

D. 考察

La protein は HCV 増殖及びテロメラーゼ活性と密接に関連していることが明らかとなった。C 型慢性肝炎肝組織では La protein は HCV 及びテロメラーゼ関連分子と複合体を形成している可能性が示唆され、細胞内局在に興味をもたれる。

E. 結論

La protein は HCV 増殖及びテロメラーゼ活性と密接に関連していることが明らかとなった。以上より La protein は HCV 増殖に対するターゲットになり得ることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 Jan 21. [Epub ahead of print]
2. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]
3. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]
4. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1098-112.
5. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):1012-24. [Epub 2008 Dec 6].
6. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2009 Jan;50(1):100-10. [Epub 2008 Oct 12].
7. Ootsuji H, Honda H, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. Altered Hepatic Gene Expression Profiles Associated with Myocardial Ischemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Feb 1;3(1):68-77. [Epub 2009 Dec 1]
8. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for IRES-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis* 2010 in press

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
特になし

HCVゲノム RNA 結合分子の探索とそのHCV治療薬への応用

研究分担者 原田 和雄 東京学芸大学 教授

研究要旨 本分担研究では、HCVゲノム RNA の5'-および3'-UTR中のRNA構造に強く結合する分子を同定し、HCV治療薬に応用することを目的としている。前研究期間は3'-UTR X-tailのSL2に結合する#3d001ペプチドを同定したが、期待された複製阻害活性は見られなかった。本研究は、まず、HCV IRESの中で翻訳開始において重要な役割を果たしているドメイン IIIのステム・ループ IIIe および IIIf を標的とした結合ペプチドのセレクションを行なった。その結果、細胞内検出系において結合活性を示すペプチドは同定できたものの、RNA 特異性は見られなかった。そこで、次に、ステム・ループ IIIf に結合する新規アンチセンス RNA ステム・ループのデザインを行ない、ゲル・シフト・アッセイの結果、期待される結合活性が見られた。さらに、HCV感染ヒト肝細胞にアンチセンス RNA ステム・ループを導入することにより、導入した RNA 量、および試験管内で見られた結合親和性に対応してウイルス RNA 量の低下が見られた。今後は、これらのアンチセンス RNA ステム・ループによるウイルス複製阻害について詳細に解析するとともに、その HCV 治療薬への応用について検討する。

A. 研究目的

本分担研究では、HCVゲノム RNA 5'-UTRのIRESおよび3'-UTR中のRNA構造に強く結合する分子をデザイン/同定し、HCV治療薬に応用することを目的としている。これまでに、本研究グループで開発したλNタンパク質のアンチターミネーション活性を利用したRNA結合性ペプチド検出系 (Peled-Zehavi et al., *RNA* 2003, 9:252-261) を用いて、3'-UTRのXtailステム・ループ2 (SL2) に結合する#5ペプチド、および、#5ペプチドを進化的改変し、より強くSL2に結合する#3d001ペプチドを同定した。これらのペプチドによるHCV RNA複製の抑制について、HCV subgenomic replicon RNAを用いた解析を行った。しかしながら、期待されたような複製の抑制は見られなかった。

HCV 5' UTRの内部リボソーム結合部位 (IRES) のドメイン IIIe, f領域はリボソーム40Sサブユニットとの結合に重要であり、高い保存性を示す (図1A)。この中で、IIIfはステム・ループ構造を有し、下流の一本鎖領域と pseudoknot 構造を形成すると考えられている (図1B)。Pseudoknot 形成を妨げる変異は著しく翻訳効率低下させ、再び Pseudoknot 構造を

restore する相補的な変異により効率は部分的にしか回復しない (Kieft et al., *RNA*, 2001)。このことから、pseudoknot 領域の配列と構造がいずれも翻訳活性において重要であることが分かった。以上のことから、HCVゲノム RNA の IIIf に相当するステム・ループ構造への結合により翻訳を阻害することにより、HCVの増殖を抑制することができる可能性がある。

本研究期間は、HCV IRES ドメイン IIIの中で、翻訳因子との結合において特に重要な役割を果たすと考えられるステム・ループ IIIe および IIIf に結合するペプチドの同定を試みた。これは、本研究グループで開発したλNタンパク質のアンチターミネーション活性を利用したRNA結合性ペプチド検出系 (Peled-Zehavi et al., *RNA* 2003, 9:252-261) を用いて行なった。また、当研究室では、RNA-タンパク質相互作用を阻害する新しい方法として、アンチセンス RNA ステム・ループの利用に着目し、U1Aタンパク質とU1 hpII RNAとの相互作用などをモデルとしてその有効性を示した (A. Yano et al., *Nucleic Acids Res.*, 2010)。そこで、このようなアンチセンス RNA ステム・ループによる IRES による翻訳の阻害

も試みた。

B. 研究方法

1) アンチターミネーション・システムを用いた HCV IRES IIIe および IIIf 結合ペプチドのスクリーニング。

標的 RNA である HCV IRES の IIIe, IIIf, および IIIef を持つカナマイシン耐性 pACK レポーター・プラスミドを作製し、N567 細胞に導入してエレクトロコンペtent細胞とした。ペプチド・ライブラリーは、ポリアルギニン 15 残基の各残基を「VVK コドン」(V=C, A, G; K=G, T)を用いてコドン単位で 50% の割合でドーピングした arginine-rich peptide library 2 (ARPL2) を pBR プラスミドに導入した。スクリーニングは、次の 5 段階で行った。(1) 一次セクション: pACK レポーター・プラスミドを含む N567 細胞にペプチド・ライブラリーをエレクトロポレーション法により導入し、得られた $\sim 10^7$ の形質転換体の中からカナマイシンを含むプレート上で生存した大腸菌を集菌し、ライブラリー・プラスミドを単離した。(2)、(3) 二次・三次セクション: 単離したライブラリーを再びレポーター細胞に導入し、カナマイシンを含むプレート上で生存するコロニーからライブラリー・プラスミドを単離した。(4) 四次スクリーニング: 単離したライブラリーを pAC(LacZ) レポーター細胞に導入し、X-gal を含むプレート上で青いコロニーからライブラリー・プラスミドを個別に単離した。(5) 特異性チェック: 四次スクリーニングにおいて陽性だったクローンの RNA 特異性を X-gal プレート上で β -ガラクトシダーゼ活性によって個別にテストした。

2) HCV IRES IIIe および IIIf 結合に結合するアンチセンス RNA ステム・ループのデザイン (図 2)

アンチセンス RNA SL 分子 IIIf-a0 は、HCV ゲノム RNA IIIf のループに相補的な 6 塩基をループにもつようにデザインした。IIIf-a1 は IIIf-a0 のループ根元に GA ミスマッチ塩基対を挿入した。IIIf-a2 は IIIf-a1 より 2 塩基多い 8 塩基の相補的な塩基をループに持つようにデザインした。IIIf-a1m は、IIIf-a1 のループ先端の塩基 CG を GC に置換した変異体で、IIIf-a1 の陰性コントロールとして作成した。同様に IIIf-a2m は、IIIf-a2 のループ先端の塩基 CG を GC に置換した変異体で、IIIf-a2 の陰性コントロールを目的として作成した。このようにデザインした当該アンチセン

ス RNA SL 分子は、RNA 二次構造予測プログラム (Mufold) によってステム・ループ構造をとるか確認した。

3) デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループの作製

アンチセンス RNA SL 分子は、T7 polymerase を用いた *in vitro* 転写法によって合成した。当該アンチセンス RNA SL 分子と相補的な DNA 配列に T7 promoter と相補的な配列を連結した鋳型 DNA を作製した。当該一本鎖鋳型 DNA (5 μ M) は、T7 promoter (7.5 μ M)、NaCl (100nM)、Tris-HCl (10nM) を含む溶液を 95°C で 5 分間熱変性させ室温まで戻すことで T7 promoter をアニーリングさせた。これを鋳型として T7 polymerase により転写し、当該アンチセンス RNA SL 分子を含む転写反応溶液を得た。転写反応溶液 [HEPES (1 \times), ポリエチレングリコール (PEG6000, 80mg/ml), GTP (8mM), UTP (8mM), ATP (4mM), CTP (4mM) MgCl₂ (42mM), template DNA (300nM)] を調製し、T7 ポリメラーゼ加えて 37°C で 2 時間インキュベーションした。転写反応溶液は EDTA を加え反応を停止させ、エタノール沈殿をして 8M 尿素 / 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。

使用した RNA の鋳型オリゴ DNA 配列:

III f :

5' -GGACGCACTCGCAAGCGTCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

III f-a0

5' -GGGAACCTGTGCGAGCAGGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

III f-a1

5' -GGGAACCTGTTGCGAGCCAGGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

III f-a2

5' -GGGAACCTGTTTTCGAGTCCAGGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

III f-a1m

5' -GGGAACCTGTTGGCAGCCAGGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

III f-a2m

5' -GGGAACCTGTTTTCGAGTCCAGGTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'

4) デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループの HCV IRES IIIf との結合

各 RNA 基質が 6 μ M になるように標的 RNA : アンチセンス RNA ステム・ループ = 1 : 1 のモル比になるよう RNA 基室溶液を調製した。95°C で 5 分間熱変性させ氷上で 5 分間急冷した。反応溶液に 4 \times PN バッファー [(40mM)、塩化ナトリウム (200mM)] を 1 \times になるように加え、37°C で 30 分間インキュベーションした。グリセロールを終濃度の 10% となるように添加

し、ゲル TBE (89mM トリス、89mM ホウ酸、2mMEDTA)、TBM (89mM トリス、89mM ホウ酸、0.1mM 塩化マグネシウム) の各ゲルに等分してアプライした。電気泳動は、一定温度 (特記以外 4°C)、200V で行った。電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターでバンドを可視化した (図 3)。

TBE ゲルはマグネシウムイオンを含まないため kissing はみられず、2本のバンドとして検出される。TBM ゲルでは、マグネシウムイオンの存在により、kissing 可能な条件になっている。

5) アンチセンス RNA ステム・ループによる HCV 産生阻害効果の評価

HCV 感染ヒト肝癌細胞 Huh-7 を 24-well 培養プレートに 100,000 cells/well 播種し、1 日後、TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio 社) を利用してアンチセンス RNA を細胞へ導入した。アンチセンス RNA 1 または 5 microg を、TransIT-mRNA Reagent / mRNA Boost Reagent / Opti-MEM と混和し、4 分間静置後、細胞へ添加した。3 日間培養後、細胞の全 RNA を TRIZOL reagent (Invitrogen 社) により調製した。全 RNA 量を測定し、TaqMan real-time RT-PCR (Applied Biosystems 社) により HCV RNA を定量測定した。

C. 研究結果

1) アンチターミネーション・システムを用いた HCV IRES IIIe および IIIf 結合ペプチドのスクリーニング。

HCV IRES の IIIe、IIIf、および IIIef を標的とした 3 種のセレクションを行ったところ、IIIe および IIIef の場合、陽性クローンの濃縮が見られた。IIIe を標的としたセレクションの場合、一次～三次セレクション、および四次スクリーニング後の形質転換体の生存率および青いコロニーの割合は、それぞれ、0.27、0.30、0.80、および 64% だった。同様に、IIIef を標的としたセレクションの場合、一次～三次セレクション、および四次スクリーニング後の形質転換体の生存率および青いコロニーの割合は、それぞれ、0.11、0.24、0.21、および 6.1% だった。しかしながら、第 5 段階の特異性テストを行ったところ、IIIef を標的として得られたクローンの場合、IIIef 以外の RNA を持つレポーターの場合にも活性が見られ、特異性を示さなかった。セレクションによる陽性ク

ローン濃縮率が特に高かった IIIe の場合について解析を進めた結果、結合活性は見られたものの、RNA 特異性は見られなかった。

2) デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループの HCV IRES IIIf との結合 (図 3)

標的 RNA IIIf とアンチセンス RNA を組み合わせてゲルシフトを行った。IIIf-a0、IIIf-a1、IIIf-a2 すべてにおいてバンドのシフトがみられたことから、デザインしたアンチセンス RNA ステム・ループは標的に結合した。また、IIIf-a1、IIIf-a2 については、バンドのシフトの度合いが大きいことから、GA ミスマッチ塩基対の効果が得られ、IIIf-a0 よりも強く結合した。特に、IIIf-a1 は IIIf-a2 より大きなシフトが確認された。シフトの度合いが大きかったこれら 2 つのアンチセンス RNA ステム・ループ IIIf-a1、IIIf-a2 に関して、ループ先端の 2 配列を変えた変異体 IIIf-a1m、IIIf-a2m 作製し、同法によるバンドのシフトを調べた。その結果、変異体では、標的 RNA との結合がみられなかったことから、IIIf-a1、IIIf-a2 は標的に対し特異的に結合することが示された。

3) アンチセンス RNA ステム・ループによる HCV 産生阻害効果の評価 (図 4)

IIIf-a1 の場合、HCV RNA 量の 70% 程度の低下が、IIIf-a2 の場合は 30% 程度の低下が見られ、試験管内アッセイでの標的 RNA との結合活性に対応する結果が見られた。また、IIIf-a1 および IIIf-a2 のループ変異を導入した IIIf-a1m および IIIf-a2m の場合は、予想される通り阻害活性は見られなかった。

E. 結論

本研究でデザインしたアンチセンス RNA ステム・ループは、HCV IRES のドメイン III に存在する SL IIIf に結合することにより、HCV IRES によるウイルス RNA の翻訳を阻害し、HCV ウイルスの複製を抑制することが示唆された。このアンチセンス RNA ステム・ループの最大の特徴は、HCV IRES の二次構造を標的とする点である。一般的な一本鎖 RNA からなるアンチセンス分子や siRNA は RNA 二次構造を標的としにくいとされている。RNA 二次構造を標的とするメリットとして二つ考えられる。まず、HCV の翻訳において重要な役割を果たす宿主やウイルス因子の働きを直接阻害するため、効果的な翻訳の抑制が期待される。次に、このような翻訳において重要な役割を果たす宿主やウイルス因子が結合する二次構造

は高い配列保存性を有し、耐性変異が生じ難いことが考えられることである。以上のことから、このため、このアンチセンス RNA ステム・ループは、RNA ウイルス性疾患等に対する医薬として有用であることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Zahed, T. Suzuki, A. Suganami, H. Sugiyama, K. Harada, M. Takiguchi, Y. Tamura, N. Suzuki "Screening of SMG7-binding peptides by combination of phage display and docking simulation analysis" *Protein & Peptide Letters*, **16**, 301-305 (2009).
2. S. Horiya, M. Inaba, C.-S. Kou, H. Uehara, N. Masui, M. Mizuguchi, M. Ishibashi, S. Matsufuji and K. Harada* "Replacement of the I boxB RNA-N peptide with heterologous RNA-peptide interactions relaxes the strict

spacial requirements for the formation of a transcription antitermination complex" *Molecular Microbiology*, **74**, 85-97 (2009).

3. Yano, S. Horiya, T. Minami, E. Haneda, M. Ikeda, and K. Harada* "Identification of antisense RNA stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system" *Nucleic Acids Research*, Feb. 15 (Epub ahead of print) (2010).

G. 知的財産の出願・登録状況

新規アンチセンス RNA ステム・ループ

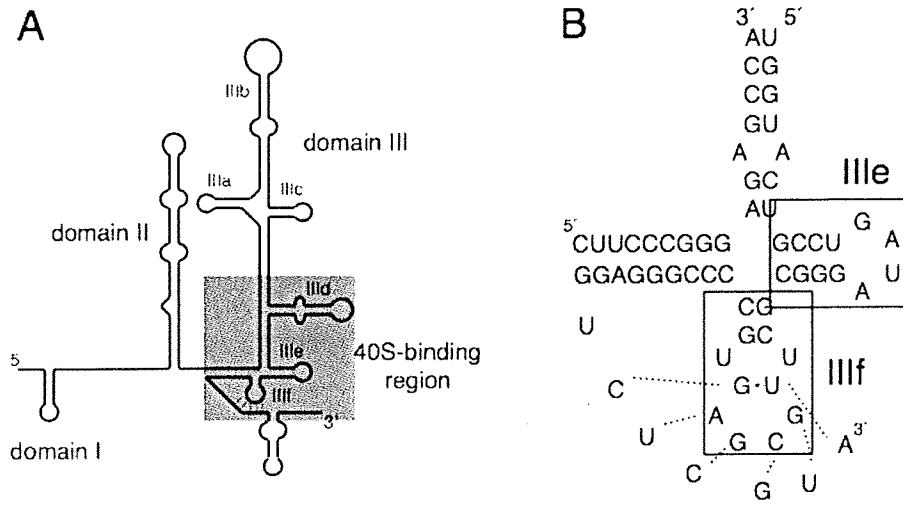
発明者：原田和雄、鈴木哲朗、脇田隆字、平尾一郎、野澤 巖

出願者：タグシクスバイオ

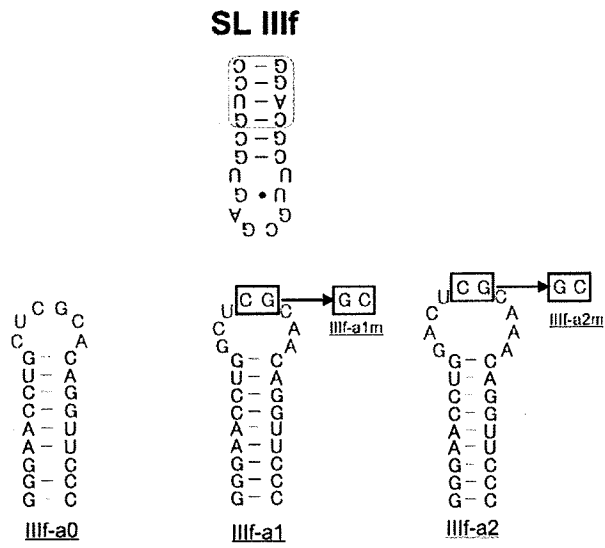
出願日：平成 22 年 2 月 5 日

特願 2010-023781

【図1】

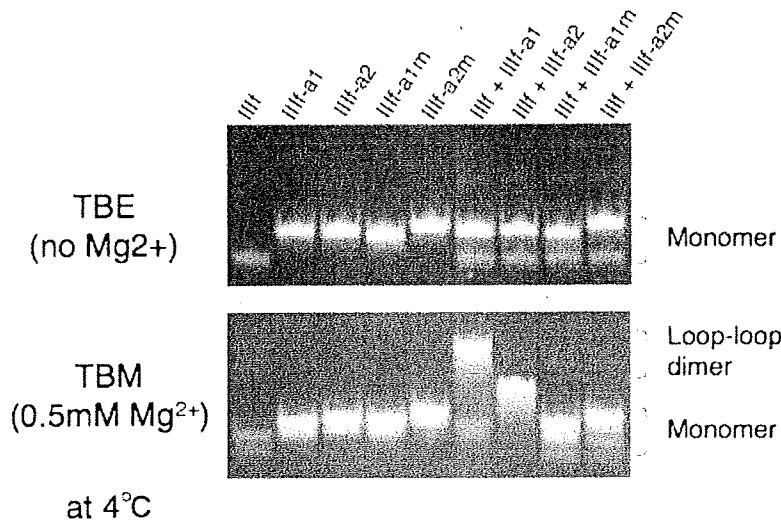


【図2】



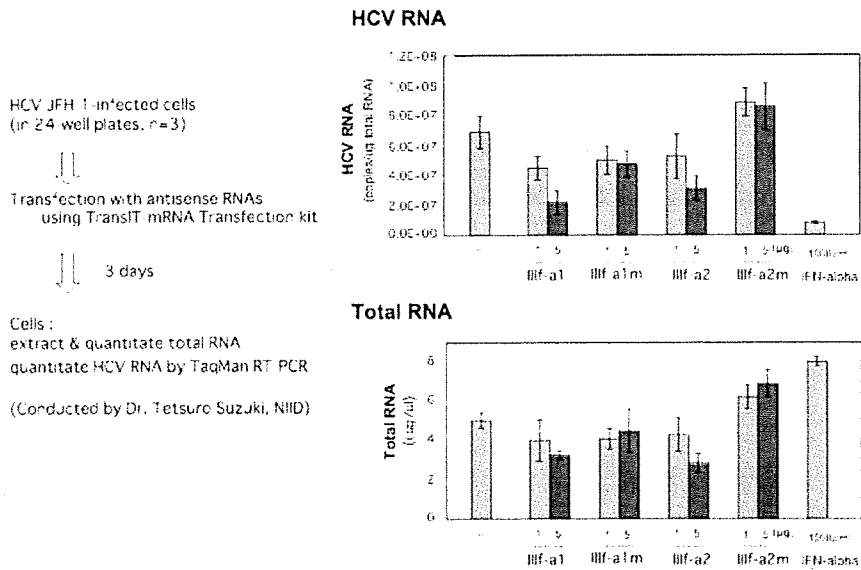
【図 3】

Gel electrophoretic analysis of the binding of designed antisense stem loops to IIIf RNA



【図 4】

The effect of anti-IIIf RNA stem loops on the production of HCV JFH-1 RNA



肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発： HCV増殖・感染細胞モデルを用いた抗ウイルス化合物・宿主因子の探索

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学 分子肝炎制御学講座 准教授

研究要旨 我々は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1)8,000種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV増殖を抑制する41種の化合物が同定され、IC50の優れた5個のepoxide誘導体を同定した。(2)HCV複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析により、脂質・コレステロール代謝に関わる代謝・シグナルネットワークの関与、関連薬剤の効果を確認した。本研究で同定された化合物の作用機構の解析、小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発につながると思われる。

A. 研究目的

我々は、独自に開発したHCVキメラリポーター・レプリコン系、およびHCV-JFH1培養系を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行した。

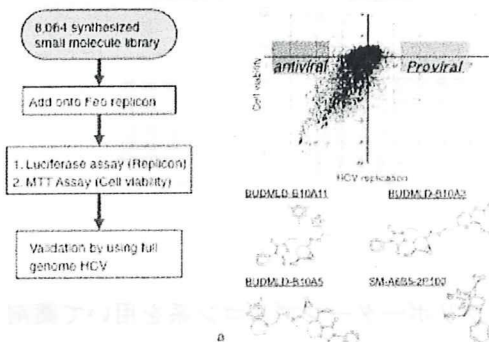
B. 研究方法

HCVキメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するHCV-Feo replicon細胞、およびHCV-JFH1培養系を用いて、HCV増殖を制御する薬剤・化合物の網羅的スクリーニングを進める。生理活性物質ライブラリー、及びDiversity-oriented synthesis化合物ライブラリー、林産加工阻害加工物ライブラリー、漢方生薬・抽出精製化合物の抗HCV活性をhigh-throughput screening (HTS)にて探索をおこなった。

C. 研究結果

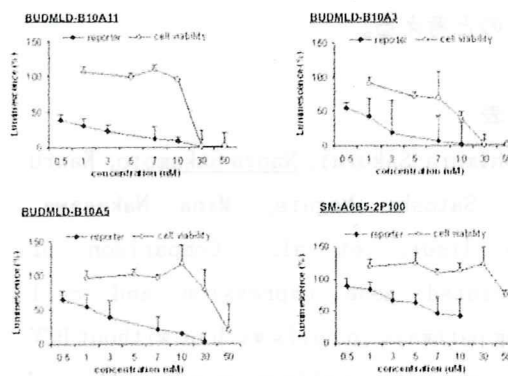
(1)多様性指向性合成により作成された8,064種の化合物のスクリーニングを施行したところ、replicon増殖を抑制する41種の化合物が同定された。構造活性相関(SAR)解析によりさらにIC50の優れた5個のepoxide誘導体を同定した。

多様性指向性合成化合物(DOS)ライブラリー・スクリーニング



多様性指向性化合物ライブラリー8,064化合物のスクリーニングによりHCV増殖を特異的に抑制する4種のエポキシ化合物を同定した

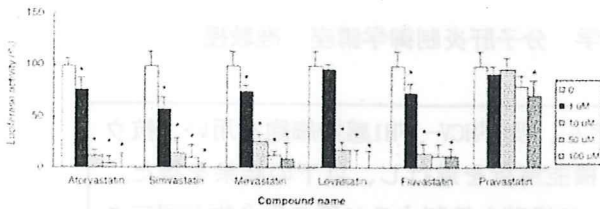
Secondary Screening of Antiviral Compounds (Antimicrob Agents Chem 2007;51:3756-3759)



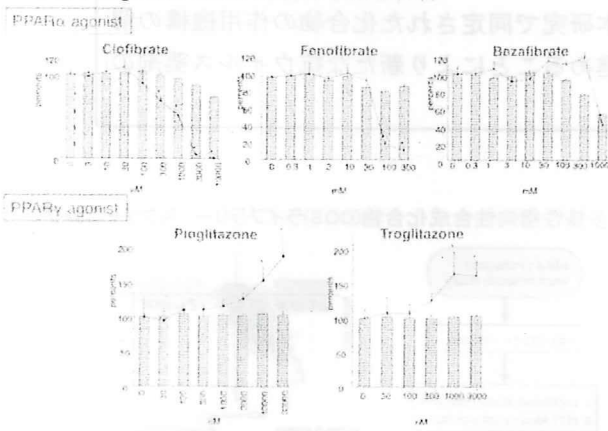
(2)HCV複製増殖に関与する代謝・シグナルネットワークの網羅的解析:

脂質・コレステロール代謝に関わる代謝・シグナルネットワークの関与、関連薬剤の効果を確認した。

Statin製剤によるHCV増殖抑制効果



PPAR agonistのHCV増殖に与える影響



D. 結論

HCVキメラリポーターレプリコン系を用いて薬剤・化合物の大規模スクリーニングを行い、HCV発現・増殖を抑制する複数の化合物を同定し、HCV培養系にて効果を確かめ得た。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることによりHCVの新規治療法開発に結びつくものと考えられる。

E. 研究発表

1. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, et al.: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol Epub*.
2. Tomokazu Mizui, Shunhei Yamashina, Isei Tanida, Motoki Takashima, Yoshiyuki Takei, Takashi Ueno, Naoya Sakamoto, Kenich Ikejima,

Tsuneo Kitamura, Nobuyuki Enomoto, Tatsuo Sakai, Eiki Kominami, Sumio Watanabe: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol, Epub*.

3. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, et al.: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 2009; 50:1727-1737.
4. Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Masayuki Kurosaki, Kentaro Matsuura, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, et al.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* 2009; 41 (10):1105-1109.
5. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, et al.: The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication. *J Biol Chem* 2009; 284(25):16998-17005.
6. Satoshi Toma, Tsuyoshi Yamashiro, Shingo Arakaki, Joji Shiroma, Tatsuji Maeshiro, Kenji Hibiya, Naoya Sakamoto, et al.: Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α . *Journal of Viral Hepatitis* 2009; 16(7):506-512.
7. Andrew W. Tai, Yair Benita, Lee F. Peng, Sun-Suk Kim, Naoya Sakamoto, Ramnik J. Xavier, Raymond T. Chung: A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 2009; 5(3):298-307.
8. Y. Sekine-Osajima, N. Sakamoto, M. Nakagawa, Y. et al.: Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication. *Hepatol Res* 2009;39:60-69.

強力な HCV エントリー阻害作用をもつ 新規マンノース特異糖鎖結合タンパク質

研究分担者 武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長
共同研究者 上西理恵、長谷彩希、廖華南 国立感染症研エイズ研究センター
Barry O' Keefe, Kirk Gustafson, James B. McMahon
米国国立がん研究所, NCI
鈴木哲朗, 脇田隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 HCV 粒子表面に存在するエンベロープタンパク質は、高度に糖鎖修飾を受けており、糖鎖修飾はエンベロープタンパク質の適切な折り畳み・細胞内輸送・アッセムブリ、さらに感染性ウイルス粒子の産生に不可欠の役割を果たしている。ウイルス・エンベロープに付加している糖鎖 N-glycan には、宿主細胞にはほとんど見いだされない高マンノース型のものが含まれ、従って、高マンノース型糖鎖に特異的に結合する物質（糖鎖結合因子, CBA）は、HCV 増殖阻害剤としての可能性が期待される。われわれは、生体物質由来の CBA の中に、極めて強力な抗 HCV 効果をもつ 2 種のタンパク質性因子（糖鎖結合タンパク質, CBP）（サイトビリンとグリフィスシン）を見いだした。HCVcc アッセイによる EC50 は、サイトビリンが 16.9 nM (SI=1, 410)、グリフィスシンは EC50=0.37 nM (SI=90, 800)であった。これまでにわれわれが探索を進めてきた物質の中で最も高い活性をもつ。両者は HCV シュード粒子 (HCVpp) の感染を阻害すること、Time-of-addition 実験の結果、作用標的がエントリー段階にあることが明らかにされた。これらの物質は、ウイルス粒子の糖鎖に結合することで、ウイルス粒子の標的細胞表面への非特異的吸着を阻害することによって、抗ウイルス作用を示すものと推定される。

A. 研究目的

HCV 粒子表面に存在するエンベロープタンパク質 E1, E2 は、それぞれ 4-5 個および 11 個の N-グリカン付加部位をもち、高度の糖鎖修飾を受けている (図 1A)。糖鎖は、エンベロープタンパク質の適切な folding, assembly, さらにウイルス粒子の感染性獲得に不可欠である。

エンベロープタンパク質に付加している N-グリカンは、一般に複合型、ハイブリッド型、高マンノース型の 3 タイプに分類されるが、ウイルス・エンベロープタンパク質には、宿主細胞にはほとんど見いだされない高マンノース型糖鎖 (図 1B) が付加しており、従って、高マンノース型糖鎖に特異的に結合する能力をもつ薬剤は、ウイルス感染阻害剤として有望な性質をもつものと期待される。

本研究は、比較的最近に同定された天然物由来の

2 種のマンノース糖鎖特異結合タンパク質 (CBP) - サイトビリン (SVN) とグリフィスシン (GRFT) - の抗 HCV 効果を評価し、その作用機構と利用可能性について考察しようとするものである。

B. 研究方法

(1) 試験検体

海洋生物から分離された新規の糖鎖結合性タンパク質 SVN および GRFT はそれぞれ大腸菌、植物発現系を用いて得られた精製組換えタンパク質を用いた (米国 NCI O' Keefe 博士から供与)。陽性対照として、インターフェロン α (5, 50 u/ml) および既知の CBP の一つであるシアノピリン-N (CV-N) を用いた。

(2) HCVcc アッセイ

抗 HCV 活性は、感染性分子クローン JFH-1 株の Huh7.5.1 細胞での増殖阻害活性を感染 3 日後の培養

上清中に放出される HCV コアタンパク質量 によって評価した。また試験化合物の細胞毒性は、WST アッセイを用いて評価した。

(3) HCV pseudoparticle (HCVpp) assay:

HIV-1 gag 発現ベクターとパッケージング・シグナルをもつ Luciferase 発現プラスミド、および HCV E1/E2 発現プラスミドあるいはコントロールとして VSV-G 発現プラスミド、HCV DE1/E2 発現プラスミドのトリプルトランスフェクションによって、それぞれ HCVpp, VSV-Gpp, HCV D E1/E2pp の 3 種の pseudoparticle を調製した (脇田博士より供与)。阻害剤存在下、非存在下での各 pseudoparticle の Huh7.5.1 細胞への感染性をルシフェラーゼ活性で測定した。陽性対照として、抗 CD81 単クローン抗体 (1 ug/ml) を用いた。

(4) 抗 HIV-1 アッセイ

試験検体の抗 HIV-1 活性は、NL432 株の株化 T 細胞 (C8166R5 細胞) での増殖阻害活性を感染 4 日後の培養上清中の RT 活性 によって評価した。

(5) HCV エンベロープ E2 結合能の ELISA による評価

市販の組換え HCV エンベロープタンパク質 を ELISA プレートに固着させた後、様々な濃度の CBP (SVN あるいは GRFT) 溶液を加え、wash の後、ウサギ抗 CBP ポリクローナル抗体を作用させ、ついでアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG を 2 次抗体として用いることによって、CBP の E2 に対する結合量を測定した (図 3 挿図)

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1) 糖鎖結合性タンパク質 (CBP) (SVN, GRFT) の抗ウイルス効果

各 CBP の抗 HCV 活性 (HCV JFH-1 株/ Huh7.5.1 細胞) を、それぞれの生化学的性質および抗 HIV-1 活性 (HIV-1 NL432 株/ C8166R5 細胞) と合わせて表 1 にまとめる。標準物質として、既知の CBA である CV-N の data を比較として掲げた。

表 1 に示すように、いずれの CBP も 50% 有効濃度 (EC50) が low nM から sub nM の極めて高い抗 HCV 活性を示した。SVN (16.9 nM; SI=1,410) は、CV-N (EC50=7.6 nM; SI=52.0) に比べて抗ウイルス活性が幾分か劣るが、細胞毒性が低く、より高い選択係数

(Selective index, SI) を示す。一方、GRFT (EC50=0.37 nM; SI=90,800) は最も高い抗 HCV 活性を示し、しかも細胞毒性が低く、10 万倍近くの高め高い SI 値を示した。

なお、これら CBP の抗 HIV-1 活性の強度は、抗 HCV 活性のそれと併行関係があり、その強度は SVN (EC50=4.35 nM; SI=291) < CV-N (EC50=2.3 nM; SI=140) < GRFT (EC50=1.91 nM; SI=9,460) の順であった (表 1)。

(2) 作用機構の解析

HCVpp アッセイによって、SVN, GRFT は共に、HCVpp の感染を阻害する (図 2) ことから、実際にその作用点がエントリー過程にあることが明らかとなった。阻害の EC50 は HCVcc assay のそれに比べてやや高めの水準にある。なお、この阻害効果は HCV エンベロープタンパク質 E1/E2 に特異的で、VSV-G pseudotype の感染には影響しない。また SVN, GRFT は JFH-1 株 (genotype 2a) だけでなく、J6 株 (2a) および TH 株 (1b) の HCVpp 感染も同程度に阻害した。

また、time-of-addition 実験によって SVN, GRFT の活性発現には、HCV 感染の前あるいは同時に加えられる必要があることが明らかとなった (data not shown)。

これらの結果は、SVN, GRFT の抗 HCV 効果が、ウイルス感染 (エントリー) のステップにあることを示すものである。

(3) CBP の E2 結合能

図 3 に見るように、SVN および GRFT は 50% 有効濃度でみて、E2 にそれぞれ 500 ng/100 ul (~0.5 uM)、10 ng/well (~8 nM) で結合した。GRFT は、SVN に比較して数 10 倍高い E2 結合能を示した。

D. 考察

高マンノース型 N-グリカンに対して特異的に結合する能力をもつ新規の生物由来の天然物質である CBP (SVN および GRFT) が、高い抗 HCV 活性を有することを、はじめて明らかにした (表 1, 図 1)。中でも GRFT は最も強力な活性を示した (表 1)。いずれの CBP も HCV pseudoparticle 感染を阻害する (図 2) ことから、エントリー段階に作用点があると考えられる。

HCV のエントリー過程は、非特異的なウイルス吸着の後に、HCV エントリー受容体群 (SR-B1, CD81 ⇒ tight junction proteins, Claudin-1,

Occludin) に受け渡され、ついでクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられているが、SVN や GRFT などの CBA はウイルスエンベロープタンパク質を被覆する N-グリカンに結合することで (図 3)、ウイルス粒子の細胞表面への非特異吸着を阻害し、その結果、ウイルス粒子の受容体群への結合が妨げられ、ウイルス感染を阻害するものと考えられる (図 4)。

SVN や GRFT はこのような (高マンノース型) 糖鎖 (図 1B) に特異的な機構によってウイルス感染を阻害することから、HIV-1 や HCV (表 1) だけでなく、同様な糖鎖修飾を受けているいわゆるエンベロープ型ウイルスの感染を広汎に阻害する活性をもっている。そのため、その抗ウイルス活性は、広範なスペクトラムをもっていて、例えば Ebola virus や SARS Co-V 感染を強力に阻害することが知られている。

しかし、一方、分子量が 10,000 を超えるタンパク質であるために、経口吸収性や良好な血中薬理動態を期待できないことや、抗体産生の誘導のために薬理効果が短期間で減弱する可能性、さらに過敏性反応などの重篤な副作用を起因する可能性から、病原体の局所での感染阻止のための "microbicide" などとしての利用の可能性が考えられる。

また、他のウイルス感染の系では皮下注 (経呼吸器性ウイルスでは経鼻噴霧) で十分な感染防御が得られていることから、HCV に関しても、モデル動物での proof of concept 実験が望まれる。

E. 結論

強力な抗 HCV 活性をもつ生体由来のタンパク質性の糖鎖結合タンパク質 (SVN, GRFT) を同定した。極めて強力な抗ウイルス作用から、新規の感染阻止薬としての可能性が期待される。また HCV エントリー機構を解明する上での有用な試薬としての利用が期待される。

F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない。

G. 研究発表 (2009-2010)

1. 論文発表

1. Tanaka, N., Mamemura, T., Abe, S., Imabayashi, K., Kashiwada, Y., Takaiishi, Y., Suzuki, T., Takebe, Y., Kubota, T., and Kobayashi, J. (2009). Biyouxanthones A-D, prenylated

xanthones from roots of hypericum chinense. (in press)

2. Hassan, R., Suzu, S., Hiyoshi, M., Takahashi-Makise, N., Ueno, T., Agatsuma, T., Akari, H., Komano, J., Takebe, Y., Motoyoshi, K., Okada, S. (2009). Dys-regulated activation of a src tyroine kinase Hck at the golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol.* 221(2): 458-468.
3. Delviks-Frankenberry, KA., Nikolenko, GN., Maldarelli, F., Hase, S., Takebe, Y., Pathak, VK. (2009). Subtype-specific differences in the HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain of CRF01_AE are associated with higher levels of resistance to 3' -azido-3' -deoxythymidine. *J. Virol.* 83(17): 8502-8513.
4. Tanaka, R., Tsujii, H., Yamada, T., Kajimoto T., Amano, F., Hasegawa, J., Hamashima Y., Node, M., Katoh, K., Takebe, Y. (2009). Novel 3alpha-methoxyserrat-14-en-21beta-ol (PJ-1) and 3beta-methoxyserrat-14-en-21beta-ol (PJ-2)-curcumin, kojic acid, quercetin, and baicalein conjugates as HIV agents. *Bioorg Med. Chem.* 17(14): 5238-46.

和文

1. 上西理恵、長谷彩希、武部 豊. 肝炎治療薬. 「C 型肝炎治療: 新規抗 HCV 薬の開発」46 (2): 109-123. 特集・抗ウイルス薬物療法の現状と今後の展望 医薬ジャーナル社. 東京. 2010.
2. 武部 豊、上西理恵. HCV エントリー・粒子形成阻害剤: 新規クラス薬剤スクリーニング. 「C 型肝炎のすべて 2009」新規治療法. 肝胆膵 57(5): 1047- 1056, アークメディア社 2008
2. 学会発表その他
 1. 武部豊. C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する新しいクラスのエンントリー阻害剤の探索とその同定. 第 25 回白金シンポジウム「独創的評価系が拓く創薬研究の新たな展開」(2009.2.13, 東京)
 2. 武部豊、上西理恵、長谷彩希、廖華南、Kirk Gustafson, James B Macmahon, Barry G O' Keefe.

新規マンノース特異糖鎖結合タンパク質による
nM オーダーの強力な HCV/HIV-1 エントリー阻害。
第 57 回日本ウイルス学会 (2009.10.25
- 10.27. 東京)

[国際学会]

1. Takebe, Y., Uenishi, R., Hase, H., Liao, H., Gustafson, K., McMahon, JB., and O'Keefe, BG. Potent Inhibition of HCV Entry by Newly Identified Carbohydrate Binding Proteins. 6th international symposium on hepatitis C virus and related viruses (October 3-7, 2009, Nice, France)
2. Uenishi, R., Hase, S., Li, Y., Liao, H., Gustafson, K., McMahon, JB., and O'Keefe, BG., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of novel HCV entry inhibitors using HCVcc assay as a primary screening platform. HepDART 2009 (Dec. 6-10, 2009, Hawaii, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2008-2010)

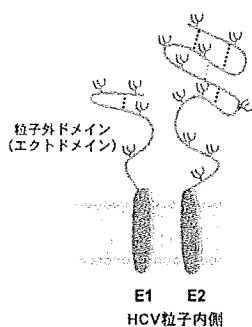
1. 特許出願

1. 「HIV/HCV デュアル阻害剤 (仮称)」 (出願準備中)
2. 新規抗ウイルス物質 (仮称)」 (出願準備中)
3. 「高分子基材 (以下略)」 (特願 2009-214371、平成 21 (2009) 年 9 月 16 日)
4. 「C 型肝炎ウイルスの宿主細胞への侵入阻害剤およびこれを含有する医薬組成物」 (特願 2009-046898、平成 21 (2009) 年 2 月 27 日)
5. 「新規 HIV-1 阻害剤」 (特願 2008-333922、平成 20 (2008) 年 12 月 26 日)
6. 「新規 HCV エントリー阻害剤」 (特願 2008-300937、平成 20 (2008) 年 11 月 26 日)
7. 「C 型肝炎ウイルス阻害剤」 (特願 2008-115873、平成 20 (2008) 年 4 月 25 日)
8. 「新規 HCV エントリー阻害剤」 (特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日)

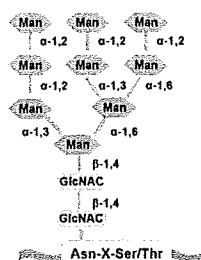
表 1. 糖鎖結合タンパク質の性状と抗ウイルス (HCV/HIV-1) 活性のまとめ

	シアノピリン-N Cyanovirin-N (CV-N)	サイトピリン Scytovirin (SVN)	グリフィスシン Griffithsin (GRFT)
由来	シアノバクテリア (<i>Cyanobacterium Nostoc ellipsosporum</i>)	シアノバクテリア (<i>Cyanobacterium Scytonema varium</i>)	紅藻 (Red alga <i>Griffithsia spp.</i>)
分子量	101 aa (11 kDa)	95 aa (9.7 kDa)	121 aa (13 kDa)
分子構造	domain-swapped dimer	Monomer	domain-swapped dimer
糖鎖結合特異性	$\alpha(1,2)$ Man	$\alpha(1,2)$ - $\alpha(1,6)$ Man	$\alpha(1,2)$ Man, Gic, GlcNAc
抗HCV活性			
EC50	83.7 ng/ml (7.6 nM)	157.5 ng/ml (16.9 nM)	5.36 ng/ml (0.37 nM)
CC50	4.35 μ g/ml (0.39 μ M)	222.0 μ g/ml (23.8 μ M)	486.8 μ g/ml (33.6 μ M)
SI	52.0	1,410	90,800
抗HIV-1活性			
EC50	2.3 nM	4.4 nM	1.9 nM

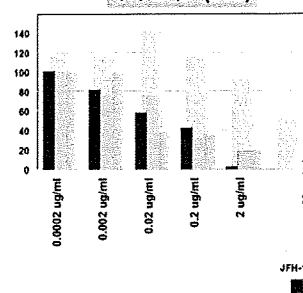
A HCVエンベロープタンパク質E1/E2の糖鎖付加部位



B 高マンノース型N-グリカンの構造



サイトピリン (SVN)



グリフィスシン (GRFT)

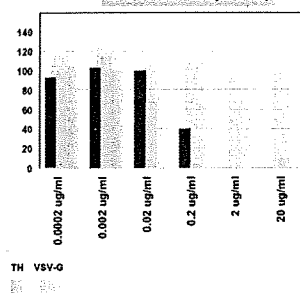


図1. HCVエンベロープタンパク質および高マンノース型N-グリカンの構造模式図

図2. CBPのHCVpp感染阻害効果

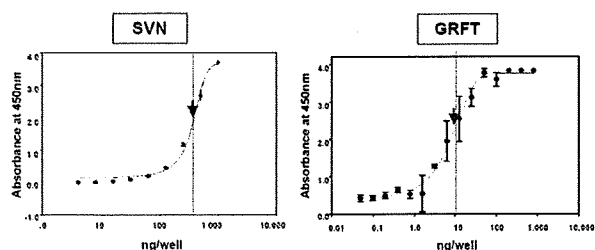


図3. CBPのHCV E2 結合能

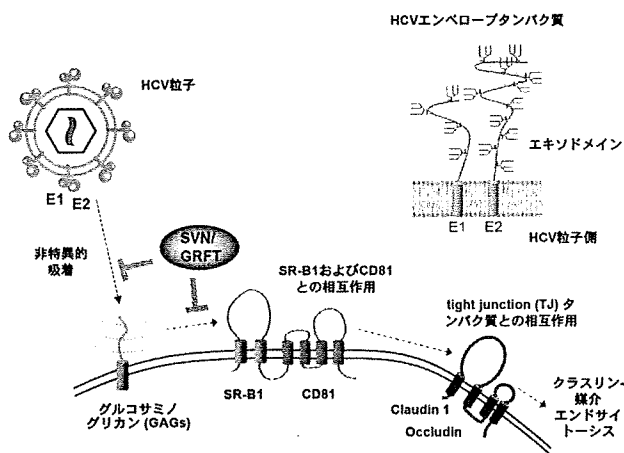


図4. CBPの作用機構

栄養成分の HCV に及ぼす効果の検討

研究分担者 池田 正徳 岡山大学 准教授

研究要旨 平成20年度は HCV RNA 複製レベルを迅速かつ簡便に定量できる HCV RNA 複製レポーターシステム (OR6 アッセイシステム) を用いて、日常的に摂取する栄養成分の抗 HCV 活性について検討した。多価不飽和脂肪酸が抗 HCV 活性を有することを見出したが、今年度は、多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸の代謝産物のうち 5-HETE が抗 HCV 活性を示すことを明らかにした。一方、8-HETE、12-HETE では HCV RNA 複製を増強する効果を認めた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高頻度に慢性肝炎を引き起こす。現在、C 型慢性肝炎に対する治療法は、ペグインターフェロン (PEG-IFN)/リバビリン (RBV) のみである。しかしながら、その有効性が約 50% であること、リバビリンの副作用である貧血により治療を中断しなければならない現状を考えるとより安全性の高い治療法や補助療法が必要である。これまで、日常的に摂取する栄養成分が HCV RNA 複製及ぼす効果は科学的に検討されていないことに注目し、4 6 種類の栄養成分の抗 HCV 活性について検討し、 β -カロテン、ビタミン D2、多価不飽和脂肪酸が抗 HCV 活性を有することを見出し報告した。本年度は、代表的な多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の代謝産物について抗 HCV 活性を検討した。

B. 研究方法

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

アラキドン酸は始めにシクロオキシゲナーゼ

(COX) あるいは、リポキシゲナーゼ (LOX) で代謝される。アラキドン酸に COX 阻害剤のインドメタシンあるいは LOX 阻害剤の NDGA を併用し HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。

アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE を OR6 細胞に添加した時の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。また、各 HETE の異性体 (R-, S-) の HCV RNA 複製に及ぼす効果についても検討した。

OR6 細胞に 5R-HETE あるいは 12R-HETE を処理した時の遺伝子発現の変化についてマイクロアレイ解析 Affymetrix GeneChip; Human Genome U133 Plus 2.0 array) を行った。

(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

アラキドン酸は始めに COX あるいは LOX で代謝される。COX 代謝産物と LOX 代謝産物のいずれが抗 HCV 活性に重要であるかを明らかにするため、アラキドン酸と COX 阻害剤のインドメタシンあるいは LOX 阻害剤の NDGA を併用し HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。アラキドン酸 (50 μ M) の抗 HCV 活性はイン

ドメタシン(20 μ M)ではキャンセルされなかったが、NDGA(20 μ M)によりキャンセルされた。この結果はアラキドン酸の LOX 代謝産物が抗 HCV 活性に重要な役割を果たすことを示している。

次に、アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。20 μ M の 5-HETE は HCV RNA 複製を 80%抑制したが、20 μ M の 8-HETE, 12-HETE は HCV RNA 複製をそれぞれ 40%増強した。15-HETE は HCV RNA 複製に影響を与えなかった。

各 HETE の異性体(R-, S-)について HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。5S-, 8S-, 12S-, 15S-HETE(各 10 μ M)はそれぞれ、80%抑制、80%増強、不変、不変であった。5R-, 8R-, 12R-, 15R-HETE(各 10 μ M)はそれぞれ、95%抑制、50%増強、120%増強、不変であった。最も強い抗 HCV 活性を示した 5R-HETE の EC₅₀、EC₉₀はそれぞれ 1.8 μ M、7.4 μ M であった。これらの結果は HETE の異性体では HCV RNA 複製に対する効果が異なることを示している。

以上の結果を受けて、次に最も強い抑制効果と増強効果を示した 5R-HETE と 12R-HETE、また、HCV RNA 複製に影響を及ぼさなかった 12S-HETE を OR6 細胞に添加してマイクロアレイ解析をおこなった。5R-HETE で特異的に変化をする遺伝子はなかったが、12R-HETE 処理により Metallothionein(MT)の発現が増強した。一方、12S-HETE では MT 遺伝子の発現は変化しなかった。

D. 考察

本年度はアラキドン酸代謝産物の中で COX ではなく LOX の代謝産物が抗 HCV 活性に重要であることを明らかにした。さらに、LOX の代謝産物のうち 5-HETE が HCV RNA 複製を抑制することを見出した。これとは対照的に 8-HETE、12-HETE は HCV RNA 複製を増強してしまうことがわかった。各 HETE の異性体について検討したところ、5R-, 5S-HETE はいずれも HCV RNA 複製を抑制するのに対して、8R-, 8S-HETE はいずれも HCV RNA 複製を増強した。一方、12-HETE、15-HETE では R 体、S 体はそれぞれ HCV RNA 複製に対して増強、不変であった。HETE の種類によりそれらの異性体は HCV RNA 複製に及ぼす効果が異なることが明らかになった。

HCV RNA 複製に対する最も強い抑制効果と増強効果を示した。5R-HETE と 12R-HETE で OR6 細胞を処理

すると、5R-HETE では特異的な遺伝子の変動はなかったが、12R-HETE では MT の増強が認められた。興味深いことに、HCV RNA 複製に影響を及ぼさない、12S-HETE 処理では MT 遺伝子の変動しなかった。MT は細胞内で抗酸化作用を有する宿主因子として知られている。我々は昨年、酸化ストレスが HCV RNA 複製を抑制すること、そして、これらの抗 HCV 活性は抗酸化剤でキャンセルされることを報告した。ビタミン E、C やセレンウムなどの抗酸化剤は HCV RNA 複製増強効果を有しているため 12R-HETE も MT を誘導し HCV RNA 複製を増強している可能性が示唆された。

今回、新たに抗 HCV 活性を見出した 5-HETE は抗 HCV 剤開発の新しい分子標的となるものと思われる。

E. 結論

アラキドン酸の LOX 代謝産物である 5-HETE の抗 HCV 活性を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.*, 82:42-50, 2009.
- 2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus 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, and 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) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters*, 583:1434-1438, 2009.

- 5) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, and Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*, 50:678-688, 2009.
- 6) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, and Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new hepatoma cell line. *Virus Res.*, 146:41-50, 2009.
- 7) Abe KI, Ikeda M, Ariumi Y, D Hiromichi, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.*, in press, 2009.

2. 学会発表

- 1)河合 良成、池田 正徳、森 京子、阿部 健一、矢野 雅彦、池田 房雄、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略 -Teprenone (Selbex[®]) と Plaunotol (Kelnac[®]) の HCV 複製抑制効果- 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、平成 21 年 6 月
- 2)中村 光康、齋藤 英胤、池田 正徳、高木 俊介、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文、三浦 総一郎 抗酸化剤 Resveratrol の C 型肝炎ウイルス複製についての検討 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、平成 21 年 6 月
- 3)森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 C 型急性肝炎患者由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立とその応用 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
- 4)黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 亜ヒ酸は酸化ストレスとグルタチオンレドックスシステムを介して C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA 複製を抑制する 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
- 5)河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、山本 和秀、加藤 宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone (Selbex[®]) と Plaunotol (Kelnac[®]) の HCV RNA 複製抑制効果- 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、平成 21 年 7 月
- 6)河合 良成、池田 正徳、加藤 宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のグラニルグラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する- 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
- 7)池田 房雄、團迫 浩方、西村 剛、河合 良成、有海 康雄、池田 正徳、高木 章乃夫、岩崎 良章、加藤 宣之、山本 和秀 HCV コア蛋白質のアミノ酸の違いと IFN 応答性との関係についての培養細胞を用いた解析 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
- 8)中村 光康、齋藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文 各種抗酸化剤の C 型肝炎ウイルス複製についての影響 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
- 9)野崎 昭人、近藤 正晃、森本 学、沼田 和司、池田 正徳、加藤 宣之、田中 克明 C 型肝炎治療薬としての Hydroxyurea の可能性 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、第 13 回日本肝臓学会大会 京都、平成 21 年 10 月
- 10)齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用における責任部位の解析 第 82 回日本生化学会大会、神戸、平成 21 年 10 月
- 11)森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 リバビリンの抗 HCV 活性を解析評価できる Li23 細胞由来の HCV-RNA 複製システム 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 12)池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之 オンコスタチン M はインターフェロンの抗 HCV 活性を相乗的に増強する 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 13)河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、西村 剛、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆字、山本 和秀、加藤 宣之 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のグラニルグラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 14)有海 康雄、黒木 美沙緒、牧 正敏、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之 ESCRT

- 小胞輸送系の HCV 産生への関与 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 15) 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 癌抑制因子 PML は HCV 粒子産生に必要である 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 16) 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 1b 型 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質 NS3 と NS4B の相互作用の解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、平成 21 年 10 月
- 17) 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦 C 型肝炎ウイルス由来非構造タンパク質 NS3-NS4B 間の相互作用 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月
- 18) Kyoko Mori, Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 19) Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 20) Yoshinari Kawai, Masanori Ikeda, Masahiko Yano, Ken-ichi Abe, Go Nishimura, Hiromichi Dansako, Yasuo Ariumi, Takaji Wakita, Kazuhide Yamamoto, and Nobuyuki Kato. Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 21) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 22) Misao Kuroki, Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, and Nobuyuki Kato. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 23) Go Nishimura, Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Takazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, and Nobuyuki Kato. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Nice, France, October 3-7, 2009
- 24) Masahiko Yano, Masanori Ikeda, Ken-ichi Abe, Yoshinari Kawai, Misao Kuroki, Kyoko Mori, Hiromichi Dansako, Yasuo Ariumi, Yasunobu Matsuda, Shougo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, and Nobuyuki Kato. Involvement of the MEK-ERK1/2 Signaling Pathway in the Anti-HCV Mechanism of Oxidative Stress. The Liver Meeting 2009, AASLD Boston, Massachusetts, USA, October. 30-November. 3, 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分岐鎖アミノ酸の HCV 増殖に与える影響

研究分担者 竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 准教授

研究要旨 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は肝不全時に血中濃度が低下し、その臨床症状の病態に関与していると考えられており、また肝硬変患者に対しては BCAA の経口投与により、低アルブミン血症や予後の改善も報告されている。一方で、BCAA は細胞内の翻訳・蛋白合成に重要な役割を果たす mTOR を活性化するという生理活性物質としての作用も持つことが近年明らかとなった。C 型肝炎ウイルス (HCV) はその複製・増殖の過程において細胞内シグナルによる調節を受けることが知られており、JAK/STAT 経路以外にも、MAP キナーゼ経路、PI3 キナーゼ/mTOR 経路など多くのシグナルが関与しているとされる。BCAA は臨床上も重要な役割を果たすものであるが、HCV 増殖との関連は今のところ明らかな報告はない。本研究では BCAA の HCV 増殖における役割について検討を行うこととした。まずレプリコン細胞を用いた結果では、BCAA は HCV IRES の抑制を介した HCV ゲノム複製の抑制を誘導し、その作用はラパマイシン存在下でも認められることから mTOR 活性に依存しないものであると考えられた。一方、HCV 感染肝癌細胞における BCAA は逆に増殖を促進する働きが認められた。ウイルス粒子形成能を持たない HCV ゲノムを用いた解析から、ウイルス粒子形成～再感染の過程において BCAA は促進的に働くものと考えられ、HCV に対する BCAA の 2 つの異なる作用が示唆された。さらに詳細なメカニズムの解明により、BCAA が抗 HCV 治療につながる可能性が考えられた。

共同研究者

石田 永 大阪大学消化器内科学 助教

A. 研究目的

Val、Leu、Ile からなる分岐鎖アミノ酸 (BCAA) はヒトの血中必須アミノ酸の約 40% を占めており、肝不全（劇症肝炎や非代償性肝硬変）時にはその濃度が低下し、肝性脳症などの病態形成に関与すると考えられている。また、経口で BCAA を投与することにより、非代償性肝硬変患者の自覚症状、アルブミン値、生命予後を改善し、さらには肝発癌の抑制効果も示唆されている。一方培養肝細胞の実験においては、mTOR が BCAA により活性化され、主としてこの経路を介してアルブミン合成が促進されるとの報告もあり、BCAA は単なる栄養素ではなく、細胞に対する生理活性物質としての作用も持つことが示されている。このように BCAA は肝疾患において重要な役割を果たすとともに、薬剤として臨床応用されているが、本邦における肝疾患の主たる原因である HCV と BCAA

との関連については十分な解明はなされていない。

そこで本研究においては、HCV レプリコン細胞並びに HCV 感染肝癌細胞を用いて、BCAA の HCV 増殖における影響について検討を行った。

B. 研究方法

HCV サブゲノムレプリコン細胞 Huh-RepSI、HCV フルゲノムレプリコン細胞 2-3、HCVcc 感染 Huh7 細胞を検討に使用した。細胞培養液としては、アミノ酸のうち BCAA のみを含まない DMEM を使い、BCAA を個別にもしくは BCAA 混合液 (Val : Leu : Ile = 1.2 : 2 : 1) として添加して、2 日間培養後ウイルス蛋白量をウエスタンブロットにて、RNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。mTOR の活性阻害にはラパマイシンを 100 nM の濃度で BCAA (-) 培地へ BCAA 添加直前に添加した。HCV IRES 活性は CMV-Renilla luciferase をコントロールとする dicistronic vector を用いたデュアルレポーターアッセイにて評価した。細胞へのウイルスゲノム RNA の導入にはエレクトロポレー

ション法を用い、翌日に培養液を BCAA(-)もしくは(+)のものに交換して2日間培養した。

C. 研究成果

Huh-RepSI の培養では、培養液中の BCAA の濃度が 0.05 mM 以上において濃度依存的に HCV 蛋白および RNA 量の低下が認められ、また HCV の構造領域を含む 2-3 細胞でも同様の現象が認められた。個別に BCAA を添加した場合、Val を添加した場合において最も強い HCV 抑制効果が得られ、次に Ile に効果が認められたが、Leu 単独では抑制は見られなかった。しかし、Val と Ile を含む培地に Leu を追加した場合には、HCV のさらなる抑制効果は認められ、結果として 3 種の BCAA すべてを含む場合に最も強い効果が示された。また、ラパマイシンを培養液中に添加して同様の検討を試みたが、ラパマイシン存在下でも BCAA によって HCV の抑制効果が見られており、BCAA による HCV の抑制は mTOR 非依存的と考えられた。次に翻訳レベルに影響がないか、HCV IRES 活性の検討を行った。cap 依存的な翻訳は BCAA の有無にて有意な変化を認めなかったが、HCV IRES 活性は BCAA の濃度依存的な低下がみられた。

さらに HCVcc 感染 Huh7 細胞にて同様の検討を行ったところ、レプリコン細胞の場合とは逆に、BCAA の濃度依存的に HCV 蛋白および RNA 量の増加が認められた。そこで、ウイルス粒子を形成する HCV 株と、その株から 2 アミノ酸置換があるため粒子形成のない HCV 株のゲノム RNA を作成し、Huh7 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入して、BCAA の影響を比較検討した。HCV 粒子を形成する株では 1 mM の BCAA の添加によりウイルス増殖の増加が見られたが、粒子形成のない株では BCAA によりウイルス増殖が抑制された。

D. 考察と結論

HCV の増殖は、サイトカインなど様々な外的刺激から細胞内シグナルを介して制御を受けていることが多数報告されている。BCAA は肝疾患においてもしばしば使用されるとともに生理活性物質としての働きも持っており、それが HCV の増殖に影響を与えるかどうかという点が今回の検討内容である。

上述の結果より、BCAA は HCV の感染・増殖の過程で少なくとも 2 カ所の作用点を持つ可能性が示唆された。すなわち、HCV ゲノム RNA の複製の過程を再現

しているレプリコン細胞の実験系においては、BCAA は IRES 活性の抑制を介して HCV 増殖を負に制御している。一方で HCV の生活環をすべて満たす HCV 感染の実験系では、逆にその促進がみられた。よってウイルス粒子形成から粒子の放出、再感染にわたる過程においては、BCAA は逆にそれを促進する働きを持つことが示唆される。BCAA は mTOR を活性化すると報告があり、それが HCV ゲノム複製を抑制している可能性も考えられたが、mTOR の阻害剤であるラパマイシンを作用させても BCAA は抗 HCV 活性を示したことより、mTOR 経路非依存的な作用機序が存在すると考えられた。ウイルス粒子形成～再感染の過程における BCAA による促進作用は今のところ詳細なメカニズムは不明である。培養肝癌細胞内では JHF-1 株を除く HCV の増殖能はきわめて低く、実際に生体内での肝細胞においてどのような影響を持つかを含め、BCAA の作用を詳細に解明することが、HCV の増殖に携わる細胞内因子の同定につながると考えられ、さらには将来的な抗 HCV 療法へと発展していく可能性が考えられた。

E. 研究発表

論文発表

1. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Kanada A, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* 81: 798-806, 2009.
2. Ohkawa K, Takehara T, Ishida H, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Yamamoto M, Kohga K, Sasakawa A, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Li W, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Katayama K, Hayashi N. Fatal exacerbation of type B chronic hepatitis triggered by changes in relaxed circular viral DNA synthesis and virion secretion. *Biochem Biophys Res Commun* (in press)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし