

がない場合、およびレプリコンのRNAポリメラーゼ活性を持たない変異体)に比べ、顕著に高い活性が認められた。このことから、2つのプラスミドのトランスフェクションにより、HCVのレプリコンゲノムが packaging された感染性粒子が産生されたものと考えられた。また変異型構造蛋白質発現プラスミドを用いた群では、野生型に比べ、より高いシフターゼ活性が認められたことから、これらの変異は感染性粒子の産生効率の向上に寄与するものと考えられた。

さらにこの感染はHCVと同様に抗CD81抗体により阻害されたことから、この粒子の感染様式はHCVと同様のメカニズムによる事が示唆された。

D. 考察

本研究により、HCVの構造蛋白質発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドをHuh-7細胞にトランスフェクションする事により、感染性を有するHCV様粒子の産生が認められた。この粒子は、transに供給された構造蛋白質に、複製するウイルスゲノムが packaging されたものであると考えられる。従ってこの系を用いれば、他の遺伝子型の粒子形成についても迅速な評価が可能となるものと考えられる。またこのシステムは、HCVの生活環の中でも、HCVのゲノムパッケージングや粒子形成等のステップを解明するのに有用であるばかりでなく、薬剤のスクリーニングにも利用可能であると考えられる。さらに今回のHCV様粒子作製法の確立は、安全性が高く、CTLの誘導が可能なワクチン開発へ道を拓くものと期待される。

E. 結論

2種類のプラスミドのトランスフェクションにより、single-roundな感染性HCV様粒子の産生に成功した。

G. 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.* 83: 2389-2392 (2009).

2. Suzuki, R., Winkelmann, E. W., Mason P. W. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J. Virol.* 83: 1870-1880 (2009).
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, S.S., 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. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. **Apoptosis.** 13: 929-937 (2008).
8. Suzuki, R., Fayzulin, R., Frolov, I., Mason P.W. Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes: Use in safer propagation of a novel vaccine candidate. **J. Virol.** 82: 6942-6951 (2008).
9. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. **J. Virol. Methods.** 148: 174-181 (2008).
- H. 知的所有権の出願・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。

HCV 大量培養法にむけた JFH-1 株の培養細胞内適応変異の解析

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)のワクチン開発のためには大量のウイルス粒子の生成法の確立が必要である。HCV JFH-1 株を用いることにより培養細胞で HCV 粒子の人工的な生成が可能になったが、さらに効率良く大量のウイルス粒子を回収できる方法を確立するため、HCV の培養細胞内での複製や粒子形成に影響を与える変異を同定し、その解析を行なった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中に多くの感染者が存在し、いったん感染すると高率に慢性化し、慢性肝炎から肝細胞癌に至る重大な感染症の一つである。現在、その治療としてインターフェロンを中心とした薬剤が用いられているが、ウイルス排除率は十分とは言えず副作用や耐性ウイルス出現の問題もある。HCV感染拡大の防止のためには新規感染者を減少させることが必要であり、予防的ワクチンの開発が急務である。また、新たな治療法の候補としての治療的ワクチンにも期待がもたれる。

近年、JFH-1株を用いたHCVの培養細胞感染増殖系が開発され、培養細胞中でこのウイルスのライフサイクルの観察が可能となり、HCV粒子の人工的な生成が可能となった。この培養細胞中で生成されたウイルス粒子は、患者血清中で観察されるウイルス粒子と同様の形態をとり、不活化することでワクチンとして使用可能と考えられる。しかし、培養細胞由来のHCVをワクチンとして使用するためには、大量のウイルス粒子の回収と精製が必要であり、現行のJFH-1株とHuh7細胞を用いたシステムよりさらに効率良くウイルス増殖が可

能なシステムの構築が必要である。これまでの検討により、JFH-1株の構造領域をJ6CF株に置換することにより、感染性ウイルス粒子の分泌が亢進することが明らかになった。またJFH-1株のゲノム領域のいくつかの変異は、細胞内での複製やウイルス分泌を増加させることも報告されている。

そこで、本研究ではJFH-1株の培養細胞中での増殖複製能を強化するようなウイルスゲノムの遺伝子変異を同定し、HCVワクチン開発に向けたウイルス大量培養法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. HCV JFH-1 株の長期培養による細胞内適応変異の同定とその評価

JFH-1株の全長RNAをHuh7.5.1細胞に導入し、長期培養することにより、JFH-1株の培養細胞内適応変異を誘導し、ダイレクトシーケンス法にてその変異を同定した。さらに同定された変異をJFH-1株に再導入することにより、それらの変異がJFH-1株の培養細胞内での増殖に与える影響を検討した。

2. JFH-1 株チンパンジー接種で認めた適応変異

が培養細胞中での増殖に与える影響の評価

培養細胞内で生成された JFH-1 株ウイルスと JFH-1 株が分離された患者血清をチンパンジーに接種し感染実験を行なった。その結果、両方のチンパンジーで感染が確認され、感染しているウイルスの全 ORF をダイレクトシーケンス法で解析したところ、共通の変異が一カ所同定された。この NS2 領域の共通変異 (G838R) を生体中での適応変異と考え、培養細胞中でこの変異の JFH-1 株の増殖に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

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。各種組換え DNA を用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1. HCV JFH-1 株の長期培養による細胞内適応変異の同定とその評価

JFH-1 株の長期培養により得られたウイルスは、培養細胞に同じ感染力価のウイルスを感染させた場合、通常の JFH-1 株ウイルスと比べ培養上清中・培養細胞内ともに、より高い HCV RNA 量を示し、通常の JFH-1 株よりも高い増殖能を獲得していると考えられた。ダイレクトシーケンスの結果、E2 の Hyper Variable 領域、NS3 領域、NS5b 領域にそれぞれ一つずつ変異を認めた。これらの変異を一つずつ JFH-1 株に導入したコンストラクトを作製し、このコンストラクトから得られた全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し変異を持ったウイルスを作製した。そのウイルスを感

染力価を合わせ感染させたところ、通常の JFH-1 株に比べやや高い増殖力を示したが、長期培養による適応ウイルスのレベルには達していなかった。さらにこれらの変異をすべて持ったウイルスを作製し比較してみたところ、それぞれ単一の変異を持ったウイルスよりは強い増殖能を示したが、やはり長期培養による適応ウイルスのレベルには達していなかった。

2. JFH-1 株チンパンジー接種で認めた適応変異が培養細胞中での増殖に与える影響の評価

JFH-1 株チンパンジー接種で認めた適応変異 G838R を JFH-1 株に導入し、培養細胞中での増殖能を比較検討した。その結果、G838R 変異株は通常の JFH-1 株に比べ、培養上清中、細胞中ともに高い HCV RNA 量を示し、強い増殖能を持つものと考えられた。そこで、この変異が JFH-1 株の培養細胞内でのライフサイクルのどの過程に影響しているかを検討するため、Huh7-25 細胞を用い、シングルラウンドの HCV 生成実験を行なった。この細胞は、HCV の増殖は可能であるが、感染に必要な CD81 の発現が欠如しているため再感染ができない。この検討の結果、G838R 変異株は培養細胞中で HCV RNA あたりの感染力価が高く、通常の JFH-1 株に比べ効率的にウイルス粒子が形成されていると考えられた。培養細胞内と細胞外の感染力価の比からは、ウイルス粒子の分泌効率に差がないと考えられた。

さらにこの変異の他の株に与える影響を検討するため、JFH-1 株の構造領域を J6CF 株に置換した J6/JFH-1 キメラ株にこの変異を導入し、培養細胞内でのウイルスの増殖を検討した。その結果、J6/JFH-1 キメラ株ではウイルス粒子形成効

率の亢進は認められず、この変異の効果は JFH-1 株の構造領域の配列に特異的なものであると考えられた。

D. 考察

HCV JFH-1 株の培養細胞内、生体内で得られた適応変異の影響を検討し、培養細胞内でこの株の増殖を強化する変異を同定し得た。

培養細胞内で JFH-1 株を長期培養することにより得られた適応変異は、JFH-1 株の増殖能を強化していたが、適応したウイルスの増殖能には及ばず、他の何らかのファクターが関与していると考えられた。

生体内で得られた適応変異は JFH-1 株の培養細胞内でのウイルス粒子形成効率を亢進していた。この変異の導入により JFH-1 株の培養細胞での生成効率の増加が期待できるが、この変異の効果は JFH-1 株のみであり、他の株を用いる場合は別の変異が必要であると考えられた。今後、詳細な検討を行うことによりさらに強い増殖能を持ったウイルス株の同定を目指す。

E. 結論

JFH-1 株の培養細胞内における増殖能に影響を与える遺伝子変異と、その変異が HCV のライフサイクルのどの過程に影響を与えているかの検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T,

Krawczynski K, Liang T.J. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology* 2008 48:732-740.

2. 学会発表

1. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Wakita T, Krawczynski K, Liang T.J. 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).

2. 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 Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. San Antonio, TX, USA. (2008, Oct 5 – 9).

3. 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 Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. San Antonio, TX, USA. (2008, Oct 5 – 9).

4. 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.

5. 渡辺則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、加藤孝宣、鈴木哲朗、脇田隆宇. HCV E2タンパク質の精製および機能、構造の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.

6. 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、脇田隆宇. 無血清培養によるHCV粒子の作製と精製工程の検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

ワクチン評価のための霊長類C型肝炎サロゲートモデル開発の基盤研究

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 岩崎優紀、飯島沙幸、木村展之、揚山直英（医薬基盤研 霊長類医科学研究センター）
石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染症研究所 ウイルス2部）
横昇、森健一（先端生命科学研究所）

研究要旨： 今年度は、新規治療薬やワクチンの評価系として慢性C型肝炎のサロゲート病態霊長類モデル確立を目指し、GBV-B持続感染マームセットに関して詳細な解析を行なった。その結果、HCV感染と類似した高い頻度のウイルスゲノム変異および間歇的なウイルス血症を伴う慢性肝炎病態を呈していることが明らかとなった。特にゲノム変異では、遺伝子領域に特異的なアミノ酸の復帰変異や連続変異が認められ、HCV感染と同様に宿主免疫応答からのエスケープ変異が生じていることが示唆された。またHCVとGBV-Bのキメラウイルスクローン構築を開始し、予備的結果ではウイルスコア蛋白の効率良い産生が確認された。本結果は、今後の抗HCV薬・ワクチンの有効性評価系としてのみでなく、C型肝炎慢性化メカニズムを解明する上でも貴重な情報をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はC型肝炎の原因ウイルスであり、日本国内で約200万人がキャリアとされている。C型肝炎に起因する肝細胞癌による死亡者は毎年3万人を数えるといったことから、厚生行政上非常に重大な感染症である。さらに世界的にもHCV感染者数は今なお増加しつつあり、現在およそ1億7千万人がHCVキャリアであると報告されている。こうした状況を踏まえ、HCV感染・発症防御ワクチン開発に向けて、その評価システムとしての霊長類モデルを樹立すると共に、その解析技術を確立することが本研究の目的である。

HCVはその宿主域の狭さから多くの実験動物に感染発症しない。そのためヒトと同じ類人猿であるチンパンジーが汎用されてきたが、チンパンジーが絶滅危惧種であることや昨今の動物福祉倫理的観点から、もはやチンパンジーをHCV感染等侵襲的実験に使用することは世界的にほぼ不可能となっている。このことがC型肝炎治療薬や抗HCVワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験、さらに

HCV感染に起因する病態の解明を行なう上での大きな障害となっている。

我々はこの点を鑑みて、HCVと同じフラビウイルス科、ヘパチウイルス属に分類され、HCVに最も近縁なウイルスであるGBV-Bを用いた急性・慢性C型肝炎のサロゲート（代用）霊長類モデルの開発をこれまで進めてきた。本モデルが確立されれば、新規治療薬やワクチンの評価系として有用であるのみならず、C型肝炎の発症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明に重要なモデルになるものと期待される。これまで我々は、①新世界ザルであるタマリンへのGBV-B感染によって亜急性C型肝炎様症状を高い再現性で発症させること、②GBV-BがHCVと同様に肝臓のみならず多様なリンパ組織に感染増殖することを明らかにし、少なくとも亜急性期のウイルス感染発症モデルとして汎用可能であることを示した。

近年、新世界ザルであるマームセットはタマリンと同様にGBV-Bに感受性であることが報告されている。マームセットは実験用小型霊長類として汎用さ

れており比較的入手し易いことから、モデル動物の選択肢のひとつとして考えられる。しかし、タマリンの場合と比較してGBV-B感染亜急性期における血中ウイルス価が1-2桁低く、顕著な肝炎症状を呈さない。またマーモセットにおけるGBV-B持続感染例は報告されていないことから、これまでC型肝炎モデル動物としてのマーモセットの有用性については疑問視されていた。

我々は、マーモセットとタマリンにGBV-B実験感染を行いウイルス動態の比較検討を行なったところ、マーモセットではこれまでの報告と同様、タマリンの場合と比較して1-2桁程度低い血中ウイルス量を示した。ところが、これら感染個体における長期フォローアップを行ない、ウイルス・免疫応答の推移について経過観察したところ、マーモセットでは感染後約3年が経過した現在でも、2頭で長期慢性感染を示しており、さらに肝炎マーカーであるALTが間欠的に上昇することから、GBV-Bはマーモセットにおいて慢性肝炎を伴う長期持続感染が可能であることが確認された。そこで、このGBV-B慢性感染サルについてそのウイルスゲノムおよびアミノ酸変異について詳細な解析を行なった。

さらに、我々は将来のより優れた霊長類モデル作出を念頭に、HCVとGBV-Bのキメラウイルス構築を開始した。今年度は予備的研究として構築したキメラクロノンのヒト及びサル肝細胞における複製能について検討を行なった。

B. 研究方法

新世界ザルであるタマリンおよびマーモセット感染実験は当センター感染症実験施設にて実施した。感染性分子クローンpGBBはDr. Bukh (NIAID, NIH, USA) より分与を受けた。pGBBからin vitro transcriptionにより得られたウイルスゲノムRNAをサルに接種後4週で全採血したplasmaを以後のウイルス接種用ストックとした。ウイルス感染サルよりケタミン麻酔下で定期的に採血し、得られた血液について血清生化学検査、plasma中ウイルス量及び抗体価測定を行った。血液および組織中のウイルスRNA量測定はリアルタイムPCR法を用いた。pGBBよりサブクローニングしたCore発現ベクターを導入した大腸菌からリコンビナントCore蛋白を得て、これによるELISA系を構築して抗体価測定を行った。plasma中ウイルスゲノムより作成した

cDNAを用いて、ゲノムDNAシーケンスを行ない、接種クロノンの核酸及びアミノ酸配列と比較検討した。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

HCVとGBV-Bのキメラウイルス構築では、HCV-1b由来感染性クローンであるTPF1およびpGBBを基に、図3のようなキメラc156-E1/E2を構築した。同キメラクローンおよびTPF1, pGBBから得たウイルスゲノムRNAをHuh-7細胞及びマーモセット初代肝細胞にトランスフェクションし、細胞及び培養上清中のウイルスコア蛋白をELISA法を用いて定量した。

C. 研究結果

マーモセット4頭におけるGBV-B感染後約3年間にわたる各種マーカーの経時的推移を図1に示した。持続感染例であるCj05-002, Cj05-004では、感染初期より現在まで、ウイルスゲノムRNAが間歇的に検出されている。Cj05-002では、感染後1年余り 10^6 GE/ml以上のウイルス血症が持続した後、検出限界以下 10^6 GE/ml程度で変動を繰り返している。Cj05-004では、ほぼ感染1年後まで主として潜伏感染状態が続いた後、現在まで持続的ウイルス血症が継続している。どちらのケースでも、抗NS3抗体価はほぼ感染1年経過後プラトーに達しその後高いレベルで維持されている。一方抗コア抗体価は、Cj05-002では比較的速やかに上昇しプラトー状態にあるが、Cj05-004では感染2年を経過し血中ウイルスRNA値が 10^5 GE/mlを越えたあたりから上昇した。2例に共通して、抗NS3抗体価上昇が遅延すると共にその後高いレベルで維持されている。この抗NS3抗体価推移は、GBV-B持続感染の予測マーカーと捉えることができる。実際、Martinらによる慢性化タマリンに関する報告でも同様の抗NS3抗体価の推移を示していることは、我々の結果を支持するものである。肝炎マーカーであるALT値を見ると、どちらの持続感染個体においても間歇的な上昇が認められ、また多くの場合この上昇は血中ウイルスRNA量とほぼ相関していた。従って慢性HCV感染と同様に、肝臓でのウイルス増殖に伴うCTL活性化により肝細胞傷害が生じていることが示唆される。以上の結果より、GBV-Bはマーモセットにおいて長期持続感染し慢性肝炎を呈することが明らかとなった。

次に持続感染個体におけるウイルスゲノムシーケンスについて経時的に比較解析を行った。RNAレベルでは、どちらの個体由来ウイルスでも3年間を通じて $2-3 \times 10^{-3}/\text{year}$ という変異率を示した。これはHCVにおける場合とほぼ同程度であった。遺伝子領域に着目すると、比較的5' UTRやp13において高い変異率を示したが、一般的にはあまり顕著な偏りは見られなかった。ところが、アミノ酸置換変異について見ると、変異領域に強い偏りを見出した。すなわち、例えばCore領域では2個体合計で8塩基の置換があったが、その中でアミノ酸置換を伴う変異は全く認められなかった。一方、E1領域では2個体合計で9塩基置換の中で8箇所がアミノ酸置換を伴う変異であった。このことから、ウイルス蛋白領域によって非常に強い選択的なアミノ酸置換を伴う変異が生じていたことが明らかとなった。

33w/45wで見られるアミノ酸変異はほとんどの場合が2個体間で共通しており、またそれ以降もほぼそのまま維持されていた(図2、黒文字)。従ってこれらの変異は主としてマーマセット個体でのウイルス増殖に有利な機能的適合変異によるものと考えられる。

88w/104wおよび135w/141wでは、1年目で見られなかった新たなアミノ酸置換変異を多数獲得していた(図2、赤/緑文字)。特に、青地で示されるアミノ酸置換変異では、復帰変異(例: V254A → A254V, S731L → L731S など)や連続変異(例: G250V → V250A)が認められ、このことはGBV-Bが長期持続感染において抗ウイルス免疫に対するエスケープ変異を獲得していること、そしてこれら復帰・連続変異を生じたアミノ酸領域は抗ウイルス免疫応答における重要なエピトープであり、この領域への選択的アミノ酸変異がマーマセットにおけるウイルス再顕在化・長期持続感染に重要な役割を担っていることが示唆された。

HCV/GBV-B キメラウイルス構築については、HCV-1b由来感染性クローンであるTPF1およびpGBBを基に、図3のようにCore領域C末端よりp6領域までGBV-B由来であるキメラクローンc156-E1/E2を構築した。同キメラクローンおよびTPF1, pGBBから得たウイルスゲノムRNAをHuh-7細胞にランブフェクションし、細胞及び培養上清中のウイルスコア蛋白をELISA法を用いて定量した。その結果、c156-E1/E2はTPF1より程度は低いものの細胞内及

び培養上清中にウイルスコア蛋白が産生されていることが示された(図4)。逆に、マーマセット初代肝細胞ではc156-E1/E2の方がTPF1より高いレベルのウイルスコア蛋白が培養上清中に検出された(図5)。以上のことからc156-E1/E2は少なくとも蛋白合成過程までは機能していることが示された。

D. 考察

今回の結果において、GBV-Bはマーマセットにおいて3年という長期に渡り持続感染することが明らかとなった。また本例ではヒトにおけるHCV感染例で見られる間欠的(回帰的)ウイルス血症が認められた。このことは、少なくともマーマセットでは、非常に低レベルの(検出限界以下の)ウイルス複製状態でも完全には排除されず生体内で潜伏感染し、何らかの刺激もしくはウイルスゲノム変異といった要因により再活性化しうることを表わしている。この低レベルでのウイルス変動は抗ウイルス獲得免疫応答によるウイルス増殖抑制作用が原因と考えられる。実際、ウイルスゲノム変異解析の結果から多数のアミノ酸残基の置換が認められており、特に復帰変異や連続変異が生じた領域はCTLや中和抗体エピトープであり、こうした抗ウイルス免疫応答からのエスケープ変異がウイルス再顕在化・持続感染に重要な役割を担っていることが示唆される。このような現象は、慢性HCV感染者の場合に認められており、GBV-B慢性化はHCVのそれと同様の機序によることが示唆された。これらの結果を踏まえ、今後は中和抗体およびCTLエピトープの解析を行ないワクチン評価に向けた測定系を確立していくと共に、慢性化を決定する要因について検索を進めていきたい。

ところで、HCVに対するワクチンの有用性を動物モデルレベルで検討するに当たり、チンパンジーが使用できない限り、実験用サル類に感染増殖可能なHCV/GBV-Bキメラウイルスが最も現実的なモデルであると考えられる。事実、AIDS研究における動物モデルではサルエイズウイルスであるSIVが代用モデルとして用いられてきたが、サルに感染性を有するHIV-1とSIVのキメラウイルスであるSHIVが確立されワクチン研究に汎用されてきた。こうした歴史的背景を考慮すると、HCVの代用モデルとしてGBV-B研究が進捗することにより、HCVとGBV-Bキメラウイルス構築における分子基盤が得られるものと期

待される。今回の我々の予備的結果では、GBV-B由来E1/E2を含むキメラクローンは少なくとも蛋白合成までは大きな障害が見られないことが示唆された。培養上清中のコア蛋白がウイルス粒子なのかについては今後の検討が必要である。今後はさらに多様なキメラクローンを構築していくとともに、より詳細なウイルスライフサイクルにおける解析を進め、最終的にサルに感染性を有するクローンの構築を目指したい。

E. 結論

本結果は、マーモセット GBV-B 感染モデルが慢性 C 型肝炎のモデル動物確立に向けたブレークスルーとなる重要な知見であり、GBV-B/HCV キメラウイルスの構築と併せて今後の抗 HCV 薬・ワクチンの有効性評価系としてのみでなく、C 型肝炎慢性化メカニズムを解明する上でも貴重な情報をもたらすものと期待される。

F. 研究発表

1. 学会発表

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 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎）平成 20 年 9 月 24 日

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 長期持続感染サルのウイルスゲノム解析

第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成 20 年 10 月 26 日

2. 論文発表

Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 60, 727-735, 2008. (Sep 23, 2008; Epub ahead of print)

Hohjoh H, Akari H, Fujiwara Y, Hirai H, Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene* 432, 60-66, 2009. (Nov 24, 2008; Epub ahead of print)

Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology* 53, 53-57, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

GBV-B持続感染マーマセット：長期フォローアップ

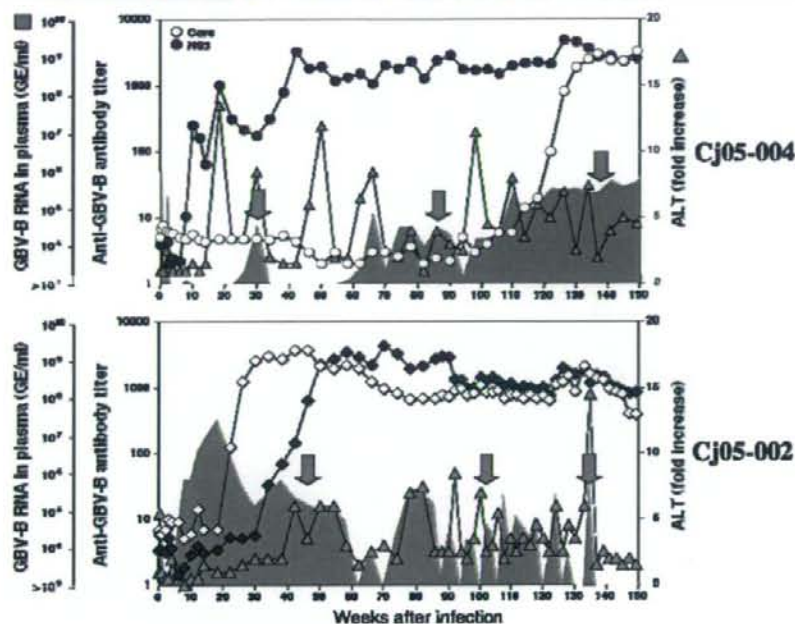


図1：マーマセットGBV-B接種後の各種マーカー長期フォローアップ

GBV-B持続感染マーマセット：ウイルスゲノム&アミノ酸変異

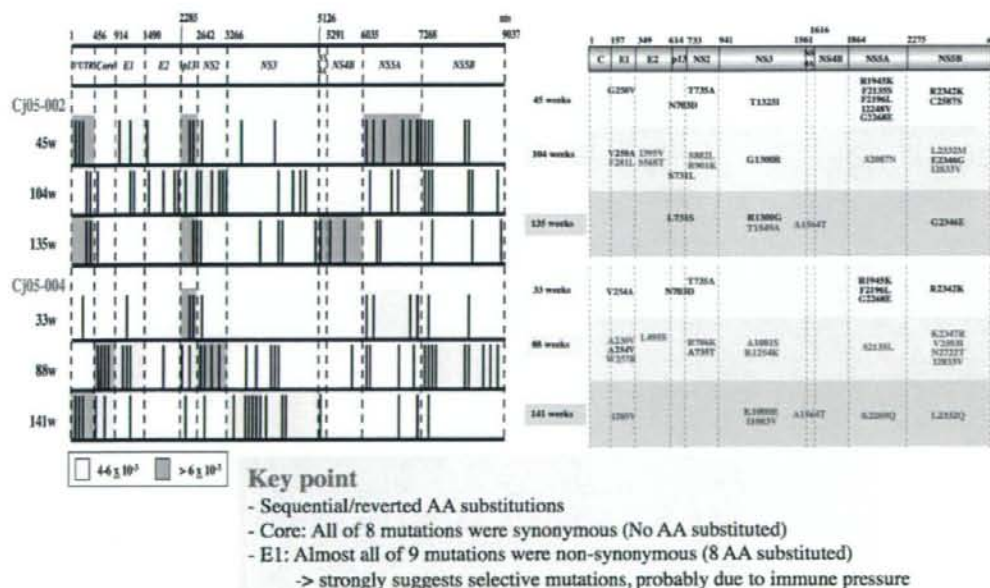


図2：長期持続感染マーマセットにおけるGBV-Bゲノム及びアミノ酸変異

HCV/GBV-Bキメラクローン

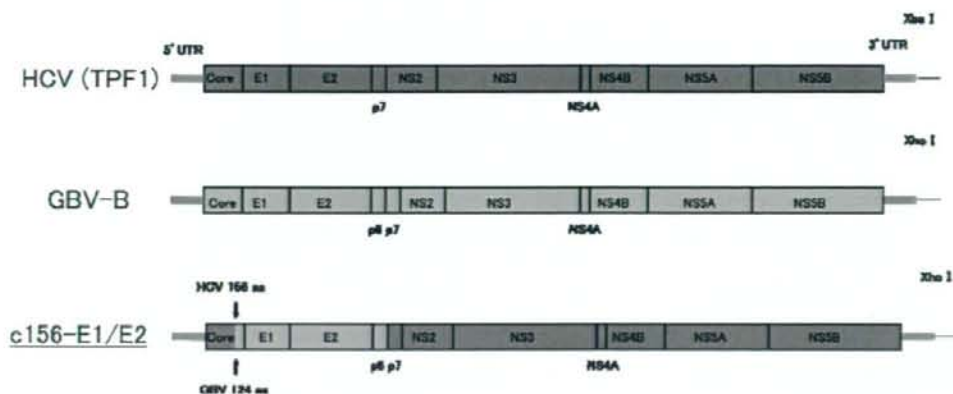


図3 : HCV/GBV-B キメラクローン構造

Transient replication of HCV/GBV-B chimera in transfected Huh-7

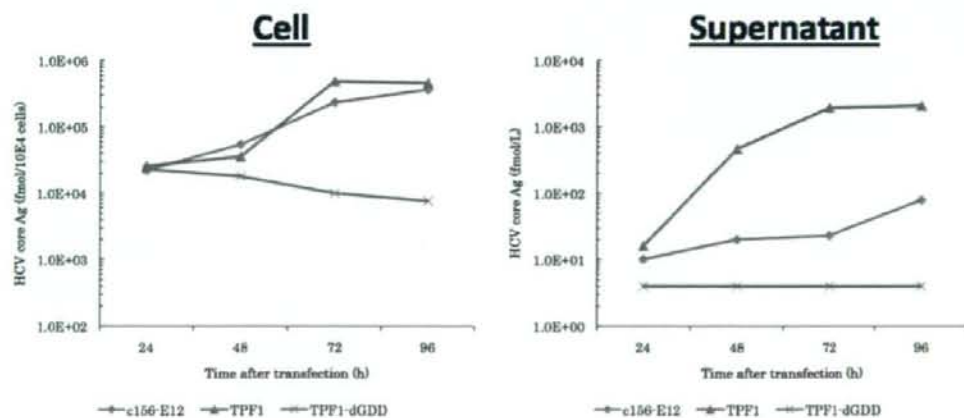
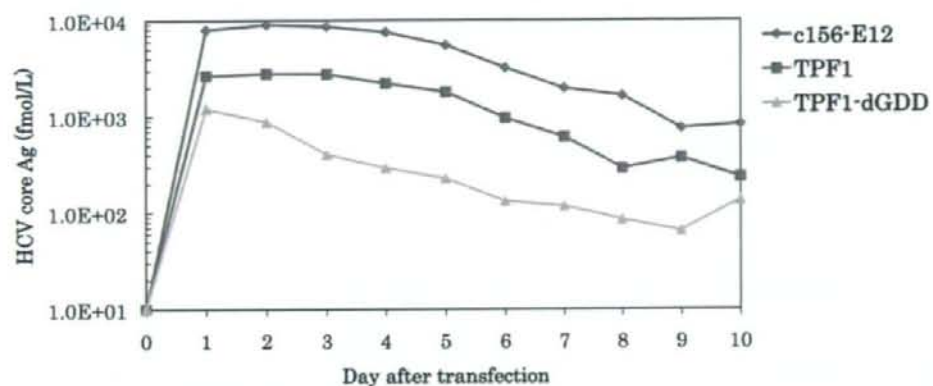


図4 : Huh-7 細胞への HCV/GBV-B キメラクローン導入後のコア蛋白産生

Production of Core protein in the supernatant of marmoset primary hepatocytes transfected with the chimera RNA



1fmol/L \approx 100 GE/ml

図5 : Huh-7 細胞への HCV/GBV-B キメラクロン導入後のコア蛋白産生

HCVの宿主免疫応答に基拠するワクチン開発

分担研究者 松本 美佐子 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 外因性dsRNAによる骨髄系樹状細胞を介したNK細胞活性化機構を解析し、TLR3-TICAM-1シグナルにより新規NK細胞活性化膜分子が発現し、NK細胞を活性化することを明らかにした。

A. 研究目的

HCVの自然免疫応答に基づき、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を惹起するための基礎研究を行う。

B. 研究方法

1. TLR3 KO, TICAM-1(別名TRIF) KO, WTマウスのBMDCをpoly(I:C)で刺激しgene chip解析を行う。TLR3-TICAM-1依存的に発現が上昇する遺伝子を探索し、NK, CTL活性化に関与する遺伝子を同定する。
2. 骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1活性化におけるとりこみ機構の関与を阻害剤等により解析する。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. WTで優位に発現が上昇しており、かつTLR3 KO, TICAM1 KOマウスで発現が低下している519遺伝子のうち、特に発現誘導が強いもので、膜貫通領域をもつ9遺伝子を選択した。GFPを発現するレンチウイルスを用いたBMDCへの強制発現系と、shRNAを発現するレンチウイルスによる候補遺伝子のノックダウンにより、新規NK活性化分子を同定した。フローサイトメトリー、免疫染色により、細胞膜に局在することを確認した。この分子をBMDCに過剰発現させNK細胞と共培養すると、NK細胞の細胞傷害活性が上昇し、IFN- γ 産生が検出された。更に、BMDCでこの分子をノックダウンすると、poly(I:C)刺激でNK活性化が起きなかった。以上より、骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1シグナルにより新規NK細胞活性化分子が発現すること、

cell-cell contactによりNK細胞を活性化し細胞傷害活性、IFN- γ 産生を誘導しうることが明らかとなった。

2. 種々のエンドサイトーシス阻害剤とdsRNAを用いた実験より、骨髄系樹状細胞のTLR3活性化はpoly(I:C)で誘導されるが、in vitro transcribed dsRNAでは誘導されないこと、dsRNAは取り込み段階で選別されTLR3が局在するエンドソームへ輸送されること、poly(I:C)は受容体を介してクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれることが判明した。

D. 考察

HCV感染細胞では、NS3/4AによるIPS-1切断によりRIG-Iを介したIFN- α/β 産生経路が遮断されることが報告されている。我々はこれまでに、HCVは樹状細胞に感染しないこと、HCVのdsRNAを含む感染細胞のdebrisが樹状細胞に取り込まれTLR3-TICAM-1経路を活性化しNK, T細胞を活性化することを明らかにしてきた。HCVワクチンの開発では、樹状細胞に働き、CTL, NK活性化や抗体産生を高めるアジュバントの選択が重要である。TLR3-TICAM-1シグナルは、抗原のクロスプライミングによるCTL活性化を誘導するが、分子機構は不明である。また、骨髄系樹状細胞のTLR3を活性化しうるdsRNAの構造や取り込みレセプターも未同定である。今後、CTL誘導やdsRNA取り込みの分子機構を明らかにし、アジュバント開発の基礎データを提示する予定である。

E. 結論

骨髄系樹状細胞のエンドソームTLR3シグナルによるNK細胞活性化の分子メカニズムを明らかにした。

G. 研究発表

- 論文発表
- Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* DOI 10.1007/s00262-008-0652-9
- Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
- Itoh K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production. *J. Immunol* 181:5522-5529.
- Matsuo A., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Teleost Toll-like receptor 22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from Birnaviruses. . 181: 3474-3485.
- Shingai, M., T. Ebihara, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated interferon-beta induction. *Int. Immunol.* 20:1169-118
- Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Current Genomics* 9:488-493.
- Fukuda, K., T. Watanabe, T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.*

oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- κ B and IRF-3 activation. 283: 18283-18291.

- Nakamura, M., K. Funami, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of

Hepatol. Int. 2: 222-230.

- Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.

- Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDR* 60: 805-812.
- Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*
- Bas, S., T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. The pro-inflammatory cytokine *Chlamydia trachomatis*

TLR2/TLR1/TLR6 and CD14.
.180: 1158-1168.

2. 学会発表

- 海老原敬、松本美佐子、脇田隆字、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
- 松本美佐子 : TLR3-TICAM-1 による dsRNA 認識とシグナル伝達、(同上)
- 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)
- 海老原敬、松本美佐子、脇田隆字、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 回夏夏季シンポジウム (ニセコ町)、2008. 7. 26-27
- 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
- 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)
- 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
発明の名称 : 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
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y. Kondo et al.	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.	199	726-36	2009
M. Kuroki et al.	Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress.	J Virol.	83	2338-48	2009
R. Suzuki et al.	Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28 γ -Dependent Mechanism.	J Virol.	83	2389-92	2009
Y. Nitahara-Kasahara et al.	Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells.	Virology	383	319-27	2009
T. Wakita	Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system.	Methods Mol Biol.	510	305-27	2009
D. Akazawa et al.	Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines.	Biochem Biophys Res Commun.	377	747-51	2008
L. Lan et al.	Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner.	J Immunol.	181	4926-35	2008
T. Kimura et al.	Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice.	J Gen Virol.	89	2108-13	2008
T. Kato et al.	Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation.	Hepatology	48	732-40	2008
D. Sir et al.	Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response.	Hepatology	48	1054-61	2008
Y. Ariumi et al.	The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication.	J Virol.	82	9639-46	2008
K. Murakami et al.	Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines.	J. Gen Virol	89	1587-92	2008

T. Ebihara et al.	Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells.	Hepatology	48	48-58	2008
T. Masaki et al.	Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles.	J Virol.	82	7964-76	2008
G. Mateu et al.	Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death.	Virology	376	397-407	2008
K. Ishii et al.	Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins.	Biochem Biophys Res Commun.	371	446-50	2008
Y. Nahmias et al.	Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin.	Hepatology	47	1437-45	2008
H. Aizaki et al.	Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection.	J Virol.	82	5715-24	2008
R. Suzuki et al.	Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2.	J Virol.	82	1870-80	2008
K. Omata et al.	Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter.	Apoptosis	13	929-37	2008
R. Suzuki et al.	Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes: Use in safer propagation of a novel vaccine candidate.	J Virol.	82	6942-51	2008
K. Murakami et al.	Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system.	J Virol Methods	148	174-81	2008
K. Ishii et al.	Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model.	Microbiol Immunol.	53	75-82	2009
H. Shirato et al.	Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding.	J Virol.	82	10756-67	2008
T. Nakajima et al.	Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution.	Immunogenetics	60	727-35	2008
H. Hohjoh et al.	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene.	Gene	432	60-6	2009
H. Akari et al.	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection.	Microbiol Immunol.	53	53-7	2009

T. Seya et al.	The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer.	Cancer Immunol. Immunother.	In press		2009
T. Seya et al.	Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing.	Immunol. Reviews	227	44-53	2009
H. Oshiumi et al.	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection.	J. Biol. Chem.	284	807-17	2009
K. Itoh et al.	The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- β production.	J Immunol.	181	5522-9	2008
A. Matsuo et al.	Teleost Toll-like receptor 22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from Birnaviruses.	J Immunol.	181	3474-85	2008
M. Shingai et al.	Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated interferon-beta induction.	Int. Immunol.	20	1169-80	2008
H. Oshimumi et al.	Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution.	Current Genomics	9	488-93	2008
K. Fukuda et al.	Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3.	J. Biol. Chem.	283	22784-94	2008
K. Funami et al.	Homo-oligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- κ B and IRF-3 activation.	J. Biol. Chem.	283	18283-91	2008
M. Nakamura et al.	Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers.	Hepato. Int.	180	7175-83	2008
H. Shime et al.	Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway.	J Immunol.	180	7175-83	2008
M. Matsumoto et al.	TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C).	Adv. Drug Delivery Rev.	60	805-12	2008
S. Bas et al.	The pro-inflammatory cytokine <i>Chlamydia trachomatis</i>				

IV. 研究成果の刊行物・別冊