

20020152

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉倉 廣

平成15(2003)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 ----- 7
神田 忠仁
2. ヒトがんウイルス感染発病予防に関する研究 ----- 11
清水 洋子
3. C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるウイルス翻訳抑制とアポトーシス調節機構 ----- 13
宮村 達男
4. C型肝炎ウイルスの複製と肝発がん ----- 19
加藤 宣之
5. 肝疾患におよぼす HCV タンパク質の機能解析 ----- 23
下遠野 邦忠
6. C型肝炎における CTL 応答と CTL エピトープの同定 ----- 27
井廻 道夫
7. 宿主細胞の細胞周期におよぼす HCV core 蛋白質の作用 ----- 29
林 紀夫
8. 献血者血液の核酸増幅検査実施状況と輸血副作用発生状況 ----- 31
初回献血者におけるウイルスマーカーの陽性頻度 ----- 33
内田 茂治

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

厚生労働科学研究費補助金(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) 複数の HPV 型の感染を防げる抗体のエピトープを HPV のキャプシド蛋白質 L2 中に同定し、このアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをボランティアに経鼻接種した処、軽度の不快感以外の副作用は認められず安全である事が確認され、同時に一部の被験者の血清中には、抗 HPV 中和抗体が誘導されワクチンとしての有効性が示唆された。
- 2) HCV のコア蛋白が細胞増殖に影響する事が分かっているが、実験系により、一見逆の現象、つまり一方では促進的に他方では抑制的、或いは致命的に働く事が明らかになって来た。それぞれの観察は確かであるので、その理由の解明は HCV のがん化機構の解明の鍵になると思われる。
- 3) HCV ゲノムの 5' 末には、ウイルス複製及び翻訳を抑制する塩基配列がある事が分かり、HCV の持続感染機構の解明に重要な意味を持つ発見がなされた。
- 4) 昨年度開発した全 C 型肝炎ウイルス(HCV)抗原に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)応答(CAI)を HCV 感染者につき検討し、ウイルス増殖と CAI は負に相関する事を見いだした。
- 5) 1999年より開始された日本赤十字社による全国の献血者血液に対する、HBV、HCVおよびHIVを対象としたミニプール核酸増幅検査(NAT)の導入により、2000年および2001年には「輸血による感染の可能性が高い」と考えられる症例数は激減した。初回感染を疑わせる感染者のウイルスの遺伝子型をみると、HBV、HCV 共に従来とは異なった傾向が見られ、感染動態の変化が示唆される。

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长
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

ヒト子宮がんの原因であるヒトパピローマウイルス並びにヒト肝臓がんの原因であるC型肝炎ウイ

ルス(HCV)を特定し、これらのウイルスの解明により感染防御、感染治療、並びに発がん予防を目的とする。同時に、人為的ながんウイルスの伝搬に関与する可能性のある輸血血液の肝炎ウイルス、白血病ウイルスなどの病原体検出動向を解析し、早期対策の為の情報解析をすることを目的とした。

HPV、HCV、何れのウイルスについても、その増殖、遺伝子発現機構、宿主細胞との相互作用を解析し、ワクチン、治療法への可能性を探る事とした。本年度は、HCVについては、宿主細胞と興味ある相互作用をするコア蛋白の解析、ウイルス複製に関わる問題、更に予防治療の鍵を握る細胞性免疫(特にCTL)に重点を置いた。HPVについてはワクチン開発を更に推進し、ヒトでの予備試験を行い安全性の確認を狙った。

B. 研究方法

研究の総括は吉倉が担当し、HPV については神田が、HCV については下遠野、宮村、加藤、清水、吉倉がウイルス学的側面から、林が臨床分子生物学的手法により、それぞれ研究を分担した。殆ど全ての研究は、細胞レベル、試験管内のものであるが、ヒト材料を用いるもの、ヒトに接種する場合については倫理審査委員会を経、患者の合意を得た上で行われている。輸血血液の感染症動向については日赤の内田が担当した。

C. 研究結果

HPV に関する研究成果

1. 複数の HPV 型の感染を防げる抗体のエピトープを HPV のキャプシド蛋白質 L2 中に同定した(昨年度報告)。このエピトープのアミノ酸配列を

持つ合成ペプチドをボランティアに経鼻接種した処、軽度の不快感以外の副作用は認められず安全である事が確認され、同時に一部の被験者の血清中には、抗 HPV 中和抗体が誘導され有効性も示唆された(神田)。

2. HPV のキャプシド蛋白質の発現は、mRNA への転写のみならず、その安定性や翻訳の効率によっても制御されていることを見いだした。皮膚細胞に角化を誘導する転写因子 hSkn-1a の発現により、CX43・ARHH 遺伝子の発現昂進と、Mx2・RALGDS 遺伝子の発現抑制が起こる。これらの遺伝子の発現変動が L2 を含め HPV 遺伝子の発現にどのような影響を与えるかを検討中である(神田)。

HCV に関する研究

1. マウス肝由来細胞の系で、HCV コア蛋白が CDK 活性化キナーゼ(CAK、CDK7/cycH/MAT1 の3者複合体)の中の CAK に結合不活化し、CDK2 の活性化磷酸化を低下せしめ細胞のS期への進行を遅延させる事が分かった(林)。一方、酵母 two-hybrid 系で、コアが RARa 依存的な転写抑制因子 Sp110b と会合し、RARa の抑制解除を介して、下流の遺伝子(tissue glutaminase (tTGase)等)を活性化し、アポトーシスを誘導する事を見いだした(下遠野)。即ち、コア蛋白は宿主細胞に対して細胞の増殖抑制或いは細胞死を誘導すると云う結論である。コア蛋白がアミノ末端部 20 アミノ酸を介し、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子を活性化するという観察(加藤)は、本酵素が宿主の RNA も分解する RNaseL を活性化する事から、細胞増殖抑制現象に何らかの関係があるかも知れない。他方、ヒト肝癌由来細胞株においては、抗 Fas 抗体、または TNF α によって

惹起される DNA 断片化がコア蛋白質の発現によって抑制され、この際、caspase 3 活性が低下し、Inhibitor of Caspase-Activated DNase の発現が上昇する事が観察され、むしろコア蛋白は細胞増殖を促進すると云う逆を示唆する結果が得られた(宮村)。それぞれの観察は確かであるので、その理由の解明は HCV のがん化機構の解明の鍵になると思われる。

2. HCV 粒子形成に於いて、ゲノム RNA とコア蛋白は、RNA の 5' 末端側 IRES の stem-loop III d 領域 (nt 253-279)において結合し、同時に、コア蛋白は当該部分での結合により HCV RNA の翻訳も抑制する事が分かった(宮村)。一方、感染肝組織や血清中 HCV の解析により、マイナス鎖からゲノム RNA が転写される際、ヌクレオチド no.364-382に存在する A-rich な領域で転写がストップし全長 RNA 合成の低下が起こるという事が分かった(清水、吉倉)。総合的に考えると、HCV ではゲノム RNA の 5' 末に於いて、複製並びに翻訳が抑えられる機構が塩基配列として埋め込まれている事となる。これは、HCV の持続感染機構に重要な意味を持つものと考えられる。

3. 全 C 型肝炎ウイルス(HCV)抗原に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)応答(CAI) (手法については昨年度報告を参照)を HCV 感染者につき検討した。慢性肝炎で健常者と比べ有意に高く、無症候性 HCV キャリア 2 例と治療によりウイルスが排除された 4 例中 2 例では健常者と同じレベルであった。C 型急性肝炎フォロー例では、CAI が高く保たれている間は血清 HCV RNA も検出限界以下であったが 3 年後に総 CAI の著明な低下に伴う血清 HCV RNA の上昇が観察され、インターフェロン治療により血清 HCV RNA が陰性化と同

時に総 CAI の回復を見た(井廻)。

4. C 型急性肝炎患者末梢血単核球を HLA-A24 結合モチーフを有する HCV ペプチドで刺激し、ELISpot 法により 11 種類の HCV 特異的 CTL エピトープを同定した。しかし、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープは 1 種類のみで、かつこのエピトープの抗原性は高くないことが示唆された(井廻)。

5. 大腸菌で発現させたヒト LF の 600-632 番目の 33 アミノ酸がヒト肝細胞における HCV 感染に対する防御活性を有することを明らかにした(加藤)。

6. 1999 年より開始された日本赤十字社による全国の献血者血液に対する、HBV、HCV および HIV を対象としたミニプール核酸増幅検査(NAT)の導入により、2000 年および 2001 年には「輸血による感染の可能性が高い」と考えられる症例数は激減した。対象となった 16,318,088 名の献血者中、HBV-DNA が 239 例(約 1/6 万)、HCV-RNA が 50 例(約 1/33 万)および HIV-RNA が 6 例(約 1/272 万)検出された。内、初感染と考えられる 244 例の HBV 遺伝子型は C 190 例(77.9%)、B 29 例(11.9%)、A 22 例(9.0%)、D 3 例(1.2%)で、従来欧米フィリピン型とされていた A 型が多くなっているのが注目される(従来 2%以下)。一方、HCV-RNA の遺伝子型は 1b が 14 例(35.0%)、2a が 15 例(約 37.5%)および 2b が 11 例(27.5%)で、2a、2b が比較的多いのが注目される(従来 1b が 70%) (内田)。

7. 2002 年 1 月から 9 月までの 9 ヶ月間に、全国の医療機関から日本赤十字社中央血液センター医薬情報部に輸血後感染症として自発報告のあった症例は、HBV 感染の疑い 54 例および HCV 感

染の疑い 24 例であった。このうち献血時の保管検体からウイルス核酸が検出され、輸血による感染の可能性が高いと考えられた症例はHBVの6例のみであった。他のウイルス感染疑い例は保管検体からそれぞれのウイルス核酸が検出されず、輸血による感染の可能性は低いと考えられた(内田)。

D. 考察

ヒトパピローマウイルスについては、子宮がんに関わる複数の HPV に共通した中和エピトープを発見し、ペプチドの経鼻投与により中和抗体が誘導される事、副作用も無いことが分かったので、ワクチン開発への道がかなり見えてきた状況である。但し、ペプチドのままでは抗原性が十分でない為に、偽ウイルス粒子の表面に発現させるなどの今後の改良が必要となる。

C型肝炎ウイルスについては、本年度の研究で一つはっきりした事は、ウイルスゲノムの5'非コード領域からコア領域にかけてウイルスの複製或いは翻訳開始を抑制する配列の存在する事である。これは、HCV の持続感染の機構を良く説明すると同時に、裏を返すと、HCV はそもそも自分自身を増えにくくする機構を持っているという事である。可能性としては、この辺りの領域に変異を入れることにより、より増えやすいHCVゲノムを構築することも可能であると云うことになる。

HCVのコア蛋白の宿主細胞に及ぼす影響については、大雑把に云えば、増殖を促進する或いは細胞死を抑えると云う現象と増殖を抑え細胞死を促進すると云う現象両方が観察され、何れとも云える状況ではない。しかし、それぞれの観察をした実験をよく見ると、観察した条件に大きな違

いが見られる。細胞死の促進を観察した下遠野の実験は、All-trans retinoic acid 存在下でのヒト由来細胞死促進であり、細胞周期の G1/S での阻害を見た林の実験はマウスの正常肝細胞での実験である。宮村のコアが細胞死を抑えると云う実験は下遠野の系同様ヒトの細胞であるが、Fas 抗体(又は TNF α)により細胞死が誘導される条件下のものである。これらに關与するコアの領域を見てみると、下遠野の系ではアミノ酸 21-80、加藤の実験で 2'-5'-oligo(A) synthetase の転写を活性化する領域はN末 20 アミノ酸で領域が異なる。宮村、林の実験系については責任領域は確定していない。従って現段階では確かな結論は出し難い。コア蛋白の発現量、宿主細胞の性質、サイトカイン、レチノイン酸等の humoral factor 等により細胞は様々な反応を示し、感染肝でもその様な現象が同時に起こっている事が考えられる。その内のどれかの現象が優勢になると治癒に向かい、どれかが優勢になると持続感染状況からがんになるのではないかと推測される。

輸血血液の調査で目立つのは NAT 導入による血液の安全性の向上である。一方、気付かれるのは検出される HBV、HCV ウイルスの遺伝子型が日本在来でないものにシフトしている事であり、我が国での感染の様態が変化しつつある事を思わせる。又、周辺状況から輸血由来と思われる肝炎ウイルス感染の大部分が輸血によらない事がはっきりしている事は、医療現場での感染も否定出来ない事となる。従って、このような感染については医療現場でのより詳しい調査が必要とされるのではないだろうか。

E. 結論

複数の HPV 型の感染を防げる抗体のエピトープを HPV のキャプシド蛋白質 L2 中に同定し、このアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをボランティアに経鼻接種した処、軽度の不快感以外の副作用は認められず安全である事が確認され、同時に一部の被験者の血清中には、抗 HPV 中和抗体が誘導されワクチンとしての有効性が示唆された。

HCV のコア蛋白が細胞増殖に影響する事が分かっているが、実験系により、一見逆の現象、つまり一方では促進的に他方では抑制的、或いは致死的に働く事が明らかになって来た。それぞれの観察は確かであるので、その理由の解明は HCV のがん化機構の解明の鍵になると思われる。

HCV ゲノムの 5' 末には、ウイルス複製及び翻訳を抑制する塩基配列がある事が分かり、HCV の持続感染機構の解明に重要な意味を持つ発見がなされた。

昨年度開発した全 C 型肝炎ウイルス(HCV)抗原に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)応答(CAI)を HCV 感染者につき検討し、ウイルス増殖と CAI は負に相関する事を見いだした。

1999年より開始された日本赤十字社による全国の献血者血液に対する、HBV、HCVおよび HIVを対象としたミニプール核酸増幅検査(NAT)の導入により、2000年および2001年には「輸血による感染の可能性が高い」と考えられる症例数は激減した。初回感染を疑わせる感染者のウイルスの遺伝子型をみると、HBV、HCV 共に従来とは異なった傾向が見られ、感染動態の変化が示唆される。

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

分担研究報告書参照。

厚生労働科学研究費補助金（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は表皮の基底層角化細胞に侵入し、潜伏持続感染する。宿主細胞が最終分化を始めるとウイルス増殖が起こり、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、HPVの感染を阻止するか、持続感染の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研究目的としている。これまでにHPVのキャプシド蛋白質のひとつL2に、複数のHPV型の感染を防げる抗体のエピトープが存在することがわかり、このエピトープを抗原とするワクチン開発をめざしてきた。今年度は、このエピトープのアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをボランティアに経鼻接種し、安全性を検討した。軽度の不快感以外の副作用は認められず、一部の被験者の血清中には、抗HPV中和抗体が誘導された。抗原性を高めて実用的なワクチン抗原とする工夫が今後の課題である。一方、HPVのキャプシド蛋白質の発現は、転写の有無に加えmRNAの安定性や翻訳の効率によっても制御されていることがわかった。角化細胞の分化を起こす転写因子hSkn-1aの発現によってどのような細胞遺伝子の発現変動が起こるか調べ、CX43、ARHH遺伝子の発現昂進と、Mx2、RALGDS遺伝子の発現抑制を見いだした。これらの遺伝子の発現変動がHPV遺伝子の発現にどのような影響を与えるか解析し、必要があればさらに分化カスケードの下流を調べることで、HPV潜伏持続感染を支える分子機構が明らかになると期待される。

A. 研究目的

- 1) HPV16型L2のアミノ酸108-120領域には、複数のHPV型を中和できるエピトープが存在する。この領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドのヒトに対する安全性を確認する。
- 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) 13名のボランティアに、抗原（HPV16型L2蛋白質のアミノ酸104-120領域と同じ配列を持つ合成ペプチド）を経鼻接種（100 μ gを5名、500 μ gを5名）した。プラセボ（3名）には生理食塩水を用いた。さらに4及び12週後に追加接種した。血清試料は、接種前、6週後及び16週後に採取した。HPV16及び52型のL2との結合をELISAで測定

した。実際にはHPV16及び52型のL1/L2-キャプシドを抗原としたELISAのOD値からL1-キャプシドを抗原としELISAのOD値を差し引いて、L2に対する値を求めた。また、HPV16及び52型偽ウイルスの感染価を1/2に抑制する最大希釈を求めた。

- 2) 培養液へドキシサイクリンを添加すると、角化細胞の分化を誘導する転写因子であるhSkn-1aを発現するHeLa細胞株を利用し、hSkn-1a発現によって変動する細胞のmRNA分子を探索した。DNAチップ、ATAC-PCRでスクリーニングし、さらにリアルタイムPCRでmRNA量の変動を確認した。また、ヒト初代角化細胞をシャーレで培養した。confluentになって分化を開始する前後のmRNAを回収し、HeLa細胞でのスクリーニングで選択した遺伝子由来のmRNA量を測定した。

- 3) CMV初期プロモーターの下流にHPV16型L1遺

伝子をつないだ発現プラスミドを作った。L1 遺伝子のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を変えた変異遺伝子は、合成オリゴヌクレオチドのアニーリングと PCR を組み合わせて作製した。

4) 薬剤耐性 マーカーと hSkn-1a を同時に発現するプラスミドを種々の細胞にトランスフェクションし、hSkn-1a 発現細胞によるコロニー形成を調べた。新たに作製した hSkn-1a 発現アデノウイルスベクターを細胞に感染させ、分化マーカー蛋白質の発現とアポトーシスを調べた。

(倫理面への配慮)

ヒトへの接種実験は全て文書による被験者の同意を得ておこなった。

C. 研究結果

1) 抗原ペプチドの経鼻接種では、一部のボランティアが軽度の不快感を訴えたのみで、大きな副作用は認められなかった。500 μ g の接種を 3 回受けた 5 名のうち、3 名の血清中に HPV16 及び 52 型キャプシドと結合する IgG 抗体が認められ、血清は HPV16 及び 52 型 pseudovirion の感染を阻止した。

2) hSkn-1a の発現によって、代表的な分化マーカーであるサイトケラチン 10、TG1 が発現し、CX43、ARHH 遺伝子の発現が著しく昂進し、Mx2、RALGDS 遺伝子の発現が抑制された。これらの遺伝子の発現変動は、ヒト初代角化細胞を培養し分化を誘導させても同様に起こった。

3) 通常の培養細胞では、キャプシド蛋白質 L1 の合成が起こらないことがわかった。L1-mRNA は分解されやすく、翻訳効率も低いことがわかった。アミノ酸配列を変えずに塩基配列を変えると、mRNA は安定化し、翻訳効率も高くなった。この変異体と野生型 L1 遺伝子のキメラ遺伝子からの L1 蛋白質の発現を調べて、L1-mRNA の 5' 端 200 塩基内にこの抑制に必要な cis 因子が存在することがわかった。

4) 角化細胞由来の癌細胞株はすべて hSkn-1a によるコロニー数とサイズの減少が認められた。トランスフェクションないしアデノウイルスベクターを用いて一過性に hSkn-1a を発現させたすべての角化細胞由来の癌細胞株で、サイトケラチン 10 の発現が誘導され、アポトーシスも検出された

D. 考察

1) 複数の HPV 型に共通な中和エпитープを含む L2-ペプチドは、ヒトに毒性が無いことが示された。

今後、このペプチドをどのように実用的なワクチン抗原とするかが課題である。HPV 粒子が抗原となった場合には、主に抗 L1 抗体が誘導されるので、ペプチドのまま抗原性を発揮させる方法を開発するか、L1 との組み換えで抗原提示されやすくする工夫が重要と考えられる。

2) HPV キャプシド蛋白質の発現は、宿主の免疫系から逃れるために、必要な時にのみ最小限の合成を行うように調節されているらしい。この調節は転写段階だけでなく、mRNA の分解や翻訳効率によってもなされている。表皮形成の過程で、分化に関わる細胞遺伝子群の発現が制御される機構を利用していると思われる。hSkn-1a による CX43、ARHH 遺伝子の発現上昇と Mx2、RALGDS 遺伝子の発現低下が HPV 遺伝子の発現にどのような影響を与えるか調べるとともに、角化細胞の分化に伴う遺伝子発現の変動をたどることで、HPV 持続感染の成立、維持の分子機構が明らかになると期待できる。

3) 角化細胞由来の癌細胞は hSkn-1a による分化誘導に应答する能力を保有していることが強く示唆された。従って、hSkn-1a は角化細胞由来の悪性腫瘍に対する分化誘導療法の機能分子となり得る。

E. 結論

1) HPV16 型 L2 蛋白質にある中和エピトープのアミノ酸配列を持つ合成ペプチドは、経鼻接種でヒトに毒性を示さず、抗体を誘導しうる。

2) HPV のキャプシド蛋白質の発現は、転写の有無、mRNA の安定性、翻訳の効率によって潜伏持続感染に適した制御が行われているらしい。これらの制御は表皮基底層角化細胞の分化プログラムと密接に関連している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii, Y., Tanaka, K, and Kanda, T.:

Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein L1: the Cysteines Affecting the Intermolecular Bonding and Structure of L1-Capsids. *Virology*, in press 2003.

2. Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Takeoka, A., Yaegashi, N., Iwasaka, T., Kanazawa, K.,

Taketani, Y., and Kanda, T. : IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids: a Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan. J. Medical Virology, in press, 2003.

3. Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y.: Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus (HPV) as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. BBRC, 296:102-105, 2002.
4. Mori, S., Murakami, M., Takeuchi, T., Kozuka, T., and Kanda, T.: Rescue of AAV by antibody-induced Fas-mediated apoptosis from viral DNA integrated in HeLa chromosome. Virology, 301: 90-98, 2002.

2. 学会発表

- 1) Kanda, T.: Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Human Papillomavirus 16 (HPV16) L1 Expression in HeLa. 感染と免疫フォーラム、
- 2) Kawana, K, Yasugi, T, Kawana, Y, Yoshikawa, H, Kanda, T., Taketani, Y Safety and Immunogenicity of a Peptide Containing the Cross-Neutralization Epitope on HPV 16 L2 in Nasal Immunization of Adult Volunteers. 第20回国際パピローマウイルス会議
- 3) 石井克幸、神田忠仁: ヒトパピローマウイルス16型キャプシド主構成タンパク質L1の変異解析。日本ウイルス学会
- 4) 緒方敏彦、神田忠仁 : アデノ随伴ウイルス組み込み領域(AAVS1)のエンハンサー遮断活性。分子生物学会

H. 知的所有権の取得
なし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

平成14年度分担研究報告書

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室長

研究要旨 我々は先に培養細胞を用いて C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染実験系を作出した。しかし、この系でのウイルス複製レベルは非常に低く詳細なウイルス学的研究への応用は難しい。複製レベルの低さに関して最近吉倉は一つの仮説を報告した (Yoshikura H. Digest Liver Dis. 33:449-451, 2001)。則ち、HCV の マイナス鎖からゲノム RNA が転写される際、ヌクレオチド no.364-382 に存在する A-rich な領域で転写がストップし全長 RNA 合成の低下が起こるという可能性である。本研究では、仮説が predict するプラス極性の 5' end short HCVRNA fragments が実際に感染肝組織や血清中に多量に検出されるか否かを調べた。結果は仮説を支持するものであった。

A. 研究目的

HCV の複製機構、持続感染、発ガンなどのメカニズムを明らかにするため効率の良い培養細胞内増殖系の構築が急がれている。我々は HCV 複製効率の悪さを克服するには何が必要かを宿主とウイルスの両面から研究している。本研究の目的は、上記吉倉の仮説を検証し、HCV 複製効率増強への手掛りを得ることである。

B. 研究方法

ヒト感染肝組織（癌部と非癌部）2 検体、非感染及び感染チンパンジー肝組織 5 検体、ヒト感染血清 10 検体、さらに実験的に HCV を感染させた培養細胞（ヒト B リンパ球樹立細胞）を対象材料とした。5' end short HCVRNA fragments の 3' 断端の位置は次の方法で調べた。HCV ゲノム上の A-rich region を中心にして primer A (321-302), B (341-322), C (360-341), D (380-361), E (398-381), F (414-398), G (442-423) を作成し、材料から

抽出した HCVRNA の逆転写をこれらのポイントから各々スタートさせ、出来た cDNA を半定量的 PCR で増幅し、アガロースゲル上で product の量を比較した。RNA fragments の 3' 末端の塩基配列は oligoRNA ligation/ anchored RT/ PCR 法を用いて決定した。

C. 研究結果

Short RNA fragment の 3' 末端は、肝組織由来の HCVRNA では D 領域に、血清由来では E 領域に存在することが示唆された。Primers D, E, F から逆転写された cDNA の相対量は肝組織では $5^4 : 5^3 : 5^2$ であった。血清では、感染価の高いものは $5^4 : 5^4 : 5^3$ であったのに対して、感染価の低いものは short RNA の相対比は高く $5^4 : 5^4 : 5^2$ であった。Short fragments の 3' 末端ヌクレオチドの位置を oligoRNA ligation 法で調べると、血清では大部分 (7 / 10) が A-rich region 直後の nt.384 でストップしていた。肝組織ではもう少

し短いものが多く 3' 末端は nt.341 から nt.384 の範囲に分布していた。このように、A-rich region 近辺を 3' 断端とする short fragments が臨床材料の感染肝や血清中に存在することが明らかになった。同様の方法を用いて実験的に HCV を感染させた培養細胞を調べた所、nt.384 でストップしている short RNA が検出された。HCV コア蛋白は HCV ゲノムの 5'UTR 部位に結合しヌクレオカプシドを形成すると報告されている。そこで、感染肝ホモジェネート及び血清を用いて short RNA とコア蛋白の結合を antigen-captured RT/PCR 法により調べた。コントロール抗体では negative だったのに対して、Anti-HCVcore 抗体でセレクトした分画からは上記のような short fragments が検出され、short fragments がコア蛋白と結合していることが示された。

D. 考察

感染肝中に 5' end short fragments が多量に存在するというデータは Quadri&Negroらの報告 (Digest Liver Dis. 33:480-486, 2001)を確認するものであった。血清中の short fragments はかなり uniform でその 3' 末端が A-rich region 直後の nt. 384 であるのは興味深い。感染培養細胞からも nt.384 fragment が検出されており、その産生には上記の仮説のような special mechanism が働いていると考えられる。

E. 結論

A-rich region 直後を 3' 末端とする 5' end short HCV RNA が感染肝臓や血清中

さらに感染培養細胞にも存在することが明らかになった。この結果は吉倉の仮説を支持する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

感染肝に存在する HCV 5' 側 short RNA フラグメント

清水洋子、土方美奈子、吉倉廣

第 50 回日本ウイルス学会学術総会、2002 年 10 月 16—18 日、札幌

C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるウイルス翻訳抑制とアポトーシス調節機構

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長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質とゲノム RNA との結合様式を解析し、コア蛋白質との結合には、5'末端側 IRES の stem-loop III_d 領域 (nt 253-279)、特にそのループ構造の GGG 配列が重要であることを見い出した。また、この GGG 配列の変異体などコア蛋白質との結合能が低下する HCV RNA ではコア蛋白質による翻訳抑制作用が消失することを示した。一方、ヒト肝癌由来細胞でコア蛋白質を誘導発現する細胞株を樹立し、コア蛋白質によるアポトーシス調節作用を解析した。抗 Fas 抗体、または TNF α によって惹起される DNA 断片化がコア蛋白質の発現によって抑制されること、この時、caspase 3 活性が低下し、Inhibitor of Caspase-Activated DNase の発現上昇を観察した。

A. 研究目的

HCVコア蛋白質は、構造蛋白としてヌクレオキャプシドを構成するが、同時に宿主細胞の増殖、アポトーシスに影響を与えること、トランスジェニックマウスで脂肪肝、肝細胞癌を発症すること、などが報告され、多機能蛋白として知られている。

我々はこれまでに、コア蛋白質とゲノムRNAとの結合様式を調べる過程で、1) コア蛋白質が、ゲノムRNAの5'末端に存在するIRES (internal-ribosome entry site)のstem-loop III_d領域と結合すること、2) その結合に相関して、自身の翻訳が抑制されること、を報告してきた。今回、stem-loop III_d領域の種々の変異体を用いてコアとの結合、及び翻訳活性を詳しく検討した。

コア蛋白質は、細胞のアポトーシスを誘導または抑制することが知られているが、実験系によって成績が異なり、その影響については依然として議論が分かれている。今回我々は、C型肝炎患者の肝臓中と同レベルにコア蛋白質の発現を誘導するヒト肝癌細胞株を樹立し、コア蛋白質がアポトーシスへ及ぼす影響を調べた。

B. 研究方法

1. 細胞内翻訳アッセイ

コア蛋白質を発現するバキュロウイルス (AcCA39)またはコントロール (AcCAG)をHepG2細胞へ感染させ2日間培養した。さらに、HCVの5' UTR (341 nt)とFirefly luciferase遺伝子とを融合させたレポーターRNAを内部標準用のCapped renilla luciferase RNAとともに細胞へ導入し、6時間後にルシフェラーゼ活性を定量した。

2. コア蛋白質-RNA結合解析

合成HCV RNAをBiacore装置のセンサーチップに固定した。組み換えバキュロウイルスで発現させ精製したコア蛋白質を添加し、相互作用をリアルタイムで定量解析した。

3. コア蛋白質の誘導発現細胞株の樹立

Ecdysone-Inducible Expression System (Invitrogen)を用いて細胞株を樹立した。コア遺伝子を組み込んだpIND191をpVgRXRとともにHepG2細胞へ導入し、G418とZeocin存在下で培養した。3~5週間後、薬剤耐性細胞におけるコア蛋白質の誘導発現をウエスタンブロットおよびELISA法にて調べ、効率良く誘導発現する細

胞株Hep191を選択した。発現は、10 μ M Ponasterone A (ecdysone analog) 添加培地で2日間培養することによって誘導した。

4. 遺伝子発現プロファイリング

Ponasterone A添加および無添加のHep191細胞からISOGEN (Nippon Gene)で全RNAを抽出しさらにPoly (A) selectionを行った。Cy3-dUTPまたはCy5-dUTPでそれぞれ標識したプローブをHuman cDNA array (2304遺伝子)とハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光シグナルをslide scannerで読み取った。RT-PCRは、各遺伝子特異的なプライマーを用いて行い、直線的に遺伝子が増幅する条件で解析するようPCRのサイクル数を設定した。

5. アポトーシスアッセイ

Hep191細胞を、抗Fas抗体 (100 ng/ml, 14時間) またはTNF α (10 ng/ml, 48時間)処理することによって惹起したアポトーシスは、Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics)及びIn Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics)で解析した。Caspase 3活性は、CaspaseACETM Assay System (Promega)を用いて測定した。

C. 研究結果

1. コア蛋白質によるHCV翻訳抑制の解析

stem-loop IIIId領域を置換変異させた種々の5' UTR配列をルシフェラーゼ遺伝子と連結させたレポーターを作成した。細胞内翻訳アッセイでコア蛋白質の影響を調べた結果、1) ループ構造内のGGG配列をCCCへ置換するとコア蛋白質による翻訳抑制が消失すること、2) bulge-loop構造を直線化してもコアの影響は維持されること、3) コアの影響は遺伝子型1a, 1bだけでなく2a, 2bの配列でも認められること、などが明らかとなった。さらに、コア蛋白質とRNAとの結合を解析したところ、GGG変異体 (前述 1) の変異で、コアとの結合能が顕著に低下することがわかつ

た。

2. 誘導型コア蛋白質発現系を用いたアポトーシス抑制機構の解析

樹立したHep191細胞は、Ponasterone Aの濃度依存的にコア蛋白質を誘導発現するが、その発現レベルは、C型肝炎患者の肝組織中とほぼ同等であった (50~1500 pg/mg total protein)。また、非誘導下では、発現を認めなかった。このHep191細胞を用いて、コア蛋白質の誘導に伴って発現が変化する細胞遺伝子をマイクロアレイ法で検索し、発現が2倍以上上昇または低下する遺伝子20種類を同定した。この中には、4種類のアポトーシス関連遺伝子が含まれており、これらについて半定量的RT-PCRで確認を行った (図2)。Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) とDefender against cell death 1遺伝子の発現が上昇し、TNF receptor 1とCytochrome c oxidase遺伝子の発現が低下していた。このHep191細胞を用いて、抗Fas抗体またはTNF α で惹起されるアポトーシスに対するコア蛋白質の影響を調べたところ、コア発現細胞では、細胞DNAの断片化が抑制され、caspase 3活性が低下していた。

D. 考察

1. コア蛋白質によるHCV翻訳抑制の解析

5' UTR stem-loop IIIId領域の置換変異体を用いた実験から、コア蛋白質によるHCVの翻訳抑制作用は、stem-loop IIIId RNAとの結合能とよく相関しており、特にループ構造のGGG配列が重要であることが示唆された。HCV感染後、ゲノムRNAから翻訳されたウイルス蛋白質が蓄積されるに従い、コアと結合したHCV RNA分子が増加する。それにより翻訳効率が低下する、といったHCV複製における負の制御機構が考えられる。

HCVの翻訳を制御しているIRES領域と結合する宿主因子は、これまでに数種類報告されているが、stem-loop IIIId領域との結合蛋白質は知られていない (図1)。現在、この領域と結合し、

翻訳調節に関与する宿主因子を検索している。

2. 誘導型コア蛋白発現系を用いたアポトーシス抑制機構の解析

Hep191細胞を用いたcDNAマイクロアレイ及び半定量的RT-PCR解析より、4種類のアポトーシス関連遺伝子の発現変化が明らかとなり、その変動パターンから、コア蛋白質の発現により抗アポトーシス状態がおこっている可能性が考えられた。実際、コア蛋白発現下では、細胞DNAの断片化が抑制され、caspase 3活性の低下が観察された。

caspase 3はICADを切断すること、ICADは、Caspase-Activated DNase (CAD)と結合し阻害的に働くが、caspase 3による切断に伴い、CADが核移行しDNAを断片化させること、が知られている。caspase 3/ICAD経路を介したコア蛋白質による新たなアポトーシス抑制機構の存在が示唆された(図3)。

E. 結論

- (1) HCVゲノムRNAとコア蛋白質との結合には、5'UTR stem-loop III領域、特にループ構造のGGG配列が重要であることを見出した。
- (2) コア蛋白質によるHCV翻訳抑制作用は、5'UTR RNAとの結合効率とよく相関する。
- (3) ヒト肝癌由来細胞でコア蛋白質を誘導発現する細胞株を樹立し、コア蛋白質によるアポトーシス調節作用を解析した。コア蛋白質が、caspase 3/ICAD経路に作用するアポトーシス抑制機構を示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R.,

Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937-946, 2002.

2. Dubourdeau M., Miyamura T., Matsuura Y., Alric L., Pipy B., and Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21^{WAF1} down-regulation - effect of transforming growth factor β . *J.Hepatology* 37, 486-492, 2002.
3. Burioni R., Matsuura Y., Mancini N., Tani H., Miyamura T., Varaldo P.E., and Clementi M. Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J.Virol.* 76, 11775-11779, 2002.
4. Miyamura T., and Matsuura Y. Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. (Margolis H.S., Alter M.J., Liang T. J., and Dienstag J. L. ed.) International Medical Press, Atlanta 289-293, 2002.
5. Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y., Someya K., Ohsumi T., Honada M., and Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus, DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302, 433-444, 2002.
6. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Characteristic gene expression in liver cell lines expressing entire polyprotein of hepatitis C virus. *Hepatology* 36, 1431-1438, 2002.
7. Matsui M., Moriya O., Abdel-Aziz N., Matsuura Y., Miyamura T., and Akatsuka T. Induction of

- hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine* 21, 211-220, 2002.
8. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., and Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304, 415-424, 2002.
 9. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 443-447, 2003.
- ## 2. 学会発表
1. Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T. Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.
 2. Aviel S., Kitzis-Livneh G., Shochat K., Nussbaum O., Landstein D., Miyamura T., Nagamori S., Eren R., Zauberman A., and Dagan S. A cell-based assay for evaluation of anti-viral agents against HCV. *ibid.*
 3. Sasano T., Shimoike T., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Characteristic bases in HCV 5'UTR among genotypes identified by principal component and multidimensional scaling analyses. *ibid.*
 4. Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Machida S., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein. *ibid.*
 5. Kimura-Someya T., Ishii K., Miyamura T., and Matsuura Y. Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum. *ibid.*
 6. Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway. *ibid.*
 7. Tsutsumi T., Matsuda M., Moriya K., Miyoshi H., Fujie H., Shintani Y., Koike K., Suzuki T., and Miyamura T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein. *ibid.*
 8. Matsui M., Moriya O., Abdel-Aziz N., Matsuura Y., Miyamura T., and Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with a replication-defective recombinant adenovirus. *ibid.*
 9. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Miyoshi H., Koike K., Miyamura T. Activation of mitogen-activated protein kinases in the liver of transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. AASLD 53rd Annual Meeting, Boston, USA, November 1-5, 2002.
 10. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第38回日本肝臓学会総会, 2002年6月, 大阪.
 11. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランス

ジェニックマウスの肝臓内における MAPK
の活性化の検討. 第 61 回日本癌学会総会.
2002 年 10 月, 東京.

12. 森石恒司, 岡林環樹, 中井康介, 鈴木亮介, 宮村達男, 松浦善治. HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構. 第 50 回日本ウイルス学会総会. 2002 年 10 月, 札幌.
13. 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男. 弱毒ワクシニアウイルス DIs を用いた C 型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 同上.
14. 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男. HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の検索. 同上.
15. 林 昌宏, 谷 英樹, 鈴木健介, 菰田泰正, 森石恒司, 鈴木亮介, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治. HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプ VSV の感染初期過程の解析. 同上.
16. 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治. C 型肝炎ウイルス E1 エンベロープタンパク質の小胞体における膜トポロジー. 同上.
17. 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.
18. 中井康介, 森石恒司, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治. C 型肝炎ウイルス E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析. 同上.
19. 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 馨, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C 型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上.
20. 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治. PA28₂ による C 型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 第

25 回日本分子生物学会, 2002 年 12 月, 横浜.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
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HCVコア蛋白質によるインターフェロン（IFN）応答刺激配列（ISRE）の活性化機構について解析した。大腸菌の発現系でチオレドキシンの融合蛋白質として発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸がHCVのエンベロープE2蛋白質への最小結合領域であることを昨年度までに見い出していたが、今年度は、マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として大腸菌で発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸がヒト肝細胞におけるHCV感染に対する防御活性を有することを明らかにした。昨年度までにHCVコア蛋白質がIFNによる発現誘導される2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子を転写レベルで活性化することを見い出していたが、今年度はこの活性化がISREを介して起こることを明らかにし、コア蛋白質のアミノ末端部20アミノ酸がこの活性化に必須であることを明らかにした。さらに、コア蛋白質はISREのconsensus配列よりもvariant配列に対して強く作用することを見い出した。

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解析を進めた結果、大腸菌の発現系でチオレドキシンの融合蛋白質として発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸がHCVのエンベロープE2蛋白質への最小結合領域であることを昨年度までに明らかにした。しかしながら、精製したチオレドキシンの融合蛋白質の培養肝細胞に対する細胞毒性のために、HCV感染に対する感染防御活性を確認するには至らなかった。今年度は、ヒトLFの600-632番目の33アミノ酸のE2蛋白質に対する結合特異性やHCV感染防御活性を調べるために、マルトース結合蛋白質（MBP）との融合蛋白質として大腸菌で発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸を作成し、以下に示す実験を行った。

これと並行して本年度は、HCVの増殖制御機構に関わると考えられるHCVコア蛋白質による2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）遺伝子の活性化機構についても解析した。

B. 研究方法

(1) ヒトLFの600-632番目の33アミノ酸をMBPとの融合蛋白質として大腸菌で発現させ、アミロース樹脂アフィニティーカラムを用いて精製した。得られたMBP融合ヒトLF（600-632）を用いて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。陰性コントロールとしては、大腸菌で発現させ同様に精製したLF断片を含まないMBP 2を用いた。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。ヒトLFの600から605番目までと625から632番目までのそれぞれのアミノ酸をアラニン残基に変換した発現ベクター（チオレドキシンの融合蛋白質）を構築し、大腸菌の系で発現させ、His tagを利用してアフィニティー精製を行った。得られたそれぞれのチオレドキシンの融合ヒトLF（600-632）変異体のE2蛋白質への結合活性をFar-Westernプロット法により検討した。HCV E2蛋白質を96-well immunoplateに固定し、MBP融合ヒトLF（600-632）をプローブとして、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行った。ライトサイクラーを用いてサイバークリーン法により細胞内HCV RNA量を定量する方法を用いて、ヒト肝PH5CH8細胞におけるMBP融合ヒトLF（600-632）のHCV感染防御活性を測定した。

(2) レトロウイルスベクターpCXbsrを用いて、HCVコア蛋白質のアミノ末端部20アミノ

酸と40アミノ酸を欠く蛋白質を発現するような発現ベクターを構築した。得られたベクターとホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に2'-5'OAS遺伝子プロモーター (-159までを含む)を有するベクターおよびウミシイタケ遺伝子を有する内部標準用ベクター (phRL-CMV)を同時にヒト肝細胞に導入して2日後にそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定した。陽性コントロールとして、完全長のコア蛋白質を発現するベクターを用いた。IFNにより発現誘導されることが知られているGBP-1遺伝子プロモーター (-216までを含む)とPKR遺伝子プロモーター (-234までを含む)についても2'-5'OAS遺伝子プロモーターと同様のレポーターアッセイを行った。ISREのconsensus配列 (AGTTTCACITTC) の5回繰り返し配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) を鋳型としてPCR法を駆使することにより、consensus配列をGGTTTCACITTCCTCに改変したpISRE(V1)-LuciとGGTTTCFTTTCCTCに改変したpISRE(V2)-Luciを作成して、レポータープラスミドとして用いた。ADAR1遺伝子プロモーター (-23までを含む)をHepG2細胞よりPCR法により単離し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入してレポータープラスミドとして用いた。

C. 研究結果

(1) これまでに、大腸菌の発現系でチオレドキシンの融合蛋白質として発現させたヒトLFの600-632番目の33アミノ酸がHCVのE2蛋白質に対する最小結合領域であることを明らかにした。精製したチオレドキシンのこの融合蛋白質のHCV感染防御活性を培養肝PH5CH8細胞を用いて調べたが、細胞毒性を示したためにHCV感染に対する感染防御活性を確認するには至らなかった。この原因の一つとして精製過程において必要な界面活性剤の残留によるものではないかと考えられた。このような界面活性剤は通常の透析では完全に除去できないことから、チオレドキシンの融合蛋白質としての解析を断念した。また、E2蛋白質に対する結合性がチオレドキシンの融合蛋白質によるものである可能性を排除する必要もあったことから、MBPとの融合蛋白質を大腸菌を用いて同様に発現させることにした。MBPとの融合蛋白質の精製は界面活性剤のない状態でアミロース樹脂アフィニティーカラムを用いることから、HCV感染防御活性まで測定できるのではないかと考えられた。そこで、pMAL-c2X発現ベクターを用い

てヒトLFの600-632番目の33アミノ酸をMBPとの融合蛋白質として発現させ精製した。得られたMBP融合ヒトLF (600-632)を用いてE2蛋白質をプローブにしてFar-Westernプロットを行った。その結果、MBP融合ヒトLF (600-632)はチオレドキシンの融合ヒトLF (600-632)と同程度にE2蛋白質と結合することが分かった。LF断片を含まないMBP 2はE2蛋白質とまったく結合しないことから、E2蛋白質との結合はヒトLFの600-632番目のアミノ酸によるものであることが明らかとなった。また、Far-Western blot法以外の方法によっても結合活性を確認する必要があることから、得られたMBP融合ヒトLF (600-632)をプローブとして96-well immunoplateに固定したE2蛋白質に対してELISA assayを行った。その結果、MBP融合ヒトLF (600-632)用量依存的にE2蛋白質に結合することが確認された。

次に、MBP融合ヒトLF (600-632)を用いてHCV感染防御活性を測定した。昨年度、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の定量システムを構築済みであったことから、この方法を用いてヒト肝PH5CH8細胞におけるMBP融合ヒトLF (600-632)のHCV感染防御活性をヒトLFと比較した。陰性コントロールとして用いたLF断片を含まないMBP 2は期待したように、細胞毒性を示さず、HCV感染防御活性も認められなかった。これに反して、MBP融合ヒトLF (600-632)は用量依存的にHCV感染防御活性を示し、IC₅₀は1 mg/ml程度であった。しかしながら、ヒトLFのIC₅₀は0.4 mg/mlであることから、分子量から換算して、MBP融合ヒトLF (600-632)のHCV感染防御活性はヒトLFに比べて数倍弱いことも明らかとなった。

しかしながら、ヒトLFの600-632番目のアミノ酸配列がE2蛋白質との結合性に最適ではない可能性もあることと、これまでの解析結果からヒトLFの600-605番目と628-632番目のアミノ酸がE2蛋白質との結合に重要であることが示唆されていたことから、どのアミノ酸が結合に重要であるかを調べるために、ヒトLFの600から605番目までと625から632番目までのそれぞれのアミノ酸をアラニン残基に変換したチオレドキシンの融合ヒトLF (600-632)変異体を作成した。得られた変異体を用いてE2蛋白質への結合活性をFar-Westernプロット法により検討した。その結果、628番目のシステイン残基を欠くと、E2蛋白質にはまったく結合しないことが分かった。また、626,627,629および630番目の残基をアラニンに変えるとE2蛋白質との結合性は強くなるこ

とを見い出した。この結果から、ヒトLFの600-632番目のアミノ酸配列はE2蛋白質との結合において至適化された配列ではないことが分かった。

(2) これまでにHCVの遺伝子型やウイルス株にかかわらず、HCVコア蛋白質がIFNにより誘導される2'-5'-OAS遺伝子を転写レベルで活性化することをヒト不死化細胞PH5CH8細胞を用いて明らかにしている。今年度はその活性化機構について解析した。コア蛋白質のどの部分がこの活性化に重要であるかという点に関しては、これまでにC末端部や内部を20アミノ酸欠失させた変異体を用いて検討したが、どの欠失体でも低下はするものの多少の活性化能が残ることから、今回はN末端部を欠失させた変異体を用いてレポーターアッセイ法により検討した。その結果N末端部20アミノ酸を欠いたコア蛋白質には2'-5'-OAS遺伝子プロモーターに対する活性化能がないことが分かった。また、N末端部20アミノ酸を欠いたコア蛋白質存在下でも、本来のコア蛋白質の活性化能は失われないことから、N末端部20アミノ酸を欠いたコア蛋白質はドミナントネガティブには作用しないことが分かった。N末端部20アミノ酸を欠いたコア蛋白質も核膜周辺部に局在しており、本来のコア蛋白質と細胞内局在に変化はみられなかった。これらの結果から、コア蛋白質のN末端部20アミノ酸が2'-5'-OAS遺伝子の活性化に重要であることが示唆された。コア蛋白質による2'-5'-OAS遺伝子の活性化はIFNによりさらに顕著になることから、プロモーター内に存在するISRE配列を介しているものと推定された。そこで、ISREのconsensus配列を有するPKR遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼレポータープラスミドを構築して検討したところ、予想外にコア蛋白質による活性化の度合いは低いことが明らかとなった。そこで、IFNにより誘導される遺伝子プロモーター内に存在するISREの配列を比較したところ、2'-5'-OAS遺伝子プロモーター内にISREは1塩基短く配列もconsensus配列とは3塩基異なっていることが分かった。これらの塩基配列の違いがコア蛋白質による活性化能の違いに寄与しているかどうかを調べるために、ISREのconsensus配列 (AGTTTCACTTCCC) の5回繰り返し配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) とpISRE-Luciを鋳型としてPCR法により、consensus配列をGGTTTCACTTCCTCとISREとは機能しないと思われる配列に改変したpISRE(V1)-Luciと2'-5'-OAS遺伝子と同じ

配列GGTTTCTTTTCCTCに改変したpISRE(V2)-Luciを作成して、PH5CH8細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、pISRE-Luciに比べてpISRE(V2)-Luciの方を効率よくコア蛋白質が活性化することと、pISRE(V1)-Luciではコア蛋白質による活性化能はほとんど消失することが分かった。この結果から、コア蛋白質によるルシフェラーゼの活性化はISREを介していることと、ISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子にみられるようなISRE配列が好まれることが分かった。このような視点に基づいて、2'-5'-OAS遺伝子に存在するISRE配列と同じ配列を有する遺伝子を探したところ、IFNにより誘導される2本鎖RNA特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR1) 遺伝子プロモーター内に存在するISRE配列はGCTTTTCGTTTCCTCであり、2'-5'-OAS遺伝子のものと1塩基しか変わらないことが明らかとなった。そこで、ADAR1遺伝子プロモーターをPCR法により単離して、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入してレポータープラスミドを作成してコア蛋白質により活性化されるかどうかの検討を行った。その結果、コア蛋白質 (少なくとも遺伝子型1bと3a) がADAR1遺伝子プロモーターをも活性化できることが分かった。

D. 考察

(1) E2蛋白質への結合性が認められたヒトLFの600-632番目をMBPとの融合蛋白質として得ることにより、今回、初めてHCV感染防御活性を確認することができた。従って、LFのHCV感染防御活性はE2蛋白質への結合を介して起こっていることが裏付けられた。しかし、LFにくらべると、このLF断片の感染防御活性はかなり低下してしまうことも明らかとなった。けれども、E2蛋白質との結合性に関しては、600-632番目のアミノ酸配列が最適ではないことも分かったことから、このアミノ酸配列を基にして、E2蛋白質により強力に結合するペプチドのscreeningが可能となった。また、この33アミノ酸を繰り返したような人工蛋白質も作成することが可能であることから、今後、さらに工夫を重ねることにより、LF以上のHCV感染防御活性を有するペプチドを開発する道が開けたのではないと思われる。E2蛋白質への結合に重要な領域が明らかになったことから、今後は、この33アミノ酸を指標にして、E2蛋白質のどの部分に結合するのかが検討することができるものと思われる。このような解析による成果は、LFとE2蛋白質との相互作用を正確に理解するばかりでなく、