

月間、HCV の高い複製レベルを維持していることを確認した。しかしながら、ヒト不死化 PH5CH8 細胞においては、感染 7 日目には既に培養上清の Core や細胞内 HCV RNA は検出限界以下であった。ただ、かろうじて miR122 を過剰発現させた PH5CH8/miR122 細胞で HCV RNA が低レベル (10^2 コピー/mg total RNA) で検出されただけであった。その一方で、0 株 HCV 陽性血清を添加した場合には、PH5CH8 細胞でのみ感染 7 日目の培養上清に Core が検出された。JFH-1 株 HCV にはほとんど感受性を示さなかった PH5CH8 細胞で初めて Core が検出されたことは、やはり過去の感染実験で遺伝子型 1b の HCV に有効な細胞株として選択されていたことを意義づけるものであると考えられる。JFH-1 株 HCV に高い感受性を示す RSc 細胞などがまったく 0 株 HCV には感受性を示さないということは、これまでに報告されている感染受容体が 2a 型 HCV と 1b 型 HCV で異なっている可能性もある。CLDN1 は JFH-1 株 HCV の感染受容体として得られたものであることから、これを過剰発現させても感染複製効率に差がないというよりむしろ低下してしまうという現象からも、1b 型 HCV には必要ない因子である可能性や、他の未知の因子を必要とする可能性がある。今後は、PH5CH8 細胞の感染 7 日目で Core 陽性の培養上清をウイルスのソースとしてナイーブな PH5CH8 細胞に再感染させる実験やもう少しスケールアップした感染系で一時的に増殖した HCV を得るなどの実験を行う予定である。我々は、PH5CH8 以外にもヒト不死化細胞株を有しているので、それらにも感染実験を行う予定である。次年度は、初代ヒト肝細胞に HCV を感染させた後に、RSc や PH5CH8 細胞などで増殖させることができないかどうかを検討する予定である。

(2) 細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗 HCV 活性評価

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 α 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。

E. 結論

今年度のまとめを以下に示す。

(1) HCV 感染複製に必要な宿主因子を過剰発現させたヒト不死化肝細胞を用いて

HCV 感染実験を行ったが、HCV の複製レベルは低レベルであった。そのため、更なる改良が必要である。

(2) 抗 HCV 活性の評価系を用いて昨年度見出した化合物 N-251 について、更なる解析を行い、リバビリン併用による相乗効果や 40%血清中における抗 HCV 活性の維持を確認した。

(3) 抗 HCV 活性の評価系を用いて今年度は、無菌養蚕サナギタケ冬虫夏草のカプセル剤に抗 HCV 活性を見出した。この活性は、冬虫夏草に 5%程度含まれる Cordycepin の効果に依るものであることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).

- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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. Ca²⁺/S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int*, 33:1008-1018 (2013).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
 - 12) 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).
 - 13) 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).
2. 学会発表
- 1) 上田優輝、森京子、團迫浩方、池田正徳、加藤宣之. 中国由来の漢方薬であるサナギタケ(北冬虫夏草)に見出された抗HCV活性. 第49回日本肝臓学会総会、東京、2013年6月.
 - 2) 篠原義康、留野渉、米田正人、今城健人、小川祐二、桐越博之、池田正徳、加藤宣之、前田慎、中島淳、斉藤聡. C型肝炎ウイルスによる肝性中性脂肪リパーゼの発現に及ぼす影響について. 第17回日本肝臓学会大会(JDDW)、東京、2013年10月.
 - 3) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of *Cordyceps militaris* used as a chinese herbal medicine. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
 - 4) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through the association with core protein around lipid droplet. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
 - 5) 上田優輝、森京子、佐藤伸哉、團迫浩方、池田正徳、加藤宣之. 抗HCV活性を有する中国由来の漢方薬であるサナギタケ(北冬虫夏草). 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
 - 6) 平本洗貴、團迫浩方、瀬島寛恵、森京子、佐藤伸哉、池田正徳、脇田隆字、加藤宣之. C型肝炎ウイルスのライフサイクルにおける宿主因子 annexin A1 の役割. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
 - 7) 團迫浩方、平本洗貴、池田正徳、脇田隆字、加藤宣之. Rab18 はC型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に重要な宿主因子である. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
 - 8) 田中寅彦、山本真民、黒田和道、脇田隆字、池田正徳、加藤宣之、槇島誠. C型肝炎ウイルス NS4B の両親媒性ヘリックス内疎水性残基がウイルス複製に果たす役割. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

HCV における脱ユビキチン化酵素の役割

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：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関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。本研究では、脱ユビキチン化酵素を網羅的にノックダウンし、HCV の複製への影響を検討することで、脱ユビキチン化酵素の USP15 と USP20 が HCV 複製に関与することを見いだした。USP15 は、脂肪滴の形成や維持に、また、USP20 は膜間輸送に関与する分子であり、HCV だけでなく日本脳炎ウイルスの複製にも関与することが示された。

A. 研究目的

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型 1b 型の高ウイルス価の難治性 C 型肝炎患者に対する著効率は 50%程度である。ウイルスのプロテアーゼやポリメラーゼ阻害剤が有用であることが明らかとなってきているが、耐性ウイルスの出現は明白であり、HCV の複製に必須な宿主因子を標的とすることが、抗ウイルス治療において最も有用な手段であると考えられる。脱ユビキチン化酵素は生体内で様々な生理現象に関わっており、癌研究においてその役割の重要性が認識され、近年様々な脱ユビキチン化酵素阻害剤が開発されている。一方、ウイルス感染における脱ユビキチン化酵素の役割に対する知見は乏しいことから、HCV 複製において重要な脱ユビキチン化酵素を同定し、その脱ユビキチン化酵素を標的とした、抗 HCV 薬開発の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、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、利益が保護

されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

昨年度我々は、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 が不在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。

D. 考察

USP15 は肝臓内で脂肪滴の形成や維持に関与することが示唆された。今後は、USP15 の脂肪滴形成の分子機構を解明する。さらに、USP20 の機能についても検討を行いたい。

E. 結論

脱ユビキチン化酵素を標的とする化合物は、HCV だけでなく、広範囲のウイルスに対して抗ウイルス効果を示す可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
3. 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
4. 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- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
5. 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
6. 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
2. 学会発表
 1. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
 2. Toru Okamoto, Shuhei Tagawa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, *Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics*, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
 3. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links” Marsala, Italy, October 20-21, 2013.
 4. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, *Infectious Diseases in Elderly Symposium*, Izmir, Turkey, October 25-29, 2013.
 5. Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, *The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation*, Tainan, Taiwan, November 16-17, 2013
 6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、12月9日、2013
 7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. *The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting*, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
 8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa

Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, and Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.

9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, and Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
11. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
12. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本 聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦 善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013
13. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川 舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

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
それを標的にした化合物開発

分担研究者：森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：ウイルス因子および宿主因子を利用してC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルスゲノム複製は成り立っている。我々は、NS5Aに相互作用する宿主因子としてFKBP6を同定している。本研究では、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をロ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。本研究の成果は、抗HCV剤および新規治療薬の開発に繋がるものと思われる。

A. 研究目的

世界で二億人、国内で約150-200万人のC型肝炎ウイルス(HCV)の感染者が推定されている。血液などを介して、HCVはヒトに感染し、高率に持続感染に移行する。持続感染患者は、慢性肝炎から肝硬変を経て、高い確率で肝細胞癌を発症する。本邦の肝癌の約7-8割は、HCV感染に起因し、高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型1の感染者に対する治療法は完全に確立されたとはいえない。新規NS3プロテアーゼ抑制剤の登場により、より高い著効率が期待できるようになったが、副作用や耐性ウイルスの出現、ウイルス排除後の肝がん発症などから、今後も新規抗HCV剤開発は必要である。

フラビウイルス科に属するHCVはプラス鎖RNAゲノムを持つエンベロープウイルスである。そのウイルスゲノムに単一のポリプロテイン前駆体がコードされており、宿主およびウイルスプロテアーゼによって切断を受け、10個のウイルス蛋白質に成熟する。C末端側2/3の領域に非構造蛋白質がコードされ、ウイルスゲノム複製に機能する。

HCVの非構造蛋白質であるNS5Aはウイルスゲノム複製、粒子形成に関与する蛋白質で、病原性にも関与するとされる。我々は、以前、イムノフ

イリン蛋白質である宿主蛋白質FKBP8を報告している。しかしながら、そのFKBP8に非依存的に複製するレプリコン細胞を見つけ、その細胞にFKBP8と同じ蛋白質ファミリーであるFKBP6が高発現していることを報告している。また、FKBP8を標的にした阻害剤DM-CHXがFKBP8非依存レプリコン細胞のウイルス複製を抑制することを報告している。

本研究では、FKBP6のがん化とウイルス感染との関連性をin vivoで検証し、さらにDM-CHXの作用機構について解析した。

B. 研究方法

HCV NS5Aを発現あるいはJFH1ウイルス株を感染させ、細胞内FKBP6/8あるいは強制発現したFKBP8/6との相互作用を免疫沈降法で解析した。また、細胞内局在の解析は、蛍光抗体法により染色した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。また、市販のTissue micro arrayを免疫染色し、HCV感染とFKBP6発現との関連性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保

護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得る。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存する。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行う。

C. 研究結果

以前、FKBP8 が HCV ゲノム複製に必要な宿主因子であることを報告し、FKBP8 ノックダウン耐性レプリコン細胞が FKBP6 ノックダウンによってウイルス複製が抑制されることが分かっている。FKBP6 と FKBP8 が多量体形成し、細胞内局在は一致した。FKBP8 を標的にした化合物 DM-CHX をレプリコン細胞に投与するとウイルス複製が有意に抑制された。また、DM-CHX の添加によって、FKBP8 と FKBP6 のホモ・ヘテロ多量体形成が抑制された。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 の発現は有意に上昇していた。また、HBV 感染と FKBP6 の発現に関連性がないことが分かった。

D. 考察

本研究で、低分子化合物 DM-CHX が抗 HCV 活性をもち、FKBP6/8 の多量体形成を標的にしていることが示唆された。従って、ウイルス複製に FKBP6/8 の機能が必須であり、NS5A との結合でそれが機能していると考えられた。がん部で FKBP6 が高発現しており、肝細胞がんとの関連が考えられる。また、HCV 感染によって FKBP6 発現が誘導されることが

示唆され、感染後、FKBP6 発現によって HCV 感染が安定化されることが示唆された。FKBP6 は感染およびがん化で誘導されることから、C型肝炎療法の良い標的になることが期待された。

E. 結論

本研究によって、HCV 感染によって FKBP6 が誘導され、感染が維持されているものと考えられた。また、がん化と FKBP6 との関連も指摘され、今後の解析が重要である。さらに、本研究によって、DM-CHX の標的となるウイルス複製ステップが分かり、今後の抗ウイルス剤開発に有用な情報を提供した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach. *J. Proteome Res.*, 12: 2537-2551, 2013
2. 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(2+)/S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 33: 1008-1018, 2013
3. 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
- 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
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

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

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

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

2. 学会発表

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013

Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and

clinical links", Trapani, Italy, October 20-21, 2013

葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司。Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いた HCV 感染細胞内脂質組成の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸

山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、森石恆司。Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸

1. 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
2. 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離した non-primate hepacivirus の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
3. 森石恆司、教育セミナー：HCV に近縁なへパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
4. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

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

研究分担者 勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質によるC型肝炎ウイルス（HCV）複製制御機構について解析した。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 κ B経路を抑制する可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎治療はNS3/4Aセリンプロテアーゼ阻害薬が承認され、Direct Acting Antivirals (DAA)の時代に突入したが、治験中の次世代薬を含め、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用による治療の中断が懸念されている。そのため、DAAとは異なる作用機序をもった新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。HCV蛋白質がユビキチンやISG15で修飾され、ウイルス増殖が調節されることが知られているが、未だ詳細は不明である。そこで、ユビキチン-プロテアソーム系およびISG15系によるHCV増殖制御の分子機構を明らかにし、新規抗HCV薬開発のための分子基盤の構築を目指した。

B. 研究方法

1. Huh7細胞におけるISG15の誘導
ヒト肝癌細胞株Huh-7細胞にIFN- α またはIFN- β 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。

2. HCV感染によるISGylation系の誘導
Huh-7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。

3. NS5AをISGylationするE3の解析
Huh-7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。

4. HCV NS5AのISGylationの解析
Con1, 0 (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a)をプラスミドpEF1A-NS5A-myc-His₆として発現させ、ISGylationを解析した。

5. NS5A ISGylation部位の解析
NS5A K-R 変異体をmyc-His₆の形で発現させ、E1, E2, E3, FLAG-ISG15をHuh-7細胞に発現させ

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 NS5A蛋白質と脱ユビキチン化酵素

OTUD7Bの相互作用解析

Huh-7細胞にFLAG-OTUD7BとNS5A-myc-His₆を一過性に発現させ、免疫沈降法により相互作用を解析した。

7. HCV NS5A上のOTUD7Bとの相互作用に重要な部位の解析

NS5Aの各種deletion mutantを用いて、NS5A上のOTUD7Bとの結合に重要な部位を免疫沈降法にて解析した。

8. NS5AによるOTUD7B脱ユビキチン化酵素活性への影響

Huh-7.5細胞にHA-Ub, NS5A-myc-His₆, FLAG-OTUD7Bをトランスフェクトし、NS5AによるOTUD7B脱ユビキチン化酵素活性への影響を解析した。

(倫理面の配慮)

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。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

1. Huh7細胞におけるISG15の誘導

ヒト肝癌細胞株Huh-7細胞にIFN- α またはIFN- β を添加し24時間後に細胞を回収したところ、内在性のISG15, UBE1L, UbcH8の発現が誘導された。

2. HCV 感染による ISGylation 系の誘導

Huh-7細胞にHCV J6/JFH1をMOI=2で感染させたところ、48時間後のISG15, Herc 5 のmRNA量が有意に上昇した。

3. 細胞内にTRIM25を発現させた場合はNS5Aの

ISGylationは認められなかったが、Herc5により、顕著なNS5AのISGylationが検出された。

4. HCV NS5AのISGylationの解析

Con1, 0 (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a)のいずれのNS5AにおいてもISGylationが認められた。

5. NS5A 上のISGylation 部位の解析

NS5Aの1箇所のLys残基だけでなく複数箇所ISGylationされることが示された。

6. HCV NS5A蛋白質と脱ユビキチン化酵素

OTUD7Bの相互作用解析

Huh-7細胞にFLAG-OTUD7BとNS5A-myc-His₆を一過性に発現させたところ、免疫沈降法により両者は相互作用を示した。

7. HCV NS5A上のOTUD7Bとの相互作用に重要な部位の解析

NS5Aの変異体の解析により、NS5A上のdomain IがOTUD7Bとの相互作用に重要であることが示された。

8. NS5AによるOTUD7B脱ユビキチン化酵素活性への影響

NS5Aのトランスフェクト量を増加させるとHA-Ubのシグナルが減少し、NS5AによりOTUD7Bの脱ユビキチン化酵素活性が促進される可能性が示された。

D. 考察

HCV NS5A蛋白質は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- α , β , 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、前年度に同定した新規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 κ 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蛋白質とOTUD7Bの相互作用がNF κ 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。

E. 結論

1. HCV NS5A 蛋白質はE3 リガーゼ Herc5 により ISGylation が促進された。
2. Con1, 0, JFH1 株いずれのNS5A も ISGylation を受け、genotype によらずHCV に共通の現象と考えられた。
3. 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。
4. HCV NS5A 蛋白質と脱ユビキチン化酵素OTUD7B が相互作用を示すことが明らかとなった。
5. NS5A domain I がOTUD7B との相互作用に重要である。
6. 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。
7. OTUD7B はNF κ 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 蛋白質とOTUD7B の相互作用がNF κ B シグナリング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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ratnoglik 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.*
- 2) 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.*
- 3) 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.
- 4) 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., and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement

component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

2. 学会発表

1) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.

2) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis.

20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.

3) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.

4) Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.

5) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.

6) Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.

7) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV感染による糖代謝障害の分子機序. 第61回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013年11月.

8) DENG Lin, 陳明, 勝二郁夫, 堀田博. C

型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

9) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 淵野裕之, 川原信夫, 堀田博.

Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) は C 型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.

10) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

11) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

12) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C 型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV 複製機構の解析

分担研究者 有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター 准教授
研究協力者 黒木 美沙緒 熊本大学エイズ学研究センター 研究員

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）に対する新規抗 HCV 剤開発には、HCV の生活環と関与する宿主因子の解明が必要不可欠である。これまで我々は P-body 因子 DDX3 及び DDX6 RNA ヘリケースをはじめ、ストレス顆粒因子 G3BP1、Ataxin2、PABP1 が HCV 感染により、HCV 産生の場である脂肪滴周辺にハイジャックされること、そしてこれら P-body やストレス顆粒因子が HCV 複製に関与することを明らかにしてきた。そこで、本年度は宿主因子を分子標的とした創薬開発のため、新たに HCV 複製に関与する以下の宿主因子を同定し、その HCV 生活環における役割について解析を行なった。（1）核内宿主因子 DDX5 RNA ヘリケース及びクロマチンリモデリング因子 INI1/hSNF5 が HCV の複製に必要であること、（2）核小体に局在する DDX21 RNA ヘリケースが HCV 複製に必要であること、そして、（3）ストレス顆粒因子 Staufen1 及び UPF1 が HCV の生活環に必要であることを見出した。

A. 研究目的

これまでの HCV 研究において、*in vitro* 細胞培養系で効率良く感染性ウイルス粒子を産生することが困難なため、ウイルス粒子形成や出芽機構に関しては不明であった。最近、細胞培養系で感染性 HCV 粒子を産生可能な JFH1 株の開発がブレークスルーとなり、HCV 複製における脂質代謝経路の重要性、そして、脂肪滴が HCV 粒子産生の場であることが見出された。実際、我々も HCV 感染に伴い、P-body に局在していた DDX3 及び DDX6 RNA ヘリケースやストレス顆粒因子 G3BP1、Ataxin2、PABP1 が脂肪滴にハイジャックされ、HCV 複製に関与していること (Ariumi *et al. J. Virol.* 2011)、ESCRT システムが HCV 産生に利用されていることを明らかにしてきた (Ariumi *et al. PLoS One* 2011)。そこで、このような経緯を踏まえ、本研究において HCV 複製や病態に関与する新規宿主因子を同定し、HCV の生活環の全容解明はもとより、細胞培養系における大量スケールの HCV 粒子産生の確立を目指し、HCV ワクチン開発や宿主因子を分子標的とした新規抗 HCV 剤の開発につなげたい。

B. 研究方法

(1) 細胞内局在の観察

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に

HCV-JFH1 株を感染させ、感染 7 2 時間後に細胞を固定後、抗 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。

(2) HCV 複製に関与する宿主因子の同定

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、Staufen1、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。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験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り、本年度の研究には、ヒトの臨床材料や実験動物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、本研究は「研究開発等に係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処置等を定める省令」に基づき実施した。特に HCV ウイルスを用いた感染実験の場合は P2 レベル実験室のバイオハザード対策用安全キャビネットを使用し、実験終了後の資料についても、UV 照射、次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素系消毒薬処理およびオートクレーブを用い、適正に廃棄を行った。

C. 研究結果

(1) 核内宿主因子 DDX5 及び INI1/hSNF5 の HCV 生活環における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 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に比べて、それほど影響しなかった。

(2) 核小体局在 DDX21 RNA へリケースの HCV 生活環における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 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-O RNA 株複製 O 細胞や HCV-O 株サブゲノムレプリコン sO 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。

(3) ストレス顆粒因子 Staufen 1 及び UPF1 の HCV 生活環における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 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

HCV 生活環に関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。これまで、我々は P-body 局在因子 DDX3 及び DDX6 RNA へリケースが HCV 複製に必要な宿主因子であることを報告してきた (Ariumi *et al.* *J. Virol.* 2007; Ariumi *et al.* *J. Virol.* 2011)。核に局在する RNA へリケース 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・複製への関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関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 複製に関与しているのかについては、今後の研究課題である。最近、我々は、HIV-1 の生活環においても DDX5 や DDX21 が HIV-1 Rev と結合し、Rev 依存的な HIV-1 mRNA の核外輸送促進に関与していることを見出している (Inoue *et al.* *BBRC* 2013)。さらに、yeast

two-hybrid 法で HIV-1 インテグラーゼ結合因子として同定された INI1/hSNF5 は、クロマチンリモデリング因子として機能することも知られている。一方、ストレス顆粒因子 Staufen 1 及び UPF1 が HCV の生活環に関与することも見出した。これに関連して、我々は HCV 感染により、感染 3 6 時間頃、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 の粒子産生に関与する (Chatel-Chaix *et al.* *MCB* 2004) という報告があるので、Staufen 1 の HCV 粒子産生への関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

(1) 核に局在する DDX5 及び INI1/hSNF5 は HCV の生活環に必要な宿主因子であることが示唆された。

(2) 核小体に局在する DDX21 は HCV の生活環に必要な宿主因子であることが示唆された。

(3) ストレス顆粒因子 Staufen 1 及び UPF1 は HCV の生活環に必要な宿主因子であることが判明した。

F. 知的所有権の取得状況

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. 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
3. 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
4. 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
5. 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

2. 学会発表等

(1) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 骨粗鬆症治療剤であるラロキシフェンの抗HCV活性機構について. 第49回日本肝臓学会総会、東京、2013年6月6-7日

(2) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 骨粗鬆症治療剤であるラロキシフェンは抗HCV活性を示す. 第28回中国四国ウイルス研究会、広島、2013年6月22-23日

(3) 武田 緑、池田 正徳、森 京子、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 遺伝子型の異なるHCV培養細胞システムを用いたラロキシフェンの抗HCV活性の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸国際会議場、神戸

(4) 黒木美沙緒、井上万里子、中島詩織、有海康雄. がん抑制因子はLINE-1のレトロトランスポジションを抑制する. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場、神戸

(5) 川野広大、黒木美沙緒、有海康雄. HIV-1によるLINE-1レトロトランスポジションの抑制. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月10日~12日, 神戸国際会議場、神戸

(6) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. 20th international symposium on hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013

(7) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue, Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi. Identification and characterization of novel restriction factors of LINE-1. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013

(8) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue, Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev and Tat function. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013

(9) Yasuo Ariumi and Misao Kuroki. Tumor suppressor proteins negatively regulates

the life cycle of LINE-1. FASEB meeting Mobile DNA in mammalian genomes, June 9-14, 2013, Big Sky, Montana, USA

(10) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue, Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev and Tat function. Frontiers of retrovirology

16-18 September, 2013, Churchill College, Cambridge University, UK

(11) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue, Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi. Tumor suppressor proteins restricts LINE-1 retrotransposition. Frontiers of retrovirology

September 16-18, 2013, Churchill College, Cambridge University, UK

(12) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi. HIV-1 interacts with LINE-1 Keystone symposia Mobile Genetic Elements and Genome Evolution (C2), March 9 - 14, 2014, Santa Fe, New Mexico, USA

(13) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi. HIV-1 suppresses LINE-1 retrotransposition. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013, Kumamoto, Japan

(14) Yasuo Ariumi. P-body, RNA helicase, and HIV-1 life cycle. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013, Kumamoto, Japan

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木哲朗	C 型肝炎ウイルスのゲノム複製や粒子形成を制御するしくみ		化学の領域	医薬ジャーナル	大阪市	2013	97-103

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, <u>Suzuki T</u> , 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	
Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, <u>Suzuki T</u> , Kanegae Y.	Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication.	Sci Rep		in press	
Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, <u>Suzuki T</u> , Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, <u>Shoji I</u> , Tsubouchi H.	Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4.	PLOS ONE		in press	
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Fukazawa H.	Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling.	Microbes Infect		in press	
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, <u>Matsuura Y</u> , Wakita T, <u>Suzuki T</u> .	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
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, <u>Suzuki T</u> , Miyamura T, Wakita T, Aizaki H.	Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro.	PLOS ONE	8	e68992	2013
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, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Imoto M, Kojima S.	HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor.	Sci Rep	3	3243	2013
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, <u>Suzuki T</u> , 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
Dansako H,	Class A scavenger receptor 1				