

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659205

研究課題名(和文) ヒト肝幹細胞分化過程におけるHCV感染増殖の解析

研究課題名(英文) Study on the infection and proliferation of HCV during hepatic differentiation of human hepatic stem cells

研究代表者

土方 誠 (Hijikata, Makoto)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：90202275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、独自に樹立したヒト肝幹細胞を成熟肝細胞へと分化させ、HCVがどの分化段階の細胞に感染するかを解明することを目的とした。肝分化誘導後、組換え体HCVの感染を試みたが、高い効率の感染増殖は認められなかった。肝細胞特異的な活性を測定したが、この細胞の肝分化が十分ではなく、HCVは高度に成熟分化した肝細胞に効率良く感染する可能性が考えられた。一方、中和抗体の処理により、ヒト肝細胞で恒常的に発現しているインターフェロン(IFN)alpha1の機能を抑制したところ、組換え体HCVの不死化肝細胞への感染増殖が亢進された。その結果、効率良いHCV感染増殖には自然免疫系の抑制が必要ながわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal the developmental stage of human hepatocytes permissive to the infection and proliferation of HCV, using human hepatic stem cells that originally established by our laboratory. Infection experiment of HCV using the hepatic stem cells after induction of hepatic differentiation suggested that the highly matured hepatocytes are required for efficient infection of HCV. Our results also suggested the requirement of suppression of innate immune system of the cells to establish efficient HCV culture system.

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 肝炎 肝幹細胞 肝分化 自然免疫 インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

HCV 感染患者における肝炎は肝細胞の増殖を誘起し、この肝炎が肝癌の発症に重要な役割を果たすと考えられているが、肝炎下の HCV 感染とその発癌に果たす役割は全く不明である。その解明には HCV 感染と病原性を正確に再現する正常肝細胞を用いた培養細胞実験系が必要である。これまで申請者らは独自の方法により新たにヒト不死化肝細胞を樹立している。立体培養したこの細胞は患者血由来の HCV の生活環を再現することが可能であった。しかしながら、この不死化肝細胞にはヒトパピローマウイルス由来の発癌遺伝子である E6 や E7 が導入されているため、発癌に関連した研究に用いることが難しい。さらに最近この研究を進展させることでヒト初代培養肝細胞からヒト肝幹細胞をクローニングすることに成功した。この細胞は癌遺伝子やウイルス遺伝子を含まず、一定の培養条件下で細胞増殖ならびに分化誘導することが可能であった。

2. 研究の目的

独自に樹立したヒト肝幹細胞を肝細胞に分化誘導し、発癌と関連することが考えられる患者血清由来の HCV が効率良く感染増殖する培養細胞系を構築し、ウイルスの感染増殖や病原性を解析し、HCV 感染による細胞機能の修飾について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

新たに樹立した正常ヒト肝幹細胞の分化誘導をおこない、肝前駆細胞や未成熟肝細胞や成熟肝細胞といった細胞へ段階的に分化させる。これまで用いてきた立体培養法を応用するなどして、より本来のヒト肝臓内環境に類似した条件を考慮しながら分化誘導をおこなう。

この分化過程におけるヒト肝幹細胞に対して感染させるHCVには性質が解析され、安定した組換え体HCVを用いる。まず現在汎用されている劇症肝炎由来のJFH1クローンを利用するが、より発癌との関連が考えられる遺伝子型1bのHCVの組換え体HCVであるKT9についても感染性ウイルスの産生系の開発をおこない、感染実験に用いる。感染実験にはウイルスの細胞への直接的な感染の他、細胞間感染を想定した感染実験をおこなう。肝幹細胞の分化において、すべての細胞を同調分化させることは非常に困難である。そこでウイルスが感染した個々の細胞を判別し、単離することができるようにHCVが感染した細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するようなシステムの構築をおこなう。既に報告があるHCVプロテアーゼの活性を用いてウイルス感染を検出する系を応用する。小胞体膜細胞質側に局在するATF6の膜結合領域とDNA組換えタンパク質CREとをHCVプロテアーゼ切断部位を挟んで融合させたキメラタンパク質をHCVセンサーとして用い、感染レポーターはCREの標的であるloxP配列で挟まれたDNA領域をCREによって取り除かれると赤色蛍光タンパク質が発現するようにデザインする。

4. 研究成果

樹立した肝幹細胞を肝分化誘導し、アルブミン遺伝子発現が誘導され、十分に高くなってから組換え体 HCV の感染を試みた。しかしながら、期待された高い効率の感染増殖は認められなかった。この細胞の肝分化の程度を検討するために、種々の肝細胞特異的な活性を測定した。アルブミンタンパク質の培養液中への産生やグリコゲンの蓄積やインドシアニングリーンを取り込みなどは観察されたが、成熟肝細胞で認められる薬剤代謝酵素遺伝子

群の発現誘導は認められなかった。このことから HCV は高度に成熟した肝細胞にのみ感染する可能性が考えられた。培養正常ヒト肝細胞には感染ウイルスの増殖を抑制する自然免疫が働いていることから、以前にヒト肝細胞で恒常的に発現していることを明らかにしているインターフェロン(IFN)alpha1 の機能を抑制することで、組換え体 HCV の感染増殖が影響されるかどうかについて検討した。増殖能の高い組換え体 HCV 感染前に IFN-alpha の活性を抑制する中和抗体などの処理を行うと、組換え体 HCV の感染後、未処理群では早期に誘導されるインターフェロン関連遺伝子群の誘導が遅延し、HCV の感染細胞内の複製増殖が亢進された。このことから、ヒト肝細胞には強く組換え体 HCV 感染を抑制する自然免疫系が機能しており、効率良く組換え体 HCV を感染増殖させるためにはこの自然免疫系を抑制する必要があることがわかった。その一つの方法には恒常的に産生されている IFN-alpha1 の活性を中和抗体などを用いて抑制することも利用できるとわかった。

HCV が感染した細胞を標識する HCV 感染インジケータ系は、NS3/4A プロテアーゼ依存的なレポーター遺伝子産生系が機能することを組換え体 HCV の感染で確認することができた。しかしながら、現時点では組換え体 HCV の感染のみを検出することができ、またその効率は低いため、今後さらにその感受性を高め、かつ非感染時の活性を抑制する改良が必要である事がわかった。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata,

Critical role of interferon-alpha constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection, PLoS ONE, 9, e89869, 2014

〔学会発表〕(計 3 件)

Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata, Type I and type III interferon play anti-viral roles cooperatively in human hepatocytes to prevent early infection spread of viruses, 20th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, 6th-10th October, Melbourne, Australia, 2013

津川陽司、加藤博己、藤田尚志、下遠野邦忠、土方 誠、ヒト肝細胞の抗ウイルス初期応答において I 型および III 型インターフェロンは協調的に作用する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日から 12 日神戸

土方 誠、C 型肝炎治療薬の新たな分子標的の探索、第 13 回肝疾患フォーラム学術集会基調講演(招待講演)2013 年 11 月 09 日、大阪

〔図書〕(計 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

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/HCV/index.html>

京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門ヒトがんウイルス研究分野土方研究グループ

ホームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土方 誠 (京都大学)

研究者番号 : 90202275

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :