

Hiroyuki Mizuguchi. The crucial role of penton base RGD motifs in adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. 第66回
日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

感染性心内膜炎起因菌によるバイオフィルム形成メカニズムの解明とバイオフィルム形成阻害薬の開発

所属 国立感染症研究所細菌第一部
研究者 中尾 龍馬

研究要旨：・歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成、および外膜タンパク OMP85 ホモログの関連性について検討した結果、*P. gingivalis* の OMP85 ホモログが糖タンパクであることが確認され、さらに本分子の修飾糖鎖がバイオフィルム形成に関与することが示唆された。また、溶連菌 *Streptococcus pyogenes* の付着能・バイオフィルム形成能について検討した結果、*S. pyogenes* は株ごとにその付着特性、バイオフィルム形成能力が異なっていることが示された。

A. 研究目的

我が国は、保健衛生・医療技術の進歩により世界一の長寿国家となる一方で、生活習慣病と関連して心・循環器疾患が増加している。これに伴い、感染性心内膜炎のハイリスク患者は増加している。特に、重篤な心疾患を有する場合、常に患者は生命の危機に曝され、現在の医療によっても天寿を全うするのは難しい。さらに、抗菌薬に対する耐性菌の増加や新たな耐性菌出現の問題などは、感染性心内膜炎においても抗菌薬治療を困難にするものと憂慮されている。従って、感染性心内膜炎に対する効果的な予防法・治療法の確立は急務となっている。

本研究は、感染性心内膜炎において細菌が形成するバイオフィルムに着目した。バイオフィルム形成に関わる分子機構の解明し、バイオフィルム形成を阻害できる細菌側のターゲット分子の決定、最終的には、感染性心内膜炎の新規予防法・治療法を開発を、本研究の目的としている。研究対象とする細菌は、感染性心内膜炎の起因菌と

して重要な口腔細菌として、特に *Porphyromonas gingivalis* について調査を行った。また、溶血性レンサ球菌感染症の起因菌である A 群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* の付着およびバイオフィルム特性についても調査した。

B. 研究方法

1) 使用菌株；

P. gingivalis ATCC33277 株

P. gingivalis ATCC33277 *galE* 変異株

P. gingivalis ATCC33277 *galE* 相補株

S. pyogenes K22 (1970年代臨床分離株：咽頭炎由来)

S. pyogenes K23 (1970年代臨床分離株：咽頭炎由来)

S. pyogenes K32 (1994年臨床分離株：咽頭炎由来、ファージ保持)

S. pyogenes 1566 (非劇症型株：膿由来)

2) *P. gingivalis* の外膜タンパクの抽出および SDS-PAGE とウエスタンブロット

P. gingivalis 各菌株の外膜タンパクは二階堂らの方法により抽出した。抽出した外膜タンパクは 10 μ g/well にて SDS を含むサンプルバッファーに溶解後 7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。タンパク染色はクマシーブリリアントブルーにて行った。また、OMP85 ホモログポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットを通常通り行った。

(倫理面への配慮)

特記事項なし。

3) 化学的糖鎖切断法

外膜抽出物の化学的糖鎖切断は、10%アニゾール含有トリフルオロメタンスルホン酸にて一時間もしくは 3 時間処理した。処理後は 60%ピリジン溶液にて中和し、さらに透析および限外濾過にて、糖鎖切断済み外膜タンパクサンプルを得た。

4) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす OMP85 ホモログポリクローナル抗体の影響

OMP85 ホモログ抗体を希釈し(50%~5%)、 2×10^7 の *P. gingivalis* 菌と混合し一時間培養後、96 穴マイクロタイタープレートを用いたバイオフィーム形成試験を行った。バイオフィームは 37°C、4 8 時間培養を行い、浮遊菌を滅菌水にて 2 回洗浄後、0.25%サフランインで染色する。100%エタノールにて溶解後、OD=492/620 で吸光値を測定した。

5) 様々なタンパク質への *S. pyogenes* の付着試験

albumin、collagen、fibronectin をニトロセルロースメンブレンにブロットする。1%BSA にてブロッキング後、FITC にてラベルした菌液をメンブレンに添加する。PBS にて洗

浄後、イメージアナライザーにて蛍光観察を行う。

C. 研究結果

1) *P. gingivalis* における OMP85 ホモログの糖鎖修飾(Fig. 1、2) ;

- *P. gingivalis* *galE*-株における OMP85 の分子量は、野生株に比べ数 kDa 少なかった。*GalE*+株の OMP85 分子量は野生株と同じレベルに回復した。
- *P. gingivalis* 野生株の OMP85 分子量は糖鎖切断により数 kDa 少なくなった。

2) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす OMP85 抗体の影響(Fig. 3) ;

- 野生株においては高濃度 OMP85 抗体 (25 と 10%)によるプレインキュベーションでバイオフィーム形成を阻害した。
- *galE*-株においても高濃度 OMP85 抗体 (25 と 10%)によるプレインキュベーションでバイオフィーム形成を阻害した。その阻害程度は野生株よりも強かった。

3) 様々なタンパク質への *S. pyogenes* の付着試験(Fig. 4)

- *S. pyogenes* K22, K23 は付着が認められなかった。
- *S. pyogenes* K32 は collagen のみに付着していた。
- *S. pyogenes* 1566 は fibronectin のみに付着していた。
- Albumin(HSA)に結合する菌株は認められなかった。

D. 考察 :

P. gingivalis の研究においては、今回、OMP85 ホモログが初めて糖タンパクであることが明らかとなった。また、本分子の

修飾糖鎖がバイオフィーム形成に関与する可能性が示唆された。

OMP85 は髄膜炎菌において、様々な外膜タンパクの集合において中心的な役割を持つ外膜タンパクとして知られている。また、OMP85 はすべてのグラム陰性菌が保存し、このうち調べられた菌種すべてにおいて、それらの OMP85 ホモログが生存に必須であった。実際、我々も *P. gingivalis* の OMP85 変異株作製を何度か試みたが、OMP85 変異株を得ることはできなかった。一方で、我々はいくつかの OMP85 ホモログ抗体を作成し、抗体による生物活性の制御の可能性を模索した。

既に我々はガラクトース代謝に関与する *P. gingivalis* の *galE*-株を得ており、本変異株がガラクトースに関連した糖合成に障害を受けることを推測していた。これを利用して、OMP85 の糖修飾の可能性を考え、*galE*-株の OMP85 を野生株と比較したところ、*galE*-株の OMP85 の分子量は野生株のそれに比べ小さくなった(Fig. 1)。さらに、化学的糖鎖切断を行い、OMP85 が糖修飾を受けることが明らかにした(Fig. 2)。加えて、OMP85 抗体に抗バイオフィーム作用があるかどうかを検討したところ、野生株および *galE* 変異株いずれにおいてもそれらのバイオフィーム形成を阻害する作用があったが、とくに *galE* 変異株でその作用は顕著であった(Fig. 3)。以上より、OMP85 の修飾糖鎖がバイオフィーム形成阻害のターゲットとなっている可能性が示唆された。

S. pyogenes の研究においては、株ごとにその付着特性、バイオフィーム形成能力が異なっていることが明らかとなった。

メンブタンへ固着化させた様々なタンパクと菌との付着実験において、K32 株は

collagen と結合すること、1566 株は fibronectin と結合することが分かった(Fig. 4)。また 1566 株は fibronectin をコートした場合のバイオフィーム形成が上昇することも確認された(データ非表示)。以上より、*S. pyogenes* は株により反応するタンパクが異なることが明らかとなった。この結果は宿主細胞の違いによる菌の付着の特異性を示すのではないかと推察されたが、今後、付着・バイオフィーム形成と *S. pyogenes* 感染症との関係を明らかにする上で、さらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

P. gingivalis の OMP85 ホモログが糖タンパクであることが確認され、さらに本分子の糖修飾がバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

溶連菌 *Streptococcus pyogenes* の付着能・バイオフィーム形成能について検討した結果、*S. pyogenes* は株ごとにその付着特性、バイオフィーム形成能力が異なっていることが明らかとなった。

F. 論文および学会発表

論文 1. Glycosylation of the OMP85 homolog of *Porphyromonas gingivalis* and its involvement in biofilm formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 365(4):784-9. (2008) Ryoma Nakao, Yosuke Tashiro, Nobuhiko Nomura, Saori Kosono, Kuniyasu Ochiai, Hideo Yonezawa, Haruo Watanabe, Hidenobu Senpuku.

学会発表 1. *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成における外膜タンパク OMP85 ホモログの修飾糖鎖の役割、日大生

物資源化学部主催講演会、2007.11、中尾龍馬。

学会発表 2 . *Porphyromonas gingivalis* の GalE に依存した外膜タンパク OMP 85 のグリコシレーション、第 49 回歯科基礎医学会学術集会・総会、2007. 8、中尾龍馬 泉福英信。

F. 知的所有権の取得状況

特許出願 1 . PA070476「緑膿菌バイオフィルムに対するワクチン抗原体」

(出願者) 野村暢彦、田代陽介、内山裕夫、泉福英信、中尾龍馬

*P. gingivalis*各株の外膜タンパク抽出物のクマシーブルー染色(左)
とOMP85抗体ウエスタンブロット(右)

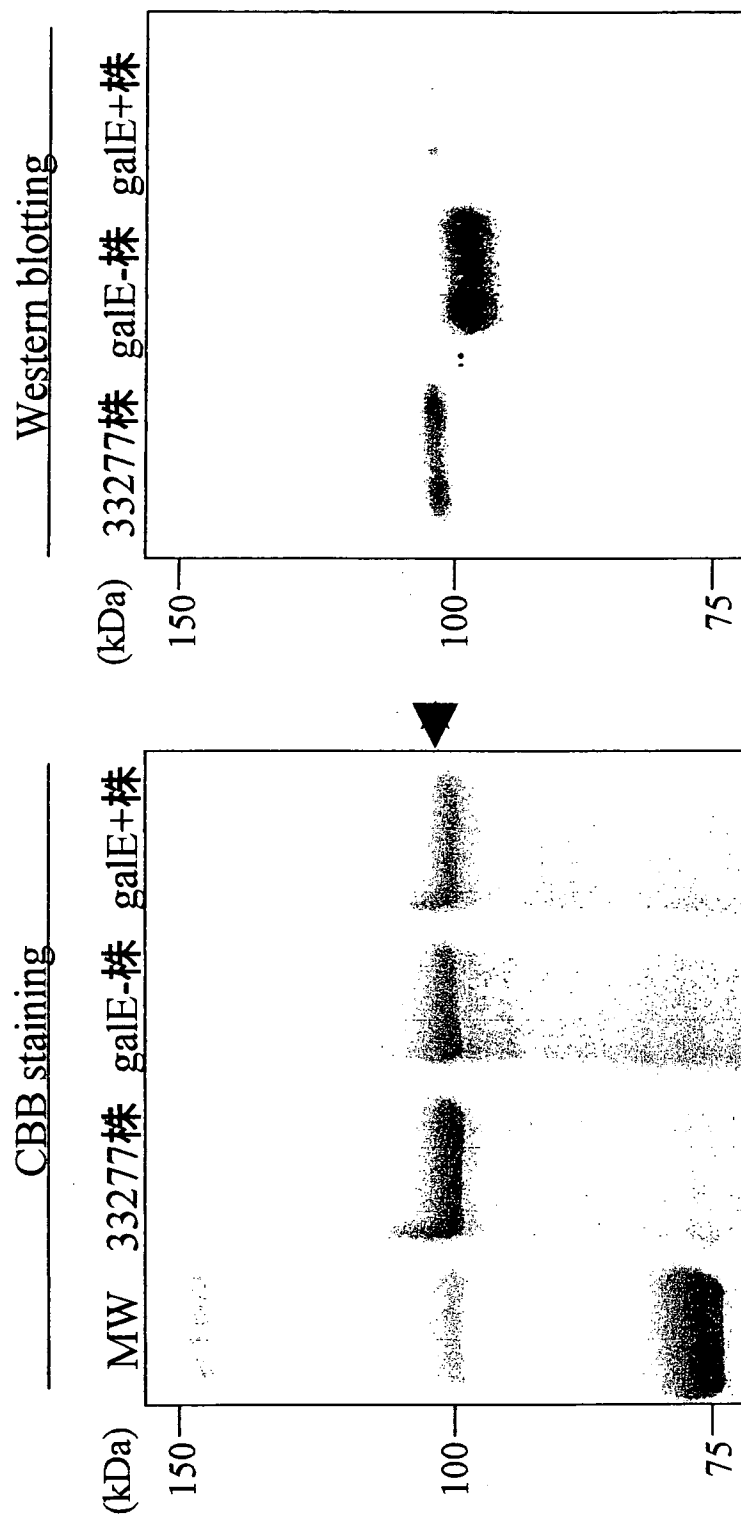


Figure 1

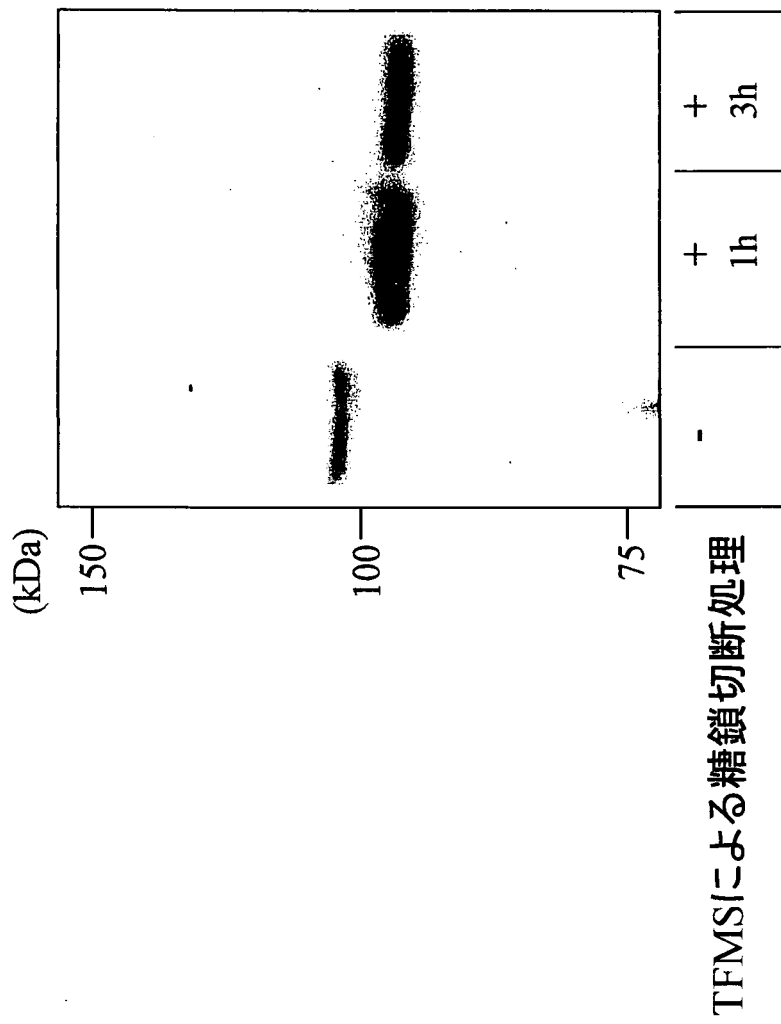


Figure 2

*P. gingivalis*野生株および*galE*変異株のバイオフィルム形成
 に対するOMP85抗体(loop3抗体)の効果

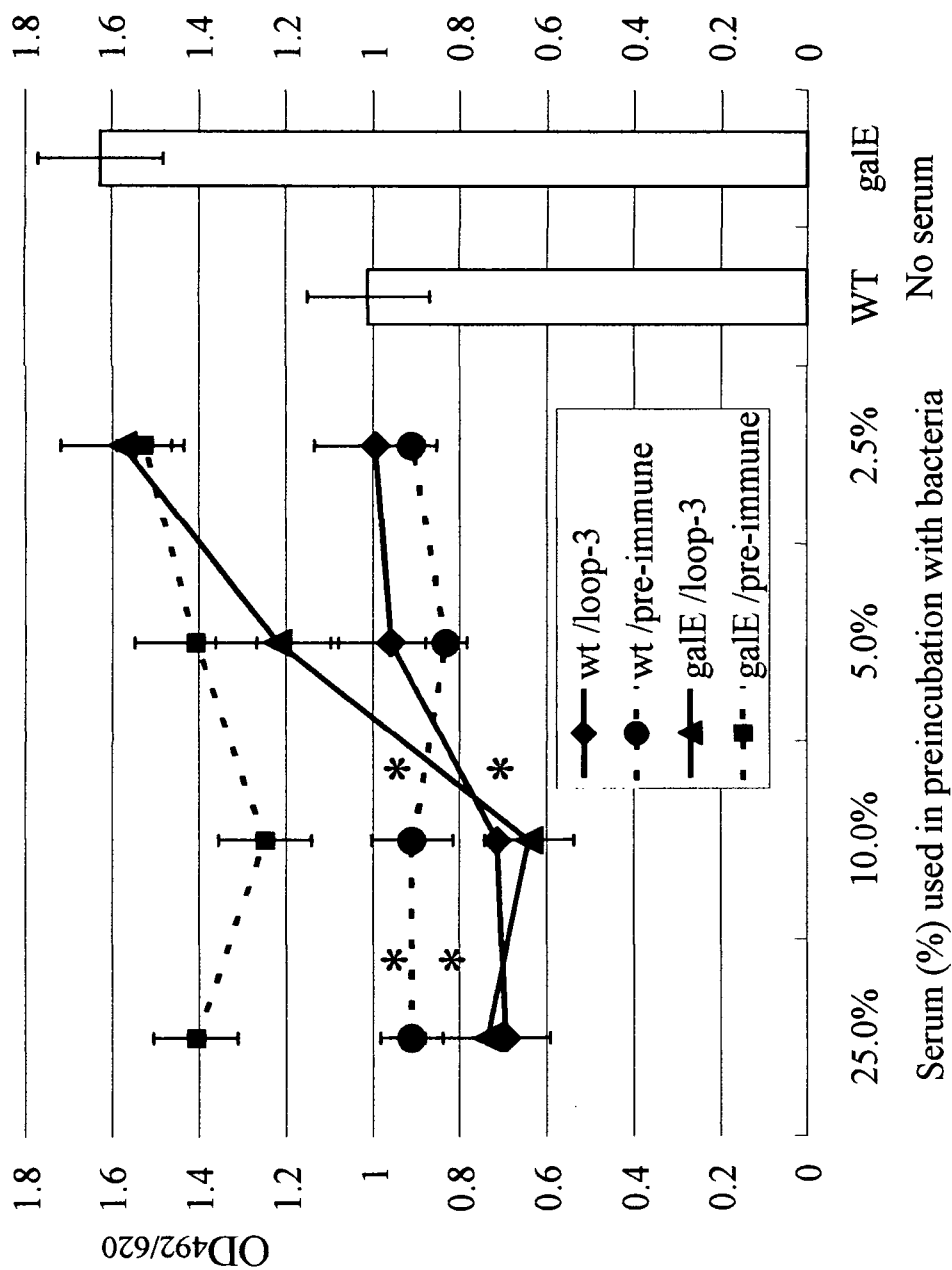


Figure 3

メンブランに固着させた様々なタンパクへの *S. pyogenes*の付着試験

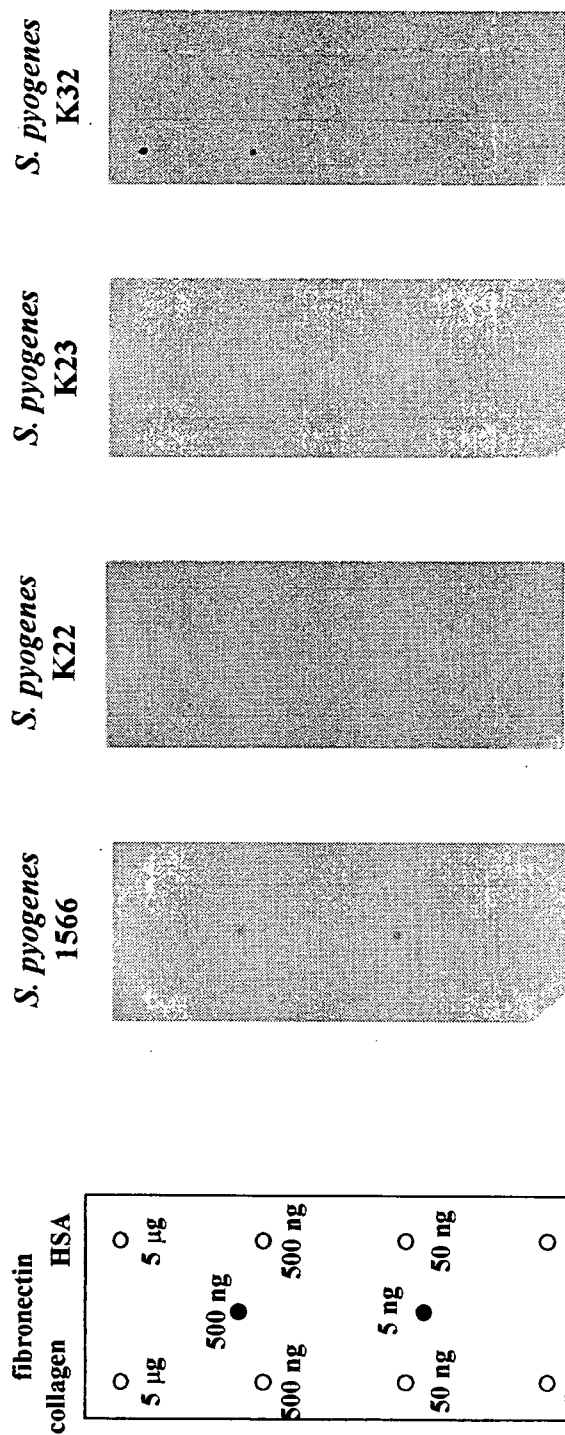


Figure 4

軸索保護の分子メカニズムの解明と神経変性疾患治療薬の開発への応用

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所

研究者 若月 修二

研究要旨 本研究では、多くの神経変性疾患に認められる軸索変性から「軸索を守る」という観点に立ち、軸索保護活性を賦与するタンパク質分子の同定、疾患モデル動物を対象にした遺伝子治療などのアプローチにより、軸索変性阻止の分子基盤の整備を目的とした。

A. 研究目的

脳神経疾患の罹患率は高齢者で高く、アルツハイマー病を例に挙げると、現在 85 歳以上の約半数が罹患していると推定されている。国連人口予測においても、80 歳以上の人口は 2050 年までに 3 億 7 千万人に達するとされており、我が国においても脳神経疾患に対する罹患率が急速に高まる可能性が高く、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの難治性神経疾患の治療、あるいは症状を改善する方法の開発が急務となる。これまで、神経変性疾患を含む脳神経疾患に関する研究では、神経細胞死に焦点を当てた研究が精力的に行われ、かつ現在もその主流となっているが、多くの脳神経疾患において神経細胞死は病態後期に観察される不可逆なプロセスであることから、有効な治療薬の開発には細胞死を対象とした研究と

は別の新たなアプローチが必要である。

軸索変性は神経変性疾患を含む脳神経疾患において神経細胞死の前段階として観察されるが、多くの脳神経疾患モデルにおいて神経細胞死を抑制しても軸索変性を抑制できないことが報告されており、軸索変性と細胞死は独立したプロセスであると考えられている。一方、軸索変性を抑制あるいは大幅に遅延させることが神経変性疾患の治療に有効である可能性は、既にさまざまな疾患モデル動物を用いて検証されており、例えば、パーキンソン病モデル、末梢神経障害モデルなどにおいては、症状の軽減や寿命の延長などを認めている。

wlds (Wallerian degeneration slow) と呼ばれる自然発症マウスは物理的傷害、あるいは薬剤による化学的傷害が誘導する軸索のワーラー変性が著しく遅延しており、脳虚血などの実験

モデルの適用, 遺伝的な疾患モデルとの交配による検証から, さまざまな軸索変性に対して抵抗性を示す結果, 疾患による症状の軽減, 寿命の延長などを認める. 同マウスにはユビキチン鎖伸長因子 Ufd2a とニコチンアミドモノヌクレオチドアデニル転移酵素 Nmnat1 のキメラタンパク質 W1d^s が発現する. 前者はユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解に関わり, 後者はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の生合成に関わる酵素である. 軸索変性を指標とした培養神経細胞を用いた解析から, W1d^s タンパク質あるいは Nmnat1 を導入することにより軸索変性が遅延するが, Ufd2a を導入し発現レベルの改変を行った場合には遅延効果が得られていない. これらのことから Nmnat1 活性によって産生された NAD が軸索変性を遅延させると考えられるが, タンパク質分解系, 特にユビキチン・プロテアソーム経路の阻害によりワーラー変性が抑制されることが別の研究により明らかにされていることから, Ufd2a の関与を主張する研究者も少なくない. 何れにしても, 神経細胞, もしくは神経軸索に内在するシグナル伝達系を改変することで軸索変性を抑制できること, すなわち軸索保護活性を賦与できることは明らかではあるが, その分子メカニズムについては十分な理解が得られていない.

上記を踏まえて, 本研究では, 多くの脳神経疾患, 特に神経変性疾患に認められる神経軸索変性の分子メカニズムを明らかにすることにより, 軸索変性を抑制, あるいは阻止する手法の

開発を大目標とし, 研究期間内に

1. 軸索保護活性を賦与する新たなタンパク質分子の同定
2. 既報の軸索保護シグナルを調節するタンパク質分子, あるいは薬剤の同定

を行い, 軸索保護シグナルを調節する薬物治療, 遺伝子治療など, 神経変性疾患に対する最適な治療法, および効果を得るための分子基盤を整備することを目的とした.

B. 研究方法

本研究では, 先ず, 神経軸索変性の分子メカニズムを明らかにすることを目指した. そのため, 軸索変性を阻止, あるいは大幅に遅延させる効果の賦与を指標とした,

1. cDNA ライブラリを用いた候補遺伝子群のスクリーニング (unbiased approach)
2. 既報のシグナル伝達関連遺伝子とのクロストークの検証 (Candidate approach)

主に, 上記2つの方法を採用した.

候補遺伝子のスクリーニング (unbiased approach)

1次スクリーニングにはマウス神経芽細胞腫由来の Neuro2a 細胞をレチノイン酸処理することにより神経細胞に分化させ, ビンクリスチン, ノコダゾールなどを与えることによって軸索変性を誘導できる培養系を用いた. この方法は神経毒性のある抗がん剤投与時に認められる末梢神経障害モデルであり, これまで多くの報告がなされており, かつ一定の成果が得られている.

これを評価系として、ヒト脳由来 cDNA ライブラリをリポフェクション、あるいはレトロウィルスを用いることにより神経細胞に導入した。

Neuro2a 細胞はレチノイン酸処理により 24-48 時間で細胞体の数倍から十数倍の神経突起を伸長させる。そのため、効果の評価については、位相差による検鏡、あるいは抗 β -チューブリン抗体を用いた微小管の間接蛍光染色観察により行った。また、軸索変性による形態変化をリアルタイムに評価するため、1 次スクリーニングにおける陽性クローンについては導入するプラスミドベクター、あるいはウィルスベクターには IRES (internal ribosomal entry site) と GFP などの蛍光タンパク質遺伝子が連結されたコンストラクトを作製した。

候補遺伝子の選別はプラスミドベクターを用いる場合には cDNA ライブラリを幾つかのプール分け、軸索保護活性の高いプールを順次選択した。また、レトロウィルスベクターを用いた場合には、細胞のゲノムに組み込まれる同ウィルスの特性から、感染させた一定数の細胞を「細胞ライブラリ」として樹立し、これを幾つかのプールに分け、上記と同様に軸索保護活性の高い細胞プールを順次選択することで候補遺伝子の選別した。選別した遺伝子は PCR 法による遺伝子増幅などを経て塩基配列を決定し遺伝子を特定した。

既報の軸索保護シグナルを調節するタンパク質分子の同定 (Candidate approach)

前述のように、*wlds* マウスは神経軸索の物理

的傷害、神経毒性を持つ薬剤による傷害、神経変性疾患モデル動物の病態に認められる軸索変性など、さまざまな軸索変性モデルに対して抵抗性を示す。軸索変性は通常は既に安定化を獲得している微小管が崩壊することによって引き起こされるが、上記の事実は *wlds* マウスにおいて軸索を構成する微小管が極度に安定化されているか、あるいは微小管を脱重合する機構、あるいはこれを制御するさらに上流のシグナル伝達系が変化している可能性が考えられた。本研究では、これらのシグナル伝達系と並行する、あるいは増強する分子群に注目した解析を行った。評価系としては、前述の Neuro2a 細胞を用いた実験系とともに、筆者らのグループが既に確立している後根神経節神経細胞を用いた軸索変性モデルを採用した。

(倫理面への配慮)

本研究はその成果を神経変性疾患治療薬開発に応用することを目指したものであるが、研究期間内においては臨床応用の前段階までの解析を実験動物を用いて行うため、人権保護に関して特別に記載する事項はない。また、実験動物の使用に際しては、動物愛護等の法令、および国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会の定める規則を遵守して行い、研究計画はすべて同委員会で審議され承認を受けた。

C. 研究結果

候補遺伝子のスクリーニング (unbiased

approach)

研究開始当初、プラスミドベクターを用いたリポフェクションによりヒト脳由来 cDNA ライブラリを Neuro2a 細胞に導入し、レチノイン酸処理によってニューロンへ分化させ、生じた神経突起のビンクリスチンに対する抵抗性を指標にしたスクリーニングを行ったが、候補遺伝子の同定まで至らなかった。そこで、レトロウィルスベクターにより、細胞ゲノムにライブラリ遺伝子を組み込み、安定的に発現させた「細胞ライブラリ」を作製し、これをニューロンへ分化させて 1 次スクリーニングに用いた。

レトロウィルスを感染させた「Neuro2a 細胞ライブラリ」を 10 分割し、それぞれを 24 時間培養して細胞数を倍加させ、半分を凍結保存し、残りの半分をレチノイン酸処理によりニューロンに分化させ、遺伝子導入を行っていない対照と比較してビンクリスチンへの抵抗性が増強した陽性プールを選別した。これを 1 回の選別とした。得られた陽性プールをさらに 10 分割し、選別を繰り返すことで候補遺伝子を含む細胞を濃縮した。選別を 4 回繰り返した後、半数以上の細胞が抵抗性を示した陽性プールからゲノムを回収し、これを鋳型として、導入遺伝子を含む遺伝子配列を増幅させる組み合わせのプライマーを用いた PCR により導入遺伝子配列を取得し、導入遺伝子を同定した。その結果、神経細胞に対して生存維持、あるいは神経軸索伸長の調節作用を有する液性因子として既に報告されている SPARC/Osteonectin を含む、5 種の独立

した候補遺伝子を取得した。このうち 2 種の遺伝子をクローン化し、Neuro2a 細胞に発現させ、ビンクリスチンに対する抵抗性を検証した結果、何れも対照に比べて有意な抵抗性を示すことが分かった。現在、後根神経節神経細胞を用いた軸索変性モデルに対して、これらの候補遺伝子の有効性の検証を行っている。また、レトロウィルスを用いて cDNA ライブラリ遺伝子を導入して作製した「Neuro2a 細胞ライブラリ」の未解析分についても着手する予定である。

既報の軸索保護シグナルを調節するタンパク質分子の同定 (Candidate approach)

神経軸索変性は微小管の脱重合に帰結される現象であり、この過程にはリン酸化、および脱リン酸化酵素が複数関与することが知られている。後根神経節神経細胞を用いた軸索変性モデルにおいて、市販の百数種のリン酸化酵素阻害剤 (Biomol 社、および Roche 社製) を材料にスクリーニングを行った。通常、同モデルでは、変性開始後の比較的短時間 (〜12 時間) に顕著な変化を認めるため、これを抑制、あるいは緩和する阻害剤を選択した。その結果、3 種の特定のリン酸化酵素をそれぞれ阻害する複数の阻害剤を同定した。現在、これらのリン酸化酵素について詳細な解析を行っている。

D. 考察

本研究により、軸索保護活性を賦与するタンパク質分子を複数同定することができた。候補遺伝子は、増殖因子が発動するシグナル伝達系

を調節する分子，細胞死の制御に関わる分子など，重要な細胞機能の調節に直接関わる分子群であることから，軸索保護に係る分子メカニズムがこれらの細胞機能を調節することによって可能になることを強く示唆した。また，神経細胞に対して生存維持，神経軸索伸長調節作用を有する液性因子として既に報告されている SPARC/Osteonectin が候補遺伝子として取得されたことから，今回の評価系が当初の目的に適合した遺伝子群のスクリーニングに有効であることが示唆された。しかしながら，今回，検証に用いた実験系は軸索変性を含めた複合的な細胞の変性を評価している危険性は否めない。本研究で得られた知見を基に，大脳皮質神経細胞などの初代培養神経細胞を用いた検証を行うとともに，既に筆者らのグループが確立している後根神経節神経細胞を用いた軸索変性モデルにより，軸索保護活性を直接的に評価する必要があると考える。

一方，候補分子は酵素活性を有することから，活性を増強，あるいは調節する低分子化合物のスクリーニングが可能である。さらに，候補遺伝子を神経特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製することにより，軸索保護効果を個体レベルで検証できる。今後はこれらのツールを整備することにより，神経変性疾患への治療に役立てたい。

E. 結論

本研究では，多くの脳神経疾患，特に神経変

性疾患に認められる神経軸索変性の分子メカニズムを明らかにすることを目的として開始された。軸索変性に対する遅延効果の賦与を指標とした，1) 候補遺伝子群のスクリーニング (unbiased approach)，2) 既報の軸索保護シグナルを調節するタンパク質分子の同定 (Candidate approach) により，

1. 軸索変性を遅延させる候補分子群を5種同定した。
2. 軸索変性に関わるタンパク質リン酸化酵素3種特定した。

これらの成果は，軸索保護シグナルを調節する薬物治療，遺伝子治療など，神経変性疾患に対する最適な治療法，および効果を得るための分子基盤を整備の端緒となると考える。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

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。培養形態により発現に差が見られた蛋白の一つである脂肪酸結合蛋白 FABP をノックダウンした所, HCV 粒子産生量の変化が見られた。

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)およびリバビリン投与であるが、日本人におおひ gen1/2a 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ス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、粒子産生に關与する宿主因子の同定を試みた。ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7細胞を平皿培養もしくは温度感受性ゲルを用いて三次元培養を行い、培養3日目、及び7日目で細胞を回収した。蛍光ディフュージョン二次元電気泳動法を用いて発現量に差のある蛋白のプロファイリングをおこない、再現性のあるスポットを選んで質量分析により同定を行った。その結果、培養形態により発現に差のある蛋白10個を同定した(H19年度報告書より)。本年度はこれらの宿主因子のノックダウン条件を検討するとともに、高効率HCV粒子産生系を用いたHCV粒子産生におよぼす影響について検討を行った。

B. 研究方法

a. 候補蛋白のノックダウン

各種 siRNA をデザインし、Hyperfect(QIAGEN)を用いて導入した。を導入後、24h-96h後に細胞を lysis buffer にて回収した。ノックダウン効果は各種抗体をもちいてウェスタンブロットングにて確認をおこなった。

また十分なノックダウンが確認できた配列については陰性コントロールとしてスクランブル配列をデザインした。

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。

b. FABP の発現レベルについての解析

ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7 または HepG2 細胞を 3 日もしくは 7 日間、平皿培養もしくは温度感受性ゲル (TGP) による三次元培養した。培養後の細胞を回収した。細胞を RIPA buffer で lysis し、ウェスタンブロッティングにより FABP 発現量を確認した。また、コントロールとして GAPDH を用いた。

また、mRNA 量の確認のため、回収した細胞を Trizol にて溶解し、total mRNA を抽出した。FABP 特異的 primer 及び TaqMan-probe を利用した定量的 RT-PCR により FABP の mRNA 量を定量するとともに、コントロールとして GAPDH の mRNA 量についても同様に定量した。

c. 粒子産生評価系の検討

Huh7 細胞に HCV-JFH1 RNA を導入し、JFH1 持続感染細胞を作製した。この感染細胞の培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量し、 1×10^4 IU TCID50/mL のウイルス液 1 mL を 1×10^5 個の naïve な Huh-7 細胞に感染させた。感染後 4-7 日後、HCV コア蛋白もしくは HCV-NS5A 蛋白に対する抗体で細胞を染色し、ほぼ 100% の細胞に HCV が感染していることを確認した。この細胞を真美戻し、siRNA を導入した。導入後 24 時間の時点で、細胞を PBS で三回洗ったのち、新たな培地を加え、2, 4, 8 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の HCV コア蛋白量は ELISA 法を用いて測定した。また、上清中の感染性ウイルス量については、以下の方法で定量した。

Naïve な Huh7 細胞に HCV-JFH1 を含む培地を加え、3 時間 37°C 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。 10^4 cells/well の濃度で naïve 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 コア蛋白または HCV-NS5A 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)

C. 研究結果

a. 候補蛋白の同定

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、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、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	1.87	1.56
glutathione S-transferase	1.75	1.64
calreticulin	-1.89	-1.89
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。FABP を含め、Glutathione S-transferase Pi day3 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。また、今年度新たにサイトケラチン 8 (KRT 8) とサイトケラチン

19 (KRT19) を同定した。平皿培養時には KRT 8 が高く、三次元培養時には KRT 19 が増加する。KRT 8 と KRT 19 はそれぞれ、胆管細胞および肝細胞のマーカーとして組織染色では汎用されている蛋白であり、細胞を三次元化することで、分化度があがった結果であることが推測された。

このように複数の候補因子を同定したが、同定した蛋白のうち脂質代謝に関与する蛋白が二種類同定された。Glutathione S-transferase Pi 及び FABP である。Glutathione S-transferase Pi は fatty acid ethyl ester synthase III という別名をもつ蛋白であり脂質代謝に関与している。FABP は脂肪酸と結合し、その脂肪酸の輸送と代謝に重要な役割をはたしている。この二つの蛋白の発現が亢進していたことから、脂質代謝全般が大きく動いていることが考えられた。近年、HCV 粒子形成の場が細胞内脂肪滴近辺である事等が報告されており、脂質代謝と HCV との関連は注目されている。競争の激しい分野であることから優先して検討を行った。まず発現増強が非常に顕著であった FABP に着目した。

b. FABP 発現レベルの比較

FABP は細胞内のエネルギー・脂質代謝及び疎水性リガンドの輸送を担う分子量 14kDa 程度の可溶性蛋白として知られている。様々な臓器で発現しており、組織特異的な複数のサブタイプが存在する。肝臓型 FABP は小腸等でも発現しているが肝細胞で特に発現がたかく、total cytosolic protein のうち 2-5% を占めている。長鎖脂肪酸、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、分岐鎖脂肪酸等様々な脂肪酸に結合する他、fatty acyl-CoA, haem, lysophosphatidic acid, eicosanoids, hypolipidemic drugs 抗高脂血症薬 (peroxisome proliferators) との結合が報告されており、特に脂質代謝とその輸送には大きな役割を果たしている事が考えられる。また、ウサギを用いた実験から、この蛋白の発現レベルはペルオキシソームの分化増殖に制御されていることがわかっている。

二次元培養と三次元培養時の発現レベルについてウエスタンブロッティングにて確認したのが図 1 である。

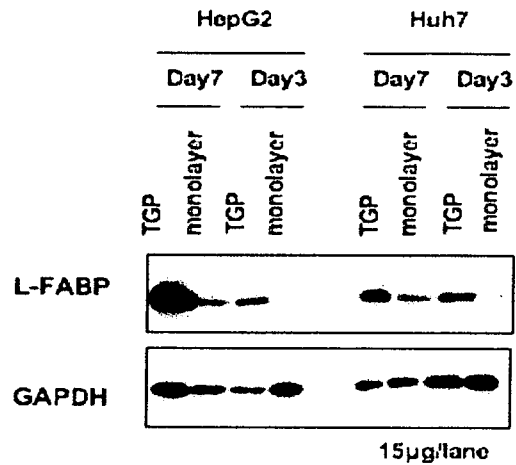


図 1 ; L-FABP 発現レベルの比較

肝癌由来細胞株 HepG2 及び Huh-7 細胞を 3 日または 7 日間 TGP または monolayer で培養し、細胞を回収し、FABP の発現レベルをウエスタンブロッティングにより比較した。いずれの場合も TGP 培養細胞で顕著に発現が上昇していた。ローディングコントロールとして GAPDH の発現レベルを示す。

図に示すように、L-FABP の発現レベルは day3, day7 いずれの場合も TGP 培養細胞で高かった。これは Huh-7 細胞と同様に肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いた場合でも同様の結果であった。

蛋白レベルでの発現変化を確認したので、mRNA レベルでの発現効率について検討した。その結果を図 2 に示す。

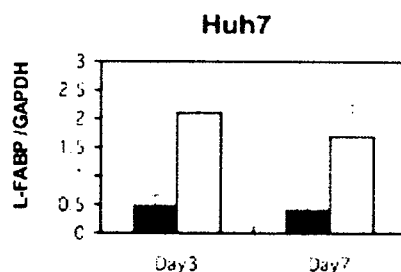


図 2 ; L-FABP の遺伝子発現レベルの検討

Huh-7 細胞を 3 日または 7 日 TGP または monolayer で培養し、細胞を回収し、RNA を抽出した。抽出

した RNA を用いて Real time RT-PCR 法により、GAPDH よび L-FABP の mRNA 量を定量した。黒い bar が monolayer、白い bar が TGP 培養細胞を示す。

L-FABP の mRNA は day3 及び day7 のいずれの場合も平皿培養時とくらべ TGP 培養時には約 4 倍亢進していた。以上の結果より、三次元培養細胞では L-FABP の発現が蛋白及び mRNA レベルの両方で亢進していることが明らかとなった。細胞の三次元化による L-FABP の遺伝子発現を調節する転写因子の発現亢進が考えられた。

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

FABP の発現が三次元培養細胞で確かに亢進していることを確認したので、高効率 HCV 粒子産生系である JFH1 感染細胞を用いてノックダウンによるウイルス粒子産生量の変化を検討した。

感染細胞に siFABP 及びそのコントロール配列 siFABPsc を導入し、24 時間後培地を除去し、PBS で三回 wash した後、新しい medium を加え、2h、4h、8h 後に培養上清を回収した。8 時間の時点で細胞を回収し、ウエスタンブロッティングによりノックダウンを確認した。その結果を図 3 にしめす。

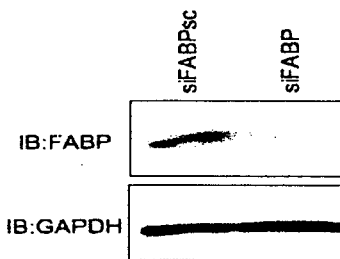


図 3; FABP のノックダウン効率の確認

感染細胞に siRNA を導入後、8h 後に培養細胞を回収し、ウエスタンブロッティングにより FABP 及び GAPDH の蛋白量について検討した。

図 3 に示す通り、siFABP 導入により、FABP の発現が約 90% 抑制された。一方、GAPDH の量はかわらなかった。次に回収した培養上清中の core 蛋白量を定量した結果を図 4 に示す。

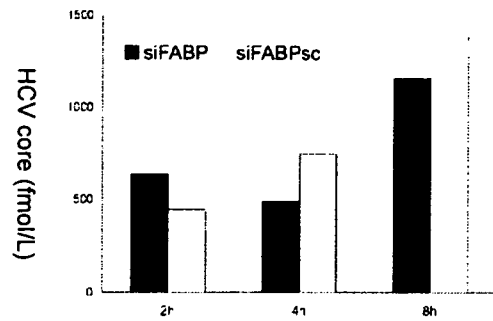


図 4; FABP ノックダウンによる上清中の HCV コア蛋白量の変化

感染細胞に siRNA を導入後、24 時間の時点で培地を交換し、その時点から 2h、4h、8h 後に培養上清を回収した。この培養上清中の HCV コア蛋白量を ELISA により定量した。黒い bar は FABP に対する siRNA をくわえたもの、白い bar はコントロールとして作製したスクランブル配列を加えたものを示す。

図 4 に示したように、培養上清中の HCV コア蛋白量は FABP のノックダウンを行った場合、培地交換後 4 時間、8 時間の時点でコントロールと比較して、70-80% 程度減少していた。

次に培地交換後 8 時間の培養上清中の HCV 感染性粒子量について検討した。

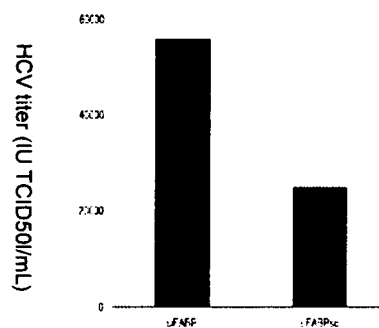


図 5 ; 培養上清中の感染性粒子量の変化

感染細胞に siRNA を導入後、24 時間の時点で培地を交換し、その時点から 8h 後に培養上清を回収した。この培養上清中の感染性 HCV 量を定量した。縦軸に感染性 HCV 量を示す。

図 5 に示したように、FABP をノックダウンした場合、培養上清中に存在する感染性粒子量は約 2

倍に増加した。図3に示したHCVコア蛋白量ではFABPをノックダウンした場合には、ややコア蛋白量が減少している結果となっていた。FABPのノックダウンによって、培養上清中のHCV粒子の量ではなく、質的な変化が起きている可能性も考えられた。

d. 候補宿主因子のノックダウン効率の検討

FABP以外の候補宿主因子のsiRNAをHuh-7細胞に導入し、24-96h後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングによりノックダウン効率を検討した。このうち、KRT19及びtubulin-betaについての結果を図6,7に示す。

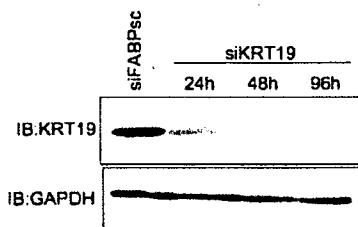


図6:KRT19のノックダウン

siKRT19もしくはsiFABPscをHuh7細胞に導入し、24-96h後に細胞を回収して、ウェスタンブロッティングによりKRT19及びGAPDHの発現量について検討した。siFABPscは96h後に回収したもののみ示す。

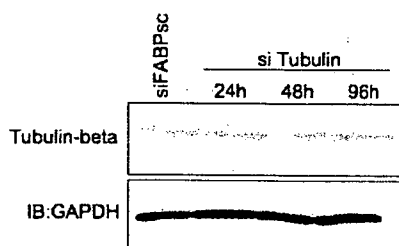


図7:tubulin-betaのノックダウン

siTubulinもしくはsiFABPscをHuh7細胞に導入し、24-96h後に細胞を回収して、ウェスタンブロッティングによりtubulin-beta及びGAPDHの発現量について検討した。siFABPscは96h後に回収したもののみ示す。

KRT19についてはノックダウン後24時間で

80%、48hで90%、96hでほぼ100%のノックダウン効率を得られた。一方、tubulin-betaについてはほとんどノックダウンできていなかった。Tubulinのノックダウンでは回収した蛋白量が非常に少なかったが、ノックダウン効果が十分得られた細胞がdishより剥離しやすくなり最終的に回収できなかった可能性が考えられた。

CDH等他の宿主因子についても同様に検討し、現在までにFABP及びKRT19を含めた5種の候補因子についてのノックダウン条件を決定した。

D. 考察

a. 三次元培養の条件検討

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

d. FABPノックダウンによる効果とその検討

FABPの発現は蛋白レベルおよびmRNAレベルいずれの場合にも三次元培養時には有意に上昇していた。しかしながら、平皿培養細胞でのノックダウン実験の結果では、FABPの発現を押さえた場合にHCV粒子産生量が上昇するという結果になった。

FABPのノックダウンにより培養上清中の感染性粒子が増加したという結論は当初の予測と反している。三次元培養細胞ではHCV-RNA複製がむしろ減少するというを以前に報告しており、このことからFABPがHCV-RNA複製を負に制御する蛋白である可能性も十分考えられる。脂肪酸がHCV-RNAの複製を抑制することは報告されているが、FABPの果たす役割については未知である。この点を明らかにするためには、培養上清のみならず、感染細胞内のHCV-RNAのtiterやウイルス蛋白の定量を通してFABPがHCVの生活環に及ぼす影響について詳細に検討する必要があるだろう。

また、FABPをノックダウンした際の培養上清中のHCVコア蛋白量とHCV感染性ウイルス量の変動は異なっており、培養上清中のHCV粒子の量ではなく、質的な変化が起きている可能性は十分に考えられる。FABPは細胞外からの脂肪酸の取り

込みに関与しているが、細胞内脂肪酸の量の変化により、LDL等の産生等に影響していることは十分に考えられる。この点を考慮すると、ウイルス粒子の密度等について検討する他にも、ウイルス粒子と結合している可能性が高い LDL等の産生量についても精査する必要があるだろう。

c. 宿主因子のノックダウン条件の検討

候補遺伝子について siRNA によるノックダウンを行い、FABP, KRT19 等で十分なノックダウン効率をえる条件を決定した。しかしながら、tubulin 等いくつかの宿主因子では十分なノックダウン効率が得られなかった。この原因として、いくつかの理由が考えられる。

第一にターゲットとした配列が問題となる場合が考えられる。今回用いた細胞は Huh-7 細胞であるが、ノックダウン配列をデザインする際に参考にしたのは GenBank に登録されている配列である。一塩基多型等がある場所をターゲットとしている可能性もあるため、他の領域をターゲットとした siRNA をデザインし、検討する必要があるだろう。

第二に、ノックダウンしたことによる細胞障害性が原因となっている場合が考えられる。Tubulin のノックダウンでは回収した蛋白量が非常に少なかったが、ノックダウン効果が十分得られた細胞が dish より剥離しやすくなり最終的に回収できなかった可能性が考えられた。

FABP については、十分なノックダウン効率がえられ、また感染細胞での検討も行ってきた。しかしながら、siRNA によるノックダウンの実験の場合、予想外のターゲットを同時にノックダウンしている可能性や dsRNA の導入による IFN 系シグナルの影響等、考えなくてはならない可能性が数多くある。今後は、これらの様々な可能性を排除するためにも他の配列をターゲットとした siRNA を作製し、ノックダウン実験を行う必要があるだろう。

E. 結論

1. TGP 培養と平皿培養で発現に差のある蛋白をプ

ロテオーム解析用いて検討し、新たに KRT19 等を同定した。

2. TGP 培養細胞では FABP の発現が、蛋白及び mRNA のレベルで平皿培養時と比較し、有意に上昇していた。

3. FABP のノックダウン条件を検討し、十分にノックダウン可能な条件を決定した。また、高効率 HCV 粒子産生系を用いて検討したところ、ノックダウンにより培養上清中に産生される HCV 感染性粒子の量は増加した。

4. FABP, KRT19 を含む 5 種類の宿主因子についてノックダウン条件を決定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyoko Murakami, Yasushi Inoue, Su-Su Hmwe, Kazuhiko Omata, Tomokatsu Hongo, Koji Ishii, Sayaka Yoshizaki, Hideki Aizaki, Tomokazu Matsuura, Ikuo Shoji, Tatsuo Miyamura, and Tetsuro Suzuki.; Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system

J. Virol. Methods. 2008 Mar;148(1-2): 174-181.

2. Kyoko Murakami, Toshiro Kimura, Motonao Osaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita and Ikuo Shoji; Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines

J Gen Virol. *in press*.

2. 学会発表

1. Murakami K., Shoji I., Hamamoto I., Suzuki T., Miyamura T., Wakita T. ; Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes

14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2007 年 9 月

2. 村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字; 系細胞における HCV JFH-1 株の感染および複製の検討