

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（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

分担研究者：名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学 飯島沙幸
研究協力者：名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学 田中靖人

分担研究課題：HBV キメラウイルスを用いたウイルス複製機構解析

研究要旨：HBV のウイルス複製の機序の詳細は明らかではなく、複製に関与するウイルス側要因と宿主側要因を解析することは患者の予後判断の側面からも重要である。HBV のウイルス複製メカニズムのウイルス側の要因を明らかにするため、ウイルス複製の異なる遺伝子型を用いてキメラウイルスを作製し解析を行った。

A. 研究目的

HBV 感染による B 型肝炎の予後判断には患者血中の HBV ゲノム DNA コピー数が指標の一つとなっているが、HBV のウイルス複製の機序の詳細は明らかではなく、複製に関与するウイルス側要因と宿主側要因を解析することは治療の側面からも重要である。

HBV は塩基配列の 8% の差異で決定される「遺伝子型」が報告されているもので 10 個存在し (Genotype A-H, I, J)、世界的に遍在していることが確認されている。日本の HBV 感染患者では遺伝子型 B, C の割合が高く、遺伝子型 A は元々日本には存在しない遺伝子型であったが 2000 年以後国内の B 型急性感染成人例で感染例が増加し問題となっている。各遺伝子型でウイルス複製効率やウイルス蛋白発現量が異なり、それらと関連して病態進行が異なる。今研究ではウイルス複製効率の著しく異なる二つの遺伝子型を用いてキメラウイルスを作製し、複製メカニズムに関わるウイルス側因子の解析を試みた。

B. 研究方法

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。臨床例の解析等からウイルス複製に特に関わるとされる領域は①コアプロモータ領域 (CP) ②プレコア領域 (PreC) ③コア領域、の三つである。この領域に注目し、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。

作製したキメラクローンを HuH7 細胞にトランスフェクションし、一定時間後ウイルス産生量を確認するため培養上清・細胞内の HBs, HBcr 抗原量を測定した。また同時にウイルス複製を比較するため、サザンブロット法にて core 粒子内の HBV-DNA を検出した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

野生型 Ae クローンと作製した Ae/C クローン間で HBs 抗原産生量に殆ど差は認められなかった。一方細胞内 HBcr 抗原量は一部の変異体で著しい増加が確認された (図 1)。in vitro ウイルス産生系において HBcr 抗原量はウイルス複製に相関する傾向にある (Sugiyama et, Hepatology, 2006) が HBcr 抗原量の増加した変異株ではウイルス複製の増強が見られ、これらの結果から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。

CP/PreC領域がHBV複製に重要

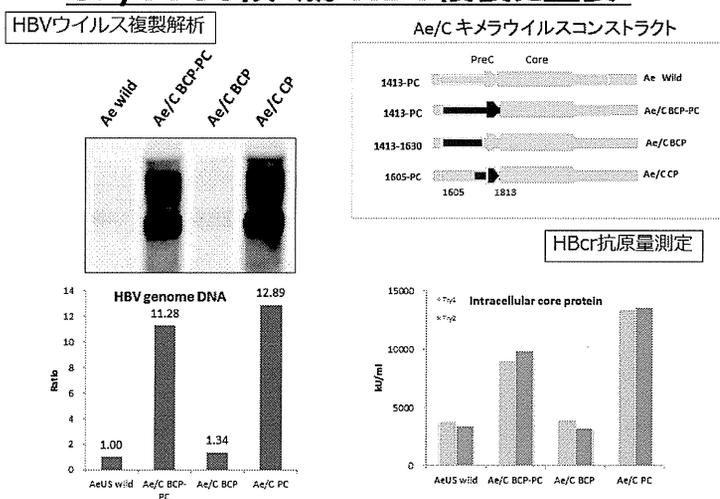


図 1 Ae/C キメラウイルス解析結果。HBcr 抗原を ELISA 法で、ウイルス複製をサザンブロットで検出した。

D. 考察

今回の結果において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る。

E. 結論

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。今後は塩基配列依存的に結合する転写因子等、宿主側因子との関連性についても解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Elkady A, Aboulfotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J. Gastroenterol. 2013; 19 (37): 6214-20.

2) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution

of hepatitis B infection in thai population. PLoS One. 2014; 9 (1): e86007.

2. 学会発表

- 1) 飯島沙幸、渡邊綱正、林佐奈衣、松浦健太郎、田中靖人: C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態. 日本ウイルス学会, 2013, 神戸.
- 2) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人: HBV genotypeF における肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定. 日本ウイルス学会, 2013, 神戸.
- 3) Murakami S, Watanabe T, Omagari K, Inoue T, Iijima S, Hamada-Tsutsumi S, Hayashi S, Tajiri K, Kishi H, Tanaka Y. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai, China.
- 4) Hayashi S, Khan A, Simmons B, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. Asian Pacific Association for The Study of the Liver. Mar. 12-15, 2014. Brisbane, Australia.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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（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

分担研究者：池田 正徳

分担研究課題：HCV ライフサイクルにおける脂質代謝の役割の解明

研究要旨：HCVのライフサイクルの各ステップにおいて小胞輸送に関わるRab蛋白質は重要な役割を果たすことが予想されるがその詳細は明らかになっていない。また、Rab蛋白質の活性化にはゲラニルゲラニル転移酵素II（GGTaseII）の修飾が必要であるため、GGTaseIIも抗HCV剤の標的となりうる。GGTaseIIを構成するRab Escort Protein (REP)にはREP-1とREP-2が存在するが、REP-2がHCV感染に重要であることを見出した。また、Rab蛋白質のなかでRab13が感染に必須であることを明らかにした。

A. 研究目的

メバロン酸経路で生合成されるゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)はHCVの増殖に必要な宿主因子のプレニル化に利用される。これまでにゲラニルゲラニル転移酵素I(GGTase I)によるFBL2の修飾がHCVの複製に重要であることが報告されている。しかしながら、小胞輸送に関わるRab蛋白質をプレニル化するGGTase IIのHCVのライフサイクルにおける役割についてはこれまで明らかにされていない。また、GGTase IIはその活性にRab escort protein (REP)を必要とすることがGGTase Iとは異なる。本研究ではREP-1とREP-2に着目してHCVのライフサイクルにおける役割を検討する。HCV増殖に必要なRab蛋白質についても明らかにする。

B. 研究方法

昨年度までの研究で、HCVの増殖が可能なHuH-7細胞由来のRSc細胞とLi23細胞由来のD7細胞がHCV JFH-1株の感染に対して高い感受性を示すことを報告した。RSc細胞とD7細胞のREP-1およびREP-2の発現を検討したところ、REP-2は両細胞で発現していたが、REP-1はD7細胞でのみ発現していることがわかった。本件研究では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。HCVにはJFH-1株にレニラルシフェラーゼを導入したレポータ JFH-1を使用して感染性、複製を評価した。同時にHCV蛋白質の発現についてもウエスタンブロット解析にて評価した。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。

（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り、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。

C. 研究結果

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あるいはREP-2に対するsiRNAでD7細胞に処理した後レニラルシフェラーゼを付加したJFH-1 HCVを感染させた。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。

D. 考察

メバロン酸合成経路は 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。これまで、GGTaseI により修飾される FBL2 などが HCV 複製に重要な役割を果たすことが知られていたが、GGTaseII の役割については不明であった。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。

REP-1 および REP-2 による Rab 蛋白質修飾における選択性についてはこれまで Rab27a が REP-1 でのみゲラニルゲラニル化されることが知られているが、これ以外では報告されていない。Rab27a は REP-2 では修飾が起こらないため REP-1 の異常により進行性の視力障害を来す Choroideremia を発症することが報告されている。

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。

本研究では HCV のライフサイクルにおけ

る Rab 蛋白質の役割について明らかにすることを目的としている。本年度は REP-2 が感染に関わることがわかったので、感染にかかわることが予想される Rab13 について検討した。Rab13 は感染後よりも感染前の処理により HCV 増殖を抑えたことからその主たる役割は HCV の感染のステップであることが示唆された。今後、Rab13 に対するゲラニルゲラニル化と REP-2 の役割について詳細な検討を行う予定である。

E. 結論

小胞輸送に関わる Rab 蛋白質をゲラニルゲラニル化する 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。Rab13 が HCV の感染に重要であることを明らかにした。

F. 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;1236-44, 2013

(2) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430;592-97, 2013.

(3) Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, and Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE* 8:e72519, 2013

(4) 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.
- (5) 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(5):620–623, 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, and 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(9):1987–1996, 2013.
- (7) 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.
- (8) 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(11):1190–8, 2013.
- (9) Ban S, Ueda Y, Ohashi M, Matsuno K, Ikeda M, Kato N, and Miyachi H. Peroxisome proliferator-activated receptor delta antagonists inhibit hepatitis C virus RNA replication. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 23(17):4774–4778, 2013.
- (10) 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(12):e82299, 2013.
2. 学会発表
- (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 隆字、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
- (2) 佐藤 伸哉、森 京子、上田 優輝、瀬島 寛恵、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之 リバビリ耐性全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立 第 61 回日本ウイルス学会学術総会、神戸、2013 年
- (3) 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*, 2013 Oct
- (4) 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 Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Melbourne, Australia*, 2013 Oct.
- (5) Sejima H, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Identification of two microRNAs showing decreased expression in cell-based HCV RNA replication for 2 years. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Melbourne, Australia*, 2013 Oct.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 主任研究官 李 天成

分担研究課題：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

研究要旨 E 型肝炎ウイルス（HEV）株 83-2 の全長クローンを構築し、合成した RNA が細胞株 PLC/PRF/5 で増殖できることを証明した。HEV の構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンを作成し、LOPAC 化合物ライブラリを用いた HEV 増殖阻害剤のスクリーニングを開始した。現在までに複数の阻害活性を有する化合物を同定した。HEV の増殖阻害活性を有する化合物が得られたことから、これらの化合物の作用機序を調べ、HEV 複製メカニズムを解析する。また、阻害剤の *in vivo* での効果の検討を行い、急性 E 型肝炎治療薬としての可能性を検討する。

A. 研究目的

E 型肝炎は、通常 HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよい HEV の増殖系を確立することが望まれている。

本年度は、感染性の HEV cDNA クローンからのレプリコンの構築を試みた。本レプリコンを用いて HEV の増殖を阻害する物質のスクリーニングを行い、急性 E 型肝炎治療薬としての可能性を検討する。また、阻害物質の機能から HEV の増殖メカニズムや病原性発現機構の解析を行う。

B. 研究方法

感染性の HEV クローン 83-2（図 1）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（図 2）、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA 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 化合物ライブラリを添加し、ルシフェラーゼの分泌を指標に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。

C. 研究結果

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。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として持つレプリコン RNA をトランスフェクションした細胞、およびルシフェラーゼとネオマイシンをレポーターとするレプリコンを恒常的に保持する細胞の 2 つの系で LOPAC 化合物ライブラリ（約 1,200）のスクリーニングを行った。100 μ M でルシフェラーゼの分泌が 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 20 μ M 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。

D. 考察

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。ピックアップされた化合物の中には、すでに HEV 増殖阻害活性が報告されていた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のではないかと思われる。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、これらの複製抑制および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。

E. 結論

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。候補化合物を選択し、今後急性 E 型肝炎治療薬としての検討、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, in press.
2. Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., Ishii K., Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both *in vitro* and *in vivo*. Gastroenterology, 145: 447-455 (2013)
3. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. Journal of Virology, 87: 6031-6036 (2013)
4. 石井孝司 A型肝炎、E型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
5. 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン BIO Clinica 28: 25-29 (2013)

2. 学会発表

1. Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N.,

Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.

2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013
3. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクシニアウイルス DI₅ 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症予防効果、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
4. 清原知子、石井孝司、多田有希、脇田隆字：A 型肝炎のリスクアセスメント、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
5. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
6. 石井孝司、李 天成、吉崎佐矢香、塩田智之、脇田隆字：E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検討、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
7. 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松 久、久保田智己：結晶構造解析と QM/MM 計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
8. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：小児における HBs 抗原保有率調査、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
9. 横川 寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：霊長類モデルを用いた培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの有効性の検討、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸

G. 知的所有権の取得状況
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（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

分担研究者：大西俊介
研究協力者：須田剛生

分担研究課題：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

研究要旨：

C型肝炎ウイルス (HCV) に対する新規治療薬導入後も難治例が存在し、肝硬変・肝発癌への進展が問題となる。今回、HCV感染により惹起される脂質代謝異常をターゲットとした薬剤を探索しL-carnitineがHCV感染にて惹起される肝脂肪化を抑制するとともにHCV増殖抑制効果を有し、更に発癌のリスク因子の酸化ストレスを改善する事を新規に明らかにした。

A. 研究目的

L カルニチンは、長鎖脂肪酸をミトコンドリアに輸送する働きを有しβ酸化に深くかかわる。NASH 症例においてカルニチン投与により脂肪化、炎症の改善が報告されている。一方、HCV 感染により脂質代謝異常が惹起され、肝脂肪化は HCV 増殖や、肝発現に関与する事が報告されている。そこで、L-carnitine の HCV 感染にて惹起される肝脂肪化更に、HCV 増殖抑制効果の検討を行う事を今回目的とした。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号) を遵守して実施する。

C. 研究結果

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でなかったが、一方 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 Lipid droplets (LD) の形成の抑制を確認した。

D. 考察

L カルニチンは、HCV レプリコン系での増殖抑制は明らかでなく 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 の形成を阻害しえた。以上の事より、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. **PLoS One** (in press)
 2. Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H. Hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS Family transcription factors. **PLoS One** 2013;8(6);e66255.
 3. Nahata M, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice. **Psychoneuroendocrinology** 2013;38(10);2051-64.
 4. Yamada C, Saegusa Y, Nakagawa K, Ohnishi S, Muto S, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto N, Takeda H. Rikkunshito, a Japanese Kampo medicine, ameliorates decreased feeding behavior via ghrelin and serotonin 2B receptor signaling in a novelty stress murine model. **BioMed Research International** 2013;2013;792940.
 5. Takeda H, Nakagawa K, Okubo N, Nishimura M, Muto S, Ohnishi S, Sakamoto N, Hosono H, Asaka M. Pathophysiologic Basis of Anorexia: Focus on the Interaction between Ghrelin Dynamics and the Serotonergic System. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 2013;36(9);1401-5.
2. 学会発表
該当なし。
 - G. 知的所得権の出願・登録状況
 1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

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（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

分担研究者：杉山和夫・慶應義塾大学医学部・特任准教授

研究協力者：齋藤英胤・慶應義塾大学薬学部・教授

分担研究課題：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

研究要旨： HCVを標的とした新たな薬剤が次々と開発され、慢性C型肝炎の治療成績の飛躍的な改善が期待される。しかし、これら薬剤によっても治癒させることのできない症例があり、特に、遺伝子型1b型のHCVには治療抵抗性のものがある。本分担研究では、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、1b型HCV構造領域を1b型サブゲノムレプリコン複製細胞へ導入することで、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。さらに、トランスパッケージングされやすい1b型HCVサブゲノムレプリコンと1b型構造領域を直接結合し1b型全長HCV株を作製した。しかし、その感染複製能は高くなく、1b型HCV感染のための宿主側の工夫として、ヒト肝オーガノイドの樹立、ヒトiPS細胞由来肝細胞などへの感染を試みた。また、これらの細胞におけるHCV持続感染の支持のためのヒト肝星細胞の樹立を行った。

A. 研究目的

従来のインターフェロンやリバビリン治療に加え、プロテアーゼ阻害剤、非構造領域蛋白質(NS5A)阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤など HCV を標的とした新たな薬剤(DAA)が次々と開発され、慢性C型肝炎の治療成績の飛躍的な改善が期待されつつある。しかし、高齢者や前回無効例にはこれらのDAAによっても治癒させることのできない症例がある。特に、遺伝子型1b型のHCVは治療抵抗性のものがあり肝癌の発症率も高い。また、すでに上記DAAに対する耐性変異も報告されており、HCVの撲滅にはさらなる努力が必要であると考えられる。

これまでに、HCVサブゲノムレプリコン複製系に加え、感染性HCV株の樹立によってHCVの基礎的研究が飛躍的に発展した。さらに、これらを利用することで抗HCV薬

剤スクリーニングが容易になり今日の多くの抗HCV薬の開発につながっている。HCVサブゲノムレプリコン複製系は1b型HCVを含め各種遺伝子型が開発されている。感染性HCV株も各種遺伝子型が開発されてきているが、最も感染効率の良い感染性HCV株のJFH-1株は遺伝子型2aであり、それ以上に効率の良い遺伝子型1bの感染性HCV株もレパートリーとして必要である。

本分担研究では、HCV構造領域をサブゲノムレプリコン複製細胞へ導入することでレプリコンをトランスパッケージングする方法を用いて感染効率の高い遺伝子型1bの感染性株を樹立することを目的とした。また、細胞側の工夫としてより効率良く感染させることが可能な細胞と最近樹立したキメラHCV持続感染系の応用も試みた。

B. 研究方法

1. HCV 構造領域によるトランスパッケージング：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。ネオマイシン存在下でコロニーを形成させ、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。

2. 界面活性剤とプロテアーゼによるウイルス粒子確認：トランスパッケージングによって得られたレプリコン含有粒子に対して界面活性剤、タンパク質分解酵素処理し、RNase に抵抗性があるかどうかでウイルス粒子中に HCV RNA が含まれていることを確認した。

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

4. 遺伝子型 1b 型全長 HCV の作製：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。

5. ヒト肝オーガノイドの樹立：ヒト肝オー

ガノイドの樹立は Sato (Nature 459: 262-265, 2009) らの方法に準じた。

6. ヒト iPS 細胞由来肝細胞への感染：ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (リプロセル社) へキメラ HCV を感染させた。感染の確認は Western blotting で行った。

7. ヒト肝星細胞の不死化：ヒト肝臓よりプライマリー肝星細胞を分離したのち、レンチウイルスベクターにより hTERT を導入した。

(倫理面への配慮)

ウイルス感染実験、DNA 組み換え実験に関しては以下のように各種法令にのっとり、適切な施設、および、適切な実験方法 (P2 レベル)、その安全性に細心の注意を払い行った。組み換え DNA 実験については組み換え DNA 実験指針に基づき実施した。遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については、遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律、同施行規則 (平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令 (平成 16 年文部科学省・環境省令第一号) その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じて行った。組み換えウイルスの作成と使用に関しては大臣確認をとってある。ヒトサンプル

を採取するにあたり、慶應義塾大学医学倫理委員会、防衛医科大学倫理委員会の承認のもと人権保護、インフォームドコンセントなど倫理的配慮を行った。また、本研究の組換え実験は慶應義塾大学医学部による機関内承認を得ている。

C. 研究結果

1. トランスパッケージング法を用いた効率良い 1b 型 HCV 感染クローンの樹立：

すでに分担研究者らは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ている。本研究では、まず、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形成されるウイルス外殻 (envelope、core) が、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 (図 1)。

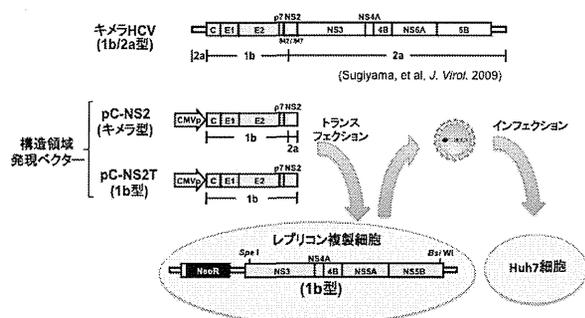


図1. 構造領域発現ベクターのトランスフェクションによるトランスパッケージング法

この上清をナイーブな培養肝細胞に接種しネオマイシン存在下で培養すると、感染が

成立した場合細胞内でレプリコン RNA が複製しネオマイシン耐性遺伝子が発現する。これをネオマイシン存在下で培養することでコロニーが形成かどうかを確認した。

トランスフェクションされる 1b 型 HCV サブゲノムレプリコン RNA 複製細胞としてはサブゲノムレプリコンライブラリー法により樹立された 4 種類の新たなもの (Y3-4、Y7-9、G23-1、G47-2) を利用した。その結果、レプリコン複製細胞 Y3-4、Y7-9、G23-1 の培養上清からネオマイシン耐性細胞コロニーが形成された (図 2)。このことは、トランスパッケージングされやすいサブゲノムレプリコンが存在することを示している。

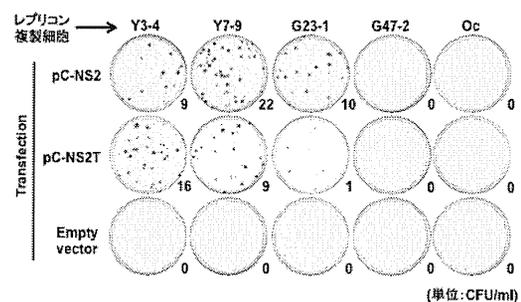


図2. 構造領域発現ベクターによるトランスパッケージングでできたネオマイシン耐性コロニー

そこで、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、比較的コロニー形成能の高かった Y7-9 細胞へのトランスパッケージングから形成されたネオマイシン耐性コロニーを単離した (TPY7-9-3 細胞)。この細胞へ再びトランスパッケージングしネオマイシン耐性コロニーを形成させ単離した。同様の操作を繰り返すことで (round7 まで)、コロニー形成率を高めていくことを試みた。その結果、Round 3 まではコロニー形成率が著しく上がり、パッケージングに有利な変異を獲得

した可能性がある(図 3)。しかし、それ以降(round3-7)はそれ以上のコロニー形成率の向上は認められなかった。

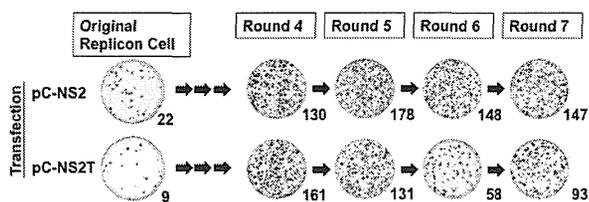


図3. 構造領域発現ベクターによるトランスパッケージングの連続でできたネオマイシン耐性コロニー

トランスパッケージングにより本当にウイルス粒子が産生されたことを確認するために、HCV のレセプターである CD81 に対する抗体、および、感染性ウイルスに共存すると考えられている ApoE に対する抗体を用いて感染阻害実験を試みた。上記のごとく、レプリコン複製細胞(TP2Y7-9-3 細胞)へトランスパッケージングをし、その上清をナイーブな細胞へ接種する際に、これらの抗体で処理すると、コロニーの形成が有意に阻害された(図 4)。従って、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。

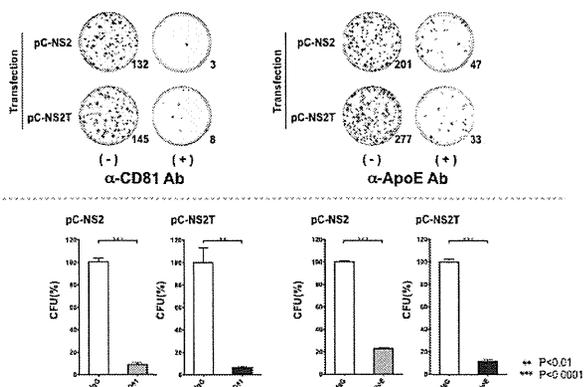


図4. 抗CD81抗体および抗ApoE抗体による感染阻害

また、サブゲノムレプリコンが本当にウイルス粒子内に存在することを確認するために、界面活性剤とプロテアーゼに対する抵抗性を調べた。界面活性剤 NP40 だけで処

理したあと RNase を加えても HCV が検出されたのに対して、NP40 とプロテアーゼで処理すると、RNase を加えると HCV は分解されて検出されなくなった。このことから、サブゲノムレプリコンはトランスパッケージングによりエンベロープおよびコア蛋白に内包されたと考えられた(図 5)。

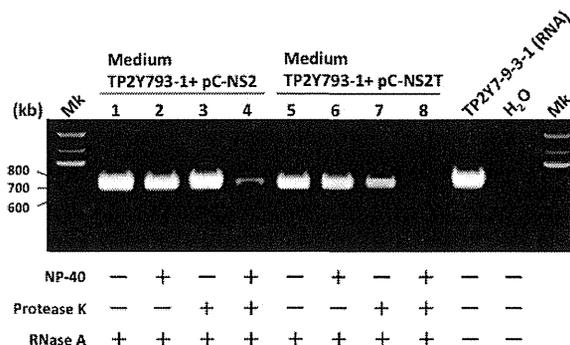


図5. ウイルス粒子の界面活性剤、プロテアーゼに対する抵抗性

トランスパッケージングに有利な変異を明らかにするために、繰り返しトランスパッケージングされてできたサブゲノムレプリコンのシーケンシングを行いアミノ酸配列の推定を行った。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(TPY7-9-3)の NS3、NS4B、NS5A に数カ所の変異が認められた(図 6)。これらの変異は round 6 (TP6Y7-9-3-1) までほぼ維持されておりトランスパッケージングに有利な適応変異だと考えられた。

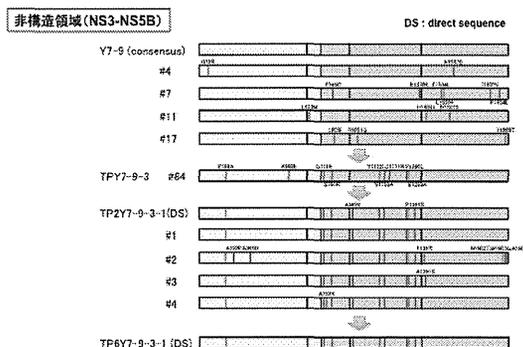


図6. トランスパッケージングされたレプリコンのアミノ酸変異

次に、トランスパッケージングに用いた構造領域と上記の適応変異が入ったサブゲノムレプリコンをつないで遺伝子型 1b 型の全長 HCV ゲノムの cDNA の作成を行った (図 7)。この cDNA から RNA を作成し、Huh7.5 細胞へトランスフェクションした。HCV 蛋白質の発現は認められたが、次第に発現が現弱し、また、細胞溶解も少なく HCV 感染の成立と判断できなかった。その原因として、トランスで構造領域を供給する場合に比較して、全長にした場合、構造領域の発現が不十分であるか、複製能が低下したためと考えられた。また、Huh7.5 細胞を利用したが、HCV 特に遺伝子型 1b の複製には必ずしも有利な細胞でない可能性もある。

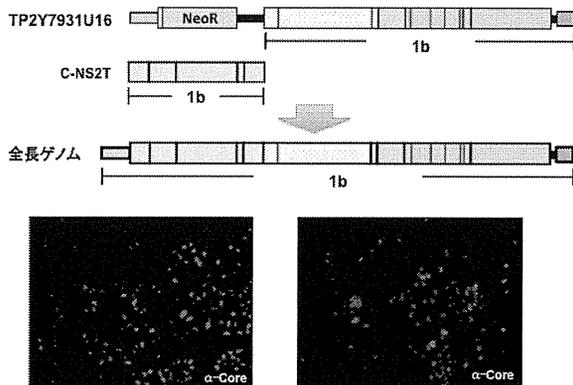


図7. 全長HCV (1b) の樹立と細胞内複製

2. 1b 型 HCV クローンに対して感染効率の高い細胞樹立の試み：

2.1 ヒト肝オーガノイドの応用

最近、Sato (Nature, 2009) らはマウスおよびヒトの消化管から肝幹細胞をオーガノイドとして樹立する方法を確立した。この技術に応用して、HBV および HCV 患者の肝臓より肝オーガノイドの樹立、および、これを

用いた HCV 持続感染系の樹立を試みた。その結果、HBV 肝臓よりオーガノイドは作成できた (図 8)。PCR の結果 HBV の持続感染は認められず、HCV 感染系へ利用可能と考えられた。しかし、その維持期間は 2-3 ヶ月であり、他の肝臓サンプルの試みや分離、培養条件のさらなる改善が必要であると考えられる。また、この系は HBV 感染系へ応用させることも可能である。

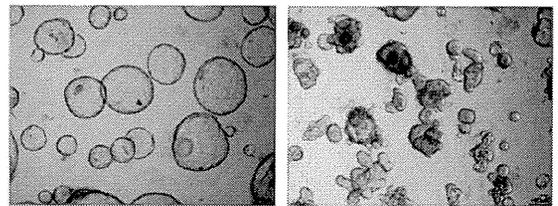


図8. HBV肝臓から樹立した肝オーガノイド

2.2 ヒト iPS 細胞由来肝細胞の利用

ヒト iPS 細胞由来肝細胞に HCV が感染することはすでに報告されている。しかし、これは遺伝子型 2a 型を利用したものであり、これを遺伝子型 1b に利用して持続感染させることを計画している。

2.3 不死化ヒト星細胞の樹立と肝細胞との共培養

ヒト肝臓組織より星細胞を分離し、さらに、これに hTERT を導入して不死化ヒト星細胞を樹立した。不死化後も約 6 ヶ月培養を継続することが可能で、星細胞マーカーの α -SMA やビタミン A の蓄積の発現が認められた (図 9)。すでに活性化している可能性もあるが培養肝細胞 (HCV 感染) と共培養することによって、慢性炎症、繊維化モデルとしても利用可能であり今後さらなる

検討が必要である。

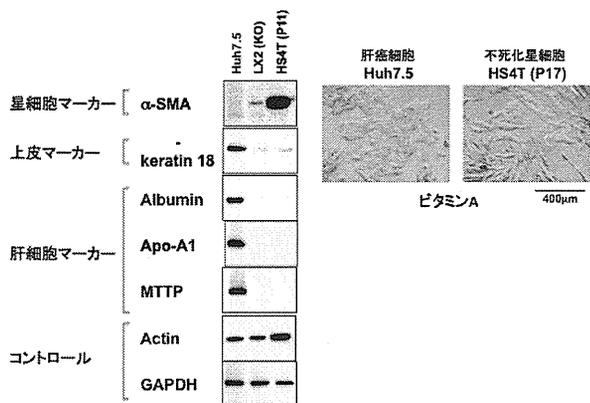


図9. 不死化肝星細胞における星細胞マーカー発現

3. キメラ HCV (1b/2a 型) 持続感染系を利用した抗 HCV 薬評価系の利用：

今のところ抗 HCV 薬評価系としての遺伝子型 1b の十分な感染系を確立できていないので、その代替として、上述のキメラ HCV (1b/2a 型) 持続感染系が抗 HCV 薬評価系として利用できないかを検討した。キメラ HCV (1b/2a 型) は構造領域が遺伝子型 1b で非構造領域が遺伝子型 2a からできており、その感染性も確認している。また、その持続感染細胞は 1 年以上 HCV を産生している (論文投稿中)。実際、従来の抗 HCV 薬を投与し培養液中のコア蛋白量を測定することで抗 HCV 効果 (IC50) を判定することができた (図 10)。また、その治癒細胞も樹立しており全長の HCV 1b 型へ応用する予定である。

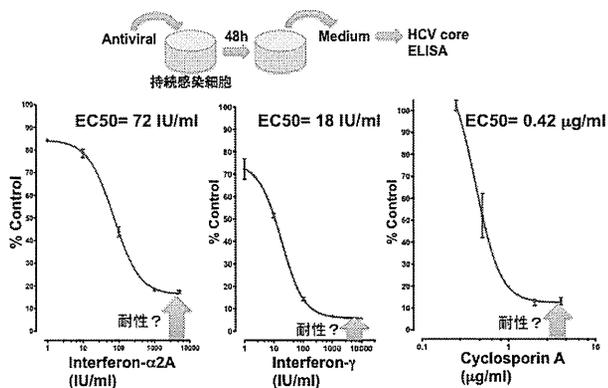


図10. キメラHCV(1b/2a型)持続感染系を利用した抗HCV薬評価系

D. 考察

遺伝子型 2a 型の JFH-1 株が培養肝細胞に感染し、効率良く感染性ウイルス粒子を産生させるのに対して、1b 型 HCV 感染株の報告はあるが 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。

サブゲノムレプリコン複製細胞によってウイルスパッケージングされやすいものとそうでないものが存在することが明らかになった。本研究では Y7-9 細胞が最もトランスパッケージされやすかった。さらに、トランスパッケージを繰り返すことでさらにトランスパッケージの効率が上がり、パッケージングに有利な変異を獲得したと考えられた。しかし、それ以降(round3-7)はそれ以上のコロニー形成率の向上は認められなかった。

実際、トランスパッケージされたシーケンスを調べてみると、初期に起きた変異はその後も維持されるが、新たな変異は入らなかった。トランスパッケージに重要と考えられる変位は 9 箇所であり、うち 6 箇所

所が NS5A に存在していた。NS5A タンパク質は core タンパク質と相互作用し HCV の粒子形成に重要であると考えられており、これらの変異がトランスパッケージの際に core タンパク質との結合にかかわるものと考えられた。本来 NS5A は変異の多い領域で、HCV のパッケージングシグナル自体はおそらく 5' 非翻訳領域に存在すると予想されるが、これらの NS5A 変異がパッケージング効率に影響していると考えられる。感染効率をあげるために、すでに報告のあった適応変異 (LSG 変異) を導入したが、複製と感染に影響はなかった。

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。

培養肝細胞 Huh7 細胞およびその派生細胞は、JFH-1 株を良く感染、複製させる細胞として知られている。この細胞は JFH-1 以外にも、他の遺伝子型感染株やサブゲノムレプリコンの複製も支持することが知られている。1b 型実験株が感染しにくいことは遺伝子型特有の現象である可能性もあるが、宿主細胞との関連の可能性もあり、今回、Huh7 以外の肝細胞の樹立を試みた。また、持続感染の成立のための支持細胞としてヒト星細胞との共培養をめざし、ヒト星

細胞の不死化を試みた。

iPS 細胞は幹細胞として確立されており今回 iPS 細胞由来の肝細胞に、効率は必ずしも良くなかったがキメラ HCV を感染させることができた。今後、今回作製した遺伝子型 1b 型の全長 HCV ゲノムの感染を試みる予定である。また、オーガノドを用いた肝乾細胞は今のところ培養維持期間が短いなどの問題があるが、樹立できれば HCV 以外の肝炎ウイルスの感染系としても非常に魅力的な系であり今後さらに改良して行く予定である。

E. 結論

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。これによって得られた 1b 型 HCV サブゲノムレプリコンと 1b 型構造領域を直接結合し 1b 型全長 HCV 株を作製したが、その感染複製能は高くなかった。また、宿主側の工夫として、ヒト肝オーガノイドの樹立、不死化ヒト肝星細胞の樹立、ヒト iPS 細胞由来肝細胞への感染を試みたが、感染性はまだ不十分でさらなる改善が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S,

Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 59(1), 154-69, 2014.

2) 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(9), 1987-96, 2013.

3) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. HCV infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross-talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol* 87(14), 8169-8178, 2013.

4) Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A, Mikami Y, Sugiyama K, Tomita K, Kanai T, Saito H, Hibi T. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. *Hepatology* 58(1), 337-350, 2013.

2. 学会発表

1) 齋藤 英胤、齋藤 義正、杉山 和夫: Epigenetics作用薬を用いたC型肝炎ウイルスの制御 ヒストン脱アセチル化阻害薬の有用性. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013. 6.

2) 杉山和夫、海老沼浩利、酒瀬川典子、齋藤義正、金井隆典、日比紀文、齋藤英胤: Nrf2/sMaf転写因子複合体はHCVによる肝細胞脂肪蓄積に関与する. 第72回日本癌学会総会, 横浜, 2013. 10.

3) 杉山和夫: メタボローム・トランスクリプトーム統合的解析によるC型肝炎肝脂肪蓄積の機構解明. 第17回日本肝臓学会大会, 東京, 2013. 10. (シンポジウム)

4) 酒瀬川典子、杉山和夫、海老沼浩利、中本伸宏、村上優子、齋藤英胤、金井隆典: HCV持続感染細胞における転写因子Nrf2に制御される遺伝子群の発現解析. 第61回日本ウイルス学会, 神戸, 2013. 11.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

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（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

分担研究者：萩原正敏 京都大学 教授

分担研究課題：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

研究要旨：分担研究者萩原らはこれまでに、SR蛋白質リン酸化酵素SRPKの特異的阻害剤SRPIN340の合成展開化合物SFV785が、おそらく宿主キナーゼをターゲットとして、フラビウイルスの増殖を抑制することを見出していた。また東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーの中から、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する新たな化合物を見出し、その作用機序を解析した。

本年度はこれら化合物の構造展開と抗HCV能・抗HBV能の評価をすすめ進め、抗HCV能については東京医科歯科大学保有化合物ライブラリーから同定された合成レチノイドがより有効であること、またその中で抗HCV能に寄与する部位を同定した。

A. 研究目的

C型肝炎について、近年ウイルス因子をターゲットとした抗ウイルス薬が上市され、治療効果の改善が見込まれているが、同時に耐性ウイルスの出現に備えた異なる作用機序の抗ウイルス剤の創製が重要となる。また薬剤耐性ウイルスの出現により B型肝炎ウイルスの新たな治療薬も必要とされている。

分担者は現在までに各種のキナーゼ阻害剤を創製し、そのいくつかが抗ウイルス効果を示すことを見いだした。また、先行事業に於いて抗HCV剤の新規スクリーニングを行い、キナーゼ阻害剤とは骨格の全く異なる化合物 Tp80 を見いだしている。本研究では、宿主細胞のリン酸化酵素阻害剤のC型肝炎治療薬としての可能性を検討するとともに、更に効果的に C型肝炎ウイルス増殖を抑制する新たな化合物をケミカルライブラリーから探索する。またヘルペスウイルスなど DNA ウイルスの増殖を抑制することが半明している独自化合物が、B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性についても検討し、新規肝炎治療薬の開発を目指す。

B. 研究方法

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) 分担者は共同研究先キノファーマとの共同研究において独自合成した新規抗 DNA ウイルス薬が in vitro 評価系にて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ており、また、in vivo 評価系においてマウス皮膚感染モデルにて高い治療効果が認められることを確認した。この化合物が B型肝炎ウイルス増殖を抑制する可能性について検討を行った。

（倫理面への配慮）

京都大学の倫理規定にしたがって、遺伝子組み換え実験や感染実験などを実施した。

C. 研究結果

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。しかしながら、現在のところは 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、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 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