

腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御
BMB2010 神戸 2010.

10) 笠間由里、関口敏、齊藤誠、佐藤正明、桑原一彦、竹屋元裕、阪口薫雄、小原道法、小原恭子 全長 HCV の B 細胞発現による B リンパ腫誘導 BMB2010 神戸 2010.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

「RRM2 のアンタゴニストを有効成分として含有する C 型肝炎治療剤」特願 2010-180981 出願日 平成 22 年 8 月 12 日 発明者 小原道法、

小原恭子、佐藤正明、須藤正幸 出願人 国立大学法人熊本大学、財団法人東京都医学研究機構、中外製薬株式会社

2. 実用新案登録
なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

遺伝子型1b型の感染性HCVの樹立とその応用

分担研究者 杉山 和夫 慶應義塾大学医学部

研究要旨

レプリコンライブラリー法によって少なくとも4種類の新たな1b型HCVサブゲノムレプリコン複製細胞を樹立することができた。そのうちの2細胞に1b型HCV構造領域（コア蛋白質からNS2）をトランスフェクションすることによって、サブゲノムレプリコンをトランスパッケージし感染性ウイルスを作成することができた。今後、これらの構造領域と非構造領域を組みあわせることで1b型全長HCVゲノムの作製を試みる予定である。

A. 研究目的

2005年、劇症肝炎患者から単離した遺伝子型2aの全長HCV株（JFH-1）が培養肝癌細胞に感染し、さらに感染性ウイルス粒子を産生させることが示された。このことによりHCVの感染サイクルの全体像が明らかになり、HCVに関するウイルス学的研究が飛躍的に発展した。

しかし、HCVには多様な遺伝子型が存在し、JFH-1株によって得られた研究結果が全てのHCVに共通する普遍的なものなのか、あるいはJFH-1固有のものなのかわかっていない。特に、日本で最も頻度の高いHCV遺伝子型は1b型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。また、約半数が治療抵抗性であり、遺伝子型1b型HCVのウイルス学的解明を進める必要がある。これまで1b型HCVに関していくつかのサブゲノムレプリコンの報告はされているが、感染効率の高い全長株の樹立は少ない。その原因として、これまで樹立されたサブゲノムレプリコンは、複製は可能であるが、効率の良いウイルス粒子への組み込みには適応していなかった可能性が考えられる。

そこで本研究では、まず、1b型感染性HCV株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能を広げるために、患者血清における

HCVゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する1b型サブゲノムレプリコン複製細胞の樹立を試みた。さらに、これらのレプリコン複製細胞へHCV構造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされるか確認した。

B. 研究方法

(1) 遺伝子型1b型HCV患者血清由来のRNAをもとにlong distance RT-PCR法によって、複製に必要なHCVゲノムの非構造領域（NS3からNS5B）を増幅した。そのPCR産物をレプリコンカセットベクターに挿入し大腸菌をトランスフォームした。大量培養後プラスミドを抽出し、サブゲノムレプリコンプラスミドライブラリーを得た。

(2) 次に、得られたライブラリープラスミドを鋳型として、インビトロ転写反応によってRNAを合成した（サブゲノムレプリコンRNAライブラリー）。

(3) 合成したライブラリーRNAを培養肝細胞（Huh7またはOc細胞）へトランスフェクションし、ネオマイシン耐性細胞コロニーを形成された。さらに得られた細胞コロニーを単離、増殖させた。

レプリコン複製の確認はlong distance

RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法、PCR 産物クローニングによる塩基配列の決定によって行った。

(4) 最後に遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域 (コア蛋白質から NS2) を上記で樹立したレプリコン複製細胞へトランスフェクションし、構造領域蛋白質のトランスパッケージにより HCV レプリコン含有感染性ウイルスが形成されるか確認した。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

(1) サブゲノムレプリコンライブラリーの作製

60 症例の 1b 型 HCV 患者血清から抽出した RNA を用いて HCV の非構造領域 (NS3 から NS5B) に対する long distance RT-PCR を行った。その結果、32 症例で PCR 増幅が認められた。特に増幅の良かった 9 症例の PCR 産物を用いてサブゲノムレプリコンライブラリーを作製した。1 症例あたりのプラスミドライブラリーの複雑性 (complexity) は計算上 1,600 から 10,000 であり、患者血清における HCV ゲノムの多様性を充分反映していると考えられた。

(2) ネオマイシン耐性細胞クローンの作製

次いで、サブゲノムレプリコンライブラリープラスミドを制限酵素 *Xba*I で消化し直線化し、これを鋳型として、インビトロ転写法によりレプリコン RNA ライブラリーを合成した。そのライブラリー RNA を、それぞれ培養肝細胞へトランスフェクションし、ネオマイシン存在下で 3 週間培養した。その結果、5 サンプルのレプリコン RNA ライブラリーからネオマイシン耐性細胞コロニーが得られた。最終的に 21 個のネオマイシン耐性細胞クローンを得ることができた。

(3) サブゲノムレプリコン複製の確認

それぞれのライブラリーにつき最低 1 クローンのネオマイシン耐性細胞に対して、実際にサブゲノムレプリコンが複製しているかどうか確認を行った。

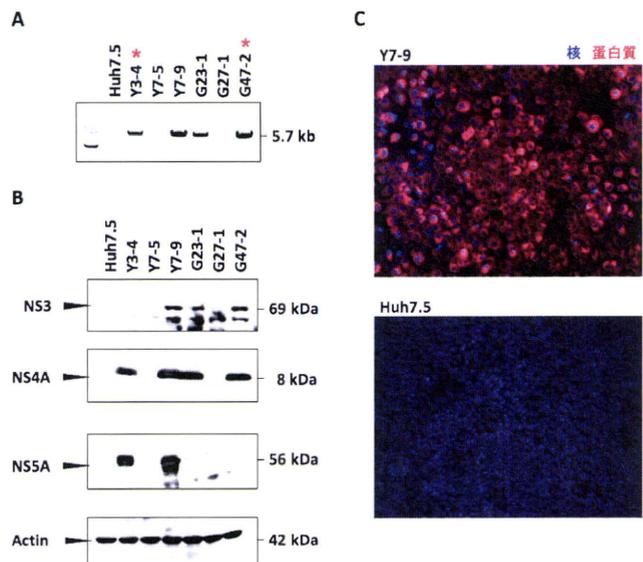


図 1. レプリコン複製細胞における HCV レプリコン RNA 複製と HCV 蛋白質発現の確認

まず、HCV 非構造領域に対して long distance RT-PCR 法を施行した。その結果、4 クローン (Y3-4、Y7-9、G23-1、G47-2) において予想通りのサイズ (5.7 kb) が増幅され、HCV サブゲノムレプリコン RNA が実際に複製していることが確認された (図 1A)。

次に、サブゲノムレプリコンの複製を蛋白質レベルで確認するために、ネオマイシン耐性細胞における各種 HCV 蛋白質 (NS3、NS4A、NS5A) 発現の確認を行ったところ (図 1B)、少なくとも NS4A 蛋白質は HCV RNA 複製が認められたすべての細胞で発現しており、レプリコン複製ともない HCV 蛋白質が発現していると考えられた。以上から、少なくとも 4 クローンがレプリコン複製細胞であることが確認された。

また、これらの HCV 蛋白質の実際のレプリコン複製細胞における細胞内発現を確認するため

に、ウェスタンブロットティングにおいて HCV 蛋白質発現が著明であった細胞クローン Y7-9 を用い、HCV 蛋白質に対する蛍光免疫染色を行った。図 1C に示すように、HCV 蛋白質がほぼすべての細胞の細胞質内において認められ、レプリコン複製細胞におけるレプリコン複製が細胞レベルでも確認された。

(4) 得られたサブゲノムレプリコン塩基配列の新規性の確認

上記の結果からレプリコン複製が確認されたレプリコン複製細胞クローンのうち 2 つの細胞クローン (Y3-4 および G47-2) から、HCV の非構造領域(NS3 から NS5B) を増幅し、それぞれ 1 クローン(Y3-4-1、G47-2-13)の cDNA 塩基配列の決定を行った。これらの配列とこれまでに報告された HCV 塩基配列との相同性はそれぞれ最高で 94%、93%であり、新規の 1b 型配列であることが確認された。

(5) 構造領域蛋白質による HCV レプリコンのトランスパッケージ

遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域(コア蛋白質から NS2) を上記で樹立した 4 種類のレプリコン複製細胞へトランスフェクションし、その培養上清を Naive な培養肝細胞へ接種した。2 種類のレプリコン複製細胞由来の培養上清を接種したところ 2 日後に HCV 蛋白質の発現が認められた(図 2)。また、接種後ネオマイシン存在下で約 3 週間培養したところ同様の培養細胞上清から、実際にネオマイシン耐性細胞コロニーの形成(それぞれ 2、11 コロニー)が認められた。以上より、構造領域蛋白質のトランスパッケージにより HCV レプリコン含有感染性ウイルスが産生されることを確認した。

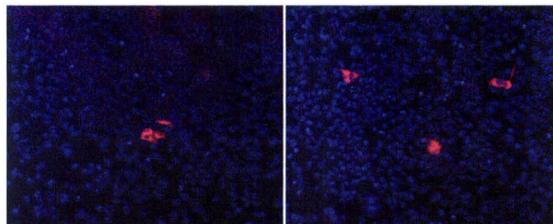


図 2. 1b 型構造領域蛋白質のトランスパッケージにより、レプリコン複製細胞から産生されたウイルスの naïve な肝細胞への感染(1-2 細胞/5 視野)。

D. 考察

最近、遺伝子型 2a 以外の遺伝子型を有する HCV 感染株の報告はあるが、遺伝子型 1b 型の感染株の感染性、複製能は必ずしも高くない。また、遺伝子型 2a であっても JFH-1 以外は必ずしも感染効率の良い感染株とはならない。一方、日本で最も頻度の高い HCV 遺伝子型は 1b 型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。したがって遺伝子型 1b 型 HCV のウイルス学的解明を進めるために感染効率の高い HCV 感染株の樹立は必須である。

我々はこれまで数種類の遺伝子型 1b のレプリコンを樹立し報告してきたが、これを利用して全長ゲノムの感染性 HCV 株の樹立には至らなかった。その考えられる原因の 1 つとして、レプリコンは培養肝細胞での複製には適応しているものの、感染性ウイルス粒子への組み立てには必ずしも適応していなかった可能性がある。ウイルス組み立てに必要な要素は JFH-1 株を用いた研究により次第に明らかになりつつあるが、遺伝子型 1b にそのまま当てはまるとは限らない。そこで本研究では、まず、1b 型感染性 HCV 株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能を広げるために、患者血清における HCV ゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブ

ラリー法によって多様な遺伝子配列を有する 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。さらに、これらのレプリコン複製細胞のうち 2 種類の細胞へ 1b 型 HCV 構造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされることを確認した。

今後、トランスパッケージにより産生されたレプリコン含有ウイルスが感染した培養肝細胞における非構造領域の遺伝子配列を解析し、ウイルス組み立てに必要な適応変異を解析する必要がある。また、その結果をもとに構造領域蛋白と非構造領域蛋白との相互作用の解析をすすめる。さらに、この非構造領域とトランスパッケージに使用した構造領域をつなぐことで感染性の 1b 型全長 HCV の作製をこころみる。また、その感染効率を上げるために、より感染効率の高い構造領域を作製する予定である。

E. 結論

レプリコンライブラリー法によって少なくとも 4 種類の新たな 1b 型 HCV サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立することができた。そのうちの 2 細胞に 1b 型 HCV 構造領域（コア蛋白

質から NS2) をトランスフェクションすることによって、サブゲノムレプリコンをトランスパッケージし感染性ウイルスを作成することができた。今後、これらの構造領域と非構造領域を組みあわせることで 1b 型全長 HCV ゲノムの作製を試みる予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Hishiki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., Wakita, T., Baumert, T.F., Miyanari, Y., Shimotohno, K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J. Virol.* 84: 12048-12057, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 ない。

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

マイクロ RNA 発現解析から見たインターフェロン応答

分担研究者 村上善基 京都大学・ゲノム医学センター 産学官連携准教授

研究要旨:C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。日本人に多い遺伝子型1b感染で高ウイルス量による慢性C型肝炎はインターフェロン治療効果が低い。治療前の慢性C型肝炎患者肝組織中の(1)マイクロRNA発現(2)インターフェロン関連遺伝子発現解析よりHCV感染によるインターフェロン関連遺伝子発現制御を解析し、生体のウイルス排除メカニズムを明らかにし患者情報に応じた包括的、体系的な慢性肝炎新規治療への基盤を構築する。またHCVを標的とするマイクロRNAを用いてインターフェロン治療耐性例への新規治療方法を確立する。

A. 研究目的

我が国のHCV感染者は全人口の約1.6%と推定されており、HCVは感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する事が知られている。現在C型慢性肝炎治療はpegインターフェロン α とリバビリン併用療法標準治療となっているが、本邦に多いgenotype 1bの高ウイルス量患者では奏効率が55%程度である事、副作用が強く治療中断例が少なくない事が問題となっている。さらに本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約3.4万人に上り感染対策は急務である。このためHCVの感染防止、慢性C型肝炎の制御は保険、医療の向上に直結し、医療費の削減をもたらす。しかし現状では満足のいくHCV感染者に対する治療結果が得られていない。この原因とし

てウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。そのために慢性肝炎において病態の進展を規定する、または薬剤応答を規定する宿主、ウイルス側因子それぞれを明らかにし、有効な治療方法の確立が必要である。マイクロRNAの発現異常と疾患について様々な報告があり、とくにウイルス感染、発癌との関連が注目されている。我々はマイクロRNAチップを利用し、C型慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、各疾患特異的なマイクロRNA発現プロファイルを得た。これらのデータを基盤として、本研究ではHCV感染制御の研究を3つの観点から行なう。(1)慢性C型肝炎の薬剤応答に関与するマイクロRNAを同定し、治療効果予測アルゴリズムの作成する事、(2)慢性C型肝炎の薬剤応答に関係するインターフェ

ロン関連遺伝子を同定し、治療効果予測アルゴリズムを作成する事、(3)HCVを標的とするマイクロRNAを同定し、RNA干渉を用いた新たな抗ウイルス治療方法の開発。

B. 研究方法

C型肝炎患者肝組織におけるマイクロRNA発現解析

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織99例よりからマイクロRNA発現プロファイルを治療効果別に作成した。

C型慢性肝炎患者肝組織におけるインターフェロン関連遺伝子発現解析

上記と同じサンプルを用いインターフェロン関連遺伝子237の解析をマイクロアレイにて行ない解析した。

末梢血由来 genomic DNA を用いた IL28B の遺伝子多系解析

上記と同じ患者の genomic DNA を用い IL28B の遺伝子多系を解析した。

マイクロRNAによるHCV複製コントロール解析

マイクロRNAの標的遺伝子検索アルゴリズムを用い、HCVレプリコン(OR6: genotype 1b型レプリコン、1βR:インターフェロンα/βレセプターを変異させた genotype 1b型レプリコン)それぞれを標的とするマイクロRNAを同定した。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成18年、G-188「肝発癌に關与しているmiRNAをコードしている領域のSNP解析」承認]、平成19年、G-219「miRNA発現プロファイルを利用したC型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換えDNA実験計画平成19年、070102「マイクロを用いたHCV複製制御の試み」について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成19-23)。

この中で肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報などを適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施している。

C. 結果

マイクロRNAによるC型肝炎治療効果予測

治療効果別のマイクロRNA発現プロファイ

ルを作成し治療効果と相関して発現するマイクロRNAを同定した。またin silico解析にてマイクロRNAが標的とする遺伝子候補を同定した。発現プロファイル結果をMonte Carlo Cross Validationを用いて治療効果をシミュレーションした。SVRとnon-SVRの予測は70.5%、RとNRの予測は70.0%と高い確率で行なう事が出来た。

インターフェロン関連遺伝子によるC型肝炎治療効果予測

治療効果別のインターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを作成し、治療効果と相関して発現するインターフェロン関連遺伝子を同定した。in silico解析によりこの遺伝子を標的とするマイクロRNA候補を同定した。NR症例では治療前から正常肝に比べ既にインターフェロン遺伝子の発現異常が強く見られ、SVR症例では正常肝における発現パターンと類似している事が分かった。インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを用いて同様の効果予測を行なったところNRとnon-NRの予測はdiagonal linear discriminant analysis (DLDA)を用いて84.1%であった。

マイクロRNAとインターフェロン遺伝子発現解析の関係

治療効果と相関した発現パターンを示すマイクロRNAとインターフェロン関連遺伝子がそれぞれ同定された。この中でお互いに標的関係であるペアが見つかった。

治療効果予測はマイクロRNAを用いた場合

SVRを分別する能力が高い事が分かり、インターフェロン遺伝子を用いた場合NRを分別する能力が高かった。またIL28Bの遺伝子多型はNRを分別する能力が高い事が分かった。

マイクロRNAによるC型肝炎ウイルスの制御（ウイルス側因子の検討）

46種のマイクロRNAを使って、HCVレプリコン(OR6)を用いて抗ウイルス活性をスクリーニングしたところ4種のマイクロRNAが抗ウイルス活性を持っている事が分かった。さらにIFNレセプターを変異させIFN耐性のあるHCVレプリコンにおいても4種のマイクロRNAがレプリコンの複製を抑制する事が分かった。

D. 考察

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロRNAとインターフェロン関連遺伝子別に同定する事ができ、これらの抗ウイルス活性を検討する事により、詳細に治療メカニズムを明らかにする事が出来る。治療効果予測はマイクロRNA発現プロファイルではSVRを、インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルではNRを分別する能力が見られた。その原因は現在に所不明であるが、それぞれのアルゴリズムの特性を相補する事により、より高い正確性をもった分別ができる。個人の臨床情報を利用したテーラーメイド医療のシーズとなりうる事が期待できる。

マイクロRNAはインターフェロン応答をおこさずにHCVの複製を制御する。今回新た

なマイクロ RNA が抗ウイルス活性を持つ事が分かり、これらを組み合わせる事により治療耐性に対応できる事が期待できる。またインターフェロン耐性レプリコンにおいても抗ウイルス活性を持つ事が分かり、インターフェロンを使用できない患者も対象にする事が出来る。以前 in vivo 解析でマイクロ RNA は HCVRNA 量を 1 週間で最大 1/100 に低下させる事を示した、今後選択するマイクロ RNA、投与方法を検討する事によって、臨床応用の期待は十分にありと考えられる。

可能性を示した、またこの手法は他の薬剤効果予測に対しても応用する事が期待され、治療のシミュレーションとして利用できる。包括的に肝疾患の進展メカニズムを理解することにより国民の衛生、保険、医療の向上や、医療費削減に有用である。

E. 結論

各種の肝疾患においてマイクロ RNA 発現プロファイルを得る事により、疾患発現メカニズムの解明の一端となる事がわかった。この情報を利用して患者ごとの肝疾患の程度に応じたテーラーメイド治療を行なう可能性と、遺伝子治療の開発に期待を持つ事が出来る。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C PLoS One. in press.

2. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e16081.

3. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Medical Genomics. 2010; 3: 48

4. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. PNAS 2010; 107: 15856-61

5. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, 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.

Pathol Int. 2010; 60: 351-357

6. 村上善基 マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の関与 細胞 42 (6) 2010

2) 学会発表

1. 村上善基、Over expression of miR-199 and 200 families is associated to the progression of liver fibrosis 第 69 回日本癌学会学術総会

平成 22 年 9 月 22 日 大阪市

2. 村上善基、インターフェロン関連遺伝子解析発現パターンを利用した慢性 C 型肝炎

治療効果予測

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

平成 22 年 6 月 25 日 北九州市

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

1. 遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法. 村上善基. 特願 2010-86966 (H22-4-5)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト遺伝子編集酵素による HCV 感染制御機構の解析

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

研究要旨

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染と、その結果生じる炎症反応やインターフェロン産生に応答し、さまざまなヒト遺伝子編集酵素がヒト肝細胞に誘導されることが明らかとなった。肝細胞に発現誘導された遺伝子編集酵素のいくつかは、その遺伝子変異導入活性により感染した HCV のウイルスゲノム配列に塩基変化を誘導することが確認された。HCV 感染を伴った肝細胞に発現している遺伝子編集酵素群が、HCV 感染制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は 9,500-9,600 塩基からなるプラス鎖 RNA をウイルスゲノムとしてもつことが知られている。HCV 感染の最大の特徴のひとつとして、ウイルスゲノムの多様性があげられる。事実、HCV 感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クローンの集合体としてウイルス感染が成立しており、このような性質は *quasispecies nature* と総称されている。HCV が単一の宿主内において多数の変異体が混在する感染様式を形成している要因としては、ウイルスゲノム配列に非常に高頻度に塩基変化が生じることが重要であると考えられてきた。一般に RNA ウィルスの変異速度は 10^3 substitution/site/year のオーダーであると推定されており、このきわめて高い遺伝子変異生成スピードは宿主 DNA の変異速度の約 100 万倍にも達するとも考えられている。このようにきわめて高い遺伝子変異が RNA ウィルスに生じる要因としては、これまではウィルス側の因子が重要と想定されてき

た。

HCV の遺伝子にはウイルス粒子を構成する構造蛋白質と一連の非構造蛋白質がコードされている。HCV ゲノム複製の際には、非構造蛋白質の中に含まれている NS5B 遺伝子がコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが中心的な役割を担っているものと考えられている。しかしながら、RNA ウィルスである HCV のもつ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼには、DNA ポリメラーゼがもつような修復機能がないため、RNA ポリメラーゼによるウイルスゲノムの複製の際に生じる読み間違いが、修復されることなくそのまま子孫に受け継がれていくことになる。このため、複製時のエラーが修復されることなく個々のウィルス・クローンに蓄積していくことで、多様な遺伝子変異をもつウィルス・クローンの集合体を産み出す原動力となっていると推定されている。

一方、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ

一群の分子が近年、次々と同定されており、その機能からこれらの一連の分子群を遺伝子編集酵素と総称されるようになった。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC)ファミリー、ならびに Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR)ファミリーである。APOBECファミリー分子は塩基配列上のシチジン(C)を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化（体細胞変異）をきたす作用を有している。一方、ADAR ファミリー分子は塩基配列上のアデニン(A)を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる RNA の塩基配列にイノシン(I)が生じることになる。これらの遺伝子編集酵素は、その生理的作用として様々な遺伝子を標的とし、遺伝情報をコードしている DNA もしくは RNA の配列を変えることにより、生体の恒常性を保つことに貢献している役割を果たしている。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、いくつかの分子は生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることが明らかになりつつある。例えば、APOBEC3G や APOBEC3F は、リンパ球に感染したヒト免疫不全ウイルス(HIV)の遺伝子配列に変異を導入することにより、宿主の免疫応答に際して抗ウイルス分子として機能していることが知られている。同様に、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は B 型肝炎ウイルス(HBV)のゲノム配列に高頻度に C→T への遺伝子変異を誘導する作用をもつことが報告されている。このように、APOBEC ファミリー分子は抗ウイルスタンパクとして機能しており、感染時にウイルス遺伝子に塩基変化を導入することで、ウイルスを不活化する役割を担っていると考えられている。また、RNA 配列への編集作用をもつ ADAR ファミリー分子も、D 型肝炎ウイルス

のゲノム配列上の特定の塩基部位に変異を誘導することが以前から知られていたが、最近、HCV に対しても増殖抑制作用を発揮する可能性が示唆されるようになってきた。

興味深いことに、我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染とそれに伴う炎症反応、ならびにインターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが発現誘導されることがわかってきた。例えば、HCV 感染時には、HCV のもつ Core タンパク質により肝細胞内の転写因子 NF- κ B が活性化されることを介して、APOBEC ファミリー群の中でも宿主 DNA を標的とする Activation induced cytidine deaminase (AID)が発現誘導されることをすでに明らかにしている。同様に *in vitro*における肝培養細胞の解析から、HCV 感染にともなって産生されるインターフェロンの刺激により、肝細胞に APOBEC3G と ADAR1 の転写が活性化され発現誘導されてくることもわかった。このように、HCV 感染により惹起される慢性肝疾患を伴った肝細胞ではさまざまな遺伝子編集酵素が発現誘導されているが、その生理的意義については不明のままである。

そこで、これらの遺伝子編集酵素による抗ウイルス活性ならびに遺伝子異常の導入活性の可能性に着目し、HCV ゲノムに生じる遺伝子変異の生成に宿主側の分子が寄与していることを検証することにより、新しい抗 HCV 制御機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV 感染と、その結果産生されてくる炎症性サイトカインやインターフェロン刺激に応答して肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素を特定する。具体的には、それぞれのヒト各 APOBEC family, ADAR family 分子に特異的な probe を作成し、ヒト肝培養細胞に

炎症性サイトカインである TNF- α やインターフェロン刺激を加えた前後におけるそれぞれの APOBEC family, ADAR family 各分子の発現量の変化を定量評価する。

(2)肝細胞に発現誘導した APOBEC family 分子、ADAR family 分子による HCV ゲノムに対する遺伝子変異生成作用の有無を明らかにする目的で、Huh-7 細胞に HCV の全長レプリコン・コンストラクトと各 APOBEC family, ADAR family の発現プラスミドを同時発現させる。引き続き、HCV ゲノムを high-fidelity RT-PCR 増幅~回収の上、塩基配列を同定し、遺伝子変異の生成の有無の評価を行う。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

C. 研究結果

(1)通常培養条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない ADAR family のひとつである ADAR1 が、インターフェロン刺激により APOBEC3G とともに肝培養細胞に発現誘導されることが確認された。同様に、生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 が、炎症性サイトカインである TNF- α 刺激によりヒト肝細胞

に AID とともに発現誘導されることが明らかとなった。また、以前の解析結果により AID は細胞内転写因子のひとつである NF- κ B の活性化を介して TNF- α 刺激により発現誘導されることが明らかとなっていたため、NF- κ B 阻害剤、IKK- α 、IKK- β の dominant negative form を用いて細胞内 NF- κ B 活性化シグナルを阻害したところ、肝細胞における APOBEC2 発現が減少~消失することが確認された。以上より、インターフェロン刺激により肝細胞には遺伝子編集酵素 APOBEC3G や ADAR1 が、HCV 感染やその結果生じる炎症性サイトカイン刺激により AID や APOBEC2 が発現誘導されることが明らかとなった。

(2) HCV に認められる多様な変異ウイルス・クローンの生成に、宿主の遺伝子編集酵素が関与している可能性を検証するため、さまざまな APOBEC family ならびに ADAR family 分子を同時発現させた HCV レプリコン Huh-7 細胞から RNA を抽出し、HCV ゲノム中の NS5A 領域の塩基配列を同定した。塩基配列の同定には、high-fidelity RT-PCR により増幅したウイルスゲノムからランダムに約 30-40 クローンを選別したものを鋳型として用いた。ウイルス変異解析の結果から、DNA 配列に変異を誘導する活性をもつ遺伝子編集酵素である AID や APOBEC3G を同時発現させた HCV レプリコン・コンストラクトには有意な遺伝子変異の生成を認めないことが確認された。これに対して、RNA 配列に変異を誘導する活性をもつ遺伝子編集酵素である APOBEC2 や ADAR1 発現細胞においては、低頻度ながらも短期間で HCV の NS5A 領域に塩基変化が生じていることがわかった。

D. 考察

さまざまな遺伝子編集酵素ファミリー分子

が、HCV のコードするウイルスタンパクの直接作用、ならびに HCV 感染を契機とする炎症反応やインターフェロン産生に応答する形で肝細胞に発現誘導されることがわかった。これらの遺伝子編集酵素の中でも RNA 配列に対して塩基変化を誘導する作用をもつ分子の発現下においては、HCV のウイルスゲノム配列に遺伝子変異が誘導されることが明らかとなった。

以上の結果から、ヒト遺伝子編集酵素ファミリー中のいくつかの分子は、HCV 感染に起因する慢性炎症の過程において肝細胞に発現し、ウイルスゲノムの RNA 配列に塩基変化を誘導することでウイルス制御に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染とその結果生じる炎症反応ならびにインターフェロン産生応答によりさまざまな遺伝子編集酵素が肝細胞に発現誘導されることが明らかとなった。遺伝子編集酵素活性が HCV のウイルスゲノムに発揮されることが、感染ウイルスを制御するための生体の防御反応としての役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat.* 2011 (in press)
- (2) Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Involvement of activation-induced

cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J Gastroenterol*, 46: 6-10, 2011.

- (3) Marusawa H, Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol.* 22(4): 442-447, 2010.
- (4) Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Individualized extension of pegylated interferon plus ribavirin therapy for recurrent hepatitis C genotype 1b after living-donor liver transplantation. *Transplantation*, 90(6): 661-665, 2010.
- (5) Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Haga H, Sato T, Tanaka Y, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Clinical features of biochemical cholestasis in patients with recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation. *J Viral Hepat.* 17(7):481-487, 2010.

2. 学会発表

- (1) 丸澤宏之. AIDによる発癌関連遺伝子への変異生成と炎症発癌. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪.
- (2) 奥山俊介, 丸澤宏之, 千葉勉. 遺伝子編集酵素APOBEC2による発癌関連遺伝子へのRNA変異導入を介した肝癌発生の分子機構. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪. 2010/9/22
- (3) 高井淳, 丸澤宏之, 千葉勉. 炎症性発癌プロセスにおけるAIDの役割. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪.
- (4) 奥山俊介, 丸澤宏之, 千葉勉. 遺伝子編集酵素によるRNA変異導入を介した肝癌発生の分子機構. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/13. 横浜.

- (5)西島規浩、上田佳秀、丸澤宏之. 次世代ゲノムアナライザー解析により明らかとなったHBVクロンの多様性と治療抵抗性の関連. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/13. 横浜.
- (6)池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 肝癌の発生源地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/13. 横浜.
- (7)那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹細胞への遺伝子異常の蓄積による肝癌発生の分子機構. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/14. 横浜.
- (8)Nonaka T, Takai A, Marusawa H, Uemura M, Chiba T, Hiai H, Honjo T, Kinoshita K. Carcinogenesis by activation-induced cytidine deaminase. 14th International Congress of Immunology. 2010/8/22. 神戸.
- (9)Marusawa H, Chiba T. Genetic aberration in hepatic stem cells leads to hepatocarcinogenesis. The 1st JSGE International Topic Conference “Stem cells in digestive organs”. 2010/9/25. 鎌倉.
- (10)Marusawa H. Molecular mechanisms linking inflammation, genetic alterations, and cancer development. BMB2010. 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. 2010/12/7. 神戸.

H. 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構造タンパク質と相互作用する宿主因子の同定とその機能解析

分担研究者 大島 隆幸 徳島文理大学 香川薬学部

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)の構造タンパク質群はウイルス粒子の構成成分であり、粒子形成の分子メカニズムを明らかにすることは、ウイルス産生をターゲットとした新たな抗HCV剤の開発に重要である。また構造タンパク質の一つであるcoreは、ウイルス粒子の形成に必須だけでなく、宿主の転写制御因子やがん抑制因子との相互作用を介して、細胞増殖やアポトーシスを制御していることも知られている。この様に多彩な作用を有する構造タンパク質群の宿主細胞への影響や未だほとんど明らかにされていないHCVの粒子形成から細胞外放出にいたる過程を明らかにするために、HCV構造タンパク質と相互作用する宿主因子について酵母ツーハイブリッド法を用いて探索した。その結果、coreタンパク質と相互作用する宿主因子として、現在までに報告されている多数の因子に加え新たにシャペロンタンパク質の一つであるFKBP8とEwing肉腫の原因因子であるEWSを同定した。その中でもEWSは染色体転座に伴い小児を中心に発症する難治性の肉腫の原因遺伝子産物であり、その構造としてRNA結合ドメインを有するとともにアルギニン・グリシン・グリシン(RGG)モチーフが存在し、そのアルギニン残基のメチル化を介して活性変換されることが報告されている。本研究において、まず免疫沈降法によりcoreとEWSが細胞内で相互作用すること、またcoreの相互作用する領域はN末端であることを明らかにした。これらの結果は、宿主RNA結合タンパク質を介したHCV粒子形成過程に重要な知見を与えるとともに、coreによる発癌分子機序の一端を明らかにするものと期待され、現在、詳細を解析中である。

A. 研究目的

近年、培養細胞レベルでのHCVの感染系が確立され、ウイルスの細胞吸着から脱殻、ゲノムの複製、そして粒子形成から細胞外放出まで、一連のウイルスのライフサイクルを研究できる環境が整ってきた。初期の非感染性サブゲノミックレプリコンシステムを用いた研究から、ウイルスの複製メカニズムに関する研究は進展しているが、ウイルス粒子形成から放出までの過程はほとんど明らかにされていない。特にウイルス構造タンパク質群は、自身のゲノムRNAを包み込みウイルス粒子を形成するための構成因子として機能するだけでなく、宿主細胞の転写制御因子や細胞増殖に関与する因子との相互作用を介して、その機能を利用または攪乱することで宿主細胞にさまざまな影響を与えることが報告されている。そしてこれらの

作用が、ウイルスのライフサイクルにとって必要なだけでなく、発癌にも深く関わっていることが示唆されている。

本研究では、このウイルスの構造タンパク質の細胞内での機能を明らかにすることを目的とし、まず構造タンパク質群と相互作用する宿主因子を網羅的に探索し、宿主細胞機能への影響とともにウイルスのライフサイクルとの関連を明らかにすること目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV構造タンパク質であるp7およびcoreと相互作用する宿主因子を同定するために、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングを行った。

(2) cDNAライブラリーとして、p7に対して

はヒト肝臓およびヒト脳由来、また core に対してはヒト肝臓およびヒト脾臓を用いた。

(3) HCV タンパク質および細胞内での相互作用に関する解析:得られた宿主因子との動物細胞内での相互作用に関する解析は、HEK293T 細胞に過剰発現させ、それぞれの抗体を用いた共免疫沈降法を行った。

(倫理面への配慮)

組換え遺伝子の作製および組み替え体を用いた実験は、徳島文理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) p7 と相互作用する因子を同定するために以下の規模でスクリーニングした。

ヒト肝臓: 5.6×10^6 クローン

ヒト脳: 3.2×10^6 クローン

その結果、機能未知遺伝子に加え、BAG6/BAT3 (Bag family protein 6) が得られた。

(2) core と相互作用する因子を同定するために以下の規模でスクリーニングした。まず全長の core に対して、

ヒト肝臓: 4.8×10^6 クローン

ヒト脾臓: 6.4×10^6 クローン

また core の N 末端 120 アミノ酸を bait として、

ヒト肝臓: 6.7×10^6 クローン

ヒト脾臓: 8.6×10^6 クローン

その結果、全長を用いた場合に得られた相互作用する因子は、そのほとんどが既に報告されているものであった。一方 N 末端 120 アミノ酸と相互作用する因子として、スプライシングの制御因子である SR タンパク質ファミリーや既に core との相互作用が報告されている cytokeratin8 に加え、タンパク質の安定した立体構造の構築に重要な役割を果たす FKBP8 や Ewing 肉腫の原因因子である EWS が得られた。

(3) 得られた宿主因子の中でも特に EWS との相互作用に着目し、まず Huh-7 細胞由来の RNA から RT-PCR 法によって EWS の全長をクローニ

ングした。次に動物細胞内での相互作用を検討するために、core および EWS を発現ベクターに組み込み、HEK293T 細胞に共発現させた後、共免疫沈降法によって解析した。その結果、両者の相互作用が確認できた。またそれぞれの相互作用する領域を決定するために、各種欠損変異体を作製し、同様に HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降法によって解析した。その結果、core の N 末端 1-40 アミノ酸と EWS の C 末端が相互作用することが明らかとなった。

D. 考察

ウイルスの構造タンパク質群はウイルスの粒子形成に必要不可欠であるが、一方で宿主因子との相互作用を介した宿主機能へ影響も示唆されている。本研究では、まず core タンパク質と相互作用する因子を探索し、EWS を同定した。先にも述べたように、EWS は Ewing 肉腫の原因因子であり、特に宿主転写制御因子である FLI1 との染色体転座によって発症する難治性の肉腫の原因遺伝子産物である。その特徴的構造として RNA 結合ドメイン、および RGG モチーフを有し、細胞内のメチル化酵素 PRMT によって RGG の R (アルギニン残基) がメチル化修飾されることにより、EWS の細胞内局在や RNA 結合能が変化する。現在までに HCV と EWS に関する報告として HCV の 5' -IRES 複合体に EWS が含まれるというものがあり、ウイルスの複製や粒子形成における EWS の関与に興味を持たれる。また癌遺伝子産物でもある EWS の機能に対して、core との相互作用を介してどのように機能変換が起こるのか、詳細に解析して行く必要がある。

また p7 と相互作用する因子 BAG6/BAT3、および core と相互作用する因子 FKBP8 は、共にタンパク質の立体構造形成に重要な役割を果たすシャペロンとしての機能を有している。このことは、HCV 粒子集合体の正確な形成にはこれら宿主因子が関与していることを示唆している。また興味深いことに、FKBP8 は HCV の非構造タンパク質の一つである NS5A とも相互作用し、ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが報告されている。これはウイルスの

非構造タンパク質と構造タンパク質が、共通の宿主因子との相互作用を介して、ウイルスの複製から粒子形成に関わる一連のウイルスライフサイクルに関与していることを示唆するものである。今後は細胞内での相互作用とともに、それらの結合するドメインの同定、また細胞内局在などを解析して行く。そして実際に HCV の粒子形成にどのように影響を与えるのか、感染性ウイルスを用いて明らかにして行く。

E. 結論

HCV 構造タンパク質群と相互作用する宿主因子を同定するために、core と p7 をベイトとして酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。その結果 p7 と相互作用する因子として BAG6/BAT3 などを、また core と相互作用する因子として FKBP8、EWS などを同定した。その中で、core と EWS は実際に動物細胞内で相互作用することを明らかにし、またそれぞれの結合領域を決定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohshima, T., Mukai, R., Nakahara, N., Matsumoto, J., Isono, O., Kobayashi, Y., Takahashi, S., Shimotohno, K. (2010). HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *J. Cell. Biochem.* 111, 187-194.
2. Murata, T., Nakayama, S., Toyama, S., Noda,

C., Hotta, N., Chiba, S., Kanda, T., Isomura, H., Ohshima, T., and Tsurumi, T. (2010). Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* 285, 23925-23935.

2. 学会発表

3. 向井理紗, 太島隆幸 (2010) HTLV-1 HBZ は転写因子 large Maf ファミリーと相互作用して Maf の活性を抑制する。
第 9 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010, 10 月, 京大薬学部
4. 向井理紗, 太島隆幸 (2010) HTLV-1 HBZ タンパク質による mTOR シグナルの活性制御機構。
第 58 回 日本ウイルス学会学術集会, 11 月, 徳島あわぎんホール
5. 向井理紗, 太島隆幸 (2010) mTOR シグナルの活性化における HTLV-1 HBZ タンパク質の役割。
BMB2010, 12 月, 神戸ポートアイランド

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

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

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 押海 裕之 北海道大学大学院 医学研究科

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）感染時の自然免疫応答に必須の宿主因子や、ウイルスによるその阻害機構の多くは未知である。我々は分子生物学的手法と免疫学的手法から、HCV感染時のI型インターフェロン産生に関与する新たな分子としてDDX3とRipletの二つの分子を発見した。また、ノックアウトマウスを用いた実験からRiplet分子がウイルス感染時のI型インターフェロン産生に必須であることが明らかとなった。また、HCVは逆にDDX3とRiplet分子の活性を阻害することでI型インターフェロン産生を阻害するという新たなメカニズムの解明を行った。

A. 研究目的

HCVが宿主の自然免疫システムを逃れ持続感染するメカニズムは未知の部分が多い。I型インターフェロンは強い抗ウイルス作用を持ち、ウイルス感染時には自然免疫システムにより生体内で産生されるが、HCVは効率よくI型インターフェロン産生を抑制する。そこで、我々はウイルス感染時のI型インターフェロン産生に関わる新たなメカニズムの解明と、HCVによるその抑制の新たなメカニズムの解明をまず試みた。

具体的には我々が発見したDDX3やRiplet分子に着目し、I型インターフェロン産生にはたす役割とその分子機構を解明し、I型インターフェロン産生の新たな分子機構の解明を試みる。加えて、HCVによるその抑制の分子機構の解明を行い、HCVがヒトの生体内で持続感染するメカニズムの解明を目指す。

B. 研究方法

(1) HCV感染時のI型インターフェロン産生を促進するDDX3分子がHCVのコア蛋白質により抑制される機構を解明する為に、遺伝子型1bのHCVゲノム全長をもったレプリコン細胞(0細胞)、及び、ヒト肝臓由来のHuH7.5細胞と感染粒子であるJFH1株を使用し、試験管内での分子生物学的解析を行った。

(2) 我々が作成したRiplet遺伝子のノックアウトマウスを用いて、生体内において

Ripletがウイルス感染時のI型インターフェロン産生に必須かどうかを検討した。また、HCVのゲノムRNAを試験管内で合成し、それに対する結合や応答を分子生物学的手法を用いて解析を行った。

(3) ヒトCD81遺伝子とRipletノックアウトマウスの肝臓由来の細胞を用い、RipletがHCV感染時にどの程度寄与するのかを評価すると共に、HCV蛋白質によりRiplet分解機構を、レプリコン細胞等を用い解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。また遺伝子組換え実験も北海道大学の遺伝子組換え実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

(1) ヒトの細胞質内ヘリケースのDDX3分子はHCV感染時のI型インターフェロン産生に関与する。今回、HCVのコア蛋白質が、DDX3のC末端領域による下流へのシグナル伝達分子の活性化を阻害することを明らかにした。

(2) Ripletノックアウトマウスを作成し、ウイルス感染時のI型インターフェロン産生を調べたところ、Riplet分子は繊維芽細胞、樹状細胞、マクロファージからのI型インターフェロン産生に必須の役割をはたすことを明らかに

した。興味深いことに Riplet ノックアウトマウスはRNAをゲノムに持つウイルス感染時のウイルスに対する抵抗性が著しく減少したことから、上記の細胞から産生されるI型インターフェロンが生体で重要であることを解明した。

(3) HCVのレプリコン細胞を用いた研究からHCV感染時にはRiplet蛋白質が減少することを発見した。詳細な解析の結果RipletのC末端領域がHCV蛋白質により阻害されていることを発見した。

D. 考察

これまでHCVによるI型インターフェロン産生の抑制は、HCVのNS3-4AプロテアーゼによりIPS-1と呼ばれる分子の切断が主な分子機構であると考えられてきた。しかし、今回の解析結果から新たにHCVのコア蛋白質によるDDX3分子の阻害や、またHCV蛋白質によるRiplet分子の阻害も、HCVによるI型インターフェロン産生の抑制において重要な働きをすることが明らかとなった。

また、HCVは細胞質内のRIG-Iと呼ばれる分子によりそのゲノムRNAが認識されることが知られて来たが、この過程に於いて、我々が単離したRiplet分子が必須の役割をはたすことが明らかとなった。今後、このRipletノックアウトマウスを用いることで、これまでなかった、マウス個体を用いたHCVの感染モデル系の作成が可能になると期待される。

E. 結論

HCV感染時のI型インターフェロン産生に関与する分子として、我々が発見したRiplet分子が生体内でウイルスの排除に非常に重要な働きをすることが明らかとなった。

また、HCVによるI型インターフェロン産生の抑制としてHCVがDDX3分子とRiplet分子を標的とすることを新たに発見した。今後、これらの阻害薬を開発することでHCVの新たな治療薬となる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe*. 8: 496-509.

Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN- β -inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase. *PLoS ONE*. 5: e14258.

Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Mol. Immunol.* 48: 497-504.

Ehira, N., H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Kondo, M. Asaka and T. Seya. 2010. An embryo-specific expressing TGF- β family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29: 135.

Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207: 2675-2687.

Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- β inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 40: 940-948.

Sasai, M., H. Oshiumi, K. Funami, M. Matsumoto, and T. Seya. 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol. Immunol.* 47: 1283-1291.