

## ヒト遺伝子編集酵素による HCV 感染制御機構の解析

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

**研究要旨：** C型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムにはさまざまな遺伝子変異が認められ、病態や治療効果などに関連していることが知られている。HCVで高頻度に認められる変異は、ウイルス複製時のエラーで生じるとともに、ヒト遺伝子編集酵素の作用で誘導されている可能性がある。しかしながら、HCV 感染は多様な遺伝子変異をもつウイルスクロンの集合体として成立しているため、C型慢性肝炎例における変異ウイルスクロンの全体像を把握することは困難であった。そこで、次世代シーケンサーを用いて、C型慢性肝炎症例の血中ウイルスゲノムの deep sequencing を行ったところ、きわめて多彩な遺伝子変異をもつクロンが多数共存する HCV 感染の全体像が明らかとなった。興味深いことに、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤、NS5A ポリメラーゼ阻害剤に対する耐性変異を有するクロンが、抗ウイルス未治療症例にすでに様々な割合で潜在していることが確認され、今後、本邦におけるこれらの薬剤とインターフェロンを併用した治療対象症例の選別には、薬剤耐性クロンの治療前評価が重要となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染の最大の特徴のひとつとして、ウイルスゲノム配列に非常に高頻度に塩基変化が生じていることがあげられる。事実、HCV感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クロンの集合体としてウイルス感染が成立しており、このような性質は quasispecies nature と総称されている。この、quasispecies を構成する多彩な変異ウイルスが、HCV感染時の病態形成や抗ウイルス治療への感受性・抵抗性と深く関連することが知られている。一般に RNA ウィルスの変異速度は  $10^{-3}$  substitution/site/year のオーダーであると推定されており、このきわめて高い遺伝子変異生成スピードは宿主 DNA の変異速度の約 100 万倍にも達するとも考えられている。

このようにきわめて高い遺伝子変異が RNA ウィルスに生じる要因としては、これまではウイルス側の因子が重要と想定されてきた。HCVゲノム複製の際には、非構造蛋白質の中に含まれている NS5B 遺伝子がコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが中心的な役割を担っているものと考えられている。しかしながら、RNA ウィルスである HCV のもつ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼには、DNA ポリメラーゼがもつような修復機能がないため、RNA ポリメラーゼによるウイルスゲノムの複製の際に生じる読み間違いが、修復されることなくそのまま子孫に受け継がれていくことになる。このため、複製時のエラーが修復されることなく個々のウイルスクロンに蓄積していくことで、多様な遺伝子変異をもつウイルスクロンの集合体を産み出す原動力

となっているものと考えられる。

他方、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が近年、同定されている。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリー、ならびに Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は塩基配列上のシチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。一方、ADAR ファミリー分子は塩基配列上のアデニン (A) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる RNA の塩基配列にイノシン (I) が生じることになる。これらの遺伝子編集酵素は、その生理的作用として様々な遺伝子を標的とし、遺伝情報をコードしている DNA もしくは RNA の配列を変えることにより、生体の恒常性を保つことに貢献している役割を果たしている。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、いくつかの分子は生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることが明らかになりつつある。例えば、APOBEC3G や APOBEC3F は、リンパ球に感染したヒト免疫不全ウイルス (HIV) の遺伝子配列に変異を導入することにより、宿主の免疫応答に際して抗ウイルス分子として機能していることが知られている。同様に、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は B 型肝炎ウイルス (HBV) のゲノム配列に高頻度に C→T への遺伝子変異を誘導する作用をもつことが報告されている。このように、APOBEC ファミリー分子は抗ウイルスタンパクとして機能しており、感染時にウイルス遺伝子に塩基変化を導入することで、ウイルスを不活化する役割を担っていると考えられている。また、RNA 配列への編集作用をもつ ADAR ファミリー

分子も、D 型肝炎ウイルスのゲノム配列上の特定の塩基部位に変異を誘導することが以前から知られていたが、最近、HCV に対しても増殖抑制作用を発揮する可能性が示唆されるようになってきた。

我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染とそれに伴う炎症反応、ならびにインターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが発現誘導されることがわかってきた。すなわち、HCV 感染時に惹起される炎症反応、ならびに HCV のもつ Core タンパク質による転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化作用を介して、APOBEC ファミリー群の中でも Activation induced cytidine deaminase (AID) や APOBEC2 が発現誘導されることをすでに明らかにしている。同様に *in vitro* における肝培養細胞の解析から、HCV 感染にともなって産生されるインターフェロンの刺激により、肝細胞に APOBEC3G と ADAR1 の転写が活性化され発現誘導されてくることもわかった。このように、HCV 感染により惹起される慢性肝疾患を伴った肝細胞ではさまざまな遺伝子編集酵素が発現誘導されているが、その生理的意義については不明のままである。

そこで、これらの遺伝子編集酵素による抗ウイルス活性ならびに遺伝子異常の導入活性の可能性に着目し、HCV ゲノムに生じる遺伝子変異の生成に宿主側の分子が寄与していることを検証することにより、新しい抗 HCV 制御機構を明らかにすることを本研究の目的とする。本年度は、HCV に生じているウイルス変異の包括的な解析 platform を構築するとともに、実際の C 型肝炎症例で検出される HCV ゲノムの全体像を掌握することを目標として、次世代シーケンサーを用いたウイルスゲノムの deep sequencing 解析を行った。

## B. 研究方法

遺伝子異常の解析には最新の大量並列シー

クエンス・テクノロジーを活用した次世代シーケンサー（Illumina 社 Genome Analyzer II）を platform とした。この deep sequencing の特性を最大限に活用することにより、1 回のランあたり 30 億塩基以上の遺伝子配列の決定と遺伝子発現プロファイル解析が可能となり、従来の方法では得ることができなかった飛躍的な遺伝子情報量を解析することが実現した。同時に、個々の検体の HCV ゲノムの識別には multiplex tagging 法を併用することで、1 回のランあたり 96 検体の全長 HCV 配列の平均 1,000-10,000 クローン相当分の塩基長の同定が期待できる。これらのゲノム解析基盤を用いて、以下の検討を行った。

(1) 抗ウイルス剤未治療である C 型慢性肝炎例 27 例の血清より RNA を抽出し、Genome Analyzer II を用いてウイルスゲノムの塩基配列を同定した。得られた各リードは各々ダイレクトシーケンシング法により決定した各個体の代表 HCV 塩基配列をリファレンス配列としてアライメントし、感染クロンの全塩基配列の決定を行った。引き続き日本で未使用の Teraplevir を含む抗ウイルス剤（NS3/4A プロテアーゼ阻害薬 6 剤、NS5A ポリメラーゼ阻害薬 3 剤）に対する既知の耐性アミノ酸変異株の存在頻度について検証した。

(2) C 型慢性肝炎に対するペグ・インターフェロン+リバビリン療法の施行前後での血中ウイルスの全ゲノム配列を deep sequencing で同定することにより、治療前後でのウイルス quasispecies の動態と治療反応性の相関の有無、ならびに治療感受性ウイルスクロンの存在の有無についての評価を行った。Quasispecies の評価は、Shannon entropy 値を用いた viral genomic complexity を算出することにより行った。

（倫理面への配慮）

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」（平成 17 年 6 月 29 日一部改正）及び「疫学研究に関する倫理指針」（平成 19 年 8 月 16 日全部改正）並びに「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）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、提供試料や個人情報を適正に管理保存した。

## C. 研究結果

(1) Deep sequencing 解析を用いることにより各症例で平均 1,705 クローン、平均 14,875,801 塩基の配列が決定され、C 型慢性肝炎患者では極めて多彩な遺伝子変異を持つクローンが多数共存することが明らかとなった。27 症例のウイルスゲノム解析からは、Teraplevir 耐性変異の T54S/A が 20 例（74.1%）、V36A/M は 12 例（44.4%）、A156T/V は 7 例（25.9%）の未治療症例の血清中で検出されることがわかった。各症例における耐性株の存在比はそれぞれ中央値 0.49%、0.47%、0.35%であった。また Teraplevir、Boceplevir を含む複数の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に対する交差耐性を示す R155K/T/Q 変異は 5 例（18.5%）で中央値 0.42%の存在比で認めた。同様に NS5B ポリメラーゼ阻害剤の耐性変異株も高頻度で存在し、全 27 症例においてこれらの抗ウイルス薬のいずれかに対する耐性変異を有するクローンが治療前に既に様々な割合で存在することが明らかとなった。

(2) C 型慢性肝炎に対してペグ・インターフェロン+リバビリン療法の導入 1 週間後、血中ウイルスが速やかに減少した immediate

virologic responder 8 例と、ほとんど治療反応性を示さなかった non-responder 8 例につき、治療前後での血中 HCV の全ゲノム配列を同定し、比較検討を行った。immediate virologic responder と non-responder では治療前の血中 HCV の quasispecies の程度に差異を認めなかった。しかしながら、immediate virologic responder 群ではインターフェロン投与後にすみやかにウイルスの genomic complexity が低下していたのに対して、non-responder 群ではインターフェロン投与前後で genomic complexity の有意な変化を認めなかった。そこで、HCV ゲノム上、もっとも多様性の高い envelope 領域の hypervariable region の塩基配列の詳細な解析を行ったところ、non-responder 群では各種変異を伴ったいずれのウイルスクローンもインターフェロン投与に対して感受性を示していないことが確認された。以上の結果から、インターフェロン治療に対して治療抵抗性を示す non-responder 群の治療不応性の要因として、宿主側のインターフェロンに対する反応性の欠如が大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

#### D. 考察

我々のこれまでの検討により、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応答する形で肝細胞に発現誘導されること、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わかってきた。次世代シーケンサーを用いた HCV ゲノムの deep sequencing 解析からは、従来 Sanger sequence 法では同定できなかった、C 型慢性肝炎症例への抗ウイルス治療と深く関連したウイルス変異クローンの全体像が明らかとなってきた。

これらのウイルスゲノム変異には、ウイルス自身の複製エラーにより生じたものと、宿主遺伝子編集酵素により誘導されたものが混在しているものと推定され、宿主により誘導されたウイルスゲノム変異が病態形成や治療に対してどのように寄与しているかを特定することが、HCV に対する新しい抗ウイルス戦略の構築につながるものと期待された。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを用いた大規模ウイルスゲノム解析により、C 型慢性肝炎症例における感染ウイルスの quasispecies の全体像が明らかとなった。HCV 感染とその結果生じる炎症反応ならびにインターフェロン産生応答によりさまざまな遺伝子編集酵素が肝細胞に発現誘導されることがわかり、遺伝子編集酵素が感染ウイルスを制御するための生体の防御反応としての役割を果たしている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

今回の解析結果から、IL-28 の SNP などの宿主側の遺伝的要因によりインターフェロン+リバビリン併用療法が無効であった症例に対して、平成 23 年度末に保険採用となった Teraplevir を加えたインターフェロン+リバビリン+Teraplevir 3 剤併用療法を施行した場合、薬剤耐性ウイルスが潜在した場合にはインターフェロン+リバビリンの作用では排除できず、3 剤治療でも無効となる可能性があることが示唆された。同時に、Teraplevir 投与により相対的に薬剤耐性ウイルスクローンの増殖が活性化されることにより、これらのウイルスの新たな変異の獲得が促進され、将来的に抗ウイルス剤に対する多剤抵抗性の増加への危険性についての考慮の必要性があることが推定された。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- (1) Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus in Association with Antiviral Therapy Determined by Ultra-deep Sequencing. PLoS ONE, 6: e24907 (2011).
- (2) Marusawa H, Takai A, Chiba T. Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Advances in Immunology*, 111: 109-141 (2011).
- (3) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*, 19: 32-38 (2012).
- (4) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer*, 130: 1294-1301 (2012).
- (5) Takahashi K, Marusawa H, Chiba T. Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology*, 142: 178-180 (2012).
- (6) Takai A, Marusawa H, Minaki Y, Watanabe T, Nakase H, Tsujimoto G, Chiba T. Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer. *Oncogene*, (2012) (in press).

### 2.学会発表

- (1) 西島規浩、上田佳秀、丸澤宏之。HBVゲノム多様性の次世代ゲノムアナライザー解析。第47回 日本肝臓学会総会。2011/6/2. ホテルグランパシフィック LE DAIBA. 東京。
- (2) 丸澤宏之。慢性炎症により誘導されるゲノム異常からの肝臓発生機構。第70回 日本癌学会学術総会。2011/10/4. 名古屋国際会議場。愛知。
- (3) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉。肝臓の発生母地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析。第70回 日本癌学会学術総会。2011/10/4. 名古屋国際会議場。愛知。
- (4) 奥山俊介、丸澤宏之、千葉勉。炎症刺激により発現誘導される遺伝子編集酵素ファミリーによる多段階肝発癌モデルマウスの解析。JDDW (第53回消化器病学会)。2011/10/20. 福岡国際会議場。福岡。
- (5) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉。肝幹細胞/前駆細胞への遺伝子異常の蓄積が肝臓の発生に果たす役割。JDDW (第53回消化器病学会)。2011/10/21. 福岡国際会議場。福岡。
- (6) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉。肝臓の発生・進展を規定するゲノム異常の次世代シーケンサー解析。JDDW (第53回消化器病学会)。2011/10/23. 福岡国際会議場。福岡。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許出願

なし

### 2.特許取得

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

HCV 構造タンパク質による宿主遺伝子発現の制御機構

研究分担者 大島 隆幸 徳島文理大学 香川薬学部

研究要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノムには、主にウイルス遺伝子の複製に重要な調節タンパク質群と、ウイルス粒子の構成成分である構造タンパク質群がコードされている。これらウイルス由来のゲノム産物は、宿主細胞因子との相互作用を介して感染細胞に様々な作用を与えることが明らかになりつつある。特に構造タンパク質の一つである core は、ウイルス粒子の形成に必須だけでなく、宿主の転写制御因子やがん抑制因子との相互作用を介して、細胞増殖やアポトーシスを制御していることも知られている。昨年我々は、HCV 構造タンパク質である p7 および core と相互作用する宿主因子について酵母ツーハイブリッド法を用いて探索した。その結果、core タンパク質と相互作用する宿主因子として、シャペロンタンパク質の一つである FKBP8 と Ewing 肉腫の原因因子である EWS を同定した。本研究では、特に core と EWS の相互作用に着目して解析を進めた結果、まず免疫沈降法により core と EWS が細胞内で相互作用すること、また core は N 末端領域を介して EWS の RGG モチーフを含む C 末端領域と相互作用することが明らかになった。EWS は肝発生の俊約因子である肝臓特異的核内受容体 HNF4 の共役因子として機能することが明らかにされているため、HNF4 の転写活性に与える core の影響を検討した。その結果 core は HNF4 の活性を抑制し、標的遺伝子である p21 の発現を抑制した。この抑制機構の一つとして、core の発現により HNF4 と相互作用する EWS 量が減少することを明らかにした。これらの結果は、core による細胞増殖制御や発癌機序に重要な知見を与えるとともに、宿主 RNA 結合タンパク質を介した HCV 粒子形成過程への関与を示唆するものであり、現在、詳細を解析中である。

A. 研究目的

HCV ウイルスの構造タンパク質群は、自身のゲノム RNA を包み込みウイルス粒子を形成するための構成因子として機能するだけでなく、宿主細胞の転写制御因子や細胞増殖に関与する因子との相互作用を介して、その機能を利用または攪乱することで宿主細胞にさまざまな影響を与えることが報告されている。そしてこれらの作用が、ウイルスのライフサイクルにとって必要なだけでなく、HCV に起因する種々の疾患に

も深く関わっていることが示唆されている。

近年、培養細胞レベルでの HCV の感染系が確立され、ウイルスの細胞吸着から脱殻、ゲノムの複製、そして粒子形成から細胞外放出まで、一連のウイルスのライフサイクルを解析できる環境が整ってきた。これまで非感染性サブゲノミックレプリコンシステムを用いた研究から、ウイルス RNA の複製メカニズムに関する知見は多く得られているが、ウイルス粒子形成から放出来

での過程や構造タンパク質群の宿主細胞への作用に関しては不明な点が多い。

本研究では、このウイルスの構造タンパク質の細胞内での機能を明らかにすることを目的とし、まず構造タンパク質群と相互作用する宿主因子を網羅的に探索し、宿主細胞機能への影響とともにウイルスのライフサイクルとの関連を明らかにすることとした。

## B. 研究方法

(1) 構造タンパク質である p7 および core と相互作用する宿主因子を同定するために、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングを行った。スクリーニングに用いた cDNA ライブラリーとして、p7 に対してはヒト肝臓およびヒト脳由来、また core に対してはヒト肝臓およびヒト脾臓を用いた。

(2) 得られた宿主因子との動物細胞内での相互作用に関する解析は、発現ベクターを用いて HEK293T 細胞に過剰発現し、それぞれの抗体を用いた共免疫沈降法を行った。

(3) HNF4 の転写活性を測定するために、HNF4 結合配列を 8 回タンデムに繋いだ 8xHNF4 および HNF4 結合配列を含む p21 プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。また内在性の p21 の発現量は、定量的 RT-PCR によって解析した。

(4) HNF4 結合配列上の HNF4 複合体の解析は、DNA 沈降法およびウエスタンブロットティング法により解析した。

### (倫理面への配慮)

組換え遺伝子の作製および組み替え体を用いた実験は、徳島文理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) p7 と相互作用する因子を同定するために以下の規模でスクリーニングした。

ヒト肝臓：5.6x10<sup>6</sup> クローン

ヒト脳：3.2x10<sup>6</sup> クローン

その結果、機能未知遺伝子に加え、BAG6/BAT3 (Bag family protein 6) が得られた。

core と相互作用する因子を同定するために以下の規模でスクリーニングした。全長の core に対して、

ヒト肝臓：4.8x10<sup>6</sup> クローン

ヒト脾臓：6.4x10<sup>6</sup> クローン

また core の N 末端 120 アミノ酸に対して、

ヒト肝臓：6.7x10<sup>6</sup> クローン

ヒト脾臓：8.6x10<sup>6</sup> クローン

その結果、全長を用いた場合に得られた因子は、そのほとんどが既に報告されているものであった。一方 N 末端 120 アミノ酸と相互作用する因子として、スプライシングの制御因子である SR タンパク質ファミリーや既に core との相互作用が報告されている cytokeratin8 に加え、タンパク質の安定した立体構造の構築に重要な役割を果たす FKBP8 や Ewing 肉腫の原因因子である EWS が得られた。

(2) 得られた宿主因子の中でも特に EWS との相互作用に着目し、まず Huh-7 細胞由来の RNA から RT-PCR 法によって EWS の全長をクローニングした。次に動物細胞内での相互作用を検討するために、core および EWS を発現ベクターに組み込み、HEK293T 細胞に共発現させた後、共免疫沈降法によって解析した。その結果、両者の相互作用が確認できた。また、それぞれの相互作用する領域を決定するために各種欠損変異体を作製し、同様に HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降法によって解析した。その結果、core の N

末端 1-40 アミノ酸と EWS の RGG モチーフを含む C 末端が相互作用することが明らかとなった。

(3) HNF4 の転写活性に対する core の影響を検討するために、HNF4 結合配列を 8 回タンデムに繋いだ DNA 断片を pGL3-luciferase ベクターに組み込み、ルシフェラーゼの活性を指標にその活性を解析した。その結果、core の発現により HNF4 の転写活性は抑制されることが明らかとなった。また HNF4 結合配列を含む p21 プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにおいても同様に抑制効果が認められた。さらに HNF4 と EWS の共発現によって認められた内在性の p21 の発現量の上昇は、core の過剰発現によって顕著に抑制された。

(4) DNA 沈降法により HNF4 結合配列上の HNF4 複合体を解析した結果、core の発現によって DNA 上にリクルートされる EWS の量が減少した。またこれは、core により HNF4 と相互作用する EWS 量が減少するためであることが明らかになった。

#### D. 考察

ウイルスの粒子形成に必要不可欠である構造タンパク質群は、宿主因子との相互作用を介して宿主機能へ様々な影響を与えることも示唆されている。本研究では、HCV の構造タンパク質である core および p7 と相互作用する宿主因子を探索し、得られた因子の中から、特に core と相互作用する因子 EWS に着目して研究を進めた。EWS は染色体転座によって発症する難治性の Ewing 肉腫の原因因子として同定された。その構造として RGG モチーフを含む RNA 結合ドメイン有し、この RGG の R(アルギニン残基)がメチル化酵素 PRMT によってメチル化修飾されることにより、その

細胞内局在や RNA 結合能が変化する。この RGG モチーフを含む領域に core は相互作用するため、今後はメチル化修飾を介した相互作用力の変化を解析する予定である。また現在までに HCV と EWS に関する報告として HCV の 5'-IRES 複合体に EWS が含まれるというものがあり、ウイルスの複製や粒子形成における EWS の関与に興味を持たれる。

先にも述べたように EWS は肝発生の俊約因子である核内受容体型転写因子 HNF4 の共役因子として機能し、core はその機能を抑制することが示唆された。EWS は HNF4 を中心とした転写開始複合体のみでなく RNA 伸長複合体にも含まれ、それぞれにおいて遺伝子発現を促進することが報告されている。これらの機能のどこを core は抑制しているのか、今後明らかにして行く必要がある。また HNF4 は糖や脂質代謝におけるマスターレギュレーター様の役割を果たし、また近年、肝がん発症との関連性も示唆されている。core による EWS の機能抑制を介した HNF4 の活性抑制メカニズムの詳細を解析することによって、HCV 持続感染時における糖代謝異常や肝細胞増殖異常などが明らかになることが期待される。

#### E. 結論

HCV 構造タンパク質の一つである core と相互作用する宿主因子として EWS を同定した。core は核内受容体 HNF4 に対する EWS の共役因子能を抑制することで、HNF4 の転写活性を負に制御した。また細胞に core を過剰発現させると、HNF4 により発現誘導される p21 の mRNA 量は減少した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mukai R, Ohshima T. Dual effects of HTLV-1 bZIP factor in suppression of interferon regulatory factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409:328-332 (2011).

### 2. 学会発表

1. Mukai R, Ohshima T. HTLV-1 HBZ activates mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34, 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses. Belgium, June, (2011).

2. Mukai R, Ohshima T. Ubiquitination mediated degradation and DNA-binding impairment of IRF-1 were induced by HTLV-1 HBZ. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, September, (2011).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

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

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

研究分担者 押海 裕之 北海道大学大学院医学研究科 講師

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染時の自然免疫応答に必須の宿主因子や、ウイルスによるその障害機構の多くは未知である。我々が発見した Riplet 分子のノックアウトマウスの解析から、Riplet 分子が HCV の RNA による I 型インターフェロン産生に必須であること、HCV が Riplet の機能を障害することを解明した。また、新たな宿主因子として DDX60 を同定した。さらに、HCV の治療効果と関連が指摘された III 型インターフェロンの生体内での産生機構の解明を行った。

#### A. 研究目的

HCV が宿主の自然免疫システムを逃れ持続感染するメカニズムは未知の部分が多い。I 型インターフェロンは強い抗ウイルス作用を持ち、ウイルス感染時には自然免疫システムにより生体内で産生される。逆に HCV はこのインターフェロン産生を抑制する能力を持つがその機構は未知の部分が多く含む。そこで、我々はウイルス感染時のインターフェロン産生に関わる新たなメカニズムの解明と、HCV によるその抑制の新たなメカニズムの解明をまず試みた。

#### B. 研究方法

ヒト肝臓由来の培養細胞を用いた分子生物学的解析方法と遺伝子改変マウスを用いた細胞生物学的解析の両方から実験を行った。HCV としては遺伝子型 1b の HCV 0 株の全長のレプリコンと、感染粒子である 2a 型の JFH1 株を持ちい研究を行った。

#### （倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。また遺伝子組換え実験も北海道大学の遺伝子組換え実験指針に基づいて行った。

#### C. 研究結果

HCV の RNA を細胞質内で認識するセンサー分子は RIG-I である。我々が発見した Riplet 分子は、この RIG-I の C 末端をユビキチン化することで I 型と III 型インターフェロンが産生されることを解明した。さらに HCV の非構造蛋白質であるプロテアーゼが、この Riplet 分子を分解することで、RIG-I のユビキチン化を障害することを発見し、これにより I 型と III 型インターフェロン産生が抑制されという新たな分子機構を解明した。

HCV 抑制の新たな因子として DDX60 ヘルパー分子を同定した。この DDX60 は主に細胞質に局在し、ウイルス感染時の I 型インターフェロンを含む炎症性サイトカインの産生に関与することを解明した。詳細なメカニズムの解析から DDX60 は、RIG-I によるウイルス RNA の結合を促進する役割を果たすことを解明した。

さらに HCV 感染時の生体内での III 型インターフェロン産生機構の解明を試

み、肝臓に於いては、IPS-1 経路依存的な III 型インターフェロン産生が重要であることを発見した。

#### D. 考察

HCV は、宿主の I 型インターフェロン産生を抑制する。これは、RIG-I のアダプター分子である IPS-1 が、HCV のもつ NS3-4A プロテアーゼにより切断されることが原因であると考えられてきた。しかし、本研究から、我々が発見した Riplet 分子も HCV の蛋白質により分解されることを発見した。これは HCV による宿主のインターフェロン抑制のメカニズムが複数存在することを意味している。今後、HCV の遺伝子型の違いにより、これらの抑制機構の違いを解明することで病態との関連が解明されると期待される。

#### E. 結論

HCV が宿主の免疫を抑制し持続感染できる新たなメカニズムとして、HCV が Riplet 分子を分解し、RIG-I のユビキチン化を阻害することで I 型インターフェロンの産生を抑制することを解明した。また、HCV 抑制の新たな宿主因子として DDX60 分子が自然免疫で働くことを解明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem.*, 151:5-11 (2012)

Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, Seya T. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol.*, 187: 5320-7. (2011)

Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol.* 31:3802-19. (2011)

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:e21284. (2011)

Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev Med Virol.* doi: 10.1002/rmv.680. (2011)

##### 2. 学会発表

H. Oshiumi, M. Miyashita, M. Matsumoto, and T. Seya Regulation of the host viral RNA sensor RIG-I by the

ubiquitin ligase Riplet 第40回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム 2011年12月 (千葉)

H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya  
The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I dependent type I interferon production in response to RNA virus infection 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小原恭子、 棟方翼、 小原道法	HCVの病原性発現に関与するウイルス因子とその機能 II C型肝炎		69 巻増刊 4 別刷「新時代のウイルス性肝炎学」	日本臨床	大阪	2011	p97-102
小原道法、 小原恭子	C型肝炎ウイルスによる免疫攪乱と炎症発がん	千葉勉	BIO Clinica	北隆館	東京	2011	p42-48
宇治野真之、 杉山和夫、 下遠野邦忠	腫瘍ウイルス (肝炎ウイルス)	渋谷正史、 湯浅保仁	がん生物学 イラストレイテッド	羊土社	東京	2011	32-42

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T.	In vitro models for the analysis of HCV life cycle. Microbiol Immunol.	Microbiol Immunol	56	1-9	2011
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
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
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	e21284	2011
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	e19799	2011
Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi	Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B.	PLoS One.	6	e18285	2011

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	e18285	2011
Sugiyama R, Hayafune M, Habu Y, Yamamoto N, Takaku H.	HIV-1 RT-dependent DNase expression inhibits HIV-1 replication without the emergence of escape viruses.	Nucleic Acids Res.	9	589-598	2011
Shoji I, Deng L, <u>Hotta H</u>	Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders.	Front. Microbiol.	2:A278	1-5	2012
Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, <u>Hotta H</u>	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
Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, <u>Hotta H</u>	A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved <i>N</i> -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
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, <u>Hotta H</u>	Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin in therapy.	PLoS ONE	7(2):	e30513	2012
El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H</u>	Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy.	Intervirology	55(1):	1-11	2012
Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, <u>Hotta H</u>	Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway.	J. Virol.	85(17):	8556-8568	2011
Nakashima K, Takeuchi K,	Inhibition of hepatitis C	Microbiol.	55(11):	774-782	2011

Chihara K, <u>Hotta H</u> , Sada K	virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways.	Immunol.			
Mori K, (加藤)	Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system.	Virus Research	151	61-70	2011
Ariumi Y, (加藤)	Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets.	Journal of Virology	85	6882- 6892	2011
Ueda Y, (加藤)	Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents.	Biochemical and Biophysical Research Communication	409	663-668	2011
Takeshita S, (加藤)	Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells.	Journal of Gastroenterology		DOI 10.1007/s00535-011-0481-z	2011
Mori K, (加藤)	Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Virus Genes		DOI 10.1007/s11262-012-0712-2	2012
Iikura M, (加藤)	ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy		DOI 10.1128//AAC.05762-11	2012
Saito M, Kohara, M, Tsukiyama-Kohara K*	Hepatitis C virus promotes expression of the 3 $\beta$ -hydroxysterol $\Delta$ 24-reductase through Sp1.	J Med Virol.			2012 accepted
Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Nagla. E. S., Harada S, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*.	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3.	Virus Res.	163	405-409	2012
Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Arai M, Sudoh M, Kai C,	Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection thorough betaine/GABA	J. Infect. Dis.	204	1172-1180	2011

Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*	transporter-1.				
Takano T, Tsukiyama-Kohara K*, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudoh M, and Kohara M.	Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes.	J. Hepatology	55(3)	512-521	2011
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.	83	801-809	2011
Tsukiyama-Kohara, K*, Sekiguchi, S., Kasama, Y., Nagla, E.S., Machida, K., & Kohara, M.	Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model.	ISRN Hematology	2011	167501	2011
Kasama Y, Satoh M, Saito M, Okada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K*	Potential of a recombinant measles virus as expression vector of hepatitis C virus envelope proteins.	World J. Vaccine	1	98-103	2011
Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T.	Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus in Association with Antiviral Therapy Determined by Ultra-deep Sequencing.	PLoS ONE	6	E24907	2011
Marusawa H, Takai A, Chiba T.	Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development.	Advances in Immunology	111	109-141	2011
Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T.	Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation.	J Viral Hepat	19	32-38	2012
Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T.	Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis.	Int J Cancer	130	1294-1301	2012
Takahashi K, Marusawa H, Chiba T.	Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon	Gastroenterolog y	142	178-180	2012

	antiviral response.				
Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami K, Shimotohno K.	Lipoprotein component associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity.	Current Opinion in Virology	1	19-26	2011
Dua H, Yoshimura K, Kobayashi N, Sugiyama K, Sawada JI, Saito Y, Morisseau C, Hammock BD, Akatsuka T	Development of monoclonal antibodies to human microsomal epoxide hydrolase and analysis of "preneoplastic antigen"-like molecules.	Toxicol. Appl. Pharmacol	260	17-26	2012
Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T.	A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells.	Gastroenterology	142	152-164 e110	2012
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
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F.	Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b	J Med Virol	84:	61-70	(2012)
Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F.	Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically-resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene.	J Med Virol	83:	1559-1564	2011
Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F,	Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin	PLoS One	6	e19799	2011

Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y.	therapy in chronic hepatitis C				
Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F.	Impact of genetic polymorphisms near the IL28B gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C.	J Med Virol	83	1203-1211	2011
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.	6	e16081	2011
Mukai R, Ohshima T.	Dual effects of HTLV-1 bZIP factor in suppression of interferon regulatory factor 1.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	409	328-332	2011
Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T.	Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I	J Biochem.	151	5-11	2012
Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, Seya T.	The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection	J Immunol.	187	5320-5327	2011
Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T.	DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling	Mol Cell Biol.	31	3802-3819	2011
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	e21284	2011
Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T	Antiviral responses induced by the TLR3 pathway	Rev. Med. Virol.		doi: 10.1002/rmv.680.	2011

#### IV 研究成果の刊行物・別刷り