

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390113

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの増殖に必須な宿主側因子の解析と新規感受性細胞株の樹立

研究課題名(英文) Analysis of propagation mechanisms of hepatitis C virus and establishment of novel permissive cell lines

研究代表者

松浦 善治 (Matsuura, Yoshiharu)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：50157252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)の生活環は徐々に解明されつつあるが、粒子産生機構については未だ不明な点が多い。今回、高分化型肝細胞癌のマーカーであるAFPを指標にして、miR-122やアポリポ蛋白質等の肝臓特異的な因子を発現する細胞株を選択し、HCVの増殖性を評価した。その結果、新たに肝細胞由来のJHH4細胞と胃癌由来のFU97細胞がHCVの感染性粒子を産生できることが示された。FU97細胞は薬剤やウイルス株に対して、Huh7細胞とは異なる感受性を示すことから、HCVの増殖に関与する新しい宿主因子や新規治療薬の探索への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that liver-specific host factors are required for efficient replication of HCV RNA and formation of infectious particles. In this study, we screened human cancer cell lines for expression of the liver-specific  $\alpha$ -fetoprotein by using a cDNA array database, and identified novel permissive cell lines for a complete propagation of HCVcc without any artificial manipulation. In particular, gastric cancer-derived FU97 cells exhibited a much higher susceptibility to HCVcc/JFH-2 infection than was observed in Huh7 cells, suggesting that FU97 cells would be useful for further investigation of the HCV lifecycle, as well as the development of therapeutic agents for chronic hepatitis C.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV replication permissive cell line

## 1. 研究開始当初の背景

HCV は肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、日本には二百万人もの感染者が存在し、毎年約三万人が HCV 感染に起因する肝癌で死亡している。特に遺伝子型 1b の HCV に感染すると、インターフェロン(IFN)療法に抵抗性を示すことが多く、常に肝癌発症のリスクを背負うこととなる。慢性 C 型肝炎患者の体内にはヘテロな HCV 集団が存在し、ダイナミックに変異を繰り返している。近年、培養細胞で増殖可能な遺伝子型 2a の実験室株 (HCVcc) が構築され、HCV の生活環に関する多くの知見が得られるようになってきた。しかしながら、HCVcc は HCV に唯一感受性を示す実験動物であるチンパンジーに接種しても病原性を示さず、また、各種薬剤に対する感受性も臨床での効果との乖離が指摘されている。即ち、抗ウイルス療法に耐性を示し、肝炎や肝癌を発症させている難治性の遺伝子型 1b の HCV を効率よく複製できる細胞培養系は未だ確立されておらず、患者血清中の HCV の感染、複製、そして肝疾患の発生病理機序は依然として解明されていない。従って、これからの HCV 研究には、人為的な馴化過程を経て作製された実験室株ではなく、患者の体内で増殖している遺伝子型 1b の野外株の分離培養系の確立が急務である。

## 2. 研究の目的

1. HCV の増殖に必須な宿主側因子の解析と新しい感受性細胞株の開発：我々はこれまでに HCV の複製に必須な宿主因子を複数同定してきた。HCVcc が唯一増殖可能なヒト肝癌由来 Huh7 細胞では、miR122 の発現が高く、HCV 増殖における miR122 の役割が注目されている。これまでに miR122 を様々な細胞株に強制発現して HCVcc の感受性を検索した結果、ヒト肝臓由来の Hep3B 細胞やヒト子宮体由来の Hec1B 細胞が HCVcc に感受性を示すことを見いだしている。HCVcc に感受性を示す新しい細胞株を樹立できれば、Huh7 細胞だけで解析されてきた HCVcc の増殖機構の検証が可能となり、HCV の宿主細胞との相互作用のより深い理解が可能となる。

2. 患者血清中の HCV 野外株の分離培養系の開発：我々はこれまでに、HCVcc の感染によって活性化される転写因子とリポーター遺伝子を組み込むことにより、感染を高感度に検出できる指示細胞株を樹立したが (Tanaka 2010)、この細胞株を用いても患者血清由来 HCV の分離には至っていない。そこで、レンチウイルスベクターに転写因子とリポーター遺伝子を搭載し、より広範な培養細胞に HCV の検出ユニットを導入できるように改良する。また、ヒト初代培養肝細胞から単離

した肝前駆細胞から分化誘導により得られる成熟肝細胞や、分化中間段階の肝細胞の感受性を検討する。さらに、上記の miR122 をはじめとする、既報の HCV の侵入や複製に重要な宿主因子を細胞株に高発現させ、臨床現場で最も重要な遺伝子型 1b の HCV 野外株を分離培養可能な細胞株の樹立を試みる。

## 3. 研究の方法

1. HCV の増殖に必須な宿主側因子の解析と新しい感受性細胞株の開発：これまでに HCV の複製や粒子形成に必須な多くの宿主蛋白質が同定されてきたが、最近、肝臓特異的に高発現している miR122 が HCV の翻訳や複製の亢進に深く関与することが明らかになってきた。HCV の実験室株が感染可能な Huh7 細胞では、内在性 miR122 の発現が他のヒト肝細胞由来細胞株より有意に高く、HCV 感染の細胞指向性を規定する宿主因子として miR122 が注目されている。そこで、本研究では HCV の増殖に必須な宿主因子と miR122 をレンチウイルスベクターで様々な細胞株に強制発現することにより、HCV に感受性を示すようになる細胞株を検索した。細胞株の感受性は、免疫プロット法や免疫蛍光染色法によるウイルス蛋白質の検出、ならびに上清中と細胞内の感染価で検討した。これまでに、Huh7 細胞以外の肝細胞株として Hep3B 細胞を、また、非肝細胞株として Hec1B 細胞や 293T 細胞を候補細胞株として同定している。さらに、U937 細胞や THP1 細胞などの単核球系の細胞株に miR122 を強制発現することによって HCV に感受性を示す細胞株を検索した。さらに cDNA マイクロアレイを用いて感染によって誘導される遺伝子群を検討し、肝細胞株と非肝細胞株での感染性の違いを検討することによって、HCV 感染の細胞指向性のメカニズムを解析した。

2. 患者血清中の HCV 野外株の分離培養系の開発：培養細胞で複製可能な HCVcc が確立されたが、患者の体内に存在する HCV を人為的な馴化過程を経ずに直接分離培養できるシステムはない。我々はこれまでに、HCVcc の感染を高感度に検出できる感染指示細胞株を樹立した。しかしながら、この感染指示細胞株を用いても、患者血清から HCV の野外株を分離できていない。慢性 C 型肝炎患者の体内には多様性 (quasispecies) を示すヘテロな HCV の集団が存在し、ダイナミックに変異を繰り返している。ところが、これまでのアプローチはある時期の患者血清から PCR で一つの HCV の cDNA クローンを分離して、その RNA の感染性を特定の細胞株で調べているに過ぎない。そこで、上記の研究により同定された、HCV の細胞への侵入、ゲノム複製、粒子形成、放出の各ステップに関

わる宿主因子と、HCV 感染によって活性化される転写因子とリポーター遺伝子をレンチウイルスベクターに搭載し、ヒト肝臓由来細胞株ばかりでなく、各種動物細胞株に発現させて、患者血清由来 HCV、特に、臨床上最も重要な遺伝子型 1b の HCV の増殖を高感度に検出可能な細胞株の樹立を試みた。

#### 4 . 研究成果

高分化型肝細胞癌のマーカーである AFP を指標にして、miR-122 やアポリポ蛋白質等の肝臓特異的な因子を発現する細胞株を選択し、HCV の増殖性を評価した。その結果、新たに肝細胞由来の JHH4 細胞と胃癌由来の FU97 細胞が HCV の感染性粒子を産生できることが示された。また、ApoE または ApoB のノックアウト細胞はワイルドタイプ (WT) の Huh7 と同等の感染性粒子の産生能を示したが、DKO 細胞では感染性粒子産生能が顕著に抑制されており、ApoB および ApoE が HCV の感染性粒子産生において、相補的な役割を演じていることが示唆された。cDNA マイクロアレイの結果より、肝組織と Huh7 細胞におけるアポリポ蛋白質の発現パターンが大きく異なることが判明した。ApoB および ApoE の発現は同等であるにも関わらず、ApoA や ApoC の発現が Huh7 細胞で抑制されていた。そこで、HCV の粒子産生における ApoA や ApoC の役割を解析するために、DKO 細胞において ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討した。興味深いことに、ApoE のみならず ApoA および ApoC によっても HCV の感染性粒子の産生が可能になることが明らかになった。種々のアポリポ蛋白質が共通した機能を保持する機構を明らかにするために、アポリポ蛋白質の 2 次構造を予測した。興味深いことに、HCV の粒子産生を可能にする ApoA、ApoC および ApoE は共通した両親媒性  $\alpha$ ヘリックスを複数、有することが明らかになった。さらに、ApoC1 および ApoE の単一の  $\alpha$ ヘリックスを発現させた DKO 細胞においても、HCV の粒子産生能が回復していたことから、アポリポ蛋白質に存在する両親媒性の  $\alpha$ ヘリックスが HCV の感染性粒子の産生に関与していることが示唆された。さらに、超遠心にてウイルスを濃縮し、アポリポ蛋白質を検出したところ、ウイルス粒子とともに濃縮されたことから、ウイルス粒子にアポリポ蛋白質が結合していることが示唆された。遺伝子型 1 および遺伝子型 3 のキメラウイルスの粒子産生は ApoB および ApoE の共欠損によって、顕著に抑制されたことから、アポリポ蛋白質は JFH1 株のみならず、様々な遺伝子型の HCV 粒子産生に重要な役割を演じていることが示唆された。

#### 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 2 件)

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens*, 査読有、2014;10:e1003534  
DOI:10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 査読有、2014; 88: 5578-5594  
DOI:10.1128/JVI.03889-13

[学会発表](計 9 件)

1. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.11
2. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$ ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.11
3. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.11
4. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.10
5. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014.9.25
6. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014.9.23
7. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko

Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff(Canada), 2014.9

8. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado(USA), 2014.6
9. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado(USA), 2014.6

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www-yoshi.biken.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA YOSHIHARU)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号: 50157252

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

無し