

平成 20 年 05 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590473
 研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスによる脂肪合成活性化と関連病態の解析
 研究課題名（英文） Study on the lipid biosynthesis and the related pathology in hepatitis C virus infection
 研究代表者
 森石 恒司 (MORIISHI KOJI)
 大阪大学・微生物病研究所・准教授
 研究者番号 90260273

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質は、細胞内のラフト様構造にも局在しているが、ウイルス感染環あるいは病原性における役割はわかっていない。本研究によって、膜内切断を受けたコア蛋白質はウイルス粒子形成に必要であることが示された。また、コア蛋白質とPA28 γ の発現によって脂質代謝が増強される現象は、インターフェロン抵抗性を示すC型肝炎患者で多く認められるコア蛋白質変異によって減弱していた。以上のことから、コア蛋白質を修飾する宿主蛋白質を標的にした薬剤が、抗HCV薬として期待出来ることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病原性、ウイルス、感染症、発現制御、C型肝炎、

1. 研究開始当初の背景

肝癌は我が国の癌死の第3位を占め、その約8割がC型肝炎ウイルス（HCV）感染に起因しており、年間3万5千人もの尊い命が奪われている (Moriishi, 2003, Antivir. Chem. Chemother. 14:285-297)。HCVに感染すると、慢性持続性感染を経て、脂肪肝・肝硬変・肝癌へと

移行する確率が極めて高い。チンパンジー以外に感受性を示す実験動物がないなどの理由から、その肝癌発症のメカニズムの解明は困難を極めている。特に、慢性感染における病態を解析する適当な系はHCV蛋白質を発現する遺伝子改変マウス以外に存在しない。ま

た、一部の株でウイルス培養系が報告されているが、患者数が多いインターフェロン非感受性の株では樹立されていない。C型肝炎における肝脂肪化は、線維化を進行させたり、脂質合成を抑制する薬剤がウイルス複製を抑制するなど、病状の進行と深い関わり合いをもつと考えられる。しかしながら、HCVが脂肪合成をどのように促進するか、よく分かっていない。

HCV蛋白質は約10kbの+鎖RNAゲノムにコードされ、単一鎖の前駆蛋白質として産生される。コア蛋白質は前駆蛋白質のアミノ末端に位置し、ウイルスキャプシドを構成する191アミノ酸の構造蛋白質である。シグナルペプチダーゼ(SP)およびシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断され、コア蛋白質は成熟することを我々は明らかにした(Okamoto, 2004, J. Virol. 78:6370-6380)。宿主及びウイルス蛋白分解酵素によってプロセッシングされ、VAP-B(Hamamoto, J. Virol. 79:13473-13482)やFKBP8(Okamoto, 2006, EMBO J. 25:5015-5035)などの宿主因子を介してウイルス非構造蛋白質がウイルス複製複合体を形成することを我々は明らかにしてきている。キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウス(CoreTG)が線維化以外ヒト患者と同じ経過を辿り、脂肪肝発症、肝発癌およびインスリン抵抗性を示し、HCV病態モデルとして期待されている。また、培養細胞にコア蛋白質を発現すると脂肪滴蓄積が認められ、脂肪合成経路の活性化が指摘されている。しかしながら、それら病原性発現へ至る分子機構の詳細は解明されていない。

我々はコア蛋白質と結合する宿主蛋白質プロテアソーム活性化因子PA28 γ を報告している(Moriishi 2003, J. Virol. 77:10237-10249)。研究代表者は既に、PA28 γ 遺伝子ノックアウト-HCVコア蛋白質発現トランス

ジェニックマウスを作製し、HCVコア蛋白質による脂肪肝誘導が有意に著しく減弱することを明らかにしている。しかしながら、コア蛋白質による肝脂肪化に至る経路の詳細はよく分かっておらず、HCV感染環における脂質構造ラフトなどの意義もよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、C型肝炎による脂質合成活性化の分子機構を解明し、肝脂肪化へ至る経路・必要性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HCV構造蛋白質の成熟過程

HCVコア蛋白質は、培養細胞に発現し、ウェスタンブロッティングによってコア蛋白質の切断を解析した。肝臓細胞由来培養細胞に感染ウイルスJFH1を感染させ、細胞をTriton X100存在下で溶解し、浮遊密度勾配法によりdetergent抵抗性画分と溶解画分に分画した。その時、SPP阻害剤、SPPドミナントネガティブ変異体などを投入し、SPP切断有無における分画を解析した。上清中のウイルスゲノム量、感染量、コア蛋白質量を測定した。

(2) HCVによる脂肪合成経路活性化の経路解明

CoreTGを用いて、定量PCR法を用いて脂肪合成遺伝子発現量を測定し、それぞれ転写因子の活性化を解析した。また、SREBP-1cおよびそれに制御されている酵素群の発現を、リアルタイムPCRによって定量した。また、SREBP-2およびそれに制御されている酵素群の発現も同様に定量した。

(3) HCVによる脂肪合成活性化の制御機構の解明

ゲノムDNAからSREBP転写調節領域をクローニングし、SREBPの転写調節がコア蛋白質によって変化があるかどうか、そして、LXR α ・RXR α の複合体に影響するかを解析する。コア蛋白質は活性酸素産生を増加させるので、

活性酸素によるそれら調節蛋白質のCarbonyl化を観察する。

4. 研究成果

(1) HCV構造蛋白質のラフト局在と成熟過程への関連性

HCVコア蛋白質は、細胞内のラフト様構造にも局在しているが、ウイルス感染環あるいは病原性における役割はわかっていない。コア蛋白質はシグナルペプチダーゼおよびSPPで切断されることによって成熟蛋白質になるが、どの過程がラフトへの局在に必要な条件であるか分かっていない。SPPによる膜内切断を受けたコア蛋白質のラフト様膜画分への移行が、ウイルス粒子形成に必要であることが本研究によって示された。SPP抑制剤およびSPP変異体発現によってウイルス増殖は抑制され、また、SPP耐性変異をコア蛋白質コード領域に挿入したウイルスでは、ウイルス産生が著しく抑制されていた。以上のことから、膜内切断酵素SPPは抗HCV剤開発の標的候補になりうる事が示唆された。

(2) HCVによる脂肪合成経路活性化の経路解明

コア蛋白質は核でPA28 γ と結合するとプロテアソームに依存して分解され、脂肪肝を発症する。PA28 γ がないと、コア蛋白質は核に集積し、脂肪肝は誘導されない。しかし、脂肪酸およびコレステロール合成経路のどの因子がコア蛋白質発現によって影響を受けるのかわかっていない。本研究によって、コア蛋白質による中性脂肪および脂肪酸合成の誘導が示され、コア蛋白質発現マウスを使ってin vivoにおいてそれら現象が確認された。脂肪酸および中性脂肪の合成促進は、転写因子核内受容体LXRおよびRXR α の活性化を介して行われており、PA28 γ の発現した状態においてコア蛋白質の発現はLXRおよびRXR α の活性化が認められた。また、インターフェロン

抵抗性を示すC型肝炎患者で多く認められるコア蛋白質変異を導入すると脂肪代謝関連遺伝子の発現低下が認められた。また、コア蛋白質による活性酸素の産生上昇には、PA28 γ の発現が必要であった。

以上、これらの研究によって、コア蛋白質を修飾する宿主蛋白質をC型肝炎治療の標的にした場合、ウイルス増殖および病原性発現の両方を制御出来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11件)

1. Mori, Y., K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Hepatitis C virus core protein: its coordinate roles with PA28gamma in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1437-1442.
2. Okamoto, K., Y. Mori, Y. Komoda, T. Okamoto, M. Okochi, M. Takeda, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82:8349-8361.
3. Okamoto, T., H. Omori, Y. Kaname, T. Abe, Y. Nishimura, T. Suzuki, T. Miyamura, T. Yoshimori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82:3480-3489.
4. Taguwa, S., T. Okamoto, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82:2631-2641.
5. 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. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2007, 104, 1661-1666.
6. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.
 7. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. J. Virol., 2007, 81, 8477-8487.
 8. 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. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. J. Virol., 2007, 81, 8601-8612.
 9. Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Rev. Med. Virol., 2007, 17, 343-354.
 10. Moriishi K., and Matsuura Y. Evaluation systems for anti HCV drugs. Adv. Drug Deliv. Rev., 2007, 59, 1213-1221.
 11. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. J. Virol., 2007, 81, 1727-1735.

[学会発表] (計 24 件)

1. 森石恆司、松浦善治、C 型肝炎ウイルス感染と肝発癌、第 82 回日本感染症学会総会、教育講演、松江、2008 年 4 月
2. 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、第 56 回日本ウイルス学会総会 (ワークショップ)、岡山 2008 年 10 月
3. 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、第 56 回日本ウイルス学会総会 (一般口演)、岡山 2008 年 10 月
 4. 田鍬修平、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 のコシヤペロン活性、第 56 回日本ウイルス学会総会 (一般口演)、岡山 2008 年 10 月
 5. 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、第 56 回日本ウイルス学会総会 (一般口演)、岡山 2008 年 10 月
 6. 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。第 56 回日本ウイルス学会総会 (一般口演)、岡山 2008 年 10 月
 7. Tani, H, Izumi, T., Kanbara, H., Kaname, Y., Mori, Y., Moriishi, K., Matsuura, Y., Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus, 15th International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
 8. Abe, T., Kaname, Y., Moriishi, K., Kanto, T., Hayashi, N., Matsuura, Y. HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 15th International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
 9. Kukiwara, H., Moriishi, K., Matsuura,

- Y., Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
10. Tanaka, Y., Mori, Y., Tani, H., Abe, T., Moriishi, K., Matsuura, Y. Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV insera from hepatitis C patients. 15th International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
 11. Moriishi, K., Matsuura, Y. Proteasome activator PA28gamma is required for efficient growth of hepatitis C virus. 15th International Symposium on Hepatitis C virus & related viruses, San Antonio, USA, 2008, October.
 12. Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
 13. 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。
 14. 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。
 15. 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. 同上。
 16. 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.
 17. 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.
 18. 田鍬修平、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 : 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10月21日-23日, 2007.
 19. 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。
 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. 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。
 22. 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、同上。
 23. Kohji Moriishi. Critical role of PA28 γ -proteasome pathway in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 7th Awaji International forum on infection and immunology, Awaji, September 1-5, 2007.
 24. Kohji Moriishi. Critical role of REG

γ /PA28 γ -proteasome pathway in
hepatitis C virus-associated
steatogenesis and
hepatocarcinogenesis, 2007
International RIMD-CVRDC Joint
Symposium, Osaka, December 18, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI KOJI)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：90260273

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし