

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））

分担研究報告書

遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルスレプリコンの樹立

分担研究者 脇田 隆字

東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門・副参事研究員

共同研究者 宮本 道子、伊達 朋子、加藤 孝宣

研究要旨

RNA レプリコンシステムを利用することにより、C型肝炎ウイルス（HCV）RNA を培養細胞内で効率よく複製することが可能となった。我々は HCV による劇症肝炎から分離したウイルス株を利用して遺伝子型 2a の HCV RNA レプリコンの樹立に成功した。このシステムはウイルスの複製機構や、遺伝子型による病態および薬剤感受性の違いの解析に有用であると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）にはこれまで良いウイルス培養系がなかったが、RNA レプリコンシステムを利用することにより、ウイルス RNA を培養細胞内で効率よく複製することが可能となった。これまで報告された HCV レプリコンはすべて遺伝子型 1b のクローンをを用いているが、他の遺伝子型での報告はない。我が国の HCV 感染者の 7 割が 1 型、3 割が 2 型のウイルスに感染していると考えられていて、遺伝子型の違いによりインターフェロンに対する感受性や病態の違いがある。そこで、我々は遺伝子型 2a の HCV 株を用いて、RNA レプリコンの樹立を試みた。

B. 研究方法

遺伝子型 2a の HCV cDNA は劇症肝炎および慢性肝炎よりクローニングした。Lohman らの報告に基づきプラスミド DNA に構築した。このプラスミドから合成した RNA を Electroporation 法により HuH7 肝癌細胞に導入し、G418 により選択培養をおこなった。3 週間後にコロニー形成率を判定した、また、一部の細胞はクローニングしてレプリコン RNA 持続複製細胞として樹立し、HCV タンパク質の発現、RNA の検出、DNA の組み込みの有無、複製している HCV RNA の遺伝子配列などを検討した、

C. 研究結果

劇症肝炎株からは効率よくレプリコン複製細胞を樹立できたが、慢性肝炎から分離した HCV クローンではできな

かった。劇症肝炎クローンから樹立したレプリコン複製細胞から HCV タンパク質および RNA を特異的に検出した。また、DNA の組み込みは検出できなかったことから HCVRNA が自律的に複製していると考えられた。さらにレプリコン RNA を RT-PCR 法により増幅し、その遺伝子配列を決定した、レプリコン RNA にはアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が見いだされるものがあった。

#### D. 考察

HCVRNA は劇症肝炎クローンを用いることにより効率よく複製できることが判明した。劇症肝炎と慢性肝炎クローンを比較することにより、効率の良い HCVRNA 複製に重要なウイルス遺伝子配列を明らかに出来ると考えられた。さらに遺伝子型 2a の HCV レプリコンと従来の 1b のレプリコンを比較することにより、ウイルス複製の効率や抗ウイルス薬に対する感受性の違いなどを分子レベルで解析できると考えられた。

#### E. 結論

遺伝子型 2a の HCV レプリコンを樹立することができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date

T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of Hepatitis C Virus Core Protein is regulated by its C-terminal Sequence.

J Med Virol 2003 69:357-366

2) Zhao Z, Wakita T, Yasui K. Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice

J Virol 2003 in publication

3) Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, Takano T, Kohara M, Takahashi H. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes

BBRC 2003 in publication

#### 2. 学会発表

1) 脇田隆字、加藤孝宣、伊達朋子、宮本道子 遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルス RNA レプリコンの樹立 平成 14 年 12 月、第 25 回日本分子生物学会年会、横浜

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））

分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染系の確立と増殖制御に関する研究

分担研究者 東京都臨床医学総合研究所 感染生体防御研究部門

室長 小原道法

研究要旨

HCV の全長 cDNA clone から再構成したウイルスをツパイに感染させ、長期にわたり経時観察し、感染の様態と病原性の評価を試みた。ツパイは HCV の持続感染が成立し、ヒトと同じように慢性肝炎から肝硬変へと進行することが長期の観察により初めて示された。また、HCV 全長遺伝子より再構築したウイルス粒子が感染増殖性を示したことから、この感染系およびレプリコンの系を用いて抗ウイルス活性物質の検討を行った。

A. 研究目的

ウイルスの病原性や免疫原性を評価するためには感染実験動物が欠かせない。HCV は宿主域の狭いウイルスであり、感染することが認められている動物はチンパンジーのみである。しかしチンパンジーは希少かつ高価な動物で利用できる個体数も限られてしまう。ツパイは小型動物で種々のヒト病原ウイルスの感染に対し感受性を示す事が知られている。HCV の全長 cDNA clone をツパイに感染させ、長期にわたり経時観察し、ツパイでのこの clone の感染の様態と病原性の評価を試みた。

B. 研究方法

HCV の全長 cDNA clone から再構成したウイルスをツパイに感染させ、長期にわたり経時観察し、感染の様態と病原性の評価を試みた。また、HCV 全長遺伝子より再構築したウイルス粒子が感染増殖性を示したことから、この感染系およびレプリコンの系を用いて抗ウイルス活性物質の検討を行った。

（倫理面への配慮）

施設内の動物実験委員会において研究計画について承認を受けて実施した。

C. 研究結果

ツパイ血清中 HCV RNA は 60-80 週にわたり、散発的に検出された。このようにツパイは HCV の持続感染が成立するがヒトで見られるような高力価のウイルス血症状態へとは推移せず、宿主免疫系により非常に抑制された状態をとることが示唆された。持続感染が成立した場合、ヒトと同じように慢性肝炎から肝硬変へと進行することが長期の観察により初めて示された。また、感染系およびレプリコンの系から抗ウイルス活性物質も得られている。

D. 考察

ツパイに持続感染が成立した場合、ヒトと同じように慢性肝炎から肝硬変へと進行することが長期の観察により初めて示された。接種後 2 年を待たずに HCV 感染による特異な病変が見られるのだとすれば、小型で寿命の短い動物の利用による優位性を示すものと期待できる。

E. 結論

今後、ウイルス持続感染複製を担うウイルス側および宿主側因子を同定し、ウイルスおよび宿主側因子との相互作用を明らかにすべく研究を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasushi Shimoda, Youichi Tajima, Michinori Kohara, Takashi Yutaka Sanai. Pax-6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating 1,3-fucosyltransferase IX expression. *J. Biol. Chem.* (2002) 277:2033-2039.
- 2) Takahito Kashiwagi, Koyu Hara, Michinori Kohara, and Tetsuya Toyoda. Kinetic analysis of C-terminally truncated RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002) 290:1188-1194.
- 3) A. Okayama, S.O. Stuver, E. Tabor, N. Tachibana, M. Kohara, N.E. Mueller and H. Tsubouchi. Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan. *J. Viral Hepatitis* (2002) 9:43-51.
- 4) Takahito Kashiwagi, Koyu Hara, Michinori Kohara, and Tetsuya Toyoda. Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome. *J. Biol. Chem.* (2002) 277:28700-28705.
- 5) Yoshiko Mizukawa, Yoshimi Yamazaki, Hideko Nuriya, Michinori Kohara and Tetsuo Shiohara. Direct Evidence for IFN- $\gamma$  Production by Effector-Memory-Type Intraepidermal T Cells Residing at an Effector Site of Immunopathology in Fixed Drug Eruption: A Model for Epidermal Injury Mediated by Skin Resident T Cells. *J. Amer. Pathol.* (2002) 161:1337-1347.
- 6) Takafumi Yoshida, Toshikatsu Hanada, Ken-ichiro Kosai, Michio Sata, Michinori Kohara, and Akihiko Yoshimura. Activation of STAT3 by the Hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J. Exp. Med.* (2002) 195:641-653.
- 7) Shun Takaku, Yohko Nakagawa, Isao Maruyama, Michinori Kohara and Hidemi Takahashi. Induction of hepatic injury by HCV structural protein-specific CD8+ class I MHC molecule-restricted murine CTLs in transgenic mice expressing the HCV structural genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））  
分担研究報告書

動物モデルを用いた肝発癌に関する研究

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・助教授

研究要旨：肝脂肪化に引き続いて肝細胞癌を発生するC型肝炎ウイルス（HCV）コア遺伝子トランスジェニックマウスをモデルとして、肝発癌のメカニズムを検討した。C型肝炎における肝脂肪化の原因は、 $\beta$ 酸化の障害に加えて肝細胞からのVLDLの分泌障害も要因であることが明らかとなった。ヒト患者においても、アポリポ蛋白を中心とした脂質代謝異常が存在することも明らかになった。また、コア蛋白はレチノイドX受容体 $\alpha$ と結合し、その機能を修飾していることも証明した。この現象はコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいても確認され、C型肝炎における脂質代謝異常から肝発癌へと至る病態のひとつの経路であることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ全く不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア遺伝子がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認している。このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行なう。また、マウス之出で得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行なう。

B, C. 方法と結果

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを用いて、以下のような解析を行なった。  
肝脂肪化(steatosis)と肝細胞癌はC型肝炎の組織学的特徴であり、動物や細胞モデルによって、HCVコア蛋白のこれらの病態

への関与が示されている。そこで、本年度はC型肝炎における肝脂肪化、脂質代謝異常に関して重点的に検討を行なった。

1) CVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝脂肪化の機序の解明。 $\beta$ 酸化の低下が、C型肝炎における肝脂肪化の機序のひとつであることを、我々は既に見出しているが、本年度は、肝からのVLDLの分泌障害が肝脂肪化のもうひとつの機序であることを明らかにした。すなわち、コア遺伝子トランスジェニックマウスでは、肝における microsomal triglyceride transfer protein の活性が低下するためにVLDLの分泌が障害されていた。さらに、肝ヒトアポAII遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとコア遺伝子トランスジェニックマウスを掛け合わせることで、VLDLの分泌は改善した。これは、コア蛋白とアポAII蛋白が結合し、コア蛋白を肝細胞から排出させるためであった。

2) C型慢性肝炎患者における脂質代謝異常を検討するため、B型慢性肝炎患者を対照として血清中のアポリポ蛋白量を測定した。C型慢性肝炎患者ではアポリポ蛋白 C2, C3 の低下を始めとする所見を認め、C型慢性肝炎においても脂質代謝障害の存在することが確認された。

3) コア蛋白が、細胞の増殖、分化や脂質代謝と関連する転写因子であるレチノイドX受容体 $\alpha$  (RXR- $\alpha$ )と結合することを見出した。コア蛋白はRXR- $\alpha$ のDNA結合部位に結合し、RXR- $\alpha$ の反応性因子への結合を強化するように作用していた。細胞レチノール結合蛋白II (CRBP II) とアシルCoAオキシダーゼをレポーターとした検討によって、コア蛋白はRXR- $\alpha$ ホモ2量体に制御される転写活性のみならず、peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\alpha$ とのヘテロ2量体によって制御される転写活性をも増強することが示された。CRBP II 遺伝子は、HCVコア遺伝子トランスジェニックマウス肝においても転写が活性化されていた。これらの結果は、RXR- $\alpha$ に制御される遺伝子発現のコア蛋白による修飾がHCV感染症の病態に関与していることを示唆している。現在、RXR- $\alpha$ のアゴニスト、アンタゴニストを用いた検討を行なっている。

#### D. 考察

HCVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては初期より脂肪肝が発生し、ヒトC型肝炎における肝細胞癌と同様に、マウスの寿命の後半において肝細胞癌が発生した。コア蛋白の発現によって、脂肪化と

相まって肝内における活性酸素の発生が増強されていた。活性酸素の発生は、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝発癌の少なくとも一部には関与していると考えられる。

肝脂肪化すなわち脂質代謝障害は、肝発癌を含むC型肝炎の病態と密接に関連していることが推測される。VLDL分泌障害のみならず、 $\beta$ 酸化障害、核内受容体との関わりがC型肝炎における脂質代謝障害を引き起こし、ひいてはC型肝炎の病態をもたらしていると考えられる。

#### E. 論文発表

1) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. FASEB J. 16: 185-194, 2002.

2) Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Retinoid X Receptor- $\alpha$  Modulates its Transcriptional Activity. Hepatology 35:937-946, 2002.

3) Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. J Gastroenterol 37:55-64, 2002.

4) Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of

hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis.

J Gastroenterol Hepatol. 17:394-400, 2002.

5) Koike K. Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine. J Gastroenterol 37:988-990, 2002.

6) Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K. HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. Transfusion 42:1616-1617, 2002.

7) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Alteration of Intrahepatic Cytokine Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. Virology 304:415-424, 2002.

8) Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Molecular Mechanism of Viral Hepatocarcinogenesis. Oncology 62: 29-37, 2002.

コホートをを用いた HCV による肝細胞障害機序の解明  
分担研究者 坪内博仁、宮崎医科大学第二内科教授

研究主旨

HCV 抗体陽性 T 町住民 1,083 名（男 415 名、女 668 名、平均年齢 70 才）の追跡調査により、C 型肝炎ウイルスによる肝細胞障害機序を明らかにすることが本研究の目的である。今年度は 6 回以上受診歴のある住民を肝機能持続正常群と持続異常群に分けて、年齢、性、HCV コア抗原量、HCV 群別および HCV core 領域の quasispecies の比較と、HLA タイピングを行った 94 名（HCV-RNA 陽性 52 例、陰性 42 例）で HCV-RNA の有無と HLA の相関を見た。

A. 研究目的

本研究の目的は、C 型肝炎ウイルス（HCV）高侵淫地区の T 町住民の追跡調査により、HCV による肝細胞障害機序を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象者は HCV 抗体陽性宮崎県 T 町住民 979 名（H13 年度死亡または町外転出者を除く）に、今年度の節目検診で HCV 抗体陽性が新たに判明した 15 名を加えた 994 名（男性、女性名）。

検診項目：食生活、喫煙歴、飲酒歴、既往歴などの質問票。CBC、血液生化学検査、腫瘍マーカー、線維化マーカー、第三世代 HCV 抗体価（ルミバルス II オート HCV；CLEIA）、HCV コア抗原（オート HCV 抗原 IRMA）、HCV-RNA 定性（RT-PCR 法）、HLA class I および class II タイピング、腹部超音波検査、宿主の免疫学的検査を行い、以下の検討を行った。

- 1) 肝機能検査を 6 回以上受けた HCV-RNA 陽性の 314 名の住民を肝機能持続正常群と肝機能持続異常群に分けて、年齢、性別、HCV コア抗原量、HCV 群別、HCV コア領域の quasispecies の比較を行った。
- 2) HCV-RNA の持続感染と相関する HLA がどうか検討した。昨年度までの HCV-RNA の結果より、HCV-RNA 陽性者 50 名、陰性者 50 名（両群とも男女 25 例）を抽出し、HLA class I, class II を測定した。

倫理面の配慮

倫理面の配慮に関しては昨年度の報告書に記載した。

C. 研究成果

- 1) 検診結果：①検診対象者 994 名（男性 387 名、女性 607 名）中、今年度の参加者は 700 人（70%）、男 262 名、女 438 名。採血を 674 名で実施し、問診表は 697 名から得られ、699 名が腹部超音波検査を受けた。②HCV 抗体陽性者は 613 名で、抗体陽性者の中で HCV RNA 陽性者は 440 名（71.7%）であった。HCV 抗体価と HCV コア抗原、HCV-RNA 陽性率の相関を表 1 に示した。低力価群を 5.0 以下と定義した場合、ウイルス陽性者はいなかった。HCV コア抗原検査の感度は 96.5% と非常に高かった。（HCV コア抗原の感度は 84.5%；表 2 参照）③40 名が肝内腫瘍病変

を指摘され、二次精査中である。昨年度は肝内腫瘍病変を指摘された 39 名の中から、8 名が肝細胞癌の確定診断を受けた。

- 2) 6 回以上検診受診歴のある 314 名の住民のうち肝機能持続正常群は 113 名、持続異常群は 63 名であった。両群間で年齢、コア抗原量に差はなかったが、持続正常群は女性に多く、HCV 群別のグループ 2 の頻度が有意に高かった（表 3）。
- 3) HCV コア領域の quasispecies については、それぞれの群で 3 例ずつ行ったが、両群間で clonality の差がなかった（図 1）。解析数が少なく、さらに症例数を増やして検討している。

HCV-RNA の有無と相関する特定の HLA は class I, class II 共になかった（表 4、5）。

D. 考察

HCV コア抗原検査の感度は 96.5% と非常に高く、検診に有用であると考えられる。節目検診が開始された当初は、HCV 抗体低力価を 10.0 以下と定義し、PCR によるウイルスの check は不要とされていたが、我々の検診では一名だけであるが、HCV 抗体価 8.0 でウイルス陽性者がいた。低力価を 5.0 以下と定義する現在の基準では、1 例もウイルス陽性者がいなかった。しかしながら、サンプル数が 613 と少なく、もう少しサンプル数を増やして検討する必要があると思われた。

HCV による肝細胞障害の要因として、男性、HCV 群別のグループ 1 が関与すると考えられたが、ウイルス量や年齢は影響しなかった。また、今回の検討では HCV core 領域の clonality と肝障害の関連は認められなかったが、解析症例数が 3 例と少なく、もう少し症例数を増やして検討する予定である。今後、direct CTL assay や ELISPOT を用いて、宿主の免疫学的要因を検討する予定である。さらに、昨年度の間診票を基に、食生活、喫煙歴、飲酒歴について、解析を進め、肝障害の危険因子の解明を行う予定である。

92 例の HLA タイピングの検討では、HCV 持続感染と相関する HLA はなかったが、毎年、100 例ずつ HLA タイピングの測定数を増やし、検討を続ける予定である。さらに、来年以降は肝障害との相関を検討する予定である。

## E. 結論

1)肝機能持続正常群と持続異常群間で、年齢、コア抗原量に差はなかったが、持続正常群は女性に多く、HCV群別のグループ2の頻度が有意に高かった。また、HCV core 領域のclonality の比較では、両群間に差はなかった。2)HCV-RNAの持続感染と相関する HLA はなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

第6回日本肝臓学会大会 DDW-J2002

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 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（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））  
（分担）研究報告書

C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変および肝がんの病態解明に関する研究  
（分担） 研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス関連肝がんの発症分子機序を明らかにする目的で、正常肝臓、C型慢性肝炎組織および関連肝がん組織、B型慢性肝炎および関連肝がん組織における包括的な発現遺伝子プロファイルを得た。それぞれの病態における発現遺伝子データベースを作製し、C型慢性肝炎および関連肝がんにおける発現遺伝子の特徴を明らかにした。

A. 研究目的

我が国における肝細胞がんの多くは、HCVの持続感染によって引き起こされる慢性肝炎を背景として発症することが明らかにされている。しかし、その発症にいたる分子機序は十分に解明されていない。本研究では包括的に発現遺伝子解析を行い、慢性肝炎から肝発がんにいたる分子機序を解析する。

B. 研究方法

serial gene expression analysis (SAGE)法を用いて、発現遺伝子解析を行った。正常肝組織、HCV感染慢性肝炎組織、HCV関連肝細胞がん、HBV感染慢性肝炎、HBV関連肝細胞がんについてRNAを調整し、各病態における発現遺伝子プロファイルを得た。得られた情報をデータベース化し、比較を行った。科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、

研究を行った。

C. 研究結果

病態毎に1症例からサンプルを得てSAGEライブラリーを作製し、合わせて157,849発現遺伝子を解析した。HCVおよびHBV感染によって、同じ慢性肝炎あるいは肝細胞がんであってもexpression profileは大きく異なっていた。また正常肝と比較して発現が増加あるいは減少する遺伝子も両ウイルス間で異なっていた。また未知の転写産物が多数見いだされた。

これらのprofileは個人により違ふことが予想され、各病態を代表するプロファイルとするには問題があるため、各病態を示す複数のサンプルを混合し、SAGEライブラリーを作製した。最終的に正常肝のSAGEライブラリーから128,132、HCV感染慢性肝炎組織より99,865、関連肝がんより911,76、HBV感染慢性肝炎より103,550、関連肝がんより79,226発現遺伝子を得た。合わせて10ライブラリー、516,862

発現遺伝子の情報が得られた。

#### D. 考察

HCV と HBV は、同様に臨床的には慢性肝炎あるいは肝硬変を引き起こし、肝細胞がんを合併するが、その過程で発現している遺伝子は異なっており、発がんにいたる機序も異なっている可能性が示唆された。本研究によって、これを解析するデータベースが整備された。

#### E. 結論

SAGE を用いて正常肝、HCV および HBV 感染慢性肝炎および関連肝細胞がんの包括的な発現遺伝子プロファイルが得られた。

#### F. 研究発表

1. K Kawaguchi, S Kaneko, M Honda, H Kawai, Y Shiota, K Kobayashi. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using a DNA microarray method. *J Clin Microbiol.* (in press).
2. Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A\*2402 peptide tetramers. *J. Med. Virol.* (in press)
3. Y Nakamoto, S Kaneko, H Fan, T Momoi, H Tsutsui, K Nakanichi, K Kobayashi, T

Suda. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp.Med* 198(8): 1105-1111, 2002

4. K Masutomi, S Kaneko, M Yasukawa, K Arai, S Murakami, K Kobayashi. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002.
5. Y Shiota, H Luo, W Qin, S Kaneko, T Yamashita, K Kobayashi, S Murakami. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277: 11149-11155, 2002.
6. Keiji, S Kaneko, K Kobayashi. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J Hepatol* 37: 231-239, 2002
7. Y Nakamoto, S Kaneko, K Kobayashi. Increased susceptibility to apoptosis and attenuated Bcl-2 expression in T lymphocytes and monocytes from patients with advanced

- chronic hepatitis C. J Leukocyte Biol 72: 49-55, 2002
8. K Arai, K Masutomi, S Khurts, S Kaneko, K Kobayashi, S Murakami. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for its oligomerization and telomerase activity. J Biol Chem 1-6, 2002.
  9. T Shimazaki, M Honda, S Kaneko, K Kobayashi. Inhibition of Internal ribosomal entry Site-Directed translation of HCV by recombinant IFN- $\alpha$  correlates with a reduced La protein. Hepatology 35:199-208, 2002.

G. 知的所有権の取得状況  
無し

厚生労働省科学研究費 肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）分担研究報告書  
C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究  
分担研究者 森脇久隆 岐阜大学医学部第一内科教授

【研究要旨】 教室で開発した非環式レチノイド（ビタミン A 誘導体）は肝細胞癌に apoptosis を誘導し肝発癌を抑制するが、天然レチノイドは無効であり肝癌はレチノイド不応性となっている。昨年度までにこの肝癌のレチノイド不応性の機序として、ヒト肝癌組織およびヒト肝癌細胞株での Erk によるレチノイド X レセプター (RXR $\alpha$ ) のリン酸化を報告した。このリン酸化 RXR $\alpha$  は転写機能を喪失しており、且つ ubiquitin/proteasome 系による分解を免れて dominant negative に作用するため、正常なレチノイドの細胞増殖抑制作用を阻害し、肝発癌の一機序であると考えられた。今年度は、非環式レチノイドが Ras/Erk 系の活性を阻害することで RXR $\alpha$  のリン酸化を抑制し、機能を回復させる知見を得た。さらに、これにより RXR/RAR の下流に

#### A. 研究目的

我々は、肝発癌にレチノイドの局所的欠乏や代謝異常が関与していることを明らかにしてきた。さらに本研究では、核レセプター側の異常を明らかにする目的で、レチノイドレセプターの機能不全と肝発癌の関連について解明を進めた。加えて、臨床試験にて肝発癌抑制効果が証明されている合成レチノイド（非環式レチノイド）の分子レベルでの機序機序の解明（すなわち機能不全に陥ったレチノイドレセプターの感受性の回復効果）を試みた。

#### B. 研究方法

ヒト肝癌細胞株 (HuH7, JHH7 など 7 種) を用い、レチノイドレセプターの一つである RXR $\alpha$  の Erk によるリン酸化およびその機能に及ぼす非環式レチノイドの効果を、Ras/Erk 系の活性・MAP kinase phosphatase 1 (MKP1) の発現・RXR $\alpha$  のリン酸化および転写活性・下流遺伝子である STAT1 の発現・細胞増殖・apoptosis 誘導を指標に検討した。

#### C. 研究結果

昨年度までの研究により、ヒト肝癌組織・肝癌細胞株では RXR $\alpha$  は Erk によるリン酸化を受け失活化すると同時に、分解を免れ蓄積していることを明らかにした。またこのリン酸化 RXR $\alpha$  は dominant negative に働き、肝癌細胞をレチノイドに

であることを明らかにした。すなわち、非環式レチノイドは STAT1 を転写レベルで誘導し、肝癌細胞の interferon に対する感受性を高め、apoptosis を誘導させた。

#### D. 考察

肝癌細胞は天然レチノイドに対し不応性となっており、レチノイン酸をそのまま治療に用いることは出来ない。昨年度までの研究結果より、その原因の一端は、核レセプター (RXR $\alpha$ ) のリン酸化による機能不全であることが明らかとなった。さらに、リン酸化 RXR $\alpha$  は肝癌細胞内での分解を免れ蓄積することで、正常な RXR $\alpha$  に対して dominant negative に作用することも明らかにされた。

一方、我々が開発した合成レチノイド（非環式レチノイド）は、肝癌細胞に apoptosis を誘導し、臨床でも肝発癌を抑制する。今回、この非環式レチノイドが、RXR $\alpha$  のリン酸化を抑制し、機能を回復することを明らかにし、その分子メカニズムについても解明を進めた。加えて、RXR $\alpha$  が機能停止するとどのような下流の遺伝子の働きが失われ、細胞増殖に抑制がかからなくなるのかを明らかにし、その一つが STAT1 であることを突き止めた。

## E. 結論

非環式レチノイドは、ヒト肝癌細胞株において RXR $\alpha$  の Erk によりリン酸化を抑制し、転写活性能を回復させ、肝癌細胞のレチノイド不応性を解除することを明らかにした。このような機序により、レチノイドは RXR $\alpha$  の下流にある STAT1 等の蛋白を誘導し、肝癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S, Sano T, Akita K, Moriwaki H, Friedman SL, Kijima S. Phosphorylation of retinoid X receptor  $\alpha$  at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 61: 7675-7682, 2001.
2. Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35, 35: 332-340, 2002.
3. Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H: Acyclic retinoid induces partial differentiation, down-regulates telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derived cell lines. *J Hepatol* 36: 660-671, 2002
4. Obora A, Shiratori Y, Okuno M, Adachi S, Takano Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Yamada Y, Akita K, Sano T, Shimada J, Kojima S, Okano Y, Friedman SL, Moriwaki H. Synergistic induction of apoptosis by acyclic retinoid and interferon- $\beta$  in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 36: 1115-1124, 2002
5. Okuno M, Kojima S, Akita K, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Sano T, Takano Y, Takai K, Obora A, Yasuda I, Shiratori Y, Okano Y, Shimada J, Suzuki Y, Muto Y, Moriwaki H. Retinoids in liver fibrosis and cancer. *Front. Biosci.* 7: d204-d218, 2002.
6. Suzui M, Okuno M, Tanaka T, Nakagama H, Moriwaki H: Enhanced colon carcinogenesis in min mice occurs via a mechanism independent of  $\beta$ -catenin mutation. *Cancer Lett* 183: 31-41, 2002
7. Suzui M, Sugie S, Mori H, Okuno M, Tanaka T, Moriwaki H: Different mutation status of the  $\beta$ -catenin gene in carcinogen-induced colon, brain, and oral tumors in rats. *Mol Carcinog* 32: 206-212, 2002
8. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S: Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- $\alpha$ /kallikrein mediated activation of latent TGF- $\beta$ . *Gastroenterology* 123: 352-364, 2002
9. Okuno M, Kojima S, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma – concept, progress and perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 1329-1335, 2001.
10. Okuno M, Sano T, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Akita K, Okano Y, Kojima S, Moriwaki H. Apoptosis induction by acyclic retinoid: A molecular basis of ‘clonal deletion’ therapy for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 31: 359-362, 2001.
11. Okuno M, Moriwaki H, Matsushima-Nishiwaki R, Sano T, Adachi S, Akita K, Kojima S. Retinoid-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma: A molecular basis for ‘clonal deletion’ therapy. In Okita K (ed), *Frontiers in Hepatology: Growth, Proliferation and Apoptosis of Hepatocytes*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 33-39, 2002.
12. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- $\beta$ . *Gastroenterology* 120: 1784-1800, 2001
13. Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H. Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: Impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic necrosis. *Hepatology* 33: 569-576, 2001
14. Okuno M, Akita K, Adachi S, Moriwaki H, Kojima S. Protease inhibitors: Suppression of activation of hepatic stellate cells by inhibiting TGF- $\beta$  generation. In: Asakura H, Aoyagi Y, Nakazawa S (eds), *Trends in Gastroenterology and Hepatology*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 361-361, 2001

HCV 感染回復期血清中の HCV 粒子に対する抗体に関する研究

分担研究者 岡本宏明 自治医科大学助教授

**研究要旨**

免疫沈降法および HCV RNA 定量測定法を用いた、HCV 感染回復期血清中の HCV 粒子に対する抗体の測定法の特異性について検討した。HCV 感染回復期血清中に、HCV の E2 蛋白超可変領域(HVR)のアミノ配列を担う peptide と反応する抗体(HVR 抗体)が存在すること、そして回復期血清より精製した HVR 抗体が HCV 粒子と結合しうることを免疫沈降法および免疫電顕法により実証できた。したがって、以上の結果は前年度から実施してきた免疫沈降法による HCV 粒子に対する抗体測定の特異性を支持するものと考えられた。

**A. 研究目的**

B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染予防については、能動免疫を担う HB ワクチンが開発され、受動免疫を担う高力価ヒト HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG: hepatitis B immune globulin)が用いられ、母児間感染防御や院内感染予防などに於いて期待通りの成果が得られている。それに対して、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染に於いては、このウイルスが多様性に富み、しかもインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス(HIV)のように変異しやすいウイルスであることも一因となり、予防手段の要であるワクチン開発は難航している。受動免疫を担う HCV 中和抗体含有免疫グロブリン製剤、HCIG の研究開発も進んでいない。培養系や発現系によるウイルス粒子の産生は研究途上にあつて、大量入手が困難で、ウイルス粒子表面に対する抗体(中和抗体)をルーチンに測定する系も確立されていないのが現状である。そこで、現時点で実施可能な手法を用いて、ウイルス粒子に対する抗体が HCV 感染回復期患者血清中に存在することを実証し、その性状を解析することを本研究の目的とした。本年度は特に免疫沈降法を応用した測定法の特異性について検討した。

**B. 研究方法**

**1. 遊離型 HCV 粒子含有血清**

前年度同様、HCV 粒子と結合する抗体を免疫沈降法により測定することを目的として、免疫複合体(immune complex)型の HCV 粒子を含まず、主として遊離型 (free form)の virions から構成されている HCV 感染初期の血清として、新たな血清検体 HC3 を用いた。この検体は第 2 世代 HCV 抗体 (HCV core 蛋白や非構造蛋白としての NS3, NS4 蛋白などに対する抗体) が陰性で、HCV RNA は前年度用いた HC1 血清および HC2 血清よりも高力価であった( $8.8 \times 10^7$  copies/ml)。また、HCV genotype は II (1b)型であった。

**2. HCV 感染回復期血清**

HCV 感染回復期血清として、HCV 抗体が高力価陽性(PHA titer:  $2^{10} \sim 2^{14}$ )で HCV RNA が陰性の 32 検体を用いた。HCV RNA は血清 1ml より核酸を抽出し、nested RT-PCR 法により測定した(Hepatology 20:1131-1136, 1994)。コントロールとして、HCV 抗体および HCV RNA がともに陰性の血清 10 検体を用いた。

**3. 免疫沈降法**

前年度と同様に、遊離型 HCV 粒子含有

血清(HC3)を生食で 10 倍に希釈し、10%溶液とした HCV RNA 陽性血清 10  $\mu$ l に 5% HCV 感染回復期血清(生食で 20 倍希釈した HCV 抗体陽性血清) 50  $\mu$ l を加え、37°C で 2 時間反応したのち、ヒト IgG に対するヤギ抗血清 (goat antiserum to human IgG [ICN/Cappel]) を 50  $\mu$ l 添加し、37°C で 30 分間反応した。10,000 回転で 5 分間遠心し分離したのち、上清と沈澱から別々に核酸を抽出し、HCV RNA を定量測定した。コントロールとして、抗ヒト IgG ヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清(normal goat serum)を用いた。

#### 4. HCV RNA の定量測定

TRIzol-LS 試薬(Invitrogen)を用いて RNA を抽出し、LightCycler System (Roche)を用いて既報の real-time detection PCR 法 (Hepatology Res 23:105-114, 2002)により HCV RNA を定量的に測定した。

#### 5. HCV の塩基配列の決定

既報(Hepatology 16:619-624, 1992)の方法に基づいて、HCV RNA 陽性血清 HC3 について、HCV E2 領域の N 末端に位置する hypervariable region (HVR)を含む E1 領域および E2 領域の塩基配列 (528 nt)を有するクローンを 10 個分離し、それぞれの塩基配列を決定した。

#### 6. ELISA 法による HCV HVR peptides に対する抗体の測定

血清 HC3 の HCV 粒子の HVR アミノ酸配列 (NH<sub>2</sub>-ETYTSGGAASHTTSTLASLFSFGASQRIQL)に基づいて、15 アミノ酸残基 (15-mer)からなる互いに一部 overlap した 3 種類の peptide を MAP (multiple antigenic peptide)法により合成した。この 8 arms-MAP は同じ配列からなる 8 本の 15-mer peptide を有する。N 末端側から順に、MAP8-HC3-HVRpA (NH<sub>2</sub>-ETYTSGGAASH-TTST)、MAP8-HC3-HVRpB (NH<sub>2</sub>-AASHTTSTLASLFSFGASQRIQL)の 3 種類の peptide を作製した。これら 3 種類の合成 peptide (5  $\mu$ g/ml) を別々に microplate (Greiner)の各 well に固相し、enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)法により、合成 peptide と反応する抗体を測定した。標識抗体として、horseradish peroxidase 標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体(No. G19)を用いた。

#### 7. HVR peptide に対する抗体の精製

MAP8-HC3-HVRpC peptide に対する抗体を多く含む HCV 感染回復期血清 Y006 を protein G-Sepharose 4FF column (Amersham) に apply し、IgG fraction を分離精製した。さらに MAP8-HC3-HVRpC peptide を conjugate した Sepharose 4B (Amersham) の affinity column に apply し、MAP8-HC3-HVRpC peptide に対する抗体を精製した。

#### 8. ショ糖密度勾配遠心法による HCV 粒子の精製

Beckman SW60 rotor を用い、既報(Virology 204:665-672, 1994)に従って HC3 血清 30 ml を遠心濃縮後、ショ糖密度勾配遠心に供した。HCV RNA-rich の画分(比重 1.09-1.12 g/cm<sup>3</sup>)を分取し、精製 HCV 粒子として以下の実験に用いた。

#### 9. 金コロイド標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いた免疫電顕

精製 HCV 粒子と Y006 血清からアフィニティ精製した抗 MAP8-HC3-HVRpC peptide 抗体を混和し、37°C で 2 時間反応したのち、金コロイド標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(British BioCell International, Ltd)を添加し、37°C で 30 分間反応した。次に 10,000 回転で 5 分間遠心したのち、沈澱物を生食に溶解し、既報(Virology 191:431-434, 1992)に準拠して電顕観察した。

倫理面への配慮：研究用血清検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は不特定化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない、人権上の問題は生じない。

### C. 研究結果

#### 1. HCV 感染回復期血清中の HCV (HC3)-HVR peptide に対する抗体の測定

HCV 感染回復期血清 32 検体について、

3種類のHCV(HC3)-HVR peptides, すなわちMAP8-HC3-HVRpA, MAP8-HC3-HVRpB, MAP8-HC3-HVRpCを固相抗原とするELISA法により、それらのpeptideと反応する抗体を測定した。Y006血清がHVRpC peptideと最も強く反応し、血清の10倍希釈液での測定ではOD値が>3.000を示し、100倍希釈液でもOD値は1.012であった。従って、この血清検体を用いて、以下の解析を行った。

## 2. HC3血清を用いた免疫沈降法による、回復期血清Y006中のHCV粒子に対する抗体の測定

前年度までの方法に準拠し、Genotype 1bのfree HCV virionsを高力価で含むHC3血清にHCV感染回復期血清(Y006)を加え、さらに抗ヒトIgGヤギ血清を添加し、遠心分離したところ、HCV RNAの52.8% (3重測定: 50.8%, 53.5%, 54.0%の平均値)が沈澱分画で回収された。それに対して、抗ヒトIgGヤギ血清の代わりに正常ヤギ血清を添加した場合には、上清で99.9%のHCV RNAが検出され、回復期血清の代わりに正常血清を反応させた場合にも99.7%のHCV RNAが上清で検出された。以上の結果から、free-form HCV粒子含有血清としてHC3血清を用いた場合にも前年度と同様に、免疫沈降法により回復期血清中のHCV粒子に対する抗体を測定することが可能であることが確認された。そして、Y006血清は52.8%のHCV(HC3)粒子に対する結合活性を有することが分かった。

そこで、予めY006血清をMAP8-HC3-HVRpC peptideと反応させ、HCV(HC3)粒子のHVRに対する抗体を吸収したのち、上記の免疫沈降反応を行ったところ、結合活性は39.3% (3重測定: 38.7%, 39.1%, 40.2%の平均値)へと低下した。一方、コントロールとして、Y006血清が反応性を全く示さなかったMAP8-HC3-HVRpB peptideで予め吸収操作をしたのち免疫沈降反応を行ったところ、吸収操作を行わない場合とほぼ同等の結合活性(51.6% [3重測定: 50.9%, 51.3%, 52.6%の平均値])を示した。したが

って、HCV粒子に結合しうる抗体の一部は粒子のHVRに対する抗体であることが示唆された。

## 3. 精製HVR抗体を用いた免疫沈降反応

HC3血清をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、比重が1.09-1.12 g/cm<sup>3</sup>のfractionを採取し、精製HCV粒子として以下の実験に用いた。Y006血清からaffinity column chromatography法によりMAP8-HC3-HVRpC peptideと反応する抗体を精製し、その精製抗体を1次抗体、抗ヒトIgGヤギ血清を2次抗体として、HC3血清中の精製HCV粒子との結合活性を測定した。HC3粒子と精製HVR抗体および抗ヒトIgGヤギ血清の3者を反応させた時には90%以上(3重測定: 90.1%, 92.5%, 93.4%)の結合活性が認められた。それに対して、1次抗体、あるいは2次抗体のいずれかを欠いた場合には沈澱分画で回収されたHCV signalはわずか0.1%-0.7%に過ぎなかった。従って、Y006血清中のHCV(HC3)-HVRに対する抗体はHCV粒子と結合する活性を有することを直接的に証明することができた。

## 4. 精製HVR抗体を用いた免疫電顕

上記の非標識抗ヒトIgGヤギ血清の代わりに、金コロイド標識した抗ヒトIgG(H+L)ヤギ抗体(直径5 nm)を用いて、免疫沈降反応を行い、電顕観察した。その結果、直径55-60 nmの球形粒子の周りに5 nmの金粒子が5個ないし15個付着した像が認められた。一方、コントロールとして精製HCV粒子に2次抗体としての標識抗体のみを反応させた場合には、このような金粒子を伴ったウイルス様粒子は全く観察されなかった。

## D. 考察

前年度、HCV感染初期の患者由来のfree HCV virionsを抗原とし、免疫沈降法を用いてHCV感染回復期血清中にHCV粒子に対する抗体が存在することを示すことができた。しかし、血清蛋白を多く含むHCV陽性血清をそのまま用い、しかも免疫沈降反応での非特異反応をなくするためにそれ



自体希釈を要し、反応させる回復期血清も20倍に希釈せざるを得なかった。従って、さらなる特異性の確認が必要であると考え、今年度の実験を行った。

HCV 粒子表面に対する抗体は、conformational epitopes に対する抗体が主体であるが、今回 linear epitopes を担うことが知られている HVR peptides を用いた免疫沈降反応の阻止実験やヒト回復期血清からの HVR peptides に対する精製抗体を直接用いた免疫沈降反応や免疫電顕法により、HCV 感染回復期血清中に存在する HCV 粒子に対する抗体の一部についてはあるが、その特異性を実証することができた。

HVR に対する hyperimmune のウサギ血清が、同一の HVR 配列を担う HCV の感染を阻止しうることが感染実験により明らかにされているが、本研究での免疫沈降法によって測定した回復期血清の HCV 粒子に対する結合活性がウイルスの中和を意味するか否かの検討は今後の研究課題として重要である。

#### E. 結論

1. HCV 感染回復期血清中に、HCV の HVR アミノ酸配列を担う peptide と反応する抗体が存在することを ELISA 法により示した。
2. その HVR 配列に対する精製抗体を用いた免疫沈降法および免疫電顕法により、回復期血清中の HVR に対する抗体が HCV 粒子と結合することを実証することができた。
3. 以上の結果は HCV 感染回復期血清中に存在する HCV 粒子に対する抗体の一部に付いてではあるが、HCV 粒子と結合しうる抗体が存在することを直接的な方法で示し、前年度より行ってきた免疫沈降法による HCV 粒子に対する抗体測定の特異性を支持するものと考えられる。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスコア蛋白質のDNA修復系への影響とISREの活性化作用に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：ヒト不死化肝細胞を用いてマイクロサテライト不安定性を測定できる新たに開発した実験系において、C型肝炎ウイルスのコア蛋白質が遺伝子型依存的にマイクロサテライト不安定性を増強する現象を昨年度見出した。今年度は、レプリコン細胞など他の細胞においてもこの現象が再現できるかどうかの検討を行った。また、培養細胞を用いた塩基除去修復活性を測定できる実験系の構築を行い、HCV蛋白質による塩基除去修復活性への影響を調べた。これまでにHCVコア蛋白質がインターフェロン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出し出していたが、今年度はこの現象について解析した。その結果、コア蛋白質による転写活性化はインターフェロン刺激応答配列（ISRE）を介して起こることと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が分かった。と同時にコア蛋白質はISREのconsensus配列よりもvariant配列に対して強く作用することを明らかにした。

A. 研究目的

肝発がんにはC型肝炎ウイルス（HCV）の感染により生じる慢性肝炎とHCVの持続感染が重要であると考えられている。HCV陽性の早期肝癌においては特定の癌関連遺伝子の異常がほとんど検出されないことから、HCVによる肝発がんには未知の発がん機構が存在している可能性があり、そのような機構にHCVが直接的に作用している可能性がある。肝発がん機構を解明することができれば、どこを抑えることが発がんの予防につながるかを明らかにすることができることから、新たな発がん予防法の開発が期待される。従って、現在、発がん予備群である慢性肝炎や肝硬変患者に対する社会的貢献は非常に大きいものと考えられる。このような観点から、現在、HCV蛋白質の細胞に対する機能修飾については盛んに研究がなされており、これまでに、転写調節やアポトーシスに影響を与えることなどが報告されている。また、免疫機構にも影響を与えていることが示唆されている。我々は、癌化の要因の一つとして、これまでにあまり検討されていないDNA修復機能に着目し、HCV蛋白質が及ぼす影響について検討することにした。

DNA損傷に対しては様々な修復経路が存在していることが現在までに分っており、それらの分子機構についても急速に研究が進展している。しかしながら、これらの修復系を定量的に扱うことのできる実験系、特に培養細胞

を用いたアッセイ系はミスマッチ修復系以外はほとんどないのが現状である。また、ミスマッチ修復系についても、特殊な細胞クローンを用いた系を使用していたり、実験に長期間要するなどの欠点がある。これらの現状を打破するために、我々は、昨年度ヒト不死化肝細胞を用いてマイクロサテライト不安定性を定量的に測定できる新たなアッセイ系を構築してHCV蛋白質のDNA修復能に対する影響を検討した。その結果、HCVのコア蛋白質が遺伝子型依存的にマイクロサテライト不安定性を増強する現象を見出した。今年度はレプリコン細胞など他の細胞においてもこの現象が再現できるかどうかの検討やコア蛋白質がマイクロサテライト不安定性の増強にどのように関わっているかについての検討を行った。

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コア蛋白質が2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）遺伝子の転写レベルでの活性化を引き起こすという我々が以前見出し出していた現象についての解析を行った。

B. 研究方法

（1）培養細胞を用いたマイクロサテライト不安定性のアッセイ系。

基本原理としては、pCXpurレトロウイルスベクターのピューロマイシンresistant gene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resistant geneのATGからの翻訳がすぐstopしてしまうつまりout of frameの状態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。従ってCA repeatのどこかで欠損や挿入が起ってin frameになるとpuromycin resistant gene productが産生されるようにアレンジされている。2 x 10<sup>5</sup>程度のヒト培養細胞に、(CA)リピート挿入によりout of frameにしたレトロウイルスベクターとパッケージング細胞としてBOSC23細胞を使う通常の方法によりRetrovirusを作成し、培養細胞に感染させた。陽性コントロールとしては本来のpCXpurから作成したレトロウイルスを感染させ、陰性コントロールとしてMock infectionを行った。レトロウイルス感染後5日程でconfluentとなることから、この時点でそれぞれのwellに1x10<sup>5</sup>細胞を分注して濃度が5, 10µg/mlとなるようにPuromycinを添加した。さらにその後14日間培養し、Puromycin抵抗性のコロニーの数を測定した。(CA) repeat挿入によりout of frameにしたレトロウイルスベクターを使用した場合、複製エラーが正確にすべて修復されれば、すべての細胞がpuromycinにより死滅するが、ある頻度で修復エラーが生じると、puromycin抵抗性のコロニーが出現してくるという方法である。

培養細胞を用いた塩基除去修復活性のアッセイ系。

アンピシリン耐性 (Amp<sup>r</sup>) 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<sup>r</sup>) 遺伝子を有するプラスミドのそれぞれ40ngを、培養細胞 (5 x 10<sup>5</sup>) にFuGene6を用いて導入した。4.5時間培養後、細胞を一度PBSで洗った後、1%NP-40を含むPBSで処理して核を回収した。得られた核画分よりプラスミドDNA抽出キットを用いてプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAを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を消化した。その後、大腸菌DH10BにelectroporationによりプラスミドDNA (全体の1/6を使用) 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した。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PH5CH8細胞にFuGene6を用いて導入した。2日後にそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定して活性化の程度を算出した。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pCXbsrベクターを用いた。インターフェロン (IFN) により発現誘導される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、2'-5'OAS遺伝子プロモーターと同様にレポーターアッセイを行った。インターフェロン刺激応答配列 (ISRE) の consensus配列 (AGTTTCACTTTCCC) 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) を用いて、コア蛋白質のISREに対する効果を同様に測定した。また、pISRE-Luciを鋳型としてPCR法により、consensus配列をGGTTTCACTTCTCに改変した pISRE(V1)-LuciとGGTTTCFTTCTC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。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いているので、特段の配慮はしていないが、レトロウイルス感染細胞については塩素系薬剤処理、UV処理および高圧滅菌処理によりウイルスの不活化を行っている。

### C. 研究結果

(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効果。

昨年度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アッセイ系によりコア蛋白質、特に遺伝子型1bのコンセンサス配列を有するコア蛋白質が有意にマイクロサテライト不安定性を増強する現象をヒト不死化PH5CH8細胞を用いて明らかにした。今年度はこのような現象が他の細胞を用いても再現できるかどうかの検討を行った。最近、我々は京都大学ウイルス研究所との共同研究によ

りHCVのNS3からNS5BまでのゲノムRNAが効率よく自己複製できるHCVレプリコン細胞をヒト肝癌細胞Huh-7由来の細胞から樹立したことから、HCVゲノムが複製している状態でのコア蛋白質の影響を調べた。しかし、残念ながら、我々のアッセイシステムでは puromycin耐性のコロニーはまったく得られなかったことから、このレプリコン細胞は PH5CH8細胞とは異なり、Replication error (RER) -のphenotypeであることが判明した。このレプリコン細胞にコア蛋白質を安定的に発現させてもコロニーは出現しなかったことから、このレプリコン細胞は我々のassay系には使えないことが分った。そこで、次に不死化のみの形質を有するPH5CH8細胞でなぜ多くの puromycin耐性コロニーが得られたかの疑問を解くために、p53遺伝子を欠くSaos-2細胞やPH5CH8細胞と同様にSV40ラージT抗原により不死化させて別途樹立されたヒト肝NKNT3細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、NKNT3細胞ではPH5CH8細胞と比較すると半分程度であるが、 puromycin耐性のコロニーが多数得られ、コア蛋白質による増強効果も観察された。これに反して、Saos-2細胞からはまったく耐性コロニーは得られず、コア蛋白質を発現させてもコロニーが出現することはなかった。これらの結果から、我々が開発した方法は昨年度報告したようにRER+の大腸癌由来の細胞で有用であるとともに、ヒト不死化肝細胞においても有用であることが分った。PH5CH8細胞を用いたアッセイ系において、(CA)リピートを含むレトロウイルスベクター由来のウイルスを細胞に感染させた後、培地に100  $\mu$ MのFeイオンを存在させておくと、最終的に出現する puromycin耐性のコロニーの数が1.5倍程度増加することが分った。コア蛋白質がミスマッチ修復系のどこに関わっているかを探るために、まず、大腸癌において変異などが見いだされているhMLH1とhMSH2の発現量に変化を与えている可能性を検討した。しかし、コア蛋白質を発現しているPH5CH8細胞において、これらの遺伝子の発現量が低下している現象は確認できなかった。

塩基除去修復活性へのHCV蛋白質の影響。

研究方法の項目に示したように、アンピシリン耐性 (Amp<sup>r</sup>) 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とテトラサイクリン耐性 (Tet<sup>r</sup>) 遺伝子を有するプラスミドそれぞれ40 ngをPH5CH8細胞に導入すると、最終的に数十個のアンピシリン耐性コロニーと100個程度のテトラサイクリン耐性

コロニーが得られることから、アンピシリン耐性コロニー数をテトラサイクリン耐性コロニー数で割った値を修復効率として測定可能であることが分った。そこでまず、レトロウイルスベクターを用いて1b型のHCVコア蛋白質とNS5A蛋白質を安定的に発現しているPH5CH8細胞を用いて同様の実験を行ったところ、コントロール細胞においては修復効率が0.5という値が得られたが、コアやNS5A蛋白質を発現している細胞での修復効率はそれぞれ0.37と0.39となりコントロール細胞よりも若干低い値が得られたが有意なものではなかった。次にHepG2細胞について同様の実験を行ったところ、コントロール細胞やNS5A蛋白質を発現しているHepG2細胞での複製効率は0.3程度であったが、コア蛋白質を発現している細胞において修復効率が0.15と半分程度に低下しているという結果を得た。様々な条件下による実験は必要であるが、今回の実験からはHCV蛋白質の発現により塩基除去修復の効率が低下するのではないかとということが示唆された

(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