

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300225
 研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルス培養系による感染増殖効率規定因子の解析と新規治療標的候補の探索
 研究課題名 (英文) Analysis of factors involved in viral replication efficiency and search for novel anti-virals using HCV culture systems.
 研究代表者
 脇田 隆字 (WAKITA TAKAJI)
 国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長
 研究者番号：40280789

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス(HCV)感染症は持続感染化して慢性肝炎から肝硬変、肝臓癌に至る疾患を引き起こす。HCVはプラス鎖RNAをゲノムとするウイルスであり、ウイルスゲノムの変異が多い。ウイルスゲノムの変異がウイルスの持続感染化に関与すると考えられているがその詳細は不明である。HCVの研究はウイルス培養系が存在せず、感染性ウイルスを用いた研究ができなかった。我々が分離した JFH-1 株は培養細胞で感染および増殖複製が世界で初めて可能であることを報告した。本研究では、HCVがどのような機構で感染増殖効率を規定しているかを解析し、ウイルス複製増殖に関与する、ウイルス側および宿主側因子を同定した。この研究により、新たな抗ウイルス戦略の標的を探索した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	0	6,400,000
2007年度	4,500,000	0	4,500,000
2008年度	4,500,000	0	4,500,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	0	15,400,000

研究分野：肝臓病学、ウイルス学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HCV、ウイルス、感染実験、ウイルス複製、インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は日本では200万人、世界中で17000万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症してくるため重大な感染症の一つである。しかしながら、その治療はインターフェロンおよびリバビリン以外にないが、その効果はいまだ不十分である。培養細胞によるHCVの良いウイルス培養系が無い

ことが新たな治療法の開発の妨げになってきた。最近、HCVレプリコンシステムが開発され、Huh7細胞内でHCV遺伝子の持続的な複製が可能となった。この系によりHCVに対する抗ウイルス薬のスクリーニングや評価が初めて可能となった。さらに我々はJFH-1株を用いることにより、世界で初めて培養細胞で増殖可能な実験系を確立した。この実験系によりHCVは培養細胞でウイルスを培養するという最も基本

的なウイルス学的研究が初めて可能となった。

2. 研究の目的

HCV 感染症は持続感染化して慢性肝炎から肝硬変、肝臓癌に至る疾患を引き起こす。HCV はプラス鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ウイルスゲノムの変異が多い。ウイルスゲノムの変異がウイルスの持続感染化に関与すると考えられているがその詳細は不明である。本研究の目的は、C型肝炎ウイルスがどのような機構で感染増殖効率を規定しているかを解析して、新たな抗ウイルス戦略の標的を探索することである。

3. 研究の方法

第一に感染性C型肝炎ウイルスを培養細胞で作製する。JFH-1株の全長cDNAからウイルスゲノムRNAを試験管内で合成し、培養細胞にトランスフェクションする。培養上清中に感染性ウイルスが得られるので、このウイルスを感染用に用いる。培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルスを培養細胞、ヒト肝細胞をもつキメラマウス、チンパンジーに感染させる。

第二にC型肝炎ウイルスが培養細胞で感染増殖するのに重要なウイルス側因子を解析する。細胞への感染の過程をJFH-1株の構造蛋白を表面に持つシュードタイプウイルスにより解析する。また、感染細胞内でのウイルス遺伝子複製に重要な領域をレプリコン実験系により解析する。また、感染性ウイルスを用いることにより、感染増殖に重要なウイルス側因子を解析する。

第三にC型肝炎ウイルス感染増殖に重要な宿主細胞側因子を解析する。すでに存在する培養細胞を用いて感染感受性を解析するとともに、感染に必要と考えられるCD81などの分子を導入することにより感染感受性が変化するかどうかを検討する。また、感染感受性の高いHuh7細胞をクローニングして感染感受性の異なる細胞を得る。さらに、Huh7細胞を突然変異誘導剤で処理することによってC型肝炎ウイルスに対する感受性が異なる細胞が得られる。この細胞の遺伝子発現を解析することにより、C型肝炎ウイルスの感受性に関与する宿主細胞性因子を同定する。

4. 研究成果

1) 試験管内で合成した全長のウイルスRNAを培養細胞中に導入してその複製を解析した。ウイルスRNA導入後、細胞内でウイルスRNAは自律的に複製増殖した。培養上清中に分泌されたウイルスはHuh7細胞を用いて感染力価を定量することができた。この複製増殖にはNS3ヘリカーゼ領域とNS5Bから3' X

領域が重要であることが明らかとなった。

2) ヒト肝細胞キメラマウスに培養細胞で作製したHCVを感染させた。感染ウイルスの変異は非常に少なかった。さらに、チンパンジーにもHCVを感染させた。約2ヶ月間ウイルス血症が持続し、感染後2週間目にはウイルス変異は無かったが、7週間後には11カ所の塩基置換を認めた。

3) ウイルス複製にはNS3ヘリカーゼ領域とNS5B-3' X領域が重要であるが、NS3ヘリカーゼ領域はウイルス粒子分泌にも重要であることを見いだした。また、NS5Aのリン酸化が感染細胞内でのウイルス粒子形成に重要な役割があった。さらにNS5B RNAポリメラーゼ活性がウイルス株により異なることとその責任アミノ酸配列を同定した。また、NS5Bと3' UTR領域のRNA2次構造もRNA複製効率に関与していることを見いだした。

4) HCVはHuh7細胞だけにおいて効率よく感染するが、感染感受性を一義的に規定するのはCD81の細胞表面発現であった。他のレセプター候補因子、SR-BIやLDLレセプターなどの発現も検討したが、これらの因子の発現に差はなかった。また、ウイルス膜および細胞膜のラフト構造が感染およびウイルス粒子形成に重要であること、およびコアとNS5aの相互作用がウイルス形成に重要であることが明らかとなった。

5) HCV感染細胞内でウイルス増殖を制御する宿主因子としてCreatinine Kinase B (CKB)を見いだした。CKBはHCVのNS4A蛋白質と結合してウイルスゲノム複製複合体に共局在し、NS3蛋白質のヘリカーゼ活性を制御することによりウイルスゲノム複製に関与する。

6) ウイルス側および宿主因子を標的とした抗ウイルス療法の開発：CKBに対するsiRNAおよび阻害剤であるCyclocreatineの感染細胞への投与によりウイルス増殖を抑制できることが確認できた。

7) 以上の研究は新たな抗HCV治療標的の探索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38件)すべて査読有り

1. Hiraga N, 他15名 Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. FEBS Lett. 2007 581(10):1983-7.

2. Akazawa D, 他8名 Wakita T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. J Virol. 2007 81(10):5036-45.

3. Kato T, 他5名 Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus

- of various genotypes in cell cultures. *J Virol.* 2007 81(9):4405-11.
4. Morikawa K, 他 7 名 Wakita T. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol.* 2007 79(6):714-23.
 5. Larrea E, 他 9 名 Wakita T, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, Prieto J. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2007 81(7):3662-6.
 5. Date T, 他 8 名 Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatology Res.* 2007 37(6):433-43.
 6. Shirakura M, 他 12 名 Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2007 81(3):1174-85.
 7. Kato T, 他 4 名 Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2334-9.
 8. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology J.* 2006, 3:89.
 9. Wagoner J, 他 6 名 Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 2006 81(1):309-18.
 10. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, 他 3 名 Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2006. 80(14):6964-72.
 11. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, 他 3 名 Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J Virol.* 2006. 80(9):4633-9.
 12. N Ishii, 他 5 名 T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *J Virol.* 2006. 80(9):4510-20.
 13. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. *Future Virology*, 2006, 1: 519-525.
 14. Y Rouillé, 他 9 名 T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol.* 2006. 80(6): 2832-41.
 15. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *PNAS.* 103(7):2310-5, 2006.
 16. Tasaka M, 他 9 名 Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol.* 2007 88:3323-33.
 17. Zeisel MB, 他 5 名 Wakita T, 他 11 名 Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology.* 2007 46(6):1722-1731.
 18. Sekine-Osajima Y, 他 9 名 Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virol.* 2008 371(1):71-85.
 19. Ariumi Y, 他 4 名 Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2007 81(24):13922-6.
 20. Miyanari Y, 他 6 名 Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007 9(9):1089-97.
 21. Delgrange D, 他 5 名 Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol.* 2007 88(9):2495-503.
 22. Kim CS, Jung JH, Wakita T, 他 2 名 Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol.* 2007 81(16):8814-20.
 23. Murayama A, 他 9 名 Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol.* 2007 81(15):8030-40.
 24. Hiraga N, 他 15 名 Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett.* 2007 581(10):1983-7.
 25. Hara H, 他 10 名 Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication

through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 83(10):5137-47.

26. Kondo Y, 他4名 Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of CD44 Splicing Variant 6. *J Infect Dis.* 2009. 199(5):726-736.

27. Kuroki M, 他3名 Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J Virol.* 2009. 83(5):2338-48.

28. Suzuki R, 他5名 Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28{gamma}-Dependent Mechanism. *J Virol.* 2009. 83(5):2389-92.

29. Nitahara-Kasahara Y, 他5名 Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. *Virol.* 2009. 383(2):319-27.

30. Akazawa D, 他10名 Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *BBRC.* 2008. 377(3):747-51.

31. Lan L, 他7名 Wakita T, 他5名 Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol.* 2008 181(7):4926-35.

32. Kimura T, 他16名 Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol.* 2008 89(9):2108-13.

33. Kato T, 他6名 Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology.* 2008 48(3):732-40.

34. Ariumi Y, 他4名 Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2008 82(19):9639-46.

35. Murakami K, 他5名 Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the

hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol.* 2008 89(7):1587-92.

36. Masaki T, 他8名 Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 2008 82(16):7964-76.

37. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virol.* 2008. 376(2):397-407.

38. Ishii K, 他8名 Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *BBRC.* 2008 371(3):446-50.

[学会発表] (計23件)

1. 脇田隆字, C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用、第43回肝形態科学研究会、2007, 5.30、ホテルグランパシフィックメリディアン

2. 脇田隆字, Infection and replication of hepatitis C virus、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム、2007, 10.17、神戸商工会議所会館

3. 脇田隆字, C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発、第11回日本ワクチン学会学術集会、2007, 12.8-9、パシフィコ横浜

4. 相崎英樹、原弘道、森川賢一、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染、粒子形成における役割、第43回日本肝臓学会総会、2007, 5.31-6.1、ホテルグランパシフィックメリディアン

5. 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢二、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字、遺伝子型2a/2b間でのキメラウイルスの作製および性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

6. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢二、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV JFH-1株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

7. 加藤孝宣、脇田隆字、HCV JFH-1株のin vivoでの病原性の検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

8. 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢二、他5名、脇田隆字、肝細胞株における感染性HCV粒子

の作製と性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007、10.21-23、札幌コンベンションセンター

9. T Wakita, H Aizaki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2007 9/1-5)

10. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T, The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

11. Akazawa D, Takahashi H, Omi N, Date T, Morikawa K, Murayama A, Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T, Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

12. Masaki T, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Analysis of NS5A region for hepatitis C virus particle production, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

13. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルス研究の進展: ウイルス増殖からワクチン開発へ、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、2008, 7. 17、日本医師会館

14. 森川賢一、脇田隆宇, 培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第44回日本肝臓学会総会、2008, 6.5-6、愛媛県民文化会館

15. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇, HCV JFH-1株のチンパンジーへの感染実験: in vivo 適応変異の機能的解析、第44回日本肝臓学会総会、2008, 6.5-6、愛媛県民文化会館

16. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルス研究の最先端、第12回日本肝臓学会大会、2008, 10.1、グランドプリンスホテル新高輪

17. 原弘道、相崎英樹、他5名、脇田隆宇、鈴木哲朗, creatine kinase BはC型肝炎ウイルス NS4A との相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28)、岡山コンベンションセンター

18. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦

善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗, HCV粒子形成におけるNS5A蛋白の役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28、岡山コンベンションセンター

19. 山下篤哉、他6名、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦, In silico screeningによるHCV NS3プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28、岡山コンベンションセンター

20. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第67回日本癌学会学術総会、2008, 10.28-30、名古屋国際会議場

21. 有海康雄、他4名、脇田隆宇、加藤宜之, ATM DNA損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である、第67回日本癌学会学術総会、2008, 10.28-30、名古屋国際会議場

22. T Wakita, HCV culture system and antiviral development, 21st International Conference on Antiviral Research (ICAR), Montreal, Quebec, Canada (April 13-17, 2008)

23. T Wakita, Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey

〔図書〕(計2件)

- 1: Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. In: Hepatitis C Methods and Protocols Second Edition (ed. by Hengli Tan) Methods Mol Biol. 2009;510:305-27. Human Press
2. Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
なし

○取得状況(計0件)
なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇田 隆宇 (WAKITA TAKAJI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

研究者番号：40280789

(2) 研究分担者

伊達 朋子 (DATE TOMOKO)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・
研究員

研究者番号：40392360

森川 賢一 (MORIKAWA KENICHI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・
協力研究員

研究者番号：60384377

相崎 英樹 (AIZAKI HIDEKI)

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：00333360

村上 恭子 (MURAKAMI KYOKO)

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：30399456

石井 孝司 (ISHII KOJI)

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：40280763

鈴木 亮介 (SUZUKI RYOSUKE)

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：50342902

(3) 連携研究者

なし