

C. 研究結果

VLP経口投与による抗体応答において、5 mg/dose群では初回投与と21日後までに血清中 HEV 抗体、初回投与 24 日後までに糞便中 HEV 抗体が検出された。0.5 mg/dose 群では HEV 攻撃 7 日後より血清中 HEV 抗体価の上昇が確認されたことから、抗体応答のプライミング効果があったと考えられた。0.05 mg/dose 群の抗体応答は対照群のそれと大きな違いは認められなかった (図 1)。

VLP経鼻投与による抗体応答において、0.5 mg/dose+CT 群では初回投与と21日後までに血清中 HEV 抗体が検出され、HEV 攻撃 7 日後までに糞便中 HEV 抗体が検出された。他の経鼻投与群ではいずれも血清抗体応答のプライミング効果が認められた

が、糞便中の抗体応答は対照群のそれと大きな違いは認められなかった (図 2)。

糞便ならびに血清中の HEV RNA は、対照群では HEV 攻撃 7 日後より検出され、糞便中では攻撃 14-21 日後まで、血清中では攻撃 7-21 日後まで検出された。VLP 経口投与では、5 mg/dose 群と 0.5 mg/dose 群のいずれも糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。0.05 mg/dose 群では HEV RNA の検出は対照群と大きな違いは認められなかった。VLP 経鼻投与においては、0.5 mg/dose+CT 群ならびに 0.5 mg/dose 群はいずれも糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。一方、他の群ではいずれの豚においても HEV RNA が検出された (図 3)。

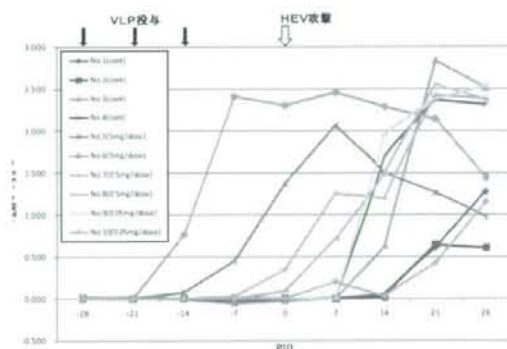


図1. 血清中HEV IgG抗体の推移(経口投与)

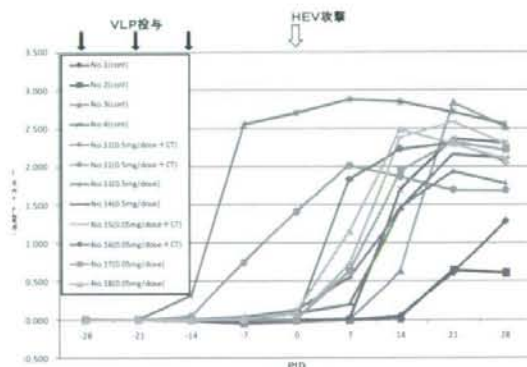


図2. 血清中HEV IgG抗体の推移(経鼻投与)

表1. Nested RT-PCR 法による糞便ならびに血清中の HEV RNA 検出成績

処理		HEV 感染後日数												
		-28	-21	-14	-7	0	3	7	10	14	17	21	24	28
対照	糞便	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	0/4	0/4
	血清	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/2	4/4	NT	2/4	NT	2/4	NT	0/4
5 mg/dose	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経口投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2
0.5 mg/dose	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経口投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2
0.05 mg/dose	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2
VLP 経口投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	NT	2/2	NT	0/2	NT	0/2
0.5 mg/dose+CT	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経鼻投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2
0.5 mg/dose	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経鼻投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2
0.05 mg/dose+CT	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経鼻投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2
0.05 mg/dose	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
VLP 経鼻投与	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2

D. 考察

われわれは、これまでにノトバイオート豚を用いた HEV の実験感染モデルを作出し、VLP の粘膜投与により感染防御効果が認められることを明らかにした。今回、VLP の経口投与あるいは経鼻投与時における HEV の感染防御を示す VLP の最小有効量を検討した。その結果、HEV の感染阻止を示す VLP の最小有効量は経口投与ならびに経鼻投与いずれにおいて 0.5 mg/dose であった。この成績は、VLP の経鼻投与時に粘膜アジュバントであるコレラトキシンを添加しても変わらなかった。このことから、VLP 自体が粘膜において高い免疫原性を有していると考えられた。また、VLP は経口投与においても高い感染防御能を示したことから、胃酸や腸の蛋白分解酵素に対して VLP は抵抗性を示すと推測された。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. VLP は豚において高い免疫原性を有する
2. VLP をノトバイオート豚に 1 週間隔で 3 回投与した時の HEV に対する最小感染阻止量は、経口ならびに経鼻投与いずれにおいても 0.5 mg/dose であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

なし

誌上発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究報告書

HBV, HCV中空粒子を利用した新規診断系の開発

分担研究者 勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 HBV の HBs 抗原の分泌効率を規定する遺伝子領域を決定するため分泌効率の異なる genotype A と C のキメラプラスミドを作製した。これらを用いてより効率のよい HBs 抗原分泌法の開発を進めている。HCV ウイルス粒子を効率よく産生させるため、HCV J6/JFH-1 株が感染した Huh-7.5 細胞を 3-4 日ごとに passage させ、適応変異を有したウイルス株を得た。ウイルス遺伝子変異を解析したところ、構造領域、非構造領域に 8 つのアミノ酸変異が検出された。E2 領域の 4 つの遺伝子変異をそれぞれ導入した組換え HCV を解析したところ、HCV の細胞への侵入効率を向上させる変位が明らかとなった。この変異を有する HCV 株は効率よく産生されることがわかった。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は従来の血清分類だけでなく、遺伝子解析により 8 つの遺伝子型に分類できるようになった。本邦では一過性 HBV 感染は急性肝炎の発症のみで完治すると考えられてきたが、遺伝子型分類による臨床疫学研究が進むにつれて、遺伝子型により慢性化しやすい遺伝子型、慢性肝炎から肝癌に移行しやすい遺伝子型が存在すると指摘されている。ヨーロッパ型の genotype A が性交感染症として日本国内、特に大都市部に侵入、拡大していることが疫学的に示され、本邦の厚生労働行政上、重大な課題となってきた。そこで、遺伝子型分類を簡便に検査できる方法の開発、また、臨床病態との関連を明らかにし、HBV の適切な診断法、予防法、治療法の開発が急務と考えられている。

また、C 型肝炎ウイルス (HCV) の診断法

は飛躍的に進歩したが、ウイルスの中和やワクチン効果の判定に重要な抗エンベロープ抗体検出系は未だ確立していない。感染性 HBV, HCV 粒子を効率よく増殖させる手段が未だ確立されておらず、大量のウイルス抗原の調製が困難であることが主たる原因である。また、感染性ウイルスと同様な形態と抗原性を有するウイルス抗原の産生は極めて困難であり、診断における特異性と感度を低下させる一因になっている。この意味で、ウイルス様中空粒子 (virus-like particles, VLP) や組換えウイルスが大量に産生できれば、ワクチン開発と診断試薬の性能向上の両面において格段の進展が期待できる。

そこで、本研究では HBV, HCV の中空粒子や組換えウイルスを効率よく発現し、ワクチン開発と検査・診断法の向上を目指すために基礎検討を行った。

B. 研究方法

<HBs 抗原分泌機構の解析>

(1)HBV キメラプラスミドの作製

HBV-Aeus, HBV-Cat 株 (名古屋市立大学、溝上教授から供与) の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を PCR 法で作製し、pSV プラスミドにサブクローニングした。

(2)Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で確認した。

(3)細胞上清中への HBs 抗原分泌効率を ELISA 法で検討し、どの領域が重要であるか解析する。

<適応変異を有する組換え HCV の作製と機能解析>

(1)適応変異 HCV ウイルス株にあるアミノ酸変異を基に QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit で HCV RNA 作製用のプラスミドを構築した。さらに適応変異株が有する E2 の 4 アミノ酸変異をもつプラスミド

(E2) と、各々一つ含むプラスミド (T396A、N416A、N534H、A712V) も作製した。

(2)HCV RNA transfection とウイルス粒子産生：上記で作製したプラスミドを Xba1 で消化し直鎖状にした後、T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System で RNA を合成し、Huh-7.5 細胞にエレクトロポレーションで導入した。その後、細胞培養し、経時的に上清中の HCV 感染性粒子を採取した。

(3)HCV コア蛋白量の測定：オーソ HCV 抗原 ELISA テストを用いて細胞内、又は上清中の HCV コア蛋白量を測定した。

(4)HCV 感染力価の測定：HCV 感染 24 時間後

に、HCV 抗原陽性細胞を抗 HCV 血清で免疫蛍光染色し、感染力価 (ffu/ml) を測定した。

(5)CD81 阻害：anti-CD81 antibody 又は対照 IgG で一時間前処理しておいた Huh 7.5 細胞に、組換えウイルスをそれぞれ moi 0.01 で感染させ、感染 24 時間後に感染力価を測定した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。患者試料を用いる際は当研究所の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行う。

C. 研究結果

<HBs 抗原分泌機構の解析>

(1)HBV キメラプラスミドの作製

HBV-Aeus, HBV-Cat 株の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を作製した。

(2)Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で確認した。予想されたサイズの HBs 抗原を検出した。

<適応変異を有する組換え HCV の作製と機能解析>

(1)細胞上清中への HBs 抗原分泌効率を

ELISA 法での検討を現在進めている。

(2)組換え HCV 感染力価の測定：各組換え HCV を moi=0.01 で感染させ、上清中の maximal infectivity titer を比較した。

増殖適応変異株は野生型に比し 5-10 倍高い感染力価を示した。しかし、アミノ酸変異を一つずつ含むウイルス株 (T396A、N416A、N534H、A712V) や E2 に 4 つアミノ酸変異を

もつウイルス株 (E2) では感染力価の上昇は認められなかった。

(3) HCV RNA エレクトロポレーション後のコア蛋白量測定: 適応変異株と野生型から *in vitro* RNA 合成し、Huh7.5 細胞にエレクトロポレーションで導入した後、その細胞と上清を 4h, 12h, 24h, 48h, 72h 後にそれぞれ回収。それらの HCV コア蛋白量を ELISA 法で比較したが、適応変異株と野生型において、細胞内及び上清中のコア蛋白質量に顕著な差は認められなかった。

(4) HCV 感染細胞のコア蛋白量の測定: Huh7.5 に組換えウイルスを感染させ、感染後 day1, 3, 5 の細胞と上清を回収後、それらの HCV コア蛋白量を ELISA 法を用いて測定した。適応変異株は野生型に比べ、感染後の細胞内のコア蛋白量が約 10 倍高く、上清中のコア蛋白量は約 5 倍高いことを確認した。

(5) CD81 阻害実験: anti-CD81 antibody によって各ウイルスのエントリーは阻害された。10 μ g/ml の anti-CD81 antibody を用いて前処理した際、野生型, T396A, N416A, A712V は約 70% 感染力価が減少したが、適応変異株, E2, N534H では約 30% の感染力価の減少にとどまった。

D. 考察

HBV genotype A 株 (HBV-Ae) は genotype C 株 (HBV-CA) に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高い。今回、分泌効率が異なるクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較するための発現系を構築した。次年度は分泌効率を制御する遺伝子配列を明らかにし、高効率 HBs 抗原発現系を樹立する。

HCV 増殖適応変異株の 8 つのアミノ酸変

異が感染性向上に重要であることが示された。その中でも、E2 の N534H 変異が CD81 依存性の HCV 感染侵入効率を上昇させることが示された。HCV E2 glycoprotein は、細胞表面上の CD81 などのウイルス受容体と結合する事で、HCV の侵入に関わる領域である。E2 上の 534 番目のアミノ酸は 11 個ある内の 6 番目の N-グリコシレーションサイトであり、HCV の侵入や、中和抗体に対する防御上、重要なアミノ酸とされている。534 番目のアミノ酸がアスパラギンからヒスチジンに変異することにより、糖鎖付加の欠失が起こり、CD81 と E2 の結合に変化をもたらす可能性が示された。しかしながら、Core と NS5A などの他の領域の変異の意義については、更なる解析を進める必要がある。

E. 結論

HBV の genotype A と C のキメラプラスミドを作製した。これらを用いて HBs 抗原分泌に重要な領域を明らかにしていき、効率の良い分泌系を構築していく。

HCV 増殖適応変異株には少なくとも 8 つのアミノ酸変異があり、E2 の N534H 変異は CD81 依存性侵入効率を向上させることが示された。他の Core, NS2, NS5A の遺伝子変異について今後検討を加える必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., and Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow

- bioreactor system. *Journal of Virological Methods*, **148**, 174-181, 2008.
- 2) Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., and Shoji, I. Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *Journal of General Virology* **89**, 1587-92, 2008.
- 3) Sasase, N., Kim, S.R., Kim, K.I., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hotta, H., Shoji, I., El-Shamy, A., Kawada, N., Kudo, M., and Hayashi, Y. Usefulness of a new immunoradiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, **51**, 70-5, 2008.
- 4) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent pathway. *Journal of Virology*, **82**, 10375-85, 2008.
- 5) Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by dual mechanisms, ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *Journal of Virology*, [epub ahead of print], 2008.
- 6) Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., and Shoji, I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
- 7) 金守良、井本勉、婦木秀一、金啓二、谷口美幸、長野基子、堀田博、勝二郁夫、寒原芳浩、前川陽子、工藤正俊、林祥剛 型高ウイルス量高齢者 型慢性肝炎に対する PEG IFN α -2 b/リバビリン治療（併用療法）の検討. *肝臓*, 145-152, 2008.
2. 学会発表
- 1) Shoji, I., Osaki, M., Fukuda, K., Murakami, K., Hotta, H., Suzuki, T., Wakita, T., and Miyamura T. Molecular mechanism of E6Ap-mediated regulation of hepatitis C virus production. Keyston Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis, Victoria, Canada, 2008.
- 2) Murakami, K., Abe, K., Shoji, I., Takamiya, S., Kimura, T., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Wakita, T. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. International Union of Microbiology 2008, Istanbul, Turkey, 2008.
- 3) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Murakami, K., Shoji, I., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatinine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San

- Antonio, USA, 2008.
- 4) Hamamoto, I., Murakami, K., Suzuki, T., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Wakita, T., and Shoji, I., ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 5) El-Shamy, A.M., Apichartpiyakul, C., Kim, S.R., Adachi, T., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance -determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/rivavirin combination therapy. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 6) Abe, K., Murakami, K., Takamiya, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Shoji, I. Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 7) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 8) Hotta, H., Kitayama, K., Yabuki, R., Deng, L., Nagano-Fujii, M., and Shoji, I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 9) Shoji, I., Osaki, M., Murakami, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Wakita, T., and Hotta, H. Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 10) 原弘道、相崎英樹、松田麻未、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 11) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫、HCVコア蛋白に結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 12) Lin Deng、足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤荘平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博、C型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 13) 堀田博、北山喜久美、矢吹玲子、Lin Deng、長野基子、勝二郁夫、C型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大、アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 14) 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多

- 屋馨子、岡部信彦、脇田隆字、勝二郁夫、C型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 15) エルシャーミーアメード、足達哲也、犬伏祥子、勝二郁夫、堀田博、ペグインターフェロン/リバビリン併用療法における HCV core および NS5A の多様性による SVR 予測因子と Non-SVR 予測因子の検討、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 16) 内海孝子、ルシダマリア、長野基子、笹山美紀子、勝二郁夫、堀田博、インドネシア・パプア州の B 型肝炎ウイルス (HBV) の分子系統樹解析と新規 subgenotype の同定、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 17) 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.
- 18) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発
分担研究報告書

PLC/PRF/5 細胞で増殖した HEV の解析
分担研究者 李天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 E 型肝炎ウイルス（HEV）は増殖のための確実な細胞培養系が未だに樹立されていないウイルスである。細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。我々はブタから分離した遺伝子型 3(G3)に属する HEV 株を PLC/PRF/5 細胞に接種し、HEV の増殖できるウイルス株を確立した。本年度、PLC/PRF/5 細胞で増殖した HEV 粒子を精製し、その特徴および感染性を解析した。

協力研究者 劉 蘭軍（国立感染症研究所）、
恒光 裕（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus; 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。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20%に達するという報告もある。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。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかにされず、ワクチン開発のための基盤的情報が不足している。今回我々はブタから分離した遺伝子型 3(G3) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5、PLC/PRF/5 細胞に接種し、HEV の増殖系を確立した。また、PLC/PRF/5 細胞で増殖した HEV 粒子を精製し、その特徴および感染性を解析した。

B. 研究方法

G3 HEV が感染した PLC/PRF5 細胞を大量に培養

し、超遠心法で培養上清に産生されたウイルス粒子を濃縮した。さらに濃縮したウイルス粒子をシヨ糖密度勾配遠心法で精製し、各フラクションを回収し、抗原および HEV-RNA をウェスタンブロット法およびリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ウイルス抗原と遺伝子の両方が検出されたフラクションを電子顕微鏡で観察した。細胞で増殖したウイルスの感染性を確認するため培養したウイルス上清をカニクイザルに接種し、便中および血中のウイルス感染価および抗体を測定し、ウイルスの増殖の有無によって感染性を評価した。

C. 研究結果

G3 HEV 感染 PLC/PRF5 細胞の培養上清に産生されたウイルス粒子を超遠心法によって濃縮した。シヨ糖濃度勾配遠心で分画したところウイルス蛋白およびウイルス遺伝子は共に 30%(w/v)のフラクションに濃縮された。このフラクションに電顕微鏡で直径約 35 nm のウイルス粒子が観察された。さらにこのフラクションのシヨ糖を除去し、カニクイザルに静脈注射したところ、一週間後に糞便から HEVRNA が検出され、その後、血中から抗 HEV 抗体が検出された。この結果から、培養細胞で増殖した HEV は感染性を保っていることが示され

た。

D. 考察

今回の実験結果は初めて細胞培養系で増殖したウイルス粒子の形態が電子顕微鏡で観察された。今後ウイルス三次構造の解析にきわめて重要な材料を提供出来ると考えられる。また、培養細胞で増殖したウイルスの感染性を保っていることが証明され、これによって HEV の不活化条件、消毒薬の評価、ワクチン効果評価、さらに治療薬のスクリーニング等を *in vitro* で容易に検討することが可能になり、食品等からのウイルス除去に有力な科学根拠を提供できる。さらに、培養細胞の樹立によって生 E 型肝炎ワクチンあるいは不活化 E 型肝炎ワクチンの開発も可能となる。

E. 結論

培養細胞による HEV 培養系を確立した。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Li T-C, Miyamura T, Wakita T, Takeda N: Characterization of recombinant virus-like particles of genotype 3 hepatitis E viruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. Tokyo. June 1-3, 2008.
2. Li TC, Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. XIV international Congress of Virology. Turkey. Istanbul, 10-15 August 2008.
3. 山下哲生, 宮崎 直幸, 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: 分析能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.
4. 森 嘉生, 山下哲生, 嶋 亮一, 森石恆司, 李 天成, 武田直和, 松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.
5. 李 天成, 恒光 裕, 宮村達男, 脇田 隆字, 武田直和: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス (HEV) の増殖. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.

2. 論文発表

- (1) Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, T-C Li, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22. Epub 2008 Mar 29.
- (2) Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim.* 2008 Jul;57(4):367-76.
- (3) Gran S, Hansman, Tmoichiro Oka, T-C Li, Osamu Nishio, Mamoru Noda, and Naokazu Takeda. Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams. *Journal of Food Protection.* 2008 Aug; 71(8): 1689-95.
- (4) T-C Li, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Hiroshi Tsunemitsu Tatsuo Miyamura, and Naokazu

Takeda. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2008. Dec;70(12):1359-62.

- (5) Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol*. Nov 9, 2008.
- (6) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec 1.

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

分担研究報告書

HCVのsubgenomic repliconを持つウイルス様粒子の形成と性状解析

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 石井 孝司

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことが研究を困難にしていたが、劇症肝炎患者からクローニングされた JFH-1 株により初めて HCV のウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に JFH-1 株の構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染は起こるが増殖はしない HCV の virus-like particles の作成を最終的な目標としている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症である。現在のウイルス保有者数は世界中で1.7億人（HIV感染者の4倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者のHCV感染やHIV感染者のHCV重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCVのワクチン開発が望まれている。

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

染性のウイルス粒子を分泌した。

哺乳類細胞にHCVの構造蛋白とsubgenomic replicon RNAを供給することにより、HCV様粒子（HCV-LPs）を形成させることができれば、HCVのゲノムパッケージングや粒子形成などライフサイクルの研究だけでなく、ワクチン開発研究にも有用と考えられる。

本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。哺乳類細胞にHCVの構造蛋白とsubgenomic replicon RNAを供給することにより、HCV様粒子（HCV-LPs）を形成させることができれば、HCVのゲノムパッケージングや粒子形成などライフサイクルの研究だけでなく、ワクチン開発研究にも有用と考えられる。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらにJFH-1株の構造遺伝子領域を哺乳類細胞で発現させると、培養液中に（HCV-LPs）を分泌する。HCV-LPsを大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

粒子中にHCV repliconを保持するHCV-LPsの形

成

HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを、HCV の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白と replicon RNA の培養上清中での挙動を調べた。

HCV-LPs の感染性の確認

上記の方法で精製した HCV-LPs を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 を添加した培地で 2 週間培養し、コロニー形成の有無を調べた。

HCV replicon への外来遺伝子導入の検討

HCV replicon のレポーター遺伝子を luciferase と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白、あるいは green fluorescent protein (GFP) と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白に置換し、本レプリコンを保持する細胞株を作成した。上記と同様の方法で HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを導入し、HCV-LPs を恒常的に分泌する細胞株を取得した。これらの細胞株から分泌される HCV-LPs を精製し、感染させた細胞で luciferase や GFP が発現されるかを調べた。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用されるヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒ

トゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

Genotype 1b の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に JFH-1 の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入した細胞株を樹立した。この株からは構造蛋白と replicon RNA が分泌され、シヨ糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白と RNA は比重が 1.15 前後の分画に回収された。HCV のエンベロープ蛋白の 1 つである E2 はヘパリンと結合する性質があることが知られているが、上記の構造蛋白と RNA が共存するフラクションをヘパリンアフィニティカラムにかけたところ、構造蛋白と RNA の大部分はヘパリンカラムに結合した。このことから、分泌された構造蛋白は RNA と共に何らかの構造体を形成していることが示唆された。

2. HCV replicon を保持する HCV-LPs の感染性の有無の検討

上記の実験で得られた構造体は粒子中に HCV replicon を保持していると考えられるため、もし感染性を有するならば感染した細胞に replicon が導入される。導入された replicon が複製することにより、感染細胞は neomycin 耐性を有することになる。上記の画分を naive な Huh7 細胞に感染さ

せ、G418 存在下で培養したところ耐性コロニーが検出された。このことから、上記の画分に存在する構造体は感染性を有する HCV-LPs であることが明らかとなった。

3. HCV replicon への外来遺伝子導入の検討

HCV replicon のレポーター遺伝子を luciferase と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白、あるいは GFP と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白に置換し、本 replicon を保持する細胞株を作成し、さらに HCV の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入して HCV-LPs を恒常的に分泌する細胞株を取得した。HCV-LPs を感染させた細胞で luciferase や GFP が発現されるかを調べたところ、感染細胞でいずれのレポーター遺伝子も発現が確認され、replicon に導入した外来遺伝子は HCV-LPs の感染にともなって細胞内へ導入されることが確認できた。

D. 考察

本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV の virus-like particles の作成しワクチンとして応用することを最終的な目標としている。昨年度までに構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認され、この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心で native な HCV 粒子と類似の比重の画分に集積していることが見出された。また、同じ画分から subgenomic replicon RNA も検出されたことから、発現蛋白は HCV 粒子様構造(HCV-LPs)を取っていることが示唆され、また、HCV-LPs には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。本年度

はこの HCV-LPs が感染性を有するかどうかの検討を行い、感染させた細胞の neomycin 耐性を調べることにより感染性を証明することができた。また、replicon に外来遺伝子を導入することにより、外来遺伝子を感染細胞内で発現させることにも成功した。本 HCV-LPs は、感染性は有するが増殖せず HCV 蛋白をすべて感染細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチンとして用いることができると考えられる。また、外来遺伝子を細胞内へ導入し発現させるベクターとしても用いることができることも確認できた。

E. 結論

HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV-LPs が培養上清中に放出されることが判明した。また、本粒子に一過性の感染能があることを証明した。今回得られた粒子は HCV の粒子形成や細胞への吸着、侵入過程の解析に好適であり、また優れたワクチン候補であると考えられる。また、外来遺伝子の肝臓特異的なデリバリーに応用できる可能性も考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Miyamura T., Matsuura M., Suzuki T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin independent but PA28γ-dependent. *Journal of Virology* in press.

2. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiology and Immunology* in press.
 3. Akazawa D., Date T., Morikawa K., Murayama A., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Ishii K., Suzuki T., Mizokami M., Mochizuki H. and Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 747-751 (2008)
 4. Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Zheng X., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. and Takeda N. Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology* 82: 10756-10767 (2008)
 5. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology* 82: 7964-7976 (2008)
 6. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008)
 7. Murakami K., Kimura T., Osaki M., Ishii K., Miyamura T., Suzuki T., Wakita T. and Shoji I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytes. *Journal of General Virology* 89: 1587-1592 (2008)
 8. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* 148: 174-181 (2008)
 9. 石井孝司、李 天成、武田直和 E型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中
 10. 清原知子、石井孝司、脇田隆宇 A型肝炎 臨床と微生物 35: 645-650 (2008)
 11. 李 天成、石井孝司、武田直和 E型肝炎と豚肉、鹿肉、猪肉の安全性 臨床とウイルス 36: 298-304 (2008)
 12. 白土東子、武田直和、石井孝司 ノロウイルスと血液型抗原との結合 遺伝子医学 MOOK 11: 192-198 (2008)
 13. 石井孝司 遺伝子組換え生ワクチン 日本臨床 66: 1903-1907 (2008)
2. 学会発表
1. Omi N., Akazawa D., Takahashi H., Morikawa K., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Inactivated recombinant HCV particle (JFH1 strain) immunization of mice could induce antibody response. 2nd Vaccine Congress,

Boston, December 7-9, 2008

2. Ishii K. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, November 1, 2008
3. Li T.C., Ishii K. and Takeda N. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, October 6, 2008
4. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
5. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Li J., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
6. Ishii K., Hasegawa H., Nagata Y., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008
7. Ami Y., Ishii K., Tsunetsugu-Yokota Y., Nagata Y., Hasegawa H. and Taguchi F. Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008
8. 岩崎優紀、森 健一、横 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、片貝祐子、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染サルのウイルスゲノム解析、第45回日本肝臓学会総会、平成21年6月、神戸
9. 岩崎優紀、森 健一、横 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、片貝祐子、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：マーマセットを用いた C型肝炎サロゲートモデルの開発、第56回実験動物学会総会、平成21年5月、大宮
10. 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、石井孝司、脇田隆字：細胞培養系で作成したC型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の正常解析、第12回日本ワクチン学会、平成20年11月、熊本。
11. 清原知子、徳永英治、石井孝司、脇田隆字：A型肝炎ワクチンの *in vitro* 力価試験の検討、第12回日本ワクチン学会、平成20年11月、熊本。
12. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、森川賢一、
13. 伊達朋子、加藤孝宣、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生されたキメラHCV ウイルス株および JFH1 株の免疫の検

- 討、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
14. 赤澤大輔、森川賢一、尾見法昭、高橋 仁、中村紀子、深澤秀輔、伊達朋子、加藤孝宣、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：無血清培養による HCV 粒子の作成と精製工程の検討、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
15. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、佐藤 隆、亀山昭彦、成松 久、脇田隆字、石井孝司、武田直和：ノロウイルスによる血液型抗原の識別、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
16. 石井孝司、村上恭子、ススムエー、張 斌、李 津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
17. 町田早苗、西村順裕、吉崎佐矢香、石井孝司、清水博之：カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルスの検出とその分子疫学、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
18. 岩崎優紀、森 健一、横 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C 型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染サルウイルスゲノム解析、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
19. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、佐藤 隆、亀山昭彦、成松 久、脇田隆字、石井孝司、武田直和：ノロウイルスによる血液型抗原タイプ 1、2 構造の識別、第28回日本糖質学会、平成20年8月、つくば
20. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV の粒子形成における NS5A 蛋白の役割、第44回日本肝臓学会総会、平成20年6月、松山
- 1.
- G. 知的所有権の取得状況
- 1) 2007-167916・石井孝司他3名・UVによるC型肝炎ウイルスの不活化方法・2007年6月26日出願
- 2) 2005-287825・石井孝司他6名・新規ヒトC型肝炎ウイルス粒子とその生産方法・2005年9月30日出願、同海外出願
- 3) 2005-287646・石井孝司他6名・感染性C型肝炎ウイルス粒子産生系・2005年9月30日出願、同海外出願
- 4) 2005-300350・石井孝司他4名・新規RNA結合ペプチド・2005年9月6日出願

B型肝炎ウイルスの粒子形成機構

新規ヒトポリオーマウイルスのウイルス様粒子の作製

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

李 天成 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究要旨 HBV の遺伝子型特異的な抗原診断法への応用を目指し、HBV PreS/S promoter/enhancer 支配下で large, middle, small S 抗原をヒト肝癌細胞で共発現させた。これまでに、遺伝子型 A 及び B 由来株について HBV 様粒子の産生を確認した。種々の蛋白輸送阻害剤、細胞骨格形成阻害剤が HBV 産生へ及ぼす影響を調べた結果、微小管形成シグナルに關与する GTPase Rac1 の阻害剤また微小管安定化剤による濃度依存的な HBV 産生阻害作用を見出した。

一方、ヒト皮膚がんから新たに発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルスの VP1 遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞でウイルス様粒子が形成できることを初めて明らかにした。

A. 研究目的

B型肝炎の診断法としては、種々のウイルス抗原、抗体検査法、また遺伝子診断法が確立している。しかしながら、近年の遺伝子工学、分子進化学の発展により、かつて血清型で分類されていた B型肝炎ウイルス (HBV) は、現在では 8 種類の遺伝子型に分類されるようになった。また、HBV の粒子形成機構は必ずしも十分に解明されていない。本研究では、我が国で患者数の多い遺伝子型 A、B、C 各クローンを使って HBV 産生系を作り、粒子形成の分子機構の解析を行った。

本年度、ヒト皮膚がんの一種であるメルケル細胞がんから新たなポリオーマウイルス (メルケル細胞ポリオーマウイルス; MCV) が発見された。そこで、本新興感染症の診断法、予防法、治療法の開発に有用と考えられる MCV のウイルス様粒子の作製を行った。

B. 研究方法

HBV 遺伝子型 A、B、C の各ゲノム cDNA は名古屋大 溝上教授より分与された。各 HBV cDNA の 1.24 ゲノムコピー長 (4 kb) を pUC19 に組み込んだ pUCHB-Ae, pUCHB-Bj, pUCHB-Ca をそれぞれ Huh-7 細胞へトランスフェクションし、発現する細胞内 HBs 抗原をウェスタンブロット法で、培養上清中の HBs 抗原、HBe 抗原を ELISA 法でそれぞれ解析した。阻害剤評価実験は、pUCHB-Ae または pUCHB-Bj のトランスフェクション翌日に種々の濃度の薬剤を添加し更に 24 時間培養し、培養上清中の HBs 抗原を測定した。

MCV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。VP1 遺伝子 (423 アミノ酸長) を組み込んだバキュロウイルストランスファクターを作製、昆虫細胞 SF9 にトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えバキュロウイルスを取得した。組み換えウイルス

を Tn5 細胞へ感染させ、7日後の培養上清からウイルス様粒子を回収した。

C. 研究結果

HBV 遺伝子トランスフェクション後、2、4、6日目の培養上清中の HBs 抗原を測定したところ、遺伝子型 A 発現細胞では4日目に 200 ng/mL、6日目には 480 ng/mL の HBs 抗原が認められた。遺伝子型 B 発現細胞においても6日目に同等の発現を観察した。しかしながら、遺伝子型 C 発現細胞はこれらに比べ HBs 抗原レベルは有意に低く6日目に 100 ng/mL 程度であった。

遺伝子型 A 及び B 発現細胞の培養上清を回収し硫酸沈殿後、5-40%ショ糖密度勾配遠心を行い 11 分画中の HBs 抗原をウエスタンブロット法で検出したところ、両細胞とも 1.14-1.15 g/mL 分画に large, middle, small S 抗原のピークを認めた。

細胞骨格阻害剤が HBV 産生に及ぼす影響を調べるため、1) Rho Family GTPase 阻害剤、2) 微小管安定化剤、3) ミオシン阻害剤、4) アクチン阻害剤、5) アクチン安定化剤を HBV 発現細胞に種々の濃度で添加した。その結果、Rho Family GTPase Rac1 に対する阻害剤 NSC23766、微小管安定化剤 Paclitaxel は濃度依存的に培養上清中の HBs 抗原レベルを低下させた。一方、ROCK 阻害剤 Y27632、ミオシン阻害剤 Blebbistatin、アクチン阻害剤 Latrunculin A、Cytochalasin D、アクチン安定化剤 Jasplakinolide は HBV 産生を抑制しなかった。

新規ヒトポリオーマウイルス MCV は近縁ウイルスとの相同性から VP1 遺伝子がウイルス構造蛋白をコードすると推定される。5.4 kb ゲノムから VP1 領域 (1.2 kb) をバキュロウイルストランスファーベクターへサブクローン化し、常法に従って組み換えバキュロウイルスを作製した。組み換えウイルス感染 Tn5 細胞では細胞に約 48 kDa の全長 VP1 蛋白が主に検出されたが、培養上清中からは 42-45 kDa 程度のバンド数本認められた。VP1 発現後に N 末端または C 末端側が切断され細胞外へ分泌される可能性が考えられた。感染後 7 日目の培養上清を集め

10,000xg, 1 時間遠心の上清を 100,000xg, 3 時間遠心でペレット化した。可溶化し塩化セシウム平衡遠心 (35,000 rpm, 36 時間) に供した。20 分画に分け VP1 蛋白検出を行ったところ、1.29-1.32 g/mL の各分画に認められ、電子顕微鏡観察によってこれらの分画から直径約 50 nm の球形粒子構造が観察された。一部の分画では、50 nm 粒子に加え約 20 nm の小さい粒子構造も認められた。

D. 考察

HBV 遺伝子型 A, B, 及び C に属するウイルスゲノム各 1 cDNA クローンから HBV 粒子産生系を樹立した。これらを用いて HBV の粒子形成に関与する細胞側の分子機構を明らかにするため、細胞内の蛋白輸送、分泌系の各過程、シグナル伝達を阻害する低分子化合物が HBV 粒子産生、細胞外への分泌にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、Microtubule stabilizer, Rac1 kinase inhibitor が容量依存的な HBV 産生、分泌阻害を示した。一方、Actin inhibitor, Myosin inhibitor などでは阻害されなかった。これらの知見から、チューブリン重合、再編成など微小管の形成にかかわる細胞内機構が HBV 粒子の成熟化、輸送に重要な役割を果たす可能性がはじめて示された。今後、微小管構成分子と HBV 構造蛋白の相互作用、微小管形成を調節するシグナル伝達と HBV 生活環との関連などを解析していくことで HBV の粒子形成をコントロールする分子機構が明らかにされていくものと期待される。また、本研究で用いている 3 クローンの HBV ゲノムは HBV 粒子の形成、分泌の効率が異なることがわかった。そこで、この差異を決定するウイルスアミノ酸配列を明らかにする実験を進める予定である。

MCV はヒトメルケル細胞がんから遺伝子がクローン化された新規ウイルスで、昨年 2 月はじめて報告された。これまでのヒトポリオーマウイルスとは違いがん組織で T 抗原遺伝子の組み込みが確認されていることから、発がんとの関連が強く示唆されている。しかしながら、そ

の生活環、感染様式はもとより、関連する疾患は他にないか、健常者における感染率、抗体保有率はどれくらいか、など全くと言ってよいほどわかっていない。今回の MCV 様粒子作製法の確立は、診断法の開発に有用であるだけでなく、粒子構造の解析、レセプター探索へ道を拓くものである。

E. 結論

HBV の粒子形成過程に微小管形成調節機構が関与することが示唆された。

新規ヒトポリオーマウイルス MCV のウイルス様粒子の作製に初めて成功した。

F. 研究発表

論文発表

1. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* (in press).
2. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* (in press)
3. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
4. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
5. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
6. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
7. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
8. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal