

D. 考察

われわれは、これまでにノトパイオート豚を用いた HEV の実験感染モデルを作出し、この実験感染モデルにおいて VLP の経鼻投与あるいは経口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。また、VLP を 1 週間隔で 3 回経口投与あるいは経鼻投与した場合、HEV の感染防御を示す VLP の最小有効量は経鼻投与ならびに経口投与いずれにおいても 0.5 mg/dose であることを明らかにした。今回、0.5 mg/dose の VLP を 1~2 回と少回数投与した場合においても、経鼻投与群で 100%、経口投与群で 50%に感染防御効果が認められた。このことから、HEV の感染防御を図る上で VLP の経粘膜投与は非常に有効な方法であると考えられた。

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. ノトパイオート豚を用いた実験感染系において、1 回の VLP 経鼻投与によっても感染防御効果が得られる。

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

B型肝炎ウイルス粒子分泌機構の解析 C型肝炎ウイルス中和抗体価測定法の開発

研究分担者 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 B型肝炎ウイルスの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HBs抗原分泌をELISA法で解析した。HBsAgの上清中への分泌量は genotype Aの方が genotype Cより高かった。genotype A と C で既知のS領域分泌に関与するアミノ酸は保存されていた。genotype A と C のHBVプラスミドで配列を比較したところ、Sはアミノ酸レベルで92.9%、PreS1は91.6%、PreS2は80% homology だった。PreS1は塩基レベルで91.6%、PreS2は85.5%、Sは94.4% homology だった。preS1-preS2を genotype A型に置換したところ、genotype CのS抗原分泌が亢進した。逆にpreS1-preS2を genotype C型に置換したところ、genotype AのS抗原分泌が減少した。このように genotype AのpreS1-preS2領域を挿入すると効率よくS抗原が分泌できる可能性が示された。また、HCV J6/JFH1感染系を用いてC型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。

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である。そこで、本研究ではHBs抗原を効率よく発現し、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。また、C型肝炎ウイルス(HCV)のエンベロープ抗体検出系が存在しないので、HCV J6/JFH1感染系を用いてC型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。

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した。

(4) HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、血清中の focus 形成阻止活性を測定し、中和抗体価を算出した。

(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。患者試料は当病院の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行った。

C. 研究結果

(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。

(3) HBsAg の上清中への分泌量は genotype A の方が genotype C より高かった。

(4) genotype A と C で S 領域の分泌に関与するアミノ酸は保存されていた。

(5) 使用した genotype A と C の HBV プラスミドで配列を比較したところ、S はアミノ酸レベルで 92.9% homology で 10 個、PreS1 は 91.6% homology で 11 個、PreS2 は 80% homology で 15 個の差が存在した。PreS1 は 91.6% homology で 29 ヌクレオチド、PreS2 は 85.5% homology で 24 ヌクレオチド、S は 94.4% homology で 37

ヌクレオチドの差があった。

(6) preS1-preS2 を genotype A 型に置換したところ、genotype C の S 抗原分泌が亢進した。

(7) 逆に preS1-preS2 を genotype C 型に置換したところ、genotype A の S 抗原分泌が減少した。

(8) HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、中和抗体価を算出できるようになった。EVR, SVR の患者では non-EVR, non-SVR の患者に比し、中和抗体価が有意に高かった。

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。HBV はヌクレオカプシドなしに S-HBsAg でコートされた中空粒子 subviral particles (SVPs) を形成する。HBV の small S 蛋白は高免疫原性であり、HB ワクチンとして世界中で使用されている。また、SVP の分泌は L-HBsAg や M-HBsAg と independent に起こるとされているが、mature virion の分泌は L-HBsAg と S-HBsAg が必要であり、M-HBsAg は必須でないと報告されている。現在までに、分泌を低下させるアミノ酸変異としては、Virion: G145R, SVPs: R79K, Virion & SVPs: L77R, R169P, SVPs: L215Q 等が報告されているが、その大部分は S-HBsAg の N 末端に存在している。しかし、本研究により、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示され、preS1 領域から発現させることにより、各遺伝子型の S 抗原を効率良く分泌させることができる可能性が示された。SVPs の細胞外への放出の分子機構を解析し、組み換え HBs 抗原粒子を効率よく細胞外へ分泌させる技術を確立するためには preS1-preS2 のどの領域

が重要であるかを明らかにする必要がある。

また、HCV J6/JFH1株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、中和抗体価を算出できるようになった。EVR, SVR の患者では non-EVR, non-SVR の患者に比し、中和抗体価が有意に高かった。今後、更に検体数を増やして中和抗体価と感染防御の関係を明らかにする必要がある。

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解析したところ、preS1-preS2領域にもS抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示され、preS1領域から発現させることにより、各遺伝子型のS抗原を効率良く分泌させることができる可能性が示された。また、HCV J6/JFH1感染系を用いてC型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological responders with genotype 1b and high viral load previously treated with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy -focus on early viral dynamics. *Intervirology*, 2010; 53, 49-54.
- 2) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral dynamics of viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 2010; 53, 44-48.
- 3) Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., Shoji, I., and Hotta, H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-Interferon plus ribavirin. *Kobe Journal of Medical Sciences*, in press.
- 4) Bungyoku, Y., Shoji, I., Makine, T., Adachi, T., Hayashida, K., Nagano-Fujii, M., Ide Y., Deng, L., and Hotta, H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *Journal of General Virology*, 2009; 90, 1681-91.
- 5) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, MMC., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *Journal of Virology*, 2009; 83, 5137-47.
- 6) Kasai, D., Adachi, T., Lin, D., Nagano-Fujii, M., Sada, K., Ikeda, M., Kato, N., Ide, Y., Shoji, I., and Hotta, H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *Journal of Hepatology*,

2009; 50, 883-94.

2. 学会発表

- 1) Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 2) Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 3) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma and E6AP in the degradation of HCV core protein and the viral production. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 4) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 5) Shoji I and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston (USA), October 30-November 3, 2009.
- 6) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. 1b型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN α -2b+RBV 併用療法(併用療法)における治療効果とウイルス dynamics との関係及びウイルス陰性化時期予測式についての検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 2009.
- 7) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. セロタイプ 2 型 C 型慢性肝炎に対する IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の背景因子及び早期ウイルス dynamics の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 2009.
- 8) 井出良浩, 兼田崇作, 犬伏祥子, 足達哲也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染によるインスリン抵抗性誘導の分子機序について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 9) 森石恆司, 勝二郁夫, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 10) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 11) Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる Bax 活性化の分子機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 12) 林田和美, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖に及ぼすエストロジオールの影響に関する

る検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

13) 兼田崇作, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. グルコーストランスポーターGLUT2 の転写制御に及ぼす C 型肝炎ウイルスの影響. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

14) 木村敬郎, 鈴木亮介, 山越智, 鈴木健裕, 堂前直, 勝二郁夫, 松浦善治, 千葉丈, 脇田隆字, 鈴木哲朗. Prohibitin2 は C 型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

15) 井出良浩, 上城博宣, 前防達也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質と相互作用する細胞性キナーゼの解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

16) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. The hnRNP H1 modulates

production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

17) 山下亮輔, 福田浩一郎, 犬伏祥子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治, Lin Deng, 井出良浩, 堀田博, 勝二郁夫. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性調節因子 E6AP 及び PA28 γ の相互作用解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

大きな粒子形成に必須な領域および重要なアミノ酸同定

研究分担者 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 これまでの研究結果は異なる株間に粒子形成の違いを示した。ネイティブな粒子に類似する G3-HEV 大きな粒子の形成に重要なアミノ酸を同定するには大きな粒子が形成しない株(T株)のN末端111アミノ酸領域にいくつかのアミノ酸を大きな粒子を形成する株(S株)の配列改変によって大きな粒子の形成するに重要なアミノ酸の配列を同定した。このアミノ酸は粒子の構造だけではなく、核酸パッケージングにも重要であることも示唆した。

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEVが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子(VLP)がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。我々はこれまでに1型と4型のHEVについてN末端を欠失した構造蛋白を発現してVLPを作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブなHEVと似ていることを明らかにした。更にネイティブなHEVときわめて類似する大きな粒子の作製にも成功した。本研究では大きな粒子の形成に影響する重要なアミノ酸の同定を試みた。

B. 研究方法

大きい粒子の形成できるS株と形成できないK

株の配列を比べ、両者の間に異なるアミノ酸を相互に置換した変異体を作製し、それぞれの組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、粒子の形成状況を解析して重要な配列を見いだす。つまり、常法どおり3型HEV ORF2の全長、およびそれぞれ変異体の組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞をMOI:10で感染後、感染細胞と培養上清から構造蛋白を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。免疫電子顕微鏡を用いて粒子の形成を観察する。

C. 研究結果

1. 変異体の作製

大きな粒子の作製の中、T株のORF2全長を組換えバキュロで発現した場合、小さな粒子が効率よく形成したものの、大きな粒子の形成が見られなかった。大きな粒子の形成に重要だと考えられたN末端の配列をS株と比べた結果、39, 69, 103番目のアミノ酸が異なっていることは分かっていた。この3つのアミノ酸を両株間で相互置換し、それぞれ組換えバキュロウイルスを作製した。

2. 粒子の形成に重要なアミノ酸

各組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 に感染し、感染細胞内および培養上清に分泌された抗原量や粒子の形成を比較した。各変異体の組み換えバキュロウイルスの発現量には明らかな差が見られなかった。67, 103 番目のアミノ酸の置換による粒子の形成変化が見られなかった。ただし、T 株の 39 番目のセリンをグリシンに置換することにより、S 株と同様大きな粒子の形成ができた。また、S 株のグリシンをセリンに置換によって大きな粒子の形成ができなくなった。この結果、39 番目のアミノ酸は大きな粒子に形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

D. 考察

これまで効率の良い培養細胞系が樹立されていない。現在、ようやく HEVPLC/PRF5 細胞で増幅できるようになったが、ウイルス構造解析に十分な粒子を獲得するのも依然困難である。組換えバキュロウイルスを用いて大量にネイティブな HEV と類似する粒子作成し、さらに大きな粒子形成に重要なアミノ酸が同定できるのはウイルスの構造解析に重要である。また、大きな粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸がしか取り込まれていないことから、HEV のパッケージングなどウイルスの複製に関する情報が得られることも期待される。

E. 結論

ネイティブな粒子類似する大きな粒子形成には HEV ORF2 の 39 番目のグリシンが重要であることが同定できた。この発見はウイルスのパッケージングなどの研究に有用である。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 李 天成、宮村達男、武田直和、脇田隆宇。

培養細胞を用いた E 型肝炎ウイルスの安定性の検討。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

- 2) 李 天成、片野晴隆、片岡紀代、中村智之、永田典代、宮村達男、佐多 徹太郎、脇田隆宇、鈴木哲朗。メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCV) 様粒子の作製およびその応用。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京
- 3) 落合 晋、石古博昭、李 天成。イムノクロマト法による抗 Hepatitis E virus 抗体の測定。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京
- 4) 山本 博、松田淳志、李 天成、鈴木樹理、田 貴文、武田直和。サルにおける E 型肝炎ウイルスの感染。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京
- 5) 三好龍也、内野清子、李 天成、武田直和、北本憲利、田中智之。野生イノシシの E 型肝炎ウイルス保有状況調査。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

2. 論文発表

- 1) Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12986-91.
- 2) 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. 2009 Apr;24(4):599-604.

- 3) Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M. Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. Ann Trop Med Parasitol. 2009 Jun;103(4):343-50.

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

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

研究分担者 石井 孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

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、一過性の感染はお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。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

1. 2種類のプラスミドトランスフェクションによるHCV-LPsの形成

HCV (JFH-1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JFH-1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。

2. 3種類のプラスミドトランスフェクションによるHCV-LPsの形成とNS2領域の感染性への関与の検討

前年度までの解析により、HCV-LPsの感染性にはNS2領域の発現が必須であることが示されている。上記の構造領域発現プラスミドをcoreからp7領域までとNS2領域に分割し、それぞれをpCAGGSに組み込んだプラスミド(pCAGC-p7およびpCAGNS2)を作成した。この2種類のプラスミドとpHH JFH1 SGR-FlucをHuh-7細胞に導入し、同様に上清中の感染価を測定した。NS2の感染性への関与を調べるため、pCAGNS2のNS2領域に欠失変異や点変異を導入した種々のプラスミドを作成した。pCAGC-p7およびpHH JFH1 SGR-Flucと共にnaïveなHuh-7へプラスミドトランスフェクションを行い、上清中の感染価を測定した。

(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、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 2種類のプラスミドトランスフェクションによるHCV-LPsの形成

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経時的に回収し、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。この事から、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、より高いルシフェラーゼ活性が認められた事から、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事から、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。

2. 3種類のプラスミドトランスフェクションによるHCV-LPsの形成とNS2領域の感染性への

関与の検討

構造領域を発現するプラスミドを core から p7 までと NS2 に分割することにより、NS2 への変異導入による機能解析が簡便に行えるものと考えられる。トランスフェクションした細胞の上清を経時的に回収し、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と比べ顕著に高い活性が認められた。3 つのプラスミドのトランスフェクションによっても HCV のレプリコンゲノムが packaging された感染性粒子が産生できることが示された。

この方法を用いて NS2 領域に変異を導入した場合の感染性 HCV-LPs の形成についての検討を行った。NS2 のプロテアーゼ活性中心や、リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成能に影響しなかったが、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸を欠損させると、感染性粒子の産生は認められなかった。

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 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。しかしながらこの方法は、cell line を取得するまでに長時間を要し、変異導入による HCV 蛋白の機能解析には適当ではない。本年度は、プラスミドトランスフェクションにより感染性の HCV-LPs を作成する方法を確立し、本手法を用いて NS2 の感染性

への関与を検討した。その結果、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸が感染性に必須であることを示すことが出来た。

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。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応用可能である。

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、感染性の HCV-LPs を形成させることに成功した。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. Hmwe S., Aizaki H., Date T., Murakami K., Ishii K., Miyamura T., Koike K., Wakita T. and Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Research, in press.
2. Kiyohara T., Totsuka A., Ishii K., Ito T. and Wakita T. Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking the antibody-binding site and the

- receptor-binding site on hepatitis A virus. *Archives of Virology* 154: 1263-1269 (2009)
3. Kiyohara T., Ouchi Y., Sato T., Yoneyama T., Ishii K., Ito T. and Wakita T. Evaluation of an in-house anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit and its practical use for analysis of an HAV outbreak. *Journal of Medical Virology* 81: 1513-1516 (2009)
 4. 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* 53: 75-82 (2009)
 5. 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 PA28g-dependent. *Journal of Virology* 83: 2389-2392 (2009)
 6. 李 天成、武田直和、石井孝司 E 型肝炎基礎 臨床とウイルス 37: 283-290 (2009)
 7. 清原知子、石井孝司 A 型肝炎 基礎 臨床とウイルス 37: 283-290 (2009)
 8. 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 (2009)
2. 学会発表
 1. Suzuki R., Saito K., Ando T., Ishii K., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
 2. Shoji I., Abe K., Murakami K., Ishii K., Suzuki T., Wakita T., Miyamura T., Koike K. and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
 3. Yoshida T., Iwasaki Y., Mori K., Maki N., Ishii K., Iijima S., Yoshizaki S., Katakai Y., Suzuki T., Miyamura T. and Akari H. Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
 4. Moriyama M., Akazawa D., Omi N., Shibuya Y., Nishimura K., Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T., Ishii K. and Wakita T. Vaccination of infectious HCV particles with several adjuvants and induction of neutralization immunoglobulin in mice. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
 5. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Maki N., Ishii K., Iijima S., Yoshida T., Yoshizaki S., Suzuki T. and Miyamura T. Characterization of chronic GBV-B infection in marmosets: selective and

frequent nonsynonymous mutations of the viral genome. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September 8-11, 2009

6. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、白土東子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
7. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来HCV粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型HCV感染阻害活性の誘導、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
8. 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来HCV粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
9. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字、宮村達男、小池和彦、堀田博：C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子hnRNP H1/H2/Fの役割、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
10. 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルスの*trans*-packaging系を用いたNS2蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
11. 大西和夫、清原知子、石井孝司、小林和夫：HAV特異的モノクローナル抗体を用いた

ELISA検出系の最適化とHAV抗体産生B細胞動態解析法の検討、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京

12. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第29回日本糖質学会、平成21年8月、高山
 13. 岩崎優紀、森健一、榎昇、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長期持続感染サルノ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
 14. 岩崎優紀、森健一、榎昇、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：マームセットを用いた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
- 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, <u>Suzuki T</u>	Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein.	J.Virol.	83	5137-5147	2009
Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., <u>Suzuki, T</u>	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
Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y	Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation.	J.Virol.	83	7959-7969	2009
Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, <u>Suzuki T</u> , Koike K.	Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein.	HepatoI	50	378-386	2009
Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, <u>Suzuki T</u> , Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.	Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway.	J.Virol.	83	10427-10436	2009
Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I	Identification of Annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation.	J Cell Biochem	16	1123-1135	2009
Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Fukasawa H	Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR.	Antiviral Res.	83	112-117	2009

Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, <u>Suzuki T</u> , Miyamura T, Koike K	Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells.	Am J Pathol	175	1515-1524	2009
Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, <u>Suzuki T</u> , 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	383	319-327	2009
Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, <u>Suzuki T</u>	Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes.	J Clin Microbiol	47	4141-4143	2009
Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, <u>Suzuki T</u>	Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin.	Antiviral Res	85	520-524	2010
田中智之、三好龍也、内野清子	ノロウイルス迅速診断法	診断と治療	97	1728-1731	2009
田中智之	改良ノロウイルス抗原検出 EIA キットの評価	医学と薬学	61	93-98	2009
Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, <u>Tanaka T</u> , Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T	Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis as a wedding hall.	J.Med.Virol			in press
Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, <u>Li TC</u> , Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y.	Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure.	Proc Natl Acad Sci USA	106	12986-12991	2009
Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, <u>Li TC</u> , 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	24	599-604	2009
Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, <u>Li TC</u> ,	Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection	Ann Trop Med Parasitol	103	343-350	2009

Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M	with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus.				
Bungyoku, Y., <u>Shoji, I.</u> , Makine, T., Adachi, T., Hayashida, K., Nagano-Fujii, M., Ide Y., Deng, L., and Hotta, H.	Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells.	Journal of General Virology	90	1681-1691	2009
Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., <u>Shoji, I.</u> , Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, MMC., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T.	Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein.	Journal of Virology	83	5137-5147	2009
Kasai, D., Adachi, T., Lin, D., Nagano-Fujii, M., Sada, K., Ikeda, M., Kato, N., Ide, Y., <u>Shoji, I.</u> , and Hotta, H.	HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.	Journal of Hepatology	50	883-894	2009
Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., <u>Shoji, I.</u> , Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y.	Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological responders with genotype 1b and high viral load previously treated with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy -focus on early viral dynamics.	Intervirolgy	53	49-54	2010
Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., <u>Shoji, I.</u> , El-Shamy, A., and Hotta, H.	Outcome and early viral dynamics of viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b.	Intervirolgy	53	44-48	2010
Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., <u>Shoji, I.</u> , and Hotta, H.	Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with peglated-Interferon plus ribavirin.	Kobe Journal of Medical Sciences			in press
Kiyohara T., Totsuka A., <u>Ishii K.</u> , Ito T. and Wakita T	Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking the antibody-binding site and the receptor-binding site on hepatitis A virus.	Archives of Virology	154	1263-1269	2009
Kiyohara T., Ouchi Y., Sato T., Yoneyama T., <u>Ishii K.</u> , Ito T. and	Evaluation of an in-house anti-hepatitis A virus (HAV)-specific	Journal of Medical Virology	81	1513-1516	2009

Wakita T	immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit and its practical use for analysis of an HAV outbreak.				
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	53	75-82	2009
李 天成、武田直和、石井孝司	E 型肝炎 基礎	臨床とウイルス	37	283-290	2009
清原知子、石井孝司	A 型肝炎 基礎	臨床とウイルス	37	283-290	2009
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

IV. 研究成果の刊行物・別冊