

201320027B

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

マイクロ RNA を標的とした  
新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発

平成 23-25 年度 総合研究報告書

研究代表者 渡士 幸一

国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

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

マイクロ RNA を標的とした  
新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発

平成 23-25 年度 総合研究報告書

研究代表者 渡士 幸一

国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

平成 26 (2014) 年 3 月

# 目 次

## I . 総括研究報告

マイクロ RNA を標的とした新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発 ..... 1

渡士 幸一

II . 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 12

III . 研究成果の刊行物・別刷 ..... 14

# 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

マイクロ RNA を標的とした新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発

研究代表者 渡士 幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：本研究では、マイクロRNA (miRNA) 等宿主因子を標的とした新規抗C型肝炎ウイルス (HCV) 治療法の開発を目的とした。そのために(1) miRNAを標的とした戦略として、miRNA阻害剤trypaflavine (TPF)によるHCV複製抑制効果の検証、(2) miRNA以外のHCV複製増殖に関わる宿主因子を同定し、またこれを標的とした抗HCV剤のリード化合物の同定、を主におこなった。培養細胞においてTPFはmiR-122とargonaute2の相互作用を解離させることによりHCV翻訳を阻害することが示唆された。また感染性HCV粒子産生系を用いたスクリーニングにより、TPFとは別系統のさまざまな抗HCV作用を有する低分子化合物が得られた。これらのうちhalopemideは宿主phospholipase Dを阻害することによりHCV放出過程を阻害すること、MA026は感染レセプターの一つであるclaudin-1と結合することによりHCV侵入を阻害すること、SCY-635はHCV感染細胞におけるPKRリン酸化の阻害を介したインターフェロン下流遺伝子群の翻訳上昇によりHCVレベルを低下させることが明らかとなった。以上の結果は抗HCV剤の創薬標的となる新たな宿主因子およびこれを標的とするリード化合物を提示するものであり、新規抗HCV剤開発に有用な知見を提供するものである。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者は本邦において約 100 万人存在すると推定されている。HCV 治療としては現在まで主にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法に加えプロテアーゼ阻害剤が用いられているが、これらの治療法は HCV 遺伝子型によって効果が異なること、インターフェロンベースの治療法では特に副作用が問題になること、プロテアーゼ阻害剤に対しては薬剤耐性ウイルスの出現が否定できないことから、新たな抗 HCV 療法が求められている。特に長期投与に伴う薬剤耐性ウイルス出現を克服するためには、宿主因子を標的とした治療薬開発が重要である。本研究ではマイクロ RNA (miRNA) 等の宿主因子を標的と

した新規治療法の開発を目指す。miRNA は多様な宿主遺伝子発現を調節する小分子 RNA であり、特に肝臓に高発現する miR-122 は HCV の複製補因子として認知されており、細胞内での HCV ゲノム複製を強く促進する。これまでに研究代表者はさまざまな miRNA 種の遺伝子サイレンシング経路を低分子化合物により阻害できることを初めて示した。そこで本研究ではまず miRNA 機能阻害による HCV 複製制御を目指してこの miRNA 阻害剤 TPF を用いた解析をおこなう。またこれとは別の抗 HCV 作用を有する化合物を探索する。得られた化合物の抗 HCV 分子メカニズムの解析をおこなうことにより、抗 HCV 剤の創薬標的となる新規宿主因子の同定を目指す。

## B. 研究方法

### (1) miRNA 阻害剤による HCV 複製抑制作用メカニズムの解析

HeLa 細胞に合成 miR-122 をトランスフェクションした後、in vitro 合成した HCV 遺伝子型 1b 型 RNA をエレクトロポレーションで導入し、HCV ゲノム複製が持続的に行われている細胞を G418 1000 $\mu$ g/ml で選択した。3 週間後に生き残った細胞をクリスタルバイオレットで染色することにより、HCV ゲノム複製活性を計測した。また AGO2 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞あるいは TPF 処理細胞を用いることにより、AGO2 の効果を検証した。また TPF を処理した、HCV レプリコンを有する Huh-7 細胞中の HCV RNA およびタンパク質を real time RT-PCR 法およびイムノブロット法を用いて解析した。また細胞溶解液にビオチン化 miR-122 を加え、ストレプトアビジン化ビーズ沈降物中の AGO2 をイムノブロット法で検出することにより、miR-122 と AGO2 の結合を評価した。

TPF 誘導体として Sigma-Aldrich より購入した 8 種類の化合物を用いた。サイレンシング活性は、ホタルルシフェラーゼ (Fluc)、ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) および Fluc に対する shRNA 発現プラスミドをトランスフェクションした細胞を用いてレポーターアッセイを行い、Fluc を Rluc により割った値の相対値により定量した。また HCV ゲノム複製は、Fluc を有する HCV レプリコンを用いたレポーターアッセイにより測定した。

ヒト肝細胞を移植した uPA TG/SCID マウスへの HCV 感染は (株) フェニックスバイ

オの標準プロトコールに則った。HCV 感染後、血中 HCV RNA 量が  $1 \times 10^6$  コピー/ml 以上で安定した後に ACF 0.5 mg/kg を筋肉注射で 1 日 1 回、2 週間投与した。さらに 2 週間ごとに ACF 投与量を段階的に上昇させ、8 mg/kg の 2 週間投与までおこなった。マウスへの毒性は、体重測定および血中ヒトアルブミン定量により評価した。また血中 HCV RNA を real time RT-PCR 法で定量することにより抗ウイルス効果の有無を調べた。また、1) ACF と ddY マウス血清を in vitro で混合し、37 $^{\circ}$ C で 30, 60, 120, 180 分間インキュベーション後の ACF 濃度、2) ACF 20  $\mu$ g/body を ddY マウスに投与し、5, 15, 30, 60, 120 分後の血中および肝臓内 ACF 濃度を、蛍光-HPLC 分析法により測定した。

### (2) miRNA 以外の宿主標的をもつ抗 HCV リード化合物の同定

HCV RNA を導入した Huh7-25 細胞に化合物を 72 時間処理し、培養上清中の HCV 感染力価を測定することにより、それぞれの化合物が感染性 HCV 産生に与える影響を評価した。

Huh-7.5.1 細胞への siRNA 導入には lipofectamine RNAiMax を用いた。また HCV core タンパク質とさまざまなオルガネラマーカーの細胞内局在は免疫蛍光法により検出した。

MA026 の宿主標的スクリーニングには、MA026 を固相化したプレートおよびランダムペプチドライブラリーを表出するファージを用いたファージディスプレイ法を用いた。MA026 と claudin-1 との結合は表面プラズモン共鳴により評価した。

SCY-635 処理細胞における ISG15、MxA、

PKR、リン酸化 PKR、eIF2a、リン酸化 eIF2a、HCV core、actin タンパク質は免疫ブロット法で検出した。

### C. 研究結果

(1) miRNA 阻害剤による HCV 複製抑制作用メカニズムの解析

1. HCV 複製における argonaute 2 (AGO2) の役割

内在性 miR-122 発現がほとんどない HeLa 細胞では HCV 遺伝子型 1 株の HCV ゲノム複製がほとんど見られないが、これに miR-122 を過剰発現することによりゲノム複製活性が著明に上昇した。この時 AGO2 に対する siRNA を持続的に処理することにより上昇した HCV 複製が大きく低下することが認められた。

2. TPF による HCV 複製の抑制

miRNA 阻害剤 TPF を処理することにより HeLa 細胞における miR-122 依存的 HCV 複製が減少した。また同様に TPF によって Huh-7 細胞内のレプリコン活性も減少した。

3. TPF による miR-122 と AGO2 の解離

HCV レプリコン細胞に TPF を処理した際の、miR-122 と AGO2 の結合がどのように変化しているかを調べた。その結果、TPF 処理により miR-122 と AGO2 の結合が減弱していること、また抗 HCV 効果をもたない TPF 誘導体ではこの解離が見られないことが示された。

4. TPF による HCV 翻訳ステップの阻害

TPF が HCV 生活環内のどのステップを阻害するのかを HCV レプリコンを用いて解析した。その結果、TPF は HCV RNA 安定性には大きな変化は与えなかったが、HCV 翻訳

およびそれに続く RNA 複製を大きく抑制した。

5. さらに抗 HCV 効果の高い miRNA 阻害剤の探索

miRNA サイレンシングおよび HCV ゲノム複製への効果を、8 種類の TPF 誘導体について調べた。これらのうち 1 種類が強い、2 種類が中程度もしくは弱い shRNA 誘導サイレンシング抑制効果を有していた。強いサイレンシング抑制効果を持つ誘導体は、顕著な HCV ゲノム複製抑制を示した。

6. *in vivo* HCV 感染系における miRNA 阻害剤の効果

ヒト肝細胞を移植した uPA TG/SCID マウスに HCV を感染させ、その後に acriflavine (ACF: TPF と proflavine の合剤) を投与することにより、*in vivo* での ACF の抗 HCV 効果の有無を検証した。しかしながら少なくとも本実験においては血中 HCV 量は大きな変化を認めなかった。抗 HCV 効果が見られなかった原因を推定するために、1) ACF と ddY マウス血清を *in vitro* で混合し ACF 濃度を測ったが、経時的な ACF 濃度濃度の減少は認めなかった。しかし 2) ACF を ddY マウスに投与し、経時的な血中および肝臓内 ACF 濃度を測定したところ、ACF 濃度は投与 5 分後で検出限界程度にまで顕著に低下が認められた。

(2) miRNA 以外の宿主標的をもつ抗 HCV リード化合物の同定

1. 抗 HCV 効果を有する低分子化合物の探索

HCV RNA を導入した Huh7-25 細胞における感染性 HCV 産生を測定することにより、抗 HCV 作用を有する化合物をスクリーニン

グした。その結果、感染性 HCV 産生を 1/3 以下に低下させるものとして 17 化合物が得られた。この際、いずれも細胞毒性はほとんど示さなかった。

## 2. halopemide の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

halopemide は HCV RNA 複製および粒子形成には影響を与えることなく HCV 放出を有意に低下させた。また halopemide の宿主標的の一つである phospholipase D (PLD) に対する siRNA を導入したところこの細胞からの感染性 HCV 産生が約 1/3 に減少した。PLD 阻害効果をもつ halopemide 以外の化合物を処理することによっても感染性 HCV 産生が減少した。また PLD 阻害によってアルブミン、アポリポタンパク質などの宿主分泌タンパク質の放出にはほとんど影響せず、またこの時、HCV core タンパク質がゴルジに蓄積していることが観察された。

## 3. MA026 の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

pseudomonas より抽出された新規天然有機化合物 MA026 が HCV 侵入を阻害することを、感染性 HCV 粒子産生系で明らかにした。MA026 の標的分子をファージディスプレイ法により探索したところ、MA026 結合配列として単離されたペプチド配列の一つが、claudin-1 の細胞外ループと相同性を有していた。さらに表面プラズモン共鳴により MA026 とリコンビナント claudin-1 タンパク質の結合が確認された。

## 4. SCY-635 のインターフェロン経路修飾作用機序の解析

SCY-635 を処理した HCV 感染細胞では ISG15、MxA などの IFN 下流遺伝子の mRNA

発現は変化することなく、これらのタンパク質量が増加することが明らかとなった。また SCY-635 処理によってリン酸化 PKR およびリン酸化 eIF2a の顕著な低下が認められた。この SCY-635 のリン酸化 PKR 低下作用はシクロフィリンの阻害を介していることが示唆された。

## D. 考察

以上のように miRNA 阻害剤 TPF は miR-122 と AGO2 を解離させることにより主に HCV 翻訳を抑制することが示唆された。これにより TPF は miR-122 依存的な HCV 複製および感染性 HCV 粒子産生を低下させた。しかしながら TPF はマウス体内では速やかに代謝・排泄されると考えられ、このため in vivo HCV 感染マウスモデルにおいて顕著な抗 HCV 効果は認められなかった。今後体内動態が最適化された TPF 誘導体の同定が求められる。

一方本研究において、miRNA 阻害剤とは別系統の抗 HCV 剤を多数同定した。これらのうち halopemide は HCV 放出過程を、MA026 は HCV 侵入を阻害し、SCY-635 は IFN による HCV 排除の促進効果を有していた。これらの化合物を用いた検討により宿主 PLD はゴルジからの HCV 輸送を制御する因子であること、シクロフィリンは PKR リン酸化を制御することにより IFN 下流遺伝子翻訳を修飾することが示唆された。またこれらおよび claudin-1 は低分子化合物の宿主標的となり得ると考えられた。

## E. 結論

以上のように本研究では、miRNA 以外に創薬標的となり得る宿主因子およびこれを標的とするリード化合物を同定した。これは HCV 生活環のさまざまなステップおよび



これを制御する宿主因子が低分子化合物の標的として機能し、HCV 生活環全般を標的とする抗ウイルス剤開発が可能であることを示唆するものである。得られたリード化合物を至適化することにより、また同定された宿主因子と結合する低分子化合物を新たにスクリーニングすることにより、新たな抗 HCV 剤を同定できると期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusahara H, Mizokami M, Wakita T.: Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. **Hepatology** (in press)
- 2) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusahara H, Wakita T.: Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. **Biochem Biophys Res Commun** 443: 808-813 (2014)
- 3) Shimura S, Ishima M, Nakajima S, Fujii T, Himeno N, Ikeda K, Izaguirre-Carbonell J, Murata H, Takeuchi T, Kamisuki S, Suzuki T, Kuramochi K, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F.: Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026. **J Am Chem Soc** 135: 18949-18956 (2013)
- 4) 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** 95 Pt 1: 60-65 (2014)
- 5) 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** 440: 515-520 (2013)
  - 6) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). **J Biol Chem** 288: 31715-31727 (2013)
  - 7) 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)
  - 8) 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)
  - 9) Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T.: Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase

- activation by cyclophilin A and B in vitro. **Biochim Biophys Acta** 1820: 1886-1892 (2012)
- 10) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T.: Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. **J Clin Microbiol** 50: 1943-1949 (2012)
- 11) Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M.: Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. **Biochem Biophys Res Commun** 415: 714-719 (2011)
- 12) Morohashi K\*, Sahara H, Watashi K\*, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F.: Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. **PLoS One** 6: e18285 (2011) (\*equally contributed)
- 13) 渡士幸一。薬学的視点からのウイルス学研究 -肝炎ウイルス複製阻害化合物の同定とその作用機序-。薬学雑誌、133, 1169-1175, 2013
- 14) 渡士幸一。HBV 培養細胞系による新規抗ウイルス化合物のスクリーニング。肝胆膵、65, 611-617, 2012
- 15) 渡士幸一。第6章 抗ウイルス薬。エッセンシャルウイルス学 (印刷中)
2. 学会発表
- 1) K. Watashi. IL-1- and TNFalpha-triggered intracellular immune response against HBV. **1<sup>st</sup> Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B virus**, Tokyo(Japan), 2013
- 2) K. Watashi, T. Daito, A. Sluder, K. Borroto-Esoda, T. Wakita. Cyclophilin inhibitors potentiate interferon signaling through diminished PKR phosphorylation in HCV-infected cells. **European Association for the Study of the Liver 2013**, Amsterdam(Netherlands), 2013
- 3) 渡士幸一、中嶋翔。ウイルス感染系を基盤とした真菌由来天然化合物の生理活性探索。天然物ケミカルバイオロジー 第4回公開シンポジウム、つくば、2013
- 4) K. Watashi, T. Daito, A. Sluder, K. Borroto-Esoda, T. Wakita. Novel regulation mechanism of interferon signaling by cyclophilin through modulation of PKR in HCV-infected cells. **20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Melbourne(Australia), 2013
- 5) S. Nakajima, K. Watashi, S. Kamisuki, K. Takemoto, R. Suzuki, H. Aizaki, F. Sugawara, T. Wakita. Isolation of a natural product inhibiting the transcriptional activity of liver X receptor and reducing the production of infectious HCV. **20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Melbourne(Australia), 2013
- 6) A. Fujimoto, H. Aizaki, M. Matsuda, N. Watanabe, K. Watashi, R. Suzuki, T. Suzuki, T. Miyamura, T. Wakita. Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection - Regulation of the lipoprotein metabolisms by hepatic lipase -.

- 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne(Australia), 2013**
- 7) K. Watashi, A. Sluder, S. Matsunaga, A. Ryo, S. Nakajima, M. Iwamoto, S. Tsukuda, K. Borroto-Esoda, M. Sugiyama, Y. Tanaka, M. Mizokami, T. Wakita. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 8) K. Watashi, G. Liang, M. Iwamoto, H. Marusawa, K. Kitamura, M. Muramatsu, R. Suzuki, J. Li, S. Tong, Y. Tanaka, K. Murata, H. Aizaki, T. Wakita. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 9) M. Iwamoto, K. Watashi, S. Tsukuda, H. Aly, R. Suzuki, H. Aizaki, O. Koiwai, H. Kusuhara, T. Wakita. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 10) S. Tsukuda, K. Watashi, M. Iwamoto, R. Suzuki, H. Aizaki, S. Kojima, T. Wakita. A retinoid derivative inhibits hepatitis B virus entry mediated by NTCP. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 11) H. Aly, K. Watashi, K. Chayama, T. Wakita. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 12) N. Ogura, K. Watashi, T. Wakita. Formation of covalently closed circular (ccc)DNA tetracycline inducible HBV expression cell line. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai(China), 2013**
- 13) S. Nakajima, K. Watashi. Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system. **The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products, Yokohama(Japan), 2013**
- 14) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字。シチジンデアミナーゼ AID 誘導を介した抗 B 型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解明。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 15) 大東卓史、渡士幸一、Ann Sluder、中嶋翔、Katyna Borroto-Esoda、藤田尚志、脇田隆字。PKR 活性化制御を介するシクロフィリン阻害剤の新たな抗 C 型肝炎ウイルス作用機序。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 16) 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉丈、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される。第 61 回日本ウイルス学会

学術集会、神戸、2013

- 17) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、アリ フセイン、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字。ヒト NTCP 安定発現細胞株における B 型肝炎ウイルス侵入機構の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 18) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。B 型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定およびその NTCP を介した感染阻害機構の解明。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 19) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。Liver X receptor 転写活性および感染性 C 型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 20) フセイン アリ、渡士幸一、茶山一彰、脇田隆字。Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 21) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字。日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 22) 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化と Hepatic Lipase 発現制御。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 23) 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス NS5A 結合膜タンパク質 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 24) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗。細胞内発現抗体（イントラボディ）による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 25) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、SuSu Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和気健二郎、宮村達男、脇田隆字。PhospholipaseA2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗 HCV 作用-。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 26) 小泉吉輝、岩見真吾、内田奈々子、脇田隆字、渡士幸一。数理モデルによる抗ウイルス薬の薬効評価系の確立。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 27) 古賀れいな、宮川敬、松永智子、渡士幸一、脇田隆字、梁明秀。Tetherin/BST-2 は HBV 複製を負に制御する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 28) 馬場昌範、外山政明、伊藤渉、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、Sharon Ashoke。新規ピラノンカルボキサミド誘導体の抗 HCV 効果とその構造活性相関。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 29) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨

- 涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字。プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス産生系の確立。第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013
- 30) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、SuSu Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、宮村達男、脇田隆字。PhospholipaseA2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗 HCV 作用-。第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013
- 31) 渡士幸一。低分子化合物を利用した肝炎ウイルス学解析。東京大学医科学研究所第一回感染症国際研究センターシンポジウム、東京、2012
- 32) 渡士幸一。抗 HBV 剤探索と HBV 感染増殖機構の解析。LIVER2012 第8回肝免疫・ウイルス・フロンティア 肝疾患研究の潮流、東京、2012
- 33) S. Shimura, M. Ishima, I. Ota, E. Tsutsui, S. Kamisuki, H. Murata, T. Yamazaki, T. Suzuki, K. Kuramochi, T. Takeuchi, K. Watashi, S. Kobayashi, F. Sugawara. Synthetic studies of MA026, a novel antiviral lipocyclodepsipeptide. **International Congress on Natural Products Research 2012**, New York(USA), 2012
- 34) 渡士幸一。数理モデルを用いた肝炎ウイルスの解析。第22回数理生物学会、岡山、2012
- 35) K. Watashi, N. Uchida, T. Daito, T. Kiyohara, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha suppressed hepatitis B virus infection through NF-kappaB signaling pathway. **2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Oxford(England), 2012
- 36) K. Watashi, M. Iwamoto, N. Uchida, T. Kiyohara, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Development of cell clones for analyzing anti-hepatitis B virus compounds. **2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Oxford(England), 2012
- 37) K. Watashi, N. Uchida, M. Saeed, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. **19th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses**, Venice(Italy), 2012
- 38) N. Uchida, K. Watashi, R. Suzuki, H. Aizaki, J. Chiba, T. Wakita. Phospholipase D regulates membrane trafficking during hepatitis C virus egress. **19th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses**, Venice(Italy), 2012
- 39) Y. Matsumoto, N. Watanabe, K. Watashi, R. Suzuki, T. Matsuura, T. Suzuki, T. Miyamura, K. Wake, T. Wakita, H. Aizaki. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. **19th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses**, Venice(Italy), 2012
- 40) R. Suzuki, M. Matsuda, K. Watashi, H. Aizaki, Y. Matsuura, T. Suzuki, T. Wakita. An alternative endocytosis pathway for the protective entry of hepatitis C virus. **19th**

- International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, Venice(Italy), 2012**
- 41) H.H. Aly, K. Watashi, N. Watanabe, M. Mizokami, T. Kato, T. Wakita. Construction of hepatitis C virus genotype 4a clone. **19th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, Venice(Italy), 2012**
- 42) S. Nakajima, K. Watashi. Identification of natural products inhibiting hepatitis C virus infection. **The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products, Kyoto(Japan), 2012**
- 43) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字。IL-1 および TNF- $\alpha$  の B 型肝炎ウイルス感染阻害効果。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012
- 44) K. Watashi, N. Uchida, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. **Japan Society of Hepatology 10th Single Topic Conference, Tokyo(Japan), 2012**
- 45) 渡士幸一。肝炎ウイルス複製を阻害する低分子化合物／生理活性物質の同定とその作用機序。日本薬学会第 133 年会、横浜、2013
- 46) K. Watashi, N. Uchida, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA. 2011.9.8-12.**
- 47) K. Watashi, H. Sahara, K. Morohashi, K. Iwabata, T. Sunoki, K. Kuramochi, K. Takakusagi, H. Miyashita, N. Sato, A. Tanabe, K. Shimotohno, S. Kobayashi, K. Sakaguchi, F. Sugawara. Identification of a novel cellular RNA helicase-like protein as a target for cyclosporin A that is involved in hepatitis C virus genome replication. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA. 2011.9.8-12.**
- 48) N. Uchida, K. Watashi, R. Suzuki, H. Aizaki, J. Chiba, T. Wakita. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA. 2011.9.8-12.**
- 49) H. Aizaki, Y. Matsumoto, K. Goto, K. Watashi, R. Suzuki, M. Fukasawa, K. Hanada, S. Sato, N. Takahashi, Y. Matsuura, K. Motojima, T. Miyamura, T. Suzuki, T. Wakita. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA. 2011.9.8-12.**
- 50) K. Goto, T. Kimura, K. Watashi, R. Suzuki, S. Yamagoe, T. Miyamura, K. Moriya, H. Yotsuyanagi, K. Koike, T. Suzuki, T. Wakita, H. Aizaki. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA.**

- 2011.9.8-12.
- 51) R. Suzuki, T. Suzuki, K. Saito, M. Matsuda, K. Watashi, Y. Matsuura, T. Wakita, H. Aizaki. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. **18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses.** Seattle, USA. 2011.9.8-12.
- 52) K. Watashi, N. Uchida, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. **International Union of Microbiological Societies 2011 Congress.** Sapporo, Japan. 2011.9.11-16.
- 53) R. Suzuki, T. Suzuki, K. Saito, M. Matsuda, K. Watashi, Y. Matsuura, T. Wakita, H. Aizaki. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. **International Union of Microbiological Societies 2011 Congress.** Sapporo, Japan. 2011.9.11-16.
- 54) Y. Matsumoto, K. Watashi, R. Suzuki, T. Matsuura, T. Suzuki, T. Miyamura, K. Wake, T. Wakita, H. Aizaki. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. **International Union of Microbiological Societies 2011 Congress.** Sapporo, Japan. 2011.9.11-16.
- 55) K. Watashi, N. Uchida, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita. Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. **2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses.** Lake Buena Vista, USA. 2011.10.9-12.
- 56) 渡士幸一. 数理モデルと肝炎ウイルス解析. 第8回生物数学の理論とその応用、京都、2011.11.15-18.
- 57) 渡士幸一. 低分子化合物を利用した肝炎ウイルス学解析. 感染・免疫・炎症・発癌、札幌、2011.12.5-6.
- G. 知的所得権の所得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表



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
Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T	Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP.	Hepatology	in press		
Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP	Biochem Biophys Res Commun	443(3)	808-813	2014
Shimura S, Ishima M, Nakajima S, Fujii T, Himeno N, Ikeda K, Izaguirre-Carbonell J, Murata H, Takeuchi T, Kamisuki S, Suzuki T, Kuramochi K, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F	Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026	J Am Chem Soc	135(50)	18949-18956	2013
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	95 Pt1	60-65	2014
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	440(4)	515-520	2013
Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T	Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID)	J Biol Chem	288(44)	31715-31727	2013

Suzuki R, Matsuda M, <u>Watashi K</u> , 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(8)	e1003589	2013
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, <u>Watashi K</u> , 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(7)	e68992	2013
Weng L, Tian X, Gao Y, <u>Watashi K</u> , Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T	Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro	Biochim Biophys Acta	1820(12)	1886-1892	2012
Murayama A, Sugiyama N, <u>Watashi K</u> , Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T	Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays	J Clin Microbiol	50(6)	1943-1949	2012
Salim MT, Aoyama H, Sugita K, <u>Watashi K</u> , Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M	Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives	Biochem Biophys Res Commun	415(4)	714-719	2011
Morohashi K*, Sahara H, <u>Watashi K*</u> , Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F (*equally contributed)	Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B	PLoS One	6(4)	e18285	2011
<u>渡士幸一</u>	薬学的視点からのウイルス学研究—肝炎ウイルス複製阻害化合物の同定とその作用機序	薬学雑誌	133(11)	1169-1175	2013
<u>渡士幸一</u>	HBV 培養細胞系による新規抗ウイルス化合物のスクリーニング	肝胆臓	65	611-617	2012
<u>渡士幸一</u>	第6章 抗ウイルス薬	エッセンシャルウイルス学	印刷中		

### III. 研究成果の刊行物・別刷

# Cyclosporin A Associated Helicase-Like Protein Facilitates the Association of Hepatitis C Virus RNA Polymerase with Its Cellular Cyclophilin B

Kengo Morohashi<sup>1</sup>\*, Hiroeki Sahara<sup>2\*</sup>, Koichi Watashi<sup>3</sup>, Kazuki Iwabata<sup>1</sup>, Takashi Sunoki<sup>1</sup>, Kouji Kuramochi<sup>1</sup>, Kaori Takakusagi<sup>1</sup>, Hiroki Miyashita<sup>4</sup>, Noriyuki Sato<sup>4</sup>, Atsushi Tanabe<sup>2</sup>, Kunitada Shimotohno<sup>5</sup>, Susumu Kobayashi<sup>1</sup>, Kengo Sakaguchi<sup>1</sup>, Fumio Sugawara<sup>1</sup>

**1** Genome and Drug Research Center, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, Japan, **2** Laboratory of Biology, Azabu University School of Veterinary Medicine, Sagami-hara, Kanagawa, Japan, **3** Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, **4** Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan, **5** Research Institute, Chiba Institute of Technology, Narashino, Chiba, Japan

## Abstract

**Background:** Cyclosporin A (CsA) is well known as an immunosuppressive drug useful for allogeneic transplantation. It has been reported that CsA inhibits hepatitis C virus (HCV) genome replication, which indicates that cellular targets of CsA regulate the viral replication. However, the regulation mechanisms of HCV replication governed by CsA target proteins have not been fully understood.

**Principal Findings:** Here we show a chemical biology approach that elucidates a novel mechanism of HCV replication. We developed a phage display screening to investigate compound-peptide interaction and identified a novel cellular target molecule of CsA. This protein, named CsA associated helicase-like protein (CAHL), possessed RNA-dependent ATPase activity that was negated by treatment with CsA. The downregulation of CAHL in the cells resulted in a decrease of HCV genome replication. CAHL formed a complex with HCV-derived RNA polymerase NS5B and host-derived cyclophilin B (CyPB), known as a cellular cofactor for HCV replication, to regulate NS5B-CyPB interaction.

**Conclusions:** We found a cellular factor, CAHL, as CsA associated helicase-like protein, which would form trimer complex with CyPB and NS5B of HCV. The strategy using a chemical compound and identifying its target molecule by our phage display analysis is useful to reveal a novel mechanism underlying cellular and viral physiology.

**Citation:** Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, et al. (2011) Cyclosporin A Associated Helicase-Like Protein Facilitates the Association of Hepatitis C Virus RNA Polymerase with Its Cellular Cyclophilin B. PLoS ONE 6(4): e18285. doi:10.1371/journal.pone.0018285

**Editor:** Robyn Klein, Washington University, United States of America

**Received:** April 15, 2010; **Accepted:** March 2, 2011; **Published:** April 29, 2011

**Copyright:** © 2011 Morohashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by The Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, Grant-in-Aid for Matching Fund Subsidy for Private Universities. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: sahara@azabu-u.ac.jp

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Cyclosporin A (CsA) possesses immunosuppressive effects and is widely used for allogeneic transplantation [1]. These therapeutic effects of CsA, in particular downregulation of interleukin 2 (IL-2) production by T cells, are considered to be responsible for the suppression of immunological events via cellular immunology [2,3]. Its mechanism is widely believed to include CsA binding to its primary cytoplasmic receptor cyclophilin A (CyPA). This CsA/CyPA complex inhibits the phosphatase activity of calcineurin, which is essential for the activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factors and their downstream cytokine production [2–5]. The cyclophilins (CyP), identified as cytoplasmic receptors for CsA are a family of peptidylprolyl cis-trans isomerases (PPIase) and include more than ten subtypes [6–8]. Recently, it was reported that several CyPs regulated hepatitis C virus (HCV) replication; CyPA binds to HCV NS5A and NS5B proteins. CyPB also interacted with HCV NS5A and NS5B [9–

11]. The interaction of CyPB stimulates the RNA binding activity of NS5B. These viral-cellular interaction mechanisms were revealed by a chemical biological analysis focusing on an anti-viral characteristic of CsA. However, it has not been fully understood how a series of CsA-target proteins regulate HCV replication. We obtained the data suggesting the possibility that CsA target factor(s) other than CyP family also modify HCV replication.

To exploit a novel drug target is a challenging but a powerful strategy to elucidate unknown aspects of cellular physiology that are modified by the compound. In this study, we identify a CsA binding factor by a phage display method. There are various methods to isolate targets of small molecules. Most of the methods, however, require tagged small molecules for screening to separate the drug and protein complex. The steps to synthesize tagged small molecules are technically limited in the case of complicated molecules such as CsA. To overcome this limitation, we recently developed a labeling method that can be theoretically utilized for