

# 地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

## 抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 物質の同定 及び HCV ならびにデングワクチンの開発

(インドネシア共和国)

平成21年度実施報告書

代表者:堀田 博

神戸大学大学院医学研究科感染症センター・センター長 教授

<平成 21 年度採択>

## 1. プロジェクト全体の実施の概要

本プロジェクトでは次の4項目について研究を実施する。(1)インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物を用いてC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス薬のスクリーニングと作用機序の解析を行う。わが国の薬用植物資源についてはパイロットスクリーニングを開始した。インドネシアの薬用植物資源の探索については、本年度は現地の研究室の立ち上げを開始した。また、(2)デングウイルスに対するDNAワクチンの動物実験レベルの開発研究、及びその技術をさらに発展させて、(3)HCVに対する組換え水痘生ワクチンの動物実験レベルの開発研究を行う。デングDNAワクチン研究については、本年度は現地の研究室の立ち上げを開始し、インドネシアで分離された4種類のデングウイルス血清型のprM+E遺伝子領域のクローニングの準備を進めている。HCV組換え水痘生ワクチン研究については、組換え水痘生ワクチンに組込むHCVタンパク質発現プラスミドを作製し、その免疫誘導能について検討を進めている。そして、(4)これらの共同研究およびインドネシア人研究者の日本への招へいを通して、インドネシアにおける研究技術の向上や人材育成を目指す。なお、インドネシアとの共同研究の開始は2010年2月下旬で、実施期間は4年間(2014年2月下旬まで)を予定している。

## 2. 研究グループ別の実施内容

### (1) 抗HCV物質研究開発グループ

#### ①研究のねらい

HCV慢性感染者は、我が国で約200万人、インドネシアで700万人以上、全世界で約1億3,000万人と推定されている。そして、毎年、日本で約2万7,000人がHCVによる原発性肝がんで、また、約1万2,000人がHCVによる肝硬変で死亡している。すなわち、日本では毎年約4万人が、HCV感染が直接原因となって死亡している。また、インドネシアでは毎年20万人以上が、HCV感染が直接原因となって死亡していると推定される。現在臨床で用いられている抗HCV治療法では、半数近い症例で完全治癒が望めず、抗HCVウイルス薬を含む新規治療法の開発が強く求められている。

抗HCV物質研究開発グループでは、インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物を用いて、HCVに対する抗ウイルス薬のスクリーニングと作用機序の解析を行う。抗HCVウイルス薬の開発は、多くのHCV慢性感染者にとって大きな福音になるとともに、感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながることを期待される。

#### ②研究実施方法

神戸大学において、(独)医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センターが保有する薬用植物資源を用いて、HCVに対して抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを行う。抗ウイルス効果を有する物質が見つければ、さらに分画精製を行って抗ウイルス効果を有する画分を絞り込み、最終的には抗ウイルス分子の同定を目指す。さらに、それらの抗ウイルス物質の作用機序を明らかにする。

また、インドネシア大学とアイルランガ大学において、それぞれの大学が保有するインドネシア特有の薬用植物資源・天然抽出物を用いて、HCVに対して抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを行う。抗ウイルス効果を有する物質が見つければ、さらに分画精製を行って抗ウイルス効果を有する画

分を絞り込み、最終的には抗ウイルス分子の同定を目指す。さらに、それらの抗ウイルス物質の作用機序を明らかにする。

### ③当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、同センターが保有する薬用植物から粗抽出物を作製し、その乾燥標品を得た。そして、神戸大学において、これら薬用植物の粗抽出物を用いて、HCV に対して抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを開始した。

インドネシア大学とアイルランガ大学においては、平成 22 年 2 月の本プロジェクト開始後に、抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築のためバイオセーフティーレベル (BSL) 2 実験室の設置を開始した。平成 22 年 3 月末までに P2 安全キャビネット等の主要な機器一式を搬入し、セットアップを行った。

### ④カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

インドネシアにおける JICA 技術協力プロジェクトの開始が平成 22 年 2 月であるため、具体的な技術移転は始まったばかりである。第一段階として、同技術協力プロジェクトでの Master Plan や PDM、PO の Output 及び Activity の計画に基づいて、BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。

### ⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況（あれば）

なし

## (2) HCV ワクチン研究開発グループ

### ①研究のねらい

HCV 慢性感染者は、我が国で約 200 万人、インドネシアで 700 万人以上、全世界で約 1 億 3,000 万人と推定されている。そして、毎年、日本で約 2 万 7,000 人が HCV による原発性肝がん、また、約 1 万 2,000 人が HCV による肝硬変で死亡している。すなわち、日本では毎年約 4 万人が、HCV 感染が直接原因となって死亡している。また、インドネシアでは毎年 20 万人以上が、HCV 感染が直接原因となって死亡していると推定される。現在臨床で用いられている抗 HCV 治療法では、半数近い症例で完全治癒が望めず、HCV 治療ワクチンを含む新規治療法の開発が強く求められている。また、インドネシアにおいては輸血以外のルートで新たな HCV 感染者が発生していると推定されており、ワクチンによる新たな感染防止対策の確立も求められている。

HCV ワクチン研究開発グループでは、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部を発現する DNA ワクチン及びこれを基にした組換え水痘生ワクチンを作製し、動物実験により中和抗体や細胞性免疫、感染防御能の誘導等、ワクチン効果について検討する。HCV に対する治療ワクチンの開発は多くの HCV 慢性感染者にとって大きな福音になり、予防ワクチンの開発は今後の新たな感染者発生の防止に役立つとともに、感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながることを期待される。

## ②研究実施方法

神戸大学において、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部をコードする遺伝子領域をクローニングし、発現ベクターに組み込む。発現ベクターを培養細胞に導入して各タンパク質の発現を確認した後、これを DNA ワクチンとしてマウスに接種し、その免疫誘導能を調べる。そして、最良の免疫誘導能が確認された発現ベクターを用いて組換え水痘生ワクチンを作製し、動物実験により中和抗体や細胞性免疫、感染防御能の誘導等、ワクチン効果について検討する。

## ③当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

神戸大学において、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部をコードする遺伝子領域を組み込んだ発現プラスミドを数種類作製した。これらの発現プラスミドを培養細胞に導入し、HCV タンパク質が予想通り発現されていることを確認した。これらを用いて HCV タンパク質を培養細胞に発現させ、この感染細胞をマウスに接種して免疫応答を調べる予備実験を開始した。

インドネシア大学においては、平成 22 年 2 月の本プロジェクト開始後に、DNA ワクチンの研究基盤の構築のため BSL2 実験室の設置を開始した。

## ④カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

インドネシアにおけるプロジェクトの正式開始が平成 22 年 2 月であるため、具体的な技術移転は始まったばかりである。第一段階として、BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。

## ⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況（あれば）

なし

### (3) デング DNA ワクチン研究開発グループ

#### ①研究のねらい

インドネシアにおいては、アジア地域の他の発展途上国と同様に、デング熱／デング出血熱が蔓延しており、保健衛生上、大きな問題になっている。毎年、10 万人以上の確定症例と 1,000 人以上の死者が報告されている。一方、航空機網の発達によりアジア諸国と我が国は数時間以内の往来で結ばれており、デング熱／デング出血熱の流行は、リアルタイムで我が国の問題でもある。しかし、認可されたワクチンは未だ開発されていないため、その開発研究が強く求められている。

デング DNA ワクチン研究開発グループでは、インドネシアに流行するデングウイルス株を用いて、有効なデング 4 価 DNA ワクチンの作製と評価を行う。予防ワクチンの開発は、インドネシアにとっても世界の流行国にとっても大きな福音になるとともに、開発途上国における感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながることを期待される。

## ②研究実施方法

インドネシア大学において、流行しているデングウイルス株を分離し、免疫誘導に重要なエンベロープタンパク質をコードする遺伝子領域をプラスミドに組み込む。このプラスミドの培養細胞における抗原発現性、マウスにおける中和抗体誘導能について調べる。

### ③当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

神戸大学においてデング DNA ワクチン作製の戦略を構築し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM シグナルーprM-E 領域をクローニングするためのプライマー設計を確立した。

インドネシアにおけるプロジェクトの正式開始が平成 22 年 2 月であるため、具体的な技術移転は始まったばかりである。第一段階として、BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。さらに、4 種類の血清型のデングウイルス遺伝子クローニングの戦略についてのノウハウを移転した。インドネシア側では、ウイルス分離の準備を行うとともに、過去のウイルス分離株を用いて塩基配列解析を開始した。

### ④カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

インドネシアにおけるプロジェクトの正式開始が平成 22 年 2 月であるため、具体的な技術移転は始まったばかりである。第一段階として、BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。また、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM シグナルーprM-E 領域をクローニングするためのプライマー設計情報を、これまでの日本側における成果に基づいて、インドネシア側に伝えた。

### ⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況（あれば）なし

## 3. 成果発表等

(1) 原著論文：国内 0 件、国際 10 件

(Accepted)

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 80:856-861, 2009.

Yamanaka A, Konishi E. A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 27:3735-3743, 2009.

Konishi E, Kitai Y. Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 27:7053-7058, 2009.

Konishi E.: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 27:7129-7130, 2009.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 163:360-367, 2010.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Jpn J Infect Dis* 63:58-60, 2010.

Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology*. 53:44-48, 2010.

Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*. 53:49-54, 2010.

(In press)

Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine*. (in press).

Sasayama M, Deng L, Kim SR, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-interferon *plus* ribavirin. *Kobe J Med Sci*. (in press).

(2) 特許出願 : 0 件

#### 4. プロジェクト実施体制

(1) 抗 HCV 物質の同定

① 研究グループリーダー : 堀田 博 (神戸大学・教授)

② 研究項目

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、同センターが保有する薬用植物から粗抽出物を作製し、その乾燥標品を得た。そして、神戸大学において、これら薬用植物の粗抽出物を用いて、HCV に対して抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを開始した。

また、インドネシア大学とアイルランガ大学において、平成 22 年 2 月の本プロジェクト開始後に、

抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築のため BSL2 実験室の設置を開始した。平成 22 年 3 月末までに P2 安全キャビネット等の主要な機器一式を搬入し、セットアップを行った。

## (2) HCV ワクチンの開発

① 研究グループリーダー：森 康子（神戸大学・教授）

### ② 研究項目

神戸大学において、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部をコードする遺伝子領域を組み込んだ発現プラスミドを数種類作製した。これらの発現プラスミドを培養細胞に導入し、HCV タンパク質が予想通り発現されていることを確認した。これらを用いて HCV タンパク質を培養細胞に発現させ、この感染細胞をマウスに接種して免疫応答を調べる予備実験を開始した。

## (3) デング DNA ワクチンの開発

① 研究グループリーダー：小西 英二（神戸大学・准教授）

### ② 研究項目

神戸大学においてデング DNA ワクチン作製の戦略を構築し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM シグナルーprM-E 領域をクローニングするためのプライマー設計を確立した。

インドネシアにおけるプロジェクトの正式開始が平成 22 年 2 月であるため、具体的な技術移転は始まったばかりである。第一段階として、BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。さらに、4 種類の血清型のデングウイルス遺伝子クローニングの戦略についてのノウハウを移転した。インドネシア側では、ウイルス分離の準備を行うとともに、過去のウイルス分離株を用いて塩基配列解析を開始した。