

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590832

研究課題名（和文） プラークアッセイ法を応用した細胞障害性HCV株のクローン化と機能解析

研究課題名（英文） Development of plaque assay to isolate cytopathic HCV clones

研究代表者

大岡 真也 (OOKA SHINYA)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361691

研究成果の概要（和文）：

本研究では、プラークアッセイ法により得た増殖力・細胞障害性の強いウイルスクローンの解析を遂行し以下の結果を得た。(1)感染レセプター欠損 Huh7 細胞を用いた解析より、変異クローンは細胞内増殖が亢進しておりウイルス粒子形成・分泌能は野生型と同等であった。(3)変異 HCV クローンをヒト肝臓移植キメラマウスに接種したところ変異ウイルスは感染早期は高度に増殖するが安定期においては野生型と同等のレベルになり変異が消失した野生ウイルスが増加した。

研究成果の概要（英文）：

HCV-JFH1 yields subclones that develop cytopathic plaques (Sekine-Osajima Y, et al., Virology 2008; 371:71). Here, we investigated viral amino acid substitutions in cytopathic mutant HCV-JFH1 clones and their characteristics in vitro and in vivo. The mutant viruses with individual C2441S, P2938S or R2985P signature substitutions, and with all three substitutions, showed significantly higher intracellular replication efficiencies and greater cytopathic effects than the parental JFH1 in vitro. The mutant HCV-inoculated mice showed significantly higher serum HCV RNA and higher level of expression of ER stress-related proteins in early period of infection. At 8 weeks post inoculation, these signature mutations had reverted to the wild type sequences. HCV-induced cytopathogenicity is associated with the level of intracellular viral replication and is determined by certain amino acid substitutions in HCV-NS5A and NS5B regions. The cytopathic HCV clones exhibit high replication competence in vivo but may be eliminated during the early stages of infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：HCV レプリコン、HCV-JFH1 培養系

1. 研究開始当初の背景

国内に約 150 万人の慢性感染者が存在する HCV は現在最も有効な PEG インターフェロン・リバビリン併用療法を用いてもウイルス排除率は約半数に過ぎず、多くの症例が非代償性肝不全・肝癌に発展する。従って、HCV 持続感染・肝障害発症の分子機構の解明および新たな抗ウイルス療法の開発が急務である。近年まで HCV は安定した培養細胞系や感染動物モデルが存在しないことが研究開発の障壁となっていたが、1999 年に開発された HCV レプリコンシステムにより、従来不可能であった細胞内 HCV 増殖機構を培養細胞内にて安定して再現することが可能となった (Lohmann, Science, 1999)。さらに 2005 年に報告された、遺伝子型 2a の劇症 C 型肝炎患者由来である HCV-JFH1 株を用いた HCV 培養細胞系の開発により、HCV の細胞表面への吸着・侵入、ゲノム増殖、ウイルス粒子形成・排出を含むすべての感染増殖サイクルの解析が可能となった (Wakita, Nature Medicine, 2005)。これらの HCV 感染・増殖モデルがブレイクスルーとなり、現在ウイルス増殖機構解明、抗ウイルス療法開発を目的とした研究が展開されている。

申請者のグループは日本で単離された HCV-J4 株より独自に HCV レプリコンを構築し (Maekawa, J Viral Hepat, 2004)、さらにネオマイシン耐性遺伝子とレポーター遺伝子の融合遺伝子を発現するキメラレポーター HCV レプリコンにより、ウイルス複製増殖レベルを高精度・高効率に検出する測定系を独自に確立し (Tanabe, J Infect Dis)、HCV 増殖制御機構に関する報告を行っている (Sakamoto, Osajima et al, 2007 BBRC; Sakamoto, Osajima, et al. J Gastro Hepat 2007; Itsui, Osajima et al. J Viral Hepat 2006)。

申請者は、HCV 複製感受性の高い Huh7 細胞由来 cured 細胞を用いた HCV-JFH1 培養細胞系 (Zhong et al, PNAS, 2005) を用いてウイルス増殖の時間的動態を観察したところ、ウイルス感染数日後、増殖が極期になる時期に感染細胞の広汎な細胞死が起こることを見出した。HCV によるこの細胞障害効果 (cytopathic effect, CPE) は高レベルの HCV 増殖系により初めて明らかになった現象であり、その機構について詳細な解析はこれまで報告されていない。そこで HCV-JFH1 培養細胞系を用いたプラークアッセイを考案し (右図)、HCV の細胞障害効果の機構を解析し報告を行った (Sekine-Osajima, 2008 Virology)。

2. 研究の目的

申請者は本研究において、HCV 増殖が宿主細胞に与える影響を解析することにより肝細胞への HCV 感染を契機とした肝細胞障害・肝炎発症の分子機構を明らかとするための研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) HCV 感染増殖が宿主細胞に与える細胞障害効果とその機構の解析

HCV-JFH1 感染細胞に対して HCV-JFH1 感染細胞を用いて、プラークアッセイ、免疫蛍光染色、Western Blotting などの手法によりアポトーシスマーカー (Annexin V, Caspases) の発現、および ER ストレス関連タンパク (GRP78, PERK, ATF6, eIF2 α) 発現の検出を行い、HCV-JFH1 感染増殖による細胞障害効果の機構の解析を進める。

(2) 細胞障害性ウイルス株の単離とその機能解析

プラーク形成 HCV-JFH1 感染細胞を単離することで、複数の細胞障害性 HCV-JFH1 株の単離を試み、遺伝子レベルでのウイルスゲノムのクローニングを行う。さらに細胞障害性ウイルス株の増殖性、細胞障害性を規定するドメインの特定及び機能解析を進める。

(3) 高度細胞障害性ウイルス株を用いた劇症肝炎動物モデルの構築

単離された高度細胞障害性 HCV クローンを現在唯一の HCV 感染マウスモデルであるヒト肝臓移植 Alb-uPA/SCID マウス (Tateno, Am J Pathol 2004) に接種し、in vivo においても同様の高度ウイルス増殖・感染、細胞障害効果が認められるか否かを確認する。これらの結果をもとに劇症肝炎動物モデルの構築を試み、その機構解明及び新たな治療法の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) HCV プラーク単離株の遺伝子解析で同定した、NS5B の 5 個のアミノ酸変異を導入した変異ウイルスクローンを Hun751 細胞にトランスフェクションしウイルス増殖粒子形成能を解析したところ、3 箇所の変位クローンで親株 JFH1 より著明に高レベルの粒子産生が観察された。以上より、HCV の特定の遺伝子構造がウイルスの増殖・感染能を規定していることが示された。(2) 変異を個々に導入した細胞障害性クローンを感染レセプター欠損 Huh7 細胞に導入し増殖、粒子分泌レベルを解析したところいずれのクローンも細胞内増殖が著明に亢進しておりウイルス粒子形成・分泌能は野生型と同等であった。(3) 3カ所の変異を導入した HCV クローンをヒト肝臓移植キメラマウスに接種したところ変異ウイルスは感染早期に感染早期の血中

ウイルスレベルが高値であったが安定期においては野生型と同等のレベルになり変異が消失した野生ウイルスが増加した。次年度以降においては、急性重症型C型肝炎、肝移植後再発肝炎症例より新たな細胞障害性 HCV を構築し HCV の細胞障害効果の解析を進める。

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4件)

1. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. The inhibitory effect on hepatitis C virus infection of a triterpenoid compound, with or without interferon-alpha. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6):2537-2545.
2. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-369.
3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M. Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication. *Hepatol Res* 2009;39:60-69.
4. 唐鎌優子、坂本直哉、井津井康浩、中川美奈、藤田めぐみ、櫻井幸、柿沼晴、大岡真也、東正新、土屋輝一郎、小野木博、萩原正敏、渡辺守: SR 蛋白リン酸化酵素阻害剤による HCV 増殖抑制効果の解析. 消化器内科 2010;51(6): 632-635.

[学会発表] (計4件)

1. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Takaji Wakita, and Mamoru Watanabe: Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by

plaque-forming assay. 16th.

International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France.

2. 三島果子 坂本直哉 中川美奈 井津井康浩 箴島裕子 田坂めぐみ 櫻井幸 須田剛生 山本満千 植山真由美 渡辺貴子 船岡祐介 渡辺守: 細胞傷害性 HCV-JFH1 subclone の単離と機能解析. (ワークショップ3). 第45回日本肝臓学会総会, 2009.6.4, 神戸.
3. 三島果子、坂本直哉、箴島裕子、中川美奈、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、今村道雄、茶山一彰、渡辺守: 細胞障害性 HCV-JFH1 における遺伝子変異の機能解析と in vivo 感染動態の検討. (一般口演) 第46回日本肝臓学会総会 2010.5.27 山形.
4. 三島果子、坂本直哉、箴島裕子、中川美奈、藤田めぐみ、櫻井幸、須田剛生、唐鎌優子、山本満千、渡辺貴子、植山真由美、船岡祐介、幾世橋佳、新田沙由梨、北詰晶子、井津井康浩、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、渡辺守: 細胞障害性 HCV-JFH1 subclone の単離と機能解析. JDDW2009 2009.10.14 京都 (ポスター).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大岡 真也 (OOOKA SHINYA)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90361691

(2) 研究分担者

坂本 直哉 (SAKAMOTO NAOYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄付講座教員
研究者番号: 10334418

東 正新 (AZUMA SEISHIN)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10376783

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：10175127

(3)連携研究者

なし