

4. Takahiro Sanada, Kyoko Tsukiyama-Kohara, S Ezzikouri, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara : Development of *Tupaia belangeri* for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomic research. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)
5. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Shosaku Hattori, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai.: Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)
6. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, Yuri Kasama : Comprehensive analysis of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)
7. Takahiro Sanada, Kyoko Tsukiyama-Kohara, S Ezzikouri, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara : HBV Pathogenesis and host response in *Tupaia belangeri*. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2014.9.3-6 Los Angeles (USA)
8. Masaaki Arai, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asako Takagi, Yoshimi Tobita, Kazuaki Inoue, Michinori Kohara : Resistance to cyclosporine S derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff (Canada)
9. Yuko Tokunaga, Kiminori Kimura, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Mitsuko Hara, Keisuke Munekata, Tsunekazu Hishima, Soichi Kojima, Michinori Kohara. : Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff (Canada)
10. Tubasa Munakata, Makoto Inada, Yuko Tokunaga, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Akio Nomoto : Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff (Canada)
11. Sayeh Ezzikouri, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara: Inhibitory effects of pycnogenol on Hepatitis C Virus replication. 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 パシフィコ横浜
12. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylactic effect of H5N1 influenza vaccine based on attenuated replicative vaccinia virus that contains endogenous adjuvant component. Keystone Symposia (The Modes of Action of Vaccine Adjuvants (S1)) 2014.10.8-13 Seattle (USA)
13. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylactic effect of H5N1 influenza vaccine based on vaccinia virus vector in cynomolgus monkeys. 8th Vaccine & ISV Congress 2014.10.26-28 Philadelphia (USA)
14. 安井文彦、宗方圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐智恵子、小原道法: H5N1高病原性鳥インフルエンザ組換えワクシニアワクチン単回接種による免疫長期持続作用機序の解析 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
15. 棟方 翼、徳永優子、真田崇弘、脇田隆宇、

野本明男、小原道法:C型肝炎ウイルス感染時にTLR3はIFN非依存的に発現して抗ウイルス作用を示す 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

16. 斎藤 誠、安井文彦、棟方 翼、飛田良美、小澤 真、小原恭子、伊東利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田規一、小原道法: 亜型を超えた感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

17. 徳永優子、木村公則、大槻貴博、林 幸子、原 詳子、宗方圭祐、比島恒和、小路弘行、小嶋聡一、小原道法: 選択的Wnt/ β -catenin/CBPシグナル阻害剤による肝線維症改善作用 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

18. Seyeh Ezzikouri、池 海英、真田崇弘、永野希織、山口千穂、神田雄大、金沢伯弘、奥谷公亮、上野晃聖、中川寛子、Chimene Nze NKOGUE、三好宣彰、小澤 真、Soumaya Benjelloum、村上周子、田中靖人、小原道法、小原恭子: Development of Tupaia belangeri fpr HBV persistent infection. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

19. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄: Anti-CCR4抗体はTregと感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

20. 安井文彦、伊藤 靖、池尻 藍、北畠正大、宗方圭祐、迫田義博、喜田 宏、坂口薫雄、小笠原一誠、小原道法: H5N1高病原性鳥イ

ンフルエンザウイルス感染に対する哺乳動物宿主の免疫応答とインフルエンザ組換え生ワクチン接種による発症防御 第18回日本ワクチン学会学術集会 2014.12.6-7 福岡国際会議場

22. Ai Ikejiri, Fumihiko Yasui, Yasushi Itoh, Masahiro Kitabatake, Nobuo Sakaguchi, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus causes severe symptoms due to insufficient induction of humoral immune response. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12. 京都国際会館

23. Kiminori Kimura, Takahiro Otsuki, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara : Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the hepatitis C virus suppresses viral protein level in mouse liver. 第5回発がんスパイラル国際シンポジウム 2015.2.26-27 神戸ポートピアホテル

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

2014年11月13日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称: C型肝炎の治療及び/又は予防用医薬組成物

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

DNAワクチンの肝炎ウイルス感染における特異的免疫反応の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長
研究協力者 塩釜ゆみ子 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特任研究員

研究要旨：C型肝炎ウイルス (HCV) の免疫学的な感染病態の解析および治療用ワクチンの開発に向けて、HCVに対するDNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法についての検討を行った。HCVの構造蛋白主体領域 (CN2) もしくは非構造蛋白主体領域 (N25) 遺伝子を組み込んだHCV-DNAワクチン (HCV-CN2, N25) とリコンビナントワクシニアウイルス (rVV-CN2, N25) をそれぞれ作製した。これらDNAワクチンとワクシニアウイルスをprime/boost法でC57BL/6マウスに免疫し、脾臓での特異的細胞性免疫の誘導についてELISPOT法を用いて検討したところ、HCVに対する高い異的細胞性免疫の誘導が認められた。またC型肝炎モデルマウスにprime/boost法にて免疫したところ、HCV-DNAまたはrVV-N25単体で免疫したマウスに比べ特異的細胞性免疫の増強が見られた。さらに、同一領域をboostするN25-DNAとrVV-N25の組み合わせよりもN25-DNAとrVV-CN2を用いた組み合わせで特異的細胞性免疫がさらに上昇することが確認された。肝臓中のHCVコア蛋白発現量が有意に減少しており、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いて一部重複するHCVの遺伝子領域をprime/boost法で免疫することにより治療用ワクチンの投与プロトコールとしてより有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV感染症では肝炎から肝硬変、肝がんに至る過程を全ての感染者が示すわけではなく、生体の免疫反応にてその発展を阻止できる可能性が示唆されている。本研究ではHCV特異的免疫反応の誘導により治療を行う治療用ワクチンの開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) マウス

poly(I:C)を投与することで、任意の時期にHCV遺伝子を誘導発現できるトランス

ジェニック (HCV-Tg) マウス (CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-), RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)) (図1A)、C57BL/6マウスを用いた。HCV-Tgマウスはpoly(I:C)を投与後、HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させた後に、実験に使用した。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスはHCV遺伝子の一部を、RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスは全長をコードしている。
(2) HCV遺伝子発現ワクチンの作製

すべてのHCV遺伝子領域を含むpBMSF7CプラスミドベクターからPCR法と制限酵素反

応を用いて、HCVの外殻蛋白領域

(CoreE1E2NS2) あるいはHCVの複製に関与している非構造蛋白領域 (NS2-5) の遺伝子領域をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込むことにより作製したHCV-DNA ワクチン (CN2-DNA, N25-DNA) をそれぞれ prime ワクチンとして使用した (図1A)。これらのワクチンのコントロールとして HCV 遺伝子領域を含まない DNA ワクチン

(empty) をコントロールとして使用した。また、DNA ワクチンに組み込んだ配列と同じ配列をワクシニアウイルス LC16m8 株に組み込んだ組換えワクシニアウイルス (rVV) である rVV-CN2 および rVV-N25 を boost ワクチンとして使用した (図1A)。

(3) 免疫方法

25 μ l の PBS に懸濁した 100 μ g の DNA ワクチンをマウスの下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション (50 V, 99 msec, 8 times) を 2 週毎に 2 回投与した。さらに boost としてワクシニアウイルスを DNA 投与完了後 2 週にワクシニアウイルス 1×10^8 pfu/50 μ l で皮内投与した。最終投与後 2 週目に脾臓、肝臓を回収し解析を行った (図1B)。

(4) ELISPOT 法による特異的細胞性免疫誘導能の測定

赤血球溶血処理を行った脾細胞 (1×10^5) または、脾細胞を磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて分離した CD8⁺、CD4⁺ 細胞 (2×10^5) を予めマイトマイシン処理を行った刺激細胞 (HCV の各遺伝子部位を過剰発現した腫瘍細胞 (EL-4/core, /E2, /NS2, /N3-4A, /CN2)) (1×10^4) で刺激し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で 48 時

間培養、HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した。

(5) 肝臓の解析

ワクチンを投与した後、肝臓を回収し、肝臓組織抽出液の作製並びにホルマリン固定を行った。肝臓組織抽出液中の HCV コア蛋白質発現量は市販の HCV core ELISA アッセイキット (Xpress Bio) を用いて定量した。ホルマリン固定した肝臓片はパラフィン包埋後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびズダンブラック染色を行った。

(6) ワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験

CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに prime/boost ワクチンを予め投与し、最後の投与から 2 週間後に、脾臓を採取し、CD11c⁺ 細胞を分離後、HCV-NS3 ペプチド (GAVQNEITL) を 5 時間パルスし、C57BL/6 もしくは CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスの足蹠に投与 (2×10^5 cells) し、2 週後に脾臓中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞について ELISPOT 法を用いて解析した (図 5 A)。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) HCV 遺伝子発現 DNA (CN2-DNA, N25-DNA) ワクチンとワクシニアウイルス (rVV-CN2, rVV-N25) の作製

pCAGGS プラスミドベクターに HCV の構

造蛋白領域または非構造蛋白遺伝子領域を組み込んだ HCV-DNA ワクチン (CN2-DNA, N25-DNA) および組み換えワクシニアウイルス (rVV-CN2, rVV-N25) を作製した (図 1 A)。マウスへのワクチン投与スケジュールは図 1 B に示した。

(2) ELISPOT 法による prime/boost ワクチンの細胞性免疫誘導能についての検討

DNA ワクチンおよび rVV を用いて prime/boost ワクチン免疫を行った C57BL/6 マウスより脾臓を採取し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した。N25-DNA 単独投与でもある程度の特異的細胞性免疫が見られたが、N25-DNA/rVV-N25 を用いた prime/boost 免疫法でより強い細胞性免疫の増強が示唆されたため (図 2 A)、N25 と CN2 遺伝子領域をコードした DNA ワクチンと組み替えワクシニアウイルスのより効果的な組み合わせを検討した。非免疫群およびコントロールワクチンとして HCV 遺伝子領域を含んでいない DNA ワクチンと rVV を投与したマウス由来の脾細胞は刺激後、特異的な免疫反応を示さなかったが、HCV 遺伝子を組み込んだ prime/boost ワクチンを投与したマウスでは全ての群で脾臓細胞における、CN2、NS3/4、NS2、E2、core に対する特異的細胞性免疫が誘導されることを確認した (図 2 B)。prime/boost 群同士で比較すると、N25-DNA/rVV-N25 や CN2-DNA/rVV-CN2 のように DNA ワクチンと組み替えワクシニアウイルスで同じ HCV 遺伝子領域を免疫するような組み合わせよりも、N25-DNA/rVV-CN2 や CN2-DNA/rVV-N25 のような一部を重複させた異なる遺伝子領域を免疫した場合の方が

全体的に特異的細胞性免疫の反応が高かった。

(3) HCV 部分長遺伝子発現 C 型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo* における HCV 特異的細胞性免疫の評価

HCV 蛋白を 3 ヶ月間持続的に発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに prime/boost ワクチンを投与し、脾臓細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定した (図 3 A)。C56BL/6 マウスを用いた場合と異なり、N25-DNA のみ、もしくは CN2-DNA のみを免疫した群では細胞性免疫が減弱していた。一方、prime/boost 群として N25-DNA/rVV-CN2 投与マウス由来の脾臓細胞で NS3/4、NS2、E2 に対する特異的細胞性免疫が十分に確認された。Core に対する反応も DNA ワクチンのみを投与した群に比べて増加していた。さらに、肝臓中の HCV コア蛋白発現量を測定したところ、empty 投与群に比べワクチン投与群全てにおいて、肝臓中コア蛋白発現量が減少しており、特に prime/boost 群として N25-DNA/rVV-CN2 を用いた組み合わせが最もコア蛋白発現量を減少させていることを確認した (図 3 B)。また、肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV 蛋白を 3 ヶ月間持続的に発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスの肝臓では、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常が多数観察されるが、ワクチン投与群においてそれらの異常が改善され、特に N25-DNA/rVV-CN2 群でその改善が顕著であったことを確認した (図 3 C)。

(4) HCV 全長遺伝子発現 C 型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo* における HCV 特異的細

胞性免疫の評価

CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスを用いた場合と同様に、HCVの全長遺伝子をコードしているRzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにワクチンを投与し、脾臓細胞における特異的細胞性免疫の誘導を測定した(図4A)。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに投与した場合と異なり、prime/boost法によるワクチン投与を行ってもN25-DNA/rVV-N25のように同一遺伝子領域を免疫した場合では特異的細胞性免疫の増強は見られなかった。しかし、N25-DNA/rVV-CN2による一部遺伝子を重複させた異なる領域に対するprime/boost法ではそれらで重複させているE2およびNS2に対する特異的細胞性免疫の増強が確認された。CD8+細胞のみを用いた場合においても同様であった(図4B)。形態学的検索においてもprime/boost群で改善が見られ(図4C)、ズダンブラック染色による脂肪滴の検出においてもN25-DNA/rVV-CN2投与群では他の群に比べて大きな脂肪滴が減少した(図4D)。

(5) HCV-Tg マウスにおける DNA ワクチンの CTL 誘導能減弱についての解析

以前の報告でN25-DNA ワクチンを投与したC57BL/6マウスをドナーとし、誘導したCTLをC57BL/6もしくはCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに移入しても、同等数のHCV特異的細胞性免疫反応が検出されたことから、成熟したCTLのIFN- γ の産生を抑制する機構がWTマウスと異なりHCV-Tgマウスに特別存在している可能性はないと考えられた。

一方で、RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスをレシピエントとしたDNAワクチン単独投与マ

ウス由来CD11c+細胞移入によるCTLの誘導は、C57BL/6マウスをレシピエントにした時と比べて、ドナーがどちらのマウスであっても大幅に減弱していた。

そこで、今回はCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスをドナーとし、N25-DNA/rVV-CN2のPrime/boost免疫法でCD11c+細胞移入による特異的細胞性免疫の賦活化が見られるか検証した。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスから脾臓中のCD11c+細胞を取り出しHCVのペプチドでパルスし、C57BL/6もしくはCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに移入した(図4A)。C57BL/6マウスへの移入において最も高い細胞性免疫の誘導が見られた。驚くべきことに、CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスをレシピエントとした場合、N25-DNAのみを複数回免疫したCD11c+細胞を移入しても特異的細胞性免疫の増強は見られなかったのに対し、N25-DNA/rVV-CN2のprime/boost法において細胞性免疫の誘導が見られた(図4B)。

D. 考察

現在行われている手法ではPrimeとBoostを違うワクチンにより行う、Prime/Boostの手法が最も効果が高いと考えられている。この手法の利点は組み換えウイルス等のベクターに対する反応を考慮すること無く、追加接種できる点にある。これらの場合はいずれもワクチン抗原はPrimeとBoostで全く同じものが使用されるのが通常である。我々の結果はこの点において全く新しい知見を与えるものとなった。抗原の重複されるNS2に対する細胞性免疫の誘導が増強されたのはNS2のみが重

複している場合のみであり、それ以外の部位は重複しない場合であった。これらの知見は他に報告されていないものであり、今後のこの機序の解明は他にも応用できる可能性を示した。

E. 結論

HCV の構造蛋白領域もしくは非構造蛋白領域を発現する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いて一部領域が重複させた prime/boost ワクチン接種法は C 型肝炎モデルマウスを用いた実験の結果より、各ワクチン単独投与に比べて、また同じ領域をコードする prime/boost の組み合わせに比べても治療用ワクチンの投与プロトコールとして更なる有用性がある可能性が示された。HCV-Tg マウス、特に HCV 全長遺伝子をコードさせたマウスにおける HCV に対する免疫抑制機構についての解析をさらに行い、prime/boost ワクチンの効果検討を進めていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against Streptococcus pneumonia in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub
2. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain

accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates *PLoS One in press*

3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E], Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A], Standley DM], Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl-b-cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen *J. Immunol.* 2015 *in press*
4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32:1727-1735.
5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111:3086-3091.
6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 2014;9: E-pub
7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. *Mol Ther. Nucleic Acids* 2014:E-pub
8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y., Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune

myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. J.Am.Heart Assoc. 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y, Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi. Parasitol. Int. 2014 E-pub

2.学会発表

1.加藤 誠一、岡村 智崇、張 陰峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第62回 日本ウイルス学会学術集会
2014年11月10日～12日パシフィコ横浜 会議センター

2.Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :
Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I.第43回日本免疫学会総会
2014年12月10日～12月12日、京都国際会議場

3. 藤城 (伊藤) 康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザルMSCを用いた細胞

標識の解析。第61回日本実験動物学会学術総会。2014年5月15-17日。北海道,札幌市

4. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての*Tupaia Belangeri*の飼育および繁殖について 第157回 日本獣医学会学術集会 平成26年9月9日～9月12日 北海道、札幌

5. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C型肝炎ウイルスに対するDNAワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第18回 日本ワクチン学会学術集会 平成26年12月6日～12月7日 福岡国際会議場

G.知的所有権の出願・取得状況

1. 2014年11月6日「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014年11月13日

特許出願 :特願 2014-229283

発明の名称:C型肝炎の治療及び／又は予防用医薬組成

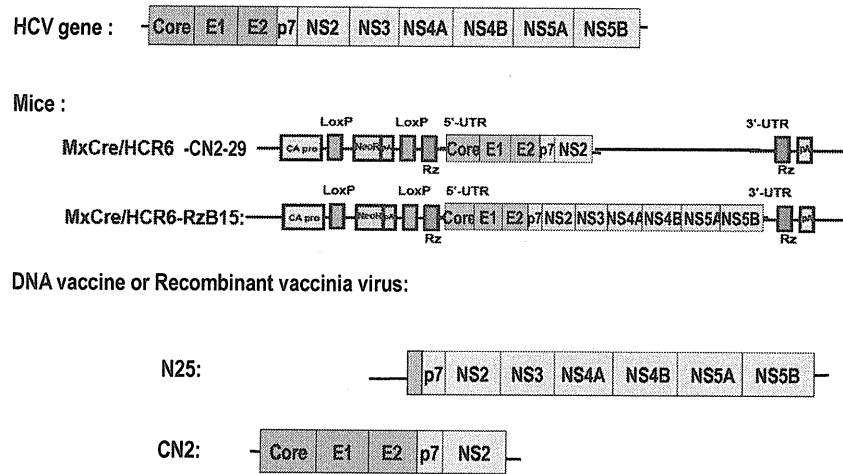


図1A. C型肝炎モデルマウスとHCV遺伝子発現DNAワクチンおよび組み換えワクシニアウイルス

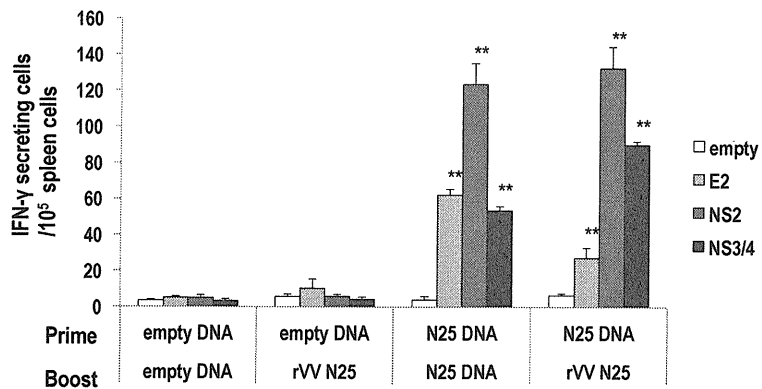


図2A. C56BL/6マウスにおけるワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

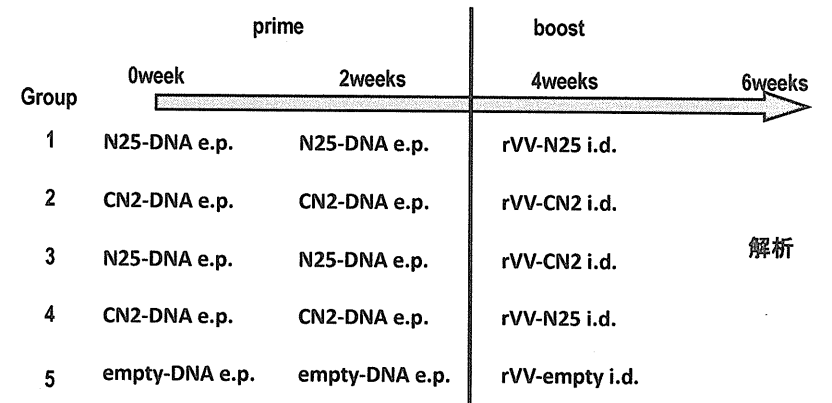


図1B. Prime/boostワクチン投与スケジュール

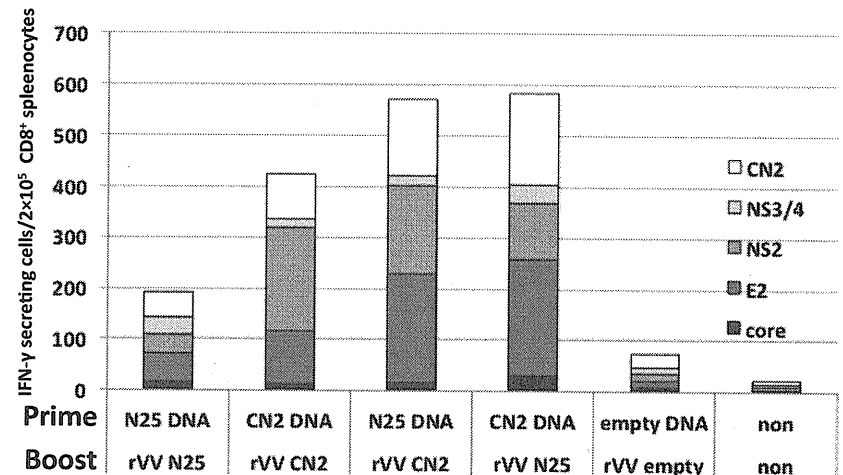


図2B. C56BL/6マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

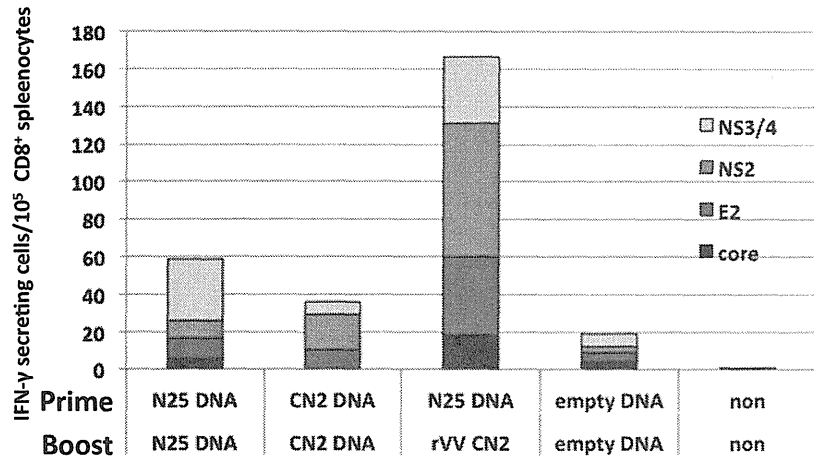


図3A. CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

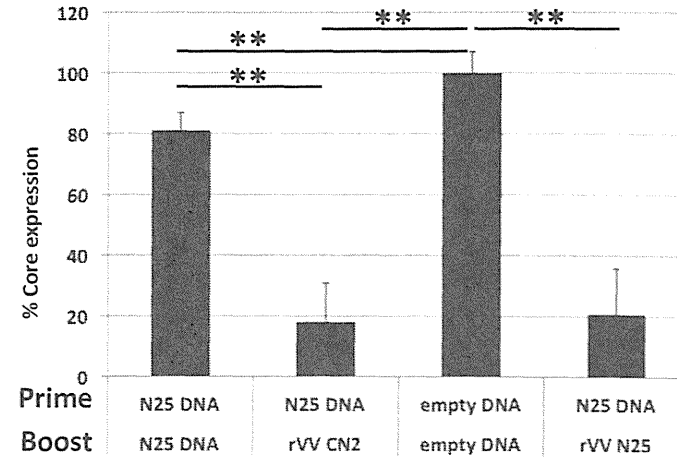


図3B. CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにおけるprime/boostワクチン投与後のHCVコア蛋白発現量の評価

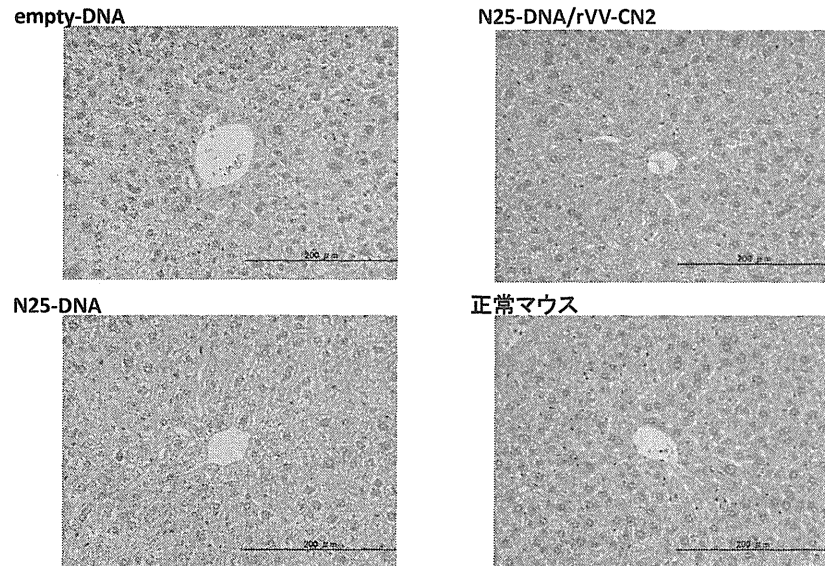


図3C. CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウス肝臓における形態学的検索

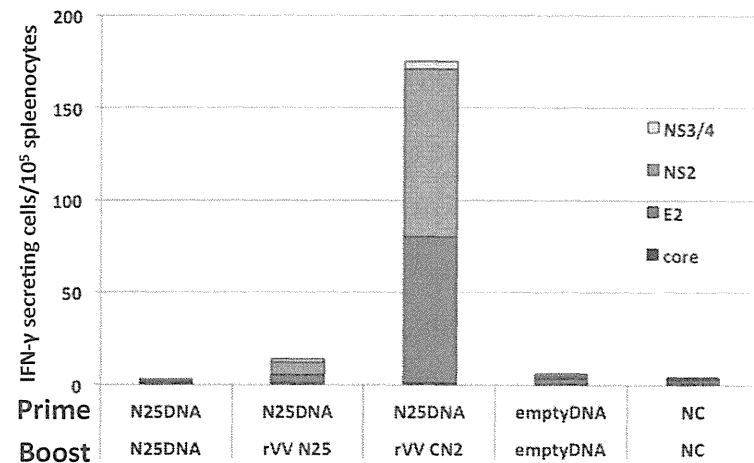


図4A. RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにおけるprime/boostワクチン投与後の特異的細胞性免疫の評価

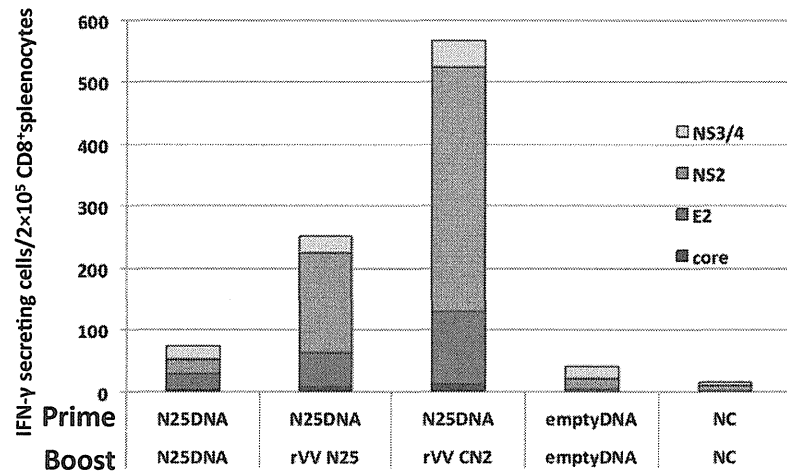


図4B. prime/boostワクチン投与後のRzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウス CD8+細胞におけるHCV特異的細胞性免疫の評価

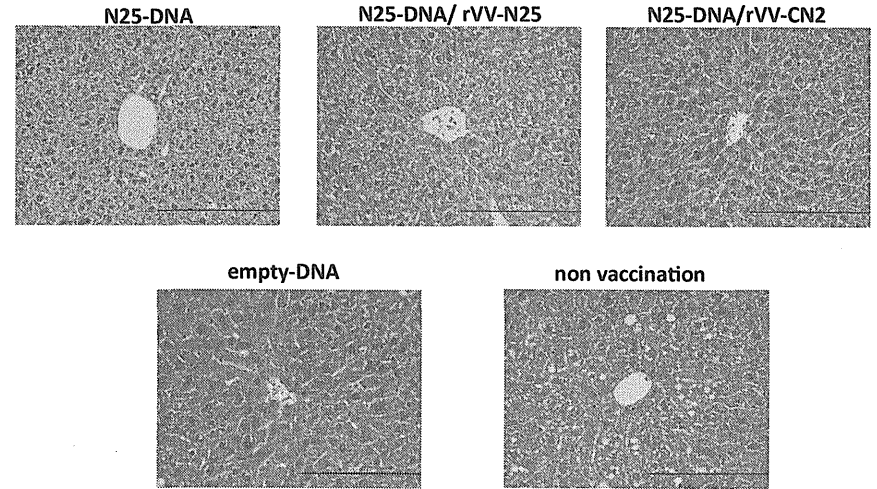


図4C. RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウス肝臓における形態学的検索

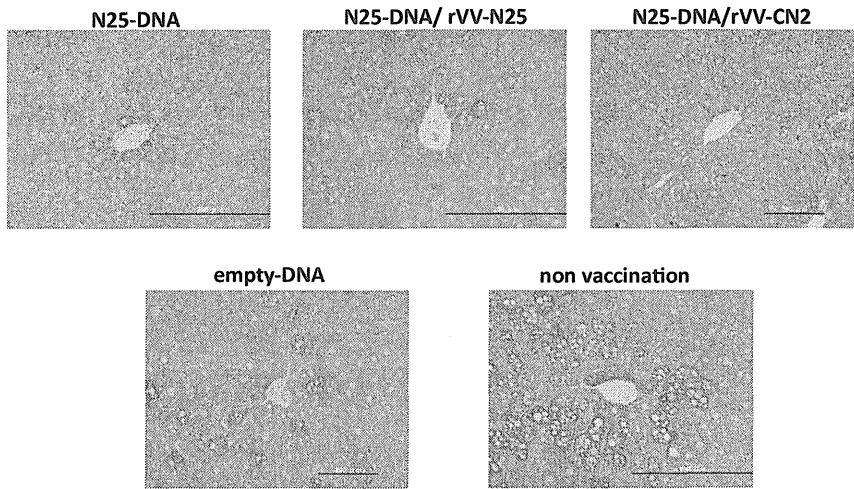


図4D. RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウス肝臓における脂肪滴の観察

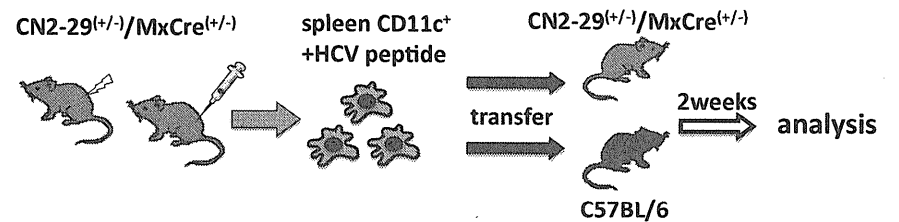


図5A. CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスへの脾臓CD11c+細胞移入実験

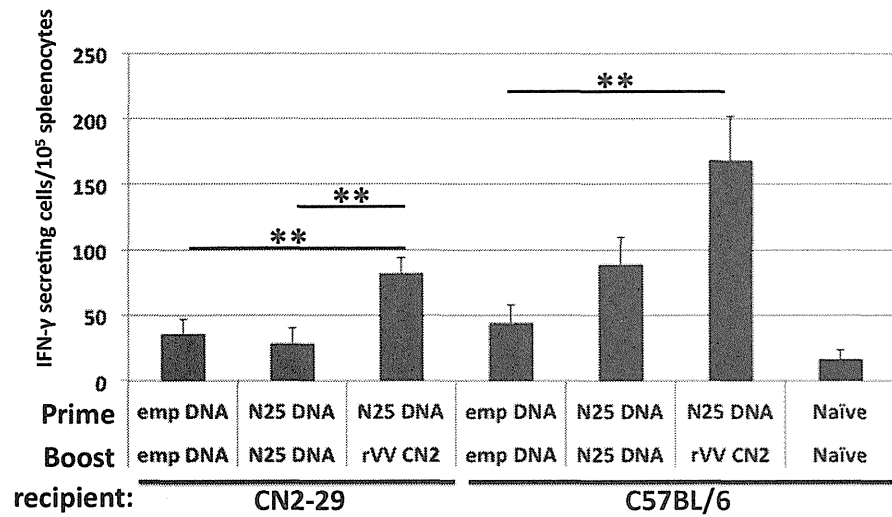


図5B. CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスおよびC57BL/6マウスへの脾臓CD11c⁺細胞移入後のHCV特異的細胞性免疫の解析

ツパイ自然感染モデルでの発症・治療評価

研究分担者 小原 恭子 鹿児島大学共同獣医学部 教授

研究要旨： これまでにツパイの飼育、繁殖法を確立し、150匹の産子を得た（平成26年12月現在）。繁殖に用いた♀は15匹であるが、全ての♀が出産し、平均産子数は3.7匹であった。また、HCV遺伝子型1a, 1b, 2a, 4aを成獣ツパイに接種したが、全ての遺伝子型に感染感受性を示した。このうち、2aのウイルス価は最も高くなったが、4aが最も頻回のウイルス増殖を示した。そこで、新生児に4aを接種して持続感染成立を試みている。接種経路に関する検討を行い、皮下接種での感染が効率が良いと考えられた。ツパイのゲノム解析から、ヒトと近いゲノム情報を持つ事が明らかとなり、IFN λ 4遺伝子を持つ事も明らかとなった。HCV1a, 1b, 2a, 4aを感染させた成獣ツパイ肝臓での発現を解析したところ、2aを感染させた個体の肝臓においてIFN λ 4遺伝子の発現が検出された。今後は、HCV持続感染個体を樹立し、ワクチンや薬剤評価系としての開発を目指す。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の自然感染動物モデルはチンパンジーのみであり、動物での感染実験は難しい。ヒト肝臓キメラマウスは免疫系に不備があり、病原性解析ができない。ツパイがこれらに変わる動物実験モデルとなれば、基礎研究やワクチン・創薬において極めて強力なツールとなる。そこで、本研究では、ヒトに近いゲノム情報を持つツパイを**C型肝炎**の実験動物として樹立する。これを用いれば**C型肝炎**の病態解析が進み、治療ワクチンの開発に大きく貢献すると期待される。

B. 研究方法

生後約1年のツパイにHCV genotype 1a, 1b, 2a, 4aのウイルスを 5×10^4 – 2×10^8 腹腔

内に接種した。

また、免疫力の弱い新生児のツパイにも genotype 4a(5×10^4)のHCVを腹腔内に接種した。HCVの接種法は皮下接種も行い、比較した。HCVを接種したツパイは2週間おきに0.5mLずつ採血し、HCV-RNA量を定量PCRで測定すると共に、ALT値を測定した。HCV量の測定は定量PCRで、ALTは測定キット（和光）を用いた。その後2週間隔で測定を継続している。

（倫理面への配慮）

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H16.12.28)、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針(H14.1.31)に基づき、実施する。遺伝子

組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H24年5月；承認番号24002 ウイルスの病原性に関わる宿主因子の検討)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従う。

C. 研究結果

成獣ツパイにHCVの各種遺伝子型(1a, 1b, 2a, 4a)株を接種した。いずれも感染が成立し、特に2aは最も高いウイルス価を示した。一方で、4aは最も頻回ウイルスの増殖を示した。そこで、新生児への感染は4a株を用いて行った。また、HCVを皮下接種する事で効率良く感染が成立しており、現在経過を観察している。これまでに、ツパイの全ゲノム解析から、ヒトと近いゲノム情報を持つ事が明らかとなった。また、マウスとは異なり、IFN λ 4遺伝子を持つ事も明らかとなった。HCV1a, 1b, 2a, 4aを感染させた成獣ツパイ肝臓での発現を解析したところ、2aを感染させた個体の肝臓においてIFN λ 4遺伝子の発現が検出された。IFN λ 4は、マウスやラットは持たない事が知られており、ツパイがよりヒトに近い自然免疫系を持つ可能性が明らかとなった。さらに、フランス松の樹液から作成された天然物であるピクノジェノールがHCVに抗ウイルス効果があり、特にプロテアーゼ阻害剤であるテラプレビル耐性のHCVにも抗ウイルス活性がある事を示した。

D. 考察

ツパイの妊娠期間は40日程度であり、

離乳までの期間が60日程度である。年間3-4回の繁殖が可能である。これから計算すると、1匹あたり、年間10-15匹の産子が得られる。調べた全てのHCV株に感染感受性を示したが、持続感染を成立させるためには、4a株の皮下接種が良いと考えられた。また、ツパイのHCV感染感受性系統を今後確立していく必要がある。

E. 結論

ツパイの飼育法も確立し、持続感染を成立できるHCVの株は4aである事が明らかとなった。また、接種法は皮下が良い事も明らかとなった。HCV感染に感受性が良い個体も存在し、これらを系統化する事で、より良い評価系の確立が可能となった。今後は、この様なツパイHCV持続感染系を用いてワクチンや薬剤候補物質の評価を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ezzikouri S, Nishimura T, Kohara M, Benjelloun S, Kino Y, Inoue K, Matsumori A, Tsukiyama-Kohara K*. Inhibitory Effects of Pycnogenol[®] on Hepatitis C Virus Replication. *Antiviral Research* 113C 93-102, 2015.
- 2) Tsukiyama-Kohara K*, Kohara M*. Tupaia belangeri as an Experimental Animal Model for Viral Infection. *Experimental Animal* Oct 30; 63(4):367-74, 2014.
- 3) Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M*. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in

hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* May 23;448(1):56-62, 2014.

- 4) Kasama Y, Mizukami T, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuochi T, Tsukiyama-Kohara K*. B-cell-intrinsic hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signalling. *PLoS One.* Mar 20;9(3):e91373, 2014.

2. 学会発表

- 1) Tsukiyama-Kohara K and Kohara M. A comprehensive study of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells. 第37回日本分子生物学会 2014年11月
- 2) Kohara M, Tokunaga Y, Tsukiyama-Kohara K, Sudoh M. Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. 第37回日本分子生物学会 2014年11月
- 3) Sayeh E, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K, Inhibitory Effects of Pycnogenol on Hepatitis C Virus Replication. 第73回日本癌学会, 2014年 9月 (神奈川).
- 4) Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M, Resistance to cyclosporin A derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins, HCV2014, 2014年 9月 (カナダ).
- 5) Sanada T, Yamamoto N, Tsukiyama-Kohara

K, Ezzikouri S, Tateno C, Kohara M, HBV pathogenesis and host response in Tupaia belangeri, 2014 HBV international Meeting, 2014年 9月 (アメリカ).

- 6) 池海英, Ezzikouri, S, 真田崇弘, 永野希織, 山口千穂, 神田雄大, 金澤伯弘, 奥谷公亮, 上野晃聖, 中川寛子, Nkogue, C. N., 小澤真, 三好宣彰, 小原道法, 小原恭子. ツパイを用いたHCV感染・発症モデル系並びに治療評価系の開発, 日本ウイルス学会九州支部総会, 2014年 9月 (鹿児島).

- 7) Ezzikouri S, Nishimura T, Kohara M, Benjelloun S, Kino Y, Inoue K, Matsumori A, Tsukiyama-Kohara K. Inhibitory Effects of Pycnogenol® on Hepatitis C Virus Replication, 日本ウイルス学会九州支部総会, 2014年 9月 (鹿児島).

- 7) Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, and Kasama Y, Comprehensive analysis of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells, 第16回国際ウイルス学会(ICV2014), 2014年 7月 (カナダ).

G. 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

病態解析と細胞性免疫誘導能の高いアジュバントの開発

研究分担者 押海裕之、北海道大学医学研究科免疫学分野 講師

研究要旨： HCVワクチンの開発における問題点は慢性炎症を助長しないかつTh1シフトを達成するワクチンアジュバントの欠如である。本分担研究はこの問題を克服し、非炎症性のCTL誘導性ワクチンアジュバントの開発を目指している。

共同研究者

瀬谷 司

北海道大学医学研究科免疫学分野 教授

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

A. 研究目的

C型肝炎の慢性化を抑える HCV ワクチンを開発する。DNA ワクチンは一般に Th2 シフトを形成し、抗体産生によいが T 細胞応答は低い。HCV の抑制にはアジュバントの併用による細胞性免疫起動が必要になる。慢性化を抑えながらの CTL 誘導には Th1 型にスキューすること、炎症を促進しないこと、が求められる。本分担ではこの HCV ワクチンに適合するアジュバントを開発する。

B. 研究方法

マウス肝細胞、樹状細胞は既報に準じて調整した。HCV 感染モデルマウスは小原博士より恵与を受けた。他の KO マウスは当研究室で樹立した。TLR3 アゴニスト（合成 RNA と polyI:C）は既報に調製法を記載した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

マウス肝細胞の HCV 応答は MAVS 経路の活性化と IFN- λ の発現が特徴である

(Okamoto et al., JI 2013)。MAVS 経路は IFN 以外に炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α) を強力に発現誘導する。一般に炎症性サイトカインは肝炎の増悪因子となる (Kohara et al., PLoS ONE 2013)。一方、樹状細胞は肝細胞由来の exosome を取り込んで TICAM-1 経路を活性化し、cross-priming による CTL 誘導（活性化）を惹起する (Ebihara et al. Hepatology 2008)。HCV 特異的細胞性免疫の起動には TICAM-1 経路を活性化する必要がある。この目的に叶うアジュバントは TLR3 のアゴニスト、2 重鎖 RNA（アナログは polyI:C）である (Tatematsu et al., Nat Immunol 2013)。HCV に RNA アジュバントを適用して問題になるのは炎症性サイトカインの産生なので、MAVS 経路を活性化せず TICAM-1 経路だけを活性化する RNA アジュバントをデザインするのが合理的である。我々は実際に試行

錯誤でそのような RNA を in vitro 合成した (Matsumoto et al. Nat Commun 2015)。期待通りの非炎症性アジュバント活性が得られたので前臨床試験を目指して GMP 標品の化学合成を目指している。

D. 考察

IFN- λ は IFN- α/β と異なり、樹状細胞の NK 細胞活性化能と cross-presentation 能を上げない (Okamoto JI 2014)。これに対し、polyI:C は IRF3 依存性に樹状細胞の細胞性免疫を起動する。従って、IFN- λ より IRF3 を活性化する RNA アジュバントを開発し、TLR3 経路の活性化を目指すことを本開発の目標にした。

PolyI:C 投与の問題点は TLR3/TICAM-1 経路以外に MAVS 経路に働いて in vivo でサイトカイン血症を誘発することである (Seya, EOTT 2013)。マウスの polyI:C i. p. モデルでは IFN- α/β の他に IL-6, TNF- α , IL-10, が大量に出る。慢性肝炎にサイトカイン血症は重大な悪性因子となりうる (Kohara et al., PLoS ONE 2013)。一方、今回開発した RNA アジュバントは TLR3 を特異的に活性化し MAVS 経路は活性化しないためこの問題を克服している。マウスへの外用投与でサイトカイン血症を全く誘発せずに強力な CTL 増殖を可能にした (Nat Commun 2015)。

今後、ヒトへの外挿性を解析する必要があるが、基本的にマウスとヒトの TLR3 と RNA 認識機構は保存されているため、ヒトで再現データが取れることが期待される。

E. 結論

TLR3/TICAM-1 特異アゴニストを開発し、HCV ワクチンにアジュバントとして適用することを目指した。毒性の少ない非炎症性アジュバントの開発が見込まれる。本アジュバントの成功は多くの感染症ワクチンに福音をもたらすかも知れない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaki, H., K. Honda, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2014. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molec. Immunol.* 57: 100-110.
2. Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate Immun.* 6: 293-305.
3. Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 192: 2770-2777.
4. Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM Plays a Critical Role in IFN- γ Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells. *J. Immunol.* 193: 5199-207.
5. Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* 193: 5118-28.

6. Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol.* 27: 285-294.
7. 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 Biomol NMR.* 58: 227-230.
8. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int J Biochem Cell Biol.* 53C: 329-333.
9. Tatematsu, M., T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 458: 195-201.
10. Seya, T. 2014. Measles virus takes a two-pronged attack on PPI. *Cell Host Microbe.* 16: 1-2.
11. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tatematsu, M. Azuma, and T. Seya. 2014. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling. *Methods. Enzymol.* 535: 149-165.
12. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H Takaki, M. Matsumoto, K.Chayama, and T. Seya. 2015. MAVS/TICAM-1independent interferon inducing pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J. Innate Immun.* 7: 47-58.
13. Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiol.* 220: 74-82.
14. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat Commun.* (in press).
15. Maruyama, A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).

G. 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

C型肝炎ウイルス E1 蛋白質由来中和エピトープを有するフラビウイルス粒子の 発現と中和抗体の誘導に関する研究

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： C型肝炎ウイルス(HCV) 1回感染性トランスパッケージング型粒子(HCVtcp)は、HCV本来の性質を保持した感染初期過程の解析やHCVに対する中和抗体の適切な評価が可能なツールとして有用である。我々はこの系に改良を加え、遺伝子型1a、1b、2a、3a由来の7株のエンベロープ蛋白質を用いてHCVtcpの産生に成功した。これらを用いてHCVに対する中和活性を有する抗体を探索したところ、幅広い遺伝子型のHCVtcpに対して中和活性を示す抗E1モノクローナル抗体を見だし、この抗体のエピトープ領域を同定した。さらにこのエピトープ配列を日本脳炎ウイルス(JEV)のエンベロープ蛋白質中に挿入し、HCV中和エピトープを有するJEV subviral particleを作成した。またこの粒子がHCV 中和エピトープを粒子表面に提示している事を、蛍光相関分光法を用いて確認した。この粒子のワクチン抗原としての評価を現在マウスを用いて行っている。

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1.6億人、国内で100万人以上と言われている。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝臓癌へと移行し、肝臓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。さらには薬剤耐性ウイルスの出現も報告されている。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。ウイルスに対する効果的なワクチンは細胞性免疫と液性免疫の両者を誘導する事が重要と考えられており、そのうちの液性免疫では、感染を阻害しうる中和抗体を効率良く誘導する事が必要である。従って、血清あるいは抗体の正確な中和ア

ッセイ系および中和エピトープ解析はワクチン開発において必要不可欠である。これまでHCVに対する中和抗体の評価には、レトロウイルス表面にHCVのエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス(HCVpp)が汎用されてきた。しかしながらHCVppはレトロウイルス由来の蛋白質を含み、また肝細胞以外の細胞を用いて作製される事から、培養細胞由来のHCV(HCVcc)とは粒子構造や感染機構が大きく異なる事が明らかになりつつある。そこで我々はより適切なHCV中和抗体の評価が可能な1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)産生系を、遺伝子型の異なる複数の株を用いて確立した。この評価系を用いる事により、様々な抗体、血清の中和活性の評価を行ない、幅広い遺伝子型のHCVに対して中和活性を示す抗E1マウスモノクローナル抗体を見出した。さらにこのエピトープを解析し、このエピトープに対する抗体を誘導するウイルス粒子抗原の産生を試みた。

B. 研究方法

1. 抗体および血清の中和活性の評価

HCV の E1 および E2 に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清を段階希釈し、遺伝子型の異なる複数の株由来の HCV エンベロープ蛋白質を持つ感染性 HCVtcp とそれぞれ混合し、室温で 1 時間反応させた後に Huh7.5.1 細胞に添加した。2 日後の培養上清の Luc の活性を測定し、コントロール群と比較する事により、感染中和活性を評価した。

2. 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体のエピトープを同定する為に、HCV JFH-1 株のエンベロープ蛋白質由来のアミノ酸配列をオーバーラップさせて合成した 20aa のペプチド鎖をプレートに固相化させ、抗体を反応させる事により抗体のエピトープを決定した。

3. 中和エピトープを有するウイルス粒子の産生

同定されたエピトープ配列領域の遺伝子型 1b および 2a のアミノ酸配列を日本脳炎ウイルス (JEV) の E 蛋白質に挿入し、prM-E 領域を発現させる事により、HCV エピトープ配列を持った JEV subviral particle (SVP) を産生させた。

4. ウイルス粒子と抗体の反応

HCV エピトープ配列を持ったウイルス粒子と HCV E1 抗体との結合は、ウイルス粒子と抗体を混合し、37°C で 30 分静置し、その後、AlexaFluor488 標識 2 次抗体を混合し、遮光下 37°C で 30 分静置後、FCS-101B (浜松ホトニクス株) で相関解析を行う事により評価した。

5. 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 E1 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。

6. ウイルス粒子の免疫

マウス (Balb/c、5 週齢メス) に 20 μ g の抗原をアジュバント (Alum + CpG) とともに腹腔内免疫を開始した。2 週おきに計 3 回免疫した後に、血清の中和活性を評価する計画である。

(倫理面への配慮)

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、動物実験は本研究所の動物実験委員会に申請し、承認を得ており、当研究所における指針に準じて、実験に伴い動物に与えると考えられる苦痛をできる限り軽減して行った。

C. 研究結果

1. 中和活性を有する抗体の同定

HCV の E1 および E2 に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清について感染中和活性を評価した結果、遺伝子型の異なる複数の株の HCVtcp に対して中和活性を示す抗 E1 マウスモノクローナル抗体を見いだした。

2. 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体を JFH-1 (遺伝子型 2a) のアミノ酸を基にしたオーバーラップペプチドに反応させ、抗体と強く反応する 12 アミノ酸の領域を明らかにした。

3. 中和エピトープを有するウイルス粒子の産生

同定された HCV 中和エピトープ領域の 2 種の遺伝子型のアミノ酸配列 (遺伝子型 1b および 2a) を、日本脳炎ウイルス (JEV) の E 蛋白質中の外来ペプチドの挿入を許容