

機関番号：32503

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790449

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） Mechanism of Hepatitis C Virus assembly

研究代表者

日紫喜 隆行 (HISHIKI TAKAYUKI)

千葉工業大学・附属総合研究所・特別研究員

研究者番号：30535761

研究成果の概要（和文）：本研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）粒子がリポタンパク質の一種であるアポリポタンパク質E（ApoE）と相互作用し、HCVの感染性に重要な役割を果たしている事を明らかにした。さらにそれらの相互作用は細胞内においておこりHCVはApoEを含むリポタンパク質との複合体として細胞外に放出されることが示された。また、細胞外に放出されたHCVはApoEをリガンドとし、Low density lipoprotein receptor（LDLR）と Scavenger receptor B, type I（SR-BI）を介して宿主細胞に感染している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that Hepatitis C virus（HCV）associate with Apolipoprotein E（ApoE）prior to virus release. Moreover, we clarified that ApoE is important factor for HCV infectivity. Infectivity of HCV to cells that were suppressed endogenous LDLR as well as SR-BI was severally reduced. Furthermore, suppression of both the receptors didn't alter the infectivity to cells that were suppressed either one of the receptors. These results suggest that the infectivity of HCV required both LDLR and SR-BI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子・C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎、肝硬

変、肝臓がんの原因ウイルスであり、我が国では約200万人が感染していると推定されて

いる。また、肝臓がんによる犠牲者の約 80% が HCV 感染によるものである。この割合は、1 年間に死亡するがん患者全体の約 10% に相当する。現在、我が国において大きな社会問題になっており、HCV による疾患の治療法の開発は緊急な課題となっている。

現在のところ、C 型肝炎患者への治療としてはインターフェロンとリバビリンの併用療法が主に採用されているが、約 40% の感染患者に対してのみ有効である。より有効な抗 HCV 薬の開発するためには、HCV の生活環（感染・複製・粒子産生）に関する分子生物学的研究が強く求められているが、ウイルス粒子産生機構についての詳細は不明な点が多い。

2. 研究の目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) のウイルス粒子が VLDL (very low density lipoprotein) と相互作用していることが示唆されている。VLDL とはトリグリセリド (中性脂肪) およびコレステロールとアポリポプロテイン (ApoB, ApoC, ApoE 等) より構成される 100 nm 程度の球状粒子であり、肝臓によって産生され血液中に放出される。その中でも特に ApoE が HCV の感染性に関与していることが報告されているが、その詳細な分子機序は未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、ウイルス粒子産生における ApoE の詳細な分子機序を明らかにすることを目的とし解析を行なった。

3. 研究の方法

HCV RNA は感染性の HCV 粒子を産生する JFH1 株とその構造領域を 1b 型に置換した TNS2-J1 株を用いた。HCV 粒子は試験管内で合成した HCV RNA をエレクトロポレーション法によって Huh7.5 細胞に導入し、その培養

上清を用いた。ApoE 抑制細胞は ApoE 特異的 shRNA を HuH7.5 細胞に導入し、ピューロマイシンによって選別し作製した。ウイルス粒子の浮遊密度は Iodixanol を用いた超遠心分画法により解析した。ウイルス粒子の感染性は、培養液を非感染 HuH7.5 細胞に感染させ、48 時間後に蛍光免疫染色法を用いて解析した。また、HCV RNA は TaqMan probe を用いた RT-PCR 法により、Core タンパク質は抗 Core 抗体を用いた ELISA 法によりそれぞれ定量した。LDLR と SR-BI 抑制細胞はそれぞれ特異的な siRNA を HuH7.5 細胞に導入して作製した。

4. 研究成果

HCV 複製細胞内の ApoE の発現を抑制した結果、ウイルスの複製効率に変化はないが、ウイルス粒子の感染性が顕著に減少した。また、抗 ApoE 抗体と HCV 粒子を混合すると HCV の感染力価が低下した。細胞外に分泌できない ApoE 変異体 (ApoE-KDEL) を HCV 複製細胞に発現させるとウイルスの複製には影響を与えないが、感染性ウイルス粒子が細胞外に放出されずに細胞内に蓄積した。また、非感染性ウイルス粒子に精製 ApoE タンパク質を添加しても感染性は回復しなかった。さらに、LDLR (low density lipoprotein receptor) との親和性が低い ApoE 変異体を含むウイルス粒子を作製し解析した結果、正常型の ApoE を含むウイルス粒子と比較し、ウイルス粒子の産生量、ウイルス粒子の浮遊密度および ApoE と相互作用しているウイルス粒子の量に差がないもののウイルス粒子の感染性が顕著に減少した。さらに、ApoE のレセプターである LDLR と SR-BI の発現をそれぞれ抑制した細胞に HCV を感染させると、HCV の感染効率が減少するが、これらのレセプターを同時に抑制しても HCV の感染性に更なる減少は認められなかった。抗 LDLR 抗体および抗

SR-BI 抗体を用いた感染阻害実験においても同様の結果となった。

本研究の結果から、ApoE は HCV の複製には影響を与えないが、HCV 粒子の感染性に重要な因子であることが明らかとなった。また、HCV 粒子が細胞内において ApoE と相互作用し ApoE を含みリポタンパク質との複合体として細胞外に放出されることが示唆された。また、細胞外に放出された HCV は ApoE をリガンドとし、ApoE のレセプターである LDLR や SR-BI を介して宿主細胞に感染している可能性が示唆された。今後は HCV がどのような形態で ApoE と相互作用し細胞外に分泌されるのかなど更なる解析が必要である。

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 4 件)

① Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*. 査読有り 84(22):12048-57, 2010.

② Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*. 査読有り 407(1):152-9, 2010.

③ Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc*

Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 査読有り 85(7):217-28, 2009.

④ Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol*. 査読有り 83(13):6922-8, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

① Hepatitis C Virus Hijacks Lipid Metabolism for its Proliferation; Likely Underlying Mechanisms for the Development of Hepatocellular Carcinoma. 日紫喜隆行、清水裕子、宮成悠介、杉山和夫、舟見健児、宇治野真之、高久洋、下遠野邦忠 The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference 2011 年 3 月 2 日東京ベイ舞浜ホテル (千葉県)

② C 型肝炎ウイルスの感染性におけるアポリポプロテイン E の役割. 日紫喜隆行、清水裕子、杉山和夫、舟見健児、宇治野真之、高久洋、下遠野邦忠 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月 7 日あわぎんホール (徳島県)

③ Apolipoprotein E isoform affects infectivity of HCV. 日紫喜隆行、清水裕子、杉山和夫、舟見健児、宇治野真之、高久洋、下遠野邦忠 17th International meeting on HCV2010 年 9 月 11 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

④ Apolipoprotein E is Required for Infectivity of Hepatitis C Virus. 日紫喜隆行、飛田怜里、清水裕子、小川和也、舟見健児、宮成悠介、大崎雄樹、藤本豊士、高久洋、杉山和夫、下遠野邦忠 日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ C型肝炎ウイルス粒子の感染性とリポタンパク質. 日紫喜隆行、飛田怜里、清水裕子、小川和也、舟見健児、宮成悠介、大崎雄樹、藤本豊士、高久洋、杉山和夫、下遠野邦忠 日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 4 日都市センターホテル (東京都)

⑥ Apolipoprotein E is Required for Infectivity of Hepatitis C Virus. 日紫喜

隆行、飛田怜里、清水裕子、小川和也、舟見健児、宮成悠介、大崎雄樹、藤本豊士、高久洋、杉山和夫、下遠野邦忠 16th International symposium on HCV 2009年10月26日 Nice (France)

〔図書〕(計2件)

- ① 日紫喜隆行、清水裕子 最新医学社 最新医学 (ウイルス肝炎の病態解明と治療の進歩) 2010 50-55
- ② 日紫喜隆行、杉山和夫 ニュー・サイエンス社 細胞 (C型肝炎ウイルスの増幅機構) 2009 8-11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日紫喜隆行 (HISHIKI TAKAYUKI)
千葉工業大学・附属総合研究所・特別研究員
研究者番号：30535761

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし