

C. 研究結果

これまでにオルガノイドを樹立し、長期培養可能となったヒト腸管（小腸，大腸）上皮培養オルガノイドを用いて検討を行った。

培養に用いるマトリゲルはウイルス粒子の核酸を阻害するため，マトリゲルを酵素処理により除去する必要があった。また，トリプシン処理によって上皮細胞を単細胞化することにより，ウイルス感染効率の改善が確認された。培養ヒト腸管上皮細胞はこのような処置に対して細胞死が誘導されるため，培養培地を最適化を行い，感染細胞の長期培養に成功した。

同様の方法により，GFP 発現アデノウイルス・レトロウイルスの感染も確認し，ウイルス感染プロトコルを確立した。

ノロウイルス感染研究の確立するため，患者由来ヒト腸管上皮オルガノイドを他施設へ提供できるよう，慶應義塾大学医学部において倫理研究計画を申請し，承認を得た（承認番号：20140292）。また，培養技術，最適化されたウイルス感染プロトコルを実際に他施設の本研究事業研究分担者に直接指導を行った。他施設での倫理申請が承認を得て受け入れ基盤が整い次第，オルガノイドの提供を行い，感染系確立に向けた研究をすすめていく。継続的に，培養技術，ウイルス感染プロトコルに関する指導および，培養に必須となる培地成分の提供を行っていく。

D. 考察

ヒト腸管上皮オルガノイドは細胞株と異なり，一般的なウイルス感染処置に対して培養技術の最適化が必要であったが，異なる3種類のウイルスにおいて効率のよい感染が確認できている。今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される。

E. 結論

ヒト腸管上皮オルガノイドのウイルス感染系の基盤技術が開発され，実験可能施設への提供準備は整った。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. in press: doi: 10.1038/nm.3802 (2015)
- 2) Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGF β Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer. *Cancer Res* 75: 766-76 (2015)
- 3) Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. *Integr Biol (Camb)* 7: 213-28 (2015)
- 4) Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5: 5728 (2014)
- 5) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res* 74: 2882-91 (2014)
- 6) Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1820-7 (2014)

- 7) Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR γ t⁺ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1426-34 (2014)
- 8) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* 9: e84619 (2014)
- 9) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther* 15: 81-8 (2014).
- 10) Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet* 5:169 (2014)
- 11) Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)* 1: 14 (2014)
- 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.

ウシロタウイルスの発生動向と遺伝学的特性

分担研究者 鈴木 亨 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域

研究要旨 培養細胞における実験感染系が確立されていないために、本ウイルスの性状や生態がほとんど理解されていないロタウイルス B、特に動物由来ロタウイルス B について、それらの遺伝学的性状を明らかにし、診断予防法の開発に役立つ有益な情報を得る。これまでにウシならびにブタロタウイルス B 複数株を用いた遺伝子解析の結果、動物由来ロタウイルス B は国内外問わず、異なる遺伝的背景を有する複数の株が世界中に存在・まん延していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ロタウイルスは幼若動物や乳幼児における重症下痢症の主要原因の一つであり、新興感染症病原体である。また、ロタウイルスは人獣共通感染症病原体でもあり、現在までに 8 種 (A-H) の存在が報告されているが、中でもロタウイルス A-C はヒト以外に、ウシ、ブタ等の動物からもウイルスが検出されることから、公衆衛生上注目されている。また最近では、ヒト由来ロタウイルスと動物由来ロタウイルスの間で遺伝子再集合が起こる事実も確認されている。

ロタウイルス B はウシ、ブタなどの動物では以前から広く浸潤しているが、ヒトではまだ中国、インドなどの東南アジア諸国での散発発生に留まっており、わが国での発生報告はない。しかし依然として、東南アジア諸国におけるロタウイルス B 症の発生事例が続いていることやわが国における動物ロタウイルス B 症の発生事例が増大していることから、本ウイルスに対する診断予防法を開発することは緊急性の高い課題である。これまでのところ、本ウイルスは培養細胞感染系での分離が極めて困難であるため、それらの性状解析すらほとんど進展しておらず、まだ多くの課題が残されている。

これまでに、2001 年から 2009 年にかけてわ

が国で検出されたブタロタウイルス B 複数株について、それらの遺伝子解析を実施した結果、異なる遺伝子背景を有する複数の株が全国に点在・伝播していることを明らかにしてきた。そこで、本年度はブタロタウイルスとほぼ同時期に、採集されたウシロタウイルス B 複数株について、それらの遺伝子解析を実施し、わが国におけるウシロタウイルス B の発生動向ならびに遺伝子性状を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

2002 年から 2011 年にかけて山形県内で検出されたウシロタウイルス B 12 株を材料に使用した。それら複数株の VP1, VP2, VP6, VP7, NSP1, NSP2 および NSP5 の 8 つの遺伝子について、独自に設計したプライマーを用いて RT-PCR 法でもって ORF 全長を増幅し、シーケンス解析を実施した。今回解読したウシロタウイルス B 12 株の各種遺伝子情報に既知の他動物種由来ロタウイルス B の遺伝子情報を加えた上で、系統樹解析を実施し、本ウイルスの起源並びに生態を明らかにすることを試みた。

C. 研究結果

ウシロタウイルス B 12 株の各遺伝子の配列

を既知のヒトやブタ、さらにウシロタウイルス B 株と比較した結果、それぞれの遺伝子において、ウシロタウイルス B 株はヒトやブタロタウイルス B 株と遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。また、インドで検出されたウシロタウイルス B 株との比較では、今回解読した全ての遺伝子において、ORF の長さは同じであったが、配列が異なることが明らかとなった。

ロタウイルス B の VP7 遺伝子に関する系統樹解析の結果、山形県内で検出されたウシロタウイルス B 株は過去に北海道、さらに米国で検出されたウシロタウイルス B 株と同じ遺伝子型に分類されたが、インドで検出されたウシロタウイルス B 株とは異なる遺伝子型に分類された

(表 1)。また、ロタウイルス B の NSP1, NSP2 および NSP5 遺伝子に関する系統樹解析では、いずれの遺伝子において、山形県内で検出されたウシロタウイルス B 株はインドで検出されたウシロタウイルス B 株とは区別される新たな遺伝子型に分類された。さらに、VP1, VP2, VP6 遺伝子に関する系統樹解析において、ウシロタウイルス B 株は系統発生学的にヒトやブタロタウイルス B 株とは明確に区別された。

D. 考察

今回の研究を通じて、1990 年代に北海道で検出されたウシロタウイルス B Nemuro 株について、新たにウシロタウイルス B 12 株の複数の遺伝子に関する塩基配列が明らかとなった。遺伝子解析の結果、わが国で流行しているウシロタウイルス B 株は Nemuro 株と遺伝学的に近縁な株が全国に存在・伝播していることが示唆された。

系統樹解析の結果、わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は米国で検出されたウシロタウイルス B 株と共通の起源に由来することが示唆されたが、インドで検出された株とは早い段階で分岐し、それぞれがこれまでに交わることなく独自に進化を遂げてきた可能性が示唆された。今後、東南アジア諸国や世界中に拡散しているウシロタウイルス B、あるいは他動物種由来のロタウイルス B 株を収集し、それらの遺伝子解析を実施することで、ウシロタウイルス B

を含めたロタウイルス B の生態ならびに起源が明らかになってくることと思われる。

最後に、ここで得られた知見は遺伝子再集合や種間伝播によって生じる新たな変異ウイルスの監視体制の強化、さらには分子基盤に基づく新たな診断予防法の開発につながるが大いに期待できる。

E. 結論

少なくともわが国で検出されたウシロタウイルス B 株は、インドで検出されたウシロタウイルス B 株と遺伝的に異なる起源に由来することが明らかとなった。

F. 研究発表 論文発表

1. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus Res.* 197: 26-34 (2014).
2. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. *Microbiol. Immunol.* 58: 530-535, (2014).
3. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 26: 223-227, (2014).
4. Marthaler D, Suzuki T, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnssens J. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172: 359-366, (2014).

5. Mawatari T, Hirano K, Tsunemitsu H, Suzuki T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan 2003-2010. J. Gen. Virol. 95: 1117-1125, (2014).

ルスの遺伝的多様性. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014. 11.

学会発表

1. Suzuki T. Whole-genome characterization of animal rotavirus C. IUMS2014, Motreal, Canada, Jul 2014.
2. 鈴木 亨、馬渡隆寛、平野かおり、宮崎綾子、恒光 裕. 国内におけるウシロタウイ

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。

表1. ウシロタウイルスB 遺伝子解析のまとめ

Gene	Cut-off value [%]	Total of Genotypes	Genotypes of bovine RVBs	Genotypes of porcine RVBs
VP7	80	20	2 (G3, G5)	16 (G4, G6-20)
VP6	81	13	1 (I3)	10 (I4-13)
NSP1 ORF1,2	77, 75	8	2 (A4, A8)	3 (A5-7)
NSP2	83	9	2 (N3, N9)	5 (N4-8)
NSP5	81	10	2 (H3, H10)	5 (H5-9)
VP1	70	3	1 (R3)	-
VP2	74	3	1 (C3)	-

高感度ウイルス検出技術の開発

メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染侵入機構

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究協力者 朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所 教授

研究要旨 現行のウイルス抗原検査法より、高感度でかつ迅速性を保持した診断技術の開発を目指す。局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム／量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出していることを明らかにした。

一方、メルケル細胞ポリオーマウイルス MCPyV の感染機構の解析を行い、psudovirion を利用した感染モデル系から、ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

A. 研究目的

多くのウイルス感染症について、ウイルス抗原を検査する診断法が開発され実用化されているが、より高感度かつ迅速な診断技術の開発が求められている場合も少なくない。例えば、インフルエンザの診断ではイムノクロマト法による検査キットが開発され広く使われているが、検出感度の低さから、感染したウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。本研究では、局所表面プラズモン共鳴反応を利用して、現行より早期診断が可能な高感度ウイルス検査法の開発を行った。

ヒトポリオーマウイルス BKPvV, JCPyV, MCPyV（メルケル細胞ポリオーマウイルス）と糖脂質糖鎖との結合解析また同ウイルスの psudovirion を利用して感染細胞モデルを作製しガングリオシド依存的な感染様式を見出してきた。本年度は、さらに解析を進め、MCPyV の感染侵入に重要なガングリオシド分子の同定を目指した。

B. 研究方法

金フィルムと量子ドットからなるインフルエンザウイルス検出系は以下のように作製した。表面を凹凸加工した金ナノプラスフィルム（NPGL）をシステアミン処理しアミノ基修飾した。同様に量子ドット（QD）表面にアミノ基修飾を施した。抗インフルエンザウイルス HA 抗体を *N*-Hydroxysuccinimide（NHS）/*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide（EDC）処理した後、上記 NPGL、QD にそれぞれコンジュゲートした。蛍光測定用 96 ウェルプレート各ウェルに抗 HA 抗体-NPGL を入れ、種々の濃度のインフルエンザウイルス液を添加。さらに抗 HA 抗体-QD を添加し反応させ、励起 380 nm、発光 518 nm 波長で蛍光強度を測定した。インフルエンザ検体としては、A/Yokohama/110/2009（H3N2）株を用いた。

MCPyV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。ポリオーマウイルスのカプシドをもつ psudovirion は以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち

分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。

C. 研究結果

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

本検出系では、NPGL-ウイルス-QD 複合体が形成されると、複合体局所で表面プラズモン共鳴が生じることによって発光した蛍光が増強されることが想定される。NPGL 含各ウェルへ 1-1000 PFU/mL の種々の濃度のインフルエンザウイルス H3N2 を添加し、さらに QD を反応させた。各ウェルの蛍光強度を測定したところ 5, 10, 50, 100, 500, 1000 PFU/mL でウイルス濃度-蛍光強度の相関 (直線性) が認められた。このウイルス濃度レンジで定量測定可能と考えられる。次に、一般医院で診断に用いられているイムノクロマトグラフィ (ImmunoAce Flu; TAUNS Lab Inc) との感度比較を同ウイルス検体について行った。その結果、イムノクロマト法では 5000 PFU/mL 以上で検出が可能であった。本開発技術はイムノクロマト法に比べ 100 倍程度高感度であると結論づけた。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV-LP と糖脂質糖鎖との結合解析の結果から、GD3 と GM3 が MCPyV と高い親和性を示すことをこれまでに見出している。これらのガングリオシドまた MCPyV 感染に関与すると文献的に知られている GT1b について psudovirion 感染系で MCPyV の感染感受性に寄与するかを調べた。まず、GM95 (マウス由来ガングリオシド合成酵素欠損) へ GM1, GM3, GD3, GT1b を添加し 1 日後に SV40 の psudovirion を接種し、GM1 点かの場合のみ感染が成立することをレポータールシフェラーゼアッセイで確認した。次に、同様の解析を MCPyV psudovirion で行った。その結果、

GD3 添加が最も高レポーター活性を示し、次に GM3、さらに GT1b であった。GM1 添加では全くレポーター活性が検出されなかった。GD3 が MVPyV の細胞への感染侵入に最も重要な役割を果たしうることが示された。

D. 考察

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

ウイルス感染症の早期かつ正確な診断・検出技術の開発は依然として重要な課題である。代表的な迅速診断系であるイムノクロマト法はインフルエンザ診断などで汎用されている。しかしながら、感度に難があり、インフルエンザでは感染後ウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。発症 48 時間以内の抗インフルエンザ薬投与が望まれることから、現行より早期診断が可能な検査法の開発、実用化が期待されている。本研究では、局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、マルチウェルプレートで必要試薬と検体を混和し、洗浄操作なく 10 分程度で測定が可能であることを示した。さらに、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルスを検出しうることを明らかにした。種々の臨床検体を用いた解析により本開発技術の有用性を評価する予定である。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV の細胞への感染侵入に、ガングリオシド GD3

(NeuAc α (2-8)NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide) が重要な役割を担っている可能性が示された。これまでに行った VLP と糖脂質との *in vitro* 結合解析では、GD3 とともに GM3

(NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide) も高い親和性を示した。MCPyV と糖鎖との結合にはラクトースにシアル酸が一個結合した構造で十分であるが、細胞への侵入にはさらにシアル酸が結合した構造が有効であることが示された。GD3 は、脳細胞分化に関与しており、神経外胚

葉性細胞や上皮性癌細胞では高発現を示すのに対し、分化度の高い成熟神経細胞では低発現であることが知られている。GD3 の生理的役割と MCPyV の感染様式が関連するか今後明らかにしたい。

E. 結論

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム／量子ドットを用いたインフルエンザウイルス高感度検出系を開発した。

ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たす可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. *J Virol*. 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol*.

89: 2220-2232, 2015.

3. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 95: 2658-2667, 2014.
4. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 207: 38-44, 2014.
5. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. *Biosens Bioelectron*. 58:33-39, 2014.

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。

ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

分担研究者 柗元 巖 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター第一室室長
研究協力者 石井 克幸 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官

研究要旨：

臨床検体を用いてヒトパピローマウイルス（HPV）のゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とした。これまでに、一部の子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）の擦過細胞検体において、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に C to T の置換変異が蓄積している現象（hypermutation）を見出した。また HPV16 ゲノムを維持する CIN 由来のヒト培養細胞において APOBEC タンパク質を強制的に発現させると、同様の hypermutation が HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に導入された。APOBEC タンパク質が HPV ゲノムに hypermutation を導入し、HPV ゲノムの細胞 DNA への組込みを容易にすることで、子宮頸部発癌に関わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染は子宮頸癌発症の原因であり、子宮頸部基底細胞での HPV 癌タンパク質 E6 および E7 の持続的な発現が、異常増殖細胞を生み出すことが示されている。一方で、E6/E7 の恒常的な発現のみでは、悪性形質を獲得した癌細胞の発生には至らず、通常 10 年以上に及ぶ持続感染の間に、宿主細胞ゲノムに変異や染色体異常が蓄積することで、浸潤癌の発生につながると考えられている。

近年、様々な臓器の癌ゲノムが解読されることで、発癌過程における宿主ゲノム変異の包括的な解析が進展した結果、子宮頸癌の発症にホストの抗ウイルス因子である APOBEC3B タンパク質の関与が想定されている。APOBEC3 タンパク質群による変異導入は、細胞ゲノムのみならず HPV ゲノムにも検出されることが報告されているが、その子宮頸癌発症との関連は明らかに

されていない。

本研究は、子宮頸部臨床検体を用いて HPV ゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

HPV16 陽性の子宮頸部上皮内腫瘍（cervical intraepithelial neoplasia: CIN）の擦過細胞から DNA を抽出して、Differential DNA Denaturation PCR (3D-PCR) 法により、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内の A/T-rich hypermutation について検討した。臨床検体は、NTT 東日本関東病院・産婦人科の近藤一成先生より供与を受けた。3D-PCR 増幅産物をプラスミドにクローニングして、その配列を解読した。また、CIN 由来の W12 細胞を用いて、APOBEC3 タンパク質による HPV16 ゲノムへの変異導入の可能性についても、3D-PCR 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体の利用にあたっては、関連機関の倫理審査委員会の承認を得て、提供者本人から書面での同意書を得た上で行った。

C. 研究結果

軽度病変 (CIN1) 11 例および高度病変 (CIN3) 27 例を解析した結果、E2 領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%)、CIN3 で 6 例 (22%) 検出された (図 1)。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコーディング鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった (図 2)。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C to T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていた。

W12 細胞をインターフェロン β で処理すると、幾つかの APOBEC3 タンパク質 (APOBEC3A, 3F, 3G) の mRNA 発現が誘導され、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内に C to T hypermutation が検出された。この現象は、APOBEC3G に対する siRNA の導入によりブロックされた。また W12 細胞に APOBEC3A, 3G を強制発現すると、同様の hypermutation が検出された。

D. 考察

臨床検体で検出された C to T hypermutation の標的配列から、APOBEC3 タンパク質の関与が強く示唆された。特に近年、子宮頸癌でのゲノム変異蓄積における APOBEC3B の役割が提唱されており、APOBEC3B が HPV ゲノムにも作用して hypermutation を導入する可能性が考えられた。

臨床検体での HPV ゲノムの hypermutation は、著しく低い割合 (HPV ゲノム全体の 0.5%以下) でしか検出されなかったことから、ウイルス増殖や維持に及ぼす影響は小さいことが予想された。

一方で、hypermutation が検出された E2 遺伝子は、子宮頸癌において細胞ゲノムへの組み込みにより、しばしば欠失していることが知られて

いる。APOBEC3 タンパク質による C to T 置換変異は、細胞の DNA 修復系により切断処理されることが示されており、E2 遺伝子内での DNA 二本鎖切断が細胞ゲノムへの組み込みを容易にして、子宮頸癌の発生に関わる可能性が考えられた。

E. 結論

子宮頸部の HPV 感染病変において、APOBEC3 タンパク質が HPV ゲノムに変異を導入することで、子宮頸部発癌に関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
2. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. *J. Virol.* 89: 2448-2452 (2015)
3. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44: 910-917 (2014)

4. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. *J. Virol.* 88: 1308-1317 (2014)

学会発表

1. 森 清一郎、柗元 巖
ヒトパピローマウイルス16型のがん蛋白質 E6/E7によるAPOBEC3Bプロモーターの活性化
第73回日本癌学会学会学術総会
2014年9月、横浜
2. 柗元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名 敬
日本人女性のCIN2/3および子宮頸部浸潤癌でのHPV遺伝子型分布
第73回日本癌学会学会学術総会
2014年9月、横浜
3. 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柗元 巖
ヒトパピローマウイルス16型E6/E7による APOBEC3Bプロモーターの活性化機構
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月、横浜
4. 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柗元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道
APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染性を低下させる
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月、横浜
5. 増田 雄司、柗元 巖、益谷 央豪

Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex

第37回日本分子生物学会年会
2014年11月、横浜

6. Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I.
Weel binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
7. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T.
Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology.
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル

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。

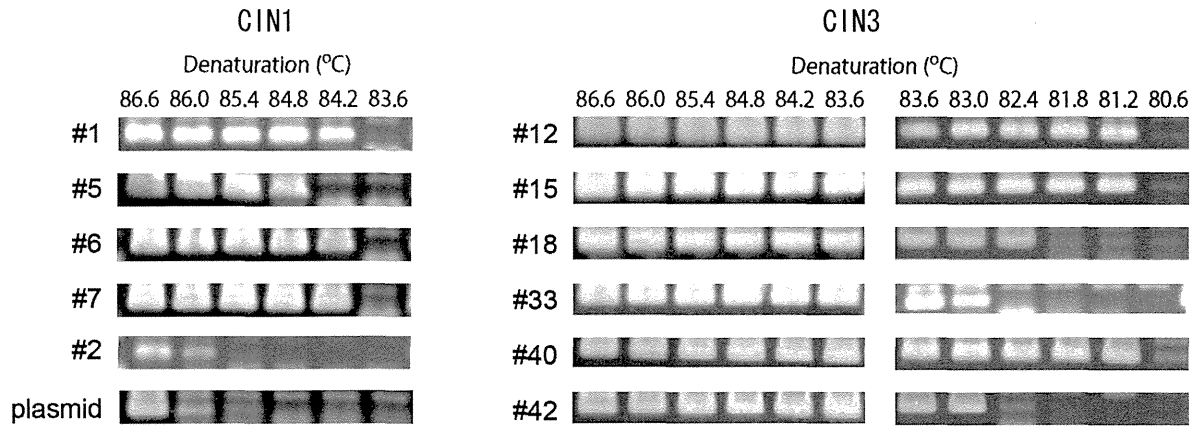


図1 3D-PCRによるE2 DNAの増幅

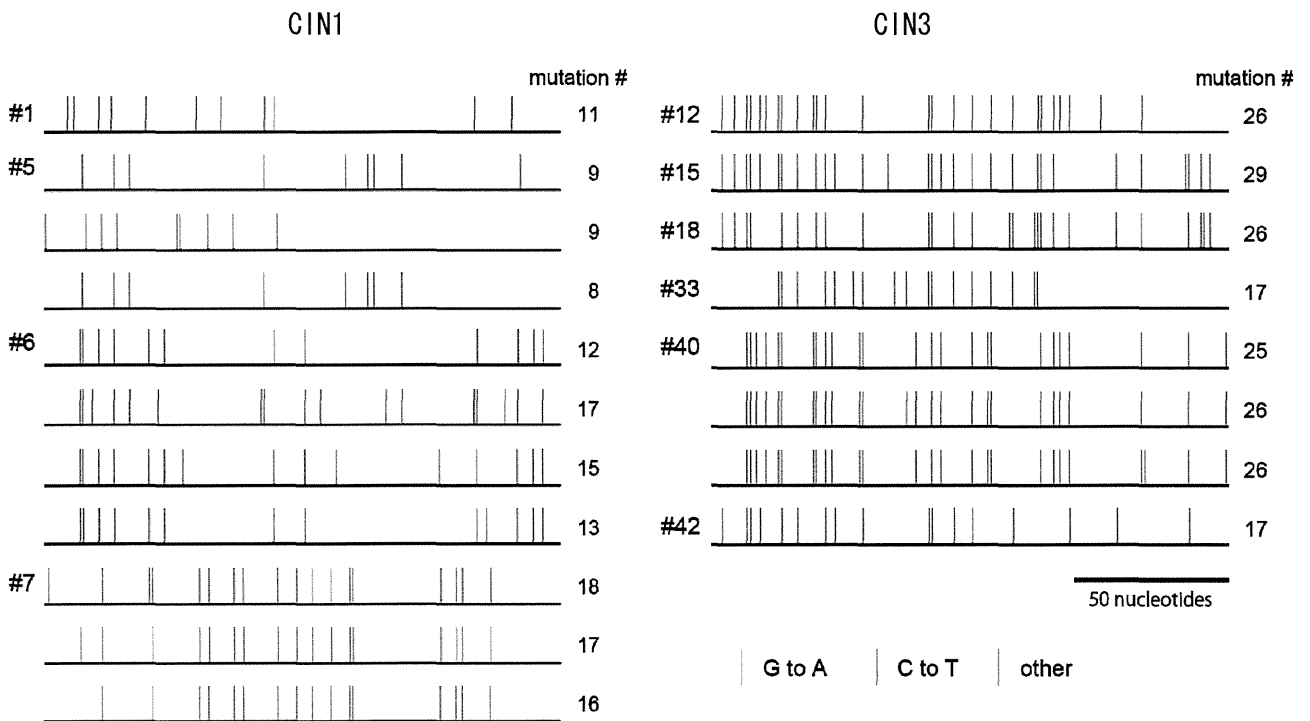


図2 E2 遺伝子への変異導入

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究

分担研究者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 ハイリスクグループのヒトパピローマウイルス (HPV) 感染により子宮頸癌が発症する。HPV の E6, E7 蛋白質による癌抑制遺伝子 p53, pRb の分解誘導が発癌に必須であり、発癌の抑制にはこれらの経路を遮断することが重要である。HPV16 型の E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御することが報告されている。そこで、E6 遺伝子が組込まれた細胞から E6 蛋白質を特異的に排除する方法の開発を目指し、USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する小分子のスクリーニングおよび特殊ペプチドの開発を試みた。DUB-Glo protease assay を用い、インヒビターライブラリー320 コンパウンドから 33 個の候補分子を同定した。さらに Di-Ub を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

A. 研究目的

子宮頸癌の発癌にハイリスク型のヒトパピローマウイルス (HPV) 感染と E6, E7 蛋白質の組込みが関与し、癌抑制遺伝子 p53, pRb のユビキチンプロテアソーム系による分解誘導が発癌に重要である。HPV ワクチンが近年、実用化され、若年女子の HPV 感染を予防し、将来的に子宮頸癌の発症が抑制されることが期待されているが、すでに HPV に感染している患者に対する特異的な抗パピローマウイルス薬は未だ存在しない。近年、E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御していることが明らかとなった。そこで、子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目的に、USP15, USP11 の特異的阻害剤の作製を目指し、阻害物質のスクリーニングと特殊ペプチドの作製を試みた。

B. 研究方法

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング
昨年、樹立した DUB-Glo protease assay (Promega) による *in vitro* USP15 assay 系を用いて inhibitor library (320 コンパウンド) から阻害活性物質をスクリーニングを行った。
(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価
DUB-GLO protease assay で阻害活性の陽性コンパウンドに関し、Di-Ub (K48) を基質にした USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析した。
(3) Avi-His₆-USP15 の発現と精製
Avi-His₆-USP15 UCH (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP (GE

Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。

(4) RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)。

(5) USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

FLAG-USP 遺伝子を pVL1393 にサブクローニングし、Sf9 にトランスフェクトして組換えバキュロウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

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。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング

DUB-Glo protease assay による *in vitro* USP15 assay 系を用いてインヒビターライブラリー(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングしたところ、DUB activity を阻害するコンパウンドが 33 個見つかった。

(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価

陽性コンパウンドに関し、Di-Ub (K48) を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析したところ、5 種類のコンパウンドで著明な USP15 阻害活性を確認した。

(3) 大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の

発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP (GE Healthcare) を用い、アフィニティ精製した。CBB 染色にて Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質の精製蛋白質を確認した。これを用いて以下のスクリーニングを行った。

(4) RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

RaPID system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチドをスクリーニングし、5 種類の環状 N-メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得て、スケールアップして精製を行っている。

(5) USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

バキュロゴールドを用いて組換えバキュロウイルス AcFLAG-USP11 を作製した。

D. 考察

HPV16E6 を排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤開発を目指した。インヒビターライブラリーから 320 compound を DUB-Glo protease assay を用いてスクリーニングしたところ、DUB protease activity を阻害する compound が 33 個見つかった。さらに Di-Ub (K48) を基質にして USP15 阻害活性を解析し、5 種類の小分子化合物で著明な USP15 阻害活性を確認した。USP15 阻害活性を確認できた小分子については今後、細胞内での USP15 阻害活性と E6 への安定性への影響を解析していく予定である。また、USP15 活性を阻害する特殊ペプチドの開発を RaPID system により行った。USP15 の catalytic domain である UCH domain に結合する環状 N-メチルペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N-メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。現在、スケールアップして精製中であり、USP15 阻害活性を解析する予定である。USP11 についても FLAG-USP11 を発現する組換えバキュロウ

ウイルスを作製しており、同様な阻害剤候補物質のスクリーニングを行う予定である。

E. 結論

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6の安定化因子であるUSP15の阻害剤作製を試みた。DUB-Glo protease assayを用い、インヒビターライブラリーから33個の候補分子を同定した。さらにDi-Ubを基質にしてUSP15の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5種類のヒット化合物を同定した。さらにUCHドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5種類の環状Nメチルペプチドと3種類の環状ペプチドを得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (1): 1-16 (2014)
2. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono, P, Shoji, I, Deng, L, Hotta, H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 9: e98877 (2014)
3. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 188-94 (2014)

4. Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto, S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 180-7 (2014)

2. 学会発表

- 1) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 2) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 3) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 6) Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.

- 7) Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 8) 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 9) 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF- β スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 10) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 11) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 13) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月 25-27 日, 2014 年.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
- 1.特許取得
なし
 - 2.実用新案登録
なし
 - 3.その他
なし

E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築と 増殖メカニズムの解明

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 李 天成

研究要旨 E型肝炎ウイルス(HEV)株83-2の感染性クローンを構築し、HEV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作成した。化合物ライブラリを用いたHEV増殖阻害剤のスクリーニングを実施し、現在までに複数の阻害活性を有する化合物を同定した。HEVの増殖阻害活性を有する化合物が得られたことから、これらの化合物の作用機序を調べ、HEV複製メカニズムを解析する。また、阻害剤のin vivoでの効果の検討を行い、E型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

A. 研究目的

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型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった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、これまでは輸入感染症と認識されてきた。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食することによってHEVに感染すると考えられる。

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く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよいHEVの増殖系を確立することが望まれている。昨年度に、感染性のHEV cDNAクローンから、ルシフェラーゼ、Green Fluorescent protein (GFP)等をレポーターとして有するレプリコンの構築に成功したことを報告した。本年度は、このレプリコンを用いてHEVの増殖を阻害する物質のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

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。(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、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が、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、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する。

C. 研究結果

感染性クローン83-2の構造蛋白であるORF2領域をレポーター遺伝子と置き換えることによりHEVレプリコンを構築した。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として持

つレプリコン RNA をトランスフェクションした細胞で LOPAC 化合物ライブラリー (約 1,200) のスクリーニングを行った。100 μ M でルシフェラーゼの分泌が 50%以下に低下し、MTT アッセイで強い毒性が見られない化合物の中で、20 μ M でも阻害活性が認められた化合物が 17 存在した。その中に、細胞培養系で HEV 増殖阻害効果が報告され、慢性 E 型肝炎の治療にも実際に使われているリバビリンが含まれていた。一方、レプリコンの複製を促進する 10 の化合物も見出された。これらの化合物の作用機序を調べ、HEV 複製メカニズムを解析する。また、阻害剤の *in vivo* での効果の検討を行い、E 型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

D. 考察

LOPAC 化合物ライブラリーから、HEV レプリコン複製阻害活性を持つ化合物 17 をピックアップした。ピックアップされた化合物の中には、すでに HEV 増殖阻害活性が報告されていたリバビリンが含まれており、本スクリーニング系の妥当性が示されたのではないと思われる。

リバビリンについてはすでに慢性 E 型肝炎での治療に用いられた実績がある。日本における、バーキットリンパ腫で HEV による慢性肝炎を発症したと思われる例について、リバビリン治療の効果と耐性ウイルス出現の可能性について検討を開始した。

E. 結論

HEV レプリコンを構築し、化合物ライブラリーからレプリコン複製阻害物質のスクリーニングを開始し、複数の候補化合物を得た。今後 E 型肝炎治療薬としての検討、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and John R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology* in press.

2. 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* in press.
3. Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., Ishii K., Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. *PLOS One*, 9, e101993 (2014)
4. 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)
5. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)

2. 学会発表

1. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, September 11-12, 2014
2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014
3. 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
4. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y., Noda M., Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi

Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014

5. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014
6. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 11 回日本小児消化管感染症研究会、平成 27 年 2 月、大阪
7. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
8. 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎：不活化 A 型肝炎ワクチンの互換性研究ーエイムゲンと HAVRIXー、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
9. 河端邦夫、清原知子、石井孝司、脇田隆字、金山敦宏、八幡裕一郎、松井珠乃、砂川富正、大石和徳：A 型肝炎の家族内感染についての疫学的解析（2014 年上半期を中心に）、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
10. 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
11. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、八幡裕一郎、河端邦夫、金山敦宏、山岸拓也、高橋琢理、有馬雄三、木下一美、齊藤剛仁、松井珠乃、大石和徳、砂川富正、脇田隆字：2014 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
12. 横川 寛、中村紀子、東濃篤徳、鈴木紗織、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HAV 粒子のマーマセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
13. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、平成 26 年 9 月、長野

厚生労働科学研究費補助金・新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究
平成 26 年度分担研究報告書

Rat HEV の細胞培養およびリバーシジェネティクス法による Rat HEV の作製

分担研究者 李 天成 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究協力者 国立感染症研究所ウイルス第二部 吉崎佐矢香 石井孝司 脇田 隆宇

国立感染症研究所病理部 片岡 紀代

国立感染症研究所動物管理室 網康至 須崎百合子

Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany. Reimar Johnhe

研究要旨 Rat HEV は人由来 HEV の遺伝子構造と類似する新しい E 型肝炎ウイルスである。ドイツにおいて初めて rat HEV が検出されて以後、アメリカ、ベトナム、インドネシアからも部分あるいは全長 rat HEV 遺伝子が確認されたことから、rat HEV が世界範囲に広がっていることが示唆された。しかしながら、これらのウイルスの増殖できる培養細胞系が樹立されていないため、ウイルスの感染性や病原性などの評価が困難である。本研究では我々はヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 細胞に接種し、Rat HEV が増殖できる細胞培養系を樹立した。また、in vitro で合成した完全長の rat HEV RNA をヌードラット肝臓に直接接種したことにより、感染性をもつ Rat HEV を獲得した。Rat HEV 培養系の樹立は rat HEV 複製のメカニズムの解明に有用である。

A. 研究目的

E 型肝炎は黄疸を主症状とする急性肝炎である。原因ウイルスは E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus, HEV) である。先進国において E 型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、全く海外渡航歴のない患者が見つかること、ブタやイノシシからヒト由来 HEV と同一の HEV がみつかることなど人獣共通感染症として注目されている。HEV はプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ小型球形ウイルスで、1~4 型まで 4 つの遺伝子型 (G1~G4) が知られている。また、ヒト以外の動物から従来ヒト由来 HEV と異なる新型 HEV が多数分離されている。これらのウイルスの病原性などはほとんど解明されていない。Rat HEV は野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒト

HEV と類似するウイルスであり、その病原性などに関する情報が少なく、その増殖、感染のメカニズムは明らかではない。ウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には細胞培養系もまた欠かせない手法である。本研究では rat HEV をヒト肝癌由来 PLC/PRF/5 細胞に接種し、ウイルスの増殖と産生されたウイルスの感染性等について検討した。また、in vitro で合成した全長 rat HEV RNA をヌードラット (Long Evans-run/run) 肝臓に直接接種し、ウイルスの獲得を試みた。

B. 研究方法

Rat HEV を感染したヌードラット (Long Evans *rnu/rnu*) の便材料を PBS で希釈し、10%便乳剤を作製した。遠心分離後、その上清を 45 μ m フ