

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。

よ

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 細胞およびシヨ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

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キャリアー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