、T289 は 5 回軸周辺の Y288 が形成する疎水性ポアの安定化に寄与していることが推測された。

3) HEV-LP 形成に必須な最小アミノ酸配列：

HEV ORF2 の 112-608 アミノ酸を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 27nm の中空粒子が多数観察される。構造蛋白が 60 コピー集合して形成される T=1 の粒子である。N 末端と C 末端をさらに欠損させた場合、N 末端は 124 アミノ酸、C 末端では 59 アミノ酸を欠失させても粒子形成を観察することができた。しかしながら、N 末端、C 末端いずれの場合もさらに 1 アミノ酸でも欠損させると粒子形成が完全に抑えられ、HEV ORF2 の 124-601 アミノ酸が HEV-LP 形成に必須な最小アミノ酸配列であった。

4) キメラ HEV-LP の作製と性状解析：1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 あるいは 124 アミノ酸を種々の長さの ORF3、あるいは離乳後多臓器発育不良症候群の原因ウイルスである 2 型ブタサーコウイルス (PCV2) 構造蛋白に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現した。定法どおり感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの場合も直径 27nm の粒子が多数観察された。キメラ HEV-LP の抗原性および免疫原性の解析から ORF3 蛋白はキメラ HEV-LP の表面に配置していることが明らかになった。一方、PCV2 構

造蛋白を併せ持つキメラ HEV-LP の免疫原性は弱いものであった。

5) ORF2 の全長の発現：定法どおり組換えバキュロウイルス感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。この粒子内部には HEV 特異的な配列を持つ核酸が取り込まれていた。

#### D. 考察

バキュロウイルスを用いて HCV ゲノムが複製している肝臓細胞からウイルスの複製を制御できる可能性が示された。今後ヒト肝細胞を移植し、HCV の感染を許容できるキメラマウスを用いて *in vivo* のウイルス排除効果を評価する。HCV 蛋白質による免疫回避機構に介入し、C 型慢性肝炎患者の免疫を賦活化することによって、生体からウイルスを排除できる新しい治療法や、HCV の複製や成熟に必須な宿主因子、VAP-B、FKBP8、hBind-1、SPP および PA28 $\gamma$  の発現を制御可能なバキュロウイルスを作製し、*in vitro* でのウイルス複製抑制および中性脂肪の産生抑制を確認したい。また、我が国での感染が問題となっている遺伝子型 III 型 HEV-LP の三次元構造が解けたことは、この粒子を用いた遺伝子デリバースystem やワクチンベクターの開発における波及効果は計り知れない物がある。

HEV 構造蛋白の N 末端および C 末端の構造と HEV-LP の形成に関する一連の実験から N 末端 111 アミノ酸からさらに絞り込んだ 111~124 の 15 アミノ酸、C 末端 52 アミノ酸からさらに絞り込んだ 601~608 の 7 アミノ酸を欠損させても VLP 形成には影響がないことが示された。したがって、構造蛋白の 125-601 アミノ酸が粒子形成に必須のアミノ酸残基で粒子のコアを形成していると考えられる。PCV2 では構造蛋白由来最長 72 アミノ酸を、HEV ORF3 蛋白では全長 123 アミノ酸を N 末端に連結することによって外来蛋白を持つキメラ HEV-LP を発現することができた。また、連結する外来性蛋白によってその抗原性や免疫原性に差がみられたことから、外来性蛋白のキメラ粒子上における構造や部位が影響しているように思われた。今後、同様な手法で外来蛋白挿入できる最適な条件を見だし、キメラ HEV-LP を作製するとともに、構造解析を進めていきたい。また、経口あるいは経鼻投与して、消化器や呼吸器系の粘膜における

*in vivo* での免疫誘導能について検討したい。35-40nm の組換え粒子が作製できたことから、三次構造解析によってネイティブな HEV 構造の情報が得られることが期待できる。この粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、HEV の除去・不活化法の研究にも有用である。今後、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。また、再構成粒子についても経口あるいは経鼻投与し粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討する。

#### E. 結論

- 1) HCV 感染細胞でのみ効率よく活性化されるように設計した組換えバキュロウイルスを構築した。
- 2) HEV-LP の結晶構造の解析に成功した。
- 3) HEV-LP 形成に必須なアミノ酸領域を同定した。N 末端に連結した外来性構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現することによって、キメラ HEV 粒子を作製することができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Yamashita T., Unno H., Mori Y., Tani H., Moriishi K., Takamizawa A., Agoh M., Tsukihara T., Matsuura Y. Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å. *Virology* (in press).
- 2 Tani H., Abe K., Matsubaga T., Moriishi K., and Matsuura Y. Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development. *Future Virology*, 2008, 3, 35-43.
- 3 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 2007, 104, 1661-1666.
- 4 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.*, 2007, 81, 8953-8966.
- 5 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y.,

- Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.*, 2007, 81, 8477-8487.
- 6 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
- 7 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
- 8 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
- 9 Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81
- 10 Li TC, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve *yamato-shijimi* (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:170-172.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治:HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28γ の役割 : 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日、2007.
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治 : C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析 : 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日、2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治 : C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治 : シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治 : C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治 : C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治 : E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析、同上。
- 13 李天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和、2007.10. シジミからの E 型肝炎ウイルス

- 遺伝子の検出、同上。
- 14 李天成, 宮村達男, 脇田隆宇, 武田直和, 2007.10. キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製、同上。
  - 15 加藤花名子, 佐藤幸代, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 土屋公幸, 仲谷淳, 鈴木和男, 樹金森弘, 李天成, 武田直和, 恒光裕, 池田秀

利, 2007.9. 野生動物における抗 E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査. 第 144 回日本獣医学会学術集会. 江別市

- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授  
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨：HCVのプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV感染細胞でのみ効率よく切断される配列を検索し、最適配列を決定した。IFNの発現によるHCV排除を確認するため、恒常的に活性化されたIFN調節因子(IRF)7遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築し、HCVゲノムが自立複製しているレプリコン細胞に感染させると、容量依存的にHCV RNAの複製抑制が観察された。HEV ORF2のN末端から111アミノ酸を欠損させたVLPの結晶化に成功し、その構造を解析した。HEV-LPは3つの機能ドメインより構成され、T=1の粒子を構成していた。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そしてRNAウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖DNAを遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入できる。2) ウイルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な免疫

応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4) 他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウイルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 感染症に対する遺伝子治療用ベクターの開発：C型肝炎ウイルス(HCV)は巧みに宿主の免疫機構から逃避して、持続感染を成立させ、最終的には肝細胞癌を発症させる。そこで、バキュロウイルスベクターを用いて、HCVに感染した細胞特異的にインターフェロンを誘導させてウイルスの排除を試みる。また、ウイルスの排除が難しいならば、肝細胞癌の発症に関与するコア蛋白質と核内プロテアソームの活性化因子PA28 $\gamma$ の相互作用によるSREBP-1cの活性化を制御して、肝癌の発症の遷延化を試みる。

2) E型肝炎ウイルス様粒子(HEV-LP)を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発：バキュロウイルスを利用してHEVの構造蛋白を発現させると、大量のウイルス様粒子(HEV-LP)が産生される。HEV-LPを改変して目的蛋白質を粒子の表面あるいは内部に発現させてキメラ粒子の作製が試みられてきたが、生産性の低下が大きな問題となっている。そこで、外来蛋白質の挿入部位と容量を効率よく設計できるように、HEV-LPの結晶構造を解析した。(倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動

物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

### C. 研究結果

1) HCV 感染症に対する遺伝子治療用ベクターの開発: HCV に感染した細胞ではウイルス由来のプロテアーゼが発現し、自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく切断される配列を検索し、最適配列を決定した。IFN の発現による HCV 排除を確認するため、恒常的に活性化された IFN 調節因子 (IRF)7 遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築し、HCV ゲノムが自立複製しているレプリコン細胞に感染させると、容量依存的に HCV RNA の複製抑制が観察された。

2) HEV-LP の結晶構造解析: HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠損させた VLP の結晶化に成功し、その構造を解析した。

HEV-LP は 3 つの機能ドメインより構成され、T=1 の粒子を構成していた。Calicivirus に属する San Miguel sea lion virus (SMSV) や Norovirus (NV) の VLP (NV-LP) と比較して、HEV-LP のみが異なるトポロジーを保持していた。SMSV や NV-LP は P1, P2 そして S ドメインが重なるようにタイトな構造を取るのに対して、HEV-LP は P1 と P2 ドメインの間に非常に長いリンカー構造が存在し、フレキシブルな構造を持っていた。

HEV-LP の P1 ドメインはアミノ酸残基 320-457 で構成されているが、NV-LP の P1 ドメインはアミノ酸残基 226-278 とアミノ酸残基 406-520 の二つの領域で構成されていた。粒子表面の突起は HEV-LP では二量体で形成されるが、Nodavirus や Reovirus では三量体で形成されていた。突起の数は Calicivirus や Hepevirus と、Nodavirus や Reovirus は同じで 20 個で同じであるが、構成様式は異なっていた。T289 を Ala に置換すると VLP が産生されなくなり、T289 は 5 回軸周辺の Y288 が形成する疎水性ポアの

安定化に寄与していることが推測された。

### D. 考察

バキュロウイルスを用いて HCV ゲノムが複製している肝臓細胞からウイルスの複製を制御できる可能性が示された。今後ヒト肝細胞を移植し、HCV の感染を許容できるキメラマウスを用いて *in vivo* のウイルス排除効果を評価する。HCV 蛋白質による免疫回避機構に介入し、C 型慢性肝炎患者の免疫を賦活化することによって、生体からウイルスを排除できる新しい治療法や、HCV の複製や成熟に必須な宿主因子、VAP-B、FKBP8、hBind-1、SPP および PA28 $\gamma$  の発現を制御可能なバキュロウイルスを作製し、*in vitro* でのウイルス複製抑制および中性脂肪の産生抑制を確認したい。また、HEV-LP の三次元構造が解けたことは、この粒子を用いた遺伝子デリバリーシステムやワクチンベクターの開発における波及効果は計り知れない物がある。

### E. 結論

- 1) HCV 感染細胞に恒常活性化型の IRF7 を発現することで IFN を誘導できる組換えバキュロウイルスを構築した。
- 2) HEV-LP の結晶構造の解析に成功した。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1 Yamashita T., Unno H., Mori Y., Tani H., Moriishi K., Takamizawa A., Agoh M., Tsukihara T., Matsuura Y. Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å. *Virology* (in press).
- 2 Tani H., Abe K., Matsubaga T., Moriishi K., and Matsuura Y. Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development. *Future Virology*, 2008, 3, 35-43.
- 3 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 2007, 104, 1661-1666.
- 4 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi

- N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.*, 2007, 81, 8953-8966.
- 5 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.*, 2007, 81, 8477-8487.
- 6 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
- 7 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
- 8 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治:HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28γ の役割：第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日、2007。
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析：第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日、2007。
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、審良静男、松浦善治：C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治：E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析、同上。
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
「遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発」  
分担研究報告書

組換え E 型肝炎ウイルス粒子の作製と応用に関する研究

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 遺伝子型 1 (G1) の組換え E 型肝炎ウイルス粒子 (HEV-LPs) 形成に必須な最小アミノ酸配列は、これまでの 111~608 からさらに絞り込んだ 125~601 残基であった。G1 HEV-LPs を基礎に、HEV ORF3 蛋白あるいは 2 型ブタサーコウイルス (PCV2) 構造蛋白を同時に発現するキメラ HEV-LPs を作製した。キメラ HEV-LPs の抗原性および免疫原性の解析から ORF3 蛋白はキメラ HEV-LPs の表面に配置していることが明らかになった。一方、PCV2 構造蛋白を併せ持つキメラ HEV-LPs の免疫原性は弱いものであった。G3 HEV の全長の ORF2 蛋白を発現し、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する HEV-LPs を作製した。

協力研究者 李 天成、劉 蘭軍、永田 典代、宮村達男（国立感染症研究所）、恒光 裕、鈴木 孝子（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。我々はこれまでに 1 型、3 型、および 4 型の HEV (G1、G3、および G4) について N 末端の 111 アミノ酸を欠失した構造蛋白を発現してウイルス様中空粒子 (HEV-LPs) を作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブな HEV と差のないことを明らかにした。本システムにおいて特筆すべきは、その産生量の多さと産生される HEV-LPs が培養上清に出ることによる精製の容易さである。本研究では HEV-LPs のこれらの性状を基礎に、HEV-LPs のベクターとしての有用性を検証することを目的とし、他の抗原を同時に発現するキメラ HEV-LPs の作製とその応用について検討した。また、ネイティブな HEV に近いサイズを持つ HEV-LPs の作製も試みた。

B. 研究方法

1. 組換えバキュロウイルスの作製と発現蛋白の解析

G1 HEV ORF2 蛋白の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させ、外来性蛋白領域を担う遺伝子

を同じ向きに連結したクローンを作製した。G3 HEV では ORF2 全長の遺伝子も用いた。定法どおり組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞に MOI:10 で感染後、培養上清および細胞からそれぞれ発現蛋白を回収した。ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。抗 HEV-LPs 抗体、E 型肝炎患者血清、および外来性蛋白に対する抗体を用い、電子顕微鏡、ELISA 法、ウェスタンブロット等で粒子の形成、抗原性、免疫原性等を解析した。

C. 研究結果

1. HEV-LPs 形成に必須な最小アミノ酸配列

HEV ORF2 の 112-608 アミノ酸を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 27nm の中空粒子が多数観察される。構造蛋白が 60 コピー集合して形成される T=1 の粒子である。N 末端と C 末端をさらに欠損させた場合、N 末端は 124 アミノ酸、C 末端では 59 アミノ酸を欠失させても粒子形成を観察することができた。しかしながら、N 末端、C 末端いずれの場合もさらに 1 アミノ酸でも欠損させると粒子形成が完全に抑えられ、HEV ORF2 の 124-601 アミノ酸が HEV-LPs 形成に必須な最小アミノ酸配列であった。

2. キメラ HEV-LPs の作製と性状解析

1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 あるいは 124 アミノ酸を種々の長さの ORF3、あるいは離乳後多臓器発育不良症候群の原因ウイルスである 2 型ブタサーコウイルス (PCV2) 構造蛋白に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現した。定法どおり感染

細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの場合も直径 27nm の粒子が多数観察された。キメラ HEV-LPs の抗原性および免疫原性の解析から ORF3 蛋白はキメラ HEV-LPs の表面に配置していることが明らかになった。一方、PCV2 構造蛋白を併せ持つキメラ HEV-LPs の免疫原性は弱いものであった。

### 3. ORF2 の全長の発現

定法どおり組換えバキュロウイルス感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。この粒子内部には HEV 特異的な配列を持つ核酸が取り込まれていた。

### D. 考察

HEV 構造蛋白の N 末端および C 末端の構造と HEV-LPs の形成に関する一連の実験から N 末端 111 アミノ酸からさらに絞り込んだ 111~124 の 15 アミノ酸、C 末端 52 アミノ酸からさらに絞り込んだ 601~608 の 7 アミノ酸を欠損させても VLP 形成には影響がないことが示された。したがって、構造蛋白の 125-601 アミノ酸が粒子形成に必須のアミノ酸残基で粒子のコアを形成していると考えられる。PCV2 では構造蛋白由来最長 72 アミノ酸を、HEV ORF3 蛋白では全長 123 アミノ酸を N 末端に連結することによって外来蛋白を持つキメラ HEV-LPs を発現することができた。また、連結する外来性蛋白によってその抗原性や免疫原性に差がみられたことから、外来性蛋白のキメラ粒子上における構造や部位が影響しているように思われた。今後、同様な手法で外来蛋白挿入できる最適な条件を見だし、キメラ HEV-LPs を作製するとともに、構造解析を進めていきたい。また、経口あるいは経鼻投与して、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での免疫誘導能について検討したい。35-40nm の組換え粒子が作製できたことから、三次構造解析によってネイティブな HEV 構造の情報が得られることが期待できる。この粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、HEV の除去・不活化法の研究にも有用である。今後、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子を

リポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。また、再構成粒子についても経口あるいは経鼻投与し粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討する。

### E. 結論

HEV-LPs 形成に必須なアミノ酸領域を同定した。N 末端に連結した外来性構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現することによって、キメラ HEV 粒子を作製することができた。G3 HEV の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ HEV-LPs を作製することができた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1 Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81
- 2 Li TC, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve *yamato-shijimi* (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:170-172.

#### 2. 学会発表

- 1 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. シジミからの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 2 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 3 加藤花名子, 佐藤幸代, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 土屋公幸, 仲谷淳, 鈴木和男, 樹 金森弘, 李天成, 武田直和, 恒光裕, 池田秀利, 2007.9. 野生動物における抗 E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査. 第 144 回日本獣医学学会学術集会. 江別市

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書  
無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tani H., Abe K., Matsubaga T., Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development.	Future Virology	3	35-43	2008
Yamashita T., Unno H., Mori Y., Tani H., Moriishi K., Takamizawa A., Agoh M., Tsukihara T., <u>Matsuura Y.</u>	Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å.	Virology			2008
Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and <u>Matsuura Y.</u>	Critical role of PA28γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis.	PNAS	104	1661-1666	2007
Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and <u>Matsuura Y.</u>	Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines.	J. Virol.	81	8953-8966	2007
Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells.	J. Virol.	81	8477-8487	2007
Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and <u>Matsuura Y.</u>	Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins.	J. Virol.	81	8601-8612	2007
Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., <u>Matsuura Y.</u> , Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S.	Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency.	J. Exp. Med.	204	2233-2239	2007
Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Host factors involved in the replication of hepatitis C virus.	Rev. Med. Virol.	17	343-354	2007
Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, <u>Takeda N</u> , Li TC.	Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, Cervus nippon, in Japan.	Arch Virol.	152	1375-1381	2007

Li TC, Miyamura T, <u>Takeda N.</u>	Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi ( <i>corbicula japonica</i> ) in Japan.	Am J Trop Med Hyg.	76	170-17 2	2007
--	--	-----------------------	----	-------------	------

# Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development

Hideki Tani,  
Takayuki Abe,  
Tomoko M Matsunaga,  
Kohji Moriishi &  
Yoshiharu Matsuura<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Author for correspondence  
Osaka University,  
Department of Molecular  
Virology, Research Institute  
for Microbial Diseases,  
3-1 Yamada-oka, Suita,  
Osaka 565-0871, Japan  
Tel.: +81 668 798 340;  
Fax: +81 668 798 269;  
matsuura@biken.osaka-  
u.ac.jp

**The baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus has been widely used not only to achieve a high level of foreign gene expression in insect cells, but also for efficient gene transduction into mammalian cells. Recombinant and pseudotyped baculoviruses possessing chimeric or foreign ligands have been constructed to improve the efficiency of gene transduction and to confer specificity for gene delivery into mammalian cells, respectively. Baculoviral DNA CpG motifs induce proinflammatory cytokines through a Toll-like receptor (TLR9)/MyD88-dependent signaling pathway. Other baculovirus components produce type I interferons via a TLR-independent pathway. Baculovirus exhibits a strong adjuvant property and recombinant baculoviruses encoding microbial antigens elicit antibodies to the antigens and provide protective immunity in mice. This review deals with recent progress in the application of baculovirus vectors to gene delivery and vaccine development, and discusses the future prospects of baculovirus vectors.**

The baculovirus is an insect virus possessing a large double-stranded circular DNA genome packaged into a rod-shaped capsid. Among the numerous baculoviruses, *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) is the species most frequently used for baculovirus studies. The baculovirus can produce two morphologically distinct forms of the virus at different time points after infection: budded virus (BV) and occlusion-derived virus (ODV). ODV is occluded in a polyhedron within the nucleus and initiates infection in the midgut epithelium cells, whereas BV is produced after the primary infection and buds through the plasma membrane of infected cells. Owing to a high infectivity to cultured cells and strong late-gene promoters, BV has been commonly used as a tool for the abundant expression of foreign genes in insect cells [1]. BV has also been shown to enter a variety of mammalian cells in order to facilitate the expression of foreign genes under the control of the mammalian promoters, without replication of the viral genome [2–4].

In addition to gene expression in insect cells and gene delivery into mammalian cells, the baculovirus has also been used as a tool for the study of viral particle assembly in both insect and mammalian cells [5,6]. Furthermore, the baculovirus has been utilized as an ubiquitous and a specific gene-transfer vector in the form of a recombinant virus bearing foreign proteins on the viral surface in addition to gp64, a major envelope glycoprotein of the baculovirus [7,8], and pseudotyped virus displaying ligands of interest alone without gp64 [9], respectively.

Following these advances, mechanisms of virus entry into mammalian cells [7] and induction of innate immunity by baculoviruses [10–12] have also been elucidated. This paper reviews the recent advances in baculovirus application in mammalian cells and research for the purpose of developing a novel viral vector for gene therapy and vaccine development.

## Gene transduction into mammalian cells

The host range of baculovirus was once believed to be strictly restricted to arthropods. Over 20 years ago, it was demonstrated that the baculovirus was taken up via endocytosis into vertebrate cells [13], and a reporter activity was detected in mammalian cells upon infection of a recombinant baculovirus possessing a reporter gene under the control of the mammalian promoter, but *de novo* gene expression was not confirmed [14]. However, 10 years later, recombinant baculoviruses encoding reporter genes under the control of mammalian promoters were shown to be capable of efficient gene transduction into mammalian cell lines, especially in human and rabbit hepatocytes [2,3]. Furthermore, we have shown that baculovirus can deliver foreign genes into various cell lines, including cells of nonhepatic origin, by using a recombinant baculovirus carrying a foreign gene under the control of a strong mammalian promoter, CAG, which consists of cytomegalovirus immediate-early (IE) enhancer, chicken  $\beta$ -actin promoter and a rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal [4].

Keywords: baculovirus, gene delivery, gene therapy, innate immunity, pseudotype, recombinant, vaccine

future  
medicine part of fsg

The gene-transfer efficiency was enhanced with the use of recombinant baculoviruses bearing an envelope glycoprotein derived from other viruses such as vesicular stomatitis virus (VSV), rabies virus and mouse hepatitis virus in combination with their own envelope protein gp64 [8], or an excess amount of gp64 [7] on the virion surface. Furthermore, gene transcription by the baculovirus in mammalian cells was enhanced by treatment with histone deacetylase inhibitors, such as butyrate, trichostatin A and valproic acid [15]. In addition, viral adsorption in phosphate-buffered saline at low temperature [16] and the treatment with a calcium chelator for a transient depletion of extracellular calcium [17] enhances the efficiency of gene transduction by the baculovirus into mammalian cells. The current status of our knowledge regarding the application of baculovirus vectors to enhance gene transduction is shown in Box 1.

#### Box 1. Application for enhancement of gene transduction by baculovirus vector.

##### Promoter

- Simian virus 40 [75]
- Rous sarcoma virus-long terminal repeat (RSV-LTR) [3]
- Cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) [2]
- Cytomegalovirus immediate early enhancer, chicken  $\beta$ -actin promoter and a rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal (CAG) [4,7]
- Hepatitis B virus (HBV) [76]
- $\alpha$ -fetoprotein (AFP) [75]

##### Histone deacetylase inhibitor

- Butyrate [77–79]
- Trichostatin A [79]
- Valproic acid [15]

##### Inoculation

- Adsorption in phosphate-buffered saline at low temperature [16]
- Calcium chelator for depletion of extracellular calcium [17]

##### Display

- Single-chain antibody fragment (scFv) against carcinoembryonic antigen [80]
- Synthetic IgG binding domain derived from *Staphylococcus aureus* [80,81]
- Arg-Gly-Asp motifs derived from coxsackievirus A9 and human parechovirus 1 [55]
- Tumor-homing peptides (LyP-1, F3, CGKRK) [55–57]

##### Pseudotyping

- Vesicular stomatitis virus glycoprotein [7]
- Extra gp64 [7]
- Rabies virus glycoprotein [8]

##### Complement inhibitor

- Anti-C5 antibody [38]
- Soluble complement receptor type 1 [39]
- Cobra venom factor [38]
- Decay accelerating factor [46]
- 6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate [8]

Although it is generally considered that the baculovirus does not replicate in mammalian cells and does not induce severe cytotoxicity, transcription of IE genes has been detected at a low level in mammalian cells [18,19]. Recent DNA microarray analyses confirmed the activation of the IE genes in mammalian cells, and demonstrated that the overexpression of the IE genes induced activation of various baculovirus genes [20,21]. However, only a marginal upregulation of the  $\beta$ -actin gene [22,23] and no appreciable change in the transcriptome profiles [22,23] was detected by DNA microarray analysis upon infection with baculovirus in mammalian cells. Nevertheless, transcriptional activation of the IE genes raises concerns regarding the safety of application of baculovirus vectors for gene therapy.

Baculovirus has also been used as an ideal tool for the production of virus-like particles (VLPs), which generally require abundant expression of viral structural proteins for self-assembly. VLPs of various viruses have been produced in insect cells upon infection with recombinant baculoviruses and have proven to be useful not only for vaccines or diagnostic reagents, but also for the study of virus–cell interactions [5,24]. Recently, VLPs of hepatitis D virus [25,26] and hepatitis C virus (HCV) [6] have been generated in mammalian cells. The production of VLPs by infection with recombinant baculoviruses is much higher than that by transfection of plasmid or in stable cell lines. In contrast to the VLP production by replication-competent viral vectors, baculovirus vectors have the advantage that VLPs will not be contaminated with the infectious viral vectors.

#### Entry of baculovirus into mammalian cells

Mammalian cells of various origins exhibit susceptibility to baculovirus entry, suggesting that the baculovirus utilizes a cell-surface molecule(s) ubiquitously expressed on mammalian cells. However, the precise mechanisms of baculovirus entry are still poorly understood. Pretreatments of insect cells with proteases or inhibitors of N-linked glycosylation reduced the virus binding, suggesting the involvement of a cellular glycoprotein(s) in virus adsorption [27,28]. Electrostatic interactions through heparan sulfate moieties are also suggested to be required for the binding of the baculovirus to mammalian cells [29]. Baculovirus is considered to enter both insect and mammalian cells via an endosomal pathway upon interaction of gp64 with its receptor(s). Information on the role of gp64 on the

membrane-fusion activity in insect cells has been accumulated [30–32]. We previously demonstrated that a recombinant baculovirus possessing 1.5-fold higher amounts of gp64, compared with a wild-type baculovirus, exhibits a 100-fold increase in reporter gene expression in various mammalian cells, and digestion of phospholipids from the cells markedly reduced the gene transduction by the baculovirus [7]. Furthermore, infection of the baculovirus was inhibited by negatively charged lipids such as phosphatidic acid and phosphatidylinositol (PI), and was reduced in a mutant CHO cell line deficient in PI synthesis. These results suggest that the interaction of gp64 with cell surface phospholipids plays a crucial role in the entry of baculoviruses into cells.

Baculovirus has been shown to enter hepatocytes via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis by using confocal and electron microscopy [33]. It has also been shown that actin filaments play a role in the cytoplasmic transport of baculovirus nucleocapsids during entry into cells [34–36], and the amount of the nucleocapsids was increased in the nucleus by treatment with microtubule depolymerizing agents, suggesting that the nucleocapsids are transported into the nucleus through a microtubule network [37]. Further studies on the entry of baculovirus, including identification of cellular receptor(s), are needed for the development of vectors suitable for the application to gene therapy.

#### ***In vivo* gene delivery**

Baculovirus has been shown to be an ideal vector for efficient gene delivery *in vitro*. However, application of the baculovirus for *in vivo* gene transfer has been hampered by serum complement-mediated inactivation. To circumvent this problem, inhibitory reagents against the complement system, such as antibody against the complement component 5 [38], cobra venom factor [38], a soluble protein of complement receptor type 1 [39] and an inhibitor for protease-activating complement (FUT-175) [8], have been used to improve *in vitro* gene transduction by the baculovirus in the presence of animal sera. Direct inoculation of the baculovirus into rodent brain [8,40–42], mouse skeletal muscle [43], testis [8] and eye [44], or rabbit carotid artery by using a silastic collar to avoid contact with complement components [45] was also successful for the delivery of foreign genes. Recombinant baculoviruses bearing chimeric gp64 proteins fused with a decay accelerating factor (DAF), which blocks

complement at the central step of both the classical and alternative pathways, exhibited some resistance to complement inactivation [46]. HIV-based lentivirus vectors pseudotyped with gp64–DAF fusion proteins also conferred resistance to complement inactivation [47]. Furthermore, the recombinant baculoviruses possessing rhabdovirus envelope proteins exhibited more resistance to complement inactivation by sera of humans, rabbits, guinea pigs and mice compared with the unmodified baculovirus [8]. The recombinant baculoviruses possessing the VSV envelope G (VSVG) protein also gave rise to a significantly higher gene expression than the unmodified virus in mouse skeletal muscle [43] and brain [8,48]. Recently, recombinant baculovirus encoding the *Diphtheria Toxin A* gene under the control of the modified promoter were shown to eliminate malignant glioma cells in the rat brain [49]. Although recombinant baculoviruses bearing VSVG proteins exhibited more resistance to complement inactivation compared with the unmodified virus [8], lentiviral vectors, including feline immunodeficiency virus (FIV) pseudotyped with gp64 proteins, exhibited more resistance to human and mouse complements than FIV pseudotype bearing VSVG proteins [50,51]. This discrepancy in the sensitivity to complement system may be attributable to the differences in glycosylation of gp64 proteins expressed in insect or mammalian cells. Gene transduction into mammalian cells and in mice [50], and a persistent expression of a transgene in mouse nasal epithelia *in vivo* [52] by the FIV pseudotype bearing gp64 proteins was significantly higher than that bearing VSVG proteins. Further studies on the pseudotype viruses bearing gp64 proteins will need to be carried out in order to realize gp64-mediated gene delivery *in vivo*.

#### **Targeting vector**

Recombinant baculoviruses bearing heterologous peptides or proteins [53,54], an RGD-motif that recognizes  $\alpha$ V integrin [55,56] and tumor-homing peptides [57] fused with gp64 or VSVG proteins exhibited efficient binding and gene transduction to target cells. However, these recombinant viruses exhibit no specificity for gene transduction owing to the retained gp64 proteins that recognize molecule(s) ubiquitously expressed on the cell surface. A pseudotyped virus system bearing heterologous ligands (e.g., viral envelope proteins or receptors) in place of the endogenous viral envelope protein has been developed in retroviruses [58] and rhabdoviruses [59] for gene

targeting. To confer specificity on gene delivery by the baculovirus, a pseudotyped baculovirus bearing only a ligand of interest, but lacking gp64, was generated by using a gp64-null baculovirus [9]. The gp64-null baculovirus revealed that gp64 is necessary for cell binding [60], membrane fusion [30] and efficient virion budding from the infected cell surface [61]. Although pseudotyped baculoviruses bearing VSVG or fusion envelope proteins from other baculoviruses exhibited a high infectivity to insect cells, gene transduction into mammalian cells has yet to be explored [62,63]. During amplification of the pseudotyped baculovirus in an insect cell line stably expressing gp64, breakthrough viruses incorporating the *gp64* gene readily emerged after more than three passages [9]. Therefore, we generated pseudotyped baculoviruses by transfection of a bacmid encoding a full-length recombinant baculovirus – possessing a ligand of interest in place of gp64 – into insect cells without amplification in a cell line expressing gp64. Pseudotyped baculoviruses bearing receptors for the measles virus, CD46 or SLAM, exhibited a specific gene transduction into target cells expressing measles virus envelope proteins [9]. Although we have to overcome the problem of emergence of the replication-competent revertants incorporating the *gp64* gene during the amplification, the pseudotyped baculovirus has important potential as a targeting vector.

#### **Induction of immune response & advantages for use as vaccine vectors**

Beside the efficient gene delivery into mammalian cells, only a few definitive findings have been reported on the induction of host immune response by the baculovirus. Intramuscular injection of recombinant baculoviruses encoding the pseudorabies virus gB protein [64] and HCV envelope glycoprotein E2 [65] and intramuscular, intraperitoneal or intranasal inoculation with those expressing hemagglutinin (HA) of the influenza virus (IFV) [11] elicited humoral immune responses in mice. Although mice intramuscularly or intraperitoneally immunized with the recombinant baculovirus produced higher levels of anti-HA antibodies than those immunized intranasally, protection from a lethal challenge with IFV was only achieved by the intranasal immunization. Furthermore, recombinant baculoviruses bearing the chimeric gp64 proteins of *Plasmodium berghei* circumsporozoite [66], *Plasmodium falciparum* circumsporozoite [67], *Theila parva* sporozoite [68], rinderpest

virus [69], foot-and-mouth disease virus [70] and avian influenza virus [71] elicit an effective antibody response.

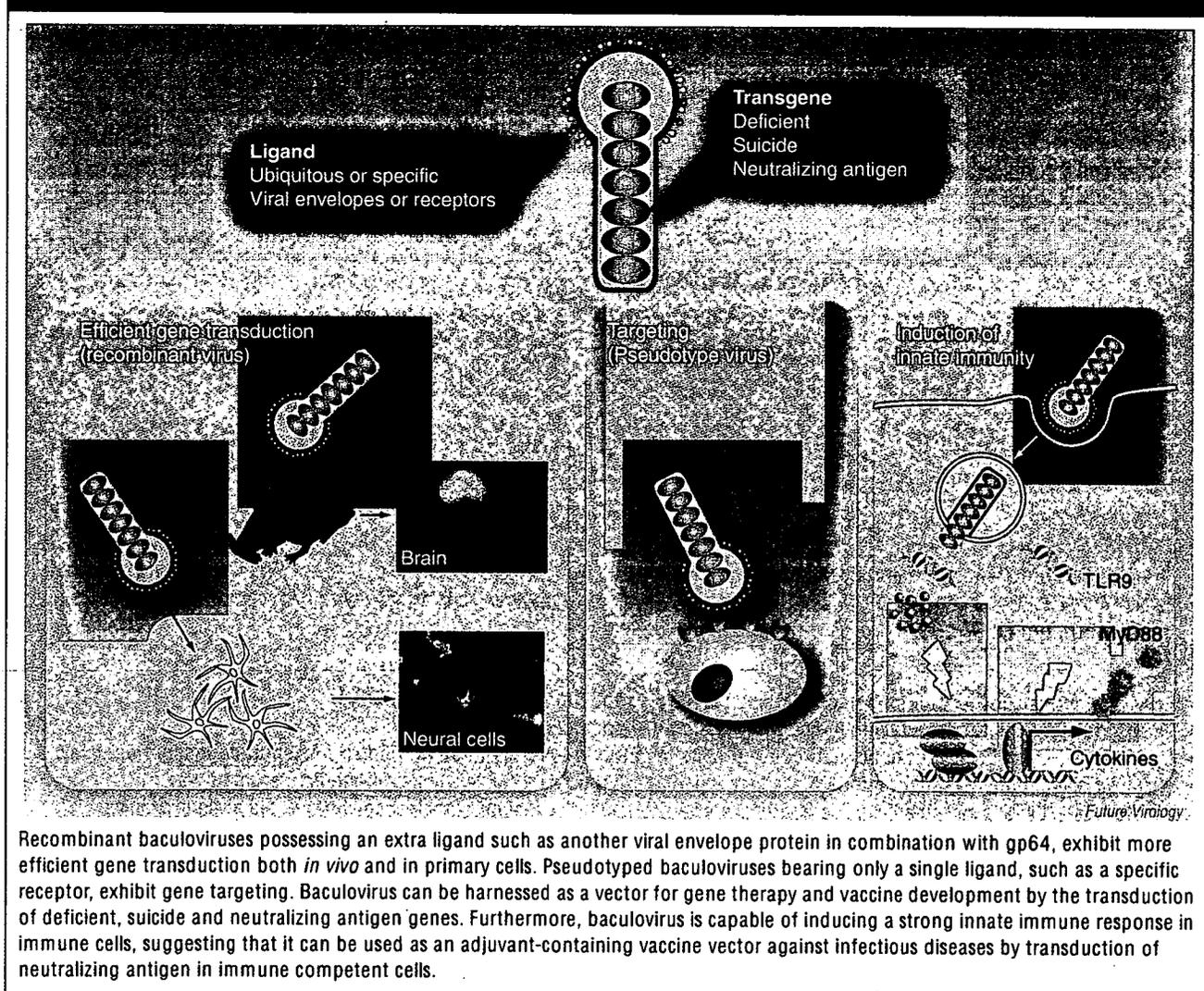
To our surprise, a sufficient protective immunity against a lethal IFV challenge was induced in mice intranasally inoculated with a wild-type baculovirus, as evaluated by reductions in virus titer, inflammatory cytokine production, and pulmonary consolidations [11]. Mouse macrophage cell lines, primary peritoneal macrophages (PECs) and CD11c-positive dendritic cells (CD11c<sup>+</sup> DCs) inoculated with a wild-type baculovirus produced a large amount of proinflammatory cytokines, such as IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$  and type-I IFNs [11,12]. These observations suggest that baculovirus has an immunostimulatory activity to produce pro-inflammatory cytokines and type-I IFNs in immunocompetent cells, by which the spread of IFV infection is suppressed. A similar phenomenon has been reported that a 67 kDa glycoprotein purified from the culture supernatants of insect cells infected with AcMNPV, which is probably identical to gp64, induced IFN production in cultured cells and protected from a lethal encephalomyocarditis virus infection in mice [10]. However, several lines of evidence suggest that gp64 is not a principal actor in the immunostimulatory properties of the baculovirus. It was shown that a recombinant gp64 protein produced in insect cells and the gp64-null baculovirus exhibited no production of pro-inflammatory cytokines and type-I IFNs in mouse macrophage cell lines [12], suggesting that a viral component(s) other than gp64 participates in the immune activation by the baculovirus.

Although the baculovirus induces a strong innate immune response in mice, the precise mechanisms of the induction remain unclear. Toll-like receptors (TLRs) have been shown to play a crucial role in the recognition of viral and bacterial components [72]. Upon infection of a microorganism, TLRs recruit a set of adaptor molecules, including MyD88, Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein (TIRAP), TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) and TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ -related adaptor molecule (TRAM), which trigger the activation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B that are essential for the expression of proinflammatory cytokines and type-I IFNs [72]. Production of proinflammatory cytokines was severely impaired in PECs and CD11c<sup>+</sup> DCs derived from mice deficient in MyD88 or TLR9 after cultivation with the baculovirus, suggesting that the

baculovirus produces proinflammatory cytokines in immune competent cells via the TLR9/MyD88-dependent signaling pathway [11,12]. By contrast, a significant amount of IFN- $\alpha$  still remained in the cells derived from MyD88- or TLR9-deficient mice after stimulation with baculovirus, suggesting that a TLR-independent signaling pathway participates in the production of IFN- $\alpha$  by the baculovirus. Further studies are needed to elucidate the precise mechanisms of the induction of TLR-independent type-I IFNs by baculovirus. TLR9 has been shown to be responsible for the stimulation of the immune system by oligodeoxynucleotides containing unmethylated CpG motifs that are present in bacterial and some viral DNAs [73]. The amounts of bioactive CpG sequences in the genome of baculovirus have been shown to be similar to those of *Escherichia coli* and herpes simplex virus type I [12]. Transfection of the purified baculovirus DNA with liposome resulted

in the production of TNF- $\alpha$ , but not in the absence of liposome, and the pretreatment with inhibitors for endosomal maturation diminished the induction of the immune response by the baculovirus [12]. These results indicate that membrane fusion with gp64 and uncoating of viral DNA via endosomal maturation, which leads to release of viral DNA into the cellular compartments expressing TLR9, are involved in the induction of innate immunity by baculovirus *in vitro*. Recently, it was shown that baculovirus has a strong adjuvant activity in mice, which promotes adaptive immune responses against coadministered antigen [74]. Immunization with ovalbumin (OVA) plus baculoviral DNA in cationic liposomes, but not with OVA in combination with either viral DNA or liposome, was sufficient to induce a cytotoxic T-lymphocyte response, suggesting that the viral genome is responsible for the adjuvant activity of baculovirus [74].

Figure 1. Baculovirus as a versatile vector.



Recombinant baculoviruses possessing an extra ligand such as another viral envelope protein in combination with gp64, exhibit more efficient gene transduction both *in vivo* and in primary cells. Pseudotyped baculoviruses bearing only a single ligand, such as a specific receptor, exhibit gene targeting. Baculovirus can be harnessed as a vector for gene therapy and vaccine development by the transduction of deficient, suicide and neutralizing antigen genes. Furthermore, baculovirus is capable of inducing a strong innate immune response in immune cells, suggesting that it can be used as an adjuvant-containing vaccine vector against infectious diseases by transduction of neutralizing antigen in immune competent cells.

**Conclusion & future perspective**

A summary of baculovirus vectors is shown in Figure 1. Since the initial discovery of efficient gene transduction into mammalian cells by recombinant baculoviruses, numerous efforts have been made to harness baculovirus as a vector for gene delivery and vaccine development. One of the advantages of the baculovirus vector over other viral vectors is that it has a large capacity to accommodate foreign genes and demonstrates efficient gene transduction into a wide variety of cell lines as well as primary cells, without severe cytotoxicity. Although construction of recombinant and pseudotyped baculoviruses, and the use of inhibitors for complement activation have been achieved to improve the efficiency of gene transduction, the efficacy of gene delivery by baculovirus vectors *in vivo* is not

sufficient for clinical gene therapy at the moment. Further innovation to establish replication-competent cell lines capable of supporting the propagation of pseudotyped viruses without the possibility of replication-competent virus breakthrough by incorporation of gp64, and to optimize the conditions necessary for the efficient incorporation of ligands into recombinant baculovirus particles in order to improve the efficiency of gene transduction by baculovirus vectors is needed. For future *in vivo* applications of baculovirus vectors for gene targeting to specific organs or virus-infected cells as a method of treatment for inherited or infectious diseases, it is imperative to exhaustively study the transcription of baculoviral genes in mammalian cells for the certification of safety. In addition, structural analyses of gp64 and identification of its cellular

**Executive summary****Baculoviruses can transduce foreign genes into mammalian cells without replication**

- Recombinant baculoviruses efficiently transduce foreign genes into a broad range of mammalian cells.
- Recombinant baculoviruses bearing vesicular stomatitis virus envelope G or other viral envelope proteins enhance gene transduction.
- Various reagents are used for enhancement of gene transduction by the baculovirus.
- Immediate-early genes of the baculovirus are expressed at a low level in mammalian cells.

**Advantages of baculoviral vectors**

- Recombinant baculoviruses can be easily prepared in insect cells by a convenient system.
- The baculovirus genome has a large capacity to accommodate foreign genes.
- Baculoviruses can transduce foreign genes into mammalian cells without replication and cytopathic effect.

**Entry mechanisms of baculovirus into mammalian cells**

- Baculovirus enters into mammalian cells using gp64, via endocytosis.
- Cell-surface phospholipids are involved in the entry of baculovirus.
- The nucleocapsid of baculovirus translocates into the nucleus through the microtubule network.

**In vivo gene delivery**

- *In vivo* gene delivery by the baculovirus is hampered by the inactivation by serum complement.
- Measures to inhibit activation of the complement improve *in vitro* gene transduction.
- Direct injection of baculovirus into rodent brain, muscle, testis and eye can deliver reporter genes.
- Modifications of gp64 improve *in vivo* gene delivery.

**Targeting vector**

- The presence of heterologous proteins in addition to gp64 on the virion surface enhances specific binding to the target cells.
- Pseudotype baculovirus bearing a ligand of interest alone in place of gp64 exhibits the ability to perform a specific gene transduction into target cells.

**Induction of immune response by baculovirus**

- Recombinant baculoviruses elicit humoral immune responses and protective immunity in mice.
- Baculovirus produces an innate immune response in immune competent cells.
- CpG motifs in the baculovirus genome produce proinflammatory cytokines through a Toll-like receptor-dependent pathway.
- Baculovirus components other than DNA produce type-I interferons via a Toll-like receptor-independent pathway.
- Baculovirus exhibits a strong adjuvant property promoting an adaptive response against coadministered antigen in mice.

**Future prospects for baculoviral vectors**

- Further characterization of cellular receptor(s) for baculovirus and the interaction with gp64 is needed for the construction of vectors sufficient for a future gene therapy.
- Elucidation of mechanisms to induce innate immunity in immune-competent cells by baculovirus is required for the development of a future vaccine vector.