

10-14)

79. 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)

80. 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)

81. 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)

82. T Wakita. HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan (2009, 9. 29)

83. T Wakita. HCV cell culture system and antiviral development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma,

Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan (2010, 2. 19)

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

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

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

87. A CARPENTIER, P PODEVIN, V PENE, L AOUDJEHANE, M CARRIERE, S ZAIDI, C HERNANDEZ, JF MERITET, O SCATTON, M DREUX, F COSSET, R

BARTENSCHLAGER, T WAKITA, F CONTI, Y CALMUS, AR ROSENBERG, HCV GROWN IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES HAS HIGHER SPECIFIC INFECTIVITY AND LOWER BUOYANT DENSITY THAN HCV GROWN IN HUH-7 CELL LINE, 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Nice, France (2009, 10. 3-7)

88. A SAULNIER, G GROULT, D GHIBAUDO, T WAKITA, L COHEN, C MARNATA, A

- MARTIN, ANALYSIS OF PARTICLE ASSEMBLY FROM CHIMERIC HCV JFH-1 GENOMES EXPRESSING E1-E2- p13 OF GB VIRUS B, Nice, France (2009, 10. 3-7)
89. R SUZUKI, K SAITO, T ANDO, K ISHII, Y MATSUURA, T MIYAMURA, T WAKITA, T SUZUKI, PLASMID-BASED PRODUCTION OF TRANS-COMPLEMENTED HCV PARTICLES: ITS USE FOR FUNCTIONAL ANALYSIS OF NS2, Nice, France (2009, 10. 3-7)
90. N ARNAUD, S DABO, P MAILLARD, A BUDKOWSKA, D GARCIN, A GATIGNOL, T WAKITA, E MEURS, HCV INDUCES IFN AT THE EARLY STEPS OF INFECTION, Nice, France (2009, 10. 3-7)
91. M MORIYAMA, D AKAZAWA, N OMI, Y SHIBUYA, K NISHIMURA, N NAKAMURA, H MOCHIZUKI, T SUZUKI, K ISHII, T WAKITA, VACCINATION OF INFECTIOUS HCV PARTICLES WITH SEVERAL ADJUVANTS AND INDUCTION OF NEUTRALIZATION IMMUNOGLOBULIN IN MICE, Nice, France (2009, 10. 3-7)
92. T Wakita, HCV replication and virus particle formation, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
93. T Wakita. Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7<sup>th</sup> Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan (June 1-3, 2008)
94. T Wakita. Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
95. Hideki AIZAKI, Kenichi MORIKAWA, Masayoshi FUKASAWA, Hiromichi HARA, Ryousuke SUZUKI, Hideki TANI, Kentaro HANADA, Yoshiharu MATSUURA, Michael M.C. LAI, Tatsuo MIYAMURA, Takaji WAKITA, Tetsuro SUZUKI. Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
96. Kyoko Murakami, T Wakita et al. Identification of hnRNP1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
97. M Saeed, T Kato, T Wakita, In vitro replication efficiencies of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged in chimpanzee, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
98. Takahashi H, Omi N, Akazawa D, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T, Biological properties of purified recombinant HCV particles with the epitope-tagged envelope, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
99. Uenishi R, Hakamata W, Nohtomi K, Liao

- H, Hase S, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y, Identification of novel Small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
100. Munakata T, Wakita T, Nomoto A, Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C virus infection, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
101. Zeisel MB, Hoffmann M, Jilg N, Stoll-Keller F, Wakita T, Barth H, Henneke P, Baumert TF. Sensing of hepatitis C virus core by toll-like receptor 2 is shielded in enveloped viral particles, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
102. I Hamamoto, K Murakami, T Suzuki, K Taya, N Okabe, T Wakita, I Shoji, ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
103. Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y, Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, Nishijima M, Mashino T, Anti-HCV activity of novel Fullerene derivatives, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
104. Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
105. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T, Production and purification of HCV particles from serum-free culture, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
106. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
107. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
108. Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

109. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
110. Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T, Purification and structural analysis of HCV E2 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
111. Angus AGN, Dalrymple DA, Boulant S, McGivern DR, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH, Hepatitis c virus replication does not depend on the interaction between the viral core protein and the cellular RNA helicase DDX3, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
112. Shin K-S, Lim Y-S, Choi S-H, Wakita T, Hwang SB, Regulation of heat shock protein 70 by hepatitis c virus NS5A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
113. Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I, Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
114. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
115. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
116. Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T, A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
117. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J, Ethanol enhances hepatitis c virus replication in human hepatoma cells supporting infectious virus production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
118. I Shoji, M Osaki, K Murakami, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita, H Hotta, Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio

TX, USA (2008, 10. 5-9)

119. Sir D, Chen W-L, Wakita T, Yen TSB, Ou J-HJ, Perturbation of autophagic response by hepatitis c virus, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

120. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Shoji I, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)

121. K Morikawa, D Akazawa, Imawari M, T Wakita. The structural analysis of highly purified infectious HCV particles produced in cultured cells. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)

122. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Onuki Y, Yamamoto M, Wakita T, Watanabe M, Establishment and genetic analysis of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)

123. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ.

Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)

124. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Li J, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況  
なし

効率の良いC型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子産生系の確立

分担研究者 石井 孝司 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

鈴木 亮介 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

**研究要旨** 2種類のプラスミドトランスフェクションによる、1回感染性のトランスパッケージング型C型肝炎ウイルス（HCV）粒子産生系を確立した。構造蛋白質に適応変異を導入する事により産生効率はさらに向上した。また遺伝子型2aだけではなく、1b由来の感染性粒子の産生も可能であった。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を行う事により、ウイルスの粒子形成効率が向上するNS3領域の変異を同定した。1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子は、HCVと同様にCD81依存的にHuh-7細胞する事から、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、培養細胞で効率良く増殖が可能なJFH1株を用い、HCVのレプリコンがパッケージングされた1回感染性HCV粒子産生系を確立した。また複数の遺伝子型の構造蛋白質を用いた粒子産生の検討も行った。さらに様々な適応変異の導入やパッケージング細胞等を用いてさ

らなる産生効率の向上を検討した。

B. 研究方法

複数の株由来のcore～NS2領域を発現するプラスミドを作製した。一方、JFH-1株のレプリコン（構造蛋白質領域を欠損したEMCV-IRESおよびF luc遺伝子を挿入したもの）cDNAをpolI promoter/terminator間に挿入したレプリコンプラスミドを作製した。これらのプラスミドをHuh7.5.1細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらにnaïveなHuh7.5.1細胞に感染させ、3日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。また、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、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。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を行い、さらに増殖の良いト

ランスパッケージング型 HCV 粒子を得た。

### C. 研究結果

HCV の構造領域発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを同時に Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションする事により、遺伝子型 2a の 1 回感染性トランスパッケージング型粒子の産生が認められた。また構造領域への適応変異の導入により、産生効率は向上した。さらに 1b の構造蛋白質を用いた場合においても感染性トランスパッケージング型粒子の産生が認められた。

また、これらの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。この変異の導入はゲノム複製には影響しなかったにもかかわらず、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た。またこの変異は 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、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~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。このシステムは、HCV の生活環の中でも、HCV のゲノムパッケージングや粒子形成等のステップを解明するのに有用であるばかりでなく、感染中和等の迅速な評価や薬剤のスクリーニングにも利用可能であると考えられる。また効率的な 1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子作製法の確立は、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、複数の遺伝子型の 1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子の産生に成功した。また適応変異の導入により、粒子の産生量を飛躍的に向上させる事に成功した。

### 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)
3. 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).
4. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* 83: 2389-2392 (2009).
5. Suzuki, R., Winkelmann, E.W., Mason P.W. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus

- vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J. Virol.* 83: 1870-1880 (2009).
6. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
  7. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
  8. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
  9. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
  10. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis.* 13: 929-937 (2008).
  11. Suzuki, R., Fayzuln, R., Frolov, I., Mason P.W. Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes: Use in safer propagation of a novel vaccine candidate. *J. Virol.* 82: 6942-6951 (2008).
  12. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods.* 148: 174-181 (2008).
- 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  
(脇田隆宇、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



分担研究報告書

HCV 粒子ワクチンに向けた HCV 大量培養法の確立  
：ウイルス側と宿主側からのアプローチ

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 株を用いることで培養細胞での HCV 粒子の合成が可能となった。しかしこの合成ウイルス粒子をワクチンとして利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 HuH-7 細胞を用いた複製系で得られるウイルス粒子量では十分では無い。そこで JFH-1 株に適応変異を導入することでさらに強い増殖能を持つ株を作製し、さらに HuH-7 細胞から HCV が増殖複製しやすい細胞を株化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

HCV 感染症は世界中に 1 億 7 千万人(HIV 感染者の 4 倍)、日本でも 100 万人以上の感染者が存在し、大きな社会問題となっている。このウイルスが世界中に蔓延している原因のひとつとして、高い慢性化率が挙げられる。一旦このウイルスに感染すると、急性肝炎から慢性肝炎、肝硬変に至る慢性肝疾患を引き起こし、自然治癒はほとんど認めない。さらに HCV 感染は肝癌発症の原因となり、現在日本の肝癌死亡数の約 75%がこのウイルスの感染によるものと考えられている。輸血用血液のスクリーニングにより HCV の新規感染者数は減少しているが、医療従事者などでは針誤刺や観血的処置に伴う感染のリスクが有り、新規感染者は少なからず存在する。また HCV キャリアの高齢化が進んでいるため、介護者における感染予防も今後重要性が

増すと考えられている。さらに薬剤常用者などでは注射器の共用から相互に感染を引き起こし、HIV や HCV の感染者が集積していることが報告されている。これらのハイリスクグループには感染を予防し得るワクチンが必要と考えられるが、いまだ有効なワクチンは開発されていない。HCV JFH-1 株と HuH-7 細胞を用いた感染増殖系により培養細胞で HCV 粒子の合成が可能となり、この培養細胞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いる。この粒子を不活化することで HCV ワクチンとして使用できると考えられるが、そのためには、大量のウイルス粒子が必要であり、効率良くウイルス粒子を産生できるシステムが求められている。

そこで、まず 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の誘導を試みた。誘導された適応変異株をクローニングすることで、さらに増殖効率の良い株を単離し、効率の良い増殖を可能にする変異を同定した。また、宿主細胞側からのアプローチとして、HCV が効率的に増殖複製できる細胞を分離同定し、HCV 粒子ワクチン作製に向けた大量培養法の構築を試みた。

## B. 研究方法

### 1. HCV JFH-1 株の長期培養による細胞内適応変異の同定とその評価

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。さらに同定された変異を 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検討した。

### 2. 得られた適応変異ウイルスのクローニングと単離されたウイルスの評価

得ら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 ウエルプレートに播いた 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。

### 3. 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 ウエ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することで最も増殖効率のよい細胞株を同定した。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。

(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細胞内適応変異の同定とその評価

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 株に培養細胞内適応変異を誘導した。この適応変異ウイルスは同量のウイルスを感染させても培養上清中で通常の JFH-1 株ウイルスよりも高い HCV 量を示し、高い増殖能を獲得していると考えられた。そこで獲得した適応変異を同定するため、このウイルスの全長ゲノ

ム配列を決定した結果、E2のHyper Variable領域、NS3領域、NS5b領域にそれぞれ一つずつ変異が認められた。そこで、これらの変異を導入した JFH-1 株を作製し、通常の JFH-1 株と比較したところ、通常の JFH-1 株よりも増殖能は高くなっていましたが、長期培養により適応変異を得たウイルスのレベルには達していなかった。

## 2. 得られた適応変異ウイルスのクローニングと単離されたウイルスの評価

そこでさらに増殖能の強いウイルスを同定するため、得られた適応変異ウイルスを96 ウェルプレート中の Huh7.5.1 細胞に 1 FFU/well で感染させ株化を行った。その結果、9つのウイルス株が得られたため、これらのウイルスを Huh7.5.1 細胞に再感染させ増殖複製能を評価した。そしてそれらのウイルスの中で最も強い増殖能を示した株、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3つ変異以外に2G株で二つの、6B株で3つの追加変異が同定された。これらの変異を JFH-1 株に導入し、増殖能を比較したところ、これら追加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3つの変異を持った株に比し、強い増殖能を示し、長期培養で適応変異を得たウイルスとほぼ同レベルであった。

## 3. 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 HCV の感染効率やウイルス粒子の分泌効率は通常 HCV がよく増える細胞として用いられる 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、その結果として培養上清中に放出されるウイルス量が高く、また多くの細胞に広がることが可能であった。

## D. 考察

JFH-1 株を Huh7.5.1 細胞で長期培養することにより細胞内適応変異を誘導し、さらにその中で最も複製活性の高いウイルス株を単離することで、高い増殖複製能を持つ JFH-1 適応変異株の同定が可能であった。また HuH-7 細胞を株化することにより、HCV がよく増える細胞として用いられている Huh7.5.1 細胞よりさらに HCV の増殖効率の良い細胞株 HuH-7T1 細胞を樹立した。これらのウイルス株、細胞株を分離する課程において限外希釈法によるクローニングが有用であった。

## E. 結論

HCV 粒子を用いたワクチン作製に向けウイルス粒子大量培養法を構築する目的で、増殖複製効率の高いウイルス株と細胞株を分離同定した。これらウイルスと細胞の組み合わせにより培養細胞において、これまでより多くのウイルス粒子産生が可能になると考えられ、今後ワクチンの材料となる HCV 粒子の大量培養法の樹立に有用と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology* 2008 48:732-740.
2. 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.
3. 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. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive

mutation. The 59th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, USA. (2008, Oct. 31 – Nov. 4).

2. Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T. Purification and structural analysis of HCV E2 protein. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. San Antonio, TX, USA. (2008, Oct 5 – 9).

3. Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T. A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. San Antonio, TX, USA. (2008, Oct 5 – 9).

4. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆字. HCV JFH-1株のチンパンジーへの感染実験: in vivo適応変異の機能的解析. 第44回日本肝臓学会総会、愛媛、2008年6月.

5. 渡辺則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、加藤孝宣、鈴木哲朗、脇田隆字. HCV E2タンパク質の精製および機能、構造の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.

6. 赤澤大輔、森川賢一、尾見法昭、高橋仁、中村紀子、深澤秀輔、伊達朋子、加藤孝宣、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字. 無血清培養によるHCV粒子の作製と精製工程の検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
7. 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).
8. Choi YK, Kato T, Wakit 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).
9. 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).
10. 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.
11. 加藤孝宣、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、山形、2010年5月.
12. 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.
13. 加藤孝宣、Mohsan Saeed、脇田隆字. C型肝炎ウイルスJFH-1株患者血清のチンパンジーへの感染実験シンポジウム11:実験用霊長類を用いたウイルス研究:基礎から応用まで. 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

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： 本研究では、これまでに新規治療薬やワクチンの評価系としてC型肝炎のサロゲート感染病態霊長類モデルの確立を目指した。まずGBV-B感染ザルの解析のため、ウイルス学・免疫学的な解析手法を多数開発した。これらの技術を用いて、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、感染ザルにおける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結果、GBV-B感染ザルの血液中にウイルス抗原特異的IFN $\gamma$ 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長期持続感染マーモセットにおいて、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、新たに構築した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年に及ぶ間歇的な血漿中ウイルスRNAが検出され、キメラウイルス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とその解析を進め、HCV感染におけるウイルス動態や病態発現といった観点での類似性、相違性を明らかに

しようと試みた。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。さらに、より優れた霊長類モデル作出を念頭に、HCVとGBV-Bのキメラウイルスクローンの構築及びサル個体への接種実験を行ない、同クローンの複製増殖能に関する検討を行なった。

## 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 $\gamma$  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スにより解析した。

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

タマリンへのGBV-Bを感染させた場合、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ヶ月を要した。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た。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 $\gamma$  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 $\gamma$ 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。しかしながら、タマリンでは殆どのケースでGBV-Bの持続感染には至らず、感染約3ヶ月後にはウイルスが消失するとともに、抗ウイルス抗体価も徐々に低下した。

### 2. GBV-B長期持続感染マーモセットの解析

マーモセット4頭におけるGBV-B感染後、2頭において長期持続感染が確認された。以下、詳細について述べる。

ケース1 (Cj05-002) : 感染後1年余り $10^5$ GE/ml以上のウイルス血症が持続した後、約3年間検出限界以下 $\sim 10^0$ GE/ml程度で間歇的ウイルス血症を示している。抗コア、NS3抗体価はどちらも緩やかな上昇を示し、それぞれ感染6ヶ月、1年を経過後プラトーに達した。その後はいずれも高いレベルで維持されている。従って血中ウイルスRNAが検出されない時点においても、抗ウイルス免疫誘導を維持しうるウイルス抗原発現は持続していると考えられ、潜伏感染状態にあると考えられる。肝炎マーカーであるALT値はほぼウイルスRNA量の増加と平行して間歇的な上昇が認められた。

ケース2 (Cj05-004) : ほぼ感染1年後まで主として潜伏感染状態が続いた後、感染2年ごろまでは約 $10^4$  GE/ml程度の低レベルのウイルスRNAが検出された。興味深いことに、抗NS3抗体価はほぼ感染1年経過後プラトーに達しその後高いレベルで維

持されているのに対し、抗コア抗体価は感染2年ごろまでは陰性であったが、その後血中ウイルスRNA値が $10^5$  GE/mlを越えたあたりから急激に上昇した。肝炎マーカーであるALT値は、ウイルス量の低い感染後2年間にも高いレベルの上昇を繰り返しており、また多くの場合この上昇は血中ウイルスRNA量とほぼ相関していた。おそらくウイルス特異的CTLによる感染肝細胞の障害がウイルス増殖を制御していたものと考えられる。また感染後2年を過ぎた以降、1年程度強いALT上昇が見られなかった。このことは、CTLからのエスケープ変異によりウイルス制御が不十分になってきたことを表わしているのであろう。

さらに感染3年を経過した頃からは、血中ウイルスRNA値が $10^6$  GE/mlを越える事が頻繁に認められ、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・血液所見で重度の消瘦や貧血、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。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。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。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。

次に持続感染個体におけるウイルスゲノムシーケンセスについて経時的に比較解析を行った。まず核酸レベルでの変異を見ると、どちらの個体由来ウイルスゲノムにおいても、 $1.5-3.6 \times 10^{-3}$  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。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：(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。

### 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

本研究において、HCV-1b由来感染性クローンであるTPF1およびpGBBを基に、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/Gc156-E1/E2を構築した。同キメラクローンはHuh-7細胞にトランスポ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、2年以上の長期に渡り低レベルながら間歇的にplasma中ウイルスRNAが検出された。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。特に、73週での血漿を超速心分離で濃縮したところ、その沈渣に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。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

本研究において、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、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に関する知見と併せて、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。

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わからない。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した。このような種差、個体差によるウイルス動態の多様性はHCV感染においても認められることから、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エピートプであり、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

本研究において我々は、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、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明らかにした。また同時に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。さらに感染性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、飯島沙幸、吉田友教、木村展之、片貝祐子、揚山直英、明里宏文: 霊長類サロゲートC型肝炎モデル. 第146回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 平成20年9月24日
2. 岩崎優紀、森健一、榎昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、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56回日本ウイルス学会学術集会 (岡山) 平成20年10月26日
3. 岩崎優紀、森健一、榎昇、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
4. 岩崎優紀、森健一、榎昇、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
5. 森健一、深井浩未、明里宏文、田中榮司、榎昇: 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
6. Yoshida T, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshizaki S, Kataikai Y, Suzuki T, Miyamura T, Akari H Selective and frequent non-synonymous mutations of the

- viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets  
16<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (France, Nice) Oct 3-7, 2009
7. 深井浩未、森健一、岩崎優紀、吉田友教、明里宏文、田中榮司、榎昇: 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
  8. 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
  9. Hirofumi Akari: Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS. 2010 KALAS international symposium (Korea, Busan), August 19-21, 2010
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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 $\alpha$ 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

17. 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. Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. **Immunogenetics** 60, 727-735, 2008.
2. 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.
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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science** 100, 778-781, 2009.
8. 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.
9. 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.

10. 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.

11. 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 vol.5, no.2, 2-5, 2009.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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

## 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 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。本研究では、合成dsRNAのpoly(I:C)による骨髄系樹状細胞を介したCTL, NK細胞活性化機構を解析し、1. TLR3-TICAM-1シグナルがNK細胞活性化に重要であること、2. poly(I:C)の細胞内取り込みと機能発現にRaftlin分子が必須であることを明らかにした。更に、樹状細胞のTLR3-TICAM-1経路のみを活性化し、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のリガンドである合成dsRNA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以外に細胞質内RNAヘリケースのMDA5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。しかしながら、CTL, NK細胞活性化にいずれの経路が重要であるか、また、細胞外dsRNAがどのようにエンドソームTLR3と細胞質MDA5へ運ばれるか不明である。本研究では、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を惹起するメカニズム（平成20年度）、およびdsRNA取り込み機構（平成21年度）を解析し、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（平成22年度）。

[平成20年度]

### B. 研究方法

1. TLR3 KO, TICAM-1(別名TRIF) KO, WTマウスのBMDCをpoly(I:C)で刺激しgene chip解析を行った。TLR3-TICAM-1依存的に発現が上昇する遺伝子を探索し、NK, CTL活性化に関与する遺伝子を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

2. 骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1活性化におけるとりこみ機構の関与を阻害剤等により解析した。

### C. 研究結果

1. WTで優位に発現が上昇しており、かつTLR3 KO, TICAM1 KOマウスで発現が低下している519遺伝子のうち、特に発現誘導が強いもので、膜貫通領域をもつ9遺伝子を選択した。GFPを発現するレンチウイルスを用いたBMDCへの強制発現系と、shRNAを発現するレンチウイルスによる候補遺伝子のノックダウンにより、新規NK活性化分子INAMを同定した。フローサイトメトリー、免疫染色により、細胞膜に局在することを確認した。INAMをBMDCに過剰発現させNK細胞と共培養すると、NK細胞の細胞傷害活性が上昇し、IFN- $\gamma$ 産生が検出された。更に、BMDCでINAMをノックダウンすると、poly(I:C)刺激でNK活性化が起きなかった。以上より、骨髄系樹状細胞のTLR3-TICAM-1シグナルにより新規NK細胞活性化分子INAMが発現すること、cell-cell contactによりNK細胞を活性化し細胞傷害活性、IFN- $\gamma$ 産生を誘導しうることが明らかとなった。

2. 種々のエンドサイトーシス阻害剤とdsRNAを用いた実験より、ヒト骨髄系樹状細胞のTLR3活性化はpoly(I:C)で誘導されるが、in vitro transcribed dsRNA では誘導されないこと、dsRNAは取り込み段階で選別されTLR3が局在するエンドソームへ輸送されること、poly(I:C)は受容体を介してクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれることが判明した。