

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590104

研究課題名(和文) 宿主変異株を用いたC型肝炎ウイルスライフサイクルに関与する宿主因子の研究

研究課題名(英文) Study on host factors involved in Hepatitis C virus life cycle

研究代表者

深澤 征義 (Fukasawa, Masayoshi)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：20291130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)のライフサイクルに関わる宿主分子については、いまだ未知の部分が多い。そこで本研究では、HCV感染に耐性を示す宿主変異株の分離を通じて、HCV感染・産生に重要な宿主因子を検索・同定し、HCVライフサイクルに関わる宿主分子メカニズムを解析することを目的とした。その結果、新たに複数の宿主因子が、HCVライフサイクルに関わることが明らかとなった。様々樹立された宿主変異株の解析から、特に、タイトジャンクションタンパク質のoccludinが、HCVのセルフリー感染および細胞-細胞間感染に必須であり、有用な創薬標的になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Life cycle of hepatitis C virus (HCV) is still poorly understood. In this project, I was trying to isolate host cell mutants resistant to HCV infection and to identify the defective genes in the mutants. A lot of hepatic cell mutants defective in HCV infection were established, and I found several novel host factors substantially involved in HCV infection. From the results of various analyses using established cell mutants defective in HCV infection, I also confirmed that a tight junction protein occludin is essential for both cell-free HCV entry and cell-to-cell HCV transmission in hepatic cells, and would be therefore a promising anti-HCV drug target.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV cell mutants

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると、極めて高率に慢性感染となり、脂肪肝、肝硬変、肝細胞がんという重篤な肝疾患を引き起こす。当時最も効果的な治療法であったインターフェロン療法においても奏効率は7割程度であり、副作用も強く、新たな薬剤の開発は急務とされていた。薬剤の開発手法としては、まずウイルス因子を標的とした方法が考えられるが、HCVは変異ウイルスの出現頻度が極めて高く、薬剤耐性の問題が懸念される。そこで宿主因子を標的とした薬剤も考えるべきであるが、培養細胞での効率的なウイルス感染・増殖が可能になって数年と経っていない状況であったこともあり、HCVライフサイクルの詳細は依然不明の点が多く、薬剤標的となりうる宿主分子の情報は乏しい状況だった。

HCVは約9.6kbの一本鎖RNAゲノムを持つプラス鎖RNAウイルスである。HCVはまず、肝細胞表面の受容体に結合した後、エンドサイトーシス経路を介し細胞内に侵入する。ゲノムには、一つのポリプロテインがコードされ、翻訳された後、プロセッシングを受けて、10個のウイルス蛋白質が産生される。次に、小胞体でゲノムの複製、粒子の会合・出芽が起こり、ウイルス粒子はゴルジ体を経て、細胞外へ放出されると考えられている(Nature 436,929,2005)。侵入過程には、CD81、SRBI、LDL受容体、claudin-1、occludinの関与が明らかとされているが(Cell. Microbiol. 10,821,2008)これら分子がHCV感染に本当に必須なのか、そして、これら分子間のクロストーク・他因子の関与については依然不明の点が多かった。また、ゲノム複製は特定の細胞内マイクロドメイン(脂質ラフト画分)で起こること(JVI 77,4160,2003; Virology 324,450,2004)ウイルス粒子の会合が脂肪滴周辺で起こること(Nat. Cell Biol. 9,961,2007)粒子の分泌過程には超低密度リポ蛋白質分泌機構が関与していること(PNAS 104,5848,2007)などが示唆されてきた。しかし、HCVライフサイクルに関する多くの宿主因子及びそのメカニズムについては未だ不明の点がきわめて多く残っている状況であった。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、HCV感染・産生に必須な宿主因子を遺伝学的に検索・同定し、それら宿主因子のHCVライフサイクルにおける機能を一つでも明らかとすることを最終目的とした。具体的には、RNAiライブラリを導入した肝細胞株(遺伝子ノックダウン株)等を親株として、HCV感染に耐性を有する宿主変異株の分離を広範に行い、変異株における欠損遺伝子を同定し、欠損遺伝子がHCVライフサイクルのどの過程に関与するかを細胞生物学的に明らかにする。さらに、可能であれば、欠損遺伝子が抗HCV薬ターゲット

トとなりうるかを考察する。

3. 研究の方法

研究戦略としては、HCV感染に耐性を示す宿主変異株の分離を通じて、HCV感染・産生に必須な宿主因子をゲノムワイドに検索・同定することをめざした。

そのためにはまず、HCV感染に耐性を示す変異株を効率的に分離する方法が必要であるが、我々はすでに、HCVに高感染感受性で、細胞変性効果(細胞死)が顕著に現れる、ヒト肝由来 Huh7.5.1-8細胞を樹立しており、本細胞株を親株として、RNAi導入細胞ライブラリを作製した。遺伝子発現解析から Huh7.5.1-8細胞は、よりヒト肝臓に分化した状態に近く、かつ、細胞増殖も優れた細胞株になっていることで、HCV感染感受性が非常に高くなっていることが明らかとなってきた(Shirasago et al., Jpn. J. Infect. Dis., 2015)。

RNAi(shRNA)ライブラリは、ヒト47,400遺伝子に対し20万ターゲットshRNAを含むレンチウイルスライブラリを用いることとした。親細胞のHuh7.5.1-8細胞については、HCV受容体として既知であるCD81およびclaudin-1を過剰発現した細胞を用いることで、(高頻度に)分離されることが予想されるCD81ノックダウン細胞やclaudin-1ノックダウン細胞が分離されにくくなる工夫を行った。本レンチウイルス(ライブラリ)をHuh7.5.1-8/CD81/claudin-1細胞にMOI:0.5で感染させ、puromycinで選択し、遺伝子ノックダウン細胞ライブラリを構築した。

また、我々の培養しているHuh7.5.1細胞は、細胞に大きな多様性があることがわかってきているので、(遺伝子改変していない)Huh7.5.1細胞を親株に用いた検討も行うことにした。

HCV耐性株の分離(スクリーニング)は、以下のように進めた。本ノックダウン細胞ライブラリにHCVを高用量(MOI:50)で10日ごとに2回感染させた後、生き残る細胞(HCV非感染細胞)集団をクローニングにより分離した。

分離した細胞に導入されたshRNA(標的遺伝子)の同定は、ゲノムPCR、増幅断片のクローニング、シーケンス解析により行った。

同定因子がHCVライフサイクルに関与していることの確認は、同定した各shRNAを導入したHuh7.5.1-8細胞を改めて樹立し、それらを用いて検討した。

HCV感染による細胞変性効果はXTTアッセイにより測定した。HCV産生能については、各細胞に37℃、2時間HCVを感染することにより行った。培養容器はコラーゲンコート48穴プレートを用いた。同定分子のノックダウンは市販のvalidated siRNAを用い、各タンパク質につき3種のコンストラクトで行った。細胞への導入はlipofectamine RNAiMAXを用い20nMで感染前後に2回行った。各タンパ

ク質の発現量は各抗体を用いた細胞破碎画分のイムノプロットにより測定した。ウイルス産生能の測定は、経時的に培養液中の HCV コア蛋白質量を ELISA で定量すること、あるいは、細胞中のウイルス蛋白質(コアタンパク質及び NS3)をイムノプロットで解析すること、また、細胞内外の RNA 量を qRT-PCR により定量することにより行った (Fukasawa et al., J. Virol. 2015)。

さらに、HCV ライフサイクルへの関与が報告されている分子 (occludin) については、CRISPR/Cas9 系によるゲノム編集技術を用い、Huh7.5.1-8 細胞を親株として、ノックアウト細胞 (欠損細胞) を作製し、それを解析に用いた。

細胞 細胞間感染の検討については、以下のように行った。核が GFP で染色された Huh7.5.1-8 細胞をあらかじめ HCV 感染させ、その感染細胞とナイーブな各欠損細胞を共培養させる。各欠損細胞に感染が広がっていくかを免疫染色で観察することにより判定した (Shirasago et al., Biol. Pharm. Bull., 2016)。

感染性ウイルス株は、HCV-JFH1 株の他に、HCV-Jc1 株、HCV-TNS2J1 株も用いた。HCV 侵入過程の測定のためには、各遺伝子型の HCV シュードウイルスを用いた。HCV 複製過程の検討には、HCV レプリコンシステムを用いた (Saito et al., J. Virol., 2015; Shirasago et al., Biol. Pharm. Bull., 2016)。

4. 研究成果

宿主遺伝子ノックダウン細胞ライブラリを用いて、HCV に耐性を示す細胞 (生き残る細胞) のスクリーニングを行った。分取した細胞群より、含有していた shRNA (ノックダウン候補遺伝子) を多数同定した。同定した各遺伝子に相当する shRNA を導入したノックダウン細胞を樹立し、HCV 感染感受性を検討した。その結果、有意な HCV 耐性を再現できた細胞が複数種得られた。この中には HCV 複製に極めて重要であることが知られる phosphatidylinositol-4-kinase III (PI4KIII) が含まれており、スクリーニング系が機能的であることが確認された。他に同定された分子は皆、少なくとも複製過程に関わっているものと考えられたが、現在その機能についてさらに詳細な解析を進めている。一方、これらの分子は、HCV ライフサイクルに関与することが強く示唆されたものの、HCV 感染に必須の因子とは言えない結果 (ノックダウンによる HCV 感染の低下が PI4KIII の場合に比べて弱い) であった。以上の結果から、HCV 感染に重要な宿主因子を複数同定できたものの、これら新規宿主分子は抗 HCV 創薬標的としては、最適とは必ずしも言えないと現状では考えている。

遺伝子改変していない Huh7.5.1 細胞を親株に用いたスクリーニングも継続して行った。その結果、多数の HCV 耐性の変異細胞株

が得られた。これら変異株の一部について、遺伝子発現解析を行った結果、親株と比較して、発現が欠損している多数の宿主遺伝子が見出された。これら分子の HCV 感染における重要性を検討するため、各 siRNA を用いた検討、CRISPR/Cas9 系を用いた遺伝子ノックアウト細胞を樹立し利用する検討を行っているが、矛盾する結果も得られており、今後さらに検討する必要があると考えている。

我々はこれまでに、CD81 欠損細胞や claudin-1 欠損細胞を分離し、HCV 侵入過程において、これらが重要な役割を果たしていること、特に、claudin-1 は、セルフリー感染および細胞 細胞間感染双方に必須であることを示し、抗 HCV 創薬標的として有用であることを報告してきた (Fukasawa et al., J. Virol. 2015)。occludin 分子は HCV の侵入過程に関わることが報告されているが、肝細胞で本当に HCV 感染に必須であるかはこれまで最終結論が得られていなかった。そこで、CRISPR/Cas9 系によるゲノム編集技術を用いて occludin ノックアウト細胞 (occludin 欠損株) を樹立し検討を行ってきた。複数の Occludin ノックアウト肝細胞株で、HCV 感染が完全に欠損していること、Occludin 遺伝子を導入することで、複数種の HCV 株の感染が回復することが明らかとなった。さらに、occludin 分子が、セルフリー感染だけでなく細胞 細胞間感染にも必須であることが、様々な検討からわかった。このことから、抗 HCV 創薬標的として occludin が極めて有用であることが確信された。

以上のように、本研究では、HCV 感染に耐性を示す宿主変異株の分離を通じて、HCV 感染・産生に重要な宿主因子のいくつかを同定することに成功した。創薬標的としての occludin の有用性に関する細胞レベルでの基盤データも本研究費の一部を用いて得られ、本成果はこの後、他の研究費の支援も受けて、感染阻止ができる occludin 結合プローブの作成などへとさらに発展している。

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)

Yoshitaka Shirasago, Tsuyoshi Sekizuka, Kyoko Saito, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Makoto Kuroda, Ryo Abe, Masayoshi Fukasawa
“Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus” Jpn. J. Infect. Dis. 68, 81-88 (2015)
doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.231
Kyoko Saito, Yoshitaka Shirasago, Tetsuro Suzuki, Hideki Aizaki, Kentaro Hanada, Takaji Wakita, Masahiro Nishijima, Masayoshi Fukasawa

“ Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus ” J. Virol., 89, 2220-2232 (2015)

doi: 10.1128/JVI.03385-14

Masayoshi Fukasawa, Shotaro Nagase, Yoshitaka Shirasago, Manami Iida, Mayo Yamashita, Kohki Endo, Kiyohito Yagi, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Hiroki Kuniyasu, Masuo Kondoh "Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in A Mouse Model" J. Virol., 89, 4866-4879 (2015)

doi: 10.1128/JVI.03676-14

Yoshitaka Shirasago, Yoshimi Shimizu, Isei Tanida, Tetsuro Suzuki, Ryosuke Suzuki, Kazuo Sugiyama, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh, Masayoshi Fukasawa "Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection" Biol. Pharm. Bull. 39, 839-848 (2016)

*Highlighted paper selected by Editor-in-Chief

*selected for the cover of the issue
doi: 10.1248/bpb.b15-01023

〔学会発表〕(計 9件)

Masayoshi Fukasawa, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Ryosuke Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba "Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations" The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12

白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉文、安部良、深澤征義、高感染能を有する HCV JFH-1 適応変異株の性状解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.13-15

深澤征義、Claudin 1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013.3.27-30

白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉文、安部良、深澤征義、高感染能を有する 2a 型 C 型肝炎ウイルス JFH-1 由来変異株の性状解析、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013.3.27-30

深澤征義、白砂圭崇、長瀬翔太郎、近藤昌夫、八木清仁、安部良、花田賢太郎、

Claudin 1 抗体の樹立と本抗体による C 型肝炎ウイルス感染阻害、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.11-13

白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、安部良、深澤征義、C 型肝炎ウイルスへの感染感受性を欠損した宿主肝細胞変異株の分離と性状解析、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.11-13

白砂圭崇、関塚剛史、齋藤恭子、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、黒田誠、安部良、深澤征義、HCV に対して高感染感受性を有する Huh7.5.1 細胞株の樹立と性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.10-12

白砂圭崇、清水芳実、谷田以誠、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、近藤昌夫、八木清仁、深澤征義、ヒト肝臓由来培養細胞株からの Occludin ノックアウト細胞株の樹立と本細胞株を用いた HCV 感染の解析、第 22 回肝細胞研究会、米子、2015.6.4-5

Yoshitaka Shirasago, Yoshimi Shimizu, Isei Tanida, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh, and Masayoshi Fukasawa "Establishment and characterization of occludin knock-out human hepatic Huh7.5.1 cells" The 22th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, 2015.10.9-13

〔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

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/basic-science/466-biochemistory/6502-biochem-2016-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 征義 (FUKASAWA, Masayoshi)
国立感染症研究所・細胞化学部・室長
研究者番号: 20291130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし