

200933023A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスワクチン実用化のための  
基盤的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスワクチン実用化のための  
基盤的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成22(2010)年 3月

## 目次

<b>I. 総括研究報告</b>	
肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究 .....	3
石井 孝司	
<b>II. 分担研究報告</b>	
1. 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 .....	23
中村 紀子	
2. 感染中和に重要な HCV の初期感染過程の解析 .....	33
脇田 隆宇	
3. C 型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子の産生とその応用.....	41
鈴木 亮介、石井 孝司	
4. 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 .....	45
加藤 孝宣	
5. 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 ..	49
明里 宏文	
6. HCV の宿主免疫応答に基拠するワクチン開発 .....	57
松本 美佐子	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b> .....	59
<b>IV. 研究成果の刊行物・別冊</b> .....	65

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

## 肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 室長 石井 孝司

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。我々が分離した 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。

### A. 研究目的

分担研究者 脇田 隆宇  
国立感染症研究所ウイルス第二部  
部長

分担研究者 明里 宏文  
京都大学霊長類研究所  
教授

分担研究者 加藤 孝宣  
国立感染症研究所ウイルス第二部  
室長

分担研究者 中村 紀子  
東レ株式会社医薬研究所  
主任研究員

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

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り、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った大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったためである。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った。一方、我々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。我々はこれまで、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アッセイ系を樹立し、また本ウイルスを精製して小動物に接種し、その血清がHCVの感染中和活性を有することを示してきた。本研究では以上の研究成果を踏まえ、HCVの感染予防ワクチンの実用化に向けた検討を行うと共に、ウイルス感染過程および感染中和機構の解析、さらに動物モデルの開発を進める。

2年目となる本年度は精製ウイルス粒子の大量生産に必要な技術開発を継続し、以下に記すようなワクチン実用化に向けた技術開発と基盤的研究を開始した。

1. 中和抗体のエピトープ解析により HCV 表面蛋白質の感染中和に重要なアミノ酸配列を同定する。異なるウイルス株における共通エピトープを探索する。
2. 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知られている。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。これらのキメラ株や変異導入株を利用し、ウイルス粒子の大量培養法の確立を目指す。
3. HCV の中空粒子中に HCV レプリコンや外来遺伝子 RNA を封入する方法を確立し、これらの粒子のワクチン効果および肝臓への遺伝子デリバリーシステムとしての応用を検討する。
4. HCV に最も近縁な肝炎ウイルスである GBV-B を用いたサロゲート霊長類モデルを利用して HCV 予防・治療ワクチン実用化に向けた基盤的研究を行なう。さらに GBV-B 慢性肝炎発症モデルおよび

HCV/GBV-B キメラウイルス感染モデルを確立し、HCV 予防・治療ワクチン臨床応用に向けたフィージビリティ・スタディを実施する。

5. HCV の自然免疫応答を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. 感染性 HCV の大量培養

Huh7 細胞（10 cm ディッシュ）に感染性 HCV(J6/JFH-1)濃縮液を multiplicity of infection(MOI)が 0.2 となるように接種し、2 時間後にウイルス液を除去し、PBS で洗浄して DMEM-10 を添加、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm<sup>2</sup> フラスコに継代培養し、さらにセルスタック（5 段、Corning）に継代培養した。培養液の回収、添加を 2 回行い、計 650 mL×3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μm フィルター濾過を行い、使用まで -80°C で保存した。

### 2. HCV 粒子大量精製

培養上清の濃縮：

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む培養上清をホローファイバーで濃縮し、その後等量の PBS を添加してダイアフィルトレーションを 5 回行った。ダイアフィルトレーション後、限外濾過膜を 200 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで洗浄し、濃縮液と混合して最終濃縮液とした。

シヨ糖密度勾配遠心：

10-60% (w/v) シヨ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、60%、50%、40%、30%、20%および 10%シヨ糖/TNE の順に 2 mL ずつ重層した後、上記のように調製した濃縮培養上清 23 mL をさらに重層した。28,000 rpm、4°C、4 時間遠心分離後、約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。各分画液の HCV-RNA およびコ

ア蛋白量を定量した。最も HCV-core および HCV-RNA 含量の多い分画 6 (Frac 6) と、最も感染力価の高い分画 8 (Frac 8) を回収し、濃縮および PBS への溶液交換を行い、以下の実験に使用した。

### 3. Naïve Huh7 に対する感染力価の測定

Naïve 細胞に対する感染力価は、マウス抗 HCV Core 抗体 2H9 を用いた免疫蛍光染色にて確認された感染フォーカス数より算出した。1 希釈液あたり 3 または 6 ウェル調製し、フォーカス数はその平均値を適用した。

### 4. 精製 HCV 粒子のマウスへの免疫

4 週齢 BALB/c マウスを 1 週間馴化の後、下記投与群に 0、2、4 および 6 週に MPL+TDM(Sigma Adjuvant System, Sigma) をアジュバントとして抗原 (UV 不活化精製 HCV 粒子) を腹腔内投与し、投与後 1、3、5 および 7 週に眼窩より採血した。陰性コントロールには生理食塩水 (大塚製薬) のみ投与した。

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。

### 5. アジュバントの検討

アジュバントとして Alum (水酸化アルミニウム)、非メチル化 CpG (合成 DNA)、polyI:C (二本鎖 RNA) を使用した。Alum は、PIERCE 社の Imject® Alum、非メチル化 CpG は Mod87 (東レ製)、polyI:C は Yamasa Shoyu 社のものを用いた。不活化した精製 J6/JFH1-HCV 粒子 (HCV core 2 pmol 相当量) を含んだ溶液 100  $\mu$ l に対して、これらアジュバントを単独もしくは組み合わせて使用した。5 週齢の雌性 BALB/c マウスに 2 pmol のコアタンパク質相当量を 2 週間毎に 4 回腹腔内投与した。陽性コントロールとしてマウス用アジュバントである

MPL+TDM を用いた。

### 6. マウス血清の感染阻害活性の測定

HCV のエンベロープ蛋白質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。陰性対照として、HCV E1E2 発現ベクターをトランスフェクションしない培養上清 (no env.) を作製した。HCVpp または感染性 HCV 粒子と終濃度 1% (v/v) 非働化マウス血清を混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、細胞に接種して 37°C で 3 時間培養した。その後、感染材料を除き、PBS で洗浄、0.5 mL の DMEM-10 を添加して 72 時間培養した。HCVpp の感染は細胞ライセートのルシフェラーゼ活性を測定することで評価した。

### 7. モノクローナル抗体の解析

UV で不活化したショ糖密度勾配精製 HCV を免疫したマウスより作製したモノクローナル抗体は、E1 および E2 蛋白質を固相化したプレートを用いて EIA にてスクリーニングし、さらに HCVpp を用いた感染阻害活性の測定を行い、感染阻害活性を有するモノクローナル抗体を選別した。次に、これらの抗エンベロープ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。

### 8. ウイルス粒子の構造解析

精製したウイルス粒子の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ショ糖密度勾配によりウイルスを精製した。精製ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察した。抗 E2 抗体による免疫電子顕微鏡観察を試みた。

## 9. HCV エンベロープ蛋白質の糖鎖機能解析

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 細胞でリコンビナント E2 蛋白を作製し、その糖鎖構造を質量分析で解析した。さらに、感染性全長 HCV 遺伝子の糖鎖付加部位を改変して、HCV の複製増殖に対する影響を検討した。

## 10. 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

JFH-1 株(2a)の core から NS2 領域を発現するプラスミドおよびアデノウイルスベクターを作製した。また core から NS2 の 1 つ目の膜貫通領域を TH 株(1b)に置換した発現プラスミドも構築した。一方、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、レプリコンプラスミドを作製した。これらのプラスミドあるいはアデノウイルスを Huh7.5.1 細胞へトランスフェクションまたは感染し、その培養上清をさらに naïve な Huh7.5.1 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。

## 11. HCV JFH-1 株の長期培養による適応変異ウイルスの分離とその評価

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。さらに分離された適応変異ウイルスを 1 FFU/well になるように希釈した後、96 well plate に播いた Huh7.5.1 細胞に感染させることで、増殖能の高いウイルスの分離を行った。分離

されたウイルスは RT-PCR およびダイレクトシーケンス法でゲノム配列を決定し適応変異を同定した。さらに得られた変異を 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評価した。

## 12. JFH-1 株チンパンジー接種で認められ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。

## 13. 新世界ザルへの GBV-B 感染実験

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。サル由来組織についてコア蛋白特異的モノクローナル抗体を用いた免疫染色ならびに各種組織染色を実施した。

## 14. HCV と GBV-B のキメラウイルス構築

HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および

pGBB を基に、core の 3' 端から p7 までが GBV-B の c156-E1/E2 を構築した。同キメラクローンから得たウイルスゲノム RNA をアカテタマリン肝臓に接種した。以後、上記 14 同様に得られた血液より解析を行なった。

#### 15. poly(I:C)の細胞内への取り込み機構の解析

TLR3発現ヒト培養細胞の可溶化物を出発材料とし、poly(I:C)の取り込みに関与する分子をpoly(I:C)-Sepharoseを用いて精製し、プロテオーム解析を行った。同定した分子は、siRNAによるノックダウンを行い、poly(I:C)の取り込みと活性への関与を査定した。

(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、個人情報を厳格に管理保存する。

#### C. 研究結果

本研究班での昨年度の主な研究成果は以下の通りである。

① HCV の初期感染過程に重要な役割を果たす E2 蛋白質の精製に成功した。この系で開発されたエンベロープ蛋白質を用いて、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。

② HCV 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。

③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。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ 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イクスルーとなる可能性を見出した。

以上の結果を踏まえ、本年度の成果について以下に記す。

#### 1. 感染性 HCV の大量培養

分画分子量 500 kDa の限外濾過膜（ホローファイバー）を用いて、24 L の培養上清を 1 L/min の一定流速で濾過し、約 400 mL まで 60 倍濃縮した。さらに等量の PBS で 5 回ダイアフィルトレーションを行い、ショ糖密度勾配を用いて超遠心分離し、分離後の分画中の HCV-core、HCV-RNA、および naïve Huh7 細胞における感染力価を測定した。ウイルス成分の浮遊密度は約 1.15 g/mL にピークが認められるのに対し、特異的感染力価の浮遊密度は約 1.10 g/mL がピークとなり、異なる性状のウイルス粒子を分離した。浮遊密度が高く、感染力価の低い HCV 粒子 (Frac 6) および浮遊密度が低く、感染力価の高い HCV 粒子 (Frac 8) を濃縮して調製し、得られた各々の精

製 HCV 粒子プロファイルを比較した。その結果、HCV-core タンパク質と HCV-RNA の比は同等 (Frac 6 : Frac 8 = 1 : 0.82) であったが、特異的感染力価について、感染力価/HCV-core の比では Frac 6 : Frac 8 = 1 : 7.61、感染力価/HCV-RNA の比では Frac 6 : Frac 8 = 1 : 6.26 となり、Frac 8 の HCV 粒子は約 6~7 倍感染力を持っていた。一方、夾雑タンパク質については、HCV-core/総タンパク質の比が Frac 6 : Frac 8 = 1 : 0.17 であることから、Frac 6 の HCV 粒子が約 6 倍、純度が高いと考えられた。

## 2. 精製 HCV 粒子に含まれるエンベロップ蛋白質量の概算

抗 core 抗体を用いた core 蛋白のウエスタンブロッティングを行ったところ、HCV 粒子は Frac 6 および Frac 8 とともに同等のバンド強度を示した。HCV core 蛋白質量 0.5 pmol の HCV 粒子における E1 および E2 蛋白質量を概算したところ、Frac 6 の E1 および E2 は 3.3 および 4.0 ng、Frac 8 の E1 および E2 は 4.7 および 6.5 ng と算出された。この結果から、HCV 粒子の core、E1 および E2 蛋白質の構成比はモル換算で概ね core:E1:E2 = 1:0.2:0.2 となり、粒子に含まれるエンベロップ蛋白質量は少ないと考えられた。また、感染力価の異なる Frac 6 および Frac 8 の HCV 粒子間での比較においては、Frac 8 の HCV で Frac 6 よりも E1、E2 含量が約 1.5 倍高かった。

## 3. 組換えタンパク質と精製 HCV 粒子の抗体誘導能の比較

精製 HCV 粒子を UV で不活化し、MPL+TDM (Sigma Adjuvant System) をアジュバントとして BALB/c マウスに免疫を行った。比較対象となる組換えタンパク質には J6E1/FLAG および J6E2/FLAG を用いた。前項の検討から、2 pmol HCV-core/head

に相当する E1、E2 タンパク質量は約 20 ng (0.02 $\mu$ g) であることが想定されるため、投与群として、①生理食塩水、②0.02 $\mu$ g J6E2/FLAG、③0.2 $\mu$ g J6E2/FLAG、④2 $\mu$ g J6E2/FLAG、⑤0.02 $\mu$ g J6E1/FLAG + 0.02 $\mu$ g J6E2/FLAG、⑥0.2 $\mu$ g J6E1/FLAG + 0.2 $\mu$ g J6E2/FLAG、⑦シヨ糖密度勾配精製 HCV (Frac 6) 2 pmol HCV-core/head および⑧シヨ糖密度勾配精製 HCV (Frac 8) 2 pmol HCV-core/head と設定し免疫 (n=5) を行った。

次に、得られた各々のマウス血清において、J6E2/Fc タンパク質を抗原とした EIA を行った。免疫開始後 1、3、5 および 7 週の各マウス血清は 3,000 倍および 1,000 倍希釈して測定した。組換えタンパク質を免疫した場合、E1 および E2 を混合して投与しても、E2 単独で投与したマウスと比較して E2 抗体価が上昇することはなかった。また、0.02、0.2 および 2 $\mu$ g/head と投与量の増加に応じて E2 抗体価は高値を示した。前項の検討より、2 pmol HCV-core の HCV 粒子は約 0.02 $\mu$ g に相当する。2 pmol HCV-core/head の HCV 粒子を投与したマウス血清では E2 抗体が誘導され、その抗体価は 0.02 $\mu$ g/head で組換えタンパク質を投与されたマウス血清の抗体価よりも高値を示した。また、HCV 粒子投与群では抗体価の誘導が組換えタンパク質投与群よりも速やかであった。一方、性状の異なる 2 種類の HCV 粒子 (Frac 6 および Frac 8) 間で抗体価の差異は認められなかった。

## 4. 組換えタンパク質と精製 HCV 粒子のワクチン効果の比較

非働化したマウス血清を J6CF の E1E2 を有する HCVpp と混合した後、naïve Huh7 細胞に感染させその感染阻害活性を調べた。その結果、本条件において HCV 粒子を免疫したマウス血清では約 50%の感

染阻害活性を示し、性状の異なる2種類のHCV粒子 (Frac 6 および Frac 8) 間で有意な差は認められなかった。また、組換えタンパク質投与群においては、0.02 および 0.2 $\mu$ g/head の投与群では有意な感染阻害活性は認められず、2 $\mu$ g/head の投与群においてもその活性はHCV粒子投与群と比較して同等以下であった。このことから、精製HCV粒子は組換えタンパク質を免疫原として用いた場合よりも抗体誘導、特に、中和抗体誘導能が高いことが示唆された。

#### 5. アジュバントによるワクチン効果の比較

不活化 J6/JFH1-HCV を抗原として、種々のアジュバントおよびその組合せたものを用いて、2週間おきに4回マウスの腹腔に投与し、最終免疫、1週間後に採血し、E2 タンパク質に対する抗体価を測定した。その結果、あるアジュバント組成 (特許出願中のため詳細を示さず) を使用した時、E2 タンパク質に対する抗体価が増加する事が示された。さらに、同一血清サンプルを使用して、免疫に使用した遺伝子型 2a 以外の遺伝子型の HCV の感染を阻害するかについて検討した。遺伝子型 1a の H77-HCVpp および遺伝子型 1b の TH-JFH1pp を使用して感染阻害活性を測定した結果においても、候補アジュバントは、HCV の感染阻害活性を示す抗体を優位に誘導することが分かった。この結果は、遺伝子型 2a の HCV で免疫して誘導される抗体中には、遺伝子型 2a の HCV の感染を阻害する抗体だけではなく、遺伝子型 1a および 1b の HCV の感染を阻害する抗体も存在することを示している。

#### 6. モノクローナル抗体のエピトープ解析

J6/JFH-1 Frac6 の粒子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。J6E1/Fc+J6E2/Fc タ

ンパク質を固相化したプレートでEIAを行い、エンベロップタンパク質を認識する抗体を産生する20クローンのハイブリドーマを得た。さらにJ6-HCVppを用いて、感染阻害活性を測定した結果、4種類の抗体が感染を阻害することが判明した。濃度依存的な感染阻害を示す2クローンのハイブリドーマが産生する抗体についてエピトープマッピングを行った結果、1種類の抗体はE2タンパク質のペプチドを認識するのに対し、もう1種類の抗体はペプチドを認識しなかった。この結果は、後者はHCVエンベロップタンパク質の立体構造を認識する抗体である可能性を示している。

#### 7. ウイルス粒子の構造解析

ショ糖密度勾配遠心法で精製したウイルス粒子 (JFH-1 および J6/JFH-1) に NP40 を添加し、4 $^{\circ}$ C でインキュベーションし、そのウイルス粒子を再度ショ糖密度勾配遠心法で精製した。精製後、ウイルス標品の総タンパク濃度は非常に低くなった。0.02%以上のNP40を添加するとウイルス粒子様構造は分解され観察されなかった。0.013% NP40の添加では20面体構造とみられる小粒子が観察され、エンベロップを失ったヌクレオキャプシドと考えられた。0.0067%および0.002% NP40の添加により直径約60nm程度のウイルス粒子様構造が確認できた。また、抗E2抗体による免疫電子顕微鏡観察によりウイルス様構造の表面への抗体付着が確認できた。

#### 8. HCVエンベロップ蛋白質の糖鎖機能解析

HCVエンベロップ蛋白質 (E1 および E2) は糖鎖による修飾を受ける。E1には4ヶ所、E2には11ヶ所の糖鎖修飾部位が存在する。293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。この精製 E2 蛋白質の糖鎖構造を質量分析で解析すると複合型であった。

E1 および E2 の糖鎖付加部位アミノ酸を N から Q へ変異させた全長ウイルスを作成し、ウイルス増殖、ウイルス粒子産生および感染性について解析した。その結果ウイルス増殖への影響はなかった。またウイルス粒子産生能は一部のアミノ酸変異ではウイルス粒子産生が低下した。興味深いことに一部のアミノ酸変位ではウイルス粒子産生は変化しないが、ウイルスの感染性の増強が観察された。複数の糖鎖付加部位を変異させたクローンを作製して、ウイルス粒子表面の糖鎖機能の解析をさらに進めている。

#### 9. 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

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 Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションする事により、遺伝子型 2a の感染性トランスパッケージング型粒子の産生が認められた。また 1b の構造蛋白質を用いた場合においても感染性トランスパッケージング型粒子の産生が認められた。また遺伝子型 2a においては、構造蛋白質の発現にアデノウイルスベクターを利用すると、プラスミドトランスフェクションに比べて数十倍の産生効率の向上が認められた。

#### 10. HCV JFH-1 株の長期培養による適応変異ウイルスの分離とその評価

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・培養細胞内ともに高い HCV RNA 量を示し、強い増殖能を獲得していると考えられた。全ゲノム領

域の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 JFH-1 株に導入し、その増殖能に与える影響を評価したところ、通常の JFH-1 株に比べ強い増殖力を示したが、適応変異ウイルスのレベルには達していなかった。

そこで得られた適応変異ウイルスを 96 well plate 中の Huh7.5.1 細胞に 1 FFU/well で感染させ、高増殖性ウイルス株の単離を試みた。感染後、focus の大きさを免疫染色で評価し、さらに増殖しているウイルスを新たな Huh7.5.1 細胞に植え継ぎ高増殖性ウイルス株を単離した。免疫染色により得られた focus のサイズはウェルにより異なり、大きな focus を認めたウェルからは増殖能の強いウイルスが分離された。そこで、最も強い増殖能を示したウイルス株、2G 株と 6B 株の全長ゲノム配列を決定したところ、適応変異ウイルスのダイレクトシーケンスで認めた変異以外に 2G 株で二つの、6B 株で三つの追加の変異が同定された。それらの変異の中で共通の変異が NS5a 領域に認められた。これらの同定された変異を JFH-1 株に導入し、その増殖能を比較してみたところ、これら追加の変異を持った株は通常の JFH-1 株や最初に適応変異ウイルスで同定された三つの変異を持った株に比し、非常に強い増殖能を示した。さらに得られたウイルスを再感染させ、適応変異ウイルスと比較してみたところ、ほぼ同レベルの増殖能を示し、適応変異ウイルスの強い増殖能はこれらの変異によるものと考えられた。

#### 11. 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。

## 12. 新世界ザルへの GBV-B 感染実験

マーモセット 2 頭における GBV-B 感染後約 4 年間にわたる各種マーカーの経時的推移を調べたところ、1 頭では、感染初期より約 3 年後までウイルスゲノム RNA が間歇的に検出されていたがその後検出限界となっている。しかし抗ウイルス抗体価は以前として高い値を示していることから、ウイルスが排除されているのではなく潜伏感染状態にあると考えられる。もう 1 頭ではほぼ感染 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、特にこの 2 年間

は常時  $10^6$  GE/ml を越える高いウイルス RNA 値を示した。これと関連し、抗コア、NS3 抗体価も特にこの 1 年ほど非常に高いレベルで推移していた。その後、感染 228 週において ALT 値の顕著な上昇（感染前の約 300 倍）を認めた。臨床・血液所見で重度の消瘦や貧血、血小板数減少が認められたことから予後不良と判断され安楽殺とし、病理学的解析を行なった。その結果、肝臓全体にびまん性の肝細胞壊死及びリンパ球浸潤・炎症像が認められた。また広汎なコア蛋白陽性像が確認され、これは高ウイルス RNA 値を裏付ける結果であった。上記 HE 染色で繊維化を示唆する組織像が見られたことから、繊維組織特異染色を行なったところ、複数の染色法で高度の繊維化が認められた。以上の結果より、本症例は GBV-B 感染による活動型慢性肝炎の急性増悪と診断された。

## 13. HCV と GBV-B のキメラウイルス構築

昨年度の研究において、HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および pGBB を基に、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 HCV/G c156-E1/E2 を構築した。同キメラクローンは Huh-7 細胞にトランフエクションすることにより細胞内及び培養上清中にウイルスコア蛋白が産生され、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。そこで同キメラクローンから得たウイルスゲノム RNA をアカテタマリン肝臓に接種したところ、低レベルながら 1 年以上の期間にわたって間歇的に plasma 中ウイルス RNA が検出された。従って、c156-E1/E2 はサル個体レベルで複製しウイルス粒子を産生していることが示唆された。また末梢血単核球細胞 (PBMC) からも間歇的に血中ウイルス RNA が検出された。興味深いことに、plasma

およびPBMCにおけるウイルスRNAの動態は必ずしも一致しておらず、このことはPBMCで検出されるウイルスRNAがplasmaのコンタミネーション等によるものではなく、PBMC中でのキメラウイルスの複製を示唆するものと考えられた。

#### 14. poly(I:C)の細胞内への取り込み機構の解析

質量分析により、poly(I:C)-Sepahroseに特異的に結合する122個の蛋白を同定した。その中から、膜蛋白ならびに膜に結合する性質を有する蛋白3個を選択し、siRNAによるノックダウンで機能査定を行った。HEK293細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイで、TLR3を介したIFN- $\beta$  promoterの活性化に関与する新規分子を同定した。HeLa細胞やヒト単球由来樹状細胞でノックダウンを行うと、poly(I:C)刺激によるIFN-b産生は非常に減弱することが判明した。

更にこの分子をノックダウンしたHeLa細胞では、FITC標識したpoly(I:C)の細胞内への取り込みが起きないことが共焦点レーザー顕微鏡での観察より明らかとなった。一方、poly(I:C)同様、クラスリン依存的経路でエンドサイトーシスされるトランスフェリンの運搬には関与していなかった。

強制発現系では、poly(I:C)刺激により細胞質から細胞膜へリクルートされることから、poly(I:C)の取り込みレセプターと協調して細胞内への運搬に関わっていることが明らかとなった。

#### D. 考察

まず、精製HCV粒子に含まれるエンベロープタンパク質を定量し、core:E1:E2の比は1:0.2:0.2程度であることを示した。すなわち、精製HCV粒子構造におけるエンベロープタンパク質の構成比は比

較的低いということが考えられる。この結果を用いて組換えエンベロープ蛋白と不活化HCV粒子をマウスに接種し免疫誘導能を比較したところ、HCV粒子は組換えタンパク質よりも中和抗体誘導能が高いことが示唆された。また、組換えタンパク質のワクチンとしての効果を確認する目的で組換えE1およびE2の混合サンプルを調製しマウスに投与する試験も行ったが、組換えE2単独投与と比較して中和抗体の誘導が上昇することはなかった。免疫マウス血清の中和活性は、抗E1およびE2抗体以外の抗体の作用である可能性も否定できず、さらに精製を行い、より精製度の高いHCV粒子のワクチン効果を調べていく必要がある。

一方、HCV粒子はショ糖密度勾配超遠心で感染力価の異なる画分に分離される。これらの性状の異なる粒子の免疫原性を比較したところ、いずれも大きな差は認められなかった。感染力価の高い画分のHCV粒子のエンベロープ量を定量すると、感染力価の低い画分のHCV粒子と比較して約1.5倍高いことが示唆され、感染力価の違いにエンベロープ量に関与していることも想定されるが、抗体誘導には大きな差がなくワクチン抗原としての差異は現時点では認められない。

本検討で用いたアジュバントSIGMA Adjuvant Systemは、monophosphoryl lipid A (MPL)とtrehalose dicorynomycolate (TDM)が混合された免疫賦活作用が強いマウス用アジュバントである。ヒトへの応用を考えた場合、アジュバントおよびそれに応じた投与経路の選定も必要となる。そのため、臨床応用に適応可能なアジュバントを用いて、より効果的なアジュバントの探索を行った。その結果、MPLに匹敵するアジュバントの組合せが見出された。今後さらに効果的なアジュバントの組合せを探索する。

今回得られたモノクローナル抗体の一つは、興味深いことに、エンベロープタンパク質の10アミノ酸残基からなるペプチドを認識しないことから、直鎖状エピトープでなく、エンベロープタンパク質の立体構造（コンフォメーション）を認識する抗体であることが示唆された。このような抗体は、Native formの抗原を認識することから、感染阻害抗体としての効果が期待できる。

昨年度の研究から、現在の精製法により得られる精製ウイルス粒子には夾雑物が多く含まれることがわかってきた。これはウイルス粒子の性質にもよるが宿主由来の脂質や蛋白質が付着していると考えられる。これらの宿主因子はHCVの感染性にも影響していると考えられ、その機能について解析する必要がある。一方でこれらの夾雑物はウイルス粒子の形態解析を阻害する。そこでその影響を避けるために、界面活性剤を添加することによりウイルス粒子に付着する夾雑物の除去を試みた。一定濃度以上の界面活性剤を添加するとウイルス粒子自体も破壊され粒子構造物は観察されなくなるが、濃度を薄くしていくことにより、ヌクレオキャプシド構造およびウイルス粒子構造が観察できた。抗E2抗体を用いた免疫電子顕微鏡によりこれらのウイルス粒子がHCV粒子であることを確認できた。クライオ電顕などをおこなうためさらにウイルス粒子の精製を試みている。

また、HCVのエンベロープ蛋白質にはE1に4ヶ所、E2に11ヶ所と多くの糖鎖付加部位がある。しかし、この糖鎖がどのような構造をして、どのような役割を果たしているかは明らかでない。そこで、精製エンベロープ蛋白質に付加している糖鎖構造を解析したところ複合型であることがわかった。さらにウイルス粒子状の糖鎖機能を解析する

ために、糖鎖付加部位を欠損するウイルス株を作製してその複製増殖感染機能を検討した。1ヶ所ずつの糖鎖欠損では複製能に影響はなかったが、ウイルス粒子の産生が低下する変異が存在した。さらに興味深いことにウイルスの感染性を増強する変異が見られた。一部の糖鎖は感染に必要な構造をマスクしている可能性が考えられる。現在糖鎖付加部位をすべて欠損するウイルスを作成してその機能を検討中である。

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、感染性を有するトランスパッケージング型粒子の産生が認められた。coreからNS2領域をJFH-1以外の配列を用いても、感染性粒子の産生が認められる事から、様々な遺伝子型の粒子の産生が可能であると考えられた。またこのシステムは、感染中和等の迅速な評価が可能となるだけでなく、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。

HCV JFH-1株を長期培養することにより強い増殖能を持つ適応変異ウイルスを得た。この強い増殖能に関与する適応変異はダイレクトシーケンス法では同定されず、このウイルスをクローニングし、増殖能の高いウイルス株を単離することによってのみ同定し得た。これは、長期培養により得られた適応変異ウイルスが単独株ではなく、複数の株が混在し、いくつかの適応変異が影響しているためと考えられる。実際に今回の検討では少なくとも二種類の強い増殖能を持つ株が適応変異ウイルス集団の中に存在し、それぞれの株が異なった適応変異を持っていることがわかった。従って同程度の増殖能を持つこれら二つの株がお互いの適応変異をマスクするためダイレクトシーケンス法では同定されな

かったと考えられる。さらに、これらの株ではNS5a領域に共通変異を認め、この部位は適応変異ウイルスのダイレクトシーケンスの結果では塩基配列がミックスになっていた。従ってこれら二種類のウイルス以外にも、ほぼ同レベルの増殖能を持つがNS5a領域のこの部位に変異を持たないウイルス株が存在していると推定される。

今回の結果において、GBV-Bはマーマセットへの感染により長期に渡り持続感染し、さらに慢性C型肝炎と同様の病態（ウイルス血症、間欠的ALT上昇、肝繊維化、炎症性リンパ球浸潤）を呈した。これまでの報告では、最大でも2年程度の持続感染例が数例ある程度であり、今回のような慢性C型肝炎様の病態は認められていなかった。本研究は、マーマセットへのGBV-B感染により慢性C型肝炎、特に活動性の急性増悪例に極めて近似した病態を示す初めての知見であり、昨年度の研究成果（抗ウイルス免疫応答からのエスケープ変異を示唆するアミノ酸復帰変異や連続変異）と併せて、今後のC型肝炎研究において極めて貴重な動物モデルとなることが期待される。

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。今回のサル個体による接種実験結果より、低レベルながら1年以上の期間にわたって間歇的にplasma中ウイルスRNAが検出された。従って、HCV/Gキメラウイルスクローンはサル個体レベルで複製し低レベルながらウイルス粒子を産生していることが示唆された。ただし、血中ウイルス粒子が感染性を有しているのかについては更なる検証が必要であり、

今後は初代サル肝細胞培養系を確立しキメラウイルスクローンの最適化を進め、最終的にサルで効率良く増殖するクローンの構築を目指したい。

Poly(I:C)の取り込みに関して、これまでに①マウスマクロファージではCD14、②ヒト上皮細胞ではScavenger receptor Aが取り込みに関与することが報告されている。しかし、樹状細胞はCD14を発現していないこと、Scavenger receptorの阻害剤でpoly(I:C)刺激によるIFN- $\beta$ 産生が変化しないことから、樹状細胞においてはこれらと異なる取り込みレセプターが存在すると考えられる。今回新たに同定された分子は取り込みレセプターそのものではなく、取り込みレセプターと協調して取り込みに関与すると考えられる。Poly(I:C)がアジュバント活性を示すには、骨髄系樹状細胞に取り込まれエンドソームTLR3を活性化することが重要である。今後、樹状細胞に発現する取り込みレセプターを同定し、poly(I:C)の細胞内分配とエフェクター活性の関連を明らかにする予定である。

## E. 結論

①ポアサイズ 500 kDa のホローファイバー（限外濾過膜）を用いて濃縮し、ショ糖密度遠心分離することで、HCV粒子は高純度に精製された。

②精製HCV粒子は core : envelope = 1 : 0.1~0.2のモル比で、構造タンパク質が存在すると考えられた。

③精製J6/JFH-1キメラHCV粒子免疫マウスでは抗エンベロープ抗体が誘導され、遺伝子型1のHCV感染阻害活性も有していた。また、免疫原性は組換えタンパク質よりも高いことが示唆された。

④評価したアジュバントにおいて、MPL+TDMと同程度に感染中和活性を誘導するものが認められた。

⑤精製J6/JFH-1キメラHCV粒子免疫マウスから感

染阻害活性を有する抗体を取得した。本抗体の一つは立体構造エピトープを認識することが示唆された。

⑤界面活性剤の添加により、より精密に HCV 粒子を電子顕微鏡で観察することができた。

⑥エンベロープ蛋白上の糖鎖は複合型であった。また、糖鎖付加部位を欠損したウイルスも感染複製増殖が可能であった。ウイルス粒子産生能、感染性の変化が観察された。

⑦ 2 種類のプラスミドのトランスフェクションにより、遺伝子型 2a および 1b の single-round な感染性トランスパッケージング型粒子の産生に成功した。アデノウイルスベクターの利用により、粒子の産生量はさらに数十倍向上した。

⑧培養細胞での長期培養により強い増殖能を持つ JFH-1 株の適応変異ウイルスを分離した。その責任領域となる適応変異はこのウイルスを限界希釈法によりクローニングすることで同定可能であった。この方法は JFH-1 株の増殖複製を増強する適応変異の同定に有用であると考えられた。

⑨GBV-B がマーマセット感染によりヒトと極めて近似した慢性 C 型肝炎を呈するなど、HCV と同様の病原性を有することを示した。サル個体レベルでの複製性を有する HCV/G キメラウイルスの構築に関する成果と併せて、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。

⑩ Poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hazari S, Chandra PK, Poat B, Datta S, Garry RF, Foster TP, Kousoulas G, Wakita T, Dash S.

- Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. *Virology*. 2010 7(1):36.
2. Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 392(3):397-402.
3. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res*. 2010 85(3):520-524.
4. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology*. 2010 398(1):57-67.
5. Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol*. 2010 91(1):122-32.
6. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD+. *J Biol Chem*. 2010, 285(2):845-54.
7. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*. 2009;154(10):1671-7.
8. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol*. 2009 47(12):4141-3.
9. Kato N, Mori K, Abe KI, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res*. 2009 146(1-2):41-50.
10. Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production

- of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy*. 2009 5(7):937-45.
11. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* 2009 83(2):112-7.
  12. Kang JI, Kim JP, Wakita T, Ahn BY. Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. *Virus Res.* 2009 144(1-2):107-16.
  13. Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol.* 2009;154(5):801-10.
  14. Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 2009;154(5):765-73.
  15. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 83(10):5137-47.
  16. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, 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.* 2009 106(6):1123-35.
  17. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem.* 2009 284(14):9237-46.
  18. 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)
  19. 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)
  20. 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)
  21. 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 PA28 $\gamma$ -dependent. *Journal of Virology* 83: 2389-2392 (2009)
  22. 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.
  23. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H., Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. **Retrovirology** 6, 1, 2009.
  24. 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.
  25. Iwasaki Y, Akari H., Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science** 100, 778-781, 2009.
  26. Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H., Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. **Journal of Cellular Physiology** 221, 458-468, 2009.
  27. Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T,

- Nomaguchi M, Adachi A, Akari A, Nakayama EE: Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. **Retrovirology** 6, 70, 2009.
28. Matsumoto Y, Miura T, Akari H, Goto Y, Haga T: Peripheral blood CD4 CD8 double-positive T cells of rhesus macaques become vulnerable to Simian Immunodeficiency Virus by *in vitro* stimulation due to the induction of CCR5. **Journal of Veterinary Medical Science**, in press.
29. 明里宏文: 霊長類飼育実験施設におけるバイオセーフティ. NBR Newsletter vol.5, no.2, 2-5, 2009.
30. 明里宏文: 新しいC型肝炎の霊長類モデル. 生き物たちのつづれ織り 第3巻、153-158, 2009.
31. Seya, T., and Matsumoto M. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. **Cancer Immunol. Immunother.** 58:1175-1184 (review).
32. 2. Seya, T., Matsumoto M, Ebihara T, and Oshiumi H. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. **Immunol. Reviews** 227: 44-53 (review).
33. Oshiumi, H., Matsumoto M, Hatakeyama S, and Seya T. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. **J. Biol. Chem.** 284: 807-817.
34. Akao Y., Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, and Seya T. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. **Cancer Science** 100: 1494-1501.
35. Iwakiri, D., Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, Imai S, Fujieda M, Kawa K, and Takada K. 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. **J. Exp. Med.** 206: 2091-2099.
36. Takaki, H., Oshiumi H, Sasai M, Kawanishi T, Matsumoto M, and Seya T. 2009. Oligomerized Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1 in the cytoplasm recruits nuclear adenovirus 5 E1A-binding protein to enhance NF- $\kappa$ B activation and type I IFN induction. **Eur. J. Immunol.** 39: 3469-3476.
37. Kubota, N., Ebihara T, Matsumoto M, Gando S, and Seya T. 2010. IL-6 and IFN- $\alpha$  from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. **BBRC** 391: 1421-1426.
38. Sasai, M., Tatematsu M, Oshiumi H, Funami K, Matsumoto M, and Seya T. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. **Molec. Immunol.** (in press)
39. Seya, T., Shime H, Ebihara T, Oshiumi H, and Matsumoto M. 2010. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. **Cancer Sci.** 101: 313-320 (review).
2. 学会発表
1. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系とその応用」第28回広島山口肝疾患研究会、リーガロイヤル広島(2009, 4.4)
2. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究結果について」, 第165回袋井病診カンファレンス、袋井市民病院(2009, 4.20)
3. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究と新規治療法開発」, Hep C Forum 2009 KANAZAWA、石川県文教会館ホール(2009, 6.13)
4. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩」, 第12回臨床肝臓研究会、ザ・ナハテラス(2009, 9.25)
5. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖に関する話題」, 第6回京滋ウイルス性肝炎研究会、ホテルグランヴィア京都(2010, 2.6)
6. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩とその応用」, 第6回九州C型肝炎研究会、ホテル日航福岡(2010, 2.20)
7. 相崎英樹、脇田隆字、感染性HCV粒子形成における宿主生体膜の役割、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、シンポジウム1「C型慢性肝炎におけ

- る宿主とウイルスの interaction]
8. 加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ワークショップ3「C型肝炎の基礎と臨床」
  9. 脇田隆宇、肝炎ウイルス基礎研究、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、(2009, 6.4-5)、ハイライトレクチャー
  10. 鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構、第13回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、(2009, 10.14-16)、パネルディスカッション13「肝炎ウイルス研究の新展開-新しい治療戦略を目指して」
  11. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)、ワークショップ7 ウイルス粒子形成
  12. 石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、藤田順一、田中輝明、清水洋子、脇田隆宇、鈴木 操、江角真理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN 発現系を用いたC型肝炎ウイルス粒子 JFH1 の感染実験、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  13. 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  14. 渡邊則幸、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 タンパク質の糖鎖機能の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  15. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)
  16. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野國勝、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  17. 久島透嘉、脇田隆宇、土方 誠、coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  18. 有海康雄、黒木美沙緒、牧正敏、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  19. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  20. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎、オートファジーはHCV粒子産生に関与している、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  21. 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、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、日本ウイルス学会第57回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  22. Wakita T. HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan (2009, 9.29)
  23. Wakita T. HCV cell culture system and antiviral development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan (2010, 2.19)
  24. Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  25. Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, 16th