

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590843

研究課題名（和文） 細胞内シグナルを分子標的とした C 型肝炎ウイルス増殖の制御

研究課題名（英文） Controlling HCV replication by targeting intracellular signaling

研究代表者

石田 永 (ISHIDA HISASHI)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（臨床研究センター）・研究員

研究者番号：00506230

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、HCV 増殖に関わる細胞内シグナルに関与する因子を検討することを目的とした。HCV 感染により変動し、HCV 増殖に影響を与えるマイクロ RNA を検討したところ、miR-192/miR-215 と miR-491 が同定された。そのうち miR-491 は PI3 キナーゼ/Akt 経路を介して HCV を抑制していることが示された。また、細胞内シグナルを活性化するといわれる分岐鎖アミノ酸（BCAA）の HCV 増殖に対する影響を検討した。BCAA は HCV のゲノム増殖を抑制する一方、ウイルス粒子形成には促進的に働くことが示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated factors affecting intracellular signaling which could control HCV replication. Among microRNAs which were regulated by HCV infection, miR192/miR-215 and miR-491 were identified as the factors which could regulate HCV replication. miR-491 was demonstrated to suppress PI3 kinase/Akt pathway, responsible for HCV augmentation. Branched-chain amino acids could suppress HCV RNA replication whereas enhance HCV particle formation, which suggested some signaling regulated by BCAA may be involved in controlling HCV replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

現在の慢性 C 型肝炎の抗ウイルス治療は、インターフェロン製剤を用いたものがその中心を占めている。今までに様々な治療法の改良がなされてきてはいるが、いまだその奏功率は本邦で過半数を占める 1 型高ウイル

ス量患者において 50%程度と、十分とはいえない。また、その強い副作用から治療を完遂できないケースもあり、より効率的で、副作用の少ない治療法の開発が望まれている。インターフェロンはその作用機序として、細胞内の JAK/STAT 経路を活性化することにより

抗ウイルス活性を発揮することが知られている。一方、申請者らはレプリコン細胞を用い、インターフェロン刺激による p38 経路の活性化が抗 HCV 活性において重要であることを明らかにした。また、同様にレプリコン細胞や感染性 HCV を用いて、PI3 キナーゼや ERK といった経路が mTOR の活性化を介して HCV の増殖を抑制することを示してきた。さらに他施設からの報告でも、smad や NF- $\kappa$ B、PKC といったシグナルの HCV 増殖過程での関与も示唆されている。以上のように、種々の細胞内シグナルは細胞機能のみならず、HCV の増殖とも密接に関連し、調節する働きを持つものと考えられる。その様なシグナルの果たすメカニズムを解明し、細胞外より制御することで、細胞内における HCV の増殖過程を抑制しうる可能性が示唆される。すなわち C 型肝炎治療における新たな分子標的となりうる細胞内因子に対する基礎的検討としての位置づけと考えている。

## 2. 研究の目的

HCV の増殖は様々な細胞内蛋白や細胞の状態によって影響を受けることが示されており、細胞内シグナルもまた主要な要因のひとつである。本項目における目的は種々の細胞内シグナルと HCV 増殖の関連について検討を行い、新たに HCV を制御しうるシグナルの同定を試みることである。申請者らはその予備的検討として、JNK 経路と HCV 増殖について解析を行った。JNK 阻害剤によりレプリコン細胞における HCV 増殖の亢進を認めており、JNK 経路もまた HCV の増殖を制御しうる因子であることが示唆された。同様の検討をその他の経路に関しても行うことを予定している。

## 3. 研究の方法

本検討で使用する実験系としては、既に申請者らが樹立した subgenomic replicon 細胞 RepS2 あるいは、Dr. Stanley Lemon より供与を受けた subgenomic replicon 細胞 RG および genome-length replicon 細胞 2-3 を使用する。また感染細胞における検討には、Dr. Stanley Lemon より供与を受けた感染性ウイルスである H-2/3-J/YH/QL を増幅した後、肝癌細胞株 Huh7 細胞に感染させたものを用いる。複数の細胞内シグナルを特異的阻害薬もしくは siRNA を用いて阻害し、HCV RNA および HCV 蛋白を RT-PCR 法もしくはウエスタンブロットを用いて定量的に評価して HCV 増殖の指標とする。さらに、HCV 感染細胞においては、同時に培養液中に放出されたウイルス粒子の定量も行う。以上の検討により、細胞内における HCV 増殖に関わるシグナルのスクリーニングを試みることにする。

①マイクロ RNA に関する検討では、まず Huh7 細胞に HCV を感染させ、miRNA アレイにより、変動する miRNA を同定し、次にそれら

が HCV 増殖に影響しうるかについて、合成した miRNA をレプリコン細胞に導入することで検討した。HCV 増殖に影響するものについては、HCV IRES 活性への影響や細胞内シグナルへの影響も解析した。

②mTOR シグナルを活性化すると考えられ、肝疾患患者にも薬剤として使用されている BCAA の HCV 増殖に対する影響を検討する。BCAA を含まない培地とそれに BCAA 投与を含む培地でレプリコン細胞を培養し、HCV 増殖への影響を検討した。さらに同様の実験を HCV 感染細胞にも行った。その際用いた細胞は Huh7 細胞と Huh7-25 細胞である。これらの細胞中ならびに培養液中のウイルス RNA 量、感染力価を測定し、ウイルス RNA の複製能、ウイルス粒子形成能を評価した。

## 4. 研究成果

①PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路は強い HCV 抑制活性を持ち、またその阻害剤であるラパマイシンにより HCV 増殖が増強することが知られている。今回我々は検討課題の一つである PI3 キナーゼ経路について、それを抑制するマイクロ RNA (miRNA) を同定し、それによる HCV 増殖の修飾作用を見いだした。HCV を肝癌細胞株である Huh7 細胞に感染させると複数の miRNA の発現に増減がみられた。その中で HCV 感染により発現が増加する miR-192/miR-215 と HCV 感染により低下する miR-491 は、レプリコン細胞に導入すると HCV 増殖を促進するものであることが分かった。そこで、HCV の翻訳に関する HCV IRES の活性を検討したが、miR-192/miR-215、miR-491 による明らかな増加はみられなかった。また、miR-491 は細胞機能そのものにも影響し、cap 依存的な翻訳を抑制し、また細胞増殖も抑制するものであった。細胞増殖が低下すると HCV 増殖も低下すると思われるにもかかわらず、HCV の増殖が促進する理由についてさらに検討を進めたところ、miR-491 は Akt のリン酸化を強く抑制することが明らかとなった。miR-491 を導入した細胞に PI3 キナーゼの阻害剤である LY294002 を添加して培養を行うと、miR-491 による HCV 増殖の促進効果は減弱することからも、miR-491 の作用は PI3 キナーゼの抑制によるものであろうと考えられた。

②BCAA は必須アミノ酸の一部であり、生体に重要な栄養素として以外に mTOR シグナルを活性化するという生理活性作用を持つ。また、慢性肝疾患、特に肝硬変期の低蛋白血症に対する治療薬としても使用される。mTOR シグナルは HCV 増殖を抑制する作用があるため、BCAA は抗 HCV 作用が期待され、さらに副作用が少ないという面からも十分な実用的で有用性が高いと思われる。そこで、まず HCV 増殖の培養細胞系である、HCV レプリコン細胞を用いて BCAA の役割を検討した。BCAA を含

まない培地に BCAA を添加して細胞培養を行ったところ、BCAA 存在下で HCV の有意な抑制が濃度依存的に認められた。BCAA により mTOR の活性化が確認されたため、mTOR 阻害剤であるラパマイシンを添加して同様の実験を行ったが、ラパマイシン存在下でも BCAA により HCV の抑制が誘導された。一方、HCV 感染 Huh7 細胞にて同様の検討を行ったところ、逆に BCAA の濃度依存的に HCV 蛋白および RNA 量の増加が認められた。そこで、ウイルス粒子を形成する HCV 株と、2 アミノ酸置換のため粒子形成を持たない HCV 株を作成し、BCAA の影響を比較検討した。HCV 粒子を形成する株では BCAA の添加によりウイルス増殖の増加が見られたが、粒子形成のない株では BCAA によりウイルス増殖が抑制された。よって、BCAA は HCV ゲノム RNA の複製の過程では HCV 増殖を負に制御し、ウイルス粒子形成から粒子の放出、再感染にわたる過程においては、BCAA は逆に促進するものと考えられた。さらにそのメカニズムについて詳細な検討として、細胞表面に HCV の細胞内への進入に関与する CD81 を持たない Huh7 細胞 (Huh7-25) を使った single-cycle virus production assay 法を用いた。Huh7-25 に HCV ゲノム RNA を導入し、細胞内のウイルス量と細胞から放出されたウイルス量を測定するものであるが、その際に CD81 が存在しないため HCV の再感染は起こらず、HCV の粒子形成能や分泌の効率を評価することができる。この方法で検討すると、やはり細胞内の HCV のゲノム RNA 増殖は BCAA の存在により抑制が認められた。しかしながら、細胞ライセート内の感染性 HCV は BCAA が存在する状態では、存在しない状態と比べて大きく増加していることが分かった。また細胞内の感染性 HCV と細胞外の感染性 HCV を比較すると、BCAA の存在は HCV の分泌にはほとんど影響しないことが示された。すなわち、BCAA のない状態では HCV RNA の増殖効率は増すが、その多くは感染性を持つウイルスの形成に関与できていないことを意味する。以上のことより、BCAA は感染性を持つ HCV 粒子形成の過程において非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらにこのメカニズムの解明は、HCV 増殖に携わる細胞内因子の同定にもつながり、将来的な抗 HCV 療法へと発展していく可能性が考えられる。

#### 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)

- ① 石田 永、竹原 徹郎、林 紀夫、HCV 感染により変動するマイクロ RNA の HCV 増殖に対する影響、消化器内科、査読無、51 巻、2010、636-641

- ② Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV via the PI3 kinase/Akt pathway. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、Vol.412, 2011, 92-97.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 石田 永、竹原 徹郎、林 紀夫、Perturbation of HCV replication by microRNAs which are regulated by HCV infection. The Liver Meeting 2009--AASLD's 60th Annual Meeting. 2009 年 11 月 1 日
- ② 石田 永、竹原 徹郎、林 紀夫、Perturbation of HCV replication by microRNAs which are regulated by HCV infection. 17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2010 年 9 月 11 日
- ③ 石田 永、竹原 徹郎、林 紀夫、分岐鎖アミノ酸の HCV 増殖に与える影響、第 14 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月 13 日

[図書] (計 0 件)

[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

石田 永 (ISHIDA HISASHI)  
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・研究員  
研究者番号 : 00506230

(2)研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)  
大阪大学大学院・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 70335355

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :