

201209002A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究	1
加藤 孝宣	
II. 分担研究報告	
1. HCVワクチン用粒子作製を目的としたHCV複製可能細胞の探索	15
加藤 孝宣	
2. 感染中和抗体と感染中和機構の解析	21
脇田 隆宇	
3. 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	27
明里 宏文	
4. E型肝炎ウイルスをベクターとする外来遺伝子発現の検討	33
石井 孝司	
5. 日本脳炎ウイルスを用いた トランスパッケージングシステムの構築に関する研究	37
鈴木 亮介	
6. C型肝炎ウイルスの大量精製方法、HCVワクチン投与アカゲザルにおける 感染阻害抗体の誘導、細胞性免疫評価モデル作製に関する研究	41
中村 紀子	
7. RNA誘導体のアジュバント機能評価に関する研究	47
松本美佐子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	57

I. 総括研究報告

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究

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

研究要旨；JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルスの細胞培養系を用い、ウイルス粒子を培養細胞で大量生成し、そのウイルス粒子を精製不活化後ワクチン抗原として用いることでC型肝炎ウイルスワクチンの樹立を目指す。本年度は培養細胞で生成された粒子を用い、霊長類モデルであるアカゲザルを用いワクチン接種の有効性と安全性の確認を行った。その結果、Alumをアジュバントとして用いた個体で中和抗体の誘導が確認され、すべての個体でワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。さらにワクチン抗原精製方法の確立、新規HCV増殖が可能な非癌細胞由来細胞株の同定、新規RNA誘導体アジュバントの評価、HCV感染評価のための新規動物モデルとなるHCVGBV-Bキメラウイルスの検討等も行っている。

研究分担者	脇田 隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長	A. 研究目的 C型肝炎ウイルス（HCV）感染は成人感染でも高率に慢性化し、肝硬変から肝臓に至る慢性肝疾患の原因となる。世界中に多くのHCV感染者が存在し、日本でも150万人の感染者の存在が報告されている。近年、輸血後のC型肝炎は減少しているが、医療従事者や薬剤常用者、もしくはC型慢性肝炎患者の介護にあたる者などハイリスク群では依然としてその感染のリスクにさらされている。
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	C型慢性肝炎患者に対するインターフェロンを中心とした現行治療の効果は十分ではなく、薬剤が高額なため医療経済を圧迫している。我々の研究によりHCVの感染予防ワクチンが実用化されれば、感染予防ワクチンによる新規感染者数およびHCV感染に関わる肝臓発症数の減少が期待できる。さらに治療用ワクチンが実用化されれば、治療によるウイルス排除率の向上が期待され医療費の削減に貢献できる。
研究分担者	石井 孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長	我々が開発したJFH-1株を用いたHCVの培養系により、培養細胞でこのウイルスを増殖させることが可能となった。またこのシステムではHCVの培養細胞への感染が観察できるため、中和活性の評価も可能である。本研究では、このJFH-1株によるHCV細胞培養系を用い、培養細胞で増殖させたウイルス粒子を免疫原として用いることでHCVワクチン
研究分担者	鈴木 亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官	
研究分担者	中村 紀子 東レ株式会社医薬研究所 主任研究員	
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	

の開発を行う。これまで我々は、培養細胞で大量生産したウイルス粒子を濃縮精製することでワクチン抗原を作成し、その抗原でマウスを免疫することで中和活性を有する抗体が得られることを確認している。

本年度は、よりヒトに近い霊長類動物モデルであるアカゲザルを用い、ウイルス粒子ワクチンの安全性と有効性の評価を行った。さらに、ウイルス粒子の生成に適した細胞株の樹立、粒子精製方法の確立、新規アジュバントの同定、新規動物モデルの構築など基礎的な検討も引き続き行っている。

B. 研究方法

1. アカゲザルを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

マカク属サル（アカゲザル3頭、Mm1938 [♀; 2.1 kg]・Mm1836 [♀; 4.0 kg]・Mm1854 [♀; 5.0 kg]）へのHCV不活化粒子ワクチン接種実験を行った。ワクチン抗原としてJ6/JFH1株感染HuH-7細胞の培養上清を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粒子を使用した。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粒子量とした。アジュバントはAlum(Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC社)、CpG(Mod87; 東レ)、MPL+TDM(Sigma Adjuvant System #S6322; Sigma社)を用い、3頭アカゲザルに、それぞれAlum、Alum+CpGおよびMPL+TDMを、UV照射によって不活化した精製ウイルス粒子とともに筋肉内に接種した。さらに4週目、12週目に追加接種を行い、14週目に実験殺を行った。得られた血清中の抗体価と感染阻害活性を測定することによりワクチンの有効性評価を行った。また、ワクチン接種2日後に血算・生化学検査、さらに接種個体の病理解剖により安全性評価も行なった。

得られたアカゲザル血清サンプルはProtein Aカラム (GE Healthcare社) を用いて精製し、IgGのタンパク量は、Bradford法にて測定した。血清中の抗体価は、リコンビナントのE1、E2蛋白質を用いたELISA法にて評価した。

免疫したアカゲザルの血漿中に含まれる抗HCV抗体の感染阻害活性は、免疫に用いたJ6株のE1、E2蛋白質を持つレトロウイルス (HCVシュードタイプウイルス; HCVpp) を用いて評価した。

2. マウスでの HCV 粒子ワクチンによる細胞性免疫誘導の確認

J6/JFH1株感染HuH-7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。免疫したマウスの脾臓細胞を回収し、HCV粒子免疫による細胞性免疫の誘導を評価した。T細胞刺激剤としてPMA、Ionomycin、Concanavalin A (Sigma-Aldrich)を用いた。またコア、E1、E2の合成ペプチド投与によりT細胞が刺激される事を確認した。IFN- γ 産生細胞の検出にはMouse IFN- γ ELISPOT antibody pair (U-CyTech社)を用い解析を行なった。

3. 培養細胞で作製した HCV 粒子精製方法の樹立

J6/JFH1株感染HuH-7細胞の継代とセルスタック (Corning) を用いた大量培養によりHCV粒子を含む培養上清を回収した。この培養上清を限外濾過膜 (ホローファイバー; UFP-500-C-8A、GE Healthcare) を用いて濃縮し、ベンゾナーゼ (Merck) 処理の後に、陰イオン交換クロマトグラフィー (CIM Disk DEAE; BIA separations、AKTA Explorer 10s システム; GE healthcare) とゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacrose 6FF; GE healthcare) で濃縮・精製を行なった。

4. 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、HCVライフサイクルの各ステップでの関与が報告されている宿主因子について、特異的なprimer/probeセットを用いたTaqMan Gene Expression Assay法によりそれぞれの発現量をHuh-751細胞と比較し検討した。また

HCVの複製に関わる宿主因子であるmiR-122を発現するレンチウイルスベクターを作製した。ウイルス力価はEGFPを発現するウイルスを用いてflow cytometryおよび、qRT-PCRにより決定した。

5. リコンビナントE2蛋白質によるHCV感染中和機構の解析

293T細胞およびショウジョウバエ由来のS 2細胞にHCVのE2蛋白質を発現させ、培養上清中に分泌したE2蛋白質をアフィニティ精製法により回収した。精製E2蛋白質によるHCV感染中和活性を、JFH-1株を用いたHCVcc感染実験系で確認した。さらに精製E2蛋白質をBALB/cマウスに免疫して感染中和抗体誘導能をHCVppおよびHCVccにより検討した。また合成ペプチドを用いて誘導された抗E2抗体のエピトープマッピングをおこなった。

6. E型肝炎ウイルスを用いた遺伝子導入システムの構築

近年、E型肝炎ウイルス (HEV) を培養細胞系で増殖させることが可能となり、感染性のHEV cDNAクローンも確立されている。HEVは腸管から感染し肝臓へ移行するため、経口的に目的遺伝子を肝臓にデリバリーするベクターとしての応用が考えられる。そこでHEVゲノムに外来遺伝子を挿入しHEV粒子に取り込ませることで、遺伝子導入システムとして利用する系の構築を試みた。

感染性のHEVクローンとしてHEV 83-2株を用いた。このHEVクローンの構造蛋白領域を様々なレポーター遺伝子で置換したレプリコンプラスミドを構築した。さらにレポーター遺伝子の5'上流にHCV-IRESを挿入したレプリコンプラスミドも同様に作製した。

7. 日本脳炎ウイルスのトランスパッケージングシステムを用いたワクチン抗原生成系の検討

日本脳炎ウイルス (JEV) はHCVと同様にフラビウイルス科であり、既にワクチンの安全性や有効性、生産手段が確立されている。そこで、HCVワクチン抗原の生成法として、より安全なトランスパッ

ーシングシステムによる粒子産生系を用い、外来遺伝子由来のペプチドを表出するJEV粒子の作製を試みた。

JEVのトランスパッケージングシステムとしてJEV Nakayama株由来のC-EおよびprME領域を持つ構造領域発現プラスミドとレプリコンプラスミドを用いた。感染性JEV粒子の産生は、培養上清をVero細胞に感染させ、抗NS1抗体による染色により確認した。キャプシド蛋白質とウイルスゲノムを含まないsub-viral particle (SVP)の産生は、構造領域発現プラスミドを293T細胞にトランスフェクションし、その培養上清を、ウエスタンブロット法を用いて確認した。E蛋白質中の外来遺伝子由来ペプチドが挿入可能な部位の探索の為に、複数の部位にFLAG Tag配列を挿入したprME発現プラスミドを構築した。

8. TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発

TLR3のリガンド認識機構を考慮し、49種類のRNA誘導体をin vitro合成した。レポーター遺伝子アッセイにより、TLR3を介したIFN- β promoterの活性化を誘導し細胞質内MDA5経路を活性化しないRNA誘導体を選択し、マウス個体でのTLR3を介したCTL, NK活性化能をマウス移植がんモデルで査定した。更に、RNA誘導体によるTLR3-TICAM-1依存的CTL誘導の責任分子同定のためジーンチップ解析を行った。また、B57BL/6マウスを用いてOVA抗原に対する抗体産生誘導を調べた。

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

ワクチンの有効性や安全性の評価のためには動物モデルでの検討が必要である。しかしHCVは宿主域が狭く、チンパンジー以外の動物では感染とそれに伴う免疫反応を観察することは難しい。この感染動物モデルの不在が、HCVワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性や安全性の評価、C型肝炎の病態解析の大きな障壁となっている。そこでHCVと近縁のGBV-Bと、新世界ザルであるマーモ

セットの感染モデルを用い、HCVとGBV-Cのキメラマウスを作製する事で、新規HCV感染霊長類モデルの樹立を試みた。

HCV/GBV-Bキメラウイルスとして、GBV-BをベースにE1、E2領域をHCV由来遺伝子に置換したHCV-G_{H, E1,2}およびコア、E1、E2領域を置換したHCV-G_{H, CE12}を構築した。これらクローン由来RNAをマーマセット初代培養肝細胞に遺伝子導入し、その複製増殖能を評価した。また、パピローマウイルスE6/E7発現プラスミドをマーマセット初代培養肝細胞に遺伝子導入し、不死化マーマセット肝細胞株を樹立した。

(倫理面への配慮)

各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた後に使用した。本研究で使用した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。すべての動物実験は、それぞれの実験を行った施設の動物実験委員会の審査・承認を得た実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実施した。アカゲザルを用いた実験は、実験を行なった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. アカゲザルを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

HCV不活化粒子ワクチンの投与を行ったアカゲザル3頭すべてで、投与後に抗原に使用したJ6株のE1、E2蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。さらに遺伝子型が異なるTH株(遺伝子型1b)のE2、コア蛋白質に対する抗体誘導を評価したところ、AlumとAlum+CpGをアジュバントとして用いた個体では抗体価の上昇が確認されたが、MPL+TDMをアジュバントとして用いた個体で十分な抗体誘導が得られていなかった。

次に、これらの検体中のIgGを精製し、誘導された抗体の感染阻害活性を培養細胞での感染系を用いて評価した。その結果、Alumをアジュバントとして用いた個体で誘導された抗体では感染阻害活性が観察されたが、Alum+CpGとMPL+TDMをアジュバントとして用いた個体で誘導された抗体では感染阻害活性が確認できなかった。

ワクチンの投与を行った3頭のアカゲザルの解剖所見、血液検査の結果ではワクチン投与に関連した異常所見は認めていない。

2. マウスでのHCV粒子ワクチンによる細胞性免疫誘導の確認

HCV粒子で免疫したマウスの脾臓細胞をPMA+IonomycinまたはConcanavalin Aを用いてin vitroで刺激しELISPOT解析を行った。その結果、IFN- γ 産生細胞が検出された。次に、同じ脾臓細胞を用いて、HCVの構造蛋白質の合成ペプチドを用いて刺激しELISPOT解析を行った。合成ペプチドはコア、E1、E2領域の混合ペプチドを使用した。ELISPOT解析の結果、E1およびEのペプチドを用いた場合にはコントロールペプチドとの差を認めなかったが、コアのペプチドを用いた場合には、IFN- γ の産生上昇が認められた。以上の結果から、マウスでのHCV粒子免疫により細胞性免疫が誘導されたと考えられた。

3. 培養細胞で作製したHCV粒子精製方法の樹立

限外濾過膜による濃縮・精製後、ベンゾナーゼ処理により、サンプルに含まれる核酸を分解し、CIM Disk DEAEにて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。pHを7.4と6.4の2つの条件で行った結果、pH6.4の条件で、コア蛋白質と夾雑蛋白質の溶出ピークがより分離し、精製度が向上した。この時のコア蛋白質の回収率は59.6%、不純物の除去率は79.3%であった。次に、コア蛋白質のピーク画分をゲル濾過クロマトグラフィーにて展開した。その結果、コア蛋白質はvoid fractionに検出され、回収率は70.3%、不純物の除去率は86.0%であった。上記工程全体のコア蛋白質回収率は38.5%、

不純物除去率は 99.96%であり、これはショ糖密度勾配遠心法による精製のコア蛋白質回収率 30%、不純物除去率 99.0-99.5%と比較して、十分な回収率と除去率が得られていると考えられた。

4. 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、およびHEK293細胞を検討した。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。

そこで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、効率的なHCV増殖が可能なHuh-7.5.1細胞と比べ、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、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の発現量が低いことがわかった。またHEK293細胞では、Entryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoE、さらに複製に関わるmiR-122の発現量が低いことがわかった。

そこで、レンチウイルスによりmiR-122を強制発現させたHEK293細胞に、JFH-1 RNAをトランスフェクションし、HCVの増殖を確認した。その結果、細胞内のコア抗原量が時間経過とともに上昇したことからmiR-122を強制発現させたHEK293細胞ではHCV複製は可能であると考えられた。しかし、複製効率はHuh-7.5.1細胞の1/100程度でワクチン抗原作製に十分な複製活性は得られなかった。

5. リコンビナントE2蛋白質によるHCV感染中和機構の解析

293T細胞由来およびS2細胞由来の精製E2蛋白質をHCVccの感染系に添加し競合的感染阻害活性を検討したところ、293T細胞由来E2蛋白質には感染阻害活性を認めなかったが、S2細胞由来E2蛋白質では50%以上の阻害活性を認めた。さらにこの二種類のE2蛋白質をマウスに免疫して抗体誘導能を確認

した。その結果、E2抗体誘導能にはこの二種類のE2蛋白質間で差を認めなかった。そこで、免疫後のマウス血清および精製IgGによるHCVppおよびHCVcc感染中和活性を検討した。293T細胞由来E2蛋白質で免疫したマウス血清では感染中和活性を検出したが、S2細胞由来E2蛋白質ではほとんど検出できなかった。そこで誘導されたE2抗体のエピトープマッピングを、E2の合成ペプチドを用いて行った。514-554アミノ酸残基領域には、どちらのE2蛋白質による免疫においても抗体が誘導されていたが、C末端側領域の644-694アミノ酸残基領域ではS2細胞由来E2蛋白質免疫のみで抗体が誘導されていた。

6. E型肝炎ウイルスを用いた遺伝子導入システムの構築

感染性のHEVクローンの構造蛋白領域をHCV-IRESとレポーター遺伝子で置換したHEVレポーターレプリコンが細胞内で複製可能であった。このHEVレポーターレプリコンをHEVの構造蛋白質を発現するPLC/PRF/5細胞に導入した。この細胞の培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、構造蛋白は一定の密度のフラクションに検出され、HEV粒子様の構造をとっていると考えられた。上記のフラクションをRNase A処理後にRNAを抽出し、構造・非構造それぞれの領域のRT-PCRを行ったところ、非構造領域のみがPCRで増幅されたことから、この粒子様構造物にはレプリコンRNAが含まれている可能性が示唆された。

7. 日本脳炎ウイルスのトランスパッケージングシステムを用いたワクチン抗原生成系の検討

JEV レプリコンプラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、ウイルスゲノムの複製を確認した。さらに JEV レプリコンプラスミドと C-E 発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、感染性粒子の産生を確認した。

C-E 発現プラスミドと prME 発現プラスミドの比較により、prME 発現プラスミドの方がより多くの E 蛋白質を分泌する事が確認された。そこで prME

発現プラスミドを用い、E蛋白質の立体構造でウイルス粒子の外側に露出すると予想される部位に FLAG Tag 配列を挿入したプラスミドを作製した。これらの prME 発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションすることにより一部のコンストラクトで SVP の分泌が確認され、FLAG Tag 配列を表出している SVP が生成されていると考えられた。

8. TLR3-TICAM-1経路を活性化する新規アジュバントの開発

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 TLR3 依存的な NK 細胞活性化によるがん退縮効果を示した RNA 誘導体 (RNA X) のアジュバント効果の検討のため、CTL 依存的抗腫瘍効果の査定を行った。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た検討の結果、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。ジーンチップ解析の結果、RNA X により誘導される遺伝子は殆ど TLR3-TICAM-1 シグナルに依存していた。また RNA X は、B57BL/6 マウスでの anti-OVA 抗体産生誘導において IgG1 サブクラスを poly(I:C) より強く、IgG2a, IgG2b サブクラスを poly(I:C) と同等に誘導した。

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

HCV/GBV-Bキメラウイルスである HCV-G_{H.CE12} および HCV-G_{H.CE12} の RNA をマーマセット初代培養肝細胞に遺伝子導入したところ、ゲノム RNA の複製が確認出来た。また、HCV-G_{H.CE12} では、細胞培養上清中に HCV コア抗原が検出されたことからウイルス粒子を産生していると考えられた。そこで、この培養上清をマーマセット初代培養肝細胞に接種したところ、RNA 複製および HCV コア抗原が培養上清中で検出可能であった。従って、HCV/GBV-Bキメラウイル

ス HCV-G_{H.CE12} はマーマセット初代培養肝細胞において感染性ウイルスを産生しうる可能性が示唆された。

しかし、HCV/GBV-Bキメラウイルスの増殖評価系として初代肝細胞は実用的ではなく、このキメラウイルスに感受性のある肝細胞株の樹立が必要と考えられた。そこで、パピローマウイルス E6/E7 発現プラスミドをマーマセット初代培養肝細胞に遺伝子導入し、不死化マーマセット肝細胞を樹立した。今後、この不死化肝細胞を用いて HCV/GBV-Bキメラウイルスの増殖の評価を行なう。

D. 考察

3頭のアカゲザルを用いた不活化 HCV 粒子ワクチン投与の実験の結果、Alum をアジュバントとして用いた個体で感染阻害活性を持つ抗体の誘導が確認された。これはマウスでの HCV 粒子ワクチン有効性の結果を支持するものであり、よりヒトに近い霊長類で確認できたということから大きな意義がある。Alum+CpG と MPL+TDM をアジュバントとして用いた2頭のアカゲザルでは、残念ながら中和抗体の誘導は確認できなかった。一般にヒトで用いられているアジュバントである Alum と、Alum に現在開発中の CpG を加えたもの、マウスで中和抗体誘導が可能であった MPL+TDM を用いての比較検討であったが、中和抗体誘導が得られたのは Alum を投与した個体のみであった。今後、さらにより中和抗体誘導が可能なアジュバントを得るため、現在開発中の RNA 誘導体を含め検討を行っていく。

中和抗体誘導が得られなかったもう1つの原因として、投与した体重比抗原量の問題があげられる。中和抗体誘導が得られた個体の体重が 2.1kg であったのに対し、中和抗体誘導が得られなかった個体の体重は 4.0kg と 5.0kg であり、いずれも得られた個体の倍以上であった。今後中和抗体誘導に必要な体重比抗原量の検討を行うため、アカゲザルより体重の少ない小型霊長類であるマーマセットを用いて、中和抗体誘導に必要な体重比抗原量を検討する予定である。

今回、不活化 HCV 粒子ワクチン投与を行なった3頭のアカゲザルでは、血液検査・病理解剖所見ともにワクチン投与に関連した異常はみつかっていない。これらの実験により、霊長類モデルでの HCV 粒子ワクチンの安全性が担保されたものと考えており、引き続き行う他の霊長類モデルでの検討も含め、さらに知見を積み重ねていきたい。

HCV 粒子ワクチン接種マウスでは、細胞性免疫誘導の評価を行っている。HCV 粒子ワクチン接種マウスの脾臓細胞をコアのペプチドで刺激することにより IFN- γ の産生誘導が確認できた。この結果から、マウスモデルでは HCV 粒子ワクチン投与により細胞性免疫が誘導されていると考えられ、今後は霊長類モデルにおいても細胞性免疫誘導の確認を行ないたい。

不活化 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、さらに生成された粒子を効率的に精製する方法の確立が必要となる。今回の検討で、限外濾過膜による濃縮・精製とベンゾナーゼ処理、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせた精製方法を確立し、38.5%のコア蛋白質回収率と 99.96%不純物除去率が得られた。これは、現在アカゲザルに投与している粒子ワクチン抗原精製に用いているショ糖密度勾配遠心法による精製法を凌ぐものであり、十分な回収率と除去率が得られていると考えられた。

また、非癌細胞での HCV 粒子の生成方法の開発にも取り組んだ。これまでワクチン製造細胞の実績が有るいくつかの細胞で検討を行ったが、いずれの細胞でも HCV の増殖は観察できていない。今回の検討で HEK293 細胞に HCV の複製に重要な miR-122 を強制発現させることで HCV の複製が可能になることを見いだしており、今後さらにいくつかの因子を補う事で HCV の効率的な増殖が観察できる可能性がある。

リコンビナント E2 蛋白質による感染中和活性と蛋白免疫による感染中和抗体誘導についても検討した。今回の検討の結果、蛋白質を作成する細胞の種類により感染中和活性と感染中和抗体誘導能

に違いを認め、それぞれの細胞で作製されたこの蛋白質の何らかの構造的な違いがこれらの機能に関与していると考えられた。また、感染中和抗体誘導能の強いリコンビナント E2 蛋白質を作製し、その機序を解析することにより、より有効な HCV ワクチン確立に寄与できる可能性がある。

新たな遺伝子導入システムの樹立についても取り組んだ。治療用ワクチン樹立のためには細胞性免疫の誘導が不可欠であり、細胞性免疫の誘導には CTL エピトープ等のウイルスゲノムの配列を抗原提示細胞に導入する事が有効である。また肝細胞に効率的に外来遺伝子を導入する事ができれば、抗 HCV 作用を持つ機能性核酸などが利用できる。今回の検討で経口感染が可能な HEV をベクターとして用いる事で、肝細胞に外来遺伝子を導入できる可能性が示唆された。さらに検討を進め効率的な遺伝子導入システムを樹立したい。

新規ワクチン抗原の候補として JEV トランスパッケージングシステムを用いた外来ペプチドを表出する JEV 粒子の作製を試みた。E 蛋白質の FLAG Tag 配列の挿入可能部位を探索することにより、ウイルス粒子の外側に FLAG Tag 露出している SVP を作製した。今後、FLAG Tag を粒子表面に持つウイルスを作製し抗 FLAG Tag 抗体でその感染が阻害できることを確認する。さらに HCV の中和エピトープを持つ JEV 粒子の作製も試みる。

また、新規アジュバント開発として RNA 誘導體 (RNA X) のアジュバント効果について検討を行った。この RNA 誘導體はマウスモデルにおいて NK 細胞および CTL 依存的な抗腫瘍効果が確認され、細胞性免疫を効率的に誘導できると考えられた。さらに抗体誘導能についてもマウスモデルで検討を行い、poly(I:C) と同等以上のアジュバント効果がある事を確認した。ジーンチップ解析の結果により、この RNA 誘導體投与により誘導される遺伝子は殆ど TLR3-TICAM-1 シグナルに依存していることが確認され、このアジュバントでは poly(I:C) などと比較し生体投与時の副反応誘導が軽減される可能性が示唆されている。

GBV-B をベースに構造領域を HCV 由来遺伝子に置

換したキメラウイルスがマーモセット初代培養肝細胞で複製可能であることを確認した。コアからE2領域までをHCVに置換したキメラウイルスでは培養上清中にHCVコア抗原が検出され、さらに培養上清の初代肝細胞への接種により接種細胞でのRNA複製が確認できたため、このキメラウイルスはマーモセット初代培養肝細胞で感染性ウイルスを産生しうる可能性が示唆されている。これらの知見はHCVワクチンにより誘導される中和抗体の有効性評価用霊長類モデル確立に向けて有望な結果と考えられた。今後、同時に樹立した不死化マーモセット肝細胞を用い、このキメラウイルスの増殖を確認し、新規HCV感染霊長類モデルの樹立を目指す。

E. 結論

1. 霊長類モデルを用い、HCV不活化粒子ワクチンの有効性と安全性について検討を行った。3頭のアカゲザルを用い、アジュバントを変えて不活化HCV粒子による免疫を行った結果、Alumをアジュバントとして用いた個体で中和抗体の誘導が確認された。また、すべての個体でワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。
2. マウスモデルにおいて、不活化HCV粒子ワクチンの接種により、細胞性免疫の誘導が確認された。
3. 限外濾過膜による濃縮・精製、ベンゾナーゼ処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせて、工業的HCV粒子精製方法を確立した。
4. HCVの複製に重要なmiR-122を強制発現することにより、非癌細胞であるHEK293細胞でHCVの複製が可能となった。
5. ショウジョウバエ由来のS2細胞で作成したリコンビナントE2蛋白質ではHCVの感染阻害活性が可能であった。また、293T細胞で作成したリコンビナントE2蛋白質は、マウスへの接種でHCV感染中和抗体の誘導が可能であった。

6. 経口感染が可能なHEVを用い、新規遺伝子導入システムの構築を試みた。

7. JEVトランスパッケージングシステムを用いた外来ペプチドを表出するJEV粒子の作製を行なった。今後、このシステムを用いたHCVワクチンの可能性について検討を行う。

8. 新規アジュバントの候補となるRNA誘導体の機能解析を行なった。このアジュバントは、細胞性免疫、液性免疫の誘導がpoly(I:C)と同等もしくは同等以上であり、炎症性サイトカイン産生量はpoly(I:C)より少ないため、副反応が少ない有効なアジュバントとして期待できる。

9. HCV感染の評価のための新規動物モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルスとマーモセット初代培養肝細胞を用いた新規感染系の構築を行った。今後、これらの知見をもとに新規HCV感染霊長類モデルの樹立を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Murayama, A., Sugiyama, N., Yoshimura, S., Ishihara-Sugano, M., Masaki, T., Kim, S., Wakita, T., Mishiro, S., and Kato, T. A Subclone of HuH-7 with Enhanced Intracellular Hepatitis C Virus Production and Evasion of Virus Related-Cell Cycle Arrest. PLoS One 7 (12), e52697, 2012.
 - 2) Saeed, M., Gondeau, C., Hmwe, S., Yokokawa, H., Date, T., Suzuki, T., Kato, T., Maurel, P., and Wakita, T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. Gastroenterology 144 (1), 56-e7, 2013.
 - 3) Matsumura, T., Kato, T., Sugiyama, N., Tasaka-Fujita, M., Murayama, A., Masaki, T., Wakita, T., and Imawari, M. 25-hydroxyvitamin D(3) suppresses hepatitis C virus

production. *Hepatology* 56 (4), 1231-1239, 2012.

4) Suzuki, R., Saito, K., Kato, T., Shirakura, M., Akazawa, D., Ishii, K., Aizaki, H., Kanegae, Y., Matsuura, Y., Saito, I., Wakita, T., and Suzuki, T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology* 432 (1), 29-38, 2012.

5) Date, T., Kato, T., Kato, J., Takahashi, H., Morikawa, K., Akazawa, D., Murayama, A., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., and Wakita, T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol* 86 (19), 10805-10820, 2012.

6) Murayama, A., Sugiyama, N., Watashi, K., Masaki, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Mizuochi, T., Wakita, T., and Kato, T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol* 50 (6), 1943-1949, 2012.

7) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T., Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 2013 15(1):45-55.

8) Ando T, Imamura H, Suzuki R., Aizaki H, Watanabe T, Wakita T., Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002561.

9) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol.* 2012 56(5): 308-17.

10) Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H. A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *Journal of Virology* 86, 3944-51, 2012.

11) Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H., Ishida T, Matano T, Kimura A: Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the

primates. *Immunogenetics* 64, 669-678, 2012.

12) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIM5Cyp in Wild-caught *Cynomolgus* Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3, 314, 2012.

13) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H., Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates* 54, 89-98, 2013.

14) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H., Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 56-65, 2013.

15) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H., Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection*, in press.

16) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology*, in press.

17) Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)

18) Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86: 11138-11150 (2012)

19) Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T.,

- Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
- 20) 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*, 42: 248-253 (2012)
- 21) 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*, 53, 219-224 (2012)
- 22) Naito, A. T., T. Sumida, S. Nomura, M-L Liu, T. Higo, K. A. Nakagawa, Okada, T. Sakai, A. A. Hashimoto, Y. Hara, I. Shimizu, W. Zhu, H. Toko, A. Katada, H. Akazawa, T. Oka, J-K. Lee, T. Minamino, T. Nagai, K. Walsh, A. Kikuchi, M. Matsumoto, M. Botto, I. Shiojima, and I. Komuro. 2012. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149(6):1298-1313.
- 23) Azuma, M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Cross-priming for anti-tumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells. *Oncoimmunology* 1: 581-592.
- 24) Seya, T., H. Shime, H. Takaki, M. Azuma, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunology* 1(6): 917-923.
- 25) Seya, T. H. Shime, and M. Matsumoto. 2012. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunology* 1(6): 1000-1001.
- 26) Yamazaki S., A. Maruyama, K. Okada, M. Matsumoto, A. Morita, and T. Seya. 2012. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3+ regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE* 2012; 7(12):e51665.
- 27) Oshiumi H., K. Funami, H. H. Aly, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Jan 5. [Epub ahead of print]
- 28) Toscano F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S-Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J-J. Pin, J-L. Casanova, T. Renno, and S. Lebecque. 2013. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 190(2):764-773.
- 29) Seya T., M. Azuma, and M. Matsumoto. 2013. Targeting TLR3 without RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. (in press) (Review)
- 30) 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
- 31) 石井孝司、脇田隆字 海外におけるA型肝炎集団発生 - わが国への警鐘- 化学療法の領域 28: 984-992 (2012)
- 32) 石井孝司 2010年春季のA型肝炎のdiffuse outbreakの分子疫学的解析 *消化器内科* 54: 233-238 (2012)

2. 学会発表

- 1) Ishii K., Kanda T., Sugiura N., Kiyohara T., Yoshizaki S., Nakamura N., Shimada T., Nakashima K., Tada Y., Yokosuka O., Wakita T. and Noda M. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. June 22-25, 2012. Shanghai, China.
- 2) Wakita T. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) April 16-19, 2012. Sapporo, Japan.
- 3) Wakita T. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza,

Beijing Marriott Hotel City Wall. May 18-19, 2012. Beijing, China.

4) Wakita T. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research. June 21, 2012. Beijing, China.

5) Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Kataoka M., Ami Y., Suzuki Y., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E virus. The 9th Japan-China International Conference of Virology. June 12-13, 2012. Sapporo, Japan.

6) Suzuki R., Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T., Suzuki T. Identification of the signal peptidase complex subunit 1 as a novel host factor that participates in the assembly of hepatitis C virus. The 11th Awaji international forum on infection and immunity. September 11-14, 2012. Awaji, Japan.

7) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R., Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T., Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 11th Awaji international forum on infection and immunity. September 11-14, 2012. Awaji, Japan.

8) Kato T., Matsumura T, Sugiyama N, Murayama A, Wakita T., Imawari M. Anti-Hepatitis C Virus Effect of 25-hydroxyvitamin D3 Targeting Infectious Virus Production. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

9) Y Abe, HH Aly, M Imamura, T Wakita. K Shimotohno, K Chayama, M Hijikata. Thromboxane A2 synthase plays a key role in production of infectious HCV particles, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

10) T Ando, H Aizaki, M Sugiyama, M Mizokami, M Kuroda, T Wakita. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

11) A Muroi, S Takahama, M Arimoto, R Morishita, T

Suzuki, T Wakita. Y Endo, T Sawasaki. Comprehensive screening of host proteins cleaved by HCV protease using wheat cell-free protein synthesis system. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

12) T Wakita. T Date, S Kim, T Kato. Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

13) D Akazawa, M Moriyama, H Yokokawa, N Watanabe, T Date, K Morikawa, H Aizaki, K Ishii, T Kato, N Nakamura, T Wakita. Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Was Effective Both In Vitro and In Vivo. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

14) K Watashi, N Uchida, M Saeed, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting Phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

15) S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

16) M Fukasawa, R Anai, Y shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, T Wakita, J Chiba, K Hanada. Isolation and characterization of a mutant Hepatitis C virus adapted to mouse CD81, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

17) N Watanabe, T Date, HH Aly, H Aizaki, T Wakita. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

18) HH Aly, K Watashi, N Watanabe, M Mizokami, T Kato, T Wakita. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012.

Venice, Italy.

19) HH Aly, K Shimotohno, T Wakita, H Oshiumi, T Seya. HCV particles production from mouse hepatocytes, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

20) A Higashino, K-i Mori, S Suzuki, Y Iwasaki, T Yoshida, A Saito, N Maki, H Akari: An animal model for chimeric virus of hepatitis C virus/GB virus B. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

21) Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

22) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

23) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during Hepatitis C virus egress. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

24) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

25) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

26) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein

and participates in the assembly of the virus through an interaction with E2 and NS2. The 34th Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. October 16-19, 2012. Sapporo, Japan.

27) Aly HH, Suzuki R, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. Overcoming host restriction barriers for HCV infection in mouse. The 34th Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. October 16-19, 2012. Sapporo, Japan.

28) Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Someya Y., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Shirato H. and Narimatsu H. X-ray crystallographic studies on binding specificity of norovirus to Lewis antigens. 4th Asian Communications of Glycobiology and Glyco-technology. October 28-31, 2012. Jeju, Korea.

29) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Mishiro S, Kato T. Efficient hepatitis C virus production associated with enhanced virus assembly and evasion of cell cycle arrest. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9-13, 2012. Boston, MA, USA.

30) Wakita T. Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species of Hepatitis C Virus, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

31) N Watanabe, T Date, H Aizaki, T Wakita. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

32) S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

33) HH Aly, T Wakita. New HCV genotype 4a genotype clone, The 10th JSH Single Topic Conference,

“Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

34) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

35) Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of Hepatitis C virus. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

36) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

37) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during Hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 21-22, 2012. Tokyo, Japan.

38) Seya T, Azuma M, Shime H, Matsumoto M. What immune responses are evoked by selective stimulation of the TLR3/TICAM-1 pathway in vaccination? Keystone Symposia. December 16, 2012. Ottawa, Canada.

39) 村山麻子、三代俊治、脇田隆宇、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの同定と解析. 第19回 肝細胞研究会、2012年6月、札幌.

40) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、脇田隆宇、小嶋聡一. C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- β I型受容体を介したTGF- β シグナルの活性化、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月、金沢.

41) 松本美佐子. Toll-like receptor 3による核酸認識とシグナル伝達. 第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月、札幌.

42) 清原知子、Niroshana Dahanayaka、脇田隆宇、石井孝司. スリランカにおけるA型肝炎の流行(2009-2010年). 第16回日本渡航医学会、2012年7月、大阪

43) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、今村道雄、脇田隆宇、下遠野邦忠、茶山一彰、土方誠. C型肝炎ウイルス(HCV)の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサンA2(TXA2)合成酵素の同定と機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

44) 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、千葉丈、安部良、深澤征義. 高感染能を有するHCV JFH-1適応変異株の性状解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

45) 渡邊則幸、伊達朋子、Hussein Hassan、相崎英樹、脇田隆宇. 異なる細胞を用いて作製したE2タンパク質の中和抗体誘導効果. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

46) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗. HuH-7由来オーバル様細胞におけるHCV感受性の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

47) 下池貴志、野島清子、脇田隆宇、岡田義昭. 血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの不活化の検討. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

48) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇. IL-1およびTNF- α のB型肝炎ウイルス感染阻害効果. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

49) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇. C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.

50) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、

- 松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆宇、相崎英樹. グリチルリチンのC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 51) 原田誠也、西村浩一、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、シカ及びブタのE型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学的解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 52) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆宇. イオン交換クロマトグラフィーを用いたC型肝炎ウイルス粒子精製の検討. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 53) 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、武田直和、脇田隆宇、石井孝司. E型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白C末端52アミノ酸の機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 54) 鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、吉田友教、齊藤暁、明里宏文. GBV-B感染新世界ザルの液性免疫解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 55) 東濃篤徳、森健一、鈴木紗織、岩崎優紀、吉田友教、齋藤暁、榎昇、明里宏文. タマリンを用いたHCV/GBV-Bキメラウイルス感染モデル. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 56) モイメイリン、大松勉、高崎友彦、中村紳一郎、網康至、片貝祐子、須崎百合子、明里宏文、倉根一郎. Role of antibodies in dengue protective immunity and infection during secondary infection of marmosets. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 57) 立松恵、瀬谷司、松本美佐子. ウイルスゲノム由来の一本鎖RNAによるToll-like receptor 3活性化の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 58) 中井正人、Hussein H Aly、松本美佐子、坂本直哉、瀬谷司. B細胞におけるHCV感染・複製. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 59) 岡本将明、押海裕之、松本美佐子、瀬谷司. C型肝炎ウイルスRNAによるI型とIII型インターフェロン産生機構のマウスモデル解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 60) 押海裕之、松本美佐子、瀬谷司. C型肝炎ウイルスが、Ripletユビキチンライゲースを分解しRIG-I依存的なI型インターフェロン産生を抑制するメカニズムの解明. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪.
- 61) 清原知子、脇田隆宇、石井孝司: B型肝炎ワクチン力価測定法の比較: 第16回日本ワクチン学会、2012年11月、横浜.
- 62) Yoshida R, Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Role of Raftlin in Toll-Like Receptor 4-mediated Signaling. 第41日本免疫学会学術集会. 2012年12月、神戸.
- 63) Yokokawa H, Moriyama M, Akazawa D, Nakamura N, Ishii K, Kato T, Wakita T. The purification system of hepatitis C virus particles using ion-exchange chromatography. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月、福岡.
- 64) Kamakura S, Azuma M, Matsumoto M, Seya T. Search for molecules that defines TICAM-1 dependent cross-presentation. 第85回日本生化学会学術集会. 2012年12月、福岡.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

HCV ワクチン用粒子作製を目的とした HCV 複製可能細胞の探索

研究分担者 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

研究要旨：JFH-1 株の発見により、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ワクチン製造に適した細胞を用いてウイルス粒子を作製する必要がある。ワクチン製造細胞として過去に実績のある細胞を用いて HCV 粒子産生能を解析した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）は世界中に多くの感染者が存在し、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存在する。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とされている。

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ため、より効率の良いウイルス産生系が必要である。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。

本研究では、HuH-7 細胞以外の細胞を用いたウイルス粒子産生系について検討した。

B. 研究方法

1. 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、継時的に培養液中と細胞内のコア抗原量を ELISA で測定した。

2. 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、分泌に関わるものが報告