

機関番号：11501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590757

研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルス株間における感染性キメラウイルスを用いた感染中和メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Mechanism of Neutralization using Infectious Hepatitis C Chimeric Viruses

研究代表者

渡辺 久剛 (WATANABE HISAYOSHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：00332536

研究成果の概要 (和文) : HCV 感染に対する感染中和抗体はウイルス排除に重要な役割を担っていると考えられる。そこで HCV 培養系を用いて感染時の中和抗体の詳細な解析を行った。その結果 HCV 感染初期は中和抗体レベルが低く、液性免疫応答よりはむしろ細胞性免疫応答が主として関わっていた。慢性期では中和エピトープの変化により中和抗体価が維持されず、ウイルス持続感染が成立するものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Neutralizing antibody (NAb) is thought to play an important role in HCV infection. Detailed analysis of HCV NAb titer using newly developed cell culture system was performed. The level of NAb was low in the early phase of infection, suggested the cytotoxic immune response was a major role. While, the titer of NAb was decreased because of the sequence of neutralizing epitope was changed during the chronic phase. These results suggest the mechanism why HCV can be infected persistently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HCV、ワクチン、中和抗体

1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に対する予防ワクチンは生体内で中和抗体を誘導することで効果が期待されているが、これまでは効率のよい HCV 細胞培養系が存在しなかったため、*in vitro*における HCV ワクチンの評価が困難であった。一方、感染中和抗体は HCV の中和から排除の機序で重要な役割を担っていると考えられているが、その詳細な解析はなされていない。そこで本研究ではまだ培

養系が樹立されていない、遺伝子型 1b および 2b に対応する HCV 培養系を樹立し、各遺伝子型に応じた中和抗体アッセイ系を確立することで、HCV 感染における感染中和抗体の意義を明らかにすることを第一の目的とした。

2. 研究の目的

本研究の骨子は、

(1) HCV 遺伝子型 1a、1b、2a、2b の 4 つの培

養細胞感染系の確立、

(2) その系を用いた、患者血清あるいはチンパンジー血清における HCV 感染時中和抗体の意義の検討、

(3) *in vitro* で得られたデータとマウスモデルを用いた *in vivo* のデータとの比較検討、である。これらより、HCV 感染における感染中和抗体の動態が明らかとなり、さらに液性免疫応答から見た HCV 感染からの治癒あるいは慢性化機序のメカニズムが明らかになることが考えられる。

3. 研究の方法

研究代表者はすでに HCV 遺伝子型 1a 感染性キメラクローン 1a/2a (JFH-1) と、遺伝子型 2a 感染性クローン 2a/2a (J6/JFH1) を所有し、これまでに培養細胞系におけるその差異を研究してきた。本基盤研究においては HCV 遺伝子型 1b と 2b に対する感染培養系の樹立後、それらキメラウイルスを用いた *in vitro* の中和アッセイ系を確立し、中和抗体の動態および意義を検討した。さらに HCV 感染マウスモデルを用いて、*in vivo* における HCV 感染中和の機序について同様の検討を行った。

(1) HCV 遺伝子型 1b および 2b の感染性クローンの構築

遺伝子型 1b および 2b 患者血清中の HCV 全長を既報のコンセンサス配列を参考に 14 前後のオーバーラップするフラグメントに分けプライマーを設定し、全長をカバーする cDNA 断片をクローニングした。また各フラグメントのそれぞれ 5 クローンの塩基配列をシーケンスし、患者血清中で増殖していた HCV のコンセンサス配列を決定した。

(2) HCV 遺伝子型 1b および 2b の感染培養系の樹立

遺伝子型 2a である JFH-1 を backbone とし、core、E1、E2、p7 領域を 1b あるいは 2b 型に置き換えたキメラを構築した。合成された遺伝子型 1b あるいは 2b の全長感染性クローン RNA を Huh7.5 細胞にトランスフェクションし、導入した HCV の増殖を観察した。HCV RNA はノザンプロットと real-time PCR 法で、培養細胞内の HCV 蛋白の発現は免疫蛍光染色法で、培養上清中へのコア抗原分泌はコア ELISA にてそれぞれ確認し、さらにこの培養上清を用いて新たな Huh7.5 細胞へ感染実験を行い、HCV の増殖を経時的に観察した。

(3) HCV 感染性クローンの適応変異の検討

HCV 培養細胞感染系においては、ウイルス増殖時にその複製効率を増強する適応変異を認めることが報告されていることから、1b/2a クローンおよび 2b/2a クローンにおい

ても同様にウイルス適応変異の有無についてシーケンスにより検討した。これらの適応変異を感染性クローンに導入し、より感染効率の優れた培養感染系を構築した。

(4) 各遺伝子型のウイルスストックの生成

データの再現性を得やすくするため、同じ感染力価を示すウイルスストックを各遺伝子型別に大量に生成した。感染力価を蛍光抗体法にて測定し、-80C にて保存した。

(5) 中和アッセイ系の確立と cross-neutralization の検討

HCV 感染初期と慢性期の患者血清あるいはチンパンジー血清 (米国 Stephen Feinstone 博士より提供) を用い、中和アッセイ系を確立した。96-well plate に Huh7.5 細胞をまいた後、3. で保存したウイルスストックを MOI=0.01 で感染させ 72 時間培養後、core 抗体を用いた免疫蛍光染色にて foci をカウントした。初期および慢性期血清についてそれぞれ 4 well ずつ測定し平均値をとった後比較し、ウイルス感染の inhibition% を計算し、50% 以上の inhibition 効果を感染中和と考えた。さらに異なる遺伝子型間のウイルス株を用いて、cross-neutralization についても検討した。

(6) 患者血清およびチンパンジー血清による中和抗体の血中動態の解析

各 HCV 遺伝子型に感染している患者のシリーズ血清を用いて、確立された中和アッセイ法により、経過中の中和抗体の変化を解析した。また Feinstone 博士の研究室からは、チンパンジー血清 (慢性化群と HCV 自然排除群)、さらに HCV 自然排除後同一ウイルスによる再チャレンジ群、中和抗体誘導のためのリコンビナント E1E2 蛋白によるワクチン接種群の血清を供与いただき、HCV 感染に伴う中和抗体レベルの詳細な解析と、再チャレンジやワクチン接種に伴う中和抗体誘導について検討した。

(7) HCV 感染マウスモデルを用いた *in vivo* における中和抗体の意義の検討

uPA/SCID トランスジェニックマウスモデルは HCV 感染小動物モデルとして報告された (Mercer et al. Nat Med, 2001) が、このモデルを購入し、HCV 培養系由来の各ウイルスストックを感染させて集めた血清をもとに、中和抗体の出現について同様のアッセイを行い、それまで *in vitro* で得られたデータと比較検討した。

4. 研究成果

平成 20 年度は、HCV 遺伝子型 1b および 2b に対応する感染性キメラクローンの構築

を試みた。構築したクローンをトランスフェクションしたところ、蛍光免疫染色およびリアルタイムPCRではHCV増殖能は予想より弱いものであった。しかし培養細胞への感染に伴うHCV感染性クローンの適応変異について詳細に検討したところ、ウイルス増殖時にその複製効率を増強する適応変異を数か所認めたことから、それらの適応変異を導入した、より感染効率の優れた培養感染系を構築しそのウイルスストックの生成を行った。

一方、平成20年から21年にかけて、感染培養系をすでに確立した遺伝子型1aおよび2aの系については、培養細胞由来HCVのウイルスストックを大量に作成し、その感染力価の測定も終え、HCV培養系を用いた中和アッセイ系の確立に向けた準備を整えた。さらに海外研究協力者である、米国食品医薬品局肝炎研究室Stephen M. Feinstone博士とMarian E. Major博士から、HCV感染チンパンジーのシリーズ血清および肝機能やウイルス動態に関するデータを供与いただき、このHCV培養系による中和アッセイ系を確立した。

平成22年度は、前年度確立した中和アッセイ系を用い、HCV感染初期と慢性期のHCV感染チンパンジー血清とHCV感染患者血清におけるHCV中和抗体の血中動態を詳細に解析した。その結果、感染中和抗体はHCV感染初期に誘導されるがそのレベルは低く、チンパンジーを用いた再感染実験においても、そのrecallを認めなかった。このことから、再感染に引き続くHCVコントロールは、肝臓内細胞性免疫応答が主として関わっていると考えられた。一方、慢性期のHCV感染では中和抗体価は次第に上昇するものの、長期になると中和抗体活性の低下が認められた。そこで血中ウイルスをシークエンスしたところ、経過にしたがってエンベロープ領域に変異が蓄積されていくことが確認された。このため本来の中和エピトープを認識できなくなり、中和活性が低下したものと思われた。

さらにMarian E. Major博士と共同で、HCV抗体陽性患者プール血漿から精製したHCV特異的Igのなかに、中和抗体とその働きを阻害する非中和抗体の存在を見出し、そのエピトープである中和エピトープIと非中和エピトープIIとが互いに干渉しあってウイルス中和活性を阻害することを見出した。このことよりHCV感染においてはウイルス中和を阻害する阻害抗体が存在し、エピトープ特

異的な中和抗体とその阻害抗体比がHCVのコントロールやウイルス排除に関与している可能性があると考えられた。

そこで阻害抗体を除去することにより、HCV培養系においてウイルスに対する交差中和性がどう変わるか検討した。非中和エピトープに対する抗体をdepleteすると、HCV株間を問わず、HCV中和活性が回復されることがわかった。このことから、HCV感染者に存在する中和阻害抗体を除くことでより広範囲な中和抗体の交差中和能が得られる可能性が示唆された。

感染初期や再感染におけるHCVのコントロールには、細胞性免疫応答だけでなく、より効果的な液性免疫応答を誘導する必要があり、今後、中和エピトープ特異的な抗体のenrichmentや、中和阻害エピトープの除去ができれば、より広範囲に作用する中和抗体を誘導できる可能性があり、有効な予防用ワクチンや治療用ワクチンの開発につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

①Ishii R, Togashi H, Iwaba A, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Okada A, Takahashi K, Saito T, Kawata S: (99m)Tc-GSA SPECT analysis was clinically useful to evaluate the effect of interferon in a patient with interferon non-responsive chronic hepatitis C. Ann Nucl Med: 520-523, 2011, 査読有

②Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. Stem Cells Dev: 1503-1510, 2011, 査読有

③El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. Microbiol Immunol: 418-426, 2011, 査読有

④Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama

A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M. Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol* : 896-965, 2011, 査読有

⑤ Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into the hepatocyte lineage. *Cell Tissue Res* 343: 371-378, 2010, 査読有

⑥ Sanjo M, Saito T, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S: Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 82: 1364-1370, 2010, 査読有

⑦ Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S: Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: the Takahata study- a cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3828-3835, 2010, 査読有

⑧ Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepatol Res* 40: 432-437, 2010, 査読有

⑨ Watanabe H, Wells F, and Major ME: Clearance of hepatitis C in chimpanzees is associated with intrahepatic T-cell perforin expression during late acute phase. *J Viral Hepatitis* 17: 245-253, 2010, 査読有

⑩ Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S: Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the

Japanese population. *Metabolism* 58: 1067-1075, 2009, 査読有

⑪ Zhang P, Zhong L, Struble EB, Watanabe H, Kachko A, Mihalik K, Virata-Theimer ML, Alter HJ, Feinstone S, and Major ME: Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (18): 7537-7541, 2009, 査読有

⑫ Zubkova I, Choi YH, Chang E, Pirolo K, Uern T, Watanabe H, Wells F, Kachko A, Krawczynski K, Major ME: T-cell vaccines that elicit effective immune responses against HCV in chimpanzees may create greater immune pressure for viral mutation. *Vaccine* 27: 2594-2602, 2009, 査読有

[学会発表] (計9件)

① Watanabe H, Saito T, Ishii R, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Kawata S: Incidence of hepatocellular carcinoma after achieving sustained virological response to interferon therapy for chronic hepatitis C. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November3, 2010.

② Watanabe H, Wells F, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Kawata S, and Major ME: Clearance of hepatitis C virus in chimpanzees is associated with intrahepatic perforin expression during the late acute phase. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona, Spain, October26, 2010.

③ Watanabe H, Saito T, Shao L, Nishise Y, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Ito J, Saito K, Shinzawa H, and Kawata S: A Long-Term Population-Based Cohort Study in an Endemic Area of Hepatitis C Virus in Japan: Spontaneous Elimination of Serum HCV RNA Detected by the Real-Time PCR System. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Washington DC, USA, March18, 2009

④ Watanabe H, Saito T, Nishise Y, Sasaki Y, Sato C, Ishii R, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Ito J, Saito K, Shinzawa H, and Kawata S: Natural Clearance of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Chronic HCV

Carriers: A Long-Term Cohort Study in an Endemic Area of HCV Infection in Japan. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 3, 2009.

⑤ 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男: B 型肝炎ジェノタイプ B 型高浸淫地域における急性 B 型肝炎の実態. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜市 パシフィコ横浜, 2010 年 10 月 13 日

⑥ 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、邵 力、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、石橋正道、富樫 整、新澤陽英、河田純男: HCV コホート研究による持続感染者の自然経過. 第 46 回日本肝臓学会総会サテライトシンポジウム「HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究」 山形市 山形テルサ, 2010 年 5 月 29 日

⑦ 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男: HCV コホートにおけるウイルス自然治癒および肝発癌の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形市 ホテルメトロポリタン山形, 2010 年 5 月 27 日

⑧ 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、佐藤智佳子、宇賀神智、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男: Real-time PCR 法を用いた HCV 持続感染者におけるウイルス自然陰性化の検討. 第 45 回日本肝臓学会総会, 神戸市 神戸ポートピアホテル, 2009 年 6 月 4 日

⑨ 渡辺久剛、斎藤貴史、河田純男: 1a/2a chimera HCV 培養細胞感染系を用いた HCV 中和抗体レベルの解析. シンポジウム「C 型肝炎ウイルス治療の新潮流」第 44 回日本肝臓学会総会, 松山市 愛媛県民文化会館, 2008 年 6 月 5 日.

[図書] (計 7 件)

① 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、邵力、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、斎藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男: HCV コホート研究による持続感染者の自然経過. HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究 (河田純男監修、佐田通夫・新澤陽英・斎藤貴史編) p45-50, 山形大学出版, 山形, 2011, 89 ページ

② 渡辺久剛: 分子標的薬治療における消

化器症状対策. 分子標的薬トータルマネージメント YURCC パッケージ ver. 1.2 (富田善彦編) p23-27, リッチヒルメディカル, 東京, 2010.

③ 渡辺久剛、河田純男: 慢性肝炎. ハリソン内科学第 3 版 (福井次矢、黒川清編) p2022-2037, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2009

④ 渡辺久剛、河田純男: HCV キャリアからの HCV RNA 自然消失はあるのか? 肝臓病診療こんなときどうする Q&A (河田純男、佐々木裕編) p47-51, 中外医学社, 東京, 2009.

⑤ 斎藤貴史、渡辺久剛、河田純男: PegIFN+リバビリン療法の治療効果はウイルス学的にどこまで予測できるか? 肝臓病診療こんなときどうする Q&A (河田純男、佐々木裕編) p364-367, 中外医学社, 東京, 2009.

⑥ 宇賀神智、奥本和夫、斎藤貴史、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、鈴木明彦、三條麻衣、西瀬雄子、伊藤純一、菅原一彦、渡辺久剛、斎藤孝治、富樫整、河田純男: 当科における肝硬変の成因別実態. 肝硬変の成因別実態 (青柳豊、他編) p77-80, 中外医学社, 東京, 2008.

⑦ 渡辺久剛、河田純男: 肝硬変. 肝臓病のすべて (与芝真彰編) p69-74, 日本評論社, 東京, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 久剛 (WATANABE HISAYOSHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 00332536

(2) 研究分担者

邵 力 (SHAO LI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 80344787

(3) 連携研究者

石井 里佳 (ISHII RIKA)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 60466612