

平成 20 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790503
 研究課題名 (和文)
 三次元培養肝細胞を利用した肝炎ウイルス感染モデルの開発
 研究課題名 (英文)
 Development of the hepatitis virus infection model using 3D cultured hepatocyte
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

三次元培養した肝細胞に対する B 型肝炎ウイルスの感染および複製の可否について検討した。その結果、簡易的な三次元培養系である温度感受性ゲルでは B 型肝炎ウイルスは感染できない可能性、人工肝臓で培養した三次元培養肝細胞には B 型肝炎ウイルスの感染が成立する可能性が示唆された。今後はこの結果についての再現性について確認するとともに、薬剤耐性ウイルス出現の評価へ応用可能であるか等を検討する必要があると考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：

医歯薬学

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：

三次元培養、HBV, HEV

1. 研究開始当初の背景

B 型肝炎及び E 型肝炎は臨床的に極めて重要な疾患である。その病原ウイルスである B 型肝炎ウイルス (HBV) 及び E 型肝炎ウイルス (HEV) は培養細胞での効率の良い感染系がないことが抗ウイルス療法の開発において問題であり、研究上の急務である。

肝臓は生体において極めて分化した細胞

の集団であり、肝炎ウイルスはその肝臓の機能を利用して増殖している。従って脱分化状態の平皿培養の肝癌細胞を用いるよりも生体内と同等の形態及び機能を保持する三次元培養肝細胞が肝炎ウイルスの感染及び増殖に適していると考えた。実際に申請者は平皿培養細胞では困難な C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染、複製及び粒子産生が二種類の三次元培養肝細胞系 (温度感受性ゲル、ラジア

ルフロー型バイオリアクター)で可能であることを報告した。(特許出願 2005-54835)。この方法をHBV、HEVに応用し、ウイルスの感染増殖系を樹立することを考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究ではB型肝炎ウイルス(HBV)及E型肝炎ウイルス(HEV)への応用を検討する。具体的には主に簡便な三次元培養系である温度感受性ゲルを利用して以下の事項を研究期間内に遂行する。

- 1.三次元培養肝細胞へのHBV感染の検討
- 2.三次元培養肝細胞へのHEV感染及びHEV粒子産生の検討

3. 研究の方法

1) HBV 及び HEV 検出系の導入

感染及び複製の確認のためウイルス蛋白の検出系(免疫染色)を導入した。

2) HBV 粒子複製細胞の作製及び HEV-RNA 複製細胞の検討

HBVはHuh7,HepG2細胞いくつかの肝細胞でウイルス粒子が産生されることが報告されている。そこで、Huh7細胞、に作製したベクターを導入しHBVを産生する細胞株を樹立した。本年度は感染実験に用いるため、培養上清のウイルス粒子について評価した。

3) 温度感受性ゲルを用いた三次元化の条件検討

簡便な三次元培養システムである温度感受性ゲルを用いて、昨年度検討が不十分であったいくつかの細胞株に関して培養条件の検討を行った。ゲルに添加する足場蛋白、および三次元化の確認はアルブミン産生能、薬剤代謝能を検討するほか、微絨毛の発達、微小胆管用構造の有無を電子顕微鏡観察によって確認した。

4) HBV 及び HEV 感染性粒子を用いた感染実験

HBV陽性血清及び培養細胞にて産生したHBV粒子が温度感受性ゲルにて三次元培養した各種細胞に感染するか否かについて検討する。またHEVを含む糞便中より精製したHEVを用いて同様の感染実験を行う。感染の成否に関しては、ウイルスゲノムのTaqMan-PCR定量系及びウイルス蛋白のELISAによる定量系を用いて評価した。

5) ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた長期感染実験

6ヶ月以上の長期培養に適しているラジ

アルフロー型バイオリアクター(人工肝装置)にて感染実験をおこなった。

4. 研究成果

クローニングしたHBVをタンデムに結合して作成したウイルス発現用ベクターをヒト肝癌由来細胞株Huh7細胞に導入し、この培養上清を超遠心操作により濃縮した。平皿培養もしくはあらかじめメビオールゲルにて三次元培養しておいたnaiveなHuh7細胞、Alexander細胞とincubateしたのち、数日間培養を継続し経時的に細胞を回収した。その結果、三次元及び平皿培養細胞どちらも感染後HBsAg量はnegativeにはならないものの経時的に減少した。

ウイルス感受性の有為な差が得られなかったことから、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)の系による感染実験を試みた。本装置は人工臓器として開発されたものであり、遺伝子型によらないHCV患者血清の感染および複製が観察できる系である。RFBでFLC4細胞を培養し、HBV感染後中和抗体が出現する前の急性期の患者血清を用いて感染実験を行った。その結果、感染後HBsAgは陰性になったが、約1ヶ月後から弱陽性となった。本研究により、三次元培養がHBV感染の感受性を変化させる可能性が示唆された。研究代表者は、他の研究成果から、いくつかの細胞接着因子は細胞の三次元によって細胞質から細胞接着面にその局在をかえる事を見いだしている。この事からも、ウイルスのレセプターが三次元化により細胞表面に局在出来るようになった、または、必要なcomplexを形成できるようになったことが考えられる。今後、細胞膜表面蛋白のプロテオーム解析等によってHBVの新規受容体が同定できる可能性があるだろう。また、培養細胞を用いたHBV長期感染系は報告されていない。本研究の成果は、薬剤耐性ウイルスの解析等にRFBが利用できる可能性を示唆した。また、簡易的な三次元培養系であるメビオールゲルと比べ、RFBがより生体に近い環境を作り出せる事をウイルス感受性の違いで示すことが出来た。今後人工肝臓の機能評価においてHCV,HBVウイルス感受性が指標として利用できる可能性も考えている。

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 件)

(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 6 件)

- ① Kyoko Murakami, Toshiro Kimura, Motonao Osaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita and Ikuo Shoji ; Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines; J Gen Virol., 89,1587-1592 (2008), 査読有
- ② Koji Ishii, Kyoko Murakami, Su Su Hmwe, Zhang Bin, Jin Li, Masayuki Shirakura, Kenichi Morikawa, Ryosuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki ; Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins ; BBRC, 371(3):446-50. (2008) 査読有
- ③ Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, 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.; 82(16):7964-76. (2008) 査読有
- ④ Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, S, Suzuki T, Murakami K, 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. Virology383(2)、319-327 (2009) 査読有
- ⑤ Prasetyo AA, Kamahora T, Kuroishi A, Murakami K, Hino S.; Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV). Virology Epub ahead of print (2009) 査読有
- ⑥ Tetsu Shimoji, Kyoko Murakami, Yuichi Sugiyama, Mami Matsuda, Sachiko Inubushi, Junichi Nasu, Masayuki Shirakura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Tatsuya Kishino, Hak Hotta, Tatsuo Miyamura, and Ikuo Shoji; Identification of Annexin A1 as a novel substrate for 1 E6AP-mediated ubiquitylation; Journal of Cellular Biochemistry Epub ahead of print (2009) 査読有

〔学会発表〕 (計 16 件)

- ① Ikuo Shoji, Motonao Osaki, Kouichirou Fukuda, Kyoko Murakami, Hak Hotta, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, and Tatsuo Miyamura. ; Molecular mechanism of E6AP-mediated regulation of hepatitis C virus production. ; keystone symposia ; 2008.04、バンクーバー
- ② Kyoko Murakami, Katsutoshi Abe, Ikuo

Shoji, Satoshi Takamiya, Toshiro Kimura, Koji Ishii, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, and Takaji Wakita ; Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA ; IUMS2008 (国際ウイルス会議)、2008.08、イスタンブール

- ③ Afieono Agung Prasetyo, Toshio Kamahora, Kyoko Murakami, and Shigeo Hino ; Requirement of Apoptin for CAV replication ; IUMS2008 (国際ウイルス会議)、2008.08、イスタンブール
- ④ Itsuki Hamamoto, Kyoko Murakami, Tetsuro Suzuki, Keiko Taya, Nobuhiko Okabe, Takaji Wakita, and Ikuo Shoji ; ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. ; 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses ; 2008.10、サンアントニオ
- ⑤ Katsutoshi Abe, Kyoko Murakami, Satoshi Takamiya, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, Takaji Wakita and Tetsuro Suzuki ; Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding protein partners for HCV core protein ; 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses ; 2008.10、サンアントニオ
- ⑥ Koji Ishii, Kyoko Murakami, Su Su Hmwe, Jin Li, Ryosuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, and Tetsuro Suzuki ; Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins ; 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses ; 2008.10、サンアントニオ
- ⑦ Hiromichi Hara, Hideki Aizaki, Mami Matsuda, Kyoko Murakami, Ikuo Shoji, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, and Tetsuro Suzuki ; The C-terminal serine cluster of NS5A is determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production ; 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses ; 2008.10、サンアントニオ
- ⑧ Ikuo shoji, Motonao Osaki, Kyoko Murakami, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, and Hak Hotta ; Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein ; 5th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses ; 2008.10、サンアントニオ
- ⑨ 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲郎、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、勝二郁夫 ;

- C型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子ERGIC-53の機能；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑩ 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫；HCVコア蛋白に結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑪ 原弘道、相崎英樹、松田麻未、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、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；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑫ 石井孝司、村上恭子、ススムエー、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗；C型肝炎ウイルスのsubgenomic repliconを持つウイルス様粒子の形成と感染性；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑬ 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；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑭ 伊藤昌彦、持田恵子、村上恭子、鈴木哲朗、山口一成、水落利明；HCV慢性感染患者におけるB細胞リンパ腫発症機序の解明：末梢血B細胞でのHCV感染増殖およびAID (activation-induced cytidine deaminase) の発現上昇；第56回日本ウイルス学会学術集会；2008.10 岡山
- ⑮ 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫；HCVコア蛋白に結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割；第31回日本分子生物学会年会；2008.12、神戸
- ⑯ 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、堀田博；C型肝炎ウイルスコア蛋白質のコピキチン化シグナル；第31回日本分子生物学会年会；2008.12、神戸

〔図書〕(計 件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 件)
なし
○取得状況(計◇件)
なし
〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書