

201227023A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

慢性C型肝炎患者由来HCV株感受性正常肝細胞による
病原性発現機構の解明および薬剤評価系の構築

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 伊藤 昌彦

平成25(2013)年3月

別添1

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

慢性C型肝炎患者由来HCV株感受性正常肝細胞による
病原性発現機構の解明および薬剤評価系の構築

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 伊藤 昌彦

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

慢性C型肝炎患者由来HCV株感受性正常肝細胞による病原性発現機構の
解明および薬剤評価系の構築

伊藤 昌彦

1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

7

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括 研究報告書

慢性C型肝炎患者由来HCV株感受性正常肝細胞による病原性発現機構
の解明および薬剤評価系の構築

研究代表者 伊藤 昌彦 浜松医科大学医学部 助教

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染により、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝臓での年間死亡者は我が国で3万人を超える。C型肝炎ウイルスに関する研究は、これまで限られたヒト肝癌細胞株とHCV株の組み合わせにより行われてきた。しかしながら、HCVの病原性発現の分子機構を解析するためには、本来の肝細胞機能を有する正常ヒト肝細胞株に様々な患者由来HCV株が感染増殖することのできるモデルが必要である。本研究では、慢性C型肝炎感染患者由来のHCV株を高効率に分離培養できる、正常肝細胞株の樹立を目指す。これにより、C型肝炎感染患者の有する様々なHCV株の病原性発現機構の解明、さらには薬剤効果や新規治療薬開発のための実験モデル系を構築する。

平成23年度では、(1)慢性C型肝炎感染患者由来のHCV株を高効率に分離培養できる正常肝細胞株を得るために、肝幹細胞からの分化誘導の条件を検討した。また肝癌由来細胞株Huh7からiPS細胞誘導により低分化細胞株を樹立した。平成24年度においては、(2)HCV感染および複製に関与する新規因子の同定。(3)慢性C型肝炎感染患者由来の多種のHCV株の病原性発現機構の解明。(4)患者由来HCV株の薬剤感受性および耐性獲得機構の解明を試みた。これによりHCV感染に伴う肝臓癌、代謝異常などの病原性発現機構、また持続感染の成立に関与する分子機構などを解明する目的で研究を行った。

A. 研究目的

国内におけるC型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約300万人とされ、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝臓での年間死亡者は3万人を超える。肝硬変、肝臓癌の発症を予防するためには、慢性肝炎の段階でHCVを体内から排除することが重要である。研究開始時の慢性肝炎に対する標準的な治療法では治癒率は50%を少し上回る程度であり、遺伝子型や

HCVゲノムの変異による薬剤耐性から、新たなHCV特異的抗ウイルス剤の開発が望まれている。HCVに関する研究は、これまで限られたヒト肝癌細胞株とHCV株の組み合わせにより行われてきた。本研究では、様々な患者由来HCV株の感染増殖機構・病原性発現機構を明らかにするため、本来の肝細胞機能を有する正常ヒト肝細胞で患者由来のHCV株が感染増殖することのできるモデルを構築する。

本研究によつては、患者個々の HCV 株の病原性発現の解析のみならず、既存の薬剤の効果の検証、さらには新規治療薬の評価法としても有用となりえる。より効果的な薬剤の選択は肝炎患者にとって大きな福音になるものと思われる。ひいては他の肝炎克服対策事業の研究推進に活用できるだけでなく、保健、医療、福祉の向上、医療費の低減を期待することができる。

B. 研究方法

(1) Hdo 細胞の HCV 感受性の解析

前年度、ヒト肝癌細胞株である HuH-7 をリプログラムすることによりオーバル細胞様の細胞株を樹立した。そこで HCVcc (J6/JFH1 株および JFH1 株)を moi=0.5 で HuH-7, Hdo 細胞に感染させ、細胞内の HCV コピー数をリアルタイム PCR 法で定量することで感染性を調べた。また、Gluc を発現する HCV サブゲノムレプリコン RNA(JFH1 株および con1 株)を作成し、in vitro transcription により RNA 合成を行った。この RNA をエレクトロポレーション法により HuH-7, Hdo 細胞に遺伝子導入し、培養上清に分泌された Luciferase 活性を測定することで HCV 複製能を検討した。

(2) iHdo 細胞の樹立

Hdo 細胞を成熟肝細胞に分化誘導する実験を試みた。誘導培地は、DMEM, 10%FBS, NEAA, 10⁻⁷M DEX, 10ng/mL OsM, 10ng/mL HGF, 10ng/mL FGF4, ITS supplement を用いた。誘導することにより得られた細胞の成熟肝細胞マーカーALB、肝芽細胞マーカーAFP、オーバル・胆管上皮細胞マーカーCK19, EpCAM の発現をリアルタイム PCR 法、ELISA 法およびイムノブロットにより調べた。誘導細胞の HCV 感染性および複製能は、HCVcc(J6/JFH1

株および JFH1 株)および HCV サブゲノムレプリコン RNA(JFH1 株および con1 株)の遺伝子導入により調べた。

(3) HCV 感染および複製に関与する新規因子の探索

樹立した細胞株における遺伝子発現を、マイクロアレイ(mRNA; ヒト 25k Ver 2.10, miRNA; Human miRNA V16.1.0.0, 東レ)による網羅的なトランスクリプトーム解析により調べた。HCV 複製能が欠損した Hdo 細胞で顕著に発現低下する遺伝子について、HCV サブゲノムレプリコン RNA を持続的に複製する細胞株(5-15)を用いて siRNA によるノックダウンを試みた。HCV 感染受容体として報告のある LDLR, CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN, NPC1L1, EGFR などの mRNA、タンパク質の発現をリアルタイム PCR、イムノブロット、FACS 解析、免疫染色法により調べた。また、一過的に CD81 を発現させた Hdo 細胞に HCVpv を感染させ、Luciferase 活性を測定することで、HCV 感染能の回復を検討した。

(4) Hdo 細胞の胆管上皮細胞への分化能

Hdo 細胞がオーバル細胞としての形質である、肝実質細胞および胆管上皮細胞への両方向性の分化能を有しているかを明らかにするために、胆管様細胞へと誘導を行った。胆管誘導培地を用いて、Cell culture insert 上で matrigel/コラーゲン I に包埋して長期培養を行った。得られた細胞の肝細胞分化マーカーの発現をリアルタイム PCR により調べた。また、CK19 および F-actin の免疫染色を行い、胆管構造にみられる極性の存在を検討した。

(5) Hdo 細胞の腫瘍原性の解析

これまでに消化器癌細胞などで iPS 化

することにより腫瘍原性が低下することが報告されている。そこで、Hdo 細胞の腫瘍原性の変化を調べた。癌関連の遺伝子の発現として、MYC, MYCN, AURKB, KLB, TP53, RB1, CDKN2A, CDKN1B などの発現をリアルタイム PCR 法により調べた。また、免疫不全マウスの背部に HuH-7, Hdo 細胞を移植し、腫瘍径の経時的変化と形成された腫瘍における AFP、p53、Ki67 の免疫染色を行い、その悪性度を調べた。

(6) 完全長 HCV RNA 濃縮法の開発

多検体の患者血清から全長 HCV RNA を簡便に分離するための方法の構築を行った。HCV ゲノム 3'NTR に存在する保存された領域に相補的な 9 種類のビオチン化プライマーを設計した。このビオチン化プライマーと HCV RNA をアニーリングし、非特異吸着を低減させたアビジンビーズによって精製を行った。HCV RNA としては JFH1 株、con1 株、患者 HCV 株(1b)を用い、ビオチン化プライマーの結合領域の検討、最適なプライマー量やビーズ量、アニーリングや RNA 解離のための溶液組成、温度などの条件検討を行った。

(倫理面への配慮) 肝炎患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝炎患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存した。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験

施設で取り扱われた。取り扱う DNA に関しては組換え DNA 実験計画を提出し承認を得、また一部の実験で第二種使用等拡散防止措置確認申請を文部科学大臣に申請し承認を得た上で実験を行った。なお、組換え HCV の作製は遺伝子組換え生物等の第二種使用等にあたるため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)の規定に従って申請を行い承認を得ている(大臣確認通知番号 平成 22 年 10 月 8 日付 22 受文科振第 1850 号)。

C. 研究結果

(1) Hdo 細胞の HCV 感受性の解析

HCVcc (J6/JFH1 株および JFH1 株) に暴露することにより Hdo 細胞の HCV 感染性を調べた結果、感染感受性が欠損していることを明らかにした。また、Gluc を発現する HCV サブゲノムレプリコン RNA (JFH1 株および con1 株) を遺伝子導入することにより、HCV 複製能も欠損していることを明らかにした。

(2) iHdo 細胞の樹立

Hdo 細胞を肝細胞へと分化誘導することにより、成熟肝細胞(induced Hdo; iHdo)を得た。iHdo 細胞では、成熟肝細胞マーカーである ALB の発現亢進、肝芽細胞マーカーである AFP の発現低下していた。iHdo 細胞の HCV 感染性および複製能を調べたところ、Hdo-23 細胞で HCV 複製能が回復することが明らかになった。しかしながら、Hdo 細胞の HCVcc の感染性は欠損したままであり、HCV 感染受容体の発現が十分でないことが示唆された。

(3) HCV 感染および複製に関与する新規因子の探索

樹立した細胞株(HuH-7, Hdo, iHdo)における遺伝子発現を、マイクロアレイにより解析した結果、既知の HCV 複製への関与する遺伝子の発現に有意な変動は認められなかった。このことから、HCV 複製に関与する新規の宿主遺伝子が存在することが示唆された。そこで、Hdo 細胞で発現が顕著に低下する遺伝子について、HCV サブゲノムレプリコン RNA を持続的に複製する細胞株(5-15)を用いて siRNA によるノックダウンを試みた結果、CES1, NUPR1, GADD45B, HERPUD1, ARHGAP8, KDELR3 のノックダウンにより HCV 複製が有意に低下した。このうち、GADD45B, HERPUD1, KDELR3 は HCV 複製能のある iHdo で発現が亢進していることが明らかになった。感染感受性については、これまで HCV 感染受容体として報告のある LDLR, SR-BI, CLDN1, OCLN, NPC1L1, EGFR などの mRNA、タンパク質の発現に変化はなかったが、CD81 の発現が顕著に低下していることが明らかになった。しかしながら、HCVpv の感染によって CD81 過剰発現 Hdo 細胞は HuH-7 と同程度にまで HCV 感染性が回復しなかったことから、他の要因もしくは新規の感染受容体の関与が示唆された。miRNA については、Hdo 細胞で HuH-7 と比べて miR-200b, -141, -145, -146a, -200c, -200a, -451, -146b, -1290, -711, -4294 の発現が亢進し、miR-152, -483, -1274a の発現が低下していた。iHdo-23 では、このうち miR-200b, -141, -146a, -200c, -200a, -451, -4294 が発現亢進することから、この中に HCV 複製もしくは感染に関与する新規の miRNA が存在していることが示唆された。

(4) Hdo 細胞の胆管上皮細胞への分化能

Hdo 細胞がオーバル細胞としての形質

である、肝実質細胞および胆管上皮細胞への両方向性の分化能を有しているかを明らかにするために、胆管様細胞へと誘導を行った。その結果、胆管上皮系マーカー遺伝子 EpCAM, CK19 mRNA の発現亢進とともに極性のある管腔様の構造を形成した細胞塊ができることが明らかになった。このことから、Hdo 細胞はオーバル細胞の特性を持つ細胞株であることを示すことができた。

(5) Hdo 細胞の腫瘍原性の解析

樹立した Hdo 細胞の腫瘍原性の変化を調べた。Hdo 細胞は増殖能が低下をしており、癌原遺伝子である Myc や KLB の発現の低下、癌抑制遺伝子の Rb の発現亢進がみられた。また、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能も HuH-7 と比べて低下するなど、悪性細胞としての性質が低下していることが明らかになった。悪性度の示す腫瘍マーカーである AFP の発現も低下しており、肝癌細胞をリプログラミング因子により低分化にすることで癌としての悪性度を緩和できることを明らかにした。

(6) 完全長 HCV RNA 濃縮法の開発

多検体の患者血清から全長 HCV RNA を簡便に分離するための方法を検討した。HCV ゲノム 3'NTR に存在する保存された領域に相補的なビオチン化プライマーのうち 2 種類を組み合わせることで効果的に HCV RNA を単離精製できることが分かった。また、アリーニングの塩濃度および解離するための EDTA 濃度および温度を決定した。最終的により 1b および 2a クローンで完全長 HCV RNA を特異的に捕捉できる系を構築した。

D. 考察

ウイルス研究におけるウイルス増殖細胞系は、ウイルスの生活環、病原性の解明だけでなく抗ウイルス薬のスクリーニングにおいて非常に重要となる。これまで国内外で多くの試みがなされ、細胞内で自律的に HCV ゲノムが複製増殖できる HCV レプリコンシステム (Lohmann V et al., Science 1999;285;110-113) や感染性 HCV 粒子を持続的に産生する感染細胞系 (Wakita T et al., Nat Med 2005;11;791-796) が開発され、HCV に関する研究は大きく進展した。しかしながら、患者由来の HCV 株を効率よく感染増殖できる細胞株はこれまで樹立されていない。

本研究において、ヒト肝細胞癌株をエピジェネティックにリプログラムすることで C 型肝炎ウイルス感受性や腫瘍原性が変化することを明らかにした。このことは、慢性 C 型肝炎感染患者の治療において、エピジェネティックな変化を誘導することにより C 型肝炎ウイルスの排除もしくは肝癌への進行を遅らせることできることを示唆する。また、成熟肝細胞への分化の過程で獲得する HCV 生活環に必須な因子は新たな創薬のターゲットとなりうる。一方、完全長の患者 HCV 株を単離する手法の樹立は、今後の患者 HCV 株の病原性解析のための有用な方法として活用できる。

本研究課題によって、変異ウイルスを生じさせないような宿主因子をターゲットとした効果的な薬剤の開発、個々の HCV クローンに対して適切な薬剤の選択が可能となることが期待される。

E. 結論

C 型肝炎ウイルスに関する研究は、これまで限られたヒト肝癌細胞株と HCV

株の組み合わせにより行われてきた。しかしながら、HCV の病原性発現の分子機構を解析するためには、本来の肝細胞機能を有する正常ヒト肝細胞に様々な患者由来 HCV 株が感染増殖することのできるモデルが必要である。

平成 23 年度では、慢性 C 型肝炎感染患者由来の HCV 株を高効率に分離培養できる正常肝細胞株を得るために、肝幹細胞からの分化誘導の条件を検討した。また、肝癌由来細胞株 Huh7 から iPSC 細胞誘導により低分化細胞株を樹立した。平成 24 年度においては、HCV 感染および複製に関与する新規因子の同定、慢性 C 型肝炎感染患者由来の多種の HCV 株の病原性発現機構の解明のための基盤を構築した。これにより HCV 感染に伴う肝発癌、代謝異常などの病原性発現機構、また持続感染の成立に関与する分子機構の解明や治療のための薬剤の選択など多岐にわたる応用が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T, Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication, 第 19 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議 (HCV2012)、2012 年 10 月、イタリア・ヴェネツィア、ポスター発表
- 2) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T,

Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV、
The 10th JSH Single Topic Conference
Hepatitis C、2012年11月、東京、ポスター発表

- 3) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、
脇田隆字、鈴木哲朗、HuH-7由来オーバル様細胞におけるHCV感受性の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪市、口頭発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙4

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

