

マウスより脾細胞を採取・調製し、ハイブリドーマ作製に用いた。

SP2/0 細胞とマウス脾細胞とを融合しハイブリドーマを作製した。EIA により抗体価を、HCVpp により感染中和活性を測定した

3. 自然免疫系を不活性化した不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の作成。

IRF7 に関してはそのドミナントネガティブ体を恒常的に発現する細胞あるいは shRNA 発現プラスミドを導入した細胞の作成をおこなった。RIG-I については shRNA 発現ベクターを導入した。また HCV タンパク質の中で RIG-I 下流の IPS1 の切断をおこない IFN $\beta$  の発現を抑制することが知られる NS3/4a タンパク質を恒常的に発現する細胞についても作成した。

4. 患者血由来 HCV の感染を特異的にそして高感度で検出するレポーター系の構築。

簡便な方法で患者血由来 HCV の感染増殖を検出するレポーターシステムの開発を試みた。まずこれまで報告のある HCV セリンプロテアーゼ活性を利用したレポーター系の構築をおこなった。

5. 各 B 細胞サブセットの細胞中 HCV RNA 定量  
33 例の HCV キャリアから分離した PBMC を AutoMACS system を用いて Naïve B 細胞分画と非 Naïve B 細胞分画に分け、それぞれから細胞中の HCV RNA 量を real time RT-PCR 法で定量した。同様に 77 例の患者について (3) Total B 細胞分画と (4) 非 B 細胞分画に分け、HCV RNA 量を定量した。更に 5 例については B 細胞サブセット特異的表面マーカー抗体を固相化した Affinity Beads を用いて (A) 形質細胞、(B) 活性化 B 細胞、(C) メモリー B 細胞、(D) ナイーブ B 細胞及び休止期 B 細胞に 4 分画し、それぞれ HCV RNA 量を定量した。

6. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着抑制分子の探索

JFH-1 株の NS5AC 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。この蛍光蛋白発現 HCV 感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plate に Huh7.5.1 細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その 2 時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5 日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

7. フェージディスプレイ法によるヒト型抗体の作成

感染性ウイルス粒子に対して、その感染を拮抗的に阻害する E2 タンパク質を、昆虫細胞発現系を用いて構築し、抗体フェージの選択に使用した。用いた HCV-E2 タンパク質は、本邦の

背景を鑑みて遺伝子型 1b に属する HCV-TH 株由来のリコンビナントタンパク質をメインに、比較として遺伝子型 2a に属する HCV-JFH1 株の E2 タンパク質も使用した。スクリーニングにより得られた Single Chain Fv (scFv) 抗体は E2 に対する ELISA により、その活性を確認した後、培養細胞で増殖が可能な JFH-HCV cell culture (HCVcc) および、1b 型の TH-HCVcc と抗 HCV コアタンパク質抗体による免疫染色法を用いてその HCV 感染中和能を測定した。今年度は、この scFv 抗体にヒト抗体の定常領域を付加し、完全ヒト IgG 抗体を作製した。

(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。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

## C. 研究結果

### 1. リコンビナント HCV E2 タンパク質の解析

S2 細胞で発現させた精製 E2 蛋白質も高マンノース型の糖鎖付加が中心だが、約 50kDa の単一分子量を示した。この E2 蛋白質は CD81 に結合した。293 細胞で発現させた E2 蛋白質では HCVpp および HCVcc による HCV 感染阻害活性が見られなかったが、S2 細胞由来 E2 蛋白質は HCVpp でも HCVcc でも感染阻害を示した。しかし、マウスへの免疫において抗 E2 抗体は誘導されるものの、感染中和抗体は誘導されなかった。また、遺伝子型 1a, 1b, 2a, 2b の E2 蛋白質を S2 細胞で発現して、E2 蛋白質による HCV 感染阻害活性を解析したが、遺伝子型に関わりなく、ほぼ同程度の感染阻害活性を認めた。

### 2. リンパ節移植 SCID マウスでの抗 HCV 抗体産生

TH E2 タンパク質で免疫したリンパ節を腎皮膜下に移植し、さらに TH E2 タンパク質で免疫した SCID マウスと通常のプロトコールで免疫した Balb/c マウスの血清中の TH E2 タンパク質に対する抗体価を TH E2/Fc タンパク質を固相化した EIA で測定した結果、リンパ節移植 SCID マウス由来の血清の方が 2.5 倍強い値であった。これらのマウス脾細胞からハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマ培養上清中の TH E2 タンパク質に対する抗体価を測定した結果、リンパ節移植 SCID マウス由来のクローン

では、ほぼ全てのクローンが、強い陽性反応を示した。通常免疫法により免疫した Balb/c マウスと比較すると、その違いは顕著であった。リンパ節移植法に得られたハイブリドマから EIA スクリーニングで特に強い値を示した well から 9 クローンを単クローン化した。これらのクローンは、いずれも IgG タイプであった。通常免疫法では、IgM の割合が多かった。これは、クラススイッチと親和性の成熟がおきたリンパ節が移植された SCID マウスで、抗原に対して強い結合能を示す抗原特異的な IgG クラスの抗体が産生されるためと考えられる。

9 種類のハイブリドマを無血清培養し、培養上清から精製した抗体およびマウス血清を用いて、HCVpp の感染価を測定した。その結果、マウス血清では、通常のプロトコールで免疫したマウスと比較して、リンパ節移植 SCID マウスにより高い感染中和活性が認められた。しかし、9 種類のモノクローナル抗体は中和活性を持たなかった。

3. 自然免疫系を不活性化した不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞の作成。

HuS-E/2 細胞に IRF7 のドミナントネガティブ体(以降 7DN と省略する)発現プラスミドを導入し、恒常的に 7DN を発現し、内在性 IRF7 の機能が低下している HuS-E/2 細胞の樹立を試みたが、目的とする細胞は得られなかった。RNA ウイルス感染の検出のためのセンサー分子である RIG-I を RIG-I mRNA に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いて抑制した HuS-E/2 細胞を作成した。センダイウイルスを用いてその細胞の IFN 遺伝子群の誘導を検証したところ、それらの遺伝子発現誘導は著しく抑制されていることが確認できた。さらに HCV の NS3/4a タンパク質を恒常的に発現する HuS-E/2 細胞についても作成し、いくつかの細胞株を得た。上記同様にセンダイウイルスを用いてその感染に対する IFN $\beta$  遺伝子転写プロモーターの活性化を検証したところ、この細胞では活性化が効率良く抑制されていることがわかった。

4. 患者血由来 HCV の感染を特異的にそして高感度で検出することが可能なレポーター系の構築。

HTLV-I の転写活性化因子である Tax を小胞体膜に局在化する HCV タンパク質である NS2 の C 末端側にリンカー配列を介して融合した分子を構築した。リンカー配列には HCV のセリンプロテアーゼの切断部位である IPS-1 の部位を挿入してある。レポーターには Tax 応答配列を有する HTLV-I LTR をプロモーターに持ち、レポーター遺伝子に分泌型の Gaussia ルシフェラーゼ遺伝子をもちいたものを作成した。HCV が感染し、HCV プロテアーゼが産生されれば、小胞体表面に NS2 を介して局在化した Tax

融合タンパク質のリンカー部位が切断され、切り離された Tax は核内に輸送されレポーター遺伝子の発現誘導をおこなうことが期待された。NS3/4a タンパク質発現プラスミドを用いた一過性の実験系では予想される反応が確認できたため、この系を導入した細胞に組換え体 HCV JFH1 を感染させ、培地中に Gaussia ルシフェラーゼが産生され、培地中のルシフェラーゼ活性を測定することで JFH1 の感染効率を検出できることがわかった。

5. ナイーブ B 細胞への HCV 感染・吸着と B 細胞単一クローン増殖発症との関連

HCV 感染者の B 細胞サブセットの解析からすべての B 細胞に HCV 感染・吸着が確認された。特定の対応抗原の決定していないナイーブ B 細胞の段階で多くの HCV 感染・吸着が確認され、非ナイーブ B 細胞を含む PBMC よりもナイーブ B 細胞への HCV 感染・吸着量が高値であることが示された。末梢血中において多数を占めるナイーブ B 細胞に HCV が主に感染・吸着していることが示された。非ナイーブ B 細胞での解析では HCV 感染者にのみ IgM 及び IgG クラスの Mono-clonality が確認され、すべてのクラスに Oligo-clonality が検出された。Oligo-clonality は健常者からも検出されたがその頻度は有意に低かった。この事実より HCV 感染に伴う B 細胞単一クローン増殖機序は HCV 感染に伴う B 細胞の抗アポトーシス、腫瘍化などに起因するものではなく、B 細胞の異常活性化に起因していることが示唆された。

6. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着抑制分子の探索

JFH1-EYFPmut、-AsRedmut 導入後、培養上清中のコア抗原は親株 JFH1 と同等で最高値  $1.35 \times 10^4$  fmol/l に達したが、T4290A、C7653T 変異を持たない wild type では経時的に減衰・消失した。HCV-RNA 導入細胞、上清の再感染ともに mutant type はウイルス陽性細胞数が指数関数的に増加し最大速度は  $10^{2.5}$ /日だった。抗 CD81 抗体を使用した侵入阻害試験では 80%以上の感染が阻害された。以上より、蛍光タグ付き HCV はウイルス粒子産生能を保持しつつ継代が可能で、flowcytometry などを用いることにより感染細胞を定量的に検出することが可能であることが示された。High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗 CD81 抗体を用いたエンتری阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。400 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35 個が 50%以上の感染阻害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗 HCV 活性を認めたものは 1 個で、残りの 34 個はエンتری過程を阻害している可能性が示唆された。

7. ファージディスプレイ法によるヒト型抗体

の作成

中和試験の結果、2クローンはTH（ジェノタイプ 1b）HCVpp を用いた感染中和試験の結果、IC50 が 1 μg/ml 以下の高い感染中和活性を示した。感染中和活性は、HCV の受容体である CD81 分子に対する中和抗体と同程度の感染中和活性を示した。これらの抗体の J6（ジェノタイプ 2a）HCVpp の中和活性は、TH HCVpp よりも 10 倍程度低かった。

#### D. 考察

今年度の各分担研究内容は報告書に詳細に記載されている。以下に簡単に内容をまとめる。

293細胞由来E2蛋白質はそれ自体によるHCV感染阻害活性はないが、マウスへの免疫により感染中和抗体を誘導した。ところが、S2細胞由来E2蛋白質ではそれ自体によるHCV感染阻害活性があるものの、マウスへの免疫による感染中和抗体誘導は見られなかった。この2種類の細胞由来のE2蛋白質の性質の違いは興味深い。

E2タンパク質であらかじめ免疫したマウスからリンパ節を採取し、これをSCIDマウスの腎皮膜下に移植し、移植後2度ブーストをかけることによって、SCIDマウスにおいて抗E2抗体誘導が認められた。さらに、リンパ節移植マウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製し、それらが産生する抗E2抗体をEIA法にて定量すると、通常の方法と比較して、約100倍高い効率で抗体産生ハイブリドーマが作製できることが判明した。これは、移植リンパ節由来の免疫細胞はSCIDマウスの脾臓や骨髄へ移動し、これらの組織で、抗体産生細胞へと分化、増殖し、免疫能力をさらに高めていることによると考えられる。

患者血液由来のHCVの感染増殖がこれまでに観察できているヒト不死化肝細胞を用いて、その自然免疫を抑制した細胞を作成することに成功した。分泌型のルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いた感染検出モデル実験系もJFH1とHuH7.5細胞では想定したような感染増殖の検出が可能であったため、今後はさらに検出の感度を高め、バックグラウンドのシグナルを低下させる必要があるものの、上記自然免疫を抑制した不死化肝細胞と組み合わせることで感度良く患者血液由来のHCV感染を定量化することが可能な実験系を構築することが期待された。

また、HCV感染は多彩な免疫異常を惹起している。本研究ではHCVキャリアのB細胞異常発症機序を明らかにする目的で、B細胞の成熟段階のどのレベルでHCV感染による機能障害が惹起されているかを解析した。HCVの宿主レセプターとしてCD81を発見したAbrignaniらは、HCV E2蛋白質がNaïve B細胞に結合（吸着）後に

非特異的活性化を惹起することを報告している。この非特異的活性化がB細胞機能異常やHCV由来の自己免疫異常、リンパ球増殖性疾患に関連する可能性がある。

HCVの感染・吸着、粒子分泌を阻害する抗ウイルス薬の得るリード化合物を同定することが可能であり、新規治療法を創出することが期待される。さらに今回構築した大規模薬剤スクリーニングは他の感染体を対象とした研究にも応用可能である。今後、構築した抗ウイルス薬剤スクリーニング系を用いて、HCV生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用を展開していく。

HCV持続感染者であり肝癌患者の生体内には高い中和活性を示す抗体遺伝子が存在するが、この抗体遺伝子が持続感染者の生体内の免疫システムが破壊され十分機能できないと思われる。生体内での中和抗体作製メカニズムの解明によるワクチン開発と免疫システム改善により、生体内で機能する抗体産生を誘導するシステム開発へと繋がる。

#### E. 結論

1. 293細胞由来E2蛋白質とS2細胞由来E2蛋白質でその性質に大きな違いが認められた。HCVの初期感染機構および感染中和機構の解明につながる。

2. HCV E2タンパク質で免疫したリンパ節をSCIDマウスの腎皮膜下に移植し、追加免疫後、SCIDマウス由来脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製すると、E2タンパク質に対するIgGクラスのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが従来の方法と比較して、約100倍高い効率で作製できることが判明した。

3. 自然免疫系を抑制したヒト不死化肝細胞が樹立された。また組換え体HCVの感染を分泌型ルシフェラーゼの活性で検出することが可能な感染検出系のモデル実験系の構築に成功した。

4. HCVキャリアーにおいてHCVのNaïve B細胞への感染・結合が非特異的活性化を惹起し、B細胞単一クローン増殖に関与する可能性が示唆された。

5. 蛍光蛋白発現HCV培養系を用いたHigh content screening assayを樹立し、エントリー阻害剤としての可能性を有する低分子化合物を同定した。この新たなアッセイシステムは、HCV生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。

6. HCV持続感染者から高い感染中和活性を持つヒトIgG抗体を作製することができた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

1. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N,

- Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 86(4):2143-52.
2. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
3. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 Aug;54(2):425-33.
4. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 407(1):135-40
5. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
6. Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* 19 : 254-262, 2012.
7. Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, and M.Imawari. Reactivation of Epstein-Barr Virus in B Cells of Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82 : 2064-70, 2010.
8. Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T and Imawari M. Strong CD8<sup>+</sup> T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 45: 451-8, 2010.
9. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka Y, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; in press.
10. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. Identification of novel N-(morpholine-4-carbonyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother*; 2012; 56 (3):1315-1323.
11. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M, Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin. *Antivir Ther*, 16(7):1081-1091, 2011.
12. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol*, 85(12):5986-5994, 2011.
13. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6):2537-2545, 2011.
14. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res*, 41:258-269, 2011.
15. 【新時代のウイルス性肝炎学-基礎・臨床研究の進歩-】 II C型肝炎 13. C型肝炎ウイルス感染関連の肝外病変とその対応 伊藤敬義、井口桃子、下間 祐、井廻道夫 日本臨床増刊号 Page302-308(2011. 05. 20)
16. 【慢性ウイルス肝炎 治療の新たな展開】 Key words C型肝炎ウイルス感染とB細胞異常 伊藤敬義 カレントセラピー 28巻8号 Page68(2010. 08)
2. 学会発表および講演など
1. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2

- binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
2. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
  3. Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi M, Miyashita M, Arai J, Hiroishi K and Imawari M. Fluctuation pattern of serum complement levels during pegylated interferon and ribavirin therapy is closely associated with the outcome in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011.11.8)
  4. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2011.11.8)
  5. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (Berlin 2011.4.2)
  6. Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2010.11.1)
  7. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Nozawa H, Hiroishi K and Imawari M. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon resistant phenotype. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010.9.13)
  8. Shimozuma Y, Ito T, Uchikoshi M, Inokuchi M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Reactivation of Epstein-barr virus in patients with chronic hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Yokohama 2010.9.13)
  9. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #1016)
  10. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)
  11. Itsui Y, Sakamoto N, Yauchi T, Watanabe M: Antiviral effect of a novel interferon-inducible protein, IFI-27, against hepatitis C virus replication. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2086)
  12. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2040)
  13. T Yoshida, F Satoh, W Akihiro, M Kondoh, H Mizuguchi, N Sakamoto, K Yagi: Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
  14. N Sakamoto, Y Funaoka, G Suda, M Nakagawa, S Kakinuma, M Watanabe: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
  15. S Nitta, N Sakamoto, M Tasaka-Fujita, K Kiyohashi, A Kusano-Kitazume, M Murakawa, K Yoshino, K Mishima, S Kakinuma, M Nakagawa, M Watanabe: HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immune response. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.

15. 打越 学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、荒井 潤、井廻道夫 1型C型慢性肝炎患者における治療前・治療開始1ヶ月血清C3値比(Response C3 ratio)を用いたPEG-IFN、リバビリン併用療法早期効果予測 第53回日本消化器病学会大会(福岡2011.10.21)
16. 下間祐、伊藤敬義、柳川達郎、井口桃子、打越 学、宮下みゆき、荒井 潤、井廻道夫 HCV陽性肝細胞癌患者におけるB細胞中Epstein-Barrウイルス再活性化 第53回日本消化器病学会大会(福岡2011.10.21)
17. 宮下みゆき、伊藤敬義、井口桃子、打越 学、下間 祐、荒井 潤、井廻道夫 Naive B細胞へのHCV感染・吸着とB細胞単一クローン増殖発症との関連 第53回日本消化器病学会大会(福岡2011.10.19)
18. 伊藤敬義 治療前宿主B細胞へのHCV感染・吸着状態とPEG IFN/リバビリン併用療法の治療反応性との関連 第5回東京肝疾患研究会(PERFECT)(東京2011.7.2)
19. 宮下みゆき、伊藤敬義、坂木理、梶原敦、広石和正、小林万里子、熊田博光、井廻道夫 C型慢性肝炎活動性及び線維化へのCOX-2プロモーター領域(-1195G>A)遺伝子多型の関与 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011.6.4)
20. 井口桃子、伊藤敬義、井廻道夫 IFN治療効果予測におけるB細胞中HCV RNA測定の有用性 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011.6.4)
21. 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫 PEG-IFN、リバビリン療法中の治療前血清補体値および治療中補体値動態による治療効果予測 第47回日本肝臓学会総会(東京、2011.6.4)
22. 伊藤敬義 HCV感染と肝外病変 第49回臨床肝臓懇話会特別講演(東京、2010.9)
23. 下間祐、伊藤敬義、井口桃子、打越学、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫 HCV感染が惹起するB細胞におけるEBV再活性化. 第45回日本肝臓学会総会(山形、2010.5)
24. 打越 学、伊藤敬義、井口桃子、下間 祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるB細胞異常関連マーカーと抗ウイルス療法反応性との関連 第45回日本肝臓学会総会(山形、2010.5)
25. 伊藤敬義、井口桃子、井廻道夫. HCV感染とB細胞異常. 第94回日本消化器病学会総会シンポジウム 8「C型肝炎」：ウイルス感染の分子免疫機構.(新潟 2010.4)
26. 下間祐、伊藤敬義、打越学、井口桃子、宮下みゆき、野沢妃佐子、広石和正、井廻道夫 HCV感染者におけるEpstein-Barrウイルス再活性化. 第94回日本消化器病学会総会(新潟、2010.4)

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 上皮性体性肝細胞の製造方法、発明者 土方 誠、アリ ハサン フセイン、山口達哉、出願日 2011年3月25日、出願番号 特願2011-67112
2. 出願番号：特願2011-194082  
発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物  
発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子  
特許出願人：東京医科歯科大学  
提出日：平成23年9月6日

## ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研究代表者 高橋 秀宗  
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

### 研究要旨

温暖化で再流行が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV)、侵入の警戒が必要なウエストナイルウイルス (WNV) 及び東南アジアの大流行で輸入症例が急激に増加しているデングウイルス (DENV) について、我々の新技術 [特開 2004-65118] で開発し、「感染性ウイルスを用いず/特殊な封じ込め施設も不要な」安全/安価な製造を担保する VLP ワクチン開発研究を継続して実施、あるいは新規に開始した。

平成 22 年度は、次世代 VLP ワクチンを目指し、フラビウイルス VLP 抗原の安定化・アジュバント効果・誘導抗体のアイソタイプ活性、フラビウイルスに対する蛋白ワクチン開発等の検討を行った。平成 23 年度は、1) DENV について、1～4 型のウイルスストック、2) DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネル、3) DENV と全フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA、4) DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種、それぞれ作成した。また昆虫細胞由来抗原のワクチン用抗原としての有用性を調べ、さらに WN-VLP, WNV の精製濃縮に Cellufine sulfate カラムクロマトグラフィーが適していることを示した。

### 研究分担者

- |                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島朝人<br>飛梅 実<br>鈴木忠樹 |
| (2) 神戸大学大学院保健学研究科  | 小西英二                 |
| (3) (財) 阪大微生物研究会   | 五味康行                 |
| (4) (株) JNC        | 畠山昌和                 |

ウス脳由来不活化 JE ワクチンは積極的接種勧奨が控えられたものの、Vero 細胞培養不活化新ワクチンの認可・販売開始で再流行防止に展望が開けた。WNV に対するヒト用ワクチンは無いものの、委託企業・微研会等は新 JE ワクチンと同様の工程で不活化 WN ワクチン開発を進めており、有効性に関する成績が蓄積されつつある。DEN ワクチンは欧米中心に開発中で、未だワクチンは無い。

### A. 研究目的

致死的な脳炎を引起す日本脳炎ウイルス (JEV) やウエストナイルウイルス (WNV) は中間増幅動物 (ブタ:野鳥) を吸血した感染蚊が媒介する同一 JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスである。しかし、ヒトからヒトへの伝播はない。一方、4 つの血清型を持つデングウイルス (DENV) は感染者を吸血した蚊によりヒトからヒトへと伝播し、以前と異なる型の DENV に再感染したヒトは致死性のデング出血熱を発症する。従って、DENV は都市 (人口密集地) 型の、フラビウイルス最大の疾病を引き起こしており、WHO は警戒を強めている。

JE 制圧に貢献し世界で唯一認可された我国発マ

我々は、委託企業・微研会と官民型共同研究において、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle)」産生技術開発に成功し、この VLP 発現技術を用いて「感染性ウイルス大量培養不要で安全/特殊封じ込め施設不要で安価」な、JE 及び WN VLP 次世代ワクチン開発に継続して取り組んできた [官民共同出願: 特願 2007-290169 「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法」、等]。

本研究では、神戸大・阪大微研会・JNC (株) との連携/共同研究強化で効率化を図り、DEN VLP ワクチンを主目標に JE, WN VLP ワクチンにも共通する、フ

ラビウイルスVLP抗原の安定化・アジュバント効果・誘導抗体のアイソタイプ活性、フラビウイルス蛋白ワクチン等の検討を進め、また昆虫細胞に着眼して、DENV-EPの生産に使用できるかどうかの基礎的検討も行った。さらにフラビウイルスVLP抗原の精製法・抗原測定等の検討を進めた。

## B. 研究方法

VLP 抗原の安定化剤に関する検討：樹立した CHO-WN12 接着性細胞株(クローン#22.6)の培養上清から、Centricon-Plus を用いた限外濾過濃縮と Sephacryl S-300 クロマトグラフィーで粗精製 VLP を調製した。分注した VLP に等量の安定化剤を混合し、4°C又は 37°Cで静置した。経時的(1~27 日後)に抗原価を ELISA で、蛋白量を Lowry 法で測定し、抗原安定性を評価した。安定化剤としては、ヒトへの使用例のある多糖類ポリマー及び単糖類・二糖類を検討した。マウス免疫実験：粗精製 VLP 抗原をリン酸緩衝液(PBS)に置換し、精製不活化 WNV(蛋白量 100 µg/ml)を標準抗原とした ELISA で 1 µg 当量の VLP 蛋白に対して 1:1~1:30(µg)量のアラムアジュバントを混合し吸着させた。これを 4 週齢雌 C3H/HeN マウス腹腔内に 1 週間間隔で 2 回投与した。免疫マウス IgG1, IgG2a 画分の抗体価：不活化 WNV 抗原あるいは WN VLP 抗原で免疫したマウス血清から 50%硫酸アンモニウムで沈殿・濃縮した粗 IgG を調製した。ここから Protein-A 及び Protein-G カラムを用いて IgG1 及び IgG2a 画分をアフィニティー精製した。細胞：昆虫細胞として、(1)カイコ (*Spodoptera flugiperda*) 由来クローンであり、ヒト用ワクチン製造に使用できるようにするために米国 FDA が開発に関与した expresSF+細胞 (Protein Sciences 社)、(2)2009 年に認可されたヒトパピローマウイルスワクチン製造に用いられている、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) 細胞、(3) JEV 抗原を連続発現する High Five 細胞 (G1 細胞; 未発表) を用いた。培養液は expresSF+細胞には BacVector (Novagen 社)、High Five 細胞には ExpressFive SFM (Invitrogen 社) を用いた。ウイルス：JEV 中山株を感染させた C6/36 細胞培養液を、生化学的解析また中和試験の抗原として用いた。プラスミド：ベクターは、expresSF+細胞には昆虫細胞発現用の pIB/V5-His ベクター (Invitrogen 社)、High Five 細胞には *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) IE-1 トランスアク

ベータ、BmNPV HR3 エンハンサー、*B. mori* アクチンプロモーターを含む pIHABla ベクターを用いた。JEV 抗原を安定発現する expresSF+細胞(exJE 細胞)の樹立：pIBJEEP を expresSF+細胞に FuGENE (Roche 社) を用いて導入し、24 時間後にプラスチジン を 10 µg/ml 添加した。EP の精製 (exJE 細胞由来抗原)：exJE 細胞を  $2 \times 10^5$ /ml となるように 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、3 日後にほぼ 100%コンフルエントとなったことを確認し、培養液を BacVector から正常マウス血清を 1%添加したサプリメント不含グレース培地へ置き換えた。培地交換から 2 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。抗原量測定の サンドイッチ ELISA：JEV に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、JEV の E 特異的 JE-10B4 抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。マウス実験 (exJE 細胞由来抗原)：精製 EP (1-10 µg) とアラム (Alu-Gel-S: SERVA 社) と混合し、液量を 100 µl に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 5 匹) に 2 週間隔で 3 回、右大腿部に筋肉内投与した。アラムアジュバントは EP の 1 µg に対し 1 µl の比率で混合し、室温で 1 時間攪拌し吸着させた。High Five 細胞の培養条件の検討：125 ml の細胞培養用三角フラスコを用いて、ExpressFive SFM 培養液 30 ml に  $2.0 \times 10^5$  cells/ml の濃度で細胞を播種し、25°C、100 rpm または 26°C、80 rpm で振とう培養を行い、経時的な生細胞数および死細胞数を求めた。密度勾配遠心：10-40%の蔗糖密度勾配液上に重層して超遠心後、20 分画を得た。EP の精製 (G1 細胞由来抗原)：G1 細胞を  $2 \times 10^5$ /ml となるように 125 ml の細胞培養用三角フラスコに 30 ml 播種し、26°C、80 rpm の条件で振とう培養を行った。5 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。マウス実験 (G1 細胞)：精製 EP (1-10 µg) を単独、あるいはアジュバントである CpG モチーフを含む pcDNA3 (100 µg) またはアラムと混合し、液量を 100 µl に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 5 匹) に 2 週間隔で 2 回、右大腿部に筋肉内投与した。DENV のウイルスストック調製：国立感染研ウイルス 1 部・高崎博士より供与を受けた DENV 1~4 型を Vero 細胞に接種した。DENV 認識単クローン抗体の ELISA：ATCC より 4 種のハイブリドーマ(2H2, 3H5, 4G2, 15H3)を入手し、不活化 DENV 1~4 混合抗原(市販キット対



照抗原)、不活化 JEV 及び不活化 WNV 抗原を用いて DENV 特異的な ELISA 系樹立の可否を検討した。

DENV-VLP 発現ベクターの作成: コドン最適化を施した cDNA 塩基配列を用いて、DENV 中和エピトープ領域を含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し発現を調べた。ウイルス: DENV2 New Guinea C 株を感染させた C6/36 細胞培養液を、ELISA、マウス免疫実験および中和試験の抗原として用いた。DENV2 抗原を安定発現する High Five 細胞 (4H11 細胞) の樹立: pIHAD2EP を High Five 細胞に FuGENE (Roche 社) を用いて導入し、24 時間後にプラスチジン<sup>®</sup>を 10  $\mu$ g/ml 添加した。導入 72 時間後に直径 100 mm の培養シャーレに  $5 \times 10^5$  細胞を移し、コロニーが目視できるまで培養を行った。継代毎に培養上清中の E 抗原量を測定した。なお、導入 24 時間以後は常にプラスチジン 10  $\mu$ g/ml 添加培地を用いた。4H11 細胞由来抗原の精製: 4H11 細胞を  $2 \times 10^5$ /ml となるように 125 ml の細胞培養用三角フラスコに 30 ml 播種し、26°C、80 rpm の条件で振とう培養を行った。6 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。すなわち、培養液に 10%PEG、1.9%NaCl を添加し、4°C で 2 時間保温して沈澱させた。この沈澱を TN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM NaCl) に溶解し、10-40% ショ糖密度勾配により分画した。抗原量測定のサンドイッチ ELISA: DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、DENV2 の E 特異的 D2-3H5 抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。マウス実験 (1): 精製 EP (0.1 または 1  $\mu$ g) とアラム (Alu-Gel-S: SERVA 社) と混合し、液量を 100  $\mu$ l に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 6 匹) に 2 週間隔で 3 回、左右大腿部に 50  $\mu$ l ずつ筋肉内投与した。マウス実験 (2): 4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 8 匹) に DNA ワクチンとして pcD2ME (Konishi et al., *Vaccine* 18, 1133-39, 2000) 50  $\mu$ g を筋肉内、または感染性ウイルスを腹腔内に 1-3 回投与し、DENV2 に対する免疫を誘導した。中和試験: Vero 細胞を用い、70%フォーカス減少法で抗体価を求めた。293T 細胞の培養とトランスフェクション: 293T 細胞を、8%FBS 含有 DMEM 培地を用いて、培養面積 225cm<sup>2</sup> のフラスコ 5 枚に播種した。培養上清から、Centricon-Plus を用いた限外濾過濃縮と Sephacryl S-300 クロマトグラフィーで粗精製 VLP

を調製した。分注した VLP に等量の安定化剤を混合し、4°C 又は 37°C で静置した。経時的 (1~27 日後) に抗原価を ELISA で、蛋白量を Lowry 法で測定し、抗原安定性を評価した。安定化剤としては、ヒトへの使用例のある多糖類ポリマー及び単糖類・二糖類、を使用した。WN-VLP の Cellufine sulfate への結合: 超遠心で培養上清から回収したペレットを、50 mM Tris-HCl (pH7.5)-150 mM NaCl で懸濁し、Cellufine sulfate カラムに結合させた。結合した WN-VLP はカルボネートバッファーに 0~2.5M の NaCl を添加し、ステップワイズ法で NaCl の上昇により解離・溶出させた。0 M NaCl で洗浄後および各ステップで溶出された WNV 抗原量を ELISA にて定量した。リン酸バッファーとトリスバッファーの比較: 同様にリン酸バッファー (PBS) とトリスバッファー (Tris-HCl) および pH を 6.5 から 8.5 まで順次変化させて、カラムからの回収率を測定した。競合溶出: PBS を基本バッファーに使用し、1-100  $\mu$ g/ml の濃度に段階的に増加させたヘパリン、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、スラミンを添加した。これらの溶出液を用いてカラムから溶出された抗原量を測定した。溶出ウイルス粒子の感染性: WNV は培養 Vero 細胞を用いて調製し、培養上清中の感染価をプラーク法にて測定した。また、抗原は ELISA 法により測定した。溶出バッファーには Tris-HCl および PBS を用い、両バッファーの溶出効率を比較した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物免疫実験は、「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」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づき、動物愛護倫理規程に則り申請・承認を受けて実施した。

### C. 研究結果

VLP 抗原の安定化剤に関する検討: 実験結果から、10%スクロースを VLP 抗原の安定化剤として用いた。免疫マウス IgG1, IgG2a 画分の抗体価: より精製度の高い画分を調整して、感染防御の主体となる中和抗体価を検討することの重要性が示唆された。VLP 抗原に対するアラムアジュバントの影響: 300 ng の精製不活化 WNV 相当の VLP 抗原に対して 1:1~1:30 のアラムアジュバントを添加してマウスを免疫しても、誘導される中和抗体価に有意の増強は認められなかった。これに対して、IgG アイソタイプ

ELISA 価は、無添加群で IgG1 タイター = 1:200 に対して IgG2a タイター = 1:800 と IgG2a 優位であった応答が、アラムアジュバント添加により IgG2a 抗体価は変化せずに、IgG1 抗体価のみが 1:10, 1:30 添加群において 1:800 に上昇し、IgG1 と IgG2a の抗体価は 1:1 の等価を示した。express+細胞の発現安定性：コロニーから増殖させた細胞が安定的に E 抗原を発現し続けるかを、30 継代まで調べた。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のプラスチシジン添加により、ワクチン当量として 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  前後の E 抗原が安定して得られた。マウス実験 (exJE細胞由来抗原)：E 抗原投与量に依存して中和抗体価の上昇がみられた。さらに、初回免疫後 6 週目に致死量の感染性ウイルス ( $5 \times 10^5 \text{LD}_{50}$ ) で攻撃を行った結果、こちらも投与量依存的に生存率が上昇し、10 および 30  $\mu\text{g}$  投与群においては全てのマウスが防御された。抗原産生量の比較：5 日目の抗原産生量を比較すると、exJE細胞の抗原産生量は、哺乳類細胞で樹立した連続発現細胞のおよそ 10 倍であり、JEV感染Vero細胞から放出されたウイルス抗原よりも 4 倍高い値であった。さらに、市販ワクチンに含まれるE抗原量と比較すると、20 倍高い値であった。High Five細胞の培養条件の検討：High Five細胞は、振とう培養により容易に高密度での培養が可能となる。6 日目に死細胞数が急増するまで、高い細胞密度が維持された。JEV 抗原を連続発現するHigh Five細胞 (G1 細胞) は、26°C、80 rpmで培養を行った。G1 細胞由来JEV抗原の生化学的解析：G1 細胞からは本来のJEV感染細胞から放出されるSHA粒子と同様に、EおよびM抗原が粒子状で放出されたことを示唆する。G1 細胞由来JEV抗原の産生量：振とう培養により、静置培養での  $1.0 \times 10^6$  cells/mlよりも 5 倍高い細胞密度で培養が可能であり、継代後 6 日目には 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のE抗原が得られた。マウス免疫実験：全ての群において、1  $\mu\text{g}$  の少量投与でも中和抗体が誘導された。10  $\mu\text{g}$  投与群では、蛋白単独では 1:320、アジュバントとしてpcDNA3 を添加した群では 1:80、アラムを添加した群では 1:640 の中和抗体価が認められた。DENV ウイルスストックの調製：DENV 1~4 型をVero細胞に接種してCPEを観察したところ、DENV 1 型と DENV 4 型では 3 日目からCPEを認めたものの、DENV 2 型と DENV 3 型はCPEの判定が困難だった。DENV 3 型はNS1 抗原陽性に転換するまでVero細胞での継代を繰り返し、最終的にDENV 1~4 型のウイルスストックを調製した。DENV認識単クローン抗体ELISA：不活化DENV 1~4 型混合抗原でプレートをコートし、

JEV-E・WNV-E認識単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種のDENV認識単クローン抗体の反応性を検討した。その結果、2H2 はDENVにのみ反応し、JEV にもWNVにも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 はDENV, JEV, WNV何れにも強い反応性を示した。他方、我々の単クローン抗体 503, N.04 はJEVのみ、WNY-11 はWNVのみ、402 はJE血清型に属するJEVとWNVのみを認識した。DENV-VLP発現ベクターの作成と発現確認：DENV中和エピトープ領域を含むフラビウイルスキメラprM/E VLP発現ベクターを 5 種作成し、ウイルス蛋白質の発現を検討した。その結果、フラビウイルスの主要中和エピトープを構成しているドメイン領域のみがDENVに由来するキメラ発現体で、細胞内のウイルス蛋白質が細胞外の培養上清中に放出されていることが見出された。4H11 細胞の抗原産生量：コロニーから増殖させた細胞が安定的にE抗原を発現し続けるかを、およそ 20 継代目まで調べた。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のプラスチシジン添加により、静置培養条件下で 40 - 60 ngのE抗原が安定して産生された。発現蛋白の性状：4H11 細胞からは、E抗原が本来のDENV2 感染細胞から放出されるSHA粒子と同様に、粒子状で放出されたことを示唆する。マウス免疫実験 (1)：4H11 細胞から産生されたEPの免疫原性をマウスを用いて評価した。2 回の免疫により 1:20 の中和抗体価が誘導された。0.1  $\mu\text{g}$  の少量投与群においても、3 回の免疫後には 1:20 の中和抗体価が認められた。マウス免疫実験 (2)：4H11 細胞由来抗原の、追加免疫用抗原としての有用性を評価した。追加免疫後 7 - 10 日目には、非追加免疫群よりも 8 - 16 倍高い中和抗体価 (1:80 - 1:160) を示した。293T細胞の培養及び濃縮：精製WN-VLPのELISA 抗原価は 33.0、たん白質含量は 21.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。WN-VLPのCellufine sulfateへの結合：カラムにアプライしたWNV抗原の 3 分の 1 は、NaClを含まないカルボネートバッファの洗浄過程で失われたが、約 60%の抗原は 0.2-0.4M NaClの溶出過程で回収された。この溶出抗原を電子顕微鏡で観察した結果、小型球形粒子構造は保存されていることが判明した。リン酸バッファ (PBS) とトリスバッファ (Tris-HCl) の比較：Tris-HClでpH7.5-8.5 の場合はカラムからのWN-VLP回収率は効果的ではなかった。80-90%の回収には 0.6 M のNaClが必要であった。競合溶出：スラミンを競合溶出に用いた場合は 80%以上が回収され、スラミンによる溶出効率のよいことが判明した。溶出ウイルス粒子の感染性：抗

原量で 200 µg、感染価で約  $2.4 \times 10^{-9}$  のプラーク形成ユニットに相当する WNV が 60 mL のウイルス培養液から Cellufine sulfate カラムで回収できることが判明した。

#### D. 考察

本課題では JE-VLP, WN-VLP に加え、新たに DEN-VLP も目標に据えて、フラビウイルス VLP ワクチン研究に取り組んだ。

添加剤として食品等に用いられている多糖類ポリマー、単糖類・二糖類を VLP 抗原に添加してその安定化剤としての効果を判定した。その結果、蔗糖という極めて平凡な二糖類に安定化作用のあることを見出した。

フラビウイルス感染においては、中和抗体が感染防御に主要な役割を果たす。しかもその抗体応答は IgG2a 優位であることがいくつか報告されている。免疫マウス血清から IgG1, IgG2a 画分を調製し、両画分のウイルス特異的抗体価を比較したところ、IgG2a 画分により高い抗体価が観察された。

ワクチン効果の増強を視野に、免疫増強剤に汎用されているアラムアジュバントの効果を検討した。一定の VLP 抗原量に対して添加するアラムアジュバントの量を順次増加させたところ、IgG2a 抗体価の上昇は観察されず、IgG1 アイソタイプの特異的抗体価のみが増強されていた。高い有効性を持つ DEN ワクチンの開発には、IgG アイソタイプごとの中和活性・ADE 活性を含めた総合的な検討が必要となろう。

本事業では、DENV に対するワクチン製造への昆虫細胞の利用について検討を行うため、抗原産生量の高い細胞株の樹立、EP の抗原性、免疫原性、およびアジュバントの効果についてしらべた。exJE 細胞由来 JEV 抗原の解析：薬剤選択により安定的に E 抗原を発現する細胞を得ることができた。昆虫細胞由来 JEV 抗原はワクチンとして有用であり、exJE 細胞からは実用化に十分な抗原が得られると考えられる。

High Five 細胞由来 EP の免疫原性とアジュバントの効果：expresSF+ 細胞を用いた検討により、昆虫細胞がワクチン製造に有用であることが示された。

実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功した。

DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、DENV と全フラビウイルスあるいは JE 血清型フ

ラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた。

DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP の発現が強く示唆された。発現ベクターのトランスフェクションにより培養上清中に放出されたウイルス蛋白質が、超遠心により蔗糖クッションを通過してウイルス粒子と同様に沈降することから、粒子状抗原を形成している可能性は極めて高い。即ち、DEN VLP 開発の有力な基盤が得られたものと思われる。

昆虫細胞は、細胞株を樹立する際に一般的に用いられる限界希釈法が適さないため、薬剤選択とコロニー選択を行い、安定的に E 抗原を発現する細胞を得ることができた。今後産業的製造へ発展していく際に有益な情報であると考えられる。アラムアジュバントを用いることにより、100 ng という少量投与群でも中和抗体価が誘導された。High Five 細胞および pIHAb1a ベクターの使用により、デング蛋白ワクチンの大量製造が可能であることが示唆された。

本研究により WNV 粒子が Cellufine sulfate に結合し、マイルドな塩濃度・中性の pH で溶出できることを示すことができた。Cellufine sulfate カラム法は従来の方法よりもワクチンの産生に適していると考えられる。

#### E. 結論

1) VLP 抗原の保存安定化剤に蔗糖が有効である。2) 免疫マウス血清では IgG2a 画分にウイルス特異抗体価がより高く誘導される。3) VLP 抗原にアラムアジュバントを添加すると、IgG1 アイソタイプの特異抗体価が増強される。4) High Five 細胞を用いて樹立した JEV 抗原安定発現細胞は高い産生量を示す。

DENV VLP 開発研究では、1) DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功。2) DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備。3) DENV と全フラビウイルスあるいは JE 血清型フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系樹立。4) DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成した。High Five 細胞を用いて樹立した DENV2 抗原安定発現細胞は高い産生量を示し、得られた抗原蛋白はアラムアジュバントにより低ドーズでもマウスに高いレベルの中和抗体を誘導した。また精製度が高く抗原性も保存される Cellufine sulfate カラム法はワクチン生産に適していた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohtaki, N., Takahashi, H., Kaneko, K., Gomi, Y., Ishikawa, T., Higashi, Y., Kurata, T., Sata, T. and Kojima, A.: Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine* 28: 6588-6596, 2010.

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine*. 28, 2664-2670, 2010

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* 1, 1000102, 2011

Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, Gomi Y, Ishikawa T, Higashi Y, Todokoro M, Kurata T, Sata T and Kojima A: Purification and concentration of non-infectious West Nile virus-like particles and infectious virions using a pseudo-affinity Cellufine Sulfate column. *J. Virol. Methods* 174: 131-135, 2011.

### 2. 学会発表

石川 知弘、小西 英二: ベネズエラウマ脳炎ウイルスレプリコン発現システムを用いた日本脳炎ウイルスNS1発現系の構築およびその性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会(徳島) 2010年11月

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. *Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections* 2010. Sapporo, Japan, 2010年12月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the predominant dengue virus in Surabaya, Indonesia: status in 2008-2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus in inhabitants of Kumamoto Prefecture, Japan, from 2004 through 2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Masahiro Kotaki, Shoko Takeda, Eiji Konishi: Monoclonal antibodies to dengue virus types 1 and 3 exhibit neutralizing and enhancing activities depending on epitopes on envelope protein and subclass of IgG. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, and Eiji Konishi: Efficient production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by recombinant insect cells. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji and Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当事項なし。

### 2. 実用新案特許

該当事項なし。

### 3. その他

該当事項なし。

## ワクチン創生の新テクノロジーによる新規ワクチンの開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研究代表者 高橋 秀宗

**研究要旨** 温暖化で再流行が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV)、侵入の警戒が必要なウエストナイルウイルス (WNV) 及び東南アジアの大流行で輸入症例が急激に増加しているデングウイルス (DENV) について、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性 VLP」を我々の新技術 [特開 2004-65118] で開発し、「感染性ウイルスを用いず/特殊な封じ込め施設も不要な」安全/安価な製造を担保する VLP ワクチン開発研究を継続して実施、あるいは新規に開始した。

本年度は、次世代 VLP ワクチンを目指し、1) 実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功した。2) DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できた、3) DENV と全フラビウイルスあるいは JE 血清型フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた。4) DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

また昆虫細胞由来抗原のワクチン用抗原としての有用性を調べ、その成果をもとに、デング 2 型ウイルス (DENV2) 抗原連続発現細胞を樹立し、基礎的評価を行った。DENV2 抗原連続発現細胞からは、670 ng/ml の E 抗原産生量が得られた。さらに、産生された DENV2 抗原をアラムアジュバントと共にマウスに免疫した結果、100 ng の投与により 1:20 の中和抗体価が誘導された。さらにフラビウイルス VLP 抗原の抗原精製、抗原測定等の検討を行った。その結果、1) prM-E VLP 抗原は Cellufine sulfate カラムクロマトグラフィーにより、0.2-0.4 M NaCl の条件で精製することができ、球状、感染性はそこなわない。2) 15 倍濃縮が可能である。3) ヘパリンのアナログであるスラミンにより競合的に WN-VLP を溶出することが可能。4) WNV 粒子であれば感染性も維持している。従って、5) WN-VLP, WNV の精製濃縮に Cellufine sulfate カラムクロマトグラフィーが適している。即ち、6) Cellufine sulfate はワクチン生産に適していることが示された。

### 研究分担者

- |                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島朝人<br>飛梅 実<br>鈴木忠樹 |
| (2) 神戸大学大学院保健学研究科  | 小西英二                 |
| (3) (財) 阪大微生物研究会   | 五味康行                 |
| (4) (株) JNC        | 畠山昌和                 |

### A. 研究目的

我国侵襲の恐れがあるウエストナイルウイルス (WNV) も、温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV) も、JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスで、中間増幅動物を吸血した感染蚊が媒介して重篤な疾病を引起す。しかし、何れもワクチンによる予防が可能である。研究組織の微研会により新不活化 JE ワクチンが世界に先駆けて開発 (2009 年 2 月認可) され、次いで細胞培養不活化 WN ワクチンも開発されつつある。

一方、フラビウイルス最大の疾病を引起すデングウイルス (DENV) は 4 つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊が媒介するヒトを宿主とするウイルスである。異なる型の DENV に再感染した場合致死性のデング出血熱を発症する。東南アジアの人口密集地 (都市部) で流行を起こしており、2010 年海外帰国者の輸入デング症例は 2009 年の 2.5 倍以上の 245 例が報告されている。しかし、DENV 1~4 型何れにも有効な 4 価ワクチンが必須であるため、欧米を中心に DENV ワクチン開発中であるものの、未だワクチンは無い。

我々は委託企業・微研会との官民型共同研究で、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle)」産生技術開発〔官民共同：特許第 4268384 号「日本脳炎抗原及びその製造方法」(2009.2.27)、特願 2007-290169「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法」、特願 2007-330151「フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント」等〕に成功してきた。そこで、本技術を用い DEN-VLP ワクチンについても開発研究することを目的とした。

また有用蛋白の大量製造に適するために近年注目されてきた昆虫細胞に着目して、DENV-EP の生産に使用できるかどうかの基礎的検討も行う。昨年度は、DENV と同じフラビウイルス属に属する日本脳炎ウイルス (JEV) を用いて、ワクチン抗原を大量生産する昆虫細胞株の種類を検討した。昆虫細胞発現系に最適化したプラスミド (pIHAb1a) に JEV の prM/E 遺伝子を組み込み、イラクサギンウワバ由来の High Five 細胞に安定発現させた細胞株から産生された JEV 抗原量は、哺乳類由来 JEV 抗原連続発現細胞よりも 200 倍高い値であった。この結果に基づき、本年度は pIHAb1a および High Five 細胞を用いてデング 2 型ウイルス (DENV2) 抗原連続発現細胞を樹立し、哺乳類由来 DENV2 抗原連続発現細胞の約 70 倍高い抗原産生量を得た。得られた抗原はマウスモデルにおいて 100 ng という低い投与量で中和抗体価を誘導し、ワクチン用抗原として有用であることが示された。遺伝子組み換え技術を用いた本戦略により安全かつ安価なワクチン開発が可能であることが示唆された。

これまでの官民共同研究において、WN-VLP 粒子は WNV に対するウイルス中和抗体誘導能を有するが、WNV のウイルス全粒子を用いた不活化ワクチンと比

較すると免疫原性の低いことが確認されている。その原因として、VLP 抗原の精製度が免疫原性の低下をもたらしている可能性が示唆されている。そこで、連携/共同研究の強化・効率化を図るため、感染研の担当する DEN-VLP 発現系樹立後に必須となり、JE-, WN-, DEN-VLP ワクチン開発の何れにも共通する課題となっている、フラビウイルス VLP 抗原の精製法・抗原測定等の検討を進めた。

## B. 研究方法

微研会との連携/共同研究体制の強化を基に準備を進めていた DEN VLP 開発研究に着手し、以下の検討を行った。

DENV のウイルスストック調製：国立感染研ウイルス 1 部・高崎博士より供与を受けた DENV 1~4 型を Vero 細胞に接種した。Cytopathic effect (CPE) を観察しつつ経時的に培養上清を採取し、市販 (Bio-Rad) の DENV NS1 抗原ストライプを用いてウイルス増殖を調査した。NS1 抗原陽性化が認められないウイルスについては、フレッシュな Vero 細胞でウイルスの継代を繰返した。

DENV 認識単クローン抗体の ELISA：ATCC より 4 種のハイブリドーマ (2H2, 3H5, 4G2, 15H3) を入手し、不活化 DENV 1~4 混合抗原 (市販キット対照抗原)、不活化 JEV 及び不活化 WNV 抗原を用いて DENV 特異的な ELISA 系樹立の可否を検討した。一方、抗-JEV 及び抗-WNV 単クローン抗体は、これまでの HS 官民共同研究で報告してきた 503, N.04 及び WNY-11, 402 を用いた。なお、アイソタイプの確認には市販のキットを用いた。

DEN-VLP 発現ベクターの作成：コドン最適化を施した cDNA 塩基配列を用いて、DENV 中和エピトープ領域を含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成した。これらのベクター DNA を 293T 細胞へトランスフェクションし、ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットによってキメラ prM/E 蛋白質の発現を調べた。

細胞：イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) 細胞を用いた。培養液は ExpressFive SFM (Invitrogen 社) を用い、28°C で培養した。DENV2 抗原を連続発現する細胞には、10 µg/ml のブラスチジンを添加した培養液を用いた。

ウイルス：DENV2 New Guinea C 株を感染させた C6/36 細胞培養液を、ELISA、マウス免疫実験および中和試験の抗原として用いた。

プラスミド：ベクターは、*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) IE-1 トランスアクチベータ、BmNPV HR3 エンハンサー、*B. mori* アクチンプロモーターを含む pIHAb1a ベクター (Yamaji et al., *Biochemical Engineering Journal* 41, 203-9, 2008) を用いた。このベクターに DENV2 の prM/E 遺伝子を挿入したものを pIHAD2EP とした。ただし、prM の開裂に伴う E の配置転換による融合活性の獲得が安定発現細胞株の樹立に障害をもたらすため、細胞内酵素フリンによる prM 上の切断部分に存在するアミノ酸モチーフ RREK を STEK に改変し、開裂を抑制するようにしている。

DENV2 抗原を安定発現する High Five 細胞 (4H11 細胞) の樹立：pIHAD2EP を High Five 細胞に FuGENE (Roche 社) を用いて導入し、24 時間後にプラスチジン 10 µg/ml 添加した。導入 72 時間後に直径 100 mm の培養シャーレに  $5 \times 10^5$  細胞を移し、コロニーが目視できるまで培養を行った。形成されたコロニーを 96 穴培養プレートに継代し、順次培養面積を増やし、25 cm<sup>2</sup> フラスコまで増殖させた後、継代毎に培養上清中の E 抗原量を測定した。なお、導入 24 時間以後は常にプラスチジン 10 µg/ml 添加培地を用いた。

4H11 細胞由来抗原の精製：4H11 細胞を  $2 \times 10^5$ /ml となるように 125 ml の細胞培養用三角フラスコに 30 ml 播種し、26°C、80 rpm の条件で振とう培養を行った。6 日後の培養上清を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法により EP を精製した。すなわち、培養液に 10% PEG、1.9% NaCl を添加し、4°C で 2 時間保温して沈殿させた。この沈殿を TN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、100 mM NaCl) に溶解し、10-40% ショ糖密度勾配により分画した。各分画の E 抗原量を ELISA により測定し、ピークとなった 3 分画を精製抗原とした。

抗原量測定のサンドイッチ ELISA：DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、DENV2 の E 特異的 D2-3H5 抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。E 抗原スタンダードから、未知試料の抗原量を計算した。E 抗原スタンダードの蛋白量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準蛋白として、電気泳動後の銀染色により E 蛋白バンドの色調と比較することにより求めた。

ウエスタンブロット：4H11 細胞、あるいは DENV2 感染 C6/36 細胞の培養液から、ポリエチレングリ

ール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心により精製したウイルス蛋白を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後、ポリビニリデンジフルオライド膜に転写した。転写された蛋白を D1-4G2 抗体で染色した。

マウス実験 (1)：精製 EP (0.1 または 1 µg) とアラム (Alu-Gel-S : SERVA 社) と混合し、液量を 100 µl に調整し、4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 6 匹) に 2 週間隔で 3 回、左右大腿部に 50 µl ずつ筋肉内投与した。アラムアジュバントは EP の 1 µg に対し 1 µl の比率で混合し、室温で 1 時間攪拌し吸着させた。初回免疫後 3 週目から 2 週間隔で 7 週目まで眼窩静脈叢から採血し、個々の ELISA 抗体値およびプール血清の中和抗体価を測定した。

マウス実験 (2)：4 週令の雄 C3H/He マウス (各群 8 匹) に DNA ワクチンとして pcD2ME (Konishi et al., *Vaccine* 18, 1133-39, 2000) 50 µg を筋肉内、または感染性ウイルスを腹腔内に 1-3 回投与し、DENV2 に対する免疫を誘導した。ELISA 抗体値が同程度となったことを確認し、各群の半数にアラムと混合した精製 EP (1 µg) を、残り半数には陰性コントロールとして High Five 細胞培養液を PEG 濃縮および蔗糖密度勾配遠心により濃縮精製したものを投与し、追加免疫を行った。追加免疫の 2 日前、4、7、10 日後に眼窩静脈叢から採血し、個々の血清を用いて中和抗体価を測定した。

ELISA 抗体値の測定：DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、DENV2 感染 C6/36 細胞培養液、1:100 希釈したマウス血清を反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸により抗原特異抗体を検出した。D2-3H5 抗体により得られた値を標準とし、ELISA 抗体値を算出した。

中和試験：Vero 細胞を用い、70% フォーカス減少法で抗体価を求めた。

293T 細胞の培養とトランスフェクション：293T 細胞を、8% FBS 含有 DMEM 培地を用いて、培養面積 225 cm<sup>2</sup> のフラスコ 5 枚に播種した。発現プラスミドのトランスフェクション 3 日後に、合計で約 3L の培養上清を得た。回収した培養上清は低速遠心処理し、4°C で保管した。培養上清から、Centricon-Plus を用いた限外濾過濃縮と Sephacryl S-300 クロマトグラフィーで粗精製 VLP を調製した。分注した VLP に等量の安定化剤を混合し、4°C 又は 37°C で静置した。経時的 (1~27 日後) に抗原価を ELISA で、蛋白量を Lowry 法で測定し、抗原安定性を評価した。また、保存抗原の粒子形態を電子顕微鏡で観察した。

安定化剤としては、ヒトへの使用例のある多糖類ポリマー及び単糖類・二糖類、を使用した。

WN-VLP の Cellufine sulfate への結合：超遠心で培養上清から回収したペレットを、50 mM Tris-HCl (pH7.5)-150 mM NaCl で懸濁し、Cellufine sulfate カラムに結合させた。結合した WN-VLP はカルボネートバッファーに 0~2.5M の NaCl を添加し、ステップワイズ法で NaCl の上昇により解離・溶出させた。0 M NaCl で洗浄後および各ステップで溶出された WNV 抗原量を ELISA にて定量した。

リン酸バッファーとトリスバッファーの比較：同様にリン酸バッファー (PBS) とトリスバッファー (Tris-HCl) および pH を 6.5 から 8.5 まで順次変化させて、カラムからの回収率を測定した。

競合溶出：PBS を基本バッファーに使用し、1-100 µg/mL の濃度に段階的に増加させたヘパリン、ヘパリン硫酸、デキストラン硫酸、スラミンを添加した。これらの溶出液を用いてカラムから溶出された抗原量を測定した。

溶出ウイルス粒子の感染性：WNV は培養 Vero 細胞を用いて調製し、培養上清中の感染価をプラーク法にて測定した。また、抗原は ELISA 法により測定した。溶出バッファーには Tris-HCl および PBS を用い、両バッファーの溶出効率を比較した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物免疫実験は、「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」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づき、動物愛護倫理規程に則り申請・承認を受けて実施した。

### C. 研究結果

DENV ウイルスストックの調製：DENV は培養細胞で増殖しないか、増殖しても高いウイルス価を得られない事が多い。しかし、DEN VLP 開発研究には必須である。そこで、ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストックの調整を試みた。供与を受けた DENV 1~4 型を Vero 細胞に接種して CPE を観察したところ、DENV 1 型と DENV 4 型では 3 日目から CPE を認めたものの、DENV 2 型と DENV 3 型は CPE の判定が困難で、5 日目にはモノレイヤーを形成した。しかし、DENV NS1 抗原ストライプを用いた検討では、DENV 3 型以外は何れもウイルス増殖陽性であった。DENV 3 型は NS1 抗原陽性に転換するまで Vero 細胞での継代を

繰返し、最終的に DENV 1~4 型のウイルスストックを調製した。

DENV 認識単クローン抗体 ELISA：不活化 DENV 1~4 型混合抗原でプレートをコートし、JEV-E・WNV-E 認識単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。その結果、2H2 は DENV にのみ反応し、JEV にも WNV にも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 は DENV, JEV, WNV 何れにも強い反応性を示した。他方、我々の単クローン抗体 503, N.04 は JEV のみ、WNY-11 は WNV のみ、402 は JE 血清型に属する JEV と WNV のみを認識した。

DENV-VLP 発現ベクターの作成と発現確認：DENV 中和エピトープ領域を含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、293T 細胞にトランスフェクションした。細胞培養上清から 20%蔗糖クッション超遠心法で調製した細胞外放出蛋白質と細胞抽出液について、電気泳動後ウエスタンブロットによってウイルス蛋白質の発現を検討した。その結果、フラビウイルスの主要中和エピトープを構成しているドメイン領域のみが DENV に由来するキメラ発現体で、細胞内のウイルス蛋白質が細胞外の培養上清中に放出されていることが見出された。

4H11 細胞の抗原産生量：コロニーから増殖させた細胞が安定的に E 抗原を発現し続けるかを、およそ 20 継代目まで調べた。10 µg/ml のプラスチック添加により、静置培養条件下で 40 - 60 ng の E 抗原が安定して産生された。

4H11 細胞の振とう培養：振とう培養条件における、4H11 細胞からの E 抗原産生量を測定した。4.0×10<sup>5</sup> cells/ml の 4H11 細胞を 125 ml の細胞培養用三角フラスコに 30 ml、または 75 cm<sup>2</sup> フラスコに 15 ml 播種した。三角フラスコは 26°C、80 rpm の条件で振とう培養、75 cm<sup>2</sup> フラスコは 28°C で静置培養を行った。継代後 6 日目まで細胞密度および上清中の E 抗原量を測定した。振とう培養、静置培養ともに継代後 3 日目に最も高い細胞密度に達し、その後低下した。ピーク時の細胞密度は振とう培養が静置培養よりも約 2 倍高い値を示した。4H11 細胞から産生された E 抗原は経時的に上昇し、継代後 6 日目に最も高い値となった。6 日目の抗原産生量を比較すると、振とう培養では 670 ng/ml、静置培養では 86 ng/ml であった。同条件での振とう培養において、4H11 細胞は 25 継代目まで 600 ng/ml 前後の E 抗原を産生した。

発現蛋白の性状：4H11 細胞の培養液を蔗糖密度勾



配遠心法で分画した結果、E抗原のピークは、DENV2 感染 C6/36 細胞培養液で示された SHA (Slowly sedimenting hemagglutinin) 粒子の E 抗原と同等の密度を示した (データ示さず)。この結果は、4H11 細胞からは、E 抗原が本来の DENV2 感染細胞から放出される SHA 粒子と同様に、粒子状で放出されたことを示唆する。

4H11 細胞培養液をポリエチレングリコール沈殿法により濃縮後、蔗糖密度勾配遠心法で得られた EP の分画をウエスタンブロット法で解析した結果を図 3 に示す。E に対する抗体 (D1-4G2) により、染色された E に相当するバンドは、DENV2 感染 C6/36 細胞由来抗原と同等の分子量であった。

マウス免疫実験 (1) : 4H11 細胞から産生された EP の免疫原性をマウスを用いて評価した。アジュバントは、昆虫細胞由来 JEV 抗原の検討で最も良い結果の得られたアラムを用い、2 週間隔で 3 回投与した。初回免疫後 3 - 7 週目の中和抗体価を図 4a に示す。1  $\mu\text{g}$  投与群では初回免疫後 3 週目、すなわち 2 回の免疫により 1:20 の中和抗体価が誘導された。0.1  $\mu\text{g}$  の少量投与群においても、3 回の免疫後には 1:20 の中和抗体価が認められた。さらに、2 群ともに初回免疫後 3 週目から高い ELISA 抗体値を示した。

マウス免疫実験 (2) : 4H11 細胞由来抗原の、追加免疫用抗原としての有用性を評価した。すでにワクチン接種歴のある個体として DNA ワクチン接種群、感染歴のある個体として感染性ウイルス接種群を設けた。それぞれの群をさらに 2 群に分け、一方には 4H11 細胞由来抗原、もう一方には High Five 細胞培養液を接種し、追加免疫を行った。二次免疫応答を捉えるため、追加免疫の 4、7、10 日後に採血を行い、中和抗体価を測定した。DNA ワクチン接種群、感染性ウイルス接種群 (図 5b) 共に追加免疫後 7 - 10 日目には、非追加免疫群よりも 8 - 16 倍高い中和抗体価 (1:80 - 1:160) を示した。

293T 細胞の培養及び濃縮 : 293T 細胞を培養面積 225 $\text{cm}^2$  のフラスコで培養し、培養上清の回収及び WN-VLP の濃縮を行った。5 回の培地交換で得た培養上清約 3L を精製し、精製 WN-VLP を得た。精製 WN-VLP の ELISA 抗原価は 33.0、たん白質含量は 21.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

WN-VLP の Cellufine sulfate への結合 : カラムにアプライした WNV 抗原の 3 分の 1 は、NaCl を含まないカルボネートバッファの洗浄過程で失われたが、約 60% の抗原は 0.2-0.4M NaCl の溶出過程で回収された。この溶出抗原を電子顕微鏡で観察した

結果、小型球形粒子構造は保存されていることが判明した。

リン酸バッファ (PBS) と トリスバッファ (Tris-HCl) の比較 : Tris-HCl で pH7.5-8.5 の場合はカラムからの WN-VLP 回収率は効果的ではなかった。80-90% の回収には 0.6 M の NaCl が必要であった。しかし、PBS の場合には pH7.0 の中性条件で回収率が最もよくなることが判明した。

競合溶出 : 用いた硫酸配糖体全てで 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でも約 20% 程度の溶出率しか得られなかった。しかし、スラミンを競合溶出に用いた場合は 80% 以上が回収され、スラミンによる溶出効率のよいことが判明した。

溶出ウイルス粒子の感染性 : 抗原量で 200  $\mu\text{g}$ 、感染価で約  $2.4 \times 10^{-9}$  のプラーク形成ユニットに相当する WNV が 60 mL のウイルス培養液から Cellufine sulfate カラムで回収できることが判明した。感染性ウイルスの場合には 0.2M NaCl を含むカルボネートバッファでも 90% 以上が回収されることが判明した。

#### D. 考察

実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功したことは今後の感染価測定法の確立に繋がる成果であろう。予試験的ながら、ウイルス価の定量が可能なプラークアッセイ法が確立しつつある。これにより、定性的な市販 NS1 抗原ストライプに依存せずに感染実験に供することのできるタイターの高いウイルス原液の調整も可能となる。

ウイルスワクチン開発においては、ウイルス調製と共に、標的ウイルス・ウイルス抗原を識別する抗体系の整備が重要である。本年度の結果は DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、DENV と全フラビウイルスあるいは JE 血清型フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた事も示している。現在、各単クローン抗体の精製と標識抗体の調製を進めている。この点に関しても予試験的な成績ではあるが、ATCC より購入したハイブリドーマ由来の精製抗体・標識抗体の組合せで VLP を構成する E 及び prM 蛋白質の特異的検出が可能な ELISA 系の構築が進展中である。

本年度における最大の成果は、DENV 中和エピト

ープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP の発現が強く示唆されたことであろう。発現ベクターのトランスフェクションにより培養上清中に放出されたウイルス蛋白質が、超遠心により蔗糖クッションを通過してウイルス粒子と同様に沈降することから、粒子状抗原を形成している可能性は極めて高い。上記の DENV-E, prM 抗体、ELISA 系等を早急に確立し、それらを駆使した粒子性状解析・抗原性解析が一層重要であろう。これらの解析を経て実験動物での免疫実験・ウイルスチャレンジ実験が比較的短期間に可能になると期待できる。

即ち、本年度の成果により DEN VLP 開発の有力な基盤が得られたものと思われる。

本事業では、昆虫細胞を用いた DENV に対するワクチン製造について検討を行った。昆虫細胞は、有用蛋白質の大量製造に適することが知られており、近年、昆虫細胞由来生物製剤の市場化が進められている。昆虫細胞は哺乳類細胞に比べ生物学的分類上大きく異なるため、ヒトに対して病原性を有する微生物等が混入する可能性が極めて低く、高密度培養が一般的に容易であり、蛋白質の大量製造が可能である。

本年度は、DENV2 に対するワクチン製造への昆虫細胞の利用について検討を行った。JEV に対するワクチン蛋白質の開発により得た知見を生かし、抗原産生量の高い細胞株の樹立、産生抗原の免疫原性について検討を行った。

4H11 細胞の樹立：昆虫細胞は、細胞株を樹立する際に一般的に用いられる限界希釈法が適さないため、薬剤選択とコロニー選択を行い、安定的に E 抗原を発現する細胞を得ることができた。通常、DENV 感染細胞の培養上清中のウイルス感染力価およびウイルス抗原量は、JEV 感染細胞のそれよりも 10 - 100 倍低い。また、当教室で哺乳類由来の CHO 細胞を用いて樹立した、DENV2 抗原連続発現細胞の抗原産生量は 10 ng/ml であった。そのため、いかに高い抗原産生量を得るかが課題であった。High Five 細胞と pIHAb1a ベクターの組合せにより、哺乳類細胞で樹立した連続発現細胞よりも 3 - 5 倍高い E 抗原を安定して産生する 4H11 細胞を得た。4H11 細胞由来抗原の生化学的性状を蔗糖密度勾配遠心およびウエスタンブロットにより解析した結果、感染性ウイルス由来抗原と同等であることが示された。4H11 細胞を振とう培養した結果、静置培養よりも 8 倍高い、670 ng/ml の E 抗原が安定して得られた。振とう培養と静置培養を比較すると、ピークの細胞密度は振とう培養が 2 倍高いだけであったが、

E 抗原量はおよそ 8 倍高い値となった。すなわち、培養条件により細胞あたりの抗原産生量を約 4 倍高められるということになる。このことは、今後産業的製造へ発展していく際に有益な情報であると考えられる。

4H11 細胞由来抗原のマウスにおける免疫原性：アラムアジュバントを用いることにより、100 ng という少量投与群でも中和抗体価が誘導された。また、DNA ワクチン接種後および感染性ウイルス接種後のマウスにおいても、少量投与により高い二次免疫応答の誘導が示された。機序の異なるワクチンを組み合わせることにより、ワクチン効果を高められることが知られている。将来、DNA ワクチンと組合せた接種方法も可能であることが示唆された。DENV が蔓延する地域では、DENV 感染歴がある可能性が高いが、感染歴のある個体においても有効かつ安全であることが示された。

以上の考察から、High Five 細胞および pIHAb1a ベクターの使用により、デング蛋白ワクチンの大量製造が可能であることが示唆された。蛋白ワクチンは他のワクチン戦略に比べて安全性が高いと考えられる。大量発現系によりワクチン製造にかかる費用を抑えることができれば、ワクチンの価格を低減できるため、昆虫細胞を用いた本戦略は、安全かつ安価なワクチン製造に有用であると考えられる。今後は他の血清型の蛋白においても高発現系の樹立を検討していく予定である。

WN-VLP の精製に蔗糖密度勾配遠心法を用いると、精製過程で抗原性が減少するという結果から、一般的に多用されている蔗糖密度勾配遠心法は WN-VLP の場合は適当ではないことを、既に以前の共同研究報告で示してきた。また、感染性の抗原を長時間超遠心機を使用して精製することについては、安全性の問題が常に生じる。固相化した抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーは、溶出液の強酸性 pH が抗原性に与える影響に大きな問題がある。

本研究により WNV 粒子が Cellufine sulfate に結合し、マイルドな塩濃度・中性の pH で溶出できることを示すことができた。カルボネートバッファーは 30% を洗浄過程で失うことから適当ではない。しかし、溶出された抗原は球状形態が守られていて、抗原性も保たれていることが判明した。しかも、生理的なバッファーである PBS が溶出に向いていることも判明した。また、感染性ウイルスを精製する場合にも、Cellufine sulfate カラムを用いた場合感染性を失うことなく溶出できることも判明した。

以上の結果から、本研究で示した Cellufine sulfate カラム法は従来の方法よりもワクチンの産生に適していると考えられる。

Cellufine sulfate の硫酸エステルはプラスに荷電した E 蛋白とイオン結合すると考えられる。マイナス荷電の硫酸基を多数持つスラミンを用いると競合的に WN-VLP を溶出させることができた。しかし、同様に硫酸基を多数持つ硫酸ポリサッカライドの競合溶出効率がなぜ悪かったのか理由は明瞭ではない。可能性としては、スラミンと多糖体との基本フレームの構造的な違いが影響したことが考えられる。

Cellufine sulfate と WNV 抗原のイオン結合には塩濃度よりも pH がより強く影響していた。酸性条件においては VLP 抗原の回収率が著しく低下することから、VLP は酸性 pH で Cellufine sulfate とより強く結合していると考えられる。フラビウイルスは酸性 pH 依存的に E 蛋白の 2 量体構造を変化させて感染することから、VLP 表面に配置されている E 蛋白もウイルスと同様に pH 依存的な構造変化を生じていることが推測される。

VLP との結合機序については不明であるものの、本研究で検討を加えた Cellufine sulfate カラムクロマトグラフィーは VLP の精製と濃縮に適し、常法のワクチン生産過程に簡単に加えることができる有力な方法だと思われる。

## E. 結論

DEN VLP 開発研究で、1) 実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功した。2) DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できた。3) DENV と全フラビウイルスあるいは JE 血清型フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた。4) DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットにより発現を確認した。

High Five 細胞を用いて樹立した DENV2 抗原安定発現細胞は高い産生量を示し、得られた抗原蛋白はアラムアジュバントにより低ドーズでもマウスに高いレベルの中和抗体を誘導することが明らかにされた。High Five 細胞および pIHAbLa ベクターは、安全かつ安価な DENV ワクチンの製造に有用であると考えられる。また精製度が高く抗原性も保存され

る Cellufine sulfate カラム法はワクチン生産に適している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, Gomi Y, Ishikawa T, Higashi Y, Todokoro M, Kurata T, Sata T and Kojima A: Purification and concentration of non-infectious West Nile virus-like particles and infectious virions using a pseudo-affinity Cellufine Sulfate column. *J. Virol. Methods* 174: 131-135, 2011.

Okamoto S, Yoshii H, Matsuura M, Kojima A, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Takahashi M, Yamanishi K, and Mori Y: Poly- $\gamma$ -glutamic acid nanoparticles and aluminum adjuvant used as an adjuvant with a single dose of Japanese encephalitis virus-like particles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Clin. Vaccine Immunol* (in press).

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* 1, 1000102, 2011, (DOI 10.4172/2157-7560.1000102)

Eiji Konishi, Yuko Miyagawa: Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes and Infection.* 13(12-13):1091-8, 2011

Eiji Konishi and Mayu Konishi: Nonstructural Protein 1 Antibody-Based Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate Japanese Encephalitis Virus from Dengue Virus Infections in Humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 64(4):284-91, 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health.* Advance Publication Article, 6 Aug 2011

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the Predominant Dengue Virus from Type 2 to Type 1 with a Subsequent Genotype Shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008–2010. PLoS One. 2011;6(11): e27322. Epub 2011 Nov 7.

## 2. 学会発表

桑原三和、窪田衣里子、斎藤直輝、永菅尚、高橋裕輔、中村匡崇、山地秀樹、小西英二：JEV抗原を高発現する昆虫細胞の樹立と産生抗原のワクチンへの適用。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会

小瀧将裕、武田祥子、小西英二：デング1型および3型マウスモノクローナル抗体の中和活性および増強活性を規定する因子の解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the predominant dengue virus in Surabaya, Indonesia: status in 2008–2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus in inhabitants of Kumamoto Prefecture, Japan, from 2004 through 2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Masahiro Kotaki, Shoko Takeda, Eiji Konishi: Monoclonal antibodies to dengue virus types 1 and 3 exhibit neutralizing and enhancing activities depending on epitopes on envelope protein and subclass of IgG. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, and Eiji Konishi: Efficient

production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by recombinant insect cells. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji and Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Atsushi Yamanaka, Helen Susilowati, Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: Isolation of chikungunya virus from patients clinically diagnosed as dengue fever in Surabaya, Indonesia, 2010. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati, Eiji Konishi: Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia 2008–2009. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

桑原三和、北井陽子、近藤高志、小西英二：ウマを対象とした2006–2010年におけるウエストナイルウイルス国内侵入の監視。第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当事項なし。

### 2. 実用新案特許

該当事項なし。

### 3. その他

該当事項なし。