様式Ｃ－１９

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 25 年　6 月 25 日現在

機関番号：82603
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2010～2012
課題番号：22590429
研究課題名（和文）　E 型肝炎ウイルスの増殖機構および病原性の解析
研究課題名（英文）　Analysis of the replication mechanism and pathology of hepatitis E virus

研究代表者
石井　孝司　（Koji Ishii）
国立感染症研究所　ウイルス第二部　室長
研究者番号：40280763：

研究成果の概要（和文）：
E型肝炎ウイルス(HEV)に感染したブタ肝臓より組織乳剤を作成し、PLC/PRF/5細胞に感染させ、本細胞で増殖可能なHEV株83-2を取得した。この83-2株からHEVの感染性クローンを作成し、本クローンの構造蛋白領域をレポーター遺伝子と置き換えたHEVレプリコンの作成に成功した。特に、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを持つレプリコンは、ウイルスの細胞内での増殖を感度よくモニターできる系として用いることができる。現在、LOPAC化合物ライブラリをHEVレプリコン導入後のPLC/PRF/5細胞に添加し、ウイルス増殖を抑制する化合物のスクリーニングを行っており、同定された化合物の作用からHEV増殖メカニズムの解析を行う予定である。また、reverse geneticsの手法によりHEVの感染性を規定する領域の解析、感染細胞内でのウイルス複製機構の解析も実施している。　一方、PLC/PRF/5細胞にHEVを感染させ、抗HEV抗体を用いて蛍光抗体染色を行うと、長期間培養後もHEVに感染していない細胞が見られ、この細胞株はヘテロな集団であることが推測された。そのため、single cell cloningを行い、クローニングされた多数の細胞株についてHEVの感染性を調べたところ、増殖性のない細胞株が複数見出された。このスクリーニングにより取得できた、HEVが感染できる細胞とできない細胞の性状を比較解析することにより、宿主側でHEV感染に重要な役割を果たすと考えられる因子の解析を行っている。現在、感受性細胞からcDNAライブラリを構築し、このライブラリを非感受性細胞に導入し、感受性になった細胞に導入された遺伝子を解析することで、HEVの細胞への感受性を規定している因子の同定を進めている。

研究成果の概要（英文）：
Hepatitis E virus (HEV) causes acute and fulminant hepatitis E in humans. Infectious cDNA clones of HEV were established by several groups, and efficient HEV propagation in cultured cells has been recently developed using PLC/PRF/5 and A549 cells. However, our PLC/PRF/5 cells showed limited permissiveness for HEV. In this study, we performed single-cell cloning of PLC/PRF/5 cells and analyzed heterogeneity by using infectious HEV clone. We constructed an infectious cDNA clone of HEV from porcine liver. Then we performed single-cell cloning of PLC/PRF/5 cells by limited dilution. To analyze the limited permissiveness of our PLC/PRF/5 cells, cloned cells were either infected with HEV or transfected with an infectious HEV RNA and the production of HEV was measured by the detection of HEV capsid protein in culture supernatant by ELISA. Ninety-eight

clones were obtained after single-cell cloning of parental PLC/PRF/5 cells. The cloned PLC/PRF/5 cells exhibited various levels of HEV virus infection efficiency, and some clones were not permissive. While the replication efficiencies measured by the transfection of infectious HEV RNA differed among the cloned PLC/PRF/5 cells, these efficiencies did not correlate with infectious permissibility. We cloned several PLC/PRF/5 cells that were nonpermissive for HEV. However, HEV could replicate in these nonpermissive cell lines, suggesting that these cell lines may have some deficiencies in the attachment or entry steps of HEV infection. Investigation of host factors responsible for these steps is in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	1,000,000	0	1,000,000
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：基礎医学・ウイルス学
キーワード： ウイルス、病原性、治療薬、スクリーニング、分子生物学

１．研究開始当初の背景

E 型肝炎は、通常 HEV が嚢口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよい HEV の増殖系を確立することが望まれている。

２．研究の目的

本研究では、ヒト肝癌由来細胞株である PLC/PRF/5 を用い、本細胞株で増殖できる HEV 株の取得と、この株からの感染性の cDNA のクローニングを行った。また、感染性の HEV cDNA クローンからのレプリコンの構築を試みた。

３．研究の方法

E 型肝炎ウイルス(HEV)に感染したブタ肝臓より組織乳剤を作成し、PLC/PRF/5 細胞に感染させ、本細胞で増殖可能な HEV 株 83-2 を取得した。本株は genotype 3 であった。全長を５つのフラグメントに分割して RT-PCR により cDNA を取得し、連結して全長 cDNA を構築した。5’端に導入した T7 promoter を用いて全長 RNA を合成し、本 RNA が感染性を有することを確認した。
感染性の HEV クローン 83-2 の構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換した cDNA を作成し、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA を作成した。本 RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコン RNA を導入することで、構造蛋白中にレプリコン RNA が包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

４．研究成果

一方、PLC/PRF/5 に HEV を感染させ、抗 HEV 抗体を用いて蛍光抗体染色を行うと、長期間培養後も HEV に感染していない細胞が見られ、この細胞株はヘテロな集団であることが推測された。そのため、single cell cloning により約 100 株を取得した。それぞれの株に 83-2 を接種し、約２ヶ月程度の長期培養を行い、培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ、一部の細胞株は２ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず、HEV が感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入しなかった場合にはレプリコンは機能しなかった。また、Luciferase をレポーターとして用いた場合には HCV IRES を持つ場合にも機能しなかったが、サイズが小さい SecNanoLuc（分泌型の Luciferase）をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した。

PLC/PRF/5 細胞については、single cell cloning により約 100 株を取得した。それぞれの株に 83-2 を接種し、約２ヶ月程度の長期培養を行い、培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ、一部の細胞株は２ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず、HEV が感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。

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）

1. Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., <u>Ishii K.</u>, Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. Viral Immunology, 25: 379-386 (2012)
2. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., <u>Ishii K.</u>, Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewin antigens by genogroup I norovirus. Journal of Virology, 86: 11138-11150 (2012)
3. Suzuki R., Saito K., Shirakura M., Akazawa D., <u>Ishii K.</u>, Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T. and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for the study of the virus assembly and infection. Virology, 432: 29-38 (2012)
4. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., <u>Ishii K.</u>, Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. Hepatology Research, 42: 828-834 (2012)
5. <u>Ishii K.</u>, Miyamura T., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. Hepatology Research, 42: 248-253 (2012)
6. <u>Ishii K.</u>, <u>Li T.C.</u>, Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. Hepatology International. 6: 292 (2012)
7. <u>Ishii K.</u>, Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Journal of Clinical Virology, 53, 219-224 (2012)
8. Iwasaki Y., Mori K., <u>Ishii K.</u>, Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J., Saito A., Funai H., Kimura N., Ageyama N., Yoshizaki S., Suzuki T., Yasutomi Y., Miyamura T., Kannnagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers in Microbiology, 2: 240 (2011)
9. Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., <u>Ishii K.</u>, Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. Vaccine, 29: 4821-4828 (2011)
10. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., <u>Ishii K.</u> and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV

genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. Japanese Journal of Infectious Diseases, 64: 260-261 (2011)

11. Li T.C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. Hepatology International. 5: 202 (2011)
12. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Hepatology International. 5: 204-205 (2011)
13. Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. Virology Journal, 7: 212 (2010)
14. Masaki T., Suzuki R., Saeed M., Mori K., Matsuda M., Aizaki H., Ishii K., Maki N., Miyamura T., Matsuura M., Wakita T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. Journal of Virology, 84: 5824-5835 (2010)
15. Zhang Y.-Y., Zhang B.-H., Ishii K. and Liang T. J. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. Journal of Virology, 84: 3396-3407 (2010)
16. Hmwe S., Aizaki H., Date T., Murakami K., Ishii K., Miyamura T., Koike K., Wakita T. and Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Research, 85: 520-524 (2010)
17. 石井孝司　A 型肝炎/E 型肝炎ウイルス　小児科臨床　65: 1380-1390 (2012)
18. 石井孝司、脇田隆字　海外における A 型肝炎集団発生　−わが国への警鐘−　化学療法の領域　28: 984-992 (2012)
19. 石井孝司　2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析　消化器内科　54: 233-238 (2012)
20. 石井孝司　B 型肝炎の現状とワクチン　愛知県小児科医会会報　94: 38-46 (2011)
21. 石井孝司、清原知子　A 型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況　小児科　52: 1819-1825 (2011)
22. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜　貞憲、石井孝司、高橋和明　2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討—1999 年ボルネオ（カリマンタン）島由来株との近縁性　肝臓　52: 497-502 (2011)
23. 石井孝司　A 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴　日本臨床　69:559-565 (2011)
24. 石井孝司、李　天成　E 型肝炎　公衆衛生　75: 43-46 (2011)
25. 清原知子、石井孝司　ファクトシート（案）1.A型肝炎．食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書：社団法人　畜産技術協会: 255-259, 2010.3.
26. 清原知子、石井孝司　A型肝炎—ウイルス感染による食中毒—　婦人之友　8 月号: 110-114 (2010)
27. 清原知子、石井孝司　新時代のワクチン戦略について考える　A型肝炎　臨床検査　54: 1383-1391 (2010)

〔雑誌論文〕（計 27 件）

〔学会発表〕（計 37 件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
石井　孝司（Koji Ishii）
国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長
研究者番号：40280763

(2)研究分担者
李　天成 (Tiancheng Li)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・
主任研究官
研究者番号：90370957

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：