

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：患者由来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 主任研究官)

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) の不活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、昨年感染者由来の HCV 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。更に本年 HCV の増殖に重要と報告されている肝臓細胞特異的に発現する miR122 (micro RNA 122) も同時に発現する培養細胞を作製した。しかし、現在のところこの細胞を用いて HCV 感染者の HCV の顕著な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、十分な不活化工程が導入されていなかった時代に製造された第IX因子製剤、第VIII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 (遺伝子型 1b) の HCV では治療効果が上がらなかったが、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 型肝炎ウイルスには、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、2005 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の不活化を評価する系を構築した。

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。また、これまでに肝臓細胞特異的に発現しているマイクロ RNA122 (miR122) は HCV の増殖に重要であることが知られている。更に、HCV 感染により活性化される宿主因子 RIG-I は HCV の感染防御に働くことが知られている。これらのことを考慮し、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 に加え、miR122 も発現し、かつ RIG-I が欠損した培養細胞を作製し、感染者由来の HCV が増殖する系を構築する。

B. 研究方法

1. RIG-I 欠損細胞の作製

種々の培養細胞 (ヒト肺がん細胞由来 NCI-H1915、ヒト絨毛癌細胞由来 JAR、及び胎児性がん細胞由来 NEC-8) に RIG-I 欠損用ガイド RNA (RIG-I Exon1, Dharmacon 社, #CM-012511-01-0002) と Cas9 発現 plasmid (Edit-R CRISPR-Cas9 Nuclease Expression Plasmid (Dharmacon 社, #U001000-120) をトランスフェクションし、Blasticidin でセレクションすることにより、RIG-I 欠損細胞を得た。それぞれ NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、NEC-8 (Δ RIG-I) と命名。(研究代表者 岡田義昭氏により作製)

2. Sec14L2 が発現する、種々の RIG-I 欠損培養細胞の作製

昨年 (H29) 度報告した方法により Sec14L2 を発現する組換えレンチウイルスを作製(pSEC14L2/BlastR、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G [各 plasmid に関しては以下参照] を 293T 細胞に同時トランスフェクションすることにより得た) し、これを 1 で作製した RIG-I 欠損培養細胞 (NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、NEC-8 (Δ RIG-I)) に感染させ、Blasticidin でセレクションすることにより、sec14L2 が発現する細胞を得た。なお、この組換えレンチウイルスには tGFP も組み込まれており、tGFP の発現が sec14L2 の発現の指標として用いることが出来る。各細胞の tGFP の発現を調べた (図 1)。

その結果、tGFP の発現は、NCI-H1915 (Δ

RIG-I)、JAR (Δ RIG-I) では、それぞれ全体の細胞の 44、及び 3.7%であった。また、tGFP 高発現の NEC -8 (Δ RIG-I) 細胞は数代しか継代出来なかった。

従って、以降の実験では NCI-H1915 (Δ RIG-I) に Sec14L2 が発現する細胞 (NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 と命名) にのみに miR122 を導入した。

3. miR122 RNA の前駆体遺伝子が組み込まれた組換えレンチウイルスの作製

レンチウイルスベクター plasmid: pLV [has-miR-122] (BIOSETTIA 社) には、EF1 α promoter 下に pre-miR122 遺伝子と赤色蛍光を発する fluorescent puromycin 耐性タンパク質をコードする遺伝子とがクローニングされている。この plasmid から miR122: UGGAGUGUGACAAUGGU GUUUGU 遺伝子が発現される。この plasmid, pLV [has-miR-122] 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、細胞上清から pre-miR122 が組み込まれた組換えレンチウイルスを得た。なお、この組換えレンチウイルスは HIV-1 のゲノム遺伝子が 4 種類の plasmids に別々にクローニングされているため、一回のみの細胞

への感染が可能である。

4. miR122 が発現する、NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 細胞の作製

作製した miR122 発現組換えレンチウイルスを、これまでに得た NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 細胞に感染させ、1 日後、puromycin (最終濃度 1.0 μ g/mL) を加え、薬剤によるセレクションを行なった (Blasticidin (最終濃度 10 μ g/mL) も常時添加)。また、得られた細胞は tGFP、及び Fluorescent puromycin 耐性タンパク質が発現しているかを蛍光により確認した (図 2)。作製した培養細胞を NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 と命名。

5. 作製した培養細胞への感染者由来 HCV の感染

作製した NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 培養細胞に HCV 感染者由来血漿 (A, B の 2 種類、HCV RNA コピー数: 2×10^7 IU/mL) を加え、HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法と HCV ゲノム RNA の検出により確かめた。なおコントロールとして JFH-1 株もこの細胞に感染させた。

免疫染色に用いた抗体は anti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific, IL)、蛍光二次抗体には Alexa Fluor 488 (#A11001, Thermo Scientific, Tokyo) を用いた。核の染色には DAPI

(#340-07971, 和光純薬、Osaka)を用いた。

また、HCV ゲノム RNA の検出には、患者由来 HCV を感染後、4、及び6 日後の細胞を RNA 抽出キット (RNA purification kit; EX-R&D) により HCV RNA を精製し、10 倍ずつ段階希釈 (10^0 - 10^{-3}) し、逆転写反応を 50°C、30min で行い、生成された cDNA を二種類の HCV 特異的 primers (sense: nt 45-64, antisense: nt 265-246; 数字は HCV JFH-1 ゲノム RNA の 5'末端からの塩基番号)を用いて PCR により増幅し、その産物を 2% agarose gel にて分離した。

(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. Sec14L2 -miR122 発現細胞の 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 NCI-H1915

(Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、及び NEC-8 (Δ RIG-I) 細胞 (それぞれ NCI-H1915 (Δ RIG-I)-Sec14L2、JAR (Δ RIG-I)-Sec14L2、及び NEC-8 (Δ RIG-I)-Sec14L2 と命名) を得た。tGFP の発現は、NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I) では、それぞれ全体の細胞の 44、及び 3.7%であった (図 1)。また、NEC-8 (Δ RIG-I)-Sec14L2 細胞 tGFP の発現は 55%であったが、数代しか継代出来なかった (data not shown)。なお、昨年度報告した Huh7.5.1-Sec14L2 での tGFP の発現は 30%であった (図 1、昨年度の結果)。

2. NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞での tGFP、fluorescent puromycin の発現

作製した RIG-I 欠損、Sec14L2 かつ miR122 発現 NCI-H1915 細胞での tGFP (Sec14L2 発現の指標) と fluorescent puromycin (miR122 発現の指標) とを調べた結果、それぞれ細胞全体の 50%の細胞でそれぞれ発現していた。その細胞で、tGFP と fluorescent puromycin が同時に発現している細胞は 6.5%であった (図 2)。

3. NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞への感染者由来 HCV の感染

NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞に HCV 感染者由来血漿 A、及び B (共に HCV RNA コピー数として 2×10^6 IU)、

及びコントロールとして JFH-1 (感染価 2×10^4) を感染させ、4、及び6日後に細胞内の 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 (data not shown)。

そこでこの感染細胞の HCV RNA 量を調べた (図3) と、患者血漿 A においてわずかながらの HCV RNA 量の増加が認められた (図3)。

D. 考察

1. HCV の感染阻害に重要な働きをする RIG-I が欠損し、かつ HCV 感染に重要な宿主因子 Sec14L2、及び miR122 を発現する NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞を作製した。この細胞に HCV 感染者由来の血漿を感染させたが、HCV コアタンパク質の発現を確認出来るほどまでには HCV が増殖しなかった。しかし、感染者由来血漿 A では、HCV RNA がわずかながらの増加 (感染時の HCV RNA 量に比べ多くても 10 倍の増加) が見られた (図3)。作製した細胞の 6.5%が、tGFP (Sec14L2 発現の指標) と fluorescent puromycin (miR122 発現の指標) とが同時に発現するのみなので、今後、tGFP と miR122 が同時発現する細胞をクローニングすることにより、感染者由来血漿の HCV がより良く増殖させることが期待できる。

2. 作製した細胞では、JFH-1 の増殖が見られなかったが (図3)、JFH-1 は Sec14L2 の発現に依存しないという報告があり、そのことを示しているのかも知れない。実際、JFH-1 が効率よく増殖する Huh7.5.1 細胞では、Sec14L2 をウエスタンブロッティング法では検出出来なかった (data not shown、及び昨年度の報告書の図2参照)。

E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖するために、RIG-I 欠損、かつ Sec14L2 蛋白質と miR122 RNA を発現する培養細胞を作製したが、今のところ、ウイルスタンパク質の発現が確認できるレベルの HCV の増殖は見られていない。今後、tGFP と miR122 とが同時発現する細胞をクローニングし、その細胞を用いて感染者由来 HCV の増殖を試みる予定である。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 : Suzuki, R, Matsuda M, **Shimoike, T.**, Watashi, K, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 *Virology*, 529 226-233.

(イ) 学会発表 : なし

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. Sec14L2が導入された細胞のtGFPの発現

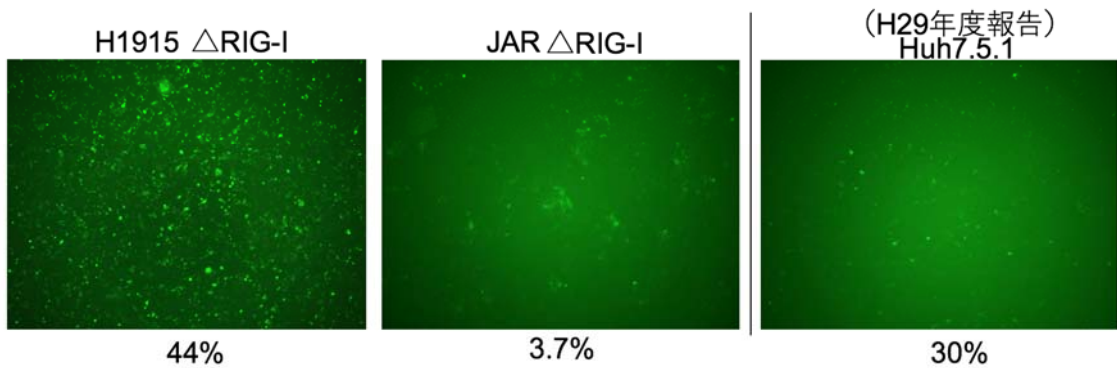


図2. NCI-H1915 (ΔRIG-I)-Sec14L2-miR122細胞

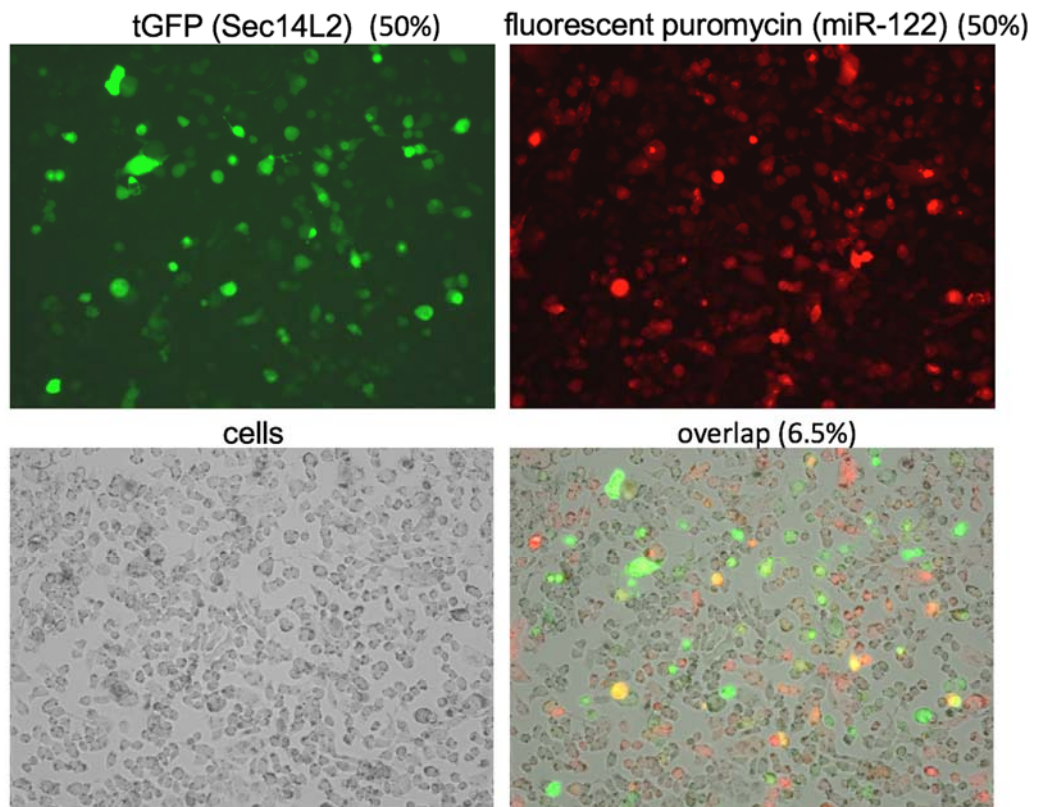


図3. 患者由来HCVの増殖

