

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コア蛋白質の成熟と病原性発現の分子機構

研究分担者 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)のコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウス(CoreTg)が顕著なインスリン抵抗性が示すことが報告されている。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。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。成熟したコア蛋白質の一部は核へ移行し、プロテアソームアクチベーターである、PA28 γ 依存的に分解される。CoreTgは有意に高値の血中インスリン濃度を示したが、PA28 γ 遺伝子をノックアウトしたCoreTg(CoreTg-PA28 γ KO)は対照のB6マウスと同等であった。また、CoreTgで観察されるIRS-1のリン酸化の低下やIRS-2の発現量の低下は、CoreTg-PA28 γ KOでは認められなかった。以上の成績から、PA28 γ はHCVコア蛋白質によるインスリン抵抗性の誘導に必要な宿主因子であることが示唆された。

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。また、多くの臨床研究によって、HCV感染と糖尿病、特にインスリン抵抗性との関連性が明らかにされている。実際に、HCVのコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウス

(CoreTg)では、顕著なインスリン抵抗性が観察される。我々はこれまでに、HCVコア蛋白質が核内のプロテアソームアクチベーター11S γ (PA28 γ)と特異的に結合し、PA28 γ 依存的に分解されることを報告している。そこで、PA28 γ 遺伝子をノックアウトさせたCoreTg(CoreTg/PA28 γ KO)を用いて、HCVコア蛋白質によるインスリン抵抗性発現におけるPA28 γ の役割を解析した。また、コ

ア蛋白質はウイルス粒子の構成因子であるが、一部は核やミトコンドリアへ移行する。本研究では、HCVコア蛋白質の成熟機構と病原性発現の関連を解析する。

B. 研究方法

CoreTgとPA28 γ 欠損マウスを交配し、CoreTg/PA28 γ KOマウスを作製した。血中グルコース濃度、血中インスリン濃度、インスリン負荷試験を行った。また、肝臓内のインスリンシグナル分子であるIRS-1とIRS-2のリン酸化および発現量を調べた。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砕した後、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、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

血中グルコース濃度について CoreTg および CoreTg/PA28 γ KO の両マウス間に差は認められなかった。血中インスリン濃度について CoreTg は、有意に高値を示したが、CoreTg/PA28 γ KO は対照の B6 マウスと同等であった。また、インスリン負荷試験においても CoreTg マウスは、インスリンに対し有意に低い反応性を示したが、CoreTg/PA28 γ KO マウスは対照の B6 マウスと同等の反応性を示した。いずれの試験でも、PA28 γ 遺伝子ノックアウトマウスは B6 マウスと同等の成績を示した。

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。また、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。さらに 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。

D. 考察

本研究により、HCV 感染と 2 型糖尿病の発症にも PA28 γ 依存的なコア蛋白質の分解との関連が明らかになってきた。また、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。HCV コア蛋白質の成熟阻害 (SPP の阻害剤あるいはコア蛋白質の SPP による切断に必須な領域の拮抗剤) や核内での PA28 γ 依存的な分解阻害剤の開発は、全く新しい慢性 C 型肝炎の治療薬となる可能性を秘めている。

E. 結論

- 1 PA28 γ は HCV コア蛋白質によるインスリン抵抗性の誘導に必要な宿主因子である。
- 2 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。
- 3 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2008;82:8349-8361.
- 2) Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* 2008;82:7964-7976.
 - 3) 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. A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2008;82:5715-5724.
 - 4) 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.* 2008;82:3480-3489.
 - 5) Taguwa 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.* 2008;82:2631-2641.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.* 2007;17:343-354.
 - 12) Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 2007;81:1727-1735.

- 13) Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 2007;81:1174-1185.
- 14) Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.* 2006;80:11265-11273.
- 15) Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBOJ.* 2006;25:5015-5025.
- 16) Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K.J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-105.
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、森石恆司、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、森石恆司、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 3.5Å 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) 田鉄修平、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性、同上。
- 10) 森石恆司、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 恆司、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。
- 18) Shuhei Tagawa, 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.
- 19) 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。
- 20) 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。
- 21) 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。
- 22) 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.
- 23) 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。
- 24) 田鉦修平、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関与する宿主蛋白質 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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。
- 28) 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。
- 29) 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。
- 30) Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura：Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
- 31) Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura：Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis Virus NS3 Helicase/Nucleoside Triphosphatase at a Resolution 1.8 Å. 同上。
- 32) Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura：Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006.
- 33) Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura：Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
- 34) Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura：Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
- 35) Takayuki Abe, Shyu-hei Tagawa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura：Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
- 36) 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製におけるFKBP8の役割、第54回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成18年11月19-21日。
- 37) 阿部隆之、田鍬修平、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治：C型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
- 38) 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子の解析、同上。
- 39) 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恆司、松浦善治：カテプシンLによってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
- 40) 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恆司、松浦善治：核小体蛋白質B23は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する、同上。
- 41) 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：HCVエンペローブ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、同上。
- 42) 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恆司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治：日

本脳炎ウイルスのRNA ヘリケースドメインのX線結晶構造解析、同上。

- 43) 森石恆司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割、同上。
- 44) 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治: カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。
- 45) 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恆司: C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症における PA28 γ の役割、第65回日本癌学会学術総会、横浜、平成18年9月28-30日。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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

研究分担者	山口 一成	国立感染症研究所 血液・安全性研究部長
研究協力者	溝呂木ふみ	慈恵医大第3病院診療部長、血液腫瘍内科教授
	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
	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

研究要旨（I～III班で構成される）

I. HCV の病原ゲノム遺伝子がヒト血液細胞に与える影響を *in vivo* で解析するため、モデルマウスの作製を行った。このモデルに HCV 病原ゲノム遺伝子を導入したヒト血液細胞を移植し、導入遺伝子の与える影響を検討した。

II. 1) 新規免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞 *in vivo* 増殖系を樹立し、C 型肝炎研究へ応用した。

2) C 型肝炎患者の NK 細胞機能を検討した。

III. HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞指向性に HCV が感染していることを明らかにした。そのような B 細胞においては HCV 蛋白の発現が見られることから、HCV が B 細胞内で増殖していることが示唆された。HCV 慢性感染患者の末梢血 B 細胞では、DNA に変異を誘導することで知られている AID (Activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子や、cyclin D などの腫瘍化関連遺伝子の発現に変動が起きており、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫の発症との関連が強く示唆された。

I. 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）

HCV の病原ゲノム遺伝子がヒト血液細胞に与える影響を *in vivo* で解析するため、モデルマウスの作製を行った。このモデルに HCV 病原ゲノム遺伝子を導入したヒト血液細胞を移植し、導入遺伝子の

与える影響を検討した。

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及び遺伝子導入

1) 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遺伝子導入し、抗 Flag 抗体によるウェスタンブロット法を用いて発現と分子量の確認を行った。また、Nucleofector II (amaxa biosystems) を用い、 1×10^5 の細胞を PBS にて 1 回洗浄し、Resuspension Buffer R 12ml に懸濁、0.5mg の GFP 発現ベクター-pmaxGFP (amaxa biosystems) と混合した。Gold-Tip 内にサンプルを充填して Electrolytic Buffer E の入った MP-Tube に装着し、24 通りの条件で遺伝子導入を行った。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。

2) pBMN-GFP ベクター (Orbigen) のマルチクローニングサイトに Flag タグを付与した HCV の core-E1-E2 遺伝子、NS5A 遺伝子を組み込んだ。pBMN-GFP/Flag-core-E1-E2 および pBMN-GFP/Flag-NS5A はリン酸カルシウム法を用いて Phoenix™-Ampho (Orbigen) に遺伝子導入し、回収したウイルス浮遊液 (培養上清) をウイルスベクターとして用いた。ヒト末梢単核球は electroporation 法 (Nucleofector II (amaxa biosystems))、またはレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。導入遺伝子の発現は抗 Flag 抗体または GFP を指標にし、フローサイトメトリー法により解析した。臍帯血 CD34+細胞は、レトロウイルスベクターを用いて目的遺伝子の導入を行い、導入効率は GFP を指標に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

1) ヒト末梢単核球は 5×10^6 の細胞を10 ul 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。

2) ヒト造血幹細胞は 5×10^4 の細胞を500 ul の PBS (含 2%FCS) に懸濁し、NOD/Scid/Jak3(-/-) マウスの尾静脈より移植した。移植 2 週間後にマウスの脾臓を摘出、または経時的に末梢血を採取し、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

a) GFP 発現ベクターを用いて、ヒト末梢単核球へ高効率に目的遺伝子が導入できる条件検討を行い、使用機器、細胞数、プラスミド濃度、遺伝子導入後の培地、および培養時間の検討結果は以下のとおりである。

1. 使用機器

通常の遺伝子導入が困難であるプライマリー細胞へ、高い導入効率の実績がある Microporator MP-100 (AR BROWN) と Nucleofector™II (amaxa bioscience) を用い、比較検討を行った。その結果、Microporator MP-100 を用いた場合には最高で3%程度しか GFP 陽性細胞数が認められなかったのに対し、Nucleofector™II を用いた場合には最低でも20%程度の導入効率を得られた。従って、使用する機器は Nucleofector™II が適していると考えられた。

2. 細胞数

10^6 - 10^8 cells の間で様々な細胞数のサンプルを用意し、Nucleofector™II を用いて GFP 陽性細胞出現率を検討した。その結果、 2×10^7 cells より少ない細胞数で遺伝子導入を行った際に GFP 陽性細胞の割合が高いことが明らかとなった。一方、生細胞数の検討では 5×10^6 cells 以上が適していた。従って、 2×10^7 cells が至適細胞数と考えられる。

3. プラスミド濃度

0-20mg の間で pmaxGFP の濃度を振り、GFP 陽性細胞の比率を検討した。その結果、10mg 以上のプラスミドを用いた際に最も高い導入効率を得られた。従って、10mg が至適プラスミド濃度と考えられる。

4. 至適培地

遺伝子導入後の細胞培養に適した培地を検討する目的で、下記2種類の培地を用いた。

① RPMI1640, 10% FCS, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6

② a-MEM, 20% FCS, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-3, 50 ng/ml TPO, 100mM β -mercaptoethanol

遺伝子導入3日後の GFP 陽性細胞数と生細胞数を検討したところ、GFP 陽性細胞の出現率には顕著な差が認められなかったものの、細胞の生存能力は①の培地を用いた方がやや高かった。従って、遺伝子導入後の細胞を培養する際には、①の10% FCS, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6 を添加した RPMI1640 培地が適すると考えられる。

5. 培養時間

遺伝子導入後の細胞を7日目まで培養し、GFP陽性細胞数と生細胞数の推移を検討した。その結果、GFP陽性細胞数は3日目を境に減少することが明らかとなった。一方、生細胞数は1日目を過ぎると急速に減少した。遺伝子導入した細胞は速やかにマウスへの移植に用い、*in vitro*で培養する場合でも1日以内がよいと考えられる。

b) 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。

c) 免疫細胞の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週間後に着生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) ヒト末梢単核球を用いた移植実験

ヒト末梢単核球を脾臓内に移植したNOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスでは、2週間後からヒト細胞の*in vivo*におけるB細胞への分化が認められたが、その割合は週を

追うごとに減少した。同時にelectroporation法(導入効率60%)およびウイルスベクターを用いて遺伝子導入したヒト末梢単核球の移植も行ったが、レシピエントマウスの長期生存が望めず、コントロールと比較して有意な差を認めるには至らなかった。

e) ヒト造血幹細胞を用いた移植実験

そこで、マウス体内におけるヒト由来細胞の動態を長期に解析するため、移植方法の切り替えを試みた。第一は、ヒト造血幹細胞(臍帯血CD34⁺細胞)を新生仔マウス(NOD/Scid/Jak3^{-/-})の肝臓へ移植するもの、第二はヒト造血幹細胞を成体マウス(NOD/Scid/Jak3^{-/-})の尾静脈経由で移植するものである。共にヒトB細胞の構築に2カ月程度を要し、また効率も脾臓内移植の場合より劣ったが、長期間にわたる解析を実現させるため、レシピエントマウスの生存期間が長く、手技が比較的簡便な第二の手法を用いることとした。

ヒト臍帯血CD34⁺細胞への遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いて行い、約30%の感染効率を認めた。これをNOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスの尾静脈より移植し、脾臓での腫瘍形成等に対する導入遺伝子の影響について、検討を行っている。

D. 考察

ヒト血液細胞をマウス体内で再構築する場合、ヒト末梢単核球を脾臓内に接種するとB細胞の出現率が比較的高いもの

の、マウス自体の長期生存は望めなかった。一方、ヒト造血幹細胞を尾静脈経由で移植した場合は、ヒト由来 B 細胞が構築されるまでに時間を要し、出現率も高くない。しかし、マウスの長期生存は望めるので、HCV 病原ゲノム遺伝子を導入したヒト血液細胞を移植し、B 細胞リンパ腫発症の有無について、数年単位で解析するのに適すると考えられ、現在解析中である。近年、理化学研究所バイオリソースセンターよりヒト不死化 B 細胞の提供が始まった。この細胞は *in vitro* での長期培養が可能であり、またヌードマウスに造腫瘍性を示さないものであることが示されている。今回の研究ではマウス体内で短期間にヒト B 細胞を高効率に再構築させ、それを長期に追跡することが困難であったが、ヒト不死化 B 細胞を用いることで、これらの課題を克服できる可能性がある。

E. 結論

HCV の病原ゲノム遺伝子がヒト B 細胞の動態に与える影響を解析するため、NOD/Scid/Jak3^{-/-}マウスにヒト血液細胞を移植し、*in vivo* での追跡を試みた。脾臓内に core-E1-E1 または NS5A を遺伝子導入したヒト末梢単核球を移植した場合、遺伝子の導入効率は高いものの移植細胞の追跡期間に限度があり、HCV 病原ゲノム遺伝子導入の効果を評価することはできなかった。そこで、core-E1-E2 または NS5A を導入したヒト臍帯血 CD34⁺細胞を経尾静脈で移植し、長期間遺伝子導入細胞の追跡を行う手法に切り替え、造腫瘍性等

への影響に関して検討を行っている。

II. 1) 新規免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞 *in vivo* 増殖系の樹立と C 型肝炎研究への応用 (岡田誠治)

A. 研究目的

HCV は、肝細胞のみならず B 細胞などにも感染し、自己免疫疾患や悪性リンパ腫の発症に深く関わっていることが知られている。しかし、HCV と血液細胞の関係を見る良い解析系が存在しないため、その機序ははっきりしていない。本研究では、ヒト B 細胞が生着・増殖するマウスモデルを構築し、HCV の血液・免疫系への影響や腫瘍との関連について解析可能なモデル系を構築することを目的として行われた。

B. 研究方法と結果

1) NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスの樹立：NOD/Scid マウスと Jak-3 欠損マウスを 10 世代交配して NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスを作成した。本マウスにおいては、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞が欠損し、高度の免疫不全状態にあることを確認した。また、本マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植したところ、マウス骨髄への造血幹細胞の生着と B 細胞への分化が認められた。移植 12 週後では、B 細胞のみならず T 細胞、樹状細胞、単球系細胞の構築も認められた。また、脾臓では、胚中心の形成も認められた。B 細胞は、最終分化した形質細胞まで確認された (Int J Hematol 88 ; 476, 2008)。

2) 免疫不全マウス体内におけるヒト B 細胞増殖・分化系の構築：2 Gy 放射線照

射したNOD/Scid/Jak-3欠損マウス腹腔内及び脾臓にヒト臍帯血単核球を移植したところ、移植後2週間で両者共にヒトリンパ球の生着が認められた。腹腔内投与では、主にT細胞の構築が認められたのに対し、脾臓内投与では、B細胞とT細胞両者の構築が認められた。T細胞B細胞共にナイーブなフェノタイプを示すものから記憶細胞までが存在することを確認した。また、本マウスに麻疹ウイルスを攻撃接種したところ、麻疹特異的抗体(Ig-M, Ig-G)の産生が認められたことから、免疫不全マウス体内でヒトの機能的な免疫系の構築が可能であることが示された(論文投稿準備中)。

3) 悪性リンパ腫治療モデルの構築:

NOD/Scid/Jak-3欠損マウスにヒト臍帯血単核球とHFWT細胞を移植することにより、マウス体内でヒトNK細胞が特異的に増殖する系を構築した。更に本マウス皮下に悪性リンパ腫細胞株Rajiを移植し、抗CD20抗体を投与したところ、投与しないものと比べて腫瘍の有為な縮小が認められた。

C. 考察

高度免疫不全(NOD/Scid/Jak-3欠損)マウス体内でヒトの免疫系をmimicする系を構築した。本系は、①C型肝炎患者B細胞の増殖分化異常の検討(自己免疫疾患発症との関連)、②C型肝炎関連悪性リンパ腫発症モデル系の樹立、③C型肝炎ウイルスに対する免疫応答の解析、などC型肝炎ウイルスと血液系特にB細胞系との相互作用の解析に有用であると考えられる。また、ヒトNK細胞と抗体によるADCC

活性を用いた悪性リンパ腫の治療モデルを樹立した。本モデルは、今後C型肝炎による悪性リンパ腫の治療法の確立に有用であると考えられる。

II. 2) C型肝炎患者のNK細胞機能の検討(岡田誠治)

A. 研究目的

慢性C型肝炎患者では免疫機能が抑制されており、C型肝炎の持続感染に関与していることが知られている。そこで、抗ウイルス作用のあるNK細胞の機能に着目してC型肝炎とNK細胞についての解析を行った。

B. 研究方法と結果

日本人慢性C型肝炎患者の末梢におけるNK細胞数、NK細胞の亜分画、NK細胞の活性化能をフローサイトメトリーを用いて解析したところ、慢性C型肝炎患者ではNK細胞数が減少するが、CD56⁺CD16⁺前NK細胞の割合は増加し、K562刺激によるCD107a発現を指標としたNK細胞活性化能は減弱していることが判明した。また、インターフェロン療法を受けた患者において、治療前、治療終了直後、治療6ヵ月後のNK細胞の状態を解析したところ、治療成功例では治療終了後6ヶ月の時点においてNK細胞数もNK活性も上昇することが判明した。現在、患者数を増やして確認しているところである。一方、エジプトではGenotype IVのHCV感染が90%を占めている。そこでエジプトの症例におけるウイルスのGenotypeの違いによるNK細胞への影響を解析中である。

C. 考察

慢性C型肝炎患者ではNK細胞機能が抑制されており、治療により回復することが判明した。治療直後のNK細胞の状態により治療の有効性を判定することが可能であることを期待したが、治療直後のNK細胞機能は抑制されており、判定は不可能であった。NK細胞機能の抑制は、C型肝炎の慢性化に寄与していることが示唆され、NK細胞活性化によるC型肝炎慢性化の回避が期待できる。C型肝炎ウイルスのGenotypeの違いによるヒト免疫機能への影響の相違について、今後更なる解析を進めていく予定である。

III. HCV感染とB細胞リンパ腫

(水落利明、池淵研二、溝呂木ふみ、浜口 功、山口一成)

A. 研究目的

HCVは、そのウイルス表皮蛋白の一種であるE2分子が、肝細胞表面に発現されるCD81分子と高親和性に結合することにより感染が成立すると考えられている。このCD81分子は肝細胞のみならずB細胞にも発現されており、実際にB細胞にHCVが感染することを示唆する報告がある。以前より、HCV感染者においてはmixed cryoglobulinemiaに代表されるB細胞免疫異常やrheumatoid factor (RF)の産生、あるいは Sjogren-like syndrome といった自己免疫様疾患の発症が報告されていた。さらにはHCV感染とnon-Hodgkin B cell lymphoma発症との関連も指摘されている。従って、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

があると考えた。そこで本研究ではHCV感染者の末梢血B細胞を材料に用いて(1)免疫学的解析(2)HCV感染/増殖の検討(3)癌化関連遺伝子/蛋白の発現検索等を行い、HCV感染とB細胞リンパ腫発症との関連について解析することを目的とした。

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、Flow cytometry(4-color)による細胞表面抗原の解析を行った。
- 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) HCV肝炎患者の肝細胞切片を用いて蛍光免疫組織染色を行った。
- 4) HCV慢性感染患者および対照として健常人から採取した末梢血液より、Ficollを用いてPBMCを分離し、さらにAutoMACS(抗体標識磁気ビーズ吸着法)を用いてCD19陽性(B細胞)およびCD19陰性細胞(非B細胞)を分離した。得られた各細胞群からRNAおよび蛋白質を抽出し、real time RT-PCR法、およびイムノプロテイング法により、HCV遺伝子、および非ホジキン型Bリンパ腫発症に関連することが示唆される様々な遺伝子および蛋白質の発現解析を行った。またB細胞に存在するHCV遺伝子配列の解析、およびEIA法と蛍光免疫染色法によるHCV慢性感染者末梢B細胞でのHCV蛋白質の発現を調べた。

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 細胞の減少および CXCR3 の発現上昇が認められた。

2) HCV 感染者では健常者に比較して、血漿中の HGF, IL-2R, IL-12, MIG (Monokine induced by IFN γ) などの上昇が見られたが、最も顕著だったのは IP-10 (IFN γ -inducible Protein 10) ケモカイン量の上昇であった。

3) HCV 肝炎患者の肝臓組織切片の蛍光染色により、IP-10 を産生している部位に CXCR3 (IP-10 receptor) 陽性の CD27 陽性メモリー B 細胞が集積している像が見られた。

4) HCV 感染者の末梢血、特に B 細胞において、real time RT-PCR 法により、HCV 慢性感染患者由来の B 細胞指向性に HCV が感染していることを明らかにした。B 細胞から単離した HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域 (IRES を含む) の遺伝子配列は、血液中に存在する HCV RNA の遺伝子配列とほぼ同一であった。また HCV の E2 領域に存在する起可変領域 (HVR-1) の遺伝子配列も両者で同様に変異しており、B 細胞に固有の変異は見られなかった。さらに ELISA 法と Western Blotting 法、および蛍光免疫染色法により B 細胞内での HCV 蛋白発

現を観察され、HCV が B 細胞内で増殖していることが示唆された。

5) HCV 感染により誘導される B 細胞内での遺伝子発現変動について、主に腫瘍関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に焦点をあてて real time RT-PCR 法により解析を行った。その結果、ウイルス性肝炎および B 細胞リンパ腫発症との関連が強く示唆されている AID mRNA の発現が、健常人に比較して約 90 倍上昇していた。また AID 蛋白発現も同様に上昇していることが確認された。さらに、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫発症において顕著に発現が変動することが報告されている遺伝子に関して rt-PCR により検討した結果、HCV 慢性感染患者 B 細胞においては LMO2、CCND1、CCND2 mRNA の発現が同様に変動していることが明らかになった。

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、IFN γ 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 IFN γ 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 receptor) 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 HCV 肝炎患者の肝臓組織切片の蛍光染色を行ったところ、IP-10 の発現部位に CD19/CD27/CXCR3 陽性細胞が存在することから、この仮説が正しいことが確認さ

れた。

HCV 慢性感染患者末梢血 B 細胞に HCV が感染していることが明らかになったことから、その合目的性を考察した。HCV 感染末期では肝臓の組織破壊が生じることから HCV が増殖できる「場」を失うことが予想される。そのために HCV が感染／増殖の「場」を肝臓細胞以外に求めることは理にかなっている。その一例として末梢 B 細胞がその「場」になることは、B 細胞が HCV の受容体を構成する CD81 分子、SR-B1 (スカベンジャーレセプターB-1)、DC-SIGN (C タイプレクチン) といった分子群を発現していることから容易に予想ができる。実際にごく最近の論文においては、B 細胞に HCV (JFH-1) が感染 (付着および内包) すること、そしてその HCV が HuH-7.5 (肝臓由来細胞株) に trans-infection することが報告されている。このように HCV が B 細胞を reservoir (貯留場) として利用しているとすると、血中の HCV を peginterferon や ribavirin の投与によって減少させるだけでなく、HCV 感染／増殖の場である可能性を持つ末梢血 B 細胞を rituximab 投与等により消滅させる治療法が有効であることが予想される。

本研究ではさらに、HCV に感染した B 細胞において腫瘍化関連遺伝子発現に異常をきたし、非ホジキン型 B リンパ腫へと transform する可能性を、特に AID (Activation-induced cytidine deaminase) および cyclin 遺伝子の発現亢進から示唆した。今後は HCV 陽性の非ホジキン型リンパ腫患者末梢血を用いて、

それらの腫瘍化関連遺伝子発現について同様の解析を行いたい。

E. 結論

- 1) 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 IFN γ -inducible ケモカインである IP-10 (CXCR3 と結合する ligand) 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。
- 2) HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞指向性に HCV が感染していることを明らかにした。また、そのような B 細胞においては HCV 蛋白の発現が見られることから、HCV が B 細胞内で増殖していることが示唆された。
- 3) HCV 慢性感染患者の末梢血 B 細胞では、DNA に変異を誘導することで知られている AID (Activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子や、cyclin D などの腫瘍化関連遺伝子の発現に変動が起きており、非ホジキン型 B 細胞リンパ腫の発症との関連が強く示唆された。

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、札幌、2007.
- 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、東京、2007.

- 3) HCV 慢性感染患者における B 細胞リンパ腫発症機序の解明：末梢血 B 細胞での HCV 感染・増殖および AID (Activation-induced cytidine deaminase) の発現上昇：伊藤昌彦、村上恭子、鈴木哲朗、山口一成、水落利明 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 4) Peripheral B cells are reservoirs for HCV infection/replication:水落利明 第 38 回日本免疫学会学術集会、京都、2008.

G. 知的所有権の取得状況

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

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

研究分担者 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に関し発症機序解明を目的としてモデルマウスを樹立し解析を行った。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)で、HCVのB細胞への直接作用を解析できる。600日以上長期に渡る経過観察の結果、Rz-CD19Creマウスでは雌での死亡率が有意に高く、脾臓の腫大や腫瘍が発生し、リンパ腫が観察される個体があった。もう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、生後任意の時期にcreアデノウイルスでHCV蛋白質を発現誘導後、持続発現するが、リンパ性増殖も高頻度に発症する事が明らかとなった。CN2 IRF-1^{-/-}マウスではIL-2, IL-10の産生上昇が見られ、リンパ組織でのBcl-2の発現上昇が観察された。試験管内で、リンパ球にIL-2, IL-10を同時に処理するとCN2遺伝子存在下でコロニー形成能が亢進しアポトーシス耐性を獲得してBcl-2の発現が上昇する事が明らかとなった。また、IL-2, IL-10の産生を誘導するのはコアタンパク質である事も明らかとなった。コア蛋白質存在下でIL-2, IL-10処理を行うとBcl-2の発現が誘導される事も明らかとなった。

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リンパ腫細胞にはHCVが存在するという報告もあるが、HCV感染とリンパ腫発症の詳細な因果関係は不明である。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事を目的として実験モデル系

を確立した。

B. 研究方法

Rz-CD19Creマウス；HCV全長遺伝子を発現するRzマウスとB細胞でCre酵素を発現するCD19Creマウスを交配して樹立した。600日齢以上まで経過を観察し体重変化やALT値を測定した。脾臓や末梢リンパ球におけるHCVの発現をELISAやRT-PCRで確認した。さらに、腫瘍などの異常が発生したマウスを解剖し組織を病理学的に解析した。

HCV持続発現マウス；HCV構造蛋白質遺伝子(CN2)をCre/loxPシステムで生後任意の時期に発現するマウスに、CTLやNK活性の低下したIRF-1^{-/-}マウスを交配して樹立した(CN2 IRF-1^{-/-}マウス)。CN2 IRF-1^{-/-}マウスの尾静脈からCre-adenovirus(2x10⁹ 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, CD45R, 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、TUNELアッセイやカスパーゼの測定で検索した。肝炎の指標は血中ALTを測定(nissui)し、組織はHE染色によって検索した。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。リンパ球のコロニー形成能はメチルセルロースを用いて解析した。カスパーゼ3/7や9の活性はAc-LEHD-AFCかAc-DEVD-AFCを基質として測定した。IL-2, 4, 10, 12, bcl-2のmRNA量は定量PCR法で測定した。

(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. 研究結果

RzCD19Creマウスについては、生後600日以上経過を観察しており、脾臓やリンパ球でのHCV遺伝子の発現が確認できた。コントロール群のマウス(WT, CD19Cre, Rz)と比べ有意な体重減少は見られず肝炎の指標であるALT値にも顕著な違いはなかった。また死亡率は他のマウス群で5~15%前後であったのに対しRzCD19Creマウス(雌)では25%以上と有意に高かった。腫瘍の発生(雄4.3%雌12.1%)脾臓の腫大(雄2%、雌12.1%)などの異常が観察され大型のリンパ系腫瘍細胞が脾臓に結節状に浸潤している個体も観察された(検討中)。

CN2 IRF-1^{-/-}マウスについては、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性増殖を形成し死亡した。リンパ性増殖を形成する細胞は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の発現亢進が観察された。HCV遺伝子を発現するリンパ球にIL-2, IL-10を処理するとコロニー形成能が亢進する事、アポトーシス耐性になりカスパーゼ3/7や9の活性が低下する事、Bcl-2の発現が上昇する事が明らかとなった。さらにリンパ球でのIL-2やIL-10の産生はコアタンパク質が誘導する事、コアタンパク質存在下でIL-2, IL-10を作用させるとBcl-2の発現が上昇する事も明らかとなった。

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。まず、RzCD19CreマウスではBリンパ腫様変化も見られた事からHCVがBリンパ球に長期に存在する事によって一定の頻度で腫瘍化が発生する可能性が明らかとなった。

CN2 IRF-1^{-/-}マウスの実験モデル系からはIL-2, IL-10のリンパ腫発生における重要性、特にコア蛋白質との共役によるアポトーシス耐性の獲得、Bcl-2蛋白質の発現誘導が明らかとなった。RzCD19CreマウスよりもCN2 IRF1^{-/-}マウス群でのリンパ性増殖発生率が高い事からIL-2, IL-10の発症における重要性が示唆された。

最近共同研究者である東京都医学研究機構の小原道法博士らのグループにより、poly(IC)でHCV遺伝子を発現誘導するMx-1Cre-CN2マウスが樹立された。本マウスでは肝臓やリンパ球においてHCVを高いレベルで発現できるが、生後180日を過ぎると40%程度のマウスにBリンパ腫が発生する事が明らかとなった。

E. 結論

本研究結果より、HCVがBリンパ腫発症に関与する可能性が強く示唆された。HCV遺伝子がIL-2, IL-10と共役してリンパ球にアポトーシス抵抗性やコロニー形成能を賦与する事が明らかとなった。その結果リンパ性増殖が持続すると、遺伝子変異によりセカンドヒットが生じ(myc遺伝子の活性化等)腫瘍化したリンパ球がモノクローナル性に増殖してBリンパ腫を形成する可能性が考えられた。本研究で樹立したマウスモデルはHCV遺伝子の直接作用(RzCD19Cre)、炎症反応との相加作用(CN2 IRF-1^{-/-}, Mx-1Cre-CN2)を検討する為に極めて有用でありリンパ腫

発症機序解明や治療法開発への応用に大きく貢献する事が期待できる。

F. 研究発表

1. 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.* (4):673-678 (2006).
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 I-T Compact Magnetic Resonance Imaging System. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 24(4):901-907 (2006).
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.* 29 (2-3): 157-165 (2006).
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* 359:324-335 (2007).