

201320013A

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

# C型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬開発

分子のための分子基盤研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成26 (2014) 年 3月

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

C型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬開発

分子のための分子基盤研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成26 (2014) 年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

C型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬のための分子基盤の  
確立に資する研究

鈴木 哲朗…………… 1

### II. 分担研究報告書

HCV 感染増殖細胞系の開発と阻害剤の探索

加藤 宣之…………… 13

HCV における脱ユビキチン化酵素の役割

松浦 善治…………… 21

HCV感染および肝がん発症におけるイムノフィリンの役割と  
それを標的とした化合物開発

森石 恆司…………… 25

ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質による HCV 複製制御機構の研究

勝二 郁夫…………… 29

HCV 複製機構の解析

有海 康雄…………… 35

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別冊



# I. 総括研究報告書

C型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬のための分子基盤の確立に資する研究

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 Direct Acting Antiviralsの実用化が期待されるものの、耐性ウイルス出現、副作用等の危惧もあり、現行薬とは作用機序の異なる新規C型肝炎治療薬の開発は依然として重要である。HCV生活環制御、病態発現の分子機構の解明を進め、阻害剤開発に有用な新たな感染増殖細胞系を作出する。得られた知見を基に阻害剤スクリーニング系を構築し阻害剤評価を行う。本年度は主として以下の成果を得た。1) HCVのゲノムパッケージングに重要なRNA領域として3' UTRを同定した。2) 抗マラリア化合物N-89とN-251の抗HCV活性、リバビリンとの相乗効果を示し、N-251は治験準備に入った。3) HCV NS5Aのリン酸化に働き粒子形成に重要なキナーゼとしてCK1alphaを同定した。4) FKBP6はHCV感染で発現上昇し肝がん発症に関連することを見出した。FKBP6阻害剤DM-CHXによる抗HCV作用を示した。5) 脱ユビキチン化酵素USP15とUSP20をHCV複製制御因子として同定した。NS5A修飾に働くユビキチンリガーゼ、脱ユビキチン化酵素OTUD7Bを見出した。6) HCV複製制御に関与する新規宿主因子として、DDX5 RNAヘリカーゼ、クロマチンリモデリング因子INI1/hSNF5、核小体局在DDX21 RNAヘリカーゼ、ストレス顆粒因子Staufen 1及びUPF1を見出した。

分担研究者

加藤 宣之 岡山大学医歯薬学総合研究科 教授  
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授  
森石 恆司 山梨大学医学部 教授  
勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授  
有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

主因子の同定と機能解析、また阻害剤評価に有用なHCV複製分子クローン、複製細胞株の樹立と応用などの領域で多くの研究成果を報告し、特許取得を行ってきた。本研究グループのこれまでのHCV研究の成果を基盤とし、保有する実験ツール、解析手法を最大限に活用して創薬のための分子基盤の確立に資する研究を推進する。

A. 研究目的

C型肝炎治療はDirect Acting Antiviralの時代に入ったが、治験中の次世代薬を含め、耐性ウイルスの出現、副作用が危惧される。現行薬とは作用機序の異なる抗ウイルス薬が実用化されれば、治療の選択肢が増え、既存の治療法で効果が得られず肝癌発症の恐怖に曝されている患者にとって福音となる。

HCV研究では、限られたHCV株でしか感染増殖解析ができず、我が国で主要な1b型の実験ツールは必ずしも十分でない。本研究グループは、これまでHCVの生活環、病態発現に関する研究を精力的に行い、ゲノム複製、粒子形成に重要な宿

HCV生活環制御、病態発現の分子機構の解明を進め、得られた知見を基に阻害剤スクリーニング系を構築する。また、肝炎ウイルス研究、阻害剤開発に有用な新たな感染増殖細胞系を作出する。研究成果は、創薬開発、肝がんを含めた慢性肝疾患の治療戦略に資することが期待される。

B. 研究方法

1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

NS5B 遺伝子領域にプライマー、プローブを設定した real-time RT-PCR 法 (NS5B-qPCR) を JFH-1 株配列で作製した。HCVcc 感染細胞の細

胞内、培養上清、また培養上清の密度勾配遠心分画について NS5B-qPCR 及び汎用している 5' UTR 領域測定 real-time RT-PCR (5UTR-qPCR) によって HCV RNA を定量した。HCVtcp を産生するトランスパッケージングシステム実験は以下のように行った。CAG プロモーター支配下で Core~NS2 を発現するプラスミド pCAG-E2p7NS2m と Gluc 遺伝子を有し Pol1 プロモーターから発現するサブゲノムレプリコンプラスミド pSGRJFH1/Gluc を Huh7.5.1 細胞へ共導入する。72 時間後の培養上清を回収し HCVtcp として、naïve な同細胞へ接種して 24 時間後の細胞内 HCV RNA を定量して HCVtcp の感染性を評価する。

## 2. HCV 感染増殖細胞系の開発：

各種細胞を 6 ウェルプレートにそれぞれ  $5 \times 10^4$  個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清 (HCV-0 株)  $150 \mu\text{l}$  ( $1.5 \times 10^7$  HCV ゲノム価相当) 或は陽性コントロールとして HCV JFH-1 株 (遺伝子型 2a) 由来の HCVcc (MOI 0.1 に相当する量) を添加した。3 時間培養した後、培地を除き PBS (1 ml) で 3 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地 (3.5 ml) を加え培養を行った。7 日後 (感染 7 日目) に培地を回収して、 $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターを通した後に、HCV Core の定量を ELISA 法により行った。細胞の方は、新しい培地と交換し、翌日 (感染 8 日目) に前日と同様の方法により培地を回収して HCV Core の定量を ELISA 法により行った。また、細胞の方は 2 つに分け、一方からは Total RNA を調製し、HCV RNA の定量を LightCycler を用いた RT-PCR 法により行った。もう一方は、継代用に使用して、細胞培養をさらに続け、一定期間後に、上述した方法により培養上清 (Core の定量) や Total RNA (HCV RNA の定量) の調製を行った。

## 3. HCV 阻害剤の探索、開発：

抗 HCV 活性の評価用の OR6 や ORL8 細胞など (24 ウェルプレートにそれぞれ  $2 \times 10^4$  個) に候補化合物 (各種濃度) を添加して 72 時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定した。得られ

た測定値より添加化合物の 50% 阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) を算出した。細胞毒性については、別途 OR6 や ORL8 細胞など (96 ウェルプレートにそれぞれ  $1 \times 10^3$  個) に候補化合物 (各種濃度) を添加して 72 時間後に WST-1 アッセイを行った。得られた測定値から 50% 細胞毒性濃度 ( $CC_{50}$ ) を算出した。選択性指数 (SI) は  $CC_{50}/EC_{50}$  にて算出した。

## 4. HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明：

全長 NS5A 蛋白と NS5A 蛋白のドメイン 3 領域をコムギ胚芽無細胞翻訳系で合成し精製した。400 種類超のヒトプロテインキナーゼを包括する cDNA ライブラリーから、同様にコムギ胚芽無細胞翻訳系でプロテインキナーゼを合成し精製した。精製 NS5A 蛋白と精製プロテインキナーゼの相互作用解析には、ハイスループットな定量解析が可能である AlphaScreen 法を用いた。NS5A 蛋白のリン酸化は、精製 NS5A 蛋白を [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP 存在化において精製プロテインキナーゼと混和し、SDS-PAGE で展開後、オートラジオグラフィーを用いて解析した。

## 5. HCV 生活環におけるユビキチン経路の役割：

レトロウイルスベクターを用いて各脱ユビキチン化酵素の shRNA ノックダウン Huh7 細胞株を作製し、HCVcc を感染させて複製に及ぼす効果を検討した。さらに、HCV 複製への関与後示された脱ユビキチン化酵素の USP15 と USP20 に関しては、人工ヌクレアーゼを用いて遺伝子欠損 Huh7 細胞株を樹立した。

Huh7 細胞に IFN- $\alpha$  または IFN- $\beta$  を添加し 24 時間後に細胞を回収し、内在性の ISG15, UBE1L, UbcH8, Herc5 の発現をウエスタンブロット法で解析した。

Huh7 細胞に HCV J6/JFH1 を MOI=2 で感染させ、0 時間、48 時間後の ISG15, Herc5 の発現を real time PCR 法にて解析した。Huh7 細胞に UBE1L, UbcH8, FLAG-ISG15 および TRIM25 または Herc5 を一過性に発現させ、NS5A の ISGylation を免疫沈降法およびウエスタンブロット法で解析



した。NS5A K-R 変異体を myc-His<sub>6</sub> の形で発現させ、E1, E2, E3, FLAG-ISG15 を Huh-7 細胞に発現させ、FLAG-ISG15 が付加される部位を免疫沈降法およびウエスタンブロット法で解析した。

#### 6. HCV 複製を制御する新規宿主因子の同定と機能解析：

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、DDX5、DDX21、INI1/hSNF5、Staufen 1、そして UPF1 を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、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。さらに抗 Core 抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。同様に DDX21 をノックダウンした 0 細胞あるいは HCV-0 株サブゲノムレプリコン s0 細胞の HCV 複製レベルについても real-time RT-PCR 法とウエスタンブロット法により検討を行なった。

細胞内局在は以下のように解析した。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 DDX21 抗体 (Bethyl 社)、及び抗 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 ImmunoResearch 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、HuH-7 由来全長 HCV-0 RNA 株複製 0 細胞を用いて、HCV 複製による DDX21 の細胞内局在の変化について観察した。

#### (倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受けた。本年度の研究に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。HCV 陽性血清は 1995 年に契約に基づき横浜日赤より入手したものである。ヒトの臨床材料を用いた解析は行っていない。取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われ

た。

#### C. 研究結果

##### 1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

C 型肝炎患者の血液、肝臓検体の HCV 遺伝子解析研究から、同一検体について 5'及び 3'末端側 RT-PCR で解析すると 5'UTR 側の検出レベルが 3'UTR に比べ明らかに高いことが報告されている (Negro et al. (2001), Shimizu et al. (2006))。合成されたゲノム RNA の一部または多くが RNA 分解酵素などによって分解されるものと考えられる。HCV の複製、粒子産生の過程で、HCV RNA の population がどのように淘汰、選択されていくかを明らかにするため、複製細胞内と細胞外の HCV RNA について、5'UTR を検出する定量 RT-PCR 及び 3'末端側検出系で解析した。複製細胞内と細胞外の HCV RNA を測定し比較した結果、NS5B RNA/5'UTR RNA 比は細胞外の方が顕著に高値であった。さらに、培養上清を密度分画し各々の感染性と NS5B RNA/5'UTR RNA 比を求めると、最も高感染性の分画が最も NS5B RNA/5'UTR RNA 比が高い (0.98) であることが示された。

得られた知見から、HCV ゲノムのパッケージングに必要な配列は 3'末端領域 (3'UTR and/or NS5B) に存在する可能性が考えられた。そこで、次に HCV Core~NS2 とサブゲノムレプリコンを別ベクターから発現させ Trans-complemented particle (HCVtcp) を作製するトランスパッケージングシステムにより HCV のパッケージングシグナル解析を行った。予想通り、野生型サブゲノムレプリコンの場合、効率よく HCVtcp が産生された。レプリコンを非複製型にすると HCVtcp 産生は 10 分の 1 程度まで低下するものの依然として産生された。そこで、HCV 3' UTR 領域に種々の変異を導入した非複製型レプリコンを用いて HCVtcp 産生を試みた。その結果、3'UTR の 3'末端側の 2 または 3 stem-loop を欠損させると HCVtcp 産生効率は最も顕著に低下することが見出された。

##### 2. HCV 感染増殖細胞系の開発：

PH5CH8 細胞に CLDN1 を過剰発現させた細胞株を作製して HCV 感染実験を行うことにした。その前に、PH5CH8 細胞では、HCV の効率的な複製増殖に係わることが分かっている miR122 の発現レベルも RSc や ORL8c 細胞に較べて非常に低くなっていることが分かったので、miR122 及び CLDN1 を高発現する PH5CH8 細胞

(PH5CH8/miR122/CLDN1) を作製した。HCV 感染実験には、これらの PH5CH8 細胞の他に、RSc 細胞、ORL8c 細胞および D7 細胞 (ORL8c 細胞をさらにサブクローン化した細胞で HCV-JFH-1 感受性が高まっていることが分かっている) を用いた。HCV のソースとしては、HCV-JFH1 ( $4 \times 10^5$ /ml の感染価を示す HCVcc) と HCV 陽性血清 (0 株、 $1 \times 10^8$  HCV ゲノム価/ml) を用いた。それぞれの細胞に HCV-JFH1 を MOI 0.1 で感染させた。その結果、感染 8 日目における培養上清中の Core の量 (fmol/ml で表示) は、RSc 細胞で 61,000、ORL8c 細胞で 11,000、D7 細胞で 18,000 で、PH5CH8 細胞では miR122 や CLDN1 の発現の有無にかかわらず検出限界以下であった。感染 7 日目でも感染 8 日目と同様の数値が得られた。細胞内 HCV RNA 量は、Core の定量結果と相関して、RSc、ORL8c および D7 細胞では、 $4-6 \times 10^8$  copy/ $\mu$ g total RNA の HCV RNA が検出された。PH5CH8/miR122 細胞のみで  $3 \times 10^2$ / $\mu$ g total RNA の HCV RNA が検出されたが、それ以外の PH5CH8 細胞や PH5CH8/miR122/CLDN1 細胞では検出されなかった。

### 3. HCV 阻害剤の探索、開発：

一方、我々がこれまでに開発した培養細胞を用いた抗 HCV 活性の評価系 (OR6 や ORL8) を用いて、昨年度強い抗 HCV 活性を見出した N-89 と N-251 (いずれも抗マラリア活性を有し、N-251 については、first in man に向けての毒性安全性試験などが岡山大学薬学部のグループにより進行中) のうち、N-251 は側鎖基を有することから、体内動態や代謝等について解析可能であ

る。そのため、C 型慢性肝炎患者への臨床応用を目指して、平成 25 年 5 月に PMDA で対面助言を受ける機会を得た。その結果、薬剤の承認までに幾つかの点 (作用機序、代謝物の抗 HCV 活性、耐性ウイルスの選択性に関する検討、宿主タンパク質に対する相互作用) について、明らかにすることが必要であるとの見解が得られた。そのため、今年度は、これらの課題に関する実験を行った。その結果、リバビリンの併用により相乗効果が得られることや 40% 血清中においても抗 HCV 活性が維持されることを示した。

また、抗 HCV 活性の評価系を用いて、無菌養蚕サナギタケ冬虫夏草 (国内製造の市販品) に抗 HCV 活性を見出した。この活性はインターフェロン $\alpha$  やリバビリンの抗 HCV 活性と相加的に作用することやサナギタケ冬虫夏草に 5% 程度含まれる核酸誘導体の Cordycepin に依るものであることを明らかにした。

NS5A に相互作用する宿主因子として FKBP6 を同定している。本年度、その阻害剤の効果と肝臓組織における発現を解析した。ウイルス複製は FKBP6 をノックダウンすると低下し、FKBP8 に FKBP6 は相互作用する。既知の HCV 宿主因子である FKBP8 を標的とした DM-CHX は、FKBP6 のホモ多量体形成を阻害し、FKBP8 とのヘテロ多量体形成も阻害した。また、FKBP6 の肝臓内発現は、非がん部ではクッパーおよび胆管上皮細胞に強く発現し、肝細胞でほとんど発現していなかった。しかし、HCV 感染している肝細胞で FKBP6 の発現は上昇し、がん部で FKBP6 の発現は上昇していた。以上の結果から、FKBP6 の発現は HCV 感染と肝がん化と相関していることが示唆された。また、低分子化合物 DM-CHX が FKBP6 の機能を阻害することがわかった。

### 4. HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明：

in vitro 合成した 410 種類のヒトプロテインキナーゼのうち 38 種類で AlphaScreen 法により NS5A 蛋白との強固な相互作用が認められた。その中で、7 種類のキナーゼが in vitro



で NS5A リン酸化活性を有していた。これらをそれぞれノックダウンした HuH-7 細胞で HCV 産生を調べた所、CK1alpha, CK1e, CK2alpha2, PLK1 でノックダウンによる有意な HCV 産生低下を示した。CK1alpha の影響が最も大きくノックダウンによって 40 分の 1 以下まで HCV 産生は低下した。このとき細胞増殖低下は認められなかった。

#### 5. HCV 生活環におけるユビキチン経路の役割：

RNAi スクリーニングにより、HCV 複製に関わる新規宿主因子として、脱ユビキチン化酵素の USP15 と USP20 を同定した。USP15 や USP20 のノックダウン細胞では顕著に HCV 複製が抑制された。USP15 がない肝癌細胞株では脂肪滴が顕著に減少し、過剰発現させると脂肪滴形成が亢進した。USP20 欠損細胞では、HCV 複製だけでなく、日本脳炎ウイルスの複製も顕著に抑制した。

HCV NS5A 蛋白質がインターフェロン刺激により ISG15 による修飾 (ISGylation) を受けるが、Herc5 が E3 リガーゼとして働くことを明らかにした。また、HCV genotype 1b の Con1, 0 株、2a の JFH1 株いずれの NS5A も ISGylation を受けた。ISGylation 部位を解析するため、Lys 残基を Ala 残基に置換した NS5A 変異体を作製したところ、複数箇所が ISGylation を受けることが示された。さらに NS5A 変異体を作製して ISGylation 部位の同定を行っている。また、NS5A と相互作用を示す脱ユビキチン化酵素として OTUD7B を同定した。両者の相互作用には NS5A の domain I が重要であり、OTUD7B の脱ユビキチン化酵素活性の促進を介して NF $\kappa$ B 経路を抑制する可能性が示された。

#### 6. HCV 複製を制御する新規宿主因子の同定と機能解析：

核内宿主因子 DDX5 RNA ヘリケース、クロマチンリモデリング因子 INI1/hSNF5、核小体局在 DDX21 RNA ヘリケース、ストレス顆粒因子 Staufen 1 及び UPF1 に注目し HCV 複製への影響を解析した。shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いて内在性 DDX5 及び INI1 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 を感染させると、HCV 感染 96 時間後の細胞内 HCV RNA レベル、細

胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生された HCV 粒子の感染性の低下も認められた。しかしながら、JFH1 サブゲノムレプリコン JRN/3-5B 細胞の内在性 DDX5 あるいは INI1 をノックダウンさせても、JFH1 サブゲノム RNA の複製レベルはコントロール細胞と有意な差を認めなかった。

内在性 DDX21 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 を感染させると、HCV 感染 96 時間後の細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生された HCV 粒子の感染性の低下も認められた。同様に全長 HCV-0 RNA 株複製 0 細胞や HCV-0 株サブゲノムレプリコン s0 細胞の内在性 DDX21 をノックダウンさせても、HCV 複製レベルは顕著に減少した。HCV 非感染 RSc 細胞において、DDX21 は核小体に局在したが、HCV-JFH1 感染細胞においても、DDX21 は核小体に局在したままで特に局在の変化はみられず、HCV Core との共局在は観察されなかった。

内在性 Staufen 1 及び UPF1 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 を感染させると、細胞内 HCV RNA レベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生された HCV 粒子の感染性の低下も認められた。

#### D. 考察

##### 1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

HCV の粒子形成過程で、HCV ゲノム RNA が選択的にパッケージングされる仕組みについては全くと言ってよいほど明らかにされていない。我々はまず次世代シーケンサーを利用して HCV 粒子に取り込まれる HCV RNA を解析し、HCV 粒子には全長または全長に近い HCV RNA がドミナントであることを見出した。また、HCV 粒子に含まれる非 HCV 配列の HCV との相同性を解析し、NS5B または 3'UTR に相同性のあるヒト由来配列が高頻度に検出されることを明らかにした。さらに、複製細胞内と細胞外の HCV RNA を測定し比較した結果、NS5B RNA/5'UTR RNA 比は細胞外の方が顕著に高値であった。これらの

知見から、3'末端領域 (3'UTR and/or NS5B) に HCV のパッケージングシグナルが存在する可能性が考えられた。そこで、トランスパッケージングシステムを利用してシグナル同定を開始した。これまでの解析から 3'UTR の 3'X 領域に存在する三ヶ所の stem-loop 領域のうち 3' 末端側二ヶ所が HCV ゲノムパッケージングに重要であることが示された。

## 2. HCV 感染増殖細胞系の開発：

HCV の培養細胞レベルでの増殖は、これまで遺伝子型 2a 等で成功しているが、遺伝子型 1b では実用的なレベルに至っていない。これまでに蓄積された HCV のライフサイクルに必要な宿主因子や HCV 複製を許容する各種ヒト細胞株を活用して、遺伝子型 1b に属する HCV 株の培養細胞レベルでの増殖系の開発を試みた。今年度は、ヒト不死化肝細胞などに HCV 感染や RNA 複製に必要な宿主因子を過剰発現させて HCV の感染実験を行った。その結果、低レベルの HCV 複製増殖は認められたものの、実用的レベルには至らず、更なる改良が必要であった。HCV) の培養細胞レベルでの増殖は、これまで遺伝子型 2a 等で成功しているが、遺伝子型 1b では実用的なレベルに至っていない。我々は、これまでに蓄積された HCV のライフサイクルに必要な宿主因子や HCV 複製を許容する各種ヒト細胞株を活用して、遺伝子型 1b に属する HCV 株の培養細胞レベルでの増殖系の開発を試みた。今年度は、ヒト不死化肝細胞などに HCV 感染や RNA 複製に必要な宿主因子を過剰発現させて HCV の感染実験を行った。その結果、低レベルの HCV 複製増殖は認められたものの、実用的レベルには至らず、更なる改良が必要であった。

## 3. HCV 阻害剤の探索、開発：

昨年度見出した抗 HCV 活性化合物 (抗マラリア薬として開発中の N-89 と N-251) について、フェーズ I 臨床試験の開始に必要なさらなる解析を行った。N-89 や N-251 に耐性を示す HCV RNA 複製細胞を得る試みでは、樹立まもない HCV 遺伝子の多様性もほとんどない細胞では耐性細胞が得られず、長期に継代培養して、HCV 遺伝子

の多様性を高めた細胞から耐性細胞が得られたことから、これらの細胞内の HCV 遺伝子の変異が耐性を獲得した原因である可能性がある。しかしながら、同時に、長期継代による細胞そのものの変化により耐性細胞が得られた可能性もあり、現時点ではどちらが主な原因であるかは判断できない。次年度は、耐性の原因がウイルス側なのか、宿主側なのかを判別できる実験を行う予定である。このようなアプローチにより、耐性の分子機構 (裏を返せば N-89 や N-251 の作用機序) を明らかにできるのではないかと期待される。

今年度、抗 HCV 活性を見出したサナギタケ冬虫夏草のカプセル剤は、健康補助食品として市販されており、その安全性は確保されている。サナギタケの抗 HCV 活性は、インターフェロン  $\alpha$  やリバビリンの抗 HCV 活性と相加的に作用することも分かったことから、C 型慢性肝炎患者の治療中にも使用できる物質として興味深い。また、今回、サナギタケ冬虫夏草の活性の有効成分が Cordycepin であることが分かった。Cordycepin は、正常細胞には影響を与えることなく癌細胞に対する増殖抑制効果が報告されている。従って、我々のヒト肝癌細胞をベースにした評価系もその影響を受けて、 $CC_{50}$  値が低くなっている可能性がある。ただ、今回、ドリンク剤では細胞毒性が強く抗 HCV 活性を見出すことができなかった。ドリンク剤の成分が公表されていないため、どのような理由により活性が評価できなかったかは現時点では分からない。可能性としては、ドリンク剤の Cordycepin の含量が低いか或は不安定で分解していることも考えられる。サナギタケ冬虫夏草のような抗 HCV 活性を有する食品は他にも存在する可能性があるため、今後もさらに探索を進める予定である。

## 4. HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明：

HCV NS5A 蛋白はセリン、スレオニン残基のリン酸化状態により、低リン酸化型 (56 kDa) 及び高リン酸化型 (58 kDa) の 2 種類が存在する。NS5A 蛋白のリン酸化はウイルスゲノム複

製だけでなく、感染性ウイルス粒子の形成にも重要な役割を担うことが知られているが、そのリン酸化部位や特に粒子形成に關与するリン酸化に關わるプロテインキナーゼについては十分明らかにされていない。そこで、全ヒトプロテインキナーゼを対象として網羅的スクリーニングを行った。その結果、NS5A リン酸化に働き感染性粒子産生に最も大きく影響するキナーゼとしてCK1alphaを同定した。ノックダウンの影響がその次に大きかったのはCK2alpha2であった。このうち後者についてはこれまでにHCV粒子産生への關与が報告されている。今後、HCV粒子産生におけるCK1alphaの作用機序の解析を進めるとともにキナーゼ阻害剤によるHCV産生阻害を評価する予定である。

#### 5. HCV生活環におけるユビキチン経路の役割：

脱ユビキチン化酵素はタンパク質のユビキチン化の逆反応を担う酵素であり、タンパク質の安定化や様々なシグナル伝達を介して、癌や免疫応答等の様々な生理現象に關与することが近年報告されている。しかしながら、HCV感染における脱ユビキチン化酵素の役割は不明な点が多い。昨年度、RNAiスクリーニングにより、HCV複製に關わる新規宿主因子として、脱ユビキチン化酵素のUSP15とUSP20を同定した。USP15やUSP20のノックダウン細胞では顕著にHCV複製が抑制された。USP15がない肝癌細胞株では脂肪滴が顕著に減少し、過剰発現させると脂肪滴形成が亢進した。USP20欠損細胞では、HCV複製だけでなく、日本脳炎ウイルスの複製も顕著に抑制した。

HCV NS5AはE3リガーゼHerc5によりISGylationされると考えられた。Con1株のNS5AはIFN- $\alpha$ ,  $\beta$ , E1, E2, E3の強発現いずれでもISGylationされた。さらに、Con1, 0, JFH1株いずれのNS5AもISGylationを受け、genotypeによらずHCVに共通の現象であると考えられた。ISGylation部位を解析したが、複数箇所ISGylationを受けることが解り、Lys残基をAla残基に置換し、一つだけLys残基が残ったNS5A変異体を作製して解析を進めている。ISGylation部位を同定し、そこに変異を導入してHCVccやHCVレプリコンの複製及ぼす影響を解析する予定である。また、前年度同定した新規HCV結合因子である脱ユビキチ

ン化酵素OTUD7BとNS5Aが相互作用を示すことを免疫沈降法で明らかにした。なかでもNS5A domain IがOTUD7Bとの相互作用に重要であった。NS5AはOTUD7Bの脱ユビキチン化酵素活性を促進する可能性が示された。OTUD7BはNF $\kappa$ Bシグナリングの活性調節をすることが報告されており、HCV NS5AとOTUD7Bの相互作用がNF $\kappa$ Bシグナリング、および炎症反応に対してどのような影響を及ぼすか明らかにする必要がある。

#### 6. HCV複製を制御する新規宿主因子の同定と機能解析：

HCV生活環に關与する宿主因子として、新たにDDX5、DDX21、INI1/hSNF5、Staufen 1、UPF1を同定した。核に局在するRNAヘリケースDDX5はHCV NS5B RNAポリメラーゼ結合因子としてすでに同定されているが(Goh *et al.* *J. Virol.* 2004)、本年度の研究によりHCV感染・複製への關与が明らかとなった。また、DDX5が肝硬変における肝の線維化との關与が示唆されており(Huang *et al.* *Gastroenterology* 2006)、HCV複製やHCV関連疾患の病態を解明する上でDDX5が重要な宿主因子として位置づけられる。さらに、核小体に局在するDDX21もHCV複製に必要な宿主因子であることが判明した。興味深いことに核小体に局在するB23がHCV Coreと結合すること(Mai *et al.* *Oncogene* 2006)、そしてNucleolinもHCV NS5Bと結合することが報告されており(Hirano *et al.* *JBC* 2003; Shimakami *et al.* *J. Virol.* 2006)、核小体がどのようにHCV複製に關与しているのかについては今後の研究課題である。Staufen 1及びUPF1はストレス顆粒因子であるが、HCV感染によりストレス顆粒が形成されること、そしてG3BP1、Ataxin2、PABP1などのストレス顆粒因子が脂肪滴周辺にリクルートされ、HCV複製に利用されることを報告してきた(Ariumi *et al.* *J. Virol.* 2011)。細胞内のストレス応答とHCV複製や病態との関連性が示唆される。最近、Staufen 1がHIV-1 Gagと結合し、HIV-1の粒子産生に關与する(Chatel-Chaix *et al.* *MCB* 2004)という報告があるので、Staufen 1のHCV粒子産生への關与についても今後検討したい。さらにRNA結合因子UPF1もHIV-1粒

子内に取り込まれ、HIV-1 の感染性に関与することが示唆されている (Serquiña *et al.* *J. Virol.* 2013)。これら RNA 結合因子 Staufen 1 や UPF1、RNA ヘリケースそして HCV RNA との 3 者における相互作用が HCV 複製制御に重要であると考えられる。

#### E. 結論

本研究グループが保有する実験ツール、解析手法を最大限に活用して創薬のための分子基盤の確立に資する研究を推進した。N-251 は第一相試験に向けた準備に入った。また、HCV ゲノムパッケージング機構の解析、感染増殖細胞系の開発と阻害剤の探索、HCV 複製制御機構の解析などに新たな知見を得た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci. Bioeng* (in press).
2. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Sci Rep* (in press).
3. Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, Suzuki T, Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, Shoji I, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. *PLOS ONE* (in press).
4. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes Infect* (in press).
5. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. *PLOS Pathog* 9; e1003589, 2013.
6. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLOS ONE* 8; e68992, 2013.
7. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi SI, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- $\beta$  type I receptor. *Sci Rep* 3; 3243, 2013.
8. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect* 15; 45-55, 2013.
9. Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathogens*, 9: e1003345 (2013).
10. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 58:1236-1244 (2013).
11. Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial

- drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE*, 8: e72519 (2013).
12. Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 432:326-332 (2013).
  13. Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J Lipid Res*, 54:881-892 (2013).
  14. Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, Saito H. Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on hepatitis C virus replication via epigenetic changes in host cells. *J Cell Biochem*, 114:1987-1996 (2013).
  15. Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R. Ca<sup>2+</sup>/S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int*, 33:1008-1018 (2013).
  16. Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Kato N, Shimizu K, Makishima M. Direct targeting of proteins to lipid droplets demonstrated by time-lapse live cell imaging. *J Bioscience and Bioengineering*, 116:620-623 (2013).
  17. Ding Q, Cao X, Lu J, Huang B, Liu YJ, Kato N, Shu HB, Zhong J. Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity. *J Hepatol*, 59:52-58 (2013).
  18. Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Fujita K, Kirikoshi H, Takahashi J, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Nakajima A, Saito S. Hepatic triglyceride lipase plays an essential role in changing the lipid metabolism in genotype 1b hepatitis C virus replicon cells and hepatitis C patients. *Hepatol Res*, 43:1190-1198 (2013).
  19. Ban S, Ueda Y, Ohashi M, Matsuno K, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Peroxisome proliferator-activated receptor delta antagonists inhibit hepatitis C virus RNA replication. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 23:4774-4778 (2013).
  20. Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, in press (2014).
  21. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
  22. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
  23. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
  24. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus



- replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
25. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res* 2013;12:2537-2551
  26. Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S: Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host Microbe*, 13: 77-86, 2013
  27. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N: Deep-Sequencing Analysis of the Association between the Quasispecies Nature of the Hepatitis C Virus Core Region and Disease Progression. *J. Virol.*, 87: 12541-12551, 2013
  28. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S: Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 133:2803-2805, 2013
  29. Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, Moriishi K, Inoue N: Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Vaccine*, 31: 3199-3205, 2013
  30. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S: Mast Cells Play a Key Role in Host Defense against Herpes Simplex Virus Infection through TNF-alpha and IL-6 Production. *J. Invest. Dermatol.*, 133: 2170-2179, 2013
  31. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K: Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLOS one*, 8: e82299, 2013
  32. Ratnogliks SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., Shoji I., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, in press.
  33. Adianti M., Aoki C., Komoto M., Deng L., Shoji I., Wahyuni T., Lusida M., Soetjipto S., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, in press.
  34. Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5381.
  35. Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., Shoji I., Deng L., Aoki C., and Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*, 2013, 10 (1): 259, 1-9.
  36. Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N.

- 14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, 2013, 126 (Pt9): 2014-26.
37. El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji, I., Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.
38. Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology* 58:1236-1244, 2013
39. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumore suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:592-597, 2013
40. Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. DDX3 RNA helicase is required for HIV-1 Tat function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441:607-611, 2013
41. Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434:803-808, 2013
42. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J, Chikata T, Brumme Z, 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 CTLs with identical epitope specificity. *J. Virol.* 87:2253-2263, 2013.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許出願  
出願番号 2013-082066.  
発明の名称：アミノ基含有親水性樹脂化合物、ウイルス除去用高分子基材、及びガスバリア材  
発明人：鈴木哲朗、中熊大英、櫻井直人、生島直也。  
出願人：DOC、浜松医科大学  
出願番号 2013-082065.  
発明の名称：糖鎖固定化親水性樹脂化合物、ウイルス除去用高分子基材、及び生体適合性材料  
発明人：鈴木哲朗、中熊大英、櫻井直人、生島直也。  
出願人：DIC、浜松医科大学
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

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 感染増殖細胞系の開発と阻害剤の探索

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)の培養細胞レベルでの増殖は、これまで遺伝子型 2a 等で成功しているが、遺伝子型 1b では実用的なレベルに至っていない。我々は、これまでに蓄積された HCV のライフサイクルに必要な宿主因子や HCV 複製を許容する各種ヒト細胞株を活用して、遺伝子型 1b に属する HCV 株の培養細胞レベルでの増殖系の開発を試みた。今年度は、ヒト不死化肝細胞などに HCV 感染や RNA 複製に必要な宿主因子を過剰発現させて HCV の感染実験を行った。その結果、低レベルの HCV 複製増殖は認められたものの、実用的レベルには至らず、更なる改良が必要であった。一方、我々がこれまでに開発した培養細胞を用いた抗 HCV 活性の評価系(OR6 や ORL8)を用いて、昨年度見出した抗 HCV 活性化合物(抗マラリア薬として開発中の N-89 と N-251)について、フェーズ I 臨床試験の開始に必要なさらなる解析を行った。その結果、リバビリンの併用により相乗効果が得られることや40%血清中においても抗 HCV 活性が維持されることを示した。さらに、今年度は、抗 HCV 活性の評価系を用いて、無菌養蚕サナギタケ冬虫夏草(国内製造の市販品)に抗 HCV 活性を見出した。この活性はインターフェロン $\alpha$ やリバビリンの抗 HCV 活性と相加的に作用することやサナギタケ冬虫夏草に5%程度含まれる核酸誘導体の Cordycepin に依るものであることを明らかにした。サナギタケ冬虫夏草は C 型慢性肝炎の治療における新規経口剤として有効であると考えられた。

A. 研究目的

HCV の複製を効率よくかつ持続的に産生できる培養細胞はヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来の細胞に限られていた。2009 年、我々は、HCV の複製が持続的に起こる新たなヒト肝癌細胞株 Li23 を見出し、この細胞株を用いて HCV RNA を効率的に複製している幾つかのクローン化細胞株の樹立に成功した。さらに、これらの細胞株を用いて抗 HCV 活性を簡便に定量評価できるアッセイ系(ORL8 と ORL11)も開発した。一方、培養細胞で容易に増殖できる HCV 株としては、依然として遺伝子型 1b (日本における主要な遺伝子型)に属する HCV 株を用いた増殖系が開発されていない。本研究においては、我々がこれまでに樹立した HCV RNA の複製を許容する細胞株に、これまでに得られている HCV 複製に必要な各種宿主因子の情報を基に工夫を加えることにより遺伝子型 1b の HCV が増殖する培養細胞系を開発する

ことを目標とした。これと並行して、抗 HCV 活性の評価系を用いて抗 HCV 活性を有する新たな化合物を探索し、副作用の少ない有望な経口阻害剤を見出すことを目標とした。

B. 研究方法

(1) HCV 感染実験

各種細胞を 6 ウェルプレートにそれぞれ  $5 \times 10^4$  個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清(HCV-0 株) 150  $\mu$ l ( $1.5 \times 10^7$  HCV ゲノム価相当) 或は陽性コントロールとして HCV JFH-1 株(遺伝子型 2a) 由来の HCVcc (MOI 0.1 に相当する量) を添加した。3 時間培養した後、培地を除き PBS (1 ml) で 3 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地 (3.5 ml) を加え培養を行った。7 日後(感染 7 日目)に培地を回収して、0.22  $\mu$ m のフィルターを通した後に、HCV Core の定量を ELISA 法により行った。細胞の方は、新し



い培地と交換し、翌日（感染8日目）に前日と同様の方法により培地を回収してHCV Coreの定量をELISA法により行った。また、細胞の方は2つに分け、一方からはTotal RNAを調製し、HCV RNAの定量をLightCyclerを用いたRT-PCR法により行った。もう一方は、継代用に使用して、細胞培養をさらに続け、一定期間後に、上述した方法により培養上清（Coreの定量）やTotal RNA（HCV RNAの定量）の調製を行った。

（2）細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗HCV活性評価

抗HCV活性の評価用のOR6やORL8細胞など（24ウェルプレートにそれぞれ $2 \times 10^4$ 個）に候補化合物（各種濃度）を添加して72時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定した。得られた測定値より添加化合物の50%阻害濃度（ $EC_{50}$ ）を算出した。細胞毒性については、別途OR6やORL8細胞など（96ウェルプレートにそれぞれ $1 \times 10^3$ 個）に候補化合物（各種濃度）を添加して72時間後にWST-1アッセイを行った。得られた測定値から50%細胞毒性濃度（ $CC_{50}$ ）を算出した。選択性指数（SI）は $CC_{50}/EC_{50}$ にて算出した。

抗HCVコアやNS5B抗体を用いたウェスタンブロットは常法に従って行った。

（倫理面への配慮）

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。HCV陽性血清は1995年に契約に基づき横浜日赤より入手したものである。本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

## C. 研究結果

### （1）HCV感染実験

昨年度、HCV-JFH1に感受性を示すヒト肝癌HuH-7由来の細胞や過去のHCV感染実験でHCV感受性を報告した不活化ヒト肝PH5CH8細胞を用いて遺伝子型1bのHCV陽性血清による感染実験を行った。その

結果、感染1週間程度では、培養上清中に産生されるHCV量は、CoreのELISA測定の検出限界（20 fmol/ml）に至らないことが明らかになった。また、この実験過程において、PH5CH8細胞では、HCV感染に必要であると報告されている宿主因子のうち、Claudin 1（CLDN1）の発現レベルがJFH-1株HCVに感受性を示すRSc（HuH-7由来の細胞株）やORL8c（Li23由来の細胞株）と比較すると1/10以下であることが分かった。

そこで、今年度は、このPH5CH8細胞にCLDN1を過剰発現させた細胞株を作成してHCV感染実験を行うことにした。その前に、PH5CH8細胞では、HCVの効率的な複製増殖に係わることが分かっているmiR122の発現レベルもRScやORL8c細胞に較べて非常に低くなっていることが分かったため、まずは、PH5CH8細胞にmiR122を過剰発現させた細胞を作成した後、その細胞にCLDN1を過剰発現させることにした。レトロウイルス発現ベクターを用いて我々が通常行っている方法により、目的とするmiR122発現PH5CH8細胞（PH5CH8/miR122）やCLDN1も併せて発現させたPH5CH8細胞（PH5CH8/miR122/CLDN1）を作成した。HCV感染実験には、これらのPH5CH8細胞の他に、RSc細胞、ORL8c細胞およびD7細胞（ORL8c細胞をさらにサブクローン化した細胞でHCV-JFH1感受性が高まっていることが分かっている）を用いた。HCVのソースとしては、HCV-JFH1（ $4 \times 10^5$ /mlの感染価を示すHCVcc）とHCV陽性血清（0株、 $1 \times 10^8$  HCVゲノム価/ml）を用いた。それぞれの細胞にHCV-JFH1をMOI 0.1で感染させた。その結果、感染8日目における培養上清中のCoreの量（fmol/mlで表示）は、RSc細胞で61,000、ORL8c細胞で11,000、D7細胞で18,000で、PH5CH8細胞ではmiR122やCLDN1の発現の有無にかかわらず検出限界以下であった。感染7日目でも感染8日目と同様の数値が得られた。細胞内HCV RNAの定量はLightCyclerを用いたRT-PCR法により行った。その結果、Coreの定量結果と相関して、RSc、ORL8cおよ



び D7 細胞では、 $4-6 \times 10^8$  copy/ $\mu\text{g}$  total RNA の HCV RNA が検出された。PH5CH8/miR122 細胞のみで  $3 \times 10^2$ / $\mu\text{g}$  total RNA の HCV RNA が検出されたが、それ以外の PH5CH8 細胞や PH5CH8/miR122/CLDN1 細胞では検出されなかった。

HCV 陽性血清（遺伝子型 1b の 0 株）を添加した場合での結果は、HCV-JFH-1 とはかなり異なっていた。感染 7 日目の培養上清中の Core は PH5CH8 細胞でのみ 70 fmol/ml という値を初めて示し、それ以外の細胞では検出限界以下であった。感染 8 日目の培養上清ではすべて検出限界以下であった。細胞内 HCV RNA のレベルは、PH5CH8 細胞で  $7.1 \times 10^2$ 、PH5CH8/miR122/CLDN1 細胞で  $3.2 \times 10^2$ 、ORL8c 細胞で  $8.4 \times 10^2$ 、D7 細胞で  $3.9 \times 10^2$  copy/ $\mu\text{g}$  total RNA であり、これら以外の細胞では検出されなかった。これらの結果から、JFH-1 株や 0 株 HCV の感受性は細胞により相当異なることが示唆された。さらに培養を続行して、感染後 17 日、23 日、29 日目の培養上清中の Core の定量と感染 29 日目の細胞内 HCV RNA の定量を行った。その結果、RSc、ORL8c および D7 細胞では 29 日目においても培養上清に Core ( $10^4$  レベル fmol/ml)、細胞内に HCV RNA ( $10^7-10^8$  レベル copy/ $\mu\text{g}$  total RNA) が検出され、持続感染状態になっていることが分かった。しかしながら、PH5CH8 細胞系からは、培養上清中の Core も細胞内の HCV RNA も検出されなかった。これらの結果から、HCV 陽性血清を用いた HCV 感染で持続感染状態を維持することは難しいこと、miR122 や CLDN1 は HCV 複製増殖の増強因子として作用していないことが示唆された。

(2) 細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗 HCV 活性評価

昨年度、強い抗 HCV 活性を見出した N-89 と N-251（いずれも抗マalaria 活性を有し、N-251 については、first in man に向けての毒性安全性試験などが岡山大学薬学部のグループにより進行中）のうち、N-251 は側鎖基を有することから、体

内動態や代謝等について解析可能である。そのため、C 型慢性肝炎患者への臨床応用を目指して、平成 25 年 5 月に PMDA で対面助言を受ける機会を得た。その結果、薬剤の承認までに幾つかの点（作用機序、代謝物の抗 HCV 活性、耐性ウイルスの選択性に関する検討、宿主タンパク質に対する相互作用）について、明らかにすることが必要であるとの見解が得られた。そのため、今年度は、これらの課題に関する実験を行った。

これまでに、N-251 はリバビリンと併用すると抗 HCV 活性は相加効果で予想される活性値より高い効果を示したことから、相乗効果であることが示唆されていた。相乗効果であるかどうかを明らかにするために、Isobole plot 解析法を用いて、N-251 とリバビリンとの併用効果を調べた。得られた結果は、当初の予想どおり、両薬剤の併用により抗 HCV 活性は相乗効果になることが明らかとなった。次に、ヒトの血液内を想定して、FBS40%存在下で抗 HCV 活性が低下することがないことを確認する実験を行った。その結果、40% FBS 存在下でも、 $EC_{50}$  値は  $0.16 \mu\text{M}$  (10% FBS 存在下では  $0.12 \mu\text{M}$ ) となり遜色ない値を示すことが分かった。さらに、40% FBS 存在下では、N-251 に対する細胞保護効果が観察され、SI 値は 106 (10% FBS 存在下では 19) と高まり、安全性の高い化合物であることが示唆された。耐性ウイルスの選択性に関する検討については、最初、ORL8 細胞に N-89 や N-251（いずれも  $0.5 \mu\text{M}$  程度）を連続的に投与する方法を用いて、耐性細胞の選択を試みた。しかしながら、この方法では、細胞は全滅し、耐性細胞を得ることは出来なかった。そこで、我々は、HuH-7 由来の HCV レプリコン複製 s0 細胞を 8 年間継代培養した s0 (8Y) 細胞や Li23 由来の HCV レプリコン複製 s0L 細胞を 5 年間継代培養した s0L (5Y) 細胞に N-89 や N-251 を連続的に投与した。その結果、10 数回の連続投与により N-89 や N-251 に耐性を示す細胞が数種類得られた。現在、それらの細胞内で増殖している HCV の遺伝子解析を進めている。

我々が開発した HCV アッセイ系(数種類)を用いて、今年度も新規経口薬としての可能性を幾つかの市販品について評価を続けて来た。その過程で、サナギタケ冬虫夏草に中程度の抗 HCV 活性があることを見出した。サナギタケ冬虫夏草は、抗がん活性を有する混合化合物であり、米国ではがん患者に対する臨床試験が行われている。国内では、無菌養蚕システムで育てた蚕のサナギにサナギタケ菌を移付け、天然冬虫夏草と同じ環境のもと完熟まで育て収穫しており、市販品としてカプセル剤とドリンク剤がある。我々は両財形のサナギタケ冬虫夏草を入手し、それらの抗 HCV 活性を測定した。その結果、ORL8 アッセイではカプセル剤が抗 HCV 活性を有することを見出した。EC<sub>50</sub> 値は 54 µg/ml で SI 値は 5.6 以上であった。また、遺伝子型 1b の AH1 株を用いて作成した AH1R アッセイでも、EC<sub>50</sub> 値が 31 µg/ml で SI 値 5.2 となり、抗 HCV 活性が認められた。しかしながら、ドリンク剤の方にはまったく抗 HCV 活性は認められなかった。これらの結果から、サナギタケ冬虫夏草の財形により、活性が大きく異なることが示唆された。次に、カプセル剤に見出された抗 HCV 活性が、現行の肝炎治療に使用されている IFN-α やリバビリンの抗 HCV 活性と相加的あるいは相乗的に作用するかどうかを調べた。その結果、カプセル剤の抗 HCV 活性は、これら両薬剤と相加的に作用することが分かった。これにより、現行の治療効率を向上させることができることが示唆された。さらに、HCV RNA の両末端部と NS3 から NS5B 領域を有する HCV レプリコンが効率良く複製している細胞アッセイ系においても、カプセル剤が抗 HCV 活性を示すことが分かった。HuH-7 由来の sOR アッセイでは EC<sub>50</sub> 値が 12 µg/ml で SI 値が 3.8、Li23 由来の sORL8 アッセイでは EC<sub>50</sub> 値が 30 µg/ml で SI 値は 4.0 であった。これらの結果から、カプセル剤はサブゲノム RNA (レプリコン)の複製を阻害する活性を有することが分かった。

カプセル剤については、日本食品分析

センターから含有成分について公表されている。この情報から、抗 HCV 活性を示すのではないかと考えられる成分について、抗 HCV 活性の評価を行った。可能性のある成分としては、100 g 中、4.95g 含まれる Cordycepin (アデノシン誘導体) と 0.705g 含まれる Ergosterol (ステロールの一種) がその候補と考え、それぞれ合成品を別途入手して、これらの抗 HCV 活性を評価した。その結果、AH1R と sOR アッセイ系において、Cordycepin に抗 HCV 活性が認められた。AH1R アッセイ系における EC<sub>50</sub> 値が 0.58 µg/ml、SI 値 3.3、sOR アッセイ系においては、EC<sub>50</sub> 値が 1.7 µg/ml、SI 値 1.8 であった。AH1R アッセイ系では、カプセル剤の EC<sub>50</sub> 値が 31 µg/ml であったので、Cordycepin の含量(約 5%)で換算すると、1.5 µg/ml 程度と計算できる。従って、AH1R アッセイ系においては、カプセル剤が示す抗 HCV 活性をすべて Cordycepin の抗 HCV 活性で説明できることが分かった。しかしながら、sOR アッセイ系では Cordycepin の活性はカプセル剤全体の 50%程度しか説明できず、OR6 や ORL8 アッセイ系では細胞毒性が強く、明確な抗 HCV 活性を検出することができないということも分かった。Cordycepin とは対照的に Ergosterol は抗 HCV 活性や細胞毒性はほとんど検出されなかったことから、カプセル剤に認められる抗 HCV 活性には全く寄与していないことが分かった。以上の結果をまとめると、サナギタケ冬虫夏草のカプセル剤に見出された抗 HCV 活性の大部分は Cordycepin の作用に依るものであると推察された。

#### D. 考察

##### (1) HCV 感染実験

今年度の実験では、遺伝子型 1b の HCV 陽性血清だけではなく、培養細胞での HCV 感染実験に汎用されている遺伝子型 2a の JFH-1 株 HCV を使用して感染実験を行い、それぞれ得られた結果を比較した。その結果、JFH-1 株 HCV に関しては、これまで我々がその感受性細胞として樹立していた RSc、ORL8c および D7 細胞では約 1ヶ