

製を評価した。JFH1 ウイルス感染 Huh7 OK1 細胞の細胞内外のウイルス RNA 量を経時的に real-time PCR によって測定した。また、ウイルス蛋白質および宿主蛋白質の相互作用を免疫沈降法により解析した。さらに大腸菌により組み換え蛋白質を作製し、直接の結合を解析した。蛍光免疫染色法によってウイルスおよび内在蛋白質を染色し、レーザー顕微鏡によって細胞内局在を解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

内在蛋白質 FKBP8 の発現を RNA 干渉によって低下させたところ、遺伝子型 1b の 0 株由来のレプリコン細胞でウイルス複製が抑制された。しかしながら、同じ遺伝子型 1b である N 株由来のレプリコン細胞株内のウイルス複製低下は認められなかった。NS5A の 121 番目の残基は Val か Ile でなければ、FKBP8 は結合で出来ない事からウイルス複製に必須残基と考えられている。

NS5A の 121 番目 Val は N 株由来レプリコン細胞の NS5A でも保存されており、FKBP8 との結合能力に変化はなかった。したがって、N 株由来のレプリコン細胞株で FKBP8 の機能を代替する細胞内因子の存在が考えられた。そこで、FKBP8 と同様の分子ドメインをもつイムノフィリンと NS5A との結合を免疫沈降法によって解析した。

FKBP4、5、6、cyclophilin40 で検討した結果、FKBP6 のみが NS5A と結合した。さらに、大腸菌による組換え蛋白質どうしの結合も可能であった事から FKBP6 と NS5A の相互作用は直接的と考えられる。FKBP6 の発現が低下すると、0 株でレプリコン RNA の複製は低下し、N 株由来のレプリコン細胞株のレプリコン RNA の複製低下は FKBP8 と FKBP6 の両方をノックダウンしなければ低下しなかった。0 株と N 株由来レプリコン細胞株の FKBP8 と FKBP6 の発現量を Real time PCR で測定すると、FKBP8 量は同等であったが、FKBP6 の発現量は N 株由来のレプリコン細胞株のほうが約 4 倍高かった。FKBP8 も FKBP6 は FK506 への結合能を有しておらず、それらを標

的にした化合物の情報は少ない。DM-CHX が、FKBP8 のイソメラーゼ活性を標的にすることができる化合物として知られる。化合物 DM-CHX をレプリコン細胞へ投与したところ、0 株および N 株由来のレプリコン細胞で、ウイルス複製が有意に抑制された。DM-CHX の誘導体を四つ作製し、その抗 HCV 活性をレプリコン細胞で評価したところ、Compound 2 の EC50 が 9.5 μ M で SI 値が 7.4 であったことから、Compound 2 をリードした抗 HCV 化合物開発が可能と考えられた。以上の結果から、FKBP8 はウイルス複製をサポートする宿主因子の一つで、FKBP8 とともにそれらを標的因子とした抗 HCV 化合物開発に繋がることが示唆された。

D. 考察

ウイルス複製に必須の新規宿主タンパク質として FKBP6 を同定した。この FKBP6 は細胞株で発現量が異なり、FKBP6 の発現量に依存してウイルス複製保持が可能で、FKBP36 は FKBP8 の機能を補い、ウイルス複製を維持できるものと考えられた。さらに FKBP8 を標的にした化合物が、抗 HCV 活性を示したことから、今後、FKBP8 や FKBP6 が抗ウイルス剤開発の標的になりうる事が考えられた。

E. 結論

ウイルス増殖に重要な宿主蛋白質性因子 FKBP6 を同定した。また、FKBP8 や FKBP6 を標的とした化合物候補のリード化合物情報も得る事ができ、今後の新規抗ウイルス薬開発に繋がる研究ができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis

C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012

2. Tripathi LP, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen YA, Matsuura Y, Mizuguchi K:

Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 11: 3664-3679, 2012

3. Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012

4. Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012

2. 学会発表

1. Kasai H., Kawakami, K., Yamashita, A., Ikeda, M., Kato, N., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., Moriishi, K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. 19th

International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. 2012. October 5-9.

2. 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司 新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

3. 藤本雄介、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、森石恆司 海綿動物 *Amphimedon* sp. 抽出画分による HCVNS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

4. 山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

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（平成 24 年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：坂本 直哉 北海道大学医学研究科消化器内科学分野

分担研究課題：宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング

研究要旨 我々は、独自に開発した HCV 増殖モデル、及び HCV-JFH1 感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1) 4,400 種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV 増殖を抑制する 4 種の化合物が同定された。(2) YFP, RFP タグ付加 HCV を用いたウイルスエントリー阻害化合物のスクリーニング系を構築した。本研究で同定された化合物の作用機構の解析、小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより新たな抗ウイルス薬剤の開発につながると思われる。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(2) 蛍光蛋白タグ付加 HCV-JFH 1 培養系を用いた解析: JFH-1 株の NS5A C 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能

を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。この蛍光蛋白発現 HCV 感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plate に Huh7.5.1 細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その 2 時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5 日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

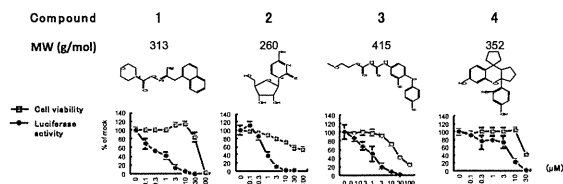
(倫理面の配慮)

本研究における遺伝子組換え実験は、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認(承認番号 2007-123, 2008-160)、および文部科学大臣の確認 (19 学文科振第 642 号) を取得している。ウイルスの使用に当たっては、東京医科歯科大学病原微生物等安全管理規則を遵守し、実験計画の届出・承認のもと遂行している。

C. 研究結果

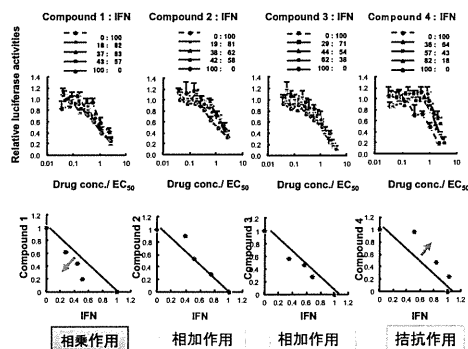
(1) 4046 化合物のうち、細胞毒性を示さずにレプリコン増殖抑制効果を示す化合物を 23 個抽出した。このうち、HCV-JFH1 細胞培養系において HCV 増殖抑

制効果を示す化合物を4種同定した。これらはHCV-IRES 翻訳活性には影響せず、HCV 増殖を特異的に阻害している可能性が示唆された。

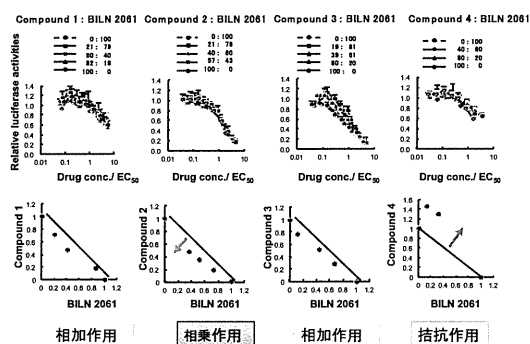


同定された4種の化合物それぞれとIFNおよびプロテアーゼ阻害薬(BILN2061)との併用効果をレプリコン細胞を用いて解析した。IFNとの併用では化合物A (N'-(morpholine-4-carboxyloxy)-2-(naphthalen-1-yl) acetimidamide, MCNA)が相乗効果、B、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。IFNとの併用では化合物Aが相乗効果、B、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。BILN2061との併用では化合物Bが相乗効果、A、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。

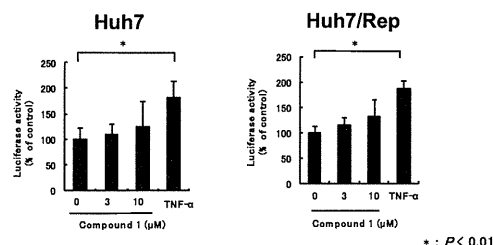
IFNとの相乗効果



プロテアーゼ阻害薬(BILN 2061)との相乗効果



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

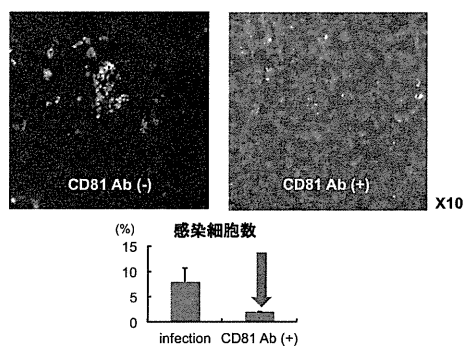


抗ウイルス活性

(N'-(morpholine-4-carboxyloxy)-2-(naphthalen-1-yl) acetimidamide, MCNA)

(2)High content analysisでは、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗CD81抗体を用いたエントリー阻害試験では、70%以上の感染阻害を示した。

CD81抗体によるウイルス感染抑制



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

E. 結論

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

応用が期待される。本研究で同定された化合物の作用機構の解析・小動物モデルを用いた効果・安全性の検証を進めることにより HCV の新規治療法開発に結びつくものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Jing-Tang Huang, Ching-Ping Tseng, Mei-Huei Liao, Shao-Chun Lu, Wei-Zhou Yeh, Naoya Sakamoto, Chuan-Mu Chen, and Ju-Chien Cheng: Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of non-structural protein NS5B and fatty acid synthase. *Journal of Virology* 2013; *in press*.
2. Sakamoto N: NX-PVKA assay, a conventional but refined prognostic biomarker for Hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; *in press*.
3. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N: A model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; *in press*.
4. Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Akuta N, Sakamoto N, Itoh Y, Izumi N, Nomura H, Hayashi N, Takehara T: A multi-center survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepato Res* 2013; *in press*.
5. Haba S, Yamao K, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Yatabe Y, Hosoda W, Kawakami H, Sakamoto N: Diagnostic ability and factors affecting accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic solid lesions: Japanese large single center experience. *J Gastroenterol* 2013; *Epub ahead of print*.
6. Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N, Tanaka Y, Nakamura M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.
7. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.
8. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S: Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepato Res* 2012;42(10):958-965.
9. Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Thuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012; 10(4):744-761.
10. Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, Sakamoto N, Asaka M: Anemia and

- thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.
11. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Haliciona* (Reniera) sp. *Plos One* 2012;7(11):e48685.
 12. Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M: Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2012;7(9):e44113.
 13. Li YJ, Wu HH, Weng CH, Chen YC, Hung CC, Yang CW, Wang YL, Sakamoto N, Tian YC: Cyclophilin A and nuclear factor of activated T cells are essential in cyclosporin A-mediated suppression of polyomavirus BK replication. *Am J Transplantation* 2012; 12:2348-2362.
 14. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka I, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; *Epub ahead of print*.
 15. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H: Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012; 165(2):214-218.
 16. Cheng J-C, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15):2621-2633.
 17. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N: Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56(3):602-608.
 18. Nichols DB, Fournet G, Gurukumar KR, Basu A, Lee JC, Sakamoto N, Kozielski F, Musmuca I, Joseph B, Ragno R, Kaushik-Basu N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; 49:191-199.
 19. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N (equal contribution), Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2012; 56(3):1315-1323.
 20. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N: Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2012; 17:35-43.
 21. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S,

Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response.

Hepatology 2012; 55(1):20-29.

[総説]

1. 新田沙由梨, 坂本直哉: NCV-NS4B 蛋白と IFN 発現シグナル分子との分子間相互作用の解析. 消化器と免疫 2011; 48: 174-177.
2. 坂本直哉: C 型肝炎治療の EBM: テラプレビル. 肝胆膵 2012; 64(3): 319-325.
3. 中川美奈, 坂本直哉: C 型肝炎治療における治療効果予測と副査用対策. 消化器の臨床 2012; 15 (3): 278-284.
4. 坂本直哉: インターロイキン 28-29 (IL-28・IL-29) -インターフェロンλ. 臨床免疫・アレルギー科特集: サイトカインのすべて 2012; 57 (Suppl. 21):184-187.
5. 中川美奈, 坂本直哉: HCV 治療抵抗性関連遺伝子の同定と治療展開. G I. Research 2012; 20 (3): 17-21.

2. 学会発表

1. Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD, Cheng JC: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. J Hepatol 2011; in submission.. 19th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-5-2012, Venice, Italy.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

出願番号: 特願 2011-194082

発明の名称: C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者: 坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人: 東京医科歯科大学

提出日: 平成 23 年 9 月 6 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者： 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター）

分担研究課題：強力な HCV 阻害活性を示す微生物生産物由来の低分子化合物の同定と
その作用機構の解析

研究要旨 微生物由来の低分子化合物ライブラリー (n≈800) から、EC50 が sub nM オーダーにある強力な抗 HCV および HIV-1 活性を持つ低分子化合物 (compound Y およびその類縁化合物) を同定した。Compound Y は HCV レプリコン・アッセイでは抗 HCV 活性を示さないが、VSV をベースとする HCV シュード・ビリオン (HCVpv) の感染を強く阻害する。Compound Y のもつ抗 HIV-1 作用機構とのアナロジーから、HCV エントリー受容体の細胞表面での発現を検討した結果、HCV エントリー受容体の一つである CD81 の細胞表面での発現を 30-75% 程度阻害することが明らかとなった。Compound Y の抗 HCV 活性は、単一のメカニズムによるものでない可能性があるが、その一つが HCV エントリー受容体の細胞膜表面での downregulation という新しい作用機構によるものであることが推定された。

A. 研究目的とその背景

本研究は、HCVcc アッセイを用いた低分子化合物ライブラリーのスクリーニングにより新規の創薬シーズを探索し、その作用機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV/HIV-1 阻害剤スクリーニング

微生物由来の生物活性物質ライブラリー (in-house collection) (n~800) を試験化合物としてスクリーニングを進めた。Huh7.5.1 細胞 (1×10⁴ 細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物を (最終濃度: 5 μM、溶媒: 0.5 % DMSO) を添加し、10-15 分後に HCV (JFH-1) を感染させた。感染から 72 時間後の培養上清を回収し、ELISA 法 (HCV 抗原 ELISA テスト・オーソ・クリニカル) によって HCV コアタンパク質量を定量した。陽性コントロールには IFN α (5 IU/mL あるいは 50 IU/mL) を用いた。

一方 HIV-1 阻害剤スクリーニングには、C8166R5 細胞 (CD4/HIV-1 coreceptor CXCR4, CCR5 発現 T 細胞株) と HIV-1 NL432 株を用いた。Assay の手順は HCV 阻害剤スクリーニングに準じて行い、抗 HIV-1 作用は、上清中の逆転写酵素 (virion-associated reverse transcriptase) 活性を

測定することで評価した。陽性対照は、既知の逆転写阻害剤 AZT を用いた。

(2) 細胞毒性試験

Huh7.5.1 細胞あるいは C8166R5 細胞 (5×10³ 細胞/well) を培養し、およそ 24 時間後、試験化合物 (最終濃度: 5 μM) を添加し、72 時間培養後、WST 法 (Cell counting Kit-8・同仁化学) により評価した。

(3) HCV pseudoparticle (HCVpp) assay および HCV pseudovirion (HCVpv) assay

HCVpp および HCVpv はそれぞれ脇田、松浦博士より供与を受けた。試験化合物存在下および非存在下での HCVpp あるいは HCVpv の Huh7.5.1 細胞への感染性をルシフェラーゼ活性で測定した。陽性対照として、抗 CD81 単クローン抗体 (1 ug/ml) を用いた。

(倫理面への考慮) 該当せず。

C. 研究結果

(1) 微生物由来の低分子化合物ライブラリーを用いた HCV および HIV-1 阻害剤スクリーニング

全体で約 800 種の低分子化合物ライブラリーの中から、阻害剤 screening およびその validation の結果、図 1 に示すように HCV および HIV-1 阻害

活性物質として、それぞれ9個および11個のヒット化合物を得た。同定された HCV 阻害活性物質は、構造的に近縁なそれぞれ3個、6個の2グループに分類された。それぞれの群の代表的で比較的容易に入手可能な化合物を compound X, compound Y と名付けた。Compound Y に代表される第2のグループは EC50 が sub nM の極めて強力な抗 HCV 効果を示す化合物を含む。非常に興味深いことに、compound Y に代表される化合物群は HIV-1 に対しても sub nM オーダーの強力な阻害活性を示し、個々の類縁化合物の抗ウイルス活性は HCV と HIV-1 とで並行関係が見られた(図1)。なお抗 HIV-1 阻害活性のみを示すその他の5種の化合物は相互に構造的関連性を持たないものであった。

(2) compound Y の作用機構の解析

a) HCV replicon assay:

Compound Y は HCV replicon assay では、ほとんど活性を示さないか (genotype 1b: Con1) あるいは弱い活性 (genotype 2a: JFH-1) を示すのみであった(図2)。そのため、その主要な作用点は HCV のライフサイクルのおそらく初期過程あるいは後期過程 Late stage にあると推定された。

b) エントリー・アッセイ (HCVpv assay)

Compound Y が HCV のエントリー過程に作用するかどうかをテストするために HCVpv assay を行った(谷/松浦博士の協力による)。図3に示すように、HCVpv アッセイでは、HCVcc assay に並行する強い阻害効果が観察されたが、その阻害活性は、control の VSV-G および JEV pseudovirion に対しても見られることから、この強い阻害効果は HCV-E2 に依存しない何らかの非特異的なメカニズムによることが推定された。

一方、HCVpp assay (赤沢/脇田博士の協力による) では明確な阻害効果を観察できなかった (data not shown)。

c) HCV エントリー受容体の細胞表面発現に対する効果

Compound Y の強力な HIV-1 阻害効果に関して知られている事実とのアナロジーから、その HCV エントリー受容体発現に対する効果を評価した。その結果、図4に見るように CD81 の細胞表面で

の発現を 30-80% 阻害することが明らかとなった。なお SR-B1 に対しては効果を示さない。Claudin 1, Occludin に対する効果は未評価である。

D. 考察

Compound Y は、これまでわれわれが HCVcc assay (HCV full replication assay) を用いてスクリーニングしてきた低分子化合物の中で、最も強力な活性をもつものである (EC50~0.5 nM, SI>45,000) (図1)。

しかし、その作用機作に関しては、現時点では、得られた実験結果を完全に整合的に理解することがむづかしい。HCV replicon assay では抗 HCV 活性を示さない (か、もしくは、あるとしても HCVcc assay でみる活性の 1/100-1/1000 程度であることから(図2)、その主要な作用点は、エントリー段階か後期段階 Late stage (あるいはその両者) にあるものと推定された。

実際、VSV をベースとする HCVpv assay では、HCVcc assay で観察されるものに匹敵する強い阻害活性が見られるが、その阻害活性は VSV-G や JEV pseudovirion においても観察されることから(図3)、HCVpv に対する感染阻害効果は、(HCV E2 特異的でない) 何らかの非特異的なメカニズムによると推定された。

一方、HCVpp assay では、明確な活性が見出されなかった。HCVpv assay と HCVpp assay の結果の差異がどこにあるかは不明である。前者が VSV を後者が HIV-1 vector をベースにしている違いが原因と考えられるが、詳細は明らかでない。

一方、compound Y の抗 HIV-1 効果とのアナロジーからテストした結果、compound Y は HCV エントリー受容体の一つである CD81 の細胞表面での発現を 30-80% 阻害することが明らかとなった(図4)。このレベルの downregulation 効果が HCVcc assay で観察される強力な抗 HCV 作用を説明するかどうかは、はっきりしないが、受容体発現量の比較的低レベルの阻害によっても、HCV エントリーの効率が低下し、さらに HCV 複製・感染のサイクルが繰り返されると、その効果が増幅されたためかもしれない。Compound Y 存在下で放出された HCV 粒子の感染性に関しては差異がないとの予備的な観察結果を得ているが (data not shown)、

compound Y が HCV ライフサイクルの複数のステップに作用点をもっている可能性は否定できない。

E. 結論

微生物由来の低分子化合物ライブラリーから HCVcc assay において EC50 が sub nM レベルにある強力な抗 HCV 活性を示す Compound Y およびその類縁化合物を同定した。Compound Y の示す抗 HCV 作用機構の詳細は完全には解明できていないが、少なくとも HIV エントリー受容体の一つである CD81 の細胞表面上での発現の downregulation 効果という新しいタイプの分子機構が関与している可能性を明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

[論文発表]

1. Takebe, Y., Saucedo, C. J., Lund, G., Uenishi, R., Hase, S., Tsuchiura, T., Knetman, N., Ramessar, K., Tyrrell, D. L. J., Shirakura, M., Wakita, T., McMahon J. B., and O'Keefe, B. R., Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent *in vitro* and *in vivo* activity against hepatitis C virus. *PLoSOne*. in submission.
2. Ng, K. T., Lee Y. M., Al-Darraj, H., Xia, X., Takebe, Y., Chan, K. G., Lu L., Mahadeva, S., Kamarulzaman, A., and Tee, K. K. Genome sequence of the hepatitis C virus subtype 6n isolated from Malaysia. *J. Virol.* 2013. accepted.
3. Raghwani, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. G. (2012). The origin and evolution of the unique HCV circulating recombinant form 2k/1b. *J Virol.* 2012 Feb;86(4):2212-20. Epub 2011 Nov 23.

[学会発表]

国際学会

1. Takebe, Y., Saucedo, C. J., Lund, G., Uenishi, R., Hase, S., Knetman, N., Wakita, T., McMahon J. B.,

and O'Keefe, B. R. Potent *in vitro* and *in vivo* anti-HCV activity of the red algal lectin, griffithsin: protection against HCV challenge in human hepatocyte-engrafted Alb-uPA/SCID mouse model. 25th International Conference of Antiviral Research (ICAR 2012) (April 17, 2012, Sapporo).

2. Molenkamp, R., Raghwani, J., Thomas, X., Koekkoek, S., Schinkel, J., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. HCV 2012 (October 5, 2012, Venice).

国内学会

1. 武部 豊, 田中靖人, 溝上雅史, Jayna Raghwani, Richard Molenkamp, Oliver G. Pybus: HCV 組換え型流行株 (CRF01_2k/1b) の起源とその進化. 第 60 回日本ウイルス学会 (Nov. 13-15, 2012, 大阪).

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

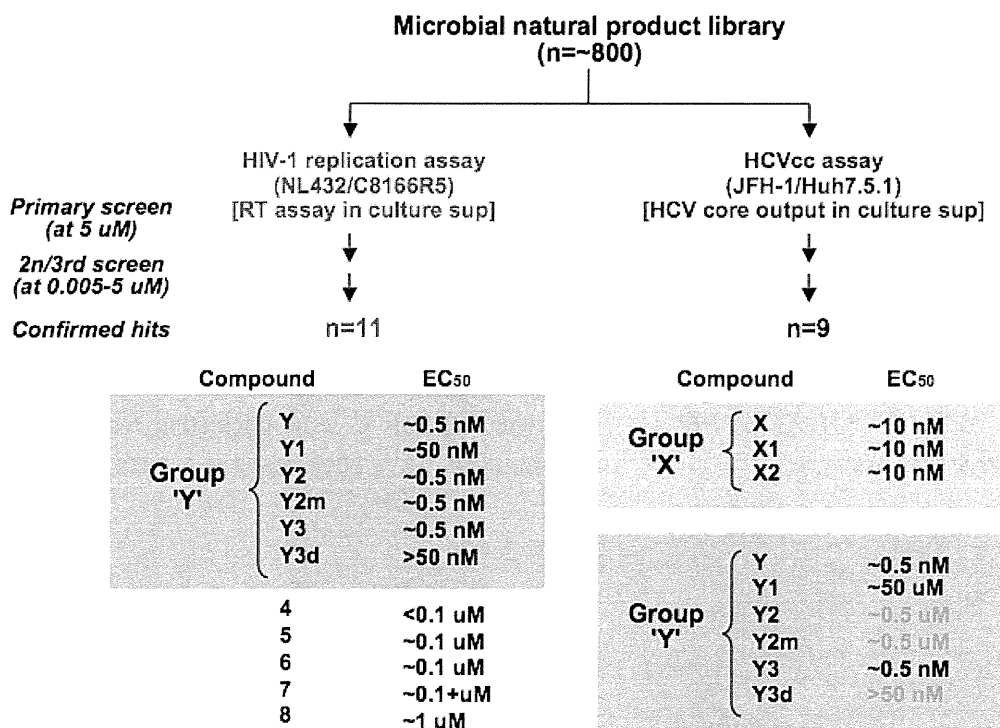


図1. HCVおよびHIV-1阻害剤スクリーニングの概要とヒット化合物リスト

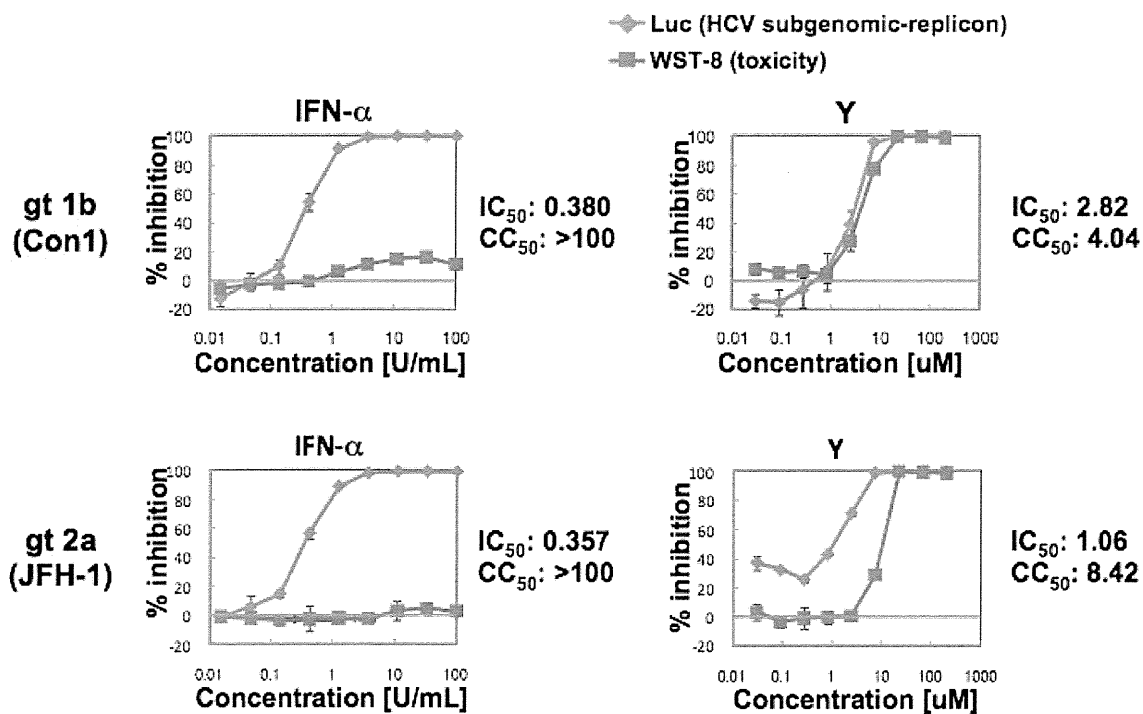


図2. HCV レプリコン・アッセイ

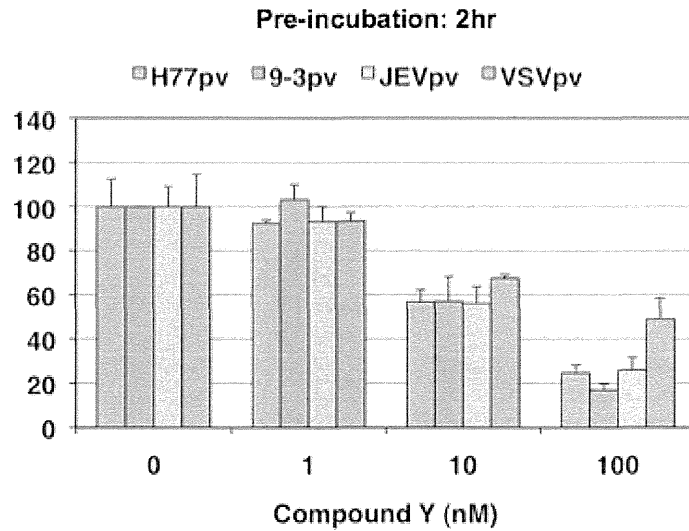
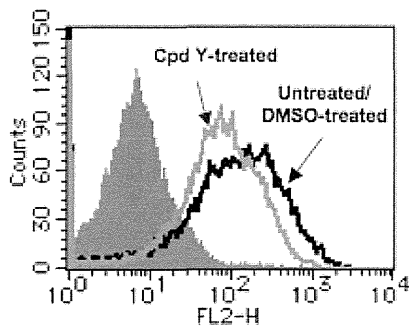


図3. Compound YによるHCVpv (pseudovirion) 感染阻害効果
 H77 (HCV gt 1a); 9-3 (gt 1b); JEV (Japanese encephalovirus, 日本脳炎)

Experiment 1

Cell: Huh7.5
 Cpd Y: 0.1 μ M, O/N



Experiment 2

Cell: Huh7-J20
 Cpd Y: 0.1 μ M, 1hr

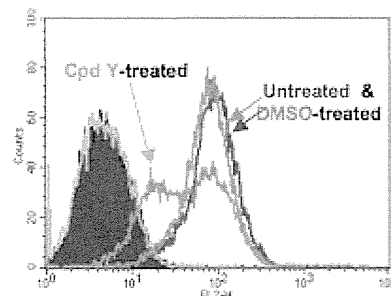


図4. Compound Yによる細胞膜表面でのCD81発現のdownregulation

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（平成24年度）

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：池田 正徳 岡山大学 准教授

分担研究課題：脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発

研究要旨：本研究では脂質代謝を標的とするHCV治療法の開発を行う。これまでに、メバロン酸経路を標的とした抗HCV剤として、臨床でも用いられているスタチン剤、テプレノンが抗HCV活性を有することを報告した。昨年度は、メバロン酸経路のゲラニルゲラニルトランスフェラーゼIIを新たな抗HCV剤の標的分子として報告した。現在、HCVのライフサイクルを再現できるのはHuH-7細胞のみである。本年度は、HuH-7細胞以外の細胞でHCVライフサイクルを再現することを目的としてLi23細胞のサブクローン化を行い、レポーターを含むHCVの感染増殖系の開発を行った。Li23細胞由来のD7細胞で効率良くレポーターHCVのライフサイクルを再現することができた。また、D7細胞におけるHCV受容体を含む宿主因子についても検討した。

A. 研究目的

メバロン酸経路における抗HCV剤の標的分子の探索において、唯一利用できる細胞株はHuH-7細胞に限定されている。この問題を解決するためにLi23細胞をHuH-7細胞に匹敵するHCV受容能にすることを目的としてサブクローン化を行った。HCV RNA複製、粒子産生を指標に細胞選択を実施しHuH-7細胞に匹敵するLi23細胞由来のD7細胞を開発を行った。

B. 研究方法

HuH-7細胞はHCV研究において唯一高レベルのHCV RNA複製、粒子産生が可能な世界標準株である。Li23細胞株はヒト肝癌細胞由来の細胞株で、HCV RNA複製、粒子産生が可能な細胞株である。しかしながら、Li23細胞と比べてHuH-7細胞のほうが、粒子産生能は高かった。HCVに対して高い感受性を示す、Li23細胞を開発するためLi23細胞のサブクローン化を行った。Li23細胞由来のORL8細胞では全長HCV RNA（遺伝子型1b：0株）が効率良く複製する。ORL8細胞からインターフェロンによりHCVを排除した治癒細胞のサブクローンであるL8c15細胞を用いて、限界希釈法により最も感染効率の高いサブクローン化細胞の選択を行った。接種材料として、JFH-1株HCV遺伝子の5'非翻訳領域にレニラシフェラーゼ遺伝子を導入したJR/C5Bが複製する感染細胞の培養上清を用いた。サブクローン化細胞の選択は、

ルシフェラーゼ活性によるHCV RNA複製能とELISA法によるHCV Coreの産生量を指標とした。また、対照としてHuH-7由来で感染効率の高いRSc細胞を用いた。Li23由来のサブクローン化細胞において感染効率が高い理由を明らかにするためにHCV受容体（CD81, SR-B1, CLDN1, OCLNおよびNPC1L1）とmiR122の各細胞における発現レベルを比較検討した。

（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。

C. 研究結果

遺伝子変異を導入したレポーターJFH-1 HCVのD7細胞に対する感染効率はHuH-7由来のRSc細胞とほぼ同じレベルであった。レポーターJFH-1 HCV感染D7細胞の培養上清中のHCVはナイーブなD7細胞に再感染し、HCVのライフサイクルがD7細胞で再現できた。D7細胞ではHCV受容体のうちCLDN1の発現レベルが親株のLi23細胞よりも高かった。また、NPC1L1とmiR122の発現レベルもD7細胞では親株のLi23細胞やHuH-7細胞よりも高かった。

D. 考察

HuH-7由来の細胞株とは異なるLi23由来のD7細胞株

を樹立し、JFH-1株HCV感染レポーターアッセイシステムを開発した。親株のLi23細胞とD7細胞の宿主因子の発現レベルを比較すると、D7細胞においてHCV受容体であるCLDN1の発現が高く、また、NPC1K1、miR122といったHCVの侵入、複製に関わる宿主因子の発現もD7saibouの方が親株のLi23細胞よりも高かった。このことは、Li23細胞のサブクローン化の過程で、HCVの感染、複製に適応した細胞クローンが選択されて来たことを示唆しているものと思われる。今回選択したD7細胞をRSc細胞株と比較することによりHCV感染における新たな知見を得ることが期待できる。

E. 結論

HuH-7細胞とは異なるLi23細胞をサブクローン化することでレポーター遺伝子を含むHCVが効率良く複製増殖することが可能なD7細胞を開発した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 44(3):374-81, 2012.
- (2) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(3):1407-13, 2012.
- (3) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Tkashima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J Gastroenterol*, 47(2):195-202, 2012.
- (4) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 93(7):1422-31, 2012.

- (5) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs*, 10:744-761, 2012.
- (6) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, 167(1):74-85, 2012.
- (7) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio.*, 2:279-283, 2012.
- (8) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7:e48685, 2012.

2. 学会発表

- (1) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 Li23細胞を用いた新しいJFH-1株HCV感染レポーターアッセイ系の開発と感受性を規定する因子の検討 第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月。
- (2) 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 IL28B SNPsの制限酵素法による判定法と比較 第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012年10月
- (3) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之 2種類の肝細胞株 (HuH-7とLi23) を用いたJFH-1株HCV感染レポーターアッセイシステムの開発と感染効率を規定する宿主因子の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

- (4) 池田 正徳、是永 匡紹、武田 緑、有海 康雄、日野 啓輔、加藤 宣之 新規IL28B SNP(rs8113007)のHCVに対するIFN応答性の検討第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
- (5) 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宣之 異なる2種類のヒト肝癌細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発とHCV感染への感受性を規定する因子の検討 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
- (6) 池田正徳、武田緑、是永匡紹、有海康雄、日野啓輔、加藤宣之IL28B SNP rs8113007によるC型慢性肝炎患者の治療効果予測 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
- (7) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、加藤 宣之 抗マラリア薬として開発中の化合物に見出された強力な抗HCV活性 第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月
- (8) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 C型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定 第48回日本肝臓学会総会、石川、2012年6月
- (9) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が不可逆的に変動した宿主遺伝子の同定 第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月
- (10) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 3年半にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した9個の宿主遺伝子の同定 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- (11) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之 長期にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定 第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- (12) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 強力な抗HCV活性が見出された抗マラリア薬として開発中の化合物 第27回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2012年6月
- (13) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 抗マラリア薬として開発中の化合物に見出された強力な抗HCV活性 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- (14) 上田 優輝、森 京子、團迫 浩方、金 惠淑、綿矢 有佑、池田 正徳、加藤 宣之 酸化ストレスを介して強い抗HCV活性を示す抗マラリア薬として開発中の化合物 第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪、2012年11月
- (15) Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N, Ariumi Y. Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- (16) Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic Regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- (17) Ueda Y, Mori K, Dansako H, Kim HS, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. Potent anti-HCV activities found in preclinical anti-malarial drugs is promptly exerted through oxidative stress. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- (18) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of Hepatitis C virus RNA. 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy
- (19) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato

N. Development of HCV reporter-assay systems using two hepatoma cell lines and analysis of the factors determining sensitivity to HCV infection. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

(21) Ikeda M, Takeda M, Korenaga M, Ariumi Y, Hino K, Kato N. New IL28B single nucleotide polymorphism compensates rs8099917 in the response to therapy for chronic Hepatitis C. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

(22) Hara Y, Yanatori I, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Ikeda M, Kishi F, Kato N, Hino K. Hepatitis C virus protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

(23) Kasai H, Kawakami K, Yamashita Y, Ikeda M, Kato N, Enomoto N, Matsuura Y, Kusunoki M, Moriishi K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. In : 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses: 2012 Oct 5-9: Venice, Italy

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：上田啓次 大阪大学大学院医学系研究科

分担研究課題：HBV pseudotype の作製と HBV 感染受容体同定への応用に関する研究

研究要旨： HBV感染の *vitro* 及び *vivo* レベルでの簡便かつ有効な感染は未だ存在しない。本研究ではこれまでに試されていない HBV pseudotype particle (HBVpp) の作製により感染能を指標にして HBV 受容体の同定を試み、感染系の構築を目指す。HBV 受容体の同定は、HBV の生活環や病態機構の解明に寄与するだけでなく、新たな治療戦略開発のために有用である。HBVpp を利用した感染スクリーニングの過程上、培養肝癌細胞株には HBV 付着因子が内在することを見出した。

A. 研究目的

HBV による病態発症機構は不明な点が多く、HBV の特性に基づいた根本的治療が展開されているとは言い難い。生命科学上も興味深いウイルス学上の最大の謎の一つである HBV 感染受容体を同定し、*vitro*、*vivo* 感染系を構築することで HBV による病態を再現させ、その機構を解明し、さらに HBV の性質に立脚した治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

- 1) 作製した HBVpp を用いて、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた感染スクリーニングを実施した。
- 2) HBV 膜蛋白の受容体リガンドに相当すると考えられる PS1~SSN を大腸菌で発現・精製した。
- 3) PS1~SSN をプローブとして、HepG2 細胞から付着因子（感染受容体）の分離・同定を試みた。

（倫理面への配慮）

該当する事項はないと思われた。

C. 研究結果

- 1) cDNA ライブラリー導入処理で、培養肝癌細胞株の HBVpp に対する感染性が著しく上昇した。
- 2) PS1~SSN をプローブとした pull-down アッセイで HepG2 細胞から付着因子（感染受容体若しくはその一

部）の分離・同定を試み、幾つかの特異的な結合因子の存在を確認した。

D. 考察

cDNA ライブラリー導入処理による培養肝癌細胞株の HBVpp に対する感染性の上昇は、現存肝癌培養細胞株に HBV 受容体若しくは付着因子が内在することを意味する。実際、PS1~SSN をプローブとした pull-down アッセイで、幾つかの相互作用因子を分離した。これらの因子が、cDNA ライブラリー導入処理により *de novo* 遺伝子発現を受けるのか、内在蛋白因子の活性化が重要なのかは、今後検討すべき課題である。MS による分離した相互作用因子の同定作業を進めるとともに、処理/未処理細胞を用いた遺伝発現プロファイル解析を用いた遺伝子発現変化レベルでの検討及び二次元蛋白電気泳動法を用いた蛋白レベルで解析を試みる予定である。

E. 結論

培養肝癌細胞株には HBV 受容体若しくはその一因子が存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano,

K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In "Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186--4. pp93-104, 2012.

(2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061/2011/726964

(3) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." *Frontiers in Virology* 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007

(4) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." *Virology* 425:95-102, 2012. doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008

(5) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. "Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7." *Neuroscience Res.* 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.

(6) Ueda, K. "For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". An Editorial. *Frontiers in Virology* 3:1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.

(7) Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma- associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded." *J.Blood and Lymph* 2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.

(8) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a

versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity." *Biophys. Res. Comm.* under revision.

(9) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集中）

(10) 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.

(11) 上田啓次. 遺伝子挿入 HBV を用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65 : 601-609、2012.

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

該当無し

2.実用新案登録

該当無し

3.その他

特に無し

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

分担研究者：加藤孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

分担研究課題：抗菌ペプチドによる抗 HCV 作用の検討

研究要旨 ビタミンDにより誘導される抗菌ペプチドのC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス作用を検討した。抗菌ペプチドで処理する事により、培養細胞へのJFH-1ウイルスの感染は約1/3程度まで押さえられ、この抗菌ペプチドには抗HCV活性があると考えられた。詳細な検討の結果、この抗菌ペプチドの抗HCV作用は、複製過程ではなく感染性ウイルス粒子直接破壊している可能性が考えられた。今後、ビタミンDが免疫細胞において抗HCV活性を発揮するに十分な抗菌ペプチドを誘導できるか検討を行う。

A. 研究目的

現在、C型慢性肝炎患者に対する標準治療はPegylated Interferon (PEG-IFN) と Ribavirin (RBV) 投与であるが、その治療効果は十分ではなく、様々な副作用がある。近年、プロテアーゼ阻害剤のようにC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルス蛋白質を直接標的とする薬剤が開発され、治療効果の向上が期待されているが、副作用や薬剤耐性株が出現するリスクもあり、他の効果的な治療法の開発も望まれている。その候補の1つとして、最近PEG-IFN/RBV治療へのビタミンD併用療法が報告された。その報告では、ビタミンDの併用により標準治療を大幅に上回るウイルス消失率が示されており注目を集めている。

我々は、これまでの研究でビタミンDの肝臓での代謝産物である25(OH)Dが抗HCV作用を持つ事を明らかにした。この25(OH)Dは、HCVの複製阻害ではなく、感染性ウイルス粒子の生成を阻害していた。しかしビタミンDは様々な機能を有する事が知られており、直接的な抗HCV作用以外にC型慢性肝炎治療に影響を与える他の働きをしている可能性も考えられる。そこで今回はビタミンDが免疫細胞で誘導する抗菌ペプチドの抗HCV作用について検討を行った。

B. 研究方法

1. HCV感染複製系を用いた抗菌ペプチドの抗HCV作用の評価

HuH-7細胞を抗菌ペプチドで処理し、その後JFH-1ウイルスをmoi=0.1で感染させた。感染後3日で培養上清と細胞をハーベストしHCVコア抗原量を測定することで抗ウイルス活性を評価した。

2. HCVシュードパーティクル(HCVpp)を用いた抗菌ペプチドの抗HCV作用の評価

HCVの感染過程のみを観察できるHCVppシステムを用い、HCV感染に与える影響を評価した。培養細胞で作製したHCVppを抗菌ペプチドと混合し、37度で1時間処理した後にHuH-7細胞に感染させた。感染2日後に細胞をハーベストし、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定することによりHCV感染に与える影響を評価した。

3. 培養細胞由来HCV(HCVcc)を用いた抗菌ペプチドの抗HCV作用の評価

培養細胞由来HCV(HCVcc)を用い、HCVppと同様に抗菌ペプチドと混合し、37度で1時間処理した後にHuH-7細胞に感染させた。感染3日後に細胞をハーベストし、細胞内、上清中のコア抗原量

を測定することにより HCV 感染に与える影響を評価した。

4. WST-8 アッセイを用いた抗菌ペプチドの細胞毒性の評価

WST-8 法により抗菌ペプチドの各種濃度での細胞毒性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はない。各種組換え DNA を用いた組換えウイルス感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けている。

C. 研究結果

1. HCV 感染複製系を用いた抗菌ペプチドの抗 HCV 作用の評価

HCV 感染複製系を用い、抗菌ペプチドの抗ウイルス活性を評価した。HuH-7 細胞に抗菌ペプチドを 10 µg/mL の濃度に加え 1 時間培養した後に JFH-1 ウイルスを感染させた。3 日後に培養上清と細胞をハーベストし、コア抗原量を測定したところ、抗菌ペプチドで処理した細胞ではコア抗原量が 1/3 程度まで低下しており、この抗菌ペプチドに抗 HCV 作用が有ると考えられた。

そこで、次に HuH-7 細胞に JFH-1 RNA を遺伝子導入し、その後抗菌ペプチドを加え抗 HCV 作用を確認した。その結果、上清中のコア抗原量は約半分程度まで低下したが、細胞内のコア抗原量の低下は認めず、この抗菌ペプチドは HCV の細胞内の複製にはあまり影響を与えないと考えられた。

2. HCVpp を用いた抗菌ペプチドの抗 HCV 作用の評価

そこで、抗菌ペプチドの HCV 感染に与える影響を見るため、HCVpp を用い評価を行った。抗菌ペプチドと混合した HCVpp は、通常の HCVpp と比較し約 30-60%程度感染力価が低下していた。しかし、この感染力価の低下は VSV の G 蛋白質をエンベロープに持つシュードパーティクルでも認め、

この抗菌ペプチドの HCV 特異的な抗ウイルス作用は評価できなかった。

3. 培養細胞由来 HCV (HCVcc) を用いた抗菌ペプチドの抗 HCV 作用の評価

そこで、同様の検討を培養細胞由来の JFH-1 ウイルスを用いて行った。10 µg/mL の濃度の抗菌ペプチドと混合した HCVpp は、通常の HCVpp と比較し約 10%程度まで感染力価が低下していた。この抗菌ペプチドの抗 HCV 作用は他の HCV 株のエンベロープを持つキメラウイルスでも同様に観察され、JFH-1 株に特異的ではないと考えられた。

さらに詳細な解析を行うため、HCV 粒子を含む培養上清をイオディキサノールの密度勾配で分画し検討を行った。その結果、抗菌ペプチド処理により感染性粒子のピークが消失し、この抗菌ペプチドは HCV 粒子を直接破壊している可能性が考えられた。

4. WST-8 アッセイを用いたビタミン D 代謝産物の細胞毒性の評価

用いた抗菌ペプチドは 10 µg/mL の濃度では細胞障害を認めなかったが、20 µg/mL の濃度では細胞生存率が約 60%程度まで低下し、20 µg/mL 以上の濃度では細胞障害があると考えられた。

D. 考察

今回の検討の結果、ビタミン D はその代謝産物である 25(OH)D による抗 HCV 作用だけでなく、免疫細胞で抗菌ペプチドを誘導することで抗 HCV 作用を示すことが明らかになった。25(OH)D は肝細胞での感染性ウイルス粒子の生成を阻害し、抗菌ペプチドは直接ウイルス粒子を破壊することで抗 HCV 作用を示すと考えられた。従って、ビタミン D 併用による標準治療の効果向上は、これらの両方の効果が関与していると考えられた。

E. 結論

今回の検討の結果から、ビタミン D により誘導される抗菌ペプチドにも抗 HCV 作用を認めた。こ