

- Infectious Diseases, 64: 260-261 (2011)
6. Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
 7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
 8. 石井孝司 B型肝炎の現状とワクチン 愛知県小児科医会会報 94: 38-46 (2011)
 9. 石井孝司、清原知子 A型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825 (2011)
 10. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明 2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討—1999年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502 (2011)
 11. 石井孝司 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565 (2011)
 12. 石井孝司、李 天成 E型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
2. 学会発表
1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 2. Noda M., Tada Y., Uema M., Nakashima K., Shimada T., Nakamura N., Kiyohara T. and Ishii K. Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan.
 3. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J. and Saito A. Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.,
 4. Uema M., Aoki N., Aoki S., Furuya Y., Nishio O., Shibata S., Kodaira A., Ishii K. and Noda M. Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 5. Someya Y., Shirato H., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Wakita T., Ishii K., Narimatsu H. and Kubota T. Structural basis for recognition of Lewis A antigen by norovirus. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 6. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
 7. Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver.

- Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
8. Nakamura N., Shimada T., Tada N., Okabe N., Kiyohara T., Ishii K. and Noda M. Diffuse outbreak of hepatitis A suspected by national case based surveillance in Japan, 2010, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2011), Vienna, Austria, February 17-20, 2011
 9. 道免和文、田中博文、春野政虎、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明：2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999年ボルネオ（カリマンタン）島由来株との近縁性、第39回日本肝臓学会西部会、平成23年12月、岡山
 10. 上間 匡、石井孝司、小原真弓、田中俊光、増本久人、入谷展弘、斎藤哲也、吉田徹也、山下育孝、柴田伸一郎、田中智之、内野清子、野田 衛：A型肝炎ウイルス検出PCRの高感度化の検証、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
 11. 野田 衛、多田有希、田中智之、石井孝司：2010年のA型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
 12. 山下育孝、青木紀子、青木里美、土井光徳、古屋由美子、西尾 治、石井孝司、野田 衛：A型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
 13. 西村浩一、原田誠也、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛：熊本県におけるイノシシ、ブタ及びシカのE型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査、第32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
 14. 石井孝司、清原知子、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛、脇田隆字：2010年春季のA型肝炎のdiffuse outbreakの分子疫学的解析、第47回日本肝臓学会総会、平成23年6月、東京
- G. 知的所有権の取得状況
- なし

霊長類モデルを用いたHCVワクチンの免疫原性・安全性評価に関する研究

研究分担者 中村 紀子 東レ株式会社医薬研究所

研究要旨 我々は不活化した培養細胞由来HCV粒子を免疫抗原とするHCVワクチンの開発を目指している。本検討ではアカゲザルにおける不活化HCV粒子の免疫原性と安全性を評価するとともに、免疫誘導能の強いアジュバントを検討した。Alumアジュバントとともに精製HCV粒子を免疫した結果、HCVエンベロップタンパク質に対するIgG抗体の誘導を確認した。このIgG抗体は免疫抗原と異なる遺伝子型に対するエンベロップタンパク質も認識した。さらに、精製したIgGがHCVppに対する感染阻害活性を有することも明らかとなった。一方、AlumとCpGを併用して用いた場合には、Alum単独や市販のSigma Adjuvant System (MPL+TDM) よりも強く抗体が誘導されることが明らかとなった。また、すべての免疫において、安全面で懸念される事象は認められなかった。以上の結果から、アカゲザルにおいて精製HCV粒子は免疫原性と安全性を有しており、Alum+CpGとともに使用することで、免疫誘導能の強い安全なHCVワクチンとして使用できることが示唆された。

A. 研究目的

HCVのワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌される。さらにJFH-1の非構造遺伝子と他のHCV株の構造遺伝子からなるキメラウイルスも作製できることが分かった。我々は、これまでに本ウイルス産生系で、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証してきた。

そこで本研究では、これまでの成果を踏まえ、ワクチンの実用化を目的として、霊長類モデルとしてのアカゲザルにおけるHCVワクチンの免疫原性と安全性を評価するとともに、ヒトに投与できる可能性のあるアジュバントの免疫誘導能を検討した。

B. 研究方法

1. 感染性 HCV の大量培養

5×10^5 個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV (J6/JFH1 : J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a) 濃縮液を multiplicity of infection (MOI) が 0.2 となるように 500 μ L の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、37°C でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm² フラスコ (Corning 社) に継代培養し、さらにセルスタック (5 段、Corning 社) に継代培養した。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM (DMEM-2) に培養液交換した。その 3 日後に培養上清を回収し、650 mL の DMEM-2 培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、DMEM-2 添加を行い、さらに 2 日後、培養液を回収する操作を行い、計 650 mL \times 3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μ m フィルター濾過を行い、使用するまで 80°C で保存した。

2. HCV 粒子大量精製

HCV 培養上清の限外ろ過膜による精製 :
上記に示したように調製した感染性 HCV を含む約

20 L の培養上清をホローファイバーUFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 倍濃縮した。その後、等量の PBS を添加してダイアフィルトレーションを 5 回行った。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液 (500mL) とした。

シヨ糖密度勾配遠心：

10-60% (w/v) シヨ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (BECKMAN 社) に 60%、50%、40%、30%、20% および 10%シヨ糖/TNE の順に 2 mL ずつ重層した後、上記のように調製した溶出プール画分を 23 mL をさらに重層した。重量を測定しバランスを合わせた後、Optima L-70K (BECKMAN 社) で SW28 ローターにて 28,000 rpm、4°C、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ社) を用いて下部を穿刺し、1.5 mL チューブに約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。予め重量を測定しておいた 1.5 mL チューブに 100 μ L の各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。

各分画液から QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により HCV-RNA を定量した。また、HCV コア定量キット (オーソ社) により HCV-core タンパク質を定量した。感染力価は、DMEM-10 で希釈した各分画液について測定した。

各々の調製された HCV 粒子は HCV-core タンパク質、HCV-RNA、感染力価および総タンパク質濃度を測定し、使用まで -80°C で保存した。

3. 精製 HCV 粒子のアカゲザルへの免疫

HCV 抗原：

J6/JFH1 培養上清から限外ろ過膜およびシヨ糖密度勾配遠心により精製した HCV を使用した。1 回の投与量は、1 匹あたり 100pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV とした。

アジュバント：

アジュバントには、Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社)、CpG (Mod87; 東レ)、および MPL+TDM (Sigma Adjuvant System #S6322; Sigma 社) を用い、3 匹のアカゲザルに、それぞれ Alum、Alum+CpG および MPL+TDM を使用した。

アカゲザルへの投与スケジュール：

アカゲザルへの投与は京都大学霊長類研究所にて行った。投与する精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。投与 8 週間前に採血をした後、1 匹あたり 100pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV を用い、0、4 および 12 週に種々のアジュバントと抗原を混合し筋肉内接種した。それぞれの投与日、投与後 2 日後および 8、14 週に採血した。採血後、Ficoll 2mL 上に血液 1mL を充填し、400 \times g、20°C、30 分間で遠心分離を行い、血漿成分を回収した。また、血清分離剤入りの遠心管で血液を 1200 \times g、室温、10 分間遠心分離を行い、血清成分を回収した。血漿および血清は使用時まで -80°C で保存した。

4. アカゲザルの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査：

BUN、TP、ALB、GOT、GPT、LDH、ALP、WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、PLT および CRP の 16 項目について検査した。

病理学的組織解析：

心臓、腎臓、肝臓、脾臓、腋化リンパ節、リンパ節、腸間膜リンパ節のホルマリン固定検体について HE 染色を行った。

5. アカゲザル血漿中の抗 E1 および抗 E2 IgG 抗体価の測定

E1、E2 タンパク質をコードする遺伝子から、これらのタンパク質の C 末端に存在する膜貫通ドメインをコードする核酸配列を除去し、翻訳されたタンパク質を細胞外へ分泌するために必要なシグナルペプチドをコードする配列を付加した。さらに、これらのタンパク質の精製を容易にするために、N 末端に FLAG ペプチドを付加させたベクター

を作製した。エンベロープタンパク質は、遺伝子型 2a の J6CF、遺伝子型 1b の TH を使用した。これらのタンパク質を EIA 用のプレートに固相化し、アカゲザルの血漿中の抗 E1 および抗 E2 抗体を EIA 法にて検出した。

6. HCV シュード粒子 (HCVpp) の作製

HCV のエンベロープタンパク質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。2.5×10⁶ 個の 293T 細胞を 10 cm コラーゲンコートディッシュ (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6 (Roche 社) を用いて 3 μg の MMLV Gag-Pol 発現ベクター (Gag-Pol)、3 μg の LTR カセット挿入 luciferase 発現ベクター (Luc126) および 1 μg の HCV E1E2 発現ベクター (pcDNAdeltaC-E1-E2) をトランスフェクションし、6 時間後に培養液を交換した。48 時間培養後の培養上清を回収し、0.45 μm フィルターで濾過して使用まで -80°C で保存した。陰性対照として、HCV E1E2 発現ベクターをトランスフェクションしない培養上清 (no env.) を作製し同様に保存した。

7. マウス血清の感染阻害活性の測定

感染阻害実験は HCVpp を用いて行った。2×10⁴ 個の Huh7.5.1 細胞を 48-well プレート (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、接種材料を感染させた。前項で得られたマウス血清は 56°C、30 分間インキュベーションすることで非働化した。HCVpp または感染性 HCV 粒子と終濃度 1% (v/v) マウス血清を混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、細胞に接種して 37°C で 3 時間培養した。その後、感染材料を除き、PBS で洗浄、0.5 mL の培地を添加して 72 時間培養した。細胞のライセートは、PBS でウェルを洗浄後、40 μL/well の 1×Cell Culture Lysis Reagent (Promega 社) を添加して調製した。HCVpp の感染は上記ライセートの 20 μL を Luciferase Assay System (Promega 社) 50 μL と反応させ、攪拌後直ちに Lumat LB9507 (Berthold) を用いて 10 秒間の発光値を測定することで評価した。

(倫理面の配慮)

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。また、本研究は、京都大学霊長類研究所との共同研究であり、アカゲザルを用いた実験は、京都大学の動物実験委員会で承認された実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実験を実施した (承認番号 2011-100、研究課題名「HCV 不活化ワクチン接種実験」)。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. アカゲザルの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査について検査した結果、3 匹のアカゲザルについて、肝臓の毒性マーカーおよび炎症マーカーに著変は見られなかった。

病理学的組織解析の結果、心臓については、血管周囲のリンパ球浸潤 (Perivascular cuffing) 及び、心筋内にリンパ球中心の炎症性細胞浸潤が認められた。肝臓については、巣状の壊死 (focal necrosis) と中心静脈周囲の肝細胞細胞質に好酸性の小体 (acidophilic body) を認められた。一方、腎、脾臓、各リンパ節には著変を認められなかった。以上から、原因は不明であるが、心筋の炎症細胞浸潤及び、肝臓の循環不全の病態が背景に有ったものと考えられた。

2. アカゲザル血漿中の抗 E1 および抗 E2 IgG 抗体価

不活化 J6/JFH1 を抗原として、種々のアジュバントおよびそれらを組合せたものを用いて、免疫スケジュールに従って筋肉内に投与し、採血した。血漿を 300 倍希釈し、E1 および E2 タンパク質に対する抗体価を EIA にて測定した。その結果、J6 株 E1 タンパク質、J6 株 E2 タンパク質および TH 株 E2

タンパク質に対する抗体の産生誘導が確認された。アジュバントとして、MPL+TDMを用いたアカゲザルにおいては、J6株E2タンパク質に対するIgG抗体価は、他の2匹のアカゲザルと同じように誘導されていたが、J6株のE1タンパク質およびTH株のE2タンパク質に対するIgG抗体価が低いことが明らかとなった。

3. 精製IgGのHCV感染阻害活性の測定 (HCVpp)

アジュバントとしてAlumを用いたアカゲザルの3回免疫後(14週)の血漿から精製したIgGを用いて、遺伝子型2aのE1およびE2タンパク質を有するJ6-HCVppに対する感染阻害活性を測定した。その結果、免疫前のIgGでは感染を抑制することはできなかったが、免疫14週目のIgGでは、IgG量依存的に感染が阻害され、1mg/mLの時、感染を66%抑制した。また、HCV受容体である抗CD81抗体を10 μ g/mLで使用した時、感染を約80%抑制した。

D. 考察

我々は、細胞培養系で産生された感染性HCV粒子をUVで不活化した不活化HCV粒子をワクチンとして開発しようと試みている。本検討では、この不活化HCV粒子の免疫原性および安全性を評価することを目的として、霊長類モデルとしてのアカゲザルを用いて検討を行った。ヒトへの臨床応用可能なアジュバント候補として水酸化アルミニウム(Alum)、また、現在まだ認可されていないが臨床開発が進んでいるCpGをAlumと併用して

(Alum+CpG)を用いた。さらに、マウスで効果の高かったSigma Adjuvant System (MPL+TDM)も試験のコントロールとして使用した。

実際の検討においては、不活化HCV粒子とそれぞれのアジュバントを混合したものをHCVワクチンとして、アカゲザルに3回免疫し、免疫期間の血漿中の抗体価の推移を測定した。なお、免疫の間隔としては、初回免疫と2回目免疫の間隔を4週間、2回目免疫と最終免疫の間隔を8週間空けて行った。

経時的に抗体価を測定した結果、免疫を行って

いないプレの血漿と比較すると、いずれの免疫個体でも明らかなIgG抗体価の上昇が認められた。評価アジュバントについては、AlumとCpGを併用した個体(Alum+CpG)において、Alum単独またはMPL+TDM使用個体よりもE1タンパク質とE2タンパク質の両方に対するIgG抗体がより強く誘導されていた。

これまでに、AlumはIgG1を誘導し、CpGはIgG2aやIgG2bの抗体を誘導することが報告されており、さらにAlumとCpGを併用した場合にはIgG1とIgG2aの両方を誘導できることがすでに知られている。HCVワクチンにおいても、マウスを用いた検討により、こうした効果をすでに確認している。アカゲザルについても確認を行う必要があると考えられるため、現在アイソタイプの解析を進めている。

一般にIgG1抗体はTh2タイプの免疫反応を示し、IgG2aやIgG3(およびIgG2b)はTh1タイプの免疫応答を反映すると考えられている。Th2タイプの免疫応答はいわゆる体液性免疫反応を示し、Th2細胞とB細胞を中心とした防御機構を意味する。一方、Th1タイプの免疫応答は細胞性免疫反応を示し、Th1細胞とCD8T細胞を中心とした防御機構のことを指している。生体における免疫反応としてはTh1とTh2のバランスが重要であり、HCVワクチンの作用としても考慮すべき重要な観点と考えられる。さらに、Th2のみに特化した反応においてはIgEを誘導するケースがあり、その場合にはアレルギー応答を引き起こすという点で望ましくない。したがって、バランスのとれた免疫応答を誘導するHCVワクチンを作製することは重要な課題である。AlumとCpGの組み合わせは、誘導抗体の量だけではなく、こうした誘導抗体の質という点でもアジュバントとして用いるときに有力な候補と成り得る。

次に、最終免疫の2週間後のAlum単独使用個体の血漿から精製したIgGを用いて、J6HCVpp(遺伝子型2a)に対する感染阻害活性を評価した。その結果、濃度増加に伴った感染阻害活性が認められた。HCVワクチンが感染阻害活性を有する抗体を

誘導可能であることは、マウスを用いた検討においても確認している。種が異なった場合でも同様に感染阻害活性を有する抗体誘導が認められたことは重要であり、さらにヒトと同じ霊長類で示されたことは大変意義深い。今後は残りの2頭の精製 IgG を用いた解析を行うとともに、HCVcc を用いた検討も進めていきたい。

今回、評価したアジュバントの中で、Alum と CpG は併用による強い免疫誘導効果が認められた。マウスを用いた検討においても、Alum と CpG は併用して使用する方が、それぞれを単独で使用するよりも感染阻害活性の誘導能が強いことが明らかとなっている。Alum+CpG を併用して使用したアカゲザル個体についても同じ効果が認められるのか検討を行っていきたい。

Alum と CpG はそれぞれ NALP3 および TLR9 という分子を介して細胞を活性化することが知られているが、両方の分子を同時に活性化することで、より強く効果が現れるという可能性が考えられる。さらには、不活化 HCV ワクチンは TLR7 を活性化するウイルス由来の RNA も含まれている。TLR7 および TLR9 の両方を有するような細胞としては、特に I 型インターフェロンの主要産生細胞であるプラズマサイト様樹状細胞が挙げられるが、このような細胞を効率的に活性化するのかもしれない。また、IgG 抗体の誘導効果は遺伝子型が異なった場合にも認められたことから、汎用性 HCV ワクチンとして使用できる可能性が示唆された。この点についてもマウスの検討結果と一致している。

最後に、3種類のアジュバントを使用して免疫したアカゲザルのいずれの個体について、これまでに安全性を危惧する事象は認められなかった。HCV ワクチンをヒトに応用することを考えると、安全性の確保ということは重要な要素であるため、実験に使用した個体が属するアカゲザル集団のバックグラウンドの調査も含めて、注意深く検討を進めていきたい。

今後は、Alum+CpG および MPL+TDM 使用個体の精製 IgG についても感染阻害活性を検討するとともに、IgG 抗体のサブタイプの解析も行う予定である。

さらには、細胞性免疫に対する効果も検証することで、今回検討を行った体液性免疫に対する作用と合わせて、アカゲザルにおける HCV ワクチンの有効性を判断する。また、アジュバントの違いによる安全性と免疫誘導効果も検証し、HCV ワクチンに最適なアジュバントを見極める予定である。

E. 結論

① 3頭のアカゲザルについて、HCV 粒子と Alum アジュバント、Alum+CpG アジュバントまたは MPL+TDM アジュバントを組み合わせて、HCV ワクチンとして免疫した。その結果、E1 および E2 タンパク質に対する抗体の誘導を確認した。また、アジュバントと抗原の組み合わせによって、抗体誘導結果が異なることが示唆された。

② HCV で免疫したアカゲザルより精製した IgG は濃度依存的に HCVpp の感染を阻害した。

③ これまでの免疫時の臨床所見および血液検査の結果は正常であった。また、病理学的組織解析において炎症像が認められたが、大きな問題としないことを確認した。

以上の結果、精製 HCV 粒子はアカゲザルにおいて感染阻害活性を有する IgG 抗体の誘導が可能であり、かつ安全な HCV ワクチンとして使用できることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

1) 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.

- 2) 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.
- 3) Moriyama M, Yokokawa H, Nakamura N, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 4) 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.

H.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

TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発と機能評価に関する研究

研究分担者 松本美佐子 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 HCVのワクチン開発において効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。Toll-like receptor 3 (TLR3)は抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞のエンドソームに発現し、二重鎖RNAを認識してアダプター分子TICAM-1（別名TRIF）を介してタイプI IFN産生、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を惹起する。合成dsRNAのpoly(I:C)は強力なアジュバント作用をもっているが、TLR3以外に細胞質RNAセンサーのMDA5やDDX familyを活性化し副作用も強い。本研究では、樹状細胞のTLR3-TICAM-1経路のみを細胞外から活性化し、過度の炎症性サイトカイン産生を誘導せず細胞性免疫を起動できる新規合成RNAアジュバントの開発に成功した。

A. 研究目的

HCVのワクチン開発において効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。Toll-like receptor (TLR) 3のリガンドである合成dsRNAのpoly(I:C)は、CTL, NK細胞活性化などの樹状細胞応答を強力に惹起し有力な次世代アジュバントとして有望視されているが、副作用の強さから臨床応用には至っていない。Poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外にも細胞質内のMDA5経路も活性化し、炎症性サイトカインやタイプI IFN産生を誘導することから、両経路の活性化が強い副作用をもたらすと考えられる。本研究では、過度の炎症性サイトカインやType I IFN産生を誘導せず、TLR3依存的にCTL, NK細胞活性化を誘導する新規アジュバントの開発を目的とした。

B. 研究方法

TLR3のリガンド認識機構を考慮し、28種類のRNA誘導体を合成した。*In vitro assay*として、1. HEK293細胞を用いてのTLR3を介したIFN- β promoterの活性化、2. 細胞質内MDA5経路の活性化、3. マウス骨髄系樹状細胞によるサイトカイン産生について検討した。また、*in vivo assay*として、1. マウス腹腔内投与後の炎症性サイトカイン産生の経時的測定、2. B16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるNK細胞依存的抗腫瘍

効果の査定、3. EG7細胞を用いたマウス移植がんモデルにおけるCTL依存的抗腫瘍効果の査定を行った。マウスはB57BL/6 (wild-type, TLR3 KO, TICAM-1 KO)を使用した。

(倫理面の配慮)

動物実験は北海道大学動物実験に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

28種類のRNA誘導体のうち11種類の誘導体について*in vivo*におけるアジュバント効果を調べた結果、2種類のRNA誘導体がB16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)とほぼ同等のNK細胞依存的ながん退縮効果を示した。1種類(RNA X)についてノックアウトマウスを用いて解析した結果、TLR3, TICAM-1依存的にがんの退縮効果を示すことが明らかとなった。さらに、OVA発現EL4細胞(EG7細胞)を用いたマウス移植がんモデルにおいて、RNA XをOVAとともに腫瘍近傍の皮下に投与することでCTL依存的ながん退縮効果を示すことが判明した。治療後のマウス脾臓細胞を用いて、OVA特異的CD8陽性T細胞の増殖、EG7に対する細胞傷害活性、IFN- γ 産生を測定したところ、RNA X+ OVA治療群はPBS投与群、あるいはRNA X単独投与群に比べ高いCTL

誘導活性を示した。これらの効果は、poly(I:C)をOVAとともに投与した場合と同等であった。野生型マウスの腹腔内投与後のIL-6, TNF- α 産生量はpoly(I:C)投与の50%、IL-10は10%程度であり、TLR3 KOマウスでは全く検出されなかった。また野生型マウスにおいて、poly(I:C)投与で産生されるIFN- β はRNA X投与では検出限界以下であった。In vitroのマウス脾臓CD11c陽性樹状細胞刺激においても、IL-6, TNF- α , IL-10産生はpoly(I:C)刺激より少量であり、細胞内RIG-I, MDA5経路を活性化しなかった。ヒト細胞を用いた評価では、HEK293細胞でのTLR3を介したIFN- β promoter 活性化能はpoly(I:C)と同等であったが、RIG-I, MDA5の活性化は誘導しなかった。

D. 考察

細胞外からTLR3のみを活性化できるRNA誘導体はこれまで報告がなく、今回の化合物がはじめてである。さらに、生体内で樹状細胞活性化によるNK細胞活性化とCTL誘導がTLR3-TICAM-1経路のみの活性化でおきうることが今回明らかになった。TLR3は抗原をクロスプライミングする能力の高い骨髄系樹状細胞（マウスではCD8 α 陽性樹状細胞、ヒトではCD141陽性樹状細胞）に高発現しており、TICAM-1を介したシグナルによりクロスプライミング関連遺伝子の発現が誘導されると考えられる。RNA XによるタイプI IFNやサイトカイン産生誘導は低く血清中でIFN- α/β は検出されないが、局所で産生されているかどうか調べる必要がある。今後、新規RNA誘導体の抗がん免疫シグナルの同定を行い、次世代アジュバントとして確立する予定である。

E. 結論

以下の特徴を有する新規アジュバントを得た。

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

4. B16メラノーマ細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、poly(I:C)と同等のNK依存性抗がん活性を示す。
5. EG7細胞を用いたマウス移植がんモデルにおいて、抗原特異的CTLを誘導し抗がん活性を示す。
6. マウス生体内投与での炎症性サイトカイン産生量はpoly(I:C)投与より少ない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shime, H., M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, T. Seya. 2012. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. PNAS 109(6): 2066-2071.
- 2) Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. The Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. J. Virol. 86(1): 185-194.
- 3) Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. J. Biochem. (Review)151(1): 5-11.
- 4) Itoh, H., M. Tatematsu, A. Watanabe, K. Iwano. K. Funami, T. Seya and M. Matsumoto. 2011. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. PLoS ONE 6(12): e28500.
- 5) Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, Fabrega S, Cardon A, Maluenda J, Tatematsu M, Mahvelati F, Herman M, Ciancanelli M, Guo Y, Alsum Z, Alkhamis N, Al-Makadma AS, Ghadiri A, Boucherit S, Plancoulaine S, Picard C, Rozenberg F, Tardieu M, Lebon P, Jouanguy E, Rezaei N, Seya T, Matsumoto M, Chaussabel D, Puel A, Zhang SY, Abel L, Al-Muhsen

- S, Casanova JL. 2011. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J. Clin. Invest.* 121(12): 4889-4902.
- 6) Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, Y. Ishikawa, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, T. Seya, M. Matsumoto, and O. Hazeki. 2011. Phosphoinositide 3-kinase controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE* 6 (10): e26836.
- 7) Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* 187(10): 5320-5327.
- 8) Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. DDX60, a DHXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol. Cell Biol.* 31(18):3802-3819.
- 9) Aly, H. H., H. Oshiumi, H. Shime, M. Matsumoto, T. Wakita, K. Shimotohno, and T. Seya. 2011. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *Plos ONE* 6 (6): e21284
- 10) Wakasa K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55(5): 373-377.
- 11) Yamazaki S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, H. Yagita, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS ONE* 6 (4): e18833.
- 12) Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, N. Inoue, T. Akazawa, Y. Fujimoto, K. Fukase, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13(4): 350-358.
2. 学会発表
- 1) AZUMA Masahiro, EBIHARA Takashi, MATSUMOTO Misako, SEYA Tsukasa. PolyI:C-induced cross-priming and antitumor CTL depends on the TICAM-1 pathway in mouse Ag-presenting cells. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011年11月, 千葉.
- 2) Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Tumoricidal activity of tumor-associated macrophages induced by RNA adjuvant therapy. (同上)
- 3) Megumi Tatematsu, Hiroki Itoh, Ayako Watanabe, Katsunori Iwano, Kenji Funami, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. (同上)
- 4) Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto. Virus-derived single-stranded RNA with stable secondary structure extracellularly activates Toll-like receptor 3. IUMS 2011 Congress. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 5) Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya. Riplet ubiquitin ligase is essential for RIG-I dependent type I interferon production during viral infection. (同上)
- 6) Moeko Miyashita, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto and Tsukasa Seya. DDX60, a novel DEXD/H box helicase, participates in evoking antiviral immunity and enhancing the cytoplasmic IFN-β-inducing pathway. (同上)
- 7) Masaaki Okamoto, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, Satoshi Koike, and Tsukasa Seya. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. (同上)
- H. 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murayama A, <u>Kato T</u> , Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, <u>Wakita T</u> .	Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1.	J Virol	86(4)	2143-2152	2012
Weng L, Kohara M, <u>Wakita T</u> , Shimotohno K, Toyoda T.	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase.	Gene.	496(2)	79-87.	2012
Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, <u>Akari H</u> , Nakayama EE	Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)	Journal of General Virology	93	594-602	2012
Saito Y, Naruse TK, <u>Akari</u> <u>H</u> , Matano T, Kimura A	Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques	Immunogenetics	64	131-41	2012
Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, <u>Akari H</u>	CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins	Archives of Virology	157	363-8	2012
Shime, H., <u>M. Matsumoto</u> , H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, T. Seya.	Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors.	PNAS	109 (6)	2066-207 1	2012

Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, <u>M. Matsumoto</u> , T. Seya, and S. Koike.	The Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice.	J. Virol.	86 (1)	185-194	2012
Oshiumi, H., <u>M. Matsumoto</u> , and T. Seya.	Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I.	J. Biochem.	151(1)	5-11	2012
Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, <u>Kato T</u> , Matsuura Y, Watanabe H, <u>Wakita T</u> , 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
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, <u>Wakita T</u> , <u>Kato T</u> .	In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology	54	425-433	2011
Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, <u>Wakita T</u> , <u>Kato T</u> .	Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2.	Biochem Biophys Res Commun	410	404-409	2011
Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, <u>Wakita T</u> , Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M.	Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novelphenanthridinone derivatives.	Biochem Biophys Res Commun.	415(4)	714-9.	2011

Sugiyama M, Tanaka Y, <u>Wakita T</u> , Nakanishi M, Mizokami M.	Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression.	PLoS One.	6(10)	e26620.	2011
Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, <u>Wakita T</u> , Meurs EF.	Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response.	PLoS Pathog.	7(10)	e1002289.	2011
Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus.	J Gen Virol.	92(Pt 9)	2082-7.	2011
Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, <u>Nakamura N</u> , Mochizuki H, Date T, <u>Ishii K</u> , Suzuki T, <u>Wakita T</u> .	Production and characterization of HCV particles from serum-free culture.	Vaccine.	29(29-30)	4821-8.	2011
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, <u>Wakita T</u> , Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group.	Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C.	Gastroenterol.	141(1)	128-40,14 0.e1-2.	2011
Aly HH, Oshiumi H, Shime H, <u>Matsumoto M</u> , <u>Wakita T</u> , Shimotohno K, Seya T.	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV).	PLoS One.	6(6)	e21284.	2011

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, <u>Akari H</u>	Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications	Microbes and Infection	13	58-64	2011
Ohtani H, Nakajima T, <u>Akari H</u> , Ishida T, Kimura A	Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates	Immunogenetics	63	417-28	2011
Ito M, Katakai Y, Ono F, <u>Akari H</u> , 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
Naruse TK, Okuda Y, Mori K, <u>Akari H</u> , Matano T, Kimura A:	ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey	Immunogenetics	63	501-9	2011
Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, <u>Akari H</u> , Kurane I	Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>) 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
Iwasaki Y, Mori K, <u>Ishii K</u> , 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, <u>Akari H</u>	Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets	Frontiers in Microbiology	2	1-8	2011

Itoh, H., M. Tatematsu, A. Watanabe, K. Iwano. K. Funami, T. Seya and <u>M. Matsumoto</u> .	UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling.	PLoS ONE	6(12)	e28500	2011
Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, Fabrega S, Cardon A, Maluenda J, Tatematsu M, Mahvelati F, Herman M, Ciancanelli M, Guo Y, Alsum Z, Alkhamis N, Al-Makadma AS, Ghadiri A, Boucherit S, Plancoulaine S, Picard C, Rozenberg F, Tardieu M, Lebon P, Jouanguy E, Rezaei N, Seya T, <u>Matsumoto M</u> , Chaussabel D, Puel A, Zhang SY, Abel L, Al-Muhsen S, Casanova JL.	Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency.	J. Clin. Invest.	121(12)	4889-4902	2011
Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, Y. Ishikawa, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, T. Seya, <u>M. Matsumoto</u> , and O. Hazeki.	Phosphoinositide 3-kinase controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages.	PLoS ONE	6(10)	e26836	2011
Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, <u>M. Matsumoto</u> , S. Koike, and T. Seya.	The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection.	J. Immunol.	187(10)	5320-5327	2011

Miyashita, M., H. Oshiumi, <u>M. Matsumoto</u> , and T. Seya.	DDX60, a DHXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling	Mol Cell Biol.	31(18)	3802-3819	2011
Wakasa K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, <u>M.</u> <u>Matsumoto</u> , M. Imamura, and T. Seya.	Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells.	Microbiol. Immunol.	55(5)	373-377	2011
Yamazaki S., K. Okada, A. Maruyama, <u>M.</u> <u>Matsumoto</u> , H. Yagita, and T. Seya.	TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo.	PLoS ONE	6(4)	e18833	2011
Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, N. Inoue, T. Akazawa, Y. Fujimoto, K. Fukase, <u>M. Matsumoto</u> , and T. Seya.	Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2.	Microbes Infect.	13(4)	350-358	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1

Asako Murayama,^a Takanobu Kato,^a Daisuke Akazawa,^a Nao Sugiyama,^a Tomoko Date,^a Takahiro Masaki,^a Shingo Nakamoto,^b Yasuhito Tanaka,^c Masashi Mizokami,^d Osamu Yokosuka,^b Akio Nomoto,^{e*} and Takaji Wakita^a

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan^a; Department of Medicine and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chuo, Chiba, Japan^b; Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi, Mizuho, Nagoya, Japan^c; The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Chiba, Japan^d; and Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan^e

To establish a cell culture system for chimeric hepatitis C virus (HCV) genotype 2b, we prepared a chimeric construct harboring the 5' untranslated region (UTR) to the E2 region of the MA strain (genotype 2b) and the region of p7 to the 3' UTR of the JFH-1 strain (genotype 2a). This chimeric RNA (MA/JFH-1.1) replicated and produced infectious virus in Huh7.5.1 cells. Replacement of the 5' UTR of this chimera with that from JFH-1 (MA/JFH-1.2) enhanced virus production, but infectivity remained low. In a long-term follow-up study, we identified a cell culture-adaptive mutation in the core region (R167G) and found that it enhanced virus assembly. We previously reported that the NS3 helicase (N3H) and the region of NS5B to 3' X (N5BX) of JFH-1 enabled replication of the J6CF strain (genotype 2a), which could not replicate in cells. To reduce JFH-1 content in MA/JFH-1.2, we produced a chimeric viral genome for MA harboring the N3H and N5BX regions of JFH-1, combined with a JFH-1 5' UTR replacement and the R167G mutation (MA/N3H+N5BX-JFH1/R167G). This chimeric RNA replicated efficiently, but virus production was low. After the introduction of four additional cell culture-adaptive mutations, MA/N3H+N5BX-JFH1/5am produced infectious virus efficiently. Using this chimeric virus harboring minimal regions of JFH-1, we analyzed interferon sensitivity and found that this chimeric virus was more sensitive to interferon than JFH-1 and another chimeric virus containing more regions from JFH-1 (MA/JFH-1.2/R167G). In conclusion, we established an HCV genotype 2b cell culture system using a chimeric genome harboring minimal regions of JFH-1. This cell culture system may be useful for characterizing genotype 2b viruses and developing antiviral strategies.

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease (5, 13), but the lack of a robust cell culture system to produce virus particles has hampered the progress of HCV research (2). Although the development of a subgenomic replicon system has enabled research into HCV RNA replication (15), infectious virus particle production has not been possible. Recently, an HCV cell culture system was developed using a genotype 2a strain, JFH-1, cloned from a fulminant hepatitis patient (14, 29, 32), thereby allowing investigation of the entire life cycle of this virus. However, several groups of investigators have reported genotype- and/or strain-dependent effects of some antiviral reagents (6, 17) and neutralizing antibodies (7, 25). Therefore, efficient virus production systems using various genotypes and strains are indispensable for HCV research and the development of antiviral strategies.

The JFH-1 strain is the first HCV strain that can efficiently produce HCV particles in HuH-7 cells (29). Other strains can replicate and produce infectious virus by HCV RNA transfection, but the efficiency is far lower than that of JFH-1 (24, 31). In the case of replication-incompetent strains, chimeric virus containing the JFH-1 nonstructural protein coding region is useful for analyses of viral characteristics (6, 9, 14, 23, 30, 31).

In this study, we developed a genotype 2b chimeric infectious virus production system using the MA strain (accession number AB030907) (19) harboring minimal regions of JFH-1 and cell culture-adaptive mutations that enhance infectious virus production.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Huh7.5.1 cells (a kind gift from Francis V. Chisari) (32) and Huh7-25 cells (1) were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's

medium containing 10% fetal bovine serum under 5% CO₂ conditions. For follow-up study, RNA-transfected cells were passaged every 2 to 5 days depending on cell status.

Full-length genomic HCV constructs. Plasmids used in the analysis of genomic RNA replication were constructed based on pJFH1 (29) and pMA (19). For convenience, an EcoRI recognition site was introduced upstream of the T7 promoter region of pMA by PCR, and an XbaI recognition site was introduced at the end of the 3' untranslated region (UTR). To construct MA/JFH-1, the EcoRI-BsaBI (nucleotides [nt] 1 to 2570; 5' UTR to E2) fragment of pMA was substituted into pJFH1 (Fig. 1A). Replacement of the 5' UTR was performed by exchanging the EcoRI-AgeI (nt 1 to 159) fragment. A point mutation in the core region (R167G) was introduced into MA chimeric constructs by PCR using the following primers: sense, 5'-TTA TGC AAC GGG GAA TTT ACC CGG TTG CTC T-3'; antisense, 5'-GGT AAA TTC CCC GTT GCA TAA TTT ATC CCG TC-3'. G167R substitution in the JFH-1 construct was performed by PCR using the following primers: sense, 5'-ATT ATG CAA CAA GGA ACC TAC CCG GTT TCC C-3'; antisense, 5'-GGT AGG TTC CTT GTT GCA TAA TTA ACC CCG TC-3'. Point mutations (L814S, R1012G, T1106A, and V1951A) were introduced into MA chimeric constructs by PCR using the following primers: L814S, 5'-GCT TAC GCC TCG GAC GCC GCT GAA CAA GGG G-3' (sense) and 5'-AGC GGC GTC CGA GGC GTA AGC CTG CTG CCG C-3' (antisense); R1012G, 5'-GAG GCT AGG TGG

Received 13 June 2011 Accepted 23 November 2011

Published ahead of print 7 December 2011

Address correspondence to Takaji Wakita, wakita@nih.go.jp.

* Present address: Institute of Microbial Chemistry, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.05386-11