

- monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72-79 (2008).
42. 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).
 43. 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).
 44. 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).
 45. 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)
 46. Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125:88-97 (2007).
 47. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
 48. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid- rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
 49. Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
 50. Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
 51. Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
 52. Yano M, Ikeda, M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2016-2027(2007).
 53. Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr, JA, Schreiber SL, Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of hepatitis C virus replication using a high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3756-3759 (2007).
 54. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno K W, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H and Shimotohno K. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. *J Virol.* 83(13): 6922-6928, 2009

55. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, and Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85: 217-228, 2009
56. Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. J. Virology 84 303-311, 2010.
57. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. *in press*.
58. Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Sekiguchi S, Seike E, Tone S, Hayashi Y, Tobita Y, Kasama Y, Shimizu M, Takahashi H, Taya C, Yonekawa H, Tanaka N, and Kohara M. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. Gastroenterology 137: 285–296, 2009
59. Saitou K, Mizumoto K, Nishimura T, Kai C and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. Virus Research 144(1-2):266-271, 2009
60. Nishimura T, Kohara M, Izumi K, Kasama Y, Hirata Y, Huang Y, Shuda M, Mukaidani C, Takano T, Tokunaga Y, Nuriya H, Satoh M, Saito M, Kai C. and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent over-expression of 3 beta-hydroxysterol delta 24 reductase. J. Biol. Chem. 284 36442-36452, 2009
61. Nishimura T, Saito M, Takano T, Nomoto A, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Comparative Aspects on the Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Internal Initiation of Hepatitis C Virus and Picornavirus RNAs. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 5:435-448, 2008
62. Chiba T and Marusawa H. A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction. J Mol Med. 87(10):1023-1027,2009
63. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. Oncogene. 28: 469-478, 2009
64. Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. J Viral Hepat. 16: 388-396, 2009
65. Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. Int J Cancer. 123: 2735-2740, 2008
66. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. Gastroenterology. 135: 889-898, 2008
67. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ,

- Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 27: 6002-6011, 2008
68. Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 1399-1402, 2008
69. Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Uemoto S, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 47: 888-896, 2008
70. Kou T, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Okazaki IM, Ueda Y, Kodama Y, Haga H, Ikai I, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 120: 469-476, 2007
71. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*. 13: 470-476, 2007
72. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. *Oncogene*. 26: 5587-5595, 2007
73. Kobayashi S, Takeda T, Nishiguchi S, et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a Multicenter retrospective cohort study of 1124 patients. *Liver Intern*. 27: 186-191, 2007.
74. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238: 265-276, 2009
75. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 70-77, 2009
76. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. *Am J Pathol.*, 75: 1975-1983, 2009
77. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26: 2705-2712, 2008
78. Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275:1260-1273, 2008
79. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007
80. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007

本研究では、HCV 複製機構と宿主因子 Hsp90 の関係を明らかにし、分子シャペロン Hsp90 によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。Hsp90 阻害剤であるゲルダマイシン誘導体 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)が NS3 と Hsp90 の相互作用を阻害し、NS3 のプロテアソーム分解を誘導することでウイルス増殖を抑制することを明らかにした。また、Hsp90 と NS3 の相互作用点は NS3 の helicase domain であることが分かった。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用い 17-AAG と併用処理を行うことで、両阻害剤の相乗効果を得ることができ、高いウイルス複製阻害効果が示されることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、HCV 複製機構と宿主因子 Hsp90 の関係を明らかにし、Hsp90 によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。分子シャペロン Hsp90 はフォールディングや蛋白質の凝集抑制や活性化などで働く際は、必ず幾つかのコシャペロンと呼ばれる蛋白質と複合体を形成し動いている。さらに、Hsp90 阻害剤も近年注目されている薬剤であり、数種類存在する。その多くは、ゲルダマイシンの誘導体である。ゲルダマイシンは抗真菌薬のスクリーニングで見出されたベンゾキノンの低分子化合物であるが臨床試験において高い毒性が問題となっていた。我々は、Hsp90 阻害剤で毒性が低いとされているゲルダマイシン誘導体 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin-(17-AAG)が HCV の増殖抑制を示すことを見出すとともに、17-AAG による HCV 増殖抑制効果の作用機序を解明する。また、新規抗 HCV 薬としてのプロテアソーム阻害剤 MG132 の開発も検討した。

B. 研究方法

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

17-AAG による長期 HCV 抑制効果の検討では NNC#2 細胞を初回のみ、または 3 日毎に 17-AAG 処理した細胞から、HCV RNA を回収し、Real-Time PCR 法で HCV RNA の定量を行った。

17-AAG による HCV 増殖抑制への作用機序を解明す

るため、NNC#2 細胞を 17-AAG で処理し、全タンパク質を回収し、Hsp90 およびその他のコファクターおよびウイルスタンパク質をウエスタンブロット法で解析した。

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

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

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

17-AAG および MG132 による HCV 増殖抑制効果の検討は NNC#2 細胞を両阻害剤で処理した後、HCV RNA を回収し Real-Time PCR 法にて HCV RNA の定量を行った。また、阻害剤処理時における細胞障害性の解析は MTS assay 法で行った。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

17-AAG による HCV 増殖抑制効果の検討ではレプリコン細胞（NNC#2）を用いて行ったところ、細胞毒性を示さない 50nM 17-AAG で 99%の HCV 増殖抑制効果を示し、IC₅₀は 0.3nM であった。また 17-AAG、

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

つぎに、HCV NS3 の活性化における Hsp90 の機能を明らかにする為に pFlag-NS3 を 293T 細胞に導入し、17-AAG の存在また非存在下で反応を行った。17-AAG 存在下では NS3 の発現は著しく減少した。また、pFlag-NS3 を用い Hsp90 との相互作用の検討を免疫沈降法で確認したところ、NS3 に Hsp90 の両 α と β サブユニットとも相互作用しており、NS3 の全長 Helicase 領域にのみ Hsp90 が結合していることを明らかにした。一方、NS3 に対する Hsp90 依存的な安定性の検討では、Hsp90 と結合するタンパク質のみ、減少が見られた。最後に 17-AAG と MG132 を NNC#2 細胞に併用処理を行った結果、NNC#2 細胞に細胞障害性はほぼ見られず、単剤時には約 20% まで複製が低下するが、併用時にはさらに高い 10% 以下まで複製が阻害されることを明らかにした。また、相乗効果を示す Combination index (CI) を算出した結果 $CI=0.42$ となり $CI<1$ となったため相乗効果が得られるという結果となった。

D. 考察

Hsp90 阻害剤 17-AAG は腫瘍細胞に対して高い親和性をもつことが知られており、Hsp90 に依存するクライアント腫瘍タンパク質に対して高い親和性を示した。17-AAG は細胞毒性も低く、臨床試験においてその効果が期待されている。本研究では 15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG でレプリコン細胞 (NNC#2) を処理した際には長期抑制効果を示し、薬剤耐性ウイルスの出現も見られなかった。また、 IC_{50} は 0.3nM であった。つぎに、HCV core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質の中で最も 17-AAG 処理でタンパク質の発現が減少していた NS3 と Hsp90 の相互作用を検討した結果、NS3 と Hsp90 は相互作用していることが明らかとなった。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いてプロテアソームの分解機能を阻害したところ、NS3 は 17-AAG で処理した細胞でもタンパク質発現は減少しない結果が得られた。これらの結果から Hsp90 が阻害されると NS3 はプロテアソームで分解されることが分かった。また、NS3 helicase 領域と protease 領域の欠損変異体を作成しそれぞれ Hsp90 との相互作用を検討すると、全長の NS3 helicase 領域のみ Hsp90 との相互作用が確認されたため、Hsp90 と NS3 の相互作用は NS3 helicase 領域を経て起こることが明らかとなった。一方、Hsp90 とプロテアソームを阻害すると NNC#2 細胞ではほぼ細胞毒性は無く、単剤時に比べ併用では高い抑制効果を示し、CI 値が 0.42 を示したことから 17-AAG と MG132 の併用処理は相乗効果があり、高いウイルス複製阻害効果があることを解明した。

E. 結論

Hsp90 阻害剤である 17-AAG は HCV の増殖抑制効果があり、HCV の複製には Hsp90 が NS3 と相互作用し安定化させることが必須である。また、17-AAG はプロテアソーム阻害剤 MG132 と併用することで高いウイルス複製阻害効果を示し相乗効果があることを明らかにした。また、両 17-AAG と MG132 剤はすでに米国で癌の臨床治験に用いられている事からも HCV に対しても治験の可能性に期待が持てる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, and Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with

heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. *Antivir Chem Chemother.* 20:161-167, 2010.

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

3. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, and Katahira M. Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J.* 28: 440-451, 2009.

4. Suzuki H, Matsumoto N, Suzuki T, Chang MO, and Takaku H. Stable replication of the EBNA1/OriP-mediated baculovirus vector and its application to anti-HCV gene therapy. *Virology J.* 6:156, 2009.

5. Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y, Sugawara T, Okabe N. (2009) HIV/AIDS Acquisition and Transmission in Bangladesh: Turning to the Concentrated Epidemic. *Jpn J Infect Dis.*, 62, 111-119.

6. Barnor J S, Habu Y, Yamamoto N, Miyano-Kurosaki, Nishikawa H, Yamamoto N, and Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA. *Antiviral Res.* 83:156-164, 2009.

7. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, and Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol.* 83:6922-6928, 2009.

8. Mondal NI, Takaku H, and Ohkusa Y. Impact of age at marriage and migration on HIV and AIDS epidemics in Japan. *Int J Equity Health.* 8:23, 2009.

9. Sugiyama R, Habu Y, Ohnari A, Miyano-Kurosaki N, and Takaku H. RNA interference targeted to the conserved dimerization initiation site (DIS) of HIV-1 restricts virus escape mutation. *J Biochem.* 146:481-489, 2009.

9. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, and Katahira M. Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity. *Nucleic Acids Symp Ser.* 53:87-88, 2009.

11. Suzuki H, Saitoh H, Suzuki T, and Takaku H. Baculovirus-mediated bispecific short-hairpin small-interfering RNAs Have remarkable ability to cope with both influenza viruses A and B. *Oligonucleotides.* 19:307-316, 2009.

12. Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO, and Takaku

H. Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus vector-mediated short-hairpin RNA expression. *FEBS Lett.* 582:3085-3089, 2008.

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

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

15. Suzuki H, Kaneko H, Tamai N, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, and Takaku H. Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 26, 815-820, 2007.

2.学会発表

国内

1. 清水裕子、日紫喜隆行、小川和也、椎名律子、飛田怜里、舟見健児、山本祐美、高久 洋、杉山和夫、下遠野邦忠： C 型肝炎ウイルス粒子の感染性とリポ蛋白質 第 57 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

2. 日紫喜隆行、飛田怜里、清水裕子、小川和也、舟見健児、山本祐美、椎名律子、高久 洋、杉山和夫、下遠野邦忠： HCV のウイルス粒子産生における VLDL およびアポリポ蛋白質の機能解析 第 57 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

3. 宇治野真之、山口紗央莉、日紫喜隆行、下遠野邦忠、高久 洋： C 型肝炎ウイルスの翻訳における Hsp90 の役割 第 57 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

4. 杉山和夫、中澤貴秀、齊藤 聡、飛田怜里、清水裕子、小川和也、日紫喜隆行、舟見健児、高久 洋、下遠野邦忠： C 型肝炎ウイルス欠損ゲノムの遺伝子解析とその感染性 第 57 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

5. 鈴木等、君塚圭亮、日紫喜隆行、下遠野邦、高久洋： C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白質による肝星細胞 (LI90 細胞) 活性化の検討。第 57 回日本ウ

ウイルス学会 東京(2009.10)

6. 飛田怜里、日紫喜隆行、清水裕子、小川和也、舟見健児、山本祐美、椎名律子、宮成悠介、杉山和夫、高久 洋、下遠野邦忠： HCV のウイルス粒子の感染性に関わるアポリポたんぱく質 E の機能解析 第 57 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

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

国外

8. 高久 洋、西部好美、金子央賢、浜野隆一、橋本香保子、松浦善治：バキュロウイルスによる肝硬変の改善 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜(2007.10)

9. 宇治野真之、山口沙央莉、海老原由佳、下遠野邦忠、高久洋：宿主因子を標的とした新規 HCV 剤候補の検討。第 55 回日本ウイルス学会 札幌 (2007.10)

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

2. Suzuki H., Tmai N., Shimotohno K., Matsuura Y. and Takaku H.: Suppression of HCV RNA Replication

by Baculovirus-mediated shRNA Expression Vectors, 21th International Conference on Antiviral Research. Quebec, Canada (2008.4) pp.A49.

3. Ujino S, Yamaguchi S, Tobita R, Miyano-Kurosaki N, Shimotohono K, and Takaku H. Inhibition of Hsp90 and the proteasome promoters hepatitis C virus genome suppression. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, Scotland UK (2007)pp206.

4. Ujino S., Yamaguchi S., Shimotohno K., and Takaku H.: Interference of Hsp90 activity by Hsp90 inhibitor suppresses hepatitis C virus (HCV) replication. HEP DART 2007 (frontiers in drug development for viral hepatitis), Maui, Hawaii (2007.12)pp37

5. Takaku H.: Hsp90 inhibitors as novel HCV chemotherapeutic agents. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy (The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation), Jeju, Korea (2007.12)

6. Ujino S., Shimotohno K., and Takaku H.: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, suppress hepatitis C virus (HCV) replication. 20th International Conference on Antiviral Research. California, USA (2007.4-5)pp62

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願 なし

2.特許取得 なし

ウイルス複製に加えて細胞の増殖を制御する細胞側因子の解明と機能解析

研究分担者 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は長期間の持続感染の後に高率に肝細胞がんを引き起こす。細胞がん化の前提として細胞の不死化・アポトーシス抵抗性の獲得があげられるが、一方、HCV 持続感染に伴って肝細胞障害・細胞死も観察される。HCV 感染に伴う肝細胞死は主に HCV 特異的細胞傷害性 T リンパ球を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきた。一方、ウイルス感染においては、細胞変性効果とよばれるウイルスによる直接の細胞障害が引き起こされることもしばしば観察される。本研究では、HCV 感染培養細胞系を用いて、HCV による細胞死及び細胞がん化に関連する細胞内事象について検討した。その結果、まず、HCV 感染 4 日後には、細胞の小型円形化を伴う細胞死が認められた。その細胞死は、Bax の活性化とミトコンドリアへの蓄積、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアからの cytochrome c の放出及び、それに引き続く caspase-3 の活性化と細胞 DNA の断片化を伴うことから、ミトコンドリア介在性アポトーシスによるものと考えられた。また、HCV 感染 2 日後から 8 日後まで、JNK のリン酸化（活性化）と、基質である c-Jun の顕著なリン酸化が観察された。JNK 阻害剤 SP600125 で処理することにより、HCV 感染による Bax の活性化は認められなくなった。また、JNK の活性化は ROS 阻害剤 *N*-acetyl cystein で処理することにより認められなくなった。これらの結果より、HCV 感染は、ROS の過剰産生を介して JNK を活性化し、それが Bax を活性化して、ミトコンドリア介在性アポトーシスを誘導すると考えられた。さらに、HCV コアタンパク質は、それ自身が持つ BH3 類似ドメインを介して Mcl-1 の抗アポトーシス活性を抑制することによって、ミトコンドリア介在性アポトーシスを増強する可能性が示唆された。一方、HCV 感染 1 週間以上経過した慢性持続感染期には、ERK1/2 の活性化によるアポトーシス抵抗性ならびに Rb がん抑制タンパク質蓄積阻害を介した細胞周期脱制御により、細胞がん化を誘導する可能性が示唆された。また、HCV 持続感染細胞では核小体の肥大が認められた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は長期間の持続感染により、慢性肝炎、肝硬変の原因となり、高率に肝細胞がんを引き起こす。肝細胞がんの発生には細胞の不死化が前提となるが、一方、HCV 持続感染に伴って、慢性炎症と肝細胞障害・細胞死

がほぼ例外なく観察される。

HCV 感染に伴う肝細胞死はアポトーシスが主体であり、HCV 特異的細胞傷害性 T リンパ球を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきた。一方、ウイルス感染においては、細胞変性効果（cytopathic effect; CPE）とよばれるウイルス

による直接の細胞障害が引き起こされることもしばしば観察される。CPE の分子機序として、ミトコンドリア障害や小胞体 (ER) ストレスの関与が示唆されている。近年、HCV タンパク質 (Core、E1、NS3/4A、NS5A、NS5B) がアポトーシスを誘導することも報告されている。我々はこれまでに、NS4A や NS3/4A 複合体が ER のみならずミトコンドリアにも局在し、ミトコンドリア経路を介した細胞障害を誘導することを報告した。

本研究では、近年開発された HCV J6/JFH-1 株及びその変異株とヒト肝がん由来 Huh-7.5 細胞を用いて、HCV による細胞死の有無とその分子機序について検討するとともに、感染の持続に伴って宿主細胞が細胞死に抵抗して生存し、がん化形質獲得に向けてどのように変化するかについて、その分子機序を含めて解析した。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス：細胞はヒト肝がん由来の Huh-7.5 細胞を、ウイルスは HCV J6/JFH1-P1 株、P47 株とその変異株を用いた。変異株は、リバーシジェネティクス法により、HCV コアタンパク質の BH3 類似ドメインに変異を導入したものをを用いた。

(2) アポトーシスの解析：アポトーシスの程度は、WST-1 法による細胞死の定量、Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche) による DNA 断片化、Caspase-Glo 3/7 and 9 Assay (Promega) を用いた caspase-3 活性の定量、及び caspase-3 の基質である PARP の切断により測定した。

(3) ミトコンドリアの解析：ミトコンドリア膜電位は green fluorochrome rhodamine-123 (Sigma) を用いて FACS 解析により測定した。形態学的解析は MitoTracker (Molecular Probes) を用いた光学顕微鏡解析及び電子顕微鏡解析によった。ミトコンドリア superoxide の産生は MitoSOX™ Red (Molecular Probes) を用いて測定した。

(4) ER ストレス:GRP78 の誘導を指標にした。

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

(6) 様々なシグナル伝達経路の解析：c-Jun N terminal kinase (JNK)、ERK、p38MAP kinase については、それぞれのリン酸化抗体を用いた免疫ブロット法により、その活性化の程度を調べた。また、それぞれのキナーゼの阻害剤を用いて、下流のシグナル伝達にどのような影響を及ぼすかについて解析した。

(7) 免疫染色法及び免疫ブロット法：HCV 抗原の検出には HCV 感染患者血清 (予め高力価を確認済) 及び市販の抗 NS3 抗体、抗 NS5A 抗体を用いた。Bax、活性化 Bax、JNK、リン酸化 JNK、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、p38、リン酸化 p38 に対する抗体は市販のものをを用いた。免疫染色法及び免疫ブロット法は定法により行った。(倫理面への配慮)

遺伝子組換え HCV を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得て行った。

C. 研究結果

(1) HCV 一段増殖実験系の確立：ウイルス感染後におこる細胞内事象を経時的に解析するためには、ウイルス感染を同調させる必要がある。そのためには multiplicity of infection (m.o.i.) = 2 の条件をかなえる必要がある。そのため、高感染価の HCV J6/JFH-1 P-47 株と Huh-7.5 細胞を用いた培養細胞感染実験系を用いて、m.o.i. = 2 でほぼすべての細胞に HCV を感染させ、感染 2 日後にはウイルス増殖がピークに達する HCV 一段増殖感染実験系を確立した。

(2) HCV 急性感染期におけるミトコンドリア介在性 caspase-3 依存性アポトーシスの誘導：感染後 4 日及び 6 日目に細胞の小型円形化を伴う細胞死が認められた。感染後 6 日目の生細胞数は非感染細胞数の約半数であった。感染後 4 日及び 6

日目の細胞 DNA 断片化の量は非感染細胞のそれぞれ 2.6 倍、5.2 倍であった。caspase-3 の活性は、感染後 4 日及び 6 日目で、非感染細胞の 4.1 倍及び 5.9 倍に増加した。また、感染後 6 日目に、caspase-3 の基質である PARP の切断が確認された。同じ時期に、Bax の活性化とミトコンドリア外膜への蓄積及びミトコンドリアにおける superoxide の産生が観察された。また、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質への cytochrome *c* の放出が認められた。ミトコンドリアの膨化等の形態変化も観察された。一方、本実験系では HCV 感染による ER ストレス誘導は認めなかった。

(3) HCV 急性感染期における Bax 活性化の機序：HCV 感染 2 日後から 8 日後まで、JNK のリン酸化と、基質である c-Jun の顕著なリン酸化が観察された。これらの結果は、JNK が活性化されていることを示している。そこで、JNK 阻害剤である SP600125 で HCV 感染細胞を処理すると、JNK 及び c-Jun のリン酸化が阻害され、同時に Bax の活性化とミトコンドリアへの移行も阻害された。JNK は活性酸素種 (ROS) の過剰産生により活性化されることが知られている。そこで、抗酸化剤である *N*-acetyl cystein (NAC) で処理すると、JNK 及び Bax の活性化はいずれも見られなくなった。一方、p38 MAP キナーゼは、HCV 感染 2 日後に対照細胞に比べて明らかなリン酸化 (活性化) を示したが、4 日後以降は対照細胞と比べて有意なリン酸化の亢進を示さなくなった。以上の結果から、HCV 感染において、ROS の過剰産生により JNK が活性化され、それが Bax 活性化を引き起こす可能性が示唆された。そして、この Bax 活性化が HCV によるミトコンドリア介在性アポトーシスを引き起こすと考えられた。

(4) HCV 介在性アポトーシスにおけるコアタンパク質の役割：HCV コアタンパク質のアミノ酸配列内に、Bcl-2 ファミリーに共通し、アポトーシス誘導に必須の BH3 ドメインに類似の配列を見出した (aa 119~126)。BH3 ドメインは抗ア

ポトーシス活性を有する Mcl-1 に結合し、その抗アポトーシス活性を阻害することが知られている。そこで、この BH3 類似ドメインにある 3 カ所の疎水性残基 (h2-h4) のいずれかひとつを Ala に置換すると、コアタンパク質のアポトーシス誘導活性とウイルス複製能はいずれも著しく低下した。119 位の疎水性残基 (h2) は BH3 ドメインでは Leu である。コアタンパク質では、HCV-1b では Leu で、HCV-2a では Val であるので、HCV-2a J6/JFH1 P-47 株のこの部位を Leu に置換した。その結果、アポトーシス誘導活性とウイルス複製能はいずれも増強し、培養液中への感染性遊離ウイルスの放出も増加した。同時に、この変異ウイルスでは、コアタンパク質と Mcl-1 の結合が増強することがわかった。以上の結果から、HCV コアタンパク質はアポトーシス誘導、ウイルス複製、感染性ウイルス粒子産生に関与し、なかでも、BH3 類似ドメインが、抗アポトーシスタンパク質である Mcl-1 との相互作用を介して、ミトコンドリア介在性アポトーシスの増強に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(5) HCV 持続感染期における核小体肥大及びその後の HCV 排除に伴う核小体サイズの回復：HCV 感染 7 日目頃から核小体の肥大が観察されるようになり、感染 10~14 日後で最も明瞭になった。そこで、感染 13 日後からインターフェロン (IFN; 1,000 IU/ml) 処理を行ったところ、10 日後 (感染 23 日後) には HCV 抗原は少数の一部の細胞を除いて、ほとんど検出されなくなった。このような HCV 排除細胞では、核小体の大きさは非感染細胞と同程度に回復した。

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

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

D. 考察

HCV を Huh-7.5 細胞に感染させると、感染 2 日後には 90%以上の細胞が HCV 陽性を示し、少なくとも 3 週間以上にわたって HCV の持続感染が認められた。急性期である感染 4 日後には細胞の小型円形化が認められ、HCV が直接的に細胞死を誘導することがわかった。この細胞死は、ミトコンドリアへの活性化 Bax の蓄積、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出、及び、caspase-3 の活性化を伴っていた。従って、HCV は急性感染期に、Bax 誘導性ミトコンドリア介在性 caspase-3 依存性アポトーシスを引き起こすと考えられた。また、HCV 感染 2 日後から 8 日後まで、JNK のリン酸化（活性化）と、基質である c-Jun の顕著なリン酸化が観察された。JNK 阻害剤 SP600125 で処理することにより、HCV 感染による Bax の活性化は認められなくなった。また、JNK の活性化は ROS 阻害剤 NAC で処理することにより認められなくなった。これらの結果より、HCV 感染は、ROS の過剰産生を介して JNK を活性化し、それが Bax を活性化して、ミトコンドリア介在性アポトーシスを誘導すると考えられた。また、HCV コアタンパク質は、それ自身が持つ BH3 類似ドメインを介して Mcl-1 の抗アポトーシス活性を抑制することによって、ミトコンドリア介在性アポトーシスを増強する可能性が示唆された。

一方、HCV 感染後 2～3 週間経過した持続感染期には、感染細胞の caspase-3 活性が低下し、HCV によるアポトーシスに対して抵抗性が認められた。そして、HCV 感染細胞の核小体の肥大も観察された。アポトーシス抵抗性は細胞がん化

に不可欠の事象であり、また、核小体の肥大は病理学的にがん細胞の指標の一つと考えられている。そこで、アポトーシス抵抗性や細胞がん化に関連する宿主因子の発現や機能に対する HCV 感染の影響について検討した。その結果、HCV 持続感染により ERK1/2 のリン酸化が増加する（活性化される）ことが明らかになった。ERK1/2 は細胞増殖促進やアポトーシス抵抗性に重要な役割を果たすことが知られている。HCV 感染初期（～3 日後）には非感染対照に比べて有意な ERK1/2 のリン酸化（活性化）は見られなかったが、持続感染期には有意の ERK1/2 リン酸化の亢進が認められた。この ERK1/2 活性化によるアポトーシス抵抗性の誘導が HCV 持続感染の成立に関与している可能性が示唆された。

また、非感染細胞では培養日数の増加とともに Rb がん抑制タンパク質の蓄積が増加したが、HCV 感染細胞ではほとんど増加は認められなかった。Rb がん抑制タンパク質は E2F 転写因子との結合・解離を介して細胞周期を制御することが知られている。従って、本研究結果は、HCV 持続感染により細胞周期が脱制御される可能性を示唆していると考えられた。

E. 結論

HCV は急性感染期に ROS の過剰産生を介して JNK を活性化し、Bax 誘導性ミトコンドリア介在性アポトーシスを引き起こすことがわかった。また、慢性持続感染期には、核小体肥大、ERK1/2 活性化及び Rb がん抑制タンパク質蓄積阻害を引き起こし、これらによるアポトーシス抵抗性や細胞周期脱制御を介して細胞がん化を誘導する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表（主なもの）

1. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, and Hotta H. Hepatitis C virus infection induces

- apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol.* 82(21): 10375-10385, 2008.
2. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, 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 Virol.* 89(5): 1231-1242, 2008.
 3. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, and Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48(1): 38-47, 2008.
 4. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, and Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J Gen Virol.* 90(7), 1681-1691, 2009.
 5. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, and Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J Virol.* 83(19): 9993-10006, 2009.
 6. 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.* 50: 883-894, 2009.
 7. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, and Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 83(18): 9237-9246, 2009.
 8. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, and Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem.* 106(6): 1123-1135, 2009.
2. 学会発表
 1. Deng L, Nagano-Fujii M, Kitayama K, An C, Bungyoku Y, and Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis via a mitochondrial-related caspase pathway. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Glasgow, UK, September 9-13, 2007.
 2. Bungyoku Y, Kitayama K, Nagano-Fujii M, and Hotta H. Analysis of adaptive mutants of the J6/JFH-1 strain of hepatitis C virus genotype 2a. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Glasgow, UK, September 9-13, 2007.
 3. Kitayama K, Bungyoku Y, Deng L, An C, Nagano-Fujii M, and Hotta H. HCV with high replication/release capacity in Huh-7.5 cell cultures obtained by a simple, rapid method exhibits two distinct types of cytopathic effect. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Glasgow, UK, September 9-13, 2007.
 4. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, and Hotta H. HCV infection induces

- Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas, USA, October 5-9, 2008.
5. Hotta H, Kitayama K, Yabuki R, Deng L, Nagano-Fujii M, and 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. San Antonio, Texas, USA, October 5-9, 2008.
 6. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, October 3-7, 2009.
 7. Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, October 3-7, 2009.
 8. Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, October 3-7, 2009.
 9. Lin Deng, 長野基子, 北山喜久美, 安春英, 分玉泰彰, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による細胞変性効果の分子機序の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.
 10. 分玉泰彰, 北山喜久美, 長野基子, 堀田博. 長期間培養により得られた増殖適応変異を有するC型肝炎ウイルス(HCV)の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.
 11. 北山喜久美, 分玉泰彰, Deng Lin, 安春英, 長野基子, 堀田博. 高感染力価のHCV J6/JFH-1株の産生とウイルス細胞変性効果(CPE)の解析 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.
 12. Lin Deng, 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.
 13. 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.
 14. Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるBax活性化の分子機序の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 15. 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子hnRNP H1/H2/Fの役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 16. 井出良浩, 兼田崇作, 犬伏祥子, 足達哲也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるインスリン抵抗性誘導の分子機序について. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 17. 兼田崇作, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. グルコーストランスポーターGLUT2の転写制御に及ぼすC型肝炎ウイルスの影響. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

術集会,東京,2009.

18. 林田和美,足達哲也,Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス増殖に及ぼすエストロジオールの影響に関する検討. 第57回日本ウイルス学会学術集会,東京,2009.
19. 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
20. 山下亮輔, 福田浩一郎, 犬伏祥子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治, Lin Deng, 井出良浩, 堀田博, 勝二郁夫. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性調節因子 E6AP 及び PA28 γ の相互作用解析. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
21. 井出良浩, 上城博宣, 前防達也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質と相互作用する細胞性キナーゼの解析. 第32回日本分子生物学会年会,横浜,2009.

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（総合）研究報告書

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

研究分担者 加藤 宣之

岡山大学 教授

研究要旨：本研究においては、（１）C型肝炎ウイルス（HCV）の増殖制御に関与する宿主因子の解析と（２）HCVの持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析を行い、以下のような成果を得た。（１）HCV Coreに会合してHCVゲノムの複製を支持するRNAヘリケース分子 DDX3を見出した。DNA損傷センサーである ataxia-telangiectasia mutated kinase（ATM）と checkpoint kinase 2（Chk2）がHCVゲノムの複製に必要であることを見出し、それらがHCV NS5Bと相互作用を示すことを明らかにした。HCV-JFH1株を用いたHCV感染増殖システムにより小胞輸送に関与するESCRT（Endosomal Sorting Complex Required for Transport）関連因子TSG101、Alix、Vps4BおよびCHMP4bがHCV粒子産生に必要な宿主因子であることを見出し、HCV CoreがESCRT関連因子と相互作用することを明らかにした。（２）全長HCVゲノム複製細胞（O細胞）を1年間培養することにより発現レベルが2倍以上亢進、或は1/2以下に低下する遺伝子群を抽出した。発現が亢進するグループで注目されたメタロチオネインのノックダウン細胞を作成してHCVゲノムの複製効率に与える影響を解析した。その結果、メタロチオネイン1Eと2AがHCVゲノムの複製効率に影響を与えていることが分った。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その8割にはC型肝炎ウイルス（HCV）の感染が認められている。肝がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、現時点で最も有効なペグインターフェロン（ペグIFN）とリバビリンとの併用療法によっても、なお、半数の患者ではHCVを体内から排除できない状況が続いている。

HCVキャリアーの体内からHCVを排除することがHCV感染症による犠牲者の

激減をもたらすものと予想されるが、画期的な治療法の開発が遅れている。その背景にはHCVの増殖機構の理解が不足していることが挙げられる。従って、HCVの増殖機構全体を解明する必要がある。そして、HCVの増殖を効率的に抑制できる人為的制御法の実用化が必要である。

さらには、HCVの持続感染により生じる宿主細胞の機能変化を明らかにして、発がんを抑制する人為的方法を開発することも必要である。本研究ではこれらの点を解決することを目指して、

（１）HCV増殖制御に関与する宿主因子の解析と（２）HCVの持続的増殖により

機能変化する宿主因子の解析の2項目について以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

1. DDX3 関係

HCV-O 株由来の Core の発現ベクターを 293T 細胞に導入して Conforcal laser scanning microscopy によりその細胞内局在を調べた。細胞を抗 Core 抗体や抗 DDX3 抗体で処理後、Core は Cy3、DDX3 は fluorescein isothiocyanate により可視化した。

HCV-O 株由来 Core の発現ベクターと HA タグを有する DDX3 の発現ベクターを 293T 細胞に導入後、細胞抽出物について抗 HA 抗体による免疫沈降実験を行った。

レンチウイルスベクター内に DDX3 に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードする配列を導入し (pLV-shRNA)、pVSV-G packaging construct とともに 293FT 細胞に導入した。得られたレンチウイルスを O 細胞、sO 細胞や RSc 細胞に感染させ、それぞれの細胞において DDX3 ノックダウン細胞を作成した。抗 DDX3 抗体を用いた Western blot 解析によりノックダウンされていることを確認した。

LightCycler を用いた HCV ゲノムの定量や各種抗体を用いた Western blot 解析はこれまでに報告されている常法に従った。

2. ATM および Chk2 関係

DNA 損傷センサー ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM)、ATM- and Rad3-related kinase (ATR)、checkpoint kinase 2 (Chk2) および poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) をノックダウンさせた全長 HCV ゲノム複製細胞株 (遺伝子型 1b の O 株由来の HCV RNA が複製している O 細胞) 及びレプリコン複製細胞株 (O 株由来のレプリコン RNA が複製している sO 細胞) の作成は、前項で述べた方法に準じて行った。また、HCV ゲノムを IFN 処理により排除した RSc 細胞 (治癒細胞) についても、それぞれの宿主因子のノックダウン細胞を作成した。

適応変異 (K1609E) が挿入された O 株由来の全長 HCV RNA (ON/C-5B/KE RNA) を導入した細胞を用いたコロニー形成能を調べるアッセイは、これまでに報告されている常法に従った。

ATM などの上記遺伝子がノックダウンされた治癒細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染4日目の細胞内の HCV ゲノムの複製レベルを定量的 RT-PCR 法により、また培養上清中の HCV Core については ELISA 法で定量した。

ATM キナーゼ阻害剤 (2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) を全長 HCV ゲノム複製細胞 (O 細胞やルシフェラーゼアッセイが可能な OR6 細胞) に作用させ、その抗 HCV 活性を評価した。

ATM 或は Chk2 と HCV NS5B との相互作用については以下の方法により調べた。O 細胞を 0.5% NP-40 を含む lysis

buffer で可溶化させ、抗 ATM 抗体、抗 Chk2 抗体および抗 NS5B 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を Western blot 法により解析した。HCV NS5B、FLAG タグを有する ATM (FLAG-ATM) 或は HA タグを有する Chk2 (HA-Chk2) 発現ベクターを 293FT 細胞に導入して、抗 FLAG 抗体あるいは抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を Western blot 解析により解析した。HCV NS5B と FLAG-ATM あるいは HA-Chk2 を 293FT 細胞に共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡によりそれらの細胞内局在を観察した。細胞を抗 ATM 抗体、抗 HA 抗体や抗 NS5B 抗体で処理後、NS5B は Cy3、FLAG-ATM や HA-Chk2 は fluorescein isothiocyanat により可視化した。

3. ESCRT 関連因子関係

ESCRT 関連因子 TSG101、Alix、Vps4B 或は CHMP4b のノックダウン細胞の作成並びに HCV 感染実験は前々項と前項で述べた方法に準じて行った。

ESCRT 関連因子 と Core や NS5A との相互作用や各種因子の細胞内局在についても前項で述べた方法に準じて行った。Myc タグを有する TSG101 (Myc-TSG101)、FLAG タグを有する Alix (FLAG-Alix)、Vps4B (FLAG-Vps4B) および CHMP4b (FLAG-CHMP4b) 発現ベクターを作成して解析に使用した。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析

O 細胞, O1 細胞 (O 細胞を 1 年間継代培養した細胞), Oc 細胞および Oc1 細胞 (Oc 細胞を 1 年間継代培養した細胞)

細胞) を同じ培養条件下で継代培養した。それぞれの細胞より RNA を抽出し、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子) による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

メタロチオネインのノックダウン細胞の作成は、各種メタロチオネインに共通するヌクレオチド配列を 5 種類選定し、Oc 細胞を用いて前項で述べた方法に準じて行った。

2 年間培養した全長 HCV ゲノム複製細胞 (O2 細胞) から total RNA を調製し、メタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A など) の発現量を RT-PCR 法により調べ、樹立時の細胞 (O と Oc) や 1 年間培養した細胞 (O1 と O1c) における発現量と比較した。

G418 耐性コロニーの形成効率を調べる定性的アッセイ (ECF アッセイ) は細胞にエレクトロポレーション法により全長 HCV ゲノム (ON/C-5B/KE RNA) を導入し、G418 存在下で約 3 週間培養することにより出現してくるコロニー数を測定することにより評価した。

(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。そのために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) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

1. DDX3 関係

HCV Core に結合することが知られている RNA ヘリケース分子 DDX3 が HCV ゲノムの複製効率に影響を及ぼすかどうかを検討した。最初に、我々が使用している HCV ゲノム複製細胞を用いて、細胞染色法と免疫沈降法で検討したところ、HCV-O 株由来の Core と DDX3 の相互作用が確認された。次に、sO 細胞や O 細胞で DDX3 をノックダウンさせた場合に RNA 複製効率に影響が出るかどうかを検討した。その結果、O 細胞において DDX3 がノックダウンされると、HCV ゲノムの複製レベルが 10%以下に低下することを見出した。これとは対照的に sO 細胞における低下率は 50%程度であった。また、全長 HCV ゲノムを導入して G418 存在下でのコロニー形成能を測定する ECF アッセイにおいても、DDX3 をノックダウンさせた Oc 細胞では、著しくコロニー形成数が低下した。以上の結果から、DDX3 は全長 HCV ゲノムの複製効率を高める役割を担っていることが示唆された。

次に、HCV-JFH1 を用いた感染増殖系における DDX3 の影響を調べた。HCV-JFH1 の効率的な感染増殖を支持する細胞として我々が樹立した RSc 細胞株を用いて DDX3 のノックダウン細胞 (#3 と #7 の 2 クローン) を作成した。これらのクローン化細胞に HCV-JFH1 を感染させ、感染後 4 日目の細胞内 HCV ゲノム量と培養上清中の Core の量を定

量した。その結果、両クローン化細胞とも、細胞内の HCV ゲノムと Core の量が著しく低下していることが分った。これらの結果から、2a 遺伝子型の JFH1 株についても DDX3 は RNA 複製の効率を高める分子であることが示唆された。

2. ATM および Chk2 関係

HCV の複製増殖は細胞質内で起こることが分かっているが、これまでに HCV 感染や Core および NS3 の発現により、宿主ゲノムに二重鎖切断が誘導され、宿主ゲノムの不安定性が増すことが報告されている。我々も HCV の NS5B が発現したヒト不死化肝 PH5CH8 細胞では二重鎖切断を誘導する DNA 損傷に対して感受性が高まることを以前報告している。そこで、DNA 損傷センサーが HCV の複製にどのような影響を与えるのかを各種 DNA 損傷センサーのノックダウン細胞を用いて詳細に検討した。

その結果、以下に示すような点が新たに分った。全長 HCV ゲノム (O 株) とそのレプリコン RNA の複製レベルは、ATR や PARP-1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と同様、高い複製レベルが維持されていたが、ATM や Chk2 ノックダウン細胞においては顕著に複製レベルが抑制されていることが分った。また、全長 HCV ゲノム (O 株) を導入した Oc 細胞のコロニー形成能 (ECF アッセイ) を比較した結果、ATM や Chk2 ノックダウン細胞におけるコロニー形成能がコントロール細胞、ATR および PARP-1 ノックダウン細胞に比べ著しく抑制されていることが分った。HCV-JFH1 を ATM や Chk2 ノックダウン細

胞に感染させた場合においても、感染4日目の細胞内の HCV ゲノムの複製レベルと培養上清中の Core の量は顕著に減少していた。一方、ATM キナーゼ阻害

剤 (2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) を全長 HCV ゲノム複製細胞株である O 細胞や OR6 細胞に作用させると強い抗 HCV 活性が認められた (EC_{50} : 1.9 μ M)。さらに免疫沈降法により、内在性の ATM 或は Chk2 と NS5B が相互作用を示すことが分った。また、ATM や Chk2 と NS5B との細胞内局在が、核と細胞質との境界部分及び細胞質においてドット状に部分的に一致していることも判明した。

3. ESCRT 関連因子関係

HCV 粒子産生のために小胞輸送に関与する ESCRT 関連因子が係わっているかどうかを明らかにするために HCV-JFH1 感染増殖システムを用いて、以下に示す実験を行った。

ESCRT 関連因子である TSG101、Alix、Vps4B 或は CHMP4b をノックダウンさせた RSc 細胞を作成し、それぞれの細胞に HCV-JFH1 を感染させた。その結果、どの細胞内の HCV RNA の複製レベルもそれほど影響を受けなかったにも関わらず、培養上清中の Core の量が顕著に低下していることを見出した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて ESCRT 因子と Core の細胞内局在を観察した結果、Core が FLAG-CHMP4b と共局在すること、そして、Myc-TSG101、FLAG-Alix 或は FLAG-Vps4B とともに部分的に共局在していることが分かった。HCV-JFH1 を感染さ

せた RSc 細胞に CHMP4b-GFP を発現させても Core との部分的な共局在が観察され、HCV-JFH1 を感染させた RSc 細胞と Myc-TSG101、FLAG-Vps4B 或は FLAG-CHMP4b を各々発現させた 293FT 細胞ライゼートを用いた免疫沈降法により、Core と TSG101、Vps4B 或は CHMP4b との相互作用が確認された。これらの結果から、ESCRT 小胞輸送システムが HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化 する宿主因子の解析

O 細胞と O 細胞を1年間継代培養した O1 細胞および Oc 細胞と Oc 細胞を1年間継代培養した Oc1 細胞を cDNA マイクロアレイ解析により相互に比較した。

O 細胞と比較して O1 細胞で2倍以上発現量が上昇する61遺伝子のうち16遺伝子は Oc1 細胞でも Oc 細胞と比較して2倍以上発現量が上昇していたので、O1 細胞でのみ発現量が上昇する遺伝子として45個を抽出した。逆に O 細胞に比べて O1 細胞で1/2以下に発現量が低下する遺伝子は、217遺伝子確認されたが、そのうち、142遺伝子は Oc1 細胞においても Oc 細胞と比べて、1/2以下になっていたため、O1 細胞でのみ発現量が低下する遺伝子として69個を抽出した。これらの結果から、HCVゲノムの複製が長期間起こると、発現量に変動が生じる遺伝子が存在することが示唆された。

発現量に変動をきたす遺伝子群は特

定のグループに入るといふような傾向は特に認められなかったが、O1 細胞でのみ発現が上昇している遺伝子群 (45 遺伝子) の中にメタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A) が 5 種類含まれていることに注目した。メタロチオネインは肝臓での発現レベルが高いことが知られているので、発現上昇により HCV ゲノムの複製環境がさらに良くなっている可能性がある。従って、メタロチオネインの量が低下すると HCV ゲノムの複製効率が低下する現象を捕えられるのではないかと考えられた。そこでこの可能性を検証するために、メタロチオネインをノックダウンさせた Oc 細胞 (5 種類) を作成し、それらの細胞に全長 HCV ゲノムを導入して G418 存在下での ECF アッセイを行った。その結果、3 種類の細胞においては、メタロチオネインをノックダウンさせていないコントロール細胞と比較して生じるコロニー数が大幅に低下したが、残りの 2 種類では有意なコロニー数の減少は認められなかった。しかしながら、これらの細胞におけるメタロチオネイン遺伝子のノックダウン率はメタロチオネインの種類によりまちまちであったことから、再現性をとることも目的として、次に HCV ゲノムの複製への関与が示唆されたメタロチオネイン 1E と 2A に焦点を絞り、再度ノックダウン細胞 (mRNA 量が 80-90% 低下した) の作成を行った。これらの細胞に *in vitro* で合成した全長 HCV RNA (ON/C-5B/KE RNA) をエレクトロポレーションにより導入して G418 存

在下での ECF アッセイを行った。その結果、対照コントロールの Oc 細胞においては、数十個の G418 耐性コロニーが出現したが、ノックダウン細胞においては、わずか 2-3 個の G418 耐性コロニーしか得られなかった。これらの結果から再現性がある現象であることが分った。

D. 考察

(1) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

1. DDX3 関係

本研究では HCV ゲノムの複製効率に影響を与える新規宿主因子として DDX3 を見出した。ほぼ同時期に別の研究グループにより、HCV-JFH1 の感染増殖系に様々な遺伝子の siRNA を作用させて、HCV の複製に影響を与える分子の同定がなされた (Randall et al., PNAS 104:12884, 2007)。この論文において、最も大きな影響を与える分子として DDX3 が同定された。実験系が異なるにも関わらず、同じ宿主因子が同定されたことから、DDX3 は HCV の複製に重要な宿主因子であると考えられる。

2. ATM および Chk2 関係

HCV ゲノムの複製が細胞質で行われるために、HCV の複製増殖機構には DNA 損傷センサー関連分子の積極的な関与はないのではないかと予想されていたが、本研究により DNA 損傷センサー分子である ATM と Chk2 が RNA 複製の中心的役割を担い RNA polymerase 活性を有する NS5B と相互作用を示し HCV の複製効率を維持するために関与しているこ