

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590473

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスゲノム動態を制御する宿主因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Study on the host factors which regulate hepatitis C virus genome replication

研究代表者

有海 康雄 (ARIUMI YASUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60303913

研究成果の概要(和文)：

C型肝炎ウイルス(HCV)の複製に関与する以下の宿主因子を同定した。(1) DNA 損傷センサーATM が HCV RNA ゲノム複製に必要であること、(2) HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body 因子である DDX6 が HCV ウイルス産生の場合である脂肪滴周辺にハイジャックされること、そして、DDX6 が HCV 複製に必要であること、(3) ESCRT 小胞輸送系が HCV 産生に必要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：

We have identified following host factors involved in HCV replication: (1) DNA damage sensor ATM is required for HCV RNA replication. (2) HCV infection disrupts P-body and DDX6 is required for HCV replication. (3) ESCRT system is required for HCV production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：C型肝炎ウイルス、RNA ウイルス、宿主因子、DDX3、ATM、ESCRT、P-body

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国のC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染者は約200万人いると推定される。我が国における肝がんの約80%において、HCVの感染が認められている。2009年には約3万3000人が肝がんにより死亡し、肺がん、胃がん、大腸がんについてがん死亡の第4位を占めるに至っている。B型肝炎とは異なり、HCV感染者の多くは持続感染が成立し、慢性肝炎となり、肝線維化を伴う肝硬変を経て、さらに肝がんへと進展する。HCV感染による長期間に及ぶ持続的な炎症反応とHCV蛋白質と宿主の発がん関連因子との相互作用により、肝発がんが起こるものと考えられている。

一方、これまでのHCV研究において、細胞培養系で効率良く感染性ウイルス粒子を産生することが困難なため、ウイルス粒子形成や出芽機構に関しては不明であった。HCVの生活環の全容の解明が抗ウイルス剤及びワクチン開発のため、急務とされる。

## 2. 研究の目的

本研究では、HCV生活環に関与する宿主因子について明らかにし、HCVの排除、肝炎や肝発がんの予防及び治療法開発の分子基盤の確立を目指すことを目的とする。特に殆ど解明されていないHCV粒子形成機構を明らかにして、HCV生活環の全容の解明はもとより、細胞培養系における大量スケールのHCV粒子産生の確立を目指し、HCVワクチン開発につなげたい。

## 3. 研究の方法

(1) HCV生活環に関与する宿主因子の同定と機能解析

short hairpin (sh) RNAを発現するレンチ

ウイルスベクターを用いて、ATM、Chk2、ESCRT因子(TSG101、Alix、Vps4B、CHMP4b、そしてBrox)、DDX6をノックダウンさせたHuH-7由来RSc細胞株を樹立し、HCV-JFH1株を感染させ、感染細胞内のHCV RNAの複製レベルと培養上清中に分泌されるCoreの発現量をそれぞれreal-time RT-PCR法とELISA法で定量した。また、抗Core抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌されたHCVの感染性を解析した。さらにHCV蛋白質と宿主因子との相互作用について、免疫沈降法や免疫蛍光抗体法を用いて解析した。

(2) HCV感染によるP-body形成への影響

ヒト肝癌細胞株HuH-7由来RSc細胞にHCV-JFH1株を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV感染に伴うP-body因子の局在変化を詳細に観察する。細胞を固定後、抗HCV Core抗体及び抗DDX6抗体、抗Lsm1抗体、抗Ago2抗体、抗Xrn1抗体、抗Dcp2抗体、あるいは抗PATL1抗体で処理後、CoreはCy3、P-body因子はfluorescein isothiocyanate (FITC)により可視化した。

## 4. 研究成果

(1) 感染性HCVウイルス粒子形成に関与する宿主因子の解析

HCVはエンベロープを保持するRNAウイルスに属しているが、これまで細胞培養系で効率良く感染性ウイルス粒子を産生することが容易でないため、HCVの生活環、特にウイルス粒子形成や出芽に関与する宿主因子やその分子機構については、あまり解析が進んでいない。今回、我々はレトロウイルスの出芽に必要なESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

小胞輸送経路が HCV ウイルス粒子産生に関与していることを見出した。RNA 干渉法により、ESCRT 関連因子である TSG101、Alix、Vps4B、CHMP4b、そして Brox をノックダウンさせた RSc 細胞に JFH1 を感染させると、細胞内の HCV RNA レベルはほとんど影響されないものの細胞の培養上清中に放出される HCV Core の量は顕著に抑制された。また、その際の HCV 粒子の感染性も顕著に抑制された。一方、細胞内の HCV 粒子の感染性はコントロール細胞とノックダウン細胞とでは、ほとんど変わらないことを見出された。この結果、ESCRT 因子は HCV の RNA 複製や HCV 粒子の組立てのステップにはあまり関与せず、HCV の粒子放出のステップに関与していることが示唆された。

## (2) 発がん関連因子と HCV の相互作用

### ① DNA 損傷センサー ATM の HCV 複製への関与

DNA 損傷センサー ATM は多くの DNA ゲノムを保持するウイルス感染により活性化され、ウイルスの複製に関与する宿主因子であることが知られているが、RNA 干渉法を用いた本研究により、RNA ゲノムしか保持しない HCV も自身の RNA 複製に ATM や Chk2 が必要であることが、明らかとなった。HCV NS3 や Core が宿主ゲノムに dsDNA breaks を誘導することにより、RNA ゲノムしか保持しない HCV も ATM シグナル伝達経路を活性化できるのかもしれない。実際、我々も HCV RNA 複製細胞において、ATM が直接リン酸化することが知られている Chk2 の Thr68 がリン酸化されていることを確認した。さらに我々は ATM が HCV NS3-4A 及び NS5B と結合すること、Chk2 が NS5B と結合することを免疫沈降法により見出した。この知見は以前、我々が報告した HCV NS5B を発現させたヒト不死化肝細胞株 PH5CH8 細胞において、

dsDNA breaks が誘導される DNA 損傷に感受性が高いこととの関連が示唆される。最近、興味深いことに Lai らのグループは HCV NS3-4A が ATM に結合することにより、宿主の DNA 修復機構を抑制していることを報告している。HCV が自己複製のため、ATM と相互作用する結果、宿主の DNA 修復機構が阻害され、宿主のゲノム不安定性が増強される。その結果、宿主ゲノムの変異率が高まり、細胞が癌化する可能性も示唆された。

ATM が HCV RNA 複製に必要な知見の裏付けとして、ATM 特異的阻害剤 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933) が、顕著に HCV RNA 複製を阻害していることを見出した。この ATM 阻害剤の HCV RNA 複製を半減させる  $EC_{50}$  値は  $1.9 \mu\text{M}$  であるが、エイズの原因ウイルスである HIV-1 の複製を半減させる  $EC_{50}$  値は  $2.3 \mu\text{M}$  である。今後、ATM 特異的阻害剤が慢性 C 型肝炎とエイズの両方の慢性持続ウイルス感染症に有効な抗ウイルス剤として、臨床の場で期待される。

### ② HCV 感染による P-body 形成の阻害

共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内局在の解析の結果、HCV-JFH1 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた発がん関連因子 DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 などの microRNA effector が HCV ウイルス産生の際である脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV Core と共局在することを見出した。しかしながら、HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。HCV 感染 1 2 時間および 2 4 時間後の感染初期の段階では、まだ P-body の形成が確認されたが、感染 3 6 時間後より P-body 形成の阻害が始まり、感染 4 8 時間後では顕著となった。この結果、HCV 感染による P-body 形成阻害は感染

後期にみられるイベントであることが判明した。さらに RNA 干渉法により、DDX6 をノックダウンしたヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 を感染させると、コントロール細胞に比べて、細胞内の HCV RNA レベル、細胞培養上清中に放出される HCV Core の量および HCV 粒子の感染性が顕著に減少していることが見出された。以上の結果より、P-body 因子は HCV ゲノム動態に必要な宿主因子であることが示唆された。

#### 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 20 件)

- (1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system, *Virus Res*, 査読有, in press
- (2) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N, Anti-ulcer agent Teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C, *Liver Int*, 査読有, in press
- (3) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production, *PLoS One*, 査読有, 6, e14517, 2011
- (4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatitic cell lines, *Hepatol Res*, 査読有, 40, 1248-1253, 2010
- (5) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K, Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  in vitro, *Liver Int*, 査読有, 30, 1324-1331, 2010
- (6) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宣之. DNA 損傷センサー ATM キナーゼと Chk2 は C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である. *岡山医学会雑誌*, 査読無, 122, 9-16, 2010
- (7) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A, *Arch Virol*, 査読有, 154, 1671-1677, 2009
- (8) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new hepatoma cell line, *Virus Res*, 査読有, 146, 41-50, 2009
- (9) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N, Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase, *Hepatology*, 査読有, 50, 678-688, 2009
- (10) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N, Development of a hepatitis C virus relapse model using genome-length

- hepatitis C virus ribonucleic acid-harboring cells possessing the interferon-alpha-resistance phenotype, *Hepatol Res*, 査読有, 39, 898-909, 2009
- (11) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako T, Kato N, Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents, *Antiviral Res*, 査読有, 82, 42-50, 2009
- (12) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N, Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases, *Arch Virol*, 査読有, 154, 801-810, 2009
- (13) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N, Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha, *FEBS Lett*, 査読有, 583, 1434-1438, 2009
- (14) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress, *J Virol*, 査読有, 83, 2338-2348, 2009
- (15) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture, *Arch Virol*, 査読有, 154, 77-85, 2009
- (16) 有海康雄, 加藤宣之, 肝癌 HCV による発癌メカニズム 慢性肝炎から肝癌に至るパスウェイ, *日本臨床*, 査読無, 67 巻, 増刊 3 号, 138-142, 2009
- (17) 有海康雄, 加藤宣之, ウイルス感染と発癌, *臨床検査*, 査読無, 53 巻, 29-35, 2009
- (18) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication, *J Virol*, 査読有, 82, 9639-9646, 2008
- (19) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N, A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication, *Virus Res*, 査読有, 137, 72-79, 2008
- (20) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N, New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 371, 104-109, 2008
- [学会発表] (計 10 件)
- (1) 有海康雄. 癌抑制因子と HCV のクロストーク. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島
- (2) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之. がん抑制因子 PML は HCV のライフサイクルに必須である. 第 58 回日本ウイルス学会学

- 術集会, 2010年11月7日-9日, 徳島
- (3) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. がん抑制因子PMLはHCVの生活環に必須である. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日-24日, 大阪
- (4) 有海康雄, 黒木美沙緒, 牧正敏, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25日-27日, 東京
- (5) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. 癌抑制因子PMLはHCV粒子産生に必要である. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25日-27日, 東京
- (6) Ariumi Y, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan
- (7) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009, Nice, France
- (8) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009,

Nice, France

- (9) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008, San Antonio, USA
- (10) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008, San Antonio, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有海 康雄 (ARIUMI YASUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60303913

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

黒木 美沙緒 (KUROKI MISAO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院