

in MIMM by Takaki et al. *Molec. Immunol.* 48: 1589-1590.

8. 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: 5320-5327.

9. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86: 185-194.

10. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2011. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. (in press).

11. Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, A. Ghadiri, S. Boucheriti, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rosenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, T. Seya, M. Matsumoto, N. Rezeai, D. Chaussabel, A. Puel, L. Abel, S-Y. Zhang, S. Al-Muhsen, and J-L. Casanova. 2011. Human TRIF deficiency in otherwise healthy patients with herpes simplex encephalitis. *J. Clin. Invest.* 121: 4889-4902.

12. Itoh, H., 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.

13. Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2011. Phosphoinositide 3-kinaseγ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE.* 6(10): e26836.

Review

1. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67-77.

2. Seya T., J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto. 2011. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J. Innate Immunity.* 3: 264-273.

3. Wakita, T., T. Suzuki, M. J. Evans, K. Shimotohno, K. Chayama, Y. Matsuura, M. Hijikata, K. Moriishi, T. Seya, N. Enomoto, K. Koike, N. Kato, T. Kanto, and H. Hotta. 2011. Will there be an HCV meeting in 2020?: Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 141: e1-5.

4. Aly, H. H., K. Shimotohno, M. Hijikata, and T. Seya. 2012. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.* (in press).

5. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012.

Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem. (Tokyo)*. (in press)

2. 学会発表

省略

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

3. その他

なし

HCV感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究協力者 和田剛 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特任研究員

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の免疫学的な感染病態の解析および治療用ワクチンの開発に向けて、HCVに対するDNAワクチンの開発を試み、その免疫誘導効果をC57BL/6マウスおよびHCVタンパクがスイッチング発現可能なTgマウスを用いて免疫誘導効果と病態の変化を検討した。HCVの全遺伝子、外殻蛋白領域遺伝子および非構造蛋白領域遺伝子をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込み各種HCV-DNAワクチン（HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25）を作製した。これらDNAワクチンをエレクトロポレーションによりC57BL/6マウスに免疫し、誘導される免疫反応を検討したところ免疫マウス脾細胞中での細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の誘導を⁵¹Cr遊離法およびELISPOT法においてHCVに対する強いCTLの誘導が認められた。また、C型肝炎モデルマウスにDNAワクチンを投与したところ、肝臓中のHCVコア蛋白発現量が有意に減少し、さらに形態学的異常の改善も認められた。以上のことから、これらHCV-DNAワクチンは治療用ワクチンとして有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はヒトに慢性感染症を引き起こす病原体であり、その病態は肝炎から肝硬変、肝癌へと進行する。この進行における生体のウイルスに対する免疫反応の詳細は不明であり、HCVに対する免疫反応の解析や、それによる治療法の確立が強く望まれている。本研究ではベクターに対する反応が無く、目的とした抗原に対してのみ免疫反応が誘導されるDNAワクチンを構築し、HCV感染モデルマウスを用い、HCVに対する免疫反応の解析と、治療用ワクチンの開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV遺伝子発現DNA（HCV-DNA）ワクチンの作製

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

さらにこれらのワクチンのコントロールとしてHCV遺伝子領域を含まないDNAワクチン (emp) を作製した。

(2) ウェスタンブロット法によるHCV蛋白質発現の確認

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

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

25 μ lのPBSに懸濁した100 μ gの各種DNAワクチンを5週齢のC57BL/6マウスの下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション (50 V, 99 msec, 8 times) を行った。投与は2週毎に右脚、左脚、右脚の3箇所投与し、最後の投与から4週後にマウスより脾臓を採取した。赤血球溶血処理を行った脾細胞 (1×10^5) を予めマイトマイシン処理を行った刺激細胞 (1×10^4) と37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂インキュベーター中で48時間培養し、脾細胞中のHCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定した。刺激細胞として、HCVの各遺伝子部位を過剰発現した腫瘍細胞 (EL-4/Core, /E1, /E2, /NS2, /N3-4 (東京都医学総合研究所、小原道法先生から分与)) を用いた。⁵¹Cr遊離試験においては、50 mlフラスコ内で脾細胞 (5×10^7 /ml) と刺激細胞 (1×10^7 /ml) を5日間培養し、エフェクター細胞を誘導した後、⁵¹Cr標識した標的細胞を用いて測定した。

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

(3) と同様に、HCV-DNA ワクチンを予め2週毎に3回投与し、最後の投与から4週間後に、HCV 蛋白過剰発現腫瘍細胞 (EL-4/NS2) をマウスに移植し、その後のマウスの生存率を測定した。

(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

poly (I:C) を投与することで、任意の時期にHCV 遺伝子を誘導発現できるトランスジェニック (HCV-Tg) マウス (東京都医学総合研究所、小原道法先生から分与) を用い、マウスにHCV 遺伝子を誘導し、HCV 蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた後、(3) と同様にHCV-DNA ワクチンを投与し、最後の投与から4週間後に脾臓中のHCV 抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定した。また同時に血清、肝臓片を回収し、血清はALT濃度測定に用い、肝臓片は組織抽出液の作製と、ホルマリン固定を行った。血清中ALT濃度は市販のキット

(WAKO) を用いて、また、肝臓組織抽出液中のHCV コア蛋白質発現量は市販のHCV 抗原ELISAキット (Ortho Clinical Diagnostics) を用いて定量した。ホルマリン固定した肝臓片はパラフィン包埋後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員

会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) HCV 遺伝子発現 DNA (HCV-DNA) ワクチンの作製

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

(2) HCV 蛋白の発現確認

作製したHCV-DNAワクチンをCOS7細胞に導入し、ウエ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 (図 2)。

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

HCV-DNAワクチンを投与したC57BL/6マウスより脾臓を採取し、脾細胞中のHCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定したところEL-4/E2、/NS2、HCV-N25投与群では、EL-4/E2、NS2、/N3-4細胞による刺激後に、顕著にIFN- γ を産生することを確認した (図 3)。 ^{51}Cr 遊離法によるCTL誘導の検討ではHCV蛋白を発現しないEL4細胞をtarget細胞とした時、マウスから採取したいずれの脾細胞においても細胞傷害活性はほとんど見られなかったがtarget細胞として、EL-4/NS2またはEL-4/NS3-4細胞を用いたところ、HCV-CN2、HCV-N25投与群由来の脾細胞は、それぞれEL-4/NS2、EL-4/NS2、/N3-4細胞による刺激後に細胞傷害活性が認められ、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 (図 4)。

(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

HCV-DNAワクチンを投与したC57BL/6マウスに、HCV蛋白発現腫瘍細胞 (EL-4/NS2) をマウスに移植し、その後の生存率を評価したところ、生存率は、オントロール群に比べHCV-DNAワクチン (HCV-CN2、HCV-N25) 投与群で有意に上昇し、マウス体内においてHCV抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた (図 5)。

(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

HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させたHCV-TgマウスにHCV-DNAワクチンを投与し、その後、脾臓中のHCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定したところ、HCV-DNAワクチン投与群由来の脾細胞のIFN- γ 産生能はC57BL/6マウスを用いた結果に比べ、減弱あるいは消失していることを確認した (図 6)。

しかし、肝臓中のHCVコア蛋白発現量を測定したところ、コントロール群に比べHCV-N25投与群において、肝臓中コア蛋白発現量が有意に減少していることを確認した (図 7 A)。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 (図 7 B)。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 (図 8)。

D. 考察

HCV 感染症は肝炎から、肝硬変、肝癌へと進行する慢性感染症疾患である。現在用いられている治療法においても治療効果を得られない患者は多く、新規の治療法、治療薬の開発は急務となっている。一方、HCV が病態を進行させるには極めて長い期間が必要であり、生涯を通じて HCV をコントロールし、寛快される例も存在することから、適切な免疫反応を強く誘導すれば治療に結びつく可能性があると考えられる。しかしながら、その間の免疫機構においては極めて不明な点が多い。これらのことから、本研究では HCV に対する免疫反応の解析ならびに免疫療法、治療用ワクチンの開発を試みた。治療用ワクチンは現在では主に癌において試みられており、実用化も行われている。治療用ワクチンを考える場合、癌と HCV の大きな違いは癌においては標的となる抗原は限られており、目的とする抗原に対し、如何に強い細胞性免疫を誘導するかということである。一方、HCV 感染症に対する治療用ワクチンの開発には治療の標的に適している抗原を確定する必要があり、同時に、自然感染では標的抗原に対する免疫反応が十分でない可能性等の新たな視点の研究が必要である。本研究ではベクターに対する反応等の複雑な免疫反応を排除し、より抗原特異的な細胞性免疫を主体

とした免疫反応を誘導すべく HCV 各種遺伝子を用いた DNA ワクチンを使用した。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- γ 産生能は減弱あるいは消失しており (図 6)、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、特に 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 (図 7, 8)、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。

E. 結論

HCV 各遺伝子に対する DNA ワクチンを構築し、特に HCV の非構造蛋白領域を発現する DNA ワクチン (HCV-N25) は C 型肝炎モデルマウスを用いた実験の結果より、治療用ワクチンとして有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M.,

- Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai, Y., Kumagai,J., Yasutomi, Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* in press
- 2) Iwasaki, Y., Mori,K., Ishii,K., Maki,N., Iijima,S., Yoshida,T., Okabayashi,S., Katakai, Y., Lee,J., Saito,A., Fukai,H., Kimura,N., Ageyama,N., Yoshizaki,S., Suzuki,T., Yasutomi, Y., Miyamura,T., Kannagi,M. and Akari,H. Longe-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers Microbiol.* in press
- 3) Hirata,H., Kawai,S., Maeda,M., Jinnai,M., Fujisawa,K., Katakai, Y., Hikosaka,K., Tanabe,K., Yasutomi, Y. and Ishihara,C. Identification and Phylogenetic Analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) Detected from a Japanese Macaque (*Macaca fuscata fuscata*). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* in press
- 4) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasutomi, Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and Nakayama,E.E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) *J.Gen.Virol.* in press
- 5) Matsuo,K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011 Epub
- 6) Chono,H., Saito,N., Yasutomi, Y., Mineno,J., and Kato,I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-I gene therapy model. *PloS One* 2011; 6: Epub
- 7) Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara,J., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and Holland,R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J.Virol.* 2011;85:1117-1124.
- 8) Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi, Y., Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.
- 9) Okabayashi,S., Uchida,K., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia(PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J.Comp.Pathol.* 2011;144:204-211.
- 10) Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S., Lee, Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T., Yasutomi, Y., Adachi,A., Matano,T., Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes and Infection* 2011;13:58-64.

2. 学会発表

「国内」

- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発 第15回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日-11日
- 2) 塩釜ゆみ子、保富康宏：Th制御とインフルエンザ感染の関係 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 3) 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫不全ウイルスの効果 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 4) 和田剛、小原道法、保富康宏：C型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの評価 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 5) 辻村佑祐、保富康宏：好酸菌分泌抗原Ag85Bは局所にインターロイキン-17、-22を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 6) 渡邊健太、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 7) 田尻和子、保富康宏：SOCS1遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 8) 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応 第

152回日本獣医学会 大阪 2011年9月19日-21日

「国際」

- 1) Akatsuki SAITO, Masako NOMAGUCHI, Ken KONO, Emi E. NAKAYAMA, Tatsuo SHIODA, Tomoyuki YOSHIDA, Yasuhiro YASUTOMI, Naofumi TAKAHASHI, Tetsuro MATANO, Akio ADACHI, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. Non-Human Primate model for AIDS Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.
- 2) Kenta WATANABE, Akihiro MATSUBARA, Mitsuo KAWANO, Satoru MIZUNO, Yusuke TSUJIMURA, Hiroyasu INADA, Masayuki FUKUMURA, Isamu SUGAWARA, Tetsuya NOSAKA, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Intranasal immunization with -deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporo.
- 3) Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian -human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in Cynomologous monkeys. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17,

2011, Sapporo.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造
方法(特願2011-025234)

2) 新規な組換えBCGワクチン(特願2011-
199422)

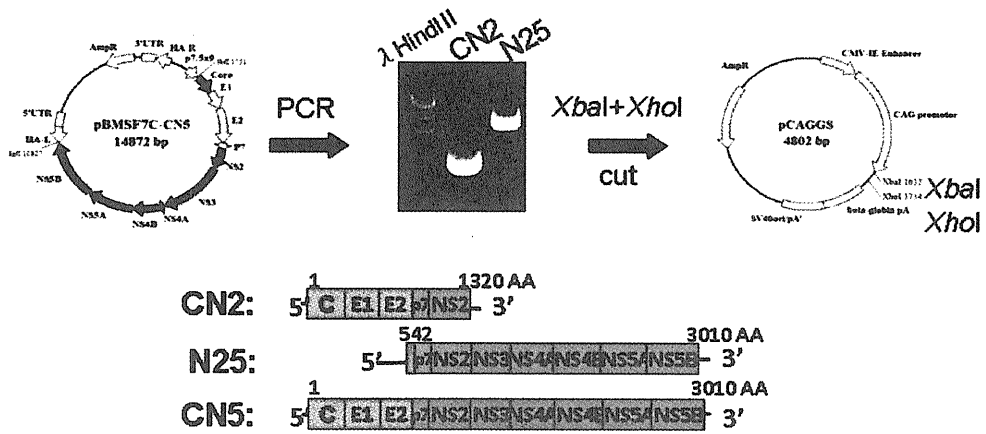


図1. HCV遺伝子発現DNAワクチンの作製

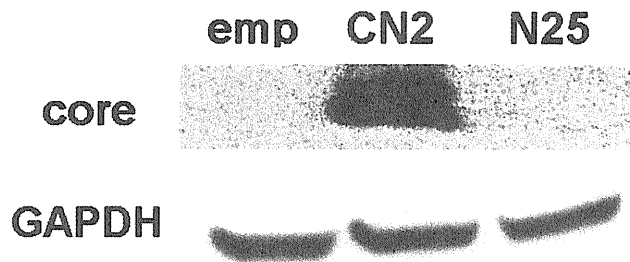


図2. ウェスタンブロット法によるCore蛋白質発現の確認

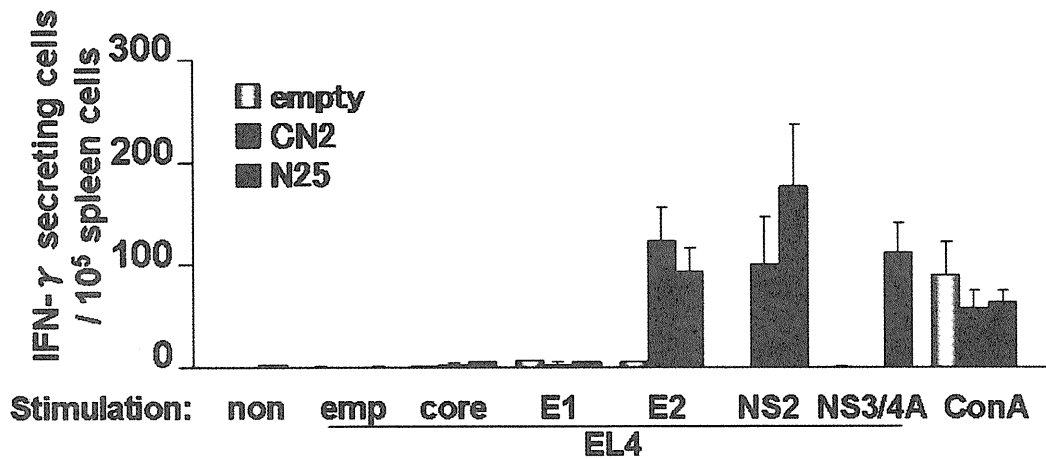


図3. ELISPOT法による細胞性免疫誘導能についての評価

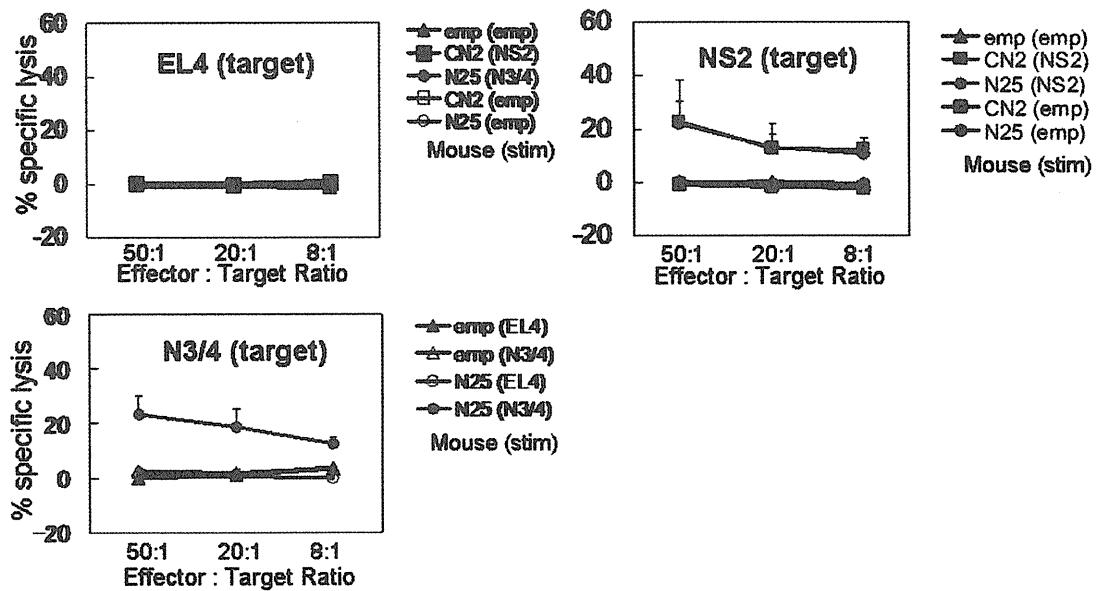


図4. ⁵¹Cr遊離法による細胞性免疫誘導能についての評価

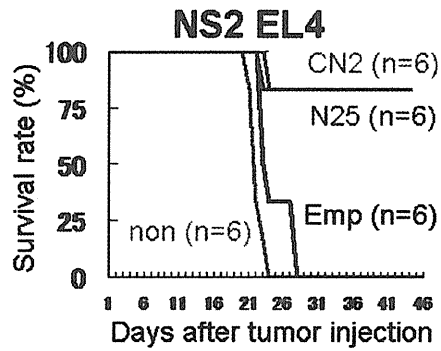


図5. HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスモデルを用いた HCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価

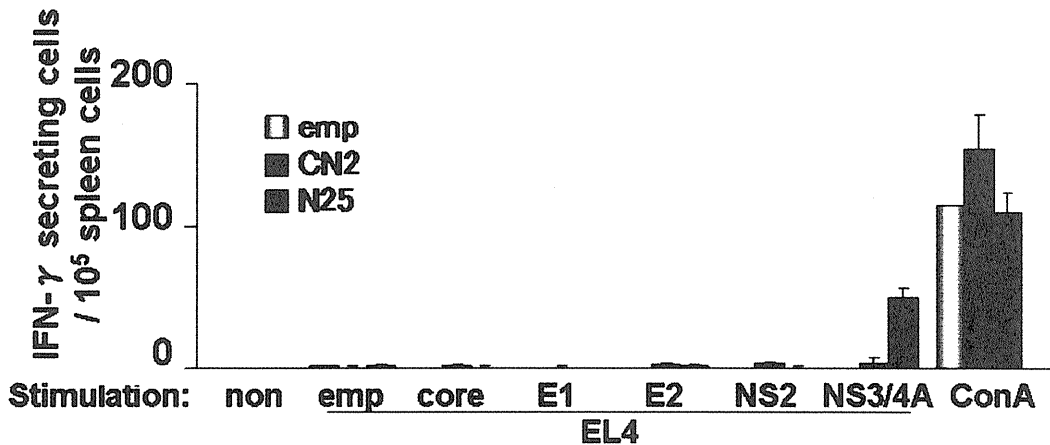


図6. C型肝炎モデルマウスにおける細胞性免疫誘導能についての ELISPOT法を用いた評価

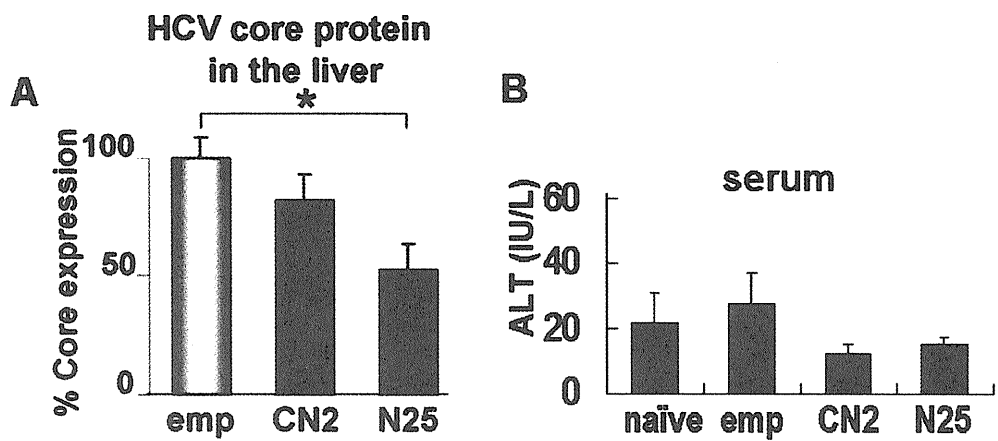


図7. C型肝炎モデルマウス肝臓中のコア蛋白発現量について評価(A)と血清中ALT濃度の評価(B)

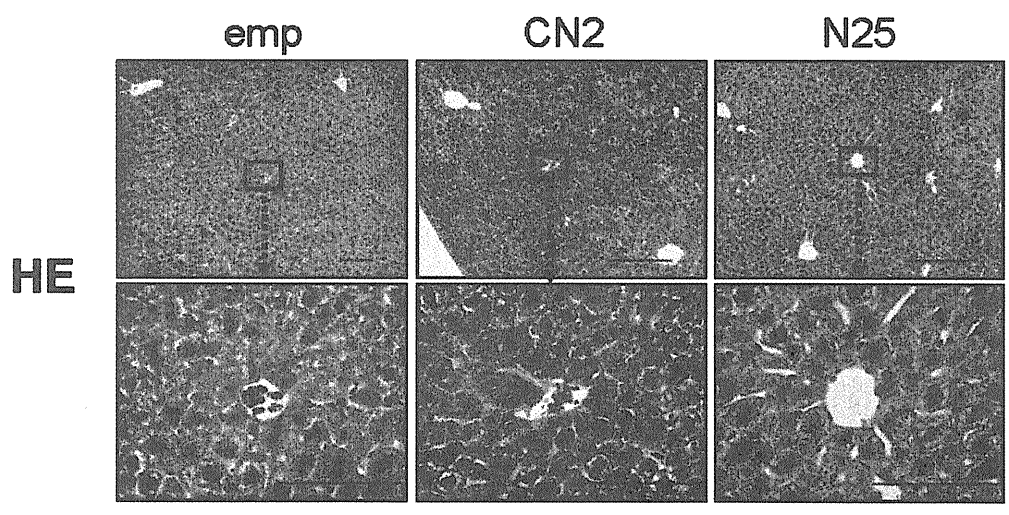


図8. C型肝炎モデルマウス肝臓における形態学的検索

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

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 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究要旨：複数の遺伝子型／株由来の構造蛋白質を用いて、C型肝炎ウイルス（HCV）の1回感染性トランスパッケージング型粒子（HCVtcp）を産生させる事に成功した。HCV感染の初期過程の解析には、これまでレトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス（HCVpp）が汎用されて来たが、培養細胞由来のHCV（HCVcc）とHCVppでは感染機構が異なる事も明らかになってきている。HCVtcpは一回感染性の性質を持つ事からその感染を定量的に評価する事が可能であり、さらにその感染過程がよりHCVccの性質を反映していると考えられる。本研究ではHCVtcpを用いてウイルスの細胞侵入過程であるエンドサイトーシス経路を解析し、HCV感染経路として新たにクラスリン非依存性エンドサイトーシスの存在を明らかにした。

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で1.7億人、国内で150万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者は国内で年間3万人を超えている。治療薬の効果は比較的高いが、効果が不十分の症例もあり、さらに新しい治療法の開発が望まれている。

これまでHCVの細胞侵入過程の解析や中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス（HCVpp）が用いられてきた。しかしHCVppは必ずしもHCVの性質と同一でない性質が明らかになりつつある。現在開発中の

HCV遺伝子発現組換えワクチニアウイルスワクチンの治療効果における中和抗体誘導能の関与を評価する為にも、より正確なウイルス感染系を用いたのアッセイ法の確立が求められている。本研究では、1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子（HCVtcp）を作製し、それを用いてウイルスの細胞侵入過程の解析を行った。

B. 研究方法

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（構造蛋白質領域を欠損し、EMCV-IRESおよびF luc遺伝子を挿入したもの）の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によりノックダウンし、HCVtcp感染後3日目の細胞内のルシフェラーゼ活性を調べる事により、HCV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)

動物実験は行っていない。

C. 研究結果

初めに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

以上の結果から、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。

E. 結論

HCVppに比べて、よりHCV本来の性質を反映した解析ツールと考えられるHCVtcpを用いた細胞侵入経路の解析により、従来報告されているクラスリン依存性エンドサイトーシスに加え、HCVがクラスリン非依存性エンドサイトーシス経路により細胞侵入している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology*. 421:96-104 (2011)
- 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 ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.* 286: 37264-37273 (2011)

2. 学会発表

- 1) Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are

- involved in HCV production. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
- 2) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 3) Takebe Y, Uenishi R, Tani H, Suzuki R, Takagi M, Hase S, Liao H, Tsuchiura T, Shinya K, Wakita T, Matsuura Y, Patel A. Small molecules that elicit strong anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptor. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 4) Fukasawa M, Shirasago Y, Saito K, Murakami Y, Fukazawa H, Suzuki T, Suzuki R, Wakita T, Hanada K, Chiba J. Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 5) Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. 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 Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 6) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 7) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.
 - 8) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
 - 9) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
 - 10) Matsumoto Y, Watashi K, Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得

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

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

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

特許番号：1930416

登録国：E P
 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

Yoshikawa K. et al. (小原)	Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance	<i>Bioconjugate Chemistry</i>	22	42-49	2011
Arai M. et al. (小原)	Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA	<i>Arch. Virol.</i>	156	295-304	2011
Kimura K. et al. (小原)	Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury	<i>Journal of Leukocyte Biology</i>	89	433-442	2011
Takano T. et al. (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response	<i>J. Med. Virol.</i>	83	801-809	2011
Kimura K. et al. (小原)	Frontiers of Model Animals for Human Diseases	<i>Experimental Animals</i>	60	93-100	2011
Takano T. et al. (小原)	Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes	<i>J. Hepatology</i>	55	512-521	2011
Chiyo T. et al. (小原)	Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice	<i>Virus Res.</i>	160	89-97	2011
Satoh M. et al. (小原)	Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1	<i>J. Infect Dis.</i>	204	1172-1180	2011
Tsukiyama-Kohara K. et al. (小原)	Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model	<i>Hematology</i>	2011:167-171	Epub 2011	2011

Kasama Y. et al. (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3	<i>Virus Res.</i>	163	405-409	2012
Saito M. et al. (小原)	Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1	<i>J. Med. Virol.</i>	in press		2012
Weng L. et al. (小原)	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase	<i>Gene</i>	in press		2012
Konishi H. et al. (小原)	An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication	<i>Sci. Comm.</i>	In press		2012
Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. (瀬谷)	Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice.	<i>J. Virol.</i>	86	185-194	2012
Itoh, H., A. Watanabe, K. Iwano, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. (瀬谷)	UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling.	<i>PLoS ONE.</i>	6(12)	e28500	2011
Sancho-Shimizu, V., R. et al. (瀬谷)	Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency	<i>J. Clin. Invest.</i>	121	4889-4902	2011
Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. (瀬谷)	Phosphoinositide 3-kinase γ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages.	<i>PLoS ONE.</i>	6(10)	e26836	2011
Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. (瀬谷)	The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection.	<i>J. Immunol.</i>	187	5320-5327	2011

Wakita, T., T. Suzuki, M. J. Evans, K. Shimotohno, K. Chayama, Y. Matsuura, M. Hijikata, K. Moriishi, <u>T. Seya</u> , N. Enomoto, K. Koike, N. Kato, T. Kanto, and H. Hotta. (瀬谷)	Will there be an HCV meeting in 2020?: Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. (review)	<i>Gastroenterology</i>	141	e1-5	2011
Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and <u>T. Seya</u> . (瀬谷)	Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus.	<i>PLoS ONE.</i>	6(6)	e21284	2011
Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, <u>T. Seya</u> , T. Saga, and M. Miyazawa. (瀬谷)	Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions <i>in vivo</i> .	<i>J. Virol.</i>	85	5423-5435	2011
Hiromi Takaki, Yumi Watanabe, Masashi Shingai, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, <u>Tsukasa Seya</u> (瀬谷)	Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- γ -inducing potential	<i>Mol. Immunol.</i>	48	497-504	2011
Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u> . (瀬谷)	Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2.	<i>Microbes Infect.</i>	13	350-358	2011
Matsumoto, M., H. Oshiumi, and <u>T. Seya</u> . (瀬谷)	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. (review)	<i>Rev. Med. Virol.</i>	21	67-77	2011
Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and <u>T. Seya</u> . (瀬谷)	TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors.	<i>Proc Natl Acad Sci USA.</i>	in press		2012
Oshiumi, H., M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u> . (瀬谷)	Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. (review)	<i>J. Biochem. (Tokyo).</i>	in press		2012
Matsuo, K. and <u>Yasutomi, Y.</u> (保富)	Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control.	<i>Tuberculosis Res. Treat.</i>	Epub		2011

Chono,H., Saito,N., <u>Yasutomi,Y.</u> ,Mineno,J., and Kato,I. (保富)	In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-I gene therapy model.	<i>PloS One</i>	Epub		2011
Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., <u>Yasutomi,Y.</u> , Lara,J., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and Holland,R.C. (保富)	Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain.	<i>J.Virol</i>	85	1117-1124	2011
Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K.,, Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., <u>Yasutomi,Y.</u> , Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. (保富)	Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase.	<i>Human Gene Ther.</i>	22	35-43	2011
Okabayashi,S., Uchida,K., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and <u>Yasutomi,Y.</u> (保富)	Periventricular Leucomalacia(PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis).	<i>J.Comp.Pathol</i>	144	204-211	2011
Yoshida T. et al. (保富)	CD16+ natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins	<i>Arch Virol</i>	in press		2012
Iwasaki,Y., et al. (保富)	Longe-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. <i>Frontiers Microbiol.</i>	<i>Frontiers Microbiol.</i>	in press		2012
Winkelmann ER, Widman DG, <u>Suzuki R,</u> Mason PW (鈴木)	Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1.	<i>Virology</i>	421	96-104	2011