

## 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31日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790447

研究課題名（和文） ウイルス感染による脂肪酸合成制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanisms for regulation of fatty acid synthesis by a viral infection

研究代表者

棟方 翼（MUNAKATA TSUBASA）

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

研究成果の概要（和文）：我々はC型肝炎ウイルス（HCV）が脂肪酸合成酵素（FASN）の発現を活性化することを以前に証明した。そこで、FASN 或いはその合成産物が HCV の生活環で果たす役割を解明する為、阻害剤を利用して解析した結果、FASN 阻害剤は HCV 複製を抑制した。FASN 阻害による HCV 複製抑制はパルミチン酸を加えることで解除されたことから、パルミチン酸依存の HCV 複製制御という新しい概念を提案した。

研究成果の概要（英文）： We previously demonstrated that hepatitis C virus (HCV) activated expression of fatty acid synthase (FASN). Thus, we managed to understand the roles of FASN and its products in the HCV life cycle, and, using FASN inhibitors, we found that inhibition of FASN activities resulted in repression of HCV replication. Since this repression was restored by addition of palmitic acid, we have proposed the new molecular mechanism for regulation of HCV replication by FASN via a fatty acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、低分子化合物、阻害剤、脂肪酸合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）は、全世界で推定1億7千万人の感染者が存在する、極めて重要な感染症の原因因子である。HCVはフラビウイルス科・ヘパシウイルス属のRNAウイルスであり、9.6kbのプラス鎖の一本鎖RNAをゲノムとする。HCVの最大の病理

学的特徴は、感染後に急性肝炎を起こす稀な株もあるものの、一般にヒト肝細胞に長期間持続感染することで肝炎が慢性化して脂肪肝・肝繊維症となり、最終的に肝硬変を経て肝臓癌に至ることにある。慢性のC型肝炎で生じる炎症及びその酸化ストレスが、HCV感染後の肝臓癌の進行に寄与する可能

性が臨床的に示唆されているものの、一つ以上のウイルス由来の蛋白質が癌化に直接寄与することを示す結果が、トランスジェニック・マウスにおいて明らかとなっている。全HCV蛋白質を比較的少量発現するトランスジェニック・マウスで肝臓癌への進行が確認されているが、HCVの構造蛋白質であるコアのみを多量に発現するトランスジェニック・マウスでも肝臓癌の発生が報告されている。これらの結果を鑑みると、HCV由来の蛋白質が癌化に直接影響を与えていることが考えられる。

一方で、これらのマウスでは癌以外の病態も再現する。特に、HCV感染後の中性脂肪の蓄積による脂肪肝の形成は、近年注目されているメタボリック・シンドロームとも関係する。しかし、どのウイルス蛋白質がどのような分子メカニズムで脂肪肝の形成を促すのかについて、未だ十分な知見は無いことから、感染患者の病態の進行過程を解析し、感染後の肝細胞内の代謝変化を観察することは非常に有益であると予想できる。我々は、HCVのNS5B蛋白質が宿主細胞のがん抑制遺伝子産物Rbの分解を誘導して、下流のE2F応答性遺伝子群の発現を活性化することを見出している (Munakata *et al.*, *PNAS*, 2005; Munakata *et al.*, *PLoS Pathog*, 2007)。この遺伝子群の中に、脂肪酸合成酵素 (FASN) を含む脂肪酸合成経路の因子が存在することが予備的実験で判明した。そこで、HCV依存に発現上昇する脂肪酸合成経路の因子群を解析することで、HCV感染細胞で脂肪滴が形成され脂肪肝になる現象を、分子生物学的かつ細胞生物学的に解明する基盤が出来たと考えている。

## 2. 研究の目的

HCVをはじめとする RNA ウイルスは細胞

質で複製することが分かっている。その足場として特別な膜組織が必要であるという知見が蓄積しつつある。ウイルスのゲノム複製酵素でもある NS5B が宿主細胞のスフィンゴリン脂質と結合することも考慮すると、脂肪酸合成経路の活性化は、ウイルス感染後の病態解析のみならず、ウイルス複製の分子機構の解明にも繋がる。更にこの経路の阻害剤を見出すことで、宿主因子を標的とした新たな抗ウイルス薬の開発に至ることも予測できる。インターフェロンとリバビリンに替わる新たな抗 HCV 薬としては、コレステロール合成阻害剤であるスタチン類も開発されつつあるが、副作用の出る高濃度で使用しないと効果が出ないことから、脂肪酸合成経路を標的とする我々の研究は新たな展開を期待できる。

脂肪酸合成酵素 (FASN) の阻害剤が HCV 複製をも阻害することが我々の予備的実験で判明している。真核生物の FASN は、七種の酵素活性を有する分子量 260 kDa の巨大ポリペプチドの二量体であり、細胞質でアセチル CoA とマロニル CoA と NADPH を原材料として炭素数 16 のパルミチン酸や炭素数 18 のステアリン酸を合成する。FASN が持つ酵素活性は、N 末から順に、ケトアシル・シンテース (KS)、マロニル CoA/アセチル CoA・ACP・トランスアシレーズ (MAT)、デヒドラターズ (DH)、エノイル・リダクテース (ER)、ケトアシル・リダクテース (KR)、アシル・キャリア・プロテイン (ACP)、チオエステラーズ (TE) である。FASN の KS と TE のどちらの酵素活性に対する阻害剤も 培養細胞系での HCV の複製を阻害することから、FASN 或いはその合成産物が HCV の生活環で重要な役割を果たすことが示唆されている。

## 3. 研究の方法

(1). HCV の増殖に関与する Rb/E2F の下流の脂肪酸合成経路遺伝子の同定

(1-1) HCV 依存に活性化される下流遺伝子のプロモーターの解析

HCV の感染又は複製依存に発現が mRNA レベルで変化する因子は、培養細胞系やチンパンジーの感染実験により、多量のデータが報告されている。それらの因子群から脂肪酸合成経路に関わる因子を選び、そのプロモーター配列を、TRANSFAC データベース (<http://motif.genome.jp/>) にて解析することで、E2F 転写因子の認識配列のコンセンサスに相同的な DNA 配列の有無を判定する。解析の positive control としては、既に E2F が結合することが生化学的に証明されている p107 及び MAD2 のプロモーターを利用する。その後、E2F 結合配列があると判断されたプロモーターをゲノム DNA からクローニングして、ルシフェラーゼのレポーター・ベクターに組み込み、そのプロモーターの活性が HCV の複製依存に上昇するかを培養細胞系で確認する。さらに、プロモーター中の E2F 結合部位に変異を導入することで、プロモーター活性の上昇が E2F 依存か否かを判定する。我々の予備的な実験では、HCV 依存に活性化される Rb/E2F 経路の下流遺伝子として、既に FASN やステアシル CoA・デサチュレース (SCD) を見出している。

(1-2) HCV 依存に活性化される遺伝子の miRNA による制御の解析

HCV の場合、RNA ゲノムを持つことから miRNA による複製と翻訳の制御が既に報告されている。(1-1) で同定された宿主遺伝子についても、HCV と同様に miRNA による制御が存在するか否かを検討する。まず、同定された遺伝子の mRNA 配列を PubMed データベースから取得して、その 3' 非翻訳領域のみを単離す

る。次に miRNA ターゲット解析データベース (<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>) を利用してその領域に結合可能な miRNA を網羅的に選択する。その後、その miRNA を過剰に発現し、或いはノック・ダウンすることで miRNA の宿主遺伝子に対する発現制御効果と、HCV 増殖に対する効果を観察する。特に有望なターゲットについてはその配列をルシフェラーゼ遺伝子の下流に繋いだレポーターを作成して、miRNA 結合配列の変異による影響も見る。我々の予備的な解析では、FASN の 3' 非翻訳領域に結合し得る miRNA による HCV 複製の制御が明らかとなりつつある。

(1-3) FASN の HCV 病態動物モデルでの発現解析

これまでの HCV 蛋白質のトランスジェニック・マウスでは出生時からウイルス蛋白質を発現しているため免疫寛容状態になっており、HCV 依存の免疫応答や炎症反応を観察することに適した系ではなかった。上記問題に対応するため、我々は HCV 蛋白質のマウスでの発現を時期特異的に操作できる誘導発現系を開発した。このトランスジェニック・マウスでは、HCV 蛋白質の誘導後、三週間で脂肪肝が観察され、慢性肝炎状態が続き、誘導後 20 ヶ月で肝細胞癌が生じる。この系を利用して、「HCV の増殖に関与する Rb/E2F の下流の脂肪酸合成経路遺伝子」群の中で既に我々が同定した FASN の発現量の変動を mRNA と蛋白質のレベルで調査する。各ステージでの肝臓組織の標本は既に用意されているので、免疫蛍光法で HCV 蛋白質発現細胞での FASN 蛋白質の発現を観察する。また、誘導後の FASN 蛋白質の発現変動を定量化するために ELISA も行う。mRNA の発現プロファイルは TaqMan による定量的 RT-PCR 法で検討する。

(1-2)で同定した miRNA の発現解析も行う。

## (2). 脂肪酸合成経路の阻害がウイルス複製・感染に与える効果の解析

(2-1) HCV 感染・複製で重要な脂肪酸の同定  
脂肪酸合成酵素 (FASN) は七種の酵素活性を有する。我々はその中の二種に対する阻害剤を用いて、HCV 複製に FASN が必要であるという予備的知見を得た。FASN 阻害剤は他に複数入手可能であるため、まず新たな阻害剤を用いて同様の結果が得られるかを検討する。その際、HCV 複製活性はルシフェラーゼ活性だけでなく、ウイルス RNA と蛋白質を検出することでも判定する。哺乳類 FASN の主要な合成産物はパルミチン酸 (16:0) であり、パルミチン酸は長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 によりステアリン酸 (18:0) となる。これらの脂肪酸は小胞体やミトコンドリアでアラキジン酸 (20:0) のような長鎖脂肪酸へと変換される。またステアリン酸は SCD によりオレイン酸 (18:1) となる。FASN 阻害剤を加えた後にこれらの飽和・不飽和脂肪酸をレプリコン細胞へ添加することで、HCV 複製に重要な脂肪酸を同定する。同様の解析を HCV 感染細胞でも行う。

## (2-2) FASN 阻害剤の HCV 感染動物モデル系での効果の解析

培養細胞系で抗 HCV 作用が観察された FASN 阻害剤に関して、ヒト肝臓キメラマウスを用いた HCV 感染動物モデル系での効果を検討する。FASN 阻害剤の中には既に FDA に認可された薬物も存在する。その場合は、安全性試験と代謝試験の結果を参考にしてマウスへの投与方法と投与量を決定する。キメラマウスへ感染させる HCV の遺伝子型は、既存のインターフェロン治療で難治型の 1b 型とする。まず、複数の FASN 阻害剤について単独投与の場合の抗 HCV 効果を観察する。単独投与で

最も効果があった FASN 阻害剤について、インターフェロン等の既知の薬物との併用投与を行って、HCV への阻害効果が最大でどの程度か、治癒が可能かどうかを検証していく。

## 4. 研究成果

我々は、HCV の NS5B 蛋白質が宿主細胞のがん抑制遺伝子産物 Rb の分解を誘導して、下流の E2F 応答性遺伝子群の発現を活性化することを見出している。この遺伝子群の中に、脂肪酸合成酵素 (FASN) を含む脂肪酸合成経路の因子が存在することが予備的実験で判明していた。そこで、FASN 或いはその合成産物が HCV の生活環で果たす役割を解明する為、FASN 阻害剤の HCV 複製に対する効果を検討した結果、*in vitro* (培養細胞実験) と *in vivo* (ヒト肝臓キメラマウスを用いた動物実験) で共に、FASN 阻害剤が HCV 複製を抑制することが判明した。FASN に対する siRNA の効果も、FASN 阻害剤の効果と一致して、HCV 複製・増殖の抑制を示した。FASN 阻害による HCV 複製抑制は炭素数 16 の脂肪酸、パルミチン酸を加えることで解除されたことから、パルミチン酸依存の HCV 複製制御という新しい概念を提案 (論文作成中) している。また、肝炎や脂肪肝を生じるモデル動物である HCV-Tg マウスにおいて、病態の発症と FASN の発現が相関することも我々は見出した。従って、FASN 阻害剤はウイルス感染の治療だけでなく、HCV 感染由来の病態の治癒にも応用可能であると考えている。

## 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 Okamoto Y, Masaki T, Murayama A,

Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Jul 8;410(3):404-9. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.144

- ② Kohara K, Munakata T, Kohara M. The pathogenesis of hepatitis C virus induced by viral proteins. *Nihon Rinsho* 2011 May;69 Suppl 4:97-102. 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① Tsubasa Munakata, Hideko Nuriya, Akio Nomoto, and Michinori Kohara. Regulation of HCV replication by fatty acid synthase. The 18th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. (シアトル、2011年9月8-12日) ポスター発表
- ② 棟方 翼、野本 明男、小原 道法 脂肪酸合成酵素を介したパルミチン酸によるC型肝炎ウイルスの複製制御 第58回日本ウイルス学会学術集会(徳島、2010年11月8日) 口頭発表
- ③ Tsubasa Munakata, Akio Nomoto, and Michinori Kohara Palmitate regulates HCV replication. The 17th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. (横浜、2010年9月11日) 口頭発表

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

棟方 翼 (MUNAKATA TSUBASA)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号: 50420237

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし