

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成27 (2015) 年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

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

### II. 分担研究報告書

HCV 感染増殖細胞系の開発と阻害剤の探索

加藤 宣之

HCV感染および肝がん発症におけるイムノフィリンの役割と  
それを標的とした化合物開発

森石 恆司

ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質による HCV 複製制御機構の研究

勝二 郁夫

HCV 複製機構の解析

有海 康雄

HCV における脱ユビキチン化酵素の役割

松浦 善治

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別冊

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

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。トランスパッケージ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 ( $1.5 \times 10^7$  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  $4 \times 10^5$  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  $2 \times 10^4$  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 ( $EC_{50}$ ) 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  $1 \times 10^3$  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 ( $CC_{50}$ ) を算出した。選択性指数 (SI) は  $CC_{50}/EC_{50}$  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参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 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

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）  
分担研究報告書（平成 26 年度）

HCV 感染増殖細胞系の開発と阻害剤の探索

研究分担者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルス(HCV)の培養細胞レベルでの感染増殖系は、これまで遺伝子型 2a 等で成功しているが、遺伝子型 1b では作出されていない。我々は、これまでに蓄積された HCV 複製に必要な宿主因子の情報や HCV 複製を許容する各種ヒト細胞株を活用して、遺伝子型 1b の HCV 感染増殖系の開発を試みた。昨年度、ヒト不死化肝細胞を用いて行った実験により、HCV 複製を支持する宿主因子の更なる追加が必要であることが示唆された。そのため今年度は、この点を改良してさらに実験を継続した。その結果、残念ながらヒト不死化肝細胞を用いた 1b 型 HCV の持続感染系の作出には至らなかった。しかしながら、この実験過程において、無血清培地 AEM を使用することにより感染性 HCV 粒子(2a 型 HCV)の産生を数十倍高めることができることを見出した。一方、HCV 阻害剤については、昨年度までに強い抗 HCV 活性を見出しその性状解析を進めている N-89 と N-251（抗マalaria薬としても開発中）の臨床応用に向けた有用性についてさらに検討を加えた。我々がアッセイ系として使用している全長 HCV-RNA 複製細胞に各種の直接作用型抗ウイルス剤(DAA)製剤を添加して、DAA 製剤に耐性を示す細胞を作出した。これらの DAA 耐性細胞に対しても N-89(N-251)は有効に作用し、相加効果（一部相乗効果）を示すことを確認した。さらに、N-89(N-251)に耐性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞の作出にも成功したため、これらの化合物の抗 HCV 活性作用機序の解明に向けた研究基盤を整えることができた。

A．研究目的

HCV の複製を効率良くかつ持続的に産生できる培養細胞はヒト肝癌細胞株である HuH-7 由来の細胞に限られていた。2009 年、我々は、HCV の複製が持続的に起こる新たなヒト肝癌細胞株 Li23 を見出し、この細胞株を用いて HCV-RNA を効率的に複製している幾つかのクローン化細胞株の樹立に成功した。さらに、これらの細胞株を用いて抗 HCV 活性を簡便に定量評価できるアッセイ系（ORL8 と ORL11）も開

発した(特許登録 5535073, 2014)。

一方、培養細胞を用いた遺伝子型 1b(日本における主要な遺伝子型)HCV の感染増殖系は依然として開発されていない。

本研究においては、我々がこれまでに樹立した HCV-RNA の複製を許容する細胞株やヒト不死化肝細胞に、HCV 複製に必要な各種宿主因子を追加発現させることにより遺伝子型 1b の HCV 感染増殖系を開発することを目標とした。この研究課題については、昨年度までに、1b 遺伝子型である O 株 HCV と陽性コントロールとして

2a 遺伝子型の JFH-1 株 HCV を HuH-7 や Li23 由来の細胞 (HCV-RNA の複製を許容する) やヒト不死化肝 PH5CH8 細胞に感染させる実験を行った。その結果、JFH-1 株 HCV の感染実験では、HuH-7 由来の RSc 細胞や Li23 由来の ORL8c や D7 細胞で持続感染状態になることが確認された。しかしながら、PH5CH8 細胞では HCV の感染増殖は確認されなかった。さらに検討を加えたところ、PH5CH8 細胞では、miR122 や Claudin 1 (CLDN1) の発現レベルが低いことが分かった。そこで、これらの因子を追加発現させた細胞を作成して HCV の感染実験を行った。しかしながら、短期間 (2 週間程度) の観察では、JFH-1 株 HCV、O 株 HCV とともに、HCV の増殖を確認するには至らなかった。今年度は、これらの感染培養実験のフォロー期間を長くすること、並びに更なる工夫を加えて再度実験を試みることにした。

本研究のもう 1 つの課題である HCV 阻害剤の探索については、我々の開発した抗 HCV 活性を評価する細胞アッセイ系 (OR6 や ORL8) を用いて抗 HCV 活性を有する新たな化合物を探索し、副作用が少なく安価な経口阻害剤を見出すことを目標とした。昨年度までに、抗マラリア薬として開発中の N-89 とその誘導体である N-251 に強い抗 HCV 活性を見出し、その性状解析を行った。その結果、この化合物は安価で製造できることや数十 nM で有効性を示すことなどから臨床応用可能と判断され、臨床研究中核拠点である岡山大学病院における薬剤シーズに選定され、安全性試験の評価が行われている。今年度は、最近認可された HCV 特異的直接作

用型抗ウイルス剤 (DAA) 製剤との併用でも有効であるかどうかや N-89 (N-251) の抗 HCV 活性の分子機序解明に向けた研究基盤として、これら化合物に耐性を示す HCV-RNA 複製細胞株の樹立を試みた。今年度の研究成果を以下に示す。

## B. 研究方法

### (1) HCV 感染実験および長期継代培養実験

各種細胞を 6 ウェルプレートにそれぞれ  $5 \times 10^4$  個ずつ播き、一晚 37 度で培養した後、HCV 陽性血清 (O 株) 150  $\mu$ l ( $1.5 \times 10^7$  HCV ゲノム価相当) や陽性コントロールとして JFH-1 株 HCV (遺伝子型 2a) 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 (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  $\mu$ m のフィルターを通した後に、HCV Core の定量を ELISA 法 (平成 26 年度より検出限界は 1 fmol/L と従来の 20 fmol/L より高感度となった) により行った。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 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  $4 \times 10^5$  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。

## (2) 細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗 HCV 活性評価

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  $2 \times 10^4$  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( $EC_{50}$ )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  $1 \times 10^3$  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( $CC_{50}$ )を算出した。

選択性指数(SI)は  $CC_{50}/EC_{50}$  にて算出した。

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(詳細は研究結果の項に記載した)。

## (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 感染実験および長期継代培養実験

HCV 感染実験については、感染後 29 日までの結果を昨年度報告した。ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞(miR122 や miR122/CLDN1 を追加発現させた細胞を含む)については、感染後 7 日目で JFH-1 株 HCV と O 株 HCV が細胞内や培養上清に少量検出されたが、感染後 17 日目や 29 日目では検出されなかった。しかしながら、RSc、ORL8c および D7 細胞において、JFH-1 株 HCV は感染後、少なくとも 29 日目まで、細胞内

や培養上清に持続的に検出された。ただ、O株 HCV ではやはり感染後 7 日目の細胞でしか HCV を検出することが出来なかった。

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、今年度は、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  $2.2 \times 10^7$ 、 $4.0 \times 10^6$  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。平成 24-25 年度の 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、O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  $2.0 \times 10^7$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA のままで、培養上清中の Core 量は約 8 分の 1 ( $300 \text{ fmol/L}$ ) 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 ( $1.1 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA) に低下し、培地上清中の Core 量は  $1 \text{ fmol/L}$  (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 ( $3.8 \times 10^6$  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  $1.4 \text{ fmol/L}$  と比較して 55 倍高い  $77 \text{ fmol/L}$  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 量が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 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 ( $6.7 \times 10^7$  コピー/ $\text{mg}$  total RNA) に、培養上清の Core 量は 12 分の 1 ( $710 \text{ fmol/L}$ ) 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 ( $2.7 \times 10^6$  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  $67 \text{ fmol/L}$  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 ( $8.3 \times 10^7$  コピー/ $\mu\text{g}$  total RNA) に低下したものの、培養上清の Core 量は、 $100$  から  $2,500 \text{ fmol/L}$  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  $100 \text{ fmol/L}$  から  $2,500 \text{ fmol/L}$  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 O 株 HCV や同じ 1b 型 HCV である 1B-4 株 HCV ( $1 \times 10^8$  HCV ゲノム/ $\text{mL}$  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 O 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。

## (2) 細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗 HCV 活性評価

本研究により強い抗 HCV 活性を見出した N-89 と N-251 (いずれも抗マalaria 活性を有する。これらの化合物は、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 first in man に向けての毒性安全性試験などが進行中) については、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。

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。これまでに、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が、いずれも治癒細胞となり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、遺伝的多様性を獲得した HCV-RNA から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。そこで、我々は、これまで試みていなかった抗 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。OR6 細胞については、N-251 の濃度を 4  $\mu\text{M}$  から 8  $\mu\text{M}$  に徐々に上げて行く方法で行ったが、G418 抵抗性細胞 (N-251 に耐性を示すと 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  $\mu\text{M}$  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  $\text{EC}_{50}$  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  $\text{EC}_{50}$  値は 2  $\mu\text{M}$  となり、ORL8 細胞での 0.1  $\mu\text{M}$  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  $\text{EC}_{50}$  値も測定したところ、ORL8 N-251r 細胞では 1.9  $\mu\text{M}$  の値が得られた。ORL8 細胞では 0.089  $\mu\text{M}$  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、この系列細胞からさらに N-251 耐性の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。O 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 阻害剤としては 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  $EC_{50}$  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。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  $EC_{50}$  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  $EC_{50}$  値をプロットしていくという Isobole plot 解析を行った。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。このような方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

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度を調べるために再度 EC<sub>50</sub> 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 EC<sub>50</sub> 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 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。

#### D. 考察

##### (1) HCV 感染実験および長期継代培養実験

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。そのためには、1b 型 HCV 株の複製に適した培養細胞株の探索が必要であるが、HCV の複製に必要と思われる宿主因子をほぼそろえたと思われる PH5CH8 細胞においても、HCV の複製増殖が困難であった。従って、さらにどんな宿主因子を必要としているかを丹念に検討していく研究が必要である。その過程において、AEM 培地が HCV の遺伝子型に依存して有効であるかの結論も得られるのではないかと思われる。

## (2) 細胞アッセイ系を用いた候補化合物の抗 HCV 活性評価

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と期待される。この点を明らかにすることができると、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。

今年度は、現在開発中の 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。

## E. 結論

今年度のまとめを以下に示す。

(1) ヒト不死化肝細胞に HCV 複製に必要な宿主因子を追加発現させたが 1b 型 HCV の持続感染系の作出には至らなかった。しかしながら、無血清培地 AEM の使用により感染性 HCV 粒子(2a 型 HCV)の産生が数十倍高まることを見出した。

(2) 幾つかの HCV 特異的 DAA 剤に耐性を示す HCV を作出した。それら耐性 HCV に対しても抗 HCV 剤として開発中の N-89 や N-251 は有効であり、各種 DAA との併用による相加効果(一部相乗効果)を確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 95(12):2658-2667 (2014).
- 2) 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'-deoxyribonucleo

- sides 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).
- 3) 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).
  - 4) 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).
  - 5) 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*, 462-463:166-174 (2014).
  - 6) 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).
  - 7) 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).
  - 8) 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).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) 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).
- 2.学会発表
- 1) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫



- 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。C 型肝炎ウイルスのライフサイクルにおける Rab13 の重要性。第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月。
- 2) 上田 優輝、金 惠淑、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、土居 弘幸、綿矢 有佑、加藤 宣之。抗マalaria薬候補で強い抗 HCV 活性を示す N-251 の臨床応用に向けた研究と DAA との併用効果。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
- 3) 松野 研司、上田 優輝、福田 美和、斧田 賢嗣、脇 稔、池田 正徳、加藤 宣之、宮地 弘幸。ヘキサフルオロイソプロピルベンズアミド誘導体による抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 活性。第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸、2014 年 11 月。
- 4) 山本 樹、大橋 雅生、上田 優輝、松野 研司、加藤 宣之、宮地 弘幸。C 型肝炎治療薬を指向した PPAR / デュアルアンタゴニストの創製。第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸、2014 年 11 月。
- 5) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。HCV ライフサイクルにおける小胞輸送蛋白質 Rab13 の役割。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
- 6) 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之。臨床応用に向けた抗マalaria薬候補 N-251 の抗 HCV 活性作用機序の解析。第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)。神戸、2014 年 10 月。
- 7) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。小胞輸送蛋白質 Rab13 は HCV 感染に必要な因子である。第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014 年 10 月。
- 8) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Human hepatoma HuH-7 cell line-derived RSc cells show higher viral productivity in response to infection with HCV-JFH-1 than Huh7.5 cells. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014 年 9 月。
- 9) Ueda Y, Kim HS, Hiromichi Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014 年 9 月。
- 10) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates HCV RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014 年 9 月。
- 11) Ariumi Y, Kuroki M, Siddiqui R, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX21 RNA helicase restricts HCV infection. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014 年 9 月。
- 12) Takeda M, Ikeda M, Satoh S, Dansako

H, Wakita T, Kato N. Rab13 is an essential host factor for HCV entry. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.

G. 知的財産権の出願・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

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）  
分担研究報告書（平成 26 年度）

HCV 感染および肝がん発症におけるイムノフィリンの役割と  
それを標的にした化合物開発

研究分担者：森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)のウイルスゲノム複製は宿主因子の利用によって成り立っている。我々は、NS5Aに相互作用する宿主因子としてFKBP6を同定している。今回、既存抗HCV剤と抗FKBPFKBP6/8阻害剤の併用効果と肝臓組織における発現を解析した。FKBP6ノックダウンによってウイルス量やレプリコンRNA量は低下し、FKBP6にFKBP6は結合する。感染患者の肝臓から低ウイルス量領域と高ウイルス量領域で比較した場合、FKBP6はウイルス量に依存して発現していた。HCVを感染させるとFKBP6は上昇し、培養細胞レベルでもFKBP6発現量はHCV感染に依存していた。FKBP8阻害剤DM-CHXはFKBP6に対してダイマー形成を阻害することを昨年報告した。既存薬剤との併用効果を解析すると、DaclatasvirとIFNとの相乗あるいは相加作用がみられたが、Telaprevirとはアンタゴニスト作用が認められた。以上の結果から、FKBP6の発現はHCV感染と関連していることが示唆され、低分子化合物DM-CHXがFKBP6の機能を阻害し、DaclatasvirあるいはIFNと相乗・相加作用があることがわかった。

A. 研究目的

世界で二億人、国内で約150-200万人のC型肝炎ウイルス(HCV)の感染者が推定され、血液などを介して、HCVはヒトに感染し、高率に持続感染に移行する。持続感染患者は、慢性肝炎から肝硬変を経て、高い確率で肝細胞癌を発症する。日本の肝癌の約7-8割は、HCV感染に起因する。新規NS3プロテアーゼ抑制剤の登場により、より高い著効率が期待できるようになった。しかしその一方、副作用や耐性ウイルスの出現、ウイルス排除後の肝がん発症などの問題が残されている。さらに、既に肝線維化が進行している方や肝移植前後の方に対するウイルス排除の有効性は議論がわかるところである。今後、ウイルス排除ばかりではなくC型肝炎疾患に対する予防治療方法や診断予測法の開発が必要と思われる。

HCVの非構造蛋白質であるNS5Aはウイルスゲノム複製、粒子形成に関与する蛋白質で、病原性にも関与するとされる。我々は、以前、イムノフィリン蛋白質である宿主蛋白質FKBP8を報告している。しかしながら、そのFKBP8に非依存的に複製

するレプリコン細胞が存在し、その細胞にFKBP8と同じ蛋白質ファミリーであるFKBP6が高発現していることを報告し、がん部で高発現しており、ウイルス感染およびC型肝炎疾患に関与していることが示唆された。

今回、既存抗HCV剤と抗FKBPFKBP6/8阻害剤の併用効果と肝臓組織における発現を解析した。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、

および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

#### C. 研究結果

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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

本研究によって、HCV 感染によって FKBP6 が誘導され、感染が維持されているものと考えられた。またさらに、本研究によって、FKBP6 を標的とした薬剤の既存抗 HCV 剤との併用効果が期待された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

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 hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014

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

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

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

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

## 2. 学会発表

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepatitis virus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.

Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angeles, USA.

山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからのB型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜

安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜

田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜

土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、トリプシン・EDTAによるNTCP依存HBV感染の増強、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日

～12日、横浜

天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物のC型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜

Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし



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）  
分担研究報告書（平成 26 年度）

ユビキチンおよびユビキチン様蛋白質による HCV 複製制御機構の研究

研究分担者 勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルス（HCV）NS5A 蛋白質がインターフェロン刺激により ISG15 による修飾（ISGylation）を受ける。従来、ウイルス増殖に対する意義は正と負の相反する報告があり、詳細は不明である。そこで、NS5A の ISGylation のウイルス増殖における意義を明らかにするために ISGylation 部位を解析した。HCV Con1 株（genotype 1b）の NS5A の Lys 残基を Ala 残基に置換し、1 カ所のみ Lys 残基を有する NS5A 変異体を各種作製した。NS5A の 14 カ所ある Lys 残基のうち 5 カ所の Lys 残基に ISG15 が結合することがわかった。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、機能に違いがある可能性が考えられた。ISG15 同士の di-ISGylation は否定的であった。

A. 研究目的

C 型肝炎治療は NS3/4A セリンプロテアーゼ阻害薬が承認され、Direct Acting Antivirals (DAA) の時代に突入したが、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用による治療の中断が懸念されている。そのため、DAA とは異なる作用機序をもつ新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。HCV 蛋白質が ISG15 で修飾され、ウイルス増殖が調節されることが知られているが、未だウイルス増殖における意義は不明である。そこで ISG15 系による HCV 増殖制御の分子機構を明らかにし、新規抗 HCV 薬開発のための分子基盤の構築を目指した。

B. 研究方法

1. 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。

2. HCV NS5A の ISGylation の解析

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。

3. 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-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。

4. 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。

#### (倫理面の配慮)

取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

### C. 研究結果

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

### D. 考察

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。

### E. 結論

1. HCV NS5A 蛋白質は UBE1L, UbcH8, Herc5 により ISGylation が促進される。

2. Con1, 0, JFH1 株いずれの NS5A も ISGylation を受け、genotype によらず HCV に共通の現象と考えられた。

3. ISGylation 部位を解析したところ、HCV Con1 株の 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。

4. 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示された

5. GFP-ISG15 を用いた解析から ISG15 同士の di-ISGylation は否定的であった。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表



## 1. 論文発表

1. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Induction of T 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 E6AP6 activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21 (1): 1-16.

## 2. 学会発表

- 1) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. 7) Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- $\beta$  superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 $\alpha$  protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第 62 回日本ウイルス学会学

- 術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 8) 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルスXタンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 9) 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF-スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 10) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 11) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 蛋白質の選択的分解機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 13) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
  - 14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる

HNF-1 $\alpha$  蛋白質の選択的分解機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月25-27日, 2014年.

H. 知的所有権の出願・取得状況  
特になし

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）  
分担研究報告書（平成 26 年度）

HCV 複製機構の解析

研究分担者 有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

**研究要旨：**我々はこれまで、RNA ゲノムしか保持しない C 型肝炎ウイルス(HCV)が DNA 損傷センサーである ATM と相互作用し、HCV の自己複製に必要な宿主因子であること、そして ATM 特異的阻害剤 KU-55933 に抗 HCV 効果があることを報告してきた(Ariumi *et al.* J. Virol.82:9639-9646, 2008)。そこで、本年度は ATM と同じ核内 PI3 キナーゼに属し、DNA 損傷センサーである DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)と ATM の下流で相同性組換え修復を担う Rad18 の HCV 複製における役割について検討を行い、宿主因子を分子標的とした創薬開発を目指す研究を行った。その結果、( 1 ) DNA 損傷センサー DNA-PKcs が HCV 複製に必要であること、( 2 ) DNA-PK 阻害剤は抗 HCV 活性を有していること、( 3 ) ユビキチン E3 リガーゼ Rad18 が HCV 複製に必要であること、そして、( 4 ) Rad18 が HCV NS5B と結合し、Rad18 が形成するリング状の核内構造体の外縁部において、NS5B と共局在していることを見出した。以上の結果より、異なる DNA 損傷応答経路が HCV と相互作用し、HCV 複製に必要な宿主要因であること、また DNA 損傷応答経路が新規抗 HCV 剤開発の標的となりうること、そして、HCV と DNA 損傷応答経路との相互作用が、肝臓がんの原因として示唆された。

#### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、そして肝がんの原因ウイルスである。現在、我が国のHCV感染者は約200万人いると推定されており、実に日本人の肝がんの原因の約80%をHCV感染が占めるに至っているのが現状である。しかしながら、日本人の多くはインターフェロンが効きにくい1b遺伝子型HCVに感染しているため、インターフェロンとリバビリンの併用両方のみでの著効率は約50%程度に留まっている。最近、HCVプロテアー

ゼ阻害剤の開発がなされ脚光を浴びているが、HCVはRNAウイルスのため、変異しやすく薬剤耐性株の出現が危惧される。そこで、宿主因子を分子標的とした新規抗HCV剤の開発が急務とされる。

我々はこれまで、RNAゲノムしか保持しないHCVがDNA損傷センサーであるAtaxia Telangiectasia Mutated (ATM)と相互作用し、HCVの自己複製に必要な宿主因子であること、そしてATM特異的阻害剤である2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933)に抗HCV効果があることを報告してきた(Ariumi *et al.* J.

Virology 82:9639-9646, 2008)。そこで、本年度はATMと同じPI3キナーゼに属し、DNA損傷センサーであるDNA-dependent protein kinase (DNA-PK)とDNA複製時に生じるDNA損傷修復をはじめ、ATMの下流で相同性組換え修復を担うRad18のHCV複製における役割について検討を行い、宿主因子を分子標的とした創薬開発を目指す研究を行った。また、HCVがこれらDNA損傷応答経路と相互作用することが肝臓がんの要因になっているのか考察した。

## B. 研究方法

### (1) HCV複製に關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、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なった。

### (2) 細胞内局在の観察

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。

### (3) 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。

### (4) 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 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

料や実験動物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、本研究は「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止処置等を定める省令」に基づき実施した。特に HCV ウィルスを用いた感染実験の場合は BSL2(P2) レベル実験室のバイオハザード対策用安全キャビネットを使用し、実験終了後の資料についても、UV 照射、次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素系消毒薬処理およびオートクレーブを用い、適正に廃棄を行った。

### C. 研究結果

(1) DNA 損傷センサー DNA-PKcs 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 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。

(2) ユビキチン E3 リガーゼ Rad18 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 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 損傷に応答して、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 損傷に応答した Rad18 foci

形成には影響を及ぼさないことが判明した。

#### D. 考察

これまで、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、肝発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 依存的 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 損傷に応答して、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 損傷に応答した 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 $\alpha$  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 $\beta$  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

(1) DNA 損傷センサー DNA-PKcs が HCV 複製に必要であることが示唆された。

(2) DNA-PK 阻害剤(DNA-PK inhibitor II/NU7026; Calbiochem)は抗 HCV 活性を有していることを見いだした。

(3) ユビキチン E3 リガーゼ Rad18 が HCV 複製に必要であることが示唆された。

(4) Rad18 が HCV NS5B と結合し、Rad18 が形成するリング状の核内構造体の外縁部において、NS5B と共局在していることが判明した。

Granules 2014). June 8-10, 2014, Halifax, Nova Scotia, Canada

(3) Yasuo Ariumi. HIV-1 Vpr and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> restrict the LINE-1

retrotransposition. 15<sup>th</sup>

Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014, Kumamoto, Japan

(4) 有海康雄. LINE-1の転移因子と宿主因子. 2014年度国立遺伝学研究所研究集会

「転移因子と宿主の相互作用による生命進化」2015年2月26日-27日, 三島市, 静岡.

## F. 知的所有権の取得状況

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ariumi Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Frontiers Genet.* 5:423, 2014

### 2. 学会発表等

- (1) Yasuo Ariumi. Tumor suppressor proteins restrict LINE-1 retrotransposition. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2014
- (2) Yasuo Ariumi. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 1<sup>st</sup> International Symposium on Stress-Associated RNA Granules in Human Disease and Viral Infection (RNA

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）  
分担研究報告書（平成 26 年度）

HCV における脱ユビキチン化酵素の役割

研究分担者 岡本徹 大阪大学微生物病研究所 助教

**研究要旨：** 脱ユビキチン化酵素(DUB)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種々のシグナル伝達に関与し、癌や免疫応答等の様々な生理現象に関わることが報告されている。しかしながら、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染における DUB の役割は不明な点が多い。本研究では DUB の発現を網羅的に抑制して、脂肪滴の形成や維持に関わる DUB の USP15 が、HCV の複製に関与することを明らかにした。

**A. 研究目的**

HCV に感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。ペグ化 IFN とリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型 1b 型の高ウイルス価の難治性 C 型肝炎患者に対する著効率は 50%程度である。ウイルスのプロテアーゼやポリメラーゼ阻害剤が有用であることが明らかとなってきたが、耐性ウイルスの出現は明白であり、HCV の複製に必須の宿主因子を標的とすることが抗ウイルス治療において、最も有用な手段であると考えられる。脱ユビキチン化酵素(DUB)は生体内で発癌、免疫、発生等、さまざまな生理現象で重要性が認識されつつある。中でも、癌研究において、いくつかの DUB 阻害剤が抗癌作用を示すことから、近年様々な DUB 阻害剤が開発されている。一方、ウイルス感染における DUB の役割に対する知見は乏しいことから、HCV 複製において重要な DUB を同定し、その阻害剤の開発を提案することを目的とした。

**B. 研究方法**

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。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

**C. 研究結果**

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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

USP15 を阻害できる化合物は、HCV 複製の抑制だけでなく、広範囲の肝疾患に対しても効果を示すことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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
2. 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

##### 2. 学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、

- 山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
  12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
  13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014
  14. Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Ayano Ito, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HBV propagation and pathogenesis. The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference. Hiroshima, 2014

## H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中島謙治、鈴木哲朗	進歩するC型肝炎治療		感染・炎症・免疫	医薬の門社		2015	81-82

### 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
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, <u>Suzuki T</u> .	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$ in Infectious Virus Production.	J Virol	88	7541-7555	2014
Saito K, Shirasago Y, <u>Suzuki T</u> , 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
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, <u>Suzuki T</u> , Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol	95	2658-2667	2014
Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Takeda N, Li TC.	Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses	J Virol Method	207	38-44	2014
Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, <u>Suzuki T</u> , 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
Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, <u>Suzuki T</u> , 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	
Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, <u>Suzuki T</u> , Lee J, Park EY.	Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection.	Biosens Bioelectron.	58	33-39	2014
Shimada H, Haraguchi K, Hotta K, Miyaike T, Kitagawa Y, Tanaka H, Kaneda R, Abe H, Shuto S, Mori K, Ueda Y, <u>Kato N</u> , 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	6174-6176	2014

Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, <u>Kato N</u> , 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	3026-3039	2014
Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, <u>Kato N</u> , 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	4276-4280	2014
Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, <u>Kato N</u> .	Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets.	Virology	162	166-174	2014
Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, <u>Kato N</u>	Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus <i>Cordyceps militaris</i> .	Biochem Biophys Res Commun,	447	341-345	2014
<u>Kato N</u> , 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	e91156	2014
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, <u>Kato N</u> , 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	2770-2777	2014
Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, <u>Kato N</u> .	Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of hepatitis C virus.	Acta Medica Okayama	64	in press	
Murakami Y, Itami S, Eguchi Y, Mizutani T, Aoki E, Ohgi T, Kuroda M, Ochiya T, <u>Kato N</u> , Suzuki H, Kawada N.	Control of HCV replication with iMIRs, a novel anti-RNAi agent.	Molecular Therapy-Nucleic Acids		in press	
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, <u>Moriishi K</u>	Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus.	J Virol	88	13352-13366	2014
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> , 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
Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, <u>Moriishi K</u> , 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
Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> ,	Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase	Mar. Drugs.	12	462-476	2014

Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N	from a marine sponge				
Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, <u>Moriishi K</u> , 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
Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, <u>Shoji I</u> , Deng L, 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	9	e98877	2014
Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Antiviral activity of extracts from Morinda citrifolia leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.	Microbiol Immunol.	58	188-194	2014
Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Wahyuni T, Lusida M, Soetjpto S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Anti-hepatitis C virus compounds obtained from Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species.	Microbiol Immunol.	58	180-187	2014
Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, <u>Shoji I</u> , 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	21	1-16	2014
<u>Ariumi Y</u> .	Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection.	Frontiers Genet.	5	423	2014
<u>Fukuhara T</u> , Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, <u>Okamoto T</u> , Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y.	Amphipathic $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles.	PLOS Pathogens	11	e1004534	2014
Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, <u>Okamoto T</u> , Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y.	Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus.	J Virol.	88	5578-5594	2014