

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究推進事業

**培養細胞感染系の確立されていない病原体の
実験技術の開発と予防診断法に関する研究**

平成26年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成27(2015)年 3月

目 次

・ 総括研究報告

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

石井 孝司

□ . 分担研究報告

1. ノロウイルス感染、複製機構の研究

カリシウイルスのリバースジェネティックス

片山 和彦

2 . ノロウイルス複製機構について

染谷 雄一

3 . マウスノロウイルスのベクター化に関する研究

中西 章

4. ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団の包括的遺伝系統解析・

本村 和詞

5 野生ネズミ由来ノロウイルスの遺伝子解析

遠矢 幸伸

6 . ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立

佐藤 俊朗

7 . ウシロタウイルスの発生動向と遺伝学的特性

鈴木 亨

8 . 高感度ウイルス検出技術の開発 メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染侵入機構…………… 鈴木 哲朗	
9 . ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌 ……………	
柊元 巖	
10 新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究 ……………	
勝二 郁夫	
11 . E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築および増殖メカニズムの解明……………	
石井 孝司	
12 . Rat HEV の細胞培養およびリバーシジェネティックス法による Rat HEV の 作成 ……………	
李 天成	
.研究成果の刊行に関する一覧表 ……………	

. 總括研究報告

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の 開発と予防診断法に関する研究

研究要旨 培養細胞での感染増殖系が確立されていないためにウイルス学的研究に制約があり、その感染症対策が十分でないウイルスについて、診断技術・実験モデルの開発、予防・治療法開発のための基盤研究等を包括的に行う。食中毒、下痢症の原因であるヒトノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス、最近同定された新規ヒトポリオーマウイルス(MCV、KIV、WUV など)、子宮頸癌の原因ウイルスであるヒトパピローマウイルス(HPV)、ウイルス性肝炎の原因ウイルスである E 型肝炎ウイルス(HEV)を対象とした。

NoV：ヒトおよびマウス NoV の感染性クローンにレポーター遺伝子を組み込むことに成功した。感受性細胞の探索や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。また、小腸のオルガノイドを使ってヒト NoV を培養できるか検討を開始した。NoV 非構造蛋白を発現する RNA レプリコン候補遺伝子を作成した。マウス NoV の VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によってウイルス遺伝子発現が誘導されたことから、NoV において初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になった。次世代シーケンサーを用いて、感染者体内に存在する NoV 配列を包括的に解析した結果、優位に検出された GII.4 2006b 亜株は、どの集団でもウイルスコピー数が高く、複製能・増殖能に優れたウイルスである可能性が示唆された。韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミ由来 NoV は、実験用マウス由来 NoV とは異なる新規 NoV のグループに属することを明らかにした。

ロタウイルス：ウシならびにブタロタウイルス B 複数株を用いた遺伝子解析の結果、動物由来ロタウイルス B は国内外問わず、異なる遺伝的背景を有する複数の株が世界中に存在・まん延していることが明らかとなった。

ポリオーマウイルス：Pseudovirion を利用した感染モデル系から、ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

HPV：一部の子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）の擦過細胞検体において、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に C to T の置換変異が蓄積している現象（hypermutation）を見出した。また HPV16 ゲノムを維持する CIN 由来のヒト培養細胞において APOBEC タンパク質を強制的に発現させると、同様の hypermutation が HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に導入された。APOBEC タンパク質が HPV ゲノムに hypermutation を導入し、HPV ゲノムの細胞 DNA への組込みを容易にすることで、子宮頸部発癌に関わる可能性が示唆された。脱ユビキチン化酵素 USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する小分子のスクリーニングおよび特殊ペプチドの開発を試み、インヒビターライブラリー-320 コンパウンドから最終的に 5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

HEV：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、化合物ライブラリから現在までに複数の HEV レプリコン増殖阻害を有する化合物を同定した。Rat HEV が増殖できる細胞培養系を樹立した。また、in vitro で合成した完全長の rat HEV RNA をヌードラット肝臓に直接接種したことにより、感染性をもつ Rat HEV を獲得した。

高感度ウイルス検出技術の開発：局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出していることを明らかにした。

研究代表者

石井孝司 国立感染症研究所・室長

分担研究者

鈴木哲朗 浜松医科大学・教授
片山和彦 国立感染症研究所・室長
李 天成 国立感染症研究所・主任研究官
染谷雄一 国立感染症研究所・主任研究官
柊元 巖 国立感染症研究所・室長
勝二郁夫 神戸大学医学部・准教授
鈴木 亨 動物衛生研究所・主任研究員
中西 章 国立長寿医療研究センター・室長
本村和詞 大阪大学微生物病研究所・特任准教授
遠矢幸伸 日本大学生物資源科学部・教授
佐藤俊朗 慶応義塾大学医学部・特任准教授

研究協力者

田中智之 堺市衛生研究所・所長
石井克幸 国立感染症研究所・主任研究官
朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所・教授
佐藤 豪 日本大学生物資源科学部 助手
朴 英斌 国立感染症研究所・研究員
戸高玲子 国立感染症研究所・非常勤職員
吉田和央 国立長寿医療研究センター・流動研究員

A. 研究目的

本研究班では、培養細胞での感染増殖系が確立されていないためにウイルス学的研究に制約があり、その感染症対策が十分でないウイルスについて、診断技術・実験モデルの開発、予防・治療法開発のための基盤研究等を包括的に行うことを目的とする。本研究で開発、確立されるウイルス増殖（モデル）系を利用することにより、これらのウイルスの感染増殖、病態発現の解析を進めることが可能になると考えられる。このような基盤的研究を発展させることにより、ウイルス性下痢症、子宮癌、慢性肝疾患等の制圧に貢献し、医療、福祉の向上に繋がり医療費の低減に寄与することが期待される。

B. 研究方法

1. ノロウイルス（NoV）

1-1 MuNoV、HuNoV のリバーシジェネテ

ックシステム（RGS）

pHuNoV_{U201F} を骨格として、U201 株 cDNA 部分を MNV genome cDNA に置き換え、pMNV_{S7F} を構築した。株化細胞（HEK293T）に HuNoV pKS-U201F または pKS-FCV-F をトランスフェクションした後上清を回収し、感受性細胞がある MNV は RAW264.7 細胞株に感染させ TCID₅₀ を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス titer を定量した。

GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子を作るべく、ORF1 に GFP 遺伝子を導入した。また、細胞内で RdRp の活性を可視化してモニターするために、ORF2 に GFP を導入した。また、活性を数値化するために、ウミシイタケルシフェラーゼ（Rluc）やナノルシフェラーゼ（Nluc）をレポーターとして導入した。

1-2 NoV レプリコンの構築

全塩基配列が解明されている NoV チバ株（GI.4）RNA レプリコン候補遺伝子作成のため、C 型肝炎ウイルス（HCV）JFH-1 株由来の IRES 支配下に置かれたネオマイシン耐性遺伝子（Neo）断片、GFP 融合 Neo 断片、分泌型 NanoLuc（secNLuc）遺伝子断片を導入した。また、細胞培養が可能ないげ歯動物ノロウイルス MuNoV1 株についても同様の操作を行った。

1-3 MuNoV のベクター化

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS MuNoV S7 DNA を元に、MuNoV ORF3 の一部欠損変異体を作製した。また、MuNoV の ORF2 および 3、ORF3 単独を発現するベクター（pKS MNV ORF23 あるいは pKS MNV ORF3）も作成した。これらの pKS MNV S7 DNA そしてその変異体を単独に、あるいは ORF2、3 を発現するプラスミドと共に 293T 細胞にトランスフェクションによって導入し、その培養上清を RAW264.7 細胞に感染させた。MuNoV 遺伝子発現の有無を VP1/VPg の免疫染色により確認し、293T 細胞上清の感染性粒子の存在を検証した。

1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実態

2012 年 3 月に島根県で発生した集団食中毒

事例を対象に解析した。原因施設調理従事者 (n=7) から、汚染食材を介して、原因施設弁当喫食者 (n=9)、関連他施設 A 料理喫食者(n=3)、関連他施設 B 料理喫食者(n=6)と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、カプシド遺伝子シエル領域の配列情報を取得し、配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-house の配列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調べ比較した。

1-5 野ネズミ由来 NoV の検出と培養細胞での分離の試み

昨年度の研究で NoV 遺伝子が検出された 4 検体のチェジュセスジネズミ由来腸管内容物の Total RNA から RT-PCR を行い、増幅産物が得られた場合は塩基配列を常法に従い決定した。

1-6 培養腸管上皮細胞感染系の確立

ヒト小腸および大腸粘膜より腸管上皮陰窩を採取し、マトリジェルに包埋し、ヒト腸管上皮幹細胞培養に最適化した培地 (Advanced DMEM/F12, EGF, Noggin, R-spondin, A83-01, Wnt-3A) により培養を行った。ヒト腸管上皮幹細胞のウイルス感染システムの確立のため、GFP 発現カセットを有する自己不活型第三世代レンチウイルスベクターより高力価ウイルス上清を作成した。

2. ロタウイルス

2002 年から 2011 年にかけて山形県内で検出されたウシロタウイルス B 12 株を材料に使用した。それら複数株の VP1, VP2, VP6, VP7, NSP1, NSP2 および NSP5 の 8 つの遺伝子について、RT-PCR 法で ORF 全長を増幅し、シーケンス解析を実施した。今回決定したウシロタウイルス B 12 株の各種遺伝子情報から系統樹解析を実施し、本ウイルスの起源並びに生態を明らかにすることを試みた。

3. ポリオーマウイルス

ポリオーマウイルスのカプシドをもつ pseudovirion を以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち分泌

型 Gaussia ルシフェラーゼ(Gluc)を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、連続密度勾配遠心により分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 pseudovirion を回収した。

4. パピローマウイルス (HPV)

4-1 ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

HPV16 陽性の子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の擦過細胞から DNA を抽出して、Differential DNA Denaturation PCR(3D-PCR)法により、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内の A/T-rich hypermutation について検討した。臨床検体は、NTT 東日本関東病院・産婦人科の近藤一成先生より供与を受けた。また、CIN 由来の W12 細胞を用いて、APOBEC3 タンパク質による HPV16 ゲノムへの変異導入の可能性についても、3D-PCR 法にて検討した。

4-2 in vitro USP15 assay 系の作製

昨年、樹立した DUB-Glo protease assay による in vitro USP15 assay 系を用いて inhibitor library から阻害活性物質をスクリーニングを行った。阻害活性の陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にした USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析した。

4-3 大腸菌を用いた Avi-His₆-USP15 UCH の精製と結合ペプチドのスクリーニング

Avi-His₆-USP15 UCH(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP(GE Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した (東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)。

5. E型肝炎ウイルス (HEV)

5-1 HEV レプリコンの構築

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。

5-2 ラット HEV の解析

Rat HEV を感染したヌードラット (Long Evans *rnu/rnu*) の便材料をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清中の rat HEV の増殖を、電子顕微鏡や免疫染色で確認した。また、感染細胞培養上清をヌードラットに接種することにより産生されたウイルスの感染性を確認した。

リバースジェネティクス法による rat HEV 作製をするため、rat HEV ドイツ株 (GU345042) から ratHEV RNA を合成し、ヌードラット肝臓に直接接種した。経時的に採血、採便し、血中および便中の Rat HEV RNA を RT-PCR 法により測定し、ウイルス増殖の有無により、全長 rat HEV RNA の感染性を評価した。また、感染ヌードラット糞便中の Rat HEV の感染性を確認した。

6 高感度ウイルス検出技術の開発

表面を凹凸加工した金ナノプラスフィルム (NPGL) をシステアミン処理しアミノ基または量子ドット (QD) 表面にアミノ基修飾を施した。抗インフルエンザウイルス HA 抗体を *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) / *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 処理した後、上記 NPGL、QD にそれぞれコンジュゲートした。蛍光測定用 96 ウェルプレート各ウェルに抗 HA 抗体-NPGL を入れ、種々の濃度のインフルエンザウイルス液を添加。さらに抗 HA 抗体-QD を添加し反応させ、励起 380 nm、発光 518 nm 波長で蛍光強度を測定した。

C. 研究結果

1. ノロウイルス (NoV)

1-1 MuNoV、HuNoV の RGS

蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子作製の試み

GFP 遺伝子を NTPase コード領域と 3A-like protein コード領域の間に挿入したコンストラクトを、細胞のトランスフェクションすると、細胞内部にブロードに GFP の発光が認められた。上清からウイルスを精製し、電子顕微鏡で観察すると、産生効率は低いが生ウイルス粒子が観察された。生ウイルス粒子から RNA を抽出し、抽出した RNA を細胞内にトランスフェクションすると、細胞に GFP のシグナルが認められた。この結果は、生ウイルス粒子は GFP が挿入されたゲノムを内包しており、そのゲノムは細胞内で自己複製が可能であることを示唆していた。

生ウイルス粒子の感染性を確かめるため、MNV を用いて、GFP 遺伝子の挿入を試みた。N-terminal protein と NTPase の間のみ GFP 遺伝子の受け入れが許され、それ以外の場所は RGS が稼働しなかった。GFP を挿入したクローンを 293T 細胞にトランスフェクションし、回収した上清を MNV 感受性細胞である RAW264.7 細胞に感染させ、GFP の蛍光を観察した。本実験で産生される感染性粒子への GFP 遺伝子内包には成功したが、GHFP 遺伝子は複製過程で排除されるか、リバータントの出現によって、淘汰されていると考えられた。

細胞内 RdRp 活性測定法構築の試み

RdRp の活性測定のため、GFP を ORF2 に組み込んだ pHuNoV_{U201F-2GFP} とネガティブコントロールを、それぞれ COS7 細胞にトランスフェクションして、GFP の発現を観察したところ、トランスフェクション 12 時間後から GFP の発色が認められ、GFP が発現している細胞の数、発色強度は、30、36 時間に最大になった。それに対し、ネガティブコントロールをトランスフェクションした細胞では、48 時間後に至っても GFP の発色は認められなかった。

次に、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201FΔ4607G-2RS} を用いてルシフェラーゼによる RdRp 活性の定量化を検討したところ、トランスフェクション後 6 時間から上昇を始め、24 時間でピークに達した後、42 時間後にはバックグラ

ウンドと同レベルにまで低下した。他方、ネガティブコントロールをトランスフェクションした細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から徐々に上昇を始めたが、42 時間でピークに達した後、48 時間後に向けて低下した。ピーク時の 24 時間では、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201FA4607G-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性の差は 8 倍程度の開きがあり、24 時間後には RdRp 活性の定量、活性差測定が可能であると思われた。

1-2 NoV レプリコンの構築

培養細胞での NoV 粒子形成機構を解明するため、RNA レプリコンの作成を試みた。HuNoV チバ株 (GI.4) と MuNoV のレプリコン数種を構築し、Vero 細胞に導入したが現在のところ薬剤耐性を示す細胞は得られていない。構造蛋白を恒常的に発現する細胞株は、現在薬剤耐性細胞を取得しており、目的蛋白の発現について確認を行っている。

1-3 MuNoV のベクター化

MuNoV 感染性ゲノム配列をコードする pKS MNV S7 の VP2 コード領域 (ORF3) の欠損変異、あるいは stop codon 導入による点変異の各変異体を 293T 細胞にトランスフェクションし、その細胞上清を RAW264.7 細胞に共培養させることにより感染性粒子の形成を調べた。全ての変異体について 293T 細胞に導入した際の細胞上清には、RAW264.7 細胞を VP1/VPg 陽性にできるものではなく、感染性粒子の形成は見られなかった。以上の変異体についてさらに、293T 細胞へ pKS MNV ORF23 あるいは pKS MNV ORF3 との共導入を行い、293T 細胞内での VP2 の補完を試みたが、その細胞上清の中には RAW264.7 細胞を VP1/VPg 陽性にできるものはなかった。しかし同じ上清を RAW VP2 と共培養したところ、293T 細胞への欠損および点変異体と pKS MNV ORF3 の共導入、 ΔM と pKSMNV ORF23 の共導入で得られたその細胞上清には RAW VP2 細胞でウイルス遺伝子発現を示す VP1/VPg 陽性細胞の出現が認められた。

1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実

態

25 検体からカプシド遺伝子シエル領域の配列情報を取得したところ、シエル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、25 検体中 23 検体で検出された。食中毒事例では原因施設調理従事者群 (n=7) は 7 種、原因施設弁当喫食者群 (n=9) は 7 種、関連他施設 A 料理喫食者群 (n=3) は 4 種、関連他施設 B 料理喫食者群 (n=6) は 5 種の、異なる遺伝子型と亜株が検出された。2012 年秋冬期に大流行した GII.4 2012 Sydney は、個体内に微小集団 (0.1 - 22.0 %) として、13 例で検出された。2006b は、調理従業員発症者群で 7 名中 6 名、弁当喫食者で 9 名中 9 名、関連他施設 A 料理喫食者では、3 名中 3 名、関連他施設 B 料理喫食者群では、6 名中 6 名検出された。

1-5 野ネズミ由来 NoV の検出と培養細胞での分離の試み

チェジュセスジネズミ由来腸管内容物 4 検体のうち、1 検体において、ORF2 及び ORF3 を含む NoV ゲノムの 3'側領域 2,867 塩基の配列を決定できた。系統樹解析の結果、実験用マウス由来 NoV とは異なり、ヨーロッパの野生ネズミから検出された NoV とクラスターを形成した。

実験用マウス由来 NoV、野生げっ歯類由来 NoV との相同性を調べたところ、ORF2 は塩基、アミノ酸ともに実験用マウス由来より野生げっ歯類由来 NoV との方がやや相同性が高かった。また、アミノ酸配列における変異を調べると、P2 領域において変異が多く認められた。推定 ORF4 領域でも同様の傾向が見られた。

2. ロタウイルス

ウシロタウイルス B 12 株の各遺伝子の配列の解析結果から、ヒトやブタロタウイルス B 株と遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。また、インドで検出されたウシロタウイルス B 株との比較では、今回解読した全ての遺伝子において、ORF の長さは同じであったが、配列が異なることが明らかとなった。

ロタウイルス B の各遺伝子に関する系統樹解析の結果、山形県内で検出されたウシロ

タウウイルス B 株は過去に北海道、さらに米国で検出されたウシロタウイルス B 株と同じ遺伝子型に分類されたが、インドで検出されたウシロタウイルス B 株とは異なる遺伝子型に分類された。また、ウシロタウイルス B 株は系統発生的にヒトやブタロタウイルス B 株とは明確に区別された。

3. ポリオーマウイルス

これまでに高い親和性を示すことが見いだされている GD3 と GM3、MCPyV 感染に関与すると文献的に知られている GT1b について pseudovirion 感染系で MCPyV の感染感受性に寄与するかを調べた。GM95 (マウス由来ガングリオシド合成酵素欠損) へ GM1, GM3, GD3, GT1b を添加し、SV40 および MCPyV の pseudovirion を接種した結果、GD3 が MCPyV の細胞への感染侵入に最も重要な役割を果たしていることが示された。

4. パピローマウイルス (HPV)

4-1 ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

軽度病変 (CIN1) 11 例および高度病変 (CIN3) 27 例を解析した結果、E2 領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%)、CIN3 で 6 例 (22%) 検出された。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコーディング鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C to T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていた。

W12 細胞をインターフェロン β で処理すると、幾つかの APOBEC3 タンパク質 (APOBEC3A, 3F, 3G) の mRNA 発現が誘導され、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内に C to T hypermutation が検出された。この現象は、APOBEC3G に対する siRNA の導入によりブロックされた。また W12 細胞に APOBEC3A, 3G を強制発現すると、同様の hypermutation が検出された。

4-2 in vitro USP15 assay 系の作製

DUB-Glo protease assay による in vitro

USP15 assay 系を用いてインヒビターライブラリー (320 コンパウンド) から阻害活性物質をスクリーニングしたところ、DUB activity を阻害するコンパウンドが 33 個見つかった。陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48) を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析したところ、5 種類のコンパウンドで著明な USP15 阻害活性を確認した。

4-3 大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5 α で発現させアフィニティ精製した。Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチドをスクリーニングし、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

5. E 型肝炎ウイルス (HEV)

5-1 HEV レプリコンの構築

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かと思われる。これらの阻害剤のウイルス複製における作用機序について解析を進める。

5-2 ラット HEV の解析

Ferret HEV-LPs をバキュロウイルス発現系を用いて作成した。抗 ferret HEV-LPs 抗体は G1, G3, G4, rat HEV との交叉反応を示したが、G3 HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を中和しなかった。また、アメリカから輸入された実験用フェレットから抗 ferret HEV IgG および IgM 抗体が検出された。

6 高感度ウイルス検出技術の開発

NPGL 含各ウェルへ 1~1000 PFU/mL の種々の濃度のインフルエンザウイルス H3N2 を添加し、さらに QD を反応させたところ 5~1000 PFU/mL でウイルス濃度-蛍光強度の相関 (直線性) が認められた。このウイルス濃度レンジで定量測定可能と考えられる。また、本開発技術は一般医院で診断に用いられ

ているイムノクロマト法に比べ 100 倍程度高感度であると結論された。

D. 考察

ノロウイルス

NoV のリバースジェネティックシステムを構築し、ORF1、ORF2 それぞれにレポーター遺伝子を挿入し機能させることに成功した。HuNoV の場合、感受性を示す細胞がまだ見出されていないため感染性粒子であるかを実証するのが困難であるが、感染性粒子である可能性は極めて高いものと推察される。ORF1 にレポーター遺伝子を挿入した場合は複製過程で排除されるか、リバータントの出現によって、淘汰されていると考えられ、今後継代可能な GFP 遺伝子内包ウイルスの作製を試みる。また、ORF2 にルシフェラーゼを挿入した NoV は、RdRp 活性の定量、活性差測定に有用と考えられ、阻害剤のスクリーニングへの応用が考えられる。また、レプリコンを用いた系も確立できれば同様に有効と思われる。一方、ヒト腸管上皮オルガノイドのウイルス感染系の基盤技術も確立され、HuNoV 感染実験の体制が整った。

293T 細胞内での組換え MuNoV 粒子の形成過程、そして permissive な細胞 (RAW264.7 細胞) 内でウイルス遺伝子発現での過程、の両方に VP2 を補完した場合、ゲノム自身に VP2 を欠損していても、タンパクをトランスに供給することによりウイルス遺伝子発現を開始できることが示された。このことは、VP2 は構造タンパク質としての役割だけでは無く、ウイルス遺伝子発現に対しても機能的な役割を果たしていることが示唆される。

次世代シーケンサーを用いた NoV による集団食中毒事例での包括的な配列解析により、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイルス亜集団が抽出されるボトルネックが生じている可能性が示唆された。ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

韓国の済州島において固有種であるチェジュセスジネズミから新たな NoV 遺伝子が検出された。系統解析の結果、この NoV 遺伝子が既知のどの系統とも異なることが示唆された。NoV は広範な地域において、多様な種類のげっ歯類に保持されている可能性が示された。

ロタウイルス

遺伝子解析の結果、わが国で流行しているウシロタウイルス B 株は Nemuro 株と遺伝学的に近縁な株が全国に存在・伝播していることが示唆された。また、系統樹解析の結果、わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は米国で検出されたウシロタウイルス B 株と共通の起源に由来することが示唆されたが、インドで検出された株とは早い段階で分岐し、それぞれがこれまでに交わることなく独自に進化を遂げてきた可能性が示唆された。今後、東南アジア諸国や世界中に拡散しているウシロタウイルス B、あるいは他動物種由来のロタウイルス B 株を収集し、それらの遺伝子解析を実施することで、ウシロタウイルス B を含めたロタウイルス B の生態ならびに起源が明らかになってくることと思われる。

ポリオーマウイルス

MCPyV の細胞への感染侵入に、ガングリオシド GD3 が重要な役割を担っている可能性が示された。MCPyV と糖鎖との結合にはラクトースにシアル酸が一個結合した構造で十分であるが、細胞への侵入にはさらにシアル酸が結合した構造が有効であることが示された。GD3 は、脳細胞分化に関与しており、神経外胚葉性細胞や上皮性癌細胞では高発現を示すのに対し、分化度の高い成熟神経細胞では低発現であることが知られている。GD3 の生理的役割と MCPyV の感染様式が関連するか今後明らかにしたい。

パピローマウイルス

臨床検体で検出された C to T hypermutation の標的配列から、APOBEC3 タンパク質の関与が強く示唆された。APOBEC3B が HPV ゲノムにも作用して

hypermutation を導入する可能性が考えられた。一方、臨床検体での HPV ゲノムの hypermutation は著しく低い割合でしか検出されなかったことから、ウイルス増殖や維持に及ぼす影響は小さいことが予想された。

HPV16E6 を排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤開発を目指した。インヒビターライブラリーから、5 種類の小分子化合物で著明な USP15 阻害活性を確認した。USP15 阻害活性を確認できた小分子については今後、細胞内での USP15 阻害活性と E6 への安定性への影響を解析していく予定である。また、USP15 の catalytic domain である UCH domain に結合する 5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。現在、スケールアップして精製中であり、USP15 阻害活性を解析する予定である。

E 型肝炎ウイルス

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た。特に東京大学の化合物ライブラリーから、比較的強い複製阻害活性を有すると考えられる化合物を得ることができた。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。

Rat HEV のヌードラット体内での増幅を確認できたことから、PLC/PRF/5 細胞で増殖された rat HEV が感染性を有することが示された。また、リバースジェネティクス法によって感染性を持つ rat HEV を取得できることが証明された。

高感度ウイルス検出技術の開発

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、マルチウェルプレートで必要試薬と検体を混和し、洗浄操作なく 10 分程度で測定が可能なことを示した。さらに、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルスを検出しうることを明らかにした。種々の臨床検体を用いた解析により本開発

技術の有用性を評価する予定である。

E. 結論

ノロウイルス

HuNoV、MuNoV の感染性クローンに GFP 遺伝子を導入し、感染すると細胞が GFP のシグナルを発する GFP-Tagged progeny virus を産生することに成功した。この新生ウイルスは、感受性細胞の探索、スクリーニングに有用である。また、機能タンパク質 (RdRp) の活性測定システムを構築した。本システムによって、RdRp の活性差を測定することで、HuNoV の病原性を調べることができるともかもしれない。NoV チバ株の RNA レプリコン候補遺伝子およびその対照としてマウスノロウイルスの RNA レプリコン候補遺伝子も作成した。また、ヒト腸管上皮オルガノイド培養系を確立し、HuNoV 感染が成立するか検討を開始した。

VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によりウイルス遺伝子発現を誘導することが出来た。この結果は、ノロウイルスにおいて初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になったことを示しており、HuNoV カプシドタンパク質機能を解析できる実験系としての MuNoV ベクター系の構築へ前進した。

次世代シーケンサーを用いて、個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにした。

チェジュセスジネズミから検出された NoV ゲノムの塩基配列 (2,876 塩基) を決定し、マウス由来の NoV とは異なる特性を有する NoV であることが示唆された。今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして非常に期待される。

ロタウイルス

わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は、インドで検出されたウシロタウイルス B 株と遺伝的に異なる起源に由来することが明らかとなった。

ポリオーマウイルス

ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たす可能性が示された。

パピローマウイルス

子宮頸部の HPV 感染病変において、APOBEC3 タンパク質が HPV ゲノムに変異を導入することで、子宮頸部発癌に関与する可能性が示唆された。

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6 の安定化因子である USP15 の阻害剤作製を試みた。インヒビターライブラリーから USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

HEV

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。

Rat HEV 培養系が樹立できたことから、今後 rat HEV 複製のメカニズムの解明が可能となる。また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 感染性クローンの作製は、cDNA への特定の突然変異の導入やウイルス感染のトロピズムなどの研究に非常に有用である。

高感度ウイルス検出技術の開発

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス高感度検出系を開発した。

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 John R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E

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)
6. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
7. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. J. Vet. Med. Sci. 76(7), 1045-50, 2014.
8. Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol, in press, 2015.
9. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.
10. 片山和彦 ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型2014年版 IASR

- ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.
11. 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol.17 No.1 12-15, 2014.
 12. 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No.4723, 59-60, 2014.
 13. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol.20 No.12, 10-12, 2014
 14. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19, 2014
 15. 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策ICTジャーナル vol.9 No.4 2014.
 16. 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.
 17. 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.
 18. Watanabe M., Phamduong E., Huang CH., Itoh N., Bernal J., Nakanishi A., Rundell K., Gjoerup O., Kasamatsu H. Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells. *Journal of Virology*, 87: 5053-5064 (2013)
 19. Tange S., Zhou Y., Nagakui-Noguchi Y., Imai T, and Nakanishi A. Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase. *Virology Journal*, 10: 153 (2013)
 20. Diotti RA., Nakanishi A., Clementi N., Mancini N., Criscuolo E., Solfrosi L, and Clementi M. JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes? *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: Article ID 967581, (2013)
 21. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus. *J. Virol. Methods*. 207: 178-81 (2014)
 22. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K, Tohya Y. Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *J Vet Med Sci*. 76: 1045-50 (2014)
 23. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. in press: doi: 10.1038/nm.3802 (2015)
 24. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGFβ Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer. *Cancer Res* 75: 766-76 (2015)
 25. Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. *Integr Biol (Camb)* 7: 213-28 (2015)
 26. Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5: 5728 (2014)
 27. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res* 74: 2882-91 (2014)
 28. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of RORγt-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1820-7 (2014)
 29. Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T,

- Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR γ t⁺ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1426-34 (2014)
30. Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* 9: e84619 (2014)
 31. Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther* 15: 81-8 (2014).
 32. Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet* 5:169 (2014)
 33. Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)* 1: 14 (2014)
 34. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus Res.* 197: 26-34 (2014).
 35. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. *Microbiol. Immunol.* 58: 530-535, (2014).
 36. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 26: 223-227, (2014).
 37. Marthaler D, Suzuki T, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnsens J. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172: 359-366, (2014).
 38. Mawatari T, Hirano K, Tsunemitsu H, Suzuki T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan 2003-2010. *J. Gen. Virol.* 95: 1117-1125, (2014).
 39. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. *J Virol.* 88: 7541-7555, 2014.
 40. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol.* 89: 2220-2232, 2015.
 41. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 95: 2658-2667, 2014.
 42. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 207: 38-44, 2014.
 43. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. *Biosens Bioelectron.* 58:33-39, 2014.
 44. Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A

- and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** in press.
45. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. **J. Virol.** 89: 2448-2452 (2015)
 46. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 44: 910-917 (2014)
 47. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. **J. Virol.** 88: 1308-1317 (2014)
 48. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. **Antioxidants & Redox Signaling** 21 (1): 1-16 (2014)
 49. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono, P, Shoji I, Deng L, Hotta, H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., **PLoS One**, 9: e98877 (2014)
 50. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. **Microbiology and Immunology**, 58 (3): 188-94 (2014)
 51. Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto, S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. **Microbiology and Immunology**, 58 (3): 180-7 (2014)
 52. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yang T, Takeda N, and Wakita T. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. **Intervirology**. 2015, *In press*.
 53. Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Li TC, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. **BMC Vet Res.** 2015 Jan 27;11(1):11.
 54. Li TC, Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T and Maeda K. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. **JJID** 2015.68(1).60-62.
 55. Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, and Wakita T. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. **Emerg Infect Dis.** 2014.20 (4),709-712.
- ## 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 粒子のマーマセットにおける抗 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
 14. Nakanishi A., Tange S, Tasaki H, Zhou Y. Association of autophagic process during human astroviral infection. **American Society for Virology** (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, United States
 15. 中西 章、山本真由子. ポリオーマウイルスの細胞感染効率率は Vp2/3 が関与する細胞内移行ステップに影響される. **第 62 回日本ウイルス学会学術集会** 2014 年 11 月 12 日 横浜
 16. Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A. Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes. **第 37 回日本分子生物学会** 2014 年 11 月 27 日 横浜
 17. 染谷雄一「ノロウイルスプロテアーゼの基質特異性について」日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
 18. Suzuki T. Whole-genome characterization of animal rotavirus C. IUMS2014, Motreal, Canada, Jul 2014.
 19. 鈴木 亨、馬渡隆寛、平野かおり、宮崎綾子、恒光 裕. 国内におけるウシロタウイルスの遺伝的多様性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11.
 20. 森 清一郎、柗元 巖. ヒトパピローマウイルス 16 型のがん蛋白質 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの活性化 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月、横浜
 21. 柗元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名敬 日本人女性の CIN2/3 および子宮頸部浸潤癌での HPV 遺伝子型分布 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月、横浜
 22. 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柗元 巖 ヒトパピローマウイルス 16 型 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの

- 活性化機構 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月、横浜
23. 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柗元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道 APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染性を低下させる 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月、横浜
 24. 増田 雄司、柗元 巖、益谷 央豪 Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月、横浜
 25. Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I. Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16 29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
 26. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology. 29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
 27. Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
 28. Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
 29. Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 30. Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 31. Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 32. Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 33. Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 34. 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素SMYD3の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 35. 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるTGF- β スーパーファミリーにおけるSmad2/3とSmad1/5/9経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 36. 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 37. 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイル

- ス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
38. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
39. Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
40. 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月 25-27 日, 2014 年.
41. 李天成, 網康至, 須崎百合子, 浅沼秀樹, 岸田典子, 白倉雅之, 武田直和, 脇田隆字. フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性と E 型肝炎動物モデル. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月横浜.
42. 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候補に関する研究. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月横浜.
43. 李天成, 米満研三, 寺田豊, 片岡紀代, 網康至, 須崎百合子, 岸田典子, 白倉雅之, 浅沼秀樹, 前田健, 武田直和, 脇田隆字, Ferret HEV 抗体検出系の樹立およびその疫学調査, 第 1 5 7 回日本獣医学会, 2014 年 9 月 北海道
44. バキュロウイルスによるブタサーコウイルス 2 型(PCV2)カプシド蛋白の発現, 中江優貴, 岸塚慎吾, 久保田智江, 青木博史, 池田秀利, 鈴木孝子, 李天成, 福士秀悦, 第 1 5 7 回日本獣医学会, 2014 年 9 月 北海道
45. Reimar Johne, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, Tian-Cheng Li. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology, 18–21 March 2015 in Bochum, Germany.
46. Tian-Cheng Li, Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) July 27-August 1, 2014, Canada.
47. Tian-Cheng Li, Kaori Ochiai, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. The 10st Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC 2014 Conference). May 8-10, 2014. Vietnam.

G. 知的所有権の取得状況
なし

. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）培養細胞感染系の確立
されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の研究 カリシウイルスのリバースジェネティクス

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 室長
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 研究員
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 非常勤職員

研究要旨 昨年度構築したHuNoV GII.3 U201株、GII.4 Saga1株、TCH04-577株、GI.1 NV68株、murine norovirus (MNV) S7株の感染性クローンのうちU201株、MNV-S7株の感染性クローンにGFP遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込むことに成功した。また、小腸のオルガノイド（エンテロイド）を導入し、ヒトノロウイルス感受性細胞の研究を開始した。

A. 研究目的

本研究は、培養細胞で増殖させることのできないヒトノロウイルス（HuNoV）を研究対象とし、培養細胞を用いた効率の良い HuNoV 増殖システム構築を行うことを目的としている。我々の構築した HuNoV のリバースジェネティクスシステムは、プラスミドに組み込んだ HuNoV の cDNA をほ乳類細胞に導入し、HuNoV ウイルスゲノムが内包されたウイルス粒子を産出することが可能である。しかし、電子顕微鏡で粒子を確認するには、225cm² の培養フラスコ 20 枚ほどのスケールを必要とする。HuNoV は、通常、感染者の糞便中に 10⁵⁻⁹ 乗/g 程度の濃度で含まれており、自然宿主であるヒト体内では、非常に効率よく増殖していると考えられる。我々の開発した、HuNoV のリバースジェネティクスシステム(RGS)は、株化細胞内に HuNoV のゲノムを発現させ、ウイルス蛋白質の合成、ゲノムの複製、新生ウイルス粒子産生までを再現できるシステムである。しかし、新生ウイルス粒子の感染性は、HuNoV 感受性細胞が無い場合、検証することができない。

完全な RGS を構築するためには、HuNoV に近縁で、感受性細胞の存在するマウスノロウイルス（MNV）

を代替ウイルスとして用いて研究を進め、その結果を HuNoV に反映させるとよい。昨年度は、MNV-S7 株の cDNA、FC-F4 株の cDNA を EF-1 alpha promoter vector に組み込み HuNoV と全く同様なプラスミドコンストラクトを構築し、RGS の検証を行った。さらに、MNV の RGS を用いて、遺伝子改変感染性ウイルスを作出し、感染性粒子の性状解析、VPg, VP2 の機能解析を行った。本年度は、非構造タンパク質領域もしくは構造タンパク質領域に GFP 等の蛍光たんぱく質やルシフェラーゼなどの蛋白質を組み込み、ウイルスの非構造タンパク質の機能解析、ノロウイルス感染の機序解明のための研究に使用することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2002 年遠矢幸伸現日本大学教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株を MNV として用いた。マウス RAW264.7 細胞、ヒト HEK293T 細胞は、ATCC より購入した。MuNoV S7 株の各種タンパク質、Nterminal protein, NTPase, VPg, protease, RNA dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 に対する抗体は、各タンパク質を大腸

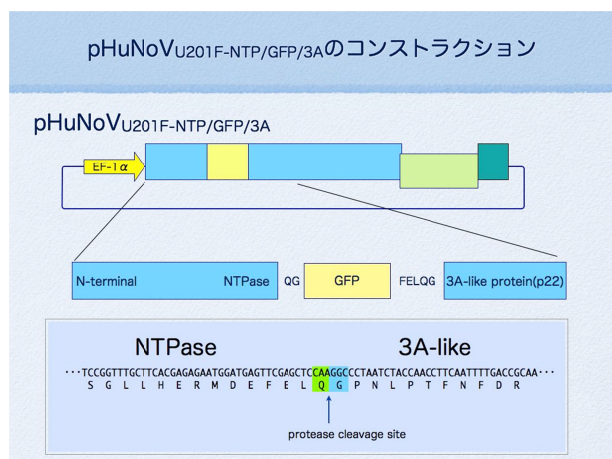
菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して作製した (Nterm, NTPase, VPg, Protease RdRp, VP1, VP2 と表記する。)

2. MuNoV、HuNoV の RGS

pHuNoV_{U201F} (旧称: HuNoV pKS-U201F) を骨格として、U201 株 cDNA 部分を MNV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pMNV_{S7F} (旧称: pKS-MNV-F) を構築した。株化細胞 (HEK293T) を 6 well ディッシュに 90% コンフルエントになるように培養し、4ug の HuNoV pKS-U201F または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清を回収し、感受性細胞がある MNV は RAW264.7 細胞株に感染させ TCID₅₀ を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス titer を定量した。

3. 遺伝子エンジニアリング

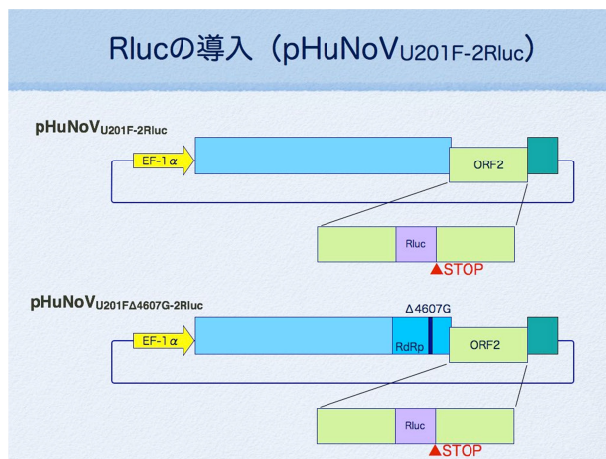
RGSでは、プラスミドを細胞内にトランスフェクションすると、EF-1 プロモーター下流に挿入したHuNoV, MNVのゲノムがドライブされる。その後、ウイルスの複製サイクルが再現されて、感染性粒子が放出される。我々は、GFP等の蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子を作るべく、ORF1にGFP遺伝子を導入した。GFP遺伝子の5'側、3'側それぞれに自身のコードするproteaseで切断されるよう、protease認識モチーフを導入した(図1)。



(図1)

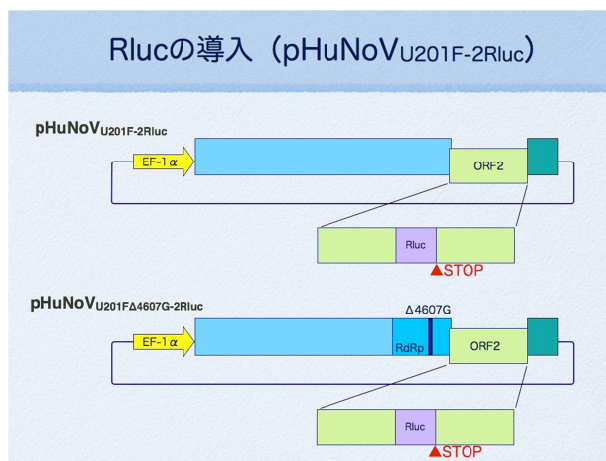
NoVの特徴の一つに、sub-genomic RNAの合成がある。NoVが感受性細胞に感染するとORF1が翻訳され、非構造タンパク質が合成される。非構造タンパク質にはRdRpが含まれている。RdRpが合成されて成熟すると、ゲノムRNAの転写に加え、

ORF2,3をコードするsub-genomic RNAが大量に転写され始める。Sub-genomic RNAの合成量をモニターすればRdRpの活性を測定できると考えられる。そこで、我々は、細胞内でRdRpの活性を可視化してモニターするために、ORF2にGFPを導入した(図2-1)。一方、RdRpのYGDDモチーフ(活性を発揮するために必須なアミノ酸モチーフ)を崩したミュータントpHuNoV_{U201F Δ4607G-2GFP}を作製して陰性コントロールとした。



(図2-1)

また、活性を数値化するために、ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) やナノルシフェラーゼ (Nluc) をレポーターとして導入した(図2-2)。



(図2-2)

4. GFP ならびにルシフェラーゼの検出

細胞内で発現した GFP の検出にはオリンパス社ライブセルイメージャーLCV110を用いた。

ルシフェラーゼを導入したプラスミドを細胞 (Cos7 or 293T) にトランスフェクションした後、24-32 時間後にハーベストして、ルシフェラーゼ

活性を測定した。

5. ヒトエンテロイドの導入準備

近年、ヒトの小腸パイオプシに含まれる腸管上皮細胞の幹細胞を増殖させ、様々なサプリメントを与えつつ培養することで、ヒト腸管組織をマトリジェルという特殊なジェルの中で増殖、組織再構築を行わせることが可能となった (Sato T et. Al. Science 340:1190-1194. 2013)。このインビトロで無限に増殖可能となったヒト腸管組織のオルガノイドをエンテロイドと呼称する。

今年度は、本技術の開発者であり、かつ本研究班の分担研究者でもある慶応大学の佐藤俊朗准教授、杉本真也博士によって樹立されたエンテロイドの導入準備を行った。

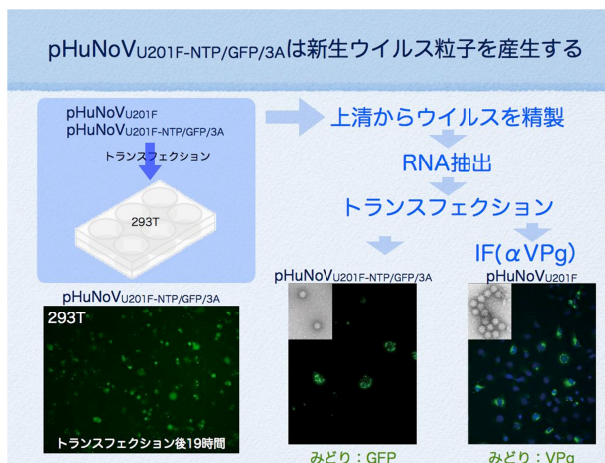
Wnt 溶液、Notch シグナル、上皮成長因子 (EGF)、Bone morphogenetic protein: BMP 阻害物質の内、Wnt 以外は、購入後、小分け分注を行い、-80 に小分け分注した。Wnt 溶液については、必要に応じて慶応大学佐藤准教授の教室より分与されることとなった。その他の市販サプリメントも購入後、同様に小分け分注して保管した。

ヒトエンテロイド培養技術の研修は、研究打ち合わせを兼ねて、2 回実施し、実技研修後、受け入れ先である感染研ウイルス第二部の受け入れ環境を整備した。

C. 結果と考察

(1) 蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子作製の試み

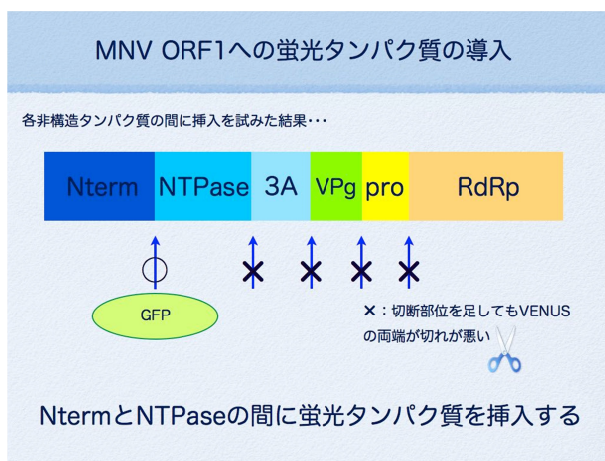
GFP 遺伝子を NTPase コード領域と 3A-like protein コード領域の間に挿入したコンストラクト pHuNoV_{U201F-NTP/GFP/3A} を、細胞のトランスフェクションすると、細胞内部にブロードに GFP の発光が認められた。上清からウイルスを精製し、電子顕微鏡で観察すると、図 3 に示したように新生ウイルス粒子が観察された。新生ウイルス粒子産生効率は、pHuNoV_{U201F} と比較すると 1/10 から 1/100 程度であった。新生ウイルス粒子から RNA を抽出し、抽出した RNA を細胞内にトランスフェクションすると、細胞に GFP のシグナルが認められた。この結果は、新生ウイルス粒子は GFP が挿入されたゲノムを内包しており、そのゲノムは細胞内で自己複製が可能であることを示唆していた。



(図 3)

HuNoV は、感受性株化細胞が無い場合、新生ウイルス粒子の感染性を確かめることができない。そこで、MNV を用いて、GFP 遺伝子の挿入を試みた。

図 4 に示したように、6 種類の非構造タンパク質のプロテアーゼによる切断点に GFP の挿入を試みたところ、N-terminal protein と NTPase の間のみ GFP 遺伝子の受け入れが許され、それ以外の場所は RGS が稼働しなかった。



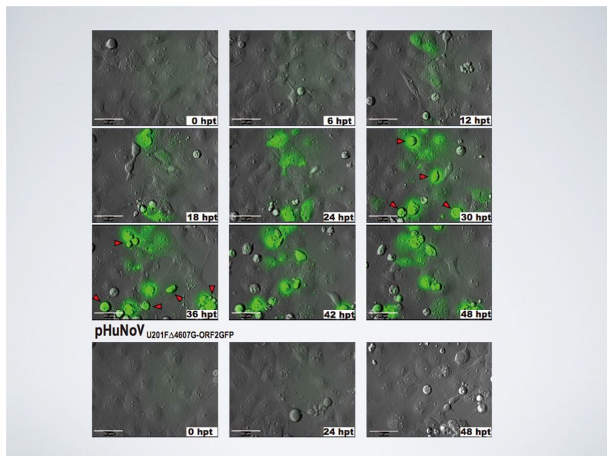
(図 4)

N-terminal protein と NTPase の間に GFP を挿入したクローン pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTP} を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に上清を回収した。回収した上清を MNV 感受性細胞である RAW264.7 細胞に感染させ、GFP の蛍光を観察したところ、感染後 3 時間から GFP の発光が始まり、感染後 12 時間、24 時間と異なる細胞に GFP の発光が観察された。さらに、この培養上清を継代培養したところ、GFP の蛍光を発する細胞数の減少

が認められた。pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTP} から産生される感染性粒子への GFP 遺伝子内包には成功したが、GHFP 遺伝子は複製過程で排除されるか、リバータンの出現によって、淘汰されていると考えられた。今後、GFP 内包感染性粒子の感染後の培養上清に存在すると思われる新生感染性ウイルスのゲノム塩基配列を解析し、その情報を pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTP} にフィードバックすることで、継代可能な GFP 遺伝子内包ウイルスの作製を試みる。

(2) 細胞内 RdRp 活性測定法構築の試み

RdRp の活性測定のため、GFP を ORF2 に組み込んだ pHuNoV_{U201F-2GFP} とネガティブコントロール pHuNoV_{U201F-4607G-2GFP} を、それぞれ COS7 細胞にトランスフェクションして、GFP の発現をライブセルイメージャー LCV110 で観察した (図 5)。

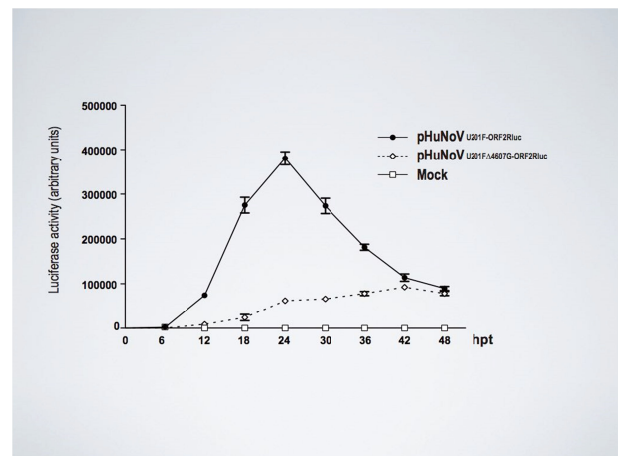


(図 5)

トランスフェクション 12 時間後から GFP の発色が認められ、GFP が発現している細胞の数、発色強度は、30, 36 時間に最大になった。それに対し、pHuNoV_{U201F-4607G-2GFP} トランスフェクション細胞には、48 時間後に至っても GFP の発色は認められなかった。RdRp の活性を GFP の発色によって可視化し、ライブセルイメージャーによってモニター可能となった。

次に、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201F-4607G-2RS} を用いてルシフェラーゼによる RdRp 活性の定量化を検討した (図 6)。pHuNoV_{U201F-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から上昇を始め、24 時間でピークに達した後、42 時間後にはバックグラウンドと同レベルにまで低下した。他方、pHuNoV_{U201F-4607G-2RS}

トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から徐々に上昇を始めたが、42 時間でピークに達した後、48 時間後に向けて低下した。ピーク時の 24 時間では、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201F-4607G-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性の差は 8 倍程度の開きがあり、24 時間後には RdRp 活性の定量、活性差測定が可能であると思われた。



(図 6)

(3) ヒトエンテロイドの導入準備

ヒトエンテロイド継代培養の技術研修が終了した。また、導入準備も整った。今後、国立感染症研究所所内倫理審査にかけ、審査通過後、エンテロイドを導入する予定である。

D. 結論

ヒトノロウイルス U201 株、ネズミノロウイルス MNV-S7 株の感染性クローンに GFP 遺伝子を導入し、感染すると細胞が GFP のシグナルを発する GFP-Tagged progeny virus を産生することに成功した。この新生ウイルスは、感受性細胞の探索、スクリーニングに有用である。また、機能タンパク質 (RdRp) の活性測定システムを構築した。本システムによって、RdRp の活性差を測定することで、HuNoV の病原性を調べることができるとも思われる。小腸のオルガノイド (エンテロイド) を導入準備が整った。HuNoV 感受性細胞樹立に向けた研究を加速すると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
2. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. J. Vet. Med. Sci. 76(7), 1045-50, 2014.
3. Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol, in press, 2015.
3. 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol.17 No.1 12-15, 2014.
4. 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No.4723, 59-60, 2014.
5. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol.20 No.12, 10-12, 2014
6. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19, 2014
7. 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策ICTジャーナル vol.9 No.4 2014.
8. 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.
9. 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.

邦文

1. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.
2. 片山和彦 ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型2014年版 IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ノロウイルス複製機構について

研究分担者 染谷 雄一 国立感染症研究所・ウイルス第二部

培養細胞や実験動物では増殖させることができないヒトノロウイルスの遺伝子複製機構、粒子複製機構を明らかにすることを目的に、RNA レプリコン系の構築を試みた。レプリコン候補遺伝子には、ノロウイルス非構造タンパク質遺伝子（ORF1）に加え、HCV IRES 依存に発現する薬剤耐性遺伝子が含まれる。in vitro 合成した RNA を培養細胞に導入したが、現在のところ薬剤耐性細胞は得られていない。一方、ノロウイルスの構造タンパク質遺伝子（ORF2, ORF3）を含むプラスミドを Vero 細胞に導入し、薬剤で選択したところ、耐性を示す細胞を得た。今後、この薬剤耐性細胞で ORF2 および ORF3 タンパク質が発現しているか調べる。

A. 研究目的

ヒトに感染して嘔吐下痢症を引き起こすノロウイルスは培養細胞や実験動物を用いて増殖させることができない。そのためノロウイルスの生活環の大部分は未だ解明されていない。ノロウイルス遺伝子複製機構および粒子複製機構を解明することを目指し、RNA レプリコンの作成とキャプシドタンパク質を安定に恒常的に発現する細胞株の樹立を試みた。また、ノロウイルスの構造タンパク質遺伝子を恒常的に発現鎖得る細胞株の樹立を試みた。

B. 研究方法

すでに全塩基配列が解明されているヒトノロウイルスチバ株（GI.4）を用いた。また、細胞培養が可能なげっ歯動物ノロウイルス MNV1 株についても同様の操作を行った。両ウイルス株の RNA レプリコン候補遺伝子作成

のため、国立感染症研究所・ウイルス第二部 石井孝司室長より分与された C 型肝炎ウイルス（HCV）JFH-1 株由来の IRES 支配下に置かれた薬剤耐性遺伝子ネオマイシン耐性遺伝子（Neo）断片、E GFP 融合 Neo 断片、分泌型 NanoLuc（secNLuc）遺伝子断片を用いた。また、別の薬剤耐性マーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子（Puro）のほか、薬剤耐性遺伝子に融合させるレポーターとして、ホタルルシフェラーゼ遺伝子（FLuc）、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子（RLuc）を用いた。

C. 研究結果

1. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 1

チバ株の非構造タンパク質遺伝子（ORF1）下流に HCV IRES 依存の Neo 遺伝子を有する一連のレプリコン候補遺伝子は、昨年度作成し

た。

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-GFPNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo2-Tt ...

(は の改変体で、Neo の N 末端に相当する領域に AscI 部位および Bsp119I 部位をもつ。)

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucNeo-Tt ...

の Neo に換えて Puro を導入した、

pT7CVORF1-HCVIRES-Puro-Tt ...

を作成した。 の AscI-Bsp119I 部位に EGFP、FLuc、RLuc、NLuc を挿入し、

pT7CVORF1-HCVIRES-EGFPNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucPuro-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucPuro-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucPuro-Tt ...

を作成した。

2. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 2

E 型肝炎ウイルス (HEV) の RNA レプリコン系では、HCV IRES を含まずに secNLuc 遺伝子を HEV ORF1 下流に置いたものでも成功している。これと同様の候補遺伝子を昨年度作成している。

pT7CVORF1-secNLucNeo-Tt ...

pT7CVORF1-dsNLucNeo-Tt ...

の遺伝子から発現する secNLucNeo 融合タンパク質は細胞外へ放出されることになり、細胞に Neo 耐性を付与することはできない。HEV の RNA レプリコンで secNLuc の導入の

みで成功した事例を考えると、secNLuc をコードする塩基配列が重要であることが考えられる。そこでシグナル配列に対応する塩基配列を残しつつ NLuc 本体のみを発現するよう新たな開始コドンが付与した を作成した。更に の Neo を Puro に置き換えた、
pT7CVORF1-dsNLucPuro-Tt ...
を作成した。

3. げっ歯動物ノロウイルス RNA レプリコン候補遺伝子

げっ歯動物ノロウイルスは培養細胞で増殖が可能であるので、その遺伝子を利用して複製可能な RNA レプリコンを作り出すことが可能であると期待される。また、ヒトノロウイルスの RNA レプリコン作成において良い対照となると思われる。

げっ歯動物ノロウイルス MNV1 株に由来するレプリコン候補遺伝子は昨年度作成した。

pBMT7MNV1NS-HCVIRES-Neo-Tt ...

pBMT7MNV1NS-HCVIRES-GFPNeo-Tt...

4. RNA レプリコン候補遺伝子の細胞への導入

チバ株由来遺伝子を含む候補遺伝子、および、MNV1 株由来遺伝子を含む候補遺伝子から、in vitro で Cap 構造を付加した RNA を合成した。これを OptiPRO 無血清培地に馴化した Vero 細胞にトランスフェクションし、200 µg/mL の G418 で選択したが、薬剤耐性を示す細胞は得られなかった。

5. 構造タンパク質を恒常的に発現する培養細胞株の樹立

昨年度、pEBMulti-Bsd および pEBMulti-Ble (和光純薬; EB ウイルス由来の遺伝子を含み、細胞に導入した際エピゾームとして複製する) にチバ株 ORF2 (VP1 タンパク質) および ORF3 (VP2 タンパク質) を含む遺伝子断片を挿入したプラスミドを作成した。

pEBAgCVORF2,3-Bsd ...

pEBAgCVORF2,3-Ble ...

これらのプラスミドにおいて ORF2, ORF3 の発現を制御するのは CAG プロモーターである。これをヒト EF1 α プロモーターに置き換えたプラスミド、

pEBEFCVORF2,3-Bsd ...

pEBEFCVORF2,3-Ble ...

も作成した。

MNV1 株についても同様に、以下のプラスミドを作成した。

pEBEFMNV1VP-Bsd ...^①

pEBEFMNV1VP-Ble ...^②

以上 6 種のプラスミドをそれぞれ OptiPRO 無血清培地に馴化した Vero 細胞にトランスフェクションし、5 μ g/mL のプラストサイジン S、あるいは、250 μ g/mL のゼオシンで選択を続けたところ、継代可能な薬剤耐性細胞株を得ることができた。

D. 考察

今回レプリコン候補遺伝子から調製した合成 RNA では薬剤耐性を示す Vero 細胞を得ることができなかったが、トランスフェクション試薬を用いた遺伝子導入であったため、細胞への RNA 導入量が少なかった可能性がある。今

後、エレクトロポレーションで合成 RNA を Vero 細胞に導入したい。また、PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞(ヒト肝がん由来)、Huh-7 (ヒト肝がん由来)、Caco-2 (ヒト結腸がん由来)、COLO-320 (ヒト結腸がん由来)、HeLa (ヒト子宮頸がん由来)、HEK293 (ヒト胎児腎由来) 等を試す。

チバ株、あるいは、MNV1 株の構造タンパク質を導入し、薬剤で選択して耐性を獲得した Vero 細胞はそれぞれの構造タンパク質の発現を確認する必要がある。

E. 結論

ノロウイルスチバ株および MNV1 株の RNA レプリコン候補遺伝子を作成した。

ノロウイルスチバ株および MNV1 株の構造タンパク質遺伝子を有するプラスミドを Vero 細胞に導入し、薬剤耐性を示す細胞株を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

本年度はなし

2. 学会発表

本年度はなし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用登録新案

なし

3. その他

なし

マウスノロウイルスのベクター化に関する研究

分担研究者 中西 章 国立長寿医療研究センター

老化制御研究部遺伝子治療研究室・室長

研究協力者 吉田和央 国立長寿医療研究センター

老化制御研究部遺伝子治療研究室・流動研究員

研究要旨 現在ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス（MuNoV）を用い、そのベクター化の試みを行った。VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によってウイルス遺伝子発現の誘導を観察できた。この結果は、MuNoV ベクター化への可能性を開くもので有り、MuNoV の感染増殖系を利用した HuNoV カプシドタンパク質解析系開発への糸口となる。

A．研究目的

ヒトノロウイルス(HuNoV)による集団感染の流行により毎年日本は甚大な人的、経済的な負担を余儀なくされている。特に高齢者への感染は、死亡例をしばしば引き起こすことから、高齢者医療にとってその感染予防・防御は不可欠である。しかしながら、HuNoV の感染増殖を支持する細胞が見つからないため、その感染制御・予防につながる基礎研究は遅れている。本研究では、ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス(MuNoV)を用い、HuNoV カプシドタンパク質機能を解析できる実験系を構築すべく、MuNoV のウイルスベクター化を試みた。

ウイルスベクター化には一般的にウイルス増殖を阻害せずかつウイルス増殖とは独立に構造タンパク質（カプシドタンパク質）をトランスに補完する実験系を作成することが必要である。しかしこれまでの研究から、トランスに発現させたカプシドタンパク質はウイルス増殖を顕著に阻害することが明らかになっている。このため本年度は、種々の発現ベクターの中から、MuNoV 感染性粒子の形成を阻害しないようなカ

プシドタンパク質発現方法を検討した。またウイルスベクター化のためには、トランスでカプシドタンパク質を補完しつつ、ウイルス増殖を損なわずにカプシドタンパク質発現を抑制(例えばその遺伝子コード配列の除去)するシステムを構築する必要がある。しかし、主要カプシドタンパク質 VP1 をコードする配列の遺伝子操作は、殆どの場合 MuNoV RNA 複製を阻害するような現象が見られ、VP1 コード配列の操作は、そのままでは難しいことが予想された。一方、非主要カプシドタンパク質 VP2 コード配列（ORF3 配列）は、前年度の研究結果あるいは Thorne et al. JVI (2012)の結果にもあるように、ウイルス増殖を阻害せずに遺伝子操作が可能とされる数少ない領域と考えられている。本年度は、この領域を標的として遺伝子操作を試み、VP2 を発現できない変異体に対してトランスに VP2 を供給した状態で粒子形成、そしてウイルス遺伝子発現(ウイルス増殖)が可能か検討した。

B．研究方法

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS

MuNoV S7 DNA(国立感染症研究所片山和彦先生より分与)を元にして、同じEF1 プロモーターで発現する pKS MNV ORF23、pKS MNV ORF3、プロモーター部分を HCMV immediate early promoter と SV40 early promoter を組み合わせたものに交換した pSCMV MNVORF23, pSCMV MNVORF3,そして HCMV immediate early enhancer ~Chicken beta actin promoter ~beta-globin splicing signal のハイブリッドプロモーター (CAG プロモーター) より発現する pCAG MNV ORF23, pCAG MNV ORF3、最後に SV40 early promoter より発現する pSG MNV ORF23, pSG MNV ORF3 を作成した。

MuNoV ORF3 の欠損変異体として、VP2 コード領域 (208a.a.) の 4-105a.a., 53-156a.a., 115-205a.a., そして4-205a.a.コード部分を欠損したそれぞれ N, M, C, を作成、また点変異体として、VP2 の 7, 10 番目のコドンをストックコドンに置換した変異体 (ORF3 stop +) を作成した。

これらの pKS MNV S7 DNA そしてその変異体を単独に、あるいは pKS MNV ORF23 DNA 等と共に、293T 細胞にトランスフェクションによって導入し、24-48 時間後にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させた。48 時間後に細胞を固定し、MuNoV 遺伝子発現の有無を VP1/VPg の免疫染色により確認し、293T 細胞上清の感染性粒子の存在を検証した。ORF2、ORF3 の発現レベルは、モルモット抗 VP1、あるいはモルモット抗 VP2 抗体を使用し Western blot により検出、発現量を比較した。

Mouse Stem Cell Virus (MSCV)ベクターでの VP2 発現を行うため、MSCV-IRES-EGFP の IRES 上流に ORF3 コード領域を挿入した MSCV-VP2-IRES-EGFP を作成した。MoMuLV の gag-pol 遺伝子を恒常発現する 293gp 細胞に対して、VSV-G を発現する pCMV-VSV-G と MSCV-VP2-IRES-EGFP をトランスフェクションして作成した MSCV ベクターを RAW264.7 細胞に導入することにより、MuNoV を発現する RAW VP2 細胞を作成した。

C . 研究結果

MuNoV 増殖を阻害しないでカプシドタンパク質を共発現できる条件を検討するため、293T 細胞にトランスフェクションにて感染性粒子を形成させる実験系を利用した。まず、MuNoV 感染性ゲノム配列をコードする pKS MNV S7 を各種カプシドタンパク質発現 DNA と共に 293T 細胞へ導入した。次に、その細胞上清を RAW264.7 細胞へ共培養し、出現する MuNoV VP1/VPg 陽性細胞の数から感染性粒子の存在を検証した。pKS MNV 7 と共に、pKS MNV ORF23、pSCMV MNVORF23, pCAG MNV ORF23, pSG MNV ORF23,それぞれを導入した 293T 細胞上清を RAW264.7 細胞と共培養した際、pKS MNV ORF23 の場合を除き、VP1/VPg 陽性細胞の出現は抑制されていた。Western blot で発現する ORF3 の量を検出し、293T 細胞へ導入する際に pKS MNV S7 との量比を変えるなど、のアプローチを行ったが、例えば SV40 promoter による弱い発現誘導であっても、ORF23 の発現は感染性粒子形成に抑制的に働いた。一方、感染性 MuNoV ゲノムと ORF3 の共発現については、pKS MNV ORF3、pSCMV MNVORF3, pCAG MNV ORF3, pSG MNV ORF3 などそれぞれの ORF3 発現ベクターと pKS MNV S7 と共に 293T 細胞に導入しその細胞上清を RAW264.7 細胞と共培養した場合、pCAG MNV ORF3 との共導入の場合以外では、pKS MNV S7 単独導入された細胞上清を使用した場合とほぼ同程度の VP1/VPg 陽性 RAW264.7 細胞が観察できた。つまり ORF3 のみの共発現は ORF2 が共存する場合に比べて感染性粒子の形成の抑制は軽いと考えられた。以上の実験結果から、293T 細胞での VP1 タンパク質の共発現に使用するプロモーターとして EF1 (pKS MNV S7 由来) が適切であり、VP2 の共発現は量の多少に関わらずウイルス増殖への影響は小さいと思われた。

ORF3 の欠損変異、N, M, C, 、そして点変異 stop +の各変異体を 293T 細胞にトランスフェクションし、その細胞上清を RAW264.7 細胞に共培養させることにより感染性粒子の形成を調べた。全ての変異体について 293T 細

胞に導入した際の細胞上清には、RAW264.7細胞をVP1/VPg陽性にできるものではなく、感染性粒子の形成は見られなかった。以上の変異体についてさらに、293T細胞へpKS MNV ORF23あるいはpKS MNV ORF3との共導入を行い、293T細胞内でのVP2の補完を試みたが、その細胞上清の中にはRAW264.7細胞をVP1/VPg陽性にできるものもなかった。しかし同じ上清をRAW VP2と共培養したところ、293T細胞へのN, M, stop+の各変異体とpKS MNV ORF3の共導入、MとpKSMNV ORF23の共導入で得られたその細胞上清にはRAW VP2細胞でウイルス遺伝子発現を示すVP1/VPg陽性細胞の出現が認められた。

D. 考察

トランスでウイルス遺伝子産物を補完するシステムを検討するため、種々のプロモーターを利用したカプシドタンパク質発現が、MuNoV感染性粒子の形成に及ぼす影響を検討した。その結果、EF1, HCMV/SV40, CAG, SV40の各プロモーターによるORF23の共発現は、EF1プロモーターによる場合を除き、どのプロモーターでもORF23を発現すると感染性粒子形成の抑制が見られた。一方、ORF3の共発現は、CAGプロモーターの場合を除き、感染性粒子形成を抑制しなかった。これらの結果は、VP1タンパク質発現量の制御は感染性粒子形成に必要であることを意味している一方でVP2の共発現については、その発現量の多少については粒子形成への影響は小さいことが明らかになった。許容できるVP2の発現量のウィンドウが広いことは、今後VP2の補完によるベクター作成も可能であることが予想できる。

実際、293T細胞内での組換えMuNoV粒子の形成過程、そしてpermissiveな細胞(RAW264.7細胞)内でウイルス遺伝子発現での過程、の両方にVP2を補完した場合、ゲノム自身にVP2を欠損していても、ウイルス遺伝子発現を開始できることが示された。このことは、VP2は構造タンパク質としての役割だけではなく、ウイルス遺伝子発現に対しても機能的な役割を果たしていることが示唆される。また、VP2コード領

域のC末端部分の欠損については、VP2が補完されていてもウイルス遺伝子発現が見られなかった。ノロウイルスのゲノム配列は解析が進んでいないこともあり、RNA二次構造をとって機能的なシスエレメントとして機能している領域が各所に存在していることが考えられる。同様な結果はFeline Calicivirusでも報告されており(Sosnovtsev et al. JVI 2005)、VP2のC末端部分の配列にはこのようなシスエレメントが存在している可能性がある。

E. 結論

VP2コード領域を欠いた複製欠損型MuNoV変異体は、VP2の共発現によりウイルス遺伝子発現を誘導することが出来た。この結果は、ノロウイルスにおいて初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になったことを示しており、HuNoVカプシドタンパク質機能を解析できる実験系としてのMuNoVベクター系の構築へ前進した。

F. 研究発表

論文発表

Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 111: E4043-E4052 (2014)

学会発表

1. Nakanishi A, Tange S, Tasaki H, Zhou Y. Association of autophagic process during human astroviral infection. **American Society for Virology** (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, United States

2. 中西 章、山本真由子. ポリオーマウイルスの細胞感染効率はVp2/3が関与する細胞内移行ステップに影響される. **第62回日本ウイル**

ス学会学術集会 2014年11月12日 横浜

3. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西 章、脇田隆字、片山和彦. レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み. **第62回日本ウイルス学会学術集会**
2014年11月11日 横浜

4. Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A. Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes. **第37回日本分子生物学会** 2014年11月27日 横浜

5. Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. **17th International Conference on Emerging Infectious Diseases** (2015) Jan. 29. Taipei, Taiwan

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団の包括的遺伝系統解析

担当責任者 氏名: 本村 和嗣 所属: 大阪大学微生物病研究所 日本—タイ新興再興感染症共同
研究センター 役職: 特任准教授(常勤)

研究要旨

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。我々は、ヒト集団における優位なノロウイルスの特徴を抽出するため、集団食中毒が発生した4集団を対象にした。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス配列を包括的に収集し、遺伝子型および亜株の比較を行った。本解析で優位に検出されたGII.4 2006b亜株は、どの集団でもウイルスコピー数が高く、複製能・増殖能に優れたウイルスである可能性が示唆された。これらの解析をもとに流行発生のおよびを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供したい。

A. 研究目的

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。飯塚らは、第60回本学会にて、2012年3月に発生した集団食中毒事例の原因汚染食材よりパンソルピントラップ法を用い、原因微生物として、ノロウイルスGII.2とGII.4を検出したと報告した。本研究では、本集団食中毒発生事例のノロウイルス感染者体内におけるウイルス亜集団の実態を明らかにすることを目的とする。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス capsid 遺伝子シェル領域(330bps, 24検体)の配列情報を収集し、感染者体内に存在する亜株、遺伝子型の種類と頻度を解析した。

ヒト集団におけるノロウイルス感染伝播、拡大の解明となる基盤情報が得られる。

個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のおよびを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重

要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2012年3月に島根県で発生した集団食中毒事例を対象に解析した。原因施設調理従事者(n=7)から、汚染食材を介して、原因施設弁当喫食者(n=9)、関連他施設A料理喫食者(n=3)、関連他施設B料理喫食者(n=6)と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルスRNAを抽出した後、G2SKR (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、capsid 遺伝子シェル領域をPCRで増幅した。ION TORRENT (Life technologies)を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-houseの配列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調べ比

較した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) カプシド遺伝子シェル領域の配列情報 (1503418 配列: 約 5.0×10^8 塩基 / 25 検体) を取得した。(ii) シェル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、25 検体中 23 検体で検出された。(iii) 食中毒事例では原因施設調理従事者群 ($n=7$) は 7 種、原因施設弁当喫食者群 ($n=9$) は 7 種、関連他施設 A 料理喫食者群 ($n=3$) は 4 種、関連他施設 B 料理喫食者群 ($n=6$) は 5 種の、異なる遺伝子型と亜株が検出された。(iv) 2012 年秋冬期に大流行した GII.4 2012 Sydney は、個体内に微小集団 (0.1 - 22.0 %) として、13 例で検出された。(v) 2006b は、調理従事員発症者群で 7 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.2×10^9 copies/g であった。弁当喫食者で 9 名中 9 名検出され、平均ウイルスコピー数は 6.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 A 料理喫食者群は、3 名中 3 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 B 料理喫食者群は、6 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 1.8×10^9 copies/g であった。

D. 考案

集団食中毒事例では、シェル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染が多いことがわかった (23/25 例)。2006b 亜株は、原因施設調理従事者群 ($n=7$) 種、原因施設弁当喫食者群 ($n=9$)、関連他施設 A 料理喫食者群 ($n=3$)、関連他施設 B 料理喫食者群 ($n=6$)、以上、4 群で、平均ウイルスコピー数が、 10^9 copies/g で極めて高かった。このことにより、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイ

ルス亜集団が抽出されるボトルネックが生じている可能性が示唆された。2012-2013 秋冬期に日本国内で流行した GII.4 2012 Sydney が、ヒト個体内で、微小集団として、2012 年 3 月に存在していることが判明した。今後、先端技術を用いたゲノム情報収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行監視、および、流行予測の基盤情報となることが期待される。ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

E. 結論

今年度は、次世代シーケンサーを用いて、個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにした。次年度は、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイルスが流行形成するという作業仮説を証明するために、VLP を作成して、温度変化、pH 変化への安定性の比較、VLP を用いた IgA 抗体価の動態を加えて、検証を続けていきたい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

飯塚節子先生 (島根県保健環境科学研究所)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., Motomura K., Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channel Hum Mol Genet. Vol.9 2014 p1-p12

2 . 学会発表

国際学会

1. **Motomura, K.**, Ode, H. , Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
2. **Motomura K.**, Introduction of application study on NGS. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
3. **Motomura K.**, Yokoyama M., Ode H., Oka T., Katayama K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Takeda N., Norovirus Surveillance Group of Japan. Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
4. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
5. **Motomura K.**, Takeda N., Distribution of Norovirus Genotypes through Genomic Analysis in Japan and Thailand. JGRID Vietnam-Thailand seminar :2014; Hanoi
6. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis IUMS :2014; Montreal
7. Sato H., Yokoyama M., Nakamura H., **Motomura, K.**, Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks IUMS :2014; Montreal

8. **Motomura, K.**, Norovirus Surveillance Group of Japan. Genetic evolution of norovirus for survival in human population as a strategy DASAN Conference :2014; Kyongju

9. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel World Muscle Society ;2014; Berlin

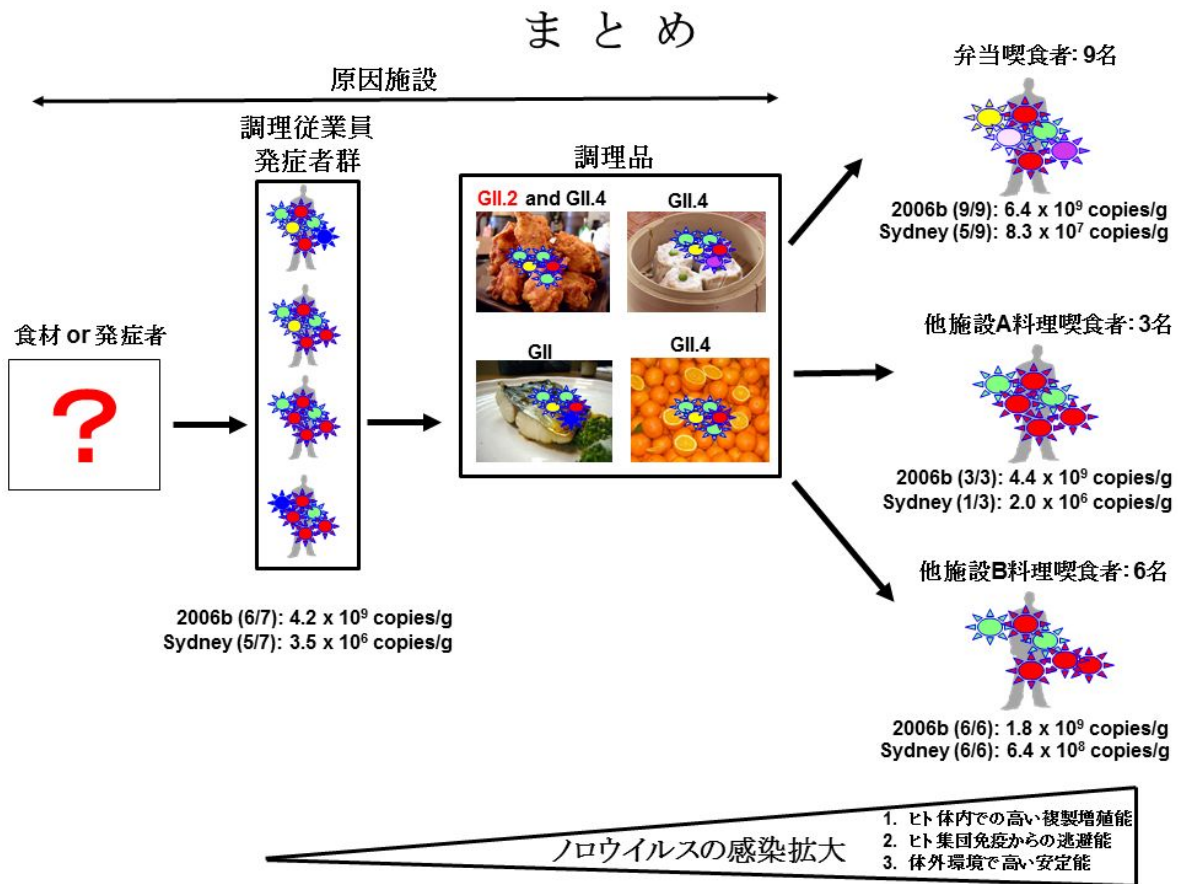
国内学会

10. **本村和嗣**, 横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス感染者体内における混合感染の解析 第88回日本感染症学会学術集会 ;2014; 福岡
11. **本村和嗣**, 飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和、ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
12. 佐藤裕徳、横山勝、**本村和嗣**、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
13. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
14. 佐藤裕徳、**本村和嗣**、横山勝 ノロウイルスの多様性と進化の制約 第37回日本分子生物学会. ;2014; 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1



野生ネズミ由来ノロウイルスの遺伝子解析

分担研究者 遠矢 幸伸 日本大学 生物資源科学部 教授

研究協力者 佐藤 豪 日本大学 生物資源科学部 助手

研究要旨 韓国の済州島で捕獲された野生のチェジュセスジネズミの腸管内容物より検出された新規ノロウイルス（NoV）の性状解明を目的として、そのゲノムの塩基配列の解析を行い、3'側2,876塩基の配列を決定した。得られた塩基配列を用いた系統樹解析では、実験用マウス由来NoVとは独立した野ネズミ由来のNoVの枝をハンガリーのセスジネズミやスコットランドのモリアカネズミ由来のNoVとともに形成し、新規NoVのグループを構成することが示された。

A．研究目的

ヒトNoVは培養細胞での増殖が不可能であるが、実験用マウス由来のNoVは培養細胞での増殖が可能であるため、実験モデルとして活用されている。一方、マウス以外の野生げっ歯類にも遺伝学的に異なるNoVが存在することが新たに報告され、マウス由来NoVとは宿主特異性なども異なる可能性が示唆されている。昨年度は、動物由来新規ノロウイルス（NoV）の分離を目標として、逆転写（RT）-PCR法によるウイルスゲノムの検出を試みたところ、韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物より、新規NoV遺伝子が検出された。そこで、本年度はチェジュセスジネズミ由来NoVのゲノム解析を進めた。

B．研究方法

昨年度の研究でNoV遺伝子が検出された4検体のチェジュセスジネズミ由来腸管内容物を用いた。PBSを用いて各検体を10%乳剤とし、15,000 rpm、5分間遠心した上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてTotal RNAを抽出した。RT-PCRは昨年度に決定したORF3

内の領域の塩基配列をもとにデザインしたプライマー並びに各種ネズミ由来NoVの塩基配列から推定される配列に基づくプライマーを用い、PrimeScript II Reverse Transcriptase (TAKARA)を使用してcDNA合成を行い、PCRにはPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA)を使用した。その後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物をSYBR safe DNA gel stain (Invitrogen)で染色、観察した。増幅産物が得られた場合は、DNAバンドを精製し、塩基配列を常法に従い決定した。

得られた塩基配列情報はATGC-Win ver.7およびGenetyx-Win ver.11(株式会社ゼネティクス)を用いてアセンブルし、系統樹はMEGA ver.6を使用して作成した。

C．研究結果

チェジュセスジネズミ由来腸管内容物4検体のうち、1検体(No.76)において、ORF2及びORF3を含むNoVゲノムの3'側領域2,867塩基の配列を決定できた。ORF2全領域の配列を用いた系統樹解析を行ったところ、実験用マウス由来NoVとは別のクラスターをヨーロッパ

パの野生ネズミから検出された NoV と形成した。特に、ハンガリーのセスジネズミで検出された NoV に比較的近縁で、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは別のクラスターを形成した。

実験用マウス由来 NoV、野生げっ歯類由来 NoV との相同性を調べたところ（塩基/アミノ酸）ORF2 は、実験用マウス由来とは 76.4% - 77.9% / 82.6% - 85.0%、野生げっ歯類由来とは 78.8% - 86.9% / 85.7% - 92.4%であった。また、アミノ酸配列における変異を調べると、P2 領域において変異が多く認められた。

ORF2 領域上には第 14 - 652 塩基（639 nt）に推定 ORF4 領域が確認され、スコットランドのモリアカネズミの NoV（Apo 450）の推定 ORF4（618 nt）より 21 塩基長かった。相同性は、実験用マウス由来 MNV とは 84.5% - 85.8% / 61.5% - 64.7%、ハンガリーのセスジネズミ由来 NoV とは 92.0% - 93.6% / 79.3% - 83.5%、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは 85.8% / 69.9%であった。

D . 考察

本研究では、韓国の済州島において固有種であるチェジュセスジネズミから新たな NoV 遺伝子が検出された。系統解析の結果、この NoV 遺伝子が既知のどの系統とも異なることが示唆された。これまでにスコットランドでモリアカネズミ、ハンガリーでセスジネズミ、日本でアカネズミとクマネズミという野生げっ歯類から NoV 遺伝子が検出されていることから、NoV は広範な地域において、多様な種類のげっ歯類に保持されている可能性が示された。

NoV の ORF2 領域は、カプシド蛋白をコードする領域で shell domain (S) と protruding domain (P) に分けられる。P は P1 と P2 のサブドメインに分けられ、P2 はウイルスの最表層に飛び出し S-P1-P2-P1 の順に並んでいる。ウイルスの遺伝型によって構造が微妙に変化しており、すなわち P2 領域は抗原性や細胞レセプターに関係し遺伝型による違いを微細形態学的に反映している。野生げっ歯類由来 NoV は、その P2 領域を

実験用マウス由来 NoV と比べると多くのアミノ酸が異なっていた。このことから、野生げっ歯類由来 NoV は実験用マウス由来 NoV とは抗原性や細胞レセプターが異なっていると推定される。加えて、チェジュセスジネズミの NoV の ORF2 内にも ORF4 領域が同定され、実験用マウス由来 NoV と同様の宿主の免疫抑制とウイルス複製に影響する機能を有すると考えられる。

E . 結論

チェジュセスジネズミから検出された NoV ゲノムの塩基配列（2,876 塩基）を決定し、マウス由来の NoV とは異なる特性を有する NoV であることが示唆された。培養細胞での分離はまだできていないが、今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして非常に期待される。

F . 研究発表

論文発表

1. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus. *J. Virol. Methods*. 207: 178-81 (2014)
2. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K, Tohya Y. Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *J Vet Med Sci*. 76: 1045-50 (2014)

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立

分担研究者 佐藤 俊朗 慶應義塾大学医学部 消化器内科 特任准教授

研究要旨 食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因となるノロウイルスは，腸管上皮細胞に感染すると考えられているが，培養細胞感染系が確立されておらず，その感染メカニズムは明らかでない．我々はヒト腸管上皮細胞の培養技術を世界に先駆けて開発し，この培養技術を用いて，ノロウイルス培養細胞感染系の確立を目指す．

培養ヒト腸管上皮細胞は培養細胞株と異なり，細胞ストレス感受性が極めて高いため，ウイルス感染等の処置に対する抵抗性を示したが，我々は三種のウイルス（レンチ，アデノ，レトロウイルス）の GFP 発現ベクターを用いて，ヒト腸管上皮細胞に対するウイルス感染条件の最適化に成功した．また，ノロウイルス研究者の培養上皮細胞感染系開発のための基盤的な整備を行い，本年度は，ヒト腸管上皮細胞の供与に関する倫理申請の承認を得た上，腸管上皮細胞培養技術，ウイルス感染プロトコルの直接指導などを行った．今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される．

A．研究目的

本研究課題であるノロウイルスは，食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因として有名だが，培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないウイルスで，ヒトが唯一の感受性動物と考えられている．ヒトの空腸の上皮細胞に感染して繊毛の萎縮と扁平化，さらに剥離と脱落を引き起こして下痢を生じると考えられているが，このような現象がどのようなメカニズムによるものなのかは不明であり，感染拡大を防ぐ有効な手段がないのが現状である．腸管上皮細胞の培養が困難であったため，このようなメカニズムの解明はすすんでいなかった．我々は，2009年に世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養系の確立を報告し，2011年にはヒト腸管上皮幹細胞の培養系を確立した．本研究では，このヒト腸管上皮幹細胞培養を用い，ノロウイルスの培養細胞感染系を確立することで，治療・予防につなげることを目的とする．

B．研究方法

ヒト腸管上皮粘膜より腸管上皮陰窩を採取し，マトリゲルに包埋し，ヒト腸管上皮幹細胞培養に最適化した培地（Advanced DMEM/F12, EGF, Noggin, R-spondin, A83-01, SB202190, Wnt-3A）により培養を行う．培養により腸管上皮細胞は三次元組織様構造体オルガノイドを形成し，永続的な培養が可能となる．

GFP 発現カセットを有する自己不活型第三世代レンチウイルスベクターより高力価ウイルス上清を作成し，ヒト腸管上皮幹細胞のウイルス感染システムを確立する．当研究室では病原性ウイルスの取り扱いが困難であるため，倫理申請を行った上で，ノロウイルス研究者への培養腸管上皮細胞の供与，培養指導を行い，感染プロトコルの構築に関して宿主側の培養条件のアドバイスを行っていく．

C. 研究結果

これまでにオルガノイドを樹立し、長期培養可能となったヒト腸管（小腸，大腸）上皮培養オルガノイドを用いて検討を行った。

培養に用いるマトリゲルはウイルス粒子の核酸を阻害するため，マトリゲルを酵素処理により除去する必要があった。また，トリプシン処理によって上皮細胞を単細胞化することにより，ウイルス感染効率の改善が確認された。培養ヒト腸管上皮細胞はこのような処置に対して細胞死が誘導されるため，培養培地を最適化を行い，感染細胞の長期培養に成功した。

同様の方法により，GFP 発現アデノウイルス・レトロウイルスの感染も確認し，ウイルス感染プロトコルを確立した。

ノロウイルス感染研究の確立するため，患者由来ヒト腸管上皮オルガノイドを他施設へ提供できるよう，慶應義塾大学医学部において倫理研究計画を申請し，承認を得た（承認番号：20140292）。また，培養技術，最適化されたウイルス感染プロトコルを実際に他施設の本研究事業研究分担者に直接指導を行った。他施設での倫理申請が承認を得て受け入れ基盤が整い次第，オルガノイドの提供を行い，感染系確立に向けた研究をすすめていく。継続的に，培養技術，ウイルス感染プロトコルに関する指導および，培養に必須となる培地成分の提供を行っていく。

D. 考察

ヒト腸管上皮オルガノイドは細胞株と異なり，一般的なウイルス感染処置に対して培養技術の最適化が必要であったが，異なる3種類のウイルスにおいて効率のよい感染が確認できている。今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される。

E. 結論

ヒト腸管上皮オルガノイドのウイルス感染系の基盤技術が開発され，実験可能施設への提供準備は整った。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. in press: doi: 10.1038/nm.3802 (2015)
- 2) Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGF β Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer. *Cancer Res* 75: 766-76 (2015)
- 3) Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. *Integr Biol (Camb)* 7: 213-28 (2015)
- 4) Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5: 5728 (2014)
- 5) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res* 74: 2882-91 (2014)
- 6) Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1820-7 (2014)

- 7) Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1426-34 (2014)
- 8) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* 9: e84619 (2014)
- 9) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther* 15: 81-8 (2014).
- 10) Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet* 5:169 (2014)
- 11) Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)* 1: 14 (2014)

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

ウシロタウイルスの発生動向と遺伝学的特性

分担研究者 鈴木 亨 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域

研究要旨 培養細胞における実験感染系が確立されていないために、本ウイルスの性状や生態がほとんど理解されていないロタウイルス B、特に動物由来ロタウイルス B について、それらの遺伝学的性状を明らかにし、診断予防法の開発に役立つ有益な情報を得る。これまでにウシならびにブタロタウイルス B 複数株を用いた遺伝子解析の結果、動物由来ロタウイルス B は国内外問わず、異なる遺伝的背景を有する複数の株が世界中に存在・まん延していることが明らかとなった。

A．研究目的

ロタウイルスは幼若動物や乳幼児における重症下痢症の主要原因の一つであり、新興感染症病原体である。また、ロタウイルスは人獣共通感染症病原体でもあり、現在までに 8 種 (A-H) の存在が報告されているが、中でもロタウイルス A-C はヒト以外に、ウシ、ブタ等の動物からもウイルスが検出されることから、公衆衛生上注目されている。また最近では、ヒト由来ロタウイルスと動物由来ロタウイルスの間で遺伝子再集合が起こる事実も確認されている。

ロタウイルス B はウシ、ブタなどの動物では以前から広く浸潤しているが、ヒトではまだ中国、インドなどの東南アジア諸国での散発発生に留まっており、わが国での発生報告はない。しかし依然として、東南アジア諸国におけるロタウイルス B 症の発生事例が続いていることやわが国における動物ロタウイルス B 症の発生事例が増大していることから、本ウイルスに対する診断予防法を開発することは緊急性の高い課題である。これまでのところ、本ウイルスは培養細胞感染系での分離が極めて困難であるため、それらの性状解析すらほとんど進展しておらず、まだ多くの課題が残されている。

これまでに、2001 年から 2009 年にかけてわ

が国で検出されたブタロタウイルス B 複数株について、それらの遺伝子解析を実施した結果、異なる遺伝子背景を有する複数の株が全国に点在・伝播していることを明らかにしてきた。そこで、本年度はブタロタウイルスとほぼ同時期に、採集されたウシロタウイルス B 複数株について、それらの遺伝子解析を実施し、わが国におけるウシロタウイルス B の発生動向ならびに遺伝子性状を明らかにすることを試みた。

B．研究方法

2002 年から 2011 年にかけて山形県内で検出されたウシロタウイルス B 12 株を材料に使用した。それら複数株の VP1, VP2, VP6, VP7, NSP1, NSP2 および NSP5 の 8 つの遺伝子について、独自に設計したプライマーを用いて RT-PCR 法でもって ORF 全長を増幅し、シーケンス解析を実施した。今回解読したウシロタウイルス B 12 株の各種遺伝子情報に既知の他動物種由来ロタウイルス B の遺伝子情報を加えた上で、系統樹解析を実施し、本ウイルスの起源並びに生態を明らかにすることを試みた。

C．研究結果

ウシロタウイルス B 12 株の各遺伝子の配列

を既知のヒトやブタ、さらにウシロタウイルス B 株と比較した結果、それぞれの遺伝子において、ウシロタウイルス B 株はヒトやブタロタウイルス B 株と遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。また、インドで検出されたウシロタウイルス B 株との比較では、今回解読した全ての遺伝子において、ORF の長さは同じであったが、配列が異なることが明らかとなった。

ロタウイルス B の VP7 遺伝子に関する系統樹解析の結果、山形県内で検出されたウシロタウイルス B 株は過去に北海道、さらに米国で検出されたウシロタウイルス B 株と同じ遺伝子型に分類されたが、インドで検出されたウシロタウイルス B 株とは異なる遺伝子型に分類された (表 1)。また、ロタウイルス B の NSP1, NSP2 および NSP5 遺伝子に関する系統樹解析では、いずれの遺伝子において、山形県内で検出されたウシロタウイルス B 株はインドで検出されたウシロタウイルス B 株とは区別される新たな遺伝子型に分類された。さらに、VP1, VP2, VP6 遺伝子に関する系統樹解析において、ウシロタウイルス B 株は系統発生的にヒトやブタロタウイルス B 株とは明確に区別された。

D . 考察

今回の研究を通じて、1990 年代に北海道で検出されたウシロタウイルス B Nemuro 株について、新たにウシロタウイルス B 12 株の複数の遺伝子に関する塩基配列が明らかとなった。遺伝子解析の結果、わが国で流行しているウシロタウイルス B 株は Nemuro 株と遺伝学的に近縁な株が全国に存在・伝播していることが示唆された。

系統樹解析の結果、わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は米国で検出されたウシロタウイルス B 株と共通の起源に由来することが示唆されたが、インドで検出された株とは早い段階で分岐し、それぞれがこれまでに交わることなく独自に進化を遂げてきた可能性が示唆された。今後、東南アジア諸国や世界中に拡散しているウシロタウイルス B、あるいは他動物種由来のロタウイルス B 株を収集し、それらの遺伝子解析を実施することで、ウシロタウイルス B

を含めたロタウイルス B の生態ならびに起源が明らかになってくることと思われる。

最後に、ここで得られた知見は遺伝子再集合や種間伝播によって生じる新たな変異ウイルスの監視体制の強化、さらには分子基盤に基づく新たな診断予防法の開発につながるが大いに期待できる。

E . 結論

少なくともわが国で検出されたウシロタウイルス B 株は、インドで検出されたウシロタウイルス B 株と遺伝的に異なる起源に由来することが明らかとなった。

F . 研究発表 論文発表

1. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus Res.* 197: 26-34 (2014).
2. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. *Microbiol. Immunol.* 58: 530-535, (2014).
3. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 26: 223-227, (2014).
4. Marthaler D, Suzuki T, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnsens J. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172: 359-366, (2014).

5. Mawatari T, Hirano K, Tsunemitsu H, Suzuki T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan 2003-2010. *J. Gen. Virol.* 95: 1117-1125, (2014).

学会発表

1. Suzuki T. Whole-genome characterization of animal rotavirus C. IUMS2014, Motreal, Canada, Jul 2014.
2. 鈴木 亨、馬渡隆寛、平野かおり、宮崎綾子、恒光 裕. 国内におけるウシロタウイ

ルスの遺伝的多様性. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11.

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

表1. ウシロタウイルスB 遺伝子解析のまとめ

Gene	Cut-off value [%]	Total of Genotypes	Genotypes of bovine RVBs	Genotypes of porcine RVBs
VP7	80	20	2 (G3, G5)	16 (G4, G6-20)
VP6	81	13	1 (I3)	10 (I4-13)
NSP1 ORF1,2	77, 75	8	2 (A4, A8)	3 (A5-7)
NSP2	83	9	2 (N3, N9)	5 (N4-8)
NSP5	81	10	2 (H3, H10)	5 (H5-9)
VP1	70	3	1 (R3)	-
VP2	74	3	1 (C3)	-

高感度ウイルス検出技術の開発
メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染侵入機構

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究協力者 朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所 教授

研究要旨 現行のウイルス抗原検査法より、高感度でかつ迅速性を保持した診断技術の開発を目指す。局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出していることを明らかにした。

一方、メルケル細胞ポリオーマウイルス MCPyV の感染機構の解析を行い、psudovirion を利用した感染モデル系から、ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

A . 研究目的

多くのウイルス感染症について、ウイルス抗原を検査する診断法が開発され実用化されているが、より高感度かつ迅速な診断技術の開発が求められている場合も少なくない。例えば、インフルエンザの診断ではイムノクロマト法による検査キットが開発され広く使われているが、検出感度の低さから、感染したウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。本研究では、局所表面プラズモン共鳴反応を利用して、現行より早期診断が可能な高感度ウイルス検査法を開発を行った。

ヒトポリオーマウイルス BKPv, JCPv, MCPyV (メルケル細胞ポリオーマウイルス) と糖脂質糖鎖との結合解析また同ウイルスの psudovirion を利用して感染細胞モデルを作製しガングリオシド依存的な感染様式を見出してきた。本年度は、さらに解析を進め、MCPyV の感染侵入に重要なガングリオシド分子の同定を目指した。

B . 研究方法

金フィルムと量子ドットからなるインフルエンザウイルス検出系は以下のように作製した。表面を凹凸加工した金ナノプラスフィルム (NPGL) をシステアミン処理しアミノ基修飾した。同様に量子ドット (QD) 表面にアミノ基修飾を施した。抗インフルエンザウイルス HA 抗体を *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) / *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 処理した後、上記 NPGL、QD にそれぞれコンジュゲートした。蛍光測定用 96 ウェルプレート各ウェルに抗 HA 抗体-NPGL を入れ、種々の濃度のインフルエンザウイルス液を添加。さらに抗 HA 抗体-QD を添加し反応させ、励起 380 nm、発光 518 nm 波長で蛍光強度を測定した。インフルエンザ検体としては、A/Yokohama/110/2009 (H3N2) 株を用いた。

MCPyV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。ポリオーマウイルスのカプシドをもつ psudovirion は以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち

分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ(Gluc)を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。

C . 研究結果

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

本検出系では、NPGL-ウイルス-QD 複合体が形成されると、複合体局所で表面プラズモン共鳴が生じることによって発光した蛍光が増強されることが想定される。NPGL 含各ウェルへ 1~1000 PFU/mL の種々の濃度のインフルエンザウイルス H3N2 を添加し、さらに QD を反応させた。各ウェルの蛍光強度を測定したところ 5, 10, 50, 100, 500, 1000 PFU/mL でウイルス濃度-蛍光強度の相関(直線性)が認められた。このウイルス濃度レンジで定量測定可能と考えられる。次に、一般医院で診断に用いられているイムノクロマトグラフィ(ImmunoAce Flu; TAUNS Lab Inc)との感度比較を同ウイルス検体について行った。その結果、イムノクロマト法では 5000 PFU/mL 以上で検出が可能であった。本開発技術はイムノクロマト法に比べ 100 倍程度高感度であると結論づけた。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV-LP と糖脂質糖鎖との結合解析の結果から、GD3 と GM3 が MCPyV と高い親和性を示すことをこれまでに見出している。これらのガングリオシドまた MCPyV 感染に関与すると文献的に知られている GT1b について psudovirion 感染系で MCPyV の感染感受性に寄与するかを調べた。まず、GM95 (マウス由来ガングリオシド合成酵素欠損)へ GM1, GM3, GD3, GT1b を添加し 1 日後に SV40 の psudovirion を接種し、GM1 点の場合のみ感染が成立することをレポータールシフェラーゼアッセイで確認した。次に、同様の解析を MCPyV psudovirion で行った。その結果、

GD3 添加が最も高レポーター活性を示し、次に GM3、さらに GT1b であった。GM1 添加では全くレポーター活性が検出されなかった。GD3 が MVPyV の細胞への感染侵入に最も重要な役割を果たしていることが示された。

D . 考察

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

ウイルス感染症の早期かつ正確な診断・検出技術の開発は依然として重要な課題である。代表的な迅速診断系であるイムノクロマト法はインフルエンザ診断などで汎用されている。しかしながら、感度に難があり、インフルエンザでは感染後ウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。発症 48 時間以内の抗インフルエンザ薬投与が望まれることから、現行より早期診断が可能な検査法の開発、実用化が期待されている。本研究では、局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、マルチウェルプレートで必要試薬と検体を混和し、洗浄操作なく 10 分程度で測定が可能であることを示した。さらに、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルスを検出していることを明らかにした。種々の臨床検体を用いた解析により本開発技術の有用性を評価する予定である。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV の細胞への感染侵入に、ガングリオシド GD3
(NeuAc α (2-8)NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide) が重要な役割を担っている可能性が示された。これまでに行った VLP と糖脂質との in vitro 結合解析では、GD3 とともに GM3 (NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide)も高い親和性を示した。MCPyV と糖鎖との結合にはラクトースにシアル酸が一個結合した構造で十分であるが、細胞への侵入にはさらにシアル酸が結合した構造が有効であることが示された。GD3 は、脳細胞分化に関与しており、神経外胚

葉性細胞や上皮性癌細胞では高発現を示すのに対し、分化度の高い成熟神経細胞では低発現であることが知られている。GD3 の生理的役割と MCPyV の感染様式が関連するか今後明らかにしたい。

E . 結論

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム / 量子ドットを用いたインフルエンザウイルス高感度検出系を開発した。

ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たす可能性が示された。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. **J Virol**. 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. **J Virol**.

89: 2220-2232, 2015.

3. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol**. 95: 2658-2667, 2014.
4. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.
5. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron**. 58:33-39, 2014.

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

分担研究者 柊元 巖 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター第一室室長

研究協力者 石井 克幸 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官

研究要旨：

臨床検体を用いてヒトパピローマウイルス（HPV）のゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とした。これまでに、一部の子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）の擦過細胞検体において、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に C to T の置換変異が蓄積している現象（hypermutation）を見出した。また HPV16 ゲノムを維持する CIN 由来のヒト培養細胞において APOBEC タンパク質を強制的に発現させると、同様の hypermutation が HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に導入された。APOBEC タンパク質が HPV ゲノムに hypermutation を導入し、HPV ゲノムの細胞 DNA への組込みを容易にすることで、子宮頸部発癌に関わる可能性が示唆された。

A．研究目的

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染は子宮頸癌発症の原因であり、子宮頸部基底細胞での HPV 癌タンパク質 E6 および E7 の持続的な発現が、異常増殖細胞を生み出すことが示されている。一方で、E6/E7 の恒常的な発現のみでは、悪性形質を獲得した癌細胞の発生には至らず、通常 10 年以上に及ぶ持続感染の間に、宿主細胞ゲノムに変異や染色体異常が蓄積することで、浸潤癌の発生につながると考えられている。

近年、様々な臓器の癌ゲノムが解読されることで、発癌過程における宿主ゲノム変異の包括的な解析が進展した結果、子宮頸癌の発症にホストの抗ウイルス因子である APOBEC3B タンパク質の関与が想定されている。APOBEC3 タンパク質群による変異導入は、細胞ゲノムのみならず HPV ゲノムにも検出されることが報告されているが、その子宮頸癌発症との関連は明らかに

されていない。

本研究は、子宮頸部臨床検体を用いて HPV ゲノム内の変異の有無を検討し、子宮頸部発癌におけるその生理的意義を明らかにすることを目的とする。

B．研究方法

HPV16 陽性の子宮頸部上皮内腫瘍（cervical intraepithelial neoplasia: CIN）の擦過細胞から DNA を抽出して、Differential DNA Denaturation PCR(3D-PCR)法により、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内の A/T-rich hypermutation について検討した。臨床検体は、NTT 東日本関東病院・産婦人科の近藤一成先生より供与を受けた。3D-PCR 増幅産物をプラスミドにクローニングして、その配列を解読した。また、CIN 由来の W12 細胞を用いて、APOBEC3 タンパク質による HPV16 ゲノムへの変異導入の可能性についても、3D-PCR 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体の利用にあたっては、関連機関の倫理審査委員会の承認を得て、提供者本人から書面での同意書を得た上で行った。

C . 研究結果

軽度病変(CIN1)11例および高度病変(CIN3)27例を解析した結果、E2領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%) CIN3 で 6 例 (22%) 検出された (図 1)。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコーディング鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった (図 2)。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C to T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていた。

W12細胞をインターフェロン で処理すると、幾つかの APOBEC3 タンパク質 (APOBEC3A, 3F, 3G) の mRNA 発現が誘導され、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内に C to T hypermutation が検出された。この現象は、APOBEC3G に対する siRNA の導入によりブロックされた。また W12 細胞に APOBEC3A, 3G を強制発現すると、同様の hypermutation が検出された。

D . 考察

臨床検体で検出された C to T hypermutation の標的配列から、APOBEC3 タンパク質の関与が強く示唆された。特に近年、子宮頸癌でのゲノム変異蓄積における APOBEC3B の役割が提唱されており、APOBEC3B が HPV ゲノムにも作用して hypermutation を導入する可能性が考えられた。

臨床検体での HPV ゲノムの hypermutation は、著しく低い割合 (HPV ゲノム全体の 0.5%以下) でしか検出されなかったことから、ウイルス増殖や維持に及ぼす影響は小さいことが予想された。

一方で、hypermutation が検出された E2 遺伝子は、子宮頸癌において細胞ゲノムへの組み込みにより、しばしば欠失していることが知られて

いる。APOBEC3 タンパク質による C to T 置換変異は、細胞の DNA 修復系により切断処理されることが示されており、E2 遺伝子内での DNA 二本鎖切断が細胞ゲノムへの組み込みを容易にして、子宮頸癌の発生に関わる可能性が考えられた。

E . 結論

子宮頸部の HPV 感染病変において、APOBEC3 タンパク質が HPV ゲノムに変異を導入することで、子宮頸部発癌に関与する可能性が示唆された。

F . 研究発表

論文発表

1. Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** in press.
2. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. **J. Virol.** 89: 2448-2452 (2015)
3. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 44: 910-917 (2014)

4. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. *J. Virol.* 88: 1308-1317 (2014)

学会発表

1. 森 清一郎、柊元 巖
ヒトパピローマウイルス16型のがん蛋白質 E6/E7によるAPOBEC3Bプロモーターの活性化
第73回日本癌学会学会学術総会
2014年9月、横浜
2. 柊元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名 敬
日本人女性のCIN2/3および子宮頸部浸潤癌でのHPV遺伝子型分布
第73回日本癌学会学会学術総会
2014年9月、横浜
3. 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柊元 巖
ヒトパピローマウイルス16型E6/E7による APOBEC3Bプロモーターの活性化機構
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月、横浜
4. 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柊元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道
APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染性を低下させる
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月、横浜
5. 増田 雄司、柊元 巖、益谷 央豪

Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex

第37回日本分子生物学会年会
2014年11月、横浜

6. Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I.
Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
7. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T.
Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology.
29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

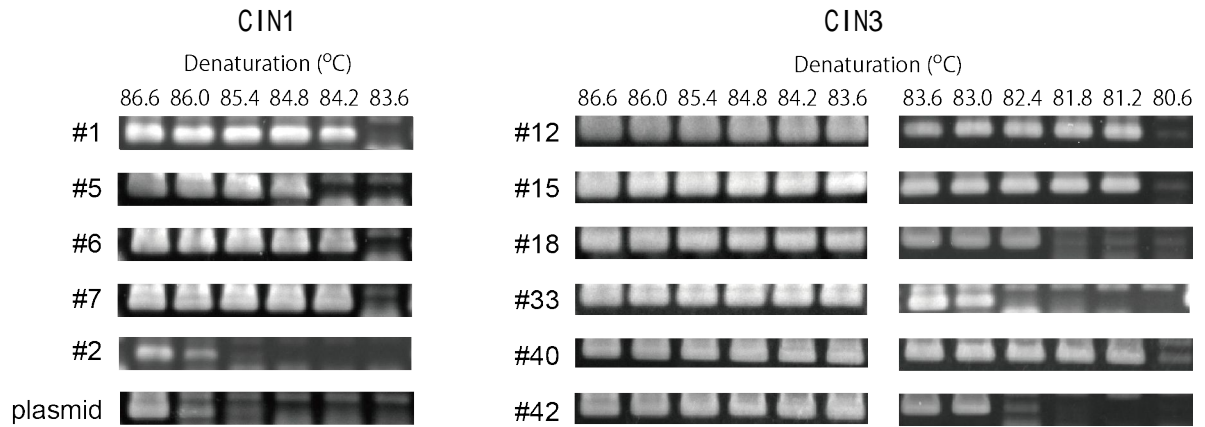


図1 3D-PCRによるE2 DNAの増幅

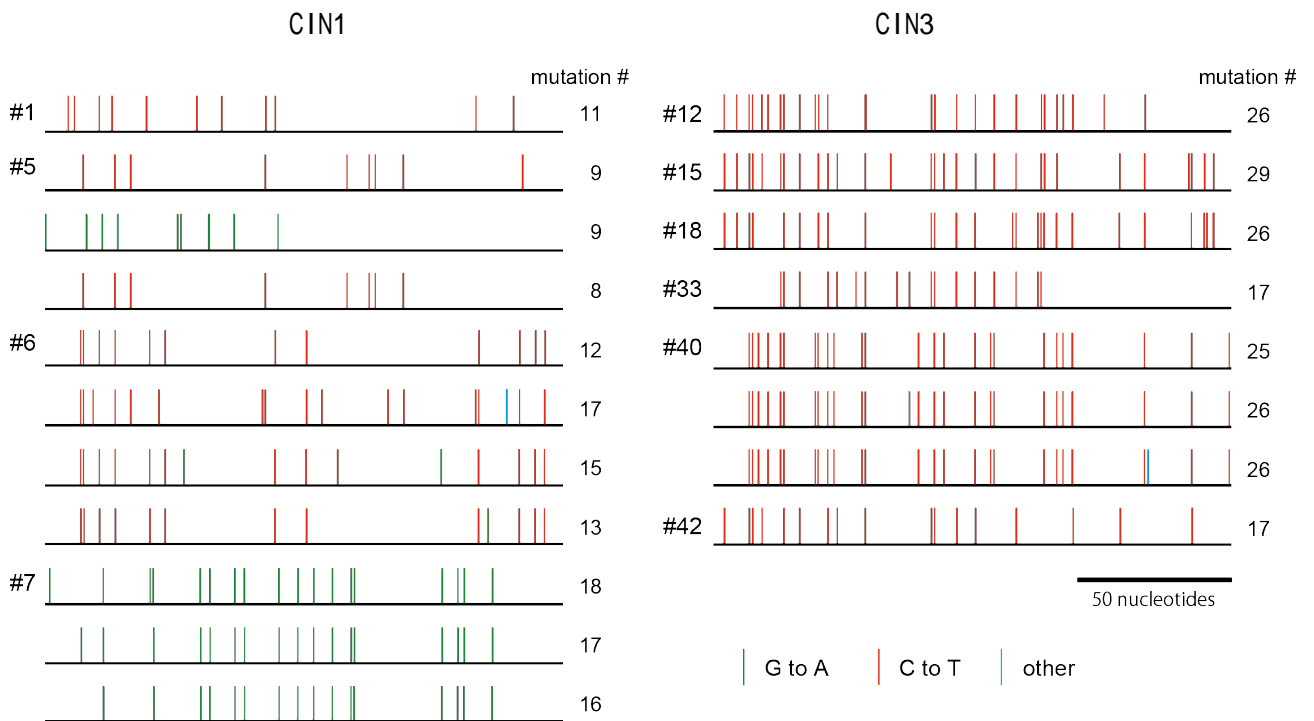


図2 E2 遺伝子への変異導入

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究

分担研究者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 ハイリスクグループのヒトパピローマウイルス(HPV)感染により子宮頸癌が発症する。HPV の E6, E7 蛋白質による癌抑制遺伝子 p53, pRb の分解誘導が発癌に必須であり、発癌の抑制にはこれらの経路を遮断することが重要である。HPV16 型の E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御することが報告されている。そこで、E6 遺伝子が組込まれた細胞から E6 蛋白質を特異的に排除する方法の開発を目指し、USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する小分子のスクリーニングおよび特殊ペプチドの開発を試みた。DUB-Glo protease assay を用い、インヒビターライブラリー320 コンパウンドから 33 個の候補分子を同定した。さらに Di-Ub を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

A. 研究目的

子宮頸癌の発癌にハイリスク型のヒトパピローマウイルス(HPV)感染と E6, E7 蛋白質の組込みが関与し、癌抑制遺伝子 p53, pRb のユビキチン-プロテアソーム系による分解誘導が発癌に重要である。HPV ワクチンが近年、実用化され、若年女子の HPV 感染を予防し、将来的に子宮頸癌の発症が抑制されることが期待されているが、すでに HPV に感染している患者に対する特異的な抗パピローマウイルス薬は未だ存在しない。近年、E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御していることが明らかとなった。そこで、子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目的に、USP15, USP11 の特異的阻害剤の作製を目指し、阻害物質のスクリーニングと特殊ペプチドの作製を試みた。

B. 研究方法

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング

昨年、樹立した DUB-Glo protease assay (Promega)による *in vitro* USP15 assay 系を用いて inhibitor library(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングを行った。

(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価

DUB-Glo protease assay で阻害活性の陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にした USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析した。

(3) Avi-His₆-USP15 の発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP(GE

Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。

(4)RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)。

(5)USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

FLAG-USP 遺伝子を pVL1393 にサブクローニングし、Sf9 にトランスフェクトして組換えバキュロウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) *in vitro* USP15 assay 系による阻害物質のスクリーニング

DUB-Glo protease assay による *in vitro* USP15 assay 系を用いてインヒビターライブラリー(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングしたところ、DUB activity を阻害するコンパウンドが 33 個見つかった。

(2) ヒット化合物の Di-Ub を基質とした USP15 活性阻害の評価

陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析したところ、5 種類のコンパウンドで著明な USP15 阻害活性を確認した。

(3) 大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の

発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5α で発現させ、HisTrap HP(GE Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。CBB 染色にて Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質の精製蛋白質を確認した。これを用いて以下のスクリーニングを行った。

(4)RaPID system による USP15 結合特殊ペプチドの作製

RaPID system で USP15 の活性部位 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチドをスクリーニングし、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得て、スケールアップして精製を行っている。

(5)USP-11 を発現する組換えバキュロウイルスの作製

バキュロゴールドを用いて組換えバキュロウイルス AcFLAG-USP11 を作製した。

D. 考察

HPV16E6 を排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤開発を目指した。インヒビターライブラリーから 320 compound を DUB-Glo protease assay を用いてスクリーニングしたところ、DUB protease activity を阻害する compound が 33 個見つかった。さらに Di-Ub (K48)を基質にして USP15 阻害活性を解析し、5 種類の小分子化合物で著明な USP15 阻害活性を確認した。USP15 阻害活性を確認できた小分子については今後、細胞内での USP15 阻害活性と E6 への安定性への影響を解析していく予定である。また、USP15 活性を阻害する特殊ペプチドの開発を RaPID system により行った。USP15 の catalytic domain である UCH domain に結合する環状 N メチルペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。現在、スケールアップして精製中であり、USP15 阻害活性を解析する予定である。USP11 についても FLAG-USP11 を発現する組換えバキュロウ

イルスを作製しており、同様な阻害剤候補物質のスクリーニングを行う予定である。

E. 結論

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6 の安定化因子である USP15 の阻害剤作製を試みた。DUB-Glo protease assay を用い、インヒビターライブラリーから 33 個の候補分子を同定した。さらに Di-Ub を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (1): 1-16 (2014)
2. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono, P, Shoji I, Deng, L, Hotta, H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 9: e98877 (2014)
3. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 188-94 (2014)

4. Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto, S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, 58 (3): 180-7 (2014)

2. 学会発表

- 1) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 2) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 3) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 6) Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.

- 7) Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 8) 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 9) 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF-スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 10) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 11) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene AGR3. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 13) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月25-27日, 2014年.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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、個人情報等を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 粒子のマリ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

厚生労働科学研究費補助金・新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究
平成 26 年度分担研究報告書

Rat HEV の細胞培養およびリバースジェネティクス法による Rat HEV の作製

分担研究者 李 天成 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究協力者 国立感染症研究所ウイルス第二部 吉崎佐矢香 石井孝司 脇田 隆字

国立感染症研究所病理部 片岡 紀代

国立感染症研究所動物管理室 網康至 須崎百合子

Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany. Reimar Johne

研究要旨 Rat HEV は人由来 HEV の遺伝子構造と類似する新しい E 型肝炎ウイルスである。ドイツにおいて初めて rat HEV が検出されて以後、アメリカ、ベトナム、インドネシアからも部分あるいは全長 rat HEV 遺伝子が確認されたことから、rat HEV が世界範囲に広がっていることが示唆された。しかしながら、これらのウイルスの増殖できる培養細胞系が樹立されていないため、ウイルスの感染性や病原性などの評価が困難である。本研究では我々はヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 細胞に接種し、Rat HEV が増殖できる細胞培養系を樹立した。また、in vitro で合成した完全長の rat HEV RNA をヌードラット肝臓に直接接種したことにより、感染性をもつ Rat HEV を獲得した。Rat HEV 培養系の樹立は rat HEV 複製のメカニズムの解明に有用である。

A . 研究目的

E 型肝炎は黄疸を主症状とする急性肝炎である。原因ウイルスは E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus, HEV) である。先進国において E 型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、全く海外渡航歴のない患者が見つかること、ブタやイノシシからヒト由来 HEV と同一の HEV がみつかることなど人獣共通感染症として注目されている。HEV はプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ小型球形ウイルスで、1~4 型まで 4 つの遺伝子型 (G1~G4) が知られている。また、ヒト以外の動物から従来ヒト由来 HEV と異なる新型 HEV が多数分離されている。これらのウイルスの病原性などはほとんど解明されていない。Rat HEV は野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒト

HEV と類似するウイルスであり、その病原性などに関する情報が少なく、その増殖、感染のメカニズムは明らかではない。ウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には細胞培養系もまた欠かせない手法である。本研究では rat HEV をヒト肝癌由来 PLC/PRF/5 細胞に接種し、ウイルスの増殖と産生されたウイルスの感染性等について検討した。また、in vitro で合成した全長 rat HEV RNA をヌードラット (Long Evans-run/run) 肝臓に直接接種し、ウイルスの獲得を試みた。

B . 研究方法

Rat HEV を感染したヌードラット (Long Evans *rnu/rnu*) の便材料を PBS で希釈し、10% 便乳剤を作製した。遠心分離後、その上清を 45 μ m フ

フィルターで濾過した後、ヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種した。細胞を継代せず、三日ごとに培地の更新によって細胞を維持した。経時的に培養上清中の rat HEV RNA, 構造蛋白を RT-PCR, ELISA 法で測定し、rat HEV の増殖を確認した。さらに培養上清を超遠心で濃縮し、電子顕微鏡でウイルス粒子を観察した。感染細胞内のウイルス抗原の局在は間接蛍光免疫染色法で検証した。感染細胞培養上清をヌードラットに接種することにより産生されたウイルスの感染性を確認した。

また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 作製をするため、rat HEV ドイツ株 (GU345042) の全長配列に基づき、T7 promoter プラス DcHEV 全長配列を含む cDNA を合成し、ベクター pUC19 にクローニングし、プラスミド pUC19-ratHEV を作製した。pUC19-ratHEV を制限酵素 XbaI で切断し、mMESSAGE mMACHINE T7 kit を用いて Cap 付きの ratHEV RNA を合成した。Cap 付きの全長 rat HEV RNA をヌードラット (Long Evans-run/run) 肝臓に直接接種した。接種後、経時的に採血、採便し、血中および便中の Rat HEV RNA を RT-PCR 法により測定し、ウイルス増殖の有無により、全長 rat HEV RNA の感染性を評価した。また、感染ヌードラット糞便を 10% 便乳剤にして、濾過除菌した後、PLC/PRF/5 細胞、またはヌードラットに接種することによりウイルスの感染性を確認した。

C . 研究結果

Rat HEV を接種したラット肝細胞 RLN-B2、ラット肝癌細胞 dRLh-84 から接種後 3 ヶ月までウイルスが検出されなかった。それに対して、Rat HEV を接種した PLC/PRF/5 細胞培養上清に接種後 15 日から rat HEV RNA が検出され、21 日からウイルス構造蛋白が検出された。その後、ウイルス量が経時的に増加していた。ウイルス構造蛋白は接種後 4 週の培養上清中から検出され、6 週目にピークに到達しその後も高いレベルを維持していた。構造蛋白は細胞質に分布していた。培養上清を濃縮後、電子顕微鏡で観察したところ、直径 35nm のウイルス粒子が観察された。

10 週目の培養上清をヌードラットに静脈接種し、経時的に糞便中、血液中の HEV RNA を測定した結果、ヌードラット体内での増幅を確認した。この結果は PLC/PRF/5 細胞で増殖された rat HEV が感染性を有することが示された。一方、ヌードラット肝臓に rat HEV RNA を直接接種した二週間後、rat HEV RNA が血中および便中から検出された。さらに便中のウイルスは PLC/PRF/5 細胞およびヌードラットに接種した後、ウイルスの増殖が認められた。この結果はリバーシジェネティクス法によって感染性を持つ rat HEV を獲得したことが証明された。

D . 考察

PLC/PRF/5 は rat HEV に感受性を有し、この細胞で増幅したウイルスは感染性を持つことが明らかになった。Rat HEV 培養系が樹立できたことから、今後 rat HEV 複製のメカニズムの解明が可能となり、rat HEV に関する新知見が大いに期待出来る。また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 作製が成功した。これは cDNA への特定の突然変異の導入やウイルス感染のトロピズムなどの研究に非常に有用である。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1) Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takaji W, Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. J Gen Virol. 2015 Jan 29.

2) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tingting Yang, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. Intervirology. 2015, *In press*.

3) Tian-Cheng Li, Kenji Iwasaki, Harutaka Katano, Michiyo Kataoka, Noriyo Nagata,

Kazumi Kobayashi, Tetsuya Mizutani, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki Characterization of Self-assembled Virus-like Particles of Merkel Cell Polyomavirus. PLOS ONE, 2015, In Press.

4) Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Li TC, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. BMC Vet Res. 2015 Jan 27;11(1):11.

5) Tian-Cheng Li, Kenzo Yonemitsu, Yutaka Terada, Naokazu Takeda, Wakita Takaji and Ken Maeda. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. JJID 2015.68(1).60-62.

6) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of Hepatitis E virus infection-permissive and -nonpermissive human hepatoma PLC/PRF/5, subclones. Microbiol Immunol. 2014 Dec 10.

7). Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Hideki Asanuma, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis. 2014.20 (4),709-712.

8) Ling Fang, Zejun Wang, Shili Song, Michiyo Kataoka, Changwen Ke, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li, Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. J Virol Methods, Oct; 207:38-44, 2014

2 . 学会発表

1) 李天成、網康至、須崎百合子、浅沼秀樹、岸田典子、白倉雅之、武田直和、脇田隆字。フェ

レットE型肝炎ウイルスの病原性とE型肝炎動物モデル。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月横浜。

2) 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候補に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月横浜。

3) 李天成、米満研三、寺田豊、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、浅沼秀樹、前田健、武田直和、脇田隆字、Ferret HEV抗体検出系の樹立およびその疫学調査、第157回日本獣医学会、2014年9月 北海道

4) バキュロウイルスによるブタサーコウイルス2型(PCV2)カプシド蛋白の発現、中江優貴、岸塚慎吾、久保田智江、青木博史、池田秀利、鈴木孝子、李天成、福士秀悦、第157回日本獣医学会、2014年9月 北海道

5) Reimar Johne, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, Tian-Cheng Li. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology, 18-21 March 2015 in Bochum, Germany.

6) Tian-Cheng Li, Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) July 27-Augst 1, 2014, Canada.

7) Tian-Cheng Li, Kaori Ochiai, Tingting

Yang, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. The 10st Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC 2014 Conference). May 8-10, 2014. Vietnam.

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., <u>Ishii K.</u> , 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		2015
Shiota T., <u>Li T.C.</u> , Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma PLC/PRF/5 Subclones.	Microbiology and Immunology	In press		2015
Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., <u>Ishii K.</u> , Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O.	Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus.	PLOS One	9	e101993	2014
<u>Li T.C.</u> , Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,	90	764-766	2014
<u>石井孝司</u>	A型肝炎、E型肝炎	臨床と微生物	41	72-78	2014
<u>Katayama K.</u> , Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK.	Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA.	Proc Natl Acad Sci U S A.	111	E4043-52	2014
Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, <u>Katayama K</u> and <u>Tohya Y.</u>	Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	76	1045-50	2014
Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Huang JC, Wu HS.	Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013.	Arch Virol		In press	2015
片山和彦	ノロウイルス感染症とその対策	救命救急	17	12-15	2014
片山和彦	質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性	日本医事新報	4723	12-15	2014

片山和彦	特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは	調剤と情報	20	10-12	2014
片山和彦	特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには	調剤と情報	20	14-19	2014
片山和彦	備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態	感染症対策ICTジャーナル	9		2014
片山和彦	ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型 2014年版	IASR	35	ノロウイルス特集号	2014
片山和彦	ノロウイルスの感染予防	少年写真新聞社 中学保健ニュース			2014
片山和彦	ノロウイルスの感染予防	少年写真新聞社 高校保健ニュース			2014
Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., <u>Motomura K.</u> , Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I.	Dominant mutations in ORA11 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca ²⁺ channel	Hum Mol Genet.	9	1-12	2014
Oka T, Takagi H, <u>Tohya Y.</u>	Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus.	J. Virol. Methods.	207	178-81	2014
Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, <u>Sato T.</u>	Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids.	Nature Medicine		In press	2015
Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, <u>Sato T.</u> , Sato H, Taketo MM, Oshima M.	Suppressing TGF β Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer.	Cancer Res	75	766-76	2015
Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, <u>Sato T.</u>	An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestrictive growth of the intestinal epithelium.	Integr Biol (Camb)	7	213-28	2015
Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, <u>Sato T.</u> , Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J.	Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2.	Nat Commun	5	5728	2014
Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, <u>Sato T.</u> , Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R.	KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells.	Cancer Res	74	2882-91	2014

Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, <u>Sato T</u> , Matsuoka K, Kanai T	Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis.	Inflamm Bowel Dis	20	1820-7	2014
Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, <u>Sato T</u> , Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T.	Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease.	Inflamm Bowel Dis	20	1426-34	2014
Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, <u>Sato T</u> , Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T.	Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation.	PLoS One	9	e84619	2014
<u>Suzuki T</u> , Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H.	Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan.	Virus Research	197	26-34	2015
Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, <u>Suzuki T</u> .	Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011.	Microbiology and Immunology	58	530-535	2015
<u>Suzuki T</u> , Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H.	Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan.	Infection, Genetics and Evolution	26	223-227	2014
Marthaler D, <u>Suzuki T</u> , Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnssens J.	VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs.	Veterinary Microbiology	172	359-366	2014
Mawatari T, Hirano K, Tsunemitsu H, <u>Suzuki T</u> .	Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan 2003-2010.	Journal of General Virology	95	1117-1125	2014
Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, <u>Suzuki T</u> .	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production.	J Virol	88	7541-7555	2014
Saito K, Shirasago Y, <u>Suzuki T</u> , Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M.	Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus.	J Virol	89	2220-2232	2015
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, <u>Suzuki T</u> , Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol	95	2658-2667	2014

Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Takeda N, Li TC.	Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses	J Virol Method	207	38-44	2014
Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, <u>Suzuki T</u> , Lee J, Park EY.	Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection.	Biosens Bioelectron.	58	33-39	2014
Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, <u>Kukimoto I</u> , Muramatsu M.	APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity.	Biochem. Biophys. Res. Commun.		in press	2015
Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, <u>Kukimoto I</u> , Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T.	Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology.	J. Virol.	89	2448-2452	2015
Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, <u>Kukimoto I</u> .	Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women.	Jpn. J. Clin. Oncol.	44	910-917	2014
Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, <u>Kukimoto I</u> , Muramatsu M.	APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation.	J. Virol.	88	1308-1317	2014
Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, <u>Shoji I</u> , Wilcox CS, Lai EY, Han F.	Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo.	Antioxidants & Redox Signaling	21	1-16	2014
Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, <u>Shoji I</u> , Deng L, Hotta H.	Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities.	PLoS One	9	e98877	2014
Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Antiviral activity of extracts from Morinda citrifolia leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.	Microbiology and Immunology	58	188-194	2014
Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Anti-hepatitis C virus compounds obtained from Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species.	Microbiology and Immunology	58	180-187	2014
<u>Li TC</u> , Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yang T, Takeda N, and Wakita T.	Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection.	Intervirology.		In press	2015

<u>Li TC</u> , Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda N, Wakita T, Suzuki T.	Suzuki Characterization of Self-assembled Virus-like Particles of Merkel Cell Polyomavirus.	PLOS ONE		In press	2015
Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, <u>Li TC</u> , Suzuki A, Oshitani H.	Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines.	BMC Vet Res.	11	In press	2015
<u>Li TC</u> , Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T and Maeda K.	Ferret hepatitis E virus infection in Japan.	JJID	68	60-62	2015
<u>Li TC</u> , Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, and Wakita T.	Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets.	Emerg Infect Dis.	20(4)	709-712	2014