

57. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama, Japan.

58. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. . 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama, Japan.

59. Masanori Ikeda, Kyoko Mori, Takahide Nakazawa, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Nobuyuki Kato. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

60. Kyoko Mori , Masanori Ikeda, Yasuo Ariumi, Hiromichi Dansako, Takaji Wakita, Nobuyuki Kato. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

61. Yasuo Ariumi, Masanori Ikeda, Tkaji Wakita, Nobuyuki Kato. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010

62. Akito Nozaki, Kazushi Numata, Manabu Morimoto, Masaaki Kondo, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Katsuaki Tanaka. Hydroxyurea suppresses hepatitis C virus replication in human: a phase I trial of oral hydroxyurea in chronic hepatitis C patients. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

63. Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, Yuichi Nozaki, Hiroyuki Kirikoshi, Kento Imajo, Kaori Suzuki, Kengo

Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

64. Yoshiyasu Shinohara, Koji Fujita, Yuichi Nozaki, Kento Imajo, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, , Hiroyuki Kirikoshi, Kengo Funakoshi, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato, Shin Maeda, Atsushi Nakajima, Satoru Saito. Hepatitis C Virus infection changes the lipoprotein profiles in the replicon system. 17th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan, 2010.

65. Takebe, Y., Uenishi, R., Hase, S., Tsuchiura, T., Liao, H., McMahon, J.B., and O'Keefe, B, R. Effective protection of HCV infection by HCV entry inhibitor griffithsin, newly identified carbohydrate binding protein, in mouse infection model. 7th International symposium on Hepatitis C virus and related viruses. September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.

66. Yoshida T, Satoh F, Kondoh M, Mizuguchi H, Yagi K. Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication. 50th annual meeting of the American society for cell biology. December 11-15, 2010. Philadelphia, USA

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

1. プロスタグランジン I 2 のアゴニストを含む、C 型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方誠、阿部雄一、脇田隆宇、出願日 2010 年 9 月 30 日、出願番号 特願 2010-222045

2. 名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法
出願番号：特願 2010-154225、出願日：2010/7/6
基礎出願：特願 2009-247342 (2009/10/28)、
特願 2010-121282 (2010/05/27)

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
発明者：水口裕之、川端健二、稲村充、古江美保。

II. 分担研究報告

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発の総括

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 肝炎ウイルス感染症は我が国における最も重要な疾患のひとつであり、その対策については社会的要請もあり、迅速に進める必要がある。HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。一方HBV感染では、ラミブジンなど核酸アナログ剤による抗ウイルス療法の導入により治療法が大きく変化した。核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下する。しかし、長期間にわたる治療が必要であり、HBV排除は容易に達成できない。さらに薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、人獣共通感染症としてのE型肝炎ウイルス（HEV）感染症が問題となってきた。特に老人における感染の中には重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。そのために肝炎ウイルスの感染複製増殖過程の解明に寄与する研究を遂行する。

A. 研究目的

HCV感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分であり、新たな抗ウイルス薬の開発による治療効果の改善が望まれている。HBV感染では、核酸アナログ剤の長期投与によりHBVキャリアの肝癌発生率は低下するが、薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、HEV感染では、老人の感染が重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。

本研究では肝炎ウイルス培養系や増殖系を用いて、ウイルス感染増殖過程の解明による新規治療標的の探索と新規肝炎治療法の開発を目的とする。HCVにはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができる。このウイルス培養系を利用してHCVの感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV感染レセプターが明らかとなり、レセプター導入トランスジェニックマウスによる新規感染動物モデルを開発し、治療薬開発に役立てる。HBVは感染レ

セプターの同定を含めて、HBVの新たな感染実験系の開発を実施する。さらに、HBV、HCVともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進め、同定した化合物の作用機序、標的の解析を進める。HEVも最近ウイルス培養系が確立された。このHEVのウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬の開発を進める。また、ヒトiPS細胞の肝細胞分化誘導法が開発され、従来不可能とされていた薬物代謝酵素活性を有する肝細胞分化誘導条件を確立されつつある。この技術により、肝炎ウイルス感染増殖が成立する肝細胞分化誘導状態を特定し、関与する宿主因子を網羅的に解析する。

分担研究としてはHBV、HCV、HEVのウイルス増殖機構の解析、抗ウイルス活性を有する化合物の同定などを進めるとともに、研究班に参加する研究分担者の研究をまとめ、研究者間の共同研究を推進する。

B. 研究方法

1. HBV増殖細胞の解析

抗ウイルス薬スクリーニングに適したHBVゲ

ノムが増殖する細胞を探索した。Hep2215 細胞、HepAD38 細胞、HepaRG 細胞などを入手しウイルス増殖を解析した。

2. HCVのE2タンパク質に結合する環状ペプチドによる感染阻害

S2 細胞で発現させた精製E2タンパク質を東京大学の菅研究室に提供し、結合する環状ペプチドを探索した。その環状ペプチドを用いてHCVの感染阻害活性をシュードタイプ粒子および感染性HCVの実験系で解析した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、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、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. HBV増殖細胞の解析

HBVは培養細胞による感染実験系が存在しない。このためHBVのウイルスゲノムをタンデムに結合したプラスミドを培養細胞に導入することにより、ウイルスゲノム複製とウイルス粒子産生を観察できる。Hep2215細胞はHBVプラスミドが組み込まれ安定的にウイルス増殖が見られるが、入手した細胞ではウイルス産生能は低かった。そこで米国のDr. SeegerよりHepAD38細胞を入手し検討した。HepAD38細胞ではHBV遺伝子がテトラサイクリンで発現制御可能なプロモーターで転写され、テトラサイクリン非存在下でHBV複製増殖が誘導される。また、HepaRG細胞ではHBVの感染が可能と

報告されているが、感染効率は低いためウイルス感染増殖を解析するには感染効率を向上させる必要がある。

2. HCVのE2タンパク質に結合する環状ペプチドによる感染阻害

HCVのE2タンパク質をハエ由来のS2細胞で発現させ、Hisタグによるアフィニティ精製およびゲル濾過により精製した。単量体のE2タンパク質を数ミリグラム得ることができた。精製E2タンパク質はHCVシュードタイプ粒子および感染性HCVのHuh7細胞への感染を容量依存的に阻害した。従ってこの精製E2蛋白はHCVの細胞表面のレセプター結合を競合的に阻害できると考えられた。この精製E2蛋白に特異的に結合する環状ペプチドを東大・菅研究室でスクリーニングしてもらい、4種類のペプチド(D2, D4, L1, L7)を提供された。このなかで、L1およびL7のペプチドは感染性HCVのHuh7細胞への感染を容量依存的に阻害した。

D. 考察

HCVにはウイルス培養系が開発され、ウイルスライフサイクルの各過程を標的とすることができる。このウイルス培養系を利用してHCVの感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。HBVの場合、ウイルスゲノム導入による複製増殖系は確立しているものの、ウイルス感染が可能な培養細胞系が存在しないため、ウイルスライフサイクルの解析は限定的である。そこで、HBVの新たな感染実験系の開発も実施する。さらに、HBV、HCVともにハイスループット実験系を構築して低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進めたい。同定した化合物についてはその作用機序、標的の解析を進める。

今年度はHBV増殖系の評価を行った。HepAD38細胞によりウイルス増殖・ウイルス粒子産生を解析できることが明らかとなったので、来年度は抗ウイルス薬のスクリーニング、作用標的の同定などを進

めていく。

また、HCVのE2タンパク質に結合する環状ペプチドを共同研究による入手し、その感染阻害活性を解析した。ペプチドおよびE2タンパク質上の結合領域の同定などを進めていく。感染初期過程を阻害する抗ウイルス薬の開発が期待される。

E. 結論

1. HepAD38細胞によりHBVのウイルス増殖・ウイルス粒子産生を解析できた。
2. HCVのE2タンパク質に結合する環状ペプチドのHCV感染阻害活性を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*. 2010 84(22):12048-57.
- 2: von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol*. 2010 53(5):797-804.
- 3: Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology*. 2010 405(2):361-9.
- 4: Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. 2010 139(4):1355-64.

5: Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol*. 2010 84(18):9118-27.

6: Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2010 51(6):1922-32.

7: Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 202(1):75-85.

8: Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One*. 2010 5(5):e10575.

9: Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*. 2010 6(4):e1000885.

10: Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 395(4):565-71.

11: 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*. 2010 84(11):5824-35.

2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第23回肝臓フォーラム(東部)、日本工業倶楽部会館(2010, 6.5)

2. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第9回KMU研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院 新館12階大会議室 (2010, 6.18)
3. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構」、京都大学ウイルス研究所 学術講演会、京都大学 京大会館 101号室 (2010, 7.15)
4. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第17回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6階602会議室 (2010, 11.25)
5. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCVNS5A 蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンキナーゼの探索、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)、ワークショップ5 「C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用」
6. 有海康雄、黒木美沙緒、土方誠、Qi Yue、池田正徳、脇田隆宇、下遠野邦忠、加藤宜之、ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
7. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆宇、HCVの増殖適応変異とその意義、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)、シンポジウム6 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明
8. 相崎英樹、後藤耕司、松本喜弘、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、本島清人、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、(2010, 5.27-28)
9. 鈴木亮介、齋藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
10. 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、千葉丈、深澤征義、感染・増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
11. 阿部雄一、Aly Hassan Hussein、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠、Exploration of a new signaling pathway related to infectious HCV production、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
12. 土方誠、阿部雄一、Aly Hassan Hussein、齊月、脇田隆宇、下遠野邦忠、臨床分離 HCV 株の培養と性状、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
13. 深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、村上裕子、C型肝炎ウイルス (HCV) に阻害作用を示す物質の探索、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
14. 渡士幸一、下遠野邦忠、Kuan-Teh Jeang、脇田隆宇、マイクロRNA経路のC型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール (2010, 11.7-9)
15. 江角真理子、石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、菊田幸子、榊原由子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス感染に対する自然防御について、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9)
16. 渡邊則幸、村山麻子、Mohsan Saeed、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCVエンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、日本ウイルス学会第58回学術集会、あわぎんホール(2010, 11.7-9))
17. I Wakita, HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold Spring Harbor Asia Conference, October 18 - 22, 2010, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China

18. T Wakita. HCV replication in vitro, The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Makuhari Messe, Chiba, Japan (2010 Dec 17-18)
19. R Suzuki, D Akazawa, K Ishii, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, Efficient production of *trans*-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
20. T Masaki, S Matsunaga, H Takahashi, T Kato, Y Endo, T Sawasaki, T Wakita, T Suzuki, Identification of hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
21. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, T Wakita, Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
22. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of a Purification Method of Highly Purified HCV Virion for Industrial Production, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
23. M Moriyama, H Yokokawa, D Akazawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
24. K Watashi, K Shimotohno, K-T Jeang, T Wakita, Inhibition of HCV replication by a small molecule that suppresses microRNA pathway, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
25. M Saeed, T Kato, M Shiina, M Imamura, K Chayama, Y Choi, K Krawczynski, T. J Liang, T Wakita, Hepatitis C Virus JFH-1 Strain That Adapted In Vivo Acquired Abilities for Efficient Virus Production and Anti-apoptosis, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
26. T Kanda, R Tamura, F Imazeki, S Nakamoto, S Wu, T Roger, T Wakita, H Shirasawa, O Yokosuka, HEPATITIS C VIRUS NS5A ATTENUATES LPS-INDUCED APOPTOSIS BY DOWNREGULATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 SIGNALING PATHWAY, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)
27. Y OKAMOTO, T MASAKI, A MURAYAMA, T KATO, H WATANABE, T Wakita, Affects of NS5a replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture, 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (2010, Sep. 10-14)

G.知的所有権の出願・登録状況
なし

患者由来 HCV の感染増殖に機能する肝細胞因子の解析

研究分担者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 これまで開発してきたヒト不死化肝細胞の中空糸による簡便な立体培養法で患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を再現することができた。この細胞は平面培養した場合と比較して立体培養することで HCV の生活環を再現することが可能になるため、このことを利用して立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析した。その結果、これまでにアラキドン酸カスケードに関連するいくつかの遺伝子の発現が明らかに変動していることを見出し、このカスケードの上流酵素であるシクロオキシゲナーゼ 1 の阻害剤が感染性 HCV 粒子産生に抑制的な効果を示すことをこれまでに見出している。このカスケードによって産生される各種プロスタグランジン (PG) は種々の生理活性を有するため、各種 PG の受容体に対するアゴニストならびにアンタゴニストで組換え体 HCV 産生細胞を処理した結果、2 種類の PGI 受容体 (IP) アゴニストによる処理で感染性粒子産生が抑制されることがわかった。以上の結果から、これら IP アゴニストが HCV の感染性粒子産生の抑制する効果を有することが明らかとなり、抗 HCV 薬の候補となりうることがわかった。また IP アゴニストによって変化する細胞因子は新たな抗 HCV 薬開発の標的になることが示唆された。

A. 研究目的

これまでに独自に樹立した不死化肝細胞を用いて、患者血液由来の天然型 C 型肝炎ウイルスが効率良く感染増殖する新たな細胞培養系を構築している。これら HCV 培養系を用いて、その感染増殖機構を解明することにより、このウイルスの感染増殖に関わる細胞側因子の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 我々はこれまでに独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来 HCV の感染増殖を効率良くおこなう培養細胞系を開発している。マイクロアレイ法を用いて通常培養を対照として立体培養によって変化する遺伝子発現パターンを解析することで、立体培養法によってその発現が変化する細胞の遺伝子を検索し、HCV の感染

増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケードを同定した。

2. アラキドン酸カスケードの活性因子である各種 PG の受容体に対するアゴニストとアンタゴニストを用いて組換え体 HCV 産生細胞を処理し、その HCV RNA 複製や感染性粒子産生に対する影響を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 中空糸を用いて不死化肝細胞を立体培養した場合と培養皿による通常培養法を用いた場合における細胞の遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ法を用いて解析したところ、PGD 合成酵素とトロンボキサン A (TXA) 合成酵素の mRNA 量が立体培養時に上昇し、それとは逆に PGI と PGE 合成酵素の mRNA 量が減少していることがわかった。
2. 上記のように立体培養によってその合成量が変動することが考えられた PG や TXA の HCV 感染増殖に対する影響を検討するため、まず組換え体 HCV 産生細胞にそれらの受容体に対するアゴニストやアンタゴニストで処理したところ、そのすべてにおいて HCV ゲノム複製や培地中への粒子産生には大きな変化は認められなかった。
3. 組換え体 HCV 産生細胞に PGI 受容体 (IP) に対するアゴニスト ON01301 で処理した場合、用量依存的にその培養上清中の感染性が低下することが明らかとなった。
4. 組換え体 HCV 産生細胞に PGI 受容体 (IP) に対する異なるアゴニスト BM45778 で処理した場合でも同様の効果が認められた。
5. 組換え体 HCV 産生細胞から得られた感染性 HCV 粒子を含む培養液に組換え体 HCV RNA を導入していない細胞を ON01301 で処理して得られた培養上清を混ぜても感染性には何ら影響はなかった。

D. 考察

1. ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められたアラキドン酸カスケードによって産生される PG は感染性粒子産生に重要なシグナルであることが考えられた。
2. 少なくとも組換え体 HCV 産生細胞においては 2 種の IP アゴニストによって感染性粒子産生が制御されている可能性が考えられた。
3. 組換え体 HCV 産生細胞から得られた感染性 HCV 粒子を含む培養液に組換え体 HCV RNA を導入していない細胞を ON01301 で処理して得られた培養上清を混ぜても感染性には何ら影響はなかったことから ON01301 の効果は組換え体 HCV 産生細胞に働きかけ

て感染性ウイルスの産生を抑制することにあると考えられた。

E. 結論

2 種類の IP アゴニスト (ON01301 と BM45778) は HCV 粒子産生細胞に働きかけ感染性粒子産生を制御する働きを有することが示唆された。したがって、これらの IP アゴニストは抗 HCV 薬の候補と考えられ、またこれらの効果によって変化する細胞因子は抗 HCV 薬剤開発の新たな標的となることが期待された。

G. 研究発表

1. 論文

1) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.*, 84(18), 9118-9127, 2010

2. 学会発表

1) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

2) Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

3) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

4) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov.

24-26 2010

- 5) 久島透嘉、脇田隆宇、土方誠 : Core による S-S 結合型二量体は C 型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
- 6) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠 : 感染性 HCV 粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010
- 7) 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、斉月、脇田隆宇、下遠野邦忠、土方誠 : シンポジウム 06 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離 HCV 株の培養と性状、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

プロスタグランジン I₂ のアゴニストを含む、C 型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆宇、出願日 2010 年 9 月 30 日、出願番号 特願 2010-222045

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

不死化ヒト肝細胞を用いた HBV の新規 3 次元培養系の試み

研究分担者：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科

研究協力者：杉山 真也、村上 周子

研究要旨 HBV の 3 次元培養系の確立を目的として、平成 22 年度は肝炎ウイルス感染モデルおよび培養系の選定を行った。培養には不死化ヒト肝細胞および肝癌細胞株を用い、中空系に細胞を充填した培養系ならびにスフェロイドと呼ばれる組織様の細胞塊による培養系について比較検討した。各培養系にウイルス粒子を含む血清を添加することで感染を成立させ、培養上清中の HBs 抗原を測定することにより、HBV 感染を確認した。中空系に不死化ヒト肝細胞を充填した培養系では HBs 抗原の増加を認め、長期培養下で感染の持続を確認した。一方、スフェロイドにおける HBs 抗原は低値であった。今後、中空系に不死化ヒト肝細胞を充填した 3 次元培養系の実用化に向けた改良を重ねるとともに、この系を用いて HBV 各種変異体の感染効率の違いや新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどについても検討を行いたい。

A. 研究目的

3 次元培養系における B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染・複製の可能性について検討している。今年度は、感染に適した細胞と培養系の選定を行うとともに、患者血清からの HBV 感染・複製を試みた。

B. 研究方法

- 1) 中空系モジュール、あるいは特殊なナノレベルの加工を底面に施した培養プレートを用いて 3 次元培養系を作成した。
- 2) 細胞は不死化ヒト肝細胞および肝癌細胞株を用い、感染源としては、HBV のウイルス粒子を含む患者血清を用いた。
- 3) 3 次元培養系に患者血清を 10^5 copies/well となるように投与することで感染を成立させ、その後培養上清中の HBs 抗原、HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原を測定し、HBV 感染・複製を確認した。

C. 研究結果

- 1) 不死化ヒト肝細胞、肝癌細胞株ともに中空系を用いた培養系では約 1 ヶ月間の培養が可能であった。また、特殊加工の培養プレートを用いた培養においてス

フェロイドを形成、3 次元化することができた。スフェロイド形成は 2 週間程度持続することを認めた。

- 2) 培養上清中に HBs 抗原や HBV DNA、細胞内 HBV core 関連抗原が検出された。中空系では抗原量の増加を認め、特に不死化ヒト肝細胞を充填した中空系の培養では、上清中の HBs 抗原と HBV DNA 量が培養期間を通じて継続的に検出され、感染の持続を確認した。また、中空系を用いた培養では培養上清中にも HBV core 関連抗原の検出を認めた。一方、HBs 抗原量はスフェロイドにおいて低値であり、培養日数に伴い検出量は減少した。

D. 考察

不死化ヒト肝細胞を用いた 3 次元培養系は長期間での培養が可能であり、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索や粒子放出過程などを解析できる。また、患者血清からの感染が認められたことから、検体別の解析が期待できる。引き続き、培養上清からの再感染を検討中である。今後、この系を用いた感染防御実験（特にワクチンエスケープミュータントに関して）、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討

していきたい。

E. 結語

不死化ヒト肝細胞を中空糸に充填した3次元培養系による患者血清からのHBV感染・複製の可能性が示されたことから、この3次元培養系は非常に有用な感染モデルとなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*, 54(1):19-25, 2011.
- 2) Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in immunosuppressive condition. *Uirusu*, 60(1):79-86, 2010.
- 3) Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis*, 202(2):202-13, 2010.
- 4) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*, 395(4):565-71, 2010.
- 5) Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6(4): e1000885, 2010.

2. 学会発表

- 1) 坂本知行、田中靖人、杉山真也、山川慶洋、松浦

健太郎、日下部篤宣、新海登、木村吉秀、勝美康平、城卓志、溝上雅史. B型肝炎ウイルス Genotype G の共感染下における複製メカニズムの検討. 第46回日本肝臓学会総会, 2010年5月, 山形.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HCV コア蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割

分担研究者 森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルス(HCV)のキャプシド蛋白質であるコア蛋白質は、肝癌、脂肪化、インスリン抵抗性などの病原性発現を誘導することが報告されている。コア蛋白質による病原性発現およびウイルス増殖は宿主蛋白質 PA28 γ の発現を必要とする事を、我々は明らかにしてきた。本研究では、化合物スクリーニングによる抗HCV剤の開発を最終目標に、宿主蛋白質 PA28 γ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。また、より有望な内在標的因子の同定を目的とし、膜結合型酵母2ハイブリット法によるスクリーニングによって 11 個のコア蛋白質結合蛋白質を単離し、ネットワーク解析および培養細胞系によってウイルス増殖への影響を解析することで二つの蛋白質分子に絞り込んだ。これらの成果は、新規抗HCV薬開発に繋がるものと考えられる。

A. 研究目的

国内で約200万人もの感染者が推定されているC型肝炎ウイルス(HCV)は、高率に持続感染に移行し、慢性肝炎・肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。本邦の約8割の肝細胞癌はHCV感染に起因する。先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型1の感染者に対して現行で最も有効な治療法であるインターフェロン/リバビリンによる併用療法の著効率は約50%程度に留まり、より有効な治療法が開発が求められている。

フラビウイルス科に属するHCVはプラス鎖RNAゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムには単一のポリプロテイン前駆体がコードされており、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10個のウイルス蛋白質に成熟する。キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質は前駆体のアミノ末端に位置し、シグナルペプチダーゼによる切断を始めに受け、更にC末端膜貫通領域がシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断を受けて成熟する。宿主蛋白質PA28 γ 存在下で、コア蛋白質は肝脂肪化、肝癌などの病原性発現を誘導し、PA28 γ 遺伝子を欠損させるとその病原性発現誘導が失われることを我々は報告している。さらに、PA28 γ はウイルス増殖においても必須因子であることを、昨年報告している。ウイルス粒子形成のメカニズムはよくわかっておらず、宿主蛋白質因子の分子機構は明確になっていない。

本研究では薬剤スクリーニング方法の開発と、新規内在性標的因子を同定することを目的として、PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築を試み、また、膜結合型酵母2ハイブリット法によるスクリーニングによってコア蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を単離した。さらにネットワーク解析とウイルス培養系の解析から新規標的因子を更に絞り込んだ。

B. 研究方法

感染24時間前に、RNA干渉によってEno1およびPaxillinの発現を抑制しJFH1ウイルス感染Huh7 OK1細胞の細胞内外のウイルスRNA量を経時的にreal-time PCRによって測定した。また、Con1(遺伝子型1b) full replicon およびJFH1(遺伝子型2a) subgenomic replicon 細胞内のEno1およびPaxillinの発現をRNA干渉で抑制し、細胞内ウイルスRNA量をreal-time PCRによって測定した。pAct およびpBINDにPA28 γ 遺伝子あるいはプロテアソーム活性化能を持たないPA28 γ Pro245A1a(PA28 γ P245A)遺伝子を組み込み、VP16およびGAL4蛋白質との融合蛋白質として発現するように、プラスミドを構築し、Huh7OK1細胞にGAL4結合領域を5つ(pG5luc)あるいは9つ(pGL4.35)もつFirefly luciferase レポータープラスミドと共に導入した。48時間後、導入細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

コア蛋白質をベイトにして、ヒト肝臓ライブラリーをスクリーニングした結果、11個の遺伝子を単離した。コア蛋白質のプロセッシングに必須である膜蛋白質 SPP が単離され、生理的な条件に近い状態でスクリーニングが実施されていることが示唆された。また、RNA 干渉試験で HCVcc (JFH1, 遺伝子型 2a) では Enol の発現低下によってウイルス量が減少し、JFH1 サブレプリコン細胞によるウイルス RNA 増殖試験でもウイルス RNA 量低下が認められたことから、Enol はウイルス RNA 複製に必須な宿主遺伝子であることが示唆された。また、Paxillin に対するノックダウンによって、HCVcc および JFH1 subgenomic replicon 細胞内のウイルス RNA 量の低下が認められなかったが、Con1 full genomic replicon 細胞 (Con1, 遺伝子型 1b) では有為な低下が認められた。

次に化合物スクリーニングによる抗 HCV 剤の開発を最終目標に、宿主蛋白質 PA28 γ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。PA28 γ はホモ 7 量体を形成することでプロテアソームを活性化する。VP16-PA28 γ および GAL4-PA28 γ との結合によって、GAL4 プロモーターを活性化し、下流にコードされているルシフェラーゼが発現する培養細胞系の構築を試みた。トランスフェクションによってプラスミドをそれぞれ Huh70K1 細胞に導入し、48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4 結合領域が 5 つのものより、9 つのレポータープラスミドの感度が高かった。また、変異型との組み合わせより、PA28 γ の野性型同士の結合によるルシフェラーゼ活性が高かった。また、VP16 のみと GAL4-PA28 γ の組み合わせ、および VP16-PA28 γ と GAL4 のみの組み合わせではルシフェラーゼ活性は認められなかった。

D. 考察

コア蛋白質と相互作用し、ウイルス増殖に関与する遺伝子が二つ同定された。Enol はウイルス遺伝子型 2a

の JFH1 ウイルスによる HCVcc およびレプリコン細胞系に必要な宿主遺伝子であることが分かった。ウイルス複製における Enol の機能は今後の課題としたい。また、Paxillin のノックダウン試験ではウイルス遺伝子型 1b の Con1 株レプリコンでのみ有為な低下が認められ、Paxillin はウイルス遺伝子型に依存した機能が示唆された。今後 Enol および Paxillin の抗ウイルス標的遺伝子としての評価とウイルス複製における役割を解析する必要がある。

また、PA28 γ のホモ多量体形成能を利用した培養細胞系の基盤が出来た。今後、安定して発現する細胞株を樹立し、薬剤スクリーニングに用いて、ウイルス培養系で効果を確認する予定である。

E. 結論

ウイルス増殖に関与する宿主蛋白質性因子 Enol および Paxillin を同定した。また、PA28 γ のホモ多量体形成をアッセイする培養細胞系を確立し、PA28 γ を標的とした化合物スクリーニングが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tripathi, L. P., C. Kataoka, S. Taguwa, K. Moriishi, Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi. 2010. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.* 6:2539-2553.
2. Tanaka, Y., Y. Mori, H. Tani, T. Abe, K. Moriishi, H. Kojima, T. Nagano, T. Okabe, T. Suzuki, M. Tatsumi, and Y. Matsuura. 2010. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.* 54:206-220.
3. Moriishi, K., I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura. 2010. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52:411-420.

2. 学会発表

1. 森石恆司、松浦善治、HCV による脂質代謝障害の分子機序、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 2. 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治、C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 3. 加藤大志、森嘉生、寒原裕登、要祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷亘、森石恆司、松浦善治、核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルス複製を抑制する第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 4. Kambara H., Taguwa S., Fujia N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 5. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 6. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング

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) 4,400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4種の化合物が同定された。(2) YFP, RFPタグ付加HCVを用いたウイルスエンタリー阻害化合物のスクリーニング系を構築した。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

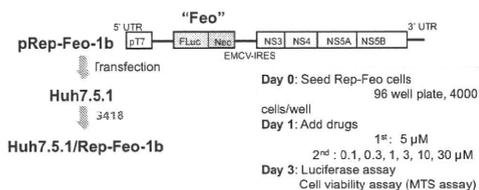
C型慢性肝炎の標準治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法は、依然として著効率が50%にとどまり治療困難例が存在することから、新しい作用機構に基づいた治療法の開発が必須である。我々は、新規HCV阻害剤の探索を目的に、(1) HCV subgenomic replicon系を用いたウイルスゲノム増殖抑制化合物スクリーニング、および(2) 蛍光蛋白タグ付加HCV-JFH1培養系を用いたウイルスエンタリー阻害化合物のHigh-content screening assayを目的として研究を遂行した。上記スクリーニングで抽出された化合物のHCV増殖抑制効果について解析を行った。

B. 研究方法

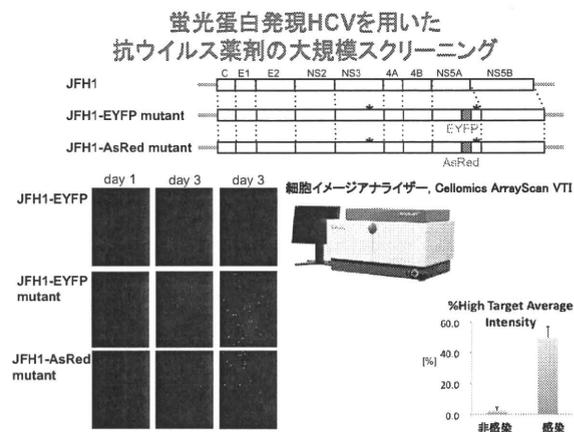
(1) HCV subgenomic repliconを用いたウイルス増殖抑制化合物のスクリーニング：HCVキメラルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するHCV-Feo replicon細胞、およびHCV-JFH1培養系を用いて、HCV増殖を制御する薬剤・化合物のhigh-throughput screening (HTS)をおこなった。

対象： 4046化合物
「Lipinski則」にのっとったdrug likeかつ構造の多様性を重視した化合物という条件のもとに化合物サプライヤー（InterBioScreen社、Chemical Block International社）から購入。重金属は含まない。

方法： 1. Screening：Feoレプリコン（Sakamoto et al. 2003, Tanabe et al. 2004）
2. Validation：HCV-JFH1細胞培養系（Wakita, Nature Med 2005）

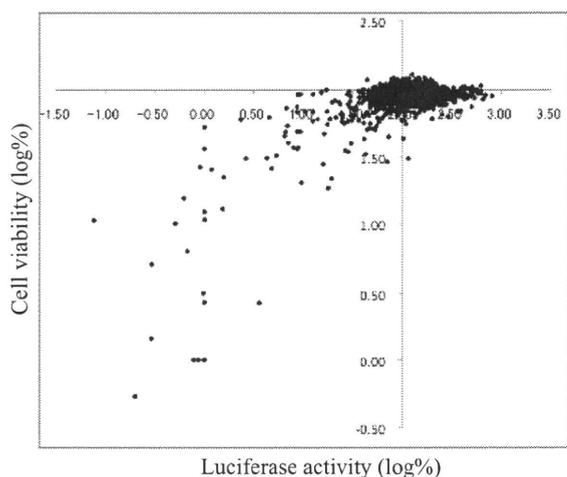


(2) 蛍光蛋白タグ付加HCV-JFH1培養系を用いた解析：JFH1株のNS5A末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290AとC7653Tに変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白YFP発現HCVを構築した。この蛍光蛋白発現HCV感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plateにHuh7.5.1細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その2時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5日間の培養後high content analysisを利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エンタリー阻害剤として抽出した。



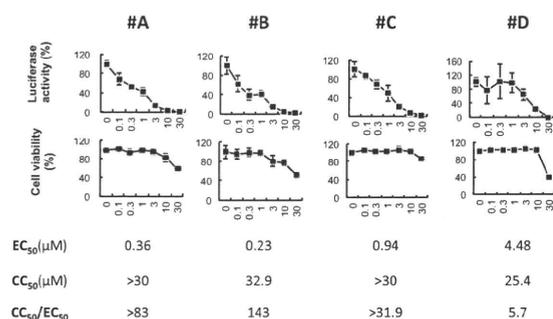
C. 研究結果

(1) 4046化合物のうち、細胞毒性を示さずにレプリコン増殖抑制効果を示す化合物を23個抽出した。



このうち、HCV-JFH1 細胞培養系において HCV 増殖抑制効果を示す化合物を 4 個同定した。これらは HCV-IRES 翻訳活性には影響せず、HCV 増殖を特異的に阻害している可能性が示唆された。

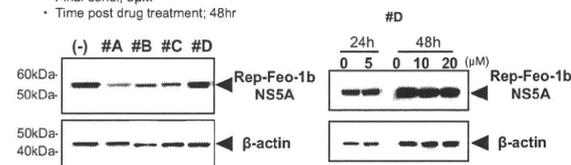
抽出された化合物のレプリコン増殖抑制効果



抽出された化合物のレプリコン蛋白発現抑制効果

Western Blotting

- Final conc.: 5 μM
- Time post drug treatment: 48h



化合物#A, #B, #Cは、レプリコン蛋白発現を抑制する。

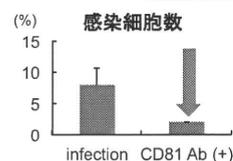
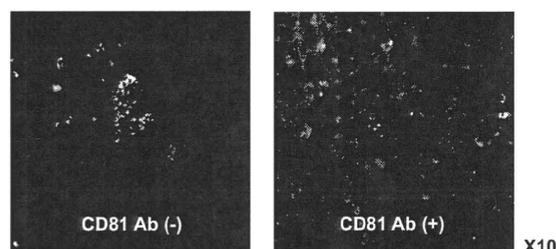
化合物#Dは、レプリコン蛋白発現を抑制しない。

細胞内シグナル伝達系に対する効果についての解析では、1 個は NF κ B シグナル経路を活性化することが示され、他の 3 個は既存の IFN や NF κ B を介さない経路により抗 HCV 効果を呈することが示された。

(2) High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗 CD81 抗体を用い

たエントリー阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。400 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35 個が 50%以上の感染阻害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗 HCV 活性を認めたものは 1 個で、残りの 34 個はエントリー過程を阻害している可能性が示唆された。

CD81抗体によるウイルス感染抑制



D. 結論

HCV キメラリポーターレプリコン系、および蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いたウイルス侵入、増殖、分泌のすべてのステップを標的とした阻害薬のスクリーニング・アッセイシステムは、HCV 生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。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

英文原著

- Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yasuhito Tanaka, Yuko Sekine-Osajima, Mayumi Ueyama, Masayuki Kurosaki, Nao Nishida, Akihiro Tamori, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Shuhei Hige, Yoshito Ito, Eiji Tanaka, Yoichi Hiasa, Namiki Izumi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated- interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2010; in press.

2. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto (equal contribution), Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Kiichiro Tsuchiya, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence- tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011; *in press*.
3. Xiu Zheng, Kiichiro Tsuchiya, Ryuichi Okamoto, Michiko Iwasaki, Yoshihito Kano, Naoya Sakamoto, Tetsuya Nakamura and Mamoru Watanabe: The suppression of Hath1 gene expression directly regulated by Hes1 via Notch signaling causes goblet cell depletion in ulcerative colitis. *IBD* 2010; *in press*.
4. Michiko Iwasaki, Kiichiro Tsuchiya, Ryuichi Okamoto, Xiu Zheng, Yoshihito Kano, Eriko Okada, Akihiro Araki, Shinji Suzuki, Naoya Sakamoto, Keisuke Kitagaki, Takumi Akashi, Yoshinobu Eishi, Tetsuya Nakamura and Mamoru Watanabe: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. *J Gastroenterol* 2010; *in press*.
5. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Akihiro Tamori, Mina Nakagawa, Namiki Izumi: Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Medical Virol* 2011; *in press*.
6. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Hiroshi Yatsushashi, and Namiki Izumi: Pretreatment Prediction of response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2010; *EPub*.
7. Masayuki Kurosaki, Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Kentaro Matsuura, Yasuhiro Asahina, Fuminaka Sugauchi, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Mamoru Watanabe, Akito Sakai, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Kiyooki Ito, Naohiko Masaki, Katsushi Tokunaga, Namiki Izumi, Masashi Mizokami: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. *J Hepatol* 2010; *in press*.
8. Naoya Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Mina Nakagawa, Hiroshi Yatsushashi, Shuhei Nishiguchi, Nobuyuki Enomoto, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, Masao Honda, Kiyooki Ito, Masashi Mizokami, and Mamoru Watanabe: ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 2010; 40(11):1063-1071.
9. Kaori kameyama, Yasuhiro Nemoto, Takanori Kanai, Tamako Shinohara, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Naoya Sakamoto, Teruji Totsuka, Toshifumi Hibi, and Mamoru Watanabe. L-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R-high memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol* 2010; 40(9):2423-2436.
10. Goki Suda, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Onuki-Karakama, Machi Yamamoto, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Kei Kiyohashi, Sayuri Nitta, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Kazuaki Chayama, and Mamoru Watanabe: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010; 407:80-90.
11. Yuko Karakama, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Shinya Oooka, SeishinAzuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Onogi, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54 (8):3179-3186.
12. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Kei Kiyohashi, Akiko Kitazume, Kiichiro

- Tsuchiya, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Cell culture and in-vivo analyses of plaque-derived cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010; 405:361-369.
13. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Mayumi Ueyama, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, and Mamoru Watanabe: Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010; 45(6):656-665.
 14. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Onuki-Karakama, Gouki Suda, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 2010;45(5):523-536.
 15. KyeongJin Kim, Kook Hwan Kim, Hye Young Kim, Hyun Kook Cho, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong: Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Letter* 2010; 584(4):707-12.
 16. 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*. 2010 Feb;45(2):195-203.
- 総説
1. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011; in press.
 2. 坂本直哉: STAT-C 多剤併用療法: 脱インターフェロン治療なるか? 肝胆膵 2011; in press.
 3. 坂本直哉: 新しいインターフェロン製剤: PEG インターフェロンを中心. 肝胆膵 2010; in press.
 4. 箴島裕子、中川美奈、坂本直哉: HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2010, in press
 5. 坂本直哉: インターロイキン 28-29 (IL-28・IL-29)-インターフェロン. 臨床免疫・アレルギー科特集: サイトカインのすべて 2010 in press.
 6. 箴島裕子、中川美奈、坂本直哉: C 型肝炎の日常診療: 治療の適応、選択の実際. *medicina* 2010;47(3):2010-2103
 7. 坂本直哉: PEG-IFN+RBV 非著効例に対する PEG-IFN+RBV の再治療戦略. 日経 CME 2010 年 8 月号別冊.
 8. 坂本直哉: 新規治療薬の開発動向. *最新医学* 2010; 65(9):1919-1924.
 9. 坂本直哉: STAT-C(Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C)開発の動向. 肝胆膵 2010 増刊号: 204-208.
 10. 坂本直哉: 膵癌における TGF- β シグナル伝達系の関与. 肝胆膵 2010; 61(1):67-72.
 11. 植山真由美、中川美奈、坂本直哉、渡辺守: IL-6 と肝炎・肝発癌. 肝胆膵 2010; 60(5):849-856.
 12. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守: 肝疾患における血液生化学検査, IL28B 肝胆膵 2010; 60(4):657-660.

HCV エントリーおよび後期過程に標的をもつ創薬シーズ探索と その作用機構の解明：

マンノース特異糖鎖結合タンパク質 (Griffithsin) による HCV エントリー阻害とそれによるヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスに おける強力な HCV 感染防御効果

分担研究者 武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター

共同研究者 上西理恵、長谷彩希、廖華南、土浦貴代 国立感染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分子標的プログラム

研究要旨 紅藻由来のマンノース特異糖鎖結合タンパク質であるグリフィスシン (GRFT) は、JFH-1を用いたHCVcc assayにおいてEC50がlow-sub nMレベルの強力な抗HCV活性を示す。その作用機構は、GRFTがHCVエンベロープタンパク質に結合することで、HCVの標的細胞への吸着を阻害し、その結果、HCVエントリーをブロックすることによってと推定された。ヒト肝細胞移植uPA/SCIDマウスを用いたProof-of-Concept 実験を行った結果、GRFT接種群では、対照群に比べて、マウス血液中のHCV量が3-4 log 低下させ、また少なくとも30日間にわたってウイルス量のリバウンドが起らないことを明らかにした。これらの結果は糖鎖結合タンパク質を用いた新たな抗HCV治療薬・治療技術開発の可能性を示唆するものであると考えられる。

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 個の株間で高度に保存された N-グリカン付加部位をもち、分子量の 50%にも及ぶ高度の糖鎖修飾を受けていることが知られている。適正な糖鎖修飾は、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。

一方、HCV 感染粒子のエンベロープタンパク質に付加している N-グリカンの多くは、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(あるいはハイブリッド型)である。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物質は、ウイルス感染阻害剤としての性質をもつ可能性が期待される。

糖鎖結合タンパク質 (carbohydrate binding protein, CBP) のもつ抗ウイルス効果に関しては、HIV-1 に対して最もよく研究されている。中でも、

紅藻由来のマンノース特異糖鎖結合タンパク質であるグリフィスシン (GRFT) は、sub nM の極めて強力な抗 HIV-1 活性 (EC50=40 pM) を示すことが明らかにされている。GRFT は分子量 1.3 kDa のモノマーの domain-swapped dimer で、dimer 当たり 6 個のマンノース結合サイトをもつ極めて特徴的な構造をもつことが知られている。

われわれは、これまでに GRFT が、実際に HCV に対して sub nM レベルの極めて強力な抗ウイルス活性を示すことを明らかにしてきたが、本研究では、GRFT の作用機構の解析をさらに進めると共に、その個体レベルにおける抗 HCV 活性を、ヒト肝細胞移植 uPA/SCID マウスを用いて評価し、その新規治療薬としての可能性を探ろうとするものである。

B. 研究方法

(I) 試験検体

GRFT 評品としてはタバコを用いた植物発現