

201030010A

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22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成23（2011）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22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成23（2011）年 3月

目次

I. 総括研究報告	
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	
II. 分担研究報告	
1. ウイルス粒子大量精製法およびウイルス免疫法の開発	27
中村 紀子	
2. 感染中和機構に重要な HCV の初期感染過程の解析	35
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を向上させる変異 の同定とその解析	43
鈴木 亮介、石井 孝司	
4. HCV 粒子の効率的な生成のための新規細胞株の分離同定	47
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 ..	51
明里 宏文	
6. HCV の宿主免疫応答に基拠するワクチン開発	59
松本 美佐子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別冊	67

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。

分担研究者 脇田 隆字

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

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、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てきた。

本年度は3年計画の最終年度となる。過去2年間に引き続き、精製ウイルス粒子の大量生産に必要な技術開発、ワクチン実用化に向けた技術開発と基盤的研究を行い、以下に示す結果を得た。

1. HCV 粒子を2段階の精製工程（ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製まで）で高効率に夾雑蛋白質が除去できる条件を見出した。
2. 遺伝子型 2a の HCV 粒子免疫マウスにおいて、遺伝子型 2a だけではなく、遺伝子型 1a および 1b の HCVpp および HCVcc に対する感染阻害活性が誘導された。
3. 評価アジュバントの中では、Alum+CpG が最も高い免疫応答を誘導した。
4. 無血清培養により作成したウイルスの性状を解析した。感染性は血清存在下で培養したウイルスとほぼ同程度であったが、抗 CD81 抗体、抗 E2 抗体や抗アポタンパク質抗体による感染阻害を比較するといくつかの相違点も見られた。
5. 不活化精製ウイルス粒子を免疫したマウスから精製した IgG に *in vivo* における感染阻害活性を確認した。
6. 1回感染性トランスパッケージング型粒子を blind-passage する事により、ウイルス粒子形成能を高める NS3 ヘリケース領域の変異を同定した。
7. HCV の感染増殖が可能な HuH-7 細胞をクローニングすることにより、HCV が効率的に増殖複製できる細胞株 HuH-7T1 細胞を分離同定した。この細胞株はワクチンの材料となる HCV 粒子の大量培養法に有用であると考えられた。
8. C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルにおいて、ウイルスゲノム変異及び免疫学的側面からの解析を行い、HCV の慢性化機序の解明に有用な情報を多く得た。また感染性 HCV/GBV-B キメラウイルス確立に向けたサル実験で一定の成果を得た。
9. poly(I:C)同様細胞外からエンドソーム TLR3 にターゲットされ、TLR3 を活性化し TICAM-1 を介してシグナルを伝達するが細胞質 RIG-I, MDA5 経路を活性化しない新規 RNA アジュバントを得た。本アジュバントは B16 メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)と同等の抗がん活性を示したが、マウス生体内投与での炎症性サイトカイン産生量は poly(I:C)投与より少なかった。

B. 研究方法

1. HCV 粒子大量精製

・HCV 培養上清の限外ろ過膜による精製：

感染性HCVを含む21Lの培養上清をホローファイバーUFP-500-C-8A (GE Healthcare 社)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。使用した限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液(500mL)とした(最終42倍濃縮)。

・ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製：

カラム容積250mLのSephrose 6 Fast Flow(BD社)に25mLの限外ろ過膜で精製・濃縮したサンプルを添加し、3mL/min、10mLのフラクションで展開した。

・イオン交換クロマトグラフィー：

イオン交換担体として、1mLのHiTrap Q HP(BD社)を用い、20mM piperazine(pH5.0)で平衡化し、5mLのサンプルを添加し、20mL piperazine、2M NaCl(pH5.0)にて塩濃度勾配で溶出させた。

・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、60%、50%、40%、30%、20%および10%ショ糖/TNEの順に2mLずつ重層した後、上記のように調製した溶出プール画分を23mLをさらに重層し、28,000 rpm、4分、4時間遠心分離した。遠心後のチューブは約1mLずつの14分画に分けて回収し、各分画液のHCV-RNAと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。

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。

2. 精製HCV粒子のマウスへの免疫

・アジュバント：

Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社)、CpG (Mod87; 東レ)、polyI:C (Yamasa Shoyu 社)およびMPL+TDM (Sigma Adjuvant System; Sigma 社)をそれぞれ、1匹当たり、200μg、25μg、100μgおよび100μL用いた。単独および組合わせて使用した。

・投与スケジュール：

不活化した精製HCV粒子(1匹あたり2pmol)を、下記投与群に0、2、4および6週に種々のアジュバントと抗原を混合し腹腔内投与した。投与後1、3、5および7週に眼窩より採血した。投与群は1. 生理食塩水(大塚製薬、陰性コントロール)(n=5)、2. J6/JFH1+Alum (n=5)、3. J6/JFH1+CpG (n=5)、4. J6/JFH1+polyI:C (n=5)、5. J6/JFH1+Alum+CpG (n=5)、6. J6/JFH1+Alum+polyI:C (n=5)、7. J6/JFH1+CpG+polyI:C (n=5)および8. J6/JFH1+MPL+TDM (n=5)とした。感染阻害実験はHCVppまたはHCVccを用いて行った。

3. 不活化粒子免疫により誘導された抗体による *in vivo* 感染防御実験

J6/JFH1 キメラウイルス感染 Huh7 細胞の培養上清から限外濾過および超遠心により精製したウイルス粒子を UV 照射により不活化し、Sigma Adjuvant system と混合して BALB/c マウスに免疫した。免疫マウスの血清から IgG を精製し、感染阻害活性をウイルス培養系により測定した。さらにこの IgG を感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめ IgG を腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロール IgG と HCV 感

染阻害活性を比較した。

4. 無血清培養によるHCVウイルス産生

FCS 濃度を 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5% および FCS なしとした培養液を作成し、Huh7 細胞を培養した。さらに FCS 各濃度におけるウイルス培養を試みた。

5. トランスパッケージング型粒子の産生を向上させる変異の同定と解析

HCV の JFH-1 株(2a)の core~NS2 領域(3カ所の適応変異を有する)を発現する組換えアデノウイルスを作製した。この組換えアデノウイルスを Huh7.5.1 細胞に感染させてパッケージング細胞を調製した。JFH-1 株のレプリコン cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入したレプリコンプラスミドをパッケージング細胞にトランスフェクションし、1回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子を得た。この粒子をさらにパッケージング細胞に感染させ、その後再び培養上清を回収した。この操作を 10 回繰り返した。

6. HCV が効率的に増殖複製できる細胞株の分離とその評価

HCV の増殖複製が可能な HuH-7 細胞を限外希釈し 96 ウェルプレートに播種することでクローン化した。得られた株に JFH-1 株の全長 RNA を導入し、1日後・3日後・5日後に培養上清中と培養細胞内のコア抗原量を測定し、最も増殖効率のよい細胞株を同定した。

7. 分離された細胞株における HCV ライフサイクルの評価

分離同定された細胞株 HuH-7T1 株を、通常 HCV の増殖複製に用いられる Huh7.5.1 細胞と比較し検討した。まず、HCV のエンベロープ蛋白質を持ったシュードウイルス(HCVpp)を用い、

HCV の複製に影響を受けない状態で感染効率のみを比較した。また HCV の主要なレセプターである CD81 の細胞表面での発現も FACS で解析した。次に、細胞内での複製効率のみを比較するため、JFH-1 株のサブジェノミックレプリコン (JFH-1/SGR) をそれぞれの細胞に導入し、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することで複製効率の違いを評価した。さらに JFH-1 株の全長 RNA を両細胞に導入し、培養細胞中での HCV RNA 量に対する感染力価の比 (Specific Infectivity) を計算することでウイルス粒子の形成効率を、培養細胞内外の感染力価の比を計算することでウイルス粒子の分泌効率を評価した。

8. 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

感染性分子クローン 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、タマリンおよびマーモセットに接種した。ウイルス感染サルより定期的に採血し、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。細胞性免疫応答については、サル血液より PBMC を分離し、Core および NS3 タンパク、もしくは Core, E1, E2, P13 領域のオーバーラッピングペプチド (15mer) と 40 時間共培養の後 IFN γ ELISPOT アッセイを行なうことで評価した。ウイルスゲノムはサル血漿から得たウイルス RNA よりダイレクトシーケンシスにより解析した。

9. HCV/GBV-B キメラウイルスの構築とその評価に関する研究

HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および pGBB を基に、キメラクローン 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。

10. 新規合成 RNA アジュバントの開発

TLR3 のリガンド認識機構を考慮し、19 種類の RNA 誘導体を合成した。In vitro assay として、1. TLR3 を介した IFN- β promoter の活性化、2. 細胞質内 MDA5 経路の活性化、3. マウス骨髄系樹状細胞(BMDC)活性化による NK 細胞活性化、4. BMDC 活性化によるサイトカイン産生について検討した。また、in vivo assay として、1. マウス腹腔内投与後の炎症性サイトカイン産生の経時的測定、2. B16 メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるアジュバント効果の査定を行った。

(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までの主な研究成果は以下の通りである。

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。

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。

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. HCV 粒子大量精製

感染性 HCV を含む培養上清 21 L を限外濾過することにより、液量が 563mL となり、コアタンパク質と HCV-RNA 量の回収率は、それぞれ 99% および 56.4% であった。また、タンパク質量は 1% となり、コアタンパク質量に基づき、比活性 (コアタンパク質量/全タンパク質量: pmol/mg) から、限外濾過で 100 倍精製されたことになる。

部分精製 HCV 粒子、25mL を 250mL の Sepharose 6 Fast Flow でゲル濾過を行った結果、コアタンパク質のピークは void volume 分画に溶出され、その容量は 30 mL であった。そのときのコアタンパク質の回収率は 71% であり、比活性から、ゲル濾過クロマトグラフィーで 6 倍精製されたことになる。

次に、部分精製 HCV 5mL を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、コアタンパク質の回収率は 12% となった。コアタンパク質量に基づき比活性を計算するとイオン交換クロマトグラフィーで回収率が低いため精製度が約 1/2 になった。

2. 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れらを組合せたものを用いてマウスに免疫し、E1 および E2 タンパク質に対する抗体価を測定した。その結果、MPL+TDM を使用した時、E1 および E2 タンパク質に対する抗体価が最も強く、それに対して Alum および CpG 単独はその 1/3-1/6 であった。

また、各アジュバント使用時の E2 タンパク質に対する抗体のアイソタイプについて調べた。その結果、Alum 単独および CpG 単独は IgG1 の誘導は高いが IgG2a、IgG2b、IgG3 は低かった。その他のアジュバントおよびその組み合わせはいずれのアイソタイプも高く誘導した。

次に遺伝子型 2a の E1 および E2 タンパク質を有する J6-HCVpp に対する感染阻害活性を測定した。その結果、MPL+TDM、Alum 単独、CpG 単独、Alum+CpG が高い中和活性を示した。特に、Alum+CpG は HCVpp の感染を 60% 阻害した。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 HCVpp の感染阻害について検討した。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、Alum+CpG および MPL+TDM 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。

さらに、HCVcc に対する感染阻害活性を測定した。HCVcc として、遺伝子型 2a の J6/JFH1 および

遺伝子型 1b の TH/JFH-1 を用い、マウス血清は 100 倍希釈して使用した。その結果、Alum+CpG および MPL+TDM は、いずれの遺伝子型の HCVcc に対しても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。

以上から、評価したアジュバントの中では、Alum+CpG が最も高い免疫応答を誘導した。

3. 不活化粒子免疫により誘導された抗体による in vivo 感染防御実験

J6/JFH1 キメラウイルス感染 Huh7 細胞の培養上清を集めて、限外濾過により低分子夾雑物を除去および濃縮した。さらにしょ糖クッションによる超遠心法によりウイルス粒子を精製した。精製ウイルス粒子を UV 照射により不活化し、Sigma Adjuvant system と混合して BALB/c マウスに 4 回免疫した。免疫マウスの血清は JFH-1 と J6 (遺伝子型 2a), TH (遺伝子型 1b) の HCVpp に対して感染阻害活性を示した。さらに免疫マウス血清から IgG を精製し、感染阻害活性を J6/JFH1 ウイルス培養系により測定すると、容量依存性に感染を阻害した。そこでこの IgG を感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめ IgG を腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロール IgG と HCV 感染阻害活性を比較した。コントロール IgG 投与群では 6 匹中 4 匹のマウスで感染が成立したが、免疫マウスの IgG 投与群では 6 匹の全マウスで感染が認められず、in vivo での感染阻害活性が観察できた。

4. 無血清培養による HCV ウイルス産生

FCS 濃度を 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5% および FCS なしとした細胞培養液中の総蛋白濃度は 1%, 0.5% および FCS なしでほぼ同程度で、10%FCS

の約 1/4 程度であった。さらに FCS 濃度を下げると Huh7 細胞の増殖は低下するものの、1%, 0.5% および無血清で同程度に増殖した。そこで、10%FCS 培養液と無血清培養液により培養した Huh7 細胞に JFH-1 および J6/JFH1 の全長 RNA をトランスフェクションしてウイルス粒子産生を比較したところ、培養液中にはほぼ同程度の HCV コア濃度のウイルスが分泌された。感染性もほぼ同程度であったが、抗 CD81 抗体および抗 E2 抗体による感染阻害を比較すると無血清培養で作成したウイルスの方がどちらの抗体でも阻害されやすいことがわかった。さらに、apoB および apoE 抗体により免疫沈降実験で、10%FCS で作成したウイルスは感染性の一部が除去されるが、無血清で作成したウイルスは除去されなかった。

5. トランスパッケージング型粒子の産生を向上させる変異の同定と解析

1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子をパッケージング細胞を用いて blind-passage する事により、より増殖能の良いトランスパッケージング型 HCV 粒子を得る事ができた。この粒子のゲノムの塩基配列を決定したところ、NS3 領域にアミノ酸の置換を伴う変異が同定された。この変異を subgenomic replicon に導入して、そのゲノム複製への影響を調べたところ、ゲノムの複製効率の上昇は認められなかった。しかしながら、この変異の導入は感染性ウイルスおよび 1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子の産生を向上させる事から、ウイルスの粒子形成能を向上させる事が示唆された。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向上が認められた。

6. HCV が効率的に増殖複製できる細胞株の分離

とその評価

HuH-7 細胞をクローニングすることで、JFH-1 全長 RNA を導入した時に最も強い増殖を示す細胞株 HuH-7T1 細胞を得た。この細胞ではトランスフェクション 5 日後の培養上清中で Huh7.5.1 細胞の 8.3 倍、細胞内で 4.4 倍のコア抗原量を示し、HCV が効率的に増殖複製可能であると考えられた。

7. 分離された細胞株における HCV ライフサイクルの評価

まず、HuH-7T1 細胞の HCV 感染に対する感受性を HCVpp を用いて評価した。その結果、HuH-7T1 細胞では CD81 を表面に発現している細胞の比率が Huh7.5.1 細胞と比べやや低く、そのために HuH-7T1 細胞の感染効率が Huh7.5.1 細胞と比較して低くなっているものと考えられた。

次に細胞内での HCV 複製効率を比較したところ、HuH-7T1 細胞と Huh7.5.1 細胞でほとんど差を認めず、HCV 複製は二つの細胞でほぼ同様と考えられた。

さらにウイルス粒子の形成効率と分泌効率を比較したが、HuH-7T1 細胞では Huh7.5.1 細胞と比べ形成効率が約 47 倍と非常に高く、分泌効率はその逆に約 0.24 倍と低くなっていた。最後に JFH-1 全長 RNA を導入もしくは JFH-1 ウイルスを感染させ 3 日後に免疫染色でウイルスの広がりを実験したところ、HuH-7T1 細胞では Huh7.5.1 細胞にくらべ多くの HCV 陽性細胞を認め、HuH-7T1 細胞では HCV 感染が広がりやすいことが確認された。

8. GBV-B 感染初期における抗ウイルス免疫応答

タマリンへの GBV-B 感染では抗ウイルス抗体

価がピークに達するまでに 2～3 ヶ月を要し、このことが約 3 ヶ月の高いレベルのウイルス血症が持続することに寄与するものと考えられる。他方、この時期における細胞性免疫応答についてはこれまでよく知られていない。我々は、Core および NS3 タンパク、もしくは Core, E1, E2, P13 領域のオーバーラッピングペプチド (15mer) を用いた IFN γ ELISPOT アッセイ系を確立し、GBV-B 感染初期における細胞性免疫応答を検討した。その結果、意外にも感染 2～4 週といった比較的感染早期に高い割合でこれらのウイルスタンパク、ペプチドいずれに対しても IFN α 産生が認められた。このことは、ウイルス感染後相応の細胞性免疫応答が生じているにもかかわらずウイルス制御が充分出来ていないことを表わし、ウイルスによる何らかの細胞性免疫からの回避機構が機能していることを示唆していた。

9. GBV-B 長期持続感染におけるウイルスゲノム変異の解析

昨年度、我々は本研究班においてマーマセット 2 頭が GBV-B 感染後 3～4 年間に及ぶ長期持続感染を示すことを始めて報告した。特に、1 頭は感染 4 年を過ぎた頃に ALT 値の顕著な上昇 (感染前の約 300 倍)、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るとともに、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、広汎なコア蛋白陽性像が確認され、本症例はヒト C 型肝炎の終末像の一つである活動型慢性肝炎の急性増悪と診断された。

そこで、本研究では GBV-B 長期持続感染におけるウイルスゲノム変異について詳細に解析を行なった。まず核酸レベルでの変異を見ると、 $1.5\text{-}3.6 \times 10^3$ changes/site/year と HCV における変異率と同程

度であった。変異部位に関しても、経時的に見た場合に特定の遺伝子領域への変異の集中は見られなかった(図2)。アミノ酸置換変異について見ると、以下のような特徴が認められた(図3)：

(1) 感染後約2年以内では、これまで報告のあるアミノ酸残基での変異が多く認められ、かつその多くは2頭どちらでも認められたことから、これらは適合変異と考えられた。

(2) どちらの個体においても複数箇所での復帰・連続変異が見られた (G250V>A, S731L>S, E2346G>E in Cj05-002; V254A>V, I285V>I, L495S>L, T735A>T, F2135L>F>S in Cj05-004)。

(3) E1 領域において多数の非同義置換が生じていたのに対し、core 領域では殆どが同義置換であった (core, E1 領域における核酸変異数はどちらのサル個体においても同程度であることに注目：図2)。(4) 非同義置換の中でも、E1, E2, NS2, NS3 においてこれまで報告されていない新たな変異が多く認められ、また重症化個体 (Cj05-004) では NS3 における新規変異部位が多数見られた。(5) E1 領域では 230-285 アミノ酸残基の間に6箇所、NS5B 領域では 2323-2347 アミノ酸残基の間に5箇所の非同義置換部位が集積していた。以上の結果より、長期持続感染および慢性肝炎の重篤化における選択的なウイルスアミノ酸置換変異との相関性が強く示唆された。

10. HCV/GBV-B キメラウイルスの構築とその評価に関する研究

HCV-1b 由来感染性クローンである TPF1 および pGBB を基に構築したキメラクローン HCV/G c156-E1/E2 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年間にわたって間歇的に

plasma 中ウイルス RNA が検出されたことを報告した。このサル個体についてフォローアップを行なったところ、接種後73週、及び134週において低レベルながらも血中ウイルス RNA 量の上昇が認められた。また、73週での血漿を超遠心分離で濃縮したところ、その沈査に GBV-B 特異配列が確認された。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。

11. 新規合成 RNA アジュバントの開発

19種類の RNA 誘導体のうち、7種類の誘導体について *in vivo* におけるアジュバント効果を調べた結果、3種類の RNA 誘導体(#13, #18, #19)が B16 メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)とほぼ同等のがん退縮効果を示した。マウス腹腔内投与後の IL-6, TNF- α , IL-10 産生は、#18, #19 では全く検出されず(10 pg/ml 以下)、#13 では IL-6, TNF- α 産生は poly(I:C)投与の 50%、IL-10 は 10%程度であった。各 RNA 誘導体を HEK293 細胞の細胞質に直接導入し、RIG-I, MDA5 を介した IFN- β promoter の活性化を測定したところ、いずれの誘導体においても活性化は見られなかった。一方、HEK293 細胞での TLR3 を介した IFN- β promoter 活性化は、#13 で poly(I:C)と同等の活性化が見られたが、#18, #19 は殆ど活性化しなかった。#18, #19 は BMDC 刺激で、TLR3-TICAM-1 依存的に IL-6, TNF- α , IL-12 産生を誘導することが TICAM-1 ノックアウトマウスを用いた実験で明らかになった。また、BMDC 活性化による NK 細胞活性化は、3種の RNA 誘導体いずれにおいても誘導された。

D. 考察

これまでウイルス精製のために用いてきたシヨ糖密度勾配遠心で分画する方法は工業的精製法としては不向きであるため、クロマトグラフィーを使用して精製工程を検討した。その結果、Sepharose 6 Fast Flow を使用したゲル濾過は回収率もほぼ 100%と高いのに対し、イオン交換クロマトグラフィーは回収率が極めて低かった。展開緩衝液の pH についても検討したが著しい改善は認められなかった。イオン交換クロマトグラフィーにおける低回収率の原因として、溶液中の低タンパク質濃度に由来する基材、担体への吸着および HCV 粒子同士の凝集による失活が考えられる。HCV 粒子を安定的に精製するためには、精製時の緩衝液の組成、pH の条件だけでなく、タンパク質の安定化剤の添加を含めてさらに検討する必要がある。

また本研究では、不活化 HCV 粒子ワクチンの免疫原性を最も効果的に高めるアジュバントを見出すことを目的として、3 種類の臨床応用可能なアジュバント (Alum、CpG および poly I:C) および対照として、MPL+TDM を用いて検討を行った。Alum と CpG については 2 つのアジュバントを組み合わせることによって、単独で使用した場合よりも IgG1 以外のアイソタイプへのクラススイッチを強く誘導することが示された。これまでに、Alum は IgG1 を誘導し、CpG は IgG2a や IgG2b の抗体を誘導することが報告されている。本検討においても、CpG 単独投与群では Alum に比べて、IgG2a や IgG2b を比較的強く誘導した。さらに、Alum と CpG を組み合わせることにより、IgG2a や IgG2b の誘導効果がさらに高くなった。Alum と CpG の組み合わせにより、IgG1 に加えて IgG2a

も誘導することができることはすでに報告されているが、HCV 粒子ワクチンにおいてこうした効果が認められるということは、今回の検討により初めて明らかとなった。一般に IgG1 抗体は Th2 タイプの免疫反応を示し、IgG2a や IgG3 (および IgG2b) は Th1 タイプの免疫応答を反映すると考えられている。生体における免疫反応としては Th1 と Th2 のバランスが重要であるため、ワクチンの作用としても考慮すべき重要な観点と考えられ、バランスのとれた免疫応答を誘導する HCV ワクチンを作製することは重要な課題である。この点で、Alum と CpG の組み合わせは、アジュバントとして用いるときに有力な候補と成り得る。

次に、最終免疫の 1 週間後に採血した血清を用いて、HCVpp および HCVcc に対する感染阻害活性を測定したところ、Alum+CpG 群は、評価したアジュバントの中で最も強い感染阻害活性を示した。さらに、遺伝子型 1b の構造タンパク質を有する TH-HCVpp および TH/JFH1 HCVcc に対しても、MPL+TDM と同等の感染阻害活性が認められた。一方、polyI:C 使用群においては、単独あるいは併用使用群のいずれにおいても、IgG2a や IgG2b の抗体誘導活性は認められたが、HCVpp および HCVcc の感染阻害活性については、MPL+TDM 群ほどの誘導は見られなかった。Poly I:C の使用を考える場合には、poly I:C そのものを改善する必要があると考えられる。

今回評価したアジュバントの中で、Alum と CpG は併用による作用が最も効果的に認められた。Alum と CpG はそれぞれ NALP3 および TLR9 という分子を介して細胞を活性化することが知られているが、両方の分子を同時に活性化することで、より強く効果が現れるという可能性が考えられる。

また、HCVpp および HCVcc に対しても感染阻害活性の誘導効果は遺伝子型が異なった場合にも認められたことから、汎用性 HCV ワクチンとして使用できる可能性が強く示唆された。今後は、細胞性免疫に対する効果も検証することで、今回検討を行った体液性免疫に対する作用と合わせて、HCV ワクチンの免疫原性と最適なアジュバントを見極める予定である。

一方、ウイルス培養において夾雑物を減らすために重要な無血清培養によるウイルス培養を試みた。ウイルス培養に使用している Huh7 細胞は無血清培養に馴化可能なことが知られており、我々も無血清での培養が可能であった。さらに無血清で培養した Huh7 細胞によるウイルス産生が可能であることが明らかとなった。興味深いことに抗 CD81 抗体および抗 E2 抗体による感染阻害への感受性が変化していた。さらに、アポ蛋白抗体による感染ウイルスの除去実験により、無血清培養で作成したウイルスはほとんど除去されなかった。以上の結果から無血清培養で作成したウイルスはアポ蛋白の付加が少なく、そのため CD81 と E2 の結合への依存性が高い可能性が示唆された。

また、不活化精製ウイルス粒子で免疫したマウスには感染阻害抗体が誘導された。この免疫マウスから精製した IgG は *in vivo* での感染阻害活性があることが明らかとなった。この結果は感染予防ワクチンおよび抗 HCV 免疫グロブリン開発の可能性を示している。

1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子を組換えアデノウイルス感染パッケージング細胞を用いて blind-passage する事により、ウイルス感染価を上昇させる NS3 領域の変異を同定し

た。NS3 は非構造領域の蛋白質を切断するプロテアーゼ領域と、RNA ヘリケース領域からなる非構造蛋白質であるが、同定された変異は、ヘリケース領域に位置していた。同一の変異は過去に報告はないものの、HCV のみならず黄熱病ウイルスなど近縁のフラビウイルスにおいても NS3 のヘリケース領域のアミノ酸の変異がウイルスの粒子形成効率に影響を及ぼす事が知られている。本研究の研究結果も、NS3 蛋白質の特にヘリケース領域が、ウイルス粒子形成に重要である事を示唆するものと考えられる。構造蛋白質領域を遺伝子型 1b 由来の配列を用いても、同定された NS3 の変異は感染性粒子の産生を向上する事から、この変異は様々な遺伝子型の粒子の産生にも有効である可能性が考えられる。このシステムは、より安全なワクチン抗原としてだけでなく、感染中和の迅速な評価系やウイルス感染機構の解析にも有用である事が期待される。

HCV が効率的に増殖複製できる細胞株として分離された HuH-7T1 細胞は、HCV の感染効率やウイルス粒子の分泌効率は Huh7.5.1 細胞と比べ低かったが、細胞内でのウイルス粒子生成効率が高く、結果として培養上清中に放出されるウイルス量が多くなるため多くの細胞に広がる事が可能であると考えられた。

タマリンへの GBV-B 感染実験例では、殆どの場合持続感染に移行せずクリアランスされる。しかしながら、なぜ約 3 ヶ月もの期間、高いレベルのウイルス血症が持続するのかは不明である。他方、マーモセットへの GBV-B 感染実験結果より、一定の割合で HCV と同様に長期持続感染へと移行する事を我々は見出している。これらの現象は HCV 感染においても認められる事から、ヘパチウイル

ス属共通の特徴であると考えられる。本研究での知見を総合すると、(1) GBV-B そのものには慢性化を引き起こす能力が本来備わっているが、タマリンでは何らかの抵抗性要因が強く作用する。

(2) 亜急性期のウイルス血症持続に寄与する GBV-B の免疫回避機構はタマリン、マーモセットを問わず効果的に発揮される、(3) 慢性化へと移行する長期持続感染には、(2) で示された免疫回避機構では不十分であり、ウイルスゲノムにおける非同義置換による抗ウイルス免疫応答からの積極的なエスケープが重要な役割を果たしている(これ以外の、より積極的な免疫回避機構の存在も否定できない)、といった仮説が提唱される。こうした知見は、HCV 感染者や実験感染チンパンジーでも見られるものの、詳細な解析には至っていない。今後、これらの仮説を実証するためのウイルス学的、免疫学的解析を進めるとともに、慢性化へと移行するメカニズムを明らかにしていきたい。こうした知見は、HCV の慢性化機序の解明に有用な情報を提供するのみならず、HCV の制御法開発にも貢献できるものと期待される。

GBV-B 長期持続感染におけるウイルスゲノム変異に関する解析の結果、どちらのサル個体においても複数箇所での復帰・連続変異が見られた。特に、E1 領域では 230-285 アミノ酸残基の間に 6 箇所という高頻度の非同義置換変異が生じ、うち 3 箇所は連続・復帰変異であること、またこれらの変異はこれまでの報告では全く見られていなかったことから、マーモセットにおける GBV-B 長期持続感染において特に重要な変異であることが推定される。このことを裏付ける結果として、core, E1 領域における核酸変異数はどちらのサル

個体においても同程度であったが、E1 領域において多数の非同義置換が生じていたのに対して core 領域では殆どが同義置換であった点が挙げられよう。すなわち、E1 領域における非常に選択性の高い非同義置換が生じている事を表わしており、ウイルス複製増殖の維持、免疫応答からの回避等にとって特にメリットが高い変異であったことが伺われる。この約 50 アミノ酸残基が中和抗体の認識部位である可能性については今後詳細な機能・構造面からの解析が必要である。

重症化個体 Cj05-004 では、興味深いことに NS3 においてこれまで報告のないアミノ酸置換変異が多数認められている。特に、88 週での A1081S 変異の約 1 年後にはその近傍で I1083V 変異が、また 88 週で R1254K 変異の約 2 年後には同じくその近傍で K1251R 変異が生じている。これらの結果は、1081-1083, 1254-1251 アミノ酸残基が CTL エピトープであり、異なる近傍のアミノ酸変異による CTL からの回避に寄与している可能性が考えられる。

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、チンパンジーがほぼ使用不可能な現状では、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理想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 3 年ほどの長期におよぶ間歇的な plasma 中ウイルス RNA が検出された。また超遠心分離で濃縮した血漿の沈査に GBV-B 特異配列が確認されたことから、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確認された。これまでの解析では、抗ウイルス抗体応答が生じていないことから、ウイルス蛋白の産生量が抗原刺激に不

分な程度の量であることが伺われる。

細胞外から TLR3 のみを活性化できる RNA 誘導体はこれまで報告がなく、今回の化合物がはじめてである。In vivo と in vitro におけるサイトカイン産生誘導の違いは、in vivo において RNA 誘導体を取り込む細胞群が BMDC と異なる DC サブセットもしくは他の細胞集団の可能性を示唆しているが、in vivo での RNA 誘導体の分解、消費も考慮しなければならない。RNA 誘導体の抗がん活性はタイプ I IFN やサイトカイン産生能と平行ではないことから、異なるシグナル伝達系路もしくはシグナル伝達の間を介して誘導されると考えられる。今後、新規 RNA 誘導体による CTL 活性化能、in vivo デリバリー、担当細胞群および抗がん免疫シグナルの同定を行い、次世代アジュバントとして確立する予定である。

E. 結論

①HCV 粒子の 3 段階の精製工程を検討し、2 段階の精製工程 (ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製まで) で高効率に夾雑蛋白質が除去できる条件を見出した。

②イオン交換クロマトグラフィーにおける低回収率の原因として、溶液中の低タンパク質濃度由来する HCV 粒子の凝集や担体・基材などへの吸着が考えられた。

③HCV 粒子を安定的に精製するために、精製時の pH、バッファー、濃度勾配の最適化、および安定化剤の添加等を含めた、更なる検討が必要であると考えられた。

④精製 HCV 粒子免疫マウスにおいて、HCV E1 および E2 に対する様々なアイソタイプの IgG 抗体が誘導された。

⑤遺伝子型 2a の HCV 粒子免疫マウスにおいて、遺伝子型 2a だけではなく、遺伝子型 1a および 1b の HCVpp および HCVcc に対する感染阻害活性が誘導された。

⑥評価アジュバントの中では、Alum+CpG が最も高い免疫応答を誘導した。

⑦無血清培養により作成したウイルスの性状を解析した。

⑧不活化精製ウイルス粒子を免疫したマウスから精製した IgG に in vivo における感染阻害活性を確認した。

⑨HCV の感染増殖が可能な HuH-7 細胞をクローニングすることにより、HCV が効率的に増殖複製できる細胞株 HuH-7T1 細胞を分離同定した。

⑩C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルにおいて、ウイルスゲノム変異及び免疫学的側面からの解析を行い、HCV の慢性化機序の解明に有用な情報を多く得た。また感染性 HCV/GBV-B キメラウイルス確立に向けたサル実験で一定の成果を得た。抗 HCV 薬・ワクチンの有効性評価系として貴重な情報をもたらすものと期待される。

⑪poly(I:C)同様細胞外からエンドソーム TLR3 にターゲットされ、TLR3 を活性化し TICAM-1 を介してシグナルを伝達するが細胞質 RIG-I, MDA5 経路を活性化しない新規 RNA アジュバントを得た。本アジュバントは B16 メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)と同等の抗がん活性を示したが、マウス生体内投与での炎症性サイトカイン産生量は poly(I:C)投与より少なかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 395:565-571.
2. Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol.* 2010 84(22):11761-70.
3. Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol.* 2010 84(22):12048-57.
4. von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol.* 2010 53(5):797-804.
5. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology.* 2010 405(2):361-9.
6. Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology.* 2010 139(4): 1355-64.
7. Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol.* 2010 84(18):9118-27.
8. Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2010 51(6): 1922-32.
9. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. The protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis.* 2010 202(1):75-85.
10. Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One.* 2010 5(5):e10575.
11. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami

- M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog.* 2010 6(4):e1000885.
12. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol.* 2010 84(11):5824-35.
 13. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411-420 (2010)
 14. Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology Journal*, 7: 212 (2010)
 15. Zhang Y.-Y., Zhang B.-H., Ishii K. and Liang T. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *Journal of Virology*, 84: 3396-3407 (2010)
 16. 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*, 85: 520-524 (2010)
 17. 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* 72, 1057-1061, 2010.
 18. Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62, 601-611, 2010.
 19. Yoshida T, Saito A, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Katakai Y, Yasutomi Y, Reimann KA, Hayakawa T, Akari H: Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers in Microbiology* 1,128, 2010.
 20. Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection*, 13, 58-64, 2011.
 21. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*, in press.
 22. Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, Shibata S, Shime H, Yoshimura A, Obuse C, Seya T, and Matsumoto M. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol.*

- Chem.* DOI 10.1074/jbcM110.185793
23. Matsumoto M, Oshiumi H, and Seya T. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* DOI: 10.1002/rmv.680
 24. Sawahata R, Shime H, Yamazaki S, Inoue N, Akazawa T, Fujimoto Y, Fukase K, Matsumoto M, and Seya T. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* Dec 21 (Epub ahead of print)
 25. Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa A, and Inoue N. 2011. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
 26. Takaki H, Watanabe Y, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Mol. Immunol.* 48: 497-504.
 27. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, and Seya T. 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* 8: 496-509.
 28. Oshiumi H, Ikeda M, Mori K, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, and Seya T. 2010. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction. *Plos ONE* Dec. 8; 5(12):e14258.
 29. Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, and Seya T. 2010. Identification of a poly I:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207:2675-2687.
 30. Azuma M, Sawahata R, Akao Y, Ebihara T, Yamazaki S, Matsumoto M, Hashimoto M, Fukase K, Fujimoto Y, and Seya T. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *Plos ONE* 5, issue 9, e12550:1-12.
 31. Tatematsu M, Ishii A, Oshiumi H, Horiuchi M, Inagaki F, Seya T, and Matsumoto M. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285:20128-20136.
 32. Akazawa T, Inoue N, Shime H, Sugiura K, Kodama K, Matsumoto M, and Seya T. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science* 101: 1596-1603.
 33. Oshiumi H, Sakai K, Matsumoto M, and Seya T. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- β inducing potential *Eur. J. Immunol.* 40: 940-948.
2. 学会発表
1. Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Hiroshi