

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：肝炎ウイルスの複製増殖および病原性発現機構と薬剤感受性の解析
2. 研究開発代表者： 脇田 隆宇（国立感染症研究所 副所長・ウイルス第二部部长）
3. 研究開発の成果

本研究では HCV や HEV の新規肝炎ウイルス培養系を開発し、ウイルス感染増殖機構、病原性発現機構を解析して、新規薬剤開発を目指した。

(1) 遺伝子型 2b, 3, 4a の HCV 感染モデルを確立し、感染細胞の変化や抗 HCV 薬の感受性を解析した。遺伝子型 1b の全長レプリコン型ウイルスによる経代培養が可能となった。構造エピトープを認識し、HCV 感染中和活性を有する抗 E2 単鎖抗体を樹立した。

(2) HEV の感染性 cDNA クローンを樹立した。HEV レプリコンでスクリーニングして、複数の HEV 複製阻害化合物を同定した。レプリコン細胞に構造蛋白を trans に供給してレプリコン RNA を持つ擬似粒子の作製に成功した。慢性 E 型肝炎例からの分離ウイルスによりリバビリン耐性メカニズムを検討した。

(3) Lカルニチンは CPT1 を介した抗脂肪化効果により、脂肪滴の縮小を伴った HCV 粒子形成抑制が関与した。更に、カルニチンによる HCV 感染細胞の抗酸化作用が明らかとなった。カルニチンの HCV 感染病態に関する前向き観察試験を開始した。

(4) プロポリス主成分の誘導体 caffeic acid n-octyl ester や Typhostin およびその誘導体 が抗 HCV 活性を示し、IFN α および DAA に対して相乗効果を示し、その抗 HCV 機構が活性酸素産生促進と関連した。

(5) 合成レチノイド Tp80 は酸化ストレス応答に寄与する GI-GPx 発現量を HCV 感染による発現抑制状態から回復させる。構造活性相関解析から Tp80 のもつ Tropolone 環が抗 HCV 作用に関与した。Tp80 の効果は RIG-I とは独立した経路で炎症応答等を誘導し、抗ウイルス作用を示した。CDK9 標的化合物 FIT039 は、HBV を含む広汎な DNA ウイルスに対して増殖抑制作用を示した。

(6) HCV 感染過程には Rab13 が重要である。Rab を修飾する GGTase II を構成する REP1, -2 は HCV 増殖に重要である。Rab と REP の相互作用、NS5A-NS5A の相互作用を解析するアッセイ系を開発した。

(7) HBV および HCV に共通する発癌因子の同定と解析を行った。同定タンパクの各種細胞株内および感染患者肝内での発現量を mRNA および蛋白質を比較検討した。特に DDB1 は、ウイルス発癌における重要な分子として今後さらなる詳細な検討課題と考えられた。

(8) 複製効率の著しく異なる遺伝子型 HBV を用いて CP 領域キメラウイルスを構築した。BCP 領域キメラ複製効率増強が確認された。BCP 領域内の複製規定領域を絞り込み、さらに PHH 感染実験で同領域変異がウイルス複製に及ぼす影響を検証した。

(9) 感染性 HCV を産生する HCV 増殖マウスと、ヒト受容体を発現する HCV 感染感受性マウスを作製した。さらに慢性 C 型肝炎モデルマウス（HCV 増殖 Tg マウス）の作製に成功し、病態を解析している。

(10) ウイルス非感染ヒト肝細胞では IFN α が低レベルで産生され、HCV 感染に対する自然免疫応答を加速させていた。樹立したヒト肝幹細胞 HYM 細胞の肝分化能を検討した。肝細胞と胆管上皮細胞へ分化能を有する肝幹細胞様細胞であり、成熟した肝細胞には完全には分化していないが HCV 感染が可能であった。IFN λ 処理ヒト肝細胞キメラマウスでは ApoF 遺伝子が IFN λ によって発現誘導された。ApoF 発現 Huh7.5 細胞では JFH1 の感染増殖が抑制された。ApoF は IFN λ によって誘導される新たな抗 HCV 因子である可能性が示された。ApoF は感染性 HCV の構造変化を誘導した。

(11) ヒト iPS 細胞由来肝細胞分化誘導系を用いて HCV 侵入および複製に関与する候補遺伝子を絞り込み、HCV 侵入について 9 遺伝子、HCV 複製について 33 遺伝子を抽出した。シイタケ菌糸体抽出物（LEM）は抗 HCV 効果を有し、LEM 中の低分子化リグニンが HCV 侵入阻害作用、その他成分が HCV 複製阻害活性を有していることを明らかとした。

(12) iPS 細胞由来肝細胞は、HCV 感染とそれに伴う自然免疫応答との攻防を評価可能な HCV 感染評価系として有用であることが明らかとなった。