

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659204

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスに近縁なウイルスの探索と複製機構の解明

研究課題名(英文) Infection of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in Japan and analysis on its replication mechanism

研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：90260273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はC型肝炎ウイルスと近縁な非霊長類ヘパシウイルスあるいは相同性が高いウイルスの日本における感染状況を明らかにすることを目的としている。11頭の犬の鼻スワブからそのウイルスは検出できなかったが、ほぼ同一のウイルスが日本産外来種の馬から単離同定できた(馬ヘパシウイルス:EHcV)。血清学的な解析からも感染が確認され、およそ30%前後の日本産馬の既感染が分かった。また、今まで明らかになっていなかったゲノム全領域を決定し、HCVの非翻訳領域と同じ二次RNA構造をもつことがわかった。以上のことから、非霊長類ヘパシウイルスは日本でも高率に日本産馬に感染していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to clarify if non-primate hepacivirus (NPHV) infects dogs or other animals in Japan. NPHV has been recently reported as a close homologue of hepatitis C virus (HCV). We prepared nose swabs from 11 dogs but did not find NPHV gene in those samples by RT-PCR. We also attempted to identify the virus from Japanese-born horses. Sera were prepared from 30 horses and were subjected to genetic analyses using RT-PCR. We identified equine hepacivirus (EHcV) in 30% preparations and determined a whole genome sequence. Non-translated regions and closed regions exhibit a similar structure to those of HCV, although 3'untranslated region of EHcV had not been reported. These results suggest that EHcV infects Japanese-born horses at a high rate in Japan compared to other countries.

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：C型肝炎ウイルス 人獣共通感染症 非霊長類ヘパシウイルス フラビウイルス

1. 研究開始当初の背景

我が国の肝がん死三万人の約 8 割が、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染に起因するといわれており、170 万人の患者がいると報告されている。HCV はフラビウイルス科ヘパシウイルス属に属しており、2010 年まで由来がよく分からない GBV-B と HCV のみがヘパシウイルス属に分類されていた。2011 年にイヌ、ウマから HCV に近縁なウイルスが分離され、総称として非霊長類ヘパシウイルスと名付けられた。その後、小型齧歯類 (ラット、マウス) やコウモリから分離されている。非霊長類ヘパシウイルスの中で、イヌとウマから分離されたものが相同性が高く、GBV-B より近縁であることが分かった。始めにイヌから分離されたのを最後に、一切、イヌからそのウイルスが検出されず、ウマのみから検出され、ウマヘパシウイルスと名付けられた (Equine Hepacivirus: EHcV)。EHcV は欧米で報告されているのみで、日本、アジアからの報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は C 型肝炎ウイルスと近縁な非霊長類ヘパシウイルスあるいは相同性が高いウイルスの日本における感染状況を明らかにすることを目的にしている。イヌおよびウマからヘパシウイルス検出を試み、構造解析をするとともに、検出方法を確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ウイルス遺伝子の単離とキャプシド蛋白質コード領域の合成：呼吸器感染症状を伴うイヌから鼻スワブおよびウマ血清を採取し、RNA を調整し、cDNA を作製する。PCR および RACE 法によって肝炎ウイルス遺伝子 RNA をヘパシウイルス遺伝子の単離同定を行う。T7 プロモーターをもつ既存のプラスミドに組み込みウイル

スゲノム RNA を発現する系を作製し、大量に RNA を合成し、HCV の細胞培養系で一般的に使われる Huh7 細胞あるいは他培養細胞などを用いて、発現しているタンパク質を確認する。ブラインドパッセージなど様々な樹立株化細胞で感染系樹立を目指す。

(2) キャプシド蛋白質抗体作成と抗原・抗体検出系の確立：大腸菌発現プラスミドによってキャプシド蛋白質を調整し、抗体および抗原検出方法を確立する。キャプシド蛋白質の抗原抗体検出系確立を目標に、感染動物の有無を探る。CHV キャプシドタンパク質のコード領域を大腸菌発現プラスミドに組み込み、GST 融合蛋白質として精製し、ウサギおよびマウスに免疫し、ポリクローナル抗体を定法に従って作製する。ELISA による抗原検出系および抗体検出系の確立を目指す。抗体検出系は、組み換え CHV キャプシド蛋白質をプレートに付着させ、検体の血清サンプルを加え、HRP 結合イヌ IgG あるいは IgM 抗体を加えて、基質で発色させて定量する。

(3) キャプシド蛋白質のプロセシングおよび性状解析：ヘパシウイルスキャプシド蛋白質は Signal Peptidase (SP) によって E 蛋白質から遊離される位置は正確にわかっていない。保存されている領域から Signal peptide peptidase (SPP) でさらに膜貫通領域が切断されるものと予想される。キャプシド蛋白質変異体を発現させ、SP および SPP 切断箇所を特定する。また、HCV キャプシド蛋白質と同様、脂肪滴にキャプシド蛋白質が存在するのか、蛍光抗体法で細胞内局在を解析する。

(4) ウイルス複製・感染システムの確立と複製機構の解明：感染動物の血清および鼻スワブから感受性培養細胞を定法に

従って探索する。感受性細胞が認められない場合、HCVと同様、CHV ウイルスゲノム複製を模倣できるレプリコン RNA を作製し、細胞に導入し、レプリコン RNA の複製を許容する細胞株の樹立を目指す。導入された細胞の細胞内 RNA 複製状況をレシフェラーゼ活性で確認する。コントロールとして NS5 部分のポリメラーゼ活性不活化変異体を用いて対象とする。複製効率がよい細胞を選択し、インターフェロンでレプリコン RNA を排除し、高感染性細胞株を樹立する。その細胞へ検体が全長 CHV の RNA を細胞に導入し、完全な感染環が成立するか確認する。

#### 4. 研究成果

(1) ウイルス遺伝子の単離とキャプシド蛋白質コード領域の合成：11 頭のイヌ鼻スワブを用いて、RT-PCR によりウイルス遺伝子同定を試みたが、四カ所の領域で遺伝子は増幅されてこなかった。ウマ血清を北海道および東京から収集し、30 頭の血清から RT-PCR を試みた。コア、NS3、NS5B 領域を標的にしたプライマーで RT-PCR を試みたところ、11 頭でウイルス遺伝子が検出された。また、3' 非翻訳領域が poly A 配列によって酵素反応が障害をうけるため、通常の RACE 法では読むことができなかった。そこで、poly (U) ポリメラーゼを用いた RACE 法によって、一頭から分離されたウイルスの 3' 非翻訳領域を決定することができた。二次 RNA 構造を HCV と比較すると、Long range RNA-RNA interaction や Kissing loop 構造が保存されており、HCV ゲノム構造との相似性が証明された。

(2) キャプシド蛋白質抗体作成と抗原・抗体検出系の確立：キャプシド蛋白質の抗原予測を行い、N 末端側のアミノ酸配列に対するペプチド抗体をウサギに免疫することで作製した。培養細胞にキャプ

シド蛋白質を発現し、この抗体が Western プロテイングおよび蛍光染色で細胞が染色されることを確認した。この抗体を陽性コントロールにウマの血清中のキャプシド蛋白質に対する抗体検出を試みたが、既報の LIPS の方法ではバックグラウンドが高く方法として不適格である結論に達した。E L I S A 法も試みたが、G S T に対する非特異的抗体がウマ血清中に認められたので、この方法による血清学的解析をあきらめ、ウエスタンプロテイングによって血清学的解析を試みた。P C R 陽性血清のほとんどがウエスタンプロテイングで陽性となり血清学的にも感染が確認された。

(3) キャプシド蛋白質のプロセシングおよび性状解析：EHcV キャプシド蛋白質を HCV のコア蛋白質と比較したところ、C 末端の膜貫通領域に高い相同性が認められ、S P P で切断される領域も保存されていた。必須アミノ酸残基に変異を導入したところ、HCV コア蛋白質と同様に S P P による膜内切断が抑制された。また、S P P dominant negative 変異体を共発現すると、EHcV キャプシド蛋白質の切断が抑制され、その変異体と EHcV キャプシド蛋白質の相互作用が免疫沈降によって確認された。また、野生型の EHcV キャプシド蛋白質は脂肪滴に局在し、それは S P P 切断に依存していた。以上のことから、EHcV キャプシド蛋白質は HCV コア蛋白質と同様のプロセシングを受け、脂肪滴に局在すると考えられ、ウイルス粒子形成過程が同等であることが示唆された。

(4) ウイルス複製・感染システムの確立と複製機構の解明：EHcV レプリコンおよび培養細胞によるウイルス増殖を試みたが、持続的はウイルス複製および粒子放出は確認されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

- Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K: Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS one*, 8: e82299, 2013、査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0082299
- Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R: Ca(2+) /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 33: 1008-1018, 2013、査読有  
doi: 10.1111/liv.12151
- Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach. *J. Proteome Res.*, 12: 2537-2551, 2013、査読有 doi: 10.1021/pr3011217
- Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012、査読有  
doi: 10.3892/etm.2011.415
- Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012、査読有、  
doi: 10.3389/fmicb.2012.00054
- Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge Amphimedon sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012、査読有、  
doi: 10.1371/journal.pone.0048685

Tripathi LP, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen YA, Matsuura Y, Mizuguchi K: Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 11: 3664-3679, 2012、査読有、  
doi: 10.1021/pr300121a

〔学会発表〕(計 12件)

- 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostinとその類縁化合物によるC型肝炎ウイルス複製阻害、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸
- 葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司。Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いたHCV感染細胞内脂質組成の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
- 山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、森石恆司。Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物によるHCVゲノム複製阻害。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
- 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
- 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離したnon-primate hepacivirusの性状解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
- 森石恆司、教育セミナー：HCVに近縁なヘパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
- Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
- Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and

Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links ”, Trapani, Italy, October 20-21, 2013

葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司 新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～15 日、大阪

藤本雄介、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、森石恆司 海綿動物 Amphimedon sp. 抽出画分による HCVNS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～15 日、大阪

山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～15 日、大阪

Kasai H., Kawakami, K., Yamashita, A., Ikeda, M., Kato, N., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., Moriishi, K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. 2012. October 5-9., Venice, Italy

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：90260273

### (2) 連携研究者

山下 篤哉 (YAMASHITA, Atsuya)  
山梨大学・医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：00334871

葛西 宏威 (KASAI, Hirotake)  
山梨大学・医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：20324189