

201030037A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する
治療ワクチンの開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 23(2011)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの
開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 23(2011)年 3 月

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
小原 道法	財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所	プロジェクトリーダー
<u>研究分担者</u>		
瀬谷 司	北海道大学・大学院医学研究科	教授
保富 康宏	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター	センター長
鈴木 亮介	国立感染症研究所・ウイルス第二部	主任研究官

目次

I. 総括研究報告

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

小原 道法1

II. 分担研究報告

1. 組換えワクチニアワクチンの作成及び治療効果の解析

小原 道法5

2. HCV 感染が誘導する免疫エフェクターと病態解析

瀬谷 司9

3. HCV 感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

保富 康宏13

4. C型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子を用いた感染機構の
解析

鈴木 亮介18

III. 研究成果の刊行に関する一覧表21

IV. 研究成果の刊行物・別刷25

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

研究代表者：小原 道法 東京都臨床医学総合研究所・感染制御プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨： C型肝炎ウイルス(HCV)感染者に対するインターフェロン治療は副作用等の問題も大きく、またB型肝炎ウイルス(HBV)は現在用いられている核酸アナログ製剤では根治が困難である。他方で、HCVは感染することにより80%の被感染者が慢性化してしまうが、20%は慢性化せず自己の免疫によりウイルスを排除する。また、HBVに関しては、慢性化した成人において増悪化を契機に自己の免疫により排除する例が知られている。これらのことは、免疫を賦活化することによりウイルスのコントロールができる可能性を示唆している。そこで本研究ではHCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目的とする。慢性肝炎状態のHCV/CrE-TgにC型肝炎ウイルス遺伝子組換えワクチンHCVN25-RVvを接種したところ治療効果が認められた。また、C型肝炎ウイルス遺伝子DNAワクチンで強い細胞性免疫の誘導が認められた。さらに、細胞内免疫活性化剤や構築したHCV-DNAワクチンを併用することで治療効果増強法の検討、抗体価の測定や細胞性免疫応答の解析を行う。また、最も効果的なワクチン免疫法を選択し、HCV感染ヒト肝臓型キメラマウスでの治療効果と安全性を検討する。

研究分担者：

瀬谷司：北海道大学・大学院医学研究科
教授

保富康宏：独立行政法人医薬基盤研究所・
霊長類医科学研究センター センター長

鈴木亮介：国立感染症研究所・ウイルス第
二部 主任研究官

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者に対する
インターフェロン治療は副作用等の問題

も大きく、またB型肝炎ウイルス(HBV)は
現在用いられている核酸アナログ製剤で
は根治が困難である。他方で、HCVは感染
することにより80%の被感染者が慢性化
してしまうが、20%は慢性化せず自己の
免疫によりウイルスを排除する。また、
HBVに関しては、慢性化した成人において
増悪化を契機に自己の免疫により排除す
る例が知られている。これらのことは、
免疫を賦活化することによりウイルスの
コントロールができる可能性を示唆して

いる。そこで本研究ではHCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目的とする。

本研究者らは、HCV遺伝子をスイッチング発現できる新規HCVトランスジェニックマウス（HCV Tgマウス）を樹立した。このHCV Tgマウス出生後の任意の時期のHCV蛋白質発現により、持続的なHCV蛋白発現と慢性肝炎発症を引き起こし、HCV感染患者で見られる病態推移を模倣していると考えられる。また、HCVを臓器特異的に発現してウイルスの直接作用も解析できる。よって、このHCV Tgマウスを用い、1) 肝炎ウイルスに対する免疫寛容成立の機序と、2) 免疫寛容の破綻、慢性肝炎の発症機序、ウイルスの直接作用を明らかにし、3) これらの知見を基に、免疫寛容の解除による肝炎ウイルスの排除及び慢性肝炎発症抑制を目指した。

B. 研究方法

研究代表者（小原道法）

HCVN25-RVV を慢性肝炎状態のHCV/Cre-Tgに接種し、HCV排除及びその作用機序を解析する。また、HLA2.1TgにHCVN25-RVV及び免疫活性化剤を接種し、排除・正常化効果の解析を行った。

研究分担者（瀬谷司）

ウイルスRNAや蛋白質を認識する細胞内シグナル分子群のKOマウスと、HCV/Cre-Tgマウスと交配させることで、各種分子がKOされたHCV蛋白質持続発現トランスジェニックマウス（KO-HCV/Cre-Tg）を作製し、HCV

感染における細胞内のHCV認識機構の関与を解析した。また、マウス肝細胞にHCVの複製を許容させるために、ヒトCD81あるいはoccludinを導入したIPS-1^{-/-} or IFNAR^{-/-} マウス肝細胞株を樹立した。

研究分担者（保富康宏）

HCV遺伝子発現DNAワクチンを作製し、慢性肝炎状態のHCV/Cre-Tgに接種し、HCV蛋白質の排除及びその作用機序を解析した。

研究分担者（鈴木亮介）

HCVトランスパッケージングシステムで作製したHCV-JFH1株ウイルス、遺伝子型1bキメラウイルス及びHuh7細胞を用いた中和抗体測定系を確立した。

（倫理面への配慮）

患者由来の組織や血清の使用に当たっては各研究機関の倫理委員会において承認を受ける。提供者には「インフォームド・コンセント」を書面で行う。動物の管理は法律に従って行い、各研究機関の動物実験委員会の承認を得る。

C. 研究結果

研究代表者（小原道法）

（1）慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えワクチン r VV-N25を単回皮内接種し、接種後1週および4週のマウス肝臓を解析した。接種後1週目ではHCV蛋白発現量に変化はみられなかったものの、肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性

といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。

(2) 4週目では形態異常の正常化に加え、肝臓内のHCV蛋白の減少がみられた。抗CD8抗体および抗CD4抗体の投与によりこのHCV蛋白の排除は見られなくなった。また、HCV蛋白の減少時にALT値の上昇やCTLなどによるHCV発現細胞の排除が認められなかったことから、r VV-N25接種によるHCV蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。

(3) 肝臓の形態異常は抗CD8抗体および抗CD4抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成とHCV蛋白排除は別の機序であることが明らかとなった。

研究分担者 (瀬谷司)

(1) HCV (JFH1) 株の感染によってCoreがDDX3と結合し、DDX3-IPS-1複合体を壊し、結果としてIFN-betaの誘導活性を阻害することを証明した。

(2) マウス肝細胞にHCVの複製を許容させるために、ヒトCD81あるいはoccludinを導入したIPS-1^{-/-} or IFNAR^{-/-} マウス肝細胞株を樹立した。これらの細胞株はJ6-HCVに感受性となり、HCVのマウス感染系が*in vitro* で組めるようになった。

研究分担者 (保富康宏)

(1) HCVのすべての遺伝子領域、外殻蛋白領域、非構造蛋白領域の遺伝子を組込んだDNAワクチン(HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25)を作製した。ウエスタンブロット法により、作製したHCV-DNAワクチンが*in*

*vitro*においてHCV蛋白質を発現させることを確認した。

(2) ELISPOT法によりHCV-DNAワクチンの細胞性免疫誘導能についての評価を行ったところ、HCV-CN2、HCV-N25投与群由来の脾細胞は、それぞれEL-4/CN2、EL-4/N3-4細胞による刺激後、顕著にIFN- γ を産生することを確認した。さらに、HCV蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いた*in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価を行ったところ、emp投与群に比べHCV-DNAワクチン投与群で有意に減少し、マウス体内においてHCV抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。

研究分担者 (鈴木亮介)

(1) 複数の遺伝子型/株の遺伝子配列を用い、HCVのcoreからNS2領域を発現するプラスミドを作製し、非増殖型HCV粒子(HCVtcp)を得た。遺伝子型2aの構造蛋白質を用いた場合、JFH-1株およびJ6株のいずれを用いても、HCVtcpの産生が認められた。1bの構造蛋白質を用いた場合、Con1株およびTH株においてはE1領域に適合変異を導入する事により、HCVtcpの産生が認められた。

(2) 産生させたHCVtcpと、HCVppおよびHCVccについて、抗CD81抗体および抗ApoE抗体による感染中和をHuh7.5.1細胞を用いて調べところ、HCVtcpおよびHCVccは抗CD81抗体により高い感受性を示した。

D. 考察

初年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

(小原道法)

慢性肝炎状態のHCV/Cre-TgにHCVN25-RVV及び免疫活性化剤を接種し、排除・正常化効果の増強を目指す。さらに、HCV-RVVを接種したヒトHLA2.1トランスジェニックマウスの脾細胞をHCV感染ヒト肝臓キメラマウス(HLA2.1)に移入し、HCV-RVVによる賦活化機序を解析する。また、感染性粒子を産生するHBV-TgにHBV組換えワクチニアウイルスを接種し、その排除・治療効果を検討する。さらに、その排除・正常化機序について解析する。

(瀬谷司)

自然免疫系ノックアウトマウスと交配したHCV-Tgにワクチンを投与し、自然免疫系を介した排除機序を解析する。これらマウスから樹状細胞を調整し、CTL, NK, Treg, Th1/2, Th17細胞などに対するエフェクター誘導能を機能解析し、肝炎の病態形成にどの様に関与するかを明らかにし、治療に最も効果的な免疫系活性化法を確立する。

(保富康宏)

HCV-DNA ワクチンと RVV による prime/boost ワクチンによる併用療法による治療効果機序を解析する。HBV 遺伝子発現 DNA ワクチンを作製し、HBV-Tg に接種し、HBV 蛋白質の排除及びその免疫応答を解析する。

(鈴木亮介)

ワクチン接種したHCV/Cre-Tgから得られた血清中の中和抗体価について、各種遺伝子型のトランスパッケージングHCVを用いて測定する。

E. 結論

C型肝炎ウイルス遺伝子組換えワクチン及びDNAワクチンで効果が認められたので、さらに、細胞内免疫活性化剤や構築したHCV-DNAワクチンを併用することで治療効果増強法の検討、抗体価の測定や細胞性免疫応答の解析を行う。また、最も効果的なワクチン免疫法を選択し、HCV感染ヒト肝臓型キメラマウスでの治療効果と安全性を検討する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

各分担研究報告書を参照

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

出願日：平成22年9月9日、出願番号：「特願2010-202355」、発明の名称：「難治性ウイルス感染症の治療剤」、発明者：小原道法、中川慎一郎、出願人：東京都医学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

組換えワクチニアウイルスの作成及び治療効果の解析

東京都臨床医学総合研究所・感染制御プロジェクト
プロジェクトリーダー 小原 道法

研究要旨： C型肝炎ウイルスに対する抗HCV薬とされているインターフェロンは、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルス「LC16m8株」を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス（HCV-RVV）株を樹立し、治療ワクチンとしての効果を検討した。Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスの肝臓におけるHCV蛋白は完全に排除されることなく、1年以上の持続的な発現が確認され、肝臓における炎症や脂肪変性、線維化等の慢性肝炎の病態を示した。この慢性肝炎モデルマウスに対してHCV-RVV接種後1週のCre/loxP/HCV-MxCre Tgマウス肝臓ではN25接種群では肝臓の索状構造や肝細胞の状態など、形態学的な異常の正常化が認められた。さらに、4週後ではN25接種群で肝臓中HCV蛋白質量が減少していた。Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスは正常な免疫応答下で持続的にHCV蛋白を発現させることができ、慢性肝炎を発症させることができるHCV持続感染モデルとして非常に有用であり、HCVの持続感染化と宿主の免疫応答の関係を解析することを可能にした。さらに、HCV-RVV接種によりマウス肝臓におけるHCV蛋白の減少及び慢性肝炎症状の正常化が認められたことから、HCVの排除及び肝炎抑制を目指した治療ワクチンの開発が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎は日本で200万人に及ぶ患者がおり、唯一の有効な抗HCV薬とされているインターフェロンは、30-40%程度の患者にしか治療効果が認められず、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は強ちに宿主の免疫応答を惹起し、HCVを排除する目的で、哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチ

ニアウイルス「LC16m8株」を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス（HCV-rVV）株を作製した。

B. 研究方法

HCV-rVVはHCVの構造蛋白質を主に発現するrVV-CN2、非構造蛋白質を発現するrVV-N25、全蛋白質を発現するrVV-CN5を用いた。これらHCV-rVVの治療効果を評価するために、HCV蛋白を持続的に

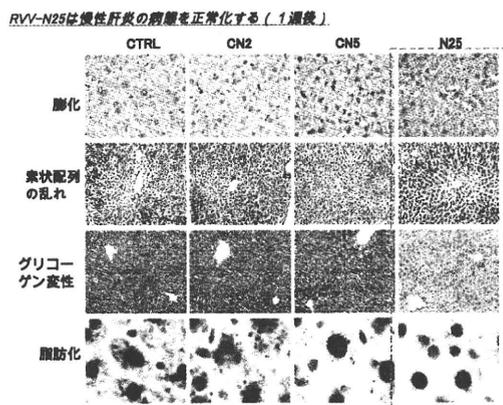
発現した慢性肝炎状態の Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスに単回皮内接種し、接種後 1 週および 4 週のマウス肝臓における HCV 蛋白の発現量と形態学的、生化学的および免疫学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

接種後 1 週目では HCV 蛋白発現量に変化はみられなかったものの、r VV-N25 群の肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。



血清中の炎症性サイトカインの変化を経時的にみると、接種後 6~7 日目で上昇していた炎症性サイトカインレベルが r VV-N25 群では正常レベルにまで戻っていたことがわかった。さらに、4 週目の r VV-N25 接種群では形態異常の正常化に加え、肝臓内の HCV 蛋白の減少がみられた。FACS 解

析により、4 週目の r VV-N25 接種群では肝臓内の CD8+T 細胞が増加していることがわかった。

D. 考察

抗 CD8 抗体および抗 CD4 抗体を予め投与した状態のマウスに r VV-N25 を接種すると、どちらも HCV 蛋白の減少はみられなくなった。このことから、r VV-N25 の HCV 蛋白の排除には CD 4 および CD8+T 細胞が重要であることが示唆された。しかし、肝臓の形態異常は抗 CD8 抗体および抗 CD4 抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成と HCV 蛋白排除は別の機序であることが明らかとなった。

E. 結論

肝臓内 HCV 蛋白の制御に関して、CTL などによる HCV 発現細胞の排除を検討するために、肝臓の HCV 遺伝子のスイッチング効率および HCV の mRNA 量を TaqMan 法により検索した。その結果、DNA レベルおよび RNA レベルともにコントロールと差がなかった。このことから、r VV-N25 接種による HCV 蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。以上のことから HCV-r VV は HCV の排除及び肝炎抑制を目指した安全で効果的な治療ワクチンの開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu

Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).

2) Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).

3) Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).

4) Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010)

5) Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virology* 84(22):11761-11770 (2010).

6) Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and

nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).

7) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).

8) Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

9) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).

10) Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* (2011) in press.

11) Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudoh, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* (2011) in press.

.2. 学会発表

1) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better

environment its replication. Keystone Symposia 2010.6.6-11 Kyoto

- 2) Nakagawa S., Hirata Y., Tokunaga Y., Hirabatashi K., Yano J., Tateno C., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Yoshiba M., Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral effect in human hepatocyte. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- 3) Sekiguchi S., Kimura K., Chiyo T., Tobita Y., Yasui F., Kohara M. : Hepatitis C virus mediated pathogenesis is dependent on inflammatory cytokines with irrespective of HCV protein level. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2010.9.10-14. 横浜
- 4) 木村公則、小原道法 : C型慢性肝炎に対するHCV遺伝子組換えワクチニアウイルスによる新たな治療戦略 第18回日本消化器関連学会 2010. 10. 13-16. 横浜
- 5) 平田雄一、井上和明、小原道法 : IFNλを強力に誘導する核酸/リポソーム製剤の同定とその抗HCV効果 第18回日本消化器関連学会 2010. 10. 13-16. 横浜
- 6) Hirata Y., Nakagawa S., Tokunaga Y., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Kohara M. : Interferon lambda plays a critical role on antiviral response by hepatotropic inducer of innate immunity in human hepatocyte. American Association for the Study of Liver Diseases 2010.10.29-11.2. Boston.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

出願日：平成 22 年 9 月 9 日、出願番号：
「特願 2010-202355」、発明の名称：「難
治性ウイルス感染症の治療剤」、発明者：
小原道法、中川慎一郎、出願人：東京都医
学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV感染が誘導する免疫エフェクターと病態解析

北海道大学大学院医学研究科
教授 瀬谷 司

研究要旨：HCVに罹るマウスの確立を目指してHCV/Cre-Tg の慢性肝炎誘導系とIPS-1-/-/hCD81TG の2つのマウス系の免疫系の解析を目指す。IPS-1 KOマウスの不死化肝細胞にヒト(h)CD81を強制発現した細胞株はJ6-JFH1株の感染を許容した。HCV粒子の産生は見られなかった。培養系からマウスモデル作製を目指している。

A. 研究目的

宿主免疫はHCVの病態形成に強く関与するが、免疫解析のできる HCV 感染マウスモデルはまだ確立されていない。本研究で我々は(1)HCV/Cre-Tg の慢性肝炎誘導系を使ってHCV replicon活動状態の宿主免疫応答の解析を試みる。さらにHCV-RVW の治療効果を自然免疫の各種KOマウスを使って免疫応答から解析する。(2)HCV感染マウス肝細胞株を確立し、in vitro のHCVマウス解析系を確立する。(3) マウス感染モデル系を使って、HCVが如何にして持続感染を成立せしめ肝硬変、肝がんの転機をとるか、それに関与する宿主因子の同定を試みる。

B. 研究方法

(1) HCV/Cre-Tg の慢性肝炎誘導系のマウスは大臣承認を得て小原研から北海道大学へ搬入する。現在その手配を終えた。研究(2)ではMyD88-/-, TICAM-1 -/-, IPS-1-/-, IRF-3-/-, IRF-7-/-, IF

NAR-/-の各種KOマウスを確立して、それらから不死化肝細胞株を樹立し、HCVの複製を許す細胞株を抽出する。現在いくつかの亜株を継代培養している。NK, CTL 活性の測定やELISAなど免疫学的手法は既報に準じた。(3)は次年度以降に取り組む。

(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。

C. 研究結果

進行度が比較的高い研究(2)の結果を概説する。HCV replicon J6-JFH1 の複製を指標にT 抗原で不死化した肝細胞株をスクリーニングした。IFNAR-/-, IPS-1-/-肝細胞株で複製が確認された。これら細胞株にヒト(h)CD81を強制発現させるとHCV粒子を外からかけるだけで感染を許すマウス肝細胞株の樹立に成功した。しかし、上

清にウイルス粒子は残念ながら回収できなかった。従ってHCV life cycle を保証するには到らなかったが、HCVのマウス感染系がin vitro で組めるようになった (Aly et al., 論文投稿中)。なお、このマウス系でhOccludin は感染のエントリーレセプターとして機能しなかった。また、IPS-1以外のIFN誘導因子を壊してもHCV感染は助長されなかった。意外にも、J6のcore-E1-E2部位が感染の成立に必須であった。

D. 考察

HCVのマウスモデルは炎症や免疫応答の解析にはもちろん、抗ウイルスの創薬スクリーニング、感染株の分離など広い応用が見込める。本研究の成果はIFNARよりIPS-1のKOで優れた感染モデル系が創出しうることを示唆する。IPS-1は複数のIFN誘導経路の1つなのでIFNAR KOマウスのような免疫不全状態にならず、NK細胞、CTLの活性化能力を保持したマウス感染系が期待できる。細胞株のレベルでは感染株の分離用の細胞系に留まるが将来的にマウス肝細胞を感染細胞株に置き換えればHCVの持続感染と慢性化のモデルを自然感染に近い状態で再現可能になる。Steatosis からがん化に到る過程の解析も可能になるかもしれない。

HCVの慢性炎症と肝実質細胞の激しい再構成の分子基盤は未解明である。免疫系の過剰応答が分子基盤にあることは患者血液を使った臨床研究の成果、抗体、CTL, NK活性化について報告がある。マウスを使ったHCV感染解析ができれば樹状細胞・自然免疫の活性化を含めてHCV病態解明に進展

が期待できる。

現状ではHCV患者からウイルス株を分離培養する系も確立されておらず、JFH1

(2a) 株で多くのin vitro 実験が行われている現状である。HCVの株間でIFN感受性は大きく異なり、臨床的に治療法を含めた問題として残っている。本ウイルス分離系を使ってHCVのcDNAを患者からクローニングできればIFNの有効性と株間の遺伝子配列の相違を解析しうる。

本研究の自然免疫改変モデルマウスが有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

E. 結論

IPS-1 KOマウスの肝細胞株を不死化し、hCD81を発現させた細胞株を樹立した。この細胞株はIFNAR^{-/-}株より効率よくJ6-JFH1株の感染を許容した。IPS-1 経路はNK, CTLの起動に重要でないので、マウスモデルを作製すればHCVの免疫攪乱を分子解析できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283–1291.
2. Kubota, N., T. Ebihara, M. Matsumoto, S. Gando, and T. Seya. 2010. IL-6 and interferon-alpha induced by polyI:C-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells regulate peripheral expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1421–1426.

3. Hirata, N., Y. Yanagawa, M. Satoh, H. Ogura, T. Ebihara, M. Noguchi, M. Matsumoto, H. Togashi, T. Seya, K. Onoé, and K. Iwabuchi. 2010. Dendritic cell-derived TNF- α is responsible for development of IL-10-producing CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 261: 37-41.
4. 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.
5. 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 Sci.* 101: 1596-1603.
6. Kasamatsu, J., H. Oshiumi, M. Matsumoto, Kasahara, and T. Seya. 2010. Phylogenetic and expression analysis of Lamprey Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 855-865.
7. 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: e12550.
8. Tatematsu, M., A. Ishii, M. Horiuchi, H. Oshiumi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. Molecular mechanism for activation of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1). *J. Biol. Chem.* 285: 20128-20136.
9. 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 polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675-2687.
10. Ehira, N., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Kondo, M. Asaka and T. Seya. 2010. An embryo-specific expressing TGF- β family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29: 135.
11. Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN- β -inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase. *PLoS ONE.* 5: e14258.
12. Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe.* 8: 496-509.
13. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2010. Lactic acid acts on macrophages to induce antigen-dependent IL-17 production from effector/memory helper T cells. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
14. 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. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
15. Watanabe A., C. Obuse, K. Saeki, H. Shime, A. Yoshimura, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin mediates cell entry of poly(I:C) to induce TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* (in press).
16. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to activate NK cells through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* (in press).
17. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated

signaling. *Molec. Cell. Biol.* (in press)

Review

18. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313-320 (review).

19. Seya, T., 2010. Innate immunity and vaccine. *Vaccine* 28: 8041-8042. (preface)

20. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2010. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* (in press) (review).

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長
研究協力者 和田剛 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特任研究員

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の免疫学的な感染病態の解析および治療用ワクチンの開発に向けて、HCVに対するDNAワクチンの開発を試みた。HCVの全遺伝子、外殻タンパク領域遺伝子および非構造タンパク遺伝子をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込み各種HCV-DNAワクチン（HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25）を作製した。これらDNAワクチンをエレクトロポレーションによりマウスに免疫し、誘導される免疫反応を検討した。免疫マウス脾細胞をHCVの各HCV遺伝子導入腫瘍細胞株を用いて、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の誘導を⁵¹Cr遊離法およびELISPOTにおいて検討したところ、HCVに対するCTLの誘導が認められた。また、マウスにHCV遺伝子導入腫瘍細胞株を接種したところ、DNAワクチン免疫マウスでは腫瘍細胞株は排除された。以上のことから、HCVのDNAワクチンは非常に強い細胞性免疫が誘導することが示され、細胞性免疫のHCVに対する効果や、治療用ワクチンとしての可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はヒトにおける慢性感染症を示す病原体であり、肝炎から肝硬変、肝癌へと進行することから、HCVに対する免疫反応の解析や、治療法の確立は強く望まれている。本研究ではベクターに対する反応が無く、目的とした抗原に対してのみ免疫反応が誘導されるDNAワクチンを構築し、HCVに対する免疫反応の解析と、治療用ワクチンの開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV遺伝子発現DNA（HCV-DNA）ワクチンの作製

すべてのHCV遺伝子領域を含むpBMSF7CプラスミドベクターからPCR法と制限酵素反応を用いて、HCVのすべての遺伝子領域（CE1E2NS2-5）、外殻蛋白領域（CE1E2NS2）あるいは、複製に関与している非構造蛋白領域（NS2-5）の遺伝子領域をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込むことにより各種HCV-DNAワクチン（HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25）を作製し、さらにこれらのワクチンのコントロールとしてHCV遺伝子領域を含まないDNAワクチン

(emp) を作製した。

(2) ウェスタンブロット法によるHCV蛋白質発現の確認

COS 7 細胞に、作製したHCV-DNAワクチンを遺伝子導入試薬 (Lipofectamine2000) を用いて導入した。導入から48時間後に細胞を回収した後、細胞を溶解し、抗Core蛋白質抗体 (H6-29) を用いて、ウェスタンブロット法によりCore蛋白質の発現を確認した。

(3) ELISPOT法および⁵¹Cr遊離法による細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 誘導能の測定

25 μ l の PBS に懸濁した 100 μ g の 各種 DNA ワクチンを 5 週齢の C57BL/6 マウスの 下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション (50 V, 99 msec, 8 times) を行った。投与は 2 週毎に 右脚、左脚、右脚の 3 箇所 に投与し、最後の投与から 4 週後に マウスより脾臓を採取した。赤血球溶血処理を行った脾細胞 (1×10^5) を 予め マイトマイシン処理を行った刺激細胞 (1×10^4) と 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ インキュベーター中で 48 時間培養し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した。刺激細胞として、HCV 蛋白過剰発現腫瘍細胞 (EL-4/CN2 または EL-4/N3-4 (東京都臨床医学総合研究所、小原道法先生から分与)) を用いた。細胞傷害性試験においては、50 ml フラスコ内で脾細胞 (5×10^7 /ml) と刺激細胞 (1×10^7 /ml) を 5 日間培養し、エフェクター細胞を誘導した後、⁵¹Cr 標識した標的細胞を用いて測定した。

(4) HCV 蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスモデルを用いた HCV 特異的細胞性免疫誘導能

についての評価

(3) と同様に、HCV-DNA ワクチンを 予め 2 週毎に 3 回投与し、最後の投与から 4 週間後に、HCV 蛋白過剰発現腫瘍細胞 (EL-4/CN2 または EL-4/N3-4) を マウス側腹部皮下に移植し、7 日後に腫瘍の大きさ (長径 \times 短径 \times 厚径 \times 1/2) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) HCV 遺伝子発現 DNA (HCV-DNA) ワクチンの作製

pCAGGS プラスミドベクターに HCV の 各種 遺伝子領域をそれぞれ組み込んだ各種 HCV-DNA ワクチン (HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25、emp) を作製した (図 1)。

(2) HCV 蛋白の発現確認

作製した HCV-DNA ワクチンを COS7 細胞に導入し、ウェスタンブロット法により Core 蛋白質の発現が見られることを確認した (図 2)。

(3) ELISPOT 法および ⁵¹Cr 遊離法による HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能の検討

HCV-DNA ワクチンを投与した C57BL/6 マウスより脾臓を採取し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した。emp 投与群由来の脾細胞は刺激後、何ら特異的なスポットを示さなかったが、HCV-CN2、HCV-N25 投与群由来の脾細胞