

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書（平成26年度）

C型肝炎ウイルスの増殖制御機構解明と創薬開発のための分子基盤

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 将来にわたる、長期的なウイルス肝炎対策として、現行のDirect Acting Antiviralsとは作用機序の異なる新規C型肝炎治療薬の開発は重要な課題である。本研究では、HCV生活環制御、病態発現の分子機構の解明を進め、阻害剤開発に有用な実験系の作出、また阻害剤探索を行う。本年度は主として以下の成果を得た。1) HCV 3' UTRをパッケージングシグナルとして同定し、創薬標的の可能性を示した。2) 臨床試験予定のN-89とN-251の橋渡し研究として、耐性ウイルスの解析、DAAとの併用効果を明らかにした。3) HCV複製制御に働く脱ユビキチン化酵素USP15は、脂質代謝にも関与し、ノックアウトマウスで脂肪肝発症が抑制されることを見出した。4) FKBP6はHCV複製を制御し、その阻害剤DM-CHXは顕著な抗HCV効果を示した。5) HCV NS5A蛋白質はUBE1L、UbcH8、Herc5によりISGylationが促進されることを見出した。6) DNA損傷応答経路に関与するDNA-PKcsとRad18をHCV生活環に関与する新たな宿主因子として同定した。

分担研究者

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

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

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

NS5B 遺伝子領域にプライマー、プローブを設定した real-time RT-PCR 法 (NS5B-qPCR) を JFH-1 株配列で作製した。HCVcc 感染細胞の細胞内、培養上清、また培養上清の密度勾配遠心分画について NS5B-qPCR 及び汎用している 5' UTR 領域測定 real-time RT-PCR (5UTR-qPCR)

によって HCV RNA を定量した。トランスパッキングシステム実験は以下のように行った。RdRp を不活性型変異させた非複製型サブゲノムレプリコン (Gluc 遺伝子を有し Pol1 プロモーターから発現; pSGRJFH1GND/Gluc) と CAG プロモーター支配下で Core~NS2 を発現するプラスミド pCAG-E2p7NS2m とを Huh7.5.1 細胞へ共導入し、72 時間後の培養上清を回収した。これを HCVtcp として、naïve な同細胞へ接種して 24 時間後の細胞内 HCV RNA を定量して HCVtcp の感染性を評価した。また、非複製型サブゲノムレプリコンのかわりに、pCAG-UTR-GFP と pCAG-NS3-NS5B を用いた HCVtcp 産生系も構築した。

## 2. HCV 感染増殖細胞系の開発:

6 ウェルプレートに播いた各種細胞へ、HCV 陽性血清 (0 株) 150  $\mu$ l (1.5  $\times$  10<sup>7</sup> HCV ゲノム価相当) や陽性コントロールとして JFH-1 株 HCV 由来の HCVcc (MOI 0.1 に相当する量) を添加した。3 時間培養した後、培地を除き PBS で 3 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地を加え培養を行った。7 日後 (感染 7 日目) に培地を回収して、0.22  $\mu$ m のフィルターを通した後に、HCV Core の定量を ELISA 法により行った。細胞は 2 つに分け、一方からは Total RNA を調製し、HCV-RNA の定量を LightCycler を用いた RT-PCR 法により行った。もう一方は、継代用にして細胞培養をさらに続け、一定期間後 (多くは 1 週間後) に、上述した方法により培養上清 (Core の定量) や Total RNA (HCV-RNA の定量) の調製並びに細胞の継代を行った。このような作業を毎週続け、HCV 感染細胞の長期継代を行った。

培養上清に存在する HCV の感染性は以下のように解析した。HuH-7 由来の RSc 細胞と Li23 由来の D7 細胞を 6 ウェルプレートに 4  $\times$  10<sup>5</sup> 細胞ずつ播き、翌日、凍結保存しておいた各種上清 0.1 ml を添加、36 時間培養した。その後、培地 2 mL で 2 回細胞を洗い、3 日間培養した。その後、細胞より Total RNA を調製して、上記の RNA 定量法により HCV-RNA の定量を行った。

## 3. HCV 阻害剤の探索、開発:

抗 HCV 活性の評価用で全長 HCV-RNA 複製細胞である HuH-7 由来の OR6 や Li23 由来の ORL8 細胞など (24 ウェルプレートにそれぞれ 2  $\times$  10<sup>4</sup> 個) に N-89 或いは N-251 および各種 DAA 製剤 (各種濃度) を添加して 72 時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定した。得られた測定値より添加化合物の 50% 阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出した。細胞毒性については、別途 OR6 や ORL8 細胞など (96 ウェルプレートにそれぞれ 1  $\times$  10<sup>3</sup> 個) に N-89 或いは N-251 および各種 DAA 製剤 (各種濃度) を添加して 72 時間後に WST-1 アッセイを行った。得られた測定値から 50% 細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) を算出した。選択性指数 (SI) は CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> にて算出した。

## 4. HCV 生活環におけるユビキチン経路及びユビキチン様タンパク質の役割:

Huh7 細胞にレトロウイルスベクターを用いてそれぞれの DUB のノックダウン細胞を作製し、HCV を感染させることで網羅的なスクリーニングを行った。HCV 複製への関与が認められた USP15 に関して、人工ヌクレアーゼを用いて遺伝子欠損細胞を作製し、HCV 感染における影響を詳細に調べた。さらに、USP15 欠損マウスを作製し、肝機能における影響を調べた。

Huh-7 細胞に UBE1L, UbcH8, FLAG-ISG15 および TRIM25 または Herc5 を一過性に発現し、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。Con1, 0 (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a) をプラスミド pEF1A-NS5A-myc-His<sub>6</sub> として発現させ、ISGylation を解析した。HCV Con1 株の NS5A (genotype 1b) をプラスミド pEF1A-NS5A-myc-His<sub>6</sub> として発現させた。14 個あるすべての Lys 残基を Arg 残基に置換した pEF1A-NS5A-Lys null-myc-His<sub>6</sub> を作製した。さらに各部位 1 カ所のみ Lys 残基をもつ NS5A 変異体を作製した。これらを用いて E1, E2, E3, FLAG-ISG15 を Huh-7 細胞に発現させ、FLAG-ISG15 が付加される部位を免疫沈降法およびウエスタンブロット法で解析した。

## 5. HCV 複製を制御する新規宿主因子の同定と

## 機能解析：

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 FKBP6/8 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。Daclatasvir、IFN、Telaprevir との DM-CHX の併用効果は EC50 で解析した。

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、DNA-PKcs、そして Rad18 をノックダウンさせたヒト肝がん HuH7 細胞由来 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 HCV Core の発現量をそれぞれリアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法と ELISA 法で定量した。同様に DNA-PKcs あるいは Rad18 をノックダウンした全長 HCV 株 RNA 複製 0 細胞の HCV 複製レベルについてもリアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法により検討を行った。

293T 細胞に Myc-Rad18 及び HA-NS5B 発現プラスミドをコトランスフェクションし、48 時間後に細胞を固定後、抗 HA 抗体 (HA-7; Sigma 社) を反応させた後、Cy3 結合抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch 社) 及び Alexa488 結合抗 Myc 抗体 (MBL 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 (FV1200、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、細胞をアドリアマイシン (100 nM) で 3 時間処理後、DNA 損傷に伴う Rad18 及び NS5B の細胞内局在の変化について観察した。

細胞を 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 4mM EDTA, 0.2% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF を含む RIPA バッファーで可溶化した。細胞ライゼートは抗 Myc 抗体 (MBL 社) を加えインキュベートし、Protein G-Sepharose (GE) に吸着させ、免疫沈降した。免疫沈降物は、抗 HA 抗体 (HA-7, Sigma) あるいは抗 Myc 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ遺伝

子を保持する全長 HCV-0 株 RNA 複製細胞株 OR6 細胞や JFH1 株のサブゲノムレプリコン JRN35 細胞を DNA-PK 阻害剤 (DNA-PK inhibitor I1/NU7026; Calbiochem) で処理し、72 時間後、細胞ライゼートの *Renilla* ルシフェラーゼ活性をルミノメーター Lumat LB9507 (Berthold) を用いて測定した。

## (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る。HCV 陽性血清は 1995 年に契約に基づき横浜日赤より入手したものである。本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

## C. 研究結果

### 1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

昨年度までに得られた知見から、HCV ゲノムのパッケージングに必要な配列は 3' 末端領域 (3'UTR and/or NS5B) に存在する可能性が考えられ、Trans-complemented particle (HCVtcp) を作製するトランスパッケージングシステムにより、予備的ながらその仮説を支持する知見が得られた。本年度は、HCVtcp システムでパッケージングシグナルの詳細な解析を行った。

5'UTR/NS3~NS5B/3'UTR 遺伝子からなり、NS5B RdRp に不活性化変異を導入した非複製型レプリコンでも HCV Core~NS2 タンパク質による特異的なパッケージングが可能であることが示されたため、次に、非 HCV 遺伝子にパッケージングシグナルを付与することによって HCV 粒子に取り込まれるかを調べた。UTR 配列 (3'UTR または 5'UTR) とレポーター GFP 遺伝子からなるコンストラクトを構築し、Core~NS2 発現ベクターと共発現させた。しかしながら、5'UTR-GFP、3'UTR-GFP とも HCVtcp 産生は認められなかった。HCV NS タンパク質が粒子形成に関与することが知られていることから、上記の発現ベクターに加えて、NS3~NS5B 発現プラス

ミドを同時に発現させたところ、非常に興味深いことに、3'UTR-GFP の場合、HCVtcp 産生が観察された。これは、3'UTR が JFH-1 株、H77C 株由来の場合で同様の結果であった。これらの共発現細胞で NS5A と脂肪滴、NS5A と Core の局在を調べると、予想通り、HCVtcp 産生が認められた細胞では、NA5A と脂肪滴、NS5A-Core の共局在分子数が他の細胞の場合に比べ有意に高い値を示すことがわかった。

## 2. HCV 感染増殖細胞系の開発 :

感染後一旦 HCV が検出されなくなったとしても、相当期間日数が経過した後に、再度出現してくる可能性が考え、感染後 29 日目で一端-80 度で保存してあった細胞を再度培養することにより、その可能性がないかどうかを検証した。JFH-1 株 HCV を感染させた RSc、ORL8c および D7 細胞では、感染 133 日目においても、細胞内の HCV-RNA 量はそれぞれ  $2.2 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^6$  および  $1.1 \times 10^7$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA となり RNA 複製が持続的に継続していることが分かった。培養上清についても、HCV Core は、RSc 細胞で 2600 fmol/L、D7 細胞でも 3 fmol/L が検出され、これらの細胞においては、持続感染状態になっていることが分かった。

昨年 Virology(Mathiesen CK et al, 458-459: 190-208)に HuH-7 由来の Huh7.5 細胞で無血清培地である AEM 培地を DMEM(10%FBS 入り)培地に置き換えて 2 日ほど培養すると感染性 HCV の産生が 10 倍ほど亢進することが報告された。AEM 培地に置換すると無血清のため細胞増殖能が低下するためか、細胞内の HCV-RNA レベルは逆に低下傾向になるという報告でもあった。そこで、我々は、この現象が我々の HCV 感染実験系においても再現できるかどうかの検証を行った。Li23 由来の D7 細胞においては、細胞内の HCV-RNA 量は ORL8c 細胞と同様、約 3 分の 1 ( $3.8 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA) に低下したものの、培養上清中の HCV Core の量は通常培地で得られた 1.4 fmol/L と比較して 55 倍高い 77 fmol/L が得られた。この培養上清中の HCV Core 量が感染力価と比例しているかどうかについては、培養上清を D7 細胞に感染させることにより(方法

の詳細は研究方法の項を参照)測定した。その結果、AEM 培地交換で得られた培養上清の感染力価は通常培地で得られたものと比較して 100 倍高いことが分かった。細胞クローンの種類によって、Virology により報告された現象が我々の培養細胞システムにおいても再現されることが分かった。

次にもう少し HCV の複製レベルが高い状態でも AEM 培地の効果が観察されるかどうかを検証した。Li23 由来の ORL8c 細胞と D7 細胞では AEM 培地の添加効果が認められた。ORL8c 細胞では、細胞内 HCV-RNA 量は 3.5 分の 1 ( $2.7 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA) に低下したものの、培養上清の Core 量は、2.0 から 67 fmol/L と 33 倍上昇した。AEM 培地の効果は、感染後 1 ヶ月以内の細胞においても効果があることが明らかとなった。特に培養上清中の 100 fmol/L から 2,500 fmol/L への上昇は特筆すべき点である。

AEM 培地の効果が 0 株 HCV や同じ 1b 型 HCV である 1B-4 株 HCV ( $1 \times 10^8$  HCV ゲノム/mL 血清) の感染実験系でも認められないかどうかの検討を行った。AEM 培地の効果が認められた ORL8c 細胞や D7 細胞、その他に PH5CH8 細胞や miR122/CLDN1 を発現させた PH5CH8 細胞に 0 株 HCV や 1B-4 株 HCV を感染させ、感染後 4 日目に AEM 培地に置換して、3 日後の培養上清の HCV Core 量の測定を行った。1b 型 HCV の感染実験においては、大幅なウイルス産生亢進は起こらないことが分かった。

## 3. HCV 阻害剤の探索、開発 :

本年度は、N-251(N-89)に抵抗性を示すヒト細胞評価系の開発を試みた。抗 HCV 活性の評価細胞系である HuH-7 由来の OR6 細胞と Li23 由来の ORL8 細胞から N-251 に抵抗性を示す細胞クローンの単離を試みた。ORL8 細胞に対して、OR6 細胞の場合とは異なる濃度(4 日ごとに  $1 \mu\text{M}$  で N-251 を 10 回投与後、 $3 \mu\text{M}$  まで徐々に濃度を上げていく方法)で行ったところ、G418 に抵抗性を示す細胞コロニーが初めて多数得られた。これらの細胞コロニーをプールして増殖さ

せ、ORL8 N-251r 細胞と命名した。この ORL8 N-251r 細胞における N-251 の EC<sub>50</sub> 値を測定して、N-251 に対する耐性度を調べた。その結果、ORL8 N-251r 細胞での EC<sub>50</sub> 値は 2 μM となり、ORL8 細胞での 0.1 μM と比較して 20 倍耐性であることが分かった。同様にして N-89 の EC<sub>50</sub> 値も測定したところ、ORL8 N-251r 細胞では 1.9 μM の値が得られた。ORL8 細胞では 0.089 μM であるため、ORL8 N-251r 細胞は ORL8 細胞より 21 倍耐性であることが分かった。

次に、N-89 や N-251 が各種 DAA 製剤との併用により相加効果や相乗効果を示して有用であるかどうかを検討した。まず、各種 DAA 製剤の抗 HCV 活性をを調べた。0 株 HCV 由来で、これまで汎用していた OR6 細胞と ORL8 細胞の他に、今回同じく 1b 型である 1B-4 株 HCV 由来の細胞アッセイ系である 1B-4R 細胞 (HuH-7 由来) と 1B-4RL 細胞 (Li23 由来) も用いて DAA 製剤の抗 HCV 活性を評価した。DAA 製剤としては、NS3-4A 阻害剤である Telaprevir、Boceprevir、Simeprevir および Asunaprevir を評価し、NS5A 阻害剤としては Daclatasvir、NS5B 阻害剤として Sofosbuvir を評価した。その結果、OR6 細胞と ORL8 細胞では、多少の差はあるものの、これまで別の細胞アッセイ系で報告されている値 (EC<sub>50</sub> 値や SI 値) と同程度の値が得られ、我々の細胞アッセイ系が評価系として有用であることが分かった。しかしながら、1B-4R や 1B-4RL 細胞では、4 種類全ての NS3-4A 阻害剤について、OR6 や ORL8 細胞で得られた EC<sub>50</sub> 値より 1桁高い値が得られ抵抗性を示すことが分かった。例えば、Boceprevir では OR6 細胞で 140 nM、ORL8 細胞で 130 nM の EC<sub>50</sub> 値だったが、1B-4R 細胞では 1900 nM、1B-4RL 細胞では 2900 nM という値が得られた。そこで、1B-4 株 HCV の NS3 領域の塩基配列を決定したところ、NS3 の 54 番目のアミノ酸が T ではなく S になっていることが分かった。この場所は NS3-4A 阻害剤投与で生じる薬剤抵抗性の T54S 置換に相当していた。従って、1B-4 株 HCV は薬剤処理前に薬剤抵抗性型になっていたことが分かった。

以上の結果を考慮して、N-251(N-89) と DAA 製剤との併用効果を調べる実験については、OR6

細胞と ORL8 細胞を用いて行うこととした。

Isobole plot 解析を行った結果、ORL8 細胞においては、調べた 6 種類の全ての DAA 製剤は、N-251 と相加効果を示すことが分かった。OR6 細胞においても、Telaprevir と Boceprevir については N-251 と相加効果を示した。ただ、Simeprevir、Asunaprevir、Daclatasvir および Sofosbuvir については、弱いながらも相乗効果を示すことが分かった。N-89 についても、N-251 と同様の効果を示すことを確認した。相反効果を示すケースはまったくなかったため、N-89 や N-251 は各種 DAA 製剤との併用が可能な化合物であることが明らかとなった。

次に、DAA に抵抗性を示す HCV に対しても N-89 や N-251 が有効であるかどうかについて検討した。今回得られた DAA 耐性細胞は、N-251 に対しては耐性になっていないことが分かった。N-89 について N-251 とほぼ同様の傾向が得られた。従って、N-89 や N-251 は DAA 耐性となった HCV に対しても有効に抗 HCV 活性を示すことが分かった。

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、高ウイルス量領域で高発現しており、低ウイルス量領域ではその発現が低下してしていた。Huh7 への HCVcc 感染によっても FKBP6 の発現上昇が認められ、培養細胞レベルでも再現された。DM-CHX と既存抗 HCV 剤との併用効果を検討した。IFN および Daclatasvir との併用では、相乗あるいは相加作用を示し、Telaprevir に対してアンタゴニスト作用を示した。

#### 4. HCV 生活環におけるユビキチン経路及びユビキチン様タンパク質の役割：

RNAi スクリーニングにより新たな HCV 複製に関わる新規の宿主因子として、USP15、USP20 を同定した。これらの DUB ノックダウン細胞では顕著に HCV 複製が抑制された。USP15 欠損 Huh7 肝癌細胞株では、HCV 増殖能が著しく減弱した。HCV シュードタイプウイルスを用いた検

討により、HCV 感染には USP15 が関わらず、HCV レプリコンを用いたコロニー形成能では、USP15 欠損細胞でコロニー数が減少したことから、USP15 は HCV のゲノム複製に関与している事が示唆された。USP15 欠損 Huh7 細胞では、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。脂肪滴の恒常性維持に関与すると言われている Adipocyte differentiation related protein (ADRP) や Fatty acid binding protein (FABP) と相互作用し、それらのユビキチン化を解除することから、USP15 は脂質代謝を制御していることが示唆された。そのため、USP15 の肝臓での脂質代謝を検討するため、USP15 欠損マウスを作製し、コリン欠乏メチオニン減量飼料を用いた非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルを用いて、肝臓での脂肪肝への影響を調べた。すると、USP15 欠損マウスでは野生型マウスと比較して顕著に脂肪肝発症を抑制した。これらの成績から、USP15 は肝細胞の脂質代謝を制御し、HCV 複製を制御できる事が示唆された。

HCV NS5A 蛋白質は E3 ligase Herc5 により ISGylation されたが、TRIM25 では変化がなかった。Con1 株の NS5A は IFN- 投与または E1, E2, E3 の強発現のいずれでも ISGylation された。また、Con1、0、JFH1 株いずれの NS5A も ISGylation を受けることが示された。NS5A の ISGylation 部位を解析するために NS5A (Con1) の Lys 残基を Ala 残基に置換し、Lys 残基が 0 個または 1 個だけ残った変異体を作製し、いずれもウエスタンブロット法で発現を確認した。NS5A 変異体を用いた解析では 14 カ所ある Lys 残基のうち、5 カ所の Lys 残基に ISG15 が結合することが示された。Domain I に 3 カ所、LCS I に 1 カ所、Domain II に 1 カ所 ISGylation 部位が存在した。また、ISGylation による NS5A の泳動度の変化に 2 種類あり、何らかの翻訳後修飾が存在し、機能に相違がある可能性が考えられた。GFP-ISG15 を用いた解析から ISG15 同士の di-ISGylation は否定的であった。

##### 5. HCV 複製を制御する新規宿主因子の同定と機能解析：

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを

用いて内在性 DNA-PKcs 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 72 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。同様に全長 HCV-0 株 RNA 複製 0 細胞の内在性 DNA-PKcs 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。この実験結果より、DNA-PKcs が HCV 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。

一方、ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ遺伝子を保持する全長 HCV-0 株 RNA 複製細胞株 OR6 細胞や JFH1 株のサブゲノムレプリコン JRN35 細胞を DNA-PK 阻害剤 (DNA-PK inhibitor II/NU7026; Calbiochem) で処理すると、濃度依存的にルシフェラーゼ活性、すなわち HCV 複製能が顕著に抑制された。DNA-PK 阻害剤の抗 HCV 効果は、HCV-0 株の方が JFH1 株に比べて、感受性が高いことが判明した。

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 Rad18 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 72 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。同様に全長 HCV-0 RNA 複製 0 細胞の内在性 Rad18 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。

293T 細胞において、Myc-Rad18 と HA-NS3-4A あるいは HA-NS5B を共発現させ、免疫沈降実験を行った結果、Myc-Rad18 は HA-NS5B と共沈したが、HA-NS3-4A とは共沈しなかった。さらに両者の細胞内局在を観察するため、293T 細胞に Myc-Rad18 と HA-NS5B を共発現させると、Rad18 は核小体とは異なるリング状の核内構造体を形成するが、NS5B もこの Rad18 の核内構造体の外縁部に共局在することが観察された。以上の結果より、Rad18 は HCV NS5B と相互作用することが判明した。一方、DNA 損傷を誘発するアドリアマイシンで 293T 細胞を処理すると、アドリアマイシン処理 3 時間後に DNA 損傷にตอบสนองして、核内に無数の Rad18 foci の形成が観察された。しかしながら、NS5B と Rad18 の両者が共発現している細胞でも、同等に Rad18 foci の形成が確認されたので、少なく

とも HCV NS5B は DNA 損傷にตอบสนองした Rad18 foci 形成には影響を及ぼさないことが判明した。

#### D. 考察

##### 1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

HCV の粒子形成過程で、HCV ゲノム RNA が選択的にパッケージングされる仕組みについては全くと言ってよいほど明らかにされていない。昨年度、HCV ライフサイクルの過程で、HCV RNA の population が選択されていくかを調べた。複製細胞内と細胞外の HCV RNA を測定し比較した結果、NS5B RNA/5' UTR RNA 比は細胞外の方が顕著に高値であった。また、培養上清を密度分画し各々の感染性と NS5B RNA/5' UTR RNA 比を求めると、最も高感染性の分画が最も NS5B RNA/5' UTR RNA 比が高い (0.98) であることが示された。ゲノム複製、粒子形成過程で、HCV RNA は淘汰、選択され、NS5B RNA/5' UTR RNA 比が 1 に近い RNA 分子が感染性粒子に存在する可能性が示された。また、HCVtcp 解析から、3' 末端領域 (3' UTR and/or NS5B) に HCV のパッケージングシグナルが存在する可能性が推定された。本年度はさらに解析を進め、非 HCV 遺伝子でも、3' 末端側に HCV 3' UTR 配列を付加することに HCV 粒子へのパッケージングが可能になること、その粒子形成には HCV NS3~NS5B タンパク質の共存も必要であることを示すことができた。HCV ゲノムパッケージングの基本システムが明らかになったと言える。予備的ながら、HCV 3' UTR と Core の結合アッセイ系も構築しており、この系を応用することで、HCV ゲノムパッケージング阻害剤を探索することが可能となった。

##### 2. HCV 感染増殖細胞系の開発：

今年度の研究より我々の HCV 感染増殖系においても AEM 培地が感染性 HCV 粒子 (2a 遺伝子型の JFH-1 株 HCV) の産生レベルを大幅に亢進させることを明らかにした。しかしながら、この亢進効果は、報告された HuH-7 由来の Huh7.5 に近い HuH-7 由来の RSc 細胞では起こらず、我々が独自に見出した HCV-RNA 増殖許容細胞である Li23 由来の ORL8c や D7 細胞で AEM 培地の効果

が認められたことは興味深い。AEM 培地がどのようなメカニズムで感染性 HCV 粒子の産生亢進を引き起こすかは不明ではあるが、おそらく、ウイルスの集合や放出の過程で促進的に働くものと思われる。これは、HuH-7 や Li23 のような親細胞の性質ではなく、おそらくサブクローン化された細胞の性質に依存して AEM 培地の効果の有無が規定されている可能性がある。その原因が分かれば、ウイルスの産生量をさらに上げることができる可能性がある。一方、1b 型 HCV については、AEM 培地を使用しても、ウイルス産生量の明確な亢進を確認することが出来なかった。従って、HCV の遺伝子型に依る可能性もあることから、この点を明らかにする必要がある。

##### 3. HCV 阻害剤の探索、開発：

これまでに強い抗 HCV 活性を見出した N-89 と N-251 について、PMDA での対面助言 (平成 25 年) を受け検討課題となった実験 (作用機序、耐性ウイルスの選択性に関する検討、各種 DAA 製剤との併用効果など) を引き続き行った。これまで、様々な方法により N-89 や N-251 に耐性を示す全長 HCV-RNA 細胞の作出を試みて来たが、明らかな耐性細胞は得られず、宿主のバリアーは高いと思われた。作用機序が不明な化合物ではあるが、薬剤耐性が生じにくいところを標的にしている可能性があり、優れた抗 HCV 剤であると考えられる。そのような状況下で、今年度は、化合物の投与方法や全長 HCV-RNA 複製細胞の種類を変更するなどして試みた結果、今年度初めて ORL8 細胞から N-89 や N-251 に約 20 倍程度耐性を示す細胞が得られた。この耐性細胞と親細胞の ORL8 を丹念に比較することにより、それがウイルス側の変異に依るものなのか、宿主側の因子の変化に依るものなのかを今後、明らかにすることができるのではないかと期待される。この点を明らかにすることができるのと、抗 HCV 標的も明らかになる可能性が高く、N-89(N-251) の抗 HCV 活性の作用機序の解明につながることを期待される。今回耐性細胞が得られなかった OR6 細胞についても、投与方法を変えるなどして耐性細胞を得る努力

も引き続き行っている。

さらに今年度は、N-89 や N-251 が DAA 耐性になった HCV にも有効に作用することを示すことができた。この結果から、N-89 や N-251 は DAA とは異なる作用機序であることが改めて示唆された。我々が得た DAA 耐性細胞内の HCV が耐性変異を獲得しているかどうかについて、現在、HCV-RNA の塩基配列の解析を行っている。これまでに得られた結果によると、耐性変異として報告されている変異も検出される一方、新規の変異と思われるものも検出されている。この点については、今後全体像を明らかにできるものと考えている。

昨年度の本研究で、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。今回、高ウイルス量領域の肝臓で FKBP6 が高発現しており、*in vivo* における肝細胞感染と FKBP6 発現との関連が考えられる。また、培養細胞レベルでも 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 感染サイクルが維持されることが示唆された。

#### 5. HCV 生活環におけるユビキチン経路の役割：

脱ユビキチン化酵素はタンパク質のユビキチン化の逆反応を担う酵素であり、タンパク質の安定化や様々なシグナル伝達を介して、癌や免疫応答等の様々な生理現象に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。本年度、USP15 が肝臓で脂肪滴の形成や維持に関与することが示された。今後は、USP15 がどのような分子メカニズムで、脂肪滴形成に関わるのかを明らかにする。USP15 を標的とする化合物は、HCV 複製の抑制だけでなく、脂質代謝を制御することで、脂肪肝の抑制が期待される。

HCV NS5A 蛋白質は UBE1L, UbcH8, Herc5 により ISGylation が促進された。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る。NS5A 変異体を用いた解析では 14 カ所ある Lys 残基のうち、5 カ所の Lys 残基に ISG15 が結合することが示された。Domain I に 3 カ所、LCS I に 1 カ所、Domain II に 1 カ所の ISGylation 部位が存在した。ISGylation による NS5A の泳動度の変化に 2 種類存在し、何らかの翻訳後修飾が存在し、機能に違いがある可能性が考えられた。GFP-ISG15 を用いた解析から ISG15 同士の di-ISGylation は否定的であった。NS5A が ISG15 が付加する場所でさらに翻訳後修飾が起こる可能性があり、ウイルス増殖、病原性における意義を今後明らかにする必要がある。

#### 6. HCV 複製を制御する新規宿主因子の同定と機能解析：

DNA ゲノムを保持するウイルスが、感染細胞内の DNA 損傷応答経路を活性化し、ウイルスの自己複製に利用していることが知られている。一方、RNA ゲノムしか保持しない HCV の場合も、HCV 感染により、宿主細胞に DNA 二重鎖切断 (Double Stranded DNA Breaks, DSBs) を誘導し、宿主ゲノムの不安定性を増加させることにより、肝臓がんを誘発している可能性が示唆されてきた。実際、HCV 構造タンパク質である Core、エンベロープ E1、そして非構造タンパク質 NS3 が活性化酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) を誘導させ、DNA 損傷を誘発していることが明らかとなっている。また、HCV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B を発現させたヒト不死化肝細胞株 PH5CH8 細胞において、DNA 二重鎖切断が誘導される DNA 損傷に感受性が高いことが報告されている。さらに我々も HCV NS3-4A 及び NS5B が ATM と相互作用すること、そして ATM が HCV 複製に必要な宿主因子であることを報告してきた。

本年度の研究成果として、新たに DNA 損傷応答経路に関与する DNA-PKcs と Rad18 を HCV 生活環に関与する宿主因子として同定した。DNA-PKcs も ATM も同じ PI3 キナーゼファミリーに属する DNA 損傷センサーである。実際、ATM 阻害剤 KU-55933 と DNA-PK 阻害剤 DNA-PK inhibitor II/NU7026 の両者ともに HCV 複製能

を抑制したので、新規の抗 HCV 剤開発の候補として期待される。しかしながら、DNA-PK が HCV のどのタンパク質と相互作用し、HCV タンパク質をリン酸化するのか、逆に HCV が DNA-PK のキナーゼ活性を阻害するのか今後の検討課題である。

興味深いことに Rad18 は HCV NS5B と結合することが見いだされた。Rad18 は核小体とは異なるリング状の核内構造体を形成するが、NS5B もこの Rad18 の核内構造体の外縁部に共局在することが観察された。アドリアマイシン処理すると、DNA 損傷に反応して、核内に無数の Rad18 foci の形成が観察された。しかしながら、HCV NS5B と Rad18 の両者が共発現している細胞でも、同等に Rad18 foci の形成が確認されたので、少なくとも HCV NS5B は DNA 損傷に反応した Rad18 foci 形成には影響を及ぼさないことが判明した。

Rad18 はユビキチン E3 リガーゼとして機能し、DNA 複製中に DNA 損傷が生じると Rad18 がリクルートされ、PCNA をモノユビキチン化することにより、DNA ポリメラーゼスイッチング、Pol からモノユビキチン化された PCNA により強い親和性のある DNA 修復酵素 Pol に置換され、DNA 修復が開始される。また、Rad18 は ATM の下流において、相同性組換え修復にも関与していることが知られている。しかしながら、HCV NS5B が Rad18 依存的な DNA 複製時や相同性組換えによる DNA 修復経路を阻害するのか不明であるので、今後の検討課題である。さらに Rad18 が HCV タンパク質をユビキチン化し、HCV 複製関与に関与しているか、逆に HCV NS5B が Rad18 依存的なユビキチン化反応を阻害するのかについても今後、明らかにする必要がある。

#### E . 結論

創薬のための分子基盤の確立に資する研究を推進した。HCV ゲノムパッケージの基本機構を明らかにした。N-251、N-89 は第一相試験に向けた橋渡し研究を行った。新たな HCV 複製調節因子を同定し、複製解析から、DM-CHX 等抗 HCV 化合物を見出した。さらに、脱ユビキチン化酵素の HCV 複製、脂質代謝における役割などユビキチン関連機構と HCV との関連に種々の新

知見を得た。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$  in Infectious Virus Production. **J Virol.** 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. **J Virol.** 89: 2220-2232, 2015.
3. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, and Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in A Mouse Model. **J Virol.** (in press).
4. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol.** 95: 2658-2667, 2014.
5. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.

6. Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. **Biosens Bioelectron.** 64: 311-317, 2014.
7. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron.** 58:33-39, 2014.
8. Shimada H, Haraguchi K, Hotta K, Miyaike T, Kitagawa Y, Tanaka H, Kaneda R, Abe H, Shuto S, Mori K, Ueda Y, Kato N, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J. Synthesis of 3',4'-difluoro-3'-deoxyribonucleosides and its evaluation of the biological activities: Discovery of a novel type of anti-HCV agent 3',4'-difluorocordycepin. **Bioorg Med Chem**, 22(21):6174-6182 (2014).
9. Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. **Amer J Pathol**, 184(11):3026-3039 (2014).
10. Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl)aniline analogs. **Bioorg Med Chem Lett**, 27(17): 4276-4280 (2014).
11. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. **Virology**, 462:166-174 (2014).
12. Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Biochem Biophys Res Commun**, 447(2):341-345 (2014).
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**, 9(3):e91156 (2014).
14. Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. **J Immunol**, 192(6):2770-2777 (2014).
15. Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of hepatitis C virus. **Acta Medica Okayama**, in press (2015).
16. Satoh S, Mori K, Ueda Y, Sejima H, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Establishment of hepatitis C virus RNA-replicating cell lines possessing ribavirin-resistant phenotypes. **PLOS ONE**, in press (2015).
17. Murakami Y, Itami S, Eguchi Y, Mizutani T, Aoki E, Ohgi T, Kuroda M, Ochiya T, Kato N, Suzuki H, Kawada N. Control of HCV replication with iMIRs, a novel anti-RNAi agent. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, in press (2015).
18. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus. **J. Virol.**, 88: 13352-13366, 2014

19. Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. **Molecules**, 19: 4006-4020, 2014
20. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. **J. Invest. Dermatol.**, 134: 1158-1161, 2014
21. Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. **Mar. Drugs**, 12: 462-476, 2014
22. Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. **PLOS ONE**, 9: e85360, 2014
23. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities. **PLOS ONE**, 2014, 9 (6): e98877.
24. 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**, 2014, 58 (3): 188-94.
25. 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**, 2014, 58 (3): 180-7.
26. 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**, 2014, 21 (1): 1-16.
27. Ariumi Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. **Frontiers Genet.** 5:423, 2014
28. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. **PLOS Pathogens** 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
29. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. **J. Virol.** 2014; 88: 5578-5594.

H. 知的所有権の出願・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