

能を反映していることが示唆された。今後DENV病態形成機序におけるCD32の役割をさらに検討する。

また様々なDENV株を患者血清より検出し、サンプルとして供試するためにDENVを含むフラビウイルス迅速診断法を確立した。DENV流行地域では日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス等の他のフラビウイルスが流行している。またDENVの流行地域においてはトガウイルス科アルファウイルス属に分類されるチクングニヤウイルスによって発症するチクングニヤ熱の流行が報告されている。これらウイルスとは非特異反応を示さないフラビウイルス迅速診断法の開発は本研究のみならず、フラビウイルスに係る公衆衛生の恒常に資する。

E. 結論

Fc γ 受容体を介したデングウイルスの細胞内侵入機序をターゲットとするデング出血熱(DHF)の治療法を開発するためFc γ 受容体に注目しFc γ 受容体恒常発現BHK-21細胞を用いた *in vitro* ADEモデルを作製した。本モデルにより、ADEを阻害する抗体および薬剤の探索が可能となった。また本モデルを用いて患者血清中のDENV-DENV型交差抗体複合体が血清中の中和抗体価に影響することを示した。また様々なDENV株を患者血清より検出し、サンプルとして供試するためDENVのみならず多くのフラビウイルスを検出する迅速診断法を確立した。今後は確立したADEモデルを用いてADEをターゲットとする抗体および薬剤の探索を継続すると共に得られた特異的抗体の特異性の向上と治療薬としての可能性を検討する。

DENVの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の多くの要因が複雑に関わり、その流行状況の予測は困難である。DHFやデングショック症候群はひとたび発症するとその致死率が高い重篤な疾患であり、本感染症の病態形成機序を解明し、その治療法を開発することは本邦へ

の防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に貢献する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Discrepancy in Dengue Virus Neutralizing Antibody Titers between Plaque Reduction Neutralizing Tests with Fc γ Receptor (Fc γ R)-Negative and Fc γ R-Expressing BHK-21 Cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3), 402-407, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK cell lines expressing Fc γ RIIA. *J. Virol. Methods*, 163(2), 205-209, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Gen. Virol.*, 2010. 91(1): 103 - 111.

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009. 81(5):865-868.

Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Tajima, S., Omatsu, T., Moi, M.L., Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.*, 2009. 4(5):322-328.

Aoyama, I., Uno, K., Yumisashi, T., Takasaki, T., Lim, C.K., Kurane, I., Kase, T., Takahashi, K. A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan,

Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2010. 63(1):65-66.

Lim, C.K., Kurane, I., and Takasaki, T. (2010) Re-emergence of chikungunya virus, pp. 1-22. In Maeda, A. (ed), *Animal Viruses*. Transworld Research Network., Kerala, India.

林 昌宏. チクングニヤウイルス. 臨床と微生物, 2009. 36(3): 211-216.

2. 学会発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcRIIA. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting, (Washington, D.C. USA) 2009/11/18-22.

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009 National Conference, (Savannah, GA, USA) 2009/2/19-20.

モイ=メンリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎. Fc γ RIIA発現BHK-21細胞を用いた抗デングウイルス抗体依存性感染増強(ADE)アッセイの開発. 第57回日本ウイルス学会(東京都)2009年10月25-27日

モイ メイリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎: Discrepancy in viremic titers in dengue serum samples between BHK cells and Fc γ R-expressing BHK

cells. 第16回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会(東京都)2009年10月24日

青山幾子, 弓指孝博, 高崎智彦, 林 昌宏, 加瀬哲男, 高橋和郎. 日本脳炎患者およびワクチン接種者血清のウエストナイルウイルスに対する中和抗体の交差反応性. 第57回日本ウイルス学会(東京都)2009年10月25-27日

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 小滝 徹, 倉根一郎, 東南アジアにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第57回日本ウイルス学会(東京都)2009年10月25-27日

林 昌宏. チクングニヤ感染症の診断法. 平成21年度希少感染症診断技術研修会(東京都)2010年2月25-26日

高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニヤ熱の現状と臨床. 平成21年度希少感染症診断技術研修会(東京都)2010年2月25-26日

水野泰孝, 氏家無限, 竹下望, 加藤康幸, 金川修造, 工藤宏一郎, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎: 遅延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の3症例. 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京都)2009年10月30-31日

林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎. フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会(北海道)2009年6月19-20日

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項無し

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

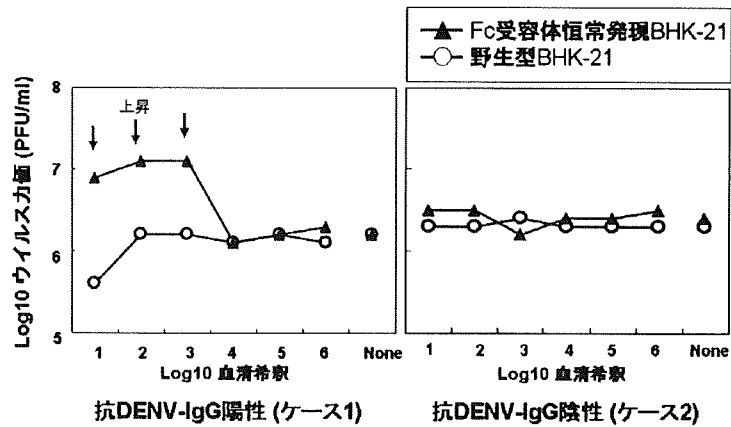


図1. 患者血清によるDENV-2感染増強の検討

デングウイルス 2 型をデングウイルス IgG 陽性患者血清と反応させたとき Fc γ 受容体恒常発現 BHK-21 細胞においてデングウイルスの感染増強が観察された。

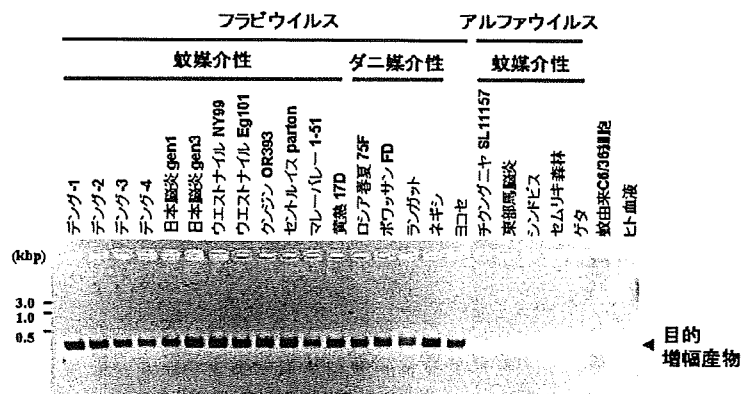


図2. フラビウイルス共通プライマーの様々なフラビウイルスに対する反応性の検討

デングウイルスを含む様々なフラビウイルスを検出する迅速診断法を開発した。このとき他の昆虫媒介性ウイルスおよびヒト血液サンプルに対する非特異的反応は検出されなかった。

日和見感染症の予防・早期診断・治療法の開発に向けた 基礎的研究

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 金子幸弘

研究要旨 日和見感染症の予防・早期診断・治療への応用を目的として、主たる病原体である *Candida albicans* および緑膿菌のバイオフィルムに関する基礎的検討を行った。また、免疫学的なアプローチによる基礎的検討を行った。

A. 研究目的

日和見感染症は、移植手術の主な死亡原因であり、術後のコントロールを困難にしている主要因でもある。*Candida albicans* (*C. albicans*) および緑膿菌は日和見感染症の重要な病原体であると同時に、バイオフィルムと呼ばれる菌の集塊を形成することが知られている。バイオフィルムは、治療抵抗性に関与しており、治療に際して考慮すべき重要な要素である。

このような観点から、*C. albicans* および緑膿菌のバイオフィルムに関する有用な基礎的知見を探索し、日和見感染症の予防・早期診断・治療への応用を目指す。また、免疫学的なアプローチも同時に検討した。

B. 研究方法

1. *C. albicans* の接着・バイオフィルム形成についての基礎研究

使用菌株：

C. albicans SC5314 株

C. albicans ATCC10261 株

C. albicans ATCC10231 株

C. glabrata NIID11 株

使用薬剤：

ミカファンギン (MFG)

ポリコナゾール (VRC)

ラディシコール (Rad) : Hsp90 阻害剤

サイクロスポリン A (CsA) : カルシニューリン阻害剤

セルコスボラマイド (Cer) : PKC1 阻害剤

ニッコーマイシン Z (NZ) : キチン合成阻害剤

培養方法：

YPD 寒天培地に同菌を開き、single colony をとり、YNB 培地 5ml で、30℃、震盪培養した。

Candida albicans のバイオフィルムの作製方

法：

一晚培養した菌液を遠心し、上清を取り除い

た後、菌を 25ml の PBS に浮遊させた。この浮遊液の中に、血清処理した直径 4mm 大のシリコンエラストマーディスク (SE ディスク) を沈め、37℃、90 分間静置し、SE ディスクに菌を付着させた。その後、付着していない菌を軽く PBS で洗浄して取り除き、YNB を加えて、37℃で 24 時間培養することで、SE ディスク上にバイオフィルムを形成させた (図 1)。

図1 SEディスク上のバイオフィルム



a. バイオフィルム形成前のSEディスク

b. バイオフィルムを形成させたSEディスク

治療：

96well microplate の各 well に、各種濃度の抗真菌薬およびその他の阻害剤を添加した YNB 培地を 200 μ l ずつ入れ、その中に、バイオフィルムを形成させた SE ディスクを沈めて 37℃で静置した。

目的に応じて、個々に示す濃度、時間およびタイミングで治療を行った。

抗真菌効果の評価

評価方法として、XTT 法を用いた

遺伝子発現：

バイオフィルム形成後、無治療のまま、または VRC 1 μ g/ml で 24 時間治療したのち、バイオフィルム内の菌を集菌し、ホットフェノール法にて mRNA を抽出し、カルシニューリン依存性の遺伝子の一つである *UTR2* 遺伝子の発現解析を行った。

2. *C. albicans* 浮遊菌の抗真菌薬による増殖抑制に関わるストレス応答因子制御の効果 使用菌株

Candida albicans SC5314 株。

評価方法

96well microplate の各 well に、0-2 μ g/ml の MFG または VRC を 2 倍ごとの段階希釈で添加した。併用薬として、Rad、CsA、または NZ をそれぞれ、1 μ M、10 μ M、0.2 μ g/ml (単独では菌の増殖を抑制しない濃度) ずつ添加した。一晚培養した菌液を 10⁴cfu/ml になるように希釈して、各 well に接種した。24 時間 37°C で静置培養後、遠心し、上清のみを取り除いた後、菌の増殖を、XTT を用いて比較した。

3. 緑膿菌のバイオフィームにおける薬剤耐性に関連した遺伝子の探索 (海外合同研究)

使用菌株

緑膿菌 PAO1 株およびトランスポゾン変異株、欠失変異株。

使用薬剤

tobramycin (TOB)

flowcell 法

1/100 強度の TSB 培地の培地を用いて、菌を flow-chamber 内で培養し、バイオフィームの形成を共焦点顕微鏡で確認した。また、死細胞を赤色に染め分けることで、TOB の殺菌効果を評価した。

4. 免疫学的アプローチによる基礎的検討

日和見感染症には、菌側要因のみならず、宿主側要因も大きく関与している。宿主側因子として、免疫に関わる遺伝子の一つである LECT2 の欠損マウスにおける真菌感受性の変化を検討した。

使用動物：

Balb/c 系、8 週齢、野生型マウス(WT)および LECT2 ノックアウトマウス(LECT2-KO)。

使用菌株：

C. albicans SC5314 株

培養および菌の接種：

YPD 培地を用いて、mid-log phase まで菌を増殖させ、遠心し、上清を取り除いた後、約 10⁵cfu/ml となるように PBS に菌を浮遊させた。同菌液を 500 μ l ずつ、マウスの尾静脈から接種した。

生存比較

菌接種後の経過日数をプロットし、log-rank 検定により生存率を比較した。

倫理面への配慮：

* 実験動物に対する動物愛護上の配慮：動物実験(マウス実験)に際しては、国の定める「動物の愛護及び管理に関する法律」および本研究所の定める「国立感染症研究所動物実験実施規程」に基づき行った。

* 組換え体の使用に関する配慮：組換え体の作成・使用に際しては、国の定める「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および本研究所の定める「組換え DNA 実験実施規則」に基づき行った。

C. 研究結果

1. *C. albicans* の接着・バイオフィーム形成についての基礎研究

抗真菌薬の併用効果による拮抗作用

MFG は単独で、バイオフィームに対して、明らかな抗真菌効果を示した (図 2a)。また、MFG は、VRC と併用することで、抗真菌効果が低下していた (図 2a)。すなわち、*C. albicans* のバイオフィームに対して、VRC と MFG を併用すると、拮抗的に作用すること、特に VRC が、MFG の殺菌作用を減弱することが明らかとなった。

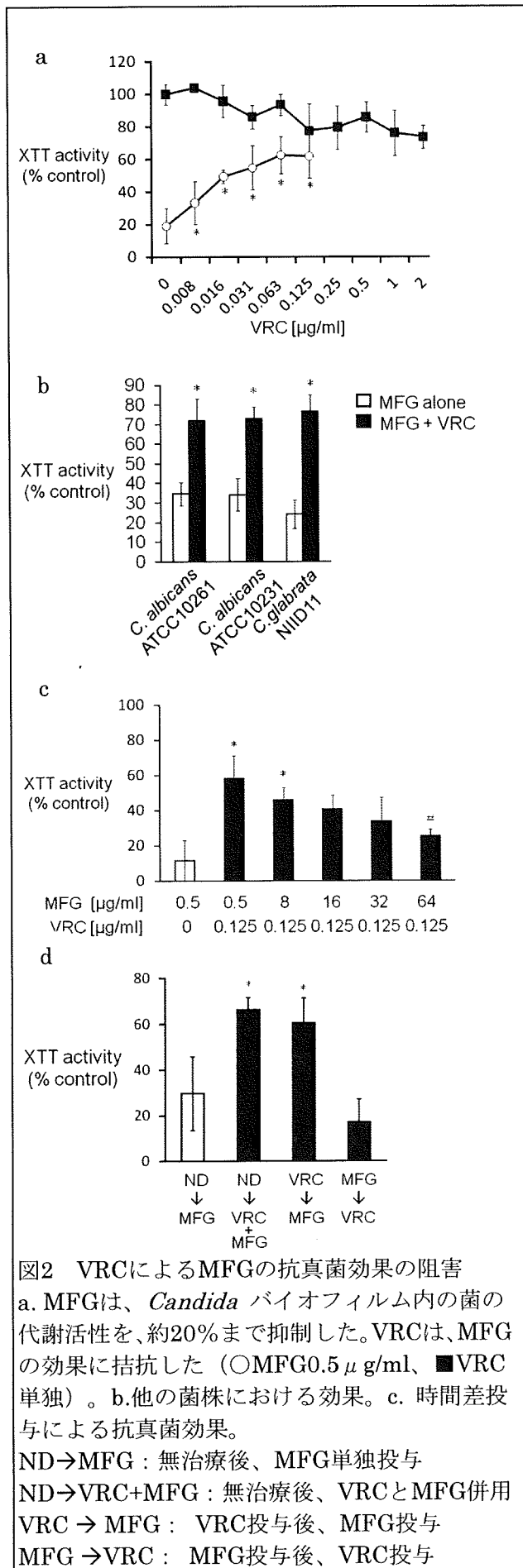
SC5314 株以外の菌株についても、同様に、VRC の拮抗作用が見られた (図 2b)。

また、MFG は単独の場合には 0.5 μ g/ml で顕著な抗真菌効果を示すが、VRC と併用した場合には、0.5 μ g/ml と同等の効果を示すためには 64 μ g/ml が必要であった (図 2e)。

さらに、時間差での投与を検討したところ、VRC を先に投与した後に MFG を加えると MFG の抗真菌効果が弱まることが判明した。また、MFG を先に投与して VRC を加えると MFG 単独とほぼ同等の効果が得られた (図 2f)。

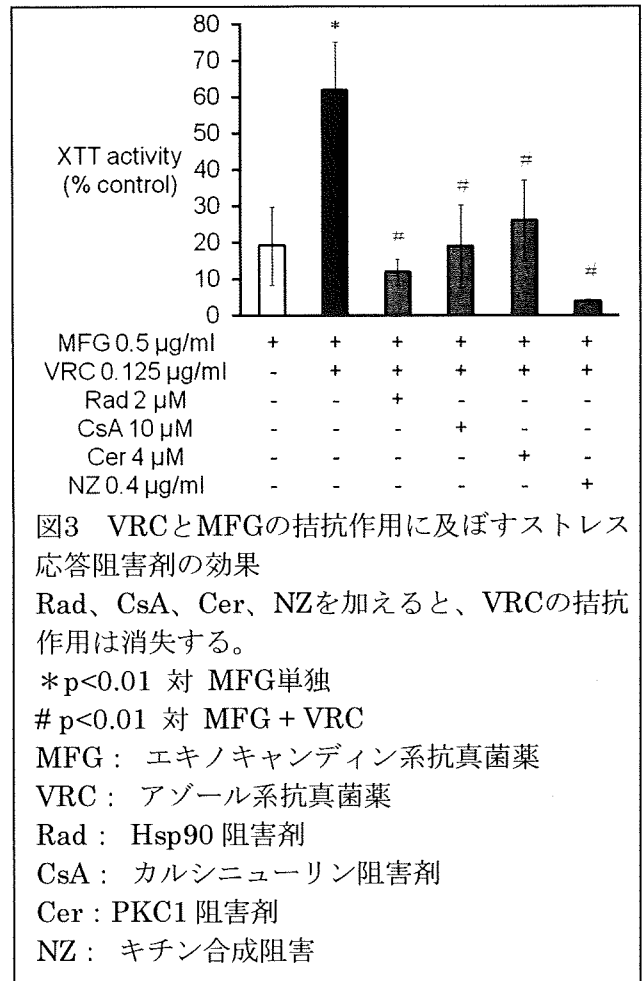
また、Rad、CsA、NZ を加えて、ストレス応答因子を制御する事により、MFG の殺菌作用が回復した (図 3)。

このことから、*C. albicans* のバイオフィームは、VRC 存在下では、Hsp90 を介した経路により、MFG に対して抵抗性となることが示唆された (図 4)。



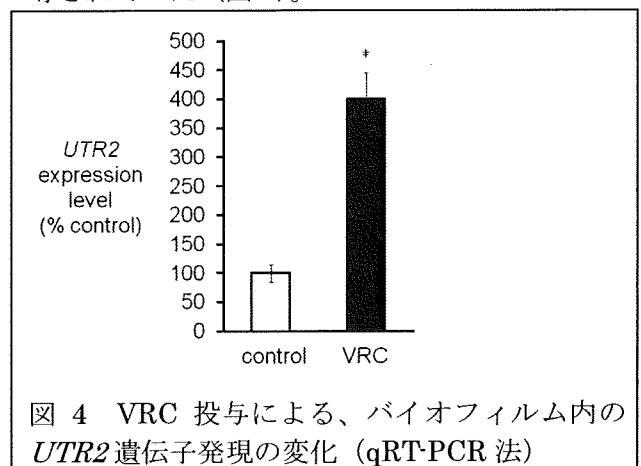
VRCとMFG拮抗作用とストレス応答制御

Rad、CsA、Cer、NZ（それぞれ単独では代謝を抑制しない濃度）を加えると、VRCの拮抗作用は消失し、MFGによる代謝抑制効果が回復していた（図3）。



バイオフィルムの遺伝子発現

VRC添加によって *UTR2* 遺伝子が、約4倍誘導されていた（図4）。



2. 浮遊菌の増殖に関わるストレス応答因子制御の効果

MFG および VRC の増殖抑制曲線を図 3 に示す。

MFG は、非常に強い増殖抑制効果を示すが、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上で効果が減弱した(paradoxical effect(PE))。Rad、CsA、NZ を加えることにより、PE の消失が認められた(図 3a)。このことから、Hsp90 経路が MFG の PE に関与していることが示唆された(図 4)。

VRCは、0.008 $\mu\text{g/ml}$ で増殖抑制効果を認めるものの、MFGに比べて弱く、また、0.016以上の濃度でも増殖抑制効果の増強は認めなかった(トレランス)。Rad、CsAを加えることにより、明らかに作用の増強を認めた(図 3b)。しかしながら、NZは、VRCに関しては、その作用増強の程度はわずかであった。

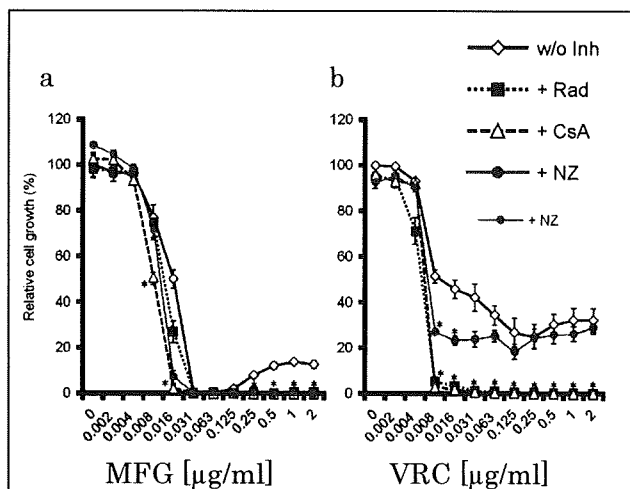


図5 遊離菌に対する増殖阻害効果

a. MFG 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上でparadoxical effect (PE) が認められたが、Rad、CsA、NZを加えることによりPEが消失した。b. RadおよびCsAは、VRCの効果を増強したが、NZはVRCの効果を劇的に増強することはなかった。

* $p < 0.01$ 対 阻害剤なし

MFG: エキノキャンディン系抗真菌薬

VRC: アゾール系抗真菌薬

Rad: Hsp90 阻害剤

CsA: カルシニューリン阻害剤

NZ: キチン合成阻害剤

3. 緑膿菌のバイオフィームにおける薬剤耐性に関連した遺伝子の探索 (海外合同研究)

トランスポゾン変異株を用いて、Tob耐性に関わる遺伝子として、amgRS遺伝子を同定した。次に、amgRS遺伝子の欠失変異株を作製し、バイオフィーム状態でのTob感受性を比較した。

amgRS変異株は、野生株と同様のバイオフィームを形成したが、amgRS変異株は、野生株に比べて、Tobに感受性であることが確認された(図 6)。

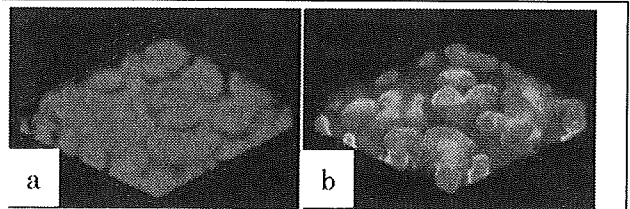


図6 amgRS遺伝子とバイオフィームにおける抗菌薬トブラマイシン (Tob)耐性
野生株 (a) と比較して、amgRS変異株 (b) は、Tobに対する感受性が高い。
緑: 生きている細菌。赤: 死滅した細菌。

3. 免疫学的アプローチ

C. albicans 感染後の生存率の比較で、野生型とLECT2-KOとの間に、統計学的に有意差を認めた。すなわち、LECT2-KOの方が、*C. albicans*に耐性を示すことが分かった(図 7)。今後、どのような機序でこのような有意差が生じるのか検討する余地がある。

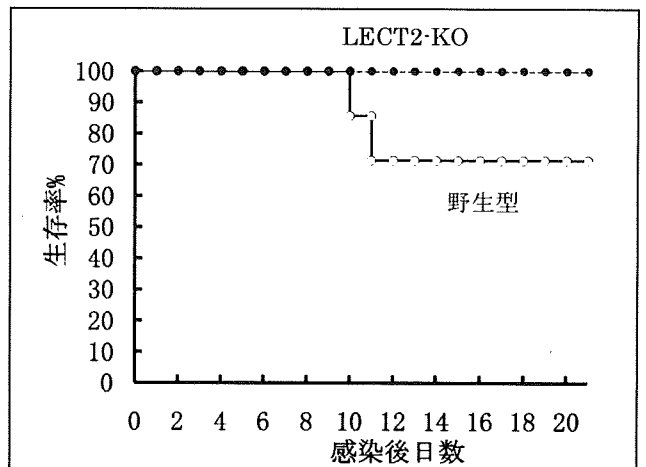


図7 *C. albicans*感染マウスの生存率

生存率において、LECT2-KO マウスと野生型との間に、統計学的有意差を認めた。しかしながら、その差は劇的ではなかった。

D. 考察

これまで、VRCはMFGとの併用で、*Candida*に対する増殖抑制効果に関しては、相加または相乗的に作用することが報告されてきた。しかしながら、バイオフィームに対しては、拮抗的に作用することが明らかとなった。さらに、ストレス応答因子に着目し、その拮抗作用に、Hsp90等が関与している可能性を発見した。こ

のことは、抗真菌薬の併用療法に注意を喚起するとともに、併用療法の拮抗作用の防止に、Hsp90等の阻害剤が有効であることを示した。今後、真菌に特異的なHsp90等の阻害剤のスクリーニングを行うことで、より有効な真菌の治療に発展するものと期待される。

今回の検討で、Hsp90等は、PEにも関与していることが示唆された。PEは、MFGの耐性の出現に関与している可能性が示唆されており、このPEをRad等が抑制することを示したことは非常に有意義である。すなわち、Rad等を併用することにより、MFGの耐性出現を抑制する可能性がある。

また、現在、解析中の遺伝子発現に関しても、バイオフィルムの形成や、バイオフィルムの薬剤耐性に関する遺伝子を解明し、そのような遺伝子をターゲットとすることで、新たな治療法の開発が可能であると期待している。

免疫学的アプローチに関しては、まだデータが不十分であり、動物実験も含めて、予備的な実験も必要である。

E. 結論

今回の研究においては、*Candida albicans*のバイオフィルムを中心に検討を行った。今後、バイオフィルム内の遺伝子発現が明らかになれば、それらの遺伝子をコントロールすることで、バイオフィルムの形成や抗真菌薬に対する感受性をコントロールできる可能性がある。

また、ストレス応答因子が、薬剤の耐性に関与している可能性が示唆された。これらのストレス応答因子(特にHsp90)をコントロールすることが、新規治療法に発展する可能性があり、今後も継続して研究を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses. *Medical Mycology*, in press.
- 2) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An

outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Internal Medicine*. 49:491-5, 2010.

- 3) Lee S, Hinz A, Bauerle E, Angermeyer A, Juhaszova K, Kaneko Y, Singh PK, Manoil C. Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:14570-5, 2009.
- 4) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Sep;62(5):392-3.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 ストレス応答阻害による *Candida albicans* の抗真菌薬耐性の制御 真菌症フォーラム第11回学術集会 東京 平成22年3月
- 2) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、河野茂 緑膿菌のガリウム耐性機序とガリウム耐性の影響についての検討 第44回緑膿菌感染症研究会 東京 平成22年2月
- 3) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、Pradeep Singh 難治性緑膿菌呼吸器感染症に対するガリウム治療の呼吸機能等に与える影響 第49回日本呼吸器学会総会 東京 平成21年6月
- 4) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、河野茂 難治性緑膿菌感染症に対するガリウム治療の効果および耐性機序に関する検討 第57回日本化学療法学会総会 東京 平成21年6月
- 5) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 *Candida albicans* の biofilm に対する micafungin と voriconazole、amphotericin B との併用効果 第83回日本感染症学会総会 東京 平成21年4月
- 6) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 *Candida albicans* の biofilm に対するミカファンギンとボリコナゾール、アムホテリシン B との併用効果 第52回医真菌学会 長崎 平成20年9月
- 7) 金子幸弘、柳原克紀、宮崎義継、河野茂、Pradeep Singh 緑膿菌バイオフィルムに対するガリウム(Ga)の作用についての検討(第5回奨励賞みのるメモリアル受賞講演) 第

43回緑膿菌感染症研究会 京都 平成21年
2月

- 8) 金子幸弘, 宮崎義継, 柳原克紀, 河野茂, Singh PK. 難治性緑膿菌呼吸器感染症に対するガリウム治療の試み 第48回日本呼吸器学会総会 神戸 平成20年6月
- 9) 金子幸弘, 柳原克紀, 宮崎義継, 河野茂, Singh PK. 緑膿菌によるバイオフィルム感染症に対するガリウム治療の試み 第82回日本感染症学会総会 島根 平成20年4月

国際学会

- 1) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of antifungal combinations against *Candida* biofilms and stress responses. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco. 2009, 9.
- 2) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 Inhibitor Preferentially Attenuates Postnadir Resistance to Micafungin and Tolerance to Voriconazole of *Candida albicans*. International Society for Human and Animal Mycology. Tokyo. 2009, 5.
- 3) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Combination therapy of micafungin with voriconazole and amphotericin B against *Candida* biofilms. International Society for Human and Animal Mycology. Tokyo. 2009, 5.
- 4) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 Inhibitor Preferentially Attenuates Postnadir Resistance to Micafungin and Tolerance to Voriconazole of *Candida albicans*. 109th American Society for Microbiology. Philadelphia. 2009, 5.
- 5) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole attenuates the effect of micafungin against *Candida* biofilms in vitro possibly via stress responses. 109th American Society for Microbiology. Philadelphia. 2009, 5.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず

C型肝炎ウイルスの粒子形成過程を標的とした新規治療法の萌芽的研究

所属 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究者 政木 隆博

研究要旨：本研究では、HCVの粒子形成過程を標的とした新規治療法の開発を目的とし、以下の3項目、(1)NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索、(2)NS5A蛋白質を基質とする蛋白質リン酸化酵素(PK)の網羅的探索、(3)同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に及ぼす影響の解析、を行った。その結果、NS5A蛋白質と相互作用し、NS5A蛋白質をリン酸化する新規セリン/スレオニンPKを同定し得た。さらに、この中からHCVゲノム複製もしくは粒子形成に関与するPKを数種類(CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)取得した。本研究は、HCVゲノム複製、粒子形成機構の解明や新たな創薬ターゲットの同定に道を拓く可能性を有する。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、公衆衛生上きわめて重要なウイルスである。本邦では約200万人の感染者が存在し、持続感染後肝硬変を経て高率に肝細胞癌を引き起こす。主たる治療法であるペグインターフェロンとリバビリンの併用療法もその効果は未だ充分とはいえない。また、HCVは変異しやすいウイルスであり、多剤併用療法が望ましい。そのため、従来の抗HCV薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発が厚生労働行政上急務である。

HCVの生活環は、ウイルス蛋白質同士あるいはウイルス蛋白質が様々な宿主因子と相互作用することによって維持されている。特に、生活環において最も重要なステップの一つである粒子形成には、非構造蛋白質5A(NS5A)とCore蛋白質間の相互作用が必須であることが示されている。また、NS5A-Core蛋白質間相互作用には、NS5A蛋白質のC末端領域に存在するセリン残基クラスターのリン酸化が必要であることから、蛋白質リン酸化酵素(PK)などの

宿主因子がこの相互作用の制御に関わっている可能性がある。したがって、NS5A-Core蛋白質間相互作用やこの相互作用に関与する宿主因子は、粒子形成過程を制御する新規治療法の標的となり得る。本研究目的は、HCVの粒子形成過程を標的とした新規治療法の開発研究であり、具体的には以下の3項目、(1)NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索、(2)NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索、(3)同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に及ぼす影響の解析、を行う。

B. 研究方法

(1) NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索

NS5A-Core蛋白質複合体に特異的に結合する宿主因子を探索するために、野生型JFH-1 RNAと変異型JFH-1 RNA(NS5AのC末端領域に変異が導入されており、NS5A-Core蛋白質間相互作用及びウイルス粒子形成効率が著しく障害さ

れるもの) をエレクトロポレーション法によりHuh-7細胞に導入し、抗NS5A抗体で免疫沈降後、免疫沈降産物をSDS-PAGEで分離した。泳動後のゲルを銀染色し、両サンプル間においてバンドパターンの比較を行った。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索

NS5A蛋白質を基質とするPKを探索するために、まず、NS5A蛋白質と相互作用するPKの同定を試みた。具体的には、全長NS5A蛋白質及びリン酸化に重要なセリン残基クラスターを有するNS5A蛋白質のドメインIII領域をコムギ胚芽無細胞翻訳系で合成し精製した。同様に、408種類のヒトPKを包括するcDNAライブラリーからPKを合成し精製した。その後、NS5A蛋白質とPKの相互作用をハイスループットな定量解析が可能であるAlphaScreen法を用いて解析した。次に、NS5A蛋白質との相互作用が認められたPKに関して、NS5A蛋白質に対するリン酸化能を調べた。具体的には、NS5A蛋白質を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在化において候補PKと混和し、SDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーを用いて解析した。

(3) 同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、 粒子形成に及ぼす影響の解析

HCVサブゲノミックレプリコン細胞、HCV感染細胞を用いて、同定された宿主蛋白、PKの細胞内発現をsiRNAによりノックダウンし、HCVゲノム複製、粒子形成に及ぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

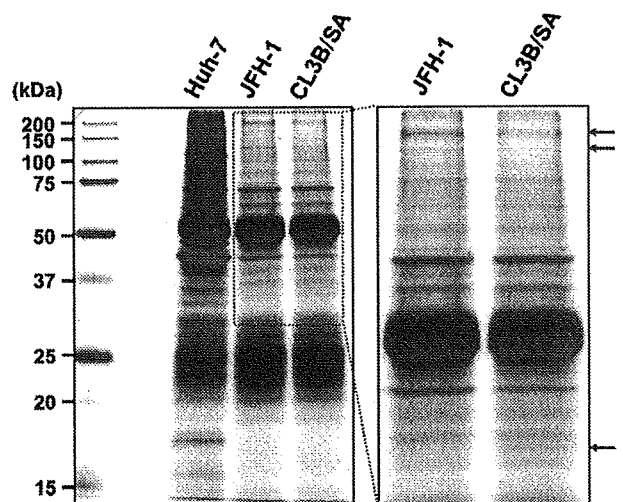
各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委

員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。組換えHCVの作製は遺伝子組換え生物等の第二種使用等にあたるため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)の規定に従って申請を行い、承認を得た(大臣確認通知番号 平成18年1月23日付17国文科振第47号、及び平成18年8月10日付18国文科振第16号)。

C. 研究結果

(1) NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索

抗NS5A抗体による免疫沈降産物のバンドパターンに関して、野生型JFH-1 RNA導入細胞と変異型JFH-1 RNA導入細胞との間に幾つかの相違がみられた。具体的には、約200 kDaと約170 kDaのバンドは野生型JFH-1 RNA導入細胞(JFH-1)に多く、約35 kDaのバンドは変異型JFH-1 RNA導入細胞(CL3B/SA)に多く認められた(下図)。現在、再現性の確認と宿主蛋白質の同定を試みている。



(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索

AlphaScreen法で解析した408種類のヒトPKのうち、89種類のPKにNS5A蛋白質との強い相互作用が認められた。このうち79種類がセリン/スレオニンPKであり、これらのPKに関してNS5A蛋白質のin vitroリン酸化アッセイを行ったところ、9種類のPK(TSSK2、PLK1、PKAC β 、CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 ϵ 、CK2 α 2)にリン酸化活性が認められた。

(3) 同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に及ぼす影響の解析

AlphaScreen解析、in vitroリン酸化アッセイによりスクリーニングされた9種類のPKについて、それらの細胞内発現をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、4種類(CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 ϵ 、CK2 α 2)においてHCVゲノム複製の低下が認められた(サブゲノミックレプリコン細胞を用いた検討)。HCV感染細胞を用いた検討では、感染性ウイルス粒子の産生量がCK1 α 及びCK1 ϵ のノックダウンにより著明に減少し、CK2 α 2のノックダウンにより中等度減少した。

D. 考察

平成21年度は、(1)NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索、(2)NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索、(3)同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に及ぼす影響の解析、に焦点をあてて研究を行った。(1)に関しては、NS5A-Core蛋白質間相互作用に関与する宿主因子をgenome-lengthのHCV複製細胞を用いて探索するため、ウイルス生活環に重要な役割を担う宿主因子の同定が期待できる。しかし、免疫沈降産物の精製度を高めることが困難なため、未だに特定の宿

主因子の同定には至っていない。今後は条件の最適化を図りつつ、かつ、NS5A及びCore蛋白質の強制発現細胞による解析も併せて行い、平成22年度も継続して宿主因子の同定を目指す。(2)及び(3)に関しては、NS5A蛋白質を基質とするPKとして9種類(TSSK2、PLK1、PKAC β 、CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 ϵ 、CK2 α 2)を同定した。HCVサブゲノミックレプリコン細胞、感染細胞を用いた結果から、そのうちの5種類のPK(CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 ϵ 、CK2 α 2)がウイルスゲノム複製もしくは粒子形成に関与することが示唆された。CK1 ϵ 、CK2 α 2は主にHCVゲノム複製に関与し、その複製調節を介して粒子形成制御に働くものと考えられる。一方、CK1 α はウイルスゲノム複製に大きな影響は与えないものの、その発現をノックダウンすることにより粒子形成効率を著明に低下させた。Genotype 1bのサブゲノミックレプリコン細胞を用いた検討において、CK1 α はHCVゲノム複製に関与することが報告されているが、粒子形成過程への関与は不明であった。今回認められたCK1 α の作用は新たな知見であり、その作用機構の解明のため、今後、CK1 α によるNS5A蛋白質リン酸化部位の同定等、詳細な解析が必要であると考えている。CK1 γ 1、CK1 γ 2に関しては、HCVゲノム複製に関与するものの、粒子形成には影響を与えないという結果が得られた。これは、siRNAのサブゲノミックレプリコンに対するoff-target効果の可能性があり、今後はこれを回避するために、全長のHCV複製細胞を用いたゲノム複製能の解析を予定している。

NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主蛋白質(PKを含む)が同定されれば、HCV粒子形成を標的とした治療法への応用が可能であり、

さらに、主に宿主因子を標的とした治療法であるため、遺伝子型やウイルス変異による薬剤耐性の問題を克服できるものと期待される。本研究成果を利用した医薬品が開発されれば、医療サービスの向上、国民の健康増進につながるるとともに、肝癌発症率の低下にともなう医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考える。

E. 結論

NS5A蛋白質と相互作用し、NS5A蛋白質をリン酸化する新規セリン/スレオニンPKを網羅的手法により同定した。さらに、この中からHCVゲノム複製もしくは粒子形成に関与するPKを数種類(CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)取得した。本研究は、HCVゲノム複製、粒子形成機構の解明や新たな創薬ターゲットの同定に道を拓く可能性を有する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* in press.
- 2) Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Amano A, Masaki T, Miyakawa K, Yoshida T. The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2009;38:644-648.
- 3) 政木隆博、鈴木哲朗. HCVの分子生物学. 肝癌-基礎・臨床研究のアップデート. 日本臨床、67巻増刊号3、PP. 134-137、2009.

2. 学会発表

- 1) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Miyamura T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel serine/threonine protein kinases responsible for HCV NS5A phosphorylation. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009. 10. 3-7.
- 2) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009. 10. 25-27.
- 3) 政木隆博. C型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析(非構造蛋白NS5Aをリン酸化するプロテインキナーゼの探索). 第6回ウイルス学キャンプ in 湯河原、熱海、2009. 6. 29-30.
- 4) 政木隆博. HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの網羅的探索. HCVキャンプ in Yamanashi、山梨、2009. 12. 13-14.
- 5) 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、野本明男、脇田隆字. HCV遺伝子型2b MA株を用いた感染増殖系開発の試み. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第8回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010. 2. 11-13.
- 6) 金ソレイ、岡本有加、政木隆博、渡邊治雄、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス genotype 2bの感染増殖系作成の試み. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第8回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010. 2. 11-13.

G.知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

平成21年度
政策創薬総合研究事業
政策創薬総合研究
研究報告書

平成22年3月

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 タナカ印刷株式会社

