

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

持続的なHCV感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析

分担研究者 小原 恭子 鹿児島大学 教授

**研究要旨：** C 型肝炎ウイルス(HCV)の持続発現に伴う宿主因子の修飾機序をあきらかにする事により、その病原性発現のメカニズムを探る事を目的に研究を進行している。これまでに、HCV 持続発現細胞を認識する単クローン抗体の中で DHCR24 や Ku70, TOM70 といった宿主因子を認識するものを樹立しており、DHCR24 が HCV によって発現誘導され p53 活性を抑制する事、ウイルスの複製に関与する事を明らかにしている。本年度は DHCR24 の抗体が HCV の複製抑制活性を持つ事を明らかにし、これに関与する可能性のある宿主因子 betaine/GABA transporter -1(BGT-1)もマイクロアレイを用いた解析等で新たに同定した。

#### A. 研究目的

分担研究者らは、典型的な癌遺伝子を持たないC型肝炎ウイルス（HCV）が、持続的に発現する事によって腫瘍原性亢進を先に見いだしている (*J. Biol. Chem* 279 (15), 14531-14541, 2004)。この分子機序を解明するため、HCV 持続発現細胞に対する単クローン抗体を多数樹立し、肝癌患者組織と反応するものを得て HCV 病原性発現との関連を解析してきた。これまでに HCV 感染が 3 hydroxysterol- 24-reductase (DHCR24)分子の発現を誘導し酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制する事、p53 活性を低下させる事を見いだしている。

本年度は DHCR24 に対する単クローン抗体が BGT-1 を介してウイルス複製を抑制している可能性が明らかとなった。

#### B. 研究方法

##### (1) 細胞培養

HCV 遺伝子の発現は、RT-PCR, RTD-PCR, ウェスタンブロット(WB)法、コア ELISA

(オーソ社)法で解析を行った。

宿主因子の解析は WB 法、RTD-PCR 法で行った。蛋白質の発現レベルは LAS1000UVmini (FUJI)で定量した。

HCV 複製細胞は、FLR3-1, R6FLR-N, RepJFH を用いた。HCV 感染系は JFH-1 株を用いた。

(3) キメラマウス HCV 感染系による評価

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)、HCV を感染後 1～2 ヶ月で  $1.8 \times 10^7$  コピー/mL にウイルス量が達したところで、2-152a 抗体は 400mg/20gB.W.、PEG-IFN (中外)は 30 g/g 腹腔内投与を 2 日間隔で 2 週間行なった。血中の HCV 量を定量 PCR (Gastroenterology 1999) で測定した。

(4) マイクロアレイ解析

レプリコン細胞などから RNAeasy で抽

出、精製した RNA を用い、Whole Human Genome Oligo Microarray (G4410; Agilent Technology) で発現プロファイルを解析した。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H24 年 5 月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1) に従った。また、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得ている (一部手続き中)。

### C. 研究結果

DHCR24 に対する単クローン抗体のうち、クローン 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、10 g/mL の濃度で 48-72 時間処理で 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。2-152a 抗体による抗ウイルス効果の分子機序を解明するためにマイクロアレイで解析を行った。その結果、HCV レプリコン細胞に 2-152a 抗体処理したときのみ発現低下し、cured 細胞 (IFN で HCV レプリコンを除去した細胞) では発現が変化しない分子として、betaine/GABA transporter-1 (BGT-1) が同定された。

そこで、BGT-1 が HCV の複製に関与するかを siRNA を用いて解析したところ、HCV レプリコン細胞での複製抑制が明らかとなった。また、HCV 持続感染細胞に

siRNA を導入しても、ウイルス複製が抑制された。さらに、BGT-1 siRNA の作用の特異性を検討するため、siRNA 認識配列に変異を入れた BGT-1 発現ベクターを作成して BGT-1 siRNA 処理細胞に導入したところ、HCV の複製が回復した。以上の事から、BGT-1 は HCV の複製に関与していると考えられた。

### D. 考察

DHCR24 に対する単クローン抗体 2-152a は HCV 複製抑制作用を持ち、これに BGT-1 が関与している可能性が考えられた。BGT-1 を介したウイルス複製抑制機序の詳細は明らかではないが、BGT-1 は細胞の浸透圧制御に関与している事から、この経路が関連している可能性がある。また、BGT-1 が DHCR24 と直接相互作用している可能性もあり、予備的な知見では、DHCR24 の siRNA 処理により BGT-1 の発現が変化する。また、コレステロール合成経路への作用がウイルス複製に影響を与えている可能性もあるため、BGT-1 との関連を今後検討する必要がある。

### E. 結論

今年度の研究成果により、DHCR24 単クローン抗体 2-152a の抗ウイルス効果が明らかになった。また、BGT-1 が HCV 複製に関与する可能性が新たに提示された事から、ウイルス複製に関与する新規経路が明らかになる可能性が期待される。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K. Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M. Targeted induction of interferon- in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS ONE*, accepted.
2. 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
3. Tsukiyama-Kohara, K. Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int J Mol Sci*, 13:15271-15278, 2012.
4. 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.
5. Inoue K, Tsukiyama-Kohara K. Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, Kuge S, Yoshiba 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.
6. 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.

7. 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.

### 8. 学会発表

1. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. Congress of European Association for the Study of the Liver (EASL2012). April 2012 Barcellona
2. K. Tsukiyama-Kohara, M. Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012年9月兵庫
3. Satoh, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. Antibody against  $3\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta$ 24-Reductase Suppresses Hepatitis C Virus Infection through Betaine/GABA Transporter-1. HCV2012 Oct. Venice
4. 佐藤正明、齊藤誠、小原道法、小原恭子. C型肝炎ウイルスの複製に關与する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術總會2012年9月札幌
5. 小原恭子、笠間由里、小原道法. C型肝炎ウイルスのBリンパ腫発症要因解明に向けた研究. 第60回日本ウイルス学会2012年11月大阪
6. Qi, X, Harada, S., Tsukiyama-Kohara, K. Elevation of apoptosis induced by mutant DHCR24 with potential MDM2 binding motif in hepatocytes.

- 第60回日本ウイルス学会2012年11月大阪
7. Takano, T., Kasama, Y., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. Modification of translocase of outer mitochondrial membrane 70 by hepatitis C virus in apoptotic response and interferon induction. 第35回日本分子生物学会 2012 12 月福岡
  8. Tsukiyama-Kohara, K., Kimura, K., Kohara, M. Inflammation and cancer in hepatitis C virus infection. 3<sup>rd</sup> IGAKUKEN International Symposium on *Control of Influenza and Hepatitis* 2013 Feb. Tokyo

小原恭子、佐藤正明、須藤正幸 出願人 国立大学法人熊本大学、財団法人東京都医学研究機構、中外製薬株式会社

## 2. 実用新案登録

## 3. その他

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 「C型肝炎ウイルス阻害剤」 出願番号 12/241868 出願国 アメリカ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学
2. 「Hepatitis C virus inhibitors」 出願番号 CA2640954 出願国 カナダ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学
3. 「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」特願 2011-125440 出願日 平成23年6月3日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構
4. 「RRM2のアンタゴニストを有効成分として含有するC型肝炎治療剤」特願 2010-180981 出願日 平成22年8月12日 発明者 小原道法、

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

1b遺伝子型の感染性HCVの開発とその応用

分担研究者 杉山 和夫 慶應義塾大学医学部 特任准教授

**研究要旨：** HCV 血清よりレプリコンライブラリー法によって新たな 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。このレプリコン複製細胞へ 1b 型 HCV 構造領域をトランスフェクションすることで、感染性ウイルス粒子として効率良くパッケージング (trans-packaging) させるシステムを開発することができた。trans-packaging は繰り返して行うことが可能であり、この際の HCV アミノ酸配列解析からパッケージングには非構造領域 NS5A の変異が重要と考えられた。今後、得られた 1b 型 HCV サブゲノムレプリコンと 1b 型構造領域を直接に結合し 1b 型全長 HCV 株の樹立に発展可能である。

**A. 研究目的**

遺伝子型 2a 型の感染性 C 型肝炎ウイルス (HCV) 株 (JFH-1) が開発され HCV の感染サイクルの全体像が明らかになり、HCV のウイルス学的研究が飛躍的に発展した。

しかし、HCV には 2a 型以外にも多様な遺伝子型が存在し、JFH-1 株によって得られた研究結果が全ての HCV に共通する普遍的なものなのか、あるいは JFH-1 固有のものなのかわかっていない。特に、日本で最も頻度の高い HCV 遺伝子型は 1b 型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。近年、HCV 自体を標的にした新規の抗 HCV 薬の開発により C 型肝炎治癒率は飛躍的に向上したが、高齢者など未だに難治症例が存在し、1b 型 HCV のウイルス学的解明を進める必要がある。これまで 1b 型 HCV に関してサブゲノムレプリコンの報告は多いが、感染効率の高い全長株の樹立は少ない。その原因として、

これまで樹立されたサブゲノムレプリコンは、複製は可能であるが、効率の良いウイルス粒子への組み込みには適応していなかった可能性が考えられる。

本研究では、まず、1b 型感染性 HCV 株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能を広げるために、患者血清における HCV ゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞の樹立を試みた。さらに、これらのレプリコン複製細胞へ 1b 型 HCV 構造領域をトランスに供給することで、感染性ウイルス粒子として効率良くパッケージ (trans-packaging) させる 1b 型レプリコンを樹立した。

**B. 研究方法**

1. サブゲノムレプリコンライブラリーの作製

1b 型 HCV 患者血清から抽出した RNA サンプルを用いて long distance RT-nested-PCR 法により HCV 非構造領域の増幅を試みた。特に増幅の良い 9 サンプルの PCR サンプルをレプリコンカセットベクターへライゲーションして大腸菌をトランスフォームし、サブゲノムレプリコンプラスミドライブラリーを作製した。これを鋳型に RNA を合成し、サブゲノムレプリコン RNA ライブラリーを作製した。

## 2. 新しいサブゲノムレプリコン複製細胞の樹立

サブゲノムレプリコンライブラリー RNA を培養肝細胞へトランスフェクション、ネオマイシン存在下で培養しネオマイシン耐性細胞クローンを得た。long distance RT-nested-PCR 法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法によってレプリコン複製細胞クローンであることを確認した。

## 3. trans-packaging 実験

レプリコン複製細胞に構造領域発現ベクター-pC-NS2 (1b/2a キメラ) および pC-NS2T (完全 1b 型) をトランスフェクションすることによって細胞内サブゲノムレプリコン RNA を trans-packaging し、レプリコン含有粒子として上清に放出させナイーブな細胞へ感染させた。感染効率はコロニー形成能 (FFU/ml) で測定した。

## 4. Protease protection assay

trans-packaging によって得られたレプリコン含有粒子に対して protease protection assay すなわち海面活性剤、タンパク質分解酵素処理による RNase 抵抗性を判定した。

## 5. 感染阻害実験

HCV レセプターを介して感染することを証明するために、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体を用いて感染阻害実験を行った。

## 6. Trans-packaging 実験の反復とレプリコンアミノ酸配列の解析

trans-packaging 実験によって形成された細胞コロニーを回収、培養して繰り返し trans-packaging 実験を行った。その際に生じた遺伝子変異をみるために PCR クローニングまたはダイレクトシーケンシングを行った。

### (倫理面への配慮)

患者から試料提供を受けた場合、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得た。その際、インフォームドコンセントを得たうえで個人情報特定できないように配慮した。また、試料提供者、その家族に対する人権が保護されるよう配慮した。当研究が非介入研究であり資料提供者には全く危険性がないことを説明した。また、試料提供を拒否した場合でも診療上まったく不利益がないことを説明した。

## C. 研究結果

### 1. 1b 型サブゲノムレプリコンライブラリーの作製

これまでに、数種類のレプリコン複製細胞株へ 1b 型 HCV 構造領域発現ベクターをトランスフェクションし trans-packaging 実験を行ったがコロニーは形成されなかった。そこで、

trans-packaging 可能なサブゲノムレプリコン複製細胞樹立の可能性を高めるために、HCV 患者血清から多様な遺伝子配列をもつサブゲノムレプリコンライブラリーを作製した。9 症例の HCV 患者血清から作製したサブゲノムレプリコンライブラリー RNA を使用して、5 例からネオマイシン耐性コロニーが形成された。これらから 4 種類の新たな 1b 型 HCV サブゲノムレプリコン RNA 複製細胞を樹立した (Y3-4、Y7-9、G23-1、G47-2)。

## 2. レプリコン複製細胞への 1b 型構造領域導入による transpackaging

すでに分担研究者が感染性を報告している 1b/2a キメラ HCV 配列を元に 2 種類の構造領域発現ベクター pC-NS2 (1b/2a キメラ型) および pC-NS2T (完全 1b 型) を作製し、これらを上記のレプリコン複製細胞へそれぞれトランスフェクションした。これによって形成される 1b 型のウイルスの外殻 (envelope, core) が、細胞内のサブゲノムレプリコン RNA をパッケージングし (trans-packaging)、ウイルス粒子を形成して上清に放出されることを期待した。この上清をナイーブな培養肝細胞に接種しネオマイシン存在下で培養すると、感染が成立した場合のみ細胞内でレプリコン RNA が複製し、コロニーが形成される。

その結果、レプリコン複製細胞 Y3-4、Y7-9、G23-1 の培養上清からネオマイシン耐性細胞コロニーが形成された (図 2)。次に、コロニー形成能の高かった Y7-9 生細胞コロニーを単離増殖させ (Y7-9-3、Y7-9-9、Y7-9-26、Y7-9-27)、各々細胞から RNA を抽出し RT-PCR 法によって HCV ゲノムの非構造領域

(NS3-NS5B) の増幅を試みた結果、4 クローンすべてにおいて予想通りのサイズ (5.7 kb が検出され、レプリコン RN が実際に複製していることがわかった。以上から、1b 型レプリコン複製細胞に 1b/2a キメラ型または 1b 型の構造領域発現ベクターをトランスフェクションすることによって、ウイルスの外殻が細胞内のレプリコン RNA を trans-packaging し、ウイルス粒子として上清に放出させナイーブな細胞へ感染させることができた。

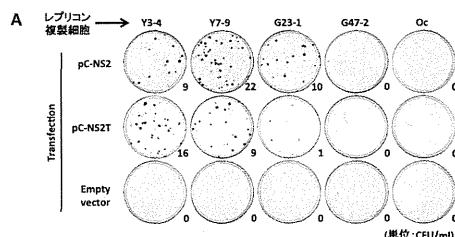


図 1. Trans-packaging によるコロニー

## 3. 再 trans-packaging によるコロニー形成能の増強

より多くのウイルス粒子形成が可能なレプリコン複製細胞を得るために、コロニー形成能の高かったレプリコン RNA 複製細胞 Y-9 から trans-packaging で形成された細胞コロニーをクローニングし (Y7-9-3)、再び構造領域発現ベクター (pC-NS2、pC-NS2T) をトランスフェクションし、trans-packaging 実験を行ったところ、ネオマイシン耐性細胞コロニー数は数倍に増加した (図 2A)。得られたコロニーからさらに 5 個のレプリコン複製細胞を単離 (TP2Y7-9-3-1, 3, 8, 9, 11)、または、プレートごとまとめて回収し (TP2Y7-9-3B)、それぞれ増殖させた。そして、これらのレプリコン複製細胞

それぞれに対して再度 trans-packaging 実験を行ったところ、細胞間でコロニー形成数にばらつきがあったが、TP2Y7-9-3-1 で最も多くのコロニー形成が認められた (図 2B)。DNA トランスフェクション効率の高い細胞ほどコロニー形成能が高く DNA トランスフェクション効率がコロニー形成能を決定する要因のひとつであると考えられた (図 2B 下)。

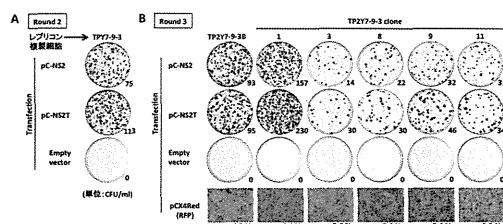


図 2. Trans-packaging 効率の高いレプリコン複製細胞クローンの選択

#### 4. レプリコン含有粒子の界面活性剤、タンパク分解酵素、RNase に対する抵抗性

trans-packaging により培養上清に放出されたレプリコン含有粒子が、通常の HCV 粒子と同様の形態であることを確認するために、レプリコン複製細胞 Y7-9-3-1 へ構造領域発現ベクターをトランスフェクションした培養上清を濃縮し、NP-40、Protease K、または、その両方で処理したのちに RNase A によるレプリコン RNA 分解の有無を確認した (図 3)。

NP-40 は界面活性剤であり脂質二重膜であるウイルス外殻を分解するが、ヌクレオカプシドを分解することはない。一方、Protease K はタンパク質分解酵素であり、ウイルス外殻を分解しないが、Core タンパク質 (ヌクレオカプシド) を分解する。どちらの構造領

域ベクターを用いても、NP-40、Protease K とともに加えない場合、予想通りのサイズのレプリコン RNA の増幅が認められた。一方、NP-40、Protease K のみを加えたものにおいても、RNase A の添加にも関わらず予想サイズの増幅が認められた。しかし、NP-40 と Protease K を両方加えた場合、増幅は認められなかった。このことは NP-40 と Protease K によってレプリコン RNA が二重に保護されていることを示している。すなわち、trans-packaging によって上清に放出されたウイルス粒子は、通常の HCV と同様、外殻およびヌクレオカプシドを有していると考えられた。

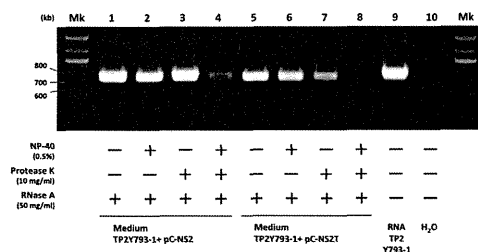


図 3. Protease 界面活性剤の影響

#### 5. 抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体によるレプリコン含有粒子の感染阻害

次に Trans-packaging 実験によって上清に放出されたレプリコン含有粒子が、通常の HCV 感染同様に HCV レセプターを介して感染するものであるか確認した。レプリコン複製細胞クローン Y7-9-3-1 へ構造領域発現ベクターをトランスフェクションした。そのウイルス上清を濃縮し、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体を添加することで感染阻害を試みた。その結果、コントロールと比較して、抗 CD81 抗体または抗 ApoE 抗体を添加した場合、コロニー形成能が



有意に減少した (図 4A、B)。これらのことから、trans-packaging で産生されたレプリコン含有粒子は通常の HCV と同様に CD81 および ApoE を利用して感染することが明らかになった。先の結果ともあわせ、trans-packaging で得られたレプリコン含有粒子は HCV と同様の感染性ウイルス粒子を形成していると考えられた。

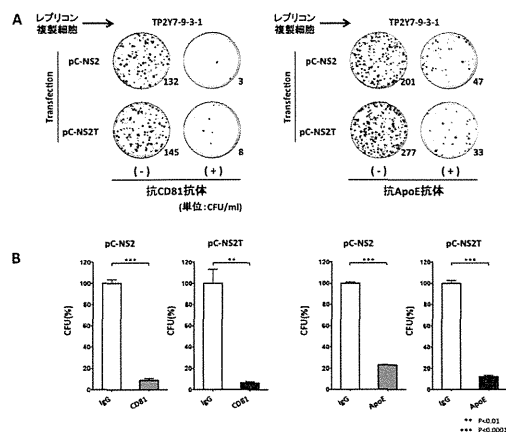


図 4. 抗 CD81、抗 ApoE 抗体による感染阻害

## 6. Trans-packaging 実験の反復

Trans-packaging により産生されるウイルス粒子の感染性は 1 回限りであるが、trans-packaging で得られた細胞に毎回構造領域発現ベクターを導入することで、trans-packaging を繰り返すことが可能かどうか検討した。

これまでの実験で、レプリコン複製細胞 TP2Y7-9-3、TP2Y7-9-3-1 へそれぞれ構造領域発現ベクター pC-NS2 および pC-NS2T を用いてすでに 3 回 trans-packaging を繰り返している (Round 3)。レプリコン複製細胞コロニーが形成される度にまとめて回収し、ネオマイシン存在下で培養した後、再度 trans-packaging 実験を繰り返し、

その都度細胞コロニー数をカウントした。その結果、少なくとも 7 回 (Round7) まで連続して trans-packaging が可能であった。形成された細胞コロニー数に増減はあったが、ほぼ安定して細胞コロニーが形成された。感染させられる細胞は毎回ナイーブな細胞なので、連続的な感染を可能にしたのはウイルス側の要因と考えられた。

## 7. trans-packaging 反復によるレプリコン遺伝子の変化

サブゲノムレプリコン RNA がウイルス粒子にパッケージされるために重要なアミノ酸配列を明らかにするために、繰り返しの trans-packaging の間もよく保存されているレプリコンアミノ酸配列の変化を解析した。

最初に樹立したレプリコン Y7-9 から得られた PCR クローン (Y7-9 #4, #7, #11, #17) およびそのコンセンサス配列 (Y7-9 Con) を比較した。さらに、最初の trans-packaging で形成されたレプリコン複製細胞 Y7-9-3 から得られた PCR クローン (TPY7-9-3 #1, #7, #8, #84) およびそのコンセンサス配列 (TPY7-9-3 Con) を比較した。これらコンセンサス配列を比較したところ 7 箇所 (E158A、Q711R、S761R、T1132I、V1155A、V1290L、E1293A) が trans-packaging で生じた変異と考えられた。さらに、2 回目の trans-packaging で形成されたレプリコン複製細胞 (TP2Y7-9-3-1) のコンセンサス配列においては上記の 7 箇所に加え、2 箇所 (A945V、P1351S)、計 9 箇所のアミノ酸変異が生じていた。6 回目の trans-packaging で形成されたレプリコン複製細胞 TP6Y7-9-3-1 の遺伝子配列をダイレクトシーケンスにより

決定したところ、上記 9 箇所の変異は完全に保存されていた。これら 9 箇所のうち 7 箇所は最初の trans-packaging で既に認められており、残り 2 箇所においても 2 回目以降保存されていることから、これらの変異がウイルス粒子のパッケージングにおいて重要な要因であると考えられた。一方、polyU 領域について、TP2Y7-9-3-1、TP6Y7-9-3-1 からそれぞれ 16 クローンずつ遺伝子配列を解析した。この配列は本来のレプリコンカセットベクターに由来する単一の配列であるが、配列および長さが多様に変化しており、特定の polyU 領域の配列のみが複製やパッケージングに有利であるとは言えなかった。

#### D. 考察

遺伝子型 2a 型の JFH-1 株が培養肝細胞に感染し、効率良く感染性ウイルス粒子を産生させるのに対して、1b 型 HCV 感染株の報告はあるものの感染効率の高いものはない。効率良い感染性ウイルス株の必要条件としては少なくとも複製効率が高いこと、ウイルスパッケージング効率が高いことが挙げられる。本研究においては、感染性ウイルス株樹立の予備段階として、まず、複製効率のよい新たなサブゲノムレプリコン複製細胞の樹立を試みた。さらに、これらの細胞を用いて trans-packaging 法を用いてパッケージング効率の高いウイルス RNA を樹立しようとした。

HCV の trans-packaging は申請者も含め、遺伝子型 2a 型の JFH-1 株またはそのキメラ株を用いて報告しているが、純粋に遺伝子型 1b 型を用いた報告はなく、本研究が 1b 型構造領域を用いて 1b

型サブゲノムレプリコンを trans-packaging した初めての研究である。反復 trans-packaging による HCV アミノ酸変化をみた限り、trans-packaging に重要と考えられる変位は 9 箇所であり、うち 6 箇所が NS5A に存在していた。NS5A タンパク質は core タンパク質と相互作用し HCV の粒子形成に重要であると考えられており、これらの変異が trans-packaging の際に core タンパク質との結合にかかわるものと考えられた。本来 NS5A は変異の多い領域で、HCV のパッケージングシグナル自体はおそらく 5' 非翻訳領域に存在すると予想されるが、これらの NS5A 変異がパッケージング効率に影響していると考えられる。本研究では界面活性剤、タンパク分解酵素に対する反応や HCV レセプター阻害実験などから trans-packaging で産生される粒子が本来の HCV 粒子と同様の構造を有していると考えられたが、密度勾配法や免疫電子顕微鏡観察などさらに詳細な検討が必要である。

今後、得られた 1b 型 HCV サブゲノムレプリコンと 1b 型構造領域を直接に結合し、本研究の最終的な目的である効率良くパッケージングされ、感染、複製する 1b 型全長 HCV 株を作製する予定である。本研究では 1b 型構造領域を固定して trans-packaging 実験に使用していたが、他の 1b 型構造領域に変えることで、ワクチン株の作製などへの応用が可能になると考えられる。

#### E. 結論

1b 型レプリコン複製細胞に、1b 型構造領域プラスミドを導入することで、

細胞内レプリコン RNA を効率よく trans-packaging するシステムを開発した。今後、得られた 1b 型 HCV サブゲノムレプリコンと 1b 型構造領域を直接に結合し 1b 型全長 HCV 株の樹立に発展させる予定である。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*, 84: 12048-12057, 2010;
2. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology*, 407: 152-159, 2010;
3. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami K, Shimotohno K. Lipoprotein component associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion Virol*, 1:19-26, 2011;
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*, 163:390-395, 2011;
5. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 142:152-164, 2012;
6. Dua H, Yoshimura K, Kobayashi N, Sugiyama K, Sawada JI, Saito Y, Morisseau C, Hammock BD, Akatsuka T. Development of monoclonal antibodies to human microsomal epoxide hydrolase and analysis of "preneoplastic antigen"-like molecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 260:17-26, 2012;
7. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Oshikawa H, Yokoyama K, Shimamura K, Nishiyama N, Mataka R, Irie T, Minamino Y, Okada C, Kurihara H, Ebinuma H, Saito I, Shimizu Y, Yoshida R, Hokari K, Sugiyama K, Hatsuse J, Yamamoto T, Kanai S, Miura S, Hibi T. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol*, 57 :837-843, 2012;

### 2. 学会発表

1. Sugiyama K, Shimizu Y, Hishiki T, Funami K, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. Establishment of a Cell Line Persistently Infected with Chimeric HCV of Genotypes 1b and 2a. 17th International symposium of hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010;
2. Hishiki T, Shimizu Y, Sugiyama K, Funami K, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. Apolipoprotein E isoform affects infectivity of HCV. 17th International symposium of hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010;
3. 杉山和夫, 下遠野邦忠. HCV 欠損ゲノムの臨床的、ウイルス学的解析. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW 2010 ワークショップ), 横浜, 2010;
4. Sugiyama K, Murakami Y, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Ujino S, Saito H, Saito S, Kato N, Hibi T, Takaku H. Infectious hepatitis C virus bearing genotype-1b subgenomic replicon by trans-encapsidation with the structural regions of genotype 1b. The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle USA, 2011;
5. Sugiyama K, Saito H, Ebinuma H, Takaku H, Hibi T. Metabolome analysis of the cultured hepatocytes persistently infected with Chimeric HCV (1b/2a). 第 70 回日本

- 癌学会総会, 名古屋, 2011;
6. Sugiyama, K., Saito H, Ebinuma H, Sakasegawa N, Murakami Y, Nakamoto N, Usui S, Ishibashi Y, Chu P, Wakayama Y, Saito Y, Kanai T, Hibi T. Usefulness of a long-term (over 2 years) cultured cell clone persistently and productively infected with chimeric HCV. The 63<sup>rd</sup> annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston USA, 2012;
  7. Chu P, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Sugiyama, K., Kanai T, Saito H, Hibi T. Recruited CCR9+ macrophages promote murine liver fibrosis through induction of TGF- $\beta$  in hepatic stellate cells. The 63<sup>rd</sup> annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston USA, 2012;
  8. 楮柏松, 海老沼浩利, 中本伸宏, 碓井真吾, 梅田瑠美子, 石橋由佳, 若山遊子, 菊池真大, 山岸由幸, 杉山和夫, 金井隆典, 齋藤英胤, 日比紀文. C型肝炎ウイルス持続感染における肝発癌と免疫異常: 高発癌リスク因子を中心とした検討. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  9. 碓井真吾, 海老沼浩利, 若山遊子, 楮柏松, 石橋由佳, 中本伸宏, 山岸由幸, 杉山和夫, 金井隆典, 齋藤英胤, 日比紀文. 当院における免疫抑制剤投与中のHBV感染の現状. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  10. 冨田謙吾, 寺谷俊昭, 鈴木貴博, 横山裕一, 岡田義清, 栗原千枝, 海老沼浩利, 齋藤英胤, 渡辺知佳子, 高本俊介, 穂刈量太, 川口淳, 永尾重昭, 杉山和夫, 金井隆典, 日比紀文, 三浦総一郎. コレステロール多量摂取は、肝星細胞の遊離コレステロール蓄積を介して、肝臓繊維化進展を引き起こす. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  11. 佐藤郁美, 齋藤義正, 永見早耶花, 酒瀬川典子, 福田真也, 木村真規, 杉山和夫, 海老沼浩利, 齋藤英胤. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)によるC型肝炎ウイルス(HCV)の増殖抑制効果. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  12. 杉山和夫, 齋藤英胤, 酒瀬川典子, 村上優子, 海老沼浩利, 中本伸宏, 梅田瑠美子, 碓井真吾, 石橋由佳, 楮柏松, 若山遊子, 齋藤義正, 日比紀文. 新たなHCV研究ツールとしてのHCV持続感染培養肝細胞およびその治癒細胞の樹立. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  13. 海老沼浩利, 齋藤英胤, 中本伸宏, 山岸由幸, 碓井真吾, 梅田瑠美子, 楮柏松, 石橋由佳, 若山遊子, 杉山和夫, 金井隆典, 日比紀文. Peginterferon (PEG)/ Rivabirin (RBV)併用療法の治療成績からみた高齢者とりわけ高齢女性にたいする今後の治療展望. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012;
  14. 村上優子, 杉山和夫, 齋藤英胤, 海老沼浩利, 中本伸宏, 酒瀬川典子, 齊藤聡, 金井隆典, 日比紀文, 高久洋. 1b型HCVレプリコン複製細胞内のレプリコンRNAを効率よく感染性粒子としてtranspackagingする方法. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012;
  15. 酒瀬川典子, 杉山和夫, 齋藤英胤, 海老沼浩利, 村上優子, 中本伸宏, 金井隆典, 日比紀文. 長期間の持続感染培養肝細胞におけるHCVゲノムの自然発生の遺伝子変異の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012;
  16. 小倉大直, 君塚圭亮, 杉山隆一, 日紫喜隆行, 下遠野邦忠, 杉山和夫, 高久洋. C型肝炎ウイルス(HCV)複製制御に係わる宿主因子Hsp70の機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012;
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。

厚生労働省難治性疾患対策研究事業  
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

血中 miRNA 発現と HCV 持続感染の関係

分担研究者 村上善基 大阪市立大学・肝胆膵内科 病院講師

研究要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は感染すると高率に慢性化し、年余の経過を経て慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。慢性C型肝炎患者は血中でHCVRNAが検出されるが、血中でのHCVRNAの存在様式は明らかになっていない。今回血中でのHCVRNAの存在様式の解析を行いウイルスの持続感染メカニズムを明らかにすることを試みた。

A. 研究目的

我が国のHCV感染者は全人口の約1.6%と推定されており、HCVは感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する。

マイクロRNAは20-22bpの蛋白をコードしていない小分子RNAで現在ヒトマイクロRNAは約1600種類同定されている。マイクロRNAは生物の発生、細胞の分化など生命現象に深く関与して庵、その発現異常は疾患と深く関係しており、特に発癌、ウイルス感染との関連が注目されている。我々はマイクロアレイ解析を行い、ウイルス性肝炎の線維化の進展、肝発癌にマイクロRNAの発現異常が深く関係している事を今までに明らかにした。血清中のエクソソームと呼ばれる直径50-100nmの小胞体は、non-coding RNAやサイトカインを細胞特異的に伝達する事

が知られている。最近ウイルス粒子を含んだエクソソームがウイルス感染の伝播する事、またB、T細胞や樹状細胞などから放出されるエクソソームはそれぞれ固有のマイクロRNA発現プロファイルをもっている事が報告された、これらの知見はエクソソーム中のマイクロRNAはウイルス感染に関与している可能性を示唆するものである。

本研究では血中におけるHCVRNAの存在様式を明らかにし、HCV感染肝細胞から非感染肝細胞や肝細胞周辺の星細胞、類洞構成細胞などへの細胞間情報伝達に関与しているマイクロRNAを同定し、感染肝細胞から周辺肝細胞の感染防止、線維化に関与している肝星細胞の活性化を防止し、新たな観点からのウイルス感染方法の開発を目標とする。

## B. 研究方法

### 血液中における肝炎に関係する miRNA と HCVRNA の存在様式の解析

末梢血中における HCVRNA は多い症例で  $10^6$  コピー/ml 以上存在しているが、ほとんどが非感染粒子である。通常血中の RNA は RNA 分解酵素が豊富に存在している血中では安定に存在できないことが予想される。そのため RNA 分解酵素から保護された状態で存在していることを考え、(1) RNA 結合蛋白との共存、(2) HDL/LDL と共存、(3) エクソソームに包埋、について検討した。

#### (0) 血中 HCVRNA と miRNA の関係

血清中より HCVRNA 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。

(1) Argonaute2(Ago2) と HCVRNA の関係  
血中で最も豊富に存在している RNA 結合蛋白である Ago2 によって免疫沈降(IP)を行い、miRNA と HCVRNA が共存するか否かを検討した。

#### (2) 脂質蛋白と HCVRNA の関係

HDL/LDL は血液中の様々な物質を運搬することが知られている。慢性 C 型肝炎、正常肝それぞれより液体クロマトグラフィーにてリポ蛋白の画分を行い、HDL/LDL/VLDL それぞれの画分を作成した。

それぞれの画分より HCVRNA の存在様式と miRNA の発現パターンを解析した。

#### (3) エクソソームと HCVRNA

細胞間情報伝達を行うエクソソームには miRNA が豊富に存在している。慢性 C 型肝炎 64 例、正常肝 12 例よりエクソソーム画分を行い、それから total RNA を抽出しマイクロアレイによって miRNA 発現解析を行った。さらにこの結果を確認するために in vitro の感染実験を行った。肝がん細胞株の huh-7.5 に HCV 感染株である JFH-1 を感染させたものとさせなかったものから同様にエクソソーム画分から miRNA の発現解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成 18 年、G-188「肝発癌に関与している miRNA をコードしている領域の SNP 解析」承認]、平成 19 年、G-219「miRNA 発現プロファイルを利用した C 型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換え DNA 実験計画平成 19 年、070102「マイクロを用いた HCV 複製制御の試み」について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成 19-23)。

この中で肝疾患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ている。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を適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施している。

### C. 結果

#### 0) 血中 HCVRNA と miRNA の関係

血清中より HCVRNA 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。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。

(1) Argonaute2(Ago2)と HCVRNA の関係  
慢性 C 型肝炎患者血清と正常肝血清を用い Ago2-IP を行った所、HCVRNA は Ago2 結合画分に血清中の 1/7 から 1/36 の量比で存在した。Ago2 に非特異的な結合を除外するために mouse-IgG にて IP を行った所 HCVRNA との結合は認めなかった。一方 miRNA の結合について Ago2-IP に hsa-miR-AC が Ago2 画分に存在したが、

mouse-IgG による非特異的な結合を認めなかった。

#### (2) 脂質蛋白と HCVRNA の関係

HCVRNA は慢性肝炎から得られた VLDL 画分より豊富に検出されたが、他の画分からは検出されなかった。慢性 C 型肝炎と正常肝それぞれから VLDL/LDL/HDL 画分を行いマイクロアレイによって miRNA 発現解析を行った。全体的に慢性肝炎で発現が検出できず、正常肝のみで発現解析が見られた miRNA が存在していた。

#### (3) エクソソームと HCVRNA

正常肝で 12 例中 11 例または 12 例検出でき、慢性 C 型肝炎 64 例中 0-2 例で検出できた miRNA は 10 種存在した。さらに肝がん細胞株の huh-7.5 に HCV 感染株である JFH-1 を感染させたものとさせなかったものから同様にエクソソーム画分から miRNA の発現解析を行った所 2 例の miRNA が HCV の存在している症例で検出できなかった。

### D. 考察

慢性 C 型肝炎と正常肝の間で血中の miRNA の発現を比較すると、慢性 C 型肝炎にて発現の低下している、または発現が検出できない miRNA が存在したが、逆に正常肝で発現が低下、または発現が検出できない miRNA は存在しなかった、このことより血中に HCVRNA が存在すると miRNA の発現、または細胞から血中への miRNA の移行が低下することが示唆された。また血中の HCVRNA は Ago2 や VLDL な

どの RNA 結合媒体と存在しているか、エクソソームなどの粒子に含まれていることが明らかになり、そこに決まった miRNA が共存していることが今回の解析で示された。これらのことはエクソソームはウイルス粒子(HIV)を運ぶ、免疫担当細胞(B細胞、T細胞、樹状細胞)それぞれにマイクロRNA発現プロファイルをもっており、免疫に深く関与している。以上のことよりHCV感染によって末梢血中のHCVRNAは末梢血中のmiRNAの発現の変化を将来し、ウイルスの感染、細胞間の感染の拡大、持続感染に深く関与していると考えられる、またエクソソームは細胞特異的に情報伝達を行う事が報告されており、適切なマイクロRNAを選択する事で、抗ウイルス遺伝子治療ができる事が期待される。またエクソソーム中のマイクロRNAの発現プロファイルを得る事で慢性ウイルス性肝炎の状態を把握できる新たなバイオマーカーとしての利用が期待される。

#### E. 結論

血中のHCVRNAはRNA結合蛋白、リポ蛋白と共存している。HCVRNAはmiRNAとも会合している可能性が高い。C型肝炎ウイルスに感染すると末梢血miRNAの発現が抑制される可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

論文発表 (英文、原著)

1. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama 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.
2. 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
3. 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.

(和文、総説)

1. 村上善基、棚橋俊仁、田口善弘 肝疾患におけるmiRNA診断細胞工学 2013; 1:79-84

#### H. 知的財産権の出願、登録状況



- |  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 特許取得  | 2. 実用新案登録          |
| 1. テスト体液サンプルの分離方法 村上善基 特願2012-37586 (H24-2-23) | なし<br>3. その他<br>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

ヒト遺伝子編集酵素による HCV 感染制御機構の解析

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

研究要旨： C 型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムにはさまざまな遺伝子変異が認められ、病態や治療効果などに関連していることが知られている。一方、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応答し、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。この、肝細胞に発現した遺伝子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。

・ 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は 9,500-9,600 塩基からなるプラス鎖 RNA をウイルスゲノムとしてもっている。事実、HCV 感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クローンの集合体としてウイルス感染が成立しており、この quasispecies を構成する多彩な変異ウイルスが、HCV 感染時の病態形成や抗ウイルス治療への感受性・抵抗性と深く関連することが知られている。しかしながら、このような HCV ゲノム変異が生じる時期や頻度、分子機構については不明な点が多い。

一般に RNA ウィルスに遺伝子変異が生じる要因としては、これまではウィルス側の因子が重要と想定されてきた。HCV ゲノム複製の際には、非構造蛋白質の中に含まれている NS5B 遺伝子がコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが中心的な役割を担っているものと考えられて

いる。しかしながら、RNA ウィルスである HCV のもつ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼには、DNA ポリメラーゼがもつような修復機能がないため、RNA ポリメラーゼによるウイルスゲノムの複製の際に生じる読み間違いが、修復されることなくそのまま子孫に受け継がれていくことになる。このため、多様な遺伝子変異をもつウィルスクローンが産まれてくると考えられている。

他方、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が近年、同定されている。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリー、ならびに Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は塩基配列上のシチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、

標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。一方、ADAR ファミリー分子は塩基配列上のアデニン (A) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる RNA の塩基配列にイノシン (I) が生じることになる。これらの遺伝子編集酵素の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、いくつかの分子は生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることがわかってきている。例えば、APOBEC3G や APOBEC3F は、リンパ球に感染したヒト免疫不全ウイルス (HIV) の遺伝子配列に変異を導入することにより、宿主の免疫応答に際して抗ウイルス分子として機能していることが知られている。また、RNA 配列への編集作用をもつ ADAR ファミリー分子も、D 型肝炎ウイルスのゲノム配列上の特定の塩基部位に変異を誘導することが以前から知られていたが、最近、HCV に対しても増殖抑制作用を発揮する可能性が示唆されるようになってきた。

他方、我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染時に惹起される炎症反応、ならびに HCV のもつ Core タンパク質による転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化作用を介して、APOBEC ファミリーの Activation induced cytidine deaminase (AID) や APOBEC2 が肝細胞に発現誘導されることがわかってきた。同様に *in vitro* における肝培養細胞の解析から、HCV 感染にともなって産生されるインターフェロンの刺激により、肝細胞に APOBEC3G と ADAR1 が発現誘導されてくることも明らかとなった。このように、HCV 感染により惹起される慢性肝疾患を伴った肝細胞ではさまざまな遺伝子編集酵素が発現誘導されているが、その生理的意義については不明のままである。

そこで、これらの遺伝子編集酵素による抗ウイルス活性ならびに遺伝子異常の導入活性の可能性に着目し、HCV ゲノムに生じる遺伝子変異の生成に宿主側の分子が寄与していることを検証することにより、新しい抗 HCV 制御機構を明らかにすることを本研究の目的とする。

## ・ 研究方法

肝細胞に発現した APOBEC family 分子、ならびに ADAR family 分子による HCV ゲノムに対する遺伝子変異生成作用の有無を明らかにする目的で、Huh-7.5.1 細胞に HCV クローンの JFH-1 株を *in vitro* で感染させるモデルを活用した。Huh-7.5.1 細胞に JFH-1 株を感染 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 回収を行った。コントロールとしては、GFP 発現レンチウイルスベクターを併用した。引き続き、HCV ゲノムを high-fidelity RT-PCR 増幅~回収の上、amplicon を作成し、遺伝子変異の生成の有無の評価は、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 (IRoche 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。

## (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を含む遺伝子組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則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「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)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸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換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

## ・ 研究結果

Huh7.5.1細胞への任意のタンパク発現誘導は、レンチウイルスベクター系を用いて実施した。まずはじめに、ヒトAPOBEC2, ADARB1, AID,それぞれのcDNAをクローニングし、レンチウイルスベクターに挿入、それぞれの発現ベクターのコンストラクトを作成した。このレンチウイルス発現ベクターを用いたHuh7.5.1細胞への発現誘導の効率は、同時に作成したGFP発現レンチウイルスベクターにより確認した。

引き続き、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,それぞれの発現レンチウイルスベクターの発現導入を行った。APOBEC2, ADARB1, AID持続発現の3週間後に細胞からRNA回収を行った。前年度に行った、次世代シーケンサーを用いたヒト臨床検体中のHCV全ゲノムの塩基配列決定の結果をふまえ、HCVゲノム領域中でも変異の多様性の少ないNS3領域を選択し、同領域HCV RNAのampliconを特異的primerとhigh fidelity増幅反応により作成した。これらのampliconを用いた次世代シーケンサーを行ったところ、コントロール、GFP-, ADARB1-, APOBEC2-, AID-発現レンチウイルス検体でそれぞれ、平均3,835,484, 4,445,836, 4,980,586, 4,979,681, 2,854,318

read数の塩基が決定され、個々の塩基部位の平均coverageはそれぞれ、4,604, 5,337, 5,979, 5,978, 3,427塩基を同定することができた。

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実施したところ、APOBEC2を誘導発現したHuh-7.5.1細胞では計8か所に新たに遺伝子変異が生成しており、変異頻度は各塩基部位で1.0-2.7/1,000塩基の頻度であった。同様に、ADARB1発現細胞では2か所に遺伝子変異の出現が見られ、変異頻度は各塩基部位で1.8ならびに9.7/1,000塩基の頻度であった。

以上の結果から、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。

## ・ 考察

我々のこれまでの検討により、さまざまな遺伝子編集酵素ファミリー分子が、HCVのコードするウイルスタンパクの直接作用、ならびにHCV感染を契機とする炎症反応やインターフェロン産生に応答する形で肝細胞に発現誘導されることが明らかとなっている。今回、*in vitro*でのHCV感染系を用いて、これらの遺伝子編集酵素の中でもRNA配列に対して塩基変化を誘導する作用をもつ分子の発現下においては、HCVのウイルスゲノム配列に遺伝子変異が誘導されることがわかった。HCVゲノム変異には、ウイルス自身の複製エラーにより生じたものと、宿主遺伝子編集酵素により誘導されたものが混在しているものと推定され、宿主により誘導されたウイルスゲノム変異が病態形成や治療に対してどのように寄与しているかを特定することが、HCVに対する新しい抗ウイルス戦略の構築につながるもの