

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18779

研究課題名(和文)非霊長類ヘパシウイルスの遺伝的多様性と宿主特異性の解明

研究課題名(英文)Analysis of genetic diversity and host-specificity of non-primate hepacivirus

研究代表者

田中 智久(TANAKA, Tomohisa)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：30585310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非霊長類ヘパシウイルス(NPHV)はC型肝炎ウイルス(HCV)と共通の祖先ウイルスから派生したと考えられており、HCVの起源や病原性、宿主特異性などを解明する上で重要なウイルスモデルとなるが、NPHVに関する疫学情報やウイルス学的知見はいまだ乏しい。本研究課題では、本国固有の哺乳類動物に分布するNPHVの遺伝的背景を明らかにすることを目的とし、幾つかの動物よりNPHVを分離した。また、HCV近縁種であるウマヘパシウイルスの5' UTRが有するIRES依存性翻訳開始活性の詳細や、miR-122非依存性ゲノム複製の亢進機能について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Non-primate hepacivirus (NPHV) is thought to share the ancestor with hepatitis C virus (HCV), which is an important viral model for elucidating the origin, pathogenicity or host-tropism of HCV. However, the epidemiological or virological evidence is still poor. In this study, we isolated NPHV from some endemic species in Japan and phylogenetically analyzed them in order to elucidate the genetic diversity of NPHV. Moreover, we investigated the mechanisms of equine hepacivirus (EHcV) 5' UTR in IRES-dependent translation initiation and the association of EHcV 5' UTR with miR-122-independent viral replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヘパシウイルス 翻訳 ゲノム複製 多様性

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎の原因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)やその近縁種のGBウイルス-B(GBV-B)は、フラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、プラス鎖一本鎖のゲノムRNAとエンベロープを有するウイルスである。HCVは宿主特異性が極めて高く、人以外からは分離されないのみでなく、霊長類動物以外の動物には実験的感染も成立しない。このようなウイルスが自然界でどのように誕生し、進化してきたのかはこれまで不明であったが、近年、HCVと近縁なヘパシウイルス属ウイルスが、ウマ、ウシ、イヌ、コウモリ、げっ歯類動物などから見つかった(1-3)。これらのヘパシウイルス属ウイルスは、非霊長類ヘパシウイルス(non-primate hepacivirus; NPHV)と総称されている。NPHVのうち、ウマやイヌなどから分離されるウマヘパシウイルス(equine hepacivirus; EHcV)は、ウイルスゲノムRNAの塩基配列の比較解析より、HCVと極めて近縁な関係にあり、1000~1500年前に共通の祖先ウイルスから派生したウイルスと考えられている。しかしながら、EHcVを含むNPHVの疫学的・ウイルス学的情報は乏しく、感染経路や宿主への病原性、人獣共通感染症としてのリスクが不明なため、畜産産業・公衆衛生上の懸念材料の一つと考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、(1)NPHVの疫学調査を通じ、NPHVの遺伝的多様性を明らかにすること、(2)NPHVの遺伝子発現機構やウイルス侵入のメカニズムを解明することにより、その宿主特異性を明らかにし、人獣共通感染症としてのリスクを評価することである。本課題の目的を達成するため、以下の具体的な目標を設定した。

- (1) 疫学調査によるNPHVの遺伝的多様性の調査
- (2) NPHVの翻訳活性やゲノム複製機構の解析による宿主特異性の評価
- (3) 人臨床検体におけるNPHV感染のスクリーニングによる人獣共通感染症としてのリスク評価

3. 研究の方法

- (1) 疫学調査によるNPHVの遺伝的多様性の調査

HCVは多様性に富んだウイルスで、少なくとも11個の遺伝子型が存在する。これまで、ヨーロッパやアフリカで分離されたげっ歯類由来ヘパシウイルスには、HCVと同じような遺伝的多様性が見られる一方(2)、日本、米国、ヨーロッパ諸国の軽種馬から同定され

たウマヘパシウイルス(EHcV)は、いずれも相同性が高く(アミノ酸配列で95%一致)、遺伝子型などの多様性が乏しくみえる(1、3)。この理由として、軽種馬は繁殖馬の輸出入が盛んであるため、輸入馬由来の単一のEHcVが優勢となり、本来のEHcVの遺伝的多様性が評価できていない可能性がある。本課題では、わが国が比較的、地理的に閉鎖された島国であるという特性を生かし、日本在来馬などのような固有種におけるEHcV感染の有無、およびEHcVの遺伝的多様性、病原性について解析した。日本固有の動物の血清や肝臓組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法によりNPHVゲノムの検出を行った。また、我々が過去に開発したウェスタンブロット法による血清抗EHcV抗体のスクリーニング検査法を用い(3)、日本在来馬のEHcV感染歴を調べた。

- (2) NPHVの翻訳活性やゲノム複製機構の解析による宿主特異性の評価

プラス鎖RNAをゲノムとするウイルスでは、宿主細胞内に放出されたウイルスゲノムからのウイルス蛋白質の発現が感染維持に必須である。HCVゲノムRNAはinternal ribosome entry site(IRES)を介したキャップ非依存性の翻訳開始機構によりウイルス蛋白質の合成を行うことが知られているが、HCV近縁種であるEHcVの遺伝子発現機構の詳細は不明な点が多い。本研究課題では、EHcVのIRES依存性翻訳開始機構の特徴を明らかにするため、HCVやEHcVの5'非翻訳領域(UTR)を持つレポータープラスミドを作製し、両ウイルスのIRES活性の特徴を調べた。また、各IRESの欠損変異体や、部分キメラIRESを作製し、HCV-EHcV間のIRESドメインの機能的相同性を調べた。

HCVの5'UTRは、ウイルスゲノム複製においても必須の役割を持つ。また、HCV5'UTRは、肝臓特異的microRNA(miR-122)と相互作用することで、ゲノムRNAの安定化などを促し、HCVゲノム複製を大きく亢進させる。このHCVゲノムRNAとmiR-122の相互作用は、HCVの肝臓指向性を規定する重要な要因のひとつとして知られている。EHcVは、培養細胞を用いた感染実験系やレプリコンシステムがまだ確立されておらず、EHcVのゲノム複製メカニズムはほとんど解析されていない。本課題では、EHcV5'UTRのゲノム複製における役割を解明するため、EHcVの5'UTR配列を持つHCV-EHcVキメラレプリコンを作製し、そのゲノム複製メカニズムを解析した。

- (3) 人臨床検体におけるNPHV感染のスクリーニングによる人獣共通感染症としてのリスク評価

NPHVの人への感染リスクや病原性は不明であり、人獣共通感染症としてのリスクの解明が重要であると考えられる。そこで、本課題

では、人の肝臓生検サンプルより RNA を抽出し、RT-PCR 法により NPHV 遺伝子の検出を行った。また、人血清サンプルを用い、ウェスタンブロット法による抗 NPHV 抗体検出を行い、NPHV 感染歴の有無を調査した。

4. 研究成果

(1) 疫学調査による NPHV の遺伝的多様性の調査

日本在来馬など、日本固有の哺乳類動物の血清サンプルを用い、NPHV 感染の疫学調査を行った。ウェスタンブロット法により、抗 NPHV 抗体の有無を調べたところ、複数の日本在来馬が抗 NPHV 抗体を保有していることが分かった。対州馬など、離島で飼育されている日本在来馬は、サラブレッドなどの軽種馬と地

理的に隔離されていると考えられる。NPHV の感染伝播経路はまだ特定されておらず、今後、NPHV のウイルス学的特性を解明する上で重要な知見となると考えられる。現在、日本在来馬や日本固有の哺乳類動物より得られた NPHV のシーケンス解析を行い、それら NPHV の遺伝的特性を詳細に解析している。

(2) NPHV の翻訳活性やゲノム複製機構の解析による宿主特異性の評価

EHcV の 5' UTR 配列の二次構造を予測解析した。EHcV の 5' UTR は、5' 末端の巨大なステムループ構造 (ドメイン I)、HCV のドメイン I、II、III とそれぞれ相同なドメイン I'、II、III から構成されることが分かった (図 1A)。HCV 5' UTR でみられるドメイン IV は EHcV 5' UTR には認められなかった。

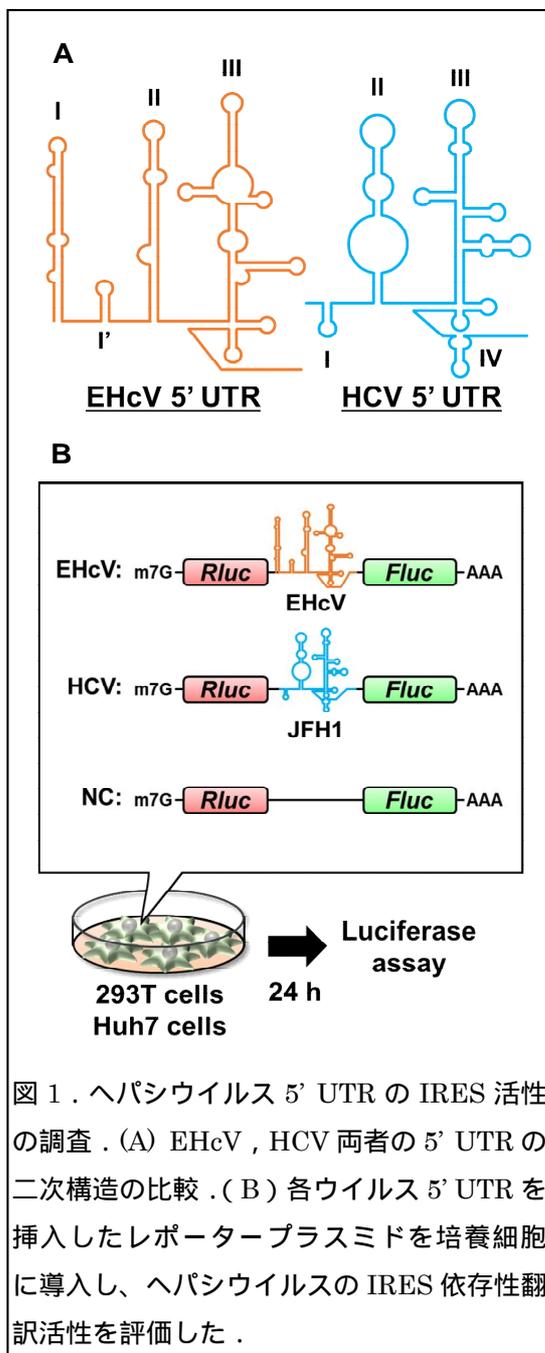


図 1. ヘパシウイルス 5' UTR の IRES 活性の調査。(A) EHcV, HCV 両者の 5' UTR の二次構造の比較。(B) 各ウイルス 5' UTR を挿入したレポータープラスミドを培養細胞に導入し、ヘパシウイルスの IRES 依存性翻訳活性を評価した。

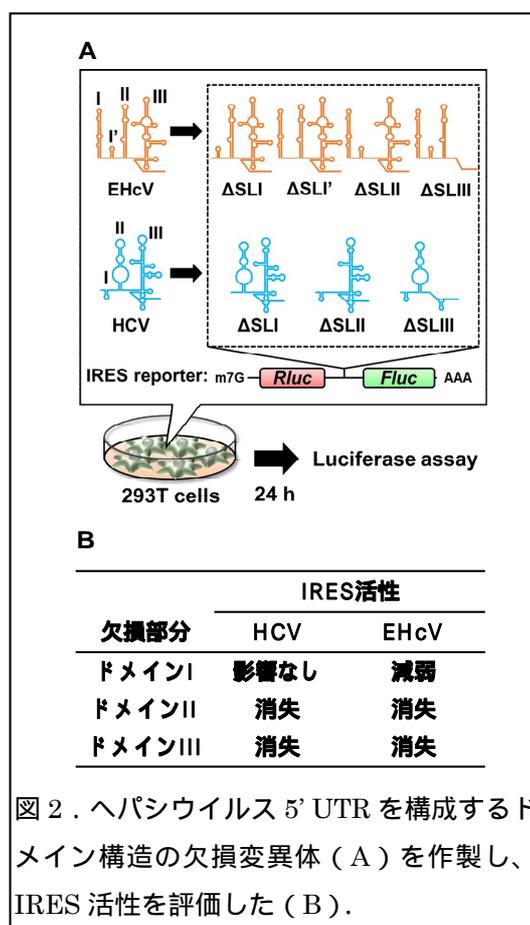


図 2. ヘパシウイルス 5' UTR を構成するドメイン構造の欠損変異体 (A) を作製し、IRES 活性を評価した (B)。

これらヘパシウイルス 5' UTR の IRES 活性を調べるため、各ウイルス 5' UTR 配列を有するレポータープラスミドを哺乳類動物由来の培養細胞に導入し、レポーター遺伝子の発現レベルを評価した (図 1B)。これらヘパシウイルスの 5' UTR は、使用したすべての細胞株で IRES 活性を示したが、EHcV の IRES 活性は HCV よりも有意に低いことが示唆された。また、ヘパシウイルス 5' UTR を構成するドメイン構造の欠損変異体を作製し、IRES 活性におけるドメイン構造の役割を調べた。両ヘパシウイルスにおいてドメイン II、III は IRES 活性に必須であり、EHcV

のドメイン I は HCV と異なり、IRES 活性に部分的に関与していることが示唆された (図 2)。また、これらへパシウイルスのドメイン構造を相互に置換した変異体を作製し、IRES 活性を評価した (図 3 A)。その結果、IRES 活性に必須の構造であるドメイン II、III は、HCV と EHcV 間でどのように組み合わせても IRES 活性を発揮できることが分かり、IRES 活性におけるこれらドメイン構造の機能は、へパシウイルス間で高度に保存されていることが示唆された (図 3 B)。また、EHcV ドメイン III を持つ変異体は、野生型の EHcV IRES と同程度の IRES 活性を示し、HCV ドメイン III を持つ変異体は、野生型の HCV IRES と同程度の IRES 活性を示すことが分かった (図 3 B)。これらのことから、図 1 でみられたへパシウイルス間の IRES 活性の強弱は、ドメイン III に依存することが示唆された。

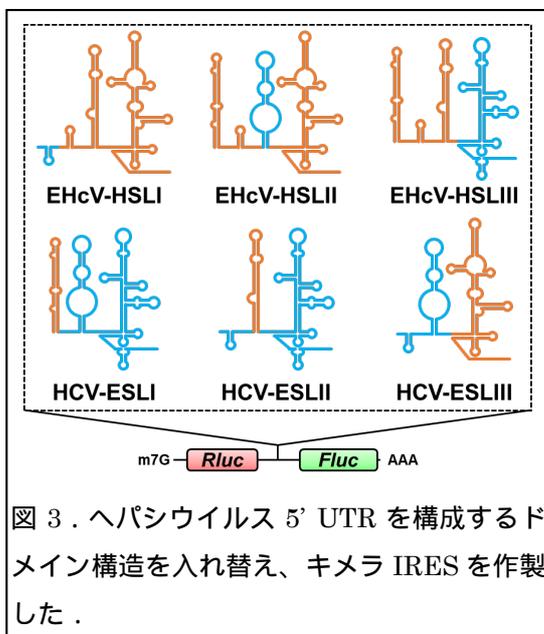


図 3. へパシウイルス 5' UTR を構成するドメイン構造を入れ替え、キメラ IRES を作製した。

次に、ウイルスゲノム複製における EHcV 5' UTR の役割を調べるため、HCV サブゲノムレプリコンの 5' UTR 配列を EHcV 5' UTR 由来配列に置換し、HCV - EHcV キメラレプリコンを作製した (図 4 A)。これらレプリコン RNA を用いてコロニー形成試験を行ったところ、EHcV 5' UTR の全長またはドメイン II をもつキメラレプリコンでは、コロニー形成能が消失した (図 4 B)。一方、EHcV のドメイン I、III をもつキメラレプリコンではコロニー形成が認められた (図 4 B)。コロニー数を計測したところ、EHcV ドメイン I を持つキメラレプリコンでは、コロニー形成効率が 10 倍以上に増加していることが分かった。これらのことから、ウイルスゲノム複製において、HCV ドメイン II、EHcV ドメイン I には、それぞれ何らかの特有の機能があること、ドメイン III の機能はへパシウイルス間で保存されていることが示唆された。

次に、EHcV ドメイン I の機能を調べるため、EHcV ドメイン I やその直後の配列を組

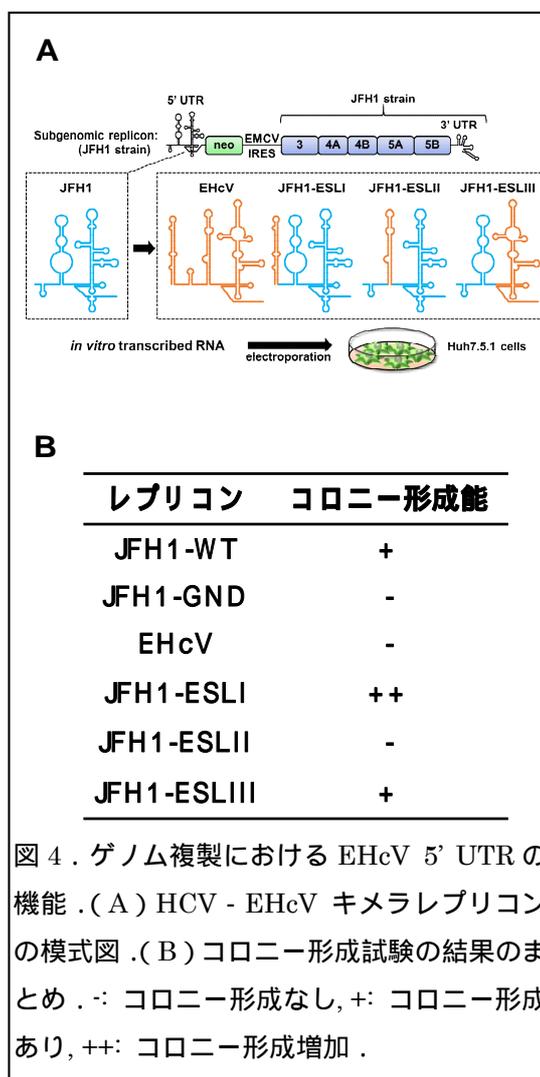
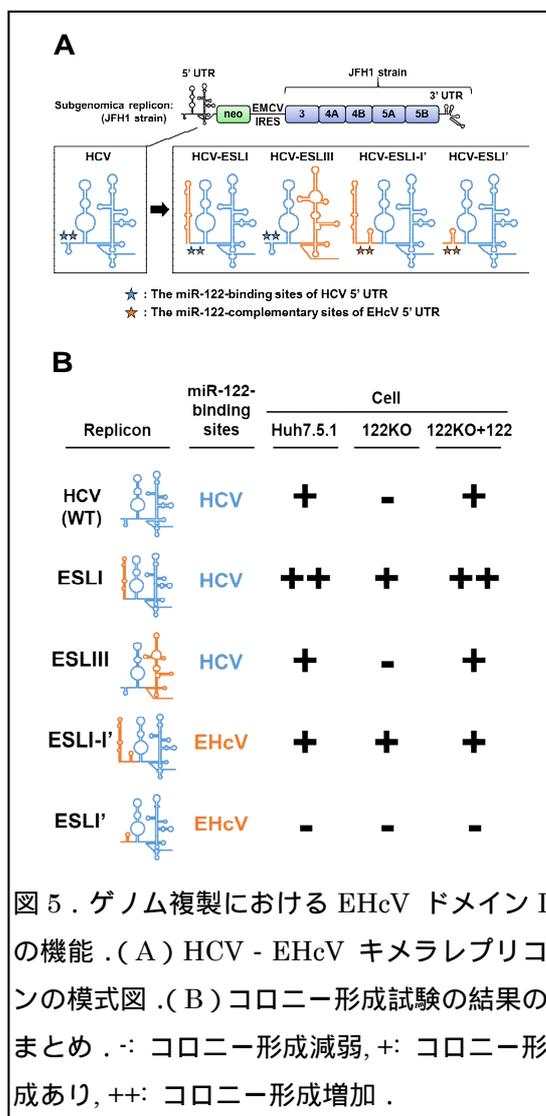


図 4. ゲノム複製における EHcV 5' UTR の機能。(A) HCV - EHcV キメラレプリコンの模式図。(B) コロニー形成試験の結果のまとめ。-: コロニー形成なし, +: コロニー形成あり, ++: コロニー形成増加。

換えた HCV - EHcV キメラレプリコンを作製した。これらレプリコン RNA を miR-122 ノックアウト Huh7 細胞 (Huh-122KO) およびその発現回復細胞 (Huh-122KOR) に導入し、コロニー形成試験を行った (図 5 A)。野生型 HCV レプリコンと、HCV 由来の miR-122 結合配列を持つ EHcV ドメイン I、ドメイン III のキメラレプリコンは miR-122 非存在下でコロニー数が減少したが、EHcV ドメイン I と EHcV 由来の miR-122 結合配列を持つキメラレプリコンは miR-122 存在下 / 非存在下で同レベルのコロニーを形成した (図 5 B)。これらのことから、EHcV ドメイン I によるコロニー形成効率の亢進は、miR-122 非依存的であることが示唆された。また、EHcV の miR-122 結合配列は、HCV の miR-122 結合配列と違い、ウイルスゲノム複製効率に寄与しないことが示唆された。RNA decay アッセイの結果、EHcV ドメイン I を持つレポーター RNA は、Huh-122KO 細胞内で安定性が更新していることが分かった。これらの結果から、EHcV ドメイン I は、miR-122 非依存的に RNA の安定化を亢進させることで、miR-122 非依存的なゲノム複製効率を上げることが示唆された。この EHcV ドメイン I の機能により、EHcV は miR-122

が存在しない非肝臓組織においてもウイルスゲノム複製を行うことができると考えられた。



(3) 人臨床検体における NPHV 感染のスクリーニング

RT-PCR 法によりヒト検体中の EHcV ゲノムを、ウェスタンブロット法により抗 EHcV 抗体をスクリーニングしたが、いずれも陰性となった。本課題では検体数が少なかったため、この結果のみで人獣共通感染症としてのリスクを評価することは難しいと思われる。ただ、近年報告があった大動物獣医師の血清を用いた疫学調査の結果においても、EHcV 感染歴が疑われる検体が認められなかったことを考慮すると(4)、少なくとも EHcV の人獣共通感染症としての脅威は今のところ低いと考えられる。しかしながら、NPHV の遺伝的多様性はまだ完全には解明されておらず、今後、EHcV 以外の NPHV の感染スクリーニング法を確立し、リスク評価を広げていくことが必要と考えられた。

引用文献

- Kapoor A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 2011.
DOI: 10.1073/pnas.1101794108.
- Burbelo PD, J. Virol., 86, 2012.
DOI: 10.1128/JVI.00250-12.
- Tanaka T, J. Virol., 88, 2014.
DOI: 10.1128/JVI.02280-14.
- Pfaender S, J. Gen. Virol., 96, 2015.
DOI: 10.1099/vir.0.000208.

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2件)

Tanaka T, Otoguro T, Yamashita A, Kasai H, Fukuhara T, Matsuura Y, Moriishi K. J. Virol., 92, 2018. 査読有。
DOI: 10.1128/JVI.01997-17.

Hayashi S, Tanaka T, Moriishi K, Hirayama K, Yamada A, Hotta K.J. Vet. Med. Sci., 80, 2018. 査読有。
DOI: 10.1292/jvms.17-0527.

[学会発表](計7件)

田中智久. 第6回肝炎ウイルス研修会. 東京. 2018. 口頭

Tanaka T, Otoguro T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 第65回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2017. 口頭.

Tanaka T, Otoguro T, Yamashita A, Kasai H, Moriishi K. 23rd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses. Kyoto, Japan. 2016. ポスター.

Tanaka T, Otoguro T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 福岡. 2016. 口頭.

田中智久. 第4回肝炎ウイルス研修会. 東京. 2016. 口頭

Tanaka T, Chen W, Otoguro T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡. 2015. ポスター.

Tanaka T, Otoguro T, Yamashita A, Kasai H, Moriishi K. 22nd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses. Strasbourg, France. 2015. ポスター.

[その他]

ホームページ等

https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/microbio/Microbiology_Yamanashi_Uni_Japanese/Our_study.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 智久 (TANAKA, Tomohisa)

山梨大学・総合研究部・特任助教

研究者番号：30585310