

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K08362

研究課題名(和文)フラビウイルスが必要とする宿主脂質に関する研究

研究課題名(英文)Studies on host lipid requirements of flaviviruses

研究代表者

齊藤 恭子 (Saito, Kyoko)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：70235034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：フラビウイルス科フラビウイルス属は、節足動物が媒介する感染症の原因ウイルスを多く含むが、それらに対する有効な抗ウイルス剤は開発されていない。本研究では、フラビウイルスの複製におけるコレステロール等脂質の重要性を解析することを目的とした。まず、フラビウイルスの一種、黄熱ウイルス17D株をベースとしたサブゲノミックレプリコンを作製し、それが持続的に複製されるVero細胞を樹立した。このレプリコン細胞と黄熱ウイルス17D株の培養細胞感染系を用いて、コレステロール合成阻害剤の一つが当該ウイルスのゲノム複製を阻害することを見出した。今後は薬剤標的を精査して、抗ウイルス剤としての有望性を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹立したレプリコン細胞は抗ウイルス剤の探索の他、宿主因子の遺伝学的探索にも利用可能であり、宿主因子を標的とした抗フラビウイルス戦略の研究にも有用であると考えられる。また、レプリコン細胞はウイルス感染細胞におけるゲノム複製過程をミミックしているため、その分子メカニズムの解析にも役立つ。本研究で見出したコレステロール合成阻害剤の一つは、黄熱ウイルス17D株の一過的な複製に加えて持続化した複製に対する抑制効果が高く、抗ウイルス剤候補として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* includes many viruses that cause arthropod-borne infectious diseases. Currently, no effective antiviral agents have been developed against flaviviruses. The aim of this study was to analyze the importance of host cell lipids such as cholesterol in the replication of flaviviruses. First, a subgenomic replicon based on yellow fever virus strain 17D, a type of flavivirus, was generated and then Vero cell lines in which the replicon continuously replicates were established. Using the replicon cells and a cultured cell-based infection system, it was found that one of the cholesterol synthesis inhibitors inhibited the genome replication of yellow fever virus strain 17D. The target of the inhibitor will be closely examined and its potential as an antiviral agent will be evaluated in the future.

研究分野：遺伝生化学、ウイルス学

キーワード：フラビウイルス コレステロール 脂質 ゲノム複製 レプリコン 黄熱ウイルス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フラビウイルス科ヘパシウイルス属のC型肝炎ウイルス(HCV)はライフサイクルの様々な過程で宿主細胞のコレステロールおよびその代謝を利用することが知られている。申請者らは、スクアレン合成酵素の阻害剤が、コレステロール生合成を阻害することによって、HCV産生を低下させることを見出し、同酵素が抗HCV標的となりうることを示した(Saito et al. J. Virol., 2015)。興味深いことに、スクアレン合成酵素阻害剤がHCV産生を抑える濃度では、細胞のコレステロールは10%程度しか減少せず、細胞増殖にも影響がなかった。このことから、HCV産生に不可欠なコレステロールプールの存在が予想された。

先行研究から、HCVの複製複合体にはコレステロールが集積していること、また、その集積には脂質輸送タンパク質が関与していることが明らかされた。しかしながら、脂質輸送タンパク質だけがコレステロール集積に関与しているのかどうかは不明で、例えば、コレステロール生合成系に富むオルガネラ膜が利用されている可能性も考えられた。また、HCV近縁のフラビウイルス科のウイルスについては、そのライフサイクルにおけるコレステロールの重要性の解析はさらに遅れており、不明な点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、HCV複製の場にコレステロールが蓄積するメカニズムについて手がかりを得ると同時に、近縁のフラビウイルスを対象として、複製におけるコレステロール等脂質の重要性を解析することを目的とした。なお、研究提案時にはHCVに主軸を置いていたが、より未解明な部分が多いフラビウイルス(特に黄熱ウイルス[以下、YFV])に研究の主対象を移した。YFVは蚊を媒介してヒトに感染する感染症・黄熱を引き起こすウイルスである。黄熱は重症化すると致死性の高い重篤な疾患であり、効果的な予防ワクチンはあるものの、特異的治療薬は存在しない。

### 3. 研究の方法

#### (1) フラビウイルス感染系の至適化とYFVレプリコン細胞の樹立

フラビウイルスとして、日本脳炎ウイルス(JEV)・YFV17D株の2種の感染系を導入し、至適化・整備する。また、YFV17D株の複製をレポーター遺伝子の発現でモニター可能なレプリコン細胞を構築する。具体的には、YFV17D株ゲノムを利用して、構造遺伝子をレポーター遺伝子に置換したレプリコンを作成し、これが持続的に複製する細胞を樹立する。

#### (2) フラビウイルスにおけるコレステロールの重要性の解析

JEVならびにYFV17D株とそのレプリコンを用いて、ゲノム複製過程やウイルス産生に対するコレステロール生合成系阻害剤等の影響を調べ、抗ウイルス効果の有無を判断する。培地へのコレステロール等添加によって、阻害剤の抗ウイルス効果のキャンセル実験も行い、これらのウイルス感染におけるコレステロール生合成系の重要性を評価する。

#### (3) コレステロールと関連するウイルスタンパク質の同定

コレステロール合成阻害剤で増殖が阻害されないYFV17D変異株を分離する。具体的には、阻害剤添加細胞にYFV17Dを感染させ、子孫ウイルスを回収し、新たな阻害剤添加細胞に感染させることを繰り返す。その変異箇所の解析から、コレステロールと関連するウイルスタンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) JEV感染におけるコレステロールの重要性の解析

フラビウイルスであるJEVの培養細胞における増殖に、コレステロールやその代謝物が関与するかどうかを調べた。JEV感染条件ならびにウイルス定量のためのブランクアッセイの至適化を行い、スクアレン合成酵素阻害剤のJEV産生に対する効果を調べた。その結果、JEV産生はやや阻害されたものの、HCVで見られたような強力な阻害効果は認められず、JEVはHCVよりもコレステロール要求性が低い可能性が考えられた。また、コレステリルエステル合成阻害剤についても同様に解析したが、JEV産生は抑制されなかったことから、コレステリルエステルのJEV産生過程への寄与は低いと考えられた。

#### (2) ヒト肝がん由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析

研究開始早期に主軸をHCVからフラビウイルスへと移し、まずは培養細胞における感染系を立ち上げた。その過程で、HCV高増殖能を指標に樹立されたヒト肝がん由来Huh7.5.1-8細胞が、



(5) コレステロール合成阻害剤 X の標的の解析

阻害剤 X の標的が、コレステロール生合成系であるかを調べるために、レプリコン細胞を利用して他のコレステロール合成阻害剤のレプリコン複製に対する効果を調べた。コレステロール合成過程に作用する 2 種の薬剤（トリパラノール、AY9944）については、細胞増殖に影響しない濃度下では阻害効果が見られなかった（図 2B, C）。また、コレステロール生合成の上流を阻害するスタチンや、X と同じ酵素を標的とする別の薬剤についても抗 YFV 効果を示さなかった。さらに、X の抗 YFV 効果は、低密度リポ蛋白質や水溶性コレステロールを培地に添加しても（コレステロールを細胞に補給する条件）、解除されなかった。以上の結果から、当該阻害剤の標的はコレステロール代謝以外である可能性が生じた。現在、この阻害剤の耐性ウイルスを分離中であり、今後はその解析から当該阻害剤の抗 YFV 標的を探っていく予定である。また X にはコレステロール合成以外の脂質代謝にも影響を及ぼすことが知られていることから、その代謝系の YFV 複製への寄与についても調べていく予定である。一方、リバビリン、インターフェロン $\beta$  といった多くのウイルス種に有効な薬剤は、YFV17D 株の一過的な複製を阻害するものの、持続的な複製に対しては効果が減弱する傾向があったが、コレステロール合成阻害剤 X はどちらの複製にも有効であることを見出した。フラビウイルスでは持続的な感染が起こることが報告されているが、X はそれに対する有効な薬剤の候補となる可能性が考えられ、レプリコン細胞は X のような強力な薬剤のスクリーニングに有用であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamanaka Atsushi, Matsuda Mami, Okabayashi Tamaki, Pitaksajjakul Pannamthip, Ramasoota Pongrama, Saito Kyoko, Fukasawa Masayoshi, Hanada Kentaro, Matsuura Tomokazu, Muramatsu Masamichi, Shioda Tatsuo, Suzuki Ryosuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00339-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00339-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Yoshitaka Shirasago, Ryosuke Suzuki, Naoki Osada, Toshiyuki Yamaji, Takaji Wakita, Eiji Konishi, Kentaro Hanada	4. 巻 15
2. 論文標題 Comparative characterization of flavivirus production in two cell lines: Human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 and African green monkey kidney-derived Vero	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 齊藤恭子、深澤征義	4. 巻 88
2. 論文標題 宿主細胞コレステロール生合成系を標的としたC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス戦略	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 411-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Ryosuke Suzuki, Tomohiko Takasaki, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Characterization of persistent replication of yellow fever virus 17D subgenomic replicons in Vero cells
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤恭子, 深澤征義, 白砂圭崇, 鈴木亮介, 山地俊之, 脇田隆字, 小西英二, 花田賢太郎
2. 発表標題 ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Ryosuke Suzuki, Tomohiko Takasaki, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Construction of a yellow fever virus subgenomic replicon system and characterization of cell lines harboring the replicon
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤恭子, 深澤征義, 白砂圭崇, 鈴木亮介, 脇田隆字, 小西英二, 花田賢太郎
2. 発表標題 ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来 Vero細胞におけるフラビウイルス産生の比較解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤恭子, 深澤征義, 白砂圭崇, 鈴木亮介, 脇田隆字, 小西英二, 花田賢太郎
2. 発表標題 ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞における日本脳炎ウイルス産生の比較解析 Comparative characterization of human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 cells and African green monkey kidney-derived Vero cells in Japanese encephalitis virus production
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒト肝がん由来Huh7.5.1-8細胞とサル腎由来Vero細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9615-virology-2020-6.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------