

2006 21016A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 忠仁

平成19(2007)年4月

## 目次

I. 総括研究報告	
ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 1
神田 忠仁	
II. 分担研究報告	
1. ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析	----- 5
神田 忠仁	
2. ウイルスを標的とする発がん予防の研究	----- 8
川名 敬	
3. HCVゲノム複製を支配するウイルス及び細胞側因子の解析	----- 12
下遠野 邦忠	
4. C型肝炎ウイルスコア蛋白質のプロテアソーム依存的分解機構の解析	--- 16
鈴木 哲朗	
5. 樹状細胞からみたC型肝炎ウイルス(HCV)持続感染機構の解析	----- 21
林 紀夫	
6. C型肝炎ウイルスの感染および複製機構の解析	----- 22
松浦 善治	
7. C型肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞が認識する抗原エピトープの同定	----- 25
井廻 道夫	
8. HCVによるインターフェロンシステムの攪乱機構の解析	----- 27
加藤 宣之	
9. 初回献血者におけるウイルスマーカー陽性率	----- 36
2006年の輸血感染症報告	----- 40
内田 茂治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

ウイルスを標的とする発がん予防の研究

主任研究者：神田 忠仁  
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

ヒトパピローマウイルス（HPV）は生殖器の粘膜に、C型肝炎ウイルス（HCV）は肝細胞に感染し、数年から数十年に渡る持続感染を経て、それぞれ子宮頸がんや肝臓がんを発症させる。従って HPV、HCV の感染予防ないし持続感染阻止による発がん予防をめざしている。

抗 HPV 抗体の中和活性の測定に必要な感染性偽ウイルスの品質を大幅に改善し、HPV16、18、31、52、58 型に対する抗体の交差中和活性を定量的に比較することができるようになった。この測定系を使って、型共通中和エピトープを提示するワクチン抗原候補の抗原性を調べた。また、SH 基に結合する試薬が HPV 偽ウイルスの感染性を阻害することがわかった。

シクロスポリン誘導体 NIM811 は HCV の複製を抑制し、インターフェロンとの併用で抗 HCV 効果が増強された。NIM811 は免疫抑制作用を持たないので、抗 HCV 剤として臨床応用が期待される。HCV の NS5A は FKBP8 と結合し、さらに Hsp90 と結合した。この複合体形成は HCV ゲノム複製に不可欠であった。全ての遺伝子型 HCV のコア蛋白質が E6AP 依存性にユビキチン経路で分解されることが分かった。HCV の増殖量を持続感染に適したレベルに維持する機構であると考えられた。HCV の NS3-4A プロテアーゼは Cardif 分子を切断して、2 本鎖 RNA の細胞内刺激による IFN- $\beta$  産生を抑制するが、TRIF 分子は切断できないので、細胞外刺激による IFN- $\beta$  産生は抑制できないことがわかった。C 型慢性肝炎患者では、樹状細胞のウイルス感知機能が低下していた。これが HCV に対する免疫系が効果的に活性化されない原因であると考えられた。C 型急性肝炎の解析から、CTL 応答の強さは細胞障害の強さには関連するが、ウイルス排除とは必ずしも関連せず、ウイルス排除には自然免疫と獲得免疫の両者の協調が必要であることがわかった。

発がんや密接な関係のある B 型肝炎ウイルス、HCV、ヒトリンパ球向性ウイルス（HIV、HTLV-1）は血液を介して感染するので、日赤の輸血感染データを基に感染の動向を調査した。

分担研究者

神田 忠仁 国立感染症研究所・センター長  
川名 敬 東京大学医学部・助手  
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所・教授  
鈴木 哲朗 国立感染症研究所・室長  
下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所・教授  
加藤 宣之 岡山大学医学部・教授  
林 紀夫 大阪大学大学院・教授  
井廻 道夫 昭和大学医学部・教授  
内田 茂治 東京西赤十字血液センター・  
課長

パピローマウイルス（HPV）の感染である。欧米で開発されたワクチンは、16、18 型の感染予防効果しかないため、全ての高リスク型に有効な感染予防ワクチンの開発を目的とした。また、性器粘膜の基底細胞に潜伏・持続感染し、宿主細胞の分化に伴って増殖する HPV 生活環を支える分子機構を明らかにし、介入してウイルスを排除する方法を探ることを目指した。（神田、川名）

C 型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎および肝がん発症の危険因子のひとつであり、我が国においてはこれらの疾患のほぼ 80% と関連している。HCV は肝細胞での増殖・再感染を繰り返すので、ウイルスの肝細胞への吸着・侵入からゲノムの

A. 研究目的

子宮頸がんの原因は 15 種類の高リスクヒト

複製、ウイルス粒子の形成に至るすべての素過程を詳しく調べ、これらの過程を阻害してウイルスの増殖を抑制する方法を探った。また、IFNとリバビリンの併用療法の効果を向上させる方法を開発するために、C型慢性肝炎患者の抗HCV免疫応答の詳細な解析を目指した。(下遠野、松浦、鈴木、加藤、林、井廻)

輸血により伝播するHBV、HCV、ヒトリンパ球性ウイルス(HIV、HTLV-1)の感染は発がんと密接な関係がある。新規感染者のウイルス遺伝子を解析して、感染者の背景を明らかにし、輸血によるウイルス感染の実状把握を目的とした。(内田)

## B. 研究方法

1) 昨年見出したHPV16型L2蛋白質の型共通中和エピトープを、HPV16型L1蛋白質に挿入したキメラキャプシドを作り、抗原性を調べた。HPVのキャプシド蛋白質の多数のシステイン残基に注目し、SH試薬との反応が感染性に与える影響を調べた。また、HPV16型の複製開始点を持つoriプラスミドを293細胞で複製させる実験系を作り、HPV複製に関わる細胞因子の探索に応用した。(神田)

2) HPV感染細胞に対するT細胞応答を直接解析するために、子宮頸部前癌病変からのリンパ球の分離・培養系を作った。(川名)

3) 抗HCV作用を示す化合物の探索に使うため、HCV全長、部分ゲノムを効率よく感染・複製させる自立複製細胞系の開発を試みた。また、HCV-1bを基にしたレプリコン細胞4種類とHCV-2aを基にしたレプリコン細胞を用い、サイクロスポリンA(CsA)とその誘導体NIM811の抗HCV効果を調べた。HCV複製の自然環境に近い細胞として、ヒト肝臓細胞をHPVE6/E7で不死化し、株化を試みた。(下遠野)

4) 酵母two-hybrid法を用い、ヒト脳及びヒト肝臓のcDNAライブラリーを対象に、HCVのCon1株(genotype1b)のNS5Aと結合する蛋白質を探し、FKBP8を見出した。HCVレプリコン細胞やJFH1株を用いたHCV細胞培養系でのFKBP8ノックダウンと定量的RT-PCRによって、FKBP8のHCV複製への影響を解析した。また、FKBP8の変異体を作製し、NS5AおよびHsp90との相互作用を検討した。(松浦)

5) FLAG-tagを付加した遺伝子型1a、1b、2a、

2b、3aのコア蛋白質とE6APを細胞で発現させ、コア蛋白質のsteady-state-levelをウエスタンブロット法で解析した。各コア蛋白質とHA付加ユビキチンを共発現させ、コア蛋白質のユビキチン化を免疫沈降とウエスタンブロット法で解析した。(鈴木)

6) polyI:Cを培養液に添加(細胞外刺激)又はトランスフェクション(細胞内刺激)し、NS3-4A存在下でのIFN-β遺伝子プロモーターの活性を調べた。細胞内で発現させたMyc-TRIFおよびMyc-Cardif分子を発現させ、NS3-4Aによる切断をウエスタンブロット法で解析した。(加藤)

7) 樹状細胞(DC)にはウイルス感知系であるToll様受容体(TLR)、RIG-I、MDA-5が発現しており、I型IFNや炎症性サイトカインなどを介して先天免疫、獲得免疫の効率的な活性化に関与している。そこで、C型慢性肝炎患者のDCサブセットにおけるTLR/RIG-I/MDA-5の発現と機能を調べた。(林)

8) 昨年度同定した細胞障害性T細胞(CTL)が認識するHCV抗原ペプチド(NS4:アミノ酸1758-1777、NS5B:アミノ酸2551-2570、NS5B:アミノ酸2801-2820アミノ酸)の解析を進めた。(井廻)

9) 東京都、茨城県、栃木県、神奈川県、福岡県の5ヶ所の血液センターで、初回献血者を対象にHBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-I抗体の陽性率を調査した。(内田)

## 倫理面への配慮

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「国立感染症研究所動物実験に関する基本方針」、「大学等における実験動物について」等を踏まえ、動物実験が適切に行われるよう配慮した。

患者試料を使う場合は、提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省より示された「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存した。

### C. 研究結果

1) HPV は培養細胞で増殖しないため、抗体の中和活性は感染性偽ウイルスを使って測定している。感染性偽ウイルスの作製方法を改良し、抗体の中和活性交差性を定量的に解析した。キメラキャプシドで誘導されたウサギ抗血清は、HPV16、18、31、52、58型を中和した。SH 試薬との反応によって、HPV 偽ウイルスの感染性が消失した。HPV ori プラスミドの複製を hSkn-1a が促進し、Oct-1、Tst-1、C/EBP $\beta$  は抑制した。CDP は顕著な効果を示さなかった。(神田)

2) 子宮頸部からリンパ球を分離し培養することができた。陽性コントロールに対する子宮頸部リンパ球の T 細胞応答を ELISPOT 法によって確認した。(川名)

3) HuH7 細胞に部分ゲノムおよび全ゲノムからなる HCV レプリコン RNA を導入し、HCV ゲノムが効率よく自立複製する細胞を得た。この細胞で HCV 複製阻害剤を探索し、シグナル系 (TGF $\beta$ 、ERK 経路) に作用する薬剤も抗 HCV 作用を示すことが分かった。

CsA の濃度が 1 $\mu$ g/ml で HCV-1 のゲノム複製は約 1/10 に、HCV-2a のゲノム複製は 1/3 に低下した。CsA と IFN の共存により、相加的ないし相乗的に抗 HCV 効果を示した。免疫抑制作用のないサイクロスポリン誘導体、NIM811 と IFN で HCV レプリコン細胞を処理すると、CsA に比べ低用量で複製を阻害した。

ヒト肝細胞を HPVE6/E7 で不死化した細胞株には、HCV レプリコン (JFH1) が感染性を示した。慢性 C 型肝炎患者由来の血清を用いた HCV 感染実験においても、HCV の感染増殖が見られ、IFN や CsA による複製抑制を評価できた。(下遠野)

4) HCV レプリコン細胞や HCV 感染細胞から FKBP8 をノックダウンすると、HCV RNA 複製が抑制された。FKBP8 は Hsp90 と複合体を形成し、そこに NS5A 蛋白質が結合した。Hsp90 の ATPase 阻害剤であるゲルダナマイシンは濃度依存的に HCV の複製を阻害した。(松浦)

5) 調べた全ての遺伝子型のコア蛋白質は E6AP によってユビキチン化され、分解された。コア蛋白質のアミノ酸 58-66 領域は全ての遺伝子型でよく似た配列であり、この領域が E6AP の標的となっていることが示された。HCV 増殖細胞系で E6AP を高発現させると、ウイルス産生が

低下し、E6AP をノックダウンするとウイルス産生は増加した (鈴木)。

6) HCV の NS3-4A プロテアーゼは Cardif 分子を切断して、2 本鎖 RNA の細胞内刺激による INF- $\beta$  産生を抑制するが、TRIF 分子は切断できないので、細胞外刺激による INF- $\beta$  産生は抑制できないことがわかった。(加藤)

7) C 型慢性肝炎患者のミエロイド DC (MDC) では、非感染者と比較して TLR2、TLR4、RIG-I の発現は増加しているが、TLR3、MDA-5 の発現には差を認めなかった。また、各 TLR や RIG-I に対するアゴニストによる IFN- $\alpha$  や TNF- $\beta$  などの産生は、非感染者に比べ低下しており、DC においても HCV 感染による TLR/RIG-I シグナル抑制機構が存在することが明らかになった。(林)

8) NS4 のアミノ酸 1760-1768、NS5B のアミノ酸 2556-2564、NS5B のアミノ酸 2803-2811 領域が CTL の認識する最小最適エピートープであることがわかった。C 型急性肝炎患者を解析し、NS4 のアミノ酸 1958-1977 に CTL が認識するエピートープが存在することを見いだした。(井廻)

9) 全国の初回献血者における HTLV-I 抗体陽性率の調査から、九州を中心とした西日本で HTLV-I 陽性率が高いことが再確認された。平成 7、12、17 年にかけて、福岡では明らかな陽性率の低下が認められたが、関東地方、特に栃木と東京では若年層における陽性率の低下傾向が全く認められなかった。平成 18 年度には核酸増幅検査導入後はじめての C 型肝炎ウイルス感染が 1 例確認された。(内田)

### D. 考察

1) HPV のキャプシドは 360 分子の L1 蛋白質からなる正二十面体の骨格構造 (L1-キャプシド) をもつ。従って、キメラキャプシドは、360 個の型共通 L2 中和エピートープを持つことになり、高い抗原性が期待できる。臨床試験に使う型共通ワクチン抗原とする予定である。SH 試薬が HPV 感染阻害剤基となる可能性がある。HPVori プラスミドの複製系によって、HPV ゲノム複製阻害剤の探索が可能になった。(神田)

2) 子宮頸部での HPV に対する局所免疫応答を解析すれば、HPV 感染の治癒における免疫系の役割が明らかになる、HPV ワクチンの有効性評価にも役立つ。(川名)

3) CsA と NIM811 の抗 HCV 作用の強さは、HCV の遺伝子型によって異なり、NS5B に対するサイクロフィリンBの働きが遺伝子型により異なる可能性が示唆された。ヒト肝臓細胞を不死化して樹立した細胞は慢性C型肝炎患者の血清由来のHCVにも感受性を示した。今後の抗ウイルス剤の探索に有用である。(下遠野)

4) FKBP8 は、Hsp90 を HCV の複製複合体にリクルートするコシャペロンとして機能していると思われる。NS5A と FKBP8、あるいは FKBP8 と Hsp90 との結合阻害は、慢性C型肝炎の新たな創薬ターゲットになりうる。特に、免疫抑制活性を欠損し、FKBP8 に結合可能な FK506 誘導体は、HCV の複製阻害剤となる可能性がある。(松浦)

5) E6AP による HCV コア蛋白質分解機構は HCV の過剰増殖を抑制して、持続感染の維持に寄与している可能性がある。(鈴木)

6) NS3-4A だけでは自然免疫系を完全に抑制できないことがわかった。(加藤)

7) C 型慢性肝炎患者では、DC のウイルス感知系が機能低下しており、そのため HCV 感染に対する免疫系の活性化が効果的に進まないと考えられる。(林)

8) C 型急性肝炎の解析から、CTL 応答の強さは細胞障害の強さには関連するが、ウイルス排除とは必ずしも相関せず、ウイルス排除には自然免疫と獲得免疫の両者の協調が必要であることがわかった。(井廻)

9) 人工乳で育児をする割合が増えているとはいえ、妊婦に母子感染の危険性を周知し、希望者には出産前に抗体検査を行うべきであろう。平成 18 年確認された 1 例の HB キャリアは母子感染防止対策を施したにもかかわらずキャリア化した例であった。(内田)

#### E. 結論

1) HPV16 型 L2 蛋白質の型共通中和エピトープを HPV16 型 L1 蛋白質に挿入したキメラ蛋白質で形成されるキャプシドは、ウサギに免疫すると、HPV16 型に対する型特異的抗 L1 中和抗体と型共通抗 L2 中和抗体を誘導した。型共通ワクチン抗原への応用をめざす。SH 基に結合する試薬は、HPV の感染性を失わせることが示された。感染阻害薬としての発展が期待される。(神田、川名)

2) サイクロスポリン誘導体 NIM811 は、IFN との併用で強い抗 HCV 複製阻害効果を示し、免疫抑制作用のないことから臨床応用が期待される。(下遠野)

3) HCV のゲノム複製、キャプシド形成の詳細な分子機構、免疫抑制機構がわかれば、抗ウイルス剤による介入の標的となる。HCV が増殖する細胞系は、抗 HCV 作用を持つ薬剤のスクリーニングに役立つ。(松浦、鈴木、下遠野、加藤、林、井廻)

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

別紙に記載

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中  
識別番号 11000010 (神田)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発並びにウイルス持続感染機構の解析  
分担研究者 神田忠仁 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染が子宮頸がんの原因である。従って、高リスク HPV の感染や感染拡大をワクチンや抗ウイルス剤で防ぐか、持続感染に介入してウイルス増殖を阻害できれば子宮頸がんを予防できる。最近欧米の製薬会社によって開発された HPV 感染予防ワクチンは、高リスク型の 15 の遺伝子型のうち 16、18 型にしか効果がない。本研究では、HPV16 型の副キャプシド蛋白質 L2 に高リスク群 HPV に共通する中和エпитープが存在することを見出したので、このエピトープを HPV16 型主キャプシド蛋白質 L1 に組み込み、形成されるキメラキャプシド粒子をワクチン抗原に応用する研究をすすめた。L1 蛋白質に複数のシステイン残基が存在するが、SH 基に結合する試薬が、HPV の感染性を失わせることを見出した。HPV16 型ゲノムの複製開始点に依存して細胞内でプラスミド DNA を複製させる実験系を作った。角化細胞転写因子 hSkn-1a がこの複製を促進することがわかった。

A. 研究目的

高リスクヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染が子宮頸がんの原因である、HPV は性行為等で生じた微少なキズから侵入し、表皮基底細胞に核内エピソームとして潜伏持続感染する。感染細胞が最終分化を始めると、小規模なウイルス増殖が起こり、周囲の細胞や別の個体に感染する。稀に HPV ゲノムが細胞染色体に組み込まれると、HPV の E6、E7 遺伝子を継続的に高発現する細胞が生じ、不死化し、やがて悪性形質を獲得する。従って、HPV の感染や感染拡大をワクチンや抗ウイルス剤で防ぐか、持続感染に介入してウイルス増殖を阻害できれば子宮頸がんの発症リスクが大幅に下がると期待できる。本研究は、高リスク HPV（16、52、58 型等 15 の遺伝子型）の感染を一括して予防するワクチン抗原や感染阻害剤の開発を目的とした。また、HPV 持続感染機構に介入する方法を探るために、HPV の生活環を支える分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) HPV は培養細胞で増殖しないため、抗体の中和活性は感染性偽ウイルスを使って測定している。作製方法を見直し、L1（主要キャプシド蛋白質）、L2（副キャプシド蛋白質）の発現プラスミドとレポーター発現プラスミドの量比の最適化、SV40T 抗原発現細胞株や精製方法の再検討等を進めた。
- 2) 昨年見出した HPV16 型 L2 蛋白質の型共通中和エピトープを、HPV16 型 L1 蛋白質に挿入し

たキメラキャプシドを作り、精製した。これをウサギに免疫して得た抗血清の中和活性を調べた。

- 3) 全ての高リスク HPV のキャプシドには、12 個のシステイン残基が共通の配置で存在する。HPV16 型 L1 蛋白質の N 末端から 175 と 428 番目のシステイン残基は正二十面体のキャプシド骨格形成に関わるが、他の残基の役割は不明である。HPV16 型偽ウイルスに SH 試薬を反応させ、感染性の変化を調べた。2m モル濃度で以下の試薬を含む培養液に偽ウイルスを浮遊させ、37 度 2 時間後に細胞に感染させた。  
DTNB: 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)  
NEM: N-Ethylmaleimide  
MBTA: 4-(N-Maleimido)benzyl-a-trimethylammonium iodide  
MTSET: [2-(Trimethylammonium)ethyl] Methanethiosulfonate bromide

- 4) HPV16 型 E1、E2 蛋白質の発現プラスミドと HPV16 型の複製開始点を持つ ori プラスミドを 293 細胞に導入し、ori プラスミドの複製を検出する実験系を作った。Hirt 法で回収した DNA を DpnI で消化し、抵抗性を示す複製 ori プラスミドの量を SYBR Green を用いた real-time PCR 法で定量した。角化細胞転写因子である hSkn-1a、Oct-1、Tst-1、C/EBP $\beta$ 、CDP の共発現で生じる複製 ori プラスミド量の変化を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て国立感染症研究所動物実験指針に従い、動物実験委員会の審査を経て行っ

た。

### C. 研究結果

1) 各プラスミドの最適混合比は、型によって異なっていた。網羅的に条件設定を行い、高い感染価を持つ HPV16、18、31、52、58 型の感染性偽ウイルスを作製できた。偽ウイルスを用いた抗体の中和活性測定感度、定量性が飛躍的に向上した。

2) キメラキャプシドは、HPV16 型の L1 キャプシドの持つ型特異的中和エピトープを維持しており、キメラキャプシドの免疫で得たウサギ抗血清は、HPV16 型を中和した。また、型共通エピトープに対する抗体も誘導されており、18、31、52、58 型を中和した。

3) SH 試薬との反応によって、HPV 偽ウイルスの感染性が消失した。HeLa 細胞を、同様に SH 試薬を含む培地で培養後、培地をかえれば HPV 偽ウイルスが正常に感染するので、SH 試薬は粒子に結合し感染性を失わせると考えられた。電子顕微鏡による観察では、SH 試薬による形態変化は認められなかった。

4) HPV ori プラスミドの複製は hSkn-1a の共発現で約 2 倍に増加した。DNA 結合能を欠失した hSkn-1a のアミノ酸変異体 (N331A) や hSkn-1a の DNA 結合ドメイン (POU ドメイン) だけを発現しても複製促進は認められなかった。ori プラスミドから E6-E7 領域を除いても複製の促進が認められ、E7 領域に存在する hSkn-1a 結合部位はこの減少に関わらないことが示された。一方、同じ POU ドメイン転写因子ファミリーに属する Oct-1 と Tst-1 は複製を阻害した。C/EBP  $\beta$  も複製に対して阻害的に働いた。CDP は顕著な効果を示さなかった。

### D. 考察

1) これまでの HPV 偽ウイルス作製方法では、レポータープラスミドをパッケージしていない空粒子が大部分を占めていた。空粒子の細胞への吸着・侵入はモニターできないが、抗体との反応は感染性粒子と同様に起こるため、空粒子は中和抗体を希釈する効果を持っている。HPV 型によって空粒子の含有量が大きく異なっていたため、これまで中和抗体の交差性を定量的に評価することができなかった。

まだ改良の余地が残されているものの、新たな方法で作製した偽ウイルスを使い、信頼度の高いデータを得ることができた。

2) HPV のキャプシドは 360 分子の L1 蛋白質からなる正二十面体の骨格構造 (L1-キャプシド) をもつ。従って、キメラキャプシドは、360 個

の型共通 L2 中和エピトープを持つことになり、高い抗原性が期待できる。臨床試験に使う型共通ワクチン抗原とする予定である。

3) HPV の感染成立には、L1 蛋白質のシステイン残基が持つ SH 基が必要らしい。どの SH 基がどのような役割を担うのか不明であるが、2mM の DTNB と NEMI には細胞毒性が見られず、CIN 病変で増殖している HPV に作用させ、生殖器内での HPV 拡散防止に有用な感染阻害剤になる可能性がある。

4) hSkn-1a は皮膚の suprabasal cells で発現が誘導され、表皮形成の最終分化に向かう引き金を引く転写因子である。hSkn-1a は HPV ori 及び後期プロモーター近傍に結合することが知られており、後期プロモーター近傍への結合では転写活性を促進する。ori 近傍への hSkn-1a 結合が複製を促進するか、あるいは hSkn-1a が発現を誘導する他の細胞遺伝子群の機能が複製を促進すると思われる。

### E. 結論

1) HPV16 型 L2 蛋白質の型共通中和エピトープを HPV16 型 L1 蛋白質に挿入したキメラ蛋白質で形成されるキャプシドは、ウサギに免疫すると、HPV16 型に対する型特異的抗 L1 中和抗体と型共通抗 L2 中和抗体を誘導した。型共通ワクチン抗原への応用をめざす。

2) SH 基に結合する試薬は、HPV の感染性を失わせることが示された。感染阻害薬としての発展が期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Takatani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P<sub>670</sub> Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. *Virus Genes*, 2007, in press.

2. Takizawa, S., Nagasaka, K., Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Yasugi, T., Takeuchi, T., Kanda, T., Huibregtse, J.M., Akiyama, T., and Taketani, Y.: Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli.



- Gene to Cell, 11:453-464, 2006.
3. Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T. : Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 Pseudovirions with Antisera Induced by Immunizing Rabbits with Synthetic Peptides Representing Segments of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 Surface Region. *Virology*, 358:266-272, 2007.
  4. Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Kanda, T. : Inhibitory cis-Element-Mediated Decay of Human Papillomavirus Type 16 L1-Transcript in Undifferentiated Cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 288:47-57, 2006.
  5. Matsumoto, K., Yasugi, T., Oki, A., Fujii, T., Nagata, C., Sekiya, S., Hoshiai, H., Taketani, Y., Kanda, T., Kawana, T., and Yoshikawa, H. : IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Lett.*, 231:309-313, 2006
  6. Kukimoto, I, Takeuchi, T., and Kanda, T. : CCAAT-Enhancer Binding Protein  $\beta$  Binds to and Activates the P<sub>670</sub> Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*, 346:98-107, 2006.

## 2. 学会発表

- 1) 神田忠仁、近藤一成、越智寛幸、吉川裕之 : ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチン。第 65 回日本癌学会。
- 2) 柗元 巖、神田忠仁 : 角化細胞転写因子 hSkn-1a による HPV16DNA 複製の促進。第 54 回日本ウイルス学会。
- 3) 神田忠仁 : ヒトパピローマウイルス感染と子宮頸癌。第 54 回日本ウイルス学会
- 4) 神田忠仁 : ヒトパピローマウイルスの生活環と感染予防ワクチン戦略。第 19 回性感染症学会

## H. 知的所有権の取得

「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中  
識別番号 110000109

## ウイルスを標的とする発がん予防の研究

分担研究者 川名 敬、東京大学医学部附属病院 産科婦人科学

### 研究要旨

HPV 感染に対する細胞性免疫能を観察するために、HPV 感染者の子宮頸部リンパ球中のヒトパピローマウイルス（以下、HPV）に対する T cell response を調べることをめざしている。本年度（平成 18 年度のみ）の研究班参加は子宮頸部からのリンパ球の分離・培養系を樹立し、陽性コントロールに対する子宮頸部リンパ球の T cell response の検出を ELISPOT 法によって確認した。また、免疫応答分子 CD1d は Natural killer T (NKT)細胞のリガンドとして粘膜の細胞性免疫誘導能に関連していることから、HPV 感染細胞における CD1d の発現を検討した。CD1d は正常子宮頸部上皮の基底細胞に発現しているが、子宮頸癌では消失し、HPV 感染巣である子宮頸部上皮異形成では減弱傾向にあった。

HPV 感染巣の消退・進展と子宮頸部における HPV に対する局所免疫応答の関連性を知ることは、HPV 感染の治癒過程の解明や HPV ワクチン開発の基礎データとして役立つと考えられる。

### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（以下、HPV）は、性行為感染によって子宮頸部粘膜に感染し、そのごく一部の感染者が子宮頸癌を発症する。HPV の長期的な持続感染が子宮頸癌発症の最大リスク因子である。HPV 感染は若年層を中心に広く蔓延しているが、多くの感染者は一過性感染にとどまり、HPV に対する自然免疫能によって感染を制御できると考えられている。T cell response は感染制御に必須であるが、子宮頸部リンパ球中の HPV に対する T cell response は未だ研究されていない。

本研究の目的は、子宮頸部リンパ球の分

離・培養法を確立し、子宮頸部局所における T cell response を測定することである。子宮頸部に HPV 関連疾患を有する患者から検体を採取し、その病変の消長と子宮頸部の局所細胞性免疫の関連性を検討することをめざしている。

MHC 様膜蛋白質である CD1d は、感染上皮細胞から粘膜下の Natural killer T (NKT)細胞への細胞間シグナル伝達を担っている。NKT 細胞はサイトカインを介して強い細胞性免疫を誘導する。そこで、HPV 感染細胞における CD1d の変化を調べることにより、感染上皮細胞の視点から子宮頸部の細胞性免疫誘導能を検討することとした。

## B. 研究方法

HPV 感染巣は、病理組織学的には子宮頸部上皮異形成 (cervical intraepithelial neoplasia, 以下 CIN) に相当する。本研究では、HPV に対する局所免疫応答を調べるために、CIN 患者および子宮頸癌患者の子宮頸部リンパ球、子宮頸部上皮細胞を抽出することから始めている。当該施設の婦人科外来で採取された子宮頸部擦過細胞を Ficoll 法を用いて分別遠心し、上皮細胞と単核球に分離し、それぞれを回収した。

リンパ球分画は、免疫染色によって CD3 陽性細胞、CD56 陽性細胞が得られたことを確認し、IL-2、anti-CD3 抗体存在下に初代培養を行った。細胞数の増減を測定した。T cell response を調べるために、ELISPOT 法を用いて Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) 産生 T 細胞数をみた。

上皮細胞は、初代培養はできないため、転写産物を調べるために mRNA を抽出した。

CD1d の局在と CIN 病変における発現変化を観察するために、CIN 病変もしくは子宮頸癌の組織を採取した。それぞれ凍結切片を作製し、CD1d の免疫染色を行った。

### (倫理面への配慮)

子宮頸部擦過細胞の採取、子宮頸部病変の組織検査については、東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得て、文書で同意を得た患者から採取された。これらの検体採取法は、通常の外来診療で施行される検査法と同じものである。

## C. 研究結果

大部分の CIN 患者において、 $10^5 \sim 10^6$  細胞

の子宮頸部リンパ球が得られた。これらのリンパ球の免疫染色では、CD3 陽性細胞が多く、CD56 陽性細胞は比較的少ないことがわかった。子宮頸部リンパ球をリコンビナント IL-2 と抗 CD3 抗体を添加した RPMI (10% FBS) で培養すると、リンパ球の細胞数は数日間で 50~200% 近く増加した。

CIN 患者から分離された子宮頸部リンパ球の生物活性をみるために、ELISPOT 法を行った。ELISPOT 法の陽性コントロールとして Phytohemagglutinin (PHA) を用いた。子宮頸部リンパ球を PHA で抗原刺激すると、IFN- $\gamma$  を産生するリンパ球がスポットとして検出された。

正常子宮頸部、CIN 病変、子宮頸癌、尖圭コンジローマ (HPV6/11 型による良性乳頭腫) の各組織の凍結切片もしくはホルマリン切片を作製し、抗 CD1d 抗体に対する免疫反応性を検討した。正常組織では、基底層~傍基底層において CD1d の発現が確認された。分化とともに発現量は低下した。子宮頸癌の癌病巣では CD1d の発現が消失していた。尖圭コンジローマでは、CD1d の発現は減弱していた。CIN は患者によって CD1d の発現は様々であった。

## D. 考察

本研究によって樹立された子宮頸部リンパ球の分離・培養系は、HPV に対する子宮頸部局所の細胞性免疫能の検出を可能にすると考えられる。CIN 病変の増悪症例と無増悪症例の細胞性免疫能の違いを調べることにより、HPV 感染を制御するために必要な戦略を探りたい。この情報は HPV に対する治療的ワクチンの開発に役立つものと考えられる。

現在、HPV 感染病変に対する治療的ワクチンとして期待されているのは、E7 蛋白質を抗原としたワクチンである。そこで今後は、日本で多く検出される HPV16, 52, 58 型の E7 蛋白質に対する細胞性免疫能を調べていく予定である。また、E7 以外にも E2、L1、L2 蛋白質などに対する細胞性免疫能も調べる必要があると思われる。

本研究によって、CD1d の発現が HPV 感染によって変化することが示唆された。HPV 関連病変の進展レベルと CD1d の減弱には相関があるかも知れない。CIN 病変で CD1d の発現に強弱があることから、症例を蓄積し病変の進展・消退との関連を更に検討したい。また、CD1d の発現制御は、単純ヘルペスウイルス、HIV、クラミジアトラコマティスなど多くの病原体で報告されていることから、HPV による免疫エスケープ機構の 1 つになっているかも知れない。HPV による CD1d 発現制御についても、今後の研究課題としたい。

#### E. 結論

本研究では、HPV ワクチンの開発の基礎的研究として、子宮頸部における局所免疫能を調べる系を立ち上げた。臨床検体を用い、リンパ球と感染上皮細胞の両面から、自然感染に対するヒトの細胞性免疫能を検討している。これらの基礎データは、HPV 感染の治療過程の解明や HPV ワクチン開発に役立つと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawana K, Quayle AJ, Ficarra M, Ibane JA, Shen L, Kawana Y, Greene S, Yang H, Yavagal S, Marrero L, Zhang YX, Pyles RB, Blumberg RS, Schust DJ: CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is a result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J. Biol. Chem.*, 282(10): 7368-7375, 2007
- 2) Kawana K, Kawana Y, Schust DJ: Female steroid hormones utilize Stat protein-mediated pathways to modulate the expression of T-bet in epithelial cells: a mechanism for local immune regulation in the human reproductive tract. *Mol. Endocrinol.*, 19(8): 2047-2059, 2005.

##### 2. 学会発表

- 1) Kawana K, Shen L, Yang HX, Ficarra M, Kawana Y, Xu S, Patel RN, Blumberg RS, Quayle AJ, Schust DJ: CD1d degradation upon *Chlamydia trachomatis* infection is proteasome-dependent and may promote persistent infection, *Society for Gynecologic Investigations (SGI), 2005 Annual Meeting*, Mar., Los Angeles, **President Presenter's Award**
- 2) Kawana K, Kawana Y, Ashby RK, Huddleston HG, Xu S, Patel RN, Glimcher LH, Schust DJ: T-bet, a key transcriptional factor for Th1 development, is expressed and regulated via Stat family in the epithelial cells of the reproductive tract, *American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 60<sup>th</sup> Annual Meeting*, Oct., 2004, Philadelphia, **Reproductive Immunology Special Interest Group Prize**
- 3) 川名 敬、生殖器における粘膜免疫機構と性行為感染症、第 18 回日本性感染症学会学術大会、教育講演、2005、北九州
- 4) 川名 敬、松本順子、三浦紫保、佐藤英貴、永松 健、藤井知行、武谷雄二 Schust DJ、NKT cell のリガンド分子である CD1d の生殖器粘膜における発現パターンと機能解析に関する検討、第 19 回日本生殖免疫学会学術集会、2006、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

I. 参考文献

特になし。

## 分担研究報告書

### HCV ゲノム複製を支配するウイルス及び細胞側因子の解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染により発症する肝がんの予防・治療には感染持続するウイルスの排除が重要である。本研究においては HCV ゲノム複製を制御する細胞側要因を明らかにする目的で、HCV ゲノム自立複製細胞を用いて宿主因子の解析およびサイクロスポリン、その誘導体による抗 HCV 効果に関する研究を行った。また、効率よく HCV 感染・複製する系の開発のために、ヒト肝臓由来の細胞を樹立してそれを用いた HCV 複製を調べた。

#### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子のひとつである。HCV 感染がどのようにしてこれらの疾患を誘発するかには不明な点が多い。一方、HCV 感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのために、これまでに樹立した HCV サブゲノムが効率よく自立複製する細胞を用いて、複製を制御する細胞側の因子の解析を行う。また、これまでのスクリーニングから得られた抗 HCV 作用を示した薬剤に対して、詳細な抗 HCV 効果を調べる。一方、HCV 感染・複製する培養細胞を開発する目的で、ヒト肝臓細胞を不死化して新たな細胞株を樹立し、それを用いて、患者由来の HCV 感染・複製研究に供する。

#### B. 研究方法

(1) 抗 HCV 作用を示す化合物の探索のための HCV ゲノム自立複製細胞系の開発。

HCV を効率よく感染・複製させる系がないために HCV ゲノムが自立的に効率よく複製する細胞を用いて、その複製を制御する種々の因子を明らかにする。そのために、まず、HCV の全長、部分ゲノムが効率よく自立複製する細胞を樹立する。さらにウイルスゲノム複製を簡便に測定するために

ルシフェラーゼ活性を指標にして解析できる系を用いてアッセイを行う。

(2) シクロフィリン誘導体による抗 HCV 効果

シクロスポリンが強く抗 HCV 効果を示すことを明らかにしたが、この効果がウイルスの遺伝子型を超えて発揮されるか否かについて調べる。現状で入手可能なレプリコン細胞を用いて、シクロスポリンおよびその誘導体を処理することによる抗 HCV 効果をウイルス RNA の量の変化を調べることにより評価する。

(3) HCV 感染を評価するための培養細胞の樹立。

これまでに得られている、培養細胞を用いた HCV 感染・複製系は HuH7 細胞に限られている。また、HCV-2a 型に由来する特定の遺伝子配列を持ったレプリコンに限定されている。従って、患者血清中に存在するウイルスがどのような感染様式を取るかについては、解析する手段がない。そこで、HCV 感染の宿主を開発することにより、この問題を解決することを考えた。このことにより、Huh7 細胞が何故 HCV 感染の感受性が高いのかについても、一定の解答が得られると考えられる。そこで、できるだけ HCV 複製の自然環境に近い細胞として、ヒ

ト肝臓細胞を不死化して細胞株として樹立する。それを用いて、HCV 感染・複製の指摘条件を探るために、自然免疫に関する因子を人為的に制御して調べる。

### C. 研究成果

(1) 抗 HCV 作用を示す化合物の探索のための HCV ゲノム自立複製細胞系の開発。

HCV 複製を効率よく行わせ、その分子機構を解析する系として、HCV レプリコン細胞の樹立を行った。それぞれ、部分ゲノムおよび全ゲノムからなる HCV レプリコン RNA を構築し、それらに薬剤耐性マーカーの遺伝子を導入したのを調製した。これらの配列は、既に報告されているものとは、異なる。いずれも HuH7 細胞にトランスフェクトすることにより、効率よく自立複製する細胞を得ることができた。

(2) シクロフィリン誘導体による抗 HCV 効果

シクロスポリンが強く抗 HCV 効果を示すことを明らかにしたが、この効果がウイルスの遺伝子型を超えて発揮されるか否かについて調べて、現状で入手可能なレプリコン細胞は、HCV-1b と HCV-2a を基にしたものである。異なる配列からなる HCV-1b を基にしたレプリコン細胞 4 種類と HCV-2a を基にしたレプリコン細胞 2 種類について、シクロスポリンとその誘導体 NIM811 の抗 HCV 効果を調べた。その結果これらの薬剤の用量依存的にウイルスゲノム複製は抑制された。HCV-1b と HCV-2a レプリコン細胞の抑制割合を調べると、HCV-1b では CsA の濃度が 1 マイクログラム/ml で約 10 分の 1 まで低下するのに対して、HCV-2a では 3 分の 1 に低下した。このことは両者のウイルスが CsA およびその誘導体に感受性を示すにもかかわらず、遺伝子型により差があることを示す。HCV-2a 遺伝子型レプリコン細胞では、HCV-1b レプリコン細胞と異なり、シクロフィリン B を抑制してもウイルスゲノム複製は低下しない。このことは、HCV-2a の NS5B は HCV-1b のそれと異なり、シクロフィリン B で構造変化を受ける前から既に活性化状

態になっている可能性が考えられる。

一方、シクロスポリンとインターフェロンの共存状態による抗 HCV 効果を調べた。その結果、シクロスポリンとインターフェロンの共存により、相加的に抗 HCV 効果を示す場合と、相乗効果を示す場合があることがあることが明らかになった。

免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体、NIM811 に強い抗 HCV 効果が見られ、インターフェロンと共に HCV レプリコン細胞を処理すると、シクロスポリンの場合に比べ低用量で効果を示すことがわかった。

(3) HCV 感染を評価するための培養細胞の樹立。

HCV 感染・複製はウイルス側の要因以外に、宿主細胞の種類によっても大きく影響を受ける。これまで培養細胞を用いた効率の良い HCV 感染増殖系は、HuH7 細胞だけである。そこで、HuH7 細胞の何が HCV を効率よく複製させるのか、を明らかにするために、ヒト肝臓細胞を不死化し、その細胞を用いた HCV 複製を解析した。

まず、京都大大学倫理委員会から承認を得て、肝臓移植の際の肝臓組織を入手した。そこからヒト細胞を調製し、これを HPVE6/E7 で不死化した。不死化細胞の形質はポリオーマウイルスの LT で不死化した場合よりも穏やかで、細胞は平面に増えるが、重なり合うことはなかった。

本細胞を用いて、HCV 感染実験を行った。既に報告されている感染性 HCV レプリコン (JFH1) は感染性を示した。一方、慢性 C 型肝炎患者由来の血清を用いた HCV 感染実験においても、HCV の感染増殖が見られた。感染効率は JFH1 よりも低いが、インターフェロンあるいはシクロスポリンによる複製抑制を評価できるほどであった。

### D. 考察

HCV ゲノム自立複製細胞はウイルスの複製増殖機構の解析に役立つ。これまでにウイルスゲノム複製を制御している細胞側要因を明らかにする目的で、すでに薬理機能が明らかかな薬による抗 HCV 効果を調べた。

その結果サイクロスポリンに加え、細胞のシグナル系 (TGF ベータ、ERK 経路) に作用する薬剤も抗HCV作用を示すことが分かった。一方シクロスポリンおよびその誘導体、NIM811 は、抗HCV作用を示すものの、遺伝子型の違いにより効果に違いが見られることも分かった。また、シクロスポリンによる抗HCV効果はHCVの遺伝子型により異なることも明らかになった。少なくともHCV NS5B に対するサイクロフィリンBの働きが遺伝子型により異なる可能性が示唆された。

効率よいHCV複製を培養細胞を用いて再現させるために、HuH7細胞以外の培養細胞の樹立を試みた。ヒト肝臓細胞を不死化して樹立した細胞、HuH7は慢性C型肝炎患者の血清由来のHCVにも感受性を示した。本細胞の自然免疫に関与するIRF7を抑制した細胞においては、とくに高い感染性を示した。

#### E. 結論

現在慢性C型肝炎患者に対するPEG-インターフェロンとリバビリンを併用することによる治療成績は5割近くになっており、HCV感染は治療できると疾患のひとつであるといえる。今後、HCV感染による細胞の増殖制御を明らかにしつつ、抗HCV作用を持つ薬剤のスクリーニングは、HCVによる肝炎発症、および肝発がんの予防に役立つ。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Biol Chem.* 281(30):20788-20800, 2006.

Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):988-994, 2006.

Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis

C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):879-884,2006.

Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* 80 :3332-3340, 2006

Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR, Nakayama J, Okano M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells.* 11(7):805-814, 2006.

Suzuki H, Kaneko H, Tamai N, Miyano-Kurosaki N, Hashimoto K, Shimotohno K, Takaku H. Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 49:339-340, 2005.

Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.

Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.

Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 :869-878, 2006

Hamazaki H, Ujino S, Abe E, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. RNAi expression mediated inhibition of HCV replication. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 48:307-308, 2006.

Komohara Y, Yano H, Shichijo S, Shimotohno K, Itoh K, Yamada A. High expression of



- APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol.* 37(8-9):327-332, 2006.
- Hamazaki H, Takahashi H, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of hcv replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(7):801-805, 2006.
- Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
- Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007

C型肝炎ウイルスコア蛋白質のプロテアソーム依存的分解機構の解析

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究協力者 勝二 郁夫 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究要旨 ユビキチンリガーゼ E6AP は HCV コア蛋白質のユビキチン化、選択的分解に働く。種々の遺伝子型のコア蛋白質は、共通に E6AP と結合しプロテアソーム依存的に分解された。ユビキチンシステムが HCV 産生を調節することを初めて明らかにした。この機構により、HCV の過剰産生が抑制され免疫監視システムから逃れ持続感染の成立に寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質は、ヌクレオキャプシド蛋白質としてウイルス粒子形成を担っていると同時に、HCV の翻訳抑制に働くこと、宿主細胞の遺伝子発現、アポトーシス、脂質代謝調節などに影響を及ぼすことが明らかとなっている。コア蛋白質の成熟化、機能発現調節の分子機構を明らかにすることは、HCV の生活環及び病原性を理解する上で極めて重要である。本研究では、コア蛋白質結合因子として同定されたユビキチンリガーゼ E6AP によるコア蛋白質のユビキチン修飾とプロテアソーム依存的な蛋白分解機構とその生理的意義を解析した。

B. 研究方法

1) ユビキチン・プロテアソーム系による蛋白分解機構の解析

E6AP 野生型あるいは不活性型変異体を FLAG tag 付加コア蛋白質（genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a）と共に細胞内で発現させコア蛋白質の steady-state level をウエスタンブロット法で解析した。コア蛋白質のユビキチン化は各コア蛋白質と HA 付加ユビキチンを共発現させ、免疫沈降—ウエスタンブロット法によって解析した。

2) コア蛋白質—E6AP の相互作用解析

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

3) HCV 感染増殖細胞系を用いた E6AP 依存的なコア蛋白分解の解析

HCV JFH-1 クローンのゲノミック RNA を Huh-7 細胞へトランスフェクションし培養上清よりウイルスストックを調製した。HCV を感染させた Huh-7 細胞（Scripps 株）に E6AP を強制発現させ、細胞内のコア蛋白質および HCV RNA レベル、また感染性ウイルスタイターを測定した。また、感染細胞へ siRNA を導入することにより、E6AP の機能阻害によってコア蛋白質レベル及び感染性ウイルス産生がどのように変化するかを検討した。

C. 研究結果

昨年度、エピトープタグアフィニティ精製法によるスクリーニングからコア蛋白質結合因子として新たに同定された E6AP が、コア蛋白質のユビキチン化、選択的分解に働くことを、E6AP の強制発現、E6AP siRNA による機能阻害

等の実験から明らかにした。さらに、コア蛋白質と E6AP の欠損変異体を用いた GST pull-down assay 等により、コア蛋白質—E6AP の相互作用には、コア蛋白質の aa 58-71 領域及び E6AP の aa 418-517 領域が重要であることが明らかとなった。

HCV には 6 種類の genotype (1~6) がありそれぞれに数種類の subtype が存在する。そこで、種々の HCV genotype, subtype 由来のコア蛋白質の aa 58-71 領域のアミノ酸配列を比較したところ、この領域の配列がよく保存されていること、特に aa 58-66 領域は配列を調べたすべてのコア蛋白質で完全に一致することがわかった (図 1)。そこで、genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a の各コア蛋白質の E6AP 依存的な不安定化を調べたところ、E6AP 発現によってどの genotype のコア蛋白質も同等に不安定化されることが明らかとなった。さらに、aa 58-66 領域を欠損させたコア蛋白質変異体を使った解析から、E6AP 依存的なコア蛋白質のユビキチン化および分解には aa 58-66 領域が重要であることが示された。

次に、プロテアソームによるコア蛋白質の分解が HCV の生活環においてどのような役割を果たしているかを明らかにするため、HCV の感染増殖細胞に野生型または不活性型変異体の E6AP を発現させウイルス産生への影響を調べた (図 2)。その結果、E6AP 発現細胞では HCV 感染後 7 日目には細胞内のコア蛋白質量およびウイルス産生量はコントロール細胞または不活化 E6AP 発現細胞に比べ有意に低下した。一方、感染増殖細胞に E6AP に対する siRNA を導入したところ、細胞内コア蛋白質レベルの上昇とともに感染性ウイルスの産生も亢進することが明らかとなった。

#### D. 考察

HCV 蛋白質の中ではこれまでコア、E2、NS5B 蛋白質などがプロテアソームによって選択的に分解されることが報告されてきたが、その分子機構はほとんど不明であった。本研究から、HCV 蛋白質のユビキチン化を担う E3 ユビキチンリガーがはじめて同定された。HCV は多くの

genotype, subtype を持つウイルスであるが、E6AP との相互作用に必要な領域のアミノ酸配列はすべての genotype で完全に一致しており、実際、5 種類の HCV クローンを用いた解析から、E6AP 依存的なコア蛋白質分解機構は、多様性に富む HCV 株で共通に働くことが示された。さらに、HCV 増殖細胞系において、E6AP を高発現させることによりウイルス産生レベルは低下し、E6AP をノックダウンした場合、ウイルス産生は増加することも見出された。HCV 感染症の特徴のひとつは高率に持続感染することである。E6AP 依存的なコア蛋白質分解機構は HCV の過剰増殖を抑制する役割を担い、これにより免疫系からのエスケープ、さらに持続感染の成立につながる可能性が考えられる。

#### E. 結論

E6AP 依存的なコア蛋白質のユビキチン化および分解にはコア蛋白質の aa 58-66 領域が重要であり、そのアミノ酸配列はすべての HCV genotype で保存されている。このコア蛋白質分解機構によってウイルス産生は負に制御される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).

- 3) 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).
  - 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 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).
  - 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: 5015-25 (2006).
  - 6) 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).
  - 7) 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).
  - 8) 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).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) 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).
  - 12) Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434-445 (2006).
  - 13) 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).
- F. 知的所有権の出願・登録状況