

200/0144

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉倉 廣

平成14(2002)年4月

目次

I. 総括研究報告	
ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究	----- 1
吉倉 廣	
II. 分担研究報告	
1. ヒトパピローマウイルスによる子宮頸がん発症機構の解明と感染予防に関する研究	
神田 忠仁	----- 5
2. ヒトがんウイルス感染発病予防に関する研究	----- 9
清水 洋子	
3. ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたC型肝炎ウイルス複製系の構築	
宮村 達男	----- 11
4. C型肝炎ウイルスの複製と肝発がん	----- 15
加藤 宣之	
5. 肝疾患におよぼす HCV タンパク質の機能解析	----- 19
下遠野 邦忠	
6. 全 HCV 抗原に対する CTL 応答評価システムの開発と新しい CTL エピトープの同定	
井廻 道夫	----- 23
7. HCV core 蛋白の JAK-STAT シグナル伝達経路に及ぼす影響	
林 紀夫	----- 25
8. 献血者血液の核酸増幅検査実施状況と導入後の輸血副作用発生状況	----- 27
初回献血者におけるウイルスマーカーの陽性頻度	----- 37
内田 茂治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49

厚生科学研究費補助金(がん克服戦略研究事業)

総括研究報告書

ウイルスを標的とした発がん予防に関する研究

主任研究者 吉倉 廣 国立感染症研究所 所長

研究要旨

- 1) HPV DNA 陽性女性の中で、血清中に感染中和抗体を持つ症例では病変が無いか、軽度であり、中和抗体を持たない症例では子宮頸がんへと進展する傾向が見られた。
- 2) 細胞表面に発現した抗 HCV E2 単鎖抗体を介し HCV が感染する Huh7 細胞を開発した。3次元高密度培養装置を用いた HCV 感染肝細胞培養系を作成した。
- 3) HCV 各遺伝子を発現する自己 B 細胞株を標的細胞とし、全抗原に対する末梢血リンパ球の細胞障害性 T 細胞 (CTL) 応答を評価する方法を確立した。
- 4) HCV 感染防御活性を示すヒトラクトフェリンの HCV E2 蛋白質最小結合領域 (アミノ酸 108-120) を決めた。
- 5) 献血者での HBV 感染は 20-30 才に多く HIV 感染者と同様な年齢分布を示す。

分担研究者

神田忠仁 国立感染症研究所遺伝子解析室 室長
宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部部長
井廻道夫 自治医科大学大宮医療センター 教授
内田茂治 東京都赤十字血液センター検査二課長
林紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授
下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所 教授
加藤宣之 岡山大学大学院医学総合研究科 教授
清水洋子 国立国際医療センター研究所
呼吸器疾患研究部 ウイルス性呼吸器疾患室長

A. 研究目的

世界の女性のがんの 11% (45 万人) は HPV 感染が原因とされ、WHO は感染予防ワクチンの開発を呼びかけている。特に、14 種類の遺伝子型が

高リスクとされている。そこで、HPV 感染を予防できる有効なワクチン及び HPV 感染細胞を発がん前に選択的に除去する方法を開発し、子宮頸がん発症の抑制を目的とする。

わが国の肝がん患者の大半は HCV キャリアに由来する。HCV 感染が肝発がんと密接に関わっていることは疫学的にも明らかである。逆転写酵素をもたない HCV のような RNA ウイルスが、持続感染し細胞を究極的にがん化するためには、未知の全く新しいメカニズムが存在すると想定される。このような中で、HCV のゲノム構造や発現産物の解析はかなり進んだがウイルスの増殖機構の解明は遅れており、効率の良い HCV 培養細胞増殖系の確立が必要とされている。そのような系の開発により、ウイルスと細胞との相互作用の理

解が深まり、細胞からのウイルスの効率の良い排除法が開発されると同時に肝発がんを予防できるものと期待される。また、HCV 特異的 T 細胞の抗原エピトープの同定と免疫応答の研究は、C 型肝炎の発生機序を明らかにし、免疫応答を利用した HCV 感染に対する新しい治療法を開発する上で重要である。他方、前癌状態であるヒト慢性肝疾患からの肝発癌の過程を細胞内情報伝達の面より解析し、それに関与する宿主遺伝子発現、蛋白発現の変化を検討することは、HCV のいかなる構成分子が形質転換の責任分子、修飾分子として働いているかを知る上で非常に重要である。

B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、HTLV-I および HIV 感染は発がんと密接な関係にあり、輸血による感染の実状ならびに感染者の疫学調査は行政的にも重要である。

B. 研究方法

HPV16 型 L2 のアミノ酸 108-120 領域に結合する抗 L2 抗体が、主な高リスク型 HPV を中和できるので、この領域に対する抗体を能率良く誘導する免疫方法を検討する。HPV の後期プロモーターの活性化から、ウイルスゲノムの複製に至る機構を解析し、感染細胞から HPV を排除する方法を探る(神田)。

HCV のより効率の良い感染増殖系の開発の為、HCV 感染スケジュールの検討、並びに、抗 HCV エンベロープ E2 抗体を単鎖抗体として発現した肝細胞樹立株 Huh7 や、Fc レセプターを介した HCV の感染を試み(清水、吉倉)、HCV の複製レベルをさらに向上させるため、3次元高密度肝細胞培養系の確立をする(宮村)。

HCV とラクトフェリンとの相互作用の分子機構を解析する。ラクトフェリンの抗 HCV 活性責任領域を同定する為、ラクトフェリン側の結合領域を狭める作業や合成ペプチドによる結合実験を行い、HCV 感染防御活性をヒト肝細胞 PH5CH8 細胞を用いて検討する(加藤)。

HCV タンパク質の複製における作用を重点的に明らかにするため、ウイルスの複製系の開発にシフトする。方法としては、HCV のレプリコンの作成とそれを用いたウイルスタンパク質の機能解析を自己複製可能な HCV ゲノムを構築して明らかにする。この方法には、ゲノム cDNA の作成、トランスフェクションによる感染性ゲノムの単離、変異 HCV ゲノムを用いた遺伝子の機能解析などを含む(下遠野)。

HCV 特異的細胞障害性 T 細胞が認識する抗原エピトープと HLA 拘束性の解析を更に進めると共に、抗原エピトープのアミノ酸の置換により、より抗原性の高いペプチドの開発を行う。HCV 特異的ヘルパー T 細胞の抗原エピトープ、HLA 拘束性の研究を更に進めると共に、抑制性 T 細胞の解析も開始する(井廻)。

肝発癌進展を担う細胞内情報伝達機構と HCV 蛋白の悪性形質転換に及ぼす影響の解析を行う。細胞生存維持に関わる PI-3 kinase-Akt-Bad 系の機能を制御するために、ヒト肝癌細胞に Akt 欠失変異体や dominant negative form を導入し、細胞死回避に及ぼす影響を解析し、肝細胞の増殖を担うシグナル伝達機構である JAK/STAT pathway に対するウイルス蛋白の作用点について検討する(林)。

初回献血者におけるウイルスマーカーの推移につき、引き続き茨城県、栃木県、神奈川県湘南、

福岡県の各赤十字血液センターの協力を得て、初回献血者の年齢別感染症マーカー(HBs 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体、HTLV-I 抗体)の陽性率を調査する(内田)。

C. 研究結果

1. HPVDNA 陽性女性 83 例で、血清中に感染中和抗体を持つ症例では病変が無いが、軽度であり、中和抗体を持たない症例では子宮頸がんへと進展する傾向が見られた。又、ケラチノサイトの分化誘導に関わる転写因子 hSkn-1a が HPV 後期遺伝子の発現を誘導した。
2. Huh7 細胞に抗 HCV E2 単鎖抗体を発現させると、細胞の HCV 感受性が 10 倍以上上昇した。3次元高密度培養装置を用いた肝細胞培養系に HCV 感染性クローン H77c を遺伝子導入すると、培養上清中に抗 E1 抗体と反応するウイルス様粒子が検出された。
3. HCV コア、E1、E2、NS2、NS3、NS4、NS5 を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルス感染自己 B 細胞株を標的細胞とし、全抗原に対する末梢血リンパ球の細胞障害性 T 細胞(CTL)応答を評価する方法を確立した。
4. インターフェロン(IF)は PKR 磷酸化を介し eIF2 の転写活性を阻害し抗 HCV 効果を発揮すると思われるが、NS5A C 端側のセリン磷酸化を介した相互作用により、NS5A は PKR の阻害効果を相殺しているらしい。
5. HCV コア蛋白は、IL-6 刺激下では JAK 活性を阻害し、IFN- γ 刺激下ではサイトカインレセプターの転写を上昇させ、STAT 依存性転写活性に影響を与えている事が分かった。
6. HCV 感染防御活性を示すヒトラクトフェリンの

HCV E2 蛋白質最小結合領域を決めた。ヒトラクトフェリンの 600-632 アミノ酸部分が HCV の E2 蛋白に結合することを見いだした

7. 日赤でプール NAT を導入したことにより、2000 年、2001 年とも HCV、HIV の輸血による感染はゼロである。献血者での HBV 感染は 20-30 才に多く HIV 感染者と同様な年齢分布を示し、本年齢層の性的活動に関係あるものと推定される。

D. 考察

中和抗体の存在と子宮頸がん発症の血清疫学的な関係がはっきりしたので、予防の為に HPV 感染中和抗体誘導ワクチンの有効性を臨床検証を試みる段階となった。

HCV については以下のような事が考察出来る。

1. HCV のインターフェロン感受性を何が決めているかは大きな問題である。NS5A に感受性を決める部位があると云う報告を PKR との相互作用の解析と HCV 自己複製可能なレプリコン細胞の使用により明確にする必要がある。
2. ヒトラクトフェリンと HCV の相互作用する部位が明確になったので、研究を進展させ抗 HCV 人工感染防御ペプチドの開発を行う事が可能となった。
3. 抗 HCV エンベロープ E2 単鎖抗体を細胞表面膜上に発現させた高感受性細胞や 3次元高密度培養装置を更に改良し、ウイルスゲノムの複製、翻訳の研究に有用なものにしなければならない。
4. 全 HCV 抗原に対する細胞障害性 T 細胞応答を評価出来る状況となったので、CTL の病状の進行、治療での役割につき明確に出来る状況となった。

5. 献血者での HBV 感染は 20-30 才に多く、HIV 感染者と同様な年齢分布を示すことが分かり、献血データのフォローが重要であることが分かった。

分担研究報告書参照。

E. 結論

HPVDNA 陽性女性の中で、血清中に感染中和抗体を持つ症例では病変が無いか、軽度であり、中和抗体を持たない症例では子宮頸がんへと進展する傾向が見られた。これにより、予防の為に HPV 感染中和抗体誘導ワクチンの有効性を臨床検証を試みる段階となった。

細胞表面に発現した抗 HCV E2 単鎖抗体を介し HCV が感染する Huh7 細胞を開発し、3次元高密度培養装置を用いた HCV 感染肝細胞培養系を作成した。又、HCV レプリコンの追試にも成功した。

HCV 各遺伝子を発現する自己 B 細胞株を標的細胞とし、全抗原に対する末梢血リンパ球の細胞障害性 T 細胞 (CTL) 応答を評価する方法を確立した。

HCV 感染防御活性を示すヒトラクトフェリンの HCV E2 蛋白質最小結合領域を決めた。

献血者での HBV 感染は 20-30 才に多く HIV 感染者と同様な年齢分布を示す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

分担研究報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルスによる子宮頸がん発症機構の解明と感染予防に関する研究
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

子宮頸がん発症の最大リスクファクターはヒトパピローマウイルス（HPV）の感染である。HPVは表皮基底層の細胞に潜伏持続感染する。宿主の最終分化に伴って増殖し、近傍に感染が拡大したり別の個体への感染を起こす。このような持続感染は数年から十数年にわたり、その間にウイルスゲノムの染色体への組み込み等によって生じた不死化細胞が、やがてがん化すると考えられている。従って、この持続感染の成立及び維持を防ぐことが、子宮頸がん発症の最も有効な予防法である。そこでHPVの感染を防ぐワクチンの開発とHPV持続感染機構の解明をめざしている。これまでHPV抗原をマウスに免疫して得た抗体には、培養細胞へのHPV感染を防ぐ中和活性を示すものがあることを明らかにした。今年度は、抗HPV中和抗体が子宮頸がん及びその前駆病変である子宮頸部上皮内新生物（CIN）発症を予防し得ることを確認するために、HPVDNA抗体陽性女性83例を集め、感染中和抗体の有無と病変の関連を調べた。病変を持たない14例中13例（93%）に中和抗体が検出され、子宮頸がん患者13例には中和抗体が検出されなかった。また中和抗体を持たない患者ほどCIN病変が進行していた。これらの結果は中和抗体を持った個体では、CINの発症や癌化が起こりにくいことを示しており、子宮頸がん発症予防には中和抗体を誘導するワクチンが有効であることを強く示唆している。また、HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120領域が複数の型のHPV感染を予防するワクチン抗原候補であることを示してきたが、アミノ酸70-85領域にも同様な中和エピトープが存在することがわかった。一方、ケラチノサイトの分化誘導に関わる転写因子hSkn-1aがHPV16のE1及びL1遺伝子の発現を誘導することがわかった。これらの成績は、今後のHPV感染予防ワクチンの実用化及び感染病変の治療方法の開発に役立つ。

A. 研究目的

- 1) 抗HPV中和抗体が子宮頸がん及びその前駆病変である子宮頸部上皮内新生物（CIN）発症を予防し得るか知るために、HPV16型感染者の血清を採取し抗HPV16中和抗体の有無と病変の関連を明らかにする。
- 2) HPVの複数の型に共通な中和エピトープがHPV16型L2のアミノ酸108-120領域の他にも存在するか調べる。
- 2) 皮膚基底層細胞に持続感染しているHPVが、宿主細胞の分化に伴って増殖する機構を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) ヒト血清はHPVDNA陽性女性83例から採取した。抗HPV16抗体はL1/L2-キャプシドを抗原とするELISAで測定し、中和活性はHPV16型偽

ウイルスの感染価を1/2に抑制する最大希釈で定量した。

- 2) HPV16型L2蛋白質のアミノ酸70-85、86-103、104-120、121-135、及び136-150領域と同じアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをPBSに溶かし、2週間隔で2回Balb/cマウスに経鼻接種した。12週後に血清を回収し、特異抗体の存在はHPV6、16、18及び58型L1/L2-キャプシドを抗原とするELISAで調べた。中和活性は、ヒト血清中の中和抗体と同様の方法で定量した。

- 3) 培養液へのドキシサイクリンの添加でhSkn-1aの発現を誘導できるHeLa細胞株を作った。HPV16のE1遺伝子ないしL1遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたプラスミド、pE1-Luc及びpL1-Luc、を作り、このHeLa細胞株に導入し、hSkn-1a発現下でのE1及びL1遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性で測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト血清は全て提供者から文書による同意を得て研究に使った。動物実験は全て国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針(昭和62年11月19日)に沿って、審査委員会に実験計画を申請し、許可を得て行っている。

C. 研究結果

- 1) HPV16型DNAが陽性な女性83例のうち、CIN病変を持たない14例中13例(93%)、CIN I群37例中8例(22%)、CIN II/III群19例中3例(16%)にHPV16中和抗体が検出され、子宮頸がん群13例には中和抗体保有者はいなかった。ELISAでの抗体力価は中和抗体の有無と相関しなかった。
- 2) 合成ペプチドを経鼻接種したマウスの血清中に、HPV6、16、18、58型キャプシドと結合するIgGが誘導された。このうちアミノ酸70-85及び104-120領域と同じ配列を持つペプチドに誘導された抗体は高い中和活性を示した。
- 3) HeLa細胞でhSkn-1aの発現が誘導されると、増殖がほぼ停止した扁平な細胞と、良く増殖する細胞の2群に分かれた。また表皮分化の指標であるサイトケラチン10の発現が起こった。この状態で、pE1-Luc及びpL1-Lucからルシフェラーゼが発現した。

D. 考察

- 1) 血清中に抗HPV中和抗体を持つヒトは、子宮頸がんの発症頻度が有意に低いことがわかった。中和抗体は、HPVの最初の感染を阻止できなくても、持続感染部位で増殖したウイルスによる二次感染を抑制したり、持続感染そのものにも抑制的な効果があると予想される。ワクチンの効果に多いに期待を抱かせる。

CINや子宮頸がん患者では、HPVに結合する抗体はあっても感染中和活性を持たない例が多い。また、HPV粒子と結合する抗体の力価と中和活性のレベルとは相関が無く、中和エピトープに結合する抗体の有無がHPV感染者の予後に影響を与えていることを示して。HPV粒子が抗原となった場合、中和エピトープを認識する程度に個体差があるらしい。従って、HPV粒子そのものを抗原とするワクチンではなく、中和エピトープを含む抗原を用い、全てのヒトに免疫応答を誘導する方法を開発することが、有効なワクチン開発のカギとなる。

- 2) 複数の高リスク型に共通な中和エピトープが

HPV16L2蛋白質のアミノ酸108-120領域にあることを明らかにしてきた。この領域はHPV粒子の表面に露出しており、細胞表面の未同定の分子と結合してウイルスの侵入を助けている。この両側のアミノ酸70-150の領域もウイルス粒子表面に出ていて、特にアミノ酸70-85の領域に抗体が結合すると感染が阻害されることがわかった。ヒトに応用するワクチン抗原として、アミノ酸108-120領域に加え、70-150の領域も適していると思われる。この合成ペプチドをボランティアに経鼻接種し、中和抗体の誘導を試みる試験について、東京大学医学部倫理委員会の許可を得たので、臨床試験を開始する予定である。

- 3) 皮膚基底層細胞の分化誘導因子hSkn-1aがHPV16型の後期プロモーターの近傍に結合し、YY1による抑制を解除することを示してきた。この抑制解除によってE1遺伝子に加え、L1遺伝子の転写も起こった。HPVDNAをベクターから切り離し、環状にしてからhSkn-1a発現HeLa細胞に導入すると、DNAの複製も起こることを示唆する成績も蓄積しつつある。

E. 結論

- 1) HPV感染者のうち中和抗体を持った個体は、CINの発症や進展を起こしにくい。抗HPV中和抗体を誘導するワクチンの有効性が強く示唆された。
- 2) 複数のHPV型に共通な中和抗体が結合するHPV16型L2蛋白質のエピトープは、これまで明らかにしたアミノ酸104-120領域に加え、70-85領域にも存在することがわかった。
- 3) 皮膚基底層に持続感染しているHPVのE1及びL1遺伝子の転写は、未分化の細胞では抑制されているが、分化に伴って発現する転写因子hSkn-1aによって抑制が解除される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kukimoto and Kanda, T.: Displacement of YY1 by Differentiation Specific Transcription Factor hSkn-1a Activates P670 Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 75:9302-11, 2001.
2. Igaki, H., Nakagawa, K., Aoki, Y., Ohtomo, K., Kukimoto, I., and Kanda, T.:

Characterization of the Bi-directional
Transcriptional Control Region between the
Human UFD1L and CDC45L Genes. BBRC
283, 569-576, 2001

3. Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H.,
Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.:
Human Papillomavirus 16 Minor Capsid
Protein L2 N-terminal Region Containing a
Common Neutralization Epitope Binds to the
Cell Surface and Enters the Cytoplasm. J.
Virol. 75:2331-1336, 2001.
4. Kawana, K., Kawana, Y., Yoshikawa, H.,
Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T.:
Nasal Immunization of Mice with Peptide
Having a Cross-Neutralization Epitope on
Minor Capsid Protein L2 of Human
Papillomavirus Type 16 Elicits Systemic and
Mucosal Antibodies. Vaccine, 19:
1496-1502, 2001.

2. 学会発表

- 1) 川名 敬、八杉利治、松本光司、武谷雄二、吉
川裕之、神田忠仁：ヒトパピローマウイルス 16 型
(HPV16) に対する血清中和抗体の有無と子宮頸
部病変。第 60 回日本癌学会総会。
- 2) 榎本 裕、終元 巖、神田忠仁：ヒトパピロー
マウイルス 16 型 (HPV16) 後期プロモーターの転
写調節機構。第 49 回日ウイルス学会総会。

H. 知的所有権の取得
なし。

分担研究報告書

ヒトがんウイルス感染発病予防に関する研究

分担研究者 清水洋子 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

研究要旨 効率の良いC型肝炎ウイルス (HCV) 培養細胞内増殖系の構築を目標として、抗 HCV エンベロープ E2 単鎖抗体を表面膜上に発現する Huh7 細胞を作製しその HCV 感受性を調べた。則ち、単鎖抗体が代理レセプターとして機能しウイルスの細胞吸着効率が上がるか否か、そしてその結果ウイルス感染が増強されるか否かを検討した。

A. 研究目的

HCV の増殖機構、持続感染、発がんなどのメカニズムを明らかにするため、効率の良い HCV *in vitro* 感染実験系の作出が急がれている。我々はウイルス複製効率の悪さを克服するには何が必要なのか宿主とウイルスの両面から研究している。本年度は、感染の第一ステップである細胞への吸着を上げる目的で、抗 HCV エンベロープ E2 単鎖抗体を細胞表面膜上に発現させ、感染効率の増強を図った。

B. 研究方法

昨年度、HCV 持続感染患者より得た PBMC を EB ウイルスで不死化させることにより、抗 HCVE2 抗体を安定に産生するヒト B 細胞クローン 2 種 (#37 及び #55) を得た。これらの産生細胞より RT/PCR 法で VH と VL に相当する DNA 断片を調製し、合成オリゴヌクレオチドリンカーで連結させ、融合組み換え蛋白質をほ乳類動物細胞表面に表示するようにデザインされているベクター pDisplay (Invitogen) に挿入した。この発現ベクターをヒト肝癌由来の樹立細胞 Huh7 に導入し、単鎖抗体発現細胞をクローニングした。単鎖抗体の発現は pDisplay に付いているタグ (HA と myc) に対する抗体を用いた蛍光抗体法及び単鎖抗体をコードする mRNA を RT/PCR 法で検出することにより確認した。

C. 研究結果

#37 や #55 或いはコントロール抗体の単鎖抗体発

現 Huh7 に HCV を接種し、2 時間後に細胞から回収された HCVRNA 量を比較すると #37 及び #55 発現細胞からはコントロールの 10 倍量が検出され、ウイルス吸着量の増加が認められた。更に培養を続け HCV 蛋白の出現を蛍光抗体法により追うと、コントロール細胞では出現は観察されなかったのに対して、#37 や #55 細胞では 24 時間をピークとしてコア、NS3、NS4 などの蛋白が検出された。またこの時、HCV 感染の間接的マーカーである宿主蛋白 p44 の出現も観察された。

D. 考察

抗 HCVE2 単鎖抗体発現 Huh7 細胞が HCV に対して感受性を持つことが明らかになった。感染の定量的測定またこの系が感染性ウイルスを産生するプロダクティブな系か否かは現在検討中である。

E. 結論

Huh7 細胞膜上に抗 HCVE2 単鎖抗体を発現することにより HCV 感染の効率を上げることが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

抗 HCVE2 ヒトモノクローナル抗体による HCV 感染増強

清水洋子、土方美奈子、吉倉廣

第 49 回日本ウイルス学会、11 月 18~20 日、大阪

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略 研究事業）
分担研究報告書

ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたC型肝炎ウイルス複製系の構築

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部部长

研究要旨 改良した3次元高密度肝細胞培養系にC型肝炎患者血清を接種したところ、培養細胞中のウイルスコア蛋白の増加が確認でき、この培養系はHCVの複製の機構を解明するのに有用と考えられた。感染性クローンの感染実験ではウイルス様粒子が観察され、この培養系でHCVのリバースジェネテックスの手法を用いた研究が可能なが示された。また、ヘリカーゼ、ポリメラーゼ遺伝子変異体の結果から、この系が基礎実験だけでなく抗HCV薬のスクリーニングなど臨床応用可能なことも示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の効率良い感染増殖可能な培養細胞系の構築をめざし、昨年度までに我々はラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用い、肝細胞を3次元で高密度に長期間維持・増殖可能な系を確立した。そして、その培養系にC型肝炎患者血清又は感染性クローンRNAを接種したところ、ウイルスの感染・増殖を示唆する結果が得られた。今回、我々はこのRFBを改良し、HCVの感染・増殖の仕組みについてより詳細な検討を行うと伴に、抗HCV薬のスクリーニングに利用する際の基礎になる研究を行った。

B. 研究方法

まず初めに、継時的な細胞の採取が不可能という従来のRFBの問題点に対して、小型化したカラムを並列に並べた新型リアクターを開発し、その機能を解析した。そして、ヒトキャリア血清no 6をこの新型リアクターで培養した肝細胞で感染実験を行い、培養細胞中のウイルスコア蛋白について測定した。

次に、米国NIH Dr. Bukhより供与された感染性クローンHCV RNAのヘリカーゼ、ポリメラーゼ遺伝子の活性部位の変異体を作製し、オリジナルの感染性クローンの感染実験の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

患者血清についてはプライバシーの保護に十分な配慮を払いつつ実施するため、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果と考察

細胞を培養するカラムのサイズを30mlから15mlに小型化し、このカラムを並列に複数個並べることにより、継時的に細胞の採取可能なリアクターシステムを開発した。すべてのカラム内の細胞の酸素消費量がほぼ均一に増加することから、このシステムで安定的に長期に渡り大量の細胞の培養が可能なが示された。次にこの新型リアクターに患者血清1mlを接種したところ、細胞中のコア蛋白の量も16日目ごろ74.2ug/mgまで増加した。この量は慢性肝炎患者の肝組織に匹敵した。また、培養上清中のHCV RNAは2ヶ月半以上に渡り持続的に検出された(図1)。

ヘリカーゼ活性部位やポリメラーゼ活性部位に変異を導入したHCV RNA 10ugをトランスフェクトしたものは40日目以降培養上清中にHCV RNAが検出できず、一方オリジナルの感染性クローンの感染実験では55日後に再び増加し100日以上持続した(図2)。

この培養液中のウイルス粒子の存在様式を調べるために、トランスフェクション後100日目

前後の培養液約 1L を濃縮し、電子顕微鏡で観察したところ、多数の多様な粒子が観察された。そこで更に詳細に調べるため、ショ糖密度勾配法にて分画した (図 3)。免疫電子顕微鏡で観察したところ、HCV RNA とコア蛋白が多い分画で抗 E1 モノクローナル抗体と特異的に反応するウイルス様粒子が観察できた。

D. 結論

3次元高密度肝細胞培養系にC型患者血清を接種したところ、培養上清中のウイルス抗原の増加だけでなく、培養細胞中のウイルスコア蛋白の増加も確認でき、また培養上清中のウイルス抗原は2ヶ月半以上に渡り持続したことから、この培養系はHCVの複製の機構を解明するのに有用と考えられた。

感染性クロンの感染実験ではウイルス様粒子が観察され、昨年度の結果より2次感染も成立可能なことから、この培養系でHCVのリバースジェネテックスの手法を用いた研究が可能なが示された。

また、抗HCV薬のターゲットと考えられているヘリカーゼ、ポリメラーゼ遺伝子の活性部位の変異体の実験の結果から、この系が基礎実験だけでなく抗HCV薬のスクリーニングなど臨床応用可能なことが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, R., Tamura, K., Li, J., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T and Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxy terminus. *Virology* 280, 301-309, 2001.
2. Moriya, K., Todoroki, T., Tsutsumi, T., Fujie, H., Shintani, Y., Miyoshi, H., Ishibashi, K., Takayama, T., Makuuchi, M., Watanabe, K., Miyamura, T., Kimura, S., and Koike, K. Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and

humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 281, 1207-1212, 2001.

3. Urbani, S., Uggeri, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., Penna, A., Boni, C., and Ferrari, C. Identification of immunodominant hepatitis C (HCV)-specific cytotoxic T cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 33, 1533-1543, 2001.
4. Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C. S., Whitt, M. A., and Miyamura, T. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 286, 263-273, 2001.
5. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Kimura, S., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor- α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).

2. 学会発表

1. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Analysis of the genes differentially expressed in HCV core gene transgenic mice. IASL-APASL Joint Meeting. June 2000, Fukuoka, Japan.
2. Takikawa, S., Someya, T., Suzuki, R., Tani, H., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, T., Whitt, M. A., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Biological functions of HCV envelope proteins. *ibid.*
3. Aizaki, H., Nagamori, S., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Propagation of hepatitis C virus in human liver cells grown in a three-dimensional radial flow culture. 7th International Meeting on Hepatitis and Related Viruses. December 2000, Gold Coast, Australia.
4. Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T.,

- Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Characterization of ecdysone-inducible expression system of hepatitis C virus protein in human liver cells. *ibid.*
5. Suzuki, R., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Ubiquitin-mediated degradation of HCV core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *ibid.*
 6. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein binds to retinoid X receptor- α and modulates its transcriptional activity. *ibid.*
 7. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. HCV core protein modulates intrahepatic cytokine expression and activates AP-1 in transgenic mice. *ibid.*
 8. Shimoike, T., Suzuki, T., Tanaka, Y., Matsuura, Y., Totsuka, A., and Miyamura, T. The stem-loop IIIId domain of the HCV 5'UTR is important to its translational repression by the core protein. *ibid.*
 9. Takikawa, S., Suzuki, K., Someya, T., Tani, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Production of human monoclonal antibodies against HCV envelope proteins by transgenic mice with human immunoglobulin loci. *ibid.*
 10. Suzuki, T., and Li, J.: Regulation of TT virus gene expression. The 22nd joint meeting of the United States-Japan hepatitis panels. February 2001, Kobe.
 11. Suzuki, R., Sakamoto, S., Negishi, H., Li, J., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Degradation Signal in the HCV core protein. 8th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. September 2001, Paris, France.
 12. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Tomobe, K., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the liver of hepatitis C virus core gene transgenic mice. *ibid.*
 13. Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Otsuka, M., Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. The tightly regulated inducible expression system of HCV proteins: The core protein modulates fas- and TNF α -mediated apoptosis in human liver cells. *ibid.*
 14. Aizaki, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Li, Y-W., Harada, T., Otsuka, M., Seki, N., Matsuura, Y., Miyamura, T. Characterization of an human hepatoma cell line carrying entire open reading frame of the HCV genome. *ibid.*
 15. Miyamura, T. Molecular biology of HCV. Third International Symposium on Hepatology. October 2001, Hang Zhou, China.
 16. 亀井 昭, 玉置繁憲, 古田さと, 高村史記, 垣内雅彦, 松浦善治, 宮村達男, 足立幸彦, 保富康宏. HCV 遺伝子組み換えアデノウイルスベクターを用いたC型肝炎モデルの作製. 第37回日本肝臓学会総会, 2001年5月, 横浜.
 17. 堤 武也, 鈴木哲朗, 下池貴志, 鈴木, 森屋恭爾, 四柳 宏, 新谷良澄, 藤江 肇, 松浦善治, 木村 哲, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスは retinoid X receptor- α と結合し, その転写活性を調節する. 同上.
 18. 相崎英樹, 宮村達男, 永森静志. ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたC型肝炎ウイルス複製系の構築. 第8回肝細胞研究会. 2001年6月, 東京.
 19. 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 四柳 宏, 新谷良澄, 藤江 肇, 松浦善治, 木村 哲, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスは retinoid X receptor- α と結合し, その転写活性を調節する. 第60回日本癌学会総会. 2001年9月, 横浜.
 20. 森石恆司, 中井康介, 岡林環樹, 鈴木亮介, 宮村達男, 松浦善治. HCV コア蛋白質に結合するプロテアソーム結合蛋白質の解析. 第49回日本ウイルス学会. 2001年11月, 大阪.
 21. 相崎英樹, 鈴木哲朗, 松田麻未, 李 悦偉,

原田 卓, 大塚基之, 関 直彦, 松浦善治,
宮村達男. C型肝炎ウイルス全蛋白質を発現
する肝細胞株の解析. 同上.

22. 守屋 修, 松井政則, 宮澤仁志, 鈴木哲朗,
松浦善治, 宮村達男, 赤塚俊隆. 樹状細胞利
用による HCV 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘
導. 同上.
23. 下池貴志, 鈴木哲朗, 力丸晃子, 松浦善治,
戸塚敦子, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア
タンパク質による翻訳抑制に重要な 5'非翻訳
領域内の RNA 領域の解析. 同上.
24. 鈴木亮介, 坂本真一郎, 根岸英雄, 松浦善治,
宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルス
(HCV) コア蛋白質の分解メカニズム. 同上.
25. 堤 武也, 鈴木哲朗, 友部 賢, 森屋恭爾,
新谷良澄, 藤江 肇, 松浦善治, 小池和彦,
宮村達男. C型肝炎ウイルスコアトランスジ
ェニックマウスの肝臓内における MAPK の
活性化の検討. 同上.
26. 鈴木哲朗, 李 津, 鈴木亮介, 李 天成, 松
浦善治, 宮村達男. TT ウイルス遺伝子の転写
調節機構. 同上.

F. 知的所有権の取得状況

なし。

分担研究報告書

C型肝炎ウイルスの複製と肝発がん

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：肝炎治療および肝発がんの予防への道をひらくためにC型肝炎ウイルス（HCV）に対する感染防御物質であるラクトフェリン（LF）の作用機序の解析と肝臓組織内におけるHCVの準種状態を解析した。大腸菌の発現系でヒトLFの種々の領域をチオレドキシンの融合蛋白質として発現させ、どの部分がHCVのエンベロープE2蛋白質との結合に関与しているのかについて解析した結果、ヒトLFの600-632番目の33 アミノ酸をE2蛋白質に結合する最小結合領域として同定した。肝がん患者由来のがん部および非がん部に存在するHCVのコア蛋白質をコードしている遺伝子領域について、proofreading活性を有するDNAポリメラーゼを用いて遺伝子解析を行った結果、従来報告されていたようながん部におけるヌクレオチドの欠損や終止コドンの出現はまったく認められず、がん部と非がん部におけるHCVの準種の状態にも差が見られないことを明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染機構や増殖機構を解明することは、HCVの生活環の理解とともに、HCVの増殖制御法の開発につながるものと考えられる。これまでに、抗ウイルス剤の評価系として用いることのできるヒト培養肝細胞を用いたHCV感染増殖系を開発し、感染防御物質として見出したラクトフェリン（LF）の作用機序に関する解析を行ってきた。LFのどの部分がHCVエンベロープ蛋白質と直接的に相互作用を示すかを明らかにすることを目的としてさらに解析を進めた。これと並行して本年度は、肝発がんに関与すると考えられているコア蛋白質について、肝臓組織内における準種（quasispecies）状態を高いproofreading活性を有するDNAポリメラーゼを用いて遺伝子増幅を行い詳細に解析した。

B. 研究方法

(1) ヒトLF cDNAを用いてLFの種々の領域を大腸菌でチオレドキシンの融合蛋白質として発現させ、His-tagを利用してそれぞれ精製した。得られたLFの種々の領域（それぞれ0.5 μg）に対してCHO細胞で発現分泌させたHCV E2蛋白質をプローブにしてFar-Westernプロットを行った。LFフラグメントに結合したE2蛋白質の最終的な検出は抗E2モノクローナル抗体により検出した。LFのHCV感染防御活性の定量システムを開発するために、ライトサイクラーを用いてサイバーグリーン法により細胞内HCV RNA量を測定した。この際、*in vitro*の転写翻訳系により作成したHCV RNAを外部標準として用いた。

(2) HBs抗原陰性でHCV陽性のインフォームド・コンセントの得られた肝がん患者4例を対象とした。がん部および非がん部の肝臓組織からRNAを調整し、HCVのコア蛋白質をコードしている遺伝子領域をRT-nested PCRにより増幅した。増幅には高いproofreading活性を有するKOD-plus DNAポリメラーゼを用いた。対照としてはproofreading活性のないTaq DNAポリメラーゼを用いた。得られた増幅産物（652 bp）をpTZ19Rプラスミドベクターに組み込み、塩基配列を決定した。症例1～3ではがん部（pTH1、pTH2およびpTH3シリーズ）、非がん部（pTL1、pTL2およびpTL3シリーズ）ともにそれぞれ20クローン、症例4ではがん部（pTH4シリーズ）、非がん部（pTL4シリーズ）ともに40クローンについて塩基配列を決定し、それぞれの部位におけるquasispeciesの状態を調べた。

C. 研究結果

(1) これまでに、ヒトLFのカルボキシル末端部93アミノ酸がE2蛋白質に結合することウシやウマ由来のLFのカルボキシル末端部もヒト由来のものと同様にE2蛋白質に対する結合性を有することを明らかにしており、これらのアミノ酸配列を基にしたホモロジー検索の結果、この93アミノ酸の中にはHCVの受容体候補とされるCD81と似たアミノ酸配列が存在していることを明らかにした。昨年度、LFはCD81と同等以上のE2蛋白質に対する結合性を有することを確認していることから、本年度は、LFのE2蛋白質との結合領域を93アミノ酸からさらに狭める作業を行った。93アミノ酸のN末端側とC末端側からそれぞれ順

次削ったいくつかのチオレドキシンの融合蛋白質を作成し、E2蛋白質をプローブとしてFar-Western blotを行った。その結果、652番目までC末端側を削っても、それ程E2蛋白質に対する結合性の低下は認められなかったが、N末端部は610番目まで削るとE2蛋白質に対する結合性が著しく低下することが判った。この時点でE2蛋白質との結合領域を600番目から652番目までと絞り込み、さらに解析を進めた。次に、600番目から652番目のアミノ酸配列についてC末端側とN末端側から順次5アミノ酸づつ削ったものを作成して、E2蛋白質への結合性を同様に解析した結果、N末側は605番目になると結合しなくなり、C末側は632番目までが結合し627番目まで短くすると結合しなくなることが分った。また、N末端側を590番目まで長くしてもE2蛋白質に対する結合性に変化が見られなかったことから、E2蛋白質に結合するLFの最小領域を600から632番目の33アミノ酸であると同定した。

得られた最小結合領域を含むペプチドのHCV感染防御活性について定量的検討を行うためにライトサイクラーを用いたreal-time PCR定量法による細胞内HCV RNAの定量システムを新たに構築した。このアッセイ系では細胞由来のRNAが0.5 μ g存在していても、25コピーのHCV RNAを検出定量できることが判った。このアッセイシステムを用いることにより、ウシLFのHCV感染防御活性のIC₅₀が120 μ g/ml (1.5 μ M)であることを明らかにした。また、ヒトLFの活性はウシLFよりも若干弱く、IC₅₀が400 μ g/ml (5 μ M)であることも判った。

(2) 症例1のがん部より抽出したRNAからKOD-plusとTaq DNAポリメラーゼを用いて増幅したコア遺伝子の塩基配列を相互に比較した。それぞれランダムに20クローンを選択して解析した結果、KOD-plusポリメラーゼにより得られたクローン間で見られた塩基置換の頻度はTaqポリメラーゼにより得られたものに較べて7分の1程度であった。また、KOD-plusポリメラーゼにより得られたクローンではヌクレオチドの欠失がまったく無かったが、Taqポリメラーゼにより得られたものでは3割に相当する6クローンで1ヌクレオチド(異なる場所)の欠失が認められた。

肝がんのがん部と非がん部におけるHCVのquasispeciesの状態を調べるために、KOD-plusポリメラーゼを用いてHCV陽性肝がん患者4症例のがん部および非がん部由来のHCVコア遺伝子(1b型、573ヌクレオチド)を増幅して、それぞれ得られたクローンの塩基配列を解析した。それぞれのRNA試料から得られたコンセンサス配列は遺伝子型1bのコンセンサ

ス配列と比較して1.4 - 2.6%の塩基配列の違いを示したが、これらの値は遺伝子型1b内で観察される遺伝的多様性の範囲内であった。しかしながら、3症例においては、がん部と非がん部より得られたコンセンサス配列が異なっており、特に、症例4では9ヌクレオチドの違いを示した。また、症例1、2および4では、塩基配列レベルでのそれぞれのコンセンサス配列からの置換の程度で示したquasispeciesの状態ががん部と非がん部でかなり異なっていた。がん部由来のpTH4シリーズの50%のクローンはコンセンサス配列と同じであったが、非がん部由来のpTL4シリーズではコンセンサス配列と同じクローンはまったくなく、大きく異なっていた。pTH2とpTL2シリーズではこれとは逆の現象が認められた。

それぞれのコンセンサス配列からの置換様式と置換数を算出すると、症例2と3では転移型(UとC、またはAとGの違い)或いは転換型(UとA、UとG、CとA、CとGの違い)置換の数は非がん部よりもがん部で高値を示したが、症例1と4では逆に非がん部で高値を示した。同義置換が非同義置換よりも2.4~8倍高値であり、転移型置換が転換型置換よりも7.8~40倍高いことも明らかとなった。総計、200クローンについて塩基配列を決定したが、ヌクレオチドが欠失したものや終止コドンを持つものはなかった。

D. 考察

(1) HCV E2蛋白質に対する最小結合領域として今回の解析により明らかにしたヒトLFの600 - 632番目のアミノ酸配列を、既に明らかになっているヒトLFの立体構造に当てはめると、606 - 622番目のアミノ酸が α ヘリックス構造をとり、それ以外の部分は特定の構造をとらないものと推察された。Far-Westernプロット解析の結果からみると、600から604番目までのアミノ酸と628から632番目までのアミノ酸がE2蛋白質との結合に重要であると考えられる。これらの部分のアミノ酸配列はウシLFでも良く保存されている。E2蛋白質に対してほとんど結合性を示さないヒトやウシのトランスフェリンと比較すると、629番目と631番目のアミノ酸が異なることから、これらのアミノ酸が特に結合に関与しているものと考えられる。この点に関しては現在、幾つかの部位に関してアミノ酸の置換体を作成してどのアミノ酸がE2蛋白質との結合性に最も関与しているかについて検討中である。このような探索により、さらに結合性の高いペプチド配列を見出す可能性がある。E2蛋白質結合性を有するLFフラグメントのHCV感染防

御活性については、現在、ライトサイクラーを用いたreal-time PCR定量法により検討中である。

(2) KOD-plus ポリメラーゼとTaq ポリメラーゼにより得られたクローンの塩基配列解析から今回得られた結果は、HCVのquasispeciesに関する遺伝子解析にはproofreading活性を有するDNAポリメラーゼが必要であることを示していることから、HCVゲノムの他の領域(例えば超可変領域1)のquasispeciesの状態を解析するにはKOD-plusなどのproofreading活性を有するDNAポリメラーゼが必須であると考えられる。

コア蛋白質をコードする領域のquasispeciesに関する遺伝子解析はこれまでに2, 3 報告されているが、いずれもproofreading活性を持たないDNAポリメラーゼを用いて遺伝子増幅がなされている。これらの報告においては、特にがん部由来のHCV遺伝子にはヌクレオチドの欠失や終止コドンが検出されているが、KOD-plus ポリメラーゼを用いた今回の解析ではそのようなクローンはまったく得られなかった。以前の報告では、がん部に見られたヌクレオチドの欠失により別のフレームが翻訳されることが予想されることから、発がんへの関与が議論されていたが、今回の解析結果から、そのような可能性は非常に低いということが明らかになった。また、HCVの遺伝的多様性は非がん部よりがん部で顕著であり、がん化との関与が指摘されていたが、今回の4症例を用いた解析においては、2症例では逆に非がん部の方で遺伝的多様性が顕著であるという結果を得たことから、HCVの遺伝的多様性は症例により異なり、病態に依存しているわけではないことが示唆された。しかし、今回の解析では、個々の感染個体におけるがん部と非がん部で増殖しているHCV分子種がかなり異なっていることが示されたことから、今後、さらに症例数を増やして、HCV分子種と病態との関係を調べる必要がある。

E. 結論

(1) HCV感染防御物質であるヒトLFの600-632番目の33 アミノ酸をHCV E2エンベロープ蛋白質に結合する最小結合領域として同定した。

(2) HCVコア蛋白質をコードしている遺伝子について高いproofreading活性を有するDNAポリメラーゼを用いて塩基配列の解析を行い、従来報告されていたようながん部におけるヌクレオチドの欠損や終止コドンの出現はまったく認められないこととがん部と非がん部におけるHCVのquasispeciesの状態にも差が見られないことを明らかにした。

F. 研究発表

1. Kato, N., Nozaki, A., Naganuma, A., Ikeda, M. and Tanaka, K. Antiviral activity of lactoferrin. *Cur. Top. Biochem. Res.*, (2001) 3, 163-173.
2. Kato, N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med. Okayama*, (2001) 55,133-159.
3. Kato, N. Hepatitis C virus as a promoter in hepatocarcinogenesis. *Biotherapy*, (2001) 15, 573-578.
4. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, in press (2002).
5. Alam, S.S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouse, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, in press (2002)

分担研究報告書

肝疾患におよぼす HCV タンパク質の機能解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝疾患を予防及び治療する目的でウイルスタンパク質のウイルス複製および細胞増殖に及ぼす機能の解析を行った。本年は特にウイルス非構造タンパク質の一つである NS5A についての機能解析を行った。また、ウイルスの複製を模倣するウイルスの部分的なゲノム複製細胞を構築してその細胞の性質を解析した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子のひとつである。HCV感染がどのようにしてこれらの疾患を誘発するかについての知見を得るために、ウイルスタンパク質が細胞の増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。また、ウイルス感染予防の目的で複製機構を理解して感染防御法を確立するために、ウイルスゲノムの複製系を構築しその細胞における増殖特性を解析する。

B. 研究方法

(1) HCV 蛋白質のうちコアおよび NS5A を発現するプラスミドを作成し、それを培養細胞に導入する。その際に発現が誘導される系にしてタンパク質の機能をきちんと評価できるようにする。そのために NS5A タンパク質をテトラサイクリン誘導体で産生が ON/OFF になるようにする。細胞は Saos-2 を用いた。本細胞を用いてウイルスタンパク質産生を誘導したときとしないときにおける細胞の増殖特性を解析する。

(2) HCV コアタンパク質はウイルス粒子の構成成分であるが、他に細胞の増殖制御などの働きをする。これまでにコアが細胞の NF- κ B 活性をあげることを見出したが、その機構は不明である。コアタンパク質にはキナーゼ活性が存在しないので、NF- κ B の活性化にはコア自身がある種のタンパク質と相互作用していると考え、コアタンパク質に相互作用するタンパク

質の探索を酵母 two-hybrid 系を用いて行う。

(3) NS5A の機能を明らかにするために、まず、本タンパク質と相互作用する細胞側タンパク質を探索する。実験方法は酵母を用いた Two-hybrid 法により会合するタンパク質を明らかにする。

(4) ウイルスの複製の素反応明らかにして、複製活性を阻害する物質を探索する目的で、HCV ゲノムの複製を模倣できる系を構築する。さらに、この系を用いて細胞の増殖変化を解析する。

C. 研究成果

(1) コアたんぱく質と会合する新規タンパク質の解析

コアタンパク質による細胞増殖制御のうち、NF- κ B 活性化機構を明らかにするために、酵母の系を用いた Two-Hybrid system を持ちいて会合する新たな細胞性因子を同定した。本タンパク質はこれまでに報告されていないために機能が不明であるが、核に局在することは明らかにできた。一方、コアタンパク質と共発現させると細胞質側に本タンパク質の局在が変化する。現在、本タンパク質がコアのどの機能に関係するかを解析中である。

(2) NS5A と会合し細胞接着に関するタンパク質の同定。

酵母 Two-Hybrid 系により NS5A と会合する細胞側のタンパク質を同定した。本タンパク質は NS5A のプロリンに富む配列に特異的に結合

する。この領域は SH3 ドメイン結合のコンセンサス配列を持っている。これまでに NS5A と会合するタンパク質として Grb2 が報告されているが、このタンパク質は SH3 ドメインを持つ。同様に本研究で新たに結合が示されたタンパク質も SH3 ドメインを持つ。このことは SH3 が細胞の SH3 ドメインを持つタンパク質と広く会合する可能性を示唆する。しかし、この会合の生理的な意味については今後の研究課題である。

(3) NS5A を発現する細胞における細胞増殖変化

テトラサイクリンの添加による発現誘導細胞を用いて NS5A の細胞増殖におよぼす効果を解析した。まず、本細胞を NS5A 発現誘導した場合、細胞の増殖（細胞の性状、複製速度など）に顕著な差はなかった。しかし、本細胞をポリ IC で処理し、インターフェロン誘導させ PKR の活性を測定すると NS5A 発現細胞においては PKR の活性が抑制されていた。

(4) HCV サブゲノムレプリコンの作成とその複製能の解析

HCV の自己複製系を作製する目的で、既にレプリコン活性が報告されている HCV レプリコンを構築した。本レプリコンを培養細胞に導入すると、自己複製が観察された。一方、本研究者らがこれまでに培養細胞を用いて感染能があることを示してきた HCV のゲノムから部分的な配列を取り出し、それを用いてレプリコンを構築した。それを導入した細胞においても HCV ゲノムの複製が観察された。このことは感染性を示した HCV ゲノムがレプリコンとしての機能を保持している事を示す。本細胞を用いてインターフェロンに対する効果を調べたところ、100 IU/ml の濃度で HCV レプリコンはもとの量に比べ 100 分の 1 に低下した。

D. 考察

HCV 感染がどのようにして肝臓疾患を惹起するかについては、不明な点が多い。本研究では HCV のたんぱく質が細胞の増殖に及ぼす効果について解析するために、コアタンパク質と

NS5A に注目してそれらのタンパク質の細胞増殖に及ぼす機能を、コアについては NF- κ B 活性化を、NS5A については誘導発現系を構築してインターフェロンに対する効果を指標にして解析している。これまでの実験からコアタンパク質は、小胞体膜に会合して NF- κ B を活性化することが明らかになっているがその機構は不明である。今回、コアと会合する細胞タンパク質を同定したので、本タンパク質の NF- κ B 活性化との関連が注目される。コア蛋白質が Fas によるアポトーシスを抑制する働があることを既に明らかにした。この効果がコアによる NF- κ B の活性化によることも明らかにした。コアによる NF- κ B 活性化は疾患の発症を考える上で興味深い。NF- κ B 活性化は炎症の惹起と深く関連すると考えられる。NF- κ B の活性化による他のサイトカインの産生が炎症の惹起に関与している可能性もあるので、ウイルス感染によるウイルスたんぱく質による直接的な炎症も、慢性肝炎の発症には重要である可能性が考えられる。

HCV RNA レプリコンを作製し、それが細胞内で稼動していることを示す結果を得た。このことは、今後の抗ウイルス剤の開発のみならず、ワクチンの開発にも寄与すると期待される。

E. 結論

HCV たんぱく質の機能解析を行い、細胞の増殖を直接制御することを示した。この現象が疾患とどのように関連するかは今後の課題であるが、免疫により誘導される炎症に加えてウイルスたんぱく質が質的に炎症を変化させている可能性を示す。

HCV の効率良い複製系を作製する目的で HCV RNA レプリコンの作成を行った。予備的な検査によりレプリコンとして機能するものが取れていると期待された。

F. 研究発表

1. Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates

- recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol.* 33:440-447, 2000
2. Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, elk1, in response to mitogenic stimuli, *Hepatology.* 33:159-65, 2001
 3. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K., Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease., *Biochem Biophys Res Commun.* 279:557-562, 2000
 4. Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K. Inhibitory effects of sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease, *Phytother Res.* 14:510-516, 2000
 5. Okoshi S, Takeda Y, Takimoto M, Shimotohno K., Asakura H, Jay G., *Molecular Dissection of Hepatitis C Virus Expression.*, *Intervirology.* 44 : 21-28, 2001
 6. Marusawa H, Hijikata M, Watashi K, Chiba T, Shimotohno K. Regulation of Fas-mediated apoptosis by NF-kappaB activity in human hepatocyte derived cell lines. *Microbiol Immunol.* 45:483-489, 2001.
 7. Watashi K, Hijikata M, Marusawa H, Doi T, Shimotohno K. Cytoplasmic localization is important for transcription factor nuclear factor-kappa B activation by hepatitis C virus core protein through its amino terminal region. *Virology.* 286:391-402, 2001.