

- 21) Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-521 (2011).
- 22) Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
- 23) Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
- 24) Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163:405-409 (2012).
- 25) Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84(1):303-311 (2010).
- 26) Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. *J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).
- 27) Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23):4926-4933 (2010).
- 28) Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010).
- 29) Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virology* 84(22):11761-11770 (2010).
- 30) Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).
- 31) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
- 32) Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in

acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

33) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) 出願日：平成24年12月12日、出願番号：特願2012-270987

発明の名称：肝線維症の予防または治療剤

発明者：公益財団法人東京都医学総合研究所；小原道法、株式会社PRISM Pharma；小田上剛直、小路弘行

出願人：公益財団法人東京都医学総合研究

所、株式会社PRISM Pharma

2) 出願日：平成22年9月9日、出願番号：「特願2010-202355」、発明の名称：「難治性ウイルス感染症の治療剤」、発明者：小原道法、中川慎一郎、出願人：東京都医学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成22年度～24年度 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

ウイルス性肝炎に対する治療的ワクチンの開発に関する研究

瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：ヒトに使える抗HCVのDNAワクチンの開発を目的とした。細胞性免疫誘導のため、DNAワクチンに併用するTh1アジュバントと評価のための免疫不全の無いHCV感染マウスモデル(MAVS^{-/-})の確立を担当した。Th1アジュバントは細胞性免疫誘導のため必須であり、マウスモデルは汎用的なC型肝炎のマウスモデルとなりうる。成果は肝炎・肝がん対策の免疫創薬に導入することができ、独創性の高いHCV対策への戦略が期待できる。

A. 研究目的

小原らの作製したC型肝炎マウスモデル(HCV/Cre-Tg)を基に、組み替えワクチニアウイルス株(GMP準拠)のヒト(C型肝炎患者)への治療ワクチンとしての開発を目指す。現行のHCV罹患者に対するインターフェロン/リバビリン療法は副作用や不応答群の問題が残されており、分子標的剤の開発により治療改善が期待できるが、20%程度の治療抵抗群が残る。発がんは今後も特に開発途上国で増えると想定されるのでワクチン開発の意義は高い。HCVを完全排除し、NK細胞、CTLを十分に活性化できるワクチンを創成できればHCV持続感染患者にもたらす福音は計り知れない。

B. 研究方法

HCV蛋白の高持続発現Tgマウス(KO-HCV/Cre-Tg)の作製を目指してHCV/Cre-TgマウスをMAVS^{-/-}、Riplet^{-/-}マウスと交配中である。一方、Th1アジュバントとしてRNA duplexを想定しており、多く

の合成品を作製して機能を検討中である。正常マウスのNK, CTL, Th1/2, Th17などの誘導機能を査定した。NK, CD8 T, CD4 T細胞の枯渇系とCross-priming査定系を構築した。

(倫理面への配慮)

本研究は大学等における実験動物の指針に準じて行い、大学の動物実験委員会に申請して承認を得た。

C. 研究結果

HCV感染のマウスモデルとしてMAVS^{-/-}、Riplet^{-/-}の肝細胞がJ6JFH-1株の複製を許すこと、ヒトCD81を発現させればHCV感受性になることを証明した。肝細胞株でその成果を検証し、培養系のHCV感染実験を施行している。HCV感染動物モデルとしてKO-HCV/Cre-Tgマウスの発がん頻度がMAVS経路の遮断で上がるかを検討する。

次にDNAワクチンがTh2シフトを誘導し、CTL, NKを強く活性化し難いことを見出した。この問題を克服するため、C型肝炎患

者に害のない Th1 アジュバントを合成することを試みた。多くの候補から RNA duplex の特有な 2 次構造を持つ試作品を得、現在化学合成を施行している。

In vitro 合成物には NK 活性化、CTL 誘導に有利な物質があり、これを DNA ワクチンと併用して効果の改善が果たせるかを検討予定である。なお、DNA の単独投与は STING 経路を活性化するため、この経路と Th2 指向性の関係を検証している。

Cross-priming アッセイで Th1 から CTL を誘導する機構についても HCV が誘導する宿主蛋白の機能修飾を含めて検討中である。

D. 考察

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。この MAVS^{-/-}系は今後の HCV 発がんモデル実験の試金石になる。本 MAVS^{-/-}マウス肝細胞株を使って肝炎患者からウイルス分離ができれば IFN のバイアスの無いウイルス株を抽出しうる。本研究の HCV/Cre-Tg と自然免疫改変モデルマウスが以上の解析に有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

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。我々の RNA アジュバントはこの目的に合致する。現在の試作品が化学合成できれば CTL, NK などエフェクター効果の高いワクチンの提供が可能になる。副作用などの有害事象を排除

した最善の剤形について今後の検討が必要である。

DNA ワクチンは DNA センサーを活性化する。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。この点を自然免疫の分子機構として解明することは重要なのでヒトへの投与の前に解析を進める必要がある。

E. 結論

HCV の DNA ワクチン開発のために DNA ワクチンに併用する Th1 アジュバントの開発を行い、効果的な細胞性免疫誘導に成功した。今後 HCV/Cre-Tg のマウス系で効果査定を進める。その評価のための免疫不全の無い HCV 複製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。マウスモデルは汎用的な C 型肝炎のマウスモデルとなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表
320 (review).

2012

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. *Oncol Immunol.* 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)
- 2011**
13. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2011. IL-23-dependent and -independent enhancement pathway of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23: 29-41.
 14. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Molec. Immunol.* 48: 497-504.
 15. Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 86: 10702-10711.
 16. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.
 17. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* 31: 3802-3819.
 18. Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. 2011. Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* 85: 5423-5435.
 19. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides *in vivo*. *PLoS ONE.* 6 (4). e18833.
 20. Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. 2011. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. *PLoS ONE.* 6 (6): e21284.
 21. Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* 187: 5320-5327.
 22. Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, A. Ghadiri, S. Boucheriti, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rosenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, T. Seya, M. Matsumoto, N. Rezeai, D. Chaussabel, A. Puel, L. Abel, S-Y. Zhang, S. Al-Muhsen, and J-L. Casanova. 2011. Human TRIF deficiency in otherwise healthy patients with herpes simplex encephalitis. *J. Clin. Invest.* 121: 4889-4902.
 23. Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, M.

Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2012. Phosphoinositide 3-kinase<gamma> controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE*. 6(10): e26836.

24. Matsumoto, M., H. Oshiumi, and T. Seya. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21: 67–77 (review).

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

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

2010

27. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molec. Immunol.* 47: 1283–1291.

28. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40: 940–948.

29. Akazawa, T., N. Inoue, H. Shime, K. Sugiura, K. Kodama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101: 1596–1603.

30. Azuma, M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* 5: e12550.

31. Tatematsu, M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 (TICAM-1)-mediated IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 285: 20128–20136.

32. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207:

2675–2687.

33. Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus (HCV) core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS ONE*. 5: e14258.

34. Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe*. 8: 496–509.

35. Seya, T., H. Shime, T. Ebihara, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2010. Pattern-recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 101: 313–

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（総合研究報告書）

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、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

ンの作製

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

(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) ウェスタンブロット法によるHCV蛋白質発現の確認

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

(4) 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週目に脾臓、肝臓を回収し解析を行った。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。

(5) ELISPOT法および ^{51}Cr 遊離法による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 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 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。 ^{51}Cr 遊離試験においては、50 mlフラスコ内で脾細胞(5×10^7 /ml)と刺激細胞(1×10^7 /ml)を5日間培養し、エフェクター細胞を誘導した後、 ^{51}Cr 標識した標的細胞(EL-4/NS2)を用いて測定した。

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

HCV-DNA ワクチンを予め2週毎に3回投与し、最後の投与から4週間後に、HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞(EL-4/CN2またはEL-4/N3-4)をマウス側腹部皮下に移植し、7日後に腫瘍の大きさ(長径 \times 短径 \times 厚径 \times 1/2)を測定した。また、HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞(EL-4/NS2)をマウスに移植し、その後のマウスの生存率についても測定した。

(7) 肝臓の解析

2週毎に3回、HCV-DNA ワクチン投与した

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

(8) DNAワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験

C57BL/6マウスに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蛋白質を発現させた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コア蛋白質発現量測定)と脾臓(ELISPOT法によるCTLの測定)を採取し、解析を行った。

(9) マウス脾臓樹状細胞の機能解析

C57BL/6、RzCN5-15^(+/-)/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RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスの足蹠に投与(2×10⁵)し、2週後に脾臓中の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) HCV遺伝子発現DNA(HCV-DNA)ワクチンの作製

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

(2) HCV蛋白質の発現確認

作製したHCV-DNAワクチンをCOS7細胞に導入し、ウエスタンブロット法によりCore蛋白質の発現が見られることを確認した(図2)。

(3) 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。empty投与群由来の脾臓細胞は刺激後、何ら特異的なスポットを示さなかったが、HCV-CN2投与群由来の脾臓細胞は、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3A)。さらに、脾臓より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3B)。

⁵¹Cr遊離法によるCTL誘導の検討ではHCV蛋白質を発現しないEL4細胞をtarget細胞とした時、empty、HCV-CN2、HCV-N25を投与したマウスから採取したいずれの脾臓細胞にお

いても細胞傷害活性はほとんど見られなかった (data not shown) が、target細胞として、EL-4/NS2を用いたところ、empty投与群由来の脾細胞において、細胞障害活性は見られなかったが、HCV-CN2、HCV-N25投与群由来の脾細胞は、EL-4/NS2による刺激後に細胞傷害活性が認められ、HCV抗原特異的な細胞傷害活性がHCV-DNAワクチンにより誘導されていることを確認した (図4)

(4) HCV蛋白発現腫瘍細胞接種マウスを用いた *in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能の評価

HCV-DNAワクチンを投与したC57BL/6マウスに、HCV蛋白発現腫瘍細胞 (EL-4/CN2またはEL-4/N3-4A細胞) をマウス側腹部皮下に移植し、7日後に腫瘍の大きさを評価したところ、腫瘍の大きさは、empty投与群に比べHCV-DNAワクチン (HCV-CN2、HCV-N25) 投与群で有意に減少した (図5)。

また、HCV蛋白発現腫瘍細胞 (EL-4/NS2) をマウスに移植し、その後の生存率を評価したところ、生存率は、empty投与群に比べHCV-DNAワクチン (HCV-CN2、HCV-N25) 投与群で有意に上昇し、マウス体内においてHCV抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが確認できた (図6)。

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

HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させたCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにHCV-DNAワクチンを投与し、肝臓中のHCVコア蛋白発現量を測定したところ、empty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していることを確認した (図7A)。

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7B) ことから、HCV-N25 DNA ワクチンによるHCV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。

また、肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させたマウスの肝臓では、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常が多数観察されるが、HCV-N25投与群においてそれらの異常が改善されることを確認した (図8)。

しかし、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9A)。さらに、脾臓よりCD8⁺、CD4⁺細胞を分離し、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 9 B)。これらの現象は別種の 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 9 C)。(6) 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 10) 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によるものである可能性が考えられたので、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 11)。

(7) 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 HCV-DNA ワクチンを投与した後、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 12 A) が、肝臓中のコア蛋白発現量については、HCV-N25 DNA ワクチン 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 12 B)。

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 7A)、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 (図 8)。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 9)、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 11) 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事が考えられる。

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 12 A) が、WT マウスに投与した際に誘導される細胞性免疫 (図 12 C) 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

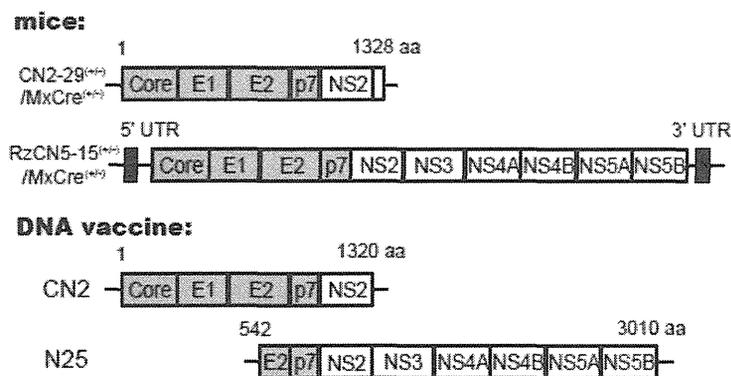
1. 論文発表

- 1) Yoshida,T., Omatsu,T., Saito,A., Katakai,Y., Iwasaki,Y., 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.
- 2) 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.
- 3) Uchida,A., Sasaguri,H., Kimura,N., Tajiri,M., Ohkubo,T., Ono,F., Sakaue,F., Kanai,K., Hirai,T., Sano,T., Shibuya,K., Kobayashi,M., Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai,Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012;135;833-846.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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; 44:1051-1055.
- 7) 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.
- 8) Nomaguchi,M., Yokoyama,M., Kono,K., akayama,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*
- 9) 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*
- 10) Tougan,T., Aoshi,T., Coban,C., Katakai,Y., Kai,C., Yasutomi,Y., Ishii,KJ. and Horii,T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum.Vac.Immunother. in press*
- 11) Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H.,

- Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi,Y.
Periventricular Leucomalacia(PVL)-like
lesions in two neonatal cynomolgus
monkeys (*macaca fascicularis*).
J.Comp.Pathol. 2011;144:204-211.
- 12) Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda, H.,
Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata, H.,
Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi,Y.,
Mineno,J., Kim,S., Inouye,M. and Kato,I.
Acquisition of HIV-1 Resistance in T
Lymphocytes Using an ACA-specific E. coli
mRNA interferase. *Human Gene Ther.*
2011;22:35-43.
- 13) Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S.,Lee,Y-
J.,Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T.,
Yasutomi,Y., Adachi,A., Matano,T.,
Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1
derivative encoding only minimal SIV
sequences can replicate in cynomolgus
monkeys. *Micorbes and Infection*
2011;13:58-64.
- 14) Xing,L., Wang,J.C., Li,T-C., Yasutomi,Y.,
Lara,J., Khudyakov,Y., Schofield,D.,
Emerson,S., Purcell,R., Takeda,N.,
Miyamura,T. and R.Holland Cheng. Spatial
configuration of hepatitis E virus antigenic
domein. *J.Virol.* 2011;85:1117-1124.
- 15) Chono,H., Saito,N., Tsuda, H., Shibata, H.,
Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi,Y.,
Mineno,J. and Kato,I. In vivo safety and
persistence of endoribonuclease gene-
transduced CD4+ T cells in cynomolgus
macaques for HIV-1 gene therapy
model. *PLoS One* 2011;6:
16) Matsuo,K. and Yasutomi,Y.
Mycobacterium bovis bacille Calmette-
Guérin as a vaccine vector for global
infectious disease control.
Tuberculosis Res. Treat. 2011
17) Hirata,H., Kawai,S., Maeda,M., Jinnai,M.,
Fujisawa,K., Katakai,Y., Hikosaka,K.,
Tanabe,K., Yasutomi,Y. and Ishihara,C.
Identification and Phylogenetic Analysis of
Japanese Macaque *Babesia*-1 (JM-1)
Detected from a Japanese Macaque
(*Macaca fuscata fuscata*).
Am.J.Trop.Med.Hyg. 2011;85:653-658.
- 18) Iwasaki,Y., Mori,K., Ishii,K., Maki,N.,
Iijima,S., Yoshida,T., Okabayashi,S.,
Katakai,Y., Lee,YJ., Saito,A., Fukai,H.,
Kimura,N., Yoshizaki,S., Suzuki,T.,
Yasutomi,Y., Miyamura,T., Kumagai,M
and Akari,H. Long-term persistent GBV-B
infection and development of a choronic
and progressive Hepatitis C-like disease in
Marmosets. *Front.Microbiol.* 2011;2:240.
- 19) Yasuhiro Yasutomi. Establishment of
Specific Pathogen-Free Macaque Colonies
In Tsukuba Primate Research Center of
Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010:
B75-B77.
- 20) Yoshida,T., Saito,A., Iwasaki,Y.,Iijima,S.,
Kurosawa,T., Katakai,Y., Yasutomi,Y.,
Reimann,K.A., Hayakawa,T. and Akari,H.
Characterization of natural killer cells in
tamarins: a technical basis for studies of
innate immunity. *Frontiers Microbiol.*
2010; 1:1-9.
- 21) Fujimoto,K., Takano,J., Narita,T.,
Hanari,K.,

- Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K., Kurata,T. and Yasutomi,Y. Simian Retrovirus type D infection in a Colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.
- 22) Cueno,M.E., Karamatsu,K., Yasutomi, Y., Laurena,A.C. and Okamoto.T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010;19:889-895.
- 23) Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., Yasutomi,Y., Matano,T. and Kimura,A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.



Recombinant Vaccinia Virus:

rVV-CN2、rVV-N25はそれぞれDNA vaccineに組み込んだCN2、N25と同配列を持つ

図1. C型肝炎モデルマウスとHCV遺伝子発現DNAワクチン

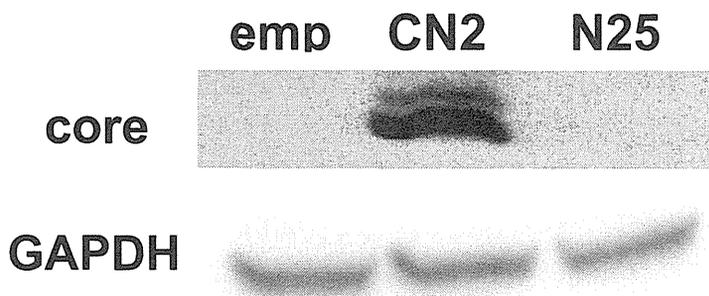


図2. ウェスタンブロット法によるCore蛋白質発現の確認

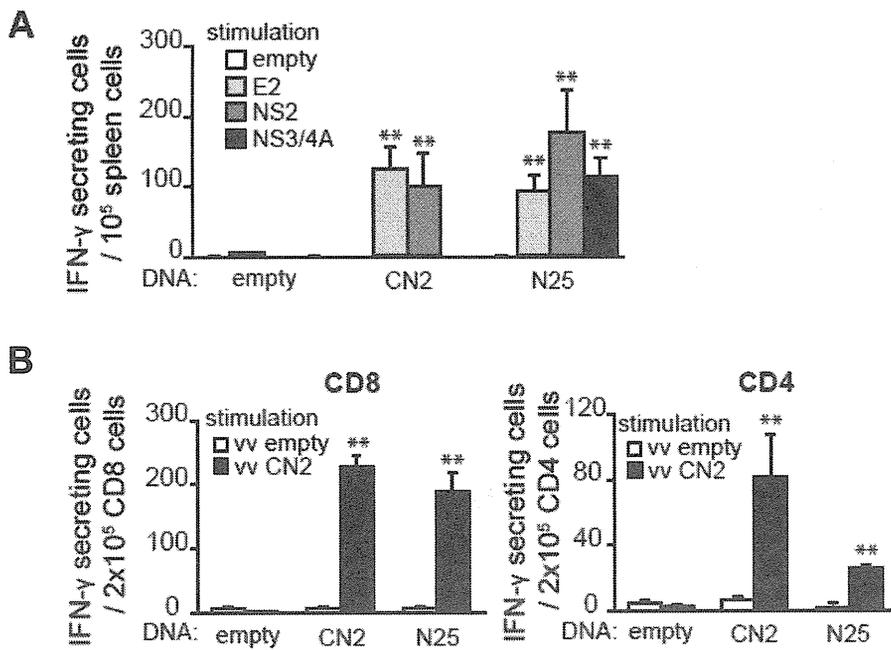


図3. HCV DNAワクチンはHCV特異的細胞性免疫反応を誘導する

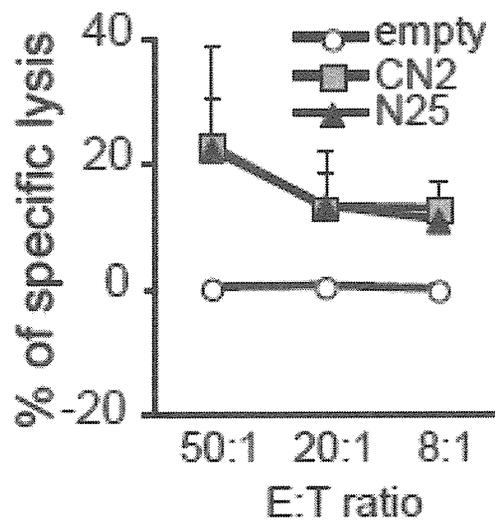


図4. ⁵¹Cr遊離法による細胞性免疫誘導能についての評価

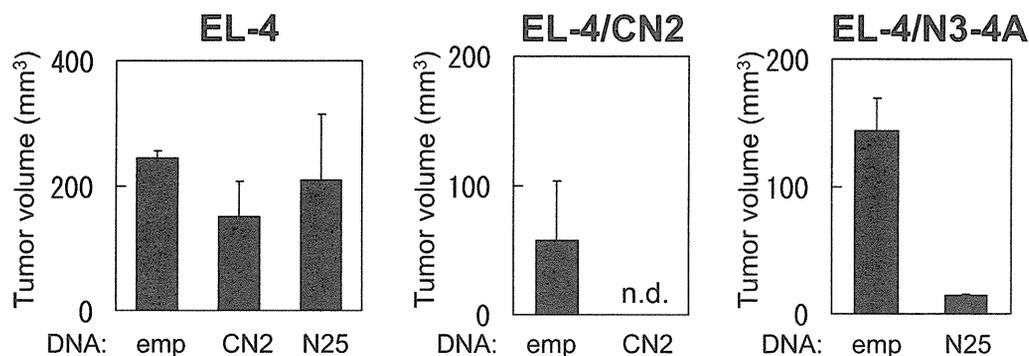


図5. HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスモデルを用いたHCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価 (腫瘍の大きさ)

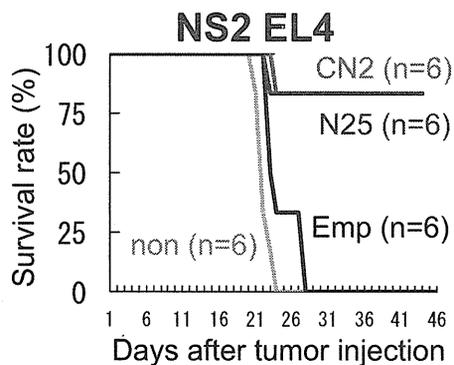


図6. HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスモデルを用いたHCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価 (生存率)

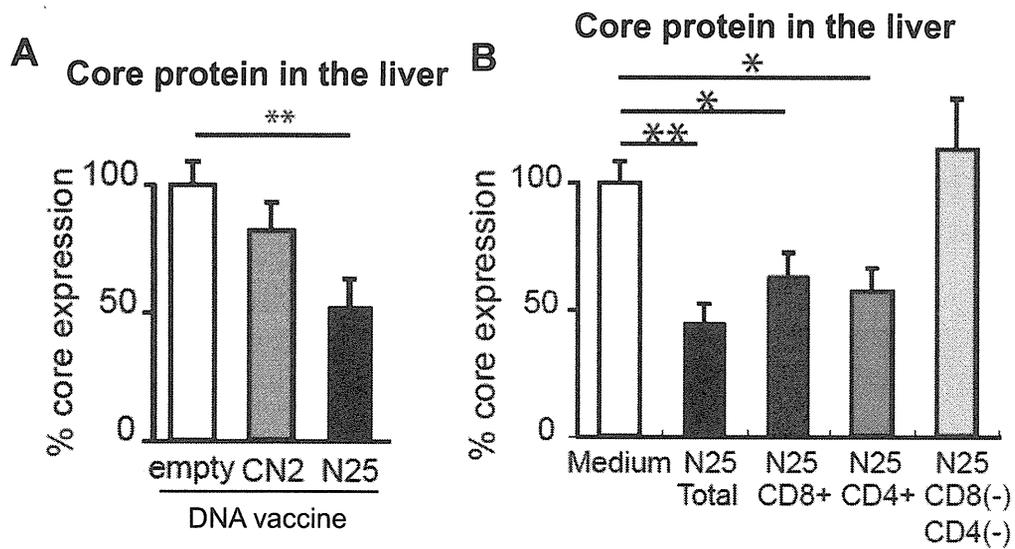


図7. HCV N25DNAワクチンはCD8+,CD4+細胞依存的に肝臓中コア蛋白発現量を減少させる

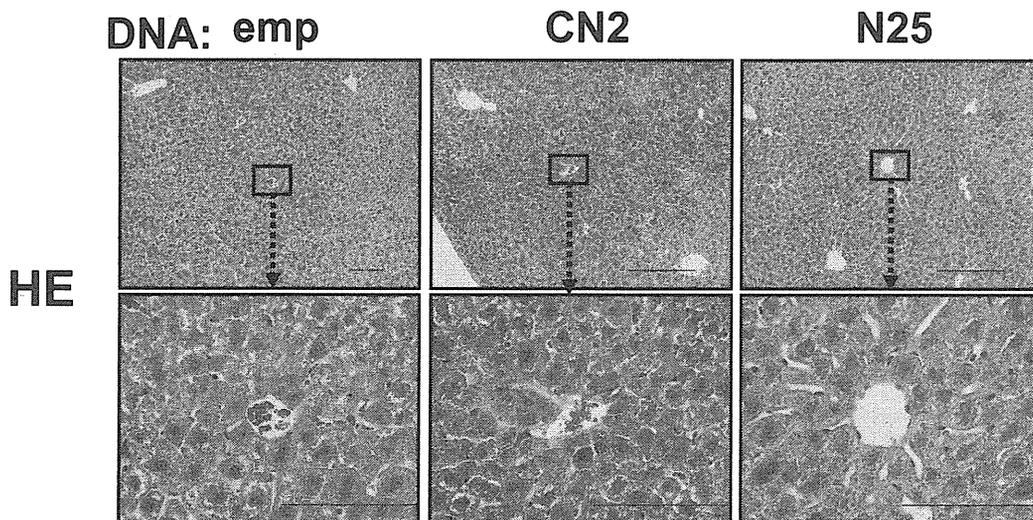


図8. C型肝炎モデルマウス肝臓における形態学的検索

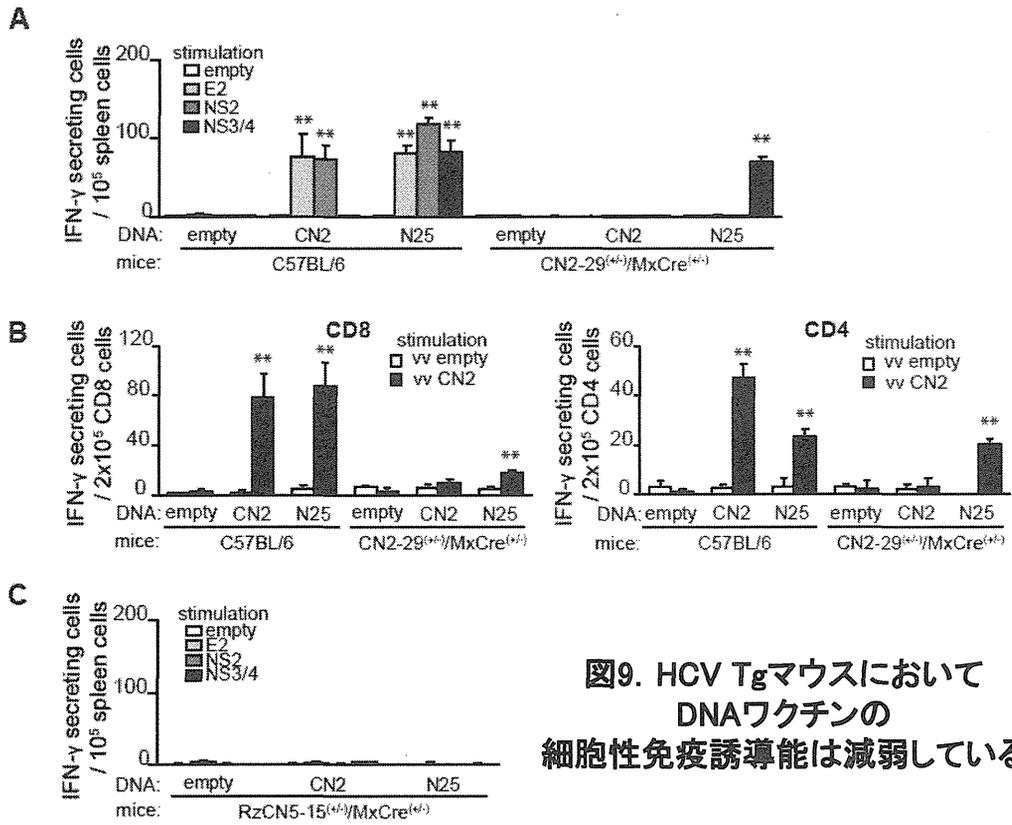


図9. HCV T_gマウスにおいて DNAワクチンの細胞性免疫誘導能は減弱している

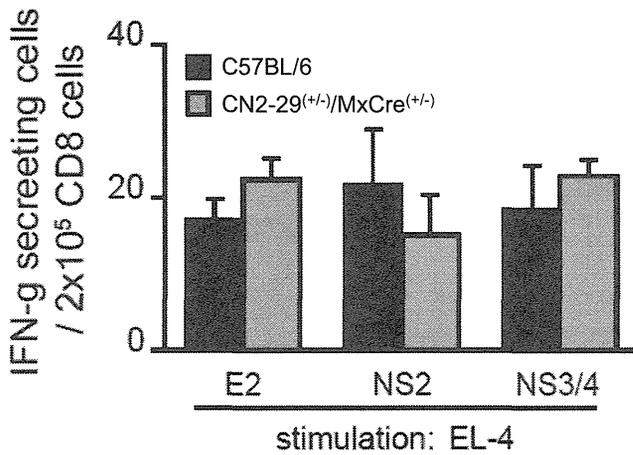


図10. HCV N25投与WTマウスから WT,HCV T_gマウスへの脾臓細胞移入実験