

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17-19年度 総合研究報告書

主任研究者 宮村 達男  
鈴木 哲朗

平成20年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別冊（抜粋） -----	41
----------------------------	----

# I. 総合研究報告書

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 宮村 達男 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長 17年度  
鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長 18, 19年度

研究要旨 HCV キャリアからの発症予防対策及び治療薬開発は保健、医療、福祉の向上に直結する。本研究では、HCV 生活環の分子機構、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総合的に行った。以下の研究成果を得た。1) HCV 粒子表面に存在する脂質成分が粒子構造保持、感染性に重要であることを示した、2) HCV 粒子形成の場として油滴が重要な役割を果たしていることを明らかにした、3) HCV 構造蛋白間、コア蛋白-RNA の結合様式を同定し、粒子アセンブリーモデルを提唱した、4) NS5A、NS4A、NS5B 蛋白とそれぞれ結合する宿主因子 FKBP8、CKB、CCT5 を同定し、それらを介した HCV RNA 複製調節機序を明らかにした、5) ゲノム複製効率を規定する RNA シスエレメント、適応変異を同定した。6) コア蛋白による肝脂肪化、癌化に PA28 $\gamma$ 、PPAR $\alpha$ 、SOCS1 が重要な役割を果たすことを見出した、7) DDX3、vimentin がコア蛋白と相互作用し HCV 産生に影響を与えること、コア蛋白の一部はミトコンドリアに局在しミトコンドリア蛋白発現に介入することを示した、8) NS3-p53、NS5A-Syk の各相互作用による p53、Syk の機能抑制機構を明らかにした、9) 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、10) NS3-4A 蛋白は TRIF を切断せず、TRIF を介するシグナル経路を抑制しないことを明らかにした、11) RNA Pol I システムを利用し感染性ウイルス持続産生細胞株を樹立した、12) ゲノム複製の簡便な定量化アッセイ系及び複製細胞の可視化モデルを開発し Lipid-rich albumin を加えた無血清培地による複製細胞の長期培養法を確立した、13) 遺伝子型 1b/2a キメラウイルスを作製し、また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、14) タマリン、マーモセットを用いて急性、慢性肝炎発症のサロゲート動物モデルを樹立した、15) GBV-B 急性感染系は、HCV と同様に多臓器指向性感染モデルとなることを見出した、16) ヒト肝臓キメラマウスの改良を目指して肝細胞死誘導 Tg マウスを樹立した、17) HCV ゲノム複製阻害化合物として、シクロスポリン誘導体、スタチン剤、コレステロール生合成阻害剤、スフィンゴ脂質生合成阻害剤、ミゾリピン、フラーレン骨格化合物などを見出した、18) HCV 粒子形成阻害化合物としてグルコシダーゼ阻害剤、スフィンゴ脂質生合成阻害剤を見出した。

分担研究者 深澤 征義 国立感染症研究所 室長 (19年度)  
下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所 教授/千葉工業大学附属総合研究センター 専任研究員  
堀田 博 神戸大学医学研究科 教授  
瀬谷 司 北海道大学医学研究科 教授  
小原 道法 東京都臨床医学総合研究所 プロジェクトリーダー  
西島 正弘 国立感染症研究所 部長 (17, 18年度)  
加藤 宣之 岡山大学歯学総合研究科 教授

小池 和彦 東京大学医学部 教授  
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授  
深澤 秀輔 国立感染症研究所 室長

明里 宏文 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究  
センター リーダー

## A. 研究目的

C 型肝炎は我が国の国民病とも言われ、現在、HCV キャリアは約 200 万人とされる。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝臓での年間死亡者は 3 万人を超える。インターフェロン (IFN)、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は 40-50% 程度であり、半数以上の C 型肝炎患者は、肝臓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

各研究の方法については、17、18、19 年度の各総括研究報告書に記載した。

### (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、個人情報等を厳格に管理、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 粒子形成機構の解析

#### 1-1. 粒子構造、感染性における粒子表面脂質ラフトの役割 (鈴木)

HCV 粒子表面に存在する脂質ラフトが粒子構造、感染性へ及ぼす影響を明らかにした。HCV 感染増殖細胞の中で HCV コア蛋白、エンベロープ蛋白の一部は低温下 TritonX-100 処理に抵抗性の膜画分に存在することが示された。一方、感染細胞および非感染細胞の全膜画分、また部分精製 HCV 粒子サンプルに含まれるコレステロールとリン脂質を定量したところ、HCV 粒子では細胞の膜画分に比べ、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。そこで、産生された HCV 粒子をコレステロール除去薬剤である  $\beta$ -CD 処理したところ、ウイルス密度が 1.17 g/mL から 1.19 g/mL へシフトし同時に不安定化した。また、ウイルスの感染性は  $\beta$ -CD の濃度依存的に低下した。このような  $\beta$ -CD 処理による HCV 粒子の構造変化、

感染性低下は、 $\beta$ -CD 処理後のウイルス粒子へコレステロールを添加することによって回復することも明らかとなった。

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

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。

## 1-2. 粒子産生における油滴の役割 (下遠野)

HCV 非構造蛋白質の細胞内局在を調べるために、それぞれのタ蛋白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、コア蛋白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、主として非構造蛋白質に注目して解析を行った。NS5A、NS5B を中心に非構造蛋白質の局在は核膜周辺に局在した。小胞体膜蛋白質のマーカである PDI の局在とほぼ一致したことからこれらのウイルス蛋白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。コア蛋白質の細胞内局在も、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、コア蛋白質の一部はボディピニーと局在が一致した。以上から、このウイルス蛋白質の局在は、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 JFH-1

を Huh7 に導入し、その細胞におけるウイルス蛋白質の細胞内局在を解析した。特にコア蛋白質および非構造蛋白質として NS5A、5B、4A、4B を中心に調べた。いずれの蛋白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蛋白質 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、コア蛋白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蛋白質の局在を調べたところ、油滴の近辺にも非構造蛋白質が一部局在することが分かった。

このような HCV 蛋白質の局在の違い (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蛋白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蛋白質が局在すること、そのコアを取り巻く様にして非構造蛋白質が局在することが分かった。非構造蛋白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、ウイルス蛋白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。

油滴へのウイルス蛋白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。

### 1-3. コア-E1、コア-RNA 相互作用様式の解析 (松浦)

TMHMM アルゴリズムによって、E1 蛋白質はコア蛋白質 C 末端膜貫通領域をシグナル蛋白質として利用して、細胞外へ貫通し、265-287 残基の疎水領域を用いてまた細胞内貫通し、361-377 残基の C 末端の疎水性領域でまた膜を貫通するポリトピックな構造が予測された。したがって、288-360 残基が細胞質内領域と推測され、今まで報告されてきた type I 型のトポロジーをとるものとの共存が示唆された。糖鎖付加部位を人工的に E1 蛋白質に付加して、細胞外領域を予測したとき、ポリトピックな構造と今まで報告されてきた Type I 型の構造が示唆された。また、膜存在下で E1 蛋白質を発現したとき、細胞外領域と同じ大きさの Flag タグをもつフラグメントがトリプシンによる消化から保護されたことから、E1 蛋白質の細胞質内ループ構造の存在が間接的に裏付けられた。コア蛋白質を 293T 細胞に発現させ、その溶解物をシヨ糖密度勾配遠心によって解析したとき、0.1mg/ml tRNA と 1mM MgCl<sub>2</sub> が存在したときにオリゴマー形成が認められた。コア蛋白質と E1 蛋白質との結合にはコア蛋白質 72-91 残基の領域が必要で、その領域はオリゴマー形成にも必要であったが、その部位のみを発現させても E1 蛋白質との相互作用が認められなかった。また、E1 蛋白質とコア蛋白質との相互作用には tRNA と MgCl<sub>2</sub> の添加が必要であることから、E1 とコア蛋白質との相互作用にはコア蛋白質のオリゴマー形成が必要であることが示唆された。また、E1 蛋白質の細胞質領域の 312-315 残基の欠損によって、コア蛋白質との相互作用が消失することから、その領域がコア蛋白質との結合に必要であることが示唆された。

## 2. HCV ゲノム複製調節機構の解析

### 2-1. NS5A 結合因子 FKBP8 の同定と機能解析 (松浦)

HCV NS5A 蛋白質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 FKBP8 を同定した。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。

### 2-2. NS5B 結合因子 CCT の同定と機能解析 (鈴木)

二次元蛍光ディフレンシャルゲル電気泳動と質量分析法によって HCV 複製複合体分画に含まれる宿主因子を同定した。二次元電気泳動にて約 1300 蛋白質が検出され、45 蛋白質 (3.5%) が、高 HCV 複製期に 1.5 倍以上増加していた。その中には二種類の分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex subunit ε (CCT5) 及び Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) が含まれていた。ウエスタンブロット解析から、両蛋白質は細胞の増殖相によって発現レベルに差は認められないものの、高 HCV 複製細胞の膜分画で明らかな量的増加を確認した。また、エピトープタグ免疫沈降法により、CCT5 が HCV NS5B 蛋白質と特異的に結合することを見出した。さらに、

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、が明らかとなった。

### 2-3. NS4A 結合因子 creatine kinase B (CKB) の同定と機能解析 (鈴木)

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。

### 2-4. HCV RNA 複製における適応変異の解析 (加藤)

5 種類の全長 HCV RNA 複製細胞 (0, OA, OB, OD 及び OE) を用いた遺伝子解析から、NS3 領域内の 4 カ所 (Q1112R, P1115L, E1202G および K1609E) の適応変異を見出した。

それらを組み合わせると HCV RNA の複製効率がどのように変化するかについて解析した結果、Q1112R と K1609E の組み合わせと Q1112R と P1115L の組み合わせが HCV RNA の複製レベルを上昇させることが分った。細胞に導入後 24 時間の値と比較すると導入後 96 時間では約 10 倍に上昇することが分った。適応変異のこれら以外の組み合わせでの最高は 6 倍程度であり、K1609E などの適応変異 1 個だけだと、

約 2 倍程度にしか上昇しなかった。さらに長期間の培養 (1 年間および 2 年間培養) を行った結果、NS3 領域に最初に観察された適応変異に加えて、経時的に新たな適応変異が NS3 領域に出現してくることが分った。アミノ酸置換を伴う変異は全非構造タンパク質内に経時的に蓄積してくることが確認されたが、それらの部位は不均一で NS5A 内のドメイン I (亜鉛配位領域) や NS5B のポリメラーゼ活性触媒部位においては、ほとんど変異は観察されなかった。これらとは対照的に NS5A の C 末端部では変異が集中的に認められた。

## 3. 病原性発現機構の解析

### 3-1. コア蛋白による肝脂肪化、肝発癌 (小池、西島/深澤 (征))

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)  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  の安定性が増加することが核内 PPAR  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  活性化の意義を明らかにするために、PPAR  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  KO マウスにおいては PPAR  $\alpha$  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  $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ ヘテロマウスに比し有意に高率であった。

HCV コア蛋白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行った。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、その中から DDX1、DDX3 及び vimentin について詳細な解析を行った。DDX1、DDX3 分子は、RNA helicase/ATPase 活性を有する DEAD box ファミリーに属するが、未だ生理機能は明らかでない。しかし、DDX1 はある種のガン細胞で高発現していることが知られ、HCV による病態との関連が非常に注目される。生化学的な解析から、DDX1 分子はコアタンパク質の N 末端領域と相互作用し、コアタンパク質によりその ATPase 活性が活性化されることを見いだした。DDX3 はコア蛋白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。

### 3-2. NS3 蛋白と p53 との相互作用 (堀田)

非構造タンパク質 NS3 とがん抑制タンパク質 p53 の相互作用について解析した。臨床分離株から得られた種々のアミノ酸配列を有する NS3 を培養細胞で発現させると、その細胞内局在は斑点状、びまん性及び中間型の3通りに分けられること、及び斑点状局在を示す NS3 は、びまん性のものに比べて、p53 とより効率よく結合し、p53 機能をより強く阻害することを明らかにした。さらに、NS3 と p53 の結合は HCV レプリコン複製細胞においても見られ、p53 機能は対照細胞に比べて減弱していることを明らかにした。また、NS3 の Leu-106 を Ala に置換 (L106A) すると、NS3 と p53 の結合が著しく阻害され、NS3 による p53 機能阻害の程度が減弱することを明らかにした。NS3 のセリンプロテアーゼ活性も L106A 置換により著しく減弱した。

### 3-3. NS5A 蛋白と Syk、amphiphysin II との相互作用 (堀田、深澤 (秀))

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解析した。HCV 感染患者肝組織と非感染対照肝組織におけるチロシンキナーゼ Syk の発現を免疫染色により調べたところ、Syk の発現態様が HCV 感染の有無により異なることがわかった。そこで、培養細胞を用いたタンパク質発現系において HCV タンパク質と Syk の相互作用について検討したところ、NS5A が効率よく Syk と結合すること、及び NS5A の Syk 結合責任領域は N 末端であることがわかった。また、HCV レプリコン複製細胞や HCV 感染細胞においても NS5A が Syk と結合することを明らかにした。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 結合に必要な 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。NS5A により、Syk シグナル伝達経路の下流の PLC- $\gamma$ 1 の活性化も阻害された。

プロテオミクスの手法により NS5A と結合する宿主蛋白質を探索し、amphiphysin II (Bin1) と c-Src を同定した。amphiphysin II は SH3 領域を介して NS5A と結合した。In vitro キナーゼ反応で、amphiphysin II の結合は NS5A のリン酸化を抑制したことから、amphiphysin II が NS5A のリン酸化の調節を通じて、HCV の生活環に関与することが示唆された。

### 3-4. HCV 複製に伴う糖代謝異常 (堀田)

HCV は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞がん等の肝内病変を引き起こすのみならず、2 型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。一方、グルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーは細胞内への糖の取り込みに重要な役割を果たしており、GLUT2 は肝細胞、膵  $\beta$  細胞に、GLUT1 は肝細胞がんをはじめとする様々な悪性腫瘍に発現が認められている。そこで、HCV RNA 複製細胞と HCV J6/JFH-1 感染培養細胞を用いて、肝細胞におけるグルコースの取り込みに対する HCV の影響について検討を行った。その結果、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 感染細胞においては、対照 Huh-7.5 細胞に比べて、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面への発現が著明に抑制され、細胞内グルコースの取り込みが有意に抑制されることがわかった。さらに GLUT2 については、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞において、mRNA 発現の抑制を認めた。HCV 感染ヒト肝組織においても、非感染肝組織に比べて、肝細胞の GLUT2 の発現が著明に抑制されていることがわかった。以上の結果から、HCV 感染により、GLUT2 及び GLUT1 の細胞表面の発現が低下し、グルコースの取り込みが抑制されていることが示唆された。

### 3-5. HCV 蛋白質結合因子の探索 (深澤 (秀))

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、その存在が膜画分にのみ見られたため、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

### 4-1. 樹状細胞による抗 HCV CTL 誘導機構 (瀬谷)

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。

#### 4-2. $\beta$ -IFN 活性化阻害への NS3-4A 蛋白の関与 (加藤)

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を用いた解析で二本鎖 RNA (dsRNA) の細胞外からの添加による IFN- $\beta$  遺伝子の活性化は NS3-4A ではほとんど抑制されないことを見出した。このメカニズムとして、従来の Galeらの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005) とは異なり、NS3-4A が TRIF 分子を切断できないためではないかという可能性が考えられた。そこで、この点を明らかにするために、PH5CH8 細胞に Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させ、IFN- $\beta$  遺伝子 promoter を用いたレポーターアッセイを行った。Myc-TRIF を発現させると IFN- $\beta$  遺伝子 promoter 活性は約 1,200 倍程度上昇した。しかし、この状態で NS3-4A を共発現させても、promoter 活性の阻害はまったく認められなかった。IRF3 の二量体 (活性化型) の形成についての解析においても、NS3-4A による阻害効果は認められなかった。これらのことから、NS3-4A は TRIF を介するシグナル伝達経路を抑制しないことが明らかとなった。次に、Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させた PH5CH8 細胞において Myc-TRIF が切断されているかどうかを調べた。その結果、Myc-TRIF 分子はまったく切断されていないことがわかった。対照として行った Myc-Cardif と NS3-4A を発現させた場合においては、NS3-4A により IFN- $\beta$  遺伝子 promoter 活性は完全に抑制され、Myc-Cardif の切断も起こっていることが確認された。

#### 5. HCV 複製増殖細胞系の開発、改良

##### 5-1. プラスミドトランスフェクションによる感染性 HCV 産生系の作製 (鈴木)

HCV JFH-1 株の genomic RNA を Huh7 細胞へ導入することにより、効率よく感染性 HCV が産生されることが見出された。我々はこの実験系を改変し、JFH-1 全長 cDNA を RNA Pol I promoter/terminator 支配下で発現させることにより、プラスミドトランスフェクションによる簡便な感染性ウイルス粒子産生系を樹立した。また、Zeocin 耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターを利用することにより、恒常的に感染性ウイルスを産生する細胞株 HuhJFHZeo 及び H751JFHZeo を樹立した。

##### 5-2. ゲノム複製の簡便な定量系の作製 (加藤)

Huh7 細胞に由来する HCV ゲノム自律複製 (レプリコン) 細胞については、サブゲノムおよび全ゲノムが複製する細胞を樹立した。複製効率を定量的に評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子または NeoR-ルシフェラーゼ融合遺伝子を挿入したサブゲノムまたは全ゲノム複製細胞を確立した。その一つである OR6 細胞を IFN- $\alpha$  で処理して得られるルシフェラーゼ活性の低下率と定量的 RT-PCR 法により得られた HCV RNA 量の低下率はよく一致しており、ウエスタンブロット解析により HCV 蛋白質の発現レベルも高かったことから、HCV RNA の複製レベルが高いことが分った。また、通常 1 日以上かかっていたアッセイがわずか 30 分程度で済むという時間節約の利点も大きい。以上の結果、OR6 アッセイシステムはルシフェラーゼ活性を測定することにより HCV RNA の複製レベルを定量的にかつ簡便に測定できるアッセイシステムであることが明らかとなった。

##### 5-3. ゲノム複製の可視化モデルの作製 (加藤)

EGFP をコードする領域を含む全長 HCV RNA が複製している OGN/C-5B/KE7 細胞を樹立し、その細胞における HCV RNA の複製レベルを調べた。その結果、細胞の蛍光強度が播種後経時的に増加することが確認され、ウエスタンブロット法による解析で各種 HCV 蛋

白質も検出され、それらの発現レベルは全長 HCV RNA 複製細胞である O 細胞と同程度であった。

OGN/C-5B/KE7 細胞を用いて IFN- $\alpha$ による HCV RNA の複製抑制効果を定量的に測定できるかどうかを調べた。IFN- $\alpha$ の濃度に依存して蛍光強度の減弱が観察され、その程度は定量的 RT-PCR で算出した HCV RNA 量の低下率とほぼ一致していた。また、ウェスタンブロット法による解析でもコアや NS3 蛋白質の発現量の低下が観察された。HCV RNA の複製抑制効果が知られている IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、シクロスポリン (CsA) およびフルバスタチンについても IFN- $\alpha$ と同様のアッセイを行い、蛍光強度の低下率と HCV RNA 量の低下率が一致していることを確認した。以上の結果、この樹立した細胞の蛍光強度を測定することにより、HCV RNA の複製レベルを定量化することができることが分かり、抗 HCV 剤の活性評価を簡便に行える細胞培養システムであることが明らかとなった。

#### 5-4. 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム (加藤)

HCV ゲノム複製細胞 OR6 について無血清培地で HCV RNA の複製を維持できる可能性について調べた。OR6 細胞自体は、DMEM+Selenium により増殖維持されるが、HCV RNA の複製レベルは低下してしまう。しかしながら、この培地に LDL 或は LRA を添加した培地の場合、FBS 存在下とほぼ同程度の HCV RNA の複製が維持されるようになることを見出した。比較的安価である LRA を用いて、LRA の存在により長期間 HCV RNA の複製が維持されるかどうかの検討を行った。その結果、LRA (0.5~2 mg/ml) を存在させると、少なくとも1ヶ月間 HCV RNA の複製レベルは FBS を用いた場合と同程度に維持されることを見出した。添加物として Selenium+LRA のみで1ヶ月間培養した細胞においても、HCV コアや NS3 蛋白質の発現レベルは高く、ウェスタンブロット法による解析でも明確なバンドが得られた。このような LRA 添加無血清培地で培養された OR6 細胞と通常の

FBS (10%) 存在下で培養された OR6 細胞における抗 HCV 剤の効果に差があるかどうかを比較検討した。

その結果、CsA と IFN- $\alpha$ に関しては、LRA 添加無血清培地の方が強い抗 HCV 効果を示すことが分かった。しかし、フルバスタチンに関しては、逆に LRA 添加無血清培地において効き目が弱くなることがわかり、培地が違くと抗 HCV 剤の効果が異なってくることが明らかとなった。

#### 5-5. 遺伝子型 1b/2a キメラウイルスの作製 (加藤)

全長 HCV-0 (1b 型) RNA を OR6c と RSc 治癒細胞 (異なる全長 HCV RNA 複製細胞クローン由来) に導入すると、OR6c 細胞では HCV-0 RNA の複製が活発に起こるが、RSc 細胞ではほとんど複製しないことが分かった。しかしながら、これとは対照的に JFH-1 (2a 型) RNA を OR6c 細胞に導入した場合は JFH-1 RNA の複製が起こらず、RSc 細胞に導入した場合にのみ JFH-1 RNA の複製が起こることが観察された。また、JFH-1 RNA を導入した RSc 細胞からは、長期間 (少なくとも5ヶ月間) 感染性の HCV 粒子の産生が認められた。以上の結果、OR6c 細胞では HCV-0 RNA が効率的に複製し、RSc 細胞では JFH-1 RNA が効率的に複製することが明らかとなり、両者に細胞指向性が存在することが示唆された。

HCV RNA の複製効率に関与すると考えられる3種類のシスエレメント (5' UTR, CRE, and 3' UTR) の塩基配列を HCV-0 RNA と JFH-1 RNA で比較すると、それぞれ26塩基、6塩基、4塩基 (3' Xのみ) 異なることから、それぞれの部分をお互いに置換した7種類 (計14種類) のキメラ HCV-0 RNA およびキメラ JFH-1 RNA を作成した。キメラ HCV-0 RNA は OR6c 細胞に、キメラ JFH-1 RNA は RSc 細胞に導入し、9日目にコア蛋白質の発現量をウェスタンブロット法により解析した。その結果、キメラ HCV-0 RNA の場合は、JFH-1 由来の CRE を置き換えても、HCV RNA の複製にはそれほど影響が生じなかったが、5' UTR を JFH-1 のものに置き換えた場合には、HCV RNA の複製レベルがかなり低下し、3' UTR を JFH-1 のもの

に置き換えた場合には HCV RNA の複製は起こらなくなる事が分った。このような HCV RNA 複製抑制現象はキメラ JFH-1 RNA においても観察された。特に、3' UTR を置換するとその効果が顕著に観察された。しかしながら、CRE を HCV-0 のものに置換した場合には、逆に野生型 JFH-1 よりも HCV RNA の複製効率が上昇していることも明らかとなった。このような現象は、キメラ JFH-1 HCV 導入細胞から産生されるキメラ HCV 粒子の量 (コアタンパク質を定量) と RSc 細胞への感染性を調べることによっても確認された。HCV-0 由来の CRE を有するキメラ JFH-1 RNA を導入した RSc 細胞では、野生型 JFH-1 RNA 導入細胞より約 4 倍のコアタンパク質が導入後 6 日目の培養上清より検出され、感染性 HCV 粒子の量も野生型 JFH-1 よりも多いことが分った。

#### 5-6. 急性肝炎患者血清から単離した新規 HCV ゲノムを用いたゲノム複製系の作製 (加藤)

C 型急性肝炎患者血清 (AH1) 由来の HCV RNA を用いて、HCV レプリコン複製細胞株 (sAH1) と全長 HCV RNA 複製細胞株 (AH1) を樹立した。HCV RNA の複製に対する抗 HCV 剤の効果を AH1 株と HCV-0 株で比較した結果、AH1 株は HCV-0 株に比べて IFN- $\gamma$  に感受性が低く、CsA に感受性が高いことが分った。これらの結果から、HCV 株により薬剤に対する感受性が異なる可能性が考えられた。

### 6. 動物モデルの開発

#### 6-1. サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発 (明里)

HCV に最も近縁なサル肝炎ウイルスである GBV-B を新世界ザルの一種であるタマリンにチャレンジすることにより、ウイルス増殖に伴う急性 C 型肝炎様症状を再現性良く発症させることに成功した。次に感染初期における GBV-B の体内動態を解析したところ、肝臓のみならずリンパ・血液系組織や泌尿・生殖器系組織においてウイルス増殖が認められたことから、GBV-B が HCV 同様に多様な組織へのトロ

ピズムを有する、pleiotropic virus である事が初めて明らかとなった。

本サロゲートモデルの HCV 感染への外挿を念頭において、ウイルス接種ルートによる病態への影響、及びウイルス感染後の長期フォローアップによるウイルス・免疫応答の推移に関する解析を行なった。その結果、ウイルス感染経路によりその病態に大きな影響が見られることが明らかとなった。経肝臓による接種と比べ、経静脈による接種では肝炎惹起が遅れる可能性が示唆された。

近年、新世界ザルであるマーモセットはタマリンと同様に GBV-B に感受性であることが報告されている (Bright et al.: J Virol, 2004)。マーモセットは実験用霊長類として汎用されておりタマリンと比較して入手し易いことから、モデル動物の選択肢のひとつとして有用と考えられた。本研究では、マーモセットにおいて初めて長期に渡り持続感染を呈する 2 例を見出し、感染初期における血中ウイルスレベルおよび免疫応答レベルがマーモセットにおける慢性化を左右しうることを明らかにした。さらに、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。

#### 6-2. ヒト肝細胞キメラマウスモデルの作製 (小原)

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

トラクトを導入した Tg マウスであり、これにより、GCV を投与することによって任意の時期に肝細胞死を誘導出来る。HBX pro-HSVTK 発現ベクターを SCID マウスに導入した Tg マウスの作出に成功した。

## 7. 抗 HCV 薬の探索

### 7-1. CsA 誘導体 (下遠野、小原)

CsA が強く抗 HCV 効果を示すことが明らかになったが、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た。異なる配列からなる HCV-1b を基にしたレプリコン細胞 4 種類と HCV-2a を基にしたレプリコン細胞 2 種類について、CsA とその誘導体 NIM811 の抗 HCV 効果を調べた。その結果これらの薬剤の用量依存的にウイルスゲノム複製は抑制された。HCV-1b と HCV-2a レプリコン細胞の抑制度合いを調べると、HCV-1b では CsA の濃度が 1 マイクログラム/ml で約 10 分の 1 まで低下するのに対して、HCV-2a では 3 分の 1 に低下した。このことは両者のウイルスが CsA およびその誘導体に感受性を示すにもかかわらず、遺伝子型により差があることを示す。

### 7-2. スタチン、コレステロール生合成阻害剤 (加藤、小原、西島/深澤 (征))

高脂血症薬の一つである Lovastatin の近縁化合物で、国内で認可されているスタチン剤 (Atrovastatin, Fluvastatin, Simvastatin および Pravastatin) の抗 HCV 効果を調べた結果、前 3 化合物で Lovastatin より強い抗 HCV 効果が認められた。これらの中で Fluvastatin が最も強い抗 HCV 活性を示し、また IFN- $\alpha$  との併用により、相乗的な抗 HCV 効果を示すことを明らかにした。

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。

### 7-3. スフィンゴ脂質生合成阻害剤 (小原、西島/深澤 (征))

スフィンゴ脂質生合成を阻害する NA255 および Myriocin を HCV レプリコン細胞に添加、また HCV 感染動物に投与してその阻害活性を検討した。両化合物は、培養細胞系での HCV ゲノム複製を効率よく阻害した。実際に HCV が持続感染しているヒト肝臓キメラマウスに Myriocin を投与したところ、8 日間で血中 HCV 量が 1/10-1/100 に減少し、PEG-IFN よりも減少率が大きかった。

### 7-4. リバビリン誘導体 (加藤)

Ribavirin と類似した構造を有する Mizoribine の抗 HCV 活性を測定した結果、Ribavirin とほぼ同程度の HCV ゲノム複製抑制効果があることを明らかにした。Mizoribine は 10<sup>-6</sup> M 程度の低濃度 (臨床上での血中濃度) でも IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果を増強する効果が認められた。また、抗 HCV 効果が報告されている CsA との併用効果が認められることも示した。

### 7-5. フラーレン骨格化合物 (西島/深澤 (征))

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。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。試験管内 HCV RNA ポリメラーゼ活性を阻害するフラー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<sub>50</sub>=0.75 $\mu$ M) であり、その次がプロリン型誘

導体である 2 ( $IC_{50}=2.0\mu M$ ) 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 ( $50\mu M$ ) 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 (JFH-1 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。

#### 7-6. Tacrolimus (FK506) (小池)

ミトコンドリア保護作用をもつ Tacrolimus を

CoreTg マウスに投与し、脂質代謝、糖代謝および酸化ストレス産生への影響を検討した。3ヶ月間の Tacrolimus の投与によって、CoreTg マウスにおける肝脂肪化、インスリン抵抗性は著明に改善された。また、低用量の Tacrolimus によっても同様の効果があることも明らかになった。免疫低下作用を発揮しない低容量の Tacrolimus を投与することによって、HCV 感染症における肝脂肪化やインスリン抵抗性発生、酸化ストレス産生が抑制され、C 型肝炎における肝癌を含む病態進行の抑制あるいは病態の改善が期待される。

#### 7-7. 糖鎖修飾阻害剤 (鈴木)

HCV JFH-1 株の感染増殖細胞系で糖鎖修飾阻害剤 (各種グルコシダーゼ阻害剤、マンノシダーゼ阻害剤) の抗 HCV 作用を調べた結果、 $\alpha$ -glucosidase 阻害剤 NN-DNJ が感染性 HCV の産生抑制作用を示すことがわかった。

#### 7-8. ランダムスクリーニング (深澤 (秀)、下遠野)

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。

HCV 感染増殖細胞系でのランダムスクリーニング：HCV JFH-1 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 JFH-1 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 CsA、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 JFH-1 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  $\mu$ g/ml 以下で効果を示す物質が 8 個得られている。

## D. 考察

本研究の特徴は、HCV の生活環の分子機構（ゲノム複製、粒子形成）、持続感染機構、また病原性発現機構の解明から、実験モデル系（感染性ウイルス産生細胞、レプリコンシステム、ヒト肝臓キメラマウス、GBV-B サロゲートモデルなど）の開発、改良まで、HCV 感染症の予防、治療法の開発に必要な研究を総合的に行うことである。さらに、既存のあるいは新たに構築した抗 HCV 剤スクリーニング系を使って化合物ライブラリー等をスクリーニングして創薬シーズの探索をおこなった。

### 1. 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。本研究期間において HCV の粒子形成機構に関して以下の成果を得た。

1) HCV の粒子形成過程に細胞の脂質ラフト構造が関与する、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、3) 感染性ウイルス産生には細胞内に存在する油滴の存在が重要であり、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、4) E1 蛋白質の小胞体膜上でのトポロジーが二つ存在し、一つは細胞質ループ構造をもつ、5) コア蛋白質のオリゴマー形成には 72-91 残基の領域が必要であり、E1-コア蛋白質相互作用には E1 蛋白質の 312-315 残基の 4 残基が重要である、ことを見出した。粒子形成過程を標的とした抗 HCV 薬の開発研究は全く進んでいない。例えば、脂質代謝阻害剤、コア-E1 相互作用に重要なペプチド配列と類似した構造を有する化合物など、新たな治療薬の開発につながる可能性が期待される。また、コア蛋白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。

## 2. 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うる。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。

## 3. 病原性発現機構の解析

PPAR $\alpha$  の持続的な活性化が HCV コア蛋白による病原性発揮に必要であることが示す知見を得た。しかしながら、PPAR $\alpha$  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。コア蛋白と PPAR $\alpha$  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 $\alpha$  活性化をもたらす。また、RXR $\alpha$  を介して、コア蛋白は PPAR $\alpha$  を活性化する。PPAR $\alpha$  活性化自体は通常は脂肪の異化をもたらすが、PPAR $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 コア、NS3、NS5A 蛋白と宿主因子との相互作用の解析、また比較プロテオーム解析を通じて、HCV 感染による病態発症に関わる宿主因子の同定とその影響について広範に解析した。これによって、宿主内での HCV の病原性発現機構を理解する上で重要な知見が得られるものと期待され、さらに今までに試みられていない新たな創薬ターゲットを見出すことを目指している。コア-宿主因子相互作用については、1) DDX3、vimentin がコア蛋白と相互作用し、HCV 産生に影響を与えること、2) コア蛋白

がミトコンドリアに局在し、prohibitin等のミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることを見出した。

NS3 と p53 の相互作用様式を解析し、p53 結合に関与する NS3 の 3 つのアミノ酸残基 (Phe-43, Leu-106, Val-158) を同定した。それらはいずれも、NS3 の立体構造上比較的近い領域にあり、それぞれ p53 と直接相互作用している可能性が考えられた。このうち Phe-43, Leu-106 は、セリンプロテアーゼ活性にも関与していることがわかった。p53 結合性及びプロテアーゼ活性に関与するこれらのアミノ酸について、今後さらに機能面での解析を進める予定である。さらに、これらのアミノ酸残基に作用し得る低分子化合物の探索により、HCV の増殖能と発がん性を同時に抑制する効果的な HCV 治療薬の開発に結びつく可能性が示唆された。

NS5A は肝細胞内の非受容体型チロシンキナーゼ Syk と結合し、そのキナーゼ活性を抑制することが明らかになった。Syk は乳がんの発症や浸潤・転移に対して抑制的に機能するがん抑制タンパク質であると報告されている。従って、NS5A は Syk との相互作用を介して、肝細胞がん化あるいはその他の細胞変化を引き起こす可能性が考えられる。また、Syk キナーゼ活性の抑制には、NS5A の結合領域のみならず、PKR 結合領域を含む領域を必要とすることが明らかとなった。現在、NS5A による Syk 機能制御機構について、さらに詳細に解析を進めている。また、Syk キナーゼ活性の抑制により影響を受ける下流のシグナル伝達分子や関連する宿主細胞因子についても解析している。

また、NS5A と結合する宿主蛋白質を探索し、amphiphysin II (Bin1) と c-Src を同定した。amphiphysin II は SH3 領域を介して NS5A と結合した。In vitro キナーゼ反応で、amphiphysin II の結合は NS5A のリン酸化を抑制したことから、amphiphysin II が NS5A のリン酸化の調節を通じて、HCV の生活環に関与することが示唆された。

HCV が糖尿病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が肝臓の代謝異常に関与することが考えられる。そこで、HCV 感染における糖の取り込みに及ぼす影響について検討を行ったところ、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 細胞に比して有意に抑制されることがわかった。この結果から、HCV 感染により糖の取り込みが抑制され、それが、生体における耐糖能異常の原因の一つになっ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。これらの結果から、HCV 感染による糖取り込みの低下は、細胞表面の GLUT2 及び GLUT1 の発現低下によるものであることが考えられた。

#### 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。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。

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。

#### 5. HCV 複製増殖細胞系の開発、改良

RNA レプリコンを基盤とした、または感染性粒子を産生する培養細胞系の改良、開発はウイルス複製増殖機構の解析に役立つとともに抗 HCV 薬の探索にも有用である。

本研究期間に以下の成果を得た。1) プラスミドトランスフェクションによる簡便な感染性ウイルス粒子産生系を樹立した。2) レプリコンシステムにおいて、NS3 領域の適応変異の組み合わせで HCV RNA の複製がさらに高まることを見出した。3) Lipid-rich albumin を加えた無血清培地により HCV RNA 複製細胞を長期に培養でき抗 HCV 剤の活性評価にも有効であることを示した。4) 可視化遺伝子を利用して生細胞のまま蛍光強度を測定するシステムが抗 HCV 剤のアッセイ系としても有効であることを示した。5) HCV-0 (1b) RNA と JFH1 (2a) RNA の複製には細胞指向性があることを見出した。6) 新たに急性肝炎患者血清からクローン化した HCV ゲノムを用いて複製系を作製した。

#### 6. 動物モデルの開発

HCV はヒトとチンパンジーにしか感染しないため、HCV 感染のメカニズム解析などを行う HCV 感染モデ

ル動物としてチンパンジーが使用されているが、コストや倫理上の問題が存在するため代替するモデル動物の樹立が強く求められている。そこで本研究では、HCV 研究に有用な動物実験モデルの開発、改良を目指して、1) ヒト肝臓キメラマウスの改良と 2) 新世界サルによるサロゲートモデルの開発、に取り組んだ。

現行の uPA/SCID を利用したヒト肝臓キメラマウスではゲノムがタンデムに導入されているため、一部の肝細胞において組換えによって導入された遺伝子が抜け落ちることが知られている。これにより uPA 遺伝子の脱落したマウス肝細胞が増殖しヒト肝細胞を排除するためマウス肝細胞のヒト肝細胞への置換率が低下する。この問題点を解決するため本研究では、マウスの肝細胞死を誘導する新たな系の開発を行った。肝臓特異的な promoter である HBX promoter の下流に HSVTK 遺伝子をつないだコンストラクトを導入した Tg マウスであり、これにより、GCV を投与することによって任意の時期に肝細胞死を誘導出来る。HBX pro-HSVTK 発現ベクターを SCID マウスに導入した Tg マウスの作出に成功した。

一方、急性及び慢性肝炎の病態モデルとして、HCV に最も近縁の GBV-B を用いたタマリン、マーモセットモデルの開発を行った。GBV-B/タマリン急性感染実験における解析結果より、GBV-B は HCV と同様、肝臓だけでなく脾臓やリンパ節、生殖器などの多様な組織にて感染・増殖する、いわゆる pleiotropism (多指向性) の特性を有することが明らかとなった。一方、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。

## 7. 抗 HCV 薬の探索

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

CsA の誘導体の薬効評価から興味深い成績が得られた。CsA は免疫抑制作用に加え腎障害や高血圧によるサイクロスポリン脳症を起こすために、安全な使用には厳密な血中濃度のコントロールが必要となり、特定の施設以外では使用が難しい薬剤である。CsA の抗 HCV 作用はサイクロフィリンの抑制によるものであり、カルシニューリンと結合しない免疫抑制作用の無い CsA 誘導体が HCV の治療薬となりうる可能性があるかどうかを検討された。その結果、1) レプリコンシステムにおいて、CsA の EC<sub>50</sub> が 0.24 μg/ml であるのに対し、CsA の誘導体で免疫抑制活性のない Debio-025 では 1.3 μg/ml であった。2) ヒト肝臓キメラマウスによる HCV 感染実験系において、Peg IFN と Debio-025 併用群では 14 日目までに最大で 4 log の血清 HCV RNA の低下が認められた。これに対し Peg IFN/CsA 併用群では 1 週以内にすべてのマウスが死亡した。3) 遺伝子型 1b、2a レプリコンを使って CsA 及び誘導体 NIM811 の効果を調べたところ、両薬剤とも用量依存的な抗 HCV 活性が認められるものの、遺伝子型の違いにより効果に差が認められた。免疫抑制作用の無い CsA 誘導体は単独でも抗ウイルス活性を持ち、IFN との併用では

相乗効果を示すことより、今後の有望な治療薬の 1 つと考えられる。今後副作用の少ないサイクロフィリン阻害薬が HCV の治療薬となる可能性がある。

この他の化合物について以下の成果を得た。1) Mizoribine の抗 HCV 活性を測定し Ribavirin とほぼ同程度の HCV ゲノム複製抑制効果があることを明らかにした。Mizoribine には Ribavirin に認められるような貧血の副作用（高齢者に頻発）がないことから、高齢者に対する治療における選択肢の一つになるものと思われる。CsA と Mizoribine を併用すると相加効果が認められることから、移植後における C 型肝炎治療にも有効ではないかと考えられる。2) スタチン剤は安全な薬剤として長期間の服用が可能な薬剤であるので、IFN との併用で治療に使用できる可能性が示唆された。3) スフィンゴ脂質合成を阻害する NA255 および Myriocin はセリンパルミトイルトランスフェラーゼ（SPT）を特異的に阻害し、培養細胞系での HCV ゲノム複製を効率よく阻害した。ウイルス蛋白でなく SPT のような宿主因子を標的にした薬剤の場合、ウイルス変異誘導は認められないので長期に使用できるといった利点がある。4) ミトコンドリア機能保護作用を有する Tacrolimus は、HCV コア蛋白による脂質代謝異常（今回の検討では肝脂肪化）を低用量においても改善することからヒトへの応用が期待できる。5) サッカーボール型の分子 C<sub>60</sub> 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。