

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790513

研究課題名(和文)細胞内適応変異導入によるJFH-1株以外の新規C型肝炎ウイルス感染増殖系の樹立

研究課題名(英文)Establishment of novel HCV cell-culture system using HCV strains other than JFH-1

研究代表者

村山 麻子(Murayama, Asako)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・協力研究員

研究者番号：40415534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究では、JFH-1株以外のC型肝炎ウイルス株を用いた新規感染増殖系の樹立を目的とし、新たに遺伝子型2aのJ6CF株、遺伝子型2bのMA株を用いたHCV感染増殖系を樹立した。それにより、HCVの生活環における遺伝子型またはウイルス株による差異や、薬剤感受性の違いについての比較検討が可能となる。さらに、これらのウイルス株を複製可能にするために必要なJFH-1株の最少領域や導入した変異の情報は、他のウイルス株を用いたさらなる感染増殖系の樹立に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established a novel HCV genotype 2a cell-culture system using J6CF strain harboring five mutations in NS4A, NS5B and 3'UTR. We also established an HCV genotype 2b cell-culture system using a chimeric genome of MA strain harboring minimal regions of JFH-1. These cell-culture systems will be useful for characterizing genotype 2a and 2b viruses and developing antiviral strategies. Our data provide information that will prove essential for the establishment of replication-competent variants of HCV strains that are currently replication incompetent in cultured cells.

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：ウイルス 細胞培養 ゲノム複製

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は日本で約 200 万人と推定されており、このウイルスに感染すると慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと進行するため大きな社会問題となっている。国内の慢性肝炎患者では遺伝子型 1b が一番多く、次いで 2a、2b の順に多い。HCV 感染症の治療には主にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その効果はウイルスの遺伝子型やウイルス量により大きく異なる。特に日本で一番多い遺伝子型 1b で高ウイルス量の症例では十分な治療効果が得られないため、より有効な薬剤の開発が望まれている。HCV にはウイルス培養系と小動物の感染モデルが存在せず、長い間 HCV の基礎研究の妨げになってきた。1999 年に HCV レプリコンシステムが報告され、ようやく培養細胞内で HCV のゲノム複製が観察できるようになった。その後、2005 年に、遺伝子型 2a の HCV、JFH-1 株と、肝癌細胞由来の HuH-7 細胞を用いて、感染性ウイルス粒子を培養細胞で作製する技術が確立された (Wakita et al., Nat. Med. 2005)。この技術により、HCV のリバーシジェネティクスが可能となり、また感染からウイルス粒子の放出にいたる HCV の生活環をすべて再現できるため、その後 HCV の研究は急速に発展した。しかし、培養細胞で効率よく複製可能なウイルス株は JFH-1 株以外には存在しなかった。

我々は、JFH-1 株と同じ遺伝子型 2a の J6CF 株を用いて、JFH-1 株と比較することにより、JFH-1 株が培養細胞で効率よく複製できる理由を調べた。J6CF 株は JFH-1 株と配列相同性が高く、JFH-1 株と同様にチンパンジーには感染が認められるが、培養細胞での複製は観察できていない。ウイルス遺伝子の各領域を置換して複製およびウイルス産生を比較した結果、JFH-1 株の高い複製能を担う責任領域が NS3 helicase 領域、NS5B 領域

および 3' UTR にあることを見いだした (Murayama et al., JVI 2007)。この 3 力所の領域を JFH-1 株由来のものに置換することにより、J6CF 株は培養細胞で複製可能となり、感染性のウイルス粒子が産生できるようになった。さらに、NS5B 領域と 3' UTR について詳細に解析した。JFH-1 株の NS5B は J6CF 株の NS5B より高い RNA ポリメラーゼ活性を有している。そこで、その高い活性に寄与するアミノ酸を同定した (Murayama et al., PLoS Pathog 2010)。また、JFH-1 株と J6CF 株の 3' UTR 内の可変領域は、RNA の二次構造が異なっている。JFH-1 型の構造が効率の良い複製に重要であることから、JFH-1 型の構造を規定するヌクレオチド変異も同定した (Murayama et al., PLoS Pathog 2010)。これらの同定した変異は JFH-1 株に特異的なものが多いことから、これらの変異を導入することにより、他の遺伝子型のウイルス株でも細胞内で複製できるようになる可能性がある。新たなウイルス株を用いた感染増殖系は HCV のウイルス学的研究だけでなく、新規治療法やワクチンの開発にも有用である。

2. 研究の目的

本研究は HCV の JFH-1 株以外の株を用いた培養細胞での新規の感染増殖系を樹立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HCV レプリコンシステムを用いた複製能の解析

本研究で使用した HCV レプリコンにはレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子が挿入してあるため、複製レベルはルシフェラーゼ活性で比較できる。in vitro で合成したレプリコン RNA を Huh-7.5.1 細胞に導入し、2 日後の細胞を回収した。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(2)HCV 全長コンストラクトの複製およびウイルス産生能の比較

in vitro で合成した RNA を Huh-7.5.1 細胞に導入後、細胞、培養液を継続的に回収した。回収した培養細胞は溶解させ、細胞溶解液中および培養上清中のコア抗原量を測定した。

(3)培養液中の感染性の評価

in vitro で合成した RNA を Huh-7.5.1 細胞に導入し、3 日後に回収した培養液を新たな Huh-7.5.1 細胞に感染させ、さらに3日後に細胞を固定した。感染細胞は抗コア抗体を用いて可視化し、感染フォーカス数を決定した。

(4)長期培養および適応変異の同定

HCV RNA 導入細胞を長期にわたって継代培養した。培養液中のコア抗原量が最大になった時点での培養液から HCV RNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法により導入された変異を同定した。

4. 研究成果

(1)遺伝子型 2b の MA 株を用いた感染増殖系の樹立

遺伝子型 2b の MA 株はそのままでは培養細胞での複製が見られないが、非構造領域全体を JFH-1 株に置換することにより効率よいキメラウイルス産生が可能となる (MA/JFH-1 株)。そこで、J6CF 株の知見を参考に MA 株の複製に必要な最少の JFH-1 領域を同定した。その結果、MA 株の 5' UTR、N3H および N5BX を JFH-1 株に置換することにより、MA/JFH-1 株と同程度のゲノム複製能を持つ株が得られた (MA/N3H+5BX-JFH1 株)。

MA/N3H+5BX-JFH1 株は、ゲノム複製は可能であるが、感染性ウイルス産生の効率が低かったため、長期培養し、感染性が上昇した変異ウイルスを得た。変異ウイルスから

5 カ所の変異を同定し、それらの変異の導入により MA/JFH-1 株と同程度の感染性ウイルス産生能を持つ株が得られた (MA/N3H+5BX-JFH1/5am 株)。

MA/N3H+5BX-JFH1/5am 株の IFN 感受性について、JFH-1 株および MA/JFH-1 株と比較した。JFH-1 株は IFN に耐性を示した。MA/JFH-1 株および MA/N3H+5BX-JFH1/5am 株はともに IFN に感受性であったが、両者の間で比較すると、MA/N3H+5BX-JFH1/5am 株はより IFN に感受性を示した。

(2)遺伝子型 2a の J6CF 株を用いた感染増殖系の樹立

遺伝子型 2a の J6CF 株は、培養細胞では自律複製できないが、NS3 ヘリカーゼ領域 (N3H) と NS5B-3' X 領域 (N5BX) を JFH-1 株に置換するとウイルス産生が可能であった。さらに、N5BX の JFH-1 株への置換は、NS5B 領域内の 3 つのアミノ酸置換と、3' UTR 内の塩基置換で代用できる。そこで、J6CF 株を培養細胞で複製可能にする変異を同定することを目的とし、J6CF 株の NS5B の C 末端側領域 (5BSL) を JFH-1 株と置換した J6/5BSLX-JFH1 を作製した。J6/5BSLX-JFH1 は短期間の観察では複製が見られないが、RNA を導入した細胞を長期間にわたって継代培養すると、複製できるようになり、感染性ウイルスが得られた。ウイルスゲノムのシーケンス解析により、NS4A 領域の変異が同定され、以前に同定した 4 カ所の変異に加えて NS4A の変異を導入した J6m 株は培養細胞で複製できるようになった。NS4A 領域の変異は、レプリコンの複製能を上昇させることから、複製のステップに関与することが明らかとなった。さらに同定した変異について詳細に解析した。タグ付加した NS4A を用いて NS4A の変異の影響を解析したが、NS4A の局在自体に変化はなかった。そこで mKG システムを用いて NS3-NS4A 間の相互作用への NS4A の変異

の影響を観察した。その結果、J6CF 株では NS3-NS4A 間の共局在が見られないが、NS4A の変異により共局在がみられるようになることから、この変異が NS3-NS4A 間の相互作用を強めることにより複製が可能となることが示唆された。

本研究で遺伝子型 2a の J6CF 株、遺伝子型 2b の MA 株を用いた新規 HCV 感染増殖系を樹立した。その結果、HCV の生活環における遺伝子型またはウイルス株による差異や、薬剤感受性の違いについての比較検討が可能となる。さらに、これらのウイルス株を複製可能にするために必要な JFH-1 株の最少領域や導入した変異の情報は、他のウイルス株を用いたさらなる感染増殖系の樹立に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture-adapted hepatitis C virus by end-point dilution and infection. PLoS One. 2014 May 21;9(5):e98168.

2) 村山麻子、加藤孝宣. NS5B-RNA ポリメラーゼの構造と機能. 肝胆膵, 67(6), 918-923, 2013.

3) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. J Clin Microbiol. 2012 50(6):1943-9.

4) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A,

Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol. 2012 86(19):10805-20.

5) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki T, Kim S, Wakita T, Mishihiro S, Kato T. A Subclone of HuH-7 with Enhanced Intracellular Hepatitis C Virus Production and Evasion of Virus Related-Cell Cycle Arrest. PLoS One. 2012;7(12):e52697.

6) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. J Virol. 86(4): 2143-2152, 2012.

〔学会発表〕(計 14 件)

1) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸.

2) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. HCV NS5A キメラウイルスを用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸.

3) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and

full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

4) Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

5) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1 variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

6) 村山麻子、杉山奈央、岡本有加、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A 領域置換 HCV キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡.

7) 村山麻子、加藤孝宣、杉山奈央、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス遺伝子型 2b 株と JFH-1 株のキメラウイルスを用いた抗ウイルス薬評価系の樹立. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13-15 日、大阪.

8) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Mishiro S, Kato T. Efficient hepatitis C virus production associated with enhanced virus

assembly and evasion of cell cycle arrest. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 9-13, 2012. Boston, USA.

9) Murayama A, Kato T, Sugiyama N, Wakita T. Infectious Virus Production with Hepatitis C Virus Genotype 2b Genome Harboring Minimal Regions of JFH-1 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.

10) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルス産生効率の良い HuH-7 細胞サブクローンの同定と解析. 第 19 回肝細胞研究会、2012 年 6 月 29-30 日、札幌.

11) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

12) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.

13) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly

efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

14) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：C型肝炎ウイルス J6CF 株ゲノム由来の変異体レプリコン（MUTANT REPLICON DERIVED FROM GENOME OF HEPATITIS C VIRUS J6CF STRAIN）

発明者：脇田隆字、村山麻子、加藤孝宣

権利者：同上

種類：PCT/P2012/064070

番号：W02012/165542

出願年月日：2012年5月31日

国内外の別：国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 麻子（MURAYAMA, Asako）

国立感染症研究所・ウイルス第二部

・協力研究員

研究者番号：40415534