

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 哲朗

平成19（2007）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 -----	1
主任研究者 鈴木 哲朗	
II. 分担研究報告書	
HCV 複製増殖機構の解析 -----	19
鈴木 哲朗	
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 -----	23
下遠野 邦忠	
HCV 宿主蛋白質—宿主因子相互作用の網羅的解析 -----	27
西島 正弘	
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 -----	31
堀田 博	
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 -----	37
瀬谷 司	
動物モデルの開発およびそれを用いた解析 -----	39
小原 道法	
HCV RNA 複製システムの改良と HCV 持続感染機構の解析 -----	41
加藤 宣之	
C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白の プロテオミクス解析 -----	51
小池 和彦	
C型肝炎ウイルスの粒子形成機構 -----	55
松浦 善治	
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 -----	59
深澤 秀輔	
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 -----	63
明里 宏文	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	71
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	81

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 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：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) HCV の粒子形成過程に細胞の脂質ラフト構造が関与すること、ウイルス粒子に含まれるコレステロール、スフィンゴ脂質が粒子構造の安定化、感染性を保つ役割を担っていることを見出した、2) E1 蛋白質の小胞体膜上トポロジー、コア-E1 蛋白相互作用等の様式を明らかにした、3) 感染性ウイルス産生には細胞内に存在する油滴の存在が重要であることを見出した、4) HCV RNA 複製を調節する分子シャペロン CCT の作用機序を解析した、5) DDX3、vimentin がコア蛋白質と相互作用し、HCV 産生に影響を与えること、コア蛋白がミトコンドリアに局在しミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることを示した、6) NS5A と Syk が会合し、Syk のチロシンキナーゼ活性及び PLC- $\gamma$ 1 の活性化を阻害することを明らかにした、7) NS3-4A 蛋白は TRIF を切断せず TRIF を介するシグナル経路を抑制しないことを明らかにし、また、ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株の HCV 感受性を解析した、8) HCV RNA 複製システムを改良し、NS3 領域の適応変異の組み合わせで複製が高まること、Lipid-rich albumin を加えた無血清培地により HCVRNA 複製細胞を長期に培養できることを見出し、可視化遺伝子を利用して生細胞のまま HCVRNA 複製を定量できるシステムを開発した、9) HBX pro-HSVTK トランスジェニックマウスを作出し、その肝臓細胞が GCV 濃度依存的に細胞死が誘導されることを示した、10) GBV-B サロゲートモデルにおいて、ウイルス感染経路が病態に影響すること、マーマセットにおける持続感染例を見出した、11) HCV 増殖阻害、肝炎治療薬の候補として、シクロスポリン誘導体、糖鎖修飾阻害剤等を見出した。

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 客員研究員  
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  
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言われ、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。インターフェロン (IFN)、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できないこと、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、チンパンジーに代わり多数の個体が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 複製増殖及び持続感染の分子基盤、3) C 型肝炎治療薬創薬シーズの探索、について研究を行った。

## B. 研究方法

### (1) HCV 粒子形成機構の解析

HCV JFH-1 株のゲノム RNA を Huh-7 細胞へトランスフェクションし培養上清から HCV 粒子を調製した。得られた HCV 粒子を methyl- $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD)処理することによりコレステロール除去を行い、また shingomyelinase (SMase)処理によりスフィンゴミエリンを加水分解させた。ウイルス検

体をショ糖密度勾配遠心し各分画中のコア蛋白を ELISA 法で測定しウイルス粒子、抗原の密度分布を解析した。 $\beta$ -CD または SMase 処理したウイルスから限外ろ過により薬剤、酵素を除去した後、naive Huh-7 細胞へ接種した。洗浄後 3 日間培養しコア抗原量を測定した。

TMHMM アルゴリズムを用いて、E1 蛋白質の膜貫通様式の構造予測を行った。また、酵母 2 ハイブリット法および免疫沈降法によって、コア蛋白質と E1 細胞質内領域との相互作用は解析した。コア蛋白質疎水性領域の下流の E1 蛋白質の細胞外領域のアミノ末端に Flag タグ、E1 蛋白質のカルボキシル末端に HA を付加したものを *in vitro* 転写翻訳法によって発現/ラベルし、膜存在下/非存在下でトリプシンによるプロテアーゼプロテクションアッセイを行った。ショ糖密度勾配による沈降速度法によってコア蛋白質オリゴマー形成を解析した。

### (2) 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。

### (3) 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 Heps wx (コントロール用コア蛋白質非発現細胞)、Hep39 細胞 (コア蛋白質発現細胞)、あるいは自ら樹立した Huh7 細胞由来の Uc321 (コントロール用コ

ア蛋白質非発現細胞)、Uc39-2 及び Uc39-6 細胞 (コア蛋白質発現細胞) を用いた。各培養細胞を回収後 0.5% Triton-X100 を含む溶液で処理し、不溶性の画分を超遠心法等により生化学的に分離・精製した。分画した界面活性剤不溶性画分中の蛋白質は二次元電気泳動法によりさらに分離し、染色後、コア蛋白質発現細胞・非発現細胞の蛋白質パターンを比較した。発現量に変動が見られた蛋白質スポットを採取し、トリプシン消化後、MALDI-TOF マススペクトロメトリー(MS)により蛋白質を同定した。

同定された分子の生化学的・細胞生物学的解析は以下のように行った。発現量の解析はイムノプロット法を用いた。コア蛋白質との相互作用の解析は、免疫沈降法により行った。

HCV 感染培養細胞系は、Huh7.5.1 あるいは Huh7(FVC)細胞に HCV(JFH-1 株)を感染させる系を用いた。コア蛋白質及び同定分子の細胞内発現抑制は siRNA(dsRNA)法を用いて行った。

Hep39 細胞から、Nycodenz 密度遠心によってミトコンドリア分画の精製を行った。ミトコンドリアの purity は以下の様に確認した。すなわち、精製したミトコンドリア蛋白質を用いてウエスタンプロット法を行なったところ、コア蛋白とミトコンドリア蛋白 (complex I) は検出されたが、ER 蛋白 (OST48) は検出されなかった。ミトコンドリア蛋白を二次元電気泳動した後、銀染色にて検出し、発現量の有為に異なる蛋白スポットを切り出し、MALDI-TOF MASS により蛋白の同定を行った。

#### (4) HCV NS5A 蛋白-宿主因子相互作用の解析

免疫組織染色：治療を目的として外科的に摘出し病理検査に供された HCV 感染及び非

感染ヒト肝組織 (非がん部) を、抗 Syk 抗体を用いて免疫染色し、Syk の細胞内局在を調べた。

HCV 蛋白質の発現と会合の解析：HCV (Con1 株) の各蛋白質を単独発現させた Huh7 細胞及び HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞に Syk を発現させ、免疫共沈法を用いて HCV 蛋白質と Syk との会合の有無を調べた。

Syk キナーゼ活性の測定：上記細胞の抽出液から Syk を免疫沈降後、*in vitro* kinase assay により Syk のチロシンキナーゼ活性を、H2B ヒストンのリン酸化および Syk の自己リン酸化を指標に検討した。また、Syk の下流シグナル伝達分子である PLC- $\gamma$ 1 のリン酸化に NS5A が関与しているかを調べるため、PLC- $\gamma$ 1 リン酸化特異抗体を用いてウエスタンプロット法で調べた。

#### (5) HCV 持続感染機構の解析

HCV 感染により樹状細胞・肝実質細胞が IFN を誘導するか、HCV の感染認識がこれらの細胞において TLR3, RIG-I, MDA5 のいずれの経路によって起こるか、を解析した。CTL/NK を活性化する *in vitro* 評価システムを確立する。HCV 存在下でヒト樹状細胞が CTL/NK 活性化の指向性を獲得するか、をテストする。NK 活性化を付与する樹状細胞因子を同定した。

IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターのレポーターアッセイは以下に示す方法により行った。

PH5CH8 細胞を 6 ウェルプレートに蒔き込み、翌日に pCXbsr レトロウイルス発現ベクター (Myc-TRIF, Muc-Cardif, NS3-4A など)、レポータープラスミド (pIFN- $\beta$ (-125)-Luc) および pRL-CMV internal control ベクターを FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。培養 48 時間後に Dual-

Luciferase Assay を行った。IRF3 の二量体解析は、回収した祖蛋白質画分を Native-PAGE にて分離して IRF3 抗体により検出した。Myc-TRIF および Myc-Cardif 分子の切断状況については、抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

#### (6) HCV 複製細胞系の開発、改良

HCV RNA 複製における適応変異解析：HCV RNA の複製効率の測定にはルシフェラーゼアッセイ法を用いた。ルシフェラーゼアッセイ法では NS3 領域にそれぞれ変異を導入した全長 HCVRNA の他にルシフェラーゼ遺伝子を含むように改変した HCV RNA を人工的に合成し、Oc 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入した後に経時的に (1-3 日) 上昇してくるルシフェラーゼ活性を測定した。全長 HCVRNA 複製細胞である O, OA, OB, OD および OE 細胞を G418 存在下、DMEM 培地にて長期に培養した。1 週間ごとに 50-70 倍希釈による継代を繰り返し、最長 2 年間培養した。培養開始 1 年後或は 2 年後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HCVRNA を増幅した。NS 全領域 (6.1 kb) をカバーする DNA 増幅産物を pBR322MC ベクターに導入して、O~OE について、それぞれ独立的に得られた 3 クローンの全塩基配列の決定を行い、相互に比較解析した。

HCV RNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム：OR6 細胞を各種培地にて培養し、培地の違いにより HCV RNA の複製レベルが変化するかどうかを検討した。通常の DMEM 培地に 100 nM の sodium selenium を加えた培地を基本にし、さらに FBS、Insulin、Linoleic acid、Oleic acid)、LDL 或は Lipid-rich albumin (LRA) を種々の用量で加えた培地を使って OR6 細胞を培養した。培養開始後 24 時間および 96 時間後のルシフェラーゼ活

性を測定比較した。また、長期継代した細胞における HCV コアや NS3 タンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した。抗 HCV 剤の効果を調べるために OR6 細胞を 24 ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤 (シクロスポリン A (CsA)、フルバスタチンや IFN- $\alpha$  など) を添加して 72 時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを評価するシステム：EGFP 遺伝子を複製可能な全長 HCVRNA の Neo<sup>R</sup> 遺伝子の前に挿入した plasmid より RNA を作製して、OR6c 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入して得られた G418 耐性細胞 (OGN/C-5B/KE7) を用いて HCVRNA の複製レベルを調べた。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をフルオロシキアンアセントにより測定した。別途、LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により細胞内の HCV RNA を定量した。HCV 蛋白質についてはウェスタンブロット法により検出した。抗 HCV 剤の効果を調べるために OGN/C-5B/KE7 細胞に、各種薬剤を添加して 72 時間後に細胞の蛍光強度と LightCycler を用いた RT-PCR 法により HCVRNA の定量を行った。

1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質：HCV-O (1b 型) と JFH1(2a 型) RNA のシスエレメントとして知られている 5' UTR (340 塩基)、CRE (NS5B 領域に存在する 46 塩基) および 3' UTR (オリゴU + 3' X 98 塩基) をお互いに交換したキメラ HCV RNA を作成して、OR6c 或は RSc 治癒細胞に導入して、HCVRNA の複製レベルや細胞の培地中に産生されるコア蛋白質や HCV 粒子の感染性を調べた。

#### (7) 抗 HCV 薬スクリーニング系の開発と創

## 薬シーズの探索

HCV JFH-1 株ゲノムを発現し、HCV ウィルス粒子を恒常的に産生する細胞 H751JFHZeo が昨年度本研究班で作製された。この細胞株の培養上清を Huh7.5.1 細胞に加えて培養すると、さらに感染性 HCV ウィルス粒子が産生されたので、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系の構築を試みた。阻害の指標は、上清に放出されたウィルス RNA の real-time RT-PCR、また細胞内のコア蛋白質の cell-based ELISA による定量を検討した。文部科学省がん特定領域研究・統合がん・化学療法基盤情報支援班の配布する標準阻害剤キット (SCADS inhibitor kits) を用いて系の有効性を確かめた。

微生物研究所から供与を受けたバクテリア培養上清に抗 HCV 活性を示すものがあるかをルシフェラーゼレプリコンの系を用いて解析した。活性を示すものについては、その上清を分画して解析を進めた。

### (8) ヒト肝細胞キメラマウスモデルの作製

Hepatitis B virus X protein (HBX) promoter で誘導できる HBX pro-HSVTK 発現ベクターを構築し、SCID マウスに導入したトランスジェニック (Tg) マウスの作製を試みた。また、CsA の誘導體で免疫抑制活性のない Debio-025HCV 増殖に与える影響を検討した。ヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1a の血清を接種して HCV の持続感染モデルを作成した。これらのキメラマウスに Debio-025 100mg を投与して血中 HCV RNA レベルの変化を検討した。

### (9) 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 により得られたウィルスゲノム RNA をタマリンまたはマーモセットに接種し、4 週間後に全採血した plasma を以後のウィルス接種用ストックとした。ウィルス感染サルよりケタミン麻酔下で定期的に採血し、得られた血液について血清生化学検査、plasma 中ウィルス量及び抗体価測定を行った。血液および組織中のウィルス 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コア蛋白発現ベクターを導入した大腸菌からリコンビナントコア蛋白を得て、これによる ELISA 系を構築して抗体価測定を行った。

### (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、個人情報に厳格に管理、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 年総理府告示第 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 粒子形成機構の解析

HCV 粒子表面に存在する脂質ラフトが粒子構造、感染性へ及ぼす影響を明らかにした。

HCV 感染増殖細胞の中で HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白の一部は低温下 TritonX-100 処理に抵抗性の膜画分に存在することが示された。一方、感染細胞および非感染細胞の全膜画分、また部分精製 HCV 粒子サンプルに含まれるコレステロールとリン脂質を定量したところ、HCV 粒子では細胞の膜画分 비해、コレステロール/リン脂質比が有意に上昇していることが示された。これらの結果、HCV 粒子形成過程における脂質ラフトの関与、コレステロール等の脂質が HCV 粒子に含まれている可能性が示された。そこで、産生された HCV 粒子をコレステロール除去薬剤である $\beta$ -CD 処理したところ、ウイルス密度が 1.17 g/mL から 1.19 g/mL へシフトし同時に不安定化した。また、ウイルスの感染性は $\beta$ -CD の濃度依存的に低下した。このような $\beta$ -CD 処理による HCV 粒子の構造変化、感染性低下は、 $\beta$ -CD 処理後のウイルス粒子へコレステロールを添加することによって回復することも明らかとなった。

コレステロールとともに脂質ラフトの主要な構成分子であるスフィンゴ脂質についてもその役割を調べる目的で、HCV 粒子を SMase 処理したところ、粒子構造の不安定化とともに感染性の低下が観察された。以上のことから、HCV の粒子形成過程には細胞の脂質ラフト構造が関与し、ウイルス粒子に含まれるコレステロール、スフィンゴ脂質は粒子構造の安定化、感染性を保つ役割を担っていることが明らかとなった。

TMHMM アルゴリズムによって、E1 蛋白質はコア蛋白 C 末端膜貫通領域をシグナル蛋白質として利用して、細胞外へ貫通し、265-287 残基の疎水領域を用いてまた細胞内貫通し、361-377 残基の C 末端の疎水性領域でまた膜を貫通するポリトピックな構造が予測された。したがって、288-360 残基が細胞質内領域と推測

され、今まで報告されてきた type I 型のトポロジーをとるものとの共存が示唆された。糖鎖付加部位を人工的に E1 蛋白質に付加して、細胞外領域を予測したとき、ポリトピックな構造と今まで報告されてきた Type I 型の構造が示唆された。また、膜存在下で E1 蛋白質を発現したとき、細胞外領域と同じ大きさの Flag タグをもつフラグメントがトリプシンによる消化から保護されたことから、E1 蛋白質の細胞質内ループ構造の存在が間接的に裏付けられた。コア蛋白質を 293T 細胞に発現させ、その溶解物をシヨ糖密度勾配遠心によって解析したとき、0.1mg/ml tRNA と 1mM MgCl<sub>2</sub> が存在したときにオリゴマー形成が認められた。コア蛋白質と E1 蛋白質との結合にはコア蛋白質 72-91 残基の領域が必要で、その領域はオリゴマー形成にも必要であったが、その部位のみを発現させても E1 蛋白質との相互作用が認められなかった。また、E1 蛋白質とコア蛋白質との相互作用には tRNA と MgCl<sub>2</sub> の添加が必要であることから、E1 とコア蛋白質との相互作用にはコア蛋白質のオリゴマー形成が必要であることが示唆された。また、E1 蛋白質の細胞質領域の 312-315 残基の欠損によって、コア蛋白質との相互作用が消失することから、その領域がコア蛋白質との結合に必要であることが示唆された。

## (2) 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

HCV 複製複合体分画のプロテオーム解析を通じて同定された分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex (CCT) による HCV RNA 複製調節機構を解析した。CCT のサブユニット CCT5 が HCV NS5B 蛋白と特異的に結合することが見出された。また、1) CCT の全サブユニットを過剰発現させることにより HCV RNA 複製が亢進すること、2) CCT5 siRNA によって HCV



RNA 複製レベルが低下すること、3) レプリコン細胞から調製した複製複合体を用いた試験管内 HCV RNA 複製活性が抗 CCT 抗体によって阻害されること、も明らかとなった。

### (3) ウイルス蛋白質の細胞内局在の解析

これまでの研究から、ウイルスゲノムが自立的に複製する細胞においては、ウイルス蛋白質が小胞体に局在することを明らかにしてきた。しかし、感染性ウイルス培養系を用いた研究での報告はない。そこで感染性ウイルス RNA, JFH1 を用いてウイルス蛋白質の細胞内局在の検討を行った。その結果、ウイルス蛋白質の大部分は、小胞体に局在した。同時に、一部は油滴にも局在することが分かった。油滴へのウイルス蛋白質の局在は、コアに変異を導入したウイルスでは観察されないことから、コア蛋白質依存的事であることが分かった。一方、コア蛋白質が野生型でも NS 蛋白質に変異がある場合には油滴へのウイルス蛋白質の局在が起こらない変異ウイルスゲノムも取れた。これらの変異ウイルスゲノムの解析から、油滴の周りにウイルス蛋白質が局在することが、感染性ウイルス粒子の放出に重要であることを明らかになった。なお、感染性ウイルス粒子は、密度勾配遠心による解析から、浮遊密度が幾分軽いことも明らかになった。

### (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 コア蛋白質発現により変動する宿主蛋白質の網羅的解析を培養肝細胞系を用いている。HCV コア蛋白質の主要な細胞内局在部位である脂肪滴画分及び界面活性剤不溶性画分を用いた比較プロテオーム解析から各種変動蛋白質を見出し、本年度はその中から DDX3 及び vimentin について解析を行った。

DDX3 はコア蛋白質発現により蛋白質量が有意に増加し脂肪滴画分に分布するようになった。細胞内 DDX3 量を siRNA により抑制すると HCV 産生が顕著に低下することも明らかとなった。一方、vimentin はコア蛋白質発現細胞で蛋白質量が有意に減少しており、vimentin 発現量がコア蛋白質量に影響し、両者の細胞内タンパク質量は逆相関することがわかった。vimentin 発現量の増加/抑制が HCV 産生を抑制/増加させることも明らかとなった。見出されたこれら蛋白質の量及びコア蛋白質との相互作用を操作することで HCV 感染時に HCV 産生を抑制できることが示唆された。

コア蛋白により発現変動するミトコンドリア蛋白を明らかにするため、コア蛋白発現細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白の発現の変化を解析した。ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、コア蛋白を発現する細胞と発現しないコントロール細胞を比較したところ、発現量が大きく変化する蛋白が複数認められた。これらの中でミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞で発現が高く、コア蛋白の存在によって安定性を増していた。今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることが明らかとなった。

HCV NS5A 蛋白と、乳がんのがん抑制タンパク質として近年注目を集めている非受容体型チロシンキナーゼ Syk の相互作用について検討した。はじめに、HCV 感染患者の肝組織と、非感染対照肝組織を用いて Syk の免疫組織染色を行ったところ、HCV 感染により Syk の発現形態が変化することがわかった。次に、培養細胞を用いて HCV 各蛋白質と Syk を共に発現させて免疫沈降を行い、両者の相互作用

用について検討した。その結果、NS5A 蛋白と Syk が強く会合することがわかった。HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞においても NS5A と Syk の会合が見られた。NS5A の Syk 会合責任領域は N 末端であった。In vitro kinase assay により、全長 NS5A が Syk のキナーゼ活性を抑制すること、及びその Syk キナーゼ活性の抑制には、Syk 会合に必要な NS5A の N 末端領域のみならず、PKR 結合領域も必要であることがわかった。さらに、NS5A により、Syk の下流分子である PLC- $\gamma$ 1 のリン酸化も抑制された。

#### (5) 持続感染機構の解析

ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株の HCV 感受性を調べ、樹状細胞の IFN 産生機構と CTL 誘導能、NK 活性化能を解析した。

ヒト myeloid 樹状細胞は HCV JFH-1 株に以下の条件で感染が証明できなかった。成熟樹状細胞, moi=1-10, 48 h, 特異 primer による PCR と特異抗体による組織染色。肝実質細胞では容易に感染が証明されるので樹状細胞の直接感染は成立しにくいと結論した。HCV 感染細胞に対する CTL が誘導されるという報告が多数あるので樹状細胞に HCV の抗原が取り込まれる機構は感染以外に別にあると考えられる。外部から抗原が endosomal uptake される場合、RIG-I ではなく TLR3-TRIF (TICAM-1) 経路が働く。事実 HCV の Huh7 細胞への感染では IFN 誘導の際、RIG-I が働いたが樹状細胞では働かなかった。HCV が胆管上皮細胞や肝実質細胞に感染して debris が DC に取り込まれる系を検討した結果、この経路は NK 活性の責任経路の 1 つであることが判明した。樹状細胞以外の NK 活性化経路についても検討中である。また、一般に抗原取り込みとともに cross-priming が

起きるはずで、これに付随する CTL 誘導機構も一緒に解析する。

HCV 刺激によりヒト肝細胞は ULBP 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。ULBP は樹状細胞も発現するが樹状細胞は HCV 感染せず、ULBP の発現上昇も NK の細胞傷害も見られない。TLR3 から NK 指向性の樹状細胞を誘導する分子機構を genechip など明らかにする。感染と ULBP 誘導の誘導機構も解析し、NK 活性化の HCV 感染における意義を検討する。

昨年度、PH5CH8 細胞を用いた解析で二本鎖 RNA (dsRNA) の細胞外からの添加による IFN- $\beta$  遺伝子の活性化は NS3-4A ではほとんど抑制されないことを見出した。このメカニズムとして、従来の Gale らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:2992-2997, 2005) とは異なり、NS3-4A が TRIF 分子を切断できないためではないかという可能性が考えられた。そこで、この点を明らかにするために、PH5CH8 細胞に Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させ、IFN- $\beta$  遺伝子 promoter を用いたレポーターアッセイを行った。Myc-TRIF を発現させると IFN- $\beta$  遺伝子 promoter 活性は約 1,200 倍程度上昇した。しかし、この状態で NS3-4A を共発現させても、promoter 活性の阻害はまったく認められなかった。IRF3 の 2 量体 (活性化型) の形成についての解析においても、NS3-4A による阻害効果は認められなかった。これらのことから、NS3-4A は TRIF を介するシグナル伝達経路を抑制しないことが明らかとなった。次に、Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させた PH5CH8 細胞において Myc-TRIF が切断されているかどうかを調べた。その結果、Myc-TRIF 分子はまったく切断されていないことがわかった。対照として行った Myc-Cardif と NS3-4A を発現

させた場合においては、NS3-4A により IFN- $\beta$  遺伝子 promoter 活性は完全に抑制され、Myc-Cardif の切断も起こっていることが確認された。

#### (6) HCV 複製細胞系の開発、改良

HCV RNA 複製における適応変異解析：昨年度見出された NS3 領域内の適応変異 (Q1112R, P1115L, E1202G および K1609E) について、それらを組み合わせると HCV RNA の複製効率がどのように変化するかについて解析した。Q1112R と K1609E の組み合わせと Q1112R と P1115L の組み合わせが HCV RNA の複製レベルを上昇させることが分った。細胞に導入後 24 時間の値と比較すると導入後 96 時間では約 10 倍に上昇することが分った。適応変異のこれら以外の組み合わせでの最高は 6 倍程度であり、K1609E などの適応変異 1 個だけだと、約 2 倍程度にしか上昇しなかった。さらに長期間の培養 (1 年間および 2 年間培養) を行った結果、NS3 領域に最初に観察された適応変異に加えて、経時的に新たな適応変異が NS3 領域に出現してくることが分った。アミノ酸置換を伴う変異は全非構造タンパク質内に経時的に蓄積してくることが確認されたが、それらの部位は不均一で NS5A 内のドメイン I (亜鉛配位領域) や NS5B のポリメラーゼ活性触媒部位においては、ほとんど変異は観察されなかった。これらとは対照的に NS5A の C 末端部では変異が集中的に認められた。

HCV RNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム：OR6 細胞について無血清培地で HCV RNA の複製を維持できる可能性について調べた。OR6 細胞自体は、DMEM+Selenium により増殖維持されるが、HCV RNA の複製レベルは低下してしまう。しかしながら、この培地に LDL 或は LRA を

添加した培地の場合、FBS 存在下とほぼ同程度の HCV RNA の複製が維持されるようになることを見出した。比較的安価である LRA を用いて、LRA の存在により長期間 HCV RNA の複製が維持されるかどうかの検討を行った。その結果、LRA(0.5~2 mg/ml)を存在させると、少なくとも 1 ヶ月間 HCV RNA の複製レベルは FBS を用いた場合と同程度に維持されることを見出した。添加物として Selenium+LRA のみで 1 ヶ月間培養した細胞においても、HCV コアや NS3 蛋白質の発現レベルは高く、ウェスタンブロット法による解析でも明確なバンドが得られた。このような LRA 添加無血清培地で培養された OR6 細胞と通常の FBS(10%)存在下で培養された OR6 細胞における抗 HCV 剤の効果に差があるかどうかを比較検討した。その結果、CsA と IFN- $\alpha$ に関しては、LRA 添加無血清培地の方が強い抗 HCV 効果を示すことが分った。しかし、フルバスタチンに関しては、逆に LRA 添加無血清培地において効き目が弱くなることがわかり、培地が違えば抗 HCV 剤の効果も異なってくるということが明らかとなった。

生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを評価するシステム：EGFP をコードする領域を含む全長 HCV RNA が複製している OGN/C-5B/KE7 細胞を樹立し、その細胞における HCV RNA の複製レベルを調べた。その結果、細胞の蛍光強度が播種後経時的に増加することが確認され、ウェスタンブロット法による解析で各種 HCV 蛋白質も検出され、それらの発現レベルは全長 HCV RNA 複製細胞である O 細胞と同程度であった。

OGN/C-5B/KE7 細胞を用いて IFN- $\alpha$ による HCV RNA の複製抑制効果を定量的に測定できるかどうかを調べた。IFN- $\alpha$ の濃度に依存して蛍光強度の減弱が観察され、その程度は定量的 RT-PCR で算出した HCV RNA 量の

低下率とほぼ一致していた。また、ウェスタンブロット法による解析でもコアや NS3 蛋白質の発現量の低下が観察された。HCV RNA の複製抑制効果が知られている IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、CsA およびフルバスタチンについても IFN- $\alpha$  と同様のアッセイを行い、蛍光強度の低下率と HCV RNA 量の低下率が一致していることを確認した。以上の結果、この樹立した細胞の蛍光強度を測定することにより、HCV RNA の複製レベルを定量化することができることが分かり、抗 HCV 剤の活性評価を簡便に行える細胞培養システムであることが明らかとなった。

1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作製とその性質：全長 HCV-O (1b 型) RNA を OR6c と RSc 治癒細胞(異なる全長 HCV RNA 複製細胞クローン由来)に導入すると、OR6c 細胞では HCV-O RNA の複製が活発に起こるが、RSc 細胞ではほとんど複製しないことが分った。しかしながら、これとは対照的に JFH1-(2a 型)RNA を OR6c 細胞に導入した場合は JFH1 RNA の複製が起こらず、RSc 細胞に導入した場合にのみ JFH-1 RNA の複製が起こることが観察された。また、JFH-1 RNA を導入した RSc 細胞からは、長期間(少なくとも5ヶ月間)感染性の HCV 粒子の産生が認められた。以上の結果、OR6c 細胞では HCV-O RNA が効率的に複製し、RSc 細胞では JFH-1 RNA が効率的に複製することが明らかとなり、両者に細胞指向性が存在することが示唆された。

HCV RNA の複製効率に関与すると考えられる3種類のシスエレメント(5'UTR, CRE, and 3'UTR)の塩基配列を HCV-O RNA と JFH1-RNA で比較すると、それぞれ26塩基、6塩基、4塩基(3'Xのみ)異なることから、それぞれの部分をお互いに置換した7種類(計14種類)のキメラ HCV-O RNA およびキメ

ラ JFH-1 RNA を作成した。キメラ HCV-O RNA は OR6c 細胞に、キメラ JFH1 RNA は RSc 細胞に導入し、9日目にコア蛋白質の発現量をウェスタンブロット法により解析した。その結果、キメラ HCV-O RNA の場合は、JFH-1 由来の CRE を置き換えても、HCV RNA の複製にはそれほど影響が生じなかったが、5'UTR を JFH-1 のものに置き換えた場合には、HCV RNA の複製レベルがかなり低下し、3'UTR を JFH-1 のものに置き換えた場合には HCV RNA の複製は起こらなくなることが分った。このような HCV RNA 複製抑制効果はキメラ JFH-1 RNA においても観察された。特に、3'UTR を置換するとその効果が顕著に観察された。しかしながら、CRE を HCV-O のものに置換した場合には、逆に野生型 JFH-1 よりも HCV RNA の複製効率が上昇していることも明らかとなった。このような現象は、キメラ JFH-1 HCV 導入細胞から産生されるキメラ HCV 粒子の量(コアタンパク質を定量)と RSc 細胞への感染性を調べることによっても確認された。HCV-O 由来の CRE を有するキメラ JFH-1 RNA を導入した RSc 細胞では、野生型 JFH-1 RNA 導入細胞より約4倍のコアタンパク質が導入後6日目の培養上清より検出され、感染性 HCV 粒子の量も野生型 JFH-1 よりも多いことが分った。

#### (7) 抗 HCV 薬の探索

HCV 感染増殖細胞系でのスクリーニング：恒常的に HCV 粒子を産生する H751JFHZeo の培養上清を、Huh7.5.1 細胞に添加し培養したところ、上清中に Core 蛋白質が放出されることが、ELISA キットを用いて確認できた。培養上清を Huh7.5.1 細胞に感染させることを繰り返して、力価の高いウイルス液を得た。Huh7.5.1 細胞を 96 穴プレートにまき、ウイ

ウイルス液を加え培養し、上清中に放出されたウイルス RNA の real-time RT-PCR による検出を試みた。種々の RNA 精製法、定量法を検討した結果、培養上清を PCR チューブに移しウイルス粒子を吸着させ、そのまま one-step real-time RT-PCR を行うことで簡便に検出できることがわかった。また細胞内コア蛋白質を免疫蛍光抗体法にて検出すると、感染後 2 日目より陽性細胞が見え始め、5 日目にはほぼ 100% の細胞がコアを発現していた。cell-based ELISA 系を検討したところ、peroxidase 標識の二次抗体を用いることにより、比色による細胞内 Core 蛋白質の測定が十分可能であった。real-time RT-PCR および cell-based ELISA の測定値は、市販の Core ELISA キットの値と良く相関し、抗 HCV 薬のスクリーニングへの応用が可能であると考えられた。既存の制がん剤や各種阻害剤からなる阻害剤キットを使ってスクリーニングを行った結果、既に HCV の複製を阻害することが報告されている CsA は real-time RT-PCR においても、cell-based ELISA においても強い活性を示し、両系が抗 HCV 薬のスクリーニングに応用できることがわかった。その他 Hsp90 阻害剤、エストロゲン受容体モジュレーター、代謝拮抗剤などが阻害活性を示した。

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：バクテリア培養上清の濃縮物を DMSO で可溶化し、それをルシフェラーゼレプリコン細胞に添加、その後、3 日間培養を続けた後にウイルスゲノム活性をルシフェラーゼ活性を指標にして解析した。これまでに約 5000 種類の上清を解析して、150 種類に抗ウイルス活性のあるのを見いだした。同時にこれらの上清の細胞毒性を解析し、2 種類に毒性が少なく、しかしウイルス複製を抑制することを見いだした。

CsA 誘導体による抗 HCV 効果：CsA が強く抗 HCV 効果を示すことを明らかにしたが、この効果がウイルスの遺伝子型を超えて発揮されるか否かについて調べて、現状で入手可能なレプリコン細胞は、HCV-1b と HCV-2a を基にしたものである。異なる配列からなる HCV-1b を基にしたレプリコン細胞 4 種類と HCV-2a を基にしたレプリコン細胞 2 種類について、CsA とその誘導体 NIM811 の抗 HCV 効果を調べた。その結果これらの薬剤の用量依存的にウイルスゲノム複製は抑制された。HCV-1b と HCV-2a レプリコン細胞の抑制度合いを調べると、HCV-1b では CsA の濃度が 1 マイクログラム/ml で約 10 分の 1 まで低下するのに対して、HCV-2a では 3 分の 1 に低下した。このことは両者のウイルスが CsA およびその誘導体に感受性を示すにもかかわらず、遺伝子型により差があることを示す。

#### (8) ヒト肝細胞キメラマウスモデルの作製

HBX promoter 支配下で Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVTK) 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 (GCV) 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。レプリコンシステムにおける EC50 は CsA が 0.24  $\mu$ g/ml であるのに対し、Debio-025 は 1.3  $\mu$ g/ml であった。ヒト肝細胞キメラマウスの HCV 持続感染モデルで抗 HCV 活性を調べたところ、Peg IFN と Debio-025 併用群では 14 日目までに最大で 4 log の血清 HCV RNA の低下が認められた。

#### (9) サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発

GBV-B RNA を 2 頭のタマリン肝臓に接種

したところ、2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。次に、上記タマリン由来 plasma をタマリン2頭に経肝臓接種したところ、どちらの個体においても先の実験同様に顕著なウイルス血症が認められた。この際、肝炎マーカーである ALT 値は接種後2週～3週でピークとなり、8～10週後の血中ウイルス消失と共にバックグラウンドレベルに復した。一方、同様のタマリン由来 plasma を経静脈接種すると、前述の感染個体と同程度のウイルス血症が認められるにも関わらず、ALT 値の上昇ははるかに緩やかとなりピークに達するのに接種後7～9週を要した。このことは、経肝臓による接種と比べ、経静脈による接種では肝炎惹起が遅れることを意味するものである。GBV-B は HCV 同様に肝臓のみならず血液リンパ系組織を中心に多様な指向性を示すことから、経静脈による接種では肝外組織を主としたウイルス複製がおこったことを示唆するものと考えられた。

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。昨年度は、Brightらのデータを追試する目的でマーモセットとタマリンに実験感染を行いウイルス動態の比較を行なったところ、マーモセットではタマリンの場合と比較して1～2桁程度低い血中ウイルス量を示していた。今年度は、タマリン、マーモセット両方における長期フォローアップを行ない、ウイルス・免疫応答の変化を調査した。今回調査したタマリン4頭では、

感染後約1年半の観察期間において亜急性期以後ウイルスゲノムは検出されなかった。ところが、マーモセットでは感染後約1年半を経過した時点でも、なお4頭中2頭でウイルスゲノムが検出されていることを見出した。特に、1頭は間欠的にウイルスが検出されることから、GBV-B は生体内で潜伏感染していることが示唆される。そこで、この2例における慢性感染の原因を探る目的で、抗ウイルス抗体価の推移を比較検討した。タマリン4例および亜急性期以降ウイルスが検出されなかったマーモセット2例では、感染8～12週に抗コア・NS3 抗体価どちらも急激な上昇を示し、抗体価がピークに達する時期と相反して血中ウイルスが検出限界以下となる。その後抗体価は徐々に低下していく。一方マーモセットにおける慢性感染2例では、抗体誘導が顕著に遅延していることが明らかとなった。このことは、何らかの理由でウイルス感染により誘導される宿主免疫応答が充分機能しなかったことを示唆していた。

#### D. 考察

本研究の特徴は、HCV の生活環の分子機構（ゲノム複製、粒子形成）、持続感染機構、また病原性発現機構の解明から、実験モデル系（感染性ウイルス産生細胞、レプリコンシステム、ヒト肝臓キメラマウス、GBV-B サロゲートモデルなど）の開発、改良まで、HCV 感染症の予防、治療法の開発に必要な研究を総合的に行うことである。新たな抗 HCV 剤スクリーニング系が構築されれば、化合物ライブラリー等を利用して探索研究を行うことにより創薬への応用を図る。

本年度、生活環の分子機構については、特に粒子形成機構の解析に大きな進展が見られた。すなわち、1) HCV の粒子形成過程に細胞の脂質ラフト構造が関与すること、2) ウ

ウイルス粒子に含まれるコレステロール、スフィンゴ脂質が粒子構造の安定化、感染性を保つ役割を担っていること、3) E1 蛋白質の小胞体膜上でのトポロジーが二つ存在し、一つは細胞質ループ構造をもつこと、4) コア蛋白質のオリゴマー形成には 72-91 残基の領域が必要であり、E1-コア蛋白質相互作用には E1 蛋白質の 312-315 残基の 4 残基が重要であること、5) 感染性ウイルス産生には細胞内に存在する油滴の存在が重要であること、が見出された。粒子形成過程を標的とした抗 HCV 薬の開発研究は全く進んでいない。例えば、脂質代謝阻害剤、コア-E1 相互作用に重要なペプチド配列と類似した構造を有する化合物など、新たな治療薬の開発につながる可能性が期待される。

HCV コア、NS3、NS5A 蛋白と宿主因子との相互作用の解析、また比較プロテオーム解析を通じて、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、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、さらに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。今年度は、1) DDX3、vimentin がコア蛋白質と相互作用し、HCV 産生に影響を与えること、2) コア蛋白がミトコンドリアに局在し、prohibitin 等のミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていること、3) NS5A と Syk が会合し、Syk のチロシンキナーゼ活性及び Syk 下流シグナル伝達分子 PLC- $\gamma$ 1 の活性化を阻害すること、などを明らかにした。

持続感染機構については、従来の報告とは異なり、NS3-4A 蛋白は TRIF を切断することができず TRIF を介するシグナル経路を抑制しないことを明らかにした。また、ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株の HCV

感受性を調べ、CTL 誘導、NK 活性化の機構解析系を確立中である。

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。今年度は、1) レプリコンシステムにおいて、NS3 領域の適応変異の組み合わせで HCV RNA の複製がさらに高まること、2) これらの適応変異は HCV RNA 複製細胞の長期培養（2年）により出現し蓄積されること、3) Lipid-rich albumin を加えた無血清培地により HCV RNA 複製細胞を長期に培養でき抗 HCV 剤の活性評価にも有効であること、4) 可視化遺伝子を利用して生細胞のまま蛍光強度を測定するシステムが抗 HCV 剤のアッセイ系としても有効であること、5) HCV-O(1b)RNA と JFH1(2a)RNA の複製には細胞指向性があること、などを見出した。

HCV はヒトとチンパンジーにしか感染しないため、HCV 感染のメカニズム解析などを行う HCV 感染モデル動物としてチンパンジーが使用されているが、コストや倫理上の問題が存在するため代替するモデル動物の樹立が強く求められている。そこで本研究では、HCV 研究に有用な動物実験モデルの開発、改良を目指して、1) ヒト肝臓キメラマウスの改良と2) 新世界サルによるサロゲートモデルの開発、に取り組んでいる。

現行の uPA/SCID を利用したヒト肝臓キメラマウスではゲノムがタンデムに導入されているため、一部の肝細胞において組換えによって導入された遺伝子が抜け落ちることが知られている。これにより uPA 遺伝子の脱落したマウス肝細胞が増殖しヒト肝細胞を排除するためマウス肝細胞のヒト肝細胞への置換率が低下する。この問題点を解決するため本研究では、マウスの肝細胞死を誘導する新たな

系の開発を行っている。肝臓特異的な promoter である HBX promoter の下流に HSVTK 遺伝子をつないだコンストラクトを導入した Tg マウスであり、これにより、GCV を投与することによって任意の時期に肝細胞死を誘導出来る。これまでに HBX pro-HSVTK 発現ベクターを SCID マウスに導入した Tg マウスの作出に成功した。

一方、急性及び慢性肝炎の病態モデルとして、HCV に最も近縁の GBV-B を用いたタマリン、マーモセットモデルの開発を行っている。これまでに、GBV-B/タマリン急性感染実験における解析結果より、GBV-B は HCV と同様、肝臓だけでなく脾臓やリンパ節、生殖器などの多様な組織にて感染・増殖する、いわゆる pleiotropism (多指向性) の特性を有することが明らかとなり、またマーモセットが1年以上の長期にわたり GBV-B ウイルス血症および持続的抗ウイルス抗体を伴う慢性感染を呈することを世界で初めて見出した。

このような、HCV の生活環、病原性発現機構などの基盤的研究、新たな培養細胞実験系及び動物モデルの開発に加え、抗 HCV 薬のスクリーニングを含む創薬シーズの探索研究を行っている。

下遠野、小原らによって、CsA が強い HCV RNA 複製阻害活性を有することが知られているが、今回、CsA の誘導体の薬効評価から興味深い成績が得られた。CsA は免疫抑制作用に加え腎障害や高血圧によるサイクロスポリン脳症を起こすために、安全な使用には厳密な血中濃度のコントロールが必要となり、特定の施設以外では使用が難しい薬剤である。CsA の抗 HCV 作用はサイクロフィリンの抑制によるものであり、カルシニューリンと結合しない免疫抑制作用の無い CsA 誘導体が HCV の治療薬となりうる可能性があるかどうかを検討された。その結果、1) レプリコン

システムにおいて、CsA の EC50 が 0.24  $\mu$ g/ml であるのに対し、CsA の誘導体で免疫抑制活性のない Debio-025 では 1.3  $\mu$ g/ml であった。2) ヒト肝臓キメラマウスによる HCV 感染実験系において、Peg IFN と Debio-025 併用群では 14 日目までに最大で 4 log の血清 HCV RNA の低下が認められた。これに対し Peg IFN/CsA 併用群では 1 週以内にすべてのマウスが死亡した。3) 遺伝子型 1b、2a レプリコンを使って CsA 及び誘導体 NIM811 の効果を調べたところ、両薬剤とも用量依存的な抗 HCV 活性が認められるものの、遺伝子型の違いにより効果に差が認められた。免疫抑制作用の無い CsA 誘導体は単独でも抗ウイルス活性を持ち、インターフェロンとの併用では相乗効果を示すことより、今後の有望な治療薬の 1 つと考えられる。今後副作用の少ないサイクロフィリン阻害薬が HCV の治療薬となる可能性がある。

HCV JFH-1 株の感染増殖細胞系を基盤とした、HCV 全生活環を標的とする薬剤スクリーニングを進めている。これまでに、Hsp90 阻害剤、エストロゲン受容体モジュレーター、代謝拮抗剤などで強い HCV 増殖阻害作用が観察されている。また、レプリコン細胞で HCV RNA 複製阻害作用のない糖鎖修飾阻害剤の中にも抗 HCV 活性が認められた。従来抗 HCV 化合物とは異なる作用機序を持つ創薬シーズが見出されるものと期待される。

## E. 結論

以下の研究成果を得た。

(1) HCV 複製増殖機構の解析：

- 1) HCV 粒子表面の脂質成分が粒子構造保持、感染性に重要であることを示した。
- 2) E1 蛋白質の小胞体膜上トポロジー、コア-E1 蛋白相互作用等の様式を明らかにした。
- 3) 感染性ウイルス産生には細胞内に存在す



る油滴の存在が重要であることを見出した。

4) HCV RNA 複製を調節する分子シャペロン CCT の作用機序を解析した。

(2) HCV 病原性発現、持続感染機構の解析：

1) コア蛋白と DDX3、vimentin の相互作用、ミトコンドリア蛋白の発現変動を示した。

2) NS5A と Syk との結合、Syk チロシンキナーゼ、PLC- $\gamma$ 1 の活性阻害を明らかにした。

3) ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株の HCV 感受性を解析した。

(3) 新たな実験モデルの開発：

1) HCVRNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム、生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを評価するシステム、1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスを作製した。

2) ヒト肝臓キメラマウスの改良を目指して肝細胞死誘導 Tg マウスを作出した。

3) GBV-B サロゲートモデルにおいて、ウイルス感染経路が病態に影響すること、マーマセットにおける持続感染例を見出した。

(4) 抗 HCV 薬スクリーニングと創薬シーズの探索：

1) HCV JFH-1 株の感染増殖系、ルシフェラーゼレプリコン細胞系を用いて抗 HCV 薬スクリーニングを行った。

2) 創薬シーズとして、シクロスポリン誘導体、糖鎖修飾阻害剤を見出した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* (in press).

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, and Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1174-1185 (2007).

Moriishi K., Suzuki T., Koike K., Matsuura Y., et al. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1661-1666 (2007).

Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).

Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim C-K, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.* 80: 11265-11273 (2006).

Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated

- by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* 25: 5015-25 (2006).
- Baek K-H, Park H-Y, Kang C-M, Kim S-J, Jeong S-J, Hong E-K, Park J-W, Sung Y-C, Suzuki T, Kim C-M, and Lee C-W. Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J. Mol. Biol.* 359: 22-34 (2006).
- 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* 351: 381-392 (2006).
- Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, and Nishijima M. Proteomic Profiling of Lipid Droplet Proteins in Hepatoma Cell Lines Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Biochem.* 139: 921-930 (2006).
- Fukasawa M, Tanaka Y, Sato S, Ono Y, Nitahara-Kasahara Y, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, and Nishijima M. Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1958-61 (2006).
- Suzuki T, and Suzuki R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. In: *Molecular Biology of the Flavivirus*. Horizon bioscience U.K. pp. 295-312 (2006).
- Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, and Suzuki T. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J.* 397: 345-353 (2006).
- 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).
- Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimuzu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, and Braet F. Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J. Gastroenterol.* 12: 1881-1888 (2006).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 鈴木哲朗 他. 新規組換え型ヒト C 型肝炎ウイルス粒子とその産生方法. 特願 2005-287825.
- 鈴木哲朗 他. 新規 RNA 結合ペプチド. 特願 2005-300350.
- 鈴木哲朗 他. 「C 型肝炎ウイルス粒子及びその増殖法」特願 2005-054835

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HCV 複製、粒子形成機構の解析

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  
研究協力者 相崎 英樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨 HCV の粒子形成過程に細胞の脂質ラフト構造が関与すること、ウイルス粒子に含まれるコレステロール、スフィンゴ脂質が粒子構造の安定化、感染性を保つ役割を担っていることを見出した。サブユニット分子 8 量体からなる分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex (CCT) が、サブユニット CCT5 と NS5B 蛋白との結合を介して HCV 複製複合体へ取り込まれることによって HCV RNA 複製を調節している可能性を示した。

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、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 HCV の粒子形成過程の分子機構の解析を行う。その研究成果から、新たな創薬研究の分子標的が提示され、従来とは異なる作用機序を持つ治療薬の開発研究に繋がるものと期待される。

B. 研究方法

(1) HCV 粒子形成機構の解析

HCV JFH-1 株のゲノム RNA を Huh-7 細胞へトランスフェクションし培養上清から HCV 粒子を調製した。得られた HCV 粒子を methyl- $\beta$ -cyclodextrin (B-CD) 処理することによりコ

レステロール除去を行い、また shingomyelinase (SMase) 処理によりスフィンゴミエリンを加水分解させた。ウイルス検体をショ糖密度勾配遠心し各分画中のコア蛋白を ELISA 法で測定しウイルス粒子、抗原の密度分布を解析した。B-CD または SMase 処理したウイルスから超遠心法により薬剤、酵素を除去した後、naive Huh-7 細胞へ 1 時間接種した。細胞を洗浄後、3 日間培養し細胞内のコア抗原量を測定した。

(2) 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。