

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659145

研究課題名（和文） マウス指向性C型肝炎ウイルスを用いた感染動物モデルの樹立

研究課題名（英文） Establishment of mouse-directed HCV infection models

研究代表者

坂本 直哉（SAKAMOTO NAOYA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：10334418

研究成果の概要（和文）：

我々は、HCV培養系を用いて未だ報告されていないマウス指向性HCV株の樹立を目的として本研究を遂行した。蛍光蛋白eYFPを挿入したHCV-JFH1ウイルスHuh7細胞にて高効率に感染、増殖し、その感染はCD81抗体で阻害された。本ウイルスの長期の培養により安定してウイルス蛋白・蛍光蛋白を発現する細胞株を樹立し得た。本研究の成果を元に、さらに種々の遺伝子導入・改変マウスを用いた新たな小動物モデルの樹立を目指す。

研究成果の概要（英文）：

In our present study, we constructed two fluorescence protein-tagged recombinant JFH1 virus clones, JFH1-EYFP and JFH1-AsRed, as well as two corresponding clones with adaptive mutations, JFH1-EYFP mutant and JFH1-AsRed mutant, that and were as effective as JFH1 in producing infectious virus particles, and investigated their viral infection life cycles. After infection of the fluorescence-tagged mutant viruses, infected cells increased exponentially. In cells, EYFP or AsRed and NS5A were expressed as a fusion protein and co-localized in core proteins. The rate of the cell-cell spread was dependent on the cell densities with a maximum of 102.5/ day. Treatment of cells with interferon or a protease inhibitor suppressed expansion of virus-positive cells. Taken together, these results indicate that fluorescence-tagged HCV is a useful tool to study virus infection life cycles and to assist in the search for novel antiviral compounds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1500000	0	1500000
2011年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	2800000	390000	3190000

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、CD81

1. 研究開始当初の背景

| HCV感染症は国内に約150万人存在するが、

未だ十分な治療法は確立しておらず、ウイルス感染・肝炎発症・治療抵抗性の分子機構の解明が急務である。一方 HCV は感染宿主がヒトと一部の霊長類に限られるため、感染小動物モデルとしてはヒト肝細胞移植

Albumin-uPA/SCID マウスしか利用できない。しかし、このマウスは免疫不全マウスであり、HCV はヒト由来の肝ゼノグラフトに感染することから、宿主免疫応答の解析や種々のマウスとの交配による病態解析は不可能である。以上より詳細な肝炎病態解析には新規の感染小動物モデルの開発が必要である。

HCV の肝細胞への吸着・侵入には 3 種の細胞表面蛋白、scavenger receptor-B1(SR-B1)、CD81 および Claudin が関与している。HCV は血中で LDL と結合しており(viro-lipo particle)、LDL が SR-B1 と、HCV エンベロープ E1 蛋白が CD81 に結合し、Claudin により Endocytosis が誘導され細胞内に侵入する。中和抗体を用いた解析から、これらのレセプター蛋白のうちウイルス蛋白と直接会合し感染種特異性に関与しているのは CD81 であることがわかっている。

我々は独自に HCV レプリコン系を構築し(Sakamoto, 2003 EMBO Rep; Tanabe, 2004 J Infect Dis)、これらを用いて

Cyclosporine(Nakagawa, Gastroenterology 2005)、IRF1 (Kanazawa, J Virol 2004)、BMP7 (Sakamoto, BBRC 2007)、Statin (Kim, Gastroenterology 2007)等の HCV 増殖制御機構を報告してきた。また我々は独自に確立したブラクアッセイ法により増殖効率を約 102 倍に高めた高増殖性 HCV-JFH 株を単離・クローン化している (Sekine-Osajima, 2008 Virology)。

2. 研究の目的

本研究では、マウス型 HCV レセプター蛋白(mCD-81, mClaudin-1)を導入した Huh7 細胞への高増殖性 HCV 株の経代反復培養によりマウス肝細胞に感染増殖可能なウイルス株(mHCV)を樹立することを目的として研究を遂行する。さらに樹立した mHCV 株の SCID マウスおよび Balb/c マウスに対する感染性の検証を行い、未だ報告されていないマウス指向性 HCV 感染動物モデルを確立する。ごく最近、マウス細胞への HCV 感染・経代によりマウス型細胞に一部適応した HCV 株の構築が報告されている。このウイルスでは HCV-E1,E2 蛋白に変異を生じており CD81 結合能の種特異性の変移が確認されている。

3. 研究の方法

(1)マウス CD81 親和性 HCV 株の選択・樹立
細胞表面蛋白である CD81 は 2 個の細胞外ループ構造からなり、そのうち Long

Extracellular Loop (LEL) と HCV-E2 蛋白が特異的に結合する。CD81 はヒトとマウスで約 10%の塩基配列の相違があり種特異性に關与しているとされる。我々は通常型 Huh7 細胞と CD81 欠損 Huh7 細胞(Lavillette, 2005 Hepatology)にマウス CD81 を恒常的に導入した細胞 Huh7/mCD81 を用い以下の手順でウイルス表面抗原の適応化を進める。使用する HCV クローンとして、我々の独自に構築した高増殖性 HCV-JFH-P1 plasmid

(Sekine-Osajima, 2008 Virology) から RNA を in-vitro 合成し使用する。

I. Huh7 細胞への HCV-JFH1 RNA の導入 (electroporation)

II. HCV 導入 Huh7 と Huh7/mCD81 細胞との共培養。

III. 培地に分泌されたウイルスの naïve huh7/mCD81 細胞への再感染の繰り返し
マウス指向性クローンの生成効率が未知であるため、hCD81 および mCD81 発現細胞の比率を適宜至適化し経代を継続する。以上の手順で生成された HCV の感染性を Huh7/hCD81 および Huh7/mCD81 細胞株を用いて比較検討する。

(2)マウス SR-B1、Claudin-I 親和性 HCV 株の選択・樹立

SR-B1 は主に肝細胞及びマクロファージに発現している。HCV は LDL と複合体を形成した lipo-viro particle として肝細胞表面の SR-B1 に結合したあと Claudin-1 の作用で Endocytosis に導かれる。我々はマウス SR-B1 および Claudin-1 をそれぞれ恒常的に導入した細胞 Huh7/mSR-B1、Huh7/mClaudin-1 を用い以下の手順でウイルス表面抗原の適応化を進める。

I. Huh7 細胞への HCV-JFH1 RNA の導入 (electroporation)

II. HCV 導入 Huh7 と Huh7/mSR-B1、Huh7/mClaudin-1 細胞との共培養。

III. 培地に分泌されたウイルスの再感染の繰り返し

マウス指向性株の生成効率が未知のため、ヒトおよびマウスレセプター発現 Huh7 細胞の比率を適宜至適化し経代を継続する。以上の手順で生成された HCV の感染性を Huh7/mSR-B1、Huh7/mClaudin-1 を用いて比較する。

(3)マウス肝細胞への親和性の検証

樹立した mHCV 株はマウス型感染レセプターを発現する Huh7 細胞での感染・増殖性を確認した後、種々のマウス由来培養肝細胞に対する感染・増殖性を確認する。使用する細胞種として、Huh7、HepG2、HEPA、HEK293、NIH3T3、CAC02 細胞を用いる。さらに collagen 灌流にて採取したマウス初代肝細胞を用い

て mHCV の細胞表面への吸着、細胞内でのウイルスゲノムの増殖を確認する。

4. 研究成果

JFH1-EYFPmut、-AsRedmut 導入後、培養上清中のコア抗原は親株 JFH1 と同等で最高値 1.35×10^4 fmol/l に達したが、T4290A, C7653T 変異を持たない wild type では経時的に減衰・消失した。HCV-RNA 導入細胞、上清の再感染ともに mutant type はウイルス陽性細胞数が指数関数的に増加し最大速度は 102.5/日だった。抗 CD81 抗体を使用した侵入阻害試験では 80%以上の感染が阻害された。以上より、蛍光タグ付き HCV はウイルス粒子産生能を保持しつつ継代が可能で、flowcytometry などを用いることにより感染細胞を定量的に検出することが可能であることが示された。

High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗 CD81 抗体を用いたエンタリー阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。400 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35 個が 50%以上の感染阻害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗 HCV 活性を認めたものは 1 個で、残りの 34 個はエンタリー過程を阻害している可能性が示唆された。また、長期培養により E1, E2, NS3, NS5B 領域の特定の部位にアミノ酸変異が出現した。今後変異 HCV 株培養系で出現したウイルスアミノ酸変異を個々に導入したウイルスクローンの感染増殖能、細胞特性を解析する。本研究の成果によりウイルス-宿主感染免疫応答の解析、さらに種々の遺伝子導入・改変マウスを用いた生体における HCV 感染分子機構の解析など広範な応用展開を目指し、新たな小動物モデルの樹立を目指す。

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 11 件)

1. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H: Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012; *Epub ahead of Print*. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.02.003.
2. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N (equal contribution), Okuno Y, Sekine-Osajima Y,

Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother*; 2012; 56(3):1315-1323.

3. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K: Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416(1-2):119-124.
4. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K. Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(10):e64.
5. Funaoka Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Kakinuma S, Suda S, Watanabe T, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, and Watanabe M: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011; 85(12):5986-5994.
6. 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* 2011;41:258-269.
7. Toyoda M, Kitaoka A, Machida K, Nishinakagawa T, Yada R, Kohjima M, Kato M, Kotoh K, Sakamoto N, Shiota G, Nakamura M, Nakashima M, Enjoji M. Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med* 2011;27:619-624.
8. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90.
9. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K,

- Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-369.
10. 箆島裕子、中川美奈、坂本直哉：HCVの複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2010; 69:52-58.
 11. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守：シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011;62:403-412.

〔学会発表〕（計10件）

1. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)
2. Masayoshi Yada, Ryoko Yada, Motoyuki Kojima, Kazuto Goto, Naoya Sasamoto, Akihito Masumoto and Makoto Nakamura: Ezetimibe and interferon synergistically suppress subgenomic replication of hepatitis C virus via the acceleration of IFN-mediated ISG15 conjugation system. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) The 7th Single Topic Conference, Dec-17-2010, Chiba, Japan.
3. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Seishin Azuma, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Yukiko Okuno, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Identification of Novel Small Molecules Inhibitors of Hepatitis C Virus Replication Using a Cell-Based High-Throughput Screen. 17th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-9-2010, Yokohama, Japan.
4. 北詰晶子、坂本直哉、奥野友紀子、中川美奈、柿沼晴、山本満千、幾世橋佳、新田沙由梨、村川美也子、萩原正敏、渡辺守: EYFP 発現 HCV 培養系を用いた High-content screening assay によるウイルス侵入阻害剤の同定. (ポスター P26) 第15回日本肝臓学会大会 2011.10.20 福岡.
5. 北詰晶子、坂本直哉、奥野友紀子、箆島裕子、中川美奈、柿沼晴、植山真由美、

- 小野塚 泉、船岡祐介、渡辺貴子、幾世橋 佳、新田沙由梨、村川美也子、萩原正敏、渡辺 守：Cell based high-throughput screening による新規抗ウイルス小分子の同定及びその作用機構の解析. 第47回日本肝臓学会総会,2011.6.3, 東京（一般口演,O-156）
6. 北詰晶子、坂本直哉、奥野友紀子、箆島裕子、中川美奈、柿沼晴、植山真由美、小野塚 泉、船岡祐介、渡辺貴子、幾世橋 佳、新田沙由梨、村川美也子、萩原正敏、渡辺 守：蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いた High-content screening assay の樹立及び HCV エントリー阻害剤探索への応用. 第47回日本肝臓学会総会,2011.6.3, 東京（一般口演,O-164）
 7. 山本満千、坂本直哉、中川美奈、柿沼晴、東 正新、加藤孝宣、脇田隆宇、渡辺守: 蛍光タグ付加 HCV 培養系を用いたウイルスライフサイクルの解析. JDDW2010 2010.10.13 横浜（ポスター）.
 8. 三島果子、坂本直哉、箆島裕子、中川美奈、柿沼晴、東 正新、脇田隆宇、今村道雄、茶山一彰、渡辺 守: 細胞障害性 HCV-JFH1 subclone の細胞培養系および感染動物モデルにおける機能解析. JDDW2010 2010.10.13 横浜（ポスター）
 9. 山本満千、坂本直哉、中川美奈、柿沼晴、東正新、加藤孝宣、脇田隆宇、渡辺守: 蛍光タグ付加 HCV 培養系を用いたウイルスライフサイクルの解析. (一般口演) 第46回日本肝臓学会総会 2010.5.27 山形.
 10. 北詰晶子、坂本直哉、箆島裕子、中川美奈、東正新、柿沼晴、渡辺守: HCV レプリコン系を用いた抗ウイルス小分子の大規模スクリーニング. (ポスター) 第46回日本肝臓学会総会 2010.5.27 山形.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 直哉 (SAKAMOTO NAOYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄付講座教員
研究者番号：10334418

(2) 研究分担者

柿沼 晴 (KAKINUMA SEI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄付講座教員
研究者番号：30372444

中川 美奈 (NAKAGAWA MINA)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30401342

(3) 連携研究者

なし