

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 感染した細胞では脂肪代謝活性が修飾を受ける。その結果、脂肪滴の増加を引き起こしウイルスの産生をあげると考えられる。また、培養上清中に放出されるウイルス粒子は脂肪成分を多く含む因子（リポ蛋白質）を含んでいる。HCV 感染者の血液中のウイルス粒子は ApoB48 とも会合しているために、HCV が小腸にも感染する可能性が示唆されている。そのため、本研究では HCV 感染肝臓培養細胞での ApoB48 産生に関わる遺伝子編集酵素（APOBEC1）の発現を解析し、肝臓細胞からの ApoB48 の産生の可能性と、HCV と ApoB48 会合との可能性を調べた。また、誘導発現される APOBEC1 により HCV 産生が影響を受けるかについても調べた。その結果、

（1）実験に用いた培養肝細胞 HuH7.5 では HCV 感染により HCV 感染により培養上清中の ApoB48 量は僅かに増加したが、APOBEC1 の蛋白質レベルでの発現が増加することを確認できるまでには至らなかった。（2）しかし、APOBEC1 mRNA の量は HCV 感染により増加した。（3）その量の増加は APOBEC1 遺伝子の転写活性化によるものではなく、HCV 感染により APOBEC1 mRNA の安定性によるものである可能性が考えられた。（4）なお、外来的に APOBEC1 を発現させた場合、HCV の産生は抑制される傾向にあった。これらの事から、HCV 感染は APOBEC1 mRNA のレベルを高め維持する働きがある事、しかし、そのことにより HCV 産生が増加することはない（むしろ抑制された）。APOBEC1 は遺伝子編集酵素としての働きを介して、RNA の変異の導入やメチル化された DNA の脱メチル化反応の一部に関与するので、HCV 感染による宿主遺伝子の発現調節等にも関係している可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV 感染により細胞内では脂肪代謝活性が修飾を受ける。その結果、脂肪滴の増加が見られるが、そのような変化はウイルスの産生と深く関わっている。また、培養上清中に放出されるウイルス粒子は脂肪成分を多く含む因子（リポ蛋白質）を含むために浮遊密度が小さい。リポ蛋白質の成分のひとつ、ApolipoproteinE (ApoE)は感染の際に細胞表面上のリポ蛋白質受容体を認識

する働きをしていると考えられている。リポ蛋白質産生を制御する microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) を抑制するとウイルス粒子産生が低下するので、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。HCV 感染者血流中の HCV は各種リポ蛋白質と会合しており、その成分のひとつである ApoB48 との会合

も報告されている。ApoB48 は小腸細胞で ApoB100 が APOBEC1 で切断されて産生され、小腸に取り込まれた脂肪と複合体を作り、それがカイロミクロンとして血液中に放出される。その為 HCV が小腸細胞にも感染する可能性が示唆された。一方、APOBEC1 はシチジンデアミナーゼ活性により、RNA の遺伝子編集に携わる。また、DNA の脱メチル化過程の一部にも関与している。これまでに HCV 感染やそれにより惹起された炎症により各種遺伝子編集酵素の誘導も報告されている。

これらの背景を踏まえて本研究では、

- (1) APOBEC1 の発現誘導が HCV 感染により観察されるか？
- (2) ApoB48/HCV 複合体がウイルスに感染した肝臓由来細胞で観察されるか？
- (3) APOBEC1 は HCV の産生に影響を与えるか？などを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) HCV 感染細胞上清の APOBEC1 発現解析。

HCV 感染複製系として、JFH1/HuH7.5 を用いる。APOBEC1 蛋白質を検出する高感度の抗体が存在しない為、本蛋白質の量を測定する事が困難である。そこで、APOBEC1 のシチジンデアミナーゼ活性により産生される ApoB48 の量を指標にして発現を推定する事にする。その為感染細胞培養上清の ApoB, ApoB48 をウエスタンブロットにより解析する。

(2) APOBEC1 mRNA の発現解析。

HCV 感染と APOBEC1 遺伝子発現の関係を感染後の時系列で解析する。mRNA の定量には定量 RT-PCR を用いる。

(3) APOBEC1 mRNA 発現誘導の解析  
APOBEC1 の遺伝子発現が HCV 感染以外でも生じる可能性を調べる為、細胞の培養条件を変化させた時の本遺伝子の活性化を RT-PCR 法により解析する。

(4) APOBEC1 mRNA 量と HCV 感染との関連性の解析。

培養細胞の培養条件を一定にした条件下で HCV を感染させ、APOBEC1 mRNA の量を定量する事により、HCV 感染による APOBEC1 の変化を明らかにする。

(5) APOBEC1 と HCV 産生との関連。  
APOBEC1 が HCV の産生に与える影響を HCV の感染性ウイルス粒子産生を定量して解析する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

## C. 研究結果

(1) HCV 感染細胞上清の APOBEC1 発現解析。

APOBEC1 の酵素作用により産生される ApoB48 の量を指標にして、APOBEC1 の産生を解析した。HuH7.5 に JFH1 を感染させ、その上清の ApoB100 および ApoB48 の量をウエスタンブロットにより定量した。HuH7.5 細胞培養上清から ApoB100 が容易に検出された。しかし、ApoB48 は非感染細胞においても検出は極めて僅かであった。HCV を感染させた場合には、僅かであるが ApoB48 に相当するバンドが確認された。こ

の増加した量のバンドの大きさは別途 ApoB48 を産生するプラスミドを導入した細胞におけるのと同じ事から、ApoB48 そのものであると結論した。

## (2) APOBEC1 mRNA の発現解析。

APOBEC1 の産生を確認する為の良い抗体がないために、APOBEC1 の遺伝子発現を mRNA の測定により行った。HuH7.5 に HCV を感染させ、その 36, 72 時間後の細胞から RNA を回収し、APOBEC1 mRNA の量を定量 RT-PCR を用いて解析した。感染後 36 時間においては非感染細胞内の APOBEC1 mRNA の量に比べ感染細胞では 4 倍量、また、72 時間においては 7 倍量近い増加が認められ、HCV 感染により APOBEC1 の量は増加すると考えられた。

しかし、感染 0 時間目の細胞においても APOBEC1 mRNA の量が高いレベルになっている事が判明した為に、APOBEC1 mRNA の量は HCV 感染により特異的に誘導された結論づけるまでには至らなかった。

## (3) APOBEC1 mRNA 発現誘導の解析

HCV 感染する前に既に APOBEC1 mRNA 量が高く維持されていた事から、APOBEC1 遺伝子は細胞の培養状態により変化すると考えられた。HuH7.5 細胞の場合における APOBEC1 の誘導と細胞分裂との関係を調べる為に、HuH7.5 を継代培養する過程で APOBEC1 の発現がどのように変動するかを調べた。細胞の継代を続け、細胞全体が占める面積が培養基全体の面積に対して 90% 近い飽和状態にした場合の細胞における APOBEC1 mRNA 量が一番低く、継代して新しい培養基に移した時点での APOBEC1 量が最大値を示した。その後培

養を 24, 36, 48, 72 時間経る毎に量は低下して、継代直前で最低の値になった。

この事から、APOBEC1 は細胞継代という人為的な操作で発現誘導される事が明らかになった。

従って、(3) で観察された HCV 感染細胞において APOBEC1 mRNA レベルが高い状態に維持されていたのは、HCV 感染が APOBEC1 遺伝子を活性化したと考えるよりも、細胞継代時に発現誘導された APOBEC1 の活性化が維持されたか、産生された APOBEC1 mRNA の減衰速度が抑えられたと考えられる。

なお、細胞継代時における APOBEC1 の活性化は HuH7.5 以外の細胞（例えば HeLa）においても観察されたので、一般的な現象のひとつと考えられる。

## (7) APOBEC1 の活性化はストレス誘導等により生じる。

細胞継代時に APOBEC1 の活性化が生じる事から、他のストレス誘導による APOBEC1 発現増加の可能性を調べた。細胞をツニカマイシンやアドリアマイシンで処理した場合にも APOBEC1 の発現亢進が観察された。

## (6) APOBEC1 mRNA 量増加と HCV 感染との関連性の解析。

HCV 感染細胞での APOBEC1 mRNA 量が非感染細胞よりも多い理由として、HCV による APOBEC1 遺伝子の活性化および mRNA の減衰抑制が考えられる。前者の可能性を調べる為に、ウイルス感染後、経時的に細胞を回収し、APOBEC1 mRNA 量を調べた。その結果、(2) で述べた通り、非感染細胞よりも常に高いレベルを維持した。一方、継代して数日経た細胞に感染させた場合、APOBEC1 mRNA の量は感染前の細胞の

APOBEC1 の量を凌駕する事はなかった。この事は、HCV 感染が APOBEC1 遺伝子を活性化することを否定するものではないが、それよりも mRNA の崩壊を抑制していると考えられる。

#### (7) APOBEC1 と HCV 産生との関連。

APOBEC1 の産生がウイルス産生に及ぼす影響を調べる為に、人為的に APOBEC1 を過剰発現させた細胞からの HCV 産生を調べた。その結果、APOBEC1 が過剰産生している細胞からの感染性粒子の産生は、コントロール細胞に比べ低かった。

#### D. 考察

HCV 感染により宿主細胞の脂肪代謝変化が生じ、また脂肪輸送経路に関わる細胞側要因がウイルスの放出、感染過程に導入される結果、宿主の脂肪代謝のホメオスターシスに変化が起これると考えられる。この事が長い間持続する事により、肝疾患が悪性化すると考えられる。

ウイルスの生活環に重要な役割を果たすリポ蛋白質を構成する宿主因子としてアポリポ蛋白質がある。これまでに ApoE はウイルス粒子に会合して、感染性に重要な働きをされると考えられている。一方、MTTP 阻害によるリポ蛋白質産生抑制は、感染性粒子の産生も抑制するので、ApoB100 の粒子形成あるいは粒子の感染性における働きが示唆されている。一方、ApoB48 は小腸でのみ産生されカイロミクロンを形成する因子のひとつであるが、C 型慢性肝炎患者血液中の HCV は ApoB48 とも会合しているとされている。そこで、本研究では、培養細胞を用いた感染複製系を用いて、ApoB48 が実際にウイルス粒子産生に重要な役割を果たすかを明らかにする為に、

ApoB48 産生に必須の遺伝子 APOBEC1 の発現を介してその意義を調べた。その結果、小腸細胞以外の細胞でも一過性であるが APOBEC1 の発現が観察される事が明らかになった。特に細胞を継代、あるいはストレスを誘導する試薬処理により顕著な誘導が観察された。

HuH7.5 に HCV を感染させることにより、APOBEC1 mRNA の量は増えた。また、培養上清中の ApoB48 の量も非感染細胞に比べ僅かであるが高くなった。この事から HCV は APOBEC1 の転写を活性化しているように思えたが、詳細な解析の結果、転写を活性化しているよりも APOBEC1 mRNA の安定化に関係していると考えられる結果を得た。

つまり APOBEC1 は細胞継代の操作やストレスにより活性化される。そして活性化された APOBEC1 mRNA の減衰を HCV は抑制していると考えられる。

APOBEC1 と HCV 産生との関連については、APOBEC1 が過剰産生している細胞からの感染性粒子の産生は、コントロール細胞に比べ低いので、APOBEC1 の産生は HCV に対して負の効果を示すと考えられた。他のグループが C 型慢性肝炎患者血清で HCV が ApoB48 と会合している事から、小腸にも感染する可能性を示唆しているが、本実験からは、肝臓細胞でも APOBEC1 が産生され、また ApoB48 の量も僅かであるが増加する事から、HCV は小腸に感染すると思えなくても説明できると思われる。

APOBEC1 の生理的な機能として RNA の C から T への変換による変異導入、および DNA メチル化の除去が知られている。APOBEC1 を産生するトランスジェニックは効率にがんを発症する事から、これらの生

理的な機能が HCV 感染細胞の肝疾患の増悪化に働いている可能性が考えられる。

特に、HCV 感染細胞では APOBEC1 mRNA レベルが高く維持されることから、本遺伝子の疾患への積極的な関与が考えられる。

#### E. 結論

HCV の生成過程で重要な働きをしている宿主因子としてリポ蛋白質がある。血流中で HCV との会合が示されている ApoB48 の意義を調べる為に、ApoB48 産生に重要な働きをする APOBEC1 の産生と HCV 感染、複製との関連を解析した。その結果、ApoB48 の産生は肝細胞でも僅かであるが観察される事から、HCV は肝臓細胞でも ApoB48 と会合する可能性が示唆された。HCV 感染により APOBEC1 mRNA 量の減衰が抑制された。APOBEC1 は細胞の遺伝子や RNA に働いて細胞増殖を修飾する事が知られている。従って、ウイルスゲノムへの変異導入の可能性の他に、細胞増殖を修飾する事による肝疾患の増悪にも働く可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol Immunol.* 56: 1-9, 2011

2. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163: 390-395, 2011
3. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funmi K, Shimotohno K. Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology.* 1: 19-26, 2011
4. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One.* 6(6): e21284, 2011
5. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One.* 6(5): e19799, 2011
6. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS One.* 6(4): e18285. 2011
7. 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.* Jan 24;6(1): e16081, 2011

#### H.知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許出願

なし

#### 研究要旨

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。前年度は Hsp90 が HCV RNA の翻訳制御に係わる宿主因子であることを見出した。本年度は HCV RNA の翻訳には Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成が必須で、eIF3c と Hsp90 の相互作用には HCV IRES RNA が要求されることを明らかにした。また、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、Hsp90 阻害剤で Hsp90 の活性を阻害したところ、Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体より eIF3c が遊離し、プロテアソーム依存的分解が起こることを見出した。以上のことから Hsp90 は HCV 複製を正に制御する宿主要因因子であることが示唆された。

#### 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、宿主因子Hsp90によるHCV RNAの翻訳制御とその作用機序の解明を目指した。

前年度の研究ではHsp90もHCV RNAの翻訳に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依存的な翻訳に係わっていることを明らかにした。また、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eIF3c

がHsp90と相互作用していることがわかった。さらに、eIF3cとHsp90の結合にはHCV RNAが要求されることが示唆された。

本年度は、HCV IRESの存在下でeIF3cとHsp90の分子間相互作用の解析およびHCV RNAの翻訳過程でのHsp90の役割を詳細にする。

## B. 研究方法

1) 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およびEMCV依存的firefly luciferase(FL)とCap依存的Renilla luciferase (RL)とを発現するbicistronic reporter plasmid, pRL-HCV-IRES-FLとpRL-EMCV-IRES-FLを作製し、Huh7細胞に導入し、Hsp90阻害剤、17-AAGまたはeIF3c-siRNAで濃度依存的に処理したのち、luciferase活性をdual-luciferase系で測定した。

2) 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法で解析した。

3) 17-AAGによるeIF3cのプロテアソーム依存的分解を解析するため、NNC#2細胞を17-AAGまたはプロテアソーム阻害剤、MG132, 17-AAG-MG132で処理した後、全タンパク質を回収し、eIF3cをWestern blot法で解析した。さらに、17-AAGによるeIF3cのユビキチン化への影響を調べるため、ubiquitin発現プラスミドpMyc-UbをNNC#2細胞に導入した。さらにMG132を添加後に、細胞溶解物を回収し、anti-Myc Abで免疫沈降法によりユビキチン結合タンパク質を免疫沈降した後、western

blotting法によりeIF3cを検出することで、eIF3cのpoly-ubiquitination assayを行った。

4) eIF3c knockdownによるHCV IRESを介した翻訳への影響を調べるため、Huh7細胞をeIF3c-siRNAで処理した後、HCV full-genome RNA (NN/1b/FL)を導入した。24時間後、培養上清を回収し、化学発光酵素免疫測定法(Chemiluminescent Enzyme Immuno Assay; CLEIA)によりHCV-coreタンパク質濃度を測定した、

(倫理面への配慮)

特になし

## C. 研究結果

前年度の研究ではHsp90もHCV RNAの翻訳に係わっていることが強く示唆された。

すなわち、HCV IRESを介したHCV RNAの翻訳過程でeIF3cがHsp90と相互作用していることを明らかにした。

本年度は、HCV IRESの存在下でeIF3cとHsp90の分子間相互作用の解析およびHCV RNAの翻訳過程でのHsp90の分子メカニズムを詳細にする。

はじめに、実際にNNC#2細胞を17-AAG処理した場合、Hsp90の機能が阻害されているかを検討したところ、細胞内のHsp90( $\alpha$ , $\beta$ )およびコシャペロンであるHsf-1とHsp70の発現をWestern blotにより検出できた。ここでHsp70は、Hsp90阻害剤によりHsp90の機能が抑制されるとHsp90と複合体を形成していたHsf-1が解離し、核内でHsp70の転写を活性化させHsp70を過剰発現させることが知られていることから、Hsp70発現量を指標とした。Hsp90の減少は見られなかったが、Hsp70の発現量が濃度依存的に増加したこと

から Hsp90 の機能が抑制されたことが示唆された。

前年度、NNC#2 細胞では eIF3 の 5 つのサブユニット (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i) の中で eIF3c のみ、17-AAG の濃度依存的に発現が減少したことから、Hsp90 が eIF3c の安定化に関与していることが示唆された。そこで、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、ユビキチン化され、プロテアソーム依存的経路で分解されるか否か検討した。NNC#2 細胞を 17-AAG または MG132, 17-AAG-MG132 で処理したところ、17-AAG 処理した系では eIF3c の発現が著しく減少した。一方、MG132 または 17-AAG-MG132 で処理した系では eIF3c の減少は認められなかった。さらに、17-AAG による eIF3c のユビキチン化への影響を調べるため、ユビキチン発現プラスミド (pMyc-Ub) を NNC#2 細胞に導入した。さらに MG132 で処理した後に、細胞溶解物を回収し、anti-Myc Ab で免疫沈降法によりユビキチン結合タンパク質を免疫沈降した後、western blotting 法により eIF3c を検出することで、eIF3c のポリユビキチン化の検出を行ったところ、17-AAG 存在下では eIF3c のユビキチン化が認められた。これらの結果より、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、ポリユビキチン化され、プロテアソーム依存的経路で分解されることが明らかとなった。

eIF3c が Hsp90 依存的クライアントタンパク質であることが確認されたので、実際に eIF3c を siRNA で knockdown することで HCV IRES を介した翻訳への影響を調べた。Huh-7 細胞を siRNA-eIF3c (50nM) で処理した後、pRL-HCV-IRES-FL または pRL-EMCV-IRES-FL を導入した。24 時間培養後、ルシフェラーゼ

活性を測定した。その結果、HCV-IRES (62%) と EMCV-IRES (40%) は IRES 依存的ルシフェラーゼ活性が減少したが、Cap 依存的ルシフェラーゼ活性の減少は認められなかった。さらに、この事実を検証するために、eIF3c を siRNA で knockdown した Huh-7 細胞へ HCV full-genome RNA (NN/1b/FL) を導入し、CLEIA 法で HCV-core タンパク質濃度を測定したところ、HCV-core タンパク質は減少した。これらの結果から Hsp90 の機能が阻害されると、翻訳開始因子 eIF3c がプロテアソーム依存的経路で分解されることで HCV IRES RNA 依存的翻訳の阻害が起こることを明らかにした。

eIF3c が Hsp90 依存的クライアントタンパク質であることが実証されたので、実際に eIF3c と Hsp90 が相互作用しているか検討した。はじめに、eIF3c 全長が発現する pFLAG-eIF3c 発現 vector を制限酵素 ClaI と SmaI で処理した pFLAG-CMV2 vector に eIF3c 全長を挿入することで作成した。Hsp90 との相互作用を検討した。Huh-7 細胞および NNC#2 細胞に pFLAG-eIF3c 発現 vector を導入し、1×CAT ELISA buffer により細胞を溶解した。細胞溶解物を回収し、anti-FLAG Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90Ab と anti-FLAG Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行った。その結果、Huh-7 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドは検出できなかったが、NNC#2 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドが検出され Hsp90 と eIF3c が相互作用していることが示唆された。また Huh-7 細胞では eIF3c と Hsp90 との相互作用は認められなかった。NNC#2 細胞と Huh-7 細胞との相違は細胞内で HCV replicon RNA および HCV のウイルスタンパク質存在の有無である。また、ウイルスタ

ンパク質は HCV replicon RNA から翻訳されることや、eIF3 が翻訳開始因子であり HCV IRES に直接結合することを考慮すると、HCV replicon RNA が Hsp90 と eIF3c の会合に係わっていると考えた。そこで、HCV replicon RNA で翻訳に最も重要な部位である HCV IRES を Huh-7 細胞で発現させ、Hsp90 と eIF3c が相互作用するか検討を行った。まず、HCV IRES を発現させ 17-AAG 処理をすることで、NNC#2 細胞と同様に 17-AAG による eIF3c のタンパク質減少がおこるか検討するために、Huh-7 細胞に HCV IRES/Luc である pC5' IL-II vector を導入し、17-AAG で処理した。培養タンパク質を回収し、eIF3c を Western blot 法により検出を試みた。eIF3c は Huh-7 細胞を 17-AAG 単独処理または pC5' IL-II vector を単独導入した場合においては、タンパク質量の減少は全く見られなかった。しかし、HCV IRES 発現細胞を 17-AAG 処理した際、Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体より eIF3c が遊離し、プロテアソーム依存的分解が起こることを、eIF3c が減少した。すなわち、HCV IRES を細胞内で発現させることで、Hsp90 と eIF3c が相互作用するようになり、そこへ 17-AAG で Hsp90 を阻害した場合に eIF3c が減少するのではないかと考えられる。さらに、Hsp90 と eIF3c が相互作用に HCV IRES が関与していることを実証するために、NNC#2 細胞を RNase A で処理し、細胞溶解物を回収し、anti-eIF3c Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90 Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行った。その結果、Hsp90 と eIF3c の会合が消失したことから、Hsp90 と eIF3c が相互作用には HCV IRES が必須であることが明らかになった。

## D. 考察

前年度、HCV 複製を正また負に制御する宿主因子の探索を行ったところ、宿主因子である Hsp90 が HCV RNA の翻訳に係わっていることが強く示唆された。特に Hsp90 が HCV RNA 翻訳に対して、翻訳開始因子 eIF3c の安定化に寄与していた。本年度は eIF3c の安定化に対する Hsp90 の役割を調べたところ、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、Hsp90 阻害剤で Hsp90 の活性を阻害した際、Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体より eIF3c が遊離し、プロテアソーム依存的分解が起こることを明らかにした。また、eIF3c と Hsp90 の相互作用には HCV IRES RNA が必須であることが判明した。さらに、HCV RNA の翻訳には Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成が要求されることを明らかにした。宿主因子である Hsp90 は HCV 複製を正に制御する必須因子であることから、HCV の複製を Hsp90 阻害剤で人為的に制御することは可能であり、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できる。

今後は、HCV RNA の翻訳過程での Hsp90 および Hso70 の分子メカニズムを詳細にする。

## E. 結論

HCV 複製を正また負に制御する宿主因子の探索を試みたところ、分子シャペロン・宿主因子である Hsp90 が HCV RNA の翻訳制御に係わることを見出すとともに、eIF3c と Hsp90 の分子間相互作用の解析および HCV RNA の翻訳過程での Hsp90 の分子メカニズムを詳細にすることが出来た。ここで得られた知見は、HCV 複製制御の解明と宿主因子である Hsp90 を標的とした新たな治療薬の開発に貢献するものと期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1.Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163:390-395 (2012).
- 2.Chang MO, Suzuki T, Suzuki H, Takaku H. HIV-1 Gag-Virus-Like Particles Induce Natural Killer Cell Immune Responses via Activation and Maturation of Dendritic Cells. *J. Innate Immun.* 4:187-200 (2012).
- 3.Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 286: 10051-10057 (2011).
- 4.Sugiyama R, Naganuma H, Nishitsuji H, Takaku H. Human immunodeficiency virus-1 Nef suppresses Hsp70-mediated Tat activation. *FEBS Lett.* 585:3367-3371 (2011).
- 5.Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 585:3372-3377 (2011).
- 6.Noguchi K, Ishitu Y, Takaku H. Evaluating target silencing by short hairpin RNA mediated by the group I intron in cultured mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 11: 79 (2011).

7.Sugiyama R, Hayafune M, Habu Y, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 RT-dependent DNAzyme expression inhibits HIV-1 replication without the emergence of escape viruses. *Nucleic Acids Res.* 39: 589-598 (2011).

### 2.学会発表

(国内学会)

1. 月本あつ子、鈴木等、高久 洋、PGA<sub>1</sub>を用いた抗 HCV 活性とその作用機序の解明. 第 34 回日本分子生物学会、2011 年、横浜.
2. 柴田千帆里、鈴木等、松本則彦、鈴木友幸、Chang Myint Oo、高久 洋、EBNA1/OriP を発現するバキュロウイルスベクターの構築とその抗 HCV 遺伝子治療への応用、第 34 回日本分子生物学会、2011 年、横浜.
3. HSP70 による Vif の抗 APOBEC3G 活性の阻害. 杉山 隆一、西辻 裕紀、長沼 晴樹、小関 寛、古川 亜矢子、片平 正人、羽生 勇一郎、高久 洋. 第 21 回日本抗ウイルス療法研究会、2011 年、金沢.
4. HSP70 は APOBEC3G と Vif の結合を阻害することで APOBEC3G のポリユビキチン化および分解を抑制する. 杉山 隆一、西辻 裕紀、長沼 晴樹、小関 寛、古川 亜矢子、片平 正人、羽生 勇一郎、武内寛明、梁明秀、高久 洋. 第 25 回日本エイズ学会 学術集会・総会、2011 年、東京.
5. ZBRK1/ZNF350 は HIV-1 LTR の転写活性を抑制する. 西辻 裕紀、高久 洋. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京.
6. Chang Myint Oo, Tomoyuki Suzuki, Hiroshi Takaku、HIV-1 Gag Virus-like particles

- induce natural killer cell immune responses via activation and maturation of dendritic cells. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京.
7. 後藤裕一、Chang Myint Oo、森裕美子、飯森香月、高久 洋、HIVgag 発現組み換えバキュロウイルス感染樹状細胞による免疫応答、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京.
  8. 近藤敬吾、Chang Myint Oo、鈴木友幸、高久 洋、FrC-OVA 発現バキュロウイルスを用いた免疫応答解析. 第 34 回日本分子生物学会、2011 年、横浜.
  9. Metabolome analysis of the cultured hepatocytes persistently infected with Chimeric HCV(1b/2a). Kazuo Sugiyama, Hidetsugu Saito, Hirotohi Ebinuma, Hiroshi Takaku, Hoshifumi Hibi. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年、名古屋.
- (国際学会)
1. Makoto Abe, Hitoshi Suzuki, Hironori Nishitsuji, Hisatoshi Shida, Hiroshi Takaku, INTERACTION OF HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I REX WITH DICER SUPPRESSES RNAI SILENCING, XV-International Congress of Virology, 2011, Sapporo, Japan
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許出願  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスによる宿主転写調節機構の脱制御について

研究分担者 堀田 博 神戸大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨： C型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌のような肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変をも引き起こす。また、2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たすことも知られている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、HCV感染により肝臓における糖新生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) の遺伝子発現が亢進し、グルコースの産生が亢進することを報告した。本研究では、HCV J6/JFH1 感染 Huh7.5 細胞を用いて、HCV が PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現を亢進させる分子機序、とくに酸化ストレス及び c-Jun N-terminal kinase (JNK) の関与について検討した。その結果、HCV 感染はミトコンドリア reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進による酸化ストレスを介して JNK を活性化し、これが FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、PEPCK と G6Pase の遺伝子転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。また、一過性発現細胞を用いた解析により、上記の現象に HCV NS5A が関与していることが示唆された。

#### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌のような肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病等の肝外病変をも引き起こす。また、2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たすことも知られている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。我々は、HCV感染により肝臓における糖新生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) の遺伝子発現が亢進し、その結果、グルコースの産生が亢進することをこれまでに報告した。一方、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現は転写因子 forkhead box O1 (FoxO1) により制御されていることが知られている。本研究では、HCV J6/JFH-1 感染 Huh7.5 細胞を用いて、HCV が PEPCK

及び G6Pase の遺伝子発現を脱制御する分子機序、とくにミトコンドリア reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進による酸化ストレス及び c-Jun N-terminal kinase (JNK) の関与について検討した。

#### B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞：ウイルスは HCV J6/JFH-1 株、細胞は Huh-7.5 細胞を用いた。

(2) 転写因子 FoxO1 の解析：抗 FoxO1 抗体を用いた間接蛍光抗体法により FoxO1 の細胞内局在を調べた。また、細胞溶解液を核分画と細胞質分画に分け、抗 FoxO1 抗体を用いたウエスタンブロット法により FoxO1 の細胞内局在を調べた。さらに、抗リン酸化 FoxO1 抗体を用いたウエスタンブロット法によりリン酸化 FoxO1 の量を調べた。

(3) JNK 活性化の検討：抗リン酸化

JNK (Thr183/Tyr185) 抗体を用いたウエスタンブロット法により JNK のリン酸化状態を調べ、JNK 活性化の指標とした。また、JNK によりリン酸化される c-Jun のリン酸化の程度を、抗リン酸化 c-Jun (Ser63) 抗体を用いたウエスタンブロット法により調べた。一部の実験では JNK 活性化の影響を解除するために、JNK 特異的阻害剤である SP600125 を用いた。

(4) Akt 活性化の検討：抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体を用いたウエスタンブロット法により Akt のリン酸化状態を調べ、Akt 活性化の指標とした。

(5) ミトコンドリア障害及び ROS 産生の解析：細胞を MitoSOX™ Red を加えて培養し、共焦点レーザー顕微鏡によりミトコンドリアの ROS 産生を観察した。一部の実験では ROS の影響を解除するために、抗酸化剤である *N*-acetyl cysteine (NAC) を用いた。

(6) PEPCK mRNA 及び G6Pase mRNA の定量：それぞれの mRNA 量を特異的プライマーを用いた定量的 qRT-PCR により調べた。

(7) HCV の各タンパク質 (core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) を発現するプラスミドを導入した一過性発現細胞を用いて、上記の解析を行った。

(倫理面への配慮)

組換え遺伝子を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

(1) HCV 感染による転写因子 FoxO1 のリン酸化の低下及び FoxO1 の核内蓄積：

HCV 感染細胞では感染 4 日目 (4 dpi) 以降に、対照細胞に比べて、FoxO1 のリン酸化の著しい低下が認められた。また、蛍光抗体法解析により、FoxO1 が核内に蓄積することが観察

された (4 dpi)。

(2) HCV 感染による Akt のリン酸化：

HCV 感染細胞では 2 dpi 以降継続して、対照細胞に比べて、Akt のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。このことは、HCV 感染による FoxO1 のリン酸化の低下は、Akt 活性の低下によるものではないと考えられた。

(3) HCV 感染による JNK の活性化と FoxO1 リン酸化の低下の相関：

HCV 感染細胞では 4 dpi 以降に、対照細胞に比べて、JNK のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。また、JNK の下流シグナル分子である c-Jun のリン酸化 (活性化の指標) と c-Jun 絶対量の増加が認められた。このような HCV による JNK の活性化は、特異的阻害剤である SP600125 (20  $\mu$ M) 処理により解除された。それに伴って、FoxO1 リン酸化の著しい低下が解除され、同時に FoxO1 の核内蓄積も解除され、非感染細胞と同じ状態になった。

(4) HCV 感染によるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下の相関：

MitoSOX™ Red (5  $\mu$ M) 存在下で、HCV 感染細胞ではミトコンドリアの ROS 産生が亢進することが共焦点レーザー顕微鏡により観察された (4 dpi)。このような HCV によるミトコンドリア ROS 産生の亢進は、抗酸化剤 NAC (5 mM) で処理することにより解除された。それに伴って、JNK の活性化が解除され、さらに FoxO1 リン酸化の低下と FoxO1 の核内蓄積も同時に解除され、非感染細胞と同じ状態になった。

(5) NS5A によるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下の相関：

HCV タンパク質 (core, NS2, NS3,

NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) のうちどのタンパク質が糖新生の亢進に関与しているかについて、発現プラスミドによる一過性発現細胞を用いて解析した。その結果、NS5A 発現細胞において、ミトコンドリア ROS 産生の亢進、JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下、並びに PEPCK mRNA と G6Pase mRNA の発現増加とグルコース産生の増加が確認された。

#### D. 考察

HCV 感染細胞では、非感染対照細胞に比べて、転写因子 FoxO1 のリン酸化が抑制され、FoxO1 の核外輸送が阻害されて核内に蓄積することが明らかになった。そのため FoxO1 転写活性が継続的に維持され、糖新生律速酵素である PEPCK と G6Pase の遺伝子発現を促進して、糖新生が亢進すると考えられた。通常、FoxO1 のリン酸化はインスリンシグナル経路の Akt によって制御されており、HCV による FoxO1 リン酸化の抑制は Akt 活性の低下による可能性が当初考えられた。しかし、HCV 感染細胞においては Akt のリン酸化が亢進しており、Akt はむしろ活性化していると考えられた。すなわち、HCV による FoxO1 リン酸化の抑制は Akt 非依存性であると考えられた。そこで、FoxO1 リン酸化の抑制をひきおこす上流の分子機序について検討を行った。

FoxO1 リン酸化の制御に JNK が関与している可能性が報告されている。一方、我々はこれまでに、HCV 感染によるミトコンドリア障害を介して JNK が活性化されることを報告した。そこで、本研究において、HCV 感染細胞における FoxO1 リン酸化の低下と JNK 活性化の関連について、特異的 JNK 阻害剤 SP600125 を用いて検討した。その結果、HCV 感染による FoxO1 リン酸化の低下は JNK 阻害剤処理によって解除される

ことが明らかになった。さらに、ミトコンドリア ROS 産生により JNK が活性化されることが知られているので、HCV 感染細胞における FoxO1 リン酸化の低下とミトコンドリア ROS 産生の関連について、抗酸化剤 NAC を用いて検討した。その結果、HCV 感染による FoxO1 リン酸化の低下は抗酸化剤処理によって解除されることが明らかになった。これらの結果より、HCV 感染はミトコンドリア ROS 産生の亢進による酸化ストレスを介して JNK を活性化し、これが FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素 PEPCK と G6Pase の遺伝子転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。

HCV 感染により誘導されるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化を介した FoxO1 転写活性の継続的維持及びそれを介した糖新生の亢進に HCV のどのタンパク質が主に関与しているかについて、core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B それぞれの一過性発現細胞を用いて検討した。その結果、NS5A が上記の経路を介して糖新生の亢進に関与していることが示された。

#### E. 結論

HCV 感染はミトコンドリア ROS 産生の亢進による酸化ストレスを介して JNK を活性化し、これが FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素 PEPCK と G6Pase の遺伝子転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。この糖新生亢進には、通常インスリンシグナル経路で重要な役割を果たしている Akt は関与していないと考えられた。また、ミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化を介した FoxO1 転写活性の継続的維持及びそれを介した糖新生の亢進に HCV NS5A が関与し

ていることが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front. Microbiol.*, 2:A278, 1-5 (2012).
2. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnogliik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect.*, 14(1):69-78 (2012).
3. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J. Med. Virol.*, 84(2):229-234 (2012).
4. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2):e30513 (2012).
5. 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*, 55(1):1-11 (2012).
6. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J. Virol.*, 85(17): 8556-8568 (2011).
7. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol. Immunol.*, 55(11): 774-782 (2011).

### 2. 学会発表

1. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
2. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. HCV-induced suppression of glucose transporter 2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
3. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that targets hepatitis C virus NS5A protein for ubiquitylation. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.

4. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediated ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress,. September 14, 2011. Sapporo, Japan.
  5. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses glucose transporter 2 gene expression by downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011. Sapporo, Japan.
  6. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 15, 2011. Sapporo, Japan.
  7. Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスは酸化ストレスを介して糖新生を亢進し糖尿病発症に関与する. 第47回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
  8. 甘翔, Lin Deng, 陳明, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aの新規結合タンパク質であるヒストンメチル基転移酵素 SMYD3の同定. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011, 大阪.
  9. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, Matsui C, Jang DP, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein.第34回日本分子生物学会年会, 2011, 横浜.
  10. 松井千絵子, 勝二郁夫, 兼田崇作, Deng Lin, 井出良浩, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる GLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第64回日本細菌学会関西支部総会, 2011, 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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）  
分担研究報告書

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

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）RNAの複製が細胞内で長期に及んだ場合において、HCV-RNAがどのような遺伝的多様性を獲得し、細胞機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。HCV研究にこれまで汎用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すヒト肝癌細胞株 Li23 由来の細胞株を用いて本研究を行った。HCV 1b 遺伝子型で 0 株由来の全長 HCV-RNA が効率よく複製している細胞（OL, OL8, OL11 および OL14 の 4 種類）を 2 年以上継代培養した。また、OL8 と OL11 細胞からそれぞれ HCV-RNA を排除した治癒細胞（OL8c と OL11c）についても、並行して 2 年以上継代培養した。これらの細胞を用いたマイクロアレイ解析や RT-PCR 解析により、HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現変動した遺伝子の探索を昨年引き続き行った。また、今年度は miRNA の発現変動についても検討した。その結果、以下に示すような成果を得た。（1）HCV-RNA の長期複製（3.5 年）により不可逆的に発現が亢進したと考えられる宿主遺伝子（*WISP3*, *TBC1D4*, *ANGPT1*, *SEL1L3* および *CDKN2C*）を同定した（2）HCV-RNA の長期複製（3.5 年）により不可逆的に発現が低下したと考えられる宿主遺伝子（*BASP1*, *CPB2*, *ANXA1* および *SLC1A3*）を同定した。（3）HCV-RNA の長期複製（2 年）により不可逆的に発現が亢進したと考えられる 6 種類の miRNA と発現が低下したと考えられる 2 種類の miRNA を得た。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の 8 割に認められており、HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C 型慢性肝炎に対する治療もペグ化インターフェロン（IFN）とリバビリンとの併用療法により患者の半数程度は治癒するようになっている。しかしながら、HCV の持続感染による発がん機構については、諸説あるものの未だ解明されていない。そ

れは、HCV が宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく分かっていないためである。これまで、多くの研究者が HCV の複製増殖系を用いてこの問題にアプローチして来たものの、HCV が複製増殖する培養細胞株はヒト肝がん由来の HuH-7 細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換マウスも実験系として登場しているものの、高価な上に HCV の複製増殖に個体間で差があることから発がんに関する研究にはあまり適していない。

2008 から 2009 年にかけて、我々はこ

これまでの HCV 研究に汎用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは遺伝的発現プロファイルも異なるヒト肝癌細胞株 Li23 が HCV の複製増殖を許容することを見出した。そして、この Li23 由来の細胞を用いることにより HCV 1b 遺伝子型で 0 株由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株 (OL, OL8, OL11 および OL14 細胞) を樹立することに成功した。

我々は、樹立したこれらの全長 HCV-RNA 複製細胞を用いることにより、これまでの HuH-7 由来の細胞を用いた研究では得られなかった知見が新たに見出されるのではないかと考えた。また、これまでは、HCV が存在するかしないかでの差を見出すことを目的とした研究がなされ、HCV の複製増殖に關与する多くの宿主因子の同定がなされて来た。しかし、本研究ではこのような方向の研究ではなく、HCV の複製が長期間に及んだ場合に宿主側に生じた微細な変化が蓄積して結果的には不可逆的な大きな変化になるのではないかという仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証して捉えることを目指した。昨年度から継続して研究を行い、今年度は以下に示すような研究成果を得た。

## B. 研究方法

### (1) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

OL8 細胞と OL11 細胞について、セルバンカーにて-80度で保存してあった樹立時の細胞[OL8(0Y)と OL11(0Y)]、2年間培養後の細胞[OL8(2Y)と OL11(2Y)]および 3.5年間培養後の細胞[OL8(3.5Y)と OL11(3.5Y)]を再培養し、70-80% confluent になった時点において、それぞれの細胞から Total RNA を調製した。

これらの RNA を用いて、昨年度マイクロアレイ解析や RT-PCR 解析により選択した遺伝子の発現レベルを通常の RT-PCR 解析と LightCycler を用いて定量的 RT-PCR 解析を行った。

治癒細胞である OL8c と OL11c についても、同様に作成時の細胞[OL8c(0Y)と OL11c(0Y)]、2年間培養後の細胞[OL8c(2Y)と OL11c(2Y)]および 3.5年間培養後の細胞[OL8c(3.5Y)と OL11c(3.5Y)]を再培養し、70-80% confluent になった時点において、それぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA についても、上述したように通常の RT-PCR 解析や定量的 RT-PCR 解析を行った。

定量的 RT-PCR 解析により得られた結果については、Student の t 検定を行い、有意差があるかを検討した。P が 0.05 以下になった場合を有意差ありとした。

### (2) HCV-RNA の長期複製による宿主の miRNA の変動解析

70-80% confluent になった OL8(0Y)、OL8(2Y)、OL11(0Y)および OL11(2Y)細胞より QIAGEN 社の miRNeasy minikit を用いて miRNA を含む Total RNA を調製した。治癒細胞である OL8c(0Y)、OL8c(2Y)、OL11c(0Y)および OL11c(2Y)細胞からも同様に miRNA を含む Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、Agilent 社の Human miRNA rel 16.0 によるマイクロアレイ解析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

## C. 研究結果

### (1) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

昨年度、cDNA マイクロアレイ解析と RT-PCR 解析を組み合わせることにより、HCV-RNA が 2 年間持続的に複製した際、発現レベルが亢進する遺伝子として 6 種類、発現レベルが低下する遺伝子として 4 種類同定したと報告した。しかし、この場合の解析対象は発現量が比較的高い上位 200-300 個の遺伝子プローブのみであった。そのため、今年度は、中程度の発現レベルを示す遺伝子プローブも含めて上位 500 個ほどのプローブに範囲を拡げてさらに検討した。

その結果、発現レベルが亢進したと考えられる遺伝子が 2 種類追加され、発現レベルが低下したと考えられる遺伝子が 5 種類追加された。それにより、発現が亢進したとして得られた遺伝子は以下の 8 種類（遺伝子シンボル名で記す）となった。*ACSM3*, *ANGPT1*, *CDKN2C*, *PLA1A*, *SEL1L3*, *SLC39A4*, *TBC1D4* および *WISP3*。また、発現が低下したとして得られた遺伝子は以下の 9 種類となった。*ANXA1*, *AREG*, *BASP1*, *CIDEA*, *CPB2*, *HSPA6*, *PI3*, *SLC1A3* および *THSD4*。

このようにして得られた遺伝子について、今年度は、再現性の確認と、培養期間を 2 年からさらに延ばした場合に発現レベルがどう変化するかを調べることにした。その時点で長期培養は 3.5 年まで進んでいたもので、今回は 3.5 年培養した細胞も用いることとした。OL8, OL11, OL8c および OL11c 細胞について、

樹立時 (0Y)、2 年培養後 (2Y) および 3.5 年培養後 (3.5Y) の細胞をそれぞれ再培養して、70-80% confluent になった時点で、それぞれの細胞から Total RNA を調製した。得られた Total RNA を用いて、まず、RT-PCR 法により 2 年間の培養により得られたこれまでの data の再現性を調べた。その結果、発現が亢進したとして得られていた *ACSM3* と発現が低下していたとして得られていた *HSPA6* では 2 年培養時までの発現変動に関して再現性がとれなかった。おそらく、これらの遺伝子の発現レベルは細胞増殖の状態により大きく変動するものであると判断して、以後の解析から外すこととした。

*ACSM3* と *HSPA6* 以外の 15 遺伝子については、培養 3.5 年までの発現レベルの経時的変化を LightCycler を用いた定量的 RT-PCR にて調べた。

その結果、発現が亢進した遺伝子群のなかでは、*WISP3* (WNT1 inducible signaling pathway protein 3), *TBC1D4* (TBC1 domain family member 4), *ANGPT1* (Angiopoietin 1), *SEL1L3* (Sel-1 suppressor of lin-12-like 3) および *CDKN2C* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C) が、OL8 細胞、OL11 細胞ともに HCV-RNA 複製細胞におけるこれらの遺伝子の発現亢進は 3.5 年の培養後も維持されていることが分かり、治癒細胞を 3.5 年培養した細胞における発現レベルとの比較においても、 $P < 0.01$  の有意差をもって発現亢進していることが明らかになった。しかしながら、*PLA1A* については、OL8(3.5Y) 細胞と

OL8c(3.5Y)細胞間で有意差がなくなり、*SLC39A4*ではOL11(3.5Y)細胞とOL11c(3.5Y)細胞間で有意差がなくなっていることが分かったため、この段階で、この2遺伝子については候補遺伝子から除外した。そのため、最終的には、*WISP3*, *TBC1D4*, *ANGPT1*, *SEL1L3*および*CDKN2C*の5種類をHCV-RNAが長期に複製することにより不可逆的な発現亢進が起った遺伝子として同定した。

次に、発現が低下した遺伝子群について、同様に調べた。その結果、*BASP1* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1), *CPB2* (Carboxypeptidase B2), *ANXA1* (Annexin A1), *SLCIA3* (Solute carrier family member 3)については、OL8細胞、OL11細胞ともにHCV RNA複製細胞におけるこれらの遺伝子の発現低下は3.5年の培養後も維持されていることが分かり、治癒細胞を3.5年培養した細胞における発現レベルとの比較においても、 $P < 0.01$ の有意差をもって発現上昇していることが明らかになった。しかしながら、*AREG*と*CIDEA*については、OL8(3.5Y)細胞とOL8c(3.5Y)細胞間で有意差がなくなり、*THSD4*ではOL8c(3.5Y)細胞よりOL8(3.5Y)細胞の方が発現レベルが高くなったり、OL11(3.5Y)細胞とOL11c(3.5Y)細胞間で有意差がなくなっていることがわかったため、この段階で、これら3遺伝子については候補遺伝子から除外した。また、PI3については、OL8cやOL11c細胞の方が経時的な発現低下率が非常に大きいことが判明したため、この時点で候補遺伝子から除外し

た。そのため、最終的には、*BASP1*, *CPB2*, *ANXA1*および*SLCIA3*の4種類をHCV-RNAが長期に複製することにより不可逆的な発現低下が起った遺伝子として同定した。

## (2) HCV-RNAの長期複製による宿主のmiRNAの変動解析

OL8(0Y), OL8c(0Y), OL11(0Y)およびOL11c(0Y)細胞とそれぞれ2年間培養したOL8(2Y), OL8c(2Y), OL11(2Y)およびOL11c(2Y)細胞から得られたmiRNAを含むTotal RNAを用いて、Agilent社のHuman miRNA rel 16.0によるmiRNAのマイクロアレイ解析を行った。まず、OL8(0Y)とOL8(2Y)との比較やOL11(0Y)とOL11(2Y)との比較を行い、両者の比較において共通して2倍以上発現が亢進あるいは1/2以下に発現が低下しているmiRNAを選択した。

その結果、OL8とOL11細胞で共通して発現が亢進している7種類のmiRNAと発現が低下している4種類のmiRNAを選択した。次に、これらのmiRNA発現について、治癒細胞であるOL8cやOL11c細胞を2年間培養した場合においても同様の変動を示すかどうかを調べた。OL8c(0Y)とOL8c(2Y)の比較やOL11c(0Y)とOL11c(2Y)の比較を行った結果、発現亢進の見られたmiRNAのうち1種類については、治癒細胞の2年間培養によっても発現亢進が認められ、発現低下の見られたmiRNAのうち2種類については、治癒細胞の2年間培養によっても発現低下が認められた。そのため、これら3種類のmiRNAをこの時点で除