

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19110

研究課題名(和文) 非肝臓細胞で複製可能なC型肝炎ウイルスの作製と増殖機構の解析

研究課題名(英文) Characterization of adapted HCV that can replicate efficiently in non-hepatic cells

研究代表者

小野 慎子(Ono, Chikako)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：30626437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓特異的なmiR-122はHCVの肝臓指向性を決定する因子の一つであるが、本研究において、非肝臓組織のようなmiR-122非存在下でも、miR-122による翻訳・複製亢進作用を必要とせず効率よく複製できるHCVの適応変異体を得た。さらに、ウイルスゲノムRNAに存在するmiR-122結合部位周辺への変異導入が、miR-122非依存的なウイルス増殖に重要であることが明らかとなり、同様の変異ウイルスがHCV感染患者の非肝臓細胞内でも出現し、HCV感染患者で高率に誘発される肝外病変の原因となりうることが示された。

研究成果の概要(英文)：A liver-specific microRNA, miR-122, is one of the key determinants of hepatotropism of hepatitis C virus (HCV). We established mutant viruses with adaptive mutations in the 5' UTR of HCV RNA adjacent to miR-122 binding sites, which exhibits efficient RNA replication in miR-122-deficient condition. Furthermore, same adaptive mutation was detected from HCV-RNA replicating in non-hepatic cells of chronic HCV patients. These results suggest that HCV mutants capable of replicating in the absence of miR-122 may participate in the induction of extrahepatic manifestations in chronic hepatitis C patients.

研究分野：肝炎ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 感染症 肝外病変 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性感染すると持続的な炎症を引き起こし、持続感染したまま肝硬変、肝癌を引き起こす病原体である。現在臨床現場ではインターフェロンとリビリンによる治療が行われているが、近年ウイルスタンパク質を直接標的とした抗HCV薬の開発により、劇的に著効率が上昇した。しかしながら、非肝臓細胞におけるHCVの複製や、治療後の患者血清中にウイルスRNAが検出されなくなった症例でも、肝癌や肝外病変の発症が報告されていることから、非肝臓組織で非常に低いレベルでHCVが複製しており、肝炎の再燃や発癌に関与している可能性が考えられる。しかしながら、これまでHCVの非肝臓細胞での複製はほとんど検討されていない。

肝臓特異的なマイクロRNAであるmiR-122は、肝臓で発現する全マイクロRNAの7割を占め、HCV RNAの5'非翻訳領域(UTR)に結合して翻訳を亢進し、HCVの肝臓特異性の重要な決定因子の一つである。一方、我々の研究室では、miR-122が発現していない種々の非肝臓由来細胞においても、HCVは侵入しゲノムを複製できることを見出している(Fukuhara *et al.*, 2012)。またmiR-122を欠損させた細胞株を樹立し、HCVを感染させたところ、僅かながらゲノム複製と感染性粒子の産生が認められた。最近当研究室では、それを継代することで、miR-122非依存的に非肝臓組織で増殖可能なHCV変異株(HCV_{122KO})を樹立した。このHCV_{122KO}はmiR-122の阻害剤に抵抗性を示すことから、miR-122に非依存的に複製していることが確認された。

2. 研究の目的

HCVの増殖には肝臓特異的に発現しているmiR-122が重要であるが、肝外組織でのウイルス増殖は、治療後に血中からウイルスRNAが検出できなくなったとしても、非肝臓細胞においてHCVが潜伏感染し、微量の感染性粒子を産生することで、肝癌や肝外病変を発症させる、リザーバーとなっている可能性を示唆している。これまで、非肝臓系の細胞にHCVは感染し、ウイルスの複製が可能であることは示されてきたが、従来用いられてきた野生型HCVでは複製効率が低いために粒子の産生は検出できておらず、非肝臓細胞での感染性粒子の産生は実証されていない。そこで、本研究ではHCV変異株HCV_{122KO}を用いて非肝臓細胞での複製・増殖に必須な適応変異を同定し、**変異型ウイルスの非肝臓系細胞での増殖機構を明らかにする。**

3. 研究の方法

変異型HCVの遺伝子構造解析

変異型HCVのmiR-122非依存的複製は、miR-122非存在下におけるウイルス継代の過

程でゲノム配列に適応変異が挿入されたことによると考えられる。HCV RNAの5' UTRには2カ所のmiR-122結合サイトが存在し、さらに3' UTRやIRES領域にも種々の宿主因子が結合することで、RNA分解から保護され、翻訳や複製効率が亢進されることが知られている(Shimakami *et al.*, 2012; Scheller *et al.*, 2009)。また、ウイルスの構造タンパク質は細胞への侵入・ウイルス粒子産生に、ウイルスのプロテアーゼはウイルスゲノムから翻訳された前駆体タンパク質の切断に、RNAポリメラーゼはウイルスRNA合成を司ることが報告されている。そこで、ウイルスRNAの全配列を、5'および3' RACE法や次世代シーケンサーを用いたDeep sequenceにより解析し、miR-122非依存的複製を可能にする変異の同定と、そのメカニズムを解析する。

非肝臓細胞における野生型と変異型HCVのウイルス増殖性の比較

同定したmiR-122非依存的複製に必要な適応変異のみを含む変異型HCVを作製し、非肝臓系の培養細胞に接種し、増殖性を肝臓系細胞と比較する。また、変異型ウイルスに導入された適応変異は、肝臓由来細胞でのウイルス継代により元に戻るのか(復帰変異体の出現)についても検証する。

非肝臓系細胞における変異型ウイルスの粒子産生能の評価

我々の研究室では、HCVの粒子産生には、肝臓特異的な脂質親和性のアポリポタンパク質(ApoBやApoE)のみならず、非肝臓組織でも発現が認められる他のアポリポタンパク質や両親媒性の α -ヘリックス構造をもつ分泌型タンパク質が重要であることを明らかにしている(Fukuhara and Wada *et al.*, 2014)。アポリポタンパク質以外にもこうした特徴をもつタンパク質は種々の組織で発現していることから、複製能の高い変異型ウイルスの感染により、非肝臓系細胞からのHCV粒子産生の可能性を検証する。また可能であれば、非肝臓系細胞からの粒子産生に関する宿主因子を同定する。

4. 研究成果

HCV変異株における適応変異の同定と野生株との性状比較

HCV変異株(HCV_{122KO})の5' RACEおよびDeep sequence解析により、G28A変異が有意に認められた。逆遺伝学的手法を用いて作製したG28Aウイルスは、miR-122欠損細胞内で野生株に比べ効率良く増殖可能であった。そのメカニズムとしては、変異導入によってHCVの複製複合体形成が促進されることが示唆された。以上から、G28A変異がmiR-122非依存性獲得に必須であることが明らかとなった。

遺伝子型 1b を用いた適応変異の検討

遺伝子型 2a では 28 番目の塩基はグアニンだが、他の遺伝子型では元々アデニンであることが多い。そこで、日本の患者数で 7 割を占める遺伝子型 1b に属する Con1 株を用いて、導入される適応変異を解析した。5' UTR および構造タンパク質領域は Con1 株で、非構造タンパク質領域は JFH-1 株由来であるキメラウイルスを作製し、miR-122 欠損細胞で継代することで変異ウイルスを得た。するとウイルス RNA 全域への複数の適応変異に加え、5' UTR の miR-122 結合領域近傍に C30U 変異が認められた。以上の結果から、miR-122 結合領域近傍への変異導入が miR-122 非依存性獲得に寄与している可能性が示唆された。

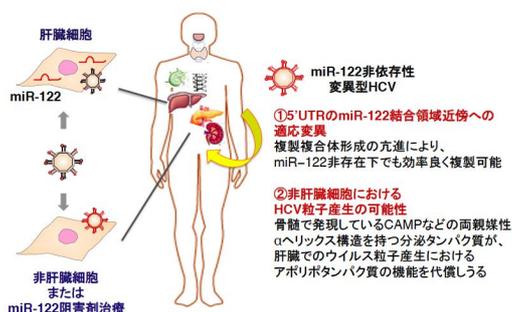
臨床検体を用いた検討

広島大学との共同研究で、遺伝子型 2a の HCV 患者の血液から血清と末梢血単核球 (PBMC) を分離し、血清中のウイルスを肝臓由来、PBMC 中のウイルス RNA を非肝臓細胞内という miR-122 非存在環境下で持続的に複製したもものとして、G28A 変異が導入されているか否かを解析したところ、甲状腺機能異常や悪性リンパ腫等の肝外病変を併発している患者を含む、約 4 割の PBMC 由来サンプルから G28A 変異が有意に検出された。以上の知見から、非肝臓組織における持続感染により、miR-122 非依存的に増殖可能な HCV 変異株が出現しうること、そして肝外病変の発症との関連性が明らかとなった (Ono and Fukuhara *et al.*, 2017)

非肝臓細胞における HCV 粒子産生の可能性の検討

以前我々は、アポリポタンパク質の両親媒性ヘリックス領域が、HCV の粒子産生に重要であることを報告した (Fukuhara and Wada *et al.*, 2014)。そこで、同様の構造を持つ他の分泌タンパク質が粒子産生に寄与しうるか否かを検討したところ、骨髄や白血球で高発現している分泌性タンパク質 CAMP が HCV の粒子産生を可能にすることが明らかとなった (Puig-Basagoiti and Fukuhara *et al.*, 2016)。

図. miR-122非依存性変異型HCVの非肝臓組織における増殖性



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)

Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, Tamura T, Mori H, Sato A, Uemura K, Fauzyah Y, Kurihara T, Suda T, Nishio A, Hmwe SS, Okamoto T, Tatsumi T, Takehara T, Chayama K, Wakita T, Koike K, Matsuura Y.

Characterization of miR-122-independent propagation of HCV.

PLoS Pathog. 13(5):e1006374 (2017)

doi: 10.1371/journal.ppat.1006374

Puig-Basagoiti F, Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Uemura K, Kawachi Y, Yamamoto S, Mori H, Kurihara T, Okamoto T, Aizaki H, Matsuura Y.

Human Cathelicidin Compensates for the Role of Apolipoproteins in Hepatitis C Virus Infectious Particle Formation.

J Virol. 90(19) 8464-8477 (2016)

doi:10.1128/JVI.00471-16.

Fukuhara T, Ono C, Puig-Basagoiti F, Matsuura Y.

Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus,

Trends Microbiol. 23(10) 618-629 (2015)

doi: 10.1016/j.tim.2015.07.007.

[学会発表](計 8 件)

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Kentaro Uemura, Toru Okamoto, Su Su Hmwe, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura

「G28A mutation facilitates an efficient propagation of HCV in miR-122-independent manner」

第 64 回日本ウイルス学会学術集会

2016 年 10 月、札幌コンベンションセンター (札幌)

Tomokazu Tamura, Francesc Puig-Basagoiti, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Takeshi Kurihara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura

「Human cathelicidin can compensate the role of apolipoproteins in the formation of infectious HCV particles」

23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses

2016 年 10 月、京都国際会館 (京都)

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Kentaro Uemura, Toru Okamoto, Su Su Hmwe, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura

「G28A mutation is necessary for an efficient propagation of HCV in miR-122 deficient condition」

23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses

2016年10月、京都国際会館（京都）

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Kentaro Uemura, Yukako Kawachi, Toru Okamoto, Su Su Hmwe, Takaji Wakita, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura

「Characterization of miR-122 -independent propagation of HCV」

American Society for Virology 2016 Meeting

2016年6月、ブラックスバーグ（アメリカ合衆国）

Tomokazu Tamura, Francesc Puig-Basagoiti, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Takeshi Kurihara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura

「Human cathelicidin can compensate the role of apolipoproteins in the formation of infectious HCV particles」

American Society for Virology 2016 Meeting

2016年6月、ブラックスバーグ（アメリカ合衆国）

Puig-Basagoiti Francesc, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Takshi Kurihara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura

「Human cathelicidin (hCAP18/LL37) can compensate the role of apolipoproteins in the formation of infectious HCV particles」

第63回日本ウイルス学会学術集会

2015年11月、福岡国際会議場（福岡）

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Toru Okamoto, Su Su Hmwe, Takaji Wakita, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura

「Characterization of miR-122 -independent propagation of HCV」

第63回日本ウイルス学会学術集会

2015年11月、福岡国際会議場（福岡）

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Toru Okamoto, Su Su Hmwe, Takaji Wakita, Kazuhiko Koike and Yoshiharu Matsuura,

「Characterization of miR-122

-independent propagation of HCV」
22nd International symposium on Hepatitis C and related viruses ,
2015年10月、ストラスブール（フランス）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 慎子 (ONO, Chikako)

大阪大学・微生物病研究所

特任研究員（常勤）

研究者番号：30626437