

C型肝炎ウイルス粒子形成機構におけるNS5A蛋白質の役割

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

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）粒子形成の分子機構、特に、新たに合成されたウイルスRNAが構造蛋白にリクルートされパッケージングされるメカニズムはほとんど解明されていない。本年度我々は、HCVの非構造蛋白質のひとつNS5AのC末端領域がHCV粒子形成にとって重要であること、粒子形成過程にNS5A-Coreの相互作用が関与していること、を示す知見を得た。HCV粒子形成の初期過程において、新たに作られたウイルスRNAがNS5Aによって捕捉され、更にこのNS5A-HCV RNA複合体がCore蛋白質と会合することがRNAパッケージングの引き金になる可能性が考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）粒子形成の分子機構は未だ不明な点が多い。特に、細胞内膜画分で新たに合成されたウイルスRNAがどのように構造蛋白にリクルートされパッケージングされるのかは全く解明されていない。非構造蛋白NS5Aはリン酸化蛋白でありHCV RNA複製複合体を形成する。また、そのN末端側にRNA結合領域を有すること、またCore蛋白質と相互作用する可能性があることなどが報告されている。そこで、本研究ではNS5A蛋白がHCV粒子形成に関与する可能性を考え、NS5A変異が粒子形成に及ぼす影響、Core-NS5A相互作用等の解析を行った。

B. 研究方法

HCV遺伝子型2a JFH-1株のゲノムcDNAプラスミド（pJFH1）またサブジェノミックレプリコンプラスミド（pSGR-JFH1/Luc）をXbaI切断により直鎖化し精製後、これらを鋳型として試験管内にてRNA合成を行った。得られたRNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞へ導入した。ゲノムRNA導入細胞では、細胞内外のHCV Core蛋白質及びRNAをELISA法、リアルタイムRT-PCR法でそれぞれ定量することによりウイル

ス産生を評価した。サブジェノミックレプリコンRNA導入細胞では、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定することによりHCV RNA複製をモニターした。NS5A変異コンストラクト（pJFH1/m1, /m2, /m3; pSGR-JFH1/m1, /m2, /m3）はPCRを利用した部位特異的変異導入法によって作製し、各wild-typeと同様にRNAを調製し細胞へ導入した。

Core-NS5A相互作用解析には、FLAG-tagged-Core発現プラスミド、HA-tagged-NS5A発現プラスミドを用いた。293T細胞へco-transfectionした後、抗FLAG抗体によって免疫沈降を行い、沈降検体について抗HA抗体または抗FLAG抗体を一次抗体としたウエスタンブロット解析を行った。

C. 研究結果

種々のNS5A変異を導入したHCVゲノム及びサブゲノムRNAレプリコンを作製し（図1A）、RNAトランスフェクション後、ウイルス産生（培養上清中のウイルレベル）（図1B）及び細胞内のRNA複製（図1C）を解析した。その結果、NS5A C末端側のセリンクラスターをアラニンに置換した場合（JFH1/m2）、RNA複製には全く

影響を与えないものの、ウイルス粒子産生が10分の1以下に低下することが示された。これまで、多くのNS5A変異体(例えばN末端側変異)でHCV RNA複製効率が低下することが報告されてきたが、今回、RNA複製に影響を与えず粒子産生を低下させるNS5A変異を見出した。

NS5A蛋白質が粒子形成に関与する機構として、パッケージングされるべきHCV RNAを構造蛋白へ橋渡しする役割を担う可能性が考えられる。そこで、NS5A変異によってNS5A-Core蛋白質の相互作用が影響を受けるかどうかを免疫沈降—ウエスタンブロット法で解析した(図2)。その結果、wild-type (WT)及び粒子産生効率に影響しなかったm1ではNS5A-Core相互作用が認められたのに対し、粒子産生が低下したm2, m3ではこのような相互作用は観察されなかった。さらに、Wild-typeのHCVゲノム導入細胞(JFH1/WT)とm2変異を持つHCVゲノム導入細胞(JFH1/m2)について細胞内でのNS5AとCore蛋白の局在を免疫蛍光法で調べた。Wild-typeではNS5AとCoreが細胞質(おそらくERとlipid droplet)で共局在するが、m2ではそのような共局在は認められなかった。

D. 考察

本研究により、NS5A蛋白質のC末端領域がHCV粒子形成にとって重要であることが見出され、粒子形成過程にはNS5A-Coreの相互作用が関与する可能性が示唆された。HCVの粒子形成過程の分子機構として以下のモデルを考えている。(1)複製複合体によって新生されたウイルスRNAはNS5AのN末端領域によって捕捉される。(2)Core蛋白質とこのNS5A-HCV RNA複合体が細胞質内で会合することがCore蛋白によるRNAパッケージングの引き金になる。

NS5A蛋白質のC末端セリンクラスターはリン酸化されることが示唆されている。NS5A蛋白質のリン酸化がCore蛋白質との相互作用、粒子形成における機能にとって重要であるかなどを今後明らかにしていきたい。

E. 結論

HCV NS5A蛋白質のC末端領域がウイルス粒子形成にとって重要であること、また粒子形成過程にNS5A-Coreの相互作用が関与していることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* (in press).
2. Tagawa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* (in press).
3. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods.* (in press).
4. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212 (2007).
5. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23 (2007).
6. 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, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and

- degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81:1174-1185 (2007).
7. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
 8. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1661-1666 (2007).
 9. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect.* 9: 515-21 (2007).
 10. Mizutani T, Endoh D, Shirato K, Shimizu H, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Kwang L, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 322-324 (2007).
 11. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J. Virol.* 81: 8030-8040 (2007).
 12. Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T. Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 173-178 (2007).
- G. 知的所有権の出願・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。

図 1. HCV粒子形成におけるNS5A蛋白質の役割

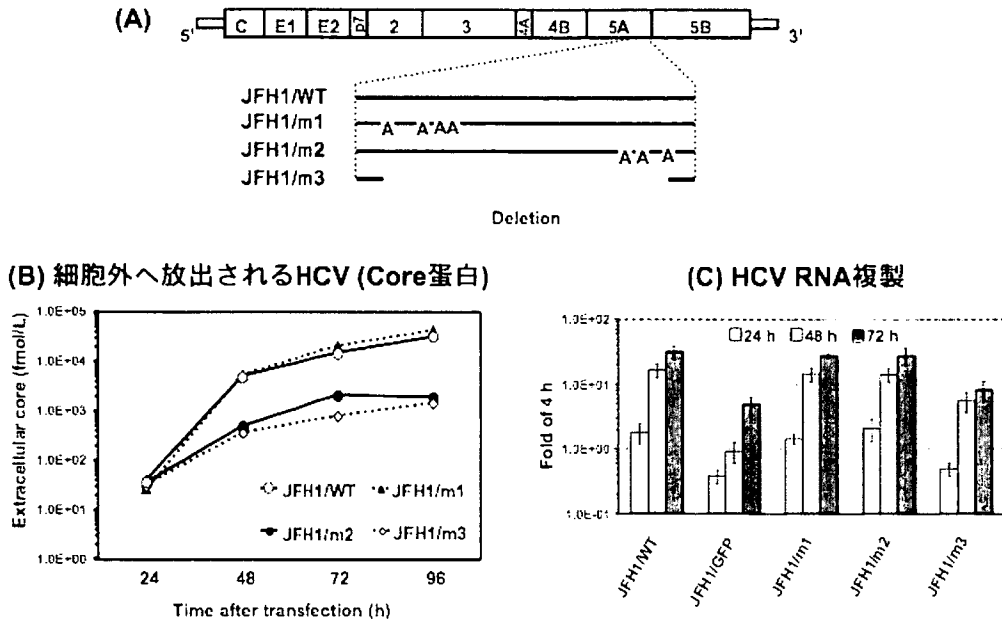
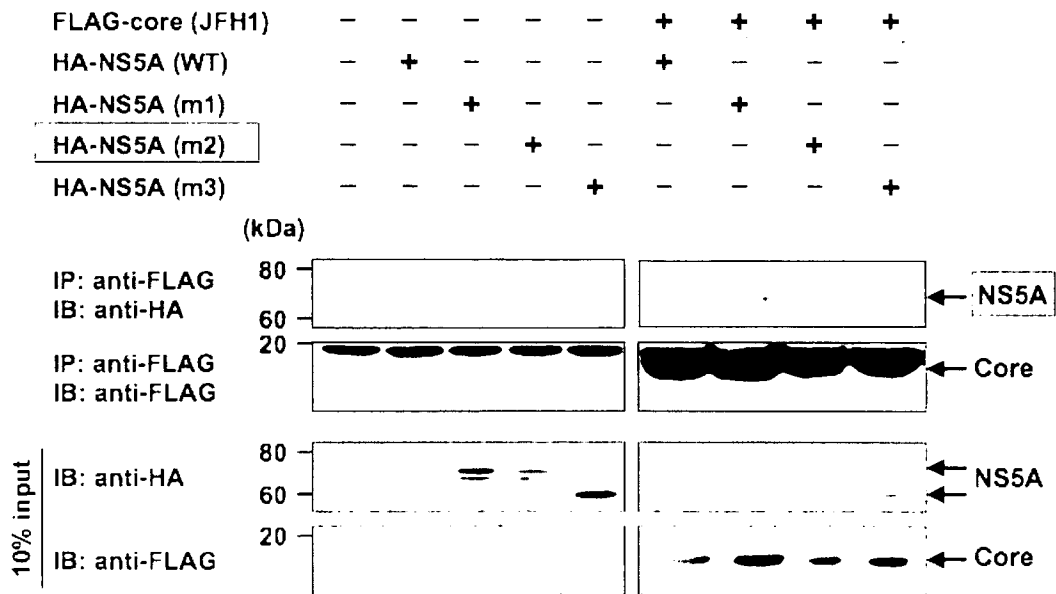


図 2. HCV Core-NS5A蛋白質相互作用



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

HCV の持続感染維持機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染維持機構の解明を目的として実験（2項目）を行い、以下のような成果を得た。実験項目1：HCV増殖に必要な宿主因子の探索（1）親株のHuH-7細胞からHCVRNAの複製レベルが高い細胞株と低い細胞株を選別樹立した。（2）HCVRNAの複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している4種類の宿主遺伝子をマイクロアレイ解析により抽出した。実験項目2：IFN抵抗性全長HCVRNA複製細胞株の樹立と抵抗性になる要因の解析（1）全長HCVRNA複製細胞（HCVRNAの複製レベルを定量できるOR6アッセイシステム）からIFNに抵抗性を示す細胞株を樹立した。（2）IFN抵抗性の要因は主に宿主側に依るものと考えられたが、一部ウイルス側の寄与も示唆する結果を得た。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その9割以上には肝炎ウイルスの感染が認められる。特に、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割を占めている。HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞がん化の重要な因子である。しかしながら、C型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）を主体にした現在の治療成績は向上してはいるが50%程度である。新しい治療法の開発に手間取っている理由の1つとしてHCVの持続感染が維持される分子機構についてあまりよく理解されていないことが挙げられる。そのためにはまず、HCVの持続感染、すなわち細胞内におけるHCVの持続的増殖を引き起こしている宿主因子を明らかにする必要がある。また、HCVはどのような因子（ウイルス側および細胞側）を利用してIFN

に対して抵抗性を獲得するかについても解明する必要がある。これらの因子の全体像を明らかにすることができれば、それらを標的にしてHCVの持続的増殖を阻止する方法を開発することが可能になるものと期待される。

本研究では、我々が独自に樹立したHCVレプリコン複製細胞や全長HCV RNA複製細胞を実験系として用いて、HCVの持続的増殖を支持するウイルス側および宿主側因子を解明することを目的として以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

（1）HCV増殖に必要な宿主因子の探索
ルシフェラーゼ活性を測定することによりHCVRNAの複製レベルを測定できる全長HCVRNA複製細胞全長であるOR6細胞をIFN- γ で処理（500-1000 IU/mlを4日ごとに添加して3週間）して、全

長 HCV RNA を排除した治癒細胞 (OR6c) を作成した。OR6c 細胞に *in vitro* で作成した HCV レプリコン RNA をエレクトロポレーション法により導入して HCV レプリコン複製細胞を作成、幾つかをクローン化した。細胞株として得られたクローン化細胞を再度 IFN- γ で処理して、それぞれの治癒細胞を作成した。また、一方、ネオマイシン耐性遺伝子の代わりにチミジンキナーゼ遺伝子をコードする HCV レプリコン RNA を作成して 0c 治癒細胞に導入後、ガンシクロビル (GCV) にて細胞を選択した (ネガティブセクション法)。

大部分の細胞は GCV 処理により死滅するが、GCV 耐性として得られたコロニーから幾つかの細胞株 (HCV RNA の複製レベルが低いと予想される) を得た。

以上の実験により得られた細胞に *in vitro* で合成した HCV レプリコン RNA (QR/3-5B/QR, KE) をエレクトロポレーション法により導入して経時的 (24, 48, 72 および 96 時間) にルシフェラーゼ活性を測定してレプリコン RNA の複製効率を調べた。

HCV レプリコン RNA (QR/3-5B/QR, KE) の複製効率の異なる細胞から RNeasy extraction kit を用いて Total RNA を調製し、Affmetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.9 array, 47000 genes) による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

(2) IFN 抵抗性全長 HCV RNA 複製細胞株の樹立と抵抗性になる原因の解析

OR6 細胞 (OR6(O):Original type) に

IFN- α (5 IU/ml 又は 10 IU/ml) を 4 日ごとに 2-3 週間処理し、その後 G418 (0.3 mg/ml) 存在下 3 週間培養した。得られた OR6 細胞 (OR6(R):Resistant type of 1st generation) から Total RNA を調製して、OR6c 細胞にエレクトロポレーション法にて導入、その後 G418 (0.3 mg/ml) 存在下 3 週間培養して G418 抵抗性 OR6 細胞 (OR6(R):Resistant type of 2nd generation) を得た。このような IFN 処理と並行して、IFN 処理を行わないで同様の操作を OR6 細胞 (OR6(O):Original type) に行い、2 種類の対照細胞 (OR6(P):Parent type of 1st generation と OR6(P):Parent type of 2nd generation) を得た。

得られた 4 種類の細胞 (OR6(R):Resistant type of 1st generation、OR6(R) Resistant type of 2nd generation、OR6(P):Parent type of 1st generation、OR6(P):Parent type of 2nd generation) に IFN- α (1~60 IU/ml) を添加して、72 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。IFN- β (4 IU/ml まで)、IFN- γ (4 IU/ml まで)、フルバスタチン (16 μ M まで)、シクロスポリン (1 μ g/ml まで) についても薬剤添加後、同様の測定を行った。

1st generation の OR6(P) 細胞と OR6(R) 細胞由来の Total RNA を RNeasy extraction kit にて調製し Superscript III と KOD-plus DNA polymerase を用いた RT-PCR 法により、全長 HCV RNA を増幅した。得られた増幅産物について直接法により HCV RNA の塩基配列を決定して Original type の

HCVRNA (OR6 (O) 細胞由来) の塩基配列と比較した。

(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。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) HCV 増殖に必要な宿主因子の探索

OR6c 細胞に再度 HCV レプリコン RNA を導入して作成したクローン化細胞群とチミジンキナーゼ遺伝子を利用したネガティブセレクション法により単離したクローン細胞群から作成した治癒細胞における HCV レプリコン RNA の複製効率を調べた結果、大きな差があることが分かった。

レプリコン RNA を細胞内に導入 96 時間後に測定したルシフェラーゼ活性を指標にした。全長 HCVRNA 複製細胞である O 細胞から作成した Oc 細胞で得られたルシフェラーゼ活性と比較すると OR6c 細胞、s0/J4c 細胞、s0/J2c 細胞では 3 倍、5 倍、9 倍と高くなっており、さらに、s0/J3c 細胞では 10 倍複製効率が高くなっていることが分かった。逆にネガティブセレクション法により単離した Oc/clone 2 細胞では 1/10 に低下しており、さらに、Oc/clone 9 細胞では 1/100 以下に複製効率が低くなってい

ることが明らかとなった。

これらのデータから、s0/J2c と s0/J3c 細胞を RNA 複製効率の高い High fitness 細胞、そして Oc/clone2 と Oc/clone9 細胞を RNA 複製効率の低い Low fitness 細胞として位置付け、Oc 細胞をその中間 (基準) としてマイクロアレイ解析を行った。Oc 細胞と比較して Low fitness 細胞群で共通して発現レベルが 1/2 以下に低下している遺伝子として 19 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子の中で、Oc 細胞と比較して High fitness 細胞群で共通して発現レベルが 1.5 倍以上亢進している遺伝子は以下の 4 遺伝子であった (Group-specific component (GC)、Hyaluronan-binding protein 2 (HABP2)、Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3 (SLC01B3)、serum amyloid A4, constitutive (SAA4))。これらの遺伝子産物が HCV 蛋白質と相互作用を示し、HCVRNA の複製に影響を与えている可能性があるため、現在、全長 HCVRNA 複製細胞においてこれらの遺伝子をノックダウンさせる実験を進めている。

(2) IFN 抵抗性全長 HCVRNA 複製細胞株の樹立と抵抗性になる原因の解析

Original type の OR6 (O) 細胞を IFN- α (5 IU/ml 或は 10 IU/ml) で処理することにより得られた 1st generation と 2nd generation の OR6 (P) および OR6 (R) 細胞について、HCVRNA の複製に対する IFN- α の感受性に違いが認められるかどうかをルシフェラーゼ活性を測定す

ることにより評価した。その結果、1st generationのOR6(P)およびOR6(R)細胞では、細胞を樹立する際に用いたIFN- α の量が5 IU/mlでも10 IU/mlであっても、有意に($P < 0.05$) OR6(R)細胞の方がIFN- α に対して抵抗性になっていることが分った。IFN- α 抵抗性の程度は10 IU/mlのIFN- α を使用して樹立したOR6(R)細胞の方が高かった。この場合におけるIFN- α のEC₅₀値はOR6(P)細胞で0.60 IU/ml、OR6(R)細胞で1.32 IU/mlであった。また、EC₉₀値でも、OR6(P)細胞で3.5 IU/ml、OR6(R)細胞で6.7 IU/mlと差が認められた。宿主因子の関与を除いた2nd generationのOR6(P)およびOR6(R)細胞についてもIFN- α 感受性に関する同様の測定を行った結果、1st generationより、IFN- α 抵抗性の差は小さくなるものの、やはり有意に($P < 0.05$) その傾向は残っていることが分った。以上の結果から、今回IFN- α 抵抗性として得られたOR6細胞由来の全長HCV RNA複製細胞がIFN- α 抵抗性になった要因は大部分宿主因子にあると推定されたが、一部ウイルス側因子の関与もあることが示唆された。

ウイルス側因子の手がかりを得るために、OR6(R)細胞内のHCV RNAに変異が生じていないかどうかを調べた。RT-PCR産物をDirect sequencing法により検討した。その結果、対照細胞(OR6(P))由来のHCV RNAにはOriginalな配列と比較すると、アミノ酸置換を伴うような変異が全体で7カ所と比較的多く検出されたが、OR6(R)細胞由来のHCV RNAでは4カ所のみで、OR6(P)細

胞の場合と同じものは1カ所のみであった。以上の結果、OR6(R)細胞で認められたアミノ酸置換を伴う3カ所の変異(E1領域に2カ所とNS3領域に1カ所)がIFN- α 抵抗性に関与する可能性もある。

次に、今回得られたIFN- α 抵抗性という現象がIFN- α に特異的で他の抗HCV剤では認められないのかどうかを1st generationのOR6(P)とOR6(R)細胞を用いて調べた。その結果、OR6(R)細胞ではOR6(P)細胞と比較してIFN- α と同じ受容体を使うIFN- β に対しても抵抗性になっているが、IFN- γ 、フルバスタチンおよびシクロスポリンではまったく差がないことを確認した。これらの事実から、今回得られたOR6(R)細胞はI型IFNのシグナル伝達系のみ抵抗性になっているということが明らかになった。

D. 考察

(1) HCV増殖に必要な宿主因子の探索

これまでに、我々は全長HCV RNAの複製効率を支持する宿主因子としてRNAヘリカーゼDDX3を見出しているが、この発見はHCVコア蛋白質に結合する蛋白質として知られていた分子をピンポイント式に調べた結果であるという幸運な面を考えると、新たな因子を見出すという点では使えない手法である。そこで、我々は網羅的にこのような宿主因子を探索できないかと考え、本研究をスタートさせた。初年度においては、HCV RNAの複製レベルの異なる細胞群を用いたマイクロアレイ解析を行い、

最終的に4遺伝子が選択された。これらの遺伝子は肝臓でよく発現しているものであるが、現在までのところC型慢性肝炎との関係を示唆する報告はない。今後、これら4遺伝子とHCV複製との関係の有無を調べる予定である。これと並行して、Low fitness細胞にヒトcDNA発現ライブラリーを導入して、High fitness細胞に変化した細胞をスクリーニングする実験を進めている。このような試みから新規宿主因子が得られる可能性もある。また、我々が樹立したHigh fitness細胞とLow fitness細胞はHCVRNAの複製に特異的なのかどうかについても他のウイルスRNA複製系を用いて明らかにする予定である。

(2) IFN抵抗性全長HCVRNA複製細胞株の樹立と抵抗性になる原因の解析

今回、IFN治療を受けている肝炎患者における血中濃度(最大100 IU/ml)よりかなり低いIFN濃度(5や10 IU/ml)でHCVRNA複製細胞を複数回処理することによって、わずかではあるが、IFN抵抗性に変化することを見出した。今回の実験ではIFN処理期間を2-3週間としたが、肝炎患者に対する実際の治療では約1年間、IFNに暴露されることから、よりIFNに抵抗性になっても不思議ではない。細胞で見られた現象を引き起こす分子機構がそのまま患者に当てはまらないということも十分考えられるが、適当な動物実験モデルがない現状では、今回用いた細胞実験システムでIFN抵抗性になる分子機構を解明できれば、患者で起

こっているIFN抵抗性の機構解明により近づけるのではないかと考えられる。また、今回得られたIFN抵抗性株ではIFN処理を中止して数日経過すると、再びHCVRNAの複製レベルが再上昇してくることから、臨床上よく認められる治療後再発のモデルシステムとして使用することが可能ではないかと思われる。つまり、このような実験システムを用いることにより、EC₅₀値程度の低濃度のIFNと併用して完全にHCVRNAの複製を抑制することができる薬剤の探索や評価に役立つものと思われる。このようなモデルシステムとして有用かどうかの検定を今後行う予定である。

E. 結論

選別樹立したHCVRNAの複製レベルが高い細胞株と低い細胞株を用いたマイクロアレイ解析を行い、HCVRNAの複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している4種類の宿主遺伝子を抽出した。

全長HCVRNA複製細胞(OR6細胞)からIFNに抵抗性を示す細胞株を樹立し、IFN抵抗性となる要因を解析した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus

- serine protease in cultured human hepatocytes. FEBS J. 274:4161-4176 (2007).
- 2) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. J Pharmacol Sci. 105:145-150 (2007).
 - 3) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:1277-1289 (2007).
 - 4) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. J. Virol. 81:13922-13926 (2007).
 - 5) Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2016-2027 (2007).
 - 6) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain 0 of genotype 1b) replication. Virus Res. 125:162-168 (2007).
 - 7) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. Virus Res. 125: 88-97 (2007).
 - 8) Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr, JA, Schreiber SL, Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of hepatitis C virus replication using a high-throughput screen. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3756-3759 (2007).
 - 9) Abe K, Nozaki A, Tamura K, Ikeda M, Naka K, Dansako H, Hoshino H, Tanaka K, 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).
2. 学会発表
 - 1) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. Limited suppression of the interferon- β production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007年7月.
 - 2) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 抗HCV剤治療効果の増強が期待される物質の網羅的スクリーニング—C型肝炎に対する治療効果の最大化を目指して—. 第43回日本肝臓学会総会、東京、2007年5月.

- 3) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 持続的な全長HCV RNA複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発. 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.
- 4) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 全長HCV RNAの複製に影響を与える日常的に摂取する栄養成分の同定および評価. 第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.
- 5) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 6) Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive analysis of the ordinary nutrients as the novel partners of anti-HCV reagents. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 7) 池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. C型慢性肝炎に対する新しい治療剤候補の培養細胞アッセイ系を用いた探索・評価. 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007年7月.
- 8) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 日常的に摂取し抗HCV効果を有する栄養成分の

全長HCV RNA複製細胞を用いた網羅的探索. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許番号：第4009732号
出願番号：特願2006-101483号 発明の名称：レポーター遺伝子産物を発現するHCV全長ゲノム複製細胞、並びに、当該細胞を用いたスクリーニング方法およびスクリーニングキット

発明人：加藤 宣之、池田 正徳

特許権者：岡山大学

出願日：2006年4月3日

特許原簿登録日：2007年9月14日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
分担研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教授

研究の要旨

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の発現を介して自然免疫、獲得免疫の効率的な活性化に関与する。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、各アゴニストによる IFN- β 、TNF- α 、IL-12 などの産生は低下していた。その機序として TLR3、TLR4 のアダプター分子である TRIF、TRAF6 の発現低下が関与している可能性が示唆された。また HCV の NS3/4A プロテアーゼ阻害剤により MDC のサイトカイン産生能は改善した。以上より、C 型肝炎患者 MDC における TLR の機能低下は HCV プロテアーゼによる TRIF、TRAF6 の発現低下が関与しており、その阻害によって MDC 機能回復効果が得られるため、新たな免疫療法の治療標的になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）は強力な抗原提示細胞であり、ウイルス、癌に対する免疫応答の中心的役割を果たしている。我々の検討により C 型慢性肝炎患者ではミエロイド DC（MDC）とプラズマサイトイド DC（PDC）が減少しており、MDC の Th1 誘導能や PDC の IFN 産生能が低下していることが明らかになった。DC には Toll 様受容体（TLR）や RIG-I が発現しており、ウイルス感染を感知して免疫応答を効果的に発動させる。HCV 感染においてもウイルス感知系が免疫病態に関与していると想定されるが、その発現と機能については明らかではない。本研究では C 型肝炎患者の DC における TLR/RIG-I の発現と機能を解析し、HCV による DC 機能修飾機序を解明すること、また DC の機能制御によって HCV 排除、肝発癌予防の治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

C 型肝炎患者および非感染者の末梢血より MDC を分離し、各 TLR/RIG-I に特異的なアゴニストを用いて MDC を刺激し、サイトカイン産生を検討した。MDC におけるシグナル伝達機構を明らかにするために、PCR-Array を用いてシグナル関連分子を網羅的に比較した。また TLR/RIG-I のアダプター分子に関しては、その発現量を多数例で比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は C 型肝炎患者で亢進していたが、TLR3、MDA-5 の発現は非感染者と同程度であった。TLR3、TLR4 のアゴニスト刺激による MDC の IFN- β 、TNF- α 、IL-12p70 の産生量は C 型肝炎患者で低かった。PCR-Array

により患者 MDC では IFN 系、NF- κ B 系、MAPK 系のシグナル分子の発現が全般的に低下していた。また患者 MDC において MyD88、IPS-1 の発現は高値であったが、TRIF、TRAF6 の発現は低下していた。NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の前処理により、患者 MDC のサイトカイン産生能は部分的に回復した。

D. 考察

C 型肝炎患者 MDC における TLR/RIG-I 系の機能低下が示された。これは DC が HCV などの病原体を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆している。その機序として TRIF、TRAF6 の発現低下が関与する可能性が示唆された。NS3/4A 阻害剤によって MDC のサイトカイン産生能回復効果が得られ、同薬剤は HCV 複製抑制のみならず、免疫賦活効果も期待できる可能性が示された。

E. 結論

C 型肝炎患者 MDC における TLR 機能低下に TRIF-TRAF6 の系が関与しており、HCV に対する新たな免疫療法の治療標的になり得る可能性が示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanto, T. et al. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatology Res* 2007 37 Suppl 3: S319-326.

Itose, I. et al. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 2007 79: 511-521.

Miyatake, H., et al. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007 14: 404-412.

Takehara, T., et al. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int J Cancer* 2007. 120: 1252-1260.

2. 学会発表

Kanto, T., et al. Dendritic cells and regulatory T cells as decision makers for the duration of pegylated interferon- α and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, November 2-6, 2007.

Itose, I., et al. Involvement of regulatory T cell dynamics in the achievement of biochemical response in 48-week PEG-IFN α 2b and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C patients. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, November 2-6, 2007.

Miyazaki, M., et al. Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in HCV-infected individuals. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, November 2-6, 2007.

Miyatake, H., et al. Involvement of IL-7 and thymic stromal lymphopoietin in functional impairment of myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, November 2-6, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

分担研究報告書

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

分担研究者 井廻 道夫 昭和大学医学部教授

研究要旨 新たにC型慢性肝炎患者で細胞障害性T細胞（CTL）が認識するC型肝炎ウイルス（HCV）抗原エピトープを決定した。CTLが認識する最小最適エピトープはHCV蛋白NS3 1618-1626アミノ酸LHGPTPLLYで、HLA拘束性は現在検討中である。また、肝炎患者の肝浸潤制御性T細胞（Treg）を検討し、C型慢性肝炎患者では肝組織にTregの浸潤が強い症例がB型慢性肝炎患者より多いことを見いだした。

A. 研究目的

C型肝炎に対するペプチドワクチンの開発を目指し、日本人におけるHCV特異的CTLエピトープのlibraryを作る目的で、HCV蛋白全体をカバーするオーバーラッピングペプチドを用い、マトリックスセッティングのELISpotアッセイにより新しいCTLエピトープを同定する。同時に免疫応答を抑制するTregのC型慢性肝炎患者の肝組織における検討を行う。

B. 研究方法

HCV特異的CTLエピトープは、HCV蛋白全体をカバーし、10アミノ酸ずつオーバーラップする297種類の20アミノ酸のペプチドをマトリックスセッティングで10種類ずつ（1組のみ7種類）混合し、C型肝炎患者の末梢血単核球のCD8陽性細胞を、マクロファージを抗原提示細胞として混合ペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞を算定することによりスクリーニングした。マトリックスセッ

ティングによるペプチド混合物刺激であるため、陽性ウェルの組み合わせにより直ちにエピトープペプチドが推定された。同定したCTLエピトープペプチドについて、両端のアミノ酸を削ったペプチドを作製し、最小最適エピトープの決定も行った。

肝浸潤Tregの検討は、ホルマリン固定された肝組織を抗FoxP3抗体で免疫組織染色することにより行った。

（倫理面への配慮）

この研究は昭和大学医学部の研究倫理委員会の承認を得、患者からはインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究成果

HCV蛋白全体をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いたマトリックスセッティングのELISpotアッセイによりHLA A*2402, B*3501, 4002, Cw*0303, 0304, 遺伝子型2型低ウイルス量のC型慢性肝炎患者でHCV NS3 1617-1626にCTLエピトープが含まれる

ことを証明した。NS3 1617-1626 のペプチドのN端あるいはC端から1個あるいは2個アミノ酸を削除したペプチドを作成し、検討した結果、NS3 1618-1626 が最小最適エピトープと判明した。HLA 拘束性は現在検討中であるが、NS3 1610-1630 には HLA-A2.1 および B8 の CTL エピトープも存在し、この部分は抗原性が高いものと考えられる。今回の症例は長い経過のC型慢性肝炎であるにも、治療前からHCV特異的CTLが血中に検出され、これまでの例と異なり治療中にCTLの数が減少することもなく、C型急性肝炎でみられるCTLの動態であった。尚、この症例は16週のpegインターロン、レベトール併用療法でSVRとなった。

一方、慢性ウイルス感染症では、CTL応答を抑制する機序としてTregの存在が報告されている。TregはCTL応答を抑制することにより、C型肝炎治療に対して負の作用を持つ可能性がある。C型慢性肝炎患者肝組織では健常組織と比べTregの数が増加しているが、B型慢性肝炎の肝組織と比較し、Tregが多い症例が多く、Tregのコントロールも将来のC型慢性肝炎の治療戦略の1つと考えられる。

E. 結論

今回、新たにHCV NS3 1218-1626をCTLエピトープと同定し、日本人におけるHCV特異的CTLエピトープのlibraryに加えた。HCV NS3 1610-1630にはこのCTLエピトープも含め少なくとも3種類のCTLエピトープが存在する抗原性の高い部位であることが判明した。ウイルス肝炎の肝組織におけるTregの検討から、Tregのコントロールは将来のC

型慢性肝炎治療戦略の1つとなりうると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M, Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatology Res* 38:354-361 [2008].

2. 学会発表

広石和正, 平出綾子, 井廻道夫. C型肝炎の獲得免疫. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, 5月31日 [2007]

坂木理, 馬場俊之, 広石和正, 井廻道夫. 自己免疫性肝炎, 原発性胆汁性肝硬変, C型肝炎に対する肝浸潤制御性T細胞の比較検討. 6月1日 [2007]

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

輸血によるがんウイルス感染の予防に関する研究

分担研究者 内田 茂治 東京都西赤十字血液センター

研究要旨 われわれは平成7年から東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象として、HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-I抗体の陽性率の調査を行っている。HBs抗原、HBc抗体ならびにHCV抗体の陽性率は年毎に低下傾向を示し、16歳初回献血者のHBs抗原陽性率の調査から、「B型肝炎の母子感染防止対策」の効果が確認された。HTLV-I抗体は明確な低下傾向が認められていない。しかし福岡県の10歳代の初回献血者では10年間で陽性率が半減しているのに対し、関東地方の1都3県では陽性率が全く低下していない。

A. 研究目的

献血者のウイルスマーカー陽性率の動向を調査することは、輸血用血液の安全性や献血者スクリーニングの有効性をモニタリングする上で重要である。初回献血者は感染症陽性通知による選択を受けないため、その陽性率は地域住民の陽性率を反映していると考えられ、そのウイルスの疫学調査が可能となる。また年齢別の調査を行うことにより、過去の感染原因を推定することが可能となる。1985年から一部の医療機関で、1986年からは全国の医療機関で行われている「B型肝炎ウイルスの母子感染防止事業」や、一部地方自治体で行われているHTLV-Iの母子感染予防対策の成果を確認することもできるはずである。

B. 対象と方法

東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象としてHBs抗原、

HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-I抗体の陽性率の調査を行った。HBs抗原検査は逆受身赤血球凝集反応（RPHA法）、HBc抗体検査は逆受身赤血球凝集阻止法（HI法）、HCV抗体検査は血球凝集反応（PHA法）または粒子凝集反応（PA法）、HTLV-I抗体は粒子凝集反応（PA法）により行った。

C. 研究結果

1. 初回献血者におけるHBs抗原陽性率

図1に初回献血者における年齢別HBs抗原陽性率を平成7年より2年置きに示す。平成19年の陽性率は平成7年、平成10年や平成13年に比べてほぼ全年代で陽性率の明らかな低下が認められ、全ての年代で陽性率が0.8%を下回った。平成16年5月より輸血用血液の安全性向上を目的として、献血時の本人確認を一部の血液センターで試験的に実施し、マスコミ報道等でも大きく取り上げられた。また、同

年10月からは全国の血液センターで本人確認を実施している。このことが初回献血者のHBs抗原陽性率の低下に何らかの影響をしている可能性がある。一方、16歳初回献血者におけるHBs抗原陽性率は平成7年から直線的に低下して、平成15年は陽性率がついにゼロとなったが、平成16年には陽性率の上昇が認められた(図2)。しかし、この年の陽性者は全て水平感染であることが確認されており、平成15年から平成17年までの3年間に、16歳初回献血者でHBVキャリアは確認されなかった。しかし、平成18年には母子感染防止対策を施したにもかかわらず、垂直感染を防げなかったHBVキャリア例が1例確認されている。平成19年の陽性者がキャリアであるか否かの確認はされていない。

2. 初回献血者におけるHBc抗体陽性率

初回献血者におけるHBc抗体の陽性率は、平成9年に陽性基準の変更があったため、平成10年の陽性率は高齢者を中心に平成7年より高くなった。しかしながら、その後は年毎に陽性率が少しずつ低下して、平成19年はほとんどの年代で過去最低の陽性率を示した(図3)。また平成10年の陽性率曲線と比較すると、同一陽性率で15歳以上の開きがあり、出生年で揃えても陽性率に差異が認められた。

3. 初回献血者におけるHCV抗体陽性率

HCV抗体陽性率もHBc抗体陽性率と同様に、年毎に陽性率が少しずつ低下していたが、平成19年では30歳代以降で明らかな陽性率の低下が認められ、全年代で陽性率が1%を下回った(図4)。平成7年の60歳代は陽性率が9%を超えており、その他での差

を明確にするために図4では平成7年の陽性率を省略した。HCV抗体陽性率の低下にもHBs抗原と同様に、献血時の本人確認の影響が関与している可能性が考えられた。

4. 初回献血者におけるHTLV-I抗体陽性率

HTLV-I抗体の陽性率は他のマーカーほど明確な陽性率の低下傾向が認められなかった(図5)。しかし、もともと陽性率の高い福岡県と陽性率の低い関東地方の1都3県の10歳代の初回献血者で陽性率を比較すると、平成7年から平成17年までの10年間で福岡県の陽性率が半減しているのに対して、関東地方では陽性率が全く減少していなかった(図6)。

D. 考察

平成15年から平成17年までの3年間は16歳初回献血者にHBVキャリアは認められていなかったが、H18年にはキャリアが1例確認された。当該献血者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。

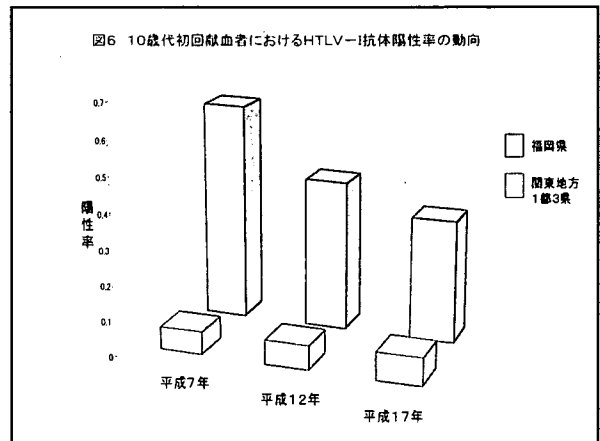
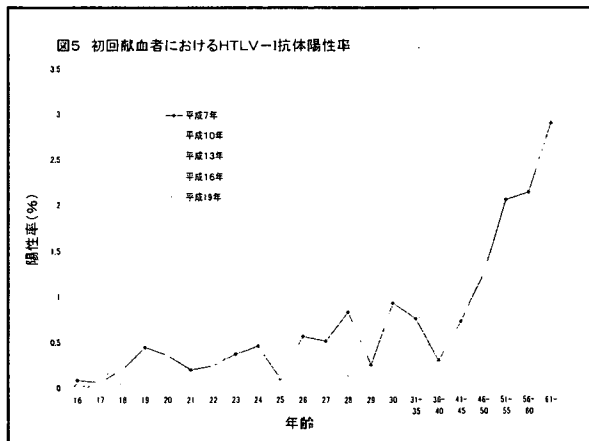
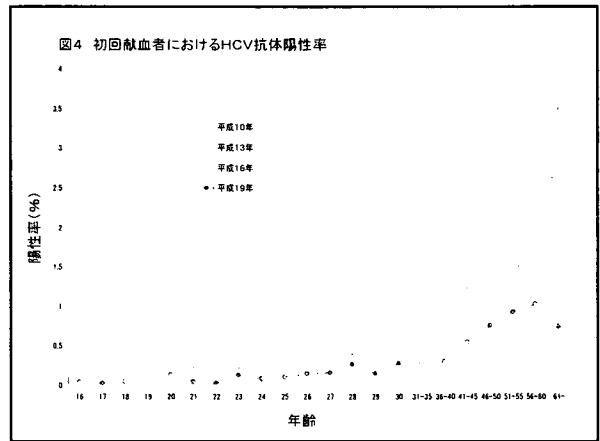
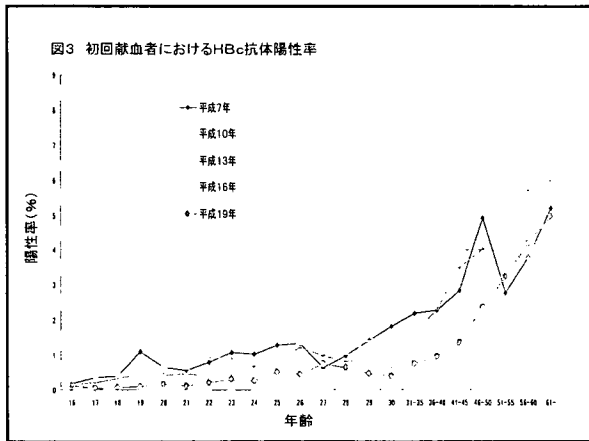
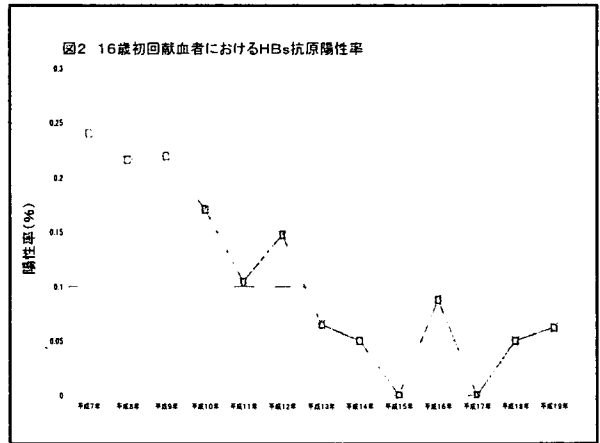
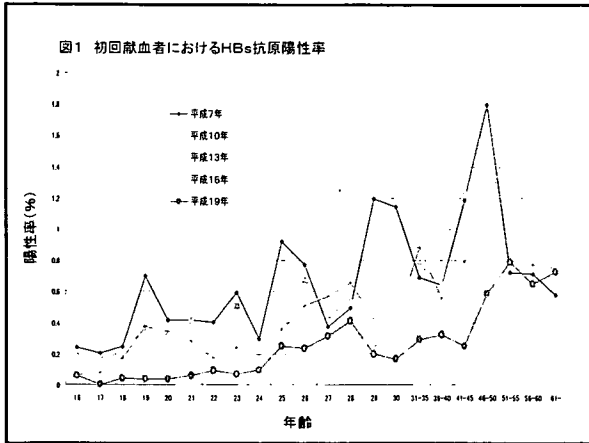
HTLV-I抗体の平成7年、12年、17年の陽性率の比較から、福岡では明らかな陽性率の低下傾向が認められた。長崎、鹿児島などでは自治体がHTLV-I母子感染防止事業に積極的に取り組んでいることが全国的にも知られている。福岡でこのような事業が行われているかどうかは分からないが、少なくとも陽性率の低い関東地方よりは住民の関心も高いと考えられる。一方の関東地方では陽性率の低下傾向が明らかでなく、特に若年層では陽性率の低下傾向が全く認められていない。人工乳で育児をする割合が増えているとはいえ、妊婦に母子感染の危険性を周知し、希望者には出産前に抗体検査を行うべきと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Patterns in the prevalence of hepatitis C virus infection at the start of hemodialysis in Japan. Yuko Iwasa, Shigeru Otsubo, Oriie Sugi, Keitaro Sato, Yukari Asamiya, Aya Eguchi, Tomihito Iwasaki, Nami Matsuda, Kan Kikuchi, Norisato Ikebe, Naoko Miwa, Naoki Kimata, Keiko Uchida, Shigeharu Uchida, Kosaku Nitta and Takashi Akiba. Clin Exp Nephrol, 12:53-57, 2008.

Positivity rate of hepatitis B surface antigen in 16-year-old first-time blood donors: effectiveness of immunoprophylaxis with hepatitis B vaccine and immunoglobulin in newborn infants with mothers positive for hepatitis B e antigen. Shigeharu Uchida and Kenji Tadokoro. Jpn J Infect Dis, 61:94, 2008.



研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishii Y, Kondo K, Matsumoto T, Tanaka K, Shinkai-Ouchi F, Hagiwara K, Kanda T.	Thiol-reactive reagents inhibits intracellular trafficking of human papillomavirus type 16 pseudovirions by binding to cysteine residues of major capsid protein L1.	Virology J.	4	110	2007
Sato K, Takeuchi T, Kukimoto I, Mori S, Yasugi T, Yano T, Taketani Y, Kanda T.	Human papillomavirus type 16 P670 promoter is negatively regulated by CCAAT displacement protein.	Virus Genes.	35	473-481	2007
Kondo K, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T.	Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes.	J. Med. Virol.	80	841-846	2008
Kawana K, Quayle AJ, Ficarra M, Ibana JA, Shen L, Kawana Y, Yang H, Marrero L, Yavagal S, Greene SJ, Zhang YX, Pyles RB, Blumberg RS, Schust DJ.	CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity.	J. Biol. Chem.	282	7368-7375	2007
Inman D, Kawana K, Schust D, Lininger R, Young S.	Cyclic regulation of T-Bet and GATA-3 in human endometrium.	Reprod Sci.	15	83-90	2008
Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y.	Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis.	Proc Natl Acad Sci U S A.	104	1661-1666	2007
Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Tagawa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, Matsuura Y.	Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines.	J. Virol.	81	8953-8966	2007
Mori Y, Yamashita T, Tanaka Y, Tsuda Y, Abe T, Moriishi K, Matsuura Y.	Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of Japanese encephalitis virus in neural and macrophage cells.	J. Virol.	81	8477-8487	2007
Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, Moriishi K, Fujiyama K, Kanto T, Hayashi N, Owsianka A, Patel AH, Whitt MA, Matsuura Y.	Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins.	J. Virol.	81	8601-8612	2007