

## 厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

### 分担研究報告書

分担課題：感染者由来C型肝炎ウイルスの不活化の評価

分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

#### 研究要旨

血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) を不活化させる条件を明らかにするため、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に加え、様々な条件で不活化条件の検討を行っている。これまで用いた HCV は唯一培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。しかし、最近 JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 が同定された。本件研究では、感染者由来の HCV 株の不活化の評価を行うため、Sec14L2 を発現する培養細胞を作製したが、現在のところこの細胞を用いて、感染者由来の HCV の増殖は見られていない。

#### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 1 因子製剤、第 2 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの方が C 型肝炎に感染した経緯がある。

C 型肝炎の治療法はリバビリンとペグインターフェロンとの併用療法 (PEG-IFN/ribavirin) により治療効果 (それでも約 50%) が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型 (1b 型) の HCV では治療効果が未だ上がらなかったが、ここ数年、数種類の阻害剤 (HCV ウイルスタンパク質であるプ

ロテアーゼ (NS3/NS4A)、ポリメラーゼ (NS5B)、及び NS5A タンパク質に対する阻害剤 (これらをまとめて **Direct acting antivirals (DAA)** と呼ばれている)) が開発、使用が開始され、1b 型も含めその療効果が上がっている。しかも、副作用の多い PEG-IFN/ribavirin の併用なしの DAA のみの治療法も開発され、今や HCV は治療可能な感染症となりつつある。実際、2014 年末に C 型肝炎治療ガイドラインが改訂され、新規経口薬 (DAA) に期待が寄せられているところである。

C 型肝炎ウイルスは、治療薬の開発に必須な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感

染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中の HCV 不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス(BVDV)が用いられてきた。こうした中、2015年に培養細胞で HCV を増殖させることが可能な系が発表され研究が急速に進展した。本研究でもこの HCV JFH-1 株(遺伝子型 2a)を増殖させ、増殖した HCV JFH-1 を血液製剤にスパイクウイルス不活化を評価する系を構築した。

更に最近、JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 が同定された。本件研究では、感染者由来の HCV 株の不活化の評価を行うため、Sec14L2 を発現する培養細胞を作製し、感染者由来 HCV の増殖する系を構築する。

## B. 研究方法

### 1. sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスの作製

宿主因子である sec14L2 が CMV プロモーターにクローニングされたレンチウイルスベクター pSEC14L2/BlastR (pLOC plasmid, Thermo Fisher Scientific) に sec14L2 がクローニングされている。この plasmid は Saeed M 氏から供与を受けた(参考: Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature)。この plasmid と pMDLg/pRRE (HIV-1 の gag, pol 遺伝子、及び REE 配

列を持つ, Addgene 社), pRSV-Rev( HIV-1 Rev 遺伝子を持つ, Addgene 社)、及び pMD2.G (VSV の Glycoprotein の遺伝子を持つ, Addgene 社) の合計 4 種類の plasmids を同時に 293T 細胞にトランスフェクションすることにより、この細胞上清から sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスを得た。

### 2. Sec14L2 を発現する培養細胞の作製

作製した sec14L2 組換えレンチウイルスを培養細胞 Huh7.5.1 に感染させ、1 日後、Blasticidin (最終濃度 10 $\mu$ g/mL) を加え、薬剤によるセレクションを行なった。また、セレクションされた細胞は tGFP が発現しているかを確認した(図 1)(以降、Huh7.5.1 (sec14L2)と表記)。なお、pSEC14L2/BlastR は sec14L2 遺伝子意外に、tGFP (GFP の一種)、及び Blasticidin 耐性遺伝子を持つ。

### 3. 培養細胞 Huh7.5.1 (sec14L2) の Sec14L2 の発現の確認

作製した Sec14L2 を発現する培養細胞をウエスタンブロッティング(図 2)、及び免疫染色法(図 3)により、抗体 anti-Sec14L( #GTX115716, GeneTex, Inc. CA) を用いて、Sec14L2 の発現を調べた。ウエスタンブロッティングには、2 次抗体 HRP を結合させたヤギ抗マウスモノクローナル抗体 (#170-5047, BioRad, CA)、及び SuperSignal West Femto (#34094,

Thermo Scientific, Tokyo)による発光により検出した。また、免疫染色には蛍光二次抗体 Alexa Fluor 488、及び Alexa Fluor 594 (それぞれ#A11001, A11037, Thermo Scientific, Tokyo)を用いた。核の染色には DAPI (#340-07971, 和光純薬、Osaka)

4 .作製した Huh7.5.1 (sec14L2) 2 に米国で HCV 感染者由来血漿 (市販されている window 期血漿) を加え、この HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法で確かめた。用いた抗体は anti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific, IL)、蛍光二次抗体 Alexa Fluor 488 を用いた。

#### (倫理面への配慮)

この培養細胞でウイルスが増殖させる系は、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。この研究に関して、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」で承認を受けた(受付番号 8 5 1「血液製剤における病原体不活化に関する研究」)。

### C. 研究結果

#### 1 . Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞の Sec14L2、及び tGFP の発現

sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスを作製し、Huh7.5.1 細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた Huh7.5.1 細胞

(Huh7.5.1 (sec14L2) と表記) を得た。この Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞を蛍光顕微鏡で観察し、tGFP の発現を調べた結果、全細胞の約 30% が tGFP を発現していることが分かった(図 1)。

Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞の lysate を用い、ウエスタンブロッティングを、Sec14L2 を特異的に検出する anti-Sec14L 抗体を用いて行なった結果、Huh7.5.1 (sec14L2) の細胞 lysate には、SDS PAGE 上、約 46kDa のバンドが特異的に検出された。一方、Huh7.5.1 細胞の lysate にはこのバンドは検出されなかった。よって、Huh7.5.1 (sec14L2) には Sec14L2 蛋白質が発現していると考えられる(図 2)。

#### 2 . Huh7.5.1 (sec14L2) への HCV 患者さん由来血漿に含まれる HCV の感染

Huh7.5.1 (sec14L2) に HCV 患者さん由来血漿 (HCV RNA コピー数:  $2 \times 10^7$  IU/mL) を感染させ、4-5 日培養して、細胞内の HCV コア蛋白質の発現を免疫染色法で調べたが、コア蛋白質の発現は認められなかった。

### D. 考察

1 . ウエスタンブロッティングによる Sec14L2 の発現を、SDS-PAGE 上、約 46kDa の泳動度を示し、計算上の分子量約 46kDa と一致しており、このバンドが Sec14L2 と考えることができる。

2 . sec14L2 が組み込まれた Huh7.5.1 細胞

(Huh7.5.1 (sec14L2)) を作製し、sec14L2 がクローニングされている plasmid に存在する tGFP の発現を確認したが、全細胞の約 30% であり、このため、患者さん由来 HCV の増殖効率が悪く、HCV コア蛋白質を検出できなかったのかも知れない。

3 .Sec14L2 以外に、HCV の増殖には培地が還元状態である方が良く、また、micro RNA の一つである mi122RNA が重要であるという報告があるので、今後これらの条件で患者さん由来の HCV の増殖を調べてゆく予定である。

#### E. 結論

患者さん由来の HCV を培養細胞で増殖するために、Sec14L2 蛋白質を発現す

る培養細胞を作製したが、今のところ、患者さん由来 HCV の増殖は見られていない。今後、Sec14L2 蛋白質が発現する細胞の率を増加させるために、細胞のクローニングを行い、また、還元条件で、かつ、mi122 RNA を過剰発現させた条件で患者さん由来 HCV の増殖を試みる予定である。

#### G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表 :

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請 : なし

2. 実用新案登録 : なし

3. その他 : なし

図 1 . 組換えレンチウイルスを用いて Huh7.5.1 細胞に sec14L2、tGFP を導入した細胞の tGFP の発現

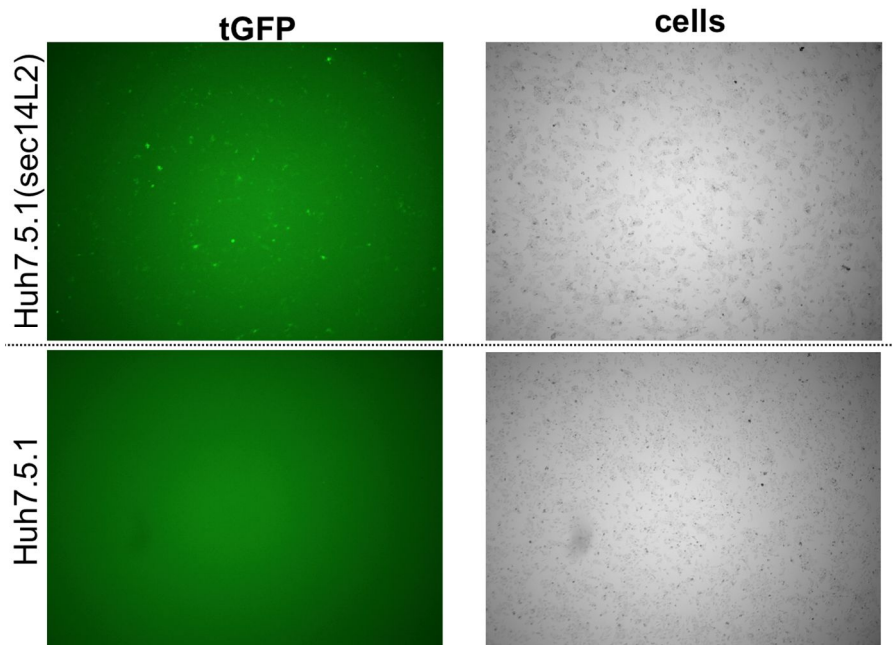


図 2 . Huh7.5.1 (sec14L2)細胞 lysate 中の Sec14L2 蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで調べた

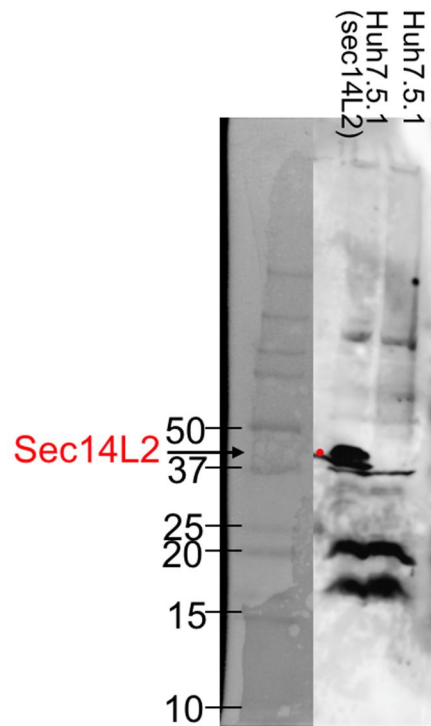


図 3. 免疫染色による Sec14L2, 及び tGFP の Huh7.5.1 (sec14L2)細胞内の発現、及び局在

