

NK, CTL が高く誘導されることが判明した。

一方、HCV の複製を許す MAVS^{-/-}マウス肝細胞株を樹立した。効率は落ちるが HCV 感染によって NS5A の蛋白産生が確認できた。この細胞株を用いて DNA uptake の効果と免疫（樹状細胞）系への影響を調べている。

HCV 感染のマウスモデルとして小原研より恵与頂いた HCV/Cre-Tg に MAVS^{-/-}マウスを交配して HCV replicon の複製効率が *in vivo* で上がるか検討する。そのためにマウスの交配を進めている。また、RIG-I 欠損マウスは致死だが、同様の表現型を導く Riplet^{-/-} マウスは致死でないため、HCV/Cre-Tg と Riplet^{-/-} も交配している。

D. 考察

DNAワクチンはDNAセンサーを活性化したが、その副作用の問題点は未解明である。特にHCV感染における樹状細胞の動態は判っていない。一方、DNA, RNA刺激が異なった免疫応答を起動することは以前から知られていた。近年の進歩はSTING-TBK1の経路、MAVS-TBK1の経路に特有の遺伝子発現の相違があるか、その相違が樹状細胞の活性化状態にどう反映されるか、がDNAワクチンの効果解析の鍵になることを示唆している。HCV感染患者の免疫系にDNAワクチンが有効であるにはTh1シフトとIFN誘導が同時に起きるアジュバントのデリバリーが必要である。本研究はその対策にRNAアジュバントの併用が良いことを示唆した。

IFN誘導経路を欠損したマウス肝細胞株のスクリーニングからMAVS経路とIFNAR経路がHCVの感染抵抗性に関与することが判

明した。IFNARと異なり、MAVSはIRF-3のみを活性化して病態への影響が少ない。RNAセンサーのRIG-IがMAVSを活性化するが、RIG-I はRiplet によるユビキチン化が必須である。肝細胞とHCVの許容性は検討中だが、HCV/Cre-TgとRiplet^{-/-}交配マウスでHCV感染モデルが作製しうる。

小原の DNA ワクチンを患者に実用化する過程で Th2 シフトを改善した剤形が免疫応答の誘導には重要となる。我々は polyI:C に見られる副作用を極少にした RNA (Th1) アジュバントの化学合成を進めており、完成すれば CTL, NK などエフェクター効果の高いワクチンアジュバントの提供が可能になる。

E. 結論

HCV に対する DNA ワクチンの作用機構を樹状細胞で検討し、DNA ワクチンに併用する Th1 アジュバントの必要性を検証した。今後 HCV 複製下のマウス系でワクチンの効果査定を進めるため、HCV 感染マウス肝細胞株とマウスモデルの確立を遂行した。MAVS^{-/-}の HCV/Cre-Tg (KO- HCV/Cre-Tg) の確立を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. Azuma M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells.

OncoImmunol. 1: 581-592.

3. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 2066-2071.

4. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, T. Renno, S. and Lebecque, K. 2013. Cleavage of TLR3 by cathepsins generates two fragments that remain associated to form a functional receptor. *J. Immunol.* 190: 764-773.

5. Yamazaki, S., A. Maruyama, K. Okada, M. Matsumoto, A. Morita, T. Seya. 2012. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3⁺ regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE* 7(12):e51665.

6. Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat Commun.* (in press).

7. Aly, H. H., K. Shimotohno, M. Hijikata, T. Seya. 2011. Toward establishment of *in vitro* systems for analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.* 56(1): 1-9.

8. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem.*

(Tokyo) 151: 5-11..

9. Seya T, Shime H, Matsumoto M. 2012. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunol.* 1: 1000-1001.

10. Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunol.* 1: 917-923.

11. Oshiumi, H., K. Funami, H. H. Aly, M. Matsumoto, T. Seya. 2012. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* (in press).

12. Seya, T., M. Azuma, and M. Matsumoto. 2013. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp. Opin. Target. Therap.* (in press)

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長
研究協力者 和田剛 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特任研究員

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の免疫学的な感染病態の解析および治療用ワクチンの開発に向けて、HCVに対するDNAワクチンの開発を試みた。HCVの外殻蛋白領域遺伝子および非構造蛋白領域遺伝子を組み込んだHCV-DNAワクチン（HCV-CN2、HCV-N25）を作製した。これらDNAワクチンをエレクトロポレーションによりC57BL/6マウスに免疫し、脾臓での細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の誘導についてELISPOT法を用いて検討したところ、HCVに対する強いCTLの誘導が認められた。C型肝炎モデルマウスにDNAワクチンを投与したところ、誘導されてくるCTLはC57BL/6マウスに比べて減弱していたものの、肝臓中のHCVコア蛋白発現量が有意に減少し、治療用ワクチンとして有用である可能性が示唆された。さらに、より強く細胞性免疫を誘導する為に、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法についての検討を行った。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）はヒトに慢性感染症を引き起こす病原体であり、その病態は肝炎から肝硬変、肝癌へと進行することから、HCVに対する免疫反応の解析や、治療法の確立が強く望まれている。本研究ではベクターに対する反応が無く、目的とした抗原に対してのみ免疫反応が誘導されるDNAワクチンを構築し、HCVに対する免疫反応の解析と、治療用ワクチンの開発を行うことを目的とした。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発へ道を開き、国民の健康増進につながると共に、肝硬変及び肝癌発症率の低下に伴う

医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考える。

B. 研究方法

(1) マウス

poly(I:C)を投与することで、任意の時期にHCV遺伝子を誘導発現できるトランスジェニック（HCV-Tg）マウス（CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-), RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)）（図1）、C56BL/6マウスを用いた。HCV-Tgマウスはpoly(I:C)を投与後、HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた後に、実験に使用した。

(2) HCV遺伝子発現DNA（HCV-DNA）ワクチン

すべてのHCV遺伝子領域を含むpBMSF7CプラスミドベクターからPCR法と制限酵素反応を用いて、HCVの外殻蛋白領域

(CE1E2NS2)あるいは、複製に関与している非構造蛋白領域(NS2-5)の遺伝子領域をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込むことにより作製したHCV-DNAワクチン(HCV-CN2、HCV-N25)(図1)と、これらのワクチンのコントロールとしてHCV遺伝子領域を含まないDNAワクチン(empty)を使用した。また、それぞれのDNAワクチンに組み込んだ配列と同じ配列をワクシニアウイルスLC16m8株に組み込んだ組換えワクシニアウイルス(rVV)であるrVV-CN2、rVV-N25を使用した。

(3) 免疫方法

25 μ lのPBSに懸濁した100 μ gの各種DNAワクチンをマウスの下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション(50 V, 99 msec, 8 times)を行った。投与は2週毎に2回投与し、4週目にマウスより脾臓を採取し、解析を行った。ワクシニアウイルスを用いたprime/boost法では、DNAを投与してから2週目にワクシニアウイルス 1×10^8 pfu/50 μ lを皮内投与し、4週目に解析を行った。

(4) ELISPOT法によるCTL誘導能の測定

赤血球溶血処理を行った脾細胞(1×10^5)を予めマイトマイシン処理を行った刺激細胞(HCVの各遺伝子部位を過剰発現した腫瘍細胞(EL-4/E2, /NS2, /N3-4A))(1×10^4)で刺激、または、脾細胞を磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いてCD8⁺、CD4⁺細胞(2×10^5)に分離後、HCV遺

伝子を発現するワクシニアウイルス(rVV-CN2)を感染させた同系脾臓細胞(4×10^4)もしくはHCV-NS3ペプチド(GAVQNEITL)0.1 μ g/mlで刺激を加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂インキュベーター中で48時間培養し、HCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定した。

(5) 肝臓中のHCVコア蛋白発現量の測定

市販のHCV抗原ELISAキット(Ortho Clinical Diagnostics)を用いて定量した。

(6) DNAワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験

HCV-N25 DNA ワクチンを予め2週毎に2回投与し、最後の投与から2週間後に、脾臓を採取し、CD8⁺、CD4⁺、CD8⁻CD4⁻細胞に分離後、HCV蛋白を発現させたCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)もしくはC57BL/6マウスに腹腔内投与し、1週間後に、マウスから肝臓(HCVコア蛋白発現量測定)と脾臓(ELISPOT法によるCTLの測定)を採取し、解析を行った。

(7) マウス脾臓樹状細胞の機能解析

C57BL/6、CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスの脾臓よりCD11c⁺細胞を分離し、HCV-NS3ペプチド(GAVQNEITL)を5時間パルス後、C57BL/6もしくはCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスの足蹠に投与(2×10^5)し、2週間後に脾臓中のHCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞についてELISPOT法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) ELISPOT 法による HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能についての検討

HCV-DNA ワクチンを投与した C57BL/6 マウスより脾臓を採取し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した。emp 投与群由来の脾細胞は刺激後、何ら特異的なスポットを示さなかったが、HCV-CN2 投与群由来の脾細胞は、EL-4/E2、/NS2、HCV-N25 投与群では、EL-4/E2、/NS2、/N3-4A 細胞による刺激後に、顕著に IFN- γ を産生することを確認した (図 2A)。さらに、CD8⁺、CD4⁺ 細胞を分離し、HCV の遺伝子を発現するワクシニアウイルス (rVV-CN2) を感染させた細胞を刺激細胞として、HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を測定したところ、HCV-CN2、HCV-N25 の DNA ワクチン共に CD8⁺、CD4⁺ 細胞で HCV 抗原特異的 IFN- γ の産生が認められた (図 2B)。

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

前年度までの研究で、HCV 蛋白を 3 ヶ月間持続的に発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに HCV-DNA ワクチンを投与すると、emp 投与群に比べ HCV-N25 投与群において、肝臓中コア蛋白発現量が有意に減少する

(図 3A) ことが分かっており、このコア蛋白発現量の減少にどのような細胞が関与しているのかについて検討した。HCV-N25 を免疫した C57BL/6 (WT) マウス脾臓から CD8⁺、CD4⁺ 細胞を分離し、HCV 蛋白を発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに投与

したところ、両投与群でコア蛋白発現量の減少が見られた (図 3B) ことから、HCV-N25 DNA ワクチンによるコア蛋白発現量の減少に CD8⁺、CD4⁺ 両細胞が重要な役割を果たしていることが分かった。

CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに HCV-DNA ワクチンを投与し、その後、脾臓中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定したところ、HCV-DNA ワクチン投与群由来の脾細胞の IFN- γ 産生能は WT マウスを用いた結果に比べ、減弱あるいは消失していることを確認した (図 4A)。さらに、CD8⁺、CD4⁺ 細胞に分離し、IFN- γ の産生を測定したところ、HCV-CN2 DNA 投与群では、CD8⁺、CD4⁺ 両細胞で HCV 特異的 IFN- γ の産生がみられなくなった。また、HCV-N25 DNA 投与群の CD4⁺ 細胞の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生数は WT マウスと同等の結果が得られたが、CD8⁺ 細胞の IFN- γ 産生数が WT マウスと比べて、抑えられていた

(図 4B)。この現象は別種の HCV-Tg マウスである RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに HCV-DNA ワクチンを投与した際も確認された (図 4C)。

(3) HCV-Tg マウスにおける DNA ワクチンの CTL 誘導能減弱についての解析

WT マウスに HCV-N25 DNA ワクチンを投与することで誘導した CTL を WT もしくは CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに移入しても、同等数の HCV 特異的 IFN- γ 産生細胞が検出される (図 5) ことから、成熟した CTL の IFN- γ の産生を抑制する機構が WT マウスと異なり HCV-Tg マウスに特別存在している可能性はないと考えられる。

次に、CTL 誘導能の減弱は樹状細胞の機能低下の可能性が存在するために、樹状細胞の CTL 誘導能についての検討を行った。WT、RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスから脾臓樹状細胞を取り出し HCV-NS3 のペプチドをパルスし、WT もしくは RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに移入する実験を行ったところ、WT マウスに移入した際は、WT、ならびに RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)由来樹状細胞は、共に同程度の CTL を誘導できることから、両者の脾臓樹状細胞の CTL 誘導能に差が無いことを確認した。しかし、レシピエントを RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにしたところ、WT、ならびに RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)由来樹状細胞による CTL の誘導は、WT をレシピエントにした時と比べて、大幅に減弱した (図 6)。

(4) DNA ワクチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost 法についての検討

今回の DNA ワクチンの投与方法では、HCV-Tg マウスでは、CD8 T 細胞反応の誘導が減弱しており、より強く細胞性免疫を誘導できるような投与方法として、DNA ワクチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost 法について検討した。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに DNA を投与後、2 週目にワクシニアウイルスを投与し、4 週目に解析を行った。すると併用することにより、細胞性免疫反応が増強することを ELISPOT 法により確認した (図 7A) が、肝臓中のコア蛋白発現量については、HCV-N25 DNA 2 回投与群に比べて減少する傾向が見られたものの、有意差は無かった (図 7B)。

D. 考察

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

この DNA ワクチンと C 型肝炎モデルマウスを用いて HCV 抗原と免疫反応の検討を行ったところ、特に HCV の非構造蛋白領域を

発現する DNA ワクチン (HCV-N25) は、マウス肝臓中の HCV コア蛋白発現量を有意に減少させ(図 3A)、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常を改善させた(前年度研究より)。しかし、HCV-DNA ワクチン投与後の脾細胞の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生能は減弱あるいは消失しており(図 4)、HCV 蛋白が発現することで免疫抑制の状態になり、強い細胞性免疫が誘導できていないことが考えられる。HCV-Tg マウス由来樹状細胞の CTL 誘導能は正常である(図 6)が、HCV-Tg マウス体内で樹状細胞から T 細胞への、CTL 誘導につながるどこかの部分に障害があり、WT マウスに比べて CTL 誘導が抑制されていると考えられる。これらの機構が解明されれば、治療用ワクチンのさらなる開発に繋がることが考えられる。

また、HCV-Tg マウス体内でより強く細胞性免疫を誘導できるような投与方法として、DNA ワクチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost 法について検討したところ、細胞性免疫が増強することを確認した(図 7A)が、WT マウスに投与した際に誘導される細胞性免疫(図 7C)に比べれば大幅に減弱しており、今後さらに投与方法などの検討を行いたい。

E. 結論

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

れた。HCV-Tg マウスにおける HCV に対する免疫抑制機構についての解析が進めば、さらに HCV-N25 の効果を増強することが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press
- 2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K.J. and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum. Vac. Immunother.* 2012 in press
- 3) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M. and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H. and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microve. Infect.* in press

- 5) Yoshida,T., Omatsu,T., Saito,A., Katakai,Y., Iwasaki,Y., Iijima,S., Kurosawa,T., Hamano,M., Nakamura,S., Takasaki,T., Yasutomi,Y., Kurane,I Akari,H. CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins Archives Virol 2012;15:;363-368.
- 6) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Matsubara,A., Tsujimura,Y., Hiroe,M., Naka,T.,Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K. and Yasutomi,Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. J.Immunol 2012;189;2043-2053.
- 7) Uchdida,A., Sasaguri,H., Kimura,N., Tajiri,M., Ohkubo,T., Ono,F., Sakaue,F., Kanai,K., Hirai,T., Sano,T., Shibuya,K., Kobayashi,M., Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai,Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Brain 2012;135;833-846.
- 8) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasutomi,Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and Nakayama,E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). J.Gen. Virol. 2012;93:594-602.
- 9) Higashino,A., Sakate,R., Kameoka,Y., Takahashi,I., Hirata,M., Tanuma,R., Masui,T., Yasutomi,Y. and Osada,N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. Genome Biol. 2012 Epub
- 10) Tachibana,S., Sullivan,SA., Kawai,S., Nakamura,S., Goto,N., Arisue,N., Palacpac,NMQ., Honma,H., Yagi,M., Tougan,T., Katakai,Y., Kaneko,O., Mita,T., Kita,K., Yasutomi,Y., Kim,HR., Sutton,PL., Shakhbatyan,R., Horii,T., Yasunaga,T., Bamwell,JW., Escalante,AA., Carlton,JM. And Tanabe,K. Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Nature Genetics 2012; 44:1051-105
- 2.学会発表
- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日
- 2) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：C型肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの検討 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日
- 3) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能とC型肝炎モデルマウスを用いた治療効果についての検討 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏：強力な細胞性免疫を誘導するAg85B発現弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日

5) Okamura,T., Matsuo,K., Yasutomi,Y. :
Induction of protective immune responses
against pathogenic AIDS virus infection in
monkeys infected with non-pathogenic AIDS
virus carrying an adjuvant molecule.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12
月5日-7日

6) TSUJIMURA,Y., YASUTOMI,Y. :
Suppressive effects of Mycobacteria major
secretion protein, Ag85B, to inflammatory
responses in human bronchial epithelial cells.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12
月5日-7日

7) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Hiroe,M.,
Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K.,
Yasutomi,Y.: Suppressor of Cytokine

Signaling 1 in Dendritic Cells Inhibits
Myocardial Inflammation in Experimental
Autoimmune Myocarditis. Basic

Cardiovascular Sciences 2012 scientific
sessions, 2012.7.23-26, New Orleans, USA

8) 田尻和子、下條信威、町野智子、酒井
俊、今中一吉、田恭子、廣江道昭、保富康宏、
青沼和隆：スタチンはCD4陽性T細胞の
Th1/Th17細胞への分化を抑制し心臓の炎症
を制御する。第16回心血管内分泌代謝学会、
2012. 11. 23-24、東京

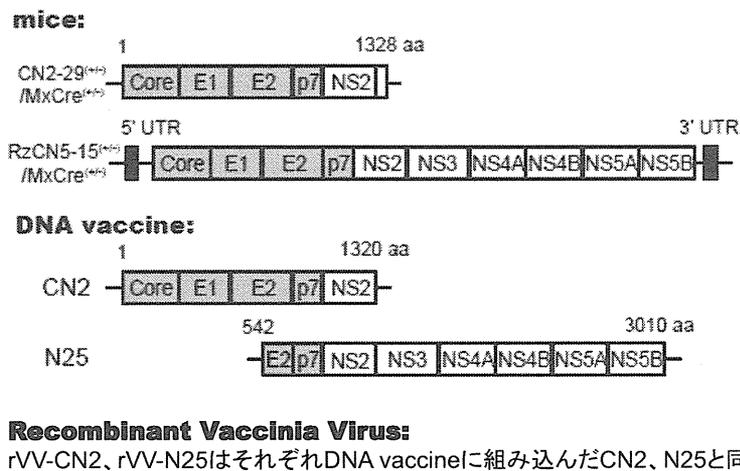


図1. C型肝炎モデルマウスとHCV遺伝子発現DNAワクチン

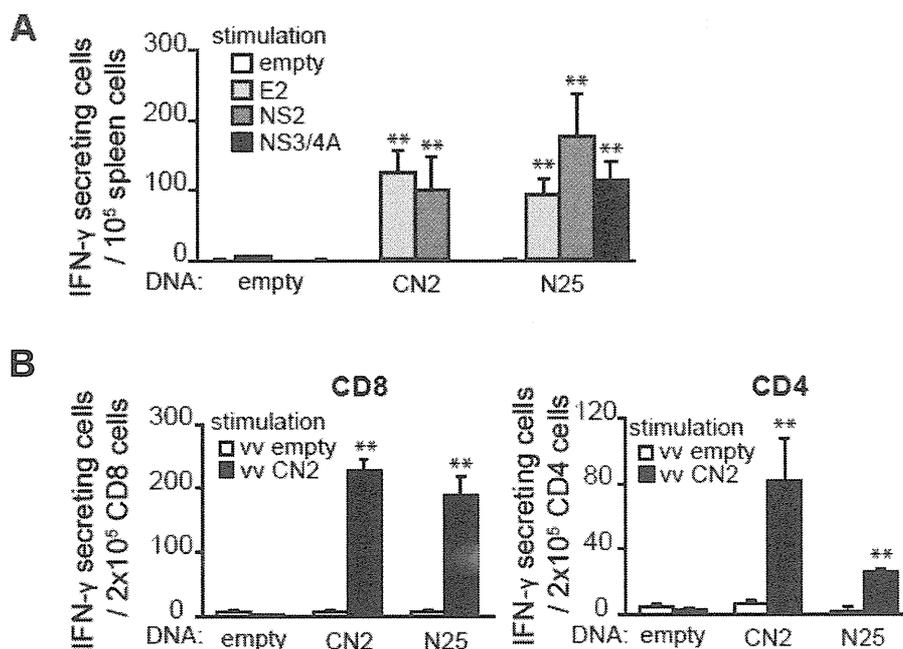


図2. HCV DNAワクチンはHCV特異的細胞性免疫反応を誘導する

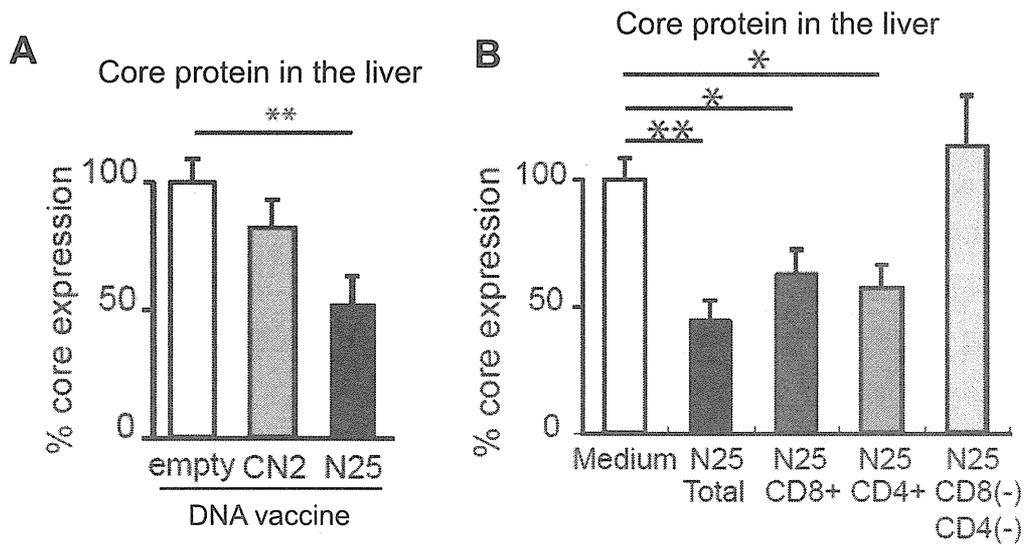


図3. HCV N25DNAワクチンはCD8+,CD4+細胞依存的に肝臓中コア蛋白発現量を減少させる

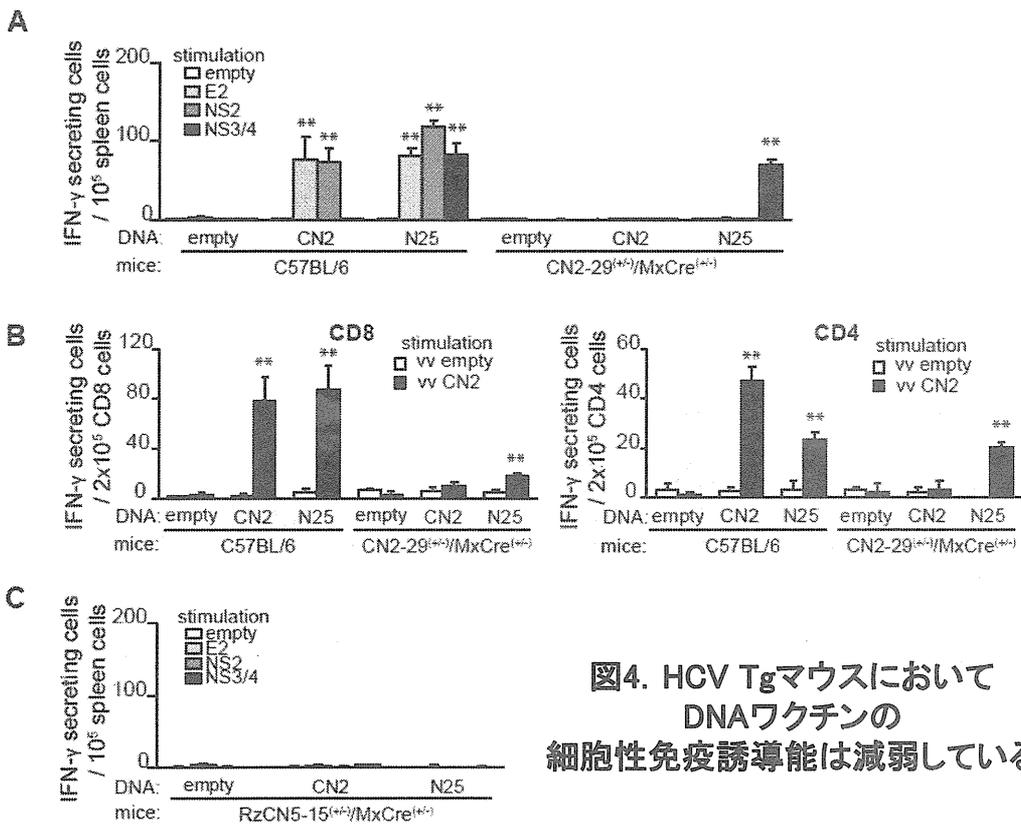


図4. HCV TgマウスにおいてDNAワクチンの細胞性免疫誘導能は減弱している

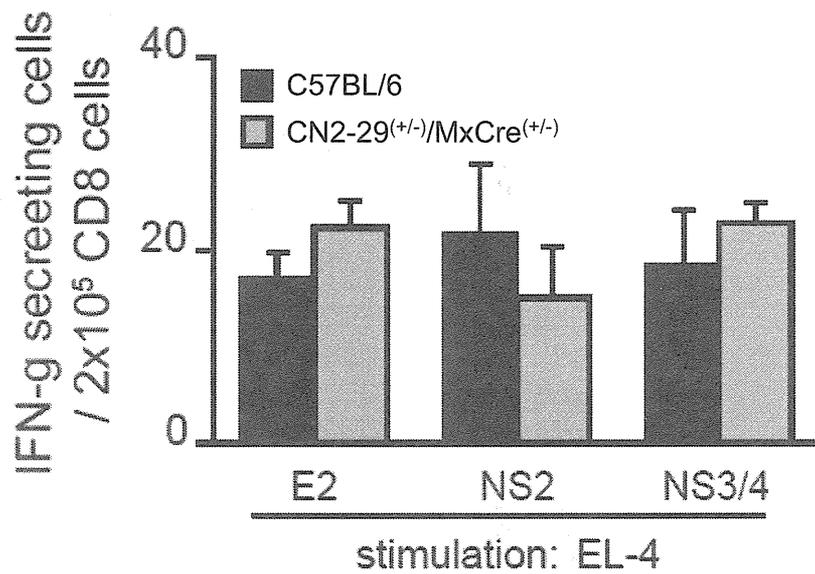


図5. HCV N25投与WTマウスから
WT,HCV T_gマウスへの脾臓細胞移入実験

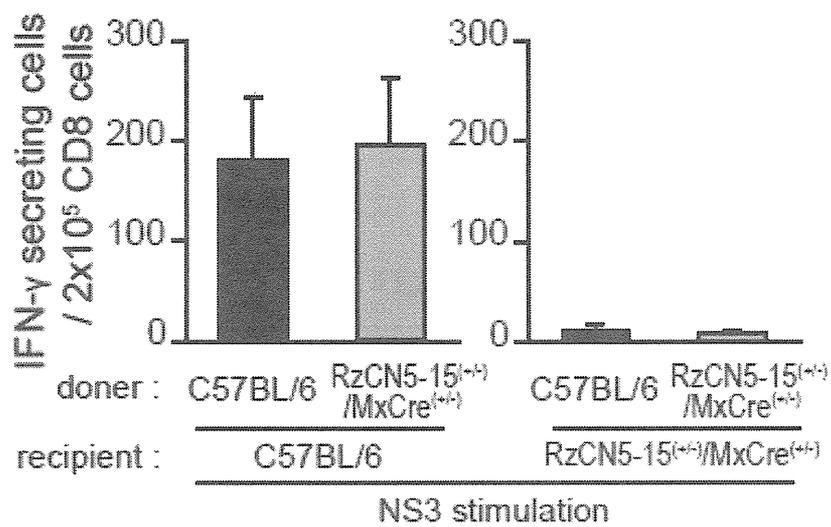


図6. WT,HCV T_gマウスへの脾臓樹状細胞移入実験

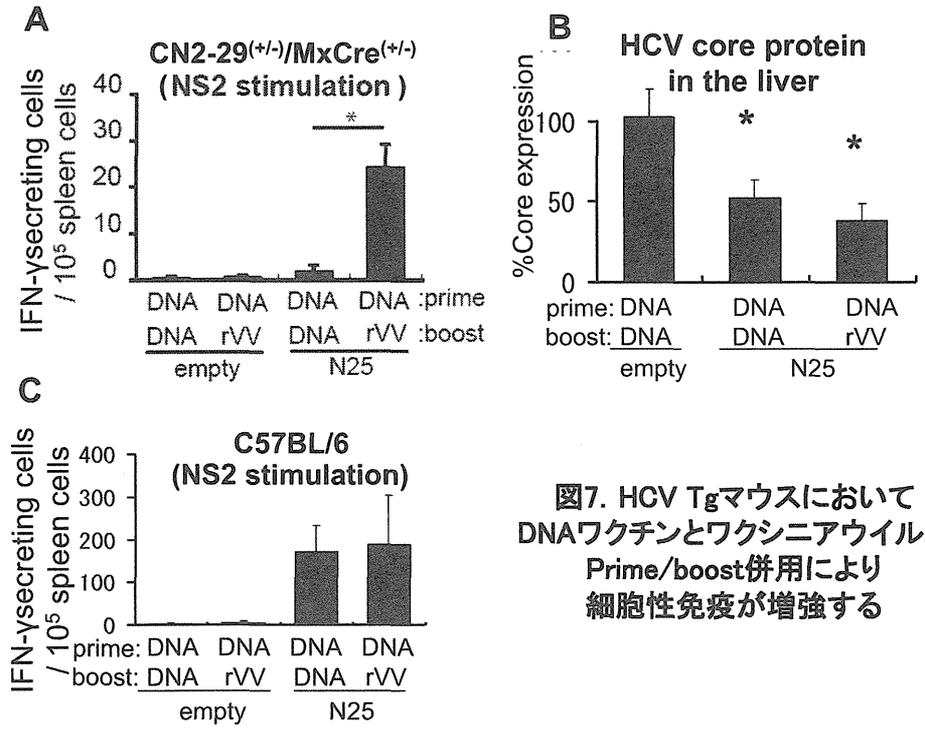


図7. HCV Tgマウスにおいて DNAワクチンとワクシニアウイルス Prime/boost併用により 細胞性免疫が増強する

C型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子を用いた感染機構の解析と中和抗体の
評価

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： これまでに遺伝子型1b、2a由来の構造蛋白質を用いてC型肝炎ウイルス

(HCV) の1回感染性トランスパッケージング型粒子(HCVtcp)産生系を確立し、ウイルス感染機構の解析を行った。今年度はHCVtcp作製に用いるHCVレプリコンのレポーター遺伝子を改変し、検出感度を約100倍高める事に成功した。これにより、従来の方法では感染価が認められなかった株でもHCVtcpの作製が可能となり、現在までに遺伝子型1a、1b、2a、3a由来の7つの株の感染性HCVtcpが得られた。これらのHCVtcpを、HCVエンベロープ蛋白質であるE1およびE2に対するモノクローナル抗体あるいはウサギ抗血清の中和活性評価に用い、遺伝子型の異なるHCVtcpに対して中和活性を示すモノクローナル抗体を見いだした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界で1.7億人、国内で150万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者数は国内で年間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、難治療の症例も未だ存在する事から、さらに新しい治療法の開発も求められており、そのためにもHCVの生活環についてのより詳細な理解が必要不可欠である。

これまでHCV生活環の中でも感染初期段階であるウイルスの細胞侵入過程の解析や

中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス(HCVpp)が用いられてきた。しかしHCVppは肝臓由来ではない細胞で作製され、またそのウイルス粒子中にレトロウイルス由来の蛋白質を含む事から、培養細胞由来のHCV(HCVcc)とは部分的に異なる性質を有する事が明らかになりつつある。本研究では、HCVワクチン等により免疫誘導された抗体の感染中和活性を正しく評価する為に、HCVppと同様に1回感染性でありながら、よりHCV本来の性質に近いと考えられるトランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)の作製方法の改良を行った。ウイルス感染の検出感度を高める事により、従来の方法

では感染価が認められなかった株由来の構造蛋白質を用いたHCVtcpの作製が可能になった。またそれらのHCVtcpを用い、抗体の中和活性の評価を行った。

B. 研究方法

遺伝子型1a、1b、2a、3a由来HCVの遺伝子配列を用い、coreからNS2領域を発現するプラスミドを作製した。一方で、JFH-1株由来のレプリコンプラスミドのレポーター遺伝子部分を、従来から用いているFirefly luciferaseから、Gaussia Luciferase (G Luc)に置換したプラスミドを作製した。構造領域発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドの2種類をHuh7.5.1細胞へトランスフェクションしてHCVtcpを作製した。HCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清についての感染中和活性の評価の為に、段階希釈した各種抗体または抗血清とHCVtcpを室温で1時間反応させ、その後ウイルス液をHuh7.5.1細胞に添加し、感染させた。2日後の培養上清のG Lucの活性を測定し、コントロール群と比較する事により、感染中和活性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は行っていない。

C. 研究結果

レポーター遺伝子をG Lucに置換したレプリコンプラスミドをHuh7.5.1細胞に導入すると、ウイルスゲノム複製により得られるLuciferase活性はFirefly luciferaseを

用いた場合よりも約2桁高かった。このレプリコンプラスミドを、様々な株由来のHCV構造領域発現プラスミドと一緒にHuh7.5.1細胞に導入すると、これまでのレプリコンプラスミドでは感染価が認められなかった株においても、HCVtcpの感染性が確認できた。しかし依然として感染性が認められない株も存在した。

次にこれらのHCVtcpを用いて、HCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清について感染中和活性を評価した結果、中和活性を持つモノクローナル抗体を見だし、またこのモノクローナル抗体は、遺伝子型の異なる複数の株のHCVtcpに対しても中和活性を示した。

D. 考察

HCVレプリコンのレポーター遺伝子をG Luc遺伝子に置換する事により検出感度が約100倍高まり、従来の方法では感染価が認められなかった株を用いてHCVtcpを作製する事が出来た。これはウイルスのゲノム複製効率や感染性粒子の形成/産生効率が向上したのではなく、レポーターの検出感度の上昇が寄与しているものと考えられた。本研究による複数の遺伝子型/株由来のHCVtcpを用いる事により、迅速、簡便な感染中和アッセイのスクリーニングが可能となり、幅広い遺伝子型に対して活性を示す中和抗体の探索が期待される。

E. 結論

HCVpp に比べて、より HCV 本来の性質を反映した解析ツールと考えられる HCVtcp

を、多くの株を用いて作製する事が可能となった。これらを用いる事により、感染中和活性の評価が可能となり、中和活性を有するモノクローナル抗体を見いだした。

F. 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 H.H, Suzuki R, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. Overcoming hostrestriction 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-alpha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.

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.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

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
Yasui F. et al. (小原)	Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication	<i>J. Med. Virol.</i>	85	241-249	2013
Watanabe T. et al. (小原)	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene	<i>Gut</i>	In press		2013
Kasama Y. et al. (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3	<i>Virus Res.</i>	163	405-409	2012
Saito M. et al. (小原)	Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1	<i>J. Med. Virol.</i>	84	733-746	2012
Weng L. et al. (小原)	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase	<i>Gene</i>	496	79-84	2012
Konishi H. et al. (小原)	An orally available, small-molecule interferon inhibitor inhibits hepatitis C virus replication	<i>Sci. Comm.</i>	2:259	1-9	2012
Kubota N. et al. (小原)	HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells	<i>FEBS letter</i>	30:586	2318-2325	2012