

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460580

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルス感染性クローンを用いた増殖機構および病原性の解析

研究課題名(英文) Analysis of replication mechanism and pathogenesis of hepatitis E virus using infectious clone

研究代表者

石井 孝司 (ISHII, Koji)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：40280763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：E型肝炎ウイルス(HEV)の感染性クローンを構築し、構造蛋白をレポーター遺伝子に置換したレプリコンを作製した。本レプリコンを用いて低分子化合物の大規模なスクリーニングを行い、強い複製阻害活性を示す化合物を複数見出した。これらの化合物の中には共通の生理活性を示す物質が複数存在する。このような情報は、HEVの複製機構や病原性メカニズムの解析に重要な情報を提供すると思われる。

また、これまで明らかになっていない非構造蛋白(ORF1)のプロセシング機構の解析のため、無細胞コムギ胚芽発現系を用いてプロテアーゼと推定される領域の発現を行い、活性を検討したところ、弱いながらも活性が見出された。

研究成果の概要(英文)：We constructed infectious hepatitis E virus (HEV) clone from infected porcine liver and replaced the structural protein to reporter genes resulted in successful construction of HEV replicon. This replicon was used for the screening of the library of chemical compounds. We found some compounds that shared the same bioactivity. Although more detailed analysis is still needed to reveal the effect of these compounds to HEV replication, but these results would contribute to the analysis of the mechanism of HEV replication and pathogenesis.

We also analyzed the processing of HEV nonstructural protein (ORF1) that encodes viral proteins responsible for the replication of HEV. We expressed whole ORF1 and potential protease region by using wheat germ-based cell free expression system. Protease activity was detected from ORF1 protein, suggesting that this cell free expression system is useful for the analysis of the processing mechanism of HEV nonstructural protein.

研究分野：ウイルス学

キーワード：E型肝炎ウイルス 複製機構 感染メカニズム 病原性

### 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は、通常 HEV が糞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型肝炎はこれまでの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、輸入感染症として認識されてきた。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取することによって HEV に感染すると考えられる。以上の事実から、E型肝炎は希少な輸入感染症ではなく、我が国においても常に流行の危険は存在すると考えられ、日本でも予防、治療研究への真剣な取り組みが必要になってきていると言える。一方において、アジア、アフリカ地域では依然として HEV は蔓延状況にあり、日本からの旅行者が感染する危険性は高いままである。

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い。また、HEV は感染から発症までに平均約 6 週間を要する。このことから、免疫応答の強い臓器である肝臓で比較的長期に渡り感染状態を維持するメカニズムが存在することが推定される。一方近年の研究で、HEV の genotype 3 と genotype 4 には病原性に違いがあり、genotype 4 が重症化、劇症化しやすいことが示唆されている。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ヒト由来肝癌細胞である PLC/PRF/5 で効率よく増殖する Genotype1、3、4 の HEV 株を取得し、いずれのクローンもすでに完全長の cDNA 取得に成功した。また、この cDNA から合成された RNA に感染性があることも証明できた。本クローンの構

造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンを構築し、細胞内で複製させることにも成功しており、このレプリコン RNA を持続的に保持する細胞も樹立できている。

本研究ではまず、このレプリコン保持細胞株を用いて、現在まで不明のままである ORF1 のプロセシング様式の解析を行う。ORF1 由来のポリプロテインから各成熟蛋白にプロセシングされる切断点を決定し、プロテアーゼ、RNA ポリメラーゼ、ヘリカーゼの成熟型を同定する。また、いまだ機能が不明な複数のドメインが ORF1 内に存在しているが、これらのドメインの機能をホモロジーサーチなどによって推定し、機能不明なドメインのウイルス複製における役割を明らかにする。以上により、ウイルス複製における HEV の各成熟蛋白の機能を明らかにし、複製に必須なウイルス由来酵素活性の *in vitro* でのスクリーニング系を確立する。これらのスクリーニング系を用いて化合物ライブラリーから複製を抑制する活性を持つ化合物を選択することで、それらの化合物が持つ本来の作用から、HEV の細胞内での複製のメカニズムを解析することも可能になると考えられる。

### 3. 研究の方法

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 (SecNanoLuc) で置換した cDNA を作成し、合成した RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞に導入するとレプリコンが複製しレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) が分泌されることを確認した。レポーターの分泌を指標にレプリコン複製を阻害する物質のスクリーニングを行った。また、非構造蛋白のプロセシングを解析する目的で、コムギ胚芽由来の無細胞蛋白発現系を用いて、ORF1 (非構造蛋白) 全長と、プロテアーゼと推定される領域の発現を行い、プロテアーゼ活性についての検討を行った。

#### 4. 研究成果

上記のレプリコンを用いて、LOPAC 化合物ライブラリおよび植物エキスライブラリ（筑波薬用植物資源研究センターとの共同研究）の HEV 増殖阻害剤のスクリーニングを開始し、現在までに複数の阻害活性を有する化合物を同定した。本スクリーニング系については、阻害活性を有すると判定された化合物の中に、すでに臨床的に増殖阻害効果が確認されているリバビリンが含まれていたことから、本アッセイ系の有用性が示されたものと考えている。これらの阻害活性が確認された化合物について精査したところ、共通の作用機序を有する化合物群が見出されたため、この作用と HEV 増殖メカニズムとの関連について現在検討を進めている。また、リバビリンについては、リバビリン治療に抵抗性を示す慢性 E 型肝炎患者由来の HEV 配列を解析し、リバビリン治療後にウイルス配列中出现した複数の変異を同定した。この変異の意義を解析することで、耐性株の作用機序を解明する。リバビリンは現在のところ、慢性 E 型肝炎に対する唯一の治療薬であるため、作用機序の解明は治療方針に重要な情報を提供できると考えられる。

一方、まだ明らかにされていない非構造蛋白のプロセッシングについての検討も行った。HEV のプロテアーゼ領域は毒性が強く、組換え蛋白としての発現が難しいため、愛媛大学プロテオサイエンスセンターと共同で、コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白発現系を検討した。その結果、ORF1 全長蛋白と、プロテアーゼ領域と考えられる蛋白のいずれについても発現に成功した。また、ORF1 全長蛋白は、弱いながらもプロテアーゼ活性を有することが確認された。

#### 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）

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Miyoshi M., Kakinuma S., Tanabe Y., Ishii K., Li T.C., Wakita T., Tsuura Y., Watanabe H., Asahina Y., Watanabe M. and Ikeda T. A Case of Chronic Hepatitis E Infection in a Persistently Immunosuppressed Patient Unable to be Eliminated after Ribavirin Therapy. *Internal Medicine*, in press
2. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Kishida N., Shirakura M., Asanuma H., Takeda N. and Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. *Veterinary Microbiology*, in press.
3. Motoya T., Nagata N., Komori H., Doi I., Kurosawa M., Keta T., Sasaki N and Ishii K. The high prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Ibaraki Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77: 1705-1709 (2016)
4. Kanayama A., Arima Y., Tamagishi T., Kinoshita H., Sunagawa T., Yahata Y., Matsui T., Ishii K., Wakita T. and Oishi K. Epidemiology of domestically-acquired hepatitis E virus infection in Japan: assessment of the nationally reported surveillance data, 2007-2013. *Journal of Medical Microbiology* 64: 752-758 (2015)
5. Li T.C., Kataoka M., Takahashi K., Yoshizaki S., Kato T., Ishii K., Takeda N., Mishiro S. and Wakita T. Generation of hepatitis E virus-like particles of two new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes. *Veterinary Microbiology* 178:

150-157 (2015)

6. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology* 96: 1320-1327 (2015).

7. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma PLC/PRF/5 Subclones. *Microbiology and Immunology* 59: 89-94 (2015).

8. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 764-766 (2014).

9. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. *Journal of Virology*, 87: 6031-6036 (2013)

10. 石井孝司, 今川稔文 生肉食とE型肝炎 日本臨床 73: 693-698 (2015)

11. 石井孝司 A型肝炎、E型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)

[学会発表](計 10 件)

1. Li T.C., Yang T., Ami Y., Suzaki Y., Yoshizaki S., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Takeda N., Johne R. and Wakita T. A reverse genetic system to explore the function of rat hepatitis E virus ORF4. Fukuoka, Japan, November 22-24, 2015

2. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Nishimura Y., Shimizu H., Shimojima M., Saijo M., Wakita T. and Ishii K. The validation study of hepatitis E virus receptor candidate. Fukuoka, Japan, November 22-24, 2015

3. Johne R., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T., Li T.C. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology. Bochum, Germany, March 18-21 2015

4. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T., Johne R. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014

5. Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S., Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014

6. Li T.C., Ishii K., Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., Takeda N. and Wakita T. An unrecognized hepatitis E outbreak in a monkey facility The 23st Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 6-10 June 2013, Singapore

7. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司 : E型肝炎ウイルス感染性規定因子宿主候補に関する研究、第62回日本ウイルス学会、平成

26年11月、横浜

8. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸

9. 石井孝司、李 天成、吉崎佐矢香、塩田智之、脇田隆字：E型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋VLP作成の検討、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸

10. Tingting Yang 落合香織 脇田隆字、石井孝司、李 天成：スペインからのE型肝炎輸入感染症例の解析、第54回日本臨床ウイルス学会、平成25年6月、倉敷

〔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 (ISHII, Koji)

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 (Li, Tian Cheng)

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：