

MMP in HPV-infected cell. 第 67 回日本
癌学会学術総会, 名古屋, 2008.

吉田智志、梶谷直子、佐塚文乃、中村博
保、酒井博幸: Ras たんぱく質による HPV
がん遺伝子産物発現細胞の増殖能と浸潤
能の亢進. 第 56 回日本ウイルス学会学術
集会, 岡山, 2008.

佐塚文乃、吉田智志、梶谷直子、中村博
保、酒井博幸. 3次元皮膚モデル培養系を
利用したHPV感染機構の解析. 第 56 回
日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.

佐塚文乃、吉田智志、梶谷直子、中村博
保、酒井博幸. Replication mechanism, life
cycle using a 3-D skin model system. 第 67
回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.

3. 総説

佐塚文乃、酒井博幸. 皮膚分化とヒトパピ
ローマウイルス. ウイルス, 12 月号,
2008.

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

HCV コア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによる切断の生物学的意義

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)のコア蛋白質は、宿主のシグナルペプチダーゼによって前駆体蛋白質から切り出され、そのシグナル配列がシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によって切断されて成熟する。しかしながら、ヒト細胞内での正確な切断部位や、粒子形成におけるSPPによる切断の役割は明らかにされていない。本研究ではHCVコア蛋白質(SPP)によるプロセッシングの生物学的意義を解析した。精製した成熟コア蛋白質のペプチド断片を質量分析した結果、そのC末端はPhe177であった。成熟コア蛋白質は界面活性剤耐性膜画分(DRM)にも検出されたが、SPPに耐性を示す変異コア蛋白質はDRMには存在しなかった。また、同様の変異を導入したHCVのJFH1株では、ウイルスの放出量が顕著に減少したことから、SPPによるコア蛋白質のプロセッシングは、HCVの粒子形成に重要な役割を演じていることが示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。近年、特定のクローン(JFH-1株)を用いたHCVの増殖系が確立されたものの、未だHCVの感染機構の詳細は明らかにされていない。HCVのコア蛋白質は、前駆蛋白質からシグナルペプチダーゼによって切り出された後、シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によってそのC末端領域が切断されて成熟する。しかしながらヒト由来細胞内でのSPPによる正確な切断部位は明らかとなっていない。また、コア蛋白質の界面活性剤耐性膜画分(DRM)への局在とウイルス粒子形成におけるSPPによる切断の関係も未だ明らかにされていない。本研究では、ヒト株化細胞でのSPPによる切断部位を同定するとともに、コア蛋白質の細胞内局在とウイルス増殖におけるSPPによる切断の生物学的意義を解析し、新しいC型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

293T細胞で発現させたFLAGタグをN末端に付加した全長コア蛋白質(1-191アミノ酸残基)を、抗FLAG抗体で免疫沈降した。SDS-PAGEで分離したコア蛋白質をAsp-Nプロテアーゼによってゲル内消化し、ペプチド断片をMALDI-TOF MS/MSで分析した。コア蛋白質発現細胞を1% TritonX-100存在あるいは非存在下で破碎した後、超遠心による分画を行い、コア蛋白質のDRM局在を解析した。このとき、SPPによる切断の影響を、SPP阻害剤(L685458)の添加、SPP切断耐性変異体、あるいは、SPPドミナントネガティブ体の発現により解析した。さらに、SPP阻害剤添

加時のJFH-1株の増殖性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

成熟型コア蛋白質のC末端はPhe177であり、さらに、Ile176とPhe177に変異を導入したコア蛋白質がSPP切断に耐性であることから、ヒト由来細胞でのSPPによるコア蛋白質の切断部位はPhe177/Leu178であることが支持された。成熟型コア蛋白質はDRMにも検出されたが、SPPに耐性を示す変異コア蛋白質はDRMには検出されなかった。SPP阻害剤処理やSPPドミナントネガティブ体の発現により、コア蛋白質の切断が阻害されDRMへの局在も消失した。また、JFH-1株感染細胞をSPP阻害剤で処理すると、細胞内ウイルスのRNA量に比べて、培養上清へ放出されるウイルスRNA量の顕著な減少が認められた。さらに、同様の変異を導入したHCVのJFH1株では、ウイルスの放出量が顕著に減少したことから、SPPによるコア蛋白質のプロセッシングは、HCVの粒子形成に重要な役割を演じていることが示された。

D. 考察

SPPによるHCVコア蛋白質のプロセッシングは、コア蛋白質のDRMへの局在に重要な役割を演

じており、ウイルス粒子の集合にも関与している可能性が示唆された。HCV のプロテアーゼやポリメラーゼを標的とした抗ウイルス剤が開発され、臨床試験が進行中であるが、ウイルスの酵素を標的とした薬剤に対しては耐性株の出現が大きな問題となっている。従って、宿主因子との相互作用を標的とした抗 HCV 剤の開発が今後の重要な課題である。SPP も慢性 C 型肝炎の有望な創薬ターゲットの一つであると考えられる。

E. 結論

- 1 HCV コア蛋白質の SPP) によるプロセッシングの生物学的意義を解析した。
- 2 精製した成熟コア蛋白質のペプチド断片を質量分析した結果、その C 末端は Phe177 であった。
- 3 成熟コア蛋白質は DRM にも検出されたが、SPP に耐性を示す変異コア蛋白質は DRM には存在しなかった。
- 4 同様の変異を導入した HCV の JFH1 株では、ウイルスの放出量が顕著に減少した。
- 5 SPP によるコア蛋白質のプロセッシングは、HCV の粒子形成に重要な役割を演じていることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82,

3480-3489 (2008).

- 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).

2. 学会発表

- 1 Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7月9-11日、2008。
- 7 Xiaoyu Wen, 阿部隆之、森石恒司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10月21日-23日、2008。
- 8 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恒司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、10月26日-28日、2008。
- 9 田敏修平、阿部隆之、森嘉生、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性、同上。
- 10 森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28γ の役割、同上。
- 11 森嘉生、山下哲生、嶋亮一、森石恒司、李天成、武田直和、松浦善治: E 型

- 肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
- 12 谷 英樹、泉 貴之、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
 - 13 久木原 博、森石恆司、松浦善治：ヒトVAP-CはC型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 14 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なIFNの誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
 - 15 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：C型肝炎ウイルス感染によるTLR経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生、同上。
 - 16 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治：患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。
 - 17 松浦善治：C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関与する宿主因子：第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12月9日-12日、2008。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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 昨年度の本研究で、C型肝炎ウイルス（HCV）の非構造蛋白質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報告した。本年度、HCV粒子形成におけるNS5Aの機能を更に解析し、NS5A domain IIIのC末端側セリンクラスター（3-B）のリン酸化がNS5A-Core相互作用及び粒子形成に重要であること、3-B変異ではNS5A-Core-HCV RNA複合体が形成されなくなること、NS5AはHCV粒子形成の初期過程に関与すること、を見出した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の非構造蛋白NS5Aは、ウイルスRNAの複製やインターフェロン感受性、HCVの病原性発現などに関与する多機能蛋白である。最近、NS5A蛋白は複製複合体の構成因子であるだけでなく、感染性粒子の形成に関与する可能性が示された。我々は昨年度の本研究で、NS5A蛋白の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報告した。HCV粒子形成過程におけるNS5A蛋白の役割を解明することを目的として、粒子形成に重要なNS5A領域、アミノ酸配列を決定し、NS5A変異ゲノムを用いて粒子形成機構の解析を行った。

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）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HCV粒子を産生させた。細胞内外のHCV Core蛋白質及びRNAをELISA法、リアルタイムRT-PCR法でそれぞれ定量し、また感染価（TCID₅₀）を求めウイルス産生を評価した。種々のNS5A変異コンストラクト

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。

NS5A-Coreの相互作用は免疫沈降法で、また、両者の細胞内局在は免疫細胞染色及び細胞分画法により解析した。HCV RNA-Coreの相互作用は抗Core抗体を用いた免疫沈降-RT-PCR法により検討した。

C. 研究結果

昨年度、NS5A domain IIIへのGFP挿入、domain III内50アミノ酸欠損などによりNS5A-Core相互作用が損なわれ、HCV粒子産生効率が低下することを見出した。そこで、粒子産生に重要なNS5A領域、アミノ酸配列を明らかにするため、種々の点変異NS5Aゲノムを作製し（図1）、RNAトランスフェクションによってHCV産生を試みた。その結果、domain III内2ヶ所のセリンクラスターのうちC末端側Cluster 3-Bの3セリン残基すべて（CL3B/SA）または任意の2セリン残基（S2428/2430A, S2428/2433A, S2430/2433A）のアラニン置換によりHCV産生が顕著に低下し（図2A）、Coreとの相互作用が消失した（図2B）。一方、Cluster 3-Bセリンを1残基ずつ置換した場合はこのよ

うな変化は観察されなかった。また、Cluster 3-B 変異により実際に NS5A リン酸化が低下していること、Cluster 3-B の 2 セリン残基をグルタミン酸に置換した場合、HCV 粒子産生、NS5A-Core 相互作用は維持されることを見出した。これらのことから、NS5A C 末端領域の負電荷が Core との相互作用、粒子形成に重要であることが示唆された。

NS5A 蛋白が粒子形成に関与する機構として、Core との相互作用を介して HCV ゲノム RNA がパッケージングの場へ運ばれるものが考えられる。その場合、NS5A-Core-HCV RNA 複合体が存在し、NS5A 変異がその複合体形成に影響を与える可能性がある。これを検証するため、野生型または NS5A 変異ゲノム (CL3B/SA) を導入した Huh7 細胞を用いて免疫沈降-RT-PCR 解析を行った (図 3)。その結果、野生型ゲノム発現細胞では抗 Core 抗体沈降物中に HCV ゲノム RNA が検出されるのに対し、NS5A 変異ゲノム導入細胞では免疫沈降物から HCV RNA は検出されなかった。

NS5A 変異が粒子の輸送、細胞外放出に影響を及ぼすかを明らかにするため cell-associated infectivity assay を行った (図 4)。NS5A 変異ゲノム (CL3B/SA) では、細胞外ウイルス量の低下と共に、細胞内の感染性ウイルスレベルも低下していた。以上の結果より、NS5A 変異は粒子の分泌過程ではなく、ヌクレオキャプシド形成など初期過程に影響を及ぼしていることが示唆された。

D. 考察

NS5A はリン酸化蛋白で、低リン酸化型 (56 kDa) と高リン酸化型 (58 kDa) が存在し、HCV ゲノム複製に必須であることが示されている。3 種類のドメイン構造を有し、N 末端側の domain I は立体構造が解かれ RNA 結合能を有する。Domain II にはインターフェロン感受性に関係する ISDR (Interferon sensitivity determining region) が含まれているが、domain II、III とも構造、機能について十分に解析されていない。NS5A domain III には、リン酸化

に関与するセリン残基のクラスターが二ヶ所 (Cluster 3-A, 3-B) 存在し、これらは HCV クローン間でよく保存されている。我々は domain III のリン酸化がウイルス産生に及ぼす影響を調べるため、種々の部分欠損または置換変異体を構築し、ゲノム複製、粒子産生能を解析した。その結果、Cluster 3-B の 3 セリン残基のうち、任意の 2 残基または 3 残基をアラニンへ置換することにより、ゲノム複製は野生型と同等であるものの、産生されるウイルス量が顕著に低下することを見出した。また、このような変異に伴って NS5A 蛋白のリン酸化レベルが低下することも確認した。

NS5A 蛋白はゲノム複製複合体を構成し、RNA 結合能を有している。NS5A 蛋白が粒子形成に関与する分子機構として、複製複合体で新生されたウイルスゲノムが NS5A 蛋白に捕捉され、さらに NS5A-Core 蛋白相互作用によってゲノム RNA がヌクレオキャプシドの場へリクルートされる、という作業仮説を提唱している。HCV NS5A 蛋白の domain III が粒子形成にとって重要であるという知見は、最近、米国とドイツのグループからも報告された。粒子形成を左右するセリン残基の一つが casein kinase II でリン酸化される可能性が示されているが、今後、NS5A 蛋白のリン酸化制御とウイルス粒子形成との関連を明らかにしていくことが重要になると思われる。また、NS5A-Core 相互作用様式の詳細を解明することによって、HCV 粒子形成を選択的に阻害する新たな治療薬の開発へ道が拓かれるものと期待される。

E. 結論

HCV NS5A-Core 相互作用は、粒子形成の初期過程に関与する。NS5A domain III のセリンクラスター 3-B のリン酸化が Core との相互作用 / 粒子形成に重要である。

F. 研究発表

論文発表

1. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T.,

- Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* (in press).
2. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* (in press).
 3. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
 4. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
 5. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
 6. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
 7. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
 8. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
 9. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
 10. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1

interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).

11. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis.* 13: 929-937 (2008).
12. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
13. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S.,

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.* 148: 174-181 (2008).

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. 用いたHCV NS5A変異体

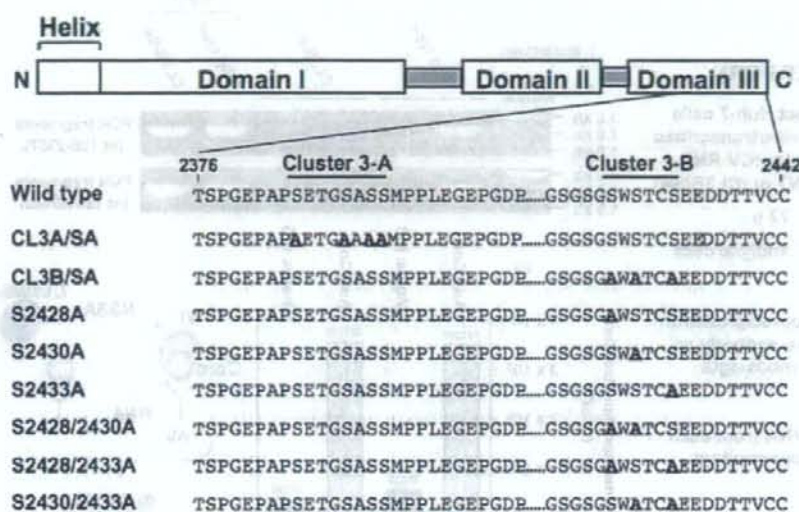


図2. NS5A変異が粒子形成、NS5A-Core結合へ及ぼす影響

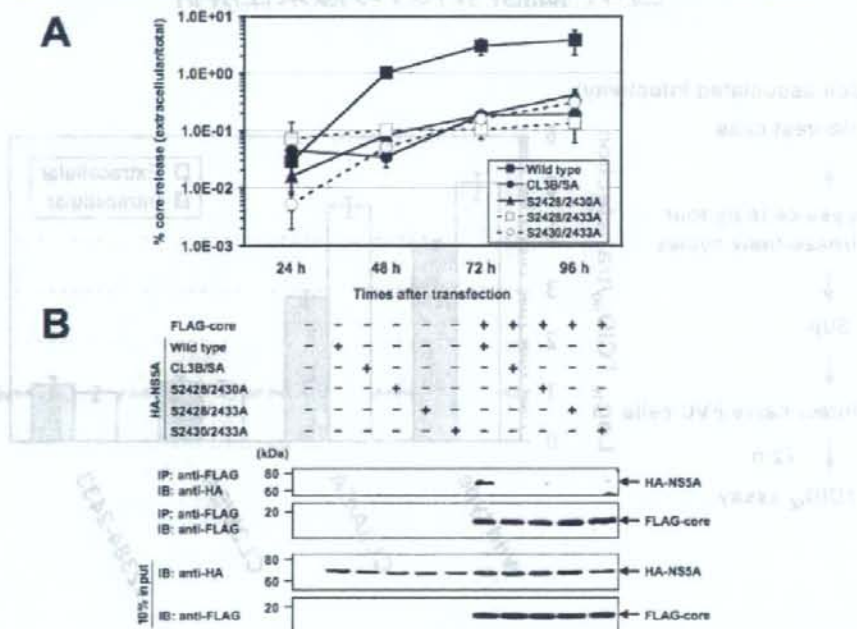


図3. 免疫沈降-RT-PCRによるNS5A-Core-HCV RNA結合解析

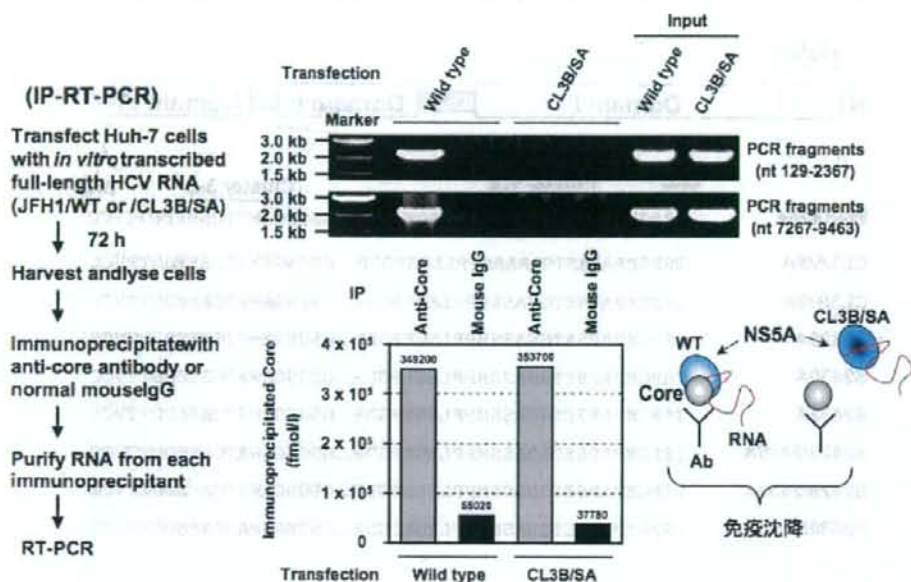


図4. 細胞内HCVの感染性解析

(Cell-associated infectivity)

Harvest cells

↓

Lyse cells by four freeze-thaw cycles

↓

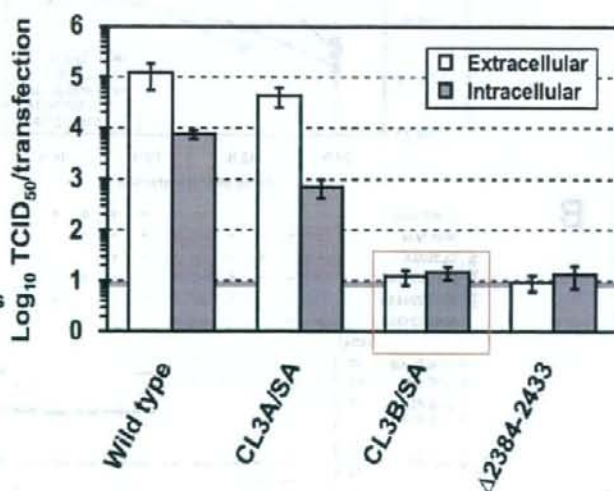
Sup

↓

Infect naïve FVC cells

↓ 72 h

TCID₅₀ assay



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増殖に影響を与える宿主因子の機能解析（1）シクロスポリンの抗HCV活性に関与する宿主因子の機能解析を行い、従来報告されていたシクロフィリンBよりシクロフィリンAの関与が大きいことを明らかにした（2）シクロフィリンAの抗HCV活性は従来考えられていたNS5Bとの相互作用では説明できないことを示した。実験項目2：インターフェロン（IFN）に抵抗性を示す全長HCV RNA複製細胞の単離と抵抗性になる因子の解析。2年間培養してHCVの遺伝的多様性を獲得した全長HCV RNA複製細胞からIFNに抵抗性を示す細胞群を単離し、細胞内のHCV RNAの塩基配列を決定して系統樹解析を行った。親細胞群のHCVと比較して、IFN抵抗性群のHCVは系統樹解析において限局したクラスター群を形成することを見出した。

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並びにHCVのIFN抵抗性獲得機構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増殖に影響を与える宿主因子の機能解析

全長HCV RNA複製OR6細胞からIFN- α 処理によりHCV RNAを一度排除した治

癒細胞であるOR6c細胞にルシフェラーゼ遺伝子をG418耐性遺伝子に融合させた形にした1b型(HCV-0株)HCVレプリコンRNA或はNS5B領域のみ2a型(JFH1株)のものに置換した1b/2aキメラレプリコンRNA(100 ng或は1 µg)をエレクトロポレーション法により導入してG418(0.3 mg/ml)にて3週間selectionを行った。

各種薬剤の抗HCV活性については、1b細胞或は1b/2a細胞(24ウェルプレートにそれぞれ 2×10^4 個)にIFN- α 、IFN- γ 、Pitavastatin或はシクロスポリン(CsA)を添加し、72時間後にルシフェラーゼアッセイを行い検討した。それぞれ少なくとも3回の実験を行い、平均を算出した。

シクロフィリンA(CyPA)或はCyPBのノックダウン細胞はCyPAとCyPBに対する特異的short hairpin RNA(shRNA)を作成し、それぞれのshRNA或は両方のshRNAをレンチウイルスベクターに載せる形で1b細胞と1b/2a細胞に導入することにより作成した。導入1週間後の細胞Lysateを用いてWestern blot解析を行い、CyPA或はCyPBがノックダウンされていること或はCyPAとCyPBの両方がノックダウンされていることを確かめた。

CyPとNS5Bの相互作用については、HA-tagを有するNS5Bとmyc-tagを有するCyPA或はCyPBを293T細胞、1b細胞或は1b/2a細胞で発現させ、myc-tag抗体にて免疫沈降させた後、HA-tag抗体によりimmunoblottingを行い検出した。

JFH1株HCVの感染増殖系については、HCVの感染増殖を許容するHuH-7細胞由来のRSc細胞を用いて、CyPA或はCyPBのノックダウン細胞やCyPAとCyPBのダブルノックダウン細胞を作成し、これらの細胞にJFH1株由来のHCVcc(培養細胞由来の感染性HCV)を感染させ、CsAの抗HCV活性をreal-time RT-PCR法やWestern blot法により検討した。

(2) IFNに抵抗性を示す全長HCV RNA複製細胞の単離と抵抗性になる因子の解析

全長HCV RNA複製細胞株として樹立したO細胞を2年間継代培養して得られた細胞(O2細胞と命名)を10-cm dishに 2×10^4 個播き、翌日から4日ごとに培地交換とともにIFN- α (50 IU/ml)を添加しG418存在下(0.3 mg/ml)で25日間培養した。コントロール細胞として、G418非存在下で同様の処理をした細胞を用意した。G418存在下で最終的に得られたIFN- α 抵抗性の細胞コロニーをすべてトリプシンにて剥がして集めて、O2r細胞とした。コントロール細胞としてO2細胞を用いた。O2およびO2r細胞からRNeasyによりTotal RNAを調製し、HCVのNS3-NS5Bまでの領域をRT-PCRによりHCVゲノムを増幅した。PCRにはfidelityの高いKOD-plus DNAポリメラーゼを用いた。増幅産物(6 kb)をpBR322MCベクターにクローニングして、それぞれ10クローンについて塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸配列についてGENETYX-MACプログラム

を用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。

(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、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 増殖に影響を与える宿主因子の機能解析

免疫抑制剤である CsA が臨床血中濃度で HCV の増殖を特異的に抑制することが 2003 年に見出されて以来、その抗 HCV 活性にかかわる宿主因子の解析が幾つかのグループによりなされている。しかしながら、これまでに得られた結果は、CyPA、CyPB 或は CyPC の関与を示すまちまちの結果が得られている。使用する HCV 株によって違う可能性もあることから、今回、遺伝子型 1b の HCV-0 株と遺伝子型 2a の JFH1 株の HCV 増殖系を用いて、CsA の抗 HCV 活性を担う CyP の種類の同定作業を行った。また、これまでの報告によると CyP と HCV の NS5B との相互作用が CsA の抗 HCV 活性を担うのではないかと示唆されている。そこで、NS5B に注目して以下の実験を行った。HCV 株の違いが CsA に対する感受性に差がないかどうかを検討するために、まず最初にルシフェラーゼ遺伝子を有する 1b 型 (HCV-0 株) HCV レプリコン複製細胞 (1b) と NS5B 領域のみ 2a 型 (JFH1 株) のものに置換した 1b/2a キメラレプリコン複製細胞 (1b/2a) の樹立を行った。HCV レプリコン RNA を OR6c 細胞に導入して得られ

た多数の G418 耐性コロニーをクローン化することなく、ポリクローンとしてそれぞれレプリコン細胞 (1b 細胞と 1b/2a 細胞) として得た。1b 細胞と 1b/2a 細胞における HCV レプリコンの複製レベルは同程度であることを Western blot 解析により確認した。また、HCV レプリコンの遺伝子解析によっても、新たなアミノ酸置換は認められないことを確認した。次に 1b 細胞と 1b/2a 細胞を用いて、IFN- α 、IFN- γ 、Pitavastatin および CsA に対する感受性の比較実験を行った。各種薬剤添加 72 時間後におけるルシフェラーゼアッセイの結果、2a 型の NS5B を有する 1b/2a 細胞は 1b 細胞と比較して IFN- α 、IFN- γ 、Pitavastatin については感受性にほとんど差は認められなかったが、CsA に対してはかなり抵抗性になることが分かった。この現象は抗 NS3 および NS5A 抗体を用いた Western blot 解析によっても確認した。

次に CsA の標的分子がどの CyP であるかどうかを検討するために、細胞内で発現レベルが高い CyPA や CyPB がノックダウンされた細胞或は CyPA と CyPB の両方がノックダウンされた細胞を作成して調べた。その結果、これらの細胞における HCV タンパク質 (NS5A と NS5B) の発現レベルは 1b 細胞において、CyPA をノックダウンすると著しく低下したが、CyPB のノックダウン状態ではほとんど低下しないことが分かった。1b/2a 細胞においても、同様の傾向にあったが、CyPB のノックダウンにより HCV タンパク質量の若干の低下が認められた。

次に CyPA や CyPB の発現量の低下が CsA の抗 HCV 活性にどのような変化をもたらすかを検討した。それぞれの細胞に CsA (0.25 ~ 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して 72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行い比較した。1b 細胞においては、CyPA のノックダウン細胞と CyPA と CyPB のダブルノックダウン細胞では CsA に対する感受性が顕著に高まるが、CyPB

のノックダウン細胞では CsA に対する感受性がまったく変化しなかった。1b/2a 細胞においても、CyPA のノックダウン細胞と CyPA と CyPB のダブルノックダウン細胞では 1b 細胞と同様に CsA に対する感受性が顕著に高まったが、CyPB のノックダウン細胞でも CsA に対する感受性が若干高まることが分かった。このような現象が CsA に特異的な現象であることを示すために、これらの細胞に IFN- α (1 ~ 4 IU/ml) を添加して 72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行い、相互に比較した。その結果、これらの細胞は CyPA や CyPB のノックダウンに関わらず、IFN- α に対する感受性にまったく変化が認められなかった。以上の結果、1b および 2a 型 HCV レプリコンの複製には CyPA が必須であること、CyPB は 1b 型 HCV レプリコンでは必要ないが、2a 型 HCV レプリコンでは若干レプリコンの複製効率に影響を与えていること、そして CsA の抗 HCV 活性には CyPA が主に関与していることが示唆された。

CyPB が NS5B と相互作用を示すことが知られているので、この相互作用と CsA の抗 HCV 活性の間に相関関係があるかどうかを次に調べた。HA-tag を有する 0 株の NS5B と JFH1 株の NS5B および myc-tag を有する CyPA と CyPB をそれぞれの組み合わせで 293T 細胞で発現させ、myc-tag 抗体にて免疫沈降を行った後、HA-tag 抗体により immunoblotting を行った。その結果、0 株と JFH1 株の NS5B はどちらも CyPA より CyPB に強い相互作用を示すことが分かった。また、JFH1 株より 0 株の NS5Bの方が強い相互作用を示すことが分かった。

次に HCV レプリコン複製細胞である 1b 細胞と 1b/2a 細胞において myc-tag を有する CyPA と CyPB を発現させた後、同様の免疫沈降実験を行った。その結果、1b 細胞では 293T 細胞で得られた結果と同様、NS5B は CyPA よりむしろ CyPB に強い相互作用を示し、CsA の添加や

抗酸化剤であるビタミン E の添加によっても相互作用の強さに変化は認められなかった。1b/2a 細胞でも同様の結果であったが、NS5B と CyP との相互作用は弱く、CyPA との相互作用はほとんど認められなかった。これらの結果から NS5B は CyPB とは相互作用を示すが、CyPA との相互作用はかなり弱いことが示唆された。

最後に JFH1 株 HCV の感染増殖系における CsA の抗 HCV 活性に対する CyPA と CyPB のノックダウン効果を解析した。まず、HCV の感染増殖を許容する HuH-7 細胞由来の RSc 細胞を用いて、CyPA 或は CyPB のノックダウン細胞や CyPA と CyPB のダブルノックダウン細胞を作成した。これらの細胞に JFH1 株 HCV を感染させ 1 週間後に CsA (0.5 および 1.0 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、その抗 HCV 活性にどのような影響を与えるかを添加 72 時間後に検討した。その結果、CyPA をノックダウンさせると細胞内の HCV RNA の量は著しく低下して、CsA に対する感受性の増大が認められた。しかしながら、CyPB をノックダウンさせても細胞内の HCV RNA の量も低下せず、CsA に対する感受性の増大もほとんど認められなかった。

(2) IFN に抵抗性を示す全長 HCVRNA 複製細胞の単離と抵抗性になる因子の解析

0細胞を 2 年間継代培養した O2 細胞に IFN- α (50 IU/ml) を 4 日ごとに添加した結果、大部分は G418 感受性になり死滅したが、 2×10^4 個の細胞あたり大小合わせて 50 個程度の G418 耐性コロニーが得られることが分かった。0細胞の樹立時に同様の処理を行った場合には G418 耐性コロニーは数個と少なかった。G418 非存在下で同様の IFN- α 処理をした場合には細胞は confluent 状態に

なった。

O2細胞から得られたG418耐性のコロニーをすべてまとめた細胞をO2r細胞と名付けた。G418非存在下でIFN- α 処理を行い、十分に増殖した細胞をO2細胞のコントロール細胞(O2)とした。

次にO2細胞とO2r細胞内で複製増殖しているHCV RNAの遺伝子をRT-PCRで増幅して遺伝子解析を行い、相互に比較した。IFN抵抗性への関与が示唆されるNS3領域からNS5B領域までの6kbについてそれぞれ10クローンについて塩基配列を決定した。その結果、O2r細胞内にのみ認められる特異的配列は認められなかったが、Neighbor-joining法による系統樹解析の結果、O2r細胞から得られたHCV遺伝子の塩基配列(推定アミノ酸配列)はO2細胞から得られたHCV遺伝子群の一部を占め、クラスターを形成することが分かった。そのような傾向はNS5Aの領域に顕著に認められた。しかしながら、特定のアミノ酸に限定することはできなかった。

D. 考察

(1) HCV増殖に影響を与える宿主因子の機能解析

CsAの抗HCV活性はCsAの免疫抑制経路とは独立した細胞内受容体であるCyPの機能阻害を介することが明らかになっている。現在、CsA本来の免疫抑制作用をまったく持たないCsA誘導体であるDEBIO-025やNIM811が開発され、ペグIFNとの併用によるPhase IIの臨床試験が進行中であり、実用化が期待される抗HCV剤となっている。し

かしながら、その作用機序は完全には理解されていない。現在までに作用機序の1つとして、HCVのNS5Bと相互作用を示してHCVゲノムの複製複合体に参加しているCyPBの機能がCsAにより阻害されるという説が提唱されているが、CsAの抗HCV活性に関与するのはCyPAであるという報告が最近なされている。このような食い違いがあることから、本研究では、CsAの抗HCV活性に関与しているCyPの種類を我々独自のHCV増殖システムを用いて行った。その結果、CsAの抗HCV活性にはCyPBよりCyPAの関与が大きいことを明らかにした。また、CsAの抗HCV活性は、従来考えられていたようなCyPとNS5Bとの相互作用を阻害することによるものではないことを示唆する結果を得た。CyPAがどのような機序によりHCVゲノム複製複合体に参加しているかについては、今後さらに詳しく調べる必要がある。それを解明することにより、CsAの抗HCV活性の分子機序が理解され、より強力な抗HCV剤の開発が可能になるものと思われる。

(2) IFNに抵抗性を示す全長HCV RNA複製細胞の単離と抵抗性になる因子の解析

以前、全長HCV RNA複製細胞としてO細胞を樹立した際にIFN抵抗性になる細胞群の単離を試みたが、ほとんどすべての細胞がG418感受性になり耐性コロニーはほとんど得られなかった。しかしながら、今回2年間長期に培養継代した細胞(O2細胞と呼んでいる)を用いた

場合、IFN 抵抗性を示すかなりの数の G418 耐性コロニーが得られた。2年間の培養により細胞自体の IFN に応答する能力が低下した細胞が出現している可能性もあるが、2年の培養期間で生じた HCV ゲノムの変異や多様性が関与している可能性がある。HCV ゲノムの遺伝子解析の結果、IFN 抵抗性を示す細胞群からは、系統樹解析により1つのクラスターを形成する集団となっていることが分かったことから、今後これが、HCV ゲノムの多様性によるものか或は細胞の変化によるものかを調べる必要がある。そのために、O2 細胞および IFN- α に抵抗性を示す O2r 細胞を IFN- γ で処理して治癒細胞 (HCV RNA が排除された細胞) を作成して、IFN- α のシグナルの伝達効率に変化がないかどうかを調べる予定である。また、このような治癒細胞に O2r 細胞より回収した HCV RNA を導入することにより IFN 抵抗性になるかどうかを検討する予定である。

E. 結論

CsA の抗 HCV 活性には CyPB より CyPA の関与が大きいことを明らかにし、NS5B との相互作用では説明できないことを示した。

2年間培養して HCV の遺伝的多様性を獲得した全長 HCV RNA 複製細胞から単離された IFN 抵抗性群の HCV ゲノムは系統樹解析により限局したクラスター群を形成することが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* in press (2009).
- 2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J. Virol.* in press. doi:10.1128/JVI.01840-08 (2008).
- 3) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* in press. doi:10.1007/s00705-008-0282-8 (2008).
- 4) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82:9639-9646 (2008). *J. Virol.* 82, 9305 (2008)

spotlight

- 5) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72-79 (2008).
- 6) Mori K, Abe KI, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:104-109 (2008).
- 7) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158-1166 (2008).
- 8) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292-298 (2008).
- 9) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol.* 80 (4):632-639 (2008)
2. 学会発表
- 1) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 抗HCV成分・製剤のHCV RNA複製に対する抑制機序におけるMAPK signaling pathwayの関与. 第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月.
- 2) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之、山本和秀. 全長HCV-RNA複製細胞を基に作成したIFN治療後再発モデルによる有効な治療法に検討・評価. 第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月.
- 3) Ikeda M, Abe K, Kuroki M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 4) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- α resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related

- Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 5) Abe K, Ikeda M, Tani H, Ariumi Y, Dansako H, Matsuura Y, Kato N. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 6) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 7) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 8) 池田 正徳、阿部 健一、黒木 美沙緒、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 抗HCV活性を示すアラキドン酸代謝産物 5-HETEの同定. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 9) 池田 正徳、森 京子、西村 剛、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なる1b型HCV陽性血清由来の全長 HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 10) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之. IFN抵抗性全長HCV-RNA複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 11) 阿部 健一、池田 正徳、谷 秀樹、有海 康雄、團迫 浩方、松浦 善治、加藤 宣之. HCV複製に関与する宿主因子探索用細胞株の Negative selection法による樹立. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 12) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. Cyclosporine Aに対し抵抗性を示す1b/2aHCVキメラレプリコン. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 13) 西村 剛、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なるHCV陽性血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 14) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に抑制する. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
 - 15) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a

patient with acute hepatitis C. 第
67回日本癌学会学術総会、名古屋、
2008年10月.

- 16) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura
G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T,
Kato N. Development of
genome-length HCV RNA replication
reporter assay systems using
various genotype 1b HCV strains.
第67回日本癌学会学術総会、名古屋、
2008年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
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

前年度までに我々は、C型肝炎患者のミエロイド DC(MDC)では、TLR や RIG-I に対するアゴニスト刺激によるサイトカイン産生は低下していることを明らかにした。我々は HCV が MDC に感染することを明らかにしており、肝細胞と同様に HCV NS3/4A による TRIF などのアダプター分子の切断が TLR/RIG-I 系の機能低下に関与している可能性がある。B 型肝炎患者では MDC の TLR2/TLR3/TLR4 の発現は非感染者と同様であるが、C 型肝炎患者 MDC と同様にアゴニスト刺激によるサイトカイン産生の低下を認めた。従って MDC の TLR/RIG-I 系の機能低下には、ウイルス感染を介する機序と介さない機序があることが示唆された。C 型肝炎患者 MDC を NS3/4A プロテアーゼ阻害剤で処理すると、TLR 刺激による IFN- β 産生能が回復し TRIF 発現も回復した。一方、非感染者 MDC では阻害剤によるサイトカイン産生能の変化は認められなかった。これは NS3/4A 阻害剤によって、抗ウイルス作用のみならず、感染免疫細胞での免疫能回復効果も期待できることを示しており、TLR3/TRIF/TRAF6 系が HCV に対する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、B 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、TLR/RIG-I のアダプター分子の発現を群間で比較した。また MDC に HCVNS3/4A 阻害剤を添加した後 TLR リガンド刺激を加え、サイトカインの産生能を比較した。

(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

C 型肝炎患者 MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は非感染者より亢進していたが、TLR3 の発現は同程度であった。一方、B 型肝炎患者 MDC では、TLR2、TLR3、TLR4 いずれも非感染者と同程度であった。TLR3 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、B 型肝炎ともに低かった。C 型肝炎患者 MDC では 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、TRIF、TRAF6 の発現は増加し、C 型肝炎患者 MDC のサイトカイン産生能が回復した。

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。また B 型肝炎患者 MDC では、TLR/RIG-I の発現動態は C 型肝炎とは異なるものの TLR/RIG-I 系の機能低下が認められ、HCV と HBV は異なる機序で MDC 機能に干渉することが示唆された。C 型肝炎では TRIF、TRAF6 の発現低下が関与しており、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ることから、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