

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04736

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの病原性発現に關与するシグナルペプチドペプチダーゼの機能解析

研究課題名(英文) Characterization of SPP involved in pathogenesis of HCV

研究代表者

松浦 善治 (Matsuura, Yoshiharu)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：50157252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにC型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白質の成熟に宿主のシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)が必須であることを報告している。本研究ではSPPと相同性が高いガンマセクレターゼ阻害剤の中からSPPに対して阻害効果のある化合物を検索し、化合物のジベンゾアゼピン構造がSPPの223番目のバリオンと相互作用することにより高い阻害活性を示すことを明らかにした。SPP阻害剤は全ての遺伝子型のHCVコア蛋白質の成熟を阻害し、SPP阻害剤の存在下で継代しても耐性ウイルスは出現しなかった。本研究により、SPPは慢性C型肝炎治療薬の新しい創薬標的となり得ることを提案できた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the maturation of core protein of hepatitis C virus (HCV) by the cleavage with signal peptide peptidase (SPP) is essential for propagation of HCV. In this study, we examined the inhibitory activity of inhibitors for  $\gamma$ -secretase, another intramembrane cleaving protease, to SPP and revealed that interaction of Val223 in SPP with dibenzoazepine structure in the  $\gamma$ -secretase inhibitors is critical for inhibition of SPP. Treatment with SPP suppressed maturation of HCV core proteins of all genotypes of HCV and did not induce emergence of drug-resistant viruses. These results suggest that SPP is an ideal target for the development of therapeutics against chronic hepatitis C.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SPP HCV

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における癌死の第4位は肝癌で、その約8割がHCV感染に起因しており、毎年約3万人が肝癌で死亡している。ウイルスRNAが自立増殖するレプリコン細胞や培養細胞で増殖可能な実験室株が開発され、HCVの感染増殖機構の解析は進展し、有効な治療薬も開発され、8割以上のC型肝炎患者からウイルスを排除できるようになってきた。しかしながら、耐性ウイルスの出現だけでなく、ウイルス排除後の発癌も年齢とともに増加していることから、治療後の発癌予防対策が今後ますます重要となっている。さらに、患者で増殖しているHCVの培養系は未だ確立されておらず、また、HCVに感受性を示す実験動物も限られ、HCV感染による病原性の発現機構は、未だ多くの謎に包まれたままである。

HCVの持続感染による肝臓の慢性的な炎症によって繰り返される細胞死と再生による遺伝子異常の蓄積が、肝癌発症の原因の一つと考えられているが、激しい慢性肝炎像を呈する自己免疫性肝炎による肝発癌は希である。したがって、慢性的な炎症による遺伝子異常の蓄積だけではなく、HCVの構成因子が肝発癌に直接関与しているものと推測されている。HCV蛋白質を発現するトランスジェニックマウスの成績から、HCV粒子を構成するコア蛋白質がHCV感染による肝病変の発症に関与していると考えられている。

脂肪酸や中性脂肪は脂肪滴の構成因子であり、脂肪滴の蓄積が脂肪肝の原因である。コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスは高率に脂肪肝を発症し、16ヶ月齢以降になると肝細胞癌が認められる。これまでに我々は、コア蛋白質の一部が核へ移行し、プロテアソーム活性化因子PA28 $\gamma$ 依存的に分解されることが、粒子産生を亢進させ、さらに、脂肪肝や肝細胞癌の発症に関与していることを報告している。HCVコア蛋白質は、前駆体蛋白質からシグナルペプチダーゼによ

って切断された後、さらに、SPPによって切断されて成熟する。しかしながら、HCVコア蛋白質の病原性発現の分子機構は未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は血液や血液製剤を介して感染し、10~30年の長期に渡る持続感染の後に、脂肪肝や肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。しかしながら、HCV感染による病原性の発現機構は未だ多くの謎に包まれたままである。HCV粒子を構成するコア蛋白質は、ウイルスゲノムから直接翻訳された巨大な前駆体蛋白質から、シグナルペプチダーゼによって切断された後、ERに存在し9回膜を貫通するシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によってさらに切断されて成熟する。また、HCVのコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスはインスリン抵抗性、脂肪肝、肝細胞癌を発症することから、HCV感染による病原性発現に、コア蛋白質が中心的な役割を演じていることが示唆されている。

本研究では、HCVの病原性発現における、SPPによるコア蛋白質の切断のウイルス学的意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

肝臓特異的にSPPを欠損させたマウスを作製し、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝細胞癌発症状況を検討する。また、SPP遺伝子を欠損させたマウス繊維芽細胞とヒト肝細胞株を用いて、SPP欠損環境におけるコア蛋白質の分解機構を明らかにする。SPPと酵素活性中心が類似している $\gamma$ セクレターゼ阻害剤を用いて、HCVコア蛋白質を発現するマウスで観察される、インスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症に及ぼす効果を検討する。

#### 1. 肝臓特異的 SPP 欠損マウスの作製

SPP欠損マウスは胎生期13.5日で死亡するこ

とをすでに申請者は明らかにしており（右図）、肝臓特異的 SPP 欠損マウス(Alb-Cre SPP<sup>flox/flox</sup>)を作製する。さらに、CoreTg マウスと SPP 欠損マウスを交配し、肝臓特異的に SPP を欠損させた CoreTg マウス (CoreTg Alb-Cre SPP<sup>flox/flox</sup>)を作製し、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝細胞癌の発症状況を検討する。

#### 2. SPP 欠損細胞におけるコア蛋白質の分解機構の解析

SPP 欠損マウス胎児の繊維芽細胞(MEF)だけでなく、CRISPR/Cas9 システムを用いて、SPP 遺伝子を欠損させたヒト肝癌細胞株(Huh7)を樹立した。SPP 欠損細胞にコア蛋白質を発現させると、コア蛋白質の発現が検出できなかった（下図）。SPP 欠損細胞ではコア蛋白質は速やかにプロテアソームで分解されることが明らかとなった。そこで、SPP 欠損細胞におけるコア蛋白質分解機構を解明するため、これまでに報告されているコア蛋白質の分解に關与する宿主因子である、PA28 $\gamma$ や、E3 ライゲースの E6-associated protein (E6AP)の欠損細胞株を樹立し、それらの関与を明らかにする。

3. SPP 阻害剤による HCV 複製と病原性発現への影響 : SPP は $\gamma$ -セクレターゼと酵素の活性中心が類似しており、 $\gamma$ -セクレターゼの阻害剤である LY-411575 は SPP のプロテアーゼ活性を阻害することが知られている。HCV コアタンパク質を発現させた細胞に、LY-411575 を処理すると顕著にコア蛋白質の発現量が減少した（下図）。さらに、CoreTg マウスに LY-411575 を経口投与すると、肝細胞におけるコア蛋白質の減少が確認された。そこで、CoreTg マウスで観察されるインスリン抵抗性や脂肪肝の発症に及ぼす、LY-411575 の影響を検討する。

#### 4. SPP 欠損細胞におけるコア蛋白質の分解機構の解析

SPP 欠損細胞におけるコアタンパク質分解機構を解明するため、PA28 $\gamma$ や E6AP 等プロテ

アソーム分解系以外に、ER-associated degradation (ERAD)経路に關与する E3 ライゲースを、RNAi スクリーニングで検索し、ヒットした新規 E3 ライゲース欠損細胞を SPP 欠損細胞で作製し詳細に解析する。

#### 5. SPP 阻害剤による HCV 複製と病原性発現への影響

$\gamma$ -セクレターゼの阻害剤である LY-411575 は SPP のプロテアーゼ活性を阻害することが知られている。前述の様に、HCV コア蛋白質を発現させた細胞に、LY-411575 を処理すると顕著にコア蛋白質の発現量が減少した。さらに、CoreTg マウスに LY-411575 を経口投与すると、肝細胞のコアタンパク質が減少する。そこで、CoreTg マウスで観察されるインスリン抵抗性や脂肪肝の発症に及ぼす、LY-411575 の影響を検討する。

#### 4 . 研究成果

本研究では SPP のプロテアーゼ活性を阻害できる薬剤を探索し、その相互作用部位の同定と HCV 増殖における SPP 阻害剤の有効性を評価した。SPP と相同性が高いことが報告されているガンマセクレターゼの阻害剤の中から SPP に対して阻害効果のある化合物を同定し、SPP 阻害剤処理により、HCV の全ての遺伝子型のコア蛋白質の成熟化を阻害することができ、SPP 阻害剤による耐性ウイルスの出現がないことを明らかにした。

次に SPP 阻害剤と SPP との相互作用部位を検討するため、SPP の 3 次元立体構造を in silico で構築し、SPP 阻害剤との相互作用部位の予測を行うことで、SPP の 223 番目バリント、258 番目のフェニルアラニンが SPP 阻害剤との相互作用に關与していることを明らかにした。

（結語）本研究により、ガンマセクレターゼ阻害剤の 1 部に SPP を阻害できる化合

物が含まれていることを明らかにすることができ、SPP 阻害剤は薬剤耐性ウイルスを出現させることなく、世界に分布しているすべての種類の HCV に効果があることを示すことができた。

ガンマセクレターゼ阻害剤は古くから臨床試験が行われており、PhaseIII に到達した化合物もある。したがって、このような化合物をリード化合物とし、SPP に特異的な阻害剤を開発することは広範囲な HCV 感染症に有効であると考えられる。本研究で明らかにした SPP とその阻害剤との 3 次元立体構造の情報を元に SPP に特異的に作用する低分子化合物を作製すれば、慢性 C 型肝炎に効果のある治療薬の開発が可能であることを提案できた。

## 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 5 件 )

Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, Ono C, Mori H, Sato A, Fauzyah Y, Okamoto T, Kurosu T, Setoh YX, Imamura M, Tautz N6 Sakoda Y, Khromykh AA, Chayama K, Matsuura Y, Characterization of recombinant Flaviviridae viruses possessing a small reporter-tag, *Journal of Virology*, 査読有, 92巻, 2018, 1-19, DOI:10.1128/JVI.01582-17

Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, Matsuura Y, Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection, *Viruses*, 査読有, 9巻, 2017, 243~243, DOI: 10.3390/v9090243

Hirano J, Okamoto T, Sugiyama Y, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Fukuhara T, Sasai M, Tougan T, Matsunaga Y, Yamashita K, Sakai Y, Yamamoto M, Horii T, Standley D,

Moriishi K, Moriya K, Koike K, Matsuura Y, Characterization of SPP inhibitors suppressing propagation of HCV and protozoa, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 114巻, 2017, E10782~E10791, DOI: 10.1073/pnas.1712484114

Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, Tamura T, Mori H, Sato A, Uemura K, Fauzyah Y, Kurihara T, Suda T, Nishino A, Hmwe SS, Okamoto T, Tatsumi T, Takehara T, Chayama K, Wakita T, Koike K, Matsuura Y, Characterization of miR-122-independent propagation of HCV, *PLoS Pathogens*, 査読有, 13巻, 2017, e1006374, DOI: 10.1371/journal.ppat.1006374

Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Shiokawa M, Mori H, Uemura K, Yamamoto S, Kurihara T, Okamoto T, Suzuki R, Yoshii K, Kurosu T, Igarashi M, Aoki H, Sakoda Y, Matsuura Y, Host-derived apolipoproteins play comparable roles with viral secretory proteins Erns and NS1 in the infectious particle formation of Flaviviridae, *PLoS Pathogens*, 査読有, 13巻, 2017, e1006475, DOI:10.1371/journal.ppat.1006475

[ 学会発表 ] ( 計 11 件 )

松浦善治、福原崇介、岡本 徹 C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子北 大部局横断シンポジウム, 第2回北大部局横断シンポジウム「免疫・癌・感染」(招待講演) 2017年

Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Hiroyuki Mori, Takeshi Kurihara, Asuka Sato, Kentaro Uemura, Toru Okamoto, Hiroshi Aoki, Yoshihiro Sakoda, Yoshiharu Matsuura, Viral secretory proteins Erns and NS1 play

comparable roles with apolipoproteins in the infectious particle formation of Flaviviridae, The American Society for Virology (ASV), the 36th Annual Meeting (国際学会) 2017

Tomokazu Tamura, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Hiroyuki Mori, Takeshi Kurihara, Toru Okamoto, Takeshi Kurosu, Norbert Tautz, Yoshihiro Sakoda, Yoshiharu Matsuura  
Characterization of Flaviviridae viruses possessing a reporter gene, The American Society for Virology (ASV), the 36th Annual Meeting (国際学会) 2017

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, Kazuaki Chayama, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura,  
Characterization of miR-122-independent propagation of HCV, 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム (国際学会) 2017

Tomokazu Tamura, Takasuke Fukuhara, Takuro Uchida, Chikako Ono, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, Takeshi Kurosu, Norbert Tautz, Yoshihiro Sakoda, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura,  
Characterization of recombinant Flaviviridae viruses possessing a small reporter-tag, 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム (国際学会) 2017年

Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Satomi Yamamoto Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Shinya Yamada, Toru Okamoto, Hiroshi Aoki, Yoshihiro Sakoda, Yoshiharu Matsuura, Viral secretory glycoproteins of Pestivirus and Flavivirus have similar roles with exchangeable apolipoproteins on the formation of infectious HCV particles, 24th International Symposium

on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会) 2017年

Tomokazu Tamura, Takasuke Fukuhara, Akatuski Saito, Takuro Uchida, Chikako Ono, Hiroyuki Mori, Toru Okamoto, Takeshi Kurosu, Norbert Tautz, Yoshihiro Sakoda, Tatuso Shioda, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, Engineering of Small Reporter-Tagged Flaviviridae Viruses Applicable to Antiviral Screening and in vivo Dynamics, 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会) 2017年

Fukuhara Takasuke, Tamura Tomokazu, Matsuura Yoshiharu  
Viral secretory glycoproteins Erns and NS1 play comparable roles with apolipoproteins in infectious particle formation of Flaviviridae, 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, Kazuaki Chayama, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura,  
Involvement of other miRNA on the propagation of HCV in miR-1-deficient cells, 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Tomokazu Tamura, Takasuke Fukuhara, Takuro Uchida, Chikako Ono, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, Takeshi Kurosu, Norbert Tautz, Yoshihiro Sakoda, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura,  
Engineering of small reporter-tagged Flaviviridae viruses applicable to antiviral screening and in vivo dynamics, 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Hiroyuki Mori, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Tomokazu Tamura, Asuka Sato, Yuzy

Fauzyah, Shinya Yamada, Toru Okamoto,  
Masami Wada, Takeshi Noda, Tamotsu  
Yoshimori, Yoshiharu Matsuura,  
Characterization of selective autophagy  
induced by HCV RNA replication, 第65回日  
本ウイルス学会学術集会 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-yoshi.biken.osaka-u.ac.jp/publication/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA Yoshiharu)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：50157252

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者

岡本 徹 (OKAMOTO Toru)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80628595

福原 崇介(FUKUHARA Takasuke)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：70598739

### (4)研究協力者 なし