

200831029A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発
のための基礎的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成21年(2009) 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発
のための基礎的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成21年(2009) 3月

目次

I. 総括研究報告書

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究	1
研究代表者	鈴木 哲朗

II. 分担研究報告書

HCV複製増殖の機構解析	17
	下遠野 邦忠
C型肝炎治療薬創薬シーズの探索に関する研究	
ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究	21
	堀田 博
C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究	26
	瀬谷 司
C型肝炎ウイルス排除機構の研究	28
	小原 道法
実験モデルの開発に関する研究	29
	加藤 宣之
HCV増殖と脂質代謝	38
	小池 和彦
ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する	43
	松浦 善治
C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究	46
	深澤 秀輔
C型肝炎ウイルス感染、増殖、病原性発現に関与する宿主因子の探索	48
	深澤 征義
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別冊	63

I. 総括研究報告書

C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための基礎的研究

研究代表者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の複製増殖機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析、新たな実験モデルの開発、及び創薬シーズの探索を行い、以下の研究成果を得た。1）CKBがNS4Aとの結合を介してHCV複製複合体ヘリクルートされ、HCVゲノム複製活性に重要な役割を果たすことを見出した。2）VAP-CはVAP-A、VAP-BのNS5Bへの結合を競合的に阻害しうることが明らかとなった。3）感染性HCVの産生に脂肪関連因子、特にアポリポ蛋白B、VLDLの関与が重要であることを明らかにした。4）VimentinがHCV Core蛋白の翻訳後修飾に介入しウイルス産生を制御することを見出した。5）一価不飽和脂肪酸の増加はCore蛋白によるdesaturase活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内へのNADH蓄積にあることが明らかになった。6）HCV複製が糖代謝の入り口であるGLUT1及び脂質代謝の入り口であるFABP1の発現に影響することを見出した。7）RNA認識複合体にDDX3 helicaseとring-finger protein Ripletが含まれることを明らかにした。8）新規ヒト肝癌細胞株Li23を樹立し、HCVレプリコン、全長HCV RNA複製細胞およびそのレポーターアッセイシステム、さらにHCV持続感染システムの開発に至った。9）感染初期過程の分子機構の解析に有用な、HCV非感受性Huh7変異株を樹立した。10）HCV感染キメラマウスモデルでリボソーム製剤NS9が抗ウイルス活性を示すことを見出した。11）HCV全生活環を標的とする抗HCV薬スクリーニング系で約2000化合物を評価し、新規標的を有すると考えられる抗HCV物質を見出した

分担研究者

下遠野邦忠 千葉工業大学附属総合研究所
専任研究員
堀田 博 神戸大学医学研究科 教授
瀬谷 司 北海道大学医学研究科 教授
小原 道法 東京都臨床医学総合研究所
参事研究員
加藤 宣之 岡山大学医歯学総合研究科 教授
小池 和彦 東京大学医学部 教授
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
深澤 秀輔 国立感染症研究所 室長
深澤 征義 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

高感度な診断系の開発により輸血によるHCV感染は激減したが、全世界には1.7億人もの感染者が存在する。HCV感染症は、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝癌での年間死亡者は我が国で3万人を超える。インターフェロン（IFN）、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は40-50%程度であり、半数以上のC型肝炎患者は、肝癌発症のリスクを避けられない。本研究では、HCVの生活環における各ステップ、特にウイルスゲノム複製と粒子形成過程の分子機構を解明することによりC型肝炎治療薬開発のための新たな標的を見出す。また、実際に阻害剤スクリーニングを行い、創薬候補化合物を

同定する。さらに、HCV 感染に伴う肝発癌、脂質代謝異常などの病態、また持続感染の成立に関与する分子機構を明らかにし、得られる知見を基に発症予防など HCV キャリア対策に資する提案を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. HCV 複製増殖機構の解析

HCV レプリコン細胞及び parental Huh-7 細胞それぞれから界面活性剤不溶性画分を調製し蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動解析を行った。レプリコン細胞サンプルで有意に多量存在するスポットを切り出し、質量分析法によって蛋白同定を行った。同定された蛋白群について、レプリコン細胞を用いた siRNA による遺伝子ノックダウン解析から HCV RNA 複製に関与するものを選抜した。

各種 Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) を NS5A や NS5B とともに培養細胞に発現し、免疫沈降法によって相互作用を解析した。また、HCV レプリコン細胞や JFH-1 ウイルスの培養系に各種 VAP を発現させ、免疫ブロットや定量的 RT-PCR によって、ゲノム複製や粒子産生への影響を解析した。さらに、VAP-C の C 末端に存在するサブタイプ特異配列を認識する特異抗体を作製し、VAP-C の臓器分布を解析した。

培養外液に放出される感染性ウイルス粒子と非感染性粒子の両者には浮遊密度の違いが存在する。これに関与するウイルス側要因の探索を行った。コアを特異的に発現する欠失ウイルスゲノムからの HCV 産生、欠失ゲノムを持つウイルス粒子の回収を行った。

コアタンパク質の分解系における vimentin の役割の検討には Huh7 細胞を用い、コア蛋白質としては FLAG タグ分子を用いた。Huh7 細胞をコントロール及びビメンチン siRNA で処理し遺伝子発現をノックダウンさせ、さらにコア蛋白質を発現させその発現量をプロテアソーム阻害剤 MG132 存在・非存在下で調べた。HCV 感染系における vimentin を介したプロテアソーム系の影響についても検討した。Huh7 細胞を用いて

vimentin をベクターで高発現あるいは siRNA でノックダウンさせる条件で HCV 感染させ、HCV 産生能に対するプロテアソーム阻害剤の影響を調べた。HCV 産生能はコア蛋白質の存在量で定量した。

2. HCV 病原性発現機構の解析

コア遺伝子を導入した HepG2 細胞である Hep39 細胞と対照である Heps wx 細胞、また JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いて脂質解析を行った。脱脂脂肪化ウシアルブミンを含むメディウムに溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後に細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。eicosatetraenoic acid, eicosatetraenoic acid (EPA)、arachidonic acid (AA)、ビルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

Huh7.5 細胞、SGR 細胞、FGR 細胞及び HCV 感染細胞において、2-deoxy-D-[1,2-³H] glucose (2-DG) を用いて、グルコースの取り込みを測定した。細胞表面の GLUT2 および GLUT1 の発現については、各マウスモノクローナル抗体 (Alpha Diagnosis) を用いて、フローサイトメトリーで測定した。GLUT2 および GLUT1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により測定した。また、GLUT2 についてはルシフェラーゼをレポーター (pGL 4.23 ルシフェラーゼレポーターベクター; Promega) としたプロモーターアッセイを行った。プロモーター部分には、GenBank ID: AH002747 の -1296~+312 および GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠失変異体として、-1193~+314、-1155~+314、-1100~+314、-1030~+314、-206~+314、+29~+314 および +126~+314 を用いた。

3. 持続感染機構の解析

肝実質細胞の RNA センサー系 (RIG-I, MDA5, IPS-1 etc) にカップルする分子を yeast two-hybrid などで収集した。polyI:C 結合分子をプロテオーム解析の手法で同定した。RNA とセンサー両方に結合する分子について機能解析を行い、ウイルス応答から宿主免疫系に与える影響を解析した。IPS-1 KO, MyD88 KO, TICAM-1 (別名 TRIF) KO, などマウスの系を用いて HCV

感染細胞に起きうる宿主応答を解析し、肝臓の病態進行との関連を推考した。

4. 新規 HCV 実験系の開発

NS3 と NS5A 領域に Q1112R、K1609E 及び S2200R 或は Q1112R、P1115L 及び S2200R の変異を有する HCV レプリコン RNA (ON/3-5B/QR, KE, SR および ON/3-5B/QR, PL, SR) を様々なヒト肝培養細胞にエレクトロポレーション法により導入した。G418 存在下で 3 週間培養して G418 耐性のコロニー (細胞株化できたものは HCV レプリコン複製細胞と呼ばれている) を作成させた。

NS3 領域に Q1112R と K1609E 及び NS5A 領域に S2200R の変異を有する全長 HCV RNA (ON/C-5B/QR, KE, SR) を HCV レプリコン複製細胞の治癒細胞 (インターフェロン (IFN) γ を添加して細胞から HCV レプリコンを排除した細胞) にエレクトロポレーション法により導入した。G418 存在下で 3 週間培養して G418 耐性のコロニーを作成させた。得られたコロニーをそれぞれ細胞株化して、HCV RNA 量については、ノーザンブロット法と定量的 RT-PCR 法により測定した。HCV タンパク質量については、ウェスタンブロット法により測定して HCV RNA の複製効率のよい細胞クローンの選択を行った。

細胞由来の各種 mRNA についての RT-PCR は常法により行った。また、各種抗 HCV 剤の効果については、薬剤添加 7 2 時間後にウェスタンブロット法により解析した。HCV タンパク質や二本鎖 RNA (dsRNA) を検出するための免疫蛍光染色も常法に従って行った。

HCV 感染能を欠損した宿主細胞変異株を分離する系を構築するにあたり、HCV 感染による宿主細胞死の現象を利用した。すなわち、各種条件下で Huh7.5.1 細胞を HCV で処理し、長時間培養後、生き残ってくる細胞をクローニングすることで各種 HCV 非感染細胞株を樹立した。

5. 抗 HCV 薬の探索

HCV の持続感染が成立しているヒト肝臓キメラマウスに polyIC リポソーム製剤である NS9 を 0.01、0.03、0.1mg/kg で 1 日 1 回投与し、経日的に血清中 HCV 量の

変化を定量した。

抗 HCV 物質の一次スクリーニングは、昨年度までに確立したウイルス RNA の定量 RT-PCR、cell-based ELISA による細胞内の Core 蛋白質の測定、JFH1 感染による H7.5.1 細胞の細胞変性効果の解除のなどを指標として抗 HCV 作用を測定することにより行った。標的分子が基本的にははっきりしていて、阻害剤として定着している種々の化合物や、植物、微生物の二次代謝産物およびそれらの誘導体を収集した化合物ライブラリーをスクリーニングした。ヒットした化合物で標的分子が未知のものについては、その作用点を知るため、レプリコン細胞に対する作用や、細胞中および放出された HCV RNA や蛋白質のレベルを調べるとともに、活性物質をウイルス感染前後の様々な時点で添加して、その効果を解析した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理、保存した。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

1. HCV 複製増殖機構の解析

1-1. creatine kinase B (CKB)

プロテオミクス技術により HCV 複製複合体(RC)を構成する宿主因子として同定された CKB について HCV 複製

における役割を解析した。レプリコン細胞において、3種類の異なる方法でCKの活性を抑制し、HCV RNA複製への影響の検討を行った。siRNAによるCKB遺伝子発現抑制、dominant negative CKBの強制発現、CKのinhibitor (Cyclocreatine) によるCK活性の抑制のいずれの方法によっても、HCV RNA複製は抑制された。HCV感染細胞においてもCK活性の抑制により、同様の結果が得られ、CKBはHCVの複製に必要な宿主因子と考えられた。また、免疫沈降法では、CKBは、HCVNS4A蛋白と結合し、種々の酵素活性をもつNS3/4A複合体とのcomplexを形成することを明らかにした。NS4Aとの結合部位を欠損したCKBは、HCV複製への影響が減少すること、膜分画への局在が減少することから、CKBはNS4Aを介してRCへrecruitされ、複製調節に関与していることが示唆された。さらに、permeabilized HCV複製細胞を実験、in vitro helicase assay, protease assayから、CKBは、ゲノム複製活性、特に、NS3 helicase活性を調節していることを明らかにした。

1-2. VAP-C

これまでに、VAP-AおよびVAP-BがHCVの複製を正に調節していることを報告してきた。しかしながら、VAP-BのスプライシングバリエーションであるVAP-Cの機能はほとんど解析されていない。そこで今回、HCVの複製におけるVAP-Cの役割について検討した。

VAP-Cは主に腸管、子宮、膀胱などに発現していたが、VAP-AやVAP-Bの発現が高い肝臓ではほとんど検出されなかった。VAP-AとVAP-Bはmajor sperm protein (MSP)ドメイン、coiled-coil motif、および膜貫通領域の三つ機能ドメインで構成されており、coiled-coilとMSPドメインを介してそれぞれNS5AとNS5Bに結合することが知られている。一方、VAP-CはVAP-BのMSPドメインとサブタイプ特異配列のみで構成されており、NS5Bとは結合するがNS5Aには結合しなかった。VAP-Cを過剰発現させると、VAP-AとVAP-BのNS5Bへの結合が阻害された。また、VAP-AやVAP-Bを発現させたHuh70K1細胞にJFH-1ウイルスを感染させると、対照細胞に比べて細胞内のウイルスRNA量は10-30倍に増

加したが、VAP-Cを発現させた細胞では5分の1以下に減少した。

1-3. アポリポ蛋白質B、VLDL

感染性HCV粒子の放出にはウイルスゲノムがコードする遺伝子産物以外に宿主因子が重要であると考えられる。感染性粒子は浮遊密度が非感染性粒子に比べ小さいことから、脂肪性の因子あるいは脂質関連因子が感染性に関与していると考えられた。VLDL産生阻害因子であるMTP阻害剤処理した細胞からの感染性粒子産生は強く抑制された。この阻害はアポリポ蛋白質Bの細胞外への放出抑制、およびVLDLそれ自身の放出抑制ともよく関連していた。さらにはアポリポ蛋白質B産生をshRNA処理により抑制した場合、感染性粒子産生は抑制された。このときにVLDL産生も同時に抑制された。

1-4. Vimentin

培養肝細胞でのコア蛋白質発現により変動する宿主蛋白質の網羅的解析を行い、HCVコア蛋白質の特徴的な局在部位である界面活性剤不溶性画分を用いた比較プロテオーム解析からvimentinの変動を見だしHCV産生への重要性を示してきた。今回、Vimentin発現がHCV産生を抑制する機構として、コア蛋白質のプロテアソーム系による分解過程にVimentinが関与していることが明らかとなった。すなわち、プロテアソーム阻害剤でコア蛋白質発現細胞を処理するとコア蛋白質は安定化されるが、この系において、VimentinをsiRNAでノックダウンするとコア蛋白質量の増加が全く認められなくなった。また、HCV感染細胞をプロテアソーム阻害剤処理することによりウイルス産生は増加するが、siRNAによるVimentinノックダウン下ではその増加がほとんど認められなかった。

2. HCV病原性発現機構の解析

2-1. 脂質代謝

C型肝炎における脂肪化、および一価不飽和脂肪酸増加の機序とその意義を知るために、コア蛋白質発現HepG2

細胞と JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いて分析を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。多価不飽和脂肪酸(PUFA)である eicosatetraenoic acid(EPA)や arachidonic acid(AA)の投与によって一価不飽和脂肪酸はコア蛋白非特異的に減少したが、コア蛋白によって誘発されている活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)は減少しなかった。これに対して、ビルビン酸の投与によって解糖系において NADH を消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもがコア蛋白発現細胞で特異的に減少した。コア蛋白発現 HepG2 細胞で対照細胞に比して発現の増加していた脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な転写因子である SREBP-1c は、ビルビン酸の投与によって低下が認められたが、EPA や AA の投与では低下は認められなかった。また、JFH-1 増殖 Huh-7 細胞にても中性脂肪の増加が認められた。

2-2. 糖代謝

昨年度、HCV ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR、FGR) および HCV J6/JFH-1 感染培養細胞 (HCV 感染細胞) において、グルコースの取り込みが抑制され、糖の取り込みに重要な役割を果たしているグルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーの細胞表面の発現が低下、GLUT2 については mRNA 発現の低下およびプロモーター活性の低下を明らかにした。そこで本年度は、インターフェロン α (IFN) 処理によって HCV 複製を抑制させることで、上記の現象が回復するかについて検討を行った。その結果、SGR、FGR および HCV 感染細胞において、IFN 処理によって、グルコースの取り込みは対照 Huh-7.5 細胞と同程度にまで回復した。また、SGR、FGR および HCV 感染細胞で低下した細胞表面 GLUT 発現、GLUT2 mRNA 発現および GLUT2 プロモーター活性が、IFN 処理によって回復した。この結果から、HCV 複製が GLUT の発現を制御し、グルコースの取り込みに影響することが示唆された。さらに GLUT2 mRNA 発現制御領域を特定するために、GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠失変異体を作製した。

SGR および FGR において、転写因子 Hepatic Nuclear Factor (HNF-1 α) 結合領域を境に HCV による抑制が認められなくなった。この結果から、HCV による GLUT2 mRNA 発現は HNF-1 α 結合領域で制御されている可能性が示唆された。また本年度において、HCV における細胞内代謝異常を包括的に解析するため、HCV 感染細胞 (14 dpi) において、プロテオーム解析を行った。その結果、細胞内の脂肪酸輸送に関連する遊離脂肪酸結合タンパク (FABP) 1 の発現低下を見いだした。FABP1 発現について詳細に検討したところ、HCV 感染細胞において、感染後経時的に FABP1 mRNA 発現の低下が認められた。また FGR において、FABP1 mRNA 発現の低下が認められた。

3. 持続感染機構の解析

IPS-1 の特異結合蛋白として DDX3 が同定された。DDX3 は細胞増殖因子、HCV コア結合蛋白と報告されている DEAD Box 型 helicase である。DDX3 は IPS-1 との強制発現により IPS-1 単独より強く IFN-beta を誘導した。この活性は HCV の polyU/UC を加えると強く誘導された。また HCV コア蛋白を発現させると IPS-1 依存性の IFN-beta 誘導は阻害され、これは DDX3 をコアが IPS-1 複合体から奪い取るためと判明した。HCV 感染における DDX3 の機能を 0 cell replicaon の系で検討の予定である。

RIG-I 結合蛋白として Riplet (RNF135) が同定された。Riplet は TRIM25 と 65%の相同性で Ring finger ドメインを持ち、ユビキチン E3 ligase として働く事が類推された。事実、実験的に RIG-I C 末をユビキチン化して IFN-beta の誘導活性を強く増強することが判明した。HCV の polyU/UC によって RIG-I が活性化する際、Riplet は必須因子であった。

4. 新規 HCV 実験系の開発

4-1. 全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-0 株) の複製が効率良く起こるヒト細胞株の樹立

NS3 と NS5A 領域に適応変異を有する HCV レプリコン RNA (ON/3-5B/QR, KE, SR 及び ON/3-5B/QR, PL, SR) を様々

なヒト肝培養細胞にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性のコロニー形成能を調べた。その結果、10 年以上前に国立がんセンター研究所病理部の石川博士により樹立されたヒト肝癌細胞株である Li21-Li24 細胞において多数の G418 耐性コロニーが得られた。ウェスタンブロット解析により HCV タンパク質の発現量を調べた結果、ON/3-5B/QR, KE, SR の場合は、HuH-7 細胞由来の HCV レプリコン複製細胞である s0 細胞と同様の発現レベルであったが、ON/3-5B/QR, PL, SR の場合はかなり低レベルであったことからこれ以降の実験には ON/3-5B/QR, KE, SR RNA を導入した細胞を使用することとした。ON/3-5B/QR, KE, SR RNA が複製しているレプリコン複製細胞を sOL 細胞と命名した (L は Li23 由来という意味)。

sOL 細胞に IFN- α , - β , - γ などの抗 HCV 剤を添加して RNA 複製に対する感受性を調べた。その結果、sOL 細胞は s0 細胞と同様に各種抗 HCV 剤に高感受性を示したことから、まず IFN- γ によりレプリコン RNA を細胞内から完全に排除した治癒細胞 (sOLc) の作成を行った。治癒細胞は RNA 複製のための環境が整った細胞であることがこれまでの研究により分かっているため、全長 HCV RNA の複製も効率的に起こる可能性があると考えた。

そこで、次に sOLc 細胞に *in vitro* で合成した全長 HCV RNA (ON/C-5B/QR, KE, SR) をエレクトロポレーション法にて導入し、G418 耐性のコロニーを出現させ、コロニーのクローニング (OL1-OL14) を行った。このうち、OL8 と OL11 細胞は HuH-7 由来の全長 HCV RNA 複製細胞である 0 細胞と比較すると若干発現レベルは低かったが、十分量の HCV タンパク質を発現していることが分かった。OL8 と OL11 細胞を以後の実験に使用する細胞株として選択し、それぞれの治癒細胞 (OL8c と OL11c) を IFN- γ を添加することにより作製した。

4-2. 抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便なアッセイシステムの開発とその応用

作成した OL8c と OL11c 細胞に *in vitro* で合成した ORN/C-5B/QR, KE, SR (レニラルシフェラーゼを発現する全長 HCV RNA) をエレクトロポレーション法により導入

し、G418 耐性コロニーを出現させた。得られたクローニング細胞における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定し、最も高い値が得られたクローンを選択してそれぞれ ORL8 細胞と ORL11 細胞と命名した。両細胞に IFN- α (0, 1, 10, 100 IU/ml) を添加して 24 時間後におけるルシフェラーゼ活性と HCV RNA 量 (定量的 RT-PCR 法により測定) を測定した。その結果、IFN- α の濃度依存的に RNA 複製が阻害される程度が両測定法でほぼ一致していたことから、ORL8 や ORL11 細胞は OR6 細胞と同じく抗 HCV 活性をルシフェラーゼ活性を測定するだけで簡便にかつ定量的に評価できるシステムであることが分かった。

そこで、次に現在までに抗 HCV 活性が報告されている薬剤のうちから代表的なもの (IFN 製剤やスタチン剤など) について、ORL8、ORL11 および OR6 細胞を用いてそれぞれの抗 HCV 活性を比較検討した。それぞれの薬剤についての 50% 阻害濃度 (EC_{50}) を算出して比較した。その結果、IFN- α , - β , - γ , シクロスポリン、スタチン剤 (フルバスタチン、シンバスタチン、ローバスタチン、ピタバスタチン)、ミリオシンでは、Li23 由来の ORL8 や ORL11 細胞が HuH-7 由来の OR6 細胞より感受性が高く、逆に β -カロテンやゲルダナマイシンでは OR6 細胞の方が感受性が高いことが分かった。さらに、IFN- α とスタチン剤 (フルバスタチン) との併用効果については、ORL8 や ORL11 細胞を用いることでより一層顕著に認められることが分かった。従って、ORL8 や ORL11 細胞を用いたアッセイ系は OR6 細胞アッセイ系より優位であることが判明した。そして、ORL8 細胞や ORL11 細胞は非常に鋭敏なバイオセンサーの役割を持つ細胞であるという結論に達した。

4-3. HCV 持続的産生増殖システムの開発

JFH-1 株 HCV RNA を HuH-7 由来の RSc 細胞にエレクトロポレーション法により導入して感染性 HCV (HCVcc) をまず産生させた。得られた HCVcc を RSc, ORL8c 或は ORL11c 細胞に感染させ、1 週間後に培養上清を再び未感染の RSc, ORL8c 或は ORL11c 細胞に感染させた。感染後 1 週間ごとに HCV の増殖レベルを調べた。その結

果、RSc 細胞から産生された HCVcc は RSc、ORL8c および ORL11c 細胞のどれにも感染し、HCV 産生が効率よく起こることが分かった。特に、ORL8c 細胞においては HCV の生活環が効率よく再現されていることが示唆された。ORL8c 細胞においては感染性 HCVcc が効率よく産生されていることが示された。

4-4. HCV 非感染宿主細胞株の分離

HCV の産生・病原性に関与する宿主因子の探索法として遺伝学的手法も有用と考えられる。そこで本年度は HCV 感染を起こさない宿主肝細胞変異株のスクリーニング系を構築し、変異株分離を広範に始めた。

HCV 感染後に生き残って来る細胞のうち CD81 分子の欠損株以外のものを分離できるよう親株として CD81 をベクターで発現させた株を用いて主にスクリーニングを行った。処理するウイルス量、処理時間等を様々な条件に設定しスクリーニングを試みた。また、ウイルス複製過程以外の欠損株を分離する目的で、HCV レプリコンを高発現する細胞を濃縮し、その後、インターフェロンでレプリコンを除去し、その細胞集団を親株にするなどの工夫も行っている。現在までに 10 回以上のスクリーニングを行い、ウイルス複製過程の欠損でない細胞株として 10 種類以上の HCV 非感染 Huh7.5.1 由来変異株を分離している。遺伝子発現解析及び生化学的性状解析の結果、この中に Claudin1 の欠損細胞が複数含まれていることが明らかとなった。Claudin1 遺伝子をこの欠損株に戻すことで HCV 感染能が回復することも明らかとなった。この Claudin1 欠損細胞では Claudin ファミリーに属する Claudin16 分子も欠損していたが、Claudin16 遺伝子を単独で欠損株に戻しても HCV 感染能は回復しなかった。しかし興味深いことに Claudin1 遺伝子と共に戻してやると HCV 感染率が極めて高くなることもわかった。Claudin16 が Claudin1 の制御因子として働きうるのかもしれない。

5. 抗 HCV 薬の探索

polyIC リポソーム製剤である NS9 を HCV 感染キメラマウスに投与すると強い抗ウイルス活性を示すことを

見いだした。すなわち、初回投与後 14 日間に渡り HCV 量の顕著な減少が認められた。0.01mg/kg の投与で、現在臨床に使われている PEG-IFN の 20 倍投与と同じ阻害活性を示した。

H7.5.1 細胞-JFH1 の感染系を用いて、約 2000 の化合物をスクリーニングしヒットした化合物の活性を確認した。低濃度 (約 1 μ g/ml) で HCV 阻害作用を示し、標的分子に関する報告がない 7 化合物について作用機作を検討した。これらの阻害物質がレプリコン細胞で作用するかを調べたところ、7 物質のうち 2 つは処理した細胞で NS5A レベルを減少させたが、他の 5 物質の処理では NS5A の量は変化せず、細胞内での HCV の RNA 複製、蛋白質合成は標的でない可能性が考えられた。さらにこのうち 2 物質は、JFH1 感染系においても感染細胞内の HCV コア蛋白質レベルを低下させず、細胞内 HCV RNA はむしろ増加していた。しかし培養上清中の HCV RNA は著しく減少していたことから、この 2 物質はウイルス粒子放出過程が標的であると推測された。また、エンドサイトーシス阻害剤クロロプロマジンと同様にウイルスの吸着侵入時に添加すると抗 HCV 作用を示すが、ウイルス侵入後に添加すると活性が弱くなる物質が 2 つあった。これらは主として HCV の侵入過程を阻害していると思われる。

昨年度までに、epigallocatechin gallate (EGCG) に抗 HCV 活性があることを見いだしていたが、EGCG 以外の catechin を調べたところ、3 位の水酸基への gallate の結合と B 環の水酸基の数が活性の強さに関係していた。2 位、3 位の立体の影響はなく、gallocatechin gallate には EGCG とほぼ同等の活性が観察された。その他 C75、TOFA などの fatty acid synthase (FASN) の阻害剤に抗 HCV 作用があった。

D. 考察

本研究グループでは、HCV の生活環の分子機構 (ゲノム複製、粒子形成)、持続感染機構、また病原性発現機構の解明から、新規実験モデル系 (感染性ウイルス産生細胞、レプリコンシステム) の開発、抗 HCV 薬の

探索、評価まで、HCV 感染症の予防、治療法の開発に必要な研究を総合的に推進している。

1. HCV 複製増殖機構の解析

HCVゲノム複製に重要な宿主因子としてCKBを同定した。CKBはHCVが複製している細胞においてdetergent resistant膜分画にエンリッチされ、NS4Aとの相互作用が認められる。得られた結果から、CKBはNS4Aとの結合を介してHCV複製複合体へリクルートされ、HCVゲノム複製活性の維持に重要な役割を果たすと考えられた。NS4AとCKBの相互作用を選択的にブロックすることにより、HCVゲノム複製の場でのエネルギー供給が遮断され、これによりウイルス複製、産生が抑えられるものと考えられる。NS4A-CKBの結合阻害は抗HCV薬開発のための新たな標的になるものと期待される。

HCVのNS5A蛋白質と相互作用する宿主因子として、VAP-AおよびVAP-BがHCVの複製を正に調節していることが知られている。しかしながら、VAP-BのサブライミングパラバントであるVAP-Cの機能はほとんど解析されていない。今回の解析により、VAP-CはVAP-AやVAP-BのNS5Bへの結合を競合的に阻害する事によって、HCVの複製を抑制していることが明らかとなった。また、VAP-Cの発現はHCVの臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。

HCV感染性の獲得にはウイルス自身の密度を下げる要因の関与が重要であると考え、脂肪代謝に関係する宿主因子との関連性を調べた。その結果、HCVの感染性にはVLDLあるいはアポリポ蛋白質Bが直接関与している可能性が考えられた。この感染性獲得の分子機構を解明することにより新たな抗HCV剤開発への道が開けると期待される。また、このような感染性獲得の機構が遺伝子型を異にするHCVについても共通に見られる現象なのかも検証する必要がある。

vimentin発現量がコアタンパク質量、ひいてはウイルス産生にも影響を与え、そのメカニズムとしてユビキチン-プロテアソーム系の関与が明らかとなった。このことから、vimentinが関与するユビキチン-プロテアソーム系がHCV治療薬の標的となる可能性が提示

され、将来的に宿主因子を標的とした新たな治療薬開発の糸口になる可能性が示唆された。vimentinを介したコア蛋白質のプロテアソーム系による分解系の特異性をさらに検討した結果、宿主蛋白質であるp53分子のプロテアソームを介した分解に関してもvimentinの関与が認められている。このことはvimentinが宿主蛋白質のプロテアソームを介した分解制御にも関わっている可能性を示唆し、普遍的な制御過程としても注目される。

2. HCV 病原性発現機構の解析

HCV感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCVコア蛋白は動物モデルにおいて肝癌を発生させることが明らかになっており、ヒトC型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わりが想定されている。

C型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP活性低下による肝からのVLDL分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化の阻害等が明らかになってきている。C型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白によるdesaturase活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内へのNADH蓄積にあることが明らかになった。また、SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼといった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADHの減少によって、それが改善されることも重要な所見である。HCVによるミトコンドリア電子伝達系複合体I (NADH dehydrogenase)の機能障害が、C型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示されたといえる。NADHを減少させる方法によってC型肝炎の病態を改善

させる可能性がある。

HCV が糖尿病に関与する機序として、糖代謝の入り口である糖の取り込みが肝臓の代謝異常に関与することが考えられる。昨年度の本研究プログラムにおいて、SGR、FGR および HCV 感染細胞において、GLUT2 および GLUT1 の細胞表面の発現、GLUT2 mRNA およびプロモーター活性の抑制が認められ、グルコースの取り込みが抑制されていることを明らかにした。そこで本年度は、IFN 処理によって HCV 複製を抑制させることで、グルコースの取り込み抑制からの回復が認められるかについて検討を行った結果、IFN 処理した SGR、FGR および HCV 感染細胞について、グルコースの取り込みは対照と同程度にまで回復した。この取り込み抑制からの回復の分子機序を明らかにするため、細胞表面 GLUT 発現、GLUT2 mRNA 発現およびプロモーター活性について検討したところ、IFN 処理した SGR、FGR および HCV 感染細胞において、いずれについても抑制からの回復が認められた。この結果から、HCV 複製におけるグルコースの取り込みの抑制作用は可逆的であり、HCV 治療により肝細胞への糖の取り込みの改善が期待できるものと考えられる。今後は、HCV の糖代謝全般への作用メカニズムについて、詳細な解析を進めたい。

また、GLUT2 について、SGR、FGR および HCV 感染細胞においては、mRNA 発現およびプロモーター活性の低下が認められた。本年度において、GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠失変異体により GLUT2 mRNA 発現制御に関与するプロモーター領域の検索を行った結果、SGR、FGR および HCV 感染細胞において、転写因子 HNF-1 α 結合領域を境に HCV による GLUT2 プロモーター活性抑制が認められなくなった。この結果から、HCV による GLUT2 mRNA 発現低下は HNF-1 α 結合領域で制御されている可能性が示唆された。HNF-1 α の機能異常が若年発症糖尿病の原因のひとつとなることが報告されていることから、HCV が、HNF-1 α 発現および機能に影響する可能性も考えられる。今後は、HCV タンパクと HNF-1 α との相互作用について詳細な検討を進めるとともに、HNF-1 α により制御されている他の細胞内タンパクについて、HCV 複製によって制御されるかについて

も検討をしたい。

さらに本年度は、HCV における細胞内代謝異常を包括的に解析するため、HCV 感染細胞において発現変化するタンパクを、プロテオーム解析を用いて検索を行った。HCV 感染細胞において、細胞内脂肪酸輸送に関連する FABP1 の発現低下を見いだした。FABP1 の発現について詳細に検討した結果、HCV 感染細胞において経時的に FABP1 mRNA 発現の低下が認められ、FGR についても mRNA 発現の低下が認められた。この結果から、HCV によって脂質代謝の入り口である FABP1 の発現に影響することが示唆された。今後は、HCV による脂質代謝全般の作用メカニズムについて詳細な解析を進めたい。また、FABP は脂肪酸輸送のみならず、脂溶性リガンドの細胞内輸送能を有し、細胞内情報伝達および遺伝子発現調節に作用することも報告されていることから、HCV の FABP1 発現抑制による、薬剤耐性を含めた各種リガンドの作用への影響についても追求したい。

3. 持続感染機構の解析

HCV が罹患した際 RNA genome 複製が起き、肝実質細胞で展開する免疫応答を分子レベルで解析した。RNA 認識は RIG-I、MDA5 の他 Dicer, PKR, 各種 helicase, 翻訳複合体などが関与する認識反応である。本研究で RNA 認識複合体に DDX3 helicase と ring-finger protein, Riplet が含まれることを明らかにした。Riplet は RIG-I, DDX3 は IPS-1 に特異結合して IFN-beta 誘導活性を上げる。故に抗ウイルスの RNA 初期認識複合体は未知の因子を含み RIG-I への RNA 選択配分や強い IFN 誘導に関与するものと考えられる。

HCV の持続感染時にこのような RNA 応答が継続して細胞にどのような影響をもたらすかは興味ある命題である。DDX3 の場合、コア蛋白が IFN 誘導を抑制して細胞増殖、ウイルス増殖に切り替えを行うため、がん化を促進する条件を提供しうる。遺伝子変異など他のがん化要因が何故起きるかも含め今後の検討課題である。DDX ファミリーは多数細胞内に存在して HCV 感染細胞の機能変調に関与するという未発表データが得られており、これらの因子と肝がんの発症機序も解析予定

である。

RIG-I 以外に多数の RNA 認識分子が細胞内にあり、HCV RNA がなぜ RIG-I によって認識されて翻訳複合体に取り込まれないかを説明できるに至っていない。この選択性を HCV RNA に付与する因子を同定するのも次の焦点となる。

4. 新規 HCV 実験系の開発

全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-0 株) の複製が効率良く起こるヒト肝癌細胞株 Li23 由来の複数のクローン化細胞株を樹立した。依然として、HuH-7 由来の細胞だけが、どうして HCV RNA の複製に有利な環境を有しているのかはよく分かっていないが、今回 Li23 由来の細胞株が得られたことから、HuH-7 細胞との詳細な比較により RNA 複製に有用で両細胞に共通した宿主因子を抽出できる可能性がある。

また、両細胞は肝特異的遺伝子発現プロファイル(アルブミン、アシアログライコプロテイン受容体、トランスフェリンなど)を示すが、cDNA マイクロアレイによる解析を行うと、非常に多くの遺伝子の発現レベルが両細胞間で相当異なっていることから両細胞の性質もかなり異なることが予想される。実際、HuH-7 由来の細胞は 10%胎児血清存在下で通常の DMEM 培地で増殖するが、Li23 由来の細胞の増殖は Epidermal growth factor の存在に依存している点からも細胞の性質が大きく異なっていることが示唆される。

今回、Li23 由来の細胞株 ORL8 と ORL11 の樹立に成功し、各種検体物質の抗 HCV 活性を容易に定量評価することができるようになった。これまで、HuH-7 由来の細胞株 OR6 などのみ依存してきたが、異なる細胞株によるアッセイを加えて総合的に検体物質の抗 HCV 活性を定量評価できるようになった効果は大きく、現在まで、抗 HCV 活性ありとされていた物質の再評価もさることながら、効率的に抗 HCV 活性を有する物質を見出せるシステムが出来上がったと考えられる。実際、これまで抗 HCV 活性ありとされていた物質について ORL8 や ORL11 細胞を用いて EC_{50} 値を再評価したところ、大部分が HuH-7 由来の OR6 細胞を用いて算定していた

EC_{50} 値より低い値を示した。このことは、ORL8 や ORL11 細胞を用いたアッセイ系は OR6 細胞を用いたアッセイ系より感度面で優れたアッセイ系であることを示している。従って、今迄見逃されていた物質に抗 HCV 活性があることを見出す可能性もある。今後、そのような物質が存在するかどうかを検討する予定である。本研究により得られたこれらの細胞アッセイ系の用途はかなり広範囲になるものと思われる。

Li23 細胞由来の ORL8c 細胞では感染性 HCV 粒子が産生され、それがさらに未感染の ORL8c 細胞に感染して増殖することを見出した。このことは、従来世界中で汎用されている HuH-7 由来の細胞を用いなくとも HCV の生活環を培養細胞レベルで再現できることを示している。現在のところ、産生される HCV 量は HuH-7 由来の細胞と比較すると若干低いが、HuH-7 細胞でなされたように、HCV 産生量がさらに高くなるサブクローンが ORL8c 細胞から得られる可能性がある。

現在までに HuH-7 由来の細胞を用いて産生させた HCV 粒子や HCV 粒子産生機構に関する研究などが進んでいるが、Li23 由来の細胞を用いた HCV 産生系を使うことにより、これまでに得られた研究結果と同じ結果が得られるかどうかを初めて検証できるものと考えられる。次年度はこのような研究を進める予定である。

ウイルス感染による宿主細胞死を指標に、各種 HCV 非感染肝細胞変異株を樹立した。HCV 感染過程に重要と考えられている CD81、Claudin 1 の欠損株がこの方法により複数分離されていることから、本法が有用なスクリーニング系であることを意味している。上記以外にも複数の HCV 非感染株が取られているが、CD81 + Claudin 1 過剰発現株を親株にすることで有用な新規非感染変異株がさらに分離できるかもしれない。Claudin 1 欠損株に一過的に Claudin 1 遺伝子を戻し、HCV 感染を検討した実験から、HCV 感染には Claudin 1 の発現は必須だが、Claudin 1 発現量と HCV 感染量とは必ずしも比例していないようであった。むしろ Claudin 1 の細胞内局在状態が重要との印象を受けており、Claudin 16 共存下での HCV 感染上昇のメカニズムとも関連する現象かもしれない。今後さらに検討を行

う予定である。

5. 抗HCV薬の探索

細胞内に感染しているウイルスを完全排除する、個体レベルでの免疫応答および細胞内レベルでのウイルス構成因子の認識機構及び分解排除機構を解明し、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目的としている。本年度、polyICリボソーム製剤であるNS9が、PEG-IFNよりも非常に強力な阻害活性を示すことを明らかにした。NS9の投与期間中にIFN- α 、IFN- β の顕著な発現上昇は認められず、IFNによる抗ウイルス活性ではない別の阻害機序が関与している可能性が示された。NS9の臨床での使用量は0.1mg/kgであるのでこのままヒトに使用できるレベルであった。NS9の抗HCV機序を明らかにするためにHCV感染ヒト肝臓キメラマウスの肝組織を用いたプロテオミクス解析を行う予定である。

HCVの全ライフサイクルを標的とするスクリーニングで見つかった7物質のうち2物質はウイルスの放出過程を、また別の2物質はウイルスの侵入過程を標的としていると思われる。レプリコン細胞を用いたスクリーニングでは発見困難と思われる、新規な標的を持つ物質を見つけることができた。

E. 結論

本年度、以下の研究成果を得た。

(1) HCV複製増殖機構の解析

1) ATP産生酵素CKBがHCV NS4Aと会合し複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働くことを示した。

2) 小胞輸送関連分子VAP-BのバリエーションVAP-CがHCV産生を負に調節することを明らかにした。

3) VLDL産生に必要なMTPの機能、またアポEの産生がHCV粒子産生に重要であることを示した。

4) ビメンチンがHCVコア蛋白の翻訳後修飾に介入しウイルス産生を制御することを見出した。

(2) HCV病原性発現機構の解析

1) HCV感染初期における細胞内中性脂肪量の減少とウイルス増殖に伴う脂質量及び1価不飽和脂肪酸の増

加を明らかにした。

2) HCV感染により糖輸送体GLUT2発現と糖取り込みの低下を見出し、GLUT2発現低下に関わる転写調節機構を明らかにした。

(3) 持続感染機構の解析

RNA認識複合体にDDX3 helicaseとring-finger protein, Ripletが含まれることを明らかにした。

(4) 新規HCV実験系の開発

新規ヒト肝臓細胞株Li23を樹立し、HCVレプリコン、全長HCV RNA複製細胞およびそのレポーターアッセイシステム、さらにHCV持続感染システムの開発に至った。

(5) 抗HCV薬の探索

1) HCV感染キメラマウスモデルでリボソーム製剤NS9が抗ウイルス活性を示すことを見出した。

2) HCV全生活環を標的とする抗HCV薬スクリーニング系で約2000化合物を評価し、活性物質数種類を得た。感染初期過程を選択的に阻害する化合物などを取得した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (研究代表者分)

論文発表

- Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, M. M. C., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* (in press).
- Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T.,

- Shoji, I. Identification of Annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J. Cell. Biochem.* (in press).
3. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* 83: 2389-2392 (2009).
 4. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383: 319-327 (2008)
 5. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
 6. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
 7. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
 8. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
 9. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
 10. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).

11. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. **J. Virol.** 82: 2631-2641 (2008).
12. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. **Apoptosis** 13: 929-937 (2008).
13. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. **J. Gen. Virol.** 89: 1587-1592 (2008).
14. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. **J. Virol. Methods.** 148: 174-181 (2008).
- H. 知的所有権の出願・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。

II. 分担研究報告書

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 複製増殖の機構解析

分担研究者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨 感染性HCV粒子の放出にはウイルスゲノムがコードする遺伝子産物以外に宿主因子が重要であると考えられる。感染性粒子は浮遊密度が非感染性粒子に比べ小さいことから、脂肪性の因子あるいはリポ蛋白質関連因子が感染性に関与していると考えられた。VLDL 産生阻害因子である MTP 阻害剤処理した細胞からの感染性粒子産生は強く抑制された。この阻害はアポリポ蛋白質 B の細胞外への放出抑制、および VLDL それ自身の放出抑制ともよく関連していた。さらにはアポリポ蛋白質 B 産生を shRNA 処理により抑制した場合、感染性粒子産生は抑制された。このときに VLDL 産生も同時に抑制された。以上から、HCV の感染性には VLDL あるいはアポリポ蛋白質 B が直接関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリアーの多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、年間の死亡者も我が国では5万人を超えている。インターフェロンなどによる治療率は50%程度であり、画期的な治療薬が切望されている。この問題を解決するために、HCV 増殖を支える種々要因を明らかにし、増殖を人為的に抑制する制御法の開発が必要である。本研究では我々が最近明らかにした油滴を利用した HCV 複製の分子機構を解明し、粒子産生における脂肪代謝の意義、脂肪代謝に関する分子を用いたウイルス感染様式を明らかにした新たな切り口による抗 HCV 剤開発に向けた研究を進展させ、これまでの治療に対する研究に相乗的な効果が現れる治療方法の原理を生み出す事を目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV 感染・複製培養細胞系を用いて感染性獲得に対する細胞側要因の解析。

感染性ウイルスゲノム、JFH1 を導入した細胞から、培養外液にウイルス粒子が放出されるが、粒子の大部分は非感染性である。さらに感染性と非感染性の両者には浮遊密度の違いが存在する。この違いがウイルス粒子構成成分の中で、ウイルス蛋白質およびウイルス核酸の組成の違いに由来する可能性は排除出来ないが、それ以外に起因する原因を明らかにし、感染性に重要なウイルス側要因を明らかにする。

(2) 脂肪の産生を制御するウイルス蛋白質コアの機能解析

コア蛋白質が感染細胞に於いて脂肪滴の量を増やす働きを持つことを示してきた。その意義を明らかにしている過程で、コアを特異的に発現する欠失ウイルスゲノムの存在を明らかにした。そのようなゲノムの存在は、既に報告されているが、生

理的な意義については明らかになっていない。本研究では欠失ゲノムからコアが産生されることがウイルス粒子産生に果たす役割を明らかにしたいと考え、欠失ゲノムを持つウイルス粒子が回収されるか、について解析し、もし産生されるならその生理的意義はないかを明らかにしたいと考えている。そこで、さしあたり、欠失ゲノムを持つウイルス粒子が産生されるか否かを調べる。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) HCV 感染・複製培養細胞系を用いた感染性獲得に対する細胞側要因の解析。

HCV 感染性の獲得にはウイルス自身の密度を下げる要因の関与が重要であると考え、脂肪代謝に関係する宿主遺伝子との関連性を調べた。これまでの他の研究者の研究報告によると、特に脂肪複合体、VLDL (very low density lipoprotein) 関連の生体内因子が感染性の付与に重要であると述べている。そこで、VLDL 産生に重要な働きをする MTP (microsomal triglyceride transfer protein) に着目してウイルス産生との関連で解析を行った。MTP の機能を阻害する薬剤 (Bay13) を投与した HCV 感染細胞からの感染性ウイルス粒子産生を薬剤濃度を変えて解析し、薬剤濃度依存的に感染粒子産性が抑制されることを見いだした。すなわち、薬剤濃度 0.001 マイクロモル濃度に於いて、既に感染性粒子産生は 3 分の 1 以下に低下していた。濃度を 0.01 マイク

ロモル濃度にとすると、5 分の 1 以下の量に低下した。これらの濃度においては感染細胞の増殖抑制は全く観察されないことから、感染性粒子産生は薬剤投与による脂肪代謝、特に MTP の機能阻害によるものと考えられた。

次に、MTP 機能の何が感染性 HCV 粒子産生を抑制するかについて調べるために、MTP の標的となるアポリポ蛋白質 B、およびアポリポ蛋白質 E の変化を調べた。0.001 マイクロモル濃度処理細胞においてはアポリポ蛋白質 B の培養液中への放出は既に抑制がかかっており、ウエスタンブロットで調べる限り、3 分の 1 以下に低下していた。0.01 マイクロモル濃度では、ウエスタンブロットの検出限界以下の量であった。一方、アポリポ蛋白質 E の細胞外への放出は 0.01 マイクロモル濃度でも未処理細胞の 50% 以上に相当する量が検出された。なお、コントロールとして用いたアポリポ蛋白質 A1 はこれらの濃度で顕著な違いは見られなかった。

これらの条件に於いて細胞外に放出されるウイルス蛋白質をコアを指標にして定量した。その結果、0.001 マイクロモル濃度ではコアの量はコントロールの 8 割程度であった。このことから、粒子そのものの放出は大きくは妨げられないが、感染性が付与が阻害されていると予想された。

次に、これらの低濃度の MTP 阻害条件における細胞外への VLDL の放出を調べると、0.001 マイクロモル濃度の薬剤処理濃度に於いて、既に放出が阻害されており、その傾向はアポリポ蛋白質 B の放出低下とよく一致していた。

以上の実験では MTP がアポリポ蛋白質 B