

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した  
基礎的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 孝宣

平成26(2014)年 3月

## 目 次

I . 総括研究報告	
C 型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究 -----	1
加藤 孝宣	
II . 分担研究報告	
1 . 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 -----	16
加藤 孝宣	
2 . 感染中和抗体と感染中和機構の解析 -----	23
脇田 隆字	
3 . 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 -----	26
明里 宏文	
4 . 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 -----	32
石井 孝司	
5 . 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 -----	36
鈴木 亮介	
6 . マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの有効性の検討 -----	41
成見 英樹	
7 . HCV粒子ワクチン製造用細胞株の探索 -正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試み- -----	45
中村 紀子	
8 . TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能 -----	49
松本美佐子	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	53

## C型肝炎ウイルスワクチン実用化を目指した基礎的研究

研究代表者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨；JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルスの細胞培養系を用い、ウイルス粒子を培養細胞で大量生成し、そのウイルス粒子を精製不活化後ワクチン抗原として用いることでC型肝炎ウイルスワクチンの樹立を目指す。本年度は粒子ワクチンを用い、小型霊長類モデルであるマーモセットを用いワクチン接種の有効性と安全性の検討を開始した。その結果、一部の個体で抗HCV抗体の誘導および細胞性免疫の誘導が確認されている。また、ワクチン投与に関連した異常所見は認めていない。さらに新規HCV増殖が可能な非癌細胞由来細胞株の検索、新規ワクチン抗原の試み、新規アジュバントの確立とその評価、HCV感染評価のための新規動物モデルとなるHCVGBV-Bキメラウイルスの検討等も行っている。

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

研究分担者 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

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は成人感染でも高率に慢性化し、肝硬変から肝臓に至る慢性肝疾患の原因となる。世界中に多くのHCV感染者が存在し、日本でも150万人の感染者の存在が報告されている。近年、輸血後のC型肝炎は減少しているが、医療従事者や薬剤常用者、もしくはC型慢性肝炎患者の介護にあたる者などハイリスク群では依然としてその感染のリスクにさらされている。

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

C型慢性肝炎患者に対する現行治療の効果は十分ではなく様々な副作用の報告もある。また、薬剤が高額なため医療経済を圧迫している。本研究によりHCVの感染予防ワクチンが実用化されれば、感染予防ワクチンによる新規感染者数およびHCV感染が関わる肝臓発症数の減少が期待できる。

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

我々が開発したJFH-1株を用いたHCVの培養系により、培養細胞でこのウイルスを増殖させることが可能となった。またこのシステムではHCVの培養細胞への感染が観察できるため、中和活性の評価も可能である。本研究では、このJFH-1株によ

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

研究分担者 中村 紀子  
東レ株式会社医薬研究所  
主任研究員

るHCV細胞培養系を用い、培養細胞で増殖させたウイルス粒子を免疫原として用いることでHCVワクチンの開発を行う。これまで我々は、培養細胞で大量生産したウイルス粒子を濃縮精製し、その精製粒子をワクチン抗原として接種することにより中和抗体が得られることをマウスモデルで確認している。さらに昨年度の検討で、よりヒトに近い霊長類動物モデルであるアカゲザルでも同様の検討を行い、中和抗体の誘導を確認した。しかし、アカゲザルの検討で、中和抗体誘導が得られたのは3頭中Alumをアジュバントとして用いた1頭のみであった。この中和抗体誘導能の差は、アジュバントの違いに依るものである可能性と体重抗原量比に依存する可能性が考えられた。そこで、本年度は、霊長類動物モデルでアカゲザルより小さいマーマセットを用いて、ウイルス粒子ワクチンの安全性と有効性の評価を開始した。さらに、ワクチン抗原用ウイルス粒子の作製に適した細胞の検索、新規アジュバントの同定、新規動物モデルの構築など基礎的な検討も行っている。

## B. 研究方法

### 1. マーマセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

HCV粒子ワクチンとしてJ6/JFH1株のウイルス粒子を使用した。J6/JFH1株を感染させた培養細胞を大量培養し、HCV粒子を含む培養上清を限外ろ過膜とショ糖密度勾配遠心法により精製してワクチン抗原とした。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、アジュバントにはアカゲザルで効果があったAlum (Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC社)を用いた。

小型霊長類動物モデルとしてマーマセットを3頭用い、ワクチンの投与は京都大学霊長類研究所にて行った。ワクチン接種が終了したマーマセットは投与開始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固定し、病理組織学的検査を行った。

また血中のHCV抗体価は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)を用いたELISA法で定量した。

### 2. ワクチン接種マーマセット細胞性免疫応答の確認

ワクチン接種マーマ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- $\gamma$ およびGAPDH mRNA発現量をリアルタイムPCR法にて定量し、IFN- $\gamma$ /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- $\gamma$ mRNA相対値を算出した。

### 3. ワクチン用HCV粒子作製に適した培養細胞の探索

HuH-7細胞以外でHCVの複製と粒子産生が可能な培養細胞の同定のため、Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞を用いて探索を行った。また、HCVライフサイクルの各ステップでの関与が報告されている宿主因子について、特異的なprimer/probeセットを用いたTaqMan Gene Expression Assay法によりそれぞれの発現量をHuh 751細胞と比較し検討した。またHCVの複製に関わる宿主因子であるmiR-122を発現するレンチウイルスベクターを作製した。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. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子を導入し、不死化細胞株の作製を試みた。細胞を不死化するためにアデノウイルスのE1遺伝子発現ユニットを構築し、インターフェロン (IFN) シグナルの阻害のためIRF7ドミナントネガティブ変異体 (IRF7DN)発現ユニットを構築した。これらの遺伝子が同時に細胞内で導入され発現されるように、

これらの発現ユニットを結合し、さらにレンチウイルスベクターに組み込んだ。このレンチウイルスを用いてヒト正常肝細胞にこれらの遺伝子を導入した。

#### 5. 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。

#### 6. 日本脳炎ウイルスsubviral particleを用いたHCVワクチン抗原作製の研究

日本脳炎ウイルス(JEV)はHCVと同様にフラビウイルス科であり、既にワクチンの安全性や有効性、生産手段が確立されている。そこでJEVのsubviral particle (SVP) を用いて、この粒子上にHCVの中和エピトープを提示させる事により、HCVワクチンの抗原として使用する系の構築を試みた。まず、JEV E蛋白質中の外来遺伝子挿入可能部位の探索のため、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。さらに構造領域内のエンベロープ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。こ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。

#### 7. pH応答性炭酸アパタイトを用いた新規アジュバントの検討

HCVワクチンにより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。この炭酸アパタイトは、他の蛋白質や核酸と複合体を形成する事が可能であり、形成された複合体は細胞内へ効率よく導入される。従って、このアパタイトをアジュバントとして使用すれば樹状細胞への効率的な抗原導入が可能であり、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報告されている。

そこでこの炭酸アパタイトをHCVワクチンのアジュバントとして用いるために、ウイルスのVLPと炭酸アパタイトの複合体形成が可能か検討を行った。HEVおよびノロウイルスのVLPをDMEMに加え、さらにCaCl<sub>2</sub>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た後、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。

#### 8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

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、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。そこで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することで、副作用が少なく効果的に細胞性免疫応答を誘導する新規TLR3アジュバントの開発を試みた。

TLR3がdsRNA以外のRNA構造を認識するかどうかが明らかにするため、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遺伝子アッセイで調

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- $\alpha$ 、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。

## 9. HCVワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

ワクチンの有効性や安全性の評価のためには動物モデルでの検討が必要である。しかしHCVは宿主域が狭く、チンパンジー以外の動物では感染とそれに伴う免疫反応を観察することは難しい。この感染動物モデルの不在が、HCVワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性や安全性の評価、C型肝炎の病態解析の大きな障壁となっている。そこでHCVと近縁のGBV-Bと、新世界ザルであるマーモセットの感染モデルを用い、HCVとGBV-Cのキメラマウスを作製する事で、新規HCV感染霊長類モデルの樹立を試みた。

HCV/GBV-Bキメラウイルスとして、GBV-BをベースにE1、E2領域をHCV由来遺伝子に置換したGB/HC<sub>E12</sub>およびコア、E1、E2領域を置換したGB/HC<sub>uCE12</sub>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。

(倫理面への配慮)

各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。本研究で使用した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。すべての動物実験は、それぞれの実験を行った施設

の動物実験委員会の審査・承認を得た実験計画に基づき、倫理的配慮を行いながら実施した。マーモセットの実験は、実験を行なった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. マーモセットを用いたHCV粒子ワクチンの安全性と抗体誘導能の評価

Alum をアジュバントとして HCV 粒子ワクチンを投与したマーモセット 3 頭の血漿中に含まれる抗 HCV 抗体価を EIA にて評価した。3 頭中 2 頭のマーモセットで抗原投与開始後に抗 E2、抗 E1 抗体価の上昇を認め、HCV に対する抗体誘導が確認できた。また、他の遺伝子型株に対する反応性の確認のため、ワクチンに使用した株とは異なる遺伝子型 1 のコアタンパク質である HCV-213 を抗原とした EIA でも確認した。その結果、抗 E2、抗 E1 抗体価の上昇を認めた 2 頭のマーモセットでは、遺伝子型 1 に対する抗コア抗体価の上昇が確認できた。しかしワクチン投与を行ったうちの残りの 1 頭ではこれらの抗体誘導は確認できなかった。

安全性の評価のため、ワクチン投与を行った 3 頭のマーモセットすべてで血液検査を行ったが、肝逸脱酵素や炎症マーカーなど肝障害や他の有害事象を思わせる所見は得られなかった。3 頭中 1 頭のマーモセットでは解剖し、病理組織学的解析を行ったが、ワクチンに由来すると思われる異常所見は認めていない。

### 2. ワクチン接種マーモセット細胞性免疫応答の確認

ワクチン接種マーモセットでの細胞性免疫誘導についても解析を行った。ワクチン接種マーモセットのPBMCに、ワクチンと同じ遺伝子型2a株由来Coreペプチドを添加し刺激したところ、接種前のPBMCと比較して有意なIFN- $\alpha$  mRNAの発現誘導が認められた。このIFN- $\alpha$ 発現はワクチン接種回

数とともに上昇し、また遺伝子型1株由来のCoreペプチド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ていると考えられた。

### 3. ワクチン用 HCV 粒子作製に適した培養細胞の探索

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細胞を選択し検討を行った。これらの細胞に全長HCV RNAを導入し、HCVの増殖について検討したが、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。そこで、これらの細胞で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、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、HEK293細胞ではEntryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低いことがわかった。

そこで、HEK293細胞に注目し、レンチウイルスでmiR-122、ApoE、Claudin-1を導入することによりHuh-7.5.1細胞と同レベルの発現が見られるHEK293細胞を作製し、HCVの増殖について確認した。その結果、この細胞ではHCVの複製が可能である事が確認でき、また培養上清中にはごくわずかではあるが感染性のHCVが存在することも確認できた。

### 4. 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps を使用し、HGF を添加して培養した。その後、アデノウイルスの E1 遺伝子を発現するレンチウイルス (pLVSIN-AdE1)、E1 遺伝子とともに IRF7DN を発現するレンチウイルス (pLVSIN-AdE1-IRF7DN) をそれぞれ感染させた。これらのウイルスを感染さ

せた hNHeps を puromycin を含有するメEDIUM で培養したが、増殖する細胞は出現しなかった。導入効率の確認のため、hNHeps に GFP 発現レンチウイルスを感染させたところ、約 50% の細胞への遺伝子導入が確認できた。

### 5. 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S2細胞で発現させた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。しかし中和活性の検討では、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。そこで、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ところ、同程度の感染中和活性が確認できた。従って、293T細胞由来E2蛋白質でのマウスでの免疫で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ていると考えられた。

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。その結果、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確認された。さらにHCVのE2蛋白質の11ヶ所のN型糖鎖付加部位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 (E2NQ1~E2NQ11)、マウスに免疫することで抗E2抗体誘導能を検討したところ、すべてのマウス個体で抗E2抗体の上昇が見られ、糖鎖付加は感染中和抗体誘導にあまり影響を与えないと考えられた。

### 6. 日本脳炎ウイルスsubviral particleを用いたHCVワクチン抗原作製の研究

JEV の 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。さらに培養上清中に分泌されている SVP をウエスタンブロット法で検出したところ、一部で SVP の分泌が確認できた。そこで、これらのコンストラクトの FLAG tag 部分を HCV 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に置換して検討したところ、HCV の中和エピトープを持つ SVP でも培養上清への分泌が確認された。そこで、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。

#### 7. pH応答性炭酸アパタイトを用いた新規アジュバントの検討

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、CaCl<sub>2</sub>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、CaCl<sub>2</sub>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。

#### 8. TLR3活性化RNA構造の同定とアジュバント機能

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。この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。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 RNase III で処理すると IFN- $\alpha$  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。

#### 9. HCV ワクチン評価のための新規霊長類モデルの確立

HCV/GBV-B キメラウイルスである GB/HC<sub>E12</sub> および GB/HC<sub>uCE12</sub> の RNA をマーマセットの肝臓に接種した。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、上記のキメラウイルスはマーマセット体内で増殖可能であることが示唆された。

#### D. 考察

本研究では、不活化した HCV 粒子をワクチンとして使用する場合の有効性と安全性の評価を目的としている。本年度は体重抗原量比を考慮して小型霊長類であるマーマセットを用いて検討を行った。マーマセットは霊長類実験モデル動物として広く利用され、またワクチンの有効性評価に用いられた実績もある。本検討ではマウスで感染中和抗体誘導が認められた抗原量 (2 pmol core protein/20g BW) を目安として、マーマセットの体重 (約 300g) から投与量を決定した (60 pmol core protein/300g BW)。アジュバントはアカゲザルのワクチン接種実験において感染中和抗体が誘導された Alum を用いた。

ワクチン投与の結果、免疫したマーマセット 3 頭中 2 頭で HCV の E1, E2 蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。さらにこれらの個体では免疫に用いた HCV 株とは異なる遺伝子型株のコアタンパク質に対する抗体誘導も確認された。残りの 1 頭では抗 HCV 抗体の誘導は確認できず、これは個体差によるものと考えられた。また、細胞性免疫誘導について解析を行ったマーマセットでは、ワクチンと同じ遺伝子型 2a 株由来 Core ペプチド添加刺激により IFN $\gamma$  mRNA の発現誘導が認められ、このワクチン投与により液性免疫だけではなく細



胞性免疫が誘導されることも確認できた。なお、これらのワクチン投与マウスセットの血液検査や解剖による病理組織学的検査の結果では、これまでのマウスやアカゲザルでの検討と同様にワクチンに由来すると思われる有害事象は確認されていない。今後は Alum よりも効率的に抗体誘導、細胞性免疫誘導が期待できる新規アジュバントを用いて、さらに検討を進める予定である。

HuH-7 細胞以外の培養細胞で HCV 増殖が可能な細胞の検索の結果、調べた範囲では HCV の増殖が可能な新規細胞は同定されなかった。その中で HEK293 細胞では、miR122 を強制発現させることにより HCV の複製が可能になり、さらに Claudin-1 と ApoE を発現させることにより、わずかではあるが感染性ウイルス粒子の産生も確認できた。今後、さらに HCV 複製に関わる宿主因子をこの細胞に補う事で、HCV の増殖が可能な非癌細胞 HCV 産生系を構築したい。

また別の方法として、正常肝細胞を不死化することによる HCV 増殖が可能な細胞系の構築にも取り組んだ。正常肝細胞にレンチウイルスを用いてアデノウイルスの E1 遺伝子および IRF7 ドミナントネガティブ変異体を導入し不死化を試みたが、増殖してくる細胞は獲得できなかった。過去の報告では初代培養肝細胞の不死化にテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子が必要だった事も報告されており、今後アデノウイルスの E1 遺伝子と IRF7 ドミナントネガティブ変異体に加え hTERT の遺伝子の導入についても検討したい。

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も検討した。今回の検討の結果、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抗体誘導能が高く、この 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 HCV<sub>cc</sub> に対しても同程度の感染中和活性を示すことが明らかとなった。またこの 293-E2-IgG のエピトープは E2 蛋白質の 540-550 アミノ酸近辺に存在し、また E2 蛋白質の糖鎖付加は感染中和抗体誘導にあまり影響しないことも明らかになった。

これらの結果をふまえ、今後効率的に感染中和抗体誘導が可能な免疫源となるエピトープを探索したい。

また新たなワクチン抗原作製方法として、JEV の SVP を用いる方法を試みた。JEV prME に FLAG タグ配列および HCV の中和エピトープ由来配列を挿入することで、これらの配列を表面に持った SVP が分泌される事を確認した。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の可能性についても検討を行い、さらに精製した抗原をマウスに免疫することで中和抗体の誘導が可能か評価を行いたい。

新規アジュバントの候補として炭酸アパタイトの可能性について検討を行った。今回の検討では HEV とノロウイルスの VLP の炭酸アパタイトへの結合が確認できた。しかし、これらの VLP はいずれもエンベロープ蛋白質を持たないキャプシドのみで構成されるウイルスのものであり、エンベロープ蛋白質を持つ HCV の VLP の炭酸アパタイトへの結合についてはさらに検討が必要である。今後、パキウイルス発現系による HCV VLP を用いた検討を進めて行く。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、免疫誘導能の確認を行いたい。

さらに次世代のアジュバントとして期待されている TLR3 アゴニストについても、その活性化機構について検討を行った。本年度の研究により、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事が明らかになった。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と考えられた。

ワクチンの有効性評価のためには、中和抗体の誘導能の評価だけでなく、慢性化阻止効果の評価も重要となる。しかし、現状では慢性化阻止能を評価できる実験系は存在しない。我々は

HCV/GBV-Bキメラウイルスを用いて、マーモセット感染モデルの構築を行っている。本年度の研究により、HCV/GBV-BキメラウイルスRNAを肝臓に接種したマーモセットから断続的にウイルスRNAの検出が可能であった。これは用いたキメラウイルスがマーモセットの肝臓で増殖可能であることを示していると考えられ、今後さらに詳細な検討を進めて行く。

#### E. 結論

1. 小型霊長類モデルであるマーモセットを用い、HCV不活化粒子ワクチンの有効性と安全性について検討を行った。ワクチン投与を行った3頭のマーモセットの中で、2頭で抗HCV抗体の誘導が認められた。ワクチン投与に関連した異常所見は認めなかった。

2. 上記のワクチン接種を行ったマーモセットにおいて、細胞性免疫の誘導が確認された。

3. 非癌細胞であるHEK293細胞においてレンチウイルスベクターを用いてmiR-122を発現させることによりHCV複製が観察される様になり、さらにClaudin-1とApoEを発現させることにより、感染性のウイルス産生が認められた。

4. 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。

5. 正常ヒト肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子とIRF7DNを発現する事により不死化細胞の樹立を試みた。これらの因子の導入のみでは、不死化細胞を得る事は出来なかった。今後、さらに必要な因子の同定を目指す。

6. 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することができた。

7. 新規アジュバント候補として炭酸アパタイトについて検討した。炭酸アパタイトにHEVおよびノロウイルスのVLPを結合させることが可能であった。

8. 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。

9. HCV感染評価のための新規動物モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルスとマーモセットを用いた感染系の構築を行った。このモデルはワクチン投与による感染防御効果の実証のために適したモデル動物と考えられ、今後このモデルの確立に向けて検討を続けて行く。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### 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) 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.

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

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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*, 2013; 8(7):e68992.

8) 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.

9) 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.

10) 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.* 2013; 440:515-20.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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.* (DOI: 10.1159/000355126) Published Online: October 29.

18) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, 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*, 2013; 87: 6031-6036.

19) 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; 9(8): e1003589.

20) 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* 2013; 8(12): e83639.

21) 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.

22) 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.

23) 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.

24) 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.

25) 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<sup>+</sup> T lymphocytes in common marmosets by novel CD8

monoclonal antibody administration. *Immunology Letters* 154, 12-17, 2013.

26) 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.

27) 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)

28) 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

29) 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]

30) 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).

31) 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)

32) 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.

33) 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.

34) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 2014, in press.

35) 石井孝司、清原知子. A型肝炎ワクチン. *BIO Clinica*, 28: 25-29 (2013)

36) 鈴木亮介、小西英二：フラビウイルスのリバーシブルジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013

37) 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.

38) 石井孝司. A型肝炎、E型肝炎. *臨床と微生物*, 41: 72-78 (2014)

## 2.学会発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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, Australia.

6) 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, Australia.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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 cryoglobulin-related diseases. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

14) Imamura H, Yamada N, Yotsuyanagi H, Kawasaki S, Takayama T, Yamamoto M, Kokudo N, Kato T, Tanaka S, Arii 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.

15) 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.

16) Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Tsukasa Seya and Misako Matsumoto. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.

17) Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. TLR3/BATF3 axis in CD8a<sup>+</sup>DC induces anti-tumor CTLs by dsRNA. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.

18) Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Supportive involvement of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy for cancer. 15th International Congress of Immunology. August 22-27/2013. Milan, Italy.

19) T Wakita. Molecular Biology and Experimental Models of HCV. 19th Annual KASL Meeting, Sheraton Grande Walkerhill Hotel, Seoul, Korea (2013, 6.13 - 15)

20) 東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 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.

21) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 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.

- 20) 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.
- 21) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、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.
- 22) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、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.
- 23) 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.
- 24) 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、2013年11月10-12日、神戸.
- 25) 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字、エンペローペプチドを用いた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、2013年11月10-12日、神戸.
- 26) 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学術集会、2013年11月10-12日、神戸.
- 27) 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学術集会、2013年11月10-12日、神戸.
- 28) 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学術集会、2013年11月10-12日、神戸.
- 29) 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学術集会、2013年11月10-12日、神戸.
- 30) 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、2013年11月10-12日、神戸.
- 31) 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、2013年11月10-12日、神戸.
- 32) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、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.
- 33) 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.

34) 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.

35) 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.

36) 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).

37) 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・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

## 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, Arii 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、脇田隆字、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、脇田隆字、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.

16) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、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.

#### 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。

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 (IC<sub>50</sub>) 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. 19<sup>th</sup> 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  
槇 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マ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 $\gamma$ およびGAPDH mRNA発現量をリアルタイムPCR法にて定量し、IFN $\gamma$ /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 $\gamma$  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<sub>uCE12</sub>及びGB/HC<sub>E12</sub>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 $\gamma$  mRNAの発現誘導が認められた。このIFN $\gamma$ 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、比較的短期間に頻繁な連続・復帰変異を生じたもの、長期にわたり固定され再変異が生じないもの、さらに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。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 $\gamma$ 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IFNA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<sup>+</sup> 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, 榎昇, 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, 榎昇, 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. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 6-10, 2013, Melbourne.

(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

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. 20<sup>th</sup> 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

## 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 CaCl<sub>2</sub> 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、CaCl<sub>2</sub> 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、CaCl<sub>2</sub> 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

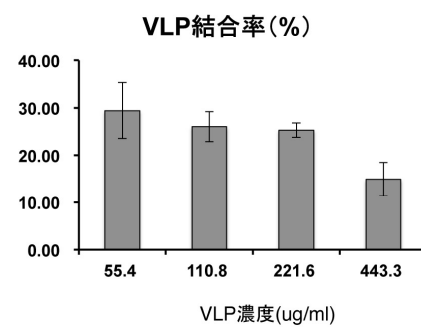
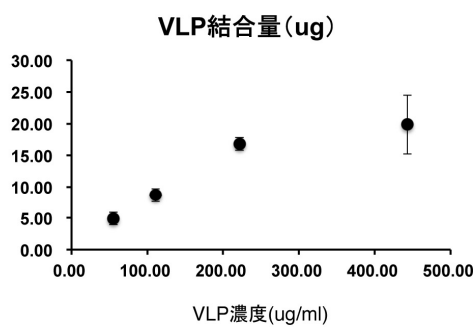
1. Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 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

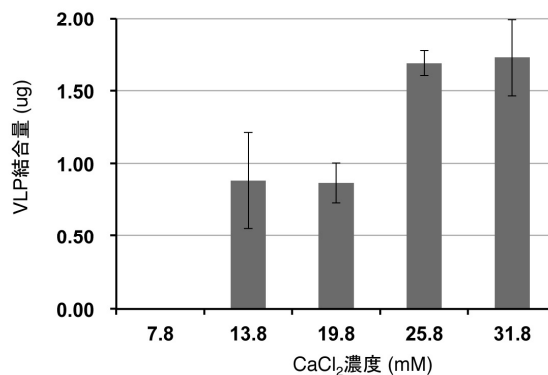
## HEV VLPの炭酸アパタイトへの結合量

VLP添加量 (ug)	VLP濃度 (ug/mL)	CaCl <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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



## 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 $\mu$ 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。

## 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粒子のエンベロー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クセシ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、HCVワクチンとして免疫した結果、HCVエンベロー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

$5 \times 10^5$  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  $\mu$ L 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ルトレーションを 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 分、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℃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 分、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℃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 分で一晩静置

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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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、尿細管における尿円柱、尿細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 - 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試み -

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から、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當である。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、GGCTAGCAGAATTCCCACCatgagacatattatctgccacggag およびGAGCGGCCGCAACGCGTcctcaatctgtatcttcatcgctag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、pLV SIN-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® 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-pLV SIN-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(pLV SIN-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-pLV SIN-EF1 $\alpha$ -E1-Puro、pLV SIN-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® 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 pLV SIN-AdE1、pLV SIN-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 細胞をに播種し、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™ 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

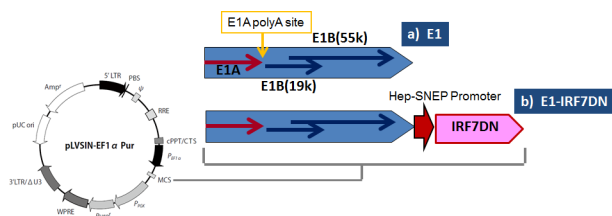


図-1 ベクターの構造

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。pLVGreen-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. ウィルスベクターの力価の評価

pLVGreen-AdE1、pLVGreen-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、 $1 \times 10^4$  TU/mL であった。ウィ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。

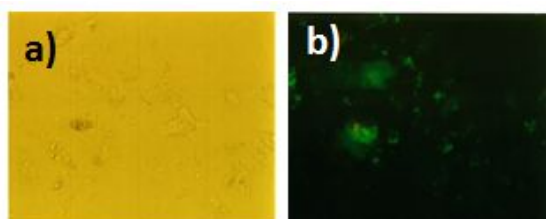


図-2 pLVGreen 感染 hNHeps™

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、pLVGreen-AdE1、pLVGreen-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

E1 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

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。

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が明らかにするため、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遺伝子アッセイで調べた。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- $\alpha$ , 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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必要があると考えられた。

### 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. 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

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
<u>Matsumoto M</u> , 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
<u>Matsumoto M</u> , 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, <u>Ishii K</u> , <u>Kato T</u> , Mochizuki H, <u>Nakamura N</u> , <u>Wakita T</u> .	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, <u>Matsumoto M</u> , 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, <u>Kato T</u> , 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,	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



<u>Akari H</u> , Matsuoka M.					
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	11447-11461	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	e1003533	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, <u>Akari H</u> .	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
Saito A, <u>Akari H</u> .	Macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt): Break out of the host factors.	Frontiers in Microbiology	4	187	2013
Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, H. Oshiumi H, <u>Matsumoto M</u> , Seya T.	Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor model.	J. Innate Immun.	DOI:10.1159/000355126		2013
Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, <u>Kato T</u> , <u>Wakita T</u> , <u>Ishii K</u> .	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	6031-3036	2013
<u>Suzuki R</u> , Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2	PLoS Pathog	9	e1003589	2013

	and NS2.				
Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, <u>Matsumoto M</u> , Seya T.	Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA.	PLos ONE	8	e83639	2013
Takaki H, Honada K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, <u>Matsumoto M</u> , Shingai M, Seya T.	MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon b-induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.	Mol Immunol.	57	100-110	2013
Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, <u>Matsumoto M</u> , Seya T.	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	4740-4747	2013
Tanaka Y, Suenaga T, <u>Matsumoto M</u> , Seya T, Arase H.	Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion.	J. Virol.	87	10900-10903	2013
Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, <u>Matsumoto M</u> .	Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA.	Nat. Commun.	4	1833	2013
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, <u>Akari H</u> .	Efficient <i>in vivo</i> depletion of CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration.	Immunology Letters	154	12-17	2013

Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, <u>Akari H</u> .	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.	Archives of Virology	158	1209-1220	2013
Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, <u>Suzuki R</u> , Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, <u>Wakita T</u> .	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
Kumeta H, Sakakibara H, Enokizono Y, Ogura K, Horiuchi M, <u>Matsumoto M</u> , Seya T, Inagaki F.	The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1.	J. Biomolec. NMR	DOI:10.1007/s10858-014-9819-1		2014
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, <u>Matsumoto M</u> , Seya T.	IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection.	J. Immunol.			2014
<u>Suzuki R</u> , Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, <u>Wakita T</u> .	Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon.	J Gen Virol.	95	60-65	2014

Tatematsu M, Seya T, <u>Matsumoto M.</u>	Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses.	Biochem. J.	45	195-201	2014
Li TC, Yang, T, Shiota T, Yoshizaki S, Yoshida H, Saito M, Imagawa T, Malbas F, Lupisan S, Oshitani H, <u>Wakita T,</u> and <u>Ishii K.</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene		In press	2014
Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Yuriko S, Saijo M, <u>Akari H,</u> Kurane I.	Demonstration of marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) 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		In press	2014
Naruse TK, <u>Akari H,</u> Matano T, Kimura A.	Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques.	Immunogenetics		In press	2014
<u>石井孝司、清原知子</u>	A 型肝炎ワクチン	BIO Clinica	28	25-29	2013
<u>鈴木亮介、小西英二</u>	フラビウイルスのリバースジェネティクス	ウイルス	63(1)	13-22	2013
<u>村山麻子、加藤孝宣</u>	NS5B-RNA ポリメラーゼの構造と機能.	肝胆膵	67(6)	918-923	2013

石井孝司	A 型肝炎、E 型肝炎	臨床と微生物	41	72-78	2014
------	-------------	--------	----	-------	------