

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22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活性のスクリーニング、抗ウイルス物質の同定と作用機序の解析を行う。インドネシアの薬用植物資源等については、インドネシア大学と共同でサンプルを得て、インドネシア大学において抗 HCV 活性を調べるとともに、アイルランガ大学においても同様の研究が行えるよう研究室を整備し、研究を実施する。また、我が国においては、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで収集・抽出した薬用植物資源等の抗 HCV 活性の測定、抗ウイルス物質の同定と作用機序の解析を、共同して神戸大学において行う。(2)デングウイルス 1 型-4 型に対するDNAワクチン候補の作製と動物実験レベルの開発研究を、インドネシア大学及び神戸大学において共同で行う。現地の研究室の整備を行うとともに、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を行い、DNAワクチン候補を作製する。(3)HCV タンパク質発現組換え水痘生ワクチン候補株を作製し、その免疫誘導能について検討する。そして、(4)これらの共同研究及びインドネシア人若手研究者の日本への招へいと日本人若手研究者のインドネシアへの派遣を通して、インドネシア及びわが国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期間は平成 22 年 2 月から平成 26 年 2 月までの 4 年間である。

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

(平成 21 年度)

神戸大学において、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、抗ウイルス物質の研究の基盤構築のため、必要機材の購入・設置を図る。

(平成 22 年度)

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、すでに収集・保有している薬用植物に加えて新たな試料から、メタノール加温抽出法を用いて抽出液を作製し、乾燥により粗抽出標品を調整する。

神戸大学においてそれらの標品を DMSO に溶解し、その溶解液を用いて 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実施する。具体的な手順として、まず、上記薬用植物抽出液とウイルス液を混合し 1 時間反応後に培養細胞に感染させ、ウイルスの吸着阻害効果を調べる。また、薬用植物抽出液を加えずにウイルスを感染させ、2 時間ウイルス吸着させてから感染細胞に薬用植物抽出液を加えることにより、吸着以降のウイルス増殖過程における阻害効果の有無を検討する。

医薬基盤研薬用植物資源研究センターでは、上記アッセイ法において効果が認められた植物メタノール抽出エキスについて、さらに各種有機溶媒にて分配を行い、それぞれの分画についてアッセイを行う。ここで効果が見られた分画はさらに各種クロマトグラフィーによりさらに精製を進めていく。最終的に単離された化合物については、核磁気共鳴スペクトルなどにより化学構造の解明を行っていく。

インドネシア大学において、バイオセーフティーレベル (BSL) 2 実験室の設置を完成させ、まず HCV の培養を開始する。そして順次、抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築を進める。そして、インドネシア大学と共同で入手した薬用植物抽出液について、神戸大学で実施しているスクリーニング法を用いて、HCV に対する抗ウイルス活性を測定する。

アイルランガ大学においては、HCV の培養と抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築がまだ十分でないため、BSL2 実験室の設置等、研究基盤の構築を開始する。

また、インドネシア大学とアイルランガ大学において、インドネシアの薬用植物からの粗抽出を開始する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(平成 21 年度)

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国内産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 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。

(平成 22 年度)

神戸大学において、国内産薬用植物エキスを用いて、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。そして、抗 HCV 作用を有する数種類の薬用植物エキスを見出した。また、インドネシア人短期研修員に抗 HCV 作用のスクリーニング法を技術移転し、同研修員が持参したインドネシア産植物エキスについて抗 HCV 作用のスクリーニングを行った。そして、抗 HCV 作用を有する数種類の薬用植物エキスを見出した。

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは、国内産薬用植物メタノールエキスについて効果が見られた 3 種類についてクロロホルム、ブタノールにて分配を行い、活性の集中した分画の分取薄層クロマトグラフィーを行った。またインドネシア産植物エキスについては、効果のみられたエキスのうち、1 種類のエキスについて、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノールにて分配をし、活性の集中していた酢酸エチル層について各種クロマトグラフィー(オープンシリカゲルカラム、HPLC など)を繰り返し、最終的に 10 種類の化合物を単離した。それらの化学構造は各種二次元 NMR データにより解析した。それらの化合物の単独でのアッセイを今後行う予定である。

インドネシア大学においては、平成 22 年 5 月の日本人常駐研究者の着任後に、抗ウイルス薬スクリーニング用に新設した BSL2 実験室において、培養細胞を用いて HCV の培養を開始した。そして、インドネシア人共

同研究者とともにスクリーニングを行い、抗 HCV 作用を有する数種類のインドネシア産薬用植物エキスを見出した。今後、それらの薬用植物エキスをクロロホルム、ブタノールにて分配を行い、抗 HCV 作用を有する化合物の同定を行う予定である。

アイルランガ大学においては、平成 23 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の購入設置ができるよう、諸手続きを進めている。

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)

(平成 21 年度)

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。

(平成 22 年度)

平成 22 年 5 月 13 日～8 月 12 日まで 3 ヶ月間、アイルランガ大学薬学部講師を JICA 研修員として招へいし、神戸大学において、HCV の培養と、インドネシア産薬用植物エキスの抗ウイルス活性測定及び細胞障害活性測定の実技指導を通して技術移転を行った。また、同じ研究者が、平成 22 年 11 月 9 日～12 月 16 日まで 1 ヶ月間、神戸大学において、インドネシア産薬用植物エキスのクロロホルム、酢酸エチル、ブタノールにて分配抽出した物質の抗 HCV 活性測定を行った。

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいては、平成 22 年 9 月 27 日～12 月 14 日までの約 3 カ月間、インドネシアからアイルランガ大学助教授を JICA 研修員として招へいし、インドネシア産植物エキスの活性成分の分離精製を行ない、生薬成分の分離精製技術、ならびに化合物の化学構造決定手法に関しての技術指導を通して技術移転を行った。

平成 22 年 5 月 10 日から、インドネシア大学に、JICA 長期専門家として神戸大学特命助教 1 名を常駐させ、HCV の培養と、薬用植物エキスの抗ウイルス活性及び細胞障害活性のスクリーニングの実技指導を開始した。

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)

(平成 21 年度)

なし

(平成 22 年度)

本年度は実質上初年度であったので、予算の範囲内で、同一インドネシア人若手研究者を、時期を隔てて同一年度内に 2 回、JICA 短期研修員として神戸大学に招へいできるよう調整したが、2 度の研修により、抗ウイルス活性スクリーニングの技術移転が非常に効率良く行われた。今後も、状況に応じて、同一年度内に複数回の研修を行う「シャトル型短期研修」を実施できればよいのではないかと考えている。

(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、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事が期待される。

②研究実施方法

(平成 21 年度)

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する。

(平成 22 年度)

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 NS3 の一部をコードする遺伝子領域を PCR 法により増幅し、その DNA 断片を哺乳動物細胞発現ベクターに組み込んだ発現プラスミドをさらに追加して作製する。そして、これらの発現プラスミドを培養細胞に導入し、個々の HCV タンパク質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法により、それぞれの HCV タンパク質が予想通り発現されていることを確認する。

これらの発現プラスミドを用いて 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、まず抗体産生及び細胞性免疫の誘導を指標に抗 HCV 免疫応答を調べる。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(平成 21 年度)

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。

(平成 22 年度)

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、抗体産生及び細胞性免疫の誘導を指標に抗 HCV 免疫応答を調べる予備実験を開始した。これまでに、マウスにインターフェロン γ の産生をより効率良く誘導する非構造タンパク質の領域を同定した。

また、神戸大学において、HCV ゲノムを水痘ワクチンゲノムに挿入するために、先ず水痘ワクチン株ゲノム内において外来遺伝子挿入可能箇所を探索した。その結果、水痘ワクチンゲノム内の ORF2、ORF3 間に外来遺

伝子を挿入してもウイルス増殖能の低下が認められなかったことより、HCV ゲノムを ORF2,3 間に挿入することに決定した。

インドネシア大学に、DNA ワクチン研究基盤として、平成 23 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の購入設置ができるよう、諸手続きを進めている。

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)

(平成 21 年度)

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。

(平成 22 年度)

平成 22 年 10 月 1 日から、インドネシア人若手研究者 2 名を文部科学省国費留学生として招へいし、ワクチン学及びウイルス学の勉学の機会を提供している。(平成 26 年 3 月まで)

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)

(平成 21 年度)

なし

(平成 22 年度)

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

(平成 21 年度)

神戸大学において、プロトタイプとされているこれまでのデングウイルス株分離株のエンベロープタンパク質をコードする遺伝子領域を発現プラスミドに組み込み、DNA ワクチン候補株を作製する。これをマウスに接種し、抗デングウイルス中和抗体誘導能について調べる。

インドネシア大学において、インドネシアで流行しているデングウイルス株を分離し、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とともに、この遺伝子領域の塩基配列を決定する。このための共同研究体制を構築する。

(平成 22 年度)

インドネシア大学において、流行時に採取した患者血液等の臨床検体からデングウイルスの分離を継続して実施する。そして、デングウイルス分離株のエンベロープタンパク質をコードする遺伝子領域のシーケンスを

順次決定する。インドネシア大学においてはウイルス分離のためのBSL2実験室の設置やシーケンス解析等の研究基盤の構築がまだ十分ではないため、本年度に、本プロジェクトのデングウイルス研究専用のBSL2実験室を整備する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(平成21年度)

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。

(平成22年度)

インドネシア大学において、患者血清からデングウイルスのすべての型(1型~4型)を分離し、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した。クローン化された各型のprMシグナルーprM-Eは、哺乳類細胞発現用ベクターであるpcDNA3に組み込み、第1段階のDNAワクチンが構築された。また、デング3型ウイルス遺伝子については、ヒト用ワクチンベクターであるpUMVC4に組み込み、第2段階のDNAワクチンを構築した。また、P2安全キャビネットや高速遠心機などの機器類が3月中に納入されることになっており、研究基盤が改善される予定である。

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)

(平成21年度)

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。

(平成22年度)

本年度上期には、インドネシア大学において、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。また神戸大学から、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。下期では、インドネシア大学におけるクローニング段階で発生した遺伝子操作上の問題点に対して、神戸大学から解決策を伝えた。

平成22年10月25日~12月25日まで2ヶ月間、インドネシア大学医学部講師をJICA研修員として神戸大学に招へいし、DNAワクチンの開発研究に関する実技指導を行った。

平成22年10月1日から、インドネシア人若手研究者1名を文部科学省国費留学生として招へいし、ワクチン学及びウイルス学の勉学の機会を提供している。(平成26年3月まで)

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)

(平成21年度)

なし

(平成22年度)

なし

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 5 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 7 件)
- ③ 論文詳細情報

(平成 21 年度)

(Accepted)

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, 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.

(平成 22 年度)

(In press)

Konishi E, Takizawa Y. Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat*. 2011.

(Accepted)

Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684–690, 2010.

Sasayama M, Deng L, Kim SR, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-Interferon plus ribavirin. *Kobe J Med Sci*. 56(2): E60–66, 2010.

Yu L, Aoki C, Shimizu Y, Shimizu K, Hou W, Yagy F, Wen X, Oshima M, Iwamoto A, Gao B, Lin W, Gao GF, Kitamura Y. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *J Virol Methods* 69: 380–384, 2010.

Kuwahara M, Konishi E. Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol*. 17: 1560–1566, 2010.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 抗 HCV 物質の同定

① 研究者グループリーダー名：堀田 博(神戸大学・教授)

② 研究項目

インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物由来の抗 HCV 物質の同定と作用機序の解析

(2) HCV ワクチンの開発

① 研究者グループリーダー名：森 康子(神戸大学・教授)

② 研究項目

HCV タンパク質発現組換え水痘生ワクチン候補株の作製

(3) デング DNA ワクチンの開発

① 研究者グループリーダー名：小西 英二(神戸大学・准教授)

② 研究項目

デングDNAワクチン候補の作製

以上