

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390133

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルスの感染および複製に関与する宿主因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of host factors involved in the infection and replication of hepatitis C virus

研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA YOSHIHARU)

大阪大学・微生物病研究所・教授

50157252

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染機構を解析するために、HCVのエンベロープ遺伝子を組み込んだ、自立増殖可能な組換え水疱性口内炎ウイルスの作製に成功した。また、HCVの成熟、複製、そして病原性発現に関与する宿主因子を複数同定し、これらの宿主因子を標的とした、耐性株の出現しにくい、新規C型肝炎治療薬開発の可能性を提示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HCV, 感染、集合、宿主因子、病原性

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。最近、限定された細胞でのみ感染可能なHCVクローンが構築されたが、HCVに感受性を示す唯一の実験動物であるチンパンジーに接種しても全く病原性を示さない。したがって、実際に臨床現場で問題となっているインターフェロン(IFN)に耐性を示し、肝炎や肝癌を発症させているHCVを効率よく複製できる細胞培養系は確立できておらず、HCVの感染、複製、そして肝

疾患の発生病理機序は依然として謎に包まれたままである。我々はこれまでに、HCVのエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(HCVpv)を用いてHCV感染に重要な宿主因子を探索し、HCVにはhCD81依存的に感染できるものと、それ以外の受容体を介して感染する、少なくとも2種類の細胞親和性を異にするウイルスが存在する可能性を提示している。HCV粒子を構成するウイルス蛋白質は細胞のSignal peptidase(SP)によって切断され、さらに小胞体の膜に存在するSignal peptide peptidase(SPP)によって切断されて成熟し(Okamoto JV 2004)、エンベロープ蛋白質の

細胞質領域と会合してヌクレオキャプシドを形成するが (Nakai JV 2006)、一部は核に移行してプロテアソーム調節蛋白質 PA28 γ 依存的に分解される (Moriishi JV 2003) ことを報告している。また、HCV と近縁な日本脳炎ウイルス (JEV) のコア蛋白質も、SP とウイルス由来プロテアーゼで切断され、やはり一部が核へ移行する。コア蛋白質が核に移行できなくなった変異 JEV は、蚊の細胞での増殖性に変化はないが、哺乳動物細胞での複製能が顕著に低下し、さらに、マウスでの病原性の著しい低下が観察された (Mori JV 2005)。HCV ゲノムはウイルスにコードされている複製酵素と宿主因子とによって構成される複製複合体で複製される。これまでに多くの宿主蛋白質が HCV の複製に重要であることが報告されており、我々も細胞の小胞輸送に参与する VAP-B が HCV の複製複合体形成に重要であることを報告している (Hamamoto JV 2005)。また、免疫抑制剤である FK506 と結合することによって、免疫抑制効果を発揮する宿主蛋白質 (FK506-binding protein, FKBP) の一種である FKBP8 が、HCV の複製複合体の構成因子である NS5A 蛋白質と結合するだけでなく、細胞内のシャペロン分子である Hsp90 とも結合することを明らかにしている。NS5A 蛋白質と Hsp90 は直接結合できないが、FKBP8 を介して 3 つの蛋白質が複合体を形成することが、HCV の複製に重要であることを報告している (Okamoto EMOJ 2006)。

2. 研究の目的

HCV の細胞親和性の解析 : HCV は多種性 (quasispecies) を示すことが知られており、一人の C 型肝炎患者の体内にはポリクローナルな HCV が持続感染している。これまでの感染様式の解析は、一つの HCV の cDNA に由来するモノクローナルなエンベロップ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて進められてきたものであり、実際に患者の体内で進行している HCV の感染を正確に反映しているものとは言い難い。また、hCD81 依存的な感染性を示すシュードタイプレトロウイルス (HCVpp) を中和できる抗体が、ほとんどの慢性 C 型肝炎患者の血清中に検出されるのに対し、シュードタイプ水疱性口内炎ウイルス (HCVpv) は hCD81-非依存的に感染し、患者血清中に中和抗体はほとんど検出されない。即ち、hCD81 を介して感染する HCV は容易に生体から排除され、hCD81-非依存的に感染する HCV が、慢性持続感染の成立に重要な役割を演じている可能性がある。そこで、hCD81-

非依存的な感染性を示す HCVpv の感染機構を明らかにする。さらに、hCD81 の依存性を決定するエンベロップ蛋白質の翻訳後修飾ならびに宿主因子を明らかにする。

HCV の成熟・複製に参与する宿主因子の

解析 : HCV 粒子を構成するウイルス蛋白質は宿主由来のプロテアーゼによって切断されて成熟し、エンベロップ蛋白質の細胞質領域と会合してヌクレオキャプシドを形成するが、一部は核に移行してプロテアソーム調節蛋白質 PA28 γ 依存的に分解される。また、HCV ゲノムはウイルスにコードされている複製酵素と宿主因子とによって構成される複製複合体で複製される。これまでに多くの宿主蛋白質が HCV の複製に重要であることが報告されており、我々も細胞の VAP-B や FKBP8 が HCV の複製複合体形成に重要であることを報告している。また、VAP-B や FKBP8 以外にも HCV の複製に必須な複数の宿主因子を同定している。これまでに報告された HCV の複製複合体にリクルートされる宿主因子の相互作用を整理して、それぞれの HCVRNA 複製における意義を詳細に解析する。また、PA28 γ 欠損コア Tg マウスや SPP 欠損コア Tg マウスを作製してのコア蛋白質発現量と肝臓病理を検討し、コア蛋白質のプロセッシングと細胞内局在が肝臓疾患に及ぼす影響を *in vivo* で検証する。

3. 研究の方法

HCV の細胞親和性の解析 : これまでに、CHO 細胞で作製したシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス (HCVpv/CHO) を用いて HCV 感染に重要な宿主因子を探索し、HCVpv/CHO は、これまでに HCV の受容体候補分子として報告されている hCD81 が全く発現していない HepG2 細胞に感染することが示された。また、シュードタイプレトロウイルス (HCVpp) と同じように、ヒト胎児腎臓細胞 (293T) で作製した HCVpv (HCVpv/293T) や特殊な Huh7 細胞に感染性を示す JFH1 株 (HCVcc) は HCVpp と同様に、hCD81 依存的に感染できることを明らかにしている。即ち、シュードタイプウイルスは産生した細胞に依存した細胞親和性を示すのである。実際に患者血清中に存在する HCV 粒子や HCV 様粒子は、hCD81 の発現していない HepG2 細胞にも hCD81 陽性の Huh7 細胞にも同等に結合することから、HCV には hCD81 依存的に感染できるものと、それ以外を受容体を介して (hCD81-非依存的に) 感染する、少なくとも 2 種類の細胞親和性を示すウイルスが存在するものと考えられる。そこで、hCD81-非依存的な感染受容体の候補分子

の絞り込みを試みる。

HCV ゲノムはウイルス自身がコードしている酵素群と宿主因子から構成される複合体で複製される。我々はこれまでに、細胞の小胞輸送に関与する VAP-B やコシャペロン分子として知られている FKBP8 が NS5A 蛋白質と特異的に結合して、HCV の複製複合体形成に重要な働きを演じていることを報告している。VAP-B を過剰発現すると HCV RNA の複製が増強されることから、VAP-B と相互作用する宿主因子の解析を進める。また、NS5A 蛋白質と Hsp90 は直接結合できないが、FKBP8 を介して 3 つの蛋白質が複合体を形成することが、HCV の複製に重要であることを報告しており、この分子の RNA 複製における役割をより詳細に解析する。さらに、これまでに報告されている HCV の複製複合体にリクルートされる宿主因子の相互関係を整理して、それらの RNA 複製における役割を解析する。また、我々はフラビウイルスが節足動物から哺乳動物へと種の壁を超えて複製の場を拡大させる過程で、コア蛋白質を核に移行させて宿主遺伝子の発現を巧みに調節し、ウイルスの複製に適した細胞環境に改変してきたとの仮説を提唱している。これまでにコア蛋白質と相互作用する核内因子をいくつか分離しているが、これらの HCV の複製における役割を解析する。

4. 研究成果

これまでに C 型肝炎ウイルス (HCV) のエンベロップ蛋白質を被ったシュードタイプウイルス (HCVpv) を用いて感染機構の解析が進められてきたが、HCVpv はゲノムにエンベロップ遺伝子を持たないため、一度しか感染できず、二次感染は起こらない。本研究では水疱性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロップ遺伝子を欠損させ、代わりに HCV のエンベロップ遺伝子を組み込んだ組換え VSV (HCVrv) を作製し、その感染様式を解析した。293T や Huh7 細胞で作製した HCVrv は、Huh7 細胞に最も高い感染性を示し、抗 hCD81 抗体や C 型肝炎患者血清で感染が中和された。また、一部の Huh7 細胞株では、HCVrv の感染拡大が確認された。自立増殖可能な HCVrv は、各種遺伝子型の HCV の感染機構の解析に有用であると考えられた。CoreTg は肝脂肪化と肝発がんを発症する。本研究では、HCV コア蛋白質の安定性を調節する宿主因子として我々が同定した PA28 γ の HCV による肝脂肪化と肝発がんにおける役割について解析した。PA28 γ 遺伝子をノックアウトにより CoreTg マウスの肝脂肪化および肝発がんは消失した。脂肪酸合成遺

伝子の発現を調節する転写因子 SREBP-1c とその下流遺伝子の発現上昇および SREBP-1c 遺伝子の転写を調節する LXR α /RXR α の活性の上昇がコア蛋白質の発現で個体レベルおよび培養細胞レベル認められ、PA28 γ 遺伝子のノックアウトあるいはノックダウンによってその活性化は著しく軽減された。以上の結果から、PA28 γ は HCV によって誘導される病原性に必須であることが示唆された。

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究は HCV の感染、成熟、そして複製過程に関与する宿主因子を解析し、これらの宿主因子をターゲットとした新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とした。我々はこれまでに、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) subtype A (VAP-A) および B (VAP-B) が HCV の複製を正に調節していることを報告してきた。しかしながら、VAP-B のスプライシングバリエーションである VAP-C の機能はほとんど解析されていない。そこで今回、HCV の複製における VAP-C の役割について検討した。VAP-C は VAP-A や VAP-B の NS5B への結合を競合的に阻害する事によって、HCV の複製を抑制していることが明らかとなった。また、VAP-C の発現は HCV の臓器親和性を規定する要因の一つである可能性が示唆された。

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 13 件)

- 1 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 82, 2631-2641 (2008).
- 2 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol.,

- 82, 3480-3489 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
 - 4 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
 - 5 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
 - 6 Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Moriishi K., and Matsuura Y. *Rev. Med. Virol.*, 17, 343-354 (2007).
 - 7 Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. *J. Exp. Med.*, 204, 2233-2239 (2007).
 - 8 The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
 - 9 Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
 - 10 Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
 - 11 Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
 - 12 Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Tagawa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8953-8966 (2007).
 - 13 Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y., *PNAS*, 104, 1661-1666 (2007).
- [学会発表] (計 29 件)
- 1 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子: 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12月9日-12日, 2008.
 - 2 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治: 患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立: 第56回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日, 2008.
 - 3 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染によるTLR経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上.

- 4 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
- 5 久木原 博、森石恆司、松浦善治: ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 6 谷 英樹、泉 貴之、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
- 7 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
- 8 森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上。
- 9 田鋏修平、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシャペロン活性、同上。
- 10 Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10 月 21 日-23 日、2008。
- 11 松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7 月 9-11 日、2008。
- 12 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 13 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 14 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 15 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 16 Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 同上。
- 17 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日、2007。
- 18 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析、同上。
- 19 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
- 20 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 21 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
- 22 田鋏修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析、同上。
- 23 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割: 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日、2007。
- 24 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 25 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro

- Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 26 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 27 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 28 Shuhei Tagawa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 同上。

[その他]

ホームページ

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_matsuura.php

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

阿部 隆之 (ABE TAKAYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号: 90403203

(3) 連携研究者

なし