

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

2. 研究開発代表者：石井 孝司（国立感染症研究所）

3. 研究開発の成果

本研究では、すでにヒトにとって重要な疾患の原因であることが判明しているか、何らかのヒト疾患との関連性が強く示唆されているにも関わらず、培養細胞系が存在しないか、あるいは培養細胞系での増殖効率が非常に悪いために研究の進展が大きく制約されているウイルス（ヒトノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス(RoV)、ヒトポリオーマウイルス(PyV、例えば MCV、KIV、WUV など)、ヒトパピローマウイルス(HPV)、E 型肝炎ウイルス(HEV)など) による疾患について、バキュロウイルス系や哺乳類細胞系などを用いた virus-like particles (VLP)の作製と診断系への応用、感染感受性細胞の検索などを行うことにより、これらのウイルスの感染増殖、病態発現機構の解析、これらのウイルスが原因となる疾患の診断、予防を目的とした。

1) 抗原抗体診断系、実験モデルの開発とウイルス生活環の解析

HPVに関して、日本人健康人男女での14種の発癌性HPVに対する抗体価を測定したところ、男女ともに幅広い年齢層でHPV35, 31, 6の抗体保有率が高いことが分かった。一方、子宮頸癌で高頻度に検出されるHPV型の抗体保有率は、HPV16: 男3.1%, 女1.9%、HPV18: 男4.1%, 女1.0%、HPV52: 男5.2%, 女3.9%、HPV58: 男4.1%, 女4.9%であった。

ヒトNoV (GII.3、GII.4、GI.I株) の全長cDNAからの粒子産生に成功し、NoVのリバースジェネティックシステムを構築することができた。また、ヒト、マウスNoVの感染性クローンにレポーター遺伝子を組み込んだウイルスの作成に成功した。非構造蛋白領域にレポーター遺伝子を組み込んだウイルスはNoV感受性細胞のスクリーニングに有用であり、構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置換したNoVはレプリコンとしてウイルス増殖阻害剤のスクリーニングに有用である。また、NoVの中で唯一細胞増殖できるマウスNoVのORF3を欠損した変異ウイルスに外来性のORF3を供給することでウイルス複製に成功し、マウスNoVのベクター化にも成功した。ヒト小腸、大腸から樹立し、長期培養可能となったヒト腸管上皮オルガノイドを用いて検討を行った。培養に用いるマトリゲルはウイルス粒子の核酸を阻害するため、マトリゲルを酵素処理により除去し、トリプシン処理によって上皮細胞を単細胞化することにより、ウイルス感染が効率化することが確認された。

ヒトHEVについて、フェレットを用いたサロゲート動物モデルの構築に成功し、本モデルを用いて病原性発現機構の解析や治療薬の効果検討を開始している。

2) 宿主免疫応答の解析と予防・治療法開発

次世代シーケンサーを用いて、感染者体内に存在する NoV 配列を包括的に解析したところ、従来のダイレクトシーケンシング法では単独の遺伝子型しか検出されなかった例で、直近に国内で流行していた亜株や遺伝子型がマイナーな配列として検出され、様々な感染経路で混合感染が頻繁に生じている可能性が示唆された。このような包括的な研究を進めることにより、NoV の変異機構、病態との関連、今後出現する新変異株の予測に貢献できると考えられる。

RoV のフルゲノム解析方法を開発し、各遺伝子の型別やリアソータントの診断を迅速かつ容易にした。

HPV に関して、HPV16 の E6 蛋白質の脱ユビキチン化を制御する脱ユビキチン化酵素の発現とアッセイ系を確立した。また、ヒト Wee1 キナーゼが HPV16 の複製タンパク質 E1 に結合して、その分解を阻害することを見出した。このように、HPV ゲノム複製に必須なウイルス蛋白質 (E1、E6、E7) の制御により、HPV ゲノム複製を抑制することができることを示し、新たな抗 HPV 薬の開発に繋がる成果を得た。

NoV、HEV について、VLP の中に外来遺伝子を包埋したシュード粒子を形成させることに成功し、ワクチンや遺伝子デリバリーベクターとしての応用について検討している。