

Hsp90 の分子間相互作用の解析および HCV RNA の翻訳過程での Hsp90 の分子メカニズムを詳細にする。

E. 結論

Hsp90 は HCV IERS を介して eIF3c と相互作用することで、HCV RNA の翻訳に影響を与えていることが明らかとなった。ここで得られた知見は HCV 翻訳を指標とした、スクリーニング系の開発とともに、新たな治療薬の開発が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. **J. Biol. Chem.** in press. 2011.
2. Sugiyama R, Hayafune M, Habu Y, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 RT-dependent DNAzyme expression inhibits HIV-1 replication without the emergence of escape viruses. **Nucleic Acids Res.** 39:589-598, 2011.
3. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. **Antivir. Chem. Chemother.** 20:161- 167, 2010.
4. Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H., Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of Hepatitis C

virus is influenced by association of apolipoprotein E isoforms. **J. Virol.** 84:12048-12057, 2010.

5. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H., Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. **Virology.** 407:152-159. 2010.
6. Abe M, Suzuki H, Nishitsuji H, Shida H, Takaku H. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. **FEBS Lett.** 584: 4313-4318, 2010.
7. Suzuki T, Chang MO, Kitajima M, Takaku H. Induction of antitumor immunity against mouse carcinoma by baculovirus-infected dendritic cells. **Cell. Mol. Immunol.** 7: 440-446, 2010.
8. Suzui T, Chang MO, Kitajima, M, Takaku H. Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses. **Cell. Immunol.** 262:35-43, 2010.

2. 学会発表

(国内学会)

1. 西部好美、鈴木 等、高久 洋 : バキュロウイルスによる肝硬変の改善. 第 20 回抗ウイルス療法研究会記念大会 ; p. 43、熊本 (2010 年 5 月)
2. 日紫喜 隆行、清水 裕子、杉山 和夫、舟見 健児、宇治野 真之、高久 洋、下遠野 邦忠 : C 型肝炎ウイルスの感染性におけるアポリポプロテイン E の役割. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 ; p. 196、徳島 (2010 年 11 月)

3. 君塚圭亮、鈴木 等、日紫喜隆行、下遠野邦忠、高久 洋：Hsp70knockdown による C 型肝炎ウイルス (HCV) ライフサイクルへの影響。第 58 回ウイルス学会学術集会；p. 350、徳島 (2010 年 11 月)
4. 鈴木 等、君塚 圭亮、日紫喜 隆行、下遠野 邦忠、高久 洋：C 型肝炎ウイルスによる肝星細胞線維化への TGF- β の関与。第 58 回日本ウイルス学会学術集会；p. 352、徳島 (2010 年 11 月)
5. 杉山 和夫、清水 裕子、日紫喜 隆行、舟見 健児、宇治野 真之、高久 洋、下遠野 邦忠：キメラ HCV (遺伝子型 1b/2a) 持続感染細胞の樹立。第 58 回日本ウイルス学会学術集会；p. 353、徳島 (2010 年 11 月)
6. 清水 裕子、日紫喜 隆行、杉山 和夫、舟見 健児、宇治野 真之、高久 洋、下遠野 邦忠：Hepatic triglyceride lipase is a novel host factor affecting HCV infectivity. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会；p. 359、徳島 (2010 年 11 月)
7. 杉山隆一、西辻裕紀、長沼晴樹、小関 寛、古川亜矢子、片平正人、羽生勇一郎、高久 洋：HSP70 は Vif による APOBEC3G のユビキチン化を阻害することで APOBEC3G の分解を抑制する；p. 455、第 58 回ウイルス学会学術集会、徳島 (2010 年 11 月)
8. 小関 寛、杉山隆一、西辻裕紀、古川亜矢子、片平正人、高久 洋：Hsp70 は APOBEC3G の HIV-1 粒子への取り込みを促進する；p. 220、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京 (2010 年 11 月)
9. 野口耕世、石橋 啓介、三代川かおり、帆苺 まなみ、菅野敬行、平野智哉、高久洋：HIV-1 複製と miRNA interference 効果。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸 (2010 年 12 月)

(国際学会)

1. Hiroshi Takaku, Saneyuki Ujino, Saori Yamaguchi, Kunitada Shimotohno : Combination Therapy for HCV with Hsp90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132, The 23rd International Conference on Antiviral Research, Late-Breaker # 7), San Francisco (2010.4)
2. Ryuichi Sugiyam, Hironori Nishitsuji, Yuichiro Habu, Haruki Naganuma, Hiroshi Koseki, Ayako Furukawa, Takashi Nagata, Masato Katahira, Hiroshi Takaku : Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of Apobec3G, The 5th German-Japanese HIV-Symposium; p.3, Tokyo (2010.5)
3. Hiroshi Takaku, Saneyuki Ujino, Saori Yamaguchi, Takayuki Hishiki, Kunitada Shimotohno : The role of Hsp90 in HCV IRES-mediated translation, The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses; p.252, Yokohama (2010. 10)
4. Kazuo Sugiyama, Yuko Shimizu, Takayuki Hishiki, Kenji Funami, Saneyuki Ujino, Hiroshi Takaku, Kunitada Shimotohno : Establishment of a cell line persistently infected with chimeric HCV of genotypes 1b and 2a, The 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses; p.172, Yokohama (2010. 10)

G.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許出願 なし
- 2.特許取得 なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御

分担研究者 堀田 博 神戸大学 大学院医学研究科

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）の非構造蛋白質 NS5A は多機能蛋白質であり、HCV RNA 複製複合体として機能するのみならず、様々な宿主蛋白質と結合して細胞機能を脱制御することが知られている。また、NS5A は SREBP-1c 遺伝子や IL-8 遺伝子等の宿主遺伝子の転写を脱制御することも知られている。このように多彩な宿主遺伝子の転写を脱制御するにあたって、共通のメカニズムが働いている可能性が考えられる。本研究では、NS5A と相互作用する宿主因子を探索し、遺伝子転写調節に広範な影響を与える可能性のあるものに着目して検討した。その結果、タンデムアフィニティー精製法と質量分析法により、NS5A 結合蛋白質として SMYD3 を同定した。SMYD3 はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し、ヌクレオソームの構造を変化させて転写因子の標的 DNA 配列への結合を促進させること、及び肝細胞癌、大腸癌、乳癌で過剰発現することが知られている。本研究において、免疫共沈法により、HCV RNA レプリコン複製細胞で NS5A が内在性 SMYD3 と結合すること、及び Proximity Ligation Assay 法を用いた免疫染色法により、NS5A が内在性 SMYD3 と共局在することを証明した。また、SMYD3 は原癌遺伝子として知られる WNT10B の発現を促進することが知られているが、SMYD3 と NS5A を共発現させると WNT10B の発現がさらに促進されることをルシフェラーゼレポーターアッセイにより明らかにした。これらの成績は、NS5A による多彩な遺伝子転写脱制御の分子機序を合理的に説明するとともに、NS5A による発癌分子機序の一端を示唆しているものと考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の非構造蛋白質 NS5A は多機能蛋白質である。NS5A は他の HCV 蛋白質と結合して HCV RNA 複製複合体として機能するのみならず、p53、Grb2、PI3K、Syk、hVAP-A、Bin1、ApoA1、ApoE、PKR、2-5OAS 等、様々な宿主蛋白質と結合して細胞機能を脱制御することが知られている。また、NS5A は核移行シグナルを有し、N 末端欠失により核に移行すること、及び、SREBP-1c 遺伝子や IL-8 遺伝子等の宿主遺伝子の転写を脱制御することが報告されている。我々も独自に、NS5A が HNF-1 α 遺伝子や糖輸送担体 GLUT2 遺伝子の転写を抑制したり、肝糖新生律速酵素 PEPCK や G6Pase 遺伝子の転写を亢進することを観察している。このように多彩な宿主遺伝

子の転写を脱制御するにあたって、共通のメカニズムが働いている可能性が考えられる。

本研究では、NS5A と相互作用する宿主因子のうち、遺伝子転写調節に広範な影響を与える可能性のあるものに焦点を当て、NS5A の転写調節機序を詳細に解析し、宿主細胞機能がどのような影響を受けるかについて検討した。

B. 研究方法

(1) タンデムアフィニティー精製法による NS5A 結合蛋白質の探索：pEF1/Myc-His A (Invitrogen) 発現ベクターを用いて Myc-His 融合 NS5A を Huh-7 細胞に発現させた。その細胞抽出液から、C-Myc tagged protein mild purification kit (MBL) を用いて Myc-His 融合 NS5A を回収した。さらに、Ni-NTA-agarose

(QIAGEN)を用いて Myc-His 融合 NS5A を精製回収した。このようにして得た精製画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、NS5A と結合した宿主蛋白質の有無について解析した。特異的バンドを切り出し、質量分析法で解析した。

(2) 細胞とウイルス：Huh-7.5 細胞及び Huh-7 細胞と HCV J6/JFH-1 株を用いた培養細胞感染実験系を用いた。

(3) HCV 蛋白質及び SMYD3 の発現並びに両者の結合の解析：HCV 蛋白質発現 Huh7 細胞、HCV RNA レプリコン複製細胞及び HCV 感染細胞に SMYD3 発現プラスミドを導入して SMYD3 させ、免疫共沈法を用いて NS5A と SMYD3 との結合の有無を調べた。また、内在性に発現する SMYD3 との結合の有無についても同様に免疫共沈法を用いて調べた。

(4) HCV 蛋白質及び SMYD3 の発現並びに両者の細胞内共局在の解析：NS5A と SMYD3 の細胞内共局在は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法及び Proximity Ligation Assay 法を用いた。(Duolink®II Fluorescence system)

(5) HCV 蛋白質及び SMYD3 の相互作用が WNT10B 発現に及ぼす影響の解析：WNT10B プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターを、NS5A 及び SMYD3 発現プラスミドとともに HEK293T 細胞にトランスフェクションし、1~3 日後に細胞を回収して、常法によりルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えウイルスの作製及び使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。組換え遺伝子を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) タンデムタグ付き NS5A 発現細胞と対照細胞を用いて、タンデムアフィニティー精製法と質量分析法により、NS5A 結合蛋白質 SMYD3 を同定した。(なお、NS5A との結合が既に報告されている BIN1 や VAP-A も同時に同定されていることから、この方法がうまく機能していると考えられた。)

(2) 免疫共沈法により、強制発現した NS5A と SMYD3 が結合することを証明した。さらに、HCV RNA レプリコン複製細胞において、HCV 複製により発現する NS5A と内在性 SMYD3 が結合することを証明した。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法及び Proximity Ligation Assay 法により、HCV RNA レプリコン複製細胞において、NS5A と内在性 SMYD3 が共局在することを証明した。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、SMYD3 と NS5A を共発現させると、原癌遺伝子として知られる WNT10B の発現が促進されることを明らかにした。

D. 考察

NS5A は多機能蛋白質であり、HCV RNA 複製複合体として機能するのみならず、様々な宿主蛋白質と結合して細胞機能を脱制御し、さらに、多彩な宿主遺伝子の転写を脱制御することが知られている。本研究では、NS5A と相互作用し遺伝子転写調節に広範な影響を与える可能性のある宿主因子として、SMYD3 を同定した。SMYD3 はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基を特異的にメチル化して、ヌクレオソームの構造を変化させ、転写因子の標的 DNA 配列への結合を促進させることが知られている。また、原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子などの発現を促進させること、及び、肝細胞癌、大腸癌、乳癌で過剰発現し、機能亢進していることが報告されている。本研究により、HCV RNA

レプリコン複製細胞において NS5A と内在性 SMYD3 が結合すること、及び、細胞内共局在を示すことがわかった。また、SMYD3 は原癌遺伝子として知られる WNT10B の発現を促進することが知られているが、SMYD3 と NS5A を共発現させると WNT10B の発現が促進されることが、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより明らかになった。これらの成績は、NS5A による多彩な遺伝子転写脱制御の分子機序を合理的に説明するとともに、NS5A による発癌分子機序の一端を示唆しているものと考えられ、今後さらに解析を進める必要があると考えられた。

E. 結論

NS5A 結合宿主蛋白質として SMYD3 を同定した。HCV RNA レプリコン複製細胞において、NS5A と内在性 SMYD3 の結合、及び、両者の細胞内共局在を証明した。また、SMYD3 と NS5A を共発現させると、原癌遺伝子として知られる WNT10B の発現が促進されることがわかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, (in press), 2011.
2. El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Ide Y-H, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence Heterogeneity of NS5A and Core Proteins of Hepatitis C Virus and Virological Responses to Pegylated-Interferon/Ribavirin Combination Therapy. *Microbiol Immunol*. (in press), 2011.

3. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684–690, 2010.
 4. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 82(8): 1364–1370, 2010.
 5. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010.
 6. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111(3): 676–685, 2010.
2. 学会発表
1. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated

- apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
2. Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
 3. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
 4. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
 5. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.
 6. Deng Lin, 兼田崇作, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博 糖代謝に及ぼすC型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析 日本ウイルス学会学術集会 2010. 徳島
 7. 勝二郁夫, Lin Deng, 堀田博 HCVによる糖代謝障害の分子機序 日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム 2010. 徳島
 8. 笹山美紀子, 勝二郁夫, Adianti Myrna, 井出良浩, 姜大鵬, Lin Deng, 堀田博. 慢性C型肝炎患者血清および非感染者血清を用いたC型肝炎ウイルス中和感受性決定部位の検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島
 9. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a及びHCV-2bのNS5A多様性は治療効果と相関する. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.
 10. El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2aおよび2bのNS5A多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
 11. Shoji I, Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitinligase mediates ubiquitin-dependent degradation of

peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会、2010. 神戸.

12. 岡田典子, 勝二郁夫, 甘翔, Lin Deng, 姜大鵬, 井出良浩, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aに結合するユビキチンリガーゼ

の同定. 第33回日本分子生物学会、2010. 神戸.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

持続的な HCV 複製による細胞機能変化の解析に関する研究

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）RNAの複製が長期に及んだ場合において、HCV-RNAがどのような遺伝子変化を起こし細胞機能にどのような修飾が及ぶかを明らかにすることを目的とした。従来のHCV研究に汎用されてきたヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なるヒト肝癌細胞株Li23を用いて開発した遺伝子型1bで0株由来の全長HCV-RNA複製細胞（OL, OL8, OL11 および OL14 の4種類）を2年間継代培養した。また、比較対照として使用するために、OL8とOL11細胞からそれぞれHCV-RNAを排除した治癒細胞（OL8cとOL11c）についても、並行して2年間継代培養した。細胞株樹立時と2年間継代培養後の細胞を用いてHCVの遺伝子解析や宿主遺伝子の発現変動解析（マイクロアレイ解析やRT-PCR解析）を行い、以下に示すような成果を得た。（1）2年間の継代培養によるHCVの遺伝子変動は、これまで解析したHuH-7由来の全長HCV-RNA複製細胞の場合と同程度に起こっていた（2）2年間のHCV-RNAの複製によりmRNAの発現レベルが不可逆的に亢進したと考えられる6種類の宿主遺伝子と逆に発現レベルが低下したと考えられる4種類の宿主遺伝子を同定した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化における重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する治療法もペグ化インターフェロン（IFN）とリバビリンとの併用療法により患者の半数強は治癒するようになっている。しかしながら、HCVの持続感染による発がん機構については、未だ解明されていない。それは、HCVが宿主において長期間複製増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるか

がよく分っていないためである。これまで、多くの研究者がHCVの複製増殖系を用いてこの問題にアプローチしてきたものの、HCVが複製増殖する培養細胞株はヒト肝癌由来のHuH-7細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換マウスも実験系として登場してはいるものの、高価な上に個体間でのバラツキもあり、詳しい解析を行う実験系には適していない。

2008年から2009年にかけて、我々は従来のHCV研究に汎用されてきたヒト肝癌細胞株HuH-7とは遺伝的背景も異なるヒト肝癌細胞株Li23を用いて遺伝子型1bで0株由来の全長HCV-RNA複製細胞株（OL, OL8, OL11 および OL14細胞）

を樹立した。OL 細胞はポリクローナルな細胞で他はクローン化した細胞である。

我々は、これら Li23 由来の全長 HCV-RNA 複製細胞を用いることにより、HuH-7 由来の細胞を用いたこれまでの研究結果の妥当性を検証できるばかりでなく、HuH-7 由来の細胞では得られなかった新たな知見が得られるのではないかと考え、本研究を開始した。本研究では、HCV-RNA の複製が長期に及んだ場合において、HCV-RNA がどのような遺伝子変化を起こし細胞機能にどのような修飾が及ぶかを明らかにすることを目的とした。今年度以下に示すような研究成果を得た。

B. 研究方法

(1) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析

樹立時の OL、OL8、OL11 および OL14 細胞とこれらの細胞を 2 年間継代培養した細胞 [OL(2Y)、OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y)] からそれぞれ Total RNA を調製した。Total RNA の調製はそれぞれ 70~80% confluent の状態になった時点で行った。得られた Total RNA を用いて、RT-PCR 法により 5' 末端から NS2 領域までの 5.1 kb と NS3~NS5B 領域までの 6 kb を増幅した。逆転写酵素は Primscript (Takara) を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase (HCV ゲノム全長を含む plasmid) を用いて PCR 増幅後、再度ベクターへのクローニングにより得た 5 クローンを解析してもまったく変異が入

っていないことを確認済み) を用いた。増幅した DNA 断片 (5.1 kb と 6 kb) を pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的に得られた 5~10 クローンの塩基配列の決定を行った。細胞の樹立時に得られた HCV クローンの塩基配列と 2 年間培養した後に得られた HCV クローンの塩基配列を比較して、HCV-RNA の変異速度や変異様式の解析を行った。

また、得られた塩基配列を最初に導入した original の HCV-RNA の塩基配列 (ON/C-5/QR, KE RNA) と相互に比較し、GENETYX-MAC プログラムを用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った

(2) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

前項で得た Total RNA [OL14 と OL14(2Y)を除く]を用いて、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 プローブ)による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

また、OL8 と OL11 細胞に IFN-gamma (1,000 IU/ml)を 4 日ごとに 6-7 回添加することにより HCV-RNA を排除した治療細胞 OL8c と OL11c を作成した。OL8c と OL11c 細胞を 2 年間継代培養して、OL8c(2Y)と OL11c(2Y)細胞を得た。これらの細胞についても、上述した cDNA マイクロアレイ解析を行った。

OL8(2Y)と OL11(2Y)細胞についても、IFN-gamma (1,000 IU/ml)を添加することにより治療細胞 OL8(2Y)c と OL11(2Y)c を作成した。

RT-PCR 解析は常法に従って行った。逆転写反応はオリゴ dT をプライマーとして MLV の逆転写酵素を用いた。PCR は DDBJ 遺伝子バンクに登録されている塩基配列から独自にアレンジして作成したプライマーセットと Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて行った。cDNA マイクロアレイ解析により推定された発現量に応じて、PCR のサイクル数 (22~30 サイクル) を予想して実施した。PCR 産物は、3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により確認した。予想位置における染色バンドの濃淡で発現量の定性的比較を行った。

(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に廃棄した。

C. 研究結果

(1) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析

OL, OL8, OL11 および OL14 細胞を 2 年間継代培養して得られた OL(2Y)、OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y) 細胞由来の HCV-RNA の塩基配列を OL(2Y) 細胞については 10 クローン、その他の細胞については、それぞれ 5 クローン決定して、樹立時の細胞から得られた

HCV-RNA の塩基配列や最初に細胞に導入した元の HCV-RNA の塩基配列と比較した。

4 系統の細胞から得られた HCV-RNA の変異速度は $4.2 \sim 5.3 \times 10^{-3}$ /塩基置換/ヌクレオチド/年という値が得られた。細胞樹立時における HCV-RNA の塩基配列と比較すると 2 年間の培養でどの HCV クローンにおいても約 1% 異なっていた。また、HCV-RNA の変異様式は U から C と A から G が最も高頻度であり、全体として HCV-RNA の GC 含量が増加していた。HCV の遺伝的多様性も 2 年間の培養で生じており、今回得られた HCV クローン間で比較すると 0.36~1.03% (平均約 0.7%) の範囲で異なっていた。

今回得られた HCV クローンの塩基配列をもとに Neighbor-joining 法による系統樹解析を行うと、最初に導入した元の塩基配列 (ON/C-5/QR, KE RNA) と異なることが明確に示され、OL, OL8, OL11 および OL14 細胞由来の HCV-RNA はそれぞれ変異の特徴を持った独自のクラスターを形成していることが分かった。この現象は、アミノ酸レベルでも観察され、HCV-RNA の変異が一方向にのみ進んでいないことが示された。

(2) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

HCV-RNA が 2 年間細胞内で複製した場合に細胞内の遺伝子発現プロファイルがどのような影響を受けるかを調べるために、OL, OL11 および OL14 系列の細胞由来の Total RNA を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行った。まず、OL vs.

OL(2Y)、OL8 vs. OL8(2Y)およびOL11 vs. OL11(2Y)の3セットで検討した。それぞれのセットにおいて発現シグナルが100以上でRT-PCR解析も十分可能なプローブを対象とし、発現レベルが亢進したプローブ上位200~300個を選択した。次に、これら選択したプローブから、OL、OL8およびOL11系列のセット間で共通して得られたプローブの絞り込みを行った。その結果、3セットとも発現量が亢進したプローブ10種類と2セットで発現量が亢進したプローブ67種類が得られた。これらのうち、読み取り枠(ORF)があり、遺伝子であると思われるプローブで3セットとも共通して亢進しているものが8種類、2セットで共通して亢進しているものが44種類得られた。

今回のスクリーニングにおける目的の遺伝子は、HCV-RNAの長期複製により発現量が変化するものであることから、細胞培養を2年間続けただけで発現量が亢進した遺伝子と区別する必要がある。その方策として、治癒細胞であるOL8cとOL11c細胞をOL8細胞とOL11細胞から作成して、別途2年間継代培養を行い、OL8c vs. OL8c(2Y)とOL11c vs. OL11c(2Y)の2セットでcDNAマイクロアレイ解析を行った。発現亢進した遺伝子として選択された計52種類の遺伝子の個々について、発現亢進がHCV-RNAの複製による効果ではなく、長期培養による効果であるかどうかを検討した。その結果、明らかに長期培養効果により発現が亢進したと判断された遺伝子は多く、これらについては、この段階で以後の検討からはずした。しかし

ながら、判断に困る遺伝子もあったため、それらについては、次のステップとして計画したRT-PCR解析により判断することとした。

発現量が低下した遺伝子の検討も同様に行った。この場合は、継代培養開始前の発現レベルを指標にしてプローブの選択を行った。継代培養開始前に発現量が100以上あり、次のステップのRT-PCR解析が行えるものの中から発現量の低下が大きい上位200~300個を選択した。

次に、これら選択したプローブから、OL、OL8およびOL11系列のセット間で共通して得られたプローブの絞り込みを行った。その結果、3セットとも発現量が低下したプローブ26種類と2セットで発現量が亢進したプローブ80種類が得られた。これらのうち、ORFがあり、遺伝子であると思われるプローブで3セットとも共通して低下しているものが22種類、2セットで共通して低下しているものが63種類得られた。

このステップで得られた計72種類の遺伝子について、発現が亢進した遺伝子の選択の際に使用したOL8c vs. OL8c(2Y)とOL11c vs. OL11c(2Y)のcDNAマイクロアレイの結果を用いて、発現レベルの低下がHCV-RNAの複製による効果ではなく、単に2年間細胞を継代培養した効果によるものであるかどうかを検討した。その結果、発現低下の場合も、明らかに長期培養効果により発現が低下したと判断された遺伝子が多く、これらについては、この段階で以後の検討から外した。しかしながら、判断に困る遺

伝子については次のステップの RT-PCR 解析により判断することとした。

以上の選択作業により、HCV-RNA が長期に複製したために発現量が亢進したと考えられる候補遺伝子 12 種類と発現量が低下したと考えられる候補遺伝子 9 種類を得た。

これらの遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法により次のステップとして詳細に解析した。cDNA マイクロアレイ解析結果の検証も必要であることから、cDNA マイクロアレイ解析に使用した Total RNA のサンプルの他に、OL8(2Y) と OL11(2Y)細胞を IFN-gamma 処理により作成した治癒細胞 OL8(2Y)c と OL11(2Y)c 由来の Total RNA および OL14 と OL14(2Y)細胞由来の Total RNA を調整し、RT-PCR 解析のサンプルとした。まず、それぞれの遺伝子 (mRNA) に特異的なプライマーセットを作成し、RT-PCR による増幅産物が明確な 1 バンドになる条件を検討した。この段階の PCR は定量的 PCR ではないので、できるだけマイクロアレイ解析の結果を確認することができるように PCR により増幅産物が増えて検出が可能になる位のサイクル数を設定して PCR を施行した。大部分の遺伝子の場合、25 サイクル前後が選択された。

発現量が亢進した遺伝子については、大部分マイクロアレイの解析結果を確認できた。しかし、解析した 12 種類の遺伝子の半数で、OL, OL8, OL11 および OL14 系列のどれかで、発現亢進が認められなかったり、OL8(2Y)と OL8(2Y)c 細胞間で発現レベルが異なっていた。後者

の場合は、HCV-RNA の複製による可逆的な変化であると考えられた。残りの 6 遺伝子 (ラボネームとして 23-1~23-6) については、ほぼ 4 系統の細胞において発現の亢進が認められ、HCV-RNA の複製による可逆的な変化によるものでもなかった。

発現量が低下した遺伝子についても、同様に解析した。この場合も、大部分マイクロアレイの解析結果を確認でき。しかし、解析した 9 種類の遺伝子の 5 種類では、目的としている遺伝子の発現レベルの変化とは異なる挙動を示した。残りの 4 遺伝子 (ラボネームとして 23-11~23-14) については、ほぼ 4 系統の細胞において発現の低下が認められ、HCV-RNA の複製による可逆的な変化によるものでもなかった。

以上の結果、HCV-RNA が長期間複製を続けたことにより不可逆的に発現が亢進する遺伝子として 6 種類、発現が低下する遺伝子として 4 種類を選択同定することができた。

D. 考察

(1) HCV-RNA の長期複製による HCV の遺伝的変動解析

本研究においては、HuH-7 細胞株とは異なる Li23 細胞株を用いて開発した全長 HCV-RNA 複製細胞を 2 年間継代培養して HCV の遺伝的変動を解析した。既に、HuH-7 細胞株由来の細胞については同様の解析を済ませて報告している。HCV-RNA の複製レベルがほぼ同じ場合、細胞株が違えば HCV の変異速度や変異動態が異なるかどうかを本研究で知る

ことができた。変異速度については、これまで HuH-7 細胞株由来の細胞での解析で得られていた $3.5 \sim 4.8 \times 10^{-3}$ /塩基置換/ヌクレオチド/年より少し高い値が得られたが、個々の HCV クローンについて、元の塩基配列との差異については、HuH-7 細胞株の場合とほど同程度であった。

また、変異様式としても U から C と A から G が最も高頻度で、結果的にも HuH-7 細胞由来の細胞を用いて解析した結果と同じような結果が得られた。今回の解析では樹立時と 2 年経過後の 2 点であったが、HuH-7 由来の細胞においては、GC 含量の継時的変化が認められたことから Li23 由来の細胞においても継時的に GC 含量が高まっているものと思われる。このような現象が HCV-RNA の複製機構のどのような因子により起こっているのかは不明である。さらに継代を続けた場合にいずれ GC 含量の増加が頭打ちになるのか、あるいは、HCV-RNA の複製がある時点で停止してしまうのかも興味深い点である。

HCV の遺伝的多様性の蓄積についても今回検討した。解析した HCV クローン間では、最も似ているものでも、0.36% 異なり、最も異なるものでは 1.03% の違いがあった。HuH-7 由来の細胞系での同様の解析では、0.64% から 1.05% の違いが認められていたので、ほぼ同程度の遺伝的多様性が Li23 由来の細胞系においても生じていることが分かった。

HuH-7 由来の細胞では、多くの既知の適応変異 (HuH-7 由来の細胞を用いた実験で同定された) が継代とともに出現し

てくる傾向にあった。しかしながら、Li23 由来の細胞系においては、NS5B 領域に唯一 Q2933R が出現したのみで、これまで知られている適応変異の出現は認められなかった。Li23 由来の細胞における適応変異の種類は HuH-7 由来のものとは異なる可能性がある。

今回の系統樹解析では、OL, OL8, OL11 および OL14 細胞系列における HCV クローンがそれぞれクラスターを形成して独自の方向で遺伝的多様性を獲得していく様子が分かった。そこで、HuH-7 由来の細胞系列 (0, OA, OB, OD および OE の 5 種類) を 2 年間継代培養して得られた同じく HCV-0 株由来の HCV クローンを加えて系統樹解析を行った。その結果、元の HCV 配列 (HCV-0 株) を起点として、それぞれの細胞系列が独自のクラスターを形成している系統樹が出来上がり、細胞系列間でキメラ状になるようなクラスター形成は認められなかった。また、Li23 細胞系列と HuH-7 細胞系列が二つに分離したような系統樹にはならず、Li23 や HuH-7 の区別なく、それぞれの細胞系列が独自の位置を占めているような系統樹になった。本研究の結果から、HuH-7 と Li23 と起源の異なる細胞株ではあるが、HCV-RNA の複製による遺伝的多様性の獲得は同程度にそして独自の方向で起こっていることが示唆された。

(2) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

本研究では、全長 HCV-RNA が効率よく複製している 4 種類の Li23 由来の細胞系列を使用して、cDNA マイクロアレイ

解析と RT-PCR 解析を組み合わせることにより、HCV-RNA が長期間複製増殖することにより不可逆的に発現レベルが変化する宿主遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、発現レベルが亢進した 6 遺伝子と低下した 4 遺伝子を同定した。

発現が亢進した遺伝子群として cDNA マイクロアレイ解析では有望であった Claudin 4 は OL8 と OL11 細胞の系列では 4 倍以上の発現亢進を認めた。しかし、OL と OL14 細胞系列では発現の亢進が認められなかったため、この段階で脱落となった。しかしながら、OL8 と OL11 細胞においては不可逆的な発現レベルの変化を示したので、HCV-RNA の複製による影響ではないと言い切ることはできない。このような範疇に入る遺伝子として、Cathepsin E, Prothymosin alpha, Tumor necrosis factor receptor などがあった。

同様に OL8 や OL11 細胞系列では発現が低下したが他の細胞系列ではそのような現象が認められなかった遺伝子として、Apolipoprotein L1, melanoma antigen family C2, Anterior gradient homolog 2 などがあった。

これらの遺伝子についての検討は今後行わないが、本年度選択同定した遺伝子を解析する過程でふたたび検討する可能性はある。

今年度、発現が亢進した遺伝子として得られた 6 遺伝子と、発現が低下した遺伝子として得られた 4 遺伝子については、次年度、データマイニング解析とともにヒト不死化肝細胞での発現レベル

を調べ、実施可能であれば遺伝子の過剰発現実験や遺伝子の発現抑制実験により、これらの遺伝子の機能解析を行う予定である。

また、今回の cDNA マイクロアレイ解析では、比較において上位 200-300 個のプローブを対象にして検討した。しかしながら、中程度の発現を示す遺伝子群については目的遺伝子を取りこぼしている可能性もある。そこで、改めて、個々の比較解析において上位 500 個ほどのプローブに範囲を拡げてさらに検討を加える予定である。

E. 結論

今年度、以下に示した 2 項目の成果を得た (1) 2 年間の継代培養による HCV の遺伝子変動は、これまで解析した HuH-7 細胞由来の全長 HCV RNA 複製細胞の場合と同程度に起こっていた。

(2) 2 年間の HCV-RNA の複製により mRNA の発現レベルが不可逆的に亢進したと考えられる 6 種類の宿主遺伝子と逆に発現レベルが低下したと考えられる 4 種類の宿主遺伝子を選択同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res.* in press

- (2011).
- 2) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. *Liver Int.* in press (2011).
 - 3) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* 6(1):e14517 (2011).
 - 4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatol. Res.* 40:1248-1253 (2010).
 - 5) Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, and Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction. *PLoS One* 5(12):e14258 (2010).
 - 6) Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91:2080-2090 (2010).
 - 7) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351-357 (2010).
 - 8) Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6(1): e15967 (2011).
 - 9) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro. *Liver Int.* 30:1324-1331 (2010).
 - 10) Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa,

Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. Arch. Virol. 155:601-605 (2010).

11) Nozaki A, Numata K, Morimoto M, Kondo M, Sugimori K, Morita S, Miyajima E, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Tanaka K. Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. Antiviral Therapy 15:1179-1183 (2010).

12) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. World J. Gastroenterol. 16:184-192 (2010).

13) Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. J. Biosci. Bioeng, 110, 374-376 (2010).

2. 学会発表

1) Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using

HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.

2) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.

3) Ariumi Y, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September, 2010.

4) Shinohara Y, Fujita K, Nozaki Y, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Hepatitis C virus infection changes the lipoprotein profiles in the replicon system. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September, 2010.

5) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The PML tumor suppressor protein is required for HCV life cycle. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、平

成 2 2 年 9 月.

- 6) 田中 寅彦、黒田 和道、榎島 誠、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルス NS 4 B と lipid droplet の相互作用. 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、平成 2 2 年 1 1 月.
- 7) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. がん抑制因子 PML は HCV のライフサイクルに必須である. 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、平成 2 2 年 1 1 月.
- 8) 有海 康雄、土方 誠、黒木 美沙緒、齊 月、池田 正徳、脇田 隆字、下遠野 邦忠、加藤 宣之. 癌抑制因子 HCV のクロストーク. 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、平成 2 2 年 1 1 月.
- 9) 田中 寅彦、黒田 和道、榎島 誠、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルス非構造タンパク質 4 B における lipid droplet との相互作用部位の同定. BMB2010. 第 3 3 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 2 2 年 1 2 月.
- 10) 池田 正徳、森 京子、武田 緑、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. IL28B 領域の SNP が異なる肝細胞株 (HuH-7、Li23) における抗 HCV 剤の感受性. BMB2010. 第 3 3 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 2 2 年 1 2 月.

なし

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究
分担研究報告書

持続的な HCV 感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析

研究分担者 小原 恭子 熊本大学 特任教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)の持続発現に伴う宿主因子の修飾機序をあきらかにする事により、その病原性発現のメカニズムを探る事を目的に研究を進行している。これまでに、HCV 持続発現細胞を認識する単クローン抗体の中で DHCR24 や Ku70, TOM70 といった宿主因子を認識するものを樹立しており、HCV 陽性肝癌患者組織での発現を検索すると DHCR24 は高頻度に発現上昇しており(5/5)、Ku70 は比較的高頻度に非癌部組織での発現低下が見られ(4/5)、TOM70 は一定頻度での癌部組織での発現上昇が見られた(3/5)。さらに、HCV 感染が DHCR24 発現を亢進し、p53 アセチル化低下や MDM2 との細胞質相互作用亢進を介して活性を抑制する事を見いだしている。また、HCV のコア蛋白質が正常肝臓細胞で Ku70 の分解を亢進し、DNA-PK 活性を低下させて DNA 修復能を抑制している可能性もあきらかにした。また、HCV が TOM70 の発現を誘導する事、アポトーシス制御にも関与する事が明らかになりつつある。現在さらに詳細な分子機構の解明を進めている。

A. 研究目的

分担研究者らは、C型肝炎ウイルス（HCV）が持続的に発現する事による腫瘍原性亢進を先に見いだしている(*J. Biol. Chem.* 279 (15), 14531-14541, 2004)。この分子機序を解明するため、HCV 持続発現細胞に対する単クローン抗体を多数樹立し、肝癌患者組織と反応するものを得て HCV 病原性発現との関連を解析してきた。これまでに HCV 感染が DHCR24 分子の発現を誘導し酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制する事、p53 活性を低下させる事を見いだしている。

今年度は HCV による Ku70 の修飾とウイルス病原性との関連を中心に解析を進めた。同時に TOM70 と HCV との関連についての研究にも着手した。

B. 研究方法

(1) 単クローン抗体の樹立：

HCV の持続発現により発揮される腫瘍原性亢

進機序を解明するため HCV 発現継代細胞をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。本細胞では全長の HCV ゲノム RNA (1 b 型) をリボザイム (Rz) で正確切り出す事ができ、また Cre/loxP 制御下で任意の時期に発現開始可能である。樹立した単クローン抗体は 1,000 種以上であり、この中で HCV 発現継代細胞や HCV 陽性肝癌患者組織で発現が亢進する分子を認識するクローンを得た。

(2) 発現解析・細胞培養：

HCV 遺伝子の発現は、RT-PCR、ウェスタンブロット (WB) 法、コア ELISA (オーソ社) 法で解析を行った。

宿主因子の解析は WB 法、RTD-PCR 法で行った。蛋白質の発現レベルは LAS1000UVmini (FUJI) で定量した。

HepG2 細胞、WRL68 細胞は American Type Culture Collection から購入し HepG2 細胞は 10% 牛胎児血清添加 Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM)で WRL68 細胞は DMEM に 1mM sodium pyruvate, 0.1mM nonessential amino acids (GIBCO-BRL) を添加して培養した。

(3) DNA-PK assay

DNA-PK assay は DNA-PK を免疫沈降後、SignaTECT DNA dependent protein kinase assay system (Promega) を用いて行った。免疫沈降には細胞を NP-40 バッファー (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH7.8, 1mM EDTA) で可溶化して行った。DNA-PK assay は反応バッファー (50 mM Tris pH 7.4, 5mM MnCl₂, 5mM DTT, 5mM NaF, 40 mM MgCl₂, 1mM Na₃VO₄, 4 mM ATP, 50 mg/ml salmon sperm DNA) と [γ -³²P]ATP 10 mCi を用いて行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H18 年 6 月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1) に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た (H18 年 4 月)。

C. 研究結果

(1) HCV 発現細胞認識クローンの樹立とその反応性

HCV 持続発現細胞を認識する単クローン抗体の中で DHCR24 や Ku70, TOM70 といった宿主因子を認識するものを樹立しており、HCV 陽性肝癌患者組織での発現を検索すると DHCR24 は高頻度に発現上昇しており (5/5)、Ku70 は比較的高頻度に非癌部組織での発現低下が見られ (4/5)、TOM70 は一定頻度での癌部組織での発現上昇が見られた (3/5)。

(2) HCV による Ku70 の発現修飾

正常の肝臓細胞に近い形質を持つ肝臓胎児

由来細胞 WRL68 に HCV の各種発現ベクターを用いて解析したところ、HCV 全長遺伝子と同様にコア蛋白質を含む発現ベクターは Ku70 蛋白質の発現レベルを低下させる事が明らかとなった。また、Ku70 の mRNA ではなく蛋白質のレベルをコア蛋白質が低下させる事も判明した。さらに、コア蛋白質は Ku70 のユビキチン化を促進する事も明らかとなった。

(3) HCV による DNA-PK 活性の修飾

HCV 全長遺伝子を発現させ、DNA-PK 活性を測定すると有意な活性低下が観察された。同時にこの細胞では Ku70 の発現レベルが低下している事も確認できた。

D. 考察

Ku70 は Ku80, DNA-PKcs と複合体を形成し、ゲノム DNA の損傷を修復する。本研究結果から、正常肝臓細胞に近い WRL 細胞では、HCV コア蛋白質が Ku70 を分解し、DNA 修復に重要な DNA-PK 活性を低下させる事が明らかとなった。この事により、HCV のコア蛋白質は正常肝臓細胞では遺伝子損傷の修復活性を抑制する事を通じ癌の発生などを誘導しやすくしている可能性が考えられた。また、癌部、非癌部における Ku70 の分解機構が異なる可能性もあり、今後の検討が必要である。

E. 結論

今年度の研究から HCV のコア蛋白質が Ku70 の分解を促進し、DNA 修復活性を抑制している可能性が明らかとなった。

次年度以降は、HCV が誘導する事を見いだしている TOM70 とそれによるアポトーシス制御やインターフェロン産生系への修飾を中心に解析を行う。

また、既に HCV による修飾機構が明らかとなってきた DHCR24 と HCV 病原性発現との関連についてもさらに詳細な解析を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takano T., Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Translocase

- of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J Med Virol.* accepted.
- 2) Takano T, Tsukiyama-Kohara T, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology*, in press.
 - 3) Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116(23): 4926-4933, 2010.
 - 4) Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem NE, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp. Immunol. Immunopathol.* 33 E81-88, 2010.
 - 5) Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84 303-311, 2010.
2. 学会発表
- 1) Salem NE, K. Tanaka, T. Nishimura, M. Saito, M Kohara, S Harada, A El-Gohary, and K. Tsukiyama-Kohara. Application of DHCR24 for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
 - 2) Nishimura, T., M.Kohara, Y. Kasama, Y. Hirata, T. Takano, Y. Tokunaga, M. Satoh, M. Saito, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysterol delta24-reductase. The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
 - 3) Tsukiyama-Kohara, K., and M. Kohara. Hepatitis C virus impairs p53 activity by persistent over-expression of DHCR24. Cell Symposia, Inflammation in Disease Conference, Lisbon 2010.
 - 4) Sekiguchi, S., K. Kimura, K. Tsukiyama-Kohara, and M. Kohara. Immunotherapy using recombinant vaccinia virus cures chronic hepatitis. Cell Symposia, Inflammation in Disease Conference, Lisbon 2010.
 - 5) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子DHCR24の転写制御 第47回日本ウイルス学会九州支部総会 宮崎 2010.
 - 6) Kasama, Y., S. Sekiguchi, M. Saito, M. Satoh, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, M. Takeya, Y. Hiasa, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010.
 - 7) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス複製におけるBetaine/GABA transporter-1 (BGT-1)の役割 日本ウイルス学会 徳島2010.
 - 8) 笠間由里、関口敏、齊藤誠、佐藤正明、桑原一彦、阪口薫雄、竹屋元裕、小原道法、小原恭子 マウスモデルを用いたC型肝炎ウイルス誘発性Bリンパ腫発生機序の解析 日本ウイルス学会 徳島 2010.
 - 9) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる