

分担研究報告書

HCV コア蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割

分担研究者 大阪大学微生物病研究所 准教授 森石 恆司

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) のキャプシド蛋白質であるコア蛋白質は、シグナルペプチダーゼによって E1 から切り離され、その直後の膜貫通領域が更にシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) によって切断される。しかしながら、感染における SPP によるコア蛋白質の切断の意義はよくわかっていない。本研究では、JFH1 培養系を用いて、SPP によるコア蛋白質切断の感染における意義を明らかにすることを目的とし、コア蛋白質の細胞画分およびウイルス粒子放出を解析した。コア蛋白質を培養細胞に発現させ、アフィニティー精製し、MALDI-TOF-MS/MS によって成熟コア蛋白質の C 末端を同定した。SPP 抑制剤の処理によって、界面活性剤抵抗性画分に局在する成熟コア蛋白質および細胞外ウイルス RNA 量は著しく減少した。以上のことから、SPP によるコア蛋白質の切断は、ウイルス感染に必要であることが示唆された。

A. 研究目的

国内に約 200 万人もの感染者が推定されている C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は主に血液を介して感染し、高率に持続感染に移行する。感染者の病態は、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の約 8 割の肝癌は HCV 感染に起因するものと考えられている。現行のインターフェロン/リバビリンによる抗ウイルス療法は、先進国に多いウイルス遺伝子型 1 の HCV 感染者に対しては約 50% 程度の著効率であり、より有効な治療法の開発が求められている。

HCV はフラビウイルス科に属するプラス鎖 RNA ゲノムを持つウイルスである。そのプラス鎖 RNA ゲノムは単一のポリプロテイン前駆体をコードしており、そのポリプロテインは宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、約 10 個のウイルス蛋白質に成熟する。キャプシド蛋白質であ

る HCV コア蛋白質はポリプロテインのアミノ末端に位置し、始めにシグナルペプチダーゼによる切断を受け、その直後の C 末端膜貫通領域が SPP によって更に切断を受けて成熟する。しかしながら、SPP による膜内切断の感染粒子産生における意義というものは、相反する報告がなされており、明確になっていない。

本研究では SPP によるコア蛋白質切断の感染サイクルにおける意義を明らかにする目的で、コア蛋白質の SPP による切断部位、SPP 抑制剤処理による細胞画分の変化およびウイルス産生の変化を解析し、感染における SPP の役割を評価した。

B. 研究方法

HCV コア蛋白質のアミノ末端に FLAG エピトープタグを付加し、293T 細胞に発現して、FLAG 抗体で精製し、SDS-PAGE で泳動した後、Asp-N 酵素でゲ

ル内消化した。その消化物を MALDI TOF-MS/MS にかけて、ペプチドのアミノ酸配列を決定した。単独で発現させたコア蛋白質あるいは感染細胞内のコア蛋白質を Triton X-100 で溶解した後、密度勾配遠心法によって分画した。SPP 抑制剤によるコア蛋白質の細胞画分および SPP による切断への影響を持続感染している細胞を用いて解析した。

(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

ほ乳類細胞で発現したコア蛋白質の C 末端は未だ同定されていない。HCV コア蛋白質の Asp-N で消化される 160 番目 Asp から検出された断片は、DGVNYATGNLPGCSFSIF であった。従って、成熟コア蛋白質の C 末端は 177 番目の Phe であり、それより大きい断片は検出されなかった。この結果から、SPP によって切断される箇所は 177 番目の Phe と 178 番目の Leu の間であり、既報のパキウイルスによって発現させたコア蛋白質と同じ C 末端であった。コア蛋白質は SPP で切断を受けると、一部のコア蛋白質は界面活性剤抵抗性膜画分 (DRM) に分画される。しかしながら、SPP 活性を SPP 抑制剤で抑制した場合、コア蛋白質のほとんどが未成熟状態になり、DRM に分画されなくなった。持続感染している Huh7 細胞を SPP 抑制剤で処理するとコア蛋白質は未切断のものが多くなり、全く DRM に分画されなかった。既報による SPP 抵抗性コア蛋白質変異体は異なる箇所で切断され、さらに 177 番目 Phe 付近で更に切断され、多段階切断である

ことが分かった。

D. 考察

今までは乳類細胞で発現された成熟 HCV コア蛋白質の SPP 切断部位は同定されていなかった。本研究により、ヒト細胞で発現された HCV コア蛋白質の 177 と 178 番目の間が SPP 切断箇所として同定された。また、コア蛋白質の一部が DRM に移行することは以前から分かっていたが、SPP による切断が必要なことが明らかになった。また、SPP 活性がウイルス増殖に必須であることが明確になり、既存のプレセニンおよび SPP 抑制剤が抗ウイルス剤として有効であることが示唆された。

E. 結論

以上の結果から、SPP によるコア蛋白質の切断は、ウイルス産生機構にとって必要であることが示唆された。宿主膜内蛋白質分解酵素 SPP は、新規 C 型肝炎治療法開発の標的蛋白質として期待できる。

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 PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 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 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Evaluation systems for anti HCV drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, 59, 1213-1221.
- 7 Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 2007, 81, 1727-1735.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Taguwa, 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 γ 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関与する宿主蛋白質 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。
 - 13 Kohji Moriishi. Critical role of PA28 γ -proteasome pathway in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 7th Awaji International forum on infection and immunology, Awaji, September 1-5, 2007.
 - 14 Kohji Moriishi. Critical role of REG γ /PA28 γ -proteasome pathway in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis, 2007 International RIMD-CVRDC Joint Symposium, Osaka, December 18, 2007.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

分担研究報告書

HCV-IRES 依存性タンパク翻訳に関わる宿主因子の同定と HCV 複製制御

分担研究者 金沢大学医学部先端医療技術学 教授 本多政夫

研究要旨 C型慢性肝炎に対するインターフェロン/リバビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C型肝炎ウイルス（HCV）の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した（Gastroenterology, 128: p449. 2005）。今回、HCVの蛋白翻訳効率と複製制御について検討した。La protein, PTB, PSMA7, eIF2gammaの発現抑制により、EMCV-IRESをHCV-IRESで置き換えた非定型レプリコン（MH14B由来MH14C）の複製を著明に抑制した。JFH-1を用いた検討でも、La protein, PTB, PSMA7, eIF2gammaの発現抑制によりHCVの有意な複製抑制が認められた。興味深いことにJFH-1の感染によりLa proteinの発現誘導が認められ、HCV自身が翻訳関連因子を誘導していることが明らかとなった。事実、C型肝炎肝組織ではLa proteinを含む翻訳関連宿主因子の発現が上昇しており、それらの発現はHCVウイルス量と相関した。今後、HCV蛋白翻訳関連因子をターゲットとした治療法の可能性についてさらに検討を行う。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン/リバビリン併用治療が広く行われているが、依然として存在するインターフェロン治療抵抗性例に対して新たな治療法の開発が望まれる。我々はこれまでに、C型肝炎ウイルス（HCV）の蛋白翻訳は宿主因子の発現に強く依存していることを報告した（Gastroenterology, 128: p449. 2005）。今回、HCVの蛋白翻訳効率と複製制御について検討した。

B. 研究方法

HCVの蛋白翻訳因子であるLa protein, PTB, eIF3 p170, PSMA7, eIF2gamma及びHCV蛋白翻訳を制御する internal ribosome entry site

(IRES)に対する siRNA を用い、Subgenomic HCV replicon の複製を RTD-PCR 法にて検討した。さらに JFH-1 の複製を RTD-PCR 法及びコア蛋白の発現にて評価した。また肝組織における HCV 蛋白翻訳因子の発現を正常肝 9 例、C 型肝炎 40 例の肝組織を用いて検討した。

C. 研究結果

ウサギ網状赤血球溶解液では HCV 蛋白翻訳は La protein, PTB, eIF3 p170, eIF2gamma の発現量依存性にそれぞれ、16 倍、7 倍、7.5 倍、2.5 倍に増加した。一方、同じ IRES 依存性蛋白翻訳を有する EMCV 蛋白翻訳には変化は認められなかった。HCV-IRES 及び EMCV-IRES を恒常的に発現する Huh7 由来細胞では、La

protein, PTB, PSMA7, eIF2gamma の発現抑制により HCV 蛋白翻訳の抑制が認められたが、EMCV 蛋白翻訳の変化は認めなかった。HCV replicon では、La protein, PTB, PSMA7, eIF2gamma の発現抑制は、薬剤耐性遺伝子と NS3 が EMCV-IRES で繋がれた定型レプリコン (MH14B) の複製には影響しなかったが、EMCV-IRES を HCV-IRES で置き換えた非定型レプリコン (MH14B 由来 MH14C) の複製を著明に抑制した。したがって、HCV レプリコン複製は HCV 蛋白翻訳に強く依存していた。

JFH-1 用いた検討でも、La protein, PTB, PSMA7, eIF2gamma の発現抑制により HCV の有意な複製抑制が認められた。また興味深いことに、JFH-1 の複製により La protein の有意な発現上昇が認められた。

一方、C 型慢性肝炎肝組織におけるこれらの宿主因子の発現を検討すると La protein, PSMA7, eIF2gamma は正常肝より C 型慢性肝炎肝組織で発現が誘導されており、肝組織の HCV-RNA と有意な相関を示した。

D. 考察

HCV の複製は HCV の蛋白翻訳に強く依存していた。興味深いことに JFH-1 の感染により La protein の発現誘導が認められ、HCV 自身が翻訳関連因子を誘導していることが明らかとなった。事実、C 型慢性肝炎肝組織では La protein を含む翻訳関連宿主因子の発現が上昇しており、それらの発現は HCV ウイルス量と相関した。今後、HCV 蛋白翻訳関連因子をターゲットとした治療法の可能性につき更に検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Honda M, Shimazaki T, Kaneko S. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 2005 128 (2) :449-62.

分担研究報告書

HCVゲノム RNA 二次構造を標的とした抗HCVペプチドの創製と
そのHCV治療薬への応用

分担研究者 東京学芸大学 准教授 原田 和雄

研究要旨 本分担研究では、HCVゲノム RNA の 5' -および 3' -UTR 中の RNA 構造に強く結合するペプチドを同定し、HCV 治療薬に応用することを目的としている。本研究期間は、これまでに細胞内 RNA-ポリペプチド相互作用の検出系（アンチターミネーション・システム）を用いて同定した 3' -UTR の X tail に存在するステム・ループ 2 (SL2) に結合する #5 および #3d001 ペプチドによる RNA 複製阻害活性の評価を行った。今回、HCV レプリコン RNA に #3d001 ペプチドを添加した後、肝細胞中に導入し、#3d001 ペプチドのウイルス複製阻害効果の評価を行った結果、#3d001 ペプチドはウイルス複製を抑制しなかった。また、蛍光偏光法を用いて、*in vitro* における #3d001 ペプチドと HCV レプリコン RNA の相互作用を解析したところ、#3d001 ペプチドと HCV レプリコン RNA の相互作用は非特異的であった。そこで、ペプチドのスクリーニング時に使用した改変型 SL2 よりもステム部分の長い野生型 SL2 と #3d001 ペプチドの結合を、アンチターミネーション・システムを用いて確認したところ、改変型 SL2 に比べて結合親和性が非常に低く、この結合親和性の低さが #3d001 ペプチドの薬理効果が見られなかった原因と考えられた。一方、SL2 と 5BSL3.2 とのループ・ループ相互作用をゲルシフト法により確認できたことから、今後は、SL2 の標的としての有効性を確認する意味で、この相互作用を第三のステム・ループによる阻害について検討中である。

A. 研究目的

本分担研究では、HCVゲノム RNA の 5' -および 3' -UTR 中の RNA 構造に強く結合するペプチドを同定し、HCV 治療薬に応用することを目的としている。これまでに、本研究グループで開発した入 N タンパク質のアンチターミネーション活性を利用した RNA 結合性ペプチド検出系 (Fig. 1) (Peled-Zehavi et al., *RNA* 2003, 9:252-261) を用いて、3' -UTR の X tail に存在するステム・ループ 2 (SL2) に結合する #5 ペプチド、および、

#5 ペプチドを進化的改変し、より強く SL2 に結合する #3d001 ペプチドを同定した (Fig. 2)。そこで、本研究期間は、これらのペプチドによる HCV RNA 複製の抑制について、1) HCV subgenomic replicon RNA を用いた解析を行った。一方、SL2 は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B をコードする領域に存在するステム・ループ 5BSL3.2 とループ・ループ相互作用をすることが提唱されている。このため、*in vitro* での SL2 と 5BSL3.2 との相互作用の解析を行った。また、ループ・ループ相互作用

を阻害することによる、HCV RNA の複製への影響について解析するため、SL2、あるいは、5BSL3.2 に相当する RNA ステム・ループが HCV subgenomic replicon RNA の複製に及ぼす影響について解析した。

B. 研究方法

1) SL2 結合ペプチドによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

レプリコン RNA 合成の鋳型となるプラスミド DNA は pSGR-JFH1/Luc と pSGR-JFH1/Luc-GND を使用した (Fig. 3)。それぞれ T7 プロモーターの下流に 5' UTR、ルシフェラーゼ、EMCV IRES (Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site)、非構造タンパク質、3' UTR を持ち、3' 末端には *Xba* I サイトを有する。pSGR-JFH1/Luc-GND は RNA 依存 RNA ポリメラーゼである NS5B の GDD モチーフを GND に変え、酵素活性を失わせた変異体である。

これらのプラスミド DNA を *Xba* I 処理し、Mung Bean Nuclease により末端の平滑化を行い、この DNA を鋳型として、T7 RNA polymerase RNA による転写反応を行った。このように調製したレプリコン RNA に対しペプチドを 6 倍、30 倍、100 倍当量に加えた混合物を Huh7 細胞に電ポレーション法により導入した。遺伝子導入後 4、24、48、72、96 時間培養した細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

2) アンチターミネーション・システムを用いた SL2 RNA とペプチドとの相互作用の解析。

アンチターミネーション・システムを用いた相互作用の解析は、SL2 RNA および改変型 SL2 RNA

(SL2T) を持つ pAC レポータープラスミド、および、#5 ペプチド、あるいは #3d001 ペプチドを発現する pBR プラスミドを大腸菌 N567 に導入し、X-gal を含む寒天培地上で培養することにより行った。#5 ペプチド、および、#3d001 ペプチドとの結合に重要な SL2 上のヌクレオチドの解析は、SL2 のループ、およびステム上部の塩基を一つずつ置換した変異体プラスミドを作成し、λN タンパク質のアンチターミネーション活性を利用した RNA 結合性ペプチド検出系を用いて解析した。

3) 蛍光偏光度測定による SL2 RNA と #3d001 ペプチドとの相互作用の解析

蛍光偏光度測定は、FLC (fluorescein) 修飾 #3d001 ペプチドに対して、SL2T RNA あるいはレプリコン RNA を添加し、蛍光偏光度測定装置 (BEACON2000, Panvera) を用いて 4°C で蛍光偏光度を測定した。

4) ゲルシフト法による SL2 と 5BSL3.2 RNA との相互作用の解析。

SL2、5BSL3.2、およびこれらのループ変異体に相当する短いステムループ RNA は、T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成 DNA 鋳型から合成した。ゲルシフト法による解析は、トリス-ホウ酸 (TB) 緩衝液に $MgCl_2$ を 0.1~1.0 mM 含むポリアクリルアミド・ゲルを用いた電気泳動により行った。

5) RNA ステム・ループによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

レプリコン RNA に対して RNA ステム・ループが 6 倍、150 倍当量になる様に調製した溶液を Huh7 細胞に電ポレーション法により導入した。遺伝子導入後 4、24、48、72、96 時間培養した細

胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

1) #3d001 ペプチドによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

#3d001 ペプチドの SL2 への結合による、レプリコン RNA の複製抑制効果を評価するため、レプリコン RNA と #3d001 ペプチドの混合溶液を作製し、エレクトロポレーションによりヒト肝癌由来 Huh7 細胞に導入した (Fig. 4)。ペプチドを含まないレプリコン RNA (SGR-JFH1/Luc RNA) 単独、あるいは SGR-JFH1/Luc RNA に対し 30 倍当量で HIV Rev ペプチドを加えた場合、導入後 4 時間と比較して、導入後 24、48、72、96 時間後と時間経過とともにルシフェラーゼ活性が約 250 倍まで増加し、HCV RNA の複製が観察された。一方、SGR JFH1/Luc RNA に対し 6 倍、30 倍、100 倍当量で #3d001 ペプチドを加えた場合においても、経時的に同程度までルシフェラーゼ活性は上昇し、#3d001 ペプチドによる HCV RNA の複製阻害効果は認められなかった

2) アンチターミネーション・システムによる SL2 RNA-#3d001 ペプチド相互作用の解析

SL2 結合ペプチドの標的として用いて来た SL2T RNA は、二次構造の安定化のために野生型 SL2 のステム下部を改変したものである。この SL2T RNA と #3d001 ペプチドはアンチターミネーション・システムにおいて +6 の結合活性を示したが、野生型の SL2 と #3d001 ペプチドの結合は確認されていなかったため、アンチターミネーション・システムを利用して、野生型 SL2 RNA と #3d001 ペプチドの結合検出を試みた。同時に、ペプチド・スクリーニング時に使用した #5 ペプチドについても野生型 SL2

RNA との結合検出を行った。#5 ペプチドと SL2T RNA の結合活性が +2 であるのに対し、#5 ペプチドと野生型 SL2 RNA との結合活性は +1 以下であった。また、#3d001 ペプチドと SL2T RNA の結合活性が +6 であるのに対し、#3d001 ペプチドと野生型 SL2 RNA との結合活性は +1 以下と大幅な低下が見られた (Fig. 5)。

3) 蛍光偏光度測定による SL2 RNA と #3d001 ペプチドとの相互作用の解析

既知の HIV Rev ペプチドと RRE RNA との特異的な相互作用を観察することができたが、改変型の SL2T RNA と #3d001 ペプチドとの相互作用は検出できなかった。

4) ゲルシフト法による SL2 と 5BSL3.2 RNA との相互作用の解析。

5BSL3.2 と SL2 の相互作用のポリアクリルアミド・ゲル電気泳動による検出を試みた (Fig. 6)。その結果、5BSL3.2 のバルジと下部ステムを除き、二次構造を安定化させた JFH-5BSL3 と Con1-5BSL3 に対して野生型の SL2 を加え、1mM 以上の $MgCl_2$ を添加したポリアクリルアミド・ゲルを用いて検出を行った場合に、バンドのシフトが観察された。一方、変異体の SL2 を加えた場合にはバンドのシフトは見られず、JFH-5BSL3、Con1-5BSL3 と野生型の SL2 の相互作用は特異的なものであった

5) RNA ステム・ループによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

5BSL3.2 と SL2 のループ・ループ相互作用を阻害することでレプリコン RNA の複製を抑制できるか確認するため、SL2 に相当するステム・ループ SL2

wt RNA、5BSL3.2 の上部ステム・ループに相当する 5BSL3 wt RNA、またそれぞれの逆配列の SL2 mut、5BSL3 mut RNA を作製し、これらのステム・ループの結合によってレプリコン RNA 中の SL2 と 5BSL3.2 とのループ・ループ相互作用を阻害し、レプリコン RNA の複製の阻害が起こるかを試験した。

まず、RNA ステム・ループとレプリコン RNA の混合溶液を作製し、これを電ポレーションにより Huh7 細胞に導入した。培養後、細胞を経時的に回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、コントロールとして用いたステム・ループを含まない SGR-JFH1/Luc RNA を導入した場合、24、48、72、96 時間後と時間経過に伴ってルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。一方、野生型 SL2 RNA あるいは SL2 変異体 RNA を SGR-JFH1/Luc RNA に対し 6 倍および 150 倍当量で加えても、ルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった (Fig. 7a)。

次に、5BSL3 wt RNA、5BSL3 mut RNA を用いて、RNA ステム・ループのレプリコン RNA 複製に与える影響を解析した。その結果、SGR-JFH1/Luc RNA に対し 150 倍当量で 5BSL3 wt RNA あるいは 5BSL3 mut RNA を加えた場合に、SGR-JFH1/Luc RNA のみを導入した場合と比べ、60%~70%のルシフェラーゼ活性の低下が見られた。しかし、HCV RNA に結合する 5BSL3 wt RNA を使用した場合と結合しない変異体 5BSL3 mut RNA を使用した場合を比較すると、ルシフェラーゼ活性に有意な差は見られなかった (Fig. 7b)。

以上のことから、RNA ステム・ループのレプリコン RNA への特異的な結合による複製阻害は検出できなかった。

D. 考察

本研究で、人工ペプチド・ライブラリーから同定した HCV RNA に特異的に結合するペプチドを用い、HCV RNA の複製阻害効果の解析を行った。HCV レプリコン RNA と #3d001 ペプチドの混合溶液を肝細胞中に導入し、#3d001 ペプチドのウイルス複製阻害効果の評価を行った結果、#3d001 ペプチドによる抑制効果は見られなかった。#3d001 ペプチドが HCV レプリコン RNA の SL2 に特異的に結合するかを検討するため、蛍光偏光法を利用しレプリコン RNA とペプチドの結合検出を試みた結果、SL2 を持つレプリコン RNA と SL2 を持たないレプリコン RNA 共に #3d001 ペプチドへの結合が見られたことから、レプリコン RNA と #3d001 ペプチドは非特異的に相互作用している可能性が高いことがわかり、これが #3d001 ペプチドによってレプリコン RNA の複製を阻害出来なかった原因と考えられた。蛍光偏光法により SL2T RNA と #3d001 ペプチドとの結合が検出出来なかったが、アンチターミネーション・システムを用いた実験により SL2T RNA と #3d001 ペプチドが特異的に相互作用することが示されているため実験条件については更なる条件検討が必要であると考えられる。

一方、アンチターミネーション・システムにより、野生型の SL2 と #5、#3d001 ペプチドとの結合活性を評価したところ、ペプチド・スクリーニング時に使用した改変型の SL2 (SL2T RNA) と #5、#3d001 ペプチドとの結合活性に比べ、結合活性が低下することがわかった。特に、野生型 SL2 RNA と #3d001 ペプチドの結合活性が +6 であるのに対し、SL2 RNA と #3d001 ペプチドの結合活性は +1 以下と著しく活性が低下していることがわかった。この結合親和性の低さも、#3d001 ペプチドによってレプリコン RNA の複製を阻害出来なかった原因の一つである

と考えられる。SL2 はペプチド・スクリーニング時に予測していた構造以外にもステム・ループを2つ持つような構造なども形成できることが示されている (Fig. 8)。SL2T RNA に比べ野生型 SL2 RNA と #3d001 ペプチドのアンチターミネーション・システムにおける結合活性が低下したことは、#3d001 ペプチドが野生型 SL2 による SL2T 型のステム・ループ構造を十分に安定化することが出来なかったことを示している。今後、野生型 SL2 を標的としたペプチド・セレクションにより、新規ペプチドが得られることが期待される。

また、SL2 の標的としての有効性の検討するため、第三のステム・ループを用いて SL2 と 5BSL3.2 のループ・ループ相互作用の阻害による HCV RNA 複製の抑制を試みたが、今回は HCV RNA 複製の抑制を検出することは出来なかったため、再検討をする必要がある。

SL2 と 5BSL3.2 の *in vitro* における相互作用をゲルシフト・アッセイにより検出した結果、5BSL3.2 のバルジと下部ステムを除いたステム・ループと SL2 の野生型ステム・ループを用いた場合に、相互作用を観察することが出来た。今後、この検出系を応用し、*in vitro* で SL2 結合ペプチドによる SL2-5BSL3.2 のループ・ループ相互作用の阻害を観察することが可能となった。

E. 結論

本研究により、改変型 SL2T RNA と結合する #3d001 ペプチドによる複製阻害活性が低いことが明らかになった。その原因の一つとして、#3d001 ペプチドによる野生型 SL2 RNA との結合親和性が低いことが考えられたことから、今後は、#3d001 ペプチドを出発点とした SL2 に対する高親和性ペ

プチドの同定を行う必要があると考えられる。一方、SL2 と 5BSL3.2 のループ・ループ相互作用をゲルシフト法により同定出来たことから、この相互作用を阻害することによるウイルス複製阻害の可能性について検証することが必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Sugaya, R. Saito, Y. Matsumura, K. Harada and A. Katoh "A facile method for the detection of specific RNA-polypeptide interactions using MULDI-Tof MS spectrometry" *J. Peptide Science*, 14: in press (2008).
2. M. Sugaya, N. Nishino, A. Katoh and K. Harada* "Combinatorial analysis of the amino acid requirements for the high affinity arginine-rich peptide-RNA interaction" *J. Peptide Science*, 14: in press (2008).
3. M. Sugaya, F. Nishimura, A. Katoh and K. Harada* "Tailoring the peptide-binding specificity of an RNA by combinations of specificity-altering mutations" *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, in press (2008).

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

資料

Fig. 1 アンチターミネーション・システムの概要

アンチターミネーション・システムにおける RNA-ペプチド相互作用検出系の概要を示した。詳細については本文を参照。

Fig. 2 #3d001 ペプチドのスクリーニング

#3d001 ペプチドのスクリーニングの過程を示した。詳細は本文参照。

Fig. 3 レプリコン発現プラスミドの模式図

使用したレプリコン発現プラスミド（上段;pSGR-JFH1/Luc、下段;pSGR-JFH1/Luc-GND）の模式図を示した。T7 プロモーター、5' UTR の下流にルシフェラーゼ、EMCV IRES、非構造タンパク質、3' UTR が存在する。pSGR-JFH1/Luc-GND は RNA 依存 RNA ポリメラーゼである NS5B の GDD モチーフを GND に変え、酵素活性を失わせた変異体であり、今回陰性コントロールとして使用した。

Fig. 4 #3d001 ペプチドによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

レプリコン RNA への#3d001 ペプチド添加によるルシフェラーゼ活性の経時変化をグラフに示した。Relative activity はトランスフェクション後 4 時間のルシフェラーゼ活性を 100 とした時の、ルシフェラーゼ活性の相対値を表す。SGR-JFH1/Luc-GND RNA を除き全てにおいて高いルシフェラーゼ活性を示し、#3d001 ペプチドによるレプリコン RNA 複製阻害は観察されなかった。

Fig. 5 アンチターミネーション・システムを用いた野生型 SL2、SL2T RNA と#3d001、#5 ペプチドとの相互作用解析

左に改変型 SL2 の予測される二次構造と#5、#3d001 ペプチドに対するアンチターミネーション活性を、右に野生型 SL2 の予測される二次構造と#5、#3d001 ペプチドに対するアンチターミネーション活性を示した。

Fig. 6 ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動による 5BSL3.2 と SL2 の相互作用解析

5BSL3.2 と SL2 のゲルシフト・アッセイによる相互作用解析の結果を示した。lane 1: 5BSL3.2、lane 2: 5BSL3、lane 3: JFH1 5BSL3.2、lane 4: JFH1 5BSL3、lane 5: SL2 wt、lane 6: SL2 mut、lane 7: 5BSL3.2 + SL2 wt、lane 8: 5BSL3.2 + SL2 mut、lane 9: 5BSL3 + SL2 wt、lane 10: 5BSL3 + SL2mut、lane 11:

JFH1 35SL3.2 + SL2 wt, lane 12: JFH1 5BSL3.2 + SL2 mut, lane 13: JFH1 5BSL3 + SL2 wt, lane 14: JFH1 5BSL3 + SL2 mut

Fig. 7 RNA ステム・ループによるレプリコン RNA 複製阻害の評価

a. 上図にレプリコン RNA への SL2 wt、SL2 mut RNA 添加によるルシフェラーゼ活性の経時変化をグラフに示した。Relative activity はトランスフェクション後 4 時間のルシフェラーゼ活性を 100 とした時の、ルシフェラーゼ活性の相対値を表す。下図には SL2 を用いたレプリコン RNA の 5BSL3.2 と SL2 相互作用阻害の模式図を示した。

b. 上図にはレプリコン RNA への 5BSL3 wt、5BSL3 mut RNA 添加によるルシフェラーゼ活性の経時変化をグラフに示した。全てにおいて高いルシフェラーゼ活性を示した。RNA ステム・ループによるレプリコン RNA 複製阻害は観察されなかった。下図には 5BSL3 を用いたレプリコン RNA の 5BSL3.2 と SL2 相互作用阻害の模式図を示した。

Fig. 8 SL2 の二次構造

a. ペプチド・スクリーニング時に標的とした SL2 の二次構造を示した。

b. SL2 領域で形成される 2 つのステム・ループの二次構造を示した。

c. 5BSL3.2 と相互作用する際に予測される SL2 の二次構造を示した。

d. 本研究で用いた改変型 SL2 (SL2T) の二次構造を示した。野生型の SL2 の上部ステム・ループに、二次構造安定化のために G-C 塩基対を付加してある。付加した塩基は小文字で示した。

分担研究報告書

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発：
HCV増殖・感染細胞モデルを用いた抗ウイルス化合物・宿主因子の探索

分担研究者 東京医科歯科大学 分子肝炎制御学講座 准教授 坂本 直哉

研究要旨 我々は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1) シクロフィリンに結合する宿主蛋白を網羅的に解析したところ、7種の蛋白が同定され、それらの発現抑制によりHCV増殖が有意に低下した。(2) 8,000種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV増殖を抑制する41種の化合物が同定され、IC50の優れた5個のepoxide誘導体を同定した。(3) 漢方生薬成分化合物のうち甘草由来の、isoliquiritigenin、及びglycycomarinに抗HCV効果を見出した。本研究で同定された化合物の作用機構の解析、小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発につながると思われる。

A. 研究目的

独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を。

B. 研究方法

(1) シクロスポリンAのHCV増殖抑制効果の解析から特定された分子シャペロン蛋白であるシクロフィリン蛋白の機能・HCV複製増殖への関与を解明するため、シクロフィリンA,BおよびCに結合するウイルス・宿主蛋白をmammalian two-hybrid法、及びbacterial two-hybrid法にてスクリーニングを行う。

(2) HCVレプリコン系・JFH1培養系を用いて、HCV増殖を制御する薬剤・化合物の網羅的スクリーニ

ングを進める。生理活性物質ライブラリー、及びDiversity-oriented synthesis化合物ライブラリー、漢方生薬・抽出精製化合物の抗HCV活性をhigh-throughput screeningにて検索する。

C. 研究結果

・シクロフィリンA,B及びCとHCV構造・非行蛋白との分子間結合は確認されなかった。

・Bacterial two-hybrid法によりシクロフィリンに結合する肝細胞内蛋白を網羅的に解析したところ、7種の宿主蛋白が同定された。これらのうちFumarylacetate hydroxylaseの発現をsiRNAによりknock downしたところHCVレプリコンの発現が有意に低下した。

・キメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するHCV-Feo replicon細胞を用いて、

Diversity-Oriented Synthesis (DOS) 法で合成した 8,000 種の化合物のスクリーニングを施行したところ、replicon 増殖を抑制する 41 種の化合物が同定された。構造活性相関 (SAR) 解析によりさらに IC50 の優れた 5 個の epoxide 誘導体を同定した (文献 7)。

・漢方生薬成分化合物の細胞内 HCV 増殖に対する効果を HCV レプリコンシステムを用いて解析を行い、甘草由来の 2 種の化合物、isoliquiritigenin、及び glycycomarin に HCV replicon 増殖抑制作用を見出した。これらの薬剤は、HCV-JFH1 培養系においてもウイルス感染増殖を抑制することを確認した (文献 1)。

D. 考察

シクロスポリン A の抗ウイルス効果はシクロフィリンへの特異的結合・機能阻害によって発現することがわかっており、HCV-NS5B 蛋白がその標的分子との報告があるが、依然不明な点が多い。今回の結果より、同定されたシクロフィリン結合蛋白のいくつかはウイルス増殖に関連することが発現解析により明らかになった。これらの蛋白の機能解析を進めることによりウイルス増殖の新たな機構が明らかになる可能性がある。

E. 結論

1. HCV キメラリポーターレプリコン系を用いて薬剤・化合物の大規模スクリーニングを行い、HCV 発現・増殖を抑制する複数の化合物を同定し、HCV 培養系にて効果を確認し得た。
2. 本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発に

つながる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, *Glycyrrhizae radix*, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. *Hepatology Res*, in press.
2. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses HCV replication in vitro. *Hepatology Res*, in press.
3. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
4. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S: Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, in press.

5. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2007; Epub.
 6. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis* 2008; 197 (3) :361-370.
 7. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL and Chung RT: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication, . . a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10) :3756-3759.
 8. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N and Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008:371:71-85.
 9. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif -induced interferon response. *J Gen Virol* 2007; 88:3323-3333.
 10. Sakamoto N, Yoshimura M, Kimura T, Toyama K, Sekine-Osajima Y, Watanabe M, Muramatsu M: Suppression of hepatitis C virus replication by bone morphogenetic protein-7 and synergistic action with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:467-473.
 11. Kim SS, Peng LF, Lin W, Choe WH, Sakamoto N, Schreiber SL, Ikeda M, Kato N, Chung RT: A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of HCV replication, *Gastroenterology* 2007; 132:311-320.
 12. 中川美奈、坂本直哉：小胞体ストレスによるシグナル伝達。 *分子消化器病* 2007; 4 (4) :367-372.
 13. 坂本直哉：C型慢性肝炎の進展と治療抵抗性：ウイルス変異の観点から。 *日本内科学会雑誌* 2007; 97 (1) :64-68.
 14. 中川美奈、坂本直哉：C型肝炎ウイルスの構造と病態。 *治療学* 2007 in press.
2. 学会発表
1. Megumi Tasaka, Naoya Sakamoto, Yoshie Itakura, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Yuki

Nishimura-Sakurai, Chen-Hsin Chen, Mamoru Watanabe: HCV nonstructural proteins responsible for impairing RIG-I/Cardif-induced interferon responses. APASL May-27-2007, Kyoto, Japan.

2. Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, for the Ochanomizu Liver Conference: Clinical and virological factors that predict outcomes of interferon plus ribavirin combination therapy for HCV infection (APDW2007 Symposium, Oct-18-2007, Kobe, Japan).
3. 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、Bone morphogenetic proein-7 (BMP-7)によるHC 増補区抑制効果と interferon- α との相乗効果の解析、2007 年 6 月 1 日;肝臓 2007; 48 suppl (1) p27.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

HCV 増殖環の全過程を標的とした阻害剤探索を可能とするスクリーニング法の開発と、それによる低分子量 HCV エントリー阻害剤の同定：
ポスト-HAART 時代のエイズ治療戦略の創出を目指して

分担研究者 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長 武部 豊

研究要旨 われわれは、脇田らによって樹立された感染性 HCV クローン (JFH-1) に基づく HCV 感染/増殖アッセイ (HCV infectivity assay) を樹立し、阻害剤スクリーニングのためのアッセイ・プロトコルの最適化を行った。このスクリーニング系は、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できるという大きな利点をもっている。また本アッセイ系を用いたスクリーニングによって、化合物ライブラリー（約 8,000 化合物）の中から 4 種のヒット化合物（化合物 A-D）を同定した。中でも、化合物 A は最良の efficacy profile [EC50=70 nM, CC50=35 μM (Selective index=500)] を示すだけでなく、非常に興味深いことに、i) HCV infectivity assay では活性を示すにも拘わらず、レプリコン・アッセイによっては活性が認められないこと、ii) HCV 感染直後に薬剤を添加しない限り、抗 HCV 作用が発揮されないこと (Time of addition 実験)。iii) HCV pseudoparticle (HCVpp) の感染を阻害することなどから、HCV エントリーを阻害する可能性が強く示唆された。現在その作用の分子メカニズムの解明に向けた解析と構造活性相関に基づく最適化の作業が進行中である。

共同研究者

上西理恵、長谷彩希、Liao Hunan、
磯貝まや、納富香子

国立感染研エイズ研究センター
脇田隆宇、鈴木哲朗

国立感染研ウイルス第二部

感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫などによる死亡率が高まってきている。とりわけ、我が国における血友病 HIV-1 感染者では HCV 共感染率が 97%以上で、共感染した HCV による肝障害が死亡原因として重要となりつつある。

現在、HCV による肝疾患に対してはインターフェロンとリバビリンの併用療法が標準的な治療法となっているが、半数以下の感染者にしか有効でないことと、発熱、精神症状、溶血性貧血などの重篤な副作用があることから、有効且つ安全性の高い治療薬の開発が待ち望

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) の導入によりエイズ患者の予後が大幅に改善された結果、エイズに関連する HCV や EBV などの他のウイルス感

まれている。

これまで、HCV 阻害剤スクリーニングやその薬効評価には部分ゲノムあるいは全ゲノムを用いたレプリコン・アッセイが用いられてきた。しかし、レプリコン・アッセイによっては HCV 生活環境の細胞内過程に対する阻害剤の探索・評価は可能であるが、エンタリー阻害剤などの感染初期過程や粒子放出などの感染後期過程の阻害剤の検出はできないという難点があった (図 1)。

そこで、われわれは、脇田らによって樹立された感染性 HCV 分子クローン (pJFH-1) (Wakita *et al.* *Nat. Med.* 2005) を用いた新たな阻害剤スクリーニング法の開発とそれによる新規阻害物質の探索を進め、その結果、新しいメカニズムによる阻害剤候補の同定に成功した。

B. 研究方法

(1) 感染性 HCV ストックの調製

pJFH-1 由来の HCV ゲノムを Pol I プロモーター支配下に発現するプラスミド pHH-JFH1 を Huh7.5.1 細胞に導入して得た stable transformant (国立感染研 鈴木より分与を受けた) の培養上清を感染性 HCV ストックとして用いた。通常 HCV コア抗原量として約 2 万 fmol/L が得られるが、必ずしも感染のタイターとは平行しないため、感染の力価を実験に用いる前に確認した。

(2) 阻害剤スクリーニング法 (図 2)

(1) で得た HCV ストックを Huh7.5.1 細胞に感染させた後、試験化合物 (5 μ M) を加え 72 時間後の培養上清中の HCV コア抗原量をコア抗原アッセイキットを用いて測定し、抗ウイルス効果を評価した。併行して、WST アッセイを用いて、試験化合物の細胞毒性を評価した。アッセイの陽性対照としては、インターフェロン α (5, 50 u/ml) を用いた。

(3) HCV pseudoparticle assay

レトロウイルスベクターを用いた系を利用した。HIV-1 gag 発現ベクターとパッケージング・シグナルをもつ Luciferase 発現プラスミド、および HCV E1/E2 発現プラスミドあるいはコントロールとして VSV-G 発現プラスミド、HCV D E1/E2 発現プラスミドのトリプルトランスフェクションによって、それぞれ HCVpp, VSV-Gpp, HCV D E1/E2pp の 3 種の pseudoparticle を調製。阻害剤存在下、非存在下での各 pseudoparticle の Huh7.5.1 細胞への感染性をルシフェラーゼ活性で測定した。HCVpp 感染の阻害効果を示す陽性対照として、抗 CD81 単クローン抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

該当する項目なし。

C. 研究結果

(1) 阻害剤スクリーニング・システムの確立
96-well format での HCV infectivity/replication assay 系を確立した。アッセイの標準条件は次のようである。

- 1) 前日に Huh7.5.1 細胞 (10^4 cells) をシード
- 2) 試験化合物 5 μ M を添加
- 3) 約 15 分後に感染性 HCV ストック (HCV コアタンパク質量として約 0.2 fmol に対応する量) を感染させる
- 4) 72 時間後に培養上清を回収。HCV 産生量 (HCV output) を HCV コア抗原アッセイを用いて測定する。
- 5) 併行して、試験化合物の細胞毒性を、48-72 時間後の WST アッセイによって評価する。
- 6) 陽性対照 IFN α 5-50 u/ml の抗 HCV 効果に匹敵する活性をもち、且つ 5 μ M の濃度では細胞毒性をほとんど示さない試験化合物をヒット化合物として、それぞれの EC₅₀, CC₅₀ を用量応答曲線から算定する。

アッセイのフロー図を図2に示す。

(2) 上記のアッセイ系を用いることにより、化合物ライブラリー (分子量 300-550) (8,000化合物) より4個のヒット (化合物 A-D) を得た。

図3に、各ヒット化合物の抗ウイルス効果、細胞毒性に関する用量応答曲線とそれから算出される EC50, CC50 値を示す。

(3) 中でも化合物 A の EC50 \approx 70 nM, CC50 \approx 35 \cdot M (Selective index \approx 500) で、現在最も期待されている抗 HCV 治療薬候補である VX-950 (Telaprevir: NS3/NS4A プロテアーゼ阻害剤) の replicon EC50 (354nM) に匹敵する *in vitro* efficacy を示す (図4)。

(4) しかしながら、非常に興味深いことに、化合物 A は、genotype 1b, 2a の双方ともレプリコン・アッセイによっては活性を示さない (図5A)。

(5) 化合物 A は HCV pseudoparticle assay において HCV E1/E2 発現 pseudoparticle (HCVpp) の感染を用量依存的に阻害した。阻害の EC50 は infectivity assay のそれにほぼ一致する (数十 nM レベル) (図5B)。また Time of addition 実験によれば、化合物 A が抗 HCV 作用を発揮するには、HCV 感染前から直後の HCV ライフサイクルの極早期に添加する必要があることが明らかになった (data not shown)。

D. 考察

われわれは、脇田らによって樹立された感染性 HCV クローンをベースとした新規の HCV 増殖アッセイ系を樹立した。このスクリーニング系は、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できるという大きな利点をもっている。とりわけレプリコン・アッセイによっては評価できない HCV 増殖サイクルの初期過程 (ウイルス・エントリーから脱殻) や最後期過程 (ウイ

ルス放出を含むアッセムブリー以降) に標的をもつ阻害剤の探索が可能となると考えられる。

このアッセイ系を用いたスクリーニングによって得られたヒット化合物の1つ (化合物 A) は、i) レプリコン・アッセイによっては活性が認められないこと (図5A)、ii) HCV 感染の極く早期に薬剤の作用する過程があること (Time of addition 実験)、また iii) HCV pseudoparticle の感染を阻害すること (図5B) から、HCV エントリーを阻害する活性を持っている可能性が強く示唆された。

現在、化合物 A の分子標的を解明する解析が進行中であり、これまでに HCV 受容体分子として考えられている膜タンパク質の一つがその標的分子そのものであるという可能性が明らかになりつつある。

脇田らによって樹立された感染性 HCV 分子クローンをもちいることによって、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できる新規の HCV 阻害剤アッセイ系の確立に成功した。また本アッセイ系を用いることによって、低分子化合物ライブラリーからいくつかのヒット化合物を同定した。その一つは、これまでに報告のない低分子性の HCV エントリー阻害剤である可能性が高い。

F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない。

G. 研究発表 (2006-2008)

1. 論文発表

1. Takebe, Y., Uenishi, R., and Li, X.-J. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh