

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790778

研究課題名（和文）次世代シーケンサを用いたHCV感染に関連する宿主遺伝子・シグナル経路の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis on genes and molecular pathways in host cells associated with Hepatitis C virus infection using next-generation sequencing technology

研究代表者

櫻井 幸（SAKURAI YUKI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70547455

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス(HCV)感染・増殖ライフサイクルに関連する宿主シグナル経路を明らかにすることを目的に研究を行った。宿主細胞のマイクロアレイ解析及び階層的クラスタ解析を行い、HCVレプリコン高発現細胞では脂質関連経路の発現亢進を認めた。さらに、HCV-NS4B蛋白と自然免疫系シグナル分子の相互作用の解析により、NS4BとSTINGが直接結合し、STINGを介したIFN発現誘導を抑制していることを示した。以上の結果は、新たなウイルス・宿主相互作用機序を明らかにし、将来的な新規クラス抗HCV薬の開発に重要な知見を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research project is to clarify the molecular pathways in host cells related to life cycle of Hepatitis C virus (HCV) infection, including entry and replication of HCV. Comprehensive microarray analysis and hierarchical clustering of gene expression data revealed that the expressions of genes related to molecular pathways of lipid metabolism are significantly increased in host cells expressing HCV replicon. Furthermore, analysis on the interaction between HCV-NS4B protein and cellular interferon (IFN)-mediated antiviral signaling clarified that NS4B specifically binds STING, and that NS4B suppresses STING-mediated IFN production. These results showed that we explored the new interaction between HCV and host signal protein related to HCV replication. Disruption of that interaction could constitute a novel therapeutic strategy for the eradication of HCV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス、包括的解析、pathway解析、宿主・ウイルス相互作用、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

国内に約 150 万人の慢性感染者が存在する HCV は、最新の治療を用いても現行治療の無効例に対する有効率は 4 割に満たず、将来に渡り多くの症例が非代償性肝不全・肝癌に発展する。従って、HCV 持続感染・肝障害発症の分子機構の解明および新たな抗ウイルス療法の開発が急務である。HCV 感染・増殖は様々な宿主蛋白との相互作用を示すことがわかっており、現在まで自然免疫応答に影響を及ぼす蛋白（インターフェロン・インターフェロン誘導遺伝子・RIG-I・TLRs など）、細胞増殖関連蛋白、分子シャペロンなどとの相互作用について報告されている。これらの遺伝子発現を包括的に検出・解析する手法として、従来 DNA マイクロアレイ法が標準的手法として使用されているが、発現レベルの低い多くの遺伝子の解析は不可能である。近年、次世代シーケンサが開発され、ほぼ全遺伝子の発現解析が安定して行えるようになった。

2. 研究の目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染・増殖ライフサイクルに関連する宿主蛋白、代謝・シグナル経路を明らかにするため、申請者の研究室で独自に開発した HCV 増殖・培養細胞系を用いて、DNA チップ法、および次世代シーケンサ技術により、発現遺伝子の包括的解析、pathway 解析を行い、増殖に関連する宿主代謝・シグナル経路を解析する。得られた結果を基に HCV 増殖制御に関連する宿主・ウイルス蛋白の相互作用を明らかとし、新たな抗ウイルス療法開発の基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛍光蛋白発現レプリコン細胞の構築、DNA マイクロアレイ解析、次世代シーケンサ解析：HCV-1b および 2a replicon プラスミドのネオマイシン (Neo) 遺伝子を、yellow fluorescent protein (YFP) と Neo を融合させたキメラ遺伝子(Yeo)に置換した後、Huh7細胞に導入して、Yeo replicon恒常発現細胞を構築した。またセルソーターを用いてYeo replicon 高発現細胞の選別を行い、これらにIFN を投与

することにより replicon を除去し、cured /Huh7 細胞 (cHuh7) を作製した。このようにして得られた 1b, 2a-Yeo replicon 高発現細胞、cured-1b, -2a 細胞、親株 Huh7 細胞の各々から total RNA を抽出後、Gene Chip を用いたマイクロアレイ解析、およびそのデータを元に階層的クラスタ解析を行った。また、発現差の見られた遺伝子間における分子間反応やパスウェイについて検討するために、KEGG Pathway データベースに登録されているパスウェイ上への遺伝子発現変動のマッピングを行った。また、次世代シーケンサでの解析を行った。

(2) HCV-NS4B truncated plasmid の作成、発現解析：構築した欠失 NS4B プラスミドを Cardif または STING 発現プラスミド共に Huh7 細胞で強制発現させ、INF- β プロモーター・リポーター、および ISRE-リポータープラスミドを用いて IFN 発現シグナルレベルを定量し、IFN 発現系抑制の責任分子、及びそのドメイン、相互作用する宿主蛋白を検討した。

(3) HCV-NS4B と Cardif, STING の免疫染色：NS4B は 5 カ所の膜貫通ドメインを持ち小胞体膜に局在する。一方、Cardif は C 末端の膜貫通ドメインでミトコンドリア外膜にアンカーしている事が報告されている。これらの蛋白の相互作用を確認するため、それぞれ局在をと小胞体膜との位置関係を解析するべく共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫蛍光染色による解析を行った。

(4) HCV-NS4B と Cardif, STING の BiFC アッセイ、免疫沈降：Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法とは、結合能を調べようとする 2 つの蛋白質のそれぞれと、N 末側半分と C 末側半分に分割した YFP の間で融合蛋白質を作成し、2 つの蛋白質が結合する場合に YFP の立体構造が再生され、蛍光が観察されるという、原理に基づくものである。この手法を用いて申請者は HCV-NS4B と Cardif 及び STING との相互作用の解析を行い、解析した。また免疫沈降法による解析を行った。

(5) HCV 増殖に関連する宿主肝細胞の micro RNA 発現の包括的解析：HCV 増殖に関連する宿主肝細胞の micro RNA (miRNA) を標的とした anti-micro RNA (antagomir) を探索し、

Vitamin E、コレステロールをはじめとする化学修飾を施したantagomirを作成、それらのウイルス増殖に与える効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 蛍光蛋白発現レプリコン細胞の構築、DNAマイクロアレイ解析、次世代シーケンサ解析：genotype 1b, 2aのHCV-replicon高発現Huh7細胞、これをIFN処理で除去したcured-1b, -2a Huh7細胞、親株Huh7細胞の各々からtotal RNAを抽出後、Gene Chip (Affymetrix)を用いたマイクロアレイ解析、および階層的クラスター解析を行った。その結果、1b, 2a-Yeo replicon高発現細胞では脂質関連経路の有意な発現亢進を認めた。また、次世代シーケンサ解析によっても同様の結果が得られた。このことは、脂質代謝の調節がウイルス複製過程と密接に関与することを示していた。この結果をもとに、レプリコン細胞を用いて化学的多様性のある低分子化合物のスクリーニングを行い、N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine化合物がHCV増殖を抑制することを見いだした (*Antimicrob Agent Chemother*, 2012)。

(2) HCV-NS4B truncated plasmidの作成、発現解析、HCV-NS4BとCardif, STINGの免疫染色：構築した欠失NS4BプラスミドをCardif, RIG-I, STING発現プラスミドと共に強制発現させ、IFN-β発現系抑制の責任分子、及びそのドメイン、相互作用する宿主蛋白について解析した。その結果、Cardifにより誘導されるIFN-β産生誘導は、HCV-NS3/4A蛋白とNS4B蛋白の双方で抑制を受けること、STINGにより誘導されるIFNβ産生誘導は、HCV-NS3/4A蛋白では抑制されないが、NS4B蛋白で特異的に抑制を受けることが示された。さらに、NS4BのN末端側にIFN-βプロモーター・リポーターの活性と相関する部位が存在することが明らかとなった。

(3) HCV-NS4BとCardif, STINGの免疫染色：HCV-NS4BとCardif, STINGの相互作用を確認するため、それぞれの局在と小胞体膜との位置関係を解析するべく強制発現細胞における免疫蛍光染色を行った。その結果、HCV-NS4BとSTINGが極めて近傍に存在するのに比して、

NS4BとCardifは一致する部分と一致しない部分があることが示された。

(4) HCV-NS4BとCardifのBiFC assay：生細胞を用いてタンパク質-タンパク質相互作用の時間的・空間的な変化を可視化できるBiFC assayを用いて、HCV-NS4BとSTINGの相互作用の解析を目的に、BiFC assayを行った。免疫沈降法との結果も併せ、HCV-NS4BとSTINGは直接結合しうること、NS4BとCardifの結合は不安定で有り、むしろCardifとSTINGの結合によるシグナル伝達を、NS4Bは干渉する形で結合して阻害し、IFN-β発現誘導を抑制していることを明らかにし、発表した (*Hepatology*, 2013)。

(5) HCV 増殖に関連する宿主肝細胞のmicro RNA 発現の包括的解析：HCV 増殖に関連する宿主肝細胞のmicro RNA (miRNA)を標的としたanti-micro RNA(antagomir)を探索し、Vitamin E、コレステロールをはじめとする化学修飾を施したantagomirを作成、それらのウイルス増殖に与える効果を検証した。その結果、ウイルス増殖に影響を与える特異的なantagomirの同定には至らなかったものの、得られた結果を次年度以降に、研究協力者とともにさらに解析することを計画している。

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9件)

1. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57:46-58, 2013. 査読有 DOI:10.1002/hep.26017
2. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka I, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M,

- Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 7(1): 153-161, 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s12072-012-9363-6
3. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carbonyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother*; 56(3):1315-23, 2012. 査読有 DOI:10.1128/AAC.05764-11
 4. Suzuki Y, Ohtake T, Nishiguchi S, Hashimoto E, Aoyagi Y, Onji M, Kohgo Y; The Japan Non-B, Non-C Liver Cirrhosis Study Group (Goto T, Ohnishi H, Maeda S, Saito Y, Nakajima S, Abe M, Okada M, Haneda M, Hosoki T, Hasebe C, Nakamoto S, Yokosuka O, Murohisa T, Hiraishi H, Utsunomiya T, Michitaka K, Tokumoto Y, Kanno Y, Ohira H, Hashizume H, Mori M, Sakamoto N, Aoki T, Kawata S, Kazuyuki Suzuki KK, Abe H, Aizawa Y, Kon K, Watanabe S, Deguchi A, Masaki T, Saito T, Tsutsumi M, Usui S, Hibi T, Yoshimaru Y, Sasaki Y, Kawaguchi T, Sata M, Morita A, Sugimoto R, Takei Y, Takahashi Y, Izumi N, Mori H, Wada S, Fujimoto M, Fukui H, Nozaki Y, Yanase M, Arakawa Y, Moriyama M, Hirano M, Kawai H, Doi T, Okuda T, Morikawa H, Kawada N, Oshita M, Miyatake H, Kim SK, Osaki Y, Nishiwaki M, Okanoue T, Inao M, Mochida S, Endo A, Nagasaka A, Nakajima T, Toyota J, Kimura T, Tanaka E, Mikami M, Takikawa H, Shida H, Tsuji K, Nishimura-Sakurai Y, Yara S, Matsuzaki Y, Tobari M, Oyama K, Murawaki Y, Enooku K, Koike K, Amemiya F, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H, Ishii R.) Survey of non-B, non-C liver cirrhosis in Japan. *Hepatol Res*. 2012 Dec 26. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23347437. 査読有 DOI:10.1111/hepr.12056
 5. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 16:1081-1091, 2011. 査読有 DOI:10.3851/IMP1864
 6. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Kato T, Wakita T, Watanabe M: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 41:258-269, 2011. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2010.00771.x
 7. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M, and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Medical Virol* 83:871-878, 2011. 査読有 DOI: 10.1002/jmv.22038
 8. 東 正新, 朝比奈 靖浩, 櫻井 幸, 吉野

耕平, 幾世橋 佳, 新田 沙由梨, 北詰 晶子, 村川 美也子, 中川 美奈, 柿沼 晴, 渡辺 守. 多血性肝細胞癌の検出能に関する Gd-EOB-DTPA 造影 MRI と CTAP/CTHA との比較検討: 医学と薬学 69 卷 1 号 Page64-66, 2013. 査読無

9. 新田 沙由梨, 坂本 直哉, 藤田 めぐみ, 柿沼 晴, 村川 美也子, 北詰 晶子, 幾世橋 佳, 船岡 祐介, 渡辺 貴子, 植山 真由美, 小野塚 泉, 櫻井 幸, 中川 美奈, 東 正新, 渡辺 守. HCV-NS4B 蛋白と IFN 発現系シグナル分子との分子間相互作用の解析: 消化器と免疫 48 号 Page174-177, 2012. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

1. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Mori, K, Nakagawa, M, Kakinuma S, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Matsumoto A, Hagiwara M, Asahina Y, Watanabe M: Antiviral effects and action mechanisms of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds against hepatitis C virus. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA.
2. Asahina Y, Murakawa M, Sakamoto N, Kakinuma S, Nakagawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe M: Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon in chronic hepatitis C patients. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA.
3. 北詰晶子, 坂本直哉, 奥野友紀子, 中川美奈, 柿沼晴, 幾世橋佳, 新田沙由梨, 村川美也子, 東正新, 櫻井幸, 萩原正敏, 渡辺守: 抗 HCV 活性を有する N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine 化合物の同定. JDDW 2012 第 16 回日本肝臓学会大会 2012 年 10 月 10 日 神

戸.

4. Murakawa M, Sakamoto N, Nakagawa M, Kawai F, Fuziki J, Otani S, Yamanaka H, Kitazume A, Nitta S, Watanabe T, Sakurai Y, Kakinuma S, Asahina Y, Watanabe M : Impaired induction of IL28B expression in PBMC is associated with null response to interferon therapy in chronic hepatitis C. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct-8-2012, Venice, Italy
5. 村川美也子, 坂本直哉, 中川美奈, 吉野耕平, 幾世橋佳, 北詰晶子, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 東正新, 柿沼晴, 渡辺守: インターフェロン λ 産生能および抗ウイルス治療効果に関わる IL28B 遺伝子多型(SNP)の機能解析. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 8 日 金沢
6. 櫻井幸, 中川美奈, 東 正新, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守: 非 B 非 C 肝硬変の肝発癌に関連する因子の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 金沢.
7. 東正新, 坂本直哉, 櫻井幸, 吉野耕平, 幾世橋佳, 新田沙由梨, 北詰晶子, 村川美也子, 中川美奈, 柿沼晴, 渡辺守: EOB-MRI および Angio-CT による多血性肝細胞癌に関する検討. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 金沢.
8. 東正新, 坂本直哉, 櫻井幸, 吉野耕平, 幾世橋佳, 新田沙由梨, 北詰晶子, 村川美也子, 中川美奈, 柿沼晴, 渡辺守: 肝細胞癌における EOB-DTPA 造影 MRI と Angio-CT の比較検討. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 19 日 東京.
9. Azuma S, Sakamoto N, Sakurai Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M: Treatment and outcomes for elderly patients with hepatocellular carcinoma. The 22nd Conference of the Asian Pacific

Association for the Study of the Liver,
Feb-18-2012, Taipei, Taiwan.

10. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62nd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA.
11. 櫻井幸, 中川美奈, 坂本直哉: 非 B 非 C 肝硬変の実態に関する検討. 第 15 回日本肝臓学会大会 2011 年 10.20 福岡.
12. 東正新, 坂本直哉, 櫻井幸, 吉野耕平, 幾世橋佳, 新田沙由梨, 北詰晶子, 村川美也子, 中川美奈, 柿沼晴, 渡辺守: 高齢者肝細胞癌患者に対する治療方法とその成績. 第 15 回日本肝臓学会大会 2011 年 10 月 20 日 福岡.
13. 櫻井幸, 中川美奈, 坂本直哉, 植山真由美, 筈島裕子, 東正新, 柿沼晴, 田中靖人, 溝上雅史, 渡辺守: C 型慢性肝炎の PEG-IFN α -2b/Ribavirin 併用療法における ITPA 遺伝子の臨床的意義. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011 年 6 月 3 日 東京.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 幸 (NISHIMURA-SAKURAI YUKI)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 70547455

(2)分担研究者

なし

(3)連携研究者

なし