

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013045

研究課題名（和文） 肝炎ウイルスによる肝炎・肝がんの発症機構と予防

研究課題名（英文） Development of preventive measures of liver failures caused by HCV infection by clarification of the mechanisms of liver diseases

研究代表者

下遠野 邦忠 (SHIMOTOHNO KUNITADA)

千葉工業大学 附属総合研究所 教授

研究者番号：10000259

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎ウイルス（HCV）感染による慢性肝炎の発症は肝疾患を増悪させ肝がんの発症を高める。本研究ではHCVの持続感染を阻害することによるウイルス感染維持の遮断、ウイルス感染による細胞の変化、を分子レベルで捉え、肝細胞の増悪化を予防する方法の開発に資する研究を行った。以下に研究成果の概要を示す。ウイルスの持続感染を阻止する目的で、ウイルス複製を阻害する化合物を探索し、その抗HCV効果を調べた。その結果サイクロスポリンAおよび免疫抑制作用を示さないサイクロスポリン誘導体が高い抗HCV作用を示すことを明らかにした。また、HCV感染が体内で持続感染するには、宿主がもつ自然免疫機構がHCV増殖を抑制しきれないためであると考えられる。抗HCV作用を示すインターフェロンシグナル系を解明することにより、自然免疫機構を活性化させる方策が見出せる可能性を考え、特にRIGIによるインターフェロン活性化の分子機構を解析した。その結果、インターフェロンシグナルを負に調節するユビキチンE3酵素を見出した。長期間のC型慢性肝炎は肝疾患を増悪させるが、その際に脂肪代謝異常が肝疾患の増悪に働くと考えられる。そこで、HCV感染による脂肪代謝異常を解析した。その結果、HCV感染により細胞内の脂肪滴量が増加することを見出した。また、脂肪輸送経路に働くリポタンパク質の生成がHCVの細胞外への放出に重要な働きをすることを見出した。さらに、細胞外に分泌されたHCVはリポタンパク質と会合して存在すること、ウイルス粒子にアポリポタンパク質Eが会合していること、アポリポタンパク質Eのウイルスへの会合はウイルス感染性に重要であることを明らかにした。これらの成果は、細胞内の脂肪代謝系が修飾され、ウイルスが増殖しやすい環境を構築することを明らかにしたばかりでなく、このようなHCVによる脂肪代謝の変化は、肝臓内での脂肪代謝を変化させ疾患の増悪に関与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）

Hepatitis C virus is a major causative agent for development of various liver failures including chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. One of the major problem of the developing such liver failures by HCV is persistent nature of HCV infection. In fact, those of individuals who became free from HCV infection by interferon treatment were cured from HCV associated liver failures thereafter. Thus, the development of efficient anti-HCV agents is one goal to prevent HCV related liver diseases. In addition, clarification of the mechanism of the development of liver failures contributes to establish preventive measures for onset of HCV-related diseases. Aims in this work are, therefore, firstly, to understand detail mechanisms of HCV proliferation to obtain insights of the knowledge to develop anti-HCV agents and, secondary, to reveal the mechanisms of the development of liver failure which contributes to develop measures to prevent exacerbation of liver diseases. In this work, I discovered following evidences; (1) Cyclosporin A inhibited HCV genome replication efficiently through impairing the

function of cyclophilins, (2) a new ubiquitin E3 ligase which regulates interferon signaling was discovered, (3) HCV infection dys-regulated lipid metabolism as well as lipid transfer mechanism. And this dys-regulation is important for efficient replication of HCV. (4) Dys-regulation of lipid metabolisms and lipoprotein transfer mechanism may contribute to exacerbate of liver failure and, therefore, regulation of lipid metabolism will be therapeutics for not only prevent liver diseases but also prevent HCV proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	39,600,000	0	39,600,000
2006年度	39,600,000	0	39,600,000
2007年度	47,700,000	0	47,700,000
2008年度	29,500,000	0	29,500,000
2009年度	29,500,000	0	29,500,000
総計	185,900,000	0	185,900,000

研究分野： 生物系

科研費の分科・細目： 発がん

キーワード： C型肝炎ウイルス、複製阻害、サイクロスポリン、脂肪滴、慢性肝炎

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症の主たる原因ウイルスのひとつである。慢性肝炎患者は肝がん発症の高危険要因なので、慢性肝炎の発症を予防することにより、肝がん発症を予防することが可能である。

(1) 慢性肝炎患者の炎症を抑えることにより肝がんの発症を予防することが可能であるが、HCV感染による発症の危険性を取り除くことはできない。望ましい方法は感染者からHCVを排除することである。事実、インターフェロン・リバビリン療法により治療を受けた約半数からウイルスを排除できるようになった。しかし副作用の問題およびウイルスが排除されない感染者に対する問題が存在しており、新規の抗HCV剤の開発が今後の重要な課題である。

(2) さらに、HCV感染による肝疾患の発症およびその増悪化についての分子レベルでの理解が十分でないために、事実に基づいた疾患予防、治療方策が十分でないなど、多くの未解決な問題が蓄積している。

2. 研究の目的

(1) 近年明らかにされたHCVゲノムの複製細胞系、およびHCV感染増殖系を用いて抗HCV作用を示す低分子化合物をスクリーニングして、新規の薬剤を明らかにすることを目的のひとつとした。

(2) インターフェロンシグナル系の理解が

深まれば、インターフェロンによる抗HCV作用の分子機構の解明が深まると期待されるので、インターフェロンシグナル系を解析し、持続感染を遮断する方策を探ることを目的とした。

(3) HCV感染が培養細胞に与える影響を解析し、HCV感染が肝疾患の発症にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染性HCVゲノムが複製する細胞を用いて、種々の薬剤によるゲノム複製を評価する。ゲノム複製能に影響を与える物質については、その機構を明らかにする。

(2) HCV持続感染の機構を分子レベルで解明するために、インターフェロンシグナル系に働く制御因子を解析する。そのためにインターフェロンシグナル系の一部をアッセイできる方法を駆使して解析を行う。

(3) HCV感染増殖系を用いた系を用いて、細胞内の変化を解析する。特に脂肪代謝に注目して、細胞内の脂肪の蓄積を調べ、その意義をウイルス複製との関連で調べる。

これらの解析を通して、HCV増殖の効率よい制御法の開発に役立てると同時に、肝疾患増悪の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) サイクロフィリンによるHCV複製制御。

HCV ゲノムが自立的に複製する細胞を用いて、ウイルスゲノム複製を制御する細胞側要因を探索することが可能である。すでに薬理作用が明らかな薬剤について、抗 HCV 効果を調べ、数種類のもので強く HCV ゲノム複製を抑制した。一連の研究で抗 HCV 作用が顕著な薬剤のうち、サイクロスポリン A (CsA) はこれまでの研究から、(1) CsA が用量依存的、時間依存的に HCV ゲノム複製を阻害する、(2) CsA の抗 HCV 作用は免疫抑制作用とは異なる機構によることを明らかにしてきたので、この作用機序を明らかにする目的でさらに解析を進めた。その結果、(3) サイクロスポリンによる抗 HCV 効果はシクロフィリン B (CypB) の抑制を介して発揮される、(4) CypB はウイルスポリメラーゼに働いてその機能を向上させる、(5) CypB はウイルスポリメラーゼと結合してポリメラーゼの RNA 結合能を高める。(6) サイクロスポリンが共存すると、ポリメラーゼと CypB の結合が抑制される、等を明らかにした。また、CsA の誘導体で、免疫抑制作用を全く示さない化合物が CsA と同様に強い抗 HCV 作用を示すことも明らかにした。これらの結果は HCV を排除するために有効な薬の開発に道を拓くと期待される。事実、臓器移植患者においてはタクロリムス投与に比べてサイクロスポリン投与群で慢性肝炎発症の遅延が観察されること、C 型慢性肝炎患者において、免疫抑制作用のないサイクロスポリン誘導体とインターフェロンの投与が抗 HCV 効果を示す、という報告がされている。

なお、サイクロスポリンによる抗 HCV 効果が、遺伝子型の異なる HCV にも適応されるかを、HCV-2a 遺伝子型のウイルスゲノムが自立複製する細胞を用いて解析した。その結果、複製抑制はされるものの、HCV-1b に比べてその程度は低いことを見出した。したがって、サイクロスポリンの持つ抗 HCV 作用は、遺伝子型により異なりその作用機序についての解析は今後の課題である。

(2) インターフェロン経路を抑制する新しいユビキチン化酵素

HCV プロテアーゼが、TLR3 および RIGI シグナル経路を遮断し、その結果、IFN 産生を抑制する。TLR3 および RIGI は IFN 産生に働くセンサー分子であり、また、これらの因子を介する IFN 産生の経路は IFN により正に制御されている。一方、IFN 等のサイトカイン産生は免疫状態を正常に維持するために厳密に制御される必要があり、ウイルス感染などにより一時的に増加した IFN は速やかに正常値のレベルに戻る機構があると考えられる。しかし、ウイルス感染後の IFN シグナルの制御については不明な点が多い。本研究で、活性化された RIGI 経路が減衰する分子機構について解析を行った。その結果、RIG-I は、

インターフェロンで誘導されるユビキチン E3、RNF125 によりユビキチン化修飾を受けて分解されることを見出した。RNF125 活性は IFN により誘導されるので、IFN 産生が多くなると、RIG-I の産生亢進が生じ、その結果 IFN シグナルが活性化される。しかし、同時に活性化される RNF125 により RIG-I がユビキチン化を受け、分解が進む結果、このシグナルが減衰して IFN 産生を抑えるように働く。以上から、RIGI シグナルの negative feedback として RNF125 による RIGI ユビキチン化が考えられた。RNF125 は RIG-I をユビキチン化するだけでなく、RIG-I 族のひとつ MDA5 をユビキチン化し、また RIG-I シグナル下流でシグナルの伝達に重要な働きをする IPS-1 もユビキチン化する。また、RNF125 は RIG-I と IPS-1 の会合を抑制することも見いだした。これらのことから、RNF125 は RIG-I を介した IFN シグナルを負に制御する因子であると考えられる。

これらの情報は、HCV の持続感染を阻止するための方策を考える上で新たな切り口を与えると考えられる。

(3) リポタンパク質の産生はウイルス粒子の産生に重要である。

リポタンパク質産生に重要な働きをする酵素、microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の活性阻害剤で処理すると、肝臓細胞からの VLDL の産生は強く抑制される。このときに Apo-B の培養上清への放出は Apo-E よりも強く抑制される。すなわち、低濃度の阻害剤で Apo-B の細胞外への放出が Apo-E よりも抑制された。これらの条件下で感染性 HCV の培養上清への放出は Apo-B の細胞外への放出と呼応して低下した。従って、Apo-B はウイルス粒子の細胞外放出に重要な働きを持つといえる。

さらに、Apo-E について調べた。既に Apo-E 産生をノックダウンさせた細胞からは感染性粒子の産生が阻害される事を見いだしている。MTP 阻害反応では、Apo-E の培養上清への放出低下が、Apo-B よりも高い濃度でしか見られないために、Apo-E 低下による HCV 放出効果が見にくい。そこで、Apo-E の機能を直接解析する方法を考えた。Apo-E は細胞内で産生され、一部は VLDL と会合して細胞外に放出されると考えられる。一方、VLDL の様なリポタンパク質と会合しない Apo-E はオリゴマーを形成して細胞の外に放出される。細胞の外に遊離されない Apo-E 変異体を用いて、ウイルス粒子の産生と細胞外への放出を調べた。小胞体貯留シグナルである 4 つのアミノ酸からなるペプチド (KDEL) を Apo-E 分子の C 端に付加すると、この Apo-E 変異分子 (Apo-E KDEL) は細胞の外に放出されなくなる。まず、細胞の内在性 Apo-E の産生が抑制されている細胞を樹立し、それに外来的に Apo-E KDEL を発現

するようにした。この細胞に HCV を感染させ感染性ウイルス粒子の産生を調べた。その結果、この細胞からの感染性ウイルスの産生は強く抑制された。この細胞から放出されるウイルス粒子の量をコアで調べると粒子の量には大きな差が認められない。以上から、感染性を示す粒子の産生が特異的に抑制される事が明らかになった。一方、細胞内の感染性粒子を調べると、野生型の Apo-E を放出する細胞に比べ、高濃度の感染性ウイルス粒子が存在した。この事から、Apo-E が細胞外に放出されないために、感染性粒子として細胞外に放出されないと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

(全て査読有り)

1. HH. Aly, Y. Qi, K. Atsuzawa, N. Usuda, Y. Takada, M. Mizokami, K. Shimotohno, M. Hijikata Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology*. 50(3): 689-696. 2009
2. K. Ogawa, T. Hishiki, Y. Shimizu, K. Funami, K. Sugiyama, Y. Miyanari, K. Shimotohno. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 85(7): 217-28, 2009
3. K. Goto, K. Watashi, D. Inoue, M. Hijikata, K. Shimotohno. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci*. 100(10): 1943-1950, 2009
4. M. Okamoto, M. Sakai, Y. Goto, MT. Salim, C. Baba, K. Goto, K. Watashi, K. Shimotohno, Baba M Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. *Antivir Chem Chemother*. 20(1): 47-54, 2009.
5. M. Ikejiri, T. Ohshima, A. Fukushima, K. Shimotohno, T. Maruyama. Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 18(16):4638-4641, 2008.
6. J. Zhang, O. Yamada, K. Kawagishi, H. Araki, S. Yamaoka, T. Hattori, K. Shimotohno. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology*. 379(2):306-313, 2008.
7. O. Isono, T. Ohshima, Y. Saeki, J. Matsumoto, M. Hijikata, K. Tanaka, K. Shimotohno. Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J Biol Chem*. 283(49):34273-34282, 2008.
8. K. Arimoto, H. Takahashi, T. Hishiki, H. Konishi, T. Fujita, and K. Shimotohno, Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7500-7505, 2007
9. MA. El-Farrash, HH. Aly, K. Watashi, M. Hijikata, H. Egawa, and K. Shimotohno. In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol*. 251(1) : 127-133, 2007
10. K. Watashi and K. Shimotohno. Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol*. 2007 in press
11. Y. Takao, A. Yamada, S. Yutani, H. Ono T. Takedatsu, K. Etoh, Y. Wang, S. Suzuki, T. Ide and K. Shimotohno, M. Sata and K. Itoh. Identification of new immunogenic peptides in conserved regions of hepatitis C virus (HCV) 1b with the potentiality to generate cytotoxic T lymphocytes in HCV1b(+) HLA-A24(+) patients. *Hepato Res*. 2007 37(3):186-195, 2007
12. J. Zhang, O. Yamada, H. Yoshida, T. Sakamoto, H. Araki and K. Shimotohno. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun*. 352(1):170-176, 2007
13. HH. Aly, K. Watashi, M. Hijikata, H. Kaneko, Y. Takada, H. Egawa, S. Uemoto and K. Shimotohno. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol*. 46(1):26-36, 2007.
14. H. Hamazaki, H. Takahashi and K. Shimotohno, N. Miyano-Kurosaki, H. Takaku. Inhibition of HCV replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25(7):801-805, 2006.

15. Y. Komohara, H. Yano, S. Shichijo, K. Shimotohno, K. Itoh and A. Yamada. High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol.* 37(8-9) : 327-332, 2006.
16. H. Hamazaki, S. Ujino, E. Abe, N. Miyano-Kurosaki, K. Shimotohno and H. Takaku. RNAi expression mediated inhibition of HCV replication. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 48:307-308, 2006.
17. K. Goto, K. Watashi, T. Murata, T. Hishiki, M. Hijikata and K. Shimotohno. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3) : 879-884, 2006.
18. H. Hamazaki, S. Ujino, N. Miyano-Kurosaki, K. Shimotohno and H. Takaku. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3) : 988-994, 2006.
19. T. Murata and K. Shimotohno. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Biol Chem.* 281(30) : 20788-20800, 2006.
20. T. Shimakami, M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko and S. Murakami. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* 80 : 3332-3340, 2006
21. K. Naka, K. Abe, K. Takemoto, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 : 869-878, 2006
22. N. Ishii, K. Watashi, T. Hishiki, K. Goto, D. Inoue, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato and K. Shimotohno. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.
23. H. Hamazaki, S. Ujino, N. Miyano-Kurosaki, K. Shimotohno and H. Takaku. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.
24. Y. Murakami, T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue and K. Shimotohno. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 25 : 2537-2545, 2005,
25. K. Sudo, K. Yamaji, K. Kawamura, T. Nishijima, N. Kojima, Aibe K and K. Shimotohno and Y. Shimizu. High-throughput screening of low molecular weight NS3-NS4A protease inhibitors using a fluorescence resonance energy transfer substrate. *Antivir Chem Chemother.* 16:385-392, 2005.
26. J. Zhang, O. Yamada, T. Sakamoto, H. Yoshida, H. Araki, T. Murata and K. Shimotohno. Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region. *Virology.* 342:276-285, 2005
27. K. Watashi, N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari and K. Shimotohno. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19 : 111-122, 2005.
28. T. Murata, M. Hijikata and K. Shimotohno. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology.* 340 : 105-115, 2005.
29. K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J Gen Virol.* 86: 2787-2792, 2005.
30. T. Murata, T. Ohshima, M. Yamaji, M. Hosaka, Y. Miyanari, M. Hijikata and K. Shimotohno. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology.* 331:407-417, 2005.
31. N. Kato, T. Nakamura, H. Dansako, K. Namba, K. Abe, A. Nozaki, K. Naka, M. Ikeda and K. Shimotohno. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J Gen Virol.* 86:645-656, 2005.
32. Y. Obata, K. Yamamoto, M. Miyazaki, K. Shimotohno, S. Kohno and T. Matsuyama. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol*

- Chem. 280:18355-18360, 2005
33. H. Takahashi, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Kishine, M. Hijikata and K. Shimotohno. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. Intervirology. 48 : 104-111, 2005.
 34. J. Zhang, O. Yamada, T. Sakamoto, H. Yoshida, H. Araki and K. Shimotohno. Exploiting cis-Acting Replication Elements To Direct Hepatitis C Virus-Dependent Transgene Expression. J Virol. 79:5923-5932, 2005.

[学会発表] (計 3件)

1. Sugiyama K. and Shimotohno K. et al., Genetic analysis of HCV with defective genome and its infectivity in vitro. The 16th Int. Symp. On HCV and related viruses. Oct. 3-7, 2009, Nice, France
2. Shimizu Y. Shimotohno K. et al., Lipoproteins are involved in infectivity of the HCV particles. The 16th Int. Symp. On HCV and related viruses. Oct. 3-7, 2009, Nice, France
3. Hishiki T, Shimotohno K. et al., Apolipoprotein E is essential for infectivity of HCV. The 16th Int. Symp. On HCV and related viruses. Oct. 3-7, 2009, Nice, France

[図書] (計 3件)

1. 下遠野 邦忠 「HCV複製のメカニズム」 Medical Practice (文光社) 27: 107-109, 2010
2. 宮成 悠介、臼田 信光、土方 誠、下遠野 邦忠 「C型肝炎ウイルスの生活環と発がん」 化学と生物 (日本農芸学会) 826-831 ページ、2008
3. 宮成 悠介、臼田 信光、下遠野 邦忠 「C型肝炎ウイルスの増殖戦略」 蛋白質核酸酵素 (共立出版株式会社) 666-672 ページ、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下遠野 邦忠 (SHIMOTOHNO KUNITADA)
千葉工業大学 附属総合研究所 教授
研究者番号 : 10000259