

チン剤 (Atrovastatin, Fluvastatin, Simvastatin および Pravastatin) の抗 HCV 効果を OR6 アッセイシステムを用いて調べた。その結果, 前3者はLovastatinより強い抗HCV効果が認められたが、Pravastatinには抗HCV活性は認められず、他のスタチン剤とは異なることが分った。これらのスタチンの中で Fluvastatin が最も強い抗 HCV 活性を示し、添加3日後の測定における IC<sub>50</sub>は0.9 μM、IC<sub>90</sub>は6.7 μMであった。これらのスタチン剤の抗 HCV 効果は、細胞に対するスタチン剤の毒性によるものではないこと、スタチン剤がルシフェラーゼそのものの活性を阻害することによるものではないこと、およびスタチン剤が EMCV の IRES 活性を阻害することによるものではないことを確かめた。スタチン剤は IFN のシグナル伝達系を亢進させることはなかったが、スタチン剤、特に Fluvastatin は IFN-αと併用することにより、相乗的抗 HCV 効果を示すことを明らかにした。

#### D. 考察

##### (1) 全長 HCVRNA 複製システムの改良

これまでに樹立した全長 HCVRNA 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 HCVRNA 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 HCVRNA 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。全長 HCVRNA 複製細胞の長期培養 (1年) により HCVRNA は予想されたス

ピードで遺伝的多様性を獲得していることが確認された。さらに培養を続けることにより時間経過とともに直線的にさらに遺伝的多様性が増大していくかどうかを明らかにすることができる。これらの遺伝的多様性の獲得と細胞内の HCVRNA レベルの変化、IFN、シクロスポリン、スタチン剤などに対する感受性の変化、癌化関連遺伝子の発現レベルの変化などとの関係を調べることもできる。また、HCV の遺伝的多様性ととも宿主細胞側も変化していると考えられることから、長期培養した細胞の性質 (遺伝子発現プロファイルなど) を調べる必要性もある。これらは次年度以降の研究課題である。得られる情報は HCVRNA の複製増殖機構の理解にもつながるものと思われる。また、遺伝的多様性を有する HCVRNA 集団は HuH-7 細胞以外のヒト肝細胞でも複製増殖する可能性があることから、そのような肝細胞の樹立も必要である。

##### (2) HCV 持続感染機構の解析

IFN-β遺伝子の活性化に対する NS3-4A の抑制効果は HCV の持続感染においては有利な点であると思われるが、PH5CH8 細胞を用いた解析では dsRNA の細胞外からの添加による IFN-β遺伝子の活性化は NS3-4A ではほとんど抑制されず、従来考えられているようなメカニズムでは説明できない。現在、一般的に支持されているメカニズムに従うと二本鎖 RNA の細胞外刺激では TLR3/TRIF 系を介して IRF3 の活性化 (2 量化など) が起こり IFN-βが産生されることになっている。この場合、NS3-4A は TRIF 分子を切断して、このシグナル伝達をブロックするという事になっている。しかしながら、今年度の我々の解析結果から NS3-4A により TRIF の切断が起こっていないか、或は TLR3/TRIF 以外のシグナル伝達系が存在して

いる可能性が考えられる。今後、この問題の解明が必要である。

### (3) HCV 増殖制御機構の解析

ミゾリビンにはリバビリン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。免疫抑制剤のシクロスポリンとミゾリビン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。ミゾリビンもリバビリンもイノシン酸デハイドロゲナーゼ阻害剤であるが、抗 HCV 作用と直接関与しているかどうかは証明されておらず、リバビリンは細胞免疫を増強させる効果を有するという説もあることから、これら薬剤の作用機序を明らかにする必要がある。

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。スタチン剤はコレステロール生合成系における律速酵素である HMG-CoA レダクターゼの特異的阻害剤であるが、Pravastatin にまったく抗 HCV 効果がないことから、別の作用機序が考えられる。メバロン酸やゲラニルゲラニルニリン酸を添加するとスタチン剤の抗 HCV 効果が低下することから、スタチン剤はメバロン酸より下流のゲラニルゲラニルニリン酸の段階における蛋白質のプレニル化のところで作用しているものと考えられる。実際、Lovastatin の作用機序として他のグループからゲラニルゲラニルニリン酸のレベルを低下させるためであると報告されている。今後、どうして Pravastatin に抗 HCV 効果がないのかを明らかにすることによりスタチン剤の作用機序が明らかになるのではないかと考えられる。

スタチン剤は IFN- $\alpha$  と併用すると相乗的抗 HCV 効果を示すことから、スタチン剤は IFN シグナル伝達系のどこかを増強するのかもしれない。しかしながら、スタチン剤単独では FN シグナル伝達系の活性化は認められないことから、相乗効果を示す分子機序をさらに追究する必要がある。

OR6 アッセイシステムを用いることにより、抗 HCV 作用を示す別の物質を見付けさせる可能性もあるため、引き続き薬剤の探索を行う必要がある。

## E. 結論

### (1) 全長 HCV RNA 複製システムの改良

ルシフェラーゼ活性の測定により HCV RNA の複製レベルを定量的にかつ簡便に測定できる OR6 アッセイシステムを開発した。

可視化遺伝子 (GFP) を全長 HCV RNA 複製系に導入して、生細胞のまま蛍光強度を測定することで HCV RNA の複製レベルを知ることが出来る細胞系を作成した。

全長 HCV RNA の複製効率を高める 5 種類の適応変異を見出し、適応変異の組み合わせでさらに複製効率が上昇することを明らかにした。

全長 HCV RNA が複製している 5 種類の細胞を 1 年間培養し、HCV RNA の遺伝子解析を行った。その結果、 $3.7 \sim 5.3 \times 10^{-3}$  塩基置換/部位/年の変異率で HCV RNA に変異が蓄積することを明らかにした。

### (2) HCV 持続感染機構の解析

ヒト不死化肝細胞における IFN- $\beta$  の活性化に対する HCV NS3-4A の抑制効果は非常に強く認められる場合（二本鎖 RNA の細胞内導入時）とほとんど認められない場合（細胞外から二本鎖 RNA を添加した場合）があることを明らかにした。

### (3) HCV 増殖制御機構の解析

OR6 アッセイシステムを用いて、HCVRNA の複製を抑制するミゾリビンとスタチン剤を見出した。スタチン剤の一つであるフルバスタチンと IFN- $\alpha$ には相乗的抗 HCV 効果があることを見出した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka and N. Kato. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain 0, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 329, 1350-1359.
2. K. Naka, M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako and N. Kato. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 330, 871-879.
3. H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 336, 458-468.
4. N. Kato, T. Nakamura, H. Dansako, K. Namba, K. Abe, A. Nozaki, K. Naka, M. Ikeda and K. Shimotohno. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.* (2005) 86, 645-656.
5. K. Li, Z. Chen, N. Kato, M. Gale, Jr and S. M. Lemon. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- $\beta$  production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 16739-16747.
6. K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, K. Shimotohno and N. Kato. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.* (2005) 107, 73-81.
7. K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno, and N. Kato. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.* (2005) 86, 2787-2792.
8. K. Tamura, A. Oue, A. Tanaka, N. Shimizu, H. Takagi, N. Kato, 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.* (2005) 7, 29-40.
9. K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- $\beta$  via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* in press
10. K. Naka, K. Abe, K. Takemoto, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance

of hepatitis C virus replicon-harboring cells. J. Hepatology in press.

11. L. Deng, M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada and H. Hotta. 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.
12. N. Ishii, K. Watashi, T. Hishiki, K. Goto, D. Inoue, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, and K. Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. J. Virol. in press.

## 2. 学会発表

1. 池田正徳、阿部健一、團迫浩方、仲一仁、加藤宣之. 全長 HCV RNA レポーター評価システムにより見出したスタチンとインターフェロンの併用による相乗的抗ウイルス効果. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005 年 9 月
2. 阿部健一、池田正徳、團迫浩方、仲一仁、加藤宣之. HCV-0 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞群の樹立. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005 年 9 月
3. K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Interferon resistance of HCV replicons is caused by functional disruption of type I interferon receptors. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
4. M. Ikeda, K. Abe, M. Yamada, H. Dansako, K. Naka and N. Kato. HMG-CoA reductase inhibitors as a new class of anti-HCV reagents: their different effects on HCV replication and their applications for combination therapy with IFN. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
5. H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and N. Kato. HCV proteins exhibit contradictory effects on interferon system in human hepatocyte cells. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
6. K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka and N. Kato. Identification of a cell culture-adaptive mutation in newly established genome-length HCV RNA replicating cell lines. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Montreal, Canada, October, 2005.
7. 加藤宣之, 阿部健一, 竹本和憲, 團迫浩方, 池田正徳, 下遠野邦忠. C 型肝炎ウイルス レプリコン細胞のインターフェロン抵抗性獲得機構. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月
8. 池田正徳、阿部健一、山田将士、團迫浩方、加藤宣之. 全長 HCV RNA 複製抑制効果を示すスタチン:スタチンの種類による抗 HCV 効果の違いとインターフェロンとの併用による相乗的抗 HCV 効果. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月
9. 團迫浩方、池田正徳、加藤宣之. C 型肝炎ウイルス蛋白質のインターフェロン- $\beta$  産生系に対する相反的效果. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月

10. 竹本和憲、團迫浩方、池田正徳、加藤宣之. 各種病態由来のC型肝炎ウイルスNS3-4A: インターフェロン- $\beta$ 産生抑制効果の比較. 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
11. 阿部健一、池田正徳、團迫浩方、加藤宣之. HCV-0株由来の全長HCV RNA複製細胞群の樹立と適応変異に関する解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
12. 田村一志、大上厚志、清水宣明、加藤宣之、森川昭広、星野洪郎. VSV/HCV pseudotype virus 感染系を用いたHCV母子感染症例の感染機構の検討. 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月

#### H. 知的財産権の出願・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

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

Tacrolimus による C 型肝炎病態への介入：肝発癌抑制へ向けて

分担研究者 小池 和彦 東京大学医学部（病） 教授

**研究要旨** C型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと到る一連の事象以外に、脂肪肝ならびに脂質代謝異常、糖代謝異常といった代謝異常を引き起こし、肝発癌等の病態への影響も示唆されている。私たちは、マウスモデルを用いて、C型肝炎では脂質や糖の代謝異常が発生することを示してきた。この動物モデルでは、炎症不在下に酸化ストレス産生が増加しており肝発癌に関与しているが、この酸化ストレス発生はミトコンドリアの機能異常によることが推察されている。今回私たちは、ミトコンドリア保護作用をもつ Tacrolimus(FK506)を HCV コア遺伝子発現トランスジェニックマウスに投与し、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、コア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、低容量の 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。

A. 研究目的

C型慢性肝炎と2型糖尿病の間の関連性が、疫学的研究のみならず、実験的なシステムにも確認されてきている。また、脂質代謝異常とC型肝炎の関連性は以前から指摘されてきている。これらの代謝異常で注目すべきことは、慢性肝炎すなわち肝の線維化速度との関係である。すなわち、肝脂肪化やインスリン抵抗性の強い慢性C型肝炎患者においては、線維化の進行速度が大きく、これらの代謝異常がC型肝炎の悪化因子であることが指摘されてきている。

慢性C型肝炎の治療は、現在のところインターフェロンを中心とした抗ウイルス薬によって行われてきている。リバビリン併用ペグ・インターフェロンによって、1型高ウイルス量の患者の50%近くでHCV排除が可能

となってきたが、残りの50%の人ではHCV排除は現在不可能である。したがって、ウイルス排除できない状態で慢性肝炎の病態を改善させる方法が切望されている。そのような治療法が見いだされれば、慢性C型肝炎の進行、肝癌の発生の予防が可能となり、厚生労働行政上、経済上の意義は極めて大きいと考えられる。

B. 研究方法

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを用いて以下のような解析を行なった。

マウスはSPF下で通常の餌を与えられた。対照として正常 littermate が用いられた。必要に応じて高カロリー（脂肪）食（Oriental Yeast Co, Ltd. Tokyo, Japan）を2ヶ月間

与えた。カロリーは高カロリー食では 4.70 kcal/g、普通食は 3.56 kcal/g であった。なお、動物実験にあたっては、当施設のガイドラインに則り動物愛護上の配慮を十分に払い、倫理面で問題が生じないように行なった。

HCV コア遺伝子導入トランスジェニックマウス(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。

#### C. 研究結果

(1) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスに認められた、①肝組織中の脂肪量の増加、②構成脂肪酸に占める C16:1、C18:1 などの不飽和脂肪酸の増加が、Tacrolimus 投与によって、placebo 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで改善した。

(2) インスリン抵抗性増強も、Tacrolimus 投与によって、placebo 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで改善した。

(3) 低容量 Tacrolimus 投与によって、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおけるインスリン抵抗性は有意に低下した。

(4) Tacrolimus 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスでは、血清インスリン値が低下していた。

(5) Tacrolimus 投与時の肝内細胞遺伝子発現を DNA アレイにて検討したところ、コア遺伝子トランスジェニックマウス、対照マウスのいずれにおいても発現が連動して増減する遺伝子が多かったが、Tacrolimus 投与時に対照マウスとコア遺伝子トランスジェニックマウスでは増減の挙動の異なる細胞遺伝子群が見いだされた。現在、これらの遺伝子についての詳細を検討中である。

#### D. 考察

HCV コア蛋白による肝臓の脂肪化にはミトコンドリア障害が関与していることが強く示唆されている。Tacrolimus は核カルシニューリンへの作用とともにミトコンドリア機能保護作用をもつことが示唆され、広く臨床への応用が行われつつある。今回の我々のデータから、Tacrolimus により 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)が改善していることが初めて示された。ミトコンドリア保護作用によるものであるか否かは、今後の検討を要する。また、血清インスリン値低下作用については、コア蛋白存在の有無にかかわらず Tacrolimus が有している事が示唆された。

また、低容量の Tacrolimus によって同様の効果をもたらされたことは、今後のヒトへの応用を期待させるものであり、さらに本研究を推し進めたい。

#### E. 結論

Tacrolimus によって、C型肝炎における肝臓の脂肪化、インスリン抵抗性が抑制されることが示唆された。免疫抑制作用を示さない低容量の Tacrolimus 投与によって、HCV 感染症により引き起こされる肝脂肪化等の代謝異常の抑制が可能であることが示された。肝脂肪化やインスリン抵抗性の肝病変進行への影響を考慮すると、その病態解明と病変進行の予防に極めて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005;40:329-336.
2. Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J Gastroenterol* 2005;40:664-665.
3. Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol* 2005;43:757-763.
4. Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005;33:145-150.
5. Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:S132-S135.
6. Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006;49:51-57.
7. Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006;34:65-76.

8. Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J Gastroenterology* 2006 in press.

2. 学会発表

1. Matsuura, Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Suzuki T, Koike K, Miyamura T.: Involvement of PA28gamma-in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. P18, 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, 2005.
2. Miyoshi H, Moriya K, Shinzawa S, Fujie H, Todoroki T, Tsutsumi T, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Alteration in fatty acid enzyme activities induced by HCV core protein: analysis using HepG2 cells, p130, 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, 2005.
3. Koike K, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Shinzawa S: Treatment of HCV-associated progressive liver disease with Tacrolimus: Trial using a mouse model. P540A, 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, 2005.
4. K Koike. Pathogenesis of HCV-associated HCC. 4th JSH Single Topic Conference "HCC". 2005 Awajishima.
5. K Koike. Metabolic Aspects of HCV-Associated HCC. International Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology. Tokyo 2005.
6. Koike K. Molecular Basis of HCV-



associated hepatocarcinogenesis:  
Lessons from Animal Model Studies. 2nd  
AGA-JSGE Joint Meeting “Hepatitis C:  
Clinic-Basic Interface” Tokyo 2005.

7. Koike K. HCV-associated  
hepatocarcinogenesis. 5th Sino-Japan  
Hepato- Pancreato- Biliary Symposium.  
Beijing 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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

ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構解析

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨** C型肝炎ウイルス（HCV）のコア蛋白質はC型肝炎と相関があるインスリン抵抗性をマウスに誘導する。また、我々はHCVコア蛋白質が核内のプロテアソームアクチベーター（PA28 $\gamma$ ）と特異的に結合し、分解されることをこれまでに報告している。本年度は、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 $\gamma$ の関与を個体レベルで明らかにすることを目的とする。インスリン抵抗性の発症におけるコア蛋白質トランスジェニックマウス（CoreTg）とPA28 $\gamma$ ノックアウトマウス（PA28 $\gamma$ KO）からPA28 $\gamma$ KO-CoreTgマウスを作製した。インスリン負荷試験でCoreTgはインスリンに対し有意に低い反応性を示したが、PA28 $\gamma$ KO-CoreTgでは対照マウスと同等の反応性を示したことから、コア蛋白質によって誘導されるインスリン抵抗性にPA28 $\gamma$ が重要な役割を演じていることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、HCVコア蛋白質による脂肪肝・肝癌そしてII型糖尿病の発症（インスリン抵抗性の獲得）におけるPA28 $\gamma$ の関与を個体レベルで明らかにすることを目的としている。本年度はコア蛋白質発現によるインスリン抵抗性の獲得とPA28 $\gamma$ との関連性を検証した。

B. 研究方法

B6マウス由来PA28 $\gamma$ 遺伝子ノックアウトマウス（PA28 $\gamma$ KO）およびコア蛋白質遺伝子発現マウス（CoreTg）は既に得ていた。これらマウスを交配することで、PA28 $\gamma$ 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 $\alpha$ を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

使用したマウスに体重に差は認められなかった。血中グルコース濃度についてCoreTgおよびPA28 $\gamma$ KO-CoreTgの両マウス間に差は認められなかった。血中インスリン濃度についてCoreTgは摂食時および絶食時ともに有意に高値を示したが、PA28 $\gamma$ KO-CoreTgは対照のB6マウスと同等であった。また、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 $\gamma$ 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のみで肥大し、インスリン産生増強が原因と考えられた。インスリンと結合することによって

インスリン受容体が活性化し、細胞内下流因子 IRS-1 をチロシンリン酸化する。CoreTg マウスでは IRS-1 のリン酸化の抑制が認められたが、PA28 $\gamma$  KO-CoreTg マウスでは B6 マウスと同等であった。TNF $\alpha$  は CoreTg のみで蛋白質レベルおよび転写レベルで有為の高い値を示し、IRS-1 リン酸化抑制は TNF $\alpha$  の産生増強が原因と推察された。いずれの試験でも、PA28 $\gamma$  KO マウスは B6 マウスと同等の成績を示した。

#### D. 考察

HCV コア蛋白質によって誘導されるインスリン抵抗性の発現に、PA28 $\gamma$  発現が必須であることが明らかになった。

#### E. 結論

1. 血糖値および糖負荷試験はいずれのマウスでも変化は認められなかった。
2. 血中インスリン濃度は CoreTg で有為の高い値を示したが。PA28 $\gamma$  KO-CoreTg は野生型マウスと同等であった。
3. インスリン負荷試験で、CoreTg マウスはインスリン抵抗性であったのに対して、PA28 $\gamma$  KO-CoreTg では B6 および PA28 $\gamma$  KO マウスと同等であった。
4. CoreTg マウスでは TNF $\alpha$  の産生増強および IRS-1 のチロシンリン酸化が抑制されていたが、PA28 $\gamma$  KO-CoreTg では野生型マウスと同等であった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, 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).

1. Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, and Cheng RH. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79, 12999-13006, (2005).
1. 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).
1. Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79, 3639-3652, (2005).
1. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 79, 3448-3458, (2005).
1. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki 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).
2. 学会発表
  1. Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura,

- Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M.C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 12th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
2. Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
  3. Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上。
  4. Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上。
  5. Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上。
  6. 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森 嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
  7. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治：HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
  8. 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
  9. 森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上
  10. 宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28 $\gamma$  の役割、同上。
  11. 岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシングとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究

分担研究者 深澤 秀輔 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨 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。HCV レプリコンシステムを用いて、抗ウイルス物質のスクリーニング系の構築を試みた。

A. 研究目的

HCV 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を解析し、創薬研究への応用を計る。HCV 治療薬開発のために探索系を確立し、探索を実施する。

B. 研究方法

HCV 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 蛋白質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。また HCV レプリコンシステムを用いて、ウエスタンブロットによる抗ウイルス物質のスクリーニングが可能かどうか試みた。

C. 研究結果

NS5A に結合する宿主蛋白質複合体の解析を行い、LC-MS/MS より muscle type amphiphysin

II (Bin1) を同定した。NS5A との結合領域を調べるため amphiphysin II のアミノ酸残基 1-47 (amphiphysin II  $\Delta$ N)、250-266 (amphiphysin II  $\Delta$ 10)、377-451 (amphiphysin II  $\Delta$ SH3) を欠失した変異体を作製し、293T 細胞で NS5A と共発現させた。NS5A と結合する  $\Delta$ N の量は野生型とほぼ同じであったが、 $\Delta$ 10 は減少し、 $\Delta$ SH3 は全く NS5A と結合しなかった。293T および HuH7 細胞に NS5A をトランスフェクトし、その免疫沈降物を [ $g$ - $^{32}$ P]ATP と反応させると、NS5A のリン酸化が観察された。amphiphysin II を同時に発現させると NS5A のリン酸化レベルは低下したが、NS5A と結合しない amphiphysin II  $\Delta$ SH3 はリン酸化を低下させなかった。また、NS5A と結合する他の宿主蛋白質を調べるため、ウエスタンブロットによる解析を行い、c-Src が結合していることを見いだした。IFN- $\alpha$ 処理により NS5A と amphiphysin II との結合は変わらなかったが、NS5A と c-Src との結合は減少した。

HCV レプリコンシステムを用いて、ウエスタンブロットによる抗ウイルス物質のスクリーニングが可能かどうか試みた。種々の既知阻害剤が NS5A 発現量に及ぼす影響を調べ、Hsp90 阻害剤などに薬剤選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子の発現よりも NS5A の発現を強く阻害する活性を見いだした。

#### D. 考察

NS5A が amphiphysin II と結合することは知られていたが、c-Src との結合は初めての報告である。変異体を用いた実験から、NS5A は amphiphysin II の SH3 (Src Homology 3) 領域と結合すると推測される。NS5A はリン酸化蛋白質であり、その過剰なリン酸化は HCV の複製を阻害するという報告がある。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 の生活環に関与していることが考えられ、amphiphysin II-NS5A 結合は抗 HCV 薬の標的になる可能性がある。NS5A と c-Src の結合は、IFN- $\alpha$  により阻害されたことから、IFN と Src のシグナル伝達経路が相互作用していることが考えられるが、その意義は今後の課題である。その他の宿主結合蛋白質を探するため、HCV NS5A の N-末、Core の N-末および C-末に Flag-tag を付け、安定的に発現する細胞株を樹立し、SDS-PAGE、二次元電気泳動によるウイルス-宿主蛋白質複合体の解析を行っている。

抗ウイルス物質のスクリーニングは多数の

サンプルを扱うためにはより効率的なアッセイ系が必要である。HCV 細胞培養系を用いた ELISA、あるいは RT-PCR による探索系の確立を目指している。

#### E. 結論

NS5A 結合宿主蛋白質として、amphiphysin II (Bin1) と c-Src を同定した。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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Yoshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K. Nucleolin is involved in Interferon Regulatory Factor-2 dependent transcriptional activation. *Oncogene*, in press.
2. Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway LB, Prendergast GC, Komuro K, 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  
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

HCV 複製増殖機構の解析及び HCV 増殖細胞系の開発

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨 (1) HCV ゲノム自立複製細胞株を用いた比較プロテオミクス解析から、HCV 複製複合体分画に含まれる宿主因子として分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex subunit  $\epsilon$  (CCT5) 及び Heat shock cognate protein 70 (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 T-complex polypeptide 1 ring complex 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。(2) HCV JFH1 ゲノムを Huh-7 細胞で RNA ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーター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。更に、薬剤耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、HCV 粒子を恒常的に産生する細胞株を作製した。この細胞株は、培養上清中のウイルス抗原定量を指標とする抗 HCV 薬のハイスループットスクリーニングへの応用が可能である。

A. 研究目的

インターフェロン、リバビリン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、肝硬変、肝癌の発症リスクを避けられない。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。

本研究では、1) HCV 蛋白質と相互作用しウイルス複製増殖に関与する宿主因子を同定し、その作用機構を解明するとともに、2) 抗ウイルス薬のスクリーニングに適した全長 HCV RNA 複製システム、感染性ウイルス産生細胞系を樹立する。新たな抗 HCV 薬の開発研究に貢献し、究極的には HCV 感染症の予防、

治療に資すものと期待される。

B. 研究方法

(1) HCV RNA 複製調節に関与する宿主因子の同定

Genome-length dicistronic HCV RNA を含む Huh-7 細胞 (RCYM1) 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 (RC) 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。

(2) 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 の BsmBI 部位に、HCV JFH1 株のゲノム cDNA を挿入し pHHJFH1Zeo を作製した。得られた発現プラスミドをヒト肝細胞癌株 Huh7 または Huh7.5.1 へトランスフェクトし、0.4 mg/mL 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 (Dr. F. Chisari [Scripps Res. Inst.]より分与) に感染させ、4日間培養後にコア蛋白質の免疫染色によって感染細胞のフォーカスを検出した。

### C. 研究結果

#### (1) HCV RNA 複製調節に関与する宿主因子の同定

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  $\epsilon$  (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。

#### (2) プラスミドトランスフェクションによる感染性 HCV 産生細胞系の作製

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 ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーター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。

発現プラスミド pHHJFH1 をトランスフェクションした Huh7 細胞の培養上清中のコア蛋白質を ELISA 法で調べたところ、2-7日目では約 1 nmol/mL/day のコア蛋白質が分泌されることが示され、この培養上清をショ糖密度勾配遠心によって分画しコア蛋白質の密度分布を調べたところ、1.15 g/mL 分画をピークとして分布することがわかった。この培養上清を Huh7.5.1 細胞に添加し4日間の培養後、コア蛋白質の免疫染色を行い、フォーカス状の染色像を観察した。

また、Zeocin 耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクター pHHJFHZeo を作製し、Huh7 細胞及び Huh7.5.1 細胞へ導入した。Zeocin 耐性細胞クローンを分離し、培養上清中のコア蛋白発現を ELISA 法でスクリーニングすることにより、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。

### D. 考察

#### (1) HCV RNA 複製調節に関与する宿主因子の同定

HCV ゲノム自立複製細胞株のウイルス複製期と非複製期の発現蛋白についてプロテオミクス技術を利用して比較解析を行い、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 複製調節に参与する可能性が示唆された。

## (2) プラスミドトランスフェクションによる感染性 HCV 産生細胞系の作製

脇田らによって分離された HCV JFH1 ゲノムを Huh-7 細胞で RNA ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーター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。更に、上記ベクターに薬剤耐性遺伝子を組み込み、HCV 粒子を恒常的に産生する細胞株を作製した。この細胞株は、培養上清中のウイルス抗原定量を指標とする抗 HCV 薬のハイスループットスクリーニングへの応用が可能である。同研究班 深澤班員と共同で、本年度樹立した HCV 産生細胞株を使って、化合物ライブラリーの抗 HCV スクリーニングを実施する。nM レンジあるいはそれ以下の低濃度で HCV 産生阻害効果を示す化合物についてはその作用機序解析を行う。

## E. 結論

(1) 比較プロテオミクス解析から、HCV 複製複合体分画に含まれ HCV ゲノム複製を調節する宿主因子として CCT5 及び Hsc70 を同定した。

(2) HCV JFH1 ゲノムを Huh-7 細胞で RNA ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーター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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.

2. 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. Outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 1087-1093, 2005.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. Masumi, A., Aizaki, H., Suzuki, T., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Komuro, K., Fukazawa, H. Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 572-8, 2005.
7. 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.
8. 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).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 「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）。
  2. 「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 DIs 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）。
  3. 「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）。

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

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

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）  
研究協力者 飯島沙幸、木村展之、揚山直英、李 永仲  
（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）  
石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染研ウイルス第二部）  
八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇（先端生命科学研究所）

研究要旨 HCV は、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。このことは病態解明および治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。本研究ではこの克服を目的として、C 型肝炎のサロゲート病態動物モデルの開発を試みた。その結果、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 C 型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。

A. 研究目的

現在、本邦における C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリアは約 200 万人とされる。その多くが肝硬変・肝細胞癌へと移行し、年死亡者は 3 万人を数えることから、保健医療上その克服は急務である。インターフェロン・リバビリンを基軸とした現行治療法ではそのウイルス排除率は 50%程度であり、半数の患者は肝癌発症のリスクを避けられないことから、新規治療法の開発が不可欠な状況となっている。一方 HCV は、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しないため、このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。

本研究ではこの点を克服すべく、HCV に最

も近縁なウイルスである GBV-B を用いた急性・慢性 C 型肝炎のサロゲート（代用）病態モデルの開発を目標とする。本モデルが確立されれば、新規治療薬やワクチンの評価系として有用であるのみならず、C 型肝炎の発症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明に重要なモデルになるものと期待される。

B. 研究方法

新世界ザルであるタマリンおよびマーモセット感染実験は当センター感染症実験施設にて実施した。感染性分子クローン 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 をサルに接種後 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。血液および組織中のウイルス RNA 量測定はリアルタイム PCR 法を用いた。pGBB よりサブクローニングした Core 発現ベクターを導入した大腸菌からリコンビナント Core 蛋白を得て、これによる ELISA 系を構築して抗体価測定を行った。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

### C. 研究結果

感染性分子クローン pGBB から *in vitro* transcription により得られたウイルス RNA を 2 頭のタマリン肝臓に接種したところ、二頭ともに接種後 2～8 週にわたり顕著なウイルス血症 ( $10^9 \sim 10^{10}$  copies/ml) および ALT, AST 値の上昇を主徴とする急性 C 型肝炎様症状を発症した。またウイルス血症および血清生化学値の低下と相反して anti-Core 抗体価の上昇が認められた (図 1)。

そこで次に、①ウイルス感染の再現性確認、②感染性ウイルスストック作成、の 2 項目を目的として、上記タマリン 1 頭由来 plasma もしくは pGBB から得たウイルスゲノム RNA をそれぞれタマリン 2 頭に接種した (Tm3～Tm6)。その結果、4 頭共に先の実験同様に顕著なウイルス血症が認められたことから、ウイルス感染の再現性が確認確認された。そこで、感染 3～4 週時点で 3 頭 (Tm3～Tm5) について安楽殺により前採血を実施、plasma 分画 (~10ml) を分注保存し今後の感染性ウイルスストックとした。

ところで、上記 3 頭について血液生化学値を検討したところ 2 頭 (Tm3, Tm4) は高い ALT 値を示したのに対し、残る 1 頭 (Tm5) はほとんど上昇が認められなかった。Tm5 の plasma 中ウイルス RNA 値は 3 頭中もっとも高値 ( $1.3 \times 10^{10}$  copies/ml) であり、ウイルス増殖効率に起因するものとは考えられなかった。そ

こでこの原因を探るべく、肝臓について病理学的解析を行ったところ、Tm3, Tm4 では肝細胞変性、類洞拡張および Core 抗原陽性細胞が認められ、また TUNNEL 陽性のアポトーシス像も観察された。一方、Tm5 では病理学的変状は僅かであり、アポトーシス陽性細胞数も Tm3, Tm4 と比較して遙かに少ないものであった (図 2)。そこで、Tm5 においては肝外におけるウイルス増殖が優位であったとの仮説に基づき、主要組織におけるウイルスゲノム RNA を定量した。その結果、Tm5 では肝臓におけるウイルス RNA 量は比較的低値であったのに対し、PBMC, 脾臓、リンパ節などにおいて Tm3, 4 より遙かに高値を示した。以上のことより、Tm5 では肝外組織、特に血液リンパ系組織において顕著にウイルスが増殖したことが、ALT 低値&plasma RNA 高値の原因であることが明らかとなった。なお、その他の組織においても、特に腎臓、精巣、卵巣において有意なレベルのウイルス RNA が検出された (表 1)。

ところで近年、新世界ザルであるマーモセットはタマリンと同様に GBV-B に感受性であることが報告されている (Bright et al.: *J Virol* 78, 2062, 2004)。マーモセットは実験用霊長類として汎用されておりタマリンと比較して入手し易いことから、モデル動物の選択肢のひとつとして有用と考えられた。そこで Bright らのデータを追試する目的で前述の感染タマリン由来ウイルスストックを用いてマーモセット 2 頭に実験感染を行った。その結果、タマリン同様の kinetics で感染 1 週より 1 2 週程度までウイルス血症が認められたが、その程度はタマリンの場合と比較して 1～2 桁程度低いものであった。また血液生化学値においても有意な上昇はほとんど認められなかった (図 3)。

### D. 考察

本研究の結果より、新世界ザルの一種であ