

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、様々な条件下で不活化の検討を行っている。これまで用いた HCV は培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。しかし、2015 年、JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 の同定が報告された。今年度は JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に Sec14L2 が発現する FU97-sec14L2 細胞を作製し、感染者由来の HCV 陽性血漿を感染させた。しかし、現在のところこの細胞を用いて 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人々が 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。

本研究は、JFH-1 以外の HCV、特に患者由来の HCV の不活化を調べることが目的であり、過去二年間、様々な培養細胞に HCV の増殖に重要な宿主因子 Sec14L2（参考：Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature）を高発現させ、これら培養細胞に患者由来 HCV を感染させ、その HCV が増殖できる系の構築の検討を行って来た。今年度は JFH-1 とは別の株の JFH-2（遺伝子型は JFH-1 と同じく 2a）が増殖出来る FU97 細胞を用いる。FU97 細胞は、HCV の増殖に重要な、肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子マイクロ RNA; miR122 が高発現し、且つ、HCV の増殖に重要な、これも肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子 -fetoprotein も高発現している（参考：Shiokawa M. et al. 88 5578-5594, 2014 J. of Virol.）。この FU97 細胞に Sec14L2 を高発現する培養細胞を作

製し、感染者由来 HCV を感染させた。

B. 研究方法

1. Sec14L2 が発現する、FU97 培養細胞の作製

H29 年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 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。詳しくは H29 年度の同研究費報告書参照) し、これを胃がん由来 FU97 細胞に感染させ、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。その結果、tGFP の発現は全体の細胞の 73%であった (図 1)。

3. 作製した培養細胞への患者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた FU97 培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) (1×10^5 /well) に HCV 感染者由来血漿 A, B の 2 種類、HCV RNA コピー数: A: 8.3×10^7 , B: 6.9×10^7 IU/mL 野島清子氏により測定) をそれぞれ 5 μ l (培地に対して 1/100 の体積) ずつ加え、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 株を m.o.i.=1.1 でこの細胞に感染させた。

感染 1, 2 及び 3 日後の細胞を用いた。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 594(#A11032 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 の感染 1, 2 及び 3 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、逆転写反応とそれに続く cDNA の増幅を PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TAKARA Bio, Shiga) を用いて行った。反応条件は、50 30min, 94 2min の後、[94 15s, 55 15s, 72 60s] を 32 回繰り返し、その後、72 3min で行った。用いた二種類の HCV 特異的 primers は、sense: nt 45-64 と 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) である。この反応により増幅された cDNA 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 発現 FU97 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、FU97 細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた FU97 (FU97-sec14L2) を得た。tGFP の発現は、全体の細胞の 73% であった (図 1) 。

2. FU97-sec14L2 細胞への患者由来血漿の HCV の感染

FU97-sec14L2 細胞に HCV 感染者由来血漿 A, 及び B (HCV RNA コピー数 : A: 8.3×10^7 , B: 6.9×10^7 IU/mL 野島清子氏により測定)、及びコントロールとして JFH-1 (感染価 5.6×10^6) を感染させ、1, 2, 及び 3 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。HCV 感染者由来血漿 A, 及び B の感染では、コア蛋白質の発現は認められなかった (図 2) 。

そこでこの感染細胞の HCV RNA 量を調べたが、患者血漿 A, B 共に HCV RNA 量の増加は認められなかった (図 3) 。

3. FU97-sec14L2 細胞へのコントロール JFH-1 の感染

上記 2 の実験で、コントロールとして用いた JFH-1 は、FU97-sec14L2 細胞に感

染 2 , 及び 3 日後、コア蛋白質が検出された(図 3)。また、感染 3 日後に、JFH-1 の HCV ゲノム RNA の増加が見られた(図 2)。なお、感染 4 日後以降では、返って JFH-1 のゲノム RNA 量が減少した (data not shown)。

D. 考察

1 . 前年度は、培養細胞に HCV の増殖に重要な Sec14L2、及び miR122 を組換えレンチウイルスの感染により発現させ、そこに HCV 感染者由来 HCV を感染させ、その増殖を調べたが、このとき Sec14L2 と miR122 とが同時に発現している細胞数は、わずか全細胞の 6.5%であった。

今年度は既に miR122 が高発現し、その上、HCV の増殖に重要である他の宿主因子 -fetoprotein も高発現する細胞 FU97 に sec14L2 を導入したので、Sec14L2 が発現する細胞には、理論的には、miR122 と -fetoprotein が同時に高発現することになり、HCV が増殖出来ると考えられる細胞の割合を増加(全細胞の 73%)させることが出来た。しかしながら、感染者由来 HCV の増殖はウイルス蛋白質、ウイルス RNA 共に検出出来なかった。

これまで多くの、しかも長年にわたる研究を振り返ると、培養細胞で患者由来 HCV を増殖させるには、HCV、細胞の両方の変異が必要だと考えられる。今後、患者由来 HCV を FU97-sec14L2 細胞に感染させ、長期にわたり培養し、HCV、細

胞に変異が入り、その HCV が増殖出来るようになったら、その細胞から Ribavirin などの薬剤で感染した HCV を取り除いた cured 細胞を得て、変異前の感染者由来 HCV を再感染させ、その HCV が増殖出来るかを調べる予定である。

2 . 図 2 で、感染 1 日後、JFH-1 のゲノム RNA が検出されたのは、感染させたときの HCV が細胞に吸着して、残存していたためと考えられる。一方、同じく感染 1 日後、感染者由来血漿 A、及び B では、HCV RNA が検出されなかったのは、JFH-1 の量に比べ、RNA コピー数で、患者血漿 A、B は約 1/20 であったためと考えられる。感染させる感染者由来血漿 A、及び B の量を増加させると、これら血漿に含まれる成分のため、細胞の培地がゲル状になり、細胞に悪影響を与えてしまうので、これらの血漿の量を増加させることが難しい。

3 . FU97-sec14L2 細胞で、JFH-1 株の増殖が見られたが、そのウイルスゲノム RNA の検出とコア蛋白質の検出とに時間的な一致が見られなかった(感染後 2 日目の図 2 と図 3 とを比較)。これは、発現した HCV コア蛋白質(或いは、ウイルス粒子)が細胞内で分解せずにしばらく(1, 2 日)の間存在しているためだと考えられる。

4 . JFH-1 の FU97-sec14L2 細胞への感染 4 日以降では、検出されるゲノム RNA の

量が減少したのは、生細胞の減少に加え、この細胞での再感染効率が悪いためだからかもしれない。

られた細胞から感染した HCV を薬剤で排除した cured 細胞の作製を試みる予定である。

E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖するために、miR122 RNA と α -fetoprotein とを高発現する FU97 細胞に、Sec14L2 蛋白質を高発現する培養細胞を作製し、その結果、73%の FU97-sec14L2 細胞が、miR122, α -fetoprotein, Sec14L2 を同時に発現するが、現在のところ、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。HCV 患者由来血漿をこの細胞に感染させ、HCV が増殖するまで長期に培養し、そこで得

G. 研究発表

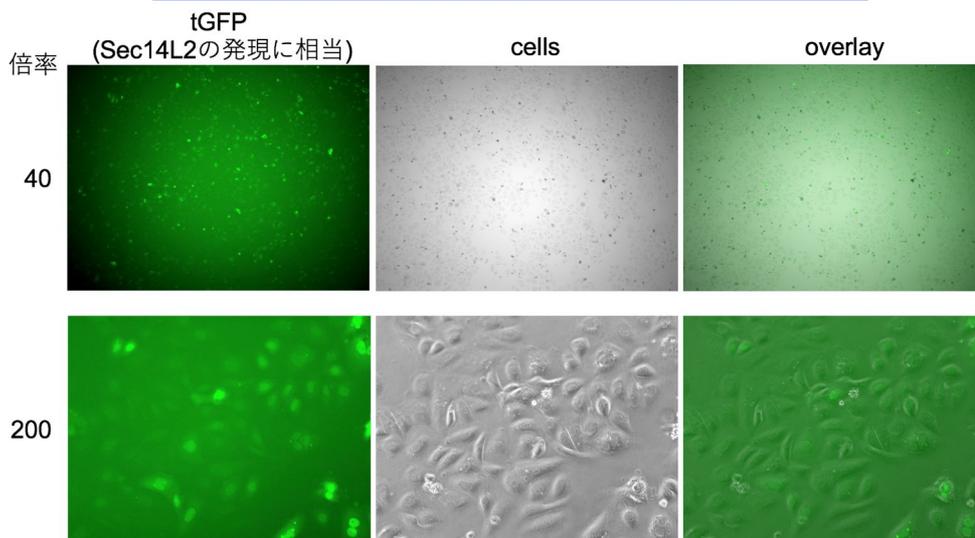
(ア) 論文発表：Suzuki, R., Matsuda M., Shimoike, T., Watashi, K., Aizaki H., Kato T., Suzuki T., Muramatsu M., Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 Virology, 529 226-233.

(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. FU97-sec14L2細胞のtGFPの発現



(顕微鏡：倍率40, 及び200倍の図)

図2. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖

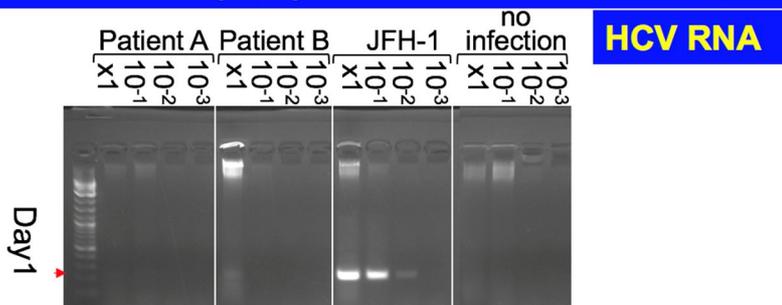


図3A. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖 HCV コア蛋白質

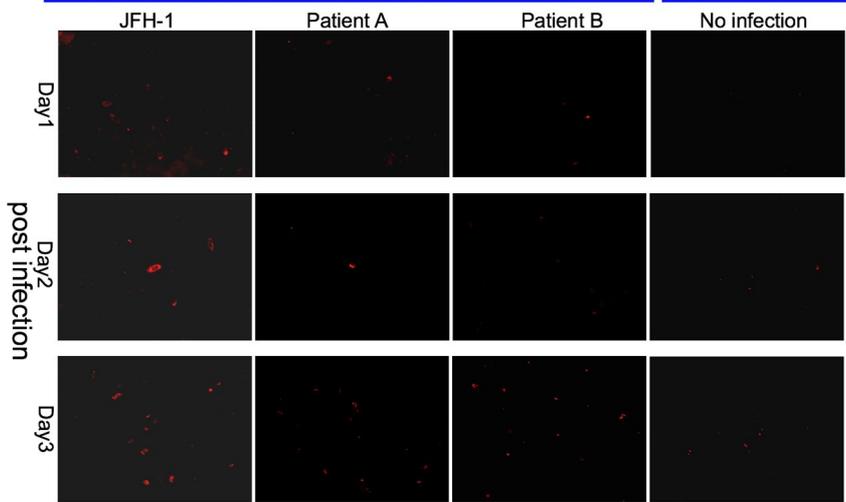


図3B. FU97 (+Sec14L2)で増殖したJFH-1 コア蛋白質 (拡大)

