

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCVの複製に関与する宿主因子hB-ind1の機能解析

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：NS5Aに相互作用する宿主蛋白質として、human butyrate-induced transcript 1 (hB-ind1)を同定した。siRNAによりhB-ind1の発現を抑制すると、ウイルス複製および感染性ウイルス粒子の産生が抑制された。また、siRNAに耐性を示すhB-ind1の発現によって、ウイルス複製および粒子産生が回復した。hB-ind1のアミノ酸配列内にHsp90のコシャペロンであるp23と相同性の高い領域が観察され、Hsp90との結合に必須なFxxWモチーフが認められる。免疫沈降実験から、このモチーフを介してhB-ind1はHsp90と結合することが示唆され、この相互作用はウイルス複製および感染性ウイルス粒子の産生にも必須であった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は主に血液を介して感染し、世界で約2億人、国内でも200万人もの感染者が存在する。HCVは高率に持続感染し、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の肝癌の約8割はHCV感染に起因するものと考えられている。現行の抗ウイルス療法は、先進国に多く認められる遺伝子型が1型のHCV感染者に対しては著効率が50%程度であり、より有効な治療法の開発が急務である。

近年、HCVの感染や複製機構の解析も進み、HCVの複製にはウイルス蛋白質以外に複数の宿主蛋白質が必須であることが明らかとなってきた。しかしながら、そのメカニズムにまだ不明な点は多く、未同定の宿主因子の存在が指摘されている。本研究では、ウイルスの複製機構の解明と慢性C型肝炎治療薬の新規標的因子を同定することを目的として、HCVの複製に必要な新規宿主蛋白質を探索し、ウイルス複製における役割を解析した。

B. 研究方法

B-ind1変異体を培養細胞にNS5Aとともに発現し、免疫沈降法によってNS5A結合領域を解析した。また、既報のNS5A結合宿主蛋白質とB-ind1との相互作用を同様に解析した。各変異体をHCVレプリコン細胞やJFH1株を用いたウイルス培養系に導入し、ウェスタンブロット法、定量的RT-PCR、フォーカスフォーミングアッセイによって、HCVゲノム複製およびウイルス増殖への影響を解析した。

(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

免疫沈降法の結果から、B-ind1のcoiled coil領域は、NS5Aとの相互作用に重要であった。このcoiled coil領域を含むB-ind1変異体をHCVレプリコン細胞に発現させると、ウイルスゲノムの複製が抑制された。また、この変異体の発現によって

JFH1 株の増殖も抑制された。一方、coiled coil 領域を欠損させた変異体では抑制効果は認められなかった。免疫沈降法によって、B-ind1 は FKBP8 および HSP90 と結合することが示された。

D. 考察

B-ind1 は NS5A と結合して HCV ゲノムの複製を調節していることが示唆された。また、B-ind1 は FKBP8 や HSP90 とも相互作用することが示された。B-ind1 は HSP90 結合蛋白質 p23 と相同性領域を持ち、HSP90 のシャペロン活性に影響することが推測される。現在、これらの NS5A と相互作用する宿主蛋白質の HCV 複製への影響を検討中である。

E. 結論

新規の NS5A 結合宿主因子として hB-ind1 を同定した。hB-ind1 は FKBP8 や Hsp90 とも相互作用して、HCV の複製や感染性粒子の産生を制御していることが示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2) Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage

Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.

- 3) Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. J. Virol., 2007, 81, 8477-8487.

- 4) Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. J. Virol., 2007, 81, 8601-8612.

- 5) Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. J. Exp. Med., 2007, 204, 2233-2239.

- 6) Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Rev. Med. Virol., 2007, 17, 343-354.

2. 学会発表

- 1) Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.

- 2) Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu

Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。

3) Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura:

Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。

4) Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。

5) Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.

6) 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、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:第

43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5月31日-6月1日, 2007.

7) 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスゲノム複製に關与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析: 第55回日本ウイルス学会総会、札幌、10月21日-23日, 2007.

8) 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C型肝炎ウイルスによるTLRシグナル伝達経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生、同上。

9) 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いたC型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。

10) 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスゲノム複製におけるFKBP8の役割、同上。

11) 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。

12) 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治: E型肝炎ウイルス様粒子の結晶化とX線結晶構造解析、同上。

H. 知的所有權の出願・登録状況
特になし。

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

アミノ酸によるC型肝炎病態抑制に関する研究

分担研究者 森屋 恭爾 東京大学感染制御学 講師

研究要旨：

C型肝炎のみならず NASH、糖尿病においても肝臓脂肪化 steatosis が病態で大きな意味を持つことが研究者の共通認識となってきた。特にC型肝炎において steatosis (脂肪化) が発癌に関与すること、およびウイルス蛋白によって肝臓の脂肪化とインスリン抵抗性が直接惹起されうることを我々は HCV core 遺伝子発現トランスジェニックマウスで示してきた。肝臓脂肪化の軽快をきたす製剤は国民癌死3位を占める肝細胞癌の死者数を低下させるのみならず、NASH ひいては増大する糖尿病患者の抑制をもたらす可能性が高い。

昨年分枝鎖アミノ酸（イソロイシン、バリン）を HCVcore 遺伝子発現マウスに投与し、steatosis について検討し有意に改善させるデータを報告した。今回インスリン抵抗性についても検討し改善を確認しそのメカニズム検討を行っている。

A. 研究目的

HCVの病態においてにおいて肝臓の脂肪化とミトコンドリア電子伝達系の障害が関与することを我々は示してきた。電子伝達系に共役するTCAサイクルについてもマウスの検討においてTCAサイクルに関連する遺伝子発現が変化し平衡を変化させているデータを得ている。(図1) TCAサイクルでは脂肪代謝において産生されたアセチルCoAを代謝する。SteatosisはTCAサイクルの効率を改善させることで軽快する可能性がある。今回TCAサイクルの平衡に関与するスクシニルCoAを新生する分枝鎖アミノ酸(イソロイシン、バリン)をHCVcore遺伝子発現マウスに投与し、steatosisおよびインスリン抵抗性の改善の有無について検討した。

B. 研究方法

対象) 3ヶ月齢♂HCV core 遺伝子発現マウスおよび 3ヶ月齢♂コントロールマウス

投与食) 1) コントロール餌：通常食+1.7%カゼイン添加

(カゼイン添加によりBCAA餌と同一N含量) 361.0Kcal/100g (通常食 360Kcal/100g)

2) BCAA添加餌 通常食+2.5%BCAA 361.0Kcal/100g 添加BCAAアミノ酸組成

Ile:Leu:Val=1:2:1.2

3) 投与方法と測定

3ヶ月齢 通常食絶食後 5時間後 血糖
インスリン測定 体重測定

1日絶食後 BCAA 食、カゼイン含有食
開始 3ヶ月(12週) 連続投与

最終日 絶食5時間後 採血
血糖 インスリン測定 体重測定

(倫理面の配慮) 動物実験に関する倫理遵守 苦痛を与えない頸椎亜脱臼で対応

C. 研究結果

BCAA食によって有意に肝臓の脂肪化抑制が認められた。(図2)

実験開始時と終了時にマウス体重において有意な差は認められなかった。

BCAAはHCV core蛋白発現マウスにおいてコントロール食と比較し血糖を低下傾向であった。

血中アミノ酸組成変化については検討中である。

D. 考察

肝臓が糖、脂質、アミノ酸代謝の中心臓器である。またHCVにおいて脂質、糖代謝の直接的変化がもたらされることを我々は示してきた。アミノ酸代謝において以前より進行した肝障害において分枝鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸費の変化(分鎖鎖アミノ酸の低下)が知られ肝性脳症改善薬、栄養補給剤として非代償製肝硬変で使用されて安全性も長年確認されている。今回、HCV core蛋白による電子伝達系障害からTCAサイクルの変化がもたらされることから、直接的なTCAサイクル平衡改善変化を分枝鎖アミノ酸直接投与の方法で検討した。分枝鎖アミノ酸TCAサイクル平衡変化は予測のように肝臓脂肪化を改善させた。今後インスリン抵抗性、血中アミノ酸の構成変化、肝発癌についても検討を加えていく。

E. 結論

BCAAはC型肝炎における肝臓の脂肪化を軽減し、insulin抵抗性の進行を抑制し、糖尿病の発症を遅延させる可能性がある。

F. 研究発表

論文発

- 1) 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. *Hepatology* 2007;37:2-5.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in S region of hepatitis B virus in the sera from patients with acute hepatitis. *Hepatology* 2007;37:731-739.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. A novel proteomics method revealed disease-related proteins in the liver of

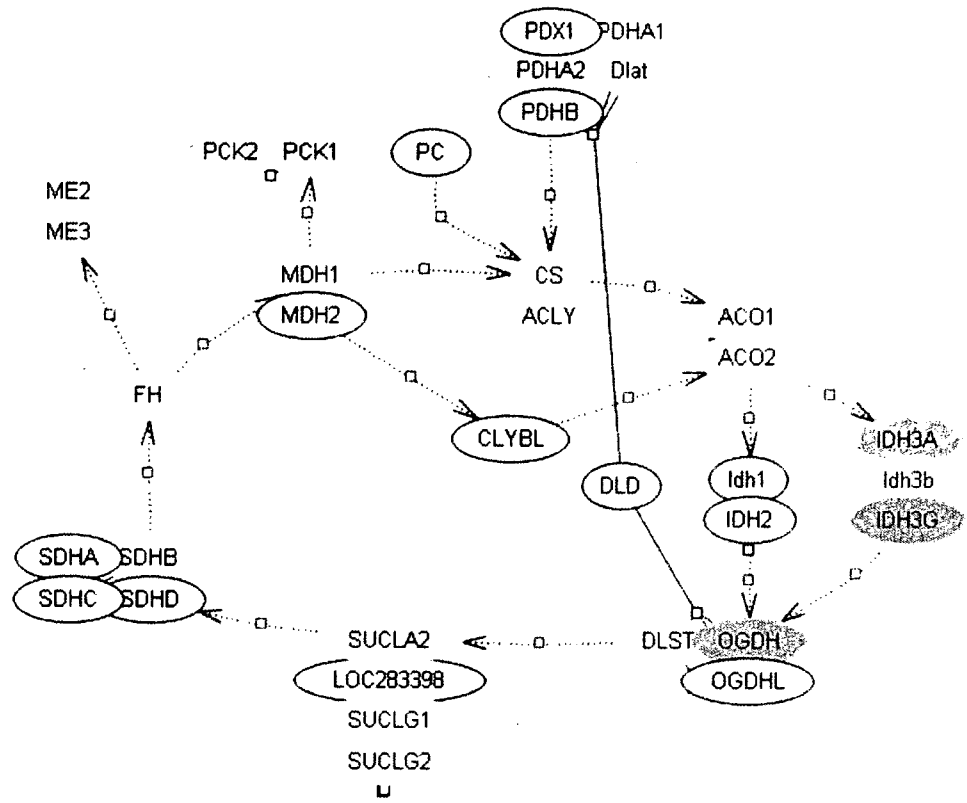
- hepatitis C mouse model. *J Proteome Res* 2007;6:2841-2849.
- 6) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Impact of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage postoperatively after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:3271-3275.
- 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-131.
- 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 9) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008 118:683-694.
- 10) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis* 2008 in press.
- 11) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 in press.
- 2.学会発表
- 1) K Moriya, H Miyoshi, S Shinzawa¹ T Tsutsumi, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Suzuki, T Miyamura, Y. Matsuura, K Koike. FK506 ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress in hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, Barcelona, 2007.
- 2) K Moriya, H Miyoshi, S Shinzawa¹ T Tsutsumi, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Suzuki, T Miyamura, Y. Matsuura, K Koike. Amelioration of Metabolic Disturbances and Oxidative Stress in Hepatitis C Viral Infection by FK506 (Tacrolimus). *HepDart*, Maui, 2007.
- 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Iino S, Koike K. Nucleoside and amino acid sequences determining the fate of persistent hepatitis B virus infection with seroconversion to anti-HBe antibody. *Asian Pacific Digestive Week (APDW)*, Kobe, 2007.
- 4) Takeya Tsutsumi, Mami Matsuda, Kyoji Moriya, Hideyuki Miyoshi, Hajime Fujie,

Yoshizumi Shintani, Hiroshi Yotsuyanagi,
Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura,
Kazuhiko Koike. Proteomics Analysis
Reveals Overexpression of Prohibitin in
Cultured Cell and Mouse Expressing
Hepatitis C Virus Core Protein. International

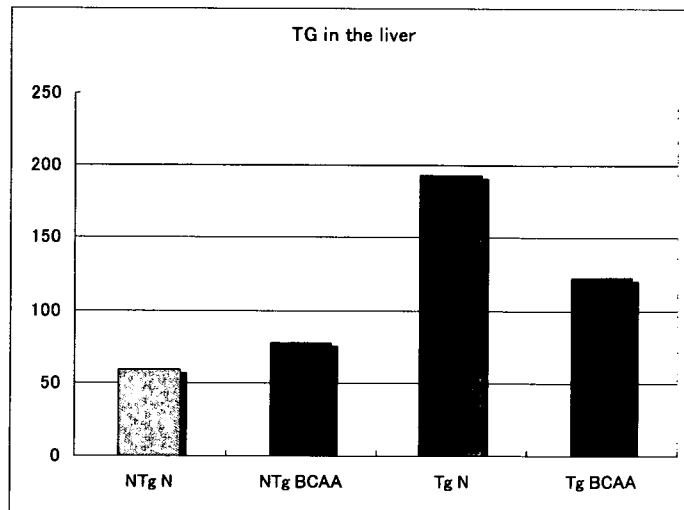
Liver Cancer Association, 1st annual
Meeting, Barcelona, 2007.

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

☒ 1



☒ 2



肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCV感染とBリンパ腫発症機構の解明

分担研究者	山口 一成	国立感染症研究所	血液・安全性研究部長
協力研究者	水落 利明	国立感染症研究所	血液・安全性研究部第2室長
	濱口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部第4室長
	百瀬 暖佳	国立感染症研究所	血液・安全性研究部研究員
	岡田 誠治	熊本大学	エイズ学研究センター・予防開発分野 教授
	池淵 研二	埼玉医科大学	輸血部 教授
	溝呂木ふみ	慈恵医大第3病院	診療部長、血液腫瘍内科助教授

研究要旨

近年、HCV 感染によって慢性の肝臓疾患が誘発されるだけでなく、HCV 感染の肝外病変として、悪性リンパ腫（B 細胞リンパ腫）への進展例が存在することが示唆される。しかし、その作用機序は明らかでなく、HCV 感染に随伴する B 細胞リンパ腫の予防法や治療法は確立されていない。

本研究では慢性 C 型肝炎患者末梢血 B 細胞について、免疫学およびウイルス学的見地から検討を行ない、HCV 感染による B 細胞の機能および動態変化についての興味ある結果を得た。さらに本研究課題では、HCV 病原ゲノムを強制発現させたヒトリンパ球の動態を免疫不全マウスの脾臓に移植し、増殖変化等の細胞動態を *in vivo* で追うことで、HCV 感染による B 細胞リンパ腫の発症機序を解明することを目的とする。

1. HCV 感染による B 細胞の機能および動態変化に注目し、HCV 慢性感染患者から採取した末梢血液について各種細胞表面マーカーの解析、HCV を含む遺伝子発現の検索等を行った。その結果、患者末梢血においてメモリー B 細胞が減少していることを見だし、その原因として HCV 感染により肝臓細胞から放出されるある種のケモカインがそれに対応するレセプターを高発現するメモリー B 細胞を肝臓へと誘導する可能性が考えられた。

2. HCV はヒトとチンパンジーにのみ感染するウイルスであり、HCV 感染による病態を解析できるモデル小動物は存在しない。そこで、重症免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3^{-/-}) にヒト末梢血を移植し、ヒト B 細胞の動態を *in vivo* で検討できる新しい評価系の構築を行う。この評価系において、HCV 病原ゲノムを導入した B 細胞集団の構成変化、遺伝子発現変化、及びリンパ腫発症の有無を検討し、HCV 感染による B 細胞リンパ腫発症の機序を解明する。

1. HCV 感染 B 細胞の免疫学的解析 (水落利明、溝呂木ふみ、池淵研二、山口一成)

A. 研究目的

B 細胞には肝細胞と同様に、HCV に親和性を持つ CD81 分子が表現されている。HCV 感染者においては mixed cryoglobulinemia に代表される B 細胞免疫異常、あるいは B 細胞の関与が示唆されている Rheumatoid Factor の産生や Sjogren-like syndrome といった自己免疫疾患の発症が報告されていること、さらには non-Hodgkin B cell lymphoma 発症との関連も指摘されていることなどから、このような HCV 感染と相関する肝外病変には B 細胞が深く関与している可能性が高いと考えた。そこで本研究では HCV 感染者の末梢血 B 細胞について様々な免疫学的解析を行った。

B. 研究方法

- 1) 瀉血療法により採取された HCV 感染者血液 (譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得ている)、また対照としては健常人血液を用いて、Flowcytometry による細胞表面抗原の解析 (CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD27, CD81, CD45RA, CXCR3, CCR7, Annexin5 各分子に対する蛍光抗体により染色) を行った。
- 2) 検体血漿中の様々な

cytokines/chemokines/growth factors を、蛍光抗体ビーズを用いた染色と Luminex System を用いて定量した。

- 3) 検体血液から、昨年の本研究にて精製方法を確立した、autoMACS による分画法を用いて精製した B 細胞を用い、HCV RNA を含め様々な遺伝子の発現を RT-PCR, real time RT-PCR、および Luminex System を用いた QuantiGenePlex 法にて解析した。

C. 研究結果

- 1) HCV 感染者末梢血について免疫染色および Flow cytometry による解析を行った結果、B 細胞総数の増減は認められないが、健常人と比較して B 細胞における CD81 抗原 (HCV に親和性を持ち感染に必須な分子) の発現上昇が観察された。また、最も顕著な変化としては CD27 陽性 (メモリー) B 細胞の減少があげられた。
- 2) HCV 感染者では健常人と比較して、血漿中の HGF, IL-2R, IL-12, MIG (Monokine induced by IFNg) などの上昇が見られたが、最も顕著だったのは IP-10 (IFNg-inducible Protein 10) ケモカイン量の上昇であった ($p < 0.0001$)。
- 3) HCV 感染者の末梢血、特に B 細胞において、real-time RT-PCR 法、および QuantiGene

Plex 法の両者によって HCV RNA が検出された。

D. 考察

HCV 感染者の末梢血 B 細胞においては、CD27 陽性メモリーB細胞の減少が顕著だった。さらに HCV 感染者の末梢血においては、IFNg により産生誘導されるケモカインの一種である IP-10 量が非常に亢進していた。以上の結果から HCV が肝臓細胞に感染することにより IFNg の産生が亢進し、それによって IP-10 産生が亢進するため、末梢血中の CXCR3 (IP-10 のレセプター) 陽性細胞が肝臓へとリクルートされることが考えられた。そこで末梢血中の CD27 陽性メモリーB細胞における CXCR3 発現を解析したところ、HCV 感染者の CD27 陽性 B 細胞では明らかに CXCR3 が高発現であることが示され、この仮説を裏付ける結果となった。また HCV 感染者の末梢血 B 細胞には HCV が感染していることが示唆された (HCV RNA が検出された)。以上の結果、および HCV 感染が B 細胞の遺伝子変異を引き起こすという報告があることから、このような HCV 感染 B 細胞が肝臓に蓄積され、最終的には lymphoma へと移行していく可能性が考えられた。

E. 結論

HCV 感染者の末梢血中では、CXCR3 を発現する CD27 陽性メモリーB細胞の数が減少しており、肝臓内で発現される IFNg-inducible ケモカインである IP-10 (CXCR3 と結合する) の産生亢進によって、このような

B細胞が肝臓へとリクルートされる可能性が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

- 1) HCV 感染による肝外病変:慢性 C 型肝炎患者末梢血 B 細胞の免疫学的解析: 水落利明、山口一成 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌市)
- 2) HCV 感染により誘導される肝外病変:メモリーB細胞の動態: 水落利明 第 37 回日本免疫学会学術集会 (2007 年 11 月、東京都)

2. モデルマウスを用いた C 型肝炎関連悪性リンパ腫発症のメカニズム (百瀬暖佳、浜口 功、山口一成)

A. 研究目的

近年、HCV 感染によって慢性の肝臓疾患が誘発されるだけでなく、HCV 感染の肝外病変として、悪性リンパ腫への進展例が存在することが示唆される。しかし、その作用機序は明らかでなく、HCV 感染に随伴する B 細胞リンパ腫の予防法や治療法は確立されていない。

HCV はヒトとチンパンジーにのみ感染するウイルスであり、HCV 感染による病態を解析できるモデル小動物は存在しない。そこで、重症免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3^{-/-}) にヒト血液細胞を移植し、ヒト B 細胞の動態を *in vivo* で検討できる新しい評価系の構築を行う。この評価系において、

HCV 遺伝子を導入した B 細胞集団の構成変化、遺伝子発現変化、およびリンパ腫発症の有無を検討し、HCV 感染による B 細胞リンパ腫発症の機序を解明する。

B. 研究方法

細胞の調整

末梢血よりヒト末梢単核球の調製を行った。使用した末梢血は、日本赤十字社より譲渡された献血血液である。末梢血は PBS/2%(w/v)FCS で希釈し、3,000rpm にて 10 分間、室温で遠心操作を行った。沈降してきた細胞分画を PBS/2%(w/v)FCS 30ml に懸濁して 15ml の Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD PoC AC) に重層し、これを 1,800rpm にて 25 分間、室温で遠心した。境界面にある単核球層を採取して PBS/2%(w/v)FCS で洗浄した後、生細胞数を算定し、実験に用いた。

遺伝子発現ベクターの構築

pcDNA3 ベクターのマルチクローニングサイトに Flag タグを挿入し、その下流に HCV の遺伝子を組み込んだ。Lipofectamine2000 (Invitrogen, Inc.) を用いて HEK293T 細胞に各々の発現ベクターを導入し、抗 Flag 抗体によるウェスタンブロット法を用いて遺伝子の発現と分子量の確認を行った。また、Nucleofector II (amaxes biosystems) を用い、昨年度に決定した条件で末梢単核球に構築したプラスミドを導入し、その発現を

抗 Flag 抗体によるフローサイトメトリー法により解析した。

末梢単核球の移植

ヒト末梢単核球は 5×10^6 の細胞を 10 ul の PBS にて懸濁し、2Gy の放射線を照射した NOD/Scid/Jak3(-/-) マウスの脾臓に移植をした。移植 2 週間後にマウスの脾臓を摘出し、ヒト由来血液細胞の分化についてフローサイトメトリーによる解析を行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現ベクターの構築、および発現確認

HCV core、E1、E2、E1-E2、core-E1-E2、NS5A の 6 種類の遺伝子断片を pcDNA3 ベクターに組み込み、各々の遺伝子の強制発現ベクターの構築を行った。各々のベクターを HEK293T 細胞に導入し、目的のサイズにバンドが認められることを確認した。また、末梢単核球においても、導入した各遺伝子の発現を確認した。

2. 免疫細胞ヒト化マウスの作製

ヒト末梢単核球を NOD/Scid/Jak3-/- マウスの脾臓内に接種し、2 週間後に生着したヒト細胞の解析を行った。その結果、ヒト CD3 発現細胞が 85% 程度、ヒト CD19 発現細胞 3.5% 程度存在していることが確認でき、ヒト細胞の *in vivo* における T 細胞、B 細胞への分化が認められた。

D. 考察

C 型肝炎に伴う悪性リンパ腫は脾臓で頻度高く認められている。本研究におけるヒト末梢血細胞の脾臓への直接接種は病態のメカニズム解析に有用と考えられる。

E. 結論

HCV core、E1、E2、E1-E2、core-E1-E2、NS5A の 6 種類の遺伝子断片を pcDNA3 ベクターに組み込み、各々の遺伝子の強制発現ベクターの構築および解析に必要なマウスの準備が整った。現在、ヒト B 細胞をより高効率に再構築するための検討を行っている。条件検討が完了次第、HCV 遺伝子導入を行ったヒト血液細胞を移植し、*in vivo* においてその動態を解析する予定である。

3. NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスにおけるヒト免疫担当細胞の発現および機能解析 (岡田誠治)

A. 研究目的

近年、HCV 感染によって慢性の肝臓疾患が誘発されるだけでなく、HCV 感染の肝外病変として、悪性リンパ腫への進展例が存在することが示唆される。しかし、その作用機序は明らかでなく、HCV 感染に随伴する B 細胞リンパ腫の予防法や治療法は確立されていない。

HCV はヒトとチンパンジーにのみ感染するウイルスであり、HCV 感染に

よる病態を解析できるモデル小動物は存在しない。そこで、重症免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3^{-/-}) にヒト血液細胞を移植し、ヒト B 細胞の動態を *in vivo* で検討できる新しい評価系の構築を行う。この評価系において、HCV 感染患者及び HCV 遺伝子を導入した B 細胞集団の構成変化、遺伝子発現変化、およびリンパ腫発症の有無を検討し、HCV 感染による B 細胞リンパ腫発症の機序を解明する。

B. 研究方法

細胞の調整

ヒト末梢血及び臍帯血より単核球の調製を行った。使用した末梢血は健康成人ドナーから採血、臍帯血は福田病院より御供与いただいた。研究は、熊本大学医薬研究部等倫理委員会の承認を得た上で行われ、採血はドナー或いは母親の同意の上で行われた。血液は Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD PoC AC) に重層し、これを 1,800rpm にて 25 分間、室温で遠心し、単核球層を採取して PBS/2%(w/v)FCS で洗浄した後、生細胞数を算定し、実験に用いた。

末梢単核球の移植

ヒト末梢単核球は 5×10^6 の細胞を 10 μ l の PBS にて懸濁し、NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスの脾臓に直接移植を行った。移植 2 週間後にマウスの脾臓を摘出し、ヒト由来血液細胞の分化についてフローサイトメトリーによる解析を行った。一部では、

マウス腹腔内に移植して比較を行った。

C. 研究結果

ヒト末梢単核球を NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスの脾臓内に接種し、2週間後に生着したヒト細胞の解析を行った。その結果、ヒト CD3 発現細胞が 50%程度、ヒト CD19 発現細胞 50%程度存在していることが確認でき、ヒト細胞の *in vivo* における T 細胞、B 細胞への分化が認められた。これに対し、腹腔内に移植した場合にはほぼ T 細胞の構築のみが認められた。

現在、ヒト B 細胞をより高効率に再構築するための検討を行っている。条件検討が完了次第、HCV 遺伝子導入を行ったヒト血液細胞を移植し、*in vivo* においてその動態を解析する予定である。

D. 考察

脾臓にヒト臍帯血単核球を移植したマウスに麻疹ウィルスワクチン株

を攻撃接種したところ、麻疹に対する抗体の産生が認められたことから、マウス体内で機能的な B 細胞が分化していると考えられる。

E. 結論

ヒト化マウスにおける免疫細胞は免疫担当能を保持しており、C 型肝炎発症のメカニズムの解析に有用と考えられる。

F. 研究発表

高度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 欠損マウス) 体内におけるヒト B 細胞の増殖と分化
岩永寿真子 小野歩 原田英樹
鈴伸也 岡田誠治
Cytometry Research 印刷中

4. 臨床検体の収集 (池淵研二、溝呂木ふみ)

昨年度に引き続きそれぞれの学内倫理委員会の承認と、十分な informed consent のもと血液等の検体収集を行っている。

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

マウスモデルを用いたHCV誘発性リンパ腫発生機序の解析に関する研究

分担研究者 小原 恭子 熊本大学大学院医学薬学研究部・特任教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝臓以外にも自己免疫疾患の発生や悪性リンパ腫、扁平苔癬などの疾患を引き起こす。本研究では、これら肝外病変のうちリンパ腫発症機序解明を目的として2種のHCV誘発性リンパ腫モデルマウスの樹立を行った。1つはHCVの構造蛋白質遺伝子を持続発現するマウス(CN2 IRF-1^{-/-})で、HCV蛋白質発現が長期に渡って持続しリンパ腫を形成する事が明らかとなった。さらに、IL-12の産生低下とIL-2, IL-10の産生上昇が見られた。また、Bcl-2の早期発現上昇が観察された。もう1つは、全長HCV遺伝子をB細胞で発現するトランスジェニックマウス(Rz-CD19Cre)を樹立した。Rz-CD19Creマウスの樹立により、HCVのB細胞への直接作用解析が可能となり、長期に渡る経過観察を開始した。

A. 研究目的

HCV 感染に伴う肝外病変の発症機序は未だ不明な点が多い。B細胞リンパ腫の発生は欧米でまず報告され、日本においても発生が報告されている。これらのB細胞リンパ腫ではHCVの存在が報告されているが、具体的な発症の分子機序は未だ明らかではない。本研究では、2種のHCVトランスジェニックマウスを樹立して、Bリンパ腫発症の分子機序解明を行い、治療法開発に寄与する基礎的知見を得る実験モデル系の確立を目的とする。

B. 方法

1.HCV持続発現マウス;HCV構造蛋白質遺

伝子(CN2)をCre/loxPシステムで任意の時期に発現するマウスを、CTLやNK活性の低下したIRF-1欠損マウスと交配させる事によりHCV発現細胞が排除されず長期に渡って発現できると予測し作製した(CN2 IRF-1^{-/-}マウス)。CN2 IRF-1^{-/-}マウスの尾静脈からCre-adenovirus(2×10^9 PFU)を投与後HCVコア蛋白質を500日以上に渡って測定した。また、これらマウスの生存率を測定し、リンパ腫形成の有無を観察した。リンパ腫については病理組織切片の観察、及びこれらを構成する細胞種についてはCD3, B220, CD4, CD8などに対する抗体を用いたFACS解析で同定を試みた。Fas抗体投与によるアポトーシス感受性については、肝炎の指標は血中ALTを測定(nissui)し、肝臓組織はHE染色やTUNNELアッセ

イによって検索した。血清中のIL-2, 4, 10, 12のレベルはELISAキット(R&D Systems)を用いて測定した。Bcl-2蛋白質は特異抗体(SantaCruz社)を用いて検出した。

1のモデルマウスではCre-adenovirusで発現誘導するためB細胞でのHCV発現が低い。そこでHCVのB細胞への直接作用を明らかにするため、HCV全長(Rz)あるいはCN2マウスとCD19遺伝子座にCre遺伝子をノックインしたマウスを交配し、Bリンパ球でのHCVの発現をコアELISAシステムやRT-PCR法で検出した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H18年6月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た(H18年4月)。

C. 結果

モデルマウス(1)については、Cre-adenovirus感染後500日まで肝臓においてHCVコア蛋白質の発現が確認でき、接種後180日を過ぎるとHCV発現マウスの中にリンパ腫を発生する個体が現れた。生後500日を過ぎると50%以上のマウスがリンパ腫を形成し死亡した。リンパ腫を形成する細胞はB, T細胞の双方で構成されていた。IRF-1を欠損する事によりFas誘導性アポトーシスが耐性になっており、これによってHCVの発現が持続している可能性が考えられた。また、IRF-1欠損マウスではIL-12の産生が低下しており、このうち

HCV遺伝子を発現するマウス群では非発現群に比べIL-2やIL-10の産生が顕著に増加していた。さらに、Bcl-2の発現亢進がより早期に観察された。

モデルマウス(2)については、全長HCVとHCV構造蛋白質部分の遺伝子を持つマウスと、CD19Creマウスを交配して作出した。現在36週令に達しているが、脾臓やリンパ球でのHCV遺伝子の発現が確認できた。

2. B細胞特異的にHCVを発現するマウス；これまでのところ顕著な体重の変化、B細胞数の変化及びサイトカイン産生の変化などは確認されていない。引き続き観察を継続している。

D. 考察

2つのモデルマウスを用いてHCVによるリンパ腫発症機序の解析が可能となった。モデルマウス(1)においては、リンパ腫の発生機序、特にこれに関わるサイトカインの作用機序に関して研究を進める。(2)においては既に得られた産仔マウスの観察を引き続き継続し、これらに生じる変化、特にリンパ腫の発生の有無などについての経過観察を行う。

E. 結論

今年度、HCVを持続発現し、リンパ腫を発生するマウスとHCVをB細胞で発現するマウスを樹立した。今後これらのモデルマウスを用い、HCVのリンパ球への直接作用やHCVによりリンパ腫発生を誘導する分子機序について解析を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) M. Kaito, S. Watanabe, H. Tanaka, N. Fujita, M. Konishi, M. Iwasa, Y. Kobayashi, E.C. Gabazza, Y. Adachi, K. Tsukiyama-Kohara, and M. Kohara. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med.* 2006; 4: 673-678.
- 2) Y. Inoue, Y. Nomura, T. Haishi, K. Yoshikawa, T. Seki, K. Tsukiyama-Kohara, C. Kai, T. Okubo, and K. Ohtomo. Imaging of Living Mice Using a 1-T Compact Magnetic Resonance Imaging System. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2006; 24(4):901-907.
- 3) M. Masuda, H., Sato, H. Kamata, T. Katsuo, A. Takenaka, R. Miura, M. Yoneda, K. Tsukiyama-Kohara, K. Mizumoto, and Kai C. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2006; 29 (2-3): 157-165.
- 4) K. Fujita, R. Miura, M. Yoneda, F. Shimizu, H. Sato, Y. Muto, Y. Endo, and K. Tsukiyama-Kohara, and C. Kai. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement heparin-like molecule in CDV infection. *Virology* 2007; 359:324-335.
- 5) H. Sato, M. Masuda, M. Kanai, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, and C. Kai. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J Virol.* 2007; 81(21):11569-11576.
- 6) M. Matsumura, H. Inoue, T. Matsumoto, T. Nakano, S. Fukuyama, K. Matsumoto, K. Takayama, M. Saito, K. Kawakami, Y. Nakanishi. Endogenous metalloprotease solubilizes IL-13 receptor alpha2 in airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007) 360:464-469.
- 7) T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, in press.
- 8) S. Yamaguchi, H. Ishihara, T. Yamada, A. Tamura, M. Usui, R. Tominaga, Y. Munakata, C. Satake, H. Katagiri, F. Tashiro, H. Aburatani, K. Tsukiyama-Kohara, J. Miyazaki, N. Sonenberg and Y. Oka. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism*, in press.
- 9) 小原恭子. C型肝炎ウイルスの発揮する腫瘍原性 黎明 2007;16: i-ii.

口頭発表

- 1) 笠間由里, 田中康介, 佐藤正明, 齋藤誠, 桑原一彦, 阪口薫雄, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルスにおける肝外病変モデルマウスの作製 第44回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎 2007.
- 2) M. Saito, K. Tsukiyama-Kohara Hepatitis C Virus-associated Regulatory Mechanism for DHCR24 Gene Expression. (C型肝炎ウイル

スによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 遺伝子の発現制御機構) 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.

3) T. Takano, M. Kohara, C. Kai, K. Tsukiyama-Kohara. The novel regulatory pathway of TOM70 concerning with cell death. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.

4) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス誘導蛋白質 DHCR24 による p53 の修飾制御 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.

5) 齊藤 誠、高野貴士、笠間由里、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス(HCV)のライフサイクルにおける宿主因子 DHCR24 の機能解析第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.

6) 佐藤正明・笠間由里・小原道法・小原恭子. Dehydrocholesterol reductase 24 (DHCR24)をターゲットとした単クローン抗体処理の C 型肝炎ウイルス複製細胞に対する生理学的影響を担う宿主因子の同定. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.

7) 高野 貴士、小原 道法、甲斐 知恵子、小原 恭子 HCV 関連抗原 P70 の同定及び解析 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.

8) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス全長遺伝子発現細胞における p53 の修飾制御 BMB2007.

(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会年会・合同大会) 横浜 2007

9) 佐藤正明・斎藤誠・田中康介・岩永寿真子・岡田誠治・甲斐知恵子・小原恭子 ヒトリンパ球 NOD/SCID マウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換麻疹ウイルス評

価系の構築 第 44 回日本ウイルス学会九州 2007.

10) 佐藤正明、徳永優子、笠間由里、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス(HCV)の腫瘍原性亢進機序およびライフサイクルにおける宿主因子 DHCR24 の機能解析 The role of DHCR24 in

hepatocarcinogenesis and the viral life cycle during hepatitis C virus (HCV) infection BMB2007 ワークショップ 5W9* (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会年会・合同大会) 横浜 2007.

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得

- 1) 「C 型肝炎治療用抗体」、特願：2006-49572、発明者：小原恭子、甲斐知恵子、西村友裕、出願日：平成 18 年 2 月 27 日、出願人：国立大学法人 熊本大学、甲斐知恵子、(財)化学及血清療法研究所
- 2) 「ウイルスの複製に関与する宿主因子」発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕、出願人：国立大学法人 熊本大学、(財)化学及血清療法研究所
- 3) 出願準備中

I. その他

なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

リンパ球培養細胞でのC型肝炎ウイルス増殖系の開発

分担研究者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 肝以外の細胞で効率良く C 型肝炎ウイルス(HCV)が感染増殖する実験系がないため、肝外病変発現機構の解明が進んでいない。そこで、リンパ球系細胞株を用い HCV 増殖系を樹立することを試みた。近年開発された HCV JFH1 株と 8 種類のヒト B 細胞株と 1 種類のヒト T 細胞株を用い、感染、複製、蛋白翻訳、プロセシングの過程を解析した。解析した 9 種類の細胞では効率の良い感染、複製は見られなかったが、蛋白翻訳、プロセシングは Huh7 細胞と同等のレベルで起こることが分かった。HCV 粒子の細胞表面への吸着効率に差が認められ、効率の良いものを選択し、HCV 株と細胞の組み合わせを更に検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓で複製し、肝炎、肝硬変、肝癌を発生するウイルスである。また、HCV は肝臓以外の臓器（血液、心臓、腎臓、代謝性疾患など）で混合型クリオグロブリン血症、Bリンパ腫、心筋症、糸球体腎炎、耐糖能異常などの多様な病態を引き起こすことが知られており、慢性C型肝炎の制圧とともに肝外病変への対策は社会的要請が極めて高い。HCV は肝臓のみでなく Bリンパ球、Tリンパ球などの血球系細胞や心筋、腎細胞に感染増殖することが示唆されているが、肝以外の細胞で効率良く HCV が増殖する実験系がないため、肝外病変発現機構の解明が進んでいない。そこで、HCV 非肝臓細胞での効率の良い HCV RNA レプリコン細胞、および HCV 培養系の構築を図り、肝外病変の分子機序を明らかにし、治療法開発へとつなげることを目的とした。

B. 研究方法

- (1)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への吸着：8種類の Bリンパ球系細胞 (Bjab, BL41, C1R, IB4, Namalwa, P3HR1, Raji, Ramos) と 1種類の Tリンパ球系細胞 (Jurkat) を用い、近年、開発された HCV JFH1 株の吸着効率について検討した。Huh-7 細胞で産生させた HCV JFH1 ウイルス液を 5×10^3 TCID₅₀/mL または 5×10^4 TCID₅₀/mL で各細胞に接種し、37℃、3時間インキュベートしたのち、PBSで3回washし、細胞を回収、HCV core ELISA でコアタンパク量を測定し、吸着したウイルス量を評価した。
- (2)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への感染：(1)と同様にリンパ球系細胞にウイルス液を接種し、0,4,8 日目に細胞を回収し、HCV core ELISA でコアタンパク量を測定し、細胞内での発現量を比較した。
- (3)サブゲノムレプリコンによる HCV 複

製の検討： HCV JFH1 株由来のサブゲノムレプリコン RNA を in vitro 合成し、各リンパ球系細胞内にエレクトロポレーション法で導入、ルシフェラーゼ活性を測定し、複製効率を比較した。

(4)HCV IRES 依存性蛋白翻訳効率の検討

HCV IRES 下に firefly-luciferase 遺伝子を挿入し、EMCV IRES 下に HCV NS3-NS5B 遺伝子を挿入したダイシストロニック RNA を作製した。in vitro 合成した RNA を各リンパ球系細胞内にエレクトロポレーション法で導入し、ルシフェラーゼ活性を測定して、IRES 依存性蛋白翻訳の効率を比較検討した。

(5)HCV ポリプロテインの NS3/4A プロテアーゼによるプロセッシング

HCV ポリプロテインのプロセッシングを解析するために、pSGR-JFH1/luc を各細胞にトランスフェクトし、T7 ワクチニアウイルスを感染させ蛋白発現させ、ウエスタンブロット法で HCV ポリプロテインのプロセッシングを解析した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。患者試料を用いる際は当研究所の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行う。

C. 研究結果

(1)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への吸着：回収した細胞のライセートを用い、core ELISA で core タンパク量を比較し

たところ、IB4, Jurkat, Ramos 細胞では検出感度以下であり、ほとんど細胞表面に HCV 粒子が吸着していないことが示唆された。Bjab, Namalwa 細胞では高力価のウイルスを接種しても core 蛋白量に変化がなく吸着効率が低かった。一方、BL41, C1R, P3HR1, Raji 細胞では高力価で感染させた方が core 蛋白量は増加し、ウイルス粒子が細胞表面に効率良く吸着していることが示唆された。

(2)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への感染：ウイルス液接種後、0,4,8 日目に細胞を回収し、HCV core ELISA で core タンパク量を測定し、細胞内での core タンパク発現量を JFH1 感染 Huh-7 細胞と比較したところ、Huh-7 細胞より発現が著しく低く、感染効率が悪いことが示唆された。

(3)サブゲノムレプリコンによる HCV RNA 複製の検討

そこで、HCV の生活環のどのステップに問題があるか調べるためサブゲノムレプリコンで複製活性を検討した。C1R, P3HR1, Raji 細胞でわずかにルシフェラーゼ活性を検出できたが、増加傾向がなく経時的に減少しており、リンパ球系培養細胞での HCV JFH1-SGR の複製効率は低いものと考えられた。

(4)HCV IRES 依存性蛋白翻訳効率の検討

HCV IRES 依存性の蛋白翻訳は C1R, IB4, Namalwa, P3HR1 で Huh-7 細胞と同等に高かった。それ以外の細胞株でも Huh-7 の 25-50% 程度の IRES 活性が検出できた。