

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

1) Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporin A among strains: K. Watashi, N. Ishii, K. Goto, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, K. Shimotohno

The regulation mechanisms of hepatitis C virus (HCV) genome replication in the cells have widely been unclear. Until now, we have shown that an immunosuppressant, cyclosporin A (CsA) suppresses HCV genome replication in cell culture system. And we also analyzed the anti-HCV mechanism of CsA. Cyclophilin (CyP) B, one of the targets of CsA, served as a cellular cofactor for replication of a genotype 1b HCV strain: CyPB bound HCV NS5B to stimulate its RNA binding capacity. In this study, we further characterized the association of CyPB with HCV replication. We observed that the presence of viral structural proteins did not influence the anti-HCV activity of CsA. Among HCV strains, the replication of genotype 1b replicons was strongly suppressed by treatment with CsA. In contrast, JFH1 replication was less sensitive to CsA and its analog, NIM811. Replication of JFH1 did not require CyPB. CyPB stimulated the RNA binding activity of NS5B in the genotype 1b replicon. But in the case of JFH1, CyPB did not augment NS5B-RNA binding. So far, no reports have described the different cellular-dependency for HCV replication among strains. The findings in this study provide an insight into the mechanisms of diversity governing virus-cell interactions and in sensitivity of these strains to anti-viral agent.

2) Evaluation of the anti-HCV effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporine A and NIM811: K. Goto, K. Watashi, T. Murata, T. Hishiki, M. Hijikata, K. Shimotohno

We have recently discovered that an immunosuppressant cyclosporin A (CsA) and its analogue lacking immunosuppressive function, NIM811, strongly suppress the replication of HCV in cell culture. The maximum effect of each cyclosporin was comparable to that of IFN α . We revealed that the inhibition of a cellular replication cofactor, cyclophilin (CyP) B, is critical for its anti-HCV effects. Here, we explored the potential use of CyP inhibitors for HCV treatment by analyzing the HCV replicon system for the development of new anti-HCV strategies. Treatment with CsA and NIM811 for 7 days reduced HCV RNA levels by 2-3 logs, and treatment for 3 weeks reduced HCV RNA to undetectable levels. NIM811 exerted higher anti-HCV activity than CsA at lower concentrations. Both CyP inhibitors rapidly reduced HCV RNA levels even further in combination with IFN α carrying little increased cytotoxicity. This combination treatment showed synergistic anti-HCV effects at dose levels providing higher antiviral effects than ED₉₉, showing much stronger anti-HCV effects than those of ribavirin in combination with IFN α . No modification

on the IFN α signal transduction pathway was observed by the addition of CsA. In conclusion, CyP inhibitors may provide a novel strategy for anti-HCV treatment.

3) Establishment of efficient serum-derived hepatitis C virus infectivity in innate immune response-suppressed human primary hepatocytes: H.H. Ali, K. Watashi, M. Hijikata, H. Kaneko, Y. Takada, H. Egawa, Uemoto, K. Shimotohno

Infection with Hepatitis C virus (HCV) is a serious problem worldwide as the number of infected individuals is estimated to exceed 170 million. HCV infection develops chronic hepatitis, cirrhosis, and, ultimately, hepatocellular carcinoma. Therapeutic options are still limited and under progress. Hence the developing of an efficient in-vitro infection system for HCV is important in order to develop new anti-HCV strategy. The JFH-1 strain derived from fulminant HCV-2a and its chimeras were shown to produce infectious virions that infected and propagated efficiently to Huh7.5.1 and Huh7.5 cells. There is no hepatocyte cell line other than Huh7 able to replicate HCV efficiently. In a trial to establish a mature hepatocyte cell line that is phenotypically and functionally close to the original primary hepatocytes, we established human hepatocyte cell lines transduced with human telomerase reverse transcriptase together with human papilloma virus 18/ E6E7 (HPV18/E6E7) genes or simian virus large T gene (SV40 T). Our results showed that even after prolonged culture HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes stably expressed hepatocytes markers and functions and were more prone to HCV infection than those immortalized with SV40 T. The susceptibility of HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes to HCV infectivity was further improved in these cells, in particular, by impairing the innate immune response and by the utilization of 3-dimensional culture system. HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes are useful for the analysis of HCV infection, anti-HCV innate immune response, and screening of antiviral agents with a variety of HCV strains.

4) Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of c-Jun mediated by HTLV-1 HBZ: O. ISONO, T. OSHIMA, J. Matsumoto, and K. SHIMOTOHNO

Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) encodes an antisense viral gene product termed HTLV-1 basic leucine-zipper factor (HBZ). We have previously reported that HBZ suppresses AP-1 activity by two distinct mechanisms. HBZ not only impairs DNA-binding activity of c-Jun, a member of AP-1 family, but also promotes its proteasomal degradation. We further investigated the mechanism by which HBZ destabilizes c-Jun. Most of the proteasomal substrates are targeted for degradation by the conjugation of polyubiquitin chains. However, the ubiquitination level of c-Jun was remarkably decreased in the presence of HBZ. Interestingly, ubiquitination was not required in HBZ-mediated proteasomal degradation of c-Jun. Deletion and point mutation

analysis of HBZ revealed that the N-terminal region of HBZ (especially some hydrophobic residues) is essential for the destabilization of c-Jun. Furthermore, we revealed that the N-terminal region of HBZ directly interacts with 26S proteasome via multiple proteasomal subunits. These results suggest that HBZ acts as a bridging factor between c-Jun and proteasome, and facilitates degradation of c-Jun in ubiquitin-independent manner.

5) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues: Y. MURAKAMI, T. YASUDA, K. SAIGO, T. URASAHIMA, H. TOYODA, T. OKANOUE, and K. SHIMOTOHNO

MicroRNAs (miRNAs) are a non-coding family of genes involved in post-transcriptional gene regulation. These transcripts are associated with cell proliferation, cell differentiation, cell death and carcinogenesis. We analysed the miRNA expression profiles in 25 pairs of hepatocellular carcinoma (HCC) and adjacent non-tumorous tissue (NT) and nine additional chronic hepatitis (CH) specimens using a human miRNA microarray. Targets and references samples were co-hybridized to a microarray containing whole human mature and precursor miRNA sequences. Whereas three miRNAs exhibited higher expression in the HCC samples than that in the NT samples, five miRNAs demonstrated lower expression in the HCC samples than in the NT samples ($P < 0.0001$). Classification of samples as HCC or NT by using support vector machine algorithms based on these data provided an overall prediction accuracy of 97.8% (45/46). In addition, the expression levels of four miRNAs were inversely correlated with the degree of HCC differentiation ($P < 0.01$). A comparison of CH and liver cirrhosis samples revealed significantly different pattern of miRNA expression ($P < 0.01$). There were no differences, however, between hepatitis B-positive and hepatitis C-positive samples. This information may help clarify the molecular mechanisms involved in the progression of liver disease, potentially serving as a diagnostic tool of HCC.

LIST OF PUBLICATIONS

Division of Viral oncology

Laboratory of Human Tumor Viruses

Goto K., Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., and Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(3): 879-884 (2006).

Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(3): 988-994 (2006).

Ishii N., Watashi K., Hishiki T., Goto K., Inoue D., Hijikata M., Wakita T., Kato N., and Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.* 80(9): 4510-4520 (2006).

Shimakami T., Honda M., Kusakawa T., Murata T., Shimotohno K., Kaneko S., and Murakami S. The effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J. Virol.* 80(7): 3332-3340 (2006).

Murakami Y., Yasuda T., Saigo K., Urashima T., Toyoda H., Okanoue T., and Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25: 2537-2545 (2006).

Naka K., Abe K., Takemoto K., Dansako H., Ikeda M., Shimotohno K., Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J. Hepatol.* 44(5): 869-878 (2006).

Tsumura A., Hayakawa T., Kumaki Y., Takebayashi S., Sakaue M., Matsuoka C., Shimotohno K., Ishikawa F., Li E., Ueda H.R. Nakayama J., and Okano M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to cells* 11(7): 805-814 (2006).

Murata T., and Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *J. Biol. Chem.* 281(30) : 20788-20800 (2006)

Hamazaki H., Takahashi H., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Inhibition of HCV replication in HCV replicon by shRNA. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 25(7): 801-805 (2006).

Komohara Y., Yano H., Shichijo S., Shimotohno K., Itoh K., Yamada A. High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J. Mol. Histol.* 37(8-9): 327-332 (2006).

土方 誠 : HCVによる肝癌発症機序 ウイルス 56巻 231-240 2006

渡士幸一 : シクロスポリンの抗HCV効果 免疫の進化-シクロスポリン20年の軌跡 (医薬ジャーナル社) 221-227 2006

渡士幸一・下遠野邦忠・中牟田誠：肝疾患におけるシクロスポリンの有用性 肝臓病の最新治療 336-350 2006

渡士幸一：シクロフィリン阻害剤の新たな可能性：シクロスポリンによるC型肝炎ウイルスの排除 Visual Dermatology 5(10): 1020-1022 2006

渡士幸一：シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルスの排除 実験医学 24(19): 2953-2957 2006

Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Goto K., Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus effect of cyclosporin A reveals the functional regulation of RNA polymerase by cyclophilin B. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 19, 2006.

Isono O., Ohshima T., Matsumoto J., Shimotohno K. HTLV-1 HBZ targets c-Jun for proteasomal degradation via ubiquitin-independent pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006.

Watashi K., Ishii N., Goto K., Hijikata M., Wakita T., Kato N., Shimotohno K. Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporin A among strains. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Molecular Virology and Pathogenesis, Cairns, Australia, Aug. 30, 2006.

Miyanari Y., Usuda N., Atsuzawa K., Watashi K., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Molecular Virology and Pathogenesis), Cairns, Australia, Aug. 29, 2006.

Ali H.H., Watashi K., Hijikata M., Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Shinji U., Shimotohno K. Establishment of efficient serum-derived hepatitis C virus infectivity in innate immune response-suppressed human primary hepatocytes. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Molecular Virology and Pathogenesis), Cairns, Australia, Aug. 28, 2006.

Goto K., Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., Shimotohno K. Evaluation of the anti-HCV effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. 13th

International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses (Molecular Virology and Pathogenesis), Cairns, Australia, Aug. 29, 2006.

Shimotohno K., Regulation of hepatitis C virus replication by cellular mechanisms. The 26th International Symposium of Sapporo Cancer Seminar, Sapporo, Jul. 21-23, 2006

Shimotohno K., Hepatitis C virus: viral and cellular factors involved in regulation of HCV replication. The 13th East Asia joint Symposium on Biomedical Research. Seoul, Korea, Jul. 17-19, 2006

Shimotohno K., Regulation of HCV genome replication by host factors. The 22nd Ernst Klenk Symposium. Kologne, Germany, Nov. 5-7, 2006

Shimotohno K., Hepatitis C virus: Viral and cellular factors involved in host/virus interactions. The 19th International Symposium: Infection, Cancer and Prevention, Tokyo, Feb 23-25, 2006

下遠野 邦忠、C型肝炎：ウイルス発がんおよび予防。日本癌学会シンポジウム、平成18年7月29日

渡士幸一、後藤覚、土方誠、脇田隆宇、加藤宣之、下遠野邦忠：シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製の抑制。第65回日本癌学会学術総会 平成18年9月28日横浜

村上善基、下遠野邦忠：microRNAのターゲットとなる癌関連遺伝子同定の試み 第65回日本癌学会学術総会 平成18年9月30日横浜

渡士幸一、後藤覚、土方誠、下遠野邦忠：抗C型肝炎ウイルス化合物をバイオプローブに用いたウイルス複製機構の解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月21日名古屋

後藤覚、渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：シクロフィリン阻害剤のC型肝炎ウイルス複製阻害とその薬剤耐性ウイルス株樹立 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月21日名古屋

村上善基、下遠野邦忠：肝発癌に関与するmiRNA同定の試み ゲノム創薬フォーラム第16回 談話会 平成18年7月7日東京都

村上善基、下遠野邦忠：肝臓癌におけるマイクロRNAの発現プロファイル解析とその応用
臨床応用を目指した産学連携セミナー6 平成18年10月3日東京都

平成18年度に本研究分野に参加した人は以下の通りである。博士研究員としては村上善基の1名、大学院学生として、医学研究科大学院博士課程4年生のFussein Ali、同2年生の有元啓一郎、後藤 覚、薬学研究科大学院博士課程3年生の金子央賢、同2年生の磯野修、生命科学研究科修士課程2年生の小西秀幸の計6名、教務職員として日紫喜隆行、実験補助員として梅原典子と服部、他に京都大学医学部保健学科学生が参加した。職員3名（下遠野邦忠、土方 誠、渡士幸一）と非常勤職員の湯汲まどかと山本佳奈が秘書として研究室の運営をおこなっている。研究テーマはヒトT細胞白血病ウイルスとC型肝炎ウイルスのウイルス学的な側面からの研究、および感染細胞の増殖変化の分子機構に解析の焦点をあて、分子レベルでの解明を目指している。今年度の研究内容は以下の通りである。

1) HCV複製の細胞性補助因子シクロフィリンBがHCV株間で異なるシクロスポリンA感受性の多様性を決定している。

細胞内におけるC型肝炎ウイルスゲノム複製の制御機構はまだほとんど解明されていない。我々はこれまでに免疫抑制薬剤であるシクロスポリンA(CsA)がHCVゲノム複製を抑制する効果があることを培養細胞系を使って示してきた。また、CsAによる抗HCV機構を解析し、CsAの標的因子のひとつであるシクロフィリンB(CyB)がHCV遺伝子型1bの複製に対して細胞性補助因子として機能すること、つまりCyPBはHCVのNS5Bに結合してそのRNA結合活性を上昇させることを示してきた。我々はさらにHCV複製とCyPBの関連について検討をおこなった。まず、CsAの抗HCV活性はウイルスの構造タンパク質によって影響を受けないことがわかった。またHCVの株間では、遺伝子型1bの複製が強くCsA処理によって抑制を受けるが、JFH1株の複製はCsAやその誘導体であるNIM811に対して感受性が低いことがわかった。JFH1の複製にはCyPBが必要でなかった。CyPBは遺伝子型1bのHCV複製単位の複製においてNS5BのRNA結合を活性化するが、JFH1の場合はCyPBがNS5BとRNAの結合を増加させることはなかった。これまで、株間でHCV複製に対してことなる細胞因子依存性に関する報告はなかった。今回の発見はウイルスと細胞の相互作用を制御している多様性や抗ウイルス薬剤に対するこれらの株の感受性のメカニズムに重要な知見となる。

2) シクロスポリンAとNIM811というシクロフィリン阻害剤の抗HCV効果の評価

最近我々は免疫抑制剤シクロスポリンA(CsA)とその免疫抑制効果を失った誘導体であるNIM811が細胞培養系におけるHCVの複製を強く抑制することを見いだしている。それぞれのシクロスポリンの最大効果はインターフェロンalphaのそれと同等であった。我々はその抗HCV効果には細胞側の複製補助因子であるシクロフィリンB(CyPB)が重要な役割を担っていることを明らかにした。我々はここで新たな抗HCV戦略を開発するため、HCVレプリコン実験系を用いてHCV治療法にCyP阻害薬利用する可能性について検討した。CSA並びにNIM811で7日間処理することでHCV RNAレベルは10の2乗から3乗分の1に低下し、3週

間の処理では検出できないに低下した。低濃度の処理ではNIM811はCsAより高い抗HCV活性を示した。双方のCyP阻害剤もインターフェロンalpha(IFN alpha)との組み合わせにおいてもほとんど細胞障害性を上昇させることなくHCV RNAレベルを速やかに低下させた。この組み合わせ処理はED99よりも高い抗ウイルス効果を示す処理濃度では相乗的な抗HCV効果を示すため、IFN alphaとリバビリンの併用よりも遥かに強い抗HCV効果を示すことがわかった。ここでシクロスポリンA処理をした場合にもIFN alphaのシグナル系には変化が認められなかった。結論として、シクロフィリン阻害剤が抗HCV治療に新しい戦略のひとつとなると考えられた。

3) 血清由来のC型肝炎ウイルスが自然免疫反応を抑制したヒト初代培養肝細胞に効率良く感染する実験系の構築

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染は感染者数が1億7千万人を超えると推定されているように全世界的に深刻な問題となっている。HCVの感染により慢性肝炎や肝硬変、そして最終的に肝がんが引き起こされる。その治療法の選択肢は未だに限られており、開発途上である。そこで新たな抗HCV戦略の開発のために培養細胞を用いた効率の良いHCV感染実験系の開発が重要になっている。最近、劇症肝炎患者由来で遺伝子型2aに属するJFH1株とそれをもちいたキメラウイルスが効率良くHuH7.5やHuH7.5.1細胞に感染し増殖することができる感染性ウイルス粒子を産生することが示されている。しかしながらHuH7細胞以外にHCVが効率よく複製することができる肝細胞株はない。表現形や機能的にもととの初代肝細胞に近い成熟肝細胞株を樹立することを目指し、我々はヒト初代培養肝細胞にヒトパピローマウイルス18HPV18/E6E7)テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を導入して新たにヒト肝細胞株を樹立した。長期間の継代培養の後にもHPV18/E6E7により不死化した肝細胞は安定して肝細胞特異的遺伝子の発現を示し、SV40Tで不死化した細胞よりもよりHCVの感染性が高い傾向が見られた。HPV18/E6E7不死化肝細胞のHCV感染感受性は特に自然免疫反応を抑制したり、3次元培養システムを用いることでさらに改良することができた。HPV18/E6E7不死化肝細胞はHCVの感染の研究や抗HCV自然免疫応答、そして様々なHCV株に対する抗ウイルス薬剤の探索に有用である。

4) HTLV-1HBZタンパク質によるc-Junのプロテアソーム依存性、ユビキチン非依存性の分解

ヒトT細胞白血病ウイルス1へと導かれる。しかしながら、c-Junのユビキチン化レベルはHBZの存在下著しく低下する。興味深いことにユビキチン化はHBZが介在したc-Junのプロテアソームによる分解には必要とされていない。HBZの欠失ならびに点変異体を用いた解析からHBZのアミノ末端領域、特にいくつかの疎水性残基がc-Junの不安定化に必要であることがわかった。さらに、HBZのアミノ末端領域は直接26Sプロテアソームと複数のプロテアソームサブユニットを介して相互作用することがわかった。これらの結果からHBZはc-Junとプロテアソームの間の橋渡し因子として働き、ユビキチン非依存的なc-Junの分解を促進することが示唆された。

5) 肝細胞がんと非がん組織におけるマイクロRNA発現パターンの総合的な解析

マイクロRNA(miRNA)は転写後遺伝子調節に関与する非コード遺伝子ファミリーの一つである。これらの転写産物は細胞増殖、細胞分化、細胞死やがん化と関連している。我々は25組の肝細胞がん(HCC)と近傍の非がん組織(NT)と9つの慢性肝炎(CH)標本についてヒトmiRNAマイクロアレイシステムを用いてそのmiRNA発現プロファイルの解析をおこなった。標的と参照用のサンプルは全ヒト成熟ならびに前駆体miRNA配列を含むマイクロアレイに同時にハイブリダイズさせた。3種のmiRNAはNTサンプルよりもHCCサンプルに高発現を示したが、5つのmiRNAはNTサンプルよりもHCCサンプルで低い発現を示した。これらのデータに基づいてサポートベクターマシナリーアルゴリズムを用いたHCCあるいはNTのようなサンプルの分類は97.8%の全体的な予想精度を示していた。加えて、4種のmiRNAの発現レベルはHCCの分化度と逆相関していた。CHと肝硬変サンプル間の比較により、miRNA発現が非常に異なるパターンを示すことがわかった。しかしながら、B型肝炎ウイルス陽性とC型肝炎ウイルス陽性例の間には相違はなかった。この情報は肝臓病の進行に関する分子機構の解明に有用であり、HCCの検査方法として役立つ可能性がある。