

解明と増殖抑制に重要なこと、第41回  
日本移植学会総会、平成17年10月、  
新潟

8. 渡士幸一、石井直人、土方誠、井上大輔、  
村田貴之、宮成悠介、下遠野邦忠 シク  
ロスポリンを用いたC型肝炎ウイルス複  
製制御機構の解析、第53回日本ウイル  
ス学会学術集会、平成17年11月、横  
浜

G. 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

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）  
分担研究報告書

プロテオミクスの手法を用いたC型肝炎ウイルスの病原性に関与する宿主候補因子の探索

分担研究者 西島 正弘 国立感染症研究所 細胞化学部 部長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）コアタンパク質はウイルス産生のみならず病原性発現にきわめて重要な働きをしていることが強く示唆されている。我々はHCVの病原性に関与する宿主候補因子の探索を目的として、コアタンパク質発現により変動する宿主タンパク質のプロテオーム解析を、培養肝細胞系を用いて行った。今回はまず、HCVコアタンパク質の主要な細胞内局在部位である脂肪滴画分を用い比較プロテオーム解析を試みた。その結果、コアタンパク質発現細胞の脂肪滴には新たにDDX1、DDX3分子が存在するようになることを見いだした。DDX1、DDX3分子は、RNA helicase/ATPase活性を有するDEAD boxファミリーに属するが、未だ生理機能は明らかでない。しかし、DDX1はある種のガン細胞で高発現していることが知られ、HCVによる病態との関連が非常に注目される。生化学的な解析から、DDX1分子はコアタンパク質のN末端領域と相互作用し、コアタンパク質によりそのATPase活性が活性化されることを見いだした。このことから、コアタンパク質がDDX1分子の生理機能に影響を与え、HCVの病態に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）による病原性発現機構についてはいまだ不明の点が多く、治療ターゲットとなり得ていないのが現状である。そこで、今までほとんど試みられてこなかったプロテオミクスの手法を用いることで、HCVによる病原性発症に関与する宿主候補因子を探索することを本研究の目的にする。これにより、HCVによる病原性発現メカニズムの一端が明らかにされることが期待され、治療薬開発へ展望を開くことができるものと考えている。

B. 研究方法

HCVのコードするタンパク質の中でコアタンパク質はウイルス産生のみならず病原性発現に重要な働きをしていることが強く示唆さ

れている。そこで我々はHCVコアタンパク質に焦点を当て、コアタンパク質発現により変動する宿主タンパク質のプロテオーム解析を培養肝細胞系を用い行うことにした。細胞は、HepG2細胞由来のHepswx（コントロール用コアタンパク質非発現細胞）、Hep39細胞（コアタンパク質発現細胞）を用いた。今回は、HCVコアタンパク質の主要な細胞内局在部位である脂肪滴を用い比較プロテオーム解析をおこなった。具体的には、各培養細胞に脂肪負荷し脂肪滴を形成させ、超遠心分離法等を用い脂肪滴を生化学的に分離・精製し、2つのマスマスペクトロメトリーを用いた方法で脂肪滴タンパク質の網羅的解析を行った。第1の方法は脂肪滴タンパク質をSDS-PAGE電気泳動後、タンパク質バンドを切り出しtrypsin消化後、MALDI-TOFマスマスペクトロメトリー（MS）

により同定する方法、第2の方法は脂肪滴画分を脱脂後、タンパク質を Lys-C 消化して直接 nano-LC-MS/MS で同定する方法である。第1の方法は電気泳動によりタンパク質の増減が視覚的に比較できる利点がある一方、分子量が近い複数の分子が存在する場合は（特に量に差があると）同定が困難になる場合がある。第2の方法は基本的には視覚的に増減を比較できないが、分子量の近い分子でも同定可能である。従って両方法は互いに補完関係にもあり、双方を併用することにより、より確実な同定が可能である。

### C. 研究結果

両マススペクトロメトリーを用いた方法により同定されたタンパク質を表1に示した。Hepswx 細胞より30種、Hep39 細胞より38種のタンパク質が同定された。コアタンパク質発現により大きく変動すると考えられるタンパク質として脂肪滴構造タンパク質 ADRP、TIP47、および DEAD box タンパク質 DDX1、DDX3 が見いだされた。

#### 1) 脂肪滴構造タンパク質 ADRP、TIP47

抗 ADRP 抗体、抗 TIP47 抗体を用いたイムノブロット法により、Hep39 細胞の脂肪滴画分において実際に ADRP の減少と TIP47 の増加がみられることが確認された。この変動が細胞全体の ADRP、TIP47 量の変動を反映しているかを検討するため、各分子の mRNA 量を定量 real-time-PCR により、タンパク質量をイムノブロットにより検討した。その結果、Hep39 細胞では、ADRP は脂質負荷条件でもその mRNA 発現が誘導されず細胞タンパク質量も非常に低いことから、細胞内発現量自体が低下していることが明らかとなった。一方、TIP47 は Hep39 細胞で mRNA 発現量の増加は認められず（むしろ減少しており）、細胞内の局在が細胞質から脂肪滴へ大きく変動していることがわかった。 [<sup>35</sup>S]メチオニンの pulse

label & chase によりタンパク質分泌能を検討した結果、Hep39 細胞ではタンパク質の細胞外への分泌が強く抑制されていることも明らかとなった。

#### 2) DEAD box タンパク質 DDX1、DDX3

市販の抗 DDX1 抗体、作製した抗 DDX3 抗体を用いたイムノブロット法により、コントロールである Hepswx 細胞の脂肪滴画分では DDX1、DDX3 は検出されず、Hep39 細胞の脂肪滴画分において DDX1、DDX3 が新たに検出されるようになることがわかった。そこで DDX1 についてはさらに解析を行った。まず、抗体を用いた共沈実験により DDX1 とコアタンパク質が相互作用することもわかった。さらにコアタンパク質の各種 truncated constructs を作製し細胞レベルで相互作用を検討した結果、コアタンパク質の N 末端 1-5 アミノ酸が相互作用に必須であることが明らかとなった。さらに、DDX1 の生物活性の一つである ATPase 活性に対するコアタンパク質の影響についても検討した。リコンビナントの FLAG-tagged DDX1、GST&His-tagged コアタンパク質を調製し、活性測定に用いた。その結果、コントロールの GST タンパク質存在下では活性に影響が見られなかったが、GST-tagged コアタンパク質存在下では有意に ATPase 活性が増加していた。DDX1 の ATPase 活性は poly(U) により活性化することも知られているが、poly(U) 存在下・非存在下ともにコアタンパク質による活性上昇が見られた。

### D. 考察

C型肝炎ウイルスコアタンパク質発現により、その主要存在部位である脂肪滴で構造タンパク質 ADRP 量の減少、TIP47 量の増加が認められたことは HCV 感染における肝脂肪化と考え合わせると興味深い。コアタンパク質発現により細胞内の中性脂質量はむしろ上昇している事もわかっている。従って脂肪滴を維

持するためにはその最も主要な構造タンパク質である ADRP が、コアタンパク質発現下ではその発現低下により不足していることが考えられる。ADRP と TIP47 はアミノ酸相同性が非常に高く同じ PAT タンパク質ファミリーに属しているため、Hep39 細胞では TIP47 は脂肪滴上で ADRP の代わりに構成タンパク質として働いているのではないかと推察される。Hep39 細胞では TIP47 の発現量は増加していないため、その局在が細胞質から脂肪滴へと大きく変動する結果となっていると思われる。また、コアタンパク質発現下ではタンパク質の細胞外への分泌が強く抑制されていることから、細胞内膜輸送系に必須の因子でもある TIP47 が脂肪滴構成に使われてしまい膜輸送系が阻害されているという仮説も考えられる。細胞内膜輸送系は、肝臓においてはリポタンパク質の分泌など細胞外への脂質の放出にも必須の過程であり、その阻害による細胞内への脂質の蓄積と肝脂肪化との関連などに興味を持たれる。

今回、DDX1、DDX3 が Hep39 細胞の脂肪滴に新たに存在するようになることが示された。DDX3 についてはコアタンパク質と結合する分子としてすでに報告されていたが、今回 DDX1 もコアタンパク質と相互作用することが示され、さらに DDX1 の ATPase 活性がコアタンパク質により増強されることも明らかとなった。従って、脂肪滴上での DDX1、DDX3 の機能とコアタンパク質による病態発現との関連が非常に興味深い。特に、DDX1、DDX3 の高発現と細胞癌化との関連が予想されており、この面でのさらなる解析が一つの重要な課題である。

また、コアタンパク質の N 末端 1-5 アミノ酸が DDX1 との相互作用に重要であることも示されたので、これら相互作用を阻害することでコアタンパク質による病原発現を抑制できる可能性（治療薬ターゲットとしての可能性）などについて今後さらに検討していきたい。

今回は主要な一部の変動タンパク質のみに焦点を当てたが、プロテオーム解析により見いだした他の宿主因子群の変動も病態進行の指標（マーカー）となる可能性がある。治療戦略の策定の観点からも重要であり、さらなる解析により重要な知見が得られるかもしれない。

## E. 結論

プロテオミクス的手法を用い HCV コアタンパク質発現により変動する宿主脂肪滴タンパク質の網羅的解析を行った結果、大きく変動する分子として ADRP、TIP47、DDX1、DDX3 を同定した。特に DDX1 分子についてはコアタンパク質と相互作用し、その ATPase 活性がコアタンパク質により増強されることから、DDX1 分子は HCV の病原性に関与する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

1. Fukasawa M, Sato S, Osawa T, Yamakawa Y, Suzuki T, Shoji I, Suzuki R, Aizaki H, Miyamura M and Nishijima M:  
Interaction of DEAD box protein 1 with hepatitis C virus core protein. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, October, 2005
2. 佐藤慈子、深澤征義、大澤智子、山河芳夫、鈴木哲朗、勝二郁夫、鈴木亮介、宮村達男、西島正弘：HCV コアタンパク質発現細胞の脂肪滴における DEAD box protein 1 の局在、第 78 回日本生化学会大会大会、神戸、2005 年 10 月
3. 田中康仁、加藤健吾、佐藤慈子、深澤征義、鈴木哲朗、宮村達男、田口 良、西島正弘：C 型肝炎ウイルスのコアタンパク質発現が Huh7 細胞の脂質プロファイルに及

ぼす効果、第78回日本生化学会大会、神  
戸、2005年10月

- II. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表 1

**Lipid droplet proteins identified in Heps wx and Hep39 cells**

	Heps wx	Hep39
<b>Structural proteins</b>		
adipophilin/ADRP	○	○
cargo selection protein/TIP47	○	○
<b>Lipid metabolism</b>		
retinal short-chain dehydrogenase/reductase retSDR2	○	○
alcohol dehydrogenase Pan1b	○	○
lanosterol synthase	○	○
NAD(P)dependent steroid dehydrogenase-like; H105e3	○	○
long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 3	○	○
long-chain fatty-acid-Coenzyme A ligase 4	○	○
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	○	○
sterol carrier protein 2-related form 58.85K	○	○
cytosolic phospholipase A2 (CPLA2)	○	○
transport-secretion protein 2.1 (TTS-2.1)	○	○
CGI-58 protein	○	○
<b>small G proteins</b>		
rab1A	○	○
rab1B	○	○
rab7	○	○
rab18	○	○
rab5C	○	○
rab5A	○	○
rab10	○	○
<b>RNA metabolism</b>		
DDX3	○	○
DEAD box protein RB (DDX1)	○	○
HC56/gemin4	○	○
IGF-II mRNA-binding protein 3	○	○
ribosomal protein L29 (heparin binding)	○	○
<b>Others</b>		
NADH cytochrome b5 reductase	○	○
gastric-associated differentially-expressed protein(GAPDH)	○	○
heat shock protein gp96 precursor	○	○
BiP protein	○	○
protein disulfide-isomerase ER60 precursor	○	○
molecule possessing ankyrin-repeats induced by LPS	○	○
glutathione-insulin transhydrogenase (216 AA)	○	○
ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	○	○
major vault protein	○	○
Pex protein	○	○
NADPH-cytochrome P-450 reductase	○	○
ring finger protein 17	○	○
protein disulfide-isomerase precursor P55	○	○
heat shock 60kD protein 1	○	○
EGLN2 protein(cell growth regulator Falkor )	○	○
Similar to ribophorin I	○	○
78 KD glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	○	○
nebulin	○	○
BAT2	○	○
NYD-SP16 protein	○	○
procollagen-proline 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	○	○
tumor protein D52-like 2; hD54	○	○
<b>Unknown</b>		
CGI-49 protein [Homo sapiens]	○	○
MGC:13000	○	○
hypothetical protein DKFZp586A0522.1	○	○
unnamed protein product	○	○
hypothetical protein FLJ21820	○	○
ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) homolog	○	○
heart and neural crest derivatives expressed transcript 2	○	○
KIAA0873 protein	○	○
similar to Pacific ray VAT1 protein	○	○
hypothetical protein DKFZp564F0522.1	○	○
KIAA0887 protein	○	○
RIKEN cDNA 0610006F02 gene	○	○
similar to C. elegans hypothetical 55.2 kD protein F16A11.2	○	○
<b>HCV protein</b>		
core	○	○

Detected both in Heps wx and Hep39  
 Detected only in Heps wx  
 Detected only in Hep39

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）  
分担研究報告書

C型肝炎治療薬創薬シーズの探索に関する研究  
ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究

分担研究者 堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）非構造タンパク質 NS3 と癌抑制タンパク質 p53 の相互作用について解析した。臨床分離株から得られた種々のアミノ酸配列を有する NS3 を培養細胞で発現させると、その細胞内局在は斑点状、びまん性及び中間型の3通りに分けられること、および斑点状局在を示す NS3 は、びまん性のものに比べて、p53 とより効率よく会合し、p53 機能をより強く阻害することを明らかにした。さらに、NS3 と p53 の会合は HCV レプリコン複製細胞においても見られ、p53 機能は対照細胞に比べて減弱していることを明らかにした。また、NS3 の Leu-106 を Ala に置換(L106A)すると、NS3 と p53 の会合が著しく阻害され、NS3 による p53 機能阻害の程度が減弱することを明らかにした。また、NS3 のセリンプロテアーゼ活性も L106A 置換により著しく減弱した。NS3 の Phe-43 を Ala に置換(F43A)した場合にも同様のことがみられたが、その程度は L106A の場合に比べると軽度であった。

さらに、HCV 非構造タンパク質 NS5A と非受容体型チロシンキナーゼ Syk の相互作用について解析した。まず、HCV 感染患者肝組織と非感染対照肝組織におけるチロシンキナーゼ Syk の発現を免疫染色により調べたところ、Syk の発現態様が HCV 感染の有無により異なることがわかった。そこで、培養細胞を用いたタンパク質発現系において HCV タンパク質と Syk の相互作用について検討したところ、NS5A が効率よく Syk と会合すること、およびその会合により Syk キナーゼ活性が阻害され、その下流の PLC- $\gamma$ 1 の活性化も阻害されることを明らかにした。また、HCV レプリコン複製細胞においても NS5A が Syk と会合することを明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に肝細胞癌を引き起こすが、肝発癌の機序については未だ不明な点が多い。HCV 非構造タンパク質 NS3 の N 末端領域は、ウイルス増殖に必須なセリンプロテアーゼ活性を有するのみならず、HCV の腫瘍形成能の一部を担う可能性が示唆されている。我々はこれまでに、HCV NS3 が癌抑制タンパク質 p53 と相互作用することを報告してきた。一方、p53 以外にも宿主細胞

はいくつかの重要な癌抑制タンパク質を有することが知られている。乳癌の抑制因子として報告された非受容体型チロシンキナーゼ Syk もその一つである。本研究では、HCV NS3 と p53 の相互作用、及び NS5A をはじめとするその他の HCV タンパク質と Syk との相互作用の詳細な解析を通して、HCV による発癌の分子機構を明らかにすることを目的とした。そして、このウイルス蛋白-宿主因子相互作用に介入し得る細胞環境や低分子化合物の解

析を通して、抗 HCV 薬創薬シーズの探索を図る。

## B. 研究方法

(1) NS3 の発現と細胞内局在：RT-PCR により肝疾患患者血清から HCV 遺伝子の NS3 の N 末端 198 アミノ酸残基をコードする領域を増幅し、発現プラスミドにクローニングした。種々の点変異を有する NS3 やそれらを含む全長 NS3 を発現するプラスミドも構築した。これらのプラスミドを用いて、ワクシニアウイルス-T7 ハイブリッド発現系により培養細胞に NS3 発現させ、特異抗体による免疫染色法及び細胞内小器官マーカーとの共局在を指標にして、NS3 の細胞内局在を調べた。

(2) NS3 と p53 の結合：NS3 と p53 を培養細胞に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により両蛋白の会合について調べた。

(3) NS3 セリンプロテアーゼ活性：NS3 及びその基質である NS5A5BDC を HeLa 細胞内で共発現させ、NS5A5BDC の切断の程度を指標にして、NS3 セリンプロテアーゼ活性を調べた。

(4) 上記(1)(2)と同様に、全長あるいは種々の欠失(または点)変異を有する HCV NS5A とチロシンキナーゼ Syk を培養細胞に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により、NS5A と Syk の会合について調べた。他の HCV タンパク質(コアタンパク質~NS5B)と Syk の相互作用についても調べた。種々の HCV タンパク質の発現は、単独発現系のみならず、ポリプロテイン発現系及び HCV RNA レプリコン複製系(サブゲノミック及び全長ゲノミック)をも用いた。

(5) Syk キナーゼ活性に及ぼす NS5A の影響：NS5A と Syk を培養細胞内で共発現させ、特異抗体で免疫沈降した Syk のチロシンキナーゼ

活性を、基質であるヒストン H2B のリン酸化を指標にして調べた。また、Syk の下流のシグナル伝達分子である PLC- $\gamma$ 1 のリン酸化についても、リン酸化特異抗体を用いた免疫ブロット法により調べた。

(6) ヒト肝組織における Syk の発現解析：病理検査用に採取した HCV 感染及び非感染のヒト肝組織を、抗 Syk 抗体を用いて免疫染色した。

### (倫理面への配慮)

ヒト肝組織は HCV 感染あるいは非感染の肝がん患者から治療目的で摘除されたものを用いた。組換え遺伝子を用いた実験は組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### (1) NS3 と p53 の相互作用の解析：

臨床分離株から得られた種々のアミノ酸配列を有する NS3 を培養細胞で発現させると、その細胞内局在は斑点状、びまん性及び中間型の 3 通りに分けられた。検討した 29 株のうち約 50%は核と細胞質内に斑点状に局在し、約 30%はびまん性に分布した。残りの 20%は両者の混合型であった。

斑点状局在を示す NS3 は、びまん性のものに比べて、p53 とより効率よく会合し、p53 機能をより強く阻害した。また、斑点状局在を示す NS3 に 1~4 カ所の点変異を導入すると、その局在はびまん性に变化し、p53 との会合能が減弱した。さらに、NS3 と p53 の会合は HCV レプリコン複製細胞においても見られ、p53 機能は対照細胞に比べて減弱していることがわかった。

次に、NS3 欠失変異体を用いた解析により、aa 31-90, 61-130, 121-198 の 3 つの領域において p53 結合部位が存在することがわかった。さらにそれぞれの領域において、Ala への単一点変異により p53 結合性が低下する 3



つのアミノ酸 (Phe-43, Leu-106, Val-158) を同定した。これらの変異を 180 アミノ酸残基あるいは全長 NS3 に導入して p53 との相互作用について検討し、Leu-106 を Ala に置換 (L106A)すると、NS3 と p53 の会合が著しく阻害され、NS3 による p53 機能阻害の程度が減弱することがわかった。また、NS3 のセリンプロテアーゼ活性も L106A 置換により著しく減弱した。このことは、NS3 の Leu-106 またはその近傍に結合する低分子化合物により HCV の増殖と癌原性を同時に阻害できる可能性を示唆している。NS3 の Phe-43 を Ala に置換 (F43A)した場合にも同様のことがみられたが、その程度は L106A 置換の場合に比べると軽度であった。

#### (2) NS5A と Syk の相互作用の解析 :

HCV 感染患者肝組織と非感染対照肝組織におけるチロシンキナーゼ Syk の発現を免疫染色により調べたところ、Syk の発現態様が HCV 感染の有無により異なることがわかった。そこで、培養細胞を用いたタンパク質発現系において HCV タンパク質と Syk の相互作用について検討したところ、NS5A が効率よく Syk と会合することがわかった。NS5A 以外の HCV タンパク質 (Core, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5B) はほとんど Syk と会合しなかった。また、NS5A と Syk の会合は、他の HCV 非構造タンパク質の存在下でも見られた。NS5A と Syk の欠失変異体を用いて会合領域について解析したところ、NS5A の N 末端領域 (aa 1-180) 及び Syk の 2 つの SH2 領域 (aa 1-261) がそれぞれ会合に関与することがわかった。次いで、NS5A が Syk のキナーゼ活性に及ぼす影響について検討した。その結果、全長 NS5A (1-447) と NS5A (1-302) は Syk と会合すると共にそのキナーゼ活性を抑制したが、NS5A (1-147) は Syk と会合するが、Syk キナーゼ活性を抑制しないことがわかった。一方、N 末端を欠失する NS5A (175-447) は Syk と会合せず、キナ

ーゼ活性も抑制しなかった。さらに、NS5A 発現により、Syk の下流のシグナル伝達分子である PLC- $\gamma$ 1 の活性化も阻害された。また、HCV レプリコン複製細胞においても NS5A が Syk と会合することもわかった。

#### D. 考察

HCV の NS3 はウイルス株により、斑点状、びまん性及びその中間型の三つのパターンで局在することが分かった。このことより、NS3 の局在を決定する細胞内タンパク質の存在する可能性が示唆される。興味あることに、斑点状パターンの NS3 は、びまん性パターンのものより強く、p53 と結合した。そして、その結合能の相違が p53 の機能に影響を及ぼすことがわかった。

さらに、今回我々は、p53 結合に関与する NS3 の 3 つのアミノ酸 (Phe-43, Leu-106, Val-158) を同定したが、それらはいずれも、NS3 の立体構造上比較的近い領域にあり、作用に強弱はあるものの、それぞれ p53 と直接相互作用している可能性が考えられた。このうち Phe-43, Leu-106 は、セリンプロテアーゼ活性にも関与していることがわかったが、これらは立体構造上、NS3 プロテアーゼの活性中心 (His-57, Asp-81, Ser-139) の近傍にあり、Ala への変異によって活性を低下させる何らかの構造上の変化が起こったと考えられた。p53 結合性およびプロテアーゼ活性に関与するこれらのアミノ酸について、今後さらに機能面での解析を進める予定である。さらに、これらのアミノ酸残基に作用し得る低分子化合物の探索により、HCV の増殖能と発癌性を同時に抑制する効果的な HCV 治療薬の開発に結びつく可能性が示唆された。

一方、HCV の NS5A は、肝細胞内の非受容体型チロシンキナーゼ Syk と会合し、そのキナーゼ活性を抑制することが明らかになった。Syk は乳癌の発症や浸潤・転移に対して抑制的に機能する癌抑制タンパク質であると報告

されている。従って、NS5A は Syk との相互作用を介して、肝細胞癌化あるいはその他の細胞変化を引き起こす可能性が考えられる。また、Syk キナーゼ活性の抑制には、NS5A の会合領域のみならず、PKR 結合領域を含む領域を必要とすることが明らかとなった。現在、NS5A による Syk 制御機構についてさらに詳細に解析を進めている。また、Syk キナーゼ活性の抑制により影響を受ける下流のシグナル伝達分子や関連する宿主細胞因子についても解析している。

今後は、実際の HCV 感染患者の肝組織において、NS3 と p53 が会合しているか否か、p53 機能が阻害されているか否か、また、NS5A と Syk が会合しているか否か、Syk キナーゼ活性が阻害されているか否かについて、HCV による肝癌および HCV 以外の肝癌 (B 型肝炎ウイルスによる肝癌や転移性肝癌) の摘除術で得られた癌組織や非癌組織を用いて比較解析する。そして、それらの相互作用が下流のシグナル伝達に及ぼす影響について詳細に解析する。さらに、HCV タンパク質と癌抑制タンパク質の相互作用の詳細な解析を通して、その相互作用に介入して HCV の癌原性 (できれば増殖能も) を阻害し得る細胞環境あるいは低分子化合物について探索する。

#### E. 結論

HCV NS3 の細胞内局在及び p53 癌抑制タンパク質との相互作用は、異なる臨床分離株由来の NS3 によって異なり、斑点状局在を示す NS3 は、びまん性のものに比べて、p53 とより効率よく会合し、p53 機能をより強く阻害した。さらに、NS3 と p53 の会合は HCV レプリコン複製細胞でも見られ、p53 機能は対照細胞に比べて減弱していた。

また、別の癌抑制タンパク質として知られる非受容体型チロシンキナーゼ Syk がヒト肝組織で発現していることを確認し、さらに、培養細胞において HCV NS5A が Syk と会合し、

Syk キナーゼ活性及びその下流のシグナル伝達分子である PLC- $\gamma$ 1 の活性化を阻害することを明らかにした。また、NS5A と Syk の会合は HCV レプリコン複製細胞でも見られた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nomura-Takigawa Y., Nagano-Fujii M., Deng L., Kitazawa S., Ishido S., Sada K. Hotta H. The nonstructural protein 4A of hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergo mitochondria-mediated apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 2006 (in press).
2. Deng L., Nagano-Fujii M., Tanaka M., Nomura-Takigawa Y. Ikeda M., Kato N., Sada K. Hotta H. The NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.*, 2006 (in press).
3. Tanaka M., Nagano-Fujii M., Deng L., Ishido S., Sada K, Hotta H. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340(3):792-799, 2006.
4. Hidajat R., Nagano-Fujii M., Deng L., Tanaka M., Takigawa Y., Kitazawa S., Hotta H. Hepatitis C virus NS3 protein interacts with ELKS- $\delta$  and ELKS- $\alpha$ , members of a novel protein family involved in intracellular transport and secretory pathways. *J. Gen. Virol.*,

86:2197-2208, 2005.

5. Kadoya H., Nagano-Fujii M., Deng L., Nakazono N., Hotta H. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the Interleukin 8 promoter. *Microbiol. Immunol.*, 49:265-273, 2005.

## 2. 学会発表

1. Hotta H, Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K. The nonstructural protein 4A of hepatitis C virus accumulates on mitochondria and induces apoptotic cell death through the mitochondria-mediated pathway. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal (Canada), 2006.
2. Nagano-Fujii M, Inubushi S, Mizuta H, Tanaka M, Yamamura H, Sada K, Hotta H. The nonstructural protein 5A of hepatitis C virus associates with and negatively regulates the enzymatic activity of non-receptor tyrosine kinase Syk in Huh-7 cells. 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal (Canada), 2006.
3. 瀧川有紀、長野基子、Lin Deng、石戸聡、定清直、堀田博：C型肝炎ウイルスNS4Aのミトコンドリア集積とそれを介したアポトーシスの誘導。第53回日本ウイルス学会学術集会、
4. 長野基子、犬伏祥子、田中基文、安春英、野村亮太、定清直、堀田博：C型肝炎ウイルスNA5Aは非受容体型チロシンキナーゼ Syk に会合しそのキナーゼ活性を負に制御する。第53回日本ウイルス学会学術集会、2005（横浜）

5. 犬伏祥子、長野基子、田中基文、安春英、野村亮太、山村博平、定清直、堀田博：C型肝炎ウイルス非構造タンパク質NA5Aは非受容体型チロシンキナーゼ Syk に会合し抑制的に作用する。第58回日本細菌学会関西支部総会、2005（神戸）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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）  
分担研究報告書

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基礎研究

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学教授

研究要旨 ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株のHCV感受性を調べ、樹状細胞のCTL誘導能、NK活性化能の機構を解析中である。

A. 研究目的

ウイルス感染を感知して宿主細胞に type I interferon (IFN) を誘導させる機構が自然免疫のシグナル伝達経路として判明してきた。本研究ではC型肝炎発症に関与するウイルス、宿主側の要因を解明し、抗ウイルス環境、IFNを内因的に誘導させる系を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1. HCV particleによりサイトカイン応答 (TLRによる type I interferon と NF- $\kappa$ B 依存性のサイトカイン) がおきるかの評価。サイトカイン応答が起きるのであればそれが TLR dependent か independent なのかを明らかにする。RIG-I、PKR、MDA5等の pathway も考慮。これらの系は当講座で確立されている。

2. HCV particle 存在下でのヒト樹状細胞の maturation を評価。必要であれば MLR で allostimulatory capacity の評価。HCV particle 存在下での DC-NK interaction を評価。樹状細胞 (DC) の抗 HCV 活性 CTL 誘導能も検討する。前者はウイルス感染による NKG2D ligand である ULBP などの発現上昇を樹状細胞と肝実質細胞で検討する。後者は tetramer や CTL 活性で検討する。

(倫理面への配慮)

Huh7.5.1 に感染する HCV の亜株を脇田博士より恵与を受けた。他に試料として倫理的配慮を要するものは現在ない。

C. 結果と考察

1. ヒト myeloid DC は脇田株に以下の条件で感染が証明できなかった。成熟樹状細胞, moi=1, 48h, 特異 primer による PCR と特異抗体による組織染色。高感度の検出法と DC 調整の条件検討を行う。HCV 感染細胞に対する CTL が誘導されるという報告が多数あるので樹状細胞に HCV の抗原が取り込まれるのは必然と考えられる。HCV が樹状細胞に感染しない場合、外部から抗原が endosomal uptake される可能性がある。HCV が胆管上皮細胞や肝実質細胞に感染して debris が DC に取り込まれるかを検討する予定である。この場合、一般に抗原取り込みとともに cross-priming が起きるはずで、この機構も一緒に解析する。

2. HCV 刺激によりヒト細胞は ULBP3 を発現上昇することが判明した。ULBP は NKG2D を介した NK 活性化を誘導し、感染細胞を傷害する。ULBP は DC も発現するが DC は NK の細胞傷害を受けない。感染と ULBP 誘導の機構を解析し、NK 活性化の HCV 感染における意義を検討する。

3. Type I IFN 外的投与無効例、副作用発症例の HCV 感染対策に IFN の内因的誘導機構を

解明することは重要である。現在以下の分子同定を試行中である。

- a. 感染によって発現誘導を受ける宿主因子群
- b. 各 HCV 蛋白質に結合し、IFN 誘導経路に関与する因子群
- c. HCV 陽性患者に発現顕著な分子の同定と機能解析

#### D. 結論

ヒト樹状細胞、胆管上皮細胞株、肝実質細胞株の HCV 感受性を調べ、CTL 誘導、NK 活性化の機構解析系を確立中である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shingai, M., N. Inoue, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. A mouse model for wild-type measles virus infection: CD11c-positive dendritic cells are nidus for systemic viral spreading. *J. Immunol.* 175: 3252-3261.
2. Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Interferon- $\beta$  induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* 24: 614-623.
3. Tsuji, Y., M. Hatanaka, T. Maeda, T. Seya, H. Takenaka, and A. Shimizu. 2005. Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med.* 16: 889-893.
4. Tsujita, T., A. Ishii, H. Tsukada, M. Matsumoto, F-S. Che, and T. Seya. 2006. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24: 2193-2199.
5. Muromoto R, Okabe K, Fujimuro M, Sugiyama K, Yokosawa H, Seya T, Matsuda T. 2006. Physical and functional interactions between STAT3 and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA. *FEBS Lett.* 580: 93-98.
6. Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, Hazeki O, Kitazaki T, Iizawa Y. 2006. A novel cyclohexene derivative, TAK-242, selectively inhibits Toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol.* 2005 Dec 22; [Epub ahead of print]
7. Murai, M., K. Hazeki, S. Kinoshita, H. Kubo, R. Kashiwagi, M. Matsumoto, N. Inoue, T. Seya, and O. Hazeki. 2005. IRAK-4-dependent phosphorylation and ubiquitination of IRAK-1 is a negative feedback signal for TLR-mediated NF- $\kappa$ B activation. *FEBS J.* (in press).
8. Sukenobu, N., K. Hazeki, K. Yoshikawa, T. Yamamoto, U. Kikkawa, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2005. Protein kinase Cd associates TIRAP/Mal and regulates NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinases in Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* (in press).
9. Seya T., M. Taniguchi, K. Funami, and M. Matsumoto. 2005. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J. Endotoxin Res.* 11: 369-374 (review).
10. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. The TICAM-1 pathway in

Toll-like receptor signaling. J.  
Biochem (Tokyo). 139: 171-175 (review).

11. Seya T., T. Akazawa, T. Tsujita, and M.  
Matsumoto. 2005. Application of Toll-  
like receptor agonists to vaccine  
adjuvant therapy. eCAM. (in press)  
(review).

F. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

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）  
分担研究報告書

動物モデルの開発およびそれを用いた解析

分担研究者 小原 道法 東京都臨床医学総合研究所 感染症プロジェクト リーダー

研究要旨 HCV 感染症の感染機構、および発症過程の解明に役立つモデル動物の樹立し、新たな感染複製阻害剤の開発を行い、これらウイルス疾患の制御を目的とする。Hepatitis B virus X protein promoter (HBX)で誘導できる HBX pro-HSVTK 発現ベクターを構築し、SCID マウスに導入した Tg マウスの作製を試みた。この Tg マウスの肝臓細胞は濃度依存的な GCV の感受性を示し肝細胞死が認められた。現在、ヒト肝細胞への置換率を上昇させることも検討中である。スフィンゴ脂質合成を阻害する NA255 およびミリオシンはセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) を特異的に阻害する物質として知られ、それが HCV レプリコンの複製を強く阻害した。*In vitro* の結果を受け、実際に HCV が持続感染しているヒト肝臓キメラマウスにミリオシンを投与したところ、8 日間で血中 HCV 量が 1/10-1/100 に減少し、PEG インターフェロンよりも減少率が大きかった。

A. 研究目的

HCV 感染症の感染機構、および発症過程の解明に役立つモデル動物を樹立し、現在までにほとんど研究が進んでいない個体レベルでの HCV 感染症の感染機構を解析し、さらに、これらの実験系をもとに新たな感染複製阻害剤の開発を行い、これらウイルス疾患の制御を目的とする。

B. 研究方法

Hepatitis B virus X protein promoter (HBX)で誘導できる HBX pro-HSVTK 発現ベクターを構築し、SCID マウスに導入した Tg マウスの作製を試みた。また、脂質ラフトは主にスフィンゴ脂質とコレステロールから成ることから、HCV レプリコン保持細胞中のこれらの合成を抑制することを試みた。スフィンゴ脂質合成を阻害する NA255 およびミリオシンを HCV レプリコン細胞及び HCV 感染動物に投与して、その阻害活性を検討した。

(倫理面への配慮)

施設内の動物実験委員会において研究計画について承認を受けて実施した。

C. 研究結果

HBX pro-HSVTK Tg マウスの肝臓細胞は濃度依存的な GCV の感受性を示し肝細胞死が認められた。さらに GCV を 50mg/kg 投与したマウスにおいては体重減少および肝湿重量の低下も認められた。スフィンゴ脂質合成経路の抑制の方がコレステロール合成経路よりも 100 倍以上効果的に HCV レプリコンの複製を阻害した。*In vitro* の結果を受け、実際に HCV が持続感染しているヒト肝臓キメラマウスにミリオシンを投与したところ、8 日間で血中 HCV 量が 1/10-1/100 に減少し、PEG インターフェロンよりも減少率が大きかった。

D. 考察

現在、効率よく肝細胞を死に導く GCV の投

与法を検討中である。また、ヒト肝細胞への置換率を上昇させることも検討中である。また、SPT が抗 HCV 薬のターゲットとして有効であることを *in vivo* で証明することに成功した。

#### E. 結論

これまでは HCV のコードするプロテアーゼや RNA ポリメラーゼが抗 HCV 薬の標的となっていた。これらの阻害剤は HCV 遺伝子の変異により速やかに耐性株が出現し、長期間使用できないといった大きな問題点がある。これに比較して、SPT のような宿主因子を標的にした場合には、変異はほとんど入らないので長期に使用できるといった利点がある。本研究により宿主因子を標的にした抗 HCV 薬の開発に大きな進展をもたらした。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hiroshi Sakamoto, Koichi Okamoto, Masahiro Aoki, Hideyuki Kato, Asao Katsume, Atsunori Ohta, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, Michinori Kohara & Masayuki Sudoh. Host sphingolipid biosynthesis as a

target for hepatitis C virus therapy. *Nat. Chem. Biol.* 1: 333-337 (2005).

2. Kazuhiro Hayashida, Michinori Kohara, Mine Harada, Takeshi Okanoue, Satoru Ito, and Shuichi Kaneko. Pre-treatment Prediction of Interferon- $\alpha$  efficacy in chronic hepatitis C patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (2005) in press.
  3. Tsunamasa Watanabe, Makoto Miyagishi, Masaaki Arai, Kazuaki Inoue, Kazunari Taira, Makoto Yoshida, Michinori Kohara. Targeting the Hepatitis C Virus genome with RNA interference using highly effective and non-toxic long double-stranded RNA. *Gene Therapy* (2005) in press.
  4. Hideo Akashi, Makoto Miyagishi, Tsunamasa Watanabe, Takanori Yokota, Michinori Kohara, and Kazunari Taira. Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA. *Mol. BioSystems* (2005) in press.
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし



HCV RNA 複製システムの改良と HCV 持続感染および増殖制御機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨 C 型肝炎の治療向上および発症予防に貢献することを目的として以下の 3 項目に関する研究を行った (1) 全長 C 型肝炎ウイルス(HCV)RNA 複製システムの改良 (2) HCV 持続感染機構の解析 (3) HCV 増殖制御機構の解析。主な研究成果を以下に示す。(1) ルシフェラーゼ活性の測定により HCV RNA の複製レベルを定量的にかつ簡便に測定できる OR6 アッセイシステムを開発した。可視化遺伝子を全長 HCV RNA 複製系に導入して、生細胞のまま蛍光強度を測定することで HCV RNA の複製レベルを知ることができる細胞系を作成した。全長 HCV RNA の複製効率を高める 5 種類の適応変異を見出し、適応変異の組み合わせでさらに複製効率が上昇することを明らかにした。全長 HCV RNA が複製している 5 種類の細胞を 1 年間培養し、HCV RNA の遺伝子解析を行った。その結果、 $3.7\sim 5.3\times 10^{-3}$  塩基置換/部位/年の変異率で HCV RNA に変異が蓄積することを明らかにした。(2) ヒト不死化肝細胞における IFN- $\beta$ の活性化に対する HCV NS3-4A の抑制効果は非常に強く認められる場合（二本鎖 RNA の細胞内導入時）とほとんど認められない場合（細胞外から二本鎖 RNA を添加した場合）があることを明らかにした。(3) OR6 アッセイシステムを用いて、HCV RNA の複製抑制活性を有するミゾリビンとスタチン剤を見出した。スタチン剤の一つであるフルバスタチンと IFN- $\alpha$ には相乗的抗 HCV 効果があることを見出した。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年 3 万人を超えており、その 9 割以上には肝炎ウイルスの感染が認められる。特に、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染は肝がん患者の 8 割を占めている。HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子であるが、HCV による持続感染機構については未だよく理解されていない。

肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン (IFN) しかなく、我が

国における治癒率も 30%と低い。最近ようやく、IFN との併用により効果を示すリバビリンや IFN の安定性を高めたペグ IFN が登場してきているが、それでも治癒率は 50%程度であり、依然として半数は難治性という状態が続いている。また、リバビリンには貧血などの副作用が高齢者を中心に目立つという問題もある。

HCV を体内から排除する、あるいは HCV の増殖を抑制する方法を開発するためには HCV の生活環の解明が必須である。しかしながら、現在の実験システムは HCV の生活環を研究するには不十分である。従って、現有的実験モデルの改良が必要である。そこで、本研究で

は、培養細胞を用いた HCV の複製増殖モデルである全長 HCV RNA 複製系を改良して、より解析のしやすい実験系を開発することを目的とする。また、本研究では HCV の持続感染に密接に関与していると考えられている HCV 蛋白質と IFN システムとの関係についても詳細に解析を行い、HCV 持続感染機構の解明に迫ることを目的とする。さらに、HCV の複製増殖に関する改良型実験モデルを用いて、HCV の増殖抑制剤の探索やそれらの作用機序の解析および HCV の増殖を制御する宿主因子の探索を行い、HCV に対する新規増殖抑制法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

細胞内で複製可能な全長 HCV-0 RNA のネオマイシン耐性 (Neo<sup>R</sup>) 遺伝子の upstream にウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼ遺伝子を組み込み (全長で 12 kb の RNA となる)、この RNA を HCV-0 細胞を IFN- $\alpha$  処理により HCVRNA を排除した 0c cured (治癒) 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性細胞の樹立を試みた。得られたクローン細胞における HCVRNA の複製レベルはノーザンブロット法、ウエスタンブロット法、定量的 RT-PCR 法などにより測定した。

EGFP 遺伝子を複製可能な全長 HCVRNA の Neo<sup>R</sup> 遺伝子の前、コア遺伝子の前、NS5A 遺伝子の後ろなどに挿入した。それぞれの場所に EGFP 遺伝子を 1 コピー有するものや組み合わせで EGFP 遺伝子を 2 或は 3 コピー有するものを作成して、OR6c 治癒細胞 (OR6 細胞から HCV RNA を IFN- $\alpha$  で排除した細胞) にエレクトロポレーション法により導入し、G418 耐性細胞の樹立を試みた。EGFP 遺伝子の発現による蛍光強度はフェノールレッドを含んでいない培地下で培養した細胞を 485 nm で励起し、510 nm の蛍光強度をフルオロシキヤンアセントにより測定した。共焦点レーザー顕微鏡による細胞内の蛍光検出は、細胞をパラホルムアルデヒドで固定後行った。HCV コアの発現は、同

様に固定後、1 次抗体としてコア抗体、2 次抗体として蛍光色素 Cy3 を標識した抗体を使用することにより確認した。

これまでに樹立した 5 種類の全長 HCVRNA 複製細胞 (0, 0A, 0B, 0D および 0E) 内で複製している全長 HCV RNA の遺伝子解析を行った。Dicistronic な全長 HCV RNA を 2 つの断片 (前半 5kb、後半 6kb) に分け、Superscript II と KOD-plus DNA polymerase を用いた Long RT-PCR 法により HCV RNA 全体を増幅した。その後、sequencing 用 plasmid にサブクローニングし、それぞれ 3 クローンについて全塩基配列を決定した。それぞれ 3 クローンずつ解析することにより主要な変異なのかどうかを判断した。HCVRNA の複製効率を上昇させる適応変異であるかどうかを調べるために、コロニーアッセイ法とルシフェラーゼアッセイ法を用いて HCVRNA の複製効率を測定した。コロニーアッセイ法では合成した変異を有する HCVRNA を 0c 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入し、培養後生じる G418 耐性細胞のコロニー数を測定した。ルシフェラーゼアッセイ法では変異を有する全長 HCVRNA の他にルシフェラーゼ遺伝子を含むように改変した HCVRNA を合成し、0c 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入した後に上昇してくるルシフェラーゼ活性を経時的 (1-3 日) に測定した。

上述の 5 種類の全長 HCVRNA 複製細胞を 1 年間長期培養 (1 週間毎に継代) した。上述したように細胞内で複製している全長 HCV RNA の塩基配列を決定し、樹立時の配列と比較して変異率や多様性の程度を調べた。

### (2) HCV 持続感染機構の解析

二本鎖 RNA (dsRNA) の培地内への添加および細胞内導入による IFN- $\beta$  遺伝子プロモーターのレポーターアッセイは以下に示す方法により行った。

PH5CH8 細胞を 1 ウェルあたり  $1.5 \times 10^5$  ずつ 6 ウェルプレートに蒔き込み、翌日に

pCXbsr レトロウイルス発現ベクター (NS3-4A など) 2  $\mu$ g、レポータープラスミド (pIFN- $\beta$ (-125)-Luc) 0.5  $\mu$ g および pRL-CMV internal control ベクター 1 ng を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。培養 42 時間後に二本鎖 RNA (poly I:C) 刺激を行った。

培地内に添加する場合は、poly I:C を 50  $\mu$ g/ml となるように添加し、6 時間後に Dual-Luciferase Assay を行った。一方、細胞内に導入する場合は、poly I:C 5  $\mu$ g を Lipofectamine 2000 を用いて、トランスフェクションし、6 時間後に Dual-Luciferase Assay を行った。

IRF3 の二量体は上述したように PH5CH8 細胞を poly I:C で刺激し、回収した祖蛋白質画分を Native-PAGE にて分離して IRF3 抗体により検出した。

### (3) HCV 増殖制御機構の解析

OR6 細胞を 1 ウェルあたり  $2 \times 10^4$  ずつ 24 ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤 (リバビリン、ミゾリビン、スタチン剤、シクロスポリン、IFN- $\alpha$ など) を添加して 72 時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

OR6 細胞の増殖に対する各種薬剤の効果は、薬剤添加後 3 日目における生細胞数を測定することにより求めた。スタチン剤の EMCV IRES に対する影響については、pEMCV-RL (EMCV IRES を Runilla luciferase 遺伝子につないだもの) を細胞内に導入して 3 日目に、ルシフェラーゼ活性の値を測定してスタチン剤の影響を調べた。

### (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段の必要性はない。

## C. 研究結果

### (1) 全長 HCV RNA 複製システムの改良

Neo<sup>R</sup> 遺伝子の上流に Renilla 由来のルシフェラーゼ遺伝子を融合させ dicistronic な構造有する複製可能な全長 HCVRNA を作成し、0 細胞由来の治癒細胞に導入することにより 12 kb の HCV RNA が効率よく複製している細胞を得た。12 kb の RNA は複製増殖により一部脱落しやすいことがわかったことから、安定的に複製増殖できる細胞クローンの選択を行い、#6 のクローンを選択し、OR6 細胞と命名した。OR6 細胞を IFN- $\alpha$  で処理して得られるルシフェラーゼ活性の低下率と定量的 RT-PCR 法により得られた HCVRNA 量の低下率はよく一致しており、ウエスタンブロット解析により HCV 蛋白質の発現レベルも高かったことから、HCVRNA の複製レベルが高いことが分った。また、通常 1 日以上かかっていたアッセイがわずか 30 分程度で済むという時間節約の利点も大きい。以上の結果、OR6 アッセイシステムは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かつ簡便に測定できるアッセイシステムであることが明らかとなった。

EGFP 遺伝子を全長 HCV RNA 複製系に導入し、生細胞のまま HCV RNA の複製レベルの観察を可能にする系の開発を試みた。その結果、蛍光が観察される様々な G418 耐性のクローン細胞が得られた。それらの細胞内での HCV 蛋白質や EGFP の発現量を調べ、予想される EGFP 融合蛋白質などが検出された。蛍光量も経時的に増加することが確認されたが、検出された蛍光量は少なく、現時点では、まだ満足できるレベルには達していないと判断された。現時点では Neo<sup>R</sup> 遺伝子の前に EGFP 遺伝子を挿入した場合が最も良く、観察された蛍光は細胞を IFN- $\alpha$  で処理すると 72 時間後には消失し、HCV コア蛋白質も同じく消失することから観察された蛍光は HCV RNA の複製によるものであることが確認された。

これまでに樹立した 5 種類の全長 HCV RNA

複製細胞 (0, OA, OB, OD および OE 細胞) 内で複製している全長 HCV RNA の遺伝子解析を行った。それぞれの細胞由来の 3 クローンについて塩基配列を決定した結果、0 細胞で以前見出されていた K1609E (NS3 領域) は他の細胞では認められなかった。しかしながら、OA 細胞では E1202G (NS3 領域) と D2415G (NS5A 領域)、OB および OE 細胞では P1115L (NS3 領域)、OD 細胞では Q1112R (NS3 領域) のアミノ酸置換が認められた。これら 5 種類の細胞から 5 種類の新たなアミノ酸置換が認められ、これらが HCVRNA の複製効率を上昇させる適応変異である可能性が考えられた。次にこれらのアミノ酸置換を導入した全長 HCV RNA を作成し、0c 治癒細胞に導入後、コロニーアッセイ法とルシフェラーゼアッセイ法を用いて HCVRNA の複製効率を測定した。その結果、単独のアミノ酸置換でも HCVRNA の複製効率が上昇することから、これらのアミノ酸置換は適応変異であると考えられた。さらに、E1202G と K1609E の両方を有する場合の複製効率がさらに高まることが分かった。

上述の 0, OA, OB, OD および OE 細胞を 1 年間長期培養し、HCV RNA の遺伝子解析を行った。それぞれ、樹立時の塩基配列と比較した結果、全長 HCV RNA は  $3.7 \sim 5.3 \times 10^{-3}$  base substitutions/site/year の速度で変異が蓄積し、遺伝的多様性を獲得していることがわかった。最も変異率の高かった HCV RNA は OB 細胞由来のもので、10,972 ヌクレオチド中 63 個の変異が認められた。樹立時に認められた適応変異は 1 年培養後も検出されたが、新たな適応変異と考えられる主要な分子種の出現は認められなかった。

## (2) HCV 持続感染機構の解析

ヒト不死化肝 PH5CH8 細胞において NS5B を発現させると TLR3 の活性化を介して IFN- $\beta$  の産生誘導が起こり、コアを共発現させると IFN- $\beta$  の産生がさらに亢進する。この状態で NS3-4A を共発現させると IFN- $\beta$  の産生が顕

著に抑制されるが、その抑制は不完全であることをこれまでに明らかにしている。また、PH5CH8 細胞は HuH-7 や HepG2 細胞などのヒト肝癌細胞株と異なり、IFN- $\beta$  産生システムの TLR3/TFIF および RIG-I/IPS-1 の両シグナル系がよく機能していることを最近明らかにしている (Dr. Lemon との共同研究)。今年度は PH5CH8 細胞を二本鎖 RNA (poly I:C) で処理した場合における NS3-4A の影響を詳細に調べた。二本鎖 RNA を細胞内に導入することにより TLR3 や RIG-I の系が活性化され IFN- $\beta$  の産生が起こるが、NS3-4A を細胞内で発現させると IFN- $\beta$  の産生は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して顕著に抑制された。しかしながら、予想外に二本鎖 RNA を培地内に添加し細胞外から刺激を与えた場合に起こる IFN- $\beta$  の産生誘導は NS3-4A を細胞内で発現させてもほとんど抑制されないことを見出した。

IRF3 の 2 量体の増減 (活性化に伴い出現する) を調べる Native-PAGE によるアッセイ系においても同様の現象が確認された。

## (3) HCV 増殖制御機構の解析

OR6 アッセイシステムを用いて、リバビリンと類似した構造を有するミゾリビンの抗 HCV 活性を測定した。その結果、ミゾリビンにはリバビリンとほぼ同程度の HCV RNA の複製を抑制する効果があることを明らかにした。ミゾリビン添加後 3 日目において HCVRNA の複製を 50% 阻害するミゾリビンの濃度 ( $IC_{50}$ ) は  $99 \mu\text{M}$  と阻害剤としては弱いものであったが、 $10 \mu\text{M}$  程度の低濃度 (临床上での血中濃度) でも IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果を増強する効果が認められた。また、抗 HCV 効果が報告されているシクロスポリンとミゾリビンを併用すると相加効果が認められることも示した。

高脂血症薬の一つである Lovastatin (国内では認可されていない) に抗 HCV 作用があることが以前別のグループにより報告されていたことから、国内で認可されている他のスタ