

II. 分担研究報告

HCV粒子ワクチン作製に適した培養細胞の探索

研究代表者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 村山 麻子 国立感染症研究所ウイルス第二部 研究員

研究要旨 JFH-1株の発見により、人工的に培養細胞中でHCV粒子の合成が可能になり、この合成ウイルス粒子を用いた感染予防ワクチンの開発が期待されている。ウイルス粒子を用いてワクチンを作製するためには大量のウイルス粒子が必要であるが、現行のJFH-1株をHuH-7細胞で複製させることで得られるウイルス粒子産生系では十分で無い。そこでHuH-7細胞をクローニングすることで、HCV粒子を大量に産生できる細胞株を同定し、効率の良いHCV粒子産生システムの構築を試みた。また、ワクチン製造細胞として過去に実績のある細胞を用いたHCV粒子産生法についても検討した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は世界中に広がっており、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより、輸血後のC型慢性肝炎発症者は減少しているが、医療従事者などのハイリスク群では現在でも新規感染者が報告されている。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているが、その治療効果は十分ではない。HCV感染による肝疾患を減少させるためには新規感染者をなくすことが重要であり、感染予防ワクチンの開発が必要である。

2005年にJFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、感染性HCV粒子を培養細胞で作製できるようになった。この培養細胞中で作製されたHCV粒子は、患者血清中のウイルス粒子とほぼ同様の形態であることが電子顕微鏡で確認されており、不活化することによりHCVワクチンとして使用できると考えられる。しかし、このHCV粒子をワクチンとして使用するためには、大量のウイルス粒子が必要であり、現行のHuH-7細胞を用いた感染増殖系では限界がある。また、ワクチン用のウイルス粒子産生において、過去にワクチン製造細胞として実績のある細胞が利用できれば、ワクチンとしてより承認されやすくなると考えられる。

そこで本研究では、通常HuH-7細胞よりさらにHCVが効率的に増殖複製できる細胞を分離同定することでウイルス粒子の大量培養に適した細胞株を樹立し、さらにHuH-7細胞以外の細胞を用いたウイルス粒子産生系の構築の可能性についても検討した。

B. 研究方法

1. HCVが効率的に増殖複製できる細胞株の分離とその評価

HCVの増殖複製が可能なHuH-7細胞を限外希釈し、96 well plateに播種することによりクローン化細胞株を得た。得られた株にHCV JFH-1株の全長RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量を測定し、最もHCVの増殖効率のよい細胞株を同定した。

2. 分離された細胞株におけるHCVライフサイクルの評価

分離同定した細胞株を、通常HCVの増殖複製に用いられるHuh-7.5.1細胞と比較し検討した。まず、HCVのエンベロープ蛋白質を持ったシュードウイルス（HCVpp）を用いて、細胞のHCV感染感受性を比較した。またHCVの主要なレセプターであるCD81の細胞表面での発現もFACSで解析した。

細胞内でのHCV RNA複製効率については、JFH-1株

のレポーターサブジェノミックレプリコン (SGR-JFH-1/ Luc) をそれぞれの細胞に導入し、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することで比較した。

さらにJFH-1株の全長RNAをそれぞれの細胞に導入し、細胞中でのHCV RNA量に対する感染力価の比 (Specific Infectivity) を計算することにより感染性ウイルス粒子の形成効率を評価した。また、細胞内外の感染力価の比を計算することによりウイルス粒子の細胞外への分泌効率を評価した。

3. HCV感染が細胞周期に与える影響の解析

JFH-1全長RNAを導入3日後に細胞にEdu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を添加し培養した。その後細胞を固定し、HCV陽性細胞を抗NS5A抗体で染色した後、DNAを7-AADで染色し、FACSによりHCV感染・非感染細胞それぞれにおける細胞周期の分布を解析した。

4. HCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量測定パネルの作製および発現量の細胞間での比較

HCVライフサイクルの各ステップ、すなわち、侵入、複製、粒子形成、分泌に関わることが報告されている宿主因子について、それぞれに特異的な primer/probeセットを用い、宿主因子の発現量を比較できるパネルを作製した。細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写して得られたcDNAを用い、この primer/probeセットでTaqman Gene Expression Assayを行った。それぞれの宿主因子の発現量は内部標準 (18S rRNAまたはHPRT1) の何倍かで比較した。

5. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

HuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞に全長JFH-1 RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量を測定した。

また、それぞれの細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写して得たcDNAを各wellに入れ、Taqman Gene Expression Assayを行った。それぞれの宿主因子の発現量は内部標準 (18S rRNAまたはHPRT1) の何倍

かで比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換えDNAを用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1. HCVが効率良く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ウイルス産生量の多い細胞株HuH-7T1細胞を得た。この細胞ではトランスフェクション5日後の培養液中でHuh-7.5.1細胞の8.3倍、細胞内で4.4倍のコア抗原量を示し、Huh-7.5.1細胞と比べてHCVがより効率良く増殖複製できると考えられた。

2. 分離された細胞株におけるHCVライフサイクルの評価

HuH-7T1細胞のHCV感染に対する感受性をHCVppを用いて評価した。その結果、HCVppをHuH-7T1細胞に感染させた時のルシフェラーゼ活性はHuh-7.5.1細胞の約40%であったことからHuH-7T1細胞のHCVの感染感受性はHuh-7.5.1細胞より低いことが明らかとなった。そこで、それぞれの細胞の細胞表面でのCD81の発現をFACSで解析したところ、HuH-7T1細胞ではCD81を表面に発現している細胞の割合がHuh7.5.1細胞と比べてやや低く、これがHuH-7T1細胞の低い感染感受性に関与していると考えられた。

次に、細胞内でのHCV RNA複製効率を比較した。レポーターサブジェノミックレプリコンのRNA導入4h後の値で補正した24h後48h後のルシフェラーゼ活性はHuH-7T1細胞とHuh7.5.1細胞ではほとんど差がなく、HCV RNA複製効率は二つの細胞でほぼ同様であると考えられた。

さらにウイルス粒子の形成効率と分泌効率を比較した。HuH-7T1細胞ではHuh7.5.1細胞と比べてウイルス粒子形成効率が約47倍と非常に高く、分泌効率

はその逆に約0.24倍と低くなっていた。

3. HCV感染が細胞周期に与える影響の解析

JFH-1ウイルス感染5日後の感染フォーカスはHuH-7T1細胞ではHuh7.5.1細胞よりサイズが大きく、またFACSで調べた感染細胞数もHuH-7T1細胞の方が多かった。そこで、HCV感染による細胞周期への影響を解析した。Huh-7.5.1細胞ではHCV感染によりS期の細胞の割合が減少し、G1、G2/M期の細胞の割合が増加していたことから、HCV感染により、細胞周期が停止していることが示唆された。一方HuH-7T1細胞ではHCV感染により細胞周期の分布に大きな変化は見られなかった。

4. HCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量測定パネルの作製および細胞間での比較

HuH-7T1細胞およびHuh-7.5.1細胞中の宿主因子の発現量を発現量測定パネルを用いて測定し、比較した。HuH-7T1細胞ではCD81の発現量がわずかに低く、これはFACSで細胞表面のCD81の発現を解析した結果と一致していた。また、粒子形成に関わる宿主因子の発現は全体的にHuH-7T1細胞の方が高かったが、突出して発現の高いものは見られなかった。

5. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、HuGK-14細胞、MRC-5細胞を、さらにHEK293細胞を加えて検討を行った。まず、それぞれの細胞に全長JFH-1 RNAを導入し、HCVのゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、いずれの細胞でもHCVのゲノム複製、ウイルス産生は観察されなかった。

宿主因子の発現量測定パネルを用いてHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を測定した。その結果、HuGK-14細胞では複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoE、cPLA2の発現量がHuh-7.5.1と比べて低かった。MRC-5細胞ではEntryに関わるClaudin-1、複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。HEK293細胞では、Entryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低か

った。

D. 考察

HCVが効率的に増殖複製できる細胞株として分離されたHuH-7T1細胞は、HCVの感染効率やウイルス粒子の分泌効率はHuh-7.5.1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、結果として培養上清中に放出されるウイルス量が多くなると考えられた。また、HCV感染により、Huh-7.5.1細胞は細胞周期が停止するが、HuH-7T1細胞では細胞周期に影響が少ないため、感染細胞が増殖し続ける。その結果、HuH-7T1細胞では感染が多くの細胞に広がるのが可能であると考えられた。

HuH-7細胞以外の培養細胞を用いてワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、ワクチン製造の実績のあるHuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞ではJFH-1の増殖は認めなかった。それぞれの細胞においてHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現をHuh-7.5.1細胞と比較し、発現量の低い数種類の宿主因子を明らかにした。今後は、これらの宿主因子を強制発現させ、JFH-1 RNA導入後のゲノム複製、ウイルス産生について検討する予定である。

E. 結論

HCVの感染増殖が可能なHuH-7細胞をクローニングすることにより、HCVが効率的に増殖複製できる細胞株HuH-7T1細胞を分離同定した。この細胞株はワクチンの材料となるHCV粒子の大量培養法に有用であると考えられた。また、HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、ワクチン製造の実績のあるHuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞ではJFH-1の増殖は認めなかった。

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. 86(4):

2143-2152, 2012.

2) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem*, 286: 37264-37273, 2011.

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*, 54: 425-433, 2011.

4) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 404-409, 2011.

5) 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.

2. 学会発表

1) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

2) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production

system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

3) Moriyama M, Yokokawa H, Akazawa D, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.

4) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Kato T, Ishii T, Wakita T. Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.

5) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

6) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

7) Watanabe N, Murayama M, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T. Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

8) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.

9) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回日本肝臓学会総会、2011年6月、東京.

10) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5A阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

11) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫. Vitamin D とその代謝産物の抗HCV作用の検討. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

12) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆字. HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析. パネルディスカッション4: 肝疾患動物モデルとTranslational Research 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

13) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクロンの分離と同定. 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.

14) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. クロマトグラフィー法を用いたC型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月、横浜.

G. 知的所有権の出願・登録状況

脇田隆字、村山麻子、加藤孝宣. 培養細胞で感染性ウイルス粒子産生可能なC型肝炎ウイルスJ6CF株変異体

2011年5月出願済み

出願番号: 2011-122795

感染中和抗体と感染中和機構の解析

研究分担者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能である。そこでウイルスの感染中和抗体の誘導とその感染中和機構に関する解析を進める。ワクチン開発によりC型肝炎の予防が可能となるだけでなく、HCV の感染過程の解明による新たな治療標的が探索できることも期待できる。本分担研究ではHCV 感染中和機構の解明を目指し、中和抗体の *in vivo* での効果、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

A. 研究目的

JFH-1株を用いることによりHCVの細胞培養が可能となった。この実験系により感染中和抗体の存在が確認できるようになった。さらに、ウイルス粒子を大量精製して小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることが可能となった。これらの結果をふまえHCVに対する中和抗体の *in vivo* での効果、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など、ウイルスの初期感染過程に関連する機構の解析を進める。HCVに対するワクチン開発は新たなHCV感染を減少させ、HCV感染症の最終病態である肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。

B. 研究方法

1. 不活化粒子免疫により誘導された抗体による *in vivo* 感染防御実験

J6/JFH1 キメラウイルス感染 Huh7 細胞の培養上清から限外濾過および超遠心により精製した

ウイルス粒子を UV 照射により不活化し、Sigma Adjuvant system と混合して BALB/c マウスに免疫した。免疫マウスの血清から IgG を精製し、感染阻害活性をウイルス培養系により測定した。さらにこの IgG を感染性ウイルスと混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめ IgG を腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロール IgG と HCV 感染阻害活性を比較した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォー

ムドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 不活化粒子免疫により誘導された抗体による in vivo 感染防御実験

J6/JFH1 キメラウイルス粒子を精製し、UV 照射により不活化し、Sigma Adjuvant system と混合して BALB/c マウスに 4 回免疫した。免疫マウスの血清は JFH-1 および J6 (遺伝子型 2a), TH (遺伝子型 1b) の HCVpp に対して感染阻害活性を示した。コントロールとしてリコンビナント E1 および E2 蛋白質もマウスに免疫してその免疫原性を比較すると、ウイルス粒子の方がリコンビナント抗原よりも中和活性誘導能に優れていることが明らかとなった。さらに免疫マウス血清から IgG を精製し、感染阻害活性を J6/JFH1 ウイルス培養系により測定すると、容量依存性に感染を阻害した。そこでこの IgG を免疫に使用したものと同一キメラウイルスをチャレンジウイルスとして混合してヒト肝細胞キメラマウスに接種した。ウイルス接種マウスにはあらかじめ IgG を腹腔内にも投与した。非免疫マウスから精製したコントロール IgG と HCV 感染阻害活性を比較した。コントロール IgG 投与群では 6 匹中 4 匹のマウスで感染が成立したが、免疫マウスの IgG 投与群では 6 匹の全マウスで感染が認められず、in vivo の感染阻害活性が観察できた。しかし、チャレンジウイルスを遺伝子型 1 b を用いた場合、感染阻害は観察できなかった。

D. 考察

不活化した精製ウイルス粒子で免疫したマウ

スには感染阻害抗体が誘導された。精製ウイルス粒子はリコンビナント E1 および E2 蛋白質よりも感染中和抗体誘導能にすぐれていた。E1 および E2 蛋白質の立体構造はまだ解明されていないが、感染および感染中和に重要な構造が、感染性粒子上の表面蛋白質では良く保たれている可能性が考えられた。In vivo における感染阻害実験では免疫原と同じチャレンジウイルスの場合は感染阻害を認めたが、異なる遺伝子型のウイルスの場合は観察できなかった。免疫により誘導された中和活性が不十分か、あるいは in vivo においてはウイルス株または遺伝子型特異的な中和活性が感染阻害に重要なものかもしれない。しかし、少なくとも同一ウイルスでは精製 IgG による in vivo の感染阻害活性があることが明らかとなった。この結果は感染予防ワクチンおよび抗 HCV 免疫グロブリン開発の可能性を示している。

HCV は世界中で 1.7 億人にのぼる感染者が存在し、肝細胞癌に至る重大な感染症である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンも期待されている。HCV ワクチンが開発され、HCV の新たな予防法および治療法が開発されれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる。また、予防用及び治療用ワクチンを世界に先駆けて開発することができれば HCV キャリアー率の高い国々への国際協力が可能となる。

E. 結論

1. 精製不活化ウイルス粒子の免疫により感染中和抗体が誘導可能であり、その中和抗体は同一ウ

イルスの *in vivo* における感染阻害活性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.

2: 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.

3: Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.

4: Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.

5: Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.

6: Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the

endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.

7: Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 410(3):404-9.

8: Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2011 92(Pt 9):2082-7.

9: 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.

10: 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 54(2):425-33.

11: Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver

Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-40,140.e1-2.

12: Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 2011;6(6):e21284.

2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆宇, 「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(2011, 12.14)

2. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤」

3. 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆宇、HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5a阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」

4. 加藤孝宣、脇田隆宇、HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルとtranslational research」

5. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓

学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、

6. 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆宇、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)

7. 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆宇。国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)

8. 村山麻子、三代俊治、脇田隆宇、加藤孝宣。C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)

9. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8.6)

10. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10.7)

11. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16)

12. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia,

Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13)

13. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)

14. Takebe, Y., Uenishi, R., Tani. H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

15. 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)

16. K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

17. R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX 1 THAT

INTERACTS WITH HEPATITIS C VIRUS NS2 PROTEIN AND IS INVOLVED IN THE VIRAL ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

18. J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

19. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

20. M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

21. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

22. M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima,

- M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
23. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
24. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
25. N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
26. 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)
28. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
29. R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
30. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
31. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
32. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
33. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

34. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA

G.知的所有権の出願・登録状況

なし

HCV予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立

研究分担者 明里宏文 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター 教授
研究協力者 東濃篤徳 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
吉田友教 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
齋藤 暁 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
森山正樹, 横川 寛, 中村 紀子 東レ株式会社医薬研究所 創薬薬理研究室
榎 昇, 森 健一 先端生命科学研究所

研究要旨 C型肝炎ウイルスワクチンの実用化には、モデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。モデル動物を用いたワクチンの安全性・有効性の確認のため、霊長類モデルとしてマカク属サル（アカゲザル）に精製した不活化HCV粒子を接種した。その結果、HCVに対する抗体誘導能および接種個体における安全性を確認した。また誘導された抗体はHCVに対する感染阻害活性が得られた。さらにワクチン評価に必要な慢性C型肝炎のサロゲート病態解析に用いる霊長類モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルス感染モデルの確立を目指し、キメラウイルスの構築および新世界ザル（タマリン）への接種を行った。現在GBV-B/マーモセット感染実験に用いた個体の血清中抗体のGBV-B感染阻害活性測定のための初代肝細胞を用いた実験系構築を進めている

A. 研究目的

C型肝炎の原因ウイルスであるHepatitis C virus (HCV) は非A, 非B型肝炎ウイルスとしてヒト骨髄から20年以上前に単離された (Choo et al., Science, 1989, 24, 359-362)。現在HCVは世界的に蔓延しており、1億7千万（世界人口の3%近く）がキャリアと見られている。日本での持続感染者は190万人～230万人存在すると推定されているが、自覚症状がないことが多く、肝硬変や肝癌へ移行する感染者が多く存在することが問題となっているため、抗ウイルス剤や治療用ワクチン開発が急務である。

近年、脇田らのJFH-1株の発見によりHCVの培養が可能となった (Wakita et al., Nature Medicine, 2005, 11, 791-796)。大量精製したHCV粒子を不活化することでHCVの予防・治療ワクチンとしての実用化を目指しているが、そのためにはモデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。我々はモデル動物を用いたワクチンの安全性・有効性の確認として、霊長類モデルとしてマカク属サル（アカゲザル）に精製した不活化HCV粒子を接種し

評価を行なった。

一方でワクチン有効性評価における病態解析にはHCV感染動物モデルが必要である。しかしHCVはチンパンジー以外の動物では疾患モデルが存在しないという宿主域の狭さの問題がある。さらにチンパンジーの感染実験使用は絶滅危惧種である上に、倫理的観点から我が国を始め諸外国でも認められていない。これらのことがワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの安全性・有効性評価、さらにC型肝炎の病態解析を行なうにあたって大きな障壁となっている。

この問題を克服する方法の1つとしてGBV-B/新世界ザル-サロゲート感染モデルの使用が挙げられる。GBV-Bはタマリンから単離され、HCVと同じくヘパチウイルスとして分類されており、新世界ザルに感染性を示し、急性および慢性C型肝炎様病態を引き起こす。我々が行なってきたマーモセットへのGBV-B接種実験では4年以上の長期に渡り、ウイルス血症およびALT値の上昇、肝線維化を伴う慢性C型様肝炎を呈することを世界で初めて見出した。(Iwasaki et al., Front Microbiol., 2011, 2, 240)。

本研究ではHCVワクチン評価に必要な慢性C型肝炎のサロゲート病態解析に用いる霊長類モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルス感染マーマセットモデルの確立を目指し、キメラウイルスの構築および複製能の評価を行った。また、上記モデルにおける評価パラメーターの一つとして重要になると考えられるマーマセット初代肝細胞でのウイルス増殖系の確立を進めた。

B. 研究方法

マカク属サル（アカゲザル3頭, Mm1938およびMm1836, Mm1854）へのHCV不活化粒子ワクチン接種実験は京都大学霊長類研究所にて実施した。HCV不活化粒子ワクチンは国立感染症研究所ウイルス二部で精製された（詳細は中村紀子氏の報告書を参照）。ワクチン接種に用いる個体はHCV E1, E2リコンビナントタンパク質を抗原とした抗HCV抗体検出ELISA系によって抗HCV抗体陰性であることが確認された後に選抜した。Mm1938へのワクチン接種（J6/JFH1, 100 pmol/head）はアジュバントにAlum（250 ug/head）を用い、初回接種日から起算して4週目、12週目に追加接種を行い（合計3回の接種、合計300 pmol/head）、14週目に実験殺を行った（現在のところMm1938のみ、他2頭は近日実施）。各ワクチン接種の2日後の血算・生化学検査によっても安全性評価を行なった。さらに実験殺によって得られた組織病理解析によってワクチン安全性評価、および血液からの抗体精製とその感染阻害活性の測定によってワクチン有効性評価を行った。なお Mm1836, Mm1854へのワクチン接種はアジュバントとしてAlum（250 ug/head）+CPG（250 ug/head）およびMPL+TDL（500 ul/head）を用い、アジュバントの比較検討を行っている。

キメラウイルスクローン作成においては、先行して構築を行っていたc156-E12wild/GBV-B（HCV TPF1/wildクローンをベースとしてCoreの一部およびE1, E2をGBV-Bの相当する遺伝子領域に組換えたもの）をマーマセット初代肝細胞に遺伝子導入し、その複製能を評価した。さらにc156-E12wild/GBV-Bをタマリン肝臓内に接種し、生体内における複製

能を評価した（本実験は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感染症実験施設にて実施した）。接種個体からは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算・生化学検査、血漿中ウイルスRNA量の測定を行った。またこれと平行して、GBV-BをベースとしてCore領域をHCV型に組換えた5U156cGB をマーマセット初代肝細胞に感染させ、その複製能を評価した。

GBV-B/タマリン再感染実験においては、初回GBV-B接種から起算して190週目に2回目のGBV-B接種を行った。さらに218週目（2回目の免疫から起算すると27週目）に3回目のGBV-B接種を行った。接種個体からはケタミン麻酔下で定期的に採血し、血算・生化学検査、血漿中ウイルス量および抗GBV-B抗体価の測定を行った。

なおすべての動物実験は、倫理面を含めて京都大学霊長類研究所サル委員会および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) HCVワクチンの評価研究

霊長類（アカゲザル）を用いた不活化HCV粒子ワクチンの接種による血算・生化学検査および組織切片観察（Mm1938）からの安全性の確認を行った結果、肝炎マーカー（アラニントランスアミナーゼ、ALT）をはじめとして異常を示す項目は認められなかった。アジュバントの比較検討としてアカゲザル3頭（Mm1938, Mm1836, Mm1854）のワクチン接種による血清中抗体誘導を確認したところ、初回免疫から4週目の血漿で、抗E1, E2 IgG抗体の誘導が確認された。Alum使用個体（Mm1938）と比較した場合、Alum+CpG使用個体（Mm1836）で同じ傾向が見られ、J6E2抗体はより強く誘導された。MPL+TDMアジュバント使用個体（Mm1854）ではJ6E1とTHE2が低くなった。また誘導された抗体はワクチン接種前の血中抗体に比べて約66%のHCVに対する感染阻害活性が見られた。

次に、新世界ザルを用いたワクチン評価実験における宿主側免疫応答についての参照データとして、合計3回のウイルス接種からなるGBV-B/タマリ

ン再感染実験を実施した。初回のGBV-B感染では、接種後8週目まで血中ウイルスRNA量はピーク値が (1×10^9 GE/ml程度を示した。抗GBV-B抗体である抗Core, NS3抗体はそれぞれ接種後5週目, 9週目あたりから上昇が見られ, 9週目, 18週目にはピークに達した。同時に血中ウイルスRNA量は減少傾向を示し, 24週目には検出限界以下となった。その約3年後、GBV-B再感染を行なったところ、接種後4週目まで血中ウイルスRNA量は初感染時と同程度のピーク値 ($\sim 1 \times 10^9$ GE/ml) を示した。他方、抗Core, NS3抗体価は再接種2週で強い上昇を示した。これと同時に血中ウイルスRNA量は減少傾向を示し6週目以降には検出限界以下となった。さらにウイルスRNAが検出限界以下となってから20週後に再びGBV-Bを接種したところ、接種後1週目で血中ウイルスRNA量は 1×10^6 GE/ml程度を示したものの、その後全く検出されなかった。以上のことから、6ヶ月程度の再感染ではsterilizing immunityを誘導すること、また3年後といった長期間を経た再感染でもprotective immunityを誘導しうることが示された。

(2) HCVワクチンの評価系確立のための基礎的研究

HCVをベースとしてCoreの一部の領域、およびE1, E2領域をGBV-Bの相当する遺伝子領域に置換したHCV-G(c156-E12/wild)をマーマセツト初代肝細胞に遺伝子導入した結果、良好な複製増殖が示された。そこで生体内での感染増殖能を確認するために、タマリン肝臓内に同クローン由来RNAを接種した結果、低レベルながら検出可能な程度のウイルス血漿が検出された。そこで、このキメラウイルスクローン構築のストラテジーをベースに、より複製増殖能が高い改変クローンの構築を検討している。他方、GBV-BをベースとしてCoreもしくはE1, E2領域をHCVの相当する遺伝子領域に置換したG-HCV (5U156cGB, GBc156E2) を構築した。現在その複製増殖能について検討中である。

マーマセツト初代肝細胞を用いたGBV-Bおよび上述のキメラウイルス感染実験系の構築を目的として、新世界ザル初代肝細胞の保存培養系を確立し

た。また多数の初代肝細胞保存バイアルを作成した。これを用いて、GBV-Bウイルスストックとして保存されていたサル血漿を用いて感染させたところ、培養上清中に 10^4 - 10^6 copies/ml程度のウイルスRNAが1週間ほど検出され、GBV-Bの増殖が確認された。この上清中ウイルス量は実験ごとに大きく異なり、ウイルス増殖に最適な初代肝細胞の培養条件を今後明らかにすることが重要であると考えられた。

D. 考察

霊長類 (アカゲザル) を用いた不活化HCV粒子ワクチンは血算・生化学検査および組織切片観察から異常所見が見られなかったことから、その安全性が確認されたと考えられる。またワクチン接種による血中抗体誘導を確認したところ、初回免疫から4週目の血漿で抗E1, E2 IgG抗体の誘導が確認されたが、抗体誘導能をさらに増加させる必要があると思われたため、HCV抗原の質・量の検討とアジュバントの最適化が次年度の課題である。また今後、細胞性免疫誘導評価のための測定系 (ELISPOTなど) 構築が必要と考えられる。

これまでHCV感染チンパンジーモデルにおいて、初回接種から3ヶ月程度の免疫記憶が報告されている (Beams et al., J. Virol., 2000, 74, 11764-11772) が、長期記憶に関してはどの程度へパチウイルス制御に有効な免疫記憶が維持されるのか、詳細は不明であった。そこで今回、新世界ザルを用いたワクチン評価実験における宿主側免疫応答についての参照データとして、合計3回のウイルス接種からなるGBV-B/タマリン再感染実験を実施した。その結果、初感染から3年後も一定の感染制御免疫が誘導されることが確認された。この際、抗体価上昇と血中ウイルス量低下が相関していることから、この制御には中和抗体誘導が主要な役割を担っていることが示唆される。一方、3回目 (再感染から約半年) のウイルス感染では、低レベルの血中ウイルス量及び短期のバイレミア期間となり、いわゆるsterilizing immunityが誘導されたと考えられる。この本態については現在検討

中であるが、中和抗体のみならず強いCTLが誘導されたことが推察される。このことは、有効な感染予防治療ワクチン開発においては両者の免疫誘導能を考慮する事が望ましいことを表わしているかもしれない。

HCVをベースとしてCoreの一部の領域、およびE1, E2をGBV-B型に組換えたc156-E12/wildを構築し、マーマセツト初代肝細胞に感染させた結果、効率は低レベルであるものの感染増殖することが示された。また、このキメラウイルスをタマリン肝臓内に接種したところ、一過性ではあるが高値のウイルスRNAが血中に産生されることを確認したが、その感染性は低いと考えられたため、今後さらにクローンの改良が求められる。これらHCVをベースとしてCoreの一部の領域、およびE1, E2をGBV-B型に組換えたキメラウイルスが高い感染能を獲得すれば、抗HCV core, NS蛋白特異的細胞性免疫誘導型治療ワクチンの評価モデルとして用いることが可能となる。他方、GBV-BをベースとしてCore領域もしくはE1, E2領域をHCVの相当する遺伝子領域に置換したG-HCV (5U156cGB, GBc156E2) を構築した。このキメラウイルスは抗HCV中和抗体誘導型ワクチンの評価モデルとして用いることが可能となることから、特に本研究での不活化HCVワクチン有効性評価に特に重要となる。従って、次年度は特に本キメラウイルスクローン研究に力点を置いて進めていきたい。

E. 結論

本研究はC型肝炎ウイルス (HCV) ワクチンの実用化を目的として遂行された。霊長類モデルを用いたHCVワクチン安全性・有効性の評価はHCVワクチン実用化にとって重要な知見となる。さらに、構築中のHCV/GBV-Bキメラウイルス・新世界ザルを用いたC型肝炎サロゲート感染モデルはHCVに対する予防・治療ワクチンの効果、C型肝炎病態解析を行う上で有用な実験系になると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology*, in press.
- (2) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 64, 131-41, 2012.
- (3) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. *Archives of Virology*, 157, 363-8, 2012.
- (4) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13, 58-64, 2011.
- (5) Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63, 417-28, 2011.
- (6) Ito M, Katakai Y, Ono F, Akari H, Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I: Serotype-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses in cynomolgus monkeys after infection with multiple dengue virus serotypes. *Archives of Virology* 156, 1073-77, 2011.

(7) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A: ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. Immunogenetics 63, 501-9, 2011.

(8) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate Model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. Journal of General Virology 92, 2272-80, 2011.

(9) Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers in Microbiology 2, 240, 2011.

2.学会発表

(1) Hirofumi Akari, Yuki Iwasaki, Ken-ichi Mori, Koji Ishii, Noboru Maki, Sayuki Iijima, Tomoyuki Yoshida, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Young-Jung Lee, Akatsuki Saito: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 September, 2011, Sapporo.

(2) 明里宏文 : 霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究. 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会 (東京) 平成23年10月7日

(3) 明里宏文 : エイズウイルスの宿主適合戦略. 京都大学ウイルス研究所・ウイルス研究の潮流シリーズセミナー (京都) 平成23年6月22日

G.知的所有権の出願・取得状況

特になし

HCV 構造蛋白の組換えバキュロウイルスによる発現

研究分担者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 加藤 孝宣
国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 李 天成

研究要旨 JFH-1 株によりC型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、多量のウイルスを精製するのは技術的な困難が伴う。そこで、多量の抗原を調製することを目的として、HCV の構造蛋白領域をバキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現させ、virus-like particles (VLP)が形成されるかどうかを調べる。VLPが形成できるようなら精製法の検討と免疫誘導能を調べ、ワクチンとしての可能性を追究する。

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中で1.7億人（HIV感染者の4倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者のHCV感染やHIV感染者のHCV重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCVのワクチン開発が望まれている。

多量の抗原を調製することを目的として、HCVの構造蛋白領域をバキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現させ、virus-like particles (VLP)が形成されるかどうかを調べた。

B. 研究方法

HCVのJFH-1 (genotype 2a)、J6 (genotype 2a)、TH (genotype 1b)のそれぞれについて、構造蛋白領域のcore-E2、core-p7を発現するバキュロウイルストランスファクターを構築し、常法に

従って組換えバキュロウイルスを作成した。昆虫細胞Sf9およびTn5にこれらの組換えバキュロウイルスを感染させ、目的蛋白の発現をウェスタンブロットで確認し、VLP形成の有無をショ糖密度勾配遠心法で調べた。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

使用した3種類のクローンいずれも、それぞれの構造領域を組み込んだ組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞(Tn5)で目的蛋白(core、

E2) が発現していることを確認した。これらの目的蛋白は昆虫細胞内に留まり、細胞外に分泌はされなかった。TH (genotype 1b)についてはシヨ糖密度勾配遠心法でシヨ糖濃度が約 30%の分画に core、E2 蛋白がともに検出されることから、VLP 様の構造を取っている可能性が高いことが示唆された。一方、genotype 2a の 2 種のクローンはいずれもシヨ糖密度勾配で core、E2 は bottom に沈降することから、目的蛋白がうまく可溶化できていないと考えられる。

D. 考察

Genotype 1b のクローンについては、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて VLP を作成できる可能性が示唆された。2a については今のところまだ VLP の形成は確認できていないが、昆虫細胞を Sf9 に代える、可溶化条件について他の detergent を検討するなどして VLP の取得を試みる予定である。1b の VLP については、電顕を用いた確認や、精製条件の検討を行い、抗原性の有無や中和抗体誘導能についてさらに検討して行く。

E. 結論

今年度の研究により、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて genotype 1b の HCV の VLP を取得できる可能性が示された。不活化 HCV 粒子と比べ簡便かつ多量に粒子が精製できれば、ワクチンとして応用可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T.,

Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, in press.

2. Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J., Saito A., Funai H., Kimura N., Ageyama N., Yoshizaki S., Suzuki T., Yasutomi Y., Miyamura T., Kannagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers in Microbiology*, in press
3. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, in press
4. Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. *Vaccine*, 29: 4821-4828 (2011)
5. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of*