

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、現在のウイルス保因者数は世界で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ための培養法、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こと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。我々はこれまでに、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 μ 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、千葉丈、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、千葉丈、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、脇田隆字 . 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、脇田隆字、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、脇田隆字 . 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、脇田隆字 . 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。