

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16267

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルス伝播経路の選択バランス制御機構の解析

研究課題名（英文）The analysis for the HCV propagation strategy from the infected cells to uninfected cells

研究代表者

大橋 啓史（Ohashi, Hirofumi）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・研究員

研究者番号：40866761

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）は非感染細胞へと自身を伝播する際にcell free経路およびcell-to-cell経路を利用するが、伝播経路のバランスをどのように制御するかは明らかではない。本研究ではウイルス株の違いと脂肪滴産生のウイルス伝播への寄与を明らかにした。臨床分離株JFH-1と実験室型キメラウイルス株Jc1-n間ではJc1-n株の方が、ウイルス粒子放出能が高いことが示唆された。また、脂肪滴産生を低下させることでcell-to-cell経路によるウイルス伝播が顕著に低下した。すなわちウイルスの伝播戦略は株間で異なりかつ、感染細胞内の脂肪滴産生量が重要な役割を果たすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCVの伝播において、cell-to-cell経路は中和抗体からの回避に重要と考えられているが、この経路に関わる宿主細胞機能は未解明であった。本研究により、HCVのcell-to-cell伝播には宿主細胞の脂肪滴産生が重要であることを明らかとした。本研究で得られた知見により、HCVの伝播機構に関する理解を深めることができた。また、cell-to-cell経路に関与する宿主機能の発見は、この経路を標的とした新たな抗ウイルス化合物探索につながる期待される。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis C virus (HCV) uses cell-free and cell-to-cell transmission pathways to spread progeny viruses to uninfected cells. However, the control machinery for these transmission pathways is unclear. This study revealed that the production of lipid droplets in the infected cells is important for cell-to-cell pathway dependent viral transmission. Additionally, the laboratory HCV strain, Jc1-n, had a higher ability to release progeny viruses as compared to the clinically isolated strain, JFH-1. These data suggest that increased LD formation is important for cell-to-cell transmission and that the strategy of viral spread is also different between HCV strains.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV Lipid droplets

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は非感染細胞へと自身を伝播する際に cell free および cell-to-cell の2経路を利用する。Cell free 経路は健常者へのHCV感染の開始に、cell-to-cell 経路は免疫回避および肝臓での局所的感染拡大にそれぞれ利用され、HCVが慢性感染を成立・維持させるのに重要である。これまで、HCVの伝播については各経路それぞれに関して、制御する分子の同定と制御機構解析が別々になされておりウイルスの伝播経路選択機構の全容を解明しようとするアプローチはなされていない。そのため、細胞内で産生された感染性子孫HCV粒子がどちらの経路を選択して伝播するかのバランス制御機構は明らかではない。

2. 研究の目的

研究の目的は感染性子孫HCV粒子が伝播経路を決定するのに関与する宿主細胞機能並びに宿主因子を同定するとともに、ウイルス自身の伝播戦略を株間比較することでウイルス伝播経路のバランス制御機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) HCVの配列に着目した株間比較による解析

HCVのウイルス側因子による伝播効率の違いを解析するため、臨床分離株であるJFH1と実験室型キメラウイルス株のJc1-nを用いてウイルス産生とその伝播を比較した。これら2つの株のHCVを感染させたのち、感染細胞数、ウイルスRNA複製量、細胞外へのウイルスRNA放出量をそれぞれ継時的に定量した。感染培養細胞を用いて得られた実験データをもとにウイルス生活環を数学的に表した方程式を用いて解析した。

2株間で感染細胞内でのウイルスRNAの増幅には顕著な差がなかったものの、感染効率はJFH1株の方が高かった。また、Jc1-n株はJFH1株よりもウイルス粒子放出能が顕著に高いことが示唆された。

2) 宿主機能に依存したHCV伝播経路選択機構の解析

HCV感染細胞内では脂肪滴の産生・巨大化が促進される。脂肪滴は感染性子孫粒子の産生に関与することから、宿主細胞における脂肪滴産生状態に依存したウイルス伝播を解析することとした。HCVのNS3/4Aプロテアーゼにより特異的に切断されることで、mCherryの局在が細胞質から核内に変化する細胞(レシピエント細胞)を用いてHCVの新規感染をmCherryの局在変化により評価した。

HCV JFH1株感染細胞(プロデューサー細胞)と上述したレシピエント細胞を共培養し、HCV伝播を定量した。HCVのエンベロープ抗体を処理することでcell free感染を阻害した条件ではレシピエント細胞への感染の広がりがコントロールの36.9%まで低下した。すなわち、cell free経路によるHCVの伝播は全体の63.1%、cell-to-cell経路による伝播は36.9%であった。一方で芳香族炭化水素受容体(AhR)の阻害剤を処理し、プロデューサー細胞とレシピエント細胞ともに脂肪滴産生を低下させた条件では、cell free経路によるHCVの伝播は全体の79.4%、cell-to-cell経路による伝播は20.6%であった。

4. 研究成果

本研究では、感染性子孫HCV粒子が伝播経路を決定するバランス制御機構を明らかにするため、宿主細胞機能およびウイルス自身の配列の2つの点に着目した。

HCVの配列に着目した株間の比較による解析から、産生された感染性粒子の感染効率はJFH1株の方が高かった一方で、ウイルス放出はJc1-n株の方が顕著に高かった。このことから、Jc1-n株は子孫ウイルス粒子の放出とそれに伴う新規感染によりウイルス伝播を効率的に行うのに対し、JFH1株は感染細胞内でのウイルスRNA量の最大化に適していることが考えられる。

HCV JFH1株を用いた宿主機能に依存したHCV伝播経路選択機構の解析により、AhR経路による感染細胞内での脂肪滴の蓄積がcell-to-cell経路によるウイルス伝播に寄与することが示唆された。これまで、脂肪滴はHCVの感染性子孫粒子構築の場として利用されることが報告されているものの、ウイルス伝播における役割についてはほとんど明らかにされていない。得られた結果は、HCVの生活環における脂肪滴の新たな役割を明らかにするものである。

以上の成果は、HCV の感染性子孫ウイルス粒子がどのようにして伝播経路を選択するか¹の制御機構を解明する一助になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohashi H, Watashi K, Saso W, Shionoya K, Iwanami S, Hirokawa T, Shirai T, Kanaya S, Ito Y, Kim KS, Nomura T, Suzuki T, Nishioka K, Ando S, Ejima K, Koizumi Y, Tanaka T, Aoki S, Kuramochi K, Suzuki T, Hashiguchi T, Maenaka K, Matano T, Muramatsu M, Saijo M, Aihara K, Iwami S, Takeda M, McKeating JA, Wakita T.	4. 巻 24(4)
2. 論文標題 Potential anti-COVID-19 agents, cepharanthine and nelfinavir, and their usage for combination treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102367.	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 Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M.	4. 巻 6(6)
2. 論文標題 Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e0062321.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00623-21.	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 Ejima K, Kim KS, Ludema C, Bento AI, Iwanami S, Fujita Y, Ohashi H, Koizumi Y, Watashi K, Aihara K, Nishiura H, Iwami S.	4. 巻 35
2. 論文標題 Estimation of the incubation period of COVID-19 using viral load data.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epidemics.	6. 最初と最後の頁 100454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epidem.2021.100454.	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 Shionoya K, Yamasaki M, Iwanami S, Ito Y, Fukushi S, Ohashi H, Saso W, Tanaka T, Aoki S, Kuramochi K, Iwami S, Takahashi Y, Suzuki T, Muramatsu M, Takeda M, Wakita T, Watashi K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Mefloquine, a Potent Anti-severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Drug as an Entry Inhibitor in vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 651403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.651403	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 Nishiuchi K, Ohashi H, Nishioka K, Yamasaki M, Furuta M, Mashiko T, Tomoshige S, Ohgane K, Kamisuki S, Watashi K, Kuramochi K.	4. 巻 85(1)
2. 論文標題 Synthesis and Antiviral Activities of Neoechinulin B and Its Derivatives.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nat Prod.	6. 最初と最後の頁 284-291.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c01120.	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 Iwanami Shoya, Kitagawa Kosaku, Ohashi Hirofumi, Asai Yusuke, Shionoya Kaho, Saso Wakana, Nishioka Kazane, Inaba Hisashi, Nakaoka Shinji, Wakita Takaji, Diekmann Odo, Iwami Shingo, Watashi Koichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Should a viral genome stay in the host cell or leave? A quantitative dynamics study of how hepatitis C virus deals with this dilemma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000562	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 Ohashi Hirofumi, Wang Feng, Stappenbeck Frank, Tsuchimoto Kana, Kobayashi Chisa, Saso Wakana, Kataoka Michiyo, Yamasaki Masako, Kuramochi Kouji, Muramatsu Masamichi, Suzuki Tadaki, Sureau Camille, Takeda Makoto, Wakita Takaji, Parhami Farhad, Watashi Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Oxysterol Derivatives In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063163	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 Saito Shiki, Ohashi Hirofumi, Nakamura Kou, Otagaki Junichiro, Nishioka Kazane, Nishiuchi Kota, Nakamura Ayaka, Tsurukawa Yukine, Shibasaki Hisanobu, Murakami Hironobu, Nagane Masaki, Okada Maiko, Kuramochi Kouji, Watashi Koichi, Kamisuki Shinji	4. 巻 70
2. 論文標題 Cyclic Phthalate Esters as Liver X Receptor Antagonists with Anti-hepatitis C Virus and Anti-severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 679 ~ 683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00345	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 -

1. 著者名 Ohashi H, Hishiki T, Akazawa D, Kim KS, Woo J, Shionoya K, Tsuchimoto K, Iwanami S, Moriyama S, Kinoshita H, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Ebihara H, Suzuki T, Maeda K, Fukushi S, Takahashi Y, Iwami S, Watashi K	4. 巻 205
2. 論文標題 Different efficacies of neutralizing antibodies and antiviral drugs on SARS-CoV-2 Omicron subvariants, BA.1 and BA.2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105372 ~ 105372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2022.105372	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 -

1. 著者名 Machitani Mitsuhiro, Takei Junko, Kaneko Mika K., Ueki Saori, Ohashi Hirofumi, Watashi Koichi, Kato Yukinari, Masutomi Kenkichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of novel monoclonal antibodies against nsp12 of SARS-CoV-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-022-01948-2	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 -

1. 著者名 Nakajima Shogo, Ohashi Hirofumi, Akazawa Daisuke, Torii Shiho, Suzuki Rigel, Fukuhara Takasuke, Watashi Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Antiviral Activity of Micafungin and Its Derivatives against SARS-CoV-2 RNA Replication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 452 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v15020452	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋啓史
2. 発表標題 植物由来天然物と類縁体のRNAウイルス増殖への作用と効果の解析
3. 学会等名 JBA植物バイオ研究会勉強会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------