

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 哲朗

平成20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複製増殖の分子基盤解析 -----	19
下遠野 邦忠	

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 -----	23
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 -----	29
瀬谷 司	

動物モデルの開発およびそれを用いた解析 -----	31
小原 道法	

HCV複製モデルの改良 -----	33
加藤 宣之	

C型肝炎における肝脂肪化と肝傷害・肝発癌 -----	39
小池 和彦	

FKBP8のHCV増殖における役割 -----	45
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 -----	49
深澤 秀輔	

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 -----	53
深澤 征義	

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 -----	57
明里 宏文	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	65
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	73
-----------------------	----

I . 総括研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究

主任研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

分担研究者研究要旨：本研究では、HCV 複製増殖の制御機構、持続感染機構、病原性発現の制御機構の解析、新たな実験モデルの開発、及び創薬シーズの探索を目的とした。本年度は以下の研究成果を得た。1) NS4A 結合因子 CKB を同定した。CKB は HCV 複製複合体への ATP 輸送、ATP/ADP 濃度の保持に働き、HCV RNA 複製調節に寄与することが示唆された。2) NSSA 結合因子 FKBP8 は、Hsp90 を複製複合体へリクルートすることによりゲノム複製を調節することを見出した。3) HCV 粒子表面の脂質成分が粒子構造保持、感染性に重要であり、スフィンゴ脂質生合成阻害剤により粒子形成が阻害されることを示した。4) 細胞内油滴と HCV 蛋白との会合が感染性粒子形成に重要であることを示した。5) PPARalpha がコア蛋白による肝発癌に関与することを明らかにした。6) HCV 感染に伴うグルコーストランスポーターGLUT1/2 の発現低下を見出した。7) 傷害破壊された感染細胞由来のウイルス因子が樹状細胞に取り込まれ、TLR3 依存的に NK が誘導され、T 細胞が活性化されるモデルを提唱した。8) 生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを定量できる OGF7 システムの有用性を示し、新たに急性肝炎患者血清からクローン化した HCV ゲノムの複製系を作製した。9) コレステロール生合成阻害剤 U18666A が HCV 複製細胞系、HCV 感染キメラマウスにおいて HCV 産生阻害活性を有することを示した。10) フラーレン骨格化合物の HCV ポリメラーゼ阻害作用を見出し、誘導体探索の結果、高い抗 HCV 作用を有し細胞毒性の低い新規化合物を同定した。11) HCV 感染増殖細胞系を用いて、植物代謝物、微生物代謝物、天然物誘導体、合成化合物などのライブラリーをランダムスクリーニングし抗 HCV 活性物質を 10 数種類見出した。12) GBV-B 感染マーマセットを用いて慢性 C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルを確立した。

分担研究者	深澤 征義 国立感染症研究所 室長
下遠野邦忠 千葉工業大学附属総合研究センター 専任研究員	明里 宏文 医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター リーダー
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	A. 研究目的
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	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
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	

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 ゲノム複製調節機構の解析

HCV レプリコン細胞及び parental Huh-7 細胞それぞれから、ウイルス RNA 複製活性を保持した状態で界面活性剤不溶性画分を調製し蛍光標識二次元ディフュージョンゲル電気泳動解析を行った。各蛋白スポットの量的比較を行いレプリコン細胞サンプル（複製複合体リッチサンプル）で有意に多量存在するスポットを切り出し、トリプシンでゲル内消化後、質量分析法によって蛋白同定を行った。

ヒト脳及びヒト肝臓の cDNA ライブラリーを用いて HCV の Con1 株(genotype1b)の NS5A と相互作用する宿主因子を Yeast two hybrid 法でスクリーニングし、免疫抑制剤である FK506 に結合するイムノフィリンに分類される FK506 結合蛋白質 8(FKBP8)を同定した。HCV レプリコン細胞や JFH1 株を用いた HCV 細胞培養系でのノックダウン法と定量的 RT-PCR によって、FKBP8 の HCV 複製への影響を解析した。また、FKBP8 の変異体を作製し、NS5A および Hsp90 との相互作用を検討した。免疫沈降法によって、FKBP8 との結合に必須

の NS5A 内アミノ酸残基を同定し、レプリコン RNA を用いて HCV 複製における重要性を検討した。さらに大腸菌によって組換え NS5A と FKBP8 を作製し、精製標品を調製した。それら精製標品を用いて、プルダウン法および表面プラズモン共鳴によって分子間相互作用を解析した。細胞内の NS5A と FKBP8 の局在を、共焦点レーザー顕微鏡などで解析した。

2. 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- β -cyclodextrin (β -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。 β -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。

HCV ゲノムを効率よく自立複製可能な細胞、特に、サブゲノムレプリコン複製細胞を用いて、ウイルス蛋白質の細胞内局在を解析した。さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するためにルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を用いてアッセイを行った。同時にウイルス RNA の局在についても解析した。同様の解析を、HCV 感染増殖系を用いて行った。これまでの研究から、コアは油滴と会合することが明らかにされている。そこで、コアと油滴との会合がウイルス産生にどのような役割を果たすかについて、感染性ウイルス粒子産生系を用いて解析した。具体的にはすでに感染性が証明されている HCV JFH-1 株を用いて、そのレプリコンが複製している細胞における油滴への HCV タンパク質の会合とウイルス粒子産生について調べた。

3. 病原性発現の分子機構

対象動物として用いたトランスジェニックマウス (Tg) は、HCV タンパク質そのものが肝発癌活性

を有することを証明する上で重要な動物モデルである。このマウスモデルにおいては、2か月齢でインスリン抵抗性を、3か月齢で肝脂肪化を、16か月齢で肝癌を発生する。また、このマウスでは若年時から肝細胞のミトコンドリアに機能障害を起こし、特に電子伝達系コンプレックス I の傷害によって酸化ストレスの過剰産生を起こす事が明らかになっている。PPAR α を始めとするタンパクの発現は、ウェスタンブロッティングあるいは免疫組織染色を行ない発現レベルを確認した。また、ノーザンブロッティング、Taqman PCRも適宜施行した。さらに、米国 NIH の Frank Gonzalez 博士との共同研究により、PPAR α ノックアウト(KO)マウスとコア遺伝子本 Tg との掛け合わせを行なった。

HCV 複製が細胞へのグルコース取り込みへ及ぼす影響の解析は以下のように行った。ヒト肝がん細胞 (Huh-7.5) と同細胞由来の HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR)、HCV 全長ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (FGR) 及び HCV J6/JFH-1 感染細胞を用いて、2-deoxy-D-[1,2-³H]glucose (2-DG) の取り込みを測定した。上記細胞の細胞表面の GLUT2 及び GLUT1 の発現について、各マウスモノクローナル抗体(Alpha Diagnosis)を用いて、フローサイトメトリーで測定した。対照として、トランスフェリン受容体の細胞表面発現を測定した。これらの細胞における GLUT2 及び GLUT1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により測定した。また、GLUT2 についてはルシフェラーゼをレポーター (pGL 4.23 ルシフェラーゼレポーターベクター) としたプロモーターアッセイを行った。プロモーター部分には、GenBank ID: AH002747 の-1296 ~+312 を用いた。剖検検体及び病理診断用に採取した HCV 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染肝組織並びに非感染肝組織 (いずれも非がん部) を用いて、ウサギ GLUT2 ポリクローナル抗体によって免疫染色を行った。

NS4B または NS5A 蛋白と相互作用する宿主因子は以下のように探索した。3xFLAG の後に 3xHA のタグを連結する発現ベクターを構築し、マルチクローニングサイトに HCV 遺伝子を導入した。HeLa S3 に各ウ

イルス遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、ウイルス蛋白質を安定的に発現する株を樹立した。ウイルス蛋白質発現細胞をスピナーフラスコにて培養し細胞を集め、細胞を破碎し遠心分離後、上清と核画分を得た。さらに上清は超遠心により膜画分と細胞質画分に、核画分は塩抽出により核抽出液画分と核不溶性画分に分けた。膜画分、核不溶性画分は 1% Triton X-100 処理により蛋白質を可溶化した。各画分の塩濃度を 150mM の終濃度に調整後、M2-agarose に吸着させ FLAG ペプチドで蛋白質を溶出し、さらに HA-agarose に吸着させ 100mM Glycine-HCl buffer pH2.5 で溶出した。SDS-PAGE により蛋白質複合体を各蛋白質に分離し、切り出し後、トリプシンでゲル内消化し LC-MS/MS により解析した。

4. 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した。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、をテストした。NK 活性化を付与する樹状細胞因子を同定した。

5. HCV 複製細胞系の開発、改良

(1) OGF7 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムの性能比較

抗 HCV 剤の効果を調べるために OGF7 細胞あるいは OR6 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 ずつ 24 ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤 (IFN- α 、シクロスポリン(CsA)、フルバスタチン(FLV)) を添加して 72 時間後に OGF7 細胞については細胞の蛍光強度を、OR6 細胞については細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。これらの実験は少なくとも 3 回行った。

(2) レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)の樹立

C 型急性肝炎患者 (AH1) の血清より RNA を抽出

し、RT-PCR により HCV ゲノムの前半部と後半部を NS3 領域で一部重複させるようにして増幅を行った。増幅産物（前半部と後半部）を pBR322MC ベクターに組み込み、それぞれ 3 clone ずつ塩基配列を決定して、AH1 のコンセンサス配列を決定した。

別途、後半部の増幅産物を HCV-O 株のレプリコン複製細胞を樹立した際に使用したレプリコンカセットプラスミド (Kato et al., BBRC 306;756,2003) に導入して、*Xba*I にて切断後、*in vitro* にてレプリコン RNA ライブラリーを作成した。この RNA ライブラリーを各種治療細胞 (sOc, Oc, OR6c など) にエレクトロポレーション法により導入して G418 (0.3 mg/ml) 存在下 3 週間ほど培養して細胞の選択を行った。

LightCycler を用いた RT-PCR 定量解析 (少なくとも 3 回行った)、Genomic PCR 解析、Western blot 解析、Northern blot 解析については常法に従った。

(3) AH1 株および HCV-O 株 HCVRNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果

AH1 細胞と O 細胞に IFN- α (1, 10, 100 IU/ml)、IFN- γ (0.25, 1.0, 10, 100 IU/ml) および CsA (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 μ g/ml) を添加して、72 時間後に RNA を調製した。何も添加していない細胞を対照コントロールとした。得られた RNA を用いて、RT-LightCyclerPCR にて HCVRNA 量を定量した。これらの実験は少なくとも 3 回行った。並行して、薬剤で処理した細胞から蛋白質を調製してコア抗体による Western blot 解析を行った。

6. 抗 HCV 薬の探索

試験管内 HCV RNA ポリメラーゼ (NS5B) 阻害活性は、各フラレン誘導体に対し、poly(A)-oligo(U) を鋳型、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を基質として含む反応液にリコンビナント HCV RNA ポリメラーゼタンパク質 (NS5B) を加え、37°C、1 時間インキュベートすることにより測定した。各フラレン誘導体は DMSO に溶解して用いた。

HCV の RNA 複製能に対する各フラレン誘導体の影響は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む

HCV subgenomic replicon を培養肝細胞株 Huh7 細胞に導入して 2 時間後にフラレン誘導体を添加し、2.5 日間培養後にルシフェラーゼ活性を測定する事により検討した。

HCV (JFH1 株) 産生に対する各フラレン誘導体の影響は、Huh7 細胞に HCV を 2 時間感染させ 6 時間培養後に各フラレン誘導体を培地に添加し 5.5 日間培養後、培養上清中に放出された HCV 量は HCV コア蛋白質の ELISA 法により定量、細胞内の HCV 量は HCV コア蛋白質のイムノブロットにより解析した。細胞増殖・毒性に対する各フラレン誘導体の影響は、XTT を用いた比色法により行った。

HCV 感染細胞系によるランダムスクリーニングは以下の方法で行った。HCV JFH1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させる系を用いて、ウイルス RNA を RT-PCR、また Core 蛋白質を cell-based ELISA により定量した、さらに、HCV による細胞増殖阻害効果の解除を指標としたスクリーニング系を構築した。新たに確立した系と定量 RT-PCR の系を用いて、種々の既知阻害剤や化合物ライブラリーをスクリーニングした。

7. サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発

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 4 週で全採血した plasma を以後のウイルス接種用ストックとした。ウイ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 蛋白質を得て、これによる ELISA 系を構築して抗体価測定を行った。plasma 中ウイルスゲノムより作成した cDNA を用いて、ゲノム DNA シークエンシングを行ない、接種クローンの核酸及びアミノ酸配

列と比較検討した。サルを用いた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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. HCV ゲノム複製調節機構の解析

1-1. NS4A 結合因子 creatine kinase B

比較プロテオーム解析により HCV 複製複合体を構成する宿主因子として creatine kinase B (CKB) を同定した。CKB は細胞内の ATP 輸送に働き、ATP/ADP 濃度を一定に保つ役割を担っている。HCV 複製細胞において、CKB 遺伝子のノックダウン、dominant negative CKB の強制発現あるいは CKB 阻害剤(基質アナログ)cyclocreatine 処理により HCV RNA 複製の有意な抑制が観察された。CKB は HCV RNA 複製調節に関与する可能性が示された。

複製複合体を構成する HCV 非構造蛋白が CKB と相互作用するかどうかを検討した。エピトープタグを付加した NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B をそれぞれ発現させた細胞を用いて免疫沈降/ウエスタンブロット解析を行った結果、CKB は NS4A 蛋白と相互

作用する可能性が示された。

1-2. NS5A 結合因子 FKBP8

HCV レプリコン細胞や HCV 感染細胞から FKBP8 をノックダウンすると、顕著に細胞内のウイルス RNA の発現抑制が観察された。エピトープタグ法により、FKBP8 は Hsp90 と複合体を形成することが示された。NS5A 蛋白質は Hsp90 とは直接結合しないが、FKBP8 を介して 3 つの蛋白質が複合体を形成した。さらに、FKBP8 の蛋白質との相互作用を担う Tetratricopeptide repeat (TPR) 領域の異なる部位で、NS5A 蛋白質と Hsp90 がそれぞれ結合することが示された。特に、Hsp90 の C 末端の MEEVD 配列が FKBP8 の TPR 領域との結合に重要であった。また、Hsp90 の ATPase 阻害剤であるゲルダナマイシンは濃度依存的に HCV の複製を阻害した。組換え FKBP8 と NS5A との解離定数は、特異的な結合を示した。FKBP8 結合に必須な残基を同定し、その残基に変異を入れたレプリコン RNA の複製は Huh7 細胞で顕著に抑制された。複製が回復した、わずかに出現したコロニーのレプリコン RNA にコードされる NS5A は、親株と同じアミノ酸残基に戻っていた。また、FKBP8 は通常ミトコンドリアに局在しているが、ミトコンドリアと異なるドット様の領域で NS5A と共局在していた。

2. HCV 粒子形成機構の解析

2-1. 粒子構造、感染性における粒子表面脂質ラフトの役割

昨年度、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を示す成績を得た。そこで、コレステロール除去薬剤である β -CD を使って HCV 粒子表面からコレステロールを除去したところ、感染性が顕著に低下し、コレステロールを添加したところその感染性が回復することを見出した。また、スフィンゴミエリン分解酵素 (SMase) で HCV 粒子を処理すると感染性が減弱した。さらに、HCV JFH-1 感染増殖系にスフィンゴ脂質生合成阻害剤 (ISP-1、HPA-12) を加えると

各薬剤とも濃度依存的にウイルス産生阻害作用が認められた。これらの薬剤は HCV JFH-1 株については RNA 複製阻害作用は顕著でないことから、感染または粒子形成過程への介入によって抗 HCV 活性を示しているものと考えられた。

2-2. 粒子産生における油滴の役割

HCV 非構造タンパク質の細胞内局在を調べるために、それぞれのタンパク質を単独に培養細胞 Huh7 に発現させその細胞内局在を調べた。これまで、コアタンパク質については油滴に局在することが報告されている。そこで、主として非構造タンパク質に注目して解析を行った。NS5A, NS5B を中心に非構造タンパク質の局在は核膜周辺に局在した。小胞体膜タンパク質のマーカである PDI の局在とほぼ一致したことからこれらのウイルスタンパク質は主として小胞体膜に局在することが明らかになった。コアタンパク質の細胞内局在も、主として小胞体膜周辺に観察された。これまでにコアは油滴に会合しているとの報告があるために、油滴を染色するボディピニーを用いて解析したところ、コアタンパク質の一部はボディピニーと局在が一致した。以上から、このウイルスタンパク質の局在は、小胞体あるいは油滴であることが明らかになった。

つぎに、感染性ウイルスゲノムレプリコン JFH1 を Huh7 に導入し、その細胞におけるウイルスタンパク質の細胞内局在を解析した。特にコアタンパク質および非構造タンパク質として NS5A, 5B, 4A, 4B を中心に調べた。いずれのタンパク質も単独で発現させたときと同様に小胞体膜に存在するマーカートンパク質 PDI と局在が一致した。しかし、細胞内局在の解析で小胞体膜と油滴とを区別しながら解析することにより、コアタンパク質は小胞体膜近辺の油滴にも局在することが分かった。さらにこの解像条件下で非構造ウイルスタンパク質の局在を調べたところ、油滴の近辺にも非構造タンパク質が一部局在することが分かった。

このような HCV タンパク質の局在の違い（小胞体膜周辺と油滴周辺）がウイルス産生にどのような影響

を与えるかについて調べるために、ウイルス粒子産生を指標にして油滴とウイルスタンパク質の会合に意義を調べた。まず、油滴に隣接する周辺にコアタンパク質が局在すること、そのコアを取り巻く様にして非構造タンパク質が局在することが分かった。非構造タンパク質とコアの直接的な会合は電子顕微鏡観察からは見られなかった。一方、ウイルスタンパク質が会合している油滴の周りには膜様構造が構築されていることが分かった。

油滴へのウイルスタンパク質の会合が粒子産生に果たす役割を調べるために、油滴と会合できない HCV 変異ゲノムを構築して、そのゲノムを発現している細胞におけるウイルス粒子産生を調べた。それらの細胞上清からウイルスを濃縮して、蔗糖密度勾配遠心によりウイルス粒子を分画した。各分画について、ウイルス粒子をコアの量で定量すると同時に、感染性の解析を行った。その結果、油滴と会合できないウイルスゲノムを産生する細胞からは非感染性粒子が産生されるにもかかわらず、感染性粒子の産生は見られなかった。一方、もとの HCV ゲノムを産生する細胞の上清には非感染性、感染性粒子の両方が産生された。

蔗糖密度勾配遠心により分画したウイルス粒子の解析から、感染性ウイルス粒子は浮遊密度が 1.12、非感染性粒子のそれは 1.15 であった。油滴に会合できない HCV ゲノム変異体からは、感染性粒子の産生が見られなかったことから、浮遊密度の小さい感染性粒子の産生には油滴が重要な働きをしていると結論づけた。

3. 病原性発現の分子機構

3-1. 肝脂肪化と肝発癌

脂質代謝に関連する核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α の、HCV コア遺伝子トランスジェニック(Tg)マウスにおける発現状態を検討した。HCV コア遺伝子 Tg 肝においては、PPAR α タンパクが増加していた。主に核内に蓄積しており、また mRNA レベルには変化が認められなかった。Pulse-chase 実験によって、コア蛋白の存在によって PPAR α の安定性が増加することが核内

PPAR α タンパク増加の機序と考えられた。

HCV コア遺伝子 Tg 肝において、PPAR α ターゲット遺伝子である cyclin D1、CDK4、acyl-CoA oxidase、peroxisome thiolase、liver-fatty acid binding protein (L-FABP)等のタンパク、mRNA はともに増加していた。

HCV コア蛋白による病原性発現における PPAR α 活性化の意義を明らかにするために、PPAR α KO マウスとコア遺伝子 Tg を掛け合わせてハイブリッドマウスを作製した。この CoreTg/PPAR α KO マウスにおいては、肝脂肪化が認められなかった。

更に、CoreTg/PPAR α KO マウスにおいては PPAR α ターゲット遺伝子の発現は消失・低下し、ミトコンドリア障害も軽減していた。CoreTg/PPAR α KO マウスにおいては肝癌も発生しなかった。これに対して CoreTg/PPAR α intact マウスでは、これまでの報告通りに雄の約 35%で肝癌を発生した。

PPAR α がヘテロのコア遺伝子 Tg においても肝脂肪化、肝癌は発生しなかった。これらの事実は、コア蛋白による病原性発現のためには PPAR α の存在ではなく、持続的な活性化が必要であることを示している。

PPAR α ヘテロのマウスに clofibrate (peroxisome proliferator agonist)を 24 ヶ月にわたり投与したところ、コア遺伝子 (+) PPAR α ヘテロマウスでのみ肝脂肪化を生じ、肝発癌もコア遺伝子 (-) PPAR α ヘテロマウスに比し有意に高率であった。

3-2. 糖代謝

グルコースの取り込み：SGR、FGR 及び HCV 感染細胞においては、対照 Huh-7.5 細胞に比して、2-DG の取り込み能が約 60%抑制された。

細胞表面の GLUT の発現：SGR 及び FGR において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面への発現は、対照 Huh-7.5 細胞に比して、著明に抑制されていた。また HCV 感染細胞においても、非感染対照細胞に比して、GLUT2 及び GLUT1 の発現の抑制が認められた。一方、膜タンパク質であり膜への輸送によって機能が制御されることが知られているトランスフェリン受容体では、その細胞表面の発現レベルに有意な差は認められな

った。

さらに、細胞内プロテアソームにおける GLUT タンパク分解の関与を検討するために、SGR、FGR、HCV 感染細胞及び対照 Huh-7.5 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンの処理を行った。その結果、ラクタシスチン処理の有無に関わらず、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現レベルは、対照細胞に比して低値のままであった。

GLUT mRNA の発現とプロモーター解析：SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、GLUT2 mRNA の著明な発現の抑制を認めた。一方、GLUT1 mRNA の発現には有意な差は認められなかった。GLUT2 のプロモーター活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討したところ、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、有意に低値を示した。

ヒト肝組織を用いた検討：非感染肝組織においては、肝細胞の細胞質辺縁部に GLUT2 の発現を認めたが、HCV 感染肝組織においては GLUT2 の発現は著明に抑制されていた。この発現の抑制は、一様ではなく、肝小葉の限局された肝細胞で認められた。一方、HBV 感染肝組織においてリンパ球浸潤が認められ、肝全体で GLUT2 の発現低下が認められた。

3-3. HCV 蛋白-宿主因子の相互作用解析

NS4B 結合因子の探索：N 末端に FLAG-HA タグを付けた NS4B 蛋白質を発現する HeLa 細胞を大量に培養した。細胞分画により、その存在が膜画分のみ見られたため、細胞膜画分、核不溶性画分由来の抽出液に対して、FLAG、HA の 2 種類の抗タグ抗体にて連続して精製した。その 2 つのサンプルを SDS-PAGE にて分離し、蛋白質のバンドを切り出し、トリプシンで分解後、LC-MS/MS で 202 個の蛋白質を同定した。ほとんどが報告のない新規蛋白質で、シャペロン蛋白質 9 個、脂質代謝関連蛋白質 14 個が含まれ、すでに報告のある Rab5 が含まれていた。

NS5A 結合因子の探索：NS5A 蛋白質を HeLa 細胞

に発現させ細胞内分布を生化学的に調べたところ、細胞質、核画分において若干の発現が見られたが、多くは膜画分に存在することが分かった。細胞膜画分、核不溶性画分由来の抽出液に対して、FLAG, HA の2種類の抗タグ抗体にて連続して精製した。その2つのサンプルを SDS-PAGE にて分離し、蛋白質のバンドを切り出し、トリプシンで分解後、LC-MS/MS で 169 個の蛋白質を同定した。ほとんどが報告のない新規蛋白質で、シャペロン蛋白質 7 個、脂質代謝関連蛋白質 16 個が含まれ、報告のある Amphiphysin II, FKBP38, hVAP-33, Lyn, Prohibitin が含まれていた。

4. 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 誘導能、NK 活性化能を解析した。

ヒト myeloid 樹状細胞は HCV JFH-1 株に如何なる条件でも感染が証明できなかった。しかし、肝細胞株 Huh7.5.1 には $moi=1-10$ の間で CPE が観察できた。この肝細胞株の debris を樹状細胞が取り込むと強い Mixed lymphocyte reaction (MLR), Th1 誘導、NK 細胞活性化が *in vitro* assay で確認できた。

この樹状細胞の debris 取り込みで HCV 由来の dsRNA が endosome (TLR3 が存在する) にマージするのが共焦点レーザー顕微鏡で確認できた。樹状細胞は TLR3, TICAM-1 (TRIF) 経路を持ち TICAM-1 経路が活性化すると NK 細胞が誘導される (Akazawa PNAS 2007)。HCV 感染の場合、この経路がヒトの樹状細胞でも機能して IFN 誘導、NK 活性化が誘起すると判明した。

NK 細胞を HCV が直接活性化する可能性も調べたが、殆ど起きない事が判明した。

5. HCV 複製細胞系の開発、改良

OGF7 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムの性能比較： IFN- α (1~100 IU/ml)、CsA (0.125~0.50 μ g/ml) および FLV (1.25~5 μ M) を OR6 細胞および OGF7 細胞に添加して 72 時間後にそれぞれアッセイを

行い、両細胞における抗 HCV 効果を比較した。その結果、3 薬剤の抗 HCV 効果は両アッセイ系においてほとんど同じ結果となった。これらの結果から、O 両アッセイ系の感度はほぼ同程度であることが分かった。次に、OGF7 アッセイシステムを用いて、IFN- α (0.4 と 2.0 IU/ml) と CsA (0.125 と 0.25 mg/ml) との併用効果を測定することができるかどうかを調べた。その結果、両薬剤の添加による相加効果についても OGF7 アッセイシステムにより確認することができた。

レプリコン複製細胞株(sAH1)と全長 HCVRNA 複製細胞株(AH1)の樹立： 作成した AH1 レプリコン RNA ライブラリーを各種治癒細胞に導入して G418 選択を行った結果、OR6c 細胞に導入したケースにおいて、G418 耐性コロニーが 1 個得られた。このコロニーは増殖して細胞株として樹立することができ sAH1 細胞と名付けた。定量的 RT-PCR で測定した結果、sAH1 細胞におけるレプリコン RNA は 3.1×10^7 copies/mg RNA と算出され、HCV-O 株由来の sO 細胞 (3.5×10^7 copies/ μ g RNA) とほぼ同程度であった。Genomic PCR により HCV の 5'UTR 領域が DNA に組み込まれていないことを確認した。また、sAH1 細胞内でのレプリコン RNA の複製が IFN- α , IFN- β および IFN- γ に感受性を有していることも確認した。

次に sAH1 細胞内で複製しているレプリコン RNA の遺伝子解析を行った。RT-PCR によりレプリコン RNA を増幅させて、増幅産物をサブクローニング後に 3 クローンについて塩基配列を決定した。その結果、3 クローンに共通して NS3 内に 1 カ所 (L1262S) と NS4B 内に 1 カ所 (V1897A) のアミノ酸置換が検出された。後者は過去の論文 (Lohmann et al., JVI, 77:3007,2003) により適応変異であることが報告されており、1 クローンからは別の適応変異 (P1115L) も検出された。2 種類の適応変異を組み合わせることにより HCVRNA の複製効率がさらに亢進することを、最近明らかにしている (Abe et al., Virus Res. 125:88, 2007) ので、次に V1897A と P1115L 変異を有するクローンと AH1 株由来の構造領域の DNA 断片 (RT-PCR にて得られた増幅産物をサブクローニングしたもの) を基にして、全長

HCV RNA を含むプラスミドを作成、*Xba*I にて切断後 *in vitro* にて RNA を作成した。得られた RNA を sAH1c 細胞 (sAH1 細胞を IFN- γ にて処理して治癒細胞を作成した) に導入して、G418 存在下 3 週間培養した。その結果、幾つかの G418 耐性コロニーが得られ、最終的に増殖した 4 種類の細胞株 (2-1, 2-2, 2-3 および 2-5) が得られた。これらの細胞株について、HCV RNA のレベルを定量的 RT-PCR 法により、HCV 蛋白質のレベルを Western blot 法により調べた。その結果、2-2 細胞における HCV RNA の複製レベルが高いことが分かった。2-2 細胞を AH1 細胞と命名して、以後の解析に使用することとした。Northern blot 解析により AH1 細胞において予想される 11 kb の全長 HCV RNA を検出した。HCV RNA のレベルは HCV-O 株の全長 HCV RNA 複製細胞である O 細胞と同程度であった。NS5B 領域をプローブに用いた Northern blot であったが、11kb より短い RNA は AH1 および O 細胞において検出されなかった。Western blot 解析によっても、各種 HCV 蛋白質 (コア、E2, NS3, NS4A, NS5A および NS5B) を検出することが出来、それらの発現レベルも O 細胞と同程度であった。ただ、E2 のサイズは 65 kDa と O 細胞の場合の 57 kDa より幾分大きいという特徴があった。このサイズの違いは N 型糖鎖付加部位が AH1 株の場合 11 カ所と予想され、HCV-O 株の 9 カ所と比べて 2 カ所多いために生じたものと推測される。また、AH1 細胞内で複製している全長 HCV RNA を RT-PCR 法により増幅して sAH1 細胞の場合と同様に遺伝子解析を行ったが、解析した 3 クローンに共通して認められるアミノ酸置換を伴う変異は検出されなかった。

以上の結果、今回得られた AH1 細胞は以前我々が樹立した全長 HCV RNA 複製細胞である O 細胞と同程度の複製効率を有する全長 HCV RNA 複製細胞であると判断された。

AH1 株および HCV-O 株 HCV RNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果： AH1 細胞と O 細胞における HCV RNA の複製に対する IFN- α 、IFN- γ および CsA の効果を調べた。IFN- α の場合は AH1 株での EC_{50} が約 1.0 IU/ml、O 株での EC_{50} が約 1.5 IU/ml となったが、western

blot 解析ではその差は反映されていなかったため、ほぼ同程度と判断された。しかしながら、IFN- γ の場合は、AH1 株での EC_{50} が 1.85 IU/ml、O 株での EC_{50} が 0.34 IU/ml となり、Western blot 解析においても、明らかに AH1 株の方が感受性に乏しいという結果になった。一方、CsA の場合は、逆に AH1 株での EC_{50} が 0.13 μ g/ml、O 株での EC_{50} が 0.35 μ g/ml という結果になり、Western blot 解析でも明らかに AH1 株の感受性が高いという結果が得られた。以上の結果から、AH1 株と O 株の HCV RNA 複製に対する抗 HCV 剤の感受性は幾分異なることが示唆された。

6. 抗 HCV 薬の探索

6-1. DHCR24 阻害剤の抗 HCV 作用

HCV 遺伝子発現により発現量が亢進する分子 Dehydrocholesterol reductase 24 (DHCR24) を同定した。

DHCR24 に対する siRNA での発現抑制により HCV 複製は約 40% 減少した。DHCR24 阻害剤として知られている U18666A および 4-hydroxitamoxifen (4OH-Tam) を用いて HCV 複製を検討した結果、阻害剤添加後 48 時間で細胞傷害性を示すことなく HCV 複製能のみを約 60~80% 減少させた。U18666A をヒト型肝臓キメラマウスに 2 週間単独投与する事により血清中の HCV RNA 量が約 1/100 に減少した。U18666A 投与キメラマウスは異常を示すことなく、HCV 複製を特異的に阻害できた事から、U18666A が抗 HCV 薬になる可能性が示唆された。

6-2. NS5B ポリメラーゼ阻害剤の抗 HCV 作用

HCV RNA ポリメラーゼ (NS5B) は HCV のゲノム複製に必須の因子であり抗 HCV 薬ターゲットとして有望である。今回、新規構造を有する HCV NS5B 阻害剤を見いだす目的でサッカーボール型構造を有するフラレン化合物に注目した。

試験管内 HCV RNA ポリメラーゼ活性を阻害するフラレン化合物を検索した結果、誘導体 1、2 が見いだされた。最も強い阻害活性を示したのがピロリジニウム型誘導体である 1 (IC_{50} =0.75 μ M) であり、その次がプロリン型誘導体である 2 (IC_{50} =2.0 μ M) であった。

誘導体 2 と構造が類似する誘導体 3 (カルボキシル基が一つ少ない) は有意な阻害活性を示さなかった ($IC_{50} > 10\mu M$)。

培養細胞レベルでの HCV ゲノム RNA 複製に対する各フラベン化合物の影響について検討した結果、誘導体 1 は $IC_{50} = 2\mu M$ であり、RNA 複製を強く阻害した。一方、誘導体 2 および 3 は双方とも $IC_{50} >> 25\mu M$ であり有意な RNA 複製阻害は見られなかった。

培養細胞レベルでの HCV (JFH1 株) 産生に対する各フラベン化合物の影響についても調べた結果、誘導体 1 は $IC_{50} = 0.4\mu M$ と強く阻害した。一方、誘導体 2 および 3 は $IC_{50} >> 25\mu M$ であり有意な阻害を示さなかった。

以上の結果より、ピロリジニウム型誘導体 1 が HCV 産生阻害薬として有望と考えられた。しかしながら、細胞増殖・毒性に対する影響を検討した結果、誘導体 1 は高濃度 ($50\mu M$) で細胞毒性を示してしまうことがわかってきた。(誘導体 2 および 3 は高濃度 ($50\mu M$) でも細胞毒性は示さなかった。)

そこで、誘導体 1 の構造類似体としてスルホニウム型誘導体 4 および 5 を合成しさらに検討を行った。

まず、細胞増殖・毒性に対する影響を検討した結果、誘導体 4 および 5 は $50\mu M$ まで全く増殖抑制・毒性を示さなかった。

誘導体 4 および 5 の試験管内 HCV RNA ポリメラーゼ阻害活性は、それぞれ $IC_{50} = 10\mu M$ 、 $1.0\mu M$ であり、有意な阻害活性を示した。

また、HCV (JFH1 株) 産生に対する誘導体 4 および 5 の影響を検討した結果、両化合物とも誘導体 1 と同様に強い HCV 産生阻害活性を示し、 IC_{50} はそれぞれ、 $0.6\mu M$ 、 $1.0\mu M$ だった。

以上の結果から、フラベン誘導体 4 および 5 は、細胞増殖抑制・細胞毒性作用がなく、細胞レベルでも HCV ゲノム RNA 複製を阻害し、ウイルス産生を強く抑制する事が明らかとなった。

6-3. 化合物ライブラリーのランダムスクリーニング

HCV JFH1 株ゲノムを発現し、感染性ウイルスを恒

常的に産生する細胞株の培養上清を Huh7.5.1 細胞に加えて培養し、産生されたウイルス RNA を RT-PCR、また細胞内の Core 蛋白質を cell-based ELISA により定量する、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系を昨年度構築した。これらの系を用いて種々の阻害剤を評価したところ、bisindolylmaleimide、indolocarbazole 系の PKC 阻害剤に抗 HCV 活性を見いだした。しかし PKC 阻害活性の強さと抗 HCV 活性とは相関しなかった。また bisindolylmaleimide、indolocarbazole 以外の PKC 阻害剤には抗 HCV 作用は見られず、作用機序は現在のところ不明である。

上記の定量 RT-PCR、cell-based ELISA によるスクリーニング系では $MOI = 0.01$ で感染させたが、 MOI をさらに高くしていくと、ウイルスの力価に応じて Huh7.5.1 細胞の増殖阻害が観察された。抗 HCV 作用を持つ物質は、HCV により抑制された細胞増殖を回復させることが考えられるので、HCV による細胞増殖阻害効果の解除を指標にした抗 HCV 物質のスクリーニングが可能かどうか検討した。

Huh7.5.1 細胞を 96 ウェルプレートにまき、HCV JFH1 を感染させて、細胞増殖を MTT 法で定量した。 $MOI = 2$ で感染させると、感染細胞の増殖はコントロールの $1/4$ 以下に抑制された。HCV の複製を阻害することが知られる cyclosporin A、tamoxifen を添加して培養すると細胞増殖阻害は弱くなり、至適濃度では高力価の HCV JFH1 を感染させても細胞は、コントロールと同程度に増殖したことから、この MTT で細胞増殖を測定する系が抗 HCV 薬のスクリーニングに応用できると考えられた。前述の bisindolylmaleimide、indolocarbazole 類はこの MTT 法でも活性を示した。

さらに MTT 法で種々既知物質を試験したところ、epigallocatechin gallate (EGCG) に抗 HCV 活性を見いだした。EGCG には多くの作用が報告されており、抗 HCV 効果には複数のメカニズムが関与すると思われるが、無血清培地でアッセイを行うと活性が強まり、脂質を添加すると作用がほとんど無くなることから、作用機序の一つは脂質合成の阻害であることが考えられた。その他、天然物、天然物誘導体ライブラリーの 2,000

の化合物の抗 HCV 作用を定量 RT-PCR、MIT 法を用いて評価した。1 μ g/ml 以下で効果を示す物質が 8 個得られている。

7. サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発

慢性 C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデル確立を目指し、GBV-B 持続感染マーモセットに関して詳細な解析を行った。

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、GBV-B 感染タマリンでのケースと同様に、血中ウイルス RNA の低下と相反して抗コア・NS3 抗体価の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には血中ウイルスが検出限界以下となった。その後抗体価は徐々に低下した。一方持続感染 2 例では、抗体価上昇が顕著に遅延している。#4 では抗 NS3 抗体価がほぼ感染後 1 年経過してピークレベルに達したものの、抗コア抗体価は感染 3 年目になって上昇した。もう 1 例の #2 では、抗コア抗体価は比較的速やかに上昇したが、抗 NS3 抗体価は感染後 1 年経過してピークレベルに達した。2 例に共通して、抗 NS3 抗体価上昇が遅延すると共にその後高いレベルで維持されている。この抗 NS3 抗体価推移は、GBV-B 持続感染の予測マーカーと捉えることができる。実際、Martin らによる慢性化タマリンに関する報告でも同様の抗 NS3 抗体価の推移を示していることは、我々の結果を支持するものである。

持続感染 2 例では、感染開始後約 2 年半を経過した現在でも、ウイルスゲノム RNA が検出されている。#4 では、ほぼ感染 1 年後まで主として潜伏感染状態が続いた後、現在まで持続的ウイルス血症が継続している。#2 では、感染後 1 年余り 10^5 GE/ml 以上のウイルス血症が持続した後、検出限界以下 $\sim 10^5$ GE/ml 程度で変動を繰り返している。

肝炎マーカーである ALT 値を見ると、どちらの持続感染個体においても間歇的な上昇が認められ、また多くの場合この上昇は血中ウイルス RNA 量とほぼ相関していた。従って慢性 HCV 感染と同様に、肝臓でのウイルス増殖に伴う CTL 活性化により肝細胞傷害

が生じていることが示唆される。以上の結果より、GBV-B はマーモセットにおいて長期持続感染し慢性肝炎を呈することが明らかとなった。

ところで、どちらの個体でも血中ウイルス RNA 量は感染後 1 年前後で一旦検出限界以下まで低下しながら、その後上昇している。また前述のようにウイルス増殖に伴う CTL 活性化が示唆される。これらのことから、感染後 1 年前後でウイルスゲノムが CTL からのエスケープ変異を獲得し、それによってウイルスが再顕在化した可能性が示唆される。そこで、持続感染個体におけるウイルスゲノムシーケンスについて経時的に比較解析を行った。まずウイルスタンパクのアミノ酸変異について解析した結果を以下に表わす。

① Core, NS4A/4B には全く変異が認められなかった。このことから、これらの領域はアミノ酸変異を許容し難い（すなわち機能維持のため高いアミノ酸保存性が必要）と考えられる。

② 33w/45w で見られるアミノ酸変異はほとんどの場合が #2 と #4 間で共通しており、また 88w/104w でもそのまま維持されていた（特に NS5A の変異はこのパターンが殆ど）。従ってこれらの変異は主としてマーモセット個体でのウイルス増殖に有利な機能的適合変異によるものと考えられる。

③ E1/E2, p13, NS2, NS3, NS5A/B において、88w/104w では 33w/45w で見られない変異を多数獲得していた。これらの変異は、マーモセット細胞への機能的適合変異によるものよりはむしろ抗ウイルス獲得免疫に対するエスケープ変異であるものと示唆される。実際、88w/104w で生じたアミノ酸変異が、33w/45w での場合と異なりそのほとんどが #2 と #4 間で異なったアミノ酸残基に生じていることは、この考えを支持している。

④ これまで報告のある長期 GBV-B 持続感染タマリンにおけるウイルスゲノム解析では、E1/E2 についてはアミノ酸変異がほとんど認められていない。他方、本結果では 88w/104w において E1/E2 領域に複数の変異が見られた。特に、250 番目のグリシンは #2 において 45w でバリンに、104w にはさらにアラニンに変異

していた。#4 においても、88w でこのアミノ酸のごく近傍に2箇所も変異が認められた (A254V, W257R)。これらの結果より、この領域は宿主抗ウイルス免疫応答における重要なエピトープであり、この領域への選択的アミノ酸変異がマーマセットにおけるウイルス再頭在化・長期持続感染に重要な役割を担っているものと思われた。

⑤ ウイルスゲノム変異は、5'UTR においても複数認められた。変異 RNA の機能的意義を検討する目的で、5' UTR の2次構造に変異 RNA をプロットしたところ、興味深いことに、全ての変異挿入部位はヘアピンループ部に認められていた。また U217A を除き全てウラシル/アデニンからシトシン/グアニンへの変異であった。従ってこれらの変異は、IRES 作用へ何らかの機能的影響があることを示唆するものと考えられた。

D. 考察

1. HCV ゲノム複製調節機構の解析

HCV の非構造蛋白と相互作用し RNA 複製の調節に関与する宿主因子は VAP (NS5A, NS5B 結合)、シクロフィリン (NS5B 結合) などいくつか報告されているが、今回初めて NS4A 蛋白との結合能を有する CKB が同定された。CKB は creatine kinase の isoform の一種で種々の組織の細胞質に存在する。1) エネルギー代謝において「energy buffer」として ATP, ADP 濃度を一定に保つ、2) 「energy transport」として ATP を産生する場所から、ATP を消費する場所へ high-energy phosphate を使ってエネルギーを運ぶ、といった役割を担っている。HCV RNA 複製の場において必須であるヘリカーゼ活性、RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ活性は ATP 依存的な反応であることが知られている。CKB はこれらの反応を進めるために重要な働きをしていると考えられる。また、NS4A-CKB 相互作用を解除することができれば、複製複合体へのエネルギー供給が遮断あるいは阻害される。NS4A-CKB 相互作用阻害は抗 HCV 薬開発の新たな分子標的となる可能性が考えられる。

多くのウイルスの複製に分子シャペロンが関与していることが知られているが、今回見いだされた FKBP8 は、Hsp90 を HCV の複製複合体にリクルートするシャペロンとして機能しているものと思われる。NS5A と FKBP8、あるいは FKBP8 と Hsp90 との結合阻害は、慢性C型肝炎の新たな創薬ターゲットと思われる。FKBP8 は NS5A と高い親和性を持って結合した。しかしながら、FKBP8 は NS5A と一部の細胞内領域で共局在し、HCV 複製に機能しているものと思われる。FKBP8 と相互作用できないように NS5A 内必須残基に変異を加えると HCV の複製は大きく抑制される。さらに、複製能の回復にはそのアミノ酸残基が元に戻る必要がある。従って、その相互作用あるいは FKBP8 自身を標的にしたとき、耐性ウイルス出現度が低い抗 HCV 薬の開発が期待できるかもしれない。

2. HCV 粒子形成機構の解析

HCV が細胞内で感染性粒子を産生する機構は明らかでない。この機構を明らかにすることにより、抗 HCV に向けた薬剤の開発が可能になると期待される。本研究ではウイルスタンパク質の細胞内局在を解析しながら、粒子産生の分子機構解明に役立てようと試みた。その結果、粒子産生には油滴が重要な役割を果たしていることを明らかにした。すなわち、構造タンパク質コアが油滴に会合し、その周りに新たな膜様構造が構築される。その膜様構造の中にウイルス非構造タンパク質が会合する。非構造タンパク質が油滴に会合できない変異体では感染性粒子の産生が見られないことから、油滴とウイルスタンパク質との会合が感染性粒子の産生に重要であるといえる。なお、感染性粒子は非感染性粒子に比べて浮遊密度が小さいことも分かった。これらのことから、HCV が感染性を付与されるためには、脂質性の因子と会合する可能性が考えられる。これらの成果より、コアが油滴に会合できなくなる方策、非構造タンパク質が油滴に会合できなくなる方策の開発は抗 HCV 剤開発に道を開くと期待される。また、感染性粒子の物理的性状の解析はウイルス感染の分子機構を明らかにするために重要である。

3. 病原性発現の分子機構

PPAR α の持続的な活性化が HCV コア蛋白による病原性発現に必要であることが示唆された。しかしながら、PPAR α の活性化のみでは肝脂肪化は起こらず、また肝発癌も低頻度である。HC コア蛋白と PPAR α 活性化の共存がこの様な表現型をもたらすと推測された。

コア蛋白によって肝脂肪化、脂肪酸の増加がもたらされると、これが PPAR α 活性化をもたらす。また、RXR α を介して、コア蛋白は PPAR α を活性化する。PPAR α 活性化自体は通常は脂肪の異化をもたらすが、PPAR α 活性化は同時に ACO 活性化を介して酸化ストレスを増加させ、ミトコンドリア機能を障害する。つまり、コア蛋白によって既に誘発されているミトコンドリア機能障害、電子伝達系の障害が PPAR α 活性化によって更に増悪し、脂肪酸を介した「負のループ」の形成、いわば「脂肪酸スパイラル」とでも呼ぶべきものが起こり、肝脂肪化、脂肪酸増加、酸化ストレス産生、細胞増殖遺伝子発現増加という一連の現象を次々と惹起し、細胞増殖遺伝子発現増加と相まって、最終的に肝癌の発生へと至ると考えられる。

HCV による病原性発現において、コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾は大きな意義を保持していること、PPAR α の活性化はそれを更に増悪する因子として機能することが示唆された。C 型肝炎における病態解明と病変進行の予防法の開発において重要な発見と考える。

HCV が糖尿病発症に関与する機序として、細胞内糖代謝の入り口である糖の取り込み異常が肝臓の代謝異常に関与することが考えられる。そこで本研究では、細胞の糖の取り込みに及ぼす HCV の影響について検討を行った。2-DG の取り込み能が、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して抑制されていた。この結果から、HCV 感染により糖の取り込みが抑制されると考えられた。すなわち、生体における耐糖能異常の原因の一つとして、HCV 感染による糖の取り込み低下が関与している可能性が示唆

された。

細胞内への糖取り込みの役割を演じる GLUT について、細胞表面への発現を検討したところ、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、細胞表面の GLUT2 及び GLUT1 の発現が低値を示した。この結果から糖取り込みの低下は、細胞表面の GLUT2、GLUT1 の発現低下によるものであると考えられた。

GLUT 細胞表面発現の低下のメカニズムを検討するために、細胞内プロテアソームでのタンパク分解の影響について調べた。プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン処理を施したが、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現レベルの回復は認められなかった。

次に、GLUT の mRNA 発現レベルを検討するために、定量 RT-PCR を行った。GLUT2 mRNA は、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して、有意に低値を示した。また、GLUT2 のプロモーター活性についても SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照細胞に比して、有意に低値を示した。これらの結果から、HCV 感染は、GLUT2 の転写レベルでの発現制御を介して細胞表面の発現を低下させることが考えられた。一方、GLUT1 mRNA については、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、対照 Huh-7.5 細胞に比して差を認めなかったことから、GLUT1 の細胞表面発現の抑制は、転写やプロテアソーム系を介したタンパク質分解とは異なる制御機構により引き起こされている可能性が考えられる。近年、いくつかの膜タンパク質ではリサイクリング機構も提唱され、トラフィッキング経路の存在が認められてきている。GLUT ファミリーのうち、GLUT4 ではインスリン作用による細胞膜へのトラフィッキングが報告されている。本研究において、HCV における GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現低下に、HCV によるトラフィッキング作用への影響が関与する可能性が考えられる。HCV による GLUT 細胞表面発現の低下機構については、今後トラフィッキング機構を含めて、詳細な検討を進めたい。

非感染肝組織で認められる細胞質辺縁部での GLUT2 の発現が、HCV 感染肝組織において著明に抑制されていた。またこの抑制は肝小葉の限局された肝細胞で認められたことから、HCV 感染では肝組織内の HCV 感染の起こっている細胞で、GLUT2 の発現の低下が引き起こされている可能性が考えられる。一方、HBV 感染肝組織では、肝全体で GLUT2 の発現低下が認められ、肝でのリンパ球浸潤が認められたことから、炎症反応に伴った肝全体の GLUT2 の発現低下が考えられる。HCV 感染及び HBV 感染における GLUT2 の発現抑制のメカニズムについては、今後の詳細な検討が必要である。

4. 持続感染機構の解析

TICAM-1 陽性、陰性の KO マウスを使って genechip subtraction を行ない、NK 指向性の樹状細胞を誘導する分子機構を明らかにすることを試みた。TICAM-1 特異的に誘導される膜分子を 2 種同定できた。これらをレンチウイルスベクターで樹状細胞に発現させると *in vitro* で NK 活性化が高く誘導された (未公表)。従って HCV 感染では肝実質細胞が感染巣となり、HCV の RNA を含んだ細胞小胞ができると樹状細胞が取り込んで細胞性免疫が活性化すると考えられる。この樹状細胞経路はヒトでも TLR3-TICAM-1 経路を使うことが分かっている。

TICAM-1 経路は IFN を誘導する系でもある。しかし、IFN-beta は NK 活性化を誘導しなかった。一方、樹状細胞膜の NK リガンドが NK 活性化を誘導することが判明した。この細胞応答は一般に + 鎖 RNA ウィルスと 2 重鎖 RNA ウィルスの産物 (dsRNA) で起きる (未発表データ)。HCV も特有な外因性のウィルス RNA 取り込みによって細胞性免疫を起動する結果になっているのかもしれない。

肝炎の予防にワクチンを開発する際、TLR3 を活性化するワクチン株は CTL/NK を効率よく誘導できるはずである。また、*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。

最後に、HCV は樹状細胞に感染しにくいので、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。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 誘導機構も解析し、今後の肝炎対策への基礎資料としたい。

5. HCV 複製細胞系の開発、改良

OGF7 アッセイシステムと OR6 アッセイシステムの性能比較: OGF7 アッセイシステムの感度は OR6 アッセイシステムと同等であったという実験結果と OGF7 アッセイシステムが OR6 アッセイシステムに比べて、非常に安価で時間もかからないという点から、多くの物質を一気に探索するようなハイスループットスクリーニングに非常に有効な手段であると思われる。さらに、改良するとすれば、もう少し高い蛍光強度を達成して、96 ウェル以上の小さなウェルでのアッセイ法の開発が望まれる。

レプリコン複製細胞株 (sAH1) と全長 HCVRNA 複製細胞株 (AH1) の樹立: AH1 株についても、以前 HCV-O 株で採用したレプリコン RNA ライブラリーを用いた方法でトライしたが、sO 細胞を樹立した際とは異なり、sAH1 細胞を得るまでに予想外に何種類もの治癒細胞や何度となく実験を行う必要があった。得られた sAH1 細胞においては、特徴的な適応変異が見つかったことから、おそらく、作成したレプリコン RNA ライブラリーにはこの適応変異は存在していなかったのではないかと推察される。従って、この方法が今後も有効であるかどうかは現時点では判断できない結果となった。得られた AH1 細胞は OR6c 細胞 (O 細胞がその親細胞) から得られたものだが、O 細胞と AH1 細胞を比較すると、細胞の増殖速度がかなり異なる。予備的実験によると、O 細胞の倍化時間は 30 時間程度であるのに対して AH1 細胞の倍加時間は 48 時間程度と遅い。しかし、AH1 細胞から治癒細胞を作成すると細胞増殖速度がかなり上昇することから、HCV 株により細胞増殖に与える影響が異なる可能性もあり、今後検討に値

する現象ではないかと思われる。急性肝炎症例の HCV 株についての HCV RNA 複製細胞は未だ報告されていないことから、既報の HCV レプリコン複製細胞や全長 HCV RNA 複製細胞との様々な比較実験に使用できるのではないかと思われる。

AH1 株および HCV-O 株 HCV RNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果： 今回の比較において、IFN- α ではほぼ同程度の結果を得たが、IFN- γ や CsA ではかなり異なることが分った。この違いが宿主側に原因があるのか或はウイルス側にあるのかは現時点では分らないが、AH1 細胞の親細胞は OR6c 細胞であり、そのさらに一代前の細胞は O 細胞であることから HCV 株による違いの可能性があると考えられる。この点を明らかにするために、IFN- γ については、IFN- γ 応答配列を有する Guanine binding protein (GBP) 遺伝子プロモーターを用いて、AH1 細胞と O 細胞において IFN- γ のシグナル伝達効率に差があるかどうかを検討する予定である。また、現在 AH1 細胞を基にしてルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを構築中であることから、作成できた場合には O 細胞を基にして作成した OR6 ルシフェラーゼレポーターアッセイシステムと詳細な比較が可能になるものと思われる。今回は3種類の抗 HCV 剤についての比較を行ったが、さらに幾つかの抗 HCV 剤 (各種スタチン剤やミリオシンなど) についても同様の検討を行う予定で、抗 HCV 剤の評価は1種類の HCV 株で十分なのか、或は複数の HCV 株が必要なのかを明らかにする予定である。

6. 抗 HCV 薬の探索

DHCR24 が HCV 複製に重要な因子であることが明らかとなり、治療薬の標的分子となる事が示唆された。また、HCV は DHCR24 のようなコレステロール合成に関与する宿主因子の発現量を亢進させ自己複製しやすい環境を整えていることが明らかになった。

サッカーボール型の分子 C_{60} に代表されるフラレン類は、ダイヤモンド、グラファイトに次ぐ炭素同素体として 1985 年に発見され、新規機能性材料への応用が期待されている分子群である。これまでに、フラ

レン誘導体による活性酸素消去活性、抗菌活性、がん細胞増殖抑制、HIV 逆転写酵素阻害などの有用な生物活性が示されてきている。今回、HCV RNA ポリメラーゼ阻害活性、さらに HCV の RNA ゲノム複製およびウイルス産生阻害活性が見いだされ、フラレン化合物の抗 HCV 薬としての有用性が明らかとなり、フラレン誘導体の生理活性物質としての可能性をさらに示すことができた。

今回見いだし用いたフラレン化合物については、ピロリジニウム型誘導体 1 はがん細胞増殖抑制効果がみられることが知られており、プロリン型誘導体 2, 3 は HIV 逆転写酵素阻害活性も示すことが知られている物質であった。スルホニウム型誘導体 4, 5 は今回新規に合成したものであり、現在、他の生物活性は知られていない。

誘導体 2 は試験管内の HCV RNA ポリメラーゼ活性阻害を示したが、細胞レベルでは HCV RNA 複製阻害を示さなかった。この原因として誘導体 2 が細胞内に取り込まれていない可能性がある。構造を修飾し細胞内に取り込まれる形にすれば HCV 産生を阻害するようになるかもしれない。誘導体 2 は HIV 産生も阻害する可能性があることから、HCV/HIV 共感染治療の観点からも興味深い対象となるかもしれない。

スルホニウム型誘導体 4 および 5 の検討から、スルホニウム置換基の数が 1 つより 2 つの方が試験管内 HCV RNA ポリメラーゼ阻害活性は強かったが、細胞レベルでのウイルス産生阻害では置換基が 1 つの方が若干強い作用を示した。この違いは細胞への各化合物の取り込み能や HCV 産生に対する他の複合作用による可能性が考えられる。この点については今後の課題である。

7. サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発

GBV-B はマーマセットにおいて 2 年半という長期に渡り持続感染することが明らかとなった。これまでの知見では、タマリンにおいて 1-2 年程度の長期持続感染例が 2 例報告されている。しかしいずれも異なる研究グループで例外的に見出されたケースであり、

再現性は認められていない。またどちらのケースでも一定レベル以上の高いウイルス血症が持続しており、潜伏期は見られていない。一方本研究で見られたマーモセットでの長期持続感染例は始めてであり、しかも4例中2例が慢性化したことは特筆すべき点である。また本例ではヒトにおける HCV 感染例で見られる間欠的（回帰的）ウイルス血症が認められた。このことは、少なくともマーモセットでは、非常に低レベルの（検出限界以下の）ウイルス複製状態でも完全には排除されず生体内で潜伏感染し、何らかの刺激もしくはウイルスゲノム変異といった要因により再活性化しうることを表わしている。この低レベルでのウイルス変動は抗ウイルス獲得免疫応答によるウイルス増殖抑制作用が原因と考えられる。実際、ウイルスゲノム変異解析の結果から、潜伏感染時（感染1年前後）を境として多数のアミノ酸残基の置換が認められており、CTL 等からのエスケープ変異であるものと推測される。さらに#2において、45w で E1 領域 250 番目のグリシンがバリンへ置換が生じ、さらに 104w にてさらにバリンがアラニンへ置換されていることから、この部位が重要な中和抗体（若しくは CTL）エピトープであって、かつ抗ウイルス免疫応答からのエスケープ変異がウイルス再顕在化・持続感染に重要な役割を担っていることが示唆される。

一方核酸レベルでの置換であるが、5'UTR において IRES 機能に関わるヘアピンループ部分に限定されていたことから、これらの変異は IRES からの翻訳効率向上に寄与している可能性が考えられる。これまでの報告で、AUG コドンを含むステムループドメイン IV における構造的不安定化は IRES の翻訳効率を向上することが示されているが（Rijnbrand, J Virol 2000）、今回見られた A444G 変異ではドメイン IV の不安定化に繋がることから、この変異が翻訳効率を向上していることが考えられた。

これまで当研究グループにて実施したタマリン GBV-B 感染実験では、長期経過フォローアップを行なっている15例のうち2例で1年を超える GBV-B 持続感染例が見出されている（未発表データ）。した

がって GBV-B はタマリンやマーモセットに持続感染しうることを表わしている。さらにマーモセットは、より効率良く持続感染に移行する感染モデル動物と考えられ、慢性肝炎の病態や亜急性期から慢性移行時における宿主免疫からの回避機序の解明といった基礎的研究に有用なモデルになるものと期待される。今後は慢性化タマリンにおいても同様にゲノム変異の解析を行なうと共に、中和抗体および CTL の解析技術を開発し、ウイルス制御に関わる抗ウイルス獲得免疫について解析を行なう予定である。さらに新規治療法の評価系として有用なマーモセットにおける再現性良い慢性感染モデル作出を目指したい。この目的で、最近持続感染マーモセット2頭由来血液をナイーブマーモセットへ輸血することで個体間ウイルス継代を開始したところである。

E. 結論

本年度、以下の研究成果を得た。

(1) HCV ゲノム複製調節機構の解析：

- 1) NS4A 結合因子 CKB を同定し、RNA 複製調節機能を明らかにした。
- 2) NS5A 結合因子 FKBP8 は、Hsp90 を複製複合体へリクルートすることによりゲノム複製を調節することを見出した。

(2) HCV 粒子形成機構の解析

- 1) HCV 粒子表面の脂質成分が粒子構造保持、感染性に重要であり、スフィンゴ脂質生合成阻害剤により粒子形成が阻害されることを示した。
- 2) 細胞内油滴と HCV 蛋白との会合が感染性粒子形成に重要であること、HCV が感染性を付与されるためには脂質性因子との会合が重要であることを明らかにした。

(3) 病原性発現の分子機構

- 1) コアトランスジェニックマウスを用いた解析から、PPARalpha がコア蛋白による肝発癌に関与することが示された。
- 2) HCV とインスリン抵抗性獲得とを関連づける知見として、HCV 感染に伴うグルコーストランスポー

ターGLUT1/2 の発現低下を見出した。

(4) 持続感染機構の解析

樹状細胞が抗 HCV CTL を誘導する機構として、傷害破壊された感染細胞由来のウイルス因子が樹状細胞に取り込まれ、TLR3 依存的に NK が誘導され、T 細胞が活性化されるモデルを提唱した。

(5) HCV 複製細胞系の開発、改良

生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを定量できる OGF7 システムの有用性を示し、新たに急性肝炎患者血清からクローン化した HCV ゲノムの複製系を作製した。

(6) 抗 HCV 薬の探索

1) コレステロール生合成阻害剤 U18666A が HCV 複製細胞系、HCV 感染キメラマウスにおいて HCV 産生阻害活性を有することを示した。

2) フラーレン骨格化合物の HCV ポリメラーゼ阻害作用を見出し、誘導体探索の結果、高い抗 HCV 作用を有し細胞毒性の低い新規化合物を同定した。

3) HCV 感染増殖細胞系を用いて、植物代謝物、微生物代謝物、天然物誘導体、合成化合物などのライブラリーをランダムスクリーニングし抗 HCV 活性物質を 10 数種類見出した。

(7) サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発
GBV-B 感染マーマセットを用いて慢性 C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルを確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (主任研究者分)

1. 論文発表

1. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol* (in press).
2. Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y,

Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol* (in press).

3. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol* (in press).
4. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol Methods*. (in press).
5. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212 (2007).
6. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23 (2007).
7. 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. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81:1174-1185 (2007).
8. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
9. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1661-1666 (2007).