

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成19(2007)年4月

目次

I.	総合研究報告書 遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発 松浦 善治	3
II.	分担研究報告書 遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発 松浦 善治・森石 恆司	8
	アミノ末端改変キメラE型肝炎ウイルス粒子の作製 武田 直和	12
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・別冊	別添

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

主任研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：本研究事業により以下の点を明らかにした。1) HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 蛋白質が発現している細胞でのみ効率よく切断されて活性化されるように設計した組換えバキュロウイルスを構築した。2) バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析し、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構の存在が示唆された。3) 遺伝子型 1 のキメラ E 型肝炎ウイルス粒子を作製した。VLP 形成に必須な最小アミノ酸配列はこれまでの 111～608 からさらに絞り込んだ 125～601 残基であった。1 型 HEV ORF2 の N 末端から 124 アミノ酸をそれぞれ ORF3 の N 末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および ORF3 全長に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現したところ、ORF3 蛋白質はキメラウイルス粒子の表面に配置していることが明らかになった。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
武田直和 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そして RNA ウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子として持つ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入で

きる。2) ウイルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な免疫応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4) 他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウイルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 感染症やがんに対する遺伝子治療用ベクターの開発：gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドのみを持ったターゲティング可能なシュードタイプウイルスの作製系を構築し、水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質 (VSV-G) や、麻疹ウイルスの受容体である CD46 あるいは SLAM を被ったシュードタイプウイルスがターゲット細胞に特異的に遺伝子を導入できることを証明した。しかしながら、どんなリガンド分子でも粒子表面に効率よく提示できる訳ではなく、SLAM の場合はその細胞質領域を短くすることで粒子表面への取り込みが飛躍的に改善できた。本年度は、C型肝炎ウイルス (HCV) に感染した細胞でのみインターフェロン誘導遺伝子が稼働するバキュロウイルスベクターを作製し、遺伝子導入細胞を死滅させることなく、慢性持続感染細胞から HCV を排除可能なバキュロウイルスベクターの開発を試みた。

2) バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析とその応用：バキュロウイルスをマウスの鼻腔内に接種すると自然免疫を強力に誘導し、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃を完

全に防御できる強力な自然免疫を誘導できることを明らかにした (Abe et al., 2003)。バキュロウイルスの感作により、炎症性サイトカインは TLR9 依存的に産生されるのに対し、抗ウイルス活性の要であるインターフェロン (IFN) の発現は TLR 非依存的に誘導された。また、IFN の産生誘導は 2 本鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (PKR) 阻害剤の影響を受けなかった (Abe et al., 2005)。これらの成績は、TLR9 リガンドである非メチル化 CpG DNA やヘルペスウイルスによるものとは異なり、バキュロウイルスに特異的な TLR-PKR 非依存的な IFN の誘導機構が存在することを示唆するものである。今年度は、バキュロウイルスに特異的な TLR 非依存的な IFN の誘導機構を IRF や STAT 等の転写因子欠損マウスを用いて解析する。アジュバント活性を兼ね備え、自然免疫と獲得免疫を誘導できる新規ワクチンベクターとしてのバキュロウイルスベクターの開発を試みた。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発: バキュロウイルスを利用して各種ウイルス (HEV、パルボウイルス、レオウイルス等) の構造蛋白を発現させると、大量のウイルス様粒子が産生されることが知られている。特に HEV-LP の産生性は驚くほど高く、さらに、HEV-LP そのものを経口投与することによって、HEV に対する感染中和抗体の誘導が可能であることを明らかにしている (Li et al., 2004)。しかし、これまでに作製できた HEV-LP はネイティブな粒子に比べ小さく、粒子内部には 1kb の核酸を取り込めるに過ぎない。そこで、ネイティブな粒子と同じ大きさを持つ HEV-LP を作製し、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。再構成された HEV-LP の遺伝子導入効率を各種培養細胞に接種して検討する。今年度は、再構成粒子を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討した。

4) 1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。このコンストラクトの N 末端側に 1 型 HEV ORF3 の N 末 16、33、および 123 アミノ酸を同じ向きに連結したクローンを作製し、これらについても定法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。N 末端、および C 末端から 1 アミノ酸ずつを欠失したコンストラクトについても組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、培養上清から VLP を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 ORF3 に対する抗体を用い、電子

顕微鏡、ELISA 法、Dot immunoblotting 等で発現、抗原性等を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1) 感染症やがんに対する遺伝子治療用ベクターの開発: HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく切断されて活性化されるように設計した IFN 調節因子 (IRF) 7 遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築した。

2) バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析とその応用: IRF や STAT の欠損マウスを用いてバキュロウイルスによる IFN の誘導機構を解析した結果、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構の存在が示唆された。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発: HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を外来アミノ酸に置き換えた VLP を作製できた。今後、HEV-LP を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討する。

4) VLP 形成に必須な最小アミノ酸配列: 組換えバキュロウイルス感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察すると、N 末端 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の場合、直径約 23-24nm の中空粒子が多数観察される。これは 112-608 アミノ酸残基で構成される構造蛋白が 60 コピー集合して形成される T=1 の粒子であることがアミノ酸配列の解析から明らかになっている。N 末端と C 末端をさらに欠損させた場合、N 末端は 124 アミノ酸、C 末端では 59 アミノ酸を欠失させても粒子形成を観察することができた。しかしながら、N 末端、C 末端いずれの場合もさらに 1 アミノ酸でも欠損させると粒子形成が完全に抑えられた。

5) ORF3 を N 末端に連結した ORF2 の発現: 1 型 HEV ORF2 の N 末端から 124 アミノ酸を ORF3 全長に、あるいは 1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸をそれぞれ ORF3 の N 末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および 53 アミノ酸に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現した。1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を ORF3 の N 末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および

53 アミノ酸に置き換えた組換えバキュロウイルスでは感染 7 日目の感染細胞培養上清を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの場合も直径 23-24nm の粒子が多数観察された。

6) キメラ粒子の抗原性: ORF3 がコードする蛋白のエピトープが粒子の表面に出ているか、あるいは粒子の内部に位置するのかを明らかにするため ORF3 蛋白に特異的な抗体を用いてその発現状態を解析した。Dot immunoblotting、抗体 ELISA いずれの場合も抗 ORF3 抗体は明らかな陽性反応を示し、ORF3 蛋白が粒子表面に発現しているものと考えられた。

D. 考察

バキュロウイルスは大きな外来遺伝子を組み込むことが可能であり、哺乳動物細胞に接種しても細胞傷害性をほとんど示さず、また、ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が無いことなど、ウイルスベクターとして優れた特性を備えている。この様な特性を持ったバキュロウイルスを用いて HCV に感染した肝臓細胞からウイルスを排除したり、発症を制御可能なベクターの開発が可能である。HCV に感染した細胞特異的に *in vitro* で IFN 遺伝子を誘導可能なバキュロウイルスベクターが構築できた。今後ヒト肝細胞を移植し、HCV の感染を許容できるキメラマウスを用いて *in vivo* のウイルス排除効果を評価する。また、最近我々が同定した、HCV の複製や成熟に必須な宿主因子、VAP-A/B、FKBP8、SPP、および PA28 γ の siRNA をコードした組換えバキュロウイルスを作製し、*in vitro* でのウイルス複製抑制および中性脂肪の産生抑制を確認する。バキュロウイルスが免疫担当細胞に自然免疫を誘導できる特性を活用した新しいウイルスベクターの開発は、先天性・後天性疾患の遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、新規 DNA ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高いものと思われる。

HEV 構造蛋白の N 末端および C 末端の構造と VLP の形成に関する一連の実験から N 末端 111 アミノ酸からさらに絞り込んだ 112~124 の 15 アミノ酸、C 末端 52 アミノ酸からさらに絞り込んだ 601~608 の 7 アミノ酸を欠損させても VLP 形成には影響がないことが示された。したがって、構造蛋白の 125-601 アミノ酸が粒子形成に必須のアミノ酸残基で粒子のコアを形成していると考えられる。このコンストラクトによって形成される VLP の N 末端、C 末端には外来蛋白を挿入できる可能性が考えられた。インドの E 型急性肝炎から分離された株では構造蛋白領域の内部に 1 アミノ酸変異があり、このコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現しても粒子は形成できない。したがって、現時点では外来蛋白は N 末端あるいは C 末端に連結して発現するしか方

法はなさそうである。幸い、N 末端には 16-53 アミノ酸を連結することによって外来蛋白を VLP 表面に発現できることが確認された。今後、有用蛋白を同様な手法で連結したキメラ HEV VLP を作製し、経口あるいは経鼻投与して、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での免疫誘導能について検討したい。

E. 結論

- 1) HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく活性化されるように設計した組換えバキュロウイルスを構築した。
- 2) バキュロウイルスによる、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構が示唆された。
- 3) HEV ORF2 の N 末端を外来アミノ酸に置き換えた VLP を作製できた。
- 4) 組換えバキュロウイルスで遺伝子型 1 の ORF3 蛋白を N 末端に連結した構造蛋白を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。N 末に連結した ORF3 は粒子の外側に配置しているように思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 104, 1661-1666 (2007).
2. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007)
3. Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
4. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T.,

- Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.*, 80,11265-11273 (2006).
5. Okamoto T, Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J*, 25, 5015-5025 (2006).
 6. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-105 (2006).
 7. Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 2007; in press.
 8. Li TC, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:170-172.
 9. Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1171-1177.
 10. Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 2006;159:853-854.
 11. Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:932-936.
2. 学会発表
 1. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
 2. Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Triphosphatase at a Resolution 1.8 Å. 同上。
 3. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006
 4. Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
 5. Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
 6. Takayuki Abe, Shyu-hei Taguwa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
 7. 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型肝炎ウイルスの複製におけるFKBP8の役割、第54回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成18年11月19-21日。
 8. 阿部隆之、田鋤修平、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
 9. 田鋤修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製に關与する新規宿主因子の解析、同上。

10. 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恆司、松浦善治: カテプシンLによってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
 11. 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する、同上。
 12. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV、同上。
 13. 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恆司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治: 日本脳炎ウイルスのRNA ヘリケースドメインのX線結晶構造解析、同上。
 14. 森石恆司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割、同上。
 15. 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治: カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
 16. 松浦友紀子、李 天成、吉松組子、有川二郎、恒光裕、高島郁夫、鈴木正嗣、宮村達男、武田直和。日本に生息するシカのE型肝炎ウイルス抗体保有、同上。
 17. 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恆司: C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症における PA28 γ の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 18 年 9 月 28-30 日。
 18. Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006. 11.
 19. Takeda N: Risk factors for hepatitis E virus infection. In 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006. 8
 20. Li T-C, Takeda N, Miyamura T: haracterization of Recombinant Virus-Like Particles of Genotype 3 Hepatitis E Virus. In 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, 2006. 7.
 21. Sugitani M, Sheikh A, Tamura A, Shimizu YK, Shimizu K, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Suzuki K, Ishaque SM, Hasan M: Investigation of hepatitis e virus (hev) rna and genotype in sera of bangladesh. In 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, 2006. 7.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授

研究要旨：HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 蛋白質が発現している細胞でのみ効率よく切断されて活性化されるように設計した組換えバキュロウイルスを構築した。バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析し、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構の存在が示唆された。E 型肝炎ウイルスの ORF2 の N 末端に外来アミノ酸に置き換えたウイルス様粒子を作製した。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そして RNA ウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入できる。2) ウイルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な免疫応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4)

他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウイルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 感染症やがんに対する遺伝子治療用ベクターの開発：gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドのみを持ったターゲティング可能なシュードタイプウイルスの作製系を構築し、水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質 (VSV-G) や、麻疹ウイルスの受容体である CD46 あるいは SLAM を被ったシュードタイプウイルスがターゲット細胞に特異的に遺伝子を導入できることを証明した。しかしながら、どんなリガンド分子でも粒子表面に効率よく提示できる訳ではなく、SLAM の場合はその細胞質領域を短くすることで粒子表面への取り込みが飛躍的に改善できた。本年度は、C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染した細胞でのみインターフェロン誘導遺伝子が稼働するバキュロウイルスベクターを作製し、遺伝子導入細胞を死滅させることなく、慢性持続感染細胞から HCV を排除可能なバキュロウイルスベクターの開発を試みた。

2) バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析とその応用：バキュロウイルスをマウスの鼻腔内に接種すると自然免疫を強力に誘導し、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃を完全に防御できる強力な自然免疫を誘導できることを明らかにした (Abe et al., 2003)。バキュロウイルスの感作により、炎症性サイトカインは TLR9 依存的に産生されるのに対し、抗

ウイルス活性の要であるインターフェロン (IFN) の発現は TLR 非依存的に誘導された。また、IFN の産生誘導は 2 本鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (PKR) 阻害剤の影響を受けなかった (Abe et al., 2005)。これらの成績は、TLR9 リガンドである非メチル化 CpG DNA やヘルペスウイルスによるものとは異なり、バキュロウイルスに特異的な TLR-PKR 非依存的な IFN の誘導機構が存在することを示唆するものである。今年度は、バキュロウイルスに特異的な TLR 非依存的な IFN の誘導機構を IRF や STAT 等の転写因子欠損マウスを用いて解析する。アジュバント活性を兼ね備え、自然免疫と獲得免疫を誘導できる新規ワクチンベクターとしてのバキュロウイルスベクターの開発を試みた。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発:バキュロウイルスを利用して各種ウイルス (HEV、パルボウイルス、レオウイルス等) の構造蛋白を発現させると、大量のウイルス様粒子が産生されることが知られている。特に HEV-LP の産生性は驚くほど高く、さらに、HEV-LP そのものを経口投与することによって、HEV に対する感染中和抗体の誘導が可能であることを明らかにしている (Li et al., 2004)。しかし、これまでに作製できた HEV-LP はネイティブな粒子に比べ小さく、粒子内部には 1kb の核酸を取り込めるに過ぎない。そこで、ネイティブな粒子と同じ大きさを持つ HEV-LP を作製し、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。再構成された HEV-LP の遺伝子導入効率を各種培養細胞に接種して検討する。今年度は、再構成粒子を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討した。(倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1) 感染症やがんに対する遺伝子治療用ベクターの開発: HCV のプロテアーゼが自然免疫の誘導に必須なアダプター分子を切断して、宿主の免疫機構から逃避していることが知られている。そこで、HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく切断されて活性化されるように設計した IFN 調節因子 (IRF)7 遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスを構築した。

2) バキュロウイルスの自然免疫誘導機構の解析とその応用: IRF や STAT の欠損マウスを用いてバキュロウイルスによる IFN の誘導機構を解析した結果、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構の存在が示唆された。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発: HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を外来アミノ酸に置き換えた VLP を作製できた。今後、HEV-LP を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討する。

D. 考察

バキュロウイルスは大きな外来遺伝子を組み込むことが可能であり、哺乳動物細胞に接種しても細胞傷害性をほとんど示さず、また、ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が無いことなど、ウイルスベクターとして優れた特性を備えている。このような特性を持ったバキュロウイルスを用いて HCV に感染した肝臓細胞からウイルスを排除したり、発症を制御可能なベクターの開発が可能である。HCV に感染した細胞特異的に *in vitro* で IFN 遺伝子を誘導可能なバキュロウイルスベクターが構築できた。今後ヒト肝細胞を移植し、HCV の感染を許容できるキメラマウスを用いて *in vivo* のウイルス排除効果を評価する。また、最近我々が同定した、HCV の複製や成熟に必須な宿主因子、VAP-A/B、FKBP8、SPP、および PA28 γ の siRNA をコードした組換えバキュロウイルスを作製し、*in vitro* でのウイルス複製抑制および中性脂肪の産生抑制を確認する。バキュロウイルスが免疫担当細胞に自然免疫を誘導できる特性を活用した新しいウイルスベクターの開発は、先天性・後天性疾患の遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、新規 DNA ワクチンとし

での可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高いものと思われる。

E. 結論

1) HCV のプロテアーゼによって特異的に認識されるアミノ酸配列を検討し、HCV 感染細胞でのみ効率よく活性化されるように設計した組換えバキュロウイルスを構築した。

2) バキュロウイルスによる、TLR 非依存的な自然免疫誘導機構が示唆された。

3) HEV ORF2 の N 末端を外来アミノ酸に置き換えた VLP を作製できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 104, 1661-1666 (2007).
- 2 Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
- 3 Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P. M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
- 4 Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J. H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope

protein. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).

- 5 Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
 - 6 Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-105 (2006).
- ##### 2. 学会発表
- 1 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
 - 2 Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Trisphosphatase at a Resolution 1.8 Å. 同上。
 - 3 Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006
 - 4 Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of

- PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
- 5 Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
 - 6 Takayuki Abe, Shyu-hei Tagawa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
 - 7 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型肝炎ウイルスの複製におけるFKBP8の役割、第54回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成18年11月19-21日。
 - 8 阿部隆之、田鍬修平、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
 - 9 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子の解析、同上。
 - 10 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恆司、松浦善治: カテプシンLによってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
 - 11 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質B23は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する、同上。
 - 12 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、同上。
 - 13 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恆司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治: 日本脳炎ウイルスのRNAヘリケースドメインのX線結晶構造解析、同上。
 - 14 森石恆司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCVコア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症におけるPA28 γ の役割、同上。
 - 15 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治: カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
 - 16 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恆司: C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症におけるPA28 γ の役割、第65回日本癌学会学術総会、横浜、平成18年9月28-30日。
- 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（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
「遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発」
分担研究報告書

アミノ末端改変キメラ E 型肝炎ウイルス粒子の作製

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 遺伝子型 1 のキメラ E 型肝炎ウイルス粒子を作製した。VLP 形成に必須な最小アミノ酸配列はこれまでの 111～608 からさらに絞り込んだ 125～601 残基であった。1 型 HEV ORF2 の N 末端から 124 アミノ酸をそれぞれ ORF3 の N 末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および ORF3 全長に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現したところ、ORF3 蛋白はキメラウイルス粒子の表面に配置していることが明らかになった。

協力研究者 李 天成（国立感染症研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。我々はこれまでに 1 型、3 型、および 4 型の HEV について N 末端の 111 アミノ酸を欠失した構造蛋白を発現してウイルス様中空粒子（VLP）を作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブな HEV と差のないことを明らかにした。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製された VLP がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられている。本システムによる VLP 産生において特筆すべきは、その産生量の多さと産生される VLP が培養上清に出ることによる精製の容易さである。本研究ではこれらの特徴と利点を生かし有用医薬品開発の一助として VLP をベースに構造蛋白に外来遺伝子を挿入したキメラ粒子の作製とその性状解析を目的とした。

B. 研究方法

1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。このコンストラクトの N 末端側に 1 型 HEV ORF3 の N 末 16、33、および 123 アミノ酸を同じ向きに連結したクローンを作製し、こ

れらについても定法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。N 末端、および C 末端から 1 アミノ酸ずつを欠損したコンストラクトについても組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、培養上清から VLP を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 ORF3 に対する抗体を用い、電子顕微鏡、ELISA 法、Dot immunoblotting 等で発現、抗原性等を解析した。

C. 研究結果

1. VLP 形成に必須な最小アミノ酸配列

組換えバキュロウイルス感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察すると、N 末端 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の場合、直径約 23-24nm の中空粒子が多数観察される。これは 112-608 アミノ酸残基で構成される構造蛋白が 60 コピー集合して形成される T=1 の粒子であることがアミノ酸配列の解析から明らかになっている。N 末端と C 末端をさらに欠損させた場合、N 末端は 124 アミノ酸、C 末端では 59 アミノ酸を欠失させても粒子形成を観察することができた。しかしながら、N 末端、C 末端いずれの場合もさらに 1 アミノ酸でも欠損させると粒子形成が完全に抑えられた。

2. ORF3 を N 末端に連結した ORF2 の発現

1 型 HEV ORF2 の N 末端から 124 アミノ酸を ORF3 全長に、あるいは 1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸をそれぞれ ORF3 の N

末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および 53 アミノ酸に置き換えたコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現した。1 型 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を ORF3 の N 末端 16 アミノ酸、33 アミノ酸、および 53 アミノ酸に置き換えた組換えバキュロウイルスでは感染 7 日目の感染細胞培養上清を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの場合も直径 23-24nm の粒子が多数観察された。

3. キメラ粒子の抗原性

ORF3 がコードする蛋白のエピトープが粒子の表面に出ているか、あるいは粒子の内部に位置するのかを明らかにするため ORF3 蛋白に特異的な抗体を用いてその発現状態を解析した。Dot immunoblotting、抗体 ELISA いずれの場合も抗 ORF3 抗体は明らかな陽性反応を示し、ORF3 蛋白が粒子表面に発現しているものと考えられた。

D. 考察

HEV 構造蛋白の N 末端および C 末端の構造と VLP の形成に関する一連の実験から N 末端 111 アミノ酸からさらに絞り込んだ 112~124 の 15 アミノ酸、C 末端 52 アミノ酸からさらに絞り込んだ 601~608 の 7 アミノ酸を欠損させても VLP 形成には影響がないことが示された。したがって、構造蛋白の 125-601 アミノ酸が粒子形成に必須のアミノ酸残基で粒子のコアを形成していると考えられる。このコンストラクトによって形成される VLP の N 末端、C 末端には外来蛋白を挿入できる可能性が考えられた。インドの E 型急性肝炎から分離された株では構造蛋白領域の内部に 1 アミノ酸変異があり、このコンストラクトを組換えバキュロウイルスで発現しても粒子は形成できない。したがって、現時点では外来蛋白は N 末端あるいは C 末端に連結して発現するしか方法はなさそうである。幸い、N 末端には 16-53 アミノ酸を連結することによって外来蛋白を VLP 表面に発現できることが確認された。今後、有用蛋白を同様な手法で連結したキメラ HEV VLP を作製し、経口あるいは経鼻投与して、消化器や呼吸器系の粘膜における in vivo での免疫誘導能について検討したい。

E. 結論

組換えバキュロウイルスで遺伝子型 1 の ORF3 蛋白を N 末端に連結した構造蛋白を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。N 末に連結した ORF3 は粒子の外側に配置しているように思われた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 2007:in press.
- 2 Li TC, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:170-172.
- 3 Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1171-1177.
- 4 Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 2006;159:853-854.
- 5 Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:932-936.

2. 学会発表

- 1 Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006.11.
- 2 Takeda N: Risk factors for hepatitis E virus infection. In 2006 Interational workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006.8
- 3 Li T-C, Takeda N, Miyamura T: haracterization of Recombinant Virus-Like Particles of Genotype 3 Hepatitis E Virus. In 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, 2006.7.

- 4 Sugitani M, Sheikh A, Tamura A, Shimizu YK, Shimizu K, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Suzuki K, Ishaque SM, Hasan M: Investigation of hepatitis e virus (hev) rna and genotype in sera of bangladesh. In 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, 2006.7.
- 5 松浦友紀子、李 天成、吉松組子、有川

二郎、恒光裕、高島郁夫、鈴木正嗣、宮村達男、武田直和。日本に生息するシカのE型肝炎ウイルス抗体保有。日本ウイルス学会、第54 学術集会 2006 11月 横浜

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y.	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis.	PNAS	104	1661-1666	2007
Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y.	Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein.	J. Virol.	81	1727-1735	2007
Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I.	The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein.	J. Virol.	81	1174-1185	2007
Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y.	Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein.	J. Virol.	80	11265-11273	2006
Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y.	Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90.	EMBO J.	25	5015-5025	2006
Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S.	Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.	Nature	441	101-105	2006
Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N	Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose.	Am J Trop Med Hyg	74	932-936	2006
Li T.C., Miyamura T., Takeda N.	Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (corbicula japonica) in Japan.	Am J Trop Med Hyg	76	170-172	2007

Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis

Kohji Moriishi*, Rika Mochizuki*, Kyoji Moriya[†], Hironobu Miyamoto*, Yoshio Mori*, Takayuki Abe*, Shigeo Murata[‡], Keiji Tanaka[‡], Tatsuo Miyamura[§], Tetsuro Suzuki[§], Kazuhiko Koike[†], and Yoshiharu Matsuura*[¶]

*Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; [†]Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan; [‡]Department of Molecular Oncology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo 113-8613, Japan; and [§]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

Edited by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, and approved December 1, 2006 (received for review August 23, 2006)

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease that frequently leads to steatosis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma (HCC). HCV core protein is not only a component of viral particles but also a multifunctional protein because liver steatosis and HCC are developed in HCV core gene-transgenic (CoreTg) mice. Proteasome activator PA28 γ /REG γ regulates host and viral proteins such as nuclear hormone receptors and HCV core protein. Here we show that a knockout of the PA28 γ gene induces the accumulation of HCV core protein in the nucleus of hepatocytes of CoreTg mice and disrupts development of both hepatic steatosis and HCC. Furthermore, the genes related to fatty acid biosynthesis and *srebp-1c* promoter activity were up-regulated by HCV core protein in the cell line and the mouse liver in a PA28 γ -dependent manner. Heterodimer composed of liver X receptor α (LXR α) and retinoid X receptor α (RXR α) is known to up-regulate *srebp-1c* promoter activity. Our data also show that HCV core protein enhances the binding of LXR α /RXR α to LXR-response element in the presence but not the absence of PA28 γ . These findings suggest that PA28 γ plays a crucial role in the development of liver pathology induced by HCV infection.

fatty acid | proteasome | sterol regulatory element-binding protein (SREBP) | RXR α | LXR α

Hepatitis C virus (HCV) belongs to the Flaviviridae family, and it possesses a positive, single-stranded RNA genome that encodes a single polyprotein composed of \approx 3,000 aa. The HCV polyprotein is processed by host and viral proteases, resulting in 10 viral proteins. Viral structural proteins, including the capsid (core) protein and two envelope proteins, are located in the N-terminal one-third of the polyprotein, followed by nonstructural proteins.

HCV infects >170 million individuals worldwide, and then it causes liver disease, including hepatic steatosis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma (HCC) (1). The prevalence of fatty infiltration in the livers of chronic hepatitis C patients has been reported to average \approx 50% (2, 3), which is higher than the percentage in patients infected with hepatitis B virus and other liver diseases. However, the precise functions of HCV proteins in the development of fatty liver remain unknown because of the lack of a system sufficient to investigate the pathogenesis of HCV. HCV core protein expression has been shown to induce lipid droplets in cell lines and hepatic steatosis and HCC in transgenic mice (4–6). These reports suggest that HCV core protein plays an important role in the development of various types of liver failure, including steatosis and HCC.

Recent reports suggest that lipid biosynthesis affects HCV replication (7–9). Involvement of a geranylgeranylated host protein, FBL2, in HCV replication through the interaction with NS5A suggests that the cholesterol biosynthesis pathway is also important for HCV replication (9). Increases in saturated and monounsaturated fatty acids enhance HCV RNA replication, whereas increases in polyunsaturated fatty acids suppress it (7). Lipid homeostasis is regulated by a family of steroid regulatory element-binding proteins (SREBPs), which activate the expression of >30 genes involved in

the synthesis and uptake of cholesterol, fatty acids, triglycerides, and phospholipids. Biosynthesis of cholesterol is regulated by SREBP-2, whereas that of fatty acids, triglycerides, and phospholipids is regulated by SREBP-1c (10–14). In chimpanzees, host genes involved in SREBP signaling are induced during the early stages of HCV infection (8). SREBP-1c regulates the transcription of acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, and stearoyl-CoA desaturase, leading to the production of saturated and monounsaturated fatty acids and triglycerides (15). SREBP-1c is transcriptionally regulated by liver X receptor (LXR) α and retinoid X receptor (RXR) α , which belong to a family of nuclear hormone receptors (15, 16). Accumulation of cellular fatty acids by HCV core protein is expected to be modulated by the SREBP-1c pathway because RXR α is activated by HCV core protein (17). However, it remains unknown whether HCV core protein regulates the *srebp-1c* promoter.

We previously reported (18) that HCV core protein specifically binds to the proteasome activator PA28 γ /REG γ in the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. PA28 γ is well conserved from invertebrates to vertebrates, and amino acid sequences of human and murine PA28 γ s are identical (19). The homologous proteins, PA28 α and PA28 β , form a heteroheptamer in the cytoplasm, and they activate chymotrypsin-like peptidase activity of the 20S proteasome, whereas PA28 γ forms a homoheptamer in the nucleus, and it enhances trypsin-like peptidase activity of 20S proteasome (20). Recently, Li and colleagues (21) reported that PA28 γ binds to steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) and enhances the degradation of SRC-3 in a ubiquitin- and ATP-independent manner. However, the precise physiological functions of PA28 γ are largely unknown *in vivo*. In this work, we examine whether PA28 γ is required for liver pathology induced by HCV core protein *in vivo*.

Results

PA28 γ -Knockout HCV Core Gene Transgenic Mice. To determine the role of PA28 γ in HCV core-induced steatosis and the development of HCC *in vivo*, we prepared PA28 γ -knockout core gene transgenic mice. The PA28 γ -deficient, PA28 γ ^{-/-} mice were born without

Author contributions: K. Moriishi, K.T., T.M., T.S., K.K., and Y. Matsuura designed research; K. Moriishi, R.M., K. Moriya, H.M., Y. Mori, and T.A. performed research; S.M. contributed new reagents/analytic tools; Y. Matsuura analyzed data; and K. Moriishi, K.K., and Y. Matsuura wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: CoreTg, HCV core gene-transgenic; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; LXR, liver X receptor; LXRE, liver X receptor-response element; MEF, mouse embryonic fibroblast; ROS, reactive oxygen species; RXR, retinoid X receptor; SRC-3, steroid receptor coactivator-3; SREBP, steroid regulatory element-binding protein.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: matsuura@biken.osaka-u.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0607312104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

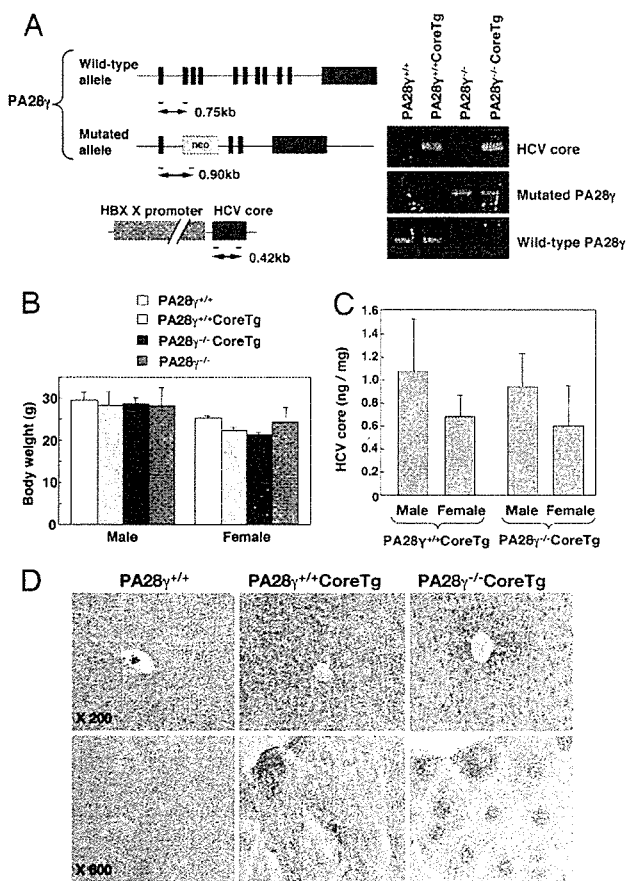


Fig. 1. Preparation and characterization of PA28 γ -knockout HCV core-transgenic mice. (A) The structures of the wild-type and mutated PA28 γ genes and the transgene encoding the HCV core protein under the control of the HBV X promoter were investigated. Positions corresponding to the screening primers and sizes of PCR products are shown. PCR products of the HCV core gene as well as wild-type and mutated PA28 γ alleles were amplified from the genomic DNAs of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice. (B) Body weights of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice at the age of 6 months. (C) HCV core protein levels in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were determined by ELISA (mean \pm SD, $n = 10$). (D) Localization of HCV core protein in the liver. Liver sections of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at the age of 2 months were stained with anti-HCV core antibody.

appreciable abnormalities in all tissues examined, with the exception of a slight retardation of growth (22). HCV core gene-transgenic (PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg) mice were bred with PA28 $\gamma^{-/-}$ mice to create PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice. The PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg offspring were bred with each other, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were selected by PCR using primers specific to the target sequences (Fig. 1A). No significant differences in body weight were observed among the 6-month-old mice, although PA28 $\gamma^{-/-}$ mice exhibited a slight retardation of growth (Fig. 1B). A similar level of PA28 γ expression was detected in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{+/+}$ mice (see Fig. 5B). The expression levels and molecular size of HCV core protein were similar in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1C; see also Fig. 5B).

PA28 γ Is Required for Degradation of HCV Core Protein in the Nucleus and Induction of Liver Steatosis. HCV core protein has been detected at various sites, such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid droplets, and nucleus of cultured cell lines, as well as in hepatocytes of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice and hepatitis C patients

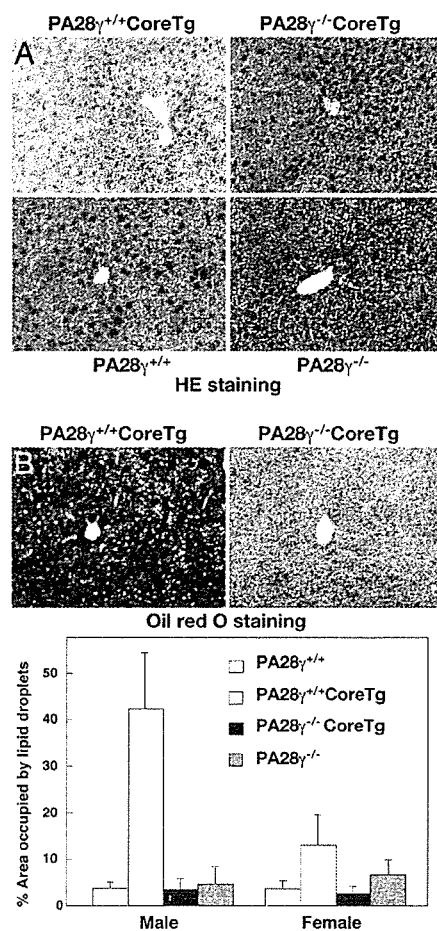


Fig. 2. Accumulation of lipid droplets by expression of HCV core protein. (A) Liver sections of the mice at the age of 6 months were stained with hematoxylin/eosin (HE). (B) (Upper) Liver sections of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at the age of 6 months were stained with oil red O. (Lower) The area occupied by lipid droplets of PA28 $\gamma^{+/+}$ (white), PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg (gray), PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg (black), and PA28 $\gamma^{-/-}$ (dark gray) mice was calculated by Image-Pro software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) (mean \pm SD, $n = 10$).

(6, 23, 24). Although HCV core protein is predominantly detected in the cytoplasm of the liver cells of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice, as reported in ref. 6, in the present study a clear accumulation of HCV core protein was observed in the liver cell nuclei of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1D). These findings clearly indicate that at least some fraction of the HCV core protein is translocated into the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. Mild vacuolation was observed in the cytoplasm of the liver cells of 4-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice, and it became more severe at 6 months, as reported in ref. 25. Hematoxylin/eosin-stained liver sections of 6-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice exhibited severe vacuolating lesions (Fig. 2A), which were clearly stained with oil red O (Fig. 2B Upper), whereas no such lesions were detected in the livers of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{+/+}$, or PA28 $\gamma^{-/-}$ mice at the same age. The areas occupied by the lipid droplets in the PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mouse livers were ≈ 10 and 2–4 times larger than those of male and female of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice, respectively (Fig. 2B Lower). These results suggest that PA28 γ is required for the induction of liver steatosis by HCV core protein in mice.

PA28 γ Is Required for the Up-Regulation of SREBP-1c Transcription by HCV Core Protein in the Mouse Liver. To clarify the effects of a knockout of the PA28 γ gene in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice on lipid

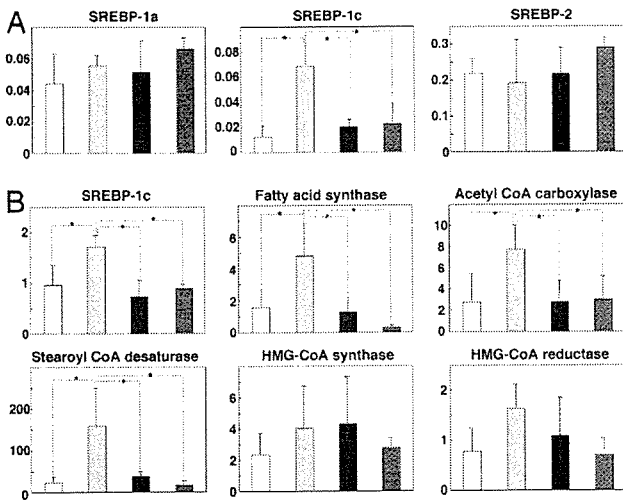


Fig. 3. Transcription of genes regulating lipid biosynthesis in the mouse liver. (A) Total RNA was prepared from the livers of 2-month-old mice; and the transcription of genes encoding SREBP-1a, SREBP-1c, and SREBP-2 was determined by real-time PCR. (B) The transcription of genes encoding SREBP-1c, fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, stearyl-CoA desaturase, HMG-CoA synthase, and HMG-CoA reductase of 6-month-old mice was measured by real-time PCR. The transcription of the genes was normalized with that of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, and the values are expressed as relative activity ($n = 5$; $*$, $P < 0.05$; $**$, $P < 0.01$). The transcription of each gene in PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice is indicated by white, gray, black, and dark gray bars, respectively.

metabolism, genes related to the lipid biosyntheses were examined by real-time quantitative PCR. Transcription of SREBP-1c was higher in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice than in those of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice at 2 months of age, but no such increases in SREBP-2 and SREBP-1a were observed (Fig. 3A). Although transcription of SREBP-1c and its regulating enzymes, such as acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, and stearyl-CoA desaturase, was also enhanced in the livers of 6-month-old PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice compared with the levels in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$, PA28 $\gamma^{-/-}$, and PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice, no statistically significant differences were observed with respect to the transcription levels of cholesterol biosynthesis-related genes that are regulated by SREBP-2 (e.g., HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase) (Fig. 3B). These results suggest the

following: (i) the up-regulation of SREBP-1c transcription in the livers of mice requires both HCV core protein and PA28 γ ; and (ii) the nuclear accumulation of HCV core protein alone, which occurs because of the lack of degradation along a PA28 γ -dependent proteasome pathway, does not activate the *srebp-1c* promoter.

HCV Core Protein Indirectly Potentiates *srebp-1c* Promoter Activity in an LXR α /RXR α -Dependent Manner. LXR α , which is primarily expressed in the liver, forms a complex with RXR α and synergistically potentiates *srebp-1c* promoter activity (16). Activation of RXR α by HCV core protein suggests that cellular fatty acid synthesis is modulated by the SREBP-1c pathway, although HCV core protein was not included in the transcription factor complex in the electrophoresis mobility shift assay (EMSA) (17). To analyze the effect of HCV core protein and PA28 γ on the activation of the *srebp-1c* promoter, we first examined the effect of HCV core protein on the binding of the LXR α /RXR α complex to the LXR-response element (LXRE) located upstream of the SREBP-1c gene (Fig. 4A). Although a weak shift of the labeled LXRE probe was observed by incubation with nuclear extracts prepared from 293T cells expressing FLAG-tagged LXR α and HA-tagged RXR α , a clear shift was obtained by treatment of cells with 9-*cis*-retinoic acid and 22(*R*)-hydroxycholesterol, ligands for LXR α and RXR α , respectively. In contrast, coexpression of HCV core protein with LXR α and RXR α potentiated the shift of the probe irrespective of the treatment with the ligands. Addition of 500 times the amount of nonlabeled LXRE probe (competitor) diminished the shift of the labeled probe induced by the ligands and/or HCV core protein. Furthermore, coincubation of the nuclear fraction with antibody to FLAG or HA tag but not with antibody to either HCV core or PA28 γ caused a supershift of the labeled probe. These results indicate that HCV core protein does not participate in the LXR α /RXR α -LXRE complex but indirectly enhances the binding of LXR α /RXR α to the LXRE.

The activity of the *srebp-1c* promoter was enhanced by the expression of HCV core protein in 293T cells, and it was further enhanced by coexpression of LXR α /RXR α (Fig. 4B). Enhancement of the *srebp-1c* promoter by coexpression of HCV core protein and LXR α /RXR α was further potentiated by treatment with the ligands for LXR α and RXR α . The cells treated with 9-*cis*-retinoic acid exhibited more potent enhancement of the *srebp-1c* promoter than those treated with 22(*R*)-hydroxycholesterol. HCV core protein exhibited more potent enhancement of the *srebp-1c* promoter in cells treated with both ligands than in those treated with either ligand alone. These results suggest that HCV core protein poten-

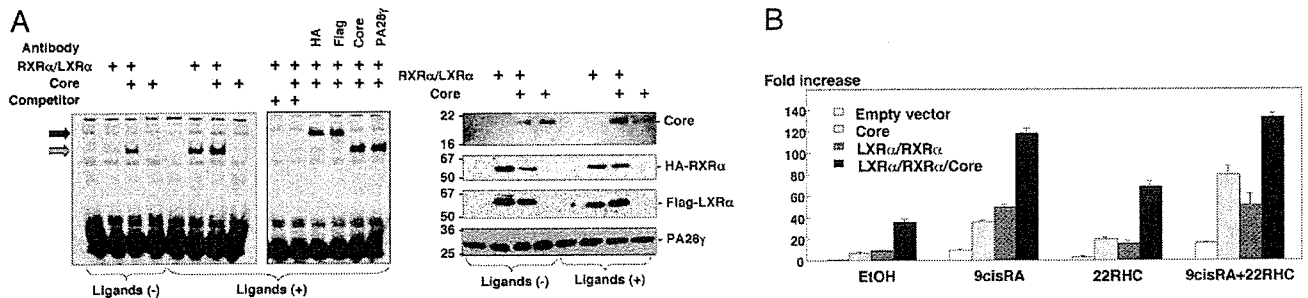


Fig. 4. Activation of the *srebp-1c* promoter by HCV core protein. (A) FLAG-LXR α and HA-RXR α were expressed in 293T cells together with or without HCV core protein. Ligands for LXR α and RXR α dissolved in ethanol [Ligands (+)] or ethanol alone [Ligands (-)] were added to the culture supernatant at 24 h posttransfection. Cells were harvested at 48 h posttransfection, and nuclear extracts were mixed with the reaction buffer for EMSA in the presence or absence of antibody (100 ng) against HA, FLAG, HCV core, or nonlabeled LXRE probe (Competitor). (Left) The resulting mixtures were subjected to PAGE and blotted with horseradish peroxidase/streptavidin. The mobility shift of the LXRE probe and its supershift are indicated by a gray and black arrow, respectively. (Right) Expression of HCV core, HA-RXR α , FLAG-LXR α , and PA28 γ in cells was detected by immunoblotting. (B) Effects of ligands for RXR α , 9-*cis*-retinoic acid (9cisRA), and for LXR α , 22(*R*)-hydroxycholesterol (22RHC), on the activation of the *srebp-1c* promoter in 293T cells expressing RXR α , LXR α , and/or HCV core protein. Ligands were added into the medium at 24 h posttransfection at a concentration of 5 μ M, and the cells were harvested after 24 h of incubation.

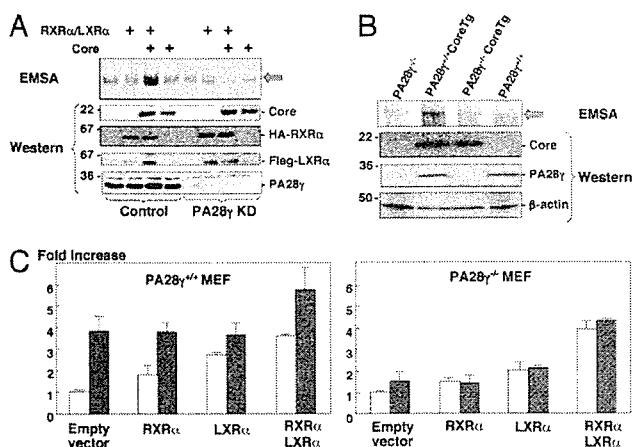


Fig. 5. PA28 γ is required for HCV core-dependent activation of the *srebp-1c* promoter. (A) Effect of PA28 γ knockdown on the LXR α /RXR α -DNA complex. FLAG-LXR α and HA-RXR α were expressed in FLC4 (control) or PA28 γ -knockdown (PA28 γ KD) cells together with or without HCV core protein. Cells were harvested at 48 h posttransfection, and nuclear extracts were mixed with the reaction buffer for EMSA. (Upper) The resulting mixtures were subjected to PAGE and blotted with horseradish peroxidase-streptavidin. The mobility shift of the LXRE probe is indicated by an arrow. (Lower) Expression of HCV core, HA-RXR α , FLAG-LXR α , and PA28 γ in cells was detected by immunoblotting. (B) Effect of PA28 γ knockout on the LXR α /RXR α -DNA complex in the mouse liver. (Upper) Nuclear extracts were prepared from the livers of 2-month-old PA28 $\gamma^{-/-}$, PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg, PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg, and PA28 $\gamma^{+/+}$ mice and subjected to EMSA. The mobility shift of the LXRE probe is indicated by an arrow. (Lower) The expression of HCV core, PA28 γ , and β -actin in the livers of the mice was detected by immunoblotting. (C) Effect of HCV core protein on *srebp-1c* promoter activity in PA28 γ -knockout fibroblasts. A plasmid encoding firefly luciferase under the control of the *srebp-1c* promoter was transfected into MEFs prepared from PA28 $\gamma^{+/+}$ (Left) or PA28 $\gamma^{-/-}$ (Right) mice together with a plasmid encoding a *Renilla* luciferase. An empty plasmid or plasmids encoding mouse RXR α or LXR α were also cotransfected into the cells together with (gray bars) or without (white bars) a plasmid encoding HCV core protein. Luciferase activity under the control of the *srebp-1c* promoter was determined, and it is expressed as the fold increase in relative luciferase activity after standardization with the activity of *Renilla* luciferase.

tiates *srebp-1c* promoter activity in an LXR α /RXR α -dependent manner.

HCV Core Protein Activates the *srebp-1c* Promoter in an LXR α /RXR α - and PA28 γ -Dependent Manner. To examine whether PA28 γ is required for HCV core-induced enhancement of *srebp-1c* promoter activity in human liver cells, a PA28 γ -knockdown human hepatoma cell line (FLC4 KD) was prepared. Enhancement of binding of the LXRE probe to LXR α /RXR α by coexpression of HCV core protein and LXR α /RXR α in FLC4 cells was diminished by knockdown of the PA28 γ gene (Fig. 5A). Furthermore, formation of the LXR α /RXR α -LXRE complex was enhanced in the livers of PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice but not in those of PA28 $\gamma^{-/-}$, PA28 $\gamma^{+/+}$, or PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 5B). The expression of the HCV core protein in the mouse embryonic fibroblasts (MEFs) of PA28 $\gamma^{+/+}$ mice induced the activation of the mouse *srebp-1c* promoter through the endogenous expression of LXR α and RXR α (Fig. 5C Left). Further enhancement of the activation of the *srebp-1c* promoter by HCV core protein in PA28 $\gamma^{+/+}$ MEFs was achieved by the exogenous expression of both LXR α and RXR α . However, no enhancing effect of HCV core protein on *srebp-1c* promoter activity was observed in PA28 $\gamma^{-/-}$ MEFs (Fig. 5C Right). These results support the notion that HCV core protein enhances the activity of the *srebp-1c* promoter in an LXR α /RXR α - and PA28 γ -dependent manner.

Table 1. HCC in mice at 16–18 months of age

Mouse and sex	Total no. of mice	No. of mice developing HCC	Incidence, %
PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg			
Male	17	5	29.4
Female	28	3	10.7
PA28 $\gamma^{+/-}$			
Male	16	0	0
Female	4	0	0
PA28 $\gamma^{-/-}$			
Male	23	0	0
Female	13	0	0
PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg			
Male	15	0	0
Female	21	0	0

PA28 γ Plays a Crucial Role in the Development of HCC in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg Mice. The incidence of hepatic tumors in male PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice older than 16 months was significantly higher than that in age-matched female PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice (6). We reconfirmed here that the incidence of HCC in male and female PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice at 16–18 months of age was 29.4% (5 of 17 mice) and 10.7% (3 of 28 mice), respectively. To our surprise, however, no HCC developed in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (males, 15; females, 21), although, as expected, no HCC was observed in PA28 $\gamma^{+/-}$ (males, 16; females, 4) and PA28 $\gamma^{-/-}$ mice (males, 23; females, 13) (Table 1). These results clearly indicate that PA28 γ plays an indispensable role in the development of HCC induced by HCV core protein.

Discussion

HCV core protein is detected in the cytoplasm and partially in the nucleus and mitochondria of culture cells and hepatocytes of transgenic mice and hepatitis C patients (6, 23, 24, 26). Degradation of HCV core protein was enhanced by deletion of the C-terminal transmembrane region through a ubiquitin/proteasome-dependent pathway (27). We previously reported (18) that PA28 γ binds directly to HCV core protein and then enhances degradation of HCV core protein in the nucleus through a proteasome-dependent pathway because HCV core protein was accumulated in nucleus of human cell line by treatment with proteasome inhibitor MG132. In this work, accumulation of HCV core protein was observed in nucleus of hepatocytes of PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Fig. 1D). This result directly demonstrates that HCV core protein migrates into the nucleus and is degraded through a PA28 γ -dependent pathway. However, HCV core protein accumulated in the nucleus because knockout of PA28 γ gene abrogated the ability to cause liver pathology, suggesting that interaction of HCV core protein with PA28 γ in the nucleus is prerequisite for the liver pathology induced by HCV core protein. We have previously shown (18) that HCV core protein is degraded through a PA28 γ -dependent pathway, and Minami *et al.* (28) reported that PA28 γ has a cochaperone activity with Hsp90. Therefore, degradation products of HCV core protein by means of PA28 γ -dependent processing or correct folding of HCV core protein through cochaperone activity of PA28 γ might be involved in the development of liver pathology. We do not know the reason why knockout of the PA28 γ gene does not affect the total amount of HCV core protein in the liver of the transgenic mice. PA28 γ -dependent degradation of HCV core protein may be independent of ubiquitination, as shown in SRC-3 (21), whereas knockdown of PA28 γ in a human hepatoma cell line enhanced the ubiquitination of HCV core protein [supporting information (S1) Fig. 6], suggesting that lack of PA28 γ suppresses a ubiquitin-independent degradation but enhances a ubiquitin-dependent degradation of HCV core protein. Therefore, the total amount of HCV

core protein in the liver of the mice may be unaffected by the knockout of the PA28 γ gene.

Our results suggest that the interaction of HCV core protein with PA28 γ leads to the activation of the *srebp-1c* promoter along an LXR α /RXR α -dependent pathway and the development of liver steatosis and HCC. HCV core protein was not included in the LXR α /RXR α -LXRE complex (Fig. 3A), suggesting that HCV core protein indirectly activates the *srebp-1c* promoter. Cytoplasmic HCV core protein was shown to interact with Sp110b, which is a transcriptional corepressor of RAR α -dependent transcription, and this interaction leads to the sequestering of Sp110b in the cytoplasm, resulting in the activation of RAR α -dependent transcription (29). The sequestration of an unidentified corepressor of the LXR α /RXR α heterodimer in the cytoplasm by HCV core protein may also contribute to the activation of the *srebp-1c* promoter. Although the precise physiological function of PA28 γ -proteasome activity in the nucleus is not known, PA28 γ has previously been shown (21) to regulate nuclear hormone receptors by means of the degradation of its coactivator SRC-3 and to participate in the fully Hsp90-dependent protein refolding (28). It appears reasonable to speculate that degradation or refolding of HCV core protein in a PA28 γ -dependent pathway might be involved in the modulation of transcriptional regulators of various promoters, including the *srebp-1c* promoter. Saturated or monounsaturated fatty acids have been shown to enhance HCV RNA replication in Huh7 cells containing the full-length HCV replicon (7). The up-regulation of fatty acid biosynthesis by HCV core protein may also contribute to the efficient replication of HCV and to the progression of HCV pathogenesis.

Expression of HCV core protein was reported to enhance production of reactive oxygen species (ROS) (30), which leads to carbonylation of intracellular proteins (31). Enhancement of ROS production may trigger double-stranded DNA breaks and result in the development of HCC (30, 32, 33). HCV core protein could enhance the protein carbonylation in the liver of the transgenic mice in the presence but not in the absence of PA28 γ (SI Fig. 7), suggesting that PA28 γ is required for ROS production induced by HCV core protein. Development of HCC was observed in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice but not in PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice (Table 1). Enhancement of ROS production by HCV core protein in the presence of PA28 γ might be involved in the development of HCC in PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice.

It is well known that resistant viruses readily emerge during the treatment with antiviral drugs targeting the viral protease or replicase, especially in the case of infection with RNA viruses. Therefore, antivirals targeting the host factors that are indispensable for the propagation of viruses might be an ideal target for the development of antiviral agents because of a lower rate of mutation than that of viral genome, if they have no side effects to patients. Importantly, the amino acid sequence of PA28 γ of mice is identical to that of human, and mouse PA28 γ is dispensable because PA28 γ knockout mice exhibit no abnormal phenotype except for mild growth retardation. Therefore, PA28 γ might be a promising target for an antiviral treatment of chronic hepatitis C with negligible side effects.

In summary, we observed that a knockout of the PA28 γ gene from PA28 $\gamma^{+/+}$ CoreTg mice induced the accumulation of HCV core protein in the nucleus and disrupted the development of both steatosis and HCC. Activation of the *srebp-1c* promoter was up-regulated by HCV core protein both *in vitro* and *in vivo* through a PA28 γ -dependent pathway, suggesting that PA28 γ plays a crucial role in the development of liver pathology induced by HCV infection.

Materials and Methods

Histology and immunohistochemistry, real-time PCR, and detection of proteins modified by ROS are discussed in *SI Materials and Methods*.

Plasmids and Reagents. Human PA28 γ cDNA was isolated from a human fetal brain library (18). The gene encoding HCV core protein was amplified from HCV strain J1 (genotype 1b) (34) and cloned into pCAG-GS (35). Mouse cDNAs of RXR α and LXR α were amplified by PCR from the total cDNAs of the mouse liver. The RXR α and LXR α genes were introduced into pEF-FLAGspGBK (36) and pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectively. The targeting fragment for human PA28 γ knockdown (GGATCCGGTGGATCAGGAAGTGAAGTTCAAGAGACTTCACTTCCTGATCCACCTTTTTTGGAAAAGCTT) was introduced into the BamHI and HindIII sites of pSilencer 4.1 U6 hygro vector (Ambion, Austin, TX). Mouse anti-FLAG (M2) and mouse anti- β -actin antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Rabbit polyclonal antibody against synthetic peptides corresponding to amino acids 70–85 of PA28 γ was obtained from AFFINITI (Exeter, U.K.). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit IgGs were purchased from ICN Pharmaceuticals (Aurora, OH). Rabbit anti-HCV core protein was prepared by immunization with recombinant HCV core protein (amino acids 1–71), as described in ref. 24. Mouse monoclonal antibody to HCV core protein was kindly provided by S. Yagi (37). The plasmid for expression of HA-tagged ubiquitin was described in ref. 27.

Preparation of PA28 γ -Knockout HCV CoreTg Mice. The generation of C57BL/6 mice carrying the gene encoding HCV core protein genotype 1b line C49 and that of PA28 $\gamma^{-/-}$ mice have been reported previously (22, 25). Both strains were crossbred with each other to create PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice. PA28 $\gamma^{-/-}$ CoreTg mice were identified by PCR targeted at the PA28 γ or HCV core gene (22, 25). Using 1 μ g of genomic DNA obtained from the mouse tail, the PA28 γ gene was amplified by PCR with the following primers: sense, PA28-3 (AGGTGGATCAGGAAGTGAAGCTCAA); and antisense, PA28 γ -5cr (CACCTCACTGTGATCCGCTCTCT-GAAAGAATCAACC). The targeted sequence for the PA28 γ -knockout mouse was detected by PCR using the PA28-3 primer and the PAKO-4 primer (TGCAGTTCATTCAGGGCACCAGGACAG). The transgene encoding HCV core protein was detected by PCR as described in ref. 25. The expression of PA28 γ and HCV core protein in the livers of 6-month-old mice was confirmed by Western blotting with mouse monoclonal antibody to HCV core protein, clone 11-10, and rabbit antibody to PA28 γ . Mice were cared for according to the institutional guidelines. The mice were given ordinary feed, CRF-1 (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan), and they were maintained under specific pathogen-free conditions.

All animal experiments conformed to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and they were approved by the Institutional Committee of Laboratory Animal Experimentation (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University).

Preparation of Mouse Embryonic Fibroblasts. MEFs were prepared as described in ref. 22. MEFs were cultured at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, and nonessential amino acids.

Transfection and Immunoblotting. Plasmid vectors were transfected into the MEFs and 293T cells by liposome-mediated transfection by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The amount of HCV core protein in the liver tissues was determined by an ELISA as described in ref. 37. The cell lysates were subjected to SDS/PAGE (12.5% gel), and they were then transferred onto PVDF membranes. Proteins on the membranes were treated with specific antibody and Super Signal Femto (Pierce, Rockford, IL). The results were then visualized by using an LAS3000 imaging system (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). The method of immunoprecipitation test is described in ref. 18.