

201030011B

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 **基盤的研究**

平成20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成23(2011)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20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

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

鈴木 哲朗 1

II. 分担研究報告書

HCV 複製増殖機構の解析に関する研究

下遠野 邦忠 23

HCV の複製に関与する宿主因子の機構解析

松浦 善治 29

高感染性HCV 適応変異株の分離と HCV ライフサイクル解析への応用

深澤 征義 37

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

堀田 博 43

C型肝炎と脂質代謝、抗酸化系、酸化ストレス

小池 和彦 53

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ネースの探索

澤崎 達也 65

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

瀬谷 司 75

実験モデルの開発に関する研究

加藤 宣之 81

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

鐘ヶ江 裕美 101

C型肝炎ウイルス排除機構の解析

小原 道法 107

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

深澤 秀輔 115

抗C型肝炎ウイルス(HCV)活性を有する化合物の探索・創製研究

掛谷 秀昭 119

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

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

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 浜松医科大学医学部 教授

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）CKBのNS4A結合とHCVゲノム複製制御、2）VAP-CによるHCVゲノム複製阻害、3）NS5A結合因子hB-ind1によるHCV複製制御、4）Micro RNA-122によるHCV翻訳亢進機構の解析に有用な細胞株の取得、5）粒子形成におけるNS蛋白の役割、6）感染性粒子のVLDL様リポ蛋白との複合体形成及びHCV-ApoE会合の重要性、7）VimentinによるCore蛋白翻訳後修飾とウイルス産生制御、8）HCVコアに対する細胞内抗体の作出とHCV産生阻害、9）感染性HCV粒子の性状、10）高感染能を持つHCV適応変異株の分離、11）感染過程におけるタイトジャンクション蛋白の重要性、12）HCV複製に起因する糖代謝関連遺伝子発現変化、糖新生亢進とその分子機構、13）Core蛋白による脂質代謝関連遺伝子発現、代謝酵素活性の変動と脂質代謝異常の誘導機構、14）Core蛋白による酸化ストレス亢進及び抗酸化系阻害、15）HCVプロテアーゼの宿主側基質蛋白の同定、16）Core蛋白-DDX3結合を介したIPS-1依存性IFN-beta誘導の阻害、17）樹状細胞のTICAM-1経路を介した細胞性免疫起動機構、18）ヒト肝癌細胞株Li23を用いた新規HCVゲノム複製、感染増殖モデルの確立、19）リバビリンの抗HCV活性の作用機序、20）Li23由来及びHuH7由来アッセイ系による抗HCV剤の感受性の相違、21）治療用遺伝子とshRNAを併せ持つアデノウイルスベクターの作製、22）リポソーム製剤NS9による抗ウイルス活性、23）HCV感染依存的な脂肪酸合成経路の活性化及び脂肪酸合成酵素阻害剤によるHCV複製阻害、24）既存薬ライブラリー、試薬ライブラリー約4000化合物の評価と抗HCV治療薬候補（チロシンキナーゼ阻害剤、非ステロイド系抗炎症剤、エストロゲン受容体調節物質等）の取得、25）構造活性相関解析に基づいた細胞障害性と抗HCV活性の分離。

分担研究者	加藤 宣之 岡山大学医歯学総合研究科 教授
平成20～22年度：	小池 和彦 東京大学医学部 教授
下遠野邦忠 千葉工業大学附属総合研究所 教授	松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
堀田 博 神戸大学医学研究科 教授	深澤 秀輔 国立感染症研究所 室長
瀬谷 司 北海道大学医学研究科 教授	深澤 征義 国立感染症研究所 室長
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	平成21～22年度： 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

鐘ヶ江裕美 東京大学医科学研究所 助教

平成 22 年度：

掛谷 秀昭 京都大学薬学研究科 教授

A. 研究目的

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 億人もの感染者が存在する。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、肝臓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、肝臓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 感染に伴う肝臓癌、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

各研究方法の詳細は、20、21、22 年度の各総括・分担研究報告書の当該項目に記載した。

(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 年総理府公示第 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. HCV ゲノム複製における creatine kinase B (CKB) の役割

プロテオミクス技術により HCV 複製複合体(RC)を構成する宿主因子として同定された CKB について HCV 複製における役割を解析した。レプリコン細胞において、3 種類の異なる方法で CK の活性を抑制し、HCV RNA 複製への影響の検討を行った。siRNA による CKB 遺伝子発現抑制、dominant negative CKB の強制発現、CK の inhibitor (Cyclocreatine) による CK 活性の抑制のいずれの方法によっても、HCV RNA 複製は抑制された。HCV 感染細胞においても CK 活性の抑制により、同様の結果が得られ、CKB は HCV の複製に必要な宿主因子と考えられた。また、免疫沈降法では、CKB は、HCVNS4A 蛋白と結合し、種々の酵素活性をもつ NS3/4A 複合体との complex を形成することを明らかにした。NS4A との結合部位を欠損した CKB は、HCV 複製への影響が減少すること、膜分画への局在が減少することから、CKB は NS4A 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た。さらに、permeabilized HCV 複製細胞を実験、in vitro helicase assay, protease

assay から、CKB は、ゲノム複製活性、特に、NS3 helicase 活性を調節していることを明らかにした。

1-2. HCV ゲノム複製における human butyrate-induced transcript 1 の役割

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. VAP-C による HCV ゲノム複製の抑制

これまでに、VAP-A および VAP-B が HCV の複製を正に調節していることを報告してきた。しかしながら、VAP-B のスプライシングバリエーションである VAP-C の機能はほとんど解析されていない。そこで今回、HCV の複製における VAP-C の役割について検討した。

VAP-C は主に腸管、子宮、膀胱などに発現していたが、VAP-A や VAP-B の発現が高い肝臓ではほとんど検出されなかった。VAP-A と VAP-B は major sperm protein (MSP) ドメイン、coiled-coil motif、および膜貫通領域の三つ機能ドメインで構成されており、coiled-coil と MSP ドメインを介してそれぞれ NS5A と NS5B に結合することが知られている。一方、VAP-C は VAP-B の MSP ドメインとサブタイプ特異配列のみで構成されており、NS5B とは結合するが NS5A には結合しなかった。VAP-C を過剰発現させると、VAP-A と VAP-B の NS5B への結

合が阻害された。また、VAP-A や VAP-B を発現させた Huh70K1 細胞に JFH-1 ウイルスを感染させると、対照細胞に比べて細胞内のウイルス RNA 量は 10-30 倍に増加したが、VAP-C を発現させた細胞では 5 分の 1 以下に減少した。

1-4. microRNA による翻訳亢進機構の解析

近年、HCV の複製に重要な因子として肝臓特異的な micro RNA である miR-122 が報告され、その阻害剤が臨床応用されつつある。しかし、その複製亢進のメカニズムは不明なままである。広く HCV 感染増殖実験に用いられている Huh7 細胞は miR-122 の発現が非常に高いため、翻訳に対する miR-122 の影響を正確に評価するのは困難である。本研究では miR-122 を強制発現することにより、HCVcc 感染を許容する細胞株の検索を試みた。調べた細胞株の中で子宮頸癌由来の Hec1B 細胞は、HCV の感染受容体候補分子を全て発現しており、miR-122 を強制発現させると感染後 48 時間後にはウイルス RNA 量が 100 倍に増加することが明らかになった。

1-5. HCV 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。

1-6. HCV 粒子産生及び感染性における脂質関連因子の役割

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。

HCV の粒子密度が粒子の組成から期待されるものよりも小さいこと、感染性を示す粒子はさらに低密度であることなどから、HCV はリポ蛋白質に会合していること、および感染性にリポ蛋白質の重要性が示唆されているが、その実体は不明である。そこで、培養細胞で感染増殖させ得られたウイルス画分をリポ蛋白質分解酵素で処理し、ウイルス粒子の性状および感染性の変化を調べた。その結果リポプロテインリパーゼ (LPL) で処理したウイルス粒子は浮遊密度が大きくなり、感染性を失った。感染性の喪失はウイルス粒子調製液に共存している hepatic triglyceride lipase (HTGL) の混在により、LPL 処理に引き続き HTGL でも加水分解されるために起こったと推定した。

ゲル濾過法によって HCV 粒子の性状、大きさの解析を行った。各画分のウイルス感染性を調べたところ、大部分の HCV 粒子が溶出される exclusion volume 画分には感染性は存在せず、exclusion volume に引き続いて溶出される画分以降に多峰性を示して感染性が認められた。最も高い感染性を示した画分は LDL が溶出される画分と一致した。また、各画分中で HCV と会合している ApoE の分布を調べた。その結果、感染性を示す画分にあるウイルスとは会合していたが、その他に exclusion volume の HCV とも会合していた。

1-7. HCV 産生における Vimentin の役割

培養肝細胞でのコア蛋白質発現により変動する宿主蛋白質の網羅的解析を行い、HCV コア蛋白質の特徴的な局在部位である界面活性剤不溶性画分を用いた比較プロテオーム解析から vimentin の変動を見だし HCV 産生への重要性を示してきた。今回、Vimentin 発現が HCV 産生を抑制する機構として、コア蛋白質のプロテアソーム系による分解過程に Vimentin が関与していることが明らかとなった。すなわち、プロテアソーム阻害剤でコア蛋白質発現細胞を処理するとコア蛋白質は安定化されるが、この系において、Vimentin を siRNA でノックダウンするとコア蛋白質量の増加が全く認められなくなった。また、HCV 感染細胞をプロテアソーム阻害剤処理することによりウイルス産生は増加するが、siRNA による Vimentin ノックダウン下ではその増加がほとんど認められなかった。

1-8. HCV コア蛋白質に対するイントラボディの作出と粒子産生阻害

HCV コア蛋白質は、粒子形成に不可欠であるとともに、肝脂肪化、肝発がんなど病原性にも関与する。抗コア抗体を産生する 5 種類のハイブリドーマから RNA を抽出し、抗体遺伝子の H 鎖、L 鎖の variable region をクローン化した。各遺伝子を CAG プロモーター支配下で発現するプラスミドを作製し、細胞へコア発現ベクターと共導入しコア-抗体 (イントラボディ) 相互作用を免疫沈降法で解析した。また、各イントラボディの HCV 産生阻害作用を評価した。その結果、大部分のイントラボディがコアとの相互作用を示し、ハイブリドーマ 2H9 由来 L 鎖、AA10 由来 H 鎖などではウイルス産生を 80% 以上抑制した。2H9、AA10 について L 鎖と H 鎖をリンカーを介して連結した一本鎖抗体 (scFV) scFV に発現ベクターを構築し、抗 HCV 活性を調べたところ、AA10 では L、H 鎖単独の場合に比べ有意に抗 HCV 活性が亢進し 90% 以上の阻害

を観察した。2H9 の場合は、L 鎖単独の場合より scFV の阻害効果が低かった。さらに、scFV を産生する組換えアデノウイルスを作製し細胞内接種による抗 HCV 効果を明らかにした。

1-9. 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。

1-10. 高感染性 HCV 適応変異株の性状解析

高感染増殖能を示す適応変異株 HCV-JFH1 (K74T/I414T) を分離し変異導入部位などを決定した。さらに、K74T、I414T 単独、あるいは両変異を有する HCV-JFH1 RNA ゲノムを調製し、HCV 産生能を調べた結果、ウイルス産生には顕著な差は見られなかった。培養上清に放出された各変異ウイルス粒子を Huh7.5.1 細胞に感染さ

せたところ、K74T 変異ではわずかな HCV 産生の上昇しか見られなかったが、I414T 変異では親株に比べ顕著な宿主内でのウイルス蛋白質の経時的な蓄積、HCV RNA の上昇 (100 倍以上) と HCV 粒子の放出促進が見られた。二重変異体 (K74T/I414T) ではさらなるウイルス産生上昇がみられた。以上の結果から、I414T 変異が HCV 産生の上昇、特にウイルス侵入過程促進に主要な寄与をしており、K74T 変異もその活性を強める働きがあるものと考えられた。二重変異ウイルスでは HCV RNA/HCV コア蛋白質比が 10 倍以上高いこともわかった。

HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株は、効率は悪いながらもマウス CD81 を持つ 751r/mCD81 細胞への感染が見られた。このことは、ウイルスが K74T/I414T 変異により、マウス CD81 を受容体として利用できるようになっていたことを示している。そこで HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株を親株として 751r/mCD81 に対してより高い感染能を有する適応変異株の分離をさらに進めた。その結果、継代を繰り返すことで 751r/hCD81 と同程度に 751r/mCD81 にも感染する適応変異株が複数分離された。その中から 4 バッチについて構造タンパク質領域のゲノム配列を決定した結果、全てで同じ配列を示し、K74T/I414T 変異に加え、E1 領域では N234D、V293A、T331S 変異が、E2 領域では V402A の変異が認められた。これらの変異はマウス CD81 の認識に重要と考えられた。

2. 病原性発現機構の解析

2-1. 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。

これまでに、HCV ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR、FGR) および HCV J6/JFH-1 感染培養細胞 (HCV 感染細胞) において、グルコースの取り込みが抑制され、糖の取り込みに重要な役割を果

たしているグルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーの細胞表面の発現が低下、GLUT2 については mRNA 発現の低下およびプロモーター活性の低下を明らかにした。そこで更に、IFN 処理によって HCV 複製を抑制させることで、上記の現象が回復するかに否かについて検討を行った。その結果、SGR、FGR および HCV 感染細胞において、IFN 処理によって、グルコースの取り込みは対照 Huh-7.5 細胞と同程度にまで回復した。また、SGR、FGR および HCV 感染細胞で低下した細胞表面 GLUT 発現、GLUT2 mRNA 発現および GLUT2 プロモーター活性が、IFN 処理によって回復した。この結果から、HCV 複製が GLUT の発現を制御し、グルコースの取り込みに影響することが示唆された。さらに GLUT2 mRNA 発現制御領域を特定するために、GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠変異体を作製した。SGR および FGR において、転写因子 Hepatic Nuclear Factor (HNF-1 α) 結合領域を境に HCV による抑制が認められなくなった。この結果から、HCV による GLUT2 mRNA 発現は HNF-1 α 結合領域で制御されている可能性が示唆された。また、HCV における細胞内代謝異常を包括的に解析するため、HCV 感染細胞 (14 dpi) において、プロテオーム解析を行った。その結果、細胞内の脂肪酸輸送に関連する遊離脂肪酸結合タンパク (FABP) 1 の発現低下を見いだした。FABP1 発現について詳細に検討したところ、HCV 感染細胞において、感染後経時的に FABP1 mRNA 発現の低下が認められた。また FGR において、FABP1 mRNA 発現の低下が認められた。

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。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。

FOXO1 転写活性の亢進に関わる Akt 非依存性シグナル伝達経路、及びそれに関与する HCV 蛋白質について調べた。その結果、HCV 複製・感染細胞においては、reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進に伴って c-Jun N-terminal kinase が活性化されることが FOXO1 リン酸化の低下と密接に相関することが明らかになった。また、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現の亢進及びグルコース産生の亢進は HCV 非構造蛋白質 NS5A の単独発現により引き起こされることも明らかになった。

2-2. 脂質代謝異常への HCV の関与

C 型肝炎患者及び HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスの肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。そこで、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、コア蛋白発現 HepG2 細胞と JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いた解析を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。多価不飽和脂肪酸 (PUFA) である eicosatetraenoic acid (EPA) や arachidonic acid (AA) の投与によって一価不飽和脂肪酸はコア蛋白非特異的に減少したが、コア蛋白によって誘発されている活性酸素種 (ROS, reactive

oxygen species)はPUFAによっては減少しなかった。これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系においてNADHを消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS産生のいずれもがコア蛋白発現細胞で特異的に減少した。コア蛋白発現HepG2細胞において、対照細胞に比して発現の増加していた脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な転写因子であるSREBP-1cは、ピルビン酸の投与によって低下が認められたが、EPAやAAの投与では低下は認められなかった。また、JFH-1増殖Huh-7細胞にても中性脂肪の増加が認められた。

2-3. 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ュレートしたところ、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。

2-4. HCVプロテアーゼによる宿主因子のプロセッシング

独自に開発した真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を利用して作製した390種類の完全長ビオチン化プロテインカイネース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カイネースの探索を行った。その結果、6種類のヒトプロテインカイネースが切断されることを見出した。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。そのうちのひとつSGK495は、HCV感染細胞においても切断されることが分かり、HCV複製細胞において、切断型SGK495がHCV複製を亢進することが見出された。

3. 持続感染機構の解析

IPS-1の特異結合蛋白としてDDX3が同定された。DDX3は細胞増殖因子、HCVコア結合蛋白と報告されているDEAD Box型helicaseである。DDX3はIPS-1との強制発現によりIPS-1単独より強くIFN-betaを誘導した。この活性はHCVのpolyU/UCを加えると強く誘導された。またHCVコア蛋白を発現させるとIPS-1依存性のIFN-beta誘導は阻害され、これはDDX3をコアがIPS-1複合体から奪い取るためと判明した。

RIG-I結合蛋白としてRiplet(RNF135)が同定された。RipletはTRIM25と65%の相同性でRing fingerドメインを持ち、ユビキチンE3 ligaseとして働く事が類推された。事実、実験的にRIG-I C末をユビキチン化してIFN-betaの誘導活性を強く増強することが判明した。HCVのpolyU/UCによってRIG-Iが活性化する際、Ripletは必須因子であった。

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。

RNA ウイルスの複製過程で生じる dsRNA は内因性に RIG-I/MDA5, 外因性に TLR3 を刺激し、樹状細胞 (mDC) に免疫応答を惹起する。dsRNA primed mDC は NK 細胞を活性化し、抗原特異的に CD8⁺ T を増殖させる。mDC のどの dsRNA 認識経路が如何なる転写系で NK, CTL をドライブする成熟化状態を起動するのかを分子レベルで解明することを目的とした。樹状細胞を移入した各種ノックアウトマウスへの polyI:C 刺激の実験などから、樹状細胞以外の非骨髄細胞が NK 活性化に関与すると判明した。一方、TICAM-1 は樹状細胞で働いて DC-NK の接着で NK 活性化を誘起し、mDC が NK 活性化に向かう成熟状態になると判明した。その担当分子は新規分子 INAM であった。

polyI:C と OVA の投与マウスで OVA cross-presentation と CTL 誘導を検討した。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。一方、IRF-1 単独 KO マウスでも CTL 誘導は抑制がかかることから別の CTL 誘導経路も存在すると考えられた。

4. 新規 HCV 実験系の開発

4-1. Li23 細胞株を用いた HCV 複製増殖システムの開発

HuH-7 由来のクローン化細胞を用いた全長 HCV-RNA 複製システムの開発過程で、非構造領域 NS3 や NS5A に生じた適応変異の特殊な組み合わせ

が HCV-RNA の複製効率を著しく上昇させることを見出した。そこで、このような適応変異の組み合わせを有する HCV レプリコン RNA や全長 HCV-RNA を HuH-7 細胞とは異なる細胞に導入した場合でも HCV-RNA の複製が起こるのではないかと考え、様々なヒト培養細胞株を用いて HCV レプリコン複製細胞株の樹立を試みた。

NS3 と NS5A 領域に適応変異を有する HCV レプリコン RNA (ON/3-5B/QR, KE, SR 及び ON/3-5B/QR, PL, SR) を様々なヒト肝培養細胞にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性のコロニーの出現を待ったが、ほとんどの場合、期待したようなコロニーを得ることは出来なかった。しかしながら、唯一ヒト肝癌細胞株 Li23 において多数の G418 耐性コロニーが得られた。得られたコロニーをミックスしてポリクローン化細胞 sOL を得た (O は HCV-O 株で、L は Li23 細胞由来という意味)。

次に、IFN-g によりレプリコン RNA を sOL 細胞から完全に排除した治癒細胞 (sOLc) を作製した。この sOLc 細胞に *in vitro* で合成した全長 HCV RNA (ON/C-5B/QR, KE, SR) をエレクトロポレーション法にて導入し、G418 耐性のコロニーを得た。最終的に 14 種類のクローン化細胞株を樹立し OL1~OL14 細胞と命名した。これらの細胞内における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により調べ、HCV RNA 量が多い OL8 と OL11 細胞を以後の実験に使用する細胞株として選択し、それぞれの治癒細胞 (OL8c と OL11c) を IFN-g を添加することにより作製した。

作製した OL8c と OL11c 細胞に *in vitro* で合成した ORN/C-5B/QR, KE, SR (レニラルシフェラーゼを発現する全長 HCV RNA) をエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性コロニーを得た。それぞれ得られたクローン化細胞における HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法により測定し、最も高い値が得られたクローンを選択してそれぞれ ORL8 細胞と ORL11 細胞と命名した。ORL8 と ORL11 細胞は HuH-7 由来で抗 HCV 活性の評価のためのアッセ

イ系に使用されている OR6 細胞と比較すると発現レベルはやや低いものの、十分量の HCV タンパク質を発現していることが分かった。

次に得られた ORL8 や ORL11 細胞が抗 HCV 活性を評価するアッセイ系として使用されている OR6 細胞と同じようにアッセイ系として使用できるかどうかについて検討した。現在までに抗 HCV 活性が報告されている代表的なもの (IFN 製剤やスタチン剤など) について、ORL8、ORL11 および OR6 細胞を用いてそれぞれの抗 HCV 活性を測定し比較検討した。それぞれの化合物についての 50%阻害濃度 (EC50) を算出して比較した。その結果、IFN- α 、 β 、 γ 、シクロスポリン、スタチン剤 (フルバスタチン、シンバスタチン、ローバスタチン、ピタバスタチン)、ミリオシンでは、ORL8 や ORL11 細胞の方が OR6 細胞より感受性が高く、逆に b-カロテンやゲルダナマイシンでは OR6 細胞の方が感受性が高いという結果になった。ORL8 や ORL11 細胞は OR6 細胞同様、非常に鋭敏なバイオセンサーの役割を持つ細胞であることが分かった。

次に、ORL8c や ORL11c 細胞が感染性 HCV 粒子を産生させる能力を有するかどうかを検討した。HuH-7 由来の RSc 細胞から産生された JFH-1 株 HCVcc は RSc、ORL8c および ORL11c 細胞のすべてに感染し、HCV 産生が効率よく起こることが分かった。しかしながら、ORL11c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞には感染して増殖するものの、もう一度、未感染の ORL11c 細胞に感染させた場合ほとんど増殖しないことが分かった。これに反して、ORL8c 細胞から産生された HCVcc は RSc 細胞で増殖し、もう一度、未感染の ORL8c 細胞に感染させた場合でも増殖してくることが分かった。従って、少なくとも ORL8c 細胞においては HCV の生活環が再現され、感染性 HCVcc が効率よく産生されていることが示された。

4-2. Li23 由来の細胞アッセイ系で抗 HCV 活性が見いだされたリバビリンの作用機序の解析

HuH-7 由来の OR6 アッセイ系では、リバビリンの EC50 は 100 μ M 以上と抗 HCV 活性が非常に弱いのは対照的に、ORL8 や ORL11 アッセイ系ではリバビリンの EC50 値が、それぞれ 8.7 μ M と 15.9 μ M と予想外に低く、強い抗 HCV 活性を示すことを明らかにした。細胞の違いによるリバビリンの抗 HCV 活性の違いは、JFH-1 株 HCV を感染させ HCV が増殖している状態においても観察された。

リバビリンが抗 HCV 活性を示す分子機序については、これまでに、RNA 変異源としての作用、インターフェロンシグナル伝達経路の活性化作用、イノシン酸脱水素酵素 (IMPase) の阻害による細胞内 GTP プールの減少効果、HCV の NS5B ポリメラーゼの活性阻害効果、T 細胞を介した免疫の亢進作用など、幾つも提唱されている。にも係わらず、現在でも解明されていない。そこで、ORL8 や ORL11 アッセイ系を用いて、これまでに提唱されている仮説のどれが、リバビリンの抗 HCV 活性に寄与しているかについて一つずつ検証を行った。

リバビリンが IFN シグナル伝達系を亢進させるかどうかを検証した。その結果、IFN- α については、1 IU/ml でも ISG15 や IRF7 の発現が誘導されたが、リバビリンでは 100 μ M の濃度でもまったく誘導されなかった。さらに、同じ濃度で、薬剤添加後 30 分で STAT1 のリン酸化が起こるかどうかについても比較検討した。IFN- α については、1 IU/ml でも STAT1 のリン酸化が観察されたが、リバビリンでは 100 μ M の濃度でも STAT1 のリン酸化はまったく観察されなかった。

リバビリンが酸化ストレス状態を亢進させて RNA 複製を抑制するかどうかを調べた。これまで、我々は、抗酸化剤であるビタミン E がシクロスポリン A や b-カロテンなどの抗 HCV 剤の活性をキャンセルする効果があることを報告している。そこで、リバビリンの抗 HCV 活性がビタミン E によりキャンセルされるかどうかを検討した結果、シクロスポリン A の抗 HCV 活性は 10 μ M のビタミン E により著しくキャンセルされたが、リバビリンの

抗 HCV 活性はビタミン E によってはキャンセルされなかった。

リバビリンがプリン生合成経路におけるインシンーリン酸デヒドロゲナーゼ (IMPDH) の阻害剤として作用することにより HCV-RNA の複製を抑制するかどうかを調べた。ORL8 アッセイ系を用いて検討した結果、リバビリンの抗 HCV 活性はグアノシンの添加によりほぼ完全にキャンセルされることが分かった。同様の現象は、ORL11 アッセイ系においても観察された。これらの結果から、リバビリンの抗 HCV 活性は、主に IMPDH の阻害を介していることが示唆された。

4-3. 異なる細胞株由来のアッセイ系を用いた化合物の抗 HCV 活性評価

各種抗 HCV 剤 (インターフェロン (IFN) やスタチン剤) について、Li23 由来の ORL8 や ORL11 アッセイ系で再評価を行い、HuH-7 由来の OR6 アッセイ系で得られた結果と比較した。その結果、多くの抗 HCV 剤に対して、ORL8 や ORL11 アッセイ系は OR6 アッセイ系より高い感受性を示すことが分かった。その一方で、OR6 アッセイ系の方が高い感受性を示す抗 HCV 剤もあった。化合物の抗 HCV 活性を正確に評価するためには、単独のアッセイ系ではなく、異なる由来の複数のアッセイ系を用いる必要があるのではないかと考えた。

さらに種々の抗 HCV 候補化合物 28 種類 (19 種類の合成化合物と 7 種類の植物抽出物由来の化合物を含む) を選択し、OR6 アッセイ系と Li23 由来の ORL8 アッセイ系を用いて抗 HCV 活性の評価を行った。また並行して、細胞毒性についても評価を行った。評価した化合物を以下に示す 6 つのクラスに分類した。

[1] どちらか一方のアッセイ系で既報と同程度の EC50 値が得られた 7 化合物: Griseofulvin, Crucumin, Cinanserin hydrochloride, 2'-deoxy-5-fluorouridine, Hydroxyurea, Nelfinavir, Resveratrol

[2] どちらか一方のアッセイ系で既報の EC50 値より 3 分の 1 以下の低い値を示した 7 化合物:

Acetylsalicylic acid, Artemisinin, 6-Azaauridine, Clemizole, Hemin, Isoliquiritigenin, Methotrexate

[3] どちらか一方のアッセイ系で既報の EC50 値より 3 倍以上高い値を示した 2 化合物: Nitazoxanide, Tizoxanide

[4] HCV 以外で抗ウイルス活性が認められていて、今回両方のアッセイ系で抗 HCV 活性が新たに見いだされた 4 化合物: Artesunate, Cantharidin, Cephalotaxine, Homoharringtonine

[5] 両方のアッセイ系で抗 HCV 活性が認められなかった 3 化合物: Guanazole, HA1077, Rolopram

[6] 両方のアッセイ系で HCV-RNA の複製を逆に増強させた 5 化合物: Bisindolymaleimide, Carvedilol, Esomeprazole, Silibinin A, Y27632

4-4. 新規アデノウイルスベクターの開発

肝臓への遺伝子導入効率が極めて高い非増殖型アデノウイルスベクター (AdV) を用いて、C型肝炎に対する治療法に資する、多目的型 short-hairpin RNA (shRNA) 高度発現型新規 AdV の開発を試みた。

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 Pol III 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) のリン酸が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。Pol III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。

次に、治療用遺伝子IFN- α 2のcDNAをクローン化し、EF1 α プロモーターからIFN- α 2を発現する発現単位をE1領域に、hU6プロモーターからshRNAを発現する発現単位をE4領域左向きに挿入したVA欠失AdV作製用コスミドカセットとIFN- α 2のみを持つVA欠失AdV作製用コスミドカセットを作製し、-41-293細胞へ導入しベクター作製に成功した。

5. 抗HCV薬の探索

5-1. カチオニックリポソーム及びpolyIC複合体

の抗ウイルス効果

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感染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、0.01mg/kgの投与で、現在臨床に使われているPEG-IFNの20倍投与と同じ阻害活性を示した。

polyICはその作用機序から、ウイルスにかかわらず免疫を誘導して抗ウイルス効果を示すことが考えられた。そこでHCVと同様に肝臓に感染し病原性を示すB型肝炎ウイルス(HBV)を感染させたヒト肝臓型キメラマウスを使用し、カチオニックリポソーム及びpolyIC複合体の抗HBV効果の評価を行った。やはりHBVにおいても投与後わずか1週でウイルス量を約1/100まで低下させ、既存の薬剤であるエンテカビルとの10倍以上の阻害効果を示した。

5-2. 脂肪酸合成酵素(FASN)阻害剤によるHCV複製阻害

これまでの解析から、HCV複製依存にFASNのプロモーター活性が上がることを培養細胞系で見出した。また、ヒト肝臓キメラマウスを用いた感染実験で、FASN阻害剤が新たなHCV治療薬となる可能性が示された。種々の化合物を解析し、調べたFASN阻害剤全てが抗HCV作用を有することが判明した。HCV複製の抑制活性はC75が一番高く、次いでオルリスタット、トリクロサンの順だった。この結果は、FASNの持つ酵素活性の中でケトアシルACPシンターゼ活性がHCV複製に最も必要である可能性を示している

5-3. HCV全生活環を標的にする抗HCV剤スクリーニング

HCV JFH1株をHuh7.5.1細胞に感染させる系を用いて、HCVの全生活環を標的とした抗HCV薬のスクリーニングを行った。

既存薬ライブラリー、試薬ライブラリーの約4000化合物を評価した結果、HMG-CoA還元酵素阻害剤、SERMsなど既にHCV阻害活性が報告されている薬剤以外に、imatinib、gefitinibなどのチロシンキナーゼ阻害剤、orlistatなどの脂肪酸合成酵素阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬、核内レセプターアゴニストなどに活性が見いだされた。チロシンキナーゼ阻害剤はHCV感染後に添加すると、HCV阻害作用が弱くなることから、少なくとも一部は侵入過程を標的としていると考えられた。

また、ヒット化合物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IC₅₀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IC₅₀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。

上記スクリーニングとは独立に、HCV持続感染

細胞を用いて、独自に合成した化合物群について抗HCV活性を評価した。その結果、顕著な抗HCV活性を有するヒット化合物を見出し、構造活性相関研究に適した化合物群のデザイン・創製・評価を行った。構造活性相関に関して、宿主細胞への細胞障害活性と抗HCV活性を分離可能であることを示唆する重要な知見が得られた。

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)病原性発現機構、持続感染機構の解明から、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た。

1. HCV複製増殖機構の解析

HCVゲノム複製に重要な宿主因子としてCKBを同定した。CKBはHCVが複製している細胞においてdetergent resistant膜分画にエンリッチされ、NS4Aとの相互作用が認められる。得られた結果から、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考えられた。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る。NS4A-CKBの結合阻害は抗HCV薬開発のための新たな標的になるものと期待される。

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。

HCVのNS5A蛋白質と相互作用する宿主因子として、VAP-AおよびVAP-BがHCVの複製を正に調節していることが知られている。しかしながら、VAP-BのスプライシングバリエントであるVAP-Cの機能はほとんど解析されていない。今回の解析により、VAP-CはVAP-AやVAP-BのNS5Bへの結合を競合的に阻害する事によって、HCVの複製を抑制していることが明らかとなった。また、VAP-Cの発現はHCVの臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。

HCVの複製を許容する細胞株はHuh7細胞に限定されているが、Huh7細胞はmiR-122の発現量が極めて高いため、HCV RNAの翻訳におよぼすmiR-122の影響を正確に評価するのは難しい。そこで本研究では、miR-122の強制発現によってHCV複製を許容する新たな細胞株を検索してHec1B細胞を見出した。この細胞はHuh7細胞に比較して、内在性のmiR-122の発現レベルが低いため、HCV複製におけるmiR-122の機構解析に適した細胞であることが示された。今後、miR-122と結合するHCVの5'UTRに変異を導入し、翻訳亢進機構の解析を進めたい。

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。

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るが、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、ApoE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。

分子篩によるウイルス粒子の解析から、感染性ウイルス粒子の大きさはVLDLよりも小さい事が示された。ウイルス粒子本来の大きさを加味すると、ウイルス粒子に会合しているリポ蛋白質はVLDLよりも遥かに小さいと考えられ、粒子産生においてリポ蛋白質がどのような機構で取り込まれるかに興味が待たれる。また、ゲル濾過法によりHCV粒子を分画すると、感染性を示さない粒子にもApoEが結合している事が判明した。これが、ApoEだけでは感染性を賦与するのには十分で無い事を示しており、今後感染性を示す分子機構の解析が重要になる。

vimentin 発現量がコアタンパク質量、ひいてはウイルス産生にも影響を与え、そのメカニズムとしてユビキチン-プロテアソーム系の関与が明らかとなった。このことから、vimentin が関与するユビキチン-プロテアソーム系がHCV 治療薬の標的となる可能性が提示され、将来的に宿主因子を標的とした新たな治療薬開発の糸口になる可能性が示唆された。vimentin を介したコア蛋白質のプロテアソーム系による分解系の特異性をさらに検討した結果、宿主蛋白質であるp53分子のプロテアソームを介した分解に関してもvimentin の関与が認められている。このことはvimentin が宿主蛋白質のプロテアソームを介した分解制御にも関わっている可能性を示唆し、普遍的な制御過程としても注目される。

HCV コア蛋白に対するイントラボディを作出しそのHCV産生阻害活性を明らかにした。今後、コア発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウ

スなどを用いて、イントラボディが脂質代謝改善効果を有するかを明らかにして行きたい。また、コア-イントラボディ複合体の構造解析を行うことにより、相互作用部位の立体構造が明らかになり、コアの機能をブロックすることによる新たな抗HCV薬の開発に有益な知見が得られるものと期待される。

HCV 適応変異の解析から E2 領域の I414T 変異がウイルス産生上昇、特に侵入過程の促進に関与することが明らかになった。変異導入により感染性粒子の比重が幅広くなっていることから、侵入に有利となるリポタンパク質との相互作用が促進されている可能性が考えられた。また、変異ウイルスでは HCV RNA/HCV コア蛋白比が高く、粒子形成において HCV RNA のパッケージングの効率が上がっている可能性も示唆された。このことも感染能の上昇に寄与しているものと考えられた。また今回、ヒト CD81 と同等にマウス CD81 を侵入に利用できる HCV 適応変異株を樹立することができた。この変異株は構造タンパク質である E1, E2 のウイルス表面領域に計 5ヶ所の変異を有しており、N234D による糖鎖の欠損が一つの特徴と考えられる。これらの変異により、ヒト CD81 に加えマウス CD81 との高親和性も獲得したものと考えられた。

2. HCV 病原性発現機構の解析

2 型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要である。肝細胞は糖を産生し、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。

HCV 感染は、酸化ストレスの誘導 (ROS 産生の亢進) を介して JNK を活性化し、この経路が FOXO1 のリン酸化を抑制してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素遺伝子 (PEPCK 及び G6Pase) の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。通常のインスリンシグナル経路で FOXO1 の転写活性調節に重要な役割を果たしている Akt/PKB は

HCV 感染により逆に活性化されており、HCV 感染による糖新生促進において Akt/PKB シグナル伝達経路は直接には関与していないと考えられた。また、FOXO1 リン酸化の抑制及び糖新生の亢進に HCV NS5A が関与している可能性が示唆された。

C 型肝炎における肝脂肪化の機序については、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の阻害等が明らかになってきている。C 型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。また、SREBP-1c, fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼといった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることも重要な所見である。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示されたといえる。NADH を減少させる方法によって C 型肝炎の病態を改善させる可能性がある。

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。

網羅的探索技術を基盤に、HCV NS3/4A プロテアーゼにより切断される宿主プロテインカインースタンパク質の探索を行った。同定したプロテインカインース 6 種類が細胞内で HCV プロテアーゼにより切断され、少なくともその中の 1 つは、HCV 感染細胞内でも切断され、HCV 複製を亢進する結果を得た。これは、HCV が自身のプロテアーゼを用いて、宿主プロテインカインースを切断し、細胞内シグナル伝達系を改変して、複製に利用している可能性を示唆している。また、見出されたプロテインカインースの中には、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、切断部位は、カインースドメイン内であったため、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、RNA 認識ドメインを別のカインースも、lipid raft に局在することが見出され、カインースドメインと RNA 結合ドメインとの間を切断することが分かり、HCV 複製時における RNA 結合ドメインの関与は興味深いところである。

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、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、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。

HCV の持続感染時にウイルス dsRNA がどの様に機能するかは殆ど未解明の課題と言える。本研究でマウス肝実質細胞に HCV 感染が成立し、mDC を介した NK 細胞の活性化と cross-priming による抗原特異的 CTL 誘導が TICAM-1 経路を介して強く起きることがノックアウトマウスを使って証明された。HCV の免疫病態の解明の他、HCV の患者株の抽出、創薬のスクリーニングなど多くの臨床研究に本研究の自然免疫改変モデルマウスが有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

4. 新規 HCV 実験系の開発

これまでの研究により得た HCV 適応変異の組み合わせ (Q1112R, K1609E 及び S2200R) により HuH-7 細胞株以外の細胞株 (Li23) で全長 HCV-RNA 複製を伴うレポーターアッセイ系と JFH-1 株 HCVcc の産生系を初めて開発することができた。

現時点で、これらの適応変異の組み合わせがどのように Li23 細胞内での HCV-RNA の複製効率の向上に関与しているかについては不明である。現

在でも HuH-7 由来の細胞だけが、HCV-RNA の複製に有利な環境を有している理由についてはよく分かっていない。本研究により HuH-7 とは異なる Li23 由来の細胞株が得られたことから、HuH-7 細胞との詳細な比較により RNA 複製に有用で両細胞に共通した宿主因子を抽出できる可能性がある。

本研究により Li23 由来の細胞株 ORL8 と ORL11 の樹立に成功し、化合物の抗 HCV 活性を定量評価するアッセイ系が完成した。これまで、HuH-7 由来の細胞株にのみ依存してきたが、今後はこれらのアッセイ系も使用して総合的に化合物の抗 HCV 活性を定量評価できるようになった。実際、これまで抗 HCV 活性ありとされていた物質について ORL8 や ORL11 アッセイ系を用いて EC50 値を評価したところ、大部分が HuH-7 由来の OR6 アッセイにより得られた EC50 値より低い値を示した。このことは、ORL8 や ORL11 アッセイ系は OR6 アッセイ系より感度の面で優れたアッセイ系であることを示唆する。従って、今迄見逃されていた物質に抗 HCV 活性があることを見出す可能性もある。

本研究では、Li23 由来の ORL8c 細胞で感染性 HCV 粒子が産生され、それがさらに未感染の ORL8c 細胞に感染して HCV が増殖することを示した。このことは、従来世界中で汎用されている HuH-7 由来の細胞を用いなくとも HCV の生活環を培養細胞レベルで再現できたことを示している。現在のところ、産生される HCV 量は HuH-7 由来の細胞と比較すると 1 ケタ低いいため、今後細胞のサブクローニングを行い、HCV 産生効率のよい細胞を探す必要性がある。

リバビリンの抗 HCV 活性が Li23 由来のアッセイ系で顕著に認められた。リバビリンについては、これまで、HCV-RNA の複製に対する抗 HCV 活性の検出が困難であったことから、HCV-RNA の複製阻害機構を説明できる様々な仮説がいくつも提唱されていたものの直接検証することは困難であった。しかしながら、Li23 由来の細胞系を用いることに

より、仮説を直接検証することが可能になった。その結果、リバビリンが抗 HCV 活性を示す分子機序として IMPDH の阻害を介したものであ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-RNA の複製が抑制されるものと考えられる。OR6 アッセイ系では、なぜリバビリンの抗 HCV 活性が検出されないかについての解答は今後の研究課題ではある。また、ORL8 や ORL11 アッセイ系を使用することにより、リバビリンのように OR6 アッセイ系と結果が大きく異なる他の化合物を見出せる可能性がある。

異なる細胞株由来のアッセイ系を用いて種々の化合物の抗 HCV 活性を評価した実験結果から、
1) 細胞が同じ HuH-7 由来のアッセイ系でも HCV 株の違い (HCV Con1 株と HCV-0 株) により得られる結果が異なることが示唆された。
2) 同じ HCV 株 (HCV-0 株) でもアッセイに用いる細胞の種類が異なると得られる結果も異なることが示唆された。

以上本研究により得られた結果から、化合物の抗 HCV 活性を正しく評価するためには、複数の細胞株と複数の HCV 株由来のアッセイ系から得られた EC50 値と CC50 値から SI 値を求めて総合的に評価する必要があることが分かった。

多目的型 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った。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。これまでは、VA RNAs の発現に関して問題視するよりも、AdV 自体の免疫原性が大きな問題であったが、我々はこの免疫原性により引き起こされた炎症反応の原因がウイルスの pIX タンパ