

200500462 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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 忠仁

平成18(2006)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	----- 1
神田 忠仁	
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	----- 6
2. C型肝炎ウイルスの感染成熟機構	----- 9
松浦 善治	
3. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の選択的分解機構の解析	
DNA トランスフェクションによる感染性 HCV 産生細胞系の樹立	
宮村 達男	----- 12
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	-----19
下遠野 邦忠	
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	----- 23
加藤 宣之	
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	----- 33
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питープの同定	
井廻 道夫	----- 34
8. 初回献血者におけるウイルスマーカー陽性率	----- 36
2005年の輸血感染症報告	----- 42
内田 茂治	
III.研究成果の刊行に関する一覧表	----- 47
III.研究成果の刊行物・別刷	----- 50

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

主任研究者：神田 忠仁

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

HPV は生殖器の粘膜に、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、それぞれ子宮頸がんと肝臓がんを発症させる。そこで HPV、HCV の感染予防ないし持続感染阻止によって発がんを防止する方法を研究している。

HPV 感染予防ワクチン抗原の開発をすすめた。これまでに複数の発がん性 HPV を中和する抗体のエピトープ（型共通中和エピトープ）をひとつ発見し、ワクチン抗原への応用を目指してきたが、新たに2つの有力な型共通中和エピトープを見つけた。HPV は感染した表皮基底細胞の分化の最終段階でのみ増殖する。この HPV 増殖機構に介入して、HPV を排除するには、HPV 後期プロモーターの調節機構を理解し、そこに介入することが重要と考え、後期プロモーターからの転写の抑制と活性化に関わる転写因子群を解析した。

HCV は肝細胞で小規模な増殖・再感染を繰り返す。HCV が感染に利用する受容体分子、ゲノムの複製機構、ウイルス粒子の成熟過程の分子機構を詳しく調べて、ウイルス増殖のどの過程が持続感染遮断の標的となるかを明らかにし、阻害剤の開発を目指した。感染受容体候補分子として hCD81 および hFGFR5 を見出した。HCV ゲノム自律複製細胞を使った研究で、サイクロフィリン B が複製に重要であること、ミゾリピンとスタチン剤が複製阻害剤となることを見出した。また、p7 が HCV 粒子のアセンブリーまたは細胞外への放出に重要であることがわかった。HCV 持続感染者で樹状細胞 (DC) の減少と機能低下及びインターフェロン (IFN) 不応答性が生じる分子機構、HCV に対する感染者の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答について調べ、免疫系による HCV 排除の可能性を探った。C 型慢性肝炎患者では DC サブセットの数・機能が低下していること、C 型慢性肝炎患者の単球由来 DC では、非感染者と比較して TLR2 発現が低下しており、TLR2 を介した DC の成熟と T 細胞の増殖刺激活性の低下が認められることを明らかにした。また、HCV 急性肝炎患者で新たな HCV 特異的 CTL エピトープを7種同定した。

発がんと密接な関係のある 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感染の動向を調査した。

分担研究者

神田 忠仁 国立感染症研究所・センター長  
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

の発がん性 HPV が子宮頸がんを引き起こす。発がん性 HPV 群の感染防御免疫を誘導できる実用的なワクチン抗原を開発すれば、子宮頸がんを予防できると期待され、集団検診の負担からも解放される。また、性器粘膜の基底細胞に数年から数十年にわたって潜伏・持続感染し、宿主細胞の分化に呼応して増殖しては感染の拡大を続ける HPV 生活環を支える分子機構を明らかにし、持続感染している HPV ないし、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。

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。100以上の HPV 遺伝子型のうち16、18型等の15種類

現在、世界には2億人もの HCV のキャリアーが存在すると推定されている。HCV は肝炎および肝がん発症の危険因子のひとつであり、我が国においては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、肝細胞での増殖・再感染を繰り返すので、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素過程を詳しく調べる。これらの過程を阻害してウイルスの増殖を抑制する方法を探る。完全な排除ができなくても、体内のウイルス量を低減することで、発がんリスクが著しく低下すると期待できる。

IFN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目標とする。免疫細胞療法は、高齢化傾向にある患者群の副作用軽減や治療の受けやすさの向上の点からも利点が多い。IFN不応答性の分子機構を明らかにし、応答性の向上を図る。

免疫応答を利用したHCV持続感染に対する新しい治療戦略を開発するために、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。

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。

## B. 研究方法

1) HPVキャプシドはL1及びL2蛋白質からなる。HPV16型L2蛋白質のうちキャプシド表面に出ている領域に注目した。この領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドをウサギに免疫して得た抗血清の感染中和能を調べた。また、HPV16型後期プロモーター領域に塩基置換変異を導入し、転写活性の調節に関わるシス因子を探した。L1mRNAの安定性の制御機構を調べた。(神田)

2) 遺伝子型の異なるHCVのエンベロープ蛋白質をCHO細胞と293T細胞でポリプロテインの形で発現させ、そこでエンベロープ欠損水疱性口内炎ウイルス(VSV)を増殖させて得たシュードタイプウイルス(HCVpv)を用いて、HCVの感染機構を解析した。(松浦)

3) Myc-tag-TEVprotease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。RNA Pol I promoter/terminatorによってHCV JFH1株またはH77株のゲノムcDNAをヒト肝細胞癌株Huh7で一過性に発現させる方法で、HCVの増殖を試みた。(宮村)

4) HCVの全長、部分ゲノムが効率よく自律複製する細胞を樹立し、その細胞でのウイルスゲノム複製をルシフェラーゼ活性によってモニターできる実験系を作成した。この実験系で、ゲノム複製阻害剤を探索した。また、HCVゲノム複製時に変異が入りにくい領域を探し、そこを標的にするsiRNAによる複製阻害を検討した。(下遠野)

5) IFN抵抗性HCVレプリコン細胞におけるIFNシグナル伝達系遺伝子の発現状態を調べた。ヒト不死化肝PH5CH8細胞でNS3-4Aを発現させるIFN-β産生が抑制されたので、この細胞でのIFN-β遺伝子プロモータの転写活性を調べた。(加藤)

6) 末梢血単核球より誘導したDCにおけるTLRの発現をリアルタイムPCR法を用いて検討した。また各TLRに特異的なアゴニストを用いてDCを刺激し、TLRの発現変化、DCの成熟度、DCのサイトカイン産生を検討した。TLRアゴニスト刺激DCのT細胞増殖刺激能、Th1誘導能を検討した。(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型急性肝炎患者あるいはC型急性肝炎治癒後の患者、C型急性肝炎慢性化後1年経過した患者の末梢血単核球のCD8陽性細胞をを刺激したのち、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、個人情報に厳格に管理、保存した。

### C. 研究結果

1) HPV16 型 L2 蛋白質のキャプシド表面領域は感染に重要な役割を担うことが分かった。この領域のうちアミノ酸 28 から 42、61 から 75、64 から 81、96 から 115、107 から 122、131 から 144 に結合する抗体は感染阻害能があった。これら 3 種の抗体を混合すると、中和活性が増強した。また、これらの抗体には HPV18 型、31 型、58 型を中和するものもあった。

HPV16 型後期プロモーター領域の 2 カ所に CCAAT displacement protein が結合することで、転写活性が抑制されていることが分かった。HPV16 型 L1 遺伝子の 5' 側 500 塩基の領域は、未分化細胞においては mRNA の成熟過程で RNA の分解を促進する機能を持つことが分かった。(神田)。

2) HCV の受容体候補分子である hCD81 を全く発現していない HepG2 細胞に HCVpv が感受性を示すことから、HCV の感染に hCD81 以外の細胞表面因子の関与が示唆された。HCVpv の感染が可溶化型のヒト繊維芽細胞成長因子受容体 5 (hFGFR5) によって特異的に阻害されること、hFGFR5 を恒常的に発現する CHO 細胞株は HCVpv の感染を許容できるようになり、siRNA によって hFGFR5 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、hFGFR5 が HCVpv の新規受容体であることが示唆された。

HCV のエンベロープ蛋白質を発現させた CHO 細胞と 293T 細胞を用いて、それぞれ HCVpv/CHO と HCVpv/293T を作製した。HCVpv/CHO は hFGFR5 依存的に HepG2 細胞に高い感染性を示し、HCVpv/293T は hCD81 依存的に Huh7 細胞に高い感染性を示した。また、慢性 C 型肝炎患者血清中には HCVpv/293T に対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHO に対する中和抗体価は低かった。患者血清中に存在する天然の HCV 粒子も、HCVpv と同様に HepG2 細胞と Huh7 細胞に結合した。HCV 粒子の HepG2 細胞への結合は可溶型 hFGFR5 や抗 hFGFR5 抗体で、また、Huh7 細胞への結合は抗 hCD81 抗体によって阻害された。(松浦)。

3) 7 種類の新規 HCV コア蛋白質結合因子を見出した。このうち約 100kDa 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼの一種 E6-associated protein

(E6AP) であった。コア蛋白質は E6AP によってユビキチン化されることがわかった。

pHHJFH1 を Huh7 細胞へトランスフェクション後 3-5 日目の培養上清を回収し限外濾過にて約 30 倍に濃縮した後、Huh7. 5. 1 細胞へ添加した。4 日間の培養後、コア蛋白質の免疫染色を行ったところ、10% 程度の細胞でフォーカス状の染色像が観察され、pHHJFH1 導入細胞から感染性 HCV が産生されることが示された。(宮村)。

4) HCV ゲノム複製を制御する低分子化合物を探索し、インターフェロン、TGF ベータ、IL1 ベータ、シクロスポリン A が強い抗 HCV 作用を示すことがわかった。サイクロスポリン A は細胞のシクロフィリン B を抑制することにより抗 HCV 作用を持つことが分かった。シクロフィリン B は NS5B と RNA の結合性を昂進することがわかり、この昂進がサイクロスポリン A によって阻害されるらしい。また、シクロスポリン誘導体の一つ、NIM811 は免疫抑制作用を持たないが強く HCV 複製を抑制することを見いだした。

ERK シグナルの阻害剤である PD98059 が HCV ゲノム複製をあげることがわかった。HCV IRES の翻訳反応がこの試薬の存在により昂進することを見いだした。PD98059 はキャップ依存的な翻訳反応には影響を与えない。また、他の IRES 配列を持つ RNA からの翻訳にも影響を与えなかった。(下遠野)

5) 高度に IFN 抵抗性を持つ HCV レプリコン細胞では、IFNAR1 遺伝子に構造異常が認められ、これが原因で IFN 系が活性化しないことが分かった。軽度に IFN 抵抗性を持つ HCV レプリコン細胞では、IFN シグナル伝達系の上流域に位置する IFNAR1 遺伝子群がメチル化され、発現量が低下していることが示唆された。

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞で、NS3-4A の発現によって IFN-β 産生が抑制される機構を調べた。poly I:C を直接細胞内に導入すると、IFN-β 遺伝子プロモーターの活性化は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して抑制された。しかし、poly I:C を細胞の外部から添加して刺激した場合は IFN-β 遺伝子プロモーターの活性化は NS3-4A により抑制されないことがわかった。

全長 HCV RNA の複製レベルを簡便に定量できる OR6 アッセイシステムを用いて、既存薬を中心に HCV RNA の複製を抑制する薬剤の探索を行った。その結果、リバビリンと類似した構造を持つミゾリビンがリバビリンとほぼ同程度の

抗 HCV 活性を持つことを見出した。国内で認可されている他のスタチン剤である

Atrovastatin、Fluvastatin、Simvastatin は抗 HCV 効果を示した。特に Fluvastatin は他の薬剤よりも有意に強い抗 HCV 効果を示した。抗 HCV 効果を示すスタチン剤は IFN- $\alpha$  との併用によっても相乗効果を示すことが明らかになった。(加藤)。

6) DC における TLR2 の発現は C 型慢性肝炎患者で低下していたが、TLR3、TLR4 の発現は非感染者と同程度であった。また TLR2、TLR3、TLR4 の各アゴニスト刺激により DC の TLR2 の発現は亢進したが、その程度は C 型慢性肝炎患者で低かった。TLR3 アゴニスト刺激による IL-12p70、IL-23、IL-27 の発現誘導は患者 DC で高い傾向を認めた。TLR アゴニスト刺激 DC の T 細胞増殖能、Th1 誘導能は、TLR2 刺激では患者 DC で低下していた。(林)。

7) これまでに同定した 7 種の CTL エピトープの最小有効エピトープを明らかにした。HCV 特異的 CTL の経過を観察できた C 型急性肝炎 2 例の内の 1 例は急性肝炎発症時に HCV 抗体が陰性であるにもかかわらず HCV に対する CTL 応答が認められ、血清中に HCV RNA が微量検出され C 型急性肝炎と確定した。この患者ではその後も HCV 抗体値の上昇は認められず、HCV 排除における CTL 応答の重要性が確認された。別の一例では、肝炎早期には末梢血中に多数の HCV 特異的 CTL が認められるものの、肝炎の改善、HCV 量の減少と共に減少した。(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) L2 蛋白質のキャプシド表面領域のアミノ酸配列は高リスク HPV 群で大部分共通であり、感染に重要な共通の機能を担っているらしい。この領域に抗体が結合すると感染が阻害されることから、アミノ酸配列の相同性の高さを利用して、型共通ワクチン抗原の開発が可能であると思われる。複数の抗体による相乗的な感染阻害効果が認められたので、感染阻害ワクチンは L2 表面領域に結合する複数の抗体を誘導することが望ましい。今後、HPV16 型後期プロモーターの調節機構がさらに明らかになれば、その

機構に介入する低分子の探索が可能になる。

(神田)

2) hFGFR5 は HCV の新しい受容体候補分子である。C 型肝炎患者の体内には hCD81-tropic と hFGFR5-tropic な HCV が産生されている可能性が示唆された。hCD81-tropic な HCV は大量に産生されて、hCD81 との相互作用を介して、主に免疫機構の攪乱やクリオグロブリン血症などの肝外病変の発症に関与し、hFGFR5-tropic な HCV は少量産生され、抗体に中和されずに持続感染に関与しているのかも知れない。(松浦)

3) E6AP はコア蛋白質のユビキチン化を担う E3 リガーゼとして、プロテアソーム依存的なコア蛋白質分解機構に機能していることが明らかとなった。HCV コア蛋白質は、ヌクレオキャプシドを構成するウイルス構造蛋白質であることから、E6AP が HCV 粒子産生を調節している可能性がある。

C 型劇症肝炎患者から分離された HCV 遺伝子 JFH1 株の genomic RNA を Huh7 細胞へ導入して感染性 HCV を産生する実験系を改良した。RNA Pol I promoter/terminator によって転写された RNA は、cap や poly A が付加されない利点がある。(宮村)

4) シクロスポリンの持つ多彩な薬理作用のうち、抗 HCV 作用を示すのは、免疫抑制作用とは異なる機構であり、細胞側シクロフィリン B の機能阻害によることを明らかにした。シクロフィリン B は HCV ゲノム複製において、ウイルスポリメラーゼ活性を亢進する働きがあり、この働きがシクロスポリンにより阻害されるらしい。また、シクロスポリン誘導体のひとつ、NIM811 は免疫抑制作用が全くないにもかかわらず、HCV ゲノム複製を強く抑制し、シクロスポリン A よりも NIM811 による抗 HCV 作用への期待が残された。(下遠野)

5) HCV レプリコン細胞の IFN 受容体の構造異常 (変異や欠損) により高度な IFN 抵抗性が獲得されること、IFN により誘導される抗 HCV 作用を持つ遺伝子の発現調節部位のメチル化によって軽度の IFN 抵抗性になることがわかった。これらの異常が IFN 治療を受けた肝炎患者にも起こっているかどうかについて検討する必要がある。

抗 HCV 効果を示すミゾリビンにはリバビリンに認められるような貧血の副作用 (高齢者に頻発) がないことから、高齢者に対する治療においてはリバビリンに代わってミゾリビンを使用できる可能性がある。ミゾリビンもリバビ

リンもイノシン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤であるが、抗 HCV 作用と直接関与しているかどうかは証明されておらず、RNA 変異誘導活性による効果や細胞免疫を増強させる効果によるという説もあることから、それらの作用機序を明らかにする必要がある。スタチン剤は安全な薬剤として長期間の服用が可能な薬剤であるので、IFN との併用で治療に使用できる可能性がある。(加藤)

6) C 型慢性肝炎患者 DC と非感染者 DC の機能の比較から、C 型慢性肝炎患者 DC では TLR2 経路が選択的に障害されている可能性が示された。(林)

7) これまでに C 型肝炎患者末梢血からの CTL 株の樹立により 3 種類、HLA-A\*2402 結合モチーフを持つ HCV ペプチドを用いた ELISpot アッセイにより 11 種類、全 HCV オーバーラッピングペプチドを用いた ELISpot アッセイにより 8 種類の CTL エピトープを同定した。CTL エピトープの同定は急性肝炎患者あるいは感染早期の慢性肝炎患者で容易であることを明らかにした。(井廻)

8) 16 歳初回献血者の HB s 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 HB s 抗原陽性時に献血したものと考えられた。(内田)

#### E. 結論

1) HPV16 型 L2 蛋白質表面領域には複数の交差性中和エピトープがあり、ワクチン抗原への応用が期待される。また、HPV16 型後期遺伝子の発現は、プロモーター領域への CDP 結合と、転写された RNA の塩基配列特異的な分解機構によっても抑制されている。(神田)

2) hFGFR5 は HCV の新しい受容体候補分子であ

る。(松浦)

3) HCV コア蛋白質は EGAP によってユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される。また、RNA ポリメラーゼ I promoter/terminator を利用して、HCV JFH1 株 cDNA を発現させると、感染性 HCV が得られた。(宮村)

4) シクロスポリン A 及びその誘導体には免疫抑制活性とは独立した HCV ゲノム複製阻害効果があり、臨床応用が期待される。(下遠野)

5) HCV レプリコン細胞が高度に IFN 抵抗性を示す原因は IFN 受容体の構造異常(変異や欠損)であり、軽度に IFN 抵抗性を示す原因は IFN 誘導性遺伝子の発現調節部位のメチル化によるものである。ミゾリビン等のスタチン剤に抗 HCV 作用がある。(加藤)

6) C 型慢性肝炎患者 DC では TLR2 経路は障害されているが TLR3 経路は保たれており、TLR3 経路を介した DC 機能の活性化が治療に有効である可能性がある。(林)

7) 日本人における HCV 特異的 CTL エピトープの library に新たに 7 種類を加えた。自然治癒した C 型急性肝炎患者には、極めて低レベルの HCV RNA を持ち、HCV 抗体は陰性で、CTL 応答のみ観察される症例が存在した。(井廻)

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)

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・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染が子宮頸がん発症の最大リスクファクターである。高リスク型の15の遺伝子型のうち16型、18型のみを対象とした感染予防ワクチンが開発され、臨床試験で良好な成績を示しつつあるが、他の型への対応が残された課題である。本研究では、キャプシド蛋白質L2内に高リスク群HPVに共通する複数の中和エпитープが存在することを見出したので、それらを実用的なワクチン抗原に応用する方法を探っている。また、HPV潜伏持続感染細胞からのウイルス増殖を阻害するには、後期遺伝子の発現に介入することが重要と考え、HPV16型後期プロモーターの転写調節機構を詳細に解析している。本年度は、CCAAT displacement proteinがプロモーター領域の2カ所に結合して、未分化細胞での転写活性を抑制していることを明らかにした。

#### A. 研究目的

子宮頸がん発症の最大リスクファクターは、15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、表皮基底細胞に核内エピソームとして潜伏持続感染する。感染細胞が最終分化を始めると、小規模なウイルス増殖が起こり、周囲の細胞や別の個体に感染する。従って、HPVの感染や感染拡大をワクチンで防ぐか、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。本研究の目的は、高リスク型HPV群の感染を予防するワクチン抗原の開発と、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ことである。

#### B. 研究方法

1) HPVキャプシドは360分子のL1蛋白質からなる正二十面体の骨格構造（L1-キャプシド）に12分子のL2蛋白質が組み込まれて形成されている。L2蛋白質のN末端側の一部はキャプシド表面に出ており、この表面領域のアミノ酸配列の大部分は、高リスク型ヒトパピローマウイルスに共通である。HPV16型L2蛋白質の表面領域にアミノ酸置換変異を導入した偽ウイルスの感染性を調べた。  
2) HPV16L2蛋白質の14番目から27番目までのアミノ酸配列を持つペプチド（P-14/27）、P-28/42、P-61/75、P-64/81、P-96/115、P-107/122、P-131/144を合成し、ウサギに免疫して抗血清を得た。抗血清の感染中和能を調

べた。

3) HPV16型後期プロモーターP670を含む塩基番号(nt)103から855までの領域に、20塩基ずつ塩基置換変異を導入し、P670の転写活性に与える影響を調べた。P670の転写活性は、E1遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を置換したリポータープラスミドをHeLa及びHaCat細胞に導入し、発現したルシフェラーゼ活性で定量した。

4) HPV16型L1-ORF内部にある遺伝子発現抑制領域（全長約1500bpのL1-ORF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、その遺伝子発現抑制機構を調べた。

（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) HPV16L2蛋白質の28番目のシステインをアラニンに置換した変異体（C28A）、D31A、E37A、T40A、R69A、Y72Aを持つ偽ウイルスの感染性は、有意に低下した。

2) P-14/27に対する抗体は、HPV16型キャプシドに結合しなかったが、他の抗ペプチドL2抗体はキャプシドに結合した。

抗P-28/42、抗P-61/75、抗P-64/81、抗



P-96/115、抗 P-107/122、抗 P-131/144 抗血清は HPV16 型感染性偽ウイルスの感染阻害能があり、特に抗 P-64/81 は強い活性を示した。また、3 種の抗血清を等量ずつ混合すると、中和活性の増強が観察された。

HPV18 型感染性偽ウイルスに対しては抗 P-61/75 と抗 P-64/81 抗血清が、HPV31 型感染性偽ウイルスに対しては抗 P-96/115 血清が、HPV18 型感染性偽ウイルスに対しては抗 P-61/75 と抗 P-64/81 抗血清が、HPV58 型感染性偽ウイルスに対しては抗 P-28/42、抗 P-61/75、及び抗 P-64/81 抗血清が中和活性を示した。

3) HPV16 型後期プロモーターからの転写は、HeLa や HaCat のような通常の培養細胞では強く抑制されているが、nt546-565 及び nt666-685 領域の置換変異で、抑制の一部解除が起こった。これらの領域には CCAAT displacement protein (CDP) の結合配列があり、ゲルシフト法で CDP との結合が確認できた。

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その mRNA レベルを低下させた。遺伝子の 5' 端から 1000 塩基長以内に挿入すると強い抑制効果がみられ、5' 端からの距離がそれ以上長くなると効果を失った。抑制領域由来配列をもつ mRNA の安定性に変化は無かった。RNA ポリメラーゼ I を使うプロモーターに変えると、RNA レベルの低下はみられなかった。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抑制領域由来配列が除かれた mRNA が検出された。

#### D. 考察

1) L2 蛋白質の N 末端側のアミノ酸配列は高リスク HPV 群で大部分共通である。特に 15 の高リスク HPV 群 L2 蛋白質のアミノ酸が同一な C28、D31、E37、T40、R69、Y72 は、感染に重要な働きをしているらしい。

2) 各抗 L2 ペプチド抗体と HPV16 型キャプシドとの結合から、アミノ酸 28 から 144 までの領域がキャプシド表面に出ていることが強く示唆された。この L2 表面領域に抗体が結合すると、上記の機能が阻害され、感染が阻止されるらしい。感染阻害に相乗効果が認められたので、感染阻害ワクチンは L2 表面領域に結合する複数の抗体を誘導することが望ましい。

アミノ酸配列から予想されたとおり、HPV16 型 L2 ペプチドに対する抗体は HPV18、31、58 型に中和能の交差性を示した。交差性の強さは

アミノ酸配列の相同性の程度とほぼ比例していた。L1-キャプシドを抗原とするワクチンは、極めて型特異性の高い中和抗体を誘導するが、L2 表面領域にある中和エピトープをワクチン抗原に応用すれば、複数の高リスク HPV に有効なワクチンの開発が可能になる。

3) HPV16 型後期プロモーターの nt546-565 及び nt666-685 領域に CDP が結合して、転写活性を抑制しているらしい。CDP の発現量や DNA との結合能は分化が進んだ細胞で低下するとの報告があり、HPV16 型後期プロモーターの転写活性抑制は宿主細胞の分化で解除されると思われる。

4) 抑制領域由来配列をもつ RNA は転写後、mRNA として成熟するまでの間に分解されるらしい。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が未分化な細胞ではあるのかもしれない。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) HPV16 型 L2 蛋白質表面領域には複数の中和エピトープがあり、これらのエピトープに対する抗体は、他の高リスク HPV に対して中和活性の交差性をもつ。ワクチン抗原への応用が期待される。

2) HPV16 型後期遺伝子の発現は、プロモーター領域への CDP 結合によって抑制されている。さらに、転写された RNA の塩基配列特異的な分解機構によっても抑制されている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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*, 31(3), 321-328, 2005.

2) 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*

- 3) Kukimoto, I., Takeuchi, T., and Kanda, T.: CCAAT-Enhancer Binding Protein • Binds to and Activates the P<sub>670</sub> Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*, 346, 98-107, 2006.
- 4) Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Kanda, T.: Inhibitory cis-Element-Mediated Decay of Human Papillomavirus Type 16 L1-Transcript in Undifferentiated Cells. *Mol. Cell. Biochem.* in press, 2006.
- 5) Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 Pseudovirions with Anti-sera Induced by Immunizing Rabbits with Synthetic Peptides Representing Segments of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 Surface Region. 投稿中
- 6) Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Yasugi, T., Taketani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P<sub>670</sub> Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. 投稿

2. 学会発表

1) 近藤一成、越智寛幸、吉川裕之、神田忠仁：HPV16型キャプシド蛋白質L2の中和エピソード。第64回日本癌学会。

2) 終元 巖、神田忠仁：CCAAT-enhancer binding protein  $\beta$ によるHPV16型P670プロモーターの活性化。第64回日本癌学会。

2) 森清一郎、尾崎さおり、吉川裕之、神田忠仁：HPV16型L1遺伝子がコードするRNA配列による遺伝子発現抑制。第53回日本ウイルス学会

3) 佐藤香央里、竹内隆正、終元 巖、神田忠仁：HPV16型後期プロモーター制御因子の解析。第53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)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2百万人もの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。遺伝子型の異なるHCVのエンベロープ蛋白質をポリプロテインの形で発現させたCHO細胞と293T細胞を用いて、HCVのエンベロー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、HCVpv/CHOとHCVpv/293Tをそれぞれ作製した。HCVpv/CHOはhFGFR5依存的にHepG2細胞に高い感染性を示したのに対し、HCVpv/293TはhCD81依存的にHuh7細胞に高い感染性を示した。また、慢性C型肝炎患者血清中にはHCVpv/293Tに対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHOに対する中和抗体価は低かった。C型肝炎患者の体内にはhCD81-tropicとhFGFR5-tropicなHCVが産生されている可能性が示唆された。

### 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2百万人もの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

これまで、CHO細胞に発現させたHCVのキメラエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて、HCVの感染機構の解析を進めてきた。今回新たに、遺伝子型の異なるHCVのエンベロープ蛋白質をポリプロテインの形で発現させたCHO細胞と293T細胞を用いて、シュードタイプ水疱性口内炎ウイルス(HCVpv)を作製した。

#### (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、個人情報厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

HCVの受容体候補分子であるhCD81を全く発現

していないHepG2細胞にHCVpvが感受性を示すことから、HCVの感染にhCD81以外の細胞表面因子の関与が示唆された。HCVpvの感染はヒト繊維芽細胞成長因子(hFGF)、特にFGF2とFGF7によって阻害され、可溶性型のhFGF受容体5(hFGFR5)がHCVpvの感染性を特異的に阻害した。また、hFGFR5を恒常的に発現するCHO細胞株はHCVpvの感染を許容できるようになり、siRNAによってhFGFR5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、hFGFR5がHCVpvの新規受容体であることが示唆された。これまでは、CHO細胞で発現させたHCVエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを用いて解析を進めてきたが、293T細胞で作製したシュードタイプレトロウイルスはhCD81依存的な感染性を示し、HepG2細胞には全く感受性を示さなかった。そこで、HCVのエンベロープ蛋白質を発現させたCHO細胞と293T細胞を用いて、それぞれHCVpv/CHOとHCVpv/293Tを作製した。両シュードタイプウイルスとも高マンノース型のエンベロープ蛋白質を保持していた。HCVpv/CHOはhFGFR5依存的にHepG2細胞に高い感染性を示したのに対し、HCVpv/293TはhCD81依存的にHuh7細胞に高い感染性を示した。また、慢性C型肝炎患者血清中にはHCVpv/293Tに対する高い中和抗体が高率に検出されたのに対し、HCVpv/CHOに対する中和抗体価は低かった。患者血清中に存在する天然のHCV粒子も、HCVpvと同様にHepG2細胞とHuh7細胞に結合した。HCV粒子のHepG2細胞への結合は可溶性hFGFR5や抗hFGFR5抗体で、また、Huh7細胞への結合は抗hCD81抗体によって阻害された。

#### D. 考察

hFGFR5 は HCV の新しい受容体候補分子であることが示された。293T 細胞で作製した HCVpv はレトロウイルスで作製したシュードタイプと同様に hCD81 依存的な感染指向性を示し、CHO 細胞で作製すると hFGFR5 依存的に感染することが示された。また、C 型肝炎患者血清中にも同様な親和性を示す HCV 粒子が存在することが示された。

#### E. 結論

C 型肝炎患者の体内には hCD81-tropic と hFGFR5-tropic な HCV が産生されている可能性が示唆された。この性状の違いは、感染細胞の種類（肝細胞、リンパ球など）に起因するのか、あるいは同一細胞における感染経過の違いによるものなのかは今のところ不明である。hCD81-tropic な HCV は大量に産生されて、hCD81 との相互作用を介して、主に免疫機構の攪乱やクリオグロブリン血症などの肝外病変の発症に関与し、hFGFR5-tropic な HCV は少量産生され、抗体に中和されずに持続感染に関与しているのかも知れない。今後、異なる細胞親和性を示す HCV 粒子の産生様式と感染論学的な意義を明らかにしたい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79:13473-13482, (2005).
2. Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, and Cheng RH. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79, 12999-13006, (2005).
3. Abe T, Hemmi H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79, 2847-2858, (2005).
4. Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79, 3639-3652, (2005).

5. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 79, 3448-3458, (2005).
6. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki 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).
2. 学会発表
1. Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M.C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
2. Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
3. Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上。
4. Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上。
5. Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上。
6. 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恒司、松浦善治:C 型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
7. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恒司、

- 考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治:HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
8. 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治:C 型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
9. 森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治:日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上
10. 宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治:C 型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28  $\gamma$  の役割、同上。
11. 岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治:シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシングとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。
- H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

分担研究報告書

- (1) C型肝炎ウイルスコア蛋白質の選択的分解機構の解析
- (2) DNAトランスフェクションによる感染性HCV産生細胞系の樹立

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 (1) HCV コア蛋白質結合因子として新たに同定されたユビキチンリガーゼ E6AP がコア蛋白質のユビキチン化、選択的分解に働くことを、E6AP wild-type 及び dominant negative の強制発現、E6AP siRNA による機能阻害等の実験から明らかにした。コア蛋白質-E6AP の相互作用には、コア蛋白質の aa 58-71 領域及び E6AP の aa 418-517 領域が重要であることが示された。(2) RNA Pol I promoter/terminator 発現系を利用して、HCV JFH1 株 cDNA トランスフェクションによる感染性 HCV の産生細胞系を確立した。本実験系は HCV 生活環の解析および抗ウイルス薬のスクリーニング法として有用である。レプリコン細胞系では見出されなかった粒子形成阻害剤等の開発研究に道が拓かれるものと期待される。

A. 研究目的

研究目的

我々は、HCV コア蛋白質が、ヌクレオキャプシド蛋白質であると共に、自身の翻訳制御に働くこと、宿主細胞の遺伝子発現、アポトーシスなどの調節機構や脂質代謝に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。このような性質は、HCV の生活環及び病原性を解析する上で重要である。本研究では、HCV の粒子形成機構を明らかにしていくと同時に、HCV の病原性発現機構の解明を目指してコア蛋白質と宿主細胞との新たな相互作用を解析することを目的としている。本年度は、コア蛋白質結合因子として新たに同定されたユビキチンリガーゼ E6AP を介したコア蛋白質の選択的分解機構を明らかにするとともに、

DNAトランスフェクション法による簡便な感染性HCV粒子産生系を樹立した。

B. 研究方法

1) 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。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。

#### 2) コア蛋白質-E6AP の相互作用解析

コア蛋白質の N 末端に FLAG tag を付加した各種部分欠損変異体及び E6AP の N 末端に GST を付加した同様の変異体を構築し、GST pull-down assay によって両蛋白質の相互作用を解析した。

#### 3) ユビキチン・プロテアソーム系による蛋白質分解機構の解析

E6AP wild-type (WT) あるいは dominant negative (DN) を FLAG 付加コア蛋白、HA 付加ユビキチンと細胞内で共発現させ、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行いユビキチン化コア蛋白質を検出した。siRNA による E6AP の機能阻害によってコア蛋白質の安定性が変化するかを検討した。

#### 4) 感染性 HCV 産生細胞系の作製

RNA Pol I promoter/terminator を有するプラスミド pHH21 の BsmBI 部位に、HCV JFH1 株または H77 株のゲノム cDNA を挿入し pHHJFH1、pHHH77c を作製した。得られた発現プラスミドをヒト肝細胞癌株 Huh7 へ一過性に導入し、HCV 蛋白質の発現をウエスタンブロット法、ELISA 及び免疫蛍光抗体法にて検出した。また、この HCV 遺伝子導入細胞の培養上清中に含まれる HCV の感染性アッセイには、培養上清を Huh7.5.1 細胞 (Dr. F. Chisari (Scripps Res. Inst.) より分与) に感染させ、4 日間培養後にコア蛋白質の免疫染色によって感染細胞のフォーカスを検出した。

### C. 研究結果

#### (1) HCV コア蛋白質の選択的分解機構の解析

エピトープタグアフィニティ精製法によって HCV コア蛋白質結合因子を探索した結果、2 種類の既知の蛋白質以外に 7 種類の新規結合因子を見出した。このうち約 100 kDa 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼの一種 E6-associated protein (E6AP) であった。In vivo ubiquitylation assay を行った結果、E6AP (WT) との共発現ではコア蛋白質のユビキチン化及び不安定化が促進された。一方、E6AP (DN) と共発現させた場合、コア蛋白質のユビキチン化及び不安定化は抑制された (図 1 A)。コア蛋白分解への内在性 E6AP の働きを明らかにするため siRNA による E6AP 機能阻害実験を行った。コントロール siRNA はコア蛋白質の安定性に影響を与えなかったが、E6AP 特異的な siRNA ではコア蛋白質の分解が抑制された (図 1 B)。また、GST pull-down assay の結果、コア蛋白質-E6AP の相互作用には、コア蛋白質の aa 58-71 領域及び E6AP の aa 418-517 領域が重要であることが明らかとなった。

#### (2) 感染性 HCV 産生細胞系の作製

pHHJFH1 等をそれぞれ Huh7 細胞へトランスフェクションし 4 日後に細胞抽出液のウエスタンブロットを行ったところ、HCV JFH1 株遺伝子 (pHHJFH1) を導入した細胞では HCV コア蛋白質及び NS5A 蛋白質が検出された。これに対して、JFH1 株の NS5B 変異体 (pHHJFH1/GND) または H77c 株 (pHHH77c) を導入し

た細胞では HCV 蛋白質は検出されなかった (図 2A)。培養上清中のコア蛋白質を ELISA 法で調べたところ、トランスフェクション後 2-7 日目では約 1 nmol/mL/day のコア蛋白質が分泌されることが示された。この培養上清をショ糖密度勾配遠心によって分画しコア蛋白質の密度分布を調べたところ、1.15 g/mL 分画をピークとして分布することがわかった。また、NP40 による de-envelopment 処理を行ったところ、そのピークは 1.20 g/mL へシフトした (図 2B)。このような pHHJFH1 導入細胞の上清に分泌したウイルスの感染性を調べるため、トランスフェクション後 3-5 日目の培養上清を回収し限外濾過にて約 30 倍に濃縮した後、naïve な Huh7.5.1 細胞へ添加した。4 日間の培養後、コア蛋白質の免疫染色を行ったところ、10%程度の細胞でフォーカス状の染色像が観察された。pHHJFH1 導入細胞から感染性 HCV が産生されることが示された。

#### D. 考察

##### (1) HCV コア蛋白質の選択的分解機構の解析

これまでコア蛋白質の E3 ユビキチンリガーゼは不明であった。今回の研究から、E6AP はコア蛋白質のユビキチン化を担う E3 リガーゼとして、プロテアソーム依存的なコア蛋白質分解機構に機能していることが明らかとなった。HCV コア蛋白質は、ヌクレオキャプシドを構成するウイルス構造蛋白質であることから、E6AP が HCV 粒子産生を調節している可能性が考えられる。また、他のウイル

スでは、ユビキチンシステムがウイルスのバディン、抗原提示、免疫回避あるいは細胞シグナル伝達等に関与していることが報告されており、HCV においても、E6AP がこれらのウイルス生活環あるいは宿主細胞の環境攪乱に影響している可能性も考えられる。

##### (2) 感染性 HCV 産生細胞系の作製

最近、C 型劇症肝炎患者から分離された HCV 遺伝子 JFH1 株の genomic RNA を Huh7 細胞へ導入することにより、効率よく感染性 HCV が産生されることが見出された。我々はこの実験系を改良し、Huh7 細胞へのプラスミドトランスフェクションによる HCV 産生系を確立した。RNA Pol I promoter/terminator は 5' cap 構造、3' poly A tail が付加されない ribosomal RNA の転写調節を担っている。このため、pHH ベクターを用いた発現系では、外来遺伝子転写産物の両末端にはエキストラ配列が付加されないという特長を有している。1) HCV ゲノムを発現させる場合、従来法のように遺伝子導入前に DNA の直鎖化と試験管内 RNA 合成を行う必要がないこと、2) 細胞内の RNA polymerase I 活性を利用して転写されるため、RNA 導入に比べて細胞内で HCV RNA が比較的長時間維持されること、が本法の利点と考えられる。現在、この実験系を用いて機能解析が進んでいなかった p7 蛋白質の変異体を作製し、HCV 粒子形成における p7 蛋白質の役割を解析中である。これまでに、E2/p7 の切断部位または p7 細胞質領域の塩基性アミノ酸を変異させることにより培養上清の HCV



量が激減することから、p7 蛋白質が HCV 粒子のアセンブリーまたは細胞外への放出に重要であることが明らかとなった。本実験系は HCV の生活環の解析に有用である。また、抗ウイルス薬のスクリーニング法としても有用と考えられ、レプリコン細胞系では見出されなかった粒子形成阻害剤等の開発研究に道が拓かれるものと期待される。

#### E. 結論

(1) HCV コア蛋白質結合因子として新たに同定された EGAP が、コア蛋白質のユビキチン化を担う E3 リガーゼとして、プロテアソーム依存的なコア蛋白質分解機構に機能することが明らかとなった。

(2) RNA Pol I promoter/terminator 発現系を利用して、HCV JFH1 株 cDNA トランスフェクションによる感染性 HCV の産生細胞系を確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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  $\tau=1$  virus-like particle in BK polyomavirus. *J. Virol.* 79, 5337-5345, 2005.
3. 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. Outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 1087-1093, 2005.
4. Suzuki, T., Omata, K., Satoh, T., Miyasaka, T., Arai, C., Maeda, M., Matsuno, T., and Miyamura, T. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4413-4417, 2005.
5. Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, Y., Suzuki, T., Lai, M. M. C, Miyamura, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79, 13473-13482, 2005.
6. Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, and Koike K. Hepatitis C virus core protein

exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol.* 43, 757-763, 2005.

7. Matsuo E, Tani H, Lim CK, Komoda Y, Okamoto T, Miymoto H, Moriishi K, Yagi S, Pate, AH, Miyamura T, Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 200-208, 2005.
8. Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology* (in press).

G. 知的所有権の取得状況

なし

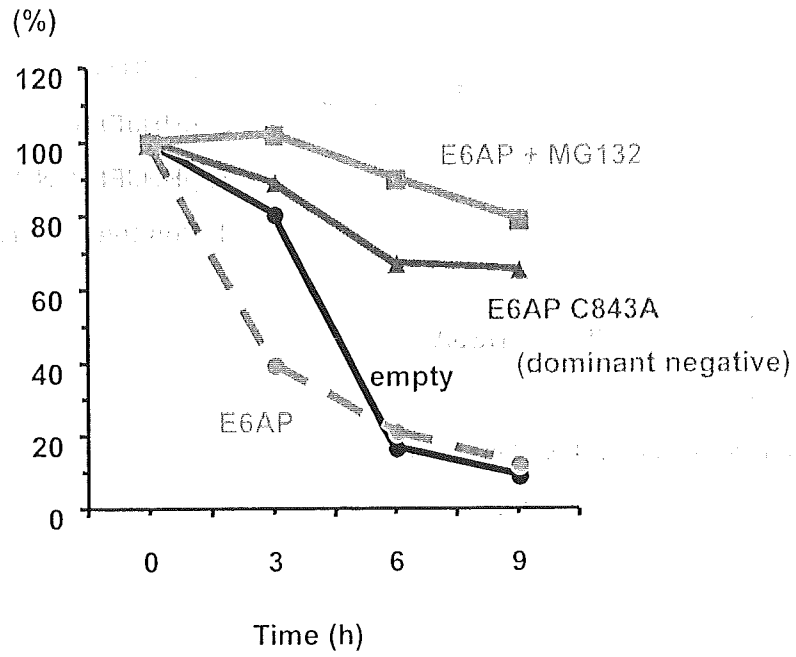


図1A. HCV コア蛋白分解のキネティクス

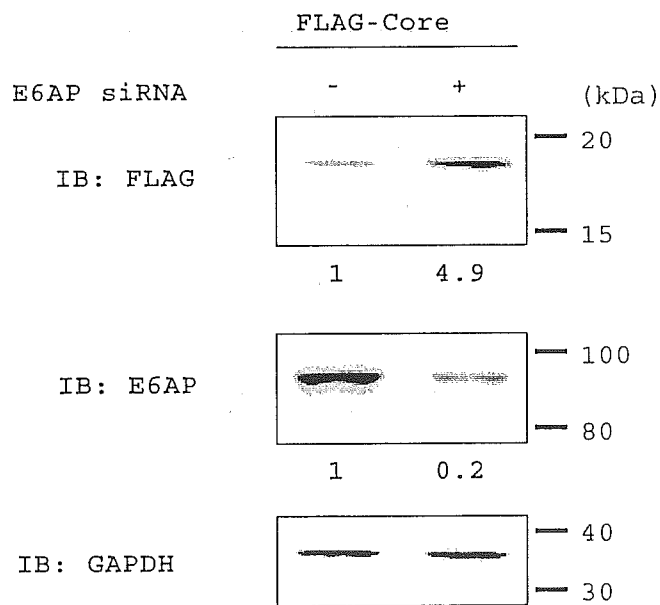


図1B. 内在性 E6AP のノックダウンによるコア蛋白分解の阻害

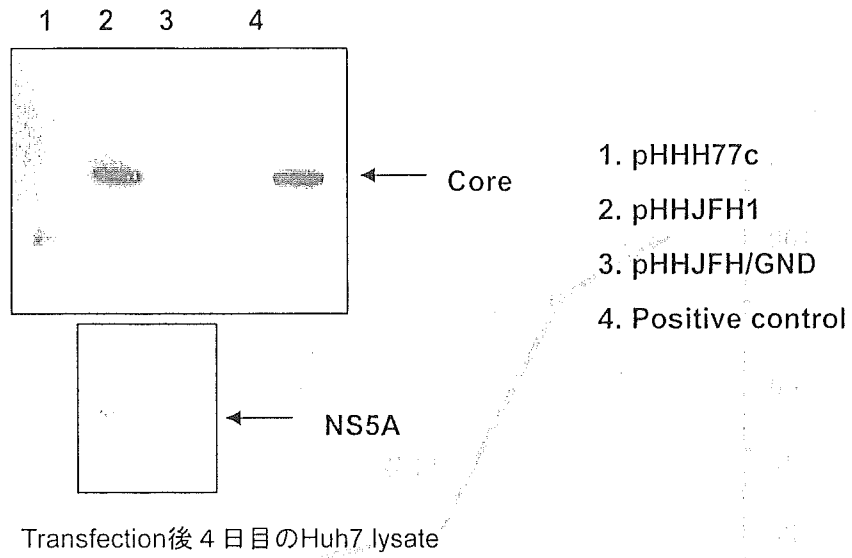


図2A. pHH ベクター導入細胞での HCV 蛋白質の発現

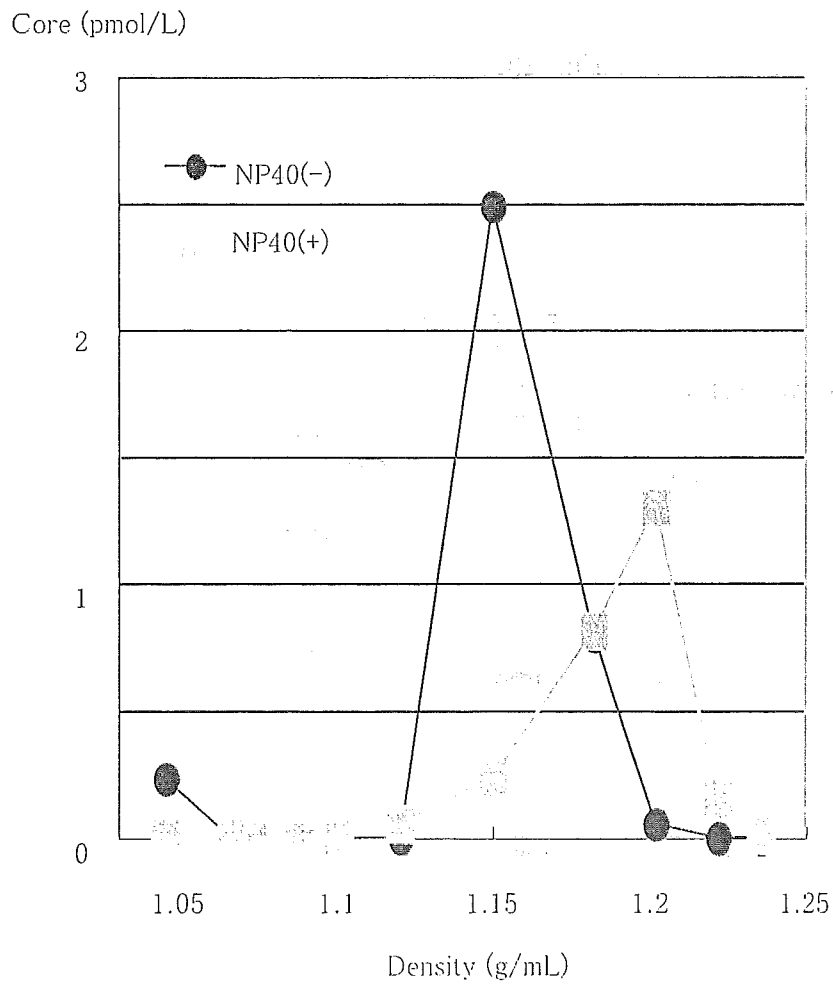


図2B. 培養上清中のコア蛋白質の密度分布