

## 化合物ライブラリーを用いた抗 HCV 創薬シーズの探索とその同定

研究分担者 武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター・室長

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) をベースとするウイルス産生系を利用して、新規阻害剤探索のためのアッセイ系を確立し、アッセイ方法の最適化を行った。この系を用いることによって、従来のレプリコン・アッセイでは評価ができなかった HCV 感染から放出までの HCV 生活環全体を標的として、HCV 阻害剤の探索できるものと期待される。化合物ライブラリーその他を用いたランダムスクリーニングの結果、数種のヒット化合物 (A, A0, B, AD01-AD06, NU01, 02 など) を同定した。A, A0, B は HCV pseudoparticle の感染を阻害することからエントリー阻害剤と推定される。NU01, 02 は alpha-グリコシダーゼ阻害剤として同定されてきた経緯から、粒子形成阻害剤である可能性が推定される。それぞれの阻害剤候補の作用機構の詳細に関して解析が進行中である。

### A. 研究目的

HCV に対する阻害剤スクリーニングには、一般にレプリコン・アッセイが汎用されている。しかし、レプリコン・アッセイによっては、エントリーや脱殻などの感染初期過程や、ウイルス粒子放出などの感染後期過程に対する阻害剤の探索・評価ができないという難点があった。そこで、われわれは、脇田らによって樹立された HCV 感染性 HCV クローン (JFH-1) を用いた HCV cell-culture (HCVcc) アッセイによって、ウイルスエントリーから粒子放出までの HCV 生活環のあらゆるステップを標的とする阻害剤の探索を目指した。

### B. 研究方法

#### (1) 試験化合物

多様性指向低分子化合物ライブラリー (8,000 化合物)、天然物誘導体ライブラリー (3,000 化合物) を用いて HCV 阻害剤のスクリーニングを行った。また、alpha-

グリコシダーゼの活性中心の構造情報を利用して molecular docking 法によって virtual library から選択された約 30 種の化合物の HCV 阻害効果を評価した。

#### (2) HCV 阻害剤スクリーニング法

Huh7.5.1 細胞 ( $1 \times 10^4$  細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物を (最終濃度:  $5 \mu\text{M}$ 、溶媒: 0.5 % DMSO) を添加し、数十分後に HCV を感染させた (M.O.I = ~0.01)。感染から 72 時間後の培養上清を回収し、ELISA 法 (HCV 抗原 ELISA テスト・オーソ・クリニカル) によって HCV コアタンパク質量を定量した。陽性コントロールには IFN $\alpha$  ( $5 \text{ IU/mL}$  あるいは  $50 \text{ IU/mL}$ ) を用いてアッセイの有効性を評価した。

#### (3) 細胞毒性試験

Huh7.5.1 細胞 ( $5 \times 10^3$  細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物 (最終濃度:  $5 \mu\text{M}$ ) を添加した。72 時間培養後、WST 法 (Cell counting Kit-8・同仁

化学)により評価した。

(倫理面への考慮) 該当せず。

### C.研究結果

(1) 阻害剤スクリーニングの概要を、天然物誘導体ライブラリーからの探索の経緯を例にして述べる。一次スクリーニングによって、3,000化合物より、IFN $\alpha$  50 IU/mLに匹敵する強い抗ウイルス効果(HCVコアタンパク質の培養上清への産生(HCV output)の抑制効果)があり且つ細胞傷害性が低い53化合物を選択した(アッセイ結果の1例を図1に示す)。ついで、これらの化合物から更に絞り込みを行い、Titrationによって、選択的な阻害活性(selectivity index)が10以上の14化合物を選択しヒット化合物とした。それらのうち、SIが約20を超える化合物6種(EC<sub>50</sub> = 200~600 nM、selectivity index = 20~80)の抗HCV活性のプロファイルを図2に示す。

(2) alpha-グリコシラーゼ阻害剤は、エンペローブタンパク質の正常な糖鎖修飾を阻害するため、エンペローブタンパク質の正常なfolding, assemblyを阻害し、その結果ウイルス粒子は感染性を失う。われわれは、alpha-グリコシラーゼの活性中心領域に結合する可能性のある化合物をVirtual libraryよりmolecular dynamics simulationによって選択し、その抗HCV活性をHCVccアッセイによって評価し、うち2個のヒット化合物(NU01, NU02)を得た(日大生物資源部袴田航博士との共同研究)。

(3) 昨年度、多様性指向低分子化合物ライブラリー(8,000化合物)から得た5個のヒット化合物(A, A0, B, C, D)と合わせ、これまでに同定された主要なヒット化合物の抗ウイルス活性を表1にまとめる。

この中で、A, A0が相互に近縁の化学構造をもつことをのぞいて、いずれの化合物も、

既知のHCV阻害剤と構造的類縁性は認めない。

### D. 考察

化合物A, A0, BはHCV pseudoparticleの感染を阻害することからエントリー阻害剤であることが推定される。ADシリーズの化合物に関しては解析が未完了で、現時点で作用機構に関して明らかでない。一方、化合物NU01, NU02はスクリーニングの経緯からalpha-グリコシダーゼ阻害剤として作用しているものと考えられ、従って、おそらく粒子形成阻害剤のカテゴリーに入る化合物であると推定される。しかし、その詳細は明らかでない。いずれの阻害剤候補に関しても作用機序に関するさらなる解析が必要である。

### E. 結論

感染性HCVクローンを用いた新規阻害剤探索系は、これまでレプリコン・アッセイではできなかった新しいカテゴリーの阻害剤を探索するツールとして有効と考えられる。化合物ライブラリーからのHCVcc assayを用いたランダムスクリーニングの結果、数種のHCV阻害剤候補が同定された。作用機構の詳細は未解明であるが、同定された化合物のうち、化合物A, A0, Bはエントリー阻害剤候補、NU01, NU02は粒子形成阻害剤と推定される。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. J Virol Methods. 2009 Jan 3. [Epub ahead of print]



- 2) Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A. Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis.* 2008 Nov 13. [Epub ahead of print]
- 3) Xia, X., Lu, L., Tee, K. K., Zhao, W., Wu, J., Yu, J., Li, X., Lin, Y., Mukhtar, MM., Hagedorn, CH., Takebe, Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J. Med Virol.* 80 (7): 1142-52.
- 4) Tee, K. K., Pybus, OG., X-J, Li., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2008). Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08\_BC and 07\_BC in Asia. *J. Virol* 82: 9206-9215.
- 5) Shimizu, N., Tanaka, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Hoque, A., Jinno-Oue, A., Apichartpiyakul, C., Kusagawa, S., Takebe, Y., and Hoshino, H. (2008). A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52
- 6) Xia X, Lu L, Tee KK, Zhao W, Wu J, Yu J, Li X, Lin Y, Mukhtar MM, Hagedorn CH, Takebe Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J Med Virol.* 2008 Jul;80(7):1142-52.
- 7) Liu P, Xiang K, Tang H, Zhang W, Wang X, Tong X, Takebe Y, Yang R. (2008). Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008 Jan;24(1):1-6.
- 8) Louisirothanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. (2008). Host genetic analysis of HIV type 1 subtype CRF01\_AE (E)-infected Thai patients with different rates of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Dec;23(12):1605-8.
- 9) Tee, K. K., Pybus, OG, Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. (2008). Chronology of the HIV-1 CRF07\_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2008.
- 10) Takebe, Y. Uenishi, R., and Li. X-J. (2008). Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.

(注: HCV 阻害剤探索関連論文は未報告)

#### 和文

- 1) 武部 豊 (2009). エイズワクチンの開発動向: アデノウイルスワクチン国際臨床治験頓挫の波紋とその意味 (特集: 各医療機関における国際共同治験の取り組み) *PHARM STAGE* Vol.8, No.10: 1-6, 2009
- 2) 武部 豊, 上西理恵 (2008). HCV エントリー・粒子形成阻害剤: 新規クラス薬剤スクリーニング. *C 型肝炎のすべて*・2009 新規治療法. *肝胆膵* 57(5): 1047-1056, 2008.
- 3) 武部 豊. 「エイズワクチン開発の最新動向」 *Challenges to AIDS vaccine development* 細胞, Sept. 2008.
- 4) 武部 豊, 長谷彩希, 廖 華南, 上西理恵. (2008). アジアにおけるエイズ危機と日本: 危険水域に入った我が国. *感染・炎症・免疫* 2008 Vol.38 (3): 182-193, 2008.
- 5) 廖 華南, 長谷彩希, 上西理恵, 武部 豊 (2008), エイズに対する新規治療薬の開発動向. *Pharmastage* ファームステージ

2008年8月号.

6) 武部 豊, 山本直樹. 「エイズワクチン (メルク・アデノウイルスワクチン)・トライアルの失敗の意味すること」. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [http://idsc.nih.gov/jp/iasr/index-j.html] June, 2008.

7) 上西理恵, 長谷彩希, Liao Huanan, 武部豊. (2008). C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向. PHARM STAGE Vol.8, No.3: 1-5, 2008.

## 2. 学会発表

1) Takebe, Y., Uenishi, R., Isogai, M., Hakamata, W., Tetsuro Suzuki, T., Wakita, T., Nohtomi, K. Identification of novel small molecule HCV entry inhibitor that may act through CD81. 3rd Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (June 5-6, 2008, Boston).

2) Takebe, Y., Uenishi, R., Nohtomi, K., Liao, H., Hase, S., Suzuki, T., Wakita, T., Hakamata, W. Identification of novel small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81. HCV2008 (San Antonio, Texas, Oct.5-9, 2008).

3) 上西理恵, 廖 華南, 納富香子, 長谷彩希, 赤澤大輔, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 武部 豊. HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価. 第56回日本ウイルス学会抄録 (岡山 Nov 26-28, 2008)

4) 武部 豊, 上西理恵, 納富香子, 廖華南, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 袴田 航. CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定 (岡山 Nov 26-28, 2008) .

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (2008-2009)

### 1. 特許出願 (準備中を含む)

1) 「C型肝炎ウイルス侵入阻害剤」(出願準備中)

2) 「新規 HIV 阻害剤」(特願 2008-333922, 2008年12月26日)

3) 「HCV 阻害剤」(特願 2008-115873, 2008年4月25日)

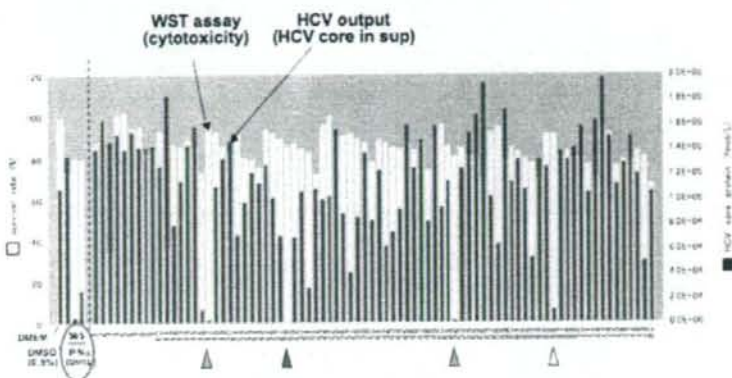
4) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598, 2008年2月14日)

5) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767, 2007年6月13日)

5) 「C型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007- 018145) [PCT 出願: PCT/JP2008/51086]

# 図1 Inhibitor screening based on HCV JFH-1 infectivity assay

Test compound: 5  $\mu$ M d3



## 図2

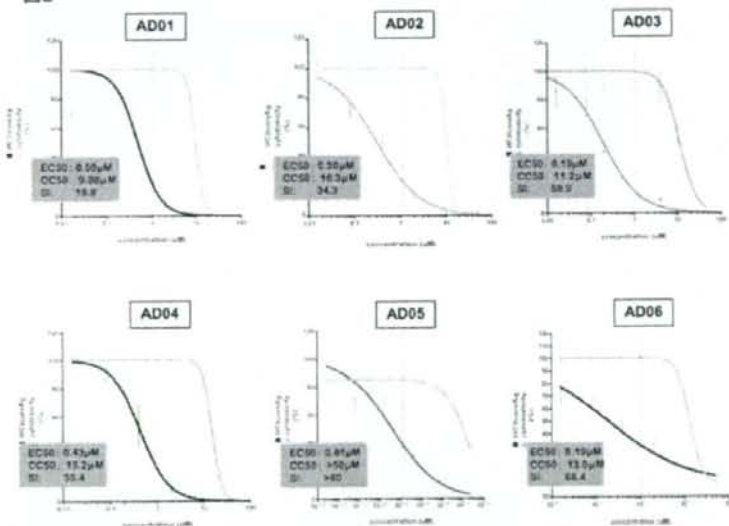


表1

HCV阻害剤スクリーニングのまとめ

Source/ property	Hit compound	JFH-1 HCVcc assay			HCVpp assay	Anti-HIV-1 activity
		EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI		
[1] Small molecule (representative diversity) (n=8,000)	A	0.07	35	500	+	-
	A0	0.4	50	125	+	-
	B	0.5	>50	>100	+	-
	C	1.0	35	35	+	-
	D	3.0	>100	>33	-	-
[2] Natural product derivatives (n=3,000)	AD01	0.5	9.88	19.8	-	-
	AD02	0.3	10.3	34.3	-	-
	AD03	0.19	11.2	58.9	+?	-
	AD04	0.43	15.2	35.4	-	-
	AD05	0.61	>50	>80	-	-
	AD06	0.19	13	68.4	-	-
[3] $\alpha$ -glycosidase inhibitor candidates ( <i>in silico</i> screened) (n=27)	NU01	1.6	168.6	105	-	?
	NU02	2.1	113.5	54.1	-	?



## 栄養成分の HCV に及ぼす効果の検討

研究分担者 岡山大学 准教授 池田 正徳

**研究要旨** H19 年度にレポーター遺伝子を含む全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 アッセイシステム) を用いて、46 種類の栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討し  $\beta$ -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の 3 成分が HCV RNA の複製を抑制することを明らかにした。本年度はこれらの栄養成分の抗 HCV 活性機構についてさらに検討し、以下のことを明らかにした。(1)  $\beta$ -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の抗 HCV 活性はビタミン E、MEK の阻害剤である U0126 によりキャンセルされた。(2) 抗 HCV 剤のなかでサイクロスポリン A、IFN- $\gamma$  の抗 HCV 活性はビタミン E、U0126 によりキャンセルされたが、スタチン剤ではキャンセルされなかった。以上の結果より栄養 3 成分、サイクロスポリン A、IFN- $\gamma$  などの抗 HCV 活性には酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 のリン酸化が重要であることを明らかにした。

### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高率に慢性肝炎を引き起こし、致命的な肝硬変、肝癌へと進行する。C 型肝炎に対する治療は、1989 年に HCV が発見される以前から非 A 非 B 型肝炎に対する有効性が報告されていたインターフェロン (IFN) 療法が中心となっている。IFN 療法の有効性は IFN 単独で行われていた頃の治癒 (SVR) 率が約 10% 程度であったのに対して、現在の PEG-IFN とリバビリン (RBV) の併用療法では約 50% 程度まで改善している。しかしながら、依然として約半数の C 型肝炎患者ではウイルスを排除することができずにいるのが現状である。このため、新しい C 型肝炎に対する治療法の開発は社会的なニーズも大きく急務となっている。

新しい C 型肝炎の治療法の研究は HCV のタンパク質に対する特異的な阻害剤やサイクロスポリン A やスタチン剤などの宿主因子を標的と

した研究が進んでいる。本研究ではこれらの研究とは異なる視点で C 型肝炎に対するアプローチを試みた。すなわち、日常的に摂取している栄養成分が HCV RNA 複製にどのような影響を与えるかについて検討した。昨今のサプリメントブームで C 型肝炎に有効な栄養成分などの情報がマスメディアに氾濫しているが、これらの多くは科学的な検証を経ていないものである。H19 年度はレポーター遺伝子を含む全長 HCV RNA (遺伝子型 1b) 複製細胞 (OR6 アッセイシステム) を用いて 46 種類の栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果について検討した。ほとんどが、HCV RNA 複製に対して影響を及ぼさなかったが、 $\beta$ -カロテン (BC)、ビタミン D2 (VD2)、リノール酸 (LA) は HCV RNA の複製を抑制することを見だし報告した。一方、ビタミン C (VC) やビタミン E (VE)、セレンウムなどの抗酸化物質には HCV RNA 複製を増強することがわかった。また、VE には BC、VD2、LA の抗 HCV 活性をキャンセルしてしまう働きを

有することも報告した。

本年度はこれらの栄養3成分に加えてサイクロスポリンA (CsA)、スタチン剤、IFN- $\gamma$ などの抗HCV剤を加えて酸化ストレスが抗HCV活性に及ぼす効果とその機構について検討した。

## B. 研究方法

HCV-0株(遺伝子型1b)由来の全長HCV RNA複製細胞(OR6細胞)を用いて栄養成分のHCV RNA複製に及ぼす効果を検討した。OR6細胞はレニラルシフェラーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を含む全長HCV RNAをヒト肝癌細胞株であるHuH-7細胞に導入後、薬剤選択により得られたクローン化細胞株である。OR6細胞ではレニラルシフェラーゼ活性を測定することでHCV RNAの複製レベルを評価することが可能である(OR6アクセスシステム)。

BC, VD2, 多価不飽和脂肪酸(LA, アラキドン酸(AA), エイコサペンタエン酸(EPA), ドコサヘキサエン酸(DHA)), CsA, IFN- $\gamma$ , フルバスタチン(FLV), ピタバスタチン(PTV)を単独あるいはMEK阻害剤であるU0126と併用して24時間前に $2 \times 10^4$ 個のOR6細胞を播種した24well plateに処理し、72時間培養した。細胞を回収してレニラルシフェラーゼ活性を測定した。

各栄養成分、抗HCV剤の抗HCV活性に対するU0126のキャンセル効果をHCVタンパク質の発現量で検討した。24時間前に $6 \times 10^4$ 個のOR6細胞を播種した6well plateに栄養成分、抗HCV剤を単独あるいはU0126と併用して処理して72時間培養した。細胞を回収してCore, NS5Aに対する抗体でウエスタンブロット解析を行った。

MEK1あるいはMEK2を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスベクターを用いてMEK1あるいはMEK2を恒常的にノックダウンしたOR6細胞を作成して、ERKがリン酸化されない細胞内でのLAあるいはPTVの抗HCV活性について検討した。

各栄養成分、抗HCV剤がERKをリン酸化するかどうかを検討するために $10^5$ 個のOR6細胞を播種

し48時間無血清培地で培養した後、各栄養成分、抗HCV剤で15分間処理した。細胞を回収してERK、リン酸化ERKに対する抗体でウエスタンブロット解析を行った。VEが各栄養成分、抗HCV剤によるERKリン酸化をキャンセルするかを検討する実験では各栄養成分、抗HCV剤を処理する1時間前にVEで細胞を前処理した。

## (倫理面への配慮)

本研究で実験に用いられた材料は全てこれまでに確立されているものであり、新たに用いた臨床材料はない。そのため、倫理面への特段の配慮はなかった。

## C. 研究成果

BC (10  $\mu$ M)、VD2 (5  $\mu$ M)、LA (50  $\mu$ M)を単独、あるいはMEK阻害剤のU0126 (5, 10  $\mu$ M)と併用でOR6細胞に添加して72時間培養しレニラルシフェラーゼ活性を測定した。BC、VD2、LA単独ではそれぞれHCV RNA複製を約50%抑制したがU0126を併用するとこれらの栄養成分の抗HCV活性はキャンセルされた。この結果はCore, NS5Aタンパク質の発現レベルを指標としたウエスタンブロット解析でも示された。これら結果はBC、VD2、LAの抗HCV活性にはERKの活性化が必要であることを示している。

LA以外の多価不飽和脂肪酸(AA, EPA, DHA)でもU0126がこれらの栄養成分の抗HCV活性をキャンセルするかどうか検討した。LA (50  $\mu$ M), AA (30  $\mu$ M), EPA (45  $\mu$ M), DHA (45  $\mu$ M)を単独あるいはU0126 (5, 10  $\mu$ M)と併用でOR6細胞に添加して72時間培養しレニラルシフェラーゼ活性を測定した。LA, AA, EPA, DHA単独ではそれぞれHCV RNA複製を約50-60%抑制したがU0126を併用するとこれらの栄養成分の抗HCV活性はキャンセルされた。この結果はCore, NS5Aタンパク質の発現レベルを指標としたウエスタンブロット解析でも示された。これら結果はLAの多価不飽和脂肪酸の抗HCV活性にもERKの活性化が必



要であることを示している。

抗 HCV 活性が報告されている抗 HCV 剤 (CsA、IFN- $\gamma$ 、FLV、PTV) で、U0126 がこれらの薬剤の抗 HCV 活性をキャンセルするかどうか検討した。CsA (0.2  $\mu$ g/ml)、IFN- $\gamma$  (0.4 IU/ml)、FLV (3  $\mu$ M)、PTV (1  $\mu$ M) を単独あるいは U0126 (5, 10  $\mu$ M) と併用で OR6 細胞に添加して 72 時間培養しレニラルシフェラーゼ活性を測定した。CsA、IFN- $\gamma$ 、FLV、PTV 単独ではそれぞれ HCV RNA 複製を約 50-60%抑制した。U0126 を併用すると CsA、IFN- $\gamma$  の抗 HCV 活性はキャンセルされたが、FLV、PTV の抗 HCV 活性は U0126 によりキャンセルされなかった。これらの結果は CsA、IFN- $\gamma$  の抗 HCV 活性にも ERK の活性化が必要であるが、スタチン剤の抗 HCV 活性には ERK の活性化は必要でないことを示している。

栄養成分、抗 HCV 剤 (スタチン剤を除く) の抗 HCV 活性は U0126 以外の MEK 阻害剤である PD98059 によってもキャンセルされた。さらに、ERK のリン酸化が抗 HCV 活性に与える影響を検討するため MEK1 あるいは MEK2 を shRNA でノックダウンした OR6 細胞を作成した。LA の抗 HCV 活性が MEK1 あるいは MEK2 をノックダウンした OR6 細胞で減弱したのに対して PTV の抗 HCV 活性は影響を受けなかった。これらの結果より LA は ERK の活性化が必要であるのに対して PTV は ERK の活性化は必要でないことが示された。

VE、MEK 阻害剤、MEK のノックダウンにより BC、VD2、LA、CsA の抗 HCV 活性をキャンセルされることが示された。これらの結果は酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化がこれらの栄養成分、抗 HCV 剤の抗 HCV 活性に重要であることを示している。そこで、実際に栄養成分、抗 HCV 剤が ERK1/2 をリン酸化しているかまた、VE がリン酸化を阻害するかどうかについて検討した。BC、VD2、LA、AA、EPA、DHA、IFN- $\gamma$ 、CsA 処理により ERK1/2 はリン酸化されたが、FLV、PTV 処理で ERK1/2 はリン酸化されなかった。また、BC、VD2、LA、AA、IFN- $\gamma$ 、CsA 処理による ERK1/2 のリン酸化は VE

によりキャンセルされた。以上の結果より BC、VD2、多価不飽和脂肪酸 (LA、AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$  は ERK1/2 を活性化し、ERK1/2 を活性化は VE によりキャンセルされるが、スタチン剤 (FLV、PTV) では ERK1/2 を活性化しないことがわかった。

#### D. 考察

H19 年度に抗 HCV 活性を有する栄養成分として BC、VD2、LA を同定し、またそれらの抗 HCV 活性が抗酸化作用のある VE によりキャンセルされてしまうことを報告した。また、酸化ストレスは MEK-ERK1/2 を活性化することが知られている。これらより、VE で抗 HCV 活性がキャンセルされる抗 HCV 作用のある物質において MEK-ERK1/2 が重要な役割を果たす可能性について検討した。本年度は BC、VD2、LA 以外に多価不飽和脂肪酸 (AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$ 、スタチン剤 (PTV、FLV) の抗 HCV 活性の知られている物質を加えて MEK-ERK1/2 の抗 HCV 活性における役割を検討した。

BC、VD2、多価不飽和脂肪酸 (LA、AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$  は ERK1/2 を活性化したが、スタチン剤 (PTV、FLV) では ERK1/2 を活性化されなかった。また、ERK1/2 の活性化は VE を併用することでキャンセルされた。栄養成分、抗 HCV 剤 (スタチン剤を除く) の抗 HCV 活性は MEK 阻害剤である U0126、PD98059、MEK のノックダウンでキャンセルされてしまうことを明らかにした。今回検討したスタチン剤以外の栄養成分、抗 HCV 剤では ERK1/2 の活性化が VE によりキャンセルされてしまうことより、これらの物質の抗 HCV 活性には酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が必要ながわかった。これらの結果は、予想していた以上に広範囲の抗 HCV 剤においてその抗 HCV 活性に酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が重要な役割を果たしていることがわかった。一方では、スタチン剤のように抗 HCV 活性に酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が必要でない抗 HCV 剤もあることがわかった。



酸化ストレスは DNA ダメージ、細胞障害ではネガティブな作用となるが、その一方で、HCV RNA 複製に対しては MEK-ERK1/2 の活性化を介して抑制効果があることがわかった。新規の抗 HCV 剤を含めた C 型慢性肝炎の治療に際し、抗酸化剤のむやみな投与や、サプリメントとしての摂取は治療効果を減弱させてしまう可能性があるため十分な注意が必要と思われる。

#### E. 結論

BC( $\beta$ -カロテン)、VD2(ビタミン D2)、LA(リノール酸)を含む多くの抗 HCV 剤において酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 のリン酸化が抗 HCV 活性に重要であることが分かった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) G. Nishimura, M. Ikeda, K. Mori, T. Nakazawa, Y. Ariumi, H. Dansako and N. Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to ant-HCV reagents. *Antiviral Res.* In press (2009).
- 2) N. Kato, K. Abe, K. Mori, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, and M. Ikeda. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch Virol.* 154, 77-85 (2009).
- 3) M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol.* 83, 2338-2348 (2009).
- 4) Y. Ariumi, M. Kuroki, H. Dansako, K. Abe, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato: ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82, 9639-9646 (2008).
- 5) H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, K. Mori, K. Takemoto, Y. Ariumi, and N. Kato: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137, 72-79 (2008)
- 6) K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. 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).
- 7) K. Hirano, T. Ichikawa, K. Nakao, A. Matsumoto, H. Miyaaki, H. Shibata, S. Eguchi, M. Takatsuki, M. Ikeda, H. Yamasaki, N. Kato, T. Kanematsu, N. Ishii, K. Eguchi. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin A, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292-8 (2008).
- 8) M. Nakamura, H. Saito, M. Ikeda, S. Tada, N. Kumagai, N. Kato, K. Shimotohno, T. Hibi. 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).
- 9) M. Ando, M. Korenaga, K. Hino, M. Ikeda, N. Kato, S. Nishida, I. Hidaka, I. Sakaida. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158-66 (2008).

## 2. 学会発表

- 1) H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N Kato. Modulation of dsRNA-induced IFN-beta and inflammatory cytokine productions by HCV NS3-4As derived from patients with different hepatic diseases. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 2) K. Abe, M. Ikeda, H. Tani, Y. Ariumi, H. Dansako, Y. Matsuura, N. Kato. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 3) K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, N. Kato. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 4) M. Ikeda, K. Abe, M. Kuroki, Y. Ariumi, H. Dansako, N. Kato. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 5) N. Kato, K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, T. Wakita, M. Ikeda. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 6) Y. Kawai, M. Ikeda, K. Abe, M. Yano, Y. Ariumi, H. Dansako, K. Yamamoto, N. Kato. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN-a resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 7) Y. Ariumi, M. Kuroki, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 8) K. Abe, M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 9) M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 10) 加藤宣之、森 京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆字、池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 11) 西村 剛、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、中沢貴秀、加藤宣之. 異なるHCV陽性血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 12) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部 健一、池田正徳、脇田隆字、加藤宣之. DNA損傷センサーATM及びChk2とHCV NS5Bとの相互作用. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 13) 團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之.

- 二本鎖RNAによるIFN- $\beta$ 及び炎症性サイトカイン産生誘導に対する肝病態の異なるHCV NS3-4Aの影響. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 14) 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫 浩方、脇田隆宇、加藤宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に抑制する. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 15) 池田正徳、阿部健一、黒木美沙緒、有海 康雄、團迫浩方、加藤宣之. 抗HCV活性を示すアラキドン酸代謝産物5-HETEの同定. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 16) 森 京子、加藤宣之、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株Li23由来の全長HCV-RNA複製細胞を用いた薬剤評価システム. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 17) 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宣之. Cyclosporine Aに対し抵抗性を示す1b/2aキメラレプリコン. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 18) 河合良成、池田正徳、阿部健一、矢野雅彦、有海康雄、團迫浩方、山本和秀、加藤 宣之. IFN抵抗性全長HCV-RNA複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 19) 池田正徳、森 京子、西村 剛、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、中沢貴秀、加藤宣之. 異なる1b型HCV陽性血清由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 20) 阿部健一、池田正徳、谷 英樹、有海康雄、團迫浩方、松浦善治、加藤宣之. HCV複製に関与する宿主因子探索用細胞株のNegative Selection法による樹立. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月.
- 21) 森 京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之. 急性C型肝炎患者由来の新しいC型肝炎ウイルスゲノム複製系. 第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月.
- 22) 池田正徳、森 京子、阿部健一、西村 剛、團迫浩方、有海康雄、中沢貴秀、加藤宣之. 異なるHCV(1b型)株由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発. 第67回 日本癌学会総会、名古屋、2008年10月.
- 23) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部 健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宣之. ATM DNA損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である. 第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## ラミブジン耐性 B 型慢性肝炎に対するアデホビル追加投与における治療効果に影響を及ぼす HBV 遺伝子変異の網羅的解析

研究分担者 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨 B 型肝炎に対する核酸アナログ製剤であるアデホビル (ADV) はラミブジン (LAM) とは異なる耐性変異プロファイルを有することから、LAM 耐性症例に対しても優れた抗ウイルス効果を有する薬剤である。しかし、ADV の有効性は個々の患者においてばらつきがあり、その原因は明確にされていない。本年度は LAM 耐性症例に ADV の追加投与を行った 30 例の保存血清を用いて、ADV 追加投与後の抗ウイルス効果と関連するウイルス変異を網羅的に解析した。コアプロモーター領域に存在する V1753 変異 (V = C/G/A) とコア遺伝子内に存在する C2189 変異を有する症例において、有さない症例に比して累積 HBV DNA 消失率が有意に高値であり ( $p < 0.005$  for V1753,  $p < 0.05$  for C2189)、これらの変異を有する症例では ADV 治療効果がより良好であることが明らかとなった。in vitro 増殖系を用いた検討では C1753 変異、C2189 変異を有する HBV と wild-type HBV との間には LAM、ADV とともに薬剤感受性に差を認めなかった。V1753 変異あるいは C2189 変異を有する HBV が ADV 治療下で排除されやすいのは、ADV の直接的な抗 HBV 作用に対する感受性がより高いという理由ではなく、宿主免疫反応によるウイルス排除をより受けやすいなどの他の理由によるものであることが考えられた。

共同研究者

大川和良 大阪大学消化器内科学 助教

### A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法においては、核酸アナログが主たる役割を占めており、日本ではラミブジン (LAM)、アデホビル (ADV)、エンテカビル (ETV) の 3 剤が保険適応を受けている。この中で ADV は核酸アナログ未治療 (naïve) 症例のみならず LAM 耐性症例にも有効であることが知られている。LAM 耐性 B 型慢性肝炎に対しては LAM を投与したまま ADV を追加投与するのが一般的であるが、ADV 追加投与後における抗ウイルス効果には症例によって相違が認められる。しかしながら、このような ADV 感受性を規定する因子に関してはいまだ完全には明らかになっていない。

そこで本研究においては、LAM 耐性をきたし ADV 追加投与を施行した B 型慢性肝炎 30 例を対象として、ADV 投与前に採取した血清サンプルを用いて、直接シーケンス法にて HBV 全長の塩基配列解析を行い、ADV 治療感受性に影響を与える HBV 変異を網羅的に検討した。

### B. 研究方法および研究成果

2 カ所の HBV 変異が ADV 治療効果と有意な関連を有していた。すなわち、コアプロモーター領域に存在する V1753 変異 (V = C/G/A) とコア遺伝子内に存在する C2189 変異を有する症例において、有さない症例に比して累積 HBV DNA 消失率が有意に高値であり ( $p < 0.005$  for V1753,  $p < 0.05$  for C2189)、これらの変異を有する症例では ADV 治療効果がより良好であることが明らかとなった。さ

らに、各種臨床因子を含めた多変量解析を施行したところ、累積 HBV DNA 消失率に有意に寄与する因子は V1753 変異 ( $p = 0.001$ )、C2189 変異 ( $p = 0.007$ )、投与前 HBV DNA 低値 ( $p = 0.008$ )、投与前 ALT 高値 ( $p = 0.011$ ) の 4 因子であり、やはりこれら 2 つの HBV 変異は有意な因子として含まれていた。次に、これらの変異 HBV の ADV 感受性に対する直接的な影響を確認するために *in vitro* 増殖系を用いた検討を行った。すなわち HBV adr4 株 (genotype C) を 1.2 周分 tandem に組み込んだ wild-type HBV 発現プラスミドと、C1753 変異、C2189 変異をそれぞれ導入した変異 HBV 発現プラスミドを作成し、これらを Huh-7 細胞に導入した後、LAM 1 mM、10 mM、ADV 1 mM、10 mM、ならびに LAM 10 mM + ADV 10 mM 処理を行い、HBV 増殖抑制効果を Southern blot にて検討した。その結果 C1753 変異、C2189 変異を有する HBV と wild-type HBV との間には LAM、ADV とも薬剤感受性に差を認めなかった。

#### C. 考察と結論

以上の結果より、V1753 変異と C2189 変異は、LAM 耐性 B 型慢性肝炎に対する ADV 追加治療における抗ウイルス効果に影響を与える HBV 変異であることが示唆された。また、実際の臨床症例において V1753 変異あるいは C2189 変異を有する HBV が ADV 治療下で排除されやすいのは、ADV の直接的な抗 HBV 作用に対する感受性がより高いという理由ではなく、宿主免疫反応によるウイルス排除をより受けやすいなどの他の理由によるものであることが考えられた。

#### D. 研究発表

##### 論文発表

1. Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M,

Hayashi N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res* 38: 450-456, 2008.

2. Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Kato M, Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatol Res* 38: 622-628, 2008.
3. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Supportive role of precore and preS2 genomic changes on establishment of lamivudine-resistance hepatitis B virus. *J Infect Dis* 198: 1150-1158, 2008.
4. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Kanada A, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* (in press).

#### D. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



をリン酸化しているかまた、VE がリン酸化を阻害するかどうかについて検討した。BC、VD2、LA、AA、EPA、DHA、IFN- $\gamma$ 、CsA 処理により ERK1/2 はリン酸化されたが、FLV、PTV 処理で ERK1/2 はリン酸化されなかった。また、BC、VD2、LA、AA、IFN- $\gamma$ 、CsA 処理による ERK1/2 のリン酸化は VE によりキャンセルされた。以上の結果より BC、VD2、多価不飽和脂肪酸 (LA、AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$  は ERK1/2 を活性化し、ERK1/2 を活性化は VE によりキャンセルされるが、スタチン剤 (FLV、PTV) では ERK1/2 を活性化しないことがわかった。

### C. 考察

H19 年度に抗 HCV 活性を有する栄養成分として BC、VD2、LA を同定し、またそれらの抗 HCV 活性が抗酸化作用のある VE によりキャンセルされてしまうことを報告した。また、酸化ストレスは MEK-ERK1/2 を活性化することが知られている。これらより、VE で抗 HCV 活性がキャンセルされる抗 HCV 作用のある物質において MEK-ERK1/2 が重要な役割を果たす可能性について検討した。本年度は BC、VD2、LA 以外に多価不飽和脂肪酸 (AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$ 、スタチン剤 (PTV、FLV) の抗 HCV 活性の知られている物質を加えて MEK-ERK1/2 の抗 HCV 活性における役割を検討した。

BC、VD2、多価不飽和脂肪酸 (LA、AA、EPA、DHA)、CsA、IFN- $\gamma$  は ERK1/2 を活性化したが、スタチン剤 (PTV、FLV) では ERK1/2 を活性化されなかった。また、ERK1/2 の活性化は VE を併用することでキャンセルされた。栄養成分、抗 HCV 剤 (スタチン剤を除く) の抗 HCV 活性は MEK 阻害剤である U0126、PD98059、MEK のノックダウンでキャンセルされてしまうことを明らかにした。今回検討したスタチン剤以外の栄養成分、抗 HCV 剤では ERK1/2 の活性化が VE によりキャンセルされてしまうことより、これらの物質の抗 HCV 活性には酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が必要なことがわかった。これらの結果は、予想していた以上に広

範囲の抗 HCV 剤においてその抗 HCV 活性に酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が重要な役割を果たしていることがわかった。一方では、スタチン剤のように抗 HCV 活性に酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 の活性化が必要でない抗 HCV 剤もあることがわかった。

酸化ストレスは DNA ダメージ、細胞障害ではネガティブな作用となるが、その一方で、HCV RNA 複製に対しては MEK-ERK1/2 の活性化を介して抑制効果があることがわかった。新規の抗 HCV 剤を含めた C 型慢性肝炎の治療に際し、抗酸化剤のむやみな投与や、サプリメントとしての摂取は治療効果を減弱させてしまう可能性があるため十分な注意が必要と思われる。

### D. 結論

BC ( $\beta$ -カロテン)、VD2 (ビタミン D2)、LA (リノール酸) を含む多くの抗 HCV 剤において酸化ストレスによる MEK-ERK1/2 のリン酸化が抗 HCV 活性に重要であることが分かった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) G. Nishimura, M Ikeda, K. Mori, T. Nakazawa, Y. Ariumi, H. Dansako and N. Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to ant-HCV reagents. *Antiviral Res.* In press (2009).
- 2) N. Kato, K. Abe, K. Mori, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, and M. Ikeda. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch Virol.* 154, 77-85 (2009).
- 3) M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Arsenic trioxide



- inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J. Virol.* 83, 2338-2348 (2009).
- 4) Y. Ariumi, M. Kuroki, H. Dansako, K. Abe, M. Ikeda, T. Wakita, and N. Kato: ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82, 9639-9646 (2008).
- 5) H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, K. Mori, K. Takemoto, Y. Ariumi, and N. Kato: A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137, 72-79 (2008)
- 6) K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. 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).
- 7) K. Hirano, T. Ichikawa, K. Nakao, A. Matsumoto, H. Miyaaki, H. Shibata, S. Eguchi, M. Takatsuki, M. Ikeda, H. Yamasaki, N. Kato, T. Kanematsu, N. Ishii, K. Eguchi. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin A, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver. Transpl.* 14:292-8 (2008).
- 8) M. Nakamura, H. Saito, M. Ikeda, S. Tada, N. Kumagai, N. Kato, K. Shimotohno, T. Hibi. 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).
- 9) M. Ando, M. Korenaga, K. Hino, M. Ikeda, N. Kato, S. Nishida, I. Hidaka, I. Sakaida. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158-66 (2008).
2. 学会発表
- 1) H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, and N. Kato. Modulation of dsRNA-induced IFN-beta and inflammatory cytokine productions by HCV NS3-4As derived from patients with different hepatic diseases. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 2) K. Abe, M. Ikeda, H. Tani, Y. Ariumi, H. Dansako, Y. Matsuura, N. Kato. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 3) K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, M. Ikeda, N. Kato. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 4) M. Ikeda, K. Abe, M. Kuroki, Y. Ariumi, H. Dansako, N. Kato. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 5) N. Kato, K. Mori, K. Abe, H. Dansako, Y. Ariumi, T. Wakita, M. Ikeda. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for

- anti-HCV reagents. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 6) Y. Kawai, M. Ikeda, K. Abe, M. Yano, Y. Ariumi, H. Dansako, K. Yamamoto, N. Kato. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- $\alpha$  resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 7) Y. Ariumi, M. Kuroki, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 8) K. Abe, M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 9) M. Kuroki, Y. Ariumi, M. Ikeda, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA. October, 2008.
- 10) 加藤宣之, 森 京子, 阿部健一, 團迫浩方, 有海康雄, 脇田隆宇, 池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 11) 西村 剛, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 中沢貴秀, 加藤宣之. 異なるHCV陽性血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 12) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部 健一, 池田正徳, 脇田隆宇, 加藤宣之. DNA損傷センサーATM及びChk2とHCV NS5Bとの相互作用. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 13) 團迫浩方, 有海康雄, 池田正徳, 加藤宣之. 二本鎖RNAによるIFN- $\beta$ 及び炎症性サイトカイン産生誘導に対する肝病態の異なるHCV NS3-4Aの影響. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 14) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に抑制する. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 15) 池田正徳, 阿部健一, 黒木美沙緒, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 抗HCV活性を示すアラキドン酸代謝産物5-HETEの同定. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 16) 森 京子, 加藤宣之, 阿部健一, 有海康雄, 團迫浩方, 池田正徳. 新しいヒト肝癌細胞株Li23由来の全長HCV-RNA複製細胞を用いた薬剤評価システム. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 17) 阿部健一, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之. Cyclosporine Aに対し抵抗性を示す1b/2aキメラレプリコン. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 18) 河合良成, 池田正徳, 阿部健一, 矢野雅彦, 有海康雄, 團迫浩方, 山本和秀, 加藤 宣之. IFN抵抗性全長HCV-RNA複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.
- 19) 池田正徳, 森 京子, 西村 剛, 阿部健一, 有海康雄, 團迫浩方, 中沢貴秀, 加藤宣之. 異なる1b型HCV陽性血清由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発. 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会, 岡山, 2008年10月.

- 20) 阿部健一、池田正徳、谷 英樹、有海康雄、團迫浩方、松浦善治、加藤宣之。HCV複製に関する宿主因子探索用細胞株のNegative Selection法による樹立。第56回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008年10月。
- 21) 森 京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、池田正徳、加藤宣之。急性C型肝炎患者由来の新しいC型肝炎ウイルスゲノム複製系。第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月。
- 22) 池田正徳、森 京子、阿部健一、西村 剛、團迫浩方、有海康雄、中沢貴秀、加藤宣之。異なるHCV(1b型)株由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発。第67回 日本癌学会総会、名古屋、2008年10月。
- 23) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部 健一、池田正徳、脇田隆字、加藤宣之。ATM DNA損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である。第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## GFP 挿入ウイルスを用いた HCV 感染細胞検出系の確立

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

**研究要旨** C型肝炎ウイルス(HCV)の培養細胞への感染を簡便に検出できる系を構築するため、GFP 遺伝子を HCV のゲノムに挿入し、細胞感染後に GFP を発現するレポーターウイルスシステムの構築を試みた。このシステムは、HCV の感染増殖が可能な細胞を生きのまま分離できることから HCV の感染増殖に関与する宿主側の因子の同定も可能である。本年度は効率的な GFP 挿入ウイルス作製のための基礎的な検討を行った。

### A. 研究目的

近年、JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス(HCV)の培養細胞感染増殖系が開発され、培養細胞でのこのウイルスのライフサイクルの観察と、抗ウイルス剤による感染増殖阻害の評価が可能となった。しかし現行の方法では、抗ウイルス剤の活性を評価するために感染細胞の免疫染色が必要であり、操作が煩雑で時間もかかることから多くの薬剤のスクリーニングには不向きであると考えられる。さらに感染細胞同定のためには細胞の固定が必要となり、感染増殖が可能な細胞と不可能な細胞の宿主因子等の違いを評価することが難しい。そこで、簡便なHCVの培養細胞へ感染検出系を構築するため、GFP遺伝子をHCVのゲノムに挿入し、細胞感染後にGFPを発現するレポーターウイルスシステムの構築を試みた。このシステムでは、HCV感染後に生細胞中でGFPが発現するため、HCVの感染増殖が可能な細胞が生きのまま分離でき、宿主側の因子も同定可能であると考えられる。

昨年度はJFH-1ウイルスにおけるGFP遺伝子挿入可能部位をNS5a領域に同定し、GFP遺伝子を持ったウイルスの感染増殖系の構築を試みたが、ウイルスの生成効率、感染効率ともに低く、抗ウイルス剤による感染阻止実験が可能なシステムは得られなかった。また、JFH-1株よりもウイルスの生成効率の良いことが知られているJ6/JFH-1キメラウイルスを用い同様にGFPをNS5aに挿入したウイルスを作製し、さらに全長のレプリコン、コア領域N末端にGFPを挿入したウイルスと、その生成効率、感染効率を比較したところ、全長レプリコンが最も良いウイルス生成と感染性を示し、GFPをNS5aに挿入したウイルスではJFH-1株を用いたウイルスよりは高い効率を示したものの全長のレプリコンには及ばなかった。

そこで本年度はJFH-1株NS5a領域にGFPを挿入したウイルスを長期培養することにより適応変異を誘導し、ウイルスの変異によるウイルス生成と感染効率への影響を検討した。さらにJFH-1株を長期培養することにより得られた適応変異を

GFP挿入ウイルスに導入することにより、同様の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. GFP 挿入 JFH-1 ウイルスの長期培養

JFH-1 株の NS5a 領域に GFP を挿入したコンストラクトの RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、長期に培養することにより、そのウイルス増殖能と GFP をもったウイルスの安定性を検討した。GFP 挿入ウイルス感染増殖細胞の比率は FACS を用いた解析により同定した。

### 2. JFH-1 株長期培養で得られた細胞培養内適応変異の GFP 挿入ウイルスへの導入

JFH-1 株を Huh7.5.1 細胞に導入し、長期培養することにより得られた適応変異を GFP 挿入ウイルスに導入し、そのウイルス生成効率と感染性に与える影響を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換え DNA を用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

## C. 研究結果

### 1. GFP 挿入 JFH-1 ウイルスの長期培養

JFH-1 株の NS5a 領域 C 末端に GFP を挿入したコンストラクトの全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、約四週間の培養を行なった。その結果 Day 18 (Passage 5) より培養上清中、細胞中の HCV RNA の上昇を認め、同時に培養上清の感染

力価の上昇も観察された。しかし FACS による解析では、HCV コアが陽性の細胞の増加は認めるものの GFP が陰性の細胞の比率が Day 14 (Passage 4) より徐々に増加し、Day 28 (Passage 7) では HCV コア陽性細胞中の GFP 陽性細胞の数は陰性細胞の数を下回っていた。

そこで培養細胞中で増殖している HCV の NS5a 領域 C 末端の GFP 挿入部位を RT-PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法により検討した。その結果、培養細胞内の RNA では Day 9 (Passage 2) より、培養上清中の RNA では Day 15 (Passage 4) より、GFP 挿入部位が欠失したウイルス株が出現していた。ダイレクトシーケンスの結果、欠失部分は GFP のみでなく HCV ゲノムの NS5a の一部領域を含み欠失が起っていた。

### 2. JFH-1 株長期培養で得られた細胞培養内適応変異の GFP 挿入ウイルスへの導入

GFP 挿入ウイルスの長期培養では、細胞内適応変異を持ったウイルスが得られなかったため、JFH-1 株の長期培養により得られた適応変異を GFP 挿入ウイルスに導入することにより、このウイルスの生成効率と感染性に与える影響を検討した。JFH-1 株を約四週間培養することにより JFH-1 株よりも高い生成効率をもつウイルスが得られた。このウイルス株の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定したところ、E2・NS3・NS5b 領域にそれぞれ変異が同定された。これらの変異を一つずつ JFH-1 株に導入したところ、培養上清中の HCV RNA 量の増加が認められた。さらにすべての変異を導入すると、培養上清中の HCV RNA 量は 1 log 以上増加した。そこでこれらの変異を GFP 挿入 JFH-1 ウイルスに

導入し、生成されたウイルスを感染させることにより GFP 陽性の HCV 感染細胞を比較したところ、変異を持ったウイルスではより多くの GFP 陽性細胞を認め、これらの変異の導入により GFP 挿入 JFH-1 ウイルスの生成能と感染能が増強されていると考えられた。

#### D. 考察

今年度の検討により、GFP を挿入したウイルスは培養細胞中では長期にわたり維持されないことが判明した。従って、JFH-1 ウイルスで用いられるような長期培養により多くのウイルスを貯留し、濃縮する方法では高力価の GFP 挿入ウイルスを作製することは難しいと考えられた。通常の JFH-1 株で同定された細胞内適応変異の導入によりウイルスの生成は増強されることから、変異の導入によるウイルス生成能・感染能の改善は可能であると考えられる。

#### E. 結論

NS5A 領域に GFP 遺伝子を挿入した JFH-1 ウイルスは、培養細胞中では非常に不安定であった。高力価の GFP 挿入ウイルスを得るためには、効率的に GFP 挿入ウイルスが生成できる挿入部位と方法を選択するとともに、ウイルスゲノムに増殖感染を増強するような変異の導入が必要であると考えられた。従って、昨年度の成果である GFP 挿入方法として全長のレプリコンを用い、さらにレプリコンのウイルスゲノムに適応変異を導入することにより、より高力価の GFP 挿入ウイルスの生成法を確立したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kato I, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology* 2008 48:732-740.

##### 2. 学会発表

1. Kato I, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, USA. (2008, Oct. 31 – Nov. 4).

2. Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato I, Suzuki T, Wakita T. Purification and structural analysis of HCV E2 protein. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. San Antonio, TX, USA. (2008, Oct 5 – 9).

3. Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato I, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T. A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related