

D. 考察

本研究ではこれまでの報告をもとに、HCV 関連 HCC を 3 つのサブクラスに分類している。過去の報告では Class 1 はチロシンキナーゼの活性化、p53 の変異、AKT の活性化などを介して細胞の異常増殖が起こっている特徴を有しており、AFP の高値、低分化度で大きい腫瘍が多く、予後不良な例が含まれるとされている。Class 2 は β -カテニンの変異、WNT シグナルの活性化が関与しており、高分化で腫瘍径は比較的小さいとされている。

今回対象症例の分類に当たっては、過去に報告されているデータを Training data として用いているが、人種もアレイのプラットフォームも異なるデータを用いることにより起こるバイアスが懸念される。しかしながら Centering と Scaling をかけることで 2 つのデータの均一化を図ることで、図 4 に示すようにこの問題は解決されている。また Boyault らのデータによる分類と Chiang らのデータによる分類が近似したものになったことはこの分類方法の信頼性の裏付けとなると考えられた。

サブクラスの非癌部遺伝子発現の比較では Class 1 では 1855 の遺伝子が有意であったが、中でも COL4A6 や LOX といった線維化関連の遺伝子が上位にランクされていた。このサブクラスに分類された症例はすべて F3 以上の線維化が起こっており、Hypergeometric test の結果と合わせると線維化と炎症がこのサブクラスの特徴である可能性が示唆された。

Class 2 では MAGEH1 の低発現ときわめて強い関連が示唆され、この遺伝子と β -カテニンの変異との関連に関し、さらなる検討を要すると思われた。選択された遺伝子の数が 12 と少ないため Hypergeometric test の結果の信頼性に疑問が残るが、MAGEH1 は PTPRH、XAF1 とともにアポトーシス関連のカテゴリーに分類され、アポトーシスと β -カテニンの変異との間にも何らかの関連があるという可能性も示唆された。

E. 結論

Class 1 の非癌部では線維化、炎症に関連する遺伝子が有意に発現していた。Class 2 の非癌部ではアポトーシスに関連する遺伝子が特徴的に発現していた。これらの結果を踏まえて、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・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

【参考文献】

- ① Boyault S, et al: Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):42-52
- ② Chiang D, et al: Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Aug 15;68(16):6779-88.
- ③ Hoshida Y, et al: Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Sep 15;69(18):7385-92. Epub 2009 Sep 1.

図 1. 過去の報告によるサブクラスの定義

| New subclass | Class 1 | | | Class 2 | | Class 3 | | |
|-------------------------------|--|----|---------------------------|----------------------------------|----|--|--------|-------------|
| | G1 | G2 | G3 | G5 | G6 | G4 | | |
| Boyault | Proliferation | | | CTNNB1 | | Interferon | Poly 7 | Unannotated |
| Chiang | S1 | | | S2 | | S3 | | |
| Hoshida | S1 | | | S2 | | S3 | | |
| Published biological features | | | | | | | | |
| Boyault | Mitotic cell cycle | | | WNT activation | | | | |
| | AKT activation | | | E-cadherin, p16 hypermethylation | | | | |
| Chiang | TP53 mutation | | | CTNNB1 mutation | | Overexpression of IFN-stimulated genes | | |
| | Proliferation driven by tyrosine kinase activation | | | | | | | |
| Hoshida | E2F1 ↓, p53 ↓ | | | | | | | |
| | TGF-β ↑, WNT ↑ | | | MYC ↓, AKT ↓, IFN ↓ | | | | |
| Published clinical features | | | | | | | | |
| Boyault | High AFP | | Vascular invasion | | | | | |
| | HBV infection | | Significantly poor OS/DFS | | | | | |
| Chiang | High AFP, Macrovascular invasion | | | Tumor > 3cm | | Tumor < 3cm | | |
| | Moderately/poorly differentiated | | | Well differentiated | | | | |
| Hoshida | Larger tumor | | | Smaller tumor | | | | |
| | Early recurrence More vascular invasion More satellite lesions | | | High AFP | | | | |

図 2. 対象症例のサブクラス分類の結果

| new.class | tumors | PAM | | | | | | NTP | | | | | |
|-----------|--------|--------------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | | chiang class | | | boyault class | | | chiang | | boyault | | hoshida | |
| | | Prolif | CTNNB1 | Other | G123 | G56 | G4 | class | BH.FDR | class | BH.FDR | class | BH.FDR |
| 1 | JT.37 | 0.9994 | 0.0001 | 0.0005 | 0.9746 | 0.0054 | 0.0200 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S2 | 0.001 |
| 1 | JT.45 | 0.9846 | 0.0067 | 0.0087 | 0.9322 | 0.0397 | 0.0281 | Prolif | 0.001 | G12 | 0.001 | S2 | 0.001 |
| 1 | JT.14 | 0.9818 | 0.0009 | 0.0172 | 0.9410 | 0.0086 | 0.0504 | Prolif | 0.001 | G12 | 0.001 | S2 | 0.001 |
| 1 | JT.18 | 0.9705 | 0.0026 | 0.0269 | 0.6227 | 0.0304 | 0.3469 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.005 | S1 | 0.001 |
| 1 | JT.38 | 0.9638 | 0.0046 | 0.0315 | 0.8120 | 0.0600 | 0.1280 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S2 | 0.034 |
| 1 | JT.39 | 0.9275 | 0.0054 | 0.0672 | 0.5511 | 0.0642 | 0.3846 | Prolif | 0.001 | G12 | 0.001 | S1 | 0.001 |
| 1 | JT.47 | 0.8522 | 0.0177 | 0.1300 | 0.4891 | 0.1193 | 0.3915 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S1 | 0.001 |
| 1 | JT.22 | 0.8515 | 0.0920 | 0.0565 | 0.6473 | 0.2585 | 0.0942 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S1 | 0.001 |
| 1 | JT.06 | 0.8369 | 0.0257 | 0.1374 | 0.8369 | 0.1643 | 0.5394 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.372 | S1 | 0.993 |
| 1 | JT.17 | 0.8309 | 0.0267 | 0.1424 | 0.6833 | 0.0710 | 0.2457 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S2 | 0.001 |
| 1 | JT.15 | 0.8103 | 0.0203 | 0.1694 | 0.8832 | 0.0147 | 0.1021 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S2 | 0.035 |
| 1 | JT.32 | 0.7142 | 0.0376 | 0.2482 | 0.7511 | 0.0401 | 0.2088 | Prolif | 0.008 | G3 | 0.001 | S1 | 0.200 |
| 2 | JT.30 | 0.0004 | 0.7861 | 0.2135 | 0.0059 | 0.8891 | 0.1049 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.001 |
| 2 | JT.16 | 0.0058 | 0.6930 | 0.3012 | 0.0458 | 0.8087 | 0.1455 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.005 |
| 2 | JT.20 | 0.0120 | 0.6889 | 0.2991 | 0.0422 | 0.7424 | 0.2154 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.149 |
| 2 | JT.33 | 0.0387 | 0.6588 | 0.3025 | 0.0682 | 0.6873 | 0.2444 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.008 |
| 2 | JT.35 | 0.0395 | 0.6522 | 0.3082 | 0.1261 | 0.6772 | 0.1967 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.006 | S2 | 0.011 |
| 2 | JT.36 | 0.0136 | 0.6477 | 0.3386 | 0.0298 | 0.7805 | 0.1897 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.001 |
| 2 | JT.24 | 0.1313 | 0.6154 | 0.2533 | 0.3379 | 0.5216 | 0.1405 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S2 | 0.001 |
| 2 | JT.40 | 0.0193 | 0.5906 | 0.3901 | 0.0570 | 0.7292 | 0.2139 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.001 |
| 2 | JT.28 | 0.1069 | 0.5867 | 0.3064 | 0.1342 | 0.6623 | 0.2035 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S2 | 0.018 |
| 2 | JT.04 | 0.0478 | 0.5081 | 0.4440 | 0.1032 | 0.5957 | 0.3011 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S3 | 0.352 |
| 2 | JT.43 | 0.0627 | 0.5008 | 0.4365 | 0.0877 | 0.6030 | 0.3093 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.011 | S3 | 0.021 |
| 2 | JT.26 | 0.1827 | 0.4601 | 0.3571 | 0.0949 | 0.5914 | 0.3136 | CTNNB1 | 0.001 | G56 | 0.001 | S1 | 0.191 |
| 3 | JT.19 | 0.0016 | 0.1285 | 0.8698 | 0.0557 | 0.1385 | 0.8058 | other | 0.001 | G12 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.44 | 0.0212 | 0.1193 | 0.8595 | 0.3447 | 0.0843 | 0.5710 | Prolif | 0.001 | G3 | 0.001 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.12 | 0.0003 | 0.1485 | 0.8512 | 0.0136 | 0.1808 | 0.8056 | IFN | 0.001 | G56 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.41 | 0.0043 | 0.1586 | 0.8371 | 0.0641 | 0.1627 | 0.7732 | IFN | 0.001 | G56 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.31 | 0.0058 | 0.1619 | 0.8324 | 0.0805 | 0.1377 | 0.7817 | P7 | 0.001 | G12 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.27 | 0.0241 | 0.1472 | 0.8287 | 0.0531 | 0.1859 | 0.7610 | IFN | 0.023 | G56 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.13 | 0.1221 | 0.0536 | 0.8244 | 0.5571 | 0.0334 | 0.4095 | Prolif | 0.053 | G12 | 0.111 | S1 | 0.491 |
| 3 | JT.42 | 0.0258 | 0.1634 | 0.8108 | 0.1824 | 0.0908 | 0.7269 | P7 | 0.001 | G12 | 0.001 | S3 | 0.008 |
| 3 | JT.34 | 0.0918 | 0.1079 | 0.8003 | 0.4994 | 0.0539 | 0.4466 | other | 0.096 | G12 | 0.007 | S2 | 0.001 |
| 3 | JT.25 | 0.0040 | 0.1969 | 0.7991 | 0.0980 | 0.3176 | 0.5845 | other | 0.001 | G56 | 0.449 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.11 | 0.0019 | 0.2427 | 0.7554 | 0.0301 | 0.3090 | 0.6609 | IFN | 0.001 | G12 | 1 | S1 | 0.001 |
| 3 | JT.07 | 0.0711 | 0.1762 | 0.7526 | 0.1733 | 0.1468 | 0.6800 | P7 | 0.004 | G12 | 1 | S3 | 0.001 |
| 3 | JT.23 | 0.1725 | 0.1303 | 0.6972 | 0.2955 | 0.2754 | 0.4290 | Prolif | 0.006 | G3 | 0.001 | S1 | 0.001 |
| 3 | JT.21 | 0.3241 | 0.0440 | 0.6319 | 0.2396 | 0.0756 | 0.6848 | IFN | 0.001 | G12 | 0.308 | S1 | 0.001 |
| 3 | JT.29 | 0.1212 | 0.3301 | 0.5488 | 0.4598 | 0.3293 | 0.2108 | CTNNB1 | 0.148 | G3 | 0.001 | S2 | 0.008 |
| 3 | JT.46 | 0.0028 | 0.4682 | 0.5290 | 0.0511 | 0.5994 | 0.3495 | CTNNB1 | 0.002 | G56 | 0.001 | S3 | 0.001 |

表 1. Class 1 の非癌部に特徴的な遺伝子 (FDR<0.05 であった上位 23 の遺伝子を示す)

| Gene ID | Symbol | Name | Score(d) | q-value(%) | p-value |
|--------------|----------------|---|----------|------------|---------|
| A_23_P217379 | COL4A6 | collagen, type IV, alpha 6 | 3.5 | 0 | 0.0001 |
| A_23_P24129 | DKK1 | dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis) | 4.28 | 0 | 0.0000 |
| A_24_P148811 | RUVBL1 | RuvB-like 1 (E. coli) | 3.42 | 0 | 0.0001 |
| A_24_P33429 | | | 3.33 | 0 | 0.0002 |
| A_32_P199551 | C3orf57 | chromosome 3 open reading frame 57 | 3.76 | 0 | 0.0001 |
| A_23_P122216 | LOX | lysyl oxidase | 3.02 | 2.31 | 0.0005 |
| A_23_P161563 | RAB38 | RAB38, member RAS oncogene family | 3.14 | 2.31 | 0.0003 |
| A_23_P205746 | EML1 | echinoderm microtubule associated protein like 1 | 3.2 | 2.31 | 0.0003 |
| A_23_P339098 | SLC35F2 | solute carrier family 35, member F2 | 3.19 | 2.31 | 0.0003 |
| A_23_P59022 | TRERF1 | transcriptional regulating factor 1 | 3.26 | 2.31 | 0.0002 |
| A_23_P83134 | GAS1 | growth arrest-specific 1 | 3.01 | 2.31 | 0.0005 |
| A_24_P109854 | ZNF468 | zinc finger protein 468 | 3.01 | 2.31 | 0.0005 |
| A_24_P360206 | PCDHA11 | protocadherin alpha 11 | 3.01 | 2.31 | 0.0005 |
| A_24_P398147 | NEBL | nebullette | 3.19 | 2.31 | 0.0003 |
| A_24_P400970 | | | 3.26 | 2.31 | 0.0002 |
| A_24_P68088 | TCAM1 | testicular cell adhesion molecule 1 homolog (mouse) | 3.07 | 2.31 | 0.0004 |
| A_32_P497742 | GPR161 | G protein-coupled receptor 161 | 3.14 | 2.31 | 0.0003 |
| A_23_P138435 | ZMIZ1 | zinc finger, MIZ-type containing 1 | 2.9 | 3.2 | 0.0007 |
| A_23_P213678 | PAM | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase | 2.99 | 3.2 | 0.0005 |
| A_23_P417282 | IGF1R | insulin-like growth factor 1 receptor | 2.99 | 3.2 | 0.0005 |
| A_23_P429491 | C11orf82 | chromosome 11 open reading frame 82 | 2.89 | 3.2 | 0.0007 |
| A_23_P500464 | COL2A1 | collagen, type II, alpha 1 | 2.93 | 3.2 | 0.0007 |
| A_23_P72387 | | | 2.9 | 3.2 | 0.0007 |

表 2. Class 2 の非癌部に特徴的な遺伝子

| Gene ID | Symbol | Name | Score(d) | q-value(%) | p-value |
|--------------|----------------|---|----------|------------|---------|
| A_23_P34144 | MAGEH1 | melanoma antigen family H, 1 | -2.87 | 0 | 0.0001 |
| A_23_P101642 | PTPRH | protein tyrosine phosphatase, receptor type, H | 2.46 | 21.69 | 0.0006 |
| A_23_P163666 | WFIKKN1 | WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1 | 2.38 | 21.69 | 0.0009 |
| A_23_P27649 | ZNF433 | zinc finger protein 433 | 2.07 | 26.4 | 0.0032 |
| A_23_P421423 | TNFAIP2 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 | 2.01 | 26.4 | 0.0041 |
| A_23_P4283 | XAF1 | XIAP associated factor 1 | 2.07 | 26.4 | 0.0032 |
| A_23_P4286 | XAF1 | XIAP associated factor 1 | 2.06 | 26.4 | 0.0033 |
| A_23_P501451 | GIYD1 | GIY-YIG domain containing 1 | 2.06 | 26.4 | 0.0033 |
| A_24_P220454 | CUX1 | cut-like homeobox 1 | 2.17 | 26.4 | 0.0021 |
| A_24_P261929 | IFI27L1 | interferon, alpha-inducible protein 27-like 1 | 2.02 | 26.4 | 0.0038 |
| A_32_P16975 | ANKS3 | ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 3 | 2.14 | 26.4 | 0.0023 |
| A_32_P64668 | | | 2.1 | 26.4 | 0.0028 |

表 3. Class 3 の非癌部に特徴的な遺伝子 (FDR<0.1 であった上位 36 の遺伝子を示す)

| Gene ID | Symbol | Name | Score(d) | q-value(%) | p-value |
|--------------|----------|--|----------|------------|---------|
| A_24_P659836 | | | 3.24 | 1.56 | 0.0003 |
| A_23_P152235 | IRX3 | iroquois homeobox 3 | -3.04 | 3.43 | 0.0005 |
| A_23_P256107 | HPSE | heparanase | 2.75 | 3.43 | 0.0014 |
| A_23_P47691 | TRIM21 | tripartite motif-containing 21 | 2.94 | 3.43 | 0.0007 |
| A_23_P99642 | SLC7A7 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7 | 2.67 | 3.43 | 0.0018 |
| A_24_P315862 | | | 2.92 | 3.43 | 0.0008 |
| A_23_P139575 | PRR13 | proline rich 13 | 2.5 | 5.55 | 0.0033 |
| A_23_P142075 | ACP5 | acid phosphatase 5, tartrate resistant | 2.35 | 5.55 | 0.0054 |
| A_23_P209527 | | | -2.52 | 5.55 | 0.0031 |
| A_23_P329261 | KCNJ2 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2 | 2.55 | 5.55 | 0.0028 |
| A_23_P82324 | CARD11 | caspase recruitment domain family, member 11 | 2.38 | 5.55 | 0.0050 |
| A_24_P261929 | IFI27L1 | interferon, alpha-inducible protein 27-like 1 | -2.55 | 5.55 | 0.0028 |
| A_24_P270460 | IFI27 | interferon, alpha-inducible protein 27 | 2.37 | 5.55 | 0.0052 |
| A_24_P341882 | TESK1 | testis-specific kinase 1 | -2.52 | 5.55 | 0.0031 |
| A_24_P490109 | | | 2.33 | 5.55 | 0.0058 |
| A_24_P941912 | DTX3L | deltex 3-like (Drosophila) | 2.49 | 5.55 | 0.0034 |
| A_32_P162443 | | | -2.45 | 5.55 | 0.0040 |
| A_32_P56249 | | | 2.33 | 5.55 | 0.0058 |
| A_23_P101950 | MDH1 | malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) | 2.22 | 8.54 | 0.0084 |
| A_23_P140277 | SYNE2 | spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 | -2.15 | 8.54 | 0.0105 |
| A_23_P209394 | CFLAR | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | 2.19 | 8.54 | 0.0093 |
| A_23_P39840 | VAMP5 | vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin) | 2.07 | 8.54 | 0.0136 |
| A_23_P75769 | MS4A4A | membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4 | 2.12 | 8.54 | 0.0115 |
| A_23_P79545 | SUCLG1 | succinate-CoA ligase, alpha subunit | 2.27 | 8.54 | 0.0071 |
| A_23_P80162 | TMPRSS3 | transmembrane protease, serine 3 | -2.13 | 8.54 | 0.0111 |
| A_24_P212024 | | | 2.21 | 8.54 | 0.0088 |
| A_24_P219785 | CALM3 | calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta) | 2.28 | 8.54 | 0.0069 |
| A_24_P31527 | MBD3 | methyl-CpG binding domain protein 3 | -2.44 | 8.54 | 0.0040 |
| A_24_P333525 | RABGAP1L | RAB GTPase activating protein 1-like | 2.1 | 8.54 | 0.0122 |
| A_24_P345866 | | | 2.07 | 8.54 | 0.0135 |
| A_24_P382319 | CEACAM1 | carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein) | 2.28 | 8.54 | 0.0068 |
| A_24_P45446 | GBP4 | guanylate binding protein 4 | 2.08 | 8.54 | 0.0131 |
| A_24_P50245 | HLA-DMA | major histocompatibility complex, class II, DM alpha | 2.23 | 8.54 | 0.0081 |
| A_24_P511686 | | | 2.27 | 8.54 | 0.0072 |
| A_32_P148122 | IGKC | immunoglobulin kappa constant | 2.25 | 8.54 | 0.0075 |
| A_32_P48086 | | | -2.36 | 8.54 | 0.0053 |

表 4. Class 1 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリー (上位 20 のカテゴリーを示す)

| GOBPID | GO.term | OddsRatio | ExpCount | Count | Size | P.value | Q.value |
|------------|--|-----------|----------|-------|------|----------|----------|
| GO:0002541 | activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response | 21.94 | 3.19 | 23 | 33 | 1.34E-16 | 3.38E-13 |
| GO:0009611 | response to wounding | 2.95 | 38.92 | 92 | 402 | 1.12E-15 | 1.41E-12 |
| GO:0009605 | response to external stimulus | 2.42 | 62.93 | 126 | 650 | 4.67E-15 | 3.92E-12 |
| GO:0006956 | complement activation | 19.99 | 3.00 | 21 | 31 | 7.17E-15 | 4.51E-12 |
| GO:0002526 | acute inflammatory response | 7.68 | 6.97 | 32 | 72 | 1.40E-14 | 7.05E-12 |
| GO:0055114 | oxidation reduction | 2.56 | 48.31 | 102 | 499 | 7.81E-14 | 3.28E-11 |
| GO:0006082 | organic acid metabolic process | 2.47 | 45.50 | 94 | 470 | 3.05E-12 | 1.10E-09 |
| GO:0006959 | humoral immune response | 7.17 | 6.10 | 27 | 63 | 4.77E-12 | 1.50E-09 |
| GO:0006954 | inflammatory response | 3.15 | 23.33 | 59 | 241 | 1.01E-11 | 2.82E-09 |
| GO:0008202 | steroid metabolic process | 3.69 | 16.46 | 47 | 170 | 1.49E-11 | 3.74E-09 |
| GO:0002455 | humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin | 16.12 | 2.61 | 17 | 27 | 1.67E-11 | 3.83E-09 |
| GO:0019752 | carboxylic acid metabolic process | 2.40 | 45.02 | 91 | 465 | 2.45E-11 | 4.74E-09 |
| GO:0043436 | oxoacid metabolic process | 2.40 | 45.02 | 91 | 465 | 2.45E-11 | 4.74E-09 |
| GO:0051605 | protein maturation by peptide bond cleavage | 6.71 | 6.10 | 26 | 63 | 3.35E-11 | 6.03E-09 |
| GO:0042180 | cellular ketone metabolic process | 2.35 | 46.28 | 92 | 478 | 4.89E-11 | 7.78E-09 |
| GO:0006958 | complement activation, classical pathway | 20.28 | 2.13 | 15 | 22 | 4.95E-11 | 7.78E-09 |
| GO:0006629 | lipid metabolic process | 2.12 | 64.58 | 117 | 667 | 5.30E-11 | 7.85E-09 |
| GO:0050896 | response to stimulus | 1.62 | 215.51 | 296 | 2226 | 1.78E-10 | 2.49E-08 |
| GO:0034641 | cellular nitrogen compound metabolic process | 2.51 | 34.56 | 73 | 357 | 3.33E-10 | 4.41E-08 |
| GO:0006952 | defense response | 2.36 | 39.31 | 79 | 406 | 7.30E-10 | 9.19E-08 |

表 5. Class 2 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリ

SAM_class2 vs class1/3/JC (12 genes with FDR<0.3)

| GOBPID | GO.term | OddsRatio | ExpCount | Count | Size | P.value | Q.value | Genes |
|------------|---|-----------|----------|-------|------|---------|---------|-------------------|
| GO:0010792 | DNA double-strand break processing involved in repair via single-strand annealing | 1699.50 | 0.001 | 1 | 2 | 0.001 | 0.020 | GIYD1 |
| GO:0000729 | DNA double-strand break processing | 566.39 | 0.003 | 1 | 4 | 0.003 | 0.020 | GIYD1 |
| GO:0045002 | double-strand break repair via single-strand annealing | 566.39 | 0.003 | 1 | 4 | 0.003 | 0.020 | GIYD1 |
| GO:0000738 | DNA catabolic process, exonucleolytic | 339.77 | 0.004 | 1 | 6 | 0.004 | 0.023 | GIYD1 |
| GO:0000726 | non-recombinational repair | 130.58 | 0.010 | 1 | 14 | 0.010 | 0.034 | GIYD1 |
| GO:0000724 | double-strand break repair via homologous recombination | 99.81 | 0.012 | 1 | 18 | 0.012 | 0.034 | GIYD1 |
| GO:0000725 | recombinational repair | 99.81 | 0.012 | 1 | 18 | 0.012 | 0.034 | GIYD1 |
| GO:0006891 | intra-Golgi vesicle-mediated transport | 99.81 | 0.012 | 1 | 18 | 0.012 | 0.034 | CUX1 |
| GO:0006915 | apoptosis | 8.13 | 0.593 | 3 | 864 | 0.016 | 0.037 | MAGEH1,PTPRH,XAF1 |
| GO:0012501 | programmed cell death | 8.04 | 0.599 | 3 | 873 | 0.017 | 0.037 | MAGEH1,PTPRH,XAF1 |
| GO:0008219 | cell death | 7.30 | 0.654 | 3 | 953 | 0.021 | 0.040 | MAGEH1,PTPRH,XAF1 |
| GO:0016265 | death | 7.28 | 0.656 | 3 | 956 | 0.022 | 0.040 | MAGEH1,PTPRH,XAF1 |

表 6. Class 3 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリ

| GOBPID | GO.term | OddsRatio | ExpCount | Count | Size | P.value | Q.value | Genes |
|------------|---|-----------|----------|-------|------|----------|----------|-------------------------------|
| GO:0006955 | immune response | 4.91 | 5.23 | 21 | 499 | 3.84E-08 | 2.56E-05 | 21 genes |
| GO:0002376 | immune system process | 3.44 | 8.05 | 23 | 768 | 3.45E-06 | 0.001 | 23 genes |
| GO:0050871 | positive regulation of B cell activation | 24.70 | 0.26 | 5 | 25 | 5.19E-06 | 0.001 | CARD11,CD27,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0030890 | positive regulation of B cell proliferation | 39.18 | 0.15 | 4 | 14 | 1.05E-05 | 0.002 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0050864 | regulation of B cell activation | 17.63 | 0.35 | 5 | 33 | 2.17E-05 | 0.003 | CARD11,CD27,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0030888 | regulation of B cell proliferation | 26.10 | 0.20 | 4 | 19 | 3.92E-05 | 0.004 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0042100 | B cell proliferation | 18.64 | 0.26 | 4 | 25 | 0.0001 | 0.012 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0032944 | regulation of mononuclear cell proliferation | 8.79 | 0.64 | 5 | 61 | 0.0004 | 0.029 | CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14 |
| GO:0050670 | regulation of lymphocyte proliferation | 8.79 | 0.64 | 5 | 61 | 0.0004 | 0.029 | CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14 |
| GO:0070663 | regulation of leukocyte proliferation | 8.79 | 0.64 | 5 | 61 | 0.0004 | 0.029 | CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14 |
| GO:0006346 | methylation-dependent chromatin silencing | 96.15 | 0.04 | 2 | 4 | 0.0006 | 0.037 | DNMT3A,MBD3 |
| GO:0032946 | positive regulation of mononuclear cell proliferation | 10.85 | 0.42 | 4 | 40 | 0.0008 | 0.037 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0050671 | positive regulation of lymphocyte proliferation | 10.85 | 0.42 | 4 | 40 | 0.0008 | 0.037 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |
| GO:0070665 | positive regulation of leukocyte proliferation | 10.85 | 0.42 | 4 | 40 | 0.0008 | 0.037 | CARD11,CD38,CD40,IL7 |

NS2/3 プロテアーゼ阻害剤開発基盤の構築と抗 HCV 剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性

分担研究者 山下 篤哉 山梨大学大学院・医学工学総合研究部・微生物学

研究要旨

1. a). NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系として NS2 領域を含んだサブゲノムレプリコン細胞を樹立した。
b). Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を構築した。
2. NS3 Helicase をターゲットタンパクとし、海洋生物ライブラリーより活性阻害物質の検索を行った。その結果、NS3 Helicase および HCV 増殖阻害活性を有する物質を同定した。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療は、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法の登場により格段に進歩した。今後、STAT-C などの新規治療薬の導入によって、更なる治癒率の上昇が期待されている。その反面、薬剤耐性や副作用という問題は確実に存在し、多種・多様な新たな治療薬の開発は今後も必要である。

そこで、本研究では C 型慢性肝炎新規治療薬の開発の基盤構築をするために、2 つのことに視点を定め、研究を行う。まず、第 1 に、これまで治療薬のターゲットタンパクとして、その報告例のない NS2/3 プロテアーゼに着目し、in silico screening 法を用いて、C 型慢性肝炎治療薬候補化合物の検索を行う。第 2 に、創薬ライブラリーとして海洋生物に着目し、その抽出物より、C 型慢性肝炎治療薬候補化合物の検索を行うものである。本研究期間においては、HCV NS3 Helicase をターゲットタンパクとして、その検索を行う。

B. 研究方法

1. NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系の構築

1). NS2 をコードした薬剤スクリーニング用サブゲノムレプリコン細胞の構築

pON/3-5B/KE プラスミドに O 株由来の NS2 遺伝子を挿入し、pON/2-5B/KE プラスミドを作製。次に、in vitro transcription により RNA を作製後、Huh7 細胞に導入し、replicon 細胞を構築した。

2). Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系の構築

Huh7 細胞に、Gal4 binding site が 9 つ tandem に繋がり、その下流に firefly Luciferase を挿入したレポータープラスミド pGL4.35[*luc2P/9XGAL4UAS/Hygro*]と HCV NS4B 遺伝子の下流に Gal4VP16 遺伝子を挿入し、HCV NS4B Gal4VP16 融合タンパクを発現するプラスミド pCAG NS4B Gal4VP16 IN を導入し、レポーター細胞を

ている Cyclosporin A および HSP90 阻害剤 17-AAG について、NS2 をコードしたレプリコン細胞と NS2 をコードしていないレプリコン細胞の両者の間に、これまでに報告があるような HCV 増殖抑制効果の差を見ることが出来るかについて検討を行った。しかし、我々の樹立した系では、NS2 をコードしたものとしていないレプリコン細胞において、上記2つの薬剤の HCV 増殖抑制効果の差は見られなかった(Ⅰ-表 1)。

2). Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系の構築

Ⅰ-図 2A に示すような NS4B の下流に Gal4VP16 を繋ぎ、NS2/3 プロテアーゼおよび NS3 プロテアーゼ活性化により、NS4B Gal4VP16 融合タンパクより、Gal4VP16 切断され、その結果、Firefly Luciferase が発現するようなレポーター細胞を樹立した。NS2、NS3、および NS4A タンパクの発現は、アデノウイルスベクターを用いて、レポーター細胞に発現させるようにした。次に、樹立した細胞システムが機能するかどうかについて確認した。NS2、NS3、および NS4A タンパクの発現アデノウイルスベクターを M.O.I:200 でレポーター細胞に感染させたところ、コントロールアデノウイルスベクターを感染させた時に比べ、25 倍の Luciferase 活性を示した。

II. 抗HCV剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性

1) 海洋生物抽出物ライブラリーをライブラリーソースとした NS3 Helicase 活性阻害物質のスクリーニング

インドネシア近海、沖縄近海に生息する海洋生物抽出物 593 サンプルについて、PET 法と FRET 法という2つの蛍光の *in vitro* NS3 Helicase assay システム(Ⅱ-図1) を用いて、

NS3 Helicase 活性阻害物質の同定のためのスクリーニングを行った。その結果、海洋抽出物終濃度 25ug/ml として測定した場合、50% 以上(% of control)の抑制活性が見られたサンプル数は 119 サンプル存在した(Ⅱ-図2A)。

そのうちのひとつ、沖縄近海のカイメンの 1 種 C-11EA を、更に、シリカカラムで4つの分画に精製したものの中で、NN-7-12-1 と名付けた分画成分は、ほぼ純粋な精製化合物のみが存在することが成分分析結果から判明したため、以後、この分画精製物の解析を進めた(Ⅱ-図2B)。

2) NN-7-12-1 の HCV NS3 Helicase 活性阻害と HCV 増殖阻害の検討

PET 法および FRET 法を用いて、NN-7-12-1 の HCV NS3 Helicase 阻害活性を検討した。その結果、PET 法における IC_{50} は $13.8 \mu M$ 、FRET 法における IC_{50} は $13.2 \mu M$ とほぼ同等の抑制活性を示した(Ⅱ-図3)。次に、NN-7-12-1 が HCV の増殖阻害活性を示すかについて、1b N 株由来のサブゲノムレプリコン細胞 Huh7/ Rep Feo 細胞を用いて検討した。その結果、 EC_{50} は $12 \mu M$ 、 CC_{50} は $43 \mu M$ 、Selectivity Index は 3.2 となり、NN-7-12-1 が HCV の増殖阻害活性を有することがわかった(Ⅱ-図4)。

3) NN-7-12-1 の HCV NS3 Helicase 活性阻害機序の解析

HCV NS3 は、ATPを加水分解し(ATPase 活性)、エネルギーを得て、RNA unwinding 活性を持つようになる。そこで、NN-7-12-1 が、NS3のATPase 活性を阻害するかについて検討した。その結果、濃度依存的にATPase の活性を阻害した(Ⅱ-図5)。次に、NN-7-12-1 がNS3とRNAとの結合を阻害するかどうかについて検討を行った。その結果、NN-7-12-1

はNS3とRNAとの結合も阻害することがわかった(II-図6)。

D. 考察

I. NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系の構築

NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング用のサブゲノムレプリコン細胞の樹立に成功した。この細胞を使って薬剤評価が可能かどうかについて、これまでにNS2タンパクの活性阻害剤として報告のある Cyclosporin A および HSP90 阻害剤である 17-AAG を用いて、NS3~NS5B までをコードしたサブゲノムレプリコンと比較・検討を行った。その結果、2つのレプリコン細胞の間に、これら薬剤の HCV の増殖抑制効果の差は見られなかった。Cyclosporin A は、JFH-1 でNS2領域の有無でその効果違いあることが報告され、また、HSP90 阻害剤については、in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系で、その活性を阻害することが報告されている。従って、今後は、過去の報告例と我々の実験結果の違いについて、ウイルス株の違いや実験系の違いによるものなのかについて等、検討を行う予定である。

アデノウイルスベクターを用いた Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系の構築も成功した。

今後は、樹立したレプリコン細胞や Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて、In silico screening によりヒットした NS2/3 抑制化合物について、その抑制活性を評価することを計画している。

II. 抗HCV剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性

天然物由来の創薬ライブラリーの中でも、海洋生物は、多種多様な生物活性を示すユ

ニークな化学構造式を有する化合物を有するとして注目されている。そこで、我々は、抗HCV剤開発のための創薬ライブラリーとして海洋生物に着目し、NS3 Helicaseをターゲットとして、その活性抑制物質の検索を行った。インドネシア、沖縄近海に存在する海洋生物の抽出物 593サンプルについて、PET法とFRET法という2つの蛍光のin vitro NS3 Helicase assay システムを用いて、NS3 Helicase 活性阻害物質の同定のためのスクリーニングを行い、119サンプルがその活性を有するという結果を得られた。その結果、海洋生物抽出物ライブラリーは、創薬ライブラリーとしては、極めてヒット率の高いライブラリーであると考えられる。次に、本年度は、その中でも、比較的容易に、抑制成分と考えられる純粋な精製化合物が単離出来た、沖縄産カイメン由来サンプルNN-7-12-1について詳細な解析を行った。このNN-7-12-1は、in vitro NS3 helicase 活性、および、サブゲノムレプリコン細胞のHCV増殖抑制活性の50%抑制活性濃度が10 μ Mオーダーを示すものであった。更に、詳細な作用メカニズムについて検討を行ったところ、NS3の ATPase活性並びにRNA結合活性を抑制することを見出した。従って、NN-7-12-1のHCV増殖抑制メカニズムは、NS3のATPase活性並びにRNA結合活性を抑制する結果、NS3 Helicase活性に影響を及ぼし、最終的に、ウイルス増殖を抑制するという機序が考えられる。今後は、この精製化合物の抑制メカニズムについて、更に、詳細な解析を検討していく予定である。

また、ヒットした多くの海洋生物抽出物についても、今後、更に、分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めていく予定である。

E. 結論

- 1). NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系としての HCV サブゲノムレプリコン細胞と Cell based assay 系の樹立に成功した。
- 2). 抗HCV剤創薬ライブラリーソースとして、海洋生物が有用なライブラリーソースとなる可能性があることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤本雄介、山下篤哉、葛西宏威、前川信哉、榎本信幸、田中淳一、池田正徳、加藤宣之、伊藤正彦、森石恆司

HCV NS2 タンパク活性阻害剤 High throughput screening のための HCV subgenomic replicon 細胞の構築

第 58 回日本ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月

山下 篤哉、古田 篤史、松田 泰嘉、谷 英典、藤田 統、秋光 信佳、田中 淳一、池田 正徳、加藤 宣之、前川 信哉、榎本 信幸、伊藤 正彦、森石恆司、常田 聡、関口 勇地、野田 尚宏

沖縄産ウミシダ (*Alloeocomatella polycladia*) 抽出物の抗 HCV NS3 helicase 阻害活性による HCV 増殖抑制効果

第 58 回日本ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I-図1

A) NS2～NS5B サブゲノムレプリコン pORN/2-5B/KE および NS3～NS5B サブゲノムレプリコン pORN/3-5B/KEの構造
 B) 樹立した NS2～NS5B 遺伝子をコードしたサブゲノムレプリコン細胞において、NS2 が発現しているかどうかについて RT-PCR にて確認

1. pORN/C-5B/KE (Positive Control)
2. Huh7#94cORS ORN/2-5B/KE
3. Huh7#94 cORSORN/3-45B/KE (Negative control)



| | | EC ₅₀ (μ M) | CC ₅₀ (μ M) | Selectivity Index |
|----------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Cyclosporine A | ORN/25B/KE | 0.25±0.02 | >80 | >320 |
| | ORN/35B/KE | 0.29±0.01 | >80 | >276 |
| 17-AAG | ORN/25B/KE | 0.25±0.07 | 1.74±0.01 | 6.96 |
| | ORN/35B/KE | 0.29±0.13 | 1.44±0.21 | 4.97 |

EC₅₀ : 50% effective concentration

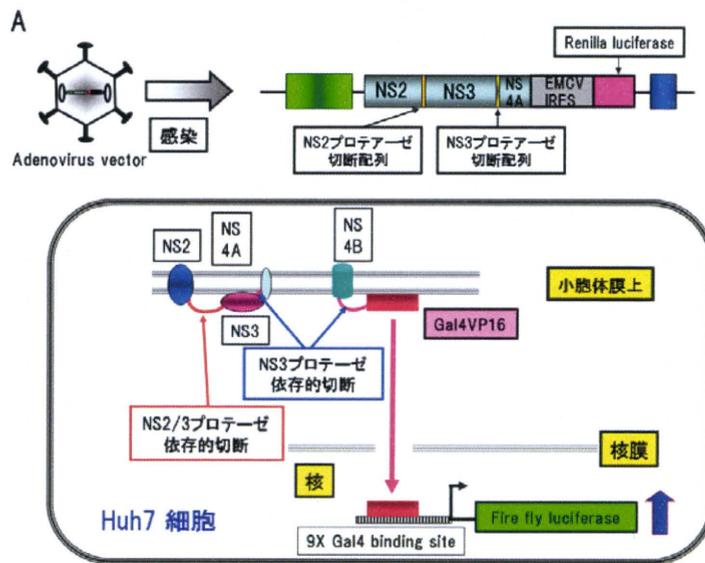
CC₅₀ : 50% cytotoxicity concentration

Selectivity Index : CC₅₀/ EC₅₀

I-表1 NS2 タンパク活性阻害剤の抑制効果の検討

I-図2

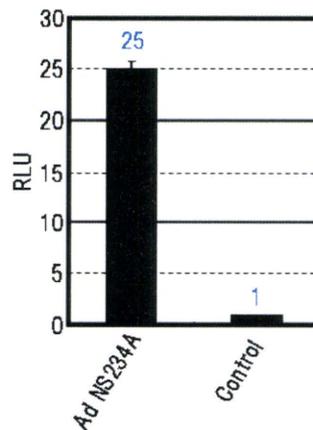
A) Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系の概略図



B) NS2/3プロテアーゼの活性評価

A の概略図にあるような NS2 から NS4A までをコードしたアデノウイルスベクターを作製し、このウイルスベクターをレポーター細胞に感染させ、firefly Luciferase の活性を測定した。ウイルスタンパクの発現のないアデノウイルスベクターを感染させたものをコントロールとした。また、*Renilla Luciferase* を測定することにより活性の normalization を行った。

B

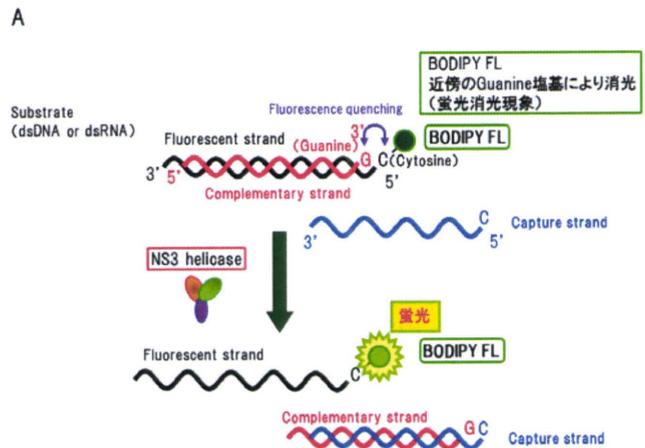


II-図1

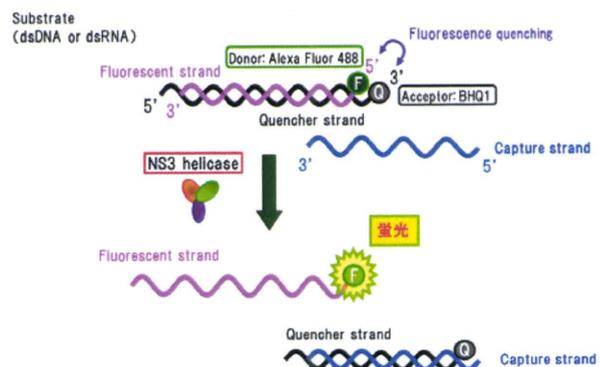
蛍光法を用いた in vitro NS3 Helicase 活性測定法の概略

A) Photoinduced Electron Transfer (PET)法の概略

B) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法の概略



B



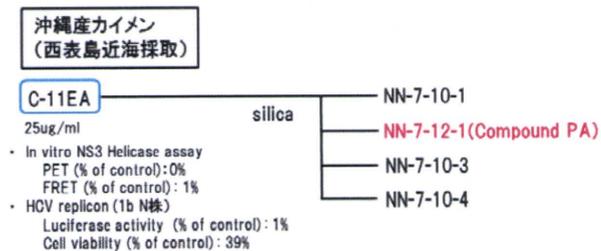
II-図2

A) 海洋生物抽出物ライブラリーのスクリーニングの概略

B) 沖縄産カイメン C-11EA の分画・精製の概略



B



II-図3

沖縄産カイメン由来精製化合物

NN-7-12-1 の HCV 増殖抑制効果

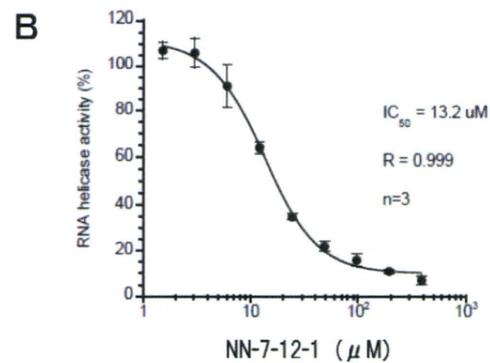
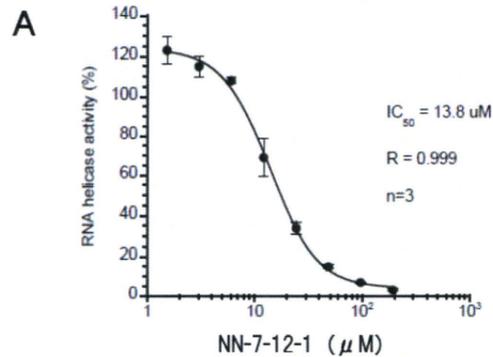
A) PET 法を用いた NS3 Helicase 抑制活性の評価

NN-7-12-1 を 2 倍階段希釈し、NS3 Helicase 抑制活性を測定した。

B) FRET 法を用いた NS3 Helicase 抑制活性の評価

NN-7-12-1 を 2 倍階段希釈し、NS3 Helicase 抑制活性を測定した。

得られたデータより 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求めた。



II-図4

沖縄産カイメン由来精製化合物

NN-7-12-1 の HCV 増殖抑制効果

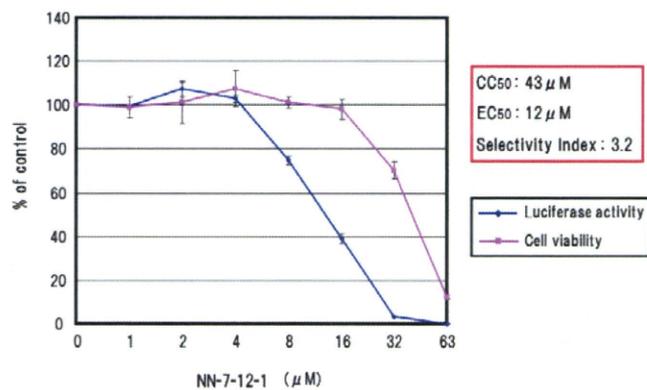
HCV 1b N 株由来のサブゲノムレプリコン細胞である Huh7/Rep

Feo 細胞を用いて、NN-7-12-1 を 63 μM から 1 μM まで 2 倍階段希釈し、各濃度における HCV

増殖抑制効果と細胞毒性能の評価を行った。次に、50% HCV

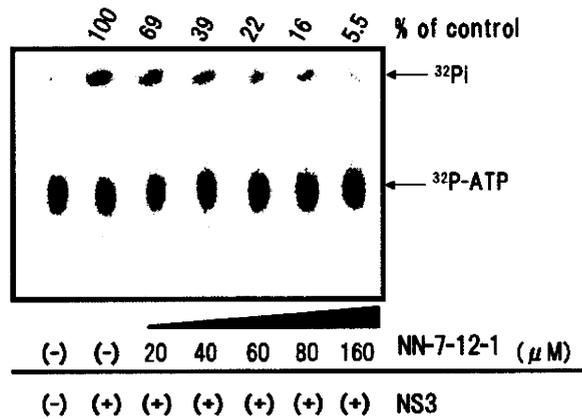
増殖抑制効果の濃度 (EC_{50})、および、50% 細胞増殖抑制

効果の濃度を求め (CC_{50})、Selectivity index (CC_{50}/EC_{50}) を計算した。



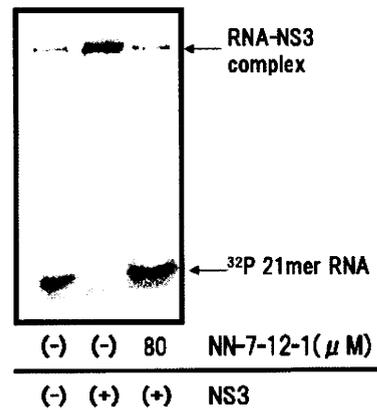
II-図5

沖縄産カイメン由来精製化合物
NN-7-12-1 の HCV NS3 ATPase 活
性の抑制能についての検討
リコンビナント NS3 タンパク、
Poly(U)RNA、³²P-ATP、NN-7-12-1
を混合し、37°C1 時間の条件で反応
後、薄層クロマトグラフィにて展開し
た。



II-図6

沖縄産カイメン由来精製化合物
NN-7-12-1 の HCV NS3 タンパク
RNA結合能に対する影響の検討
リコンビナントNS3 タンパク、³²P-21mer RNA、
海洋生物抽出物精製品を混合し、室温で 15
分間反応させた後、ポリアクリルアミド電気泳
動を行った。



薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

分担研究者：松本 武久 独立行政法人理化学研究所 上級研究員

研究要旨

HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に続く新たな C 型肝炎治療薬の標的分子を NS2/3 プロテアーゼとした阻害剤探索に必要な細胞ベースでの阻害剤スクリーニング系の構築を実施し、スクリーニング系に使用できる細胞を樹立した。

A. 研究目的

HCV タンパク質前駆体をプロセッシングする主たる酵素 NS3/4A プロテアーゼは、NS2/3 プロテアーゼがその N 端をポリペプチド鎖から切り離すことにより初めて活性化される。NS2/3 プロテアーゼは膜タンパク質であるため、一般に膜貫通ドメインを除いた不溶性のタンパク質を発現させた後、リフォールディングによって活性型に変化させるが、一過性に生じた活性は消失するため、阻害剤のアッセイには不向きである。近年、その立体構造が発表された (Nature, 442: 831-835, 2006) ことからインシリコによる薬剤設計の道が開かれた。本研究では NS2/3 プロテアーゼタンパク質発現細胞を阻害剤スクリーニングに使用して、これまでに滞っていた NS2/3 プロテアーゼ阻害剤探索研究を実施する。松本らは前年度まで、HCV 増殖を阻害する NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の発見に続いて、NS2/3 プロテアーゼタンパク質の立体構造情報に基づいて、コンピューター上でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物を探索するとともに、細胞ベースでの阻害剤スクリーニング系の構築を実施してきた。本研究では NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系を完成させ、阻害剤を探索・設計し、telaprevir に続く、新たな薬剤標的を狙う C 型肝炎治療薬のシーズとする。

B. 研究方法

HCV NS2 の膜貫通ドメインを N 端に有する全長 NS2/3 プロテアーゼタンパク質のフォールディングと酵素活性化を細胞内環境において実現させるように、レポーター遺伝子として GAL4 を上流にもつホタルルシフェラーゼタンパク質と、CMV プロモーターの下流に NS2/3 プロテアーゼ、NS3/4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラクトを作成し、その遺伝子を組み込んだ細胞に化合物を投与した後の光学的変化を測定することにより、インシリコスクリーニングで探索された活性候補低分子化合物のスクリーニングを実施する。第一段階の、阻害剤スクリーニングでヒットした化合物についてウイルスの細胞感染実験で活性の有無を確認して、発見候補化合物の周辺もインシリコスクリーニングで探索して、lead optimization の種探しを目指す。この工程を繰り返すことにより、さらに発見された恐らくはマイクロモル程度の活性をナノモルレベルになるように、lead generation を目指して、その周辺化合物を再度インシリコスクリーニングを行って探索する。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトならびに実験動物を研究の対象としない。

C. 研究結果

GAL4 を上流にもつレポーター遺伝子としてのホタルルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、CMV プロモーターの下流に NS2/3 プロテアーゼ、NS3/4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラクトを作成した。上記の両遺伝子を浮遊性培養細胞株 HeLa S3 に導入し、薬剤選択することで 20 クローンの薬剤耐性株を得た。これらのクローン細胞のルシフェラーゼ活性を測定したところ、クローン No. 2, 4, 6, 12 および 24 で非常に高いルシフェラーゼ活性を観測できた。さらに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤である VX-950 (telaprevir) 5 μ M 濃度 (一昼夜投与) に対するこれらのクローン細胞の感受性を測定した結果、クローン No. 4 および 6 のみにルシフェラーゼ活性の有意な低下を観測した。クローン No. 4 および 6 の細胞のルシフェラーゼ活性に対する VX-950 の濃度依存性阻害を測定したところ、クローン No. 6 細胞では 1.25 μ M を起点に 40 μ M までの間で濃度依存性の阻害が観測され、IC₅₀ 値は約 2.5 μ M であった。また VX-950 の細胞毒性は 10 μ M から観測され、40 μ M で 30% の増殖を阻害した。一方、クローン No. 4 細胞の VX-950 感受性は 5 μ M 以上で観測されたが、VX-950 の細胞毒性は 10 μ M から観測された。しかしながらクローン No. 4 細胞においては明瞭な濃度依存性の阻害効果を観測できなかった。

クローン No. 4 および 6 の細胞破碎液遠心上清を使用して、抗 HCV NS3 抗体で免疫沈降した産物を SDS-PAGE で展開したのち、別の抗 HCV NS3 抗体によるウェスタンブロッティングを実施した。70 kD 付近に NS3 と推測されるバンドを検出し、その量はクローン No. 4 細胞のほうが多かった。

D. 考察

少なくともクローン No. 6 の細胞のルシフェラーゼ活性は、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤である VX-950 に対して、濃度依存性に阻害されること、また NS2/3 プロテアーゼにより N 端の NS2 から切り離され、C 端の NS4A 以降のペプチドを自らのプロテアーゼ活性で切り離した NS3 が免疫沈降で検出された

ことから、クローン No. 6 の細胞内では NS2/3 プロテアーゼ、NS3/4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質のプロセッシングが正常に行われており、本細胞はわれわれが計画する NS2/3 プロテアーゼ阻害剤探索に使用できると考えられる。今後、VX-950 を投与した後のクローン No. 6 細胞内で融合タンパク質のプロセッシングが阻害されることを免疫沈降法で解析するとともに、クローン No. 6 細胞にルシフェラーゼ活性リファレンス用の遺伝子として、CMV プロモーターを上流に持つウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子を導入する。

クローン No. 6 以外で、クローン No. 4 細胞をはじめ、高いルシフェラーゼ活性を観測できたクローン細胞は、ルシフェラーゼ活性が過剰すぎる、すなわち NS2/3 プロテアーゼ、NS3/4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質の発現量が過剰であることから、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の効果が見えにくくなったと考えられる。

E. 結論

レポーター遺伝子として GAL4 を上流にもつホタルルシフェラーゼタンパク質と、CMV プロモーターの下流に NS2/3 プロテアーゼ、NS3/4A プロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けた VP-16/GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現する遺伝子を導入した HeLa S3 細胞株を樹立し、NS2/3 プロテアーゼ阻害剤探索に使用できることを確認した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

「誘導適合を考慮したバーチャルスクリーニングによる新規 HCV NS3-4A プロテアーゼ阻害剤の探索」高谷大輔、上條加寿恵、山下篤哉、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、榎本信幸、伊藤正彦、本間光貴、