

20021378

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

肝炎ウイルスによる宿主細胞のがん化
メカニズムの解明に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 宣之

平成15（2003）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

肝炎ウイルスによる宿主細胞のがん化メカニズムの解明に関する研究 ----- 1

加藤 宣之

II. 分担研究報告

C型肝炎ウイルスタンパク質による細胞の増殖変化に関する機能解析 ----- 9

下遠野 邦忠

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----13

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----14

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

肝炎ウイルスによる宿主細胞のがん化メカニズムの解明に関する研究

主任研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：3年計画の1年目にあたる平成14年度は、1) C型肝炎ウイルス(HCV)が宿主側のDNA修復能を低下させる可能性の追究、2) HCV蛋白質による細胞の増殖変化に関する解析、3) HCVの複製増殖制御機構の解析等を軸に研究を行った。HCVのコア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性は、我が国に多い遺伝子型である1bや2a型の場合に顕著に増強されることを示した。このマイクロサテライト不安定性はFeイオン存在下においても増強されることを明らかにした。コア蛋白質発現細胞においてall trans retinoic acidの処理により細胞のアポトーシスが亢進することを見い出した。この現象の機構解析により、コア蛋白質が核内受容体RAR α に対して転写抑制的に作用する新規因子Sp110bと会合することを見い出した。インターフェロン α や β に著しく抵抗性を示すHCVレプリコン複製細胞の単離に初めて成功した。

分担研究者 下遠野 邦忠
京都大学ウイルス研究所・所長

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の数十年に亘る持続感染が肝発がん重要な要因であることがこれまでの研究で示されているが、早期の肝がん組織において共通した特定のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常は認められておらず、依然として肝発がん機構の詳細は不明である。我々は、HCV

感染増殖により生じるHCV蛋白質が細胞にとって異質な分子となり、それ自体が宿主側の遺伝子の不安定性や細胞増殖の変化を徐々にもたらすように作用し、最終的な肝発がんに至るのではないかという発がん機構を想定している。また、HCVの持続感染状態を維持するために、HCVが感染に対する生体防御機構である免疫、特にインターフェロンシグナル伝達系の機能低下を引き起こしている可能性も想定している。そこで、我々は、これらの点を実験的に検証

できると考えられる幾つかのシステムを構築して詳細に実験を行うことにより、肝発がんのメカニズムの解明に迫るとともに、得られた研究成果を肝発がんの予防に役立てることを目的としている。

B. 研究方法

(1) ヒト不死化肝細胞やヒト大腸がん細胞を用いてこれまでに開発したマイクロサテライト不安定性を定量的に測定できる新しいアッセイ系を用いて解析を行った。このアッセイ系の基本原理は以下の通りである。pCXpur レトロウイルスベクターのピューロマイシン抵抗性遺伝子の5'側にCAの17回繰り返し配列を挿入することによりピューロマイシン抵抗性遺伝子のATGからの翻訳がすぐ停止してしまう(out of frameの状態)ようになるように作成したレトロウイルスベクターを使用した、CA repeatのどこかで欠損や挿入が起ってin frame状態になるとピューロマイシン抵抗性遺伝子産物が産生されるようにアレンジされている。HCV コア蛋白質を恒常的に発現しているヒト不死化肝細胞を用いたアッセイ系において出現するピューロマイシン抵抗性のコロニー数を測定する。コア蛋白質を発現している細胞において生じるコロニー数の増減をもってコア蛋白質の効果とする。

培養細胞を用いた塩基除去修復活性に関するアッセイ系は以下のような基本原理に従い構築した。アンピ

シリン耐性(Amp^r)遺伝子と任意の位置に8-oxoG:Cの修飾が施されたプラスミド(Fox Chase Cancer Center, USAの松本吉博博士より供与された)とテトラサイクリン耐性(Tet^r)遺伝子を有するプラスミドを、培養細胞に導入する。数時間培養後、細胞より核を回収する。得られた核画分よりプラスミドDNAを回収し、Fpg DNAグリコシダーゼ、ExoIIIおよびmung bean nucleaseで処理して、修復されずに残ったプラスミドDNAを消化する。その後、大腸菌DH10BにプラスミドDNAを導入してアンピシリン含有プレートとテトラサイクリン含有プレートに同じ量の大腸菌をまき、出現してくる耐性コロニーの数をそれぞれ測定する。得られたアンピシリン耐性コロニーの数をテトラサイクリン耐性コロニーの数で割って得られた数を修復効率とする。コア蛋白質発現細胞において修復効率に差が認められるか否かをもってコア蛋白質の効果調べることができる。

(2) コア蛋白質発現プラスミドを培養細胞内に導入して、恒常的に産生しているコア蛋白質の発現量が異なる細胞コロニーを分離し樹立する。得られるコア蛋白質産生細胞を用いて種々の薬剤処理による細胞の増殖が、コア蛋白質の有無でどのように変化するかを観察する。

コア蛋白質に会合する細胞側蛋白質の単離を酵母のtwo-hybrid系を用いて行う。コア蛋白質と会合する蛋白質の機能解析を行い、コア蛋白質と会合する蛋白質の機能からコア蛋白質の機能を推定する。

(3) 我々が独自に開発したHCVサ

ブジェノミックレプリコン複製細胞 (50-1) に 100 IU/ml のインターフェロン α を 4-5 日置きの添加を数カ月間に渡って繰り返したり、細胞よりサブジェノミックレプリコン RNA を含む総 RNA を回収して、再度ヒト肝細胞内に導入して G418 抵抗性の細胞のコロニーを形成させることにより、インターフェロン α に抵抗性を示す HCV レプリコン複製細胞の単離を試みる。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのためには、倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究結果

(1) これまでに、1b 遺伝子型の HCV コア蛋白質がヒト不死化肝細胞 (PH5CH8) においてマイクロサテライト不安定性を 2-3 倍増強することを見い出している。今回、このような効果が他の遺伝子型由来のコア蛋白質によっても観察されるかどうかについて検討した結果、マイクロサテライト不安定性のコア蛋白質による増強効果は 1b 型の場合が最も顕著であるが、2a 型の場合においても認められることが分った。しかしながら、1a、2b、3a 型由来のものではほとんどこのような効果は認められなかった。また、このマイクロサテライト不安定性は 100 μ M の Fe イオン存在下で 1.5 倍程度増強さ

れることも観察された。この現象の分子機序の一つとして、コア蛋白質がミスマッチ修復系に関わる遺伝子群 (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, hMSH3, hPMS1) の発現量を低下させていることが想定されたが、RT-PCR 法により調べた限りにおいては、コア蛋白質を発現している細胞でこれらの遺伝子群の発現が低下しているという現象は認められなかった。また、我々が用いているヒト不死化細胞では、不死化細胞樹立の際に使用した SV40 ラージ T 抗原により p53 の機能が低下していると考えられたことから、p53 の機能低下がマイクロサテライト不安定性をもたらす可能性を検討するために、p53 を欠損している Saos-2 細胞を用いて同様にアッセイを行ったが、マイクロサテライト不安定性はまったく認められず、コア蛋白質を発現させても我々のアッセイ系ではマイクロサテライト不安定性を確認することはできなかった。また、最近我々が独自に開発した HCV サブジェノミックレプリコン細胞を用いて同様の検討を行ったが、この細胞は Replication error が陰性の表現型を示すことが分ったことから、このアッセイに適した細胞ではないことが分った。

8-oxo グアニンに関する塩基除去修復能をヒト培養細胞において測定できるアッセイ系の構築に関しては、得られるデータに若干のばらつきが認められたが、ヒト不死化肝細胞における修復効率を測定することが可能になった。従って、HCV 蛋白質の発現により塩基

除去修復効率にどのような影響が見られるかを今後検討する手段を得ることができた。

(2) コア蛋白質を恒常的に発現する培養細胞を複数得た。これらの細胞におけるコア蛋白質の発現を解析したところ、発現量に違いが観察されたので、発現量の違いに応じて3種類に分類した。コア発現細胞を細胞増殖を制御する種々の因子で処理し、細胞増殖性をアポトーシス感受性で解析した。その結果、all trans retinoic acid

(ATRA) で処理した細胞において顕著にアポトーシスを誘導することが分った。このアポトーシス誘導性はコア蛋白質の発現量と相関していた。ATRA は核内受容体の一つである RAR α 依存的な転写活性を活性化するので、RAR α 結合配列を持つレポータープラスミドを用いて転写活性の解析を行った。その結果、RAR α 依存的な転写活性化の増強がコア蛋白質の発現で観察された。コア蛋白質による RAR α の転写活性化には細胞内でコア蛋白質と会合して転写活性化をあげる働きを持つ介在分子があると考え、酵母を用いた Two-hybrid 法を用いてコア蛋白質と会合する蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、RAR α の転写活性を上げる候補蛋白質として Sp110b が得られたため、この遺伝子の機能解析を行った。その結果、コア蛋白質が RAR α 依存的転写活性に抑制的に作用する Sp110b と会合することにより、RAR α 依存的転写活性の高進が引き起こされていることが明らかとなっ

た。RAR α 依存的転写活性の高進という現象は、コア蛋白質が Sp110b と会合することにより Sp110b の細胞内局在性が核から細胞質に変わり、Sp110b による RAR α 依存的転写活性の抑制が解除されることによるものであることが示唆された。また、ATRA 処理により誘導されるアポトーシスに参与する遺伝子として RAR α の下流に存在する tissue trans-glutaminase 遺伝子が得られた。

(3) インターフェロン α を持続的に数カ月間作用させ経代を繰り返すことにより、若干インターフェロン抵抗性の様相を示すことになったことから、細胞よりレプリコン RNA を回収して、元の細胞に再度導入して G418 抵抗性の細胞コロニーを多数得た。これらのコロニーをプールして、インターフェロン α の濃度を徐々に増加させ、生き残ってくる細胞コロニーの選択作業を行った。その結果、最終的にインターフェロン α (2,000 IU/ml) に抵抗性を示す5クローンが得られた。また、インターフェロン β は α よりも強い HCV ゲノム複製抑制活性を示したが、インターフェロン β (1,000 IU/ml) に対しても抵抗性を示すクローンが4種類得られた。このようなインターフェロン抵抗性が HCV ゲノムの変異に由来するのか、或いは細胞側因子に由来するのかについては、現在解析中であり、今後明らかにする予定である。

D. 考察

(1) 不死化肝細胞においてマイクロサテライト不安定性が認められる原

因として、不死化肝細胞内で発現している SV40 ラージ T 抗原による p53 の機能低下が考えられたが、p53 を欠損している Saos-2 細胞においてもマイクロサテライト不安定性が認められなかったことから、マイクロサテライト不安定性の出現に p53 の機能状態は関与していないことが示唆された。コア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性の増強効果が我が国に多い遺伝子型である 1b 型に顕著に認められた事は、我が国に多発している肝がん患者における 1b 型の比率が高くなっているという現象と合致しているように思われる。この現象の分子機序についての解析も行ったが、コア蛋白質がミスマッチ修復関連遺伝子群の発現量に影響を与えるとさらなる p53 の機能低下を引き起こすというようなものではないことが示唆されたことから、コア蛋白質による効果はコア蛋白質がミスマッチ修復関連酵素と相互作用を示して機能低下を導くなどの別の機序によるものではないかと考えられた。

(2) HCV による肝疾患の発症にはウイルス蛋白質による細胞増殖の制御異常が関与するものと考えられる。今年度、コア蛋白質が核内受容体の転写活性を増進させることを明らかにしたことから、この現象は細胞増殖の制御異常に関わるものと考えられる。また、核内転写因子により活性化される細胞側因子は多岐に亘り、その結果細胞増殖も種々に制御されるものと考えられる。今回明らかにした ATRA 添加によるコア蛋白質発現細胞のアポトーシスの誘導は核内

受容体の下流に位置する遺伝子の一つ tissue trans-glutaminase によるものと考えられる。これまでに HCV 感染細胞でホルモンの作用により病態が変化するという報告は多くないが、HCV 感染とレチノイドとが密接に関連することを示唆している。今後この様な方面からの研究が重要であると考えられる。

(3) これまでに開発された HCV レプリコン細胞はすべてインターフェロンに高感受性であることから、実際の肝炎患者体内に存在するインターフェロン抵抗性の HCV に対する抗ウイルス剤のスクリーニング系とはなりにくい面があったが、今回単離に成功したインターフェロン抵抗性レプリコン細胞はインターフェロンの改良或いは併用を目的とした薬剤の有用なスクリーニング系になるのではないかと考えられる。今後、このインターフェロン抵抗性の分子機序を分子生物学的手法を用いて明らかにすることにより、HCV を効率よく排除する新たな方法の開発につながるものと期待される

E. 結論

(1) コア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性の増強は、我が国に多い遺伝子型である 1b や 2a 型の場合に観察されることが分った。また、このマイクロサテライト不安定性は Fe イオン存在下でも増強されることを明らかにした。

(2) コア蛋白質発現細胞において ATRA の処理により細胞のアポトーシ

スが亢進することを見い出した。この現象の分子機序を解析することにより、コア蛋白質が核内受容体 RAR α に対して転写抑制的に作用する新規因子 Sp110b と会合することを見い出した。

(3) インターフェロン α や β に著しく抵抗性を示す HCV レプリコン複製細胞の単離に初めて成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* in press, 2003.
2. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M. and Yosida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of Interferon alpha improves dimethinitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther.* in press, 2003.
3. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 993-999, 2002.
4. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, 56, 107-110, 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*, 56, 141-147, 2002.
6. Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Res.*, 24, 228-235, 2002.
7. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 993-999, 2002.
8. Shimotohno, K., Watashi, K., Tsuchihara, K., Fukuda, K., Marusawa, H., Hijikata, M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J. Gastroenterol.* 37, 50-54, 2002.
9. Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Takada, R., Takada, S., Chiba, T., Shimotohno, K. Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int. J. Cancer.* 99, 681-688, 2002.

学会発表

1. 野崎 昭人、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部における C 型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、平成 14 年、10 月、第 61 回日本癌学会総会、東京

2. 団迫 浩方、長沼 篤、野崎 昭人、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインターフェロンシグナル伝達経路の活性化、平成14年、10月、第61回日本癌学会総会、東京
3. 野崎 昭人、中村 孝志、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部におけるC型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会総会、札幌
4. 団迫 浩方、長沼 篤、中村 孝志、高見 まり香、野崎 昭人、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスコア蛋白質のインターフェロン刺激応答配列に対する転写活性化能、平成14年10月、第50回日本ウイルス学会総会、札幌
5. 高橋 仁、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(full-genome replicon)細胞の構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
6. 保坂 匡洋、土方 誠、岸根 弘依、高橋 仁、熨斗 武、仁尾 泰徳、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス(HCV)full-genome replicon の構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
7. 宮成 悠介、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武志、高橋 仁、仁尾 泰典、保坂 匡洋、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、新規 C型肝炎ウイルス(HCV) Subgenomic Replicon を用いたゲノム複製機構の解析、平成14年10月、第50回日本ウイルス学会 札幌
8. 団迫 浩方、長沼 篤、中村 孝志、高見 まり香、野崎 昭人、加藤 宣之、インターフェロン刺激応答配列を介した C型肝炎ウイルスコア蛋白質の転写活性化能、平成14年12月、第25回日本分子生物学会総会、横浜
9. 中村 孝志、野崎 昭人、長沼 篤、能祖 一裕、下村 宏之、加藤 宣之、肝癌および非癌部におけるC型肝炎ウイルスの準種：コア蛋白質をコードしている領域、平成14年12月、第25回日本分子生物学会総会、横浜
10. 野崎 昭人、中村 孝志、犬童 道治、長沼 篤、高見 まり香、池田 正徳、田中 克明、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスエンベロップ E2蛋白質とヒトラクトフェリンとの相互作用、平成14年12月、第25回日本分子生物学会総会、横浜
11. 野崎 昭人、加藤 宣之、田中 克明、ラクトフェリンの C型肝炎ウイルス (HCV) E2 エンベロップ蛋白質結合領域の同定、平成14年12月、第10回浜名湖シンポジウム、浜松
12. 高橋 仁、岸根 弘依、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、土方 誠、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(subgenomic replicon)細胞の抗ウイルス剤スクリーニングに対する有効性の検討、平成14年、3月、第12回抗ウイルス化学療法研究会、東京
13. 松本美貴子、土方 誠、下遠野 邦忠、HCVNS5A タンパク質と相互作用する宿主細胞因子の検索、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
14. 川田 早苗、有海 康雄、下遠野 邦忠、Tax 発現細胞における p21(Waf1/Cip1)の機能、平成14年12月、第25回日本分子生物学会年会、横浜

15. 宮成悠介、土方 誠、保坂匡洋、
山路剛史、高橋 仁、岸根弘依、
下遠野邦忠、C型肝炎ウイルス
RNA ゲノム複製機構の解析、平
成 14 年、12 月、第 25 回日本分子
生物学会年会、横浜

H. 知的財産権の出願・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

厚生科学研究費補助金（肝炎など克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスタンパク質による細胞の増殖変化に関する機能解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所 所長

研究要旨：HCV 蛋白質はウイルスの複製に働くばかりでなく、感染細胞の増殖を制御する可能性が示唆されている。本研究においては HCV 蛋白質のうちコアに注目して細胞増殖に及ぼす役割を解析した。その結果、コア蛋白質発現細胞においては all trans retinoic acid(ATRA)の処理により細胞のアポトーシスが亢進することを発見した。アポトーシス亢進の機構をさらに解析することにより、コア蛋白質が核内受容体に対して転写抑制的に作用する新規因子と会合を発見した。また、核内受容体の活性化とアポトーシスとの関連についても考察した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染による慢性肝炎の発症には宿主免疫機構の活性化による感染細胞の監視による細胞死、それに伴う肝臓細胞の再生が主たる原因であると考えられているが、その機構の詳細は不明である。HCV 蛋白質を産生する細胞においては、細胞の増殖様式が非産生細胞に比べて異なることが観察されている。従って、慢性肝炎発症には宿主免疫による場合に加えてウイルス蛋白質による細胞増殖制御が相加的あるいは相乗的に作用する必要がある可能性がある。本研究ではウイルスタンパク質が細胞増殖に及ぼす効果とその機構を明らかにしつつ、HCV 感染による病気発症の予防に向けた研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV 蛋白質を恒常的に産生する細胞株の樹立。

コア蛋白質を恒常的に産生する細胞を得るために、コア蛋白質発現プ

ラスミドを細胞にトランスフェクトする。この細胞を継代培養し、コア蛋白質発現量の異なる細胞コロニーを分離する。

(2) コア蛋白質産生細胞を用いて種々の薬剤処理による細胞の増殖が、コア蛋白質の有り無しでどのように変化するかを観察する。

(1) で得られた細胞について増殖特性を調べる。通常の状態では増殖に対して顕著な違いを示さないので、細胞増殖を制御する因子を培地に投与しそれによる細胞増殖をコア蛋白質発現細胞と非発現細胞とで比較する。

(3) コア蛋白質に会合する細胞側蛋白質の単離と機能解析

コア蛋白質と会合する細胞側蛋白質の単離を酵母の two-hybrid 系を用いて行う。

(4) コア蛋白質と会合する蛋白質の機能から推定されるコア蛋白質の機能解析。

コア蛋白質と会合する蛋白質の機能解析を行うと同時に、コア蛋白質の細胞増殖へ及ぼす役割を明らかに

する。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究成果

(1) コア蛋白質を産生する細胞株の樹立。

コア蛋白質を発現する遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドをトランスフェクトした培養細胞を G418 で選択し、複数のコロニーを得た。それぞれコロニーに由来する細胞のコア蛋白質の発現を解析したところ発現量に違いが観察されたので、発現量の違いに応じて3種類に分類した。

(2) コア発現細胞を細胞増殖を制御する種々の因子で処理し、そのときの細胞増殖性をアポトーシス感受性で解析した。その結果 ATRA 処理した細胞においてはコア蛋白質の発現が顕著にアポトーシスを誘導することを観察した。このアポトーシス誘導はコア蛋白質の産生と相関しており、コア蛋白質の量が多い細胞ではアポトーシスが起こりやすい。ATRA は核内受容体の一つである RAR α 依存的な転写活性を活性化するので、RAR α 結合配列を持つレポータープラスミドを用いて転写活性の解析を行った。その結果、期待していたように RAR α 依存的な転写活性化の増強がコア蛋白質の発現で観察された。

(3) コア蛋白質と会合する細胞側蛋白質の単離と同定

RAR α はリガンドと会合して核内へ移行し標的遺伝子の転写活性化を行う。一方コア蛋白質の大部分は細胞質の核膜周辺に局在する。従ってコア蛋白質による RAR α の転写活性化には細胞内でコアに会合して転写活性化をあげる働きを持つ介在分子があると考えられた。そのために、コア蛋白質と会合する蛋白質を単離する試みを行った。

酵母を用いた two-hybrid 法を施行してコア蛋白質と会合する蛋白質を単離した。その中から RAR α の転写活性をあげる候補蛋白質を得るために発現プラスミドに候補蛋白質の遺伝子を組み込み、それらを細胞に導入し RAR α 依存的な転写活性を測定したところ、一つの遺伝子にその活性が存在した。その遺伝子を Sp110b と呼びこのものの機能解析を行った。

(4) Sp110b はコア蛋白質と結合すると同時に RAR α にも結合して RAR α 依存的な転写活性を阻害した。

Sp110b を強制発現させると RAR α 依存的な転写活性を抑制した。この状態の細胞にコア蛋白質を産生させると抑制効果が緩和された。次に、コア蛋白質と結合できなくなる Sp110b を作成して同様の実験を行ったが、この場合にはコア蛋白質を産生させた条件でも活性化は見られなかった。従ってコア蛋白質による RAR α 依存的な転写活性化には Sp110b が必要であると考えられ、また、Sp110b の機能がコア蛋白質によるこの転写活性化には必須である事が分かった。すなわち、コア蛋白質は核内に通常時に存在する Sp110b

II. 分担研究報告書

を細胞質側に局在を変える。その結果 RAR α 依存的な転写活性を抑制できなくなると考えられる。

(5) RAR α の下流に存在する tissue transglutaminase (tTG) は細胞のアポトーシスを促進する。

コア蛋白質産生細胞では ATRA 処理によりアポトーシスが誘導されやすくなる事に対して、RAR α の下流遺伝子の中にアポトーシスを起こしやすくする遺伝子の存在が期待された。種々の候補遺伝子を解析してゆく中で、コア産生細胞を ATRA 処理すると tTG の遺伝子の発現促進が観察された。tTG 遺伝子産物の抑制剤を添加した場合アポトーシスはある程度抑制されたので、本遺伝子産物がアポトーシス誘導に関与していると推定された。

D. 考察

HCV による肝疾患の発症にはウイルス蛋白質による細胞増殖の制御異常が存在すると考えられる。本研究ではコア蛋白質が核内受容体の転写活性を増進させることを明らかにした。核内転写因子により活性化される細胞側因子は多岐に亘り、その結果細胞増殖も種々に制御される。ATRA 添加によるコア蛋白質発現細胞のアポトーシスの誘導は核内受容体の下流に位置する遺伝子の一つ tissue trans-glutaminase によるものと考えられる。事実、コア蛋白質の発現によりこの遺伝子の発現が亢進される。これまでに HCV 感染細胞でホルモンの作用により病態が変化するという報告は多くない。分担者がここに報告した研究内容は HCV 感染とレチノイドとが密接に関連するこ

とを示唆している。今後このような方面からの研究が重要であると考えられる。

E. 結論

ウイルス蛋白質が細胞の増殖を種々の機構で修飾していることを示す報告は多くあるが、コア蛋白質がどのような分子機構で細胞の増殖制御に関わるかについてはほとんど知られていない、本研究においては、コア蛋白質が核内受容体の転写を制御していることを示した。またその分子機構についても明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* ;293 :993-999, 2002.
2. Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation., *J Gastroenterol.* 37 : 50-54, 2002.
3. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Takada R, Takada S, Chiba T, Shimotohno K. Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int J Cancer.* 99 : 681-688, 2002.

2. 学会発表

- (1) 高橋 仁、岸根 弘依、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、土方 誠、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(subgenomic replicon)細胞の抗ウイルス剤スクリーニングに対する有効性の検討、平成14年、3月、第12回抗ウイルス化学療法研究会、東京
- (2) 宮成 悠介、土方 誠、岸根弘依、熨斗武志、高橋仁、仁尾泰典、保坂匡洋、杉山和夫、加藤宣之、下遠野邦忠、新規 C型肝炎ウイルス(HCV)Subgenomic Replicon を用いたゲノム複製機構の解析、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (3) 松本美貴子、土方 誠、下遠野邦忠、HCVNS5A タンパク質と相互作用する宿主細胞因子の検索、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (4) 保坂匡洋、土方誠、岸根弘依、高橋仁、熨斗武、仁尾泰徳、宮成悠介、杉山和夫、加藤宣之、下遠野邦忠、C型肝炎ウイルス(HCV)full-genome replicon の構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (5) 高橋 仁、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(full-genome replicon)細胞の構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (6) 川田早苗、有海康雄、下遠野邦忠、Tax 発現細胞におけるp21(Waf1/Cip1)の機能、平成14年12月、第25回日本分子生物学会年会、横浜
- (7) 宮成悠介、土方 誠、保坂匡洋、

山路剛史、高橋 仁、岸根弘依、下遠野邦忠、C型肝炎ウイルス RNA ゲノム複製機構の解析、平成14年、12月、第25回日本分子生物学会年会、横浜

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) Kishine, H. (加藤)	Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	293	993-999	2002
2) Nozaki, A. (加藤)	Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR.	Acta Med. Okayama	56	107-110	2002
3) Alam, S. (加藤)	Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region.	Acta Med. Okayama	56	141-147	2002
4) Hara, K. (加藤)	Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes.	Hepatology Res.	24	228-235	2002
5) Kishine, H. (下遠野)	Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	293	993-999	2002
6) Shimotohno, K (下遠野)	Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation.	J. Gastroenterol.	37	50-54	2002
7) Ueda, Y. (下遠野)	Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts.	Int. J. Cancer	99	681-688	2002

20021378

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.13の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。