

C型肝炎における肝脂肪化と肝傷害・肝発癌

分担研究者 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨 我々は、マウスモデルを用いて C 型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝発癌を引き起こすことを示してきた。この動物モデルでは、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌が発生している。このマウスモデルおよび C 型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸などの C18 一価不飽和脂肪酸が増加しており、HCV 感染により脂質代謝異常が引き起こされることが明らかになっている。また、インスリン抵抗性も HCV により惹起されることが示され、HCV による代謝への影響が、HCV による病原性発現において重要な役割を果たしている可能性がある。今回、我々は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マウスにおける発現状態を検討した。PPAR α タンパクは本マウスモデルの肝において核に蓄積し、cyclin D1 や acyl-CoA oxidase (ACO)等の PPAR α ターゲット遺伝子産物も同様に増加していた。HCV 関連肝発癌における PPAR α 活性化の意義を明らかにするため、PPAR α ノックアウトマウスとコア遺伝子トランスジェニックマウスを掛け合わせたところ、PPAR α の持続的な活性化無しでは肝脂肪化も肝癌も生じないことが明らかになった。肝脂肪化、ミトコンドリア機能障害と肝発癌が密接に関連していることを示すデータであり、HCV の病原性発現を抑制する方策の開発に有用と考えられる。

A. 研究目的

C型慢性肝炎における肝発癌の機序はまだ完全にはわかっていない。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデル動物がないことも、解明の妨げとなっている。我々は、HCVのコア蛋白がトランスジェニックマウス(Tg)において肝細胞を誘発することを確認し、このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行ってきた。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子 Tg においては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌（肝癌）が発生してい

る。また、このマウスモデルおよび C 型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。また、インスリン抵抗性も HCV により惹起されることが示され、HCV による代謝への影響が HCV による病原性発現において重要な役割を果たす可能性がある。

また、我々はこれまでに脂質代謝に関連の深い RXR (retinoid X receptor) α が HCV コア蛋白と DNA 結合領域で結合して、RXR α 反応性エレメントをもつ遺伝子の発現を活性化することを示してきた。更に、RXR α と heterodimer を形成する PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) α への反応

性エレメントをもつ遺伝子の発現も、コア蛋白によって活性化されることも示してきた。本年度、我々は脂肪酸の輸送と異化に関連が深い PPAR α 発現の状態を本マウスモデルにおいて検討した。

B. 方法

本研究の対象動物として用いた 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、ウェスタンブロット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、ノーザンブロットティング、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。

C. 結果

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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 (一) PPAR α ヘテロマウスに比し有意に高率であった。

D. 考察

今回の研究において、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

たらずが、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。

E. 結論

PPAR α タンパクは HCV コア遺伝子 Tg 肝において核に蓄積し、cyclin D1 や ACO 等の PPAR α ターゲット遺伝子産物も同様に増加していた。PPAR α の持続的な活性化無しでは肝脂肪化も肝癌も生じないことが明らかになった。コア蛋白がもたらす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」が形成され、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て、最終的に肝癌の発生へと至ると考えられる。HCV の病原性発現を抑制する方策の開発に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan. *Hepatol Res* 2007;37:2-5.
- 2) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 γ -Dependent Pathway. *J Virol* 2007;81:1727-1735.
- 3) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1661-1666.
- 4) Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report. *World J Gastroenterol* 2007;13:964-969.
- 5) Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. *J Gastroenterol* 2007;42:329-335.
- 6) Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:S108-111.
- 7) Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007;37:S38-S43.

- 8) Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in S region of hepatitis B virus in the sera from patients with acute hepatitis. *Hepatology* 2007;37:731-739.
- 9) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. A novel proteomics method revealed disease-related proteins in the liver of hepatitis C mouse model. *J Proteome Res* 2007;6:2841-2849.
- 10) Okuse C, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C as a Systemic Disease: Virus and Host Immunologic Responses Underlie Hepatic and Extrahepatic Manifestations. *J Gastroenterol* 2007;42:857-865.
- 11) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Impact of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage postoperatively after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:3271-3275.
- 12) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-131.
- 13) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 14) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008 118:683-694.
- 15) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatology* 2008;38:252-258.
- 16) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis* 2008 in press.
- 17) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 in press.
- 18) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatology* 2008 in press.
- 19) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008 in press.
2. 学会発表
- 1) Koike K. Oxidative stress and iron in HCV-associated hepatocarcinogenesis. *BioIron* 2007. 2nd Congress of the International BioIron Society, Kyoto, 2007.
- 2) K Moriya, H Miyoshi, S Shinzawa¹ T Tsutsumi, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Suzuki, T Miyamura, Y. Matsuura, K Koike. FK506 ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress in hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, Barcelona, 2007.
- 3) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie

H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Koike K. Amelioration of Metabolic Disturbances and Oxidative Stress in Hepatitis C Viral Infection by FK506 (Tacrolimus). HepDart, Maui, 2007.

4) Koike K. Molecular Basis for Synergy between HCV Infection and Alcohol in Hepatocarcinogenesis. 2nd International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis (ALPD), Kobe, 2007.

5) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Iino S, Koike K. Nucleoside and amino acid sequences determining the fate of persistent hepatitis B virus infection with seroconversion to anti-HBe antibody. Asian Pacific Digestive Week (APDW), Kobe, 2007.

6) Tsutsumi T, Matsuda M, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Proteomics Analysis Reveals Overexpression of Prohibitin in Cultured Cell and Mouse Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. International Liver Cancer Association, 1st annual Meeting, Barcelona, 2007.

7) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in HCV Infection. Hepatic Inflammation and Immunity 2008, Galveston, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

FKBP8 の HCV 増殖における役割

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV の NS5A 蛋白質と相互作用する宿主因子を検索し、FK506 結合蛋白質 8(FKBP8) を同定した。内在性の FKBP8 をノックダウンすると、レプリコン細胞のゲノム複製は顕著に抑制され、その抑制は siRNA に耐性なサイレント変異を導入した FKBP8 の発現で回復した。エピトープタグ法を用いて FKBP8 と相互作用する細胞内因子を探索し、分子シャペロンである Hsp90 を同定した。NS5A は FKBP8 を介して Hsp90 を HCV の複製複合体に取り込む役割を演じており、Hsp90 の阻害剤であるゲルダナマイシンは HCV の複製を阻害した。以上の成績から、FKBP8 は NS5A に結合し、HCV RNA の複製に必須な宿主因子であると推測された。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人も HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究は HCV の感染、成熟、そして複製過程に関与する宿主因子を解析し、これらの宿主因子をターゲットとした新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

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、精製標品を調整した。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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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、今回我々が見いだした FKBP8 は、Hsp90 を HCV の複製複合体にリクルートするコ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 との結合は、高い親和性を示した。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。

E. 結論

FKBP8 のノックダウンにより HCV RNA 複製は抑制された。FKBP8 は Hsp90 と複合体を形成することが示された。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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28g in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.
- 3 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. J. Virol., 2007, 81, 8477-8487.
- 4 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K.,

- Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
- 5 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Tagawa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治:HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 gの役割：第43回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5月31日-6月1日, 2007.
- 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治 : C型肝炎ウイルスゲノム複製に關与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析：第55回日本ウイルス学会総会、札幌、10月21日-23日, 2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治 : C型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治 : シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治 : C型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治 : C型肝炎ウイ

ルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。

- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治：E型肝炎ウイルス様粒子の結晶化とX線結晶構造解析、同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況

特に無し。

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究

分担研究者 深澤秀輔 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨 HCV JFH1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させる系を用いて、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニングを行った。抗 HCV 作用はウイルス RNA の定量 RT-PCR、cell-based ELISA による細胞内の Core 蛋白質の測定、HCV による細胞増殖阻害効果の解除などを指標とした。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、抗 HCV 活性を示す物質をいくつか見いだした。ウイルス C 型肝炎ウイルスのコードする蛋白質 NS4B, NS5A に着目し、エピトグタグをつけ HeLa 細胞に発現させ、タグの抗体を用い細胞内蛋白質複合体を精製し、マスマスペクトロメトリーにより宿主蛋白質を網羅的に同定した。その結果、病原性に関わると考えられる多くの新規候補が同定された。

A. 研究目的

HCV 治療薬開発のための探索系を確立し、探索を実施する。今年度は昨年度までの系に加えて新たな探索系を確立し、化合物ライブラリーをスクリーニングする。

HCV 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を解析し、創薬研究への応用を計る。今年度は昨年度までに精製した NS4B、NS5A の細胞内蛋白質複合体を LC-MS/MS で解析し、結合蛋白質を同定する。その目的が達成されれば、その中で病原性に関与する宿主蛋白質を解析同定し、創薬に結びつけることが可能になると考えられる。

B. 研究方法

(1) 抗 HCV 薬のスクリーニング

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確立した。今年度はさらに、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。

(2) C型肝炎ウイルス蛋白質複合体の解析

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各種ウイルス遺伝子を導入した。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。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使った研究であり、倫理面への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

(1) 抗 HCV 薬スクリーニング系の構築

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、MTT 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。

2) C 型肝炎ウイルス蛋白質複合体の解析 NS4B 蛋白質複合体

NS4B 蛋白質は、小胞体、ゴルジ体等膜画分に存在し 4 つの膜貫通ドメインを持ち HCV 複製の場を提供していると考えられる蛋白質である。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 蛋白質複合体

NS5A 蛋白質は、宿主細胞の細胞周期、増殖、アポトーシス等の制御に働き、炎症、免疫反応にも影響を与えることが知られている。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。

D. 考察

(1) 抗 HCV 薬スクリーニング

昨年度定量 RT-PCR および cell-based ELISA によるアッセイ系を構築したが、今年度確立した MTT 方法はさらに簡便であり、効率のよいスクリーニングができると考えられる。しかし各種阻害剤、化合物ライブラリーを評価したところ、異なる系を用いると異なる作用機序を持つ物質がヒットする可能性が示唆されたので、当面複数のスクリーニング系を併用する予定である。

(2) C 型肝炎ウイルス蛋白質複体の解析

NS5A, NS4B に結合する多くの新規宿主蛋白質候補を同定した。その中にはすでに重要性が報告された蛋白質も同定されていた。そのことは本方法が新規結合蛋白質の同定手段として有効であることを示している。

E. 結論

HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系を構築した。種々阻害剤、化合物ライブラリーの評価を行い、抗 HCV 薬候補をいくつか見いだした。C 型肝炎ウイルス蛋白質複体を解析し、多くの新規宿主蛋白質候補を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., Takahashi, N., Yamagoe, S., and Uehara, Y. Gamma-herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci*, 98: 1288-1296, 2007.

2. 学会発表

1. 村上裕子、山越智、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔：培養細胞をもちいた C 型肝炎ウイルス (HCV) の阻害剤のスクリーニング、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月 21 ー 23 日

G. 知的所有権の取得状況

なし

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究

分担研究者 深澤 征義 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）感染による難治性ウイルス肝炎・肝硬変・肝がんの新規治療法の開発が強く求められている。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。今回我々は、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ーレン化合物に注目した。NS5Bによる試験管内RNAポリメラーゼ活性に対する阻害能を指標にフラーレン化合物を絞り込んだ。これらの化合物のうちで阻害能の一番高かったピロリジニウム型誘導体は、培養細胞におけるHCV感染・複製系においてもウイルス産生・複製を強く抑制した（ $IC_{50}=0.4mM$ ）。本化合物は高濃度（50mM）で細胞毒性を示したことから、構造類似改変体を作製しさらに検討を行った。その結果、スルホニウム型誘導体は毒性が高濃度（50mM）でも全く見られず、ピロリジニウム型誘導体と同様にウイルス産生を強く抑制することがわかった（ $IC_{50}=1mM$ ）。以上の検討から、作製した新規フラーレン骨格を有する化合物が抗HCV薬候補として有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染により高頻度で難治性ウイルス肝炎・肝硬変・肝がんを発症することが知られている。従来のインターフェロン＋リバビリン療法が有効でないHCV感染者に対する新規治療法の開発が強く求められているのが現状である。そこで、今回我々は、HCV産生に必須のウイルス因子であるHCV RNAポリメラーゼ（NS5B）に注目し、その阻害剤の開発を試みた。化合物の対象としては、新規構造としても注目され、最近様々な生理活性を有する誘導体が明らかとなりつつあるサッカーボール型構造 C_{60} を持つフラーレン化合物を用いることとした。

B. 研究方法

試験管内HCV RNAポリメラーゼ（NS5B）阻害

活性は、各フラーレン誘導体に対し、poly(A)-oligo(U)を鋳型、 $[a\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ 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℃、1時間インキュベートすることにより測定した。各フラーレン誘導体はDMSOに溶解して用いた。

HCVのRNA複製能に対する各フラー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 sub-genomic repliconを培養肝細胞株Huh7細胞に導入して2時間後にフラー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ー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ー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プ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。

(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ない。

C. 研究結果

当該報告で議論するフラレン化合物については文末の図にその構造を示した。

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 ($IC_{50}=0.75mM$) であり、その次がプロリン型誘導体である 2 ($IC_{50}=2.0mM$) 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 ($IC_{50}>10mM$)。

培養細胞レベルでの HCV ゲノム RNA 複製に対する各フラレン化合物の影響について検討した結果、誘導体 1 は $IC_{50}= \sim 2 \mu M$ 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 $IC_{50} \gg 25 \mu M$ 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レ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 $IC_{50} \gg 25 \mu M$ 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(50mM)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(50mM)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 50mM 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 $IC_{50}=10mM$ 、 $1.0mM$ 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、 $0.6mM$ 、 $1.0mM$ だった。

以上の結果から、フラレン誘導体 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。

D. 考察

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。

今回見だし用いたフラー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的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。

E. 結論

フラーレン骨格を有する新規スルホニウム型誘導体 4 および 5 が HCV RNA ポリメラーゼ (NS5B) 阻害活性を有し、細胞レベルでも増殖抑制・毒性作用が見られず、ウイルス産生を強く抑制することが明らかとなった。以上の結果から、作製した新規フラーレン骨格を有する本化合物が抗 HCV 薬候補として有用であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

1. Masayoshi Fukasawa, Yuko Nitahara-Kasahara, Fumiko Shinkai-Ouchi, Shigeko Sato, Tetsuro Suzuki, Kyoko Murakami, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Tatsuo Miyamura and Masahiro Nishijima, Cellular vimentin content affects the protein level of Hepatitis C virus core protein and the activity of Hepatitis C virus production in cultured cells. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007
2. 中村成夫, 笠原優子, 深澤征義, 森裕美子, 高橋恭子, 下遠野久美子, 増野匡彦, 抗 HCV 活性を有する新規フラーレン誘導体、第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 相模原, 講演要旨集 p72-73, 2007 年 11 月
3. 小林翔, 松田大介, 深澤征義, 西島正弘, 花田賢太郎, 司書毅, 供田洋, ACC1 阻害剤による脂肪滴蓄積阻害活性、日本薬学会第 128 年会、横浜、2008 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

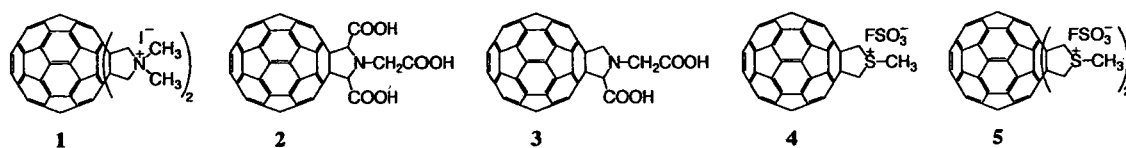


図 用いたフラーレン誘導体

サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデル開発に関する研究

分担研究者 明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター

研究要旨 今年度は、本モデルにおける最終的な目標であった慢性 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 持続感染マーマセットに関して詳細な解析を行なった。その結果、HCV 感染と類似した高い頻度のウイルスゲノム変異および間歇的なウイルス血症を伴う慢性肝炎病態を呈していることが明らかとなった。本結果は、マーマセット GBV-B 感染モデルが慢性 C 型肝炎のモデル動物確立に向けたブレークスルーとなる重要な知見であり、今後の抗 HCV 薬・ワクチンの有効性評価系としてのみでなく、C 型肝炎慢性化メカニズムを解明する上でも貴重な情報をもたらすものと期待される。

研究協力者

岩崎優紀、飯島沙幸、木村展之、揚山直英
医薬基盤研 霊長類医科学研究センター
石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男
国立感染研 ウイルス 2 部
槇昇、森健一
先端生命科学研究所

A. 研究目的

C 型肝炎の原因ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) は、その宿主域の狭さからチンパンジーを除き疾患モデルが存在しない。このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験、さらに HCV 感染に起因する病態の解明を行なう上での大きな障害となっている。

本研究ではこの点を克服すべく、HCV と同じフラビウイルス科、ヘパチウイルス属に分類され、HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた急性・慢性 C 型肝炎のサロゲート（代用）病態霊長類モデルの開発を目標

とする。本モデルが確立されれば、新規治療薬やワクチンの評価系として有用であるのみならず、C 型肝炎の発症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明に重要なモデルになるものと期待される。

本モデルにおける最終的な目標は、慢性 C 型肝炎のサロゲート病態霊長類モデルを確立することにあるが、これまでの報告では GBV-B 感染後 3～6 ヶ月でウイルスがサル個体から排除され慢性化しないのが一般的である。例外として、1～2 年間持続感染が成立したケースが報告されているが (Martin et al., PNAS 2003; Nam et al., J Virol 2004)、2 例のみであること、2 年以内でウイルス血症が消失してしまうことなど、HCV による慢性 C 型肝炎のモデル動物確立にはまだかなりのブレークスルーが必要とされている。

近年、新世界ザルであるマーマ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 2004; Jacob et al., J Gen Virol 2004)。マーマセットは実験

用小型霊長類として汎用されており比較的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である。しかし、タマリンの場合と比較して GBV-B 感染亜急性期における血中ウイルス価が 1-2 桁低く、顕著な肝炎症状を呈さない。またマーモセットにおける GBV-B 持続感染例は報告されていない。

我々は、マーモセットとタマリンに GBV-B 実験感染を行いウイルス動態の比較検討を行なったところ、マーモセットではこれまでの報告と同様、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た。ところが、これら感染個体における長期フォローアップを行ない、ウイルス・免疫応答の推移について経過観察したところ、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うることが示唆された。

今年度も引き続きこの 2 例について解析を行ない、2 年半を越える現在も慢性感染が持続していること、さらに血液内科学的解析により回帰的な慢性肝炎を呈していることを見出した。そこで、本例を中心とした GBV-B 慢性感染サル例についてウイルス学・免疫学的に詳細な解析を行ない、慢性肝炎の病態やその機序について考察を行なった。

B. 研究方法

新世界ザルであるタマリンおよびマーモセット感染実験は当センター感染症実験施設にて実施した。感染性分子クローン pGBB は Dr. Bukh (NIAID, NIH, USA) より分与を受けた。pGBB から *in vitro* transcription により得られたウイルスゲノム RNA をサルに接種後 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 シークエンスを行ない、接種クローンの核酸及びアミノ酸配列と比較検討した。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

マーモセット 4 頭における GBV-B 感染後の各種マーカーの経時的推移を図 1 に示した。

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 (図 1 左)。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ている (図 1 右上)。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 (図 1 右下)。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 はマーマ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。各ウイルスタンパクにおけるアミノ酸変異を図 2 に示した。

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マ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（図 2、黄色マーカー部）。これらの変異は、マーマ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 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（図 2、赤色マーカー部）。#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顕在化・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。そこで、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（図 3）。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、ILES 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

今回の結果において、GBV-B はマーモセットにおいて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行わしている。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頭在化・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ILES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年を越える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行わしている。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。