

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 20 年度 総括・分担研究報告書

総括研究者 下遠野 邦忠

平成 21 (2009) 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)	-----7
2. 肝炎ウイルス増殖及び制御に関与するヒートショックタンパク質の機能解析 高久 洋(千葉工業大学工学部)	-----11
3. 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 堀田 博(神戸大学大学院医学系研究科)	----- 14
4. HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析・HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析に関する研究 加藤 宣之(岡山大学院医歯薬学総合研究科)	----- 18
5. 肝発がんとミトコンドリア異常 西口 修平(兵庫医科大学)	-----27
6. DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得の分子機構解明 小原 恭子(熊本大学大学院医学薬学研究部)	-----31
7. 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)	-----37
8. 肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義 杉山 和夫(慶應義塾大学医学部)	----- 40
9. 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)	-----44
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----49
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	-----55

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

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に関わる細胞側因子が感染性ウイルス粒子の産生に重要な働きをしている。(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るが、その活性化にはウイルス蛋白質コアが関係している。また、TNFアルファによっても活性化される。(3) NS3はHsp90と相互作用するが、この相互作用はHSP90阻害剤処理で抑制される。(4) HCV感染1週間以上経過すると、核小体の肥大とRbがん抑制タンパク質の減少が認められる。(5) HCV感染により核小体肥大を認める細胞をインターフェロン(IFN)処理してウイルスを排除すると核小体の大きさは非感染対照と同程度までに回復した。(6) HCVゲノムの複製に必要な新規宿主因子としてDNA損傷センサーであるataxia-telangiectasia mutated kinase(ATM)とcheckpoint kinase 2(Chk2)を見出した。HCV NS5BがATMおよびChk2と相互作用を示すことを明らかにした。(7) HCVゲノム複製細胞を1-2年間培養することにより発現レベルが亢進することを見出したメタロチオネイン1E或は2AがHCVゲノムの複製増殖に関与しているが示唆された。(8) 肝癌症例では非癌部での組織学的変化が軽度であっても、ミトコンドリアDNAに多数の塩基変異が生じていることが判明した。(9) HCV感染がDHCR24の発現を亢進し、p53の活性低下を通じて酸化ストレス誘導性アポトーシスの反応を低下させる事を見いだした。(10) 欠損型HCVがC型慢性肝炎患者血清から比較的高頻度に検出された(24%)。(11) 分子系統樹的解析により欠損型HCVが独自に複製、進化していることが示された。(12) 欠損HCVゲノムRNAがヘルパーウイルス存在下に、複製可能な欠損HCVゲノム感染性ウイルス粒子を産生させる可能性を示した。(13) AIDの発現の結果、宿主肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルで遺伝子異常が生成することが、肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。(14) 間葉系幹細胞から分化した肝細胞を用いてウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系として利用出来る可能性を示した。

分担研究者

高久 洋	千葉工業大学工学部	教授
堀田 博	神戸大学大学院医学系研究科	教授
加藤 宣之	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
西口 修平	兵庫医科大学内科学	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	慶應義塾大学医学部	准教授
丸澤 宏之	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、粒子産生に関する

る細胞側の種々の要因を明らかにするため細胞内環境の解析をおこなう。そのために、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。また、細胞内の脂肪輸送に関係する宿主遺伝子産物とウイルス粒子産生との関連を明らかにする。

(2) HCV 増殖制御に関わる宿主因子、特にシャペロン蛋白質の複製制御に関する研究。

HSP90 阻害剤である 17-AAG は HCV ゲノム複製を強く抑制するので、その分子機序を HCV ゲノム自立複製細胞を用いて明らかにする。

(3) HCV 感染培養細胞の細胞増殖変化を、アポトーシス、核小体変化との関連で調べる。そのために、既に樹立されている HuH7 細胞および近年下遠野らにより樹立されたヒト肝細胞 HuS-E/2 を用いて解析する。核小体の解析は、抗 fibrillarlin 抗体を用いて核小体を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して、核小体の長径を計測する事により示す。

(4) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

(a) DNA 損傷センサー遺伝子産物が HCV 複製に及ぼす効果の解析。ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM)、ATM- and Rad3-related kinase (ATR)、checkpoint kinase 2 (Chk2) および poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) をノックダウンさせた HCV ゲノム複製細胞を調製して、ウイルスゲノム複製効率を RT-PCR あるいはウイルス抗体を測定することにより解析する。一方、ATM キナーゼ阻害剤を用いて、全長 HCV RNA 複製細胞における抗 HCV 活性を評価する。

(b) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析。これまでにメタロチオネイン遺伝子が HCV 複製により発現変化することを明らかにしてきた。そこで、長期間 (2 年間) 培養した全長 HCV RNA 複製細胞から total RNA を調製し、メタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A など) の発現量を RT-PCR 法により調べ、樹立時の細胞と長期培養した細胞における発現量と比較する。

(5) C 型肝炎患者の肝組織におけるミトコンドリア遺伝子の解析。

肝癌の切除組織の癌部および非癌部について、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の D-loop 領域の塩基配列につき、特異的な primer を設計して PCR により増幅後、塩基配列を決定する。

(6) HCV 発現継代細胞において発現変化する宿主遺伝子の解析。これまでに HCV 発現継代細胞をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。この中で HCV 発現継代細胞や HCV 陽性肝癌患者組織で発現が亢進する分子、DHCR24 を認識するクローンを得ている。DHCR24 の発現と細胞の増殖変化を明らかにして、その分子機序を解明する。

(6) 間葉系幹細胞から分化した肝細胞への HCV

感染実験。本細胞に HCV の RNA を遺伝子導入し、ウイルスの複製系を解析する。さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系として利用出来るかを調べる。また、本細胞を不活化してその正常を解析すると共に、それに HCV を感染させ HCV の複製能を解析する。

(7) 肝硬変、肝がんの進行に関与する microRNA の機能解析を進め、ウイルス感染との関連を検討する。

(8) C 型肝炎患者血清中の HCV ゲノムの性状をウイルスゲノム配列を決定して明らかにする。そのために、ゲノム全領域を増幅し、単離する方法を開発する。得られたゲノムの塩基配列を明らかにして、ゲノム性状を調べる。

(9) HCV 感染によるゲノム不安定化の分子機構の解析。

(a) これまでに B 細胞に特異的に発現すると考えられている AID が HCV 感染により発現誘導されることを明らかにしてきた。そこで、この誘導の分子機序を明らかにするために、さまざまなウイルスタンパク質や炎症性サイトカイン刺激を肝培養細胞に加え、細胞内シグナル伝達の変化と AID 発現の有無の定量的評価を行う。

(b) ヒト肝培養細胞において持続的に AID を発現した結果生じる遺伝子異常の全体像を明らかにする目的で、AID を発現した肝培養細胞から抽出した核酸を用いて Comparative genomic hybridization (CGH) 法によるゲノムワイドな遺伝子異常の網羅的解析を行う。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」に準拠し、各所属機関の研究倫理委員会に申請し承認を得る。動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」や「実験動物の飼育および保管に関する基準」及び「大学における実験動物について」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に配慮する。

肝疾患患者など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。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報を適正に管理保存する。

本報告に関わるヒト組織由来間葉系幹細胞は、インフォームドコンセントのもと、国内の倫理審査を得て採取され、国立がんセンター研究所での倫理審査を経て使用している。

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、粒子産生に関与する細胞側の種々の要因の中で、特に脂肪代謝およ

び脂肪輸送に関わる因子と HCV 複製、粒子産生との関連を調べた。特に脂肪輸送に関わる因子、アポリポ蛋白質が、感染性ウイルス粒子を細胞外に放出するのに重要であることを明らかにした。

まず、HuH7 細胞を siRNA で処理し、アポリポ蛋白質 E をノックダウンさせると、培養外液への感染性粒子の産生は強く抑制された。また、VLDL 産生に重要な働きをする MTP (microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤処理すると、やはり感染性粒子の放出が阻害された。このときに、培地へのアポリポ蛋白質 B および VLDL の放出も阻害された。これらの結果から、HCV (JFH1) の感染性はリポ蛋白質により担われている可能性が示唆された。

(2) ウイルスゲノム複製を制御する宿主因子の解析。

(a) 高久はこれまでに Heat shock protein 90 (HSP90) で処理すると、HCV の複製が強く阻害されることを見いだしており、HSP90 がゲノム複製に関与していることを示唆していた。今回その阻害機構を調べ、NS3 が HSP90 が結合すること、その結果 NS3 の安定性が増すことを見いだした。一方、HSP90 阻害剤、17-AAG 処理により、NS3 蛋白質が不安定になる事も明らかにした。これらのことから、HSP90 がウイルス蛋白質の安定化に働くシャペロン蛋白質であることを明らかにした。

NS3 各欠損変異体プラスミドを作製し、Hsp90 との結合部位の特定を特定した。

(b) 堀田は、下遠野らにより樹立されたヒト肝細胞 HuS-E/2 に対する HCV (J6/JFH1-P47) 感染実験を行い、感染細胞では細胞増殖が抑制される事を見いだした。また、HCV 持続感染により、核小体肥大が生じることを見いだした。核小体サイズの肥大は HCV を排除することにより回復することも明らかにした。

また、HCV 持続感染期においては ERK1/2 のリン酸化 (活性化) が亢進することを見いだした。ウイルスを排除するとこの亢進は見られなくなるので、ERK シグナルの活性化に HCV 感染が直接関与している可能性が示唆される。さらに、HCV 感染に伴う Rb がん抑制タンパク質が減少することを明らかにした。この HCV 感染細胞の Rb 量の減少は、IFN 処理でウイルスを排除することにより、見られなくなった。

(c) 加藤は、HCV RNA の複製が、二本鎖 DNA 切断の修復に関与する宿主因子、ATM, Chk2 により制御されていることを明らかにした。すなわち、ATR 及び PARP-1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と同様高いレベルに維持されていたが、ATM 及び Chk2 ノックダウン細胞においては顕著に抑制されていることが分かった。一方、ATM のキナーゼ活性を阻害する因子、

(2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) は強い抗 HCV 活性を示すことを見いだし

た。内在性 ATM 及び Chk2 は HCV NS5B と相互作用するので、これらの宿主因子による複製制御はウイルス蛋白質との会合を経て起こると考えられる。

また、HCV RNA の複製との関与が示唆されたメタロチオネイン 1E と 2A について解析を深め、これらの蛋白質が HCV の RNA 複製に必要であることが示唆された。

(d) 小原は、肝臓キメラマウス感染系で DHCR24 の発現誘導が、HCV 非感染マウス群に比べ HCV 感染マウス群では平均で 5 倍以上の有意な発現上昇がある事を明らかにしているが、この発現上昇の機構を解析すると同時に、DHCR24 の HCV 感染細胞に対する働きを調べた。とくに、HCV 発現継代細胞や、DHCR24 の過剰発現細胞では過酸化水素誘導性アポトーシスに耐性となる事を明らかにした。また、DHCR24 過剰発現により p53 の活性が抑制される可能性が考えられる結果を得た。

(3) 染色体、ミトコンドリア異常と HCV 感染との関連に関する研究。

(a) 西口は、HCV ゲノム複製細胞および C 型に由来する肝がん組織における遺伝子変異を解析して以下の結果を得た。

肝がん症例の非癌部組織では、肝がん合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織に比して mtDNA の D-loop 領域の変異数は増加しており、非がん部組織では、mtDNA の異常が蓄積している可能性が示唆された。また、炎症あるいは線維化の強い症例では変異が増加する傾向がみられた。さらに、発がん症例においては、組織学的所見が軽度であっても非がん部における mtDNA 異常が蓄積していることが推定される結果を得た。また、mtDNA の変異の生じやすさに、ROS 消去酵素 Mn-SOD や EC-SOD と酵素の遺伝子多形性の関与することが示唆する結果を得た。

(b) 丸澤は、活性化 B リンパ球において、免疫グロブリン遺伝子への体細胞突然変異やクラススイッチ組み替えを導入する活性を有する AID が、HCV 蛋白質、あるいは TNF- α 刺激によりヒト肝細胞に異所性に発現誘導されることを明らかにした。AID の発現制御が NF- κ B で引き起こされることを見いだし、HCV の Core タンパク質により活性化される NF- κ B が AID 発現に関与している可能性が示唆された。

(4) 間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞を利用した HCV 感染及び評価系の開発。

落谷は間葉系幹細胞から肝細胞へ効率よく分化させる系を開発した。分化に際して miRNA122 の発現が誘導されることを明らかにした。miRNA122 は、HCV の複製に必須であると考えられている non-coding-small RNA の一種であるので、この分化した細胞において、HCV 感染が成立すると考えられる。実際に、複製型 HCV-RNA である JFH-1 株 (2a 型) を細胞にトランスフェクションした

結果、HCVのコピー数がトランスフェクション7日後に増加していることが明らかとなり、複製の可能性が示唆された。また、本分化細胞を不死化して、感染実験が容易に実施出来る様に工夫している。

(5) HCV感染組織内のHCVゲノムの性状解析。これまでに、患者血清、および患者の肝臓組織内には、HCVゲノムが欠失したものが存在すると報告されている。そのゲノムの特徴として、主としてエンベロープ領域を含む部分が欠失しているが、コアをコードする領域は完全に保存されている。非構造領域も保存されている。以上のことから、

(1) 欠失ゲノムはそれ自身自立的に複製可能である。(2) コア蛋白質がウイルスゲノム複製、あるいは病態と関連する。(3) ヘルパーウイルス共存化には欠失ウイルスが産生される可能性がある、等が考えられる。杉山はHCV感染者の血清中に効率にこのような欠失ウイルスゲノムが見いだされることを確認し、さらに欠失ウイルスゲノムがヘルパーゲノム存在化にウイルス粒子として産生され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、昨年に引き続き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。さらに、ウイルス粒子産生には脂肪輸送に関与する因子が重要な働きをしていることも明らかにした。これらのことは、HCV感染による脂肪代謝の変化がウイルス感染・増殖にとって重要である事を示している。一方、そのような脂肪代謝異常が個体レベルでは脂肪肝を引き起こし、肝障害を増悪させると考えられることができる。したがって、HCV感染による脂肪代謝異常を抑制することができれば、ウイルス増殖を抑制し、かつ脂肪代謝異常による肝疾患の予防も可能になると考えられる。

HCV感染による肝疾患の予防には、細胞の増殖変化を分子レベルで解明すると同時に、ウイルス複製を阻害することも重要である。本研究では、ウイルスゲノムの複製を制御する各種宿主因子として、HSP90、ATM、Chk2等を明らかにした。これらの因子によるウイルス複製制御の部分を標的とした抗HCV剤ができれば、HCV治療、予防がより進むと期待される。

HCV感染による細胞増殖は多岐の機能で制御されていると考えられる。本研究では、アポトーシス、核小体の肥大化、p53、RB蛋白質の機能制御などを明らかにした。今後さらに解析を進め、人為的に制御可能な標的を見いだす必要がある。

HCV感染により細胞の遺伝子異常を引き起こす機構が明らかになりつつある。とくに、AIDの発現誘導が予防出来れば、肝発がんの予防が可能

になるかも知れない。また、ミトコンドリア異常が肝疾患にどのような影響を与えるかについては更なる今後の研究が必要である。

HCV感染・複製系の開発は今後のHCVの研究に重要である。間葉系幹細胞から効率よく肝細胞様の細胞に分化誘導することが可能となったことにより、この細胞をウイルス感染・複製細胞として開発できれば、感染実験のみならず、感染の評価研究にも利用出来る。実際にJFH-1株(2a型)HCVを細胞に導入した予備実験ではHCVのコピー数の増加を確認できた。さらにこの分化誘導した肝細胞の不死化の系も動き出したことから、培養の工夫等を行うことで、安定な細胞株を得るための方策を検討する必要がある。

HCV感染と病態との間には複雑な関係がある。特にHCVが単一、かつユニークな塩基配列でないために、ウイルスの塩基配列の違いとの関連で病態を考えてゆく必要がある。欠失HCVゲノムの存在は、このゲノムからコードされるコア蛋白質の生理的な意義、疾患との関連性などで解明される必要がある。

慢性肝炎患者に対する治療に際して、治療効果予測がされるがその際に、患者の血液内のウイルス量が予測因子のひとつとなる。ウイルスの定量にはゲノムの5'非翻訳領域を定量する方法が一般的であるが、その際に欠失ゲノムも測定されることになり、ウイルス量(完全長のゲノム)の正確さを反映しない可能性がある。したがって、欠失ゲノムと完全長ゲノムを仕分けして定量する系の開発も必要であろう。

F. 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、脂肪輸送、アポトーシス誘導、ミトコンドリア機能異常、ゲノム変異の導入による細胞の質的な変化、p53、RBの機能異常などが、病態の進行に寄与している可能性が示唆された。これらの変化の分子機構を解明することにより、エビデンスに基づく治療方法の開発が可能になるので、そのためにはさらに精力的に研究を進めることが必要である。また、種々の宿主要因がHCV複製制御に関わっていることも本研究でさらに明らかになった。これらの新規制御因子によるHCV複製制御が解明されることにより、抗HCV剤開発のレパートリーが広がり、薬の開発が容易になると期待される。

健康危険情報

C型慢性肝炎ではIFN著効例であっても、ミトコンドリア障害は残存し、ミトコンドリア遺伝子異常が高度な例は発癌リスクが高いことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 18(16):4638-4641, 2008
- Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology*. 375(2):424-432, 2008
- Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol*. 80(4):632-639, 2008
- Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):330-334, 2009.
- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Heat-shock Protein 90 is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3. *J. Biol. Chem*. 2009, 284:6841-6846.
- Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO, Takaku H. Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus vector-mediated short-hairpin RNA expression. *FEBS Lett*. 2008, 582:3085-3089.
- Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol*, 2009 (in press)
- Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 2009 (in press)
- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol*, 2008; 82(21):10375-10385.
- Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, 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*, 2008; 89(5):1231-1242.
- El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47, 2008.
- Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol*. in press (2009).
- Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J. Virol*. 83, 2338-2348(2009).
- Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol*. 154:77-85(2009).
- Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol*. 82:9639-9646 (2008).
- Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun*. 371:104-109 (2008).
- Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int*. 28:1158-1166 (2008).
- Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl*. 14:292-298 (2008).
- Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the

- relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol*. 80:632-639 (2008)
20. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. 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.* 31:435-448, 2008.
 21. T. Nishimura, M. Satoh, M. Saito, Y. Kasama, M. Kohara, and K. Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol-D-24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2008, 78 A45.
 22. Okanoue T., Itoh Y., Minami M., Hashimoto H., Yasui K., Yotuyanagi H., Takehara T., Kumada T., Tanaka E., Nishiguchi S., Izumi N., Sata M., Onji M., Yamada G., Okita K., and Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatol Res.* 38: 27-36, 2008
 23. Omata M., Yoshida H., Toyota J., Tomita E., Nishiguchi S., Hayashi N., Iino S., Makino I., Okita K., Toda G., Tanikawa K., Kumada H., and Japanese C-Viral Hepatitis Network. A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 56: 1747-1753, 2008
 24. Takahara Y., Takahashi M., Zhang Q.W., Wagatsuma H., Mori M., Tamori A., Shiomi S. and Nishiguchi S. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 7 : 2010-2022, 2008
 25. Hayashi T., Tamori A., Nishikawa M., Morikawa H., Enomoto M., Sakaguchi H., Habu D., Kawada N., Kubo S., Nishiguchi S. and Shiomi S Differences in molecular alterations of hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 19: 126-132, 2008
 26. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238:265-276, 200927.
 27. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 70-77, 2009
 28. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26: 2705-2712, 2008
 29. Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275:1260-1273, 2008
 30. Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1399-1404: 2008.
 31. Morisawa T, Marusawa H. Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer.* 123: 2735-2740: 2008.
 32. Komori J, Marusawa H. Machimoto T, Endo Y, and Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47: 888-896: 2008.

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

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、それがウイルス産生に重要であることを明らかにした。特に、ウイルスタンパク質が会合する脂肪滴は感染性ウイルス粒子の産生に重要な働きをしている。一方、ウイルス粒子産生が細胞外への脂質輸送とも関連している可能性を明らかにした。すなわち、very low density lipoprotein (VLDL) の細胞外への輸送を阻害すると感染性ウイルス粒子の産生も低下した。これらのことから、ウイルス粒子産生には、細胞内の脂肪滴そのものに加えて細胞から脂肪を放出する経路が重要である可能性が示された。

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 感染と増殖が細胞に与える効果を調べ、ウイルス複製と細胞の異常増殖との関連を分子レベルで明らかにして、その情報をもとにした治療および予防に役立てる研究を行う。

B. 研究方法

(1) ウイルス複製を制御する脂肪代謝に関与する細胞側要因の解析。

感染性 HCV ゲノムが複製する細胞を用いて、ウイルス複製により変化を受ける細胞要因を明らかにする。とくに、これまでに明らかにしてきた HCV 感染による脂肪代謝の変化が、ウイルス複製とどのような関連がある

のかを、阻害剤などを用いて別の角度から解析する。

(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増殖に及ぼす効果の解析。

種々の siRNA を細胞に導入し、それらの細胞に感染実験を行う。その結果ウイルスの産生が低下している細胞については、導入した siRNA との関連で注目される宿主因子のウイルス複製に対する効果を調べる。

特に、脂肪代謝や脂肪輸送に関与する宿主因子に注目して研究を進める。

(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) ウイルス複製を制御する脂肪代謝に関与する細胞側要因の解析。

感染性 HCV の産生が脂肪輸送に関与する宿主因子により制御されているか否かを調べるために、まず、HCV 感染増殖細胞、HuH7

細胞からの脂肪成分の細胞外への放出を調べた。肝臓細胞からの脂肪成分の放出は主として very low density lipoprotein (VLDL) が関与するといわれているので、HuH7 細胞からの VLDL の放出を調べた。細胞を無血清培地で培養した上清を native gel 電気泳動し、VLDL 抗体で反応させると、複数のバンドが検出された。それらのうちアポリポ蛋白質 B とともに反応するバンドを VLDL 様因子として解析を進めた。

VLDL の産生には宿主の microsomal triglyceride transfer protein (MTP) が重要な働きをする事が知られている。すなわち、triglyceride が少ない環境では、翻訳されるアポリポ蛋白質 B100 があっても、MTP の働きにより分解され、VLDL の細胞外放出は起こらない。このように、MTP は細胞内の脂肪成分の量に応じて VLDL の細胞外への放出を制御する重要な因子である。HCV 感染が MTP の機能を制御しているかを調べたところ、感染前の細胞に比べ感染細胞では MTP 活性が 8 割程度に低下した。既に MTP 活性は、HCV のコアあるいは NS5A が抑制するというこれまでの報告と一致するが、ウイルス感染放出系でも、同じ事が示されたといえる。

(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増殖に及ぼす効果の解析。

種々の siRNA を細胞に導入し、それらの細胞に感染実験を行い、感染性ウイルス産生を調べた。そのなかで、脂肪輸送に関係する宿主因子アポリポ蛋白質 E に対する siRNA を導入した細胞からは感染性ウイルス粒子の産生が優位に低下した。コントロール siRNA 導入細胞では低下が見られなかった。逆に、アポリポ蛋白質ノックアウト細胞にアポリ

ポ蛋白質 E 遺伝子を強制発現させると、感染性粒子の産生は回復した。このことから、アポリポ蛋白質 E が感染性粒子の産生に寄与していることが示された。

(3) 脂肪輸送を司る宿主因子の機能を阻害させたときにウイルスの増殖を調べ、脂肪輸送と感染性粒子の産生との関連を明らかにする。

VLDL 産生は脂肪としてトリグリセリド、コレステロールエステルがアポリポタンパク質 B と会合して小胞体ルーメンに放出され VLDL 前駆体を産生する。この際に microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の働きが重要である。前駆体 VLDL にはさらにトリグリセリドとアポリポタンパク質 E が会合して成長型 VLDL となり、最終的に細胞外に放出される。この過程でも MTP が重要な働きをしている。従って MTP 阻害剤で細胞を処理することにより、VLDL の細胞外への放出を制御することが可能である。HCV 感染複製細胞を異なる濃度の MTP 阻害剤で処理した後に感染性粒子の細胞外への放出を調べると、低濃度の阻害剤で感染性粒子の産生は抑制された。このときにアポリポタンパク質 B の細胞外放出は抑制され、さらには VLDL の放出も抑制された。しかし、アポリポ蛋白質 E はこの条件下では感染性ウイルス粒子放出低下が僅かしか見られなかった。

D. 考察

脂肪輸送に MTP 活性が重要であることが示されているが、HCV 感染により、MTP 活性は低下した。単純に考えれば、そのことにより脂肪の細胞外への放出が抑制されることを示唆する。一方、アポリポ蛋白質 B, E が感染

性ウイルス粒子産生に重要であることが、siRNAによるノックアウト実験、およびMTP阻害剤を用いた実験で示唆された。

これらの成果は、一件矛盾するように思えるが、報告者は以下のように考える。

まず、HCV感染細胞においては、油滴の量が蓄積する。このことは油滴を用いて感染性ウイルス粒子を産生するというこれまでの実験結果から推測すると、ウイルスによるウイルス産生に向けた宿主内環境の整備と考えられよう。一方、ウイルス感染はMTPの活性を低下させるが、この抑制作用はせいぜい2割程度であるために、感染細胞からの脂肪の細胞外への放出が強く抑制される事はないと考えられる。一方、MTP阻害剤を用いた実験から、アポリポ蛋白質BとVLDLの細胞外への放出が感染性ウイルス粒子の細胞外への放出に重要である可能性が示唆された。

さらには、アポリポ蛋白質Eの発現低下は感染性粒子の放出を低下させる。MTP阻害剤による細胞の処理では、アポリポ蛋白質Bの産生は阻害剤の低濃度処理で既に見られたが、アポリポ蛋白質Eの産生は、比較的高濃度の阻害剤処理によってみられた。これらのことから、アポリポ蛋白質BもEもHCVの感染性には重要である事が分かった。おそらく、アポリポ蛋白質Bが阻害されている条件では前駆体VLDLの産生が抑制される結果、感染性ウイルス粒子が産生されなくなり、アポリポ蛋白質Eは感染性に直接関与している可能性が考えられる。

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に加え、感染性粒子の産生にも脂肪代謝が重要な働きをしていることが明らかになった。

一方、感染性ウイルス粒子の産生には、脂肪輸送に関与する宿主蛋白質、アポリポ蛋白質B, Eの両方が必要であることを示唆する結果を得た。おそらく、HCVは細胞の外に出るときおよび感染に際してこれらの蛋白質の関与が必要と考えられる。したがって、ウイルス複製防御のひとつとして、脂肪輸送に関する遺伝子を標的とした抗HCV剤開発も視野に入れることができよう。

G. 研究発表

1.論文発表

- (1) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*). Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. *J Hepatol.* 50(3):453-460, 2009.
- (2) 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):330-334, 2009.
- (3) Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K. *J Biol Chem.* 283(49):34273-34282, 2008.
- (4) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T,

Shimotohno K. *Virology*. 379(2):306-313,
2008.

- (5) Synthesis and evaluation of 5'-modified
2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis
C virus agents. Ikejiri M, Ohshima T,
Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T.

Bioorg Med Chem Lett. 18(16):4638-4641,
2008.

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

本研究では、HCV 複製機構と宿主因子 Hsp90 の関係を明らかにし、分子シャペロン Hsp90/Hsp90 によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。Hsp90 阻害剤であるゲルダマイシン誘導体 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG)が NS3 と Hsp90 の相互作用を阻害し、NS3 のユビキチン化を誘導することでウイルス増殖を抑制することを明らかにした。また、Hsp90 と NS3 の相互作用点は NS3 の helicase domain であることが分かった。一方、Hsp90 阻害剤を用いた IRES の活性の評価では、Hsp90 依存的に IRES が活性化されることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、HCV 複製機構と宿主因子 Hsp90 の関係を明らかにし、Hsp90 によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。分子シャペロン Hsp90 はフォールディングや蛋白質の凝集抑制や活性化などで働く際は、必ず幾つかのコシャペロンと呼ばれる蛋白質と複合体を形成し動いている。さらに、Hsp90 阻害剤も近年注目されている薬剤であり、数種類存在する。その多くは、ゲルダマイシンの誘導体である。ゲルダマイシンは抗真菌薬のスクリーニングで見出されたベンゾキノンの低分子化合物であるが臨床試験において高い毒性が問題となっていた。我々は、Hsp90 阻害剤で毒性が低いとされているゲルダマイシン誘導体 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-AAG) が HCV の増殖抑制を示すことを見出すとともに、17-AAG による HCV 増殖抑制効果の作用機序を解明する。

B. 研究方法

17-AAG による HCV 増殖抑制効果の検討は HCV フルレングスレプリコン細胞である NNC#2 細胞を 17-AAG で濃度依存的に処理したのち、HCV RNA を回収し Real-Time PCR 法にて HCV RNA の定量を行った。つぎに、17-AAG の NNC#2 細胞に対する細胞障害性の評価を MTS assay 法で行った。

17-AAG による長期 HCV 抑制効果の検討は NNC#2 細胞に初回および 3 日おきに 17-AAG 処理した細胞から、HCV RNA を回収し、Real-Time PCR 法で HCV RNA の定量を行った。

17-AAG による HCV 増殖抑制への作用機序を解明するため、NNC#2 細胞を 17-AAG で処理し、全タンパク

質を回収し、Hsp90 およびその他のコファクターおよびウイルスタンパク質をウェスタンブロット法で分析した。

NNC#2 細胞を 17-AAG で処理した際の NS3 の減少を解析する為、17-AAG で処理した NNC#2 細胞にプロテアソーム阻害剤である MG132 を加えてたのち、NS3 タンパク質をウェスタンブロット法で分析した。

HCV NS3 と Hsp90 の相互作用性の検討は Flag タグ発現 NS3 ベクター (pFlag-NS3) を 293T 細胞に導入し、数日培養した後に Hsp90 との相互作用の検討を免疫沈降法により行った。また、Hsp90 との相互作用領域を決定するために、NS3 の欠損変異体プラスミドを作製、293T 細胞に導入し、数日培養した後に免疫沈降法により Hsp90 に対する NS3 の特定部位を確定した。

NS3 に対する Hsp90 依存的な安定性を検討するため NS3 欠損変異体プラスミドを、293T 細胞に導入し、細胞を 17-AAG で処理し数日培養した後、NS3 タンパク質量をウェスタンブロット法で測定した。

Hsp90 阻害による HCV IRES 翻訳への影響は HCV IRES より Luciferase を発現するレポータープラスミド(pHCV IRES-luc)を作製、Huh7 細胞に導入し数日培養した後に Luciferase 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

17-AAG による HCV 増殖抑制効果の検討ではレプリコン細胞 (NNC#2) を用いて行ったところ、細胞毒性を示さない 50nM 17-AAG で 99% の HCV 増殖抑制効果を示し、IC50 は 3nM であった。また 17-AAG、

濃度依存的に HCV RNA の減少が見られた。つぎに、17-AAG による長期 HCV 抑制効果をレプリコン細胞 (NNC#2) で検討したところ、最初に 1 回だけ 50nM 17-AAG で処理した場合 3 日間、HCV RNA レベルで 2log まで抑制していたが、12 日目ではコントロールレベルまで増加した。一方、15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG で処理した場合は 15 日間、HCV RNA レベルで 3log まで抑制した。さらに、17-AAG による HCV 増殖抑制への作用機序を解明するため、レプリコン細胞 (NNC#2) を 17-AAG で処理し、HCV core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質をウエスタンブロット法で検証した。NS5A と NS3 の発現の減少が見られたが、NS3 は NS5A よりも著しく減少した。また、17-AAG で処理したレプリコン細胞 (NNC#2) は Hsp70 の発現が増加した。すなわち、17-AAG による Hsp90 の阻害は HSF-1 を活性化する。さらに、17-AAG が NS3 の分解を促進するかをプロテアソーム阻害剤、MG132 を用いて検討したところ、NS3 の分解が抑制された。これらの結果から 17-AAG の薬理効果はプロテアソームシステムに依存することが示唆された。

HCV NS3 の活性化における Hsp90 の機能を明らかにする為に pFlag-NS3 を 293T 細胞に導入し、17-AAG の存在また非存在下で反応を行った。17-AAG 存在下では NS3 の発現は著しく減少した。また、pFlag-NS3 を用い Hsp90 との相互作用の検討を免疫沈降法で確認したところ、NS3 に Hsp90 の α と β サブユニットとも相互作用していることが分かった。さらに、NS3 各欠損変異体プラスミドを作製し、Hsp90 との結合部位の特定を検討した。その結果 NS3 の全長 Helicase 領域にのみ Hsp90 が結合していることを明らかにした。一方、NS3 に対する Hsp90 依存的な安定性の検討では、Hsp90 と結合するタンパク質のみ、減少が見られた。最後に Hsp90 を 17AGG で阻害したことによる HCV IRES 依存的翻訳阻害効果の検討では、17-AAG の濃度依存的に pHCV IRES-luc に対するルシフェラーゼの活性が減少する傾向が見られた。

D. 考察

Hsp90 阻害剤 17-AAG は腫瘍細胞に対して高い親和性をもつことが知られており、Hsp90 に依存するクライアント腫瘍タンパク質に対して高い親和性を示し

た。17-AAG は細胞毒性も低く、臨床試験においてその効果が期待されている。本研究では 15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG でレプリコン細胞 (NNC#2) を処理した際には長期抑制効果を示し、薬剤耐性ウイルスの出現も見られなかった。また、IC50 は 10nM であった。つぎに、HCV core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質の中で最も 17-AAG 処理でタンパク質の発現が減少していた NS3 と Hsp90 の相互作用を検討した結果、NS3 と Hsp90 は相互作用していることが明らかとなった。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いてプロテアソームの分解機能を阻害したところ、NS3 は 17-AAG で処理した細胞でもタンパク質発現は減少しない結果が得られた。これらの結果から Hsp90 が阻害されると NS3 はプロテアソームで分解されることが分かった。また、NS3 helicase 領域と protease 領域の欠損変異体を作成しそれぞれ Hsp90 との相互作用を検討すると、全長の NS3 helicase 領域のみ Hsp90 との相互作用が確認されたため、Hsp90 と NS3 の結合は NS3helicase 領域を経て起こることが明らかとなった。一方、Hsp90 を阻害した事による HCV IRES 依存的翻訳阻害効果の検討したところ、17-AAG の濃度依存的に pHCV IRES-luc のルシフェラーゼの活性が低下し翻訳が阻害されている事が明らかとなった。

E. 結論

Hsp90 阻害剤である 17-AAG は HCV の増殖抑制効果があり、HCV の複製には Hsp90 が NS3 と相互作用し安定化させることが必須である。また、Hsp90 が HCV IRES からのウイルスタンパク質翻訳も抑制している可能性が示唆され、作用機序については解析中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Heat-shock Protein 90 is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3. J. Biol. Chem. 2009, 284:6841-6846.

2. Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO, Takaku H. Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus vector-mediated short-hairpin RNA

expression. FEBS Lett. 2008, 582:3085-3089.

3. Nishibe Y, Kaneko H, Suzuki H, Abe T, Matsuura Y, Takaku H. Baculovirus-mediated interferon alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine model. Gene Ther. 2008, 15:990-997.

4. Kitajima M, Abe T, Miyano-Kurosaki N, Taniguchi M, Nakayama T, Takaku H. Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. Mol. Ther. 2008 16:261-268.

5. Kitajima M, Takaku H. Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. Clin. Vaccine Immunol. 2008, 15:376-378.

6. Gondai T, Yamaguchi K, Miyano-Kurosaki N, Habu Y, Takaku H. Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. Nucleic Acids Res. 2008, 36:e18.

7. Furukawa A, Nagata T, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M. NMR assignments and the identification of the secondary structure of the anti-retroviral cytidine deaminase. Nucleic Acids Symp Ser. 2008, 52:183-4.

2.学会発表

国内

1. 鈴木等、毛利友香、下遠野邦忠、小原道法、高久洋：C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質による肝星細胞（LI90細胞）活性化の検討。第56回日本ウイルス学会 岡山(2008.10)

国外

1. Nishibe Y., Suzuki H., Abe T., Matsuura Y. and Takaku H.:Baculovirus-mediated interferon alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine model. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Texas, USA (2008.10) pp.179

2. Suzuki H., Tmai N., Shimotohno K., Matsuura Y. and Takaku H.: Suppression of HCV RNA Replication by Baculovirus-mediated shRNA Expression Vectors, 21st International Conference on Antiviral Research. Quebec, Canada (2008.4) pp.A49

G.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許出願 なし
- 2.特許取得 なし

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

研究分担者 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 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、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。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。昨年度の本研究で、HCV（J6/JFH1-P47 株）感染 Huh-7.5 細胞培養系を用いて、HCV は感染数日後に Bax 誘導性ミトコンドリア介在性アポトーシスにより、細胞死を惹起することを明らかにした。一方、HCV 感染 1 週間以上経過すると、核小体の肥大と Rb がん抑制タンパク質の減少が認められることを報告した。本年度は、これらの事象について、さらに詳細に検討した。その結果、1) ヒト初代不死化肝細胞（HuS-E/2）培養系において、HCV 増殖の程度は Huh-7.5 細胞に比べて著しく低い、HCV 感染による細胞障害が明らかに認められた。このことは HCV が本来、細胞障害性（アポトーシス誘導性）を有していることを支持するものと考えられた。2) 次いで、HCV 感染と核小体肥大の直接の因果関係を証明するために、HCV 感染により核小体肥大を認める細胞をインターフェロン（IFN）処理してウイルスを排除し、核小体の大きさについて検討した。その結果、HCV 排除に伴って、核小体の大きさは非感染対照と同程度までに回復した。3) さらに、HCV 感染に伴って見られる ERK1/2 の活性化及び Rb がん抑制タンパク質の減少も、IFN 処理によるウイルス排除に伴って、認められなくなった。これらの成績は、HCV 感染と ERK1/2 の活性化及び Rb がん抑制タンパク質の減少の直接の因果関係を強く支持するものであり、HCV 持続感染に伴う細胞増殖亢進、細胞周期脱制御や細胞がん化の分子基盤のひとつであると考えられた。

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、さらには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 感染はミトコンドリア介在性アポトーシスによる細胞死を引き起こすことを我々は昨年報告した。また、HCV 持続感染期には、ERK1/2 の活性化及び Rb がん抑制タンパク質の減少など、細胞増殖亢進、細胞周期脱制御や細胞がん化に関連する細胞内事象も見られることを報告した。

本研究では、HCV J6/JFH1-P47 株を用いて、HCV による細胞死の機序をさらに詳細に解析するとともに、持続感染期に認められる様々な細胞内事象が、インターフェロン（IFN）処理により HCV を排除することに伴って、どのように変化するかについて検討した。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス：Huh-7.5 細胞及びヒト初代不死化肝細胞（HuS-E/2。京都大学ウイルス研究所・土方誠博士より分与）を用いた。ウイルスは

HCV J6/JFH1-P47 株を用いた。

(2) HuS-E/2 細胞における HCV 増殖と細胞増殖の解析：HCV 感染細胞から全 RNA を抽出し、HCV NS5B 領域に対するプライマーと β -glucuronidase に対するプライマーを用いた定量リアルタイム RT-PCR により、HCV 増殖の程度を測定した。細胞増殖の測定は WST-1 法により行った。

(3) IFN 処理による HCV の排除：HCV 感染細胞及び非感染細胞を IFN (IFN- α ; 1,000 IU/ml) で 10 日間処理し、免疫蛍光法及び免疫プロット法により、HCV の排除を確認した。

(4) 免疫染色法及び免疫プロット法：HCV 抗原の検出には HCV 感染患者血清（予め高力価を確認済）及び市販の抗 NS3 抗体、抗 NS5A 抗体を用いた。fibrillarin、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、Rb、リン酸化 Rb に対する抗体は市販のものを用いた。免疫染色法及び免疫プロット法は定法により行った。

(5) 核小体の解析：抗 fibrillarin 抗体を用いて核小体を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して、核小体の長径を計測した。

(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) HuS-E/2 細胞に対する HCV の細胞障害作用：

HuS-E/2 細胞に HCV J6/JFH1-P47 株を感染させると、感染 2-3 日後 (2-3 dpi) 及び 7-10 dpi に 2 峰性のピークで、定量リアルタイム RT-PCR 法により、HCV 増殖が観察された。WST-1 法により細胞増殖について検討したところ、5 dpi 以降 14 dpi まで、HCV 感染細胞では細胞増殖が抑制されていた。このような細胞増殖の抑制は、紫外線照射により感染性を消失させたウイルス液を接種した場合には認められなかった。

(2) HCV 持続感染期における核小体肥大及びその後の HCV 排除に伴う核小体サイズの回復：

HCV 感染後 7 dpi 頃から核小体の肥大が観察されるようになり、10-14 dpi で最も明瞭になった。そこで、13 dpi から IFN (1,000 IU/ml) 処理を開始したところ、23 dpi には HCV 抗原は少数の一部の細胞を除いて、ほとんど検出されなくなった。このような HCV 排除細胞では、核小体の大きさは非感染細胞と同程度に回復した。

(3) HCV 持続感染期における ERK1/2 のリン酸化 (活性化)：ERK1/2 のリン酸化は、HCV 感染の初期 (~3 dpi) には非感染対照細胞と同程度であった。しかし持続感染期 (7 dpi ~ 20 dpi) には、非感染対照より強い ERK1/2 のリン酸化が見られた。この HCV 感染細胞の ERK1/2 リン酸化の亢進は、IFN 処理でウイルスを排除することにより、見られなくなった。

(4) HCV 感染に伴う Rb がん抑制タンパク質の減少：細胞内 Rb 量は、HCV 感染の初期 ~ 持続感染期を通じて (3 dpi ~ 20 dpi)、非感染対照に比べて有意に減少した。この HCV 感染細胞の Rb 量の減少は、IFN 処理でウイルスを排除することにより、見られなくなった。

D. 考察

我々はこれまでに、HCV が Huh-7.5 細胞に対して明らかな細胞障害性を示すこと、及びその細胞障害はミトコンドリア介在性アポトーシスに基づくものであることを報告した。本研究により、HCV はヒト初代不死化肝細胞 (HuS-E/2) において、Huh-7.5 細胞の場合より著しく低いウイルス増殖しか示さないが、明らかな細胞障害性を有することがわかった。このことは、HCV は元来、細胞障害性を有するウイルスであることを示唆している。現在、HuS-E/2 細胞に対する HCV の細胞障害性がアポトーシスによるものか否かについて検討している。

一方、HCV は持続感染をおこし、高率に肝細胞がんを引き起こす。しかし、HCV の発がん機

序については未だ不明の点が多い。本研究により、HCV 持続感染により核小体の肥大が誘導され、HCV を排除することにより、核小体の大きさが非感染対照と同程度に回復することが明らかになった。この結果は、HCV 感染と核小体肥大の直接の因果関係を示唆している。核小体は rRNA 合成の場であり、核小体肥大は病理学的にがん細胞の指標のひとつと考えられている。HCV 感染細胞に見られる核小体の肥大は、HCV による発がん機序を考える上で興味深い知見であると思われる。

ERK1/2 は細胞増殖促進やアポトーシス抵抗性に重要な役割を果たすことが知られている。HCV 感染初期 (~3 dpi) には非感染対照に比べて有意な ERK1/2 のリン酸化 (活性化) は見られなかったが、持続感染期には有意の ERK1/2 リン酸化の亢進が認められた。このことは、急性感染期に見られたアポトーシスが、持続感染期には抑制される可能性を示唆している。実際、HCV 感染細胞はアポトーシスによりすべて死滅するのではなく、長期間にわたる持続感染状態を維持する。このような部分的なアポトーシスがすべての細胞にみられるわけではない要因として、細胞周期による表現型の違い等が考えられるが、今後の詳細な検討が必要である。

Rb がん抑制タンパク質の細胞内蓄積量は、HCV 感染初期 (~3 dpi) から、非感染対照に比較して減少した。IFN 処理による HCV 排除に伴って Rb 量の減少が見られなくなったことから、HCV 感染と Rb 量の減少に直接の因果関係があることが示唆された。この知見も、HCV による細胞周期脱制御や細胞がん化の分子基盤を考える上で興味深い。今後さらに詳細な解析を進める必要があると考えられる。

E. 結論

HCV による細胞障害はヒト初代不死化肝細胞 (HuS-E/2) 培養系でも認められ、HCV が本来、細胞障害性を有していることが示唆された。また、

HCV 持続感染により核小体肥大、ERK1/2 活性化及び Rb 蓄積量減少が見られたが、IFN 処理で HCV を排除することによりこれらの変化は消失した。以上の成績は、HCV による細胞がん化の分子機序を考える上で有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol*, 2009 (in press)
- (2) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 2009 (in press)
- (3) Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol*, 2008; 82(21):10375-10385.
- (4) Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, 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*, 2008; 89(5):1231-1242.
- (5) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts

clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47, 2008.

- (6) Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hotta H, Shoji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y. Usefulness of new immuno-radiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 51(Suppl 1):70-75, 2008.

2. 学会発表

- (1) Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008. San Antonio, Texas, USA.
- (2) Hotta H, Kitayama K, Yabuki R, Deng L, Nagano-Fujii M, Shoji I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008. San Antonio, Texas, USA.
- (3) Hotta H. Recent advances in the pathogenesis and treatment of hepatitis C virus infections. Joint Meeting of International Society of Chemotherapy for Infection and Cancer and Western Pacific Society of Chemotherapy, September 11-13,

2008. Hangzhou, China.

- (4) Hotta H. Sequence variation of the hepatitis C virus genome and its correlation with viral pathogenicity. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, February 26-28, 2009. Hong Kong.
- (5) Adachi T, Kasai D, Deng L, Nagano-Fujii M, Ide Y, Shoji I, Hotta H. Down-regulation of glucose transporter expression and glucose uptake by hepatitis C virus replication. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, February 26-28, 2009. Hong Kong.
- (6) Deng Lin, 足達哲也, 北山喜久美, 分玉泰彰, 北澤荘平, 石戸聡, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.
- (7) 堀田博, 北山喜久美, 矢吹玲子, Deng Lin, 長野基子, 勝二郁夫. C型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大, アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.
- (8) Deng Lin, 足達哲也, 北山喜久美, 分玉泰彰, 北澤荘平, 石戸聡, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染はミトコンドリア障害を介するアポトーシスを誘導する. 第61回日本細菌学会関西支部総会, 京都, 2008.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

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）
分担研究報告書

HCV増殖制御に関与する宿主因子の解析・
HCVの持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析に関する研究

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）HCVゲノムの複製に必要な新規宿主因子としてDNA損傷センサーであるataxia-telangiectasia mutated kinase（ATM）とcheckpoint kinase 2（Chk2）を見出した。HCV NS5BがATMおよびChk2と相互作用を示すことを明らかにした。（2）HCVゲノム複製細胞を1-2年間培養することにより発現レベルが亢進することを見出したメタロチオネイン1E或は2AがHCVゲノムの複製増殖に関与しているが示唆された。

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の増殖機構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増殖制御に関与する宿主因子と（2）HCVの持続的増殖により機能変化する宿主因子の2項目に関する実験を昨年度に引き続き行った。

B. 研究方法

（1）HCV増殖制御に関与する宿主因子の解析

DNA 損 傷 セ ン サ ー
ataxia-telangiectasia mutated
kinase（ATM）、ATM- and Rad3-related
kinase（ATR）、checkpoint kinase 2
（Chk2）お よ び poly（ADP-ribose）
polymerase 1（PARP-1）をノックダウン