

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)

26. 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)

27. 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)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

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 これまでにプラスミドトランスフェクションによるC型肝炎ウイルス(HCV)の1回感染性トランスパッケージング型粒子の産生系を確立した。構造蛋白質発現組換えアデノウイルスを感染させたパッケージング細胞を用い、トランスパッケージング型HCV粒子のblind-passageを行ったところ、NS3領域に変異を有する増殖の良いトランスパッケージング型粒子が得られた。このNS3の変異はゲノムの複製効率は向上させないが、ウイルスの粒子形成効率の向上が認められた。さらにこの変異は、他の遺伝子型の構造蛋白質を用いた場合にもトランスパッケージング型粒子の産生効率が向上した。このような効率の良い感染性トランスパッケージング型HCV粒子産生系は、安全なワクチンの抗原としてだけでなく、HCVの感染過程の解析にも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で1.7億人、国内で200万人と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝臓癌へと移行し、肝臓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。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等に向けた予防的ワクチンの開発も期待されている。

本研究では、感染性HCV粒子としてより安全性の高い、1回感染性トランスパッケージング型粒子の産生効率の向上を検討した。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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ことから、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。

D. 考察

本研究により、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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

論文発表

1. 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)
2. 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.* 84: 5824-5835 (2010)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

C型肝炎ウイルス粒子高生産系
(脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎)
特許番号：1956087、登録国：E P

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Moriishi K, Shoji I, Mori Y, <u>Suzuki R</u> , Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y.	Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus.	Hepatology.	52	411-420	2010
Masaki T, <u>Suzuki R</u> , 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.	84	5824-5835	2010

分担研究報告書

HCV 粒子の効率的な生成のための新規細胞株の分離同定

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ワクチンの開発が期待されている。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が、現行の JFH-1 株を HuH-7 細胞で複製させることで得られるウイルス粒子量では十分で無い。そこで HuH-7 細胞をクローニングすることで、より HCV の増殖複製に適した細胞株を同定し、効率の良い HCV 粒子産生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) 感染症は成人感染でも高率に慢性化するため、世界中に多くの感染者が存在し、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより、輸血後のC型慢性肝炎発症者は減少しているが、医療従事者などのハイリスク群では新規感染者が少なからず存在する。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているがその治療効果は十分でなく、薬剤が高額であるため医療経済を圧迫している。HCV 感染による肝疾患を減少させるためには新規感染者を無くすことが必要であり、感染予防ワクチンの開発が期待されている。

2005年に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

の感染性粒子を培養細胞で作製することが可能となった。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ほぼ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HCV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、現行の方法では限界がある。さらにHCVはそのゲノムに多様性を持つことが知られており、高い中和活性を持つワクチンを作製するためには、JFH-1以外の株の構造領域を持つウイルス株の粒子の作製が必要となる。しかし、JFH-1株の構造領域を他の株に入れ換えたキメラウイルスでは、培養細胞での増殖複製能が低いものもあるため、効率の良くウイルス粒子を産生できるシステムが必要である。

これまでJFH-1株に変異を導入することで、JFH-1株よりも増殖効率の良い適応変異ウイルスを作製することで、ウイルス因子の側から効率の良いウイルス粒子産生系の検討を行って来た。今回、本研究では宿主細胞側からのアプローチを試み、HCVが効率的に増殖複製できる細胞を分離同定することでワクチン作製に適した細胞の樹立し、さらに効率の良いウイルス粒子産生系の構築を試みた。

B. 研究方法

1. 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。

2. 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。

(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 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。

2. 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、同量の HCVpp を HuH-7T1 細胞に感染させた時のルシフェラーゼ活性は Huh7.5.1 細胞の約 40%であった。培養細胞で作製された JFH-1 ウイルスの再感染実験でもほぼ同様の結果であり、HuH-7T1 細胞の感染効率は Huh7.5.1 細胞と比較して低いと考えられた。そこで、それぞれの細胞の細胞表面での CD81 発現を FACS で解析したところ、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、これが低い感染効率に関与していると考えられた。

次に細胞内での HCV 複製効率を比較した。JFH-1/SGR 導入 4h 後のルシフェラーゼ活性は HuH-7T1 細胞では Huh7.5.1 細胞より低く、導入効率もしくは翻訳活性が HuH-7T1 細胞で低いと考えられた。4h 後の値で補正した 24h 後 48h 後のルシフェラーゼ活性は 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評価したところ、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。

D. 考察

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よく、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のが可能であるとと考えられた。

E. 結論

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と考えられた。

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*, 395, 565-571, 2010.

2. 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, 6, e1000885, 2010.

2. 学会発表

1. 加藤孝宣、脇田隆宇. C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能第45回日本肝臓学会総会、山形、2010年5月。

2. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇. HCVの増殖適応変異とその意義シンポジウム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. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月。

3. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇. HCVの増殖適応変異とその意義シンポジウム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. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11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（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、これまでに新規治療薬やワクチンの評価系として開発を進めてきたC型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルにおいて、慢性化の機序を解明する目的でウイルスゲノム変異及び免疫学的側面からの解析を行なった。その結果、GBV-B感染サル血液中にウイルス抗原特異的IFN γ 発現細胞が高い割合で検出されるにも関わらず、高いレベルのウイルス血症が数ヶ月間持続することが明らかとなった。またGBV-B長期持続感染マウモセットにおいて、高頻度の選択的なアミノ酸置換変異が認められた。以上のことから、少なくとも2段階の免疫回避機構がGBV-Bの慢性化に必要であることが示された。一方、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、ほぼ3年に及ぶ間断的な血漿中ウイルスRNAが検出された。またこの血漿を超速心分離で濃縮しその沈査に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。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感染等侵襲の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。今年度はこれまでに開発を進めてきたC型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルにおいて、慢性

化の機序を解明する目的でウイルスゲノム変異及び免疫学的側面からの解析を行なった。さらに我々は、より優れた霊長類モデル作出を念頭に、昨年度より継続しているHCVとGBV-Bのキメラウイルスクローン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。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ングにより解析した。

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、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。

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。

C. 研究結果

1. GBV-B感染初期における抗ウイルス免疫応答

これまでの知見で、タマリンへのGBV-B感染では多くの急性感染症を引き起こすウイルスと異なり、抗ウイルス抗体価がピークに達するまでに2~3

ヶ月を要する。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、この疑問を明らかにする目的で、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 γ 産生が認められた(図1)。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。

2. 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モセット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症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。

3. HCV/GBV-B キメラウイルスの構築とその評価に関する研究

昨年度までの研究において、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 (図4)。現在、よりサル細胞及び個体で効率良く複製・増殖が可能なキメラウイルスクローンの構築を進めているところである。

D. 考察

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事から、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 8

8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。

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。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十分な程度の量であることが伺われる。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

今年度は、これまでに新規治療薬やワクチンの評価系として開発を進めてきた 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。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。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 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

2. Hirofumi Akari: Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS. 2010 KALAS international symposium (Korea, Busan), August 19-21, 2010

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

2. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. **Immunogenetics**, in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1. GBV-B感染タマリンにおける抗ウイルス免疫応答

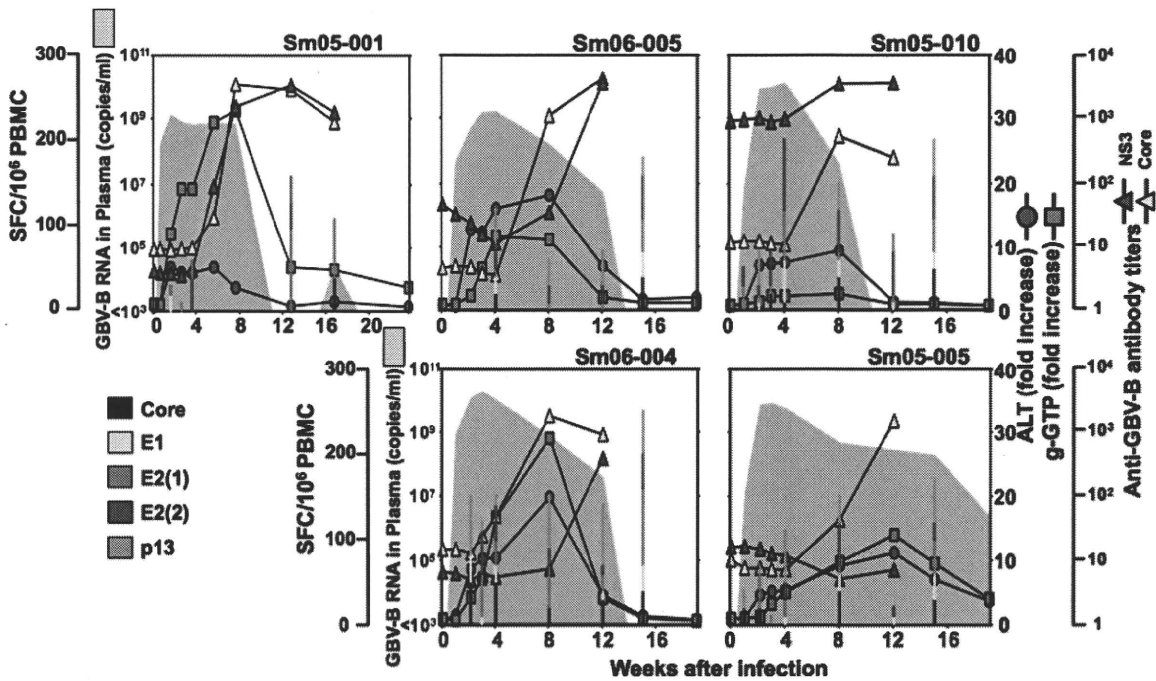
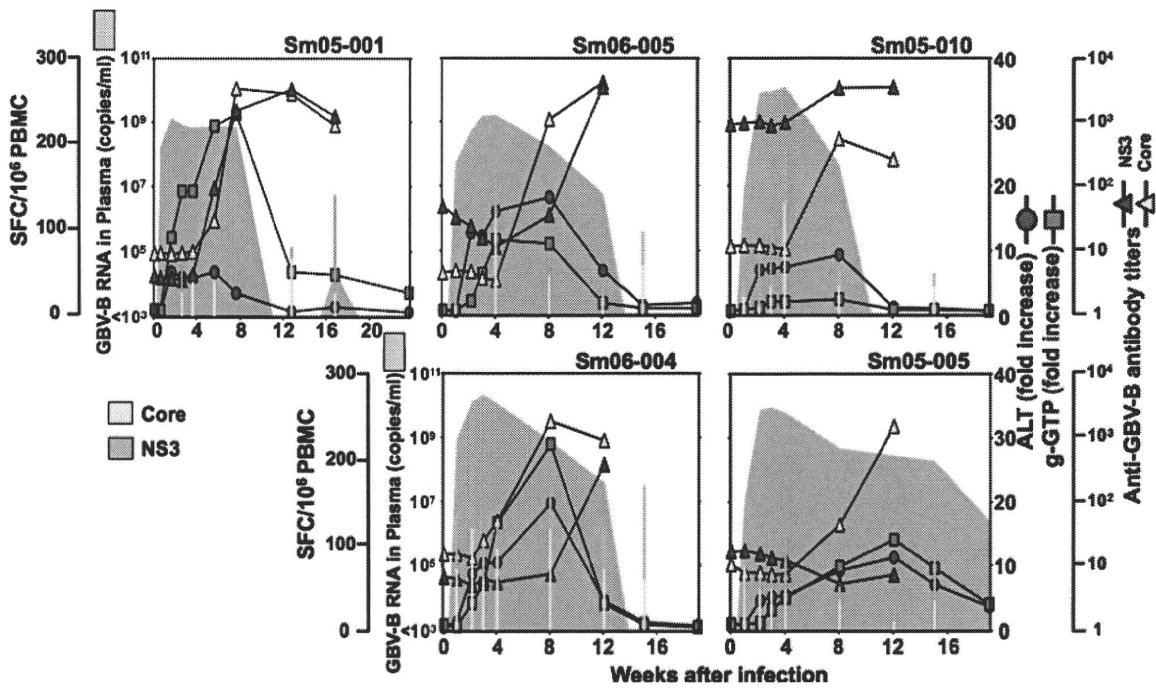


図 2. GBV-B 長期持続感染マーマセットにおける GBV-B ゲノム変異の推移

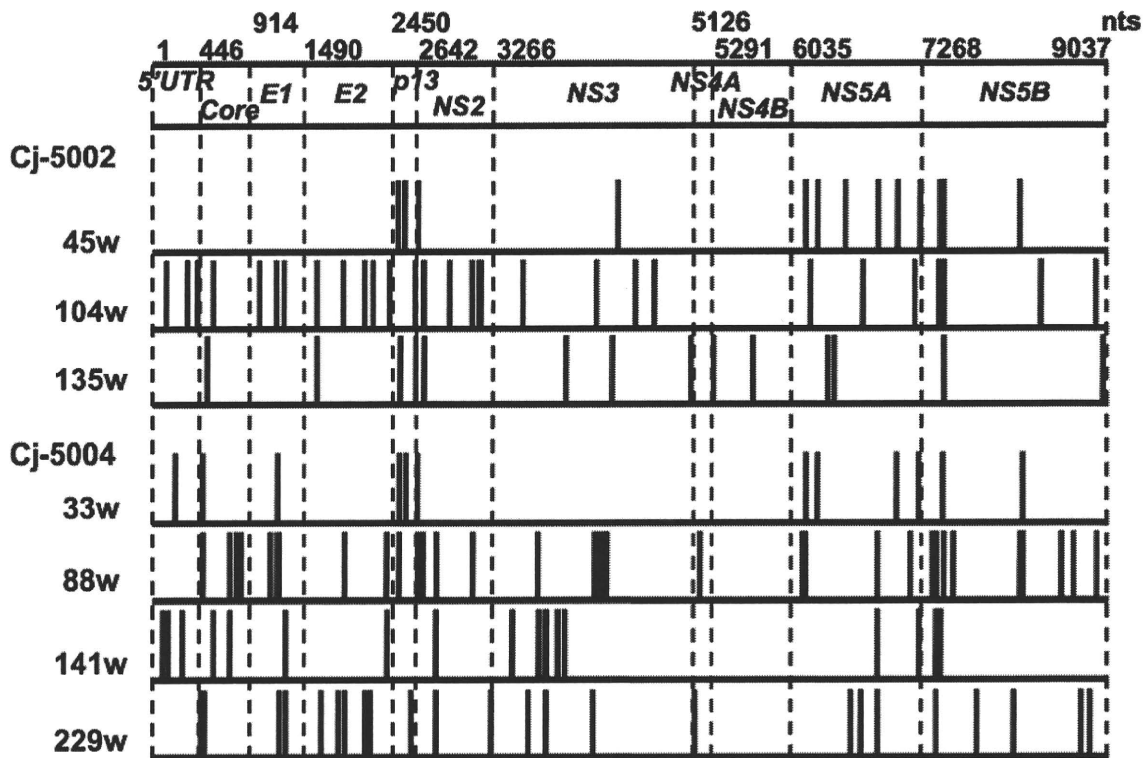


図 3. GBV-B 長期持続感染マーマセットにおける GBV-B アミノ酸変異の推移

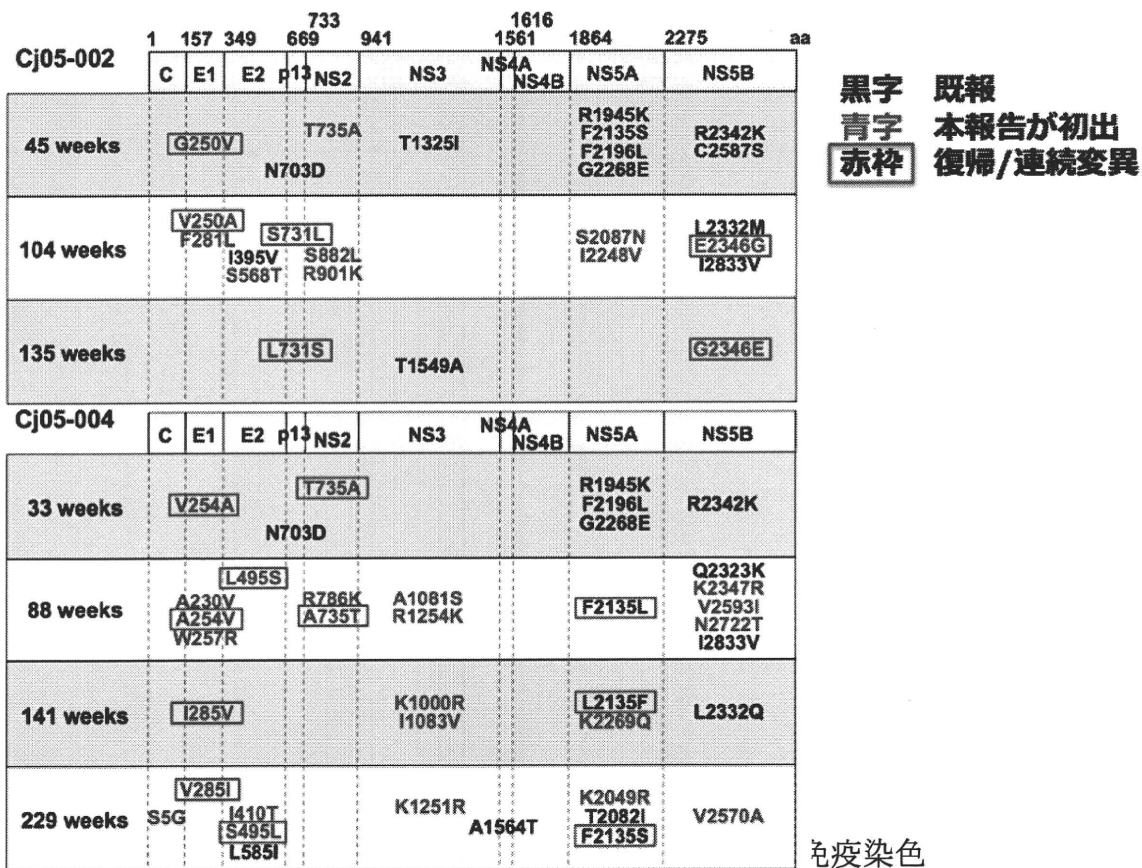
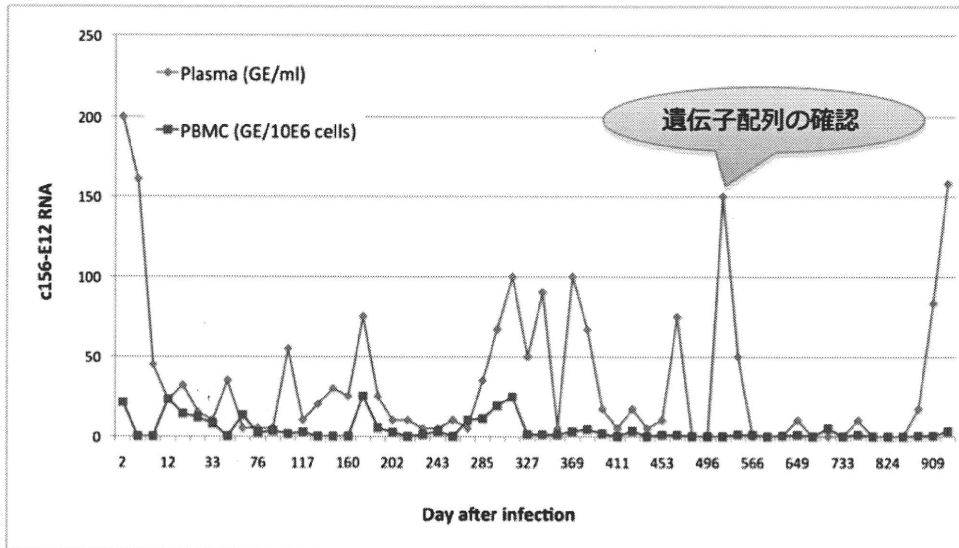
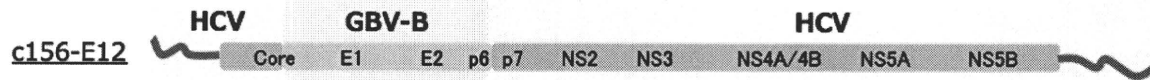


図4. タマリンへの HCV/GBV-B キメラウイルスクローン接種後のウイルスロード推移

HCV/GBV-Bキメラ感染タマリン



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 効果的な免疫応答の誘導には、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を惹起できるアジュバントが必要である。本研究では、樹状細胞のTLR3-TICAM-1経路のみを細胞外から活性化し、過度の炎症性サイトカイン産生を誘導せず細胞性免疫を起動できる新規合成RNAアジュバントの開発に成功した。

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。Toll-like receptor (TLR) 3のリガンドである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し、有力な次世代アジュバントとして有望視されているが、副作用の強さから臨床応用には至っていない。Poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外にも細胞質内のRIG-I, MDA5経路も活性化し、炎症性サイトカインやタイプI IFN産生を誘導することから、両経路の活性化が強い副作用をもたらすと考えられる。Poly(I:C)によるCTL誘導にはTLR3経路が重要であることから、本研究では、TLR3経路のみ活性化し、過度の炎症性サイトカインやType I IFN産生を誘導しない新規RNAアジュバントの開発を目的とした。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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

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パラレルではないことから、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

以下の特徴を有する新規RNAアジュバントを得た。

1. poly(I:C)同様細胞外からエンドソームTLR3にターゲットされる。
2. TLR3を活性化しTICAM-1を介してシグナルを伝達する。
3. 細胞質RIG-I, MDA5経路を活性化しない
4. 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す。
5. 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)投与より少ない

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe, A. M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* DOI 10.1074/jbcM110.185793
 2. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* DOI: 10.1002/rmv.680
 3. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, N. Inoue, T. Akazawa, Y. Fujimoto, K. Fukase, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* Dec 21 (Epub ahead of print)
 4. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, A. Akazawa, and N. Inoue. 2011. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
 5. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Mol. Immunol.* 48: 497-504.
 6. Oshiumi, H. M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* 8: 496-509.
 7. Oshiumi. H., M. Ikeda, K. Mori, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, N. Kato, K. Shimotohno, and T. Seya. 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.
 8. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 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.
 9. Azuma M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *Plos ONE* 5, issue 9, e12550:1-12.
 10. Tatematsu M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285:20128-20136.
 11. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science* 101: 1596-1603.
 12. Oshiumi H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 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. 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.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
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
H. Ohtani <i>et al.</i>	Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates.	Immunogenetics	In press		2011
A. Watanabe <i>et al.</i>	Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation.	J. Biol. Chem.	In press		2011
M. Matsumoto <i>et al.</i>	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway.	Rev. Med. Virol.	In press		2011
R. Sawahata <i>et al.</i>	Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2.	Microbes Infect.	In press		2011
A. Saito <i>et al.</i>	Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications.	Microbes and Infection	13	58-64	2011
M. Yabu <i>et al.</i>	IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid.	Int. Immunol.	23	29-41	2011
H. Takaki <i>et al.</i>	Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential.	Mol. Immunol.	48	497-504	2011
H. Takahashi <i>et al.</i>	Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope.	Biochem Biophys Res Commun.	395	565-571	2010
L. Weng <i>et al.</i>	Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner.	J Virol.	84	11761-11770	2010
T. Hishiki <i>et al.</i>	Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms.	J Virol.	84	12048-12057	2010
A. von dem Bussche <i>et al.</i>	Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication.	J Hepatol.	53	797-804	2010
K. Mishima <i>et al.</i>	Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants.	Virology	405	361-369	2010
P. Podevin <i>et al.</i>	Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes.	Gastroenterology	139	1355-1364	2010
Y. Kushima <i>et al.</i>	A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production.	J Virol.	84	9118-9127	2010
K. Banaudha <i>et al.</i>	Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis.	Hepatology	51	1922-1932	2010