

201423007B

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）

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

平成24-26年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成27 (2015) 年 3月

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）

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

平成24-26年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成27 (2015) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告書

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

鈴木 哲朗…………… 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書（平成 24-26 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：将来を見据えた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。本研究期間に以下の成果を得た。1) HCV 3' UTR をパッケージングシグナルとして初めて同定し、創薬標的の可能性を示した、2) CV 粒子形成に重要な NS5A キナーゼとして CK1alpha を同定、同阻害剤の抗 HCV 活性を見出した、3) 経口抗マalaria薬 N-89 とその誘導体 N-251 に強い抗 HCV 活性を見出し、リバビリンと相乗的、DAA と相加的な治療効果を示した（臨床試験開始予定）、4) 市販されているサナギタケカプセル剤に抗 HCV 活性を見出した、5) 新規 HCV 複製調節因子として脱ユビキチン化酵素 USP15, USP20 を同定した、6) USP15 は脂質代謝、脂肪肝発症に関与することを培養系とマウスモデルで証明した、7) HCV 複製調節因子 FKBP6 の阻害剤 DM-CHX が抗 HCV 活性を有し、IFN と相乗的、DAA と相加的に働くことを示した、8) NS5A を修飾し HCV 複製に関与するユビキチンリガーゼ DZIP3 を同定した、9) NS5A は Herc5 によって ISG15 化されること、脱ユビキチン化酵素 OTUD7B と会合することを見出した、10) RNA ヘリケース DDX21、RNA 結合因子 Staufen1 と UPF1 が HCV 生活環に関与することを見出した、11) DNA 損傷修復関連因子による HCV 複製調節機構と DNA-PK 阻害剤による抗 HCV 活性を見出した。

得られた知見を基に、開発研究へ進展させることにより、新規抗 HCV 薬の開発、進行性肝疾患の発生抑制対策に寄与することが期待される。

分担研究者

加藤 宣之 岡山大学医歯薬学総合研究科
教授（平成 24～26 年度）

松浦 善治 大阪大学微生物病研究所
教授（平成 24～25 年度）

森石 恆司 山梨大学医学部
教授（平成 24～26 年度）

勝二 郁夫 神戸大学医学研究科
准教授（平成 24～26 年度）

有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター
准教授（平成 25～26 年度）

岡本 徹 大阪大学微生物病研究所
助教（平成 26 年度）

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。

B. 研究方法

1. HCV ゲノムパッケージング機構の解析：

HCV JFH-1 クローンのE2領域にFLAG tag 配列を挿入した全長 cDNA を Huh7.5.1 細胞へ導入し、FLAG 付加 HCVcc を作製した。培養上清中より濃縮、精製した同 HCV 粒子より RNA を抽出し、Transplex Whole Transcriptome Amplification kit (Sigma-Aldrich) によって cDNA 合成、二本鎖 DNA 生成を行った。得られた DNA について、次世代シーケンサー (Illumina GA) によって網羅的な塩基配列解析を行った。

JFH-1 株の塩基配列情報を検索して、NS5B 遺伝子をプライマー、プローブとする real-time

RT-PCR 法 (NS5B-qPCR) を作製した。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。

トランスポッケージングシステム実験は以下のように行った。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 Gluc 遺伝子を有し Pol1 プロモーターから発現するサブゲノムレプリコンプラスミド pSGRJFH1/Gluc を Huh7.5.1 細胞へ共導入した。72 時間後の培養上清を回収し HCVtcp として、naive 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。

非複製ゲノムのパッケージング系は以下のように構築した。RdRp を不活性型変異させた変異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、naive 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：

HCV 感染実験は、以下に示す幾つかの方法により行った。

平成 24 年度：各種細胞を 24 ウェルプレートにそれぞれ 1×10^4 個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清 (O 株) 100 μ l (1×10^7 HCV ゲノム価相当) を添加した。2 時間培養した後、培地を除き PBS (1 ml) で 2 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地 (1.2 ml) を加え 37 度で培養を行った。2 日後に培地交換を行い、感染 7 日目に培地 1 ml をとり、HCV Core の定量を ELISA 法

(検出限界は 20 fmol/L) により行った。

平成 25 年度:各種細胞を 6 ウェルプレートにそれぞれ 5×10^4 個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清 (0 株) 150 μ l (1.5×10^7 HCV ゲノム価相当) 或は陽性コントロールとして JFH-1 株 (遺伝子型 2a) HCV (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 (1 ml) で 3 度細胞を洗い、それぞれのウェルに必要な培地 (3.5 ml) 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 μ 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。細胞の方は、新しい培地と交換し、翌日 (感染 8 日目) に前日と同様の方法により培地を回収して HCV Core の定量を ELISA 法により行った。また、細胞の方は 2 つに分け、一方からは Total RNA を調製し、HCV-RNA の定量を LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により行った。もう一方の細胞は、継代用として、細胞培養をさらに続け、一定期間後に、上述した方法により培養上清 (HCV Core の定量) や Total RNA (HCV-RNA の定量) の調製を行った。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 (平成 26 年度にも引き続き実施)。

平成 26 年度: HCV の感染実験は、前年度の方法に従って行った。但し、平成 26 年度より ELISA 法による HCV Core の検出限界は 1 fmol/L と従来の 20 fmol/L より高感度となった。

培養上清に存在する HCV の感染性については、HuH-7 由来の RSc 細胞と Li23 由来の D7 細胞を用いて、感染実験を行い評価した。6 ウェルプレートに 4×10^5 細胞ずつ播き (培地 2 ml)、翌日、凍結保存しておいた各種上清 0.1 ml を添加、37 度で 6 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。この方法により、使用した培養上清中の感染性 HCV 粒子の量を推定した。

培地の効果についての実験は以下の方法により

行った。HCV 感染細胞の培養において通常培地 (10%FBS を含む) から無血清培地 AEM (Adenovirus Expression Medium) に交換して 2 日或いは 3 日後に培養上清と細胞を回収した。培養上清中の感染性 HCV 粒子の量は、RSc や D7 細胞を用いた上述の感染実験法により推定した。細胞内の HCV-RNA 量は上記の定量的 RT-PCR 法により測定した。

各種細胞における HCV 受容体 (CD81 など) の mRNA の発現レベルについては、LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により測定した。

3. HCV 阻害剤の探索、開発 :

抗 HCV 活性の評価用に全長 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 2×10^4 個) に候補化合物 (各種濃度) や各種の直接作用型抗ウイルス剤 (DAA) (各種濃度) を添加して 72 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより化合物の 50%阻害濃度 (EC_{50}) を算出した。細胞毒性については、別途細胞 (96 ウェルプレート) に化合物 (各種濃度) を添加して 72 時間後に WST-1 アッセイにより 50%細胞毒性濃度 (CC_{50}) を算出した。選択性指数 (SI) は CC_{50}/EC_{50} にて算出した。

抗 HCV コアや NS5B 抗体を用いたウェスタンブロットは常法に従って行った。N-251 に抵抗性を示すヒト細胞評価系の作出のために、OR6 細胞や ORL8 細胞に N-251 を連続的に添加して、G418 に抵抗性を示す細胞コロニーを得ることを試みた。使用した N-251 の濃度や添加方法については、適時変化させて行った。

4. HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明 :

全長 NS5A 蛋白と NS5A 蛋白のドメイン 3 領域をコムギ胚芽無細胞翻訳系で合成し精製した。400 種類超のヒトプロテインキナーゼを包括する cDNA ライブラリーから、同様にコムギ胚芽無細胞翻訳系でプロテインキナーゼを合成し精製した。

精製 NS5A 蛋白と精製プロテインキナーゼの相互作用解析には、ハイスループットな定量解析が可能である AlphaScreen 法を用いた。NS5A 蛋白のリン酸化は、精製 NS5A 蛋白を [γ - 32 P]ATP 存在化において精製プロテインキナーゼと混和し、SDS-PAGE で展開後、オートラジオグラフィーを用いて解析した。

5. 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：

レトロウイルスベクターを用いて各脱ユビキチン化酵素の shRNA ノックダウン Huh7 細胞株を作製し、HCVcc を感染させて複製に及ぼす効果を検討した。HCV 複製への関与後示された脱ユビキチン化酵素の USP15 と USP20 に関しては、人工ヌクレアーゼを用いて遺伝子欠損 Huh7 細胞株を樹立した。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。

NS5A のユビキチン化酵素の解析は以下のように行った。

NS5A 結合因子のスクリーニング：C 末端側に myc-His₆ タグを付加した HCV NS5A (genotype 1b, 0 strain) の発現プラスミドをヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞にトランスフェクトし、タンデムアフィニティ精製と質量分析法で結合因子を同定した。

HCV NS5A 結合因子の発現と相互作用解析：NS5A 蛋白質と共沈した細胞内因子から、ユビキチンリガーゼ p138kDa の発現プラスミドを構築した。

in vitro NS5A ユビキチン化アッセイ系の構築：組換えバキュロウイルス系で発現した FLAG-p138、His₆-E1、をバキュロウイルスによる昆虫細胞系で、大腸菌 BL21 (DE3) で発現した His₆-UbcH5b で *in vitro* ユビキチン化系を構築した。

RNAi による細胞内 p138 の機能解析：内在性 p138 の HCV 増殖での機能を明らかにするために siRNA および shRNA を構築した。

HCV レプリコン細胞による p138 の機能解析：HCV

複製における p138 の機能を解析するために、genotype 1b Con1 株 全長 HCV レプリコン細胞 RCYM1 (FGR Con1) に p138 を強制発現し、HCV 複製への影響を解析した。

NS5A の脱ユビキチン化酵素の解析は以下のように行った。

HCV NS5A 蛋白質と脱ユビキチン化酵素 p100 の相互作用解析：Huh-7 細胞に FLAG-p100 と NS5A-myc-His₆ を一過性に発現させ、免疫沈降法により相互作用を解析した。

HCV NS5A 上の p100 との相互作用に重要な部位の解析：NS5A の各種欠損変異体を用い、NS5A 上の p100 との結合に重要な部位を免疫沈降法にて解析した。

NS5A による p100 脱ユビキチン化酵素活性への影響：Huh-7.5 細胞に HA-Ub, NS5A-myc-His₆, FLAG-p100 をトランスフェクトし、NS5A による脱ユビキチン化酵素活性への影響を解析した。

NS5A の ISGylation の解析は以下のように行った。Huh7 細胞における ISG15 の誘導：ヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞に IFN- α または IFN- β を添加し 24 時間後に細胞を回収し、内在性の ISG15, UBE1L, UbcH8, Herc5 の発現をウエスタンブロット法で解析した。

HCV 感染による ISGylation 系の誘導：Huh-7 細胞に HCV J6/JFH1 を M. O. I. =2 で感染させ、0 時間、48 時間後の ISG15, Herc5 の発現を real time PCR 法にて解析した。

NS5A を ISGylation する E3 の解析：ヒト肝癌細胞株 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。

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

HCV NS5A の ISGylation 部位の解析 : HCV Con1 株の NS5A (genotype 1b) をプラスミド pEF1A-NS5A-myc-His₆ として発現させた。14 個のすべての Lys 残基を Arg 残基に置換した pEF1A-NS5A-Lys null-myc-His₆ 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。

HCV NS5A 蛋白質の ISGylation の解析 : FLAG-ISG15 の代わりに GFP-ISG15 を用いて上記と同様の解析を行った。

6. 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 FKBP8/6 との相互作用を免疫沈降法で解析した。また、細胞内局在の解析は、蛍光抗体法により染色した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。また、市販の Tissue micro array を免疫染色し、HCV 感染と FKBP6 発現との関連性について検討した。Daclatasvir、IFN、Telaprevir との DM-CHX の併用効果は EC₅₀ で解析した。

細胞内局在の観察 : ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染 72 時間後に細胞を固定後、抗 DDX21 抗体 (Bethyl 社)、及び抗 HCV Core 抗体 (CP-9、CP-11; 特殊免疫研究所) を反応させた後、FITC 結合抗ウサギ抗体及び Cy3 結合抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch 社) を用いて可視化した。また、核は DAPI で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000 あるいは 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、HuH-7 由来全長 HCV-0 RNA 株複製 0 細胞を用いて、HCV 複製による DDX21 の細胞内局在の変化について観察した。さらに 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、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。

HCV 複製に関与する宿主因子の同定 : shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、DDX5、DDX21、INI1/hSNF5、Staufen 1、UPF1、DNA-PKcs、そして Rad18 をノックダウンさせた RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれリアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法と ELISA 法で定量した。さらに抗 Core 抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。同様に DDX21 をノックダウンした 0 細胞あるいは HCV-0 株サブゲノムレプリコン s0 細胞の HCV 複製レベルについてもリアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法により検討を行なった。

免疫沈降法 : 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。

抗 HCV 活性の測定 : 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。解析に用いたHCV陽性血清は、契約に基づき当該機関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。そのために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：

「HCV 粒子の中にはどのような塩基配列の遺伝子がパッケージングされるか」を明らかにするため、培養細胞系で作製したHCV JFH-1を粗精製し粒子内のRNAを次世代シーケンサーで網羅的に解析した。比較対照として、試験管内で合成したHCV JFH-1全長RNAも同様に解析した。Illumina technologyで36 baseの遺伝子断片を936万リード(HCV粒子検体)及び784万リード(試験管内合成RNA検体)取得し、まずHCV遺伝子を解析した結果、各リードの分布パターンは両検体で非常に似ており、HCVゲノム全域に亘って遺伝子断片が検出された。これにより、HCV粒子に取り込まれているHCV RNAの多くは全長あるいは全長に近いpopulationであることが示唆された。

一方、粒子検体では全リードの54%が非HCV配列であった。そこで、計約450万塩基のヒト由来配列について、HCVと相同性があるかを解析した。HCVとのミスマッチが10%以下で、polyA/U rich配列を除いた断片を相同性ありとした。得られた相同性断片をHCVゲノム上にマッピングしたところ、相同配列の相対的な出現頻度が高いのは、3'UTR内の2領域(nt9581-9593, 9645-9653)及びNS5B内のnt9307-9314であった。すなわち、HCVゲノムの3'末端側領域に相同性の高いヒト遺

伝子はHCV粒子に取り込まれやすい可能性が考えられた。

C型肝炎患者の血液、肝臓検体のHCV遺伝子解析研究から、同一検体について5'及び3'末端側RT-PCRで解析すると5'UTR側の検出レベルが3'UTRに比べ明らかに高いことが報告されている(Negro et al. (2001), Shimizu et al. (2006))。合成されたゲノムRNAの一部または多くがRNA分解酵素などによって分解されるものと考えられる。HCVの複製、粒子産生の過程で、HCV RNAのpopulationがどのように淘汰、選択されていくかを明らかにするため、複製細胞内と細胞外のHCV RNAについて、5'UTRを検出する定量RT-PCR及び3'末端側検出系で解析した。3'UTR内には適当なプライマー、プローブが設計できなかったためNS5B遺伝子を検出する定量RT-PCR系を作製し、5'UTR検出系と同等の感度で定量測定可能であることを確認した。HCV JFH-1産生細胞の細胞及び培養上清よりtotal RNAを抽出しHCV RNAを測定し、NS5B RNA/5'UTR RNA比を求めた所、細胞内(0.013)に比べ培養上清(0.323)の方が20倍以上高いことが示された。さらに、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。

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た。そこで、次にHCV Core~NS2とサブゲノムレプリコンを別ベクターから発現させ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HCVのパッケージングシグナル解析を行った。予想通り、野生型サブゲノムレプリコンの場合、効率よくHCVtcpが産生された。レプリコンを非複製型にするとHCVtcp産生は10分の1程度まで低下するものの依然として産生された。そこで、HCV 3' UTR領域に種々の変異を導入した非複製型レプリコンを用いてHCVtcp産生を

試みた。その結果、3'UTR の 3'末端側の 2 または 3 stem-loop を欠損させると HCVtcp 産生効率は最も顕著に低下することが見出された。

そこで、HCVtcp システムでパッケージングシグナルのさらに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、NS5A 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 :

遺伝子型 1b に属する O 株 HCV を用いて JFH-1 株 HCV に感受性を示す HuH-7 由来の RSc 細胞、Li23 由来の ORL8c 細胞、Li23 由来で 4 年間 HCV-RNA を複製させた後に治癒化した OL14(4Y)c 細胞およびヒト不死化 PH5CH8 細胞に HCV を感染させ、1 週間後に培養上清中の HCV Core の定量を行った。しかしながら、いずれにおいても、HCV Core は 20 fmol/L 以下であった。FBS (牛胎児血清) の代わりに HS (ヒト血清) を含む培地を用いて同様の

感染実験を行ったが、HCV Core は検出されなかった。

次に、感染 1 週間後の培養上清 (1 ml) をナイーブな細胞に添加し、みかけ感染 (2 時間) を行い、1 週間培養を続けた。1 週間後に、もう一度培養上清 (1 ml) をナイーブな細胞に添加し、みかけ感染 (2 時間) を繰り返した。1 週間後に、培養上清中の HCV Core の定量を行った。このようなめくら感染によりウイルス量が増加する可能性を期待したが、いずれの細胞においても、HCV Core は検出されなかった。

ヒト不死化 PH5CH8 細胞については、過去の感染実験 (1996～1998) により 10^3 /ml レベルの HCV-RNA が培養上清に検出されていたが、今回の実験において培養上清中の HCV Core が検出されるレベルではないことが判明した。従って、この細胞において、何か HCV 感染および産生に関わる宿主因子が欠如している可能性があると考えられた。そこで、まず感染に必要な受容体 (CD81, SR-BI, EGFR, CLDN1, OCLN および NPC1L1) について検討した。それぞれの因子について定量的 RT-PCR 法により mRNA の定量を行った結果、PH5CH8 細胞では、CLDN1 と NPC1L1 の発現レベルが非常に低くなっていることが判明した。そのため、これらの遺伝子を追加発現させることとした。ただ、NPC1L1 については、JFH-1 株 HCV が効率よく複製増殖する HuH-7 由来の RSc 細胞でも発現レベルが非常に低いので重要度は低いと考え、CLDN1 (Claudin 1) のみを追加発現させることとした。これと並行して行っていた実験により、PH5CH8 細胞では、HCV の効率的な複製増殖に係わることが分かっている miR122 の発現レベルも RSc や ORL8c 細胞に較べて非常に低くなっていることが分かったので、まずは、PH5CH8 細胞に miR122 を過剰発現させた細胞を作成した後、その細胞に CLDN1 を過剰発現させることにした。

レトロウイルス発現ベクターを用いて我々が通常行っている方法により、目的とする miR122 発現

PH5CH8 細胞(PH5CH8/mir122)や CLDN1 も併せて発現させた PH5CH8 細胞 (PH5CH8/miR122/CLDN1) を作成した。HCV 感染実験には、これらの PH5CH8 細胞の他に、RSc 細胞、ORL8c 細胞および D7 細胞 (ORL8c 細胞をさらにサブクローン化した細胞で JFH-1 株 HCV に対する感受性が高まっていることを報告している) を用いた。HCV のソースとしては、JFH-1 株 HCV (4×10^5 /ml の感染価を示す) と HCV 陽性血清 (0 株、 1×10^8 HCV ゲノム価/ml) を用いた。

それぞれの細胞に JFH-1 株 HCV を MOI 0.1 で感染させた。その結果、感染 8 日目における培養上清中の HCV Core の量 (fmol/L で表示) は、RSc 細胞で 61,000、ORL8c 細胞で 11,000、D7 細胞で 18,000 で、PH5CH8 細胞では miR122 や CLDN1 の発現の有無にかかわらず検出限界 (20 fmol/L) 以下であった。感染 7 日目でも感染 8 日目と同様の数値が得られた。

細胞内 HCV-RNA の定量は LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により行った。その結果、HCV Core の定量結果と相関して、RSc、ORL8c および D7 細胞では、 $4-6 \times 10^8$ copy/ μ g total RNA の HCV-RNA が検出された。PH5CH8/miR122 細胞のみで 3×10^2 / μ g total RNA の HCV-RNA が検出されたが、それ以外の PH5CH8 細胞や PH5CH8/miR122/CLDN1 細胞では検出されなかった。

HCV 陽性血清 (遺伝子型 1b の 0 株) を添加した場合での結果は、JFH-1 株 HCV とはかなり異なっていた。感染 7 日目の培養上清中の HCV Core は PH5CH8 細胞でのみ 70 fmol/L という値が初めて得られ、それ以外の細胞では検出限界以下であった。感染 8 日目の培養上清ではすべて検出限界以下であった。細胞内 HCV-RNA のレベルは、PH5CH8 細胞で 7.1×10^2 、PH5CH8/miR122/CLDN1 細胞で 3.2×10^2 、ORL8c 細胞で 8.4×10^2 、D7 細胞で 3.9×10^2 copy/ μ g total RNA であり、これら以外の細胞では検出されなかった。これらの結果から、JFH-1 株や 0 株 HCV の感受性は細胞により相当異なるこ

とが示唆された。

さらに培養を続行して、感染後 17 日、23 日および 29 日目の培養上清中の HCV Core の定量と感染 29 日目の細胞内 HCV -RNA の定量を行った。その結果、RSc、ORL8c および D7 細胞では 29 日目においても培養上清に HCV Core (10^4 レベル fmol/L)、細胞内に HCV-RNA (10^7-10^8 レベル copy/ μ g total RNA) が検出され、持続感染状態になっていることが分かった。しかしながら、PH5CH8 細胞の系列からは、培養上清中の HCV Core も細胞内の HCV-RNA も検出されなかった。これらの結果から、HCV 陽性血清 (0 株 HCV) を用いた HCV 感染で持続感染状態を維持することが難しいことや miR122 や CLDN1 だけでは 1b 型 HCV の複製増殖を達成できないことが示唆された。

しかしながら、他の研究室からのこれまでの報告により、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られた。そこで、我々は、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、そのような可能性がないかどうかを検証した。1 週間程度の培養で継代できるようにアレンジして、培養を行い、感染後、50, 78, 98 および 133 日目で細胞と培養上清中に存在する HCV 量 (細胞については HCV-RNA 量、培養上清については HCV Core 量) を定量した。その結果、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 2.2×10^7 、 4.0×10^6 および 1.1×10^7 コピー/ μ g total RNA となり HCV-RNA の複製が持続的に継続され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。平成 24-25 年度の ELISA 法による HCV Core の検出限界は、20 fmol/L であったが、平成 26 年度より検出感度が上昇し検出限界は、1 fmol/L となった。それでも、ORL8c

細胞での培養上清中の HCV Core は検出されなかったことから、HCV Core の量は 1 fmol/L 以下になっていることが分かった。これらの細胞とは対照的に PH5CH8 細胞 (miR122 や miR122/CLDN1 の追加発現細胞も含む) では、継代 133 日目まで細胞内および培養上清中に JFH-1 株 HCV は一切検出されなかった。この結果から、HCV の複製レベルが遅延性に上昇することはなく、持続複製状態にもならないことが確認された。

一方、0 株 HCV を感染させた細胞においては、PH5CH8 細胞並びに RSc、ORL8c、D7 細胞で感染後 133 日目まで、細胞内や培養上清中に HCV-RNA や HCV Core は一切検出されなかった。従って、このような培養細胞システムにおいては HCV の複製レベルが遅れて徐々に上昇してくるというような現象は認められないことが分かった。

このような状況下において、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。

まず、JFH-1 株 HCV 感染後 126 日経過した RSc、ORL8c および D7 細胞をそれぞれ 2 つに分けて継代培養し、130 日目に 1 つは通常培地でさらに培養を継続し、もう 1 つは AEM 培地に交換してさらに 3 日間培養した。その後 (感染後 133 日目)、細胞内 HCV-RNA 量と培養上清中の HCV Core 量をそれぞれ定量した。その結果、RSc 細胞では、AEM 培地の効果は認められず、細胞内 HCV-RNA 量は 2.0×10^7 コピー/ μg total RNA のままで、培養上清中の HCV Core 量は約 8 分の 1 (300 fmol/L) に低下してしまうことが分かった。さらに、ORL8c 細胞でも、

細胞内 HCV-RNA 量は約 3 分の 1 (1.1×10^6 コピー/ μg total RNA) に低下し、培地上清中の HCV Core 量は 1 fmol/L (検出限界値) 以下のままであった。これらの否定的な結果とは対照的に、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 (3.8×10^6 コピー/ μg 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。

これらの実験は、感染後長期間経過して、産生される HCV 量はかなり低下した状態でなされたものであったので、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討した。JFH-1 株 HCV を感染させ 17 日経過後 -80 度で保存してあった RSc、ORL8c および D7 細胞を再度培養し、感染後 30 日目となった時点で、前回の実験と同様に、通常培地と AEM 培地の 2 つに分け、3 日間培養した。その後、細胞内 HCV-RNA 量と培養上清中の HCV Core の定量を行った。その結果、HuH-7 由来の RSc 細胞では、前回同様 AEM 培地の効果は認められず、細胞内 HCV-RNA 量は 2 分の 1 (6.7×10^7 コピー/ μg total RNA) に、培養上清の HCV Core 量は 12 分の 1 (710 fmol/L) にそれぞれ低下した。これとは対照的に 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 (2.7×10^6 コピー/ μg total RNA) に低下したものの、培養上清の HCV Core 量は、2.0 から 67 fmol/L と 33 倍上昇した。D7 細胞でも細

胞内 HCV-RNA 量は、2 分の 1 程度 (8.3×10^7 コピー/ μg total RNA) に低下したものの、培養上清の HCV Core 量は、100 から 2,500 fmol/L と 25 倍上昇した。さらに、それぞれの培養上清を RSc 細胞に感染させ、3 日後の細胞内 HCV-RNA 量の測定を行った結果によっても、AEM 培地により感染性 HCV 粒子の産生量が大幅に亢進していることを確認することができた。以上の結果から、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。

そこで、次にこの AEM 培地の効果が 0 株 HCV や同じ 1b 型 HCV である 1B-4 株 HCV (1×10^8 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。通常培地で並行して実験を行った場合と比較した結果、大部分の細胞において培養上清の HCV Core は検出できるものの、どれも 4 fmol/L 以下で、明らかに AEM 培地の効果と認められるケースは無かった。これらの結果から 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：

OR6 アッセイ系と ORL8 アッセイ系を用いて、これまで多くの化合物について、抗 HCV 活性の評価を行って来た。その中で、抗マラリア薬として使用されている Artemisinin に弱い抗 HCV 活性を見つけて以前に報告していた (Ueda et al., Biochem Biophys Res Commun, 409:663-668, 2011)。Artemisinin の EC_{50} 値は OR6 アッセイ系で 81 μM 、ORL8 アッセイ系で 23 μM と高値であったためあまり注目していなかった。その後、岡山大学薬学部

の綿矢教授 (現医学部特命教授) が Artemisinin のペルオキシド構造を有するが、全体としては化学構造が異なる化合物 (N-89 とその誘導体である N-251) を抗マラリア薬として開発中であることを知り、我々の細胞アッセイ系で抗 HCV 活性を評価する機会を得た。その結果、驚くことに N-89 と N-251 は強い抗 HCV 活性を有することが分かった。特に ORL8 アッセイ系での N-89 と N-251 の EC_{50} 値は 89 nM と 100 nM と低く、SI 値も 26 と 13 と高値となった。このような SI 値は、現在臨床治療薬として使用されているリバビリン (RBV) と同等かそれ以上であると評価された。また、OR6 アッセイ系においても、N-89 と N-251 の EC_{50} 値は 660 nM と 690 nM となりいずれも 1 μM 以下の値となった。両化合物にこのような強い抗 HCV 活性が得られたことから、単独で使用しても、細胞内から HCV-RNA が完全に排除された治癒細胞を作成できるのではないかと期待された。事実、ORL8 細胞に N-89 (1 μM) を 4 日置きに 6 回投与したところ、細胞内から HCV-RNA を完全に排除することができた。この時点で、この化合物は経口の抗 HCV 剤として有望であることが示唆された。

次に、N-89 や N-251 がインターフェロン (IFN) や RBV の抗 HCV 活性を増強するかどうかを調べた。その結果、IFN- α と併用した場合は相加効果であったのに対して、RBV あるいは IFN- α および RBV と併用した場合には、相乗効果を示すことが分かった。この結果から、N-89 や N-251 は 2012 年当時の標準的治療法 (IFN と RBV の併用療法) における効果を増強しうることが分かった。

我々は、N-89 や N-251 の抗 HCV 活性がどんな作用機序により生じるかを明らかにすることは重要であると考えた。N-89 や N-251 の構造は、ペルオキシド誘導体であることから、酸化ストレスの関与が予想された。そこで、この可能性について、まず検討することとした。

我々は以前、シクロスポリン A (CsA) の抗 HCV 活性が抗酸化剤であるビタミン E (VE) により完

全にキャンセルされることを見出し報告していた (Yano et al, Antimicrob Agents Chemother 51:3756-3759, 2007) ので、N-89 や N-251 の抗 HCV 活性が VE によりキャンセルされるかどうかを調べた。その結果、IFN- α の抗 HCV 活性は VE 添加によってもキャンセルされないにも関わらず、N-89 と N-251 の抗 HCV 活性は CsA と同様、VE によりほぼ完全にキャンセルされることが分かった。従って、N-89 や N-251 は酸化ストレスを介して抗 HCV 活性を誘導している可能性が示唆された。興味深いことに、Artemisinin の抗 HCV 活性は VE によりキャンセルされなかったことから、N-89 や N-251 とは異なる作用機序により抗 HCV 活性を示すものであることも示唆された。

そこで、次に、N-89 や N-251 を細胞に添加すると実際に ROS (Reactive oxygen species: 活性酸素種) が産生されるかどうかを検討した。ROS 検出用の標識試薬 (CM-H2DCFDA) で処理した ORL8 細胞に N-89 などを添加して 2 時間後に ROS 産生が起って標識試薬が発光しているかどうかを Flow cytometry によりその蛍光強度を測定して調べた。その結果、予想どおり、N-89, N-251 および CsA では ROS の産生が観察され、IFN- α , IFN- γ , RBV および Artemisinin では ROS の産生が観察されなかった。これらの結果からも N-89 と N-251 の抗 HCV 活性は ROS 産生を介した分子機序によるものであることが示唆された。しかしながら、ROS 産生の陽性コントロールとして用いたピオシアニンでは、ROS が産生されるものの、抗 HCV 活性を示さないことから、ROS 産生が抗 HCV 活性の十分条件ではないことも分かった。

N-89 や N-251 が抗マラリア活性を示す濃度域で抗 HCV 活性を示したことから、C 型慢性肝炎患者への臨床応用が可能と考えられた。そして、平成 25 年 5 月に PMDA で対面助言を受ける機会を得た。その結果、薬剤の承認までに幾つかの点 (作用機序、代謝物の抗 HCV 活性、耐性ウイルスの選択性に関する検討、宿主タンパク質に対する相互作用)

について、明らかにすることが望ましいとの助言をいただいた。そのため、平成 25 年度以降は、これらの課題に関する実験を中心に行った。

N-89 や N-251 は RBV と併用すると抗 HCV 活性は相加効果で予想される活性値より高い効果を示したことから、相乗効果であることが示唆されていた。しかしながら、この相乗効果を数値的に示す必要がある。そこで、我々は、以下に示すような Isobole plot 解析法を用いて検討した。一方の化合物の濃度を一定にして、他方の化合物の濃度を変化させて EC₅₀ 値を測定し、そのやり方を一定にする濃度を変えながら得られた EC₅₀ 値をプロットしていくという方法であり、プロットした点が直線で結ばれる場合は相加効果、下向きの曲線となる場合は相乗効果、上向きの曲線となる場合は相反効果と判定した。N-89 或いは N-251 と RBV との併用効果を調べた結果、当初予想したとおり、RBV との併用により抗 HCV 活性は相乗効果を示すことが明らかとなった。

次に、ヒトに実際に投与した場合を想定して、血液中の状態に近い FBS40% 存在下でも抗 HCV 活性が維持されるかどうかを調べた。その結果、40% FBS 存在下でも、N-251 の EC₅₀ 値は 0.16 μ M (10% FBS 存在下では 0.12 μ M) となり FBS 濃度を上げてても遜色ない抗 HCV 活性を示すことが分かった。さらに、40% FBS 存在下では、N-251 に対する細胞保護効果が観察され、SI 値は 106 (10% FBS 存在下では 19) と高まり、安全性の高い化合物であることが示唆された。

N-89 と N-251 に抗マラリア活性とともに抗 HCV 活性が見つかったことから、これらの化合物は、平成 26 年度に臨床研究中核拠点である岡山大学病院での薬剤シーズに選定された。現在、First in man に向けての毒性安全性試験や剤型改善の研究がなされている。

本研究においては、まず、これら化合物の作用機序を明らかにすることを目標にした。これまでの研究により、酸化ストレスへの関与が予想され

たものの、これら化合物の抗 HCV 標的は、既知のもの (IFN 系の活性化、特定の遺伝子の発現制御、突然変異の誘発、HCV の各酵素への直接的阻害など) とは異なるのではないかと考えられ、その解明には困難が予想された。我々は、これら化合物に抵抗性を示す HCV-RNA 複製細胞を作出することができれば、その抵抗性機構を明らかにすることにより、これら化合物の作用機序も明らかにできるのではないかと考えた。

そこで、我々は、N-251 (N-89) に抵抗性を示す HCV-RNA 複製細胞の作出を試みた。まず最初に、長期継代培養により HCV の遺伝的多様性を獲得した HCV レプリコン複製細胞や全長 HCV-RNA 複製細胞に N-251 を数日ごとに投与したり、濃度を徐々に上げていくやり方で N-251 に抵抗性を示す細胞クローンの単離を試みた。しかし、いずれの場合も薬剤投与により治癒細胞が作出され目的の耐性細胞を得ることができなかった。これらの結果から、我々は、遺伝的多様性を自然に獲得した HCV-RNA から抵抗性細胞が選択される可能性は低く、細胞クローンの特殊性が重要ではないかと考えた。

次に、抗 HCV 活性のアッセイ系として使用している全長 HCV-RNA 複製細胞の OR6 や ORL8 を用いて、N-251 に抵抗性を示す細胞クローンの単離を試みた。OR6 細胞については、N-251 の濃度を 4 μM から 8 μM に徐々に上げて行く方法で行ったが、G418 抵抗性細胞 (N-251 に抵抗性を示すと HCV-RNA 量が減少しないので、結果的に細胞は G418 耐性を維持できる) を得ることは出来なかった。一方、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 μM で N-251 を 10 回投与後、3 μM 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_{50} 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_{50} 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_{50} 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。現在、この系列細胞から N-251 に対してさらに高度な耐性を示す細胞が得られるかどうかや OR6 細胞に N-89 を添加する方法で耐性細胞が得られないかどうかを検討中である。

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。まず最初に、各種 DAA 製剤が、我々の細胞アッセイ系においても、これまで他の研究室から報告されているように高い抗 HCV 活性を示すかどうかを検討した。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_{50} 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。例えば、Telaprevir では既報の EC_{50} 値は 290 nM であったが、OR6 細胞では 170 nM、ORL8 細胞では 140 nM という値が得られた。1B-4 株 HCV 由来の 1B-4R 細胞や 1B-4RL 細胞においても Daclatasvir や Sofosbuvir では OR6 細胞や ORL8 細胞と同程度の EC_{50} 値が得られた。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_{50} 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 EC₅₀ 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 解析法により検討解析した結果、ORL8 細胞においては、調べた 6 種類の全ての DAA 製剤が、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 Baceprevir 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。まず、OR6 細胞や ORL8 細胞に Simeprevir (2.5 nM あるいは 10 nM)、Asunaprevir (10 nM あるいは 30 nM) あるいは Daclatasvir (100 pM あるいは 500 pM) を 4 日ごとに 6 回添加しながら培養したところ、10 nM の Simeprevir を添加した ORL8 細胞、30 nM の Asunaprevir を添加した OR6 細胞と ORL8 細胞、および 500 pM の Daclatasvir を添加した ORL8 細胞では細胞内の HCV-RNA は完全に排除され治癒されたが、それ以外については、HCV-RNA が排除されずに、G418 耐性の細胞コロニーが多数得られた。このような状態になった細胞をそれぞれプールし

て、薬剤耐性細胞として増殖させた。これらの細胞の薬剤耐性を調べるために再度 EC₅₀ 値の測定を行ったところ、Simeprevir に対しては、5~26 倍、Asunaprevir に対しては 4 倍程度、Daclatasvir に対しては 140~370 倍耐性になっていることが分かった。これらの細胞における N-251 の EC₅₀ 値も再度測定したところ、親株の OR6 や ORL8 細胞での値の 0.3~2.4 倍程度の値が得られた。従って、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 についても N-251 とほぼ同様の結果が得られた。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。

本研究においては、N-89 や N-251 以外にも、我々が開発した HCV アッセイ系 (数種類) を用いて、経口で使用できる新規 HCV 剤としての可能性を幾つかの市販品について評価を続けて来た。その中で、サナギタケ冬虫夏草に中程度の抗 HCV 活性があることを見出した。

サナギタケ冬虫夏草は、抗がん活性を有する混合化合物であり、米国ではがん患者に対する臨床試験が行われている。国内では、無菌養蚕システムで育てた蚕のサナギにサナギタケ菌を移付け、天然冬虫夏草と同じ環境のもと完熟まで育て収穫しており、市販品としてカプセル剤とドリンク剤がある。我々は両財形のサナギタケ冬虫夏草を入手し、それらの抗 HCV 活性を測定した。

その結果、ORL8 アッセイ系ではカプセル剤が抗 HCV 活性を有することを見出した。EC₅₀ 値は 54 µg/ml で SI 値は 5.6 以上であった。また、遺伝子型 1b の AH1 株を用いて作成した AH1R アッセイ系でも、EC₅₀ 値が 31 µg/ml で SI 値 5.2 となり、抗 HCV 活性が認められた。しかしながら、ドリンク剤の方にはまったく抗 HCV 活性は認められなかった。これらの結果から、サナギタケ冬虫夏草の財形により、活性が大きく異なることが示唆された。次に、カプセル剤に見出された抗 HCV 活性が、現行の肝炎治療に使用されている IFN-α や RBV の抗

HCV 活性と相加的あるいは相乗的に作用するかどうかを調べた。その結果、カプセル剤の抗 HCV 活性は、これら両薬剤と相加的に作用することが分かった。これにより、現行の治療効率を向上させることができることが示唆された。さらに、HCV-RNA の両末端部と NS3 から NS5B 領域を有する HCV レプリコンが効率良く複製している細胞アッセイ系においても、カプセル剤が抗 HCV 活性を示すことが分かった。HuH-7 由来の sOR アッセイ系では EC₅₀ 値が 12 µg/ml で SI 値が 3.8、Li23 由来の sORL8 アッセイ系では EC₅₀ 値が 30 µg/ml で SI 値は 4.0 であった。これらの結果から、カプセル剤はレプリコン RNA の複製を阻害する活性を有することが分かった。

カプセル剤については、日本食品分析センターから含有成分について公表されている。この情報から、抗 HCV 活性を示すのではないかと考えられる成分について、抗 HCV 活性の評価を行った。可能性のある成分としては、100 g 中、4.95g 含まれる Cordycepin (アデノシン誘導体) と 0.705g 含まれる Ergosterol (ステロールの一種) がその候補と考え、それぞれ合成品を別途入手して、これらの抗 HCV 活性を評価した。その結果、AH1R と sOR アッセイ系において、Cordycepin に抗 HCV 活性が認められた。AH1R アッセイ系における EC₅₀ 値が 0.58 µg/ml、SI 値 3.3、sOR アッセイ系においては、EC₅₀ 値が 1.7 µg/ml、SI 値 1.8 であった。AH1R アッセイ系では、カプセル剤の EC₅₀ 値が 31 µg/ml であったので、Cordycepin の含量 (約 5%) で換算すると、1.5 µg/ml 程度と計算できる。従って、AH1R アッセイ系においては、カプセル剤が示す抗 HCV 活性をすべて Cordycepin の抗 HCV 活性で説明できることが分かった。しかしながら、sOR アッセイ系では Cordycepin の活性はカプセル剤全体の 50%程度しか説明できず、OR6 や ORL8 アッセイ系では細胞毒性が強く、明確な抗 HCV 活性を検出することができないということも分かった。Cordycepin とは対照的に Ergosterol は抗 HCV

活性や細胞毒性はほとんど検出されなかったことから、カプセル剤に認められる抗 HCV 活性には全く寄与していないことが分かった。以上の結果をまとめると、サナギタケ冬虫夏草のカプセル剤に見出された抗 HCV 活性の大部分は Cordycepin の作用に依るものであると推察された。

4. HCV 粒子形成に重要な NS5A リン酸化機構の解明：

in vitro 合成した 410 種類のヒトプロテインキナーゼのうち 38 種類で AlphaScreen 法により NS5A 蛋白との強固な相互作用が認められた。その中で、7 種類のキナーゼが in vitro で NS5A リン酸化活性を有していた。これらをそれぞれノックダウンした HuH-7 細胞で HCV 産生を調べた所、CK1alpha, CK1e, CK2alpha2, PLK1 でノックダウンによる有意な HCV 産生低下を示した。CK1alpha の影響が最も大きくノックダウンによって 40 分の 1 以下まで HCV 産生は低下した。このとき細胞増殖低下は認められなかった。

5. 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 スクリーニングの結果、HCV 複製に関わる脱ユビキチン化酵素として、USP15 と USP20 を同定した。USP15 は HCV 感染にともなって発現が上昇した。また、USP15 は脂肪酸の輸送に関わる脂肪酸結合タンパク質 (FABP) の機能を制御していることが示唆されており、FABP のノックダウンでも HCV の複製が抑制された。また、USP20 は HCV 複製に必須な VAP-A と相互作用することが示された。USP15 や USP20 のノックダウン細胞では顕著に HCV 複製が抑制された。USP15 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。USP20 欠損細胞では、HCV 複製だけでなく、日本脳炎ウイルスの複製も顕著に抑制した。

さらに、USP15 が無い肝癌細胞株では脂肪滴が顕著に減少し、過剰発現させると脂肪滴形成が亢進した。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。

NS5A のユビキチン化酵素の解析: タンデムアフィニティ精製法と質量分析法により HCV NS5A 蛋白質と結合する宿主因子を同定し、その中に分子量 138kDa のユビキチンリガーゼ p138 を同定した。ユビキチンリガーゼ p138 は NS5A 蛋白質と免疫沈降法にて共沈し、相互作用を示すことを確認した。*in vitro* における NS5A アッセイ系を樹立し、今回同定した p138 が NS5A をポリユビキチン化することを明らかにした。一方、不活化型 p138 は NS5A をユビキチン化しなかったことから、p138 による特異的なユビキチン化反応であると考えられた。p138 をノックダウンするために siRNA を 6 種類デザインした。その中の sip138-4 で高いノックダウン効率を得ることができた。この sip138-4 の配列を基に pSilencer 2.1-U6 Hygro (Invitrogen) を用いて shRNA を発現するプラスミドを構築した。Huh7.5 細胞にこのプラスミドをトランスフェクトし、Hygromycin 入りの培養液で培養し、恒常的に shRNA を発現するノックダウン細胞を作製した。

コントロールには scramble shRNA を発現する細胞を樹立した。RCYM1 細胞に p138 を一過性に発現させ、HCV 複製に対する影響を解析した。p138 の発現により NS5A 蛋白質の量が減少し、それに伴い Core 蛋白質、NS4A 蛋白質の量も減少し、複製の抑制が示唆された。

NS5A の脱ユビキチン化酵素の解析: HCV NS5A 蛋白質と脱ユビキチン化酵素 p100 の相互作用解析: Huh-7 細胞に FLAG-p100 と NS5A-myc-His₆ を一過性に発現させたところ、免疫沈降法により両者は相互作用を示した。HCV NS5A 上の p100 との相互作用に重要な部位の解析: NS5A の変異体の解析により、NS5A 上の domain I が p100 との相互作用に重要であることが示された。NS5A による p100 脱ユビキチン化酵素活性への影響: NS5A のトランスフェクト量を増加させると HA-Ub のシグナルが減少し、NS5A により p100 の脱ユビキチン化酵素活性が促進される可能性が示された。

NS5A の ISGylation の解析: ヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞に IFN- α または IFN- β を添加し 24 時間後に細胞を回収したところ、内在性の ISG15, UBE1L, UbcH8 の発現が誘導された。Huh-7 細胞に HCV J6/JFH1 を MOI=2 で感染させたところ、48 時間後の ISG15, Herc 5 の mRNA 量が有意に上昇した。細胞内に TRIM25 を発現させた場合は NS5A の ISGylation は認められなかったが、Herc5 により、顕著な NS5A の ISGylation が検出された。HCon1, 0 (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a) のいずれの NS5A においても ISGylation が認められた。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：

本研究以前の解析から、FKBP8がHCVゲノム複製に必要な宿主因子であることを報告し、FKBP8ノックダウン耐性レプリコン細胞がFKBP6ノックダウンによってウイルス複製が抑制されることが分かっている。FKBP6とFKBP8が多量体形成し、細胞内局在は一致した。FKBP6の肝臓内発現は、非がん部ではクッパーおよび胆管上皮細胞に強く発現し、肝細胞でほとんど発現していなかった。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、Talaprevirに対してアンタゴニスト作用を示した。

核内宿主因子DDX5及びINI1/hSNF5のHCV生活環における役割：shRNAを発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性DDX5及びINI1をノックダウンさせたHuH-7由来RSc細胞にHCV-JFH1を感染させると、HCV感染96時間後の細胞内HCV RNAレベル、細胞内及び培養上清中に放出されるHCV Core発現レベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生されたHCV粒子の感染性の低下も認められた。しかしながら、JFH1サブゲノムレプリコンJRN/3-5B細胞の内在性DDX5あるいは

INI1をノックダウンさせても、JFH1サブゲノムRNAの複製レベルはコントロール細胞に比べて、それほど影響しなかった。

核小体局在DDX21 RNAヘリケースのHCV生活環における役割：レンチウイルスベクターを用いて内在性DDX21をノックダウンさせたRSc細胞にHCV-JFH1を感染させると、HCV感染96時間後の細胞内HCV RNAレベル、細胞内及び培養上清中に放出されるHCV Core発現レベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生されたHCV粒子の感染性の低下も認められた。同様に全長HCV-0 RNA株複製0細胞やHCV-0株サブゲノムレプリコンs0細胞の内在性DDX21をノックダウンさせても、HCV複製レベルは顕著に減少した。

HCV非感染RSc細胞において、DDX21は核小体に局在したが、HCV-JFH1感染細胞においても、DDX21は核小体に局在したままで特に局在の変化はみられず、HCV Coreとの共局在は観察されなかった。

ストレス顆粒因子Staufen 1及びUPF1のHCV生活環における役割：内在性Staufen 1及びUPF1をノックダウンさせたRSc細胞にHCV-JFH1を感染させると、細胞内HCV RNAレベルの顕著な減少がみられた。そして、培養上清中に産生されたHCV粒子の感染性の低下も認められた。

DNA損傷センサーDNA-PKcsのHCV生活環における役割：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