

naïve な Huh7.5.1 細胞へ添加し 72 時間後に感染価 (FFU/mL) を求めた。

C. 研究結果

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターが保有する 410 種類のヒト PK cDNA ライブラリーを基に、無細胞蛋白質合成系で PK 蛋白ライブラリーを作製した。また、同無細胞合成系で FLAG タグ付加 NS5A を調製し、NS5A-PK 結合を Alpha システムで解析した。その結果、410 PK のうち約 70% は低発光シグナル (1000 以下) であったが、48 種類の PK が有意に NS5A 蛋白との結合能を示した (シグナル 2000 以上)。この中には 38 種類のセリン/スレオニンキナーゼが含まれていた。

これらのセリン/スレオニンキナーゼについて NS5A のリン酸化能を試験管内 PK アッセイで解析した。これまでに、CK1 alpha □ Casein kinase 1 alpha □, CK2 alpha2 (Casein kinase 2 alpha2), TSSK2 (Testis-specific seine/theonine protein kinase), PLK1 (Polo-like kinase) による NS5A のリン酸化が認められた。このうち、CK2 alpha2 は NS5A domain III のリン酸化に関与することが昨年報告された。これらの NS5A リン酸化が HCV の複製増殖に関与するかどうかを調べるため、HCV JFH-1 の感染増殖細胞系に各キナーゼの siRNA を導入、遺伝子ノックダウンした後、HCV 産生レベルの変化を解析した。感染性ウイルスの産生は CK1 alpha または CK2 alpha2 のノックダウンでそれぞれ 65%, 62% 低下した。TSSK2, PLK1 のノックダウンでは各々 45%, 26% の HCV 産生の低下が認められた。

D. 考察

NS5A はリン酸化蛋白であり、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。また、昨年度我々は、NS5A domain III のセリンクラスター 3-B のリン酸化が Core 蛋白との相互作用/粒子形成に重要であることを見出した。NS5A にはカゼインキナーゼ認識モチーフ配列が

存在することから、CK2 等によりリン酸化されることが実験的に示されているものの、NS5A をリン酸化し HCV 複製、粒子形成の調節に働くキナーゼを網羅的に探索した研究は報告されていない。そこで、本年度、愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター (澤崎先生) と共同で本センターが所有するヒト PK ライブラリーを利用し、Alpha テクノロジーにより NS5A domain III との相互作用解析を行った。Alpha テクノロジーでは、ドナービーズに結合した分子 (この場合、各 PK) とアクセプタービーズに結合した分子 (NS5A) とが相互作用し両ビーズが近接する場合にのみ発光シグナルが検出される。酵素-基質間反応のため、強い相互作用が必要とは限らないが、非常に発光シグナルの低いものを除外し、有意な相互作用を示した 38 種類のヒトセリン/スレオニンキナーゼを選抜した。これらについて NS5A リン酸化能を調べ、さらに遺伝子ノックダウンにより HCV 産生への影響を解析した。

その結果、NS5A をリン酸する PK を 4 種類明らかにし、そのうち 2 種類のカゼインキナーゼアイソフォーム (1 alpha, 2 alpha2) では各ノックダウンによって HCV 産生が 40% 以下まで低下することを見出した。CK2 alpha2 については NS5A のリン酸化能が報告されているが、CK1 alpha については初めての知見である。Alpha スクリーニングで結合が観察された PK について、現在、順次リン酸化アッセイ、ノックダウン解析を行っているが、さらに新たな NS5A キナーゼが見出される可能性が考えられる。

同定された NS5A キナーゼによる NS5A 蛋白のリン酸化制御とウイルス粒子形成、ゲノム複製との関連を明らかにしていくことによって、HCV 生活環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 蛋白と相互作用しリン酸化を担う蛋白キナーゼを網羅的に探索し、HCV 産生調節に関わる NS5A キナーゼを同定した。

F. 研究発表

論文発表

1. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83: 5137-5147, 2009.
2. 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* 83: 2389-2392, 2009.
3. Kukiwara H, Moriishi K, Tagawa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969, 2009.
4. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50: 378-386, 2009.
5. Tagawa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436, 2009.
6. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I: Identification of Annexin A1 as a novel substrate for EGAP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 16: 1123-1135, 2009.
7. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
8. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol.* 175: 1515-241, 2009.
9. 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* 383: 319-27, 2009.
10. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuoichi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 47:

11. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res (in press).

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。

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

研究要旨

我々は、C型慢性肝炎患者のミエロイドDC(MDC)では、TLRやRIG-I系の機能が低下しており、その機序としてTRIF/TRAF6の発現低下が関与することを明らかにした。また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 産生能が回復することから、NS3/4Aが免疫賦活の治療標的となる可能性を示した。HCV感染による免疫機能低下の機序を更に明らかにするために、トレランスに関与するアミノ酸代謝酵素Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の免疫機能への関与を検討した。HCV replicon複製細胞やJFH-1を感染させた肝癌細胞株では、HCVの複製に伴いIDOが発現した。HCV感染者、非感染者のDCを炎症性サイトカインで刺激すると、トリプトファンをキヌレニンに分解する機能的なIDOが誘導された。HCV感染者由来のIDO発現DCは、非感染者と比べて、より強く制御性T細胞を誘導し、これはIDO阻害剤である1-MTで回復した。以上の結果は、HCV感染が直接的、間接的にIDOを誘導し、制御性T細胞の誘導を介して免疫病態に関与することを示唆している。以上の結果より、IDO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。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。我々の検討により、C型慢性肝炎患者のミエロイドDC(MDC)では、TLR3/RIG-I系の機能が低下しており、その機序としてTRIF/TRAF6の発現低下が関与することを明らかにした。HCVによる免疫機能低下機序を解明することを目的として、末梢性トレランス誘導に関与するトリプトファン代謝酵素(Indoleamine-2,3-deoxygenase, IDO)の免疫機能修飾への関与を検討した。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者および非感染者の末梢血より単球由来DCを誘導し、炎症性サイトカイン添加後のIDOの発現と活性を検討した。またHCVレプリコン発現肝癌細胞株やJFH-1感染肝癌細胞株でも、同様に検討した。IDOを誘導したDCとナイーブCD4T細胞の共培養によって、FOXP3陽性の制御性T細胞(Treg)の誘導効率を検討した。IDO機能やTreg誘導へのIDOの関与の特異性は、1-MTによる変化で評価した。

(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

TNF- α 、IFN- γ 、LPSなどの刺激によって、単球由来DCにIDOが誘導され、これはトリプトファンをキヌレニンに分解する機能的分子であった。C型慢性肝炎患者DCにおけるIDO活性は、非感染者より亢進していた。HCVレプリコン発現肝癌細胞、あるいはJFH-1接種肝癌細胞にも機能的IDOは発現した。IDO発現DCにより、ナイーブCD4T細胞からTregが誘導され、その効率はC型慢性肝炎患者DCで高度であった。IDO活性やDCによるTreg誘導能は、1-MT添加によって一部抑制された。

D. 考察

C型慢性肝炎患者DCにおけるIDOの発現亢進と、それによるTreg誘導能の亢進が示された。HCVはIDOの誘導を介してTregを増加させ、トレランス誘導に関与する可能性が示唆された。IDOの発現機序として、炎症性サイトカインの関与が示されたが、肝癌細胞の系からは、HCVゲノムあるいはその複製産物が、直接的にIDOを誘導する可能性も示唆された。1-MTによるIDOの抑制は、癌に対する免疫応答の回復に繋がることを期待され、欧米で臨床試験が進行中である。IDOは、抗HCV免疫賦活療法における治療標的にもなりうる可能性が示された。

E. 結論

DCでは、炎症性サイトカイン刺激により機能的IDOが誘導された。C型慢性肝炎患者DCでは、IDO活性と、それによるTreg誘導能が非感染者DCより亢進していた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N and Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009 in press.
- 2 Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM and Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 2009 in press.
- 3 Uemura, A., Takehara, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2009.
- 4 Sasakawa, A., Tatsumi, T., Takehara, T., Yamaguchi, S., Yamamoto, M., Ohkawa, K., Miyagi, T. and Hayashi, N., Activated liver dendritic cells generate strong acquired immunity in alpha-galactosylceramide treatment. *J Hepatol* 2009. 50: 1155-1162.
- 5 Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Kurokawa, M., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 578-585.
- 6 Ohkawa, K., Takehara, T., Kato, M., Kanada, A., Deguchi, M., Kagita, M., Hikita, H., Sasakawa, A., Kohga, K., Uemura, A., Sakamori, R., Yamaguchi, S., Miyagi, T., Ishida, H., Tatsumi, T. and Hayashi, N., Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* 2009. 81: 798-806.
- 7 Nakamoto, T., Murayama, Y., Oritani, K., Boucheix, C., Rubinstein, E., Nishida, M., Katsube, F., Watabe, K., Kiso, S., Tsutsui, S., Tamura, S., Shinomura, Y. and Hayashi, N., A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers. *J Gastroenterol* 2009. 44: 889-896.
- 8 Moriwaki, K., Noda, K., Furukawa, Y., Ohshima, K., Uchiyama, A., Nakagawa, T., Taniguchi, N., Daigo, Y., Nakamura, Y., Hayashi, N. and Miyoshi, E., Deficiency of GMDS leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Gastroenterology* 2009. 137: 188-198, 198 e181-182.
- 9 Kurokawa, M., Hiramatsu, N., Oze, T., Mochizuki, K., Yakushijin, T., Kurashige, N., Inoue, Y., Igura, T., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res* 2009. 39: 432-438.
- 10 Kurashige, N., Hiramatsu, N., Ohkawa, K., Yakushijin, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A., Doi, Y., Yamada, A., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H., Nagase, T., Yoshihara, H., Hayashi, E., Imai, Y., Kato, M., Kashihara, T. and Hayashi, N., Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2009. 44: 601-607.
- 11 Kurashige, N., Ohkawa, K., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oze, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A., Doi, Y., Yamada, A., Fukuda, K., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Nagase, T., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Kashihara, T. and Hayashi, N., Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol* 2009. 44: 864-870.
- 12 Kamada, Y., Yoshida, Y., Saji, Y., Fukushima, J., Tamura, S., Kiso, S. and Hayashi, N., Transplantation of basic fibroblast growth

- factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009. 296: G157-167.
- 13 Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat* 2009.
- 14 Ishii, S., Tsuji, S., Tsujii, M., Nishida, T., Watabe, K., Iijima, H., Takehara, T., Kawano, S. and Hayashi, N., Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Gastroenterol* 2009. 44: 834-841.
- 15 Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara, H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Hoshui, A., Ishida, H., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J Viral Hepat* 2009.
- 16 Imai, Y., Tamura, S., Tanaka, H., Hiramatsu, N., Kiso, S., Doi, Y., Inada, M., Nagase, T., Kitada, T., Imanaka, K., Fukuda, K., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders. *J Viral Hepat* 2009.
- 17 Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 586-594.
- 18 Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N., Yin, X. M., Hennighausen, L., Tatsumi, T. and Hayashi, N., Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 2009. 50: 1217-1226.
- 19 Fukushima, J., Kamada, Y., Matsumoto, H., Yoshida, Y., Ezaki, H., Takemura, T., Saji, Y., Igura, T., Tsutsui, S., Kihara, S., Funahashi, T., Shimomura, I., Tamura, S., Kiso, S. and Hayashi, N., Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol Res* 2009. 39: 724-738.
- 20 Ezaki, H., Yoshida, Y., Saji, Y., Takemura, T., Fukushima, J., Matsumoto, H., Kamada, Y., Wada, A., Igura, T., Kihara, S., Funahashi, T., Shimomura, I., Tamura, S., Kiso, S. and Hayashi, N., Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009. 378: 68-72.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

C型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞株の樹立

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）に感染すると高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変を経て肝臓癌を引き起こす。ようやく培養細胞で複製可能なHCVの実験室株が確立されたが、HCV研究の最大の問題点は、患者の体内に存在するウイルスを人為的な馴化過程を経ずに、直接分離できる培養細胞系が無い点である。本研究では、レポーター遺伝子の発現を指標に、HCVの感染を高感度に検出可能な指示細胞株の樹立を試みた。ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして持つ指示細胞株は、実験室株の複製を定量的に検出可能であった。この指示細胞株を用いて、約1300種類の化合物をスクリーニングし、数種類の抗HCV活性を示す化合物を同定できた。また、細胞表面マーカー遺伝子を発現する指示細胞株では、実験室株に感染した細胞だけを単離することが可能であった。本研究で樹立した指示細胞株は、HCVの感染を高感度かつ定量的に検出できることから、抗HCV薬のハイスループレットスクリーニングだけでなく、患者血清中に存在するHCVの野生株を人為的な馴化過程を経ずに分離可能な、培養系の確立にも応用できるものと思われる。

A. 研究目的

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。特殊な細胞で複製可能な実験室株であるJFH-1ウイルスが構築され、HCVの感染環の解析が可能となった。しかしながら、JFH-1ウイルスはチンパンジーに病原性を示さず、また、各種薬剤感受性も臨床での効果とかなりの乖離が指摘されている。従って、HCV野外株の感染複製機構は依然として謎に包まれたままである。本研究では、人為的な馴化過程を経て作製された実験室株ではなく、C型肝炎患者血清中に存在するHCV野生株の感染をレポーター遺伝子の発現を指標に高感度に検出可能な感染指示細胞の樹立を試みる。

B. 研究方法

HCVのNS3/4Aプロテアーゼはウイルス前駆蛋白質を切断し、各ウイルス蛋白質を成熟させるだけではなく、ミトコンドリア外膜に局在し、細胞内二本鎖RNA認識受容体RIG-Iのアダプター分子として働くIPS-1を切断し、初期免疫シグナル伝達を阻害することが知られている。また、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）のTat蛋白質は、細胞核内でHIVのLTRプロモーターを介した転写を促進する。これをHCV感染依存的に活性化させるために、IPS-1のC末領域をTatとの融合蛋白質（Tat/IPS-1）として細胞に発現させた。同様にTatの転写活性を促進することが知られているGAL4のDNA結合領域とTATA結合蛋白質との融合蛋白質をIPS-1のC末領域との融合蛋白質

（GAL4/TBP/IPS-1）として発現させた。また末端配列を置換することで両キメラ転写因子の局在をミトコンドリアから小胞体膜に変更したTat/IPS-1ERおよびGAL4/TBP/IPS-1ERも構築した。転写活性のレポーターとしてGAL4USおよびHIV LTRプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子あるいは細胞表面マーカーLNGFR遺伝子を導入したプラスミドを用いた。これらの安定発現Huh7細胞株を作製し、JFH-1ウイルスによるレポーター遺伝子の発現誘導について検討した。

（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、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

Tat/IPS-1を単独で細胞に発現させたとさる、期待通りミトコンドリアに局在したものの、著しく細胞死を誘導した。一方、IPS-1のC末部位の塩基性アミノ酸クラスターを変異させることで小胞体膜へと局在を変化させたTat/IPS-1ERでは細胞死は認められなかった。そこで以降の実験にはTat/IPS-1ERおよび同様に作製したGAL4/TBP/IPS-1ERを用いた。これらキメラ転写因子にHCVNS3/4Aプロテアーゼを共発現させると、キメラ転写因子の限定

分解および核移行、ならびに GAL4UAS および HIV LTR タンデムプロモーターの転写活性化が認められた。次に HCV 感染における有用性を検討するため、キメラ転写因子およびレポーター遺伝子を安定的に導入した Huh70K1/TG-Luc および Huh70K1/TG-LNGFR 細胞を樹立した。レポーター遺伝子にルシフェラーゼを持つ

Huh70K1/TG-Luc 細胞に JFH-1 ウイルスを感染させた場合、ウイルス RNA 量と非常に良く相関してルシフェラーゼ活性が認められた。レポーター遺伝子の発現は日本脳炎ウイルスあるいは HCV のエンベロップ蛋白質を持つ組換え水疱性口内炎ウイルスの感染では認められなかった。また、IFN- α , M β -CD, 抗 CD81 抗体および中和抗体のある患者血清により HCV 増殖の阻害に従い、レポーター遺伝子の発現が低下した。これらのことから Huh70K1/TG-Luc 細胞では HCV 増殖特異的にレポーター遺伝子発現が認められることが示された。さらにこの細胞を用い、約 1300 種の化合物から HCV 増殖の阻害活性があるものを 2 種同定することが出来た。

レポーター遺伝子に LNGFR を持つ Huh70K1/TG-LNGFR 細胞に JFH-1 ウイルスを感染させたところ、特異的に細胞表面への LNGFR の発現が認められた。これを指標に細胞ソーティングを行ったところ、JFH-1 ウイルス感染細胞が有為に濃縮されて分離出来た。

D. 考察

今回、レポーター遺伝子にルシフェラーゼおよび LNGFR を持つ HCV 感染指示細胞株

(Huh70K1/TG-Luc および Huh70K1/TG-LNGFR 細胞) を樹立した。これらの細胞を用い、簡便に HCV 感染の定量、感染細胞の分離が行うことが可能なため、HCV 阻害剤のスクリーニングや患者血清中の HCV 分離に応用可能であると考えられた。また、このシステムを Huh7 細胞以外の細胞に導入することが可能であり、Huh7 細胞で増殖出来ない HCV の分離および解析に有用であることが考えられた。

E. 結論

- 1 HCVNS3/4A に切断され、核移行して GAL4UAS および HIV LTR タンデムプロモーター転写活性化能を示すキメラ転写因子を構築した。
- 2 レポーター遺伝子にルシフェラーゼおよび LNGFR を持つ HCV 感染指示細胞株 (Huh70K1/TG-Luc および Huh70K1/TG-LNGFR 細胞) を樹立した。
- 3 Huh70K1/TG-Luc 細胞では高感度かつ簡便に JFH-1 株の増殖を定量化できた。
- 4 Huh70K1/TG-LNGFR 細胞では JFH-1 株感染細胞を特異的に分離・濃縮することが可能であっ

た。

- 5 Huh70K1/TG-Luc 細胞を用いて、約 1300 種の化合物から HCV 増殖の阻害活性があるものを 2 種同定出来た。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
- 2 Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
- 3 Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M. Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).

2. 学会発表

- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、10 月 25 日-27 日、2009.
- 2 谷 英樹、塩川 舞、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感染における脂質セラミドの役割、同上。
- 3 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、同上。
- 4 寒原裕登、田鯨修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上。
- 5 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
- 6 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。

- 7 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：ヒアルロン酸による炎症性ケモカインIP-10の過剰産生とC型肝炎の慢性化、同上。
- 8 鈴木亮介、齋藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging系を用いたNS2蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
- 9 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
- 10 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治：C型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義：第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日-12日、2009。
- 11 松浦善治：パキウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入：第82回日本生化学会大会、神戸、10月21日-24日、2009。
- 12 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第15回日本遺伝子治療学会、大阪、6月10日-12日、2009。
- 13 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009。
- 14 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
- 15 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009。
- 16 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
- 17 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
- 18 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of *trans*-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
- 19 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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、以下のような結果を得た。実験項目1：各種抗HCV剤に対する感受性のHCV株間効果（1）4種類のHCV株由来のHCVレプリコン複製アッセイシステムを開発し、各種抗HCV剤の評価を行った（2）インターフェロン（IFN）- α 、IFN- γ 、IFN- λ 1およびスタチン剤ではHCV株間で感受性が異なることを示した（3）スタチン剤に対する感受性はウイルス側因子、IFN- λ 1に対する感受性は細胞側因子に依存していることが示唆された。実験項目2：IFN- α に対する抵抗性獲得とHCVの遺伝的多様性との関係（1）IFN- α に抵抗性を示す細胞内で複製しているHCVゲノムは遺伝的に近い集団を形成していることが分かった（2）新たに作成したHCV RNA複製細胞を用いたIFN- α に対する感受性試験により、IFN- α に対する抵抗性の獲得はHCV側および宿主側因子の両方が関与していることが示唆された。

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。

これまでに、我々は独自に開発した全長HCV RNA複製細胞を用いて、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の解析やHCVのIFN抵抗性獲得機構の解析を行った。

本年度は、HCV株間で各種抗HCV剤の効果がどの程度異なるのかを調べて、それらの効果がウイルス側因子に依存するのか或は宿主側因子に依存するのかを明らかにすることを目的とした。また、昨年度に引き続いてIFN抵抗性

獲得機構についても解析した。

B. 研究方法

(1) 各種抗 HCV 剤に対する感受性の HCV 株間効果

HCV ヘルシーキャリア (1B-4, 1B-5 および 0 株) と急性肝炎 (KAH5 株) 症例の血清より HCV ゲノムを RT-PCR 法により増幅後、プラスミドベクターにクローニングし、それらの塩基配列を決定した。

HCV ゲノムの複製にリンクして発現するレニラルシフェラーゼ遺伝子を 5' 末端側に配置させ、抗 HCV 剤のアッセイを可能にしたレプリコン用ベクターをそれぞれの HCV 株で構築した。得られたベクターより *in vitro* にて RNA を合成し、OR6 細胞より HCV RNA を排除した治癒細胞 OR6c にエレクトロポレーション法により導入した。G418 耐性になったコロニーをピックアップし、最も HCV RNA 量 (定量的 RT-PCR 法にて) の高いコロニーを最終的に増殖させ、以後の HCV レプリコン複製細胞として薬剤アッセイに使用した。

薬剤評価のために、HCV レプリコン複製細胞を 24 ウェルプレートに播き (1×10^4 個/ウェル) 一晚培養した後、薬剤を添加して 72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行い、それぞれの 50% 阻害濃度 (EC_{50}) を算出した。

治癒細胞 (OR6c) (8×10^6 個) に HCV レプリコン複製細胞由来の Total RNA (RNeasy extraction kit により調製した 100 μ g) をエレクトロポレーション法により導入し、G418 選択 (約 3 週間) を行い、得られた G418 耐性コロニ

ーをプールして第 2 世代の HCV レプリコン複製細胞とした。

(2) IFN- α に対する抵抗性獲得と HCV の遺伝的多様性との関係

2 年間継代培養した全長 HCV RNA 複製細胞、O2 細胞を IFN- α (50 IU/ml) で 3 週間処理して得られた O2r 細胞と親の O2 細胞由来の HCV ゲノム (5' 末端から NS2 領域までの 5.1 kb) の塩基配列を決定した。それぞれ独立的に得た 10 クローンについて解析し、系統樹解析 (Neighbor-joining 法) を行った。

IFN- γ により HCV ゲノムを排除した O2c 或は O2rc 治癒細胞 (8×10^6 個) に O2 或は O2r 細胞由来の Total RNA (100 μ g) をエレクトロポレーション法により導入し、G418 にて 3 週間選択した。得られた G418 耐性コロニーをプールして増殖させ第 2 世代の全長 HCV RNA 複製細胞とした。得られた細胞と O2 および O2r 細胞 (それぞれ 2×10^4) を 10 cm プレートに播き、IFN- α (50 IU/ml) で約 3 週間処理する感受性試験を行った。

(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、廃棄した。

C. 研究結果

(1) 各種抗 HCV 剤に対する感受性の HCV 株間効果

HCV 1B-4、1B-5、0 および KAH5 株由来の HCV レプリコン複製細胞株を樹立

し、それぞれ s1B-4R、s1B-5R、s0R および sKAH5R 細胞と命名した。これらの細胞株では Total RNA 1 μ g 当たり 1.1×10^8 copy \sim 5×10^7 copy の HCV レプリコンが存在していることを定量的 RT-PCR により明らかにした。コピー数は 1B-4>KAH5>O>1B-5 であり、ノーザンブロット解析により予想される 9 kb のレプリコン RNA も検出された。

IFN- α 、IFN- γ 、IFN- λ 1、シクロスポリン A、ピタバスタチン、フルバスタチンおよびロスバスタチンについて、これら 4 種類の細胞アッセイで評価を行った。その結果、シクロスポリン A の EC₅₀ 値は 0.7 \sim 1.1 μ g/ml とほとんど差がなかったが、IFN- α では 1.1 \sim 2.4 IU/ml、IFN- γ では 0.2 \sim 2.26 IU/ml とかなり異なることが分かった。さらに、IFN- λ 1 では 1.5 \sim 8.3 ng/ml とその差も顕著であった。また、スタチン 3 剤についても、1B-4 株では感受性が高い反面、KAH5 株では感受性が低かった。各抗 HCV 剤の EC₅₀ 値を比較しても、特定の HCV 株のみが調べたすべての抗 HCV 剤に感受性が高かったり低かったりすることはなかった。ただ、全体の傾向としては、1B-4 株では感受性が高く、KAH5 株では感受性が低い傾向が認められた。しかしながら、各種薬剤の抗 HCV 活性は、レプリコン RNA のコピー数に依存していないことが分かった。

1B-4 株と KAH5 株について第 2 世代の HCV レプリコン複製細胞を作成し、ピタバスタチンと IFN- λ 1 に対する感受性を調べた。ピタバスタチンについては、s1B-4R と sKAH5R 細胞で評価した際に得られた結果と同じく、1B-4 株が KAH5 株より感受性が高かった。しかしながら、IFN- λ 1 については、s1B-4R と sKAH5R 細胞で評価した際に得られた差はまったく認められなくなり、第 2 世代の両細胞から得られた EC₅₀ 値も s1B-4R と sKAH5R 細胞で評価した際に得られた EC₅₀ 値の中間値を示した。

(2) IFN- α に対する抵抗性獲得と HCV

の遺伝的多様性との関係

HCV ゲノムの 5'~NS2 領域を解析した結果、昨年報告した NS3~5B 領域と同じく、系統樹解析により IFN- α 抵抗性細胞 (02r) から得られたクローンの大部分が、1つのクラスター内に存在することが分かった。

第 2 世代の全長 HCV RNA 複製細胞 [02.1 (02)、02.1 (02r)、02r.1 (02) および 02r.1 (02r) 細胞] (02.1 (02) 細胞は 02c 細胞に 02 細胞由来の Total RNA を導入して得られた細胞を示し、02.1 (02r) 細胞は 02c 細胞に 02r 細胞由来の Total RNA を導入して得られたことを示す) を用いた IFN- α に対する感受性試験を行った。02.1 (02) 細胞でのみ G418 耐性コロニー数が極端に少なく、他の 3 種類の細胞では、かなりの数の G418 耐性コロニーが出現した。その数は 02r.1 (02r) > 02.1 (02r) > 02r.1 (02) >> 02.1 (02) で、細胞間で差があることが分かった。

D. 考察

(1) 各種抗 HCV 剤に対する感受性の HCV 株間効果

4 種類の HCV レプリコン複製細胞を用いて各種 HCV 剤の活性評価を行った結果、シクロスポリン A 以外の薬剤に対する感受性は細胞間でかなり異なっていることが分かった。この違いは、細胞内の HCV レプリコン量に依存していなかったことから、HCV 株による違いか、或は得られた細胞クローンの違いに起因すると考えられた。そこで、1B-4 株と KAH5 株については、同じ遺伝

的背景を持つ治癒細胞を用いて、第2世代の HCV レプリコン複製細胞（ポリクローナル）を作成して、ピタバスタチンと IFN- λ 1 に対する感受性を調べた。このような実験により、ピタバスタチンに対する感受性は HCV 株の違いに起因すること、一方、IFN- λ 1 に対する感受性は細胞側因子に起因しており薬剤により異なることが分かった。これらの結果から、抗 HCV 剤の違いにより活性を規定する因子が異なることが明らかとなり、抗 HCV 剤の開発において新たに検討しなければいけない点であると考えられる。今後、抗 HCV 剤の活性評価には複数の HCV 株と複数の細胞株を用いて総合的に判断しなければいけないものと思われる。

(2) IFN- α に対する抵抗性獲得と HCV の遺伝的多様性との関係

第2世代の HCV RNA 複製細胞を用いた IFN- α 感受性試験の結果から、IFN- α 耐性を示すコロニー数が $02r.1(02r) > 02.1(02r) > 02r.1(02) >> 02.1(02)$ と細胞間で差が認められた。 $02r.1(02r)$ と $02.1(02r)$ を比較すると、IFN- α 感受性は細胞側因子が規定していることが示唆されるが、 $02r.1(02r)$ と $02r.1(02)$ を比較すると、今度は HCV RNA の方が規定していることが示唆される。遺伝的にかなり近い HCV ゲノム集団が $02r$ 細胞に認められたことから、IFN- α に対する感受性は宿主側因子とウイルス側因子の両方で規定されているのではないかと考えられた。今後、第2世代の HCVRNA 複製細胞から得られた IFN- α 抵抗性細胞内で複製している HCV

ゲノムや細胞の IFN- α 応答性を詳細に調べていく必要がある。

E. 結論

(1) 新規に開発した4種類のHCV株由来のHCVレプリコン複製アッセイシステムを用いて、各種抗HCV剤の評価を行った結果、IFN- α 、IFN- γ 、IFN- λ 1 およびスタチン剤がHCV株間で異なった感受性を示すことが分かった。さらなる検討により、スタチン剤に対する感受性はウイルス側因子、IFN- λ 1 に対する感受性は細胞側因子に依存していることが示唆された。

(2) IFN- α に抵抗性を示す細胞内で複製しているHCVゲノムは遺伝的に近い集団を形成していた。新たに作成したHCVRNA複製細胞を用いた解析により、IFN- α に対する抵抗性の獲得はHCV側および宿主側因子の両方が関与していることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res.* 146:41-50 (2009).
- 2) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.* 154:1671-1677 (2009).

- 3) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, Eguchi K. Interferon- α -induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol.* 44:856-863 (2009).
- 4) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* 50:678-688 (2009).
- 5) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters* 583: 1434-1438 (2009).
- 6) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA- induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch. Virol.* 154:801-810 (2009).
- 7) Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon γ -like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 50: 585-591 (2009).
- 8) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA harboring cells possessing the IFN- α -resistance phenotype. *Hepatol. Res.* 39: 898-909 (2009).
- 9) Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolvering C, Kato N, Kietzmann T, Behrmann I, Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 α is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. *Hepatology* 50:253-260 (2009).
- 10) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.* 82:42-50 (2009).
- 11) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* 50:883-894 (2009).
- 12) 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. 83: 2338-2348 (2009).

2. 学会発表

- 1) Nishimura G, Ikeda M, Mori M, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 2) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 3) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 4) 池田 房雄、團迫 浩方、西村 剛、河合 良成、有海 康雄、池田 正徳、高木 章乃夫、岩崎 良章、加藤 宣之、山本 和秀. HCVコア蛋白質のアミノ酸の違いとIFN応答性との関係についての培養細胞を用いた解析. 第17回日本消化器関連学

会週間 (JDDW 2009) / 第13回日本肝臓学会大会、京都、2009年10月.

- 5) 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文. 各種抗酸化剤のC型肝炎ウイルス複製についての影響. 第17回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009) / 第13回日本肝臓学会大会、京都、2009年10月.
- 6) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. リバビリンの抗HCV活性を解析評価できるLi23細胞由来のHCV-RNA複製システム. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- 7) 池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. オンコスタチンMはインターフェロンの抗HCV活性を相乗的に増強する. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009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

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

初回献血者におけるがんウイルスマーカー陽性率の調査と輸血によるがんウイルス
感染予防に関する研究

分担研究者 内田 茂治 日本赤十字社 中央血液研究所

研究要旨：われわれは1995年から東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象として、HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-1抗体の陽性率の調査を行っている。初回献血者は陽性通知による選択を受けないため、陽性率はその地域住民の陽性率を反映するものと考えられる。

献血者からいただいた血液から輸血を介してこれらががんウイルス感染がどの程度発生しているかの調査を併せて行っている。輸血によるがんウイルス感染は検査試薬の改良や自動検査機器の導入による検査精度向上によって減少してきたが、HBV、HCV、後天性ヒト免疫不全ウイルスを対象に1999年に導入された核酸増幅検査（NAT）によって輸血用血液の安全性は飛躍的に高まった。しかしながら、それでも毎年10例程度の輸血後HBV感染と数年に1例の輸血後HCV感染が確認されていた。昨年度新たに導入されたNAT装置・試薬は従来のものより検出感度が高く、輸血後HBV・HCV感染は更に減少すると考えられる。今後も調査を継続してこれらNAT装置・試薬の評価を行っていききたい。

また、輸血用血液のNATを開始してから10年が経過するが、NATで検出されたHBV、HCVの検出頻度を各都道府県毎に計算して、国内のどの地域で新たな感染が多く発生しているかの検討を行った。

A. 研究目的

献血者のウイルスマーカー陽性率の動向を調査することは、輸血用血液の安全性や献血者スクリーニングの有効性をモニタリングする上で重要である。とくに初回献血者は感染症陽性通知による選択を受けないため、その陽性率は地域住民の陽性率を反映していると考えられ、そのウイルスの疫学調査が可能となる。また、年齢別の調査を行うことにより、過去の感染原因の推定

や将来の発がん件数を算定することが可能となる。1985年から一部の医療機関で、1986年からは全国の医療機関で行われている「B型肝炎ウイルスの母子感染防止事業」や、一部地方自治体で行われている「HTLV-1の母子感染予防対策」の成果を確認するためにもこれら調査は重要である。

また、献血者からいただいた血液から輸

血を介してこれらがウイルス感染がどの程度発生しているかの調査は、輸血用血液の安全性の評価とそれに対する対策を考慮するための重要な指標となりうる。1960年代には売買血の横行により輸血を受けた患者の約半数が肝炎を発症していたと報告されている。1970年代に入り完全な献血への移行がなされ、HBVの特異的な診断法の確立、更には1989年にHCVの遺伝子断片が見出され、これら検査が輸血用血液のスクリーニング検査に取り入れられたため、輸血に伴う肝炎ウイルス感染は激減した。その後も検査試薬の改良や自動検査機器の導入による検査精度向上によって輸血後感染は減少したが、年間数十例の感染が報告されてきた。1999年に導入されたNATにより感染直後のいわゆるウィンドウ期の血液が輸血用から排除されるようになり、輸血用血液の安全性は飛躍的に高まった。しかしながら、それでも毎年10例程度の輸血後HBV感染と数年に1例の輸血後HCV感染が確認されていた。昨年度新たに導入されたNAT装置・試薬は従来のもより検出感度が高く、輸血後HBV・HCV感染は更に減少すると考えられる。今後も調査を継続してこれらNAT装置・試薬の評価を行っていきたい。

このNATにより検出されたHBVやHCVの検出頻度を調査する事により、国内のどの地域でこれらウイルスの新たな感染が発生しているかの検討を併せて行った。

B. 研究方法

1) 初回献血者のがんウイルスマーカー陽性率の調査

東京都、茨城県、栃木県、神奈川県および福岡県の初回献血者を対象としてHBs

抗原、HBc抗体、HCV抗体およびHTLV-1抗体の陽性率の調査を行った。血清学的検査は化学発光酵素免疫法(CLEIA法)により行い、これらの検査結果を日本赤十字社血液事業統一システムから抽出し、性別、年齢ごとに陽性率を集計した。今年度は非特異反応による影響を排除するため、HBs抗原検査では吸収試験陽性、HCV抗体検査ではHCV-RNA陽性、HTLV-1抗体検査では間接蛍光抗体法陽性例のみの集計を行った。

2) 輸血によるがんウイルス感染に関する調査

輸血によるがんウイルス感染に関する調査は、①輸血を受けた患者の感染症マーカーが陽転化して医療機関から報告のある

「自発報告例」、②前回献血時には陰性であった献血者が今回献血時に陽転化した場合や、献血後に体調不良等で受診して感染が確認された等の「献血後情報例」が発生した場合に、献血時に同時採血して冷凍保管してある「保管検体」を融解し、ウイルスの有無や患者血液から検出されたウイルスとの遺伝子型や多変領域遺伝子配列を調べ、両ウイルスの相同性の検討を行った。HBVの遺伝子型はs領域のダイレクトシーケンシング法、HCVの遺伝子型はcore領域のダイレクトシーケンシング法により行った。

3) 核酸増幅スクリーニング検査で検出されたHBV、HCVの都道府県

国内のどの地域でHBVやHCVの新たな感染が発生しているのかを検討するため、①HBV-DNA検出例のうちHBc抗体陰性の感染初期例、②現在HBV感染で問題となっている欧米型の遺伝子型Aの感染初期例、③HCV感染初期例について、各

都道府県の採血本数（平成18年）10万本あたりの発生件数を計算した。

C. 研究結果

1) 初回献血者のがんウイルスマーカー陽性率の調査

HBs抗原の陽性率は3年前の平成18年の結果とほぼ同様の陽性率となった（図1）。HBs抗原の陽性率は毎年継続的に低下していたが、昨年の検査法の変更により感度が向上したため、3年前とほぼ同様の結果となったと考えられる。それでも平成15年以前の結果と比較すると、陽性率の大幅な低下が認められる。16歳献血者のHBs抗原陽性率は、調査を開始した平成7年以降連続的に低下し、国による「HBVの母子感染防止対策事業」実施後に出生した児が献血可能年齢となる平成15年以降、平成18年にワクチンとガンマグロブリンを投与したにもかかわらずキャリア化してしまった1例を除き、HBVキャリアは確認されていなかった。平成21年は400ml採血の推進等により、16歳献血者数の急激な減少によりデータの信頼性に問題が生じる事態となった。陽性者は男女各1名で、残念ながらいずれも水平感染か垂直感染かの確認が取れていない。

平成21年のHBc抗体陽性率は特に40歳以降で過去最低の陽性率を示した（図2）。9年前の平成12年の陽性率曲線と比較しても、同一陽性率で約20歳の開きがあり、献血者の出生年で揃えても陽性率に差異が認められた。

HCV抗体の陽性率は40歳代以降で特に上昇してしまった（図3）。平成18年以降全年代で陽性率が1%を下回って、HC

V抗体陽性者のほとんどが献血可能年齢を超えてしまったと考えられていたが、平成21年のデータはまったく逆行する結果となってしまう。この結果の意味については現在検討中である。

平成21年のHTLV-1抗体の陽性率は平成18年よりも高齢者側で若干の減少が認められた（図4）。IF法陽性例のみに対象を絞ったため、より明確な減少が期待されたが、若干の減少にとどまった。これはもともと陽性者・真の陽性者ともに多い福岡県のデータを反映した結果であると考えられる。しかし、平成7年には陽性率が3%近かった60歳代でも1.8%と低下し、HCV抗体と同様に陽性率の高かった年代層が献血年齢を超えてしまったと考えられた。

2) 輸血によるがんウイルス感染に関する調査

2009年に確認された輸血感染例はHBVの6例（自発報告例1例、献血後情報例5例）であった。これらの感染の原因となった血液のうち、半数の3例は個別のNATでも陰性の極微量のウイルス混入例であり、このような血液を輸血用から排除するのは極めて困難である。しかも、この3例中1例の献血者は低濃度キャリア（オカルト感染）で、このような血液での感染性は極めて低いと考えられているが、受血者が血液疾患の化学療法中であったため、異物を排除する免疫機能が著しく低下していたためと考えられる。

3) 核酸増幅スクリーニング検査で検出されたHBV、HCVの都道府県

1999年7月のスクリーニングNAT開始から2008年末までに、検査した4

8, 294, 349検体から、HBV: 878例、HCV: 113例、HIV: 19例の計1,010例を検出した。これらのうちHBVやHCVの新たな感染が国内のどの地域で発生しているのかを検討するため、各都道府県の採血本数(平成18年)10万本あたりの感染初期例発生件数を計算した。HBVの新規感染頻度を算出すると、採血本数10万本あたり20~24の都道府県は東京都、愛媛県、大分県、熊本県、鹿児島県であった。以下、採血本数10万本あたり15~19の都道府県は神奈川県、大阪府、兵庫県、鳥取県、山口県、福岡県、佐賀県、宮崎県であった。東京都、神奈川県、大阪府、兵庫県、福岡県といった大都市と中国、四国、九州の一部で頻度が高く、特に九州では長崎県、沖縄県以外はすべての県で高い傾向にあった。また、現在HBV感染で問題となっている欧米型の遺伝子型Aの新規初期頻度を同様に算出すると、東京都が採血本数10万本あたり5以上で一番高かった。次いで採血本数10万本あたり4~5の大阪府・沖縄県・静岡県が続き、同じく3~4の神奈川県・愛知県・千葉県で頻度が高かった。HBVと同様にHCVの新規感染頻度を算出すると栃木県が採血本数10万本あたり5以上で一番高く、次いで採血本数10万本あたり4~5の愛知県、滋賀県、広島県、福岡県、大分県、採血本数10万本あたり3~4の青森県、神奈川県、石川県、大阪府、岡山県であった。

D. 考察

初回献血者のがんウイルスマーカー陽性率の調査は検査法の変更による非特異反応

でHBc抗体以外のマーカーは信頼性が乏しかった。そこで平成20年からは、HBs抗原検査は吸収試験陽性例、HCV抗体検査はHCV-RNA陽性例、HTLV-1抗体検査はIF法陽性例のみを集計して調査を継続した。しかしHCV抗体の陽性率は上昇してしまい、現在結果の意味を検討中である。HTLV-1抗体の陽性率は若干ではあるが低下傾向が確認された。特にかつては陽性率の高かった60歳代での陽性率低下は著しく、現在から10~20年経過すればHTLV-1関連疾病の発症も大幅に減少すると考えられた。

輸血によるがんウイルス感染に関する調査では、HBV感染が平成20年の4例から平成21年は6例と増加した。しかし原因血液の半数にあたる3例の血液は、個別によるNATでも陰性である微量ウイルス混入血液であり、このような血液を輸血用血液から排除することは、現在の技術では非常に困難である。また、他の原因血液も混入するウイルス量は低値であり、今後数年をかけて新NATシステムの評価を行ってきたい。

核酸増幅スクリーニング検査で検出されたHBV、HCVの都道府県毎の検出頻度を算出した。HBVの新規感染頻度は東京都を中心とした首都圏、大阪府を中心とした関西圏、中四国の一部を含めた九州圏で高かった。HBV急性肝炎は1990年代には減少傾向にあったが、90年代後半から増加傾向に転じたといわれている。また、HBV感染は現在性感染症と捉えられている。特に近年我が国で問題となっている欧米型の遺伝子型Aの感染経路は、同性間性交渉から異性間性交渉へと拡大しており、

ユニバーサルHBワクチンの導入も検討されている。この遺伝子型Aは東京都を中心とした首都圏、愛知・静岡の中京圏、大阪府、沖縄県で頻度が高く、慢性化の問題もあり早急な対応が必要と考えられる。

一方、HCVの感染経路の主なものは静脈内薬物使用と考えられ、検出頻度の高い地域と違法薬物使用との関連が危惧される。

E. 論文・学会発表

<論文>

Effect of selective vaccination on a decrease in the rate of hepatitis B virus-positive Japanese first-time blood donors.

A Yoshikawa, K Suzuki, A Abe, T Tanaka, K Yamaguchi, T Tanaka, Y Ishikawa, K Minegishi, Y Gotanda, H Yugi, S Uchida,

M Satake, K Tadokoro. *Transfusion Medicine*, 2009, 19, 172-179.

<学会発表>

1) Miyakawa K, Gotanda Y, Takakura A, Satoh K, Uchida S, Satake M, Tadokoro K, Tanaka M, Suzuki Y, Yoshikawa A. :

Epidemiological study of hepatitis B virus genotype A in Japanese blood donors. 20th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia (2008年11月 名古屋)

2) 古居保美、五十嵐正志、蕎麦田理英子、猪俣尋史、星友二、松本千恵子、鈴木光、内田茂治、佐竹正博、田所憲治：NATで検出されたHBc抗体陽性のHBV Genotypeの分布。第33回日本血液事業学会総会(2009年11月 名古屋)