

を阻害する事により VLDL 産生阻害をもたらす結果として感染性 HCV の産生も抑制されたと考えられる。しかし、一方ではアポリポ蛋白質 B それ自身が作用した結果かもしれないし、MTP の他の働きが作用した結果かも知れない。そこで、アポリポ蛋白質 B 遺伝子を shRNA で阻害した時に、どうなるかを調べた。アポリポ蛋白質 B の産生が低下している shRNA 処理細胞について、HCV 産生を調べたところ、やはり感染性粒子の産生は強く抑制された。この条件下では VLDL の産生も同様に抑制されていた。

## (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

コアは感染細胞内の脂肪代謝を制御する。一方脂肪代謝は HCV の産生に重要な働きをしている事を明らかにしてきた。すなわちコアはウイルス複製に於いて単に粒子のコアを構築する以外に重要な働きをしているといえる。一方、これまでに臨床サンプル（血清及び肝組織）から効率に構造領域の中で外膜をコードする領域が欠失しているゲノムが検出されている。それらの特徴として、コア蛋白質をコードする領域は完全に保存されている。非構造領域はウイルスゲノムそれ自身の自律複製に重要である事を考えると、このような欠失ゲノムが存在するにはコアの過剰な機能が必要である為であると考えられる。感染細胞における脂肪滴量の増加、および脂肪代謝の活性化は感染性ウイルス粒子産生を高める為に重要であると考え、このような欠失ゲノムもウイルス粒子として産生され、細胞から細胞に感染することが考えられる。そのことを確かめるために、

欠失ゲノムを構築してそれを欠失領域から産生されるウイルス蛋白質を補完出来る細胞に導入したときに欠失ゲノム粒子が産生されるか否かを調べた。その結果予想通りに、欠失ゲノム粒子の産生が確認された。

## D. 考察

HCV が細胞内で複製し、感染性粒子を産生する機構は明らかでない。この機構を明らかにすることにより、抗 HCV に向けた薬剤の開発が可能になると期待される。筆者らはウイルスタンパク質の細胞内局在を解析しながら、粒子産生には油滴が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、感染性の獲得には、VLDL に関係する細胞性因子の必要性も明らかにした。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。

## E. 結論

感染性 HCV の産生には宿主の脂肪関連因子が関与していることを明らかにした。とくにアポリポ蛋白質 B が感染性の付与に重要であると考えられた。アポリポ蛋白質 B がウイルス感染性の獲得にどのように働くのかは今後の課題である。一方、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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

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

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

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）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。昨年度の本研究プログラムにおいて、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 $\alpha$ （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否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 $\alpha$ ）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 $\alpha$  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。この結果によって、HCV 複製が FABP1 の発現に影響することが示唆された。本年度の研究結果から、HCV 複製が糖代謝の入り口である GLUT および脂質代謝の入り口である FABP1 の発現に影響することが明らかとなった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬

変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こすこ



とが知られている。HCV 感染は 2 型糖尿病の発症および進展に関与することが知られており、持続感染において誘導される肝臓の線維化が糖尿病を誘導することも知られている。また HCV 感染は糖尿病の進展に起因するインスリン抵抗性に直接関連することも報告されてきているが、未だ不明の点も多い。

糖代謝の入り口である糖の取り込みにおいて、グルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーがその役割を果たしている。昨年度の本研究プログラムにて、HCV ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR、FGR) 及び HCV J6/JFH-1 感染培養細胞 (HCV 感染細胞) での、GLUT の細胞表面の発現が低下、GLUT2 については mRNA 発現、プロモーター活性の低下も認められ、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、インターフェロン  $\alpha$  (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回復するか否かについて検討を行った。また、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、HCV 複製において GLUT2 mRNA 発現制御に関するプロモーター領域の検索を行った。

さらに本年度は、HCV 感染細胞についてプロテオーム解析を行うことによって、HCV における細胞内代謝異常に関連する因子の包括的な解析を行った。

## B. 研究方法

### (1) 細胞培養

昨年度実施と同様に、Huh-7.5 細胞と SGR、FGR および HCV 感染細胞 (5 dpi) を用いた。また同時にこれらの細胞について、1000 IU/ml の IFN (Sigma) 処理を 10 日間行い、HCV 複製を抑制した細胞も用いた。

### (2) グルコース取り込み実験、GLUT の細胞表面発現、GLUT2 mRNA 発現および GLUT2

### プロモーター活性の測定

上述の細胞において、2-deoxy-D-[1,2- $^3$ H] 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 $\rightarrow$ +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 $\rightarrow$ +314、-1155 $\rightarrow$ +314、-1100 $\rightarrow$ +314、-1030 $\rightarrow$ +314、-206 $\rightarrow$ +314、+29 $\rightarrow$ +314 および +126 $\rightarrow$ +314 を用いた。

### (3) プロテオーム解析

HCV 感染細胞、対照細胞として非感染 Huh-7.5 細胞を用い、感染後 14 日において、タンパクサンプルを調製した。蛍光標識二次元ディフュージョン電気泳動解析システム (2D-DIGE; GE Health Science) を用いて、発現量の異なるスポットを切り出し、MALDI-TOF/MS により、スポットのアミノ酸配列解析を行った。配列解析により得られた遊離脂肪酸結合タンパク (FABP) 1 について、HCV 感染細胞 (3、7 および 14 dpi)、SGR および FGR における mRNA 発現を定量 RT-PCR により解析した。

### (倫理面への配慮)

組換え遺伝子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を得て行った。

## C. 研究結果

### (1) IFN 処理での HCV 複製抑制によるグルコース取り込みへの影響

SGR、FGR および HCV 感染細胞について、IFN を処理したところ、グルコースの取り込みは対照と同程度にまで回復した。またこれらの細胞において、GLUT の細胞表面の発現、GLUT2 mRNA 発現およびプロモーター活性についても、抑制からの回復が認められた。

#### (2) GLUT2 mRNA 発現制御に関与するプロモーター領域の検索

GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠失変異体を用いて、SGR および FGR における 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ところ、転写因子 Hepatic Nuclear Factor (HNF-1 $\alpha$ ) 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。

#### (3) HCV 感染細胞におけるプロテオーム解析

HCV 感染細胞 (14 dpi) および非感染細胞における 2D-DIGE を用いたタンパク発現解析を行ったところ、HCV 感染細胞において 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 感染細胞の感染後 3、7 および 14 日において、経時的に FABP1 mRNA 発現の低下が認められた。また FGR においても、mRNA 発現の低下が認められた。

### D. 考察

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 $\alpha$  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 $\alpha$  結合領域で制御されている可能性が示唆された。HNF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。

## E. 結論

HCV 複製が糖代謝の入り口である GLUT および脂質代謝の入り口である FABP1 の発現に影響することが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide YH, 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)
- (2) 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)
- (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, 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 YH, 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) 足達哲也、笠井大介、長野基子、勝二郁夫、**堀田博** グルコーストランスポーター GLUT2 の発現と肝臓グルコース取り込みにおける C 型肝炎ウイルスの影響に関する検討 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008.
- (7) 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.

- (8) **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.
- (9) 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



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

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 HCV 感染細胞が宿主免疫を起動する機構を解明し、肝炎の劇症化、肝硬変、肝がんへの免疫系の関与を科学的に検証する。肝細胞の抗ウイルス免疫応答の持続に関与する宿主因子を同定し、それらの動態と肝病変形成への影響を解析する。

A. 研究目的

HCVのRNAに結合するDEAD box helicaseの抗ウイルス作用を分子機構として解明し、肝実質細胞の宿主免疫起動への関与と進行病変形成への波及効果を分子レベルで解明する。

B. 研究方法

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などで収集する。一方、polyI:C結合分子をプロテオーム解析の手法で同定する。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する。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する。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 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O cell repliconの系で検討の予定である。

2. 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。

3. これ以外にもいくつかの抗ウイルス活性を発揮する分子が同定されており、HCV感染抑制との関係を検討中である。

D. 考察

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認識因子が細胞内にあり、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。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Seya, T., and M. Matsumoto. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunother.* DOI 10.1007/s00262-008-0652-9
2. Seya, T., M. Matsumoto, T. Ebihara, and H. Oshiumi. 2009. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol. Reviews* 227: 44-53.
3. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2009. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\alpha$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284: 807-817.
4. Itoh K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J. Immunol.* 181:5522-5529.
5. Matsuo A., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Teleost Toll-like receptor 22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from Birnaviruses. *J. Immunol.* 181: 3474-3485.
6. Shingai, M., T. Ebihara, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated interferon-beta induction. *Int. Immunol.* 20:1169-118
7. Oshiumi, H., A. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Seya. 2008. Pan-Vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Current Genomics* 9:488-493.
8. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283: 22784-22794.
9. Funami, K., M. Sasai, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Homooligomerization is essential for Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 mediated NF- $\kappa$ B and IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 283: 18283-18291.
10. Nakamura, M., K. Funami, M. Matsumoto, T. Seya et al., 2008. Increased expression of Toll-like receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology*. 2: 222-230.
11. Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 180: 7175-7183.
12. Seya, T. 2008. Preface. *ADDR* 60: 779-781.
13. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDR* 60: 805-812.
14. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58.
15. Bas, S., T. Seya, M. Matsumoto et al., 2008. The pro-inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* 180: 1158-1168.
16. Oshiumi, H., T. Seya, M. Matsumoto, et al. 2008. Pan-vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Cur. Genomics* 9: (in press).
17. Wu, J. D., T. Seya, M. Matsumoto, et al., 2009. Obstructing Shedding of the immunostimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin. Cancer Res.* 15: 632-639.

### 2. 学会発表

1. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆彦、瀬谷 司：抗 HCV 樹状細胞応答の解析、第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第 19 回日本生体防御学会・第 45 回補体シンポジウム合同大会（札幌）2008.7.10-12
2. 東正大、海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：TICAM1 依存性クロスプレゼンテーションの解析、(同上)
3. 海老原敬、松本美佐子、脇田隆彦、瀬谷 司：HCV 感染アポトーシス細胞を介した抗 HCV 樹状細胞応答、日本ウイルス学会北海道支部第 42 回夏季シンポジウム（ニセコ町）、2008.7.26-27
4. 東正大、海老原敬、久保田信彦、赤澤 隆、松本美佐子、瀬谷 司：樹状細胞における TLR3/TICAM-1 経路を介したクロスプレゼンテーションの制御第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都）、2008.12.1-3
5. 押海裕之、坂井圭介、松本美佐子、瀬谷 司：IPS-1 の CARD ドメインと結合する DEAD box ヘリケースの DD3 の単離同定と C 型肝炎ウイルスによる I 型インターフェロン抑制の新たな機構、第 31 回分生年会、第 81 回生化学大会の合同開催（神戸）、2008.12.9-12

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称：I型インターフェロンの発現調節剤、PCT/JP2008/001648、発明者：瀬谷 司、松本美佐子、押海裕之、出願日：2008年6月25日、出願人：北海道大学

厚生労働科学研究費補助金 (〇〇〇研究事業)  
(総括・分担) 研究報告書

C型肝炎ウイルス排除機構に関する研究

(主任又は分担) 研究者 小原 道法 (財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 参事 参事研究員

研究要旨：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する。これまでに、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。

小原 道法 (財) 東京都医学研究機構  
・東京都臨床医学総合研究所 参事  
研究員

A. 研究目的

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する。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京都臨床医学総合研究所の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

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。

D. 考察

polyICリポソーム製剤であるNS9はPEG-IFNよりも非常に強力な阻害活性を示した。NS9の投与期間中にIFN-a、IFN-b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構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。

E. 結論

NS9の抗HCV機構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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui F., Kai C., Masahiro Kitabatake, Kohara M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181(9):63-37-48 (2008).
- 2) Sakamoto N., Tanabe Y., Yokota K., Kohara M. and Watanabe M.: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology* 23(9):1437-47 (2008)
- 3) Inubushi S., Nagano-Fujii M., Kitayama K., Kohara M., Sada K. and Hotta H.: Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008)

2. 学会発表

- 1) 関口 敏、飛田良美、千代智子、小原道法：新規HCV持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008.10.26-28 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「C型肝炎ウイルス遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス」、特願：2008-05751、発明者：小原道法、村井深、出願日：2008年3月7日、出願人：東京都医学研究機構、(株)ポストゲノム研究所、(財)化学及血清療法研究所

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

実験モデルの開発に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨: 培養細胞レベルでの C 型肝炎ウイルス(HCV)の複製増殖にはヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来の細胞クローンのみが用いられているが、本来の HCV 産生系の姿を反映しているかどうかの検証システムが必要である。本研究では HuH-7 細胞株とは異なる培養細胞を用いた HCV の複製増殖系を開発することを目的として研究を行い、以下に示すような成果を得た。(1)全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-O 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(2)これらの細胞株を用いて抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便なアッセイシステムを開発した(3)これらの細胞株を用いて HCV (遺伝子型 2a の JFH-1 株)の持続的産生増殖システムを開発した。

A. 研究目的

感染性のある C 型肝炎ウイルス(HCV)を培養細胞レベルで産生増殖させることは長らく困難を極めていたが、遺伝子型 2a の JFH-1 株 HCV の登場で現在ではこの JFH-1 株 HCV を用いた研究が盛んになっている。しかしながら、不思議なことに JFH-1 株 HCV を効率よくかつ持続的に産生できる培養細胞はヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来の特殊な細胞クローンに限られており、その理由も明らかになっていない。従って、HuH-7 由来の細胞株を用いて得られた多くの研究成果は本来の HCV の複製増殖機構を反映していない可能性がある。そこで、本研究においては、HuH-7 由来の細胞株で得られた研究成果の検証も含めて、HuH-7 由来の細胞株とは異なる培養細胞株での HCV の持続的複製増殖系を開発を目指した。

分担研究者らは、これまでに HuH-7 由来のクローン化細胞を用いた全長 HCV RNA 複製システム(1b 型の HCV-O 株や

AH1 株)や HCV 持続産生システム(2a 型の JFH-1 株)を開発してきた。その過程で、非構造領域(NS)3や NS5A に生じた適応変異の特殊な組み合わせが HCV RNA の複製効率を著しく上昇させることを見出した。そこで、このような適応変異の組み合わせを有する HCV レプリコン RNA や全長 HCV RNA を HuH-7 細胞とは異なる細胞に導入した場合でも HCV RNA の複製が起こるのではないかと考え、まず HCV RNA の複製が可能な新たな細胞株を樹立し、それらを用いて HCV の持続的産生系の開発を目指すこととし、以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1)全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-O 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Q1112R、K1609E及びS2200R 又は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)- $\gamma$ 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72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。

(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

レニラルシフェラーゼを発現でき 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 (ORN/C-5B/QR,KE,SR)を全長 HCV RNA 複製細胞の治癒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。

得られたクローン化細胞が抗 HCV 剤のアッセイシステムとして有用かどうかについては、可変量の IFM- $\alpha$ の量(1, 10 或は

100 IU/ml)を添加して、24 時間後のレニラルシフェラーゼの活性値と定量的 RT-PCR 法により得られた HCV RNA 量を対比させ相関するかどうかを調べた。

各種抗 HCV 剤の評価については、アッセイ用の細胞(24 ウェルプレート)に薬剤(各種濃度)を添加して72時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより各薬剤の50%阻害濃度( $EC_{50}$ )を算定した。

(3)HCV(遺伝子型 2a の JFH-1 株)の持続的産生増殖システムの開発

In vitro で合成した HCV-JFH-1 RNA を HuH-7 由来のクローン化 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 粒子を産生させた。1週間後に培養上清(0.2 mm フィルターにて濾過後、低速遠心にて細胞残渣を取り除いた)をとり、検定する各種細胞に添加して感染させた。1週間後に再び上述した方法により産生した HCV を含む培養上清を調製して再び未感染の細胞に添加して感染させた。その後、1週間置きに培養上清および細胞をサンプリングした。培養上清については、コアのタンパク質量を ELISA で定量し、細胞については、細胞内の HCV RNA を定量的 RT-PCR 法により定量し、HCV タンパク質の発現量についてはウェスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

(1)全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-O 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)を汎用されている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 耐性のコロニーの出現を待ったが、わずかに小さなコロニーが得られる場合もあったが、期待したようなコロニーを得ることは出来なかった。そこで、汎用されていないが、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 細胞についても同様に検討した。その結果、Li23 細胞において多数の G418 耐性コロニーが得られた。ON/3-5B/QR,KE,SR の場合は1 $\mu$ g RNA あたり132、ON/3-5B/QR,PL,SR の場合は57 というコロニー出現効率であった。本研究は少なくとも全長 HCV RNA 複製細胞や感染性 HCV 粒子産生系の開発を目指していたので、この段階で細胞のクローン化は行わず、コロニーをミックスしてポリクローン化細胞を得た。それぞれについて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 sO 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- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 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 sO 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- $\gamma$ 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ので、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た。その結果、ON/C-5B/QR,KE,SR の1 $\mu$ g RNA あたり100個のG418耐性コロニーが得られた。この段階で得られたコロニーのクローン化を試み、計14個をクローン化細胞株として樹立化でき、OL1-OL14細胞と命名した。これらの細胞内における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により調べ、HCV RNA 量が多い OL8、OL11 及び OL14 細胞を選択した。これらの細胞については、ノーザンブロット解析により全長 HCV RNA に相当する11kb RNA を検出した。また、ウェスタンブロット解析により HCV タンパク質の発現量も調べた。その結果、OL8 と OL11 細胞は HuH-7 由来の全長 HCV RNA 複製細胞である O 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。しかしながら、OL14 細胞における HCV タンパク質の発現レベルはかなり低いことが分かった。また、免疫蛍光染色においても O 細胞と遜色なくコア蛋白質や二本鎖 RNA が検出された。さらに OL8、OL11 および OL14 細胞由来の全長 HCV RNA を RT-PCR 法により増幅させて、塩基配列を決定した。その結果、新たな適応変異は出現しておらず、これらの細胞における RNA 複製には新たな適応変異は必要ないことが分かった。この段階で 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- $\gamma$  を添加することにより作成した。

(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。その結果、OL8c 細胞から得られた耐性コロニーは少なかったが、最終的には9クローンを細胞株化できた。OL11c 細胞からは数

十個の耐性コロニーが得られ、16 クローンを細胞株化した。それぞれ得られたクロン化細胞における 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。ORL8 細胞と ORL11 細胞における HCV RNA 量は 1  $\mu\text{g}$  total RNA 当たり、それぞれ  $8 \times 10^6$  コピーと  $4 \times 10^6$  コピーであった。ORL8 と ORL11 細胞については、ノーザンブロット解析により全長 HCV RNA に相当する 12 kb RNA を検出した。また、ウェスタンブロット解析により HCV タンパク質の発現量も調べた。その結果、ORL8 と ORL11 細胞は HuH-7 由来で抗 HCV 活性の評価のためのアッセイ系に使用されている OR6 細胞と比較すると発現レベルはやや低かったが、十分量の HCV タンパク質を発現していることが分かった。

次に今回得られた ORL8 細胞や ORL11 細胞が抗 HCV 剤のためのアッセイ系として使用されている OR6 細胞と同じようにアッセイ系として使用できるかどうかについて検討した。両細胞に IFN- $\alpha$  (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- $\alpha$  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 ( $\text{EC}_{50}$ ) を算出して比較した。その結果、IFN- $\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\gamma$ 、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 $\beta$ -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- $\alpha$ 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。

### (3) HCV (遺伝子型 2a の JFH-1 株) の持続的産生増殖システムの開発

培養細胞を用いた効率のよい遺伝子型 1b の HCV 産生系は現在までのところ開発されていないので、現在汎用されている遺伝子型 2a の JFH-1 株 HCV RNA を HuH-7 由来の RSc 細胞(当該研究室で樹立されたクロン化細胞株で効率よく HCV 産生が起こる)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週間ごとに細胞(HCV RNA の定量と HCV コア蛋白質の検出)と培養上清(HCV コア蛋白質の定量)のサンプリングを行い、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。しかしながら、ORL11c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞には感染して増殖するが、もう一度、未感染の ORL11c 細胞に感染させた場合ほとんど増殖しないことが分かった。これに反して、ORL8c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞においても増殖するが、未感染の ORL8c 細胞にもう一度感染させた場合でも増殖してくることが分かった。従って、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。細胞内における HCV RNA 量と培養上清におけるコア蛋白質量について、RSc 細胞



と ORL8c 細胞で比較したところ、RSc 細胞の方が ORL8c 細胞よりは数倍～10 倍程度高いことが分かった。しかしながら、ORL8c 細胞内の HCV RNA 量は  $>10^7$  copies/ $\mu$ g RNA 存在し、上清中にも  $>10^4$  fmol/L RNA という値が得られたことから、少なくとも、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。

#### D. 考察

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

これまでの研究により得た適応変異の組み合わせにより HuH-7 細胞以外の細胞株を用いて比較的容易に HCV レプリコン細胞株を樹立できるものと予想していたが、そう簡単ではなく Li23 細胞株を見出すまで相当の年月を費やした。しかしながら、選択した適応変異の組み合わせがまったく効果を有していないわけではなく、並行して行っていた Q1112R, P1115L 及び S2200R の組み合わせで樹立できたレプリコン複製細胞株では Q1112R, K1609E 及び S2200R の組み合わせで樹立に成功したレプリコン複製細胞に比べて著しくレプリコン RNA の細胞内レベルが低かったことから、適応変異のこれらの組み合わせが大きく影響しているものと考えられる。これらの適応変異の組み合わせがどのように Li23 細胞内での HCV RNA の複製効率の向上に関与しているかについては不明であるが、NS3 領域内の変異で K1609E については RNA ヘリカーゼの活性を向上させる効果があるのではないかと予想される。現在でも 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、アシアログライコブロテイン受容体、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% 牛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。

(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

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 などにも依存してきたが、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の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。

(3) HCV (遺伝子型 2a の JFH-1 株) の持続的産生増殖システムの開発

今年度の研究成果として、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。

#### E. 結論

全長 HCV RNA (遺伝子型 1b の HCV-O 株) の複製が効率良く起こるヒト肝癌細胞株 Li23 由来の複数の細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて抗 HCV 活性を簡便に定量評価できるアッセイシステムや HCVcc (遺伝子型 2a の JFH-1 株) の持続的産生増殖システムを開発した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).

- 3) 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).
- 4) 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). *J. Virol.* 82, 9305 (2008) spotlight
- 5) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72-79 (2008).
- 6) 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).
- 7) 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).

- 8) 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).
  - 9) 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)
2. 学会発表
- 1) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之、山本 和秀. 全長 HCV-RNA 複製細胞を基に作成した IFN 治療後再発モデルによる有効な治療法に検討・評価. 第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月.
  - 2) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 3) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- $\alpha$  resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 4) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 5) Ikeda M, Abe K, Kuroki M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 6) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 7) Abe K, Ikeda M, Tani H, Ariumi Y, Dansako H, Matsuura Y, Kato N. 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 Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas

- USA, October 2008.
- 8) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 9) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
  - 10) 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、岡山、2008年10月。
  - 11) 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、岡山、2008年10月。
  - 12) 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、岡山、2008年10月。
  - 13) 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、岡山、2008年10月。
  - 14) 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、岡山、2008年10月。
  - 15) 阿部 健一、池田 正徳、谷 秀樹、有海 康雄、團迫 浩方、松浦 善治、加藤 宣之。HCV 複製に關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、岡山、2008年10月。
  - 16) 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/2aHCV キメラレプリコン。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
  - 17) 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、岡山、2008年10月。
  - 18) 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、岡山、2008年10月。
  - 19) 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、岡山、2008年10月。
  - 20) 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. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月.

- 21) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication reporter assay systems using various genotype 1b HCV strains. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月.
- 22) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, and Kato N. ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

出願番号:特願 2008-225323 号 (出願日:2008年9月2日)

発明の名称:新規 HCV レプリコン複製細胞および全長 HCV RNA 複製細胞、ならびにこれらの利用

発明人:加藤 宣之、池田 正徳.

出願人:岡山大学

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

HCV 増殖と脂質代謝

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨：私たちは、C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝脂肪化ののちに肝発癌を引き起こすことを示してきた。C型肝炎トランスジェニックマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸などの一価不飽和脂肪酸が増加している。今回、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  $\delta$ -9、 $\delta$ -6、 $\delta$ -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、ピ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、ピ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。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、ROS 産生、脂質代謝異常を含む 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、病態改善薬開発への可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア蛋白がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認し、このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行ってきた。また、

マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌(肝癌)が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特