
C型肝炎ウイルスの試験管内増殖に関する免疫超微形態学的研究

(課題番号：17590632)

平成17～19年度

科学研究費補助金（基盤研究(C)）

研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 渡 邊 省 三

(三重大学保健管理センター教授)

目 次

1. はしがき	1
2. 研究発表	2
3. 研究成果の概要	4
4. 研究報告	5

は し が き

課題番号 17590632

研究課題 C型肝炎ウイルスの試験管内増殖に関する免疫超微形態学的研究

研究組織 研究代表者：渡邊 省三（三重大学保健管理センター教授）
研究分担者：垣内 雅彦（三重大学大学院医学系研究科准教授）
研究分担者：小西 正芳（三重大学保健管理センター准教授）

研究経費	平成17年度	1,600千円
	平成18年度	1,100千円
	平成19年度	780千円
	計	3,480千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

1. Konishi M, Tanaka H, Kaito M, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Adachi Y, Watanabe S. Ultrastructural demonstration of hepatitis B virus production in a mouse model produced by hydrodynamic transfection. *Int J Mol Med.* 2007 ; 20 (1) : 31 – 36.
2. Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H, Kobayashi Y, Iwasa M, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M. Hecpudin expression in the liver : relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med.* 2007 ; 13 (1 – 2) : 97 – 104.
3. Kaito M, Tanaka H, Horiike S, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Gabazza EC, Adachi Y, Konishi M, Watanabe S. Unidentified virus-like particles are detected in plasmas with elevated ALT levels : are they significant of etiological agent (s) of non-B, non-C hepatitis? *Med Mol Morphol.* 2007 ; 40 (1) : 23 – 28.
4. Konishi M, Iwasa M, Araki J, Kobayashi Y, Katsuki A, Sumida Y, Nakagawa N, Kojima Y, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M. Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8 -isoprostane. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 ; 21 (12) : 1821 – 1825.
5. Konishi M, Wu CH, Kaito M, Hayashi K, Watanabe S, Adachi Y, Wu GY. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *J Viral Hepat.* 2006 ; 13 (11) : 756 – 761.
6. Kaito M, Iwasa M, Kobayashi Y, Fujita N, Tanaka H, Gabazza EC, Adachi Y, Kojima Y, Nakagawa N, Watanabe S. Iron reduction therapy by phlebotomy reduces lipid peroxidation and oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2006 ; 41 (9) : 921 – 922.
7. Iwata K, Iwasa M, Hara N, Matsumoto A, Kobayashi Y, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M. Iron content and consumption of health foods by patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2006 ; 41 (9) : 919 – 920.
8. Kaito M, Gabazza EC, Fujita N, Tanaka H, Watanabe S, Kohara M. Immune complex of hepatitis C virus particles detected by immunogold electron microscopy. *J Gastroenterol.* 2006 ; 41 (8) : 807 – 808.
9. Kaito M, Ohba H, Chiba J, Kohara M, Tanaka H, Fujita N, Gabazza EC, Watanabe S, Konishi M, Adachi Y. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med Mol Morphol.* 2006 ; 39 (3) : 136 – 145.
10. Kaito M, Watanabe S, Tanaka H, Fujita N, Konishi M, Iwasa M, Kobayashi Y, Gabazza EC, Adachi Y, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med.* 2006 ; 18 (4) : 673 – 678.
11. Konishi M, Iwasa M, Yamauchi K, Sugimoto R, Fujita N, Kobayashi Y, Watanabe S, Teraguchi S, Adachi Y, Kaito M. Lactoferrin inhibits lipid peroxidation in patients with

- chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2006 ; 36 (1) : 27 - 32.
12. Kaito M, Ishida S, Tanaka H, Horiike S, Fujita N, Adachi Y, Kohara M, Konishi M, Watanabe S. Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. *Med Mol Morphol.* 2006 ; 39 (2) : 63 - 71.
 13. Fujita N, Kaito M, Kai M, Sugimoto R, Tanaka H, Horiike S, Konishi M, Iwasa M, Watanabe S, Adachi Y. Effects of bezafibrate in patients with chronic hepatitis C virus infection : combination with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2006 ; 13 (7) : 441 - 448.
 14. Tanaka H, El-Karef A, Kaito M, Kinoshita N, Fujita N, Horiike S, Watanabe S, Yoshida T, Adachi Y. Circulating level of large splice variants of tenascin-C is a marker of piecemeal necrosis activity in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2006 ; 26 (3) : 311 - 318.
 15. Fujita N, Kaito M, Tanaka H, Horiike S, Urawa N, Sugimoto R, Konishi M, Watanabe S, Adachi Y. Hepatitis C virus free-virion and immune-complex dynamics during interferon therapy with and without ribavirin in genotype- 1 b chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat.* 2006 ; 13 (3) : 190 - 198.
 16. Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, Ma N, Tanaka H, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Wang J, Semba R, Watanabe S, Adachi Y. Accumulation of 8 -nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005 ; 43 (3) : 403 - 410.

(2) 口頭発表

1. 小林由直, 小西正芳, 藤田尚己, 杉本龍亮, 浦和尚史, 田中秀明, 岩佐元雄, 垣内雅彦, 渡邊省三, 竹井謙之 : C型肝炎ウイルス遺伝子導入肝細胞におけるトランスフェリンレセプター 2 の発現調節. 第37回日本肝臓学会西部会. 2007年12月7日 - 8日 (長崎)
2. Konishi M, Tanaka H, Kaito M, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Adachi Y, Watanabe S. Ultrastructural demonstration of hepatitis B virus replication in a mouse model produced by hydrodynamic transfection. 24 th Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver. September 7 - 11, 2006 (Cairo)
3. 小西正芳, 垣内雅彦, 足立幸彦, 藤田尚己, 岩佐元雄, 小林由直, 渡邊省三, : siRNAによるHCV増殖抑制効果とsiRNA標的領域のmutantの出現 (HCV replicon細胞を用いた検討). 第41回日本肝臓学会総会. 2005年6月16日 - 17日 (大阪)
4. 垣内雅彦, 藤田尚己, 岩佐元雄, 小林由直, 渡邊省三, 岩田加壽子, 足立幸彦 : C型慢性肝炎に対する瀉血療法に伴う酸化ストレスマーカー 8 -epiprostaglandinF 2 α の低下に関する検討. 第29回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会. 2005年9月10日 - 11日 (鹿児島)
5. 垣内雅彦, 生駒次朗, 小林由直, 岩佐元雄, 樋口国博, 堀池眞一郎, 田中秀明, 井谷俊夫, 藤田尚己, 中川直樹, 小島裕治, 石田聡, 渡邊省三, 足立幸彦 : C型慢性肝炎に対するNatural Interferon α 少量長期投与の有効性に関する臨床研究. 第36回日本肝臓学会西部会. 2005年11月25日 - 26日 (鈴鹿)

研 究 成 果 の 概 要

HCV (genotype 1b) 全長遺伝子のcDNAをT7RNAポリメラーゼプロモーターの下流に結合した発現ベクターをリポフェクション法でHCV高感受性のヒト肝細胞由来IMY-N9細胞に遺伝子導入し、さらにT7RNAポリメラーゼ発現組み換えアデノウイルスを感染させることにより、細胞培養上清中に高濃度のHCVRNAが産生されることをreal time RT-PCR法で確認し、細胞内でのHCVの構造蛋白質と非構造蛋白質の発現を特異的なmonoclonal抗体を用いたWestern blot法によって確認した。更に、この培養上清からショ糖密度勾配遠心法でHCV粒子の分離・精製を行い、HCVRNAとHCV core抗原の定量測定と免疫電子顕微鏡的検討によるHCV粒子の超微形態観察を行うことにより、C型肝炎ウイルス粒子の産生を証明した。

このHCV含有培養上清を感染材料として、IMY-N9細胞、肝癌細胞株Huh7.5細胞とHCV非感受性のサル腎由来細胞株COS7細胞などの培養細胞に添加し、試験管内感染実験を行った。細胞内のHCVRNAはすべての細胞で感染材料添加後24時間で陰性化していて、各細胞内でのHCVの増殖を確認することはできなかったが、培養上清の経時的検討では、IMY-N9細胞は感染材料添加後48時間まで、Huh7.5細胞は添加後24時間までHCVRNAが陽性であるのに対し、HCV非感受性の陰性コントロールであるCOS7細胞では24時間後にHCVRNAはすでに陰性化していて、異なる推移を示した。

今回報告したIMY-N9細胞を用いたHCV産生細胞システムは成熟したHCV粒子を産生・放出していて、ヒト肝細胞由来培養細胞はこの系で産生されたHCVに対してある程度の感受性を有しているように思われたが、HCVのライフサイクルを解明するためには、HCVに対してより感受性の高い細胞株を開発して、さらに効率の良い試験管内感染・増殖系を樹立することが必要であると考えられた。

研 究 報 告

C型肝炎ウイルスの試験管内増殖に関する 免疫超微形態学的研究

研究代表者：渡邊 省三（三重大学保健管理センター教授）

研究分担者：垣内 雅彦（三重大学大学院医学系研究科准教授）

研究分担者：小西 正芳（三重大学保健管理センター准教授）

研究目的

ヒト肝細胞とHepG2細胞のハイブリドーマであるIMY-N9細胞を用いて、T7RNAポリメラーゼプロモーターの下流に全長HCVcDNAを結合した発現ベクターをトランスフェクションし、さらにこの細胞にT7RNAポリメラーゼ発現組み換えアデノウイルスを感染させると、この細胞内で効率よくHCVが増殖することが確認されている。

本研究では、このトランスフェクション・インフェクション法によって得たHCV粒子を含むこのIMY-N9細胞上清を用いて、IMY-N9細胞、肝癌細胞株Huh7.5細胞、サル腎由来細胞株COS7細胞などへの試験管内感染性について検討した。

研究方法

HCV (genotype 1b) 全長遺伝子のcDNAをT7RNAポリメラーゼプロモーターの下流に結合した発現ベクターをリポフェクション法により、HCVに高感受性を示すヒト肝細胞由来IMY-N9細胞（東京都神経科学総合研究所・保井孝太郎博士より供与）に遺伝子導入し、さらにこの細胞にT7RNAポリメラーゼ発現組み換えアデノウイルスを感染させることによって、高濃度のHCVRNAを含有する細胞培養上清を得た。

細胞内のHCVの構造蛋白質および非構造蛋白質の発現の有無については、HCV関連蛋白質に特異的なmonoclonal抗体を用いたWestern blot法により検討し、培養上清中のHCVRNAについては、real time RT-PCR法による定量測定を行った。

これらの検討によって、IMY-N9細胞内のHCV関連蛋白質の発現と細胞培養上清中への高濃度のHCVRNAの放出を確認し、この培養上清からショ糖密度勾配遠心法によりHCV粒子の分離・精製を行った。

ショ糖密度勾配遠心は6mlの10%～60% (w/w) 連続ショ糖密度勾配溶液上に培養上清を重層し、150,000gで20時間遠心した。管底から500 μ lずつ試料を採取し、これらの分画をHCVRNAとHCV core抗原の定量測定と電子顕微鏡的検討のための試料とした。

電子顕微鏡的検討は通常の透過電子顕微鏡法と小原道法博士（東京都臨床医学総合研究所）より供与された抗HCV抗体を用いた金コロイド免疫電子顕微鏡法によって行った。

このHCV含有培養上清を感染材料として、IMY-N9細胞、肝癌細胞株Huh7.5細胞、HCV非感受性のサル腎由来細胞株COS7細胞などの培養細胞に添加して試験管内感染実験を行い、培養細胞内および培養上清中のHCVRNA量を測定し、HCVの感染状況について評価を行った。

成 績

(1) HCVcDNAをトランスフェクションしたIMY-N9細胞内のHCV構造蛋白質および非構造蛋白質の発現と培養上清中のHCVRNA量

全長HCVcDNAをトランスフェクションし、さらにT7RNAポリメラーゼ発現組み換えアデノウイルスを感染させたIMY-N9細胞について、抗HCV-Core, E1, E2, NS3, NS4a/b, NS4b, NS5a, NS5bの各抗体を用いたWestern blot法による解析を行い、IMY-N9細胞内に、予測されたサイズに切断されたHCV構造蛋白質および非構造蛋白質の発現を確認することができた(図1)。各レーン横の矢印は予測される各HCV蛋白のバンドの位置を示している。

Real time RT-PCR法により測定したIMY-N9細胞培養上清中のHCVRNA量は 1.1×10^8 copies/mlであった。

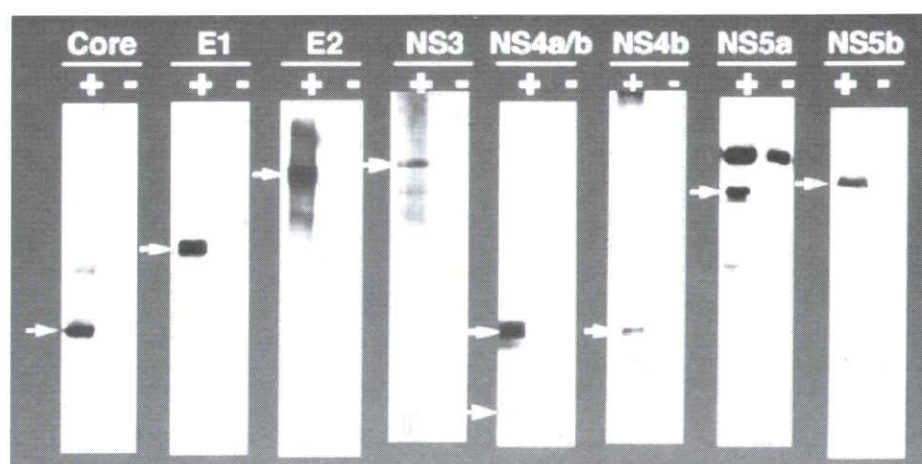


図1：トランスフェクション・インフェクション法によるIMY-N9細胞内でのHCV構造蛋白質および非構造蛋白質の発現 (Western blot 解析)

(2) ショ糖密度勾配遠心法によるHCV粒子の精製

HCV陽性IMY-N9細胞培養上清(HCVR6-Rz)からショ糖密度勾配超遠心法で分画した試料のHCV core抗原は比重1.04, 1.12, 1.23g/mlの3つ分画にピークが認められ、HCVRNAは1.12g/mlの分画にピークを認めた(図2A)。

HCVR6-Rzを1% NP40で処理した培養上清(HCVR6-Rz+NP40)をショ糖密度勾配超遠心法で分画した試料では、HCV core抗原とHCVRNAのピークは1.12g/mlから1.23g/mlに移動した(図2B)。

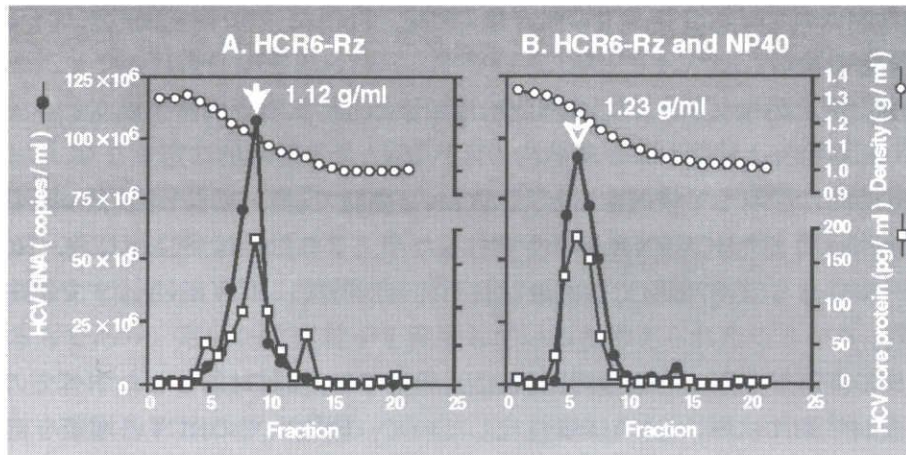


図2：HCV粒子の精製；(A) HCV陽性IMY-N9細胞培養上清（HCR6-Rz）と（B）HCR6-RzのNP40処理検体(HCV-R6+NP40)のシヨ糖密度勾配遠心分画

(3) 細胞内および培養上清中のHCV粒子の電子顕微鏡的検討

HCV陽性IMY-N9細胞の透過電子顕微鏡観察では小胞体の内部に直径55-65nmのウイルス様粒子が観察され（図3a），金コロイド免疫電子顕微鏡では抗E1，E2抗体と特異的に反応する直径55-65nmのウイルス粒子を確認することができた（図3b）。

細胞培養上清の免疫電子顕微鏡では，1.12g/ml~1.16 g/mlのシヨ糖密度勾配分画で抗E1抗体（図3c）と抗E2抗体（図3d）に特異的に反応し，5 nmの金コロイド粒子が結合した55-65 nmのウイルス粒子が観察された。これらの分画試料をネガティブ染色して観察すると微細なスパイクを有する55-65 nmのウイルス様粒子が確認された（図3e）。

培養上清の遠心分画試料の凍結融解を2回繰り返した後の検体では，35 nmのウイルス粒子の内部コア構造が視覚化された（図3f）。また，培養上清をNP40処理した検体のシヨ糖密度勾配遠心分画のうち，比重1.23 g/mlの分画では30-35 nmの粒子が抗HCVcoreポリクローナル抗体で凝集し，金コロイド粒子の特異的な結合像を認めることができた（図3g）。

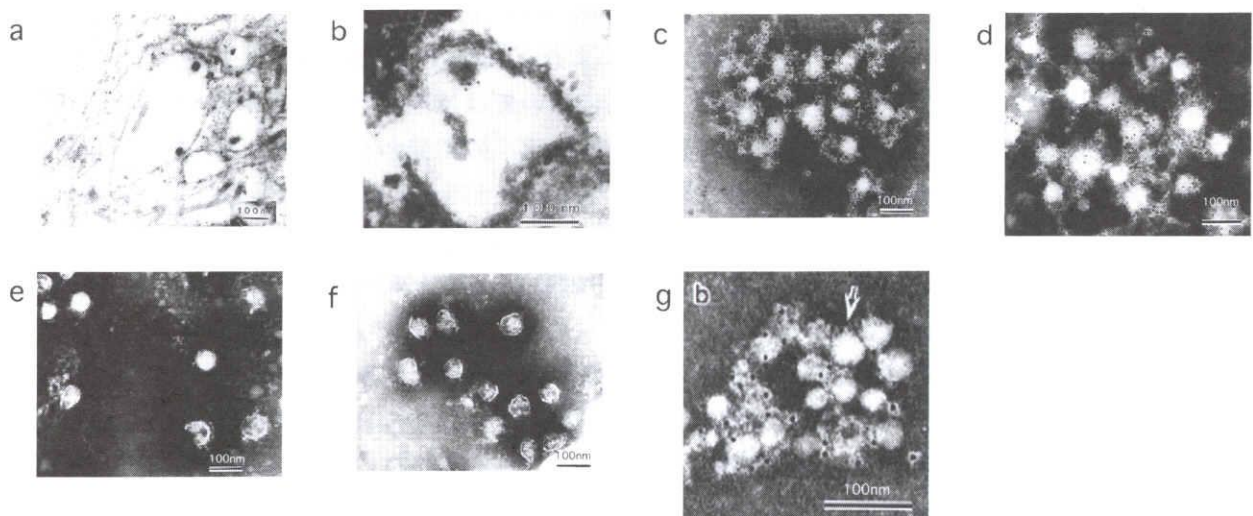


図3：IMY-N9細胞内および培養上清中のHCV粒子の電子顕微鏡像

(4) HCV陽性IMY-N9細胞培養上清のIMY-N9細胞，肝癌細胞株Huh7.5細胞，COS7細胞への試験管内感染性の検討

HCV陽性培養上清を感染材料として各細胞培地に添加し，試験管内感染成立とウイルス増殖の評価を行うため，細胞培養上清中および細胞内のHCV RNA量を経時的に定量した。

培養上清を経時的に採取して検討すると，IMY-N9細胞では感染材料添加後48時間まで，Huh7.5細胞では添加後24時間までHCV RNAが陽性であったが，それ以後は陰性化した。HCV非感受性の陰性コントロールであるCOS7細胞では感染材料添加後24時間にHCV RNAはすでに陰性化していた(図4)。

細胞のホモジェネートを用いた細胞内HCV RNA測定では，検討対象としたすべての細胞において感染材料添加後24時間にはHCV RNAは陰性化していて，細胞内でのHCVの増殖を確認できるレベルのHCV RNAは検出することができなかった。

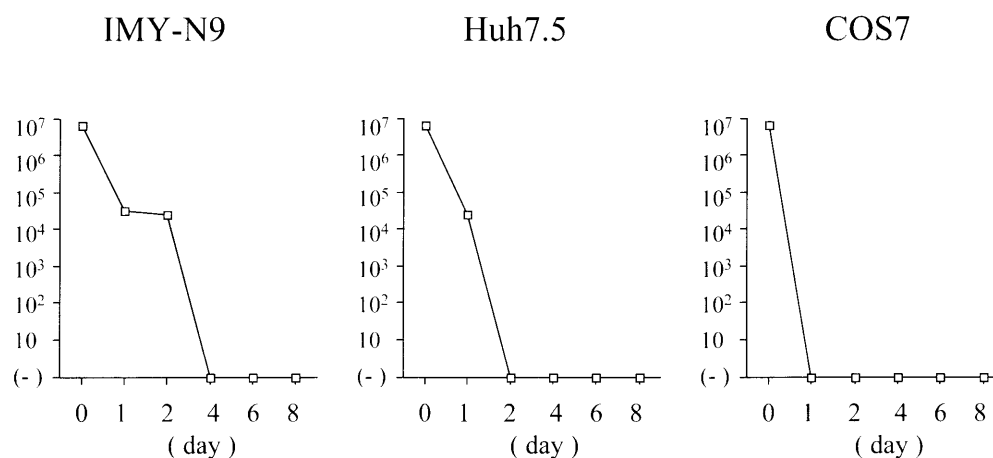


図4：HCV添加後の各種細胞培養上清中のHCV RNA量(copies/ml)の経時的推移

考 察

C型肝炎ウイルス(HCV)はヒトでの持続感染により，慢性肝炎，肝硬変，さらに肝細胞癌を起こすことが明らかとなっているが，感染機序や病態については依然不明なことが多い。HCVが同定された後，効率的なHCV増殖細胞系とHCV感染動物モデルの開発が試みられ，HCV replicon細胞(1, 2)やキメラマウス，キメララットなどを用いたHCVモデル(3, 4)が報告されているが，HCVの細胞への吸着，侵入，増殖，放出の段階を評価するためには完全な実験系とは言えない。

IMY-N9細胞はHCVの感染性が証明されたヒト肝細胞由来の細胞株であり(5)，今回，このIMY-N9細胞に強制的にHCV cDNAを遺伝子導入し，さらに組み換えアデノウイルスを感染させることによって，試験管内で効率よくHCV粒子を産生させることが可能であった。こうして産生されたHCV粒子を各種培養細胞に試験管内で添加すると，IMY-N9細胞やHuh7.5細胞などの肝細胞由来細胞の培養上清中では，それぞれ48時間後，24時間後までHCV RNAが陽性であったが，HCV非感受性のCOS7細胞では24時間後にHCV RNAがすでに陰性化しており，異なる推移を示した。しかしながら，IMY-N9細胞やHuh7.5細胞などの肝細胞由来細胞株の培養細胞ホモジェネートの

HCV RNAの解析では、細胞内へのHCVの感染と増殖を証明することはできなかった。

この原因として2つの可能性が考えられる。すなわち、産生されたHCV粒子が完全なものでなく、細胞への侵入を担うエンベロープ上の要素が不完全である可能性と、使用した感染実験用の細胞株が産生されたHCV粒子に対するレセプター保有していない可能性である。今研究のWestern blot法によるHCVの構造蛋白質と非構造蛋白質の発現の確認や培養上清中へのHCV RNA放出、HCV RNA含有培養上清のショ糖密度勾配分画法によるウイルス粒子の浮遊密度の確認、HCV粒子の免疫電子顕微鏡的形態観察などの検討結果は、C型慢性肝炎患者血清から分離・同定されたHCV粒子（6）の所見と一致するものであり、完全なHCV粒子を産生していると考えられたことから、前者の可能性は否定的である。後者については、これまでの報告からIMY-N9細胞とHuh7.5細胞はある程度のHCV感受性を有していると思われるが、これらの細胞におけるHCVレセプターの候補として推測されているCD81（7）やSRB1（8）などの発現についてさらに解析を行う必要があるであろう。

今回報告したIMY-N9細胞を用いたHCV産生細胞システムは成熟したHCV粒子を産生、放出している、ヒト肝細胞由来培養細胞はこの系で産生されたHCVに対してある程度の感受性を有しているように思われたが、HCVのライフサイクルを解明するためには、HCVに対してより感受性の高い細胞株を開発して、さらに効率の良い試験管内感染・増殖系を樹立することが必要であると考えられた。

文 献

- 1) Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999 ; 285 : 110 – 3.
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005 ; 11 : 791 – 6.
- 3) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*. 2001 ; 7 : 927 – 33.
- 4) Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology*. 2005 ; 128 : 1416 – 23.
- 5) Ito T, Yasui K, Mukaigawa J, Katsume A, Kohara M, Mitamura K. Acquisition of susceptibility to hepatitis C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes : establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system. *Hepatology*. 2001 ; 34 : 566 – 72.
- 6) Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 1994 ; 75 : 1755 – 60.
- 7) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998 ; 282 : 938 – 41.

- 8) Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B 1 scavenger receptor. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 41624 - 30.

