

## 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 25 年 8 月 22 日現在

機関番号：32202  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22390090  
 研究課題名（和文） 感染培養系を用いたE型肝炎ウイルスの放出機構・ゲノム変異・受容体に関する研究  
 研究課題名（英文） Research on release mechanism, genome mutations and cellular receptor of hepatitis E virus (HEV) using cell culture systems for HEV  
 研究代表者  
 岡本 宏明（OKAMOTO HIROAKI）  
 自治医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：30177092

## 研究成果の概要（和文）：

感染培養系を駆使し、E型肝炎ウイルス(HEV)の放出に関わるウイルス因子としてORF3蛋白質、特にそのPASP配列、宿主因子としてTsg101やVps4などが重要であることを明らかにした。ウイルスゲノムのさまざまな変異が培養細胞への馴化並びに効率的なウイルス増殖に密接な関連があることを明らかにした。また、感染の初期過程に関与するレセプター候補分子の探索に資する様々な成果を得ることができた。

## 研究成果の概要（英文）：

Utilizing our efficient cell culture systems for hepatitis E virus (HEV), we elucidated that the ORF3 protein with an intact PSAP motif as well as Tsg101 and Vps4 as host factors are essential for the formation and release of membrane-associated HEV particles. Various HEV mutations were found to be associated with adaptation to cell culture and efficient replication of HEV. Several novel findings were obtained during this study that would contribute to the identification of cell receptor molecules for HEV in future studies.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：E型肝炎ウイルス・感染培養系・感染性cDNAクローン・感受性細胞・吸着  
 ・細胞レセプター候補分子

## 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎ウイルス(HEV)は約7.2 kbの1本鎖(プラス鎖)RNAをゲノムとし、ヘペウイルス科ヘペウイルス属に分類されている。HEVゲノムは3つのORF(ORF1, ORF2, ORF3)を有し、ORF1(1704 aa)はヘリカーゼやRNAポリメラーゼなどの非構造蛋白を、ORF2(660 aa)は

キャプシド蛋白をコードしている。ORF3(113-114 aa)の機能はこれまで不明であったが、研究代表者らの研究により、ウイルス粒子の感染細胞からの放出に必須であることが明らかになっている(J Gen Virol 90:1880, 2009)。

HEV は 1983 年、アジア・アフリカの発展途上国での水系感染による流行性肝炎の原因ウイルスとして同定された。しかし、近年、日本を含む先進諸国でも流行地域からの輸入によらない、国内感染の散発性 E 型肝炎の発症が報告され、注目を集めている。研究代表者らは、国内感染の E 型肝炎でも劇症化により死亡するケースが少なからず存在することを世界で最初に報告し (N Engl J Med 347:1456, 2002)、E 型肝炎がブタを始めとする各種動物を感染源とする人獣共通感染症であることを示すデータを数多く世界に向け発表してきた (J Gen Virol 84:851, 2003; J Clin Microbiol 42:5371, 2004 など)。加えて、2007 年に世界に先駆けて HEV の培養系を確立することに成功した (J Gen Virol 88:903, 2007)。しかし、HEV の増殖機構や蛋白発現様式、及び発現蛋白質の機能に関する研究は、ほとんど進んでいない。

本研究は、世界に先駆けて HEV の培養系を確立できた研究上のアドバンテージを最大限に生かし、これまでに明らかにされていない HEV 粒子の種々の感受性細胞への吸着や侵入の機構、複製過程に影響する種々のウイルス因子及び宿主因子を明らかにし、さらには HEV が有する極めてユニークな感染細胞からの放出機構の解明を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) HEV の放出機構の解明

①HEV の放出に関わるウイルス側因子の解析：野生株感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) (J Gen Virol 90:457, 2009) を用い、ORF3 蛋白質 C 末端側に存在する PASP モチーフに変異を導入した cDNA クローンを作製し、*in vitro* トランスフェクションにより合成された全長 RNA をヒト肝癌由来 PLC/PRF/5 細胞に導入する。野生株及び  $\Delta$  ORF3 mutant (ORF3 蛋白質欠失変異体) と比較しながら粒子産生への影響を調べる。

②HEV の放出に関わる宿主側因子の解析：siRNA による Tsg101 の発現低下により培養上清中での HEV 産生量が低下するかどうかを検討する。さらに、Vps4 ドミナントネガティブ変異プラスミドをトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清中及び細胞内の HEV RNA titer を測定し、検討する。

(2) E 型肝炎の重症化・劇症化に関わるウイルスゲノム変異、及び HEV の感染、複製、遺伝子発現調節などのウイルス生活環の種々の段階に影響しうるウイルスゲノム変異の検討

#### ① E 型劇症肝炎患者 (遺伝子型 4 型) から分

離された HEV 株の増殖能に影響するウイルス変異の検討：これまで、1819 番目の塩基が C に変異し、3148 番目の塩基が U に変異、あるいは 5907 番目の塩基が C に変異した 4 型 HEV は劇症肝炎の発症と密接な関連があることを報告してきた (J Med Virol 78:476-84, 2006)。そこで、新たに劇症肝炎株である HE-JF5/15F 株 (4 型) の感染性 cDNA クローンを構築し、変異クローンの作製に供する。得られた変異導入感染性 cDNA クローン RNA を PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクトし、ウイルス生活環へのゲノム変異の影響を調べる。

②培養馴化 HEV 株の増殖能に影響するウイルス変異の検討：3 型培養馴化株について全塩基配列を決定し、野生株と比較することにより、活発な増殖能や細胞内での ORF2、ORF3 蛋白発現レベルに寄与するウイルス変異を特定する。特定された変異を導入した感染性 cDNA クローンを作製し、細胞内及び培養上清中のウイルス核酸やウイルス抗原 (ORF2, ORF3) を定性的並びに定量的に検出し、ゲノム変異の意義を明らかにする。

#### (3) HEV の侵入機構の解析と細胞受容体候補分子の同定

HEV 粒子の細胞への吸着や侵入の機構の解明を目的として HEV の細胞レセプター候補分子の同定を試みる。まず、非許容肝細胞株を選別し、次に、PLC/PRF/5 細胞及び非許容肝細胞株の cDNA ライブラリーを作製し、PLC/PRF/5 細胞で発現量が高い遺伝子のみが濃縮された PLC/PRF/5 サブトラクト cDNA ライブラリーを作製し、このサブトラクト cDNA ライブラリーを挿入したレトロウイルス cDNA ライブラリーを作製する。レトロウイルス cDNA ライブラリー感染により、PLC/PRF/5 サブトラクト cDNA ライブラリーを非許容肝細胞株に導入する。レトロウイルスにより cDNA ライブラリーを発現した非許容肝細胞株を蛍光標識モノクローナル抗体 (PLC/PRF/5 細胞を免疫原として得られた、HEV の感染阻止能を有する抗体) で処理し、抗体の結合した、すなわち HEV レセプターを発現していると思われる細胞をセルソーターで分離する。セルソーターで分離、濃縮した HEV レセプター発現細胞からゲノム DNA を抽出する。レトロウイルス由来のプロウイルス DNA から PCR で cDNA を増幅し、塩基配列を決定し遺伝子を特定する。この方法で細胞受容体候補分子の同定を同定できない場合には、Virus overlay protein binding assay 法、

共免疫沈降法と質量分析による方法を用いた細胞受容体候補分子の同定に挑戦する。

#### 4. 研究成果

##### (1) HEV の放出機構の解明

① ORF3 蛋白質の PSAP 配列に導入したアミノ酸置換がウイルス産生に与える影響：cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) の ORF3 に認められる 2 つの PSAP 配列にアミノ酸置換を導入し、どちらか一方、または両方の配列を置換した 5 つの変異体を作製した。どちらか一方の PSAP 配列を置換した 4 つの変異体 (mutLSAP, mutPSAL, mutLSAL, mutPLAP/PSAP) は、すべて野生型と同じ効率で培養上清中にウイルスを産生した。一方、両方の PSAP を置換した変異体 (mutPLAP/LSAL) では、培養上清中へのウイルス粒子の産生量が ΔORF3 と同程度まで減少した。また mutPLAP/LSAL の浮上密度は ΔORF3 と同じ  $1.27\text{g}/\text{cm}^3$  にピークを示し、粒子表面に細胞由来の膜成分及び ORF3 蛋白質を有していないことが分かった。一方、細胞内では ORF3 蛋白質が発現されていることが確認された。

② ORF3 蛋白質と Tsg101 との相互作用の解析：Tsg101 に対する抗体を用いて共免疫沈降を行った結果、野生型の ORF3 蛋白質は Tsg101 と共沈したが、PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質では共沈が認められなかった。また、蛍光抗体法によって、野生型の ORF3 蛋白質と Tsg101 は、細胞質内において共局在を示したが、PSAP モチーフを持たない ORF3 蛋白質と Tsg101 との共局在は認められなかった。以上の結果から、ORF3 蛋白質は PSAP モチーフを介して Tsg101 と細胞内で結合することが明らかになった。

③ Tsg101 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率：Tsg101 に対する siRNA を用いて、細胞内の Tsg101 をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。Tsg101 に対する siRNA (siTsg101) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。siTsg101 では 6.4% と放出効率の著しい低下が認められたことから、Tsg101 はウイルス粒子の放出に重要であり、HEV が MVB sorting 機構を利用している可能性が示唆された。

④ Vps4 ドミナントネガティブ変異体をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率：Vps4 は、MVB sorting の最終段階に作用する ATPase である。そこで、この活性部位にアミノ酸置換を導入したドミナントネガティブ変異体を細胞内に発現させたところ、16-19%

のウイルスの放出効率の低下が認められた。したがって、ウイルス粒子の放出には Vps4 の酵素活性が必要であり、HEV が vacuolar protein sorting (Vps) pathway を利用していると考えられた。

⑤ HEV 感染細胞における ORF3 蛋白質と CD63 の細胞内局在：ORF3 蛋白質と CD63 は、細胞質内において共局在を示した。

本研究により、HEV の感染細胞からの放出には、ウイルス側の因子として ORF3 蛋白質に存在する PSAP モチーフが重要であり、宿主側の因子として Tsg101 ならびに Vps4 が重要であることが明らかとなった。また、ORF3 蛋白質にコードされた PSAP モチーフが L-ドメインとしての機能を有し、エンドソーム膜上で MVB sorting の機構が利用され、HEV が放出されている可能性が示唆された。

(2) E 型肝炎の重症化・劇症化に関わるウイルスゲノム変異、及びウイルス生活環に影響するゲノム変異の検討

① E 型肝炎の重症化・劇症化に関わるウイルスゲノム変異 E 型肝炎の重症化・劇症化に関わるウイルスゲノム変異：4 型 HEV 株 (HE-JF5/15F) の 3148 番目の塩基に関して、劇症型の T に比べ、非劇症型の C に変異することにより、培養上清中及び cell lysate の HEV RNA titer は約 4 分の 1 に低下した。また、5907 番目の塩基に関して、劇症型の C から非劇症型の A (5907A) あるいは T (5907T) に置換することにより、培養上清中の HEV RNA titer は培養上清及び cell lysate の HEV RNA titer が 4 分の 1 ないし 10 分の 1 に低下し、これらの変異が同義置換ながらウイルス増殖効率に影響していることが示唆された。

② ウイルス生活環に影響するゲノム変異の検討：感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) 由来ウイルスの培養馴化株 (passage 10) で認められた変異を pJE03-1760F/wt に導入し検討した結果、2808 番目の塩基の T から C への置換 (ORF1, 928 番目のアミノ酸が Val から Ala に変異)、5054 番目の塩基の A から G への置換 (ORF1, 1677 番目のアミノ酸が Ile から Val に変異) がウイルス増殖に対して促進的に働き、両者の効果は相加的であることが示された。従って、これら変異は培養細胞への馴化並びに効率的なウイルス増殖に密接な関連があることが示唆された。

(3) HEV の侵入機構の解析と細胞受容体候補分子の同定

①HEV 粒子の性状解析と感受性細胞への吸着に関する検討：糞便及び胆汁中の HEV 粒子はシヨ糖液中での浮上密度が 1.26-1.27 g/cm<sup>3</sup>であるが、培養上清中及び血清中の HEV 粒子は上述のように 1.15-1.16 g/cm<sup>3</sup>と軽く、膜に覆われている。培養系を用いた検討において、膜に覆われた HEV 粒子も膜を持っていない HEV 粒子も A549 細胞や PLC/PRF/5 細胞への感染性においては同等であった。また、吸着効率を比較した結果においても膜の有無は大きく影響していなかった。しかし、予め中和抗体を反応させたのち、培養細胞に接種すると、膜のない HEV 粒子では感染が阻止されたのに対して、膜に覆われた HEV 粒子は中和抗体の非存在下と同等の効率で培養細胞に吸着し、効率よく子ウイルスを産生した。したがって、膜に覆われた HEV 粒子と膜に覆われていない HEV 粒子は異なる機構で感受性細胞に接着・侵入している可能性が考えられ、本研究では膜に覆われていない粒子に限定して細胞受容体候補分子の同定を試みた。

②許容細胞と非許容細胞の同定と cDNA ライブラリーの作製：株化肝細胞の中で、野生株 HEV は PLC/PRF/5 細胞でのみ増殖したが、馴化 HEV は HepG2 及び Huh7 細胞においても効率良く増殖しうることが分かった。一方、SK-HEP-1 細胞では馴化 HEV も増殖しなかった。そこで、両細胞株の cDNA ライブラリーを作製し、PLC/PRF/5 細胞で発現レベルが高い遺伝子のみが濃縮された PLC/PRF/5 サブトラクト cDNA ライブラリーを作製して HEV レセプターを発現していると思われるレトロウイルス感染細胞の分離を試みたが、候補分子の同定には至らなかった。

③Virus overlay protein binding assay 法による試み：PLC/PRF/5 細胞及び A549 細胞から膜蛋白質を精製後、HEV 粒子と結合する膜蛋白質の検出を行った。Negative control には認められない特異的と思われるバンドが 120 kDa, 65 kDa の位置に検出された。しかし、非特異的な結合が多く、結合したバンドを構成する蛋白質の特定は困難であった。

④共免疫沈降法による試み：PLC/PRF/5 細胞及び A549 細胞から膜蛋白質を精製後、共免疫沈降法ならびに質量分析により、HEV 粒子と結合する感受性細胞 (PLC/PRF/5 と A549) 由来の膜蛋白質を数種類同定した。しかし、種々の検討の結果、同定された膜蛋白質がレセプターとして主体的な働きをしている可能性は低いことが示唆された。

世界的にも HEV の細胞レセプター分子は未だ同定されておらず、本研究を通じて感染系を進展させ、許容・非許容細胞を特定し、HEV

粒子の形態の違いに対応する 2 種類の吸着・侵入機構の存在を示唆する知見を得ることができたことは、今後の更なる挑戦に資する成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. Arch Virol 155(8):1217-26, 2010 査読有
2. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. J Clin Microbiol 48(4):1112-25, 2010 査読有
3. Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, Nagashima S, Yazaki Y, Mizuo H, Iwamoto S, Okayama M, Nakamura Y, Kajii E, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. J Med Virol 82(2):271-81, 2010 査読有
4. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. J Gen Virol 92(Pt 12):2838-48, 2011 査読有
5. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. Arch Virol 156(8):1345-58, 2011 査読有
6. Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. Virus Res 161(1):65-77, 2011 査読有

7. Okamoto H. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev Med Virol* 21(1):18-31, 2011 査読有
  8. Takahashi M., Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S., Okamoto H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92(Pt 4):902-8, 2011 査読有
  9. Nagashima S., Takahashi M., Jirintai, Tanaka T., Yamada K, Nishizawa T, Okamoto H. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 92(Pt 2):269-78, 2011 査読有
  10. Takikawa Y, Miyamoto Y, Onodera M, Kuroda H, Kasai K, Miyasaka A, Takahashi M., Okamoto H., Suzuki K. Icteric acute hepatitis E with no response of immunoglobulin M class anti-hepatitis E virus antibody. *Hepatol Res* 42(11):1146-9, 2012 査読有
  11. D, Mulyanto, Takahashi M., Nagashima S., Kobayashi T., Nishizawa T, Okamoto H. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* 170(1-2):126-37, 2012 査読有
  12. Nakano T, Okano H, Kobayashi M, Ito K, Ohmori S, Nomura T, Kato H, Ayada M, Nakano Y, Akachi S, Sugimoto K, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Takahashi M., Okamoto H. Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. *Infect Genet Evol* 12(7):1524-34, 2012 査読有
  13. Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, Okano H, Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, Arai M, Okamoto H., Mishiro S. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver Int* 32(4):675-88, 2012 査読有
  14. Takahashi H, Tanaka T., Jirintai S, Nagashima S., Takahashi M., Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* 157(2):235-46, 2012 査読有
  15. Mulyanto, Depamede SN, Sriasih M, Takahashi M., Nagashima S., Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H. Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol* 158(1):87-96, 2013 査読有
  16. Okamoto H. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol* 48(2):147-58, 2013 査読有
  17. Okano H, Nakano T, Sugimoto K, Takahashi K, Nagashima S., Takahashi M., Arai M, Okamoto H. A high genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e Jirintai S, Jinshan, Tanggis, Manglai strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol Res.* 2013 May 2. doi: 10.1111/hepr.12155. [Epub ahead ofprint] 査読有
  18. Takahashi M., Okamoto H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res.* 2013 May 30. doi:10.1111/hepr.12175. [Epub ahead ofprint] 査読有
- [学会発表] (計 4 件)
1. Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, Tanaka, T., Nishizawa, T., Yasuda J, Okamoto, H.: Tsg101 and vacuolar protein sorting pathway are required for virion release of hepatitis E virus. XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September 2011.
  2. Okamoto, H. Culture systems for hepatitis E virus. The 3rd International Forum of the 98th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology, Tokyo, 21 April 2012

3. 岡本宏明：第 60 回日本輸血細胞治療学会総会 特別講演「経口肝炎ウイルス：最近の知見」、郡山市、2012 年 5 月 25 日.
4. 岡本宏明：第 60 回日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム「E 型肝炎ウイルスについての最近の知見」、大阪市、2012 年 11 月 13 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 宏明 (OKAMOTO HIROAKI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30177092

### (2) 研究分担者

長嶋 茂雄 (NAGASHIMA SHIGEO)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60433116

### (3) 研究分担者

高橋 雅春 (TAKAHASHI MASA HARU)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70326841

### (4) 研究分担者

小林 富成 (KOBAYASHI TOMINARI)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00634164