

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006 -2008
 課題番号：18590454
 研究課題名（和文） C 型肝炎ウイルス複製効率の高い培養細胞の樹立と遺伝子型 1b の感染クローンの作製
 研究課題名（英文） Establishment of the cell line supporting hepatitis C virus replication efficiently and generation of an infectious clone of genotype 1b
 研究代表者
 杉山 和夫 (SUGIYAMA KAZUO)
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：10242520

研究成果の概要： 培養肝癌細胞は HCV 複製が可能な細胞である。本研究では Huh-7 細胞株から HCV レプリコン複製能の高い細胞クローンを樹立した。これら複製能の高い細胞クローンではアポリポ蛋白質遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子をノックダウンすると HCV の複製が抑制された。また、複製効率の良い全長 HCV を作製するための複製効率の良い HCV サブゲノムレプリコンを樹立できた。一方、その過程において欠損ゲノムを有する HCV を同定するとともにその感染性を *in vitro* で証明できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	420,000	2,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス学、病理学、C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝細胞に感染し、慢性肝炎さらに肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。ウイルス学的には、HCV レプリコンが培養肝細胞中で複製することが示され、HCV 複製に関する研究が飛躍的に進んだ。また、最近、遺伝子型 2a の HCV 感染性クローンによ

る HCV ウイルス粒子産生系も開発されたが、複製効率の高い遺伝子型 1b の HCV 感染性クローンはまだ作製されていない。本研究では HCV 複製効率の高い培養細胞を樹立し、これを利用して遺伝子型 1b の HCV 感染性クローンの作製およびそのウイルス粒子産生系の開発を試みる。なお、宿主培養細胞としては、

肝癌由来の細胞株 Huh-7 が最も強い HCV 複製能を示すことが知られている。しかし、同じ Huh-7 細胞でも施設間や培養回数などで異なる複製能を示すことが知られている。

2. 研究の目的

(1) まず、同一の Huh-7 細胞株を限界希釈することによって得られた複数の細胞クローンが多様な HCV 複製能を示すことを明らかに、その多様性を逆に利用することで、HCV 複製効率の高い培養細胞の樹立を試みる。すなわち、HCV 複製能の高い細胞クローン (highly permissive) と HCV 複製能の低い細胞クローン (less permissive) の遺伝子発現をマイクロアレイ法で比較することで、HCV 複製に促進的または抑制的な遺伝子の候補を選出する。次に、実際に HCV 複製への影響が確認された遺伝子を Huh-7 細胞に強制発現またはノックダウンすることにより、HCV 複製能のより高い細胞 (super permissive) を樹立する。

(2) 最終的に遺伝子型 1b の HCV 感染性クローンを作製し、highly permissive な細胞にその転写産物 RNA をトランスフェクションすることで遺伝子型 1b の感染性 HCV ウィルス粒子を効率よく複製、産生させることを目的とする。

(3) また、近年、欠損型 HCV ゲノムが C 型肝炎患者血清に存在することが報告されたが、本研究の経過中に本研究者らも肝移植後 HCV 再発患者血清に欠損型 HCV ゲノムを検出した。しかし、これらが本当に肝臓で増殖しているのか、あるいは単なる分解産物なのかは不明である。また、全長 HCV の複製に対する影響も不明である。本研究では欠損型 HCV が翻訳、複製を行っている可能性をその遺伝子解析によって検討する。また、感染培養細胞系を用いて欠損型 HCV ゲノムが *in vitro* で感染、複製を行うことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 限界希釈法による Huh-7 細胞クローンの樹立

親株の Huh-7 細胞からの細胞クローン化は限界希釈によって行った。

(2) less permissive および highly permissive な細胞の分離

ネオマイシン耐性遺伝子を有する HCV サブゲノムレプリコン RNA を *in vitro* で合成し、これをエレクトロポレーションにて上記で樹立した Huh-7 細胞クローンへトランスフェクションし、経時的に細胞 RNA を抽出し、ノーザンブロッティングにより HCV RNA の増減をみた。また、同時に G418 存在下でトランスフェクションした細胞を培養し、3 週間後にコロニーの数を計測することで HCV の複製能を判定した。これらによって HCV 複製能の低い細胞クローン (less permissive) と高い細胞クローン (highly permissive) の選別を行った。

(3) Huh-7 細胞の遺伝子的不安定性の確認

染色体不安定性をみるためにフローサイトメトリーによって染色体の倍数性を測定した。また、代表的なマイクロサテライトマーカーを 5 箇所選び、それぞれ異なる長さを増幅するように設定された蛍光プライマーによって染色体 DNA を PCR 増幅しキャピラリー電気泳動パターンから遺伝子不安定性を測定した。

(4) HCV 複製に抑制的または促進的な遺伝子候補のスクリーニング

代表的な less permissive および highly permissive な細胞から、レプリコンを導入しない状態 (naïve) で RNA を採取する。これらの RNA を用いて約 36000 遺伝子に対してマイクロアレイ解析を行った。less permissive な細胞または

highly permissive な細胞で発現亢進しているものを、それぞれ HCV 複製に抑制的または促進的な遺伝子の候補としてスクリーニングした。

(5) HCV 複製に対して促進的な遺伝子の導入と HCV 複製能への影響

HCV 複製に対して促進的な補遺伝子に対する siRNA を作製し、レプリコン複製細胞ヘトランスフェクションし、HCV RNA の複製に対する影響をみた。また、Huh7.5 細胞へこれらの siRNA をトランスフェクションしたのち感染性 HCV 株 JFH-1 を接種し、その感染、複製への影響を調べた

(6) 欠損ゲノムを有する HCV の遺伝子的解析

C 型肝炎患者血清の症例に対して、long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。long distance RT-PCR は(i)5' 非翻訳領域(5' UTR)から NS3、(ii)NS3 から NS5B、(iii)5' UTR から NS5B の 3 領域に関して行った。さらに、欠損領域を正確に決定するために、欠損型 HCV の PCR 産物をクローニングし(計 38 クローン)、その塩基配列を分子系統樹等により解析し、遺伝子変異、分子進化などから個体内での欠損ウイルス複製の可能性を検討した。

(7) 欠損ゲノムを有する HCV の感染ウイルスの作製と感染性の確認

次に、欠損型ウイルス RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションし、その複製能を *in vitro* で検討した。また、欠損型ウイルス RNA に構造領域をトランスに発現、供給させることにより Huh7 細胞で欠損型 HCV ウイルス粒子を産生させ、naïve な Huh 細胞へ感染し、複製を行うことの確認を行った。

4. 研究成果

(1) HCV 複製能の低い細胞クローンと高い細胞クローンの樹立

Huh-7 細胞株を限界希釈することによって 12 個の細胞クローンを分離した。これらにネオマイシン耐性遺伝子を有するサブゲノムレプリコンをトランスフェクションし 4 日間培養しレプリコン RNA の増減をノーザンブロッティングによって解析した。その結果、8 クローンにおいて RNA の増幅が認められたが、4 クローンにおいて RNA の増幅が認められなかった。また、トランスフェクション後の細胞をネオマイシン存在下で培養しコロニー形成能をみても同様の結果が得られた。これらの細胞クローンへ SFV-lacZ RNA をトランスフェクションしたところ、RNA 導入効率に差は認められなかった。これらのことから、Huh-7 細胞株は様々な細胞変異を有する細胞集団であり、HCV レプリコン複製能の高い細胞クローン(highly permissive)と HCV 複製能の低い細胞クローン(less permissive)が存在することが明らかとなった。

(2) Huh-7 細胞の染色体および遺伝子的不安定性

染色体不安定性をみるために、highly permissive クローンと less permissive クローンからそれぞれ 2 クローンを選び、フローサイトメトリーによって染色体の倍数性を測定した。その結果、すべてのクローンが hyperplod であった。また、5 箇所のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子不安定性を測定したところ、正常リンパ球に比べ高い遺伝子不安定性を示した。これらのことから、Huh7 細胞は染色体不安定性、遺伝子不安定性が高いと考えられた。Huh7 細胞は肝細胞由来であり修復遺伝子変異などの関与が示唆された。

(3) HCV 複製に抑制的または促進的な遺伝子候補の同定

highly permissive な細胞クローン(2ク

ローン)と less permissive な細胞クローン (2 クローン) の遺伝子発現をマイクロアレイ法で比較することで、HCV 複製に対して促進的または抑制的な遺伝子の同定を試みた。その結果、促進的な遺伝子としてアポリポ蛋白質 A-I、A-II などが同定された。また、抑制的な遺伝子としては sICAM-1、TAP1-B などが同定された。これらのうち、アポリポ蛋白質 A-I、A-II に対する siRNA をレプリコン複製細胞へトランスフェクションするとレプリコンの複製が抑制されることが明らかになった。このことから HCV の複製が VLDL の産生などの脂質代謝に関与することが示唆された。また、感染性株 JFH-1 を用いた感染実験においてもこの siRNA が JFH-1 の感染複製に抑制的に働くことが明らかとなった。これらの highly permissive な細胞クローンにおいてはアポリポ蛋白質などの脂質代謝遺伝子の発現亢進により HCV 複製が亢進しており、全長 HCV(1b)型の樹立にも有用であると考えられた。

(4) 新しい HCV レプリコンの樹立

一方、全長 HCV(1b)型感染性クローンを樹立するために、まず複製能の高い HCV サブゲノムレプリコンの樹立を試みた。C 型肝炎患者血清から RNA を抽出し long RT-PCR 法にて HCV 非構造領域の cDNA (遺伝子型 1b) を増幅した。これを HCV サブゲノムレプリコンカセットへ挿入し、in vitro 転写法により RNA を合成し HCV サブゲノムレプリコンライブラリーを作製した。このライブラリー RNA を培養肝癌細胞 Huh-7 へトランスフェクションし、ネオマイシン存在下で 3 週間培養し HCV サブゲノムレプリコン複製細胞が樹立できた。そのうちの一つの細胞クローンをネオマイシン存在下で培養し、そこから long RT-PCR 法にて HCV 非構造領域の cDNA を増幅し、さらにプラスミドカセットへ再挿入しサブゲノ

ムレプリコンプラスミド(pSGT5)を樹立した。pSGT5 から RNA を作製し Huh-7 細胞へトランスフェクトすると、もとのライブラリーに比べ数百倍のコロニーが得られ、pSGT5 が非常に複製効率の良いサブゲノムレプリコンであることが示された。

次に long RT-PCR 法にて同じ血清から HCV 構造領域の cDNA も増幅し、pSGT5 へ挿入し、HCV 全長レプリコン RNA ライブラリーを作製した。これを上記の highly permissive な Huh-7 細胞へトランスフェクトすると、細胞内でコアタンパクの発現が認められた。しかし、発現は持続せず感染性のクローンとしてはまだ不十分であり、今後さらなる工夫が必要であると考えられた。

(5) 欠損型 HCV ゲノムの遺伝子解析と

その感染性

一方、上記レプリコンの作製の過程で同じ血清に欠損ゲノムを持つ HCV が存在することが明らかとなった。これらが全長 HCV 感染クローンの感染、複製へ関与すると考えられ、他の C 型肝炎患者血清(18 例)に対しても long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。その結果、4 症例において構造領域が広範囲に欠失した HCV ゲノムが検出され、これらに対して塩基配列の解析を行った。4 症例とも構造領域が広範囲に欠損していたが、欠損は in-frame deletion であり、肝細胞内で欠損型 HCV のゲノムが翻訳されている可能性が示唆された。また、コアタンパク領域が保存されており、この領域が欠損 HCV の複製またはウイルス粒子形成などに重要な役割を持っている可能性が示唆された。

次に、実際の患者血清から得られた欠損型ウイルス cDNA から RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションするとその RNA が複製することが明らかになった。さらに、その欠損ゲノム RNA に、構造領域タンパクを

トランスに供給することによって、欠損ゲノムがパッケージされ感染性のウイルスが産生されるかどうかをみた。キャップ構造を付加した mRNA として構造領域をトランス供給すると、HCV 欠損ゲノム RNA がパッケージされたウイルス粒子が Huh7 細胞へ感染し複製することが確認された。また、構造領域を安定的に発現する細胞を樹立し、これに HCV 欠損ゲノム RNA をトランスフェクションすることによっても同様の結果が得られ、患者血清中の HCV 欠損ゲノム RNA は、構造領域が供給されることでパッケージされ感染性ウイルスとして産生されると考えられた。

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)

C 型肝炎ウイルスの増幅機構. 日紫喜隆行、杉山和夫. 細胞 vol.41 (6), 8-11, 2009.(査読なし)

Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. Sugiyama K, Suzuki K, et.al.J Virol, Apr 15 (electric version), 2009. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

肝移植後の再発 C 型肝炎血清からの新しい HCV レプリコンの作製. 杉山和夫, 赤塚俊隆, 下遠野邦忠, 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、10月21-22日、2007.

Establishment of a New HCV Replicon from the Recurrent HCV Patient Transplanted with Liver. Sugiyama K, Akatsuka T, Shimotohno T.14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, Sep.9-13, 2007.

Proteomics Analysis Identifies an Interaction between Hepatitis C Virus NS5B and alpha-tubulin. Inoue T, Huang C, Sugiyama K, Mizutani T, Hwang SB, Enomoto N, Lemon SM, Makino S.13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, Aug. 27-31 2006.

Hepatitis C virus affects the location and function of a drug-metabolizing enzyme, microsomal epoxide hydrolase. Akatsuka T, Kobayashi N, Sugiyama K, Duan H, Takagi A, Feinstone SM, 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, Aug. 27-31, 2006.

〔図書〕(計1件)

杉山和夫, Cancer Treatment Navigator (中川和彦編), メディカルレビュー社、p40-41(家族性腫瘍), 2008年

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 和夫 (SUGIYAMA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：10242520

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし