

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15472

研究課題名（和文）HCVを基盤としたRNAウイルス変異動態の数理モデル化

研究課題名（英文）Mathematical modeling of HCV-based RNA virus mutation dynamics

研究代表者

上田 優輝（Ueda, Youki）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：90756074

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス(HCV)は、肝臓内での長期的なウイルスの感染・増殖によってウイルスゲノムに遺伝子変異が蓄積することが薬剤耐性変異や治癒後の肝発癌の原因と考えられる。しかしながら、HCV持続感染系の長期的な維持は難しく、構造領域の欠損などが頻繁に起こってしまうため遺伝子変異蓄積の多様性にアプローチした研究はあまりなされていない。本研究では、HCVの細胞内複製モデルを13年に渡り継代培養し、HCVゲノムを第3世代ロングリードシーケンサで長期的な変異動態の詳細を明らかにしただけでなく、そのデータを数理モデル化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたHCVレプリコン細胞株は申請者が所属する研究室において2002年と2003年に樹立したオリジナルの実験システムであり、HCVゲノムの進化ばかりでなく細胞がん化の要因を探る研究にも役立つと考え、HCVレプリコン細胞樹立時から継代を続けており、世界的にみてもHCVだけでなく他のウイルスでもこのような長期継代培養は皆無であり、今後もこのようなモデルの作成は極めて困難で、非常に貴重なモデルから得られた成果である。そして、この結果はHCVだけでなく他の新規ウイルスに対しても活用が大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：In hepatitis C virus (HCV), the accumulation of genetic mutations in the viral genome due to long-term infection and multiplication in the liver is considered to be the cause of drug-resistant mutations and hepatocarcinogenesis after healing. However, it is difficult to maintain HCV persistent infection systems over time, and studies of gene mutation accumulation have been rare because of frequent loss of structural regions and other events. In this study, an intracellular replication model of HCV was passively cultured for 13 years. The HCV genome was analyzed using a third-generation long-read sequencer to reveal the details of long-term mutation dynamics. A mathematical model was created from this data.

研究分野：ウイルス

キーワード：HCV C型肝炎ウイルス 数理モデル 長期継代

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

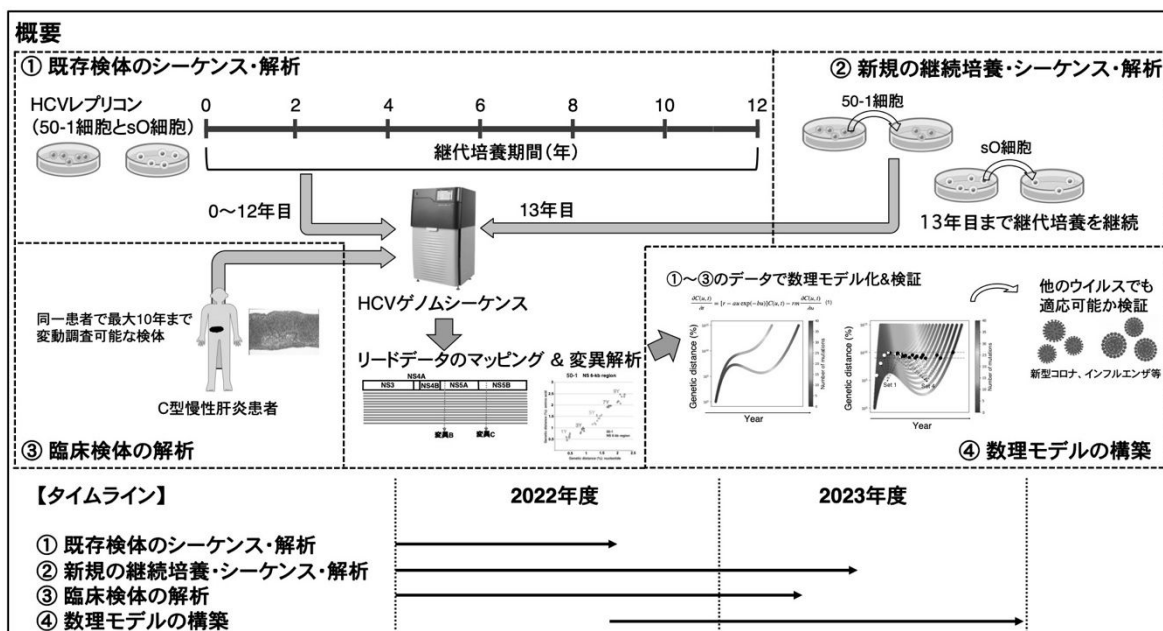
1. 研究開始当初の背景

RNA ウイルスは急速なウイルスゲノム変異を獲得し、新型コロナウイルスのように多様な変異株が出現し、その治療や予後に大きな影響を与える。C 型肝炎ウイルス(HCV)も RNA ウイルスの代表で、肝臓内での長期的なウイルスの感染・増殖によってウイルスゲノムに遺伝子変異が蓄積することが薬剤耐性変異や治癒後の肝発癌の原因と考えられる。しかしながら、HCV 持続感染系の長期的な維持は難しく、遺伝子変異蓄積の多様性にアプローチした研究はあまりなされていない。申請者らは、HCV の細胞内複製モデルを 9 年に渡り継代培養し、HCV ゲノムは多様性を保ったまま時間依存的に且つ直線的に変異が蓄積増大していくことを最近明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、貴重な同モデルを用いて継代 0~12 年目の各 HCV ゲノムを第 3 世代ロングリードシーケンサで、従来の第 2 世代ショートリードシーケンサまででは不可能だったウイルスゲノムごとの変異蓄積まで解析することで長期的な変異動態の詳細を明らかにする。さらにそのデータを数理モデル化し、新型コロナウイルスなどを含めた RNA ウイルス進化モデルへの応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法



既存検体のシーケンス・解析：既に保存してある継代年 0~12 年目(2 年毎)の s0 及び 50-1 レプリコン細胞を起し、計 12 サンプルについて第 3 世代シーケンサを用いてロングリードシーケンスを行う。得られたリードデータを HCV リファレンス配列へのマッピング(BWA など)を行う。各サンプルのゲノム変異をウイルスゲノムごとにシス・トランスまで含めて同定する。その後、塩基配列及びアミノ酸配列双方の経時的な変動を解析ソフト(R や Python3 を主に使用)により数値化及び可視化を行う。

新規の継続培養・シーケンス・解析：12 年間継代した s0 及び 50-1 レプリコン細胞を 2022 年度中継代培養し、13 年目まで継続する。2023 年度に 13 年目の 2 サンプルについても第 3 世代シーケンサを用いてロングリードシーケンスを行い、数理モデル構築時の検証及び調整に利用する。

臨床検体の解析：最大 10 年程度同一患者での HCV ゲノム変動を追うことが可能な臨床検体を既に 10 例以上集めており、代表的な 2 例(患者毎に 2 点ずつ計 4 サンプル)についても第 3 世代シーケンサを用いてロングリードシーケンスを行い、数理モデル構築時の検証に利用する。

数理モデルの構築：変異箇所、変異速度、変異蓄積レベル、複製レベル、時間をそれぞれ係数として扱い、HCV ゲノム全体或いはタンパク質毎の変異動態を非線形回帰分析やベイズ統計学モデル解析などにより数式化及び可視化を行う。得られた臨床検体のデータや公共データ(日本及び米国 HCV Database など)と照らし合わせ、HCV ゲノムの変異予測やがん化予測に利用可能かを検討する。また、13 年目のシーケンスデータが得られ次第、数理モデルの検証に利用すると共に、構築時のデータに組み込んで調整し、数理モデルの精度向上に役立てる。さらに、HCV 以外の RNA ウイルス(新型コロナウイルスやインフルエンザウイルス等)に対しても数理モ

デルの適応が可能か公共のデータベース(米国 NCBI Virus Database など)を利用し、当てはまるかを検証する。

4. 研究成果

我々が樹立し、我々が樹立し、12年間継代培養を続けていた2系統のHCV細胞内複製モデル(s0細胞と50-1細胞)についての継代培養を継続し、培養期間が13年に到達した。13年継代細胞においても細胞内HCVのmRNA複製レベルは樹立時と比較して高いレベルを維持しており、細胞増殖能については12年目の細胞より亢進していることがわかった。サンガー法による簡易的なシーケンス解析からは、HCVゲノム領域に欠損は認められず、ウェスタンブロット解析においてもウイルスタンパク質の発現が全て認められた。13年間継代培養を続けていた2系統のHCV細胞内複製モデル(s0細胞と50-1細胞)についての第3世代シーケンスを用いたロングリードシーケンスを行い、HCVゲノム全体の塩基配列を同定した。13年目でもHCVゲノムは多様性を保ったまま時間依存的に且つ直線的に変異が蓄積増大していることが明らかになった。HCVゲノムのシーケンスは継代0、2、4、6、8、10、12年時のものも並行して行い、サンガー法シーケンスでは見つからなかった新規の変異も多く見出された。これらの継時的な変異動態を数値化し、変異速度や新規変異の出現率など様々な指標データを作成した。これらのデータを用いてHCV以外のRNAウイルス(新型コロナウイルスやインフルエンザウイルス等)に対しても有効かを検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhou Wenhao, Kawashima Shusuke, Ishino Takamasa, Kawase Katsushige, Ueda Youki, Yamashita Kazuo, Watanabe Tomofumi, Kawazu Masahito, Dansako Hiromichi, Suzuki Yutaka, Nishikawa Hiroyoshi, Inozume Takashi, Nagasaki Joji, Togashi Yosuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Stem-like progenitor and terminally differentiated TFH-like CD4+ T?cell exhaustion in the tumor microenvironment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113797 ~ 113797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.113797	査読の有無 無
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 Kemotsu Naoya, Ninomiya Kiichiro, Kunimasa Kei, Ishino Takamasa, Nagasaki Joji, Otani Yoshihiro, Michiue Hiroyuki, Ichihara Eiki, Ohashi Kadoaki, Inoue Takako, Tamiya Motohiro, Sakai Kazuko, Ueda Youki, Dansako Hiromichi, Nishio Kazuto, Kiura Katsuyuki, Date Isao, Togashi Yosuke	4. 巻 154
2. 論文標題 Low frequency of intracranial progression in advanced NSCLC patients treated with cancer immunotherapies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 169 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34700	査読の有無 無
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 Kemotsu Naoya, Zhu Li, Nagasaki Joji, Otani Yoshihiro, Ueda Youki, Dansako Hiromichi, Fang Yue, Date Isao, Togashi Yosuke	4. 巻 114
2. 論文標題 Combination therapy with hydrogen peroxide and irradiation promotes an abscopal effect in mouse models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3848 ~ 3856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15911	査読の有無 無
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 Watanabe Tomofumi, Ishino Takamasa, Ueda Youki, Nagasaki Joji, Sadahira Takuya, Dansako Hiromichi, Araki Motoo, Togashi Yosuke	4. 巻 114
2. 論文標題 Activated CTLA 4 independent immunosuppression of Treg cells disturbs CTLA 4 blockade mediated antitumor immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15756	査読の有無 無
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 Watanabe Tomofumi, Ishino Takamasa, Ueda Youki, Nagasaki Joji, Sadahira Takuya, Dansako Hiromichi, Araki Motoo, Togashi Yosuke	4. 巻 114
2. 論文標題 Activated CTLA 4 independent immunosuppression of Treg cells disturbs CTLA 4 blockade mediated antitumor immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15756	査読の有無 無
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 Ishino Takamasa, Kawashima Shusuke, Tanji Etsuko, Ueno Toshihide, Ueda Youki, Ogasawara Sadahisa, Sato Kazuhito, Mano Hiroyuki, Ishihara Soichiro, Kato Naoya, Kawazu Masahito, Togashi Yosuke	4. 巻 128
2. 論文標題 Somatic mutations can induce a noninflamed tumour microenvironment via their original gene functions, despite deriving neoantigens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1166 ~ 1175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-023-02165-6	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室のホームページ http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/index.html

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