D．考察

本研究により、HCV の構造蛋白質発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを Huh-7 細胞にトランスフェクションする事により、感染性を有する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。

E．結論

2 種類のプラスミドのトランスフェクションにより、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。

G．研究発表

論文発表

1. Saeed, M., Suzuki, R., Moriishi, 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.** 47: 4141-4143 (2009).
2. 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.
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

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 praticles 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、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
14. 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

H．知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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

HCV 大量培養法にむけた JFH-1 株の培養細胞内適応変異の解析

分担研究者　国立感染症研究所ウイルス第二部　室長　加藤　孝宣

研究要旨　C型肝炎ウイルス(HCV) JFH-1 株の発見により、人工的に培養細胞中で HCV 粒子の合成が可能になり、この合成ウイルス粒子を用いた感染予防用ワクチンの開発が期待されている。この粒子を用いてワクチンを作製するためには大量のウイルス粒子が必要であると考えられるが、通常の JFH-1 株と Huh7 細胞の組み合わせで得られるウイルス粒子量には限界がある。そこで JFH-1 株を培養細胞で長期培養し、得られた適応変異ウイルスをクローニングすることにより HCV の増殖能を増強する変異を同定することで、効率の良い HCV 粒子生成システムの構築を試みた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中に多くの感染者が存在し、いったん感染すると高率に慢性化し、慢性肝炎から肝細胞癌に至る重大な感染症の一つである。現在、インターフェロンを中心とした治療が行われているが、そのウイルス排除率は十分ではなく重篤な副作用も報告されている。HCV感染の拡大防止のためには新規感染者を減少させることが必要であり、感染予防ワクチンの開発が期待されている。

近年、JFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、培養細胞中でこのウイルスのライフサイクルの観察が可能となった。さらにこのシステムを利用し、HCV粒子を人工的に合成することが可能である。この培養細胞中で作製されたウイルス粒子は、患者血清中で観察されるウイルス粒子と同様の形態であることが電子顕微鏡で確認されており、不活化することでワクチンとして使用可能と考えられる。しかし、この粒子をワクチンとして使用するためには、大量のウイルス粒子が必要であり、現行のJFH-1株とHuh7細胞を用いたシステムでは限界があると考えられる。そこで、効率の良いウイルス粒子産生システムの構築のため、HCVの培養細胞内での複製や粒子形成を増強するウイルス側の因子を検討した。

これまでの検討により、JFH-1株の全長RNAをHuh7.5.1細胞に導入し長期培養を行うことで、JFH-1株よりも増殖効率の良い適応変異ウイルスが分離できることがわかった。しかしその適応変異ウイルスのゲノムをRT-PCR法により増幅し、ダイレクトシーケンスにて同定された変異では適応変異ウイルスの増殖能を再現できていない。本研究では、この適応変異ウイルスを限界希釈法でクローニングすることにより適応変異株を単離し、さらに効率の良い増殖を可能にする変異を同定した。

B. 研究方法

1．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。

（倫理面への配慮）

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換えDNAを用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1．HCV JFH-1株の長期培養による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中・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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

1. Mohsan Saeed, Kato T, Choi YK, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T. In vivo behavior of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged after passage in chimpanzees. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7).

2. Choi YK, Kato T, Wakita T, Liang TJ, Krawczynski K. Dynamic Profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7).

3. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Suzuki T, Kato T, Toyoda T, Wakita T. Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in culture cells. The 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice, France. (2009, Oct. 3 - 7).

4. 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、2009年6月.

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等研究事業）
分担研究報告書

ワクチン評価のための霊長類C型肝炎サロゲートモデル開発の基盤研究

分担研究者　明里宏文（京都大学霊長類研究所）
研究協力者　岩崎優紀、飯島沙幸（医薬基盤研 霊長類医科学研究センター）
石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染症研究所 ウイルス２部）
槇昇、森健一（先端生命科学研究所）

研究要旨：　今年度は、新規治療薬やワクチンの評価系として慢性C型肝炎のサロゲート病態霊長類モデル確立を目指し、GBV-B持続感染マーモセットに関して詳細な解析を行なった。その結果、GBV-Bがマーモ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世界で始めて示した。また実験用サル類に感染増殖可能なHCV/GBV-Bキメラ感染霊長類モデルの確立を目指し、HCV/Gキメラウイルスクローンのサル個体への接種実験を行なった。その結果、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。本結果は今後の抗HCV薬・ワクチンの有効性評価系としてのみでなく、C型肝炎慢性化メカニズムを解明する上でも貴重な情報をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

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

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

我々はこの点を鑑みて、HCVと同じフラビウイルス科、ヘパチウイルス属に分類され、HCVに最も近縁なウイルスであるGBV-Bを用いた急性・慢性C型肝炎のサロゲート（代用）霊長類モデルの開発をこれまで進めてきた。本モデルが確立されれば、新規治療薬やワクチンの評価系として有用であるのみならず、C型肝炎の発症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明に重要なモデルになるものと期待される。昨年度の当研究班における研究により、GBV-B感染マーモセットにおいて３年を超える長期にわたる持続感染の結果、HCV感染と類似した高い頻度のウイルスゲノム変異および間歇的なウイルス血症を呈していることを初めて明らかにした。今年度は引き続き当該個体のフォローアップ解析を行なった。

さらに、我々は将来のより優れた霊長類モデル作出を念頭に、HCVとGBV-Bのキメラウイルス構築を開始した。今年度は、昨年度までに構築したキメラ

クローンのサル個体における複製能について検討を行なった。

B. 研究方法

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

HCVとGBV-Bのキメラウイルス構築では、HCV-1b由来感染性クローンであるTPF1およびpGBBを基に、図3のようなキメラc156-E1/E2を構築した。同キメラクローン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、上記同様に得られた血液より解析を行なった。

C. 研究結果

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図1に示した。Cj05-002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。他方Cj05-004では、ほぼ感染1年後まで主として潜伏感染状態が続いた後、現在まで持続的ウイルス血症が継続し、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。これと相関し、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・血液所見で重度の削痩や貧血、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（HE染色・図2-1）。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（コア蛋白特異的モノクローナル抗体による免疫染色・図2-2）。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（図2-3）。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。

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、図3のようにCore領域C末端よりp6領域までGBV-B由来であるキメラクローンHCV/G c156-E1/E2を構築した。同キメラクローンはHuh-7細胞にトランフフェ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。

D. 考察

今回の結果において、GBV-Bはマーモ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、マーモセットへの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。事実、AIDS研究における動物モデルではサルエイズウイルスであるSIVが代用モデルとして用いられてきたが、サルに感染性を有するHIV-1とSIVのキメラウイルスであるSHIVが確立されワクチン研究に汎用されてきている。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。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る。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。

E. 結論

本結果は、GBV-Bがマーモ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世界初の報告である。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。

F. 研究発表

1．学会発表

1．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回日本実験動物学会総会（大宮）平成２１年５月

２．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（神戸）平成２１年６月

３．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

４．Yoshida T, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshizaki S, Katakai Y, Suzuki T, Miyamura T, Akari H
Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets
16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (France, Nice) Oct 3-7, 2009

５．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

2．論文発表

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1α-mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel

CXCR4 antagonists. **Cancer Science** 100, 778-781, 2009.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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 vo;. 5, no. 2, 2-5, 2009.

9. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図１： マーモセットGBV-B接種後の各種マーカー長期フォローアップ結果

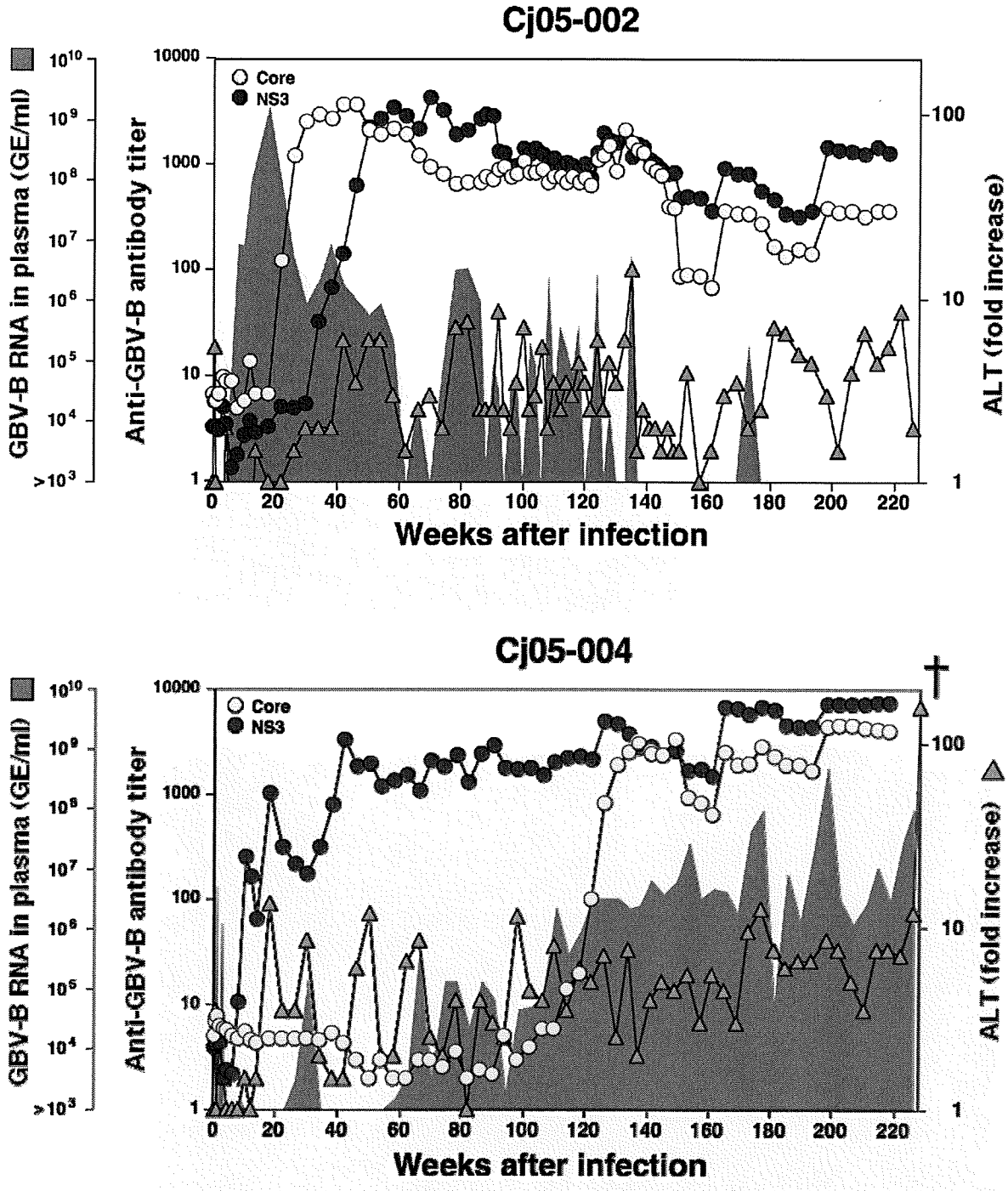


図２：慢性Ｃ型様肝炎を呈したマーモセット由来肝臓の免疫・病理染色

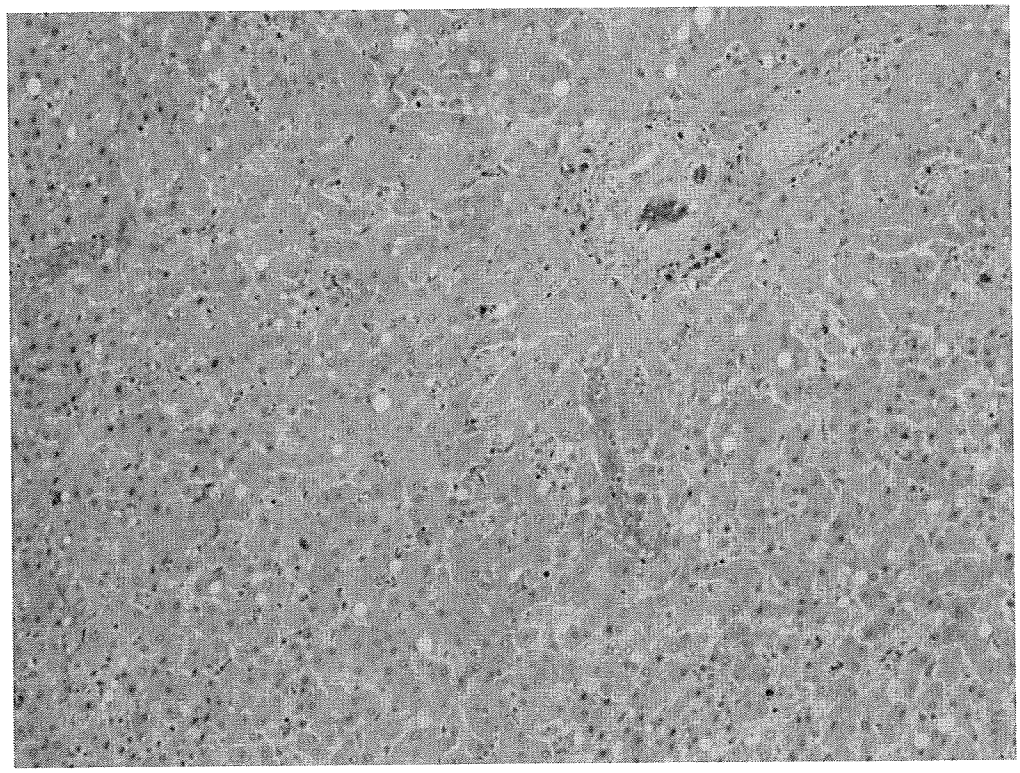


図２−１：HE 染色

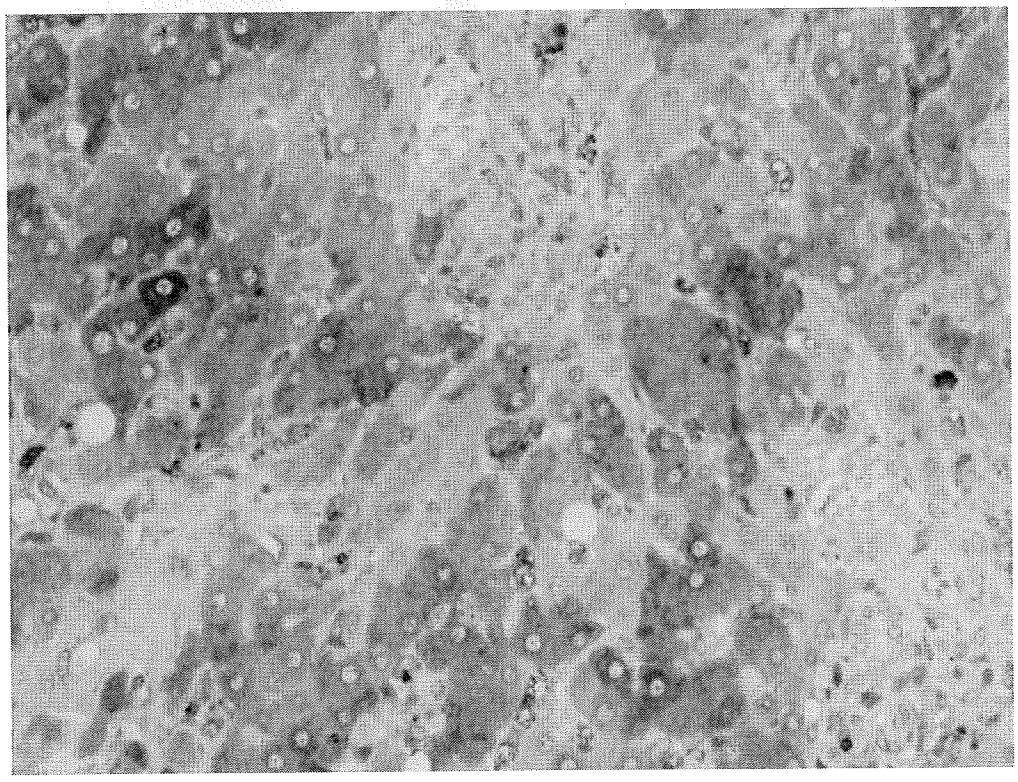


図２−２：GBV-B コア蛋白モノクローナル抗体による免疫染色

図２−３：繊維組織特異染色
上段：マッソン・トリクローム染色（左：弱拡大、右：強拡大）
下段：エラスチカ・ワンギーソン染色

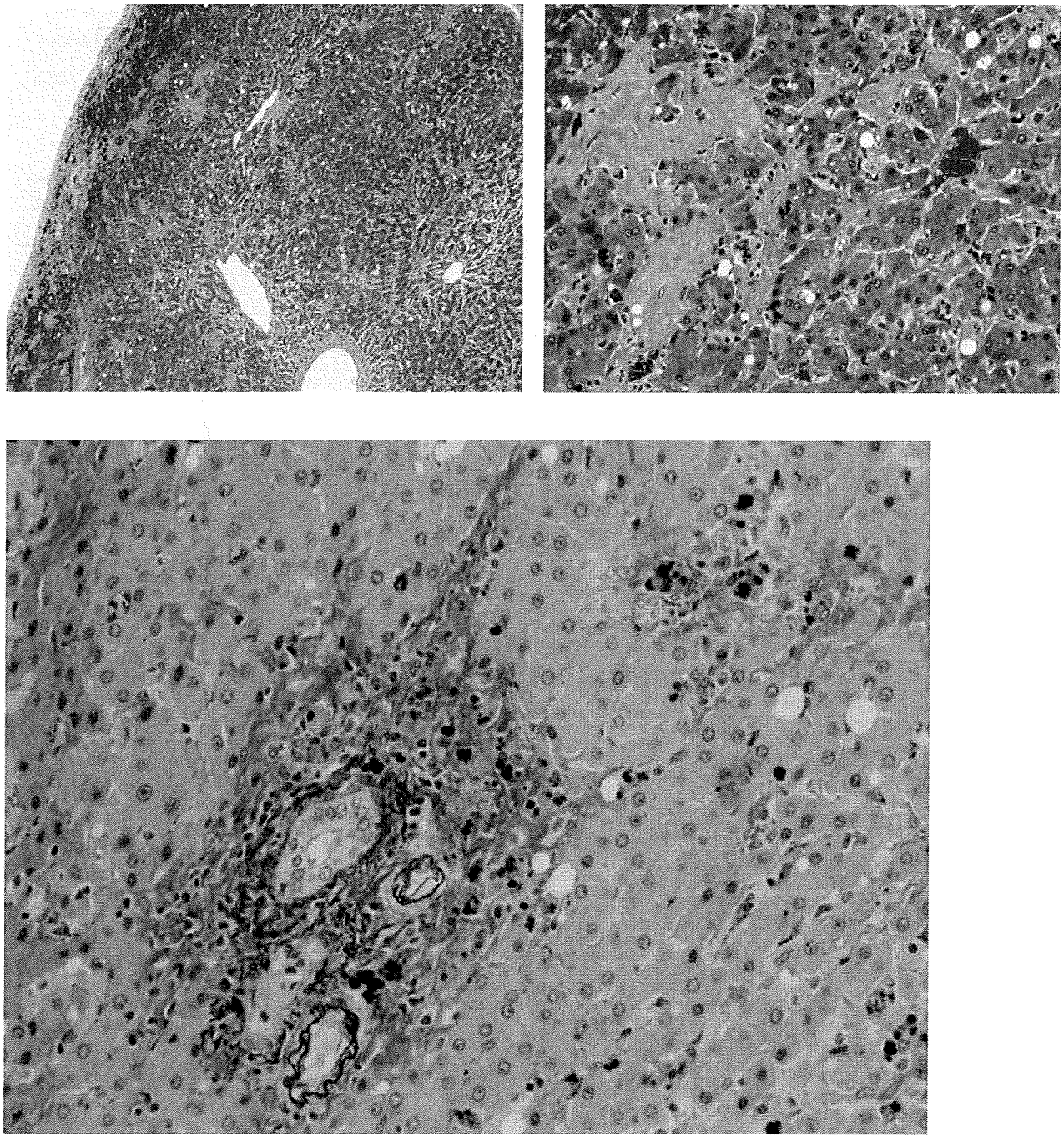
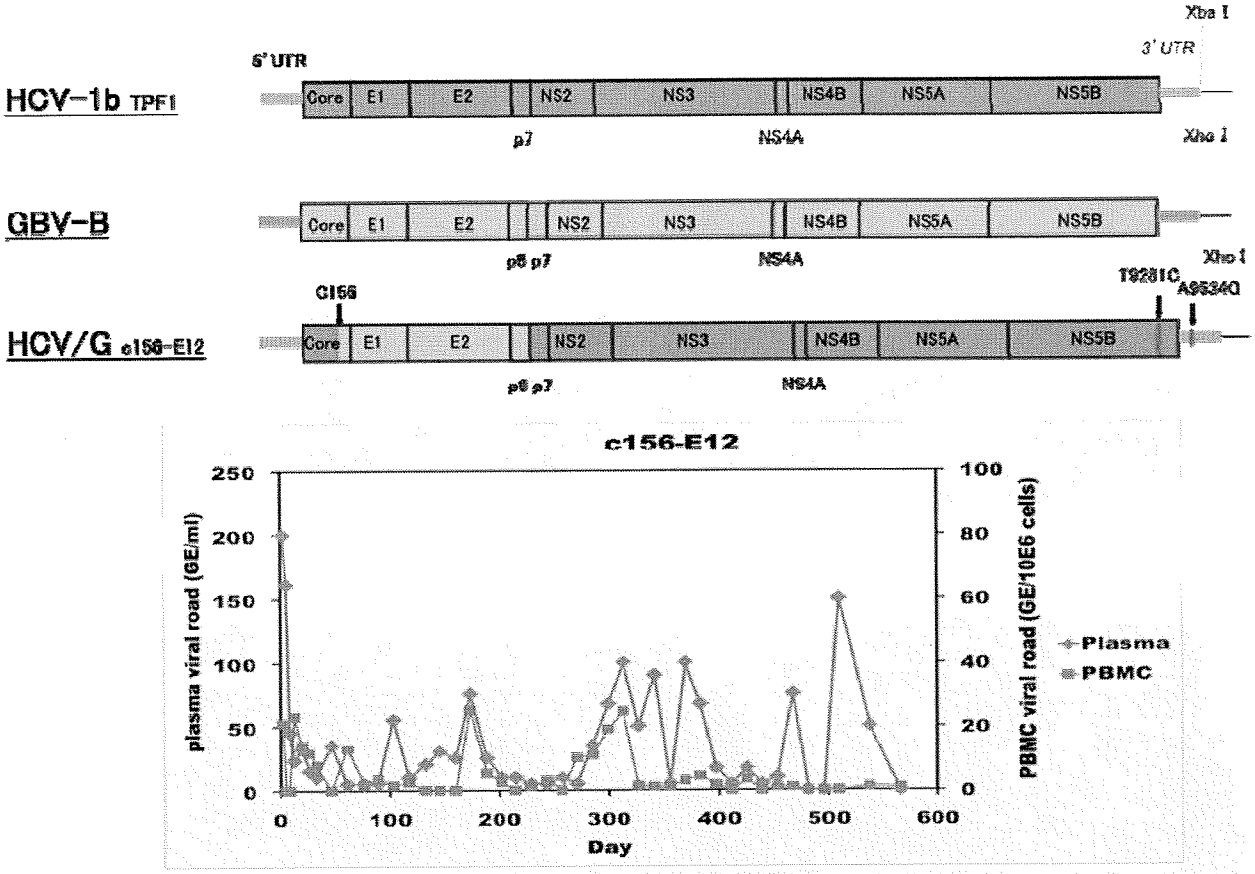


図３：サル個体へのHCV/GBV-Bキメラクローン接種後の血中ウイルスRNA推移



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

HCVの宿主免疫応答に基拠するワクチン開発

分担研究者　松本　美佐子　北海道大学大学院医学研究科　准教授

研究要旨　Poly(I:C)は樹状細胞のエンドソームTLR3を活性化し、TICAM-1依存的にNK細胞や細胞傷害性T細胞の活性化を誘導する。このため、次世代アジュバントの有力な候補と考えられているが、細胞内への運搬機構は不明である。本研究では、poly(I:C)結合タンパク質のプロテオーム解析により、poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定した。

A．研究目的

HCVのワクチン開発において、効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。次世代アジュバントとして、Toll-like receptor (TLR)のリガンドが候補にあがっているが、その中でもTLR3リガンドのpoly(I:C)は、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を強力に惹起する。Poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外にも細胞質内のMDA5経路も活性化するが、その分配機構は全く不明である。本研究では、poly(I:C)の細胞内への取り込み機構を解析し、アジュバント活性との関連を明らかにする。

B．研究方法

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う。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する。

C．研究結果

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ジーンアッセイで、TLR3を介したIFN-β 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-β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

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-β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。今回同定し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

Poly(I:C)の取り込みに必須の分子を同定した。

G．研究発表

1．　論文発表

1. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. ***Cancer Immunol. Immunother.*** 58:1175-1184 (review).
2. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. ***Immunol. Reviews*** 227: 44-53 (review).
3. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-β induction during the early phase of viral infection. ***J. Biol. Chem.*** 284: 807-817.
4. Akao Y., T. Ebihara, H. Masuda, Y. Saeki, T. Akazawa, K. Hazeki, O. Hazeki, M. Matsumoto, and T. Seya. 2009. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. ***Cancer Science*** 100: 1494-1501.
5. Iwakiri, D., L. Zhou, M Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada. 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.
6. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Kawanishi, M. Matsumoto, and T. Seya. 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-kB activation and type I IFN induction. ***Eur. J. Immunol.*** 39: 3469-3476.
7. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. ***BBRC*** 391: 1421-1426.
8. Sasai, M., M. Tatematsu, H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 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)
9. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 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．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
2．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
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）
4. 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）
5. 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
6. 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）
7. 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）

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

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

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Hazari *et al.*	Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway.	Virol J.	7	36	2010
M. Ishibashi *et al.*	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.	392	397-402	2010
S.S. Hmwe *et al.*	Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin.	Antiviral Res	85	520-524	2010
X. Liu *et al.*	Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells.	Virology	398	57-67	2010
A.G. Angus *et al.*	Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein.	J Gen Virol.	91	122-132	2010
K. Abe *et al.*	HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A.	Arch Virol.	154	1671-1677	2009
M. Saeed *et al.*	Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes.	J Clin Microbiol.	47	4141-4143	2009
N. Kato *et al.*	Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line.	Virus Res.	146	41-50	2009
I. Tanida *et al.*	Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles.	Autophagy.	5	937-945	2009
Y. Murakami *et al.*	Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR.	Antiviral Res.	83	112-117	2009
J.I. Kang *et al.*	Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity.	Virus Res.	144	107-116	2009
H. Dansako *et al.*	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.	154	801-810	2009

L. Weng *et al.*	Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain.	Arch Virol.	154	765-773	2009
H. Hara *et al.*	Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein.	J Virol.	83	5137-5147	2009
T. Shimoji *et al.*	Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation.	J Cell Biochem.	106	1123-1135	2009
C.Y. Park *et al.*	Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway.	J Biol Chem.	284	9237-9246	2009
T. Kiyohara *et al.*	Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking the antibody-binding site and the receptor-binding site on hepatitis A virus.	Arch Virol.	154	1263-1269	2009
T. Kiyohara *et al.*	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.	J Med Virol.	81	1513-1516	2009
R. Suzuki *et al.*	Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28γ-Dependent Mechanism.	J Virol.	83	2389-92	2009
K. Ishii *et al.*	Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model.	Microbiol Immunol.	53	75-82	2009
H. Hohjoh *et al.*	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene.	Gene	432	60-6	2009
T. Izumi *et al.*	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif.	Retrovirology	6	1	2009
H. Akari *et al.*	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection.	Microbiol Immunol.	53	53-7	2009
Y. Iwasaki *et al.*	Efficient inhibition of SDF-1α-mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists.	Cancer Sci.	100	778-781	2009
R. Hassan *et al.*	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms.	J Cell Physiol.	221	458-468	2009

A. Kuroishi *et al.*	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
Y. Matsumoto *et al.*	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.	J Vet Med Sci.	In press		2010
M. Sasai *et al.*	Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway.	Mol. Immunol.	In press		2010
N. Kubota *et al.*	IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells.	Biochem Biophys Res Commun.	391	1421-1426	2010
T. Seya *et al.*	Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy.	Cancer Sci.	101	313-320	2010
T. Seya *et al.*	The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer.	Cancer Immunol. Immunother.	58	1175-1184	2009
T. Seya *et al.*	Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing.	Immunol. Reviews	227	44-53	2009
H. Oshiumi *et al.*	Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-β induction during the early phase of viral infection.	J. Biol. Chem.	284	807-17	2009
Y. Akao *et al.*	Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice.	Cancer Sci.	100	1494-1501	2009
D. Iwakiri *et al.*	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	2009
H. Takaki *et al.*	Oligomerized Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1 in the cytoplasm recruits nuclear adenovirus 5 E1A-binding protein to enhance NF-κB activation and type I IFN induction.	Eur. J. Immunol.	39	3469-3476	2009

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊