

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 Johne 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～エイムゲンと HAVRIX～、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 粒子のマーモセットにおける抗 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