

- protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
67. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
68. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
69. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
70. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)
71. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA
72. T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4. 16-19)
73. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5. 18-19)
16. T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6. 21)
74. T Wakita. Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species of Hepatitis C Virus, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
75. Ishii K, Kanda T, Sugiura N, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Yokosuka O, Wakita T, Noda M, Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan, 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Shanghai International Convention Center, Shanghai, China (2012, June 22-25)
76. N Watanabe, T Date, H Aizaki, T Wakita. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
77. R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Identification of a host factor that interacts with hepatitis c virus NS2 protein and participates in the viral assembly, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
78. M Matsuda, R Suzuki, K Watashi, Hideki Aizaki, Y Matsuura, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of hepatitis C virus, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
79. S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science“ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)

80. Hussein H Aly Ibrahim, T Wakita. New HCV genotype 4a genotype clone, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science" Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
81. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis c virus egress and a possible target for antiviral strategy, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science", Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan (2012, 11. 21-22)
82. Y Abe, A H. Hussein, M Imamura, T Wakita, K Shimotohno, K Chayama, M Hijikata, Thromboxane A₂ synthase plays a key role in production of infectious HCV particles, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
83. T Ando, H Aizaki, M Sugiyama, M Mizokami, M Kuroda, T Wakita. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
84. A Muroi, S Takahama, M Arimoto, R Morishita, T Suzuki, T Wakita, Y Endo, T Sawasaki, Comprehensive screening of host proteins cleaved by HCV protease using wheat cell-free protein synthesis system, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
85. T Wakita, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
86. D Akazawa, M Moriyama, H Yokokawa, N Watanabe, T Date, K Morikawa, H Aizaki, K Ishii, T Kato, N Nakamura, T Wakita, Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Was Effective Both *In Vitro* and *In Vivo*, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
87. K Watashi, N Uchida, M Saeed, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting Phospholipase D, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
88. Y Matsumoto, N Watanabe, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
89. S Kim, T Date, H Aizaki, H Watanabe, T Wakita. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
90. M Fukasawa, R Anai, Y shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, T Wakita, J Chiba, K Hanada, Isolation and characterization of a mutant Hepatitis C virus adapted to mouse CD81, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
91. R Suzuki, M Matsuda, K Watashi, H Aizaki, Y Matsuura, T Suzuki, T Wakita. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
92. N Watanabe, T Date, A H Hussein, H Aizaki, T Wakita. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
93. A H Hussein, K Watashi, N Watanabe, M Mizokami, T Kato, T Wakita. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone, 198th International Meeting on

Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema,
Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

94. A H Hussein, K Shimotohno, T Wakita, H Oshiumi, T
Seya. HCV particles production from mouse
hepatocytes, 198th International Meeting on Hepatitis C
and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice,
Italy, (2012, Oct. 5-9)

G.知的所有権の出願・登録状況

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： 土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授

分担研究課題： 患者由来HCVの感染増殖に機能する肝細胞因子の解析

研究要旨 ヒト不死化肝細胞の中空糸による簡便な立体培養法で患者由来の C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染増殖を再現する実験系を独自に開発した。この細胞は平面培養では不可能だったが立体培養することで HCV の生活環を再現することが可能になった。この細胞において立体培養下で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ法によって解析した結果、アラキドン酸カスケードに関連するいくつかの遺伝子の発現の変動を見出した。このカスケードの律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ 1 の阻害剤が感染性 HCV 粒子産生に抑制的な効果を示すことを見出し、アラキドン酸カスケードの関与がわかった。立体培養下で発現が上昇する遺伝子トロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS 遺伝子産物を siRNA などで減少させると同様の効果が見られた。また TXAS 阻害剤 Ozagrel が JFH1 感染性粒子産生系において用量依存的な感染性粒子産生阻害効果を示した。Ozagrel 処理により培養上清中の感染性粒子量が著しく低下しており、それは、細胞内における感染性 HCV 粒子の形成を阻害していることがわかった。また TXAS の産物であり、シグナル分子である TXA₂ の効果を検討するために、細胞膜に存在する TXA₂ 受容体 (TP) に対するアゴニストおよびアンタゴニストを用いて、その感染性 HCV 粒子産生に対する効果を検討したが、これらは全く効果を示さなかった。このことから TXAS による感染性 HCV 粒子形成には TP 非依存的な TXA₂ シグナル系、あるいは TXA₂ からの誘導体が関与する可能性が考えられた。これらの作用機序の解明は感染性 HCV 粒子産生の抑制という新規の効果をもつ抗 HCV 薬剤の開発に有用であると考えられた。Ozagrel はヒト肝細胞キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播を効率良く抑制できることを明らかにした。また生体内で TXA₂ と拮抗的に働くプロスタグランジン I (PGI₂) と同様の効果を有する PGI₂ 受容体アゴニストも同様の効果を示すことを見出した。これらの薬剤はすべて他の疾患に対する薬剤として既に使用されており、また経口薬が存在しているため、HCV の感染伝播の抑制に使用する新たな抗 HCV 薬剤として有用性が極めて高いと考えられた。

A. 研究目的

独自に開発した患者由来の C 型肝炎ウイルス(HCV) の感染増殖細胞培養系では立体培養したヒト不死化肝細胞を用いている。平面培養では得られなかった効率で感染増殖や感染性粒子産生がおこなわれる原因を解明することにより、このウイルスの生活環に関わる細胞側因子を同定し、その HCV 生活環における役割の詳細を明らかにして、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HCV 薬候補として同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. これまでに独自に樹立したヒト不死化肝細胞を立体培養することにより種々の患者血清由来 HCV の感染

増殖を効率良くおこなう培養細胞系を開発している。マイクロアレイ法を用いて通常培養を対照として立体培養によって変化する遺伝子発現パターンを解析することで、立体培養法によってその発現が変化する細胞の遺伝子を検索し、HCV の感染増殖と関連する細胞内反応系候補を検索した。

2. ヒト不死化肝細胞立体培養下で発現変化する細胞内シグナル系について、これを抑制する siRNA や各種薬剤などを JFH1 感染性粒子産生系に用いて、シグナル系と HCV 生活環との関連を検討した。

3. 患者血由来 HCV を感染させたヒト肝臓キメラマウスにこのシグナル系あるいは関連性の高い細胞因子に対する阻害薬を投与し、その感染増殖に対する抑制効

果を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究で用いられているか不死化肝細胞はあらかじめ京都大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認された研究に基づくものである。不死化肝細胞作製に用いた肝臓提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。またヒト肝細胞キメラマウスを用いた研究は共同研究先の広島大学病院、消化器・代謝内科で広島大学倫理委員会の承認下に行われており、倫理面に関する問題はない。

C. 研究結果

1. 独自に樹立したヒト不死化肝細胞に関して、マイクロアレイ法を用いて通常培養を対照として立体培養によって変化する遺伝子発現パターンを解析することで、立体培養法によってその発現が変化する細胞の遺伝子を検索し、HCV の感染増殖と関連する細胞内反応系候補としてアラキドン酸カスケードを同定した。
2. JFH1 感染性粒子産生系を用いて、アラキドン酸カスケードの律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ1の阻害剤の効果を調べたところ、組換え体 HCV のゲノム複製や粒子放出には影響はなかったが、培地中に産生された粒子の感染性が著しく低下した。
3. JFH1 感染性粒子産生系を用いて、アラキドン酸カスケードの産物であるプロスタグランジン (PG) 類の効果を各種 PG 受容体に対するアゴニストやアンタゴニストを用いて調べたところ、PGI 受容体 (IP) アゴニスト ONO1301 で処理した時に、培地中に産生された粒子の感染性が著しく低下した。
4. 各種薬剤を用いて解析を進めたところ、トロンボキササン A₂ (TXA₂) 合成酵素 TXAS 阻害剤 Ozagrel でこの効果が再現され、別の IP アゴニスト Beraprost は全くそのような活性を示さなかった。ONO1301 は TXAS 阻害活性を持つことから、上記効果は TXAS 阻害活性によるものであることがわかった。
5. Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞の培養上清を濃縮し、シヨ糖密度勾配超遠心法で解析し、各浮遊

密度画分における HCV ゲノム RNA 量とその感染性を解析した結果、培養上清に認められる非感染性粒子を含む浮遊密度画分における HCV ゲノム量については、未処理と処理細胞での相違は認められなかった。しかしながら、感染性粒子を含む浮遊密度画分においては HCV ゲノム量が、処理細胞で著しく低下していた。

6. Ozagrel 未処理あるいは処理した細胞内から凍結融解法を用いて得た HCV 様粒子について、その HCV ゲノム RNA 量と感染性を解析したところ、ゲノム RNA 量は大きな変化はなかったが、感染性が著しく低下していた。
7. JFH1 感染性粒子産生系に TP アンタゴニストを作用させ、感染性粒子産生に対する効果を解析したが、TP アンタゴニストは Ozagrel 同様の効果は示さなかった。
8. JFH1 感染性粒子産生系に Ozagrel を作用させ、同時に TP アゴニストを作用させ JFH1 感染性粒子産生に対する効果を解析したが、感染性 HCV 粒子産生に対する Ozagrel の抑制効果は変化しなかった。
9. ヒト肝細胞キメラマウスに感染させた患者血由来 HCV の感染伝播は ONO1301 や Ozagrel だけでなく、生体内で TXA₂ に拮抗的に作用する IP アゴニスト Beraprost でも効率良く抑制できることがわかった。この結果は用いた薬剤が組換え体 HCV 感染性粒子産生系だけでなく、患者血由来 HCV の感染に対しても同様の抑制効果を示すことを示しており、新たな作用機序を有する抗 HCV 薬剤として利用可能であることを示している

D. 考察

1. ヒト不死化肝細胞の立体培養によって変化が認められたアラキドン酸カスケードは感染性粒子産生に重要なシグナルであることが考えられた。
2. Ozagrel 処理した細胞の培養上清中の組換え体 HCV は、その大部分が非感染性の粒子であり、またその量は未処理のものと大きな相違はなかったことや細胞中で形成されている組換え体 HCV の感染性が著しく減少していたことから、Ozagrel は細胞内で感染性粒子の産生のみを阻害していると考えられた。

3. TP アゴニストやアンタゴニストは Ozagrel の効果を抑制したり、再現することがなかったため、Ozagrel の効果はTPには依存しないシグナル系が関与している可能性が考えられた。この新たなシグナル系は新たな抗HCV薬のための標的になる可能性が考えられた。
4. Ozagrel や ONO1301 や Beraprost はヒト肝細胞キメラマウスに感染させた患者由来HCVの感染伝播を抑制することがわかった。この結果は、用いた薬剤が組換え体 HCV 感染性粒子産生系だけでなく、患者血由来HCVの感染に対しても同様の抑制効果を示すことを示しており、新たな作用機序を有する抗 HCV 薬剤として利用可能であることを示している。
5. 特に Ozagrel と Beraprost は既に経口薬剤として使用されているため、早期に使用が可能な、これまでとは作用機序の異なる抗HCV薬としてひとつの選択肢となりうるものが考えられる。

E. 結論

ヒト肝臓キメラマウスに感染させた患者血由来HCVの感染伝播はIPアゴニストとTXAS阻害剤で効率良く阻害されたことからそれぞれの薬剤はこれまでにない作用機序をもつ抗HCV薬剤であると考えられた。またこれらの薬剤はすべて他の疾患に対する薬剤として既に使用されているため、早期に使用する抗HCV薬剤として有用性が極めて高いと考えられた。TXAS阻害薬Ozagrelの感染性HCV粒子産生阻害効果は細胞内における感染性粒子形成あるいは成熟を阻害することによって考えられた。またこの過程におけるTXAS作用機序についての詳細は不明であるが、少なくともその酵素反応産物TXA₂によるTP非依存的なシグナル経路あるいはTXA₂の代謝産物による新たなシグナル系が関連している可能性が考えられた。この新たなシグナル経路の中に、特異的にしかも効率良く感染性HCV粒子産生を阻害することが可能になる新たな薬剤の標的が存在すると思われる、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata, Tsukasa Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.*, 2012, 56, 1, 1-9.
- 2) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Yukihiko Kushima, Kanae Osugi, Makoto Hijikata, Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato: Hepatitis C Virus Hijacks P-body and Stress Granule Components Around Lipid Droplets. *J. Virol.*, 2011, 85(14), 6882-6892
- 3) Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Matthew J. Evans, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, Makoto Hijikata, Kohji Moriishi, Tsukasa Seya, Nobuyuki Enomoto, Kazuhiko Koike, Nobuyuki Kato, Tatsuya Kanto, Hak Hotta: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Gastroenterology*, 2011, 141(1), E1-E5
- 4) Yukihiko Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.*, 2010, 84(18), 9118-9127

2. 学会発表

- 1) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Constitutively produced Interferon β functions in prevention of viral infection in human hepatocytes, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡 平成24年(2012年)12月11~14日
- 2) 津川陽司, 加藤博己, 藤田尚志, 下遠野邦忠, 土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 平成24年(2012年)11月13-15日
- 3) 有海康雄, 黒木美沙緒, 井上万里子, 土方誠, 池田正徳, 脇田隆宇, 下遠野邦忠, 加藤宣之: P-body因子とHCVのクロストーク, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 平成24年(2012年)11月13-15日
- 4) 土方誠: C型肝炎ウイルス培養系開発過程で最近わかったこと, 国立感染症研究所肝炎セミナー, 国立感染症研究所, 東京, 平成24年(2012年)10月31日
- 5) 津川陽司, 土方誠: ヒト肝細胞における抗ウイルス自然免疫応答機構の解析, 第8回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム, 広島, 平成24年

(2012年) 7月6日

6) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to viral infection. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

7) Misao Kuroki, Mariko Inoue. Makoto Hijikata, Masanori Ikeda Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy, Oct 5-9, 2012

8) Yoji Tsugawa, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Critical role of Interferon alpha constitutively produced in-human hepatocytes in response to virus infection. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 11-14 September 2012

9) Yoji Tsugawa and Makoto Hijikata: Hepatocyte-specific innate immune systems in response to RNA virus infection. The 10th International Student Seminar. Kyoto, 5-8 March 2012.

10) 土方誠: プロスタノイドによるHCVの感染性粒子産生制御、平成23年度 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、札幌 平成23年(2011年)12月4-5日

11) 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方誠: HCV粒子の感染性獲得に関与する肝細胞内シグナルの解析、第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、平成23年(2011年)7月1日
12) Yuichi Abe, Hussein Aly, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. 横浜、平成23年(2011年)12月12-15日

13) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011

14) Yuichi Abe, Hussein H. Aly, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Identification of signal

pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011

15) Yukihiro Kushima, Yuichi Abe, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.

16) 久島透嘉、脇田隆字、土方誠: CoreによるS-S結合型二量体はC型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第58回日本ウイルス学会学術総会、徳島、平成22年(2010年)11月7-9日

17) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠: 感染性HCV粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、第58回日本ウイルス学会学術総会、徳島、平成22年(2010年)11月7-9日

18) 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、斉月、脇田隆字、下遠野邦忠: シンポジウム06 ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離HCV株の培養と性状、第58回日本ウイルス学会学術総会、徳島、平成22年(2010年)11月7-9日

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

20) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

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

22) Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International

symposium on hepatitis C virus and related viruses.
Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 上皮性体性肝細胞の製造方法、発明者 土方 誠、
アリ ハサン フセイン、山口達哉、出願日 2011 年 3
月 25 日、出願番号 特願 2011-67112

2) C型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、
阿部雄一、脇田隆字、茶山一彰、出願日2011年9月30日、
出願番号 PCT/JP2011/072682

3) プロスタグランジンI2のアゴニストを含む、C型肝炎
ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方 誠、阿部雄一、
脇田隆字、出願日2010年9月30日、出願番号 特願 20
10-222045

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 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

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： 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科
研究協力者： 村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科
杉山 真也 国立国際医療研究センター

分担研究課題：HBV 増殖機構の解析と新規治療法の開発

研究要旨：培養細胞株は3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。in vitroにおいてB型肝炎ウイルス（HBV）増殖機構を解析することを目的として、HBVの3次元培養系を検討した。培養には不死化ヒト正常肝細胞株と、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いた。培養系は、中空系に細胞を充填して3次元化させる培養系と、スフェロイドと呼ばれる組織様の細胞塊による培養系について比較検討した。各培養系にウイルス粒子を含むHBV感染患者血清を感染源として添加した。その結果、いずれの細胞、培養系においても、感染初期から経時的に培養上清中のHBV-DNAの増加を確認した。約1ヶ月間に渡って培養上清中のHBV-DNA量は 10^5 copies/mL以上で検出された。また、培養上清中にHBs抗原が検出された。特にキメラマウス肝細胞を用いたスフェロイド形成による培養系において、高いHBs抗原値を維持した。以上より、これらの3次元培養系はHBV感染モデルとして非常に有用であることが期待される。今後、培養系の実用化に向けた改良を重ね、HBV各種変異体の感染効率の違いや新規抗ウイルス薬のスクリーニングなどについて検討を行いたい。

A. 研究目的

培養細胞株は増殖の足場となるプレート底部のコアティングを変えることや、3次元化して培養し組織化させることでその性質が変化することが知られている。3次元環境における肝細胞培養系は非常に有用なHBV感染モデルとなることが期待される。本研究では、in vitroにおいてB型肝炎ウイルス（HBV）増殖機構を解析することを目的として、新たな3次元培養系と、HBVの感染・複製実験の可能性について検討した。

B. 研究方法

- 1) 中空系モジュール、あるいは特殊なナノレベルの加工を底面に施した培養プレートを用いて3次元培養系を作成した。細胞は不死化ヒト正常肝細胞株と、ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織より単離した肝細胞を用いた。
- 2) 感染源としてHBVのウイルス粒子を含む患者血清

を用い、 10^5 copies/wellとなるように投与することで感染を成立させ、その後培養上清中のHBV DNAおよびHBs抗原、細胞内のHBV core関連抗原を測定し、HBVの感染・複製を確認した。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

- 1) 不死化ヒト肝細胞株、キメラマウス肝細胞ともに中空系を用いた培養系では約1ヶ月間の培養が可能であった。また、特殊加工の培養プレートを用いた培養においてスフェロイドを形成し、3次元化することができた。スフェロイド形成は2週間-1ヶ月間持続することを認めた。

2) HBV の 3 次元培養において、培養上清中に HBV-DNA や HBs 抗原、細胞内に HBV core 関連抗原が検出された。また、上清中にも HBV core 関連抗原の検出を認めた。上清中の HBV-DNA 量が培養期間を通じて 10^4 - 10^6 copies/ml で継続的に検出され、少なくとも 1 ヶ月間は培養の継続が可能であった。特にキメラマウス肝細胞をスフェロイド化した培養系では、抗原量の増加を認め、上清中の HBs 抗原と HBV-DNA 量が培養期間を通じて継続的に検出され、感染の持続を確認した。

D. 考察

不死化ヒト正常肝細胞株、ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞ともに 3 次元培養系による長期間での培養が可能であることが認められた。本研究で用いた肝細胞株は正常肝細胞であり一定のコンディション下での検討が可能となる。一方、キメラマウス肝細胞は肝組織より単離した初代培養であることからより生体に近い状態での検討が期待できるため、細胞それぞれの長所を活かした検討方法を選択することができる。3 次元培養系を用いた長期間での培養実験により、各種変異体の感染効率の違いや HBV 感染・複製様式の解明、特にレセプターの探索と検証、粒子放出過程などを解析できる。また、患者血清からの感染が可能であることから、検体別の解析による個別化治療への応用が期待できる。引き続き、HBV 培養上清から *in vitro* での再感染を検討中である。今後、この系を用いた感染防御実験 (特にワクチンエスケープミュータントに関して)、標的分子薬剤の探索研究や新規治療法の開発研究の可能性を検討していきたい。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞および、不死化ヒト正常肝細胞株では、3 次元培養系により長期培養が可能となった。また、この培養系を用いて患者血清を感染源とした *in vitro* での HBV 感染・複製の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral. Hepat.*, 2012 in press.
- 2) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2012 in press.
- 3) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.* 2012;84(4):587-95.
- 4) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(2): 503-6.
- 5) Sa-Nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res.* 2011; 158(1-2): 209-215.
- 6) Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, Tanaka Y, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(21): 6328-31.
- 7) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species

- during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*, 54(1): 19-25, 2011.
- 8) Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in immunosuppressive condition. *Uirusu*, 60(1): 79-86, 2010.
 - 9) Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis*, 202(2): 202-13, 2010.
 - 10) 渡邊綱正, 菅内文中, 楠本茂, 新海登, 飯尾悦子, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 宮木知克, 野尻俊輔, 田中靖人. 多剤耐性変異を認めた悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対しテノフォビルが著効した一例. *肝臓*. 2012; 53(1): 35-41.
 - 11) 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 鈴森伸宏, 齋藤伸治, 田中靖人. 高ウイルス量妊婦へのラミブジン投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. *肝臓*. 2012; 53(10): 610-614.
 - 12) 新海登, 田中靖人, 杉山真也, 溝上雅史. 【B 型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性】核酸アナログ耐性変異パターン解析とその対策. *消化器内科*. 2012; 54(5): 582-585.
2. 学会発表
- 1) Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England.
 - 2) Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Immune restoration Hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept. 22-25, 2012. Oxford, England.
 - 3) Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Watanabe T, Tajiri K, Kishi H, Mizokami M. CROSS-GENOTYPE PROTECTION OF HBV AND A ROLE OF HBS ANTIGEN MUTATION IN IMMUNITY ESCAPE IN VITRO AND IN VIVO MODEL USING UPA/SCID MICE WITH HUMAN HEPATOCYTES. THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. NOVEMBER 4-8, 2011. San Francisco, USA.
 - 4) Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Sudoh M, Mizokami M. HOST SPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS AS A THERAPEUTIC TARGET FOR HEPATITIS B VIRUS REPLICATION. THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. NOVEMBER 4-8, 2011. San Francisco, USA.
 - 5) Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Acharya Subrat K, Joh T, Allison Robert D, Mizokami M. ANALYSIS OF A NOVEL “REPLACEMENT MUTATION “ IN CORE PROMOTER OF HEPATITIS B VIRUS. THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. NOVEMBER 4-8, 2011. San Francisco, USA.
 - 6) 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, 溝上雅史. B 型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討～中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて～. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月, 石川.
 - 7) 田中靖人. ウイルス性肝炎・肝硬変における検査の進歩. 日本臨床検査自動化学会第 44 回大会. 平成 24 年 10 月, 横浜.
 - 8) 柏木有美, 可児里美, 都築祐二, 松浦健太郎, 五藤孝秋, 大橋実, 脇本幸夫, 田中靖人. リアルタイム PCR 法を用いた Abbott m2000 system による HBV-DNA 定量測定の基礎的検討. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会. 平成 24 年 11 月, 京都.

- 9) 坂本知行、田中靖人、杉山真也、山川慶洋、松浦健太郎、日下部篤宣、新海登、木村吉秀、勝美康平、城卓志、溝上雅史. B型肝炎ウイルス Genotype G の共感染下における複製メカニズムの検討. 第46回日本肝臓学会総会, 平成22年5月, 山形.

G 知的所得権の出願・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

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

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：森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究協力者：葛西宏威 山梨大学医学部 助教

山下篤哉 山梨大学医学部 助教

分担研究課題：HCV 蛋白質に相互作用する宿主蛋白質の感染における役割

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)は、必須宿主蛋白質を利用して自身の感染サイクルを成立させる。コア蛋白質やNS5Aに対して相互作用をもつ宿主蛋白質を明らかにしてきた。本研究では、必須宿主蛋白質を標的とした抗HCV剤の開発を目指し、宿主蛋白質の同定と化合物クリーニング系開発を行った。第一に、コア蛋白質による病原性発現およびウイルス粒子形成に関与する宿主蛋白質PA28 γ に対するスクリーニング系を開発し、化合物スクリーニングを可能にした。また、コア蛋白質を使った膜結合型酵母2ハイブリット法によるスクリーニングやレプリコン細胞株の比較から、新規宿主蛋白質分子Eno1、Paxillin、FKBP6を同定した。さらに、既知の宿主蛋白質FKBP8に対する化合物およびその類縁体を合成し、それらに抗HCV活性を認めた。本研究の成果は、将来的に新規抗HCV開発に繋がるものを思われる。

A. 研究目的

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

フラビウイルス科に属するHCVはプラス鎖RNAゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムには単一のポリプロテイン前駆体がコードされており、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10個のウイルス蛋白質に成熟する。キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質は前駆体のアミノ末端に位置し、シグナルペプチダーゼによる切断を始めに受け、更にC末端膜貫通領域がシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断を受けて成熟する。宿主蛋白質PA28 γ 存在下で、コア蛋白質は肝脂肪化、肝

癌などの病原性発現を誘導し、PA28 γ 遺伝子を欠損させるとその病原性発現誘導が失われることを我々は報告している。さらに、PA28 γ はウイルス増殖においても必須因子であることを、昨年報告している。ウイルス粒子形成のメカニズムはよくわかっておらず、宿主蛋白質因子の分子機構は明確になっていない。

以前、我々はウイルスゲノム複製に宿主蛋白質FKBP8が必要であることを報告している。このタンパク質はNS5Aに結合し、Hsp90と共にウイルス複製の場であるmembranous webへリクルートされ、ウイルスタンパク質のフォールディングに機能する。FKBP8との結合にNS5A内の121番目のVal(あるいはIle)が重要で、このアミノ酸残基をAlaに置換すると、ウイルス複製は完全に抑制される。FK506結合タンパク質(FKBP)ファミリーが分類されるイムノフィリンで3つのTPRをもつものは、FKBP8、FKBP51、FKBP52、FKBP36、そしてCyclophilin 40が知られている。

本研究では薬剤スクリーニング方法の開発と、新規内在性標的因子を同定することを目的として、PA28 γ

の多量体形成を利用した培養細胞系の構築を試み、また、膜結合型酵母2ハイブリット法によるスクリーニングによってコア蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を単離した。さらにネットワーク解析とウイルス培養系の解析から新規標的因子を更に絞り込んだ。また、薬剤スクリーニング方法の開発と、新規内在性標的因子を同定することを目的として、PA28 γ の多量体形成を利用した培養細胞系の構築を試みた。また、FKBPファミリー中で、FKBP8以外の新規宿主因子の同定を試み、FKBP8あるいは新規標的因子に対する抗HCV剤開発を試みた。

B. 研究方法

感染24時間前に、RNA干渉によってEno1およびPaxillinの発現を抑制しJFH1ウイルス感染Huh7 OK1細胞の細胞内外のウイルスRNA量を経時的にreal-time PCRによって測定した。また、Con1(遺伝子型1b) full repliconおよびJFH1(遺伝子型2a) subgenomic replicon細胞内のEno1およびPaxillinの発現をRNA干渉で抑制し、細胞内ウイルスRNA量をreal-time PCRによって測定した。pActおよびpBINDにPA28 γ 遺伝子あるいはプロテアソーム活性化能を持たないPA28 γ Pro245Ala(PA28 γ P245A)遺伝子を組み込み、VP16およびGAL4蛋白質との融合蛋白質として発現するように、アデノウイルスベクターを構築し、Huh7OK1細胞にGAL4結合領域を5つ(pG51uc)あるいは9つ(pGL4.35)もつFirefly luciferase レポータープラスミドと共に導入した。48時間後、導入細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

遺伝子型1bの0株とN株のサブゲノムレプリコン細胞を用いて、FKBPの解析を行った。RNA干渉によってFKBPの発現を抑制しレプリコンRNAにコードされているルシフェラーゼの活性によってレプリコンRNAの複製を評価した。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

コア蛋白質をベイトにして、ヒト肝臓ライブラリーをスクリーニングした結果、11個の遺伝子を単離した。コア蛋白質のプロセッシングに必須である膜蛋白質SPPが単離され、生理的な条件に近い状態でスクリーニングが実施されていることが示唆された。また、RNA干渉試験でHCVcc(JFH1, 遺伝子型2a)ではEno1の発現低下によってウイルス量が減少し、JFH1サブレプリコン細胞によるウイルスRNA増殖試験でもウイルスRNA量低下が認められたことから、Eno1はウイルスRNA複製に必須な宿主遺伝子であることが示唆された。また、Paxillinに対するノックダウンによって、HCVccおよびJFH1 subgenomic replicon細胞内のウイルスRNA量の低下が認められなかったが、Con1 full genomic replicon細胞(Con1, 遺伝子型1b)では有為な低下が認められた。

次に化合物スクリーニングによる抗HCV剤の開発を最終目標に、宿主蛋白質PA28 γ を標的とした培養細胞系の構築を試みた。PA28 γ はホモ7量体を形成することでプロテアソームを活性化する。VP16-PA28 γ およびGAL4-PA28 γ との結合によって、GAL4プロモーターを活性化し、下流にコードされているルシフェラーゼが発現する培養細胞系の構築を試みた。トランスフェクションによってプラスミドをそれぞれHuh7OK1細胞に導入し、48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4結合領域が5つのものより、9つのレポータープラスミドの感度が高かった。また、変異型との組み合わせより、PA28 γ の野性型同士の結合によるルシフェラーゼ活性が高かった。また、VP16のみとGAL4-PA28 γ の組み合わせ、およびVP16-PA28 γ とGAL4のみの組み合わせではルシフェラーゼ活性は認められなかった。

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い少ない。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、FKBP6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事が示唆された。

D. 考察

コア蛋白質と相互作用し、ウイルス増殖に関与する遺伝子が二つ同定された。Eno1はウイルス遺伝子型2aのJFH1ウイルスによるHCVccおよびレプリコン細胞系

に必要な宿主遺伝子であることが分かった。ウイルス複製におけるEno1の機能は今後の課題としたい。また、Paxillinのノックダウン試験ではウイルス遺伝子型1bのCon1株レプリコンでのみ有為な低下が認められ、Paxillinはウイルス遺伝子型に依存した機能が示唆された。今後Eno1およびPaxillinの抗ウイルス標的遺伝子としての評価とウイルス複製における役割を解析する必要がある。

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

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

ウイルス増殖に関与する宿主蛋白質性因子Eno1およびPaxillinを同定した。また、PA28 γ のホモ多量体形成をアッセイする培養細胞系を確立し、PA28 γ を標的とした化合物スクリーニングが可能となった。また、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可能となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tripathi, L. P., C. Kataoka, S. Taguwa, K. Moriishi, Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions.

- Mol. Biosyst. 6:2539-2553. 2010.
2. Tanaka, Y., Y. Mori, H. Tani, T. Abe, K. Moriishi, H. Kojima, T. Nagano, T. Okabe, T. Suzuki, M. Tatsumi, and Y. Matsuura. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.* 54:206-220. 2010.
 3. Moriishi, K., I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52:411-420. 2010.
 4. Wen, X., Abe, T., Kukihara, H., Taguwa, S., Mori, Y., Tani, H., Kato, N., Suzuki, T., Tatsumi, M., Moriishi, K., and Matsuura, Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6, e15967. 2011
 5. Taguwa, S., Kambara, H., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., Koike, K., Moriishi, K., and Matsuura, Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.* 85, 13185-13194. 2011
 6. Kambara, H., Tani, H., Mori, Y., Abe, T., Katoh, H., Fukuhara, T., Taguwa, S., Moriishi, K., and Matsuura, Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology* 412, 211-219. 2011
 7. 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
 8. 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
 9. Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012
 10. 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. 森石恆司、松浦善治、HCV による脂質代謝障害の分子機序、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 2. 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治、C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 3. 加藤大志、森嘉生、寒原裕登、要祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷亘、森石恆司、松浦善治、核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルス複製を抑制する第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
 4. Kambara H., Taguwa S., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 5. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 6. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., Matsuura Y. Involvement of

- PA28gamma in the propagation of HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
7. Yamashita A., Fujimoto Y., and Moriishi K. Marine natural products as a source of the novel antiviral agent targeting to HCV NS3 helicase XV International Congress of Virology., September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
 8. Fujimoto Y., Yamashita A., and Moriishi K. Inhibitory effect of marine natural products on the replication of hepatitis C virus., September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
 9. Kambara H., Tani H., Mori Y., Abe T., Katoh H., Fukuhara T., Taguwa S., Moriishi K., and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
 10. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity.. 18th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 8-12, 2011 Seattle. USA.
 11. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity.. 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜
 12. ウイルス感染による細胞内SUMO化修飾の動態解析 芦沢暁、森石恆司、藤室雅弘 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜
 13. Kataoka C., Tani H., Kaname Y., Taguwa S., Abe T., Fukuhara T., Moriishi K., and Matsuura Y. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜
 14. 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.
 15. 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
 16. 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
 17. 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。

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:宿主・ウイルスを標的とした抗ウイルス薬剤の大規模スクリーニング

研究分担者 坂本 直哉 北海道大学医学研究科消化器内科学分野

研究要旨 我々は、独自に開発したHCV増殖モデル、及びHCV-JFH1感染細胞を用い、抗ウイルス活性を持つ化合物・宿主蛋白などの探索、機能解析を遂行し、以下の結果を得た。(1)4,400種の合成化合物のスクリーニングにより、HCV増殖を抑制する4種の化合物が同定された。(2)YFP,RFPタグ付加HCVを用いたウイルスエンタ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

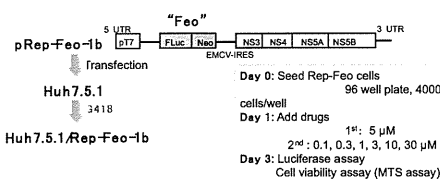
C型慢性肝炎の標準治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法は、依然として著効率が50%にとどまり治療困難例が存在することから、新しい作用機構に基づいた治療法の開発が必須である。我々は、新規HCV阻害剤の探索を目的に、(1) HCV subgenomic replicon系を用いたウイルスゲノム増殖抑制化合物スクリーニング、および(2) 蛍光蛋白タグ付加HCV-JFH 1 培養系を用いたウイルスエンター阻害化合物のHigh-content screening assayを目的として研究を遂行した。上記スクリーニングで抽出された化合物のHCV増殖抑制効果について解析を行った。

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、

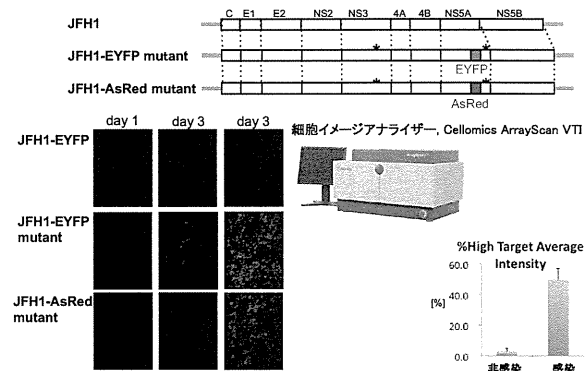
対象: 4046化合物
「Lipinski則にのっとったdrug likeかつ構造の多様性を重視した化合物」という条件のもとに化合物サプライヤー (InterBioScreen社、Chemical Block International社) から購入。重金属は含まない。

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



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NS5AC末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290AとC7653Tに変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白YFP発現HCVを構築した。この蛍光蛋白発現HCV感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plateにHuh7.5.1細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その2時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日培地を交換し、5日間の培養後high content analysisを利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エンター阻害剤として抽出した。



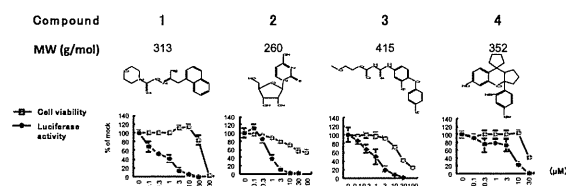
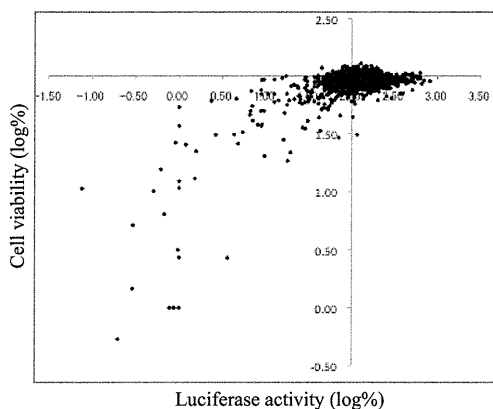
(倫理面の配慮)

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。

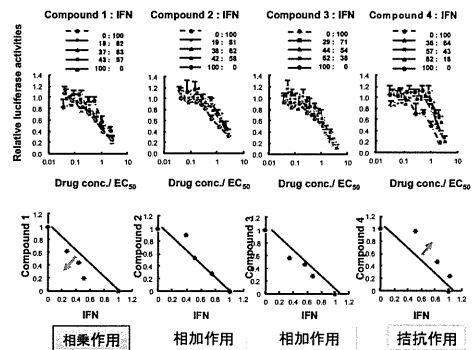
C. 研究結果

(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。

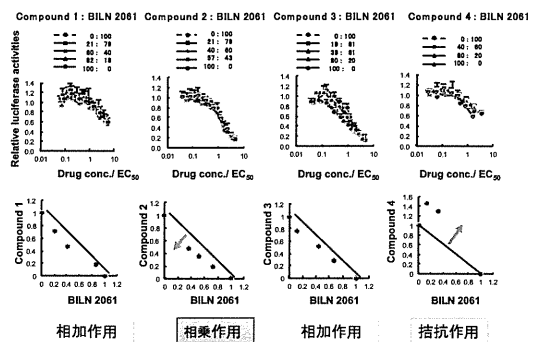


同定された4種の化合物それぞれとIFNおよびプロテアーゼ阻害薬(BILN2061)との併用効果をレプリコン細胞を用いて解析した。IFNとの併用では化合物A (N¹-(morpholine-4-carboxyloxy)-2-(naphthalen-1-yl)acetimidamide, MCNA)が相乗効果、B、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。IFNとの併用では化合物Aが相乗効果、B、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。BILN2061との併用では化合物Bが相乗効果、A、Cとは相加効果、Dとは拮抗効果であった。

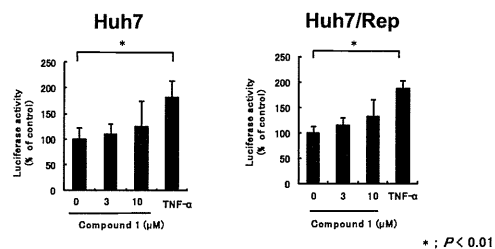
IFNとの相乗効果



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。

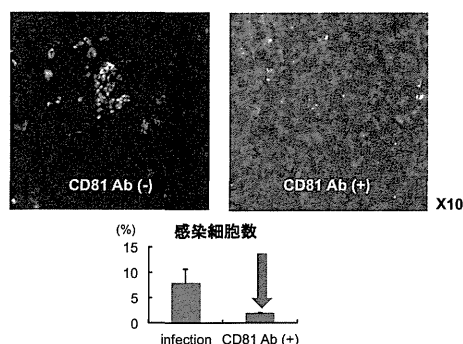


抗ウイルス活性

(N¹-(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. *Hepatol 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,