

201030034A

厚生労働省科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因  
と発症予防に関する研究

平成22年度

総合・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成23（2011）年5月

## 目 次

### I. 総合研究報告

1. 肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と  
発症予防に関する研究  
下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) ----- 1

### II. 分担者研究報告

1. HCV 粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤  
下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) ----- 10
  2. H HCV 複製制御に関与する宿主因子の探索とその機能解析  
高久 洋 (千葉工業大学工学部) ----- 14
  3. HCV 感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御  
堀田 博(神戸大学大学院医学系研究科) ----- 19
  4. 持続的な HCV 複製による細胞機能変化の解析に関する研究  
加藤 宣之(岡山大学院医歯薬学総合研究科) ----- 24
  5. 持続的なHCV感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析  
小原 恭子(熊本大学大学院医学薬学研究部) -----34
  6. 遺伝子型1b型の感染性HCVの樹立とその応用  
杉山 和夫(慶應義塾大学医学部) ----- 38
  7. マイクロ RNA 発現解析から見たインターフェロン応答  
村上善基 (京都大学・ゲノム医学センター) ----- 42
  8. ヒト遺伝子編集酵素による HCV 感染制御機構の解析  
丸澤 宏之(京都大学大学院医学研究科) ----- 47
  9. HCV構造タンパク質と相互作用する宿主因子の同定とその機能解析  
大島 隆幸 (徳島文理大学香川薬学部) ----- 52
  10. HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御  
押海 裕之 (北海道大学大学院医学研究科) ----- 55
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 58
- III. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 64

# I 総合研究報告

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

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究  
研究代表者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨: HCVが感染し複製する事が細胞に種々の効果をもたらし、最終的には肝硬変、肝がんを発症する。感染細胞の中で生じる変化を分子レベルで捉え、その機能を明らかにする事により、疾患発症の原因を突き止める事ができる。また、ウイルスの複製増殖を制御する宿主因子の解明により、複製の分子機構を明らかにできその知見をもとにしてウイルス増殖を予防する方策が見いだされると期待される。本研究ではこのような観点から研究を進めた。まず、HCV複製増殖を制御する因子として、Apolipoprotein E (ApoE), Hsp90、遺伝子編集酵素 (AID) の発現誘導、インターフェロンシグナルを制御する DDX3などを明らかにし、ウイルスの複製にどのように関わるかを解析した。また、HCVの持続感染により発現誘導される DHCR24 は p53 の機能を抑制する事を明らかにした。HCV感染により変化する細胞側因子として、SMYD3を明らかにした。本因子はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有しており、がん原遺伝子としても知られている。さらに、新規に樹立したHCV持続複製細胞において発現が変化している遺伝子を数種類特定した。培養細胞で効率よく感染増殖するHCV増殖複製系を樹立するために、新たなHCVゲノムの探索を行い、HCV-1b型由来のレプリコンを得た。また、インターフェロン関連遺伝子発現解析よりHCV感染によるインターフェロン関連遺伝子発現制御を解析し、生体のウイルス排除メカニズムを明らかにし患者情報に応じた包括的、体系的な慢性肝炎新規治療のための基盤研究を行った。

研究分担者

高久 洋 千葉工業大学 教授  
堀田 博 神戸大学大学院 教授  
加藤 宣之 岡山大学大学院 教授  
小原 恭子 熊本大学大学院 特任教授  
杉山 和夫 慶應義塾大学 特任准教授  
村上 善基 京都大学大学院  
産学官連携准教授  
丸澤 宏之 京都大学大学院 講師  
大島 隆幸 徳島文理大学 准教授  
押海 裕之 北海道大学大学院 講師

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。このような疾患発症の背景には、HCV感染細胞における宿主側の種々の変化が寄与すると考えられる。また、慢性C型肝炎患者に対する治療成績は約50%程度に留まり、副作用の点を考えると新たな治療法の開発、および新規の抗HCV剤の開発が切望される。これまでに多くの研究者がHCV感染による宿主要因の変化などを解明し、さらにウイルスの複製機構の解析を行ってきた。その結果新たな事実が見いだされているが、これらの情報をもとにしても、ウイルス感染による疾患発症の機構や、ウイルス複製を効率よく抑制する方策が欠如している。この問題に対処するためには、さらに根気強い研究の遂行が必要である。本研究では、HCV感染を制御する新たな宿主要因を探索し、それらの因子の機能を

ウイルス複製との関連と細胞の増殖との関連で明らかにすることを主たる目的として研究を進める。また慢性肝炎の治療法を少しでも改善するための方策を見いだすための研究を行う。

B. 研究方法

(1) HCVの感染性を規定している因子の研究。

HCV粒子の性状と感染性との関連を調べるために、HuH7.5にJFH1を感染させ、その上清を濃縮、密度勾配遠心によりウイルスを分画する。得られたウイルス粒子について、リポ蛋白質に作用するリパーゼ処理を行い粒子の物理的な性状の変化と感染性との関連を解析する。また、HCVをゲル濾過により分離し、粒子の大きさと感染性との関連性を解析する。培養細胞から産生されたウイルスの感染性は密度が低い画分に存在する事が知られている。ウイルスの性状と感染性をさらに調べるために、ウイルスの大きさと関連で解析を進める。それにより、感染性と粒子性状との関連がさらに理解できるようになると期待される。

(2) HCVの増殖を制御する宿主因子Hsp90とその機能の解析。

Hsp90阻害剤17-AAGおよびMG132がHCV増殖をどのように働かせるかを明らかにする。

HCV翻訳阻害効果の検討はHCV full genome replicon cells (NNC#2細胞)を両阻害剤で濃度依存的に処理しウイルスタンパ

ク質をウエスタンブロット法で解析する。HCV IRES 活性への影響は repoter plasmid (pHCV IRES-luc)を用いて luciferase 活性を指標に解析する。

(3) HCV NS5A に結合する宿主因子の単離と機能解析。

タンデムアフィニティー精製法による NS5A 結合蛋白質の探索をおこなう。Myc および His タグをつけた NS5A をベイトに用いて、会合してくる宿主因子を単離しその機能を明らかにする。

(4) HCV ゲノムが長期間複製する細胞で発現が変化した宿主因子の探索。

HCV ゲノム複製を短期間持続させた細胞と長期間持続させた細胞から RNA を精製しマイクロアレイ解析を行う。また、OL8 と OL11 細胞に IFN-gamma (1,000 IU/ml)を4日ごとに6-7回添加することにより HCV-RNA を排除した治療細胞 OL8c と OL11c を作成し、それらを2年間継代培養して、OL8c(2Y)と OL11c(2Y)細胞を得た。これらの細胞についてマイクロアレイ解析を行い両者で変化する遺伝子を解析する。

(5) HCV 持続複製細胞で発現が誘導される宿主因子 DHCR24、Ku70 の機能解析をおこなう。

そのために、モノクローナル抗体の調製、DHCR24、Ku70 遺伝子発現解析を行う。

(6) HCV 感染により誘導される遺伝子編集酵素の機能解析

HCV 感染と、その結果産生されてくる炎症性サイトカインやインターフェロン刺激に応答して肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素を特定する。具体的には、それぞれのヒト各 APOBEC family, ADAR family 分子に特異的な probe を作成し、ヒト肝培養細胞に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  やインターフェロン刺激を加えた前後におけるそれぞれの APOBEC family, ADAR family 各分子の発現量の変化を定量評価する。また、肝細胞に発現誘導した APOBEC family 分子、ADAR family 分子による HCV ゲノムに対する遺伝子変異生成作用の有無を明らかにする目的で、Huh-7 細胞に HCV の全長レプリコン・コンストラクトと各 APOBEC family, ADAR family の発現プラスミドを同時発現させる。引き続き、HCV ゲノムを high-fidelity RT-PCR 増幅~回収の上、塩基配列を同定し、遺伝子変異の生成の有無の評価を行う。

(7) HCV 増殖を制御するインターフェロンシグナルとその制御

インターフェロンシグナルを制御する事が知られている Riplet 遺伝子をノックアウト

したマウスを用いて、生体内において Riplet がウイルス感染時の I 型インターフェロン産生に必須かどうかを検討する。また、HCV ゲノム RNA を試験管内で合成し、それに対する結合や応答を分子生物学的手法を用いて解析を行う。

(8) インターフェロンとリバビリン併用療法の効果を規定する宿主要因、特にマイクロ RNA の解析。ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織 99 例よりからマイクロ RNA 発現プロファイルを治療効果別に作成する。同じサンプルを用いてインターフェロン関連遺伝子 237 の解析をマイクロアレイにて行う。

(9) HCV-1b 遺伝子型由来の感染性ゲノムを作成する。HCV 陽性患者由来の血液からウイルス RNA を調製しそれを材料にして、効率よく感染複製するウイルスゲノムを得る。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」

(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従った。これらの規則に基づく各研究機関の委員会に申請し、承認を得て研究を行った。

臨床研究については各研究機関の倫理委員会に申請を行い、承認を得て行った。

肝疾患患者など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している。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、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報を適正に管理保存した。

## C. 研究結果

(1) HCV の感染性を規定している因子の研究。

ウイルスを異なる濃度の LPL で処理し、その後の感染性を調べたところ、感染性は LPL の濃度依存的に減少した。この処理条件下でセンダイウイルスを処理しても感染性は無くならないので、LPL、HTGL 感受性は HCV に特徴的な現象であるといえよう。熱処理した LPL を加えた場合、あるいは LPL の阻害剤であるオルリスタットを添加して処理を行った場合には感染性の低下は見られなかった。したがって、ウイルス粒子の感染性の低下（喪失）は LPL の酵素活性によるものと判断された。LPL 処理粒子を密度勾配遠心で分離し、その浮遊密度を調べると、全体的に重い方に移行した。この事はウイルス粒子成分にトリグリセリドが存在しており、それが LPL 処理で取り除かれたと判断された。さらに、リポ蛋白質成分のひとつである ApoE 量の変化を調べた。その結果、ApoB に対する ApoE の相対的な量は LPL 処理により減少する事が分かった。以上から、LPL 処理により中性脂肪酸が除かれると同時に ApoE も脱離する結果ウイルスの感染性が失われると考えられた。ApoE の脱離は通常 LPL では起こらず、HTGL 処理により引き起こされる事になっている。一方、本実験で見られたように LPL 処理により ApoE が脱離した事、感染性が失われた事について、さらに解析を進めたところ、LPL 処理の過程で、精製したウイルス粒子に混在している HTGL 活性も同時に働くために、IDL 状態で止まらずに LDL まで分解が進んでしまうと考えられた。これらの実験結果は HCV にリポ蛋白質が会合している事を生化学的に証明したばかりでなく、ApoE がウイルスの感染性に重要な働きをしている事を強く示唆する結果を得た。すなわち、リポ蛋白質の HCV への会合は、ApoE が粒子に会合するために必要な条件である可能性を示唆する。

(2) HCV の増殖を制御する宿主因子 Hsp90 とその機能の解析。

HCV レプリコンが持続複製する NNC#2 細胞を用いて MG132 と 17-AAG の効果を調べた。

MG132 の処理ではプロテアソームの阻害効果により PSMA7 の発現は減少するのに伴い、HCV IRES 活性も減少し、HCV RNA の翻訳が抑制されることが明らかとなった。この系を 17-AAG で処理し、MG132 単独処理の場合と比較したところ、HCV core の発現が著しく減少した。これらの結果より、Hsp90 が HCV-NS3 の安定化に必須因子であるとともに、HCV RNA の翻訳にも関わっていることが示唆された。HCV IRES 依存的な翻訳反応の解析から、eIF3c と Hsp90 の結

合には HCV RNA が要求されることがわかった。

(3) HCV NS5A に結合する宿主因子の単離と機能解析。

NS5A 結合宿主蛋白質として SMYD3 を同定した。HCV RNA レプリコン複製細胞において、NS5A と内在性 SMYD3 の結合、及び、両者の細胞内共局在を証明した。また、SMYD3 と NS5A を共発現させると、原癌遺伝子として知られる WNT10B の発現が促進されることがわかった。共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法及び Proximity Ligation Assay 法により、HCV RNA レプリコン複製細胞において、NS5A と内在性 SMYD3 が共局在することを証明した。

(4) HCV ゲノムが長期間複製する細胞で発現が変化した宿主因子の探索。

HCV-RNA が2年間細胞内で複製した場合に細胞内の遺伝子発現プロファイルがどのような影響を受けるかを調べた。その結果 HCV の持続感染による結果発現が亢進している遺伝子と抑制されている遺伝子が存在する事が明らかになり、現在それらの遺伝子の機能解析を行っている。

(5) HCV 持続複製細胞で発現が誘導される宿主因子 DHCR24, Ku70 の機能解析をおこなう。

正常の肝臓細胞に近い形質を持つ肝臓胎児由来細胞 WRL68 に HCV の各種発現ベクターを用いて解析したところ、HCV 全長遺伝子と同様にコア蛋白質を含む発現ベクターは Ku70 蛋白質の発現レベルを低下させる事が明らかとなった。また、Ku70 の mRNA ではなく蛋白質のレベルをコア蛋白質が低下させる事も判明した。さらに、コア蛋白質は Ku70 のユビキチン化を促進する事も明らかとなった。HCV 全長遺伝子を発現させ、DNA-PK 活性を測定すると有意な活性低下が観察された。同時にこの細胞では Ku70 の発現レベルが低下している事も確認できた。

(6) HCV 感染により誘導される遺伝子編集酵素の機能解析

通常の培養条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない ADAR family のひとつである ADAR1 が、インターフェロン刺激により APOBEC3G とともに肝培養細胞に発現誘導されることが確認された。同様に、生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 が、炎症性サイトカインである TNF-alpha 刺激によりヒト肝細胞に AID とともに発現誘導されることが明らかとなった。

さまざまな遺伝子編集酵素ファミリー分子が、HCV のコードするウイルスタンパク

の直接作用、ならびに HCV 感染を契機とする炎症反応やインターフェロン産生にตอบสนองする形で肝細胞に発現誘導されることがわかった。これらの遺伝子編集酵素の中でも RNA 配列に対して塩基変化を誘導する作用をもつ分子の発現下においては、HCV のウイルスゲノム配列に遺伝子変異が誘導されることが明らかとなった。

(7) HCV 増殖を制御するインターフェロンシグナルとその制御

ヒトの細胞質内ヘリケースの DDX3 分子は HCV 感染時の I 型インターフェロン産生に関与する。今回、HCV のコア蛋白質が、DDX3 の C 末端領域による下流へのシグナル伝達分子の活性化を阻害することを明らかにした。

インターフェロンシグナルを制御する Riplet をノックアウトしたマウスを作成し、ウイルス感染時の I 型インターフェロン産生を調べたところ、Riplet 分子は繊維芽細胞、樹状細胞、マクロファージからの I 型インターフェロン産生に必須の役割をはたすことを明らかにした。興味深いことに Riplet ノックアウトマウスは RNA をゲノムに持つウイルス感染時のウイルスに対する抵抗性が著しく減少したことから、上記の細胞から産生される I 型インターフェロンが生体で重要であることを解明した。

(8) インターフェロンとリバビリン併用療法の効果を規定する宿主要因、特にマイクロ治療効果別のマイクロRNA発現プロファイルを作成し治療効果と相関して発現するマイクロRNAを同定した。また *in silico* 解析にてマイクロRNAが標的とする遺伝子候補を同定した。発現プロファイル結果を Monte Carlo Cross Validation を用いて治療効果をシミュレーションした。SVR と non-SVR の予測は 70.5%、R と NR の予測は 70.0% と高い確率で行なう事が出来た。

インターフェロン関連遺伝子による C 型肝炎治療効果予測のために、治療効果別のインターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを作成し、治療効果と相関して発現するインターフェロン関連遺伝子を同定した。 *in silico* 解析によりこの遺伝子を標的とするマイクロRNA候補を同定した。NR 症例では治療前から正常肝に比べ既にインターフェロン遺伝子の発現異常が強く見られ、SVR 症例では正常肝における発現パターンと類似している事が分かった。インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを用いて同様の効果予測を行なったところ NR と non-NR の予測は diagonal linear discriminant analysis (DLDA) を用いて 84.1% であった。

(9) HCV-1b 遺伝子型由来の感染性ゲノム作成。HCV 陽性患者由来の血液からウイルス RNA を調製しそれを材料にして、効率よく感染複製するウイルスゲノムを得た。

遺伝子型 1b 型 HCV 患者血清由来の RNA をもとに long distance RT-PCR 法によって、複製に必要な HCV ゲノムの非構造領域 (NS3 から NS5B) を増幅した。その PCR 産物をレプリコンカセットベクターに挿入し大腸菌をトランスフォームした。大量培養後プラスミドを抽出し、サブゲノムレプリコンプラスミドライブラリーを得た。次に、得られたライブラリープラスミドを鋳型として、インビトロ転写反応によって RNA を合成した (サブゲノムレプリコン RNA ライブラリー)。合成したライブラリー RNA を培養肝細胞へトランスフェクションし、ネオマイシン耐性細胞コロニーを形成がみられた。

#### D. 考察

HCV 感染による肝疾患の予防、治療は現在のところ、画期的な方策に欠けている。その原因は主として、HCV 感染による細胞の変化、あるいはウイルス複製の分子機構の理解が十分でないためである。本研究で得られた以下の成果は、脂肪代謝予防、疾患の予防、抗ウイルス剤開発、あるいはワクチン開発などに向けた研究のための新たな知見になると期待される。

HCV 複製が脂肪代謝に影響を与えることを明らかにした。

HCV が感染し持続複製する事が、肝疾患の原因になる。この過程で宿主因子の機能が変化する、あるいは変化させられると考えられる。さらにはウイルス持続感染過程で新たな宿主因子が誘導されたり抑制されたりする事も考えられる。それらの中に、ウイルスによる脂肪代謝変化がある。これまでに、ウイルス粒子がリポ蛋白質と会合している可能性が示された。この事をきちんとさせるために本研究では、生化学的手法を用いて、ウイルスとリポ蛋白質の会合を明らかにした。さらに、リポ蛋白質と会合する事がウイルス感染に重要である事も明らかにした。特に ApoE との会合が重要であると考えられたが、ゲル濾過による解析から ApoE との会合のみでは感染性には不十分である事が判明した。

HCV 複製を制御する因子として Hsp90 が知られるがその新たな機能を明らかにした。 Hsp90 は HCV IRES を介して eIF3c と相互作用することで、HCV RNA の翻訳に影響を与えていることが明らかとなった。ここで得られた知見は HCV 翻訳を指標とした、スク

リーニング系の開発とともに、新たな治療薬の開発が期待できる。

HCV 感染により変化し、細胞増殖に影響を与える因子のいくつかを明らかにした。

HCV 感染によりがん原遺伝子のひとつである SMYD3 が NS5A と会合している事を明らかにした。SMYD3 はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基を特異的にメチル化して、ヌクレオソームの構造を変化させ、転写因子の標的 DNA 配列への結合を促進させることが知られている。この蛋白質は、肝細胞癌、大腸癌、乳癌で過剰発現し、機能亢進していることが報告されている。NS5A による発癌分子機序の一端を示唆しているものと考えられ、今後さらに解析を進める必要があると考えられた。

Ku70 は Ku80, DNA-PKcs と複合体を形成し、ゲノム DNA の損傷を修復する。本研究結果から、正常肝臓細胞に近い WRL 細胞では、HCV コア蛋白質が Ku70 を分解し、DNA 修復に重要な DNA-PK 活性を低下させる事が明らかとなった。この事により、HCV のコア蛋白質は正常肝臓細胞では遺伝子損傷の修復活性を抑制する事を通じ癌の発生などを誘導しやすくしている可能性が考えられた。

HCV ゲノムが長期間複製している細胞内において発現が亢進したり、抑制されたりする遺伝子が現れる事を明らかにした。本研究では、2年間の HCV-RNA の複製により mRNA の発現レベルが不可逆的に亢進したと考えられる 6 種類の宿主遺伝子と逆に発現レベルが低下したと考えられる 4 種類の宿主遺伝子を選択同定した。

HCV 1b 由来の感染性ウイルスゲノムを樹立しつつある。

遺伝子型 2a 以外の遺伝子型を有する HCV 感染株の報告はあるが、遺伝子型 1b 型の感染株の感染性、複製能は必ずしも高くない。また、遺伝子型 2a であっても JFH-1 以外は必ずしも感染効率の良い感染株とはならない。一方、日本で最も頻度の高い HCV 遺伝子型は 1b 型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。したがって遺伝子型 1b 型 HCV のウイルス学的解明を進めるために感染効率の高い HCV 感染株の樹立は必須である。

ここでは、患者血清における HCV ゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。さらに、これらのレプリコン複製細胞のうち 2 種類の細胞へ 1b 型 HCV 構

造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされることを確認した。

インターフェロン/リバビリン療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロ RNA との関連で同定できた。

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロ RNA とインターフェロン関連遺伝子別に同定する事ができ、これらの抗ウイルス活性を検査する事により、詳細に治療メカニズムを明らかにする事が出来る。治療効果予測はマイクロ RNA 発現プロファイルでは SVR を、インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルでは NR を分別する能力が見られた。その原因は現在に所不明であるが、それぞれのアルゴリズムの特性を相補する事により、より高い正確性をもった分別ができる。個人の臨床情報を利用したテーラーメイド医療のシーズとなりうる事が期待できる。

インターフェロンシグナルに關与する因子による抗 HCV 作用が明らかになった。

これまで HCV による I 型インターフェロン産生の抑制は、HCV の NS3-4A プロテアーゼにより IPS-1 と呼ばれる分子の切断が主な分子機構であると考えられてきた。しかし、今回の解析結果から新たに HCV のコア蛋白質による DDX3 分子の阻害や、また HCV 蛋白質による Riplet 分子の阻害も、HCV による I 型インターフェロン産生の抑制において重要な働きをすることが明らかとなった。

また、HCV は細胞質内の RIG-I と呼ばれる分子によりそのゲノム RNA が認識されることが知られて来たが、この過程に於いて、我々が単離した Riplet 分子が必須の役割をはたすことが明らかとなった。今後、この Riplet ノックアウトマウスを用いることで、これまでなかった、マウス個体を用いた HCV の感染モデル系の作成が可能になると期待される。

## E. 結論

本研究から以下の点を明らかにし、あるいは明らかにしつつある。(1) HCV 複製が脂肪代謝に影響を与えることを明らかにした。

(2) HCV 複製を制御する因子として Hsp90 が知られるがその新たな機能を明らかにした。(3) HCV 感染により変化し、細胞増殖に影響を与える因子のいくつかを明らかにした。(4) HCV ゲノムが長期間複製している細胞内において発現が亢進したり、抑制されたりする遺伝子が現れる事を明らかにした。(5) HCV 1b 由来の感染性ウイルスゲノムを樹立しつつある。(7)

インターフェロン/リバビリン療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロRNAとの関連で同定できた。(7) インターフェロンシグナルに関与する因子による抗HCV作用が明らかになった。これらの成果は、脂肪代謝予防、疾患の予防、抗ウイルス剤開発、あるいはワクチン開発などに向けた研究のための新たな知見になると期待される。

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. *PLoS One*. 2011 Jan 24;6(1):e16081.
2. Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS One*. 2010 Dec 8;5(12):e14258.
3. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 3(1): 48, 2010.
4. Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol*. 84(22):11761-1170, 2010.
5. 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*. 84(22): 12048-12057, 2010
6. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*. 407(1):152-159, 2010
7. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, (in press), 2011.
8. El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Ide Y-H, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence Heterogeneity of NS5A and Core Proteins of Hepatitis C Virus and Virological Responses to Pegylated-Interferon/Ribavirin Combination Therapy. *Microbiol Immunol*. (in press), 2011.
9. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684-690, 2010.
10. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 82(8): 1364-1370, 2010.
11. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010.
12. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111(3): 676-685, 2010.
13. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res*. in press (2011).
14. Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*. in press (2011).

15. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* 6(1):e14517 (2011).
16. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatology* 40:1248-1253 (2010).
17. Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, and Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- $\beta$  induction. *PLoS One* 5(12):e14258 (2010).
18. Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91:2080-2090 (2010).
19. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351-357 (2010).
20. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6(1): e15967 (2011).
21. Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  in vitro. *Liver Int.* 30:1324-1331 (2010).
22. Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.* 155:601-605 (2010).
23. Nozaki A, Numata K, Morimoto M, Kondo M, Sugimori K, Morita S, Miyajima E, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Tanaka K. Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. *Antiviral Therapy* 15:1179-1183 (2010).
24. Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* 16:184-192 (2010).
25. Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 374-376 (2010).
26. Takano T., Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J Med Virol.* accepted.
27. Takano T, Tsukiyama-Kohara T, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology*, in press.
28. Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. *Blood* 116(23): 4926-4933, 2010.
29. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem NE, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp. Immunol. Immunopathol.* 33 E81-88, 2010.
30. Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia

- belangeri. *J. Virology* 84 303-311, 2010.
31. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C PLoS One. in press.
  32. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. *PLoS One*. 2011 Jan 24;6(1):e16081.
  33. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Medical Genomics*. 2010; 3: 48
  34. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. *PNAS* 2010; 107: 15856-61
  35. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int*. 2010; 60: 351-357
  36. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2011 (in press)
  37. Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J Gastroenterol*, 46: 6-10, 2011.
  38. Marusawa H, Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol*. 22(4): 442-447, 2010.
  39. Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Individualized extension of pegylated interferon plus ribavirin therapy for recurrent hepatitis C genotype 1b after living-donor liver transplantation. *Transplantation*, 90(6): 661-665, 2010.
  40. Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Haga H, Sato T, Tanaka Y, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Clinical features of biochemical cholestasis in patients with recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 17(7):481-487, 2010.
  41. Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe*. 8: 496-509.
  42. Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN- $\beta$ -inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase. *PLoS ONE*. 5: e14258.
  43. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- $\beta$ -inducing potential. *Mol. Immunol*. 48: 497-504.
  44. Ehira, N., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Kondo, M. Asaka and T. Seya. 2010. An embryo-specific expressing TGF- $\beta$  family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 29: 135.
  45. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med*. 207: 2675-2687.
  46. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$  inducing potential. *Eur. J. Immunol*. 40: 940-948.
  47. Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol. Immunol*. 47: 1283-1291. Ohshima, T.,
  48. Mukai, R., Nakahara, N., Matsumoto, J., Isono, O.,

Kobayashi, Y., Takahashi, S., Shimotohno, K. (2010). HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. J. Cell. Biochem. 111, 187-194. Murata, T., Nakayama, S., Toyama, S., Noda, C., Hotta, N., Chiba, S.,

49. Kanda, T., Isomura, H., Ohshima, T., and Tsurumi, T. (2010). Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with

association of histone deacetylase. J. Biol. Chem. 285, 23925-23935.

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

なし

## II 分担者研究報告

HCV粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤

分担研究者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所 教授

研究要旨： HCV 複製において生じる細胞内の脂質蓄積および細胞外脂肪輸送変化は、ウイルス複製と密接に関連する事が明らかになってきている。また、ウイルス自身がリポ蛋白質と会合して存在することも次第に明らかになってきているが、実際にリポ蛋白質が HCV に会合している事は生化学的に示されていない。HCV を LPL あるいは HTGL で処理すると、浮遊密度が増加した。そのとき感染性の低下も見られた。LPL/HTGL 処理により、ウイルス粒子から ApolipoproteinE (ApoE)が遊離する事も明らかになった。ApoE はウイルス感染に重要な因子のひとつで、粒子に会合している。一方、ウイルスをゲル濾過法により解析したところ、細胞外に放出される粒子の大部分は VLDL が溶離される大きさであった。しかし、この画分のウイルスは感染性を示さず、それよりも小さな粒子に感染性が見られた。ApoE の会合を調べると、VLDL と同じ大きさを示す非感染性ウイルスにも ApoE の会合は認められた。これらの結果から、ApoE はウイルス感染に必要な因子であるがそれだけではウイルスに感染性を賦与しない事が明らかになった。今後 HCV に感染性を賦与する因子を明らかにする事により、持続感染防御への方策が見いだせると考えられる。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。このような疾患発症の背景には、HCV 感染細胞における宿主側の種々の変化が寄与すると考えられる。特に、近年 HCV 感染により細胞内の脂肪代謝が亢進すること、また、脂肪の細胞外への輸送系にも HCV が関係する事が明らかにされてきた。肝臓における脂肪代謝異常は繊維化をもたらし、肝がんに至るといわれており、HCV 感染による脂肪代謝変化は肝疾患の悪性化に関連すると考えられるようになってきた。本研究では HCV に会合しているといわれているリポ蛋白質について、その生化学的に会合している事を示す事、および、会合しているリポ蛋白質とウイルス感染性に

ついての解析を行い、持続感染予防および疾患発症の予防に役立てる。

B. 研究方法

(1) HCV 粒子の性状解析

HuH7.5 に JFH1 を感染させ、その上清を濃縮、密度勾配遠心によりウイルスを分画する。得られたウイルス粒子について、リポ蛋白質に作用するリパーゼ処理を行い粒子の物理的な性状の変化と感染性との関連を解析する。

(2) HCV をゲル濾過により分離し、粒子の大きさと感染性との関連性を解析する。

培養細胞から産生されたウイルスの感染性は密度が低い画分に存在する事が知られている。ウイルスの性状と感染性をさらに調

べるために、ウイルスの大きさとの関連で解析を進める。それにより、感染性と粒子性状との関連がさらに理解できるようになると期待される。

(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 粒子産生条件の検討

HuH7.5 と JFH1 の組み合わせは、現状で培養細胞を用いて感染性粒子を効率よく産生させる系である。感染性ウイルスを産生させるための条件を調べ牛胎児血清 10% 存在下で培養すると高い産生を示す事を確認した。

(2) ウイルス粒子にはリポ蛋白質成分が会合している。

これまでの多くの研究から、ウイルス粒子はリポ蛋白質と会合しているとされている。しかし、その主な根拠は粒子そのものの密度がウイルス蛋白質および核酸成分から予想されるよりも小さいというものである。粒子にリポ蛋白質様因子が会合している事をきちんと示すために、ウイルスをリパーゼする事によりその性状がどのように変化するか、およびその際にウイルスの感染が変化するかを明らかにすれば、ウイルス粒子とリポ蛋白質との会合を性格に言及できる事および、粒子に会合しているリポ蛋白質の生理的な意義を明らかにできると考えた。

そこで、ウイルス粒子を Lipoprotein lipase (LPL) および肝臓由来 lipase (hepatic triglyceride lipase: HTGL) で処理したときのウイルス粒子の性状変化を調べた。LPL および HTGL は肝臓から放出されるリポ蛋白質

の中で主な成分である very low density lipoprotein (VLDL) が血流中に放出された後に働くりパーゼの種類である。LPL は VLDL に働き、中性トリグリセリドを分解する。その結果 VLDL は中性脂肪が減少し、大きさが幾分小さく、かつ密度が大きく変化したりリポ蛋白質(IDL)に変化する。IDL はさらに HTGL により水解を受けてさらに小さなリポ蛋白質である、LDL に変換するといわれている。VLDL, →IDL→LDL に変換する過程で ApoE が脱離する。

この様な事が HCV においても観察されるかを調べた。まず、ウイルスを異なる濃度の LPL で処理し、その後の感染性を調べたところ、感染性は LPL の濃度依存的に減少した。この処理条件下でセンダイウイルスを処理しても感染性は無くならないので、LPL、HTGL 感受性は HCV に特徴的な現象であるといえよう。熱処理した LPL を加えた場合、あるいは LPL の阻害剤であるオルリスタットを添加して処理を行った場合には感染性の低下は見られなかった。したがって、ウイルス粒子の感染性の低下(喪失)は LPL の酵素活性によるものと判断された。

LPL 処理粒子を密度勾配遠心で分離し、その浮遊密度を調べると、全体的に重い方に移行した。この事はウイルス粒子成分にトリグリセリドが存在しており、それが LPL 処理で取り除かれたと判断された。さらに、リポ蛋白質成分のひとつである ApoE 量の変化を調べた。その結果、ApoB に対する ApoE の相対的な量は LPL 処理により減少する事が分かった。以上から、LPL 処理により中性脂肪酸が除かれると同時に ApoE も脱離する結果ウイルスの感染性が失われると考えられた。ApoE の脱離は通常 LPL では起こらず、

HTGL 処理により引き起こされる事になっている。一方、本実験で見られたように LPL 処理により ApoE が脱離した事、感染性が失われた事について、さらに解析を進めたところ、LPL 処理の過程で、精製したウイルス粒子に混在している HTGL 活性も同時に働くために、IDL 状態で止まらずに LDL まで分解が進んでしまうと考えられた。これらの実験結果は HCV にリポ蛋白質が会合している事を生化学的に証明したばかりでなく、ApoE がウイルスの感染性に重要な働きをしている事を強く示唆する結果を得た。すなわち、リポ蛋白質の HCV への会合は、ApoE が粒子に会合するために必要な条件である可能性を示唆する。

### (3) HCV の分子サイズの解析と感染性。

培養細胞から産生されたウイルスを濃縮して、TOSO の分子篩ゲル濾過クロマトグラフィーで解析した。

本システムでは、分子篩樹脂の容積排除画分 (void volume) に large VLDL が溶離される。溶離液を 50 分画に分離してウイルスが何処に溶離されるかをコア蛋白質の ELISA, ウイルス RNA, Envelope 蛋白質およびリポ蛋白質成分などについての解析をおこなった。

コア ELISA で解析すると、大部分のウイルス粒子は void volume に続いて溶離される分画で small VLDL が溶離される場所と一致した。しかし、この画分のウイルスには感染性がない。ウイルスの感染性は、LDL や HDL が溶離される画分に多峰性を示して現れた。つまり、ウイルス粒子の大部分は small VLDL とほぼ同じ大きさを示すが感染性がない。一方、感染性を指標にして解析すると、ウイルス粒子は幾分小さめの分画

に溶離された。前の実験から、感染性には ApoE が重要である事を示したので、大きい粒子には ApoE の会合が見られずに、小さいウイルス粒子が特異的に ApoE と会合している可能性が考えられた。そこで、各分画について、ApoE 抗体を用いて免疫沈降をおこない、ApoE で沈降される分画に HCV RNA が存在するか否かを調べた。その結果、ApoE は感染性を有しないウイルス、感染性を有するウイルスともに会合している事が分かった。これらの事から、ApoE は感染に必要であるが十分ではない事が明らかになった。また、感染性を示すウイルスは分子サイズが幾分小さめであり、かつサイズが一定でない事も明らかになった。

### D. 考察

HCV により引き起こされる肝疾患の予防には、ウイルスにより引き起こされる宿主要因を明らかにし、さらにそれらの要因の中で疾患に結びつくものを解明して行く事が必要である。これまでに HCV 感染による脂肪代謝の異常化は肝疾患発症の要因になることを強く示唆した。その過程でウイルス粒子がリポ蛋白質と会合している可能性が示された。この事をきちんとさせるために本研究では、生化学的手法を用いて、ウイルスとリポ蛋白質の会合を明らかにした。さらに、リポ蛋白質と会合する事がウイルス感染に重要である事も明らかにした。特に ApoE との会合が重要であると考えられたが、ゲル濾過による解析から ApoE との会合のみでは感染性には不十分である事が判明した。

ウイルス粒子の性状を明らかにし、感染性との関連を調べる事は、ワクチン開発に向けても重要である。

## E. 結論

HCV の性状を解析し、ウイルスに会合しているリポ蛋白質の存在を生化学的に明らかにした。また、ウイルスの感染性に会合しているリポ蛋白質の重要性も明らかにした。ゲル濾過による解析から、感染性を持つ粒子は、大きさが幾分小さい事を明らかにした。また、粒子に会合している ApoE が感染性の賦与に十分が要因ではない事も明らかにした。これらの知見は、ウイルスの感染予防法の開発のみならず、HCV 粒子を精製してワクチン開発を進める研究にも資すと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

1. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e16081.
2. Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, Seya

T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. PLoS One. 2010 Dec 8;5(12):e14258.

3. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Med Genomics. 3(1): 48, 2010.
4. Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. J Virol. 84(22):11761-11770, 2010.
5. 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. 84(22): 12048-12057, 2010
6. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. Virology. 407(1):152-159, 2010

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許出願

なし

HCV 複製を制御する宿主要因を明らかにし、HCV の複製を人為的に制御する方法を見出すことは治療効果の向上を目指した抗 HCV 薬の創薬研究につながることを期待される。本研究では、HCV 複製を正また負に制御する宿主因子の探索とその解析を目的とした。宿主因子 Hsp90 が HCV-NS3 の安定化に必須因子で、HCV の複製に係わっていることをすでに報告した。そこで、Hsp90 による HCV RNA 翻訳への影響を検討したところ、Hsp90 は HCV RNA 翻訳に関与していることを見出した。また、HCV RNA 翻訳には Hsp90 が翻訳開始因子 eIF3c と相互作用することが必須であることがわかった。

#### A. 研究目的

慢性C型肝炎患者に対する治療成績は約50%程度に留まり、また副作用の点を考えると新たな治療法の開発が切望される。新規抗HCV薬の開発には、ウイルス複製を詳細に解明する必要がある、それにはHCVの複製を正また負に制御する新たな宿主因子を同定する必要がある。HCVの複製は宿主因子由来タンパク質により正または負に制御される。本研究では、HCV複製を正また負に制御する宿主因子の探索とその解析を目的とした。これまでに我々は、宿主因子Hsp90がHCV複製を正に制御にすることを明らかにしてきた。分子シャペロンHsp90はフォールディングやタンパク質の凝集抑制や活性化などで働く際は、必ず幾つかのコシャペロンと呼ばれる蛋白質と複合体を形成し動いている。一方、Hsp90の機能を阻害する、Hsp90阻害剤(17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-AAG))を用いることで、Hsp90によるHCV複製を抑制出来ることも報告した。近年、Hsp90阻害剤も注目されている薬剤であり、数種類存在する。すでに低毒性のゲルダナマイシン誘導体17-AAGは癌に対する臨床治療も開始されている。そこで、

HCV RNAの翻訳過程における宿主因子Hsp90の関与とその作用機序の解明を目指した。

#### B. 研究方法

1) Hsp90 阻害剤 17-AAG および MG132 による HCV 翻訳阻害効果の検討は HCV full genome replicon cells (NNC#2 細胞)を両阻害剤で濃度依存的に処理した後、全タンパク質を回収し、PSMA7 およびウイルスタンパク質をウエスタンブロット法で確認した。また、HCV IRES 活性への影響は HCV IRES より Luciferase を発現する repoter plasmid (pHCV IRES-luc)および EMCV IRES より Luciferase を発現する repoter plasmid (pEMCV IRES-luc)を作製、Huh7 細胞に導入し、MG132 で濃度依存的に処理したのち、luciferase 活性を測定した。

2) 17-AAG による HCV IRES 依存的翻訳抑制効果を検討するため、HCV IRES 依存的 firefly luciferase (FL) 発現 bicistronic repoter plasmid, pRL-HFL を Huh7 細胞に導入し、17-AAG で濃度依存的に処理したのち、luciferase 活性を dual-luciferase 評価系で測定した。

3) Hsp90 および eIF3 による HCV RNA 翻

訳機構への関与について解析するため、Huh-7、NNC#2 細胞を 17-AAG で処理し、72 時間後にタンパク質を回収後、各 eIF3 (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i) サブユニット特異的抗体を用いて Western blot 法で確認した。

(倫理面への配慮)

特になし

### C. 研究結果

我々は、宿主因子 Hsp90 が HCV-NS3 の安定化に必須因子で、HCV の複製に係わっていることをすでに報告している。そこで、Hsp90 阻害剤 17-AAG によって起こる NS3 タンパク質の減少が、プロテアソーム依存的経路で分解するかを明らかにするため、HCV full length レプリコン細胞である NNC#2 細胞を 17-AAG とプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理した。その結果、本来ならば 20S プロテアソームが阻害されたことにより、回復されるはずの NS3 の発現は認められなかった。また、NNC#2 細胞で MG132 のターゲットであり HCV IRES の活性化に直接影響する proteasome subunit  $\alpha 7$  (PSMA7) と 17-AAG により影響を受ける NS3 およびウイルスタンパク質翻訳時に最初に翻訳される HCVcore の発現レベルを比較した。その結果、MG132 の場合ではプロテアソームの阻害効果により PSMA7 の発現は減少するのに伴い、HCV IRES 活性も減少し、HCVRNA の翻訳が抑制されることが明らかとなった。さらに、この系を 17-AAG で処理した際に、MG132 単独の系と比較したところ、HCVcore の発現が著しく減少した。これらの結果より、Hsp90 が HCV-NS3 の

安定化に必須因子であるとともに、HCVRNA の翻訳にも関わっていることが示唆された。これらの事実を明らかにするために、以下の実験を行った。MG132 が HCV IRES を介した翻訳を抑制するのかを検討するため、pHCV IRES-luc を Huh-7 細胞に導入し、MG132 で処理し、24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性で評価した。その結果、MG132 の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が減少したことから、プロテアソーム依存的経路による HCV IRES を介した翻訳抑制が起こることがわかった。さらに、上記の系を MG132 の代わりに、17-AAG で処理し、24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性で評価したところ、17-AAG 濃度依存的にルシフェラーゼ活性が減少したことから、Hsp90 も HCV RNA の翻訳に関与していることが強く示唆された。

HCV RNA はタンパク質を翻訳するため通常の Cap 依存的に起こる翻訳系ではなく、自身の HCV RNA に HCV IRES と呼ばれる二次構造を有しており、IRES に 40S ribosome subunit、eIF3 など翻訳開始因子が結合することでウイルスタンパク質の翻訳が開始する。翻訳開始因子の中でも eIF3 は、約 700kDa もの巨大な複合体を形成しており、サブユニットの数は 13 種類も存在している。それぞれ 13 種類のサブユニットの役割や eIF3 複合体としての役割は未だそのほとんどが解明されていない。そこで、Hsp90 が翻訳開始因子である eIF3 にどのように関与しているのか、また、eIF3 の未だ解明されていない HCV IRES を介した翻訳機構を解明するため、以下の実験を行った。はじめに、Hsp90 が Cap または IRES 依存的な翻訳に関与するかを検討した。HCV IRES 依存的 firefly

luciferase (FL) 発現 bicistronic reporter plasmid, pRL-HFL を Huh7 細胞に導入し、17-AAG で濃度依存的に処理したのち、luciferase 活性を dual-luciferase で評価した。その結果、17-AAG 濃度依存的に HCV IRES の活性が抑制されたが、Cap 依存的な翻訳には影響が見られなかった。すなわち、Hsp90 は HCV IRES 依存的な翻訳に関与していることが明らかとなった。

次に、13 種類存在する eIF3 のサブユニット中で翻訳に必須で、コアサブユニットであり HCV IRES と相互作用する eIF3a, eIF3b, eIF3c と、同じく翻訳に必須であり酵母など様々な種間を超えて高い保存性をもつ eIF3g, eIF3i の 5 つのサブユニットに注目した。この 5 つの eIF3 サブユニットをについて Hsp90 との関連性を検討するため、Huh-7 またはレプリコン細胞 (NNC#2) を 17-AAG で処理した後、eIF3 各サブユニット特異的抗体で発現レベルを比較した。NNC#2 細胞に対し、Huh-7 細胞では eIF3 (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i) コアサブユニットにおいて、発現の増減は認められなかった。一方、NNC#2 細胞では eIF3 の 5 つのサブユニットの中で eIF3c のみ、17-AAG の濃度依存的に発現が減少した。これらの結果より、レプリコン細胞 (NNC#2) で、eIF3c と Hsp90 が相互作用していることが示唆された。また、レプリコン細胞 (NNC#2) のみ、eIF3c の発現が減少したことから、eIF3c と Hsp90 の結合には HCV RNA が要求されることがわかった。

#### D. 考察

宿主因子 Hsp90 が HCV-NS3 の安定化に必須因子で、HCV の複製に係わっているこ

とをすでに報告した。また、Hsp90 は HCV 非構造タンパク質 NS5A と FKBP8/Hsp90 複合体がウイルス複製に重要な役割を持つことや、NS2/3 間の切断に必須因子であることが報告されている。しかし、Hsp90 が HCV RNA 翻訳に係わっているかは未だ不明である。本研究では HCV RNA の翻訳過程における宿主因子 Hsp90 の関与とその作用機序の解明を試みた。はじめに、NNC#2 細胞を Hsp90 阻害剤 17-AAG で処理した時に起こる、NS3 タンパク質の減少がプロテアソーム依存的経路による分解であるかを検討した。その結果、Hsp90 が HCV-NS3 の安定化に必須因子であるとともに、HCV RNA の翻訳にも係わっていることが強く示唆された。

HCV RNA はタンパク質を翻訳するため通常の Cap 依存的に起こる翻訳系ではなく、自身の HCV RNA に HCV IRES と呼ばれる二次構造を有しており、IRES に 40S ribosome subunit, eIF3 など翻訳開始因子が結合することでウイルスタンパク質の翻訳が開始する。そこで、Cap または IRES 依存的な翻訳過程における Hsp90 の影響を検討したところ、Hsp90 は HCV IRES 依存的な翻訳に関与していることがわかった。

次に HCV RNA 翻訳に対して、翻訳開始因子 eIF3、13 種類存在する eIF3 のサブユニット中で翻訳に必須で、コアサブユニットであり HCV IRES と相互作用する eIF3a, eIF3b, eIF3c と、同じく翻訳に必須である eIF3g, eIF3i の 5 つのサブユニットに注目し、Hsp90 との関連性を検討したところ、eIF3c と Hsp90 が相互作用していることがわかった。また、eIF3c と Hsp90 の結合には HCV RNA が要求されることも明らかにした。

今後は、HCV IRES の存在下で eIF3c と