

平成 31 年 5 月 6 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08260

研究課題名(和文) 宿主受容体選択性を巡るウイルス-宿主攻防メカニズム

研究課題名(英文) Struggle between host defense and viral escape mechanisms

研究代表者

深澤 征義 (Fukasawa, Masayoshi)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：20291130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)の各種受容体欠損細胞株、抗HCV受容体抗体、高感染HCV適応変異株など、HCV感染培養細胞系の解析に適した多数の独自のツールをこれまで開発してきた。これらを用いることで、HCV受容体依存性の変化したHCV-JFH1亜株が分離できることがわかった。この亜株の中には、受容体として新たな分子を利用できるようになっている株もあることも明らかになってきた。さらに、このウイルス表現系の変化には、非常に少ないウイルス遺伝子変化(1アミノ酸変異)で十分であることもわかってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定のC型肝炎ウイルス(HCV)受容体に非依存性を獲得したHCV変異亜株が(比較的簡便に)分離されることを示し、そのメカニズムの一端を明らかにした。以上の成果は、宿主-ウイルス間の攻防の分子基盤の進化を考える上で、学術的意義は大きいと考えている。また、受容体の選択性が変わることによって、肝臓以外に感染する能力を獲得しうることから、依然として不明の点の多い、HCVによる肝外病変の発症メカニズムを考えるヒントとなる可能性があり、医学的な見地からも意義があるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We have developed many kinds of useful tools for analyzing hepatitis C virus (HCV) entry mechanisms, such as viral receptor-defective cell lines, anti-viral receptor monoclonal antibodies, and highly infectious HCV strains. In this project, using these tools, we isolated HCV-JFH1 sub-strains having different host receptor-dependency. We also showed that one isolated sub-strain uses new host molecule as its entry receptor. It seemed that these phenotypes of sub-strains can be acquired by only one amino acid mutation.

研究分野：生物系薬学

キーワード：C型肝炎ウイルス 受容体 宿主細胞 モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスと宿主の関係は、相互の生存戦略の最大化を盾に対峙し、ある面で均衡を保ちながら、清濁併せ飲む形で様々な進化を遂げて現在に至っている。まさに生命存続の攻防が表出する最先端の場がそこにある。即ち、生物の機能メカニズムを分子進化的側面から理解する上で宿主-ウイルス感染系は大変興味深いモデルである。例えば、ウイルスの侵入過程に目を向けてみると、1) 単純ヘルペスウイルスのように複数の異なる宿主因子を同時並行的に用いて細胞へ侵入することで、様々な臓器に感染出来るようになっている場合や、2) C 型肝炎ウイルス(HCV)のように宿主の複数の因子が一連の過程で侵入に必要であり、感染標的臓器が大きく制限(肝臓特異的感染)されている場合などが存在する。前者はウイルス側の変異(進化)が少なくとも侵入過程においては感染標的の多様性獲得にうまく実を結んだとも解釈できるだろう。後者はウイルスが多様に変異したとしても、複数の宿主因子が(多段階で)ウイルス侵入に必要であることで、新たな侵入経路の獲得は非常に難しく、ウイルス感染に対して宿主の防御(耐性)機構が発揮されていると解釈できるかも知れない。

(2) 本研究を着想した背景は、平成 27 年度終了課題である基盤研究(C)「宿主変異株を用いた C 型肝炎ウイルスライフサイクルに関与する宿主因子の研究」および日本医療研究開発機構(AMED)委託研究開発費(創薬基盤推進事業)「Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発」の研究を通じて、各種 HCV 受容体の欠損細胞株、抗 HCV 受容体抗体、高感染 HCV 適応変異株など、多数の独自のツールが得られつつあったことが元になっている。このように研究代表者はこれまで遺伝学的な手法や生化学的手法を用いてウイルスの生活環を分子レベルで解析してきており、特に侵入過程の解析ツールが充実してきたことから、さらに広範な受容体分子に対して詳細な解析を行い、総合的に HCV 受容体の依存性・選択性の分子基盤を理解したいと考えるに至った。受容体依存性が変化する事に触れた関連研究は“Zhu et al., JID, 205, 656, 2012”; “Haid et al., Hepatology, 59, 24, 2014” など、ごくわずかのみであった。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、宿主から侵入に大きな制限を受けている(侵入過程におけるウイルス-宿主双方の進化が進んでいると考えている)HCV を例に、HCV の侵入メカニズムの特異性(の変化)を各種感染受容体に注目し解析することで、宿主-ウイルス間の攻防の分子基盤を進化的側面から考察することを目指す。さらに、本研究を通じて、これまで不明であったウイルス感染による肝外表現系(病原性など)を解釈する新たな糸口も見出したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) HCV 受容体欠損宿主細胞株の樹立

HCV には、CD81、Claudin-1、Occludin 等、複数の侵入に関わる宿主因子(受容体)が一連の過程で関わっていることが知られている。これまでに、ヒト肝由来 Huh7.5.1 細胞より CD81 欠損株(Shirasago et al., JID, 2015)、Claudin-1 欠損株(Fukasawa et al., J. Virol., 2015)をすでに樹立しており、これら細胞を用いて、肝細胞への HCV 感染にこれら受容体が必須であることを示している。そこで、他の受容体分子について、ゲノム編集(CRISPR/Cas9 系)技術を用いて受容体欠損細胞株を各種細胞より樹立することを試みた。

(2) 受容体依存性・選択性の変化した HCV 変異株の取得

これまでに、Huh7.5.1 細胞に対する高感染性 HCV 適応変異株 HCV-JFH1-tau (HCV-JFH1 株由来、従来約 700 倍の感染能)の分離を行い、独自に確立した HCV 許容性の高い宿主細胞株(Huh7.5.1-8 細胞)と組み合わせた効率的な HCV 産生系を確立している(Shirasago et al., JID, 2015 及び成果論文)。そこで、この感染培養系を用い、宿主受容体依存性・選択性の変化した HCV 株を広範に分離することを試みた。

まず、遺伝的多様性を示す HCV プールを確保するため、高感染性 HCV-JFH1-tau 株を低 MOI で Huh7.5.1-8 細胞に感染させ大量の HCV 感染源を調製した(10^{11} コピー/ml が可能)。これまでに樹立した CD81 欠損細胞株や Claudin-1 欠損細胞株、および(1)で樹立した HCV 受容体欠損細胞株に対して、この HCV プールを繰り返し感染させ、増殖してくる HCV 変異株の分離を試みた。

(3) 受容体依存性・選択性の変化した HCV 変異株の性状解析

(2)で得られた HCV 変異株についての性状解析を適宜進めた。まず、本当に各 HCV 受容体依存性が消失・変化したのかを、各 HCV 受容体に対する siRNAs 及び抗体(インタクトの細胞外領域を認識)を用いて検証した。抗 Claudin-1 抗体、抗 Occludin 抗体については独自の優れた感染阻害抗体をすでに樹立している。

次に、HCV 変異株の構造タンパク質領域のアミノ酸配列を決定し、HCV-JFH1-tau 株(親株)と比較する。各変異部位について、アミノ酸変異導入ウイルスを作成し、各受容体欠損細胞株への感染を指標にその重要性を検証した。ここで、ウイルスゲノムに変異を導入すると大石確

認組換え DNA 実験となり、承認に時間がかかる。そこで、HCV-JFH1 株を感染した Huh7.5.1-8 細胞に、変異を導入した構造タンパク質のみを発現プラスミドで供給し、ハイブリッドウイルスを一過的に作製する方法、あるいは汎用される HCV 偽ウイルス(pseudo-particles、HCVpp)を用いる方法を確立し適用することを考えた。

得られた HCV 変異株が、特定の HCV 受容体への依存性を失ったのか、又は依存性を持ちつつ新たな受容体利用能を獲得したのかについても検討した。新たな受容体が予想されたため、同定を試みた。方法は、HCV 受容体非発現細胞(非肝細胞)に各受容体遺伝子セットを発現させ、HCVpp 感染能を検討する。新規受容体の検索は、当該受容体に相同性を有する分子をまず試み、該当がない場合には Huh7.5.1 細胞由来 cDNA ライブラリを導入して発現クローニングを行う方法を考えた。

(4) 新規 HCV 受容体を介する感染機構の解析および新規受容体発現細胞における HCV 感染の検討

新規 HCV 受容体が同定されたため、新規受容体を介した感染メカニズムについて解析した。また、新規受容体の発現臓器(細胞)を文献情報や RT-PCR 法により確認した。新規受容体発現培養細胞を用いて、HCV の感染感受性を検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子ノックアウトを効率的に行える CRISPR/Cas9 変法を考案し、ノックアウト細胞の効率的な分離スクリーニング系も確立した。本方法を用い、複数の Occludin ノックアウト細胞株を樹立した。(成果論文)

(2) 高感染性 HCV 適応変異株 HCV-JFH1-tau (K74T, I414T の変異を持つ) の解析から、HCV-JFH1-tau は HCV 侵入に重要である SRBI に対して非依存性を示すことをすでに明らかにしており、詳細な解析から、K74T, I414T 双方の変異が、それぞれ SRBI に対する非依存性獲得に関わっているメカニズムがわかってきた。

(3) 受容体依存性・選択性の変化した HCV 変異株の取得のスクリーニングを進めた結果、Claudin-1 欠損細胞株に対して Huh7.5.1 細胞(親株)と同レベルで感染できる HCV 変異株が分離できることがわかってきた。一方で、CD81 欠損細胞株、Occludin 欠損細胞株に対しては、研究期間中、ウイルス感染量や回収時期などを様々変化させて試みたが、これら受容体に対する非依存性ウイルスは全く分離されなかった。宿主因子に対する genetic barrier は一般的に非常に高いことが知られていることと、CD81、Occludin 非依存性株が得られない結果は矛盾しない。しかし、SRBI、Claudin-1 の結果を併せて考えると、宿主因子の中でも genetic barrier には違いが見られることがわかってきた。以上の知見は、今後、未だ不明の点の多い HCV 侵入の分子メカニズムの解析をする上でも非常に有用と考えられる。

(4) Claudin-1 依存性の変化した変異ウイルス株について、さらに検討を行った。最初に、変異ウイルス株の構造タンパク質領域に存在する遺伝子変異(アミノ酸変異)を同定した。次にどのアミノ酸変異が形質変化に関与しているかを調べた。そのためにまず、発現プラスミドを用いたハイブリッドウイルスを一過的に作製する方法の確立を行った。この実験系を用いて、アミノ酸変異を 1 カ所だけ野生型に戻した変異株を作成し、Claudin-1 欠損細胞株に対する感染感受性を調べることで、重要なアミノ酸の候補を絞り込んだ。次に、重要なアミノ酸候補のみを持つ変異株を作成し、ウイルス感受性を調べた。その結果、1 アミノ酸変異のみで、Claudin-1 欠損細胞株に感染するウイルスとなることがわかった。

(5) Claudin-1 依存性の変化した変異ウイルス株の性状をさらに検討した結果、依然として Claudin-1 を受容体として利用できること、加えてその他の分子を受容体に利用できることもわかった。そこで、研究方法に記載した方法で、受容体として利用できるようになった新たな受容体の同定も行った。

(6) 同定された新規 HCV 受容体は、Huh7.5.1 細胞などの肝がん培養細胞には発現しているが、正常肝細胞には発現していないことがわかってきた。新規受容体は免疫細胞や幹細胞に発現する分子として報告されているものだった。実際に、当該変異ウイルス株は、iPS 細胞に感染できることが明らかとなった。以上の結果から、RNA ウイルスである HCV は非常に変異しやすく、1 アミノ酸変異の導入は比較的容易に起こると考えられることから、HCV による肝外病態発現や新規病態発現の可能性を新たな視点で議論できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Yoshimi Shimizu, Yoshitaka Shirasago, Masuo Kondoh, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita,

Kentaro Hanada, Kiyohito Yagi, and Masayoshi Fukasawa, Monoclonal antibodies against occludin completely prevented hepatitis C virus infection in a mouse model, J. Virol., 査読有、Vol. 92、2018、 e02258-17. DOI: 10.1128/JVI.02258-17

Motohiko Ogawa, Yoshitaka Shirasago, Shuji Ando, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, and Masayoshi Fukasawa, Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro, J. Infect. Chemother., 査読有、Vol. 24、2018、 pp. 597-601. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.03.005

Yoshitaka Shirasago, Hidesuke Fukazawa, Hideki Aizaki, Tetsuro Suzuki, Takeru Suzuki, Kazuo Sugiyama, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Ryo Abe, Masayoshi Fukasawa, Thermostable hepatitis C virus JFH1-derived variant isolated by adaptation to Huh7.5.1 cells, J. Gen. Virol., 査読有、Vol. 99、2018、 pp. 1407-1417. DOI: 10.1099/jgv.0.001117

Yoshitaka Shirasago, Yoko Inamori, Takeru Suzuki, Isei Tanida, Tetsuro Suzuki, Kazuo Sugiyama, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Masayoshi Fukasawa, Inhibition Mechanisms of Hepatitis C Virus Infection by Caffeic Acid and Tannic Acid, Biol. Pharm. Bull., 査読有、Vol. 42、2019、 pp. 770-777. DOI: 10.1248/bpb.b18-00970

Masayoshi Fukasawa, Anti-hepatitis C Virus Strategy Targeting the Entry Steps, YAKUGAKU ZASSHI, Vol. 139、2019、 pp. 89-95.

〔学会発表〕(計2件)

深澤征義、HCV 侵入過程の基礎研究から感染防御・予防・治療の応用研究へ、日本薬学会第138年会、口頭(シンポジウム)、2018

深澤 征義、HCV 侵入機構とその感染予防・治療薬への応用、第62回日本薬学会関東支部大会、口頭(シンポジウム)、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biochem/911-3rd.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：白砂圭崇

ローマ字氏名：Yoshitaka Shirasago

研究協力者氏名：清水芳実

ローマ字氏名：Yoshimi Shimizu

研究協力者氏名：小川基彦

ローマ字氏名：Motohiko Ogawa

研究協力者氏名：鈴木 建

ローマ字氏名：Takeru Suzuki