

されている宿主因子について、96 well plate の各 well にそれぞれに特異的な primer、probe を入れ、宿主因子の発現量を測定できるパネルを作製した。細胞から total RNA を抽出し、逆転写して得た cDNA を各 well に入れ、Taqman Gene Expression Assay を行った。それぞれの宿主因子の発現量は内部標準（18S または HPRT1）の何倍かで比較した。

3. miR-122 stable 発現細胞の作製と HCV 複製の検討

miR-122 発現プラスミドを 2 種類の Vero 細胞にトランスフェクションし、薬剤耐性細胞株を得た。それぞれの細胞での miR-122 の発現量を Taqman microRNA assay により測定した。それぞれの細胞に JFH-1 subgenomic replicon RNA をトランスフェクションし、HCV 複製レベルをルシフェラーゼ活性で評価した。

4. Claudin-1、miR-122 を stable に発現する 293T 細胞を用いた検討

293T-CLDN/miR-122 細胞（Fukuhara et. al., 2012）の miR-122 の発現量を Taqman microRNA assay により測定した。また、ApoE、Claudin-1 の発現量を Taqman Gene Expression Assay により測定した。細胞に HCV subgenomic replicon RNA をトランスフェクションし、HCV 複製レベルをルシフェラーゼ活性で評価した。

この細胞に JFH-1 全長 RNA をトランスフェクションし、細胞内、培養上清のコア抗原量、感染性を解析した。感染性ウイルス粒子産生における ApoE の効果を調べるために、ApoE を発現するプラスミド DNA をトランスフェクションし、さらに JFH-1 全長 RNA をトランスフェクションした。細

胞内、培養上清のコア抗原量、感染性を解析した。

5. 宿主因子発現レンチウイルスベクターの作製
miR-122、ApoE、Claudin-1 それぞれの ORF を組み込んだ pLVSIN ベクターを作製し、293T 細胞で packaging させ、1 回感染型レンチウイルスを作製した。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。

6. レンチウイルスによる宿主因子の強制発現の検討

上記で作製したレンチウイルスをそれぞれ moi=1 で polybrene 存在下で HEK293 細胞に感染させた。各細胞は 2 週間培養後、各遺伝子の発現量を測定した。

7. miR-122 を強制発現させた HEK293 細胞における HCV 複製の検討

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、継時的に細胞内のコア抗原量を測定した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1. 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。

2. HCV ライフサイクルに重要な宿主因子発現量の細胞間での比較

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

3. miR-122 stable 発現細胞の作製と HCV 複製の検討

miR-122 を恒常的に発現する Vero 細胞における miR-122 の発現量を Huh-7.5.1 細胞と比較した結果、Vero(ATCC CCL-81)では miR-122 の発現量が Huh-7.5.1 の約 1/100 程度であり、Vero C1008(ATCC CRL-1586)では約 1/10 程度と低値であり、この細胞では HCV レプリコンの複製もみられなかった。

4. Claudin-1,miR-122 を stable に発現する 293T 細胞を用いた検討

293T-CLDN/miR-122 細胞 (Fukuhara et. al.,

2012) に JFH-1 subgenomic replicon RNA を導入すると、Huh-7.5.1 細胞に比べると効率は低い、RNA 複製がみられた。この細胞では miR-122 が Huh-7.5.1 細胞の約 5 倍と高発現していた。この細胞に JFH-1 全長 RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は Huh-7.5.1 細胞と同レベルまで増加するが、培養上清中のコア抗原量は Huh-7.5.1 細胞に比べるとはるかに低く、培養上清の感染性は確認できなかった。ApoE を発現するプラスミド DNA をトランスフェクションし、さらに JFH-1 全長 RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は変化がなかったが、培養上清中のコア抗原量がわずかに上昇し、さらに培養上清の感染性を確認できた。

5. レンチウイルスベクターによる宿主因子の強制発現の検討

HCV 複製、ウイルス産生に必要な宿主因子を細胞に効率よく高発現させるために、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。作製したレンチウイルスを用いてそれぞれ moi=1 で HEK293 細胞に感染させたところ、Claudin-1 は Huh-7.5.1 の約 10 倍の発現量が得られ、miR-122、ApoE では Huh-7.5.1 と同程度の発現量が得られた。

6. miR-122 を強制発現させた HEK293 細胞における HCV 複製の検討

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すると、細胞内のコア抗原量は時間経過とともに上昇することから HEK293 細胞では HCV 複製は可能であった。しかし、複製効率は

Huh-7. 5. 1 細胞の 1/100 程度であった。

D. 考察

HuH-7 細胞以外の培養細胞を用いてワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、ワクチン製造の実績のある HuGK-14 細胞、MRC-5 細胞、HEK293 細胞では JFH-1 の増殖は認めなかった。それぞれの細胞において HCV ライフサイクルに重要な宿主因子の発現を Huh-7. 5. 1. 細胞と比較し、それぞれの細胞において発現量の低い宿主因子を明らかにした。その結果、miR-122、ApoE はいずれの細胞でも共通して発現が低かった。

293T 細胞に miR-122 および Claudin-1 を強制発現させた細胞では、HCV 複製がみられ、その細胞にさらに ApoE を強制発現させることにより、感染性のウイルス産生がみられた。miR-122、ApoE は肝細胞で高発現している宿主因子であることから、これらの因子は HuH-7 以外の細胞で HCV を複製させるのに必須であると考えられた。

非がん細胞である HEK293 細胞でも miR-122 の強制発現により HCV 複製が観察されたが、293T 細胞を用いた場合と比較して効率は低かった。293T-CLDN/miR-122 細胞では HEK293 細胞を用いた場合と比較して miR-122 の発現量のはるかに高いことから、HEK293 細胞を用いた場合でも、miR-122 の発現量をさらに上昇させれば、HCV 複製効率が上がると期待できる。

293T-CLDN/miR-122 細胞では JFH-1 RNA トランスフェクション後の細胞内コア抗原量が Huh-7. 5. 1 細胞と同程度だが、培養上清中のコア抗原量は低く、感染性も低かった。これは、293T 細胞ではウイルス粒子形成、分泌のステップに関わる宿主因子で発現量の足りないものがあることを示しており、他の宿主因子の検討も必要かも

しれない。

来年度は、HEK293 細胞で miR-122 を高発現させ、さらに ApoE を発現させることで、ウイルス産生能を評価し、さらに、他の細胞でもこれらの宿主因子を強制発現させ、JFH-1 RNA 導入後のゲノム複製、ウイルス産生について検討する予定である。

E. 結論

HuGK-14 細胞、MRC-5 細胞、HEK293 細胞では JFH-1 の増殖は認めなかった。293T 細胞に miR-122 および Claudin-1 を強制発現させた細胞では、HCV 複製がみられ、さらに ApoE を強制発現させることにより、感染性のウイルス産生がみられた。非がん細胞である HEK293 細胞ではレンチウイルスベクターを用いて miR-122 を発現させると HCV 複製が見られた。

F. 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、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.

4) 藤田めぐみ、脇田隆字、加藤孝宣. HCV genotype 1b 株キメラウイルスを用いた HCV core 領域アミノ酸 70/91 変異株の解析. ワークショップ 18: C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略 第48回日本肝臓学会総会、2012年6月、金沢.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

感染中和抗体と感染中和機構の解析

研究分担者 脇田 隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 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（384 から 714 アミノ酸

残基、C末端の膜貫通領域は欠損）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 株による HCVcc 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。

（倫理面への配慮）

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

個人情報情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. リコンビナント E2 蛋白質による HCV 感染中和機構の解析

JFH-1 株由来のウイルスゲノム配列をもとにして、C末端の膜貫通領域を欠損した E2 蛋白質を 293T 細胞および S2 細胞で発現させた。E2 蛋白質は主として培養上清に分泌した。上清中の E2 蛋白質をアフィニティ精製により回収した。精製 E2 蛋白質の純度は 90%以上であることを SDS-PAGE および銀染色により確認した。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すると、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 μ g/ml の濃度で 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。各 E2 蛋白質を固相化した ELISA により、免疫後のマウス血清中に E2 抗体の上昇を確認できた。E2 抗体誘導能には二種類の E2 蛋白質間で差は無かった。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。合成ペプチドにより E2 抗体のエピトープマッピングを試みた。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た。

E2 蛋白質の超可変領域 (HVR) は HCV の感染性

に重要であると考えられている。そこで、この研究で観察できた感染中和の機構における HVR の関与を検討した。HVR を欠損した E2 蛋白質を S2 細胞で作成してその感染中和活性を解析したところ、野生型 E2 蛋白質と比較して感染中和活性が極めて弱いことが明らかとなった。この結果から HVR は E2 蛋白質による競合的な感染阻害機構に重要であると考えられた。

D. 考察

昨年度の研究で HCV の全粒子をマウスに免疫するとリコンビナント蛋白質による免疫した場合よりも効率よく感染中和活性が誘導できることを観察した。今年度はリコンビナント E2 蛋白質自身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検討した。興味深いことに蛋白質を作成する細胞の種類により感染中和活性の誘導に大きな違いがあることが明らかとなった。E2 蛋白質の結晶構造が明らかでないため、HCV の正確な感染中和機構は不明である。しかし、本研究で見いだした感染中和活性および感染融和抗体誘導能の異なるリコンビナント E2 蛋白質を詳細に検討することによりその機構解析を進めることができると考えられる。また、感染中和抗体誘導能の強いリコンビナント E2 蛋白質を作製することにより、より有効な HCV ワクチン開発につながることが期待できる。

HCV は世界中で 1.7 億人にのぼる感染者が存在し、肝細胞癌に至る重大な感染症である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンも期待されている。HCV ワクチンが開発さ

れ、HCVの新たな予防法および治療法が開発されれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる。また、予防用及び治療用ワクチンを世界に先駆けて開発することができればHCVキャリア率の高い国々への国際協力が可能となる。

E. 結論

1. リコンビナント E2 蛋白質による感染中和活性および感染中和抗体誘導能を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: 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.
- 2: Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology.* 2013 144(1):56-58.e7.
- 3: Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol.* 2012 86(19):10805-20.
- 4: Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology.* 2012 432(1):29-38.

5: 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.

6: 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.

7: Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. *J Virol.* 2012 86(4):2143-52.

2. 学会発表および講演など

1. 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、ホテル日航金沢、(2012, 6.7-8)
2. 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、1回感染性trans-packaging型C型肝炎ウイルス粒子を用いたエンドサイトーシス経路の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
3. 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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
4. 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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
5. 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
6. 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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
7. 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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
8. 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、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)
9. T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4.16-19)
10. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5.18-19)
11. T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6.21)
12. T Wakita. 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“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11.21-22)
13. Noriyuki Watanabe, Tomoko Date, Hideki 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“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11.21-22)
14. R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. 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“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11.21-22)
15. M Matsuda, R Suzuki, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita. 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“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11.21-22)
16. Sulyi Kim, Tomoko Date, Hideki Aizaki, Haruo

- 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“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
17. Hussein H Aly Ibrahim, T Wakita. New HCV genotype 4a genotype clone, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
18. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. 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“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
19. Y Abe, A H. Hussein, 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
20. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
21. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
22. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
23. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
24. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
25. Y Matsumoto, N Watanabe, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
26. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

27. 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
28. R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, H Aizaki, Y Matsuura, T Suzuki, T Wakita. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitic C virus, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
29. N Watanabe, T Date, HH Aly Aizaki, T Wakita. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
30. A H Hussein, 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. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
31. A H Hussein, K Shimotohno, T Wakita, H Oshiumi, T Seya. HCV particles production from mouse hepatocytes, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

なし

HCV 予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立

研究分担者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター 教授
研究協力者 東濃 篤徳 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
研究協力者 鈴木 紗織 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
研究協力者 齋藤 暁 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
研究協力者 吉田 友教 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
研究協力者 森 健一 先端生命科学研究所
研究協力者 槇 昇 先端生命科学研究所

研究要旨：C 型肝炎ウイルスワクチンの実用化には、モデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。今年度は GBV-B をベースとして E1, E2 領域を HCV 由来遺伝子に置換した HCV-G_{H.E12} および Core, E1, E2 領域を置換した HCV-G_{H.CE12} を構築した。これらキメラウイルスはマーモセット初代肝細胞において感染性ウイルスを産生しうることが示唆され、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。他方、不死化マーモセット肝細胞株の樹立やレンチウイルスベクターによる HCVpp の構築、マーモセット細胞性免疫応答の解析技術の確立などを推進した。これらの成果より、HCV ワクチンの有効性評価のための基盤技術確立に向け着実に進展した。

A. 研究目的

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

近年、脇田らの JFH-1 株の発見により HCV の培養が可能となった (Wakita et al., Nature Medicine, 2005, 11, 791-796)。大量精製した HCV 粒子を不活化することで HCV の予防・治療ワクチンとしての実用化を目指しているが、そのた

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

この問題を克服する方法の 1 つとして GBV-B/新世界ザル-サロゲート感染モデルの応用が挙げられる。GBV-B はタマリンから単離され、HCV と同じくヘパチウイルスとして分類されており、新世界ザルに感染性を示し、急性および慢性 C 型肝炎様病態を引き起こす。我々が行なってきたマーモセットへの GBV-B 接種実験では 4 年以上の長期

に渡り、ウイルス血症および ALT 値の上昇、肝線維化を伴う慢性 C 型型肝炎を呈することを世界で初めて見出した。本研究では HCV ワクチン評価に必要な慢性 C 型肝炎のサロゲート病態解析に用いる霊長類モデルとして HCV/GBV-B キメラウイルス感染マーマセットモデルの確立を目指し、キメラウイルスの構築および複製能の評価を行った。またこれと平行して、HCV ワクチンの有効性評価のための基盤技術の確立を進めた。

B. 研究方法

キメラウイルスクローン作成においては、GBV-B をベースとして Core および E1, E2 領域を GBV-B の相当する遺伝子領域に置換した HCV-G である HCV-G_{H, E1, E2} 及び 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肝細胞に遺伝子導入し、その複製増殖能を評価した。

不死化マーマセット肝細胞株の樹立においては、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肝細胞に遺伝子導入した後、継代培養を行った。

HCVpp の構築には、self-inactivated (SIN) タイプのレンチウイルスベクターによる HCVpp システムを導入した。感染価の評価インジケータには GFP の改良蛋白である Venus を用いた。

GBV-B/マーマセット感染実験においては、 10^3 - 10^5 RNA copies 相当の GBV-B を経静脈にて接種した後、ケタミン麻酔下で定期的に採血し、血算・生化学検査、血漿中ウイルス量および細胞性免疫応答等の解析を行った。すべての動物実験は、倫理面を含めて京都大学霊長類研究所サル委員会および医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) HCV/GBV-B キメラウイルスに関する研究

本研究において昨年度までに、HCV をベースとして Core の一部の領域、および E1, E2 領域を GBV-B の相当する遺伝子領域に置換した HCV-G (c156-E12/wild) を構築した。このキメラウイルスクローンはマーマセット生体内で低レベルながら長期に渡りウイルス血漿が検出された。今年度は、HCV ワクチンにより誘導される中和抗体の評価系作出を目指し、GBV-B をベースとして E1, E2 領域を HCV 由来遺伝子に置換した HCV-G_{H, E1, E2} および Core, E1, E2 領域を置換した HCV-G_{H, CE12} を構築した。これらのクローン RNA をマーマセット初代肝細胞にトランスフェクトしたところ、ある程度の RNA 複製が確認出来た。また HCV-G_{H, CE12} においては、細胞培養上清中に HCVCORE 蛋白が検出されたことからウイルス粒子産生が示唆された。そこで、この培養上清をマーマセット初代肝細胞に添加したところ、RNA 複製および HCVCORE 蛋白が培養上清中において検出された。このことから、上記キメラクローンはマーマセット初代肝細胞において感染性ウイルスを産生しうることが示唆された。

(2) HCV ワクチンの評価系確立のための基礎的研究

・不死化マーマセット肝細胞株の樹立

HCV/GBV-B 複製増殖能の *in vitro* 評価系として初代肝細胞は実用的ではないことから、GBV-B および HCV/GBV-B に感受性のある肝細胞株の樹立が重要となる。そこで我々は HCV 感受性不死化肝細胞樹立で実績のあるパピローマウイルス E6/E7 を用いて、不死化マーマセット肝細胞株の

樹立を試みた。すなわちパピローマウイルス E6/E7 発現プラスミドをマーモセット初代肝細胞に遺伝子導入し培養したところ、不死化細胞が樹立出来た。現在、本細胞株のウイルス感受性等の特性について検討を行っている。

- ・レンチウイルスベクターによる HCVpp の構築
マーモセットに高い感染性を示す HCV/GBV-B キメラウイルス構築に向けて、サル肝細胞に発現する HCV リセプターオルソログ分子の HCV E1/E2 への親和性を定量的に解析することが必要である。そこで、Venus をインジケーターとする self-inactivated (SIN) タイプのレンチウイルスベクターによる HCVpp システムを構築した。本方法は P2 で操作可能であり、ウイルスの調整も容易であること、ELISA 法により高感度でのウイルス定量が可能であることなど、有用性が高い。現在、本法を用いて HCVpp の各種サル細胞への感染性を比較検討している。

- ・慢性肝炎モデルのための基盤研究

サル類で感染増殖能の高い HCV/GBV-B キメラウイルスが構築された場合、次にキメラウイルスの長期持続感染性や病原性の獲得が課題となる。長期持続感染性や病原性を安定して発現可能な条件の確立を念頭に、本研究では低ウイルス感染価の GBV-B 感染マーモセットにおけるウイルス動態および獲得免疫応答を検討した。これまでの結果では、 10^3 - 10^5 RNA copies / 頭での GBV-B 感染実験を行ったところ、長期持続感染を呈した例に類似した低ウイルスロードを示すことが確認された。現在引き続きウイルス動態および獲得免疫応答について経過観察を行っている。

- ・マーモセットでの細胞性免疫応答に関する解析
マーモセットへの HCV/GBV-B キメラウイルス

感染時における細胞性免疫応答の評価システム確立は、ワクチンの有効性検証のためにも不可欠である。本研究では、マーモセット CD マーカーに交差反応する各種抗 CD マーカー抗体を用いたマルチカラーフローサイトメトリー法により、GBV-B 感染マーモセットにおける細胞性免疫応答の解析を行った。興味深いことに、比較的高いレベルのウイルスロード ($\sim 10^7$ copies/ml) を 2 ヶ月程度維持した GBV-B 感染マーモセット個体において、セントラル/イフェクターメモリー T 細胞の誘導が殆ど認められなかった。

D. 考察

GBV-B をベースとして Core 領域もしくは E1, E2 領域を HCV の相当する遺伝子領域に置換した HCV-G_{H, E12}、HCV-G_{H, CE12} は抗 HCV 中和抗体誘導型ワクチンの評価モデルとして用いることが可能となることから、特に本研究での不活化 HCV ワクチン有効性評価に特に重要となる。今後さらに、ウイルス感染増殖性に関する詳細な解析を進めたい。本研究では、HCV/GBV-B 複製増殖能の *in vitro* 評価系としてマーモセット初代肝細胞を用いてきた。しかし初代肝細胞は採取、保存も容易ではない上に保存細胞のロットにより GBV-B 増殖効率に差があるなど実用的ではないことから、GBV-B, HCV/GBV-B 感染を許容する不死化マーモセット肝細胞株の樹立が不可欠であった。本研究では HCV 感受性不死化肝細胞樹立で実績のあるパピローマウイルス E6/E7 を用いることにより、不死化マーモセット肝細胞株の樹立に成功した。今後、同細胞株のウイルス感受性解析の結果が待たれるところである。

以前我々が行った GBV-B 感染マーモセット感

感染実験では、HCV 感染者と同様に長期持続感染から慢性肝炎へと移行した例と初期クリアランスされる例が認められた。HCV/GBV-B キメラウイルスにおいて、そのベースとなる遺伝子は GBV-B 由来であることから、その長期持続感染性や病原性を安定して発現可能な条件の確立が求められる。これまでの報告においては高感染価の GBV-B (10^3 - 10^5 RNA copies/頭) をサルに接種するのが一般的であったが、この際に高いウイルスロードにより生じる強い獲得免疫応答を誘導する結果、初期クリアランスされることが我々の研究結果より示唆された。従って、早期のウイルス増殖を低レベルに制御することが獲得免疫の回避に繋がる可能性が考えられる。本研究では、低ウイルス感染価によるマーモセットへの GBV-B 感染実験を行ったところ、長期持続感染を呈した例に類似した低ウイルスロードを示すことが確認された。これらの感染ザルにおいて、果たして長期持続感染を呈した例と同様に抗ウイルス免疫応答の遅延、抑制が生じるのか興味深い。

本研究において、マーモセットへの HCV/GBV-B キメラウイルス感染時における細胞性免疫応答の評価システム確立を念頭に、GBV-B 感染マーモセットにおける細胞性免疫応答の解析を行った。その結果、比較的高いレベルのウイルス血症を2ヶ月程度持続しているにも関わらず、T細胞の活性化が殆ど認められなかった。最近の我々の研究において、デングウイルス感染マーモセットでは同程度の血中ウイルスRNA値を示すものの1週間ほどでクリアランスされることが確認されている。この際、ウイルス血症の低下に伴い劇的なT細胞の活性化が生じることから、GBV-Bとデングウイルスの間には細胞性免疫応答への抑制機能

に顕著な違いがあることが強く示唆された。このことは、ヘパチウイルス属に分類される HCV, GBV-B の持続感染性の機序を考える上で重要な知見と考えられた。

E. 結論

今年度新たに構築した HCV E1, E2 領域を含む2種類のキメラウイルス HCV-G_{H, E12} および HCV-G_{H, CE12} はマーモセット初代肝細胞において感染性ウイルスを産生しうることが示唆され、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。また不死化マーモセット肝細胞株の樹立やレンチウイルスベクターによる HCVpp の構築、マーモセット細胞性免疫応答の解析技術の確立などを推進した。これらの成果より、HCV ワクチンの有効性評価のための基盤技術確立に向け着実に進展した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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 TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). **Frontiers in Microbiology** 3, 314, 2012.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

2. 学会発表

1) Atsunori Higashino, Ken-ichi Mori, Saori Suzuki, Yuki Iwasaki, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Noboru Maki, Hirofumi Akari: An animal model for chimeric virus of hepatitis C virus/GB virus B. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 5-9, 2012, Venice.

2) 鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、吉田友教、齋藤暁、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 (大阪) 平成 24 年 11 月 13-15 日

3) 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 (大阪) 平成 24 年 11 月 13-15 日

4) 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 (大阪) 平成 24 年 11 月 13-15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

E 型肝炎ウイルスをベクターとする外来性遺伝子発現の検討

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
研究協力者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、多量のウイルスを精製するのは技術的な困難が伴う。そこで、同じ肝炎ウイルスである E 型肝炎ウイルス（HEV）をベクターとして用いることができるかどうかの検討を行った。HEV 感染性クローンに外来遺伝子を組み込んで発現させることに成功し、HEV の VLP に RNA を包埋させることも示唆された。

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

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス（HEV）が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立され、感染性の HEV cDNA クローンの構築にも成功している。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。本研究では、HEV 構造蛋白を外来性遺伝子と置き換えた RNA を HEV VLP に包埋させ、一過性の感染性粒子として応用することができるかどうかについて検討を行った

B. 研究方法

感染性の HEV クローン 83-2（図 1）の構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換した cDNA を作成し（図 2）、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA を作成した。本 RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポ

レーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコン RNA を導入することで、構造蛋白中にレプリコン RNA が包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

C. 研究結果

感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入しなかった場合にはレプリコンは機能しなかった。また、Luciferase をレポーターとして用いた場合には HCV IRES を持つ場合にも機能しなかったが、サイズが小さい SecNanoLuc（分泌型の Luciferase）をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した（図 3～5）。

構造蛋白（ORF2）を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作成した（図 6）。その中には構造蛋白の分泌が比較的良好なクローンがあった。これらのクローン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（図 7）、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。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、本フラクションの RNA は RNase A 抵抗性であり、非構造領域のみが PCR で増幅されたことから、レプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された（図 8）。

D. 考察

本研究で構築した HEV レプリコンでは、ORF2 をコードし発現する subgenomic RNA が作られていない可能性がある。しかしながら IRES を導入した場合は、genomic RNA が dicistronic に機能することによりレポーター遺伝子の翻訳が可能となったのではないかと推察される。Luciferase の場合は IRES を導入しても機能しなかったが、Neomycin との fusion protein である LucNeo が約 2.5kBp とサイズが大きいことが原因であるかもしれない。Luciferase 遺伝子として SecNanoLuc を使用した場合にはレポーター遺伝子が機能しているが、これは約 600Bp 程度と小さいためである可能性がある。

今後、上記のレプリコンが包埋された可能性のある画分について、電子顕微鏡での観察と感染性の有無の確認を行う予定である。感染性が確認できれば、本粒子はトランスパッケージ型の 1 回のみ感染性の粒子として使用できると考えられる。HCV の蛋白を組み込むことで、HCV 蛋白を発現する粒子を経口的に投与することも可能となり、免疫を誘導することができれば経口投与型の C 型、E 型ともに感染防御できるワクチンの可能性がある。

E. 結論

HEV をベクターとして用いた外来遺伝子の発現の構築に成功した。また、PLC/PRF/5 細胞に構造遺伝子発現プラスミドと HEV レプリコン RNA を導入することにより、レプリコンを包埋した粒子を取得できる可能性が示唆された。今後本粒子の免疫誘導能の検討を行い、ワクチンとしての可能性を追究する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)

3. Suzuki R., Saito K., 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 the study of the virus assembly and infection. *Virology*, 432: 29-38 (2012)
4. 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)
5. 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)
6. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
7. 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)
8. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
9. 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)
10. 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. 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 Glycotechnology. Jeju, Korea, October 28-31, 2012
2. 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. Shanghai, China. June 22-25, 2012
3. Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E virus. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan, June 12-13, 2012
4. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Taipei, Taiwan, February 16-19, 2012.
5. 清原知子、脇田隆字、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、平成24年11月、横浜

Cloning and RNA synthesis of HEV 83-2

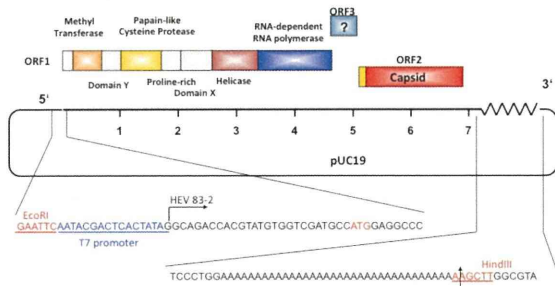


図1

Time Course of Luciferase Expression

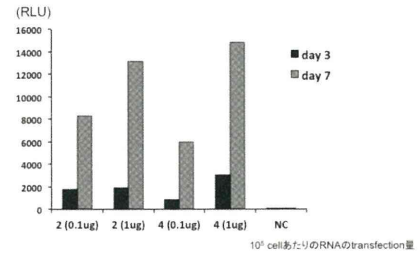


図5

Construction of HEV replicon

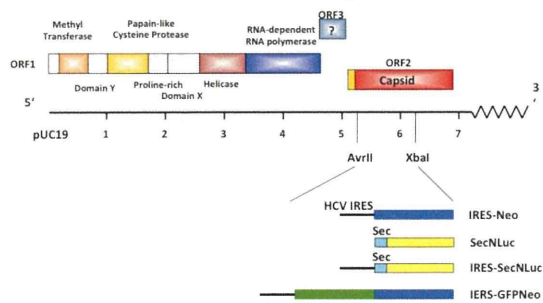


図2

Trans-encapsidation of HEV replicon RNA

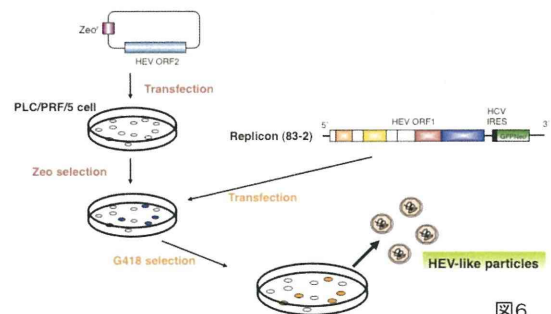


図6

Fluorescence of IRES GFPNeo-transfected cells

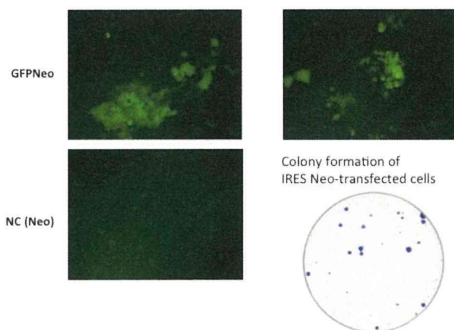


図3

Purification methods of VLPs

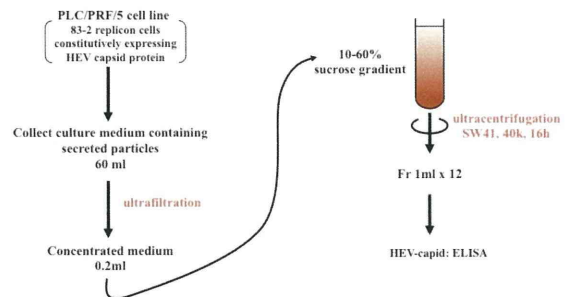


図7

Secretion of NanoLuc from HEV Replicon RNA-Transfected Cells

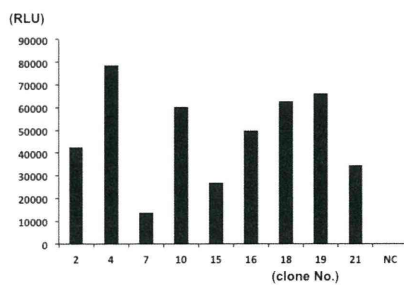


図4

Sucrose Gradient Analysis of HEV VLPs

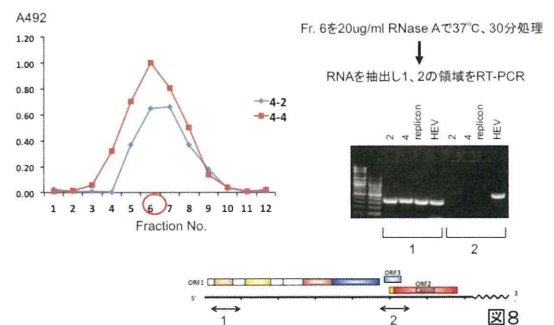


図8

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

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

研究要旨：ウイルスのリバースジェネティクス系を用いた1回感染性ウイルス粒子産生系は、ウイルス生活環の解明など基礎研究に有用であるばかりでなく、より安全な次世代ワクチン開発への応用も期待されている。C型肝炎ウイルスのワクチンの為の抗原を効率良く大量に調製する方法として、本研究では、日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型粒子の産生系を構築した。さらにこのウイルス粒子上に、粒子形成や細胞外への分泌を阻害する事なく外来遺伝子由来のペプチドを提示可能な部位の探索を行った。本結果は、増殖効率が不十分なウイルスの新たな抗原産生手段となる事が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界で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、肝臓癌へと移行し、肝臓癌による死亡者数は国内で年間3万人を超えている。有効な新規治療薬が開発され治療成績も改善されつつあるが、難治療の症例も依然として存在する。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者や薬物常用者等のハイリスク者に向けた予防的ワクチンの開発が望まれている。

近年、JFH-1株を用いたHCVの培養細胞増殖系が確立され、組換えウイルスの大量培養が可能となった。これらを抗原としたワクチン開発の為の培養法、精製法、免疫法等の研究が進められている。しかしながら培養細胞を用いたウイルスの産生効率は、従来のワクチンに比べても十分とは言えない状況である。

トランスパッケージング型HCV粒子は感染が1回のみで、感染細胞から感染性ウイルスが産生されないことから通常のウイルスに比べて安全性が高く、また宿主に感染させた場合には液性免疫だけでなく細胞性免疫の誘導も期待できる。我々はこれまでに、トランスパッケージング型HCV粒子産生系を構築し、ウイルスの様々な領域に変異を導入する事で粒子生

成効率を高める事に成功した。しかしながら、それでも依然として十分なウイルス抗原を得る事は困難である事から、本研究ではウイルスの増殖が良く、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、有効性、さらに生産手段が確立されている日本脳炎ウイルス（JEV）を用いて、トランスパッケージング型粒子の産生系の構築を試み、さらにこの粒子上に外来遺伝子由来のペプチドを提示させる事が可能かどうかの検討を行った。

B. 研究方法

JEV Nakayama 株由来の C-E および prME 領域の cDNA を CAG プロモーター下流に挿入した構造領域発現プラスミドを構築した。JEV Nakayama 株由来のレプリコン cDNA は CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入し、レプリコンプラスミドを作製した。ウイルス RNA の複製は、プラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、抗 dsRNA 抗体を用いた細胞染色により確認した。トランスパッケージング型 JEV 粒子の産生は、レプリコンプラスミドおよび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 Vero 細胞に感染させ、2 日後に抗 NS1 抗体による染色を行う事により確認した。キャプシド蛋白質とウイルスゲノムを含まない subviral particle