

- Yokokawa, Kazumi Nishimura, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)
2. Hiroshi Yokokawa, Daisuke Akazawa, Masaki Moriyama, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)
 3. 横川寛、赤澤大輔、森山正樹、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字「工業化のための高純度 HCV 粒子精製方法の構築」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、徳島 (2010.11.7-9)
 4. 森山正樹、赤澤大輔、横川寛、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誘導能と最適アジュバントの検討」、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、九段会館、東京 (2010.12.11-12)
 5. 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第 23 回肝臓フォーラム(東部)、日本工業倶楽部会館 (2010, 6.5)
 6. 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第 9 回 KMU 研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院 新館 12 階大会議室 (2010, 6.18)
 7. 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構」、京都大学ウイルス研究所 学術講演会、京都大学 京大会館 101 号室 (2010, 7.15)
 8. 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第 17 回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6 階 602 会議室 (2010, 11.25)
 9. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗、HCVNS5A 蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンキナーゼの探索、第 46 回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)、ワークショップ 5 「C 型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用」
 10. 有海康雄、黒木美沙緒、土方誠、Qi Yue、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、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 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム 6 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
 11. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字、HCV の増殖適応変異とその意義、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム 6 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
 12. 相崎英樹、後藤耕司、松本喜弘、山本真民、

- 佐藤慈子、高橋信弘、本島清人、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 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第 46 回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)
13. 鈴木亮介、齋藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
14. 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、千葉丈、深澤征義、感染・増殖能が上昇した C 型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
15. 阿部雄一、Aly Hassan Hussein、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠、Exploration of a new signaling pathway related to infectious HCV production、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
16. 土方誠、阿部雄一、Aly Hassan Hussein、齊月、脇田隆宇、下遠野邦忠、臨床分離 HCV 株の培養と性状、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
17. 深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、村上裕子、C 型肝炎ウイルス (HCV) に阻害作用を示す物質の探索、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
18. 渡士幸一、下遠野邦忠、Kuan-Teh Jeang、脇田隆宇、マイクロ RNA 経路の C 型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
19. 江角真理子、石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、菊田幸子、榊原由子、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
20. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達麻子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCV エンベロープタンパク質に付加される N 型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第 58 回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
21. T. Wakita. HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold Spring Harbor Asia Conference, October 18 - 22, 2010, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China
22. T. Wakita. HCV replication in vitro, The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Makuhari Messe, Chiba, Japan (2010 Dec 17-18)
23. R. Suzuki, D Akazawa, K. Ishii, Y Matsuura, T. Wakita, T Suzuki, Efficient production of *trans*-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
24. T Masaki, S Matsunaga, H Takahashi, T Kato, Y Endo, T Sawasaki, T. Wakita, T Suzuki,

- Identification of hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
25. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita, Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
26. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
27. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
28. K Watashi, K Shimotohno, K-T Jeang, T Wakita, Inhibition of HCV replication by a small molecule that suppresses microRNA pathway, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
29. M Saeed, T Kato, M Shiina, M Imamura, K Chayama, Y Choi, K Krawczynski, T. J Liang, T Wakita, Hepatitis C Virus JFH-1 Strain That Adapted In Vivo Acquired Abilities for Efficient Virus Production and Anti-apoptosis, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
30. T Kanda, R Tamura, F Imazeki, S Nakamoto, S Wu, T Roger, T Wakita, H Shirasawa, O Yokosuka, HEPATITIS C VIRUS NS5A ATTENUATES LPS-INDUCED APOPTOSIS BY DOWNREGULATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 SIGNALING PATHWAY, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
31. Y OKAMOTO, T MASAKI, A MURAYAMA, T KATO, H WATANABE, T Wakita, Affects of NS5a replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
32. 清原知子、石井孝司、脇田隆字：B型肝炎ワクチンの in vitro 試験：Inhibition Assay、第14回日本ワクチン学会、平成22年12月、東京
33. 森山正樹、赤澤大輔、横川 寛、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誘導能と最適ア

- ジュバントの検討、第14回日本ワクチン学会、平成22年12月、東京
34. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、脇田隆字、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛：2010年に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島
35. 石井孝司、吉崎佐矢香、杉山奈央、加藤孝宣、李 天成、武田直和、脇田隆字：E型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島
36. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、成松 久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、久保田智巳：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58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島
37. 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島
38. Ishii K. Surveillance of hepatitis A virus in Japan. Research Forum for the Tohoku-RITM Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. Manila, Philippines, December 10, 2010.
39. Li T.C., Liu R., Yoshizaki S., Ishii K., Miyamura T., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
40. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Use of trans-complemented hepatitis C virus particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
41. 明里宏文：C型肝炎とHIV感染症（AIDS）第57回日本実験動物学会シンポジウム（京都）平成22年5月12-14日
42. Hirofumi Akari: Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS. 2010 KALAS international symposium (Korea, Busan), August 19-21, 2010
43. 明里宏文：HCV, HIVの新規霊長類モデル開発 大阪大学微生物病研究所セミナー（大阪）平成22年8月26日
44. 明里宏文：C型肝炎の新規霊長類モデル開発 第47回日本ウイルス学会九州支部総会（宮崎）平成22年9月3-4日
45. Hirofumi Akari: A novel monkey-tropic HIV-1: toward the development of a new non-human primate model. 11th Kumamoto AIDS seminar (Kumamoto) October 6-8, 2010
46. 明里宏文：HIV-1感染霊長類モデルの開発 第58回日本ウイルス学会シンポジウム（徳島）平成22年11月7-9日
47. 土肥直哉、齊藤暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤宏徳、足立昭夫、野間口雅子：サル指向性HIV-1 CAの1アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する 第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）平成22年11月7-9日

48. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析 第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
49. 野間口雅子、齊藤暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤宏徳、足立昭夫：サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 の構築－アカゲザル TRIM5 α と tetherin による抑制の回避－ 第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
50. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析 第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
51. Matsumoto M, Watanabe A, Seya T.: Raftlin is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid dendritic cells. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
52. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T.: Riplet ubiquitin ligase is essential for RIG-I dependent type I interferon production. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
53. Seya T, Shime H, Azuma M, Matsumoto M.: RNA adjuvants that induce multiple effectors by dendritic cells for facilitating antitumor immunity. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
54. Watanabe A, Seya T, Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14th International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27.
55. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M.: Identification of Leu194 as a key residue of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. **14th International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27.

G.知的所有権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：C型肝炎ウイルスワクチン組成物
出願番号：PCT/JP2010/067096 出願日：2010.9.30
発明者：森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、脇田隆字

II. 分担研究報告

分担研究報告書

ウイルス粒子大量精製法およびウイルス免疫法の開発

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の開発を報告する。

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/JFH1:J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a) 濃縮液を multiplicity of infection (MOI) が 0.2 となるように $500 \mu\text{L}$ の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、 37°C 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 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、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 社) に継代培養し、さらにセルスタック (5 段、Corning 社) 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 (DMEM-2) 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 DMEM-2 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、DMEM-2 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 $650 \text{ mL} \times 3$ の培養液を回収した。得られた培養液は $0.45 \mu\text{m}$ フィルター濾過を行い、使用するまで -80°C で保存した。

2. HCV 粒子大量精製

HCV 培養上清の限外ろ過膜による精製：

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む 21 L の培養上清をホローファイバー UFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 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。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで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 Sepharose 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、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (BECKMAN 社) に 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溶出プール画分を 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、Optima L-70K (BECKMAN 社) で SW28 ローターにて 28,000 rpm、4°C、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ社) 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 μ L 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 社) 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 (オーソ社) 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。

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°C で保存した。

3. 精製 HCV 粒子のマウスへの免疫

HCV 抗原：

12 L の J6/JFH1 培養上清 (比活性 (core/protein) = 0.039 pmol/mg) から限外ろ過膜およびシヨ糖密度勾配遠心により精製し (比活性 = 94.3 pmol/mg)、2400 倍に精製された HCV を使用した。1 回の投与量は、1 匹あたり 2 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV とした。

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、200 μ g、25 μ g、100 μ g および 100 μ L 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：

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。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 (BD 社) のものを 1.5 mL チューブに約 50 μ L ずつ分注して使用した。その後、1,200 \times 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 $^{\circ}$ C で保存した。

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。

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 \times 10⁶ 個の 293T 細胞を 10 cm コラーゲンコートディッシュ (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6 (Roche 社) を用いて 3 μ g の MMLV Gag-Pol 発現ベクター (Gag-Pol)、3 μ g の LTR カセット挿入 luciferase 発現ベクター (Luc126) および 1 μ g 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 時間後に培養液を交換した。48 時間培養後の培養上清を回収し、0.45 μ m フィルターで濾過して使用まで -80 $^{\circ}$ C 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. マウス血清の感染阻害活性の測定

感染阻害実験は HCVpp または HCVcc を用いて行った。HCVpp を使用する場合は、2 \times 10⁴ 個の Huh7.5.1 細胞を 48-well プレート (IWAKI 社) 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 $^{\circ}$ C、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 $^{\circ}$ 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 の培地を添加して 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 μ L/well の 1 \times Cell Culture Lysis Reagent (Promega 社) を添加して調製した。

HCVpp の感染は上記ライセートの 20 μ L を Luciferase Assay System (Promega 社) 50 μ L と反応させ、攪拌後直ちに 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。

HCVcc を使用する場合は、前日に poly-D-lysine コート 96-well plate (BD BioCoat™ 96 ウェルマイクロプレート、BD 社、#356461) に Huh-7.5.1 細胞を 1 \times 10⁴ cells/100 μ L/well で播種した。マウス血清を培地で 50 倍に希釈して、HCVcc と等量で混合し、室温で 30 分間静置した (マウス血清の最終希釈倍率 100 倍)。また、血清の陽性対照として、HCV 受容体の一つである抗 CD81 抗体を用いた。インキュベーション後、培地を除去した細胞に、上記血清希

釈サンプルと HCVcc の混合液を 50 μ l/well で添加して 37°C、3 時間、インキュベーションして感染させた (HCVcc は moi=1) (または、マウス血清溶液 25 μ L/well、HCVcc 溶液 25 μ L/well の順に細胞に添加して、感染させた)。インキュベーション後に上清を除去し、PBS 100 μ L/well で一度洗浄した後に、培地 200 μ l/well に置換して 37°C で 72 時間培養した。培養後、培地を除去し、PBS 100 μ L/well で一度洗浄した後に、メタノールに浸して -20°C で 15 分静置した。その後、プレートを乾燥させて、検出する時まで -80°C で保存した。後日、各 well の core 量をマウス抗 HCV Core 抗体 2H9 で測定することにより、その値を感染 HCV 量として、そこから感染阻害活性を算出した。

(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。また、動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行っている。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 21 L 中のコアタンパク質量、HCV RNA 量および全タンパク質量を測定した。その結果、それぞれ、615.4 pmol、 8.7×10^7 コピー/mL、15,903 mg であった。このサンプルを限外濾過することにより、液量が 563 mL となり、

コアタンパク質量、HCV RNA 量および全タンパク質量は、それぞれ 609.3 pmol、 1.87×10^9 コピー/mL、166.8 mg となった。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、25 mL (コアタンパク質量 ; 66 pmol、全タンパク質量 ; 7.7 mg) を 250 mL 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量および全タンパク質量はそれぞれ 46.7 pmol、0.9 mg であり、コアタンパク質の回収率は 71%、コアタンパク質量に基づけば、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 5 mL (コアタンパク質量 ; 1.335 pmol、全タンパク質量 ; 0.029 mg) を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果、コアタンパク質が存在する画分の全容量は 9 mL であり、そのときのコアタンパク質量および全タンパク質量はそれぞれ 0.16 pmol、0.0082 mg であり、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、2 週間おきに 4 回マウスの腹腔に投与し、免疫後

1週間後毎に採血し、血清を調製した。血清を1,0000倍希釈し、E1およびE2タンパク質に対する抗体価をEIAにて測定した。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。マウス血清は100倍希釈して使用した。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。

D. 考察

我々は、これまでに遺伝子型2aキメラHCVであるJ6/JFH1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500kDa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。しかし、ショ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。そこで、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、Sephacrose 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。本検討においては、2週間の間隔を空けて4回免疫を行い、免疫期間中の血清中の抗体価の推移を測定した。その結果、免疫を行っていない control マウスと比較すると、いずれの投与群でも明らかな IgG 抗体価の上昇が見られた。さらに誘導された IgG 抗体中のアイソタイプを測定したところ、IgG1 については、3種類のアジュバントを単独あるいは併用した群のいずれにおいても誘導が確認された。一方、IgG2a、IgG2b および IgG3 については、poly I:C 単独あるいは3種類のアジュバントを組み合わせた群において強い抗体誘導が認められた。したがって、total IgG の抗体価に対するアジュバント間の効果の差異は、IgG2a、IgG2b および IgG3 の差異が反映されているものと考えられる。

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。Th2 タイプの免疫応答はいわゆる体液性免疫反応を示し、Th2 細胞と B 細胞を中心とした防御機構を意味する。また、Th1 タイプの免疫応答は細胞性免疫反応を示し、Th1 細胞と CD8T 細胞を中心とした防御機構のことを指している。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る。さらに、Th2 のみに特化した反応においては IgE を誘導するケースがあり、その場合にはアレルギー応答を引き起こすという点で望ましくない。したがって、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。その結果、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。以上から、Alum+CpG 群の感染阻害活性の誘導効果が、再現性を持って確認できた。一方、poly I: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。いずれの検討においても poly I:C には併用によるアジュバント効果の増

強が認められなかった。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。さらには、不活化 HCV 粒子ワクチンは TLR7 を活性化するウイルス由来の RNA も含まれている。TLR7 および TLR9 の両方を有するような細胞としては、特に I 型インターフェロンの主要産生細胞であるプラズマサイト様樹状細胞が挙げられるが、このような細胞を効率的に活性化するのかもしれない。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。

アジュバントの組み合わせを考える場合においては、大きく 2 つの要素を考慮する必要がある。1 つは細胞応答に対する作用が異なるアジュバントを組み合わせる場合で、特に樹状細胞への抗原の取り込みを高めるアジュバント (Alum など) と、樹状細胞の活性を高めるアジュバント (MPL、CpG など) というようにメカニズムが異なるものを使用するケースである。もう 1 つは細胞の受容体へ作用した後のシグナル伝達経路が異なるというケースで、これには MyD88 依存的経路のみを活性化する受容体 (TLR2、TLR5、TLR7、TRL9 など) に作用するアジュバント、MyD88 非依存的経路のみを活性化する受容体 (TLR3) に作用するア

ジュバントというように作用が異なるものがある。これらの組合せや構成比率などをさらに広く検討することにより、現状のアジュバントよりも効果の高いアジュバントを見出すことができる可能性がある。

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。

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。

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.

学会発表

1) Masaki Moriyama, Daisuke Akazawa, Hiroshi Yokokawa, Kazumi Nishimura, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)

2) Hiroshi Yokokawa, Daisuke Akazawa, Masaki Moriyama, Noriko Nakamura, Hidenori Mochizuki, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Koji Ishii and Takaji Wakita 「Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production」, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan (2010.9.10-14)

3) 横川寛、赤澤大輔、森山正樹、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字「工業化のための高純度 HCV 粒子精製方法の構築」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、徳島 (2010.11.7-9)

4) 森山正樹、赤澤大輔、横川寛、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誘導能と最適アジュバントの検討」、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、九段会館、東京 (2010.12.11-12)

G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 発明の名称：C型肝炎ウイルスワクチン組成物

出願番号 : PCT/JP2010/067096

出願日 : 2010.9.30

発明者：森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、脇田隆字

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 隆宇

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. 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。

2. 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。

(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. 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。

2. 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。

D. 考察

本年度は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。

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。

E. 結論

1. 無血清培養により作成したウイルスの性状を解析した。
2. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: 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.
- 2: 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.
- 3: 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.
- 4: 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.
- 5: 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.
- 6: 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.
- 7: 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.
- 8: Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La 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.
- 9: 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.
- 10: 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.
- 11: 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(4):565-71.
- 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.

2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第23回肝臓フォーラム（東部）、日本工業倶楽部会館（2010, 6.5）

2. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第9回KMU研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院新館12階大会議室 (2010, 6.18)
3. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構」、京都大学ウイルス研究所 学術講演会、京都大学 京大会館101号室 (2010, 7.15)
4. 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第17回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6階602会議室 (2010, 11.25)
5. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗、HCVNS5A 蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンキナーゼの探索、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)、ワークショップ5「C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用」
6. 有海康雄、黒木美沙緒、土方誠、Qi Yue、池田正徳、脇田隆字、下遠野邦忠、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58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
7. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字、HCVの増殖適応変異とその意義、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
8. 相崎英樹、後藤耕司、松本喜弘、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、本島清人、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粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)
9. 鈴木亮介、齋藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
10. 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉丈、深澤征義、感染・増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
11. 阿部雄一、Aly Hassan Hussein、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠、Exploration of a new signaling pathway related to infectious HCV production、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
12. 土方誠、阿部雄一、Aly Hassan Hussein、齊月、脇田隆字、下遠野邦忠、臨床分離HCV株の培養と性状、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
13. 深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、村上裕子、C型肝炎ウイルス (HCV) に阻害作用を示す物質の探索、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
14. 渡士幸一、下遠野邦忠、Kuan-Teh Jeang、脇田隆字、マイクロRNA経路のC型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
15. 江角眞理子、石橋眞理子、鶴田浩一、山口

- 裕美、菊田幸子、榑原由子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
16. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCV エンペロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9))
17. T Wakita. HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold Spring Harbor Asia Conference, October 18 - 22, 2010, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China
18. T Wakita. HCV replication in vitro, The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Makuhari Messe, Chiba, Japan (2010 Dec 17-18)
19. R Suzuki, D Akazawa, K Ishii, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, Efficient production of *trans*-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
20. T Masaki, S Matsunaga, H Takahashi, T Kato, Y Endo, T Sawasaki, T Wakita, T Suzuki, Identification of hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
21. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita, Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
22. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
23. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
24. K Watashi, K Shimotohno, K-T Jeang, T Wakita, Inhibition of HCV replication by a small molecule that suppresses microRNA pathway, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
25. M Saeed, T Kato, M Shiina, M Imamura, K