

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08495

研究課題名(和文) アラキドン酸カスケードによる感染性C型肝炎ウイルス粒子形成制御機構の解析

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of infectious particle formation of hepatitis C virus by arachidonic acid cascade

研究代表者

土方 誠 (Hijikata, Makoto)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90202275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アラキドン酸カスケード中のトロンボキサン合成酵素(TXAS)阻害剤OxagrelによるC型肝炎ウイルス(HCV)感染性粒子産生抑制の分子機構について解析をおこなった。Oxagrel処理で発現変化する遺伝子をマイクロアレイ法やCAGE法により網羅的な解析をおこなったが有意な結果は得られなかった。その代謝産物の変化の網羅的解析をおこなった。その結果として、炭素鎖長6の脂肪酸Hexanoic acid(HA)がOxagrel処理によって、対照に比べて著しく低下していた。現時点では、感染性HCV粒子産生との関連は不明であるが、このようなHA量の変化の現象はあらたな発見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Molecular Mechanisms for the inhibition of infectious hepatitis C virus particle formation by thromboxane A2 synthase inhibitor, Oxagrel, was examined in detail by several techniques. Microarray and CAGE analyses have showed no informative result. Metabolite study, however, showed that the reduction of hexanoic acid (HA), a fatty acid with pentatonic carbon chain, was caused in the cells treated with Oxagrel. The contribution of HA to the infectious HCV particle formation was not cleared yet. It seemed to be a novel finding that the amount of HA in the cells was changed by TXAS inhibitor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 感染性粒子産生 アラキドン酸カスケード トロンボキサン合成酵素 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

近年、C型肝炎ウイルス(HCV)の治療法では直接 HCV タンパク質の機能を抑制する薬剤(DAA)が開発され、著効率がほぼ 100%となってきた。しかしながら、HCV は多様であり、また高変異性を有するため、そうした薬剤に対する抵抗性を有するウイルスの出現が認められている。その解決法としては、異なる作用機序を持つ複数の薬剤の同時投与による治療法がある。しかしながら、慢性肝炎患者血中には、たとえ未治療の場合においても、DAA に対して抵抗性を示す変異を有する HCV 株が、既に患者血に存在する場合がある。一方、HCV の生活環と関連する宿主因子を抑制する抗 HCV 薬剤は、抵抗性株の出現率が著しく低いことが知られている。そこで、こうした薬剤の併用が解決法のひとつとして考えられる。DAA が標的としている HCV ゲノム複製とは異なる HCV 増殖過程はそのような薬剤の標的となることが考えられる。HCV のゲノム複製機構については近年詳細な解析が進められている。しかしながら HCV の感染性粒子産生機構についての詳細は不明な点が多い。これまでに我々は感染性 HCV 粒子産生機構について解析し、以下の点を明らかにしてきた。2005 年に脇田らによって開発された感染性組換え体 HCV 産生培養細胞系を用いて、感染性を有する HCV が細胞内の脂肪滴周囲に存在する脂肪滴結合膜構造で産生されることが示した。また、ショ糖密度勾配超遠心法によって、この培養細胞から産生される HCV 粒子の浮遊密度を解析し、浮遊密度 1.12 g/ml を示す感染性粒子と浮遊密度 1.15 g/ml を示す非感染性粒子の二種類 HCV 粒子が存在することを示した。また変異体組換え体 HCV を用いた解析から浮遊密度の低い方の感染性粒子は脂肪滴周囲で産生されるが浮遊密度の高い方の粒子は脂肪滴とは関係がないことを示した。しかしながら、HCV 粒子の感染性の実体は不明である。2. 感染性 HCV

粒子産生に関わる細胞因子としてアラキドン酸カスケードに含まれるトロンボキサン合成酵素(TXAS)を同定した。これは TXAS 阻害剤(Ozagrel など)で組換え体 HCV 粒子を産生している培養細胞を処理すると、細胞内における HCV ゲノム複製や細胞外への粒子産生には大きな影響を与えないが、産生された粒子の感染性が著しく低下したことから推定された。粒子の浮遊密度の解析から、Ozagrel 処理細胞から産生される粒子には感染性を有する粒子が減少していることがわかった。また、Ozagrel 処理細胞と未処理細胞から総脂質を回収し、それらの細胞間においてリポドミクス解析を行ったところ、アラキドン酸カスケード上流に存在する各種脂肪酸を含めて大きな変化は認められなかった。HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた動物実験においても Ozagrel に加えて、TXA2 と相反する生理機能を有することが知られるプロスタグランジン I₂(PI₂)の受容体 IP₂ の活性化剤を用いて、このシグナルを活性化することによっても同様の効果を示すことから、HCV 粒子の感染性の形成は TXA₂ と PI₂ によって制御されている細胞因子が関与していることが考えられた。しかしながら、この TXAS 阻害剤の効果は、用いた培養細胞に TXA₂ 受容体(TP)の発現が認められなかったこと、そしてこの細胞では IP₂ を介したシグナル系が欠損していたことから、既知の TP を介したのではないことがわかった。以上のように、これらの現象を引き起こす細胞内のシグナル系や遺伝子発現など、感染性 HCV 粒子産生に関わる詳細な分子機構については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、TP が発現していないことが確認されている培養細胞 HuH-7 細胞を TXAS 阻害剤で処理し、その細胞内でどのような遺伝子発現の変化するのか、そして細胞の生理的な

変化が誘導されるのかを解析し、その情報を元に TP 非依存的 TXA₂ シグナル系が存在するかを明らかにする、あるいは新たな TP を同定することを目指した。また、次に、そのシグナル系の中で HCV 感染性粒子産生に関わる因子を明らかにして、Ozagrel 処理によって影響を受ける未知の感染性 HCV 粒子産生機構の解明ならびに、これまで不明であった HCV 粒子の感染性を規定している分子的基盤を解明することを目指した。

3 . 研究の方法

感染性組換え体 HCV 産生系で用いている肝がん由来細胞 HuH-7 細胞を TXAS 阻害剤 Ozagrel で処理未処理の条件で培養し、それぞれの細胞について、マイクロアレイ解析を用いて、その遺伝子発現プロファイルの解析をおこなった。また、CAGE 解析をおこない、転写開始点異なる遺伝子産物の発現量の比較もおこなった。さらに全細胞からの代謝産物を回収して、その網羅的解析であるメタボローム解析をおこなった。以上の解析結果から TXAS 阻害剤処理によって変化するシグナル系および発現が変化する下流遺伝子ならびに変化する代謝産物を同定し、その結果をもとに新たな TP を同定を試みた。まず、コンピューター解析法を用いたインシリコにおけるデータ解析をおこなった。さらに siRNA 等を用いて、そのシグナルによって誘導される遺伝子の中から感染性 HCV 産生に関与する遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目指した。また、感染性組換え体 HCV を感染させた Huh-7.5 細胞を TXAS 阻害剤存在下において長期継代培養し、感染伝播の抑制が認められない TXAS 阻害剤抵抗性株の作出を試みた。この抵抗性株のゲノム構造の決定から、変異を同定し、リバーシジェネティクス法によって抵抗性責任領域を同定を試みた。野生型と変異型の抵抗性領域に相互作用する細胞因子候補分子を選択し、この因子と

上記シグナルの関連性を検証し、全体的な分子機構の解明をおこなう予定でおこなった。

4 . 研究成果

1) 感染性組換え体 HCV 産生系で用いている HuH-7 細胞を TXAS 阻害剤 Ozagrel で処理未処理の条件で培養し、それぞれの細胞について、まずマイクロアレイ解析を行い、各細胞における遺伝子発現プロファイルの比較をおこなった。その結果、Ozagrel 処理によって、いくつか共通の既知細胞内シグナルで発現制御されていると考えられる遺伝子群を見いだすことができた。いくつかの遺伝子について、その発現と Ozagrel 処理の関連を siRNA などを用いて検証したが、実際の関連性は確認されなかった。そこで、同一遺伝子でも転写開始点が異なり、異なる転写産物を産生する場合があるため、その点を考慮して、次に CAGE 法を用いて、同一の遺伝子上、複数の転写開始点から産生される転写産物の網羅的な比較をおこなった。しかしながら、この解析方法によっても、共通の細胞内シグナルで発現制御されていると考えられる遺伝子群の転写産物を見いだすことはできなかった。そこで、マイクロアレイ解析と CAGE 法において発現の変化が認められた多数の遺伝子のプロモーター領域から上流域について共通に存在する特徴的な転写因子結合配列のコンピューター解析をおこなった。しかしながら、顕著な特徴を示す共通配列をみいだすことはできなかった。したがって、これらの解析からは新規 TXA₂ 受容体の存在を示唆する結果は得られなかった。そこで次に、遺伝子発現変化ではなく、細胞全体の代謝の変化から Ozagrel による効果を総合的に捉えることを目指した。HuH-7 細胞を Ozagrel で処理未処理の条件で培養し、それぞれの細胞について、代謝産物の網羅的解析、いわゆるメタボローム解析をおこなった。その結果、最も顕著な変化として、Ozagrel 処理によって不

飽和脂肪酸群と飽和脂肪酸群が処理細胞内において未処理細胞の倍に増加していたことと細胞内の炭素鎖 6 のヘキサノ酸量が著しく低下していたことを見出した。これまでヘキサノ酸は、微生物による生合成が主な経路であることが知られているのみであり、ホニユウ類細胞においては、脂肪酸生合成および脂肪酸のベータ酸化の中間産物として知られるのみである。脂肪酸生合成において、ヘキサノ酸は、脂肪酸合成酵素に結合した状態で存在すると考えられ、脂肪酸生合成の産物として産生されることは想定されていない。また、ベータ酸化の場合もヘキサノ酸のみに影響がおよぶ機構も想定できない。これまでにホニユウ類細胞内におけるヘキサノ酸の存在量やその局在場所など知られていない。したがって、特定の化合物によるヘキサノ酸量の変動は新たな知見であり、脂肪酸合成や代謝の新たな経路が存在する可能性が考えられた。Ozagrel 処理によるヘキサノ酸量の変動が、間接的な影響である可能性は否定できないが、今後、この経路の探索を進めることで新たな TP 同定への糸口が得られる可能性が考えられた。また、不飽和脂肪酸群と飽和脂肪酸群の増加に関しては、脂肪酸生合成が HCV ゲノム複製複合体の膜形成に重要であることが知られているが、感染性粒子産生系との関連は不明であるため、今後の検討課題として考えられた。

2) 感染性 HCV 粒子産生に關与する細胞因子の同定は Ozagrel によって変動する細胞内シグナルや細胞の代謝経路が見出せなかったことから、この処理によってその発現が変動した個々の遺伝子について、その関連を検討するという方法で進めた。つまり、上記の方法で Ozagrel 処理によって発現が上昇したことが認められた各遺伝子については、Ozagrel 処理と同時に、siRNA によってその発現量を低下させること、あるいはその遺伝子産物の活性に対する抑制剤で処理するこ

とにより HCV 粒子の感染性との関連の解析をおこなった。Ozagrel 処理によって発現が低下した遺伝子については感染性 HCV 産生細胞にその転写産物に対する siRNA を導入し、これをノックダウンして、あるいは、その遺伝子産物の活性に対する抑制剤で処理し、その細胞から産生された HCV の感染性を解析した。見出した遺伝子群の中から、これまでに感染性 HCV 粒子産生となんらかの関連が報告されている生命現象、例えば、脂肪滴やリポタンパク質関連など、と相互作用が想定される十数種類の個々の遺伝子に関して検討をおこなったが、感染性 HCV 粒子産生に關与する遺伝子はみいだすことができなかった。次に上記メタボローム解析から得られたヘキサノ酸の変動と感染性 HCV 粒子産生との関連を検討するため、Ozagrel 処理と同時にヘキサノ酸を培地に加える実験をおこなったが、Ozagrel の感染性 HCV 粒子産生抑制効果には影響しなかった。ヘキサノ酸の単独培地添加がどの程度、細胞内のヘキサノ酸の存在に安定して効果を持つのかについては現在不明であり、結論は得られないが、ヘキサノ酸量が直接この現象に關連するものではない可能性が考えられた。

3) 以上の実験結果から有意な結果が得られなかった可能性を考えて、同時に、ウイルス側からの解析も試みた。つまり、感染性 HCV 粒子産生細胞の Ozagrel 長期間処理による Ozagrel 抵抗性 HCV 株の樹立を試みた。HuH-7 細胞に合成 HCV RNA を導入し、培養中に Ozagrel で感染性を低下させた組換え体 HCV を産生させ、これを新たな HuH-7 細胞に感染し、Ozagrel 存在下で培養をおこなった。この培養液を用いて、これを新たな HuH-7 細胞に感染させ、Ozagrel 存在下で培養をおこない、これを繰り返した。まず、Ozagrel の用量の検討をおこない、感染性 10%から 20%程度低下する用量を決定し、この用量を継続的に使用した。一ヶ月ほど同様の条件で感染継

代培養をおこなったが、感染性 HCV 粒子量の低下の調整が安定せず、継代感染が機能しなかった。これは感染性粒子が十分量産生されない場合には継代が十分に行われることができないことから生じることが考えられた。そこで、同様に実験を HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いておこなった。HCV を感染させた後に、Ozagrel 処理をおこない、回収した血清を未処理ヒト肝細胞キメラマウスに注射し感染させた後、Ozagrel 処理をおこなった。このヒト肝細胞キメラマウス中の HCV 量を測定したところ Ozagrel 処理による血中 HCV 量の低下は認められなかったため、その HCV に全ゲノム塩基配列の決定を試みた。しかしながら、得られた血清量がごくわずかであり、またヒト肝細胞キメラマウスが非常に高価であることから、本研究では再現することができなかった。今後研究費が潤沢に使用できるようになれば再現する予定である。

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 2 件)

Nio Y., Hasegawa H., Okamura H., Miyayama Y., Akahori Y., Hijikata M.:

Liver-specific mono-unsaturated fatty acid synthase-1 inhibitor as one option for anti-hepatitis C treatment. *Antiviral Res.*, 132C, 262-267, 2016 doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.003.

Chen M., Aoki-Utsubo, C., Kameoka M., Deng L., Terada Y., Kamitani W., Sato K., Koyanagi Y., Hijikata M., Shindo K., Noda T., Kohara M., Hotta H.: Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci. Rep.*, 2017, 7:15931, DOI:10.1038/s41598-017-16130-w

[学会発表](計 2 件)

Hasegawa H., Nio Y., Okamura H., Miyayama Y., Akahori Y., Hijikata M.:

Liver-specific mono-unsaturated fatty acid synthase-1 inhibitor as one option for anti-hepatitis C treatment. 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, Japan, Oct. 11-15, 2016

Miyayama Y., Chayama H., Miki D., Imamura M., Chayama K., Hijikata M.: Development of novel recombinant HCV1b culture system. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 . 大阪 2017 年 10 月 24-26 日

[図書](計 1 件)

土方 誠、阿部雄一、茶山一彰 HCV 感染性粒子産生機構 日本臨床 新ウイルス性肝炎 73 巻増刊号学 (通巻第 1090 号) 98-103、2015 年

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土方 誠 (HIJIKATA Makoto)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・

准教授

研究者番号：90202275

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

なし