

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. *Journal of Virology 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. *Journal of General Virology*, 91(1): 103-111, 2010.

林 昌宏, 高崎智彦. チクングニア熱と近年の流行状況. *獣医公衆衛生研究*, 13(2): 9-13, 2011.

林 昌宏, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行状況. *公衆衛生*, 75(1): 39-42, 2011.

2. 学会発表

モイ メンリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎: デング再感染患者血清中ウ

イルス力価の検討: 感染性抗体—デングウイルス複合体はFc γ R発現細胞においてのみ検出された. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using Fc γ RIIA-expressing BHK cells. 第44回日米医学ウイルス性疾患専門部会, 札幌, 2010.

3. その他 (著書等)

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

林 昌宏, 倉根一郎, 高崎智彦. チクングニア熱. 人獣共通感染症 改訂版, 木村 哲, 喜田 宏 編, 医薬ジャーナル社, 印刷中.

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

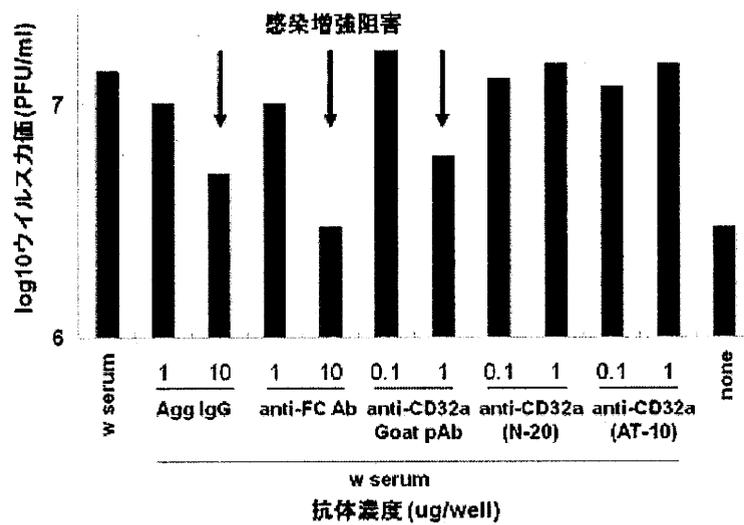


図1. 凝集 IgG, 抗 Fc 抗体, 抗 CD32 抗体による DENV-2 の感染増強阻害. DENV-DENV 型交差抗体複合体と CD32 の相互作用を阻害する凝集 IgG, 抗 Fc 抗体, 抗 CD32 抗体を用いた DENV の感染増強阻害を検討したところ、凝集 IgG, 抗 Fc 抗体, 抗 CD32A 抗体ヤギ pAb において DENV の感染増強阻害が観察された.

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

研究期間 平成20年4月～平成23年3月

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

セルコスポラマイド (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：

一晩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 200μl 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 MFG 0.5μg/ml で 4 時間または VRC 1μg/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、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。

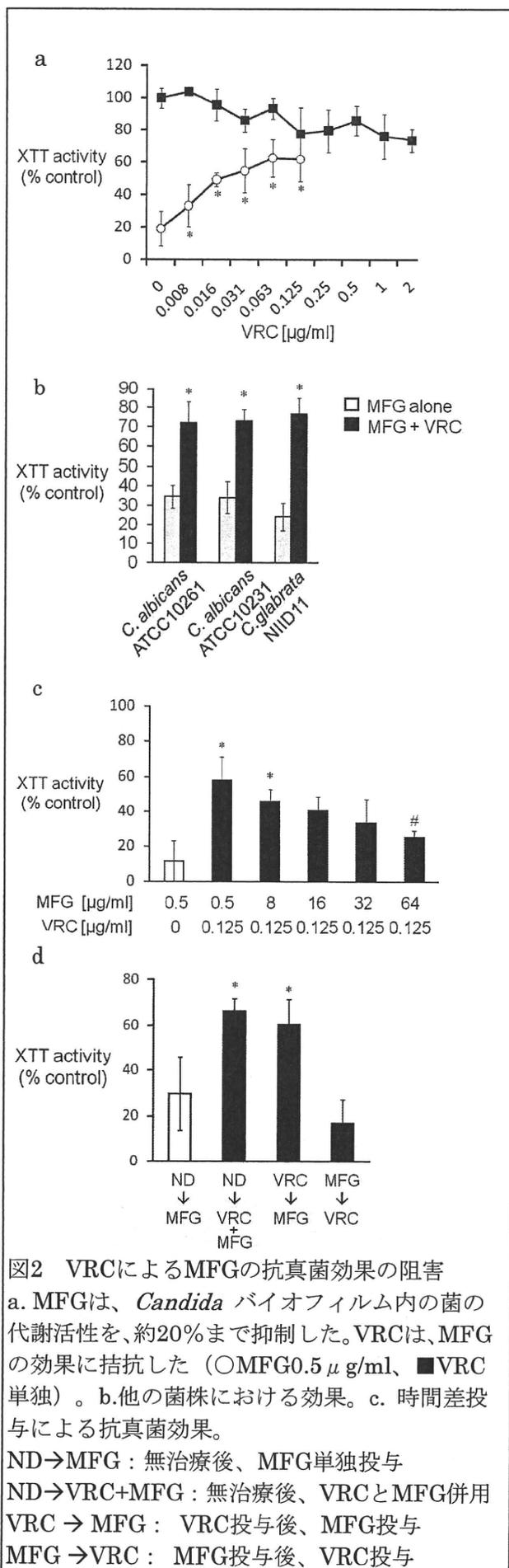
SC5314 株以外の菌株についても、同様に、VRC の拮抗作用が見られた (図 2b)。

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)。

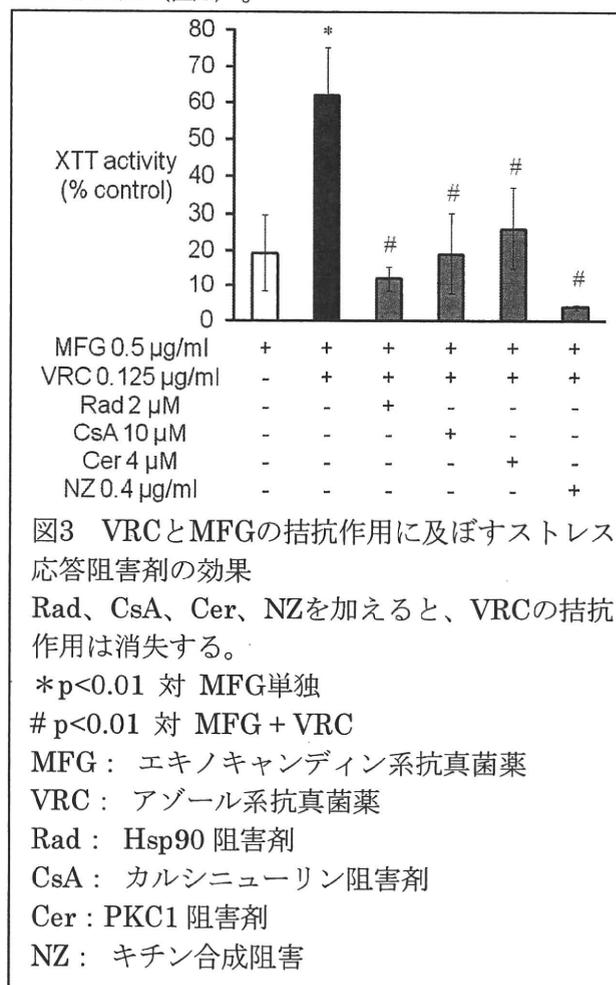
また、Rad、CsA、NZ を加えて、ストレス応答因子を制御する事により、MFG の殺菌作用が回復した (図 3)。

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)。



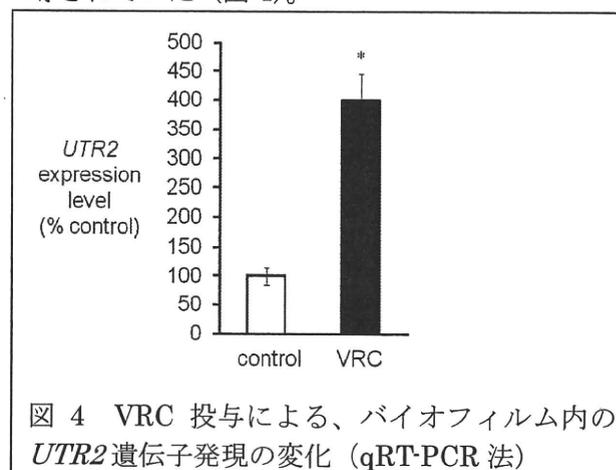
VRCとMFG拮抗作用とストレス応答制御

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)。



MFGの添加によって、CHS1-4はすべて誘導され、CHT2,3が顕著に抑制されていた。このことから、カンジダのバイオフィームでは、キチンの合成が上昇し、同分解が抑制されることによって、MFGに抵抗性を示すことが示唆された。

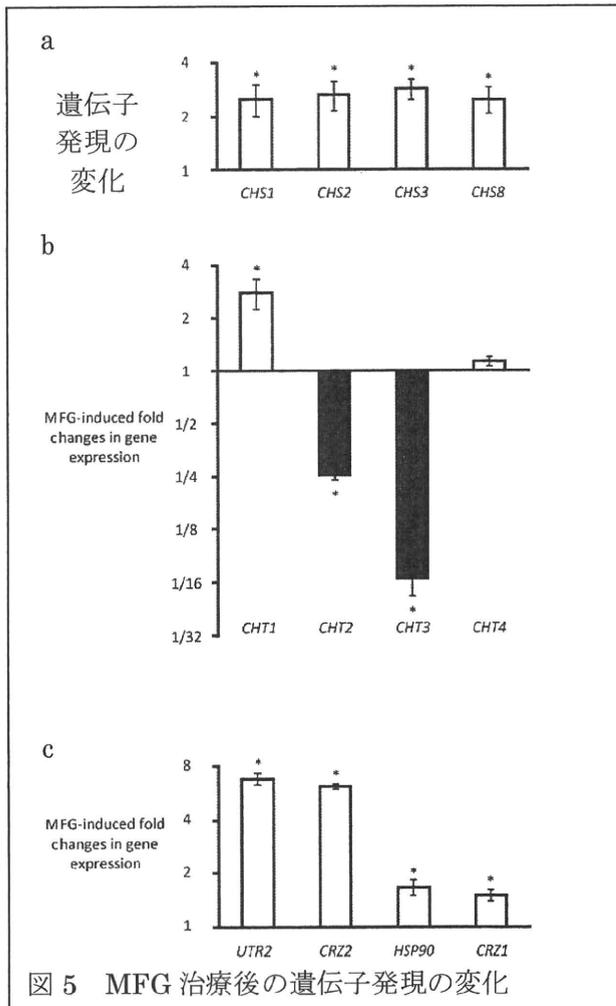


図5 MFG治療後の遺伝子発現の変化

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6に示す。

MFGは、非常に強い増殖抑制効果を示すが、0.25 μ 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6a)。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。

VRCは、0.008 μ 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6b)。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。

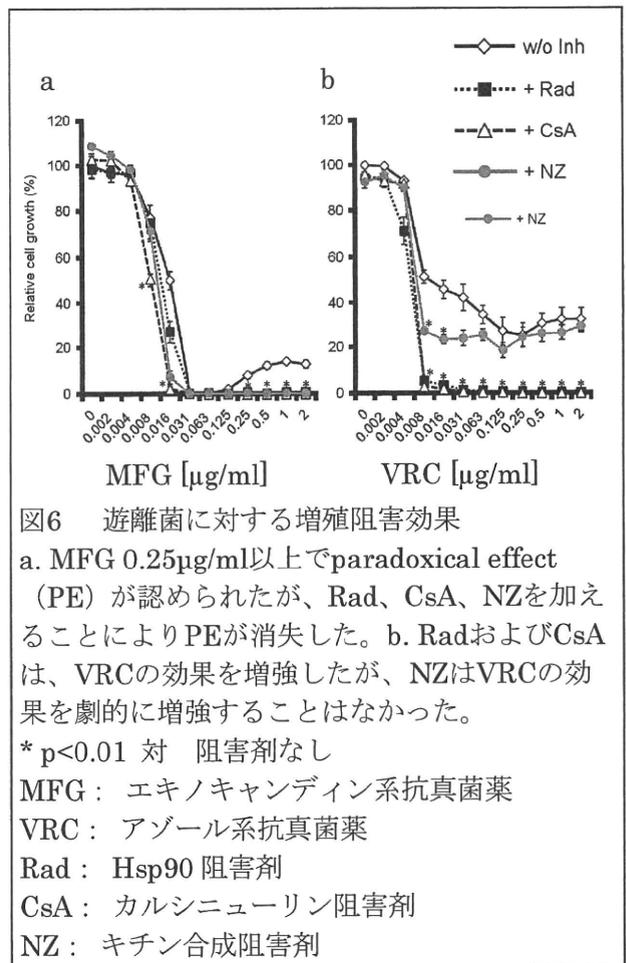


図6 遊離菌に対する増殖阻害効果

a. MFG 0.25 μ 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7)。

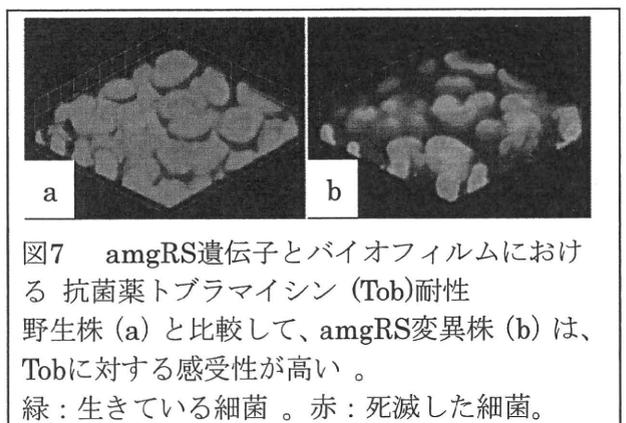


図7 amgRS遺伝子とバイオフィームにおける抗真菌薬トブラマイシン(Tob)耐性野生株(a)と比較して、amgRS変異株(b)は、Tobに対する感受性が高い。緑: 生きている細菌。赤: 死滅した細菌。

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られた。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 8)。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。

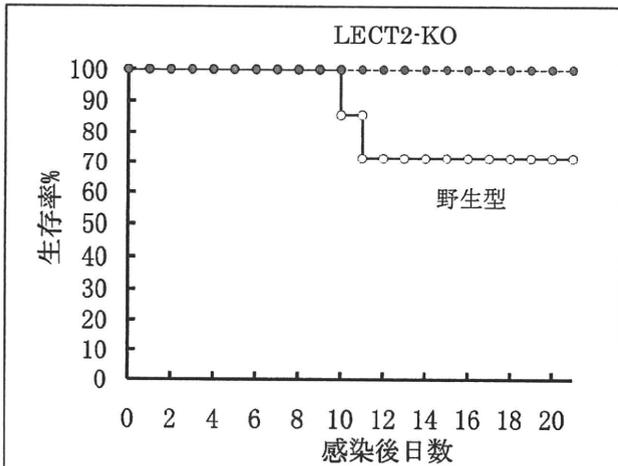


図8 *C. albicans* 感染マウスの生存率

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、薬剤投与下におけるバイオフィーム遺伝子発現の変化から、ストレス応答遺伝子が薬剤耐性に関与していることが示唆され、

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* のバイオフィームを中心に検討を行った。今後、バイオフィー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、バイオフィー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, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63:355-7, 2010.
- 2) 金子幸弘, 宮崎義継. ◇基礎編◇II. 各論 11. 耐性真菌: *Candida, Aspergillus, Cryptococcus* 感染症診療の基礎と臨床〜耐性菌の制御に向けて〜一山 智・山口恵三監修, 飯沼由嗣・館田一博編, p123-134, 2010年4月, 医薬ジャーナル社.
- 3) 金子幸弘, 宮崎義継. 5. カンジダによる各臓器感染症の推奨治療と予防 3) 慢性播種性カンジダ症の治療 河野 茂編. 米国感染症学会 IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE〜2008-2010 年のアスペルギルス, カンジダ, クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて, p145-150, 2010年, 医薬ジャーナル社.
- 4) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. カンジダ抗原. 中原一彦監修. パーフェクト検査値事典, p489, 2011年, 総合医学社, 東京.
- 5) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. クリプトコックス グルクロノキシロマンナン抗原. 中原一彦監修. パーフェクト検査値事典, p490, 2011年, 総合医学社, 東京.
- 6) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. 真菌関連遺

伝子検査. 中原一彦監修. パーフェクト検査
値事典. p492, 2011年, 総合医学社, 東京.

- 7) 金子幸弘, 宮崎義継. 呼吸器感染症に向かう
臨床医の決断力—なぜこの治療薬でいくか.
新規治療薬の展望 2)抗真菌薬. 感染と抗菌
薬. 13:377-383, 2010.
- 8) 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. *Med Mycol.*
48:606-12, 2010.
- 9) 金子幸弘, 宮崎義継. 連載企画・感染対策
真菌感染症に必要な抗菌薬対策～注意すべ
き真菌症とその治療～ . 難病と在宅ケア.
16:62-65, 2010.
- 10) 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. *Int Med.* 49:491-5, 2010.
- 11) 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・抗真菌薬の基礎
と臨床—今日の考え方— 1. アゾール系抗
真菌薬—その基礎—. 化学療法の領域.
26:540-551, 2010.
- 12) 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.
- 13) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S,
Miyazaki Y. The effects of an hsp90
inhibitor on the paradoxical effect. *Jpn J
Infect Dis.* 62:392-3, 2009.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌薬投
与下における *Candida* バイオフィルムのキ
チン合成・分解酵素遺伝子発現調節 第 54 回
日本医真菌学会 東京 平成 22 年 10 月
- 2) 金子幸弘, 今村圭文, 大野秀明, 河野茂, 宮
崎義継. *Candida albicans* の biofilm に対す
る抗真菌薬の拮抗作用に関連した Hsp90 関

連ストレス応答に関する検討 第 58 回日本化
学療法学会総会 長崎 平成 22 年 6 月

- 3) 金子幸弘, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継
Candida albicans の抗真菌薬治療抵抗性と
Hsp90 関連ストレス応答 第 84 回感染症学
会総会・学術講演会 京都 平成 22 年 4 月
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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 、
amphotericinB 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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, Kohno S, Miyazaki Y.

- Voriconazole and micafungin induce chitin synthesis genes and reduce chitinase genes in *Candida* biofilms. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, San Francisco, USA. 2010, 5.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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

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

使用薬剤：

ミカファンギン (MFG)

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 MFG 0.5 μ g/ml で 4 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、遺伝子の発現解析を行った。

2. 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、宿主側因子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 10^5 cfu/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

バイオフィームの遺伝子発現

MFG の添加によって、CHS1-4 はすべて誘導され、CHT2,3 が顕著に抑制されていた。このことから、カンジダのバイオフィームでは、キチンの合成が上昇し、同分解が抑制されることによって、MFG に抵抗性を示すことが示唆された(図 2)。

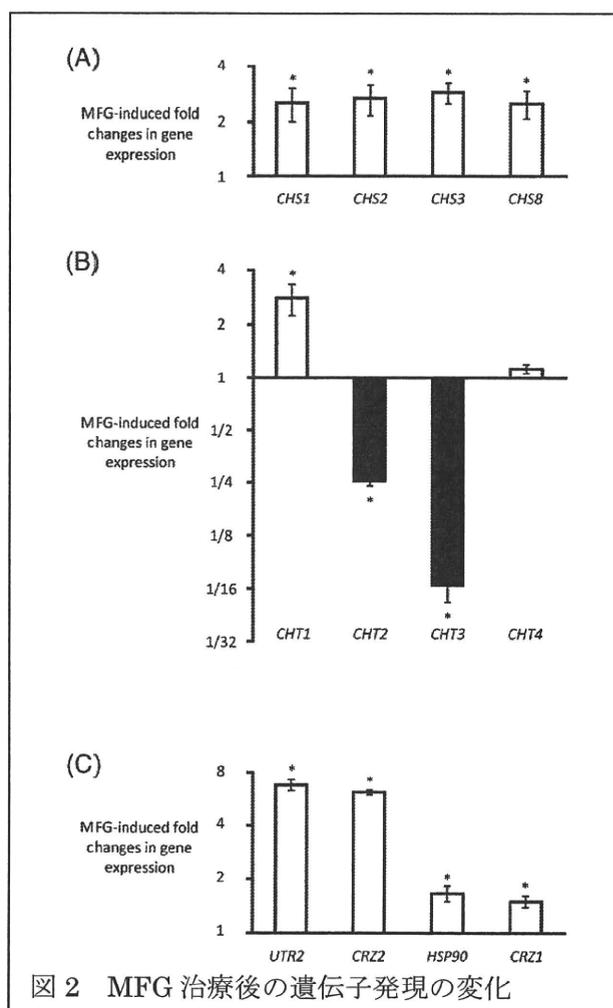


図 2 MFG 治療後の遺伝子発現の変化

2. 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られた。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 3)。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。

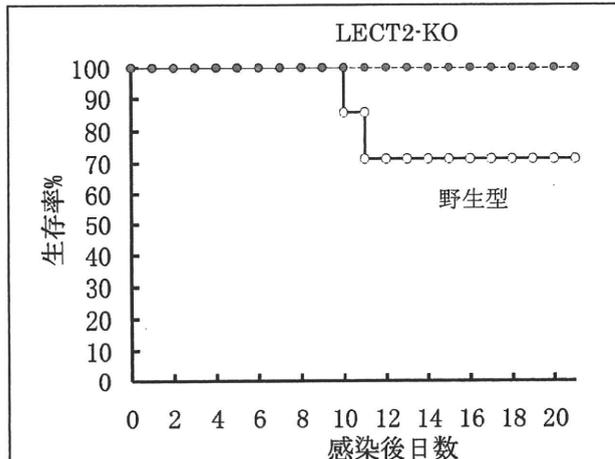


図3 *C. albicans*感染マウスの生存率

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られた。しかしながら、その差は劇的ではなかった。

D. 考察

薬剤投与下におけるバイオフィーム遺伝子発現の変化から、ストレス応答遺伝子が薬剤耐性に関与していることが示唆され、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* のバイオフィームを中心に検討を行った。今後、バイオフィー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、バイオフィー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, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63:355-7, 2010.
- 2) 金子幸弘, 宮崎義継. ◇基礎編◇II. 各論 11. 耐性真菌: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* 感染症診療の基礎と臨床～耐性菌の制御に向けて～一山 智・山口恵三監修, 飯沼由嗣・館田一博編, p123-134, 2010年4月, 医薬ジャーナル社.
- 3) 金子幸弘, 宮崎義継. 5. カンジダによる各臓器感染症の推奨治療と予防 3) 慢性播種性カンジダ症の治療 河野 茂編. 米国感染症学会 IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE～2008-2010 年のアスペルギルス, カンジダ, クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて, p145-150, 2010年, 医薬ジャーナル社.
- 4) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. カンジダ抗原. 中原一彦監修. パーフェクト検査値事典. p489, 2011年, 総合医学社, 東京.
- 5) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. クリプトコックス グルクロノキシロマンナン抗原. 中原一彦監修. パーフェクト検査値事典. p490, 2011年, 総合医学社, 東京.
- 6) 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. 真菌関連遺伝子検査. 中原一彦監修. パーフェクト検査値事典. p492, 2011年, 総合医学社, 東京.
- 7) 金子幸弘, 宮崎義継. 呼吸器感染症に向かう臨床医の決断力～なぜこの治療薬でいくか. 新規治療薬の展望 2) 抗真菌薬. 感染と抗菌薬. 13:377-383, 2010.
- 8) 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. *Med Mycol.* 48:606-12, 2010.
- 9) 金子幸弘, 宮崎義継. 連載企画・感染対策 真菌感染症に必要な抗菌薬対策～注意すべき真菌症とその治療～. 難病と在宅ケア. 16:62-65, 2010.
- 10) 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. *Int Med.* 49:491-5, 2010.

- 11) 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・抗真菌薬の基礎と臨床—今日の考え方— 1. アゾール系抗真菌薬—その基礎—. *化学療法の領域.* 26:540-551, 2010.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌薬投与下における *Candida* バイオフィルムのキチン合成・分解酵素遺伝子発現調節 第54回日本医真菌学会 東京 平成22年10月
- 2) 金子幸弘, 今村圭文, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継. *Candida albicans* の biofilm に対する抗真菌薬の拮抗作用に関連した Hsp90 関連ストレス応答に関する検討 第58回日本化学療法学会総会 長崎 平成22年6月
- 3) 金子幸弘, 大野秀明, 河野茂, 宮崎義継. *Candida albicans* の抗真菌薬治療抵抗性と Hsp90 関連ストレス応答 第84回感染症学会総会・学術講演会 京都 平成22年4月

国際学会

- 1) Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole and micafungin induce chitin synthesis genes and reduce chitinase genes in *Candida* biofilms. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, San Francisco, USA. 2010, 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
研究代表者 政木 隆博
研究機関 平成21年4月～平成23年3月

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)HCVの粒子形成過程に必須である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)HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定、を行った。*AlphaScreen*解析及び*in vitro*リン酸化アッセイを施行し、NS5A蛋白質と相互作用し、NS5A蛋白質をリン酸化するセリン/スレオニンPKを9種類同定した。さらに、siRNAを用いたノックダウン実験により、これらの中からHCVの粒子形成過程に関与するPKを3種類(CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)取得した。これらのPKはHCVの粒子形成過程を制御する新たな創薬標的として期待される。

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して魅力的である。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研究開発であり、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)HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定、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。また、両蛋白質をMycもしくはFlagタグを融合させた形で細胞内に発現させ、抗Myc抗体、抗Flag抗体による二段階の免疫沈降反応後に得られたサンプルに対しても同様の解析を行った。

(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、NS5A蛋白質をコムギ胚芽無細胞転写・翻訳系で合成した。また、404種類のPKを包括するcDNAライブラリーから同様の方法でPKを取得した。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蛋白質との間に強い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。リン酸化能の評価は、精製PKを γ - ^{32}P ATP存在化において精製NS5A蛋白質と混和し、SDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化NS5A蛋白質のバンドを検出することにより行った(*in vitro*リン酸化アッセイ)。

(3) HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定

HCVの細胞侵入過程の解析には、HCVエンベロープ蛋白質を粒子表面に被ったシュードタイプウイルスを使用した。HCVゲノム複製能はサブゲノミックレプリコンRNAを用いて、また、粒子形成能は全長HCV RNAもしくは感染性ウイルス粒子を用いて解析した。細胞にはHuH-7細胞及びその派生株を使用した。候補宿主因子及びPKの細胞内発現をsiRNAによりノックダウンした後、HCV感染もしくはHCV RNAの導入を行い、HCVの細胞侵入効率、ゲノム複製能、粒子形成能を評価し

た。また、NS5A蛋白質のリン酸化状態をウエスタンブロットング法により解析した。培養上清中の感染性ウイルス粒子量の測定は、培養上清を非感染細胞に処理後、感染巣（フォーカス）をカウントし、1 mLあたりのフォーカス形成単位 (FFU) を算出することにより行った。

(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 大20-9 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導入細胞に多く、約35 kDaのバンドは変異型JFH-1 RNA導入細胞に多く認められた。一方、Myc付加NS5A蛋白質及びFlag付加Core蛋白質を細胞内に共発現させた系では、抗Myc抗体、抗Flag抗体による二段階の免疫沈降反応後に沈降産物をSDS-PAGEで分離し銀染色を行ったが、明らかなバンドを確認することはできなかった。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索

1. NS5A蛋白質と強く相互作用するPKの探索

AlphaScreen法による解析において発光シグナル強度1,300以上を強固な蛋白質間相互作用と想定した時、このカットオフ値以上のシグナル強度を示したPKは89種類であった。このうち79種類がNS5A蛋白質のリン酸化に重要とされるセリン/スレオニンPKであった。

2. NS5A蛋白質に対するリン酸化能の評価

AlphaScreen解析でスクリーニングされた79種類のセリン/スレオニンPKに対して*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ、9種類(TSSK2、PLK1、PKAC β 、CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 ϵ 、CK2 α 2)にNS5A蛋白質に対する強い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、粒子形成に与える影響の解析

NS5A蛋白質をリン酸化する9種類のPKがHCV生活環に役割を有するか否かを調べるために、各PKの細胞内発現をノックダウンした状態でHCVを感染させ、感染後のウイルス粒子産生量を解析した。CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2ノックダウン細胞から分泌される感染性ウイルス粒子量(ウイルス感染力価)がmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞の1/5~1/10に抑制された。次に、これら3種類のPKがHCV生活環の中のどのステップに関わっているのかをより詳細に調べるために、シュードタイプウイルスを用いてHCVの細胞侵入過程を、サブゲノミックレプリコンシステムを用いてRNA複製能を、また、ウイルス感染が成立しないHuh7-25細胞を用いてHCV粒子形成能を解析した。HCVの細胞侵入効率及びRNA複製は、

レポーターとしてウイルスに組み込まれた(シュードタイプウイルス)、もしくは、レプリコンに挿入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標にして定量的に評価した。3種類のPKノックダウン細胞におけるHCVの細胞侵入効率及びRNA複製能は、mock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞と同程度であり、これらのPKの作用点はHCVの細胞侵入やゲノム複製のステップではないことが示唆された。HCV粒子形成能の評価は、全長HCV RNAをPK siRNAとともにエレクトロポレーション法でHuh7-25細胞に導入し、導入後3日目の上清中Core蛋白量を測定することにより行った。3種類のPKノックダウン細胞から分泌されるCore蛋白量はmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞における分泌Core蛋白量の1/3~1/2に減少したことから、HCV RNA複製能の結果と合わせて、ウイルス粒子形成以降の過程がこれらのPKの作用点である可能性が示唆された。最後に、3種類のPKが培養細胞内においてもNS5A蛋白質のリン酸化に関与するか否かを調べるために、PKノックダウン細胞にHCVを感染させ、NS5A蛋白質のリン酸化状態を解析した。CK1 α ノックダウン細胞では、コントロールsiRNA導入細胞と比べて、高リン酸化型NS5A蛋白質の発現低下及び高リン酸化型NS5A蛋白質/低リン酸化型NS5A蛋白質比の減少を認めた。一方、CK2 α 2ノックダウン細胞におけるNS5A蛋白質のバンドパターンは、コントロールsiRNA導入細胞と比べて、低リン酸化型NS5A蛋白質の発現低下及び高リン酸化型NS5A蛋白質/低リン酸化型NS5A蛋白質比の上昇を認めた。CK1 ϵ ノックダウン細胞におけるNS5A蛋白質のバンドパターンはコントロールsiRNA導入細胞のNS5A像と同様のパターンを呈していた。

D. 考察

(1) NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索

まず、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ことを試みた。この手法により、ウイルス生活環に重要な役割を担う宿主因子が生理的な条件下で同定される可能性を期待できる。しかし、免疫沈降産物の精製度を高めることが困難であり、未だに特定の宿主因子の同定には至っていない。一方、精製度を高めるために試みた二段階の免疫沈降反応では沈降バンドを確認することができなかった。NS5A-Core蛋白質間相互作用の強度がさほど強くないことに起因しているものと考えられる。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索及び (3) 同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、 粒子形成に与える影響の解析

404種類のヒトPKの中からNS5A蛋白質に対するリン酸化能を有し、かつ、HCV生活環に関与するPKを3種類同定可能であった。同定されたPKの中にはCK2の触媒サブユニットであるCK2 α 2が含まれていたが、CK2はNS5A蛋白質のリン酸化とHCV粒子形成に関与することが報告されており、本解析結果の妥当性が高いことを示している。

今回の解析で同定された3種類のPKは、いずれもsiRNAによるノックダウンでHCVの細胞侵入過程や複製活性には影響を与えずにウイルス粒子分泌量を低下させたことから、HCV生活環の後期過程であるウイルス粒子形成（もしくはそれ以降のステップ）に関与し、この過程を正に制御している可能性が示唆された。さらに、CK1 α のノックダウンはNS5A蛋白質の高リン酸化を著しく抑制しており、このPKの粒子形成過程への作

用はNS5A蛋白質の高リン酸化制御を介している可能性が考えられた。最近、台湾の研究チームがサブゲノミックレプリコン細胞を用いて1,210種類のヒトプロテインキナーゼ及びホスファターゼを対象とした網羅的RNAiスクリーニングを行い、HCVゲノム複製にPolo-like kinase 1 (PLK1)というPKが関与することを報告した。PLK1の作用点はHCVの複製過程であるが、その作用は本研究で同定されたCK1 α と同様NS5A蛋白質の高リン酸化制御を介する。NS5A蛋白質の高リン酸化にはその中央領域に存在する複数のセリン残基が関与すると報告されているが、同じリン酸化パターンでも責任PKやNS5A蛋白質のリン酸化部位の違いによりHCV生活環における作用点が異なる可能性は十分に考えられる。この相違を明らかにするためには、今後、責任PKによるリン酸化部位の同定や同定部位のリン酸化がHCV生活環に与える影響につき解析する必要がある。

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の粒子形成過程を制御する3種類のPK (CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)を取得した。本研究は、HCV粒子形成機構の解明や新たな創薬標的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 (欧文論文)

- 1) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT

participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011;410:38-47.

- 2) 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* 2010;84:5824-5835.
- 3) Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Amanō A, Masaki T, Miyakawa K, Yoshida T. The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2009;38:644-648.
- 4) Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. Nagatsuma K, Hayashi Y, Hano H, Sagara H, Murakami K, Saito M, Masaki T, Lu T, Tanaka M, Enzan H, Aizawa Y, Tajiri H, Matsuura T. *Liver Int* 2009;29:47-54.

(邦文論文)

- 1) 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. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆宇、澤崎達也、鈴木哲朗. *消化器内科*、51巻、PP. 627-631、2010.
- 2) C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. *ウイルス*、60巻、PP. 87-92、2010.

- 3) HCVの分子生物学. 肝癌-基礎・臨床研究のアップデート. 政木隆博、鈴木哲朗. *日本臨床*、67巻増刊号3、PP. 134-137、2009.

2. 学会発表

(国際学会発表)

- 1) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
- 2) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T. Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
- 3) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T. Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
- 4) 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.

(国内学会発表)

- 1) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 2) 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、渡邊治雄、脇田隆字. HCV JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 3) Mohsan Saeed、鈴木亮介、渡邊則幸、政木隆博、加藤孝宣、脇田隆字、鈴木哲朗. Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 4) 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字. HCVの増殖適応変異とその意義. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 5) 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蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第46回日本肝臓学会総会、山形、2010. 5. 27-28.
- 6) 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.
- 7) 金ソルイ、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.
- 8) 政木隆博. HCV NS5A蛋白のリン酸化に関する新規セリン/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.
- 9) 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蛋白のリン酸化に関する新規セリン/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.
- 10) 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.

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。

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
研究代表者 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)HCVの粒子形成過程に必須である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)HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定、を行った。(1)に関しては、幾つかの方法を試みたが、最終的にNS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の同定には至らなかった。(2)、(3)に関しては、AlphaScreen解析及び*in vitro*リン酸化アッセイを施行し、NS5A蛋白質と相互作用し、NS5A蛋白質をリン酸化するセリン/スレオニンPKを9種類同定した。さらに、siRNAを用いたノックダウン実験により、これらの中からHCVの粒子形成過程に関与するPKを3種類(CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)取得した。これらのPKはHCVの粒子形成過程を制御する新たな創薬標的として期待される。

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して魅力的である。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研究開発であり、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)HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定、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