

201320015A

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

肝炎ウイルスの複製増殖および 病原性発現機構と薬剤感受性の解析

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

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

肝炎ウイルスの複製増殖および 病原性発現機構と薬剤感受性の解析

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析 3
脇田 隆宇

II. 分担研究報告

1. 肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析の総括 31
脇田 隆宇
2. HBV キメラウイルスを用いたウイルス複製機構解析 39
飯島 沙幸
3. HCV ライフサイクルにおける脂質代謝の役割の解明 42
池田 正徳
4. E型肝炎ウイルスレプリコンの構築と阻害剤スクリーニングへの応用 . . . 46
石井 孝司
5. LカルニチンによるHCV増殖抑制、脂肪化抑制、酸化ストレス抑制効果の検討 48
大西 俊介
6. 抗HCV薬スクリーニングのためのHCV持続感染系の樹立；効率の良い1b型HCV感染クローンおよび細胞の工夫 50
杉山 和夫
7. 酸化ストレスを低下させて肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索 58
萩原 正敏
8. ヒト肝幹細胞を用いたHCVの高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いたHCVによる発癌機構の解明 61
土方 誠

9. HCV 感染性マウスの作製	65
三浦 直行	
10. IL28B 遺伝子領域に一塩基多型を持つヒト iPS 細胞由来分化肝細胞を用いた抗 HCV 薬評価系の開発	67
水口 裕之	
11. ウイルス及び宿主因子を標的にした抗 HCV 剤の探索と開発	71
森石 恆司	
12. ヒト iPS 細胞を利用した HCV 侵入・複製に関わる宿主側因子の探索と治療薬候補物質の評価	74
八木 清仁	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	87

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書（平成 25 年度）

肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 ウイルス複製増殖機構や病原性発現機構を理解するために、HBV, HCV, HEV の新規ウイルス培養系の開発と、ウイルス培養系を利用して、ウイルス複製増殖過程と病原性発現機構を解析する。さらに、抗ウイルス薬に対する感受性を解析する。HCV では増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV 感染過程に必要な宿主因子を明らかにし、新規感染動物モデルを開発し、新規治療法および予防法開発に役立てる。

研究分担者	飯島沙幸 名古屋市立大学大学院 助教	研究分担者	三浦直行 浜松医科大学医学部 教授
研究分担者	池田正徳 岡山大学大学院 准教授	研究分担者	水口裕之 大阪大学大学院 教授
研究分担者	石井孝司 国立感染症研究所 室長	研究分担者	森石恒司 山梨大学大学院 教授
研究分担者	大西俊介 北海道大学大学院 助教	研究分担者	八木清仁 大阪大学大学院 教授
研究分担者	杉山和夫 慶應義塾大学 特任准教授		
研究分担者	萩原正敏 京都大学大学院 教授		
研究分担者	土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授		

A. 研究目的

肝炎ウイルス感染症は我が国における最も重要な疾患のひとつであり、その対策を迅速に進める必要がある。HCVに対するDAA感受性や耐性変異のプロファイリングなどウイルス学的研究が必要である。HBVキャリアでは、核酸アナログ剤の長期投与により肝癌発生率は低下するが、一旦抗ウイルス薬治療を開始すると、長期間にわたる治療が必要である。薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。HEV感染症は、近年我が国土着の人獣共通感染症として問題となってきた。老人におけるHEV感染では重症化・劇症化する場合がある。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するために、本研究ではウイルス複製増殖機構や病原性発現機構を理解する。HBV, HCV, HEVの新規ウイルス培養系の開発と、ウイルス培養系を利用して、ウイルス複製増殖過程と病原性発現機構を解析する。さらに、抗ウイルス薬に対する感受性を解析する。HCVでは増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。さらに、HCV感染過程に必要な宿主因子を明らかにし、新規感染動物モデルを開発し、新規治療法および予防法開発に役立てる。HBVはウイルス感染が可能な培養細胞系が存在しないため、新たな感染実験系を開発する。HEVも最近確立されたウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬の開

発を進める。また、最近著しい進歩をとげている細胞リプログラミング技術を利用して、肝炎ウイルス感染感受性を有する新たな培養細胞モデルの開発を進める。

分担研究としてはHBV, HCV, HEVのウイルス増殖機構の解析、抗ウイルス活性を有する化合物の同定などを進めるとともに、研究班に参加する研究分担者の研究をまとめ、研究者間の共同研究を推進する。

B. 研究方法

1. 新規ウイルス培養系の開発(脇田)

急性肝炎症例から分離した遺伝子型 1b の NC-1 株を用いて全長レプリコンを構築した。レプリコン細胞を継代培養し、上清をアミコンで30倍に濃縮してHuh7.5.1細胞に接種し、G418による薬剤選択培養をおこなった。また、サブジェノミック・レプリコン細胞から同定した適応変異を遺伝子型 3a の野生型 S310 株にそれぞれ導入した全長コンストラクトを作製した。適応変異を導入した S310 株の全長 HCV RNA を合成し、Huh7.5.1 細胞に導入して経代培養を行った。

2. HBV キメラウイルスを用いたウイルス複製機構解析(飯島)

ウイルス複製効率の異なる遺伝子型 A と遺伝子型 C のクローンを用いてキメラウイルスを作製した。コアプロモータ領域(CP)、プレコア領域(PreC)、コア領域の三つの領域に注目し、複製効率の低い Ae_US clone をベースに複製効率の高い C_AT clone 配列と入

れ替えキメラウイルスクローンを作製した。

3. HCV ライフサイクルにおける脂質代謝の役割の解明(池田)

REP-1 および REP-2 を発現している D7 細胞を用いて REP の HCV ライフサイクルに及ぼす影響について検討した。D7 細胞を REP-1 あるいは REP-2 に対する siRNA を感染前後で処理して HCV 感染、複製に対する影響を検討した。また、Rab 蛋白質に対する siRNA を作製し発現抑制による HCV 増殖に及ぼす影響について検討した。

4. E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築と阻害剤スクリーニングへの応用(石井)

感染性の HEV クローン 83-2 の構造蛋白領域をレポーター遺伝子 (SecNanoLuc) で置換した cDNA を作成した。また、レポーター遺伝子の下流に HCV IRES 下流にネオマイシン耐性遺伝子を導入したレプリコンも作成し、合成した RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞に導入して恒常的にレプリコンが複製しレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) を分泌する cell line も作製した。これらのレプリコン保持細胞に LOPAC 化合物ライブラリーを添加し、レプリコン複製を阻害する物質のスクリーニングを行った。

5. L カルニチンによる HCV 増殖抑制、脂肪化抑制、酸化ストレス抑制効果の検討(大西)

HCV レプリコン、HCV 感染培養系 (JFH-1 J6/JFH-1) を用いて L-カルニチンの HCV 増殖抑制効果、脂肪化抑制効果、抗酸化作用についての検討を行う。

6. 抗 HCV 薬スクリーニングのための HCV 持続感染系の樹立(杉山)

4 種類のレプリコン複製細胞に構造領域発現ベクター pC-NS2 をトランスフェクションし、細胞内サブゲノムレプリコン RNA をトランスパッケージングしレプリコン含有粒子として上清に放出させナイーブな細胞へ感染させた。コロニー形成能からトランスパッケージングの効率を判定した。また、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体を用いて感染阻害実験を行った。トランスパッケージングに用いた遺伝子型 1b 型の構造領域と 1b 型のサブゲノムレプリコンを連結して、遺伝子型 1b 型全長 HCV の cDNA を作製した。この cDNA より RNA を合成し細胞へトランスフェクションした。

7. 酸化ストレスを低下させて肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索(萩原)

1) 抗フラビウイルス薬 SFV785 類縁体を含むキナーゼ阻害薬コレクションから、増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、抗 HCV 能を持つ化合物をスクリーニングし、SFV785 との活性比較を行った

2) 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、見つかった合成レチノイドについてその構造活性相関を行った

3) 単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスなど幅広い薬効が確認された新規抗 DNA ウイルス薬が B 型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性

について検討した。

8. ヒト肝幹細胞を用いた HCV の高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いた HCV による発癌機構の解明(土方)

不死化ヒト肝細胞 HuS-E/2 細胞を予め IFN- α に対する中和抗体やその受容体に対する中和抗体で処理して、組換え体 HCV (JFH1) を感染させて、この細胞における IFN 関連遺伝子の誘導および JFH1 の感染増殖に対する効果を検討した。

ヒト肝幹細胞 HYM1 細胞は、その遺伝子発現パターンがヒト肝幹細胞様であることを推定していた。そこで本年度は、1. 成熟肝細胞への分化が可能であるか否か、また、これまでに報告されている肝幹細胞の特徴である 2. 胆管上皮細胞への分化能を有するか否かについて検討をおこなった。

また、HCV が感染した細胞を標識し、分離するシステムの構築を行った。細胞内膜上に HCV プロテアーゼ標的ペプチドを介して繫留した転写因子を作成し、HCV プロテアーゼセンサーとした。この膜繫留型転写活性化因子が JFH1 の感染により特異的に切断され、膜から分離され、核内に輸送され、特定のリポーター遺伝子の発現を誘導するか否かと検討した。

9. HCV 感染性マウスの作製(三浦)

Huh7.5.1 細胞へのマウス Cd81 発現ベクター、マウス Oc1n 発現ベクター、および Sh NPC1L1 ノックダウンベクターをリポソーム法で遺伝子導入し、G418 で永久発現時株を

樹立した。HCV genome RNA cDNA の 5' にヒト pol I promoter を、3' にマウス pol I terminator を連結した DNA でトランスジェニックマウスを作製した。

10. IL28B 遺伝子領域に一塩基多型を持つヒト iPS 細胞由来分化肝細胞を用いた抗 HCV 薬評価系の開発(水口)

各種ヒト ES/iPS 細胞よりゲノム DNA を回収したのち、ABI Taqman allelic discrimination kit を用いて、IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 について解析した。ヒト iPS 細胞株から肝細胞への分化誘導は、Ad ベクターを用いた FOXA2、HNF1a 遺伝子導入法を改良した方法で行った。ヒト iPS 細胞株から肝細胞に分化誘導したのち、Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により HCV 受容体、IFN 受容体ならびに自然免疫受容体について、その発現レベルを解析した。またコントロールとしては、凍結ヒト初代肝細胞を用いた。ヒト iPS 細胞株から分化誘導した肝細胞に対し、Cell cultured HCV (JFH-1 株、HCVcc) を MOI0.5 で作用させたのち、経時的に Total RNA を細胞より回収した。回収した RNA を用いて定量的 RT-PCR により、HCV ゲノム量、IFN および ISG mRNA 量を検討した。

11. ウイルス及び宿主因子を標的にした抗 HCV 剤の探索と開発(森石)

遺伝子型 1b の N 株、Con1 株、遺伝子型 2a の JFH1 株のサブゲノムレプリコン細胞および遺伝子型 1b の 0 株のフルゲノムレプリコ

ン細胞を用いて、各化合物の抗 HCV 活性を検討した。細胞毒性は、MTS アッセイを用いた。各化合物は既報の方法によって合成し、DMSO に溶解し、使用時に培養液に添加した。インターフェロン誘導能を検討するため、ISG に対する RT-PCR を行った。Caffeic acid n-octyl ester に対する既存抗 HCV 剤との併用効果を isobologram によってプロットし、さらに CalcuSyn によって EC50、EC75、EC90 値から Combination Index を求めた。

12. ヒト iPS 細胞を利用した HCV 侵入・複製に関わる宿主側因子の探索と治療薬候補物質の評価(八木)

ヒト iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS 細胞由来肝 (ヒト iPS-hep) 細胞は、大阪大学大学院薬学研究科・水口裕之教授グループによって作製されたものを使用した。

iPS 細胞、ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞、ヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞、ヒト iPS-hep 細胞における遺伝子発現のマイクロアレイ解析データを用いた発現解析データマイニングを、北海道システムサイエンス社に委託し、行った。コンカナバリン A (ConA) 誘導性肝障害モデルマウスを用いて肝保護効果を評価した。HCV 感染阻害実験には、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV シュードウイルス (HCVpv) および細胞培養系により作製した HCV 粒子 (HCVcc) を用いた。HCV 複製阻害実験には HCV レプリコン細胞である Huh7.5.1 1bFeo 細胞 (北海道大学坂本

直哉教授より供与) を使用した。

(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る。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究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、提供試料、個人情報に厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 新規ウイルス培養系の開発(脇田)

急性肝炎症例の血清から分離した遺伝子型 1b のウイルス遺伝子 (NC-1) を用いて全長遺伝子構築を作成した。合成した RNA を Huh7 細胞にトランスフェクションして G418 による選択培養をおこなった。培養上清をアミコンにより 30 倍に濃縮して Huh7.5.1 細胞に接種し、G418 で選択培養した。3 週間後にコロニー形成を確認できた。つまり、トランスフェクション細胞の培養上清中には感染性ウイルス粒子が分泌されたことを確認できた。また、遺伝子型 3a の感染実験系を構築した。異なる適応変異を導入した 3 クロー

ンでは RNA 導入後、2-3 週間で培養上清中に HCV コア蛋白質を検出した。更に、他の適応変異を持つ3クローンは RNA の導入後 6-8 週間で上清中に HCV コア蛋白質を検出した。培養上清中には感染性ウイルスが分泌され、Huh7.5.1 細胞に感染させて、ウイルス増殖能を比較したところ、細胞内と細胞外の HCV コア蛋白質量は両方とも J6/JFH1 よりも低いレベルであったが、JFH-1 とはほぼ同じレベルであった。

2. HBV キメラウイルスを用いたウイルス複製機構解析(飯島)

野生型 Ae クローンと作製した Ae/C クローン間で細胞内 HBcr 抗原量は一部の変異体で著しい増加が確認された。ウイルス複製に重要な部位は CP~PreC にわたる領域であると示唆された。さらに詳細に解析するため、この領域の点変異株を作製した。Ae_US, C_AT clone で配列を比較し塩基配列の異なる部位に注目し変異株を作製したが、HBcr 抗原量、HBV ウイルスゲノム量共にわずかな変動にとどまり、現時点ではウイルス複製の規定領域の確定には至っていない。

3. HCV ライフサイクルにおける脂質代謝の役割の解明(池田)

GGTaseII には RABGGTA および RABGGTB の2種類のサブユニットを含む。また、GGTaseI には含まれない REP-1 および REP-2 が修飾に際し必要なことが GGTaseII の特徴として挙げられる。REP-1 に対する siRNA 処理では HCV 感染を抑制しなかったが、REP-2 に対する

siRNA 処理では HCV 感染が強力に抑制された。このことより、REP-1 ではなく REP-2 が HCV 感染に重要なことが示唆された。

Rab13 は occludin と claudin1 の輸送に関わることが知られている。Rab13 の発現を siRNA で抑制すると HCV の感染が強力に抑制された。Rab13 の発現を HCV 感染後に抑制すると軽度の HCV 増殖抑制が認められた。これらの結果は Rab13 が感染後の HCV 増殖よりも感染において重要な役割を果たすことを示している。

4. E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築と阻害剤スクリーニングへの応用(石井)

感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。HEV レプリコン細胞を用いて、LOPAC 化合物ライブラリー(約 1,200) のスクリーニングを行った。100uM の濃度で HEV を 50%以下に低下し、MTT アッセイで強い毒性が見られない 134 の化合物を選択し、さらに 20uM でも阻害活性が認められた化合物 17 を検討候補化合物として選択した。一方、レプリコンの複製を促進する 10 の化合物も見出された。

5. L カルニチンによる HCV 増殖抑制、脂肪化抑制、酸化ストレス抑制効果の検討(大西)

L カルニチン投与により、HCV レプリコン系での増殖抑制は明らかなでなかったが、HCV 感染培養系においては、増殖抑制、肝脂肪化抑制、酸化ストレス抑制効果を確認した。更にカルニチン投与により HCV 感染により

惹起される脂肪滴形成の抑制を確認した。

6. 抗 HCV 薬スクリーニングのための HCV 持続感染系の樹立(杉山)

構造領域が遺伝子型 1b で非構造領域が遺伝子型 2a のキメラ HCV (TNS2J1) 株を樹立しその感染性を確認した。この株由来の 2 種類の構造領域発現ベクター-pC-NS2 (1b/2a キメラ型) および pC-NS2T (完全 1b 型) を 1b 型レプリコン複製細胞へそれぞれトランスフェクションすることによって、細胞内のサブゲノムレプリコン RNA をトランスパッケージングしウイルス粒子として上清に放出されることを目指した。この上清をナイーブな培養肝細胞に接種し、ネオマイシン存在下で培養することでネオマイシン耐性細胞コロニーが形成された。よりトランスパッケージング能の高いサブゲノムレプリコンを得るために、コロニー形成能の高かったネオマイシン耐性コロニーを単離し、この細胞へ再びトランスパッケージングした。同様の操作を繰り返して、コロニー形成率を検討したところ、Round 3 まではコロニー形成率が向上したが、それ以降 (round3-7) はコロニー形成率の向上は認められなかった。CD81 抗体および ApoE 抗体によるコロニーの形成が有意に阻害されたことから、トランスパッケージングにより HCV ウイルス粒子が産生されている可能性が示された。始めのトランスパッケージングによってできたサブゲノムレプリコンの NS3、NS4B、NS5A に数カ所の変異が認められ適応変異だと考えられた。その適応変異

が入った遺伝子型 1b 型の全長 HCV ゲノムの cDNA の作成を行った。合成 RNA を作成し、Huh7.5 細胞へトランスフェクションしたところ HCV 蛋白質の発現は認められたが、次第に発現が現弱し、HCV 感染の成立と判断できなかった。

7. 酸化ストレスを低下させて肝炎ウイルス増殖を抑制する新規治療薬候補物質の探索(萩原)

1) SFV785 類縁骨格を含む化合物コレクション 557 個について HCV レプリコン複製阻害能を検討したところ、抗 HCV 能を持つ化合物を二種同定したが、SFV785 の抗 HCV 能を凌駕する化合物は得られなかった。

2) 増殖ルシフェラーゼ発現 HCV レプリコン細胞を用いて、合成レチノイド Tp80 について、先に同定された SFV785 との活性比較をしたところ、抗 HCV 能はやや高いことが示された。続いて構造活性相関をおこなったところ、Tp80 のもつ Tropolone 環の抗 HCV 作用への関与を示唆する結果が得られた。

3) DNA ウイルス増殖阻害化合物が、B 型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について、初代培養肝細胞への HBV 感染実験系で検討したところ、化合物添加による HBV DNA コピー数および HBs 抗原の減少は認められなかった。

8. ヒト肝幹細胞を用いた HCV の高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いた HCV による発癌機構の解明(土方)

IFN- α やその受容体に対する中和抗体の前処理を行った HuS-E/2 細胞に JFH1 を感

染させると、この細胞内における IFN 関連遺伝子の誘導は、そのピークが遅延することがわかった。また JFH1 の感染増殖をその細胞内におけるゲノム RNA 量の変化で検証したところ、この前処理により JFH1 RNA 量が著しく増加していることが観察された。

HYM1 細胞は未分化時には全くヒトアルブミンを産生していないが、分化誘導時間に応じてヒトアルブミン量が増加し、ヒト肝癌由来細胞である HuH7 細胞より、その産生量が多くなることがわかった。また、マトリゲルを用いた立体培養法で HYM1 細胞は細胞極性を示す中空のシスト様構造をとることが観察された。

転写活性化因子として HTLV-1 の TAX タンパク質と Gal4-VP16 を用いた HCV プロテアーゼセンサープラスミドを作成し、それぞれの転写活性化因子応答配列を有するプロモーター配列によって駆動されるレポーター遺伝子として G-Luc および GFP を有する標識プラスミドを作成した。これらのプラスミドを一過性に導入した HuH-7.5 細胞に JFH1 を感染させたところ、非感染細胞に比較して非常に高いレポーター遺伝子発現が観察された。

9. HCV 感染性マウスの作製(三浦)

マウス Cd81、Oc1n 蛋白質を強制発現させた Huh7.5.1 ヒト肝癌細胞は、HCVpp の侵入を阻害するかどうかを検討したところ、HCVpp の侵入は 20-25%の低下を示し、一方、NPC1L1 のノックダウン細胞株では50%の阻害が認められた。

HCV genome transgenic mouse の血液中に感染性ウイルスが認められ、複製阻害剤の MBS790052 投与で、ウイルス RNA copy が3分の1になった。

10. IL28B 遺伝子領域に一塩基多型を持つヒト iPS 細胞由来分化肝細胞を用いた抗 HCV 薬評価系の開発(水口)

ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs8099917 の SNP について検討したところ、ヒト ES 細胞 1 株、ヒト iPS 細胞 2 株がマイナーアレル (T/G)であった。その他の株についてはすべてメジャーアレル (T/T)であった。

次に、ヒト iPS 細胞より分化誘導した肝細胞における HCV 感染受容体 (CD81, SR-BI, Claudin, Occludin) および自然免疫関連分子 (TLR3, RIG-I, IPS-1) や IFN 受容体の発現を定量的 RT-PCR により解析した。HCV 感染受容体に関しては、ヒト未分化 iPS 細胞における発現量はヒト初代培養 (凍結) 肝細胞の 40%以下であり、特に SR-BI、Claudin はほとんど発現が認められなかった。それに対し、肝細胞に分化することで、4 種の HCV 感染受容体は大きく発現量が上昇した。特に、Occludin、CD81、SR-BI については、ほぼヒト初代培養肝細胞と同程度の発現が検出された。

自然免疫関連分子について検討したところ、RIG-I についてはヒト初代培養肝細胞、未分化 iPS 細胞、分化誘導肝細胞ともに同程度の発現が見られた。一方で、IPS-1、TLR3

については未分化 iPS 細胞ではヒト初代培養肝細胞と比較し、約 30%以下と低い値しか示さなかったのに対し、分化誘導肝細胞においてはヒト初代培養肝細胞と同程度の発現が見られた。

IFN 受容体についても、1 型 IFN の受容体である IFNRA1、3 型 IFN の受容体である IL28RA とともに、未分化 iPS 細胞では低い発現しか認められなかったものの、分化誘導幹細胞ではヒト初代培養肝細胞と比較しやや低い、もしくは同程度の発現が認められた。

分化誘導肝細胞に HCVcc を作用させ、感染・増殖するか検討したところ、作用 12 時間後と比較し、48 時間後では約 4 倍に HCV ゲノム量が増加していたことから、分化誘導肝細胞において HCVcc が感染・増殖可能であることが示唆された。さらに、ISG15 および OAS1 については、それぞれ作用 48 時間後において 2 倍および 3 倍の発現上昇が認められた。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCV が感染・増殖可能であるとともに、HCV による自然免疫応答が評価可能であることが示唆された。

1 1. ウイルス及び宿主因子を標的にした抗 HCV 剤の探索と開発(森石)

CAPE について、その抗 HCV 活性を検討した。濃度依存的に、N 株サブゲノムレプリコンに対して抗 HCV 活性を示し、ウイルス蛋白質の減少も認められた。細胞毒性はほとんど示さず、エステル側鎖部分を検討した結果、C8H17 (Caffeic acid n-octyl ester) がも

っとも EC50 値が低く (2.7 μ M)、CC50 値が 71.7 μ M で、SI 値が 26.6 と高い値を示した。それより長い C10H21 では逆に抗 HCV 活性が低く毒性も高いことから、ClogP 値が 5 付近が最適であると思われる。また、CAPE の側鎖にあるフェノール環は、抗 HCV 活性に重要でないことが分かった。Caffeic acid n-octyl ester のカテコール環の水酸基を修飾・欠損させたとき、抗 HCV 活性が低下したことからカテコール環が抗 HCV 活性に重要であることが分かった。また、Caffeic acid n-octyl ester の抗 HCV 活性は、細胞株で変動し、EC50 が 1 から 2.7 μ M で、CC50 が 60 から 71 μ M、SI が 26.6 から 63.1 であった。また HCVcc の EC50 は 1.8 μ M でほぼレプリコン細胞の値と同等であることから、主な標的はウイルス複製と考えられた。Caffeic acid n-octyl ester および CAPE の添加によって ISG が誘導されないことから、それらの抗 HCV 活性はインターフェロンを介していないと考えられる。さらに、IFN、Daclatasvir (NS5A 阻害剤)、VX222 (NS5B 阻害剤) に対して相乗作用を示し、Telaprevir (NS3 阻害剤)、Danoprevir (NS3 阻害剤) に対して相加作用あるいはアンタゴニスト作用を示した。

1 2. ヒト iPS 細胞を利用した HCV 侵入・複製に関わる宿主側因子の探索と治療薬候補物質の評価(八木)

これまでの解析により、ヒト iPS-hep 細胞は HCV 感染受容体 (CD81、SR-BI、claudin-1、

occludin) を発現していること、HCVpv の感染は内胚葉細胞、肝幹前駆細胞の段階で観察されず、最終段階の iPS-hep 細胞でのみ成立すること、HCV サブゲノムの複製は内胚葉細胞の段階から発現が見られ、分化誘導の初期に複製能を獲得することが明らかとなった。

そこで、遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行った。ヒト iPS-hep 細胞において高い発現レベルを示す 99 遺伝子が HCV の侵入に必須な宿主因子の候補遺伝子として有望であると考えられた。また、33 個の遺伝子が HCV の複製に必須な宿主因子の候補遺伝子として有望であると考えられた。

ウイルス性肝炎モデルとして汎用される ConA 誘導性肝障害モデルマウスを用いて、LEM の肝保護効果を評価した。その結果、LEM を投与することにより肝障害マーカーである ALT、AST の血清中レベルおよび肝臓における肝細胞壊死が抑制され、LEM が肝保護作用を有することが明らかとなった。また、LEM が HCVpv の細胞内侵入を抑制していることと、HCV 複製阻害活性も有していることが示唆された。また、低分子化リグニンが HCV 侵入阻害活性を有していることが明らかとなった。

D. 考察

HCV 感染増殖機構や病原性発現機構を理解するために HCV の新規ウイルス培養系の開発が重要である。本研究では遺伝子型 1b の新規感染実験系の開発と遺伝子型 3a の感染

性クローンの樹立をおこなった。遺伝子型 1b では、より感染性ウイルスの産生がよいウイルス感染実験系を構築していく。遺伝子型 3a では感染細胞の機能解析を進める予定である。

HBVキメラウイルスの解析では、ウイルス複製に大きな影響のあった CP~PreC 配列は、配列検索を行うと遺伝子型の間で同一の塩基番号にバリエーションが見られる一方、他の部位では保存性が高い。一般的に保存性の低い塩基部位は機能的に重要性が低いと考えられるので、今回の点変異体の解析結果と併せて CP~PreC 領域の保存性の高い部位にウイルス複製に重要な部位が存在すると予想された。

メバロン酸生合成経路は HCV のライフサイクルに重要な役割を持っている。GGPP は GGTaseI あるいは GGTaseII が宿主因子をゲラニルゲラニル化の際に必要な脂質である。本研究では GGTaseII に着目して REP 蛋白質が HCV のライフサイクルにおいて特に感染のステップに必須であることを明らかにした。また、2 種類の REP 蛋白質のうち REP-1 ではなく REP-2 のみが HCV の感染に関わっていた。興味深いことに HCV の増殖が可能な HuH-7 細胞では REP-1 が発現しておらず、HCV のライフサイクルにかかわる Rab は REP-2 依存性であることが示唆された。今後、REP-2 により選択的に修飾される Rab 蛋白質を同定して、Rab 蛋白質のゲラニルゲラニル化を標的とした新しい抗 HCV 剤の開発を行いた

い。

HEV 研究では LOPAC 化合物ライブラリーから、HEV レプリコン複製阻害活性を持つ化合物 17 をピックアップした。この中には、すでに HEV 増殖阻害活性が報告されているリバビリンが含まれており、本スクリーニング系の妥当性が示された。リバビリンが急性 E 型肝炎治療に使用できる可能性も示唆された。次年度以降、HEV レプリコン複製阻害化合物のウイルス複製抑制効果を調べ、急性 E 型肝炎治療薬としての可能性を検討する。また、これらの複製抑制や促進活性を有する化合物を利用し、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う予定である。

L カルニチンは、HCV レプリコン系での増殖抑制は明らかなでなく HCV 感染培養系においての増殖抑制と HCV 感染により惹起する LD の形成を阻害した。粒子形成を含むウイルス複製以後でのウイルス増殖抑制効果を有する可能性が示唆された。

遺伝子型 2a 型の JFH-1 株が培養肝細胞に感染し、効率良く感染性ウイルス粒子を産生させるのに対して、1b 型 HCV 感染株の報告はあるが JFH-1 株に相当するほど感染効率の高いものはない。効率良い感染性ウイルス株の必要条件としては、複製効率が高いこと、ウイルスパッケージング効率が高いこと、レセプターへの吸着がよいことなどが挙げられる。本研究においては、感染効率の高い 1b 型 HCV 株樹立の予備段階として、まず、複製効率のよい新たなサブゲノムレプリコ

ン複製細胞の樹立を試みた。さらに、これらの細胞を用いて trans-packaging 法を用いてパッケージング効率の高いウイルス RNA の樹立を目指した。

今後、新たな変異を導入するとともに、新たな適応変異が起こる可能性もあるのでトランスパッケージを継続する予定である。本研究では界面活性剤、タンパク分解酵素に対する反応や HCV レセプター阻害実験などから trans-packaging で産生される粒子が本来の HCV 粒子と同様の構造を有していると考えられた。しかし、エクソゾームによる伝搬も完全に否定できないので、密度勾配法や免疫電子顕微鏡観察などさらに詳細な検討が必要である。

合成レチノイド Tp80 は宿主キナーゼをターゲット候補とする SFV785 とは異なり、酸化ストレス応答に寄与する酵素・グルタチオンペルオキシターゼの一つ、GI-GPx の HCV 感染による発現抑制状態から回復させることが見いだされている。合成レチノイドは疎水性残基とカルボン酸などからなるターゲット因子との水素結合部位からなるが、本年度の構造活性相関解析からは、Tp80 のもつ Tropolone 環の抗 HCV 作用への関与を示唆する結果が得られた。従って、Tropolone 環に類する水素結合部位を保有する残基への改良、または疎水基の改変により抗 HCV 能が向上することが期待される。また、分担者が同定した抗ヘルペス薬は宿主細胞因子をターゲットとし、広範囲の DNA ウイルスに対する

増殖阻害能をもっている。同じく DNA ウイルスである HBV に対する阻害能が期待されたが、その効果が見られなかった。このことより当該阻害薬のターゲットとする宿主因子が HBV 増殖制御因子とは異なっている、もしくは寄与が少ない可能性が示唆された。

HuS-E/2 細胞で恒常的に産生されている IFN- α の活性を抑制することで JFH1 感染に対する IFN 関連遺伝子群の発現誘導が遅延し、JFH1 遺伝子量の著しい上昇が認められたことから、この恒常的 IFN- α がヒト肝細胞の抗 HCV 自然免疫系に役割を有することが考えられた。

独自の方法によりクローン化することに成功しているヒト肝幹細胞 HYM1 細胞は成熟肝細胞への分化が可能であることがわかった。しかし、胆管誘導立体培養条件では効率良く胆管様構造を形成し、内腔への物質輸送能を示したことから、この細胞は胆管上皮への分化能を持つことが認められた。従って、HYM 細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への二方向性の分化能を有する肝幹細胞であることが強く示唆された。今後は、肝細胞分化条件の至適化により、より成熟度の高い肝細胞への分化が可能になる可能性が考えられた。

HCV 感染細胞標識系は HCV のプロテアーゼ活性の検出を利用したものであり、定性的な実験には利用が可能であることがわかった。しかしながら、ウイルス非感染時におけるレポーター遺伝子の発現がまだ認められることから、これらを抑制することが可能なシス

テムの構築が必要であることが考えられた。

マウス Cd81 やマウス Oc1n 蛋白質はウイルス侵入の阻害には余りはたっていない、NPC1L1 蛋白質は侵入を助けている、と考えられる。また、HCV genome transgenic mouse は感染性粒子が産生されることから、マウス肝細胞で、ウイルスゲノム複製と粒子形成が起こっていると考えられる。

IL28B 遺伝子近傍に存在する SNP が PEG-IFN および RBV の併用療法による治療効果に大きな影響を及ぼすことが明らかになり、抗 HCV 薬の薬効解析における SNP の重要性が明らかになりつつある。本研究では、様々な遺伝的バックグラウンドを有するヒトから樹立可能な iPS 細胞を用いて肝細胞を分化誘導し、IL28B 遺伝子近傍の SNP が抗 HCV 薬の薬効および HCV の感染・増殖に及ぼす影響について検討した。rs8099917 について解析した結果、ヒト ES 細胞では 5 株中 1 株、ヒト iPS 細胞では 12 株中 2 株でマイナーアレル (TG) の株が存在した。今後さらに他の株についても解析を進めるとともに、他の SNP についても検討する予定である。また、iPS 細胞由来肝細胞 (Doctom 株、メジャーアレル) において、自然免疫活性化に関与する因子が発現しているか否かについて検討した。その結果、自然免疫活性化に関与する因子はヒト初代培養肝細胞とほぼ同レベルの発現を示した。今後は、rs8099917 がマイナーアレルの iPS 細胞より肝細胞を分化誘導し、上記因子の発現レベルを比較検討する予

定である。

今回、iPS 細胞由来分化誘導肝細胞に HCVcc を作用させたところ、作用 48 時間後において 12 時間後と比較し、約 4 倍 HCV ゲノム量が上昇していたことから、著者らが分化誘導した肝細胞では HCV が感染増殖可能であるとともに、ISG の発現上昇も見られたことから、HCV の感染により自然免疫の活性化も誘導されていることが示唆された。しかし今回の検討は、HCVcc 作用 48 時間後までの検討であることから、今後培養時間を延長するとともに、免疫染色などにより HCVcc の感染増殖に関して詳細に検討していく必要がある。

iPS 細胞から iPS-hep 細胞に至るまでの各分化段階の細胞における遺伝子発現をアレイ解析することで、HCV 侵入について 99 遺伝子、HCV 複製について 33 遺伝子の必須遺伝子候補が絞り込まれた。今回候補として挙げられた遺伝子群の中には、HCV 侵入では CES1 や AADAC、HRG が、HCV 複製では HMGCS や ASGR といった遺伝子が既に HCV 侵入、あるいは HCV 複製に関与する遺伝子であるとの報告がなされており、候補として挙げられた遺伝子と HCV 侵入および HCV 複製との関係を検証することで、あらたな HCV 治療薬の創薬ターゲットとなり得るのではないかと考えている。今後、得られた候補遺伝子について HCV 侵入および複製との関与の有無について解析を進める予定である。

また、今回新たに抗 HCV 薬候補物質として

LEM、および低分子化リグニンについて解析を行い、LEM および低分子化リグニンに抗 HCV 活性が認められた。リグニンは植物においてセルロースに次いで含量の多い成分であり、その製造は比較的安価に行うことが可能と考えられる。また、LEM および低分子化リグニンでは肝保護作用と抗 HCV 作用の 2 つの側面から C 型肝炎に対して効果を発揮する可能性が考えられる。今後、LEM および低分子化リグニンが、HCV と同じく肝臓を宿主臓器とする HBV に対して抗 HBV 効果を発揮しうるか検討を行う予定である。

E. 結論

- 培養細胞における遺伝子型 1b および 3a の感染実験系を確立した。
- 異なる HBV 遺伝子型の塩基配列の入れ替えにより複製効率に著しい影響が生じたため、ウイルスゲノム配列に直接的にかかわる複製のメカニズムが存在することが推測された。
- 小胞輸送に関わる Rab 蛋白質をグラニルグラニル化する REP 蛋白質のうち REP-1 ではなく REP-2 が HCV 感染に重要であることを明らかにした。
- HEV レプリコンを構築し、化合物ライブラリーからレプリコン複製阻害物質のスクリーニングを開始した。
- L-カルニチンによる HCV 増殖抑制/肝脂肪化抑制効果を確認した。
- 感染効率の高い遺伝子型 1b の感染性株を

樹立するために、サブゲノムレプリコンをトランスパッケージングする方法を樹立した。

- Tp80 が SFV785 より強い抗 HCV 能を示したことから、構造展開による GI-GPx 発現量回復を作用機序とする化合物創製が抗 HCV 薬創製により有効であることが示唆された。今後は Tp80 類縁体及び同一作用機序の化合物に焦点を定め、スクリーニング及び構造最適化を実施する。
- HYM 細胞はヒト肝幹細胞であることが強く示唆された。HCV 感染標識細胞のモデル系作成には成功したが、今後さらに感染特異性を高めるなどの改良をおこなう必要がある。
- マウス Cd81, Oc1n 蛋白質はウイルス侵入阻害には関わっていない。HCV genome transgenic mouse は感染性のウイルスを産生し、マウス肝細胞でウイルスの複製、粒子形成が起こっている事が判明した。
- ヒト ES 細胞 5 株、ヒト iPS 細胞 12 株における rs8099917 の SNP は、ヒト ES 細胞 1 株、ヒト iPS 細胞 2 株がマイナーアリル (T/G) であった。その他の株についてはすべてメジャーアリル (T/T) であった。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞は、HCVcc が感染可能であり、ISG の発現上昇も観察された。
- CAPE およびその誘導体の中で、最も抗 HCV 効果が高かったのは Caffeic acid n-octyl ester であった。

- ヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 侵入および複製に関与する候補遺伝子の絞り込みを行い、HCV 侵入について 9 9 遺伝子、HCV 複製について 3 3 遺伝子の候補を得た。また、LEM および低分子化リグニンの HCV に対する効果を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, 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- β type I receptor. *Sci Rep*. 2013 3:3243. Srep03243
- 2) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology*. 2014 Feb;146(2):562-72.
- 3) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol*. 2014 Jan;95 Pt1:60-5.
- 4) Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J; CEVHAP North Asia Workshop on Viral Hepatitis. Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO Framework for Global Action on viral

- hepatitis in North Asia. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):1073-80.
- 5) 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.* 2014 Feb;16(2):114-22.
 - 6) 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.* 2013 Aug;9(8):e1003589.
 - 7) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li T. Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol.* 2013 Dec;94 Pt 12:2647-56.
 - 8) 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.* 2013 Aug 30;8(8):e72519.
 - 9) Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Oct 11;440(1):150-156.
 - 10) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 1;440(4):515-20.
 - 11) Guan D, Li W, Su J, Fang L, Takeda N, Wakita T, Li TC, Ke C. Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis e virus, china. *Emerg Infect Dis.* 2013 19(8):1341-3.
 - 12) 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.* 2013 8(7):e68992.
 - 13) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology.* 2013 145(2):447-455.e4.
 - 14) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. *J Virol.* 2013 87(10):6031-6.
 - 15) Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, Li TC, Ke CW. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet Microbiol.* 2013 165(3-4):275-80.
 - 16) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice with Humanized Livers. *Gastroenterology.* 2013 Sep;145(3):658-667.e11.
 - 17) Takebe Y, Saucedo CJ, Lund G, Uenishi R, Hase S, Tsuchiura T, Kneteman N, Ramessar K, Tyrrell DL, Shirakura M, Wakita T, McMahon JB, O'Keefe BR. Antiviral Lectins from Red and Blue-Green Algae Show Potent In Vitro and In Vivo Activity against Hepatitis C Virus. *PLoS One.* 2013 May 21;8(5):e64449.
 - 18) Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T, Bukh J,