

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007年度～2008年度
課題番号：19590756
研究課題名（和文）C型肝炎ウイルス蛋白 NS3 ヘリカーゼによるウイルス増殖制御機構の解明
研究課題名（英文）
Analyzing the mechanism of replication of hepatitis C virus by NS3 helicase.
研究代表者 前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師
研究者番号：70397298

研究成果の概要：

本研究の目的は C 型肝炎ウイルス(HCV)増殖制御因子として申請者らが新たに明らかにした非構造蛋白 NS3 ヘリカーゼ・ドメインに着目し、同領域による HCV 増殖制御機構の解明を通して、新たな抗 HCV 治療戦略の基盤を形成することにある。申請者らは本研究において、HCV ゲノムの相同組み換え実験により、ウイルスゲノム増殖には HCV の非構造蛋白 NS3 ヘリカーゼドメインが決定的な役割を果たすことをまず明らかとしたが、詳細なマッピングを行うことにより、さらに最終的に6アミノ酸部位に絞られることを示した。一方、ウイルス増殖を制御する宿主の主要機構である自然免疫との関連に注目し、RIG-I に誘導されるインターフェロン発現シグナルを NS3 蛋白は構造依存的に抑制することを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HCV、NS3 ヘリカーゼ、自然免疫、HCV ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

申請者らは C 型肝炎ウイルス(HCV)の増殖力を規

定する領域を明らかにするため、HCV 増殖モデルである HCV レプリコンシステムを用い、増殖能の異

なる2種類の HCV の相同組み換えによって、NS3 ヘリカーゼ・ドメインが増殖力を規定する領域として抽出されることをおおよそ明らかとしていたが、最終的に増殖制御のクリティカル領域なのか、不明であった。

HCV 増殖は、HCV そのものの増殖力、インターフェロン等の自然免疫系分子を中心とした宿主因子群によるウイルス抑制力、さらにはこれらの自然免疫を回避するウイルスのじくみ、の3者によって決定されるものと考えられる。ところが HCV 増殖制御において、NS3 ヘリカーゼ・ドメイン構造と自然免疫には、どのような相互の関連があるのか、全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、システマチックな HCV ゲノム検索によって、増殖に必須な部位として絞り込まれた NS3 ヘリカーゼ領域において、どの領域が増殖制御にクリティカルな最終領域であるのか明らかにすること、さらに自然免疫系とNS3との関連を明らかにすること、さらにはNS3構造がインターフェロン治療を含めた臨床的事象にどのように関連するのか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HCV 増殖モデルを用い、HCV 増殖を規定する NS3 ヘリカーゼ構造のさらなる詳細な mapping を行う

(2) NS3 構造と自然免疫系分子の関連について培養細胞を用いた in vitro 解析を行う

(3) 実際の C 型慢性肝炎症例において NS3 構造がどのような意義を持つのか、臨床症例における HCV ゲノム解析を行うことによって明らかとする。

4. 研究成果

(1) HCV 増殖を規定する NS3 ヘリカーゼ構造最小領域の決定

HCV 増殖を規定する部位として、高増殖株 HCV-N と低増殖株 HC-J4 との相同組み換えにより、低増殖力の HC-J4 であっても NS3 ヘリカーゼと NS5B から 3' UTR にかけての2領域が HCV-N に置換されれば、高増殖 HCV になることを示した。さらなる詳細なマッピングによって、最終的にヘリカーゼドメインにおいては、6アミノ酸領域に絞られることを明らかとした。一方、高次構造モデルからの予想では、これらのアミノ酸領域はヘリカーゼ酵素活性の中心ドメインではなく、アミノ酸表面に位置するものと予想された。すなわち、アミノ酸変異により、NS3 蛋白と他の蛋白との相互作用の変化が、増殖力を決定づけるものと予想された。

(2) NS3 蛋白は RIG-I 誘導性自然免疫シグナル活性化を構造依存的に抑制する

細胞内センサー分子である RIG-I に誘導される自然免疫系の発動に、NS3 蛋白が構造によってどのように関与するのか、培養細胞系を用いた検討を行った。すなわち、高増殖株 HCV-N 由来の NS3/4A 蛋白発現プラスミドを Huh7 にトランスフェクションすると、RIG-I により活性化される ISRE 活性化が著明に抑制された。一方で、低増殖株 HC-J4 由来の NS3/4A では ISRE 活性化の抑制は弱かった。すなわち、NS3 構造により RIG-I 誘導性シグナルは抑制されるが、その程度は NS3 構造に依存することを明らかにした。

(3) ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例における NS3 構造の検討

一方、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例において、治療開始前の血清を用いて HCV 全ゲノムシーケンスを行い、ウイルス増殖力、あるいは薬剤感受性と関連する HCV のゲノム領域の抽出を行った。現在 HCV の NS5A、あるいはコア領域における

特定の変異と薬剤感受性、ウイルス量が著明な関連性があることを明らかとした。NS3 と関連する臨床パラメータについては、さらなる解析により検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M.
Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro.
Hepatol Res. 2008 Sep;38(9):909-18. (査読有)
- 2) Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M.
Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.
Hepatol Res. 2008 Jul 20. (査読有)
- 3) Maekawa S, Amemiya F, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N.
Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.
J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.

(査読有)

- 4) Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M.
Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response.
J Gen Virol. 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.12):3323-33. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. 前川伸哉、榎本信幸、他
Whole HCV sequencing による治療感受性規定領域の決定
第 12 回日本肝臓学会大会
ワークショップ Viral genotyping/sequencing の臨床的意義 2008 年 10 月 2 日 東京
2. 前川伸哉、榎本信幸、他
HCV ゲノム検索によるペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療感受性規定領域の決定
第 44 回日本肝臓学会総会
ワークショップ ウイルス感染・複製・排除のメカニズム 2008 年 6 月 6 日 松山
3. 前川伸哉、榎本信幸
HCV 遺伝子構造による自然免疫 RIG-I 経路阻害活性の検討
第 94 回日本消化器病学会総会
シンポジウム ウイルス肝炎・肝癌に対する生体防御 2008 年 5 月 8 日 福岡
4. Maekawa S, Enomoto N, et.al
Molecular evolution of hepatitis C virus in a

patient with liver transplantation.

International Symposium on Hepatitis C
Virus and Related Viruses (14th Annual
Meeting) September 9-13, 2007 Glasgow
(Scotland).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
講師

研究者番号:70397298

(2)研究分担者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
教授

研究者番号:20251530

(3)連携研究者

なし