

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860309

研究課題名(和文) NS5A-ISDRアミノ酸変異がHCV複製と薬剤感受性へ与える影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of HCV propagation and IFN sensitivity by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region.

研究代表者

杉山 隆一 (SUGIYAMA, Ryuichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・研究員

研究者番号：70714476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、C型肝炎ウイルス(HCV)非構造領域(NS)5Aに存在するIFN感受性規定領域(ISDR)のアミノ酸置換が、HCVのライフサイクル及びIFN感受性に与える影響を解析することを目的とし研究を行った。
その結果、ISDRにアミノ酸置換を有するウイルスで、ウイルス粒子産生において重要なNS5Aとcoreとの相互作用が減少することで感染性ウイルス粒子産生の効率が低下した。更に、IFN誘導遺伝子(ISGs)発現を評価した結果、ISDRにアミノ酸置換のないウイルスで、NS5AとSTAT1が結合することで、STAT1リン酸化の亢進が抑制され、ISGs発現が阻害された。

研究成果の概要(英文)：To assess the involvement of ISDR in the HCV life cycle and to clarify the molecular mechanisms influencing IFN susceptibility, we used recombinant JFH-1 viruses with NS5A of the genotype 1b Con1 strain (JFH1/5ACon1) and with NS5A ISDR containing 7 amino acid substitutions (JFH1/5ACon1/i-7mut), and compared the virus propagation and the induction of ISGs. By transfecting RNAs of these strains into cells, we found that the efficiency of infectious virus production of JFH1/5ACon1/i-7mut was attenuated compared with JFH1/5ACon1. After transfecting RNA into cells, the mRNA expression of ISGs was sufficiently induced by IFN treatment in JFH1/5ACon1/i-7mut-transfected but not in JFH1/5ACon1-transfected cells. These data suggested that the NS5A-mediated inhibition of ISG induction was deteriorated by amino acid substitutions in the ISDR. These observations explain the strain-specific evasion of IFN signaling by HCV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス NS5A インターフェロン 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

日本では肝癌により年間約3万人が死亡しており、その約75%がC型肝炎ウイルス(HCV)感染による肝癌と考えられている。従って、C型慢性肝炎を治療させることができれば、日本における肝癌の発生は劇的に減少する。C型慢性肝炎の治療には、Peg化インターフェロン(IFN)とリバビリン(RBV)もしくはプロテアーゼ阻害剤を加えた三剤併用療法が用いられるが、遺伝子型1bで高ウイルス量の患者では著効率が十分でなく、治療前にその治療効果を推定することや、新規治療薬による著効率の高い治療法の開発が望まれている。IFN治療効果の予測因子として、これまでの研究により、宿主側要因としてIL28Bの遺伝子多型、ウイルス側要因としてHCVコア領域のアミノ酸置換や非構造領域(NS)5Aに存在するIFN感受性規定領域(ISDR)、IFN/RBV抵抗性規定領域(IRDR)が報告されている。特に、ISDRはIFN単独療法時代からその関与が報告され、臨床的には治療効果と強い相関が有るものの、この領域の置換がHCVの感染や複製、粒子形成に与える影響は依然不明であり、どのような機序でIFN治療効果に影響を与えるのかはよくわかっていない。

HCVには長らく培養細胞での感染増殖系が存在しなかった。しかし、2005年にHCV JFH-1株とHuH-7細胞を用いた感染増殖システム(HCVcc)が報告され、このウイルスの感染から複製、ウイルス粒子の形成分泌に至るすべてのライフサイクルが培養細胞で再現できるようになり、現在でも多くの研究に利用されている。さらにこの方法は改良され、HCVのレセプター分子が発現していないHuH-7細胞(Huh7-25細胞)を用い、詳細なHCVライフサイクルの評価が可能なが樹立されている。この細胞株では、HCVの複製と感染性ウイルス粒子の生成が可能であるが、生成されたウイルス粒子はこの細胞に再感染することはできない。従って、このHuh7-25細胞にHCVの全長RNAを導入すると、複製から粒子形成、分泌への一連のライフサイクルの過程がシングルサイクルで観察でき、それぞれの過程の効率を表すパラメータの比較により各ライフサイクルの効率が解析できる。

2. 研究の目的

本研究はC型慢性肝炎におけるIFN治療効果に関与するHCV-NS5Aに存在するISDRのアミノ酸置換が、HCVのライフサイクルに与える影響及びその作用機序を解析するとともに、どのような機序でIFN感受性を規定しているかについて明らかにするものである。

3. 研究の方法

HCV JFH-1株を用いたHCVccシステムにより、このウイルスのライフサイクルが培養細胞で観察可能となった。しかし現在でも培養細胞内で効率的な複製と感染性ウイルス粒

子生成が可能なのはこの遺伝子型2aのJFH-1株のみであり、他の遺伝子型や他の株での評価は難しい。今回のテーマとなるNS5A-ISDRのアミノ酸置換は、臨床的に遺伝子型1bの株において報告されたものであり、遺伝子型2aの株では薬剤感受性において遺伝子型1b株のような強い相関は認めていない。実際に我々は、JFH-1株のNS5A-ISDRにアミノ酸置換を導入しウイルス複製と感染性ウイルス粒子生成を評価したが、アミノ酸置換の導入による影響は観察されなかった。

そこで、JFH-1株と遺伝子型1b株のキメラウイルスを用い解析する方法を考えた。JFH-1株のゲノムの一部を他のHCV株のものと置換し、感染複製が可能なきメラウイルスを作製する方法はこれまでも報告されている。我々は、JFH-1株のNS5A領域を他の遺伝子型の株に置換したキメラウイルスを用い、新規治療薬として期待されているNS5A阻害剤の遺伝子型間、株間の感受性の違いを明らかにした(Okamoto *et al.*, BBRC, 2011)。そこで今回は、JFH-1株のNS5Aを遺伝子型1bのCon1株に置換したキメラウイルス(JFH1/5ACon1)を用い、ISDRのアミノ酸置換がHCVの増殖に与える影響について検討を行った。Con1株のNS5A内ISDRを野生型(wt)にしたキメラウイルス(JFH1/5ACon1/i-wt)、さらにISDRに7個のアミノ酸置換を導入したキメラウイルス(JFH1/5ACon1/i-7mut)を構築し検討を行った(図1)。

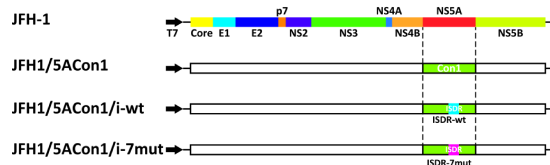


図1. NS5A置換キメラウイルスのゲノム構造

4. 研究成果

図1で構築したこれらの株のHCV-RNAを細胞に導入した結果、HCVのウイルス粒子産生において重要であるNS5Aとcoreタンパク質との相互作用が、ISDRにアミノ酸置換を有するウイルスでは減少しており、その結果、感染性ウイルス粒子産生の効率を低下した。

また、構築した組換えウイルスを導入した細胞で、IFN-の添加によるインターフェロン誘導遺伝子(ISGs)発現を評価した結果、ISDRにアミノ酸置換のあるウイルスではIFN-の添加によりISGsの発現が有意に上昇したが、ISDRにアミノ酸置換のないウイルスではISGs発現が抑制されていた。この現象について詳細に検討した結果、ISDRにアミノ酸置換のないウイルスでは、NS5AがSTAT1と結合することで、STAT1リン酸化の亢進が抑制されたのに対して、ISDRにアミノ酸置換があるウイルスでは、この現象はほとんど見られなかった。

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7件)

Toshifumi Imagawa, Ryuichi Sugiyama, Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takaji Wakita and Koji Ishii. Evaluation of Heating conditions for Inactivation of Hepatitis E virus Genotype 3 and 4. *Journal of Food Protection*. In press.

Ryuichi Sugiyama, Asako Murayama, Sayuri Nitta, Norie Yamada, Megumi Tasaka-Fujita, Takahiro Masaki, Hussein Hassan Aly, Masaaki Shiina, Akihide Ryo, Koji Ishii, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus in influences virus production and interferon signaling. *Oncotarget*. 2017; **9** 5627-5640.

Norie Yamada, Ryuichi Sugiyama, Sayuri Nitta, Asako Murayama, Minoru Kobayashi, Chiaki Okuse, Michihiro Suzuki, Kiyomi Yasuda, Hiroshi Yotsuyanagi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Resistance Mutations of Hepatitis B Virus in Entecavir-refractory Patients. *Hepatology Communications*. 2017; **1** 110-121.

Sayuri Nitta, Yasuhiro Asahina, Mami Matsuda, Norie Yamada, Ryuichi Sugiyama, Takahiro Masaki, Ryosuke Suzuki, Nobuyuki Kato, Mamoru Watanabe, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Effects of Resistance-Associated NS5A Mutations in Hepatitis C Virus on Viral Production and Susceptibility to Antiviral Reagents. *Sci Rep*. 2016; **6** 34652.

Hironori Nishitsuji*, Ryuichi Sugiyama*, Makoto Abe and Hiroshi Takaku. ATP1B3 Modulates the Restriction of HIV-1 Production and NF- κ B Activation by BST-2. *J Biol Chem*. 2016; **291** 4754-4762.

Megumi Tasaka-Fujita, Nao Sugiyama, Wonseok Kang, Takahiro Masaki, Asako Murayama, Norie Yamada, Ryuichi Sugiyama, Senko Tsukuda, Koichi Watashi, Yasuhiro Asahina, Naoya Sakamoto, Takaji Wakita, Eui-Cheol Shin and Takanobu Kato. Amino Acid Polymorphisms in Hepatitis C Virus Production and Major Histocompatibility Complex Class I

Molecule Expression. *Sci Rep*. 2015; **5** 13994.

Norie Yamada, Ryuta Shigefuku, Ryuichi Sugiyama, Minoru Kobayashi, Hiroki Ikeda, Hideaki Takahashi, Chiaki Okuse, Michihiro Suzuki, Fumio Itoh, Hiroshi Yotsuyanagi, Kiyomi Yasuda, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. *World J Gastroenterol*. 2014; **20** 3044-3049.

*: equal contribution.

[学会発表](計4件)

Ryuichi Sugiyama, Nao Sugiyama, Asako Murayama, Megumi Tasaka-Fujita, Norie Yamada, Sayuri Nitta, Takahiro Masaki, Koji Ishii, Akihide Ryo, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Amino acid substitutions in IFN sensitivity-determining region of HCV-NS5A affect infectious virus production and ISG induction. The 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October, 2016. Kyoto, Japan.

Ryuichi Sugiyama, Nao Sugiyama, Asako Murayama, Megumi Tasaka-Fujita, Norie Yamada, Sayuri Nitta, Takahiro Masaki, Akihide Ryo, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Amino acid substitutions in ISDR of HCV-NS5A affect infectious virus production and ISG induction. The 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver. February, 2016. Tokyo, Japan.

Ryuichi Sugiyama, Nao Sugiyama, Asako Murayama, Megumi Tasaka-Fujita, Takahiro Masaki, Takaji Wakita and Takanobu Kato. Elucidation of the effect of HCV propagation by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. The 21th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses. September, 2014. Banff, Canada.

杉山 隆一, 杉山 奈央, 村山 麻子, 藤田 めぐみ, 山田 典栄, 新田 沙由理, 脇田 隆字, 加藤 孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異による HCV 増殖および IFN 感受性への影響 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 隆一 (SUGIYAMA, Ryuichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・研究

員

研究者番号：70714476