

学 位 論 文 要 旨

氏名 新井 正明

題 目 : Establishment of evaluation systems of antiviral agents for hepatitis C virus and analysis of cyclophilin inhibitors as anti-HCV drugs

(抗 C 型肝炎ウイルス剤評価系の構築とそれを用いた抗 HCV 薬としてのシクロフィリン阻害剤の阻害メカニズム解析)

論文要旨 :

For the development of anti-viral drugs against hepatitis C virus (HCV) infection, the efficient and effective infection systems are required. HCV replicon systems enable in-depth analysis of the life cycle of HCV. However, the previously reported full-genome replicon system is unable to produce authentic virions.

First, I constructed newly designed full-genomic replicon RNA, which is composed of the intact 5' -terminal-half RNA extending to the NS2 region flanked by an extra selection marker gene. Huh-7 cells harboring this full-genomic RNA proliferated well under G418 selection and secreted virion-like particles into the supernatant. These particles, which were round and 50 nm in diameter when analyzed by electron microscopy, had a buoyant density of 1.08 g/mL that shifted to 1.19 g/mL after NP-40 treatment; these figures match the putative densities of intact virions and nucleocapsids without envelope. The particles also showed infectivity in a colony-forming assay. This system may offer another option for investigating the lifecycle of HCV.

Next, multiple genotype 1a clones have been reported, including the very first HCV clone called H77. The replication ability of some of these clones has been confirmed in vitro and in vivo, although this ability is somehow compromised. I now report a newly isolated genotype GT1a clone, designated HCV-RMT, which has the ability to replicate efficiently in patients, chimeric mice with humanized liver, and cultured cells. An authentic subgenomic replicon cell line was established from the HCV-RMT sequence with spontaneous introduction of three adaptive mutations, which were later confirmed to be responsible for efficient replication in HuH-7 cells as both subgenomic replicon RNA and viral genome RNA. Following transfection, the HCV-RMT RNA genome with three adaptive mutations was maintained for more than 2 months in HuH-7 cells. One clone selected from the transfected cells had a high copy number, and its supernatant could infect naïve HuH-7 cells. Direct injection of wild-type HCV-RMT RNA into the liver of chimeric mice with humanized liver resulted in vigorous replication, similar to inoculation with the parental

patient's serum. A study of virus replication using HCV-RMT derivatives with various combinations of adaptive mutations revealed a clear inversely proportional relationship between in vitro and in vivo replication abilities. Thus, I suggest that HCV-RMT and its derivatives are important tools for HCV genotype GT1a research and for determining the mechanism of HCV replication in vitro and in vivo.

Cyclosporine A (CsA) is an immunosuppressive drug that targets cyclophilins, cellular cofactors that regulate the immune system. Replication of HCV is suppressed by CsA, but the molecular basis of this suppression is still not fully understood. To investigate this suppression, I cultured HCV replicon cells (Con1, HCV genotype GT1b, FLR-N cell) in the presence of CsA and obtained nine CsA-resistant FLR-N cell lines. I determined full-length HCV sequences for all nine clones, and chose two (clones #6 and #7) of the nine clones that have high replication activity in the presence of CsA for further analysis. Both clones showed two consensus mutations, one in NS3 (T1280V) and the other in NS5A (D2292E). Characterization of various mutants indicated that the D2292E mutation conferred resistance to high concentrations of CsA (up to 2 μ M). In addition, the missense mutation T1280V contributed to the recovery of colony formation activity. The effects of these mutations are also evident in two established HCV replicon cell lines—HCV-RMT (genotype GT1a) and JFH-1 (genotype GT2a). Moreover, three other missense mutations in NS5A—D2303H, S2362G, and E2414K—enhanced the resistance to CsA conferred by D2292E; these double or all quadruple mutants could resist approximately 8- to 25-fold higher concentrations of CsA than could wild-type Con1. These four mutations, either as single or combinations, also made Con1 strain resistant to two other cyclophilin cyp inhibitors, N-methyl-4-isoleucine-cyclosporin (NIM811) or Debio-025. Interestingly, the changes in IC50 values that resulted from each of these mutations were the lowest in the Debio-025-treated cells, indicating its highest resistant activity against the adaptive mutation.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	新井 正明
審 査 委 員	主 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：山口大学 教授 前田 健
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：鹿児島大学 准教授 小澤 真
	副 査：鹿児島大学 特任准教授 松鶴 彩
題 目	Establishment of evaluation systems of antiviral agents for hepatitis C virus and analysis of cyclophilin inhibitors as anti-HCV drugs 抗 C 型肝炎ウイルス剤評価系の構築とそれを用いた抗 HCV 薬としてのシクロフィリン阻害剤の阻害メカニズム解析
審査結果の要旨： C 型肝炎ウイルス (HCV) の抗ウイルス薬を開発するためには効率的で有効な感染系が必要であった。HCV レプリコン細胞ではウイルスの生活環の一部を研究することができるが、以前の報告では全長のレプリコン細胞でウイルス粒子を産生させる事ができなかった。 そこで、申請者はまず HCV の全長遺伝子を発現するウイルス複製系を構築した。これまでに、HCV の全長を発現するクローンが作成されてきたが、ウイルス粒子の産生をさせる事ができなかった。申請者が中心となって構築した HCV 全長クローンの発現系では、直径が 50nm のウイルス粒子を産生する事が明らかとなった。また、この粒子は NP-40 で処理すると密度が 1.08 g/mL から 1.19 g/mL に移動する事も明らかとなった。また、コロニー形成活性試験で解析したところ、このウイルス粒子が感染性を持つ事も明らかとなった。以上の事から、申請者が作成した HCV 全長遺伝子を持つクローンは、HCV 感染のライフサイクル全体を解析するにふさわしい実験系の 1 つである事が明らかとなった。 申請者は HCV の遺伝子型 1a のクローンである HCV-RMT 株の感染性クローンの樹立を中心となって行った。これまでに、1a のクローンはあまり良いものが報告されていなかったが、申請者は、患者や人肝臓キメラマウス、培養細胞で良く増殖できる RMT クローンを樹立した。また、HCV-RMT の遺伝子配列の中で、レプリコン細胞になったときに発生する 3 つの適応変異があり、HuH-7 細胞や感染細胞の中でも確認できた。この 3 つの適応変異を持ったクローンは HuH-7 細胞の中で 2 ヶ月以上持続感染していた。また、これらの中で複製効率の高いものの上清を新規の	

(別紙様式第 10 号)

細胞にかけたところ、感染が成立した。同時に、人肝臓キメラマウスにこれを感染させても、元の患者血清と同様の高い複製活性を示した。また、ウイルスの適応変異を解析したところ、試験管内で高い複製活性を示すものは、生体内で低いという逆相関がある事も明らかとなった。以上の様に申請者は、HCV1a の試験管内や生体内での複製の研究に重要な HCV-RMT 株を中心となって確立した。

申請者は免疫抑制剤であるサイクロスポリン A(CsA)の HCV に対する抗ウイルス効果の検討を中心になって行った。HCV の非構造蛋白質遺伝子領域を持って複製する事ができるレプリコン細胞に CsA を処理すると HCV の複製は抑制されてレプリコン細胞の多くは死滅するが、この中に遺伝子変異を起こして CsA に耐性となった変異株が出現する。ウイルス遺伝子のどの領域に変異をおこして CsA 耐性を獲得したかを解析したところ、NS3(T1280V)や NS5A(D2292E)の遺伝子領域に変異を見いだした。特に D2292E の変異を持つ HCV は CsA を 2 μ M まで処理しても耐性を示す事が明らかとなった。また、T1280V の変異はコロニー形成能を復帰させるのに貢献した。以上の結果は HCV 遺伝子型 1b のグループで観察されたが、1a や 2a の HCV 遺伝子型のグループでも観察された。また、NS5A の中に生じた 3 つの変異、D2303H, S2362G, E2414K は、D2292E の変異を持つ HCV の CsA 耐性を 8-25 倍高めた。D2292E と 3 つの変異は、他のサイクロフィリン阻害剤である NIM811, Debio-025 への HCV の耐性も高めた。興味深い事に、Debio-025 は耐性変異株の出現に対し、最も耐性であった。申請者は、以上の解析の中で、特に耐性変異株のクローニングや解析を中心になって行った。

以上の様に本論文は、HCV の粒子産生を可能にするモデルを構築し、適応変異などウイルスの複製活性に重要な配列や免疫抑制剤の抗ウイルス活性やその抵抗性獲得機序など極めて重要な新規の知見を提供した。よって、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断された。