

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790452

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスの肝細胞への吸着・侵入機構に関する研究

研究課題名(英文) The study of attachment and entry mechanism of hepatitis E virus into hepatocyte

研究代表者

塩田 智之 (Shiota, Tomoyuki)

国立感染症研究所・その他部局等・任期付研究員

研究者番号：80616144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではE型肝炎ウイルス(HEV)に対する感受性・非感受性ヒト肝細胞の網羅的な遺伝子発現解析、プロテオーム解析、およびcDNAライブラリスクリーニングによって有力なレセプター候補を同定した。現在までE型肝炎には有効な対策が存在しないが、今後、候補因子の肝細胞への結合・感染能を詳細に解析し、その吸着・侵入機構における役割を解明していくことで効果的なワクチンや治療薬開発の基盤確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：Comparative analyses between hepatitis E virus (HEV) infection-permissive and -nonpermissive human hepatocytes by using gene expression profiling, proteome analysis and screening of cDNA library led to the identification of strong receptor candidate. We are now planning to elucidate the function of this candidate gene to viral attachment and entry into hepatocytes. To date, the effective method to control HEV infection is not yet established, but we believe this study will contribute to the development of effective vaccine and therapeutic drugs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス(HEV) HEV感受・非感受性細胞 網羅的遺伝子発現解析 プロテオーム解析 cDNAライ
ブラリスクリーニング レセプター候補 結合能 感染能

1. 研究開始当初の背景

E 型肝炎ウイルス(HEV)は、ヒトに対して急性・劇症肝炎を引き起こす。特に妊婦における致死率は 20%と高い。近年、ブタ・イノシシなどの動物にも感染することが明らかとなり、食品媒介性肝炎の原因ウイルスとして重要性を増してきている。しかし、細胞培養系の未整備がワクチン開発を始めとした研究の足かせとなってきた。われわれのグループは、世界に先駆けて昆虫細胞発現系を用いたウイルス様中空粒子(VLP: Virus Like Particle)の作製に成功し(TC Li et al. Journal of Virology 1997)、ワクチンへの応用も試みている(TC Li et al. Vaccine 2004)。更にここ数年、田中ら(Tanaka T et al. Journal of General Virology 2007)に引き続きわれわれもブタ肝臓よりクローニングした HEV のヒト肝がん細胞 Alexander 株での増殖系を確立した。

HEV 感染 Alexander 株の長期観察時の抗原陰性細胞の存在によって、Alexander 株は HEV 感受・非感受性細胞の mixture であると考えられた。そこで、Alexander 株の限界希釈によって複数の感受・非感受性細胞を分離した。本課題では、Alexander サブクローンと HEV を利用してレセプター(ウイルス受容体)を同定し、HEV ライフサイクルに特異的な E 型肝炎予防ワクチンや抗ウイルス薬開発への応用を目指す。計画を進めていくうえで、申請者は次のような予備的な研究結果を得ていた。

いくつかの非感受性細胞に対して HEV 感染性クローンをトランスフェクションしたところ、全ての細胞について抗原の分泌が確認された。つまり、これらの非感受性細胞については、細胞内での複製には何ら問題がないことが示唆される。と同時に、細胞への吸着・侵入過程における何らかの障害が示唆された。分離株の細胞表面に対する VLP の結合を抗 VLP 抗体を用いて検討したところ、非感受性細胞の中にも VLP と結合するものがあり、感受性と細胞表面への HEV 結合には必ずしも相関がなかった。

以上の予備的な結果より、非感受性細胞の多様性が示され、吸着・侵入過程に複数の感染性規定宿主因子が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、上記の背景をもとに、HEV 感染に重要なレセプターを探索・同定し、新しいワクチンや治療法への応用基盤となる研究を行うことを目的とする。研究期間内に以下のことを明らかにすべく取り組んだ。

感受性細胞ではレセプター遺伝子が翻訳

されていることから、細胞より RNA を抽出し逆転写することで cDNA ライブラリを作製する。レセプター遺伝子を含む高品質・高複雑度のライブラリ(全体で 100 万個以上の cDNA を含む独立コロニーが存在する)を構築する。

VLP を用いた発現クローニング法(パンニング法)によりレセプター候補遺伝子を呈示する。

HEV 感受・非感受性細胞の網羅的遺伝子発現比較解析によってレセプター候補遺伝子を呈示する。

HEV 感受・非感受性細胞の二次元電気泳動解析によってレセプター候補タンパク質を呈示する。

HEV 結合タンパク質を同定する。レセプター候補タンパク質の VLP への結合能を調べる。

HEV レセプターを決定する。HEV 結合タンパク質の HEV 感染への寄与を調べる。

レセプターの侵入過程に特異的な E 型肝炎予防ワクチンと抗ウイルス薬開発の基盤情報を取得する。レセプターに対する VLP の結合部位を同定し、結合部位のワクチン・抗ウイルス薬標的としての可能性を探る。

HEV の結合因子についての報告は、CD138 抗原について 1 報のみ存在する(Manjula K et al. Journal of Virology 2009)。CD138 は、膜貫通ヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、細胞外マトリックスタンパク質、細胞表面分子および可溶性タンパク質と相互作用する。Manjula らは、CD138 は細胞表面に高密度に存在するが HEV との親和性が低いこと、並びに CD138 抗体の感染阻害能の低さから、細胞表面への滞留時間を延ばすことで真のレセプターとの結合を補助しているコレセプターであるかと推論している。申請者は、本課題にて HEV に高い親和性を持つ真のレセプターの同定を目指す。予備的な結果から、分離した HEV 非感受性細胞の中には VLP との間に結合を示さないものが存在したが、その後の実験で CD138 の発現が確認された。つまり、本細胞においては真のレセプターにおける何らかの異常(欠損もしくは抑制)がある可能性が極めて高い。本細胞に対して感受性細胞から作製した cDNA ライブラリを導入することで、真のレセプターの同定が実現する。これらバラエティに富んだ非感受性細胞の存在が本研究を特色のあるものにしていく。

また、Manjula らの作製したウイルスは細胞への感染効率が極めて低い(Emerson SU et al. Journal of Virology 2004)。一方で、高効率な HEV 細胞培養システムを確立しているのは、世界で他に 1 グループのみであり、潤沢な感染性ウイルスの使用により高精度の感染実験が可能である。また、本システムによる感受・非感受性細胞のクローニングは未公表であり、単独先行であった。

本課題による HEV レセプターの同定は、

HEV の感染機構を明らかにし、HEV の侵入過程に特異的な E 型肝炎予防ワクチンや抗ウイルス薬開発への応用によって、HEV 感染リスクを低減し、安全な食肉生産を確立することで安心な日本の実現に貢献する。

3. 研究の方法

HEV レセプター候補の探索

パンニング法はレセプター同定の定石である (cDNA ライブラリに埋もれたレセプター遺伝子をウイルス粒子との親和性を利用して見つけ出すことを、砂の中から砂金を洗い出すことになぞらえてパンニング法と呼ぶ)。感受性細胞 cDNA ライブラリを非感受性細胞に発現させ、ウイルス粒子をコートしたプレート上で培養することで、レセプター遺伝子がゲノムに組込まれたコロニーを回収することができる。パンニング法の成否は、偏に高い複雑度を持つ cDNA ライブラリを作製できるか否かに懸っている。目安として 106 個以上の複雑度 (全体で 100 万個の独立コロニーが存在する) が要求される。申請者は予備実験において 3×10^5 個の複雑度のライブラリを構築したが、目安には若干の不足があり、超高品質 10^7 個の複雑度を目指し目下実験中である。そこで申請者は、感受・非感受性細胞の網羅的発現解析によって、同時並行的に別法でのレセプター同定を進める。

1) パンニング法

- a, **感受性細胞の cDNA ライブラリ構築。**
感受性細胞から mRNA を抽出して cDNA を作製し、pLIB レトロウイルスベクターへ導入する。作製したレトロウイルスベクターを GP2-293 細胞にトランスフェクションし、cDNA ライブラリが挿入された組換えレトロウイルスを回収する。
- b, **cDNA ライブラリの非感受性細胞への導入による HEV レセプター候補遺伝子の探索。**
組換えレトロウイルスを非感受性細胞へ感染させて VLP をコートしたディッシュに播種する。ディッシュ表面には、HEV に対する結合分子を発現する非感受性細胞 (結合分子の遺伝子が組込まれている) のみがコロニーを形成する。コロニーを回収し、pLIB 特異的なプライマーによって組込まれた cDNA を決定する。

2) HEV 感受・非感受性細胞の網羅的遺伝子発現解析によるレセプター候補遺伝子の探索

複数の感受・非感受性細胞から RNA を抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いた品質チェックを行う。Low Input Quick Amp Labeling Kit (2 色) を用いて Cy3 と Cy5 の 2 色でラベリングした cRNA プローブを作製する。Agilent Whole Human Genome v2 に対してプローブをハイブリダイズした後、

洗浄・スキャニングを行う。感受・非感受性細胞間での発現差からレセプター候補遺伝子を呈示する。

3) HEV 感受・非感受性細胞の二次元電気泳動解析によるレセプター候補タンパク質の探索

a, 感受・非感受性細胞の二次元電気泳動による相違構成因子の呈示。

細胞を回収後、破碎、可溶化、TCA/アセトン沈殿の後、膨潤バッファーで再溶解する。IPG Ready Strip ゲル (pH3-10) と 10-16% グラジエントゲルを用いて二次元電気泳動を行う。SYPRO Ruby 染色にて比較解析を行う。

b, 呈示された相違構成因子の質量分析による同定。

感受・非感受性細胞で違いのある構成因子を、トリプシンにてゲル内消化後、MALDI-TOF MS にて断片ペプチドの精密質量を測定する。MASCOT によるデータベース検索からレセプター候補タンパク質を呈示する。

網羅的発現解析 2)、3) によってリストアップされる遺伝子・タンパク質は比較解析による絞込みを行ってもなお多数であることが予想される。そこで、膜タンパク質を始めとした細胞表面に局在するタンパク質やそれをコードする遺伝子であることを条件に更なる絞込みを行う。

レセプター候補の検証

1) 結合能の検証

HEV レセプター候補が、HEV と細胞との結合を媒介する細胞表面分子であることを確認する。絞り込まれたレセプター候補について、市販のモノクローナル抗体によって感受・非感受性細胞間で発現に差があることをウェスタンブロットにて確認する。更に、レセプター候補遺伝子を組込んだ pEF6/V5-His を作製し、HEV への結合能を持たない細胞へトランスフェクションした後、HEV 培養上清と抗 VLP 抗体を用いた FCM にて結合能を確認する。モノクローナル抗体の VLP と当該細胞の結合阻害能も確認する。

2) 感染への寄与の検証

結合能を有する候補レセプターの感染への影響を調べる。非感受性細胞でのレセプター候補発現時の HEV 感受性を調べる。感受性を獲得した場合、対応するモノクローナル抗体および siRNA の感染阻害能を調べる。

HEV の侵入過程に特異的な E 型肝炎予防ワクチン・抗ウイルス薬開発への応用

HEV レセプターに対する VLP の結合部位を

欠失変異体・点変異体を用いて同定する。結合部位に相当するペプチドを合成し感染阻害能を調べる。合成ペプチドを用いた侵入過程に特異的な感染防御抗体の誘導を試みる。効果的な誘導が確認された場合、合成ペプチドを用いてモノクローナル抗体を作製し、感染阻害能から抗体医薬としての可能性を探る。

4. 研究成果

パンニング法。レトロウイルスベクターを用いた HEV 感受性細胞からの高品質 cDNA ライブラリが構築された。種々のコントロール実験の結果、今後販売が中止となるライブラリ作製キットの品質に疑義が持ち上がり、キットの再選定を行った。そして、PCR を介在させる(多様性が下がる)方法でのライブラリ構築に成功し、パッケージング細胞への導入によって組換えレトロウイルスを得て非感受性細胞へ感染させ、ライブラリ由来蛋白質を発現させた。この細胞を E 型肝炎ウイルス固相化プレートによって選択補足し、結合した細胞からゲノムを回収し、レセプター候補遺伝子断片を同定した。更に同断片遺伝子の全長クローニングに成功した。

HEV 感受・非感受性細胞の網羅的遺伝子発現解析。当該細胞から抽出してラベリングした cRNA プローブを作製し、遺伝子発現解析用マイクロアレイにハイブリダイズしてスクニングした。感受・非感受性細胞間で上記クローニング遺伝子の発現に強い相関が見られ、当該遺伝子のレセプターとしての可能性が示唆された。

HEV 感受・非感受性細胞の二次元電気泳動解析。当該細胞の二次元電気泳動解析より、相違 2 因子について質量分析を実施、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH)と Fatty acid-binding protein 2 (FABP2)を同定した。GAPDH は、ハウスキーピング遺伝子の一つとして、細胞の生存・維持に関わり、どの細胞でも一定量発現している遺伝子の一つである。また、FABP2 は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR: 炭化水素、脂質、タンパク質等の細胞内代謝と細胞の分化に密接に関連している転写因子)のシグナル経路に関連しており、細胞内機能から感染への関与機構の解明への端緒となる可能性を内包している。

レセプター候補発現の検証。レセプター候補に対する市販モノクローナル抗体の内、まず 1 種類を用いて感受・非感受性細胞間での発現差を FCM にて確認した。しかし、クリアな差ではなかった為、他の

モノクローナル抗体でも試験を行うことでよりクリアな差を示すことを考えている。**感受性細胞を用いたレセプター同定に向けた結合能評価系の確立と阻害能評価への応用。**感受性細胞、HEV 培養上清と抗 HE-VLP モノクローナル抗体を用いた FCM では結合能を確認することが出来た。そこで、市販モノクローナル抗体の HEV と当該細胞間の結合阻害能を確認したところ阻害能は見出せなかった。今後、他の市販モノクローナル抗体でも試験を行うことで阻害能を持つものを同定したいと考えている。

レセプター候補の感染への寄与の検証。市販モノクローナル抗体と対応する siRNA の感受性細胞への感染阻害能の検証を現在実施中。

レセプター候補遺伝子搭載哺乳細胞発現ベクターによる非感受性細胞のレセプター候補安定発現株の樹立。哺乳類細胞において候補遺伝子を安定発現するベクターを構築し、レセプター候補安定発現細胞株を樹立した。先ず、クルードの樹立細胞を用いて感受性復帰試験を試みたが、複数の矛盾点が生じたため、現象を還元論的に視る為にシングルセルクローニングを行っている。非感受性細胞でのレセプター候補の発現量について、再現性のよい安定したクローンを取得し、感受性復帰試験を再度行う予定である。

レセプター同定に向けた HEV 高速増殖能獲得馴化細胞株の作製。既に、結合能評価系を確立し、結合能および阻害能評価への応用が可能となったが、現在までの所、市販モノクローナル抗体の阻害能は見出せていない。そこで、新たに感染阻害評価系の構築を目指した。既報によって、HEV が馴化によって高速増殖能を獲得することが報告されている (Lorenzo et al. Virus Research 2008)。そこで、今後の展開を鑑み感染性クローンを有する G3 の馴化株を作製した。増殖曲線がプラトーに達した時点で、新しい細胞に植え継ぐことを繰り返し、10 日前後で感染感受性を評価可能な系の構築に成功した。今後、7)への応用が重要課題である。

結合能の阻害が想定される各種ポリペプチド、モノクローナル抗体の評価。レセプター候補は、細胞接着因子として知られ、細胞表面上の膜蛋白質と相互作用を行い、特定のペプチドモチーフに結合することが知られている。当該モチーフは、配列情報レベルで HEV の構造タンパク質に高度に保存されていることが分かっている。そこで、抗相互作用因子抗体、特定のモチーフペプチドの結合に与える影響を予備実験レベルではあるが確認したところ、阻害能が示唆された。今後、

結合能・感染能評価系を用いて詳細に検討することで所期の目的を達する。

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3件)

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Koji Ishii. Establishment of hepatitis E virus infection-permissive and -non-permissive human hepatoma PLC/PRF/5 subclones. *Microbiology and Immunology*. 査読有. Feb;59(2). 2015. 89-94. doi: 10.1111/1348-0421.12219.

Tian-Cheng Li, Tingting Yang, **Tomoyuki Shiota**, Sayaka Yoshizaki, Hiromu Yoshida, Mariko Saito, Toshifumi Imagawa, Fidelino F. Malbas, Socorro P. Lupisan, Hitoshi Oshitani, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Molecular detection of Hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 査読有. Apr;90(4). 2014. 764-6. doi: 10.4269/ajtmh.13-0562.

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Koji Ishii. The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. *Journal of Virology*. 査読有. May;87(10). 2013. 6031-6. doi: 10.1128/JVI.00444-13.

(学会発表)(計7件)

塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, 下島昌幸, 西條政幸, 脇田隆字, 石井孝司. E型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子候補に関する研究. 第62回日本ウイルス学会学術集, 2014年11月10日~12日, パシフィコ横浜, 神奈川.

Tomoyuki Shiota. Searching for the host factors involved in hepatitis E virus infection. 2014 MGH-UTokyo Symposium: Frontiers in Biomedical Engineering (Celebrating the 10th year of MGH-UTokyo Summer Student Internship Program), September 24, 2014, Simches Conference Room 3110, MGH, Boston, MA, USA

塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, 下島昌幸, 西條政幸, 脇田隆字, 石井孝司. E型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究. 第61回日本ウイルス

学会学術集, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場, 兵庫.

石井孝司, 李天成, 吉崎佐矢香, 塩田智之, 脇田隆字. E型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場, 兵庫.

塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 武田直和, 脇田隆字, 石井孝司. E型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白C末端52アミノ酸の機能解析. 第60回日本ウイルス学会. 2012年11月13日~15日

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Koji Ishii. Characterization of Hepatitis E Virus Capsid C-terminal 52 Amino Acids in the Viral Life-Cycle. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine. 2012年10月16日~19日. 北海道札幌市

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Koji Ishii. Characterization of Hepatitis E Virus Capsid C-terminal 52 Amino Acids in the Viral Life-Cycle. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2012年9月11日~14日. 兵庫県淡路市

6. 研究組織

研究代表者

塩田 智之 (Shiota Tomoyuki)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・任期付
研究員

研究者番号: 80616144