

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

# 目 次

文献No

課題番号

20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	……	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	……	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	……	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	……	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	……	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	……	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	……	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	……	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	……	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	……	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	……	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	……	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	……	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	……	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	……	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	……	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	……	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	……	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	……	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	……	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	……	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	……	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	……	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	……	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	……	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	……	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

## C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン (IFN) の治療効果を増強する新薬の開発研究

所 属 国立感染症研究所 ウイルス製剤部  
研究者 小長谷 昌功

### 分担研究者

松浦 善治 国立感染症研究所  
小林 祐次 大阪大学大学院薬学研究科  
清水 良 (株)田辺製薬 創薬研究所

### 要旨

IFNの作用を抑制するHCV蛋白はNS5A蛋白である事が明らかにする研究を行った。しかしISDR領域だけでは説明できない。それに関連してIFN誘導性PKRとNS5Aとの相互作用について検討した。さらに使用可能細胞を拡大する目的でNS5A蛋白を一過性および継続発現可能ベクターにNS5A(J1, wild)を組み込んだ。

### 1.研究目的

日本では毎年2万人以上が肝臓関連の疾患で亡くなっている。そのほとんどがHCV感染によると思われる。その対策が早急に必要であるとともに、感染者の癌発症のリスクを下げる方法の開発が必須である。現在、その治療に使われているIFNはC型肝炎患者の30%程度を治癒させるものであるが、残りの70%には全く効果がない。本研究では、宿主細胞のウイルス防御機構を抑制するウイルス側の機能を細胞レベル、分子レベルの両方から解明し新薬開発のてがかりを見い出すことを目的とする。さらに、IFN誘導性PKRとIFN作用抑制性HCV蛋白質との分子間相互作用を解明しIFN作用を増強する低分子化合物を検索する手法を確立するとともに、in vivo系で有効性を確認することによりin vitro assay系との整合性を検証する。また、NMR法またはX線回折法によって得られる構造情報及び細胞内でのHCV増殖機構の研究成果をもとに、より効果的なドラッグのデザインを行うことで、有効性、安全性の高い創薬の開発に寄与する基礎基盤を構築する。

### 2.研究方法

HCVの全蛋白発現細胞、Core, E1, E2, NS2, NS3蛋白発現細胞、NS3, NS4, NS5発現細胞、及び、NS5A単独発現細胞等を発現ベクター-pCAGGSの系を用いて500µgのG418存在下で樹立しIFNの感受性を比較した。HepG2細胞に加えてFL細胞でもNS5A (J-1)の発現細胞した。同時にそのISDR領域だけの4個のアミノ酸を置き換えたENOMOTO等(1996)がIFN抵抗性型と報告しているNS5A-wildを発現したFL細胞も樹立してIFN感受性を比較した。wild typはPCR変異法で4アミノ酸に変異を入れて作成しNS5A発現FL細胞はベクターコントロール(vc), J-1, wildについてそれぞれ、3クローンずつ分離樹立した。HCV(NIHJ1)の塩基配列は、DDBJ, EMBL, Gen Bankの塩基配列データベースに登録番号D89815で登録されている。この遺伝子NIHJ1をテンプレートにPCR遺伝子変異導入法を用いて、5末端に開始コドン、3末端に終始コドンを

持つ完全長のNS5AフラグメントNS5A(J1)を作製し、発現ベクタpEF321neoのSwaサイトにクローニングし、pEFneoNS5AJ1とした。次にこのフラグメントNS5AJ1をテンプレートにPCR遺伝子変異導入法を用いて、ISDRの4塩基を入れ替え、IFN非感受性の塩基配列を持つNS5AフラグメントNS5A(wild)を作製し、同様にしてpEFneoNS5Awildを作製した。pEF321neoはKim dong Wan (Chang Won National University, Korea)より供与された。これら発現ベクタ-で構築したNS5A (J-1) およびNS5A (wild) 遺伝子のみを導入した細胞を樹立した。以下がそれぞれのISDR領域のアミノ酸配列である。

PSLKATCTTHHSDPADLIEANLLWRQEMGGNITRVESEN(wild)

LSLKATCTTHHGAPDIDLIEANLLWRQEMGGNITRVESEN(J-1)

さらに今年度はpcDNA3.1/ His CおよびpcDNA3.1/ Myc- His A (Invitrogen) の同部位にNS5ADNAを挿入した。本プラスミドをそれぞれEcoRIおよびBamHIで同時消化し、アガロース電気泳動にて分画後、ベクター側DNA断片を回収した。これらNS5AJ1の5'側および3'側配列を含むベクターにpEFneoNS5AJ1およびpEFneoNS5Awild由来のEcoRI- BamHI断片(778bp)を挿入して計4種のプラスミド、pcDNAFlag-NS5A, pcDNAFlag-NS5Awild, pcDNANS5AJ1-MycHisならびにpcDNANS5Awild-MycHisを構築した。これらプラスミドはCONCERT (LIFE TECHNOLOGIES) を用いて大量精製を行った。

#### IFN感受性の比較

HCV蛋白発現HepG2細胞は250mlのプラスチックビンで同一条件で継代し、ダルベッコ変法培地(DMEM), 5%牛胎児血清(FCS)で培養した。48穴のプレート毎に比較する細胞 $3 \times 10^5$  cells/0.5ml/wellをまき、翌日IFNを直接添加(50 $\mu$ l/well)し一晩し、培地を除去してEMCV,3000-10000PFU/100 $\mu$ l/well接種し37C 60分incubation後、0.5ml/wellの培地を加えて24-30hr後に培養液をウイルス定量のために-80Cに保存した。FL細胞はEagle's Minimum Essential Medium(MEM), 5%(FCS)で培養した。一枚の48穴のプレートに3種の細胞(10000cells/0.5ml/well)をまき、一日培養後0.1%牛血清アルブミンを含むMEMでのIFNを一晩処理し、同じ培地でEMCVを接種し24-30時間培養後にCPE阻止法、及びブラック法でウイルス産生量を比較した。

#### HCV蛋白の大量発現及び機能解析

HCVのNS5A領域の遺伝子産物はIFN induced double stranded RNA dependent protein kinasePKRと結合し、細胞のウイルス防御機構を抑制するとの説が有力である。このことから阪大薬は、これらの蛋白質の解析を可能とする効率の良い蛋白質生産系を確立し、超遠心沈降平衡法やバイオセンサー法等の物理化学的測定法によって蛋白質の分子間相互作用の解析を行うことを計画し、大腸菌を用いてPKRとNS5A遺伝子産物を大量に生産させる系を用いた。分子間の結合実験にはピアコアを用いた。一方、田辺製薬ではpcDNA3.1/ His CおよびpcDNA3.1/ Myc- His A (Invitrogen) の同部位にNS5ADNAを挿入した。本プラスミドをそれぞれEcoRIおよびBamHIで同時消化し、アガロース電気泳動にて分画後、ベクター側DNA断片を回収した。これらNS5AJ1の5'側および3'側配列を含むベクターにpEFneoNS5AJ1およびpEFneoNS5Awild由来のEcoRI- BamHI断片(778bp)を挿入して計4種のプラスミド、pcDNAFlag- NS5AJ1, pcDNAFlag- NS5Awild, pcDNANS5AJ1- MycHisならびにpcDNANS5Awild- MycHisを構築した。これらプラスミドはCONCERT (LIFE TECHNOLOGIES) を用いて大量精製を行った。

### 3.研究成果

#### HCV全蛋白及び異なったHCV蛋白発現HepG2細胞のIFN感受性:

HepG2 352細胞はHCVの5'末端から3'末端までの全翻訳領域がふくまれる発現ベクタ-により樹立した細胞である。VC細胞と352細胞を一枚の48穴プレートの3列ずつ、 $3 \times 10^5$  cells/0.5ml/wellまいて37C 24hr培養した。それぞれのプレートにIFN- $\alpha$ Ly、- $\beta$ 、- $\gamma$ を50 $\mu$ l/well直接、添加し、一晩培養した。培地を吸引除去して100 $\mu$ l/well(5000 PFU/100 $\mu$ l)のEMCVを接種し、37C 1時間吸着後、0.5ml/wellの新鮮培地を加え30時間目のウイルス産生量を比較した。352細胞ではIFN- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ による抗ウイルス作用は顕著に抑制

されている。即ち352細胞においてVC細胞と同じレベルのウイルス増殖の抑制を得るには3-10倍高い力価のIFNが必要である。HCV治療にはIFN- $\alpha$ 、 $-\beta$ を用いているがIFN- $\gamma$ による抗ウイルス活性も抑制されている。同様に異なったウイルス蛋白発現HePG2細胞について抗ウイルス作用を調べた。352細胞はCore, E1, E2, NS2, NS3蛋白を発現している。3294細胞はNS3, NS3, NS5の全長蛋白を発現している。これらの細胞についてEMCVに対するIFN- $\alpha$  Lyによる抗ウイルス作用をしらべた。本実験ではウイルス接種 24時間後にウイルス産生量を比較した。352細胞はVC細胞と同程度のIFN感受性を示した。一方、3294細胞ではVC細胞より著しくIFN感受性が低下している。これらの結果からIFN感受性の抑制機構にはcore, E1, E2, NS2, NS3蛋白は関与していないと読みとれる。

#### NS5A 蛋白発現細胞におけるIFN感受性

上記の結果からNS4 または NS5 蛋白のIFN感受性抑制機構への関与が推察された。そこでNS5A(J-1)を発現するHepG2細胞を樹立してEMCVに対するIFNの作用をしらべた。NS5A(J-1)発現細胞ではIFN感受性が顕著に低下した。上記NS5A発現HePG2細胞の結果にもとずき、NS5A発現FL細胞を樹立した。FL細胞の場合も攻撃ウイルスとしてはEMCVを用いた。IFNによる抗ウイルス作用はJ-1、wild細胞ともVCに比べ著しく抑制された。J-1, wild細胞はほぼ同程度にIFN- $\beta$ 、 $\gamma$ の抗ウイルス作用がVC細胞より低下している。

#### ISDR欠損NS5A 蛋白発現細胞におけるIFN感受性

Hep3269細胞はNS3, NS4, ISDR欠損NS5A蛋白の発現細胞である。この細胞についてEMCVを用いてIFN感受性を調べたところ顕著に抗ウイルス状態が低かった。この結果はNS5AのISDRが必ずしもIFN感受性低下の中心部分でない事を示唆している。現在ISDR欠損NS5A発現のためのベクターを構築中である。

#### NS5AとPKRの結合実験

阪大(薬学)ではPKR遺伝子の分離はHeLa細胞よりmRNAを抽出し、このmRNAを鋳型としてoligo-d(T)プライマーと逆転写酵素によってfirst-strand cDNAを生成させ、さらにこれを鋳型としてデータベースに登録されているPKRの配列をもとに設計したプライマー (atgaccatattggctggatcttcag, atgaaggatcctaactatgtgtgcgttc) によってPCRを行いPKR遺伝子を増幅することによって大腸菌での大量発現を達成した。精製した蛋白については超遠心沈降平衡法、バイオセンサー法を用いた物理化学的測定を行い、これらの複合体形成能に関する解析を実施した。またNS5A蛋白も同様に大量発現精製しPKRとの結合能について検討した。しかし、大腸菌発現PKRとの結合は不成功であった。そこでIFN処理細胞から部分精製したPKRとの結合能について比較検討したところ、NS5A(J1), (wild)ともにNS5Aと抗体なみの強い結合力を示した。またwildの方がJ1より2.3倍程高い結合定数を示した。

#### 4. 考察

NS5aJ-1はIFN治療効果が認められた患者から分離したHCV genome 由来である。一方、NS5a wildはEnomoto等(1996)の分類では最も代表的なIFN抵抗性ISDRを含む。これらのISDR領域を持つHCVのIFN感受性を調べる増殖実験系がないので不可能である。但し、ウイルスの選択が重要であった。VSVをchallenge virusとして調べたが何ら差が認められなかった。FL細胞とSindbis virusは日本におけるIFN製剤の力価試験の標準的methodであるが、Sindbis virusもVSVと同様に我々の実験目的には使えない。そこで、HCVの代わりになり得るvirusとしてEMCVが使用可能であることが明らかになった。EMCVが属するピコルナウイルスはHCVと同様にpositive stranded RNA virusであり、リボソームとの相互作用では5' UTR末端からでなく、途中から認識されるinternal initiationであることが報告されている。さらにNS5a蛋白がPKRに結合してその活性化の過程を抑制してPKRのinitiation factor-2 (eIF-2)の機能抑制作用を阻害する事によってIFNの抗ウイルス作用を抑制すると推察されている。当初、PKRとNS5AのISDR領域がPKRと結合する事によってIFN感受性を低下させると理解していたが、今年度の実験でISDR欠損NS5A, NS4, NS3発現細胞

でもIFN感受性の低下がみられた。この事実の一つのセントラルドグマを覆すことになるので現在ISDR欠損NS5A発現ベクターの構築中である。

## 5. 結論

感染研、小長谷等の研究ではHCV(タイプ 1b,J-1)の全ての蛋白が発現している細胞ではIFN  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ によるEncephalomyocarditis virus (EMCV)に対する抗ウイルス作用がvector control細胞より顕著に抑制された。Core,E1,E2 and NS2蛋白発現細胞ではIFN感受性の抑制はなかった。NS3,NS4,NS5 発現細胞及びNS5A単独発現細胞ではIFN感受性が抑制された。EMCV以外のVSVおよびSindbis ウイルスではIFN感受性の抑制はみられなかった。最近NS3,NS4,ISDR欠損NS5A蛋白の発現細胞についてEMCVを用いてIFN感受性を調べたところ顕著に抗ウイルス状態が低かった。この結果はNS5AのISDRが必ずしもIFN感受性低下の中心部分でない事を示唆している。現在ISDR欠損NS5A発現のためのベクターを構築中である。

一方ではNS5A蛋白とPKRとの結合能について検討した。大腸菌発現PKRとの結合は不成功であったが、IFN処理細胞から部分精製したPKRとの結合能について比較検討したところ、NS5A(J1),(wild)ともにNS5Aと抗体なみの強い結合力を示した。またwildの方がJ1より2.3倍程高い結合定数を示した。これらの結果とIFN感受性の関連については未だ不明瞭である。

## 6. 研究発表

- 1、AIZAKI, H.,SAITO,S.,OGINO,T., MIYAJIMA, N., HARADA, T., MATSUURA, M., MIYAMURA, T., and KOHASE, M.: Suppression of Interferon Induced Antiviral Activity in Cells Expressing Hepatitis C Virus Proteins. J. Interferon Resr.,20,1111-1120. 2000.
- 2、KATO, A., OHNISHI, Y., HOHASE, M., SAITO, S., TASHIRO, M., and NAGAI, Y.: Y2, the smallest of the sendai virus C protein, is fully capable of both counteracting the antiviral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. J. Virol., 75, 1-9, 2001.2.14
- 3、Takahara T., Fukuyama Y., Saito S., Ogino T., Miyajima N., and Kohase M. : IL-1,EGF and HGF suppress antiviral activity of interferon in primary monkey hepatic parenchymal cells. Jap. J.Inf. Diseases.52,45-48 1999.
- 4、Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki T., Ushijima H., Mastuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. Virology (in press).
- 5、Shimoike T., Mimori S., Tani H., Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. J. Virol. 73, 9718-9725 (1999).
- 6、Fujie H., Yotsuyanagi H., Moriya K., Shintani Y., Tsutsumi T., Takayama T., Makuuchi M., Matsuura Y., Miyamura T., Kimura S., Koike K. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. J. Med. Virol. 59, 141-145 (1999).
- 7、Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. Intervirology, 42, 145-152 (1999).
- 8、Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. Hepatology, 30, 1064-1076 (1999).
- 9、Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. Virology, 254, 315-323 (1999).
- 10、Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-a promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). Vaccine 18, 675-680 (1999).

- 10, Hatada, E., Saito, S., Fukuda, R.: Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *Mar*; 73(3): 2425-33. *J Virol*. 1999
- 11, J. Hasegawa, H. Shimahara, M. Mizutani, S. Uchiyama, H. Arai, M. Ishii, Y. Kobayashi, S. J. Ferguson, Y. Sambongi, and Y. Igarashi, Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome c551 by Systematic Amino Acid Substitution Based on the Structure of Thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c552, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(53), 37533-37537



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社