

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590472

研究課題名（和文） C 型肝炎ウイルスの粒子産生機構の解析

研究課題名（英文） Study on the molecular mechanisms of hepatitis C viral particle production

研究代表者

土方 誠 (HIJIKATA MAKOTO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：90202275

研究成果の概要：我々は感染性 C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子の形成が細胞の脂肪滴周囲で行われていることを明らかにしたが、この研究ではこの粒子形成のメカニズムを詳細に解析した。脂肪滴周囲のタンパク質を詳細に解析したところ、HCV コアタンパク質が多量体を形成していることを新たに見いだした。この多量体形成を阻害するアミノ酸変異を導入した変異型 HCV を作成したところ、粒子の産生は検出されなかった。このことからこのアミノ酸に関連したコアの多量体形成が粒子産生に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ウイルス学

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、粒子産生、脂肪滴、組み換え体、コアタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルスは慢性肝炎、肝硬変そして肝がんの原因ウイルスである。世界人口の約 3%、我が国においても人口の約 1%におよぶ既感染者がおり、大きな社会問題となっている。PEG インターフェロンとリバビリンを用いた最新の治療法を用いてもその著効率は約 50%にすぎないため、さらに効果的な抗 HCV 効果を示す治療薬の開発が必要になっている。そのためには HCV の生活環を再現するための培養細胞を用いたウイルス感染増殖系の開発が必要であ

ったが、長い間そうした実験系は存在しなかった。近年、国内外のグループが共同で組換え体感染性 C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染性粒子産生実験系の開発に成功した。この実験系では試験管内で合成した HCV 遺伝子を細胞に導入する事で、その細胞の中で HCV 遺伝子が複製、増殖し、さらには感染性を有するウイルス粒子を培養液中に放出することが可能である。この感染性 HCV 粒子を含む培養液を新たな細胞にかけることでその細胞にこの HCV が感染し、またその細胞で HCV 遺伝子が複製、増幅されることが観察できる。つま

りこの系では培養細胞をもちいて HCV のすべての生活環が再現することが可能である。我々はこの実験系を用いてこれまで全く不明だった HCV のウイルス粒子産生機構の解析をおこなうことができた。これまでに電子顕微鏡による観察など以下の結果を得ている。HCV コアタンパク質は脂肪滴膜表面に局在化しているが他の HCV タンパク質は脂肪滴周辺の近傍膜構造に局在化していること、そして、ウイルス粒子は脂肪滴とその近傍膜構造が接する領域からその膜構造内へ出芽していることを示した。このことから感染性 HCV 粒子の形成そのものが脂肪滴周囲で行われていることが明らかとなった。しかしながら、脂肪滴が感染性粒子産生に果たす機能については全く不明であった。また、この実験系は組換え体 HCV と特定の癌細胞を用いて得られた実験なので患者由来の天然の HCV の感染増殖時に同様のメカニズムで粒子形成がおこなわれているのかについては全く不明であった。

## 2. 研究の目的

感染性組換え体 HCV を産生する細胞の脂肪滴 (LD) 周囲に存在する細胞そしてウイルス因子について生化学的あるいは分子生物学的方法をもちいて、その感染性粒子産生に果たす機能を明らかにすることを研究の目的にした。さらにこの感染性粒子産生機構を阻害することによって HCV の増殖を抑制するための方法を確立するための基礎研究をおこなうことを目指した。また患者血由来の HCV が感染増殖する実験系を構築することにより組換え体 HCV 増殖実験系で得られた研究結果を検証することを目指した。

## 3. 研究の方法

感染性組換え体 HCV を産生する細胞と以前の研究から非構造タンパク質 NS5A のアミノ酸に変異を導入し複製複合体が脂肪滴周囲に存在しないようにした変異体型組換え体 HCV が増殖している細胞を用いた。後者からは非感染性のウイルス粒子の産生は生じるが感染性粒子の産生は認められていない。そこで上記2つの細胞からの脂肪滴 (LD) 画分を回収し、そのプロテオーム解析をおこない、前者由来の脂肪滴に特異的に存在する、あるいは存在比率が著しく変化している細胞性あるいはウイルス性因子を同定することを試みた。細胞性因子に関しては、得られた候補因子の mRNA 配列に対する siRNA を合成し、これを感染性組換え体 HCV を産生する細胞に導入することにより候補因子の発現を低下するか否かを検討し、抑制効果の得られる siRNA

を選択した。同時にこの候補因子の cDNA のクローニングをおこなった。LD 画分に存在しているウイルス性因子に関してはその構造を解析し、またその因子と相互作用する因子の同定をおこなった。

患者血由来の HCV が感染増殖する実験系の構築のために既に独自に樹立していることを報告している不死化肝細胞 HuS-E2 細胞を立体培養したものを用いることで新たに天然 HCV の感染増殖実験系を構築することを試みた。

## 4. 研究成果

ウイルスゲノム複製は可能であり、コアタンパク質も野生型組換え体感染性 HCV と同一であるが感染性ウイルスを産生しない変異体型組換え体 HCV 複製細胞と組換え体感染性 HCV 産生細胞から細胞分画法によってそれぞれの脂肪滴画分を精製してプロテオーム解析をおこない、その構成タンパク質の比較をおこなった。各種ウイルスタンパク質に関してはイムノプロット法による検出は可能であったが、現時点ではタンパク質染色による検出はできていない。また野生型と変異型の脂肪滴画分間で著しく存在量の異なる細胞側タンパク質のいくつかについて候補因子として解析を進めた。得られた候補因子の感染性ウイルス産生への関与について siRNA を導入し、候補因子量を低下させた細胞における感染性組換え体ウイルスの産生について検討をおこなったが、細胞内の HCV ゲノム複製に大きな影響を与えずに、しかも非感染性粒子は産生される、つまり HCV 粒子の感染性のみに影響を与えるような因子は同定されなかった。ただイムノプロット法による検出結果からは精製脂肪滴画分中の HCV コアタンパク質の量が野生型と変異型間で著しく異なっていた。双方の細胞内におけるコアの細胞内局在については大きな変化は認められていないこと、そして以前の電顕像からの情報から野生型 HCV 遺伝子が複製している細胞内ではコアがその表面に局在している脂肪滴にはその周囲に密着するように脂肪滴結合膜が存在しているが、この膜は変異体の場合には認められていないことなどから、上記コアタンパク質の回収量の相違は脂肪滴を得るための細胞分画中に変異体細胞ではコアタンパク質が脂肪滴から離れて失われてしまう可能性が考えられた。このことはこれら細胞間の比較では脂肪滴画分中のタンパク質の相違が細胞内のものとは一致しないことが考えられた。しかしながら LD 画分に存在するウイルスタンパク質を詳細に解析したところ、コアタンパク質が多量体を形成していることを新たに見いだした。このコアの多量体は野生型組換え体 HCV 遺伝子複製細胞から産生されたウイルス粒子の中にも存

在した。コアに関する変異体解析などを用いてその責任領域を検討したところ、これまでに報告のあるコアタンパク質アミノ末端領域とは異なる領域に存在する1つのアミノ酸がこの多量体形成に関与する可能性が明らかになった。また野性型感染性HCV遺伝子のこのアミノ酸に点変異を導入した変異体HCV遺伝子を作成したところ感染性粒子の産生が認められなくなった。従って、このアミノ酸を介するコアタンパク質の多量体化が感染性ウイルス粒子の産生に重要であることが考えられた。

不死化肝細胞 HuS-E2 細胞を温度感受性ポリマーを用いて立体培養した。このように培養したこの細胞は肝臓組織中の肝細胞と同様に細胞極性を示すことがわかっている。このHuS-E/2細胞に患者血液由来のHCVを感染させたところ、平面培養した同細胞に比較して約100倍の高い効率でウイルスが感染し、増殖することがわかった。現時点で培養にもちいたゲル中に感染性ウイルス粒子が産生されているかどうかは不明である。しかし、3次元培養による高い感染増殖性の原因を明らかにするため、通常の平面培養したものと立体培養したもののそれぞれの遺伝子発現をマイクロアレイ法で比較し、3次元培養特異的に発現が変化した遺伝子を見いだした。その発現変化をもたらす細胞内シグナルを解析したところ、Peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) alpha のシグナルが大きく変化していることがわかった。そこでPPARalphaのアゴニストとアンタゴニストを用いて、細胞内におけるHCV遺伝子複製効率の変化を検討したところ、それぞれ、予想されたようにHCV遺伝子複製の亢進と抑制が観察された。このことから3次元培養によって活性化されたPPARalphaシグナルによってHCV遺伝子複製の少なくとも一部は活性化されることがわかった。PPARalphaシグナルは細胞の脂肪酸代謝に関わる酵素の遺伝子群の発現を誘導することが知られているため、脂肪滴の形成との関連も考えられることから、その感染性粒子産生との関連も考えられ、今後このシグナルと感染性粒子産生の関連について検討する予定である。

#### 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7件)

- ① Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata、3D cultured immortalized human

hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV、Biochem. Biophys. Res. Commun.、379巻、330-334頁、2009年、査読有

- ② 土方 誠、HCVと肝発癌、医学のあゆみ、224巻、693-698頁、2008年、査読無

- ③ 土方 誠、アリ・ハッサン・フセイン、下遠野邦忠、3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養、肝・胆・膵、57巻、679-687頁、2008年、査読無

[学会発表] (計4件)

- ① Hussein H Aly, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata、A prolonged culture system for the study of the entire life cycle and the pathogenesis of natural HCV infection、第67回日本癌学会学術総会、平成20年10月29日、名古屋国際会議場

- ②アリフセイン、齊月、山口達哉、下遠野邦忠、土方誠、不死化肝細胞の中空糸培養によって再現した患者血清由来天然HCVの感染増殖、第56回日本ウイルス学会学術集会、平成20年10月26日、岡山コンベンションセンター

- ③ Hussein H Aly, Tatsuya Yamaguchi, Yue Qi, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata、Development of the novel in vitro system supporting the entire life cycle of natural HCV、15th International Symposium Hepatitis C Virus & Related Viruses、平成20年10月7日、San Antonio

- ④ Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata、SERUM DERIVED HCV INFECTION, REPLICATION AND PARTICLE PRODUCTION IN IMMORTALIZED PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES、XIV. International Congress of Virology、平成20年8月12日、Istanbul

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ①  
名称：C型肝炎ウイルスの感染増殖性の評価方法、およびその利用  
発明者：土方 誠、山口達哉、アリ ハッサン フセイン  
権利者：同上  
種類：特願  
番号：2008-167943  
出願年月日：平成20年6月26日

国内外の別：国内

②

名称：感染性C型肝炎ウイルス粒子の製造方法、およびその利用

発明者：土方 誠、山口達哉、アリ ハッサン フセイン

権利者：同上

種類：特願

番号：2008-167942

出願年月日：平成20年6月26日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：肝炎ウイルスの増殖方法、及び肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用

発明者：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方誠

権利者：同上

種類：PCT

番号：JP2007/068611

出願年月日：平成20年4月3日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土方 誠 (HIJIKATA MAKOTO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：90202275

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者