

201307014A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成26（2014）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した
基礎的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究 -----	1
加藤 孝宣	
II. 分担研究報告	
1. HCVワクチン用粒子作製を目的としたHCV複製可能細胞の探索 -----	17
加藤 孝宣	
2. 感染中和抗体と感染中和機構の解析 -----	25
脇田 隆宇	
3. HCV 予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立 -----	29
明里 宏文	
4. VLP を含有する pH 応答性炭酸アパタイトナノ粒子形成の検討 -----	35
石井 孝司	
5. 日本脳炎ウイルス subviral particle を用いた C型肝炎ウイルスワクチン抗原の生産に関する研究 -----	39
鈴木 亮介	
6. マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの有効性の検討 -----	45
成見 英樹	
7. HCV粒子ワクチン製造用細胞株の探索 -正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試み- -----	49
中村 紀子	
8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能 -----	53
松本美佐子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	65

I. 総括研究報告

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究

研究代表者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨； JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルスの細胞培養系を用い、ウイルス粒子を培養細胞で大量生成し、そのウイルス粒子を精製不活化後ワクチン抗原として用いることでC型肝炎ウイルスワクチンの樹立を目指す。本年度は粒子ワクチンを用い、小型霊長類モデルであるマーモセットを用いワクチン接種の有効性と安全性の検討を開始した。その結果、一部の個体で抗HCV抗体の誘導および細胞性免疫の誘導が確認されている。また、ワクチン投与に関連した異常所見は認めていない。さらに新規HCV増殖が可能な非癌細胞由来細胞株の検索、新規ワクチン抗原の試み、新規アジュバントの確立とその評価、HCV感染評価のための新規動物モデルとなるHCVGBV-Bキメラウイルスの検討等も行っている。

研究分担者 脇田 隆字
国立感染症研究所ウイルス第二部
部長

研究分担者 松本美佐子
北海道大学大学院医学研究科
特任准教授

研究分担者 明里 宏文
京都大学霊長類研究所
人類進化モデル研究センター
教授

研究分担者 石井 孝司
国立感染症研究所ウイルス第二部
室長

研究分担者 鈴木 亮介
国立感染症研究所ウイルス第二部
主任研究官

研究分担者 成見 英樹
東レ株式会社医薬研究所
主席研究員

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

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は成人感染でも高率に慢性化し、肝硬変から肝臓に至る慢性肝疾患の原因となる。世界中に多くのHCV感染者が存在し、日本でも150万人の感染者の存在が報告されている。近年、輸血後のC型肝炎は減少しているが、医療従事者や薬剤常用者、もしくはC型慢性肝炎患者の介護にあたる者などハイリスク群では依然としてその感染のリスクにさらされている。

C型慢性肝炎患者に対する現行治療の効果は十分ではなく様々な副作用の報告もある。また、薬剤が高額なため医療経済を圧迫している。本研究によりHCVの感染予防ワクチンが実用化されれば、感染予防ワクチンによる新規感染者数およびHCV感染が関わる肝臓発症数の減少が期待できる。

我々が開発したJFH-1株を用いたHCVの培養系により、培養細胞でこのウイルスを増殖させることが可能となった。またこのシステムではHCVの培養細胞への感染が観察できるため、中和活性の評価も可能である。本研究では、このJFH-1株による

HCV細胞培養系を用い、培養細胞で増殖させたウイルス粒子を免疫原として用いることでHCVワクチンの開発を行う。これまで我々は、培養細胞で大量生産したウイルス粒子を濃縮精製し、その精製粒子をワクチン抗原として接種することにより中和抗体が得られることをマウスモデルで確認している。さらに昨年度の検討で、よりヒトに近い霊長類動物モデルであるアカゲザルでも同様の検討を行い、中和抗体の誘導を確認した。しかし、アカゲザルの検討で、中和抗体誘導が得られたのは3頭中Alumをアジュバントとして用いた1頭のみであった。この中和抗体誘導能の差は、アジュバントの違いに依るものである可能性と体重抗原量比に依存する可能性が考えられた。そこで、本年度は、霊長類動物モデルでアカゲザルより小さいマーモセットを用いて、ウイルス粒子ワクチンの安全性と有効性の評価を開始した。さらに、ワクチン抗原用ウイルス粒子の作製に適した細胞の検索、新規アジュバントの同定、新規動物モデルの構築など基礎的な検討も行っている。

B. 研究方法

1. マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

HCV粒子ワクチンとして J6/JFH1 株のウイルス粒子を使用した。J6/JFH1 株を感染させた培養細胞を大量培養し、HCV粒子を含む培養上清を限外ろ過膜とシヨ糖密度勾配遠心法により精製してワクチン抗原とした。1回の投与量は、1匹あたり 60 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV 粒子とし、アジュバントにはアカゲザルで効果のあった Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社) を用いた。

小型霊長類動物モデルとしてマーモセットを 3 頭用い、ワクチンの投与は京都大学霊長類研究所にて行った。ワクチン接種が終了したマーモセットは投与開始 16 週後に全採血および臓器摘出を行い、摘出臓器は安全性評価のためにホルマリン固定し、病理組織学的検査を行った。

また血中のHCV抗体価はJ6CF E1/FLAG融合組換え型タンパク質、J6CF E2/FLAG融合組換え型タンパ

ク質および遺伝子型1のコアタンパク質であるHCV-213 (Prospec社) を用いたELISA法で定量した。

2. ワクチン接種マーモセット細胞性免疫応答の確認

ワクチン接種マーモセットの血液より分離、凍結保存したPBMCに、HCV抗原 (HCV-213: ジェノタイプ1 Core 1-102aa ポリペプチド、HCV-214: ジェノタイプ2a Core 2-119aa ポリペプチド) を添加後 6 時間培養し、細胞よりmRNAを抽出した。IFN- γ およびGAPDH mRNA発現量をリアルタイムPCR法にて定量し、IFN- γ /GAPDH比を算出した。これを基に、同一サル個体におけるワクチン接種前後のIFN- γ mRNA相対値を算出した。

3. ワクチン用 HCV 粒子作製に適した培養細胞の探索

HuH-7 細胞以外で HCV の複製と粒子産生が可能な培養細胞の同定のため、Vero 細胞、MRC-5 細胞、CHO 細胞、MDCK 細胞、HEK293 細胞を用いて探索を行った。また、HCV ライフサイクルの各ステップでの関与が報告されている宿主因子について、特異的な primer/probe セットを用いた TaqMan Gene Expression Assay 法によりそれぞれの発現量を Huh 751 細胞と比較し検討した。また HCV の複製に関わる宿主因子である miR-122 を発現するレンチウイルスベクターを作製した。ウイルス力価は EGFP を発現するウイルスを用いて flow cytometry および、qRT-PCR により決定した。

4. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子を導入し、不死化細胞株の作製を試みた。細胞を不死化するためにアデノウイルスのE1遺伝子発現ユニットを構築し、インターフェロン (IFN) シグナルの阻害のためIRF7ドミナントネガティブ変異体 (IRF7DN) 発現ユニットを構築した。これらの遺伝子が同時に細胞内で導入され発現されるように、これらの発現ユニットを結合し、さらにレンチウイルスベクターに組み込んだ。このレンチウイル

スを用いてヒト正常肝細胞にこれらの遺伝子を導入した。

5. リコンビナントE2蛋白質免疫によるHCV感染中和抗体の誘導

293T細胞およびショウジョウバエ由来のS 2細胞にHCVのE2蛋白質を発現させ、培養上清中に分泌したE2蛋白質をアフィニティ精製法により回収した。精製E2蛋白質をBALB/cマウスに免疫して感染中和抗体誘導能を異なる遺伝子型のHCVで確認した。E2蛋白質のdeletion mutantを作製し、抗体のエピトープを探索した。さらにE2蛋白質の糖鎖を改変することにより、糖鎖の中和抗体誘導の影響を解析した。

6. 日本脳炎ウイルスsubviral particleを用いたHCVワクチン抗原作製の研究

日本脳炎ウイルス(JEV)はHCVと同様にフラビウイルス科であり、既にワクチンの安全性や有効性、生産手段が確立されている。そこでJEVのsubviral particle (SVP) を用いて、この粒子上にHCVの中和エピトープを提示させる事により、HCVワクチンの抗原として使用する系の構築を試みた。まず、JEV E蛋白質中の外来遺伝子挿入可能部位の探索のため、JEV Nakayama株由来のprM-E領域cDNAをCAGプロモーター下流に挿入した構造領域発現プラスミドを構築した。さらに構造領域内のエンベロープでウイルス粒子の外側に露出していると考えられる複数の部位にFLAG tag配列あるいはHCVのE2由来中和エピトープ配列を挿入した。これらのプラスミドを293T細胞にトランスフェクションし、その培養細胞内および培養上清中のSVPをウエスタンブロット法で検出した。

7. pH応答性炭酸アパタイトを用いた新規アジュバントの検討

HCVワクチンにより強い免疫を誘導するためには効果的なアジュバントの開発が必要である。近年、理化学研究所で開発された炭酸アパタイトは、炭酸イオンを含有している水酸アパタイトであり、

炭酸イオンが不純物となって結晶性が低下している。この炭酸アパタイトは、他の蛋白質や核酸と複合体を形成する事が可能であり、形成された複合体は細胞内へ効率よく導入される。従って、このアパタイトをアジュバントとして使用すれば樹状細胞への効率的な抗原導入が可能であり、複合体を形成している目的蛋白質に対する免疫を強く誘導できることも報告されている。

そこでこの炭酸アパタイトをHCVワクチンのアジュバントとして用いるために、ウイルスのVLPと炭酸アパタイトの複合体形成が可能か検討を行った。HEVおよびノロウイルスのVLPをDMEMに加え、さらにCaCl₂を加えて室温で静置し、炭酸アパタイト-VLP複合体を形成させた。複合体を遠心により沈殿させた後、pHを酸性にすることにより複合体を再度溶解させ、含有されていたVLP量をELISAにより測定した。

8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

核酸認識自然免疫レセプターのひとつであるToll-like receptor 3 (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事から、TLR3リガンドは次世代アジュバントとして期待されている。そこでTLR3によって認識されるRNA構造と細胞外核酸のデリバリーシステムを明らかにすることで、副作用が少なく効果的に細胞性免疫応答を誘導する新規TLR3アジュバントの開発を試みた。

TLR3がdsRNA以外のRNA構造を認識するかどうか明らかにするため、感染防御にTLR3が重要な役割を果たすポリオウイルスのcDNAをテンプレートにし~800ntの連続したsense RNA segments(PV1~PV10), complementary RNA segments (cPV1~cPV10), それらをアニールしたdsRNA(dsRNA1~dsRNA10)をin vitro 転写合成しTLR3活性化能をレポータージーンアッセイで調べた。TLR3活性化能を有するRNAのFCS存在/非存在下での安定性を調べるとともに、コンピューター解析で二次構造予測を行った。また、野生型およびTLR3欠損マウスの脾臓CD11c陽性樹状細胞を用い、RNA刺激による

IFN- β , 炎症性サイトカイン産生を測定した。更に、標識RNAを用いて樹状細胞、上皮系細胞におけるRNAの取り込みを解析し、poly(I:C)の取り込みに必須の分子ラフトリンが機能性RNAの取り込みにも関与するか否かノックダウン実験で確認した。RNA二次構造予測とdsRNA領域のマッピング実験より、TLR3を活性化できるコアなRNA構造を明らかにした。

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

ワクチンの有効性及び安全性の評価のためには動物モデルでの検討が必要である。しかしHCVは宿主域が狭く、チンパンジー以外の動物では感染とそれに伴う免疫反応を観察することは難しい。この感染動物モデルの不在が、HCVワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性及び安全性の評価、C型肝炎の病態解析の大きな障壁となっている。そこでHCVと近縁のGBV-Bと、新世界ザルであるマーモセットの感染モデルを用い、HCVとGBV-Cのキメラマウスを作製する事で、新規HCV感染霊長類モデルの樹立を試みた。

HCV/GBV-Bキメラウイルスとして、GBV-BをベースにE1、E2領域をHCV由来遺伝子に置換したGB/HC_{E12}およびコア、E1、E2領域を置換したGB/HC_{UCE12}を構築した。これらクローン由来ウイルスRNAをマーモセットに麻酔下で肝臓に直接接種した。その後、経時的に採血しウイルス複製増殖能を評価した。

(倫理面への配慮)

各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。本研究で使用したヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はない。すべての動物実験は、それぞれの実験を行った施設の動物実験委員会の審査・承認を得た実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実施した。マーモセットの実験は、実験を行なった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2013-061、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. マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

Alum をアジュバントとして HCV 粒子ワクチンを投与したマーモセット 3 頭の血漿中に含まれる抗 HCV 抗体価を EIA にて評価した。3 頭中 2 頭のマーモセットで抗原投与開始後に抗 E2、抗 E1 抗体価の上昇を認め、HCV に対する抗体誘導が確認できた。また、他の遺伝子型株に対する反応性の確認のため、ワクチンに使用した株とは異なる遺伝子型 1 のコアタンパク質である HCV-213 を抗原とした EIA でも確認した。その結果、抗 E2、抗 E1 抗体価の上昇を認めた 2 頭のマーモセットでは、遺伝子型 1 に対する抗コア抗体価の上昇が確認できた。しかしワクチン投与を行ったうちの残りの 1 頭ではこれらの抗体誘導は確認できなかった。

安全性の評価のため、ワクチン投与を行った 3 頭のマーモセットすべてで血液検査を行ったが、肝逸脱酵素や炎症マーカーなど肝障害や他の有害事象を思わせる所見は得られなかった。3 頭中 1 頭のマーモセットでは解剖し、病理組織学的解析を行ったが、ワクチンに由来すると思われる異常所見は認めていない。

2. ワクチン接種マーモセット細胞性免疫応答の確認

ワクチン接種マーモセットでの細胞性免疫誘導についても解析を行った。ワクチン接種マーモセットのPBMCに、ワクチンと同じ遺伝子型2a株由来Coreペプチドを添加し刺激したところ、接種前のPBMCと比較して有意なIFN α mRNAの発現誘導が認められた。このIFN α 発現はワクチン接種回数とともに上昇し、また遺伝子型1株由来のCoreペプチドでは有意な発現誘導が生じなかったことから、ワクチン抗原刺激により特異的な細胞性免疫が誘導されていると考えられた。

3. ワクチン用 HCV 粒子作製に適した培養細胞の探索

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、HuGK-14細胞、MRC-5細胞、Vero細胞、MDCK細胞、CHO細胞、非がん細胞としてHEK293細胞を選択し検討を行った。これらの細胞に全長HCV RNAを導入し、HCVの増殖について検討したが、いずれの細胞でもHCVのゲノム複製、ウイルス産生は観察されなかった。そこで、これらの細胞でHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を測定した。HCV複製に重要なmiR-122はHuGK-14細胞ではHuh-7.5.1細胞と同レベルの発現が見られたが、その他の細胞ではいずれもほとんど発現していなかった。さらに、HuGK-14細胞では複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoE、cPLA2の発現量が、MRC-5細胞ではEntryに関わるClaudin-1、複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoEの発現量が、HEK293細胞ではEntryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低いことがわかった。

そこで、HEK293細胞に注目し、レンチウイルスでmiR-122、ApoE、Claudin-1を導入することによりHuh-7.5.1細胞と同レベルの発現が見られるHEK293細胞を作製し、HCVの増殖について確認した。その結果、この細胞ではHCVの複製が可能である事が確認でき、また培養上清中にはごくわずかではあるが感染性のHCVが存在することも確認できた。

4. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps を使用し、HGF を添加して培養した。その後、アデノウイルスの E1 遺伝子を発現するレンチウイルス (pLVSIN-AdE1)、E1 遺伝子とともに IRF7DN を発現するレンチウイルス (pLVSIN-AdE1-IRF7DN) をそれぞれ感染させた。これらのウイルスを感染させた hNHeps を puromycin を含有するメディアウムで培養したが、増殖する細胞は出現してこなかった。導入効率の確認のため、hNHeps に GFP 発現レンチウイルスを感染させたところ、約 50%の細胞への遺伝子導入が確認できた。

5. リコンビナントE2蛋白質免疫によるHCV感染中和抗体の誘導

293T細胞およびS2細胞で発現させたE2蛋白質をマウスに免疫して抗体誘導能を確認した。免疫後のマウス血清中にE2抗体の上昇を確認でき、E2抗体誘導能には二種類のE2蛋白質間で差は無かった。しかし中和活性の検討では、293T細胞由来E2蛋白質で免疫したマウス (293-E2) 血清では感染中和活性を検出したが、S2細胞由来E2蛋白質によるマウス (S2-E2) 血清ではほとんど検出できなかった。そこで、293-E2血清からIgGを精製して (293-E2-IgG) 異なる遺伝子型のHCVccに対する感染中和活性を検討したところ、同程度の感染中和活性が確認できた。従って、293T細胞由来E2蛋白質でのマウスでの免疫では遺伝子型およびウイルス株に対して共通の感染中和エピトープに対する抗体が誘導されていると考えられた。

また、抗体のエピトープを探索するために、E2蛋白質のdeletion mutantを作製してELISA法により293-E2-IgGの反応性を確認した。その結果、293-E2-IgGの主要なエピトープはE2蛋白質の540-550アミノ酸近辺に存在することが確認された。さらにHCVのE2蛋白質の11ヶ所のN型糖鎖付加部位を変異させ糖鎖付加のなくなる変異型E2蛋白質を293T細胞で作製し (E2NQ1~E2NQ11)、マウスに免疫することで抗E2抗体誘導能を検討したところ、すべてのマウス個体で抗E2抗体の上昇が見られ、糖鎖付加は感染中和抗体誘導にあまり影響を与えないと考えられた。

6. 日本脳炎ウイルスsubviral particleを用いたHCVワクチン抗原作製の研究

JEVの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。さらに培養上清中に分泌されているSVPをウエスタンブロット法で検出したところ、一部でSVPの分泌が確認できた。そこで、これらのコンストラクトのFLAG tag部分

を HCV エンベロープ (E2) 蛋白質中の中和エпитープとして報告されているペプチド配列に置換して検討したところ、HCV の中和エпитープを持つ SVP でも培養上清への分泌が確認された。そこで、HCV の中和エпитープ配列を挿入した JEV SVP を高発現する 293T 細胞株を、レトロウイルスベクターを用いて樹立した。

7. pH応答性炭酸アパタイトを用いた新規アジュバントの検討

炭酸アパタイトとHEV、ノロウイルスとの複合体を形成させることができた。HEVの場合、CaCl₂濃度7.8mMで添加量の約30%弱が取り込まれた。ノロウイルスの場合、CaCl₂濃度7.8mMでは取り込みはほとんど見られなかったが、25.8mMまで上げると添加量の約10%程度を取り込ませることができた。VLPにより複合体形成の条件は異なり、カルシウム濃度等の条件検討が必要なことが判明した。

8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

PV-ssRNAのなかで一部のssRNAにTLR3活性化能があることが判明した。このTLR3活性化能を有するRNAはFCSを含む溶液中で分解抵抗性であり、安定な構造をとる。こうした構造RNA (structured RNA) は poly(I:C) の細胞内取り込みと同様に Raftlin-clathrin 依存的経路で取り込まれ、ヒト上皮系細胞や繊維芽細胞から IFN- β 産生を誘導した。また、structured RNAはdsRNA同様、TLR3細胞外ドメインのN末とC末に存在するdsRNA結合サイトを介してTLR3と結合することが判明した。dsRNA特異的RNaseIIIで処理するとIFN- β 誘導活性が消失することから、structured RNA中のdsRNA領域が活性に重要であると考えられた。コンピューター解析によるRNA二次構造予測とdsRNA領域のマッピング実験から、structured RNAはbulge/internal loopをもつ比較的長い不完全なdsRNA領域を有することがわかった。

9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

HCV/GBV-BキメラウイルスであるGB/HC_{E12}およびGB/HC_{UC-E12}のRNAをマーマセットの肝臓に接種した。その結果、感染8週までの時点で血漿中からウイルスRNAが断続的に検出され、上記のキメラウイルスはマーマセット体内で増殖可能であることが示唆された。

D. 考察

本研究では、不活化した HCV 粒子をワクチンとして使用する場合の有効性と安全性の評価を目的としている。本年度は体重抗原量比を考慮して小型霊長類であるマーマセットを用いて検討を行った。マーマセットは霊長類実験モデル動物として広く利用され、またワクチンの有効性評価に用いられた実績もある。本検討ではマウスで感染中和抗体誘導が認められた抗原量 (2 pmol core protein/20g BW) を目安として、マーマセットの体重 (約 300g) から投与量を決定した (60 pmol core protein/300g BW)。アジュバントはアカゲザルのワクチン接種実験において感染中和抗体が誘導された Alum を用いた。

ワクチン投与の結果、免疫したマーマセット 3頭中 2頭で HCV の E1, E2 蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。さらにこれらの個体では免疫に用いた HCV 株とは異なる遺伝子型株のコアタンパク質に対する抗体誘導も確認された。残りの 1頭では抗 HCV 抗体の誘導は確認できず、これは個体差によるものと考えられた。また、細胞性免疫誘導について解析を行ったマーマセットでは、ワクチンと同じ遺伝子型 2a 株由来 Core ペプチド添加刺激により IFN γ mRNA の発現誘導が認められ、このワクチン投与により液性免疫だけではなく細胞性免疫が誘導されることも確認できた。なお、これらのワクチン投与マーマセットの血液検査や解剖による病理組織学的検査の結果では、これまでのマウスやアカゲザルでの検討と同様にワクチンに由来すると思われる有害事象は確認されていない。今後は Alum よりも効率的に抗体誘導、細胞性免疫誘導が期待できる新規アジュバントを用いて、さらに検討を進める予定である。

HuH-7 細胞以外の培養細胞で HCV 増殖が可能な細胞の検索の結果、調べた範囲では HCV の増殖が可能な新規細胞は同定されなかった。その中で HEK293 細胞では、miR122 を強制発現させることにより HCV の複製が可能になり、さらに Claudin-1 と ApoE を発現させることにより、わずかではあるが感染性ウイルス粒子の産生も確認できた。今後、さらに HCV 複製に関わる宿主因子をこの細胞に補う事で、HCV の増殖が可能な非癌細胞 HCV 産生系を構築したい。

また別の方法として、正常肝細胞を不死化することによる HCV 増殖が可能な細胞系の構築にも取り組んだ。正常肝細胞にレンチウイルスを用いてアデノウイルスの E1 遺伝子および IRF7 ドミナントネガティブ変異体を導入し不死化を試みたが、増殖してくる細胞は獲得できなかった。過去の報告では初代培養肝細胞の不死化にテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子が必要だった事も報告されており、今後アデノウイルスの E1 遺伝子と IRF7 ドミナントネガティブ変異体に加え hTERT の遺伝子の導入についても検討したい。

リコンビナント E2 蛋白質による抗 E2 抗体誘導および感染中和活性誘導についても検討した。今回の検討の結果、S2 細胞よりも 293T 細胞で作製したリコンビナント E2 蛋白質の方が感染中和抗体誘導能が高く、この 293T 細胞由来 E2 蛋白質で免疫したマウス血清から精製した 293-E2-IgG は異なる遺伝子型の HCV_{cc} に対しても同程度の感染中和活性を示すことが明らかとなった。またこの 293-E2-IgG のエピトープは E2 蛋白質の 540-550 アミノ酸近辺に存在し、また E2 蛋白質の糖鎖付加は感染中和抗体誘導にあまり影響しないことも明らかになった。これらの結果をふまえ、今後効率的に感染中和抗体誘導が可能な免疫源となるエピトープを探索したい。

また新たなワクチン抗原作製方法として、JEV の SVP を用いる方法を試みた。JEV prME に FLAG タグ配列および HCV の中和エピトープ由来配列を挿入することで、これらの配列を表面に持った SVP が分泌される事を確認した。またそのような SVP を効率良く

発現、精製する事に成功した。今後、さらに長いアミノ酸配列の挿入の可能性についても検討を行い、さらに精製した抗原をマウスに免疫することで中和抗体の誘導が可能か評価を行いたい。

新規アジュバントの候補として炭酸アパタイトの可能性について検討を行った。今回の検討では HEV とノロウイルスの VLP の炭酸アパタイトへの結合が確認できた。しかし、これらの VLP はいずれもエンベロープ蛋白質を持たないキャプシドのみで構成されるウイルスのものであり、エンベロープ蛋白質を持つ HCV の VLP の炭酸アパタイトへの結合についてはさらに検討が必要である。今後、バキュロウイルス発現系による HCV VLP を用いた検討を進めて行く。また、HEV やノロウイルスの VLP を結合させた炭酸アパタイトについては、免疫誘導能の確認を行いたい。

さらに次世代のアジュバントとして期待されている TLR3 アゴニストについても、その活性化機構について検討を行った。本年度の研究により、不完全な dsRNA 領域をもち細胞外で安定な構造の RNA (structured RNA) が TLR3 のリガンドとなりうる事が明らかになった。TLR3 特異的アジュバント開発においては、TLR3 で認識される RNA 構造とともに取り込みレセプターで認識されエンドソーム TLR3 に送達されるが細胞質 RNA センサーを活性化しない構造であることが重要であると考えられた。

ワクチンの有効性評価のためには、中和抗体の誘導能の評価だけでなく、慢性化阻止効果の評価も重要となる。しかし、現状では慢性化阻止能を評価できる実験系は存在しない。我々は HCV/GBV-B キメラウイルスを用いて、マーモセット感染モデルの構築を行っている。本年度の研究により、HCV/GBV-B キメラウイルス RNA を肝臓に接種したマーモセットから断続的にウイルス RNA の検出が可能であった。これは用いたキメラウイルスがマーモセットの肝臓で増殖可能である事を示していると考えられ、今後さらに詳細な検討を進めて行く。

E. 結論

1. 小型霊長類モデルであるマーモセットを用い、

HCV不活化粒子ワクチンの有効性と安全性について検討を行った。ワクチン投与を行った3頭のマーモセットの中で、2頭で抗HCV抗体の誘導が認められた。ワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。

2. 上記のワクチン接種を行ったマーモセットにおいて、細胞性免疫の誘導が確認された。

3. 非癌細胞であるHEK293細胞においてレンチウイルスベクターを用いてmiR-122を発現させることによりHCV複製が観察される様になり、さらにClaudin-1とApoEを発現させることにより、感染性のウイルス産生が認められた。

4. 293T細胞で作製したリコンビナントE2蛋白質による感染中和抗体誘導能を検討した。

5. 正常ヒト肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子とIRF7DNを発現する事により不死化細胞の樹立を試みた。これらの因子の導入のみでは、不死化細胞を得る事は出来なかった。今後、さらに必要な因子の同定を目指す。

6. JEVのエンベロープ領域中に外来ペプチドの挿入を許容する部位を同定し、さらにHCVの中和エピトープを挿入したJEV SVPを効率良く発現、分泌する細胞株を樹立することができた。

7. 新規アジュバント候補として炭酸アパタイトについて検討した。炭酸アパタイトにHEVおよびノロウイルスのVLPを結合させることが可能であった。

8. 細胞外からTLR3-TICAM-1経路のみ活性化し、自然免疫応答を誘導する新規TLR3リガンド(structured RNA)を同定した。

9. HCV感染評価のための新規動物モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルスとマーモセットを用いた感染系の構築を行った。このモデルはワクチン投

与による感染防御効果の実証のために適したモデル動物と考えられ、今後このモデルの確立に向けて検討を続けて行く。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., Ishii K., Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both *in vitro* and *in vivo*. *Gastroenterology*, 145: 447-455 (2013)

2) Enokizono, Y., H. Kumeta, K. Funami, M. Horiuchi, J. Sarmiento, K. Yamashita, D. Standley, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2013. Structures and interface mapping of the TIR-domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(49): 19908-19913.

3) Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jul 19;437(1):127-33.

4) Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, Shimosegawa T. 1(OH)

- vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. *PLoS One*. 2013 May 23;8(5):e63672.
- 5) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates* 54, 89-98, 2013.
- 6) Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T, Bukh J, Jones CT, Rice CM, Abrignani S, Tyrrell DL, Houghton M. A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLoS One*. 2013;8(3):e59776.
- 7) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus in Vitro. *PLoS ONE*, 2013; 8(7):e68992.
- 8) Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M: Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology* 10, 118, 2013.
- 9) Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Nakamura S, Katakai Y, Yoshida T, Saito A, Tajima S, Ito M, Takasaki T, Akari H, Kurane I: Presence of viral genome in urine and development of hematuria and pathological changes in kidneys in common marmoset (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Pathogens* 2, 357-363, 2013.
- 10) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 440:515-20.
- 11) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 12) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 319-328, 2013.
- 13) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A: Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87, 11447-11461, 2013.
- 14) Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. A Distinct role of Riplet-

- mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 9(8): e1003533.
- 15) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H: TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94, 1318-1324, 2013.
- 16) Saito A, Akari H: Macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt): Break out of the host factors. *Frontiers in Microbiology* 4, 187, 2013.
- 17) Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor model. *J. Innate Immun.* (DOI: 10.1159/000355126) Published Online: October 29.
- 18) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. *Journal of Virology*, 2013; 87: 6031-6036.
- 19) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog.* 2013; 9(8): e1003589.
- 20) Suzuki, T., H. Oshiumi, M. Miyashita, H. Aly, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS ONE* 2013; 8(12): e83639.
- 21) Takaki, H., K. Honada, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2013. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* 57(2): 100-110.
- 22) Takaki, H., M. Takeda, M. Tahara, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4⁺ dendritic cells primarily triggers type I interferon production against measles virus in a mouse infection model. *J. Immunol.* 191(9): 4740-4747.
- 23) Tanaka Y., T. Suenaga, M. Matsumoto, T. Seya, and H. Arase. 2013. Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion. *J. Virol.* 87: 10900-10903.
- 24) Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2013. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* 4:1833.
- 25) Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R,

- Ito M, Akari H: Efficient *in vivo* depletion of CD8⁺ T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunology Letters* 154, 12-17, 2013.
- 26) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology* 158, 1209-1220, 2013.
- 27) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem.* 288:31715-31727 (2013)
- 28) Kumeta, H., H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2014. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. *J. Biomolec. NMR*, 02/2014; DOI: 10.1007/s10858-014-9819-1
- 29) Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* Feb 14. [Epub ahead of print]
- 30) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 95:60-65 (2014).
- 31) Tatematsu M, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 45 (2): 195-201. (Review)
- 32) Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, in press.
- 33) Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Yuriko S, Saijo M, Akari H, Kurane I: Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viremia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 2104, in press.
- 34) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 2014, in press.
- 35) 石井孝司、清原知子. A型肝炎ワクチン. *BIO Clinica*, 28: 25-29 (2013)
- 36) 鈴木亮介、小西英二: フラビウイルスのリバーズジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013
- 37) 村山麻子、加藤孝宣. NS5B-RNAポリメラーゼの構造と機能. *肝胆膵*, 67(6), 918-923, 2013.

38) 石井孝司. A型肝炎、E型肝炎. 臨床と微生物, 41: 72-78 (2014)

2. 学会発表

1) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1 variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

2) Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

3) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

4) Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.

5) Atsunori Higashino, Saori Suzuki, Akatsuki

Saito, Yuko Katakai, Sachi Okabayashi, Hirofumi Akari: Analysis of dynamics in GB virus B quasispecies in the course of long-term persistent infection and disease progression in marmosets. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 6-10, 2013, Melbourne, Australia.

6) Saori Suzuki, Atsunori Higashino, Ken-ichi Mori, Yuko Katakai, Akatsuki Saito, Noboru Maki, Hirofumi Akari: The delayed humoral immune responses may be associated with the development of chronic GBV-B infection. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 6-10, 2013, Melbourne, Australia.

7) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

8) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Takuya Matsumura, Masaaki Shiina, Shinichi Asabe, Takaji Wakita, Michio Imawari. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

9) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Chiaki Okuse, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan.

64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

10) Tasaka-Fujita M, Nao Sugiyama N, Wonseok Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

11) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells by downregulation of claudin-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

12) Kondo Y, Iwata T, Morosawa T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Kato T, SHimosegawa T. 1(OH)Vit D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C (CH-C) and CH-C with severe fibrosis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

13) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kogure T, Kato T, Nakayama K, SHimosegawa T. Lymphotropic HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune and cryoglobuline-

related diseases. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

14) Imamura H, Yamada N, Yotsuyanagi H, Kawasaki S, Takayama T, Yamamoto M, Kokudo N, Kato T, Tanaka S, Arai S. Moderately causative role of occult hepatitis B virus infection (occult HBV) in the development of non-hepatitis B virus (HBV) infection, non-hepatitis C virus (HCV) infection (NBNC) hepatocellular carcinoma (HCC). 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

15) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013.

16) Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.

17) Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. TLR3/BATF3 axis in CD8a⁺DC induces anti-tumor CTLs by dsRNA. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.

18) Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Supportive involvement of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy for cancer. 15th International

Congress of Immunology. August 22-27/2013.
Milan, Italy.

19) T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 - 15)

20) 東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: 霊長類を用いたHCV/ GBV-Bキメラウイルス感染モデル. 第60回日本実験動物学会総会(つくば)平成25年5月15-17日.

21) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: GBV-B感染新世界ザルの液性免疫解析. 第60回日本実験動物学会総会(つくば)平成25年5月15-17日.

20) 藤田めぐみ, 加藤孝宣, 村山麻子, 山田典栄, 脇田隆宇, 朝比奈靖浩, 坂本直哉. HCV Core 領域アミノ酸70/91変異株を用いた反応機序の解析. 第49回日本肝臓学会総会, 2013年6月6-7日, 東京.

21) 村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣. HCV NS5Aキメラウイルスを用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

22) 杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆宇, 加藤孝宣. ISDRアミノ酸変異がC型肝炎ウイルスの増殖に与える影響の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

23) 横川寛, 森山正樹, 中村紀子, 東濃篤徳, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆宇. 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCVワクチンの有効性の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

24) Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T: Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

25) 渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇, エンベロップペプチドを用いたHCV感染に重要なアミノ酸領域の探索. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

26) 塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, 下島昌幸, 西條政幸, 脇田隆宇, 石井孝司: E型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

27) 石井孝司, 李 天成, 吉崎佐矢香, 塩田智之, 脇田隆宇: E型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋VLP作成の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

28) 白土東子, 石田豊和, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 古川早苗, 染谷雄一, 石井孝司, 脇田隆宇, 成松久, 久保田智己: 結晶構造解析とQM/MM計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

29) 清原知子, 石井孝司, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆宇: 小児におけるHBs抗原保有率調査. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10-12日, 神戸.

30) 東濃篤徳, 鈴木紗織, 齊藤暁, 片貝祐子, 岡林佐知, 明里宏文: 新世界ザルにおける持続感染GBV-BのQuasispecies解析. 第61回日本ウイルス学

会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

31) 鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、吉田友教、片貝祐子、齊藤暁、榎昇、明里宏文：急性及び慢性GBV-B感染症における液性免疫の比較解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

32) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆宇、加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸.

33) 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆宇. アカゲザルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの抗体誘導能と安全性の検討. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸.

34) 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクシニアウイルスDIs株を母体としたインフルエンザHA組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症予防効果、第17回日本ワクチン学会、平成25年11月、津.

35) 清原知子、石井孝司、多田有希、脇田隆宇：A型肝炎のリスクアセスメント、第17回日本ワクチン学会、平成25年11月、津.

36) Jun Kasamatsu, Hiroyuki Oshiumi, Takashi Ebihara, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya. INAM plays a critical role in rapid NK-accessory cell interaction leading to IFN γ induction. 第42回日本免疫学会学術集会. 2013年12月11日. 千葉 (幕張メッセ) .

37) Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. Development of ideal adjuvant for cancer

vaccine: Beyond the scope of current immunotherapy for cancer. The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral. Infection, Immunity, and Cancer. 2014年2月10日. 札幌(京王プラザホテル).

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告