

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860343

研究課題名(和文)細胞内膜輸送系を利用したE型肝炎ウイルスの放出機構の解明

研究課題名(英文)Research on mechanism of hepatitis E virus egress utilizing membrane traffic

研究代表者

長嶋 茂雄(NAGASHIMA, Shigeo)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60433116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内でエンドソーム膜を獲得したE型肝炎ウイルス(HEV)の放出機構について、エクソソーム分泌経路の役割を中心に解析した。Small interfering RNAまたは薬剤を用いてエクソソームの形成ならびに放出を阻害した結果、ウイルスの放出が抑制された。電子顕微鏡による解析の結果、感染細胞のmultivesicular body(MVB)内腔に、膜に覆われた直径約50nmのHEV粒子が観察された。以上の結果から、HEVはMVB内腔へと出芽し、成熟ウイルス粒子がエクソソーム分泌経路を利用して細胞外に放出されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the requirement of the exosomal pathway for the release of hepatitis E virus (HEV) virions by using an inhibitor and accelerator of exosome release or small interfering RNAs against Rab27A and Hrs. These studies revealed that the exosomal pathway is required for the release of HEV virions. Electron microscopic observations revealed the presence of membrane-associated virus particles with a diameter of approximately 50 nm within the multivesicular body (MVB), which possessed internal vesicles in infected cells. These findings indicate that membrane-associated HEV particles are released together with internal vesicles (exosomes) through MVBs by the cellular exosomal pathway.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス エクソソーム 多胞体 出芽 放出 エクソソーム分泌経路

1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス(HEV)が感染することによって発症する急性肝炎であり、「人獣共通感染症」として注目を集めている。

一方で、HEVの複製機構に関しては、日本のみならず、海外においても効率の良い感染培養系が確立されておらず、増殖機構の解析は進んでいなかった。我々の研究室ではこれまで、HEVの細胞培養系および感染性cDNAクローンを用いたリバースジェネティクスによる解析方法を確立してきた。これにより、HEVの生活環を多方面から解析することが可能となった。

HEVはへペウイルス科オルソへペウイルス属に分類されている。ゲノムは約7.2kbのプラス1本鎖RNAで、3つのオープンリーディングフレーム(ORF1, ORF2, ORF3)を有している。糞便中に排泄されたHEV粒子は、エンペロープに覆われていない。我々は培養細胞や血清由来のHEV粒子の表面には、細胞由来の膜成分およびORF3蛋白質が存在することを見出した。このことから、HEVはノンエンペロープウイルスでありながら、生体内では2つの異なる粒子形態をとることが明らかとなった。これまでの解析により、膜に覆われたウイルス粒子の形成ならびに放出には、ORF3蛋白質に認められるPSAP配列が重要であること、HEVの放出には多くのエンペロープウイルスで報告されているMVB(multivesicular body; 多胞体)経路が重要であることを明らかにした。また、HEVはMVB sortingの機構を細胞膜上ではなく、エンドソームの膜上で利用し、ウイルス粒子表面の膜成分が、エンドソーム膜に由来することを見出した。しかしながら、細胞内で膜成分を獲得したウイルス粒子がどのような経路を利用して細胞外に放出されるのかについては、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

HEVはノンエンペロープウイルスでありながら、培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分が存在している。これまでの解析により、感染細胞からのHEVの放出にはMVB pathwayが重要であり、粒子表面の膜成分がエンドソーム膜に由来していることが明らかとなっている。さらに、ウイルス粒子の放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが示唆された。

本研究ではHEV粒子の放出におけるエクソソーム分泌経路の役割を、分子生物学的手法ならびに電子顕微鏡を用いた形態学的な解析により検討した。

3. 研究の方法

(1) ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与については、エクソソームの放出を促進する薬剤(bafilomycin A1)または阻害する薬剤(GW4869)を用いてJE03-1760F株(genotype 3)を接種した

PLC/PRF/5細胞を処理し、24時間後の培養上清および細胞内のHEV RNA量をリアルタイムRT-PCR法により測定することにより解析した。用いた薬剤の細胞毒性は、MTS試験により検討した。また、HEV放出におけるRab27AおよびHrsの必要性については、それぞれに対するsiRNAをトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清および細胞内のHEV RNA量を測定し、検討した。

(2) HEV感染細胞におけるウイルス蛋白質(ORF2, ORF3)と宿主蛋白質(Rab27A, Hrs, CD63)の局在は、蛍光抗体法により解析した。検出に必要なORF2およびORF3蛋白質に対する一次抗体は、既報のマウスモノクローナル抗体であるH6225抗体、TA0536抗体をそれぞれ用いた。宿主蛋白質に対する一次抗体は、市販のマウスモノクローナル抗体またはウサギポリクローナル抗体を使用した。

(3) 電子顕微鏡用超薄切片は、HEV感染細胞(PLC/PRF/5細胞、HepG2細胞、A549細胞)を用いて作製した。最初に、2.5%グルタルアルデヒドを用いて前固定を行い、その後、1%四酸化オスミウムで後固定を行った。エタノール希釈系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、60-90 nmの切片を作製した。観察は、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧80 kVで行った。免疫電子顕微鏡法には、試料をLR White樹脂に包埋し、超薄切片を作製後、ORF2蛋白質に対するH6225抗体を反応させた。その後、金コロイド(直径12 nm)標識二次抗体を反応させ、2%酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

(4) 培養上清中に含まれるエクソソームは超遠心法により精製した。HEV感染細胞および非感染細胞を無血清培地で培養し、培養上清を回収した。培養上清から細胞成分を除いた後、100,000 gで70分間遠心を行うことにより、エクソソームを沈殿として回収した。

(5) siRNAによるRab27AおよびHrsのノックダウン効率、精製したエクソソームの抗原性は、ウエスタンブロット法により解析した。検出用の一次抗体として、マウスモノクローナル抗体またはウサギポリクローナル抗体を使用した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの放出を促進または阻害する薬剤がHEVの放出に与える影響の解析

これまでの解析により、MVBのマーカー蛋白質であるCD63とORF3蛋白質は細胞質内で共局在を示すこと、感染細胞内には、培養上清中の粒子と同様の抗原性を示す膜に覆われたウイルス粒子が存在することから、HEVはMVB sortingの機構を細胞膜上ではな

く、エンドソームの膜上で利用し、ウイルス粒子表面の膜成分が、エンドソーム膜に由来していることが明らかとなっている。さらに、HEV 粒子の放出には、初期エンドソームが関与するエンドソーム輸送が重要であり、後期エンドソームの移動は関与していないことが示された。これらの知見から、エンドソーム内腔へと出芽したウイルス粒子は、細胞内の輸送系であるエクソソーム分泌経路を利用して細胞外へと放出されることが考えられた。

そこで、エクソソームの放出に影響を与える薬剤を用いて、ウイルス放出効率への影響を解析した。用いた薬剤は、エクソソームの放出を促進する bafilomycin A1、エクソソームの放出を阻害する GW4869 である。これらの薬剤で HEV 感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA を定量した。解析の結果、bafilomycin A1 で処理した細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は薬剤濃度が高くなるほど増加し、細胞内の HEV RNA 量は、薬剤濃度依存的に減少した(図 1A, B)。一方、GW4869 で処理した細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は、薬剤濃度が高くなるほど減少し、細胞内の HEV RNA は、濃度依存的に増加した(図 1C, D)。また、薬剤の細胞毒性を MTS 試験により検討したが、解析に用いた DMSO および薬剤の濃度では、細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から、エクソソームの放出を促進するとウイルスの放出が促進され、エクソソームの放出を阻害するとウイルスの放出が抑制されることが明らかとなり、ウイルス放出におけるエクソソーム分泌経路の関与が示唆された。

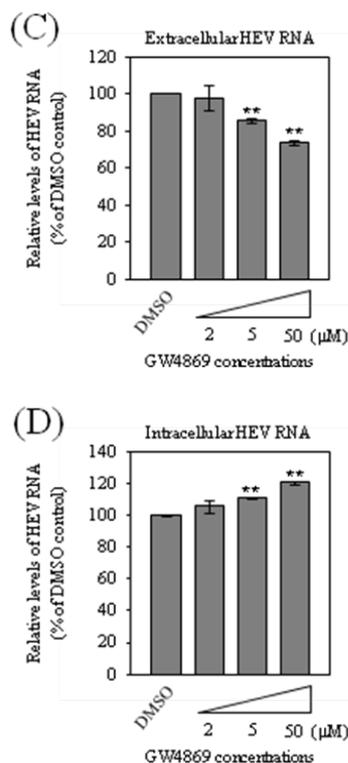
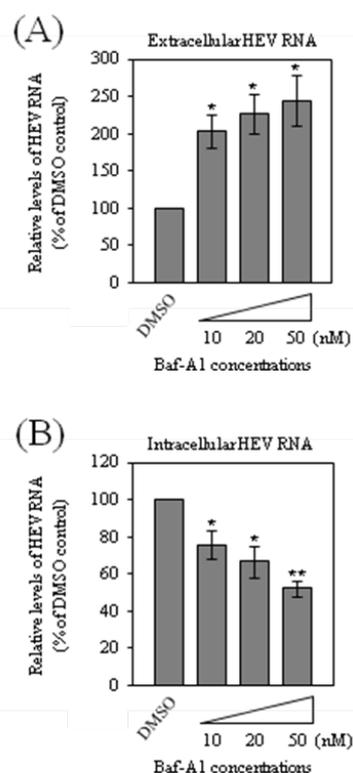


図 1 薬剤処理による HEV 放出効率への影響 (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$)

(2) Rab27A または Hrs に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Rab27A は、MVB と細胞膜との融合の制御(エクソソームの分泌)に関与していることが報告されている。また、Hrs は MVB の形成に必要であることに加え、MVB 内の膜内小胞(エクソソーム)の形成にも関与していることが報告されている。最初に、ORF3 蛋白質と Rab27A または Hrs の細胞内局在を蛍光抗体法により解析した。その結果、ORF3 蛋白質は Rab27A、Hrs と細胞質内で共局在を示すことが明らかとなった。そこで、HEV 放出におけるエクソソームの形成ならびに放出機構の関与を調べるために、siRNA を用いて細胞内の Rab27A または Hrs をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。

Rab27A、Hrs に対する siRNA (siRab27A, siHrs) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。そして、感染 10 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した(図 2)。その結果、Rab27A をノックダウンした細胞では、negative control を 100% とすると、感染 10 日目の培養上清中では 16.1% と放出効率の低下が認められた。同様に、Hrs をノックダウンした細胞においても、11.5% と放出効率の著しい低下が認められた。また、siRab27A, siHrs をトランスフェクトした細胞内の HEV RNA 量を測定した結果、NC siRNA をトランスフェクトした細胞内と同程度であった。このことから、siRNA トランスフェクションによる HEV RNA 複製への影響はないものと考えら

れた。

以上の結果から、エクソソームの形成ならびに放出を阻害すると、HEV の放出が抑制されることが明らかとなった。このことから、HEV の放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが示された。

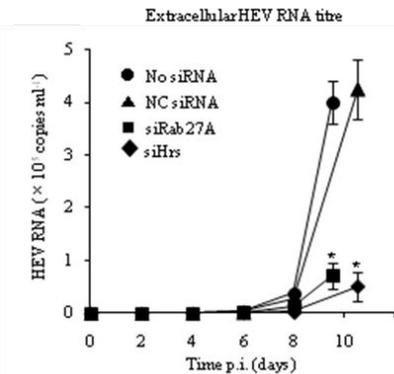


図 2 siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率 (*, $P < 0.001$)

(3) 電子顕微鏡を用いた HEV の膜獲得機序ならびに放出機構の解析

透過型電子顕微鏡を用いた HEV 感染細胞の形態解析

JE03-1760F 株を接種した PLC/PRF/5 細胞、HepG2 細胞および A549 細胞を用いて超薄切片電子染色標本を作製し、透過型顕微鏡による形態学的な解析を行った。PLC/PRF/5 細胞を観察した結果、ウイルス感染細胞の周辺に遊離した状態で存在する HEV 粒子を認めた (図 3A 矢印, B)。それらのウイルス粒子は、直径が約 50 nm の球状粒子で、外膜 (エンベロープ) に包まれ、電子密なコアを包含したヌクレオカプシドを有していた。外膜を除いたウイルス粒子の直径は約 30-35 nm と推測され、これまでに報告されている糞便中の HEV 粒子の大きさとも一致していた。また、HEV 感染 HepG2 細胞および A549 細胞を用いた超薄切片標本においても、細胞外に同様のウイルス粒子が観察された。これらのウイルス粒子においても、その表面に明瞭な膜構造が認められた。一方、対照である非感染細胞では、同様のウイルス粒子は観察されなかった。

次に、HEV 感染 PLC/PRF/5 細胞の内部を観察した結果、細胞質内に多数の小胞を有する MVB が認められた (図 3C)。さらに、その内部には 40-100 nm の大きさの膜内小胞と共に、膜に覆われた HEV 粒子が認められた (図 3C 矢印, D)。これらのウイルス粒子も、エンベロープ様の膜に覆われ、コアを有する球状粒子であり、その大きさは細胞外の HEV 粒子と一致していた。同様に、HepG2 細胞および A549 細胞においても、MVB 内腔に膜内小胞と共存する膜に覆われた HEV 粒子が観察された。一方、対照である非感染細胞では、MVB 内にウイルス様粒子は観察されなかった。さらに詳

細な電子顕微鏡観察を行った結果、膜に覆われていないウイルス粒子がエンドソーム膜から内部に出芽している像が観察された。また、MVB と細胞形質膜が融合している像が観察され、そこから膜内小胞 (エクソソーム) と共に膜に覆われた HEV 粒子が細胞外に放出される像が観察された。

これまでの解析により、HEV 感染細胞内には膜に覆われた粒子 (比重 1.16 g/ml) と膜に覆われていない粒子 (比重 1.27 g/ml) の 2 種類が存在していることが明らかとなっている。そこで、電子顕微鏡を用いて、膜に覆われていない HEV 粒子の同定を試みた。その結果、PLC/PRF/5 細胞の MVB 周辺に、コアを包含したヌクレオカプシドが認められた。その直径は、約 40 nm であり、粒子表面に膜構造は認められなかった。この粒子は、MVB に出芽する前のウイルス粒子であることが推測された。

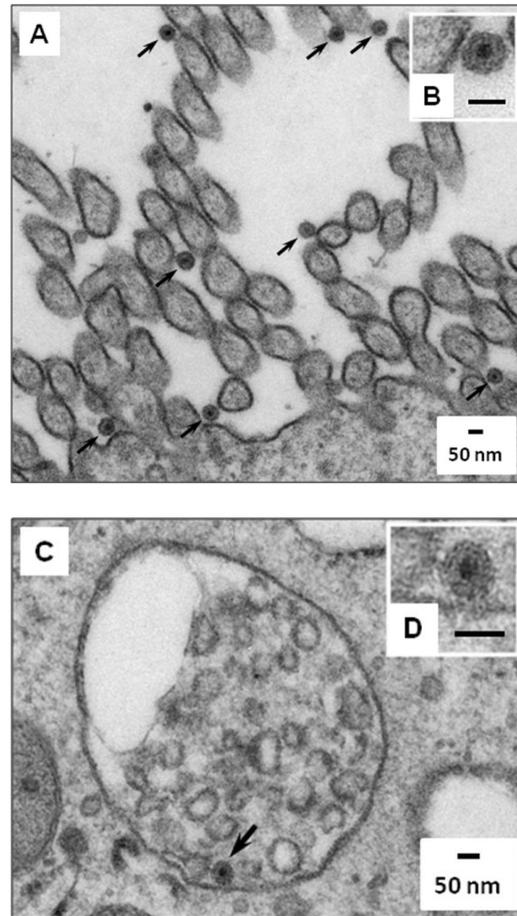


図 3 HEV 感染細胞の超薄切片電子染色像

免疫電子顕微鏡法ならびに蛍光抗体法による HEV 粒子の検出

電子顕微鏡による形態学的な解析により、MVB 内腔に膜に覆われた HEV 粒子が観察された。そこで、HEV の ORF2 蛋白質に対する H6225 抗体を用いて、免疫電子顕微鏡法によるウイルス粒子の同定を試みた。その結果、MVB 内腔に存在するウイルス様粒子に金コロイド

の結合が認められた(図4, 矢印) しながら、金コロイドの集簇は観察されなかった。これは、固定に起因する抗原性の減弱によるものと考えられた。

そこで、蛍光抗体法によりウイルス蛋白質 ORF2, ORF3, MVB のマーカー蛋白質である CD63 の細胞内局在を解析した。その結果、これらの蛋白質は細胞質内で共局在を示し、小胞状のシグナルが観察された(図5)。

電子顕微鏡による形態解析ならびに免疫電子顕微鏡法による解析の結果、培養細胞から放出された HEV 粒子は外膜(エンベロープ)に覆われていることが、形態学的に初めて証明された。また、同様の形態をとるウイルス粒子が MVB 内に存在することが明らかとなった。一方、細胞質には膜に覆われたウイルス粒子は存在せず、膜に覆われていないヌcleoカプシドが観察されたことから、粒子表面の膜成分は、HEV が MVB pathway を利用して MVB 内腔に出芽することにより獲得するエンドソーム膜であることが示された。さらに、HEV 粒子はエクソソームと共に、MVB 内に存在することから、ウイルス放出にはエクソソーム分泌経路が関与していることが明らかとなった。

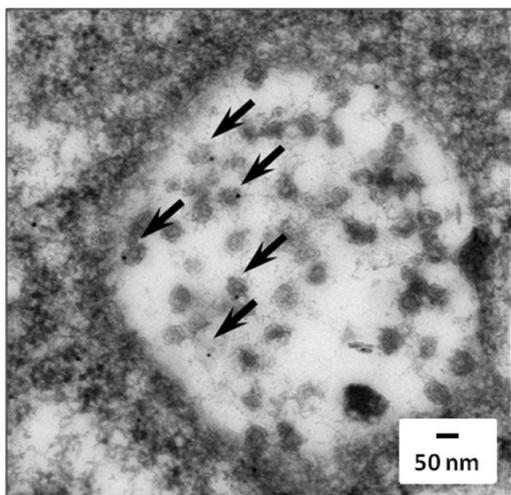


図4 ORF2蛋白質に対する金コロイド標識抗体を用いたLR White樹脂包埋切片の免疫電子顕微鏡像

(4) HEV 感染細胞に由来するエクソソームの性状解析

膜に覆われた HEV 粒子とエクソソームの関連を明らかにするために、HEV 感染細胞および非感染細胞に由来するエクソソームを超速心法により精製し、その性状を解析した。超速心法によりエクソソームが精製されたことをウエスタンブロット法により確認した結果、エクソソームのマーカー蛋白質である CD81 が HEV 感染細胞および非感染細胞の両方で検出された。さらに、HEV 感染細胞から精製したエクソソームには、ウイルスの ORF2 および ORF3 蛋白質が存在していること

が明らかとなった。そこで、感染細胞に由来するエクソソームを新たな PLC/PRF/5 細胞に接種した結果、細胞内においてウイルス蛋白質の発現が認められ、培養上清中に HEV 粒子が産生された。

以上の結果から、感染細胞から放出された膜に覆われた HEV 粒子は、エクソソーム分画に精製され、エクソソームと類似の性状を有することが示唆された。

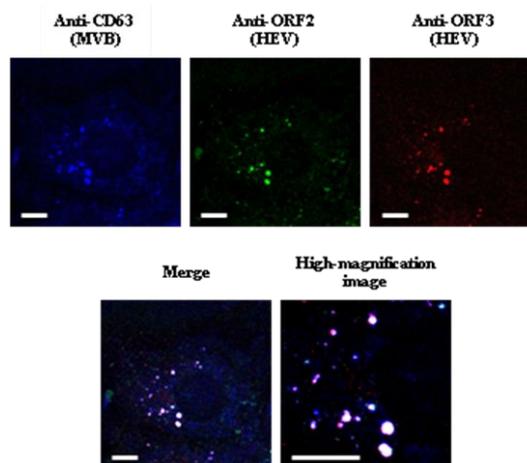


図5 HEV 感染細胞におけるウイルス蛋白質(ORF2, ORF3)と CD63 の局在

HEV はノンエンベロープウイルスであるため、糞便中のウイルス粒子は膜に覆われていない。しかしながら、血清中ならびに培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在している。これらの知見は、ウイルス粒子の比重ならびに粒子表面の抗原性の解析から得られた結果である。本研究では、電子顕微鏡を用いることにより、膜に覆われた HEV 粒子を形態学的に初めて証明することができた。これらのウイルス粒子は形態が異なるものの、ともに培養細胞への感染性を有することから、細胞への吸着に關与するレセプターならびに侵入経路の違いが考えられ、その説明は HEV の生活環を理解するうえで今後の課題として重要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 95:2166-2175, 2014. (査読有)
DOI: 10.1099/vir.0.066910-0

Jirintai S, Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo JB, Takahashi M, Kobayashi T, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto

H. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185:92-102, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.virusres.2014.03.002

Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* 180:59-69, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.014

Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res.* 179:102-112, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.virusres.2013.10.029

Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol.* 159:979-991, 2014. (査読有)
DOI: 10.1007/s00705-013-1912-3

Okano H, Takahashi M, Isono Y, Tanaka H, Nakano T, Oya Y, Sugimoto K, Ito K, Ohmori S, Maegawa T, Kobayashi M, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan. *Hepatol Res.* 44:E63-E76, 2014. (査読有)
DOI: 10.1111/hepr.12216

Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S, Takahashi M, Arai M, Okamoto H. High genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol Res.* 44:694-699, 2014. (査読有)

DOI: 10.1111/hepr.12155

〔学会発表〕(計3件)

長嶋茂雄. E型肝炎ウイルスの細胞侵入・放出機構の解明. *Liver Forum in Kyoto* 第17回学術集会. 2015年3月28日, 京都ホテルオークラ(京都府京都市).

長嶋茂雄, 吉林台, 小林富成, 唐吉思, 高橋雅春, 西澤勉, 岡本宏明. E型肝炎ウイルスの細胞侵入機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

長嶋茂雄, 高橋雅春, 吉林台, 小林富成, 西澤勉, 岡本宏明. 細胞内膜輸送系を利用したE型肝炎ウイルスの放出機構の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).

〔その他〕

ホームページ等

自治医科大学 医学部 感染・免疫学講座
ウイルス学部門

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長嶋茂雄 (NAGASHIMA, Shigeo)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60433116

(2) 研究協力者

岡本宏明 (OKAMOTO, Hiroaki)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30177092

高橋雅春 (TAKAHASHI, Masaharu)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70326841

西澤勉 (NISHIZAWA, Tsutomu)
自治医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 30306112

小林富成 (KOBAYASHI, Tominari)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00634164

屋代隆 (YASHIRO, Takashi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80119859

幸喜富 (KOUKI, Tom)
自治医科大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 70350436