

感染性 C 型肝炎ウイルス粒子形成を制御する新規
宿主因子トロンボキサン A2 合成酵素の機能解析

2013

阿部雄一

目次

要旨	3 頁
略称一覧	5 頁
導入	7 頁
材料と方法	13 頁
結果	30 頁
考察	62 頁
総括	67 頁
発表論文目録	68 頁
謝辞	69 頁
引用文献	70 頁

要旨

【背景】 これまでに、当研究室において新規に樹立した不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞を立体培養環境下におくことで、ヒト血清由来 C 型肝炎ウイルス (blood-borne HCV; bbHCV) の持続的な複製および培地中への粒子放出が可能な HCV 産生培養系の開発が行われていた。立体培養した不死化肝細胞、HuS-E/2 細胞でのみ bbHCV の粒子放出が認められたことから、立体環境が HCV 生活環に重要であることが示唆された。そのため当研究室のフセインらは立体および平面培養 HuS-E/2 細胞間にて遺伝子発現プロファイルの比較を行い、更なる解析の結果 Peroxisome-proliferation activating receptor- α (PPAR- α) シグナル経路が HCV 複製に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで私はさらにこの HCV 産生立体培養細胞系を用い、HCV 生活環に機能する新規宿主因子の同定を目的として以下の研究を進めた。

【手法】 まず、マイクロアレイ解析により立体培養した HuS-E/2 細胞の遺伝子発現プロファイルを通常の平面培養した場合と比較した。その結果、遺伝子発現の変動から立体培養によって影響を受ける細胞内シグナル経路を抽出した。組換え体 HCV 産生培養細胞系を用いて、その経路ならびにシグナル経路に位置する宿主因子を siRNA、化学試薬などにより阻害し、HCV 生活環に対する影響ならびにその作用機序を検討した。また上記の実験で効果が認められた化学試薬を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに投与し、その抗 HCV 薬剤としての評価をおこなった。

【結果】 マイクロアレイ解析の結果から、立体培養時の HuS-E/2 細胞においてプロスタノイド合成に関連するアラキドン酸カスケード遺伝子群の発現変動が示唆され、RT-PCR 法により確認された。siRNA および各種阻害剤処理の結果、シクロオキシゲナーゼ 1(COX1)およびトロンボキサン A₂(TXA₂)合成酵素(TXAS)

の発現抑制や活性阻害時に、細胞内の HCV ゲノム複製や細胞外への HCV 粒子放出に影響することなく、放出された HCV 粒子の感染性が著しく低下することが明らかになった。また、この時細胞内で形成されている HCV 粒子の感染性を検討したところ、同様に感染性の低下が認められた。TXAS 活性の感染性 HCV 粒子産生に対する作用機序を検討するために、TXAS の酵素反応産物である TXA₂ の受容体(TP)に対するアゴニスト、およびアンタゴニストを用いて、上記同様に感染性 HCV 粒子産生に対する影響を検討した。しかし、それら試薬の処理による感染性 HCV 粒子産生の低下は認められなかった。更に、解析に使用した HuH-7 細胞およびヒト肝細胞キメラマウス由来肝組織においては TP mRNA の発現が認められなかった。更に、解析に使用した TXAS 阻害剤 Ozagrel を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに投与した結果、HCV 感染初期の感染拡大を阻害することが明らかになった。

【考察】本研究で得られた結果から、TXAS が細胞内において感染性 HCV 粒子形成を制御することが示唆された。更に TP を介したシグナル経路の活性化ならびに阻害は感染性 HCV 粒子形成に影響を及ぼさないこと、加えて解析に使用した細胞群で TP mRNA の発現が認められないことを合わせて考えると、肝細胞内において TXAS に依存するが TP には非依存的なシグナル経路が存在し感染性 HCV 粒子形成がその経路により制御されていることが推測された。またヒト肝細胞キメラマウスへの TXAS 阻害剤および IP アゴニスト投与実験の結果から、TXA₂ および PGI₂ シグナル経路が新規抗 HCV 治療薬の標的となることが考えられた。

略称一覧

bbHCV, blood-borne HCV

COX, cyclooxygenase

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

dbcAMP, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS, fetal bovine serum

FFU, focus forming unit

FITC, fluorescein isothiocyanate

HCVcc, HCV from cell culture

HCVpp, HCV pseudoparticle

IP, prostaglandin I₂ receptor

JFH1, Jikei fulminant hepatitis-1

LD, lipid droplet

NS, non-structural

peg-IFN, polyethylene glycol-conjugated interferon

PG, prostaglandin

PGIS, prostaglandin I₂ synthase

PPAR, peroxisome proliferation activating receptor

RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction

qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

siRNA, small interfering RNA

shRNA, small hairpin RNA

TP, thromboxane A₂ receptor

TX, thromboxane

TXAS, thromboxane A₂ synthase

uPA/SCID, urokinase plasminogen activator/severe combined
immunodeficiency

UTR, untranslated region

導入

HCV 疫学および治療法

非A型非B型肝炎ウイルスとして分類されていたHCVは、1989年にMichael Houghtonらによりそのゲノムがクローニングされた¹。HCV感染者の80%では慢性感染化し20～30年かけて肝硬変へと移行した後、年1～5%の割合で肝がんを引き起こす²。またアルコール消費量、性別、HIVとの共感染もHCV感染による肝病変の進行を早めるリスク因子として報告されている³。HCVの遺伝子型は大きく6種類に分類され、その世界的な分布には著しい地域差が認められる⁴。

日本では、未だに約170万人のHCV感染者が存在すると推測され、その遺伝子型別の割合では、感染者の内70%が1b型、20%が2a型、残りの10%が2b型であると報告されている⁵。しかしながら1b型のHCVは、現在の一般的な抗HCV治療法であるpeg-Interferon (pegIFN)およびリバビリン併用療法に対して50%以上の高い抵抗性を示すことが知られている⁶。このことはHCV感染が未だ公衆衛生上、著しい重要性を持つことを示しており、より高効率な抗HCV治療法の開発に向けてHCV生活環の更なる理解が必要であるといえる。最近では、HCV非構造(Non-structural; NS)タンパク質3が持つ、HCV増殖に必須なウイルスプロテアーゼの一つであるセリンプロテアーゼに対する阻害剤の開発が進められている⁷⁻⁹。しかしながら、ウイルスプロテアーゼに対する単剤療法は高率に耐性ウイルスの出現を引き起こすことが報告されている¹⁰。そのため現在では、多剤療法の開発のため新規抗HCV薬剤標的の探索が進められている。

HCV ウイルス学

HCV はフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、ポジティブ鎖の一本鎖 RNA ゲノムを持つエンベロープウイルスである。約 9600 塩基のゲノムからはまず約 3000 アミノ酸から成る HCV ポリタンパク質が翻訳される¹。HCV ポリタンパク質は宿主および HCV 自身のプロテアーゼにより 10 種類のタンパク質へと切断される¹¹⁻¹⁴。10 種類のタンパク質の構成は、ウイルス粒子を構成するのに必要な Core、E1、E2、ウイルス粒子には含まれないがゲノム複製などの役割を担う非構造タンパク質である NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B、未だにその機能が明確でない p7 から成る。Core タンパク質はカプシド形成以外にも肝細胞のがん化、アポトーシス、および脂質代謝変動に関連することが報告されている¹⁵⁻¹⁷。p7、NS2 は HCV 粒子形成の初期段階において機能することが示唆されている¹⁸。NS3 と NS4A の複合体は様々なプロテアーゼ活性を持ち、HCV ポリタンパク質の切断や自然免疫におけるアダプター分子 IPS-1 の切断に関わっている^{19, 20}。NS4B は細胞内膜のリモデリングを引き起こし、HCV ゲノム複製場である“membranous web”の形成に関与している²¹。NS5A は酸化ストレス応答の誘導や脂肪滴周辺における感染性 HCV 粒子形成に関与など、様々な宿主因子との相互作用が報告されている^{22, 23}。NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして membranous web における HCV ゲノム複製に寄与している²⁴。

HCV ゲノムの両末端の非翻訳領域 (untranslated region; UTR) は多くのステムループ構造を取ることが報告されている^{25, 26}。肝臓中で高い発現を示すマイクロ RNA の 1 種 miR122 は HCV ゲノム 5'UTR 領域に結合してその安定性を増加させ、HCV ゲノム複製を亢進する機能を有することが報告されている²⁷。

In vitro, in vivo HCV 実験系

これまでに、HCV 生活環を解明するために様々な In vitro HCV 実験系が開発されてきた。まず HCV レプリコン培養細胞系では肝がん由来細胞である HuH-7 細胞内において HCV ゲノム翻訳と複製が維持されており、これらの分子機構の解析に使用されている²⁸。基本的なレプリコン RNA は HCV 複製に必須な非構造タンパク質 NS3 から NS5B まで、および薬剤耐性マーカーをコードしている。培地中にネオマイシン等の薬剤を添加することで、持続的なレプリコン RNA 複製が行われている細胞群を選択的に維持している。HCV シュードパーティクル (HCVpp) 感染系は HCV E1,E2 タンパク質をエンベロープに有する組換え体レトロウイルス偽粒子を用いた実験系である^{29,30}。この実験系では、Huh-7.5 細胞に HCVpp を感染させ HCV の侵入過程の解析を行うことができる。培養細胞系における感染性 HCV 粒子の産生は、2005 年に脇田らによって Jikei fulminant hepatitis-1 (JFH-1) HCV ゲノム RNA を HuH-7 細胞へ導入することで可能となった³¹。またこの培養系から回収された HCV 粒子(HCV cell culture; HCVcc)はチンパンジーおよびヒト肝細胞キメラマウス（後述）への感染も確認され、動物実験にも使用可能である^{31,32}。また JFH1 ゲノム配列の一部を他の HCV strain と置換した、キメラ HCV ゲノム (J6/JFH1 等) も同様に HuH-7 細胞において産生可能である³³。HCV 動物実験系としては、これまで唯一チンパンジーが免疫応答を伴った HCV 増殖動態の解析に使用されている³⁴。また肝障害モデルマウスの urokinase plasminogen activator (uPA)マウスと、重度複合免疫不全マウスである SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) マウスを掛け合わせた uPA/SCID マウスにヒト肝実質細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスも HCV 動物実験系として広く使用されている³⁵。立野らは、ヒト化肝細胞 uPA/SCID マ

ウスを使用し、HCVのみならずB型肝炎ウイルスも感染増殖可能な動物実験系の構築に成功している^{36,37}。

HCV生活環再現におけるヒト肝由来細胞の立体培養の重要性

多くのHCV実験系が開発されてきたにも関わらず、患者血清由来HCVの産生可能な培養細胞系は最近まで存在しなかった。フセインらは初代培養ヒト肝細胞にヒトパピローマウイルスE6, E7タンパク質およびヒトテロメラーゼの発現ベクターを導入し、不死化肝細胞HuS-E/2細胞を樹立した³⁸。HuS-E/2細胞は温度可塑性ゲル中にて立体培養した際に極性構造を形成するなど、従来HCV産生系で使用されていたHuH-7細胞に比べてより本来の肝細胞に類似した性質を示した。また、この細胞には平面培養時にbbHCVの一過的な感染が確認されたが³⁸。bbHCVの持続的なゲノム複製ならびに培地中への粒子放出は認められなかった。そのためフセインらは中空糸を用いたHuS-E/2立体培養系を新たに構築し、bbHCVの持続的な感染複製ならびに感染性粒子産生が認められる培養細胞系の開発に成功した³⁹。また他グループからも、立体培養したレプリコン細胞からの粒子放出、立体培養HuH-7細胞におけるHCV感染効率の上昇といった、HCV生活環を再現するためにはヒト肝由来細胞の立体培養が重要であることを強く示唆する結果が報告されている^{40,41}。そこで当研究室では、不死化肝細胞HuS-E/2細胞を用いて立体培養下においてHCV増殖に必要な宿主因子群の探索を試みた。つまり、平面、そして立体培養したHuS-E/2細胞間において遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較し、著しい変動を見せるシグナル経路の抽出を行った。フセインらはこの結果からPPAR α シグナル経路の有意な活性化を見出し、またHCVゲノム複製がPPAR α シグナル活性化により亢進されることを明らかにした⁴²。PPAR α によるHCVゲノム複製亢進は、

他のグループからも別の実験系を用いて同様の報告が行われており、このことが上記の研究の妥当性の高さを改めて示している^{43,44}。本研究において、私は立体培養時において有意な変動を見せた別のシグナル経路、プロスタノイド合成に関わるアラキドン酸カスケードに着目し、その HCV 生活環における役割を検討した。

アラキドン酸カスケードの概要およびHCV生活環における機能

アラキドン酸カスケードにおいては、アラキドン酸から 2 種類の脂質メディエーター群であるプロスタノイド、ロイコトリエンが産生される⁴⁵。これら脂質メディエーター群は炎症反応、細胞増殖、がん化といった様々な現象に関連することが既に報告されている⁴⁵。その 1 群であるプロスタノイドはプロスタグランジン(PG) E₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂, ならびに TXA₂ といった 5 種類の脂質メディエーターから構成され、これら脂質メディエーターによるシグナル伝達は主に細胞膜上に位置する受容体を介して行われることが知られている⁴⁵。また肝臓においては、複数のプロスタノイドが肝再生に関わることが既に報告されている⁴⁶。しかしながら、肝実質細胞におけるプロスタノイドの役割については未だ不明な点が多く残されていた。HCV 生活環においては、HCV レプリコン細胞を用いて PGE₂ が HCV 複製を亢進させる機能を持つことが既に報告されているのみであった⁴⁷。

本研究において、私はマイクロアレイ解析の結果から立体培養 HuS-E/2 細胞内においてアラキドン酸カスケードの有意な変動を見出した。更にアラキドン酸カスケードの HCV 生活環における役割について HuH-7 細胞を用いた感染性組換え体 HCV 産生培養細胞系で検討した所、TXAS 活性が感染性 HCV 粒子産生に関与していることを明らかにした。また、TXAS の作用機序の解析から、この

現象が既知 TXA_2 受容体である TP を介したものではないことが示され、 TXAS からの未知のシグナル経路の存在が示唆された。更にヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HCV 薬物評価系によって、 TXAS 阻害剤ならびに TXA_2 と相反する生理活性を持つと報告されている PGI_2 の受容体(IP)アゴニストの薬剤評価を行った結果、その双方共に HCV 感染初期における感染拡大の阻害能を持つことが明らかになった。本研究は、 HCV 感染性におけるアラキドン酸カスケードの役割ならびに新規抗 HCV 薬剤標的としてのプロスタノイドの可能性を示した初の報告である。

材料と方法

細胞培養

ヒト肝細胞癌由来培養細胞 HuH-7, Huh-7.5 細胞、HCV レプリコン MH14 細胞、初代肝細胞、HEK293 細胞は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 1% ペニシリン・ストレプトマイシン, 1% 非必須アミノ酸 (Nacalai Tesque, 京都、日本), および 10% fetal bovine serum (FBS)に添加した培地中で培養した。MH14 細胞は更に 0.5 mg/ml G418 (Nacalai tesque)を添加し培養を行った。HuS-E/2 細胞は先行文献通り E/2 培地(DMEM 500 ml に対して、20 mM HEPES、0.15 g/ml L-proline、0.25 g/ml insulin、50 nM dexamethasone、44 mM NaHCO₃、10 mM nicotinamide、0.1 mM Ascorbate、5ug/ml Transferrin、5ug/ml Linoleic acid、2 UG/ml Fungizone (以上 Sigma-Aldrich、セントルイス、アメリカ合衆国) 、5 ng/ml Epidermal growth factor (TOYOBO、大阪、日本)、10 ng/ml Prolactine (R&D systems、ミネアポリス、アメリカ合衆国)、0.1 mg/ml ペニシリン・ストレプトマイシン、5% ウシ胎児血清、5% ヒト胎児血清、1% DMSO、300 ug/ml L-glutamine、500 ul/ml Selenium(以上 Nacalai Tesque)の試薬類を混合) で培養した³⁸。すべての培養細胞において、培地は 2 日に一度交換した。HuS-E/2 および HEK293 細胞はコラーゲンコート培養シャーレ上で培養を行った。

プラスミド増幅

プラスミド DNA は Competent Quick (TOYOBO)へのトランスフォーメーションにより増幅させた。まず Competent Quick の DH5 α 45ul と約 10^5 ug/ul 量のプラスミド DNA 5ul を混合し、氷上で 5 分静置する。そして 30 秒 42°Cの湯せんに浸し、再び氷上に戻す。200ul の LB 溶液 (1L 中に Bacto trypton 10 g、乾燥酵母エキス 5 g、NaCl 5 g、グルコース 1 g を加え、pH7.2 に調整) を加え、アンピ

シリン添加 LB アガープレート (1L 中に Bacto trypton 10 g、乾燥酵母エキス 5 g、NaCl 10 g、グルコース 1 g、アガロース粉末 15 g、Ampicillin 50 µg/ml を調整し、10 cm プラスチックシャーレ中で固定) にまき、37°C に一晩静置させた。プレート上の DH5α コロニーを爪楊枝でつつき、3ml の LB 溶液中で一晩培養した。そこから 200ul の大腸菌混合液を 200ml の LB 溶液中で一晩培養した。プラスミド DNA は JetStar 2.0 (Genomed、ローネ、ドイツ) 用いて、製品付随のプロトコル通りに回収し、-20°C で保存した。

プラスミドトランスフェクション

HuH-7 および Huh-7.5 細胞へのプラスミド DNA トランスフェクションは Lipofectamine LTX (Invitrogen, カリフォルニア、アメリカ合衆国) を用いて製品付随のプロトコル通りに行った。HuS-E/2 細胞へのトランスフェクションは Effectene (Qiagen, ヒルデン、ドイツ) を用いて製品付随のプロトコル通りに行った。

HuS-E/2 細胞の立体培養

氷上で 10^7 個の HuS-E/2 細胞を 500 ul の Mebiol gel (池田理化、東京、日本) と懸濁し、更にその懸濁液を 5ml の E2 培地と混ぜ合わせる。細胞懸濁液を 10cm 培養シャーレ上にのせ、37°C で 5 分静置させ Mebiol gel をゲル化させた。ゲル化したサンプル上から 10ml の E/2 培地を静かに注ぎ、37°C で培養を続けた。培地は 2 日に 1 回交換した。

試薬及び抗体

FR122047, PGH₂, ONO1301, daltroban, および dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) sodium salt は Sigma-Aldrich (Missouri, USA) から購入した。Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor 1 および Ozagrel は Santa Cruz Biotechnology (カリフォルニア, アメリカ合衆国) から購入した。U-46619 は Cayman Chemical (ミシガン, アメリカ合衆国) から購入した。Beraprost は Toray Co. (東京, 日本) から贈与を受けた。FR122047, PGH₂, ONO1301, Daltroban, COX-2 inhibitor1, Ozagrel, Beraprost, および Calucium ionosphere は DMSO 中に溶解させた。U-46619 および TXB2 は酢酸メチル中に溶解させた。Dibutyryl cAMP は滅菌水で溶解させた。HCV Core タンパク質抗体 (antibody 32-1) は小原道法先生 (東京都医学総合研究所, 東京, 日本) から贈与を受けた。anti-NS5A CL1 抗体 および ヒト血清抗 HCV 抗体 は当研究室で作成した²³。TXAS 抗体, PGIS 抗体 は Cayman chemicals から購入した。PGES 抗体 および PGDS 抗体 は Abcam (ケンブリッジ, イギリス) から購入した。

細胞障害性の計測

各試薬の細胞障害性は Cell Proliferation Kit 2 (Roche, バーゼル, スイス) を用いて製品付随のプロトコルに従って行った。測定の際にはサンプルを 96 well-plate (BD, ニュージャージー, アメリカ合衆国) へ移し、プレートリーダー 1420ARVO.SX (Perkin Elmer, ボストン, アメリカ合衆国) により結果を得た。

フェノール・クロロホルム処理

DNA および RNA の抽出のため、我々はフェノール・クロロホルム処理を以下のプロトコルで行った。まずサンプルと等量のフェノール (RNA 抽出には Acid

フェノール) とを混合しよく混ぜる。15,000rpm で 5 分遠心後、水層を新しいチューブに移す。そこに 5 倍量のクロロホルムを加え再びよく混ぜ合わせる。15,000rpm で 5 分遠心後、水層を新しいチューブに移す。サンプルに 10 分の 1 量の 5uM 酢酸アンモニウムおよび 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、数回反転混和する。-20°Cに 30 分以上静置させたのち、15,000rpm、30 分遠心を行う。溶液を捨て、70%エタノールを加え再び 15,000rpm、5 分遠心を行う。溶液を捨て、5 分間乾燥させた後 Nuclease フリーウォーター(Nacalai tesque)で溶解させる。DNA および RNA は-20°Cもしくは-80°Cで保存した。

セパゾールからの RNA 抽出

細胞内および培地中の RNA は sepaSol1 および 2 (Nacalai tesque) を用いて、製品付随のプロトコルに従って行った。回収した RNA は-80°Cで保存した。

マイクロアレイ解析

平面、立体培養した HuS-E/2 細胞から回収した Total RNA を用いて、A 3D-Gene human chip 25k (Toray)によるマイクロアレイ解析を行った。立体培養時に 4 倍以上もしくは 4 分の 1 倍以下へと発現変動が起きた遺伝子群を一覧にまとめた。その遺伝子リストを The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) のパスイテ解析にかけ、有意な変動が認められるシグナル経路を抽出した。

RNA 合成

HCV ゲノム RNA 合成は、MEGAscript T7 (Promega, ウィスコンシン, アメリカ合衆国)を用いて製品付随のプロトコルに従って進めた。テンプレートには

Xba1 処理により直鎖化させたプラスミド DNA は使用した。合成された RNA は上記したフェノール・クロロホルム処理法により抽出し、-80°Cで保存した。

HCV 産生のための RNA トランスフェクションおよびサンプル回収

HCV ゲノム RNA トランスフェクションは脇田らのプロトコルに従って行った³¹。簡単にまとめると、まず 10 ug のゲノム RNA を 10^7 個の HuH-7 細胞と OPTI-MEM 中で混合する。次にこの懸濁液を 4 mm gap Electroporation Cuvettes (Molecular Bioproduct、カリフォルニア、アメリカ合衆国)に加え、250 V および 950 uF の条件で GenePulser Xcell (Biorad、カリフォルニア、アメリカ合衆国)を用いてエレクトロポレーションした。RNA 導入後、細胞は 5% FBS 含有 DMEM 培地中で培養を行った。RNA 導入 1 日後、各種化学試薬を含む培地と交換し培養を続けた。RNA 導入 4 日後に、細胞および培地を回収し、解析に使用した。

RT-PCR

抽出した Total RNA 200 ng をテンプレートとし、one-step RNA PCR kit (TAKARA、滋賀、日本)を用いて RT-PCR を行った。PCR 反応は GenoAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems、カリフォルニア、アメリカ合衆国)を用いて行った。使用したプライマー配列、PCR 条件は表 1 に記載した。

定量的 RT-PCR

抽出した Total RNA 200 ng をテンプレートとし、one-step SYBR Primescript RT-PCR kit 2 (TAKARA)を用いて定量的 RT-PCR を行った。PCR 反応は 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて行った。使用したプライマー配列、PCR 条件は表 1 に記載した。

HCV ゲノムコピー数の絶対定量

200 ng の RNA を鋳型として、我々は RevTra Ace および Thunderbird (共に TOYOBO) を用いて HCV ゲノムコピー数の定量を行った。まず、RevTra Ace 付随のプロトコルに従って RNA を逆転写反応にかけた。合成された cDNA を用い、次に Thunderbird を用いて HCV ゲノムコピー数の絶対定量を行った。HCV NS3 タンパク質から NS5B タンパク質をコードした MH14 レプリコンプラスミドからゲノム RNA を合成し、作成した 10^3 個から 10^9 個までのゲノムコピー数の希釈段階により絶対定量の検量線を作成した⁴⁸。絶対定量のプロトコル、および HCV ゲノム認識に使用するプローブ配列は竹内らの報告に従った⁴⁹。また使用した HCV プローブは Applied Bioscience から購入した。PCR 反応は 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。

感染性組換え体 HCV 産生培養細胞系における siRNA 処理

Abcam から購入した TXAS および PGIS の small interfering RNA (siRNA) (Santa Cruz) を用いてそれぞれ mRNA の発現阻害を行った。JFH1^{E2FL} ゲノム RNA および 1 μ M の siRNA を HuH-7 細胞への共エレクトロポレーションし、siRNA の導入を行った。発現阻害を行った細胞および培地は導入 3 日後に回収を行った。siRNA による発現阻害効率は上述した定量的 RT-PCR 法により検討した。

shRNA 処理

HuH-7 細胞における shRNA 導入は、TXAS shRNA lentivirus particles (Santa Cruz) により行った。まず 5 μ g/ml Polybrene (Sigma-Aldrich) を混ぜた 10% FBS 含有 DMEM において HuH-7 細胞を培養した。培養シャーレに 10^5 個の lentivirus particles を混ぜ、24 時間培養を行った。導入 48 時間後、Polybrene を含まない

培地に交換し、72 時間後に 0.5 ug/ml puromycin (Wako、大阪、日本) 含有培地に交換し shRNA 導入細胞の選択を行った。その後培地は 2 日に 1 回交換した。

HCVcc の濃縮

まず HCVcc を含む培養上清に 100 分の 1 量の HEPES を加え、20 um pore sterile filter (IWAKI、東京、日本)によりフィルタリングを行った。次に Amicon Ultra-15 centrifugal filters with Ultracell 100 membranes (Millipore、マサチューセッツ、アメリカ合衆国)に培地を入れ、3,500 rpm で 90 分遠心し濃縮を行った。濃縮上清は-80℃で保存した。この方法により、培養上清はおよそ 100 倍濃縮された。

濃縮上清の分画

濃縮上清は 20%~50%スクロース密度勾配遠心法により分画を行った。まずスクロース (Nacalai tesque)を溶媒(50 mM HEPES、100 mM NaCl、1 mM EDTA)中に溶解し、20%および 50%のスクロース溶液を作成した。20 および 50% スクロース溶液を 12 ml tube (IWAKI) に 6 ml ずつ分注し、Gradient Station model 153 (BioComp Instruments, Inc.、ニューブランズウィック、カナダ)により密度勾配を作成した。5.0 x 10⁹ 個に濃縮上清をのせ、XL-90 Ultracentrifuge(Beckman、カリフォルニア、アメリカ合衆国)を用いて 28,400 rpm、16 時間遠心を行った。遠心サンプルは Perista Pump (ATTO、東京、日本)により 10 個の分画へと分けた。各分画から 150 ul ずつ Sepasol2 と混合し、RNA 抽出の後に各分画の HCV 粒子量定量に使用した。また各分画から 250 ul ずつ透析カップ MWCO8000(Cosmo Bio)に分注し、DMEM で 48 時間透析を行った。透析サンプルは 5%量の FBS を添加して感染実験に使用し、各分画に含まれる HCV 粒子の感染性の定量に使用した。

Focus forming assay

分画サンプル中の HCV 粒子の感染力価は、1ml あたりの focus forming units (FFU)により記述した。FFU は以下のプロトコルにより算出した。まず HCV 感染一日前に 1.0×10^4 個 Huh-7.5 細胞を 96 well-plate にまき 37°Cで一晩培養した。各分画由来 HCV 含有透析サンプルは、5% FBS 含有 DMEM により 10 倍ずつ 1,000 倍まで希釈段階を作成した。各希釈段階のサンプルを 100 ul ずつ細胞に暴露し一晩 37°Cで培養した。感染開始 24 時間後に培地を交換し、更に 48 時間培養続けた。そして感染細胞コロニーを抗 HCV 抗体により染色し、各希釈段階におけるコロニー数を計測した。

Huh-7.5 細胞への HCV 感染実験および感染性の測定

HCV 粒子の感染実験には 200 ug/well の collagen 1 mouse tail (BD)でコートした 8 well-chamber plate (Nalge Nunc International、ニューヨーク、アメリカ合衆国)を用いた。 4.0×10^4 個の Huh-7.5 細胞を 8 well-chamber plate にまき、一晩 5% FBS 含有 DMEM 培地により培養した。各サンプル等量の HCVcc を含んだ各濃縮上清を Huh-7.5 細胞に 6 時間暴露した後、5% FBS 含有 DMEM 培地で三回洗浄し更に 1 日培養を続けた。その後、感染細胞数を定量し感染性の測定を行った。感染細胞内の HCV タンパク質は以下のプロトコルで間接免疫染色法により染色した。まず感染細胞を 1 度 1 x PBS (NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g/L, KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L)により洗浄し、4% paraformaldehyde (Wako) で 20 分処理し固定させた。固定した細胞を 1 度 1 x PBS で洗浄した後、0.05% Triton-X 100 (Nacalai tesque) で 15 分処理し透過処理を行った。1 度 1 x PBS で洗浄した後、患者血清由来の抗 HCV 抗体を室温で 90 分処理した。4 度 1 x PBS で洗浄した後、Alexa 546 抗ヒト抗体(Invitrogen)を室温 40 分処理した。

4 度 1 x PBS で洗浄した後、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)および Micro cover glass 24x50 mm (MATSUNAMI、大阪、日本)をガラスチャンバーにのせた。1 ウェルにつき 10 枚の感染細胞像を BioZero (Keyence、大阪、日本)により撮影した。各サンプルの感染性は 10^7 個当りの感染細胞数として定義した。

共焦点レーザー顕微鏡による細胞内 HCV タンパク質局在の解析

共焦点レーザー顕微鏡による観察に使用したサンプルの作成は、上記した間接免疫染色法を一部変更したプロトコルで行った。まず感染細胞を 1 度 1xPBS により洗浄し、4% paraformaldehyde で 20 分処理し固定させた。固定した細胞を 1 度 1 x PBS で洗浄した後、0.05% Triton-X 100 で 15 分処理し透過処理を行った。1 度 1 x PBS で洗浄した後、5%アルブミン含有 PBS により 30 分間ブロッキングを行った。溶液を除去後、各 HCV タンパク質に対する抗体をのせ 4°C で一晩静置させた。4 度 1 x PBS で洗浄した後、各 2 次抗体を室温で 40 分処理した。4°C 1 x PBS で洗浄した後、Prolong Gold Antifade Reagent および Micro cover glass 24x50 mm をガラスチャンバーにのせた。脂肪滴の観察を行う場合は、2 次抗体処理後さらに 20 ug/ml BODYPI 493/503 (Invitrogen)で 10 分間処理し、脂肪滴中の中性脂肪の染色を行った。免疫染色したサンプルは 4°C で一晩静置した後、Leica SP2 confocal microscope (Leica, ハイデルベルク, ドイツ)により各タンパク質の細胞内局在の解析を行った。

細胞内 HCV 粒子の回収

細胞内 HCV 粒子の回収は Gastaminza らのプロトコルに従って行った⁵⁰。まず、HCV RNA 導入後 4 日目のサンプルを PBS で洗浄し、1.5 ml チューブ内に回収

した。細胞のペレットを 10% FBS 含有 DMEM 内に懸濁し、液体窒素と 37°C の水槽を用いて 4 回凍結融解を繰り返した。4000 rpm で 5 分間遠心し細胞デブリを沈殿させた後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。サンプルは -80°C で保存した。

ヒト肝細胞キメラマウスによる HCV 薬剤評価実験

キメラマウスを用いたすべての実験は、広島大学における動物実験倫理委員会の承諾のもと、広島大学大学病院消化器、代謝内科において行われた。立野らプロトコルに従って作成された uPA/SCID ヒト肝細胞キメラマウスを使用した³⁶。1.0 x 10⁵ 個の HCV を感染後 1 週間目に各薬剤の投与を以下の用法に従って始めた。ONO1301 は 200 µg ずつ 1 日 2 回 腹腔内投与した。Beraprost および Ozagrel はそれぞれ 10 µg 、 300 µg ずつ 1 日 2 回経口投与した。HCV 感染 2、3、4 週間目のマウス血清を回収し、含まれる HCV RNA 量を測定した。

統計処理

得られた結果の有意差は Student's t test もしくは Wilcoxon signed-rank test (図 16 および 20) により検討した。

ウェスタンブロット法に用いたサンプルの調整

まず 15 ml チューブに細胞を回収した後、細胞を RIPA buffer (Thermo, イリノイ、アメリカ合衆国)により懸濁した。5 分間 Bioruptor (Cosmo Bio, 東京、日本)による超音波破砕を行った後、サンプルを 15 分間 4°C に静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、-80°C で保存した。

タンパク質の定量

タンパク質定量は BCA protein assay (Thermo Scientific)を用いて行った。まず BCA assay reagent A 液と B 液を 50:1 の割合で混合した。次に BCA assay 混合液 80ul と 4ul のサンプルを混合し、37°Cで 30 分間静置した。サンプルの発色を Nano-drop (SCRUM、東京、日本)により計測し、タンパク質の定量をおこなった。

ウェスタンブロット法

細胞懸濁液中のタンパク質の検出はウェスタンブロット法により以下のプロトコルに従って行った。まずサンプルを 2x sample buffer (Biorad, カリフォルニア、アメリカ合衆国)と混ぜ、100°Cで 5 分間処理、その後氷上で 5 分間静置した。その間 10% TGX pre-cast gel (Biorad) を電気泳動槽 (Biorad) に設置し、SDS-PAGE buffer (14.4 g/L Glycine、3.03 g/L Tris-HCL、1 g/L SDS)を泳動槽に注いだ。タンパク質サンプルをゲルに乗せ、200V, 100mA で 30 分間泳動を行った。泳動後、タンパク質は Transfer buffer(100 ml/L 10x Tris-Glycine(Biorad)、200 ml/L Methanol)を注いだ Wet 式ブロッティング槽 (Biorad)中にて 100V, 180mA で 60 分間処理し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜(Perkin Elmer)に転写した。PVDF 膜を blocking buffer (PBS 中に 5% ECL Prime blocking reagent (GE healthcare)、0.5%Tween-20 含有) に浸し、1 時間室温でブロッキング処理を行った。0.5% tween-20 含有 PBS 液で 3 回メンブレンを洗浄後、1 次抗体と共にメンブレンをビニルバッグ中に詰め、4°Cで一晩静置させた。0.5% tween-20 含有 PBS 液で 3 回メンブレンを洗浄後、horseradish peroxidase2 次抗体 (GE healthcare) とともにメンブレンをビニルバッグに再び詰め、室温で 1 時間静置させた。0.5% tween-20 含有 PBS 液で再び 3 回メンブレンを洗浄後、ECL Advance

(GE Healthcare, バッキンガムシャー, イギリス) 溶液を用いて HRP 抗体を化学発光させ、LAS-4000 system (Fujifilm, 東京、日本)にてタンパク質バンドの検出を行った。

HCV 感染ヒト肝臓およびキメラマウス肝臓からの RNA 抽出

ヒト肝臓組織については広島大学倫理委員会の許可の元、広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・代謝内科学研究室により取得されたサンプルの提供を受けた。HCV 感染ヒト肝臓およびキメラマウス肝臓からの RNA 抽出は RNeasy mini (Qiagen)を用いて行った。粉碎した凍結組織を Kit 付随の Lysis buffer で懸濁し、Power Masher (Nippi, 東京、日本)によりホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルから、製品付随のプロトコルに従って RNA 抽出を行った。RNA は-80°Cで保存した。

HuS-E/2 細胞、HCV 感染ヒト肝臓、およびキメラマウス肝臓の細胞分画

HuS-E/2 細胞および各肝臓組織サンプルからの細胞分画は ProteoExtract Subcellular proteome Extraction Kit(Millipore)を用いて、製品付随のプロトコルに従って行った。細胞質分画、膜分画、核分画をそれぞれ回収し、-80°Cで保存した。

cAMP レポーターアッセイ reporter assay

cAMP レポーターアッセイ用のプラスミドとして、pCRE-Luc (Agilent Technologies, カリフォルニア, アメリカ合衆国)を使用した。HuH-7、Huh-7.5、および HEK293 細胞へのプラスミド導入には Lipofectamine LTX を製品付随のプロトコル通りに使用した。HuS-E/2 細胞へのプラスミド導入は Effectene を製

品付随のプロトコル通りに使用した。プラスミド導入 1 日後、培地に各種試薬を加え更に 2 日培養を続けた。プラスミド導入 3 日目サンプルを luciferase activity detection reagent (Promega)付随の Lysis buffer により回収し、ルシフェラーゼ活性測定に使用した。5 ul のサンプルを 30 ul のルシフェラーゼ基質溶液と混合し、Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold, バート・ヴィルトバート, ドイツ)を用いて測定を行った。

カルシウムイオン濃度測定

細胞内カルシウムイオン濃度測定は、Calcium assay kit (Cayman chemical)を用いて製品付随のプロトコルに従って行った。HEK293 細胞、HuH-7 細胞、Huh-7.5 細胞、および HuS-E/2 細胞を 96well-plate で 1 日培養し、さらに各種薬剤処理を 1 日行った後サンプルとして使用した。カルシウム濃度測定には 1420ARVO.SX (Perkin Elmer)を使用した。

総脂肪酸分析

HCV 感染 Huh-7.5 細胞に含まれる脂肪酸の組成が Ozagrel 処理によってどのように変化するかを東レリサーチセンター(東京、日本)に外注し総脂肪酸分析を行った。東レリサーチセンターで解析されたサンプルの脂質抽出には Bligh-Dyer 法を用いた⁵¹。まず、PBS 中に懸濁したサンプルを、等量のメタノール・クロロホルムの 1:2 混合溶液 とよく混ぜ合わせ、Power Masher によりホモジナイズした。ホモジナイズサンプルをガラスチューブに入れ、800 ul の純水を加えた後 30 秒間ボルテックスを行った。2,000 rpm で 5 分間遠心後、有機層を新しいガラスチューブに移した。残った水層に 1 ml のクロロホルムを更に加え、30 秒間ボルテックスを行った。再び 2,000 rpm で 5 分間遠心後、有機層を先ほど

分注したガラスチューブに加えた。回収したサンプルは、窒素ガスによりが 1ml 程度になるまで溶液の揮発を行った。

ヒト肝細胞キメラマウスによる 2 次感染実験および薬剤抵抗性の検討

HCV 感染後 4 週間目のマウス血清を回収し、別のキメラマウスへの 2 次感染および薬剤投与を行った。まず上述したとおり、 1.0×10^5 個の HCV をキメラマウスに感染させ、感染後 1 週間目から Ozagrel 投与を行った。回収した血清を用い、再び 1.0×10^5 個の HCV 別のキメラマウスに感染させた。2 次感染実験では感染直後から、Ozagrel の経口投与を 1 日 2 回行った。感染後 1、2、3 週間目のマウス血清を回収し、血清中の HCV RNA 量を上述した方法により定量した。

アクチン重合アッセイ

TP を介したアクチン重合反応の解析には fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (Sigma-Aldrich) を使用した。まず HuS-E/2 細胞、HuH-7 細胞、Huh-7.5 細胞、および HEK293 細胞を 96 well-plate にまき、一晚培養した。翌日培地を血清未添加培地に交換し 2 時間培養を行った。培地に 1 μ M の U46619 を加え 30 秒, 60 秒, そして 180 秒後の細胞を 4% paraformaldehyde にて 10 分間処理し固定した。PBS で 1 度洗浄し、0.1% Triton X-100 溶液で 10 分間処理した。PBS で 1 度洗浄し 10 μ g/ml FITC-phalloidin を加え 40 分間静置させた。PBS で 3 度洗浄後、520 nm の蛍光波長を 1420ARVO.SX (Perkin Elmer) にて計測しアクチン重合量を比較した。 .

Ozagrel 処理後の HCV ゲノム配列の取得

上記した 2 次感染実験に使用したキメラマウスの血清を回収し、含まれる HCV ゲノム配列を木村らの報告中で使用された **Direct sequencing** 法に従って取得した⁵²。まず回収した血清から **SepaGene RV-R**(エーディア、東京、日本)を用いて製品付随のプロトコルに従って **HCV RNA** を抽出した。**HCV RNA** を鋳型として、**Revtra Ace** により製品付随のプロトコルに従って **cDNA** を取得した。取得した **cDNA** を用いて **HCV** ゲノムの各断片を **LA Taq** ポリメラーゼ (**TAKARA**) を用いた **PCR** 反応により増幅させた。増幅させた **PCR** 断片と、シーケンス用プライマーを混ぜファスマック (神奈川、日本) にシーケンス解析の外注を行った。**PCR** およびシーケンスに使用したプライマー配列は表 2 にまとめた。得られたシーケンスデータは **GenBank** に登録した

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)。シーケンスを取得したサンプルの説明は以下のとおりである。1. 1 次感染実験、および 2 次感染実験ともに **Ozagrel** 処理を行っていないキメラマウス由来血清 (アセッション番号 **KF006984**)。2. 1 次感染実験、および 2 次感染実験ともに **Ozagrel** 処理を行なったキメラマウス由来血清 (アセッション番号 **KF006982**)。 **Ozagrel** 投与マウス血清から回収された **HCV** ゲノムにおいて、アミノ酸置換を起こす 1 塩基置換を抽出した。

遺伝子	プライマー配列5'-3'	PCR産物 大きさ(bp)	アニーリング温度
COX1	F: GCAGCTGAGTGGCTATTTCC R: ATCTCCCAGACTCCCTGAT	324	60
COX2	F: GCAGTTGTTCCAGACAAGCA R: GGTCAATGGAAGCCTGTGAT	383	60
PGES	F: GAAGAAGGCCTTTGCCAAC R: GGAAGACCAGGAAGTGCATC	200	62
PGDS	F: AAGGCGGCGTTGTCCATGTGCAAGTC R: ATTGTTCCGTCATGCACTTATC	400	55
PGIS	F: TCCTGGACCCACACTCCTAC R: GCGAAAGGTGTGGAAGACAT	395	60
TXAS	F: TCTGCATCCCCAGACTATC R: ATAGCCAGCGATGAGGAAGA	374	60
GAPDH	F: ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG R: TGGAGGGATCTCGCTCCTGG	250	60
EP1	F: GGTATCATGGTGGTGTCTGTG R: GGCCTCTGGTTGTGCTTAGA	324	60
EP2	F: AGGAGAGGGGAAAGGGTGT R: TCTTAATGAAATCCGACAACAGAG	267	60
EP3	F: GACAGTCACCTTTTCTGCAAC R: AGGCGAACAGCTATTAAGAAGAAG	276	60
EP4	F: CAGGACATCTGAGGGCTGAC R: GTAGAAGGTCGTCTCCTTCTGCTC	269	60
DP	F: GCAACCTCTATGCGATGCAC R: GGGTCCACAATTGAAATCAC	292	60
IP	F: AAGACTGGAGAGCCCAGACC R: CCACGAACATCAGGGTGCTG	161	60
TP	F: CAGATGAGGTCTCTGAAGGTGTG R: CAGAGGAAGGTGAGGAAGGAG	304	60

遺伝子	プライマー配列5'-3'	PCR産物 大きさ(bp)
COX1	F: TCCGGTTCTTGCTGTTCTCTG R: TCACACTGGTAGCGGTCAAG	151
PGES	F: CATCCTCTCCCTGGAAATCTCG R: CCGCTTCCTACTGTGACCC	129
PGDS	F: CCTGTCCACCTTGCACAGTC R: TCATGCTTCGGTTCAGGACG	123
PGIS	F: GCAGTGTCAAAAGTCGCCTG R: ACTCTCCAGCCATTTGCTCC	83
TXAS	F: TTTGCTTGGTTGCCTGTTCC R: CCAGAGTGGTGGTCTTCCAG	99
GAPDH	F: GACAGTCAGCCGCATCTTCT R: GCGCCCAATACGACCAAATC	104

表1. 上の図はRT-PCRに使用したプライマー配列、PCR産物の大きさ、PCRアニーリング温度を示している。RT-PCRでは95°C30秒、55から62°Cで30秒、72°C1分の反応を25から40回繰り返した。下の図は、各qRT-PCR実験で使用したプライマー配列ならびにPCR産物の大きさを示している。

A

温度	反応時間	サイクル数
96°C	pause	
96°C	2min	
98°C	10sec	× 2
68°C	3min	
98°C	10sec	× 3
66°C	1min	
68°C	3min	
98°C	10sec	× 3
64°C	1min	
68°C	3min	
98°C	10sec	× 30
62°C	1min	
68°C	3min	
4°C	pause	

PCR産物 No.	プライマー名	プライマー配列
1	Xho I upper	CATGCAATTGGACTCGAGGAGAGC
	Sal lower	TCCAAGCTGAA GTCGACTGT CT
2	Sal I upper	AGACAGTCGA CTTCAGCTTGGA
	EcoRI lower	ACTTCCGTGAAGAATTCAGG
3	HCVseqXho up3	CTAGAGTGCCGTA CTTCGTG
	HCV SU2	AGGACCGAGGAATCGAACAT
4	EcoR I 1	AGCAACACGTGGCATGGAAC
	EcoR I 2	GCCTACGCTTAGCCGTCTCT

B

テンプレート	プライマー名	プライマー配列
PCR産物1	Xho I upper	CATGCAATTGGACTCGAGGAGAGC
	HCVseqSallow2	ACTGATCCTGGAGGCGTAGC
	Sal lower	TCCAAGCTGAAGTCGACTGTCT
PCR産物2	Sal I upper	AGACAGTCGACTTCAGCTTGGA
	HCVseqSalup1	CCAAGCTCCACCTCCATCAT
	HCVseqSalup3	GAATGCAGCTCGCCGAGCAA
	HCVseqEcolow2	GAAGTCAGTCAACACCGTGC
	EcoRI lower	ACTTCCGTGAAGAATTCAGG
PCR産物3	Xho up3	CTAGAGTGCCGTA CTTCGTG
	HCV SU2	AGGACCGAGGAATCGAACAT
PCR産物4	EcoR I 1	AGCAACACGTGGCATGGAAC
	EcoR I 2	GCCTACGCTTAGCCGTCTCT

表2. シーケンス解析におけるPCR条件ならびにプライマー配列。(A)シーケンス解析に使用した各DNAサンプルを増幅させるために行ったPCR条件ならびにプライマー配列を図中に示した。(B) シーケンス解析に使用したPCR産物と各プライマー対応ならびにそれぞれのを図中に記載した

結果

立体培養 HuS-E/2 細胞およびHCV感染ヒト肝臓組織におけるPG合成酵素群の発現

我々は、立体および平面培養 HuS-E/2 細胞の遺伝子発現プロファイルについてマイクロアレイ法を用いて比較した。その結果、bbHCV の生活環が再現される立体培養時において 212 遺伝子が 4 倍以上発現上昇し、一方 219 遺伝子の発現が 4 分の 1 以下に低下することが示唆された。これらの発現変動を見せた遺伝子群の生物学的な解釈を検討するため、抽出した遺伝子リストを DAVID 上で解析した。遺伝子発現プロファイルを基にシグナル変動解析した結果、有意に変動した 12 のシグナル経路が抽出された (表 3)。これらシグナル経路の一つには PPAR シグナル経路が含まれていた。PPAR α シグナル経路が HCV ゲノム複製に関与していることは我々および他の研究グループから報告されている。このことは、HCV の生活環に関与する細胞因子の研究に、この細胞の立体培養時における遺伝子発現プロファイルの変動を解析することの有用性を示唆している。ここで私は、抽出されたシグナル経路の 1 つである PG 合成経路に注目した。図 1A にマイクロアレイ解析におけるアラキドン酸カスケードに含まれる各酵素 mRNA 発現変動の結果を示した。アラキドン酸カスケードの律速酵素である COX1、PGDS、TXAS mRNA の発現が立体培養時において上昇し、一方 PGES、PGIS mRNA の発現は減少していた。これらの結果は定量的 RT-PCR 法でも同様に確認された (図 1)。またウェスタンブロット法により各タンパク質の発現も検討した結果、PGDS を除いてマイクロアレイ解析と同様の発現変動が認められた (図 1)。これらの結果をまとめると、アラキドン酸カスケードは立体培養時において有意に変動することが考えられた。次に HCV 感染ヒト肝組織中の

順位	Gene Ontology Term	P 値
1	Glycolysis / Gluconeogenesis	0.001
2	Complement and coagulation cascades	0.001
3	ECM-receptor interaction	0.005
4	PPAR signaling pathway	0.006
5	Cell cycle	0.017
6	Arachidonic acid metabolism	0.031
7	Drug metabolism	0.045
8	Tyrosine metabolism	0.049
9	Focal adhesion	0.053
10	Proteasome	0.060
11	Retinol metabolism	0.090
12	Fructose and mannose metabolism	0.091

表3. 立体培養時においてHuS-E/2細胞内で有意な発現変動を見せるシグナル経路。4倍以上もしくは4分の1以下の発現変動をみせた遺伝子群を元にDAVIDのウェブページ上でシグナル経路解析を行った。P値が0.1以下のシグナル経路を抽出した。

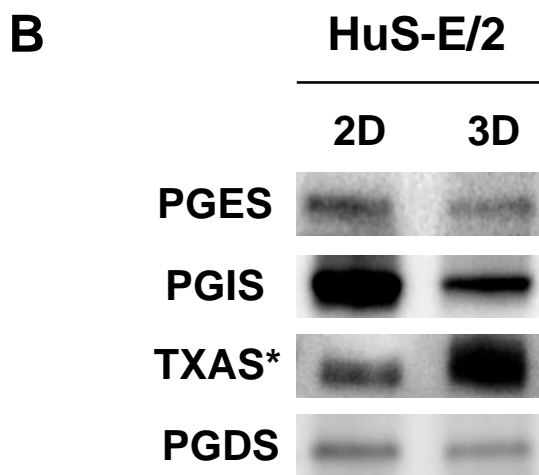
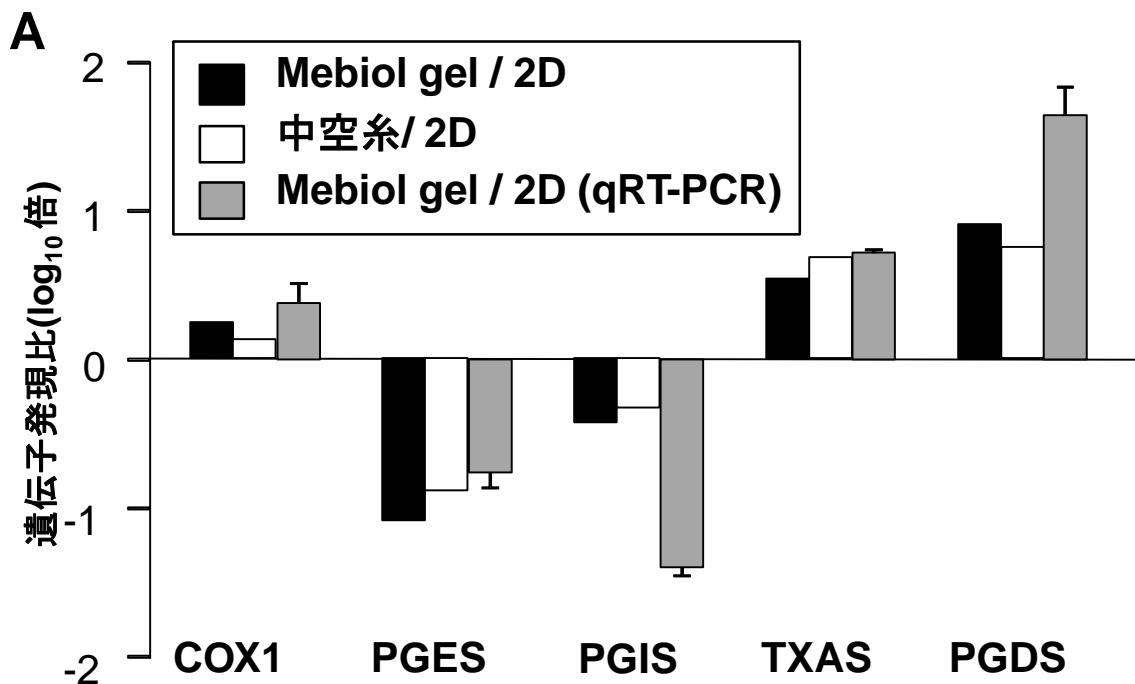


図1. 立体培養HuS-E2細胞におけるアラキドン酸カスケード関連遺伝子群の遺伝子発現変動の解析 (A) マイクロアレイ解析によって、中空系(白色)および温度可塑性ゲル(黒色)中において立体培養したHuS-E/2細胞内におけるアラキドン酸カスケードに関連する酵素群のmRNA発現変動を示した。温度可塑性ゲルを用いた立体培養時における発現変動については、qRT-PCR法による結果も示した(灰色)。qRT-PCRの結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B)温度可塑性ゲルを用いた立体培養HuS-E/2細胞における、各プロスタグランジン合成酵素のタンパク質をウェスタンブロット法により検討した。TXASの検出には膜画分を、その他の合成酵素については全細胞溶解液を用いた。*は膜画分における検出を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

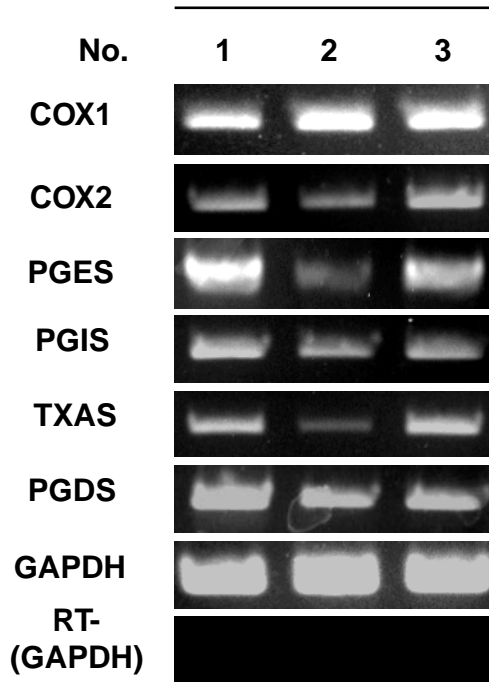
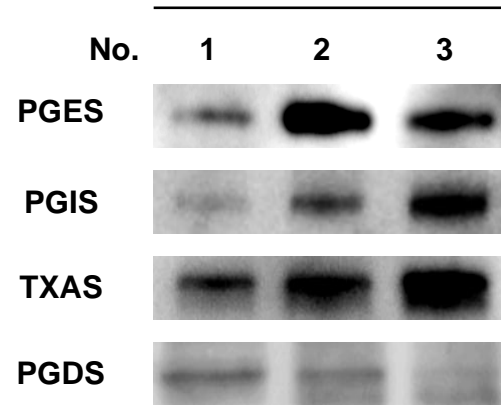
A**HCV 感染患者肝組織****B****HCV 感染患者肝組織**

図2. HCV感染患者肝組織におけるアラキドン酸カスケード関連酵素群のmRNA発現およびタンパク質の検討。(A) HCV感染患者肝組織におけるアラキドン酸カスケード関連酵素群のmRNA発現をRT-PCR法により解析した。(B) HCV感染患者肝組織における各プロスタノイド合成酵素群のタンパク質発現をウェスタンブロット法により解析した。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

各 PG 合成酵素 mRNA、タンパク質発現についても検討した。その結果すべての PG 合成酵素について、その mRNA およびタンパク質発現が認められた (図 2)。アラキドン酸カスケードの代謝産物の 1 つである PGD₂ は感染性 HCV 粒子形成の場である細胞内オルガネラ、脂肪滴の形成を制御していることがすでに報告されていた⁵³。従って我々は、本研究において HCV 生活環における PG 合成経路の役割に注目して解析を進めた。

アラキドン酸カスケードは感染性 HCV 粒子形成に関与している

HCV 生活環におけるアラキドン酸カスケードの影響を評価するため、私は HCV の生活環の各過程において定量的な解析が可能である組換え体 HCV 産生培養細胞系を用いてアラキドン酸カスケード上流に位置する律速酵素 COX1 と COX2 の阻害による HCV 生活環に対する影響について検討した。まず、恒常的な発現パターンを示す事が知られる COX1 に対する活性阻害剤 FR122047 を処理したところ、高濃度条件においても細胞内および培地中の HCV RNA 量に有意な変動は認められなかった (図 3)。一方、培地中に放出された HCVcc の感染性が COX1 阻害剤濃度依存的に低下することが観察された (図 3)。ここで、感染実験に使用した HCVcc 含有培地量を減らして再度観察を試みたところ、この場合も同様に HCVcc 感染 Huh-7.5 細胞のコロニー数の低下が認められた。これらの結果から、COX1 阻害剤処理により明らかに HCVcc の感染細胞コロニー形成能 (Focus Forming ability) の低下が認められた。次に刺激誘導性の発現パターンを見せる COX2 の阻害剤を HCV 産生培養系に処理したところ、細胞内 HCV 複製の増加が認められたものの、放出された HCVcc 量ならびに培地中の HCVcc 感染性に著しい違いは観察されなかった (図 4)。次に同様の実験系に COX1 およ

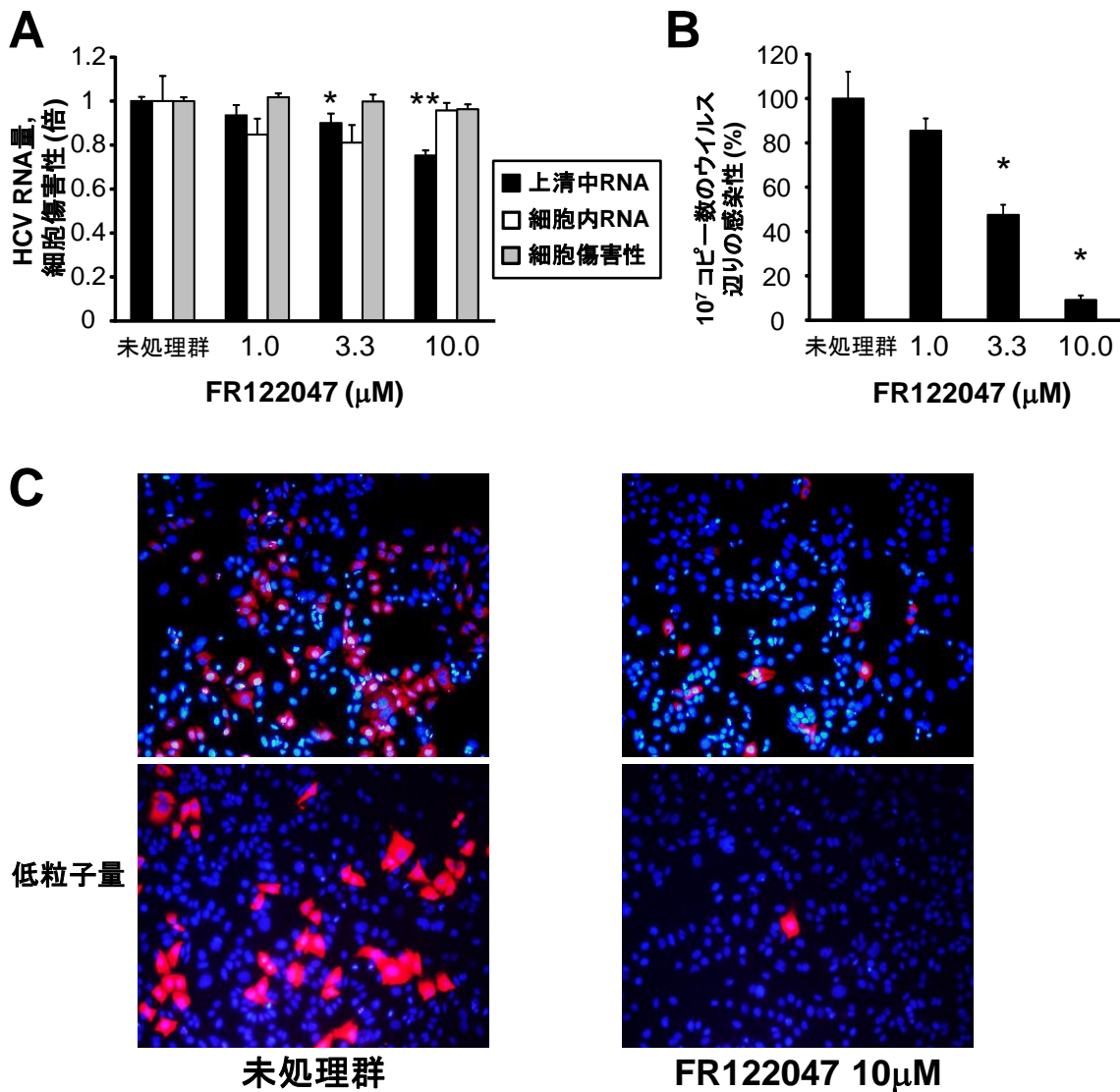
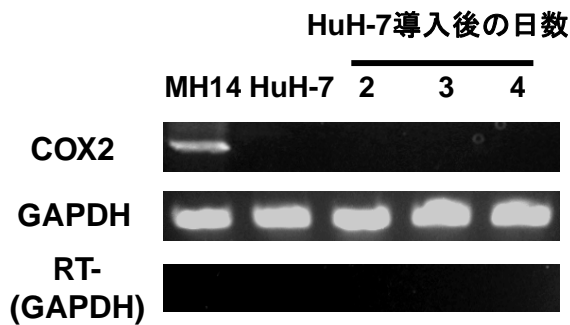
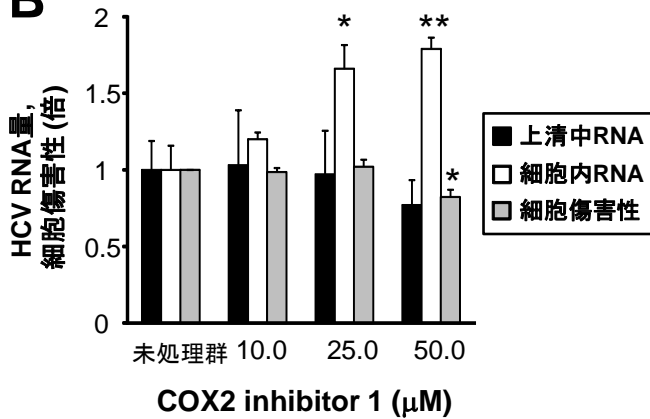


図3. COX1阻害剤FR122047のHCV産生培養系における影響の検討。(A) FR122047のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またFR122047各濃度における細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、FR122047のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(C) HCV粒子コロニー形成能を解析するため、HCV粒子を含んだ上清を希釈して作成した各希釈段階のHCV粒子量を用いて感染実験を行った。そして感染細胞コロニー形成能を免疫染色法にて観察した。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

A



B



C

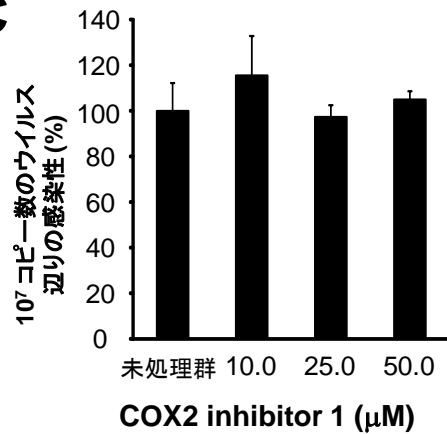


図4. COX2阻害剤COX2 inhibitor 1のHCV産生培養系における影響の検討。(A) JFH1ゲノムRNA transfection後のHuH-7細胞におけるCOX2 mRNA発現をRT-PCR法により解析した。COX2発現ポジティブコントロール細胞として、MH14レプリコン細胞を使用した。(B) COX2 inhibitor 1のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またCOX2 inhibitor 1各濃度における細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(C) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、COX2 inhibitor 1のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

び COX2 の酵素反応産物であり、各プロスタノイドの前駆体である PGH₂ を添加し、放出された HCVcc の感染性への影響を検討した。その結果、PGH₂ 処理により細胞内ならびに培地中の HCV RNA 量にもわずかな変化は認められたが、放出された HCV 粒子の感染性は有意に上昇することが観察された (図 5)。これらの結果から、COX1 を介した PG 合成経路は HCV 複製および粒子放出には大きな影響をあたえないが、感染性 HCV 粒子産生には重要な役割を果たしていることが示唆された。

TXAS は感染性 HCV 粒子形成に重要な役割を果たす。

感染性 HCV 粒子産生におけるプロスタノイドの役割を解析するため、PG 合成経路をコードする mRNA のノックダウンを行った。上記 COX1 阻害剤の結果からプロスタノイドの産生上昇が感染性 HCV 粒子産生に関与することが示唆されたため、各合成酵素中でも立体培養時においてその発現が増加する TXA₂ 合成酵素に注目して検討を進めた。一方 TXAS と同様に発現量が増加する PGDS については、HuH-7 細胞においてその発現が認められなかったため、本研究では検討をおこなっていない (図 6)。まず、組換え体 HCV 産生培養細胞系を用いて siRNA ならびに shRNA による TXAS mRNA のノックダウンの効果を検討したところ、上記 COX1 阻害時と同様に、細胞外に放出された HCVcc の感染性が低下することがわかった。細胞内ならびに培地中の HCV RNA 量についても COX1 阻害時と同様その量に有意な変化は認められなかった (図 7)。次に我々は、TXAS 酵素活性阻害剤を用いてその HCV 感染性に与える影響について検討を行った。実験にはすでに臨床で使用されている TXAS 阻害剤 Ozagrel を使用した⁵⁴。その結果、Ozagrel 濃度依存的に細胞外に放出された HCVcc の感染性

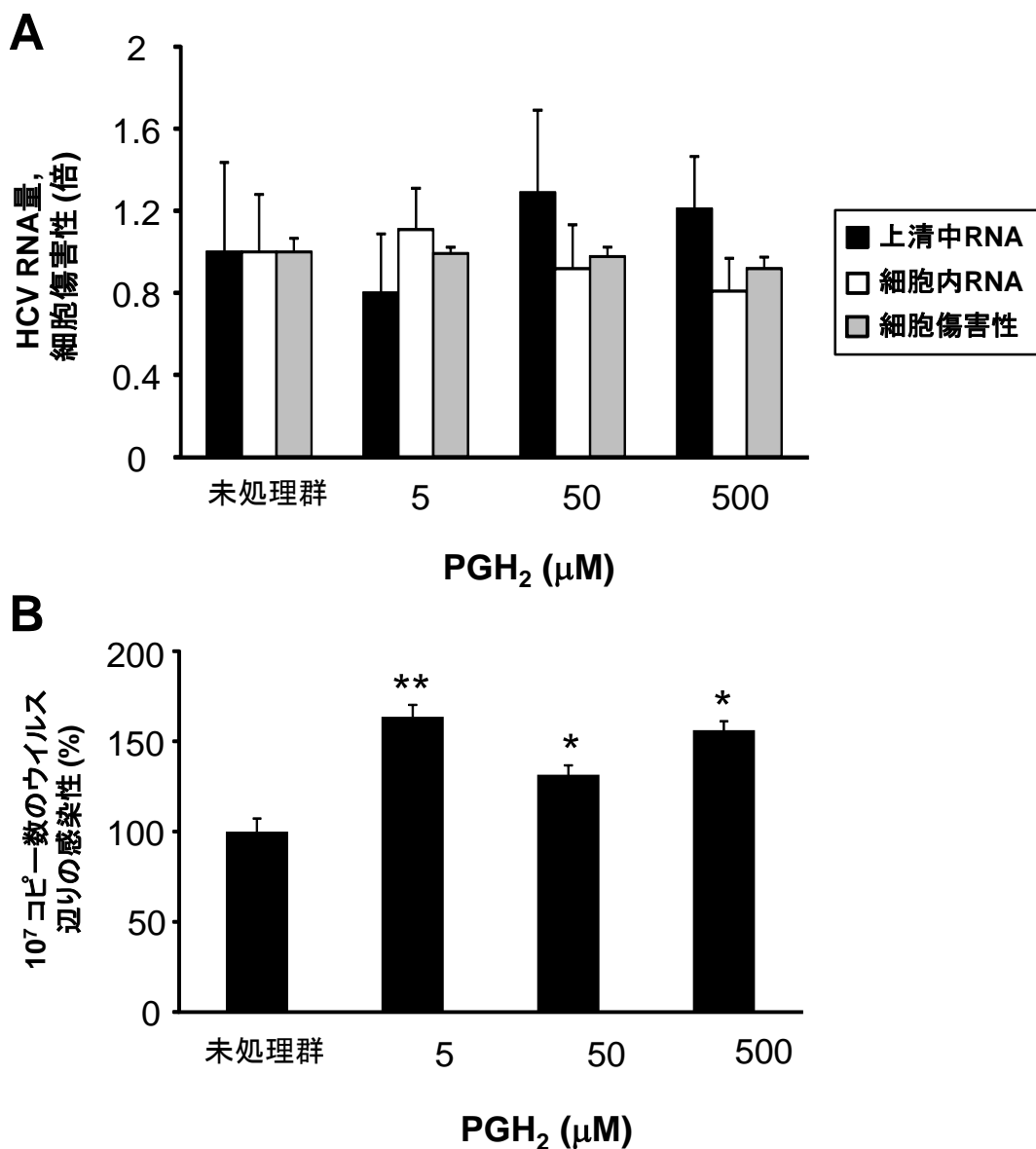


図5. 感染性HCV粒子形成におけるPGH₂の機能解析 (A) PGH₂のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またPGH₂処理の細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、PGH₂添加のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

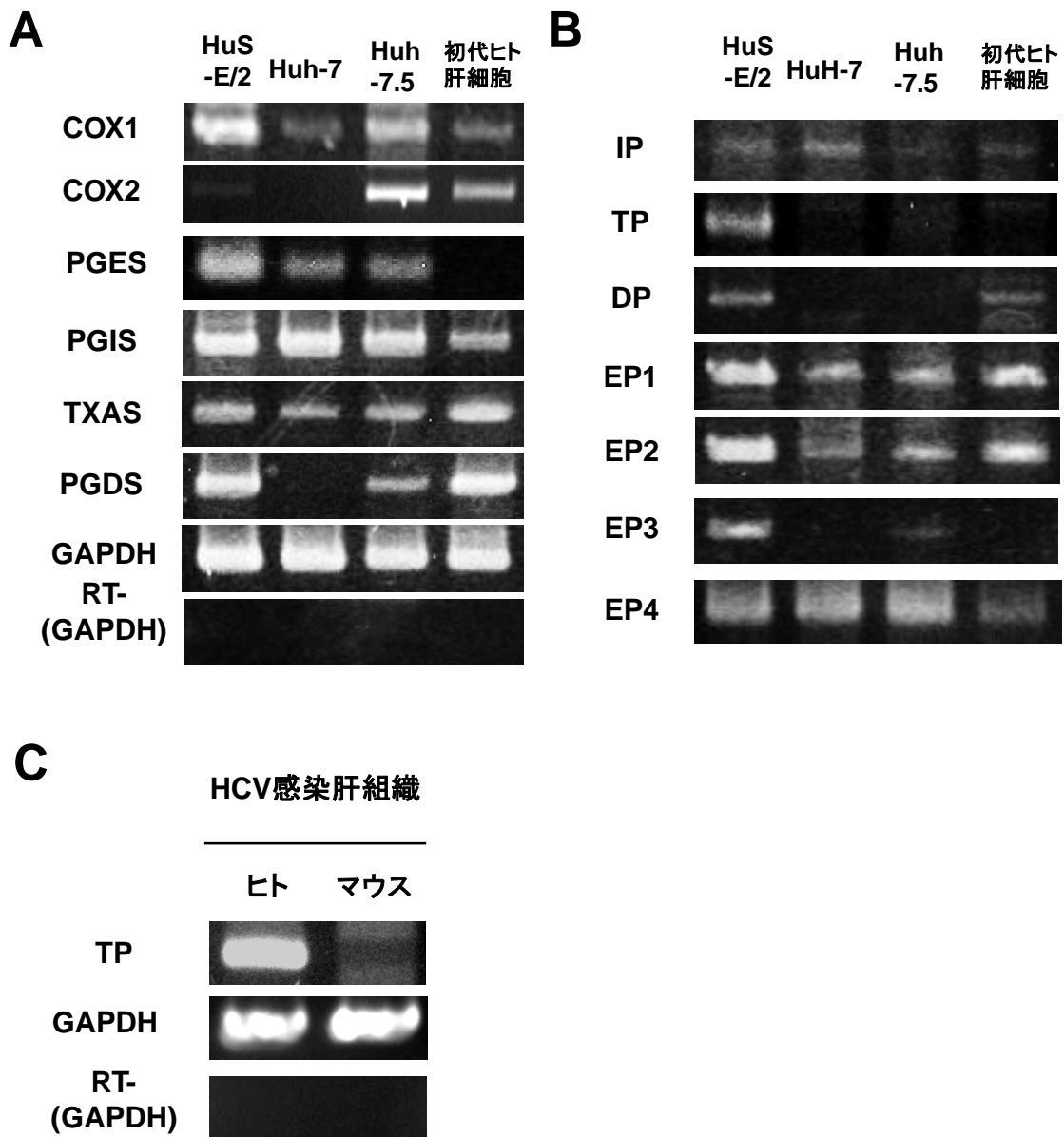


図6. 肝がん由来培養細胞ならびに肝組織におけるプロスタグランジン合成酵素およびプロスタノイド受容体mRNA発現の解析。(A), (B) HuS-E/2細胞、HuH-7細胞、Huh-7.5細胞、初代肝細胞における、アラキドン酸カスケード関連酵素群(A)および各プロスタノイド受容体(B) mRNA発現をRT-PCR法により解析した。(C) HCV感染患者肝臓組織およびHCV感染キメラマウス肝臓組織におけるTP mRNA発現をRT-PCR法により解析した。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

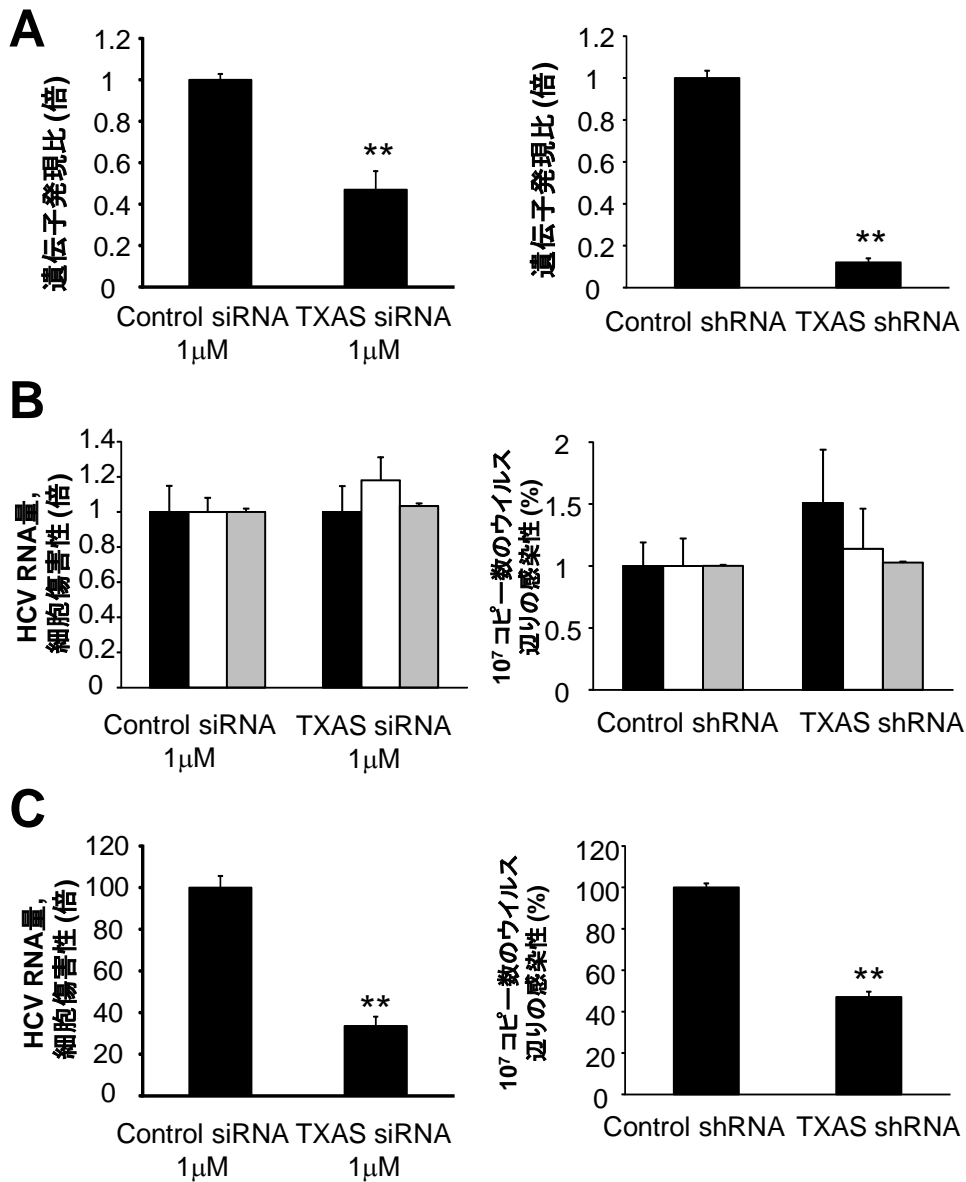


図7. 感染性HCV粒子形成におけるTXASの機能解析 (A) siRNA, shRNAを用いたTXAS発現阻害の効率をqRT-PCR法により検討した。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) siRNA, shRNAを用いたTXAS発現阻害のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またsiRNA, shRNA処理の細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(C) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、TXAS発現阻害のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

の低下が認められた。細胞内ならびに培地中の HCV RNA 量については TXAS mRNA ノックダウン時と同様その量に有意な変化は認められなかった (図 8)。また TXAS 阻害剤が、他の HCV 株についても同様の効果を示すかについて、別の HCV ゲノムの構造タンパク質領域を有するキメラリコンビナント HCV ゲノム J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に導入した組換え体 HCV 産生培養細胞系にて検討を行った。その結果、JFH1 ゲノムを用いた組換え体 HCV 産生培養細胞系と同様に、Ozagrel 濃度依存的な感染性の低下が認められた (図 9)。これらの結果から、TXAS 活性が感染性 HCV 粒子形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

既知の TXA_2 受容体 TP 非依存的に、感染性 HCV 粒子産生が制御されている

TXAS 活性が感染性 HCV 粒子産生に重要であること、そして上記のように TXAS の酵素反応基質である PGH_2 の添加によりその産生が亢進されることから、 PGH_2 を基質とした TXAS 酵素反応産物である脂質メディエーター TXA_2 が HuH-7 細胞において生理的な役割を持つことが示唆された。 TXA_2 の作用機序については、非肝臓系の細胞において検討されており、細胞膜上にある受容体 TP を介してそのシグナル伝達が行われることが既に報告されている⁴⁵。そこで我々は感染性 HCV 形成においても同様の作用機序が働いていると仮定し、TP アゴニストを用いて組換え体 HCV 産生培養細胞系を処理することで、その感染性 HCVcc 産生を向上させるか否かについて検討を行った。しかしながら、TP アゴニストを培地中に添加した場合でも、培地中に放出された HCVcc の感染性に有意な変化は認められなかった (図 10)。ここで HuH-7 細胞上の TP がすでに内在性に産生されている TXA_2 により飽和している可能性が考えられた。そこで

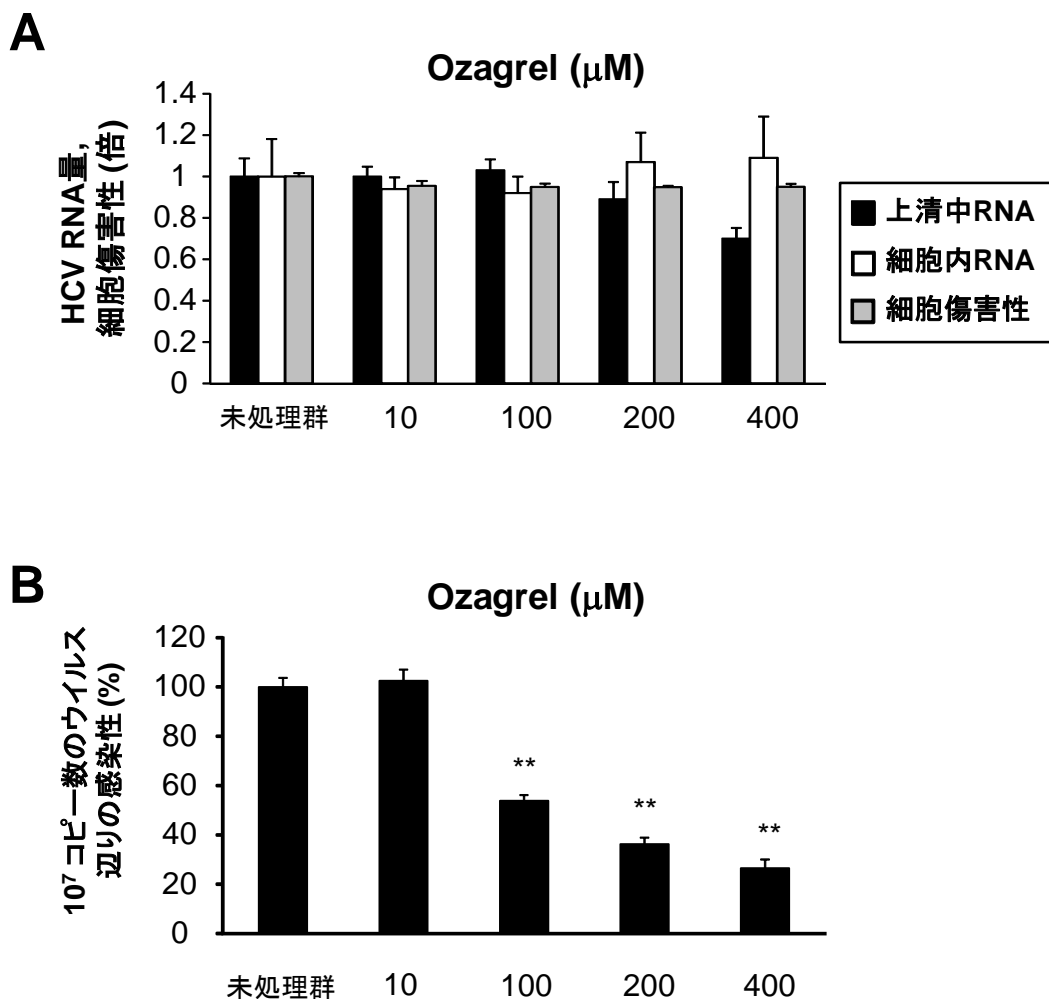


図8. 感染性HCV粒子形成におけるOzagrelの機能解析 (A) TXAS阻害剤処理によるHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またTXAS阻害剤処理による細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、TXAS阻害剤処理のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返しその再現性を確認している

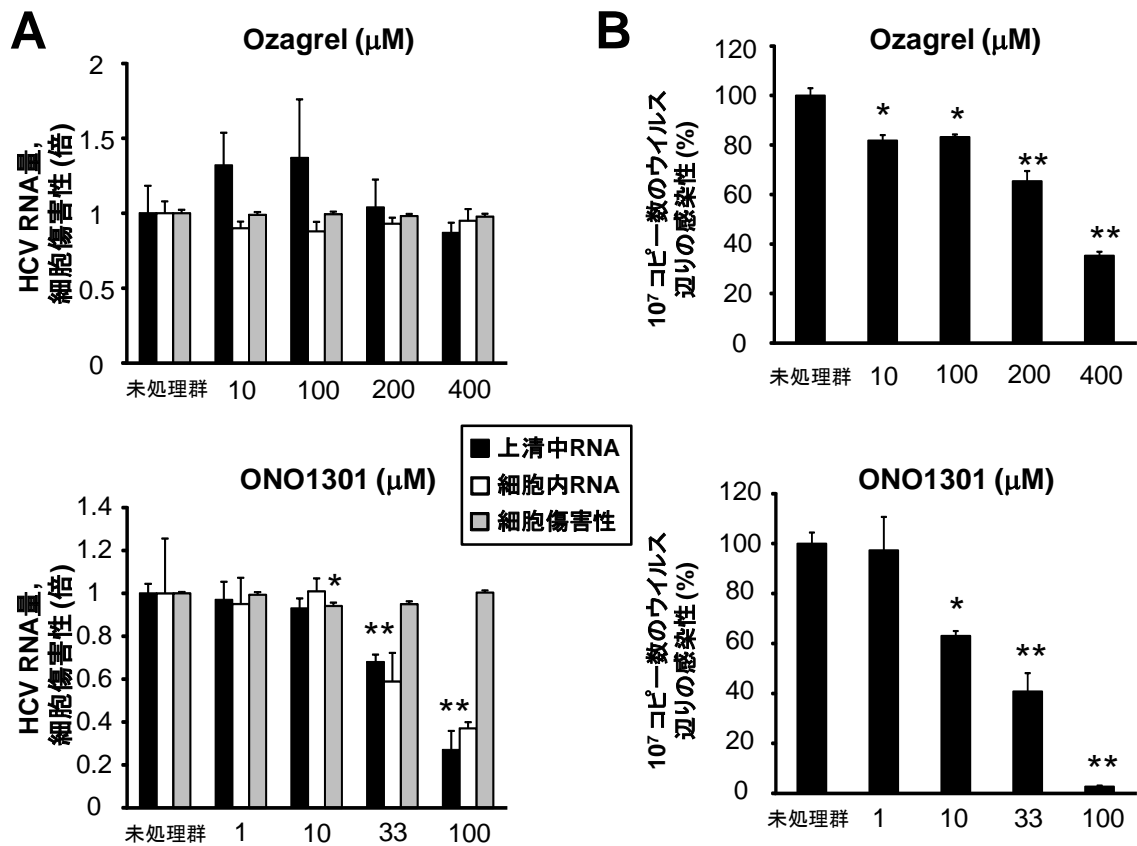


図9. J6/JFH1産生Huh-7.5細胞に対するOzagrelおよびONO1301の効果の検討。(A) Ozagrel(上グラフ)およびONO1301(下グラフ)のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またOzagrel, ONO1301各濃度における細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、OzagrelおよびONO1301のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

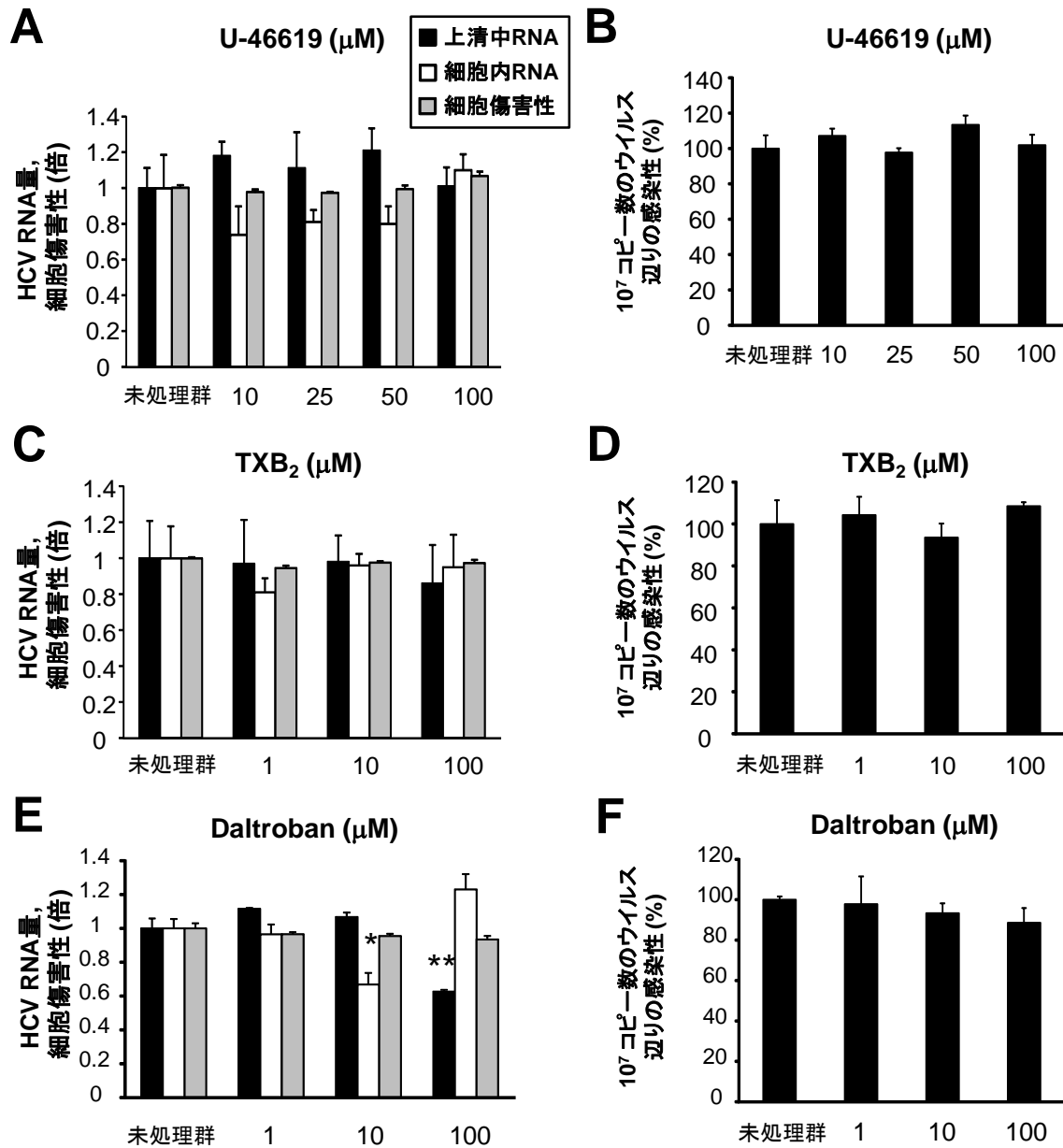
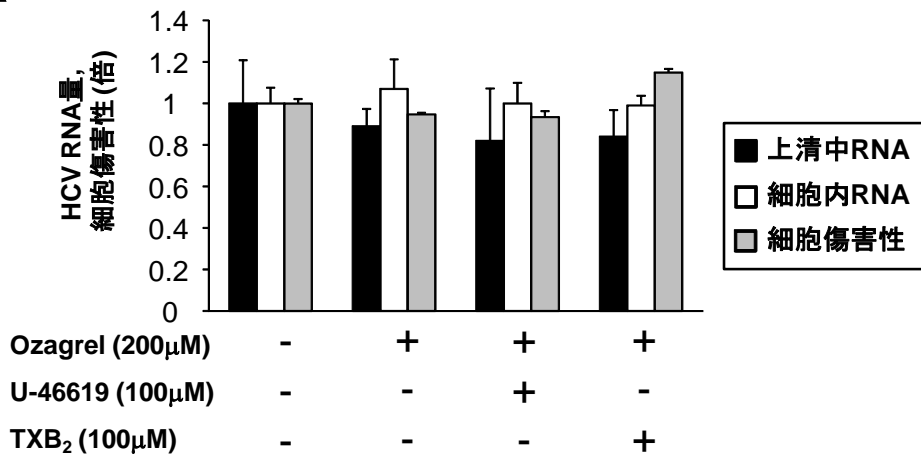


図10. U-46619、TXB₂、およびDaltrobanに感染性HCV粒子形成における影響の検討。infectious HCV production (A), (C)、(E) U-46619(A)、TXB₂ (C)、およびDaltroban (E)のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またそれぞれの試薬の各濃度における細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B)、(D)、(F) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行いU-46619(B)、TXB₂ (D)、およびDaltroban (F)のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

Ozagrel 処理により細胞による TXA_2 産生を抑制し、同時に TP アゴニストを加え、Ozagrel 処理によって低下した HCVcc の感染性が回復するか否かを検討した。しかしながら、TP アゴニスト添加によっては Ozagrel 処理の効果は変化しなかった (図 11)。さらに TP アンタゴニストが TXAS 阻害剤同様の効果を示すか否かについても同様に検討した。しかしながら、やはり感染性 HCVcc の産生には有意な影響は認められなかった (図 10)。使用した TP アゴニストについて、その活性が失われている可能性を考慮し、使用した TP アゴニストの活性について TP 依存性細胞内シグナルの下流における 2 種類の応答、細胞内 Ca 濃度上昇とアクチン重合についてその誘導能の検討を行った。TP アゴニスト処理時における HuH-7 細胞, Huh-7.5 細胞, HuS-E/2 細胞, HEK293 細胞内の Ca イオン濃度を測定した結果、HuS-E/2 細胞および HEK293 細胞では先行研究どおりにその上昇が観察された。しかしながら、組換え体 HCV 産生培養細胞で使用している HuH-7 細胞ならびに Huh-7.5 細胞では Ca イオン濃度に変化は認められなかった (図 12)。同様に、TP アゴニスト処理後のアクチン重合の誘導についても検討したが、Ca イオン濃度の変化と同様に HuS-E/2 細胞および HEK293 細胞では誘導され、HuH-7 細胞ならびに Huh-7.5 細胞では誘導が認められなかった (図 12)。そこで RT-PCR 法により HuH-7 細胞, Huh-7.5 細胞, HuS-E/2 細胞そしてヒト初代肝細胞における TP mRNA 発現を検討した。その結果、他の細胞に比較して HuH-7 細胞ならびに Huh-7.5 細胞において TP mRNA 発現が著しく低いことが明らかになった (図 6)。これらの結果から、HuH-7 由来細胞において TXA_2 /TP シグナル伝達が欠損あるいは減弱していることが考えられた。

また HCV 感染性の低下が、TXAS 阻害剤による TXA_2 産生量の低下に起因した結果ではなく、Huh-7.5 細胞内の脂肪酸群のバランスの崩壊による間接的な影

A



B

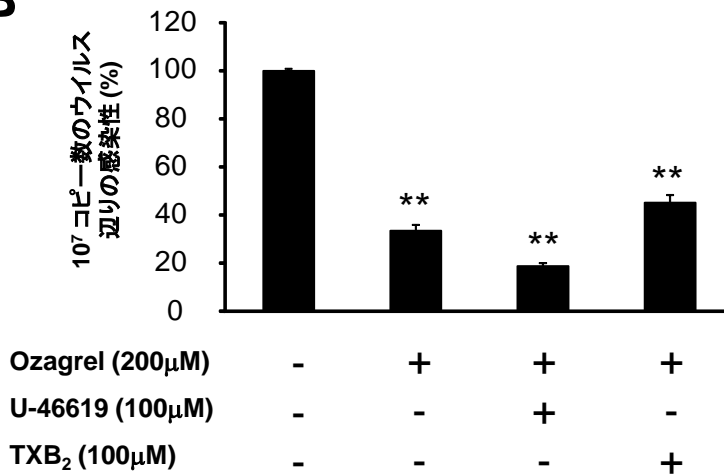
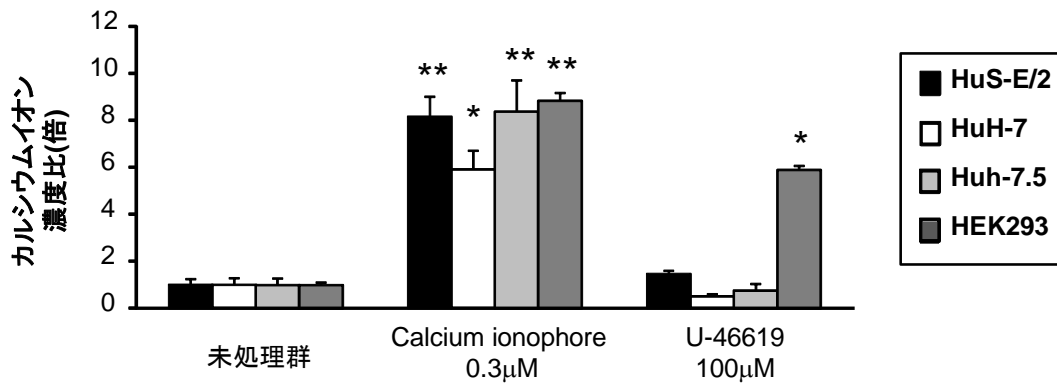


図11. TXA2受容体TPを介した感染性HCV粒子形成の制御メカニズムの検討。(A) Ozagrel処理下における、TPアゴニストU-46619およびTXB₂のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。また各試薬添加時における細胞障害性も検討した(灰色)。(B) Ozagrel処理下における、TPアゴニストU-46619およびTXB₂のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

A



B

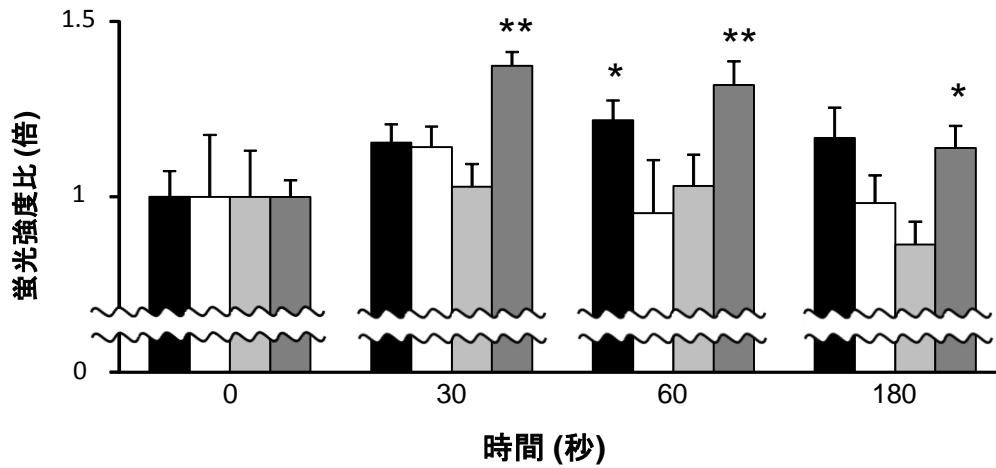


図12. HuS-E/2細胞, HuH-7細胞, Huh-7.5細胞,ならびにHEK293細胞におけるU-46619応答性の検討 (A) HuS-E/2細胞(黒色), HuH-7細胞(白色), Huh-7.5細胞(灰色),ならびにHEK293細胞(濃灰色)におけるカルシウムイオノフォアおよびU-46619処理時のカルシウムイオン濃度変動を検討した。(B) U-46619処理時のHuS-E/2細胞(黒色), HuH-7細胞(白色), Huh-7.5細胞(灰色),ならびにHEK293細胞(濃灰色)におけるアクチン重合活性化を検討した。グラフ中の結果は(A), (B)共に4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している。

響である可能性について検討した。そのため、我々は HCV 感染 Huh-7.5 細胞内における全脂肪酸構成比率を Ozagrel 処理、未処理群間において総脂肪酸分析によって比較した。その結果、Huh-7.5 細胞内のアラキドン酸(C20:4 ω -6)を含む脂肪酸構成の比率は Ozagrel 処理によって大きく変動しないことが明らかとなった (図 13)。

ここで、TXA₂の安定な分解産物である TXB₂ の感染性 HCV 粒子形成における役割についても検討を行った。図 11 に示すように Ozagrel 処理と同時に TXB₂ を添加しても Ozagrel 処理で低下した感染性 HCVcc 産生の回復はやはり認められなかった。以上の結果から、TXA₂ それ自体、もしくは未知の TXA₂ 由来代謝産物が、既知 TP 非依存的な感染性 HCV 粒子産生の制御を行なっている可能性が考えられた。

TXAS は HCV 成熟を制御している

次に TXAS が感染性 HCV 粒子産生過程の中のどの過程に関与しているかを検討した。先行研究において、HCV タンパク質群が脂肪滴周辺へ集積され、感染性粒子形成がその周辺で行われることが明らかにされていることから²³、まず HCV タンパク質の脂肪滴周辺への局在に対する Ozagrel 処理の効果について検討を行った。Ozagrel 処理下における、HCV コアタンパク質および NS5A タンパク質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、未処理時と同様に脂肪滴周辺に局在していた (図 14)。このことから TXAS は少なくとも HCV タンパク質の脂肪滴周辺への集積には関与していないことがわかった。次に TXAS が感染性粒子特異的な細胞外への放出に関与する可能性について検討を行った。つまり、これまでに HCVcc は細胞内において感染性粒子として形成

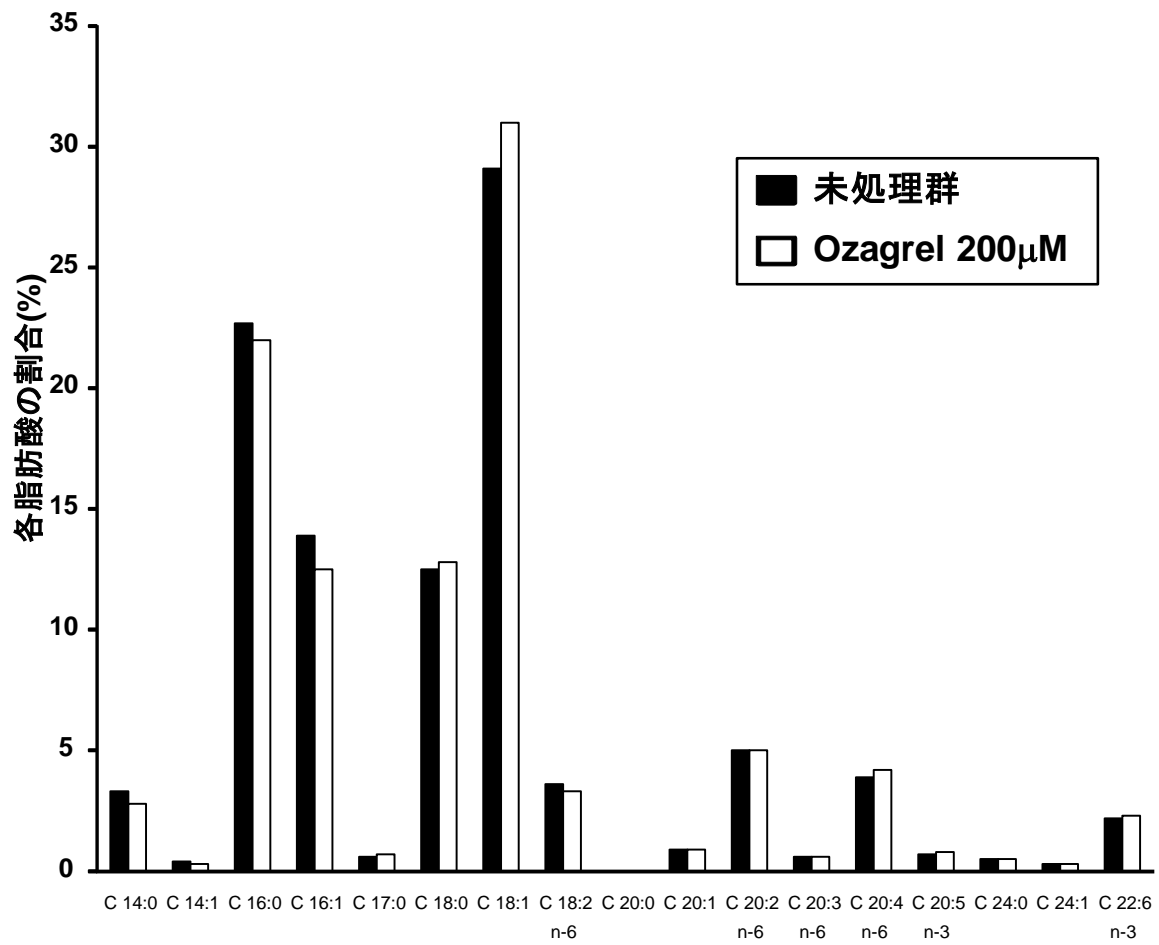


図13. HCV感染Huh-7.5細胞におけるOzagrel未処理、処理サンプル間での脂肪酸組成の比較。全脂肪酸中における各脂肪酸群の割合をOzagrel未処理(黒色)、処理サンプル(白色)をそれぞれグラフ中に示した。

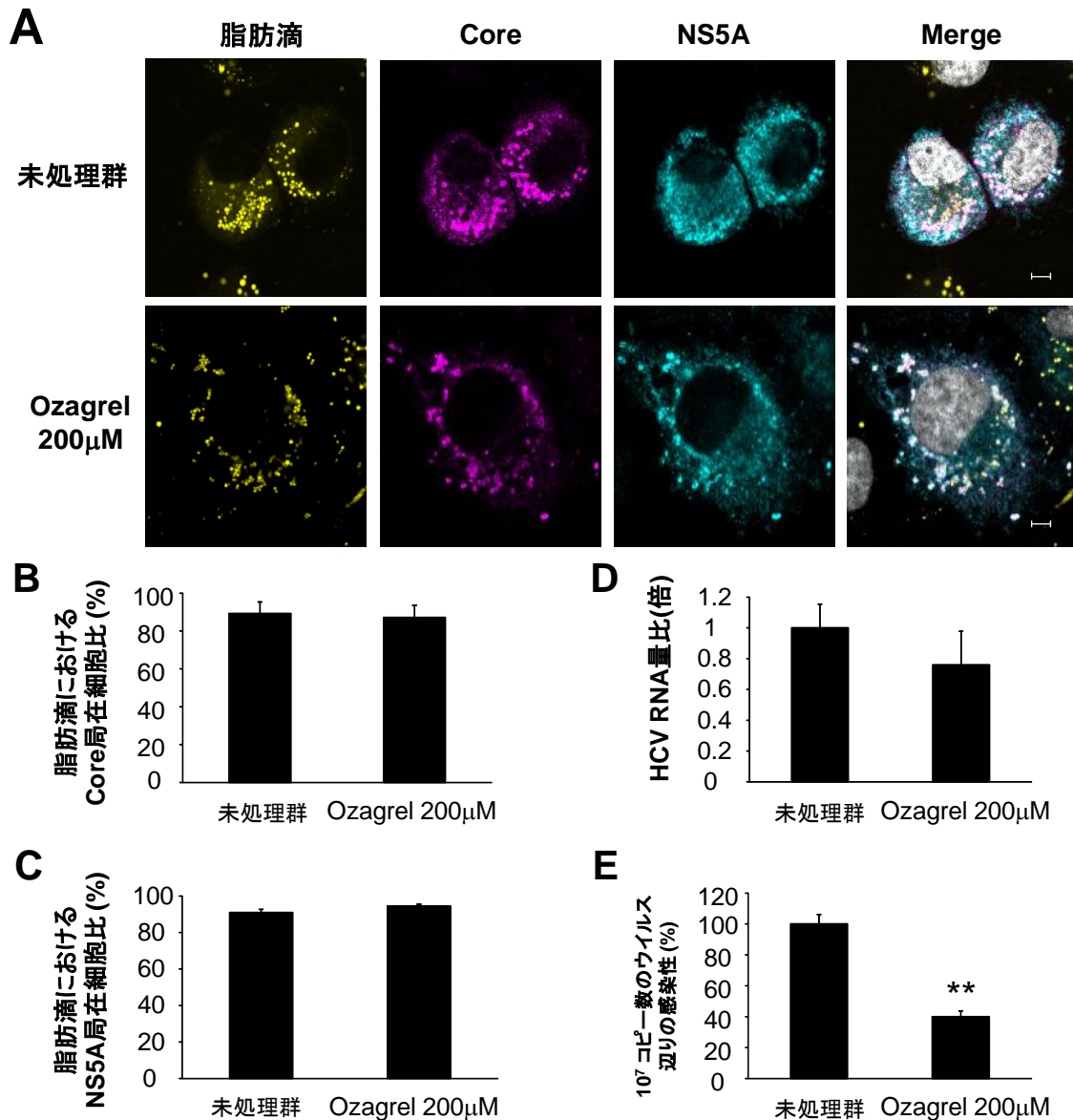


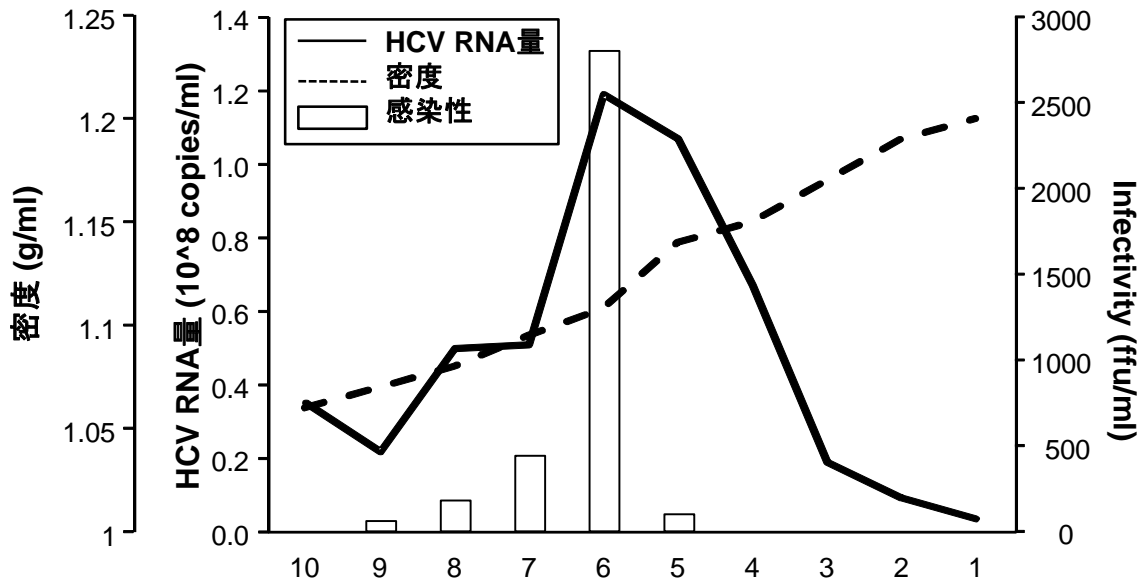
図14. TXAS阻害時におけるHCV CoreおよびNS5Aタンパク質細胞内局在の観察、ならびに細胞内HCV粒子量、感染性の検討。(A) Ozagrel存在下におけるHCV Core(マゼンタ)ならびにNS5Aタンパク質(シアン)の脂肪滴(黄色)周辺における局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。核はDAPI(灰色)により染色した。スケールバーは5μmを示している。(B), (C) 脂肪滴にHCVタンパク質Core(B), NS5A(C)が共局在している細胞の割合を定量した。グラフ中の結果は、200細胞以上を母数として共局在している細胞の割合を3回繰り返し計測した平均値および標準偏差を示している。(D), (E) Ozagrel存在下における細胞内HCV粒子量(D)および感染性(E)を、HCVゲノムコピー数の定量ならびにHuh-7.5細胞への感染実験により検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

され、その後、細胞外へ放出されることがわかっているため、この細胞内に存在する HCVcc を回収し、Ozagrel 処理未処理下においてその量と感染性を比較した。その結果、Ozagrel 処理下において、培地中に放出された HCVcc と同様に細胞内粒子の量的変化は認められなかったが、顕著な感染性の低下が認められた (図 14)。この結果から、TXAS は感染性 HCV 粒子の細胞外への放出過程ではなく、それ以前に脂肪滴周辺において行われていると考えられる成熟感染性 HCV 粒子形成過程に寄与している可能性が示唆された。

TXAS 阻害は組換え体 HCV 産生培養細胞系で産生される HCVcc の物理化学的な性質を変化させる

次に、Ozagrel 処理時において、放出された HCV 粒子の物理化学的な性質に何らかの影響を及ぼしていないか浮遊密度勾配遠心法を用いて検討を行った。先行研究において、感染性粒子の浮遊密度は非感染性のものに比べて比較的軽く、1.1-1.13 g/ml であることが報告されていた²³。それと同様に、Ozagrel 未処理細胞からの HCVcc は主に 2 つのピークを持つ画分に分けられた (図 15, No.5, 6)。この 2 つの画分は、それぞれ感染性の高い HCVcc を含む画分 (図 15, No.6) と感染性の低い HCVcc を主に含む画分 (図 15, No.5) に相当した。一方、Ozagrel 処理細胞からの HCVcc を分画したところ、感染性の低い HCVcc を主に含む画分 (図 15, No.5) における HCVcc 量は未処理サンプルと変化しなかったが、感染性の高い HCVcc を含む画分 (図 15, No.6) に存在する HCV 粒子量が著しく減少していた。これらの結果から、Ozagrel 処理により HCVcc に物理化学的な変化が起こり、このことが感染性の低下を引き起こしている可能性が考えられた。

未処理群



Ozagrel 200 μ M

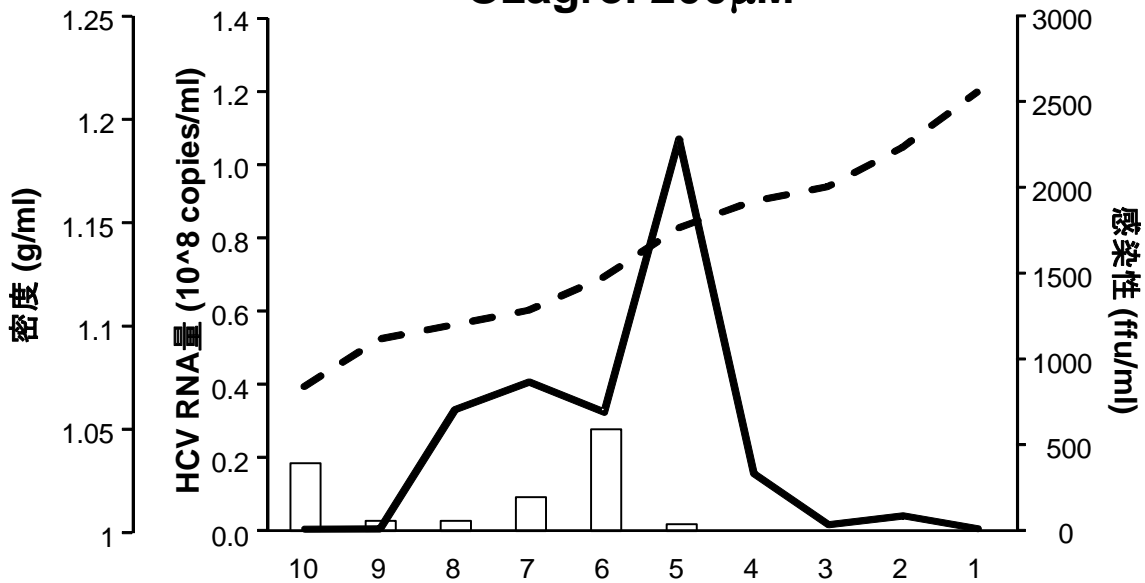


図15. Ozagrel処理時におけるHCV粒子の密度勾配分布の解析。上のグラフはOzagrel未処理群におけるスクロース密度勾配遠心法により得られた各分画中のHCV RNA量(実線)、分画の密度(点線)、HCV粒子の感染性(白色)を示している。下のグラフはOzagrel処理時におけるスクロース密度勾配遠心法により得られた各分画中のHCV RNA量、分画の密度、HCV粒子の感染性を示している。HCV RNA量はqRT-PCR法により、またHCV感染性は focus forming assayによりそれぞれ定量した。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

TXAS 阻害剤およびIP アゴニストはキメラマウス内において感染後初期のHCV 感染伝搬を阻害する

さらに、ヒト肝細胞 uPA/SCID マウスを使用して TXAS 阻害剤の in vivo における患者血由来の HCV に対する抗 HCV 増殖能の評価を行った。Ozagrel が in vitro において感染性 HCV 粒子産生の阻害効果を有することから、Ozagrel が HCV 感染後極初期の体内 HCV 感染伝搬の阻害に効果があると推定し、その検討を行った。また、これまでに PGI₂ が TXA₂ シグナル経路と相反する生理的機能を持つことが明らかにされていることから⁵⁵、PGI₂ 受容体(IP)に対するアゴニスト Beraprost も同様にその抗 HCV 能を検討した。その結果、2種類の薬剤共に、薬剤未処理群に比べ感染後2週間目における血中HCV量の著しい低下を引き起こすことが明らかとなった(図16)。さらに、Beraprost 投与群では、HCV 感染後4週間目においても薬剤未投与群に比べ4分の1以下の血中HCV量を示した(図16)。ここまでの結果をまとめると、Ozagrel は予想通り in vivo において HCV 感染伝搬阻害能を持つことが明らかとなった。さらに TXA₂ シグナル経路の阻害に加えて、PGI₂ シグナル経路の活性化も HCV 増殖を阻害することが明らかとなった。PGI₂ シグナル経路の HCV 生活環における役割をさらに検討するため、我々は Beraprost を HCV 産生培養系に加えその影響を検討した。しかしながら Beraprost 処理による HCV 複製、放出、感染性への有意な影響は全く観察されなかった(図17)。そのため HCV 産生に使用している HuH-7 細胞、Huh-7.5 細胞の、IP アゴニストへの応答性を PGI₂/IP シグナル経路の下流因子 cAMP のレポーターアッセイによって検討した。その結果、Beraprost 処理によって HuS-E/2 細胞および HEK293 細胞で cAMP シグナル経路の活性化が認められたが、HuH-7 細胞ならびに Huh-7.5 細胞ではその活性化が全く認められな

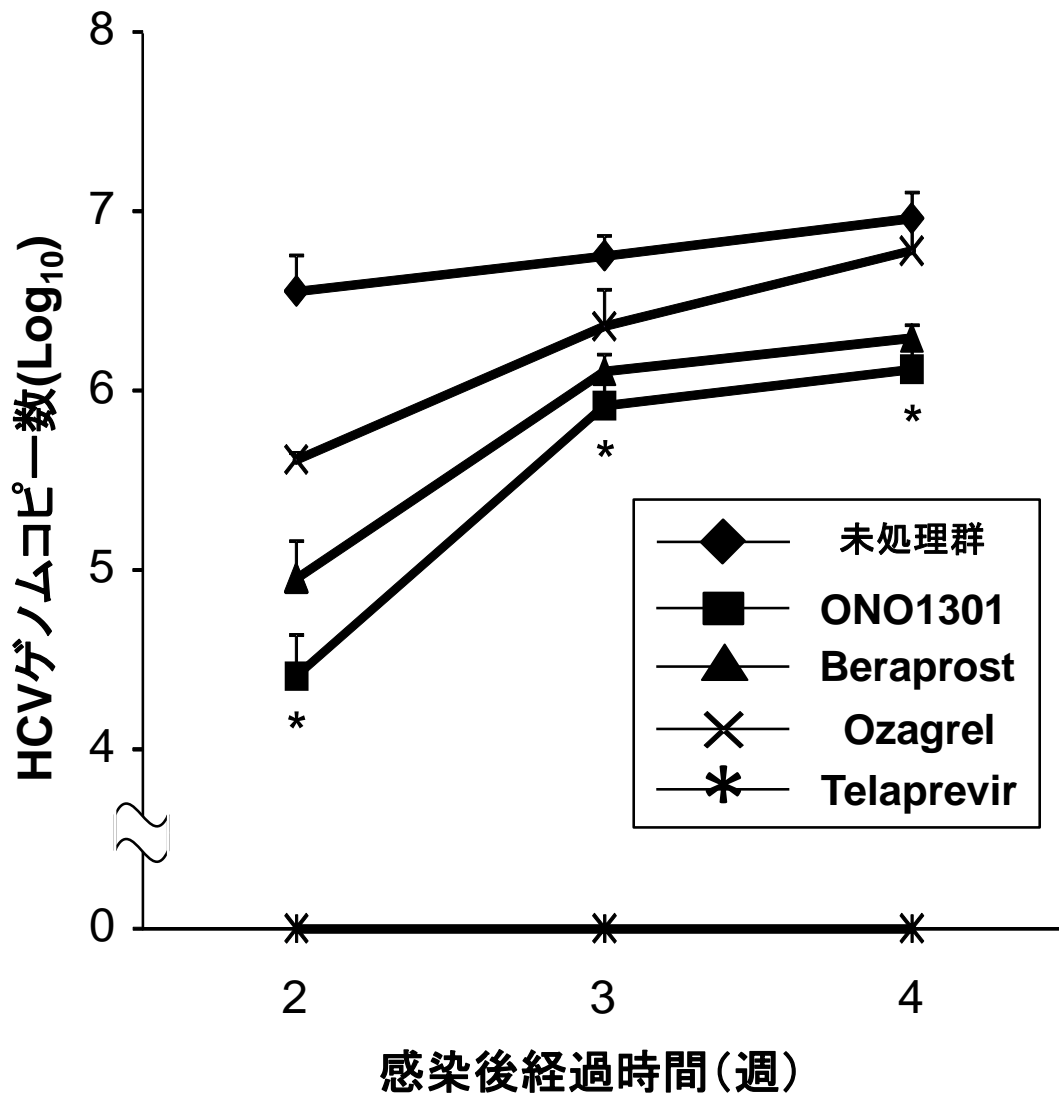


図16. ヒト肝臓キメラマウスを用いたONO1301, Beraprost, Ozagrel, およびTelaprevirの抗HCV能の評価。各薬剤はHCV感染1週間後から投与を開始した。グラフはHCV感染2, 3, 4週間目のキメラマウス血清中におけるHCV RNA量をqRT-PCR法により測定した値を示している。各サンプルの値は、それぞれ6サンプル(未処理群、ダイヤモンド), 4サンプル(ONO1301, 四角, Telaprevir, アスタリスク, Ozagrel, クロス), 3サンプル(Beraprost, 三角)の値の平均値ならびに標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.05未満を示している。

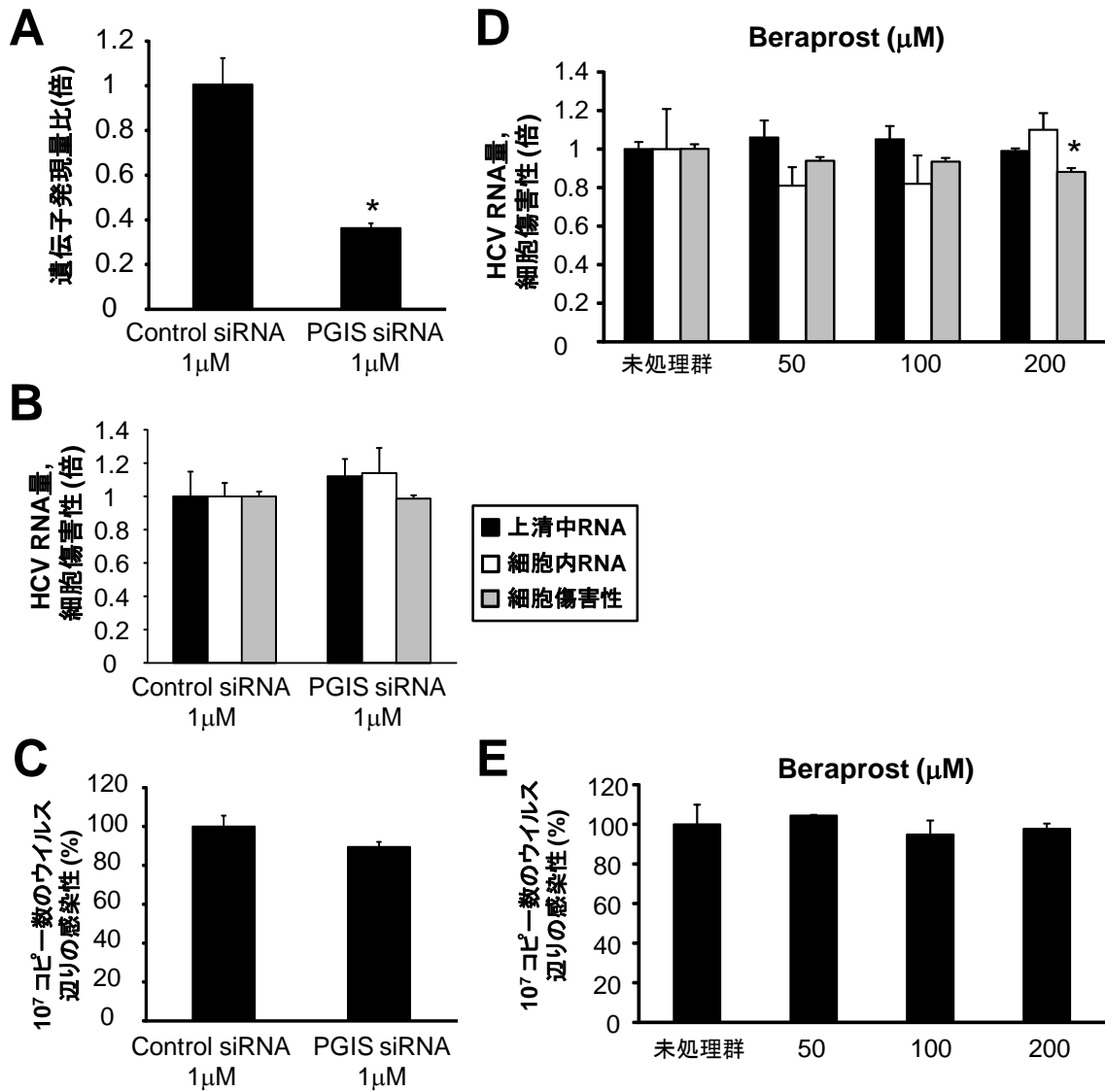


図17. PGIS発現阻害ならびにPGI2受容体IPを介したシグナル経路活性化によるHCV生活環への影響の検討。(A) siRNA PGIS発現阻害の効率をqRT-PCR法により検討した。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) siRNAを用いたPGIS発現阻害のHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またsiRNA処理の細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(C) PGIS発現阻害のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(D) IPアゴニスト処理によるHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またIPアゴニスト処理による細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(E) IPアゴニスト処理のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

った(図 18)。これらの結果から、HuH-7 ならびに Huh-7.5 細胞において PGI₂/IP シグナル伝達経路が欠損していることが明らかとなった。

また抗 HCV 薬剤候補をなりうる他の化合物について検討するため、IP アゴニストと TXAS 阻害剤両方の効果を持つことが知られている ONO1301 について同様にヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討を行った。結果は予想通り、ONO1301 投与群において Ozagrel 投与群ならびに Beraprost 投与群に比べてより強い HCV 感染伝播の抑制が観察された(図 16)。ONO1301 の HCV 産生培養系における効果も同様に検討したところ、Ozagrel と同様に放出された HCVcc の感染性の低下が認められた(図 19)。また一方で ONO1301 処理時に放出された HCVcc 量の低下も観察された。この ONO1301 の効果についての作用機序は未だ不明であり、さらなる解析が必要である。HuH-7 細胞ならびに Huh-7.5 細胞に対する ONO1301 の IP アゴニストとしての活性を cAMP レポーターアッセイで検討したが、Beraprost と同様に cAMP シグナル経路の活性化は観察されなかった(図 18)。この結果から、ONO1301 による感染性の低下が TXAS に阻害によるものであることが示唆され、TXAS 活性の感染性 HCV 粒子形成への関与をさらに支持するもの考えられる。今回のヒト肝細胞キメラマウスによる感染実験において、Ozagrel および IP アゴニストの投与期間中に血中の HCV 量が徐々に増加し未処理群に近づいていることが観察された。この結果から薬剤耐性株の出現を仮定した。Ozagrel 投与マウスから回収した血清を新たなウイルス非感染ヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、Ozagrel 投与を行った。その結果、2 次感染薬剤投与キメラマウス血中の HCV RNA 量は Ozagrel 処理によって全く影響を受けないことがわかり、このことから予想されたように薬剤投与キメラマウス中で増殖している HCV は薬剤抵抗性であることが示唆された(図 20)。

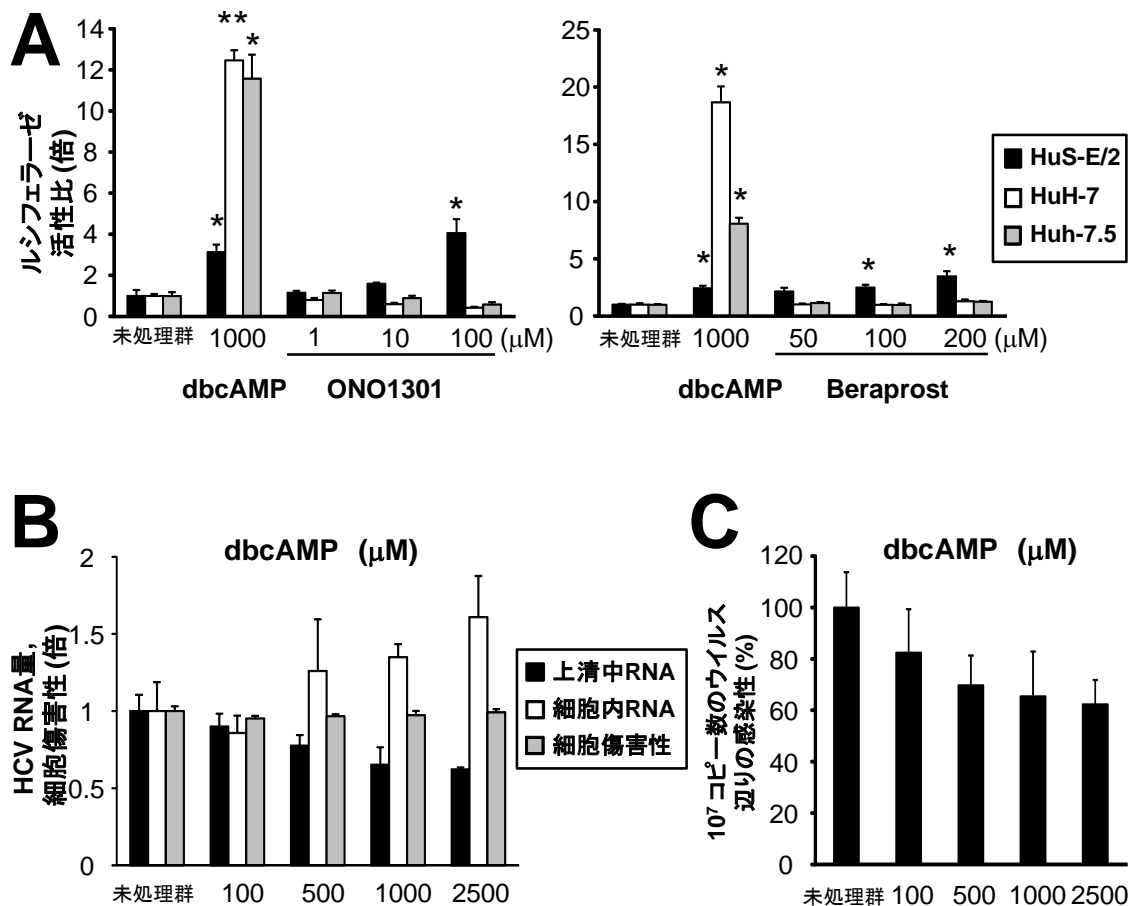


図18. dibutyryl cAMP (dbcAMP)のHCV生活環への影響の検討。(A) HuS-E/2細胞(黒色)、HuH-7細胞(白色)、Huh-7.5細胞(灰色)におけるIPアゴニストの応答性をcAMPレポーターアッセイにより検討した。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(B) dbcAMP処理によるHCV複製(白色)および粒子放出(黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。またdbcAMP処理による細胞障害性も検討した(灰色)。グラフ中の結果は4サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。(C) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、dbcAMP処理のHCV感染性への影響を検討した。グラフ中の結果は3サンプルの値の平均値および標準偏差を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

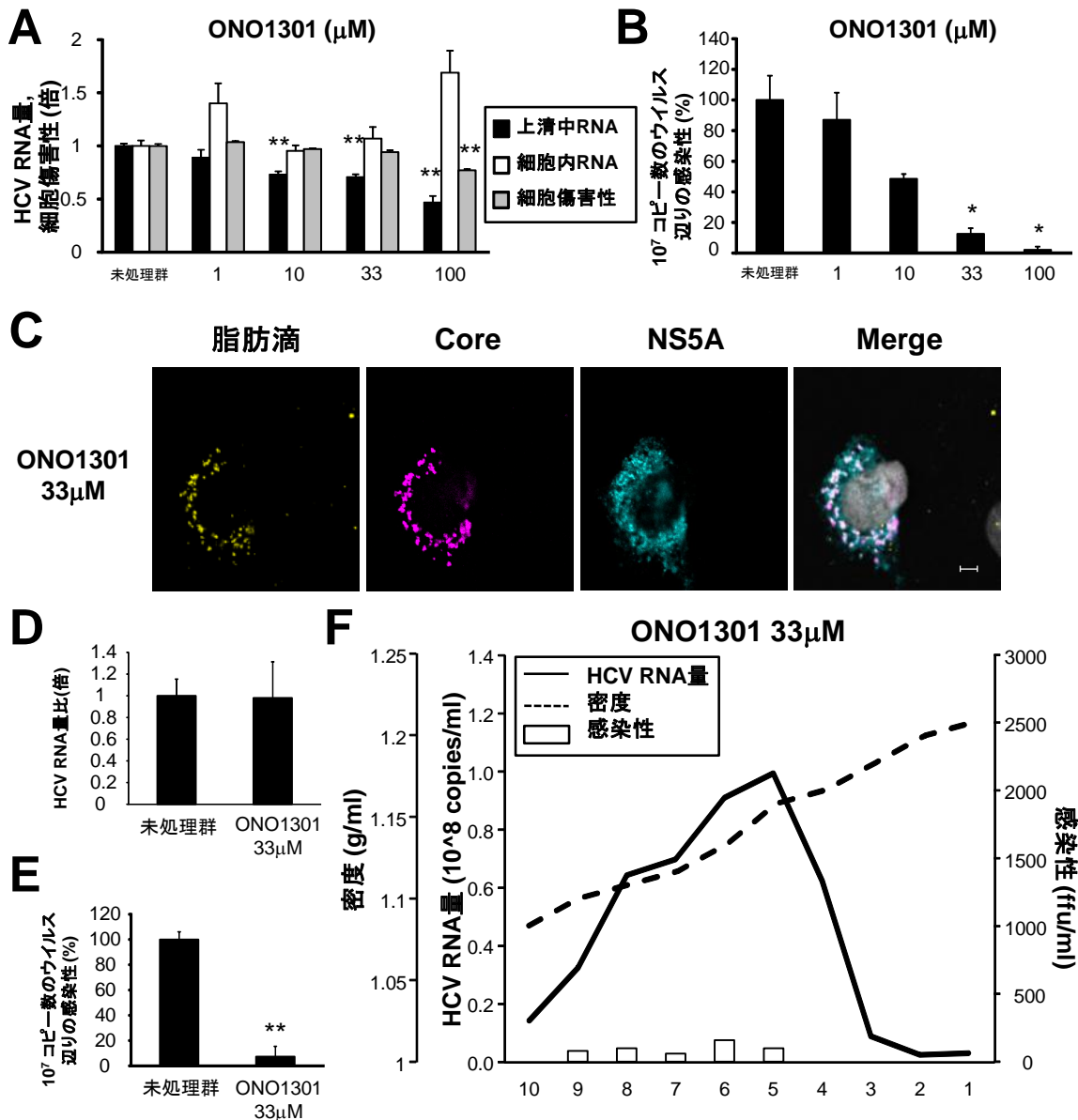


図19. ONO1301のHCV生活環における影響の検討 (A) ONO1301処理によるHCV複製 (白色)および粒子放出 (黒色)への影響をHCVゲノムコピー数を定量し検討した。また ONO1301処理による細胞障害性も検討した (灰色)。 (B) 培地中に放出されたHCVccによるHuh-7.5細胞への感染実験を行い、ONO1301処理のHCV感染性への影響を検討した。 (C) ONO1301存在下におけるHCV Core (マゼンタ)ならびにNS5Aタンパク質 (シアン)の脂肪滴 (黄色)周辺における局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。 (D), (E) ONO1301存在下における細胞内HCV粒子量 (D)および感染性 (E)を、HCVゲノムコピー数の定量ならびにHuh-7.5細胞への感染実験により検討した (F) ONO1301処理群におけるスクロース密度勾配遠心法により得られた各分画中のHCV RNA量 (実線)、分画の密度 (点線)、HCV粒子の感染性 (白色)を示している。各グラフ中「*」はP値0.01未満、「**」は0.001未満を示している。すべての実験は2回以上繰り返し、その再現性を確認している

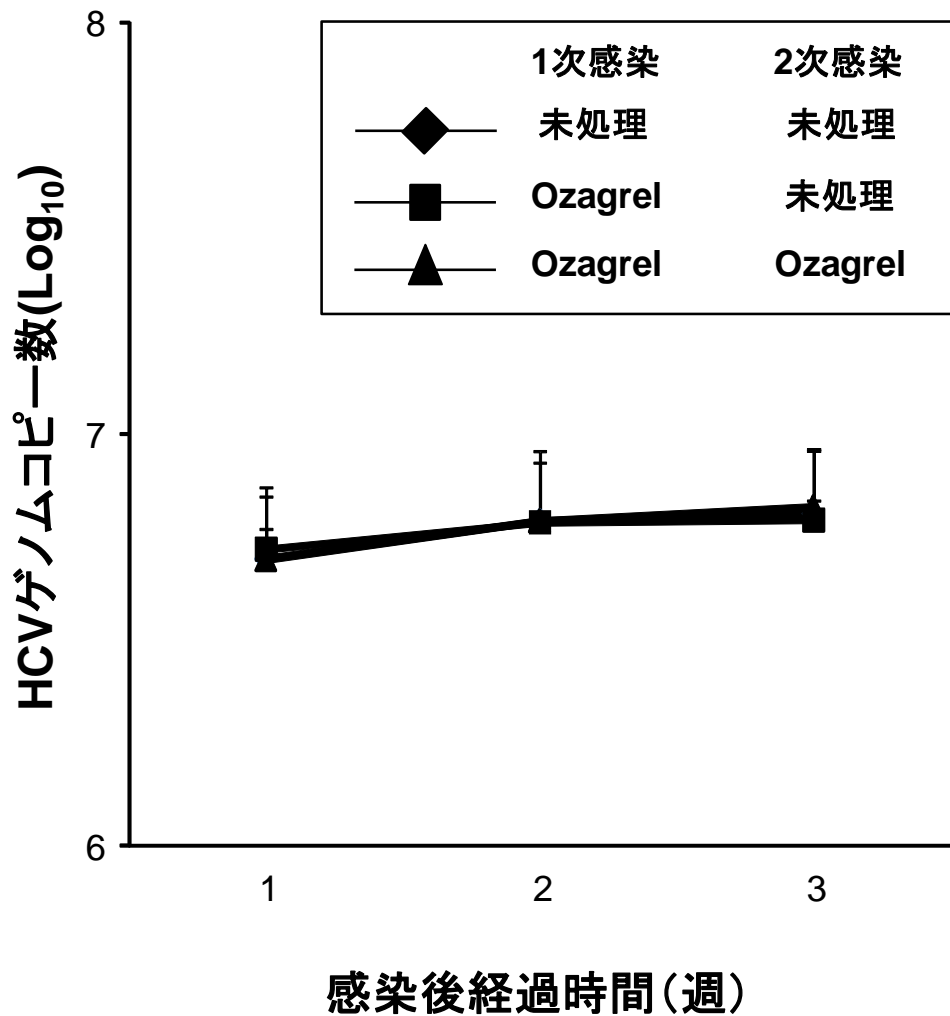
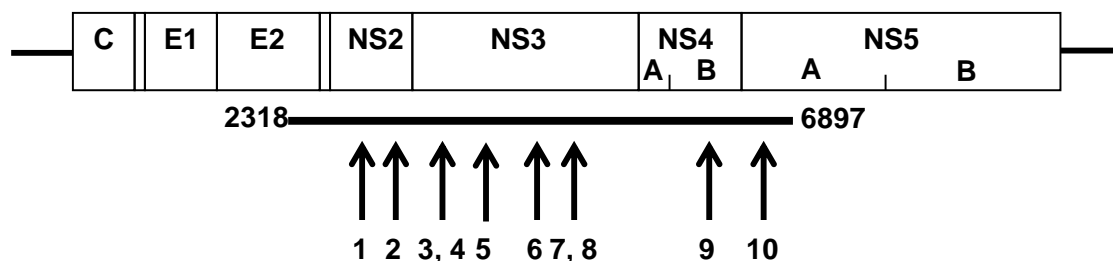


図20. Ozagrel投与、非投与群のヒト肝臓キメラマウスから回収した血清による2次感染実験。2次感染実験時のHCV増殖動態ならびにOzagrel薬効への影響を検討した。OzagrelはHCV感染直後から投与を開始した。グラフはHCV感染1, 2, 3週間目のキメラマウス血清中におけるHCV RNA量をqRT-PCR法により測定した値を示している。各サンプルの値は、それぞれ4サンプルの値の平均値ならびに標準偏差を示している。

またこの2次感染ヒト肝細胞キメラマウス血清を回収し、その HCV ゲノム配列の一部を決定したところ、Ozagrel 処理マウスからの HCV ゲノムには未処理マウスからのものに比較して10箇所のアミノ酸置換を引き起こす一塩基置換が同定された(図 21)。このことから Ozagrel 処理キメラマウス中では確かにゲノム配列に変異が導入された HCV が主に増殖していることがわかった。



変異番号	場所	1塩基置換	アミノ酸置換
1	3192	A→G	Asparagine→Aspartic acid
2	3264	A→G	Isoleucine→Valine
3	3596	T→A	Phenylalanine→Tyrosine
4	3597	C→T	
5	3859	C→T	Serine→Leucine
6	4283	G→A	Methionine→Isoleucine
7	4437	G→A	Glycine→Serine
8	4439	T→C	
9	5886	G→A	Valine→Methionine
10	6747	G→A	Alanine→Threonine

図21. Ozagrel処理、未処理2次感染キメラマウス群間における血清中のHCVゲノム配列の比較。シーケンスが得られた領域を太線で示した。アミノ酸置換を伴う1塩基置換が認められた部分を矢印で示した。下の図には各変異点における塩基の位置、1塩基置換の情報、ならびにアミノ酸置換の情報について記載した。

考察

本研究において、筆者らは①TXAS が感染性 HCV 粒子産生に関わる新規宿主因子であること、そして②TXAS による感染性 HCV 粒子制御において、TP を介さない未知の作用機序の存在、の 2 点を見出した。以下、これら 2 点に関する考察を述べていく。

1. TXAS はどのように感染性 HCV 粒子形成を制御しているのか？

過去に報告された感染性 HCV 粒子形成関連宿主因子とのフェノタイプ比較

本研究において、私は、アラキドン酸カスケード、特にその構成要素の中で TXAS が感染性 HCV 粒子産生に関与していることを明らかにした。COX1 および TXAS の阻害した際、HCV 複製および培地中への粒子放出量に変動は認められないものの、放出された HCVcc の感染性が著しく低下することが明らかになった (図 3、7)。これまでに、Apolipoprotein E、Heat shock protein 70、Annexin A2 といった宿主因子が感染性 HCV 粒子産生に関わると報告されている⁵⁶。しかしながら、これら宿主因子の発現抑制を行った際には HCVcc の培地中への放出量が低下するために培養液中の感染性 HCVcc 量が低下することが明らかになっている。したがって、これまでに同定されている感染性粒子産生宿主因子は HCV 粒子放出に関わっていることを示している。一方 TXAS 阻害時には HCVcc の細胞外放出量には大きな変化が認められず、細胞内における感染性 HCVcc に影響を与えていることから、TXAS の HCV 生活環における機能はこれまでに報告された宿主因子とは異なると考えられる。そのため細胞内における感染性粒子産生に関わる新規宿主因子 TXAS の同定に成功したと考えられる。

TXAS に制御される細胞内メカニズムとは

先行研究において、脂肪滴周辺で感染性粒子形成が行われ、またその際に HCV タンパク質群が粒子形成場周辺に集積されることが既に報告されている²³。その集積には Diglyceride acyltransferase といった宿主因子が関わる事も報告されており⁵⁷、従って我々は TXAS 阻害時における Core および NS5A の脂肪滴周辺における局在を検討した。しかしながら TXAS 阻害時において、これら HCV タンパク質の局在に変化は認められなかった (図 14)。また TXAS 阻害剤処理細胞からの密度勾配パターンの結果から、TXAS 阻害剤未処理細胞からの HCVcc において主に非感染性粒子が含まれる画分 (図 15, No.5) では粒子量に変動が認められないにも関わらず、未処理細胞からの HCVcc で主に感染性粒子が含まれる画分(図 15, No.6) ではその粒子量が著しく減少した。この密度勾配パターン変動は、先行研究において感染性粒子形成が著しく低下する NS5A mutant HCV 粒子の密度勾配パターンの変動と一致している。この結果の一致から、TXAS が脂肪滴周辺における感染性粒子形成に必要であることが強く示唆された。

感染性の低下した粒子は何が変わったのか

既に述べたように感染性組換え体 HCV 産生培養細胞系において産生される感染性 HCVcc と非感染 HCVcc ではその浮遊密度が異なり、そのことは幾つかの先行報告においても指摘されている。感染性 HCVcc の密度はおおよそ 1.1~1.13 g/ml であり、非感染性 HCVcc はより重い密度を持つと報告されている²³。加えて HCVcc の構成要素を除去し、その感染性を低下させるような処理を行った際には HCVcc 粒子の密度も変動することが既に報告されている。例えば HCVcc に対して methly- β -cyclodextrin によるコレステロールの除去、また lipoprotein lipase による lipoprotein の分解を行う、HCVcc の浮遊密度が軽くなることが知

られている^{58, 59}。しかしながらこれら先行報告と相反して、TXAS 阻害時には HCV 粒子密度のピークがより軽くなることが明らかになった (図 15)。感染性粒子と非感染性粒子との間でどのような違いが存在するのか、また TXAS によってその相違の形成にどのように関与するのかを明らかにするために更なる検討が必要であるといえる。

TXAS 阻害剤と IP アゴニストの抗 HCV 薬剤としての評価

近年、HCV タンパク質を標的とした薬剤の開発が盛んに進められており、より HCV 特異的な薬剤による治療法の確立が期待されている。しかしながら、ウイルスタンパク質を標的とした薬剤による単剤療法では、抵抗性を持った変異が高頻度に出現する問題点が指摘されていた⁶⁰。このことから薬剤抵抗性変異株の出現を防ぐために複数の標的を対象とした多剤療法を開発するために、宿主因子を含めた新規抗 HCV 標的の探索が試みられている。本研究に私が見出した、TXAS 阻害剤による感染性組換え体 HCV 産生抑制効果を基に、この薬剤並びにこれと同様の効果が期待された IP アゴニストが共にヒト肝細胞キメラマウス実験系を用いて HCV 感染伝播阻害効果を持つ事が明らかになった。この結果は新規薬剤標的としての TXA₂ および PGI₂ シグナル経路の可能性を示唆している。またこれまでに IP を介した PGI₂ シグナル経路は TXA₂ と相反する生理活性を持つと報告されている⁵⁵。キメラマウスによる実験において、TXAS の阻害と PGI₂ シグナル経路の活性化が共に HCV 増殖阻害能を示すことからこの相反する生理活性を示唆している (図 16)。しかしながら組換え体 HCV 粒子産生培養細胞系において PGI₂ シグナル経路の効果を IP アゴニストおよび siRNA を用いて検討した所、TXAS 阻害時に認められた HCV 粒子の感染性の低下は観察されなかった (図 17)。加えて IP 下流因子である cAMP シグナル経路応答をレポー

ターアッセイで検討したところ、HCV 産生に使用する HuH-7 および Huh-7.5 細胞においては IP アゴニスト処理時にその応答が認められなかった (図 18)。そこで IP mRNA の発現を検討した所、HuH-7 細胞, Huh-7.5 細胞では HuS-E/2 細胞および初代肝細胞に比べてその発現が著しく低いことが明らかになった(図 6)。まとめると動物実験系において IP を介したシグナル伝達が HCV 増殖阻害能を持つことが明らかになったものの、PGI₂/IP シグナル伝達が欠失している HuH-7 由来培養細胞では HCV 生活環における役割の解析が難しいことが示唆された。このことから、今後 HCV 生活環における PGI₂ の作用機序を解明する際には、より肝細胞の性質を保持していると HuS-E/2 立体培養系による解析が必要であるといえよう。

またキメラマウスへの薬剤投与時、特に Ozagrel 投与時において、血中 HCV 量が次第に未処理群に近づいていた (図 16)。我々は Ozagrel 投与マウス血清を用いて 2 次感染実験を行い、Ozagrel 耐性株の存在に関して検討を行った。その結果 2 次感染時に Ozagrel による HCV 感染拡大阻害効果は認められなかったことから、Ozagrel 耐性を HCV が獲得していることが示唆された(図 20)。Ozagrel 処理による一塩基置換の存在を検討するため、我々は 2 次感染実験に使用したマウス血中の HCV ゲノム配列を決定し、未処理群と比較を行った。その結果、得られた塩基配列決定領域(E2 から NS5A)においてアミノ酸置換を伴う 10 個の一塩基置換を同定した (図 21)。これらの変異が Ozagrel による感染性 HCV 粒子形成ならびに薬剤抵抗性とどのような関連を持つのかについては、今後リバーズジェニティクス法を用いた変異ウイルス株を作成し、その性状解析を進める必要がある。これらの結果から TXAS 阻害剤は使用する際に多剤療法を用いる必要と考えられ、新規 HCV 薬剤として使用するため至適濃度の検討も含めて、臨床応用に向けてさらなる研究が必要であるといえる。

2. 肝実質細胞内における TXA₂ の機能とは？

TP 非依存的な TXA₂ シグナル伝達分子メカニズムとは

TXA₂ はその半減期が 30 秒程度の非常に不安定な物質であり、そのためこれまで TXA₂ 活性を直接測定することは一般的ではなかった⁶¹。通常、細胞に対する TXA₂ 活性はその受容体に対するアゴニスト、アンタゴニストを用いて検討されていた。しかしながら、TXAS 阻害剤が感染性 HCV 粒子産生を阻害するにも関わらず、TP アゴニスト、アンタゴニストは全く影響しなかった (図 10、11)。また TXA₂ の安定的な代謝産物である TXB₂ の HCV 感染性における効果も検討したが、有意な影響は認められなかった (図 10、11)。加えて、図 5 に示したように PGH₂ 添加により感染性 HCVcc 産生が増加したことから、感染性 HCV 産生には PGH₂ 代謝産物である TXA₂ それ自体もしくは未知の代謝産物によって、TP 非依存的な経路が関与していると考えられた。細胞膜上に位置する既知の受容体非依存的なシグナル伝達経路が他のプロスタノイドでは既に報告がある。PGI₂ は核内受容体 PPAR δ のリガンドとして機能し、PGD₂ の代謝産物 15d-PGJ₂ は核内受容体 PPAR γ のリガンドとして機能することが明らかとなった^{62,63}。私の結果と合わせて考えると、TXAS 酵素反応産物においても同様に、ヒト肝実質細胞内において核内受容体を介したシグナル伝達経路が存在する可能性も考えられる。組換え体 HCV 産生に使用した培養細胞およびヒト肝細胞キメラマウスの肝組織中において TP mRNA 発現が認められなかったことも、この仮説と一致するものである (図 6)。TP 非依存的なシグナル伝達経路の詳細および、その下流経路において感染性 HCV 粒子産生がどのように制御されるかについては今後更に検討を進める必要がある。

総括

本研究において筆者は、感染性 HCV 粒子産生に関わる新規宿主因子として TXAS を同定、その HCV 生活環における機能解析を行い、以下の新しい知見を得た。

- 1) TXAS は感染性 HCV 粒子形成に関わる
- 2) TXAS による感染性粒子産生への関与は TXA_2 受容体 TP に非依存的な未知の作用機序を介して行われる
- 3) TXAS 阻害剤ならびに IP アゴニストは HCV 感染伝搬阻害効果を持つ抗 HCV 薬剤としての可能性を持つ

発表論文目録

2013年 Gastroenterology に掲載予定

謝辞:

本研究に際しまして、多岐に渡りご指導とご鞭撻を承りました京都大学ウイルス研究所准教授土方誠先生、教授朝長啓造先生に謹んで感謝の意を表します。また本研究を進めるにあたって、試薬の提供、マウスモデルにおける薬剤評価検討等でご協力いただいた小原道法先生（東京都医学総合研究所）、TOYOBO（大阪、日本）、Toray（東京、日本）、茶山一彰先生、今村道雄先生、平賀伸彦先生（広島大学）、下遠野邦忠先生（国立国際医療研究センター）、脇田隆字先生（国立感染症研究所）にも深く感謝致します。

また奨学金および特別研究員給付金といった形で筆者を財政的に支援してくださった本庄国際奨学財団（2010~2011）、日本科学振興財団(2012~2013)の方々に深く御礼申し上げます。

さらに、研究室の同僚として共に研究生活を過ごさせていただきました久島透嘉さん、筒井智恵子さん、清木麻季子さん、津川陽司さん、赤堀祐一さん、堀田祐麻さん、松田裕子さん、大庭沙蘭さん、外山栄里さん、ヒトがんウイルス研究分野朝長グループの皆様にも心から感謝致します。

最後になりましたが、筆者を陰ながら支えてくださいました、両親、家族、友人、先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
2. Younossi Z, Kallman J, Kincaid J. The effects of HCV infection and management on health-related quality of life. *Hepatology* 2007;45:806-816.
3. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567.
4. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20:1-16.
5. Chung H, Ueda T, Kudo M. Changing trends in hepatitis C infection over the past 50 years in Japan. *Intervirology* 2010;53:39-43.
6. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
7. Gao M, Nettles RE, Belema M, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010;465:96-100.
8. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012;55:742-748.
9. Lin C, Kwong AD, Perni RB. Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease. *Infect Disord Drug Targets* 2006;6:3-16.
10. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;138:447-462.
11. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-4675.
12. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993;67:2832-2843.
13. Hussy P, Langen H, Mous J, et al. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 1996;224:93-104.
14. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, et al. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994;68:5045-5055.

15. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-1067.
16. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 7):1527-1531.
17. Benali-Furet NL, Chami M, Houel L, et al. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 2005;24:4921-4933.
18. Boson B, Granio O, Bartenschlager R, et al. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002144.
19. Failla C, Tomei L, De Francesco R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 1994;68:3753-3760.
20. Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol* 2006;80:6072-6083.
21. Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984.
22. Gong G, Waris G, Tanveer R, et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9599-9604.
23. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089-1097.
24. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996;15:12-22.
25. Brown EA, Zhang H, Ping LH, et al. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5041-5045.
26. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, et al. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996;70:3307-3312.

27. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577-1581.
28. Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113.
29. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.
30. Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7271-7276.
31. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
32. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3805-3809.
33. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-626.
34. Farci P, Shimoda A, Wong D, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15394-15399.
35. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 2005;41:847-856.
36. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004;165:901-912.
37. Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005;42:1046-1054.
38. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, et al. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 2007;46:26-36.
39. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, et al. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology* 2009;50:689-696.

40. Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, et al. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 2006;351:381-392.
41. Sainz B, Jr., TenCate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology* 2009;6:103.
42. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379:330-334.
43. Chockalingam K, Simeon RL, Rice CM, et al. A cell protection screen reveals potent inhibitors of multiple stages of the hepatitis C virus life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3764-3769.
44. Gastaminza P, Whitten-Bauer C, Chisari FV. Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:291-296.
45. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, et al. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1187-1205.
46. Little P, Skouteris GG, Ord MG, et al. Serum from partially hepatectomized rats induces primary hepatocytes to enter S phase: a role for prostaglandins? *J Cell Sci* 1988;91 (Pt 4):549-553.
47. Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 2005;79:9725-9734.
48. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, et al. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 2003;278:50301-50308.
49. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, et al. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1999;116:636-642.
50. Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006;80:11074-11081.
51. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.

52. Kimura T, Imamura M, Hiraga N, et al. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 2008;89:2108-2113.
53. Xie Y, Kang X, Ackerman WE, et al. Differentiation-dependent regulation of the cyclooxygenase cascade during adipogenesis suggests a complex role for prostaglandins. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:83-93.
54. Gentilini P, Laffi G, Meacci E, et al. Effects of OKY 046, a thromboxane-synthase inhibitor, on renal function in nonazotemic cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1988;94:1470-1477.
55. Flavahan NA. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:106-110.
56. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, et al. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011;19:95-103.
57. Herker E, Harris C, Hernandez C, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 2010;16:1295-1298.
58. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, et al. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008;82:5715-5724.
59. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, et al. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology* 2010;407:152-159.
60. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:23-38.
61. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* 2008;60:3-11.
62. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-812.
63. Gupta RA, Tan J, Krause WF, et al. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13275-13280.