

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 ……	979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 ……	1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 ……	1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 ……	1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 ……	1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 脇田 隆字

研究要旨 効率よく複製可能な HCV、JFH-1 株を用いて、培養細胞における HCV の全長ウイルス RNA 複製系および感染系を確立し、その機構を解析する。そして、ウイルスの感染、複製増殖に関与する宿主およびウイルスの因子を同定し、新たな抗ウイルス治療法の標的を探索する。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科
溝上 雅史
- (2) 国立感染症研究所ウイルス第二部
勝二 郁夫
- (3) 東レ株式会社医薬研究所
望月 英典

A. 研究目的

HCV は日本では 200 万人、世界中で 17000 万人にのぼる感染者が存在する。感染すると高率に持続感染化し、多くの症例で慢性肝炎から肝細胞癌を発症する。その治療はインターフェロンおよびリバビリン以外に無く、その効果はいまだ不十分である。新たな治療法の開発が望まれているが、HCV の良いウイルス培養系が無いことが妨げになってきた。最近、HCV レプリコンシステムが開発され、培養細胞内で HCV 遺伝子の持続的な複製が可能となり、この系により HCV に対する抗ウイルス薬の培養細胞でのスクリーニングや評価が初めて可能となった。しかし、HCV 全長遺伝子を効率よく複製する実験

系および HCV の感染増殖系は未だに存在しない。我々は、これまでウイルス培養に感染材料として用いてきたウイルス株の増殖能の低さと、感染させる細胞の感受性の低さが問題と考えた。HCV はその遺伝子配列に多様性を持ち、株間でその増殖能力や薬剤反応性が異なる。そこで我々は HCV による劇症肝炎の患者から分離された株に注目した (JFH-1 株)。最近開発された RNA レプリコンによりこの JFH-1 株を解析すると、慢性肝炎患者から分離された株に比べ、はるかに効率的な複製・増殖が可能であった (Kato T, Gastroenterology 2003, 125:1808-1817)。この JFH-1 株を用いることにより、培養細胞で安定し、再現性のある増殖が可能なウイルス感染・複製系の構築が可能になると考えた。そこで本研究の目的は、これまでにない高い効率で培養細胞において複製可能な JFH-1 株を用いて、全長 HCV 遺伝子の培養細胞におけるウイルス RNA 複製系および感染系を確立し、その機構を解析し、新たな抗ウイルス戦略の構築に供することである。

B. 研究方法

1. HCV RNA 複製に関与する細胞性因子の同定：2種類のプロテオーム解析をおこなった。第一にレプリコン細胞と Huh7 細胞（親細胞）の比較。第二にレプリコン細胞において、増殖期と非増殖期の比較をおこなった。
2. HCV 感染複製に関与するウイルス側因子の同定：培養細胞で複製効率の良い JFH-1 株と、複製効率の低い株（J6CF 株）のウイルス遺伝子領域を組み換えて、RNA 複製効率に影響するウイルス遺伝子領域を同定する。
3. 全長ウイルス複製系および感染系を用いた抗ウイルス薬の探索および抗ウイルス療法の開発：ウイルス感染実験系、レプリコンなどを用いて、新規抗ウイルス物質を探索する。
4. ヒト肝細胞置換キメラマウス（uPA/SCID マウス）への HCV 感染：ウイルス量を Real-time RT-PCR 及びコア抗原量で測定し、肝臓を HE 染色及び Masson 染色。
5. 三次元培養系を用いた全長ウイルスゲノム HCV レプリコン細胞の培養と HCV RNA 複製および感染性の評価：HCV を維持する Huh7 細胞を温度感受性ゲル(TGP)にて 7 日間培養した後、ゲルを溶解し、上清中より RNA を抽出した。上清中の HCV-RNA 量、ELISA 法により HCV-core 蛋白量を測定した。
6. Huh7細胞以外の培養肝細胞によるJFH-1複製系の樹立と三次元化による粒子産生の検討：HCV JFH-1株をRNA polymerase Iプロモーター/ターミネーター(PoI Iシステム)を用いて恒常的に発現させ、感染性HCVを産生する培養細胞系をヒト肝芽腫細胞株HepG2細胞で樹立した。この細胞株をHuh7細胞と同様の条件で

三次元培養を行い、培養上清中のHCV-RNA量を測定した。

7. HCV レプリコンを用いた薬剤感受性の検討：HCV genotype 2a JFH-1 クローンの subgenomic replicon RNA 持続複製細胞を二次元培養し、リバビリン(RBV)を添加して長期培養し、RBV 耐性株を単離して解析した。
8. Huh7 細胞を用いたレポーターレプリコン評価系の最適化：被検物質はヒトインターフェロン- β （フェロン）、リバビリン、既知キナーゼ阻害剤、ビスフォスフォネート系化合物を用いた。pSGR-JFH1-Luc を鋳型として合成した RNA を Huh7 細胞に導入し、段階希釈した被検物質を加えた。24 時間培養し、培地を除去した後、5XPLB(Passive Lysis Buffer:Promega 社)を添加し、細胞を溶解した。溶解物に発光試薬を加え、ルミノメーターにて発光量を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。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る。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物（感染性のウイルスを含む）に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. HCV RNA 複製に関与する細胞性因子の同定：

レプリコン細胞と親株の Huh7 細胞を比較したプロテオーム解析と、レプリコン細胞の増殖期と非増殖期でのプロテオーム解析を行った。HCV RNA 高複製期の複製複合体分画に存在する宿主因子として分子シャペロン TriC のサブユニット CCT5 等を同定した。細胞内で HCV RNA は CCT5 と共局在し、また各 HCV NS 蛋白との相互作用解析により、CCT5 が NS5B 蛋白と結合した。siRNA 解析及び強制発現実験から、TriC が HCV 複製を制御していることが明らかとなった。

さらに、Huh7 細胞の感染感受性が低い (0.05% 以下) ことと、感染時のウイルス量を増やしても感染細胞が増えないことから、感染感受性の異なる細胞が混在している可能性を考え、親細胞を限外希釈法によりクローニングした。70 株の亜細胞株を得、その感染感受性を比較すると親株より良い株や、低い株があった。さらに、レプリコンの複製効率を比較すると、興味深いことに感染性の無い細胞が複製効率が高い傾向を示した。そこで、感染感受性を決定する因子が細胞表面に発現しているレセプターなどの初期感染過程に関与する宿主因子である可能性を考え、FACS による解析を行った。その結果、感染感受性を決定するのはレセプター候補分子の CD81 の細胞表面での発現の有無であることが明らかになった。

2. HCV 感染複製に関与するウイルス側因子の同定：HCV の複製に関与するウイルスの遺伝子領域を決定するために、培養細胞で良く複製する JFH-1 株と複製しない J6CF 株を比較した。JFH-1 株のサブジェノミックレプリコンの各遺伝子領域を J6CF 株と入れ換えて、各株の複製効率を決定する領域を探索した。その

結果、5'UTR および NS3, NS4AB, NS5A 領域を入れ換えても複製効率はほとんど変化しないことを確認した。しかし、NS3 ヘリカーゼおよび NS5B から 3'X 領域の入れ替えによって、複製効率が低下した。各領域は独立して複製効率に関与しており、J6CF 株に JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼおよび NS5B から 3'X 領域を挿入することによりほぼ完全に複製が回復することが明らかとなった。さらに、全長ウイルスゲノムによる解析で、wild-type の J6CF 株は複製しないが、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼおよび NS5B から 3'X 領域を挿入することにより複製が可能となり、感染性ウイルスを産生することが明らかとなった。つまり、JFH-1 株の培養細胞における効率の良い複製と感染性ウイルス粒子の産生には NS3 ヘリカーゼおよび NS5B から 3'X 領域が重要である。

3. 全長ウイルス複製系および感染系を用いた抗ウイルス薬の探索および抗ウイルス療法の開発：エンベロープを持つウイルスはエンベロープ蛋白の糖鎖修飾がウイルス粒子の成熟に重要と考えられる。そこで、JFH-1 株のウイルス持続産生細胞を用いて、糖鎖修飾阻害剤の効果を解析した。7種類の糖鎖阻害剤を細胞培養液中に添加してウイルス産生量の変化を観察すると1種類の薬剤で明らかな産生量の低下と、興味深いことに1種類の薬剤ではウイルス産生量を明らかに増加した。現在、この2種類の薬剤の薬効メカニズムを検討している。JFH-1 株のウイルス感染細胞を用いた新たな抗ウイルス薬のスクリーニングでは、共同研究においていくつかの候補化合物を見いだしている。今後さらにスクリーニングを

進めると共に、その薬効メカニズムの解析を行う。さらに、1. の項目で述べたウイルス複製に関与する CCT5 や、CD81 などの宿主因子の siRNA による発現阻害を試みた。その結果 siRNA のトランスフェクションによって感染感受性を抑制することが可能であることが明らかとなった。この結果から、siRNA を生体で標的細胞に効率よくデリバリーする事ができれば、ウイルス感染に必要な宿主因子を調節する新たな治療法としての可能性があると考えられた。

4. ウイルス粒子を含む培養上清を精製し、約 10^5 コピー及び 10^6 コピーに調節し、ヒト肝細胞置換キメラマウス (uPA/SCID マウス) に眼窩静脈より接種した。接種 1 週目より HCV-RNA およびコア抗原が検出され、6 週目に HCV コア抗原 20,000 fmol/L 以上となり、12 週目には約 50,000 fmol/L まで上昇し、剖検するまでの期間は高値を持続した。特に、 10^6 コピーを接種したマウスの方が血清中の HCV-RNA およびコア抗原量は高かった。17 週目に剖検を行い、組織学的に検討した結果、 10^6 コピー接種マウスでは、炎症細胞の浸潤が強く、脂肪化・繊維化もみられ、新大山分類で A2F2 と診断された。

5. 三次元培養系を用いた全長ウイルスゲノム HCV レプリコン細胞の培養と HCV RNA 複製および感染性の評価：遺伝子型 2b の HCV JFH-1 株由来ダイシストロニック HCV-RNA 細胞を RFB で三次元培養した。RFB にダイシストロニック HCV-RNA 細胞を導入後、day2-day14 の間の各時点での培養上清を回収し、上清中の HCV-RNA の定量を行った。その結果、HCV-RNA が検出できたのは day2 のみであった。day2 の

培養上清を超遠心により濃縮し、10-60%のショ糖密度勾配遠心にて分画を行い、HCV-RNA 量および HCV-core 量を測定した。その結果、密度 1.06-1.08 g/ml に HCV-RNA のピークが存在し、HCV-core 蛋白は 1.2g/ml 以上の画分に存在した。day2 培養上清中の HCV-RNA と HCV-core の密度が一致しておらず、効率の良い感染性粒子形成は起こっていなかった。

6. Huh-7 細胞以外の培養肝細胞による JFH1 複製系の樹立と三次元化による粒子産生の検討：PolI システムによる HCV 産生系を HepG2 細胞で樹立し、三次元化によりウイルス粒子産生量が増加するか検討を行った。PolI システムにより HCV-RNA が転写される HepG2 細胞を培養し、培養上清を回収した。ショ糖密度勾配遠心により分画し、1.04g/ml および 1.18g/ml の分画の HCV-RNA 量を定量した。感染性 HCV 粒子が含まれる 1.18g/ml の分画中の HCV-RNA 量は平皿培養上清より TGP 培養上清が低値となり、ウイルス産生の効率化は起こらなかった。

7. HCV レプリコンを用いた薬剤感受性の検討：HCV genotype 2a JFH-1 クローンの subgenomic replicon RNA が持続的に複製する Huh-7 細胞に 200 μ M RBV 存在下で 20 週間培養することで RBV に耐性となった。RBV 非処理細胞では、HCV RNA レベルを 50%阻害する RBV 濃度 (IC50) は 59 μ M であるのに対して、RBV 長期処理細胞では同等阻害効果に約 9 倍 (531 μ M) の RBV を要した。RBV 耐性及びコントロール細胞からそれぞれ RNA を抽出し、Huh-7 細胞へ導入し新たに replicon 細胞を作製した。得られた 2 種類の replicon 細胞について RBV の抗 HCV 作用を比較したところ、RBV 耐性細胞由来 RNA を導

入した replicon 細胞の方が明らかに RBV に対して抵抗性を示した。さらに RBV 耐性細胞中の HCV 遺伝子の塩基配列を決定した結果、アミノ酸変化を伴う特徴的な変異が NS3、NS4B、NS5A、NS5B 領域に各 1 カ所 (T1134S、P1969S、V2405A、Y2471H) 存在した。全 4 カ所の変異 (m34B5A5B)、または NS3、NS4B 領域の 2 変異 (m34B)、NS5A、NS5B 領域の 2 変異 (m5A5B) を導入した HCV JFH1 replicon プラスミドを構築し、各変異 replicon 細胞を作製した。RBV の抗 HCV 効果を比較したところ、高濃度 RBV を添加したとき、m34B5A5B あるいは m5A5B の変異 replicon 細胞は、野生型また m34B 変異 replicon 細胞に比べ明らかに HCV RNA 阻害効果が低かった。この結果、NS5A 及び NS5B 領域の点変異 (V2405A、Y2471H) が JFH1 クローンの RBV に対する耐性獲得に寄与した可能性が示された。

8. Huh7 細胞を用いたレポーターレプリコン評価系の最適化: Huh7 細胞を用いて、レポーターレプリコン評価系の最適条件を見出すために、RNA 導入後の抽出時間について検討した。RNA 導入 24 時間、48 時間および 72 時間後の結果から、発光量は RNA 導入後、48 時間で最大になることが明らかになった。この結果より、本評価系では RNA 導入 48 時間後の評価が最適であることが明らかとなった。そこで、pSGR-JFH1/Luc から合成した RNA を導入した Huh7 細胞を、各種濃度の IFN- β で 24 時間処理するとルシフェラーゼ活性は IFN- β の濃度に依存して減少した。その効果の EC₅₀ 値は 1.8U/ml であった。リバビリンにおいても、濃度依存的に減少し、その効果の EC₅₀ 値は 3 μ g/ml であった。一方、ビスフォスフォネート系の化合物は、100 μ

g/ml 以下の濃度ではルシフェラーゼ活性はコントロールと比較して有意な差は無く、300 μ g/ml ではコントロールの 60%であった。また、キナーゼ阻害剤はレプリコン複製阻害活性は見いだせなかった。

D. 考察

これまでの研究によりウイルスの感染および複製増殖の実験系を確立してきた。今年度の研究により、HCV RNA 複製増殖に関する宿主因子およびウイルス側因子を同定した。HCV の複製に関する TRiC は NS5B に結合して複製効率を調節している可能性を見いだした。ウイルス蛋白と宿主蛋白は複合体を形成して効率よくウイルスゲノムを複製していると考えられる。プロテオーム解析とウイルス複製増殖および感染実験系を組み合わせることにより、ウイルスゲノム複製のメカニズムをさらに詳細に検討していくことが可能である。実験結果の項で述べたとおり、CCT5 のノックダウンによりウイルスの複製効率が抑制される。関与する宿主因子をさらに同定することによって新たな治療標的を見いだせる可能性がある。

さらにウイルスの複製増殖と感染性に関与するウイルス側因子を同定した。NS3 ヘリカーゼ領域と NS5B から 3'X 領域が重要であることが明らかとなった。いずれの領域もウイルスのゲノム複製に関与する領域である。今後は NS3 ヘリカーゼの活性、NS5B RNA ポリメラーゼの活性が複製効率に直接関与しているかどうかを検討する必要がある。また、NS5B から 3'X の遺伝子領域はウイルスゲノム領域の中でも 2 次構造を形

成しやすいことが報告されている。2次構造の変化がウイルスゲノム複製効率をどのように調節しているかを解析する必要がある。

新たな抗ウイルス療法の開発に関しては今年度の研究によりいくつかの候補分子および標的となる宿主因子などを見いだすことができた。本研究により開発してきたツールを利用してさらに多くのライブラリーをスクリーニングすることにより候補物質を同定していく必要がある。さらにその薬理作用を解析することによりさらに新たな治療法開発につなげていく必要がある。

JFH-1 株を用いて *in vitro* で分泌されたウイルス粒子を含む培養上清の感染性をヒト肝細胞置換キメラマウス (uPA/SCID マウス) で確認した。このマウス血清中のウイルス量 (最高値) は、同時に検討した HCV genotype 1b 患者血清を接種したマウスの 1/10 程度であったが、一方でその組織障害性は 1b 接種マウスより強く、A2F2 であった。JFH-1 株において、細胞内へのウイルス蓄積及び細胞ストレス等の可能性が考えられ、今後の検討課題である。このシステムを用いることにより、*in vivo* での薬剤の抗ウイルス効果の違いも評価可能と考えられる。

TGP による三次元培養系を用いて JFH-1 株 HCV 粒子が効率よく産生される培養系の構築を試みた。その結果、JFH-1 株由来ダイシストロニック HCV-RNA 細胞の三次元培養法では培養上清中への HCV 粒子の効率的な産生増加はみとめられなかった。また、Huh7 細胞と同様に HepG2 細胞を用いた系でも HCV 粒子の産生効率の増加は得られなかった。この原因として、三次元培養時の細胞増殖効率の低下が考えられた。HCV-RNA の複製効率は細胞増殖期に高い

とする報告があり、HCV-RNA 複製効率の低下が三次元培養細胞での HCV 粒子産生量の低下の原因であると考えられた。JFH-1 株の場合には平皿培養でも HCV 粒子産生が十分みられるため、三次元化による粒子産生促進効果以前に HCV-RNA の複製低下が律速となり、粒子産生量を減少させた可能性が高い。以上の結果より、RCYM1 細胞で三次元化により粒子産生が可能となった機構を解明し、その結果を平皿培養での JFH1-Huh7 細胞系に反映させ、粒子産生効率化を図る必要があると考えられた。

今回の RBV 耐性株の研究から、RBV に対して耐性を示す HCV genotype 2 の塩基配列が初めて示された。この耐性獲得には NS5A 及び NS5B 領域の点変異が重要であった。NS5B 蛋白は RNA ポリメラーゼであり、NS5A 蛋白もゲノム複製に重要であることが知られていることから、V2405A、Y2471H の変異が、RBV による HCV RNA 複製阻害作用からの回避に働いている可能性が示された。また、JFH-1 subgenomic replicon 系はリバビリン耐性株の配列予測と対策に有用であると考えられた。

これまでのレプリコン複製評価系は、HCV サブゲノミックレプリコン RNA が導入され、複製が許容された安定的レプリコン複製細胞を用いている。この細胞を用いて、抗 HCV 効果を評価する場合、レプリコン RNA の複製量を PCR で測定するか、レプリコン RNA にコードされた薬剤耐性遺伝子の発現を利用して、選択剤存在下で形成されるコロニー数を測定する。前者は操作が煩雑であり、後者は薬剤耐性コロニーを得るため時間がかかる。さらに、レプリコンの複製が許容された細胞では、クローンにより

細胞の性質が異なると考えられる。その一例として、レプリコン複製が高い Huh7.5 はウイルス感染によるインターフェロン誘導に必要な分子である RIGI に変異があることが報告されている。そのため、安定的なレプリコン複製細胞を用いて評価する場合は、使用するクローンの性質を解析しておく必要がある。

クローンによる性質の問題を解決するために、薬剤耐性遺伝子の代わりに、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いて、正常な Huh7 細胞に一過性にレプリコン RNA を複製させることで、細胞のクローンに影響されない評価系を用いることが重要である。

安定的レプリコン複製細胞株を用いた系でリバビリンの抗 HCV 効果を RT-PCR で測定した Lanford らによる結果では、リバビリン 50 μ M (12 μ g/ml) で 1.7 倍、100 μ M (24 μ g/ml) で 2.3 倍、減少していることが示されている。それに対して、我々のルシフェラーゼレプリコン RNA を用いた一過性複製系では、リバビリン 3 μ g/ml で 2 倍、10 μ g/ml で 4 倍、30 μ g/ml で 10 倍、減少していることから、本報告では高感度でリバビリンの効果を測定することができた。一方 IFN では、安定的レプリコン複製細胞を用いた系でも本ルシフェラーゼレプリコン RNA を用いた一過性複製系でも抑制効果は変わらないことから、リバビリンの効果はレプリコン許容細胞と正常 Huh7 とでは異なるメカニズムが介在することが示唆された。

山梨大学医学部伊藤正彦教授、榎本信幸教授のグループは、ビスフォスフォネートに HCV が増殖する際に必要な脂質の一つの合成を阻害することに着目し、培養細胞を使った実験でビ

スフォスフォネートにウイルスの増殖を 90% 阻害する効果のあることを抗ウイルス化学療法学会で報告している。そこで、ビスフォスフォネート系の化合物の抗 HCV 効果について、ルシフェラーゼレプリコン RNA を用いた一過性複製系にて評価したが、使用した化合物には HCV 複製に対して抑制効果がなかった。スフィンゴ脂質の性合成経路の阻害は HCV の複製や粒子形成に影響を及ぼすことが知られている。レプリコン複製系による評価では使用したビスフォスフォネート系化合物は HCV の複製を阻害しなかったが、粒子形成を阻害する可能性もある。粒子形成や感染性の評価には完全長レプリコン複製系を用いて評価できる。従って、本評価系や完全長レプリコン複製系を使い分けることで、抗 HCV 阻害剤を効果的にスクリーニングすることができる。

E. 結論

今年度の研究により、ウイルスの感染複製増殖に関与する宿主及びウイルス因子を同定した。さらに新たな抗ウイルス薬の候補分子を同定した。

RBV に対して耐性を示す HCV genotype 2 の塩基配列が初めて明らかとなった。この耐性獲得には NS5A 及び NS5B 領域の点変異が重要であることが示された。C 型慢性肝炎患者へのリバビリン療法における薬剤耐性ウイルスの出現予測とその対策に役立つとともに、抗 HCV 薬としての核酸代謝拮抗剤の開発研究に有用な実験系となることが期待された。

薬剤耐性の代わりにルシフェラーゼをレポ-

ターとして使用することで、網羅的な抗 HCV 薬のスクリーニングにも適応できることが示された。

以上の研究成果を生かしてさらに C 型肝炎の治療法開発を進めていく事が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. D Akazawa, T Date, K Morikawa, A Murayama, M Miyamoto, M Kaga, H Barth, T F Baumert, J Dubuisson, T Wakita. CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. *J Virol.* 2007 in press.

2. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. *J Virol.* 2007 in press.

3. K Morikawa, Z Zhao, T Date, M Miyamoto, A Murayama, D Akazawa, J Tanabe, S Sone, and T Wakita. The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J. Med. Virol* 2007 in press.

4. E Larrea, JI Riezu-Boj, L Gil-Guerrero, N Casares, R Aldabe, P Sarobe, MP. Civeira, JL Heeney, T Wakita, F Borrás-Cuesta, JJ. Lasarte, J Prieto. Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus Infection. *J Virol.* 2007. 81(7):3662-6.

5. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S,

Mizokami M, Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatology Research*, 2007 in press

6. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2007 81(3):1174-85.

7. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols*, 2006 1(5): 2334-2339.

8. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology Journal* 2006, 3:89

9. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 2006 81(1):309-18

10. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouillé. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2006. 80(14):6964-72.

11. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human

hepatocytes. J Virol. 2006. 80(9):4633-9.

12. N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. J Virol. 2006. 80(9):4510-20.

13. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. Future Virology, 2006, 1: 519-525.

14. 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, 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, 2006, 351:381-92.

15. Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. Journal of Biochemistry., 2006, 921-30.

16. Stephen J. Polyak, Kevin C. Klein, Ikuo Shoji, Tatsuo Miyamura, Jaisri R. Lingappa Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. (Seng-Lai Tan ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 89-119, 2006.

17. Molecular biology of hepatitis C virus.: Suzuki T., Aizaki H., Murakami K., Shoji I., Wakita T., Journal of Gastroenterology., in press.

2. 学会発表および講演など

1) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆宇、「HCV感染に関する宿主因子の探索」、第2回広島大学肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館(2006, 6.18)

2) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」、第8回仙台Liver Meeting、仙台エクセルホテル東急、(2006, 6.24)

3) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の構築とその応用」、第7回横浜青葉・緑消化器病研究会、青葉台フォーラム、(2006, 7.21)

4) 森川賢一、脇田隆宇 C型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における HSPG および CD81 の関与 第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26) ワークショップ1「ウイルス性肝炎研究の最前線」

5) 関根裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆宇、渡辺守、C型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討、第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26)

6) 脇田隆宇、相崎英樹、鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関する宿主因子の解析 第10回日本肝臓学会大会、札幌(2006, 10.11-12) シンポジウム6「ウイルス肝炎進展因子の解明」

7) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の構築とその応用」、第4回湯沢リバーシンポジウム、NASPA ニューオータニ、(2006, 9.9)

8) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の開発

- とその展望」、第 14 回 Schering-Plough Liver Forum (Tokyo)、赤坂プリンスホテル、(2006, 11. 18)
- 9) 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、C 型肝炎ウイルス (HCV) による自然免疫受容体 TLR3 の発現制御、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 10) 森田奈央子、野村知里、石橋真理子、楠美嘉晃、杉谷雅彦、脇田隆宇、高山忠利、江角真理子、類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN と C 型肝炎ウイルス、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 11) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、脇田隆宇、HCV 感染に関与する宿主因子の探索、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 12) 相崎英樹、原 弘道、井上 寧、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、マイケルライ、鈴木哲朗、HCV RNA 複製を調節する分子シャペロンの同定とその機能解析、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 13) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、RNA Polymerase I promoter/terminator 系を用いた感染性 HCV 粒子の作成、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 14) 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C 型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝子 OASL の機能解析、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 15) 村山麻子、伊達朋子、森川賢一、赤澤大輔、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の RNA 複製に必要な領域の同定、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 16) 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、高橋由利絵、阿部克俊、奈須純一、鈴木哲朗、脇田隆宇、水本清久、宮村達男、E6AP 依存性 HCV core 蛋白分解の分子認識機構の解析、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 17) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 18) 脇田隆宇、ランチョンセミナー「C 型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 19) 脇田隆宇、「C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系開発とその応用」、第 10 回東海ウイルス感染症研究会、安保ホール(名古屋市)、(2007, 1. 13)
- 20) E6AP 依存性 HCV core 蛋白分解によるウイルス産生調節機構
勝二郁夫、村上恭子、白倉雅之、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、脇田隆宇、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 6-8 日、名古屋
- 21) T. Wakita. Production of Infectious Hepatitis Particles in vitro. 2nd international workshop on clinical pharmacology of hepatitis therapy. Vienna, Austria (2006, 4. 25).
- 22) T. Wakita. In vitro cultivation of hepatitis C

virus. Current strategy of new drug development for HCV. Biomedical Engineering Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan (2006, 5. 3).

23) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Cultured Cells. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, on July 1-5, 2006.

24) Rouille Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, on July 1-5, 2006.

25) Zeisel MB, Schnober EK, Heberstroh A, Lavillette D, Cosset F, Wakita T, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, on July 1-5, 2006.

26) T Wakita. Development of an Infectious HCV system JFH-1, a Fulminant Hepatitis. 2006 ASV Medical Virology Club Satellite meeting. Madison WI, USA (2006, 7. 1)

27) T Wakita. HCV and cell culture-progress and problems. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

28) T Wakita. HCV replication Update. 17th

Asian Pacific Association for the study of the Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan (2007, 3. 27)

29) K Morikawa, T Date, A Murayama, M Kaga, D Akazawa, T Wakita.

CHARACTERIZATIONS OF HIGHLY PURIFIED INFECTIOUS HCV PARTICLES PRODUCED IN CULTURED CELLS. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

30) K Fukuda, I Shoji, M Shirakura, K Murakami, T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, T Shimoji, K Abe, J Nasu, Y Takahashi, S Sato, M Fukasawa, Y Yamakawa, M Nishijima, T Wakita, K Mizumoto, T Miyamura. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

31) T Masaki, R Suzuki, M Matsuda, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

32) H Aizaki, Y Inoue, M Matsuda, T Shimoji, M Lai, T Wakita, T Miyamura, T Suzuki. Identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

33) A Murayama, T Date, M Miyamoto, K

- Morikawa, D Akazawa T Wakita. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 34) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Barth H, Baumert TF, Blum HE. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 35) D Akazawa T Date, K Morikawa, A Murayama, K Kaga, T Wakita CD81 expression is important for the heterogenous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 36) Machida M, Huang J, Wang CH, Kondo Y, Sung VMH, Wakita T, Lai MMC. Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 37) Miyanari Y, Usuda N, Atsuzawa K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 38) K Ishiii, B Zhang, J Li, M Shirakura, K Morikawa, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)
- 39) Kato T, Heller T, Matsumura T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang JT. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 40) M Imamura, N Hiraga, M Tsuge, C Noguchi, S Takahashi, E Iwao, Y Fujimoto, C Tateno, M Honda, S Kaneko, T Wakita, K Yoshizato, K Chayama. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)
- 41) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. The 57th Annual Meeting of the American Association for the

Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA
(October 27-31, 2006)

42) K Morikawa, T Wakita. Infectious hepatitis C virus particle binding to the Huh7 cell surface is mediated by glycosaminoglycans and its internalization by CD81. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

43) I Shoji, M Shirakura, K Murakami, T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, K Fukuda, T Shimoji, S Sato, M Fukasawa, Y Yamakawa, M Nishijima, T Miyamura. E6AP-mediated ubiquitylation and degradation of HCV core protein. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, July 1-5, 2006

44) I Shoji. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. 17th APASL conference, Kyoto, Japan, March 27-30, 2007.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社