

39. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, USA. (2008, Oct. 31 – Nov. 4).
40. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス研究の進展: ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本医師会館、(2008, 7. 17)
41. 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
42. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験: in vivo 適応変異の機能的解析、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
43. 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルス研究の最先端、第 1 2 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、(2008, 10.1)、シンポジウム1「肝炎ウイルス研究のカットングエッジ: 基礎から臨床への贈り物」
44. 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、シンポジウム 4 C 型肝炎
45. 原弘道、相崎英樹、松田麻美、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ2 ウイルス複製機構
46. 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、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ6 ウイルス侵入・粒子機構
47. 山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ8 ウイルス感染症の診断と治療
48. 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、シンポジウム 4 ウイルス発癌
49. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、ワークショップ 3-4 HCV
50. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、

石井孝司、宮村達男、脇田隆宇、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、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)

51. 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、畠山剛、光井富喜子、三木大樹、森奈美、柘植雅貴、高橋祥一、脇田隆宇、茶山一彰、HBVとHCVはインターフェロン感受性が異なる-ウイルス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討-、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)

52. 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横糸の会、東京大学医科学研究所(2008, 5.29-30)

53. 相崎英樹、脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究」「感染現象のマトリックス」横糸の会、兵庫医科大学(2008, 6.28-29)

54. 加藤宜之、森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、池田正徳、新しいヒト肝臓細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

55. 下池貴志、SA McKenna、DA Lindhout、脇田隆宇、JD. Puglisi、HCV IRES 依存的翻訳はeIF2のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

56. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、DNA損傷センサーATMおよびChk2とHCV NS5Bとの相互作用、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

57. 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、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの

subgenomic replicon を持つウイルス用粒子の形成と感染性、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

58. 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、TLR3はC型肝炎ウイルス感染を抑制する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

59. 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬朗、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

60. 石橋真理子、脇田隆宇、江角眞理子、C型肝炎ウイルス量の多い肝組織に発現亢進する分子OASLはウイルス制御分子か?、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

61. 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

62. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に阻害する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

63. 武部豊、上西理恵、納富香子、廖華南、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、袴田航、CD81を標的とする新しいクラスの低分子性HCVエントリー阻害剤の同定、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

64. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊

- 達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生されたキメラ HCV ウイルス株および JFH-1 株の免疫の検討、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
65. 上西理恵、廖華南、袴田航、納富香子、長谷彩希、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、武部豊、HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
66. 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2a キメラレプリコン、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
67. 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆宇、細胞培養系で作製した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)
68. 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、志田壽利、水野喬介、村井深、小原道法、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)
69. 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、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 3 1 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)
70. 相崎英樹、山本真良、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質の C 型肝炎ウイルス感染における役割、第 3 1 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)
71. 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、脇田隆宇、エプトープタグを付加した組換え HCV 粒子の効率的な産生と性状解析、第 3 1 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)
72. 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、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子 hnRNP H1/H2 の HCV 生活環における役割、第 3 1 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)
73. 石橋真理子、脇田隆宇、清水洋子、江角眞理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN の C 型肝炎ウイルス受容体機能の解析、第 3 1 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)
74. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験：in vivo 適応変異の機能的解析。第 44 回日本肝臓学会総会、愛媛、2008 年 6 月。
75. 岩崎優紀、飯島沙幸、吉田友教、木村展之、片貝祐子、揚山直英、明里宏文：霊長類サロゲート C 型肝炎モデル。第 1 4 6 回日本獣医学会学術集会（宮崎）平成 2 0 年 9 月 2 4 日
76. 岩崎優紀、森健一、横昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐香、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 5 6 回

日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成20年  
10月26日

77. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆宇、瀬谷 司：  
抗 HCV 樹状細胞応答の解析、第 73 回日本イン  
ターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第  
19 回日本生体防御学会・第 45 回補体シンポジ  
ウム 合同大会（札幌）2008.7.10-12

78. 松本美佐子：TLR3-TICAM-1 による dsRNA  
認識とシグナル伝達、（同上）

79. 東正大、海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：  
TICAM1 依存性クロスプレゼンテーションの解  
析、（同上）

80. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆宇、瀬谷 司：  
HCV 感染アポトーシス細胞を介した抗 HCV 樹  
状細胞応答、日本ウイルス学会北海道支部第 42  
回夏季シンポジウム（ニセコ町）、2008.7.26-27

81. 東 正大、海老原敬、久保田信彦、赤澤 隆、  
松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞における  
TLR3/TICAM-1 経路を介したクロスプレゼンテ  
ーションの制御第 38 回日本免疫学会総会・学術  
集会（京都）、2008.12.1-3

82. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞  
における新規 NK 活性化分子の解析、（同上）

83. 押海裕之、坂井圭介、松本美佐子、瀬谷 司：  
IPS-1 の CARD ドメインと結合する DEAD box  
ヘリケースの DDX3 の単離同定と C 型肝炎ウイ  
ルスによる I 型インターフェロン抑制の新たな  
機構、第 31 回分生年会、第 81 回生大会の合  
同開催（神戸）、2008.12.9-12

エンベロープ蛋白質 2 に結合する抗体及びそ  
れを用いた C 型肝炎ウイルスの遺伝子型の同  
定方法、特願 2008-254338（2008.12.26）<  
公開前>

2) I 型インターフェロンの発現調節剤、  
PCT/JP2008/001648、発明者：瀬谷 司、松本美  
佐子、押海裕之、出願日：2008 年 6 月 25 日、  
出願人：北海道大学

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

##### 特許出願

1) 渋谷悠子、中村紀子：C 型肝炎ウイルスの

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

ウイルス抗原産生系、ウイルス粒子大量精製法およびウイルス免疫法の開発と感染中和機構の解析

東レ株式会社医薬研究所 中村 紀子

研究要旨 JFH-1 株の発見により初めて HCV のウイルス培養が可能となったことから、HCV の予防的・治療的ワクチンの開発が期待されだしている。本研究では、ワクチン開発の基盤となる HCV 粒子の大量精製法および免疫法を開発すると共に抗 HCV 抗体による感染中和機構について解析する。

A. 研究目的

HCV のワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。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、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ウイルス粒子が分泌される。我々は、この JFH-1 株によるウイルス産生系を用いて、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証した。

そこで本研究では、ワクチンの実用化を目的として、ウイルスの大量精製法の開発、ウイルス粒子の効果的な免疫方法の開発、遺伝子型に依存しない感染中和活性を誘導できるワクチンの開発、さらに抗 HCV 抗体による感染中和機構について解析する。

B. 研究方法

1. HCV エンベロープタンパク質の作製。

E1, E2 タンパク質をコードする遺伝子から、これらのタンパク質の C 末端に存在する膜貫通ドメインをコードする核酸配列を除去し、翻訳されたタンパク質を細胞外へ分泌するために必要なシグナルペプチドをコードする配列を付加した。さらに、これらのタンパク質の精製を容易にするために、N 末端に FLAG ペプチドを付加させたベクター、あるいは C 末端にヒト IgG Fc ポリペプチドを付加したベクターを作製した。エンベロープタンパク質は、遺伝子型 2a の JFH-1 および J6CF、遺伝子型 1b の TH, J1 および Con1、遺伝子型 1a の H77 を使用した。

2. HCV 粒子大量精製

J6/JFH-1 キメラウイルスを無血清もしくは 2% FCS にて培養した。

HCV 粒子の精製には、限外濾過膜、ショ糖密度勾配超遠心法、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた。ウイルス量は定量的 RT-PCR およびコアタンパク質の EIA にて測定した。

### 3. エンベロープタンパク質およびウイルス粒子の免疫法

J6CF 株由来の E2 タンパク質とヒト IgG の Fc 部分とのキメラタンパク質 (J6E2-Fc) および紫外線照射にて不活化した部分精製 J6/JFH-1 粒子をフロイントの完全アジュバント、Alum など種々のアジュバントを用いて調製し、Balb/c マウスに投与して抗 E2 抗体誘導活性を EIA にて定量した。

また、これらの一部のマウスを用いて、モノクローナル抗体を作製した。

### 4. モノクローナル抗体の解析

JFH-1 由来 E2 タンパク質、J6CF 由来 E2 タンパク質、JFH-1 粒子および J6/JFH-1 粒子を免疫したマウスより作製した各種抗 E2 タンパク質モノクローナル抗体のエピトープを解析するために、エンベロープタンパク質の 10 個の連続するアミノ酸を N 末端から 3 アミノ酸ずつずらして合成したのペプチドを EIA プレートに固相化し、次いで各種モノクローナル抗体を加え、モノクローナル抗体が結合するペプチドをスクリーニングした。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

## C. 研究結果

### 1. エンベロープタンパク質の作製。

エンベロープタンパク質の N 末端側に Flag タンパク質と C 末端に Fc タンパク質を付加したキメラタンパク質を作製した。COS-1 細胞での一過的な発現では、Fc タンパク質とのキメラからなるエンベロープタンパク質は発現量が高く、1~2mg/L であった。

本エンベロープタンパク質発現系は、抗 HCV 抗体の評価用の抗原として有用であり、本抗原を用いて、HCV 抗体検出用 EIA 系を構築した。

### 2. HCV 粒子大量精製

#### ①限外濾過膜による濃縮

300kDa のタンパク質を通過するポアサイズのホロローファイバーと 500kDa タンパク質を通過するポアサイズのホロローファイバーとを比較して、500kDa タンパク質を通過するポアサイズのホロローファイバーで効果的に除蛋白が可能であることが判明した。

#### ②ゲル濾過

分画範囲の異なる 2 種類のゲル濾過クロマトグラフィーにて、ウイルス粒子の分離度を検討した。どちらの担体も HCV 粒子が void の位置に溶出されたが、分画範囲が小さいゲル濾過担体の方が比較的シャープに分離されることが判明した。

#### ③ショ糖密度勾配遠心法

20%および 60%のショ糖クッションを作製し、ウイルス液を重層し、超遠心分離を行う方法と、10-60%のショ糖グラジェントで超遠心分離を行う方法とを比較検討した。その結果、10-60%ショ糖密度勾配遠心法では、感染粒子と非感染粒子を分離できる可能性を示唆する結果が得られた。

#### ④陰イオン交換クロマトグラフィー

限外濾過膜、ゲル濾過にて精製した HCV 粒子を 4

種類の陰イオン交換クロマト担体にて精製効率を検討した。pH と塩濃度をパラメーターとしてクロマトグラフィーを行い、夾雑物を HCV 粒子とを分離する溶出条件を検討した。その結果、夾雑物を素通り画分に溶出させ、HCV 粒子の純度を向上させる陰イオン交換クロマト担体とクロマト展開条件を見出した。

### 3. アジュバントの選定

抗 HCV 抗体を誘導をより促進するアジュバントを検討した結果、その効果が強いアジュバントを 2 種類選定できた。現在これらについて、誘導される抗体のタイプ、中和活性の強さなど検討している。

### 4. モノクローナル抗体のエピトープ解析

JFH-1 ウイルスを投与したマウスから作製された HCV の感染を阻害するモノクローナル抗体 JF/M1-4 (IgM,  $\mu$ ) が認識するエピトープを解析した。その結果、WLPKCLVHYPYRLWHYPC の配列を認識することが判明した。この配列は、JFH-1 の E2 タンパク質の 606 番目から 624 番目に位置し、新たな中和エピトープであることが示唆された。

一方、J6FC 由来の E2 タンパク質を投与したマウスからもモノクローナル抗体を作製した。

モノクローナル抗体 8D10-3 は遺伝子型 1a, 1b, 2a の E2 タンパク質に、モノクローナル抗体 4E8-8 は遺伝子型 1b, 2a の E2 タンパク質に、モノクローナル抗体 1G2-32 又は 2F2-7 は遺伝子型 2a の E2 タンパク質に結合することが判明した。

### D. 考察

組換え型エンベロープタンパク質は動物中の

抗体価の測定、抗 HCV 抗体のスクリーニング、エピトープ解析、抗体が認識する遺伝子型の特異性解析など HCV のワクチン効果を判定するために必須のツールである。我々の検討で、HCV のエンベロープタンパク質を動物細胞で効率的に作製するためには、IgG の Fc 部分と融合させたキメラタンパク質として作製することが良いことが示された。Fc タンパク質と比較して、Flag タンパク質は 10 倍以上効率が悪かった。Fc タンパク質と融合させることで、エンベロープタンパク質が安定になるのかもしれない。

精製工程については、各工程の精製効率について検討してきた。その結果、各工程の最適な方法が決まりつつある。今後、どのような組合せで精製を行うかについて検討を重ねる必要がある。さらに、HCV ウイルスの純品をどのように定義するかが課題として残る。この問題を解決するために、E2 タンパク質に Flag エピトープを導入して、Flag を指標に HCV 粒子を精製するシステムについても検討しているので、これらの結果と合わせて、HCV の純品について明らかにしていく。

また、10-60%ショ糖密度勾配超遠心法で、感染性粒子と非感染性粒子が存在することを見出した。ウイルスの感染性は脂質が関与していることが報告されている。我々が見出した感染性粒子と非感染性粒子の違いは脂質であるのか、興味ある課題であり、現在さらに検討している。

E2 タンパク質および HCV 粒子を用いてワクチン効果の高いアジュバントについて検討した。E2 タンパク質を認識する抗体の誘導について、効果的なアジュバントが見出されつつある。今後中和活性抗体の誘導について検討する必要がある。

モノクローナル抗体のエピトープ解析から新



たな中和抗体のエピトープが見出された。さらに中和活性の強いモノクローナル抗体の取得とそのエピトープ解析を通して、どの遺伝子型のHCVでも中和することの出来る抗体とエピトープを明らかにする。

#### E. 結論

①エンベロープタンパク質発現系を開発し、その系で開発されたエンベロープタンパク質を用いて、ワクチン効果を判定するためのHCV抗体検出系を作製した。

②HCV粒子の大量精製に適した精製法の各工程の精製条件を検討し条件を見出した。

③E2タンパク質およびHCV粒子をマウスに免疫する系で、E2タンパク質に対する抗体の誘導を促進する2種類のアジュバントを見出した。

④モノクローナル抗体のエピトープ解析から、新たな中和エピトープを見出した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) Daisuke Akazawa, Kenichi Morikawa, Noriaki Omi, Hitoshi Takahashi, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Takaji Wakita. Production and purification of HCV particles from serum-free culture. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, USA 2008.
- 2) Noriaki Omi, Daisuke Akazawa, Hitoshi Takahashi, Noriko Nakamura, Kenichi Morikawa, Tomoko Date, Tetsuro Suzuki, Koji

Ishii, Takaji Wakita. Analysis of immunogenicity of cell culture-grown hepatitis C virus in the mouse. The 2nd Vaccine Congress Boston USA 2008.

3) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、中村紀子、森川賢一、伊達朋子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字:細胞培養系により産生されたHCVウイルスの免疫原性に関する検討、第56回ウイルス学会、平成20年10月、岡山。

4) 赤澤大輔、森川賢一、尾見法昭、高橋 仁、中村紀子、脇田隆字:無血清培養におけるHCV粒子の作製とその精製、第56回ウイルス学会、平成20年10月、岡山。

5) 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆字:細胞培養系で作製したC型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第12回日本ワクチン学会、平成20年11月、熊本。

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 渋谷悠子、中村紀子:C型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質2に結合する抗体及びそれを用いたC型肝炎ウイルスの遺伝子型の同定方法、特願2008-254338(2008.12.26) <公開前>

分担研究報告書

## 感染中和機構に重要な HCV の初期感染過程の解析

分担研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなった。そこで、HCV の予防的及び治療的ワクチンの実用化に向けた研究と共に、ウイルス感染および中和に関する基盤的研究を進める。ワクチン開発により C 型肝炎の予防が可能となるだけでなく、HCV の感染過程の解明による新たな治療標的が探索できることも期待できる。本分担研究では HCV 感染中和機構の解明を目指し、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

### A. 研究目的

HCV のワクチン開発が進まなかった最大の理由として、培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。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、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ウイルス粒子が分泌される。我々は、この JFH-1 株によるウイルス感染系を用いてウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功し、またウイルス粒子を大量精製して小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証した。HCV には多くの genotype が存在することも治療を困難にしており、genotype に関わらず効果を発揮するワクチンが望まれる。とりわけ日本人に多い genotype 1b に対して感染中和活性を有するワクチンの開発を目的として、JFH-1 (genotype 2a) の構造蛋白領域を他の genotype に置き換えて、キメラウイルス粒子によるワクチンを作製して

免疫原性を比較する。さらにウイルス粒子の不活化法を開発し、実際に投与可能な不活化リコンビナントウイルスワクチンを作製する。HCV に対するワクチン開発は新たな HCV 感染を減少させ、HCV 感染症の最終病態である肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。このために、本分担研究では HCV 感染中和機構の解明を目指し、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルス粒子の構造解析

これまで開発した精製法により精製したウイルス粒子は夾雑物が多く構造解析、中和活性解析が困難だった、そこで夾雑物を減らす目的でさまざまな濃度で界面活性剤を添加した後にしょ糖密度勾配によりウイルスをさらに精製した。精製

ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した。

## 2. HCVエンベロープ蛋白質の精製

HCVエンベロープ蛋白質 (E1およびE2) は糖鎖による修飾を受けるため、リコンビナント蛋白質による構造解析が進まなかった。そこで、一部の糖鎖修飾酵素が欠損した培養細胞を用いてE1およびE2蛋白質を精製した。

### (倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

## C. 研究結果

### 1. ウイルス粒子の構造解析

JFH-1 および J6/JFH-1 ウイルスの全長 RNA を培養細胞に導入して、培養液中に分泌されたウイルス粒子を限外濾過法により濃縮した。さらにしよ糖密度勾配遠心法で精製したウイルス粒子に NP40 を添加し、4℃でインキュベーションした。そのウイルス粒子をもう一度しよ糖密度勾配遠心法で精製した。このウイルス粒子の総タンパク濃度は非常に低く、電子顕微鏡観察ではバックグ

ラウンドの低い明瞭なウイルス粒子像が得られた。

## 2. HCVエンベロープ蛋白質の精製

E2 遺伝子の 3' 端の膜貫通領域を欠損し、5' 端に FLAG タグ配列を挿入し、哺乳細胞プロモーターの下流に挿入した発現プラスミドを作成した。293 細胞および GnTI 糖転移酵素が欠損した 293GnTI(-)細胞に E2 発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清中の E2 蛋白質を FLAG 抗体カラムで精製した。293 細胞で発現した E2 蛋白質はブロードな分子量を示したが、GnTI(-)細胞で発現させると単一のシャープな分子量を示した。この精製 E2 蛋白質はリコンビナント CD81 タンパクに結合し、Huh7 細胞の表面にも結合することを確認した。しかし、ウイルス感染実験にこの精製 E2 蛋白質を添加しても感染阻害活性は検出できなかった。

## D. 考察

本年度は感染初期過程に重要なウイルス粒子の表面構造およびエンベロープ蛋白質の構造解析に関連する研究をおこなった。ウイルス粒子の構造を解析するためには精製したウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡解析あるいは結晶解析が必要である。HCVのウイルス培養の産生量を考えると、まずクライオ電子顕微鏡解析を目指すことが妥当と考えられる。これまでの精製法に加えて界面活性剤を加えることにより精製度を高めることが可能であった。現在、精製粒子の電子顕微鏡解析を進めている。

また、エンベロープ蛋白質は糖鎖修飾が多いため結晶解析による構造解析が困難だったが、糖鎖

転移酵素欠損細胞株を使用することにより単一の分子量を示すE 2蛋白質を得ることができた。現在この蛋白質の結晶化を行うと共に、マウスに免疫して中和抗体誘導能を検討中である。

HCVは世界中で1.7億人にのぼる感染者が存在し、肝細胞癌に至る重大な感染症である。インターフェロンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者は減少しているが、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。また、治療用ワクチンも期待されている。HCVワクチンが開発され、HCVの新たな予防法および治療法が開発されれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる。また、予防用及び治療用ワクチンを世界に先駆けて開発することができればHCVキャリアー率の高い国々への国際協力が可能となる。特に海外に多い薬物常用者のHCV感染やHIV感染者のHCV重感染の予防が可能となりその意義は大きい。

1. ウイルス粒子の精製法を改良することにより精製度の高いHCV粒子を得ることができた。
2. HCVの初期感染過程に重要な役割を果たすE 2蛋白質の精製に成功した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kondo Y, Machida K, Liu HM, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of

- CD44 Splicing Variant 6. *J Infect Dis*. 2009 199(5):726-736.
2. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J Virol*. 2009 83(5):2338-2348.
3. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28(gamma)-Dependent Mechanism. *J Virol*. 2009 83(5):2389-2392.
4. 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*. 2009 383(2):319-27.
5. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol*. 2009;510:305-27.
6. 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*. 2008 377(3):747-51.
7. Lan L, Gorke S, Rau SJ, Zeisel MB, Hildt E, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Huber R,

- Wakita T, Schmitt-Graeff A, Royer C, Blum HE, Fischer R, Baumert TF. Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol*. 2008 181(7):4926-35.
8. Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13.
9. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.
10. Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008 48(4):1054-61.
11. Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 82(19):9639-46.
12. Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92.
13. Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*. 2008 48(1):48-58.
- 14: 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 particles. *J Virol*. 2008 82(16):7964-76.
15. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*. 2008 376(2):397-407.
16. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, 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*. 2008 371(3):446-50.
17. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008 47(5):1437-45.

18. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82(12):5715-24.

## 2. 学会発表および講演など

- 1) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス研究の進展: ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本医師会館、(2008, 7. 17)
- 2) 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ 7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
- 3) 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験: in vivo 適応変異の機能的解析、第 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ 7「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
- 4) 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルス研究の最先端、第 1 2 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、(2008, 10.1)、シンポジウム 1「肝炎ウイルス研究のカットングエッジ: 基礎から臨床への贈り物」
- 5) 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、シンポジウム 4 C 型肝炎
- 7) 原弘道、相崎英樹、松田麻美、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、ワークショップ 2 ウイルス複製機構
- 8) 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、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、ワークショップ 6 ウイルス侵入・粒子機構
- 9) 山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター (2008, 10. 26-28)、ワークショップ 8 ウイルス感染症の診断と治療
- 10) 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (2008, 10. 28-30)、シンポジウム 4 ウイルス発癌
- 11) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (2008, 10. 28-30)、ワークショップ 3-4

## HCV

- 12) 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、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)
- 13) 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、畠山剛、光井富喜子、三木大樹、森奈美、柘植雅貴、高橋祥一、脇田隆字、茶山一彰、HBVとHCVはインターフェロン感受性が異なる-ウイルス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)
- 14) 脇田隆字、「C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横系の会、東京大学医科学研究所(2008, 5.29-30)
- 15) 相崎英樹、脇田隆字、「C型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究」「感染現象のマトリックス」横系の会、兵庫医科大学(2008, 6.28-29)
- 16) 加藤宜之、森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆字、池田正徳、新しいヒト肝臓細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 17) 下池貴志、SA McKenna、DA Lindhout、脇田隆字、JD. Puglisi、HCV IRES 依存的翻訳はeIF2のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 18) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆字、加藤宜之、DNA損傷センサーATMおよびChk2とHCV NS5Bとの相互作用、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 19) 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、C型肝炎ウイルスのsubgenomic repliconを持つウイルス用粒子の形成と感染性、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 20) 棟方翼、脇田隆字、野本明男、TLR3はC型肝炎ウイルス感染を抑制する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 21) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬朗、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 22) 石橋真理子、脇田隆字、江角真理子、C型肝炎ウイルス量の多い肝組織に発現亢進する分子OASLはウイルス制御分子か?、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 23) 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲郎、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、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 24) 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆字、加藤宜之、亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に阻害する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
- 25) 武部豊、上西理恵、納富香子、廖華南、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆字、袴田航、CD81を標的とする新しいクラスの低分子性HCV エントリ

一阻害剤の同定、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

26) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生されたキメラHCVウイルス株およびJFH-1株の免疫の検討、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

27) 上西理恵、廖華南、袴田航、納富香子、長谷彩希、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、武部豊、HCV JFH-1 infectivity assayを用いた低分子HCV阻害剤の探索とその評価、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

28) 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、Cyclosporine Aに対し抵抗性を示す1b/2aキメラレプリコン、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

29) 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆宇、細胞培養系で作製したC型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第12回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)

30) 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、志田壽利、水野喬介、村井深、小原道法、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討、第12回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)

31) 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、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、神戸ポートアイランド

(2008. 12.9-12)

32) 相崎英樹、山本真民、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染における役割、第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)

33) 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを付加した組換えHCV粒子の効率的な産生と性状解析、第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)

34) 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、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子hnRNP H1/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、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)

35) 石橋真理子、脇田隆宇、清水洋子、江角真理子、肝臓類洞内皮C型レクチンL-SIGNのC型肝炎ウイルス受容体機能の解析、第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008, 12.9-12)

formation, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)

37) T. Wakita. Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7<sup>th</sup> Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan (June 1-3, 2008)

38) T. Wakita. Hepatitis C virus replication and



- virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
- 39) Hideki AIZAKI, Kenichi MORIKAWA, Masayoshi FUKASAWA, Hiromichi HARA, Ryousuke SUZUKI, Hideki TANI, Kentaro HANADA, Yoshiharu MATSUURA, Michael M.C. LAI, Tatsuo MIYAMURA, Takaji WAKITA, Tetsuro SUZUKI. Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
- 40) Kyoko Murakami, T Wakita et al. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIrd region of viral RNA, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
- 41) M Saeed, T Kato, T Wakita, In vitro replication efficiencies of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged in chimpanzee, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
- 42) Takahashi H, Omi N, Akazawa D, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T, Biological properties of purified recombinant HCV particles with the epitope-tagged envelope, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 43) Uenishi R, Hakamata W, Nohtomi K, Liao H, Hase S, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y, Identification of novel Small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 44) Munakata T, Wakita T, Nomoto A, Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C virus infection, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 45) Zeisel MB, Hoffmann M, Jilg N, Stoll-Keller F, Wakita T, Barth H, Henneke P, Baumert TF. Sensing of hepatitis C virus core by toll-like receptor 2 is shielded in enveloped viral particles, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 46) I Hamamoto, K Murakami, T Suzuki, K Taya, N Okabe, T Wakita, I Shoji, ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 47) Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y, Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, Nishijima M, Mashino T, Anti-HCV activity of novel Fullerene derivatives, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 48) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 49) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T,

Production and purification of HCV particles from serum-free culture, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

50) Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

51) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

52) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

53) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

54) Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T, Purification and structural analysis of HCV E2 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA

(2008, 10. 5-9)

55) Angus AGN, Dalrymple DA, Boulant S, McGivern DR, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH, Hepatitis c virus replication does not depend on the interaction between the viral core protein and the cellular RNA helicase DDX3, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

56) Shin K-S, Lim Y-S, Choi S-H, Wakita T, Hwang SB, Regulation of heat shock protein 70 by hepatitis c virus NS5A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

57) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I, Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

58) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

59) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

60) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T,

- Suzuki T, Nomoto A, Wakita T, A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 61) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J, Ethanol enhances hepatitis c virus replication in human hepatoma cells supporting infectious virus production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 62) I Shoji, M Osaki, K Murakami, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita, H Hotta, Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 63) Sir D, Chen W-L, Wakita T, Yen TSB, Ou J-HJ, Perturbation of autophagic response by hepatitis c virus, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 64) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Shoji I, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
- 65) K Morikawa, D Akazawa, Imawari M, I Wakita. The structural analysis of highly purified infectious HCV particles produced in cultured cells. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
- 66) Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Onuki Y, Yamamoto M, Wakita T, Watanabe M, Establishment and genetic analysis of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
- 67) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
- 68) Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Li J, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
- G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況  
なし

プラスミドトランスフェクションによる効率の良い  
HCV trans-packaging システムの確立

分担研究者 石井 孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長  
鈴木 亮介 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究要旨 2種類のプラスミドをトランスフェクションする事により、ウイルスの構造蛋白質を発現させ、さらに複製ゲノムを細胞に導入した。これらの細胞から single-round な感染性 HCV 様粒子の産生が認められ、また構造蛋白質に adaptive mutations (E2/N417S, p7/N765D, NS2/Q1012R) を導入する事により、感染性 HCV 様粒子の産生効率が向上する事を確認した。また複製ゲノム中にレポーター遺伝子を挿入する事により、感染および複製過程を簡単にモニター出来る事を示した。さらに感染性 HCV 様粒子は、HCV と同様に CD81 依存的に Huh-7 細胞にした。以上の事から、この感染性 HCV 様粒子は、HCV の感染過程等の解析に有用であると考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、持続感染化し肝臓がんに至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界で1.7億人、国内で200万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者は国内で年間3万人を超えている。インターフェロンおよびリビリンによる治療が行われているが、治療効果は十分とは言えずまた重い副作用もあるため、新しい治療薬や治療用ワクチンの開発が望まれている。また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、医療従事者や薬物常用者などには予防的ワクチンの開発も期待されている。

本研究では、培養細胞で効率良く増殖が可能な JFH1 株を用い、HCV のレプリコンが packaging された感染性 HCV 様粒子産生の検討を行った。

B. 研究方法

HCV (JFH1 株) の core から NS2 領域の cDNA

を pCAGGS に組み込んだ pCAG C-NS2 および、E2、p7、NS2 にそれぞれ変異 (N417S、N765D、Q1012R) を導入した pCAG C-NS2 mut を作製した。また JFH1 株のレプリコン（構造蛋白質領域を欠損し、EMCV-IRES および F luc 遺伝子を挿入したもの）cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入し、pHH JFH1 SGR-Fluc を作製した。これらのプラスミドを Huh-7 細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。

C. 研究結果

HCV の発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを同時に Huh-7 細胞にトランスフェクションした細胞の上清を径時的に回収し、これをさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3日後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、陰性コントロール群（構造蛋白質発現プラスミド