

201227008A

厚生労働省科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と  
発症予防に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成25(2013)年5月

厚生労働省科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と  
発症予防に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成 25 (2013) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究……………	1
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)	
II. 分担研究報告	
1. HCV粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤……………	13
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)	
2. HCV複製制御に関与する宿主因子の探索とその機能解析……………	17
高久 洋 (千葉工業大工学部)	
3. HCVによる糖・脂質代謝異常惹起の分子機序の解析……………	23
堀田 博 (神戸大大学院医学系研究科)	
4. 持続的なHCV複製による細胞機能変化の解析……………	29
加藤 宣之 (岡山大院医歯薬学総合研究科)	
5. 持続的なHCV感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析……………	37
小原 恭子 (鹿児島大学共同獣医学部)	
6. 1b遺伝子型の感染性HCVの開発とその応用……………	41
杉山 和夫 (慶応義塾大学医学部)	
7. マイクロRNAによるHCV感染制御の解析、薬剤応答、肝繊維化進行の 分子機能の解析……………	49
村上 善基 (大阪市立大学大学院医学研究科)	
8. ヒト遺伝子編集酵素によるHCV感染制御機構の解析……………	55
丸澤 宏之 (京都大学大学院医学研究科)	
9. 翻訳後修飾を介したシグナル伝達制御機構の解析と抗HCV剤の探索……………	61
大島 隆幸 (徳島文理大学香川薬学部)	
10. P-body因子によるHCV増殖制御機構の解析……………	65
有海 康雄 (熊本大学エイズ学研究センター)	
11. HCV複製制御に係わる自然免疫関連分子Ripletの機能解析……………	69
押海 裕之 (北海道大学大学院医学研究科)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	73
IV. 研究成果の刊行物・別刷り……………	83

# I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究

研究代表者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

要旨

本研究は3年計画の最終年度にあたり、これまでの研究成果をさらに発展させるべく研究を推し進めた。また、HCV感染が宿主にエピジェネティック変化をもたらし、それによる感染細胞および感染周辺の細胞の増殖環境を変化させている可能性についても解析を進めた。本研究はHCV感染による肝疾患の原因を明らかにし、その予防に寄与する研究を推進することを目的としているために、ウイルスの感染阻止の研究から疾患発症の機構解明とそれをもとにした疾患予防に至るまで研究の範囲は多岐に亘った。本年度の成果は以下の内容に要約できる。

1. HCV感染増殖を制御する宿主因子の探索とその機能解析：

HCV RNAの翻訳にはHsp90/eIF3c/HCV IRES複合体の形成が生じることが必須であることを明らかにした。また、Hsp70もHsp90と同様にHCV RNAの翻訳制御に係わっていることを明らかにした。

2. HCV感染による宿主側の変化：

肝細胞は糖の産生を担っており血糖値の維持に重要な役割を果たしている。HCVによる本機能制御変化を解析した。その結果、HCVが脱リン酸化酵素MAPK phosphatase-3 (MKP3)を亢進しFoxO1のリン酸化を抑制する結果、糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 及びグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase)の遺伝子発現を促進させることを明らかにした。

HCVの持続発現に伴い発現誘導されたDHCR24がHCVの増殖を促進するばかりでなく、p53活性を抑制する事を明らかにした。DHCR24によるHCVの複製制御に関わる宿主因子も新たに同定した。

Coreタンパク質と相互作用する宿主因子として、Ewing肉腫の原因因子であるEWSを同定した。EWSは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およびG6Pase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がん、また糖代謝への関与に重要な知見を与える。

3. HCV感染が宿主に及ぼす遺伝的な変化：

全長HCV-RNA複製細胞(OL8やOL11など)とそれらの細胞からHCV-RNAを排除した治療細胞(OL8cとOL11c)を2年以上継代培養した細胞を用いたマイクロアレイ解析や定量RT-PCR解析により、HCV-RNAの長期複製により不可逆的に発現変動した幾つかの宿主遺伝子について研究を行い、以下の成果を得た。(1) HCV-RNAの長期複製により不可逆的に発現レベルが低下する遺伝子として同定した*BASP1*と*CPB2*について、それらの発現レベルが低下する時期を明らかにし、発現低下がDNAのメチル化によるものであることを明らかにした(2) HCV-RNAの長期培養により不可逆的に発現レベルが亢進する遺伝子として同定した*SEL1L3*は、その発現レベル(既報)の亢進と肝線維化の進展や肥満度に相関関係があることが分かった。

HCV感染と、その結果生じる炎症反応やインターフェロン産生にตอบสนองし、さまざまなヒト遺伝子編集酵素がヒト肝細胞に誘導されることを見出した。これらの編集酵素のいくつかは、遺伝子変異導入活性により感染したHCVのウイルスゲノム配列に塩基変化を誘導することが*in vitro*で確認された。HCV感染を伴った肝細胞に発現している遺伝子編集酵素群が、HCV感染制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、

慢性 C 型肝炎患者の血中での HCV RNA の存在様式を調べ、Ago2 と会合している事を明らかにした。

HCV による細胞のエピジェネティック変化を調べるために、宿主 DNA のメチル化変化を網羅的に解析した。その結果、感染細胞においてメチル化が亢進する遺伝子と減少する遺伝子が多数検出された。この結果は、ウイルス感染による宿主遺伝子変化と情報伝達がウイルスの特定のタンパク質により一義的に決まる他に、エピジェネティック変化を介した宿主の情報伝達変化が存在することを強く示唆する。

#### 4. 宿主によるウイルス複製の抑制：

遺伝子改変マウスをモデル実験系として HCV 感染時の生体内における自然免疫応答を解析した。HCV の治療成績と相関のある III 型インターフェロンは、生体内では IPS-1 分子を介して産生されること、またこのとき CD8 陽性の樹状細胞が重要であることを発見した。さらに、III 型インターフェロンは治療に使用される I 型インターフェロンと異なり、細胞傷害活性を誘導せず肝細胞内の抗ウイルスヌクレアーゼである RNaseL や ISG20 分子の発現を誘導しウイルス排除を誘導することを解明した。また、HCV の NS3-4A プロテアーゼが IPS-1 分子の上流で働く Riplet 分子を分解すること、この Riplet 分子が癌の抑制に働く Rb 経路にも関与することが示唆され、HCV の発がん機構の一つである可能性が示唆された。

#### HCV 増殖複製系の開発：

HCV1b 型の感染複製系を樹立するための開発研究を行った。

#### 研究分担者

高久 洋 千葉工大工学部 教授  
堀田 博 神戸大大学院医学系  
研究科 教授  
加藤 宣之 岡山大院医歯薬学総合  
研究科 教授  
小原 恭子 鹿児島大学共同獣医学部  
教授  
杉山 和夫 慶応義塾大学医学部  
准教授  
村上 善基 大阪市立大学大学院医学  
研究科 病院講師  
丸澤 宏之 京都大学大学院医学部  
講師  
大島 隆幸 徳島文理大学香川薬学部  
准教授  
押海 裕之 北海道大学大学院  
医学研究科 講師  
有海 康雄 熊本大学エイズ学  
研究センター 准教授

C 型肝炎に対する治療もペグ化インターフェロン (IFN) とリバビリンとの併用療法により患者の半数程度は治癒するようになっている。しかしながら、HCV の持続感染による発がん機構については、諸説あるものの未だ解明されていない。それは、HCV が宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく分かっていないためである。本研究では、HCV 複製を阻止する方策を見出すとともにウイルス感染予防、肝疾患進展の予防法の確立を目指すことを目的とし以下の研究を推進する。

1. HCV 排除を目的として、複製、増殖を制御する宿主因子を探索しその機能を解明する。
2. HCV 感染により変化が知られている宿主機能を制御する要因の解析。
3. HCV 感染が宿主要因を変化させる分子基盤の解明。
4. ウイルスタンパク質による機能変化及び感染による宿主の機能変化に関する研究
5. HCV2 型以外の複製系の開発

#### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染は肝がん患者の 8 割に認められており、HCV の持続感染状態である C 型肝炎は肝細胞のがん発症の要因である。肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を阻止することが重要である。

#### B. 研究方法

1. DNA メチル化解析 (下遠野)  
HuH7 細胞をクローン化して遺伝的背景を合わせた細胞に HCV フルゲノムレプリコンを導入し、薬剤耐性因子 neo で選択して

コロニーを得る。一定期間後に細胞から DNA を抽出して、それを Illumina のメチル化解析システムに供して、得られるデータを整理し解析した。

2. Hsp90 の HCV IRES 依存的な翻訳反応への関与の解析 (高久)

Hsp90 と eIF3c との相互作用の検討は、Huh-7 細胞および NNC#2 細胞に pFLAG-eIF3c 発現 vector を導入して解析した。Hsp90 の翻訳反応への関与についての研究は siRNA ノックダウン、Hsp90 阻害剤 (KNK437) を用いて解析した。

3. HCV NS5A による糖新生制御 (堀田)

Huh7.5 細胞に MKP3 発現プラスミドをトランスフェクトして一過性に MKP3 を強制発現させた細胞の転写因子 FoxO1 の解析を行った。抗リン酸化 FoxO1 抗体及び抗 FoxO1 抗体を用いたウエスタンブロット法によりリン酸化 FoxO1 の量及び FoxO1 総量を測定すると同時に glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の量を測定した。また、ROS の影響を解析するために、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine (NAC) で細胞を処理して、MKP3 発現及び FoxO1 のリン酸化の程度を調べた。

4. HCV 持続感染により発現が変動する宿主因子の解析 (加藤)

長期継代培養を施した HCV 感染細胞 (OL8) から経時的に Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現量が低下する遺伝子として同定した *BASP1* と *CPB2* についてこれらの mRNA の発現レベルを LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により調べた。また、脱メチル化剤である 5-azacytidine (5-azaC) (2.5 mM) やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤である 4-phenylbutyric acid (4-PBA) (1 mM) を添加して、*BASP1* と *CPB2* の mRNA の発現レベルを LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により調べた。HCV-ゲノム RNA の長期複製により発現が亢進した遺伝子の発現レベルがどの程度なのか、それらの肝病態の進行との相関関係を検討した。

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

5. HCV 持続発現細胞で発現亢進した

DHCR24 の機能解析 (小原)

HCV ゲノム複製用として、FLR3-1, R6FLR-N, RepJFH を、感染増殖用として JFH-1 株を用いた。HCV 遺伝子の発現は、RT-PCR, RTD-PCR, ウエスタンブロット (WB) 法、コア ELISA (オーソ社) 法で解析を行った。キメラマウス HCV 感染系による評価としては、ヒト肝臓細胞を持つ uPA-SCID マウスに HCV を感染させ (Nat Med 2001, Am J Pathol 2004) たものを用いた。

6. 遺伝子編集酵素による RNA 変異解析 (丸澤)

Huh-7.5.1 細胞に HCV クローンの JFH-1 を感染させた。2 週間後にレンチウイルスベクターを用いて APOBEC2, ADARB, AID, を発現導入し、3 週間後に RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。HCV の遺伝子変異検出には 2 種類の次世代シーケンサー (Illumina 社 GS Junior, Illumina 社 Genome Analyzer II X) を platform とした。得られた各リードは JFH-1 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、感染クローンの変異の検出を行った。

7. 血液中における肝炎に関係する miRNA と HCV RNA の存在様式の解析 (村上)

血清中より HCV RNA の存在の有無別に miRNA 発現解析をマイクロアレイによって行った。肝炎の既往がなく、HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV 抗体陰性、血液検査にて ALT, T. chol 値が正常である患者を正常肝とし 4 例、また慢性 C 型肝炎患者 16 例、それぞれより total RNA を抽出し解析を行った。血液中の RNA について、Argonaute2 (Ago2) と会合するもの、リボタンパク質成分と HCV RNA の関係をゲル濾過で、またエクソソームと HCV RNA/miRNA の関連性を、エクソソーム画分を単離して調べた。

8. HCV Core と相互作用する宿主因子の解析 (大島)

Core と相互作用する宿主因子を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、ヒト肝臓およびヒト脾臓由来を用いた。得られた宿主因子 EWS と HCV 複製との関連性は siRNA によるノックダウン実験で行い、培養上清中に放出される core の量を ELISA 法で定量し

た。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、HNF4 結合配列を含む p21 プロモーター領域および G6Pase 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。

#### 9. HCV 複製を制御する自然免疫に関わる因子の解析 (押海)

マウスを用いたモデル実験系として、HCV の RNA をハイドロダイナミック法で野生型と遺伝子改変マウス生体内の肝臓へ HCV RNA を注入し、自然免疫応答を検証した。また、遺伝子改変マウスより細胞を採取し、試験管内での HCV 感染実験を行い自然免疫応答を解析した。HCV としては、遺伝子型 1b の全長のレプリコンや、2a の JFH1 株として知られる感染粒子を用いて実験を実施した。

#### 10. HCV 感染により細胞内に出現する凝集体の解析とその機能解析 (有海)

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染 7 2 時間後に細胞を固定後、抗 MOV10 抗体 (Bethyl 社)、抗 DDX6 抗体 (Bethyl 社) あるいは抗 HCV Core 抗体 (CP-9、CP-11; 特殊免疫研究所) を反応させた後、FITC 結合抗ウサギ抗体及び Cy3 結合抗マウス抗体 (Jackson Immuno Research 社) を用いて可視化した。また、核は DAPI で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、オリンパス社) を用いて細胞内局在を詳細に観察した。また、JFH1 感染 RSc 細胞あるいは HuH-7 由来全長 HCV-0 RNA 複製 0 細胞に GFP 融合 APOBEC3G (A3G-GFP) あるいは HA-tagged MOV10 を強制発現させ、細胞を抗 HA 抗体あるいは抗 HCV Core 抗体で染色し、HCV 感染や HCV 複製による APOBEC3G 及び MOV10 の細胞内局在の変化について観察した。

#### 11. 培養細胞系で効率よく複製増殖する HCV2 型以外のウイルス増殖系の開発 (杉山)

患者由来のウイルスゲノムから自立的に複製するサブゲノムを得た。それを基にして完全長ゲノムの構築を行い、その一部が感染複製する能力がある事を見いだした。

(倫理面への配慮)

各研究分担者が所属する研究機関において下記の必要な措置 (申請し承認を得る) をしてから研究に従事した。組み換え DNA 実験および遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号; 平成 16 年 2 月 18 日施行)、同施行規則 (平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令 (平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に基づき実施した。また、臨床研究に関するものについては各研究機関の倫理委員会に申請し承認を得て研究をおこなった。この中で患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報情報を適正に管理保存している。

### C. 研究結果

#### 1. DNA メチル化解析 (下遠野)

細胞から DNA を抽出して、それを Illumina のプローブを用いて CpG 部位のメチル化解析に供して、得られるデータを整理し解析した。この解析は国立がん研究センターの金井博士との共同研究として行った。Illumina が搭載しているメチル化部位を検索するプローブ約 15 万種類を用いて全ゲノムを網羅的にメチル化度合いの解析を行った。各クローンで共通してみられる変化部位に注目して整理したところ、非レプリコン自立細胞に比べてメチル化が亢進しているプローブが 15,790、低下しているプローブが 1,855 検出された。その個所を遺伝子座との関連でプロットすると、遺伝子をコードする上流、下流、遺伝子開始部位などいずれの領域でもメチル化の違いが検出され



た。また、メチル化亢進している遺伝子の中には肝臓がんで共通してみられるプロームも含まれていた。

## 2. Hsp90 の HCV IRES 依存的な翻訳反応への関与の解析 (高久)

HCV RNA の翻訳には Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成が必須で、eIF3c と Hsp90 の相互作用には HCV IRES RNA が要求されることが示唆された。eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、Hsp90 阻害剤で Hsp90 の活性を阻害したところ、Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体より eIF3c が遊離し、プロテアソーム依存的分解が起こることを見出した。実際に eIF3c と Hsp90 が相互作用していることが示唆された。また Huh-7 細胞では eIF3c と Hsp90 との相互作用が認められなかったが、HCV IRES を細胞内で発現させることで、Hsp90 と eIF3c が相互作用するようになった。Hsp90 と eIF3c の相互作用に HCV IRES が関与していることは RNase A 処理により Hsp90 と eIF3c の会合が消失したことから強く示唆された。17-AAG 処理すると eIF3c の減少傾向が認められた。別の実験から Hsp70 も HCV 翻訳制御やウイルスタンパク質の安定化に関与している可能性が示唆された。これらの結果は Hsp70、Hsp90 はともに HCV 複製制御に関与することを示す。

## 3. HCV NS5A による糖新生制御 (堀田)

定量的 qRT-PCR 法により、HCV 感染細胞では対照細胞に比べて、感染 4 日後 (4 dpi) 以降に、MKP3 mRNA 量の増加することが認められた。また、内在性 FoxO1 と MKP3 の結合が確認された。MKP3 を一過性に発現により、内在性 FoxO1 のリン酸化の程度が低下した。これまでに HCV 感染により ROS 産生が亢進し、それに伴って JNK が活性化し、FoxO1 のリン酸化の程度が低下することを報告した。そこで、HCV 感染細胞における MKP3 発現の亢進に ROS 産生及び JNK 活性化が関与しているか否かについて検討した。その結果、HCV 感染細胞を抗酸化剤 NAC あるいは JNK 阻害剤 SP600125 で処理すると、MKP3 蛋白質の発現量は非感染対照細胞における発現量に近い程度まで減少することがわかった。この時、FoxO1 のリン酸化の程度も非感染対照細胞と同程度まで回復していた。

## 4. HCV 持続感染により発現が変動する宿

## 主因子の解析 (加藤)

これまでの研究から HCV 持続感染により発現レベルが低下する遺伝子として同定した *BAP1* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1) と *CPB2* (Carboxypeptidase B2) 遺伝子は、HCV RNA の複製が 2 年間継続する間に顕著に低下し、3.5 年間細胞を継代させるとさらに発現レベルが低下することが分かった。発現低下はそれぞれの遺伝子 promoter 領域におけるメチル化や脱アセチル化による可能性が考えられた。この可能性を調べ、両遺伝子の promoter 領域のメチル化が発現レベルの低下に関わっていることが示唆された。また、発現レベルが不可逆的発現亢進した 4 遺伝子について、疾患との関連性を探った。過去の論文を検索した結果、C 型慢性肝炎患者 91 名 (いずれも HCV 遺伝子型 1b) の cDNA マイクロアレイの data (Honda et al. Gastroenterology, 139:499-509, 2010) が論文として報告されていることが分かった。そこで、この論文の著者である金沢大学医学部の金子周一先生と本多政夫先生との共同研究を行った。本研究によりこれまでに得られた HCV-RNA の長期複製で発現亢進した 4 遺伝子の発現レベルが、これら C 型慢性肝炎患者ではどの程度なのか、そして肝病態の進行との相関関係がないかを検討し、その結果、*SEL1L3* 遺伝子の発現亢進は、肝の線維化や肥満化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

## 5. HCV 持続発現細胞で発現更新された DHCR24 の機能解析 (小原)

DHCR24 に対する単クローン抗体 2-152a を HCV レプリコン細胞や持続感染細胞に処理したところ、10mg/mL の濃度 48-72 時間処理で複製が 5%以下に低下した。また HCV が持続感染した細胞や、ヒト肝臓キメラマウスに 2-152a 抗体処理したところ、有意な感染抑制が見られた。また DHCR24 の下流遺伝子として betaine/GABA transporter -1 (BGT-1) が同定された。BGT-1 siRNA 処理した細胞では HCV レプリコン細胞での複製が抑制されたことから BGT-1 は HCV の複製に関与していると考えられた。

## 6. 遺伝子編集酵素による HCV RNA 変異解析 (丸澤)

Huh-7.5.1 細胞に JFH-1 株を感染させ、感

染2週間後に APOBEC2, ADARB1, AID を導入した。その細胞から RNA を抽出して HCV NS3 領域を次世代シーケンサーで配列を解析した。オリジナルの HCV JFH-1 株の塩基配列をリファレンスとして変異解析を行い比較することにより、HCV RNA に認められる遺伝子変異の生成に、肝細胞に発現した宿主遺伝子編集酵素が関与している可能性が示唆された。

#### 7. 血液中における肝炎に関係する miRNA と HCV RNA の存在様式の解析 (村上)

血清中の miRNA 発現解析をマイクロアレイによって行った。hsa-miR-125-3p, hsa-miR-AC, hsa-miR516a-5p, hsa-miR-622, hsa-miR-623 の5種の miRNA にて正常肝4例中4例、C型慢性肝炎16例中0例検出され、ウイルス感染の状態によって末梢血 miRNA の存在に特徴があることが示唆された。また、血清中の HCV RNA の一部は Ago2 と会合していた。

#### 8. HCV Core と相互作用する宿主因子の解析 (大島)

HCV Core と相互作用する宿主因子として Ewing 肉腫の原因因子である EWS が得られた。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。EWS の siRNA 処理した細胞に HCV を感染させてもウイルス粒子の産生量に大きな違いは認められなかった。一方、HNF4 の転写活性に対する Core の影響を調べたところ、HNF4 の転写活性は抑制されることが明らかとなった。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。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 の量が減少したが、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。

#### 9. HCV 複製を制御する自然免疫に関わる因子の解析 (押海)

HCV が感染した際に生じる自然免疫応答を解析する為に、HCV RNA をマウスの肝臓へ直接導入し、自然免疫応答を調べた。その結果、HCV の治療効果と高い相関を示す III 型インターフェロンは、生体内に於いて、IPS-1 分子依存的に主に産生されることを見出した。

さらに試験管内の解析から III 型インターフェロンは、ヒトでは BDCA3 陽性樹状細胞に相当するマウス CD8 陽性樹状細胞から主に産生されることを発見した。興味深いことに、HCV の RNA が細胞質内に存在する場合は、IPS-1 分子依存的に III 型インターフェロンが産生されるのに対し、HCV の RNA を持つ肝臓細胞と共培養した樹状細胞では TICAM-1 分子依存的に III 型インターフェロンが産生され、その産生経路は主に2経路存在することが解明された。III 型インターフェロンは I 型インターフェロンとは異なり、NK の活性化やクロスプレゼンテーションによる CT の活性化は誘導しないが、肝細胞内の高ウイルスヌクレアーゼである RNaseL や ISG20 等の分子の発現を上昇させることを発見した。これは III 型インターフェロンが細胞傷害活性を誘導せずに、細胞内の HCV を排除する作用があることを示唆している。

IPS-1 分子の上流で働く我々が発見した Ripet 分子が試験管内の解析から、HCV の NS3-4A プロテアーゼにより分解されることを発見した。興味深いことに、この Riplet 分子はユビキチンライゲースとして働き、IPS-1 経路のみならず、がん抑制遺伝子として知られる Rb 経路でも働くことを発見した。

#### 10. HCV 感染により細胞内に出現する凝集体の解析とその機能解析 (有海)

i) HCV による APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在の変化。

HCV 非感染 RSc 細胞において、APOBEC3G 及び MOV10 は P-body に局在し、内在性 DDX6 と共局在した。一方、HCV-JFH1 感染細胞では、APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在は破綻し、脂肪滴周辺にリクルートされ、HCV Core と共局在した。

ii) APOBEC3G 及び MOV10 と HCV Core との相互作用。

APOBEC3G-HA あるいは HA-MOV10 を強制発現させた 293T 細胞及び HCV-JFH1 感染細胞のライゼートを混合し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により、APOBEC3G 及び MOV10 は HCV Core タンパク質と結合することが判明した。

iii) APOBEC3F 及び APOBEC3G の HCV 複製における役割。

レンチウイルスベクターを用いて、HCV-JFH1 感染 RSc 細胞に APOBEC3F あるいは

は APOBEC3G を恒常的に発現させても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性は抑制されなかった。同様に 0 細胞に APOBEC3F や APOBEC3G を強制発現させても、HCV 複製レベルは抑制されなかった。

iv) 内在性 MOV10 の HCV 複製における役割。

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 MOV10 をノックダウンさせても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性の増強はみられなかった。同様に 0 細胞の MOV10 をノックダウンさせても、HCV 複製レベルは増強されなかった。

11. 培養細胞系で効率よく複製増殖する HCV2 型以外の系の開発 (杉山)

患者由来のウイルスゲノムから自立的に複製するサブゲノムを得た。それを基にして完全長ゲノムの構築を行い、その一部が感染複製する能力がある事を見いだした。

#### D. 考察

HCV 感染による肝疾患の発症には、ウイルスによる宿主細胞の遺伝子変化が主な要因と考えられる。ウイルス側からみれば感染宿主細胞で効率よく複製する事が重要であり、そのために宿主内の環境をウイルスが複製しやすいように変化させると考えられる。一方、宿主側としてはウイルスを排除する事が重要であり、そのためにウイルスに抗して種々の宿主遺伝子の発現を制御して、ウイルス複製を抑える様に働く。ウイルス感染を認識して自然免疫系を活性化して複製を抑制したり細胞死を誘導して増殖を阻止、あるいはウイルスの広がりを抑制する機能を発揮するが、それらが十分でないときにウイルスの排除ができずに持続感染の状態になる。持続感染状態は組織の正常な機能が損なわれる状況と、炎症の継続による不自然な細胞増殖を伴いそれらが疾患を惹起して、さらに増悪化すると思われる。

本研究では HCV 感染により変化する宿主因子を、(1) HCV 複製を制御するもの、(2) HCV 感染により直接変化するもの、

(3) 抗ウイルスに働くものなどに分けて解析を進め、さらにこれらの因子の変化が何に起因するかを明らかにした。これらの解析を通して抗ウイルスあるいは疾患予防、治療に結びつく要因を明らかにする事を目的とした。従って、研究内容は多方面に亘ったが最終的な目標は疾患発症の宿主要因と予防である。

#### E. 結果

本年度の研究成果は、(1) ウイルス感染により糖新生に関わる転写因子 FOXO1 の活性化とその機構の解明、(2) HCV 翻訳反応を制御する宿主因子 Hsp とその働きの解明、(3) 肝がんの要因となる宿主因子 DHCR24 の活性化、(4) ウイルス複製を抑制する、自然免疫系に働く要因 RIPLET の発見と HCV による RIPLET 機能抑制解除機構、(5) 遺伝子編集酵素による HCV の擬種の蓄積と薬剤抵抗性の獲得、(6) HCV1b 感染クローンの単離、(7) HCV 持続感染細胞において恒常的に発現が亢進している遺伝子および抑制されている遺伝子の解明、(8) エピジェネティックによる宿主情報制御等がある。HCV 感染が種々の機能により宿主細胞を変化させる事が明らかになったが、これらの変化を人為的に制御する事が可能ならば、疾患の惹起および病態の進展を留める事ができると期待される。また、ウイルス複製予防にも新たな切り口からの対策が可能になると期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12):1886-1892, 2012
2. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K,

- Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*. 8(8):e1002860, 2012
3. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol*. 56(1):1-9. 2012
  4. 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(1):390-395, 2012
  5. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . *J Virol*, 86(23): 12903-12911, 2012.
  6. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.
  7. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect*, 14(1): 69-78. 2012.
  8. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J Med Virol*, 84(2): 229-234, 2012.
  9. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 55(1): 1-11, 2012.
  10. El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, Hotta H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clin Microbiol*, 50(12): 3886-3892, 2012.
  11. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated –interferon /ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2): e30513, 2012.
  12. Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- $\alpha$ -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, 30(5): 1048-1052, 2012.
  13. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 47(10): 1143-51, 2012.
  14. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE*, 7(10): e46634, 2012.

15. Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization. *PLoS ONE*, 8(2):e55874, 2013.
16. El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, (in press)
17. 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* 44:374-381 (2012).
18. 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.* 167:74-85 (2012).
19. Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431 (2012).
20. 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).
21. 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.*, 56:1407-1413 (2012).
22. 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).
23. 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, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, 47:195-202 (2012).
24. 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).
25. Koike K, Takaki A, Kato N, Ouchida M, Kanzaki H, Yasunak T, Shiraha H, Miyake Y, Yamamoto K. Eradication of hepatitis C virus subgenomic replicon by interferon results in aberrant retinol related protein expression. *Acta Med. Okayama*, 66:461-468 (2012).
26. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430:592-597 (2013).
27. Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshihara M, Takaoka A, Kohara M. Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS ONE*, accepted.

28. Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K. Genomic polymorphisms in 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol*, 2012 Dec 28 accepted
29. Tsukiyama-Kohara, K. Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int J Mol Sci*, 13:15271-15278, 2012.
30. Sekiguchi, S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K and Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE*, 7(12):e51656, 2012 Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, Kuge S, Yoshida M, and Kohara M. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1. *Biochem Biophys Res Com*, 428:494-499, 2012.
31. Saitou M, Kohara, M, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\delta$ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol*. 84:733-746, 2012.
32. 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*. 2012; 130: 1294-1301.
33. 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 Research*, 163: 405-409, 2012
34. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE*. 2012; 7: e35052.
35. 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*. 2012; 19: 32-38.
36. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K,
37. Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. 2012; 43: 67-71.
38. Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs. *Gastroenterology*. 2012; 143: 550-563.
39. Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 444-451.
40. Toyoda H, Kumada T, Kiriya T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in

- Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. Biomarkers.2013;18:82-7.
41. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, and Y-h Taguchi. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. PLoS ONE. 2012; 7: e48366
  42. 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. 2012 ; 84: 61-70.
  43. Torikoshi K, Abe H, Matsubara T, Hirano T, Ohshima T, Murakami T, Araki M, Mima A, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Arai H, Doi T. Protein inhibitor of activated STAT, PIASy regulates alpha-smooth muscle actin expression by interacting with E12 in mesangial cells. PLoS One., 7:e41186-41199 (2012).
  44. Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M. TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. Oncoimmunology. 1(6):917-923. (2012)
  45. Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8a(+) dendritic cells. Oncoimmunology. 1(5):581-592. (2012)
  46. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(6):2066-71. (2012)
  47. Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. J Virol. 86(1):185-94.
  48. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by cytotoxic T cells with identical epitope specificity. J. Virol. 87:2253-2263, 2013.
  49. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 430:592-597, 2013.
  50. 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. 167:74-85, 2012.
  51. 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. 93:1422-1431, 2012.
  52. Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by in silico and far-Western screening of proline-rich proteins. J. Biochem. 151:657-666, 2012.
  53. 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 44:374-381, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

1. テスト体液サンプルの分離方法 特願2012-37586 (H24-2-23) 発明者 村上 善基
2. 抗 HCV 薬 特願 2012-268884 出願日: H24 年 12 月 8 日 発明者: 田中晴雄、下遠野邦忠ほか 出願人: 学校法人明星学苑
3. C型肝炎ウイルス粒子形成促進剤及び株の評価方法及び C 型肝炎ウイルス粒の産生方法 特願 2012-215474.H24 年 9 月 28 日発明者 堀田博

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## II 分担者研究報告

## 厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

### 分担研究報告書

#### HCV粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤

分担研究者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染細胞は慢性肝炎を経て肝硬変、肝がんを発症する。感染した細胞では種々の変化を通して細胞の性質が変化する。特に細胞の脂肪代謝に関する変化が顕著であり、この変化が細胞の増悪化に関与すると考えられる。これまでに、ウイルス蛋白質の一部が脂肪代謝系を変化させる事が知られているが、多くの本研究ではウイルスが複製する環境で変化する宿主側要因を解析した。特に HCV による細胞のエピジェネティック変化を調べるために、宿主 DNA のメチル化変化を網羅的に解析した。その結果感染細胞においてメチル化が亢進する遺伝子と減少する遺伝子が多数検出された。この結果は、ウイルス感染による宿主遺伝子変化と情報伝達がウイルスの特定のタンパク質により一義的に決まる他に、エピジェネティック変化を介した宿主の情報伝達変化が存在することを強く示唆する。

#### A. 研究目的

HCV 感染による肝疾患の増悪はウイルス感染による宿主の遺伝子産物の機能変化が要因のひとつと考えられる。ウイルスは感染細胞においてそれ自身が効率よく複製するために、宿主の持つ種々の機能を変化させる。それらのひとつが脂肪代謝や糖代謝機構の修飾である。そのためにウイルス蛋白質のあるものが代謝機能に関与する宿主因子を制御する。一方、これまでの研究から、ウイルス感染細胞においてはウイルス増殖と直接関連しないと思われる宿主因子の変化も多く見られる。これが代謝機能変化や糖新生代謝機能変化の結果二次的に引き起こされるものか、あるいは感染による他の要因によるものか不明である。本研究ではウイルス感染による宿主遺伝子変化にエピジェネティック様の

要因が働いて、それが代謝異常を促進して肝障害の要因になっている可能性を調べる事を目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. HuH7 細胞のクローニング

HuH7 細胞は由来する研究室により染色体数に違いが存在すること、培養を継代している過程で宿主遺伝子に変化していくことなどから、ゲノムが不安定である。研究を開始する前に、クローン化して遺伝的背景を合わせる必要があるために、細胞を限界希釈し単一クローンを単離する。

##### 2. HuH7 細胞への HCV レプリコン導入

クローン化した細胞に HCV フルゲノムレプリコンを導入し、薬剤耐性因子 neo で選択して、コロニーを得る。

### 3. HCV レプリコン細胞のクローニングと培養

各コロニー由来の細胞を培養し、定期的に一部の細胞を回収する。

### 4. DNA 抽出とメチル化解析

細胞から DNA を抽出して、それを Illumina のメチル化解析システムに供して、得られるデータを整理し解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は樹立培養細胞およびすでにクローニングされている HCV ゲノム発現プラスミドを用いて行った研究であり、倫理面の配慮は必要ない。

## C. 研究結果

### 1. HuH7 細胞のクローニング

HuH7 細胞は由来する研究室により染色体数に違いが存在すること、培養を継代している過程で宿主遺伝子に変化していくことなどから、クローン化作業をして遺伝的背景を合わせる必要があるために、最初に細胞を限界希釈し単一クローンを単離した。コロニーの中から 2 種類 (A と B) 選びそれらを増殖させた。

### 2. HuH7 細胞への HCV レプリコン導入

クローン化した細胞 (A と B) に HCV フルゲノムレプリコン (NNC 由来) を導入し、薬剤耐性因子 neo で選択して、コロニーを 2 種類 (A-1, A-2 および B-1, B-2) を単離し、それらを培養して増やした。

### 3. HCV レプリコン細胞のクローニングと培養

経時的变化を求めるために、実験開始時を零とし (サンプル名を A-1-0, A-2-0, B-1-0, B-2-0)、その後 2 か月 (サンプル名を A-1-2, A-2-2, B-1-2, B-2-2)、4 か月間 (A-1-4, A-2-4, B-1-4, B-2-4) と続けて培養をおこなった。

### 4. DNA 抽出とメチル化解析

細胞から DNA を抽出して、それを Illumina のプローブを用いて CpG 部位のメチル化解析に供して、得られるデータを整理し解析した。この解析は国立がん研究センターの金井部長との共同研究として行った。Illumina が搭載しているメチル化部位を検索するプローブ約 15 万種類を用いて全ゲノムを網羅的にメチル化度合いの解析を行った。各クローンで共通してみられる変化部位に注目して整理したところ、非レプリコン自立細胞に比べてメチル化が亢進しているプローブが 15,790、低下しているプローブが 1,855 検出された。その個所を遺伝子座との関連でプロットすると、遺伝子をコードする上流、下流、遺伝子開始部位などいずれの領域でもメチル化の違いが検出された。また、メチル化亢進している遺伝子の中には肝臓がん で共通してみられるプローブも含まれていた。

## D. 考察

HCV 感染による宿主側の変化は、ウイルスが感染細胞の中で効率よく増殖す

るために引き起こされる結果であると考えられる。ウイルス側から見ればウイルスの増殖場を形成しやすくするための変化ととらえることができるし、宿主側からはウイルスを排除するための宿主遺伝子変化がある。自然免疫機構の活性化などは後者のケースである。前者の例としては、脂肪代謝に関わる遺伝子の活性化などが挙げられる。一方、ウイルス増殖亢進とは直接関係ないと思われる宿主因子の変化が多岐にわたることも観察されることから、ウイルス感染自身が宿主の遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。そこで、ウイルス感染によるエピジェネティック変化の中でメチル化に焦点を絞り解析を進めた。その結果、期待以上にメチル化度合いの変化が観察された。その中には肝がん組織でみられる部位の変化も観察された。これらのことは、ウイルスタンパク質が直接に宿主標的因子を制御する以外にも、種々の手段で宿主に変化を与えている可能性が示唆され、このような変化が肝疾患の増悪にも関係している可能性が考えられた。しかし、本研究で観察したメチル化変化は、HCV ゲノム複製を解析する宿主細胞ががん由来した細胞をもとにしているために、ウイルス感染とは直接関係しないエピジェネティックを反映している可能性も考慮しなければならない。

#### E. 結論

HCV 感染は特定の宿主因子を標的にしている場合と、標的が不特定である場合とが存在する可能性を示した。後者では

本研究で示したメチル化制御に加えて、遺伝子編集酵素の活性化なども存在することが明らかにされている。このような不特定遺伝子を標的とした制御機構の存在が、代謝異常を亢進したり、疾患の増悪化に働いている可能性が考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12):1886-1892, 2012
2. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*. 8(8):e1002860, 2012
3. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol*. 56(1):1-9. 2012
4. 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(1):390-395, 2012