

令和元年6月17日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19118

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスの肝細胞吸着・侵入機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism for an attachment and entry of hepatitis E virus for the hepatocyte

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・リサーチ・レジデント

研究者番号：80616144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：E型肝炎ウイルス(HEV)は世界中で急性・劇症肝炎を引き起こしている。膜有り(e)と膜なし(ne)のウイルスが見つかったが、感染開始に重要な受容体を始め重要な宿主因子の多くは不明である。今回の研究期間において、我々は有望な受容体候補を同定した。本候補は、非感受性細胞での遺伝子・タンパク質発現が遍く低かった。そこで、感受性細胞でのノックアウト、非感受性細胞での外来発現を通して、感受性の喪失と獲得に成功した。また、本候補因子の細胞外領域欠損変異体に感受性付与能がないこと、Fc融合可溶性候補因子とneHEVの直接結合を共免疫沈降法にて確認した。本因子はneHEVの細胞結合・侵入の鍵と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食品媒介性の感染が増加する一方で有効な対策法が存在しないE型肝炎ウイルス(HEV)について、HEVに対する感受・非感受性細胞の解析からレセプター(ウイルス受容体)候補を同定することに成功した。現在までにHEV感染規定レセプターは同定されていないが、HEVのトロピズム(生体内指向性)を明らかにする為にもその同定は必要不可欠である。HEVは肝細胞外感染も近年多数報告され、経口感染経路の解明や肝細胞での急性・劇症症状、更には妊婦における高い致死率などの解明に端緒を与える可能性があり、学術的意義は極めて高い。また、レセプターを基軸としたワクチンや治療薬の開発による社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis E virus (HEV) causes acute and fulminant hepatitis worldwide. Although enveloped (e) and non-enveloped (ne) forms of HEV have been discovered, host factors involved in infection, including receptors, remain to be elucidated. Here, we identified a promising receptor candidate as an essential host factor for HEV infection. The candidate expression was lower in four HEV-non-permissive cell subclones than in an HEV-permissive subclone. The candidate knockout cells lost HEV permissibility, suggesting that the candidate is critical for HEV infection. Stable expression of the candidate in an HEV-non-permissive subclone provided permissibility only to infection by neHEV; expression of the candidate lacking the ectodomain did not. Direct interaction between neHEV and the the candidate ectodomain was confirmed by co-precipitation using a soluble candidate-Fc. These results strongly suggest that the candidate is a key molecule for cellular attachment and entry of neHEV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：hepatitis E virus (HEV) non-enveloped HEV receptor candidate

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題では、近年食品媒介性の感染が増加する一方で有効な対策法のないE型肝炎ウイルス(HEV)について、レセプター(ウイルス受容体)を同定し、効果的なワクチンや治療薬開発の基盤を確立することを目指した。

HEVは従来、エンベロープを持たない経口感染性ウイルスとして認知されてきた。しかし近年の研究により、培養上清や血中においては感染細胞の膜を被って放出される経路が明らかにされた。その結果、メジャーなキャプシドタンパク質ではなく、多機能でマイナーなウイルス構造タンパク質を利用する経路で放出されることにより、培養上清や血中においては大半のHEVがエンベロープを持つ形態で存在することが明らかとなった。

当初、我々はウイルスの形態については注視しておらず、HEVの培養上清を用いてHEV培養が可能なPLC/PRF/5細胞の独特な特性について解析を行っていた。その結果、PLC/PRF/5細胞がHEV感染に感受性・非感受性の混成細胞であることが明らかとなった。これらの細胞をクローニングすることで、HEVに感受性を持つ細胞とそうでない(非感受性)細胞のクローンを多数取得した。両クローン群に対し、HEV感染性クローンから5' Cap構造を有するゲノムRNAをT7 RNAポリメラーゼで合成し、エレクトロポレーションで導入すると、HEV複製において両細胞には差異が認められなかった。このことは、両細胞の差異を規定しているのが細胞侵入段階における差異であることを強く示唆した。

## 2. 研究の目的

HEV感受性・非感受性細胞の比較解析により細胞侵入段階に必須のレセプターを同定する。

## 3. 研究の方法

そこで、HEV感受・非感受性細胞の網羅的遺伝子発現比較解析を行ったところ、多くの非感受性細胞において発現が等しく低下している細胞膜タンパク質のひとつをレセプター候補遺伝子として得た。当該遺伝子の翻訳産物の発現量も同時に低下していることをflow cytometryで確認した。

引き続き、レセプター候補因子のHEV感染への関与を詳細に調べるために、HEV感受性細胞のレセプター候補因子をゲノム編集によりノックアウトすることにより感受性が消失した。一方で、HEV非感受性細胞へレセプター候補因子を安定発現させたところ、HEV非感受性細胞へ感受性が付与された。

次の段階として、レセプター候補因子がこれまで注視してこなかったHEVの中でもエンベロープを持つタイプと持たないタイプの両方もしくは片方に特異的な感染や結合能を有する可能性について詳細に検討を行う為、培養上清からエンベロープを有するHEVと有さないHEVを調製した。更に、細胞外領域を欠損したレセプター候補因子安定発現細胞を作製し、感染への影響を両HEVで検討した。その結果、エンベロープを有さないHEVのみが、感受性細胞とレセプター候補発現細胞に対して感染能を持つと同時に、細胞外領域を欠損したレセプター候補発現細胞は感受性を持っていないことが明らかとなった。

この段階で、レセプター候補因子がエンベロープを持たないHEVに特異的な感染性付与能を有することが明らかとなったが、更に詳細なメカニズムの解明のため、エンベロープを有さないHEVを調製し、Fc融合可溶性レセプター候補因子との直接結合を共免疫沈降法により確認した所、抗HEV抗体を用いた時と同等の結合能を有すると同時に、その他のFc融合膜タンパク質に対しては結合能を有さず、特異的な直接結合を確認することが出来た。

## 4. 研究成果

本研究課題実施期間中に得られたこれらの結果は、レセプター候補因子がエンベロープを持たないHEVの細胞への結合と侵入にとって極めて重要な因子であることを示唆している。

今後の研究課題としては、レセプターとしての必須条件を満たすかどうかについて、抗レセプター候補抗体による結合・感染阻害を始めとした更なる検証が必要と考える。

エンベロープを被らない HEV は、人獣共通の糞便を含む自然界での存在と糞口感染に関与していることから、今回その端緒を掴んだレセプター候補の同定は、当初の目標である効果的なワクチンや治療薬開発の基盤確立に大きく寄与するものと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Huimin Bai, Tomoyuki Shiota, Sayaka Yoshizaki, Mariko Saito-Obata, Fedelino F. Malbas, Jr, Socorro P. Lupisan, Hitoshi Oshitani, Naokazu Takeda, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, Koji Ishii, Tian-Cheng Li. Detection of Subgenotype IA and IIIA Hepatitis A Viruses in Rivers Flowing through Metro Manila, the Philippines. Japanese Journal of Infectious Diseases. 査読有. 2019 Jan;23;72(1):53-55. doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.148.

Toshifumi Imagawa, Ryuichi Sugiyama, Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Evaluation of Heating Conditions for Inactivation of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4. Journal of Food Protection. 査読有. 2018 Jun;81(6):947-952. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-290.

染谷雄一、塩田智之、神谷元. 「FSA-EFSA 食品媒介ウイルスに関するワークショップ」への参加報告 Attendance Summary Report of the FSA-EFSA Workshop on Foodborne Viruses 2016. 食品衛生研究. 査読無. 2016年12月号 7-15頁

### 〔学会発表〕(計6件)

Ryuichi Sugiyama, Toshifumi Imagawa, Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takaji Wakita, Koji Ishii. Investigation of heat conditions to inactivate hepatitis E virus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2018年10月24-26日. 大阪国際会議場. 大阪

Tomoyuki Shiota. Toward the identification of hepatitis E virus receptor (E型肝炎ウイルスの受容体同定を目指して). AMED リサーチ・レジデント講演会. 2016年11月28日. AMED20階 201会議室. 東京

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yorihiro Nishimura, Hiroyuki Shimizu, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Takaji Wakita, Koji Ishii. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate (E型肝炎ウイルスレセプター候補の分子特性). 第64回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月25日. 札幌コンベンションセンター. 札幌

Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yorihiro Nishimura, Hiroyuki Shimizu, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Takaji Wakita, Koji Ishii. Characterization of a hepatitis E virus receptor candidate. HCV2016 - 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2016年10月11日. Kyoto International Conference Center. 京都

染谷雄一、塩田智之、神谷元. International Workshop on Foodborne Viruses (FSA,EFSA ロンドン会議)報告. 食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会(第66回). 2016年6月6日. 食品安全委員会中会議室. 東京

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. The validation study of Hepatitis E virus receptor (E型肝炎ウイルス受容体候補の妥当性検証) 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月23日. 福岡国際会議場. 福岡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。