

令和元年6月12日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08817

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスの感染初期過程に關与する宿主因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of host factors involved in early steps of hepatitis E virus infection

研究代表者

長嶋 茂雄 (Nagashima, Shigeo)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60433116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、粒子形態の異なるE型肝炎ウイルス(HEV)の感染受容体を同定するため、膜に覆われたHEV粒子の性状を詳細に解析した。その結果、膜に覆われたHEV粒子表面の膜成分はエクソソームと共通の抗原性を有し、個々のキャプシドが脂質膜に覆われた形態を取っていることを明らかにすることができた。また、これまでの解析により同定された2つの受容体候補蛋白質が、形態の異なるHEV粒子のそれぞれの感染受容体と成り得ることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの解析からHEVの感染受容体としての関与が示唆されている候補蛋白質に対して、siRNAを用いたスクリーニングを行った。その結果、どちらか一方の粒子形態でのみ増殖効率が低下する蛋白質を同定することができた。また、感染阻害実験やウイルスとの結合実験により、これらの蛋白質がHEVの感染受容体として機能することを示すことができた。感染受容体はHEVの感染初期過程に非常に重要な分子であるため、両者の結合を阻害するような化合物を探索することで、治療薬開発への基礎的知見を提供できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, to identify the possible entry receptors for hepatitis E virus (HEV) infection, we investigated the antigenicity and morphological features of the membrane-associated HEV particles. Our results indicated that membrane components are common between the membrane-associated HEV particles and exosomes, and that the capsids of HEV particles are individually covered by lipid membranes. In addition, our results suggested that the two candidate proteins identified in our previous study could serve as different entry receptors for two distinct forms of HEV particles.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス 感染初期過程 受容体 細胞内侵入 感染感受性 エクソソーム エンベロープ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、E型肝炎ウイルス(HEV)の感染による急性肝炎であるが、劇症化することも報告されており、死亡例も認められる。一方で、臓器移植患者や免疫不全患者では、HEV感染は高頻度に慢性化する。しかしながら、現在までE型肝炎に対する特異的な治療法は確立されていない。

HEVは胆汁中や糞便中のウイルス粒子の物理化学的性状からノンエンベロープウイルスに分類されている。我々は、血液および培養上清由来のHEV粒子の表面には、宿主細胞のエンドソームに由来する脂質膜が存在することを見出した。さらに、HEVは細胞内の多胞体内腔へと出芽することにより粒子表面の膜構造を獲得し、多胞体内に共存するエクソソームとともに、エクソソーム分泌経路を利用して宿主細胞を破壊することなく、エンベロープウイルス様粒子として細胞外へと放出されることを明らかにした。このことから、生体内では膜に覆われた粒子と膜に覆われていない粒子の2種類の形態のHEV粒子が存在していることが明らかとなった。また、膜に覆われたエンベロープウイルス様粒子は、回復期血清(中和抗体)の存在下でも培養細胞への感染性を有していることを実証した。すなわち、糞便(経口)と血液(輸血)による感染では粒子形態が異なるだけでなく、感染初期過程の分子機構も異なると思われる。

2. 研究の目的

これまでの研究により、形態の異なる2種類のHEV粒子は培養細胞に対して同等の感染性を有することが示されている。しかしながら、HEVの感染に必要な受容体などの感染初期過程に関わる分子については、糞便中のノンエンベロープウイルス粒子についても明らかとなっていない。

本研究では、申請者が世界で初めて樹立に成功したHEVの細胞培養系を用いて、形態の異なる2種類のHEVの感染初期過程に関与する宿主因子を同定し、その機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HEV [JE03-1760F株(遺伝子型3型)]感染PLC/PRF/5細胞、または非感染PLC/PRF/5細胞を無血清培地で培養した。培養上清中のエクソソームは超遠心法(100,000×g, 70分)により回収した。膜に覆われていないHEV粒子は、培養上清中の膜に覆われた粒子をデオキシコル酸ナトリウムとトリプシンを用いて処理をすることにより作製した。HEV粒子とエクソソームの形態はネガティブ染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。免疫電子顕微鏡法にはウイルスのORF2蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体(H6225)を用いた。膜に覆われたHEV粒子表面の抗原性は、抗CD63抗体、抗CD9抗体、抗CD81抗体、抗上皮細胞接着分子抗体、そしてホスファチジルセリン結合蛋白質を用いた免疫沈降法により解析した。

(2) HEV増殖における受容体候補蛋白質の必要性については、それぞれの候補蛋白質に対するsmall interfering RNA (siRNA)をトランスフェクトした細胞に、粒子形態の異なる2種類のHEVを接種し、培養上清中のHEV RNA量をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定することにより検討した。

(3) 感染阻害実験では、まずPLC/PRF/5細胞を受容体候補蛋白質に対する特異抗体で処理した後、形態の異なるHEV粒子を接種した。次に、感染4日後の細胞内のHEV RNA量を測定することにより、HEVの細胞内侵入が阻害されるか否かを検討した。HEVと受容体候補蛋白質との相互作用の解析は、細胞抽出液と膜に覆われていないHEV粒子を混合し、膜に覆われていない粒子を特異的に認識するH6225抗体を用いた共免疫沈降法により解析した。

(4) 受容体候補蛋白質をノックアウトした細胞は、CRISPR/Cas9システムを利用して作製した。薬剤による選択後、シングルセルクローニングにより得られた細胞株について、編集部位の配列を確認した。作製したノックアウト細胞に 1×10^4 コピーの膜に覆われた粒子と膜に覆われていない粒子を接種し、それぞれのHEVの吸着能ならびに増殖能を検討した。

4. 研究成果

(1) エクソソーム分泌経路を利用して放出されたHEVの性状解析

これまでの解析により、膜に覆われたHEV粒子はエクソソームと同じ機構で形成され、同じ経路を利用して細胞外へと放出されることが明らかとなっている。このことから、膜に覆われたHEV粒子は、エクソソームと性状が似ていることが示唆された。

そこで、エクソソーム分画に含まれるHEVの性状を詳細に解析した。培養細胞から放出されたエクソソームを超遠心法により精製し、ネガティブ染色後に電子顕微鏡による観察を行った。その結果、直径が30 nm 100 nmのエクソソームとともに、直径が39.6 nm(粒子200個の平均)で大きさが均一な球形のウイルス様粒子が観察された。また、エクソソーム分画に含まれる直径約40 nmの粒子を、デオキシコル酸ナトリウムとトリプシンで処理した結果、直径が26.9 nm(粒子200個の平均)のウイルス様粒子が観察され、その大きさは糞便中の膜に覆われていないHEV粒子と一致していた。そこで、これらの粒子が膜に覆われていないHEV

粒子であることを証明するために、キャプシドである ORF2 蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫電子顕微鏡法による解析を行った。その結果、直径約 27 nm からなる粒子の周囲に金コロイドの結合が認められた。このことから、エクソソーム分画に含まれる粒子は、個々のキャプシド蛋白質が脂質膜に覆われた HEV 粒子であることが明らかとなった。

次に、膜に覆われた HEV 粒子表面の抗原性について解析を行った。エクソソームの表面に存在する CD63、CD9、CD81、上皮細胞接着因子、ホスファチジルセリンと特異的に結合する抗体または蛋白質を用いて、培養上清中に含まれる HEV 粒子を順番に捕捉していった。その結果、これら 4 種類の抗体と 1 種類の蛋白質を用いて約 90%の膜に覆われた HEV 粒子を捕捉することができた。これらの知見は、培養上清中に放出された膜に覆われた HEV 粒子のほぼすべてがエクソソームの膜成分と共通の抗原性を有していることを示している。一方、膜に覆われていない HEV 粒子ではこれらの蛋白質が存在していないため、捕捉されなかった。

以上の結果から、膜に覆われた HEV 粒子表面の膜成分はエクソソームと共通の抗原性を有していることが明らかとなった。加えて、電子顕微鏡解析により、これらの HEV 粒子は個々のキャプシドが脂質膜に覆われた形態を取っていることを可視化することができた。そして、HEV の粒子表面には細胞への侵入に重要な役割を担うウイルス由来の糖蛋白質が存在していないことを実証することができた。このことから、HEV の感染受容体については、粒子形態により利用する受容体分子が異なることが示唆された。

(2) HEV 感染の初期過程に関与する受容体の同定

受容体候補蛋白質をノックダウンすることによる HEV の増殖効率への影響

これまでの解析により、膜に覆われた HEV の受容体として細胞膜貫通型の蛋白質ファミリーの関与が示唆されている。そこで、siRNA を用いてこの蛋白質ファミリーに属する蛋白質をそれぞれノックダウンした細胞に粒子形態の異なる HEV を接種し、ウイルスの増殖効率を網羅的に解析した。感染 10 日目の培養上清中の HEV RNA を定量した結果、受容体候補蛋白質 B をノックダウンした細胞では、膜に覆われた HEV の増殖効率のみが低下することが明らかとなった。一方、受容体候補蛋白質 A または G をノックダウンした細胞では、膜に覆われていない HEV の増殖効率が低下した。さらに、受容体候補蛋白質 E または J をノックダウンした細胞では、膜に覆われた粒子と膜に覆われていない粒子の両方で増殖効率の低下が認められた。

膜に覆われた HEV の感染初期過程に関与すると思われる受容体候補蛋白質 B の機能解析

膜に覆われていない粒子では細胞内侵入に影響がなく、膜に覆われた粒子でのみ細胞内への侵入が阻害された受容体候補蛋白質 B について、さらに解析を行った。siRNA を用いる実験とは異なるアプローチとして、同定された候補蛋白質 B の細胞外に存在する部位または細胞質内に存在する部位を特異的に認識する抗体を用いて、HEV の細胞内侵入が阻害されるか否かを調査した。その結果、細胞外の部位に対する特異抗体で処理した細胞において、濃度依存的な HEV の侵入阻害が認められた。一方、細胞質内に存在する部位を認識する抗体では、影響は認められなかった。

そこで、CRISPR/Cas9 を用いて、候補蛋白質 B をノックアウトした PLC/PRF/5 細胞を複製し、膜に覆われた HEV の増殖能を解析した。その結果、negative control ノックアウト細胞では効率の良い HEV の増殖が認められたが、候補蛋白質 B をノックアウトした細胞では、HEV の増殖効率は明らかに低下した。さらに、低いウイルス感染価での接種実験では HEV の増殖が完全に抑制された。このことから、同定された蛋白質 B は膜に覆われた HEV の感染初期過程に必要な受容体またはコレセプターとしての機能を有することが示唆された。

膜に覆われていない HEV の感染初期過程に関与すると思われる受容体候補蛋白質 G の機能解析

膜に覆われた粒子では細胞内侵入に影響がなく、膜に覆われていない粒子でのみ細胞内への侵入が阻害された受容体候補蛋白質 G について解析を行った。最初に、PLC/PRF/5 細胞を候補蛋白質 G に対する抗体で処理し、その後、両 HEV 粒子を接種することにより細胞内侵入が阻害されるか否かを調べた。解析の結果、膜に覆われた粒子では抗体処理による細胞内侵入への影響は認められなかった。一方、膜に覆われていない粒子では、濃度依存的な侵入阻害が認められた。

続いて、候補蛋白質 G と膜に覆われていない HEV 粒子の相互作用について解析した。候補蛋白質 G を含む細胞抽出液と膜に覆われていない粒子を混合し、膜に覆われていない粒子を特異的に認識する抗体を用いて共免疫沈降を行った。精製された蛋白質を ORF2 蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、膜に覆われていない粒子を形成する ORF2 蛋白質が検出された。さらに、同一のサンプルを用いて候補蛋白質 G に対する抗体でウエスタンブロットを行ったところ、候補蛋白質 G が検出された。このことから、膜に覆われていない HEV 粒子と候補蛋白質 G が結合していることが示された。

そこで、CRISPR/Cas9 を用いて、候補蛋白質 G をノックアウトした PLC/PRF/5 細胞を複製し、膜に覆われていない HEV の増殖能を解析した。最初に、候補蛋白質 G ノックアウト細胞を用いて、両 HEV 粒子の吸着効率を調査した。その結果、膜に覆われた粒子の吸着効率は negative control ノックアウト細胞と同程度であったが、膜に覆われていない粒子では negative

control を 100% とすると、候補蛋白質 G ノックアウト細胞の 2 つのクローンにおいて、18.7%、19.0% と吸着効率の低下が認められた。続いて、候補蛋白質 G ノックアウト細胞に膜に覆われた HEV 粒子を接種したところ、増殖効率は negative control ノックアウト細胞と同程度であった。それに対して、膜に覆われていない HEV 粒子を接種した候補蛋白質 G ノックアウト細胞では、感染後 20 日まで観察を続けたが HEV の増殖は認められなかった。一方、negative control ノックアウト細胞では、膜に覆われていない HEV の効率の良い増殖が認められた。このことから、同定された蛋白質 G は膜に覆われていない HEV の感染受容体として機能していることが強く示唆された。

感染受容体に関する上記の結果から、膜に覆われた HEV 粒子と膜に覆われていない HEV 粒子では、細胞内侵入に利用する受容体分子が異なると考えられた。興味深いことに、同定された 2 つの蛋白質は同じ蛋白質ファミリーに属しており、HEV は同じ蛋白質ファミリーに属する別の蛋白質を受容体として利用していることが示唆された。

(3) 感染感受性を規定する宿主因子の探索とその機能解析

感染感受性を規定する宿主因子の探索については、膜に覆われた HEV の感染初期過程に重要な働きをするタイトジャンクションの形成に関わる蛋白質を同定することができた。さらに、この蛋白質をノックアウトした細胞では粒子形態に関わらず HEV の増殖が抑制されることが明らかとなった。その他にも、形態の異なる 2 種類の HEV の感染初期に共通して必要な宿主蛋白質 [研究成果(2)- ; 蛋白質 E、J] を同定している。また、すでに樹立した膜に覆われた HEV に対する感染感受性の異なるクローン化 PLC/PRF/5 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により細胞間で発現量の異なる遺伝子を複数同定することができた。今後は、これらの宿主因子の役割についても解析を進める予定である。

HEV は胆汁中や糞便中のウイルス粒子の物理化学的性状からノンエンベロープウイルスに分類されている。一方で、血液中や培養上清中に放出された HEV 粒子は細胞由来の脂質膜に覆われている。これらの形態の異なる HEV 粒子は共に培養細胞への感染性を有しているが、それぞれが利用する感染受容体については、その詳細は明らかとなっていなかった。本研究では同一の細胞膜貫通型の蛋白質ファミリーに属する異なる蛋白質が、形態の異なる HEV 粒子のそれぞれの感染受容体と成り得ることを明らかにすることができた。今後は非感受性細胞への感受性の付与実験を行い、感染に必要な受容体候補蛋白質の機能解析と評価を行う予定である。

感染の初期過程は、それぞれのウイルスに固有の宿主域や標的組織を決定するために重要な役割を果たしている。E 型肝炎に対する特異的な治療法が確立されていない現状にあって、HEV の感染初期過程に関与する宿主因子が明らかになったことで、抗ウイルス剤の開発など特異的な治療法の確立に向けた新たな研究基盤を構築できるものと考えられる。また、宿主細胞との相互作用についての理解の深化は、有効性の高い HEV ワクチンの開発に資することが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Tanggis, Kobayashi T, Takahashi M, Jirintai S, Nishizawa T, Nagashima S, Nishiyama T, Kunita S, Hayama E, Tanaka T, Mulyanto, Okamoto H. An analysis of two open reading frames (ORF3 and ORF4) of rat hepatitis E virus genome using its infectious cDNA clones with mutations in ORF3 or ORF4. *Virus Res.* 249:16-30, 2018. (査読有) DOI: 10.1016/j.virusres.2018.02.014.

Nakano T, Takahashi M, Takahashi K, Nagashima S, Suzuki Y, Nishigaki Y, Tomita E, Okano H, Oya Y, Shiraki K, Takase K, Sugimoto K, Koyama J, Mizuo H, Ikezawa K, Aikawa T, Arai M, Okamoto H. Hepatitis E virus subtype 3f strains isolated from Japanese hepatitis patients with no history of travel to endemic areas - The origin analyzed by molecular evolution. *Virology.* 513:146-152, 2017. (査読有) DOI: 10.1016/j.virol.2017.08.008.

Nishizawa T, Primadharsini PP, Namikawa M, Yamazaki Y, Uraki S, Okano H, Horiike S, Nakano T, Takaki S, Kawakami M, Nagashima S, Takahashi M, Okamoto H. Full-length genomic sequences of new subtype 1g hepatitis E virus strains obtained from four patients with imported or autochthonous acute hepatitis E in Japan. *Infect Genet Evol.* 55:343-349, 2017. (査読有) DOI: 10.1016/j.meegid.2017.10.007.

Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, Primadharsini PP, Okamoto H. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *J Virol.* 91:e00822-17, 2017. (査読有)

DOI: 10.1128/JVI.00822-17.

Primadharsini PP, Miyake M, Kunita S, Nishizawa T, Takahashi M, Nagashima S, Tanggis, Ohnishi H, Kobayashi T, Nishiyama T, Jirintai S, Okamoto H. Full-length genome of a novel genotype 3 hepatitis E virus strain obtained from domestic pigs in Japan. *Virus Res.* 240:147-153, 2017. (査読有) DOI: 10.1016/j.virusres.2017.08.003.

Tsatsralt-Od B, Primadharsini PP, Nishizawa T, Ohnishi H, Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Nyamkhuu D, Okamoto H. Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis in Mongolia: The first report of the full genome sequence of a novel genotype 1 hepatitis E virus strain. *J Med Virol.* 2017 (査読有) DOI: 10.1002/jmv.24907.

Yamaguchi Y, Takagi H, Suzuki Y, Maruhashi K, Kosone T, Kakizaki S, Sato K, Yamada M, Nagashima S, Takahashi M, Okamoto H. Autochthonous sporadic acute hepatitis E caused by two distinct subgenotype 3b hepatitis E virus strains with only 90% nucleotide identity. *Clin J Gastroenterol.* 10:168-173, 2017. (査読有) DOI: 10.1007/s12328-017-0718-3.

Miura M, Inoue J, Tsuruoka M, Nishizawa T, Nagashima S, Takahashi M, Shimosegawa T, Okamoto H. Full-length genomic sequence analysis of new subtype 3k hepatitis E virus isolates with 99.97% nucleotide identity obtained from two consecutive acute hepatitis patients in a city in northeast Japan. *J Med Virol.* 89:1116-1120, 2017. (査読有) DOI: 10.1002/jmv.24743.

Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Jirintai S, Mulyanto, Nagashima S, Nishizawa T, Kunita S, Okamoto H. Production of monoclonal antibodies against the ORF3 protein of rat hepatitis E virus (HEV) and demonstration of the incorporation of the ORF3 protein into enveloped rat HEV particles. *Arch Virol.* 161:3391-3404, 2016. (査読有) DOI: 10.1007/s00705-016-3047-9.

Nagashima S, Kobayashi T, Tanaka T, Tanggis, Jirintai S, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Analysis of adaptive mutations selected during the consecutive passages of hepatitis E virus produced from an infectious cDNA clone. *Virus Res.* 223:170-180, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.virusres.2016.07.011.

Yamazaki Y, Naganuma A, Arai Y, Takeuchi S, Kobayashi T, Takakusagi S, Hatanaka T, Hoshino T, Namikawa M, Hashizume H, Takizawa D, Ohyama T, Suzuki H, Horiguchi N, Takagi H, Sato K, Kakizaki S, Kusano M, Nagashima S, Takahashi M, Okamoto H, Yamada M. Clinical and virological features of acute hepatitis E in Gunma prefecture, Japan between 2004 and 2015. *Hepatol Res.* 47:435-445, 2017. (査読有) DOI: 10.1111/hepr.12765.

Kobayashi T, Takahashi M, Tanggis, Mulyanto, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies raised against rat hepatitis E virus capsid protein: An evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *J Virol Methods.* 233:78-88, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.03.004.

[学会発表] (計 4 件)

Shigeo Nagashima, Putu Prathiwi Primadharsini, Tominari Kobayashi, Masaharu Takahashi, Takashi Nishiyama, Tsutomu Nishizawa, Hiroaki Okamoto. Cathepsin L is required for entry step of hepatitis E virus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018.

Shigeo Nagashima, Masaharu Takahashi, Tominari Kobayashi, Tanggis, Putu Prathiwi Primadharsini, Takashi Nishiyama, Tsutomu Nishizawa, Hiroaki Okamoto. Capsids of hepatitis E virus particles are individually covered by lipid membranes. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017.

Shigeo Nagashima, Masaharu Takahashi, Tominari Kobayashi, Tanggis, Tsutomu Nishizawa, Takashi Nishiyama, Putu Prathiwi Primadharsini, Hiroaki Okamoto. Cathepsin L is required for entry step of hepatitis E virus. *International Union of Microbiological Societies 2017 Singapore.* 2017.

Shigeo Nagashima, Tominari Kobayashi, Tanggis, Masaharu Takahashi, Tsutomu Nishizawa, Hiroaki Okamoto. Characterization of hepatitis E virus cell entry. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016.

〔その他〕

ホームページ等

自治医科大学 医学部 感染・免疫学講座 ウイルス学部門 <http://www.jichi.ac.jp/virology/>