

200400681A

厚生労働科学研究研究費補助金

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 宣之

平成17（2005）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 ----- 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

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年計画の最終年度にあたる平成16年度は、これまでの研究項目をさらに追究し、以下に示す研究成果を得た。（1）全長C型肝炎ウイルス（HCV）RNAが効率良く細胞内で複製しているクローン化細胞株を樹立した。さらに、HCV RNAにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだRNAを作成し、ルシフェラーゼ活性を測定することによりHCV RNAの複製レベルを定量的にモニターできるシステムを開発した。また、マウスにヒト肝臓由来の細胞を移植し、その細胞を用いてHCV RNAの複製を定量化できる方法を開発した。（2）前年度までに得られたインターフェロン（IFN）抵抗性HCVレプリコン細胞（部分抵抗性と完全抵抗性）を用いた解析によりIFN抵抗性の獲得には宿主側因子の変化が寄与していることを明らかにした。さらに、完全抵抗性を示すHCVレプリコン細胞（4株）では2種類のIFN受容体のどちらかで構造異常が生じ、機能欠損型になっていることを明らかにした。自然免疫を調節する細胞側因子であるTLR3がHCVの増殖制御に重要であることを見出した。また、サイクロフィリンBもHCVの増殖制御に関わる細胞側因子であることを明らかにした。（3）HCVレプリコン細胞や全長HCV RNA複製細胞を用いて、HCVの新規増殖抑制剤の探索を行った結果、抗HCV作用を示す薬剤としてTGF- β を新たに見出した。また、リバビリンの構造類似体でありリウマチ疾患等に対する既存薬であるミゾリビンがIFN併用時にリバビリンと同等以上の抗HCV作用を示すことを見出した。（4）細胞内で複製しているHCV RNAの5'末端構造を明らかにした。

分担研究者 下遠野 邦忠
京都大学ウイルス研究所・教授

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臓がんに必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、依然として肝臓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 (IFN) 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。しかし、HCV の効率よい複製増殖系がないことが、研究を推進するための大きな障害となっている。さらに、HCV を排除できる有効な薬剤も IFN しかないのが現状であり、新規抗 HCV 剤の発見も切望されている。そこで、我々は、上記の仮説を実験的に検証でき、新規抗 HCV 剤の探索評価も可能な幾つかの実験システムを新たに構築して、肝発がんのメカニズムの解明に迫るとともに、有効な抗 HCV 剤を見出し、肝発がんの予防に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 昨年度に作成開発した HCV 1B-2 株由来の HCV subgenomic レプリコン (sO) に HCV 1B-2 株由来の core から NS2 領域までの部分を結合させ、HCV IRES で drive される G418 抵抗性遺伝子 (Neo^R) と内部の EMCV IRES で drive される全長 HCV RNA を有する dicistronic な全長 HCV RNA を作成した。この RNA を IFN 処理により subgenomic レプリコンを排除した治癒細胞に導入し、G418 耐性細胞の選択を行う。

上記の dicistronic な全長 HCV

RNA の Neo^R 遺伝子の上流に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、その RNA を治癒細胞に導入して、G418 耐性細胞の選択を行う。得られた細胞のクローン化を行う。

(2) 全長 HCV RNA の複製レベルを定量することが可能な動物モデルを開発する。全長 HCV RNA が複製可能な細胞を移植したマウスを構築する。それを用いて全長 HCV RNA の複製レベルをモニターして評価できる系を樹立する。

(3) IFN に部分的抵抗性を示す HCV レプリコン細胞 (α シリーズ 5 株) と IFN に高度に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞 (β シリーズ 4 株) にサイクロスポリン A を添加して細胞から HCV レプリコンを排除した治癒細胞をそれぞれ作成する。pISRE-Luc プラスミドを用いたレポーターアッセイにより HCV レプリコン細胞と治癒細胞における IFN シグナルの伝達度を比較する。IFN 抵抗性レプリコン細胞内で複製している HCV レプリコンの遺伝子解析により見出された Q1737H や M2174V のアミノ酸置換を有する HCV レプリコン RNA 変異体を合成し、治癒細胞を用いて再度 HCV レプリコン細胞を樹立する。得られたレプリコン細胞に IFN- β (200 IU/ml) を添加して IFN 抵抗性の程度を評価する。

(4) これまでに得られた IFN に抵抗性を示す HCV レプリコンのクローン細胞 (α シリーズの 5 株と β シリーズの 4 株) について、IFN シス

テムを司る遺伝子群 (IFN 受容体である IFNAR1 と IFNAR2c、およびその下流の Jak1 と Tyk2) の cDNA を RT-PCR で増幅してプラスミドベクターにクローニングしてそれらの塩基配列を決定して比較解析する。親株で IFN 感受性の HCV レプリコン細胞由来の遺伝子を比較対照とする。

(5) 自然免疫に関わるシグナル系が HCV RNA の複製に与える影響を解析する。自然免疫機構のうち二本鎖 RNA により活性化される TLR3 シグナル経路が HCV RNA の複製にどのような効果を及ぼすかを調べる。そのために TLR3 を人為的に発現させた時の HCV RNA の複製能を調べる。

(6) HCV レプリコン細胞に種々の薬剤を添加して、HCV RNA の複製を制御する細胞側要因を明らかにする。

(7) 細胞内での HCV RNA の複製増殖レベルをルシフェラーゼアッセイにより定量的にモニターできる方法を用いて、リバピリンの構造類似体であり既存薬でもあるミゾリピンの抗 HCV 活性を測定し、リバピリンの抗 HCV 活性と比較する。

(8) サイクロスポリン A がどのような機序により HCV RNA の複製を抑制するかについて、サイクロスポリンが相互作用するタンパク質の中から、可能性のあるタンパク質の機能解析をする。

(9) HCV レプリコンおよび全長 HCV RNA 複製細胞から HCV RNA

を抽出し、5'末端標識後、末端の塩基配列を薄層クロマトグラフィーにより決定する。

(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。そのためには、倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究結果

(1) HCV 1B-2 株由来の全長 HCV RNA が細胞内で複製している G418 耐性細胞 (O 細胞) を樹立した。細胞内において HCV RNA が効率良く複製していることを Northern blot および Western blot 解析により確認した。HCV 遺伝子の解析により NS3 のヘリカーゼ領域に複製効率を亢進させる適応変異が 1 カ所存在することを見出した。

Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を有する全長 HCV RNA が効率良く複製している G418 耐性細胞を樹立した。この細胞から幾つかのクローン細胞を得ることが出来、その中から安定的に継代培養ができるクローン細胞 OR6 を得た。OR6 細胞を用いるとルシフェラーゼアッセイを行うことにより HCV RNA の複製レベルを簡便にかつ定量的にモニターできることを実験的に証明した。OR6 細胞を用いて、IFN- α の抗 HCV 作用を定量化した結果、IFN 添加後、72 時間における 50% 阻害濃度は 0.5 国際単位/mlであることを示した。

(2) 全長 HCV RNA が複製可能な細胞を移植したマウスを構築し、それを用いて HCV RNA の複製レベルを評価する系を樹立するために、全長 HCV RNA が自律的に複製しているヒト肝細胞をマウスに移植して、体内に維持される期間を観察した。その結果、1ヶ月以上に亘り細胞が増殖維持されることが明らかになった。これにより、HCV の複製阻害を定量的に測定可能なマウスモデル系が樹立された。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる検討の結果、IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞とその治癒細胞との間で IFN のシグナル伝達度に差は認められなかった。IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞株に認められたアミノ酸置換を有する HCV レプリコンを新規に作成して再度レプリコン細胞を樹立してそれらの IFN 感受性を調べたが、これらの HCV レプリコンが IFN 抵抗性に変化することはなかった。従って、IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞で見出されたレプリコンの遺伝的変異が直接 IFN 抵抗性を誘導するわけではないことが判った。

(4) IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞由来の IFNAR1、IFNAR2c、Jak1 および Tyk2 mRNA の塩基配列解析の結果、Jak1 や Tyk2 には異常は認められなかったが、IFNAR1 や IFNAR2c に高頻度にナンセンス変異や塩基の欠損が認められ、IFN 受容体の mRNA に構造異常が生じている

ことが明らかとなった。これらの構造異常は IFN に高度に抵抗性を示す β -series のレプリコン細胞に高頻度に認められたが、IFN に部分的抵抗性を示す α -series のレプリコン細胞ではほとんど認められなかった。親株の HCV レプリコン細胞でもこのような構造異常は認められなかった。さらに、IFNAR1 mRNA に構造異常を有する HCV レプリコン細胞に正常型の IFNAR1 を発現させると IFN 感受性に変化することを実験的に証明した。

(5) HCV ゲノム自律複製細胞 (HCV レプリコン細胞や全長 HCV RNA 複製細胞) を IFN で処理すると HCV ゲノムの複製は阻害されたが、二本鎖 RNA (この場合ポリ IC) で処理しても HCV RNA の複製は阻害されず、ポリ IC 処理で活性化されるはずの IRF3 の活性化も認められなかった。しかし、この細胞に TLR3 を外来的に発現させると、HCV RNA の複製は強く抑制されることが判った。以上の結果、HCV RNA の複製は二本鎖 RNA により誘導される自然免疫により強く制御されていることが分かった。

(6) HCV レプリコン細胞に種々の薬剤を添加して、HCV RNA の複製を制御する細胞側因子を探索した結果、TGF- β が HCV RNA の複製を強く抑制することを見出した。

(7) ミゾリピンもリバビリン同様、HCV RNA の複製を抑制する作用を有していることを見出した。薬剤添

加3日後における50%阻害濃度はリバビリンで76 μM 、ミゾリピンで99 μM であり、これらの濃度における細胞増殖速度の低下は認められなかった。次に、IFN- α との併用効果を調べたところ、ミゾリピンはリバビリンと同等以上の抗HCV作用を有することが判った。実際に薬剤を投与された患者における血中濃度は10 μM 程度であるが、この濃度においてもミゾリピンはIFN- α の効果を20%ほど増強することが判った。10 μM におけるリバビリンのIFN- α に対する増強効果は15%程度であった。

(8) サイクロスポリンAによるHCV RNAの複製阻害の分子機序を解析した結果、サイクロフィリンの機能阻害がHCV RNAの複製阻害を引き起こすことを明らかにした。哺乳動物細胞において知られている15種類のサイクロフィリンのうちどのサイクロフィリンがHCV RNAの複製に関与するかを調べた結果、サイクロフィリンBをsiRNAでノックダウンした場合にのみHCV RNAの複製が抑制されることを見出した。

(9) HCV RNA複製細胞から抽出したHCV RNAを用いて解析した結果、その5'末端はGとAが混在していることが判った。複製細胞の樹立に用いたHCV RNAの5'末端はGであったことから、細胞樹立後の経時的な変化を調べた。その結果、樹立後最初の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3ヶ月を経るとG以外にAも観察された。

D. 考察

(1) 国産の全長HCV RNA複製細胞とルシフェラーゼアッセイによりHCV RNAの複製レベルを定量化できる培養細胞系を確立できたことは今後のHCV研究を大きく前進させることができると考えられる。具体的には経済的にも安価で時間の節約にもなるこの培養細胞システムを用いた抗HCV剤の大規模探索が可能であると思われる。また、HCV蛋白質の細胞内機能を解析するための有用な実験系にもなるものと思われる。

(2) 今回、体内でHCV RNAが複製しているマウスが得られたことは、本マウスを用いてウイルスの複製を制御する薬剤の評価系として使用出来ることを示唆する。この系は今後抗HCV剤開発に有用であると考えられる。

(3) 今年度の実験結果から、HCVレプリコン細胞のIFN抵抗性は、ウイルス側の遺伝的因子により規定されているわけではなく、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された。しかしながら、長期間のHCVレプリコンの複製増殖が細胞内のシグナル伝達系の異常を導くという可能性もあることから、さらなる解析が必要である。

(4) HCVレプリコン細胞がIFNに高度に抵抗性を示す原因として、IFN受容体の構造異常が明らかとなったが、このような異常がIFN治療を受けた患者の肝臓で実際に起こっているかどうかについては不明であ

り、今後の解析が必要である。IFN に部分的抵抗性を示すレプリコン細胞では IFN 受容体の構造異常はほとんど認められなかったことから、別の宿主因子の異常が考えられる。この点についても、さらなる解析が必要である。

(5) HCV RNA の複製が自然免疫機構により強く抑制されるという事実、すなわち、二本鎖 RNA によりプライムされる IFN シグナルの初期過程が正常に働く場合には IFN の効果が強く現れるが、そうでない場合には内在性の IFN 産生は強く抑制され結果として HCV RNA の複製を許すものと考えられる。これが感染患者の生体内でも生じていることであれば、IFN 投与に加えて自然免疫を外因的に活性化すれば効率良く HCV の複製を抑制出来るものと考えられる。

(6) 今回、TGF- β が HCV RNA の複製を抑制する活性を有していることを見出したが、その際に細胞の増殖も抑制されたので、HCV RNA の複製増殖に関与する因子が細胞の増殖を制御する因子にも関連しているものと考えられた。

(7) ミゾリピンは我が国では抗リウマチ薬などとして認可使用されている薬剤であり、リバビリンの使用で問題になっている貧血などの副作用がほとんどないことと、リバビリンと同等以上の抗 HCV 作用が期待されることから、高齢者を中心にした IFN との併用による抗 HCV 療法

に十分使用できるものと思われる。早期の臨床試験の開始が望まれる。ミゾリピンやリバビリンはイノシン酸デハイドロゲナーゼの阻害剤として知られているが、同じ阻害剤であるミコフェノール酸には抗 HCV 作用を確認出来なかったことから、この酵素阻害が抗 HCV 作用と直接関わっているとは考えにくく、免疫作用などの他の作用機序によるものと思われる。

(8) サイクロスポリン A の抗 HCV 作用はサイクロフィリン B の機能阻害によるものであることが判った。従って、今後はサイクロフィリン B を標的にした新規抗 HCV 剤の開発が可能になるものと思われる。

(9) 今回の解析結果により細胞内で複製している HCV RNA の 5'末端には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ものと考えられた。

E. 結論

(1) 細胞内での HCV RNA の複製増殖レベルを定量的にモニターできる方法を開発した。

(2) マウスを用いて HCV RNA の複製を定量化できる方法を開発した。

(3) HCV レプリコンの IFN 抵抗性の獲得には宿主側因子の変化が寄与していることが判った。

(4) IFN に高度に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞では 2 種類の IFN 受容体のどちらかで異常が生じ、機能欠損型になっていることを明ら

かにした。

(5) 自然免疫を調節する細胞側因子である TLR3 が HCV の増殖制御に重要であることを見出した。

(6) HCV の増殖抑制剤として TGF- β を新たに見出した。

(7) リウマチ薬などとして既に用いられているミゾリビンがリバビリンと同程度の抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。

(8) HCV RNA の複製を制御する細胞側因子としてサイクロフィリン B の存在を明らかにした。

(9) 細胞内で複製している HCV RNA の 5'末端構造を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Namba, K., Naka, K., Dansako, H., Nozaki, A., Ikeda, M., Shiratori, Y., Shimotohno, K. and Kato, N. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 299-309, 2004.
2. Abe, K., Ikeda, M., Dansako, H., Naka, K., Shimotohno, K. and Kato, N. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.*, 107, 73-81, 2005.
3. Tamura, K., Oue, A., Tanaka, A., Shimizu, N., Takagi, H., Kato, N., Morikawa, A. and Hoshino, H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.*, 7, 29-40, 2005.
4. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M. and Shimotohno, K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.*, 86, 645-656, 2005.
5. Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K. and Kato, N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2005.
6. Naka, K., Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., and Kato, N. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2005.
7. Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M. Jr., and Lemon, S. M. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- β production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, in press, 2005.
8. Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K. and Murakami, S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.*, 78, 2738-2748, 2004.

9. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H, and Shimotohno, K. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 320, 135-143, 2004.
 10. Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K. : Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, 279, 29551-29557, 2004.
 11. Lin, J-Y. Ohshima, T. and Shimotohno, K.: Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Letters*, 573, 15-18, 2004.
 12. Iwai, A., Marusawa, H., Matsuzawa, S.,Fukushima, T., Hijikata, M., Reed J. C., Shimotohno, K. and Chiba, T. : Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates β -catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*, 23, 7593-7600. 2004.
 13. Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K. and Chiba, T. : The role of Notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology*, 127, 1775-1786. 2004.
 14. Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*, 331, 407-417, 2005.
 15. Takahashi, H., Yamaji, M., Hosaka, M., Kishine, H., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology*, 48, 104-111, 2005.
 16. Obata, Y., Yamamoto, K., Miyazaki, M.,Shimotohno, K., Kohno, S., Matsuyama,T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem.*, 280, 18355-18360, 2005.
 17. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Araki, H., Shimotohno, K. Exploiting cis-Acting Replication Elements To Direct Hepatitis C Virus-Dependent Transgene Expression. *J. Virol.*, 79, in press, 2005.
- 学会発表
1. Naka, K., Dansako, H., Kobayashi, N., Ikeda, M. and Kato, N. Hepatitis C virus NS5B activates TLR3 signaling pathway in non-cancerous hepatocytes. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
 2. Ikeda, M., Abe, K., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K. and Kato, N. Characterization of cured cells derived from clonal Huh-7 cell line carrying replicating a newly established genome-length HCV RNA (HCV-O). 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Heidelberg, Germany, 2004
 3. Dansako, H., Naka, K., Kobayashi, N., Ikeda, M. and Kato, N. Distraction of interferon signaling pathway in non-cancerous hepatocytes by HCV

- proteins. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
4. Abe, K., Ikeda, M., Dansako, H., Naka, K., Shimotohno, K. and Kato, N. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic and genome-length RNA replicating cells with their cured cells. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
 5. 仲 一仁、團迫 浩方、小林 直哉、池田 正徳、加藤 宣之、C型肝炎ウイルスNS5B蛋白質によるTLR3シグナル経路の活性化、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 6. 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、加藤 宣之、HCV-O (1B-2)株由来の全長HCV RNA複製系の開発、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 7. 田村 一志、大上 厚志、清水 宣明、加藤 宣之、星野 洪郎、Native formのHCV envelopeを持つVSV pseudotype virusの作製、およびその感染性についての検討 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 8. 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、下遠野 邦忠、加藤 宣之、C型肝炎ウイルス (HCV) レプリコン細胞および全長HCV RNA複製細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 9. 渡士 幸一、土方 誠、下遠野 邦忠、シクロスポリンによるHCV ゲノム複製制御のしくみ、第63回日本癌学会学術総会、福岡、平成16年9月
 10. 土方 誠、高橋 仁、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルスとインターフェロンシグナル、第63回日本癌学会学術総会、福岡、平成16年9月
 11. 村田 貴之、土方 誠、下遠野 邦忠、Erk阻害剤によるHCV IRES活性の増強、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 12. 村田 貴之、宮城 悠介、土方 誠、下遠野 邦忠、TGF-βによるC型肝炎ウイルス (HCV) レプリコン複製の抑制、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
 13. 渡士 幸一、石井 直人、土方 誠、井上 大輔、脇田 隆字、下遠野 邦忠、シクロフィリンによるHCVゲノム複製制御、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成16年11月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願

名称：レポーター遺伝子産物を発現するHCV全長ゲノム複製細胞、当該細胞を用いたスクリーニング方法、およびC型肝炎治療用組成物
 発明者：加藤 宣之 他
 整理番号：OP00089
 特願：2005-133158
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：なし

II. 分担研究報告

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 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルスゲノムが自律複製する細胞からウイルスを産生する細胞の樹立を試みたが、その様な細胞は得られなかった。また、この細胞を用いてウイルスゲノム複製を制御するウイルス側因子および細胞側因子の解析を行った。ウイルスゲノム複製を制御する細胞側因子としては自然免疫に働くTLR3からのシグナル、およびTGFβが強く阻害的に働き、シャペロンタンパク質のひとつであるサイクロフィリンがウイルス複製に重要な役割を果たすことを見いだした。また、HCVゲノムの複製機構を解析するために新たに合成されたHCVゲノムの末端構造を解析した。HCVゲノム複製を生体内でも測定可能になるマウスを開発した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎発症にはHCVの持続的な感染が必要であり、その過程で免疫系による細胞傷害が考えられる。一方、ウイルスがコードする蛋白質が、細胞増殖を積極的に変化させる事が明らかにされているので、免疫的に惹起される炎症に加えて、ウイルス蛋白質による細胞増殖の変化の作用が相乗的に作用し、細胞はがん化へと進行すると考えられる。本研究においてはこのような考えに基づいて、肝発がんに寄与していると考えられるウイルス蛋白質が細胞の増殖制御にどのように関与しているかを明らかにすると同時にウイルス感染防御という観点からウイルス複製を制御する細胞側要因を明らかにする。そのために（1）ウイルス蛋白質による細胞の増殖変化を調べる。

（2）ウイルスゲノム自律複製細胞を用いてウイルスゲノムの複製を制御するウイルス側および細胞側因子について解析することを目的とする。

B. 研究方法

（1）HCVゲノム的一部分および全ゲノムが効率よく複製する培養細胞を用いたウイルスゲノム複製の解析。HCVゲノム自律複製細胞からHCVゲ

ノムRNAを抽出しその末端構造を種々の核酸修飾酵素を用いておこなう。

（2）HCVゲノムの5'末端塩基配列の決定

HCVゲノム自律複製細胞からウイルスRNAを抽出し、5'末端標識をおこなったあと末端の塩基配列を薄層クロマトグラフィーで決める。

（3）自然免疫に関わるシグナル系がHCVゲノム複製に与える影響を解析する。

自然免疫機構能のうち二本鎖RNAにより活性化されるTLR3シグナル経路がHCVゲノム複製に及ぼす効果を調べる。そのためにTLR3を人為的に発現させたときのHCVゲノム複製能を調べる。

（4）シクロフィリンによるHCVゲノム複製制御について。

シクロスポリンがどのようにしてHCVゲノム複製を抑制するかについて、シクロスポリンが相互作用するタンパク質の中から、可能性のあるタンパク質の機能解析をする。

（5）HCVゲノム複製を制御する細胞側要因の探索。

HCV自律複製細胞に種々の薬剤を添加して、ウイルスゲノム複製を制御する細胞側要因を明らかにする。

(6) HCV ゲノム複製を定量可能な動物モデルを開発する。HCV ゲノムが複製可能な細胞を移植したマウスを構築する。それを用いてゲノム複製を評価する系を樹立する。

C. 研究成果

(1) HCV ゲノムの一部分および全ゲノムが効率よく複製する培養細胞を用いたウイルスゲノム複製の解析。

HCV ゲノムはプラス鎖 RNA からなり感染細胞では mRNA として機能する。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。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。その後にウイルス 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

HCV 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ー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。樹立後最初の 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 3 ヶ月を経ると G 以外に A も観察されるようになった。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いる。HCV ゲノムの構造はこれまでにたくさんの報告がある。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。

(3) TLR3 シグナルによる HCV ゲノム複製阻害

HCV ゲノム自律複製細胞においては、ウイルスゲノムの複製はインターフェロンで強く阻害される。事実 HCV ゲノム自律複製細胞に約 100 IU/ml 濃度のインターフェロン処理するとウイルス複製は一週間でほぼ完全に消滅する。一方、生体内ではインターフェロン投与によってもウイルスが排除される場合とされない場合とが存在する。また、Huh7 細胞においてはインターフェロン産生経路の一部に欠失があると言われている。この欠失と、HCV ゲノムが Huh7 細胞でよく複製する事実とに何らかの関係がある可能性を考えて以下に解析をおこなった。HCV ゲノム自律複製細胞をインターフェロンで処理すると確かにウイルスゲノムの複製は阻害されるが、インターフェロン

発現誘導の初期反応、つまり priming の際に、二本鎖 RNA (この場合ポリ IC) で処理してもウイルスゲノム複製は阻害されない。そこでポリ IC 処理で活性化される IRF3 の転写活性を調べたところ、この細胞においては活性化が見られなかった。一方、TLR3 の機能的な抑制が HCV ゲノム複製に及ぼす影響を Huh7 細胞に TLR3 を外来的に発現させたときの HCV ゲノム複製能で調べた。その結果、HCV ゲノム複製能は強く抑制された。以上から、HCV ゲノムの複製は二本鎖 RNA により誘導される自然免疫により強く制御されることが分かった。

(4) シクロフィリンによる HCV ゲノム複製制御

CsA による HCV ゲノム複製阻害が CsA の持ついかなる機能によるものかを明らかにするために、種々の CsA について抗 HCV 作用を調べた。その結果サイクロフィリンの機能阻害が HCV ゲノム複製阻害を引き起こすことが分かった。哺乳動物細胞においては約 15 種類のサイクロフィリンが知られている。そこで、これらのうちでどのサイクロフィリンがウイルスゲノム複製に関与するかを調べた。その結果、サイクロフィリン B (CypB) を siRNA でノックダウンした場合にのみ HCV ゲノム複製が抑制された。

(5) HCV ゲノム複製を制御する細胞側要因の探索。

HCV 自律複製細胞に種々の薬剤を添加して、ウイルスゲノム複製を制御する細胞側要因を探索し、TGF- β が HCV ゲノム複製を強く抑制することを見出した。その際に細胞の増殖も抑制されたので、HCV ゲノム増殖に関与する因子が細胞の増殖を制御する因子とも関連していると考えられる。

(6) HCV ゲノム複製を定量可能な動物モデルの開発。

HCV ゲノムが複製可能な細胞を移植したマウスを構築し、それを用いて

ゲノム複製を評価する系を樹立するために、HCV ゲノム自律複製細胞をマウスに導入して、体内に維持される期間を観察した。その結果、1ヶ月以上に亘り細胞が増殖維持されることが明らかになった。このことは、本マウスを用いてウイルス複製を制御する薬剤の評価に使用出来ることを示唆する。なお、HCV 複製阻害を定量可能なマウスモデル系を樹立した。この系は今後抗 HCV 剤開発に有用であると考えられる。

D. 考察

HCV ゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスの複製増殖に関して本格的な研究が可能になってきた。本研究ではそのうち特にウイルスゲノム複製を制御しているウイルスタンパク質からの解析と自然免疫によるウイルス複製制御について解析をおこなった。本研究ではレプリコン細胞内で新たに合成される HCVRNA の末端構造を解析した。その結果、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と考えられる結果を得た。

さらにゲノム末端構造の解析から末端の塩基配列が冗長であることを示す結果が得られた。これはウイルスポリメラーゼの特徴なのかあるいは、別の要因により変化が生じるのか大変興味を持たれる。

C 型慢性肝炎患者の治療に広く用いられているインターフェロン (あるいはインターフェロンとリバビリンの併用療法) において、完治率は満足出来るものではない。その原因としては HCV 複製阻害にインターフェロンがどのような機構で効いているかについての詳細な研究がなされてないためである。本研究では HCV ゲノム複製が自然免疫機構で強く抑制されることを明らかにした。すなわち、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その結果 HCV ゲノム複製を許すと考えられる。このようなことが感染患者の生体内でも生じているとするなら、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一層効率よく HCV ゲノム複製を抑制出来ると考えられるので、今後の治療に明るい情報になる。

E. 結論

HCV ゲノム複製を制御する細胞側因子としてサイクロフィリンの存在を明らかにした。また、ウイルス RNA の複製の開始機構について解析し、最初の塩基の選択が冗長であることを明らかにした。また、自然免疫機構が HCV ゲノム複製を制御することなども明らかにした。これらの成果は今後ウイルスの複製阻害を目指した抗 HCV 剤の開発に資すると期待される。また、最近自然免疫機能をウイルスタンパク質が抑制しているという報告もあるので、本研究で述べた TLR3 シグナルへのウイルスの持つ制御機構の研究にも道を拓くと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Iwai, A., Marusawa, H., Matsuzawa, S., Fukushima, T., Hijikata, M., Reed J. C., Shimotohno, K. and Chiba, T.: Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates b-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*. 23, 7593-7600. 2004.
2. Kodama, Y, Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K. and Chiba T.: The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology*. 127, 1775-1786. 2004.
3. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H., and Shimotohno, K.: Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 320, 135-143. 2004
4. Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K. and Murakami, S.: Effect of Interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virology*, 78, 2738-2748. 2004
5. Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K.: Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 279, 29551-29557, 2004.
6. Lin, J-Y. Ohshima, T. and Shimotohno, K.: Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Letters*. 573, 15-18, 2004.
7. Namba, K., Naka, K., Dansako, H., Nozaki, A., Ikeda, M., Shiratori, Y., Shimotohno, K. and Kato, N.: Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon resistant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.*, 323, 299-309, 2004.

8. Takahashi, H., Yamaji, Y., Hosaka, M., Kishine, H., Hijikata, M. and Shimotohno, K. : Analysis of the 5' End Structure of HCV Subgenomic RNA Replicated in a Huh7 Cell Line, *Intervirology*, 48, 104-111, 2005
9. Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*, 331, 407-417, 2005.
10. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M. and Shimotohno, K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.*, 86, 645-656, 2005.
11. Obata, Y., Yamamoto, K., Miyazaki, M., Shimotohno, K., Kohno, S., Matsuyama, T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem.*, 280, 18355-18360, 2005.
12. Abe, K., Ikeda, M., Dansako, H., Naka, K., Shimotohno, K. and Kato, N. : cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.*, 107, 73-81, 2005.
13. Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Araki, H., Shimotohno, K. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J. Virol.*, 79, in press, 2005.

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

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) Namba, K. (加藤) (下遠野)	Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	323	299-309	2004
2) Abe, K. (加藤) (下遠野)	cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells.	Virus Res.	107	73-81	2005
3) Tamura, K. (加藤)	Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication.	Microbes Infect.	7	29-40	2005
4) Kato, N. (加藤) (下遠野)	Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture.	J. Gen. Virol.	86	645-656	2005
5) Shimakami, T. (下遠野)	Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon.	J. Virol.	78	2738-2748	2004