

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮村 達男

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究・主任研究者 宮村 達男 ……1

II. 分担研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究……………下遠野 邦忠……………15

プロテオミクスの手法を用いたC型肝炎ウイルス
の病原性に関する宿主候補因子の探索……………西島 正弘……………19

C型肝炎治療薬創薬シーズの探索に関する研究
ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究……………堀田 博……………25

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究……………瀬谷 司……………31

動物モデルの開発およびそれを用いた解析……………小原 道法……………35

HCV RNA 複製システムの改良と HCV 持続感染および増殖
制御機構の解析……………加藤 宣之……………37

Tacrolimus による C 型肝炎病態への介入：肝発癌抑制へ向けて……………小池 和彦……………47

ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構解析……………松浦 善治……………51

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究……………深澤 秀輔……………55

HCV 複製増殖機構の解析及び HCV 増殖細胞系の開発	鈴木 哲朗	57
サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデル開発に関する研究	明里 宏文	61
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		67
IV. 研究成果の刊行物・別冊		75

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究

主任研究者 宮村 達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究要旨 HCV キャリアからの発症予防対策及び治療薬開発は保健、医療、福祉の向上に直結する。本研究では、HCV の実験モデル開発から、生活環の分子機構・持続感染機構、また HCV 蛋白と相互作用する宿主因子の網羅的な探索・相互作用解析まで、HCV 感染症の予防・治療法開発に必要な研究を総合的に行う。本年度は以下の研究成果を得た。1) Neo^R-ルシフェラーゼ融合遺伝子、EGFP 遺伝子等を利用して HCV ゲノム複製の簡便な定量系、複製細胞の可視化モデルを開発し、また感染性 HCV 粒子の持続産生系を改良した、2) HCV 増殖阻害、肝炎治療薬の候補として、スフィンゴ脂質生合成阻害剤、スタチン剤、Mizoribine、Tacrolimus 等を見出した、3) ゲノム複製を調節する宿主因子として、TGFβ、CCT5、Hsc70 等を同定し作用機序解析を行った、4) コア蛋白によって誘導されるインスリン抵抗性の発現に PA28γ発現が必須であること、コア蛋白は DDX1 と結合しその ATPase 活性を亢進させることを示した、5) NS3 と p53 との相互作用に伴って p53 の機能が低下すること、NS5A は Syk キナーゼと会合しその下流シグナル伝達を阻害し、また amphiphysin II と結合することによって自身のリン酸化が調節されることを明らかにした、6) NK 細胞の活性化に関与する UL16-binding protein 3 が HCV 刺激によって発現誘導すること、IFN-β の産生は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して顕著に抑制されることを見出した、7) 自殺遺伝子を導入した SCID-トランスジェニックマウス、及び GBV-B 感染タマリンによる急性肝炎モデルを構築した。

分担研究者
下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所 教授
西島 正弘 国立感染症研究所 部長
堀田 博 神戸大学医学研究科 教授
瀬谷 司 北海道大学医学研究科 教授
小原 道法 東京都臨床医学総合研究所
プロジェクトリーダー
加藤 宣之 岡山大学医歯学総合研究科 教授
小池 和彦 東京大学医学部 教授
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
深澤 秀輔 国立感染症研究所 室長
鈴木 哲朗 国立感染症研究所 室長

明里 宏文 医薬基盤研究所・霊長類医科学
研究センター リーダー

A. 研究目的

C型肝炎は我が国の国民病ともいわれ、現在、HCV キャリアは約 200 万人とされる。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝癌での年間死亡者は 3 万人を超える。Interferon (IFN)、Ribavirin を基軸とした現行の化学療法では、その有効率は 40-50%程度であり、半数以上の C 型肝炎患者は、肝癌発症のリスクを避けられない。このように、HCV キャリアからの発症予防対策及

び既存の治療法とは異なる作用機序を持つ治療薬の開発は保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減にも貢献する。一方、HCV 研究においては、細胞培養系で効率よく感染性ウイルスを産生することが容易でないこと、またチンパンジー以外に感染、発症の動物モデルが確立していないことが実験上の大きな障害となっている。HCV の完全な生活環を反映する培養細胞系の開発・改良、チンパンジーに代わり多数の個体を使用できる実験動物の樹立、育成が強く望まれている。

本研究グループでは、1) HCV 複製、病態実験モデルの開発とエビデンスに基づいた創薬への応用、2) HCV 複製増殖、持続感染及び病原性発現の分子基盤、3) C 型肝炎治療薬創薬シーズの探索、について研究を行う。

B. 研究方法

(1) HCV ゲノム自律複製細胞系の開発、改良

HCV の全長、部分ゲノムが効率よく自律複製する細胞（レプリコン細胞）を樹立した。HCV RNA を Huh7 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性細胞の樹立を試みた。得られたクローン細胞における HCVRNA の複製レベルはノーザンブロット法、ウエスタンブロット法、定量的 RT-PCR 法などにより測定した。

さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するためにルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を作成し、この細胞に各種阻害候補物質を入れてアッセイを行った。

EGFP 遺伝子を複製可能な全長 HCVRNA の NeoR 遺伝子の前、コア遺伝子の前、NS5A 遺伝子の後ろなどに挿入した。それぞれの場所に EGFP 遺伝子を 1 コピー有するものや組み合わせで EGFP 遺伝子を 2 或は 3 コピー有するものを作成して、レプリコン治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入し、

G418 耐性細胞の樹立を試みた。EGFP 遺伝子の発現による蛍光強度はフェノールレッドを含んでいない培地下で培養した細胞の蛍光強度をフルオロシキヤンアセントにより測定した。共焦点レーザー顕微鏡による細胞内の蛍光検出は、細胞をパラホルムアルデヒドで固定後行った。HCV コアの発現は、同様に固定後、1 次抗体としてコア抗体、2 次抗体として蛍光色素 Cy3 を標識した抗体を使用することにより確認した。

(2) HCV ゲノム複製を阻害あるいは増強する低分子化合物または細胞性因子の探索

レプリコン細胞に各種低分子化合物を添加または細胞因子発現ベクターを導入し、ウイルスゲノム複製活性をルシフェラーゼを標識にして測定した。HCV 複製への影響の大きい因子については、その作用機構を解析した。

(3) HCV RNA 複製調節に関与する宿主因子の同定

Genome-length dicistronic HCV RNA 複製（全長レプリコン）細胞を対数増殖期（高 HCV 複製）と非増殖期（低 HCV 複製）からそれぞれ回収し、Membrane flotation assay により HCV 複製複合体を含む膜分画を粗精製した。二次元蛍光ディファレンシャルゲル電気泳動と質量分析法によって HCV RC 分画に含まれる宿主因子を同定した。

(4) 感染性 HCV 産生細胞系の作製

RNA Pol I promoter/terminator と Zeocin 耐性遺伝子を有するプラスミド pHH21Zeo に HCV JFH1 株のゲノム cDNA を挿入し pH11JFH1Zeo を作製した。得られた発現プラスミドを Huh7 細胞または Huh7.5.1 細胞へトランスフェクトし、Zeocin 存在下で約 3 週間培養し薬剤耐性クローンを分離した。HCV 蛋白質の発現をウエスタンブロット法、ELISA 及び免疫蛍光抗体法にて検出した。HCV 発現細胞の培養上清中に含まれるウイルスの感染性アッセイに

は、培養上清を Huh7.5.1 細胞に感染させ、4 日間培養後にコア蛋白の免疫染色によって感染細胞のフォーカスを検出した。

(5) HCV 持続感染機構の解析

二本鎖 RNA(dsRNA)刺激による IFN 発現誘導に対する HCV 蛋白の影響を以下のように解析した。PH5CH8 細胞に pCXbsr レトロウイルス発現ベクター(NS3-4A など)、レポータープラスミド(pIFN- β (-125)-Luc)および pRL-CMV internal control ベクターをトランスフェクションした後、poly I:C を培地へ添加または細胞内へ導入し、IFN- β 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイを行った。

IRF3 の二量体形成は、PH5CH8 細胞を poly I:C で刺激し、回収した粗蛋白質画分を Native-PAGE にて分離して IRF3 抗体により検出した。

HCV 感染に伴うサイトカイン応答をあきらかにするため、HCV particle 刺激によって type II IFN と NF- κ B 依存性のサイトカインがおきるかを評価した。RIG-I、PKR、MDA5 等の pathway への影響も解析した。

HCV particle 存在下でのヒト樹状細胞(DC)の maturation、また DC-NK interaction を評価した。DC の抗 HCV 活性 CTL 誘導能も検討した。

(6) HCV コア蛋白発現細胞を用いた比較プロテオーム解析

HepG2 細胞由来のコア蛋白発現細胞株(Hep39)及びコントロール細胞株(Hepswx)を用いた。各細胞に脂肪負荷し脂肪滴を形成させ、超遠心分離法等を用い脂肪滴を生化学的に分離・精製し、2つのマスマスペクトロメトリーを用いた方法で脂肪滴タンパク質の網羅的解析を行った。第1の方法は脂肪滴タンパク質を SDS-PAGE 電気泳動後、蛋白質バンドを切り出し trypsin 消化後、MALDI-TOF マスマスペクトロメトリー(MS)により同定する方法、第2の方法は脂肪滴画分を脱脂後タンパ

ク質を Lys-C 消化し直接 nano-LC-MS/MS で同定する方法である。

(7) HCV NS3 蛋白-宿主因子相互作用の解析

NS3 の発現と細胞内局在：RT-PCR により肝炎患者血清から HCV 遺伝子の NS3 の N 末端 198 アミノ酸残基をコードする領域を増幅し、発現プラスミドにクローニングした。種々の点変異を有する NS3 やそれらを含む全長 NS3 を発現するプラスミドも構築した。これらのプラスミドを用いて、ワクシニアウイルス-T7 ハイブリッド発現系により培養細胞に NS3 発現させ、特異抗体による免疫染色法及び細胞内小器官マーカーとの共局在を指標にして、NS3 の細胞内局在を調べた。

NS3 と p53 の結合：NS3 と p53 を培養細胞に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により両蛋白の会合について調べた。

NS3 セリンプロテアーゼ活性：NS3 及びその基質である NS5A5BAC を HeLa 細胞内で共発現させ、NS5A5BAC の切断の程度を指標にして、NS3 セリンプロテアーゼ活性を調べた。

(8) HCV NS5A 蛋白-宿主因子相互作用の解析

NS5A-Syk 相互作用：全長あるいは種々の欠失(または点)変異を有する NS5A とチロシンキナーゼ Syk を培養細胞に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により、NS5A と Syk の会合について調べた。他の HCV 蛋白と Syk の相互作用についても調べた。種々の HCV 蛋白の発現は、単独発現系、ポリプロテイン発現系及び HCV RNA レプリコン複製系を用いた。

Syk キナーゼ活性に及ぼす NS5A の影響：NS5A と Syk を培養細胞内で共発現させ、特異抗体で免疫沈降した Syk のチロシンキナーゼ活性を、基質であるヒストン H2B のリン酸化を指標にして調べた。また、Syk の下流のシグナル伝達分子である PLC- γ 1 のリン酸化についても、リン酸化特異抗体を用いた免疫ブロッ

ト法により調べた。

ヒト肝組織における Syk の発現解析：病理検査用に採取した HCV 感染及び非感染のヒト肝組織を、抗 Syk 抗体を用いて免疫染色した。

プロテオーム解析による NS5A 結合因子の探索：NS5A の C-末に 3 x Flag-tag を付けて、HeLa 細胞にトランスフェクトし、安定的に発現する細胞を得た。細胞抽出液より NS5A-宿主蛋白複合体をアフィニティー精製し、SDS-PAGE、銀染色を行い、蛋白質バンドを切り出し、LC-MS/MS により結合蛋白質を同定した。またウエスタンブロットにより結合蛋白質を探索した。

(9) HCV コア遺伝子発現 (CoreTg) マウスを用いた解析

CoreTg マウス (3 ヶ月齢♂) に対し、Tacrolimus (FK506) (0.1mg/kg) ならびに placebo を週 3 回、筋肉注射にて投与を行なった。同様に非トランスジェニック兄弟マウスについても、3 ヶ月齢♂に対し Tacrolimus あるいは placebo の投与を行った後、肝臓の脂質量、構成脂肪酸量、血糖値、インスリン値を検討した。なお、Tacrolimus あるいは placebo の投与期間は 3 ヶ月間である。また、上記量の 1/5 および 1/25 量の Tacrolimus 投与下での検討も行なった。

CoreTg マウスを B6 マウス由来 PA28 γ 遺伝子ノックアウトマウス (PA28 γ KO) と交配することで、PA28 γ KO-CoreTg マウスを作製した。2 ヶ月齢マウスを用いて、以下の試験を行った。絶食時および摂食時で、血中内のインスリン量および血糖値を測定した。また、インスリン負荷試験および糖負荷試験をし、インスリン抵抗性を評価した。肝臓における IRS1 リン酸化および TNF α を測定した。

(10) Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase (HSV TK) 発現マウスの作製

Hepatitis B virus X protein (HBX) promoter で誘導できる HSV TK 発現ベクター

を構築した。このベクターを SCID マウスに導入した Tg マウスの作製を試みた。

(11) サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発

感染性 GBV-B 分子クローン pGBB は Dr. Bukh (NIAID, NIH, USA) より分与を受けた。pGBB から *in vitro* transcription により得られたウイルスゲノム RNA をタマリンまたはマーマセットに接種し 1-2 週ごとにケタミン麻酔下で採血した。得られた血液は血清生化学検査、plasma 中ウイルス量及び抗体価測定を行った。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し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、個人情報厳格に管理、保存する。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮する。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後実施する。

C. 研究結果

(1) HCV 複製細胞系の開発・改良

Huh7 細胞に由来する HCV ゲノム自律複製 (レプリコン) 細胞については、サブゲノムおよび全ゲノムが複製する細胞を樹立した。複製効率を定量的に評価するため、ルシフェラー

ゼ遺伝子または NeoR-ルシフェラーゼ融合遺伝子を挿入したサブゲノムまたは全ゲノム複製細胞を確立した。その一つである OR6 細胞を IFN- α で処理して得られるルシフェラーゼ活性の低下率と定量的 RT-PCR 法により得られた HCV RNA 量の低下率はよく一致しており、ウェスタンブロット解析により HCV 蛋白質の発現レベルも高かったことから、HCV RNA の複製レベルが高いことが分った。また、通常 1 日以上かかっていたアッセイがわずか 30 分程度で済むという時間節約の利点も大きい。以上の結果、OR6 アッセイシステムはルシフェラーゼ活性を測定することにより HCV RNA の複製レベルを定量的にかつ簡便に測定できるアッセイシステムであることが明らかとなった。

EGFP 遺伝子を全長 HCV RNA 複製系に導入し、生細胞のまま HCV RNA の複製レベルの観察を可能にする系の開発を試みた。その結果、蛍光が観察される様々な G418 耐性のクローン細胞が得られた。それらの細胞内での HCV 蛋白質や EGFP の発現量を調べ、予想される EGFP 融合蛋白質などが検出された。

昨年、C 型劇症肝炎患者から分離された HCV 遺伝子 JFH1 株の genomic RNA を Huh7 細胞へ導入することにより、効率よく感染性 HCV が産生されることが見出された。我々はこの実験系を改変し、JFH1 全長 cDNA を RNA Pol I promoter/terminator 支配下で発現させることにより、プラスミドトランスフェクションによる簡便な感染性ウイルス粒子産生系を樹立した。また、Zeocin 耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターを利用することにより、恒常的に感染性ウイルスを産生する細胞株 HuhJFHZeo 及び H751JFHZeo を樹立した。

(2) 抗ウイルス薬、肝炎治療薬の探索と作用機序の解析

HCV レプリコン細胞を用いて市販の薬剤、実験試薬などをスクリーニングした。その結果、IFN、TGF β 、IL1 β 、Cyclosporine A が強

い抗 HCV 作用を示した。一方、MAP キナーゼ阻害剤の一つ、PD98059 が促進作用を示した。これらのうち、IL1 β 、IFN についてはすでに報告があるので、TGF β および PD98059、Cyclosporine などについての解析を進めた。

TGF β の HCV 複製阻害効果の作用機序を調べるため TGF シグナルの解剖実験を行った結果、TGF β による HCV ゲノム複製抑制は SMAD を介した下流遺伝子の変化によることが示唆された。Cyclosporine 誘導体各種類について、抗 HCV 効果を調べ、その中の一つ、NIM811、に免疫抑制作用を持たないが強く HCV 複製を抑制するものが存在することを見いだした。

PD98059 がウイルス複製のどの段階に働いているかを調べ、HCV IRES の翻訳反応がこの試薬の存在により亢進することを見いだした。PD98059 はキャップ依存的な翻訳反応には影響を与えない。また、他の IRES 配列を持つ RNA からの翻訳にも影響を与えなかった。

Ribavirin と類似した構造を有する Mizoribine の抗 HCV 活性を測定した結果、Ribavirin とほぼ同程度の HCV ゲノム複製抑制効果があることを明らかにした。Mizoribine は 10 μ M 程度の低濃度（臨床での血中濃度）でも IFN- α の抗 HCV 効果を増強する効果が認められた。また、抗 HCV 効果が報告されている Cyclosporine との併用効果が認められることも示した。

高脂血症薬の一つである Lovastatin の近縁化合物で、国内で認可されているスタチン剤 (Atrovastatin, Fluvastatin, Simvastatin および Pravastatin) の抗 HCV 効果を調べた結果、前 3 化合物で Lovastatin より強い抗 HCV 効果が認められた。これらの中で Fluvastatin が最も強い抗 HCV 活性を示し、また IFN- α との併用により、相乗的な抗 HCV 効果を示すことを明らかにした。

スフィンゴ脂質合成を阻害する NA255 および Myriocin を HCV レプリコン細胞に添加、また HCV 感染動物に投与してその阻害活性を検討した。両化合物は、培養細胞系での HCV

ゲノム複製を効率よく阻害した。実際に HCV が持続感染しているヒト肝臓キメラマウスに Myriocin を投与したところ、8 日間で血中 HCV 量が 1/10-1/100 に減少し、PEG-IFN よりも減少率が大きかった。

ミトコンドリア保護作用をもつ Tacrolimus (FK506) を CoreTg マウスに投与し、脂質代謝、糖代謝および酸化ストレス産生への影響を検討した。3ヶ月間の Tacrolimus の投与によって、CoreTg マウスにおける肝脂肪化、インスリン抵抗性は著明に改善された。また、低用量の Tacrolimus によっても同様の効果があることも明らかになった。免疫低下作用を発揮しない低容量の Tacrolimus を投与することによって、HCV 感染症における肝脂肪化やインスリン抵抗性発生、酸化ストレス産生が抑制され、C 型肝炎における肝癌を含む病態進行の抑制あるいは病態の改善が期待される。

(3) HCV RNA 複製機構の解析：複製調節に関与する宿主因子の同定

二次元蛍光ディファレンシャルゲル電気泳動と質量分析法によって HCV 複製複合体分画に含まれる宿主因子を同定した。二次元電気泳動にて約 1300 蛋白が検出され、45 蛋白 (3.5%) が、高 HCV 複製期に 1.5 倍以上増加していた。その中には二種類の分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex subunit ϵ (CCT5) 及び Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) が含まれていた。ウエスタンブロット解析から、両蛋白は細胞の増殖相によって発現レベルに差は認められないものの、高 HCV 複製細胞の膜分画で明らかな量的増加を確認した。また、エピトープタグ免疫沈降法により、CCT5 が HCV NS5B 蛋白と特異的に結合することを見出した。さらに、CCT5 siRNA によって HCV RNA 複製レベルが低下すること、また薬剤処理によって T-complex polypeptide 1 ring complex (TRiC) を細胞内で誘導したところ HCV 複製が亢進することを見出した。

(4) 病原性発現の分子機構：HCV 蛋白-宿主因子の相互作用解析

HCV CoreTg マウス、PA28 γ KO マウスを利用して、HCV コア蛋白質による II 型糖尿病の発症 (インスリン抵抗性の獲得) における PA28 γ の関与を解析した。インスリン負荷試験においても CoreTg マウスは、インスリンに対し有意に低い反応性を示したが、PA28 γ KO-CoreTg マウスは対照の B6 マウスと同等の反応性を示した。インスリンを産生する膵臓ランゲルハンス島は CoreTg マウスのみで肥大し、インスリン産生増強が原因と考えられた。CoreTg マウスでは IRS-1 のリン酸化の抑制が認められたが、PA28 γ KO-CoreTg マウスでは B6 マウスと同等であった。TNF α は CoreTg マウスのみで蛋白レベルおよび転写レベルで有意に高い値を示し、IRS-1 リン酸化抑制は TNF α の産生増強が原因と推察された。コア蛋白によって誘導されるインスリン抵抗性の発現に、PA28 γ 発現が必須であることが明らかになった。

コア蛋白の発現によって変動する脂肪滴画分蛋白を比較プロテオームによって解析した。コア蛋白発現細胞の脂肪滴には新たに DDX1、DDX3 分子が存在するようになることを見いだした。DDX1、DDX3 分子は、RNA helicase/ATPase 活性を有する DEAD box ファミリーに属するが、未だ生理機能は明らかでない。しかし、DDX1 はある種のガン細胞で高発現していることが知られ、HCV による病態との関連が非常に注目される。生化学的な解析から、DDX1 分子はコアタンパク質の N 末端領域と相互作用し、コアタンパク質によりその ATPase 活性が活性化されることを見いだした。

NS3 蛋白と癌抑制タンパク質 p53 の相互作用について解析した。臨床分離株から得られた種々のアミノ酸配列を有する NS3 を培養細胞で発現させると、その細胞内局在は斑点状、びまん性及び中間型の 3 通りに分けられること、および斑点状局在を示す NS3 は、びまん性のものに比べて、p53 とより効率よく会合

し、p53 機能をより強く阻害することを明らかにした。さらに、NS3 と p53 の会合は HCV レプリコン複製細胞においても見られ、p53 機能は対照細胞に比べて減弱していることを明らかにした。また、NS3 の Leu-106 を Ala に置換(L106A)すると、NS3 と p53 の会合が著しく阻害され、NS3 による p53 機能阻害の程度が減弱することを明らかにした。また、NS3 のセリンプロテアーゼ活性も L106A 置換により著しく減弱した。NS3 の Phe-43 を Ala に置換(F43A)した場合にも同様のことがみられたが、その程度は L106A の場合に比べると軽度であった。

NS5A 蛋白と非受容体型チロシンキナーゼ Syk の相互作用について解析した。HCV 感染患者肝組織と非感染対照肝組織におけるチロシンキナーゼ Syk の発現を免疫染色により調べたところ、Syk の発現態様が HCV 感染の有無により異なることがわかった。培養細胞を用いたタンパク質発現系において HCV 蛋白と Syk の相互作用について検討したところ、NS5A が効率よく Syk と会合すること、およびその会合により Syk キナーゼ活性が阻害され、その下流の PLC- γ 1 の活性化も阻害されることを明らかにした。また、HCV レプリコン複製細胞においても NS5A が Syk と会合することを明らかにした。

プロテオミクスの手法により NS5A と結合する宿主蛋白質を探索し、amphiphysin II (Bin1)と c-Src を同定した。amphiphysin II は SH3 領域を介して NS5A と結合した。In vitro キナーゼ反応で、amphiphysin II の結合は NS5A のリン酸化を抑制したことから、amphiphysin II が NS5A のリン酸化の調節を通じて、HCV の生活環に関与することが示唆された。

(5) 持続感染機構の解析

HCV 刺激によりヒト細胞は UL16-binding protein 3 (ULBP3)を発現上昇することが判明した。ULBP は NKG2D を介した NK 活性化を

誘導し、感染細胞を傷害する。今後、感染と ULBP 誘導の機構を解析し、NK 活性化の HCV 感染における意義を検討する。

現在のところ、HCV JFH1 株を用いたヒト myeloid DC への感染実験は成功していない。高感度の検出法と DC 調製の条件検討を行っている。

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞において NS5B を発現させると TLR3 の活性化を介して IFN- β の産生誘導が起こり、コアを共発現させると IFN- β の産生がさらに亢進する。この状態で NS3-4A を共発現させると IFN- β の産生が顕著に抑制されるが、その抑制は不完全であることをこれまでに明らかにしている。また、PH5CH8 細胞は HuH-7 や HepG2 細胞などのヒト肝癌細胞株と異なり、IFN- β 産生システムの TLR3/TFIF および RIG-I/IPS-1 の両シグナル系がよく機能していることを最近明らかにしている (Dr. Lemon との共同研究)。今年度は PH5CH8 細胞を二本鎖 RNA (poly I:C) で処理した場合における NS3-4A の影響を詳細に調べた。二本鎖 RNA を細胞内に導入することにより TLR3 や RIG-I の系が活性化され IFN- β の産生が起こるが、NS3-4A を細胞内で発現させると IFN- β の産生は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して顕著に抑制された。しかしながら、予想外に二本鎖 RNA を培地内に添加し細胞外から刺激を与えた場合に起こる IFN- β の産生誘導は NS3-4A を細胞内で発現させてもほとんど抑制されないことを見出した。

(6) 動物モデルの開発

HBX promoter 支配下で HSV TK を発現するベクターHBXpro-HSVTK を構築し、SCID マウスに導入した Tg マウスを作製した。この Tg マウスの肝臓細胞は Ganciclovir に対して濃度依存的な感受性を示し肝細胞死が認められた。現在、ヒト肝細胞への置換率の上昇を検討中である。

HCV に最も近縁なサル肝炎ウイルスである

GBV-B を新世界ザルの一種であるタマリンにチャレンジすることにより、ウイルス増殖に伴う急性肝炎様症状を再現性良く発症させることに成功した。次に感染初期における GBV-B の体内動態を解析したところ、肝臓のみならずリンパ・血液系組織や泌尿・生殖器系組織においてウイルス増殖が認められたことから、GBV-B が HCV 同様に多様な組織へのトロピズムを有する、pleiotropic virus である事が初めて明らかとなった。

D. 考察

HCV レプリコン細胞、Tg マウスモデル等を用いた薬剤評価から、新たな C 型肝炎治療薬の開発へ直接結びつく種々の知見が得られた。

1) Mizoribine には Ribavirin に認められるような貧血の副作用（高齢者に頻発）がないことから、高齢者に対する治療における選択肢の一つになるものと思われる。免疫抑制剤の Cyclosporine と Mizoribine を併用すると相加効果が認められることから、移植後における C 型肝炎治療にも有効ではないかと考えられる。2) スタチン剤は安全な薬剤として長期間の服用が可能な薬剤であるので、IFN との併用で治療に使用できる可能性がある。3) スフィンゴ脂質生合成を阻害する NA255 および Myriocin はセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) を特異的に阻害するが、ウイルス蛋白でなく SPT のような宿主因子を標的にした薬剤の場合、ウイルス変異誘導は認められないので長期に使用できるといった利点がある。4) ミトコンドリア機能保護作用を有する Tacrolimus は、HCV コア蛋白による脂質代謝異常（今回の検討では肝脂肪化）を低用量においても改善することからヒトへの応用が期待できる。

RNA レプリコンを基盤とした、または感染性粒子を産生する培養細胞系の改良、開発はウイルス複製増殖機構の解析に役立つとともに抗 HCV 薬の探索にも有用である。これまでに樹立した全長 HCV RNA 複製細胞を用いた解

析から、幾つかの適応変異が見つかり、それらを組み合わせることにより複製効率を上昇させることが可能であることが分ったことから、EGFP 遺伝子を組み込んだ全長 HCV RNA 複製システムにこれらの適応変異を導入することにより、十分な蛍光強度を有するシステムができる可能性が出てきた。また、NS3 領域に多く認められる適応変異がなぜ HCV RNA の複製効率を上昇させるのかを追究することによっても、さらに複製効率の良いシステムの開発につながるかもしれない。そのようなシステムの開発は、世界でも未だ成功していない 1b 型の感染性 HCV 粒子の大量生成につながる可能性がある。

本研究では上記のような実験系を利用してウイルスゲノム複製を制御している細胞側要因を明らかにする目的で、1) 薬理機能が明らかでない薬による抗 HCV 効果の作用機序の解析及び2) プロテオーム解析による複製調節因子の探索を行った。その結果幾つかの薬に加え、TGF β 等の細胞のシグナルに関係する因子がウイルス複製を制御することが明らかになった。ERK 阻害剤のひとつである PD98059 がウイルス複製活性を高める働きがあることを見いだした。この薬剤は HCV IRES からの翻訳反応を高める。HCV IRES による翻訳の分子機構はまだ不明な点が多いので、ここで見いだした知見は、その機構の解明に役立つと期待され、また、その機構を足がかりにした抗 HCV 剤の開発も可能にあると期待される。また、HCV 複製複合体分画に含まれる宿主因子として CCT5 及び Hsc70 を同定した。ノックダウン、強制発現実験から両因子が HCV 複製を調節することが見出され、また CCT5 は NS5B 蛋白のポリメラーゼ活性中心の近傍に結合することが明らかとなった。Hsc70 は CCT5 を含む TRiC と相互作用することが知られている。以上より、今回同定した分子シャペロンが NS5B 蛋白との結合を介して HCV 複製複合体へ取り込まれ RNA 複製調節に関与する可能性が示唆された。

一方、HCV コア、NS3、NS5A 蛋白と宿主因子との相互作用の解析を通じて、HCV 感染による病態発症に関わる宿主因子の同定とその影響について広範に調べている。これによって、今までに試みられていない新たな創薬ターゲットを見出すことを目指している。またこのアプローチは、創薬のみならず、宿主内での HCV の病原性発現機構を理解する上で重要な知見が得られるものと期待される。今年度は、1) コア蛋白によって誘導されるインスリン抵抗性の発現に PA28 γ 発現が必須であること、2) コア蛋白は DDX1 の N 末端と結合しその ATPase 活性を亢進させること、3) NS3 と p53 との相互作用に伴って p53 の機能が低下すること、4) NS5A が Syk と会合し、Syk キナーゼ活性及びその下流のシグナル伝達分子である PLC- γ 1 の活性化を阻害すること、5) NS5A は SH3 領域を介して amphiphysin II と結合し、それに伴って NS5A のリン酸化が調節されること、などを見出した。

E. 結論

以下の研究成果を得た。

(1) HCV 増殖阻害、肝炎治療薬の候補：

スフィンゴ脂質合成阻害剤、スタチン剤、Mizoribine、Tacrolimus 等

(2) HCV 複製増殖機構の解析：

1) HCV ゲノム複製を調節する宿主因子の同定と機能の解明

2) 複製効率を規定する適応変異の同定

(3) HCV 病原性発現機構の解析：

1) HCV コア、NS3、NS5A 蛋白と結合する新規宿主因子の同定及び相互作用の解析

2) コア蛋白によるインスリン抵抗性発現の分子機構解析

(4) HCV 持続感染機構の解析：

1) HCV 感染に伴うサイトカイン応答の解析

2) 自然免疫機構を制御するウイルス側要因の同定

(5) 新たな実験モデルの開発：

1) レプリコンシステム、感染性 HCV 粒子の

持続産生系の改良

2) HSV TK 発現 SCID マウス、タマリンを用いたサロゲート動物モデルの作製

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* (in press).
2. Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434-445, 2006.
3. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Shimoike T., Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 79: 1271-1281, 2005.
4. Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Kishimoto T, Tanno S, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, and Miyamura T. An outbreak of

- hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 1087-1093, 2005.
5. Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M, Matsuno T, and Miyamura T. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4413-4417, 2005.
 6. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe Y, Suzuki T, Lai M.M.C, Miyamura T, Moriishi K, and Matsuura Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79: 13473-13482, 2005.
 7. Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, and Koike K. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J. Hepatol.* 43: 757-763, 2005.
 8. Murata T, Hijikata M, and Shimotohno K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology* 340: 105-115, 2005.
 9. Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, and Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology* 331: 407-417, 2005.
 10. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, and Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* 19: 111-122, 2005.
 11. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, and Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* (in press).
 12. Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, and Shimotohno K. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporine A among strains of hepatitis C virus. *J. Virol.* (in press).
 13. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, and Shimotohno K. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J. Virol.* 79: 5923-5932, 2005.
 14. Takahashi H, Yamaji M, Hosaka M, Kishine H, Hijikata M, and Shimotohno K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology.* 48: 104-111, 2005.
 15. Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, Shimotohno K, Kohno S, and Matsuyama T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem.* 280: 18355-18360, 2005
 16. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, Murata T, and Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures

- in the NS5B coding region. *Virology*. 342: 276-285, 2005
17. Sudo K, Yamaji K, Kawamura K, Nishijima T, Kojima N, Aibe K, Shimotohno K, and Shimizu Y. High-throughput screening of low molecular weight NS3-NS4A protease inhibitors using a fluorescence resonance energy transfer substrate. *Antivir Chem Chemother*. 16: 385-392, 2005.
 18. Kumagai K, Yasuda S, Okemoto K, Nishijima M, Kobayashi S, and Hanada K. CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem*. 280: 6488-6495, 2005.
 19. Tanaka M, Nagano-Fujii M, Deng L, Ishido S, Sada K, and Hotta H. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 340: 792-799, 2006.
 20. Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitagawa S, Ishido S, Sada K, and Hotta H. The nonstructural protein 4A of hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergo mitochondria-mediated apoptosis. *J. Gen. Virol.* (in press).
 21. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, and Hotta H. The NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.* (in press).
 22. Hidajat R, Nagano-Fujii M, Deng L, Tanaka M, Takigawa Y, Kitazawa S, and Hotta H. Hepatitis C virus NS3 protein interacts with ELKS- δ and ELKS- α members of a novel protein family involved in intracellular transport and secretory pathways. *J. Gen. Virol.* 86: 2197-2208, 2005.
 23. Kadoya H, Nagano-Fujii M, Deng L, Nakazono N, and Hotta H. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol. Immunol.* 49: 265-273, 2005.
 24. Uehori J, Fukase K, Akazawa T, Uematsu T, Akira S, Funami S, Shingai K, Matsumoto M, Azuma I, Toyoshima K, Kusumoto S, and Seya T. Dendritic cell maturation Induced by Muramyl Dipeptide (MDP) Derivatives: Monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* 174: 7096-7103, 2005.
 25. Shingai M, Inoue N, Okabe M, Akazawa T, Miyamoto Y, Ayata M, Honda K, Kurita-Taniguchi M, Matsumoto M, Ogura H, Taniguchi T, and Seya T. A mouse model for wild-type measles virus infection: CD11c-positive dendritic cells are nidus for systemic viral spreading. *J. Immunol.* 175: 3252-3261, 2005.
 26. Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Inoue N, Fujita F, Nakanishi M, and Seya T. Cutting Edge: NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN Regulatory Factor 3 activation. *J. Immunol.* 174: 27-30, 2005.

27. Okahira S, and Seya T. Interferon-beta induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell. Biol.* 24: 614-623, 2005.
28. Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, and Sudoh M. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat. Chem. Biol.* 1: 333-337, 2005.
29. Watanabe T, Sudoh M, Miyagishi M, Arai M, Inoue K, Taira K, Yoshida M, and Kohara M. Targeting the Hepatitis C Virus genome with RNA interference using highly effective and non-toxic long double-stranded RNA. *Gene Therapy* (in press).
30. Higashi K, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka T, Tanaka E, Kiyosawa K, and Kohara M. Characterization of hypervariable region in hepatitis C virus envelope protein during acute and chronic infection. *Arch. Virol.* 150: 883-898, 2005.
31. Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, and Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3. *J. Biochem.* 137: 339-347, 2005.
32. Hayashi K, Hasuike S, Kusumoto K, Ido A, Uto H, Kenji N, Kohara M, Stuver SO, and Tsubouchi H. Usefulness of a new immuno-radiometric assay to detect hepatitis C core antigen in a community-based population. *J. Viral. Hepat.* 12: 106-110, 2005.
33. Hayashida K., Daiba A, Sakai A, Tanaka T, Kaji K, Inaba N, Ando S, Kajiyama N, Terasaki H, Abe A, Ogasawara M, Kohara M, Harada M, Okanoue T, Ito S, and Kaneko S. Pre-treatment Prediction of Interferon- α efficacy in chronic hepatitis C patients. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (in press).
34. K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- β via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* (in press).
35. Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, and Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J. Hepatol.* (in press).
36. Dansako H, Naka K, Ikeda M, and Kato N. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 458-468, 2005.
37. Naka K, Takemoto K, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, and Kato N. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.* 86: 2787-2792, 2005.
38. Li K, Chen Z, Kato N, Gale, Jr. M, and Lemon S.M. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- β production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 16739-16747, 2005.

39. Naka K, Ikeda M, Abe K, Dansako H, and Kato N. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 871-879, 2005.
40. Ikeda M, Abe K, Dansako H, Nakamura T, Naka K, and Kato N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 1350-1359, 2005.
41. Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, Nozaki A, Naka K, Ikeda M, and Shimotohno K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.* 86: 645-656, 2005.
42. Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, and Kato N, A. Morikawa and H. Hoshino. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.* 7: 29-40, 2005.
43. Tamura T, Nozaki A, Abe K, Dansako H, Naka K, Ikeda M, Tanaka K, and Kato N. cDNA microarray analysis of lactoferrin expression in non-neoplastic human hepatocyte PH5CH8 cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects* 1721: 73-80, 2005.
44. Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Shimotohno K, and Kato N. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.* 107: 73-81, 2005.
45. Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J. Gastroenterol.* 40: 664-665, 2005.
46. Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol. Res.* 33: 145-150, 2005.
47. Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin. Gastroenterol Hepatol* 3: S132-S135, 2005.
48. Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 49: 51-57, 2006.
49. Koike K, and Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol. Res.* (in press).
50. Koike K, and Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: steatohepatitis resembling but distinct from NASH. *J. Gastroenterol.* 40: 329-336, 2005.
51. Abe T, Hemmi H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79: 2847-2858, 2005.
52. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 79: 3448-3458, 2005.

53. Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Yoshida M, Ozato K, Komuro K, and Yamaguchi K. Nucleolin is involved in Interferon Regulatory Factor-2 dependent transcriptional activation. *Oncogene* (in press).
54. Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway LB, Prendergast GC, Komuro K, and Fukazawa H. Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 572-578, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「C 型肝炎ウイルスの増殖法」鈴木哲朗、宮村達男、村上恭子、吉岡浩、森有一、大坪真也（出願中）。

「HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DI_s 株、及びその利用」石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗、町田早苗、松浦善治（出願中）。

「新規 RNA 結合ペプチド」飛田高孝、石橋正也、原田和雄、鈴木哲朗、石井孝司（出願中）。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアーからの発症予防に関する基礎研究

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）感染により発症する肝がんの予防のためには持続感染するウイルスの排除が必要である。そこで、HCV ゲノム複製を制御する種々の要因を明らかにし、それを標的にした抗 HCV 剤の開発が可能であると考え解析を行った。そのために、HCV ゲノム自律複製細胞を用いて複製の制御機構を解析し、これまでに数種類の細胞性因子あるいは薬剤が HCV 増殖を制御することを明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子のひとつである。HCV 感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのために、これまでに樹立した HCV サブゲノムが効率よく自律複製する細胞を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析を行う。

B. 研究方法

(1) 抗 HCV 作用を示す化合物の探索のための HCV ゲノム自律複製細胞系の開発。

HCV を効率よく感染・複製させる系がないために HCV ゲノムが自律的に効率よく複製する細胞を用いて、その複製を制御する種々の因子を明らかにする。そのために、まず、HCV の全長、部分ゲノムが効率よく自律複製する細胞を樹立する。さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するためにルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を作成する。この細胞に各種阻害候補物質を入れてアッセイする。

(2) HCV ゲノム複製を増強あるいは阻害す

る細胞性因子あるいは低分子化合物の探索。

各種低分子化合物をレプリコン細胞に添加し、ウイルスゲノム活性をルシフェラーゼを標識にして測定する。その結果抑制の高い因子については、その抑制機構を解析する。

C. 研究結果

(1) HCV ゲノム自律複製細胞の樹立と選択

Huh7 細胞に由来する HCV ゲノム自律複製細胞については、サブゲノム、および全ゲノムが複製する細胞を樹立した。なお、サブゲノム自律複製細胞についてはルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに挿入したのを構築し、本酵素活性を用いて複製効率を測定するようにした。

(2) HCV ゲノム複製を制御する低分子化合物のスクリーニング

(1) に記載した細胞を用いて市販の薬、実験試薬などをスクリーニングした。その結果、インターフェロン、TGF ベータ、IL1 ベータ、シクロスポリン A が強い抗 HCV 作用を示した。一方、MAP キナーゼ阻害剤の一つ、PD98059 が促進作用を示した。これらのうち、IL1 ベータ、インターフェロンについてはすでに報告があるので、TGF ベータおよび

PD98059、サイクロスポリンなどについての解析を進めた。

(3) HCV ゲノム複製を阻害する TGF ベータ

TGF ベータ処理により HCV ゲノム複製能が強く抑制された。この効果が TGF シグナルによるものかどうかを以下の方法により調べた。TGF ベータ受容体からの刺激は MAK キナーゼと SMAD によるシグナルに分かれる。細胞の増殖制御にはおそらく両シグナルが必要であると考えられるが、HCV の場合にどうなのかを明らかにするために、シグナルの解剖実験を行った。受容体の変異体には MAK キナーゼカスケードを構成的に活性化し、SMAD シグナルを遮断するものと、両シグナルを構成的に活性するものとが存在する。そこで、それぞれの受容体を発現させたときにレプリコン活性がどう変化するかを調べた。MAK キナーゼ活性を持続させるが SMAD 経路を遮断する受容体の場合に HCV レプリコン活性は抑制されなかった。一方、両者のシグナルが構成的に活性化された場合には、レプリコン活性は強く抑制された。さらに、SMAD3, SMAD4 を発現させた場合にも抑制がみられたが、SMAD7 を発現させた場合にはその抑制が弱くなった。これらのことから TGF ベータによる HCV ゲノム複製抑制は SMAD を介した下流遺伝子の変化によるものと考えている。

(4) シクロフィリン誘導体による抗 HCV 効果

シクロスポリン誘導体各種類について、抗 HCV 効果を調べ、その中の一つ、NIM811, に免疫抑制作用を持たないが強く HCV 複製を抑制するものが存在することを見いだした。

(5) PD98059 による HCV 複製の増強作用

PD98059 は ERK シグナルの阻害剤として知られている。HCV ゲノム自律複製細胞を用いた評価において、この試薬が HCV ゲノム複製

をあげることがわかった。ウイルスゲノム複製のどの段階に PD98059 が働いているかを調べ、HCV IRES の翻訳反応がこの試薬の存在により更新することを見いだした。PD98059 はキャップ依存的な翻訳反応には影響を与えない。また、他の IRES 配列を持つ RNA からの翻訳にも影響を与えなかった。

D. 考察

HCV ゲノム自律複製細胞はウイルスの複製増殖機構の解析に役立つ。本研究では特にウイルスゲノム複製を制御している細胞側要因を明らかにする目的で、すでに薬理機能が明らかでない薬による抗 HCV 効果を調べた。その結果幾つかの薬に加え、細胞のシグナルに関与する因子がウイルス複製を制御することが明らかになった。

TGF ベータはがん細胞においてはシグナルが伝わらなくなる場合が多い。本研究で見いだした TGF ベータによる HCV 複製阻害は、肝がんの進行に応じてその阻害が効かなくなる可能性を示す。がん化した細胞においては非がん部に比べて HCV 複製がどのようになっているかを、詳細に検討する必要があると同時に、複製の意義を明らかにする必要がある。

ERK 阻害剤のひとつである PD98059 がウイルス複製活性を高める働きがあることを見いだした。この薬剤は HCV IRES からの翻訳反応を高める。HCV IRES による翻訳の分子機構はまだ不明な点が多いので、ここで見いだした知見は、その機構の解明に役立つと期待され、また、その機構を足がかりにした抗 HCV 剤の開発も可能にあると期待される。

E. 結論

HCV ゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノム複製を阻害する因子を見いだした。本研究で得られた知見は阻害の分子機構を基本にして、今後抗 HCV 剤を開発する上で重要な知見になると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, Shimotohno K. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J Virol.* 79:5923-5932, 2005.
2. Takahashi H, Yamaji M, Hosaka M, Kishine H, Hijikata M, Shimotohno K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology.* 48:104-111, 2005.
3. Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, Shimotohno K, Kohno S, Matsuyama T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem.* 280:18355-18360, 2005
4. Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, Nozaki A, Naka K, Ikeda M, Shimotohno K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol.* 86:645-656, 2005.
5. Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology.* 331:407-417, 2005.
6. Naka K, Takemoto K, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J Gen Virol.* 86:2787-2792, 2005.
7. Murata T, Hijikata M, Shimotohno K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and

replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology.* 340:105-115, 2005.

8. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19:111-122, 2005.

2. 学会発表

1. Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., Shimotohno, K. Association of cyclophilin B with NS5B regulates HCV genome replication. 12th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, October, 2005, Montreal, Canada
2. Murata T., Hijikata M., Shimotohno K. Enhancement of IRES-mediated translation and replication of HCV by PD98059. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2005, Montreal, Canada
3. 渡士幸一、下遠野邦忠 シクロスポリンのC型肝炎ウイルス複製抑制作用、第15回抗ウイルス化学療法研究会、平成17年5月、屋久島
4. 渡士幸一 Anti-HCV activity of Cyclosporin、学術国際シンポジウム・免疫の進化、平成17年8月、東京
5. 渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠、宿主細胞におけるC型肝炎ウイルスの動態、第64回日本癌学会学術集会、平成17年9月、札幌
6. 村上善基、下遠野邦忠 肝細胞癌とその周辺部組織におけるmiRNA発現の解析、第64回日本癌学会学術集会、平成17年9月、札幌 (ランチョンセミナー)
7. 渡士幸一 C型肝炎ウイルス増殖機構の