

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。様々な細胞に Sec14L2 が発現する細胞を樹立し HCV 患者由来血漿を感染させた。しかし、現在のところ HCV ウイルス蛋白質レベルでの検出は出来ていないが、HCV ゲノム RNA レベルではわずかながらの増殖が見られた。

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。

この 3 年間の本研究の目的は、JFH-1 以外の HCV、特に患者由来 HCV の不活化を調べることであり、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することである。

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

レンチウイルスベクター-plasmid: pLOC (Thermo Fisher Scientific) の CMV プロモーター下に宿主因子である sec14L2 がクローニングされた plasmid: pSEC14L2/BlastR は Saeed Moshan 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。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。

2. 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、ヒト繊毛癌細胞由来 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 (RIG-I)、JAR (RIG-I)、NEC-8 (RIG-I)と命名。（研究代表者岡田義昭氏により作製）

3. 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

スを各種培養細胞 (Huh7.5.1, FU97)、及び 2. で作製した RIG-I 欠損培養細胞 (NCI-H1915 (RIG-I)、JAR (RIG-I)、NEC-8(RIG-I)) に感染させ、Blasticidin でセレクションすることにより、Sec14L2 が発現する各種細胞を得た。それぞれ

- i) Huh7.5.1-sec14L2
 - ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2
 - iii) JAR (RIG-I)-sec14L2
 - iv) NEC-8 (RIG-I)-sec14L2
 - v) FU97-sec14L2
- と命名した。

4. 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 [hsa-miR-122] (BiOSETTIA 社) には、EF1 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] と前述の pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、及び pMD2.G 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も前述同様、一回のみの細胞への感染が可能である。

5. miR122 が組み込まれた培養細胞の作製

作製した miR122 発現組換えレンチウイルスを、tGFP の発現細胞数が多い、即ち、Sec14L2 の発現細胞数が多いと考えられる NCI-H1915 (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 (RIG-I)-Sec14L2-miR122 と命名した。

なお、tGFP を発現する細胞数の多い NEC-8 (RIG-I)-sec14L2 は、数代しか継代することが出来なかったため、miR122 の導入は行えなかった。

6. Sec14L2 が組み込まれた培養細胞の Sec14L2 の発現の確認

- i) tGFP の蛍光の検出による方法

この組換えレンチウイルスには sec14L2 以外にマーカーとして 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)。

- ii) Huh7.5.1-sec14L2 細胞のウエスタンブロットング、及び免疫染色法による Sec14L2 の検出

作製した、sec14L2 が組み込まれた細胞の中で、代表として Huh7.5.1 細胞の Sec14L2 の発現を、一次抗体 anti-Sec14L (#GTX115716, GeneTex, Inc. CA) を用いて調べた。ウエスタンブロッティングでの 2 次抗体には 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) を用い、SuperSignal West Femto (#34094, Thermo Scientific, Tokyo) による発光により検出した。また、免疫染色での二次抗体には、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) を用いた。

7. 作製した培養細胞への患者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた各培養細胞 (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 $100 \mu\text{l}$ 、或いは $5 \mu\text{l}$ ずつ加え、HCV の増殖を 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 $\text{m.o.i.}=1.1$ でこの細胞に感染させた。

感染 1, 2, 3 日後、或いは 4, 6 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、或いは 4, 6 日の細胞を 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 回繰り返す、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。この研究に關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 851 「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 が組み込まれた各培養細胞の 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、各細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた以下の細胞を得た。各細胞での全細胞に対する tGFP が発現する細胞の割合は以下であった (図 1)。

- i) Huh7.5.1-sec14L2: 30%
- ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2: 44%
- iii) JAR (RIG-I)-sec14L2: 3.7%
- iv) NEC-8 (RIG-I)-sec14L2: 55%
- v) FU97-sec14L2: 73%

2. Sec14L2 が組み込まれた培養細胞の Sec14L2 の発現の確認

Sec14L2 の細胞内での発現の様子を Huh7.5.1-sec14L2 細胞を代表として用いて調べた。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-Sec14L2 抗体を用いて行なった結果、Huh7.5.1-sec14L2 の細胞には、SDS PAGE で、約 46kDa の泳動度の蛋白質が特異的に発現することが明らかとなった。一方、Huh7.5.1 細胞にはこの蛋白質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)。

更に、Huh7.5.1-sec14L2 細胞中での Sec14L2 の局在を調べるために、上記の

anti-Sec14L2 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Sec14L2 は細胞内全体に局在することが明らかとなった。一方、tGFP は、主に核に存在することが明らかとなった (図 2)。

3. miR122 が組み込まれた NCI-H1915-sec14L2 培養細胞の Sec14L2 と miR122 の発現の確認

NCI-H1915 (RIG-I)-Sec14L2-miR122 細胞の Sec14L2 の発現の指標となる tGFP の発現 (全細胞の 50%) と miR122 の発現 (全細胞の 50%) の指標となる fluorescent puromycin のとが同時に発現する細胞は全細胞数の 6.5% であった (図 3)。

以上、3 年間の研究で作製した細胞

- i) Huh7.5.1-sec14L2
- ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2-miR122
- iii) FU97-sec14L2

の HCV の増殖に重要な遺伝子発現について、表 1 にまとめた。

4. 各細胞への患者由来血漿の HCV の感染

上記 3. で述べた 3 種類の細胞に HCV 感染者由来血漿 A, 及び B (遺伝子型: 1 型、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、JFH-1-sec14L2、及び NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2-miR122 細胞の場合は、4, 6 日後、FU97-sec14L2 細

胞の場合は、1, 2, 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。その結果、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 4A; FU97-sec14L2 細胞の場合のみ示した)。

更に感染細胞の HCV RNA 量を調べた結果、NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR122 細胞の場合は患者血漿 A で、HCV RNA 量の増加が認められた(図 5)。一方、JFH-1-sec14L2、及び FU97-sec14L2 細胞の場合は、HCV RNA の増殖は見られなかった(図 5; FU97-sec14L2 細胞の場合のみ示した)。

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 4A, 4B)。更に、感染 3 日後に、JFH-1 の HCV ゲノム RNA の増加が見られた(図 5)。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. 患者由来 HCV を培養細胞で増殖させるため、この 3 年間の研究で以下に述べる 3 種類の細胞を樹立した。

i) Huh7.5.1-sec14L2

まず、研究機関の一年目に、Huh7.5.1

細胞は、JFH-1 が増殖できる細胞なので、この細胞に HCV の増殖に重要な sec14L2 を導入した細胞を樹立した。

ii) NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR122

二年目には、患者由来 HCV が増殖できる細胞の可能性を広げるため、肝臓由来の Huh7.5.1 とは違った臓器由来の 3 種類の細胞 (NCI-H1915: ヒト肺がん細胞由来、JAR: ヒト繊維毛癌細胞由来、NEC-8: 胎児性癌細胞由来) に sec14L2 を導入した。更に HCV の増殖に重要な肝臓細胞特異的に発現する miR122 も導入した。更に、HCV の感染を阻害する RIG-I の遺伝子を破壊した。

iii) FU97-sec14L2

二年目では、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 患者由来 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。

この点を改善するため、研究の三年目には、FU97 細胞を用いた。この細胞は Huh7.5.1 と同じく、肝臓癌由来の細胞で、JFH-1 とは違う JFH-2 (遺伝子型は JFH-1 と同じ 2a) が増殖できる。

また、この細胞では、肝臓細胞特異的に発現する miR122 が既に高発現している。それに加え HCV の増殖に重要な -fetoprotein も高発現している。従って、sec14L2 をこの細胞に挿入して、tGFP の

発現する細胞を選択すれば、理論上、sec14L2, miR122, -fetoprotein が同時に100%発現する細胞を選択することが出来る。

これら3種類の細胞を用いて患者由来 HCV の増殖を調べたが、HCV ウイルス蛋白質が検出されるレベルの HCV の増殖は今のところ見られていない。しかし、NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR12 細胞で、HCV ゲノム RNA レベルでは僅かに HCV の増殖が検出された。

2. 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、この研究で樹立した三種類の細胞に感染させ、長期にわたり培養し、HCV と細胞に変異が入り、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、変異前の患者由来 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。

E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖させるために、HCV の増殖に重要な sec14L2, miR122、及び -fetoprotein とを同時に高発現させ、更に RIG-I を欠損させたりしたが、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。しかし、HCV RNA レベルでは HCV の増殖が僅かながら検出できた。

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. 各細胞のtGFPの発現

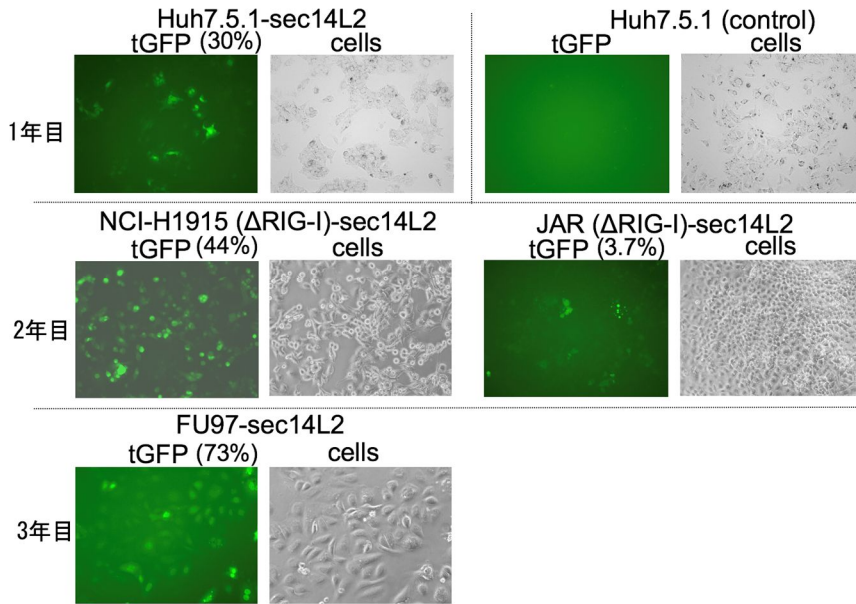


図2. Huh7.5.1-Sec14L2細胞のSec14L2, tGFPの発現、局在

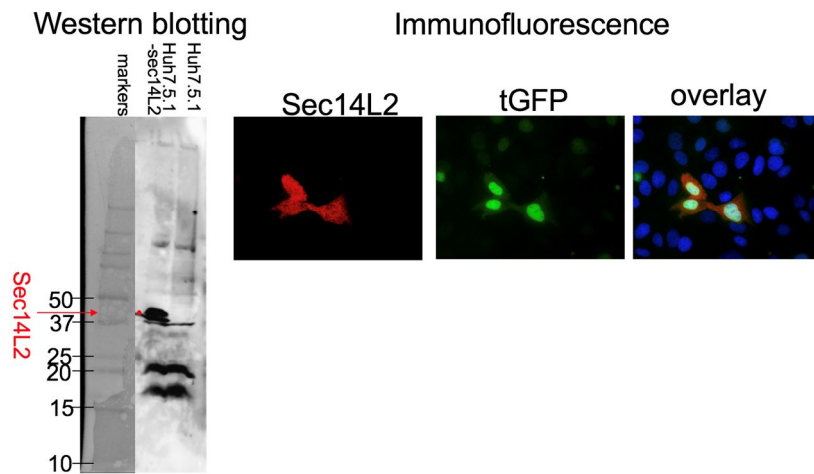


図3. NCI-H1915 (Δ RIG-I)-sec14L2へのmiR122の導入

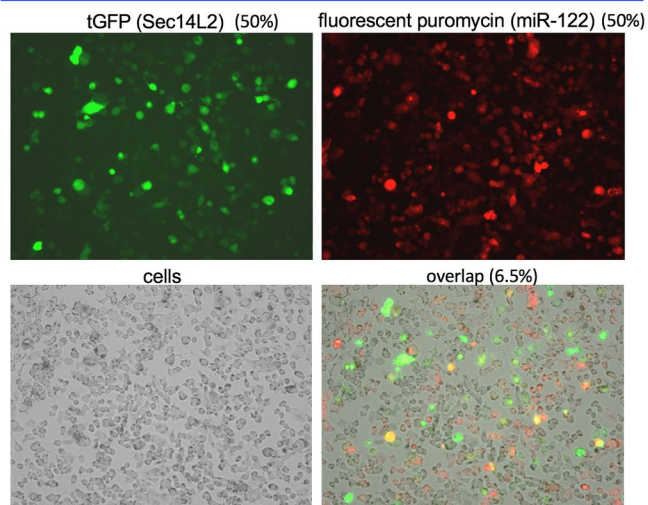


表1. 作製した各細胞のHCV増殖に重要な遺伝子発現

細胞	sec14L2	miR122	RIG-I	α-fetoprotein
Huh7.5.1-sec14L2	導入	高発現	機能的に欠損	高発現
NCI-H1915 (ΔRIG-I)-sec14L2-miR122	導入	導入	欠損させた	未確認
FU97-sec14L2	導入	高発現	未確認	高発現

図4A. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖 HCV コア蛋白質

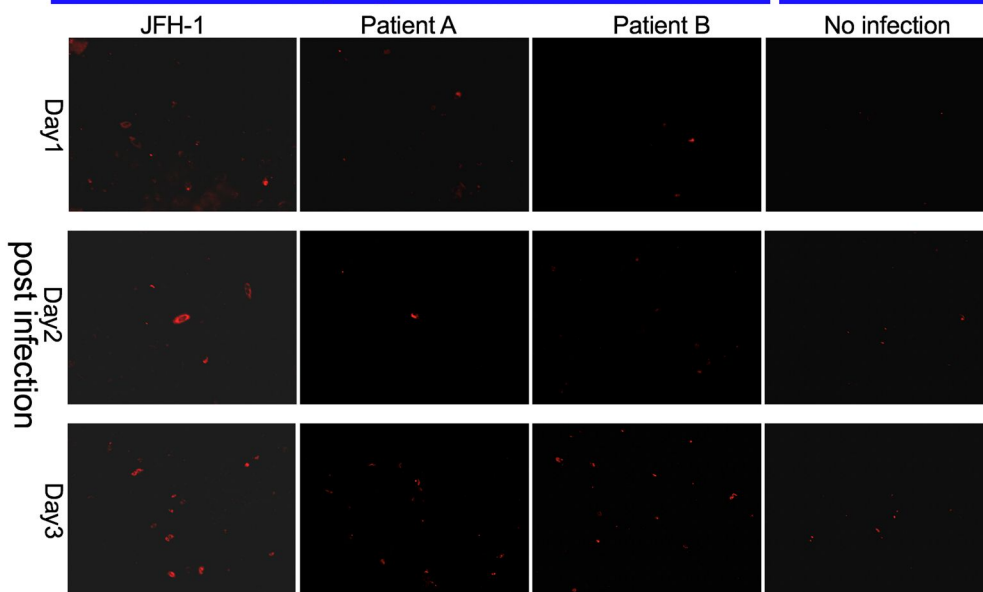


図4B. FU97 (+Sec14L2)で増殖したJFH-1 コア蛋白質 (拡大)

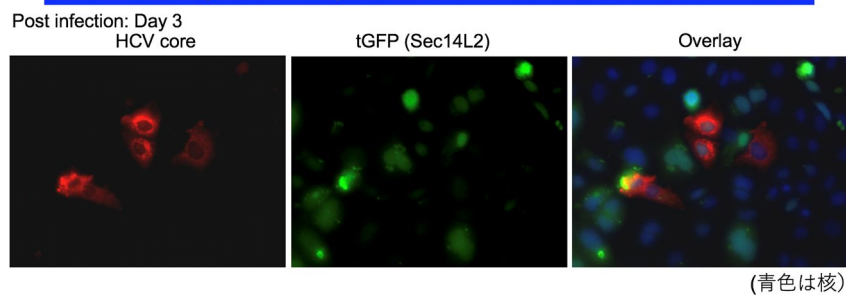


図5. 患者由来HCV (A, B)の各細胞での増殖 HCV RNA

