

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号			
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤	16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司	21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹	30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人	40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀	100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆	126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司	144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎	154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫	168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆	181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓	196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳	208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎	221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治	235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造	247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光	262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘	286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗	300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝	310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一	318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱 脇 祥 子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 …… 576

ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の 開発

所属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 鈴木 哲朗

研究要旨 HCV 3'UTR SL2 領域と選択的に結合するペプチド3種類が同定され、そのうちの1種類に細胞内でHCV RNA複製を抑制する可能性が示された。ライブラリー探索から、さらに高いRNA結合活性を示す「進化型」SL2結合ペプチドを同定した。

分担研究者

(株) 進化創薬・東京学芸大学
原田 和雄

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。C型肝炎は我が国の国民病とも言われ、現在、HCVキャリアは約200万人とされる。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝癌での年間死亡者は3万人を超える。インターフェロン、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は40-50%程度であり、半数以上のC型肝炎患者は、肝癌発症のリスクを避けられない。既存の治療薬とは異なる作用機序を有し、より有効かつ副作用の少ない抗HCV薬が開発されることにより、慢性C型肝炎を制圧し、肝硬変、肝細胞癌の発生を防ぐことが可能となる。高齢化社会をむかえ、より質の高い生活が求められる現在、その社会的要請は極めて高い。HCVは一本鎖RNAウイルスであり、約3000アミノ酸をコードする読み取り枠の両末端側に非翻訳領域(5'UTRと3'UTR)を有する。感染細胞では、5'UTR内に存在するInternal Ribosome Entry Site(IRES)から翻訳が開始される。また、生成されたウイルス蛋白の持つRNA依存的RNAポリメラーゼ活性によって3'UTRから相補鎖RNAが合成される。すなわち、HCVの生活環において、ウイルスゲノムRNAの5'UTRと3'UTRは非常に重要な役割を果たしている。

本研究では、HCVの複製に必須なウイルスRNA領域に対する、選択性の高い結合ペプチドを創製し、C型肝炎治療薬としての開発を目指す。

B. 研究方法

RNA結合ペプチド発現ベクターの作製

KANシステムによるスクリーニングから見出されたHCV RNA結合ペプチドのN末端にHAエピトープタグ配列を付加した融合ペプチドをコードするDNAを合成し、pCAGmcsベクターのKpnI、BglII部位へ挿入した(pCAGHA#5)。陰性コントロールとして、上記RNA結合ペプチドとアミノ酸組成を変えずに配列を入れ替えたペプチドを発現するベクターを作製した(pCAGHA#5mut)。

HCV RNA結合ペプチドの抗HCV活性の評価

RNA結合ペプチドのHCV RNA複製阻害活性は、HCVサブジェノミックレプリコンを保持するヒト肝がん細胞Huh-7由来細胞株(遺伝子型1b: Con1株)にペプチドを種々の濃度で添加し2または4日間培養した後、細胞内HCV RNAをリアルタイムRT-PCR法で測定することによって評価した。

HCV粒子産生に対する効果は、感染性HCVを恒常的に産生する細胞株(Huh751JFH1Zeo)を用いて行い、ペプチド添加培養後、細胞内のHCV RNAをリアルタイムRT-PCR法で、また培養上清中のコア蛋白量をELISA法でそれぞれ定量した。

HCV SL2 RNA結合ペプチドのスクリーニング

本研究グループが独自に開発したRNA結合ペプチド検出系KAN(Kanamycin antitermination)システムを用いてHCV RNA結合スクリーニングを行った。

SL2 結合ペプチド配列の中の 17 残基をそれぞれ 20 種類のアミノ酸により 25%の割合でドーピングしたライブラリーDNA を作製し、ペプチド-N 融合タンパク質発現プラスミド (pBR プラスミド) に導入した。この pBR プラスミドを標的 RNA を含む pAC(LacZ) レポーター・プラスミド細胞に導入し、b-ガラクトシダーゼ活性の高いクローンを選択した。まず、一次スクリーニングとして、 3.5×10^5 クローンの中から活性の高い 7085 クローンを選択した。次に、これらのクローンの中からレポーター・プラスミド由来の擬似陽性クローンを除くため、ライブラリー発現プラスミドを単離し、新しいレポーター細胞に導入した (二次スクリーニング)。これらのクローンの中から最も高い活性を示した 42 クローンを選択し、配列を決定した。このように単離したクローンの特異性については、HIV RRE レポーター細胞をネガティブ・コントロールとして用いることにより解析した。

ペプチド-RNA 結合の解析

試験管内でのペプチドと標的 RNA との結合能を種々の方法で解析した。ゲルシフト・アッセイは、転写の際に放射性により標識した RNA に対して、種々の濃度でペプチドを混合し、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により解析した。蛍光偏光測定法 (Beacon システムを用いた) は、ローダミン・グリーン標識したペプチドに種々の濃度の標的 RNA を混合することにより行った。また、表面プラズモン法は、ビオチン化したペプチドを固定し、標的 RNA を流すことにより行った。

HCV 翻訳活性調節に関与するシスエレメントの解析

1st cistron (Renilla ルシフェラーゼ) と 2nd cistron (Firefly ルシフェラーゼ) 遺伝子の間に HCV cDNA nt 1-914 領域遺伝子を持つ dicistronic レポータープラスミドを構築し、さらにその HCV コア領域 (nt 342-914) を塩基置換した種々の変異体を作製した。各プラスミドを直鎖化した後、試験管内で RNA を合成し、Rabbit reticulocyte lysate を加えて翻訳反応を行った。Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて 2 種類のルシフェラーゼ活性を連続的に定量した。

感染性 HCV 産生細胞系の作製

RNA Pol I promoter/terminator と Zeocin 耐性遺伝子を有するプラスミド pHH21Zeo の BsmBI 部位に、HCV JFH1 株のゲノム cDNA を挿入し pHHJFH1Zeo 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 または Huh7.5.1 へトランス

フェクトし、0.4 mg/mL Zeocin 存在下で約 3 週間培養し薬剤耐性クローンを分離した。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。HCV 発現細胞の培養上清中に含まれるウイルスの感染性アッセイには、培養上清を Huh7.5.1 細胞に感染させ、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

HCV RNA 結合ペプチドの抗 HCV 活性の評価

HCV IRES 結合ペプチドのうち 1 種類に試験管内 IRES 活性に対する阻害効果が観察された (昨年度報告)。このペプチドを HCV レプリコン細胞へ添加し HCV RNA の複製へ及ぼす影響を検討したが抑制効果は認められなかった。

次に、3'UTR 内の stem-loop (SL) 2 に対する結合をアルギニンリッチペプチドコンビナトリアルライブラリーから探索し、陽性を示すペプチド 9 配列を検出した。これらの候補配列について HIV RRE RNA をネガティブ・コントロールとした特異性試験を行ったところ、5 配列は HIV RRE RNA に対しても活性を示し、1 配列はいずれにおいても活性を示さなかったが、残りの 3 配列は SL2 選択的に結合活性を示した。また、これら 3 クローンは配列中の特定の位置に共通したアミノ酸残基を有していることから、標的 RNA に特異的に結合する構造的特徴を有することが期待された。そこで、これらのペプチドを発現するプラスミドを作製し、レプリコン細胞へ導入したところ、1 種類のペプチド #5 で HCV RNA 複製阻害効果が認められた。この #5 ペプチドと同様のアミノ酸組成を持ち配列を入れ替えた変異ペプチドではこのような阻害効果は認められなかった。

RNA 結合活性の最適化を目指した HCV SL2 結合ペプチドの再スクリーニング

細胞内 RNA-ポリペプチド相互作用検出系を用いて、SL2 結合ペプチド・ドープ・ライブラリーの中から、SL2 結合ペプチドよりも高い RNA 結合活性を示すペプチドの同定を試みた。その結果、RNA 結合能の指標となる b-ガラクトシダーゼ活性が、SL2 結合ペプチド #5 の場合 (2+) と比較して有意に高いクローン (3+ ~ 4+) が複数同定できた。

HCV 翻訳活性調節に関与するシスエレメントの解析

HCV IRES活性には5'UTR配列に加えてコア遺伝子の5'末端側12~40塩基が重要であるとされているものの、コア遺伝子が翻訳活性に及ぼす影響については報告内容が一貫しておらず、また詳細な解析も進んでいない。HCV翻訳活性調節に必要な新たなRNAエレメントが同定されれば、HCV RNA結合ペプチドスクリーニングの新たな標的配列となりうる。種々のコア遺伝子置換変異体を作製し翻訳活性を比較した結果、コア遺伝子のA rich領域 (nt 16-39) をG/Cに置換することによりHCV翻訳活性は有為に低下することがわかった。この領域より下流側は翻訳活性に影響しないことも示された。

感染性 HCV 産生細胞系の作製

C 型劇症肝炎患者から分離された HCV 遺伝子 JFH-1 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報告された。この実験系を改変し、本研究で見出された HCV RNA 結合ペプチドの抗 HCV 作用の評価系として有用な実験系の開発を試みた。JFH-1 全長 cDNA を RNA ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーター支配下で発現させることにより、プラスミドトランスフェクションによる簡便な感染性ウイルス粒子産生系を樹立した。RNA ポリメラーゼ I プロモーター/ターミネーターは 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。

一過性の発現系に加えて、Zeocin 耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクター pHHJFHZeo を作製し、Huh7 細胞及び Huh7.5.1 細胞へ導入した。Zeocin 耐性細胞クローンを分離し、培養上清中のコア蛋白発現を ELISA 法でスクリーニングすることにより、恒常的に感染性ウイルスを産生する細胞株 HuhJFHZeo 及び H751JFHZeo を樹立した。

D. 考察

HCV RNA 3'UTR SL2領域に対する結合ペプチド 1 種類で、HCV RNA複製を抑制する可能性が示された。しかしながらその抑制効果は20%程度であり必ずしも十分ではない。細胞免疫染色の結果、細胞内で発現するペプチドは主に核内に存在することから、HCV RNAが複製している細胞質でペプチド-HCV RNA複合体が形成される効率は高くないことが推定される。スクリーニング系で得られた候補ペプチドを細胞内でHCV RNA複製、翻訳反応が行われている場に局在化させるためシグナル配列等を導入することで抗HCV活性を高めることができるかもしれない。また、このペプチド配列を基にした新たなペプチドライブラリーを構築し、HCV SL2 RNAとより強く結合するペプチドの探索を進めている。すでに、プロトタイプ (#5ペプチド)に比べHCV RNAとの結合能が有意に高い「進化的型」SL2 結合ペプチドを取得している。これらは、より高い抗HCV効果が期待できるため、細胞質内に安定に局在化できるようキャリア蛋白との融合蛋白で発現するコンストラクトを作製しHCV RNA複製、及びウイルス粒子産生に対する阻害効果を検討する予定である。

5'UTRの3'末端から翻訳開始コドンをはさみコア遺伝子の5'末端領域はstem-loop構造をとることが推測される。HCV翻訳活性調節に関与するシスエレメントの解析から、この領域の配列をデザインしたレポーターはRNA結合ペプチドの探索に有用と考えられた。

E. 結論

1. KAN システムによるライブラリースクリーニングから、HCV RNA複製に重要な 3'UTR SL2 領域と選択的に結合するペプチド 3 種類が同定され、そのうちの 1 種類に細胞内で HCV RNA 複製を抑制する可能性が示された。
2. SL2 結合ペプチド・ドープ・ライブラリーの中から、上記の SL2 結合ペプチドよりも高い RNA 結合活性を示す「進化的型」ペプチドが同定された。
3. HCV 翻訳調節に重要な新規 RNA エレメントとして、コア遺伝子の A rich 領域を同定した。RNA 結合ペプチド探索の新たな標的となりうる。

G. 研究発表 論文発表

1. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* (in press).

2. 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 PM, Miyamura T, and Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1174–1185 (2007).
3. Moriishi K., Suzuki T., Koike K., Matsuura Y., et al. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1661–1666 (2007).
4. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727–1735 (2007).
5. 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 JH, 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).
6. 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: 5015–25 (2006).
7. Baek K-H, Park H-Y, Kang C-M, Kim S-J, Jeong S-J, Hong E-K, Park J-W, Sung Y-C, Suzuki T, Kim C-M, and Lee C-W. Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J. Mol. Biol.* 359: 22–34 (2006).
8. Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381–392 (2006).
9. Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, and Nishijima M. Proteomic Profiling of Lipid Droplet Proteins in Hepatoma Cell Lines Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Biochem.* 139: 921–930 (2006).
10. Fukasawa M, Tanaka Y, Sato S, Ono Y, Nitahara-Kasahara Y, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, and Nishijima M. Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1958–61 (2006).
11. Suzuki T, and Suzuki R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. In: *Molecular Biology of the Flavivirus*. Horizon bioscience U.K. pp. 295–312 (2006).
12. Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, and Suzuki T. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J.* 397: 345–353 (2006).
13. 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 III domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434–445 (2006).
14. Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, and Braet F. Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J. Gastroenterol.* 12: 1881–1888 (2006).
15. X. Li, S. Horiya, and K. Harada (2006) An efficient thermally induced RNA conformational switch as a framework for the functionalization of RNA nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**: 4035 – 4040.
16. Yano, M. Kunimoto, T. Minami, and K. Harada (2006) Identification of antisense

stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**: 77-78 (2006).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2006-169681・鈴木敏和、原田和雄、鈴木信夫、喜多和子・不活性化遺伝子再活性化ペプチド・平成18年6月20日

特願2006-210030・鈴木敏和、原田和雄、鈴木信夫、喜多和子・RNA結合ペプチド・平成18年8月1日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社