

201227008B

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22年度～24年度 総合研究報告書

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22年度～24年度 総合研究報告書

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   | 1  |
| 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<br>下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター) |    |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表                                      | 35 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷り                                       | 49 |

## I. 総合研究報告

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

研究者名 下遠野 邦忠、 所属 国立国際医療研究センター 特任部長

研究要旨：

C型ウイルス感染による慢性肝炎、肝硬変、肝がんの発症機構を理解し、予防および治療に役立てる方策を見いだすべく、平成22年から24年の3年間研究を推進した。限られた時間と限られた人材でこれらの疾患の発症機構を網羅することは困難であるために、本研究班が成立する前の研究進展状況をさらに発展させる事を主な目的とするとともに、新たな研究展開が期待できる若手研究者の参画を心がけた。焦点を絞って進める様に勤めたが、それでも下記に示すように多岐にわたる内容になった。研究内容は、（1）ウイルス複製を制御する宿主要因を明らかにして、感染を阻止する方策を見いだす、（2）HCV感染による宿主の代謝変化やその他細胞の性質を変える要因の分子基盤を明らかにする、（3）感染細胞が増殖能を獲得する分子基盤を明らかにする、（4）HCV感染増殖を抑制する宿主の自然免疫機構、（5）ウイルスによる宿主の情報制御の機構解析などを行った。それぞれの研究成果は以下の通りである。（1）HCV増殖を制御する因子とその機能解析；(i)HCVの翻訳反応にHsp90が重要な働きをしている事を見だし、Hsp90阻害剤によりウイルス増殖が抑制された。(ii)HCV感染により細胞内にP-bodyと呼ぶ凝集体が生じた。P-bodyはmRNAの働きを制御するオルガネラのひとつであり、感染細胞の脂肪滴周辺に集合する事が明らかになった。（2）HCV感染と代謝変化に関して；(i)HCVの放出にリポ蛋白質の細胞外輸送経路に関与する宿主因子が関与した。特にアポリポ蛋白質（Apo-E）はウイルス粒子に会合しており、感染初期に重要な働きをした。Apo-Eのアイソフォームの違いにより、ウイルス感染性は大きく影響を受けた。Apo-E2産生細胞からは感染性粒子の産生は少なくなる事を見出した。(ii)HCV感染にはリポ蛋白質受容体が重要な働きをするが、候補受容体のノックダウン解析などから、LDLR, SR-BIの両受容体が細胞膜表面に発現することが、感染効率を上げている可能性が考えられる結果を得た。(iii)HCV感染によるグルコースの産生亢進が見られ、それに働く因子PEPCK, G6Pase等が活性化される事を見だし、その活性化機構を明らかにした。（3）HCV感染により宿主遺伝子が恒常的に発現増加する遺伝子と発現抑制される遺伝子が存在する事をみだし、これらの変化がDNAメチル化による可能性が考えられた。また、持続感染細胞においてDHCR24やKu70, TOM70などの恒常的な産生を見出した。DHCR24はコレステロール合成に関わる酵素であるが、p53に働き細胞周期を変化させる作用もある事が分かった。（4）宿主の自然免疫反応の一つにRIGIの活性化が知られているが、HCV感染はRIGIを活性化するRipletを分解することを見出した。また、Ripletは細胞回転を制御する働きを示すことも見出した。（5）C型慢性肝炎治療における効果予測の手段としてmiRNAの変化を指標にできないか検討し、数種類のmiRNAの組み合わせが有効であることを見出した。また、肝疾患に特有のmiRNAの解析も行い疾患とmiRNAとの関連性を探った。（6）感染者体内にはゲノム配列が異なる複数のウイルスが共存しており、抗ウイルス剤効果に影響を与えられられる。ウイルス感染により遺伝子編集酵素が誘導発現されることを見出し、これらの酵素の作用が偽ウイルス集団を形成する要因の一つになると考えられる知見を得た。（7）宿主の遺伝情報の流れをコントロールする要因の解析をおこない、ウイルスタンパク質による情報伝達制御に加えて、メチル化亢進などによるエピジェネティック変化が感染細胞の多くの遺伝情報制御に関わっていることを見出した。得られた情報は多岐に亘るが、その中にはすぐに抗ウイルス因子の探索に役立つものに加えて、感染や疾患予防に向けた挑戦に新たな視点を与えるものもある。

## 分担研究者

|       |                         |     |
|-------|-------------------------|-----|
| 高久 洋  | 千葉工業大学工学部               | 教授  |
| 堀田 博  | 神戸大学大学院医学系<br>研究科       | 教授  |
| 加藤 宣之 | 岡山大学大学院医歯薬学<br>総合研究科    | 教授  |
| 小原 恭子 | 鹿児島大学<br>共同獣医学部         | 教授  |
| 杉山 和夫 | 慶応義塾大学<br>医学部           | 准教授 |
| 村上 善基 | 大阪市立大学大学院<br>医学研究科 病院講師 |     |
| 丸澤 宏之 | 京都大学大学院<br>医学研究科        | 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<br>医学研究科       | 講師  |
| 有海 康雄 | 熊本大学エイズ学<br>研究センター      | 准教授 |

### A. 研究目的

C型ウイルス感染による慢性肝炎、肝硬変、肝がんの発症機構を理解し、予防および治療に役立てる方策を見いだす必要がある。これらの疾患への対処のひとつには、原因となるウイルスを完全に排除することである。そのためにHCV複製を制御する宿主要因を明らかにし、HCVの複製を人為的に制御する方法を見出すことは疾患発症の予防につながる。これまでにウイルスを制御する種々の宿主因子が明らかにされているが、これらの宿主因子を標的にした抗ウイルス作用を示す薬剤の開発に加えて、新たな宿主標的を見いだして創薬に結びつけることが重要である。また、これまでにHCV感染により発症する肝疾患の中で、いくつかの特徴が明らかにされている。それらには脂肪代謝異常に起因する脂肪肝やII型糖尿病などがある。Non-alcohol fatty liver disease (NAFLD)と呼ばれる疾患が存在することが知られている。本疾患はウイルス感染や飲酒などを原因とせず、栄養多過による肝脂肪の蓄積を原因とするものである。これらの患者において non-alcohol steat hepatitis (NASH) を伴うと肝疾患が増悪化する。NASHは持続的な炎症、糖尿病などが発症要因と考えられている。HCV感

染肝にみられる、脂肪代謝の異常、II型糖尿病の発症に加えて持続的炎症は、NAFLDから肝疾患を発症する過程ともよく似ていると思われる。従って、慢性C型肝炎患者における糖尿病や脂肪代謝異常の機構を明らかにして、これらの疾患を軽減することにより、肝疾患の進展を制御することが可能になれば、C型肝炎以外に、NAFLDの肝疾患の増悪化の予防にも道を開くと期待される。

HCV感染による宿主の反応は多岐にわたる。上に述べた代謝変化やII型糖尿病などは、ウイルスが増殖するために必要な環境を宿主内に構築するための結果であると思われる。その他の宿主機能も変化させて、ウイルスはより効率よい増殖の場を感染細胞内に樹立するので、その要因を明らかにし、取り除くことができればウイルスの増殖を抑制し結果的に排除に結びつく。

HCV感染と肝がん発症との関連を結びつける分子機構は未だ解明されたとはいえない。がん化した組織内のHCVの存在量は、全てのがん細胞に存在すると考えた場合に比べきわめて少量である。すなわち、HCVが腫瘍細胞の状態を維持する働きをしているよりも、腫瘍化の過程で重要な役割を果たしていると考えられる。肝がん組織においてはベータカテニンシグナル経路やその他の遺伝子変化が比較的共通に見られる。このような遺伝子の異常化とHCV感染との関連性を解明することは肝がん発症の分子機構を明らかにする上に重要である。HCV感染が宿主の遺伝情報の制御をどのような手段で行っているかの全容解明が必要である。感染性因子による発がんには持続的な炎症が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。HCV感染がどのようにして炎症を惹起し、持続させるのかを明らかにしてそれを阻止できるようになれば、発がんを予防可能にできるばかりでなく、慢性疾患をもたらす他のウイルスによる疾患の予防にも応用できると考えられる。

HCV感染による疾患発症の原因には種々の要因が考えられ、ひとつの要因が解明できたからと言っても、それで疾患発症の機構解明にはならないし、予防法を確立できることにもならない。HCV感染で考えられる宿主側の多くの変化を網羅的に解析して、その中から何が最も重要な疾患要因になるかを明らかにしていくことが必要である。

本研究ではこのような現状を加味して、ひとつのテーマに絞ることなく多方面から研究を進めつつ、疾患発症に重要でかつ人為的な手法を取り込むことにより予防や治療を可能にする要因を明らかにすることを目指して研究を行った。

## B. 研究方法

HCV 感染による肝疾患発症には多くの機構が重なりあって、その働きが重なり、疾患として顕在化すると考えられる。関与する機構がどのようなものであり、どのくらい存在するのか、宿主の遺伝的な要因との関連性が存在するのかなど、不明な点が多い。そのために「目的」の項でも述べたように、多角的な方面から解析研究を進めてその中から疾患発症と強い関連性がある、あるいは関連性が期待できる成果が得られることを期待した。また、今後、新たな展開が期待される研究の進め方や手技も考えた。そのために本研究で取り扱った主なテーマは以下の通りである。

(1) ウイルス複製を制御する宿主要因を明らかにして、感染阻止に向けた研究を行う、(2) HCV 感染による宿主の代謝変化やその他細胞の性質を変える要因の分子基盤を明らかにする、(3) 感染細胞が増殖能を獲得する分子基盤を明らかにする、(4) HCV 感染増殖を抑制する宿主の自然免疫機構を解析する、(5) ウイルスによる宿主の情報制御の機構解析。(6) 感染者体内のゲノム配列の多様性の蓄積機構と、その意義を解析する。(7) 感染による宿主の情報伝達変化の分子基盤を明らかにする。

(1) ウイルス複製を制御する宿主要因を明らかにし、感染阻止に向けた研究。

1) Hsp90, Hsp70 による HCV 複製制御 (高久)

i) Hsp90 阻害剤 17-AAG および MG132 による HCV 翻訳阻害効果の検討を HCV full genome replicon cells (NNC#2 細胞) を用いて行った。また、HCV IRES 活性への影響は pHCV IRES-luc および pEMCV IRES-luc を作製し、Huh7 細胞に導入して、17-AAG または MG132 の影響を調べた。

ii) 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、anti-Hsp90 Ab を用いて会合を解析した。Hsp70 阻害剤 (KNK437) による HCV 複製

への影響は JFH1 感染 Huh7.5 細胞培養上清中の HCV-core タンパク質濃度を測定し評価した。

Hsp70 の HCV 複製制御への影響は、JFH1 株感染 Huh7.5 細胞を Hsp70-siRNA で処理し、その培養上清中の HCV-core タンパク質濃度を測定して評価した。Hsp70 阻害剤 (KNK437) による HCV RNA 翻訳機構への関与は KNK437 処理した Huh7/NNC#2 細胞抽出液中の各 eIF3 subunit (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i) および 40S ribosomal subunit (rp3, rp6) を、subunit 特異的抗体を用いて Western blot 法で検出した。

2) HCV 感染による細胞蛋白質の局在変化の解析 (有海)

i) ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、細胞を固定後、MOV10, DDX6, HCV Core の各タンパク質を、各抗体を用いて可視化した。また、JFH1 感染 RSc 細胞あるいは HuH-7 由来全長 HCV-O RNA 複製 O 細胞に GFP 融合 APOBEC3G (A3G-GFP) あるいは HA-tagged MOV10 を強制発現させ、HCV 感染や HCV 複製による APOBEC3G 及び MOV10 の細胞内局在の変化を解析した。

ii) APOBEC3F 及び APOBEC3G の HCV 生活環における役割の解析

APOBEC3G-HA あるいは APOBEC3F-HA を恒常的に発現する RSc 細胞を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法、ウエスタンブロット法と ELISA 法で定量した。培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。同様に O 細胞に APOBEC3F あるいは APOBEC3G を強制発現させ、HCV 複製レベルに対する影響について検討を行なった。

iii) MOV10 の HCV 複製における役割

MOV10 を siRNA でノックダウンさせた RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させた後に、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量を定量した。培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。MOV10 をノックダウンした O 細胞についても MOV10 をノックダウンして HCV 複製レベルの検討を行なった。

3) 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)

HCV-1 型ウイルスの培養細胞における感染増殖系を樹立する目的で、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作成し、それを基にして完全長ゲノムを構築して感染複製能を解析した。

(2)HCV 感染による宿主の代謝変化やその他細胞の性質を変える要因の分子基盤。

1)HCV 粒子と会合する脂肪成分の解析 (下遠野)

i) HuH7.5 に JFH1 を感染させ、その上清を濃縮、密度勾配遠心によりウイルスを分画する。得られたウイルス粒子について、リポ蛋白質に作用するリパーゼ処理を行い粒子の物理的な性状の変化と感染性との関連を解析した。

ii) HCV をゲル濾過により分離し、粒子の大きさと感染性との関連性を解析した。

培養細胞から産生されたウイルスの感染性は密度が低い画分に存在する事が知られている。ウイルスの性状と感染性をさらに調べるために、ウイルスの大きさと関連で解析を進めた。それにより、感染性と粒子性状との関連がさらに理解できるようになると期待した。

2)HCV 感染による糖新生を制御する機構の解析 (堀田)

i) 転写因子 FoxO1 の細胞内局在を調べた。また、抗リン酸化 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 の量を調べた。

ii) Akt 活性化のリン酸化状態を調べ、Akt 活性化の指標とした。

iii) JNK のリン酸化状態を調べ、JNK 活性化の指標とした。一部の実験では JNK 活性化の影響を解除するために、JNK 特異的阻害剤である SP600125 を用いた。

iv) ミトコンドリア障害及び ROS 産生を MitoSOX™ Red を加えて培養し、共焦点レーザー顕微鏡によりミトコンドリアの ROS 産生を観察した。一部の実験では ROS の影響を解除するために、抗酸化剤である *N*-acetyl cysteine (NAC) を用いた。

v) PEPCCK mRNA 及び G6Pase mRNA の量を、特異的プライマーを用いた定量的 qRT-PCR により調べた。

以上の実験は HCV の各タンパク質 (core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) を発現するプラスミドを導入した一過性発現細胞を用いて行った。

vi) MKP3 発現を定量的 qRT-PCR 法により定量した。MKP3 タンパクは特異抗体を用い

たウエスタンブロット法により測定した。MKP3 の細胞内局在を蛍光抗体法により解析した。

vii) MKP3 と FoxO1 の結合免疫沈降後、電気泳動後、ウエスタンブロット法により解析した。

viii) 転写因子 FoxO1 のリン酸化状態を抗リン酸化 FoxO1 抗体及び抗 FoxO1 抗体を用いて解析した。

ix) MKP3 発現における ROS 産生及び JNK 活性化を抗酸化剤である *N*-acetyl cysteine (NAC) で細胞を処理して調べた。JNK 活性化の影響は、JNK 特異的阻害剤 SP600125 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。

(3)感染細胞が増殖能を獲得する分子基盤。

1) HCV 感染により発現誘導される単クローン抗体の樹立 (小原)

HCV の持続発現により誘導される腫瘍原性亢進機序を解明するため HCV 発現継代細胞をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。樹立した単クローン抗体は 1,000 種以上であり、この中で HCV 発現継代細胞や HCV 陽性肝癌患者組織で発現が亢進する分子を認識するクローンを得た。

i) 発現解析・阻害剤・細胞培養:

HCV 遺伝子の発現は、RT-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。

ii) 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、U18666A は 10mg/kg、2-152a 抗体は 400mg/20gB.W.、PEG-IFN アルファ (中外) は 30 マイクログラム/g 腹腔内投与を 2 週間行った。血中の HCV 量を定量 PCR (Gastroenterology 1999) で測定した。

2)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、培養上精中に放出される 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。

(4) HCV 感染増殖を抑制する宿主の自然免疫機構(押海)。

遺伝子改変マウスを用い、生体内に於ける HCV に対する自然免疫応答の解析を行った。さらに、試験管内の解析では、遺伝子改変マウスより単離した樹状細胞やマクロファージ、肝細胞を使用し、遺伝子型 2a の JFH1 株の HCV や 1b の全長のレプリコン等を用いた。

(5) ウイルスによる宿主の情報制御の機構解析。

1) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析 (加藤)

樹立時の OL、OL8、OL11 および OL14 ヒト肝臓細胞とこれらの細胞を 2 年間継代培養した細胞[OL(2Y)、OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y)]からそれぞれ Total RNA を調製した。得られた Total RNA を用いて、RT-PCR 法により 5' 末端から NS2 領域までの 5.1 kb と NS3~NS5B 領域までの 6 kb を増幅した。逆転写酵素は Primscript(Takara) を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた。増幅した DNA 断片 (5.1kb と 6kb) を pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的に得られた 5~10 クローンの塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列を相互に比較し、GENETYX-MAC プログラムを用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。

i) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

前項で得た Total RNA[OL14 と OL14(2Y) を除く]を用いて、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子)による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

また、OL8 細胞と OL11 細胞に IFN-gamma(1,000 IU/ml)処理して、治癒細胞 OL8c と OL11c を作成した。OL8c 細胞と OL11c 細胞を 2 年間継代培養して、OL8c(2Y)細胞と OL11c(2Y)細胞を得た。

これらの細胞についても、上述の cDNA マイクロアレイ解析を行った。OL8(2Y)と OL11(2Y) 細胞についても、IFN-gamma(1,000 IU/ml)により治癒細胞 OL8(2Y)c と OL11(2Y)c を作成した。

OL8 細胞と OL11 細胞について、セルバンカーにて-80 度で保存してあった樹立時の細胞[OL8(OY)と OL11(OY)]、2 年間培養後の細胞[OL8(2Y)と OL11(2Y)]および 3.5 年間培養後の細胞 [OL8(3.5Y) と OL11(3.5Y)]を再培養し、それぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、選択した遺伝子の発現レベルを定量的 RT-PCR 解析により調べた。

OL8c と OL11c についても、同様に作成時の細胞[OL8c(OY)と OL11c(OY)]、2 年間培養後の細胞[OL8c(2Y)と OL11c(2Y)]および 3.5 年間培養後の細胞[OL8c(3.5Y)と OL11c(3.5Y)]を再培養し、それぞれの細胞から Total RNA を調製して、選択した遺伝子の発現レベルを定量した。

定量的 RT-PCR 解析により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。

ii) HCV-RNA の長期複製による宿主の miRNA の変動解析

OL8(OY)、OL8(2Y)、OL11(OY) および OL11(2Y)細胞、および治癒細胞である OL8c(OY)、OL8c(2Y)、OL11c(OY)および OL11c(2Y)細胞から miRNA を含む Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、Agilent 社の Human miRNA rel 16.0 によるマイクロアレイ解析を行った。

iii) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現レベルの変動解析

長期継代培養を施した OL8 細胞について、セルバンカーにて-80 度で保存してあった樹立時の細胞[OL8(OY)]、0.5 年、1 年、1.5 年および 2 年間培養後の細胞[それぞれ OL8(0.5Y)、OL8(1Y)、OL8(1.5Y)および OL8(2Y)と表記]を再培養し、70-80% confluent になった時点において、それぞれの細胞から Total RNA を調製し、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 の発現レベルを定量的 RT-PCR 法により調べた。

OL8(OY)細胞や 3.5 年間培養した OL(3.5Y)細胞に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、48 時間後にそれぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、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。

iv) HCV-RNA の長期複製により発現亢進した遺伝子と肝病態の進展との関係  
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 で公表済み; 金沢大学の金子周一博士と本多政夫博士との共同研究) を用いて、本研究により得られた HCV-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肝病態の進行との相関関係がないかを検討した。

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。

2) C 型肝炎患者治療応答に関するマイクロ RNA とその標的遺伝子同定 (村上)  
ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織 99 例より 470 種のマイクロ RNA 発現とインターフェロン関連遺伝子 237 の解析をマイクロアレイにて解析した。標的遺伝子同定のため、miRanda と Targetscan の二種のアルゴリズムを用いてマイクロ RNA が塩基配列上標的として認識する候補遺伝子を絞り込んだ。さらに in vitro で肝癌細胞株にマイクロ RNA を過剰発現した際に標的遺伝子を認識しない RNA(negative control)を導入したときに発現が低下し、マイクロ RNA の機能を低下させた際に発現が亢進する遺伝子を探索した。

i) マイクロ RNA による HCV 複製コントロール解析

マイクロ RNA の標的遺伝子検索アルゴリズムを用い、HCV レプリコン(OR6: genotype 1b 型レプリコン、1βR:インターフェロン α/β レセプターを変異させた genotype 1b 型レプリコン)を標的とするマイクロ RNA を解析した。

ii) 血液中における肝炎に関する 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<sup>6</sup> 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ために安定に存在できないと予想される。そのため血中に検出された RNA は分解酵素から保護された状態で存在していると考え、(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されている可能性、について検討した。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。

iii) 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 との会合を免疫沈降(IP)で検討した。

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

v) 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。この結果を検証するために Huh-7.5 に 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を調製して miRNA の存在分布を解析した。

(6) 感染者体内のゲノム配列の多様性の蓄積機構と、その意義(丸澤)。

i) HCV 感染と、その結果産生されてくる炎症性サイトカインやインターフェロン刺激に反応して肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素を特定するために、各 APOBEC family, ADAR family 分子に特異的な probe を作成し、ヒト肝培養細胞に炎症性サイトカインである TNF アルファやインターフェロン刺激を加えた前後におけるそれぞれの APOBEC family, ADAR family 各分子の発現量の変化を定量評価した。

ii) 肝細胞に発現誘導した APOBEC family 分子、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 細胞に HCV の全長レプリコン・コンストラクトと各 APOBEC family, ADAR family の発現プラスミドを同時発現させ、HCV ゲノムを high-fidelity RT-PCR 増幅~回収した。塩基配列の同定には、high-fidelity RT-PCR により増幅したウイルスゲノムからランダムに約 30-40 クローンを選別し、Sanger 法により塩基配列を同定、遺伝子変異の生成の有無の評価を行った。

iii) HCV の包括的な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。これらのゲノム解析基盤を用いて、以下の検討を行った。

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

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

iv) 次世代シーケンサーを用いた HCV ゲノム変異の解析基盤をもとに、Huh-7.5.1 細胞に HCV クロンの JFH-1 株を *in vitro* で感染させるモデルを用いた HCV 変異生成の解析を行った。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, ADAR1, AID, を発現導入し、これらの遺伝子編集酵素の発現 3 週間後に、high-fidelity RT-PCR 増幅~回収により HCV ゲノムの amplicon を作成、遺

伝子変異の生成の有無の評価を、次世代シーケンサーを用いて行った。

(7) 感染による宿主の情報伝達変化の分子基盤。

1) HCV 持続感染による宿主の DNA メチル化修飾 (下遠野)

i) 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が増加していき、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した。

ii) 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、コロニーを得た。

iii) 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した。

iv) 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した。

2) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現レベルとエピジェネティック解析(加藤)

OL8(OY)細胞や3.5年間培養したOL(3.5Y)細胞に脱メチル化剤である 5-azacytidine (5-azaC)(2.5 マイクロモル)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、48 時間後にそれぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、*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。

(倫理面への配慮)

肝炎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、および同様の肝炎患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。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 (平成16年12月28日制定、平成17年6月29日一部改正) に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセント

に係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報  
を適正に管理保存した。

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。

### C. 研究結果

(1) ウイルス複製を制御する宿主要因を明  
らかにし、感染阻止に向けた研究。

1) Hsp90, Hsp70によるHCV複製制御(高  
久)

HCV複製を制御する宿主因子として分子シ  
ャペロン(Hsp90)によるHCV RNAの翻  
訳制御を解析し、Hsp90がHCV RNAの翻  
訳制御に係わる宿主因子であることを新し  
く見出した。HCV RNAの翻訳には  
Hsp90/eIF3c/HCV IRES RNA複合体形成  
が必須で、翻訳開始因子eIF3cとHsp90の  
相互作用にはHCV IRES RNAを必要とした。  
また、eIF3cはHsp90依存的クライアント  
タンパク質で、Hsp90阻害剤、17-AAGで  
Hsp90の活性を阻害したところ、  
Hsp90/eIF3c/HCV IRES RNA複合体より  
eIF3cが遊離し、プロテアソーム依存的分解  
が起こり、HCV RNAの翻訳が抑制されるこ  
とを明らかにした。

HCV RNAの翻訳制御に係わる宿主因子の探  
索で見出された、Hsp90阻害剤であるゲル  
ダマイシン誘導体、17-AAG  
(IC<sub>50</sub>:0.82nM)は、選択的にHCVの翻訳  
阻害及びウイルスタンパク質の安定化に影  
響を及ぼす薬剤で、新しいタイプの抗HCV  
薬として期待される。

多様な機能を発揮するHsp70は宿主内分子  
シャペロンファミリーであり、細胞質内、  
核内と全ての領域に存在しておりその働き  
は様々であることが広く知られている。  
Hsp70もHCVの複製制御に係わりがある  
かを検討したところ、Hsp70はHCV翻訳制

御やウイルスタンパク質の安定化に關与し  
ている可能性が強く示唆された。実際に  
JFH1株感染Huh7.5細胞系でもHsp70は  
HCVの複製を正に制御することが判明した。  
また、Hsp70とウイルスタンパク質との相  
互作用は認められなかったが、Hsp70は翻  
訳開始因子eIF3cと40S ribosomal  
subunit(rpS3,rpS6)と相互作用し、HCV  
複製を正に制御する宿主要因子であるこ  
とを明らかにした。

2) HCV感染による細胞蛋白質の局在変化の  
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。  
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  
細胞の抽出液を混合し、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。

ii) 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O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。

iii) 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O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。

3) 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)

HCV-1型ウイルスの培養細胞における感染

増殖系を樹立する目的で、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。

(2)HCV 感染による宿主の代謝変化やその他細胞の性質を変える要因の分子基盤。

1) HCV 粒子と会合する脂肪成分の解析 (下遠野)

i) ウイルス粒子にはリポ蛋白質成分が会合している。

これまでの多くの研究から、ウイルス粒子はリポ蛋白質と会合しているとされている。しかし、その主な根拠は粒子そのものの密度がウイルス蛋白質および核酸成分から予想されるよりも小さいというものである。粒子にリポ蛋白質様因子が会合している事をきちんと示すために、ウイルスをリパーゼする事によりその性状がどのように変化するか、およびその際にウイルスの感染が変化するかを明らかにすれば、ウイルス粒子とリポ蛋白質との会合を正確に言及できる事および、粒子に会合しているリポ蛋白質の生理的な意義を明らかにできると考えた。

そこで、ウイルス粒子を Lipoprotein lipase (LPL) および肝臓由来 lipase (hepatic triglyceride lipase: HTGL) で処理したときのウイルス粒子の性状変化を調べた。LPL および HTGL は肝臓から放出されるリポ蛋白質の中で主な成分である very low density lipoprotein (VLDL) が血流中に放出された後に働くリパーゼの種類である。LPL は VLDL に働き、中性トリグリセリドを分解する。その結果 VLDL は中性脂肪が減少し、大きさが幾分小さく、かつ密度が大きく変化したリポ蛋白質(IDL)に変化する。IDLはさらにHTGLにより水解を受けてさらに小さなリポ蛋白質である、LDL に変換するといわれている。VLDL, →IDL→LDL に変換する過程で ApoE が脱離する。

この様な事が HCV においても観察されるかを調べた。まず、ウイルスを異なる濃度の LPL で処理し、その後の感染性を調べたところ、感染性は LPL の濃度依存的に減少した。この処理条件下でセンダイウイルスを処理しても感染性は無くならないので、LPL、HTGL 感受性は HCV に特徴的な現象であるといえよう。熱処理した LPL を加えた場合、

あるいは LPL の阻害剤であるオルリスタットを添加して処理を行った場合には感染性の低下は見られなかった。したがって、ウイルス粒子の感染性の低下 (喪失) は LPL の酵素活性によるものと判断された。

LPL 処理粒子を密度勾配遠心で分離し、その浮遊密度を調べると、全体的に重い方に移行した。この事はウイルス粒子成分にトリグリセリドが存在しており、それが LPL 処理で取り除かれたと判断された。さらに、リポ蛋白質成分のひとつである ApoE 量の変化を調べた。その結果、ApoB に対する ApoE の相対的な量は LPL 処理により減少する事が分かった。以上から、LPL 処理により中性脂肪酸が除かれると同時に ApoE も脱離する結果ウイルスの感染性が失われると考えられた。ApoE の脱離は通常 LPL では起こらず、HTGL 処理により引き起こされる事になっている。一方、本実験で見られたように LPL 処理により ApoE が脱離した事、感染性が失われた事について、さらに解析を進めたところ、LPL 処理の過程で、精製したウイルス粒子に混在している HTGL 活性も同時に働くために、IDL 状態で止まらずに LDL まで分解が進んでしまうと考えられた。これらの実験結果は HCV にリポ蛋白質が会合している事を生化学的に証明したばかりでなく、ApoE がウイルスの感染性に重要な働きをしている事を強く示唆する結果を得た。すなわち、リポ蛋白質の HCV への会合は、ApoE が粒子に会合するために必要な条件である可能性を示唆する。

ii) HCV の分子サイズの解析と感染性。  
培養細胞から産生されたウイルスを濃縮して、TOSO の分子篩ゲル濾過クロマトグラフィーで解析した。

本システムでは、分子篩樹脂の容積排除画分 (void volume) に large VLDL が溶離される。溶離液を 50 分画に分離してウイルスが何処に溶離されるかをコア蛋白質の ELISA, ウイルス RNA, Envelope 蛋白質およびリポ蛋白質成分などについての解析をおこなった。

コア ELISA で解析すると、大部分のウイルス粒子は void volume に続いて溶離される分画で small VLDL が溶離される場所と一致した。しかし、この画分のウイルスには感染性がない。ウイルスの感染性は、LDL や HDL が溶離される画分に多峰性を示して現れた。つまり、ウイルス粒子の大部分は

small VLDL とほぼ同じ大きさを示すが感染性がない。一方、感染性を指標にして解析すると、ウイルス粒子は幾分小さめの分画に溶離された。前の実験から、感染性には ApoE が重要である事を示したので、大きい粒子には ApoE の会合が見られずに、小さいウイルス粒子が特異的に ApoE と会合している可能性が考えられた。そこで、各分画について、ApoE 抗体を用いて免疫沈降をおこない、ApoE で沈降される分画に HCV RNA が存在するか否かを調べた。その結果、ApoE は感染性を有しないウイルス、感染性を有するウイルスともに会合している事が分かった。これらの事から、ApoE は感染に必要であるが十分ではない事が明らかになった。また、感染性を示すウイルスは分子サイズが幾分小さめであり、かつサイズが一定でない事も明らかになった。

2) HCV 感染による糖新生を制御する機構の解析 (堀田)

i) HCV 感染による転写因子 FoxO1 のリン酸化の低下及び FoxO1 の核内蓄積

HCV 感染細胞では感染 4 日後 (4 dpi) 以降に、対照細胞に比べて、FoxO1 のリン酸化の著しい低下が認められた。また、蛍光抗体法解析及び細胞分画のウエスタンブロット解析により、HCV 感染細胞では FoxO1 が核内に蓄積することが観察された。

ii) HCV 感染による Akt のリン酸化

FoxO1 はインスリンシグナルを介して Akt によりリン酸化されることが知られている。そこで、HCV 感染における Akt のリン酸化について検討した。その結果、HCV 感染細胞では 2 dpi 以降継続して、対照細胞に比べて、Akt のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。このことは、HCV 感染による FoxO1 のリン酸化の低下は、Akt 活性の低下によるものではないと考えられた。

iii) HCV 感染による JNK の活性化と FoxO1 リン酸化の低下の相関

HCV 感染細胞では 4 dpi 以降に、対照細胞に比べて、JNK のリン酸化 (活性化の指標) が認められた。また、活性化 JNK の基質である c-Jun のリン酸化 (活性化の指標) と c-Jun 絶対量の増加が認められた。このような HCV による JNK の活性化は、JNK 特異的阻害剤である SP600125 (20  $\mu$ M) 処理により解除された。それに伴って、FoxO1 リン酸化の著しい低下が解除され、同時に FoxO1 の核内蓄積も解除され、非感染細胞

と同じ状態になった。

iv) HCV 感染によるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下の相関

MitoSXTM Red 存在下で、HCV 感染細胞ではミトコンドリアの ROS 産生が亢進することが共焦点レーザー顕微鏡により観察された (4 dpi)。このような HCV によるミトコンドリア ROS 産生の亢進は、抗酸化剤 NAC で処理することにより解除された。それに伴って、JNK の活性化が解除され、さらに FoxO1 リン酸化の低下と FoxO1 の核内蓄積も同時に解除され、非感染細胞と同じ状態になった。

v) NS5A によるミトコンドリア ROS 産生の亢進と JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下の相関

HCV タンパク質 (core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) のうちのタンパク質が糖新生の亢進に関与しているかについて、発現プラスミドによる一過性発現細胞を用いて解析した。その結果、NS5A 発現細胞において、ミトコンドリア ROS 産生の亢進、JNK 活性化及び FoxO1 リン酸化の低下、並びに PEPCK mRNA と G6Pase mRNA の発現増加とグルコース産生の増加が確認された。

vi) HCV 感染による MKP3 mRNA 量及び MKP3 タンパク質発現量の増加

定量的 qRT-PCR 法により、HCV 感染細胞では対照細胞に比べて、4 dpi 以降に MKP3 mRNA 量の増加することが認められた。また、ウエスタンブロット解析により、MKP3 蛋白質発現量が 4 dpi 以降に増加することも確認された。

vii) Huh7.5 細胞における MKP3 と FoxO1 の結合

Huh7.5 細胞に発現プラスミドを用いて MKP3 を一過性に強制発現させ、免疫共沈法により内在性 FoxO1 と MKP3 の結合の有無について解析した。その結果、MKP3 は内在性 FoxO1 と結合することがわかった。

viii) MKP3 発現による FoxO1 リン酸化の低下

Huh7.5 細胞に MKP3 を一過性に発現させると、トランスフェクション後 2 日及び 3 日後に、対照細胞に比べて、内在性 FoxO1 のリン酸化の程度が低下することがリン酸化 FoxO1 に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により明らかになった。

ix) HCV 感染細胞における ROS 産生及び JNK 活性化による MKP3 発現の促進  
上記(iv)のように、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 のリン酸化が低下することを観察した。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。

(3)感染細胞が増殖能を獲得する分子基盤。  
1) HCV 感染により発現誘導される因子の解析 (小原)

i) HCV 発現細胞認識クローンの樹立とその反応性  
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た。HCV 陽性肝癌患者組織での発現を検索すると DHCR24 は高頻度に発現上昇しており (5/5)、Ku70 は比較的高頻度に非癌部組織での発現低下が見られ (4/5)、TOM70 は一定頻度での癌部組織での発現上昇が見られた (3/5)。

ii) HCV による Ku70 の発現修飾  
正常の肝臓細胞に近い形質を持つ肝臓胎児由来細胞 WRL68 に HCV 蛋白質を発現する各種ベクターを用いて解析したところ、HCV 全長遺伝子と同様にコア蛋白質を含む発現ベクターは Ku70 蛋白質の発現レベルを低下させる事が明らかとなった。また、Ku70 の mRNA ではなく蛋白質のレベルをコア蛋白質が低下させる事も判明した。さらに、コア蛋白質は Ku70 のユビキチン化を促進する事も明らかとなった。

iii) HCV による DNA-PK 活性の修飾  
HCV 全長遺伝子を発現させ、DNA-PK 活性を測定すると有意な活性低下が観察された。同時にこの細胞では Ku70 の発現レベルが低下している事も確認できた。

iv) HCV 複製における DHCR24 の役割  
HCV 複製における DHCR24 の役割を明らかにするために、2 種の siRNA (0.1~3.0 nM) を作製して 3 種のレプリコン細胞 (FLR3-1,

R6FLR-N, JFH-1) と反応させた。その結果 siRNA の用量依存的に HCV の複製が抑制された。一方これらの濃度では、細胞毒性は認められなかった。

v) DHCR24 の発現と細胞内コレステロールレベル

細胞内コレステロールの濃度と DHCR24 の発現レベルの関連を解析したところ、コレステロールの添加により DHCR24 の発現が低下し、メチルβシクロデキストリン投与により DHCR24 の発現が上昇した。また、DHCR24 siRNA 処理により細胞内コレステロール濃度は低下した。以上の事から、DHCR24 の発現は細胞内コレステロール濃度と関連する事が明らかとなった。

vi) DHCR24 阻害剤の HCV 複製への効果  
DHCR24 の阻害剤である U18666A を HCV レプリコン細胞に処理すると 250nM 以下では細胞毒性なしに HCV 複製を抑制した。また、この U18666A による HCV 複製抑制はコレステロールの添加により回復した。また、HCV-JFH-1 感染系にも U18666A を処理したところ、0.5 マイクロモル以上での抑制効果が観察された。そこで、キメラマウス感染系において HCV を感染させ、U18666A, PEG-IFN アルファ, U18666A+PEG-IFN $\alpha$  の投与を行った。その結果、2 週間後には、PEG-IFN $\alpha$  単独投与よりも U18666A 単独投与の方が高いウイルス抑制効果を示した。さらには、U18666A は IFN $\alpha$  の抗ウイルス活性に対し相乗効果を示した。

vii) DHCR24 単クローン抗体の効果  
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 マイクログラム/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。

## 2) 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い、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。

## (4) HCV 感染増殖を抑制する宿主の自然免疫機構 (押海)。

HCV の複製制御に関与する新たな宿主因子のスクリーニングを実施し、Riplet と名付けた新規ユビキチンライゲスを発見した。解析の結果、この Riplet 分子は細胞質のウイルス認識センサーである RIG-I 分子の活性化に必須であることを発見した。また HCV の蛋白質はこの Riplet 分子を切断することで、宿主の自然免疫応答を回避することを発見した。

HCV の複製制御に関与する宿主因子としてさらに DDX3 と DDX60 ヘリケース分子を同定した。これらヘリケース分子は上述のウイルス認識センサーである RIG-I と複合体を形成し、RIG-I と HCV の RNA との結合を

促進する働きをすることを解明した。また、HCV のコア蛋白質は DDX3 の機能を阻害することで、宿主の自然免疫応答を抑制することを解明した。

自然免疫で働くサイトカインの III 型インターフェロンは、その遺伝子上流の SNP が、HCV 患者の治療成績と相関が高いことが報告されている。生体内に於ける、HCV 感染時の III 型インターフェロン産生メカニズムを、マウスモデル実験系を用い解析をしたところ、これまでの試験管内の解析による報告とことなり、RIG-I のアダプター分子である IPS-1 分子が、III 型インターフェロン産生に非常に重要な働きをすることを発見した。さらに、ヒトの BDCA3 陽性細胞に相当するマウスの CD8 陽性細胞が特に IPS-1 分子に依存して III 型インターフェロンを大量に産生することを発見した。さらに、III 型インターフェロンは I 型インターフェロンと異なり、NK 細胞の活性化やクロスプレゼンテーションによる CTL の活性化を誘導せず、肝細胞に RNaseL や ISG20 などの抗ウイルスヌクレアーゼ分子の発現を誘導することを解明した。

## (5) ウイルスによる宿主の情報制御の機構解析。

### 1) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析 (加藤)

#### i) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析

OL, OL8, OL11 および OL14 細胞を 2 年間継代培養して得られた OL(2Y)、OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y) 細胞由来の HCV-RNA の塩基配列を複数種類決定して、もとの HCV-RNA の塩基配列と比較した。

4 系統の細胞から得られた HCV-RNA の変異速度は  $4.2 \sim 5.3 \times 10^{-3}$  /塩基置換/ヌクレオチド/年であった。細胞樹立時と比較すると 2 年間の培養で約 1% 異なっていた。また、HCV-RNA の変異様式は U から C と A から G が最も高頻度であり、全体として HCV-RNA の GC 含量が増加していた。HCV の遺伝的多様性も 2 年間の培養で生じており、今回得られた HCV クローン間で比較すると 0.36~1.03% (平均約 0.7%) の範囲で異なっていた。

得られた HCV クローンの塩基配列をもとに Neighbor-joining 法による系統樹解析から、最初に導入した元の塩基配列



(ON/C-5/QR,KE RNA)と異なることが明確に示され、OL, OL8, OL11 および OL14 細胞由来の HCV-RNA はそれぞれ変異の特徴を持った独自のクラスターを形成していることが分かった。この現象は、アミノ酸レベルでも観察され、HCV-RNA の変異が一方方向にのみ進んでいないことが示された。

ii) レプリコン細胞内の宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

レプリコン細胞内の遺伝子発現プロファイルが長期培養（2年間）で受ける影響を調べるために、OL, OL11 および OL14 系列の細胞 RNA の cDNA マイクロアレイ解析を行った。まず、OL vs. OL(2Y)、OL8 vs. OL8(2Y) および OL11 vs. OL11(2Y) の 3 セットで検討した。それぞれのセットにおいて発現シグナルが 100 以上で RT-PCR 解析も十分可能なプローブを対象とし、発現レベルが亢進したプローブ上位 200~300 個を選択した。次に、これら選択したプローブから、OL, OL8 および OL11 系列のセット間で共通して得られたプローブの絞り込みを行った。その結果、3 セットとも発現量が亢進したプローブ 10 種類と 2 セットで発現量が亢進したプローブ 67 種類が得られた。これらのうち、読み取り枠 (ORF) があり、遺伝子であると思われるプローブで 3 セットとも共通して亢進しているものが 8 種類、2 セットで共通して亢進しているものが 4 種類得られた。

今回のスクリーニングにおける目的の遺伝子は、HCV-RNA の長期複製により発現量が変化するものであることから、細胞培養を 2 年間続けただけで発現量が亢進した遺伝子と区別する必要がある。その方策として、治癒細胞である OL8c と OL11c 細胞を OL8 細胞と OL11 細胞から作成して、別途 2 年間継代培養を行い、OL8c vs. OL8c(2Y) と OL11c vs. OL11c(2Y) の 2 セットで cDNA マイクロアレイ解析を行った。発現亢進した遺伝子として選択された計 52 種類の遺伝子の個々について、発現亢進が HCV-RNA の複製による効果ではなく、長期培養による効果であるかどうかを検討した。その結果、明らかに長期培養効果により発現が亢進したと判断された遺伝子は多く、これらについては、この段階で以後の検討からはずした。しかしながら、判断に困る遺伝子もあったため、それらについては、次のステップとして計画した RT-PCR 解析

により判断することとした。

発現量が低下した遺伝子の検討も同様に行った。この場合は、継代培養開始前の発現レベルを指標にしてプローブの選択を行った。継代培養開始前に発現量が 100 以上あり、次のステップの RT-PCR 解析が行えるものの中から発現量の低下が大きい上位 200~300 個を選択した。更なる選択作業を繰り返し、HCV-RNA が長期間複製を続けたことにより不可逆的に発現が亢進する遺伝子として 6 種類、発現が低下する遺伝子として 4 種類を選択同定した。

しかしながら、この場合の解析対象は発現量が比較的高い上位 200-300 個の遺伝子プローブのみであった。そのため、さらに、中程度の発現レベルを示す遺伝子プローブも含めて上位 500 個ほどのプローブに範囲を拡げてさらに検討した。

その結果、不可逆的に発現レベルが亢進したと考えられる遺伝子が 2 種類、発現レベルが低下したと考えられる遺伝子が 5 種類新たに追加された。これにより、発現が亢進した遺伝子は以下の 8 種類（遺伝子シンボル名で記す）となった；ACSM3, ANGPT1, CDKN2C, PLA1A, SEL1L3, SLC39A4, TBC1D4 および WISP3。また、発現が低下した遺伝子は以下の 9 種類となった；ANXA1, AREG, BASP1, CIDEC, CPB2, HSPA6, PI3, SLC1A3 および THSD4。

得られた遺伝子について、再現性の確認と培養期間を 2 年以上に延ばした場合に発現レベルがどう変化するかを調べ。その結果、WISP3, TBC1D4, ANGPT1, SEL1L3 および CDKN2C の 5 種類を HCV-RNA が長期に複製することにより不可逆的な発現亢進が起った遺伝子として同定した。

発現が低下した遺伝子群についても、さらに長期培養による変化を調べ、最終的には、BASP1, CPB2, ANXA1 および SLC1A3 の 4 種類を HCV-RNA が長期に複製することにより不可逆的な発現低下が起った遺伝子として同定した。

iii) HCV-RNA の長期複製による宿主の miRNA の変動解析

OL8(OY), OL8c(OY), OL11(OY) および OL11c(OY) 細胞とそれぞれ 2 年間培養した OL8(2Y), OL8c(2Y), OL11(2Y) および OL11c(2Y) 細胞から得られた miRNA を含む Total RNA を用いて、Agilent 社の Human miRNA rel 16.0 による miRNA のマイクロ

アレイ解析を行った。まず、OL8(0Y)とOL8(2Y)との比較やOL11(0Y)とOL11(2Y)との比較を行い、両者の比較において共通して2倍以上発現が亢進あるいは1/2以下に発現が低下しているmiRNAを選択した。

その結果、HCV-RNAが2年間複製した細胞で発現亢進が起こったと考えられる6種類のmiRNA(miR-378, miR-1914\*, miR-2116\*, miR-3679-5p, miR-4270およびmiR-4298)と発現低下が起こったと考えられる2種類のmiRNA(miR-22とmiR-34a)を同定した。

iv) BASP1とCPB2遺伝子の発現レベルの変動解析

本研究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、発現低下が2年間の培養のどの時期で起こったのかを調べた。再培養には、培養開始時、半年後、1年後、1.5年後および2年後に保存してあった細胞[それぞれOL8(0Y)、OL8(0.5Y)、OL8(1Y)、OL8(1.5Y)およびOL8(2Y)と呼ぶ]を用いた。それぞれの細胞から調製したTotal RNAを用いて、BASP1とCPB2 mRNAのレベルを定量的RT-PCR法により調べた。

その結果、BASP1のmRNAレベルは、培養開始半年後で既に1/16程度に低下し、その後も時間とともに徐々に低下していくことが分かった。従って、HCV RNAの複製増殖による影響が加算的に生じていることが分かった。このような発現低下の経時的パターンとは異なり、CPB2のmRNAレベルは、培養開始半年後においては、ほとんど低下していないにも関わらず、半年~1年後の間に急激に低下し、その後の低下はないという発現レベルの変動パターンが得られた。

v) HCV-RNAの長期複製により発現亢進した遺伝子と肝病態の進展との関係

これまでの研究により発現レベルが不可逆的に変動するとして同定した遺伝子がC型慢性肝炎患者の肝病態の進展と何らかの関係があるのではないかと考え、発現亢進した4遺伝子について、その可能性を探った。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博士と本多政夫博士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どうかを検討した。

その結果、Misfoldタンパク質の輸送に関与することが報告されているSEL1L3(Sel-1 suppressor of lin-12-like 3)の発現レベルが肝炎患者の肝線維化のステージが進むに従って上昇していることが分かった(P<0.001)。また、肥満度を示すBMIについても、25以上では、25未満と比較して有意に発現レベルが高いことが分かった(P=0.0025)。これらの結果から、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。

2) C型肝炎患者治療応答に関係するマイクロRNAとその標的遺伝子同定(村上)

i) C型肝炎治療効果別に同定したマイクロRNAの標的遺伝子の同定

SVR(著効例)とNR(無効例)の間に統計的に有意な発現差をもったマイクロRNAは8種あった。これらのマイクロRNAの標的遺伝子候補をmiRandaとTargetscanの両者のアルゴリズムを用いて数種得られた。肝癌細胞株2種(Huh7, Li7)に(1)マイクロRNAを過剰発現しcontrol RNA(ヒト遺伝子に対して相補的塩基配列をもたない:標的遺伝子として認識しない小分子RNA)を導入した際にくらべ発現が抑制される、(2)マイクロRNAの相補的塩基配列をもった小分子RNAを導入した際にcontrol RNAより発現の上昇したもの(細胞内のマイクロRNAと特異的に結合しマイクロRNAの機能を抑制したもの)(Antisense oligonucleotide((ASO))、の二つの条件を満たしたものに絞り込んだ所、hsa-miR-27bはhect domain and RLD5(HERC5)を認識している事が明らかになった。

ii) マイクロRNAによるC型肝炎ウイルスの制御(ウイルス側因子の検討)

HCVレプリコン(OR6)、IFN耐性のあるHCVレプリコン(1bR、4bR)を用いて46種のマ

マイクロ RNA を過剰発現した場合とそれらの ASO を用いてレプリコン RNA の複製状況を検討した。miR-122 は既に明らかであるが、過剰発現した際にレプリコンの複製は亢進し、機能抑制をした場合には複製を抑制した。一方、miR-22 を過剰発現した際にレプリコン RNA の複製を抑制し、機能抑制した際には複製能が亢進された。これらのマイクロ RNA は OR6 だけではなく、IFN 耐性のあるレプリコンでも共通の効果が得られ、IFN 耐性株にも影響なくレプリコンを抑制する事を明らかにした。

### iii) 血清中のマイクロ RNA 発現解析

血清中 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 は正常肝 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。

### iii)-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 を行ったが、HCVRNA との結合は認められなかった。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。

### iii)-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。

### iii)-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。

### (6) 感染者体内のゲノム配列の多様性の蓄積機構と、その意義(丸澤)。

i) in vitro において、ADAR1 が、インターフェロン刺激により APOBEC3G とともに肝培養細胞に発現誘導されることが確認された。同様に、生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 が、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 刺激によりヒト肝細胞に AID とともに発現誘導されることが明らかになった。

ii) さまざまな APOBEC family ならびに ADAR family 分子を同時発現させた HCV レプリコン Huh-7 細胞から RNA を抽出し、HCV ゲノム中の NS5A 領域の塩基配列を同定したところ、RNA 配列に変異を誘導する活性をもつ遺伝子編集酵素である APOBEC2 や ADAR1 発現細胞では、低頻度ながらも短期間で HCV の NS5A 領域に塩基変化が生じていることがわかった。

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

ii)-2 C 型慢性肝炎に対してペグ・インターフェロン+リバビリン療法の導入 1 週間後、血中ウイルスが速やかに減少した immediate virologic responder 8 例と、ほとんど治療反応性を示さなかった non-responder 8 例につき、治療前後での血中 HCV の全ゲノム配列を同定し、比較検

討を行った。immediate virologic responder と non-responder では治療前の血中 HCV の quasispecies の程度に差異を認めなかった。しかしながら、immediate virologic responder 群ではインターフェロン投与後にすみやかにウイルスの genomic complexity が低下していたのに対して、non-responder 群ではインターフェロン投与前後で genomic complexity の有意な変化を認めなかった。

そこで、HCV ゲノム上、もっとも多様性の高い envelope 領域の hypervariable region の塩基配列の詳細な解析を行ったところ、non-responder 群では各種変異を伴ったいずれのウイルスクローンもインターフェロン投与に対して感受性を示していないことが確認された。以上の結果から、インターフェロン治療に対して治療抵抗性を示す non-responder 群の治療不応性の要因として、宿主側のインターフェロンに対する反応性の欠如が大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

iii) 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。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を、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。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、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。

(7) 感染による宿主の情報伝達変化の分子基盤。

1) HCV 持続感染による宿主の DNA メチル化修飾 (下遠野)

i) 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が増加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。

ii) 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。

iii) 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。

iv) 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