

(倫理面への配慮)

本研究においては医学研究倫理審査委員会への申請、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

(1) HCV 粒子形成機構の解析

HCV の粒子形成過程に脂質ラフトが関与するかどうかを解析した。脂質ラフトは細胞の膜脂質のうち特にコレステロールとスフィンゴミエリンに富んでおり、界面活性剤不溶性膜画分に分画される特徴があることが知られている。そこで、HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白と脂質ラフトの関係を明らかにするため、HCV 感染増殖細胞中での HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白の界面活性剤可溶性について調べた。HCV 感染増殖細胞の中で HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白は無処理では膜画分に存在するが、低温下 TritonX-100 処理を行っても、その一部は抵抗性の膜画分に存在することが示された。このことは、HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白の一部は脂質ラフト上に存在することを示唆している。

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に比べ、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。

次に、HCV 粒子（表面）に存在すると考えられる脂質ラフトが粒子構造、感染性へ及ぼす影響を調べた。JFH-1 感染性クローン導入細胞から産生された HCV 粒子をコレステロール除去薬剤である B-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。さらに、ウイルスの感染性は B-CD の濃度依存的に低下した。このような B-CD 処理による HCV 粒子の構造変化、感染性低下は、B-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た。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。

(2) HCV RNA 複製機構の解析

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。

D. 考察

HCV 生活環の分子機構について、特に粒子形成機構について以下の知見が認められた。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、である。HCV はゲノム配列が多様で、大変変異しやすいウイルスである。そのエンベロップ蛋白のアミノ酸配列を変えて宿主の免疫系から逃れ慢性持続感染を起こしていると考えられているだけでなく、抗ウイルス剤に対する耐性ウイルスの出現も報告されている。本研究の成果から、コレステロール、スフィンゴ脂質の代謝系をモジュレートすることにより HCV 粒子形成過程を阻害しうる可能性が考えられる。また、血中に存在する HCV 粒子から効率よくコレステロールが除去できれば二次的な感染増殖を防ぐことができるかもしれない。このような戦略で開発される抗 HCV 剤は耐性ウイルスが出現しにくい治療薬につながるものと期待される。

E. 結論

(1) HCV 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) 分子シャペロン 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 HCV RNA 複製を調節する可能性を示した。

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

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 ゲノム自立複製細胞およびウイルス感染培養細胞を用いて複製の制御機構とウイルス産生の解析をした。その過程で、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明らかにした。この成果は新たな抗 HCV 剤開発に向けた研究に寄与すると考えられる。

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およびウイルス感染複製系を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析行う。

B. 研究方法

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

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立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用いてアッセイを行う。

(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。

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する。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る。

C. 研究成果

(1) 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律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、コア蛋白質依存性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。

(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

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。

(3) シクロフィリン誘導体による抗 HCV 効果

シクロスポリンが強く抗 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、サイクロスポリンとその誘導体 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。

D. 考察

HCV ゲノム自立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な薬による抗 HCV 効果を調べた。その結果幾つかの薬に加え、細胞のシグナル系 (TGF ベータ、ERK 経路) に作用する薬剤も抗 HCV 作用を示すことが分かった。一方シクロスポリンおよびその誘導体は、抗 HCV 作用を示すものの、遺伝子型の違いにより効果に違いが見られることも分かった。

E. 結論

現在慢性 C 型肝炎患者に対する PEG-インターフェロンとリバビリンを併用することによる治療成績は5割近くになっており、HCV 感染は治療できると疾患のひとつであるといえる。今後、新規な抗 HCV の開発がウイルス複製系を用いて盛んに行われ、いい薬が生まれると信ずる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.
- Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.
- Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Epigenetic

- silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 :869-878, 2006
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* 80 :3332-3340, 2006
- Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR, Nakayama J, Okano M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells.* 11(7):805-814, 2006.
- Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Biol Chem.* 281(30):20788-20800, 2006.
- Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):988-994, 2006.
- Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):879-884, 2006.
- Suzuki H, Kaneko H, Tamai N, Miyano-Kurosaki N, Hashimoto K, Shimotohno K, Takaku H. Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 49:339-340, 2005.
- Hamazaki H, Ujino S, Abe E, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. RNAi expression mediated inhibition of HCV replication. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 48:307-308, 2006.
- Komohara Y, Yano H, Shichijo S, Shimotohno K, Itoh K, Yamada A. High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol.* 37(8-9):327-332, 2006.
- Hamazaki H, Takahashi H, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of hcv replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(7):801-805, 2006.
- Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
- Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007

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からの発症予防に関する基盤研究
HCV 宿主蛋白質—宿主因子相互作用の網羅的解析

分担研究者 西島 正弘 国立感染症研究所 細胞化学部

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質はウイルス産生及び病原性発現に密接に関連している。我々は HCV の産生及び病原性に関与する宿主因子の探索を目的として、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。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の産生機構及び病原性発現機構についてはいまだ不明の点が多く、治療ターゲットとなり得ていないのが現状である。そこで、今までほとんど試みられてこなかったプロテオミクスの解析手法を用いることで、HCV 産生及び病原性発現に関与する宿主因子を探索することを本研究の目的にする。これにより、HCV 産生機構及び病原性発現メカニズムの一端が明らかにされることが期待され、新規メカニズムを有する治療薬開発へ展望を開くことができると考えている。

B. 研究方法

HCV のコードするタンパク質の中でコアタンパク質はウイルス産生及び病原性発現に

密接に関連している分子である。そこで我々は HCV コアタンパク質に焦点を当て、コアタンパク質発現により変動する宿主タンパク質のプロテオーム解析を培養肝細胞系を用いた。培養細胞は、HepG2 細胞由来の Heps wx（コントロール用コアタンパク質非発現細胞）、Hep39 細胞（コアタンパク質発現細胞）、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タンパク質非発現細胞）、Uc39-2 及び Uc39-6 細胞（コアタンパク質発現細胞）を用いた。昨年度は、HCV コアタンパク質の主要な細胞内局在部位である脂肪滴を用い比較プロテオーム解析をおこなったが、今回は同じくコアタンパク質の主要局在部位である界面活性剤不溶性画分を用い比較プロテオーム解析を行った。具体的には、以下のように行った。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タンパク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・非発現細胞のタンパク質パターンを比較した。発現量に変動が見られたタンパク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)によりタンパク質を同定した。

同定されたタンパク質分子の生化学的・細胞生物学的解析は以下のように行った。

各タンパク質の発現量の解析はイムノブロット法を用いた。

コアタンパク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。

コアタンパク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。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床材料・実験動物等を用いていない。そのために倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

(1) DDX3 分子の HCV 産生への影響

昨年度の脂肪滴画分を用いた比較プロテオーム解析により、コアタンパク質発現細胞で脂肪滴に分布するようになるタンパク質として同定した DDX3 分子について、更に解析を行った。

Hep39、Uc39-2、Uc39-6 細胞など複数のコアタンパク質発現細胞で脂肪滴への DDX3 の分布が見られた。さらに、全長レプリコン含有培養細胞系、HCV (JFH-1 株) 感染細胞系

においても DDX3 の脂肪滴分布が見られた。

コアタンパク質発現細胞では、DDX3 の脂肪滴への分布のみならず DDX3 蛋白質量の上昇も見られた。この現象はコアタンパク質の複数の genotype で共通に見られた。一方で DDX3 の mRNA レベルでの変化は見られず、タンパク質レベルでの安定化が考えられた。DDX3 はコアタンパク質と相互作用することも示され、この相互作用が、DDX3 安定化に寄与していることもわかった。

コアタンパク質発現培養細胞において、DDX3 発現量を siRNA により抑制すると、コアタンパク質量が有意に減少することがわかった。更に、ウイルス感染培養細胞系を用い、DDX3 発現量を siRNA により抑制すると、ウイルス産生が強く阻害されることが明らかとなった。

(2) 界面活性剤不溶性画分の比較プロテオーム解析

Uc321 及び Uc39-6 細胞の界面活性剤不溶性画分を用いた比較プロテオーム解析を行った。この画分には主に核タンパク質、細胞骨格系のタンパク質が濃縮される。解析の結果、Uc39-6 細胞 (コア蛋白質発現細胞) において vimentin の顕著な減少、ケラチン 19 の増加を見いだした。また、複数の hnRNP 分子にも変動が見られた。

(3) vimentin 分子の HCV 産生への影響

界面活性剤不溶性画分において変動が顕著であった vimentin について更に解析を行った。

vimentin 量の減少は Uc39-2、Hep39 など複数のコア蛋白質発現細胞系でも再現された。しかし、コアタンパク質の一過的な細胞への発現では vimentin の低下は見られなかった。逆に、vimentin の一過性の発現抑制で、コアタンパク質の発現量が有意に上昇することが

明らかとなった。更に、ベクターで vimentin 遺伝子を導入した vimentin 高発現株ではコアタンパク質量が低いこともわかった。これらの条件ではコアタンパク質の mRNA 量には変動が見られなかった。

vimentin とコアタンパク質が細胞内で相互作用することも明らかとなった。

これらの結果を踏まえ、ウイルス感染培養細胞系を用い、ウイルス産生に対する vimentin 発現量の影響も検討した。vimentin 発現量を siRNA により抑制すると、ウイルス産生量が上昇し、ベクターにより vimentin を過剰発現した細胞ではウイルス産生量が低下していることが明らかとなった。

D. 考察

DDX3 の宿主細胞内変動はコアタンパク質発現細胞のみならず HCV 感染細胞でも見られ、HCV 感染時においても重要な宿主応答と考えられた。実際に、DDX3 の発現抑制が HCV 産生阻害を示すことから、DDX3 がウイルス産生過程で重要な役割を果たしていることがわかった。どの様な過程に DDX3 が関与しているかは今後の課題であるが、結合を介してコアタンパク質自身を安定化（・局在化）しているのか、あるいは DDX3 の生物活性（ATPase/RNA helicase 活性）がウイルス産生に重要な役割を果たしていることが考えられる。

複数のコアタンパク質発現細胞で vimentin 量の低下が認められたが、予想外に一過性のコアタンパク質発現系では vimentin の低下が見られなかった。逆に細胞内 vimentin 量がコアタンパク質量に影響を与えることがわかり、両者の細胞内量は逆相関した。この結果は我々が用いた細胞株では vimentin 発現量が元々低かった為に、コアタンパク質量が高く維持されやすく分離に都合が良かったことが原因か

もしれない。コアタンパク質の安定発現株は非常に樹立しにくいことが知られている。一般に増殖の良い培養細胞は vimentin の発現量が非常に高いので、このことと何らかの関連があるかもしれない。

vimentin 発現量によるコアタンパク質量の変動は、コアタンパク質の mRNA レベルでの変動でないことから、vimentin—コアタンパク質相互作用を介したタンパク質レベルの変動メカニズムが考えられ、今後更に解析をしたい。

vimentin 発現量がコアタンパク質量に影響を与えることから、（予想通り）vimentin 発現量がウイルス産生にも影響を与えることがわかった。このことから、vimentin 量を抑制することでより HCV 産生能の高い培養細胞を樹立できる可能性が示唆されるし、逆に vimentin 量を上げるような条件ではウイルス産生を抑制することができると考えられ、興味深い。

以上より、これら見いだした宿主因子（DDX3、vimentin）が関与する生体応答過程が HCV 治療薬の標的となる可能性があり、将来的に新たな治療薬開発につながる可能性が示唆される。

E. 結論

プロテオミクスの手法を用い HCV コアタンパク質発現により変動する宿主脂肪滴及び界面活性剤不溶性画分タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、大きく変動する分子として DDX3、vimentin を同定した。両分子ともコアタンパク質と相互作用し、HCV 産生に影響を与えることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *J. Biochem.* 139: 921-930, 2006

Fukasawa M, Tanaka Y, Sato S, Ono Y, Nitahara-Kasahara Y, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, Nishijima M. Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol. Pharm. Bull.* 29(9): 1958-61, 2006

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.* 81(3): 1174-1185, 2007

2. 学会発表

Fukasawa M, Tanaka Y, Ono Y, Sato S, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, Nishijima M. Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.

Shoji I, Shirakura M, Ichimura T, Murakami K, Shimoji T, Suzuki R, Suzuki T, Fukuda K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M. Miyamura T. E6-associated protein mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, 2006.

笠原 (仁田原) 優子, 大内史子, 深澤征義, 花田賢太郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 西島正弘. C型肝炎ウイルス(HCV)コア発現細胞にお

ける vimentin の減少. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006.

深澤 征義, 田中康仁, 佐藤慈子, 笠原 優子, 鈴木 哲朗, 宮村 達男, 花田 賢太郎, 西島 正弘. C型肝炎ウイルスコア蛋白質発現培養肝細胞における脂肪酸生合成の上昇. 日本薬学会第127年会, 富山, 2007.

笠原 優子, 深澤 征義, 中村 成夫, 下遠野 久美子, 村上 恭子, 鈴木 哲朗, 宮村 達男, 花田 賢太郎, 西島 正弘, 増野 匡彦. フラーレン誘導体によるC型肝炎ウイルス(HCV)産生の阻害. 日本薬学会第127年会, 富山, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

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

分担研究者 堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）非構造タンパク質 NS5A 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。そこで、HCV 感染が Syk に対して何らかの影響を及ぼしていると考え、培養細胞を用いて HCV 各タンパク質と Syk を共に発現させて免疫沈降を行い、両者の相互作用について検討した。その結果、HCV NS5A 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- γ 1 のリン酸化も抑制された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は持続感染し高率に肝細胞がんを引き起こすが、発がん機序については未だ不明な点が多い。HCV 非構造タンパク質 NS5A はこれまで p53 や Src ファミリー・チロシンキナーゼなど様々なタンパク質と会合することが報告されている。一方、Syk は非受容体型チロシンキナーゼで、血液細胞、内皮細胞、肝細胞などで広く発現している。Syk は2つの SH2 ドメインを有しており、抗原レセプター複合体の ITAM(Yxx[L/I]_{x6,8}Yxx[L/I])と呼ばれる配列に結合する。近年、乳がん等のがん抑

制タンパク質として注目を集めている。

本研究では HCV タンパク質 NS5A と Syk の相互作用について検討し、HCV による発がん機構に Syk が関与しているか否かを解明することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 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。

(2) タンパク質の発現と会合の解析：HCV (Con1 株) の各タンパク質を単独発

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 タンパク質と Syk との会合の有無を調べた。

(3) 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- γ 1 のリン酸化に NS5A が関与しているかを調べるため、PLC- γ 1 リン酸化特異抗体を用いてウエスタンブロット法で調べた。

(倫理面への配慮)

ヒト肝組織は、HCV 感染あるいは非感染の肝がん患者から治療目的で摘出し病理検査に供したものをを用いた。組み換え遺伝子を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) HCV 感染及び非感染のヒト肝組織(非がん部)を抗 Syk 抗体を用いて免疫染色したところ、非感染肝細胞においては細胞質全体にびまん性に発現しているのに対し、HCV 感染肝細胞では細胞膜辺縁に粗大顆粒状に局在していることがわかった。

(2) 肝がん由来 Huh7 細胞では Syk が発現していないため、各 HCV タンパク質と Syk を一過性に強制発現させ相互作用について検討したところ、HCV NS5A が Syk と強く会合することがわかった。NS5A 以外の HCV タンパク質はほとんど

Syk と会合しなかった。

(3) 次に、NS5A の種々の欠失変異体を作製し Syk 会合領域の解析を行ったところ、NS5A の N 末端領域である aa 1-126 と aa 147-175 が Syk 結合責任領域であることがわかった。Syk は ITAM (Yxx[L/I]_{x6-8}Yxx[L/I]) と呼ばれる配列に会合することが報告されているため、NS5A 内の ITAM 類似配列 (Y¹¹⁸VEV¹²¹TRVGDFHY¹²⁹) の Y118F の単一アミノ酸変異体および Y118F と V121A の二アミノ酸変異体を作製し会合の有無を検討したところ、両者とも Syk と会合した。これらのことから、NS5A と Syk の会合は ITAM 類似配列を介さないと考えられた。

(4) Syk のキナーゼ活性への影響を見るために NS5A と Syk を共発現させ、*in vitro* kinase assay をおこなったところ、全長 NS5A および aa 1-302 変異体では Syk キナーゼ活性が抑制された。一方、Syk 会合領域を含むが PKR 結合領域を含まない NS5A aa1-236 変異体ではキナーゼ活性の抑制は見られなかった。

NS5A の Syk キナーゼ活性に及ぼす影響をさらに調べるため、Syk の Tyr³⁵² 特異的リン酸化抗体および Tyr^{525/526} 特異的リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法を用いて解析したところ、NS5A により Syk の Tyr³⁵² および Tyr^{525/526} のリン酸化が抑制されることがわかった。

(5) Syk の下流シグナル伝達分子である PLC- γ 1 のリン酸化も NS5A 共発現下で抑制された。HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞においても、NS5A と Syk

が会合し、Syk のキナーゼ活性が抑制された。

D. 考察

Syk は、HCV 非感染のヒト肝臓組織において、肝細胞の細胞質全体にびまん状に発現しているのに対し、HCV 感染肝臓組織では細胞膜近辺に粗大顆粒状に局在することが明らかになった。

Huh7 細胞に一過性に発現させた NS5A は Syk と会合し、Syk のキナーゼ活性を抑制した。また、NS5A の Syk 会合部位は N 末端領域 (aa 1-175) であり、Syk キナーゼ活性の抑制には、さらに PKR 結合領域 (aa 236-302) の関与が必要であった。NS5A (aa 343-356) は、Src ファミリーの非受容体型チロシンキナーゼである Lyn や Fyn の SH3 領域と会合し、キナーゼ活性を抑制もしくは活性化すると報告されている。Syk は 2 つの SH2 領域を持っており、これらが抗原レセプター複合体の ITAM 配列に会合し、2 つのチロシン残基をリン酸化する。NS5A はこの ITAM 類似配列を持っているが、Syk との会合には関与しなかった。これらの事から NS5A と Syk の会合様式は既知のものとは異なると考えられた。また、NS5A による Syk キナーゼ活性の抑制には、次のようなことが考えられた。すなわち、NS5A の N 末端 (aa 1-175) で会合した後、①NS5A (aa 236-302) が Syk のキナーゼ領域に近づき、直接的にキナーゼ活性を阻害する。②NS5A (aa 236-302) に会合した他の分子が、Syk のキナーゼ活性を抑制する。③NS5A が Syk に会合したことにより Syk の構造変化が起こり、酵素活性が失われる。

Syk の細胞内シグナル伝達は B リンパ

球や Fc 受容体について報告されているが、肝細胞については未だ報告されていない。我々は Syk を一過性に発現する Huh7 細胞にソルビトール刺激を行い、内因性の PLC- γ 1 のリン酸化を誘導した。その結果、免疫細胞の場合と同様、肝細胞においても PLC- γ 1 が Syk のシグナル伝達下流分子であることが明らかとなった。Syk の Tyr³⁴⁸Tyr³⁵² のリン酸化が LAT、SLP-76、PLC- γ 1 および PLC- γ 2 のリン酸化を誘導し、それにより Ca²⁺流入の活性化が誘導されることが報告されている。我々は PLC- γ 1 のリン酸化に関与している Syk Tyr³⁵² のリン酸化を NS5A が抑制し、PLC- γ 1 のリン酸化も抑制することを明らかにした。しかしながら、Ca²⁺濃度の変化については未だ明らかにしておらず、今後検討していきたいと考えている。また、Syk のキナーゼ活性や PLC- γ 1 のリン酸化活性が HCV 増殖及び HCV RNA 複製にどのような影響を及ぼしているかについても検討していきたい。

E. 結論

乳がん抑制タンパク質として知られている非受容体型チロシンキナーゼ Syk がヒト肝臓において発現しており、HCV 感染によりその発現形態が変化することがわかった。さらに培養細胞内で HCV 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である PLC- γ 1 の活性化を阻害することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K, Hotta H. Non-structural protein 4A of

- Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 87:1935-1945, 2006.
- Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, Hotta H. 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* 87:1703-1713, 2006.
- Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sada K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25:3618-3626, 2006
- Kim KI, Kim SR, Sasase N, Taniguchi M, Harada S, Kinoshita K, Kim SH, Akimoto Y, Shikata M, Kimura N, Izawa S, Ohtani A, Nakao K, Motojima M, Kinoshita M, Hirai M, Ohzu M, Hirooka T, Nabeshima S, Ishii F, Tanaka K, Hotta H. 2'-,5'-Oligoadenylate synthetase response ratio predicting virological response to PEG-interferon-alpha2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharm Ther* 31:441-446, 2006.
- Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat* 14:96-106, 2007.
- El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim S R, and Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pretreatment sera. *Microbiol Immunol* (in press)
- Lu L, Li C, Fu Y, Thaikruea L, Thongswat S, Maneekarn N, Apichartpiyakul C, Hotta H, Okamoto H, Netski D, Pybus O G, Murphy D, Hagedorn C H, and Nelson K E. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J Gen Virol* (in press)
2. 学会発表
- Inubushi S, Nagano-Fujii M, An Chunying, Kitayama K, Yokozaiki H, Yamamura H, Ikeda M, Kato N, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein associates with and negatively regulates a non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, 2006.
- El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sada K, Kim S R, Hotta H. A high degree of sequence variation of HCV NS5A and the presence of anti-NS5A antibodies in the pretreatment sera are association with efficient ciral

clearance by combination therapy using pegylated interferon and ribavirin. 13th International Meeting oh Hepatitis C and Related Viruses, Cairns, 2006.

Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Yamamura H, Sada K, Hotta H. Kinase activity of the non-receptor tyrosine kinase Syk is down-regulated in Huh7.5 cells harboring an HCV RNA subgenomic replicon. 13th International Meeting oh Hepatitis C and Related Viruses, Cairns, 2006.

El-Shamy A, 笹山美紀子, 長野基子, 金守良, 定清直, 堀田博. 慢性 C 型肝炎に対するペグインターフェロン/リバビリン併用療法早期治療効果と NS5A のアミノ酸配列多様性及び血中 NS5A 抗体の有無との相関. 第 58 回日本細菌学会関西支部総会, 大阪, 2006.

犬伏祥子, 長野基子, 北山喜久美, 定清直, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染が非受容体チロシンキナーゼ Syk に及ぼす影響, 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006.

El-Shamy A, 笹山美紀子, 長野基子, 金守良, 定清直, 堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A のアミノ酸配列多様性及び血中 NS5A 抗体の有無とペグインターフェロン/リバビリン併用療法早期治療効果との相関について, 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006.

G. 知的所有権の取得状況

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事業）
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盤研究

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学 教授

研究要旨：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 活性化能の関係を解析中である。

A. 研究目的

樹状細胞は成熟化すると Natural killer (NK) 細胞・細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化する。この活性化にウイルス感染を感知して宿主細胞に type I interferon (IFN) を誘導させる機構が関与する。本研究では C 型肝炎発症に関与するウイルス、宿主側の要因を解明し、HCV の IFN 誘導機構と抗ウイルス NK に指向性をもつ樹状細胞を誘導させるメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. HCV 感染により樹状細胞・肝実質細胞が IFN を誘導するか、HCV の感染認識が上記細胞において TLR3, RIG-I, MDA5 のいずれの経路によって起こるか、を明らかにする。これらのアッセイ系は当講座で確立されている。

2. 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する。

(倫理面への配慮)

Huh7.5.1 に感染する HCV の亜株を脇田博士より恵与を受けた。他のヒト試料とともに倫理委員会の承認を得た。他に倫理的配慮を要

するものはない。

C. 研究結果

1. ヒト myeloid 樹状細胞は脇田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 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 (PNAS 2007)。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。

2. 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 (Int Immunol 2007)。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。

D. 考察

HCV は樹状細胞に感染しないので、ワクチン投与の際抗原を（非感染性に）endosome に取り込む経路を使う必要がある。この経路は TLR3-TRIF を使うことが分かっている。このとき、アジュバントを併用して TLR3 を活性化すると CTL/NK を効率よく誘導できるはずである。ワクチン株については in vitro で樹状細胞の maturation を評価し、必要であれば MLR で allostimulatory capacity と DC-NK interaction を評価するとワクチンの有効性を査定できる。樹状細胞（DC）の抗 HCV CTL 誘導能の評価系も確立したい。MHC tetramer や CTL 活性の他に B3Z などの CTL 定量系を検討中である。ウイルス感染による NKG2D ligand である ULBP などの発現上昇を抗体で査定する系を確立したので、感染細胞について NK の感受性と相関するかを検討しよう。

E. 結論

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。

F. 研究発表

G. 知的所有権の取得状況

なし

動物モデルの開発およびそれを用いた解析

分担研究者 小原道法 東京都臨床医学総合研究所 感染症プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究の目的は、HCV 感染症の感染機構、および発症過程の解明に役立つモデル動物を樹立し、現在までにほとんど研究が進んでいない個体レベルでの HCV 感染症の感染機構を解析する。また、HCV 複製に必要な宿主因子の同定と相互作用機序を明らかにし、薬剤耐性ウイルス株が出現しにくい抗ウイルス薬の開発を目的とする。HBX pro-HSVTKTg マウスの肝臓細胞は濃度依存的な GCV の感受性を示し肝細胞死が認められた。Replicon システムにおける EC50 は CsA が $0.24 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し、Debio-025 は $1.3 \mu\text{g/ml}$ であった。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。

A. 研究目的

HCV 感染症の感染機構、および発症過程の解明に役立つモデル動物を樹立し、個体レベルでの HCV 感染症の感染機構を解析する。HCV 複製に必要な宿主因子の同定と相互作用機序を明らかにし、宿主因子に対する阻害化合物を基に、薬剤耐性ウイルス株が出現しにくい抗ウイルス薬を開発し、HCV 感染患者からのウイルス駆除、ならびに HCV 関連疾患の発症予防及び治療に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

Hepatitis B virus X protein promoter (HBX)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 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。

(倫理面への配慮)

施設内の動物実験委員会において研究計画について承認を受けて実施した。

C. 研究結果

HBX pro-HSVTKTg マウスの肝臓細胞は濃度依存的な GCV の感受性を示し肝細胞死が認められた。Replicon システムにおける EC50 は CsA が $0.24 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し、Debio-025 は $1.3 \mu\text{g/ml}$ であった。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。

D. 考察

免疫抑制作用の無い CsA 誘導体 Debio-025 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。

E. 結論

これまでは HCV のコードするプロテアーゼや RNA ポリメラーゼが抗 HCV 薬の標的となっていた。これらの阻害剤は HCV 遺伝子の変異により速やかに耐性株が出現し、長期間使用できないといった大きな問題点がある。これに比較して、Debio-025 のような宿主因子を標的にした場合には、変異はほとんど入らないので長期に使用できるといった利点がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsunamasa Watanabe, Masayuki Sudoh, Makoto Miyagishi, Masaaki Arai, Kazuaki Inoue, Kazunari Taira, Makoto Yoshiba, Michinori Kohara. Targeting the Hepatitis C Virus genome with RNA interference using highly effective and non-toxic long double-stranded RNA. Gene Therapy 13: 883-892 (2006)

Takuya Umehara, Masayuki Sudoh, Fumihiko Yasui, Chiho Matsuda, Yukiko Hayashi, and Michinori Kohara. Serine palmitoyltransferase inhibitor

suppresses HCV replication in a mouse model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 346, 67-73 (2006).

Hironori Nishitsuji, Michinori Kohara, Mari Kannagi, and Takao Masuda. Effective Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Combination of Short- or Long-hairpin RNAs Targeting Essential Sequences for Retroviral Integration. J. Virology 80(15):7658-66 (2006).

Kazuaki Inoue, Takuya Umehara, Urs T. Ruegg, Fumihiko Yasui, Tsunamasa Watanabe, Hiroshi Yasuda, Makoto Yoshiba, Jean-Maurice Dumont, Pietro Scalfaro, Michinori Kohara. Evaluation of the cyclophilin inhibitor DEBIO-025 in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. Hepatology (2007) in press

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「ヒト肝細胞で置換された肝臓を有するキメラ非ヒト動物の作製方法」

出願日：2006年8月25日

出願番号：特願 2006-229802

HCV RNA 複製システムの改良と HCV 持続感染機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C 型肝炎の治療向上および発症予防に貢献することを目的として以下の 5 項目に関する研究を行った。（1）C 型肝炎ウイルス（HCV）RNA 複製における適応変異解析（2）HCV RNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム（3）生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを評価するシステム（4）1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質（5）HCV 持続感染機構の解析。主な研究成果を以下に示す。（1）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を明らかにした。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を明らかにした。（2）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ることを明らかにし、抗 HCV 剤の活性評価にも有効であることを示した（3）可視化遺伝子を全長 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 の複製レベルを定量できるシステムを開発し、抗 HCV 剤のアッセイ系としても有効であることを示した。（4）HCV-0(1b)RNA と JFH1(2a)RNA の複製には細胞指向性があることを示した。1b 型と 2a 型 HCV のシスエレメントを入れ換えたキメラ HCV を作成し、HCV の複製に及ぼす影響を明らかにした。（5）従来の報告とは異なり、NS3-4A 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。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年 3 万人を超えており、その 9 割以上には肝炎ウイルスの感染が認められる。特に、C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の 8 割を占めている。HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子であるが、HCV による持続感染機構については未だよく理解されていない。

肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン（IFN）しかなく、我が国における治

癒率も 30%と低い。最近ようやく、IFN との併用により効果を示すリバビリンや IFN の安定性を高めたペグ IFN が登場してきているが、それでも治癒率は 50%程度であり、依然として半数は難治性という状態が続いている。また、リバビリンには貧血などの副作用が高齢者を中心に目立つという問題もある。

HCV を体内から排除する、あるいは HCV の増殖を抑制する方法を開発するためには HCV の生活環の解明が必須である。しかしながら、現在の実験システムは HCV の生活環を研究するには不十分である。従って、現有の実験モデルの改良が必要である。そこで、本研究では、培養細胞を用いた HCV の複製増殖モデルである全長