International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009

26. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T. HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
27. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
28. Carpenter A, Podevin P, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Saidi S, Hernandez C, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset F, Bartenschlager R, Wakita T, Conti F, Calmus Y, Rosenberg AR. HCV grown in primary human hepatocytes has higher specific infectivity and lower buoyant density than HCV grown in Huh-7 cell line. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
29. Saulnier A, Groult G, Ghibaudo D, Wakita T, Cohen L, Marnata C, Martin A. Analysis of particle assembly from chimeric HCV JFH-1 genomes expressing E1-E2-p13 of GB virus B. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
30. Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Garcin D, Gatignol A, Wakita T, Meurs E. HCV induces IFN at the early steps of infection. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. 岩崎優紀、森　健一、槇　昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、片貝祐子、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B長期持続感染サルのウイルスゲノム解析、第４５回日本肝臓学会総会、平成２１年６月、神戸
40. 岩崎優紀、森　健一、槇　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：マーモセットを用いた 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
41. 森　健一、深井浩未、明里宏文、田中榮司、槇　昇：HCV 動物モデルの樹立に向けて（HCV/GBV-B キメラウイルス）第４５回日本肝

臓学会総会（神戸）平成２１年６月

42. 深井浩未、森　健一、岩崎優紀、吉田友教、明里宏文、田中榮司、槇　昇：C 型肝炎ウイルス動物モデル(HCV/GBV-B キメラウイルス)第５７回ウイルス学会（東京）平成２１年１０月
43. Matsumoto M., Itoh H, and Seya T.,: The TIR domain determines cellular localization of human Toll-like receptor 8, (Osaka) Immune Regulation: Present and Future, 2009.5.25-27
44. 宮下萌子、押海裕之、松本美佐子、瀬谷　司: RNA ウイルスに対する自然免疫応答に関与する新たな DEAD box 型ヘリケース DDX60 の機能解析、第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（京都）、2009. 6. 26-27
45. 3. 押海裕之、松本美佐子、瀬谷　司：自然免疫系で働く DDX3 分子を C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質が阻害し、I 型インターフェロン産生を抑制する新たな仕組み、第 57 回日本ウィルス学会学術集会（東京）、2009. 10. 25-27（口頭）
46. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷　司：HCV 感染による TLR3 経路の活性化と NK 細胞の誘導、第 57 回日本ウィルス学会学術集会（東京)、2009. 10. 25-27（ワークショップ）
47. Azuma M.,Ebihara T.,Kubota N.,Matsumoto M., and Seya T.: Regulation of crosspresentation through the TLR3/TICAM-1 pathway in mDC, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)、2009.12.2-4
48. Tatematsu M., Watanabe A., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M.: Structural and functional analysis of TICAM-1, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪)、2009.12.2-4（口頭）
49. 渡部綾子、瀬谷　司、松本美佐子：Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)、2009. 12. 2-4（口頭）

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

特許出願

1. 発明の名称：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　出願番号(PCT 出願)：PCT/JP2009/067051 出願日：2009. 9. 30 発明者：渋谷悠子、中村紀子、脇田隆字
2. 発明の名称：M161Ag からなるサイトカイン誘発剤、登録番号：2,320,656、発明者：瀬谷司、松本美佐子、登録日：2009 年８月４日、出願人：JST

Ⅱ．分担研究報告

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）

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で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．感染性 HCV の大量培養。

5×10^5 個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV(J6/JFH-1)濃縮液を multiplicity of infection(MOI)が 0.2 となるように 500 μL の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、37℃でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して DMEM-10 を 8 mL 添加、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm^2 フラスコ (Corning) 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。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM に培養液交換した。その 3 日後に培養上清を回収し、650 mL の培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、添加を行い、さらに 2 日後、培養液を回収する操作を行い、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℃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UFP-500-C-8A (GE Healthcare) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 40 倍濃縮した。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。

ショ糖密度勾配遠心：

10-60% (w/v) ショ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (Beckman) に 60%、50%、40%、30%、20%および 10%ショ糖/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。重量を測定しバランスを合わせた後、SW28 ローターにて 28,000 rpm、4℃、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ) を用いて下部を穿刺し、1.5 mL チューブに約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。予め重量を測定しておいた 1.5 mL チューブに 100 μL の各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。

各分画液から QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により HCV-RNA を定量した。また、HCV コア定量キット (オーソ) により HCV-core タンパク質を定量した。感染力価は、DMEM-10 で希釈した各分画液について測定した。

ショ糖密度勾配遠心によって分離された分画のうち、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、Amicon Ultra-15 (100,000 MWCO) を用いて濃縮し、PBS への溶液交換を行った。各々の調製された HCV 粒子は HCV-core タンパク質、HCV-RNA、感染力価および総タンパク質濃度を測定し、使用まで-80℃で保存した。

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。ポリ-D-リジンコート 96 ウェルプレート (Corning) に 1×10^4/well で Huh7.5.1 細胞を播種し、翌日に DMEM-10 で段階希釈した被検サンプルを添加して、37℃、72 時間インキュベートした。培養液をピペットで除き、100 μL PBS で 2 回洗浄した後、メタノール (一級、Wako) に浸して、-20℃にて 15 分間固定した。固定後のプレートは染色に使用するまで-80℃で保存した。染色の際は、プレートを室温に戻した後、PBS で 2 回洗浄した。ブロックエース (大日本住友製薬) に終濃度 0.3% (v/v) Triton X-100 (MP Biomedicals) を 100 μL/well で添加し、室温、1 時間インキュベートしてブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄後、ブロックエースにて 1 μg/mL に希釈したマウス抗 HCV Core 抗体 2H9 を 100 μL/well で添加し、室温、1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、ブロックエースにて 5 μg/mL に希釈した Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) を 100 μL/well で添加し、室温、1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、100 μL/well で PBS を添加し、蛍光顕微鏡 IX70 (オリンパス) で観察し、発光したフォーカスをカウントした。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．HCV シュード粒子（HCVpp）の作製

HCV のエンベロープタンパク質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。2.5×10^6 個の 293T 細胞を 10 cm コラーゲンコートディッシュ（IWAKI）に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6（Roche）を用いて 3 μg の MMLV Gag-Pol 発現ベクター（Gag-Pol）、3 μg の LTR カセット挿入 luciferase 発現ベクター（Luc126）および 1 μg の HCV E1E2 発現ベクター（pcDNAdeltaC-E1-E2）をトランスフェクションし、6 時間後に培養液を DMEM-10 に交換した。48 時間培養後の培養上清を回収し、0.45 μm フィルターで濾過して使用まで-80℃で保存した。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.）を作製し同様に保存した。

５．精製 HCV 粒子のマウスへの免疫

4 週齢雌性 BALB/c マウスは日本クレアより購入し、国立感染症研究所動物管理区 SPF 感染実験区に搬入した。投与する精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。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。採血後すぐに血清分離剤入りの 1.5 mL チューブに添加し、5 回転倒混和して 30 分間以上室温で静置した。血清分離剤は BD バキュテイナ SST Ⅱ採血管（日本ベクトンディッキンソン）のものを 1.5 mL チューブに約 50 μL ずつ分注して使用した。その後、1,200×g、10 分間室温で遠心分離し、上清に分離された血清を新しい 1.5 mL チューブに移して使用まで-80℃で保存した。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。投与群は①生理食塩水（n=5）、②0.02 μg J6E2/FLAG (n=5)、③0.2 μg J6E2/FLAG (n=5)、④2 μg J6E2/FLAG (n=5)、⑤0.02 μg J6E1/FLAG + 0.02 μg J6E2/FLAG（n=5）、⑥0.2 μg J6E1/FLAG + 0.2 μg J6E2/FLAG (n=5)、⑦ショ糖密度勾配精製 HCV（Frac 6） 2 pmol HCV-core/head (n=5) および⑧ショ糖密度勾配精製 HCV (Frac 8) 2 pmol HCV-core/head (n=5) とした。

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。

６．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 μl 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。

７．マウス血清の感染阻害活性の測定

感染阻害実験は HCVpp を用いて行った。2×10^4 個の Huh7.5.1 細胞を 48-well プレート（IWAKI）に播種し、一昼夜培養後、接種材料を感染させた。前項で得られたマウス血清は 56℃、30 分間イン

キュベーションすることで非働化した。HCVpp または感染性 HCV 粒子と終濃度 1% (v/v) 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℃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。細胞のライセートは、PBS でウェルを洗浄後、40 μL/well の 1×Cell Culture Lysis Reagent (Promega) を添加して調製した。

HCVpp の感染は上記ライセートの 20 μL を Luciferase Assay System (Promega) 50 μL と反応させ、撹拌後直ちに Lumat LB9507 (Berthold) を用いて 10 秒間の発光値を測定することで評価した。

8．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 タンパク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。次ぎに、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。

(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．HCV 粒子大量精製

感染性 HCV を含む培養上清を限外濾過およびショ糖密度勾配遠心で精製を行った。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った。得られたサンプルのうち 276 mL を 10-60%ショ糖密度勾配による超遠心分離に使用し、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ープタンパク質量の概算

組換えタンパク質と HCV 粒子の免疫原性の比較を行う目的で、まず、精製 HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量を概算した。精製 HCV 粒子の E1 および E2 量を調べるために、組換え J6E1/FLAG および J6E2/FLAG タンパク質を指標として、抗 E1 および E2 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。また、HCV 粒子のアプライ量の確認のために抗 core 抗体を用いた検出も行った。その結果、HCV 粒子は Frac 6 および Frac 8 ともに同等のバンド強度を示した (Frac 6:Frac 8 = 1:0.96)。組換え E1 および E2 の各々について 1～30 ng のアプライ量に対する検量線を作成し、HCV core タンパク質量 0.5 pmol の HCV 粒子における E1 および E2 タンパク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 タンパク質の構成比はモル換算 (E1 分子量 : 37,000、E2 分子量 : 70,000) 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ープタンパク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。5 週齢雌性 BALB/c マウスに各種 HCV 粒子を隔週で 4 回腹腔内投与し、投与後 1 週毎に採血を行って血清を分離した。投与量は、2 pmol HCV-core/head で実施した。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 μg) であることが想定されるため、投与群として、①生理食塩水のみ、②0.02 μg J6E2/FLAG、③0.2 μg J6E2/FLAG、④2 μg J6E2/FLAG の E2 単独投与群、および、⑤0.02 μg J6E1/FLAG + 0.02 μg J6E2/FLAG、⑥0.2 μg J6E1/FLAG + 0.2 μg J6E2/FLAG の E1E2 混合投与群を設定し免疫 (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 μg/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 μg 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 μg/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。HCVpp と混合する血清は 1/100 量とした。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 μg/head の投与群では有意な感染阻害活性は認められず、2 μg/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、血清を調整した。血清を 10,000 倍希釈し、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、エンベロー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、10 アミノ酸残基からなるペプチドを用いて、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、該抗体が HCV エンベロー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。

D. 考察

我々は、これまでに遺伝子型 2a キメラ HCV である J6/JFH-1 を用いた精製方法の検討を行い、大量のサンプルからポアサイズ 500 kDa のホローファイバーを使用した濃縮・粗精製の後、ショ糖

密度勾配遠心で分画することでウイルス成分と夾雑タンパク質を比較的効率よく分離することが可能であること、さらに、この工程で得られた精製 HCV 粒子がマウスにおいてワクチン能を有することを確認してきた。

一方では、近年、組換えタンパク質でもワクチン効果が期待できることが示されている。HCV の組換え E1E2 タンパク質を成分ワクチンとしてマウスまたはモルモットに免疫投与した場合に、それらの血清は感染中和能を有するというものである。そこで、本検討では、組換えタンパク質と精製 HCV 粒子の免疫原性を比較することを目的とした。

まず、精製 HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質の定量を試みたところ、E1、E2 タンパク質ともに約 10 ng/fmol HCV-core であり、分子量（core:20,000、E1:37,000、E2:70,000）から換算すると、core:E1:E2 の比は 1:0.2:0.2 程度であることが示唆された。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。これまでの検討における、ワクチン効果を示す HCV 粒子の免疫投与量は 2 pmol HCV-core/匹であり、エンベロープタンパク質量に換算すると約 20 ng/匹となる。そこで、本検討では、マウスに免疫投与する抗原量として、エンベロープタンパク質は 20～2,000 ng/匹、HCV 粒子は 2 pmol HCV-core/匹とした。その結果、20 ng/匹のエンベロープタンパク質の投与では抗体誘導も十分ではなく、投与されたマウス血清の中和活性も認められなかった。また、組換え E2 タンパク質を 2,000 ng/匹で投与した場合と比較しても中和活性の誘導は HCV 粒子のほうが高かった。このことから、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。

HCV 粒子をマウスに免疫した場合、E2 抗体だけではなく E1 抗体も誘導される。本検討では、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。結果として、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。それと比較して、不活化 HCV 粒子を投与した場合は中和抗体の誘導が高かった。精製 HCV 粒子は総タンパク質として Frac 6 で 17.6 μg/匹、Frac 8 で 103.7 μg/匹のタンパク質量を投与している。したがって、ウイルスタンパク質以外のタンパク質が未だ多く含まれていることが考えられる。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ない。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（Frac 6 および Frac 8）に分離される。そのような性状の異なる粒子の免疫原性を比較するために、同一の HCV-core タンパク質量（2 pmol/匹）の HCV 粒子をマウスに投与し血清中の E2 抗体および感染中和活性を調べたところ、いずれも大きな差は認められなかった。感染力価の高い Frac 8 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 Frac 6 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が関与していることも想定される。しかしながら、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。ワクチンを投与されたマ

ウスからモノクローナル抗体を作製し、エピトープの多様性などを調べることで、ワクチン抗原としての差異が見出される可能性もある。

精製 HCV 粒子はエンベロープタンパク質より高いワクチン効果を持つことが示唆されたが、今後は in vivo でのワクチン効果を示していく必要がある。その手段として、HCV が感染可能な動物モデルを用いた感染阻害実験がある。チンパンジーは HCV が感染する唯一の動物として知られているが、実験動物としての規制があり実施が困難である。近年、免疫不全マウスにヒトの肝臓を生着させたヒト肝臓キメラマウスが作製され、ウイルス肝炎のモデル動物として用いられるようになった。本マウスは免疫不全マウスであるためワクチン投与や感染に応じた免疫反応は望めないが、例えば、HCV の感染を中和する IgG を本マウス血中に導入、あるいは、ワクチン投与後の正常マウスの脾臓細胞をヒト肝臓キメラマウスに移植した後に HCV を感染させ、感染中和されるか否かを調べることで、感染防御としての in vivo ワクチン効果を示すことができると考えている。

我々は別の実験で、ワクチン免疫されたマウス血清から精製した IgG は in vitro で HCVcc 感染中和活性を持つことを見出している（データは示さず）ので、この中和 IgG を上記の実験に使用する計画を立てている。

J6/JFH-1 ウイルス粒子ワクチンは他の遺伝子型の HCV 感染も阻害することから、遺伝子型に依らない汎用性ワクチンとしての可能性がある。一方で、解決すべき問題点も残されており、①ワクチン作製に使用する培養細胞の選定、②生産性・精製度の向上、がある。作製に用いた培養細胞はヒト肝癌細胞である Huh7 細胞であるため、ワクチンに癌原性物質の混入の危険性もある。現在のところ、感染性 HCV 粒子を効率良く産生するには、HCV JFH-1 株と Huh7 細胞の組み合わせを逸脱することはできない。先述のように、作製された HCV 粒子に含まれるエンベロープタンパク質量は比較的低く、抗原としてはさらにエンベロープ量を増加させた粒子を用いることでワクチン効果を増強させることができるかもしれない。ひとつは、エンベロープタンパク質をトランスで発現させた細胞で HCV 粒子を作製することでエンベロープ量の多い粒子を作製する方法を試みることが挙げられる。もうひとつは、ウイルスベクターと Huh7 以外の培養細胞を用いた HCV 様粒子の作製を試みることも手段として考えられる。後者であれば、上記問題点を克服できる可能性がある。

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（詳細は特許出願中につき示さない）。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。

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。

F. 研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

1） Immunogenicity of recombinant hepatitis C virus particles in mice with several adjuvants
Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Noriaki Omi, Noriko Nakamura, Tetsuro Suzuki, Koji Ishii, Takaji Wakita
16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2009.10.3-7 NICE

2）培養細胞由来C型肝炎ウイルス粒子を利用したワクチンの免疫による感染阻害活性の誘導
赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、渋谷悠子、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字
第１３回日本ワクチン学会、2009年９月、北海道。

3）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
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
第 57 回日本ウイルス学会学術集会　2009 年 10 月、東京。

4）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
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
第 57 回日本ウイルス学会学術集会　2009 年 10 月、東京。

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

1）発明の名称：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
出願番号(PCT 出願)：PCT/JP2009/067051
出願日：2009.9.30
発明者：渋谷悠子、中村紀子、脇田隆字

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）

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　隆字

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

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しょ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。

２．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。

（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。さらにしょ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ょ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、エンベロー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。

２．ＨＣＶエンベロープ蛋白質の糖鎖機能解析

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。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。

D. 考察

本年度はウイルス粒子の界面活性剤による精製により得られる、ウイルス標品の電子顕微鏡による解析とエンベロープ蛋白質の糖鎖付加部位の変異によるウイルス複製増殖および感染性への影響を解析した。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。従って、ウイルス粒子上には多くの糖鎖が存在している。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．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。
2．エンベロープ蛋白上の糖鎖は複合型であった。
3．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。

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. Virol J. 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.

２．学会発表および講演など

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型肝炎ウィ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、脇田隆字、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．脇田隆字、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、脇田隆字、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、脇田隆字、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、脇田隆字、鈴木操、江角眞理子、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、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. 渡邉則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、加藤孝宣、鈴木哲朗、脇田隆字、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、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、脇田隆字、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、脇田隆字、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、圃迫浩方、脇田隆字、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、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、脇田隆字、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、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. T Wakita. HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan (2009, 9.29)

23. T Wakita. HCV cell culture system and

antiviral development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan (2010, 2. 19)

24. M Yamamoto, H Aizaki, K Goto, K Hamano, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)

25. H Aizaki, M Yamamoto, K Goto, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, Nice, France (2009, 10. 3-7)

26. Y ARIUMI, M KUROKI, M MAKI, M IKEDA, H OANSAKO, T Wakita, N KATO, THE ESCRT PATHWAY IS REQUIRED FOR HCV PRODUCTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)

27. A CARPENTIER, P PODEVIN, V PENE, L AOUDJEHANE, M CARRIERE, S ZAiDI, C HERNANDEZ, JF MERITET, O SCATTON, M DREUX, F COSSET, R BARTENSCHLAGER, T WAKITA, F CONTI, Y CALMUS, AR ROSENBERG, HCV GROWN IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES HAS HIGHER SPECIFIC INFECTIVITY AND LOWER BUOYANT DENSITY THAN HCV GROWN IN HUH-7 CELL LINE, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)

28. A SAULNIER, G GROULT, D GHIBAUDO, T WAKITA, L COHEN, C MARNATA, A MARTIN, ANALYSIS OF PARTICLE ASSEMBLY FROM CHIMERIC HCV JFH-I GENOMES EXPRESSING EI-E2- p13 OF GB VIRUS B, Nice, France (2009, 10. 3-7)

29. R SUZUKI, K SAITO, T ANDO, K ISHII, Y MATSUURA, T MIYAMURA, T WAKITA, T SUZUKI, PLASMID-BASED PRODUCTION OF TRANS-COMPLEMENTED HCV PARTICLES: ITS USE FOR FUNCTIONAL ANALYSIS OF NS2, Nice, France (2009, 10. 3-7)

30. N ARNAUD, S DABO, P MAILLARD, A BUDKOWSKA, D GARCIN, A GATIGNOL, T WAKITA, E MEURS, HCV INDUCES IFN AT THE EARLY STEPS OF INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)

31. M MORIYAMA, D AKAZAWA, N OMI, Y SHIBUYA, K NISHIMURA, N NAKAMURA, H MOCHIZUKI, T SUZUKI, K ISHII, T WAKITA, VACCINATION OF INFECTIOUS HCV PARTICLES WITH SEVERAL ADJUVANTS AND INDUCTION OF NEUTRALIZATION IMMUNOGLOBULIN IN MICE, Nice, France (2009, 10. 3-7)

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

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

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Huh7.5.1細胞にトランスフェクションする事により、single-roundな感染性のトランスパッケージング型粒子を産生させる事に成功した。用いる構造蛋白質の配列を変える事により、遺伝子型2aだけではなく、1bの感染性粒子も産生出来た。構造蛋白質の遺伝子導入法においてアデノウイルスベクターを用いると、感染性粒子の産生量はさらに数十倍高まる事が認められた。この感染性トランスパッケージング型HCV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、現在のウイルス保留者数は世界で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バ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JFH-1株のレプリコンを基に、複数の遺伝子型の構造蛋白質を用いて感染性トランスパッケージング型粒子産生の検討を行った。

B．研究方法

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の遺伝子を挿入したもの）cDNAをpolI promoter/terminater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。

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。