

(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 蛋白質中に外来遺伝子が挿入可能な部位を探索する為に、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。

(倫理面の配慮)

本研究で使用するヒト由来の細胞は過去に樹立された株であり、倫理面での問題は無いと考えられる。その他のヒト材料は使用していない。また、動物実験は行っていない。

C. 研究結果

1. 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

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、2 日後に細胞を固定し、抗 dsRNA 抗体を用いて細胞を染色すると陽性細胞が認められた事から、レプリコンプラスミドをトランスフェクションした細胞内でウイルスゲノムの複製が起こっている事が示唆された。次に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すると、3 日目の培養上清中に約 10^6 IU/ml の感染性粒子の産生が確認された。C-E 発現プラスミドを、C 発現プラスミドおよび prME 発現プラスミドの 2 つプラスミドに分割して発現させた場合でも、同様の結果が得られた。このようにして得られたウイルスを naive な Vero 細胞に感染させても、その感染細胞の培養上清中にはウイルス感染価が認められない事から、得られたウイルスは 1 回のみ感染性である事が確認された。

2. JEV 粒子上への外来抗原由来ペプチドの挿入

C-E 発現プラスミドおよび prME 発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、培養上清の E 蛋白質を検出したところ、C-E 発現プラスミドよりも prME 発現プラスミドの方が、より多くの E 蛋白質を分泌した。そこで prME 発現プラスミドを用い、E 蛋白質の立体構造からウイルス粒子の外側

に露出され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。FLAG tag 配列を挿入した 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と、全てのコンストラクトにおいて細胞内での発現が認められた。培養上清中に分泌された E 蛋白質を検出したところ、ほとんどがタグ配列の挿入により E 抗原の分泌が抑制されたが、一部でタグ配列の挿入にも関わらず SVP が上清に分泌された。

D. 考察

JEV のレプリコン cDNA を CMV プロモーター下流に挿入する事により、in vitro で RNA 合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入して JEV ゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1 回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。トランジェントトランスフェクションによって得られたウイルス感染価は、HCV の 1 回感染性粒子よりも高く、またより早い時間で得られた。しかしながら、レプリコンの適応変異の導入や、構造蛋白質発現細胞株の樹立を行う等により、さらに大量のウイルス抗原を得る事が期待される。

JEV prME 発現プラスミドを用い、タグ配列の挿入を許容する部位が同定された。今後、このような外来抗原が挿入された感染性ウイルスの産生が可能かどうか、またそのようなウイルス抗原を免疫した時に、外来抗原に反応する抗体が誘導されるかどうかについて検討する必要がある。

今回 E 蛋白質に挿入した外来抗原の FLAG tag は 8 アミノ酸であるが、この部位にどのくらいのサイズの外来遺伝子の挿入が許容されるかについても、今後の検討が必要である。既に HCV の中和エピトープが報告されているが、このエピトープ配列を挿入させた 1 回感染性 JEV 粒子についての解析を行う予定である。

E. 結論

プラスミドトランスフェクションによる1回感染性 JEV 粒子産生系を確立した。また JEV SVP 上に、ウイルスの粒子形成、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ない、同定した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 432:29-38, 2012
- 2) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol*. 50:1943-9, 2012
- 3) 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*. 8:e1002561, 2012)

2. 学会発表

- 1) 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. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.
- 2) 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. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.

- 3) 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. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 4) 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. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 5) 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. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 6) 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. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 7) 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. Venice, Italy 2012.10.5-9.
- 8) 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. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.
- 9) 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. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.

- 10) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆字、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. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 11) 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、脇田隆字. IL-1 および TNF- α の B 型肝炎ウイルス感染阻害効果. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 12) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字. 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. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 13) 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、脇田隆字、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. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 14) 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". Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 15) 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". Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 16) 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". Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- 17) 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". Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

C型肝炎ウイルスの大量精製法改良、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

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

研究要旨：我々は不活化した培養細胞由来HCV粒子を免疫抗原とするHCVワクチンの開発を目指している。本研究では、1. 培養細胞で作製したHCV粒子精製法の改良、2. HCV粒子で免疫したアカゲザルの血中IgGのHCV感染阻害活性の解析、3. 細胞性免疫評価モデルの作製について検討した。その結果、HCV粒子精製法については、シヨ糖密度勾配遠心法の代替法として、CIM Disk DEAE カラムが効果的であることを見出し、大量精製が可能であることが示唆された。アカゲザルの血中IgGのHCV感染阻害活性の解析では、感染阻害抗体の誘導が認められるが、投与個体により感染阻害IgGの誘導能が異なることがわかった。アジュバントの差異、体重比抗原量の差異による抗体誘導能を検討する必要がある。細胞性免疫評価モデルの作製については、HCV粒子ワクチン接種マウスの脾臓細胞をCoreタンパク質由来の4種類の混合ペプチドで刺激するとIFN- γ が産生誘導されることが確認された。

A. 研究目的

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

さらに本研究では、これまでの成果を踏まえ、ワクチンの実用化を目的として、HCV粒子の大量精製法の開発、霊長類モデルとしてのアカゲザルにおけるHCVワクチンの免疫原性と安全性を評価するとともに、ヒトに投与できる可能性のあるアジュバントの免疫誘導能を検討してきた。24年度は、これらの研究をより深化させることに主眼を置き、1. 培養細胞で作製したHCV粒子性製法の改良では、大量精

製に適した精製方法として、密度勾配遠心方に代わるクロマトグラフィーを用いたHCV粒子の精製方法の改良点について、2. HCV粒子免疫したアカゲザルの血中IgGのHCVの感染阻害活性の解析では、3種類の投与条件の異なるアカゲザルから得たIgGの感染阻害活性の比較について、3. 細胞性免疫評価モデルの作製では、HCV粒子ワクチン接種マウスを用いた細胞性免疫誘導の評価系の作製について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 培養細胞で作製した HCV 粒子精製法の改良

(1) 感染性 HCV の大量培養

5×10^5 個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV (J6/JFH1 : J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a) 濃縮液を multiplicity of infection (MOI) が 0.2 となるように $500 \mu\text{L}$ の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、 37°C でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、培養した。サブコンフルエントに達した時に、 225 cm^2 フラスコ (Corning 社) に継代培養し、さらにセルスタック

(5 段、Corning 社) に継代培養した。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM (DMEM-2) に培養液交換した。その 3 日後に培養上清を回収し、650 mL の DMEM-2 培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、DMEM-2 添加を行い、さらに 2 日後、培養液を回収する操作を行い、計 650 mL×3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μ m フィルター濾過を行い、使用するまで -80°C で保存した。

(2) 限外濾過膜による濃縮・精製

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む 21 L の培養上清をホローファイバー UFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 倍濃縮した。その後、等量の PBS を添加してダイアフィルトレーションを 5 回行った。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液とした。

(3) ベンゾナーゼ処理

ベンゾナーゼ処理は、限外濾過精製産物にベンゾナーゼ (250 U/ μ L, Merck 社) を添加し、ローテーターにチューブをセットして転倒混和しながら 4 °C で 16 hr インキュベーションした。ベンゾナーゼ処理後のサンプルは遠心して沈殿物を除き、陰イオン交換カラムに添加した。

(4) 陰イオン交換クロマトグラフィー

HPLC は AKTA Explorer 10s システム (GE healthcare 社) を用いて実施した。陰イオン交換カラムは CIM Disk DEAE (BIA separations 社) を用いた。使用したバッファーは、pH 7.4 または pH6.4 の 20 mM Tris-HCl (buffer A)、20 mM Tris-HCl, 2 M NaCl (buffer B) であり、2 M NaCl を含む buffer B で濃度勾配を負荷した。流速は 4 mL/min で、1mL のサイズで分画した。

(5) ゲル濾過クロマトグラフィー

担体には 250 mL の Sepharose 6FF (GE healthcare 社) を用い、20 mM Tris-HCl (pH6.4) にて、3mL/min の流速で展開した。

(6) HCV Core タンパク質の ELISA

精製後の各フラクションに含まれる HCV の定量は、「オーソ HCV 抗原 ELISA テスト」(栄研化学) を用い実施した。検体希釈液にて希釈したクロマトグラフィーによる分画サンプル 100 μ L に前処理液を 50 μ L 添加し、よく混和した後に 60 °C で 30 分間加熱した。抗 HCV Core 抗体固相化プレートに反応液を 100 μ L/well で加え、前処理したサンプルを 100 μ L 加えた。プレートミキサーでよく混和しながら室温にて 1 時間インキュベーションし、その後ウエル内の液を廃棄して洗浄液で 6 回ウェルを洗浄した。標準抗体液を 200 μ L/well で添加し、室温にて 30 分間インキュベーションした。ウエル内の溶液を捨て、洗浄液にて 6 回洗浄し、基質液を 200 μ L/well で添加して遮光下で 30 分間反応させた。30 分後に反応停止液を 50 μ L 加えてよく混ぜ、492 nm の吸光度を測定した。

(7) タンパク質定量測定 (Bradford 法)

タンパク質の測定は protein assay reagent (Bio-rad 社) を用いて、Bradford 法で実施した。高濃度サンプル (40~1000 μ g) の場合は 200 μ L の protein assay reagent にサンプルを 10 μ L、低濃度サンプル (1~40 μ g) の場合は 40 μ L の protein assay reagent にサンプルを 160 μ L 添加し、595 nm の吸光度を測定してサンプルのタンパク質濃度を求めた。スタンダードとして BSA を用いた。

2. HCV 粒子免疫したアカゲザルの血中 IgG の HCV 感染阻害活性の解析

(1) 精製 HCV 粒子のアカゲザルへの免疫

HCV 抗原は、J6/JFH1 培養上清から限外ろ過膜およびシヨ糖密度勾配遠心により精製した HCV を使用した。1 回の投与量は、1 匹あたり 100pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV とした。アジュバントには、Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社)、CpG (Mod87; 東レ)、および MPL+TDM (Sigma Adjuvant System #S6322; Sigma 社) を用い、3 匹のアカゲザルに、それぞれ Alum、Alum+CpG および MPL+TDM を使用した。アカゲザルへの投与は京都大

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

3 匹のアカゲザルへの投与条件を下記表にまとめた。

Mm1938♀	中国産	2.1 kg	精製J6/JFH-1 HCV粒子(UV不活化) 100 pmol core protein/head i.m. Adjuvant : Alum 250 µg/head
Mm1836♀	中国産	4.0 kg	精製J6/JFH-1 HCV粒子(UV不活化) 100 pmol core protein/head i.m. Adjuvant : Alum 250 µg/head + CpG 250 µg/head
Mm1854♀	中国産	5.0 kg	精製J6/JFH-1 HCV粒子(UV不活化) 100 pmol core protein/head i.m. Adjuvant : MPL+TDM(Sigma adjuvant system, #S6322) 500 µL/head

(2) HCV Core タンパク質の測定

アカゲザル血漿中の HCVcore タンパク質の定量は、「オーソ HCV 抗原 ELISA テスト」(栄研化学)を用い実施した。

(3) アカゲザル血清からの IgG 精製

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。

(4) HCV シュード粒子 (HCVpp) の作製

HCV のエンベロープタンパク質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。2.5×10⁶ 個の 293T 細胞を 10 cm コラーゲンコートディッシュ (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6 (Roche 社) を用いて 3 µg の MMLV Gag-Pol 発現ベクター (Gag-Pol)、3 µg の LTR カセット挿入 luciferase 発現ベクター (Luc126) および 1 µg の HCV E1E2 発現ベクター (pcDNAdeltaC-E1-E2) をトランスフェクションし、6 時間後に培養液を交換した。48 時間培養後の培養上清を回収し、0.45 µm

フィルターで濾過して使用まで-80℃で保存した。陰性対照として、HCV E1E2 発現ベクターをトランスフェクションしない培養上清 (no env.) を作製し同様に保存した。

(5) 感染阻害活性の測定

感染阻害実験は HCVpp を用いて行った。2×10⁴ 個の Huh7.5.1 細胞を 48-well プレート (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養した。HCVpp とアカゲザル IgG サンプルとを混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、細胞に接種して 37℃で 3 時間培養した。その後、感染材料を除き、PBS で洗浄、0.5 mL の培地を添加して 72 時間培養した。細胞のライセートは、PBS でウェルを洗浄後、40 µL/well の 1×Cell Culture Lysis Reagent

(Promega 社) を添加して調製した。HCVpp の感染は上記ライセートの 20 µL を Luciferase Assay System (Promega 社) 50 µL と反応させ、攪拌後直ちに Lumat LB9507 (Berthold) を用いて 10 秒間の発光値を測定することで評価した。

3. 細胞性免疫評価モデルの作製

(1) 抗原

免疫抗原には J6/JFH1 培養上清から限外ろ過膜およびシヨ糖密度勾配遠心により精製した HCV を使用した。In vitro の刺激には下記表に示す合成ペプチド (Core、E1、E2) を用いた。

Control peptide1	B770	H-2Kb, OVA	8 a.a.
Control peptide2	B771	H-2Db, Influenza A(PR8)	9 a.a.
Control peptide3	B772	H-2Kd, Influenza A(PR8)	9 a.a.
Control peptide4	B773	H-2Kd, Listeria	9 a.a.
Control peptide5	B774	H-2Ld, LCMV	9 a.a.
Core peptide mix	(B914-B917)	J6CF-Core(2-10) J6CF-Core(16-25) J6CF-Core(39-48) J6CF-Core(169-178)	9 a.a. 10 a.a. 10 a.a. 10 a.a.
E1 peptide mix	(B304-305)	J6CF-E1(94-102) J6CF-E1(122-136)	9 a.a. 15 a.a.
E2 peptide mix	(B306-307)	J6CF-E2(26-40) J6CF-E2(231-239)	15 a.a. 9 a.a.

(2) T細胞刺激剤

PMA、Ionomycin、Concanavalin A(いずれも Sigma-Aldrich 社)を用いた。

(3) 細胞

精製 HCV 粒子を 4 回免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を用いた。また、1 回の免疫時には HCV 粒子 2pmol+Sigma Ajuvant System (MPL+TDM) 100 µL を

接種した。

(4) ELISPOT 解析

IFN- γ 産生細胞の検出には Mouse IFN- γ ELISPOT antibody pair (U-CyTech 社) を用いた。

(倫理面の配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。また、本研究は、京都大学霊長類研究所との共同研究であり、アカゲザルを用いた実験は、京都大学の動物実験委員会で承認された実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実験を実施した(承認番号 2011-100、研究課題名「HCV 不活化ワクチン接種実験」)。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. 培養細胞で作製した HCV 粒子性製法の改良

実験室レベルの精製では、ウイルスの培養上清から限外ろ過膜およびシヨ糖密度勾配遠心により高純度に精製することができる。しかし、シヨ糖密度勾配遠心法はスケールアップが困難である。そこで、これに代わる方法として、クロマトグラフィーを用いた HCV 粒子の精製方法を検討した。

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、pH 6.4 の条件で、HCV core タンパク質と夾雑タンパク質の溶出ピークがより分離し、精製度が向上した。この時の回収率は 59.6%、不純物の除去率は 79.3%であった。次に、HCV core タンパク質のピーク画分(40mL)をゲル濾過クロマトグラフィーにて展開した。その結果、core タンパク質は 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。ウイルス原液か

ら、限外濾過膜による濃縮・精製、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の全工程の回収率は、38.5%であり、不純物除去率は 99.96%であった。限外濾過膜による濃縮・精製、密度勾配遠心法による精製方法の回収率 30%、不純物除去率 99.0-99.5%と比較して、向上したことが分かった。

2. HCV 粒子免疫したアカゲザルの血中 IgG の HCV 感染阻害活性の解析

前年度の報告で、遺伝子型 2a の J6/JFH1 を不活化粒子を抗原として、3 種類のアジュバントを用いて、免疫スケジュールに従って筋肉内に投与したアカゲザルの血漿中の E1 および E2 タンパク質に対する抗体価を報告した。その結果、J6 株 E1 タンパク質、J6 株 E2 タンパク質および TH 株 E2 タンパク質に対する抗体の産生誘導が確認されたことを報告した。今回、遺伝子型 1b の core タンパク質に対する抗体価を測定した。その結果、Mm1836 (Alum+CpG) および Mm1938 (Alum) は抗体価の上昇が確認されたが、Mm1854 (MPL+TDM) は抗体価が低かった。

次に各免疫アカゲザルの精製 IgG を用いて感染阻害活性を遺伝子型 2a の HCVpp にて測定した。その結果、Mm1938 (Alum) の IgG サンプルには感染阻害活性が認められたが、Mm1836 (Alum+CpG) および Mm1854 (MPL+TDM) のサンプルでは感染阻害活性が認められなかった。

3. 細胞性免疫評価モデルの作製

HCV 粒子を 4 回免疫した BALB/c 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、培養 24 時間後に回収して ELISPOT 解析を行った。その結果、IFN- γ 産生細胞がスポットとして検出された。また、96 ウエルプレートの 1 ウエル当たりの細胞数としては、 1×10^5 細胞もしくは 3×10^5 細胞あれば検出可能であることが確認できた。

次に、同じ脾臓細胞を用いて、HCV の構造タンパク質の一部分に相当する合成ペプチドを使用して、

in vitro で刺激し、培養 24 時間後に回収して ELISPOT 解析を行った。合成ペプチドとしては、コントロール 5 種類と、Core、E1 または E2（それぞれ 4 種類、2 種類、2 種類）を使用し、Core、E1、E2 についてはそれぞれを混合したものを用いた。ELISPOT 解析の結果、コントロールペプチドと比較して、E1 タンパク質および E2 タンパク質のペプチドを用いた場合には大きな差が認められなかったが、Core タンパク質に由来するペプチドを用いた場合には、IFN- γ の有意な産生上昇が認められた。以上の結果から、HCV 粒子免疫により細胞性免疫が誘導されたことが示唆された。

D. 考察

1. 培養細胞で作製した HCV 粒子性製法の改良

これまでに、イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製方法検討を行ってきた。本研究では、抗体やプラスミド、ウイルス粒子などの巨大分子精製に特化したカラムである CIM Disk を用いた精製の検討を行った。陰イオン交換カラム、CIM Disk DEAE を用いて、展開緩衝液の pH を検討し、pH6.4 の条件で、夾雑タンパク質の溶出ピークと HCV Core タンパク質の溶出ピークがシャープとなり分離したため精製効率が向上した。また、陰イオン交換クロマトグラフィーでは、50 % buffer B の濃度においてタンパク質の溶出を伴わない紫外線吸収ピークが検出される。これは培養細胞由来の夾雑核酸によるものであることが予測された。そこで、核酸分解酵素であるベンゾナーゼを用いて混入核酸の除去を検討した。限外濾過膜で精製・濃縮したサンプルをゲル濾過した後、ベンゾナーゼ処理したところ、HCV 粒子が回収できなくなってしまった。ところが、本報告のように、ベンゾナーゼを限外濾過膜濃縮・精製産物に添加したところ、核酸が除去され、HCV 粒子の精製効率を向上させることができた。

2. HCV 粒子免疫したアカゲザルの血中 IgG の HCV 感染阻害活性の解析

我々は、細胞培養系で産生された感染性 HCV 粒

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

(Alum+CpG) 用いた。さらに、マウスで効果の高かった Sigma Adjuvant System (MPL+TDM) も試験のコントロールとして使用した。最終免疫の 2 週間後のそれぞれ 3 種類の投与個体の血漿から精製した IgG を用いて、J6 HCVpp (遺伝子型 2a) に対する感染阻害活性を評価した。その結果、前回報告したように、アジュバントに Alum を用いた Mm1938 の IgG では、濃度増加に伴った感染阻害活性が認められた。しかし、今回検討した Alum+CpG を用いた Mm1836 および MPL+TDM を用いた Mm1854 の IgG では感染阻害活性が認められなかった。特に、MPL+TDM を用いた Mm1854 では、遺伝子型 1b の TH 株の E2 に対する抗体価、Core タンパク質 (遺伝子型 1b) に対する抗体価も認められなかった。Mm1854 個体は体重 5.0kg であり、一方 Alum をアジュバントとした Mm1938 は体重 2.0kg である。Mm1854 個体で抗体価が上昇しなかった原因が体重比抗原量によって、抗体誘導能がことなることが示唆される。今後、抗原量依存的な抗体誘導能の検討を行う必要があり、小型の霊長類であるマーモセットを用いて体重比抗原量による抗体誘導能を検討する。

3. 細胞性免疫評価モデルの作製

HCV 粒子ワクチン接種マウス (MPL+TDM アジュバント) を細胞性免疫誘導の評価系の作製に関する予備的検討を行った。その結果、HCV 粒子ワクチン接種マウスの脾臓細胞を Core タンパク質由来のペプチドの 4 種類の混合ペプチドで刺激すると IFN- γ の産生誘導されることが確認された。細胞性免疫の誘導には、IL-12、IL-23、IL-27 などのインターロイキン類が関与し、アジュバントの違いによ

り誘導されるインターロイキン類が異なることが示唆される。今後、アジュバントの違いによる応答性について検討する。

E. 結論

①Benzonase 処理した限外濾過精製産物を、pH 依存性の高い弱陰イオン交換カラム CIM Disk DEAE カラムを用いて精製検討を行ったところ、pH を 6.4 に上げることによって HCV 粒子と夾雑タンパク質の溶出ピークの分離が改善し、精製効率が向上した。

②陰イオン交換クロマトグラフィー精製産物をゲル濾過により精製を行った結果、限外濾過産物のゲル濾過精製結果と同様に HCV 粒子は void fraction に検出され、高効率に精製された。

③最終精製効率を求めると、クロマトグラフィー法を用いた精製は超遠心精製の精製効率を上回る結果となり、クロマトグラフィーを用いた HCV 粒子の精製工程を確立した。

④不活化 HCV 粒子と Alum、Alum+CpG、MPL+TDM を組み合わせて、HCV ワクチンとしてアカゲザルに免疫した血清から精製した IgG を用いて HCVpp 感染阻害活性を検討した結果、Alum 投与サルでのみ濃度依存的な感染阻害が認められた。

⑤アジュバントあるいは体重比抗原量によって、抗体誘導能が異なることが示唆された。

⑥今後は小型の霊長類であるマーモセットを用い、体重比抗原量による抗体誘導能を検討する必要がある。

⑦HCV 粒子を免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて、ELISPOT 解析を行った結果、HCV 粒子免疫により細胞性免疫が誘導されたことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 第60回日本ウイルス学会学術集会

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

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

2) 第35回日本分子生物学会年会

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

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

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RNA誘導体のアジュバント機能評価に関する研究

研究分担者 松本 美佐子 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨：HCVのワクチン開発において効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。本研究では、細胞性免疫応答惹起のシグナルを伝達するToll-like receptor 3 (TLR3)を活性化するRNA誘導体を開発し、マウス個体におけるCTL, NK細胞活性化能をマウス移植がんモデルで査定した。その結果、RNA誘導体はTLR3-TICAM-1経路のみ活性化し、樹状細胞を介したNK細胞活性化と抗原のクロスプライミングによるCTL活性化を誘導した。さらに、OVAに対する抗体産生も効果的に誘導することが判明した。細胞外からTLR3のみ特異的に活性化し、過度の炎症性サイトカイン産生を誘導せず細胞性免疫を起動できるアジュバントはこれまで報告がなく、本研究のRNA誘導体ははじめてである。

A. 研究目的

HCVのワクチン開発において効果的な免疫応答の誘導にはアジュバントの選択が重要である。現在ヒトで用いられるアジュバントはAlumとMPLAの2種類である。Alumは複数の作用点を介してTh2免疫応答を誘導する一方、MPLAはToll-like receptor (TLR)4-TICAM-1を介してTh1免疫応答を誘導し、抗体産生を目的とした抗感染症ワクチンのアジュバントとして使用されている。しかし感染細胞やがん細胞の排除をめざす治療用ワクチンでは強力な細胞性免疫応答(CTL, NK活性化)を誘導できるアジュバントが求められている。TLR3は抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞のエンドソームに高発現し、CTL, NK細胞活性化のシグナルを伝達することが我々の研究から明らかになっている。TLR3リガンドのpoly(I:C)はTLR3以外に細胞質のMDA5経路も活性化し強い炎症応答を誘導することから臨床応用に至っていない。本研究では、TLR3特異的リガンドを開発し副作用が少なく効果的な細胞性免疫応答を誘導するアジュバントを確立する事を目的とした。

B. 研究方法

TLR3のリガンド認識機構を考慮し、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。

(倫理面の配慮)

動物実験は北海道大学動物実験に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

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)について、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依存性のがん退縮効果を示すことが判明した。治療後のマウス脾臓細胞を用いて、OVA特異的CD8陽性T細胞の増殖、EG7に対する細胞傷害活性、IFN- γ 産生を測定したところ、RNA X+OVA治療群はPBS投与群、あるいはRNA X単独投与群に比べ高いCTL誘導活性を示した。こ

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。RNA X+ OVA 投与によって誘導される抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は TLR3 KO マウスでは減少し、IFN- γ 産生も低下した。CTL 誘導に重要な CD8 α 陽性樹状細胞を WT, TICAM-1 KO, IPS-I KO マウス脾臓から調整し、RNA X および poly(I:C)で刺激しジーンチップ解析を行った結果、RNA X により誘導される遺伝子は殆ど TLR3-TICAM-1 シグナルに依存することが判明した。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)と同等に誘導することが明らかとなった。

D. 考察

ジーンチップ解析より、RNA X は CD8 α 陽性樹状細胞において TLR3-TICAM-1 経路のみ活性化することが示された。TLR3 特異的リガンドはこれまで報告がなく、今回の RNA X がはじめてである。さらにノックアウトマウスを用いた解析から、生体内で樹状細胞活性化による NK 細胞活性化と CTL 誘導が TLR3-TICAM-1 経路のみの活性化でおきうることが明らかになった。RNA X のマウス生体内投与における炎症性サイトカイン産生量は poly(I:C)投与より少ないことから、副作用の少ない TLR3 アジュバントとして有望と考えられる。また、抗体産生誘導能も poly(I:C)同等に有しており、汎用性の高いアジュバントといえる。今後、RNA X のアジュバント機能や副作用等についてさらに詳細に解析するとともに、RNA X による TLR3 依存的 CTL 誘導の責任分子の同定を行うことが重要である。

E. 結論

細胞外から TLR3-TICAM-1 経路のみ活性化し、マウス個体において樹状細胞活性化による NK 細胞活性化と CTL 誘導能をもつ新規アジュバントを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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+/CD8 α + dendritic cells. *Oncoimmunology* 1: 581-592.
3. 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.
4. Seya, T. H. Shime, and M. Matsumoto. 2012. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunology* 1(6): 1000-1001.
5. 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.
6. 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]
7. 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.

8. 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)

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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. (同上)
- 4) 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. (同上)
- 5) 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. (同上)

6) Ryuji Yoshida, Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto. 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.

7) Satoshi Kamakura, Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. 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.

8) Tsukasa Seya, Masahiro Azuma, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto. What immune responses are evoked by selective stimulation of the TLR3/TICAM-1 pathway in vaccination? Keystone Symposia. Dec.16, 2012. Ottawa, Canada.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeed, M., Gondeau, C., Hmwe, S., Yokokawa, H., Date, T., Suzuki, T., <u>Kato, T.</u> , Maurel, P., <u>Wakita, T.</u>	Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells.	Gastroenterology	144 (1)	56-58	2013
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, <u>Wakita T</u> , Fukazawa H.	Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle.	Microbes and Infection	15(1)	45-55.	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, <u>Akari H</u> , 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
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, <u>M.</u> <u>Matsumoto</u> , J-J. Pin, J-L. Casanova, T. Renno, S. Lebecque.	Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor.	Journal of Immunology	190(2)	764-773	2013
Murayama, A., Sugiyama, N., Yoshimura, S., Ishihara-Sugano, M., Masaki, T., Kim, S., <u>Wakita, T.</u> , Mishiro, S., <u>Kato, T.</u>	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

<u>Suzuki, R.</u> , Saito, K., <u>Kato, T.</u> , Shirakura, M., Akazawa, D., Ishii, K., Aizaki, H., Kanegae, Y., Matsuura, Y., Saito, I., <u>Wakita, T.</u> , 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
Matsumura, T., <u>Kato, T.</u> , Sugiyama, N., Tasaka-Fujita, M., Murayama, A., Masaki, T., <u>Wakita, T.</u> , Imawari, M.	25-hydroxyvitamin D(3) suppresses hepatitis C virus production.	Hepatology	56 (4)	1231-1239	2012
Date, T., <u>Kato, T.</u> , Kato, J., Takahashi, H., Morikawa, K., Akazawa, D., Murayama, A., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., <u>Wakita, T.</u>	Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.	Journal of Virology	86 (19)	10805-10820	2012
Murayama, A., Sugiyama, N., Watashi, K., Masaki, T., <u>Suzuki, R.</u> , Aizaki, H., Mizuochi, T., <u>Wakita, T.</u> , <u>Kato, T.</u>	Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of HCV RNA and core antigen quantitative assays.	Journal of Clinical Microbiology	50 (6)	1943-1949	2012
Ando T, Imamura H, <u>Suzuki R</u> , Aizaki H, Watanabe T, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA.	PLoS Pathogens	8(3)	e1002561.	2012
Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, <u>Wakita T</u> .	Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone.	Microbiology and Immunology	56(5)	308-17.	2012
Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., <u>Ishii K.</u> , <u>Wakita T.</u> Yokosuka O.	Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation.	Viral Immunology	25	379-386	2012

Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., <u>Ishii K.</u> , <u>Wakita T.</u> , Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. Shirato H.	Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus.	Journal of Virology	86	11138-11150	2012
Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., <u>Wakita T.</u> , <u>Ishii K.</u> , 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
Miyamura T., <u>Ishii K.</u> , Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., <u>Wakita T.</u> 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
<u>Ishii K.</u> , Kiyohara T., Yoshizaki S., <u>Wakita T.</u> , Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. Noda M.	Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010	Journal of Clinical Virology	653	219-224	2012
Yamazaki S., A, Maruyama, K. Okada, <u>M. Matsumoto</u> , A. Morita, T. Seya.	Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3 ⁺ regulatory T cells upon antigen stimulation.	PLoS ONE	7(12)	e51665	2012
Seya, T. H. Shime, <u>M. Matsumoto</u> .	TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing.	Oncoimmunology	1(6)	1000-1001	2012
Seya, T., H. Shime, H. Takaki, M. Azuma, H. Oshiumi, <u>M. Matsumoto</u> .	TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis.	Oncoimmunol.	1(6)	917-923	2012

Azuma, M., T. Ebihara, H. Oshiumi, <u>M. Matsumoto</u> , T. Seya.	Cross-priming for anti-tumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells.	Oncoimmunol.	1	581-592	2012
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, <u>M. Matsumoto</u> , M. Botto, I. Shiojima, I. Komuro.	Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes.	Cell	149(6)	1298-1313	2012
Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, <u>Akari H</u>	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
Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , 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

Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, <u>Akari H</u>	Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (<i>Macaca fascicularis</i>).	Frontiers in Microbiology	3	314	2012
Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, <u>Akari H</u> , Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T	Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees.	Primates	54	89-98	2012
Seya T., M. Azuma, <u>M. Matsumoto</u> .	Targeting TLR3 without RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer.	Exp. Opin. Therap. Targets	in press		2013
Oshiumi H., K. Funami, H. H. Aly, <u>M. Matsumoto</u> , T. Seya.	Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus.	Arch. Immunol. Ther. Exp.	in press		2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, <u>Akari H</u> , 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		2013
Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, <u>Akari H</u>	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.	Archives of Virology	in press		2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells

MOHSAN SAEED,¹ CLAIRE GONDEAU,² SUSU HMWE,¹ HIROSHI YOKOKAWA,^{1,3} TOMOKO DATE,¹ TETSURO SUZUKI,¹ TAKANOBU KATO,¹ PATRICK MAUREL,² and TAKAJI WAKITA¹

¹Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; ²Inserm U1040, Biotherapy Research Institute, Montpellier, France; and ³Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries, Inc., Kanagawa, Japan

See Covering the Cover synopsis on page 1;
see editorial on page 13.

Hepatitis C virus (HCV) genotype 3a is widespread worldwide, but no replication system exists for its study. We describe a subgenomic replicon system for HCV genotype 3a. We determined the consensus sequence of an HCV genome isolated from a patient, and constructed a subgenomic replicon using this clone. The replicon was transfected into HuH-7 cells and RNA replication was confirmed. We identified cell culture-adaptive mutations that increased colony formation multiple-fold. We have therefore established a genotype 3a replicon system that can be used to study this HCV genotype.

Keywords: Virology; Experimental Model; HCVGT3; In Vitro Culture System.

Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic infection and advanced liver diseases in most infected adults.¹ Of the 6 major HCV genotypes, genotypes 1 and 2 are the most prevalent in North America, Europe, and Japan,^{2,3} and are the most highly studied. However, other genotypes display specific characteristics. For example, genotype 3a infection can result in hepatic steatosis⁴ and telaprevir and boceprevir are less effective against genotype 3a.⁵ Therefore, the pathogenesis and inhibitor sensitivity of all HCV genotypes should be studied. Although HCV subgenomic replicons are useful for understanding viral/host factors involved in HCV replication and inhibitor sensitivity, only HCV replicons for genotypes 1a, 1b, and 2a have been established.^{6–9} Here, we report on the robust genotype 3a replication system.

An almost complete HCV genome was recovered from the serum of a patient with post-transplantation recurrent HCV infection. This serum exhibited higher infectivity than other tested sera toward primary human hepatocytes (Supplementary Figure 1A). The isolate, named S310, contained the following structural elements: a 5'UTR (nt 1-339), an open reading frame encoding 3021 aa (nt 340-9402), and a 3'UTR (nt 9403-9654). Only the last 44 nt of the X-region (nt 9611-9654) could not be recovered. Two major virus populations were found; S310/A contained Ala, Thr, Thr, and Ile, and S310/B

contained Thr, Ala, Ala, and Thr, at the 7th, 151st, 431st, and 472nd aa of the NS3 protein, respectively. S310 was clustered into genotype 3a by phylogenetic analysis (Supplementary Figure 1B). The complexity of the virus quasi-species in the serum was analyzed by sequencing the hypervariable region. Identical amino acid sequences in all 10 hypervariable region clones indicated a very low degree of diversity. The hypervariable region sequence of the JFH-1 strain also exhibited monoclonality,¹⁰ which can be important for efficient replication in cultured cells.

Subgenomic replicons SGR-S310/A and SGR-S310/B were constructed and their replication efficiency was evaluated by G418-resistant colony-formation assay. After 3 weeks, a small number of colonies were visible for both replicons (Figure 1A). Because more colonies were observed in SGR-S310/A than in SGR-S310/B, we focused on SGR-S310/A (henceforth called SGR-S310). Ten cell colonies of SGR-S310 were isolated and analyzed for HCV replication. The mean RNA titer was $9.1 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^7$ copies/ μ g total RNA (Figure 1B). HCV RNA (approximately 8 kb) was detected by Northern blotting (Supplementary Figure 2A). Viral proteins in the replicon cells were detected by immunofluorescence and Western blotting (Supplementary Figure 2B and 2C). To determine whether the G418 resistance of the cells was transmissible by cellular RNA transfection, we electroporated total cellular RNA isolated from 4 replicon clones into naïve HuH-7 cells. Multiple G418-resistant colonies appeared after transfection of the RNA isolated from the replicon clones (Supplementary Figure 3A), but not from the naïve HuH-7 cells. These results indicate that the replicon RNA in the parental colonies could replicate in naïve cells. Thus, the G418-resistant colonies that were isolated from cells electroporated with SGR-S310 synthetic RNA contained replicating viral RNA.

Replicating genomes have been shown to accumulate cell culture adaptive mutations, which increase their replication potential. To examine whether SGR-S310 acquired mutations, the complete HCV sequences from 10 replicon clones were sequenced. At least one nonsynonymous mutation was detected in the NS3-NS5B region of each replicon clone (Figure 1B). The following mutations were identified: T1286I in the NS3 helicase (6 of 10

Abbreviation used in this paper: HCV, hepatitis C virus.

© 2013 by the AGA Institute

0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.017>