

と期待された。

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、これらの酵素のもつ遺伝子編集活性により HCV のウィルスゲノムに遺伝子変異が誘導されることが示唆された。

健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2012; 130: 1294-1301.
- 2) Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE*. 2012; 7: e35052.
- 3) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for

recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2012; 19: 32-38.

- 4) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. 2012; 43: 67-71.
- 5) Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs. *Gastroenterology*. 2012; 143: 550-563.
- 6) Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 444-451.

2. 学会発表

- (1) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.
- (2) 高橋健、那須章洋、丸澤宏之. C型肝炎ウイルス薬剤耐性クローンの次世代ゲノムアナライザー解析. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.
- (3) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 本邦に

おける薬剤耐性 HCV クローンの潜在
頻度の次世代シーケンサー解析. 第
48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8.
石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、
ANA クラウンプラザホテル金沢. 石
川.

- (4) 金秀基、上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博
典、上本伸二、千葉勉. 肝移植後 C 型
肝炎治療の重大な有害事象. 第 48 回
日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川
県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA
クラウンプラザホテル金沢. 石川.

知的所得権の出願・登録状況

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

特記事項なし

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 構造タンパク質による宿主遺伝子発現の攪乱

分担研究者 大島 隆幸 徳島文理大学香川薬学部 准教授

研究要旨：

C 型肝炎ウイルス（HCV）のゲノムには、主にウイルス遺伝子の複製に重要な調節タンパク質群と、ウイルス粒子の構成成分である構造タンパク質群がコードされている。これらウイルス由来のゲノム産物は、宿主細胞因子との相互作用を介して感染細胞に様々な作用を与えることが明らかになりつつある。特に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。一昨年我々は、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、分子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。本研究では、特に core と EWS の相互作用に着目して解析を進めた結果、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 は N 末端領域を介して EWS の RGG モチーフを含む C 末端領域と相互作用することが明らかになった。HCV のウイルス粒子形成における EWS の関与について、siRNA を用いた EWS ノックダウン系で解析した結果、特に大きな変化は認められなかった。一方 EWS は肝発生の俊約因子である肝臓特異的核内受容体 HNF4 の共役因子として機能することが明らかにされているため、HNF4 の転写活性に与える core の影響を検討した。その結果 core は HNF4 の活性を抑制し、標的遺伝子である p21 および G6Pase の発現を抑制した。この抑制機構の一つとして、core の発現により HNF4 と相互作用する EWS 量が減少することを明らかにした。これらの結果は、core による細胞増殖制御や発癌機序、また糖代謝への関与に重要な知見を与えるものである。

A. 研究目的

HCV ウイルスの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だけでなく、HCV に起因する種々の疾患にも深く関わっていることが示唆されている。

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解析できる環境が整ってきた。これまで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 RNA の複製メカニズムに関する知見は多く得られているが、ウイルス粒子形成から放出までの過程や構造タンパク質群の宿主細胞への作用に関しては不明な点が多い。

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) 構造タンパク質である 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。スクリーニングに用いた cDNA ライブラリーとして、ヒト肝臓およびヒト脾臓由来を用いた。

(2) 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、発現ベクターを用いて 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。

(3) EWS を効率よくノックダウンさせる RNAi 配列を決定し、HCV の JFH-1 株を一過性に感染させた細胞にトランスフェクションした後、培養上清中に放出される core の量を ELISA 法で定量した。

(4) HNF4 の転写活性を測定するために、HNF4 結合配列を 8 回タンデムに繋いだ 8xHNF4、HNF4 結合配列を含む p21 プロモーター領域および G6Pase プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。また内在性の p21 の発現量は、定量的 RT-PCR によって解析した。

(5) HNF4 結合配列上の HNF4 複合体の解析は、DNA 沈降法およびウエスタンブロットング法により解析した。

(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) core と相互作用する宿主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。全長の core に対して、

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリー：
4.8x10⁶ クローン

ヒト脾臓由来 cDNA ライブラリー：
6.4x10⁶ クローン

また core の N 末端 120 アミノ酸に対して、

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリー：
6.7x10⁶ クローン

ヒト脾臓由来 cDNA ライブラリー：
8.6x10⁶ クローン

その結果、全長を用いた場合に得られた因子は、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。

(2) 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 RGG モチーフを含む C 末端が相互作用することが明らかとなった。

(3) Huh-7.5 細胞に HCV の JFH-1 株を一過性に感染させ、siEWS を用いて細胞内の EWS をノックダウンさせた。その後、48 と 72 時間後に培養上清中に放出された core の量を ELISA 法によって測定した結果、ウイルス粒子の産生量に大きな違いは認められなかった。

(4) HNF4 の転写活性に対する core の影響を検討するために、HNF4 結合配列を 8 回タンデムに繋いだ DNA 断片を pGL3-luciferase ベクターに組み込み、ルシフェラーゼの活性を指標にその活性を解析した。その結果、core の発現により HNF4 の転写活性は抑制されることが明らかとなった。また HNF4 結合配列を含む p21 プロモーターおよび G6Pase プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにおいても同様に抑制効果が認められた。さらに HNF4 と EWS の共発現によって認められた内在性の p21 の発現量の上昇は、core の過剰発現によって顕著に抑制された。

(5) DNA 沈降法により HNF4 結合配列上の HNF4 複合体を解析した結果、core の発現によって DNA 上にリクルートされる EWS の量が減少した。またこれは、core により HNF4 と相互作用する EWS 量が減少するためであることが明らかになった。

D. 考察

ウイルスの粒子形成に必要不可欠である構造タンパク質群は、宿主因子との相互作用を介して宿主機能へ様々な影響を与えることも示唆されている。本研究では、HCV の構造タンパク質の中でも、これまでに細胞増殖や遺伝子発現などに深く関与する宿主因子と相互作用することが報告されている core に着目し、相互作用する宿主因子を探索するとともにその生理学的意義を明らかにすることを目的とした。そして得られた因子の中から、EWS に着目して研究を進めた。EWS は染色体転座によって発症する難治性の Ewing 肉腫の原因因子として同定された。その構造として RGG モチーフを含む RNA 結合ドメインを有し、この RGG の R(アルギニン残基)がメチル化酵素 PRMT によってメチル化修飾されることにより、その細胞内局在や RNA 結合能が変化する。この RGG モチーフを含む領域に core は相互作用するため、今後はメチル化修飾を介した相互作用力の変化を解析する予定である。

また現在までに 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 の関与について解析した。しかし、siRNA によって細胞内の EWS をノックダウンさせた場合でも、ウイルスの粒子産生量に大きな変化は認められなかったため、EWS のウイルス粒子産生への関与は小さいものと予想される。

一方先にも述べたように、EWS は肝発生の俊約因子である核内受容体型転写因子 HNF4 の共役因子として機能し、core はその機能を抑制することが示唆された。EWS は HNF4 を中心とした転写開始複合体のみでなく RNA 伸長複合体にも含まれ、それぞれにおいて遺伝

子発現を促進することが報告されている。これらの機能のどこを core は抑制しているのか、今後明らかにして行く必要がある。HNF4 は糖や脂質代謝におけるマスターレギュレーター様の役割を果たし、また近年、肝がん発症との関連性も示唆されている。EWS と相互作用する core 側の領域は、肝がんを発症した患者間で遺伝的変異が多数認められる、いわゆる「hyper variable region」であり、core による EWS の機能抑制を介した HNF4 の活性抑制メカニズムの詳細を解析することによって、HCV 持続感染時における糖代謝異常や肝細胞増殖異常などが明らかになることが期待される。

E. 結論

HCV 構造タンパク質の一つである core と相互作用する宿主因子として EWS を同定した。ウイルス粒子産生に対する EWS の関与は認められなかったが、core は核内受容体 HNF4 に対する EWS の共役因子能を抑制することで、HNF4 の転写活性を負に制御した。また細胞に core を過剰発現させると、HNF4 により発現誘導される宿主遺伝子群の mRNA 量は減少した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Torikoshi K, Abe H, Matsubara T, Hirano T, Ohshima T, Murakami T, Araki M, Mima A, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Arai H, Doi T. Protein inhibitor of activated STAT, PIASy regulates alpha-smooth muscle actin expression

by interacting with E12 in mesangial cells. PLoS One., 7:e41186-41199 (2012).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

研究課題 P-body 因子による HCV 増殖制御機構の解析

分担研究者 有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨：P-body は宿主 mRNA の分解、貯蔵、サイレンシングの場として知られているが、抗 HIV-1 因子である APOBEC3G や MOV10 も P-body に局在する。しかしながら、これら抗 HIV-1 因子の P-body 局在の意義や HCV 生活環における役割については未だ不明な点が多い。そこで、今年度は P-body に局在する抗 HIV-1 因子 APOBEC3G 及び MOV10 の HCV 生活環における役割について解析を試みた。その結果、HCV 非感染細胞では、APOBEC3G 及び MOV10 は P-body に局在したが、HCV-JFH1 感染細胞や全長 HCV-0 RNA 複製 0 細胞においては、APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在が攪乱され、脂肪滴周辺にリクルートされ、HCV Core と共局在した。さらに免疫沈降法により、HCV Core と APOBEC3G 及び MOV10 が結合することも見出された。しかしながら、APOBEC3G を強制発現しても抗 HCV 効果は観察されなかった。一方、内在性 MOV10 をノックダウンしても HCV 複製の増強は見出されなかった。以上の結果より、APOBEC3G 及び MOV10 は HIV-1 と異なり、HCV の複製に対する制限因子として作用しないことが判明した。

A. 研究目的

P-bodyは宿主mRNAの分解、貯蔵、そしてサイレンシングの場として知られているが、多くのウイルスもこのP-bodyを標的としている。実際、我々はこれまでにHCV感染により、P-body形成が阻害され、P-body因子がHCVによりHCV産生のある脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCVの複製に利用されていることを報告してきた(Ariumi *et al. J. Virol.* 85:6882-6892, 2011)。

一方、抗HIV-1因子として知られる APOBEC3G/FやMOV10もP-bodyに局在するが、これら抗HIV-1因子のP-body局在の意義やHCV複製に対する影響については不明な点が多い。そこで、本研究では、P-bodyに局在するAPOBEC3G及びMOV10のHCV生活環における役割について検討を行なった。さらに、APOBEC3G及びMOV10とHCVタンパク質との相互作用についても検討を行なった。

B. 研究方法

(1) 細胞内局在の観察

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染 72 時間後に細胞を固定後、抗 MOV10 抗体 (Bethyl 社)、

抗 DDX6 抗体 (Bethyl 社)あるいは抗 HCV Core 抗体 (CP-9、CP-11;特殊免疫研究所)を反応させた後、FITC 結合抗ウサギ抗体及び Cy3 結合抗マウス抗体 (JacksonImmunoResearch 社)を用いて可視化した。また、核は DAPI で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、オリンパス社)を用いて細胞内局在を詳細に観察した。また、JFH1 感染 RSc 細胞あるいは HuH-7 由来全長 HCV-0 RNA 複製 0 細胞に GFP 融合 APOBEC3G (A3G-GFP)あるいは HA-tagged MOV10 を強制発現させ、細胞を抗 HA 抗体あるいは抗 HCV Core 抗体で染色し、HCV 感染や HCV 複製による APOBEC3G 及び MOV10 の細胞内局在の変化について観察した。

(2) APOBEC3F 及び APOBEC3G の HCV 生活環における役割の解析

レンチウイルスベクターを用いて、APOBEC3G-HA あるいは APOBEC3F-HA を恒常的に発現する RSc 細胞を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法、ウエスタンブロット法と ELISA 法で定量した。さらに抗 Core 抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌された HCV の

感染性を解析した。同様に O 細胞に APOBEC3F あるいは APOBEC3G を強制発現させ、HCV 複製レベルに対する影響についても real-time RT-PCR 法とウエスタンブロット法により検討を行なった。

(3) MOV10 の HCV 複製における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、MOV10 をノックダウンさせた RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法、ウエスタンブロット法と ELISA 法で定量した。さらに抗 Core 抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。同様に MOV10 をノックダウンした O 細胞の HCV 複製レベルについても real-time RT-PCR 法とウエスタンブロット法により検討を行なった。

(4) 免疫沈降法

細胞を 50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 4mM EDTA, 0.1% NP-40, 10mM NaF, 0.1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, 1mM PMSF を含む RIPA buffer を用いて可溶化させ、抗 HA 抗体 (3F10, Roche 社) を用いて、免疫沈降を行なった。抗体は Protein-G-Sepharose (GE 社) に吸着させ、RIPA buffer で 5 回リンス後、複合体をウエスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験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、ヒトの臨床材料や実験動物を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、本研究は「研究開発等に係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処置等を定める省令」に基づき実施した。特に HCV ウイルスを用いた感染実験の場合は P2 レベル実験室のバイオハザード対策用安全キャビネットを使用し、実験終了後の資料についても、UV 照射、次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素系消毒薬処理およびオートクレーブを用い、適正に廃棄を行った。

C. 研究結果

(1) HCV による APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在の変化

HCV 非感染 RSc 細胞において、APOBEC3G 及び MOV10 は P-body に局在し、内在性 DDX6 と共局在した。一方、HCV-JFH1 感染細胞では、APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在は破綻し、脂肪滴周辺にリクルートされ、HCV Core と共局在した。

(2) APOBEC3G 及び MOV10 と HCV Core との相互作用

APOBEC3G-HA あるいは HA-MOV10 を強制発現させた 293T 細胞及び HCV-JFH1 感染細胞のライゼートを混合し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により、APOBEC3G 及び MOV10 は HCV Core タンパク質と結合することが判明した。

(3) APOBEC3F 及び APOBEC3G の HCV 複製における役割

レンチウイルスベクターを用いて、HCV-JFH1 感染 RSc 細胞に APOBEC3F あるいは APOBEC3G を恒常的に発現させても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性は抑制されなかった。同様に O 細胞に APOBEC3F や APOBEC3G を強制発現させても、HCV 複製レベルは抑制されなかった。

(4) 内在性 MOV10 の HCV 複製における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 MOV10 をノックダウンさせても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性の増強はみられなかった。同様に O 細胞の MOV10 をノックダウンさせても、HCV 複製レベルは増強されなかった。

D. 考察

P-bodyは、HCVをはじめ多くのウイルス感染の標的の場となっている。今年度の本研究により、HCVが抗HIV-1因子であるAPOBEC3GやMOV10のP-body局在を破綻させ、HCV産生の場である脂肪滴周辺にハイジャックすること、そしてHCV Coreタンパク質とAPOBEC3G及びMOV10が結合することが見出された。この結果、HCVによるAPOBEC3G及びMOV10の機能抑制の可能性が示唆された。最近、中国のグループにより、APOBEC3Gの抗HCV作用が報告された。また、Riceのグループも網羅的なインターフェロン(IFN)誘導因子(ISG)と抗HCV効果の検討で、MOV10を強制発現させると50%程度HCV複製を抑制することを報告している。しかしながら、少なくとも我々の実験系では、APOBEC3GやMOV10に抗HCV作用を見出されなかった。興味深いことに強制発現の系ではMOV10はHIV-1の複製を顕著に抑制するが、内在性MOV10をノックダウンしてもHIV-1の複製を増強しないことが報告されている。

一方、APOBEC3Gの肝細胞における発現レベルは低いが、インターフェロン(IFN)処理により、内在性APOBEC3Gの発現が増強されることが最近、報告された。IFNはB型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルス感染症に対して有効な治療法であり、IFNによる抗HBV及び抗HCV作用のメカニズムの一つにIFNによるAPOBEC3Gの誘導が考えられる。実際、APOBEC3GはHBVの複製を抑制する。しかしながら、APOBEC3Gのノックダウン実験により、IFNによる抗HBV効果に関与しないことが報告された。HCVの場合、APOBEC3G自身に抗HCV効果が見出されなかったため、IFNによる抗HCV効果にAPOBEC3Gは関与しないことが示唆された。

APOBEC3GやMOV10は同じくP-body因子でmicro(mi)RNA effectorとして機能するAgo2とも相互作用することが知られている。ヒトの肝臓特異的に発現するmiR122はHCV RNAの5' UTRに結合し、HCV複製や翻訳を増強するので、MOV10の関与も考えられるが、最近、MOV10にはmiRNAによるRNAサイレンシング制御に必要でないことが報告されている。

以上の結果より、APOBEC3Gと少なくとも内在性MOV10はHCVの抑制因子として機能しないことが示唆された。HCVによるAPOBEC3G

とMOV10相互作用の生理的意義の解明が今後の検討課題である。

E. 結論

(1) APOBEC3G及びMOV10はHCV非感染細胞においてはP-bodyに局在したが、HCV感染により、APOBEC3G及びMOV10のP-body局在が破綻し、脂肪滴周辺でHCV Coreと共局在した。

(2) APOBEC3G及びMOV10はHCV Coreと結合した。

(3) APOBEC3G及びMOV10はHIV-1と異なり、HCVに対しては抑制因子として機能しないことが判明した。

F. 知的所有権の取得状況

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by cytotoxic T cells with identical epitope specificity. *J. Virol.* 87:2253-2263, 2013.
- 2) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:592-597, 2013.
- 3) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85, 2012.
- 4) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter-assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431, 2012.
- 5) Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by in silico and far-Western screening of proline-rich proteins. *J. Biochem.* 151:657-666, 2012.
- 6) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay

system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes* 44:374-381, 2012.

2 学会発表等

- 1) 黒木 美沙緒、井上 万里子、有海 康雄 : P-body 因子 MOV10 は HIV-1 複製と LINE-1 のレトロトランスポジションを抑制する. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日、大阪.
- 2) 井上 万里子、黒木 美沙緒、有海 康雄 : DDX DEAD-box RNA helicase family による HIV-1 複製調節タンパク Rev、Tat の機能制御. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日、大阪.
- 3) 有海 康雄、黒木 美沙緒、井上 万里子、土方 誠、池田 正徳、脇田 隆宇、下遠野 邦忠、加藤宣之 : P-body と HCV-1 のクロストーク. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日、大阪.
- 4) 黒木 美沙緒、井上 万里子、有海 康雄 : P-body 因子 MOV10 は HIV-1 複製と LINE-1 のレトロトランスポジションを抑制する. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月11-14日、福岡

- 5) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Mariko Inoue, Makoto Hijikata, Masanori Ikeda, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato: Dynamic regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2012 年10月5-9日、ベニス、イタリア.
- 6) Misao Kuroki, Mariko Inoue, Makoto Hijikata, Masanori Ikeda, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2012 年10月5-9日、ベニス、イタリア.
- 7) Misao Kuroki, Mariko Inoue, Yasuo Ariumi: The P-body component MOV10 inhibits HIV-1 replication and LINE-1 retrotransposition. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, 2012年10月24-26日、熊本.
- 8) Mariko Inoue, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi: DDX DEAD-box RNA helicase family modulates HIV-1 Rev and Tat function. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, 2012年10月24-26日、熊本.

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

分担研究者 押海 裕之 北海道大学大学院医学研究科 講師

研究要旨： 自然免疫はウイルスの排除に重要であり、またその異常は、ウイルスによる肝炎発症の原因ともなる。HCV 感染時の生体内での自然免疫応答はこれまで十分に解明されておらず、我々は遺伝子改変マウスを用い、マウスをモデル実験系として HCV 感染時の生体内における自然免疫応答の解析を実施した。HCV の治療成績と相関のある III 型インターフェロンは、生体内では IPS-1 分子を介して産生されること、またこのとき CD8 陽性の樹状細胞が重要であることを発見した。さらに、III 型インターフェロンは治療に使用される I 型インターフェロンと異なり、細胞傷害活性を誘導せず肝細胞内の抗ウイルスヌクレアーゼである RNaseL や ISG20 分子の発現を誘導しウイルス排除を誘導することを解明した。また、HCV の NS3-4A プロテアーゼが IPS-1 分子の上流で働く Riplet 分子を分解すること、この Riplet 分子が癌の抑制に働く Rb 経路にも関与することが示唆され、HCV の発がん機構の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV 感染時の生体内に於ける自然免疫応答機構はこれまで十分には、解明されてこなかった。自然免疫はウイルスの排除や治療効果、或は肝炎の発症と密接に関連する。近年、自然免疫で重要な III 型インターフェロンが治療成績との相関が報告された。この III 型インターフェロン産生に焦点をあて、HCV 感染時の自然免疫応答機構の解明を行うことで、新たな治療薬の開発や発がん抑制の創薬に結びつく重要な成果をあげることがを目的とした。

B. 研究方法

マウスを用いたモデル実験系として、HCV の RNA をハイドロダイナミック法

で野生型と遺伝子改変マウス生体内の肝臓へ HCV RNA を注入し、自然免疫応答を検証した。

また、遺伝子改変マウスより細胞を採取し、試験管内での HCV 感染実験を行い自然免疫応答を解析した。HCV としては、遺伝子型 1b の全長のレプリコンや、2a の JFH1 株として知られる感染粒子を用いて実験を実施した。

(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

生体内の肝臓に HCV が感染した際に生じる自然免疫応答を解析する為、ヒト肝臓由来細胞の HuH7 細胞に、遺伝子型 1b の全長の HCV レプリコンが存在する細胞より RNA を抽出し、これをハイドロダイナミック法によりマウス生体内の肝臓細胞へ直接 RNA を導入した後に生じる自然免疫応答を詳細に調べた。HCV の治療効果と高い相関を示す III 型インターフェロンは、生体内に於いて、IPS-1 分子依存的に主に産生されることを発見した。

さらに試験管内の解析から III 型インターフェロンは、ヒトでは BDCA3 陽性樹状細胞に相当するマウス CD8 陽性樹状細胞から主に産生されることを発見した。興味深いことに、HCV の RNA が細胞質内に存在する場合は、IPS-1 分子依存的に III 型インターフェロンが産生されるのに対し、HCV の RNA を持つ肝臓細胞と共培養した樹状細胞では TICAM-1 分子依存的に III 型インターフェロンが産生され、その産生経路は主に 2 経路存在することが解明された。

III 型インターフェロンは I 型インターフェロンとは異なり、NK の活性化やクロスプレゼンテーションによる CT の活性化は誘導しないが、肝細胞内の高ウイルスヌクレアーゼである RNaseL や ISG20 等の分子の発現を上昇させることを発見した。これは III 型インターフェロンが細胞傷害活性を誘導せずに、細胞内の HCV を排除する作用があることを示唆している。

IPS-1 分子の上流で働く我々が発見した Ripet 分子が試験管内の解析から、

HCV の NS3-4A プロテアーゼにより分解されることを発見した。興味深いことに、この Riplet 分子はユビキチンライゲースとして働き、IPS-1 経路のみならず、がん抑制遺伝子として知られる Rb 経路でも働くことを発見した。

D. 考察

マウスをモデル実験系として用いた解析から、III 型インターフェロン産生はこれまで報告されていた TLR 3 分子を介して産生されるだけではなく、IPS-1 分子を介しても産生されることが示唆された。また III 型インターフェロンの作用機序はこれまで十分に解明されてこなかったが、I 型インターフェロンが NK 細胞や CTL 等の細胞傷害活性化を誘導し、HCV に感染した肝細胞を傷害し炎症を誘導するのに対し、III 型インターフェロンはこのような細胞傷害活性を誘導せず、HCV に感染した肝細胞に直接作用し、高ウイルス作用をもつヌクレアーゼである RNaseL や ISG20 分子の発現上昇を誘導することで、細胞内の HCV を排除していると予想される。

一方で、HCV の NS3-4A 分子は IPS-1 の上流で働く Riplet 分子を切断することを発見した。興味深いのは、この Riplet 分子が IPS-1 経路だけでなく癌の抑制に働く Rb 分子の制御にも関与することである。これまで HCV の NS3 分子の発現誘導能を知られていたが、そのメカニズムはまだ十分には解明されてこなかった。今回発見した HCV の NS3-4A 分子による Riplet 分子の分解が肝癌発症に関与していることが予想

される。

E. 結論

マウスを用いたモデル実験系から、HCV の治療効果と相関のある III 型インターフェロンは、生体内において IPS-1 分子依存的に産生されることが示唆された。また、III 型インターフェロンは、従来の治療に用いられている I 型インターフェロンとは異なり NK 細胞や CTL 等の細胞傷害活性を誘導することなく、直接肝細胞内の抗ウイルス分子の発現を誘導し HCV の排除を引き起こす効果があることが示唆された。

さらに、HCV による発がん機構の一つとして、ウイルスの NS3-4A 分子による Riplet 分子の分解がその要因の一つであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M.

TLR3/TICAM-1 signaling in tumor cell RIP3-dependent necroptosis. *Oncoimmunology*. 1(6):917-923. (2012)

Azuma M, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the

TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 α (+) dendritic cells. *Oncoimmunology*. 1(5):581-592. (2012)

Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(6):2066-71. (2012)

Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol*. 86(1):185-94.

2. 学会発表

Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. Riplet ubiquitin ligase plays essential role in RIG-I-mediated type I interferon production, and is targeted by hepatitis C virus 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 (神戸)

押海裕之、松本美佐子、瀬谷司 C 型肝炎ウイルスが、Riplet ユビキチンライゲースを分解し RIG-I 依存的な I 型インタ

ーフェロン産生を抑制するメカニズム
の解明 60回日本ウイルス学会学術
集会 2012年11月(大阪)

Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya
T. Riplet ubiquitin ligase is essential
for TRIM25-mediated RIG-I
activation and is targeted by
Hepatitis C virus IEIS2012
Homeostatic Inflammation
Symposium 2012年10月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H.	The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site.	Virus Res.	163	390-395	2012
Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T.	Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro.	Biochim Biophys Acta.	1820	1886-1892	2012
Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M.	Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis.	PLoS Pathog.	8(8)	e1002860,	2012
Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T.	In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle.	Microbiol Immunol.	56(1)	1-9	2012
Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H.	HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production.	PLoS One	7	e51393	2012
Nishitsuji H, Abe M, Sawada R, Takaku H	ZBRK1 represses HIV-1LTR-mediated transcription.	FEBS Lett.	586	3562-3568	2012

Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, <u>Hotta H.</u>	Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α .	J Virol	86(23)	12903-11	2012
Shoji I, Deng L, <u>Hotta H</u>	Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders.	Front Microbiol	2:A278	39817	2012
Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, <u>Hotta H.</u>	Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production.	Microbes Infect.	14(1)	69-78	2012
Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, <u>Hotta H.</u>	A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization.	J Med Virol	84(2)	229-234	2012
El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H.</u>	Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy.	Intervirology	55(1)	39823	2012
El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, <u>Hotta H.</u>	NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients.	J Clin Microbiol	50(12)	3886-92	2012
El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, <u>Hotta H.</u>	Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy.	PLoS ONE	7(2)	e30513	2012

Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, <u>Hotta H</u> , Hayashi Y.	Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C.	Int J Mol Med	30(5)	1048-52	2012
Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, <u>Hotta H</u> .	Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load.	J Gastroenterol	47(10)	1143-51	2012
Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H</u> , Sada K.	HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells.	PLoS ONE	7(10)	e46634	2012
Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, <u>Hotta H</u> .	Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization.	PLoS One	8(2)	e55874	2013
El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, <u>Hotta H</u> .	Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma.	Hepatology		In press	2012
Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, <u>Hotta H</u> , Hayashi Y.	Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia.	Hepato Res		In press	2012
Mori K, (加藤)	Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Virus Genes	44	374-381	2012

Sejima H, (加藤)	Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA.	Virus Research	167	74-85	2012
Takeda M, (加藤)	Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines.	Journal of General Virology	93	1422-1431	2012
Takeda M, (加藤)	Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication.	FEBS Open Bio	2	279-283	2012
Marozin S, (加藤)	Post-translational modification of VSV glycoprotein, but not JNK inhibition, is the antiviral mechanism of SP600125.	Journal of Virology	86	4844-4855	2012
Iikura M, (加藤)	ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	56	1407-1413	2012
Yamashita A, (加藤)	Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star <i>Alloeocomatella polycladia</i> .	Marine Drugs	10	744-761	2012
Takeshita S, (加藤)	Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells.	Journal of Gastroenterology	47	195-201	2012
Fujimoto Y, (加藤)	Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge <i>Amphimedon</i> sp.	PLoS One	7	e48685	2012

Koike K, (加藤)	Eradication of hepatitis C virus subgenomic replicon by interferon results in aberrant retinol related protein expression.	Acta Medica Okayama	66	461-468	2012
Kuroki M, (加藤)	PML tumor suppressor protein is required for HCV production.	Biochemical and Biophysical Research Communications	430	592-597	2013
Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Nagla. E. S., Harada S, Kohara M, <u>Tsukiyama-Kohara K.</u>	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3.	Virus Research	163	405-409	2012
Saitou M, Kohara, M, <u>Tsukiyama-Kohara K.</u>	Hepatitis C virus promotes expression of the 3β -hydroxysterol δ 24-reductase through Sp1.	J Med Virol	84	733-746	2012
Inoue K, <u>Tsukiyama-Kohara K.</u> , Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, Kuge S, Yoshida M, and Kohara M.	Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1.	Biochem Biophys Res Com.	428	494-499	2012
Sekiguchi, S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, <u>Tsukiyama-Kohara K.</u> , Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K and Kohara M.	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver.	PLoS ONE	7(12)	E51656	2012
<u>Tsukiyama-Kohara, K.</u>	Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus.	Int J Mol Sci	13	15271-15278	2012