

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590868

研究課題名（和文） C 型肝炎ウイルスの培養細胞と生体での増殖能の比較と慢性化機序の解明

研究課題名（英文） *In Vitro* Behavior of Hepatitis C Virus JFH-1 Strains with Mutations Emerged after Passage in Chimpanzees

研究代表者

加藤 孝宣 (KATO TAKANOBU)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：20333370

研究成果の概要（和文）：

培養細胞で作製した JFH-1 ウイルスとその JFH-1 株が分離された患者血清をチンパンジーに接種し感染実験を行った。感染が成立した JFH-1 株に認めた変異を JFH-1 株に導入し、それらの変異が JFH-1 株の培養細胞での感染増殖に与える影響を検討した。その結果、これらの変異を導入すると JFH-1 株の培養細胞内での増殖は低下するが、ウイルス粒子の生成効率は亢進していた。これらの変異の JFH-1 株に与える影響は、HCV のチンパンジーでの感染に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Although JFH-1 replicates efficiently and produces infectious virus in cell culture, the relationship between *in vitro* phenotype and *in vivo* pathogenesis is still unclear. We synthesized the full-genome JFH-1 constructs with mutations detected in chimpanzees and assessed effects of these mutations on viral production *in vitro*. Higher virus assembly and lower replication capacity of JFH-1 with these mutations were observed. The control of viral production such as replication, assembly and secretion by specific mutations may be a key of viral strategy to evade host defense mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	0	1,300,000
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HCV、慢性化、ウイルス培養、感染実験、チンパンジー

1. 研究開始当初の背景

HCV 感染慢性化の機序は未だ明らかにされていない。細胞レベルでの増殖複製を低く抑えることが感染遷延化に有利と考えられるが、その具体的事実をこれまで示した実験はない。本研究では、同じウイルスが存在する感染材料を接種したにもかかわらず異なった臨床像を示したチンパンジーの感染実験の結果から、これらのチンパンジーに感染していた HCV の変異を持った感染性クローンを作製し、培養細胞やヒト肝細胞移植マウスでの増殖能を評価することにより、HCV のライフサイクルと慢性化機序の解明に役立てる

すなわち、培養細胞内で強い増殖能を示す JFH-1 株が、遷延感染を起こしたチンパンジー内で認められた変異を得ることにより、培養細胞内での増殖レベルがどのように変化したかを明らかにしたい。また、その責任領域を同定することで、このウイルスの細胞内での増殖能を規定している領域を解明する。さらに、ヒト肝細胞移植マウスでこれらの変異株の感染実験を行うことにより、培養細胞とチンパンジーでの感染増殖の差が培養細胞と生体肝の差であるか、獲得免疫の影響であるかが評価できる。

2. 研究の目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は成人感染でも高率に慢性化する。この慢性化の機序は未だ不明であり、この機序の解明は C 型肝炎患者の予後向上に寄与しうると考えられる。そこで、生体と培養細胞の両方で感染増殖が可能な HCV JFH-1 株を用い、チンパンジー感染実験において、生体内で遷延感染を起こした株での変異が、培養細胞内での複製増殖および細胞死に与える影響を検討することでこのウイルスの持続感染機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

培養細胞にて作製した JFH-1 ウイルス、及び JFH-1 株が分離された劇症肝炎患者急性期血清をほぼ等量の HCV RNA を含むように調整し、二頭のチンパンジーにそれぞれ接種した。その後、それらのチンパンジーに感染している HCV JFH-1 株の全 ORF 領域の塩基配列を確認し、感染しているウイルスの変異を同定した。同定された変異を JFH-1 株に導入し、その変異を持った JFH-1 株の培養細胞内での感染増殖能を比較検討した。

4. 研究成果

培養細胞内での増殖能の検討の結果、チンパンジー内で適応変異を得た変異株では通常の JFH-1 株に比べ、培養細胞内での増殖複製能は低いが生感染性ウイルス粒子の生成効率がよく、その結果培養上清中に放出されるウイルス量が高値となっていた (図 1)。

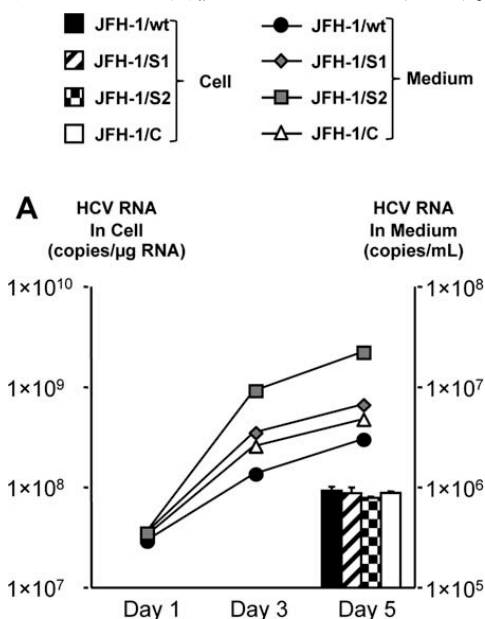


図 1. JFH-1 およびその変異株の培養細胞での増殖能の比較

さらにこれらのウイルスが感染している細胞のアポトーシスに対する反応性を検討した。チンパンジー感染実験で得られた変異株の感染細胞では通常の JFH-1 株に比べ、

TNF- α や FAS ligand などのサイトカイン投与によるアポトーシス誘導が強く抑制されていた (図2)。

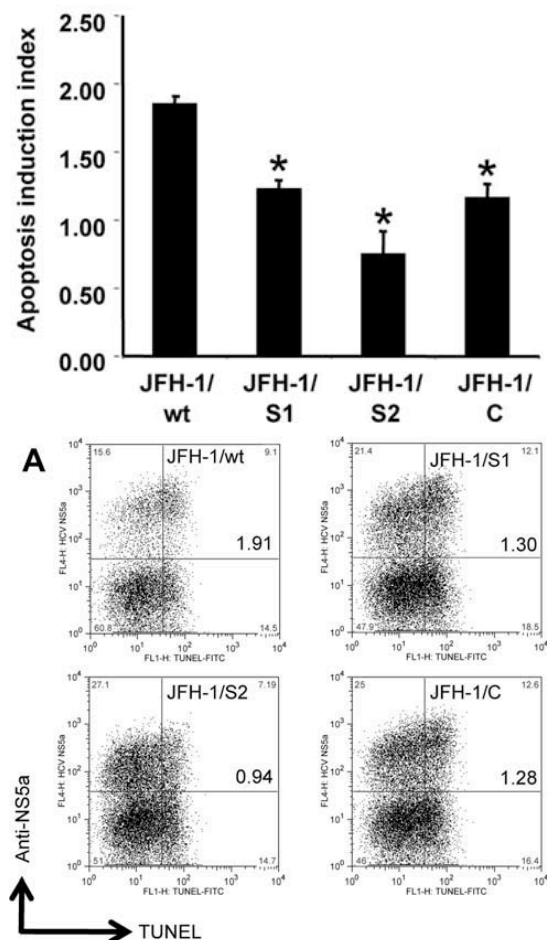


図2. JFH-1 およびその変異株のアポトーシス感受性の比較

これらの株のアポトーシス抑制効果は、適応変異株のキメラウイルスを用いた検討から、構造領域、非構造領域両方の変異が関与していると考えられた。

以上のような結果から、HCV JFH-1 株が分離された患者血清を接種したチンパンジーから得られた変異株は、培養細胞内では増殖効率は低かったがウイルス粒子生成効率が高く、その結果多くの細胞に感染可能であった。さらにこの変異株はサイトカインにより誘導されるアポトーシスの抑制作用を持ち、

生体内での変異により獲得されたこれらの機能がHCVの慢性感染の成立機序に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem*, 286: 37264-37273, 2011.

2) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.

3) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 404-409, 2011.

4) Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious

fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res*, 41: 258-269, 2011.

5) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*, 395: 565-571, 2010.

6) Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6: e1000885, 2010.

[学会発表] (計 8 件)

1) Mohsan Saeed, Takanobu Kato, Youkyung Choi, Krzyzstof Krawczynski, Jake Liang, Takaji Wakita: In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strains with mutations emerged after passage in chimpanzees. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009. 10. 3-7.

2) Youkyung Choi, Takanobu Kato, Takaji Wakita, Jake Liang, Krzyzstof Krawczynski: Dynamic profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. 16th International Meeting

on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009. 10. 3-7.

3) Asako Murayama, Tomoko Date, Daisuke Akazawa, Takanobu Kato, Tetsuro Suzuki, and Takaji Wakita : Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in cultured cells. The Liver Meeting 2009, AASLD's 60th Annual Meeting, Boston, MA, 2009. 10. 30-11. 3

4) 加藤孝宣, 岡本有加, 村山麻子, 政木隆博, 脇田隆字: HCVの増殖適応変異とその意義. 第58回 日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.

5) 加藤孝宣, Saeed Mohsan, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスJFH-1株患者血清のチンパンジーへの感染実験. 第58回 日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.

6) 加藤孝宣, 伊達朋子, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能. 第45回日本肝臓学会総会, 神戸, 2009. 6. 4-5.

7) 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの複製増殖に関するウイルス遺伝子領域の検討. 第45回日本肝臓学会総会, 神戸, 2009. 6. 4-5.

8) 村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 豊田哲也, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの複製増殖に関するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009. 10. 25-27.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 孝宣 (KATO TAKANOBU)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：20333370