

HCVワクチン用粒子作製を目的としたHCV複製可能細胞の探索

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 村山 麻子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：JFH-1株の発見により、培養細胞中でHCV粒子の合成が可能になり、この合成ウイルス粒子を用いた感染予防ワクチンの開発が期待されている。ウイルス粒子を用いてワクチンを作製するためにはワクチン製造に適した細胞を用いてウイルス粒子を作製する必要がある。ワクチン製造細胞として過去に実績のある細胞や非がん細胞を用いてHCV粒子産生能を解析し、その中でHuH-7細胞以外にHEK293細胞においてHCVの作製が可能であることを示した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は世界中に多くの感染者が存在し、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより、輸血後のC型慢性肝炎発症者は減少しているが、医療従事者などのハイリスク群では現在でも新規感染者が存在する。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているが、その治療効果は十分ではない。HCV感染による肝疾患を減少させるためには新規感染者をなくすことが重要であり、感染予防ワクチンの開発が必要とされている。

2005年にJFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、感染性HCV粒子を培養細胞で作製できるようになった。この培養細胞中で作製されたHCV粒子は、患者血清中のウイルス粒子とほぼ同様の形態であることが電子顕微鏡で確認されており、不活化することによりHCVワクチ

ンとして使用できると考えられる。しかし、このHCV粒子をワクチンとして使用するためには、大量のウイルス粒子が必要であり、現行のHuH-7細胞を用いた感染増殖系では限界があるため、より効率の良いウイルス産生系が必要である。また、ワクチン用のウイルス粒子産生において、過去にワクチン製造細胞として実績のある細胞が利用できれば、ワクチンとしてより承認されやすくなることが考えられる。

本研究では、HuH-7細胞以外の細胞を用いたウイルス粒子産生系について検討した。

B. 研究方法

1. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞に全長HCV RNAを導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量をELISAで測定した。

2. HCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量の比較

HCVライフサイクルの各ステップ、すなわち、侵入、複製、粒子形成、分泌に関わることが報告されている宿主因子について、それぞれに特異的なprimer、probeを用いて、宿主因子の発現量を測定した。細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写して得たcDNAを各wellに入れ、Taqman Gene Expression Assayを行った。それぞれの宿主因子の発現量は内部標準（18SまたはHPRT1）の何倍かで比較した。

3. 宿主因子発現レンチウイルスベクターの作製

miR-122、ApoE、Claudin-1それぞれのORFを組み込んだpLVSINベクターを作製し、293T細胞でpackagingさせ、1回感染型レンチウイルスを作製した。ウイルス力価はEGFPを発現するウイルスを用いてflow cytometryおよび、qRT-PCRにより決定した。

4. レンチウイルスを用いたmiR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞の作製とHCV複製の検討

上記で作製したレンチウイルスをそれぞれmoi=1でpolybrene存在下でVero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞に単独、もしくは重複感染させた。各細胞は2週間培養後、各遺伝子の発現量を測定した。それぞれの細胞でのmiR-122の発現量を、Taqman microRNA assayにより、ApoE、Claudin-1の発現量をTaqman Gene Expression Assayにより測定した。

5. miR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞でのHCV複製の検討

miR-122、ApoE、Claudin-1を発現する細胞細胞にHCVの全長RNAをトランスフェクションし、細胞内、培養上清のコア抗原量を解析した。培養上清の感染性を調べるために、回収した培地をAmicon Ultra-15 filter unitsを用いて40倍に濃縮し、Huh-7.5.1細胞を用いて感染性を測定した。

6. 各細胞におけるHCV RNAおよびpoly ICの導入によるISG誘導能の検討

それぞれの細胞にHCV RNAまたはpoly ICをDMRIE-C Reagentを用いて導入した。24時間後に細胞を回収し、RNeasy Mini Kitを用いてtotal RNAを回収した。MXA、25OASの発現量は特異的なprimer、probeを用いてTaqman Gene Expression Assayにより測定した。

7. B18RによるHCV複製への影響の解析

Huh-7.5.1細胞、Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞にHCV RNAを導入し、4時間後にB18Rを添加し、培養した。RNA導入3日後の細胞内コア抗原量を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換えDNAを用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認されている。

C. 研究結果

1. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、HuGK-14細胞、MRC-5細胞、Vero細胞、MDCK細胞、CHO細胞、非がん細胞としてHEK293細胞を検討した。それぞれの細胞に全長HCV RNAを導入し、HCVのゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、いずれの細胞でもHCVのゲノム複製、ウイルス産生は観察されなかった。

2. HCVライフサイクルに重要な宿主因子発現量の細胞間での比較

それぞれの細胞でHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を測定した。HCV複製に重要なmiR-122はHuGK-14細胞ではHuh-7.5.1細胞と同レベルの発現が見られたが、その他の細胞ではいずれもほとんど発現していなかった。さらに、HuGK-14細胞では複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoE、cPLA2の発現量がHuh-7.5.1と比べて低かった。MRC-5細胞ではEntryに関わるClaudin-1、複製に関わるCKB、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。HEK293細胞では、Entryに関わるClaudin-1、粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。

3. レンチウイルスベクターによる宿主因子の強制発現の検討

HCV複製、ウイルス産生に必要な宿主因子を細胞で効率よく高発現させるために、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。作製したmiR-122を発現させるレンチウイルスを

用いてmoi=1でそれぞれの細胞に感染させたところ、いずれの細胞でもHuh-7.5.1細胞と同程度のmiR-122の発現量が得られた。

4. miR-122を強制発現させた細胞におけるHCV複製の検討

レンチウイルスによりmiR-122を強制発現させたHEK293細胞に、HCV RNAをトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は時間経過とともに上昇することからmiR-122を強制発現させたHEK293細胞ではHCV複製は可能であった。しかし、複製効率はHuh-7.5.1細胞の1/100程度であった。また、miR-122を強制発現させたVero細胞では、時間経過とともにわずかながら細胞内コア抗原量の上昇が認められた。しかし、その他の細胞では、miR-122を強制発現させても、HCV複製は認められなかった。

5. miR-122、ApoE、Claudin-1を同時に発現するHEK293細胞でのHCV複製およびウイルス産生の検討

レンチウイルスにより、miR-122、ApoE、Claudin-1を同時に発現するHEK293細胞を作製した。得られた6細胞株のうち、miR-122、ApoE、Claudin-1の発現量がすべてHuh-7.5.1細胞と同等もしくはそれ以上の細胞株を選択し、HCV RNAを導入した。その結果、細胞内コア抗原量はHuh-7.5.1細胞の約1/5程度であったが、培養上清中のコア抗原量は約1/1000程度と低値であった。この培養上清を濃縮すると、感染性が観察された。

6. HEK293細胞、MRC-5細胞、Vero細胞、Huh-7.5.1細胞におけるISG誘導能の検討

それぞれの細胞にHCV RNAまたはpoly ICを導入し、細胞内のISGの発現量を測定した結果、Huh-7.5.1細胞では、poly IC導入細胞ではISGの誘導が見られたが、HCV RNA導入細胞ではどちらの誘導も見られなかった。それに対して、HEK293細胞、MRC-5細胞、Vero細胞ではpoly ICまたはHCV RNAいずれを導入した場合にも15倍から1万倍の高いISG誘導能を示した。

7. B18RによるHCV複製への影響の解析

Huh-7.5.1細胞、Vero細胞、MRC-5細胞、CHO細胞、MDCK細胞、HEK293細胞にHCV RNAを導入し、4時間後にB18Rを添加し、培養した。RNA導入3日後に細胞内コア抗原量を比較したが、いずれの細胞でもB18R添加によるHCV複製増強は見られなかった。

D. 考察

HuH-7細胞以外の培養細胞を用いてワクチン用粒子産生系の検討を行ったが、ワクチン製造の実績のあるHuGK-14細胞、MRC-5細胞、HEK293細胞ではHCVの増殖は認めなかった。それぞれの細胞においてHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現をHuh-7.5.1細胞と比較し、それぞれの細胞において発現量の低い宿主因子を明らかにした。その結果、miR-122は肝臓由来のHuGK-14細胞以外の細胞ではほとんど発現していないことが判明した。粒子形成に関わるApoE、Entryに関わるClaudin-1はいずれの細胞でも共通して発現が低く、それ以外にもHuGK-

14細胞では複製に関わるCKBと粒子形成に関わるcPLA2、MRC-5細胞では複製に関わるCKBが低かった。

HEK293細胞ではそのままではHCVの増殖は認めなかったが、HEK293細胞にmiR-122を発現させた細胞では、HCV複製がみられ、さらにClaudin-1とApoEを発現させた細胞では、感染性のウイルス産生がみられた。miR-122、ApoEは肝細胞に特異的に高発現していることから、これらの因子はHuH-7以外の細胞でHCVを複製させるのに必要であると考えられた。しかし、HEK293細胞ではmiR-122、Claudin-1、ApoEを発現させても、Huh-7.5.1細胞と比較してHCV RNAトランスフェクション後の培養上清中のコア抗原量は低く、感染性も低かった。これは、HEK293細胞では複製だけでなく、ウイルス粒子形成、分泌のステップに関わる宿主因子で発現量の足りないものがあることを示しており、他の宿主因子の検討が必要と考えられる。さらに、HEK293細胞ではHuh-7.5.1細胞と異なりHCV RNAの導入によってISGが誘導されることから、何らかの方法で自然免疫系を阻害することにより、HCV複製が増強する可能性がある。

Vero細胞もそのままではHCVの増殖は認めなかったが、miR-122を発現させた細胞では、わずかながら細胞内コア抗原量の増加がみられたことから、さらに他の宿主因子を補うことによりHCV複製、ウイルス産生ができるようになる可能性がある。さらに、Vero細胞もHCV RNAの導入によってISGの誘導がみられることから、自然免疫系を阻害することによりHCV複製が増強する可能性が考えられる。

来年度は、肝臓由来のcDNAライブラリーを

用いてHuH-7細胞以外の細胞でHCV粒子を産生させるために必要な宿主因子の網羅的解析および同定を試みる予定である。また、HCV増殖にマイナスとなる自然免疫系などの因子を阻害することにより、HCV複製を増強させることができるかについても引き続き検討を行う。

E. 結論

非がん細胞であるHEK293細胞ではレンチウイルスベクターを用いてmiR-122を発現させるとHCV複製が見られ、さらにClaudin-1とApoEを強制発現させることにより、感染性のウイルス産生がみられた。

F. 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, Shimosegawa T. 1(OH) vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. PLoS One. 2013 May 23;8(5):e63672.
- 2) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. J Virol. 2013 May;87(10):6031-6.

3) Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 19;437(1):127-33.

4) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. Gastroenterology. 2013 Aug;145(2):447-55.e1-4.

5) 村山麻子、加藤孝宣. NS5B-RNAポリメラーゼの構造と機能. 肝胆膵, 67(6), 918-923, 2013.

2 . 学会発表

- 1) 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、朝比奈靖浩、坂本直哉. HCV Core領域アミノ酸70/91変異株を用いた反応機序の解析. 第49回日本肝臓学会総会、2013年6月6-7日、東京.
- 2) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1 variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10,

2013. Melbourne, Australia.

3) Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

4) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.

5) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

6) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Takuya Matsumura, Masaaki Shiina, Shinichi Asabe, Takaji Wakita, Michio Imawari. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases,

November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

7) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Chiaki Okuse, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

8) Tasaka-Fujita M, Nao Sugiyama N, Wonseok Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

9) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells by downregulation of claudin-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

10) Kondo Y, Iwata T, Morosawa T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Kato T, Shimosegawa T. 1(OH)Vit D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-

response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C (CH-C) and CH-C with severe fibrosis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

11) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kogure T, Kato T, Nakayama K, SHimosegawa T. Lymphotropic HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune and cryoglobuline-related diseases. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

12) Imamura H, Yamada N, Yotsuyanagi H, Kawasaki S, Takayama T, Yamamoto M, Kokudo N, Kato T, Tanaka S, Arii S. Moderately causative role of occult hepatitis B virus infection (occult HBV) in the development of non-hepatitis B virus (HBV) infection, non-hepatitis C virus (HCV) infection (NBNC) hepatocellular carcinoma (HCC). 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

13) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. HCV NS5Aキメラウイルスを用いた第二世代 NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第61回日

本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

14) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. ISDRアミノ酸変異がC型肝炎ウイルスの増殖に与える影響の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

15) 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCVワクチンの有効性の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

16) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸.

17) 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. アカゲザルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの抗体誘導能と安全性の検討. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸.

G.知的所有権の出願・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