

厚生労働省科学研究補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発
要因及びウイルス増殖に対する人為的制御
による肝炎征圧

平成19年度 総括・分担研究報告書

総括研究者 下遠野 邦忠

平成20(2008)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧 下遠野 邦忠(慶應義塾大学医学部)	-----1
II. 分担者研究報告	
1. HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御 下遠野 邦忠(慶應義塾大学医学部)	-----6
2. C型肝炎ウイルス複製に加えて細胞の増殖を制御する細胞側因の解明と機能解析 堀田 博(神戸大学大学院医学系研究科)	----- 10
3. C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与する宿主因子に関する研究 加藤 宣之(岡山大大学院医歯薬学総合研究科)	----- 15
4. C型慢性肝疾患の肝組織におけるミトコンドリア DNA の塩基変異と IFN 治療による修飾 西口 修平(兵庫医科大学)	-----22
5. DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得機構の分子機構解明 小原 恭子(熊本大学大学院医学薬学研究部)	-----27
6. ステム細胞由来肝細胞のウイルス感染研究への応用 落谷 孝広(国立がんセンター研究所)	-----31
7. 肝移植後再発HCV患者における複製HCVゲノムの解析および欠損ウイルス の影響 杉山 和夫(埼玉医科大学医学部)	----- 35
8. HCV感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析に関する研究 丸澤 宏之(京都大学大学院医学研究科)	-----38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----41
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	-----47

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）
総括研究報告書

肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する
人為的制御による肝炎征圧

総括研究者 下遠野 邦忠 慶應義塾大学 医学部 教授

研究要旨：C型慢性肝炎、肝硬変、肝がん発症の分子機構あるいは、これらの疾患を誘導させるウイルス側および宿主要因を明らかにして、疾患予防の方策を生み出すことを目的として研究をすすめ、以下の成果を挙げた。(1) HCV 感染細胞における脂肪代謝異常がウイルスの効率よい複製と産生に重要である。(2) HCV ゲノム複製細胞においてはゲノム変異導入遺伝子が活性化されている。(3) C型慢性肝炎由来の肝組織におけるミトコンドリアは非可塑性的変化をもたらす。(4) HCV ゲノム複製細胞において特異的な発現様式を与える細胞側遺伝子あるいは non-coding RNA の発現を明らかにした。(5) HCV 感染細胞においてはアポトーシスが活性化されることを見出し、その分子機構を明らかにした。これらのことから、HCV 感染自身が細胞の増殖を積極的に変化させ細胞の増殖異常をもたらすことが強く示唆された。HCV ゲノムの複製を解析して、コア蛋白質が効率よく発現する欠失ゲノムの存在を明らかにした。また、HCV 感染細胞を開発する目的で、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞を分化させた。

分担研究者

堀田 博	神戸大学大学院医学系研究科	教授
加藤 宣之	岡山大大学院医歯薬学総合研究科	教授
西口 修平	兵庫医科大学	教授
小原 恭子	熊本大学大学院医学薬学研究部	特任教授
落谷 孝広	国立がんセンター研究所	独立室長
杉山 和夫	埼玉医科大学医学部	講師
丸澤 宏	京都大学医学部	助教

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。このような疾患発症の背景には、免疫機構による感染細胞の監視機構が働き、その結果炎症と肝細胞の再生が絶え間なく起こることが、肝疾患の増悪化を招くと考えられる。さらに、免疫による炎症に加えてウイルス自身が感染細胞の増殖を変化させるとも考えられる。本研究では、HCV 感染・増殖それ自体が細胞変化をもたらす原動力になっているとの考えのもとに、細胞が受ける各種変

化を明らかにし、その原因となるウイルス側要因を解明し、それらの機構を明らかにし、HCV 感染による肝疾患を予防、あるいは治療するための方策を見出すことを目的とする。さらには、持続的な感染による炎症の過程で引き起こされる細胞側の変化についても解析を進め、炎症過程で惹起される各種変化の分子機構を明らかにする。また、ウイルス自身の複製を明らかにして、人為的に効率よいウイルス排除法の確立を目指すために、ウイルス複製を制御する要因をウイルスおよび宿主側から明らかにして、複製機構の全体像を解明して人為的なウイルス排除法の確立を目指す。

B. 研究方法

(1) ウイルス複製を制御する細胞側要因の解析

HCV ゲノム自立的複製細胞あるいは HCV 感染・増殖細胞を用いてウイルス複製に関与する細胞側の種々の要因を明らかにするために、以下の方法による解析を行う。

(a) ウイルス複製を保持する細胞内環境の解析。

HCV 感染複製系を用いて、ウイルス蛋白質およびウイルスゲノム複製複合体の細胞内局在の解析を、コンフォーカル顕微鏡、電子顕微鏡、および各種生化学的手法により解析する。さらに細胞内の構造体の変化も解析し、それらを総

合しウイルス粒子産生に必要な細胞内環境を理解する。

(b) HCV 複製細胞の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイで解析し、変化のある遺伝子については、それらの HCV 複製に及ぼす効果を調べる。

(2) HCV 感染細胞およびゲノム自立複製細胞における細胞の増殖に関する解析

(a) C 型慢性肝炎患者における肝細胞の遺伝子変異率が高いと予想されるために、その要因と考えられる遺伝子編集酵素 AID の発現を調べる。また、ヒト臨床検体における AID の発現量の解析を real-time RT-PCR 法、ヒト AID に対する特異抗体を用いた免疫染色法により行い、正常肝組織との比較をおこなう。

(b) HCV ゲノムが持続的に複製している細胞で特異的に発現が亢進している細胞側遺伝子 DHCR24 による細胞増殖への影響を解析する。

(c) HCV の持続感染がミトコンドリアに及ぼす影響を、患者検体を用いて解析する。

(d) HCV 感染によるアポトーシス、小胞体ストレス、細胞周期変化を細胞形態変化などを評価可能なマーカーにより解析する。

(3) 新たな宿主肝細胞の樹立およびその細胞を用いた肝疾患の解析

脂肪組織から得られたヒト間葉系幹細胞から肝細胞への分化培養系を改良し、短時間で肝細胞様の形態、機能を持つ細胞を誘導させる。この細胞を用いて肝疾患に関係する遺伝子あるいは non-coding RNA の解析を行う。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮が必要な研究については各分担研究者が所属する機関において、倫理委員会に申請し承諾を得る。また、遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については各研究機関の承認を得る。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」従って研究を行う。

C. 研究結果

(1) ウイルス複製を制御する細胞側要因の解析

HCV ゲノム自立的複製細胞あるいは HCV 感染・増殖細胞を用いてウイルス複製に関与する細胞側の種々の要因を解析して、以下の成果を得た。

(a) HCV ゲノムは細胞内の油滴量をコア蛋白質

依存的に増やし、その結果蓄積した油滴を利用して感染性ウイルス粒子を産生させる。

まず、感染性 HCV ゲノムを発現させた Huh7 細胞において油滴の量が増えていることを見いだした。この油滴の増加はコア蛋白質により生じることを変異 HCV ゲノムの解析から明らかにした。感染性ウイルス粒子を産生する HCV レプリコンを用いてウイルスタンパク質の細胞内局在を調べたところ、構造蛋白質・非構造蛋白質ともに小胞体膜に加えて、小胞体膜近辺の油滴にも局在することが分かった。

なお、慢性 C 型肝炎患者の肝組織に、広範に構造領域が欠損している(約 2kb) ウイルス RNA が検出された。欠損領域はエンベロープタンパク 1 (E1) から非構造蛋白 2 (NS2) の一部におよんでいた。この欠損 HCV ゲノム構造領域にゲノムの非構造領域をつないで作製した欠損 HCV RNA を培養細胞 Huh7 に導入した結果、コアタンパクの発現が認められ、欠損 HCV の複製はコア蛋白質の供給に重要である可能性が考えられた。

(b) HCV 複製を制御する宿主遺伝子の解析

cDNA マイクロアレイの解析などから、HCV 複製を制御する宿主因子として、DDX3、メタロチオネインなどを明らかにした。次に、HCV レプリコン複製細胞で DDX3 をノックダウンさせると RNA の複製に影響が出るかどうかを調べた。その結果、完全長の HCV ゲノム自立複製細胞では、DDX3 をノックダウンさせると、HCVRNA の複製効率が 10%以下に低下した。一方、構造領域をもたない HCV 欠失ゲノムが自立複製している細胞において低下率は 50%程度であった。DDX3 による HCV 複製効果は HCV-2a 型感染細胞においても観察されたことから、DDX3 は HCV の効率的な複製を支持する分子であることが示唆された。

cDNA マイクロアレイ解析から特定の HCV ゲノム複製細胞においてメタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A) の発現亢進が観察された。事実、この細胞内のメタロチオネインをノックダウンさせるとノックダウンしていないコントロール細胞に比べ、生じる HCV ゲノム自立複製細胞に由来するコロニー数が大幅に低下した。

(ただし、この現象は全ての細胞で観察されたわけではない)。今回の結果から、メタロチオネインが HCVRNA の複製効率を規定しうる分子で

ある可能性が考えられた。

(2) HCV 感染細胞あるいは C 型慢性肝炎患者における細胞の増殖に関する解析

(a) C 型慢性肝炎患者由来の肝組織において、遺伝子編集酵素 AID の発現亢進を観察した。遺伝子に変異を導入する活性を有する cytidine deaminase である遺伝子編集酵素 Apobec family 分子の中で、AID のみがヒト自身の DNA 配列に遺伝子変異を導入する活性を有することが示されている。AID は生理的条件下では肝細胞ではその発現をほとんど認めなかった。しかしながら、HCV 感染や炎症性サイトカイン刺激によりヒト肝細胞に AID が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。この肝細胞における AID の発現は、HCV のコードするウィルスタンパクのひとつである Core タンパク質依存性に生じていることも判明した。

ヒト臨床検体を用いた解析からは、慢性肝炎、肝硬変、肝癌を伴った肝組織中では、内在性 AID mRNA の過剰発現が real-time PCR 法により確認された。同時に、特に HCV 感染を伴った肝組織中において、AID の発現量がより高いことも明らかとなった。ヒト AID 抗体を用いた免疫組織学的な検討からは、慢性炎症を伴ったヒト肝組織中では、組織浸潤リンパ球とともに肝細胞でも AID タンパクが過剰発現していることが確認された。

(b) HCV ゲノムが持続的に複製している細胞で特異的に発現が亢進している DHCR24 の機能解析。

HCV 感染の DHCR24 の発現に及ぼす影響をヒト肝臓キメラマウス感染系で検討した。その結果、HCV 非感染マウス群に比べ HCV 感染マウス群では平均で 5 倍以上の優位な発現上昇が見られた。この発現増加は転写レベルで生じている。DHCR24 を過剰発現する HCV 発現継代細胞においては HCV 非発現細胞に比べカスパーゼの活性が抑制されている事が明らかとなった。本遺伝子発現により p53 誘導分子の発現が HCV 発現継代細胞で低下していた。これらのことから、DHCR24 の機能のひとつとしては、感染細胞のアポトーシスを抑制する働きがあると推定された。

(c) C 型慢性患者におけるミトコンドリア異常
C 型慢性肝炎の 1 例において、IFN の投与後経時的にミトコンドリア DNA の全配列を調べた。

IFN 投与直前は 23 箇所に変異が生じており、慢性肝炎においても肝癌症例の非癌部に匹敵する変異数であり、慢性炎症によってミトコンドリア DNA に異常が生じている可能性を示唆した。さらに、IFN 投与により、HCV が消失したにも関わらずミトコンドリアの変異数の減少は認められなかった。

(d) HCV 急性感染期においてはアポトーシスが誘導されやすい。

培養細胞への HCV 感染複製系を用いて、急性感染期における caspase-3 依存性アポトーシスの誘導を調べたところ、非感染細胞に比べ優位にアポトーシスが誘導された。ミトコンドリアへの Bax の蓄積及びミトコンドリアにおける superoxide の産生が観察され、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出が認められた。ミトコンドリアの膨化等の形態変化も観察された。一方、HCV 感染による ER ストレス誘導は認めなかった。

(3) 新たな宿主肝細胞の樹立とその解析
脂肪組織から得られたヒト間葉系幹細胞から肝細胞への分化培養系を改良し、これまで 35 日以上を要した肝細胞様分化誘導をわずか 2 週間に短縮することに成功した。これらの細胞は、アルブミン染色陽性であり、培養液中にもアルブミンの産生が ELISA によって確認された。さらに RT-PCR による検討では、TDO2, CYP3A4, 2C9 などの成熟肝細胞に特徴的な遺伝子の発現も確認された。また、肝がん発生のメカニズム解明、抗ウイルス作用を検討するための基盤研究として、正常の肝臓の発生初期に発現が高く、成体肝臓でその発現が抑制されている microRNA を探索し、4 種類の microRNAs を見出した。そのうちのひとつがヒト肝がん細胞株でも発現が亢進していることを明らかにした。

D. 考察

HCV 感染による細胞の変化の解析を通して、慢性肝炎、肝硬変などの病態を理解し、予防・治療に向けた研究展開を目指して行った研究から、本年度は、HCV 複製の場として細胞内の油滴の重要性を明らかにした。また、HCV 複製により細胞内の油滴の量が増加することも見出し、HCV 感染・複製と脂肪症との関連性が示

唆された。また、感染性ウイルス粒子の物理的な性質の一部を明らかにできた。油滴の産生増加はコア蛋白質により引き起こされる。一方、慢性肝炎患者の肝組織には、外膜蛋白質をコードする遺伝子領域が欠失したHCVゲノムが存在し、そこからコア蛋白質が産生される可能性を示した。このことは、コア蛋白質がウイルス複製にとりわけ重要な働きをしていることを示唆している。

HCV複製を制御する宿主因子としてDDX3、メタロチオネインを明らかにした。これらの因子がウイルス複製でどのような働きを示すのか今後の課題である。また、ウイルス複製細胞において細胞の増殖を制御する遺伝子として、DHCR24を明らかにしたが、この遺伝子の働きとして抗アポトーシス作用を持つことがわかった。HCV感染が細胞のアポトーシスを抑制して、その結果ウイルス産生を亢進すること、さらには細胞の増殖機構を亢進させてがん化へ向かわせる可能性が考えられる。

一方、HCVの急性感染においては、細胞のアポトーシスを誘導する働きもあることを示した。その際、ミトコンドリア機能障害も伴うことも示した。このことはHCV感染が細胞障害性を示す可能性があり、感染肝組織における炎症・再生の直接的な要因のひとつになる可能性も考えられる。また、C型慢性肝炎におけるミトコンドリア異常にも関連する可能性が考えられる。ミトコンドリアの異常はインターフェロンによりウイルスが排除されても持続されることを見出しているが、このような異常の持続が病態の進展に影響を与えるかもしれない。

慢性肝炎患者からの高率の肝がんの発症は、宿主細胞の遺伝子異常をもたらす結果であると考えられる。C型慢性肝炎患者の肝組織においてウイルスのコア蛋白質依存的にDNA編集酵素AIDの高い発現が見られることを明らかにした。このことは、慢性肝炎における遺伝子異常の亢進を分子レベルで説明できる可能性があり、今後のさらなる研究が期待される。

間葉系幹細胞から肝細胞を分化誘導することが可能となり、この細胞をHCV感染の宿主に利用できる可能性が広がった。これまで、HCV感染・培養系に適した培養細胞には限りがあるために、ウイルス学的な解析が十分でない点が多々あるが、分化誘導した肝細胞にHCVが感染

し、増殖すれば、HCVのウイルス学がさらに進展すると期待される。

E. 結論

HCV感染により引き起こされる細胞の増殖制御として、細胞内への脂肪蓄積、ミトコンドリア機能異常などが、病態の進行に寄与している可能性が示唆される。また、HCVによる細胞のアポトーシス制御が炎症を引き起こしたり、あるいは細胞の増殖性を高めることが示唆される。C型慢性肝炎を背景にした肝がんの発生にAIDによる宿主細胞の遺伝子変異の蓄積が考えられることを示した。これらの成果はHCV感染による疾患発症を予防する方策の開発に役立つと考えられる。ウイルス複製を制御する宿主因子を標的とした抗HCV剤の開発み道を開く成果を得た。また、間葉系細胞を分化誘導により肝細胞を効率よく樹立することができるようになったことから、本細胞を用いたHCVウイルス学的な研究および、肝疾患の研究が進むと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K... Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282: 32765, 2007
2. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K... Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
3. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K... The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-9710, 2007
4. Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito Ji, Saito K, Togashi H, Nagano-Fujii M, Hotta H, Kawata S. Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b. *J Infect Dis.* 196(7):1006-1009, 2007.

5. Lu L, Li C, Fu Y, Thaikruea L, Thongsawat S, Maneekarn N, Apichartpiyakul C, Hotta H, Okamoto H, Netski D, Pybus OG, Murphy D, Hagedorn CH, Nelson KE. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J Gen Virol*. 88(5):1505-1518, 2007.
6. Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat*. 14(2):96-106, 2007.
7. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol*. 81:13922-13926 (2007).
8. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res*. 125:162-168 (2007).
9. Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J*. 274:4161-4176 (2007).
10. Kobayashi S, Takeda T, Nishiguchi S, et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a Multicenter retrospective cohort study of 1124 patients. *Liver Intern*. 2007; 27: 186-191.
11. Nishimura, T. Saito, M. Takano, T. Nomoto, A. Kohara, M. and Tsukiyama-Kohara. K., Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, in press.
12. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007.
13. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007.
14. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kB signaling. *Oncogene* 26, 5587-5595, 2007.
15. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T: Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*, 13, 470-476, 2007.

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

(1) 発明の名称「肝炎ウイルスの増殖法、および肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用」

発明者：下遠野 邦忠、土方 誠、山口達哉

国際出願番号：PCT/JP2007/068611

出願日：2007年9月26日

(2) 発明の名称「レポーター遺伝子産物を発現するHCV全長ゲノム複製細胞、並びに、当該細胞を用いたスクリーニング方法およびスクリーニングキット」

特許番号：第4009732号

出願番号：特願2006-101483号

発明者：加藤 宣之、池田 正徳

出願日：2006年4月3日

HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御

分担研究者 下遠野 邦忠 慶應義塾大学 医学部 教授

研究要旨： HCV 複製において細胞内の脂質蓄積に異常が生じることを明らかにした。この異常は主としてコアタンパク質によりもたらされる。HCV 感染複製系においては、蓄積した脂肪の貯蔵として知られる油滴が感染性ウイルス粒子の産生に重要な働きをすることを明らかにした。油滴と会合出来ないウイルス蛋白質を産生する変異体からは感染ウイルス粒子の産生は見られない。また、感染性ウイルス粒子はおよび非感染性粒子が培養上清に見られるが、感染性ウイルス粒子は、浮遊密度が非感染性粒子よりも小さいことがわかり、浮遊密度の小さい感染性ウイルス粒子の産生は、ウイルスタンパク質が油滴と会合している場合に見られることがわかった。これらの結果は HCV 感染が細胞内の脂肪代謝を制御してその結果蓄積される油滴を用いてウイルス粒子産生を行うことを示す。また、このような油滴の細胞内への蓄積は HCV 感染による脂肪症の発症にも寄与すると考えられる。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。このような疾患発症の背景には、免疫機構による感染細胞の監視機構が働き、その結果炎症と肝細胞の再生が絶え間なく起こることが、肝疾患の増悪化を招くと考えられる。さらに、免疫による炎症に加えてウイルス自身が感染細胞の増殖を変化させる結果、細胞の変化を促進させるとも考えられる。本研究では、HCV 感染と増殖自身が細胞に与える効果を調べ、ウイルスの何が肝細胞の増殖に変化を与え最終的にがん化させるのかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) ウイルス複製細胞における細胞側因子の解析

感染性 HCV ゲノムが複製する細胞におけ

る細胞中の変化を顕微鏡で観察し、ウイルスタンパク質発現がある場合とない場合とでの違いを調べる。

(2) ウイルスゲノム自立複製細胞を用いたウイルス蛋白質の細胞内局在の解析。

HCV ゲノムを効率よく自立複製可能な細胞を用いて、ウイルス蛋白質の細胞内局在を調べる。その際、(1) で観察した事象とウイルスタンパク質の局在との間に相関があるかを明らかにする。

(3) HCV 感染増殖系を用いて、(2) の実験を行い、ウイルス粒子産生との関連性を調べる。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する。具体的にはすでに感染性が証明されている HCV-2a 遺伝子由来の JFH1 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る。一連の実験で HCV 感染が細胞内の脂肪代謝に与える影響を調べる。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) HCV ゲノムは細胞内の油滴量を増やす

感染性 HCV ゲノムを発現させた Huh7 細胞において油滴の量が増えていることを見いだした。油滴の観察はコンフォーカル顕微鏡観察により行った。油滴のマーカースとしてボディピーを用いた。感染性 HCV ゲノム (JFH1) を導入した細胞においてボディピーによる染色が高まることを観察した。

(2) HCV コアタンパク質が油滴産生量高める

JFH1 を導入した細胞においては油滴の量が上がることを見いだしたので、ゲノムの責任領域を決めるために、各種の遺伝子を欠失したゲノムを用いて、油滴産生を解析した。その結果、コアを欠失させたレプリコンを導入した場合に油滴の量が増えることを見いだした。

(3) 感染性ウイルス粒子を産生する HCV レプリコンを用いたウイルスタンパク質の細胞内局在

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。

(4) 油滴量の増加は感染性ウイルス粒子産生に重要である

ウイルスタンパク質が小胞体膜周辺への局在と油滴周辺への局在の違いを示すことが明らかになった。そこで、これらの違い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。

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。以上から油滴が感染性ウイルス粒子に重要な働きをしていることが分かり、コアが油滴を増やす理由がウイルス複製との関連で明らかになった。

D. 考察

HCV 感染者には糖尿病あるいは脂肪代謝異常が見られるが、これらの代謝異常がウイルス感染とどのように関連しているのかについては不明な点が多い。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を通して、これら一連の反応が細胞内における代謝異常とどのように関連するかについて調べた。まず、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、その中にウイルス非構造タンパク質が会合していることを見いだした。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。

感染性ウイルス粒子の密度が、非感染性粒子のそれに比べて小さいことから油滴周辺から産生されるウイルス粒子には脂質性の因子が結合して、そのことが感染性を付与していると考えられる。

E. 結論

HCV 感染細胞では油滴の量が増える。コアタンパク質が油滴の増加に重要な働きをする。HCV タンパク質は油滴周辺に局在し、そのことが感染性粒子産生に重要であることを明らかにした。これらの結果は、HCV 感染細胞においては脂肪代謝を活性化し、油滴量を増やしウイルス複製の効率を高めることが明らかになった。HCV 感染者における脂肪肝の発症は、ウイルス複製のための油滴量増加と関係するかも知れない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watashi K, Shimotohno K. Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol.* 17: 245, 2007
2. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282: 32765, 2007
3. Arimoto KI, Konishi H, Shimotohno K. UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Mol Immunol.* 45: 1078, 2008
4. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
5. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007

6. Takao Y, Yamada A, Yutani S, Takedatsu H, Ono T, Etoh K, Wang Y, Suzuki S, Ide T, Shimotohno K., Sata M, Itoh K. Identification of new immunogenic peptides in conserved regions of hepatitis C virus (HCV) 1b with the potentiality to generate cytotoxic T lymphocytes in HCV1b(+) HLA-A24(+) patients. *Hepatol Res.* 2007 37(3):186-195, 2007
7. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K.. In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):127-133, 2007
8. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 7500-7505, 2007
9. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M,

Shimotohno K., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-9710, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明の名称「肝炎ウイルスの増殖法、および肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用」

発明者：下遠野 邦忠、土方 誠、山口達哉

国際出願番号：PCT/JP2007/068611

出願日：2007年9月26日

肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因

及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧

C型肝炎ウイルス複製に加えて細胞の増殖を制御する細胞側因子の解明と機能解析

分担研究者 堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は高率に肝細胞がんを引き起こす、がんウイルスである。細胞がん化の前提として細胞の不死化・アポトーシス抵抗性の獲得があげられるが、一方、HCV持続感染に伴って肝細胞障害・細胞死も観察される。HCV感染に伴う肝細胞死は主にHCV特異的細胞傷害性Tリンパ球を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきたが、ウイルスそのものによる細胞障害の可能性も残されている。本研究では、HCV感染培養細胞系を用いて、HCVによる細胞死及び細胞がん化に関連する細胞内事象について検討した。その結果、まず、HCV感染4日後には、細胞の小型円形化を伴う細胞死が認められた。その細胞死は、ミトコンドリアへのBaxの蓄積、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアからのcytochrome *c*の放出及び、それに引き続くcaspase-3の活性化と細胞DNAの断片化を伴うことから、ミトコンドリア介在性アポトーシスによるものと考えられた。一方、HCV感染2～3週間後の持続感染期においては、ERK1/2の活性化及びglycogen synthase kinase-3β（GSK-3β）の不活性化に伴うアポトーシス抵抗性の誘導が観察された。さらに、同じ時期に、HCV感染細胞の核小体の肥大化が観察され、Rbがん抑制タンパク質の蓄積阻害及びcyclin Eとcyclin B1の発現増加が認められた。以上の成績より、HCVは、急性感染期にBax誘導性／ミトコンドリア介在性／caspase-3依存性アポトーシスを引き起こし、一方、慢性持続感染期には、ERK1/2の活性化及びGSK-3βの不活性化によるアポトーシス抵抗性ならびにRbがん抑制タンパク質の蓄積阻害及びcyclin Eとcyclin B1の発現増加を介した細胞周期脱制御により、細胞がん化を誘導することが示唆された

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は長期間の持続感染により、慢性肝炎、肝硬変の原因となり、高率に肝細胞がんを引き起こす。肝細胞がんの発生には細胞の不死化が前提となるが、一方、HCV持続感染に伴って、慢性炎症と肝細胞障害・細胞死がほぼ例外なく観察される。

HCV感染に伴う肝細胞死はアポトーシスが主

体であり、HCV特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきた。一方、ウイルス感染においては、細胞変性効果（cytopathic effect; CPE）とよばれるウイルスによる直接の細胞障害が引き起こされることもしばしば観察される。CPEの分子機序として、ミトコンドリア障害や小胞体（ER）ストレスの関与が示唆されている。近年、HCVタン

パク質 (Core、E1、NS3/4A、NS5A、NS5B) がアポトーシスを誘導することも報告されている。我々はこれまでに、NS4A や NS3/4A 複合体が ER のみならずミトコンドリアにも局在し、ミトコンドリア経路を介した細胞障害を誘導することを報告した。

本研究では、近年開発された HCV J6/JFH-1 感染系を用いて、HCV による細胞死の有無について検討するとともに、感染の持続に伴って宿主細胞が、がん化形質獲得に向けてどのように変化するかについて、その分子機序を含めて解析した。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス：Huh-7.5 細胞及び Huh-7 細胞と HCV J6/JFH-1 株を用いた培養細胞感染実験系を用いた。

(2) アポトーシスの解析：アポトーシスの程度は、WST-1 法による細胞死の定量、Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche)による DNA 断片化、及び、Caspase-Glo 3/7 and 9 Assay (Promega)を用いた caspase-3 活性の定量により測定した。

(3) ミトコンドリアの解析：ミトコンドリア膜電位は green fluorochrome rhodamine-123 (Sigma) を用いて FACS 解析により測定した。形態学的解析は MitoTracker (Molecular Probes) を用いた光学顕微鏡解析及び電子顕微鏡解析によった。ミトコンドリア superoxide の産生は MitoSOX™ Red (Molecular Probes)を用いて測定した。

(4) ER ストレス：GRP78 の誘導を指標にした。

(5) 細胞周期の解析：Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) を用いて定法により行った。

(6) イムノブロットィング：市販の抗体を用いて定法により行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え HCV を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得て行った。

C. 研究結果

(1) HCV 一段増殖実験系の確立：Huh-7.5 細胞 (または Huh-7 細胞) と HCV J6/JFH-1 株を用いた培養細胞感染実験系を用いて、multiplicity of infection = 2 でウイルス感染を行い、ほぼすべての細胞に HCV を感染させ、感染 2 日後にはウイルス増殖がピークに達するような感染実験系を確立した。以後の実験はすべてこの感染条件下で行った。

(2) HCV 急性感染期における caspase-3 依存性アポトーシスの誘導：感染後 4 日及び 6 日目に小型円形化を伴う細胞死が認められた。感染後 6 日目の生細胞数は非感染細胞数の約半数であった。感染後 4 日及び 6 日目の細胞 DNA 断片化の量は非感染細胞のそれぞれ 2.6 倍、5.2 倍であった。caspase-3 の活性は、感染後 4 日及び 6 日目で、非感染細胞の 4.1 倍及び 5.9 倍に増加した。また、感染後 6 日目に、caspase-3 の基質である PARP の切断が確認された。同じ時期に、ミトコンドリアへの Bax の蓄積及びミトコンドリアにおける superoxide の産生が観察され、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出が認められた。ミトコンドリアの膨化等の形態変化も観察された。

一方、HCV 感染による ER ストレス誘導は認めなかった。

(3) HCV 持続感染期における caspase-3 依存性アポトーシスの低下と核小体の肥大化：HCV 感染細胞の維持培養を継続していると、やがて、caspase-3 活性は低下し始め、感染後 20 日程度で、非感染細胞の caspase-3 活性とほぼ同じレベルまで低下した。この時点で、ミトコンドリア介在性アポトーシス促進作用があると報告されている glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) のリン酸化の増加 (不活性化) が認められた。また、HCV 感染細胞の核小体の肥大化と、核小体特異的タンパク質の一つである fibrillarlin の発現増加が観察された。

D. 考察

HCV を Huh-7.5 細胞に感染させると、感染 2 日後には 90%以上の細胞が HCV 陽性を示し、少なくとも 3 週間以上にわたって HCV の持続感染が認められた。

感染 4 日後には細胞の小型円形化が明らかに認められ、HCV が直接的に細胞死を誘導することがわかった。この細胞死は、ミトコンドリアへの Bax の蓄積、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリアから細胞質への cytochrome *c* の放出、及び、caspase-3 の活性化を伴っていた。従って、HCV は急性感染期に、Bax 誘導性/ミトコンドリア介在性/caspase-3 依存性アポトーシスを引き起こすと考えられた。

興味深いことに、HCV 感染後 2~3 週間経過した持続感染期には、感染細胞の caspase-3 活性が低下し、HCV によるアポトーシスに対して抵抗性が認められた。そして、HCV 感染細胞の核小体の肥大も観察された。アポトーシス抵抗性は細胞がん化に不可欠の事象であり、また、核小体の肥大は病理学的にがん細胞の指標の一つと考えられている。そこで、アポトーシス抵抗性や細胞がん化に関連する宿主因子の発現や機能に対する HCV 感染の影響について検討した。その結果、HCV 持続感染により ERK1/2 のリン酸化が増加する（活性化される）こと及び GSK-3 β のリン酸化が増加する（不活性化される）ことが明らかになった。ERK1/2 は一般にアポトーシスを抑制し、GSK-3 β はミトコンドリア介在性アポトーシスを促進することが知られている。従って、HCV 持続感染による ERK1/2 の活性化及び GSK-3 β の不活性化により、アポトーシス抵抗性が誘導される可能性が示唆された。

また、非感染細胞では培養日数の増加とともに Rb がん抑制タンパク質の蓄積が増加したが、HCV 感染細胞ではほとんど増加は認められなかった。Rb がん抑制タンパク質は E2F 転写因子との結合・解離を介して細胞周期を制御することが

知られている。そこで HCV 持続感染による細胞周期への影響を調べた。その結果、培養日数の増加とともに、非感染細胞では G0/G1 期停止が認められたが、HCV 感染細胞では細胞周期の進行促進が認められた。細胞周期は、Rb がん抑制タンパク質による制御機構以外にも、cyclins によっても制御されるため、cyclins の発現に関して検討したところ、HCV 感染細胞において cyclin E と cyclin B1 の発現増加が認められた。

以上の結果から、HCV 持続感染細胞において、ERK1/2 の活性化及び GSK-3 β の不活性化により、アポトーシス抵抗性が惹起されることが推測された。さらに、核小体の肥大に伴うリボソーム生成の促進と、Rb がん抑制タンパク質の蓄積阻害及び ERK1/2 の活性化を介した UBF 活性化による RNA ポリメラーゼ I の転写促進誘導の結果、リボソーム合成が増大し、核小体の肥大を引き起こすことが示唆された。また、HCV 感染による Rb がん抑制タンパク質の蓄積阻害は E2F 転写因子の解離を促し、cyclin E 及び cyclin B1 の発現増加と相まって、細胞周期の脱制御を誘導すると考えられる。このような HCV 持続感染に伴う細胞形質の変化とそれに関連する分子発現の動態は、HCV による発がん機序を解析する上で重要な知見になると思われる。

E. 結論

HCV は、急性感染期に Bax 誘導性/ミトコンドリア介在性/caspase-3 依存性アポトーシスを引き起こし、一方、慢性持続感染期には ERK1/2 の活性化及び GSK-3 β の不活性化によるアポトーシス抵抗性ならびに Rb がん抑制タンパク質の蓄積阻害及び cyclin E と cyclin B1 の発現増加を介した細胞周期脱制御を通して、細胞がん化を誘導することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K,

- Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya N, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* (in press)
2. Goto E, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Aoki M, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Hotta H, Miyagishi M, Ishido S. An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals. *PLoS ONE* 3(1):e1490, 2008.
 3. Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Nagano-Fujii M, Hotta H, Kawata S. Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b. *J Infect Dis.* 196(7):1006-1009, 2007.
 4. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol.* 51(4):471-482, 2007.
 5. Lu L, Li C, Fu Y, Thaikruea L, Thongsawat S, Maneekarn N, Apichartpiyakul C, Hotta H, Okamoto H, Netski D, Pybus OG, Murphy D, Hagedorn CH, Nelson KE. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J Gen Virol.* 88(5):1505-1518, 2007.
 6. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Hasegawa T, Koseki H, Ohara O, Nakayama M, Toyooka K, Matsuoka K, Hotta H, Yamamoto A, Ishido S. Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 26(3):846-854, 2007.
 7. Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat.* 14(2):96-106, 2007.
2. 学会発表
1. Kasai D, Nagano-Fujii M, Bungyoku Y, Sasayama M, Sada K, Hotta H. Glucose uptake and GLUT1/2 expression are down-regulated in Huh-7.5 cells harboring an HCV subgenomic RNA replicon and full-genomic RNA replicon. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 2. Kitayama K, Bungyoku Y, Deng L, An C, Nagano-Fujii M, Hotta H. HCV with high replication/release capacity in Huh-7.5 cell cultures obtained by a simple, rapid method exhibits two distinct types of cytopathic effect. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 3. Deng L, Nagano-Fujii M, Kitayama K, An C, Bungyoku Y, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis via a mitochondrial-related caspase pathway. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 4. Bungyoku Y, Kitayama K, Nagano-Fujii M, Hotta H. Analysis of adaptive mutants of the J6/JFH-1 strain of hepatitis C virus genotype 2a. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 5. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Kim, RS, Hotta H. Sequence variations in and around the V3 region of NS5A of HCV genotype 1b: a predictive marker for sustained virological response upon treatment with pegylated interferon and ribavirin. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, 2007.
 6. Deng Lin、長野基子、北山喜久美、安春英、分玉泰彰、堀田博 C型肝炎ウイルス感染による細胞変性効果の分子機序の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007.
 7. 北山喜久美、分玉泰彰、Deng Lin、安春英、長野基子、堀田博 高感染力価の HCV J6/JFH-1 株の産生とウイルス細胞変性効果 (CPE)の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007.
 8. 分玉泰彰、北山喜久美、長野基子、堀田博 長期間培養により得られた増殖適応変異を有する C型肝炎ウイルス (HCV) の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007.
 9. 笠井大介、長野基子、分玉泰彰、笹山美紀子、定清直、堀田博 C型肝炎ウイルスは GLUT2、GLUT1 の細胞膜表面への発現の抑制を介してグルコース取り込みを抑制する 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007.
 10. Ahmed El-Shamy、笹山美紀子、長野基子、金守良、堀田博 C型肝炎ウイルス NS5A V3 領域近傍のアミノ酸配列多様性: ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における SVR 予測因子の検討第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007.
 11. 北山喜久美、分玉泰彰、Deng Lin、安春英、長野基子、堀田博 高感染力価の HCV J6/JFH-1 株の産生とウイルス細胞変性効果の解析 第60回日本細菌学会関西支部総会、大阪、2007.
 12. 笠井大介、長野基子、分玉泰彰、北山喜久美、

足達哲也、堀田博 C型肝炎ウイルスによる
GLUT2、GLUT1 の細胞膜表面への発現の
抑制を介したグルコース取り込みの抑制に
関する検討 第60回日本細菌学会関西支
部総会、大阪、2007.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与する宿主因子に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の増殖に必要な細胞因子を明らかにすること及びHCVの長期複製増殖による宿主遺伝子の発現変動を明らかにすることを目的として実験を行い、以下のような成果を得た。（1）マイクロアレイ解析により HCVRNAの複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している4種類の宿主遺伝子を抽出同定した。（2）HCV コア蛋白質に会合して HCV ゲノムの複製を支持する RNA ヘリケース分子 DDX3 を見出した。（3）全長 HCVRNA 複製細胞（0 細胞）を1年間培養することにより発現レベルが2倍以上亢進、或は1/2以下に低下する遺伝子群を抽出した。発現が亢進する遺伝子群から着目したメタロチオネインについてノックダウン細胞を作成して HCVRNA の複製効率に与える影響を解析した。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その8割にはC型肝炎ウイルス（HCV）の感染が認められている。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、現時点で最も有効なペグインターフェロン（ペグ IFN）とリバビリンとの併用療法によっても、なお、半数の患者ではHCVを体内から排除できない状況が続いている。

HCV キャリアーの体内からHCVを排除することがHCV感染症による犠牲者の激減をもたらすものと予想されるが、画期的な治療法の開発が遅れている。その背景にはHCVの増殖の理解が不足していることが挙げられる。従って、HCVの増殖機構全体を解明する必要がある。そして、HCVの増殖を効率的に抑制できる人為的制御法の開発が必要である。

さらには、HCVの持続感染により生じる宿主

細胞の機能変化を明らかにして、発がんを抑制する人為的方法を開発することも必要である。本研究ではこれらの点を解決することを目指して、（1）HCV増殖に必要な細胞因子の探索（2）全長HCVRNAの長期複製増殖による宿主細胞遺伝子の発現変動の2項目に焦点をあて実験を行った。

B. 研究方法

（1）HCV増殖に必要な細胞因子の探索

これまでに我々が細胞株として樹立したHCVレプリコン複製細胞や全長HCVRNA複製細胞をIFN- α やIFN- γ で処理（500-1000 IU/mlを4日ごとに添加して3週間）して、レプリコンRNAやHCVRNAを排除した治癒細胞を作成した。これらの細胞にin vitroで合成したHCVレプリコンRNA（QR/3-5B/QR, KE）を導入して経時的（24, 48, 72 および 96 時間）にルシフェラーゼ活性を測定してレプリコンRNAの複製効率を調べた。

各種治癒細胞から RNeasy extraction kit を用いて Total RNA を調製し、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.9 array, 47000 genes) による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

HCV-0 株コアの発現ベクターを 293T 細胞に導入して Conforcal laser scanning microcopy によりその局在を調べた。細胞を抗コア抗体 (CP-9 と CP-11 の混合物) や抗 DDX3 抗体で処理後、コアは Cy3、DDX3 は fluorescein isothiocyanate により可視化した。

HCV-0 株コアの発現ベクターと HA タグを有する DDX3 の発現ベクターを 293T 細胞に導入後、細胞抽出物について抗 HA 抗体による免疫沈降実験を行った。

DDX3 のノックダウン細胞を作成するために、レンチウイルスベクター内に DDX3 に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードする配列を導入し (pLV-shRNA)、pVSV-G packaging construct とともに 293FT 細胞に導入した。得られたレンチウイルスを O 細胞、sO 細胞や RSc 細胞に感染させ、それぞれの細胞において DDX3 ノックダウン細胞を作成した。ノックダウンされているかどうかについては、抗 DDX3 抗体を用いた Western blot 解析により確認した。LightCycler を用いた HCVRNA の定量や各種抗体を用いた Western blot 解析はこれまでに報告している常法に従った。

(2) 全長 HCVRNA の長期複製増殖による宿主細胞遺伝子の発現変動

O 細胞, O1 細胞 (O 細胞を 1 年間継代培養した細胞), Oc 細胞および Oc1 細胞 (Oc 細胞を 1 年間継代培養した細胞) を同じ培養条件下で継代培養した。それぞれの細胞より RNA

を抽出し、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子) による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

メタロチオネインのノックダウン細胞を作成するために、レンチウイルスベクター内にメタロチオネインに対する short hairpin RNA (shRNA) をコードする配列 (各種メタロチオネインに共通するヌクレオチド配列を 5 種類選定) を導入し (pLV-shRNA)、pVSV-G packaging construct とともに 293FT 細胞に導入した。得られたレンチウイルスを Oc 細胞に感染させ、メタロチオネインのノックダウン細胞を作成した。ノックダウンされているかどうかについては、定量的 RT-PCR 法によりメタロチオネイン mRNA 量の低下を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) HCV 増殖に必要な細胞因子の探索

これまでに作成した様々な治癒細胞における HCV レプリコン RNA の複製効率を調べた結果、大きな差があることが分かった。レプリコン RNA を細胞内に導入 96 時間後に測定したルシフェラーゼ活性を指標にした。我々が汎用している全長 HCVRNA 複製細胞である O 細胞から作成した Oc 細胞におけるルシフェラーゼ活性を 1 とすると、OR6c 細胞は 3 倍、sO/J4c 細

胞は5倍、s0/J2c細胞は9倍、そしてs0/J3c細胞では10倍複製効率が高いことが分った。逆に0c/clone 2細胞では1/10、0c/clone 9では1/100以下で複製効率が非常に低くなっていることが分った。

得られたデータを基にして、次にs0/J2cとs0/J3c細胞をRNA複製効率の高いHigh fitness細胞として、そして0c/clone2と0c/clone9細胞をRNA複製効率の低いLow fitness細胞として位置付け、0c細胞を基準としてマイクロアレイ解析を行った。0c細胞を基準として比較した結果、High fitness細胞群で発現レベルが1.5倍以上亢進していて、かつLow fitness細胞群で0.4倍以下に低下している4遺伝子（Group-specific component (GC)、Hyaluronan-binding protein 2 (HABP2)、Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3 (SLC01B3)、serum amyloid A4, constitutive (SAA4))を抽出した。これらの遺伝子産物がHCVRNAの複製にどのような影響を与えるかを現在検討中である。

HCVコアに結合することが知られているRNAヘリケース分子DDX3が全長HCVRNAの複製効率に影響を与えるかどうかを検討した。まず、これまでに報告されているようにコアとDDX3が相互作用する関係に有るかどうかを細胞染色法と免疫沈降法により調べた。両実験を行った結果、HCV-0株のコアとDDX3は核膜周辺の細胞質に共局在しておりお互いの相互作用が確認された。

次に、HCVレプリコン複製細胞であるs0細胞や全長HCVRNA複製細胞である0細胞でDDX3をノックダウンさせるとRNAの複製に影響が出るかどうかを調べた。その結果、0細胞においてDDX3をノックダウンさせると、HCVRNA

の複製効率が10%以下に大きく低下することを見出した。これとは対照的にs0細胞における低下率は50%程度であった。また、全長HCVRNA (ON/C-5B/KE)を導入してG418存在下でのコロニー形成能を測定するECFアッセイにおいても、DDX3をノックダウンさせた0c細胞では、著しくコロニー形成能が低下することを確認した。以上の結果から、DDX3は全長HCVRNAの効率的な複製を支持する分子であることが示唆された。

次に、2a型ではあるが、JFH1感染増殖増殖系におけるDDX3ノックダウンの影響を調べた。JFH1ウイルスの感染増殖が起こるRSc細胞のDDX3ノックダウン細胞(#3と#7の2クローン化細胞)を作成して検討した。JFH1ウイルス感染後4日目の細胞内HCVRNA量と培養上清中のコアの量を定量した結果、両クローン細胞とも、著しくHCVRNA量とコアの量が低下していることが分った。従って、DDX3は2a型のJFH1株についてもRNA複製を支持する重要な分子であることが示唆された。

(2) 全長HCVRNAの長期複製増殖による宿主細胞遺伝子の発現変動

0細胞と0c細胞を1年間継代培養した01細胞と0c1細胞は親株になる0細胞や0c細胞より細胞増殖速度が上昇していることを観察した。

0細胞と01細胞を比較したマイクロアレイ解析では、01細胞で2倍以上発現量が上昇する遺伝子として61遺伝子を確認したが、そのうち16遺伝子は0c1細胞でも0c細胞に比較して2倍以上発現量が上昇していたので、01細胞でのみ発現量が上昇する遺伝子として45個を同定した。逆に01細胞で1/2以下に発現量が低下する遺伝子は、217遺伝子確認された

が、そのうち、142 遺伝子は 0c1 細胞においても 0c 細胞と比べて、1/2 以下になっていたため、01 細胞でのみ発現量が低下する遺伝子として 69

個を同定した。これらの結果から、全長 HCVRNA 複製細胞を長期間培養することにより発現量に変動が生じる遺伝子の存在が明らかとなった。

発現量に変動をきたす遺伝子群は特定のグループに入るといような傾向は特に認められなかったが、01 細胞でのみ発現が上昇している遺伝子群 (45 遺伝子) の中にメタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A) が 5 種類含まれていたことに着目した。メタロチオネインは肝臓での発現レベルが高いことが知られているので、発現上昇により HCVRNA の複製環境がよくなっている可能性がある。つまり、メタロチオネインが低下すると HCVRNA の複製効率が低下する可能性が考えられた。その可能性を検証するために、メタロチオネインをノックダウンさせた 0c 細胞 (5 種類) をまず作成した。次に、その細胞に全長 HCVRNA (ON/C-5B/KE) を導入し、G418 存在下で ECF アッセイを行った。

その結果、3 種類の細胞においては、メタロチオネインをノックダウンさせていないコントロール細胞より生じるコロニー数が大幅に低下したが、残りの 2 種類では有意なコロニー数の減少は認められなかった。今回の結果からは、メタロチオネインが HCVRNA の複製効率を大きく規定している分子であるとの最終的な結論を得ることは出来なかったが、現在、さらに検討を進めている。

D. 考察

(1) HCV 増殖に必要な細胞因子の探索

HCVRNA の複製レベルの異なる細胞群を用いたマイクロアレイ解析で最終的に得られた 4 遺伝子は肝臓でよく発現しているものであるが、現在までのところ C 型慢性肝炎との関係を示唆する報告はない。現在、これら 4 遺伝子の発現ベクターを構築して、Low fitness 細胞で発現させた場合に HCVRNA の複製効率が上昇するかどうか、或は High fitness 細胞についてこれら 4 遺伝子のノックダウン細胞を作成して HCVRNA の複製レベルが低下するかどうかの実験が進行中である。

全長 HCVRNA の複製効率に大きな影響を与える分子として今回、コア蛋白質に結合する DDX3 を見出したが、最近、JFH1 株の感染増殖系に様々な遺伝子の siRNA を作用させて、HCV の複製に影響を与える分子の同定がなされた (Randall et al., PNAS 104:12884, 2007)。この論文においても、最も大きな影響を与える分子として DDX3 が同定された。実験系が異なるのも関わらず、同じ宿主因子が同定されたことから、DDX3 は HCV の複製に重要な宿主因子であると考えられる。

今回の我々の実験においては、DDX3 はコア蛋白質を含まない HCV レプリコンの複製効率にも程度は弱いものの影響を与えることを観察した。このことは、HCVRNA の複製に対する影響が DDX3 とコアとの相互作用だけで決まっているわけではないことを示唆する。その 1 つの可能性として、DDX3 が NS3 のヘリケース活性と協調的に働いて、HCVRNA の複製の支持していることが考えられる。この点についても今後検討する必要がある。

(2) 全長 HCVRNA の長期複製増殖による宿主細胞遺伝子の発現変動

今回のマイクロアレイ解析において、