

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端 健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田 智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道 一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤 晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本 亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺 公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上 浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田 直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島 伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上 恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究

所属 国立感染症研究所・ウイルス第二部
研究者 村上 恭子

研究要旨 申請者が樹立した三次元培養 HCV 粒子産生系は培養形態をかえることで粒子産生の on/off 制御が可能である。そこで、細胞内蛋白発現の変化をプロテオーム解析により比較し、HCV 粒子産生に関与する宿主因子の候補として発現に差のある蛋白 10 個を MS 解析にて同定した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染者は現在我が国に200万人以上と推定される。感染後は持続感染により肝炎が慢性化し、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を合併することが知られており、公衆衛生上きわめて重要な病原ウイルスである。主たる治療法はインターフェロン(IFN)およびリパズリン投与であるが、日本人におおひ genotype1a,1b 型はウイルス排除率がひくく、著効率は30-40%である。また重篤な副作用による治療中断となる例も多数存在している。現在、ウイルス酵素阻害剤やヌクレオチドアナログによる HCV-RNA 複製過程を標的とした薬剤が開発されているが、HCV は変異しやすいウイルスであり、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。従来抗 HCV 薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発は厚生労働行政上の急務である。

一方、HCV はその塩基配列情報をもとにリバーシブルなジェネティクスを駆使して多くの知見が得られているが、ウイルス粒子形成及び放出過程の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。近年、劇症肝炎患者より分離した HCV(JFH1 株, genotype2a)が培養細胞において高効率に HCV 粒子を産生することが報告され (Wakita et.al,2005;Nature Medicine) ウイルス粒子形成及び放出過程を解析できるようになった。一方、我々は細胞の三次元化により HCV(Con1 株, genotype1b)が産生される実験系の確立に成功した (Virology;351(2);381-92.2006, 特許出願 2005-54835)。この系は細胞の培養形態をかえるこ

とで HCV 粒子産生の on/off 制御が可能な系である。この特徴を利用して、本研究では HCV 粒子産生 on/off 状態での細胞内蛋白の変化をプロテオーム解析により検討し、粒子産生に関与する宿主因子の同定を試みた。

B. 研究方法

a. 三次元培養の条件検討

ヒト肝癌(hepatocellular carcinoma)由来細胞株 Huh7 細胞を平皿培養もしくは温度感受性ゲル(Thearmoreversible Gelation Polymer:TGP)により三次元培養した。培養後3,5,7日目に細胞と培養上清を回収した。回収した細胞は細胞数をカウントした。また、培養上清中のヒト型アルブミンを ELISA 法にて測定した。

b. 細胞の三次元化にともなう各種遺伝子発現の変化の解析

ヒト肝癌(hepatocellular carcinoma)由来細胞株 Huh7 細胞を平皿培養もしくは温度感受性ゲルにより三次元培養した。培養開始後、day3 もしくは day7 で細胞を回収し、蛋白を抽出した。蛍光標識ディファレンシャル二次元電気泳動法を用いて、発現量に差のあるタンパクのプロファイリングを行った。発現に1.5倍以上の差がみられた spot に関してはゲルから切り出し、プロテアーゼで消化後、ペプチドを抽出し、質量分析法により同定した。

c. 粒子産生評価系の検討

高効率 HCV 粒子産生系である JFH1 感染 Huh7 細胞の宿主遺伝子をノックダウンすることにより粒子産生量の変化を検討する系を確立するため以下の実験を行った。本実験では当研究室にて同定した HCV 構造蛋白の分解に関与する宿主因子 E6AP を用いて検討を行った。

Naive な Huh7 細胞に HCV-JFH1 を含む培地を加え、3 時間 37℃にて incubate した後、siRNA を導入した。48 時間後に培養上清を回収した。この培養上清中の debris を 8000g, 50min の遠心操作により除去し、希釈した。10⁴cells/well の濃度で naive な Huh7 細胞を前日に巻き戻しておいた 96well plate に希釈した培養上清を加え、96 時間培養後、細胞を固定した。HCV コア蛋白に対する抗体で免疫染色を行い、感染性ウイルス粒子量の測定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の組み換え DNA 実験は申請者の研究組織における研究委員会で承認されている。

C. 研究結果

a. 三次元培養の条件検討

プロテーム解析を行う際、培養後何日目の細胞で比較すべきかを検討するために細胞増殖および三次元化の指標としてアルブミンの分泌について検討した。

まず、細胞の増殖について検討した。結果を図 1 にしめす。平皿培養細胞にくらべ、TGP 培養細胞では対数増殖期にあたる day5 から day7 での Doubling time が二倍程度長く増殖が遅くなっていることが示唆された。

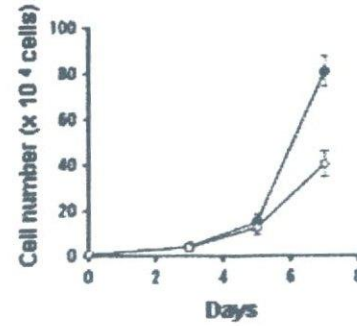


図 1. 平皿培養および三次元培養での細胞増殖

Huh7 細胞の培養形態による細胞増殖の違いを示す。(●; 平皿培養、○; 三次元培養)

次に肝細胞の分泌蛋白であり三次元培養により分泌が増加することが報告されているアルブミンについて、day3, day7 の培養上清中の濃度を検討した。その結果を図 2 に示す。

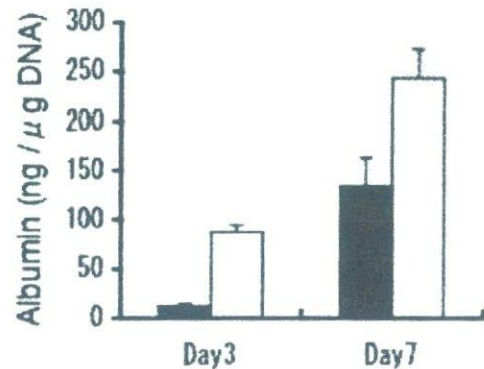


図 2. 平皿培養および三次元培養でのアルブミン分泌量

縦軸は細胞数の指標として day3, day7 で回収した細胞の DNA 量で割った値をしめす。(■; 平皿培養、□; 三次元培養)

day7 では総細胞数が大きく異なっていたため、細胞数の指標として回収した細胞より抽出した DNA 量で補正した day3, day7 いずれも三次元培養細胞でアルブミン分泌が亢進していることがしめされた。

しかしながら、光学顕微鏡下での観察では day3, day5 では細胞は単独で存在しているものが多く (data not shown)、複数の細胞が結合してできるスフェロイドを形成しているものが少ない。その

ため、細胞間に形成される微小胆管様構造等の形成までは期待できない。そのため、day3 および day7 の二点でタンパクのプロファイリングを行うことにした。

b. 細胞の三次元化にともなう各種遺伝子発現の変化の解析

Huh7 細胞を三次元もしくは平皿培養開始後、day3 もしくは day7 で細胞を回収し、蛋白を抽出した。蛍光標識ディファレンシャル二次元電気泳動法を用いて、発現量に差のあるタンパクのプロファイリングを行った。Day3 および day7 とともに同様の傾向を示し、かつ再現性がとれた 10 のスポットについて切り出しを行い、プロテアーゼ消化後ペプチド抽出を行い、質量分析により同定を行った。その結果を表 1 に示す。

protein name	Av. Ratio day3	Av. Ratio day7
fatty acid binding protein	6.22	2.49
peroxiredoxin2, isoform a	2.06	1.78
ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1	1.93	1.62
tubulin	1.83	2.03
stathmin(Pr22, oncoprotein18)	1.74	2.39
chloride channel ABP	1.97	1.56
glutathione S-transferase	1.75	1.64
calreticulin	-1.89	-1.69
heat shock 70kDa protein	-1.69	-1.56
heat shock 60kDa protein	-1.57	-1.74

表 1.TGP 培養により 1.5 倍以上増減がみられた蛋白 ; ratio は log2 の値を示す。

最も大きな増減がみられたものは fatty acid protein であった。また、細胞骨格に参与する tubulin および stathmin も三次元培養細胞で発現が亢進していた。一方、三次元培養細胞で発現が減少していたものとしてヒートショック蛋白が同定された。

c. 宿主因子のノックダウンによる HCV 粒子産生効率への影響の検討

HCV 粒子産生系は近年報告されたばかりであり、ウイルス粒子産生に参与する宿主因子は今のところ報告されていない。そこで、高効率 HCV 粒子産生系である JFH1 感染 Huh7 細胞の宿主遺伝子をノックダウンすることにより粒子産生量の変化を検討する系を確立するため、本実験では当研究室に

て同定した HCV 構造蛋白の分解に参与する宿主因子 E6AP を用いて検討を行った。

E6AP は当研究室で同定した HCV コア蛋白の E3 ligase である。HCV コア蛋白はユビキチン依存性およびユビキチン非依存性の二つの経路で分解されるが、コア蛋白のユビキチン化に参与している。この E6AP を強制発現することによって HCV コア蛋白が分解され、また宿主細胞の E6AP を siRNA にてノックダウンすることによって細胞内のコア蛋白量が増加する。HCV コア蛋白は HCV のキャプシド蛋白であり、構造蛋白である HCV コア蛋白量の増減は HCV ウイルス粒子産生を増減させている可能性は十分に考えられた。実際に E6AP の強制発現下では感染性粒子の産生量が減少することは確認しており、ノックダウンによって粒子産生が減少することが十分期待できた。

図 3 に siRNA による E6AP 発現量の変化を示す。回収した細胞より蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティングにて E6AP の発現量を検討した。

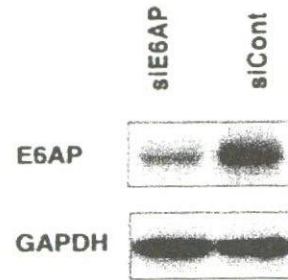


図 3 ;siRNA による E6AP のノックダウン

E6AP に対する siRNA もしくはコントロールとしてそのスクランブル配列の siRNA を JFH1 感染 k 細胞に導入した。E6AP は siRNA の導入で 90% 近くノックダウンされているが、GAPDH の発現に差はみられない。

Lane1 は E6AP に対する siRNA、Lane2 は E6AP のスクランブル配列の siRNA である。E6AP に対する siRNA を導入した場合、コントロールと比べ、E6AP の発現は 10% 程度まで減少した。一方で GAPDH の量に変化はなかった。また、HCV 非構造蛋白である NS5A の量にも変化はなく、E6AP のノックダウンが HCV-IRES(internal ribosomal entry site)依存的翻訳効率および HCV-RNA 複製

までの過程に及ぼす影響は少ないことが示唆された。

一方、細胞内のコア蛋白量を検討したのが図4である。HCV コア蛋白のウエスタンによる定量的検出は抗体の感度の問題から困難であったため、本研究ではELISA法を用いて定量した。

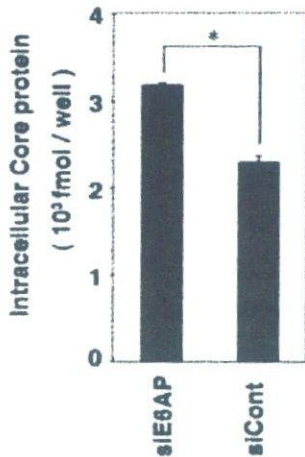


図4.E6APノックダウンによるHCVコア蛋白料の変化

図に示すように細胞内HCVコア蛋白はE6APのノックダウンにより有意に増加していることを確認した。そこで培養上清中のHCV粒子量を検討した。その結果を図3に示す。

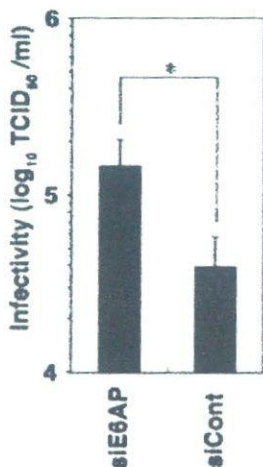


図3.培養上清中のHCV粒子量の比較

ノックダウン後、24時間から48時間の上清を回収した。この上清をnaïveなHuh7細胞に感染させ、96時間後に固定後HCVコア蛋白を蛍光抗体法により染色し、TCID50を算出した。

E6APをノックダウンした細胞ではコントロールと比べ、培養上清中のHCV感染性粒子量が有意に多かった。このことからE6APのノックダウンによりコア蛋白が安定化し、ウイルス粒子産生量が増加したと考えられる。

以上の結果より、E6APのノックダウンによってHCV感染性粒子産生が変化することが確認できた。

D. 考察

a. 三次元培養の条件検討

三次元培養細胞は平皿培養細胞に比べ、細胞増殖速度がことなっていた。三次元培養に用いているポリマーは培地に含まれている高分子も比較的自由に移動できるが、やはり液体と比較してその速度が遅いことが原因であると考えられる。

一方、アルブミンの分泌量はday3,day7ともに三次元培養細胞で亢進していた。しかしながら、day3と比較してday7では二次元培養細胞との差が小さかった。これは、三次元化による分泌促進効果があるものの、平皿培養細胞と比較して三次元培養細胞はやや増殖不良の状態にあることに起因していると考えられる。

これらの条件を考慮すると、プロテオーム解析は培養後day3で行うのが最良であると考えられた。しかし、day3では細胞集団としての三次元的構築がなされておらず、形態的には微小胆管様構造等を形成していることが期待できない。以上のことを考慮して、day3とday7の二点で解析をするのが妥当であると考えられた。

b. 細胞の三次元化にともなう各種遺伝子発現の変化の解析

培養形態の違いにより発現に差のある遺伝子を10個同定した。発現に差のみられた遺伝子は予想以上にすくなかった。本研究課題で三次元培養系による比較での長所としていた宿主細胞のバックグラウンドに差が少ないという予測を裏付ける結果となった。しかしながら、pH4-7までの間で展開したため、それ以外の範囲で重要な蛋白を見落としている可能性もある。今後はpH3以下、およびpH7以上の範囲についても検討を行いたいと考えてい

る。

今回の検討で最も大きな差異がみられたのは FABP(fatty acid binding protein)であった。この蛋白は肝細胞で強く発現している蛋白であり、細胞内での脂肪酸輸送等に重要な役割を果たしていることが知られている。HCV と FABP の関与についての報告はないが、HCV 構造蛋白であるコア蛋白と脂肪酸の関与についてはいくつかの報告があることから、粒子形成に関与する重要な因子である可能性が高いと考えられる。また、FABP を含め、day 3 でより発現亢進がみられた蛋白はいずれも代謝関係の蛋白であった。

一方、細胞骨格蛋白としてよく知られている tubulin、および microtubule の安定性制御に関与する蛋白である stathmin については day7 でより発現が亢進しており、細胞集団としての三次元的構築に重要であることが考えられる。また、三次元培養細胞で発現が低下していた蛋白としてヒートショック蛋白二種が同定された。Hsp70 については HCV 関連肝癌のバイオマーカーとしての可能性等が報告されている。今後この蛋白の意義についても注意深く検討する必要があると考えている。

c. 宿主因子のノックダウンによる HCV 粒子産生効率への影響の検討

HCV 構造蛋白の一つであるコア蛋白の分解を促進する宿主因子 E6AP のノックダウンにより HCV 粒子産生の減少を確認できた。E6AP 自体は三次元化により発現に差がみられた遺伝子ではないが、HCV 粒子の材料であるコア蛋白の分解に関与していること、強制発現により HCV 感染性粒子の産生量が減少することからノックダウンによる粒子産生量の変化は十分期待できたため、コントロールとして用いた。この結果より、同様の方法を用いてプロテオーム解析にて同定した候補遺伝子が粒子産生に及ぼす影響が検討できると考えられる。

E6AP を用いての系の検討の際、重要な条件となったのが培養上清の回収時間の設定であった。ノックダウン効果は 24 時間から始まり、48 時間で 90% 近くのノックダウン効果が得られ、少なくとも 96 時間はこの状態が続いていたが、細胞障害の問題から 48 時間以降に回収した培養上清では粒子産生量の違いを検討することが難しかった。また、24 時

間以前では粒子産生量に有意差はみられず、標的遺伝子のノックダウンから HCV 粒子形成への影響が出るまでに時間差があることが予想された。今後、目的遺伝子毎にノックダウンの持続時間および細胞障害についても重要であるが、この時間差についてもある程度考慮して実験をおこなう必要があるだろう。

E. 結論

1. 同じ細胞を二次元培養または三次元培養した場合、培養形態の違いにより発現に差のある遺伝子を 10 個同定した。

2. HCV コア蛋白の分解に関与する宿主因子である E6AP のノックダウンにより HCV 粒子産生が上昇することを確認し、宿主因子のノックダウンによる粒子産生量の変化を検討する系を樹立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masayuki Shirakura, Kyoko Murakami, Tohru Ichimura, Ryosuke Suzuki, Tetsu Shimoji, Kouichirou Fukuda, Katsutoshi Abe, Shigeko Sato, Masayoshi Fukasawa, Yoshio Yamakawa, Masahiro Nishijima, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Peter M. Howley, Tatsuo Miyamura, and Ikuo Shoji; The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol*; 81(3); 1174-1185. 2007

2. 学会発表

1. 吉崎佐矢香、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の機能的解析とプロテオーム解析
第 29 回日本分子生物学会年会；2006 年 12 月

2. 勝二郁夫、村上恭子、白倉雅之、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、脇田隆

字: E6AP依存性HCVコア蛋白分解によるウイルス産生調節機構

2006年8月

第29回日本分子生物学会年会; 2006年12月

3. 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、阿部克俊、奈須純一、高橋由利絵、鈴木哲朗、脇田隆字、水本清久、宮村達男; E6AP依存性HCV core蛋白分解の分子認識機構の解析

G. 知的所有権の出願・登録状況

1 特許取得
なし

第54回日本ウイルス学会学術集会, 2006年11月

2 実用新案登録
なし

4. K. Fukuda, I. Shoji, M. Shirakura, K. Murakami, T. Suzuki, T. Wakita, K. Mizumoto and T. Miyamura:

3 その他
なし

Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

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