

200933024A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成22(2010)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための  
基礎的研究 ..... 3  
鈴木 哲朗

### II. 分担研究報告

1. HCV 複製増殖の機構解析に関する研究 ..... 15  
下遠野 邦忠
2. ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究 ..... 19  
堀田 博
3. C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための  
基礎的研究 ..... 23  
瀬谷 司
4. C型肝炎ウイルス排除機構の解析 ..... 27  
小原 道法
5. 実験モデルの開発に関する研究 ..... 29  
加藤 宣之
6. C型肝炎ウイルスは抗酸化系を減弱させ酸化ストレス過剰産生をもたらす ..... 35  
小池 和彦
7. HCV の複製に関与する宿主因子 hB-ind1 の機能解析 ..... 39  
松浦 善治
8. 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 ..... 43  
深澤 秀輔
9. 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 ..... 45  
深澤 征義

10. 無細胞技術を用いた HCV protease で切断される宿主プロテイン カイナーシスの探索 .....	49
澤崎 達也	
11. C型肝炎ウイルスキャリア成立の分子基盤と新規治療薬開発のための 基礎的研究 .....	53
鐘ヶ江 裕美	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	59
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊 .....	69

# I . 総括研究報告

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

研究代表者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の複製増殖機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析、新たな実験モデルの開発、及び創薬シーズの探索を行い、以下の研究成果を得た。1) HCV ゲノム複製における NS4A 結合因子 CKB の重要性を見出し、NS4A antagonist が HCV 複製への CKB の介入を阻害し抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。2) NS5A 結合因子 hB-ind1 がコシャペロン活性を有し、HCV 複製調節に働くことを明らかにした。3) 感染性粒子はリポタンパク質（VLDL 様）と複合体を形成していること、Apo-E との会合が感染性に重要である事が示された。4) 既知の HCV 受容体候補分子は発現し HCV 非感受性の Huh7 細胞株を取得した。タイトジャンクション構造が感染過程に重要であることを示した。5) HCV は酸化ストレス産生を増加させるだけでなく、抗酸化系を阻害し、酸化ストレスをより増悪させることを示した。6) HCV 複製・感染によって、通常とは異なるシグナル伝達経路を介して、肝細胞における糖新生が亢進することを見出した。7) HCV NS3/4A プロテアーゼによって切断される宿主リン酸化酵素を 6 種類同定した。8) TLR, RLR の特異アダプター TICAM-1, IPS-1 の KO マウス、転写因子 IRF-3, IRF-7 KO マウスを用いてウイルス感染、発がん抑制に関与する自然免疫の鍵因子を同定した。9) 新規ヒト肝癌細胞株 Li23 を使って、リバビリンの抗 HCV 活性が、イノシンーリン酸デハイドロゲナーゼの阻害によるものであることを初めて明らかにした。10) 多目的型肝選択性遺伝子導入アデノウイルスベクターの開発を目指し、VA RNAs 欠失ベクターの作製法の確立及び最適化を行った。11) リポソーム製剤 NS9 が低用量で PEG-IFN 以上の抗ウイルス活性を示すことを見出した。12) 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い、Tamoxifen、clomifene、raloxifene、ERa antagonist の SERMs に抗 HCV 活性が観察された。

分担研究者		深澤 征義 国立感染症研究所 室長
下遠野邦忠	千葉工業大学附属総合研究所 教授	澤崎 達也 愛媛大学無細胞生命科学工学研究 センター 准教授
堀田 博	神戸大学医学研究科 教授	鐘ヶ江裕美 東京大学医科学研究所 助教
瀬谷 司	北海道大学医学研究科 教授	
小原 道法	東京都臨床医学総合研究所 プロジェクトリーダー	A. 研究目的
加藤 宣之	岡山大学医歯学総合研究科 教授	高感度な診断系の開発により輸血による HCV 感 染は激減したが、全世界には 1.7 億人も感染者 が存在する。HCV 感染症は、その多くが慢性肝炎か ら肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝癌での年間死 亡者は我が国で 3 万人を超える。インターフェロ
小池 和彦	東京大学医学部 教授	
松浦 善治	大阪大学微生物病研究所 教授	
深澤 秀輔	国立感染症研究所 室長	

ン (IFN)、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は 40-50%程度であり、半数以上の C 型肝炎患者は、肝癌発症のリスクを避けられない。本研究では、HCV の生活環における各ステップ、特にウイルスゲノム複製と粒子形成過程の分子機構を解明することにより C 型肝炎治療薬開発のための新たな標的を見出す。また、実際に阻害剤スクリーニングを行い、創薬候補化合物を同定する。さらに、HCV 感染に伴う肝発癌、脂質代謝異常などの病態、また持続感染の成立に関与する分子機構を明らかにし、得られる知見を基に発症予防など HCV キャリア対策に資する提案を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. HCV 生活環に関与する宿主因子の探索

Huh7. 5. 1 細胞を HCV で繰り返し感染処理し、長時間 (~3 ヶ月) 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。親株として CD81 を一過性あるいは恒常的に発現した細胞を用いた。

HCV 適応変異の解析は、ウイルス液よりウイルスゲノム RNA を精製し、逆転写により cDNA を調製後、配列決定を行い HCV-JFH1 親株と比較した。変異が見られた各部位に変異を導入したウイルスを構築し、そのウイルス産生能・感染能を検討した。

細胞-細胞間の HCV 感染を顕微鏡下で観察する系の構築は、核が GFP で染色された Huh7. 5. 1 細胞株 (pAcGFP1-Nuc 恒常発現株) を樹立し、HCV に感染させた後、これをドナー細胞として、各非感染レシピエント細胞と共培養することで行った。

B-ind1 と相同性を示すコシャペロンの p23 とのキメラ変異体を作成し、グルコシルチコイド受容体 (GR) シグナル抑制機構をモデルとしたコシャペロン活性検討試験を行った。またキメラ変異体を発現する細胞に JFH-1 ウイルスを感染させ、ウェスタンブロット法、定量的 RT-PCR、フォーカスフォーミングアッセイによって、HCV ゲノム複製およびウイルス増殖への影響を解析した。hB-ind1 と NS5A の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて詳細に解析した。

### 2. ウイルス粒子の性状解析

ウイルス粒子がリポタンパク質様因子と会合しているか否かを調べ、さらにその会合がウイルスの感染性とどのような関連があるかを明らかにするために、リポタンパク質内の中性脂肪酸であるトリグリセリドを加水分解する酵素処理をしたときのウイルス浮遊密度変化、感染性の変化などを解析し、ウイルス粒子の性状を明らかにし、さらに、感染性との関連も明らかにした。

### 3. 抗 HCV 剤の探索と作用機序解析

各種抗 HCV 剤の評価は、アッセイ用の細胞 (24 ウェルプレート) に薬剤 (各種濃度) を添加して 72 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより各種薬剤の 50%阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出した。HCV 感染実験は、以下のような手順で行った。HCV-JFH1 を感染させて 5 日目の RSc 細胞の培養上清を 0. 2  $\mu$ m のフィルターで濾過したものを感染性 HCV 粒子のソースとした (使用するまで -80°C で保存可能)。このソース (MOI が 0. 05 から 0. 1) を ORL8c 或は RSc 細胞に感染させた。数日間培養した細胞にリバビリンを添加して、その抗 HCV 活性を評価した。

Huh7. 5. 1 細胞-JFH1 の感染系を用いて種々化合物の阻害活性測定と作用点解析を行った。阻害活性はウイルス RNA の定量 RT-PCR、JFH1 感染による Huh7. 5. 1 細胞の細胞変性効果の解除、ウイルス蛋白質のウェスタンブロット解析等を指標とした。また、ウイルスの侵入過程を調べるため、レトロウイルスの pseudovirus を用いた。

### 4. ヒト肝臓キメラマウスを用いた抗 HCV 効果の評価

肝臓へのターゲティングカチオニックリポソームと polyI:C の複合体を作製した。この複合体を HCV を感染させたヒト肝臓型キメラマウスに投与し、抗 HCV 効果を評価した。その作用機序を明らかにするためにマイクロアレイによる検討を行った。

### 5. コア遺伝子トランスジェニックマウスを用いた酸化ストレス等の解析

同一月齢雄のコア遺伝子トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し、経腹腔的に

硫酸鉄を体重 100 g 当たり同一量投与 3 日連続投与し、24 時間後に肝臓を摘出し、肝臓内鉄量、血清 ALT 値、酸化ストレス (TBARS)、HO-1 発現量を蛋白レベルで検討した。また同一月齢雄のコア遺伝子トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し同様に週 1 回 3 ヶ月間にわたり鉄を投与し、肝臓内鉄量、血清 ALT 値、酸化ストレス (TBARS)、HO-1 発現量を蛋白レベルで検討した。

#### 6. 糖新生に及ぼす HCV 複製・感染の解析

細胞は HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR)、HCV 全長ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (FGR) 及び HCV J6/JFH-1 感染細胞、及び対照として HCV 複製のない親株 Huh-7.5 細胞を用いた。これらの細胞を 1,000 IU/ml のインターフェロン  $\alpha$  (Sigma) で 10 日間処理して HCV 複製をほぼ完全に排除した細胞も用いた。遺伝子発現量は定量 RT-PCR により、また、タンパク質発現及びそのリン酸化の程度はそれぞれの特異抗体を用いた免疫ブロット法により測定した。グルコース及びグルコース-6-リン酸の産生量の測定は既報の方法によった。

#### 7. 抗ウイルス免疫応答の解析

各種 KO マウスに polyI:C を i. p. して脾臓から mDC, リンパ球を採取するか、ex vivo 系 (骨髄性樹状細胞 (BMDC) と T 細胞の混合系) に polyI:C を加えて、mDC の dsRNA 認識経路の機能を解析した。用いたマウスは MyD88<sup>-/-</sup>, TICAM-1<sup>-/-</sup>, IPS-1<sup>-/-</sup>, IRF-3<sup>-/-</sup>, IRF-7<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> である。MyD88<sup>-/-</sup> は審良研から、IRF-3<sup>-/-</sup>, IRF-7<sup>-/-</sup> は谷口研から恵与を受けた。BMDC, 脾臓細胞の調整は既報に準じた。

#### 8. HCV プロテアーゼの新規基質の探索

MGC と FANTOM クローン、また独自にクローニングされた合計 390 種類の完全長プロテインカイネース遺伝子を鋳型に、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインカイネースタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、N 末端に FLAG 配列、C 末端にビオチン化に必要な配列を付加し、ビオチンリガーゼ BirA とビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルしたプロテインカ

イネースタンパク質を得た。切断反応は、AlphaScreen 法により検出した。また、細胞内の過剰発現 HCV プロテアーゼによるプロテインカイネース切断実験には、HEK293T 細胞を用いて行い、検出には V5 タグに対する抗体を用いたイムノブロッティングにより行った。

#### 9. 改良型アデノウイルスベクターの作製

AdV 上で唯一野生型と同程度発現している 2 種類の Virus associate RNAs (VA RNAs) のプロモーター領域を欠失したベクターを、完全長ウイルスゲノム導入法を用いて 293 細胞と 293T 細胞で作製した。またヒト U6 プロモーターから GFP あるいは Cre に対する shRNA を発現する発現単位を用いて、AdV の E1 あるいは E4 領域にゲノムに対して順方向 (R) あるいは逆方向 (L) に挿入した 8 種類の AdV を 293T 細胞を用いて作製した。得られたベクターの、GFP あるいは Cre に対する発現抑制効果を GFP 発現細胞あるいは Cre と Cre の標的配列を有するプラスミドの同時トランスフェクションを用いて、real-time PCR あるいは Western 法で判定し、最も高い発現抑制効果を示す領域及び方向を確定した。

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

## 1. HCV 複製増殖機構の解析

### 1-1. 粒子形成における非構造蛋白の役割

HCV 非構造蛋白のうち NS5A と NS2 は粒子形成にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。最近確立した HCV *trans*-packaging 系 (Core-p7 発現プラスミド、NS2 発現プラスミド、レプリコンプラスミドをコトランスフェクション) を用いて、粒子形成に重要な NS2 領域、アミノ酸残基の解析を行った。NS2 のプロテアーゼ活性中心や、リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成能は野生型と同等であったが、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸を欠損させると、感染性粒子の産生は消失した。

### 1-2. ゲノム複製に関与する宿主因子とその機能

HCV ゲノム複製複合体 (RC) に含まれ複製を正に調節する宿主因子として、昨年度までに creatine kinase B (CKB) を報告した。CKB は NS4A との相互作用を介して RC へ recruit され、複製調節に関与していることが示唆されている。今回、NS4A アンタゴニストが NS4A-CKB 結合を阻害すること、これに伴って HCV 産生が抑制されることを見出した。

NS5A と相互作用する宿主蛋白質 human butyrate-induced transcript 1 (hB-ind1) の、N 末端に保存されている p23 と相同性の高い領域は Hsp90 と相互作用し、その機能を調節するコシャペロン活性を有していた。siRNA を用いた hB-ind1 の発現抑制により低下したウイルスゲノム複製およびウイルス粒子産生は、p23 のコシャペロン領域を持つキメラ hB-ind1 の発現により回復した。hB-ind1 はウイルス感染細胞の小胞体で NS5A と共局在し、その部位には NS5A 結合蛋白質である FKBP8 や dsRNA も検出された。さらに詳細な解析の結果、hB-ind1/NS5A 両局在には折り畳まれた膜や小胞が認められた。

### 1-3. 感染性 HCV 産生における脂肪関連因子の役割

細胞外に放出されたウイルス粒子を各種リパーゼ処理により、粒子の性質および感染性を調べた。その結果、ウイルスをリポタンパク質リパーゼに続いて肝臓由来のリパーゼで処理すると感染性が失われる事、しかし、リポタンパク質リパーゼのみで

は感染性が維持されることを見いだした。これらの事から、感染性を有するウイルス粒子はリポタンパク質と複合体を作っており、そのリポタンパク質は VLDL の性質を持っている事が示唆された。さらに、アポリポタンパク質 E とウイルス粒子の会合が感染性に重要である事が示された。

### 1-4. HCV 非感染性細胞株を利用した感染機構解析

ウイルス複製過程に欠損を示さない多数の HCV 非感染 Huh7.5.1 由来変異株を分離した。この中には、ウイルス侵入過程に関与すると考えられる CD81 分子、Claudin1 分子の各欠損細胞が複数含まれていた。CD81、Claudin1 遺伝子をこれら欠損株に戻すことで HCV 感染能が回復することから CD81、Claudin1 分子が HCV 感染に必須の因子であることも遺伝学的に示された。ウイルス侵入過程には、培養液中のウイルスが細胞表面に結合し侵入する経路と細胞-細胞間で直接感染する経路があると考えられている。そこで、CD81、Claudin1 の欠損細胞を用い細胞-細胞間の感染性について検討を行ったところ、CD81 欠損株では細胞-細胞間感染が見られたが、Claudin1 の欠損株では感染が全く見られなかった。このことから、Claudin1 分子が通常の培養液からの感染だけでなく細胞-細胞間感染にも必須の因子であることが明らかとなった。さらに、Claudin1 の細胞外ドメインのうちでウイルス感染に重要と考えられる第 1 ループの PQWRIYSYAGDNIVTAQ(28-44aa) に対するウサギポリクローナル抗体を作製した。本抗体存在下でウイルス感染は強く阻害されることが明らかとなり、抗 Claudin1 抗体の有用性が示された。

## 2. 病原性発現機構の解析

### 2-1. 抗酸化系への HCV の関与

C 型慢性肝炎患者においては、他の肝炎に比較して強い肝内酸化ストレス産生が認められている。また、HCV コア遺伝子を導入したトランスジェニックマウスモデルにおいては、炎症不在下に肝内の酸化ストレスの増加が生じていることも示されている。今回、C 型肝炎患者にみられる鉄過剰状態を、マウスへの腹腔内鉄投与によりシミ 3 レートしたところ、鉄増加時に誘導される抗酸化系酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 と NADH dehydrogenase,

quinone (NQO)-1 が HCV コア蛋白存在下では誘導が阻害され、酸化ストレス消去能が低下することが見いだされた。この現象は培養細胞においても確認された。HO-1 制御因子として知られている転写因子 Nrf2 は、この現象に関与していなかった。

## 2-2. 糖代謝系への HCV の関与

HCV は 2 型糖尿病等の肝外病変を引き起こす。2 型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たしている。糖新生はその律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 及びグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) と、糖分解に関与するグルコキナーゼ (GK) のバランスによって調節されている。本研究では、Huh7.5 細胞を用いて、糖新生に及ぼす HCV 複製・感染の影響について検討した。HCV レプリコン複製細胞や HCV 感染細胞では、対照細胞に比べて、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現が亢進し、一方、G6Pase と拮抗する GK の遺伝子発現は抑制されていた。その結果、HCV 複製・感染細胞ではグルコースの産生が亢進していた。PEPCK や G6Pase の遺伝子発現は転写因子 FOXO1 によって制御されており、FOXO1 は Akt によるリン酸化によってその転写活性が調節されていることが知られている。HCV 複製・感染細胞では、FOXO1 のリン酸化が低下しており、転写活性が亢進していると推測された。しかし、Akt のリン酸化は低下しておらず、Akt 活性の低下はないと考えられた。

## 2-3. HCV プロテアーゼによる宿主因子のプロセッシング

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作成した 390 種類の完全長ビオチン化プロテインライブラリーを用いて、HCV NS3/4A プロテアーゼで切断される宿主プロテインライブラリーの探索を行った。その結果、6 種類のヒトプロテインライブラリーが切断されることを見出した。そのうち、3 種類については、HCV プロテアーゼとの共発現により細胞内での切断を確認した。

## 3. 持続感染機構の解析

TLR, RLR の特異アダプター TICAM-1, IPS-1 の

KO マウス、転写因子 IRF-3, IRF-7 KO マウスを用いてウイルス感染、発がん抑制に関与する自然免疫の鍵因子を同定した。

polyI:C 投与マウスは急性期に NK 活性化を起動した。同様の NK 活性化は *ex vivo* でも再現した。mDC が NK 活性化に向かう成熟状態になると判明した。NK 活性化には mDC の IPS-1>TICAM-1 の関与が証明された。TICAM-1 経路は INAM と名付けた分子を mDC 表面に誘導し、これが NK 細胞の INAM と相互反応を誘導して NK 活性化を起こすことを証明した。この系に MyD88 は関与しなかった。NK 活性化には IRF-3 が強く関与したが IRF-7 の関与は軽微であった。

polyI:C と OVA の投与マウスは経時 6 日後以降に CD8+ CTL 増殖を起動した。同様の CTL 誘導は OT1 を使った *ex vivo* 系でも再現した。polyI:C で mDC が cross-priming を誘導すると判明した。CTL 誘導には mDC の TICAM-1>IPS-1 の関与が証明された。CTL 誘導には IRF-3 と IRF-7 が関与し、両方の KO で cross-priming は完全に抑えられた。TICAM-1 経路の cross-priming 誘導因子は現在同定中である。

## 4. 新規 HCV 実験系の開発

### 4-1. ヒト細胞株 Li23 を使った HCV 複製増殖系

HuH-7 細胞株とは異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 複製増殖システムを新たに開発した。Li23 由来で抗 HCV 活性を定量的に評価できる簡便なアッセイシステム (ORL8 と ORL11) が、従来の HuH-7 由来の OR6 細胞システムでは困難であったリバビリンの抗 HCV 活性を評価できることを見出した。Li23 由来の HCV ゲノム複製システムを用いて、リバビリンの作用機構について解析した結果、リバビリンの抗 HCV 活性は、リバビリンがインシンーリン酸デハイドロゲナーゼを阻害し、細胞内の GTP 濃度を減少させることに起因していることを明らかにした。

### 4-2. 新規アデノウイルスベクターの開発

肝炎ウイルスに対する治療のために、多目的型 short-hairpin RNA (shRNA) 高度発現型新規アデノウイルス (AdV) ベクターの開発を行う。AdV はウイルス複製に必須である E1 領域を欠失し目的遺伝子と置換しているため、通常のベクターではウイルス由

来のタンパク質の発現は認められない。しかし、VA RNAsはPolIIIによりE1非依存的に転写されるため、ベクターにおいても野生型と同程度に発現する。VA RNAsは、Protein kinase R (PKR)のリン酸か抑制などによりウイルスの増殖に適した環境を作るために役割を果たしていると考えられており、ウイルス増殖に必須ではないものの、VA RNAsを欠失したウイルスの力価は約1/100程度に減少することが知られている。また近年、RNA干渉の仕組みが明らかになり、VA RNAsはmiRNAと同じ機構で核から細胞質に移動することが明らかになったものの、依然として細胞内の標的miRNAは同定されていない。しかし、shRNAをAdVで発現する場合には、shRNAとVA RNAsが干渉しshRNAの抑制効果を減弱する可能性が指摘されてきたものの、VA RNAs欠失ベクターは未だ作製されていない。これはウイルス力価が非常に減弱するためであると考えられる。我々も293細胞を用いてVA RNAs欠失ベクターの構築を試みたが作製は不可能であった。そこで本研究では、Rasを恒常的に発現しており、PKRの活性が抑制された状況下でもある程度ベクター作製が可能である293T細胞を用いてVA欠失ベクターの作製を試みた。その結果、VA RNAs完全欠失ベクターの作製は不可能であったものの、VAのプロモーター領域のみを欠失したベクターのみ作製が可能であった。VA RNAsの発現をreal-time PCRで確認したところ、プロモーター領域のみを欠失するだけでVAI、VAIIとも発現は認められなかったことから、これをVA欠失ベクターと定義し以下の検討を進めた。

shRNA発現単位をAdVの通常の挿入領域であるE1と我々独自のクローニングサイトであるE4領域にゲノムのR及びL向きに挿入した8種類のベクターを用いて、最適の挿入サイトと方向の同定を試みた。PolIIIで読まれるcDNAの場合には、E1の方が高い発現量が得られる傾向があるが、shRNAは意外なことにE4の方が高い目的遺伝子発現抑制効果が得られた。

## 5. 抗HCV薬の探索

HCVの全生活環を標的にする抗HCV剤スクリーニングを行ってきた。ヒットしたものの中に抗エストロゲン剤tamoxifenが含まれていたことから、選択

的エストロゲン受容体調節物質(Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs)が抗HCV薬として臨床応用できるのかどうか、様々な構造を持つSERMsのHCV阻害活性を調べた。また、HCV感染阻害の作用機序も解析した。

Tamoxifenおよびtriphenylethylene骨格を持った化合物clomifene、またraloxifeneはJFH1の感染に対してIC<sub>50</sub>約0.1 μMの強い阻害を示した。異なる骨格をもつエストロゲンレセプターα(ERα)antagonist(ICI182780, ZK164015, MPP)にもIC<sub>50</sub>約1 μMの阻害活性が見いだされたが、PPT, diethylstilbestrol, b-estradiol等のagonistは阻害は示さなかった。活性のあったSERMsはreplicon cell(1b)のHCV NS5A量を減少させた。TamoxifenがHCV複製を阻害することはすでに報告されているが、HCV感染の前後で薬剤を添加する実験を行ったところ、侵入過程も阻害することが示唆された。pseudovirusを用いた実験を行ったところ、SERMsはHCVのpseudovirus(HCVpp)の侵入を阻害したが、水泡性口内炎ウイルスのpseudovirus(VSVpp)の侵入は阻害しなかった。さらにこれらは、異なる型(1a, 1b, 2b, 4)のHCVppの侵入も阻害した。

肝臓へのターゲティングカチオニックリポソームとpolyI:Cの複合体を作製した。この複合体をHCVを感染させたヒト肝臓型キメラマウスに投与し、抗HCV効果を評価した。この複合体は投与後わずか1週でウイルス量を1/1000まで低下させ、既存の薬剤であるPEG-IFNに比較しても100倍以上の非常に強い阻害効果を示した。

## D. 考察

本研究グループでは、HCVの生活環の分子機構(ゲノム複製、粒子形成)、持続感染機構、また病原性発現機構の解明から、新規実験モデル系の開発、抗HCV薬の探索、評価まで、HCV感染症の予防、治療法の開発に必要な研究を総合的に推進している。

### 1. HCV複製増殖機構の解析

HCV NS2蛋白は、NS2/3の切断を担っていると共に、最近、粒子形成にも重要な機能を持つ事が明らかとなりつつあるが、そのメカニズムは不明である。今

回、HCV *trans*-packaging系を用いてNS2の感染性粒子形成能の解析し、NS2の粒子形成能は、プロテアーゼ活性とは独立した機能によるものであること、粒子形成にはNS2蛋白の両末端領域がともに重要であることが示された。

昨年度、HCVゲノム複製に重要な宿主因子としてCKBを同定し報告した。CKBはNS4Aとの結合を介してHCV複製複合体へリクルートされ、HCVゲノム複製活性の維持に重要な役割を果たすと推定されたことから、NS4AとCKBの相互作用を選択的にブロックすることにより、HCVゲノム複製の場でのエネルギー供給が遮断され、これによりウイルス複製、産生が抑えられるものと考えられた。そこで、NS4Aアンタゴニストによってこのような選択的阻害が可能であるかどうかを検証したところ、実際にNS4Aアンタゴニストを加えた細胞内でCKB-NS4A相互作用がされること、それに伴ってウイルス産生が抑制されることを見出した。新たな作用機序を有する抗HCV剤として創薬が非常に期待される。

hB-ind1はp23同様、Hsp90とクライアント蛋白質の乖離を促進するコシャペロン機能を有しており、その機能を以てHCVゲノム複製を調節している事が示唆された。また複製時にはウイルス特異的な膜構造体であるメンブラスウェブにおいて、他のシャペロン関連蛋白質と共に局在し、効率的に複製複合体を構成する蛋白質の安定化を図ると考えられた。

細胞外の放出された粒子の浮遊密度は一様ではなく、軽い密度のものおよび重い密度のものからなる。また、軽い密度の粒子の感染性が高い。これまでの研究から、軽い密度のウイルスはリポタンパク質が会合していると言われていたが、その実体は明らかでなかった。本研究から、感染性を有するウイルス粒子はリポタンパク質と複合体を作っており、そのリポタンパク質はVLDLの性質を持っている事が示唆された。さらに、アポリポタンパク質Eとウイルス粒子の会合が感染性に重要である事が示された。これらのことからウイルス感染制御法のひとつとして、リポタンパク質との会合を阻害することが有用であると考えられる。

各種HCV非感染肝細胞変異株を樹立した。CD81、Claudin 1の欠損株が複数分離されたが、これ以外

にもタイトジャンクション(TJ)に存在することが知られるClaudin1、Occludin、ZO-1などの分子のTJ局在に異常を示す変異株も複数分離され、HCV感染におけるTJの重要性が強く示唆された。これら変異株における欠損分子の同定や、感染メカニズムの詳細な解析等、今後さらに行いたいと考えている。

本研究によりClaudin 1分子がHCV感染に必須であり、培養細胞レベルで抗Claudin1抗体がHCV感染の阻害に有効であることが示されたことから、今後Claudin 1第1ループ前半部位を標的とした薬剤開発は極めて有用と考えられた。

## 2. HCV病原性発現機構の解析

今回、HCVは酸化ストレス産生を増加させるだけでなく、抗酸化系を阻害し、酸化ストレスをより増悪させることが明らかになった。

HO-1によって分解されたヘムの反応産物である一酸化炭素、ビリルビンは、抗酸化作用を有する。したがって、酸化ストレスによって誘導されたHO-1は酸化促進剤である遊離ヘムを除去し、かつ一酸化炭素、ビリルビンを介して細胞保護的に機能する。一方、HO-1の発現抑制やHO活性の阻害は酸化ストレスによる組織障害を悪化させる。HCVコア蛋白による、鉄によるHO-1発現誘導の抑制メカニズムの解明が重要である。肝臓特異的なHO-1発現を亢進させることにより、肝細胞保護作用がもたらされ、肝細胞の保護・回復がもたらされる可能性が高い。また、最近、HO-1はHCV複製を抑制することが示されてきており、C型肝炎治療の面からも意義は大きいと考えられる。

HCVは慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こす。2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たしている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。今年度の成績より、HCV複製・感染によって、通常とは異なるシグナル伝達経路を介して、肝細胞における糖新生が亢進することが明らかになった。そして、このようなHCV複製・感染による糖産生の亢進が高血糖状態の維持につながり、糖尿病発症の背景因子として関与している可能性が示唆された。

HCV NS3/4A プロテアーゼにより切断される宿主タンパク質を網羅的に探索し、6種類のプロテインカイネースを同定した。この中には、インターフェロン産生のレギュレーターである TBK1 が含まれており、しかも切断部位は、カイネースドメインと予想されるため、HCV は感染後細胞内の TBK1 を切断し、インターフェロン産生に必要なシグナル伝達機構をシャットオフする可能性が考えられる。また、別のカイネースは、RNA 認識ドメインをもっており、今後の感染実験等の結果を待つ必要はあるが、これらのプロテインカイネースが HCV 感染を感知し、抗 HCV 反応を行うが、HCV プロテアーゼがこれらの宿主因子を切断することにより、HCV が増殖しやすい環境を構築している可能性が考えられる。現在、今回見出されたプロテインカイネースの細胞内での切断や切断部位の同定などを進めている。

### 3. 持続感染機構の解析

HCV 感染に伴う抗体誘導、CTL, NK 活性化が肝炎の増悪因子か改善に貢献しているか定かでない。これらのエフェクター誘導の根幹に TLR, RLR シグナルを始めとする樹状細胞・自然免疫の活性化が必須なことが本研究で判明した。

HCV の JFH1 株は樹状細胞に直接感染しなかった (Ebihara et al., Hepatology 2008)。HCV の持続感染時にこのような dsRNA がどの様に mDC に供給されるのか未定であるが、外因性の取り込みが想定される。mDC が HCV 感染細胞の debris を貪食するならば、cross-priming による抗原特異的 CTL 誘導は強く起き、NK 活性化は他の (mDC に直接感染する) ウイルスより弱く起きると想定される。病態の推移にも依るが NK, CTL が肝組織傷害を増悪因子としてもたらすか、感染の鎮圧に向かわせるか興味のある問題である。HCV 感染はコア蛋白などが IFN 誘導を抑制して細胞増殖、ウイルス増殖に切り替えを行うため (Oshiumi submitted)、がん化を促進する条件を提供しうる。遺伝子変異など他のがん化要因が何故起きるかも含め今後の検討課題である。

### 4. 新規 HCV 実験系の開発

Li23 由来の抗 HCV 活性評価システムは従来の HuH-7 由来のシステムと比較して感受性が高いこ

とが分っていたが、今回、リバビリンについては圧倒的に Li23 由来のアッセイシステムの方が感受性が高いことが明らかとなった。Li23 由来の細胞システムを使用することにより、リバビリンが抗ウイルス活性を示す分子機序として以前より知られていた IMPDH の阻害が HCV ゲノムの複製抑制に関与していることを初めて明らかにした。IMPDH が阻害されることにより細胞内の GTP 濃度が急速に低下するために HCV ゲノムの複製が抑制されるものと考えられる。

ORL8 や ORL11 アッセイシステムを使用することにより、リバビリンのように OR6 システムによるアッセイ結果と大きく異なる他の薬剤を見出せる可能性もあることから、この新しいアッセイシステムは今後大いに期待できる実験系ではないかと思われる。

多目的型 shRNA 高度発現型新規アデノウイルスベクターの開発を行った。本研究で挿入した GFP あるいは Cre に対する shRNA は VA RNAs と干渉を起こさなかったため、VA 欠失あるいは VA 完全ベクターいづれでも同程度の高い目的遺伝子発現抑制効果を示した。しかし本研究で作製した VA 欠失ベクターを用いたマイクロアレー解析では細胞増殖や癌化に関連する複数の遺伝子発現が VA RNAs により増減している可能性が示唆されている。遺伝子治療を考えた時、たとえ RNA であってもベクター由来の産物が発現するベクターは安全性の疑念が生じる可能性もあり、VA RNAs 欠失ベクターは有用性が高いベクターであると考えられた。

### 5. 抗 HCV 薬の探索

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い、Tamoxifen、clomifene、raloxifene に加え、ERa antagonist の SERMs に抗 HCV 活性が観察された。これらは C 型肝炎治療への臨床応用も可能と思われる。また、Tamoxifen には複製阻害、侵入阻害の少なくとも二つの異なる HCV 阻害の機序があり、HCV 侵入の阻害活性については HCV に特異的な作用と考えられる。

細胞内に感染しているウイルスを完全排除する、個体レベルでの免疫応答および細胞内レベルでのウイルス構成因子の認識機構及び分解排除機構を

解明し、ウイルス感染に対する新たな防御法および治療法を確立することを目指している。ヒト肝臓キメラマウスの HCV/ HBV 感染モデル系で、カチオニックリポソーム及び PolyI:C 複合体がこれまで報告されている I 型インターフェロンだけでなく、III 型インターフェロンも誘導すること、そして HBV 及び HCV の排除に関しては III 型インターフェロンが主に寄与していることを示していた。

#### E. 結論

本年度、以下の研究成果を得た。

##### (1) HCV 複製増殖機構の解析：

1) HCV ゲノム複製における NS4A 結合因子 CKB(ATP 産生酵素)の重要性を見出した。NS4A antagonist は HCV 複製への CKB の介入を阻害し抗 HCV 作用を示す。

2) HCV NS2 は感染粒子産生に必要であり、特に N 末端側膜貫通領域、C 末端領域が重要である。

3) NS5A 結合因子 hB-ind1 はコシャペロン活性を有し、HCV 複製調節に働く。

4) 感染性 HCV 粒子産生にはリポ蛋白産生またはアポリポ蛋白の介在が重要である。

5) 既知の HCV 受容体候補分子は発現し HCV 非感受性の Huh7 細胞株を取得した。タイトジャンクション構造が感染過程に重要であることを示した。

##### (2) HCV 病原性発現機構の解析

1) HCV は抗酸化系の一部を減弱させ酸化ストレスを増加させることを示した。C 型肝炎における他の肝炎よりも強大な酸化ストレス産生の機序が明らかにされた。

2) HCV 複製・感染によって、通常とは異なるシグナル伝達経路を介して、肝細胞における糖新生が亢進する。

3) HCV NS3/4A プロテアーゼによって切断される宿主リン酸化酵素を 6 種類同定した。

##### (3) 持続感染機構の解析

TLR, RLR の特異アダプター TICAM-1, IPS-1 の KO マウス、転写因子 IRF-3, IRF-7 KO マウスを用いてウイルス感染、発がん抑制に関与する自然免疫の鍵因子を同定した。

##### (4) 新規 HCV 実験系の開発

1) 新規ヒト肝癌細胞株 Li23 を使って、リバビリ

ンの抗 HCV 活性が、イノシンーリン酸デハイドロゲナーゼの阻害によるものであることを初めて明らかにした。

2) 多目的型肝選択性遺伝子導入アデノウイルスベクターの開発を目指し、コスミドカセットの改変を行った。

##### (5) 抗 HCV 薬の探索

1) 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い、Tamoxifen, clomifene, raloxifene, ERa antagonist の SERMs に抗 HCV 活性が観察された。

2) リポソーム製剤 NS9 が低用量で PEG-IFN 以上の抗ウイルス活性を示すことを見出した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (研究代表者分)

##### 論文発表

1. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* (in press).
2. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, 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* 5137-5147 5137-5147, 2009.
3. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J Virol* 83: 2389-2392, 2009.
4. Kukiwara H, Moriishi K, Tagawa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T,

- Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969, 2009.
5. 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. *Hepatology* 50: 378-386, 2009.
  6. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436, 2009.
  7. 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* 16: 1123-1135, 2009.
  8. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
  9. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol.* 175: 1515-241, 2009.
  10. 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: 319-27, 2009.
  11. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 47: 4141-4143, 2009.
  12. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

## II. 分担研究報告

## HCV 複製増殖の機構解析に関する研究

研究分担者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨 感染性 HCV 粒子が集合し、産生する際にウイルスは宿主の機構を巧妙に利用している。細胞外の放出された粒子の浮遊密度は一樣ではなく、軽い密度のものおよび重い密度のものからなる。また、軽い密度の粒子の感染性が高い。これまでの研究から、軽い密度のウイルスはリポタンパク質が会合していると言われているが、その実体は明らかでなかった。本研究では、細胞外に放出されたウイルス粒子を各種リパーゼ処理により、粒子の性質および感染性を調べた。その結果、ウイルスをリポタンパク質リパーゼに続いて肝臓由来のリパーゼで処理すると感染性が失われる事、しかし、リポタンパク質リパーゼのみでは感染性が維持されることを見いだした。これらの事から、感染性を有するウイルス粒子はリポタンパク質と複合体を作っており、そのリポタンパク質は VLDL の性質を持っている事が示唆された。さらに、アポリポタンパク質 E とウイルス粒子の会合が感染性に重要である事が示された。これらのことからウイルス感染制御法のひとつとして、リポタンパク質との会合を阻害することが有用であると考えられる。

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

#### (1) HCV 感染・複製培養細胞系を用いて感染性獲得

に対する細胞側要因の解析。

感染性ウイルスゲノム、JFH1 を導入した細胞から、培養外液にウイルス粒子が放出されるが、ウイルス粒子の大部分は非感染性である。密度勾配遠心を行いウイルス粒子を分画すると、浮遊密度の小さい画分のウイルスに感染性を有する。浮遊密度の違いが何に起因するかを明らかにして、ウイルスの感染性との違いを明らかにする。

#### (2) 細胞外に放出されるウイルス粒子の性状の解析。

ウイルス粒子の浮遊密度の違いが何に起因するかを調べるために、リポタンパク質リパーゼ処理による粒子の変化および感染性を解析する。これまでに細胞外に放出されたウイルス粒子はリポタンパク質と会合しているといわれているが、そのことを示す実験的な証拠はない。HCV 感染者の血流中のウイルス粒子がリポタンパク質と会合しているという報告、および、感染したチンパンジーの血液から分離されたウイルス粒子の解析から、浮遊密度が低い粒子が

高い感染性を示す、という報告、およびウイルス粒子の密度から、リポタンパク質様物質が会合していると考えられており、それらのことを会わせ考え、ウイルス粒子がリポタンパク質と会合しているということになっている。本研究では、ウイルス粒子がリポタンパク質様因子と会合しているか否かを調べ、さらにその会合がウイルスの感染性とどのような関連があるかを明らかにするために、リポタンパク質内の中性脂肪酸であるトリグリセリドを加水分解する酵素処理をしたときのウイルス浮遊密度変化、感染性の変化などを解析し、ウイルス粒子の性状を明らかにし、感染性との関連も明らかにする。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

### C. 研究結果

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

昨年度の研究で、ウイルス粒子の産生が VLDL (very low density lipoprotein) の産生を制御する酵素、MTP (microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤の添加により抑制されることを見いだした。その際にアポリポタンパク質 B (ApoB) の培養上清への放出が MTP 阻害剤により強く阻害されることと対応したために、HCV の培養細胞への産生は ApoB の培養上清への放出と関連すると考えられた。VLDL のタンパク質成分には ApoB 以外にもアポリポタンパク質 E (ApoE), アポリポタンパク質 A (ApoA), アポリポタンパク質 C (ApoC) などが存在する。それらのアポリポタンパク質の中でウイルス粒子の産生にさらに関係する因子を探索し、ApoE が感染性ウイルス粒子の産生に重要であることを見いだした。つまり、ApoE をノックダウンした細胞からの感染性粒子の産生は強く抑制された。一方、ApoA, ApoC のノックダウン細胞は感染性粒子の産生をあまり低下させない。

また、放出される粒子の物理的性状を密度勾配遠心分離により解析し、浮遊密度の小さい粒子に感染性が高いことを確認した。これらのことから、培養

細胞の外に放出されるウイルス粒子はリポタンパク質と会合しており、感染性には ApoE が重要な働きをしていることが示唆された。

(2) 細胞外に放出されるウイルス粒子の性状の解析。

細胞外に放出されたウイルス粒子を濃縮し、その性質を各種リパーゼ処理により調べた。肝臓細胞から放出される VLDL は血液を流れる際に血管上皮細胞に存在する lipoprotein lipase (LPL) により分解されて大きさの小さいリポタンパク質 (IDL) に変換する。IDL は肝臓由来のリパーゼ (hepatic triglyceride lipase: HTGL) により分解されてさらに小さなリポタンパク質 (LDL) になる。中性脂肪酸が減少して小さなリポタンパク質になることは、その浮遊密度は大きくなることを示す。つまりこれらのリパーゼ処理により、リポタンパク質は少しずつ浮遊密度の大きなリポタンパク質に変化する。

もし、培養上清中の HCV 粒子がリポタンパク質と会合しており、そのリポタンパク質がリパーゼの加水分解を受けると考えると、リパーゼ処理により粒子の浮遊密度は大きくなると考えられる。LPL に HCV と会合していると思われるリポタンパク質を変化させる働きがあるかを調べるために、ウイルス粒子画分をウシの LPL で処理し、その後に感染性の変化を調べた。その結果、LPL 濃度依存的にウイルスの感染性は失われた。LPL をあらかじめ熱処理した場合、あるいは LPL の阻害剤であるオルリスタットを共存させると感染性は失われなかった。このことから LPL の酵素作用が HCV の感染性を阻害すると結論づけた。本実験に用いたウイルス産生細胞である HuH7 細胞は上清に肝臓特異的なリパーゼ、HGTL を大量に放出する。上の実験で LPL 処理した際に、ウイルス粒子画分に共存していた HGTL が同時に作用した可能性が考えられたために、HGTL の活性を阻害する中和抗体を共存させて LPL 処理を行うと、HCV の感染性は低下しなかった。

以上から、HCV は細胞の外に放出された際には VLDL と似たりポタンパク質と会合しておりそれが LPL で分解を受け IDL 様リポタンパク質に変化すると考えられた。さらに HGTL により分解が進み LDL 様リポタ

ンパク質に変化したと考えられる。

このような一連の変化は浮遊密度の変化としてとらえることができるので、酵素処理前後における浮遊密度変化を調べた。その結果予想通りに、LPL 処理すると浮遊密度は大きくなった。

一般に、IDL から LDL に分解される際に ApoE が遊離する。HCV に会合しているリポタンパク質においても同様なことが観察されるかを調べるために、LPL 処理前後のウイルス粒子と会合している ApoE の相対量を比較したところ、LPL 処理により ApoE の量は明らかに低下した。

以上から HCV に会合しているリポタンパク質は ApoE と会合して感染性を有しているが、リパーゼにより加水分解され ApoE が遊離することにより感染性が失われると考えられる。

#### D. 考察

HCV が細胞内で複製し、感染性粒子を産生する機構は明らかでない。しかし、感染性粒子が細胞の外に放出されるためにはリポタンパク質の細胞外放出の機構を利用している可能性が高いことがわかった。また、ウイルス粒子に会合している ApoE は感染性に重要な働きをしていることが明らかになった。おそらく HCV が細胞に感染する際に、ApoE 受容体を認識してウイルスが細胞に接触するなどの機構が考えられる。この機構がきちんと明らかになれば、抗 HCV に向けた薬剤開発の新たな標的を見いだすことができると考えられる。

#### E. 結論

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. *Antivir Chem Chemother.* 20(1):47-54, 2009
2. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyl adenosine analogs. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 53:103-104, 2009.
3. Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci.* 100(10):1943-1950, 2009
4. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(7):217-228, 2009
5. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology.* 50(3):689-696, 2009.
6. 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, Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol.* 83(13):6922-6928, 2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

## ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究

研究分担者 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こす。2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たしている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。肝臓における糖産生は糖新生とグリコーゲン分解の2経路があり、糖新生はその律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）及びグルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）と、糖分解に関与するグルコキナーゼ（GK）のバランスによって調節されている。本研究では、Huh7.5細胞を用いて、糖新生に及ぼすHCV複製・感染の影響について検討した。HCVレプリコン複製細胞やHCV感染細胞では、対照細胞に比べて、PEPCK及びG6Paseの遺伝子発現が亢進し、一方、G6Paseと拮抗するGKの遺伝子発現は抑制されていた。その結果、HCV複製・感染細胞ではグルコースの産生が亢進していた。PEPCKやG6Paseの遺伝子発現は転写因子FOXO1によって制御されており、FOXO1はAktによるリン酸化によってその転写活性が調節されていることが知られている。HCV複製・感染細胞では、FOXO1のリン酸化が低下しており、転写活性が亢進していると推測された。しかし、Aktのリン酸化は低下しておらず、Akt活性の低下はないと考えられた。すなわち、HCV複製・感染においては、Akt非依存性FOXO1リン酸化あるいはFOXO1脱リン酸化による転写調節機序の存在が推測された。以上の成績より、HCV複製・感染によって、通常とは異なるシグナル伝達経路を介して、肝臓における糖新生が亢進することが明らかになった。そして、このようなHCV複製・感染による糖産生の亢進が高血糖状態の維持につながり、糖尿病発症の背景因子として関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。また、2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たすことも知られている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。肝臓における糖産生は糖新生とグリコーゲン分解の2経路があり、糖新生はその律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）及びグルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）と、糖分解に関与するグルコキナーゼ（GK）のバランスによって調節されている。そして、それ

らの酵素発現は、主に遺伝子転写レベルで制御を受けている。本研究では、肝がん由来培養細胞であるHuh7.5細胞を用いて、糖新生に及ぼすHCV複製・感染の影響について検討した。

### B. 研究方法

(1) 細胞はHCVサブゲノムRNAレプリコン複製細胞（SGR）、HCV全長ゲノムRNAレプリコン複製細胞（FGR）及びHCV J6/JFH-1感染細胞、及び対照としてHCV複製のない親株Huh-7.5細胞を用いた。

また、これらの細胞を1,000 IU/mlのインターフェロン $\alpha$ （Sigma）で10日間処理してHCV複製をほぼ完全に排除した細胞も用いた。