

## 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

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

研究要旨：ウイルスのリバースジェネティクス系を用いた1回感染性ウイルス粒子産生系は、ウイルス生活環の解明など基礎研究に有用であるばかりでなく、より安全な次世代ワクチン開発への応用にも期待されている。昨年度は日本脳炎ウイルス (JEV) レプリコンを用いたトランスパッケージング型粒子の産生系を構築し、さらに subviral particle (SVP) 上に、粒子形成や細胞外への分泌を阻害する事なく外来遺伝子由来のペプチドを提示可能な部位の探索を行った。本年度はJEVのエンベロープ領域中にC型肝炎ウイルス (HCV) の中和エピトープの挿入を許容する部位を同定し、SVPを高発現する細胞株を樹立し、さらに培養上清からウイルス粒子をゲル濾過クロマトグラフィーで精製する事により、HCVワクチン抗原の効率良い産生系を確立した。本研究成果は、増殖効率が不十分なウイルスの新たな抗原産生手段に役立つ事が期待される。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は、持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界で1.7億人、国内で150万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者数は国内で年間3万人を超えている。有効な新規治療薬が開発され治療成績も改善されつつあるが、治療費は高額であり、また難治療の症例も依然として存在する。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、医療従事者や薬物常用者等のハイリスク者に向けた予防的ワクチンの開発が望まれている。

近年、JFH-1株を用いたHCVの培養細胞増殖系が確立され、組換えウイルスの培養が可能となった。これらを抗原としたワクチン開発の為に培養法、精製法、免疫法等の研究が進められ、中和抗体を誘導し得る抗原として期待されている。しかしながら培養細胞を用いたウイルスの産生効率は、従来のワクチンに比べても十分とは言えない状況である。

トランスパッケージング型HCV粒子は感染が1回のみで、感染させた細胞からは感染性ウイルスが産生されない事から通常のウイルスに比べて安全性が高く、また宿主に感染させた場合には液性免疫だけ

でなく細胞性免疫の誘導も期待できる。我々はこれまで、トランスパッケージング型HCV粒子産生系を構築し、ウイルスの様々な領域に変異を導入する事で粒子生産効率を高める事に成功した。しかしながら、それでも依然として十分なウイルス抗原を得る事は困難であった。そこで本研究ではさらにウイルスの増殖が良く、HCVと同様にフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス (JEV) の subviral particle (SVP) 産生系を用いて、この粒子上にHCVの中和エピトープを提示させ、効率良く発現させる事により、ワクチン抗原の効率的な産生系を確立する事を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. JEV E蛋白質中の外来遺伝子挿入可能部位の探索

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。E蛋白質中に外来遺伝子が挿入可能な部位を探索する為に、JEVのエンベロープ領域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 prME 発現プラスミドを構築した。そ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。

## 2. HCV 中和エピトープを持つ SVP を分泌する細胞株の樹立と粒子の精製

HCV の E2 由来中和エピトープ配列を挿入した SVP と GFP をダイシストロニックに発現するレトロウイルスを作製し、293T 細胞に感染させて GFP 高発現細胞をソートする事により、SVP 高発現細胞株を樹立した。樹立した細胞を無血清培地で培養し、その上清から限外ろ過およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いてウイルス粒子を精製した。

### (倫理面の配慮)

本研究で使用するヒト由来の細胞は過去に樹立された株であり、倫理面での問題は無いと考えられる。その他のヒト材料は使用していない。また、動物実験は行っていない。

## C. 研究結果

### 1. JEV SVP への外来抗原由来ペプチドの挿入

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。培養上清中に分泌された E 蛋白質を検出したところ、一部でタグ配列の挿入にも関わらず SVP の分泌が認められた。この中から、さらに HCV の異なる Genotype 間でその配列が保存されているエンベロープ (E2) 蛋白質中の中和エピトープとして報告されているペプチド配列を挿入したところ、SVP の培養上清への分泌が認められた。

### 2. HCV の中和エピトープ配列を挿入した JEV SVP 発現細胞株の樹立と粒子の精製

HCV の中和エピト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。この細胞株の無血清培地の培

養上清約 200ml から限外ろ過およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いてウイルス粒子の精製を行い、最終的に約 800  $\mu$ g の精製 SVP が得られた。

## D. 考察

JEV prME 発現プラスミドを用い、FLAG タグ配列および HCV の中和エピトープ由来配列の挿入を許容する部位が同定された。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についても検討したい。次年度は精製した抗原をマウスに免疫し、中和抗体の誘導を評価する計画である。それに伴い投与方法やアジュバントの至適化の検討をする。また、このような外来抗原が挿入された感染性ウイルスの産生が可能かどうかについても検討したい。

## E. 結論

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し、その培養上清から簡便に HCV 抗原が精製出来た事から、効率良い HCV ワクチン抗原の産生系が確立できた。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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, 8(7):e68992, (2013)

2) 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. 9(8): e1003589 (2013).

- 3) 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-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem.* 288:31715-31727 (2013)
- 4) 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.* 440:515-20 (2013).
- 5) 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).
- 6) 鈴木亮介、小西英二：フラビウイルスのリバーシジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013
2. 学会発表
- 1) Suzuki R, Konishi E, Ishikawa T, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses*, Boston, U.S.A. 2013.4.28-5.3.
- 2) Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Suzuki T, Wakita T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *17th International Symposium on cells of the Hepatic Sinusoid*. Osaka, Japan. 2013.9.23-25.
- 3) 山中敦史、鈴木亮介、小西英二。キメラ Dengue ウイルス様粒子抗原の中和及び感染増強試験における有用性評価。日本熱帯医学会第54回大会、長崎、2013年10月3-5日。
- 4) Ito M, Ito N, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. *20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
- 5) Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Wakita T and Suzuki T. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into the infectious particles. *20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
- 6) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. *20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses*. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
- 7) Suzuki R. Endocytosis pathway for entry of hepatitis C virus. *Italy-Japan Liver Workshop, Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links*. Trapani, Italy. 2013.10.20-21.
- 8) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly H H, Suzuki R, Aizaki H, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. *International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 9) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-

- 1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 10) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
- 11) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system. The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity. Yokohama, Japan. 2013.10.28-29
- 12) 鈴木亮介、小西英二、石川知弘、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 13) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉文、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗. 細胞内発現抗体 (イントラボディ) による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 14) 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉文、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 15) 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス NS5A 結合膜蛋白 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 16) 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化と Hepatic Lipase 発現制御. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 17) 青柳春代、相崎英樹、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. Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV) 分泌過程の制御—グリチルリチンによる抗 HCV 作用—. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 18) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字. Liver X Receptor 転写活性および感染性 C 型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 19) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字. B 型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定及び NTCP を介する感染阻害機構. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 20) 史国利、安東友美、鈴木亮介、伊藤昌彦、脇田隆字、鈴木哲朗. The RNA structures located at 3' end of HCV genome act as cis-elements in selective packaging of its genome into the infectious particles. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.

- 21) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、アリ フ  
セイン、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、  
脇田隆宇. ヒト NTCP 安定発現細胞株における B  
型肝炎ウイルス侵入機構の解析. 日本ウイルス学  
会第 61 回学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 22) 伊藤昌彦、伊藤徳臣、福原崇介、鈴木亮介、  
田川陽一、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗. 肝細  
胞癌株のリプログラミングによる HCV 感受性お  
よび腫瘍原性の低下. 日本ウイルス学会第 61 回  
学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 23) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、  
喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇  
田隆宇. シチジンデアミナーゼ AID 誘導を介し  
た抗 B 型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解  
明. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 神戸,  
2013 年 11 月 10-12 日.
- 24) 鈴木亮介. C 型肝炎ウイルスの粒子形成に重要  
な新規 NS2 結合宿主因子の同定. 日本ウイルス  
学会第 61 回学術集会, 教育セミナー 神戸,  
2013 年 11 月 10-12 日.
- 25) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、  
松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田  
隆宇. プラスミドトランスフェクションによるト  
ランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイル  
ス産生系の確立. 日本分子生物学会第 36 回年会,  
神戸, 2013 年 12 月 3-6 日.
- 26) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、  
Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、  
市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、  
宮村達男、脇田隆宇. Phospholipase A2 および  
Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV)分泌過  
程の制御 -グリチルリチンによる抗 HCV 作用-.  
日本分子生物学会第 36 回年会, 神戸, 2013 年 12  
月 3-6 日.
- H. 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。

## マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの有効性の検討

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

研究要旨：我々は不活化した培養細胞由来HCV粒子を免疫抗原とするHCVワクチンの開発を目指している。本研究では霊長類モデルとしてマーモセットを選択し、不活化HCV粒子の免疫原性と安全性を評価した。不活化HCV粒子免疫マーモセットの血中抗体価測定の結果、投与したHCV粒子のエンベロプタンパク質だけでなく、遺伝子型の異なるHCV粒子のコアタンパク質を認識する抗体が検出された。しかしながら投与個体により抗体誘導能が異なることがわかった。体重比抗原量に有意な差は無いことから、この抗体誘導能の差はアジュバントの抗原増強能やマーモセットの個体差に起因するものと考えられる。また、免疫したマーモセットの病理学的組織解析および生化学的血液検査において、安全面で懸念される事象は認められなかった。

### A. 研究目的

HCVのワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌され、さらにJFH-1の非構造遺伝子と他のHCV株の構造遺伝子からなるキメラウイルスも作製できることが分かった。我々は、これまでに本ウイルス産生系で、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証してきた。さらにワクチンの実用化を目的として、霊長類モデルとしてのアカゲザルにおけるHCVワクチンの免疫原性と安全性を評価するとともに、ヒトに投与できる可能性のあるアジュバントの免疫誘導能を検討してきた。3頭のアカゲザルについて、HCV粒子とAlumアジュバント、Alum+CpGアジュバントまたはMPL+TDMアジュバントを組み合わせて、HCVワクチンとして免疫した結果、HCVエンベロプタンパク質であるE1およびE2タンパク質に対する抗体の誘導を確認した。また、アジュバントと抗原の組み合わせによって、抗体誘導結果が異なる

ことが示唆されたが、個体ごとの体重差が大きく、体重比抗原量による抗体誘導能の差が現れたとも考えられた。これに対し本研究では、比較的小型で体重コントロールが容易なマーモセットを用い、HCV粒子ワクチンの免疫原性および安全性の検討を行ったので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 免疫抗原の調製

##### (1) 感染性 HCV の大量培養

5×10<sup>5</sup>個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV (J6/JFH1 : J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a)濃縮液を multiplicity of infection (MOI) が 0.2 となるように 500 μL の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、37°C でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm<sup>2</sup> フラスコ (Corning 社) に継代培養し、さらにセルスタック (5 段、Corning 社) に継代培養した。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM (DMEM-2) に培養液交換した。その 3 日後に培養上清を回収し、650 mL の DMEM-2 培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、DMEM-2 添加を行い、さらに 2

日後、培養液を回収する操作を行い、計 650 mL×3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μm フィルター濾過を行い、使用するまで-80℃で保存した。

### (2) 限外濾過膜による濃縮・精製

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む 21 L の培養上清をホローファイバー-UFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 倍濃縮した。その後、等量の PBS を添加してダイアフィльтраーションを 5 回行った。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液とした。

### (3) ショ糖密度勾配遠心

10-60 % (w/v) ショ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (BECKMAN 社) に 60 %、50 %、40 %、30 %、20 %および 10 %ショ糖/TNE の順に 2 mL ずつ重層した後、上記のように調製した溶出プール画分を 23 mL をさらに重層した。重量を測定しバランスを合わせた後、Optima L-70K (BECKMAN 社) で SW28 ローターにて 28,000 rpm、4 °C、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ社) を用いて下部を穿刺し、1.5 mL チューブに約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。予め重量を測定しておいた 1.5 mL チューブに 100 μL の各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。

各分画に含まれる HCV 粒子の定量は Lumipulse (富士レビオ社) を用いて HCV コアタンパク質を検出して求めた。また各分画に含まれる総タンパク質量は protein assay reagent (Bio-rad 社) を用いて Bradford 法で実施し、最終的な精製効率を求めた。調製された HCV 粒子は 60 pmol/tube となるようにスクリーキャップチューブに分注し、使用まで-80 °Cで保存した。

2. マーモセットを用いた HCV 粒子の免疫原性および安全性の評価

### (1) 精製 HCV 粒子のマーモセットへの免疫

HCV 抗原は、J6/JFH1 培養上清から限外ろ過膜およびショ糖密度勾配遠心により精製した HCV 粒子を使用した。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 粒子とした。アジュバントには、Alum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社) を用いた。

マーモセット 3 匹への投与は京都大学霊長類研究所にて行った。投与する精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。投与 2 週間前に採血をした後、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 Alum 250 μg を混合し、0、4 および 12 週に左右大腿筋 4 カ所に筋肉内接種した。それぞれの投与日、投与 2 日後および 8、16 週に採血した。採血後、Ficoll 2mL 上に血液 1 mL を充填し、400×g、20 °C、30 分間で遠心分離を行い、血漿成分を回収した。血漿は使用時まで-80 °Cで保存した。免疫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にて固定した。

### (2) マーモセットの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査は、BUN、TP、ALB、GOT、GPT、LDH、ALP、WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、PLT および CRP の 16 項目について検査した。

病理学的組織解析は、心臓、腎臓 (左右)、肝臓、脾臓のホルマリン固定検体について HE 染色を行い、病理学的組織解析を行った。

### (3) 血漿中の抗 HCV 抗体価の測定

抗原となる 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 PBS で 1 μg/ml に希釈し、イムノプレート (Nunc™ 社、#439454) に 50 μL/well ずつ分注し、室温で 2 時間あるいは 4 °C で一晩静置

した。その後、抗原溶液を捨て、Milli Q水で5倍希釈したブロッキング・ワン(ナカライテスク社、#03953-95)を200  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加し、室温で1時間静置した。ブロッキング終了後、ブロッキング溶液を捨て、PBS /0.05 % Tween20 を150  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し2回洗浄した。PBS /0.05 % Tween20 で100~10000倍に希釈した血漿を50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加し、室温で1.5時間静置した。血漿溶液を捨ててPBS /0.05 % Tween20 150  $\mu\text{L}/\text{well}$  で3回洗浄し、続いてPBS /0.05 % Tween20 で5000倍に希釈したHRP-anti monkey IgG (BETHYL社、#A140-102P)を50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加して室温で1時間静置した。抗体溶液を捨ててPBS /0.05 % Tween20 150  $\mu\text{L}/\text{well}$  で4回洗浄し、ペルオキシダーゼ用発色キット(住友ベークライト社、#ML-1120T)の発色溶液に1/100量の基質液を添加したものを50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加した。5~15分間静置し、青色の発色が適度になったら停止液を50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加して反応を停止させ、プレートリーダー(BIORAD社、Benchmark PlusまたはPerkinElmer社、ARVO X4)にて450 nmの吸光度を測定した。

#### (倫理面の配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべてのDNAおよび病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべてのDNAに関して組み換えDNA実験計画を提出し承認を得ている。また、本研究は、京都大学霊長類研究所との共同研究であり、マーモセットを用いた実験は、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. マーモセットの生化学的血液検査および病理学的組織解析

生化学的血液検査について検討した結果、3匹のマーモセットについて、肝臓の毒性マーカーおよび炎症マーカーに著変は見られなかった。

病理学的組織解析の結果、心臓については単核球浸潤および微小出血、肝臓については小肉芽腫、腎臓については間質における単核細胞浸潤、尿管における尿円柱、尿管上皮における色素沈着が認められた。一方、脾臓には著変は認められなかった。

### 2. 血漿中の抗HCV抗体価の測定

Alumをアジュバントとして不活化HCV粒子を投与したマーモセット3匹(識別番号:cj239, cj265, cj203)から採取した血漿中に含まれる抗HCV抗体価をEIAにて評価した。

J6E2/FLAGを抗原として用いたEIAにおいて、マーモセットcj239は抗原投与開始後8週から抗E2抗体価の上昇が認められ、ワクチン投与3回目後の血漿でも同様の抗体価上昇が認められた。これに対しcj265ではワクチン投与開始16週後まで抗体価の上昇が認められなかった。cj203ではワクチン投与開始4週後の早い段階から効果が上昇しており、その誘導はcj239と同等であった。

J6E1/FLAGを抗原としたEIAでは、抗E1抗体価はJ6E2/FLAGのEIAと同様の結果であったが、cj203の抗体価はcj239の3倍以上高い値であった。

HCVワクチンの汎用性を確認するために、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を行った。その結果、cj239ではJ6E2/FLAGおよびJ6E1/FLAGと同様ワクチン投与開始後12週および16週にて遺伝子型1に対する抗コア抗体価の上昇が認められた。しかしながら他個体では抗体価の上昇は認められなかった。

### D. 考察

我々は、細胞培養系で産生された感染性HCV粒子をUVで不活化した不活化HCV粒子をワクチンとして開発しようと試みている。本検討では、この不活化HCV粒子の免疫原性および安全性を評価することを目的として、また体重比抗原量の影響を



考慮して小型の霊長類であるマーモセットを用いて検討を行った。マーモセットは霊長類における実験モデル動物として広く利用され、またワクチン投与実績もある。本検討ではマウスで感染中和抗体誘導が認められる抗原量 (2 pmol core protein / 20 g body weight) を指標として、マーモセットの体重 (約 300 g) から投与量を算出した (60 pmol core protein / 300 g body weight)。アジュバントはアカゲザルにて感染中和抗体誘導が認められた Alum に固定し、不活化 HCV 粒子と混合してマーモセット大腿筋内 4 カ所に投与した。

安全面において、ワクチン投与部位にはアジュバントに起因する軽度の炎症以外の所見は認められず、その炎症も投与後速やかに消失した。生化学的血液検査の結果、ワクチンを投与した 3 匹のマーモセットについて、肝臓の毒性マーカーおよび炎症マーカーに著変は見られなかった。実験殺後、摘出した臓器を用いて病理学的組織解析を行ったところ、いくつかの所見 (心臓：単核球浸潤および微小出血、肝臓：小肉芽腫、腎臓：間質における単核細胞浸潤、尿管における尿円柱、尿管上皮における色素沈着。) が認められたが、これら所見はいずれも軽度であり、主に実験殺時の操作 (過麻酔および全採血) によって引き起こされる症状であることから、ワクチンとは直接関係が無いと考えられた。

血漿抗体価の検討では、免疫したマーモセット 3 匹中 2 匹に抗体の誘導が認められる結果となった。これらマーモセットは体重差がほとんど無く、体重比抗原量にも差が無い。また十分な抗原量を投与していると考えられることから、抗原量不足とは考えづらい。抗体誘導に関しても、抗体価上昇が認められたマーモセット cj239 と cj203 では差があり、cj239 では E1 および E2 に対してほぼ同等の抗体価上昇が認められたが、cj203 では E1 に対する抗体価が E2 に対する抗体価の 3 倍以上高かった。また、遺伝子型 1 のコアタンパク質に対する抗体は cj239 では認められたが、cj203 では検出されなかった。以上の結果から、不活化 HCV 粒子ワ

クチンの免疫原性は、霊長類では個体差が大きい事が示唆された。今後、Alum 以外のアジュバントを用いてマーモセットに免疫し、不活化 HCV 粒子の免疫原性をより高めるアジュバントの検討および投与条件の検討を行う。

## E. 結論

霊長類モデルとしてマーモセットを選択し、HCV 粒子の免疫原性の検討を行った。抗原量は 60 pmol/head に固定し、アジュバントは Alum を選択した。3 回免疫の結果、cj239 は E1 および E2 に対する抗体価上昇を認めた。Cj265 は抗体価の上昇が認められなかった。Cj203 は免疫開始 4 週間後から顕著な抗体価上昇が認められた。本検討の結果、HCV 粒子ワクチンの免疫原性は霊長類では個体差が大きい事が示唆された。免疫時の臨床所見、解剖時の肉眼的観察の結果は正常であった。また病理学的組織解析においていくつかの所見が認められたが、大きな問題とならないことを確認した。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 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

## HCV粒子ワクチン製造用細胞株の探索 ー正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試みー

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

研究要旨：JFH-1株を用いたウイルス培養法で効率にウイルスを生産できる細胞株はHuh7細胞のみであり、Huh7細胞は肝細胞がん由来であることからワクチン用のウイルス生産細胞株としては適当ではない。近年、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス5型のE1遺伝子で形質転換した不死化細胞Per. C6がインフルエンザワクチンの製造に使用されだしたこと、正常肝細胞にE1遺伝子を導入し、不死化細胞株を作製できれば、HCV粒子ワクチン製造用細胞株の候補となる。本研究ではこの可能性について検討した。

### A. 研究目的

HCVのワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌され、さらにJFH-1の非構造遺伝子と他のHCV株の構造遺伝子からなるキメラウイルスも作製できることが分かった。我々は、これまでに本ウイルス産生系で、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることも実証してきた。しかし、このJFH-1株を用いたウイルス培養法で効率にウイルスを生産できる細胞株はHuh7細胞のみであり、Huh7細胞は肝細胞がん由来であることからワクチン用のウイルス生産細胞株としては不適当である。従って、細胞培養法ワクチンの製造可能な高力価のウイルスを得ることのできる細胞株の探索が必要である。

近年、タンパク医薬の製造およびワクチン製造用の細胞株として注目されているのがPer. C6細胞である。Per. C6細胞は、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス5型のE1遺伝子で形質転換した不死化細胞であり、インフルエンザワクチンの製造に使用されだ

している。さらに、OCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYC遺伝子を導入して作製したiPS細胞から分化誘導した細胞が再生医療に使用されようしていることから、遺伝子導入細胞をワクチン製造株として使用することは可能であることが示唆される。この可能性をサポートする知見として、HPVのE6/E7遺伝子とhTERT遺伝子を導入して作製した不死化ヒト肝細胞株でHuh7細胞より約1/5の効率であるがHCV粒子が生産されることが示されていることから、HCVワクチン製造株として正常肝細胞に遺伝子導入して不死化した細胞を検討することは重要な課題として挙げる事ができる。

そこで本研究では、正常肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子を導入し、不死化細胞株を作製することを試みたので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. E1 遺伝子発現ベクター

##### (1) E1 遺伝子のクローニング

293細胞のゲノムDNAを鋳型に2つのプライマー、GGCTAGCAGAATCCCACatgagacatattatctgccacggagをよび

GAGCGGCCGAACGCGTctctcaatctgtatcttcatcgctagを用いてPCRを行い約3.0kbのE1遺伝子を増幅した。増幅遺伝子をpCR2.1-TOPOにクローン化し、シーケンスにて配列を確認した。

##### (2) E1 遺伝子発現ベクターの作製

E1 遺伝子を NheI と NotI で切り出し、発現ベクター、pLVSIN-EF1 $\alpha$ -Puro の XbaI と NotI 間に挿入した。

## 2. IRF7 ドミナントネガティブ変異体(IRF7DN)発現ベクター

### (1) IRF7DN 発現ベクターの作製

IRF7 アイソフォーム A の 227 番目のアミノ酸残基から 503 番目のアミノ酸残基までのポリペプチドをコードする核酸を人工合成し、CMV プロモーター、アデノウイルス pIX プロモーターおよび肝臓特異的転写因子配列+SNEP プロモーターの制御下に発現する IRES-GFP ベクターに挿入した。

### (2) プロモーターの選択

上記 3 種類のプロモーターからなる IRF7DN 発現ベクターを 293 細胞および Huh7 細胞に Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を用いて導入し、GFP の発現の頻度を指標にベクターの発現効率を評価した。

### (3) IRF7DN 遺伝子の E1 遺伝子発現ベクターへの組み込み

E1 遺伝子発現ベクター-pLVSIN-EF1 $\alpha$ -E1-Puro の MluI、NotI 間に肝臓特異的転写因子配列-SNEP プロモーター-IRF7DN からなる DNA 断片を挿入した (pLVSIN-EF1 $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro)。

## 3. レンチウイルスベクターの作製

### (1) ウイルスベクターの作製

発現ベクター-pLVSIN-EF1 $\alpha$ -E1-Puro、pLVSIN-EF1 $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro または pLV-Green(GFP 発現ベクター)を pCMV-VSV-G、pRSV-REV および pCgpV とともに 293FT 細胞に Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を用いて導入した。48 時間培養後の上清を Lenti-X Concentrator にて濃縮し、ウイルスストックとした。これらのウイルスをそれぞれ pLVSIN-AdE1、pLVSIN-AdE1-IRF7DN、pLV-Green とした。

### (2) 力価検定

ウイルスの力価は HT1080 細胞を用いて行った。6 well プレートに  $2 \times 10^5$  の HT1080 細胞を播種し、培養した。翌日、希釈したウイルス液を 1mL 加え、Polybrene を最終濃度が  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加し、一夜培養した。完全培地 2mL に置き換え、引き続き培養し、翌日に  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の Puromycin を含む

培地に置き換え、コロニーが形成されるまで培養し、コロニーの数を測定した。

## 4. 正常ヒト肝細胞の培養と遺伝子の導入

### (1) 正常ヒト肝細胞の培養

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps<sup>™</sup> を使用し、肝細胞基本培地 (CC-3199) に 肝細胞添加因子セット (CC-4182) を添加した培地 (HCM) を使用し、Type I コラーゲンコートプレート (6 well) に  $8 \times 10^4$  個/well で培養した。翌日、5%FCS、1000 単位/mL の肝細胞増殖因子 (HGF) を含む HCM (HCM-5%FCS-HGF) に培地交換し、培養を続けた。

### (2) 正常ヒト肝細胞への遺伝子の導入

レンチウイルスに ViraDuctin Lentivirus Transduction Kit (cellbiolabs 社) の試薬 A、B を加え、複合体を形成させた。この複合体を正常ヒト肝細胞に加え、一夜培養し、培養液を除去し、試薬 c を加え、1 分間処理後、HCM にて洗浄し、2mL の HCM-5%FCS-HGF を加え、培養を続けた。翌日、 $1 \text{mg}/\text{mL}$  の Puromycin を含む HCM-5%FCS-HGF で薬剤選択を行った。

### (倫理面の配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 肝細胞における IRF7DN の発現量の比較

肝細胞株 Huh7 において、IRF7DN の発現効率の高いプロモーターについて評価した。その結果 293 細胞においては、CMV プロモーターが一番強く、アデノウイルス pIX および肝臓特異的転写因子配列+SNEP プロモーターは同程度であった。一方、Huh7 細胞においては、肝臓特異的転写因子配列+SNEP プロモーターが最も発現が高い結果となった。以上から、レンチウイルスベクターにおいて IRF7DN を発現させるプロモーターとして、肝臓特

異的転写因子配列+SNEPプロモーターを選定することにした。

## 2. E1 遺伝子発現ベクターの構造

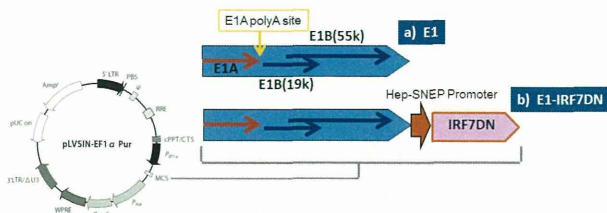


図-1 ベクターの構造

図-1 に作製したベクターの構造を示した。挿入した E1 遺伝子から EF-1 $\alpha$ プロモーターの制御下に E1A、E1B(19K)、E1B (55k) のタンパク質が発現する。pLV-SIN-EF1  $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro は、E1 遺伝子に加えて、肝臓特異的転写因子配列+SNEPプロモーターの制御下に IRF7DN を発現する。

## 3. ウイルスベクターの力価の評価

pLV-SIN-AdE1、pLV-SIN-AdE1-IRF7DN 力価を HT1081 細胞の puromycin 耐性コロニーの出現率で評価した。10 倍濃縮したにもかかわらず、力価はそれぞれ、 $2 \times 10^4$  transducing units (TU)/mL、 $1 \times 10$  TU/mL であった。ウイルス力価は低いのは E1 遺伝子中に E1A 遺伝子の polyA 付加部位が存在するため、E1B 遺伝子を含む全長 RNA が生成されにくいものと考えられた。

## 4. 正常ヒト肝細胞への E1 遺伝子の導入

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps™ を使用した。添付書では、本細胞の増殖率は高くないという記載であった。

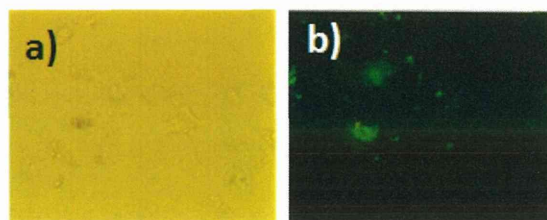


図-2 pLV-Green 感染 hNHeps™

そこで、できるだけ増殖を向上させる目的で HGF を添加して培養した。その後、レンチウイルスを感染させた。コントロールに用いた GFP 発現レン

チウイルスを感染させたときの細胞の写真を図-2 に示した。約 50%の細胞に感染することが示された。

一方、pLV-SIN-AdE1、pLV-SIN-AdE1-IRF7DN を感染させた hNHeps™ を puromycin を含有する HCM-5%FCS-HGF で培養を続けたが、増殖する細胞は出現しなかった。

## D. 考察

Aly らは、初代肝細胞に HPV の E6/E7 およびテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子を導入すると不死化細胞が樹立されることを示し、さらに IRF7DN 発現ベクターを導入したクローンは、Huh7.5 細胞の約 1/5 の効率ではあるが、JFH1 の増殖を支持することを示していること、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス 5 型の E1 遺伝子で形質転換した不死化細胞 Per. C6 がインフルエンザワクチンの製造に使用されだしたことを手がかりとして、我々は正常ヒト肝細胞にアデノウイルスの E1 遺伝子を導入し、不死化を試みた。正常ヒト肝細胞に Lonza 社の hNHeps™ を使用した。レンチウイルスベクターによる hNHeps™ への遺伝子導入の効率は GFP を指標とすると、約 50%であったが、E1 遺伝子の導入で不死化し増殖する細胞は出現しなかった。Aly らは、初代肝細胞に HPV の E6/E7 を単独で発現させても不死化細胞は得られず、hTERT を同時に発現させたときに不死化細胞が得られることを報告しているので、アデノウイルス E1 遺伝子での不死化においても hTERT が必要かもしれない。今後、E1 遺伝子と hTERT の遺伝子の導入を検討する。

我々が使用した正常ヒト肝細胞、hNHeps™ は凍結細胞であり、機能評価用に開発されたものである。一方、正常ヒト肝細胞への遺伝子導入による不死化に使用した肝細胞は、凍結保存されておらず、細胞分離後、直ちに使用している。凍結保存細胞は増殖性に問題がある可能性があるため、今後、ヒト肝臓キメラマウスより単利した肝細胞の使用を検討する。

また、HCVの増殖はIRF3、IRF7、miR122によって制御されていることも報告されている。今後不死化した肝細胞については、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムによるIFN関連遺伝子の破壊等を行い、HCVウイルス高産生細胞株の樹立を目指す。

#### E. 結論

①E1遺伝子だけでは肝細胞は不死化できず、Aly HH et. al (J Hepatol. 46:26-36, 2007)の報告のようにhTERTの発現が必要である可能性がある。今後、E1+hTERTの組合せで不死化を試みる

②不死化肝細胞樹立研究における肝細胞のソースが調製直後の細胞であるのに対し、本研究ではLonzaのhNHeps™は凍結細胞であり、これが原因で不死化ができない可能性がある。そこで、肝細胞のソースとして、ヒト肝細胞キメラマウス(PBX®マウス、フェニックスバイオ)より調製した肝細胞を使用を試みる。

③不死化細胞株を樹立した後でインターフェロンシグナル関連遺伝子をCRISPR/Casシステムを用いて破壊することも視野に入れる。

#### F. 健康危険情報

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. 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) 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。

3) 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、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。

#### H. 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

## TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

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

研究要旨：細胞性免疫応答惹起のシグナルを伝達するToll-like receptor 3 (TLR3)は次世代免疫アジュバントとして有望視されている。本研究では、二本鎖RNA以外にTLR3を活性化  
するRNA構造について解析し、不完全なステム構造を有し細胞外で安定な構造をとるRNA  
(structured RNA)がTLR3リガンドとなることを明らかにした。Structured RNAはpoly(I:C)  
と共通の取り込みレセプターで認識され、Raftlin依存的経路でエンドソームに運ばれTLR3  
を活性化したが、細胞内RNAセンサーは活性化しなかった。TLR3特異的なアジュバント開発  
において、TLR3で認識されるRNA構造とともに取り込みレセプターにより認識されエンドソ  
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。

### A. 研究目的

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、アダプター分子TICAM-1 (別名TRIF) を介して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。TLR3リガンドとしてはウイルス由来の二本鎖RNA (dsRNA)や合成dsRNAのpoly(I:C)が報告されているが、poly(I:C)はエンドソームのTLR3以外に細胞質のMDA5やDDX familyも活性化し強い炎症応答を誘導するなど、dsRNAの細胞内への送達機構は不明な点が多い。また、TLR3は非感染性の炎症応答にも関与することが知られており、dsRNA以外のRNA構造も認識すると考えられる。本研究では、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し、副作用が少なく効果的に細胞性免疫応答を誘導するTLR3アジュバントを開発することを目的とした。

### B. 研究方法

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- $\beta$ , 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。

(倫理面の配慮)

動物実験は北海道大学動物実験に関する指針に基づき行った。

### C. 研究結果

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。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とがわかった。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- $\beta$ 産生を誘導した。ノックアウトマウスを用いた解析から、structured RNAによるマウス脾臓CD11c陽性樹状細胞からのタイプI IFN, 炎症性サイトカイン産生はTLR3依存的であることが明らかになった。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- $\beta$ 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。興味深いことに、マウス樹状細胞のTLR3は短い長さのincomplete stemをもつRNAも認識しIFN- $\beta$ 産生を誘導するがヒト細胞では誘導しないことから、マウス樹状細胞ではより柔軟にRNAを認識する可能性が示唆された。

#### D. 考察

TLR3 が認識する RNA 構造に関して、ウイルス由来の dsRNA 以外に、in vitro 転写ウイルス mRNA, 非感染性のネクロシス細胞からの自己由来の RNA, UV-damaged noncoding RNA などが報告されていたが、詳細は不明であった。本研究より、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ということが明らかになった。Structured RNA は TLR3 エクトドメインの N 末と C 末側に存在する dsRNA 結合部位に結合し TLR3 をオリゴマー化する。TLR3 と 46bp-dsRNA 複合体の結晶構造解析から判断すると、structured RNA 内に存在する 11bp 以下の短い dsRNA が bulge や internal loop で分断されタンデムに並んだ領域で TLR3 と結合していると考えられ

た。細胞外から TLR3 を活性化するには、取り込まれて TLR3 が存在するエンドソームに送達されることが必要であるが、structured RNA は poly(I:C) と共通の取り込みレセプターで認識され Raftlin 依存的に取り込まれた。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。また、リガンド構造によるヒトとマウス細胞での応答性の違い、さらには細胞種間での違いなどを注意深く調べるが必要であると考えられた。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.* Published Online: Oct. 29.
5. Takaki, H., M. Takeda, M. Tahara, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4<sup>+</sup> dendritic cells primarily triggers type I interferon production against measles virus in a mouse infection model. *J. Immunol.* 191(9): 4740-4747.
  6. 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  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* 57(2): 100-110.
  7. 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.
  8. Suzuki, T., H. Oshiumi, M. Miyashita, H. H. Aly, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS ONE* 8(12): e83639.
  9. 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)
  10. 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
  11. 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]
2. 学会発表
    1. Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.
    2. Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. TLR3/BATF3 axis in CD8a<sup>+</sup>DC induces anti-tumor CTLs by dsRNA. (同上)
    3. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Supportive involvement of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy for cancer. (同上)
    4. 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  $\gamma$  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)
    5. Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. Development of ideal adjuvant for cancer vaccine: Beyond the scope of current immunotherapy for cancer. The 4<sup>th</sup> 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・取得状況
    1. 特許取得  
なし
    2. 実用新案登録  
なし
    3. その他  
なし



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Matsumoto M, Funami K, Tatematsu M, Azuma M, Seya T.	Assessment of the TLR3 pathway in endosomal signaling.	P. Michael Conn	Methods in Enzymology	Academic Press, .	UK	2014	535:149-165
Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T.	Toll-IL-1-receptor -containing adaptor molecule-1, a signaling adaptor linking innate immunity to adaptive immunity.	Jesus Giraldo	Oligomerization in Health and Disease	Academic Press	UK	2013	PMBTS 117:487-510

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
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 was effective both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Gastroenterology	145	447-455	2013
Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley D, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F.	Structures and interface mapping of the TIR-domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling.	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	110	19908-19913	2013
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.	437(1)	127-33	2013

Kondo Y, <u>Kato T</u> , 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	8(5)	e63672	2013
Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, <u>Akari H</u> , Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T	Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees.	Primates	54	89-98	2013
Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, <u>Wakita T</u> , 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.	8(3)	e59776.	2013
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Date T, Watanabe N, Watashi K, <u>Suzuki R</u> , Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Wakita T</u> , Aizaki H.	Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus in Vitro.	PLoS ONE	8	e68992	2013
Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, <u>Akari H</u> , 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

Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Nakamura S, Katakai Y, Yoshida T, Saito A, Tajima S, Ito M, Takasaki T, <u>Akari H</u> , Kurane I.	Presence of viral genome in urine and development of hematuria and pathological changes in kidneys in common marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> ) after inoculation with dengue virus.	Pathogens	2	357-363	2013
Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, <u>Suzuki R</u> , Aizaki H, Sugawara F, <u>Wakita T</u> .	Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives.	Biochem Biophys Res Commun.	440	515-20	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, <u>Akari H</u> , 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
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, <u>Akari H</u> , 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
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, <u>Akari H</u> , 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	11447-1 1461	2013
Oshiumi H, Miyashita M, <u>Matsumoto M</u> , Seya T.	A Distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses.	PLoS Pathog.	9	e100353 3	2013