

2003/1125

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 宣之

平成16(2004)年 3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 ----- 10

下遠野 邦忠

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----18

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2年目にあたる平成15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。コア蛋白質が塩基除去修復能を低下させることを示した。新規HCVレプリコン細胞株、1B-2R1を樹立した。2系統(昨年度樹立した50-1と1B-2R1)のHCVレプリコン細胞とインターフェロンでレプリコンを排除した細胞を比較したマイクロアレイ解析により、HCVレプリコン細胞で発現抑制の起きている分子を同定した。コア蛋白質が核内ホルモン受容体の転写活性をあげてことを明らかにし、その作用機序の解析を行った。昨年度樹立に成功したインターフェロン抵抗性レプリコン細胞を用いて、インターフェロン抵抗性獲得機序の解析を行い、その一端を明らかにした。HCVレプリコン細胞を用いて抗HCV活性を示す薬剤の探索を行い、HCV複製阻害活性を示すサイクロスポリンAを見出し、その作用機序の一端を明らかにした。

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に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化

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) ミスマッチ修復機構を担っている遺伝子群の発現レベルを RT-PCR 法により解析し、コア蛋白質の存在による影響を調べる。

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、使用する。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を調べることができる。

(2) 昨年度見い出したコア蛋白質

による核内ホルモン受容体の活性化機構を解析する。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。

HCV 1B-2 株由来の新規 HCV レプリコン細胞株の樹立を試みる。昨年度樹立した HCV 1B-1 株由来の 50-1 レプリコン細胞と HCV 1B-2 株由来の新規 HCV レプリコン細胞をインターフェロンで処理することにより、それぞれの細胞より HCV レプリコンを排除した「Cured 細胞」を作成し、HCV レプリコン細胞と Cured 細胞間で約 10,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行う。

ヒト不死化細胞において HCV 蛋白質を発現させ、細胞周期や細胞増殖能に及ぼす影響を解析する。

(3) 昨年度、樹立に成功した 9 種類のインターフェロン抵抗性 HCV レプリコン細胞の性状解析 (レプリコン RNA の細胞内レベル、インターフェロンに対する抵抗性の程度など) を行う。インターフェロン抵抗性レプリコン細胞内で増殖しているレプリコン RNA の遺伝子解析を行う。親株のインターフェロン感受性レプリコン細胞と樹立したインターフェロン抵抗性レプリコン細胞間で約 20,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行う。

HCV ゲノム複製を制御する細胞側因子の解析を行うために、市販されている各種薬剤をレプリコン細胞に投与して、レプリコンゲノムの複製変化を調べる。複製を強く抑制する

試薬が見つかった場合に、その試薬の作用機序を指標にして複製の分子機構および複製制御の分子機構の解析を行う。

(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) 昨年度見出し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ミスマッチ修復機構を担う一群の遺伝子の機能低下による可能性を解析した。hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, hMSH3, hPMS1 mRNA の発現レベルがコア蛋白質の発現によりどのように変化するかをコア蛋白質を恒常的に発現させたヒト不死化肝細胞を作成して RT-PCR 法により調べたが、これらの遺伝子群において発現量が大きく変化するものはなかった。

人工的に修飾を施した 8-oxo グアニンを有するプラスミドを細胞内に導入することにより、塩基除去修復能を定量的にアッセイできる系を用いて、HCV 蛋白質の存在による影響を調べた。その結果、HepG2 細胞を用いた場合、塩基除去修復能力を示す修復効率は HCV 蛋白質が発現していない細胞や HCV の NS5A が発現している細胞では、約 0.3 の値を示したが、コア蛋白質が発現している細胞では約 0.15 と値が低

下することが分った。この結果から、コア蛋白質が塩基除去修復能を低下させていることが示唆された。

(2) 異なる量のコア蛋白質を発現する細胞を樹立して、それらの細胞の増殖特性を解析し、コア蛋白質が核内ホルモン受容体を活性化することは昨年度見いだしているが、今年度はその活性化機構を解析した。コア蛋白質が細胞の転写抑制因子 Sp110b に会合して、その機能を阻害していることを示唆する結果を得た。このことから、Sp110b による他の転写因子の機能をもコア蛋白質が変化させる可能性が示唆された。そこで、Sp110b による細胞内転写因子の抑制作用を調べた。その結果、核内ホルモン受容体以外の転写因子の機能も抑制されることがわかった。このことはコア蛋白質が細胞内の各種転写因子の機能を Sp110b を介して制御していることを示唆する。

HCV 1B-2 株を感染させたヒト不死化肝細胞より HCV ゲノムの NS 領域をコードする cDNA を回収して、それをもとにして新規 HCV レプリコン細胞株、1B-2R1 を樹立した。HCV レプリコン 1B-2R1 の性状解析を行い、細胞内で効率よくレプリコンの複製が起こっていることを示した。

昨年度樹立した HCV 1B-1 株由来の HCV 50-1 レプリコン細胞と今年度樹立した HCV 1B-2R1 レプリコン細胞をインターフェロン- α で処理することにより、それぞれの細胞より HCV レプリコンを排除した「Cured 細胞」を得た。これら 2 種類の HCV レプリコン細胞と Cured 細胞間で約 10,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解

析を行った。その結果、これら2組の比較解析で共通して HCV レプリコン細胞において2倍以上発現レベルが上昇する2遺伝子と1/2以下に低下している6遺伝子を特定した。

ヒト不死化細胞に NS5B 蛋白質を発現させると、インターフェロン- β が産生され、S 期進行阻害が引き起こされることが観察された。このような現象は、HeLa や Huh-7 などのヒトがん細胞では認められなかったことから、自然免疫系が正常に働く細胞系においてのみ認められる現象であることが示唆された。

(3) 昨年度得られた9系統のインターフェロン抵抗性レプリコン細胞のインターフェロン抵抗性の程度について解析した。その結果、インターフェロンに部分的抵抗性を示す5系統とインターフェロンに完全抵抗性を示す4系統に分類することができたことが分った。これらのレプリコン細胞はインターフェロン- α とインターフェロン- β の両方に抵抗性を示した。また、インターフェロンに対する抵抗性の度合いとは関係なく効率よく HCV レプリコンの複製が起こっていることも Northern および Western blot 解析により確認した。

インターフェロンに抵抗性を示すレプリコン RNA の塩基配列を解析した結果、NS4B 領域に単純継代培養を12ヶ月間行っても出現しないアミノ酸置換が1箇所、すべてのインターフェロン抵抗性レプリコンに認められた。それ以外には、インターフェロンに完全抵抗性を示すレプリコン RNA にのみ NS5A 領域にそれぞれの系統に特異的なアミノ酸置換が認められた。親株の 50-1 レプリコン細胞

と樹立したインターフェロン抵抗性レプリコン細胞間で約 20,000 遺伝子についてのマイクロアレイ解析を行い、インターフェロン抵抗性レプリコン細胞において10倍以上発現量が高進している10遺伝子と10分の1以下に低下している6遺伝子を特定した。

市販の薬の中に HCV ゲノム複製を阻害するものがあるかどうかをレプリコン細胞を用いて解析した。約100種類の薬について HCV の複製に及ぼす影響を調べた結果、インターフェロン- α およびインターフェロン- β に加えて、サイクロスポリン A に強い抗 HCV 複製効果を見いだした。サイクロスポリン A と類似の免疫抑制剤である FK506 にはこのような HCV ゲノム複製抑制能は観察されなかったことから、サイクロスポリン A の免疫抑制能以外の働きが HCV ゲノムの複製阻害に重要であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、免疫抑制能がないサイクロスポリンの誘導体でも HCV ゲノム複製抑制能が存在することを確認した。

D. 考察

(1) ミスマッチ修復に直接関わる一群の遺伝子の発現に対してコア蛋白質は影響を及ぼさないことが分ったことから、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は既知のミスマッチ修復関連遺伝子の発現低下とは異なる機構で起こっていることが示唆された。コア蛋白質を発現している HepG2 細胞では塩基除去修復能の低下が認められたことが

ら、コア蛋白質はミスマッチ修復能ばかりでなく、塩基除去修復能にも影響を与えている可能性が示唆された。今後、このような現象の分子機序を解析していく必要があり、他のヒト培養細胞においてもこのような現象が認められるかどうかを検討する必要がある。

(2) 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ものと考えられる。コア蛋白質は Sp110b の機能を抑制するために結果的にはコア蛋白質により各種核内ホルモン受容体の活性化が起こるものと推定される。核内ホルモン受容体の下流の遺伝子のひとつに TGF ベータ II が存在するが本因子はコラーゲンの産生を促進することが知られている。HCV 感染患者は肝硬変を発症しやすいと言われているが、これらの患者においては肝組織の線維化も観察される。HCV 感染により生じる肝の線維化にはコア蛋白質のこのような働きが関与する可能性が考えられる。

HCV レプリコンの複製により発現抑制が認められる遺伝子群の中には、免疫プロテアソームのサブユニットである LMP2 と LMP7 が含まれていたことから、HCV レプリコンの増殖により、ウイルス抗原提示能の低下が引き起こされている可能性が示唆される。また、今回、HCV レプリコンの増殖により影響を受ける遺伝子群が特定されたことから、今後、これらの遺伝子の発現レベルが HCV レプリコンにコードされているどの蛋

白質によるものなのかを解析する必要がある。また、これらの遺伝子の発現制御と HCV の複製や肝疾患がどのように関与しているかについても検討していく必要がある。

(3) 昨年度樹立に成功したインターフェロン抵抗性レプリコン細胞 (9 系統) はインターフェロンに対して部分的抵抗性を示す 5 系統とインターフェロンに対して完全抵抗性を示す 4 系統に分類できることが明らかになったことから、これらの系統におけるインターフェロン抵抗性獲得機序は異なるものと推定される。このようなインターフェロン抵抗性の獲得がウイルス側因子によるものなのか、或いは細胞側因子によるものなのかを明らかにすることは重要であると思われる。レプリコン RNA の塩基配列にもインターフェロン抵抗性のものに特徴的に認められる変異が見つかっていることから、これらのウイルス側の変異がインターフェロン抵抗性の獲得に関与しているかどうかについて実験的に検討していく必要がある。また、インターフェロン感受性レプリコン細胞とインターフェロン完全抵抗性レプリコン細胞間におけるマイクロアレイ解析でも発現量が大きく異なる遺伝子群が特定されたことから、今後これらの遺伝子群がインターフェロン抵抗性の獲得に関与しているかどうかを実験的に検証していく必要がある。

免疫抑制活性のないサイクロスポリンの誘導体でも HCV ゲノムの複製阻害活性を有していたことから、今回見出したサイクロスポリン A の HCV ゲノム複製阻害活性は免疫抑制

機序とは異なる機序によるものと考えられる。

今後、このインターフェロン抵抗性獲得の分子機序やサイクロスポリン A の HCV ゲノム複製阻害機構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効果はミスマッチ修復関連遺伝子の発現低下とは異なる機構で起こっていることを示した。コア蛋白質が塩基除去修復能をも低下させることを示した。

(2) コア蛋白質が核内ホルモン受容体を活性化する機構として、コア蛋白質が細胞の転写抑制因子 Sp110b の機能を阻害することを示した。新規 HCV レプリコン細胞株、1B-2R1 を樹立した。HCV レプリコンの存在により発現量に変化を受ける遺伝子群をマイクロアレイ解析により特定した。NS5B 蛋白質を細胞内で発現させると、インターフェロン- β が産生され、S 期進行阻害が引き起こされることを明らかにした。

(3) 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に部分的抵抗性を示すものと完全抵抗性を示す 2 種類存在することを明らかにし、レプリコンゲノムにも特徴的な遺伝的変異が認められることを示した。サイクロスポリン A に強い HCV ゲノム複

製阻害活性を見だし、その作用機序を解析した。その結果、免疫抑制能以外の働きによることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Naganuma, A., Dansako, H., Nakamura, T., Nozaki, A. and Kato, N. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.*, 64, 1307-1314, 2004.
2. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A. and Shimotohno. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 756-766, 2003.
3. Dansako, H., Naganuma, A., Nakamura, T., Ikeda, F., Nozaki, A. and Kato, N. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated with the interferon stimulated response element. *Virus Res.*, 97, 17-30, 2003.
4. 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.*, 278, 10162-10173, 2003.
5. 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.*, 10, 765-773, 2003.
6. Suzuki, K., Aoki, K., Ohnami, S., Yoshida, K., Kazui, T., Kato, N., Inoue, K., Kohara, M. and Yoshida, T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon a inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 814-819, 2003.
7. Watashi, K., Hijikata, M., Tagawa, A., Doi, T., Marusawa, H. and Shimotohno, K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 7498-7509, 2003.
8. Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M. and Shimotohno, K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*, 38, 1282-1288, 2003.
9. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., Naka, K., Nozaki, A. and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 756-766, 2003.
10. Miyanari, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H., and Shimotohno, K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. *J. Biol. Chem.*, 78, 50301-50308, 2003.
11. Ohshima, T. and Shimotohno, K. TGF- β mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem.* 278, 50833-50842, 2003.
12. Watashi, K., and Shimotohno, K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci.* 94, 937-943, 2003.

学会発表

- 加藤 宣之、杉山 和夫、団迫 浩方、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞由来の新規 HCV サブジェノミクプレプリコン細胞の樹立、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、平成 15 年 9 月
- 団迫 浩方、仲 一仁、長沼 篤、野崎 昭人、加藤 宣之、ヒト培養細胞における C 型肝炎ウイルス蛋白質の DNA 修復能に及ぼす影響、第 6 2 回日本癌学会総会、名古屋、平成 15 年 9 月
- 加藤 宣之、杉山 和夫、難波 克行、団迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠 C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染ヒト肝細胞由来の新規 HCV

- subgenomic replicon 細胞の樹立、第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成15年10月
4. 阿部 健一、野崎 昭人、中村 孝志、仲 一仁、池田 正徳、田中 克明、加藤 宣之、C型肝炎ウイルス E2 エンベロープ蛋白質に結合活性を有するラクトフェリン由来ペプチドの解析、第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成15年10月
 5. 団迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、野崎 昭人、加藤 宣之、C型肝炎ウイルス蛋白質によるインターフェロンシグナル伝達系の活性化、第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成15年10月
 6. 中村 孝志、団迫 浩方、難波 克行、田村 隆彦、仲 一仁、野崎 昭人、下遠野 邦忠、加藤 宣之、長期培養におけるC型肝炎ウイルス subgenomic replicon の遺伝的変異と多様性、第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成15年10月
 7. 難波 克行、仲 一仁、中村 孝志、団迫 浩方、野崎 昭人、白鳥 康史、下遠野 邦忠、加藤 宣之、インターフェロン抵抗性C型肝炎ウイルス subgenomic replicon 細胞の樹立、第51回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成15年10月
 8. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Tamura, T., Nozaki, A., Naka, K. and Shimotohno, K. Genetic evolution of hepatitis C virus subgenomic replicon in long-term culture. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto Japan, 2003.
 9. Naka, K., Namba, K., Nakamura, T., Dansako, H., Nozaki, A., Shimotohno, K. and Kato, N. Establishment of interferon-resistant hepatitis C virus subgenomic replicons. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto Japan, 2003.
 10. Kato, N., Sugiyama, K., Namba, T., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K., Nozaki, A. and Shimotohno, K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related viruses, Kyoto Japan, 2003.
 11. Dansako, H., Naganuma, A., Nakamura, T., Nozaki, A. and Kato, N. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated with the interferon stimulated response element. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto Japan, 2003.
 12. 渡士 幸一、土方 誠、石井 直人、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルスゲノム複製を抑制する薬剤の探索、第62回日本癌学会総会、名古屋、平成15年9月
 13. 渡士 幸一、土方 誠、下遠野 邦忠、シクロスポリンのC型肝炎ウイルスゲノム複製に与える影響、第2回日本肝臓学会シングルトラックカンファレンス、大津、平成15年10月

14. Ohshima, T. and Shimotohno, K.
Involvement of p38 MAP kinase in the SUMO-1 modification of Smad4.
第 76 回日本生化学会総会、横浜、平成 15 年 10 月
 15. 高橋 仁、土方 誠、保坂 匡洋、山路 剛史、宮成 悠介、下遠野 邦忠、HCV subgenomic replicon 細胞を用いた HCV genome RNA 5' 末端構造の解析、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
 16. 高橋 仁、土方 誠、土井 崇広、保坂 匡洋、山路 剛史、宮成 悠介、下遠野 邦忠、C 型肝炎ウイルス(HCV)持続複製阻害に關与する細胞性因子の探索、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
 17. 宮成 悠介、土方 誠、保坂 匡洋、山路 剛史、高橋 仁、下遠野 邦忠、セミンタクトレプリコン細胞を用いた HCV ゲノム複製機構の解析、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都 (ワークショップ、WS02-03)、平成 15 年 10 月
 18. 渡士 幸一、土方 誠、小柳 三千代、下遠野 邦忠、C 型肝炎ウイルス Core タンパク質相互作用因子 Sp110b の機能解析、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
 19. 渡士 幸一、土方 誠、石井 直人、下遠野 邦忠、C 型肝炎ウイルスのゲノム複製を抑制する薬剤の探索、およびその抗 HCV 効果の分子機構の解析、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月
 20. 大島 隆幸、下遠野 邦忠、TGF-beta シグナルにおける p38 MAP kinase 情報伝達系は Smad4 の SUMO 化修飾を介して Smad 依存的な転写を活性化する、第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 15 年 12 月
 21. 渡士 幸一、土方 誠、小柳 三千代、下遠野 邦忠、RAR 転写コファクター Sp110b の同定およびその機能解析、第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 15 年 12 月
- 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

II. 分担研究報告書

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：C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝がんの予防を目指してひとつには、感染細胞の増殖変化の分子機構の解明、もうひとつとして、感染者からのウイルスの排除および治療をめざして、以下の研究を行った。（1）HCVゲノム自律複製細胞の樹立とその細胞の解析。HCVゲノムが恒常的に自律複製する培養細胞を樹立し、それを用いた、ウイルスゲノム複製機構を解析。その結果、ウイルスゲノムの複製がサイクロスポリンにより強く阻害されることを見いだした。サイクロスポリンには免疫機構を抑制する作用があるが、HCVゲノム複製の阻害は、サイクロスポリンの免疫抑制阻害活性ではなく、サイクロスポリンと結合し、その酵素活性が抑制されるサイクロフィリンにより制御されていることを示唆する成果を得た。（2）HCVタンパク質の中に細胞の増殖を制御するタンパク質が存在するが、その分子機構は不明であった。本研究において、コアタンパク質が核内ホルモン受容体の転写活性をあげることを明らかにした。この研究結果は、C型肝炎、肝がんにおける核内ホルモン受容体の活性化の意義を明らかにする必要があることを示す。

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。同時に、ウイルス感染者からウイルスを効率よく排除することが慢性肝炎ひいては肝がん発症を予防すると考えられるので、ウイルスの複製サイクルを理解して、抗ウイルス剤の開発に道を開くための研究も行う。

B. 研究方法

（1）HCV ゲノムが自律的に複製する培養細胞の樹立。

HCV ゲノムが細胞内で自律的に複製する細胞の樹立を行うために異なる配列からなる HCV ゲノムを作成する。それらを培養細胞 Huh7 に導入し、ゲノムに挿入した薬剤耐性因子をマーカーにして選択し複製効

率の高い自律複製細胞（レプリコン細胞を樹立する）

（2）レプリコン細胞を用いた複製制御因子の解析

（1）で得られた細胞について増殖特性を調べる。また、複製効率の高い細胞を選択し、それを用いて HCV ゲノム複製を制御する細胞側因子の解析を行う。そのために、市販されている各種薬剤をレプリコン細胞に投与して、ウイルスゲノム複製変化を調べる。複製が強く抑制する試薬が見つかった場合に、その試薬の作用機序を指標にして複製の分子機構および複製制御の分子機構の解析を行う。

（3）コア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）HCV ゲノム自律複製細胞の樹立

HCV ゲノム配列を HCV 感染者の血清中に含まれる HCV RNA の解析をもとにして明らかにした。そのうちのひとつについて、ネオマイシン耐性遺伝子をつないだレプリコン RNA を構築した。試験管内反応でゲノム RNA を作成し、それを培養細胞

Huh7 電気閃光法により導入した。その後 G418 で細胞を選択し生き残ってくる細胞を解析し、ウイルスゲノムが自律複製しているのを得た。このようにして、部分ゲノムおよび全ゲノムが自律複製する細胞を得た。

（2）HCV ゲノム自律複製細胞を用いた HCV ゲノム複製機構の解析

HCV ゲノム複製に関与する細胞側因子の解析を目的として、市販の薬の中に HCV ゲノム複製に及ぼすものがあるかを解析した。広く用いられている種々の薬は、その薬理作用などが解析されているので、もし、抗 HCV 複製作用を示すものがあれば、すでに明らかにされている薬の作用機序をもとにして HCV ゲノム複製に関わる細胞側の役割が解明できると期待される。約 100 種類の薬について HCV の複製に及ぼす影響を調べ、その結果、インターフェロンアルファおよびベータに加えて、サイクロスポリン A に強い抗 HCV 複製効果を見いだした。すなわち、1 マイクログラム/ml 濃度のサイクロスポリンで 1 週間処理すると、ウイルス RNA 量は処理前の約 1000 分の 1 に低下した。また、サイクロスポリンとインターフェロンを同時に処理するとウイルス RNA は単独投与の場合よりもさらに低下した。サイクロスポリンは免疫抑制作用があり、臓器移植患者に用いられている。類似の免疫抑制剤である FK506 にはこのような HCV ゲノム複製抑制能は観察されない。このことは、サイクロスポリンの免疫抑制能以外の働きが HCV ゲノム抑制に重要であると考えられる。

そこで、サイクロスポリンの誘導体で免疫抑制能が欠失している化合物

について HCV 複製能に与える効果を解析した。その結果、免疫抑制能がないサイクロスポリンの誘導体でも HCV ゲノム複製抑制能が存在することを確認した。

(3) HCV コア蛋白質の細胞増殖に及ぼす機能

異なる量のコア蛋白質を発現する細胞を樹立して、それらの細胞の増殖特性を解析し、コアタンパク質が核内ホルモン受容体を活性化することを既に見いだした。その機構を解析し、コアタンパク質が細胞の転写抑制因子 Sp110b の機能を阻害することを示唆した。このことは、Sp110b による他の転写因子の機能をもコアタンパク質により変化を受けられる可能性を示唆する。そこで、Sp110b による細胞内転写因子の抑制作用を調べた。その結果、核内ホルモン受容体以外の転写因子の機能も抑制されることがわかった。このことはコアタンパク質が細胞内の各種転写因子の機能を Sp110b を介して制御していることを示唆する。

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。また、Sp110b のアミノ酸配列には LXXLL モチーフが存在する。このモチーフの存在は Sp110b が RARα 以外の核内ホルモン受容体に結合することを示唆する。たとえば RXR や PPAR にも結合してそれらの転写活性化を抑制することが考えられる。コアタンパク質は Sp110b の作用を抑制するので、結果的にコアタンパク質による各種核内ホルモン受容体の活性化が推定される。核内ホルモン受容体の下流の遺伝子のひとつに TGF ベータ II が存在するが本因子はコラーゲンの産生を促進することが知られている。HCV 感染患者は肝硬変を発症しやすいと言われているが、これらの患者においては肝組織の線維化も観察される。HCV 感染により生じる肝の線維化にはコアのこのような働きが関与する可能性が考えられる。

サイクロスポリンによる HCV ゲノム複製は HCV ゲノム複製の分子機構を解明する点で興味があるだけでなく、肝臓移植患者に於ける C 型慢性肝炎の発症を予防する点においても重要な知見である。近年の生体肝移植を受ける患者には C 型肝炎ウイルス感染による患者が多い。これらの患者に対しては免疫抑制剤が使用されるが、用いる免疫抑制剤の種類により慢性肝炎の発症を制御できる可能性がある。この分野での臨床研究が重要である。また、サイクロスポリンによる HCV ゲノム複製抑制には本薬剤が持つ免疫抑制機能は

関係ない。従って、免疫抑制作用のない抗 HCV 剤がサイクロスポリンの研究から見いだされる可能性が考えられると期待される。

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するばかりでなく、細胞側の各種転写活性を Sp110b の機能抑制を介して制御していることが示唆された。このような制御活性が細胞の増殖を変化させている可能性が示唆された。また、HCV ゲノム複製を制御している新たな機構の存在を示し、その機構を標的にした抗 HCV 剤の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 306:756-766.
2. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. *J*

Biol Chem. 22003, 78: 50301-50308

3. Ohshima T, Shimotohno K. TGF- β mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem.* 2003, 278:50833-50842.
4. Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci.* 2003, 94 :937-943
5. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology.* 2003, 38 :1282-1288
6. Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K. Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol Cell Biol.* 2003, 23 :7498-7509

2. 学会発表

(1) 渡士幸一、土方誠、石井直人、下遠野邦忠: C 型肝炎ウイルスゲノム複製を抑制する薬剤の探索、平成 15 年 9 月、第 62 回日本癌学会総会、名古屋

(2) 渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠: シクロスポリンの C 型肝炎ウイルスゲノム複製に与える影響 平成 15 年 10 月、第 2 回日本肝臓学会シングルトラックカンファレンス、大津

(3) Ohshima, T. and Shimotohno, K.: Involvement of p38 MAP kinase in the SUMO-1 modification of Smad4. 平成 15 年 10 月、第 76 回日本生化学会総会、横浜

(4) 高橋仁、土方誠、保坂匡洋、山路剛史、宮成悠介、下遠野邦忠: HCV subgenomic replicon 細胞を用いた HCV genome RNA 5' 末端構造の解析、平成 15 年 10 月、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都

(5) 高橋仁、土方誠、土井崇広、保坂匡洋、山路剛史、宮成悠介、下遠野邦忠: C 型肝炎ウイルス(HCV) 持続複製阻害に関与する細胞性因子の探索、平成 15 年 10 月、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都

(6) 宮成悠介、土方誠、保坂匡洋、山路剛史、高橋仁、下遠野邦忠: セミンタクトレプリコン細胞を用いた HCV ゲノム複製機構の解析 平成 15 年 10 月、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都 (ワークショップ、WS02-03)

(7) 渡士幸一、土方誠、小柳三千代、下遠野邦忠: C 型肝炎ウイルス Core タンパク質相互作用因子 Sp110b の機能解析、平成 15 年 10 月、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都

(8) 渡士幸一、土方誠、石井直人、下遠野邦忠: C 型肝炎ウイルスのゲノム複製を抑制する薬剤の探索、お

よび その抗 HCV 効果の分子機構の解析、平成 15 年 10 月、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都

(9) 大島隆幸、下遠野邦忠: TGF-beta シグナルにおける p38 MAP kinase 情報伝達系は Smad4 の SUMO 化修飾を介して Smad 依存的な転写を活性化する、平成 15 年 12 月、第 26 回日本分子生物学会年会、神戸

(10) 渡士幸一、土方誠、小柳三千代、下遠野邦忠: RAR 転写コファクター Sp110b の同定およびその機能解析、平成 15 年 12 月、第 26 回日本分子生物学会年会、神戸

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) Naganuma, A. (加藤)	Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells.	Cancer Res.	64	1307-1314	2004
2) Kato, N. (加藤)	Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	306	756-766	2003
3) Dansako, H. (加藤)	Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated with the interferon stimulated response element.	Virus Res.	97	17-30	2003
4) Nozaki, A (加藤)	Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein.	J. Biol. Chem.	278	10162- 10173	2003
5) Suzuki, K. (加藤)	Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethinitro-samine- induced liver cirrhosis in rat model.	Gene Ther.	10	765-773	2003