

令和元年6月20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：16K08825

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルス感受性・非感受性細胞を用いたウイルス増殖機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of replication mechanism of hepatitis E virus using infection-permissive and -nonpermissive cell lines

研究代表者

石井 孝司 (Ishii, Koji)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・部長

研究者番号：40280763

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)：E型肝炎ウイルス(HEV)を培養細胞系で増殖させる系は確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよいHEVの増殖系を確立することが望まれている。本研究では、HEVの構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンの樹立に成功し、このHEVレプリコンの複製増殖系を用いて化合物ライブラリのスクリーニングを行い、複数の阻害活性を有する化合物を同定した。培養細胞へのHEV感染後に上記の薬剤を作用させたところ、HEV増殖抑制作用を示すことが知られているリバピリンと同程度あるいはそれよりも強いウイルス増殖抑制活性を示す化合物を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究から、E型肝炎は希少な輸入感染症ではなく、我が国においても常に流行の危険は存在すると考えられ、日本でも予防、治療研究への真剣な取り組みが必要になってきていると言える。HEVは慢性化しないため、薬剤としては急性期にウイルス増殖を阻害する薬剤が強く望まれる。構築したHEVレプリコンを用いてHEV増殖阻害剤のスクリーニングを行った化合物ライブラリには、すでに実用化されている薬剤のライブラリも存在するため、見出された化合物はすぐに急性E型肝炎治療薬として応用できる可能性がある。また、これらの阻害剤の阻害メカニズムの解析は、HEVの病原性の解析に重要な手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop therapeutic agents for hepatitis E by identifying chemical compounds that inhibit hepatitis E virus (HEV) replication. Chemical libraries were screened for the inhibition of HEV replication using HEV replicon. Several compounds were shown to have strong activity to inhibit HEV replication. These compounds are promising agents for chemotherapy of hepatitis E.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス 複製機構 病原性 阻害剤

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

### 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、通常 HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E型肝炎はこれまでの症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、輸入感染症として認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。以上の事実から、E型肝炎は希少な輸入感染症ではなく、我が国においても常に流行の危険は存在すると考えられ、日本でも予防、治療研究への真剣な取り組みが必要になってきていると言える。一方において、アジア、アフリカ地域では依然として HEV は蔓延状況にあり、日本からの旅行者が感染する危険性は高いままである。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅い。また、HEV は感染から発症までに平均約 6 週間を要する。このことから、免疫応答の強い臓器である肝臓で比較的長期に渡り感染状態を維持するメカニズムが存在することが推定される。しかしながら、HEV の病原性発現メカニズムや、宿主細胞への感染メカニズムについてはまだ解析途上である。E型肝炎の治療薬については、これまでリバビリンが効果を示すことが判明しており、特に慢性化した場合の治療に用いられているが、増殖阻害剤のスクリーニング等はあまり進んでいない。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ヒト由来肝癌細胞である PLC/PRF/5 で効率よく増殖する Genotype1、3、4 の HEV 株を取得し、いずれのクローンもすでに完全長の cDNA 取得に成功した。また、この cDNA から合成された RNA に感染性があることも証明できた。本クローンの構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンを構築し、細胞内で複製させることにも成功しており、このレプリコン RNA を持続的に保持する細胞も樹立できている。

一方、HEV 感染 PLC/PRF/5 株の長期観察時の抗原陰性細胞の存在によって、当該株は HEV 感受・非感受性細胞の mixture であると考えられた。そこで、当該株の限界希釈によって複数の感受・非感受性細胞サブクローンを分離した。本研究では、上記材料と HEV を利用したレセプター(ウイルス受容体)を同定し、HEV ライフサイクルに特異的な E型肝炎予防ワクチンや抗ウイルス薬開発への応用を目指した。

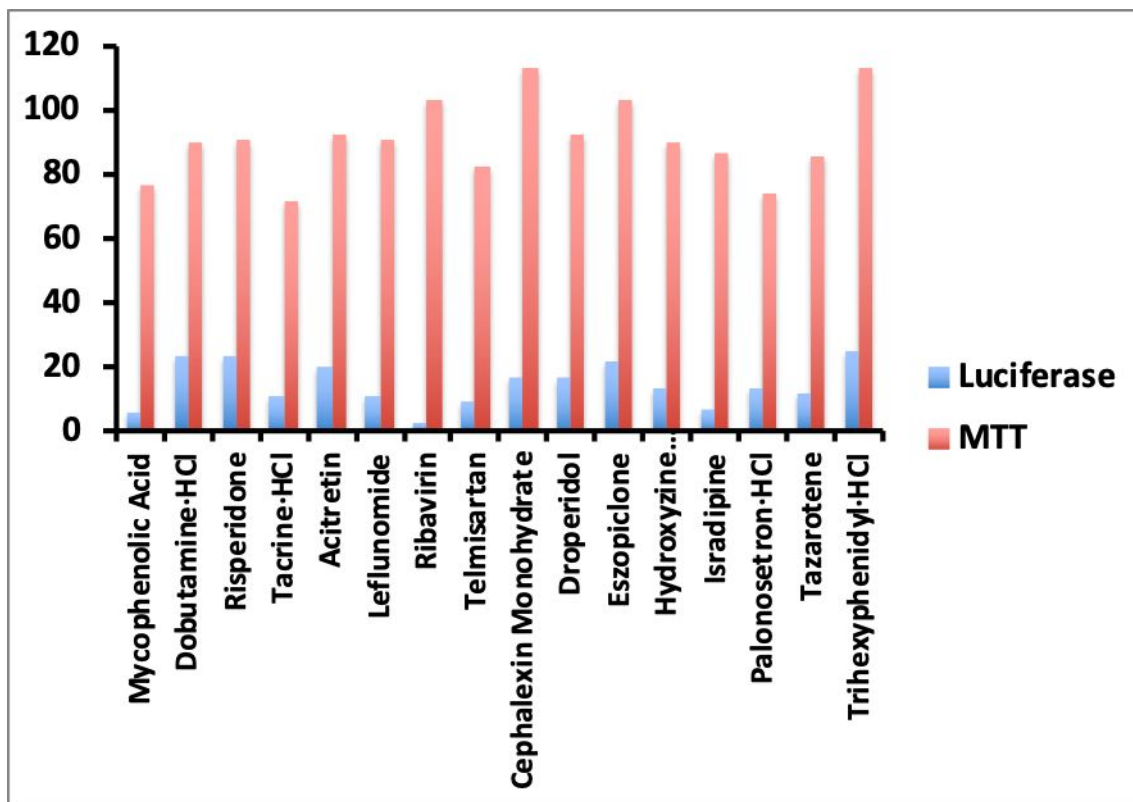
### 3. 研究の方法

感染性の HEV クローン 83-2 の構造蛋白領域をレポーター遺伝子 (SecNanoLuc) で置換した cDNA を作成し、合成した RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞に導入するとレプリコンが複製しレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) が分泌されることを確認した。レポーターの分泌を指標にレプリコン複製を阻害する物質のスクリーニングを行った。また、非構造蛋白のプロセッシングを解析する目的で、コムギ胚芽由来の無細胞蛋白発現系を用いて、ORF1 (非構造蛋白) 全長と、プロテアーゼと推定される領域の発現を行い、プロテアーゼ活性についての検討を行った。

また、PLC/PRF/5 細胞をクローニングすることで、HEV に感受性を持つ細胞と持たない (非感受性) 細胞のクローンを多数取得した。そこで、HEV 感受・非感受性細胞の網羅的遺伝子発現比較解析を行い、多くの非感受性細胞において発現が等しく低下している細胞膜タンパク質をレセプター候補遺伝子として探索した。

#### 4. 研究成果

上記のレプリコンを用いて、LOPAC 化合物ライブラリおよび植物エキストラライブラリ(筑波薬用植物資源研究センターとの共同研究)の HEV 増殖阻害剤のスクリーニングを開始し、現在までに複数の阻害活性を有する化合物を同定した。本スクリーニング系については、阻害活性を有すると判定された化合物の中に、すでに臨床的に増殖阻害効果が確認されているリバビリンが含まれていたことから、本アッセイ系の有用性が示されたものと考えている。これらの阻害活性が確認された化合物について精査したところ、共通の作用機序を有する化合物群が見出されたため、この作用と HEV 増殖メカニズムとの関連について現在検討を進めている。また、リバビリンについては、リバビリン治療に抵抗性を示す慢性 E 型肝炎患者由来の HEV 配列を解析し、リバビリン治療後にウイルス配列中に出現した複数の変異を同定した。この変異の意義を解析することで、耐性株の作用機序を解明する。リバビリンは現在のところ、慢性 E 型肝炎に対する唯一の治療薬であるため、作用機序の解明は治療方針に重要な情報を提供できると考えられる。



レプリコンを用いた HEV 増殖阻害剤のスクリーニング。10uM でのレプリコン阻害活性 (Luciferase) および細胞毒性 (MTT) を示した。実際に細胞に HEV を感染させた系でも、これらの薬剤はウイルス増殖阻害活性を示すことが判明している。

一方、まだ明らかにされていない非構造蛋白のプロセッシングについての検討も行った。HEV のプロテアーゼ領域は毒性が強く、組換え蛋白としての発現が難しいため、愛媛大学プロテオサイエンスセンターと共同で、コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白発現系を検討した。その結果、ORF1 全長蛋白と、プロテアーゼ領域と考えられる蛋白のいずれについても発現に成功した。また、ORF1 全長蛋白は、弱いながらもプロテアーゼ活性を有することが確認された。

多くの非感受性細胞において発現が等しく低下している細胞膜タンパク質のひとつは、当該遺

伝子の翻訳産物の発現量も同時に低下していることを Flow cytometry で確認した。また、本因子をゲノム編集によりノックアウトすることにより感受性が消失した。一方で、HEV 非感受性細胞へ本因子を安定発現させたところ、HEV 非感受性細胞へ感受性が付与された。

本研究課題実施期間中に得られたこれらの結果は、レセプター候補因子がエンベロープを持たない HEV の細胞への結合と侵入にとって極めて重要な因子であることを示唆している。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Motoya T., Umezawa M., Goto K., Doi I., Nagata N., Ikeda Y., Sakuta A., Sasaki N. and Ishii K. High prevalence of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Ibaraki Prefecture, Japan. BMC Veterinary Research, 15: 87 (2019) doi: 10.1186/s12917-019-1816-x
2. Ueda Y., Gu W., Dansako H., Kim H.S., Yoshizaki S., Okumura N., Ishikawa T., Nishitsuji H., Kato F., Hishiki T., Satoh S., Ishii K., Masuda M., Shimotohno K., Ikeda M. and Kato N. Multiple antiviral activities of the antimalarial and anti-hepatitis C drug candidates N-89 and N-251. Biochemistry and Biophysics Reports. 15: 1-6 (2018) DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.05.007
3. Imagawa T., Sugiyama R., Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S. Wakita T. and Ishii K. Evaluation of heating conditions for inactivation of hepatitis E virus genotype 3 and 4. Journal of Food Protection 10: 947-952 (2018) doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-290.
4. Li T.C., Yoshizaki S., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Doan Y.H., Haga K., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Genetic and physicochemical analyses of a novel ferret hepatitis E virus, and clinical signs of infection after birth. Infection, Genetics and Evolution 25; 153-159 (2017) DOI: 10.1016/j.meegid.2017.03.026.
5. Ruchusatsawat K., Wongpiyabovorn J., Kawidam C., Thiemsing L., Sangkitporn S., Yoshizaki S., Tatsumi M., Takeda N. and Ishii K. An Outbreak of Acute Hepatitis Caused by Genotype IB Hepatitis A Viruses Contaminating the Water Supply in Thailand. Intervirology 59: 197-203 (2016) DOI: 10.1159/000455856
6. Miyoshi M., Kakinuma S., Tanabe Y., Ishii K., Li T.C., Wakita T., Tsuura Y., Watanabe H., Asahina Y., Watanabe M. and Ikeda T. A Case of Chronic Hepatitis E Infection in a Persistently Immunosuppressed Patient Unable to be Eliminated after Ribavirin Therapy. Internal Medicine, 55: 2811-2817 (2016) DOI: 10.2169/internalmedicine.55.7025
7. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Kishida N., Shirakura M., Asanuma H., Takeda N. and Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. Veterinary Microbiology, 183: 30-36 (2016) DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.014
8. Motoya T., Nagata N., Komori H., Doi I., Kurosawa M., Keta T., Sasaki N and Ishii K. The high prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Ibaraki Prefecture. Japanese Journal of Veterinary Medical Science, 77: 1705-1709 (2016) DOI:10.1292/jvms.15-0173

9.

### 〔学会発表〕(計 10 件)

1. Ishii K., Yoshizaki S., Li T.C. and Wakita T. Prevalence of hepatitis E virus in pigs in Japan. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, October 24-26, 2017
2. Sugiyama R., Imagawa T., Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Wakita T. and Ishii K. Investigation of heat conditions to inactivate hepatitis E virus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, October 24-26, 2017
3. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Nishimura Y., Shimizu H., Shimojima M., Saijo M., Wakita T. and Ishii K. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, Japan, October 23-25, 2016
4. Imagawa T., Li T.C., Shiota T., Yoshizaki S., Ishii K. and Wakita T. Heat inactivation of Hepatitis E virus. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, Japan, October 23-25, 2016
5. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Nishimura Y., Shimizu H., Shimojima M., Saijo M., Wakita T. and Ishii K. Characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. 23rd International Meeting on HCV and Related Viruses, Kyoto, Japan, October 11-15, 2016
6. 本谷 匠、梅澤昌弘、後藤慶子、土井育子、永田紀子、石井孝司 : 豚における E 型肝炎ウイルスの感染実態について、平成 30 年度関東・東京合同地区獣医師大会・三学会、平成 30 年 9 月、つくば
7. 上田優輝、谷 焯琳、團迫浩方、金 恵淑、吉崎佐矢香、奥村暢章、石川知弘、西辻裕紀、

加藤文博、日紫喜隆行、佐藤伸哉、石井孝司、増田道明、下遠野邦忠、池田正徳、加藤宣之：抗マラリア及び抗 HCV 薬候補 N-89 と N-251 が有する幅広い抗ウイルス活性、第 28 回抗ウイルス療法学会学術集会、平成 30 年 6 月、札幌

8. 石井孝司：E 型肝炎の最近の動向と対策、平成 29 年度岩手県獣医師会公衆衛生部会、平成 29 年 10 月、盛岡
9. 石井孝司：A 型肝炎と E 型肝炎の動向と対策、平成 28 年度新潟県臨床検査技師会研修会、平成 28 年 12 月、新潟
10. 石井孝司：日本における A 型肝炎、E 型肝炎の最近の話題、平成 28 年度静岡県獣医師会公衆衛生部会、平成 28 年 10 月、静岡

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

(1) 研究代表者：石井 孝司 (ISHII, Koji)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・部長

研究者番号：40280763

(2) 研究分担者：李 天成 (Li, Tian Cheng)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：90370957

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：塩田 智之

ローマ字氏名：SHIOTA, Tomoyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。