

200720029A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 忠仁

平成 20(2008)年4月

目次

I. 総括研究報告	
ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 1
神田 忠仁	
II. 分担研究報告	
1. ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析	----- 6
神田 忠仁	
2. ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 9
川名 敬	
3. ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 12
酒井 博幸	
4. C型肝炎ウイルスの感染および複製機構の解析	----- 16
松浦 善治	
5. C型肝炎ウイルス粒子形成機構におけるNS5A蛋白質の役割	----- 19
鈴木 哲朗	
6. HCVの持続感染維持機構の解析	----- 23
加藤 宣之	
7. 樹状細胞からみたC型肝炎ウイルス(HCV)持続感染機構の解析	----- 30
林 紀夫	
8. C型肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞が認識する抗原エピトープの同定	----- 32
井廻 道夫	
9. 輸血によるがんウイルス感染の予防に関する研究	----- 34
内田 茂治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 42

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

主任研究者：神田 忠仁
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

ヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染が子宮頸がんの、C型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染が肝がんの原因となる。従って、HPV ないし HCV の感染予防と増殖機構への介入による持続感染細胞の排除と感染拡大の阻止によって、発がんを予防する実用的な方法を開発することをめざし、以下の成果を得た。

- 1) 15種のHPVが発がん性を持つが、現行ワクチンは16、18型にしか予防効果がない。HPV16型キャプシド蛋白質(L1)に型共通中和エピトープを挿入したキメラ粒子を作製した。ウサギやマウスに接種すると16型だけでなく、18、31、52、58型を中和する抗体が誘導された。臨床試験に使う第二世代ワクチン抗原が完成したと考えている。
- 2) 子宮頸部前がん病変(CIN)の自然治癒にCTLが関わることを示唆された。HPV16型のE7蛋白質を表面に発現している乳酸菌を作製し、マウスに経口投与すると腸管の粘膜上皮内リンパ球にE7特異的CTLが多量に誘導された。治療ワクチンへの応用を目指す。
- 3) HPV DNAを角化細胞に導入後raft-cultureで培養するHPV DNA複製系で、I型IFNが複製を強く抑制することをみつけた。
- 4) HCVエンベロープ蛋白質(E2)を水疱性口内炎ウイルス(VSV)に被らせたシュードタイプや、E2遺伝子をゲノムに組み込んだ組換えVSVを作製し、E2が担う感染初期過程を解析した。Huh7細胞への感染には、E2のハイマンノース型の糖鎖構造が重要であることが示された。
- 5) HCVのNS5A蛋白質のC末端側SerクラスターをAlaに置換すると、HCVRNA複製には全く影響を与えないが、Core蛋白質との結合とウイルス粒子産生が劇的に低下した。Core蛋白質とNS5A-HCVRNA複合体の会合が粒子産生の引き金になることが示された。
- 6) C型慢性肝炎患者のミエロイドDC(MDC)では、TRIF、TRAF6の発現が低下していた。HCV2型感染のC型慢性肝炎で、血清中のHCVRNAが低い(24.5KIU/ml)患者でCTLが認識するHCV抗原エピトープは、NS3蛋白質のアミノ酸1618-1626領域であることがわかった。
- 7) 日赤血液センターをベースに輸血を介したHIV、HTLV-1、HBV、HCV感染の調査を継続した。

分担研究者

神田忠仁 国立感染症研究所・センター長
川名 敬 東京大学医学部・助手
酒井博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授
松浦善治 大阪大学微生物病研究所・教授
鈴木哲朗 国立感染症研究所・室長
加藤宣之 岡山大学医学部・教授
林 紀夫 大阪大学大学院・教授

井廻道夫 昭和大学医学部・教授
内田茂治 東京西赤十字血液センター・
課長

A. 研究目的

15種の高リスクヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染が子宮頸がんの原因である。従って、ワクチンによって高リスク HPV 感染を

防ぐか、持続感染に介入してHPVを排除すれば、子宮頸がんを予防できる。欧米で開発された第一世代HPV感染予防ワクチンは、16、18型にしか効果がないため、高リスクHPV群の感染を一括して予防するワクチン抗原の開発を目的とした。また、HPV持続感染細胞で発現するHPV E7蛋白質を標的とするCTLを子宮頸部粘膜に誘導する治療的ワクチンの開発を目的とした。また、HPVの潜伏持続感染に介入して、ウイルスを排除する方法を開発するために、HPV遺伝子の発現調節機構を詳細に調べた。(神田、川名、酒井)

C型肝炎ウイルス(HCV)は我が国の肝炎および肝がん80%と関連している。HCVは肝細胞での増殖・再感染を繰り返すので、ウイルスの肝細胞への吸着・侵入からゲノムの複製、ウイルス粒子の形成に至るすべての素過程を詳しく調べ、これらの過程を阻害してウイルスの増殖を抑制する方法を開発するのが目的である。また、IFNとリバビリンの併用療法の効果を向上させる方法を開発するために、C型慢性肝炎患者の抗HCV免疫応答の詳細な解析を目指した。(松浦、鈴木、加藤、林、井廻)

輸血により伝播するHBV、HCV、ヒトリンパ球性ウイルス(HIV、HTLV-1)の感染は発がんと密接な関係がある。新規感染者のウイルス遺伝子を解析して、感染者の背景を明らかにし、輸血によるウイルス感染の実状把握を目的とした。(内田)

B. 研究方法

1) HPV16型L2蛋白質の型共通中和エピトープを、HPV16型L1蛋白質に挿入したキメラ蛋白質によるキメラ粒子(VLP)をワクチン抗原とする臨床試験に備え、粒子構造を維持したまま精製する方法を検討した。また、汎用アジュバントと共にヒト接種相当量(体重換算)をマウスに筋注し、誘導される抗体の中和能を調べた。

また、CIN1ないしCIN2患者から24ヶ月間隔で採取した血清のHPV中和抗体を測定した。HPV偽ウイルスの感染価を1/2以下に低下させる血清の最大希釈度を中和力価とし、40倍以上の力価を特異中和抗体陽性とした。(神田)

2) ヒトの腸内から採取された乳酸菌株の表面に、HPV16型のE7蛋白質を提示した乳酸菌E7(LacE7)を作製し、加熱処理で殺菌したもの

をワクチン抗原とした。C57BL6マウスにLacE7を0.01-1g/kg/回で、週1回もしくは5回で4週経口投与した。最終経口投与から5週後に腸管上皮内リンパ球と脾臓リンパ球を回収し、CTL反応性E7ペプチド刺激によるIFN γ 産生Tce11(E7-CTL)数を測定した(ELISPOT法)。(川名)

3) ヒト初代角化細胞にHPVDNAを導入し、ラフト培養する方法で、上皮細胞の分化に連動したウイルス複製を検討した。(酒井)

4) HCV1a型H77株および1b型Con1株のエンベロープ遺伝子を、VSVのエンベロープ遺伝子を欠損させたVSVのcDNAに挿入し、組換えVSV(HCVrv)を各種動物細胞で作製した。HCVrvの性状ならびに、感染様式をHCVpvおよびJFH-1株と比較した。(松浦)

5) 種々のNS5A変異を導入したHCVゲノム及びサブゲノムRNAレプリコンを作製し、RNAトランスフェクション後、ウイルス産生(培養上清中のウイルスレベル)及び細胞内のRNA複製を解析した。(鈴木)

6) Huh-7細胞でHCV RNAの複製レベルが高い細胞株と低い細胞株を選別樹立し、複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している宿主遺伝子をマイクロアレイ解析によって抽出した。(加藤)

7) C型慢性肝炎患者および非感染者の末梢血からミエロイド樹状細胞(MDC)を分離し、各TLR/RIG-Iに特異的なアゴニストによる刺激で産生されるサイトカインを検討した。

PCR-Arrayを用いてシグナル関連分子を網羅的に比較した。TLR/RIG-Iのアダプター分子の発現量を比較した。(林)

8) HCV全蛋白質に相当する20アミノ酸のペプチド(10アミノ酸ずつオーバーラップする297種類)10種類ずつ混合し、C型肝炎患者の末梢血単核球のCD8陽性細胞を、マクロファージを抗原提示細胞として混合ペプチドで刺激した。IFN γ 産生細胞を算定することによってHCV特異的CTLエピトープをスクリーニングした。(井廻)

9) 東京都、茨城県、栃木県、神奈川県、福岡県の5ヶ所の血液センターで、初回献血者を対象にHBs抗原(逆受身赤血球凝集反応)、HBc抗体(逆受身赤血球凝集阻止法)、HCV抗体(血球凝集反応)およびHTLV-I抗体(粒子凝集反

応)の陽性率を調査した。(内田)

倫理面への配慮

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「国立感染症研究所動物実験に関する基本方針」、「大学等における実験動物について」等を踏まえ、動物実験が適切に行われるよう配慮した。

患者試料を使う場合は、提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省より示された「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

C. 研究結果

1) キメラ VLP10 をカチオンイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過で、粒子構造を維持したまま精製した。精製品中のキメラ粒子は、総蛋白質中の 96-98%であったが、混入 DNA 量は 6.6ng/ml 以下にならなかった。キメラ VLP10 μ g と水酸化アルミニウムを混合した接種液

(50 μ l) を 5 週齢の雌 Balb/c マウスの大腿筋に接種して得たキメラ抗血清は HPV16、18、31、52、58 型を中和した。

CIN1、2 患者の少なくとも 65%は HPV16、18、31、52、58 のいずれかに対する中和抗体を持っていた。複数の型に対する中和抗体を持つ例もあった。中和抗体陽性価は 40 から 2,560 程度で、24 ヶ月間ほぼ一定していた。採血時に HPV 増殖 (HPVDNA 検出)があっても、中和抗体が検出できない例があり、また中和抗体価の上昇も見られなかった。中和抗体価と病態の経過 (progress、persist、regress) に関連性は認められなかった。(神田)

2) LacE7 を週 5 回 0.01g/kg/回の投与で粘膜型 E7-CTL が優位に誘導されていた(全身性 E7-CTL の約 60 倍)。また、LacE7 の経口投与が GST-E7 筋注よりも 10 倍以上多い粘膜型 E7-CTL を誘導した。乳酸菌の経口投与そのものが、E7 の有無にかかわらず、腸管上皮リンパ球における α BTCR+細胞数比、CD8+細胞数比を上昇させた。ELISPOT 法の評価でも、陽性コントロールであ

る PMA+ionomycin 刺激による IFN γ 産生細胞数を、PBS 投与に比べ著しく増加させたことから、腸管粘膜面での局所免疫を Th1 に傾ける効果があることがわかった。

3) HPV18DNA 導入細胞のラフト培養によって、上皮部分の過形成誘導と分化に伴う HPV 複製が確認できた。皮膚モデル構築の過程で IFN β を添加すると、強い抗腫瘍効果と抗ウイルス作用が見られた。一方 TNF α ではウイルス複製の活性化と、上皮の浸潤促進が観察された。また、HPV の E7 が分化を抑制し、同時に発現させた E4 はその効果を打ち消すことが示された(酒井)

4) HCVrv は Huh7 細胞に最も高い感染性を示した。HCVrv の作製は 37 $^{\circ}$ C よりも、30 $^{\circ}$ C で培養した方が高い感染価のウイルスが得られた。また、293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、抗 hCD81 抗体や C 型肝炎患者血清で中和された。さらに、新たに樹立した JFH-1 株の増殖効率の良い Huh7 細胞では、HCVrv の感染の拡大が観察された。(松浦)

5) NS5A C 末端側のセリンクラスターをアラニンに置換すると、RNA 複製が変わらず、ウイルス粒子産生が 1/10 以下に低下した。(鈴木)

6) HCV RNA の複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している細胞遺伝子として、Group-specific component (GC)、Hyaluronan-binding protein 2 (HABP2)、Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3 (SLCO1B3)、serum amyloid A4, constitutive (SAA4) の 4 つを見出した。(加藤)

7) MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は C 型慢性肝炎患者で亢進していたが、TLR3、MDA-5 の発現は非感染者と同程度であった。TLR3、TLR4 のアゴニスト刺激による MDC の IFN- β 、TNF- α 、IL-12p70 の産生量は C 型慢性肝炎患者で低かった。患者 MDC では IFN 系、NF- κ B 系、MAPK 系のシグナル分子の発現が全般的に低下していた。また患者 MDC において MyD88、IPS-1 の発現は高値であったが、TRIF、TRAF6 の発現は低下していた。NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の前処理により、患者 MDC のサイトカイン産生能は部分的に回復した。(林)

8) C 型慢性肝炎患者で、HCVNS3 蛋白質のアミノ酸 1618-1626 (LHGPTPLLYCTL) 10 が HTLV-1

エピトープであることを見出した。(井廻)

9) HBs 抗原、HBc 抗体ならびに HCV 抗体の陽性率は年毎に低下傾向を示した。16 歳初回献血者の HBs 抗原陽性率の調査から、「B 型肝炎の母子感染防止対策」の効果が確認された。HTLV-1 抗体は明確な低下傾向が認められない。しかし福岡県の 10 歳代の初回献血者では 10 年間で陽性率が半減しているのに対し、関東地方の 1 都 3 県では陽性率が全く低下していなかった。(内田)

D. 考察

1) 遠心とカラムクロマトグラフィの組み合わせでキメラ VLP の粒子構造を維持したまま精製したが、粒子内に取り込まれた昆虫細胞ないしバキュロウイルスに由来する核酸を除くのは困難であった。キメラ蛋白質の C 末端にある塩基性アミノ酸のクラスターに核酸が結合している可能性があり、この部分を欠失させたキメラ蛋白質を作り、VLP 形成能と抗原性の変化を検討している。

汎用アジュバントの使用でキメラ VLP はマウスに交差性中和抗体を誘導した。(神田)

2) 乳酸菌(LacE7)ワクチン経口投与は、筋注型ワクチンでは得られない高い粘膜型 E7-CTL 誘導能を示した。そのメカニズムの 1 つとして、乳酸菌そのものに腸管粘膜における Th1 優位の粘膜免疫状態する性質をもつことがわかった。(川名)

3) E7 の機能が分化依存的なゲノムの複製に関わっている。E7 が存在しないとヒト初代角化細胞は短期間の間に終末分化に到達し、HPV ゲノムの複製に十分な時間が確保できないと考えられる。E7 が分化を抑制し、同時に発現させた E4 はその効果を打ち消すことが示された。E4 が分化の進行に伴って発現し、最終的なウイルス粒子の形成/放出に関わっている可能性を示す。(酒井)

4) 組換え VSV は JFH-1 ウイルスと同様に、hCD81 依存的な感染性を示した。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv によって発現された HCV エンベロープ蛋白質を利用して、感染を拡大していた。自立増殖可能な組換え VSV を用いることにより、各種遺伝子型の HCV の感染機構を詳細に解析することが可能になるものと思われる。(松浦)

5) HCV の複製複合体によって合成された HCVRNA は NS5A の N 末端領域によって捕捉され、さらに Core 蛋白質と細胞質内で会合してパッケージングされると推定した。(鈴木)

6) HCV 複製に必要な細胞因子の候補を得たので、これらの遺伝子をノックダウンさせて HCVRNA 複製への影響を調べる。(加藤)

7) C 型慢性肝炎患者 MDC における TLR/RIG-I 系の機能低下は、DC が HCV などの病原体を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆している。NS3/4A 阻害剤によって MDC のサイトカイン産生能回復効果が得られ、同薬剤は HCV 複製抑制のみならず、免疫賦活効果も期待できる可能性が示された。

(林)

8) HCVNS3 蛋白質のアミノ酸 1610-1630 には HLA-A2.1 および B8 の CTL エピトープも存在するので、抗原性が高い領域と考えられる。(井廻)

9) 人工乳で育児をする割合が増えているとはいえ、妊婦に HTLV-1 母子感染の危険性を周知し、希望者には出産前に抗体検査を行うべきであろう。平成 18 年確認された 1 例の HB キャリアは母子感染防止対策を施したにもかかわらずキャリア化した例であった。(内田)

E. 結論

1) キメラ VLP は、全ての高リスク HPV に対応するワクチン抗原となる可能性が高い。精製方法を確立し、臨床試験をめざす。また、HPV の自然感染では、極めて低レベルの中和抗体が誘導される。HPV 増殖の前後で抗体価の変動はない。自然感染で生じた抗体価では、再感染を防止できないと考えられる。(神田)

2) HPV 治療ワクチンとして、HPV E7 蛋白質を表面に提示する乳酸菌死菌の経口投与は粘膜型 CTL を効率よく誘導する。乳酸菌の安全性が高いことから、臨床試験を計画する。(川名)

3) 初代角化細胞に HPV ゲノム DNA を導入し、ラフト培養する皮膚モデル系は HPV の生活環を解析する優れた実験系となる。(酒井)

4) HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えウイルス(HCVrv)は自立増殖が可能で、HCV 感染機構の解析に有用である。(松浦)

5) HCV NS5A 蛋白質の C 末端領域がウイルス粒子形成に重要である。粒子形成過程に

NS5A-Core の相互作用が関与する。(鈴木)

6) C型慢性肝炎患者 MDC における TLR 機能低下に TRIF-TRAF6 の系が関与しており、HCV に対する新たな免疫療法の治療標的になり得る。(林)

7) 献血者のウイルスマーカー陽性率の動向を調査することは、輸血用血液の安全性や献血者スクリーニングの有効性をモニタリングする上で重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別紙に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中

識別番号 11000010 (神田)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染が子宮頸がんの原因である。従って子宮頸がんを予防するにはワクチンによって、高リスク HPV の感染を阻止することが最も重要である。欧米で市場導入された第一世代 HPV 感染予防ワクチンは、高リスク型の 15 の遺伝子型のうち 16、18 型にしか効果がない。我々は、HPV16 型の副キャプシド蛋白質 L2 に存在する型共通中和エピトープを利用する第二世代ワクチン抗原を開発した。抗原を高度に精製する方法を検討すると共に、ヒトへの接種を想定して抗原量を設定し、水酸化アルミニウムアジュバントと共にマウス筋肉に接種した。誘導された抗体は HPV16、18、31、52、58 型を中和した。また、これらの中和抗体検出系を使って、ヒト血清中の抗 HPV 中和抗体を測定した。HPV 感染者は、極めて低レベルの抗体を持つこと、抗体価は HPV 増殖時にも変動しないことがわかった。HPV が免疫系から逃れて持続感染する実態が示された。

A. 研究目的

15 種の高リスクヒトパピローマウイルス

（HPV）の持続感染が子宮頸がんの原因である。従って、ワクチンによって HPV 感染を防げば、子宮頸がんを予防できる。最近欧米で開発され、一部の国では市場導入されている HPV 感染予防ワクチンは、16、18 型の感染予防効果しかない。本研究では、高リスク HPV 群の感染を一括して予防するワクチン抗原の開発を目的とした。

HPV の潜伏持続感染に介入して、ウイルスを排除する方法を開発するために、HPV 遺伝子の発現調節機構を詳細に調べている。HPV 遺伝子の発現が宿主の分化と連動する分子機構に、細胞のマイクロ RNA（miRNA）が関わる可能性を検討した。

また、子宮頸部異形性（CIN）患者血清の HPV 中和活性を調べ、感染によって誘導される抗体について基礎的な情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1) HPV16 型 L2 蛋白質の型共通中和エピトープを、HPV16 型 L1 蛋白質に挿入したキメラ蛋白質を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、核内に形成される粒子（キメラ VLP）を抽出し、高度に精製する方法を検討した。

2) キメラ VLP10 μ g と水酸化アルミニウムを混合した接種液（50 μ l）を 5 週齢の雌 Balb/c マウスの大腿筋に接種した。一ヶ月後に同様の接

種液で追加免疫を行った。その 10 日後に部分採血を行い、血清の抗 HPV 中和活性を調べた。

3) ヒト表皮角化細胞株である HaCat 細胞を未分化状態で維持する培養条件とインボルクリンを発現する分化状態を誘導する培養条件を明らかにした。未分化と分化した状態で発現している miRNA を網羅的に比較した。

4) CIN1 ないし CIN2 患者から 24 ヶ月間隔で採取した血清の HPV 中和抗体を測定した（筑波大産婦人科との協同研究）。HPV16、18、31、52、58 型偽ウイルスの感染価を 1/2 以下に低下させる血清の最大希釈度を中和力価とした。40 倍以上の力価を特異中和抗体陽性とした。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。ヒト血清は、筑波大産婦人科においてインフォームドコンセントを得て採取した試料を使った。

C. 研究結果

1) キメラ L1 蛋白質発現組換えバキュロウイルスが感染した細胞を凍結融解、超音波破碎後、Benzonase による DNA、RNA の分解、フィルター濾過を行ってキメラ粒子を抽出した。カチオンイオン交換クロマトグラフィー（POROS 50HS）とゲル濾過クロマトグラフィー（Sephacryl S-300 HS）で、粒子構造を維持したまま精製することができた。精製品中のキメラ粒子は、総蛋白質中の 96-98%であった。混入 DNA 量は 6.6ng/ml 以下にならなかった。

2) キメラ VLP の筋肉接種で得られたマウス抗

血清は HPV16、18、31、52、58 型を中和した。
3) miR-210 の発現量が分化に伴って大幅に上昇し、HPV の初期プロモーターからの転写を抑制することがわかった。また、キャプシド蛋白質をコードする mRNA の安定性も miRNA によって調節されていることがわかった。

4) CIN1、2 患者の少なくとも 65% は HPV16、18、31、52、58 に対する中和抗体を持っていた。40% は一つの HPV 型に、14% は二つの型に、5% は三つの型に対する中和抗体を持っていた。四つの型に対する中和抗体を持つ例もあった。中和抗体陽性価は 40 から 2,560 程度で、24 ヶ月間ほぼ一定していた。採血時に HPV 増殖 (HPVDNA 検出) があっても、中和抗体が検出できない例があり、また中和抗体価の上昇も見られなかった。中和抗体価と病態の経過 (progress、persist、regress) に関連性は認められなかった。

D. 考察

1) キメラ VLP の粒子構造を維持したまま精製する方法を検討した。遠心とカラムクロマトグラフィの組み合わせで、蛋白質としては高度に精製したが、粒子内に取り込まれた昆虫細胞ないしバキュロウイルスに由来する核酸を除くのは困難であった。キメラ蛋白質の C 末端にある塩基性アミノ酸のクラスターに核酸が結合している可能性がある。この部分を欠失させたキメラ蛋白質を作り、VLP 形成能と抗原性の変化を検討している。

2) キメラ VLP 抗原を臨床試験に使うことを想定した接種量と汎用アジュバントの使用で、マウスに交差性中和抗体を誘導した。

3) miR-210 は細胞の転写抑制因子である YY1 の発現量を変動させることが報告されており、P97 の転写活性は YY1 の発現量によって調節されているらしい。ウイルス増殖の終盤に初期遺伝子の発現が不要になると、転写を抑制する機構の一つが明らかにされた。

4) HPV の自然感染で低レベルの型特異的中和抗体が誘導されるので、中和抗体の有無を指標に感染歴を知ることができる。HPV の増殖や病態の変化があっても抗体価の変動は無く、抗体価によって HPV 増殖や予後を推定することは出来ない。

E. 結論

1) キメラ VLP は、全ての高リスク HPV に対応するワクチン抗原となる可能性が高い。精製方

法を確立し、臨床試験をめざす。

2) HPV の自然感染では、極めて低レベルの中和抗体が誘導される。HPV 増殖の前後で抗体価の変動はない。自然感染で生じた抗体価では、再感染を防止できないと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Takatani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P₆₇₀ Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. *Virus Genes*, 35: 473-481, 2007.

2. Ishii, Y., Kondo, K., Matsumoto, T., Tanaka, K., Shinkai-Ouchi, F., Hagiwara, K., and Kanda, T.: Thiol-reactive Reagents Suppress Intracellular Trafficking of Human Papillomavirus Type 16 Pseudovirion by Binding to Cysteine Residues of Major Capsid Protein L1. *Virology Journal*, 4: 110, 2007.

3. Kondo, K., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Modification of Human Papillomavirus-like Particle Vaccine by Insertion of the Cross-reactive L2-epitopes. *Journal of Medical Virology*, 80: 841-846, 2008.

2. 学会発表

1) Kondo, K., Ochi, H., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Prophylactic vaccine against multiple high-risk human papillomaviruses: Papillomavirus-like particles (VLPs) presenting the common neutralization L2-epitopes. 第 66 回日本癌学会学術総会

2) Kukimoto, I., Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T.: The hSkN-1a POU transcription factor enhances DNA replication of human papillomavirus type 16. 第 66 回日本癌学会学術総会

3) Kukimoto, I., Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T.: The hSkN-1a POU transcription factor enhances DNA replication of human papillomavirus 16 through direct binding to two sites near the replication origin.

24th International Papillomavirus
Conference

4) 石井克幸、近藤一成、松本玉恵、田中恵子、
大内史子、萩原健一、神田忠仁：ヒトパピロー
マウイルス (HPV) 16 型キャプシド 主構成タ
ンパク質 L1 のシステイン残基が持つチオール
の機能。第 30 回日本分子生物学会年会・第 8
0 回日本生化学会大会合同大会

H. 知的所有権の取得

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の
感染予防ワクチン抗原」出願中
識別番号 110000109

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

分担研究者 川名 敬、東京大学医学部附属病院 産科婦人科学

研究要旨

子宮頸癌の前癌病変である子宮頸部上皮高度異形成(CIN2-3)は、HPV の癌蛋白質 E7 を高率に発現することから、E7 を標的にした治療的ワクチンの可能性が期待される。しかし CIN を標的にするためには子宮頸部粘膜に E7 特異的 CTL を誘導する必要がある。我々は、ヒト乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) に HPV16 型 E7 を提示させた乳酸菌 E7 ワクチンをマウスに経口接種し、E7 に対する細胞傷害活性を示す粘膜型リンパ球が腸管粘膜に強く誘導されることを見いだした。一方、子宮頸部粘膜での CTL 誘導を確認するために、CIN 患者の子宮頸部からリンパ球を分離し、その B 細胞、 $\alpha\beta$ TCR+細胞、CD8+ T 細胞が含まれることを確認し、細胞性免疫の誘導能を ELISPOT 法によって検出できることを確認した。この評価系を用いれば、乳酸菌 E7 ワクチンの臨床試験を行う場合に、子宮頸部における粘膜免疫誘導能の評価が可能であると考えられた。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（以下、HPV）は、性行為感染によって子宮頸部粘膜に感染し、ウイルス増殖を伴う感染が長期間持続すると、その一部が不死化、癌化に向かい子宮頸癌を発症する。その過程で、HPV の癌遺伝子である E6、E7 の永続的な発現が不可欠である。子宮頸癌の前癌病変である子宮頸部上皮高度異形成（以下、CIN2-3）では、70-90%において E7 癌蛋白質の発現が確認されている。これまで多種の E7 を標的にした HPV 治療的ワクチンが開発され、CIN を対象とした臨床試験が行われてきたが明らかな臨床的有効性は未だ示されていない。既存のワクチンは筋肉内もしくは皮下投与により全身性免疫を誘導し、末梢血

における CTL 誘導能を評価していた。子宮頸部粘膜における細胞性免疫を評価した研究はない。

本研究の目的は、E7 に対する CTL を子宮頸部粘膜に誘導する HPV 治療的ワクチンを開発することである。安全性が高く、Th1 系の免疫誘導に優れ、腸管粘膜への親和性の高い乳酸菌に注目し、乳酸菌 E7 を用いた。また、子宮頸部粘膜における CTL 誘導能を評価するために、CIN 患者から採取した子宮頸部リンパ球についての検討を加えた。

B. 研究方法

ヒトの腸内から採取された乳酸菌株 *Lactobacillus casei* 株を用いた。共同研究者

であるジェノラック BL株が保有する手法で、子宮頸癌で最も多く検出される HPV16 型の癌蛋白質 E7 を乳酸菌の細胞表面に提示した乳酸菌 E7 (LacE7) を作製し、加熱処理によって死菌化してワクチン抗原とした。この際 E7 の Rb binding site のアミノ酸を改変して悪性形質転換能を消失させた改変型 E7 を用いた。

HPV16 型 E7 の CTL エピトープがわかっている C57BL6 マウスに、LacE7 群を 0.01-1g/kg/回で、週 1 回もしくは 5 回で 4 週経口投与した。従来の筋注型治療的ワクチンと比較するため 16 型 E7 融合蛋白質の筋肉接種(GST-E7 群)も行った。粘膜型 CTL の評価では、採取困難な子宮頸部上皮内リンパ球の代用として、同じ免疫誘導を獲得できる腸管上皮内リンパ球を用いた。全身性 CTL の評価には脾臓リンパ球を用いた。最終経口投与から 5 週後に腸管上皮内リンパ球と脾臓リンパ球を回収し、CTL 反応性 E7 ペプチド刺激による IFN γ 産生 T cell(E7-CTL)数を測定した(ELISPOT 法)。

子宮頸部リンパ球の検討では、CIN 患者の子宮頸部擦過細胞から Percoll 不連続密度勾配遠心法で単核球画分を回収し、表面抗原をフローサイトメトリーにて解析した。また、ELISPOT 法により陽性コントロールの Phytohemagglutinin (PHA) 刺激による IFN γ 産生細胞を検出した。

(倫理面への配慮)

子宮頸部擦過細胞の採取については、東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得て、文書で同意を得た患者から採取された。これらの検体採取法は、通常の外来診療で施行される検査法と同じものである。

C. 研究結果

LacE7 群のうち、週 5 回 0.01g/kg/回の投与方法が最も多い粘膜型 E7-CTL を誘導した(週 1 回 1g/kg/回投与の約 2 倍)。LacE7 群では、粘膜型 E7-CTL が優位に誘導されていた(全身性 E7-CTL の約 60 倍)。また、LacE7 群の方が GST-E7 筋注群よりも 10 倍以上多い粘膜型 E7-CTL を誘導した。また、乳酸菌の経口投与は、E7 の有無にかかわらず、腸管上皮リンパ球における $\alpha\beta$ TCR+細胞数比、CD8+細胞数比を上昇させた。また、ELISPOT 法の評価でも、陽性コントロールである PMA+ionomycin 刺激による IFN γ 産生細胞数を、PBS 投与に比べ著しく増加させたことから、腸管粘膜面での局所免疫を Th1 に傾ける効果があることがわかった。

CIN患者において、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞の子宮頸部リンパ球が得られた。その表面抗原解析では、B細胞 5%(0.3-17%)、 $\alpha\beta$ TCR+細胞 10%(3.5-46.6%)、CD8+細胞 4%(1.4-9.8%)となり、子宮頸部リンパ球中にCTL活性を示しうる細胞が含まれていることを確認した。更に、陽性コントロールであるPHAで抗原刺激すると、IFN γ を産生するリンパ球がELISPOT法によって検出されたことから生物活性を有するリンパ球が採取されていることがわかった。

D. 考察

乳酸菌(LacE7)ワクチン経口投与は、筋注型ワクチンでは得られない高い粘膜型 E7-CTL 誘導能を示した。そのメカニズムの 1 つとして、乳酸菌そのものに腸管粘膜における Th1 優位の粘膜免疫状態する性質をもつことがわかった。

乳酸菌 E7 ワクチンの投与方法は、0.01g/kg (50kg のヒトで 0.5g/回) の 1 回経口投与とし、1クールは、1回/日、週 5 回投与で、0, 1, 4, 8 週の 4 クールが最適であった。内服であることから自宅での投与が可能であり、1 回量も通常整腸剤として用いる乳酸菌製剤の半量であることから、臨床応用しやすい投与方法である。しかも、乳酸菌は、安価かつ安全であることから、CIN 病変排除を目的とした治療的 HPV ワクチンとして臨床試験が期待される。

本研究では、マウスを用いており、子宮頸部粘膜面での E7-CTL 誘導能は検討できなかった。腸管に帰巢している粘膜型リンパ球は Integrin $\alpha 4\beta 7$ を有する特徴を持つが、生殖器粘膜にも Integrin $\alpha 4\beta 7$ を有する memory CD4+T 細胞, CD8+T 細胞, B 細胞が存在することが報告されている。これらは腸管から遊走してきたと考えられることから、腸管粘膜でのワクチン効果が子宮頸部粘膜で実効される可能性が高い。

来年度には、CIN 患者から得られた子宮頸部リンパ球において、Integrin $\alpha 4\beta 7$ 陽性の腸管粘膜由来リンパ球に関して、さらに検討していく予定である。

E. 結論

本研究では、HPV 治療ワクチンとして、乳酸菌を利用した新規の粘膜免疫誘導型ワクチンの基礎的検討を行い、HPV-E7 に対する粘膜型 CTL が誘導されることがわかった。乳酸菌は高い安全性から、臨床試験を試行しやすく、本研究の結果は、子宮頸部 CIN 病変に対する治療的ワクチンの臨床試験の基礎データと考えられる。本研究で確立された子宮頸部リンパ球を用いた ELISPOT 法は、

ワクチン接種後の子宮頸部における細胞性免疫誘導効果を検出するための評価系となると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawana K, Quayle AJ, Ficarra M, Ibane JA, Shen L, Kawana Y, Greene S, Yang H, Yavagal S, Marrero L, Zhang YX, Pyles RB, Blumberg RS, Schust DJ: CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is a result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. J. Biol. Chem., 282(10): 7368-7375, 2007

2) Inman DA, Kawana K, Schust DJ, Lininger RA, Young SL: Cyclic Regulation of T-Bet and GATA-3 in Human Endometrium. Reproductive Sciences, 15: 83-90, 2008

2. 学会発表

1) Kawana K, Kawana Y, Matsumoto J, Sato H, Nagamatsu T, Fujii T, Yasugi T, Danny J Schust DJ, Taketani Y, CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. 20th Asia-Oceania Congress of Obstetrics and Gynecology (AOCOG), 2007 June, Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

I. 参考文献

特になし。

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授

研究要旨

子宮頸がんの病原因子である HPV の感染を制御するためには、ウイルスの増殖機構を解明することが重要である。しかし HPV の生活環を再現する適当な培養系の構築は難しく、これまで解明が遅れてきた。当研究課題において HPV の生活環を再現するために角化細胞で効率よく HPV DNA を維持できる系を開発した。さらにこれを利用して皮膚モデル培養系 (raft culture) を構築することで、上皮細胞の分化に応じたウイルス複製が再現可能となった。本年度はこの解析系を用いることで以下の成果を得た。【1. HPV 複製系を用いたサイトカインの抗ウイルス活性の評価】HPV の複製可能な皮膚モデル培養系に各種サイトカインを添加し、その抗ウイルス効果を調べたところ、I 型インターフェロンでウイルス増殖に対する強い抑制効果と、抗腫瘍活性を見いだした。【2. HPV ゲノム維持に関わるウイルス遺伝子の同定】ウイルスの制御遺伝子がウイルスゲノム維持に関わるかどうか、単層培養条件で解析した。その結果、角化細胞において E4-E7 のいずれの制御遺伝子も必須ではないことが明らかとなった。これは過去の報告と異なる発見である。【3. E4 の機能解析】E4 をヒト角化細胞に発現させたところ、有意の細胞周期異常は認められなかったが、E7 と E4 の共発現で G2/M 細胞周期停止が誘導された。E7 は角化細胞の分化を阻害するが、E4 はその阻害を解除することが見いだされ、E4 は E7 発現細胞を分化誘導し、ウイルス後期過程の進行に寄与している可能性が示唆された。【4. HPV 陽性細胞の Ras による悪性転換】E7 を発現している細胞は Ras 経路の活性化に寛容となっており、E7 と Ras の共発現細胞は皮膚モデル培養系において強い浸潤能を示すことが示された。これには ERK 経路を介した MMP の活性化が関与していた。

A. 研究目的

ヒトの子宮頸がんを始め、いくつかの上皮がんの責任因子であるヒトパピローマウイルス(HPV)の感染を予防・治療することを目標として、HPV の感染・増殖機構を分子レベルで解明することを目的とする。

HPV は皮膚や粘膜といった上皮組織に感染し、その遺伝子発現や複製は上皮細胞の分化機能に強く依存している。そのため通常の組織培養法では HPV の感染・増殖を支持することが出来ない。この問題を解決するために HPV の複製を再現できる皮膚モデル培養系(raft culture 法)を利用し、その感

染・増殖機構を解析することとした。

B. 研究方法

【HPV 複製系の構築】

HPVs(s for self-ligation)型の複製系では、HPV16、11、18 型の全ゲノムを含むプラスミドからウイルス DNA 領域のみを切り出し、それを T4 DNA ligase によって環状化したものをウイルス DNA として利用した。HPV DNA を維持する細胞を選別する目的で、各 HPV 由来の複製起点(ori 配列)を含む G418 耐性プラスミド(HPV-ori plasmid)を構築した。HPV-FL(FL for full-length & linear)型の複

製系のためには、HPV16、11、18 型のゲノム DNA を制限酵素処理やライゲーション反応によってつなぎ換え、両端に LCR 配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これを G418 耐性プラスミド内に挿入したものを HPV-FL とした。

【細胞培養】

HeLa, CV1, 293T, ヒト繊維芽細胞 (HFF, クラボウ) は 10%FBS/DMEM を培地として用いて、5%CO₂ 37°C 条件において培養した。ヒト角化細胞 (HFK, クラボウ) は専用の培地 (EpiLife-KG2, クラボウ) を用いて、同条件で培養した。

【遺伝子導入】

HeLa, CV1, 293T に対しては通常のリン酸カルシウム共沈法を用いて transfection を行った。HFF, HFK はそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

【サザンブロット解析】

細胞からのウイルス DNA の抽出には Hirt の方法を利用した。回収した DNA は制限酵素処理によって線状化し、それをアガロースゲルで泳動したものをナイロンメンブレンに転写した。検出/可視化には DIG-標識・検出試薬を利用した (Roche)。通常のサザン法と DIG 検出法の組合せで十分な感度が得られない場合には、HPV の L1 領域を標的とした PCR と DIG 検出法を組み合わせて用いた。

【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF をコラーゲンゲルに埋め込み、数日の間収縮させることで構築した。このゲルの表面に HFK を重層させ、さらに HFK 表面を空気に晒すことによって HFK は層状化および分化し、皮膚モデルが構築される。

【ウイルスベクターの構築】

ras や HPV 遺伝子を HFK に遺伝子導入する際には、MuLV ベースのレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて、LXSN, LPCX, LHCX (Clontech) を使い分け、それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は、各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し、培養上清中に放出された

ウイルスベクターを回収し利用した。

【メチルセルロース懸濁培養、および分化マーカーの確認】

1%メチルセルロース/EpiLife-KG2 に HFK を懸濁し、10~48 時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase, filaggrin を Western 法によって検出することで行った。

(倫理面への配慮)

この研究の遂行において用いた実験材料や方法は個人情報、および倫理面での問題を生じない。

C. 研究結果

【HPV 複製系の構築とサイトカインによる抗腫瘍効果の検討】

HPV の複製系は 11 型、16 型、18 型の HPV をもとにして構築したが、今回は特に 16 型、18 型を中心に実験を勧めた。

16 型の HPV をもとにした HPV16s 型 DNA を HPV16-ori plasmid とともに HFK に導入し、G418 で選択すると、HPV ゲノムを効率よく保持した細胞が得られた。これは co-transfection した ori-plasmid が HPV と同時に細胞内で複製し、G418 耐性能を発現したためであると考えられた。同じことは HeLa 細胞や CV1 細胞を用いても確認できた。

HPV18FL 型の plasmid を単独で HFK に導入し、G418 で選別を行った場合にも、同様にウイルス DNA を保持した細胞集団が得られた。

この HPV18FL 陽性細胞に対して、IFN β 、TGF β 、TNF α 処理を行ったところ、1~2 割程度の増殖性の低下は認められたが、HPV DNA は保持したままであった。

次に HPV18FL 陽性細胞を用いて皮膚モデル培養系を構築した。ここでは上皮部分の過形成誘導と、分化に伴うウイルス複製が確認できた。皮膚モデル構築の過程で数日間同様のサイトカイン処理を行った場合には、IFN β で強い抗腫瘍効果と抗ウイルス作用が確認できた。一方 TNF α ではウイルス複製の活性化と、上皮の浸潤促進が観察された。

【HPV ゲノム維持に関わるウイルス遺伝子の

同定]

HPV16s 型の DNA をもとにして、site-directed mutagenesis 法を利用して、ウイルスの制御遺伝子 E4-E7 のそれぞれの欠失変異体を作成し、これらの制御遺伝子がウイルスゲノム維持に関わるかを解析した。その結果、HFK において E4-E7 のいずれの制御遺伝子も必須ではないことが明らかとなった。これは過去の報告と異なる発見である。同様の結果は CV1 細胞を用いた実験でも確認された。

次にこれらの変異 HPV16 を保持した HFK をメチルセルロース懸濁培養に適用した。この分化誘導条件では野生型でゲノム複製の活性化が認められた。ところが E7 欠失 HPV では、分化に応じたゲノムの amplification が認められなかった。

【E4 の機能解析】

E4 は HeLa 細胞、CV1 細胞に導入した場合、強い G2/M 細胞周期停止を誘導することが知られている。ところが E4 を HFK に発現させたところ、有意の細胞周期異常は認められなかった。HFK においては E7 と E4 の共発現で G2/M 細胞周期停止が誘導された。メチルセルロース懸濁培養の結果から E7 は角化細胞の分化を阻害するが、E4 はその阻害を解除することが見いだされ、E4 は E7 発現細胞を分化誘導し、ウイルス後期過程の進行に寄与している可能性が示唆された。

【HPV 陽性細胞の Ras による悪性転換】

正常細胞では Ras 経路の活性化は oncogenic なストレスとなり、senescence と呼ばれる細胞死を誘導する。しかし E7 を発現している細胞は Ras 経路の活性化に寛容となっており、これには pRb 経路の不活化が関与していることが示された。E7 と Ras の共発現細胞は皮膚モデル培養系において強い浸潤能を示すことが示された。Ras 活性化は MT1-MMP を上皮-真皮の境界領域で活性化し、E7 は MMP9 を上皮において活性化していた。いずれの MMP 活性化にも ERK 経路が関与していることが、特異的阻害剤、および恒常的活性型 MAPK を利用した実験で確認できた。E7 による MMP9 の活性化機構には pRb 経路の不活化は関与しておらず、低リスク型の E7 においても同様の活性が認

められた。

D. 考察

今回の HPV 複製系、およびそれを用いた皮膚モデル培養系によって、従来不明な点が多かった HPV の生活環の解析が容易となった。この系を用いて今回は IFN β による強い抗ウイルス活性と抗腫瘍効果を見いだした。IFN β についてはこれまでもコンジローマ治療に用いられることがあったが、この系を用いることでその作用機序の解明が勧められると考えられる。この IFN の効果は単層培養では確認できなかった。これは単層培養条件では HPV の遺伝子発現、DNA 複製、細胞機能への影響が低レベルに維持されているため、IFN による抗ウイルス効果が発現しなかったためではないかと考えられる。今後は低レベルのウイルス複製も抑制できるサイトカイン、化合物の検索が重要であると考えられる。

HPV の各制御遺伝子がゲノムのメンテナンスに関与していないことは、単層培養条件下では想定できることであった。しかし、E6、E7 に関しては同様の条件下でメンテナンスに関わるという報告がある。これはこれまでの報告では E6 や E7 による細胞寿命、増殖性の亢進機能が表れているためではないかと考えられた。しかしこの点に関しては今後の検証が必要である。

E7 の機能が分化依存的なゲノムの amplification に関わっている結果が得られた。E7 は分化を抑制方向に向け、過形成誘導に関わるということが知られている。E7 が存在しないと短期間の間に HFK は終末分化に到達し、その条件ではゲノムの複製が行えないのではないかと考察できた。メチルセルロース懸濁条件によって分化過程が進行するが、E7 はその進行を穏やかにし、HPV ゲノムが複製するに最適なコンディションを整える役割があるのかも知れない。

E7 が分化を抑制方向に向けるのに対し、同時に発現させた E4 はその効果を打ち消すことが示された。E4 はサイトケラチンなどの細胞骨格成分と相互作用し、ウイルス粒子の放出に関わるという考えが提唱されている。今回の結果は E4 が分化の進行に伴

って発現し、最終的なウイルス粒子の形成/放出に関わっている可能性を示すものである。

Ras経路の活性化がHPV陽性細胞に浸潤能を獲得させることは、HPV感染前がん状態から悪性形質の獲得への宿主側の変化を考察する上で重要な地検である。MMPの活性化にはrasの下流のERKの活性化が特に重要であることを考えると、ras以外の活性化や変異によっても同様の形質転換が可能であるかも知れない。他にもakt経路やmycなどの関与の可能性も考えられ、今後はこの解析系を用いてHPV陽性細胞の悪性形質獲得機構を検索していきたい。

E. 結論

今回の実験でHPVの複製、生活環に基づいた各種の解析を行うことが出来た。いずれの研究もまだ途中段階のものが多く、今後さらに実験を進めることで、HPVの生活環の解明、およびウイルス感染の予防・治療に向けた重要な知見を提供できることを期待している。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

(J. Virology, 投稿中)

2. 学会発表

梶谷直子, 吉田智志, 佐塚文乃, 中村博保, 酒井博幸: Identification of novel function of HPV viral proteins. 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.

佐塚文乃, 吉田智志, 梶谷直子, 中村博保, 酒井博幸: Functional studies on differentiation-dependent HPV life cycle. 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.

吉田智志, 梶谷直子, 佐塚文乃, 中村博保, 酒井博幸: Analysis of the acquisition of invasive potential in HPV-infected cell. 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.

梶谷直子, 吉田智志, 佐塚文乃, 中村博保, 酒井博幸: HPV E1^{E4} 転写産物の機能解析. 第55回日本ウイルス学会学

術集会, 札幌, 2004.

佐塚文乃, 吉田智志, 梶谷直子, 中村博保, 酒井博幸: HPV ライフサイクルの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2004.

中村博保, 吉田智志, 梶谷直子, 佐塚文乃, 酒井博幸: HIV-1 感染細胞による非感染細胞へのアポトーシス誘導機構の検討. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C型肝炎ウイルスの感染および複製機構の解析

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨: これまでに C 型肝炎ウイルス(HCV)のエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルス(HCVpv)を用いて感染機構の解析が進められてきたが、HCVpv はゲノムにエンベロープ遺伝子を持たないため、一度しか感染できず、二次感染は起こらない。本研究では水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ遺伝子を欠損させ、代わりに HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV(HCVrv)を作製し、その感染様式を解析した。293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、Huh7 細胞に最も高い感染性を示し、抗 hCD81 抗体や C型肝炎患者血清で感染が中和された。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv の感染拡大が確認された。自立増殖可能な HCVrv は、各種遺伝子型の HCV の感染機構の解析に有用であると考えられた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。近年、特定のクローン(JFH-1 株)を用いた HCV の増殖系が確立されたものの、未だ HCV の感染機構の詳細は明らかにされていない。これまでに我々は、HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(HCVpv)を作製し、その感染機構の解析を進めてきた。シュードタイプウイルスはゲノムにエンベロープ遺伝子を持たないため、一度しか感染できず、二次感染は起こらない。本研究では水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ遺伝子を欠損させ、代わりに HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV(HCVrv)を作製し、その感染様式を解析し、新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

1a 型 H77 株および 1b 型 Con1 株の HCV エンベロープ遺伝子を、VSV のエンベロープ遺伝子を欠損させた VSV の cDNA に挿入し、HCVrv を各種動物細胞で作製した。HCVrv の性状ならびに、感染様式を HCVpv および JFH-1 株と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益

が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCVrv は HCVpv と同様に、293T や Huh7 細胞で作製すると感染性を示すウイルスが得られ、これらのウイルスは Huh7 細胞に最も高い感染性を示した。HCVrv の作製は 37°C よりも、30°C で培養した方が高い感染価のウイルスが得られた。また、293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、HCVpv と同様に、抗 hCD81 抗体や C型肝炎患者血清で中和された。さらに、新たに樹立した JFH-1 株の増殖効率の良い Huh7 細胞では、HCVrv の感染の拡大が観察された。

D. 考察

今回作製した組換え VSV は、これまでのシュードタイプウイルスや JFH-1 ウイルスと同様に、hCD81 依存的な感染性を示した。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv によって発現された HCV エンベロープ蛋白質を利用して、感染を拡大していることが確認された。自立増殖可能な組換え VSV を用いることにより、各種遺伝子型の HCV の感染機構を詳細に解析することが可能になるものと思われる

る。

E. 結論

1. HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えウイルス(HCVrv)を作製した。
2. HCVrv は、Huh7 細胞に高い感染性を示し、抗 hCD81 抗体やC型肝炎患者血清で中和された。
3. 一部の Huh7 細胞株で、HCVrv の感染拡大が確認された。
4. 自立増殖可能な HCVrv は、各種遺伝子型の HCV の感染機構の解析に有用である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 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 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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 森石恒司、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PA28 γ 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、森石恒司、松浦善治:C型肝炎ウイルスゲノム複製に關与する宿主蛋白質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、森石恒司、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、森石恒司、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、森石恒司、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、森石恒司、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、森石恒司、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。