

201125027A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する  
治療的ワクチンの開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 24(2012)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの  
開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 24(2012)年 3 月

## ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

### 研究組織

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

## 目次

### I. 総括研究報告

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

小原 道法 .....1

### II. 分担研究報告

1. 組換えワクチニアワクチンの作成及び治療効果の解析

小原 道法 .....7

2. HCV 感染が誘導する免疫エフェクターと病態解析

瀬谷 司 .....13

3. HCV 感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

保富 康宏 .....16

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

鈴木 亮介 .....27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....37

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

総括研究報告書

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

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

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

研究分担者：

瀬谷司：北海道大学・大学院医学研究科  
教授

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

鈴木亮介：国立感染症研究所・ウイルス第  
二部 主任研究官

A. 研究目的

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

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

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

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

## B. 研究方法

### 研究代表者（小原道法）

HCVN25-RVV を慢性肝炎状態のHCV/Cre-Tgに接種し、HCV排除及びその作用機序を解析した。治療効果を評価するために、HCV-RVVsの接種後1週および4週のマウスにおいて解析した。さらに、炎症性サイトカインの定量、肝臓、脾臓リンパ球での抗原特異的CTLsの検出などの解析を行った。慢性肝炎の病態形成にTNF- $\alpha$ 、IL-6の関与が示唆されたため、肝炎発症マウスに両者の中和抗体を投与し肝臓組織像を比較検討した。

### 研究分担者（瀬谷司）

研究(1) HCV/Cre-Tg のマウス C 型肝炎誘導系を使って自然免疫系の肝炎・肝がん発症の鍵因子を同定する。(2) 自然免疫の各種 KO マウスから HCV 感染マウス肝細胞株を確立し、in vitro の HCV 感染と自然免疫応答の関連を解析する。(3) マウス感染系を使って、HCV が如何にして持続感染を成立せしめ肝硬変、肝がんの転機をとるか、それに関与する宿主因子の同定を試みる。

### 研究分担者（保富康宏）

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

(1) HCV遺伝子発現DNA (HCV-DNA) ワクチンの作製

(2) ウェスタンブロット法によるHCV蛋白質発現の確認

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

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

(5) C型肝炎モデルマウスを用いたHCV特異的細胞性免疫誘導能並びに治療効果についての評価

### 研究分担者（鈴木亮介）

遺伝子型1bおよび2a由来の遺伝子配列を用い、HCVのcoreからNS2領域を発現するプラスミドを作製した。一方で、JFH-1株のレプリコンcDNAをpolI promoter/terminator間に挿入したレプリコンプラスミドを作製

した。これらの2種類のプラスミドを Huh7.5.1細胞へトランスフェクションして HCVtcpを作製した。HCVの感染感受性が高いHuh7細胞およびHuh7.5.1細胞について、各エンドサイトーシス経路に重要な宿主因子をsiRNAによりロックダウンし、HCVtcp感染に関わるエンドサイトーシス経路の解析を行った。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 研究代表者 (小原道法)

(1) 慢性肝炎状態の HCV-Tg マウスに組換えワクチン r VV-N25 を単回皮内接種し、接種後1週の Tg マウス肝臓では各接種群でHCV蛋白の減少が認められなかったが、4週ではN25接種群が減少していた。またN25接種群では接種後1週で肝臓の索状構造や肝細胞の steatosis など、HCV 特有の形態学的な異常の正常化が認められた。

(2) 4週目では形態異常の正常化に加え、肝臓内のHCV蛋白の減少がみられた。抗CD8抗体および抗CD4抗体の投与によりこのHCV蛋白の排除は見られなくなった。また、HCV蛋白の減少時にALT値の上昇やCTLなどによるHCV発現細胞の排除が認められなかったことから、r VV-N25接種によるHCV蛋

白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。

(3) N25接種群では、他群と比較し血清 IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6などの炎症性サイトカインが抑制されていた。N25接種群においてTgマウスのCD4またはCD8を欠損させるとHCV蛋白減少効果はみられなかったが、HCV特有の形態学的な異常の改善が認められた。TNF- $\alpha$ とIL-6の中和抗体をTgマウスに投与したところ慢性肝炎像は正常状態に改善していた。

### 研究分担者 (瀬谷司)

(1) NS3/4A protease の標的分子は IPS-1 (MAVS) とされて来たが、新たに Riplet (RIG-I 活性化に必須のユビキチンリガーゼ) も標的となると判明した。HCV 感染は宿主 Riplet, MAVS 両方の機能不全をきたすために type I IFN を誘導できなくなることが肝細胞レベルで判明した。

(2) IFNAR KO のみでなく、IPS-1 KO マウス肝細胞株で J6JFH1 の感染がより高効率で成立することが判明した (Ally PLoS ONE 2011)。

### 研究分担者 (保富康宏)

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

(2) HCV 蛋白の発現確認

ウェスタンブロット法によりコア蛋白質の発現が見られることを確認した。

(3) HCV-DNA ワクチンを投与した C57BL/6



マウスより脾臓を採取し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により測定したところ EL-4/E2、/NS2、HCV-N25 投与群では、顕著に IFN- $\gamma$  を産生することを確認した。<sup>51</sup>Cr 遊離法による CTL 誘導の検討では HCV 蛋白特異的な細胞傷害活性が HCV-DNA ワクチンにより誘導されていることを確認した。

(4) HCV 蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスを用いた *in vivo* における HCV 特異的細胞性免疫誘導能の評価したところ、マウス体内において HCV 抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。

(5) C型肝炎モデルマウスを用いた HCV 特異的細胞性免疫誘導能並びに治療効果についての評価したところ、肝臓中の HCV コア蛋白発現量が有意に減少していることを確認した。同時に、血清中 ALT 濃度を測定したが平常時に比べて有意な上昇は認められなかった。肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV 蛋白を3ヶ月間持続的に発現させたマウスの肝臓では、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常が多数観察されるが、HCV-N25 投与群においてそれらの異常が改善されることを確認した。

#### 研究分担者（鈴木亮介）

(1) 複数の遺伝子型/株の遺伝子配列を用い、HCV の core から NS2 領域を発現するプラスミドを作製し、非増殖型 HCV 粒子 (HCVtcp) を得た。遺伝子型 2a の構造蛋白質を用いた場合、JFH-1 株および J6 株のいずれを用いても、HCVtcp の産生が認められた。1b の構造蛋白質を用いた場合、

Con1 株および TH 株においては E1 領域に適合変異を導入する事により、HCVtcp の産生が認められた。

(2) クラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスに関与する3つの分子（クラスリン、カベオリン、ダイナミン）のノックダウンを行った。Huh7 細胞ではクラスリンおよびダイナミンのノックダウンにより HCVtcp 感染の抑制が認められた。しかしながら Huh7.5.1 では感染の抑制は認められなかった。そこで次にマクロピノサイトーシスに関与する2つの宿主因子（PAK1 および CTBP1）をノックダウンすると、Huh7 細胞において HCVtcp 感染の抑制が認められたものの、Huh7.5.1 では感染の抑制は認められなかった。遺伝子型 1b と 2a についての違いは認められなかった。

#### D. 考察

2年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

##### （小原道法）

抗CD8抗体および抗CD4抗体を予め投与した状態のマウスにrVV-N25を接種すると、どちらもHCV蛋白の減少はみられなくなった。このことから、rVV-N25のHCV蛋白の排除にはCD4およびCD8+T細胞が重要であることが示唆された。しかし、肝臓の形態異常は抗CD8抗体および抗CD4抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成とHCV蛋白排除は別の機序であり、肝炎の病態進展にはTNF- $\alpha$ やIL-6などのサイトカインが重要であり、HCV-rVV-N25接種に

よりTNF- $\alpha$ やIL-6などのサイトカインレベルが低下することにより正常化していることが示唆された。肝臓内HCV蛋白の制御に関して、CTLなどによるHCV発現細胞の排除を検討するために、肝臓のHCV遺伝子のスイッチング効率およびHCVのmRNA量をTaqMan法により検索した。その結果、DNAレベルおよびRNAレベルともにコントロールと差がなかった。このことから、rVV-N25接種によるHCV蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。以上のことからHCV-rVVはHCVの排除及び肝炎抑制を目指した安全で効果的な治療ワクチンの開発が期待される。

#### (瀬谷司)

NS3/4A 感受性の宿主因子としてRiplet (RIG-I 活性化に必須のユビキチンリガーゼ) が同定できた。この生理的意義は未報告であり、我々に高いpriority のある研究になることが見込まれる。HCV/Cre-Tgマウスの感染系でin vivo のHCV感染と肝硬変・がん化の増悪が見られるかを追跡調査する予定である。HCVの慢性炎症と肝実質細胞の激しい再構成の分子基盤は未解明である。免疫系の過剰応答が分子基盤にあることは患者血液を使った臨床研究の成果、抗体、CTL、NK 活性化について報告がある。HCV/Cre-Tgマウスを使ったHCV感染解析ができれば樹状細胞・自然免疫の活性化を含めてHCV病態解明に進展が期待できる。Riplet を含む自然免疫のKOマウスの成果から宿主の抗HCVの鍵因子の同定をこれらの系で検証して行く。現状ではHCV患者からウイルス株を分離培養する系も確立されておらず、JFH1 (2a)

株で多くのin vitro 実験が行われている現状である。HCVの株間でIFN感受性は大きく異なり、臨床的に治療法を含めた問題として残っている。本IPS-1 KOマウス肝細胞株を使って肝炎患者からウイルス分離ができればIFNのバイアスの無いウイルス株を抽出しうる。

本研究のHCV/Cre-Tgと自然免疫改変モデルマウスが以上の解析に有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

#### (保富康宏)

HCV 各種遺伝子を用いたDNA ワクチンを製作し、検討した。このDNA ワクチンとC型肝炎モデルマウスを用いてHCV 抗原と免疫反応ではHCV-DNA ワクチン投与後の脾細胞のIFN- $\gamma$  産生能は減弱あるいは消失しており、HCV 蛋白が発現することで免疫抑制の状態になり、強い細胞性免疫が誘導できていないことが考えられた。しかし、HCV の非構造蛋白領域を発現するDNA ワクチン (HCV-N25) は、マウス肝臓中のHCV コア蛋白発現量を有意に減少させ、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常を改善させており、DNA ワクチンにより細胞性免疫は誘導されているが検出不能の状態になっているのか、それとも細胞性傷害性T細胞以外の免疫細胞が肝炎症状の改善に関わっているのか等を今後検討し、これらの機構が解明されれば治療用ワクチンの開発に繋がることが考えられる。

#### (鈴木亮介)

HCVはHuh7細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシス経路によって細胞に侵入している可能性が示唆された。しかしながら

Huh7.5.1細胞においては、クラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスではなく、またマクロピノサイトーシス経路でもない、他の経路によって細胞侵入している可能性が示唆された。さらにワクチン接種したHCV/Cre-Tgから得られた血清中の中和抗体価について、各種遺伝子型のトランスパッケージングHCVを用いて測定する。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

各分担研究報告書を参照

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

1) 出願日：平成23年8月31日、出願番号：特願2011-189251

発明の名称：新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有するDIs株由来組換えワクシニアウイルス  
発明者：財団法人東京都医学総合研究所；小原道法、安井文彦、国立大学法人北海道大学；喜田宏、迫田義博、国立感染症研究所；石井孝司

出願人：財団法人東京都医学総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立感染症研究所、一般財団法人化学及血清療法研究所

##### 2) 特許番号：1930416

発明の名称：新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法

発明者：脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎  
出願人：国立感染症研究所、財) 東京都医学研究機構、東レ株式会社

登録国：E P

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

組換えワクチニアウイルスの作成及び治療効果の解析

東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト

プロジェクトリーダー 小原 道法

**研究要旨：** C型肝炎ウイルスに対する抗HCV薬とされているインターフェロンは、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルスLC16m8株を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス（HCV-rVV）株を複数樹立し、治療ワクチンとしての効果を検討した。Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスの肝臓におけるHCV蛋白は完全に排除されることなく、1年以上の持続的な発現が確認され、肝臓における炎症や脂肪変性、線維化等の慢性肝炎の病態を示した。この慢性肝炎モデルマウスに対してHCV-rVV-N25接種後1週で肝臓の索状構造や肝細胞の状態など、形態学的な異常の正常化が認められた。肝炎の病態進展にはTNF- $\alpha$ やIL-6などのサイトカインが重要であり、HCV-rVV-N25接種によりTNF- $\alpha$ やIL-6などのサイトカインレベルが低下することにより正常化していることが示唆された。さらに、HCV-rVV-N25接種群でALT値が上昇すること無しに肝臓中HCV蛋白質量が減少しており、rVV-N25接種によるHCV蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。以上のことからHCV-rVVはHCVの排除及び肝炎抑制を目指した治療ワクチンとしての開発が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎は日本で200万人に及ぶ患者がおり、唯一の有効な抗HCV薬とされているインターフェロンは、30-40%程度の患者にしか治療効果が認められず、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は強力に宿主の免疫応答を惹起し、HCVを排除する目的で、哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルス「LC16m8株」を母体とした

HCV遺伝子組換えワクチニアウイルス（HCV-rVV）株を作製した。

B. 研究方法

HCV Tg マウスに Poly I.C. を3回投与することによりHCV蛋白を肝細胞に発現させ経時的に、1)肝臓におけるHCV蛋白の発現量, Oil-red-O, PAS染色 2) Serum ALT, HCV core 定量をおこなった。次にワクチニアウイルス株を用いて、HCV-rVV を作製しHCVの構造蛋白質を主に発現する CN2

(rVV-CN2)、非構造蛋白質を発現する N25(rVV-N25)、全蛋白質を発現する CN5(rVV-CN5)を蛋白発現後 90 日の Tg マウスに投与した。これら HCV-RVVs の治療効果を評価するために、接種後 1 週および 4 週のマウスにおいてさらに、抗 CD4, CD8 抗体投与下で上記 1)2)に加え、炎症性サイトカインの定量、肝臓、脾臓リンパ球での抗原特異的 CTLs の検出などの解析を行った。慢性肝炎の病態形成に TNF- $\alpha$ , IL-6 の関与が示唆されたため、Tg マウスに両者の中和抗体を投与し肝臓組織像を比較検討した。

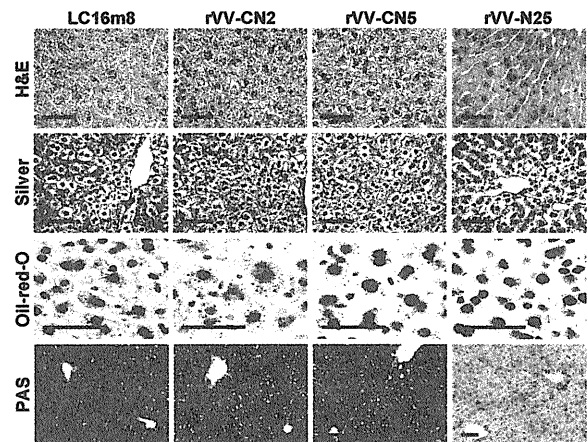
#### (倫理面への配慮)

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

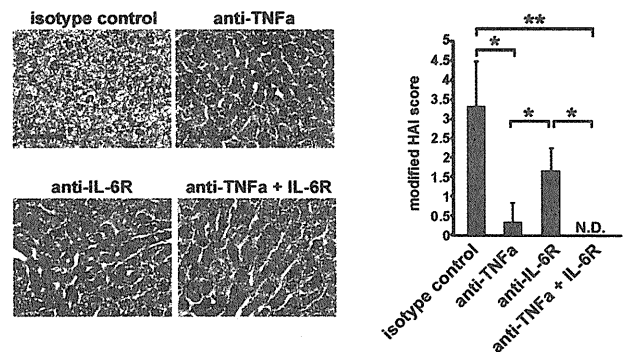
### C. 研究結果

肝細胞にHCV蛋白が発現後、約 2 年にわたり血清HCV coreの上昇が持続し、同時に ALTの上昇を認めた。約90日後ではリンパ球の浸潤像、steatosisなどの慢性肝炎の所見を肝組織でみとめ、600日後では雄に有意に肝細胞癌が発症していた。

HCV-rVV-N25 接種後 1 週の Tg マウス肝臓では各接種群でHCV蛋白の減少が認められなかったが、4 週では N25 接種群が減少していた。また N25 接種群では接種後 1 週で肝臓の索状構造や肝細胞の steatosis など、HCV 特有の形態学的な異常の正常化が認められた。



さらに N25 接種群では、他群と比較し血清 IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 などの炎症性サイトカインが抑制されていた。N25 接種群において Tg マウスの CD4 または CD8 を欠損させると HCV 蛋白減少効果はみられなかったが、HCV 特有の形態学的な異常の改善が認められた。TNF- $\alpha$  と IL-6 の中和抗体を Tg マウスに投与したところ慢性肝炎像は正常状態に改善していた。



### D. 考察

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

ら、病態形成と HCV 蛋白排除は別の機序であり、肝炎の病態進展には TNF- $\alpha$  や IL-6 などのサイトカインが重要であり、HCV-rVV-N25 接種により TNF- $\alpha$  や IL-6 などのサイトカインレベルが低下することにより正常化していることが示唆された。

## E. 結論

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).

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

3. Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of

interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

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

5. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).

6. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-521 (2011)

7. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).

8. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).

9. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012).

10. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus

induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Spl. J. Med. Virol. (2012) in press.

11. Leiyun Weng, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. Gene (2012) in press.

12. Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. Sci. Comm (2012) in press.

## .2. 学会発表

1) Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglutinin protein of H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011. 5. 23-28 Kowloon (Hong Kong)

2) 大槻貴博、関口 敏、飛田良美、木村公則、小原道法：新規C型慢性肝炎モデルマウスを用いたC型慢性肝炎の病態解析 第58回日本実験動物学会総会 2011. 5. 25-27 東京

3) 木村公則、小原道法：HCV感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与 第47回日本肝臓学会総会 2011. 6. 2-3 東京

4) 井上和明、塗谷秀子、小原道法：PCRとin situ hybridizationを組み合わせたHCVとHBVのウイルスゲノム存在様式可視化の試み 第47回日本肝臓学会総会 2011. 6. 2-3 東京

5) 小原道法：C型肝炎ウイルス研究の最前線 ウイルス学イブニングセミナー 2011. 6. 21 京都

6) 小原道法：HCV持続発現マウスを用いたHCV治療ワクチンの開発 第10回CBSM2011

2011. 6. 24-26 軽井沢

7) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. 2011 ASBMB Special Symposia Series 2011. 7. 24-26 Guangzhou China

8) Tokunaga Y., Arai M., Nakaya A., Tobita Y., Tateno C., Kohara M. : Novel infectious clone of HCV 1a strain HCV-RMT efficiently replicate in vitro and in vivo using adaptive mutations. 18<sup>th</sup> International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011. 9. 8-12. Seattle

9) Munakata T., Nomoto A., Kohara M.: Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. 18<sup>th</sup> International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011. 9. 8-12. Seattle

10) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hirata Y., Tokunaga Y., Tateno C., Sudo M., Kohara M.: Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. 18<sup>th</sup> International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011. 9. 8-12. Seattle

11) Kasama Y., Sekiguchi S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in mice. 18<sup>th</sup> International Symposium Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011. 9. 8-12. Seattle

12) Fumihiko Y., Kai C., Morita K., Kohara M. : Clearance of SARS-CoV by cooperation of antibodies and phagocytes.

International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 2011. 9. 11-16 Sapporo

13) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers.



International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 2011. 9. 11-16 Sapporo

14) Gomi S., Naganawa S., Yasui F., Munekata K., Ishii K., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : A single immunization with highly attenuated vaccinia virus DIs-based vaccines induce protective immunity against H5N1 avian influenza virus in mice. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 2011. 9. 11-16 Sapporo

15) Munekata K., Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : Protection of mice from lethal H5N1 HPAIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 2011. 9. 11-16 Sapporo

16) 小原道法, 木村公則, 小原恭子 : C型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症性サイトカイン 第70回日本癌学会学術総会 2001. 10. 3-5. 名古屋

17) 高野貴士, 小原道法, 小原恭子 : C型肝炎ウイルスの複製におけるDHCR24の役割 第70回日本癌学会学術総会 2001. 10. 3-5. 名古屋

18) 平田雄一, 小原道法 : ヒト肝細胞での自然免疫応答におけるIFN-λの重要性とその誘導メカニズム 第15回日本肝臓学会大会 2011. 10. 20-21. 福岡

19) 木村公則, 小原道法 : HCV持続発現マウスを用いたHCVワクチンの開発 第15回日本肝臓学会大会 2011. 10. 20-21. 福岡

20) Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011. 11. 4-8. San Francisco

21) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The

American Association for the Study of Liver Diseases 2011. 11. 4-8. San Francisco

22) Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011. 11. 27-29. 千葉

23) Wada T., Kohara M., Yasutomi Y. Evaluation of the therapeutic effect of DNA vaccines in the mouse model of chronic HCV infection. 第40回日本免疫学会学術集会 2011. 11. 27-29. 千葉

24) 宗片圭祐, 安井文彦, 迫田義博, 喜田 宏, 柴田伸一, 村上利夫, 小原道法 : H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA発現組換えワクシニアウイルスワクチンによる発症防御機序の解析 第15回日本ワクチン学会 2011. 12. 10-11. 東京

25) Hirata Y., Kameyama T., Tokunaga Y., Nakagawa S., Hayashi Y., Takaoka A., Kohara M. : Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第34回日本分子生物学会 2011. 12. 13-16. 横浜

26) Nishimura T., Kohara M., Kino Y. Tsukiyama-Kohara K., : French marine bark extract pycnogenol is a new candidate of Hepatitis C virus therapeutic material. 第34回日本分子生物学会 2011. 12. 13-16. 横浜

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

出願日 : 平成23年8月31日、出願番号 : 特願2011-189251

発明の名称 : 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有するDIs株由来組換えワクシニアウイルス  
発明者 : 財団法人東京都医学総合研究所 ; 小原道法、安井文彦、国立大学法人北海道

大学；喜田宏、迫田義博、国立感染症研究所；石井孝司

出願人：財団法人東京都医学総合研究所、国立大学法人北海道大学、国立感染症研究所、一般財団法人化学及血清療法研究所

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

HCV感染が誘導する免疫エフェクターと病態解析

瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

**研究要旨：**HCVに罹るマウスの確立を目指してHCV/Cre-Tg の慢性肝炎誘導系とIPS-1-/-/hCD81TG の2つのマウス系の免疫系の解析を目指す。HCV/Cre-Tg のHCVレプリコン発現マウスで宿主IFN誘導系とHCVによる制御機構及び発がんとの関係を解析する。IPS-1 KOマウスの不死化肝細胞にヒト(h)CD81を強制発現した細胞株はJ6-JFH1株の感染を許容した。HCV粒子の産生は見られなかった。マウス肝細胞培養系からHCV感染の制御機構と発がん進展因子の解析を目指している。

A. 研究目的

以下の3つの企画をHCV感染マウスモデルと細胞株を使って推進し、HCV感染の宿主要因を解明する。(1) HCV/Cre-Tg のマウスC型肝炎誘導系を使って自然免疫系の肝炎・肝がん発症の鍵因子を同定する。(2) 自然免疫の各種KOマウスからHCV感染マウス肝細胞株を確立し、in vitro のHCV感染と自然免疫応答の関連を解析する。(3) マウス感染系を使って、HCVが如何にして持続感染を成立せしめ肝硬変、肝がんの転機をとるか、それに関与する宿主因子の同定を試みる。

B. 研究方法

研究(1) NS3/4A によるRiplet の肝細胞内分解とIFN誘導阻害はレポーターアッセイとsiRNA で証明する。HCV/Cre-Tg の慢性肝炎誘導系のマウスは大臣承認を得て小原研から北海道大学へ搬入済みである。In vivo 実験は長期になるが、NS3/4AによるRiplet 分解が病態を増悪させて肝硬変・肝がんの発症を上げることを経過観察する。研究(2) ではMyD88-/-, TICAM-1 -/-, IPS-1-/-, IRF-3-/-, IRF-7-/-, IFNAR-/-の各種KOマウスからSV40による不死化肝細胞株を樹立した。現在いくつかの亜株を継代培養している。NK, CTL 活性の測定や

ELISAなど免疫学的手法は既報に準じた。(3)はHCVのpolyU/UC がNK, CTLを活性化する機構から取り組む。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。ヒト試料は使用していない。

C. 研究結果

(1)NS3/4A protease の標的分子はIPS-1 (MAVS)とされて来たが、新たにRiplet (RIG-I 活性化に必須のユビキチンリガーゼ)も標的となると判明した。HCV感染は宿主Riplet, MAVS 両方の機能不全を将来するためにtype I IFN を誘導できなくなり、持続感染に結果することが肝細胞レベルで判明した(投稿準備中)。HCV/Cre-Tg のin vivo マウスモデルでこの新知見が再現するかを検証したい。(2) IFNAR KOのみでなく、IPS-1 KOマウス肝細胞株でJ6JFH1 の感染がより高効率で成立することが判明した(Aly PLoS ONE 2011)。一方、樹状細胞からTICAM-1 or MAVS 依存性に発現誘導される遺伝子群をgenechipで同定しており、これらがKOマウスの肝細胞株でHCV感染に耐性を与えるかを検討中である。(3) Aly氏の転出に伴い、本企画は細胞レベルで行い、in vivo 実験は

HCV/Cre-Tg マウスで行うこととした。具体的には、研究 (2) で得られた成果を HCV/Cre-Tg マウスで検証する予定である。現在、脾臓の NK 細胞や CD8 T 細胞の活性測定をテストしている。

#### D. 考察

HCVのマウスモデルは炎症や免疫応答の解析にはもちろん、抗ウイルスの創薬スクリーニング、感染株の分離など広い応用が見込める。本研究 (2) の成果はIFNARよりIPS-1のKOで優れた感染モデル系が創出しうることを示唆する。IPS-1は複数のIFN誘導経路の1つなのでIFNAR KOマウスのような免疫不全状態にならず、NK細胞、CTLの活性化能力を保持したマウス感染系が期待できる。細胞株のレベルでHCVに対する宿主防御の鍵因子の同定に使う予定である。現在、genechip から抽出した多数のIFN-inducible genes から候補遺伝子を抽出中である。

今回の報告では研究 (1) に進捗が見られた。NS3/4A 感受性の宿主因子として Riplet (RIG-I 活性化に必須のユビキチンリガーゼ) が同定できた。この生理的意義は未報告であり、我々に高いpriorityのある研究になることが見込まれる。HCV/Cre-Tgマウスの感染系でin vivo のHCV感染と肝硬変・がん化の増悪が見られるかを追跡調査する予定である。

HCVの慢性炎症と肝実質細胞の激しい再構成の分子基盤は未解明である。免疫系の過剰応答が分子基盤にあることは患者血液を使った臨床研究の成果、抗体、CTL, NK 活性化について報告がある。HCV/Cre-Tgマウスを使ったHCV感染解析ができれば樹状細胞・自然免疫の活性化を含めてHCV病態解明に進展が期待できる。Riplet を含む自然免疫のKOマウスの成果から宿主の抗HCVの鍵因子の同定をこれらの系で検証して行く。

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

(2a) 株で多くのin vitro 実験が行われている現状である。HCVの株間でIFN感受性は大きく異なり、臨床的に治療法を含めた

問題として残っている。本IPS-1 KOマウス肝細胞株を使って肝炎患者からウイルス分離ができればIFNのバイアスの無いウイルス株を抽出しうる。

本研究のHCV/Cre-Tgと自然免疫改変モデルマウスが以上の解析に有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

#### E. 結論

IPS-1 KOマウスの肝細胞株を不死化し、hCD81を発現させた細胞株を樹立した。この細胞株でHCV 抵抗性の宿主因子を同定し、患者試料からウイルス分離を試行する。また、HCV/Cre-Tgマウスを使ってRipletの分解促進を確認し、Riplet分解が肝炎の増悪を助長するかを検討する。これらの系から抗HCVの宿主因子、特にNK, CTLの起動に重要な因子を同定して行く。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.

2. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* 31: 3802-3819.

3. 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: 373-377.

4. Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. 2011. Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* 85: 5423-5435.

5. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, 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.

6. Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. 2011. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. *PLoS ONE.* 6 (6): e21284.

7. Seya, T. 2011. ADDENDUM to the paper published