

201227036A

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

C型肝炎ウイルスの新規ワクチン開発に関する研究

平成24年度 研究報告書

研究代表者 渡邊 則幸

平成25(2013)年 3月

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

C型肝炎ウイルスの新規ワクチン開発に関する研究

平成24年度 研究報告書

研究代表者 渡邊 則幸

平成24(2013)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
C型肝炎ウイルスの新規ワクチン開発に関する研究 渡邊 則幸	----- 1
(資料) 研究結果の図	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11

I.総括研究報告

C型肝炎ウイルスの新規ワクチン開発に関する研究

渡邊 則幸 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨:C型肝炎ウイルスのワクチン開発を目的として、昆虫細胞を用いて virus-like particle (VLP)の作製を試みた。昆虫細胞 Drosophila S2細胞に HCV コアタンパク質を発現させると HCV コアタンパク質は培養上清中に分泌され VLP 構造を形成していた。更に、HCV コアタンパク質からエンベロープ 2 タンパク質まで含む構造領域を発現させても同様に VLP として分泌された。これらの C型肝炎ウイルスの構造領域の VLP について大量産生システム、精製法を確立した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス感染者は徐々に肝炎を発症し、炎症が慢性化すると肝硬変、最終的には10~30年かけて肝ガンへと進行することが知られている。肝ガンの原因の大部分はC型肝炎ウイルスによることが報告されており、現在のところ感染患者への治療としてはペグリバビリン-インターフェロン併用療法が有効であるが、すべての感染患者に対して効果がある訳ではない。遺伝子型1a型で約50%、遺伝子型2a型で約80%の患者において血液中のウイルスが陰性になることが報告されている。このことから感染予防ワクチンや抗ウイルス薬治療によるウイルス排除の対策が望まれる。

本研究では、ワクチンの候補としてVLPを用いることで誘導される抗体の感染中和効果について解析したい。中和抗体の誘導に関しては、培養細胞系から調整した感染性HCV粒子、

組換えウイルス蛋白質およびVLP粒子を比較検討することでVLPがワクチンの候補になり得るのかを検証したい。

本研究で使用するVLPは昆虫細胞株である Drosophila S2細胞を用いて作製する。この細胞を用いる利点としては、S2細胞で作製した精製エンベロープ2タンパク質は培養細胞でのウイルス感染評価系において感染阻害効果を示すことである。一方、ヒト293T細胞から調整した精製エンベロープ2タンパク質においては阻害効果が極めて低いことから、S2細胞で作製したタンパク質については正常な立体構造を形成しやすいと考えられる。つまりS2細胞を用いることで感染性HCV粒子と同様の構造を有するVLPの作製が期待できる。また、細胞に組み込む遺伝子はHCV構造領域のみであるためRNA複製はせずに感染性を全く示さないことからワクチンとして用いる場合の安全

性は高いと言える。初めに、HCVコアタンパク質領域のVLPの性状を解析したうえで、エンベロープ2タンパク質までを含むVLPを作製、精製する。更にワクチンとしての中和抗体の誘導効果について実験動物を用いて検討する。

B. 研究方法

・細胞培養

VLP 産生には昆虫細胞株 *Drosophila* S2 細胞を用いた。S2 細胞は、Schneider's *drosophila* 培地に 10% fetal bovine serum, 100 unit/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを添加して完全培地を用いて培養した。VLP 産生安定細胞株は 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HygromycinB を含む完全培地で培養した。

・HCV タンパク質発現プラスミド作製

発現プラスミドに挿入する遺伝子配列(コア領域:DNA 配列 341 から 913 番目、コアからエンベロープ 1 および 2 領域:DNA 配列 341 から 2605 番目)は NotI と XbaI サイトを付加したプライマーと鋳型 DNA (HCV JFH-1 株 および J6 株)を用いて PCR で増幅した。その後、制限酵素処理、ライゲーションを行い、昆虫細胞発現プラスミド pMT に挿入した。

・昆虫細胞への発現プラスミド導入と安定細胞の樹立

作製した昆虫細胞発現プラスミド pMT-JFH1-core(アミノ酸番号 1-191), pMT-J6-core(アミノ酸番号 1-191), pMT-J6-coreE1E2(アミノ酸番号 1-755)を 2 μg と薬剤選択用プラスミド pCohygro を 0.1

μg を Lipofectamine2000 試薬 5 μl を用いて 2×10^6 乗個の S2 細胞にリポフェクション法で遺伝子導入した。その後、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HygromycinB を含む完全培地で 3 日おきに継代培養し 3 週間後に安定細胞株を得た。

・樹立した安定細胞株を用いた VLP の発現誘導

$2 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度の安定細胞株に、最終濃度が 0.5 mM になるように CuSO_4 を添加して 5 日間培養する。VLP を含む培養上清は遠心 (1,000g, 10 分) した後、0.2 μm のフィルターを通して細胞および分解物を除いたものを用いた。

・HCV コアタンパク質量の測定

試料中の HCV コアタンパク質の量はルミパルス G1200 (富士レビオ) を用いて測定した。

・シヨ糖密度勾配法

不連続なシヨ糖勾配液の上に培養上清を重層した後 (図 1)、SW41 ローターを用いて超遠心 (35,000 rpm, 16 時間) を行った。超遠心で分離した後、上から 20 フラクションを回収した。

・VLP を含む培養液の濃縮

培養上清の濃縮は、Hollow Fiber (500 kDa) を用いた限外濾過を行い約 3L の培養上清を 20 倍に濃縮した。電子顕微鏡観察のための試料については Amicon ウルトラ 100K を用いた遠心法で濃縮を行った。

・硫酸アンモニウム沈殿によるタンパク質濃縮

4 °Cに冷却した培養上清に 100 ml あたり 33 g の硫酸アンモニウム試薬を攪拌しながら溶解させた。その後、4°Cで静置してタンパク質を沈殿させた。沈殿を遠心で回収して PBS に溶解した後、透析で硫酸アンモニウムを除いた。

・ゲル濾過

HCV コア粒子の分子量については培養上清を Superdex200 カラムでサイズ分画しておおよその分子量を算出した。また、濃縮した培養上清を superdex200 カラムでサイズ分画し HCV コアタンパク質のピークのフラクションを集めて、これを VLP フラクションとして電子顕微鏡で解析した。

C. 研究結果

(1)HCV コアタンパク質産生 S2 細胞の樹立

HCV コアタンパク質発現プラスミドおよび薬剤選択プラスミド pCohygro を S2 細胞にリポフェクション法で遺伝子導入し、HygromycinB 存在下で 3 週間培養することで安定細胞株を樹立した。樹立した安定細胞株に CuSO₄ を添加することで HCV コアタンパク質を発現させた。細胞培養液、および細胞抽出液中の HCV コア量をルミパルス G1200 で測定し、細胞内、培養上清中への HCV コアタンパク質の発現を確認した。S2 細胞に発現した HCV コアタンパク質は培養上清中に分泌されることが分かった。

(2)培養上清中の HCV コアタンパク質の性状解析

発現誘導によって培養上清中に分泌された HCV コアタンパク質の性状について、図 1 に示したショ糖密度勾配法で分画して HCV コアタンパク質の密度を測定した。もし肝ガン細胞株を用いた細胞培養系で産生した HCV と同じように粒子構造を形成しているのであれば 1.15 g/ml の密度で検出される。測定の結果、安定細胞株から培養上清中に分泌された HCV コアタンパク質は 1.06 g/ml の密度を示した。(図 2 上) HCV コアタンパク質の特徴の一つとして脂質との親和性が多数報告されている。そこで培養上清を界面活性剤 NP-40 で処理を行いショ糖密度勾配法で同様に密度を測定した。その結果、1.06 g/ml のピークが 1.15 g/ml に変化した。(図 2 下)これは界面活性剤処理によりコアタンパク質から脂質が除かれたための変化であると考えられる。また、培養上清をゲル濾過法にて分画して粒子構造の分子量を測定したところ約 1000kDa の巨大分子構造であることも分かった。これらの結果は S2 細胞においても粒子構造を形成した virus-like particle (VLP) が分泌されることを示唆する結果である。

分泌された粒子が VLP であることを確かめるために培養上清の濃縮、粗精製を試みた。試料を電子顕微鏡で解析したところ、図 3 に示すように 50-100 nm の粒子構造が確認された。

(3) HCV コアタンパク質からエンベロープ 2 タンパク質までを産生する S2 細胞の樹立

S2 細胞に HCV コアタンパク質を発現させるとコアタンパク質が VLP として培養上清中に分泌された。次に HCV コアタンパク質だけ

ではなくエンベロープ 2 タンパク質までを発現する安定細胞の樹立、タンパク質誘導を試みた。その結果、エンベロープ 2 タンパク質までを含む VLP ではコアタンパク質だけものより VLP の分泌が著しく低下した。

過去の報告から JFH-1 の構造領域を J6 株に置換することで培養細胞系での HCV 粒子産生が増加することが分かっている。これは J6 株の構造領域が粒子構造を形成しやすい、または安定な粒子構造であることが考えられる。そこで作製する VLP の構造領域を J6 株の配列に変更した。その結果、コアタンパク質からエンベロープ 2 タンパク質まで含む配列でも VLP 分泌の著しい低下は起こらずエンベロープ領域まで含む VLP の産生系を構築できた。

(4)大量培養と VLP の濃縮、精製

J6 株のコア領域を発現する細胞株、コアからエンベロープ 2 領域を発現する細胞株から VLP を含む約 3L の培養上清を得た。培養上清を限外濾過 (500kDa カットオフ) を用いた操作で約 20 倍に濃縮した。その後、濃縮液をシヨ糖密度勾配法で分画したが図 2 上に示した様なパターンでは分画されず VLP フラクシヨンのみを回収するのは困難であった。昆虫細胞で作製した VLP は密度が 1.06 g/ml と軽いことから脂質などの軽い分子を多く含むことが考えられ、濃縮することで脂質も濃くなり分画が困難になったと予想できる。

次に硫酸アンモニウム沈殿法によるタンパク質濃縮を試みた。HCV コアタンパク質量を指標に VLP を沈殿させる最適な硫酸アンモニウム濃度を調べた。培養上清に 55 %の飽和硫酸アンモニウムを加えることで 99 %の HCV

コアタンパク質が沈殿した。VLP を含む沈殿を遠心で回収して PBS に溶解し PBS で一晚透析を行った。その後シヨ糖密度勾配で分画したところ、VLP は 1.06 および 1.15 g/ml の 2 つのピークを示した。この結果はタンパク質を沈殿させても粒子構造は保たれることを示唆する。

D. 考察

我々の研究室では細胞培養系で産生した感染性 HCV 粒子を用いた抗体誘導実験を行い、中和抗体誘導にウイルス粒子の感染性は重要ではない結果を得ており、これをもとに VLP による中和抗体誘導効果の解析を考察した。

VLP 産生系についてはバキュロウイルスと昆虫細胞を用いた発現系が多くの研究で用いられている。本研究で用いる *Drosophila* S2 細胞はバキュロウイルスの産生系に匹敵するタンパク質産生系でウイルスではなく発現プラスミドを用いることから安定細胞株を容易に樹立できる。当研究室において S2 細胞産生を用いて作製、精製したエンベロープ 2 タンパク質は培養細胞系において HCV の感染阻害効果を示した。エンベロープ 2 タンパク質にはアミノ酸配列が保存されていない 2ヶ所の可変領域、分子量の約半分を占める 11ヶ所の N 型糖鎖、9 個の分子内ジスルフィド結合などがあることから構造が複雑であることが予想され、そのため未だに結晶化がなされていない。低温でのタンパク産生が可能な昆虫細胞タンパク質産生系ではこの複雑な構造が正常に形成されやすいと考えられ、この発現系を用いることで感染性 HCV に近い構造の VLP 産生が期待で

きる。

HCV コアタンパク質を S2 発現させたところ、HCV コアタンパク質領域の発現だけで VLP として細胞外に分泌されることが確認できた。分泌効率は 1 %以下であり HCV 感染細胞には及ばないが確かに分泌されており、エンベロープ 2 タンパク質領域までを発現させると VLP の分泌効率は約 4 倍にまで増加した。これは VLP が昆虫細胞で分泌経路を通して細胞外に移動すること、更にエンベロープ 2 タンパク質までの構造領域があることでより分泌経路で運搬されやすいことを示唆する。

VLP の性状については、ショ糖密度勾配による VLP の密度と電子顕微鏡像の解析を行い、密度については感染細胞とは異なる値を示した。HCV 感染細胞では HCV コアタンパク質は脂肪滴周辺に集まり、小胞体の複製複合体で粒子を形成すると考えられている。S2 細胞で作製した HCV コアタンパク質の VLP は 1.06 g/ml の密度を示したが、界面活性剤で脂質を除くと 1.15 g/ml と感染細胞で分泌される粒子と同じ密度を示した。VLP 産生に用いた S2 細胞は胚細胞由来であり肝臓細胞と異なる細胞であることから、粒子に相互作用する分子が異なるため密度に違いがあるのではないだろうか。また、電子顕微鏡像については感染性 HCV 粒子が示す 50-100 nm の大きさでやはり VLP 構造を形成していると言える。

濃縮法については、当研究室で行っている感染性 HCV 粒子の調整法に従って限外濾過を行ってみたが、濃縮後のショ糖密度勾配法で目的ピークの分画が困難でありこの方法については断念した。その他の濃縮方法として超遠心法による培養上清中の粒子の沈殿を試

みたが、これについても動物への免疫操作に用いる量の VLP を精製するのが困難であり断念した。次に、硫酸アンモニウムによるタンパク質沈殿法で培養上清のタンパク質の濃縮を試みたところ、沈殿操作による粒子の分解などは観察されず、VLP の粒子構造を保ったままの濃縮が可能であった。しかも一度沈殿させることで感染性 HCV 粒子と同じ 1.15 g/ml の密度を示した。これは脂質などの密度の軽い分子との相互作用はあまり強くない沈殿させることで解離するために起きた結果ではないだろうか。硫酸アンモニウムによるタンパク質濃縮法であれば限外濾過より溶液の量を少なくでき脂質の影響も低いことから有用な VLP 濃縮法であると考えられる。

本研究では VLP による中和抗体誘導効果の解析を行うために昆虫細胞を用いた VLP 産生系、精製法の構築まで行った。最終的な VLP の精製度を高めるためには VLP 産生量を増加させる工夫、血清濃度を低くした培地や無血清培地での VLP 産生などの方法が有効になる。また今回用いたカラムよりも大きい分子を分画できるカラムを用いることでも精製度の向上が望める。今回の精製法に更に改善を加えて免疫実験に用いるための VLP 試料を準備したいと考えている。

E. 結論

本研究は VLP による中和抗体誘導効果についての解析を目的としてスタートしたが、当初の予定通りには進まず実験動物への免疫操作に進むためには、VLP 産生量の増加、VLP 精製法の改善が必要であった。今後はこれらを改善して中和抗体誘導効果についての検

証を行いたい。

F. 健康危険情報

本研究は国民に生命、健康に重大な影響を及ぼすような情報は含まれない。

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

(1)Noriyuki Watanabe, Tomoko Date, Aly H. Hussein, Hideki Aizaki, Takaji Wakita: Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice (2012)

(2)Yoshihiro Matsumoto, Noriyuki Watanabe, Koichi Watashi, Ryosuke Suzuki, Tomokazu Matsuura, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kenjiro Wake, Takaji Wakita, Hideki Aizaki: Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice (2012)

(3)Daisuke Akazawa, Masaki Moriyama, Hiroshi Yokokawa, Noriyuki Watanabe, Tomoko Date, Kenichi Morikawa, Hideki Aizaki, Koji Ishii, Takanobu Kato, Noriko

Nakamura, Takaji Wakita: Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived Hepatitis C virus was effective both in vitro and in vivo, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice (2012)

(4)Aly H. Hussein, Koichi Watashi, Noriyuki Watanabe, Masashi Mizokami, Takanobu Kato, Takaji Wakita: Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice (2012)

(5)Noriyuki Watanabe, Tomoko Date, Hideki Aizaki, Takaji Wakita: The role of Envelope N-glycans in HCV Lifecycle, The 10th JSH Single Topic Conference, Tokyo (2012)

(6)渡邊則幸, 伊達朋子, Aly Hussein, 相崎英樹, 脇田隆字: 異なる細胞を用いて作製した E2 タンパク質の中和抗体誘導効果, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪

(7)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, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

3.その他

2.実用新案登録

なし

図1 ショ糖密度勾配

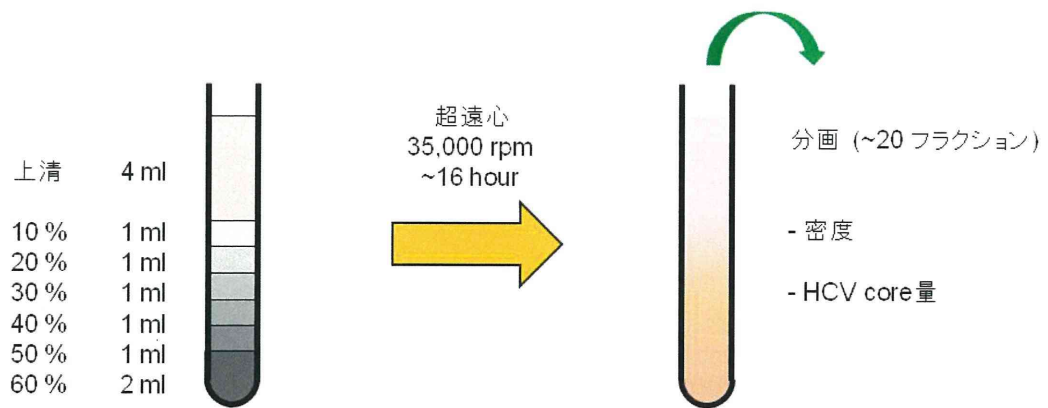


図2 上清中のHCVコアタンパク質の密度

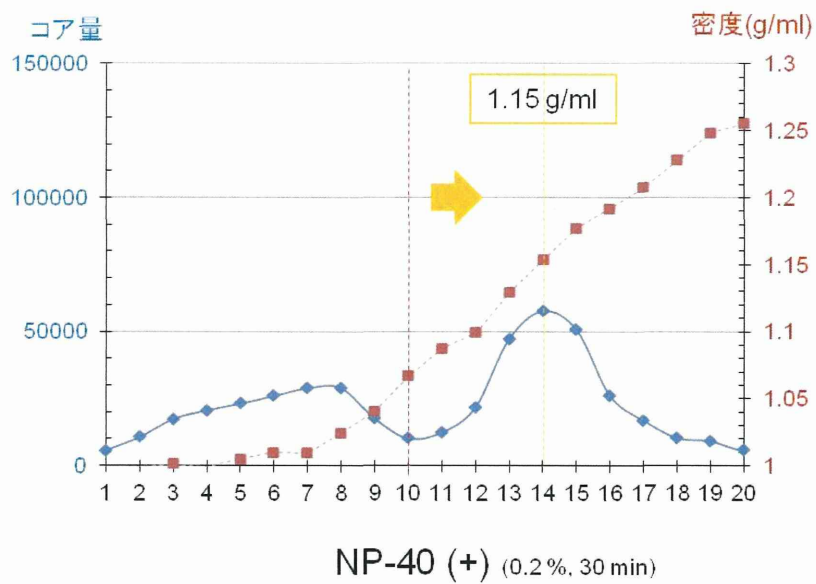
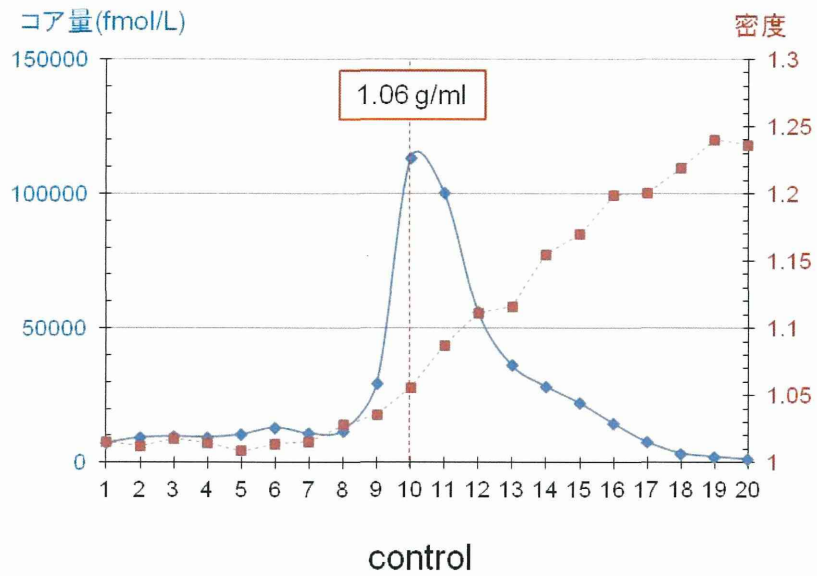
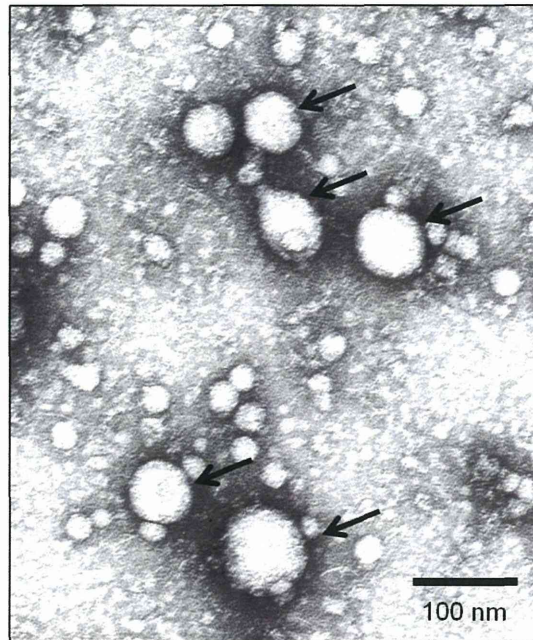


図3 電子顕微鏡解析の像



II.研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

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
	該当なし				

