

HCV RNA 複製系を改良して、より解析のしやすい実験系および抗 HCV 剤の探索システムを開発することを目的とする。また、本研究では HCV の持続感染に密接に関与していると考えられている HCV 蛋白質と IFN システムとの関係についても詳細に解析を行い、HCV 持続感染機構の解明に迫ることを目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV RNA 複製における適応変異解析

HCV RNA の複製効率の測定にはルシフェラーゼアッセイ法を用いた。ルシフェラーゼアッセイ法では NS3 領域にそれぞれ変異を導入した全長 HCV RNA の他にルシフェラーゼ遺伝子を含むように改変した HCV RNA を人工的に合成し、Oc 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入した後に経時的に (1-3 日) 上昇してくるルシフェラーゼ活性を測定した。

全長 HCV RNA 複製細胞である O, OA, OB, OD および OE 細胞を G418 (0.3 mg/ml) 存在下、DMEM 培地 (10%FBS) にて長期に培養した。1 週間ごとに 50-70 倍希釈による継代を繰り返し、最長 2 年間培養した。

培養開始 1 年後或は 2 年後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HCV RNA を増幅した。逆転写酵素として Superscript III を使用して cDNA を作成し、KOD-plus DNA polymerase により PCR を行った。NS 全領域 (6.1 kb) をカバーする DNA 増幅産物を pBR322MC ベクターの XbaI 部位に導入して、O~OE について、それぞれ独立的に得られた 3 クローンの全塩基配列の決定を行い、相互に比較解析した。

(2) HCV RNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム

OR6 細胞を各種培地にて培養し、培地の違いにより HCV RNA の複製レベルが変化するかどうかを検討した。通常の DMEM 培地に 100 nM の sodium selenium を加えた培地を基本にし、そ

れらに FBS (0.1, 1, 5 および 10%)、Insulin (3 および 10 μ g/ml)、Linoleic acid (3 および 18 nM)、Oleic acid (3 および 18 nM)、LDL (50, 100 および 200 μ g/ml) 或は Lipid-rich albumin (LRA: 0.5, 1 および 2 mg/ml) を加えた培地で OR6 細胞を培養した。培養開始後 24 時間および 96 時間後のルシフェラーゼ活性を測定比較した。

OR6 細胞を FBS (0.1, 1, 5 および 10%) 或は LRA (0.5, 1 および 2 mg/ml) 存在下、長期に培養し、経時的にルシフェラーゼ活性を測定した。また、長期継代した細胞における HCV コアや NS3 タンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した。

抗 HCV 剤の効果を調べるために OR6 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 ずつ 24 ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤 (シクロスポリン、フルバスタチンや IFN- α など) を添加して 72 時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。これらの実験は少なくとも 3 回行った。

(3) 生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを評価するシステム

EGFP 遺伝子を複製可能な全長 HCV RNA の Neo^R 遺伝子の前に挿入した plasmid より RNA を作成して、OR6c 治癒細胞にエレクトロポレーション法により導入して得られた G418 耐性細胞 (OGN/C-5B/KE7) を用いて HCV RNA の複製レベルを調べた。

EGFP 遺伝子の発現による蛍光強度はフェノールレッドを含んでいない培地下で培養した細胞を 485 nm で励起し、510 nm の蛍光強度をフルオロシキアンアセントにより測定した。

別途、LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により細胞内の HCV RNA を定量した。HCV タンパク質についてはウェスタンブロット法により検出した。

抗 HCV 剤の効果を調べるために OGN/C-5B/KE7 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 ずつ 24 ウェルプレートに蒔き込み翌日に、各種薬剤 (シクロス

ポリン、フルバスタチンや IFN- α など) を添加して 72 時間後に細胞の蛍光強度と LightCycler を用いた RT-PCR 法により HCVRNA の定量を行った。これらの実験は少なくとも 3 回行った。

(4) 1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質

HCV-0 (1b 型) と JFH1 (2a 型) RNA のシスエレメントとして知られている 5' UTR (340 塩基)、CRE (NS5B 領域に存在する 46 塩基) および 3' UTR (オリゴ U + 3' X 98 塩基) をお互いに交換したキメラ HCV RNA を作成して、OR6c 或は RSc 治癒細胞に導入して、HCVRNA の複製レベルや細胞の培地中に産生されるコアタンパク質や HCV 粒子の感染性を調べた。

(5) HCV 持続感染機構の解析

IFN- β 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイは以下に示す方法により行った。

PH5CH8 細胞を 1 ウェルあたり 1.5×10^5 ずつ 6 ウェルプレートに蒔き込み、翌日に pCXbsr レトロウイルス発現ベクター (Myc-TRIF, Myc-Cardif, NS3-4A など) $2 \mu\text{g}$ 、レポータープラスミド (pIFN- β (-125)-Luc) $0.5 \mu\text{g}$ および pRL-CMV internal control ベクター 1 ng を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。培養 48 時間後に Dual-Luciferase Assay を行った。

IRF3 の二量体解析は、回収した祖蛋白質画分を Native-PAGE にて分離して IRF3 抗体により検出した。

Myc-TRIF および Myc-Cardif 分子の切断状況については、抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はな

かった。但し、細胞および核酸については、高圧蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) HCV RNA 複製における適応変異解析

昨年度、5 種類の全長 HCVRNA 複製細胞 (0, 0A, 0B, 0D 及び 0E) を用いた遺伝子解析において見出された NS3 領域内の適応変異 (Q1112R, P1115L, E1202G および K1609E) について、それらを組み合わせると HCVRNA の複製効率がどのように変化するかについて解析した。

2 種類の適応変異を有する数種類の全長 HCV RNA を作成し、治癒細胞 0c に導入して解析した結果、Q1112R と K1609E の組み合わせと Q1112R と P1115L の組み合わせが HCV RNA の複製レベルを上昇させることが分った。細胞に導入後 24 時間の値と比較すると導入後 96 時間では約 10 倍に上昇することが分った。適応変異のこれら以外の組み合わせでの最高は 6 倍程度であり、K1609E などの適応変異 1 個だけだと、約 2 倍程度にしか上昇しなかった。

0~0E 細胞までの 5 種類について、1 年間および 2 年間培養した後にこれらの細胞内で複製している HCVRNA の塩基配列を決定して (各細胞から 3 クローンずつ)、培養開始前 (樹立時) の塩基配列と比較した。非構造領域におけるアミノ酸置換を伴う変異部位を特定して、経時的変化を解析した。その結果、各細胞において、NS3 領域に最初に観察された適応変異に加えて、経時的に新たな適応変異が NS3 領域に出現してくることが分った。アミノ酸置換を伴う変異は全非構造タンパク質内に経時的に蓄積してくることが確認されたが、それらの部位は不均一で NS5A 内のドメイン I (亜鉛配位領域) や NS5B のポリマーゼ活性触媒部位においては、ほとんど変異は観察されなかった。これらとは対照的に NS5A の C 末端部では変異が集中的に認められた。

(2) HCV RNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム

OR6 細胞は細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することにより HCVRNA の複製レベルを定量的に評価できることを利用して、無血清培地で HCVRNA の複製を維持できる可能性について調べた。OR6 細胞自体は、DMEM+Selenium により増殖維持されるが、HCVRNA の複製レベルは低下してしまう。しかしながら、この培地に LDL 又は LRA を添加した培地の場合、FBS 存在下とほぼ同程度の HCV RNA の複製が維持されるようになることを見出した。比較的安価である LRA を用いて、LRA の存在により長期間 HCV RNA の複製が維持されるかどうかの検討を行った。その結果、LRA (0.5~2 mg/ml) を存在させると、少なくとも1ヶ月間 HCV RNA の複製レベルは FBS を用いた場合と同程度に維持されることを見出した。添加物として Selenium+LRA のみで1ヶ月間培養した細胞においても、HCV コアや NS3 タンパク質の発現レベルは高く、ウェスタンブロット法による解析でも明確なバンドが得られた。

このような LRA 添加無血清培地で培養された OR6 細胞と通常の FBS (10%) 存在下で培養された OR6 細胞における抗 HCV 剤 (シクロスポリン、フルバスタチンおよび IFN- α) の効果に差があるかどうかを比較検討した。その結果、シクロスポリンと IFN- α に関しては、LRA 添加無血清培地の方が強い抗 HCV 効果を示すことが分かった。しかし、フルバスタチンに関しては、逆に LRA 添加無血清培地において効き目が弱くなることがわかり、培地が違くと抗 HCV 剤の効果が異なってくることが明らかとなった。

(3) 生細胞のまま HCV RNA の複製レベルを評価するシステム

EGFP をコードする領域を含む全長 HCVRNA が複製している OGN/C-5B/KE7 細胞を樹立し、その細胞におけ HCVRNA の複製レベルを調べた。

その結果、細胞の蛍光強度が播種後経時的に増加することが確認され、ウェスタンブロット法による解析で各種 HCV タンパク質も検出され、それらの発現レベルは全長 HCVRNA 複製細胞である O 細胞と同程度であった。

OGN/C-5B/KE7 細胞を用いて IFN- α による HCV RNA の複製抑制効果を定量的に測定できるかどうかを調べた。IFN- α (1, 10, 100 IU/ml) 添加3日後に蛍光強度を測定したところ、IFN- α の濃度に依存して蛍光強度の減弱が観察され、その程度は定量的 RT-PCR で算出した HCV RNA 量の低下率とほぼ一致していた。また、ウェスタンブロット法による解析でもコアや NS3 タンパク質の発現量の低下が観察された。HCV RNA の複製抑制効果が知られている IFN- β 、IFN- γ 、シクロスポリンおよびフルバスタチンについても IFN- α と同様のアッセイを行い、蛍光強度の低下率と HCV RNA 量の低下率が一致していることを確認した。

以上の結果、この樹立した細胞の蛍光強度を測定することにより、HCVRNA の複製レベルを定量化することができることが分かり、抗 HCV 剤の活性評価を簡便に行える細胞培養システムであることが明らかとなった。

(4) 1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質

全長 HCV-0 (1b 型) RNA を OR6c と RSc 治癒細胞 (異なる全長 HCV RNA 複製細胞クローン由来) に導入すると、OR6c 細胞では HCV-0 RNA の複製が活発に起こるが、RSc 細胞ではほとんど複製しないことが分かった。しかしながら、これとは対照的に JFH1 (2a 型) RNA を OR6c 細胞に導入した場合は JFH1 RNA の複製が起こらず、RSc 細胞に導入した場合にのみ JFH1 RNA の複製が起こることが観察された。また、JFH1 RNA を導入した RSc 細胞からは、長期間 (少なくとも5ヶ月間) 感染性の HCV 粒子の産生が認められた。以上の結果、OR6c 細胞では HCV-0 RNA が

効率的に複製し、RSc 細胞では JFH1 RNA が効率的に複製することが明らかとなり、両者に細胞指向性が存在することが示唆された。

HCV RNA の複製効率に関与すると考えられる 3 種類のシスエレメント (5'UTR, CRE, and 3'UTR) の塩基配列を HCV-0 RNA と JFH1 RNA で比較すると、それぞれ 26 塩基、6 塩基、4 塩基 (3'X のみ) 異なることから、それぞれの部分をお互いに置換した 7 種類 (計 14 種類) のキメラ HCV-0 RNA およびキメラ JFH1 RNA を作成した。キメラ HCV-0 RNA は OR6c 細胞に、キメラ JFH1 RNA は RSc 細胞に導入し、9 日目にコアタンパク質の発現量を W ウェスタンブロット法により解析した。その結果、キメラ HCV-0 RNA の場合は、JFH1 由来の CRE を置き換えても、HCV RNA の複製にはそれほど影響が生じなかったが、5'UTR を JFH1 のものに置き換えた場合には、HCV RNA の複製レベルがかなり低下し、3'UTR を JFH1 のものに置き換えた場合には HCV RNA の複製は起こらなくなることが分った。このような HCV RNA 複製抑制効果はキメラ JFH1 RNA においても観察された。特に、3'UTR を置換するとその効果が顕著に観察された。しかしながら、CRE を HCV-0 のものに置換した場合には、逆に野生型 JFH1 よりも HCV RNA の複製効率が上昇していることも明らかとなった。このような現象は、キメラ JFH1 HCV 導入細胞から産生されるキメラ HCV 粒子の量 (コアタンパク質を定量) と RSc 細胞への感染性を調べることによっても確認された。HCV-0 由来の CRE を有するキメラ JFH1 RNA を導入した RSc 細胞では、野生型 JFH1 RNA 導入細胞より約 4 倍のコアタンパク質が導入後 6 日目の培養上清より検出され、感染性 HCV 粒子の量も野生型 JFH1 よりも多いことが分った。

(5) HCV 持続感染機構の解析

昨年度、PH5CH8 細胞を用いた解析で二本鎖 RNA (dsRNA) の細胞外からの添加による IFN- β 遺伝子の活性化は NS3-4A ではほとんど抑制されな

いことを見出した。このメカニズムとして、従来の Galeらの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:2992-2997, 2005) とは異なり、NS3-4A が TRIF 分子を切断できないためではないかという可能性が考えられた。そこで、この点を明らかにするために、PH5CH8 細胞に Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させ、IFN- β 遺伝子 promoter を用いたレポーターアッセイを行った。Myc-TRIF を発現させると IFN- β 遺伝子 promoter 活性は約 1,200 倍程度上昇した。しかし、この状態で NS3-4A を共発現させても、promoter 活性の阻害はまったく認められなかった。IRF3 の 2 量体 (活性化型) の形成についての解析においても、NS3-4A による阻害効果は認められなかった。これらのことから、NS3-4A は TRIF を介するシグナル伝達経路を抑制しないことが明らかとなった。

次に、Myc-TRIF と NS3-4A を共発現させた PH5CH8 細胞において Myc-TRIF が切断されているかどうかを調べた。その結果、Myc-TRIF 分子はまったく切断されていないことがわかった。対照として行った Myc-Cardif と NS3-4A を発現させた場合においては、NS3-4A により IFN- β 遺伝子 promoter 活性は完全に抑制され、Myc-Cardif の切断も起こっていることが確認された。

D. 考察

(1) HCV RNA 複製における適応変異解析

今回、NS3 領域の適応変異は 1 種類よりも 2 種類を組み合わせるとさらに HCVRNA の複製効率が增大することを明らかにした。これらの適応変異の組み合わせと同じ変異が 0~OE 細胞を長期に培養した場合にも出現してくることがわかったことから、細胞の長期培養は細胞内での HCVRNA の複製効率を上昇させるように働くのではないかと予想される。これらの適応変異と NS3 プロテアーゼ活性の強さなどとの関係に相関が

あるかどうかについての解析が今後必要である。また、NS3 領域に多く認められる適応変異がなぜ HCVRNA の複製効率を上昇させるのかを追究することによっても、さらに複製効率の良いシステムの開発につながるかもしれない。そのようなシステムの開発は、世界でも未だ成功していない 1b 型の感染性 HCV 粒子の大量生成につながる可能性がある。また、遺伝的多様性を有する HCVRNA 集団は HuH-7 細胞以外のヒト肝細胞でも複製増殖する可能性があることから、そのような肝細胞株の樹立のためにもよい材料と言える。

(2) HCVRNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム

今回、LRA を添加すると無血清培地においても、HCVRNA の複製を維持できることを見出したことから、この培養システムは感染性ウイルス粒子の精製などに威力を発揮するのではないかとと思われる。また、抗 HCV 剤の活性評価についても、通常の FBS 存在下における結果とかなり異なっていたことから、結果を一定に保つ (FBS のロットによっても大きく異なる可能性があるため) ためにも無血清培地での抗 HCV 活性評価が必要になる可能性がある。

(3) 生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを評価するシステム

樹立した OGN/C-5B/KE7 クローン細胞における蛍光強度と HCVRNA 量の変動がよく連動していたことから、この細胞の蛍光強度の推移を測定することにより、HCVRNA の複製レベルを生細胞のままモニターできるアッセイシステムであることが確認された。今後はこのシステムを用いることにより、様々な物質の抗 HCV 活性を調べることができるのではないかとと思われる。今後の課題としては、NS3 領域の K1609E 適応変異の他にもう 1 つ新たな適応変異 (Q1112R や P1115L など) を加えて HCVRNA の複製レベルを上昇させることができれば、より蛍光強度が上

昇することにより、抗 HCV 活性の評価もより容易になるものと考えられる。

(4) 1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質

異なる遺伝子型のシスエレメントをお互いに交換したキメラ HCV RNA の複製レベルの解析から、野生型 HCV より複製効率が高まったり、逆に複製がまったく起こらなくなったりするケースがあることから、わずかの塩基配列の違いが複製効率に大きく影響するものと考えられる。特に、3'X を含む 3'UTR の影響が大きいことから、さらに詳細に解析することにより、どの部分が直接関わっているかを明らかにする必要がある。

今回えられた情報は、未だ成功していない 1b 型の感染性 HCV 粒子の産生システムの開発に役立つものと思われる。

(5) HCV 持続感染機構の解析

これまで、NS3-4A は IFN- β 産生システムにおいて重要な役割を果たしている Cardif や TRIF 分子を切断することで、Cardif を介するシグナル伝達系と TRIF を介するシグナル伝達系を遮断することにより、IFN- β の産生を阻止すると報告されて来た。しかしながら、今回ヒト不活化肝 PH5CH8 細胞を用いた解析により、Cardif を切断する NS3-4A の活性は確認できたが、TRIF を切断する活性はないことが判明した。この点は過去の報告を修正する必要があると思われ、実際の肝細胞における NS3-4A の IFN- β 産生抑制効果は完全ではないと思われる。特に、TLR3 が表出している細胞においては NS3-4A は抑制的に作用しないものと思われる。しかしながら、その場合でも、NS3-4A 以外の HCV 関連分子が作用する可能性も考えられることから更なる検討が必要である。

E. 結論

(1) HCV RNA 複製における適応変異解析

NS3 領域の適応変異の組み合わせで HCVRNA の複製がさらに高まることを明らかにした。これらの適応変異は HCVRNA 複製細胞の長期培養により出現し蓄積されることを明らかにした。

(2) HCVRNA 複製細胞の無血清培地を用いた培養システム

Lipid-rich albumin を加えた無血清培地により HCVRNA 複製細胞を長期に培養できるシステムを開発した。

(3) 生細胞のまま HCVRNA の複製レベルを評価するシステム

可視化遺伝子を全長 HCVRNA 複製系に導入して、生細胞のまま蛍光強度を測定することで HCVRNA の複製レベルを定量できる培養システムを開発し、抗 HCV 剤のアッセイ系としても有効であることを示した。

(4) 1b 型と 2a 型 HCV のキメラウイルスの作成とその性質

HCV-0(1b)RNA と JFH1(2a)RNA の複製には細胞指向性があることを示した。1b 型と 2a 型 HCV のシスエレメントを入れ換えたキメラ HCV を作成し、HCV の複製に及ぼす影響を明らかにした。

(5) HCV 持続感染機構の解析

従来の報告とは異なり、NS3-4A は TRIF を切断することができず TRIF を介するシグナル経路を抑制しないことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain 0 of genotype 1b) replication. *Virus Res.* in press, 2007.

Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, and Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* in press, 2007.

Abe K, Nozaki A, Tamura K, Ikeda M, Naka K, Dansako H, Hoshino H, Tanaka K, and Kato N. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol. Immunol.* 51: 117-125, 2007.

Yuasa K, Naganuma A, Sato K, Ikeda M, Kato N, Takagi H, and Mori M. Zinc is a negative regulator of hepatitis c virus RNA replication. *Liver Int.* 26: 1111-1118, 2006.

Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, and Kato N. Different Anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44: 117-125, 2006.

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

Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, and Hotta H. NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 87: 1703-1710, 2006.

Naka K, Dansako H, Kobayashi N, Ikeda M, and Kato N. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing

interferon- β via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* 346: 348-362, 2006.

Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, and 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.

2. 学会発表

是永 匡紹、安藤 美恵、原 裕一、池田 正徳、加藤 宣之、日野 啓輔、坂井田 功. HCV genomic replicon を用いたミトコンドリア機能解析. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.

湯浅 和久、長沼 篤、高木 均、鈴木 秀幸、柿崎 暁、佐藤 賢、市川 武、蘇原 直人、森 昌朋、池田 正徳、加藤 宣之. C型慢性肝炎に対する亜鉛補充療法. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.

池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. HCV-0 (1b) と JFH1 (2a) のシスエレメントキメラウイルスの作成とそれらを用いた HCV 複製効率規定領域の解析第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.

團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、加藤 宣之. HCV RNA の複製レベルを生細胞のまま定量できる新しい評価システムの開発. 第65回 日本癌学会総会、横浜、2006年9月.

阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之. HCV RNA の複製を著しく亢進させる適応変異の組合せの同定. 第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.

渡士 幸一、後藤 覚、土方 誠、脇田 隆

字、加藤 宣之、下遠野 邦忠. シクロフィリン阻害剤による C 型肝炎ウイルス複製の抑制. 第65回 日本癌学会総会、横浜、2006年9月.

Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, and Kato N. Combination of cell-adaptive mutations causes the drastic enhancement of genome-length HCV RNA replication. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

Abe K, Nozaki A, Tamura K, Ikeda M, Naka K, Dansako H, Hoshino H, Tanaka K, and Kato N. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-HCV peptide enhance the antiviral activity. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

9) Dansako H, Ikeda M, Abe K, and Kato N. Development of a new cell-based assay for monitoring HCV RNA replication level with living cells. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

Takemoto K, Dansako H, Naka K, Ikeda M, and Kato N. Comparative analysis of inhibiting activities against IFN-beta production of NS3-4As derived from patients with different hepatic conditions. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

Ikeda M, Abe K, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Production and characterization of infectious HCVs from JFH1 (2a) with cis-element of HCV-0. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related

Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

Watashi K, Ishii N, Goto K, Hijikata M, Wakita T, Kato N, and Shimotohno K. Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporine A among strains. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.

阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之。全長 HCV RNA の効率的な複製を引き起こす NS3 領域の適応変異に関する解析。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之。全長 HCV RNA の複製を長期間維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。1b 型と 2a 型 HCV のシスエレメント領域のキメラウイルスを用いたウイルスの複製および粒子産生に関する解析。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之。C 型肝炎ウイルス NS3-4A 蛋白質のインターフェロナー β 産生阻害メカニズム。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、加藤 宣之。HCV RNA の複製を生細胞のまま観察できる培養システムの開発。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

山田 将士、池田 正徳、阿部 健一、團迫

浩方、加藤 宣之。ヒト肝癌由来の培養細胞における C 型肝炎ウイルスおよびエタノールの TGF-β 産生に及ぼす影響に関する解析。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

田村 一志、大上 厚志、田中 淳、清水 宣明、加藤 宣之、森川 昭廣、星野 洪郎。VSV/HCV pseudotype virus 感染系を用いた HCV 母子感染症例・小児 HCV 感染例の感染機構の検討。第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析

分担研究者 小池和彦 東京大学医学部（病） 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白がトランスジェニックマウスで肝発癌を惹起すること、肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の増加に深く関与していること、そして ROS の産生に関連が深いミトコンドリアにおいて、二重膜構造の変化ならびにコア蛋白の局在が認められることなどを報告してきた。これらの結果より、コア蛋白がミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにするため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白の発現の変化を解析した。ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、コア蛋白を発現する細胞と発現しないコントロール細胞を比較したところ、発現量が大きく変化する蛋白が複数認められた。これらの中でミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞で発現が高く、コア蛋白の存在によって安定性を増していた。今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、prohibitin を含むこれらの蛋白の発現変化が、ROS の増加、肝発癌に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白は、アポトーシスや細胞増殖などに関与していることが知られている。我々はこれまでに、コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスに肝発癌が認められたこと、コア蛋白が肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の増加に深く関与していること、そしてこの ROS の産生に深く関与しているミトコンドリアにおいて、二重膜構造の変化ならびにコア蛋白の局在が認められることなどを報告してきた。これらの結果から、コア蛋白が直接的もしくは間接的にミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。そこで、コア蛋白

により変動する遺伝子発現を明らかにして、コア蛋白発現後の細胞の変化を知るため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。

B. 方法

HCV コア蛋白を恒常的に発現する HepG2 (Hep39) 細胞から、Nycodenz discontinuous gradient を用いてミトコンドリア分画の精製を行った。ミトコンドリアの purity は以下の様に確認した。すなわち、精製したミトコンドリア蛋白を用いて Western blotting を行なったところ、コア蛋白とミトコンドリア蛋白

(complex I) は検出されたが、ER 蛋白 (OST48) は検出されなかった。

ミトコンドリア蛋白を二次元電気泳動した後、銀染色にて検出し、ImageMaster 2D Elite ver. 3.1 (Amersham) により発現量の違いを検討した。適当なスポットを切り出し、in-gel trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry を行い、蛋白の同定を行った。

同定された蛋白については、特異抗体が入手可能なものについては Western blotting を行ない、発現レベルを確認した。

C. 結果

ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、Hep39 とコア蛋白を発現しないコントロール細胞 (Hepswx) の間で比較したところ、発現量の違う蛋白がいくつか認められた。その中には、ミトコンドリアの電子伝達系に関与する蛋白、細胞周期に関わる蛋白などが含まれていた。これらの蛋白の発現量の違いを Western blotting により実際に確認した。

① 発現の上昇していた遺伝子

- 1) NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase a subunit precursor
 - 2) succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase
 - 3) GrpE-like protein co-chaperone
 - 4) similar to ATP synthase b polypeptide
 - 5) leucine aminopeptidase
 - 6) pyruvate dehydrogenase E1 component b subunit, precursor
 - 7) CG015alt2
 - 8) HSP70
 - 9) prohibitin
- など。

② 発現の低下していた遺伝子

- 1) aldehyde dehydrogenase 2
- 2) aldehyde dehydrogenase 5 precursor

3) BiP protein

4) HSP60 precursor
など。

Prohibitin に関しては、mRNA レベルでは増加していないこと、コア蛋白の存在によって安定性が増加していること、コア蛋白と相互作用すること、などを確認した。

D. 考察

今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、これらの蛋白の発現変化が、ROS の増加、ひいては肝発癌に寄与している可能性が示唆される。

Prohibitin に関しては、最近、ミトコンドリアに局在するだけでなく、核にも存在してステロイド受容体などの転写因子の発現を制御していることが明らかになってきており、細胞増殖との強い関連性が注目されてきている。今後は、この面からの詳細な検討を予定している。

E. 結論

コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにして、コア蛋白発現後の細胞の変化を知るため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。いくつかのミトコンドリア蛋白がコア蛋白によって発現に影響を受けていることが明らかになった。

HCV による病原性発現において、コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾が大きな意義を保持していることが示唆された。C 型肝炎における病態解明と病変進行の予防に重要

な発見と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koike K. Hepatitis C virus infection

presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance.

Intervirology 2006;49:51-57.

Koike K., Miyoshi H. Oxidative stress and

hepatitis C viral infection. Hepatol Res 2006;34:65-76.

Koike K. Oxidative stress and apoptosis in

hepatitis C: the core issue. J

Gastroenterology 2006;41:292-294.

Okuse C, Yotsuyanagi H, Nagase Y, Kobayashi

Y, Yasuda Y, Koike K., Iino S, Suzuki M, Itoh F. Risk Factors for Retinopathy

Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in

Patients with Chronic Hepatitis C. World J Gastroenterol 2006;12:3759-3759.

Koike K. Antiviral treatment of hepatitis

C: present status and future prospects.

J Infect Chemother 2006;12:227-232.

Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K,

Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike

K., Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas

in Japan. J Gastroenterol

2006;41:981-986.

Koike K., Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya

K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of Coinfection with Human

Immunodeficiency Virus and Hepatitis C

Virus in Japan. Hepatol Res 2007;37:2-5.

Koike K. Pathogenesis of HCV-associated

HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. Hepatol Res

2007 in press.

Koike K. Hepatitis C virus contributes to

hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. J Gastroenterol Hepatol 2007

in press.

Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S,

Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K., Matsuura Y. Hepatitis C Virus Core

Protein Induces Insulin Resistance

through a PA28_γ-Dependent Pathway. J

Virol 2007;81:1727-1735.

Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto

H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K., Matsuura

Y. Critical role of PA28_γ in hepatitis

C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Proc Natl Acad

Sci USA 2007;104:1661-1666.

Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms

underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis

B and C viruses. J Gastroenterol 2007 in press.

Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y,

Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike

K., Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-

resistant hepatitis B virus: A case report. World J Gastroenterol 2007 in

press.

2. 学会発表

- Moriishi K, Moriya K, Miyamoto H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatosis and hepatocarcinogenesis. p130, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Moriya K, Shinzawa S, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Iron-reactive overexpression of anti-oxidative heme oxygenase-1 is spoiled by the effect of HCV core protein in vivo. p131, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Miyoshi H, Moriya K, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Mitochondrial dysfunction by HCV core protein and its restoration by tacrolimus. p118, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Tsutsumi T, Tomobe K, Suzuki T, Mizumoto K, Miyamura T, Koike K: HCV core protein transactivates IL-8 via ATF-6 pathway. p188, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

C型肝炎ウイルスの粒子形成機構

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)粒子はコア（キャプシド）蛋白質と二つのエンベロープ蛋白質(E1 と E2)で構造される。E1 および E2 蛋白質はヘテロダイマーを小胞体膜上で形成し、コア蛋白質と共にウイルス粒子を形成すると推測されている。膜貫通アルゴリズムによる構造予測や糖鎖付加実験により、E1 蛋白質には一つの（タイプ 1）あるいは二つの膜貫通領域をもつ（ポリトピック）分子が存在し、二つのトポロジーを有した E1 蛋白質が共存することが示唆された。ポリトピックな E1 蛋白質には、288-360 残基に渡って細胞質ループ構造が推測された。酵母 2 ハイブリットアッセイおよび超遠心法によって、コア蛋白質の 72-91 残基がホモオリゴマー形成および E1 蛋白質との結合に重要であり、さらに tRNA や Mg の添加が必要であった。免疫沈降実験から、E1 蛋白質のループ内の 312-315 残基とコア蛋白質のオリゴマーが結合することが示唆された。これらの結果から、オリゴマーを形成したコア蛋白質が E1 蛋白質の細胞質ドメインに結合し、ウイルス粒子を形成するものと考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の粒子形成の分子機構を明らかにする目的で、E1 エンベロープ蛋白質の小胞体膜上でのトポロジーとコア蛋白質との相互作用について解析した。

B. 研究方法

TMHMM アルゴリズムを用いて、E1 蛋白質の膜貫通様式の構造予測を行った。また、酵母 2 ハイブリット法および免疫沈降法によって、コア蛋白質と E1 細胞質内領域との相互作用は解析した。コア蛋白質疎水性領域の下流の E1 蛋白質の細胞外領域のアミノ末端に Flag タグ、E1 蛋白質のカルボキシル末端に HA を付加したものを in vitro 転写翻訳法によって発現／ラベルし、膜存在下／非存在下でトリプシンによるプロテアーゼプロテクションアッセイを行った。ショ糖密度勾配による沈降速度

法によってコア蛋白質オリゴマー形成を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

TMHMM アルゴリズムによって、E1 蛋白質はコア蛋白質 C 末端膜貫通領域をシグナル蛋白質として利用して、細胞外へ貫通し、265-287 残基の疎水領域を用いてまた細胞内貫通し、361-377 残基の C 末端の疎水性領域でまた膜を貫通するポリトピックな構造が予測された。したがって、288-360 残基が細胞質内領域と推測され、今まで報告されてきた type I 型のトポロジーをとるものとの共存が示唆された。

糖鎖付加部位を人工的に E1 蛋白質に付加して、細胞外領域を予測したとき、ポリトピックな構造と今まで報告されてきた Type I 型の構造が示唆された。また、膜存在下で E1 蛋白質を発現したとき、細胞外領域と同じ大きさの Flag タグをもつフラグメントがトリプシンによる消化から保護されたことから、E1 蛋白質の細胞質内ループ構造の存在が間接的に裏付けられた。コア蛋白質を 293T 細胞に発現させ、その溶解物をショ糖密度勾配遠心によって解析したとき、0.1mg/ml tRNA と 1mM MgCl₂ が存在したときにオリゴマー形成が認められた。コア蛋白質と E1 蛋白質との結合にはコア蛋白質 72-91 残基の領域が必要で、その領域はオリゴマー形成にも必要であったが、その部位のみを発現させても E1 蛋白質との相互作用が認められなかった。また、E1 蛋白質とコア蛋白質との相互作用には tRNA と MgCl₂ の添加が必要であることから、E1 とコア蛋白質との相互作用にはコア蛋白質のオリゴマー形成が必要であることが示唆された。また、E1 蛋白質の細胞質領域の 312-315 残基の欠損によって、コア蛋白質との相互作用が消失することから、その領域がコア蛋白質との結合に必要であることが示唆された。

D. 考察

以上の成績から、オリゴマーを形成したコア蛋白質が E1 蛋白質の細胞質内領域に結合することが示唆された。オリゴマー形成には Stem loop 構造をもつような高次構造をもつ RNA の存在が必要で、ウイルスゲノム RNA がそれに相当すると思われる。E1 蛋白質は二つのトポロジーが共存し、細胞質ループをもつものはコア蛋白質と結合することによって、ウイルス粒子形成をより強固なものにしていると考えられ、type I 構造の E1 蛋白質は E2 蛋白質とのダイマー形成に重要なものかもしれない。

E. 結論

1. E1 蛋白質の小胞体膜上でのトポロジーが二つ存在し、一つは細胞質ループ構造をもつことが推測された。
2. コア蛋白質は高濃度の tRNA が存在するとオリゴマー形成し、それには 72-91 残基の領域が必要であった。
3. E1 蛋白質の細胞質内領域とオリゴマーを形成したコア蛋白質が結合した。
4. コア蛋白質との相互作用には E1 蛋白質の 312-315 残基の 4 残基が重要であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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_{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_{-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).

2. 学会発表

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.

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。

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.

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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

C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に関する基盤研究

分担研究者 深澤秀輔 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨：HCV JFH1 株ゲノムを発現し、感染性ウイルスを恒常的に産生する細胞株の培養上清を Huh7.5.1 細胞に加えて培養し、産生されたウイルス RNA を RT-PCR、また細胞内の Core 蛋白質を cell-based ELISA により定量する、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系を構築した。種々阻害剤の影響を調べ、抗 HCV 薬候補をいくつか見いだした。HCV の病原性に関与するウイルス蛋白質に相互作用をする宿主蛋白質を解析し創薬への応用を目指すために、Core、NS4B、NS5A の細胞内蛋白質複合体を精製しその結合蛋白質を同定することを試みた。

A. 研究目的

HCV 治療薬開発のために探索系を確立し、探索を実施する。HCV 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質を解析し、創薬研究への応用を計る。HCV のコードする蛋白質 Core、NS4B、NS5A に着目し、エピトグタグをつけ HeLa 細胞に発現させて細胞内蛋白質複合体を精製、病原性に関与する結合する宿主蛋白質を同定し、創薬に結びつける。

B. 研究方法

(1) 抗 HCV 薬スクリーニング系の構築

HCV JFH1 株ゲノムを発現し、HCV ウイルス粒子を恒常的に産生する細胞 H751JFHZeo が鈴木主任研究者により作製された。この細胞株の培養上清を Huh7.5.1 細胞に加えて培養すると、さらに感染性 HCV ウイルス粒子が産生されたので、HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系の構築を試みた。阻害の指標は、市販の ELISA キットは高価であるため、代替法として上清に放出されたウイルス RNA の real-time RT-PCR、また細胞内の Core 蛋白質の cell-based ELISA による定量を検討した。文部科学省

がん特定領域研究・統合がん・化学療法基盤情報支援班の配布する標準阻害剤キット（SCADS inhibitor kits）を用いて系の有効性を確かめた。

(2) C型肝炎ウイルス蛋白質複合体の解析

3xFLAG の後に 3xHA のタグを連結する発現ベクターを構築し、マルチクローニングサイトに各種ウイルス遺伝子を導入した。HeLa S3 に各ウイルス遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし G418 で選別し、各々30-70 クローンを解析した。それぞれの蛋白質について、発現量に差がある 3 株を選択した。ウイルス蛋白質発現細胞をスピナーフラスコにて培養し細胞を集め、細胞を破碎し遠心分離後、上清と核画分を得た。さらに上清は超遠心により膜画分と細胞質画分に、核画分は塩抽出により核抽出液画分と核不溶性画分に分けた。膜画分、核不溶性画分は 1% Triton X-100 処理により蛋白質を可溶化した。各画分の塩濃度を 150mM の終濃度に調整後、M2-agarose に吸着させ FLAG ペプチドで蛋白質を溶出し、さらに HA-agarose に吸着させ 100mM Glycine-HCl buffer pH2.5 で溶出した。SDS-PAGE により蛋白質複合体を各蛋白質に分

離し、切り出し後、トリプシンでゲル内消化し MALDI-TOF MS により解析した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使った研究であり、倫理面への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

(1) 抗 HCV 薬スクリーニング系の構築

恒常的に HCV 粒子を産生する H751JFHZeo の培養上清を、Huh7.5.1 細胞に添加し培養したところ、上清中に Core 蛋白質が放出されることが、ELISA キットを用いて確認できた。培養上清を Huh7.5.1 細胞に感染させることを繰り返して、力価の高いウイルス液を得た。Huh7.5.1 細胞を 96 穴プレートにまき、ウイルス液を加え培養し、上清中に放出されたウイルス RNA の real-time RT-PCR による検出を試みた。種々の RNA 精製法、定量法を検討した結果、培養上清を PCR チューブに移しウイルス粒子を吸着させ、そのまま one-step real-time RT-PCR を行うことで簡便に検出できることがわかった。また細胞内 Core 蛋白質を免疫蛍光抗体法にて検出すると、感染後 2 日目より陽性細胞が見え始め、5 日目にはほぼ 100% の細胞が Core を発現していた。cell-based ELISA 系を検討したところ、peroxidase 標識の二次抗体を用いることにより、比色による細胞内 Core 蛋白質の測定が十分可能であった。real-time RT-PCR および cell-based ELISA の測定値は、市販の Core ELISA キットの値と良く相関し、抗 HCV 薬のスクリーニングへの応用が可能であると考えられた。

実際に化合物ライブラリー、微生物二次代謝産物等をスクリーニングする前に、文部科学省がん特定領域研究・統合がん・化学療法基盤情報支援班の配布する標準阻害剤キット (SCADS inhibitor kits) を用い、既知阻害剤の影響を調べた。本キットは、既存の制がん剤や各種阻害剤を体系的に収集し、まとめたものである。既に HCV の複製を阻害することが報告されている

cyclosporin A は real-time RT-PCR においても、cell-based ELISA においても強い活性を示し、両系が抗 HCV 薬のスクリーニングに応用できることがわかった。その他 Hsp90 阻害剤、エストロゲン受容体モジュレーター、代謝拮抗剤などが阻害活性を示した。

(2) C 型肝炎ウイルス蛋白質複合体の解析

Core 蛋白質複合体

Core 蛋白質はウイルスの Nucleocapsid を形成するウイルス RNA と結合する構造蛋白質である。細胞のアポトーシス、がん化との関連が示されており、C 型肝炎の病態形成に関与すると考えられている。191 アミノ酸からなる Core 蛋白質の N 末端に FLAG-HA タグを付け HeLa 細胞に発現するクローンを数種類得、そのうちの 1 つを大量培養した。発現分布を調べたところ、一部、細胞質、核画分に存在が認められたものの、大部分が膜画分に存在した。それぞれの画分について抗タグ抗体にて免疫沈降を行った。抗 FLAG 抗体では Core 蛋白質複合体が免疫沈降されたが、抗 HA 抗体では免疫沈降ができなかった。この現象は 151 アミノ酸からなる Core 蛋白質でも同じ結果であり、Core 蛋白質複合体に関しては抗 FLAG 抗体でのみの精製で結合蛋白質の同定を試みた。Core 蛋白質特異的に結合する宿主蛋白質がいくつか見られた。マスペクトロメトリーの解析により一つはすでに報告されている PA28g であることが分かった。現在、他の蛋白質について解析を進めている。

NS4B 蛋白質複合体

NS4B 蛋白質は、小胞体、ゴルジ体等膜画分に存在し 4 つの膜貫通ドメインを持ち HCV 複製の場を提供していると考えられる蛋白質である。N 末端に FLAG-HA タグを付けた NS4B 蛋白質を発現する HeLa 細胞を大量に培養した。細胞画分により、その存在が膜画分のみ見られたため、細胞膜画分、核不溶性画分由来の抽出液に対して、FLAG、HA の 2 種類の抗タグ抗体にて連続

して精製した。その結果、細胞膜画分、核不溶性画分とも非常に良く似た蛋白質が結合することが分かった。現在、その同定を試みている。

NS5A 蛋白質複合体

NS5A 蛋白質は、宿主細胞の細胞周期、増殖、アポトーシス等の制御に働き、炎症、免疫反応にも影響を与えることが知られている。HeLa 細胞に発現させ細胞内分布を生化学的に調べたところ、細胞質、核画分において若干の発現が見られたが、多くは膜画分に存在することが分かった。それぞれの画分について 2 つの抗タグ抗体で精製を試みた。いくつかの蛋白質が共沈降してくることが分かった。また、細胞質、核画分では、NS5A の存在量が少ないため宿主蛋白質の同定ができるレベルの蛋白質が検出できなかった。

D. 考察

(1) 抗 HCV 薬スクリーニング系の構築

HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系を構築した。real-time RT-PCR および cell-based ELISA によるアッセイは、市販の ELISA キットに比べ、かかる費用がずっと少なくて済む。今後化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、効果を示した物質について作用機序解析を行う。

(2) C 型肝炎ウイルス蛋白質複合体の解析

FLAG-HA タグを用いることで、バックグラウンドを下げることができ、効率的に結合蛋白質を同定することができた。しかし、Core 蛋白質で見られたように本方法で用いた連結タグでは、抗 HA 抗体が働かないことがあり、今後立体障害等を考えた系を構築する必要性が生じた。Core 結合蛋白質として同定した PA28g はすでに報告されているが、肝細胞ではない HeLa 細胞でも同定されたことは、本系が新規結合蛋白質の同定の 1 つの手段となることを示唆する。今後、結合蛋白質の解析を進め、新規の蛋白質を同定していく予定である。

E. 結論

HCV の全生活環を標的とした抗 HCV 薬スクリーニング系を構築した。C 型肝炎ウイルス蛋白質複合体を解析した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimazu T, Komatsu Y, Nakayama K-I, Fukazawa H, Horinouchi S, Yoshida M. Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* 25: 7391-7400, 2006.

Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, Fukazawa H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with daxx. *J. Biol. Chem.* 281: 28113-28121, 2006.

Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Yoshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K. Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. *Oncogene* 25: 5113-5124, 2006.

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデル開発に関する研究

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 岩崎優紀、飯島沙幸、木村展之、揚山直英

（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染症研 ウイルス 2 部）

榎 昇、森 健一（先端生命科学研究所）

研究要旨：本研究では HCV に起因する病態解明および抗 HCV 薬・ワクチンにおける個体レベルでの有効性評価を可能とする目的で、GBV-B を用いた C 型肝炎のサロゲート霊長類モデル開発を進めている。今年度は、本サロゲートモデルの HCV 感染への外挿を念頭において、ウイルス接種ルートによる病態への影響、及びウイルス感染後の長期フォローアップによるウイルス・免疫応答の推移に関する解析を行なった。その結果、(i) ウイルス感染経路によりその病態に大きな影響が見られること、(ii) マーモセットにおいて初めて長期に渡り持続感染を呈する 2 例を見出したこと、(iii) 感染初期における血中ウイルスレベルおよび免疫応答レベルがマーモセットにおける慢性化を左右しうること、を明らかにした。

A. 研究目的

C 型肝炎の原因ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) は、その宿主域の狭さからチンパンジーを除き疾患モデルが存在しない。このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験、さらに HCV 感染に起因する病態の解明を行なう上での大きな障害となっている。

本研究ではこの点を克服すべく、HCV と同じフラビウイルス科、ヘパチウイルス属に分類され、HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた急性・慢性 C 型肝炎のサロゲート（代用）病態霊長類モデルの開発を目標とする。本モデルが確立されれば、新規治療薬やワクチンの評価系として有用であるのみならず、C 型肝炎の発症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明に重要なモデルになる

ものと期待される。

昨年度の本研究班における成果により、新世界ザルを用いた GBV-B による急性～亜急性感染および C 型肝炎様症状を安定的に再現しうるシステムを確立した。また GBV-B が HCV 同様に肝臓のみならずリンパ・血液系組織や泌尿・生殖器系組織など多様な組織へのトロピズムを有する、pleiotropic virus である事を明らかにした。

今年度は、本サロゲートモデルの HCV 感染への外挿を念頭において、(1) ウイルス接種ルートによる病態への影響、(2) ウイルス感染後の長期フォローアップによるウイルス・免疫応答の推移、の 2 点について解析を行なった。

B. 研究方法