

2004 00445 A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 忠仁

平成17(2005)年4月

目次

I. 総括研究報告	
ウイルスを標的とする発がん予防の研究 神田 忠仁	----- 1
II. 分担研究報告	
1. ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の 解析 神田 忠仁	----- 5
2. C型肝炎ウイルスの感染成熟機構 松浦 善治	----- 8
3. C型肝炎ウイルスのヌクレオキャプシド形成機構及びコア蛋白質と結合する宿主 因子の探索 宮村 達男	----- 10
4. HCVゲノム複製を支配するウイルス及び細胞側因子の解析 下遠野 邦忠	-----17
5. HCVによるインターフェロンシステムの攪乱機構の解析 加藤 宣之	----- 21
6. 樹状細胞からみたC型肝炎ウイルス（HCV）持続感染機構の解析 林 紀夫	----- 29
7. C型肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞が認識する抗原エピープの同定 井廻 道夫	----- 31
8. 初回献血者におけるウイルスマーカー陽性率 2004年の輸血感染症報告 内田 茂治	----- 33 ----- 37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 42
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 44

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防に関する研究

主任研究者 神田 忠仁 国立感染症研究所・遺伝子解析室・室長

ヒトパピローマウイルス(HPV)は生殖器の粘膜に、C型肝炎ウイルス(HCV)は肝細胞に感染し、数年から数十年に渡る持続感染を経て、感染者は子宮頸がんないし肝臓がんを発症する。感染を予防するかウイルスを持続感染から排除すれば、これらのがんは防止することができる。ウイルスに対する免疫応答とウイルスの生活環を明らかにし、感染予防ワクチンや持続感染に介入する方法を探っている。HPVの感染成立をワクチンで予防できることは動物パピローマウイルスで示されているので、実用的な感染予防ワクチン抗原の開発をすすめた。複数の発がん性HPVの感染予防が期待できる第二世代ワクチン抗原を開発し、特許を申請した。HPV感染細胞が基底層に留まる限り、HPVの増殖は起こらないが、感染細胞が最終分化を始めるとHPVゲノムの複製とHPV蛋白質の大規模な発現が起こり、子孫ウイルスが形成されて周辺に放出される。このような持続感染維持に不可欠なHPV後期遺伝子の発現制御機構に研究の重点を置き、後期プロモーターを活性化する転写因子を同定した。HCVが肝細胞に侵入し、少量のウイルス増殖を伴う持続感染が成立・維持される分子機構は殆ど知られていない。本年度は、HCVエンヴェロープが細胞表面の線維芽細胞成長因子の受容体と特異的に結合することを見出し、この分子がHCV感染時の結合レセプターである可能性を示した。HCVゲノムが自立複製できる細胞株を樹立し、シクロスポリンによるゲノム複製抑制の分子機構を検討した。HCVヌクレオキャプシドの形成にはコア蛋白質N末端が重要であることがわかった。ヌクレオキャプシドとエンヴェロープ蛋白質は小胞体膜表面で邂逅し、ウイルス粒子は小胞体の内腔へ出芽するが、この過程でE1蛋白質が担う機能の一部を明らかにした。抗ウイルス療法や再発におけるDCサブセットの意義を明らかにするために、C型慢性肝炎患者を対象にIFN- α /リバビリン併用療法の治療経過あるいは再発過程に伴うDCサブセットの数、機能を解析した。また、C型急性肝炎患者で新たなHCV特異的CTLエピトープを同定した。発がんとは密接な関係のあるHBV、HCV、ヒトリンパ球向性ウイルス(HIV、HTLV-1)は血液を介して感染するので、日赤の輸血感染データを基に血液感染の動向をモニターした。データを蓄積することで疫学的な解析の質が向上する。

分担研究者

神田 忠仁 国立感染症研究所・室長
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所・教授
宮村 達男 国立感染症研究所・部長
下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所・教授
加藤 宣之 岡山大学医学部・教授
林 紀夫 大阪大学大学院・教授

井廻 道夫 昭和大学医学部・教授
内田 茂治 東京西赤十字血液センター・
課長

A. 研究目的

HPV感染は子宮頸がんを中心に世界の女性の
がんの11%の原因と推定されている。80以上の

HPV 遺伝子型のうち 16、18 型等の 14 種類の発がん性 HPV が子宮頸がんを引き起こす。発がん性 HPV の感染を予防できる実用的なワクチン抗原の開発をめざす。また、性器粘膜の基底細胞に潜伏・持続感染し、宿主細胞の分化に応じて増殖する HPV 生活環に介入し、HPV 感染細胞を体から排除する治療法の開発を目的とする。

(神田)

HCV は肝炎および肝がん発症の危険因子のひとつであり、これらの疾患のほぼ 80% と関連している。HCV はウイルス血症を呈しつつ持続感染するので、ウイルスの肝細胞への吸着・侵入からゲノムの複製、ウイルス粒子の形成に至るすべての過程を詳しく調べ、これらの過程を阻害してウイルスを体から排除する方法を探る。

(松浦、宮村、下遠野、加藤)。

HCV の持続感染における DC の減少と機能低下の分子機構、IFN α 不応答性の分子機構、及び IFN α とリバビリンの併用療法における DC、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の相互作用を解明し、DC サブセットの機能制御を介した初期免疫と獲得免疫の統合的調節によって HCV を排除する治療法の開発をめざす。(林)

HCV による慢性肝炎患者の治療時の HCV 特異的 CTL 応答および調節性 T 細胞応答を調べ、細胞性免疫応答が治療効果に及ぼす影響を解析する。(井廻)

輸血により伝播する HBV、HCV、ヒトリンパ球向性ウイルス (HIV、HTLV-1) の感染は発がん と密接な関係がある。新規感染者のウイルス遺伝子を解析して、感染者の背景を明らかにし、輸血によるウイルス感染の実状を明確にする。

(内田)

B. 研究方法

1) HPV 感染者の免疫応答に関する知見を得るために、HPV16 型 DNA 陽性 CIN 患者の血清中の抗 HPV16 型抗体価と中和活性を調べた。HPV16 型 L2 蛋白質にある高リスク型共通の感染防御エпитープ (L2 エピトープ) を L1 蛋白質に組み込んだキメラ L1-キャプシドを作製し、その抗原性を調べた。また、角化細胞の分化に伴って発現が誘導される転写因子 C/EBP β による 16 型 HPV の後期プロモーターへの影響を調べた。L1mRNA の安定性の制御機構を調べた。(神田)

2) HCV のエンベロープ蛋白質を被った VSV、組換えバキュロウイルスを用いて作製した HCV のウイルス様粒子、および、ウインドウ期の患者血清中の HCV 粒子の各種培養細胞への感染および結合をリポーター遺伝子の発現、定量 ELISA、

ならびに定量 PCR で解析した。(松浦)

3) 野生型または変異型の HCV コア遺伝子を試験管内転写翻訳反応系により発現させた。生じたコア粒子をショ糖密度勾配遠心によって分離し、透過型電子顕微鏡で観察した。また、Myctag-TEV protease 切断部位-FLAGtag を N 末端に付加したコア蛋白質を 293T 細胞で発現させ、抗 Myc 抗体による免疫沈降、TEV プロテアーゼによる切断、抗 Flag 抗体による免疫沈降によってコア蛋白質に特異的に結合する細胞蛋白質を探索した。(宮村)

4) HCV ゲノム自律複製細胞から全 RNA を抽出し、複製したウイルス RNA の 5' 末端の構造を調べた。HCV ゲノムが自律的によく複製するヒト肝がん由来 Huh7 細胞におけるインターフェロン関連のシグナルについて解析した。(下遠野)

5) ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞に各 HCV 蛋白質を発現させ、細胞周期の進行を解析した。siRNA により、TLR3 と TLR4 の発現を抑制し、IRF3 発現に与える影響を調べた。IFN に部分的抵抗性を示す HCV レプリコン細胞と高度に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞を比較した。HCVIRES の下流に G418 抵抗性遺伝子をつなぎ、内部の EMCVIRES の下流に全長 HCV 遺伝子をつないだ dicistronic な HCV RNA のレプリコン細胞を作製した。(加藤)

6) C 型慢性肝炎患者または非感染者の末梢血単球より樹状細胞 (DC) を誘導し、ナイーブ CD4T 細胞と共培養した後に、T 細胞のサイトカイン産生を解析することで DC の Th1 誘導能を評価した。DC 誘導過程において IFN α 単独または IFN α /リバビリンの添加による DC の機能変化を検討した。IFN α とリバビルン併用療法の過程での DC の Th1 誘導能を治療前及び開始後経時的に解析し、治療効果との関連を検討した。(林)

7) HCV 蛋白質のアミノ酸配列に相当する 15 アミノ酸あるいは 20 アミノ酸のペプチド (10 アミノ酸ずつ重複して全領域に該当) 401 種類を 20 個ずつ混合し、C 型急性肝炎患者末梢血 CD8 陽性細胞を刺激したのち、IFN- γ 産生細胞を算定した。陽性の場合には構成する個々のペプチドで刺激して、エピトープを決定した。(井廻)

8) 日赤をベースに輸血血液を介した HIV、HTLV-1、HBV、HCV 感染の調査を継続した。(内田)

倫理面への配慮

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「国立感染症研究所動物実験に関する基本方

針」、「大学等における実験動物について」等を踏まえ、動物実験が適切に行われるよう配慮した。

患者試料を使う場合は、提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省より示された「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究 研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

B. 研究結果

1) HPV が持続感染しても、抗体を誘導しないか抗体を誘導しても中和活性を持たない個体があることがわかった。HPV16 型 L2 蛋白質に存在する型共通感染中和エピトープを HPV16 型 L1 蛋白質の三カ所に挿入したキメラ蛋白質を作った。この蛋白質によって形成されるキャプシドは、粒子あたり 1080 個の中和エピトープを持っており、マウスに免疫すると複数の高リスク HPV L2 蛋白質に結合する抗体を誘導した。また、エンハンサー結合蛋白質のひとつ、CEBPβ、が HPV 後期プロモーターを活性化することを見出した。転写された mRNA の安定性は ORF 内 5' 側 513 塩基の領域によって調節されていることがわかった。(神田)。

2) 線維芽細胞成長因子受容体である FGFR-5 と HCV のエンヴェロップが特異的に結合することを明らかにした (松浦)。HCV の E1 蛋白質に細胞質内領域があることを明らかにした (松浦)。

3) HCV キャプシド形成の過程を詳細に調べ、コア蛋白質のアミノ末端側にある塩基性アミノ酸に富んだ領域がゲノム RNA のパッケージングに重要であることを明らかにした。また、コア蛋白質が結合する 7 種の新規細胞蛋白質を見出した。ひとつは E6AP と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼであった (宮村)。

4) HCV プラス鎖の 5' 末端に特別な修飾構造は存在せず、単にリン酸が付加した状態になっていることが強く示唆された。さらにゲノム末端の塩基配列が冗長であることが示された。HCV ゲノムが自己複製できる細胞系でのゲノム複製複合体の解析を進め、自然免疫機構によって HCV ゲノム複製が抑制されることを見出した。シクロスポリンによる HCV 増殖阻害は本薬剤の免疫抑制機能とは異なり、シクロフィリン経路によるものであることを明らかにした。(下遠野)

5) ヒト不死化肝細胞で HCV の NS5B 蛋白質を発現させると、TLR3 を介して IFN-beta の発現が

起こり、S 期進行が阻害されることを見出した。HCV ゲノム全長の複製が起こるレプリコン細胞株を樹立した。(加藤)。

6) C 型慢性肝炎患者由来の DC (HCV-DC) は非感染者 DC (N-DC) に比べて、IFNα への反応性に見られる Th1 誘導能の亢進が認められなかった。HCV-DC では N-DC に比べ、IFNα による CD86、CD80 の発現増強や、IL-10 の産生低下も軽度であった。HCV-DC では CD86 発現亢進、IL-10 産生低下と Th1 細胞誘導亢進に相関を認めなかった。IFNα のみでは DC の Th1 誘導が亢進しなくてもリバビリンを加えることで Th1 誘導能が亢進する症例では、投与開始後 DC の Th1 反応誘導能が亢進し、HCV が排除された (林)。

7) C 型急性肝炎患者で新たな HCV 特異的 CTL エピトープを同定した。また、HLA-A*2402 を持つ 3 人の C 型慢性肝炎患者リンパ球を調べ、CTL の活性化が低下しており、分化の程度も様々であることを見いだした (井廻)。

8) 日本赤十字社で進めている遡及調査により、低濃度 HBV キャリア献血者からの感染が確認された例があった。献血者は多数回の献血をしており、個別の NAT (核酸増幅検査) でも陰性の場合と陽性の場合があった。少なくとも 3 例は患者と献血者の HBV 遺伝子配列が一致しており、2 例の疑わしい例も確認された。(内田)

D. 考察

1) HPV が持続感染しても中和抗体を持たない個体を対象に、L2-エピトープを持つキメラ L1-キャプシドをワクチンとして接種して、中和抗体の誘導を調べる臨床試験を計画している。また、HPV L1 蛋白質は主要なキャプシド構成蛋白質であり、免疫系の標的になりうる。しかし、L1 蛋白質は持続感染状態では発現せず、分化しつつある細胞でのみ必要最低限量の発現が起こる。L1 蛋白質の発現調節の仕組みを解明すれば、阻害剤による介入によって HPV 粒子の形成を止めたり、免疫系による HPV の排除を誘導する方法を開発することができる。(神田)

2) FGFR-5 は HCV の感染受容体分子であることが強く示唆された。(松浦)

3) コア蛋白質の N 末端側の 3 つの塩基性アミノ酸クラスターは HCV クローン間でよく保存されている。少なくとも 1 つはヌクレオキャプシド形成に必要であることが示された。コア蛋白質はプロテアソームによって分解されるが、この過程に働くユビキチンリガーゼが E6AP であることを見出した。新たに同定したコア蛋白質結合因子には RNA 結合蛋白質やメチル基転移酵素な

どが含まれており、これらとコア蛋白質との相互作用解析を通じて、HCV 感染に伴う宿主細胞の遺伝子複製、RNA/蛋白合成の変化を明らかにしていく予定である。(宮村)

4) HCV ゲノム RNA の構造に関する知見は、ポリメラーゼを標的とした抗 HCV 剤の開発に役立つ。また、HCV ゲノム複製が自然免疫機構で強く抑制されることがわかった。二本鎖 RNA によりプライムされるインターフェロンシグナルの初期過程が正常に働く場合にはインターフェロン効果が強く現れるが、そうでない場合には内在性のインターフェロン産生は強く抑制され、HCV ゲノム複製を許すらしい。インターフェロン投与に加えて自然免疫を外因的に活性化すれば HCV ゲノム複製を抑制出来ると考えられる。

(下遠野)

5) NS5B による TLR3 を介した IFN- β の発現誘導は、NS5B の RNA ポリメラーゼ活性が TLR3 の活性化を引き起こすことによると考えられた。HCV RNA の複製が起こらない状態においても NS5B が宿主由来の RNA を基質にして 2 本鎖 RNA を合成し、TLR3 のリガンドとなる可能性がある。

HCV レプリコン細胞の IFN 抵抗性は、宿主側の IFN シグナル伝達系の異常により起こっていることが示唆された。TLR3 を介した IFN- β 誘導産生系をほぼ完全に抑えた細胞系においても、HCV レプリコン細胞を樹立出来なかったことから、PH5CH 細胞において HCV RNA の複製に必要な宿主因子が欠けている可能性がある。(加藤)

6) C 型慢性肝炎に対する IFN α /リバビリン併用療法において、DC 機能の回復は HCV 排除に重要であることが示された。治療前および治療経過中の DC 機能の解析によって、効果予測ができる可能性がある。(林)

7) C 型急性肝炎患者 2 例の自然経過における HCV ペプチド特異的 CTL の末梢血中での動態をみると、C 型肝炎の IFN 治療で HCV 量が減少し、抗原刺激の低下とともに HCV 特異的 CTL が減少する症例と、肝炎早期にはむしろ末梢血中の HCV 特異的 CTL は少なく、肝炎の改善、HCV 量の減少と共に CTL が増加する症例があった。後

者は肝炎早期には CTL が末梢血よりも肝に強く集積しているか、肝炎初期の高ウイルス量の時期には CTL が機能不全になっている可能性がある。(井廻)

8) 16 歳初回献血者の HBs 抗原陽性率は、平成 7 年より直線的に低下して平成 15 年には 0 となった。平成 16 年は逆に陽性率が増加しているが、これらは母子感染によるものではなく、一過性感染の HBs 抗原陽性時に献血したものと考えられた。(内田)

E. 結論

1) L2-エピトープを 3 個含むキメラ HPV16L1-キャプシドは、複数の高リスク型 HPV の L2 蛋白質に結合する抗体を誘導できる。HPV 自然感染で中和抗体を誘導できない患者を対象にした臨床試験を計画する。

2) HCV の感染受容体分子、ゲノムの末端構造、ゲノムの複製機構、ウイルス粒子の成熟過程等に関する情報を得たので、各過程を標的とした持続感染遮断戦略に役立てる。

3) 自然免疫が HCV ゲノム複製を強く制御することがわかった。HCV 感染初期における DC 活性化の機構を理解し、IFN 難治性患者に対する治療法を考えるうえで役立つ知見である。

4) C 型慢性肝炎患者では DC の IFN α 反応性 Th1 誘導能が低下しており、リバビリンは DC に作用して Th1 誘導能を回復させることで、治療効果をあげると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別紙に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中
識別番号 11000010 (神田)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析
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、現在14の型があるとされる高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染である。HPVは性行為等で生じた微少なキズから侵入し、表皮基底細胞に持続感染する。感染細胞が分化すると、小規模なウイルス増殖が起こり、新たな感染や別の個体への感染を起こす。従って、HPVの感染や感染拡大をワクチンで防いだり、持続感染に介入してウイルス増殖を阻害できれば子宮頸がんの発症リスクが大幅に下がると期待できる。本年度は以下の研究を進めた。1) HPV感染者の免疫応答に関する知見を得るために、HPV16型DNA陽性のCIN患者から血清を採取し、抗HPV16型抗体価と感染中和活性を調べた。血清の抗体価と中和活性に明瞭な相関は認められず、抗体が検出できない血清や、抗体があっても中和活性が全く無い血清があった。HPV持続感染における免疫応答に個体差があり、抗体を誘導した場合にも中和エピトープを認識しない個体があることを示している。2) HPV16型L2蛋白質のアミノ酸108-120領域にある高リスク型に共通の感染防御エピトープ（L2エピトープ）をL1蛋白質に組み込んだキメラL1-キャプシドを作製した。このキメラキャプシドをマウスに免疫して得た抗血清は、HPV16、18、31、33、52、58型のL2蛋白質に結合することがわかった。3) 角化細胞の分化に伴って発現が誘導される転写因子C/EBPβが、HPV16型の後期プロモーター（P670）近傍に結合し、転写活性を昂進することがわかった。4) L1遺伝子の5'端から500塩基までの領域が、核内でのL1mRNAの安定性を著しく損なうことがわかった。これらの知見は、HPVに対する患者の免疫応答やHPV生活環を知る有力な手がかりとなるものである。

A. 研究目的

高リスク型HPV群の感染を予防するワクチン抗原を開発する。また、HPV持続感染機構に介入する方法を探るために、HPVの生活環を支える分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

1) HPV16型DNA陽性CIN患者38名の血清を採取し、抗HPV16型抗体価と中和活性を調べた。抗体価はHPV16型L1-キャプシドを抗原とするELISAで測定した。中和活性は、分泌性アルカリフォスファターゼ（SEAP）発現する16型感染性偽ウイルスを1:160希釈の血清と混合したのち細胞に感染させ、抗体によるSEAP活性の低下率（%）で測定した。
2) L2-エピトープをHPV16型L1蛋白質に挿入し、組換えバキュロウイルス/sf9細胞系で発現させた。キメラ蛋白質は自律的に集合し、キャプシド様の構造を作った。このキメラL1-キャプシドをBalb/cマウス（6週令、雌）の皮下に2週間間隔で4回投与し、8週めに全採血した。血清と種々の高リスク型HPVのL2蛋白質との

結合は、L2蛋白質を抗原とするELISAで測定した。

3) C/EBPβをコードするcDNAをヒト胎盤由来cDNAライブラリーから得て、発現プラスミドpCMV-C/EBPβを作った。HPV16型後期プロモーターP670の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだりポータープラスミドと共にpCMV-C/EBPβをHeLa細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。C/EBPβとP670領域DNAとの結合は、ゲルシフト法で調べた。
4) HPV16型L1-mRNAの安定性を著しく損なう領域（全長約1500bpのL1遺伝子の5'端から500塩基までの領域）をルシフェラーゼ遺伝子の5'非翻訳領域、ORF内部の様々な領域、及び3'非翻訳領域に導入した遺伝子を作り、CMVプロモーターによってHeLa細胞で発現させた。mRNA量を測定し、その安定性を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行った。

C. 研究結果

1) HPV16 型陽性 CIN 患者血清の抗体価と中和活性に明瞭な相関は認められなかった。抗体価と中和活性が共に高いか、あるいは共に低い血清だけでなく、抗体価が高くても中和活性が低いものや、抗体価が低くても強い中和活性を示す血清があった。3名の血清は、抗 HPV16 型抗体が検出されなかった。異形成の進展例 4 名に強い中和活性 (70%以上) を示す血清は無く、逆に、CIN 消退例 9 名には強い中和活性を示すものが 5 名含まれていた。

2) キメラキャプシドをマウスに免疫して得た抗血清は、HPV16、18、31、33、52、58 型 L2 蛋白質に結合することがわかった。

3) C/EBP β は P670 の転写活性を 10 倍程度昂進した。ゲルシフト法では、C/EBP β が P670 近傍の 2 カ所に結合することが示された。この結合部位の塩基配列に置換変異を導入すると、C/EBP β による P670 の活性化が減弱した。

4) HPV16 型 L1 遺伝子の 5' 側 500 塩基の領域は、別の遺伝子に挿入しても mRNA の不安定化を引き起こした。遺伝子の 5' 端から 1000 塩基長以内に挿入すると強い分解促進が起こり、5' 端からの距離がそれ以上長くなると効果を失った。RNA ポリメラーゼ I を使うプロモーターに変えると、転写物の分解は起こらなかった。また、この領域の両端にスプライシングシグナルを配置して、転写後に除去すると mRNA の分解効率は低下した。

D. 考察

1) HPV 持続感染における免疫応答に個体差があり、抗体を誘導した場合にも中和エピトープを認識しない個体があることがわかった。いったん HPV に感染し、持続感染が成立しても、中和抗体があれば新たな持続感染部位の形成が阻害されるが、中和抗体を持たない個体は持続感染部位の数が増し、発がんのリスクが増大すると考えられる。HPV 粒子の持つ中和エピトープを認識できない個体もキメラ L1-キャプシドの L2-エピトープを認識する可能性がある。

2) HPV キャプシド蛋白質は、宿主である角化細胞の分化に伴って発現する。必要な時期に必要な量だけ合成し、徒に免疫系を刺激しないウイルスの戦略であろう。L1-蛋白質の発現は P670 プロモーターの転写活性と L1-mRNA の安定性で制御されていると考えられる。角化細胞分化では、初期に転写因子 hSkn-1a が発現し、分化が進んだ細胞で C/EBP β が発現する。P670 の転写活性の抑制は、hSkn-1a によって解除さ

れ、C/EBP β によって昂進すると考えられる。L1 蛋白質の合成は、転写された L1-mRNA 5' 端の stem-loop 構造とキャップ構造の両者を認識する分解機構によって、さらに制御されているらしい。これらの制御機構に介入する低分子化合物が開発できれば、HPV 増殖を止めることができると期待される。

E. 結論

1) L2-エピトープを 3 個含むキメラ HPV16 型 L1-キャプシドは、複数の高リスク型 HPV の L2 蛋白質に結合する抗体を誘導できる。

2) HPV16 キャプシド蛋白質は角化細胞の分化に伴ってのみ合成されるように、P670 プロモーターの転写活性と L1-mRNA の分解機構によって二重に制御されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kondo, K., Ishii, Y., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Prophylactic capsid vaccine against multiple high-risk human papillomaviruses: the chimeric L1-capsid presenting the common neutralization L2-epitope. Vaccine, in press, 2005.

2) Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., and Kanda, T.: Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. Virus Genes, in press, 2005

3) Matsumoto, K., Yasugi, T., Oki, A., Fujii, T., Nagata, C., Sekiya, S., Hoshiai, H., Taketani, Y., Kanda, T., Kawana, T., and Yoshikawa, H.: IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. Cancer Letter, 2005 in press

4) Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. Virology, 330:375-383, 2004.

5) Enomoto, Y., Enomoto, K., Kitamura, T., and Kanda, T.: The keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a

represses the growth of cervical cancer cell Lines. Oncogene, 23:5014-5022, 2004.

2. 学会発表

1) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発。第14回国立感染症研究所シンポジウム。

2) 森清一郎、竹内隆正、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス(AAV)9、10型ゲノムの分離とベクターへの応用。第52回日本ウイルス学会

3) 近藤一成、石井克之、神田忠仁：高リスクHPV群の感染を予防するワクチン抗原。第52回日本ウイルス学会

H. 知的所有権の取得

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中
識別番号 110000109

C型肝炎ウイルスの感染成熟機構

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨:C型肝炎ウイルス(HCV)の感染機構は未だ明らかにされていない。HCV のエンベロップ蛋白質を被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(VSV-pp)や、昆虫細胞で作製した HCV 様粒子(HCV-LP)を用いて HCV 感染に重要な宿主因子を探索した。VSV-pp は HepG2 細胞に特異的に感染し、HCV-LP の添加により濃度依存的に感染が阻害された。また、ヒト繊維芽細胞成長因子(FGF)が VSV-pp の感染を特異的に阻害し、その受容体である FGFR を恒常的に発現する CHO 細胞が HCV-LP や患者血清中の HCV と特異的に結合、および HCV-pp の感染を許容したことから、FGFR は HCV の新規受容体候補分子であることが示された。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人も HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究では HCV の宿主細胞への侵入および自然免疫の誘導を担うリセプター分子の同定を試みるとともに、ウイルス粒子の成熟過程の解析を解析し、各ステップをターゲットとした新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

キメラのエンベロップ蛋白質を被った VSV-pp だけでなく、レトロウイルスで報告されたように、authentic な HCV エンベロップ蛋白質を被った VSV-pp の作製を試みた。さらに、組換えバキュロウイルスを用いて作製した HCV-LP、および、ウィンドウ期の患者血清中の HCV 粒子の各種細胞への感染および結合をリポーター遺伝子の発現、定量 ELISA、ならびに定量 PCR で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

VSV-pp は HepG2 細胞に特異的に感染し、HCV-LP の添加により濃度依存的に感染が阻害された。また、ヘパリンが VSV-pp の感染を阻害することから、ヘパリンとの結合が活性発現に重要な各種成長因子による VSV-pp の感染阻止活性を調べ

たところ、FGF、特に FGF2 と FGF7 が VSV-pp の感染を特異的に阻害した。また、その可溶化型の受容体の中で、FGFR4 と FGFR5 が VSV-pp の感染を特異的に阻害し、HCV-LP や C型肝炎患者血清中の HCV 粒子とも結合した。また、セファロースに固着化した FGFR4 と FGFR5 は HCV-LP のみならず、ウィンドウ期血清中の HCV を特異的に沈降した。さらに、FGFR4 あるいは FGFR5 を恒常的に発現する CHO 細胞は HCV-LP や患者血清中の HCV と特異的に結合した。特に FGFR5 を発現する CHO 細胞株は VSV-pp の感染を許容できるようになり、siRNA によって FGFR5 を HepG2 細胞からノックダウンさせると感受性の低下が観察されたことから、FGFR5 が VSV-pp の侵入受容体である可能性が示唆された。一方、HepG2 細胞から、siRNA によって FGFR4 をノックダウンさせても、VSV-pp に対する感受性の低下は観察されなかった。

D. 考察

本研究により、FGFR4 と FGFR5 が HCV の新しい受容体候補分子であることが示唆された。

E. 結論

1. FGFR4 は HCV の結合受容体候補分子である。
2. FGFR5 は HCV の侵入受容体候補分子である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380 (2004).
2. Kaimori A., Kanto T., Limn C-K., Komoda Y., Oki C., Inoue M., Miyatake H., Itose I., Sakakibara M., Yakushiji T., Takehara T., Matsuura Y., and

- Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324, 74-83 (2004).
3. Migliaccio C.T., Follis K.E., Matsuura Y., and Nunberg J.H. Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 105, 47-57 (2004).
2. 学会発表
1. Matsuo E., Limn C.K., Komoda Y., Kitagawa Y., Miyamoto H., Yagi S., Moriishi K., and Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 2-7, 2004.
 2. Limn C.K., Komoda Y., Suzuki K., Otsubaki T., Tani H., Matsuo E., Tsuda Y., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Human fibroblast growth factor receptor 4 is a novel binding receptor for HCV. 同上
 3. Okamoto T., Kimura-Someya T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 同上
 4. Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 同上
 5. 松尾栄子、林 昌宏、菰田泰正、森石恒司1、八木慎太郎、松浦善治:ヒト肝癌由来細胞で作製したHCV様粒子の性状、第52回日本ウイルス学会総会、横浜、平成16年11月21-23日
 6. 林 昌宏、菰田泰正、鈴木健介、谷 英樹、大椿朋子、松尾栄子、津田祥美、森石恒司、宮村達男、松浦善治:HCV感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の役割、同上
 7. 谷 英樹、Michael A. Whitt、森石恒司、松浦善治:HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSVの作製、同上
 8. 森 嘉生、脇田隆字、小西英二、山下哲生、森石恒司、松浦善治:コア蛋白質が核に移行しない変異日本脳炎ウイルスの性状、同上
 9. 阿部隆之、森石恒司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治:バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、同上
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスのヌクレオキャプシド形成機構及びコア蛋白質と結合する宿主因子の探索

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 HCV コア蛋白質によるヌクレオキャプシド形成機構を解析し、コア蛋白質のセルフアセンブリー、RNA パッケージングには N 末端側に 3 カ所存在する塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が重要であることを見出した。コア蛋白結合宿主因子の探索を行い、コア蛋白質の分解を調節する E3 ユビキチンリガーゼを同定した。今後さらに、ゲノム RNA パッケージング、コア蛋白の選択的分解過程を分子レベルで明らかにしていくことにより、HCV の粒子形成、成熟化機構の解明につながることを期待される。

A. 研究目的

HCV コア蛋白質は、フラビウイルスなど近縁ウイルスとの相同性からヌクレオキャプシドを形成する構造蛋白質と考えられ、実際に RNA との結合やセルフアセンブリーによる粒子形成が報告されている。しかしながら、HCV RNA とコア蛋白質との相互作用様式、RNA パッケージングシグナルなどヌクレオキャプシド形成の分子機構は未だ明らかにされていない。そこで本年度はウイルス RNA との結合に関与すると考えられるコア蛋白質の塩基性アミノ酸クラスターが粒子形成に及ぼす影響を解析した。

一方、コア蛋白質は、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、肝細胞癌を発症させることなどが報告されている。コア蛋白質の成熟化及び細胞内環境攪乱を引き起こすメカニズムを明らかにしていくため、コア蛋白質と結合する新たな細胞因子の探索を行った。

B. 研究方法

(1) HCV コア蛋白質の試験管内発現と粒子形成

野生型または変異型の HCV コア遺伝子を pIVEX2.3d (Roche diagnostics) に組み込んだ種々の発現プラスミドを作製し、RTS 100 E coli. HY Kit (Roche diagnostics) を利用した試験管内転写翻訳反応系によりコア蛋白質を発現させた。反応液を 10-60% 糖密度勾配遠心によって分離し、各分画中のコア蛋白質をウエスタンブロットによって検出した。280,000g、1 時間の遠心操作によってコア粒子を沈殿させ、ネガティブ染色の後、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、コア粒子中の HCV 遺伝子を、コア遺伝子配列のプライマーを用いた RT-PCR によって検出した。

(2) エピトープタグアフィニティ精製法による HCV コア蛋白質結合因子の探索

MEF tag (Myc tag-TEV protease 切断部位-FLAG tag) 遺伝子の下流にコア遺伝子を挿入した発現プラスミド (pCDNA3/MEF-Core) を構築した。これを 293T 細胞にトランスフェクトし、発現蛋白質を二度の免疫沈降、固定相からの TEV プロテアーゼ切断、及び合成ペプチドに

よる解離反応によって段階的に精製した (図 1: Ichimura et al., J. Biol. Chem. (2005))。得られた蛋白質標品を SDS-PAGE で分離し、特異的バンドをゲルから切り出した。ゲル内トリプシン消化の後、LC-MS/MS 解析により蛋白質の同定を行った。蛋白質間相互作用は GST pull-down 法により解析した。

C. 研究結果

(1) HCV ヌクレオキャプシドの解析

試験管内の転写翻訳系で発現させたコア蛋白質はシヨ糖密度勾配遠心で 1.20 g/ml の分画に収束した (図 2: Wild-type)。さらに、この分画には直径 30—40 nm の粒子状構造が観察されること、RNase に耐性な状態で HCV RNA が存在することを見出した。コア蛋白質には 3ヶ所の塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が存在する。これらの配列がヌクレオキャプシド形成に重要であるかを調べるため、これらのクラスターに含まれるリジン、アルギニン残基をアラニンに置換した 7種類の変異体を作製し、粒子形成能を比較した (図 2: m1—m7)。3ヶ所のクラスター全てを変異させた場合 (m7) は粒子形成が認められず、コア蛋白質は密度 1.12—1.24 g/ml の広範囲に分布した。一方、1ヶ所、または 2ヶ所のクラスターを変異させた場合 (m1—m6) はいずれも直径 30—40 nm の粒子構造が観察された。しかしながら、多くの変異体でコア蛋白質の密度分布は Wild type と異なっており、コア粒子のコンフォメーションが変化している可能性が考えられた。

(2) コア蛋白質結合因子の探索と E3 ユビキチ

ンリガーゼの同定

MEF tag-コア融合蛋白質発現細胞からエピトープタグアフィニティ精製を行ったところ、特異的な共沈を示す 10本のバンドが SDS-PAGE で認められた。質量分析により、このうち 9種類の宿主蛋白質が同定された。2種類の蛋白質、Proteasome activator, PA28gamma と DEAD box protein 3 は既にコア蛋白質との相互作用が報告されているが、他の 7種類については報告がなく、新規結合蛋白質である可能性が考えられた。この中で、100-kDa 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼと推定された。試験管内で合成したコア蛋白質と精製した GST 融合 100-kDa 蛋白質を用いた GST pull-down 法によってコア蛋白質との相互作用を明らかにした。さらに培養細胞内でこの 100-kDa ユビキチンリガーゼの発現量依存的にコア蛋白質の分解が促進されることが示された (図 3)。

D. 考察

(1) HCV ヌクレオキャプシドの解析

C 型肝炎患者の血中にはエンベロープを含んだ直径 50—60 nm 粒子の他に、エンベロープを持たない直径 30—40 nm、シヨ糖密度勾配遠心で 1.22—1.25 g/ml のヌクレオキャプシド様粒子が存在することが報告されている (J. Hepatol. 22: 440 (1995), Hepatol. Res. 20: 335 (2001))。本研究において、試験管内の転写翻訳系から産生されたコア粒子の大きさは既報と同様であるが、密度は 1.20 g/ml とやや低かった。我々の発現系では全 HCV 遺伝子を含んでいないため、パッケージングされる遺伝子サイズの違いが粒子密度の差に反映している

のかもしれない。

コア蛋白質の N 末端側には塩基性アミノ酸クラスターが 3ヶ所存在する。これらの配列は HCV クローン間でよく保存されており、この領域を含むコア蛋白質の N 末端側 75 アミノ酸が RNA との結合に重要であることが示されている (J. Gen. Virol. 85: 971 (2004))。今回の研究から、塩基性アミノ酸クラスターのうち少なくとも 1ヶ所はヌクレオキャプシド形成に必要であることが示された。また、1または 2ヶ所のクラスターを変異させた場合、粒子形成能は保持されるもののコア蛋白質の密度分布パターンが変化することから、変異により RNA パッケージングの効率が低下すること、また取り込まれる RNA 分子がよりヘテロジニアスになることなどの可能性が考えられた。

(2) コア蛋白質結合因子の探索と E3 ユビキチンリガーゼの同定

2種類のエピトープタグを利用した MEF tag システムによるスクリーニングと質量分析によって 9種類のコア蛋白質結合因子を同定した。このスクリーニング系は 1) 非特異結合が少ない、2) 複合体の解析ができる、3) リン酸化等の翻訳後修飾の影響を解析できる、といった特長を有しているが、本研究において、酵母ツーハイブリッド法で同定された既知の結合因子 (Proteasome activator, PA28gamma と DEAD box protein 3) とともに新規結合因子も同定されたことから、改めてその有用性が示された。

新規結合因子のうち約 100 kDa 蛋白質は HECT (Homologous to E6AP COOH) domain 構造

を有する E3 ユビキチンリガーゼであった。

我々は、コア蛋白質がポリユビキチン化されプロテアソームによって分解されることを報告しているが、今回、このユビキチンリガーゼがコア蛋白質のユビキチン依存的分解に関与していることを見出した。コア蛋白質の選択的分解過程を分子レベルで明らかにしていくことにより、コア蛋白質の成熟化機構の解明につながることを期待される。また、今回新たに同定したコア蛋白質結合因子には RNA binding protein や methyltransferase などが含まれていた。これらの因子とコア蛋白質との相互作用解析を通じて、HCV 感染に伴う宿主細胞の遺伝子複製、RNA/蛋白質合成の変化を明らかにしていく予定である。

E. 結論

(1) コア蛋白質のセルフアセンブリー、RNA パッケージングには N 末端側に 3ヶ所存在する塩基性アミノ酸クラスターが重要であることを明らかにした。

(2) 2種類のエピトープタグを持つ特異的沈降法により、コア蛋白質結合因子を検索し、7種類の新規結合因子を含む 9種類の蛋白質を同定した。このうち分子量約 100 kDa の E3 ユビキチンリガーゼは、実際にコア蛋白質の不安定化に関与することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21, 3149-3156, 2003.
 3. Li, T. C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, L., Haag, L., Cheng, R. H., and Miyamura, T. Characterization of self-assembled empty virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311, 115-124, 2003.
 4. Watanabe, H., Saito, T., Shinzawa, H., Okumoto, K., Hattori, E., Adachi, T., Takeda, T., Sugahara, K., Ito, J. I., Saito, K., Togashi, H., Suzuki, R., Hayashi, M., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Kawata, S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J. Med. Virol.* 71, 56-61, 2003.
 5. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Mutrata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzulki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. PA28(-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J. Virol.* 77, 10237-10249, 2003.
 6. Aizaki, H., Nagamori, S., Matsuda, M., Kawakami, H., Hashimoto, O., Ishiko, H., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Matsuura, Y., Suzuki, T., and Miyamura, T. Production and release of infectious virions from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length- HCV RNA. *Virology* 314, 16-25, 2003.
 7. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38, 820-828, 2003.
 8. Brunetti, C. R., Amano, H., Ueda, Y., Qin, J., Miyamura, T., Suzuki, T., Li, X., Barrett, J. W., and McFadden, G. The complete genomic sequence and comparative analysis of the human tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J. Virol.* 77, 13335-13347, 2003.
 9. Sacco, R., Tsutsumi, T., Suzuki, R., Otsuka, M., Aizaki, H., Sakamoto, S.,

- Matsuda, M., Seki, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein in the ecdysone-inducible system of human liver cells. *Virology* 317, 24-35, 2003.
10. Ruggieri, A., Murdolo, M., Harada, T., Miyamura, T., and Rapicetta, M. Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing hepatitis C virus core protein. *Arch. Virol.* 149, 61-74, 2004.
11. Okamoto, K., Moriishi, K., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380, 2004.
12. Suzuki, T., Suzuki, R., Li, J., Hijikata, M., Matsuda, M., Li, T-C., Matsuura, Y., Mishiro, M., and Miyamura, T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.* 78, 10820-10824, 2004.
13. Suzuki, R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Shimoike, T., Mizumoto, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 79, 1271-1281, 2005.
14. Ishikawa, T., Fukushima, Y., Shiobara, Y., Kishimoto, T., Tanno, S., Shoji, I., Suzuki, T., Matsui, T., Shimada, Y., Ohyama, T., Nagai, R., and Miyamura, T. An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* (in press).
15. Nilsson, J., Miyazaki, N., Xing, L., Wu, B., Hammer, L., Li, T-C., Takeda, N., Miyamura, T., and Cheng, R. H. Structure and assembly of a T=1 polyoma BK virus-like particle. *J. Virol.* (in press).
- G. 知的所有権の取得状況
なし

図1. MEF tag法によるコア結合蛋白の精製

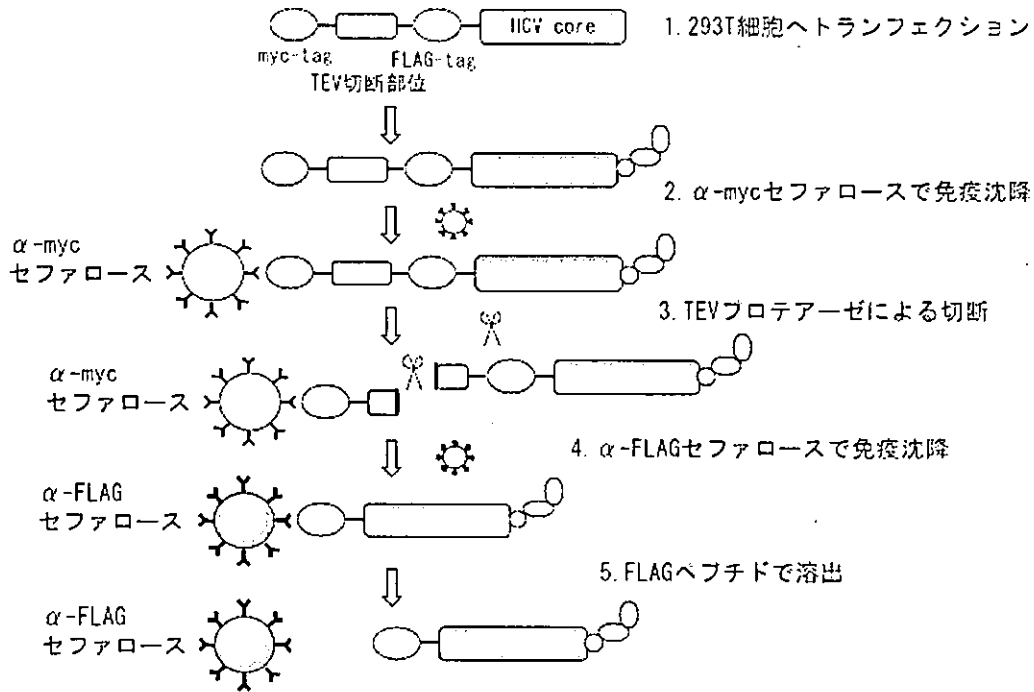
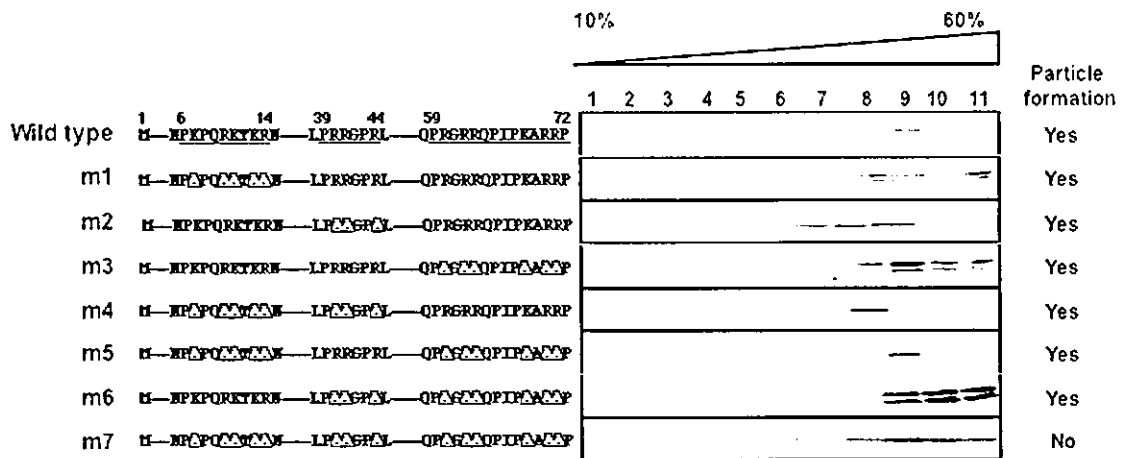
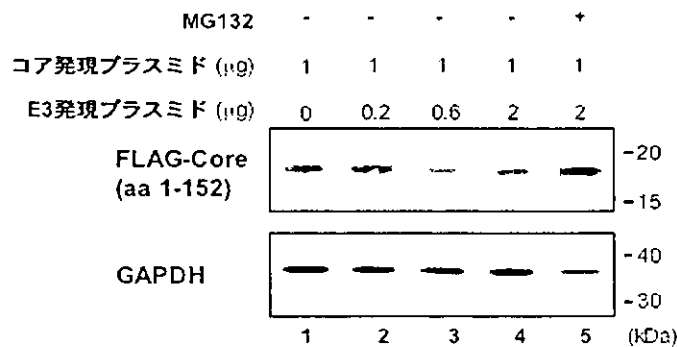


図2. コア蛋白質の塩基性アミノ酸クラスターの変異がコア粒子形成に及ぼす影響



野生型または変異型のコア発現プラスミドから試験管内転写翻訳反応によりコア蛋白質を産生した。反応液を10-60%ショ糖密度勾配遠心によって分離し各分画についてウエスタンブロットを行った。各サンプル (Wild type, m1-m7) におけるコア蛋白質のピーク分画をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡により粒子形成を観察した。

図3. 100-kDa E3リガーゼによるコア蛋白質の分解促進



HepG2細胞にコア発現プラスミド 1 μgとE3発現プラスミドをそれぞれ 0, 0.2, 0.6, 2 μgずつcotransfectし、48時間後に回収しウエスタンブロットを行った。E3の共発現により不安定化し低下したコア蛋白質レベルは、プロテアソーム阻害剤MG132の添加によって回復した。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業） 分担研究報告書

HCVゲノム複製を支配するウイルス及び細胞側因子の解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染により発症する肝がんの予防・治療には感染持続するウイルスの排除が重要である。本研究においてはHCVゲノム複製を制御する細胞側およびウイルス側因子を明らかにすることを目的として研究を進め、以下のことを見いだした。HCVゲノムが自律的に複製するヒト肝がん細胞、Huh7においては、自然免疫に関わるTLR3の機能が阻害されていた。2種類の細胞について調べ、そのうちのひとつはTLR3の発現がほとんど見られなく、他の細胞ではTLR3の発現はみられるものの、機能的に抑制されていた。一方、HCVゲノムの複製を解析している過程でプラス鎖ゲノムの開始塩基がGからAに変わることを見いだした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子のひとつである。HCV感染がどのようにしてこれらの疾患を誘発するかには不明な点が多い。一方、HCV感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのために、これまでに樹立したHCVサブゲノムが効率よく自律複製する細胞を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析、およびウイルス側要因の解析を行う。

B. 研究方法

(1) HCVゲノム自律複製細胞で合成されるウイルスRNAの解析。

これまでにHCVゲノムの構造が明らかにされているが、これらの情報は慢性C型肝炎患者の血清あるいは肝臓組織から

抽出したウイルスRNAの構造を決定したものである。分担者はこのような試料を用いて、その当時まだ解明されていなかったウイルスゲノムの3'端の構造を明らかにした。この新規の構造はその後ウイルスゲノムの複製に必須であることが証明されている。ゲノムの5'端についても同様のことが考えられる。すなわちこれまでに報告されている5'末端の構造がゲノム複製に十分であるという証拠はない。そこで、分担者らが樹立したHCVゲノム自律複製細胞を用いて、この中で自律複製しているウイルスRNAの5'末端の構造を明らかにすることにした。この実験から末端の塩基についての情報だけではなく、末端修飾のことについても新たな情報が得られると期待される。

まず、HCVゲノム自律複製細胞から全RNAを抽出し、その5'末端に修飾がないか

どうかを調べる。その後、5'末端の塩基配列を解析し、自律複製しうるHCVゲノムの構造を明らかにする。

(2) HCVゲノム複製を制御する細胞側因子の解析。

HCVゲノムが自律的によく複製する細胞は限られており、現状ではヒト肝がん由来細胞のひとつであるHuh7のみである。分担者は細胞側にウイルスの複製を促進する要因があると考えて、この原因を明らかにするために、種々の細胞要因の中からインターフェロン関連のシグナルについて解析を行う。

C. 研究成果

(1) HCVゲノムの末端修飾について。

HCVゲノムはプラス鎖RNAからなる。すなわち感染して細胞に入るとmRNAとして機能する。その際にmRNAの5'非翻訳領域はキャップ依存的な翻訳に適した構造を取るか、あるいはinternal ribosome entry site (IRES) を介した翻訳に適した構造を持つ。これまでにHCVゲノムの翻訳はIRES依存的に行われることが知られているが、このような機能を持つmRNAの末端構造についての詳細な解析はない。この点を明らかにするために、分担者はHCVゲノムの末端にキャップ様の構造があるかないかの解析を行った。まず、HCVゲノム自律複製細胞からHCV RNAを調製し、その末端を各種酵素で処理し、5'末端の構造を推定した。

細胞から調製したウイルスRNAを、無処理、フォスファターゼ単独、あるいはピロフォスファターゼ処理後フォスファターゼで処理し、その後、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端を放射性リン酸で標識した。その後、ウイルスRNAをゲル電気泳動し、ウイルスゲノムサイズのRNAバンドの放射能の取り込みを調べた。その結果、無処理の場合よりもフォスファターゼ単独処理の場合に放射能の取り込みが多く、その量はピロフォスファターゼとフォスファターゼ処理した場合とほぼ同じであった。このことから、ゲノムの末端にはキ

ャップのような構造は存在しないことが明らかになった。おそらく末端にはモノ、ジ、あるいはトリリン酸が付加した状態になっていると考えられる。

(2) HCVゲノムの5'末端塩基について。

上の実験結果から、末端の塩基を容易に調べることが可能になった。そこで、(1)の実験でウイルスRNAをフォスファターゼ処理した後にキナーゼで放射標識したRNAをアルカリ分解して、モノヌクレオチドにした。さらにこれらの加水分解物を二次元電気泳動にて、ヌクレオチドの展開を行った。オートラジオグラフィを行い、標識された塩基を調べたところ、グアニンとアデニンが主なスポットとして観察された。

HCVゲノムレプリコン細胞を樹立する際に用いたHCVゲノムは人為的に作成したものであり、その5'末端はGから始まる。しかし、ゲノムが自律的に複製する細胞内のゲノム解析からはG以外にAも観察された。そこで、細胞樹立の経時的な変化における違いを調べた。その結果最初の1ヶ月までには、ほとんどの塩基はGであったのに対して、三ヶ月を経るとG以外にAも観察されるようになった。新たに観察されるようになったA塩基がゲノムの中程から合成された結果でないことは、これらのゲノムをRT-PCRして、引き続き塩基配列を明らかにすることにより確認した。

これらの結果は最初Gから始まるウイルスゲノムの5'末端が、継代を続けるに従いGからAに変化することを示しており、HCVゲノム複製の開始機構について新たな知見を加えることになった。

HCVゲノムの構造はこれまでにたくさん報告がある。その中でも遺伝子型が異なるゲノムではその5'末端の塩基配列も異なる、HCV-1b型はGからなり、HCV-2a型ではAからなる。HCVの遺伝子系統樹を作成すると、このことがはっきり示される。

(3) HCVゲノム複製は二本鎖RNAをトリガーとする自然免疫に関わるシグナル系で制御されている。