

培養肝細胞を用いたスタチン剤のC型肝炎ウイルス抑制効果について

池田 正徳

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学

キーワード：HCV, レプリコン, スタチン, HMG-CoA reductase, ゲラニルゲラニル化

Statins inhibit hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells

Masanori Ikeda

Department of Molecular Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

C型肝炎ウイルス（HCV）はフラビウイルス科のヘパシウイルス属に分類されるウイルスである。その遺伝子の本体は約9.6kbの一本鎖のプラス鎖RNAである^{1,2)}。HCVのタンパク質はまず約3,000アミノ酸からなる前駆体ポリタンパク質として翻訳され、その後10個のタンパク質がプロセッシングにより産生されることが報告されている。HCVタンパク質の翻訳には5'非翻訳領域とcore領域の一部を含むIRES（internal ribosomal entry site）とよばれるRNAの二次構造が重要である。HCVの遺伝子の5'末端、3'末端側には非翻訳領域が存在し、それぞれの末端から約100塩基の領域はHCV RNAの複製に重要な領域であることが解明されている^{3,4)}。また、RNAポリメラーゼをコードするNS5B領域にも新たにCRE（cis-acting

replication element）とよばれるHCV RNAの複製に重要なRNAの二次構造が存在することが明らかになっている^{5,6)}。

HCVは1989年に米国のカイロン社によりHCV遺伝子の一部が発見されるまで非A非B型肝炎の病原ウイルスと考えられていた⁷⁾。その後、全長HCV遺伝子は1990年に加藤ら（現岡山大学）によって世界で初めて報告された⁸⁾。HCVの診断が可能となった現在、HCV感染者数は国内に約200万人、全世界で約1億7,000万人と推定されている。HCV感染は高率に慢性肝炎に移行し、致死的な肝硬変、肝癌へと進行する。肝硬変、肝癌の決定的な治療法が存在しない現在、慢性肝炎の段階でHCVを体内より排除して、その進行を止めることが最善のC型肝炎関連の肝疾患に対する治療戦略と思われる。C型慢性肝炎の標準的治療法は現在、ペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリンの併用療法である⁹⁾。この併用療法で体内からHCVを完全に排除できるのは、我が国でマイナー（約30%）なHCV遺伝子型である2型では約80~90%と良好な結果となっている。一方、我が国のHCV遺伝子型の約70%を占める1b型では約50%の有効率にすぎな

平成20年2月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7390 FAX：086-235-7392
E-mail：maikeda@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



C型肝炎ウイルス（HCV）との出会いは、横浜市立大学第3内科で消化器内科医としてのスタートをきった頃にさかのぼります。HCV感染によって引き起こされる肝硬変、肝癌の治療の難しさに大きな壁を感じていた頃、国立がんセンター研究所ウイルス部（下遠野邦忠部長）でHCVの研究に携わる機会にめぐまれました。当時のウイルス部は全HCV塩基配列の決定、HCV蛋白質のプロセッシングなどの重要な仕事をしつつと世界に先駆けて発表していて、それまでに経験したことのない独特の空気がただよっていました。がんセンターで現岡山大学大学院分子生物学分野の加藤宣之教授のもとC型肝炎ウイルスの複製モデルの研究を開始した後、米国のテキサス大学（Stanley Lemon教授）でHCVレプリコンの研究を行いました。帰国後は岡山大学に移られた、加藤教授の教室で再びHCV研究を続ける機会を頂き現在に至っております。一日も早くHCV感染を撲滅すべく、新しい治療法の開発に取り組んでいきたいと思ひます。

い。現在、1b型における治療成績の低いことが問題となっており、さらなる治療成績の向上が可能な新しい治療法の開発が急務となっている。

本稿では我々が世界で初めて開発したレポーター遺伝子を含む全長 HCV RNA 複製細胞を用いた薬剤の評価システム (OR6 アッセイシステム) について、また、高脂血症の治療剤であるスタチン剤の抗 HCV 効果を中心に述べたい。

HCV 複製モデル

1. HCV 複製動物モデル

新しい抗 HCV 剤の評価には HCV RNA を効率良く複製させることのできるモデルが必要となる。HCV の動物モデルはチンパンジーのみであるが、チンパンジーは稀少性、経済性、また、倫理的観点からも薬剤のスクリーニングのための動物モデルにはならない。最近では、遺伝子工学により作成されたヒト肝細胞置換マウス (uPA SCID mouse) が報告されているが、ヒトの肝細胞が必要なことや免疫系が働かないなどの問題が存在する¹⁰⁾。

2. サブゲノムレプリコン

抗ウイルス剤の一次スクリーニングとしては、簡便性、再現性の点で培養細胞が最適であるが、HCV が発見されてから約10年間は、HCV RNA を効率良く複製させることのできる培養細胞は存在しなかった。1999年にドイツの Lohmann らのグループにより HCV の遺伝子の一部に薬剤耐性遺伝子などの外来性遺伝子を組み込んだサブゲノムレプリコンが開発され、初めて効率のよい HCV 複製培養細胞系が登場した¹¹⁾。レプリコンの開発において、複製に最小限必要な HCV 遺伝子と薬剤耐性遺伝子を組み合わせたウイルス側の要因以外に忘れてはならない重要な要因として、レプリコンが複製する細胞である HuH-7 細胞が挙げられる。HuH-7 細胞は1979年に岡山大学の中林・佐藤らによって樹立された高分化型肝細胞癌由来の細胞株である^{12,13)}。今日まで、様々な HCV RNA 複製細胞株が報告されているがそのほとんどが HuH-7 細胞を改良して樹立したものである。HuH-7 は HCV 研究において最も有名な細胞株となった。現在まで、HuH-7 細胞を越える効率の良い HCV RNA の複製をサポートする細胞株は報告されていない。

レプリコンの開発により HCV の複製機構、HCV の複製に必要な宿主因子の研究が急速に進むこととなっ

た。また、レプリコンを用いた抗 HCV 剤候補の報告もされるようになった。

3. レポーターを持つ全長 HCV RNA 複製モデル (OR6 アッセイシステム)

サブゲノムレプリコンは複製に必要な HCV の非構造領域 (NS3-NS5B) からなるためにゲノムサイズが短くなり複製効率を向上させる利点があった。しかし、ゲノムサイズを短くするために複製には必須でない構造領域を欠いているという欠点も同時に存在していた。肝炎患者の肝臓では構造領域を含む全 HCV タンパク質が発現しており、この点からはサブゲノムレプリコンは HCV 感染・複製時に起こる実際の現象を忠実に再現できていないことになる。そこで、我々は、HCV-O 株 (遺伝子型 1b) 由来の全長 HCV RNA 複製系を開発した¹⁴⁾。次に、薬剤のより簡便な評価を目指してルシフェラーゼ遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子の 5'側 に組み込みネオマイシン耐性遺伝子の融合タンパク質として発現できる ORN/C-5B RNA を作成した。RNA を HuH-7 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、薬剤選択の結果、HCV RNA 複製効率の高いクローン化細胞株 (OR6) を樹立した (図1)¹⁴⁾。OR6 細胞 (HuH-7) に IFN- α を処理した時 HCV RNA とルシフェラーゼ活性は濃度依存的に減少し非常によい相関を示した (図2)。したがって、OR6 細胞 (HuH-7) では煩雑な RNA の定量の代わりに簡便でかつ精度の良いルシフェラーゼアッセイで代用できることがわかった。OR6 細胞 (HuH-7) では薬剤耐性遺伝子により安定した高い複製効率が、そして、ルシフェラーゼ遺伝子により簡便なレポーターアッセイが同時に可能となった。

スタチン剤の抗 HCV 効果

1. スタチン剤とは

高脂質血症の治療剤であるスタチン剤はわが国で開発された薬剤で、現在、世界で最もよく使われている薬剤の1つである。わが国では、現在、アトルバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンの6種類のスタチン剤が承認されている。

コレステロールはアセチル-CoA からメバロン酸、スクアレン等の中間代謝産物を経て生合成される。スタチン剤は HMG-CoA からメバロン酸の合成を行う HMG-CoA (hydroxyl methylglutaryl-CoA) 還元酵素

を抑制することで、コレステロールの生合成を抑制する（図3）。

スタチン剤には、また、コレステロールの低下作用以外に、血管内皮機能改善、抗炎症作用、血栓形成抑制などの多面的な作用を持つことが知られている¹⁵⁾。コレステロールの生合成過程でスタチン剤はコレステ

ロール生合成の抑制以外に、ゲラニルゲラニルニリン酸やファルネシルニリン酸などの産生も抑制する（図3）。これらのタンパク質はトランスフェラーゼによりGタンパク質などと結合しタンパク質の活性の調節を行っている。このことを、プレニル化によるタンパク質の修飾と呼ぶ。スタチン剤によるプレニル化の阻害

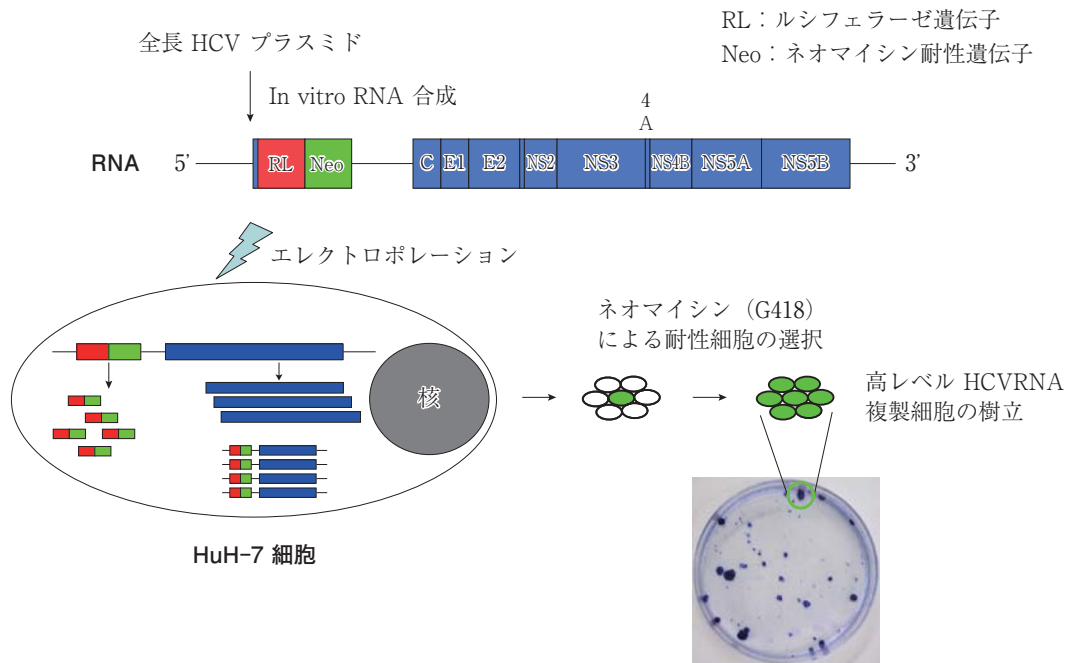


図1 レポーター遺伝子を含む全長 HCV RNA 複製細胞の作成

T7 RNA ポリメラーゼで合成した RNA をエレクトロポレーション法にて HuH-7 細胞に導入する。ネオマイシン耐性タンパク質とルシフェラーゼは融合タンパク質として発現する。ネオマイシンにより HCV RNA 複製レベルの高い耐性細胞を選択する。クローン化細胞株を樹立しルシフェラーゼアッセイ等を行う。

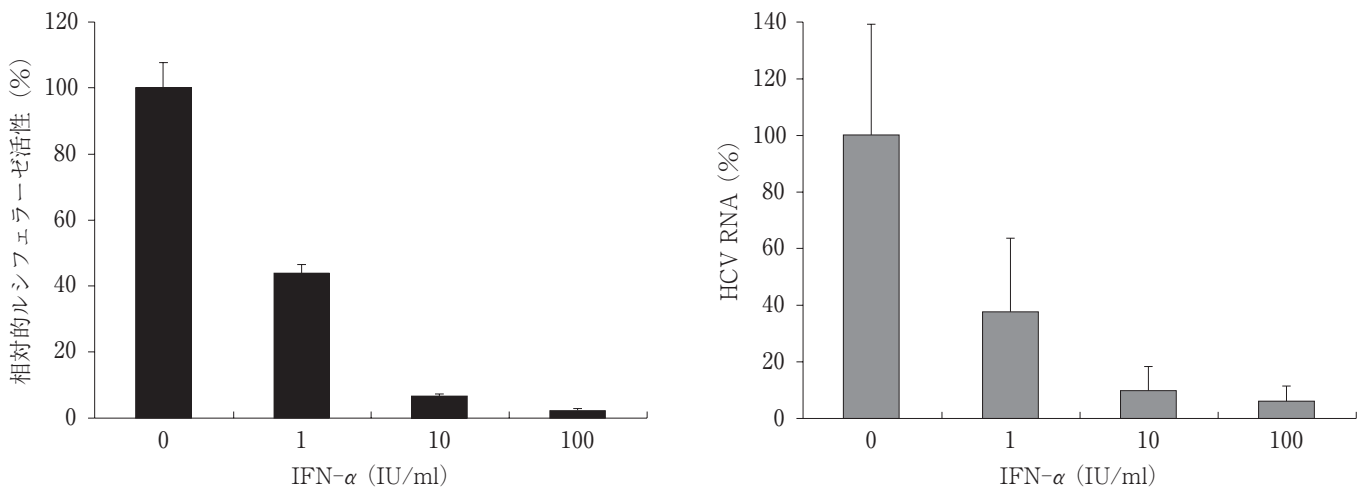


図2 OR6 細胞 (HuH-7) を用いた IFN-α の抗 HCV 効果

2×10^4 の OR6 細胞 (HuH-7) を撒き24時間後に IFN-α (0, 1, 10, 100IU/ml) を添加してさらに24時間培養した。IFN-α を添加していないルシフェラーゼ活性, HCV RNA 量を100%とし, IFN-α (1, 10, 100IU/ml) による抗 HCV 効果について比較した。(文献14より引用, 一部改変)

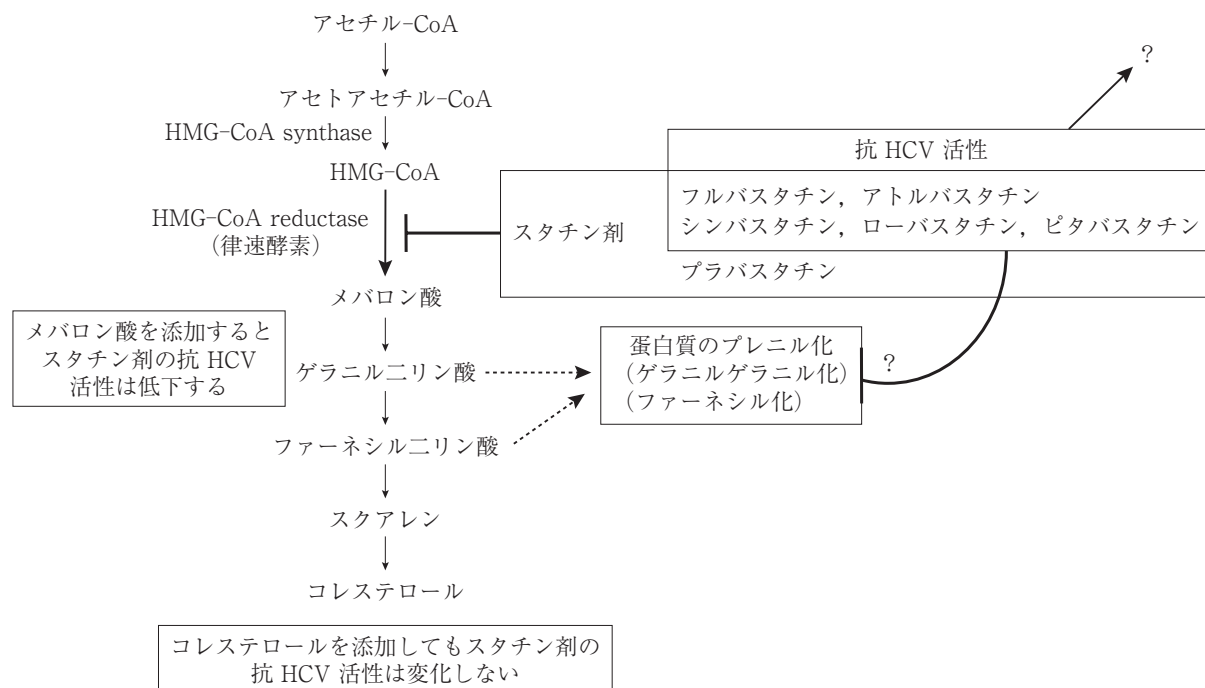


図3 コレステロール生合成系

はスタチン剤の多面的な作用の機序であることが知られている。

2. スタチン剤の抗 HCV 効果

スタチン剤の1つであるローバスタチン（国内未承認）が HCV RNA 複製を抑制することが2003年にアメリカのグループによって初めて報告された¹⁶⁾。スタチン剤の HCV RNA 複製抑制は宿主タンパク質のゲラニルゲラニル化の抑制が重要であることが報告された。その後、ゲラニルゲラニル化されるモチーフを有する宿主タンパク質のデータベース検索により FBL2 が同定された¹⁷⁾。FBL2 はユビチン化に関連するタンパク質であるが、その機能の詳細は現在まで明らかにされていない。

我々は、レポーター遺伝子をもつ全長 HCV RNA 複製細胞（OR6 アッセイシステム）を用いて、我が国で承認されているアトルバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチンの抗 HCV 効果について検討した。アトルバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチンはローバスタチンよりも強い抗 HCV 効果を持つことが分かった（図4）¹⁸⁾。一方、予想外にプラバスタチンには全く抗 HCV 効果が認められなかった¹⁸⁾。スタチン剤が HMG-CoA 還元酵素を抑制して、コレステロールの産生を低下させるとポジティブフィードバックに

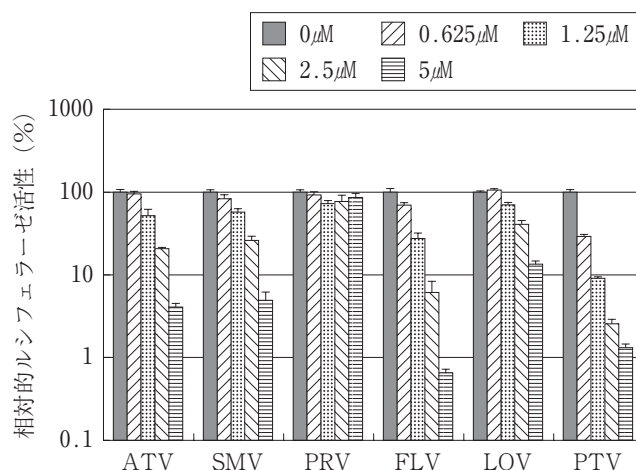


図4 スタチン剤の異なる抗 HCV 効果

2×10^4 の OR6 細胞（HuH-7）を撒き24時間後に ATV, SMV, PRV, FLV, LOV, PTV を 0–5 μ M の濃度で添加して72時間培養した。スタチン剤を添加していないルシフェラーゼ活性を100%としてスタチン剤の抗 HCV 効果について比較した。ATV；アトルバスタチン, SMV；シンバスタチン, PRV；プラバスタチン, FLV；フルバスタチン, LOV；ローバスタチン, PTV；ピタバスタチン（文献18より引用、一部改変）

より HMG-CoA 還元酵素の発現が増強することが知られている。実験に用いたスタチン剤はプラバスタチンを含めて HMG-CoA 還元酵素の発現の増強が確認できた。このことは、スタチン剤のまだ明らかにされていない HCV RNA 複製の阻害機構の存在を示唆す

るものと思われる。

3. スタチン剤と IFN- α の併用効果

C型慢性肝炎に対しては、現在 IFN とリバビリンの併用療法が行われている。我々は、スタチン剤が IFN の抗 HCV 効果にどのような影響を及ぼすかについて検討した。IFN- α を 0-8 IU/ml で OR6 細胞 (HuH-7) に添加すると同時にスタチン剤を添加する実験を行った。単独で抗 HCV 効果を示さなかったプラバスタチンでは IFN- α の抗 HCV 効果に影響を与えることはなかった (図5)¹⁸⁾。しかし、一方、フルバスタチンは IFN- α の抗 HCV 効果の作用を強く増強することがわかった (図5)¹⁸⁾。このことは、プラバスタチン以外のスタチン剤 (特にフルバスタチン) が IFN- α の新しいパートナーとなりうることを示唆している。

おわりに

抗 HCV 剤の開発には、通常の抗ウイルス剤の開発のようにスクリーニングに適した動物モデルが存在しないために培養細胞で評価した抗 HCV 剤の候補を臨床で試すという特殊な事情がある。HCV の酵素タンパク質に対する特異的な阻害剤が製薬会社によって開発され始めた当初、培養細胞で良い結果が得られていたためC型慢性肝炎は治せる病気になるとの期待が大きかった。しかし、最近の臨床試験での結果によると、薬剤抵抗性 HCV の早期出現などの問題により悲観的

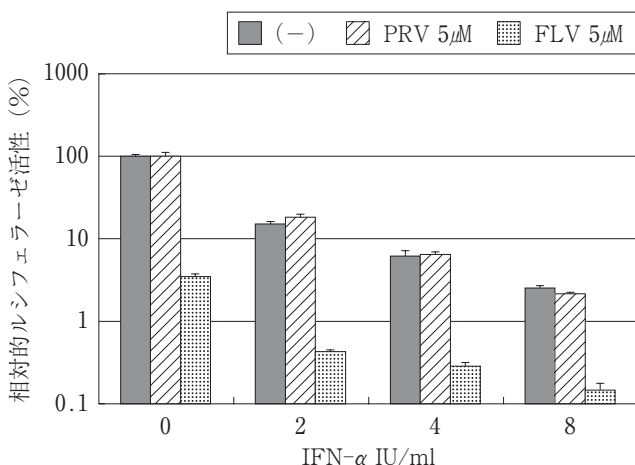


図5 スタチン剤と IFN- α との併用効果
PRV, FLV を 5 μ M 添加した OR6 細胞 (HuH-7) にさらに IFN- α を 0, 2, 4, 8 IU/ml 加えて 72 時間培養した。薬剤処理を行っていない細胞のルシフェラーゼ活性を 100% としてスタチン剤と IFN- α 併用における抗 HCV 効果について比較した。
(-) ; スタチン剤を添加していない。(文献18より引用、一部改変)

なものも多く、C型慢性肝炎の治療はなかなか一筋縄ではいかないという空気が漂ってきている。

変異率の高い HCV のタンパク質を標的とした治療剤に対する抵抗性の変異株が早期に出現することは細胞実験でも知られていた。一方、宿主タンパク質を標的としたスタチン剤やサイクロスポリンなどは抵抗性の変異株が出にくいため注目され始めてきている¹⁸⁻²⁰⁾。最近になって、瀬崎らは我々が 2006 年に発表した成果¹⁸⁾をもとに、PEG-IFN+リバビリンにフルバスタチンを併用することでC型慢性肝炎患者の完全著効率が改善されるとの報告をしている²¹⁾。今後、さらなる多施設での詳細な検討が待たれる。

全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 アッセイシステム) を用いて、我々は、これまでにスタチン剤以外にも抗 HCV 活性を有する物質の検討を行ってきた。リバビリンに構造の類似したリュウマチの治療剤であるミゾリビンにもリバビリンと同程度の抗 HCV 効果が認められた²²⁾。ミゾリビンにはリバビリンの副作用である貧血が認められない利点がある。また、日常的に摂取している栄養成分のうちビタミン D2, β -カロテン、リノール酸が抗 HCV 効果を有し、抗酸化作用をもつビタミン E は逆に HCV RNA 複製を増強させてしまうことを見だし報告した²³⁾。

細胞実験での良好な結果が必ずしも臨床試験でうまくいかないことは多い。このことを前提として、できるだけ多くの抗 HCV 剤の候補のプールを作り、臨床への情報、材料の提供を行っていききたい (図6)。そして、その中から 1 つでも C 型慢性肝炎患者の治療に役立つものを見出すことを今後の目標にしたい。

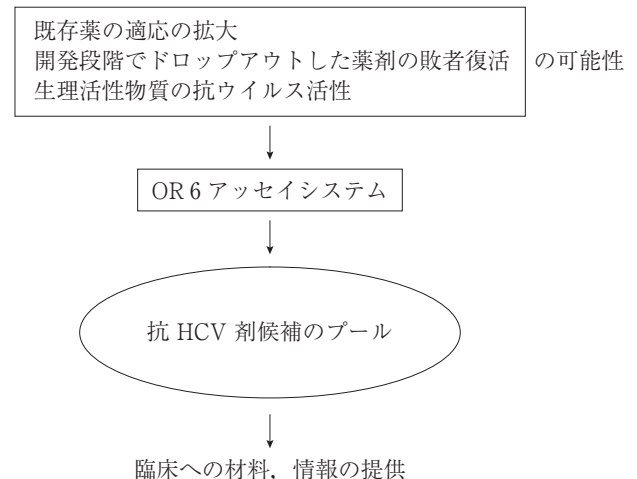


図6 抗 HCV 剤のスクリーニング

文 献

- 1) Kato N : Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* (2001) 55, 133-159.
- 2) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K : A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 215, 744-749.
- 3) Friebe P, Bartenschlager R : Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* (2002) 76, 5326-5338.
- 4) Yi M, Lemon SM : 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* (2003) 77, 3557-3568.
- 5) You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM : A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* (2004) 78, 1352-1366.
- 6) Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R : Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* (2005) 79, 380-392.
- 7) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M : Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* (1989) 244, 359-362.
- 8) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K : Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87, 9524-9528.
- 9) Hayashi N, Takehara T : Antiviral therapy for chronic hepatitis C : past, present, and future. *J Gastroenterol* (2006) 41, 17-27.
- 10) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Keneteman NM : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* (2001) 7, 927-933.
- 11) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* (1999) 285, 110-113.
- 12) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J : Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* (1982) 42, 3858-3863.
- 13) Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J : Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gann* (1984) 75, 151-158.
- 14) Ikeda M, Abe K, Dansako H, Nakamura T, Naka K, Kato N : Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 329, 1350-1359.
- 15) Liao JK, Laufs U : Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2005) 45, 89-118.
- 16) Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, Brown MS, Goldstein JL, Gale M Jr : Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100, 15865-15870.
- 17) Wang C, Gale M Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J : Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* (2005) 18, 425-434.
- 18) Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N : Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* (2006) 44, 117-125.
- 19) Inoue K, Yoshida M : Interferon combined with cyclosporine treatment as an effective countermeasure against hepatitis C virus recurrence in liver transplant patients with end-stage hepatitis C virus related disease. *Transplant Proc* (2005) 37, 1233-1234.
- 20) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyazaki Y, Shimotohno K : Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* (2005) 19, 111-122.
- 21) 瀬崎ひとみ, 鈴木文孝, 芥田憲夫, 河村祐介, 八辻寛美, 保坂哲也, 小林正宏, 鈴木義之, 斎藤 聡, 荒瀬康司, 池田健次, 熊田博光 : C型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法における HMG-CoA 還元酵素阻害剤併用によるウイルス学的効果の有用性の検討. *肝臓* (2008) 49, 22-24.
- 22) Naka K, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Kato N : Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication : effect of combination with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 330, 871-879.
- 23) Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N : Comprehensive analysis of the effects of ordinary nutrients on hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* (2007) 51, 2016-2027.