

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

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究協力者 村山 麻子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：JFH-1株の発見により、培養細胞中でHCV粒子の合成が可能になり、この合成ウイルス粒子を用いた感染予防ワクチンの開発が期待されている。ウイルス粒子を用いてワクチンを作製するためにはワクチン製造に適した細胞を用いてウイルス粒子を作製する必要がある。ワクチン製造細胞として過去に実績のある細胞や非がん細胞を用いてHCV粒子産生能を解析し、その中でHuH-7細胞以外にHEK293細胞においてHCVの作製が可能であることを示した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は世界中に多くの感染者が存在し、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより、輸血後のC型慢性肝炎発症者は減少しているが、医療従事者などのハイリスク群では現在でも新規感染者が存在する。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているが、その治療効果は十分ではない。HCV感染による肝疾患を減少させるためには新規感染者をなくすことが重要であり、感染予防ワクチンの開発が必要とされている。

2005年にJFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、感染性HCV粒子を培養細胞で作製できるようになった。この培養細胞中で作製されたHCV粒子は、患者血清中のウイルス粒子とほぼ同様の形態であることが電子顕微鏡で確認されており、不活化することによりHCVワクチン

ンとして使用できると考えられる。しかし、このHCV粒子をワクチンとして使用するためには、大量のウイルス粒子が必要であり、現行のHuH-7細胞を用いた感染増殖系では限界があるため、より効率の良いウイルス産生系が必要である。また、ワクチン用のウイルス粒子産生において、過去にワクチン製造細胞として実績のある細胞が利用できれば、ワクチンとしてより承認されやすくなることが考えられる。

本研究では、HuH-7細胞以外の細胞を用いたウイルス粒子産生系について検討した。

B. 研究方法

1. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞に全長HCV RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量をELISAで測定した。

2. HCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量の比較

HCVライフサイクルの各ステップ、すなわち、侵入、複製、粒子形成、分泌に関わることが報告されている宿主因子について、それぞれに特異的なprimer、probeを用いて、宿主因子の発現量を測定した。細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写して得たcDNAを各wellに入れ、Taqman Gene Expression Assayを行った。それぞれの宿主因子の発現量は内部標準 (18SまたはHPRT1) の何倍かで比較した。

3. 宿主因子発現レンチウイルスベクターの作製

miR-122、ApoE、Claudin-1それぞれのORFを組み込んだpLVSINベクターを作製し、293T細胞でpackagingさせ、1回感染型レンチウイルスを作製した。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. レンチウイルスを用いたmiR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞の作製とHCV複製の検討

上記で作製したレンチウイルスをそれぞれmoi=1でpolybrene存在下でVero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞に単独、もしくは重複感染させた。各細胞は2週間培養後、各遺伝子の発現量を測定した。それぞれの細胞でのmiR-122の発現量を、Taqman microRNA assayにより、ApoE、Claudin-1の発現量をTaqman Gene Expression Assayにより測定した。

5. miR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞でのHCV複製の検討

miR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞細胞にHCVの全長RNAをトランスフェクションし、細胞内、培養上清のコア抗原量を解析した。培養上清の感染性を調べるために、回収した培地をAmicon Ultra-15 filter unitsを用いて40倍に濃縮し、Huh-7.5.1細胞を用いて感染性を測定した。

6. 各細胞におけるHCV RNAおよびpoly ICの導入によるISG誘導能の検討

それぞれの細胞にHCV RNAまたはpoly ICをDMRIE-C Reagentを用いて導入した。24時間後に細胞を回収し、RNeasy Mini Kitを用いてtotal RNAを回収した。MXA, 25OASの発現量は特異的なprimer、probeを用いてTaqman Gene Expression Assayにより測定した。

7. B18RによるHCV複製への影響の解析

Huh-7.5.1細胞、Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞にHCV RNAを導入し、4時間後にB18Rを添加し、培養した。RNA導入3日後の細胞内コア抗原量を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する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と考えられる。各種組換えDNAを用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認されている。

C. 研究結果

1. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子 産生系の検討

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細胞を検討した。それぞれの細胞に全長HCV RNAを導入し、HCVのゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、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。

2. HCVライフサイクルに重要な宿主因子発現量の 細胞間での比較

それぞれの細胞で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Huh-7.5.1と比べて低かった。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の発現量が低かった。HEK293細胞では、Entryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。

3. レンチウイルスベクターによる宿主因子の強制 発現の検討

HCV複製、ウイルス産生に必要な宿主因子を細胞で効率よく高発現させるために、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。作製したmiR-122を発現させるレンチウイルスを

用いてmoi=1でそれぞれの細胞に感染させたところ、いずれの細胞でもHuh-7.5.1細胞と同程度のmiR-122の発現量が得られた。

4. miR-122を強制発現させた細胞におけるHCV 複製の検討

レンチウイルスによりmiR-122を強制発現させたHEK293細胞に、HCV RNAをトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は時間経過とともに上昇することからmiR-122を強制発現させたHEK293細胞ではHCV複製は可能であった。しかし、複製効率はHuh-7.5.1細胞の1/100程度であった。また、miR-122を強制発現させたVero細胞では、時間経過とともにわずかながら細胞内コア抗原量の上昇が認められた。しかし、その他の細胞では、miR-122を強制発現させても、HCV複製は認められなかった。

5. miR-122、ApoE、Claudin-1を同時に発現する HEK293細胞でのHCV複製およびウイルス産 生の検討

レンチウイルスにより、miR-122、ApoE、Claudin-1を同時に発現するHEK293細胞を作製した。得られた6細胞株のうち、miR-122、ApoE、Claudin-1の発現量がすべてHuh-7.5.1細胞と同等もしくはそれ以上の細胞株を選択し、HCV RNAを導入した。その結果、細胞内コア抗原量はHuh-7.5.1細胞の約1/5程度であったが、培養上清中のコア抗原量は約1/1000程度と低値であった。この培養上清を濃縮すると、感染性が観察された。

6. HEK293細胞、MRC-5細胞、Vero細胞、Huh-7.5.1細胞におけるISG誘導能の検討

それぞれの細胞にHCV RNAまたはpoly ICを導入し、細胞内のISGの発現量を測定した結果、Huh-7.5.1細胞では、poly IC導入細胞ではISGの誘導が見られたが、HCV RNA導入細胞ではどちらの誘導も見られなかった。それに対して、HEK293細胞、MRC-5細胞、Vero細胞ではpoly ICまたはHCV RNAいずれを導入した場合にも15倍から1万倍の高いISG誘導能を示した。

7. B18RによるHCV複製への影響の解析

Huh-7.5.1細胞、Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞にHCV RNAを導入し、4時間後にB18Rを添加し、培養した。RNA導入3日後に細胞内コア抗原量を比較したが、いずれの細胞でもB18R添加によるHCV複製増強は見られなかった。

D. 考察

HuH-7細胞以外の培養細胞を用いてワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、ワクチン製造の実績のあるHuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞ではHCVの増殖は認めなかった。それぞれの細胞においてHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現をHuh-7.5.1細胞と比較し、それぞれの細胞において発現量の低い宿主因子を明らかにした。その結果、miR-122は肝臓由来のHuGK-14細胞以外の細胞ではほとんど発現していないことが判明した。粒子形成に関わるApoE、Entryに関わるClaudin-1はいずれの細胞でも共通して発現が低く、それ以外にも

HuGK-14細胞では複製に関わるCKBと粒子形成に関わるcPLA2、MRC-5細胞では複製に関わるCKBが低かった。

HEK293細胞ではそのままではHCVの増殖は認めなかったが、HEK293細胞にmiR-122を発現させた細胞では、HCV複製がみられ、さらにClaudin-1とApoEを発現させた細胞では、感染性のウイルス産生がみられた。miR-122、ApoEは肝細胞に特異的に高発現していることから、これらの因子はHuH-7以外の細胞でHCVを複製させるのに必要であると考えられた。しかし、HEK293細胞ではmiR-122、Claudin-1、ApoEを発現させても、Huh-7.5.1細胞と比較してHCV RNAトランスフェクション後の培養上清中のコア抗原量は低く、感染性も低かった。これは、HEK293細胞では複製だけでなく、ウイルス粒子形成、分泌のステップに関わる宿主因子で発現量の足りないものがあることを示しており、他の宿主因子の検討が必要と考えられる。さらに、HEK293細胞ではHuh-7.5.1細胞と異なりHCV RNAの導入によってISGが誘導されることから、何らかの方法で自然免疫系を阻害することにより、HCV複製が増強する可能性がある。

Vero細胞もそのままではHCVの増殖は認めなかったが、miR-122を発現させた細胞では、わずかながら細胞内コア抗原量の増加がみられたことから、さらに他の宿主因子を補うことによりHCV複製、ウイルス産生ができるようになる可能性がある。さらに、Vero細胞もHCV RNAの導入によってISGの誘導がみられることから、自然免疫系を阻害することによりHCV複製が増強する可能性が考えられる。

来年度は、肝臓由来のcDNAライブラリーを用

いてHuH-7細胞以外の細胞でHCV粒子を産生させるために必要な宿主因子の網羅的解析および同定を試みる予定である。また、HCV増殖にマイナスとなる自然免疫系などの因子を阻害することにより、HCV複製を増強させることができるかについても引き続き検討を行う。

E. 結論

非がん細胞であるHEK293細胞ではレンチウイルスベクターを用いてmiR-122を発現させるとHCV複製が見られ、さらにClaudin-1とApoEを強制発現させることにより、感染性のウイルス産生がみられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. J Virol. 2013 May;87(10):6031-6.

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, 19;437(1):127-33.

4) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. Gastroenterology. 2013 Aug;145(2):447-55.e1-4.

5) 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.

2. 学会発表

1) 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、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.

2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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.

G. 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

感染中和抗体と感染中和機構の解析

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

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能である。そこでウイルスの感染中和抗体の誘導とその感染中和機構に関する解析を進める。ワクチン開発によりC型肝炎の予防が可能となるだけでなく、HCV の感染過程の解明による新たな治療標的が探索できることも期待できる。本分担研究では HCV 感染中和機構の解明を目指し、中和抗体の *in vivo* での効果、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など初期感染に関連する機構の解析をおこなう。

A. 研究目的

JFH-1株を用いることによりHCVの細胞培養が可能となった。この実験系により感染中和抗体の存在が確認できるようになった。さらに、ウイルス粒子を大量精製して小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることが可能となった。これらの結果をふまえHCVに対する中和抗体の*in vivo*での効果、ウイルスの粒子構造、ウイルス表面蛋白質の構造解析など、ウイルスの初期感染過程に関連する機構の解析を進める。HCVに対するワクチン開発は新たなHCV感染を減少させ、HCV感染症の最終病態である肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。

B. 研究方法

1. 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。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用する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と考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 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

JFH-1 株由来のウイルスゲノム配列をもとにして、C末端の膜貫通領域を欠損した E2 蛋白質を 293T 細胞および S2 細胞で発現させた。培養上清中の E2 蛋白質をアフィニティ精製により回収した。精製 E2 蛋白質の純度は 90%以上であることを SDS-PAGE および銀染色により確認した。昨年度の研究で、この二種類の 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。さらにマウス血清および精製 IgG による HCVpp および HCVcc 感染に対する中和活性を検討したところ、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。今年度の検討では、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。293-E2-IgG の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は JFH-1 株 (2a)、H77/JFH1 株 (1a)、TH/JFH1 株 (1b)、MA/JFH1 株 (2b)、S310/JFH1 株 (3a) に対してそれぞれ、0.5、2.5、2.4、2.0、0.8ug/ml であった。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。E2 蛋白質 (384-714 アミノ酸) の 384-530 の E2 では反応が弱かったが、384-540 よりも C 末端が長い E2 蛋白質は反応が向上した。この結果から 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示された。昨年度の検討で、合成ペプチドにより E2 抗体のエピトープマッピングでは

514-554 アミノ酸残基領域には、反応が見られている。

HCV の E2 蛋白質には 11ヶ所の N 型糖鎖付加部位が存在する。この 11ヶ所の糖鎖付加アミノ酸残基を変異させ、糖鎖付加のなくなる変異型 E2 蛋白質を 293T 細胞で作製した (E2NQ1~E2NQ11)。E2NQ1~E2NQ11 をマウスに免疫して抗 E2 抗体誘導能を検討したところ (n=3)、すべてのマウス個体で抗 E2 抗体の上昇が見られた。特に E2NQ4 による抗体誘導が強かった。それぞれの免疫マウスの血清を用いて、HCVcc (JFH-1) に対する感染中和活性を検討したところ、E2NQ6、9、11 で野生型 E2 蛋白質と同等の感染中和活性を誘導したが、その他の E2NQ1、2、3、4、5、7、8、10 では野生型よりも感染中和活性の誘導が弱かった。

D. 考察

昨年度に引き続き、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検討した。遺伝子型 2a の JFH-1 株由来の E2 蛋白質を用いたが、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活性誘導能が高かった。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 HCVcc に対しても同程度の感染中和活性を示した。この結果から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たことを示している。一方、この E2 抗体エピトープは E2 蛋白質の 540-550 アミノ酸近辺に存在することが示された。また、E2 蛋白質に存在する 11ヶ所の糖鎖付加は感染中和抗体誘導にあまり影響しなかった。これらの結果から感染中和抗体誘導により良い免疫源を探索していくことが可能と考えられた。

HCVは世界中で1.7億人にのぼる感染者が存在し、肝細胞癌に至る重大な感染症である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンも期待されている。HCVワクチンが開発され、HCVの新たな予防法および治療法が開発されれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる。また、予防用及び治療用ワクチンを世界に先駆けて開発することができればHCVキャリア率の高い国々への国際協力が可能となる。

E. 結論

1. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Aug;9(8):e1003589.
- 2) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. Gastroenterology. 2013 145(2): 447-455.e4.

- 3) 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.

2. 学会発表および講演など

- 1) T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 – 15)
- 2) H Yokokawa, M Moriyama, N Nakamura, A Higashino, H Akari, T Kato, K Ishii, T Wakita. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, (2013, Oct. 6-10)
- 3) 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字、エンベロー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、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 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
研究協力者 東濃 篤徳 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
鈴木 紗織 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
森 健一 先端生命科学研究所
榎 昇 先端生命科学研究所

研究要旨： C型肝炎ウイルスワクチンの実用化には、モデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。今年度までに、本研究班で開発したHCVワクチンを実験用霊長類へ接種し、その有効性について評価を行った。その結果、当該ワクチンでは中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが明らかとなり、HCV予防のみならず治療用ワクチンとしての可能性を示す貴重な成果を得た。更に、ワクチン免疫による感染防御効果を実証する目的で、前臨床試験用モデル動物として有望なキメラウイルス感染マウスモセットを新たに開発した。今後より優れた評価モデルに向けて重要な役割を担うものと期待される。さらに、キメラウイルスの持続感染能獲得に必要な免疫回避機構に関する基盤研究を推進した。以上、HCVワクチンの臨床応用に向けた基盤研究が大きく進展した。

A. 研究目的

C型肝炎の原因ウイルスであるHepatitis C virus (HCV) は非A, 非B型肝炎ウイルスとしてヒト骨髄から20年以上前に単離された (Choo et al., Science, 1989, 24, 359-362)。現在HCVは世界的に蔓延しており、1億7千万（世界人口の3%近く）がキャリアと見られている。日本での持続感染者は190万人～230万人存在すると推定されているが、自覚症状がないことが多く、肝硬変や肝癌へ移行する感染者が多く存在することが問題となっているため、抗ウイルス剤や治療用ワクチン開発が急務である。

近年、脇田らのJFH-1株の発見によりHCVの培養が可能となった (Wakita et al., Nature Medicine, 2005, 11, 791-796)。大量精製した

HCV粒子を不活化することでHCVの予防・治療ワクチンとしての実用化を目指しているが、そのためには安全性・有効性の評価にあたりHCV感染動物モデルが非常に重要である。しかしHCVはチンパンジー以外の動物では疾患モデルが存在しないという宿主域の狭さの問題がある。さらにチンパンジーの感染実験使用は絶滅危惧種である上に、倫理的観点から我が国を始め諸外国でも認められていない。これらのことがワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの安全性・有効性評価、さらにC型肝炎の病態解析を行なうにあたって大きな障壁となっている。

この問題を克服する方法の1つとしてGBV-B/新世界ザル-サロゲート感染モデルの応用が挙げられる。GBV-Bはタマリンから単離され、HCV

と同じくヘパチウイルスとして分類されており、新世界ザルに感染性を示し、急性および慢性C型肝炎様病態を引き起こす。我々が行なってきたマーモセットへのGBV-B接種実験では4年以上の長期に渡り、ウイルス血症およびALT値の上昇、肝線維化を伴う慢性C型様肝炎を呈することを世界で初めて見出した。以上を踏まえ、本研究ではマーモセットを用いたHCVワクチンの免疫誘導能を検証した。次に、HCVワクチン評価に必要な慢性C型肝炎のサロゲート病態解析に用いる霊長類モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルス感染マーモセットモデルの確立を目指し、キメラウイルスの構築および複製能の評価を行った。またこれと平行して、HCVワクチンの有効性評価のための基盤研究を進めた。

B. 研究方法

・細胞性免疫応答の解析：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。

・キメラウイルス接種実験：キメラウイルスクローンは、GBV-BをベースとしてCoreおよびE1、E2領域をGBV-Bの相当する遺伝子領域に置換したHC/GBであるGB/HC_{uCE12}及びGB/HC_{E12}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。

・GBV-B/マーモセット感染実験：GBV-Bストック血清を経静脈もしくは経肝臓にて接種した後、ケタミン麻酔下で定期的に採血し、血算・生化学検査、血漿中ウイルス量および抗ウイルスCore, E2, NS3抗体価の定量および次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を行った。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて京都大学動物実験委員会および医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) HCVワクチンの評価に関する研究

ワクチン接種：マーモセット3頭へHCVワクチンを接種したところ、有意な抗体誘導が確認された。また臨床的、病理的な副作用は認められなかった（詳細は別頁を参照のこと）。

ワクチン接種による細胞性免疫誘導能の検討：次に、本ワクチンによる細胞性免疫誘導能について検討を行った。ワクチン接種マーモセットPBMCに、ワクチンと同じジェノタイプ2a由来Coreペプチドを添加し刺激したところ、接種前PBMCと比較して有意なIFN γ mRNAの発現誘導が認められた。このIFN γ 発現はワクチン接種回数とともに上昇したこと、またジェノタイプ1由来Coreペプチドの添加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たものと考えられた。

(2) HCV/GBV-Bキメラウイルスに関する研究

今年度はHCV/GBV-BキメラウイルスGB/HC

uCE12及びGB/HCE12のサル個体での増殖能を検討すべく、キメラウイルスクローンRNAをマーモセット肝臓に接種した。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た。従って、上記のキメラウイルスはマーモセット体内で増殖可能であることが強く示唆された。現在引き続きフォローアップ解析を行っている。

(3) HCVワクチンの評価系確立のための基礎的研究

本研究では、急性および慢性GBV-B感染ザルにおける感染病態の違いを規定する原因を探る目的で、獲得免疫応答およびウイルスゲノム変異について焦点を当て比較検討を行った。

獲得免疫応答の解析：急性クリアランス例では血中ウイルスRNA量が低下する感染後3ヶ月頃に抗core、E2、NS3抗体価が上昇する一方で、GBV-Bキャリアでは顕著な抗体誘導の遅延が見られた。すなわち、抗core、E2、NS3抗体のいずれにおいても抗体価上昇に感染後1年以上を要した。これらの知見から、特異抗体（おそらく中和抗体）誘導の遅延が持続感染への移行につながる可能性が考えられた。

ウイルスゲノム変異の解析：GBV-Bキャリアの血中ウイルスゲノムにおいて検出された非同義置換（アミノ酸置換）変異は、その頻度が遺伝子領域間で大きな偏りが見られ、一定の選択圧が影響していると考えられた。この非同義置換部位について検討したところ、GBV-Bキャリアでのみ認められ急性クリアランス例では生じない複数の変異が確認された。この変異について各感染個体における時系列での動態を検討し

たところ、①比較的短期間に頻繁な連続・復帰変異を生じたもの、②長期にわたり固定され再変異が生じないもの、さらに③慢性肝炎へと病態が進行した例でのみ生じた変異、の3種類に区分された。①についてはCTLもしくは中和抗体からの逃避変異と想定された。また②ではウイルス増殖に有利な適応変異の可能性が考えられた。さらに③では肝障害に何らかの影響を及ぼした変異であることが示唆された。

D. 考察

今年度までの研究により、アカゲザルおよびマーモセットへのHCVワクチン接種により有意な特異抗体誘導が確認された。また、IFN γ 発現上昇により示される特異的細胞性免疫も平行して誘導されることが確認された。このことは、HCV全粒子によるワクチン接種により多様な抗ウイルス免疫を誘導しうることを表しており、HCV予防のみならず、治療用ワクチンとしての可能性を示す結果として非常に意義深い。

こうした結果を踏まえると、更なるワクチン自身の免疫原性の向上およびアジュバントの最適化と平行して、ワクチン免疫による感染防御効果の実証が臨床応用に向けた重要なポイントとなるだろう。この点において、今回示したキメラウイルス感染マーモセットはワクチンの有効性評価のための前臨床試験用モデルとして最も適していると考えられる。今後、より優れた評価モデルに向けて更なる改良が望まれる。

サル類における感染性を獲得したHCV/GBV-Bキメラウイルスが樹立されたとして、次の課題はキメラウイルスの持続感染性の獲得だろう。HCV感染においては、急性クリアランスと持続

感染への移行の違いを規定する要因としてIFN λ のSNPが報告されているが、その本態は未だ明らかではない。この点を明らかにするためには感染初期段階でのウイルス変異や免疫応答の解析が不可欠である。しかし通常、HCV感染の発見は慢性期の肝炎発症時点となることや、HCV暴露事故等で感染が明らかな場合は直ちにIFN治療をおこなうことから、未治療のHCV感染者について感染初期から経時的に血液サンプルを入手することは困難である。従って、持続感染化移行に係る原因探索は容易ではないのが実情である。我々はこれまでに、HCVと同じフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類されるGBV-Bのサル感染実験において、HCV感染と同様に急性クリアランス例と持続感染移行例

(GBV-Bキャリア)が見られることを報告している。特に、接種に用いるGBV-Bウイルスは感染性分子クローン由来であるため、病態の異なるサル個体における比較解析に適していると考えられる。今回の解析の結果、特異抗体(おそらく中和抗体)誘導の遅延およびウイルスゲノムの適応変異が持続感染への移行につながっている可能性が考えられた。今後、これらの現象がウイルス持続感染化とどのように関連しているのか、その機能的意義について詳細な解析を進めていきたい。

E. 結論

本研究班で開発したHCVワクチンは、サル類に中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが明らかとなった。HCV予防のみならず、治療用ワクチンとしての可能性を示す結果として非常に意義深い。更に、ワクチン

免疫による感染防御効果を実証するために開発を進めているキメラウイルス感染マーマセットは最も適している前臨床試験用モデル動物と考えられ、今後より優れた評価モデルに向けて重要な役割を担うものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 2014, in press.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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-1clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87, 11447-11461, 2013.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
- ## 2. 学会発表
- 1) 東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉田友教, 齊藤暁, 槇昇, 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
 - 2) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 吉田友教, 齊藤暁, 槇昇, 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

3) 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.

4) 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.

5) 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(神戸)平成25年11月10-12日

6) 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(神戸)平成25年11月10-12日

7) 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(神戸)平成25年11月10-12日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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
研究協力者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
多田 誠一 理化学研究所 基幹研究所

研究要旨：JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、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。本研究では、近年開発された炭酸アパタイトによる蛋白質や核酸の細胞内へのデリバリー法を応用し、E 型肝炎ウイルス（HEV）とノロウイルスの VLP を炭酸アパタイト内に包埋させることが可能かどうかの検討を行った。

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中で 1.7 億人（HIV 感染者の 4 倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCV のワクチン開発が望まれている。

JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、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。歯や骨を構成する成分である水酸アパタイトと比

較した場合、結晶性の低下により析出する結晶粒子のサイズが減少する一方、酸性溶液中における溶解性が向上していることが知られている。この炭酸アパタイトと蛋白質や核酸の複合体を形成させることができるが、形成された複合体は細胞内へ効率よく導入することが可能である。また、樹状細胞へ抗原を導入することにより、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示されている。

本研究では、HEV とノロウイルスの VLP を用いて、炭酸アパタイトと VLP の複合体を形成させることが可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

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、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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

本研究により、炭酸アパタイトに VLP を結合させることが可能なことが示された。今回検討した VLP は、いずれもエンベロープ蛋白を持たないキャプシドのみで構成されるウイルスであり、エンベロープ蛋白を持つウイルスの VLP を炭酸アパタイトに結合させることができるかどうかはさらに検討が必要である。HCV の VLP を多量に取得する技術の確立が必要であり、まずバキュロウイルス発現系をさらに検討していく。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、他のアジュバントを用いた場合との免疫誘導能の比較を行う。

E. 結論

HEV およびノロウイルスの VLP を結合させた炭酸アパタイトを形成させることができた。今後は、さらに複合体形成に適した条件の検討を行い、VLP を多く含有するアパタイトを作成する。また、形成されたアパタイトについてマウスなどの小動物での免疫誘導能の検討を行う。さらに、目的である HCV 粒子を含有したアパタイトを形成

させられるかどうかについても調べる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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)
3. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and 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, 87: 6031-6036 (2013)
4. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
5. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン BIO Clinica 28: 25-29 (2013)

2. 学会発表

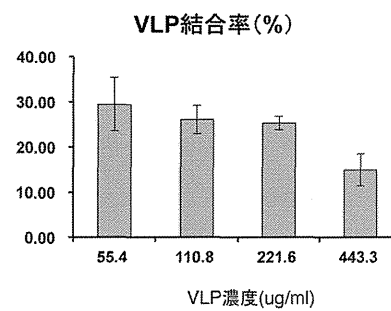
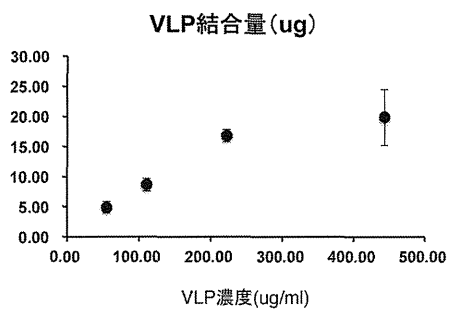
1. Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.
2. 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
3. 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
4. 清原知子、石井孝司、多田有希、脇田隆字：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
5. 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、脇田隆字、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、平成 25 年 11 月、神戸
6. 石井孝司、李天成、吉崎佐矢香、塩田智之、脇田隆字：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、平成 25 年 11 月、神戸
7. 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、脇田隆字、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、平成 25 年 11 月、神戸
8. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：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、平成 25 年 11 月、神戸
9. 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、脇田隆字：霊長類モデルを用いた培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの有効性の検討、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸

G. 知的所有権の取得状況

なし

HEV VLPの炭酸アパタイトへの結合量

VLP添加量 (ug)	VLP濃度 (ug/mL)	CaCl ₂ 濃度 (mM)	VLP結合率(%)			平均値	SD
			a	b	c		
55.41	55.4	7.8	34.18	22.84	31.27	29.43	5.89
110.82	110.8	7.8	29.41	25.55	23.12	26.03	3.18
221.64	221.6	7.8	26.99	24.92	24.02	25.31	1.52
443.27	443.3	7.8	11.44	18.45	14.93	14.94	3.51



ノロウイルスVLPの炭酸アパタイトへの結合量

VLP添加量 (ug)	CaCl ₂ 濃度 (mM)	VLP結合率(%)			平均値	SD
		a	b	c		
15	7.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	13.8	8.39	4.33	4.93	5.88	2.19
15	19.8	5.58	6.76	4.98	5.77	0.91
15	25.8	11.92	10.97	10.89	11.26	0.57
15	31.8	9.49	12.58	12.50	11.52	1.76

