

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590419

研究課題名（和文） ワクチン開発に向けた培養細胞由来 E 型肝炎ウイルス粒子の中和抗体誘導能に関する研究

研究課題名（英文） Characterization of cell culture-generated hepatitis E virus particles: evaluation of neutralizing antibodies-inducing ability as the material of inactivated vaccine production

研究代表者

高橋 雅春（Takahashi Masaharu）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70326841

研究成果の概要（和文）：PLC/PRF/5、A549、HepG2/C3A、Li-7、Huh7 及び Caco-2 の各種株化細胞による HEV 培養細胞感染系の培養上清中に高濃度に産生された HEV 粒子は細胞膜様構造物に覆われ、中和抗体誘導能を有するカプシド抗原が覆い隠されているが、界面活性剤及びタンパク質分解酵素処理により、細胞膜様構造物を除去してカプシド抗原を露出させることができた。これをマウスに免疫したところ、血中に抗カプシド抗体が産生され、*in vitro* 中和試験により糞便由来 HEV の感染を阻止しうることを実証できた。

研究成果の概要（英文）：HEV particles generated in culture supernatant of cell-culture systems of PLC/PRF/5, A549, HepG2/C3A, Li-7, Huh7 and Caco-2 cells were found to be associated with envelope-like membrane, and HEV capsid antigen which carry neutralization epitope was buried by the membrane. When treated with detergent and proteinase, the membrane of cell-generated HEV particles was removed and the capsid antigen was disclosed. Mice immunized with the membrane-dissociated HEV particles developed anti-HEV capsid antibodies, and the antiserum was capable of inhibiting the infection of feces-derived HEV in *in vitro* neutralization test.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス、ワクチン、中和抗体、培養細胞

1. 研究開始当初の背景

E 型肝炎ウイルス（HEV）は衛生環境が不良な発展途上国における流行性及び散発性急性肝炎の主要な原因ウイルスであり、従前、先進諸国には常在しないとみなされていたが、1997 年以降、先進諸国にも常在地

域とは遺伝子型が異なる地域固有の HEV 株が存在し、ブタ等をリザーバーとする人畜共通感染ウイルスとして散発性急性 E 型肝炎の原因となっていることが明らかにされ、E 型肝炎は 2003 年の感染症法の改正以降、四類感染症に指定されている。

HEVのゲノムは約7.2 kbの一本鎖RNA(+鎖)から成り、3種類の open reading frame (ORF1、ORF2及びORF3)を有する。ORF1はウイルスの複製に関与する酵素活性を持った非構造タンパク質をコードし、ORF2は capsidタンパク質を担っている。ORF3タンパク質はウイルス粒子の細胞からの放出に関与していると考えられている。

HEVを *in vitro* で培養することは不可能であったが、研究代表者らの研究室では、2006年にE型肝炎患者の糞便由来の遺伝子型3型のHEV (JE03-1760F株)をヒト肝癌細胞株のPLC/PRF/5細胞及びヒト肺癌細胞株のA549細胞に接種することにより、HEVの効率的な培養細胞感染系を世界に先駆けて開発し、感染性のあるHEV粒子を培養上清中に大量に得ることを可能にした (J Gen Virol 88: 903-911, 2007)。そして継代培養を続けることにより、野生株 (JE03-1760F株)よりも感染効率がが高く、活発な増殖能を示す馴化HEV株が得られ、馴化に関連する遺伝子変異を特定した (Virus Res 88: 903-911, 2008)。

HEV粒子の性状解析はこれまで糞便中の粒子について行われ、直径27-32 nmの non-enveloped virus であるとされてきたが、研究代表者らはORF2タンパク質及びORF3タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた immuno-capture PCR法による抗原性解析及びショ糖密度勾配平衡遠心による浮上密度の解析により、感染細胞から放出されたHEV粒子 (培養上清中の粒子及びE型肝炎患者の血清中の粒子)は表面にORF3タンパク質を有するとともに、あたかも enveloped virus のように細胞膜様構造物で覆われ、浮上密度が1.15-1.16 g/cm³であり、糞便中の粒子 (1.27-1.28 g/cm³)と比較して低いことを明らかにした。

2. 研究の目的

免疫原性が高く、感染予防効果が長期に持続するワクチンを作るためには native なウイルスを抗原材料とすることが望ましいが、HEVを培養することが不可能であったため、これまではHEVワクチン開発のための研究は主として遺伝子組み換え capsidタンパク質を抗原として行われ、native なウイルスが用いられることは無かった。しかしながら、研究代表者らの研究室では、PLC/PRF/5細胞及びA549細胞を用いてHEVの培養細胞感染系を開発し、培養細胞感染系に馴化したHEVを培養上清中に大量に得ることを可能にし、これにより、native なHEV粒子を抗原材料とする不活化ワクチン開発の可能性が開かれた。また、これまではHEVの感染性の検討及びHEV抗体の中和活性の測定はHEVに感受性のある実験動物 (サル及びブタ)を用いた感染実験に頼らざるを得

なかったが、このHEV培養細胞感染系を用いることにより、*in vitro*での試験が可能になった。

HEVは、成熟型は non-enveloped virus であるにもかかわらず、感染細胞から放出された時にはORF3タンパク質を介して enveloped virus のように宿主細胞膜様構造で覆われ、浮上密度及び抗原性が成熟型と異なっているユニークなウイルスである。本研究では、二つの形態のHEV粒子の性状の違いを明らかにするとともに、大量に産生することが可能になった培養細胞由来の native なHEV粒子を材料とした不活化ワクチンの開発に向けた基礎的検討を行い、E型肝炎の予防法確立の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糞便、血清及び培養上清中のHEV粒子の抗原性の解析

HEV ORF2タンパク質及びORF3タンパク質に対するモノクローナル抗体及びヒトガンマグロブリンに対する抗体を利用して、immuno-capture PCR法及び免疫沈降法により、HEV陽性の糞便、血清及び培養上清中のHEV粒子の抗原性及び免疫複合体の形成について解析を行う。immuno-capture PCR法とは各種HEV抗原に対する抗体を固相化したプレートのウェルにHEV粒子を加えて反応させ、抗体に捕捉されたHEV量を real-time PCR法で測定して抗原性の指標とするものである。

(2) 各種処理によるHEV粒子の浮上密度及び抗原性の変化の検討

培養HEV粒子を有機溶剤、界面活性剤、消化酵素及び胆汁等で処理し、ショ糖密度勾配超遠心法により浮上密度を測定するとともに、immuno-capture PCR法により抗原性の変化を調べ、糞便中粒子と同等の性状を示すように変化する処理条件を検討する。

(3) 処理済み培養HEVの中和抗体惹起能の検討

糞便中HEVと同等の性状を示す処理を施した培養HEVをマウスに免疫し、HEV培養細胞感染系を用いた *in vitro* 中和試験により、処理済み培養HEVの中和抗体惹起能を解析する。即ち、感染性のある糞便由来HEV粒子を予め被験検体中の抗体と反応させた後に培養細胞に接種した後に培養上清中のHEV RNA濃度を real-time PCR法で経時的に測定し、感染が阻止された場合、中和活性陽性と判定する。

4. 研究成果

(1) 患者血清中のHEV抗体は糞便中のHEVに対して中和活性を有するが、血清中及び培養上清中のHEVの感染性を阻止すること

はできなかった。また、immuno-capture PCR 法及び免疫沈降法により、血清中の HEV 粒子の 90%以上は HEV 抗体の共存下においても免疫複合体を形成していないことがあきらかになった (表 1)。以上より、血清中及び培養上清中の HEV 粒子の中和抗体エピトープは細胞膜様構造物により覆い隠されていると考えられた。

表 1 血清中 HEV 粒子の抗ヒト IgG、IgM、IgA 抗体による免疫沈降

| HEV RNA 陽性検体 (copies/test) | | 沈降分画の比率 (%) | |
|--|--------------------------|----------------------|---------|
| | | 抗ヒト IgG/IgM/IgA ヤギ血清 | 正常 ヤギ血清 |
| HEV RNA 陽性血清 | HEV抗体陰性血清 | | |
| | S1 (5.8×10^3) | 3.5 | 1.7 |
| | S2 (2.8×10^2) | 6.0 | 0.0 |
| | S3 (4.5×10^2) | 0.9 | 0.0 |
| | HEV抗体陽性血清 | | |
| | S6 (1.9×10^3) | 5.4 | 1.8 |
| S7 (2.4×10^3) | 5.4 | 0.4 | |
| S19 (4.5×10^3) | 8.1 | 0.4 | |
| S21 (1.0×10^4) | 2.4 | 1.0 | |
| HEV 陽性糞便懸濁液 + HEV 抗体陽性血清 (7.0×10^4) | | 98.2 | 0.0 |

(2) 血清中及び培養上清中の HEV 粒子は界面活性剤又は有機溶剤で処理すると、処理前には低値であった ORF2 及び ORF3 タンパク質の抗原性が部分的に出現し、浮上密度が $1.20\text{-}1.25\text{g/cm}^3$ にシフトすること、界面活性剤とタンパク分解酵素の両方で処理すると、ORF3 タンパク質が消化されて消失し、細胞膜様構造物が完全に除去されて ORF2 タンパク質が露出し、それに伴い浮上密度が糞便中 HEV 粒子と同じ $1.27\text{-}1.28\text{g/cm}^3$ になることが明らかになった (表 2、図 1)。以

表 2 各種処理による HEV 粒子の抗原性の変化

| 処理 | 結合分画の比率 (%) | | | |
|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | 培養上清 HEV | | 糞便 HEV | |
| | 抗 ORF2 MAb (H6225) | 抗 ORF3 MAb (TA0536) | 抗 ORF2 MAb (H6225) | 抗 ORF3 MAb (TA0536) |
| 0.2% Tween 20 | 22.1 | 16.5 | 92.2 | 0.0 |
| 0.5% Tween 20 | 69.0 | 76.8 | 95.7 | 0.4 |
| 10% chloroform | 87.3 | 54.4 | 92.0 | 0.1 |
| NP-40 + 2-ME + PE | 98.7 | 0.2 | 99.9 | 1.3 |
| NP-40 + 2-ME | 97.2 | 77.9 | 99.8 | 0.4 |
| NP-40 + PE | 99.0 | 0.2 | 99.4 | 0.0 |
| 無処理 | 6.3 | 5.7 | 93.1 | 0.0 |

2-ME, 2-mercaptoethanol; PE, proteinase E

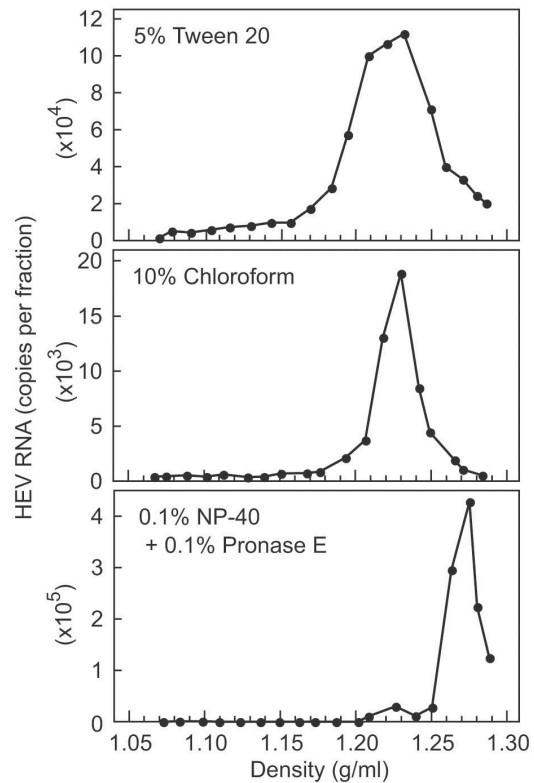


図 1 各種処理による培養上清中の HEV 粒子の浮上密度の変化

上より、培養上清中に産生された HEV を界面活性剤及びタンパク質分解酵素で処理して、細胞膜様構造物及び ORF3 タンパク質を除去することにより、ワクチンとして中和抗体誘導能を有する HEV 粒子を作製することができることが示された。

(3) 処理済み培養細胞由来 HEV をマウスに免疫し、経時的に抗血清を採取した。マウスの抗血清中には酵素免疫測定法により抗 capsid 抗体が検出され、産生された抗体は処理済み培養細胞由来 HEV と結合することが immuno-capture PCR 法によって示された。また、in vitro 中和試験によりこのマウス抗血清は糞便由来 HEV の感染を阻止しうることを実証できた。以上の結果より、処理済み培養細胞由来 HEV は中和抗体を誘導する免疫原性を有していることが明らかになった。

(4) 新たに HepG2/C3A 細胞 (ヒト肝 癌)、Li-7 細胞 (ヒト肝 癌)、Huh7 細胞 (ヒト肝 癌) 及び Caco-2 細胞 (ヒト結腸 癌) でも、培養上清中に 10^8copies/mL 以上の高濃度の HEV の約 3 カ月に及ぶ長期産生が可能となった。また、各種培養細胞由来の HEV 粒子の主分画は浮上密度 $1.15\text{-}1.17\text{g/cm}^3$ であり、ORF3 タンパク質及びエンベロープのような膜様構造物で覆われて capsid 抗原は露出していなかったが、界面活性剤 (デオキシコール酸ナトリウム) 及びタンパク質分解酵素 (ト

リプシン) で処理することにより、カプシド抗原が露出し、その抗原性が保持された HEV 粒子を調製することができた。マウスへの免疫実験及び *in vitro* 中和試験により、カプシド抗原を露出させた培養 HEV 粒子は HEV の感染を阻止する中和抗体誘導能を有することが示された。以上より、HepG2/C3A、Li-7、Huh7 及び Caco-2 の各株化細胞は HEV 不活化ワクチン原料の製造に利用可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai, S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Misuo H, Yazaki Y, Okamoto H: A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* 157: 235-246, 2012, 査読有
DOI: 10.1007/s00705-011-1153-2
2. Takikawa T, Miyamoto Y, Onodera M, Kuroda H, Kasai K, Miyasaka A, Takahashi M, Okamoto H, Suzuki K: Icteric acute hepatitis E with no response of immunoglobulin M class anti-hepatitis E virus antibody. *Hepatol Res* 42: 1146-1149, 2012, 査読有
DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01023.x
3. Nakano T, Okano H, Kobayashi M, Ito K, Ohmori S, Nomura T, Kato H, Ayada M, Nakano Y, Akachi S, Sugimoto K, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Takahashi M, Okamoto H: Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. *Infect Genet Evol* 12: 1524-1534, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.meegid.2012.06.002
4. Jirintai S, Jinshan, Tanggis Manglai D, Mulyanto, Takahashi M, Nagashima S, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H: Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* 170: 126-137, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.virusres.2012.09.015
5. Mulyanto, Depamede SN, Sriasih M, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H: Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol* 158: 87-96, 2012, 査読有
DOI: 10.1007/s00705-012-1462-0
6. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Yamada K, Nishizawa T, Okamoto H: A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 92: 269-278, 2011, 査読有
DOI: 10.1099/vir.0.025791-0
7. Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92: 902-908, 2011, 査読有
DOI: 10.1099/vir.0.029470-0
8. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H: A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotype 3 and genotype 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol* 156: 1345-1358, 2011, 査読有
DOI: 10.1007/s00705-011-0988-x
9. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H: Tumor susceptibility gene 101 and vacuolar protein sorting pathway are required for release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 92: 2838-2848, 2011, 査読有
DOI: 10.1099/vir.0.035378-0
10. 田辺利男, 水尾仁志, 矢崎康幸, 高橋雅春, 岡本宏明: 北海道東部の釧路市および根室市における E 型肝炎ウイルス感染の疫学調査: 感染の地域差と食文化の相違について. *肝臓*, 52: 567-574, 2011, 査読有
11. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H: Hepatitis E virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* 48: 1112-1125, 2010, 査読有
DOI: 10.1128/JCM.02002-09
12. Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H: Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol* 155: 1217-1226, 2010, 査読有
DOI: 10.1007/s00705-010-0706-0
13. 相川達也, 池澤和人, 間宮孝, 上野ちさと, 和田由美子, 島田沙香, 津田文男, 高橋雅春, 岡本宏明: 札幌圏内小流行 4 型 HEV 株が検出された茨城県内 E 型肝炎の 1 例. *肝臓*, 51: 579-581, 2010, 査読有

〔図書〕（計 1 件）

1. 高橋雅春, 岡本宏明: 日本臨牀社, 肝・胆道系症候群（第 2 版）I 肝臓編（上） E 型肝炎, 2010, 600 (31-37)

〔その他〕

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 ウイルス学部門ホームページ

<http://www.jichi.ac.jp/virology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 雅春 (TAKAHASHI MASAHARU)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70326841

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし