

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012 ～ 2012
課題番号：24659207
研究課題名（和文） 新発想に基づく1b遺伝子型HCVの感染増殖システムの開発
研究課題名（英文） Development of the infection and proliferation system of the 1b genotype HCV based on the new idea
研究代表者 加藤 宣之（KATO NOBUYUKI） 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 研究者番号：40150883

研究成果の概要（和文）：培養細胞を用いて遺伝子型1bのC型肝炎ウイルス（HCV）の感染増殖システムの開発を試みた。本研究では、2009年にHCV RNAの複製を許容する細胞株として見出したヒト肝癌細胞株Li23と世界中で汎用されているヒト肝癌細胞株HuH-7を用いてHCV陽性血清（1b遺伝子型）をこれら細胞株に添加してHCVを感染させた。種々な条件下で感染実験を行ったが、HCVの増殖を確認するには至らなかった。その原因の1つとしてHCV受容体の1つであるCLDN1の発現量が非常に低くなっていることを見出し、CLDN1の発現補充が必要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：We tried the development of the infection and proliferation system of the 1b genotype hepatitis C virus (HCV) using human cultured cell lines. In this study, HCV-positive serum (1b genotype) was added to the human hepatoma cell line Li23, which was found in 2009 as a cell line permitting the reproduction of the HCV RNA and human hepatoma cell line HuH-7 frequently used all over the world. We performed HCV infection under various conditions, however, we did not succeed to demonstrate an increase of the HCV. As one of the causes, we found that expression level of CLDN1, which was one of the HCV receptors, became very low, and that the supplement of CLDN1 expression was necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：基礎医学、ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス、遺伝子型1b、感染増殖システム、HCV RNA複製細胞、宿主因子

1. 研究開始当初の背景

培養細胞を用いたC型肝炎ウイルス(HCV)の感染増殖システムは、2005年に2a遺伝子型のJFH1株HCVで開発されたものの、我が国の肝炎患者の70%を占め、現行のペグインターフェロンとリバビリン併用療法でも約半数が抵抗性を示す1b遺伝子型については、依然として開発されていない。2a遺伝子型とのキメラ型HCVの産生システムは開発されたものの、1b遺伝子型の野生株HCVの実用的な感染増殖システムは開発されていない。一方、申請者らは、これまでに多くの1b遺伝子型の野生株HCV RNAが自律複製するクローン化細胞株の樹立に成功している。さらに、HCVを増殖させる細胞株として世界中で汎用されているヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なるヒト肝癌細胞株Li23も見出した。これらの細胞株を使用することにより1b遺伝子型HCVの感染増殖システムを開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

HCV RNA の高度な複製を許容するクローン化細胞株 (Li23 および HuH-7 細胞由来) と 1b 遺伝子型の野生株 HCV (液体窒素により長期保存されている) の組み合わせで、HCV の感染増殖システムの開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HCV 感染実験

各種細胞を 24 ウェルプレート (それぞれ培地 1 mL) にそれぞれ 1×10^4 個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清 (1b 遺伝子型の HCV-0 株) $100 \mu\text{l}$ (1×10^7 HCV ゲノム価相当) を添加した。2 時間 37 度で培養した後、培地を除き PBS (1 mL) で 2 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地 (1.2 mL)

を加え 37 度で培養を行った。2 日後に培地交換 (1.2 mL) を行い、感染 7 日目に培地 1 mL をとり、HCV Core の定量を ELISA 法により行った。

(2) 定量的 RT-PCR

各種細胞から調整した Total RNA を、それぞれ $2 \mu\text{g}$ を用いて、逆転写酵素により cDNA を作成した。cDNA の 1/10 を鋳型にして HCV 受容体 (CD81 など) に特異的なプライマーセットを用いて LightCycler PCR により HCV 受容体の mRNA 量を定量化した。

4. 研究成果

1b 遺伝子型に属する HCV-0 株を用いて JFH1 株 HCV (2a 遺伝子型) に感受性を示す HuH-7 由来の RSc 細胞 (小文字の c はインターフェロン処理により HCV RNA を完全に排除した治癒細胞であることを示す)、Li23 由来の ORK8c 細胞、Li23 由来で 4 年間 HCV RNA を複製させた後に治癒化した OL14(4Y)c 細胞およびヒト不死化 PH5CH8 細胞に研究方法の項目で示したように HCV 陽性血清を添加して HCV を感染させた。感染 7 日目に培養上清中の Core の定量を ELISA 法により行った。その結果、いずれの場合においても、HCV Core の量は 20 fmol/L 以下と低値であったことから、HCV の感染増殖レベルは検出限界以下であることが示唆された。

JFH1 株 HCV の感染増殖は細胞培養に用いている FBS (牛胎児血清) を HS (ヒト血清) に代えると上昇するという報告が国際 HCV 会議 (ベネチア 2012) であった。そこで、次に細胞培養に通常 1-10% で用いている FBS を HS に変更して、再度、同様の感染実験を行った。しかしながら、得られた結果に変化はなく、HCV Core は ELISA 法により検出されることは

なかった。

次に、RSc 細胞、ORL8c 細胞および PH5CH8 細胞に HCV 陽性血清 (HCV-0 株) を再度添加して HCV を感染させ、1 週間後の培養上清 (1 mL) を未感染細胞 (RSc と ORL8c 細胞) に添加するという「めくら感染 (2 時間)」を行い、1 週間培養を続けた。1 週間後に、さらにもう一度培養上清 (1 mL) を未感染細胞に添加し、めくら感染を繰り返した。そして、1 週間後に、培養上清中の HCV Core の定量を ELISA 法により行った。このようなめくら感染によりウイルス量が増加することがあるので期待したものの、いずれの細胞においても、HCV Core の量は 20 fmol/L 以下であった。

PH5CH8 細胞については、過去の感染実験 (1996-1998) により 10^3 /ml レベルの HCV RNA が培養上清に検出されていたが、HCV Core が ELISA 法により 20 fmol/L 以上の陽性になるレベルではないことが判明した。そこで、PH5CH8 細胞においては、HCV 感染に関わる何らかの宿主因子が欠如しているのではないかと考え、現在までに知られている感染に必要な宿主因子 (CD81, SR-BI, EGFR, CLDN1, OCLN) の RT-PCR による定量を行った。その結果、PH5CH8 細胞では、CLDN1 の発現量が非常に低くなっていることが判明した。そのため、これらの遺伝子の発現を補充した細胞の樹立が必要ではないかと考え、発現ベクターの構築などの準備をすることとした。

今後の展望として、以下の 2 点が考えられる。(1) HCV 感染実験に使用した細胞について cDNA マイクロアレイを作成して、HCV RNA の複製に必要な宿主因子や HCV 粒子産生に必要な宿主因子の発現レベルを調べる必要がある。発現量が低い遺伝子については、それらを発現補充した細胞を作成することを行うことにより、HCV 感染増殖に適した細胞を作成することができるのではないかと期待

される。(2) もう 1 つの可能性として、我々が長期 (2-5 年) に培養継代している 1b 遺伝子型の HCV RNA 複製細胞株の利用が考えられる。長期培養により細胞内での HCV RNA の複製環境が良くなることがこれまでに観察されている。これらの細胞が HCV の感染増殖に適した環境になっている可能性があるため、これらの細胞が HCV 感染増殖システムの開発に有用であることが期待される。

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 2 件)

- ① Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430:592-597 (2013). 査読あり
- ② Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, 167(1):74-85 (2012). 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたる C 型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-2012 年 11 月 15 日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 宣之 (KATO NOBUYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号：40150883

(2) 研究分担者

團迫 浩方 (HIROMICHI DANSAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：80379841

森 京子 (KYOKO MORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：10633604