

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が明らかになっている。今回、我々は、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。

B. 方法

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 細胞を用いて以下のような解析を行なった。また、JFH-1 増殖 Huh7 細胞も同様に用いて検討を行った。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメディア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。eicosatetraynoic acid、eicosatetraynoic acid(EPA)、arachidonic acid(AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

C. 結果

(1) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた。

(2) 一価不飽和脂肪酸(オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸、パルミトオレイン酸)の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) 不飽和脂肪酸が増加していた。

(3) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤

である eicosatetraynoic acid(ETYA)によってコア蛋白発現細胞のみで 18:1(n-9)が著増した。このことからコア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。

(4) 多価不飽和脂肪酸である EPA や AA によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)はいずれの細胞でも減少しなかった。

(5) 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 lactate dehydrogenase によって lactate 産生側へ平衡を傾けると、NADH が消費され、細胞内の蓄積中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもが、コア蛋白発現細胞においてのみ特異的に改善された。

(6) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼの発現が増加していたが、SREBP-1b、SREBP-2 の発現は増加していなかった。

(7) ピルビン酸の投与によって SREBP-1c と FAS の発現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。

(8) JFH-1 増殖 Huh7 細胞においても感染 4 日目の時点で細胞内に中性脂肪が有意に増加していることが認められた。

D. 考察

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。

今回の我々の検討によって、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。

E. 結論

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。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見いだされた。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防、病態改善薬の開発に向けて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Koike K, Nagai R. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. Eur J Pharmacol 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. J Biol Chem 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and

- carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 4) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- 6) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 9) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
- 10) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.
- 11) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
- 12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.
2. 学会発表
- 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
- 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses,

San Antonio, 2008.

- 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.
- 4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59TH Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV の NS5A 蛋白質と相互作用する宿主因子として、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) subtype A (VAP-A) および B (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。そこで本研究では、HCV の複製における VAP-C の役割について検討した。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。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究は HCV の感染、成熟、そして複製過程に関与する宿主因子を解析し、これらの宿主因子をターゲットとした新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。我々はこれまでに、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。

B. 研究方法

各種 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、イムノプロットや定量的 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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

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。

D. 考察

多くのウイルスの複製に分子シャペロンが関与以上の成績から、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。

E. 結論

- 1 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。
- 2 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
- 5 Human butyrate-induced transcript 1

interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).

2. 学会発表

- 1 Hiroshi Kukiwara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7 月 9-11 日、2008.
- 7 Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恒司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10 月 21 日-23 日、2008.
- 8 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恒司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第

- 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、10 月 26 日-28 日、2008.
- 9 田鍬修平、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性、同上。
 - 10 森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上。
 - 11 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治：E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
 - 12 谷 英樹、泉 貴之、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
 - 13 久木原 博、森石恆司、松浦善治：ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 14 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
 - 15 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
 - 16 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治：患者血清中に存在する C 型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。
 - 17 松浦善治：C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子：第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12 月 9 日-12 日、2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 深澤秀輔 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨 HCV JFH1 株を Huh7.5.1 細胞に感染させる系を用いて、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニングを行った。抗 HCV 作用はウイルス RNA の定量 RT-PCR、cell-based ELISA による細胞内の Core 蛋白質の測定、HCV による細胞増殖阻害効果の解除などを指標とした。種々の既知阻害剤や化合物ライブラリーをスクリーニングし、抗 HCV 活性を示す物質をいくつか見いだした。ヒットした化合物の作用点を解析したところ、ウイルスの放出や侵入過程など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、新規な標的を持つと考えられる抗 HCV 物質を見いだした。

A. 研究目的

変異を起こして耐性が生じやすいウイルスの治療には、多様な標的を持つ抗ウイルス剤が必要とされる。C 型肝炎ウイルス(HCV)の侵入過程や粒子の放出過程を標的とする阻害剤のスクリーニングは、レプリコン細胞では不可能であるため、H7.5.1 細胞-JFH1 の感染系を用いて、HCV 治療薬開発のための探索系を確立し、HCV の全ライフサイクルを標的とするスクリーニングを行う。

B. 研究方法

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)

培養細胞を使った研究であり、倫理面への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

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ル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、galocatechin 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

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

昨年度までに確立した探索系を用い、既知阻害剤、化合物ライブラリーのスクリーニングを進めた。ヒットした化合物の作用点を解析したところ、新規な標的を持つと思われる抗HCV物質を見いだした。

F. 研究発表

学会発表

村上裕子、鈴木哲朗、脇田隆宇、深澤秀輔:感染細胞系を用いたスクリーニングにより見いだされた新規標的を持つ抗HCV物質の作用機構解析、第55回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月26-28日

G. 知的所有権の取得状況

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）
（総括・分担）研究報告書

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

「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」

分担研究者 深澤 征義 国立感染症研究所細胞化学部

(1) C型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白質はウイルス産生及び病原性発現に密接に関連する分子である。我々は HCV の産生・病原性に関与する宿主因子の探索を目的として、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培養肝細胞系を用い行っており、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。本分解系が抗 HCV 戦略に有用であることが示唆される。(2) 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。その結果、複数の HCV 非感染 Huh7.5.1 由来の株を樹立した。今後、これら変異株の欠損原因遺伝子の同定を通じて有用な抗 HCV 薬標的を見いだしていきたい。

A. 研究目的

宿主細胞内での C型肝炎ウイルス (HCV) 感染・増殖機構、また HCV による病原性発現機構についてはいまだ不明の点が多く、宿主因子が治療ターゲットとなり得ていないのが現状である。そこで、第1の方法として今までほとんど試みられてこなかったプロテオミクス的手法を用いること、また第2の方法として宿主変異株の分離を通じた遺伝学的手法を用いることで、HCV 産生・病原性発現に関与する宿主候補因子を探索することを本研究の目的とした。本研究により、HCV 産生・病原性発現メカニズムの一端が明らかにされることが期待され、治療薬開発へ展望を開くことができると考えている。

B. 研究方法

コアタンパク質の分解系におけるビメンチンの役割の検討には 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 感染系におけるビメンチン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 細胞を用いてビメンチン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。

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。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床材料・実験動物等を用いていない。そのために倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

(1) vimentin 分子による HCV コアタンパク質のプロテアソーム分解系を介した HCV 産生への影響

コア蛋白質発現細胞の界面活性剤不溶性画分において顕著に低下する分子として同定した vimentin が、コア蛋白質発現量ひいては HCV 産生量に関与することがわかってきたのでそのメカニズムについて検討した。

vimentin 発現によりコア蛋白質発現量が顕著に低下するが、コア蛋白質の mRNA 量は低下しておらず、蛋白質レベルでの低下であることが示唆された。合成されたコア蛋白質は、ユビキチン-プロテアソーム系によりその大部分が速やかに分解されることが知られている。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量の顕著な増加が認められる。そこで、この系において、ビメンチンを siRNA でノックダウンしたときの影響を調べた結果、コア蛋白質量の増加が全く認められなくなった。このことは、ユビキチン-プロテアソーム系によるコア蛋白質の分解過程においてビメンチン分子が必要であることを示しており、ビメンチンがプロテアソーム分解系を介してコア蛋白質量を制御していることが明らかとなった。

次に、培養細胞を用いた HCV 感染系においてもビメンチンを介したプロテアソーム系が影響を与えるかを検討した。ビメンチンを過剰発現下ではウイルス産生は抑制されるが、プロテアソーム阻害剤処理によりその抑制効果は見られなくなった。また、プロテアソーム阻害剤処理によりウイルス産生は増加するが、siRNA によるビメンチン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。以上の結果から、ウイルス感染系においてもビメンチンを介したプロテアソーム系によりコア蛋白質量が制御され、その結果としてウイルス産生が影響されることが強く示唆された。

(2) HCV 非感染宿主細胞株の分離

培養肝細胞を用いた HCV 感染系の実験を各種行っていた過程で、感染後、長期に培養すると宿主細胞

の大部分が死ぬが必ず一部分生き残る細胞が存在することに気づいていた。その細胞を複数クローン化し性状解析してみると、そのほとんど全てが、HCV 感染過程に必須であることがわかっていた CD81 分子の欠損株であることがわかった。このことは、HCV 感染後に生き残って来る細胞を分離すれば、HCV 感染に必須の分子の欠損株がとれる可能性を示している。そこでこの系を利用することを考えた。

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いているのかもしれない。

分離された各種変異株の性状解析を今後さらに進めていく予定である。

D. 考察

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。

ビメンチン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ビメンチンの関与が認められている。このことはビメンチン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。

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 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、Claudin 1+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。今後さらに検討をしたい。

E. 結論

これまでに比較プロテオミクス解析により HCV コアタンパク質発現により変動する宿主界面活性剤不溶性画タンパク質として vimentin 分子を見いだしてきた。今回 vimentin 分子の HCV 産生阻止メカニズムを解析し、vimentin 分子が HCV コアタンパク質のプロテアソーム系による分解に関与していることを明らかとした。

HCV 感染を起こさない宿主肝細胞変異株の分離を広範に試み、複数の HCV 非感染株を樹立した。これら変異株の欠損原因遺伝子が同定されれば抗 HCV 薬標的として極めて有用な知見を与えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. "Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection." *J. Virol.* 82(12):5715-24, 2008
2. 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, 2009

2. 学会発表

1. Masayoshi Fukasawa, Shigeo Nakamura, Yuko Nitahara-Kasahara, Kumiko Shimotohno, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, and Masahiro Nishijima, Tadahiko Mashino. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA, October, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木哲朗、 政木隆博、 相崎英樹	C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構	小柳義夫	ウイルス	日本ウイルス学会	東京	2008	199-206
Aizaki H, Suzuki T.	RNA Replication of Hepatitis C Virus	Cheng RH, Miyamura T.	Structure-based Study of Viral Replication	World Scientific	Singapore	2008	151-172

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2009
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	2009
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

Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, <u>Suzuki T</u> , 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
Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, <u>Suzuki T</u> , 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
Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., <u>Matsuura, Y.</u> , Miyamura, T., Wakita, T., <u>Suzuki, T.</u>	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
Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., <u>Suzuki, T.</u>	Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	371	446-450	2008
Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., <u>Matsuura, Y.</u> , Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., <u>Suzuki, T.</u>	A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection.	J. Virol.	82:	5715-5724	2008
Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., <u>Suzuki T.</u> , Moriishi K., <u>Matsuura Y.</u>	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

Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., <u>Suzuki T.</u> , Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y.	A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication.	J. Virol.	82:	3480-3489	2008
Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, <u>Suzuki T.</u> , Moriishi K, Matsuura Y.	Human Butyrate-Induced Transcript 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS5A and Regulates Viral Replication.	J. Virol.	82	2631-2641	2008
Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., <u>Suzuki, T.</u>	Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter.	Apoptosis	13	929-937	2008
Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., <u>Suzuki, T.</u> , Wakita, T., Shoji, I.	Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines.	J. Gen. Virol.	89	1587-1592	2008
Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, <u>Suzuki T.</u>	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
Ikejiri M. Ohshima T. FukushimaA. <u>Shimotohno K.</u> Maruyama T.	Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents.	Bioorg Med Chem Lett.	18	4638-4641	2008
Noguchi T. Otsubaki T. Ando I. Ogura N. Ikeda S. <u>Shimotohno K.</u>	Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome.	Virology.	3752	424-432	2008

Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, <u>Shimotohno K</u> , 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
Aly HH, <u>Shimotohno K</u> , Hijikata M.	3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV	Biochem Biophys Res Commun.	379	330-334	2009
Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, <u>Hotta H</u> .	HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.	J Hepatol	(in press)		2009
Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, <u>Hotta H</u> .	Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma	J Gen Virol	(in press)		2009
Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, <u>Hotta H</u> .	Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway.	J Virol	82(21)	10375-10385	2008
Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, <u>Kohara M</u> , Sada K, <u>Hotta H</u>	Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk.	J Gen Virol	89(5)	1231-1242	2008
El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, <u>Hotta H</u> .	Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy.	Hepatology	48(1)	38-47	2008

Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, <u>Hotta H</u> , 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.	Intervirolgy	51(Suppl 1)	70-75	2008
Yasui F, <u>Kohara M</u> et al.	Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV	J. Immunology	181	6337-48	2008
Sakamoto N, <u>Kohara M</u> , et al.	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA	J. Gastroenterology Hepatology	23	1437-47	2008
Nishimura T, <u>Kohara M</u> , et al.	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA	Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.	31	435-448	2008
Ogata K, <u>Kohara, M.</u> et al.	A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon - ribavirin therapy	Arch. Virol. y	In press		2009
Ueno Y, <u>Kohara, M.</u> et al.	Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs	Bioorganic & Medicinal Chemistry	In press		2009
Kuroki M, (加藤)	Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the	Journal of Virology	83	2338-2348	2009

	Glutathione Redox System and Oxidative Stress.				
Kato N (加藤)	Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture.	Archives of Virology	154	77-85	2009
Ariumi Y, (加藤)	The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasi a mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication.	Journal of Virology	82	9639-9646	2008
Dansako H, (加藤)	A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication.	Virus Research	137	72-79	2008
Mori K, (加藤)	New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Biochemical and Biophysical Research Communications	371	104-109	2008
Ando M, (加藤)	Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication.	Liver International	28	1158-1166	2008
Hirano K, (加藤)	Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells.	Liver Transplantation	14	292-298	2008

Nakamura M (加藤)	Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment.	Journal of Medical Virology	80	632-639	2008
Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart.	Eur J Pharmacol	Dec 10	[Epub ahead of print]	2008
Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, <u>Koike K</u> , Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y.	A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization.	J Biol Chem	Dec 8.	[Epub ahead of print]	2008
Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test.	Atherosclerosis	Oct 30.	[Epub ahead of print]	2008
<u>Koike K</u> .	Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection.	J Gastroenterol	44supl	82-88.	2009
Ichibangase T, Moriya K, <u>Koike K</u> , Imai K.	Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics.	Biomed Chromatogr	Nov 27	[Epub ahead of print]	2008
Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, <u>Koike K</u> , Gonzalez FJ, Aoyama T.	PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein.	J Clin Invest	118	683-694.	2008