

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390138

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルスの感染様式の解析と感染指示細胞株の樹立

研究課題名（英文）Analysis of infection mechanisms of hepatitis C virus and establishment of the indicator cell lines for viral infection

研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA YOSHIHARU)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：50157252

研究成果の概要（和文）：肝臓細胞に特異的に発現している microRNA-122 (miR-122) を種々のヒト肝臓由来細胞株に導入し、HCV の感受性を検討した。miR-122 を発現させた Hep3B 細胞に HCV の実験室株を感染させると、Huh7 細胞と同等のゲノム複製と粒子産生能を示した。また、この細胞でレプリコンが樹立可能で、さらに薬剤でウイルスゲノムを排除させると、ウイルスの複製効率が上昇していた。

研究成果の概要（英文）：

A liver-specific microRNA, miR-122, has been shown to participate in the efficient replication of hepatitis C virus (HCV). In this study, we examined the possibility of establishing a new permissive cell line for HCV propagation by the expression of miR-122. Among the cell lines we examined, Hep3B cells stably expressing miR-122 (Hep3B/miR-122) exhibited a significant enhancement of HCVcc propagation. Furthermore, a line of “cured” cells established by elimination of HCV RNA from the Hep3B/miR-122 replicon cells exhibited an enhanced expression of miR-122.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：HCV、複製、宿主因子、マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、HCVのスクリーニング方法の確立により新たな感染者は激減した。しかしながら、本邦には200万人ものHCV感染者が存在し、毎年二万数千人がHCV感染に起因する肝臓で死亡しており、社会的にも大きな問題となっている。インターフェロンとリバビリンの併

用療法が導入され、C型慢性肝炎の著効率は50%程度にまで改善されたが、より効果的な治療法の開発が急務である。C型肝炎の征圧には、まずHCVの生活環をより正確に理解する必要がある。宿主細胞への吸着、侵入、ゲノム複製、粒子形成、そして出芽といった一連の感染機構の解析は、それぞれのステップをターゲットとした治療薬の開発にも必須である。最近、培養細

胞で増殖可能な遺伝子型 2b の HCV、JFH1 株 (HCVcc) が構築されたことで、HCV の生活環に関する多くの知見が得られるようになってきた。しかしながら、HCV に感受性を示す唯一の実験動物であるチンパンジー接種しても HCVcc は病原性を示さない。即ち、抗ウイルス療法に耐性を示し、肝炎や肝癌を発症させている難治性の遺伝子型 1b の HCV を効率よく複製できる細胞培養系は未だ確立されておらず、HCV の感染、複製、そして肝疾患の発生病理機序は依然として謎に包まれたままである。

## 2. 研究の目的

HCV 感染は、脂肪肝、肝硬変、肝細胞癌などの肝病変の発症だけでなく、リンパ腫やクリオグロブリン血症などの肝外病変にも関与することが知られている。しかし、HCV の肝臓に対する感染指向性や肝外病変の発症メカニズムは不明である。その理由として、HCV の感染培養系が肝癌細胞株である Huh7 細胞と HCV の実験室株である JFH1 ウイルスの組み合わせに限定されているからである。最近の研究により、肝臓特異的な micro RNA である miR-122 が HCV-RNA の翻訳および複製を増強することが明らかになってきた。また、検討した細胞株の中では Huh7 細胞で最も miR-122 の発現が高いことから、In vitro の感染増幅系成立に miR-122 の発現が関与していることが予想された。今回、miR-122 を発現させることによって HCVcc の感染増幅が可能になる非肝臓細胞株を樹立し、肝臓系細胞株との感染性の違いを検討することにより、感染指向性を規定する因子を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

HCV のレセプターを発現する 10 種類のヒト細胞株にレンチウイルスベクターにて miR-122 を強制発現した。HCVcc の感染性は HCV-RNA の定量およびウイルス蛋白質の発現を検討した。miR-122 と HCV-RNA の結合部位の遺伝子特異性の検討には、変異を導入した mt-miR-122 と mt-HCVcc を用いた。HCVcc の感染性の違いとして、上清中の感染価を肝臓系と非肝臓系細胞株の間で比較した。細胞株の検索には cDNA array データベースを用いた。

## 4. 研究成果

HCV 研究に必須な in vitro 培養系としては、実験室株である HCVcc と、ヒト肝癌由来細胞株である Huh7 細胞の組み合わせに限定されている。HCV の感受性細胞株が一つだけでは、ウイルス感染によって惹起される宿主遺伝子の変動を正確に解析するのは難しい。従って、比較対照となる HCV の感染性細胞株が必要である。そこで

今回、miR-122 を過剰発現させることで、HCVcc に感受性を示す新しいヒト肝細胞株の樹立を試みた。レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を種々のヒト肝臓由来細胞株に導入し、HCV の感受性を検討した。調べたヒト肝細胞株の中で、miR-122 を発現させた Hep3B 細胞 (Hep3B/miR-122) に HCV の実験室株を感染させると、Huh7 細胞と同等のゲノム複製と粒子産生能を示した。また、Hep3B/miR-122 細胞で HCV レプリコンが樹立可能で、さらに薬剤でウイルスゲノムを排除させた “Cured 細胞” は、ウイルスの増殖効率が上昇していた。

これまでに miR-122 を様々な細胞株に強制発現して HCV の感受性を検索した結果、ヒト肝臓由来の Hep3B 細胞やヒト子宮体由来の Hec1B 細胞が HCV に感受性を示すことを見いだした。HCV に感受性を示す新しい細胞株を樹立できれば、Huh7 細胞だけで解析されてきた HCV の増殖機構の検証が可能となり、HCV の宿主細胞との相互作用のより深い理解が可能となる。C 型慢性肝炎に対して IFN とリバビリンに加え、プロテアーゼ阻害剤の併用が開始され、難治性患者の 6 割で著効が得られるようになってきたが、耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている。患者血清由来の HCV 野外株の分離培養系の確立は、HCV 遺伝子がクローニングされてから、世界中で試みられているが、未だ成功例はない。本研究により HCV 野外株の感染・増殖機構が解明され、さらに、高感度な感染指示細胞が樹立されれば、HCV の基礎研究のみならず、慢性 C 型肝炎に対する新規抗ウイルス剤の開発への貢献は計り知れないものがある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- 1 Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. Kambara H., Fukuhara T., Shiokawa M., Ono C., Ohara Y., Kamitani W., and Matsuura Y. *J. Virol.* 86, 1382-1393 (2012). (査読有り)  
doi:10.1128/JVI.00567-12
- 2 Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Koike K., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 85, 13185-13194 (2011). (査読有り)  
doi:10.1128/JVI.06099-11
- 3 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. Katoh H., Mori Y., Kambara H., Abe T., Fukuhara T., Morita E., Moriishi K., and Kamitani W., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 85, 10976-10988 (2011). (査読有り)

- doi:10.1128/JVI.00846-11
- 4 Structure of hepatitis E viral particle. Mori Y., and Matsuura Y. *Virus Res.*, 61, 59-64 (2011). (査読有り)  
doi:10.1016/j.virusres.2011.03.015
  - 5 Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. Kambara H., Tani H., Mori Y., Abe T., Katoh H., Fukuhara T., Taguwa S., Moriishi K., and Matsuura Y. *Virology*, 412, 211-219 (2011). (査読有り)  
doi:10.1016/j.virol.2011.01.011
  - 6 Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. Wen X., Abe T., Kukihara H., Taguwa S., Mori Y., Tani H., Kato N., Suzuki T., Tatsumi M., Moriishi M., and Matsuura Y. *PLoS One*, 6, e15967 (2011). (査読有り) doi:10.1371/journal.pone.0015967
  - 7 Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. Fukuhara T., Tani H., Shiokawa M., Goto Y., Abe T., Taketomi A., Shirabe K., Maehara Y., Matsuura Y. *Microbes Infect.*, 13, 405-412 (2011). (査読有り) doi:10.1016/j.micinf.2011.01.005
  - 8 Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., and Matsuura Y. *Hepatology*, 52, 411-420 (2010). (査読有り) doi: 10.1002/hep.23680
  - 9 Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. Tani H., Shiokawa M., Kaname Y., Kambara H., Mori Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 84, 2798-2807 (2010). (査読有り)  
doi:10.1128/JVI.02499-09
  - 10 Animal models for hepatitis C and related liver disease. Koike K., Moriya K., and Matsuura Y. *Hepatology Res.*, 40, 69-82 (2010). (査読有り) doi: 10.1111/j.1872-034X.2009.00593.x
  - 11 Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009). (査読有り) doi:10.1128/JVI.01035-09
  - 12 Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12986-12991 (2009). (査読有り)  
doi:10.1073/pnas.0903699106
  - 13 Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K.,

Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009). (査読有り) doi:10.1128/JVI.00889-09

[学会発表] (計 42 件)

- 1 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日, 2011.
- 2 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日-16日, 2011.
- 3 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. : 第59回日本ウイルス学会総会、札幌、9月12日-16日, 2011.
- 4 Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
- 5 Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells, Seattle, September, 8-12, 2011.
- 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子 ―細胞内蛋白質分解システムの関与について― : 第10回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8月27日, 2011.
- 7 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8月26日-27日, 2011.
- 8 Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
- 9 Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells, July 16-20, 2011.
- 10 松浦善治: C型肝炎・肝癌制圧の分子基

- 盤：第 47 回日本肝臓学会総会、東京、6 月 2 日-3 日、2011.
- 11 松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に關与する宿主因子: 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日、2010.
  - 12 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 13 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C 依存的なシグナル伝達経路の關与: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 14 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 15 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc 細胞)への患者血清由来 HCV の感染: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 16 森石恆司、松浦善治: HCV による脂質代謝障害の分子機序、同上。
  - 17 温 曉玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、森 嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 18 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 19 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンは C 型肝炎ウイルスの複製を制御する: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 20 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷 英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
  - 21 松浦善治: 温故知新・C 型肝炎ウイルス研究の源流: 第 52 回日本消化器病学会大会、横浜、10 月 13 日-16 日、2010.
  - 22 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 23 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 24 Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 25 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 26 Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for recurrent hepatitis C. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 27 Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 28 Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜、9 月 10 日-14 日、2010.
  - 29 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, , and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
  - 30 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、5 月 19 日-21 日、2010.
  - 31 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、

- 森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日-12日, 2009.
- 32 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCVコア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 33 谷 英樹、塩川 舞、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 34 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来HCVの細胞内導入法: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 35 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCVの増殖とオートファジー: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 36 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカインIP-10の過剰産生とC型肝炎の慢性化: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日, 2009.
- 37 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
- 38 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
- 39 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
- 40 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
- 41 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
- 42 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第15回日本遺伝子治療学会、大阪、6月10日-12日, 2009.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act\\_matsuura.php](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_matsuura.php)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA YOSHIHARU)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号: 50157252