

平成20年6月3日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790333
 研究課題名（和文） サイクリン依存性リン酸化酵素阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製
 阻害の分子機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism for repression of HCV replication
 by cyclin dependent kinase inhibitors
 研究代表者
 棟方 翼（MUNAKATA TSUBASA）
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：50420237

研究成果の概要：

我々は、癌抑制遺伝子産物Rbのリン酸化状態の変化がC型肝炎ウイルス（HCV）の複製に及ぼす効果を調べるため、Rbをリン酸化するサイクリン依存性リン酸化酵素（CDK）の阻害剤を利用した。その結果、複数のCDK阻害剤が培養細胞でのHCVの複製を抑制することを発見した。特に、CDK4の過剰発現はウイルス複製を活性化し、ノックダウンはウイルス複製を抑制したことから、CDK4の関与は明らかである。更に我々は、ヒト肝臓キメラマウスを用いたHCV感染の動物モデルでも、CDK阻害剤が抗HCV効果を有することを実証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・ウイルス学

キーワード： 病原性、抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）は、全世界で推定1億7千万人の感染者が存在する、極めて重要な感染症の原因因子である。HCVはフラビウイルス科・ヘパシウイルス属のRNAウイルスであり、9.6kbのプラス鎖の一本鎖RNAをゲノムとする。HCVの最大の病理学的特徴

は、肝臓に特異的に感染した後、急性肝炎を起こす稀な株もあるものの、一般にヒト肝細胞に長期間持続感染することで肝炎が慢性化して脂肪肝・肝繊維症となり、最終的に肝硬変を経て肝臓癌に至ることにある。日本では近年、HCVはB型肝炎ウイルス（HBV）を抜いて、最も肝臓癌の発症と関連したウイルスと

しての立場を確立している。

一方 HCV 感染者の治療に関しては、未だにワクチンが実用化されていないため、ペグ付加により体内での安定性を高めたインターフェロン・アルファ (IFN α) と、核酸アナログの抗ウイルス薬リバビリンとの併用療法が现阶段でのスタンダード・プロトコルである。しかし、この標準的な治療法でさえ治癒率が六割に届かず、細胞毒性が高く副作用が強いことから、より効果的で同時に副作用の弱い、新規の治療法の開発が必須である。

2. 研究の目的

我々は、宿主細胞の癌抑制遺伝子産物 Rb が HCV 複製により負に制御されることを発見し、ウイルス性の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B が Rb に結合してタンパク質分解を誘導することを昨年報告した (Munakata, T, *et al*, PNAS 102, 18159-18164, 2005)。HCV 感染に由来する肝細胞癌において、Rb 及び Rb が抑制的に作用する転写因子 E2F の経路に異常があることは既に明らかであったが、我々はそれらの臨床的な知見を裏付ける分子メカニズムを始めて提唱した。RB は網膜芽細胞腫で変異が導入された遺伝子として最初に同定されたが、その後、骨肉腫や小細胞肺癌でも RB への変異が見つかり、Rb の関わる経路が様々な癌の発生に共通して存在することが分かっている。特に、アデノウイルスの E1A やヒト・パピローマウイルスの E7 等の、複数の DNA ウイルスが持つ oncoprotein の共通の標的因子として Rb が再発見されて以来、我々の成果とも合わせて、ウイルス感染による細胞の癌化で Rb の果たす役割は広く認知されてきた。

今回我々は、Rb のリン酸化状態を変化させることが HCV の複製にどのような効果をもたらすのか調べるため、**Rb をリン酸化すること**

が判明しているサイクリン依存性リン酸化酵素 (CDK) の阻害剤が HCV の複製に及ぼす効果を観察した。Rb が HCV の複製に必須なウイルス性 RNA ポリメラーゼ NS5B に結合して、その複製活性を阻害すること、また Rb がリン酸化により不活性型になるとこれまで報告されていることを考え合わせると、CDK 阻害剤は Rb を非リン酸化型にして、HCV 複製阻害を誘導することが予想された。

3. 研究の方法

(1) CDK阻害剤によるHCV複製阻害の特異性及び細胞毒性の解析

予備的な実験においてCDK阻害剤の抗HCV作用をHCVレプリコン細胞で検討したところ、CDK4阻害剤が一番効果的だった。この時、阻害剤の濃度は三点(5, 20, 100 microM)、添加時間は一点(24hr)しか条件検討を行っていない。より詳細にHCV複製阻害効果を検討するため、レプリコン細胞(HCV N株)とコントロール細胞に対する阻害剤の添加条件を、濃度は0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100 Mの十点で、時間は12, 24, 48, 72, 168 hrの五点で振り、実験を行う。各条件でウエスタン・プロット法によりウイルス蛋白質(Core, NS3, NS5A, NS5B)の発現量を調べると同時に、RNA抽出も行い、定量的RT-PCR法によりウイルスRNAの発現量も比較する。また、阻害剤の各添加条件での細胞毒性を検討するため、WSTアッセイ又はLDHアッセイを行う。

CDK阻害剤としては、予備実験に用いたRoscovitineとCDK4 Inhibitor以外に、Alsterpaullone, Aminopurvalanol A, CDK2 Inhibitor I, CDK4 Inhibitor II, Fascaplysin, Hymenialdisine, Olomoucine II, NU6102, Staurosporine, SU9516等が存在する。これらの薬剤に対しても同様に解析を行い、HCVの複製阻害活性と細胞毒性の検討を行う。

(2) CDK4の機能抑制又は機能過剰がHCV複製に与える効果の解析

阻害剤を使用せずにCDK4の機能を抑制するため、siRNAによるノック・ダウン実験を行い、CDK4又はその活性化因子であるサイクリンD1、D2、D3の発現を抑える必要がある。まず、各標的に対するsiRNAの配列の選定及びトランスフェクションの最適化を行い、標的蛋白質の発現量が80%以上低下する条件をウエスタン・ブロット法で検討する。適切な抗体がない場合は、定量的RT-PCR法により、mRNAの発現量の低下を検討する。

またCDK4のリン酸化酵素活性を上げるために、培養細胞系でCDK4及びサイクリンDを過剰発現するための発現ベクターを構築する。コントロールとしてCDK4以外のCDKの発現ベクターも準備する。野生型の配列だけでなく、CDK4の場合、活性化変異であるR24C及び酵素活性を失う変異を導入した発現ベクターも作成する。その後、各発現ベクターの細胞へのトランスフェクションを行い、目的の蛋白質が細胞で過剰発現するかをウエスタン・ブロット法で検討する。

(3) CDK阻害剤がHCV感染に与える効果の解析

予備の実験で用いたHCVのレプリコン細胞は、ジェノタイプ1b型のHCV N株由来の全長ゲノムRNAを有する。我々は、ジェノタイプ2a型のJFH-1株由来の全長ゲノムRNAを持つReplicon細胞も保持していることから、上記の解析をこの細胞でも行う（JFH-1株のサブゲノム・レプリコン細胞では、同様の結果を得ている）。CDK4 InhibitorでJFH-1のレプリコンの複製阻害も認められた場合は、JFH-1由来の感染性HCV粒子を利用して、HCVの感染及びそれに続く複製をCDK阻害剤が阻害可能かを検討する。CDK4 InhibitorでJFH-1のレプリコンの複製阻害が起こらない

場合、他のジェノタイプ1b型のレプリコン細胞もしくはジェノタイプ1a型のレプリコン細胞を利用して、この阻害剤の作用が1b型特異的か否かを検討する。

感染細胞でCDK4 InhibitorがHCV複製を有効に阻害した場合、まず、長期間の阻害剤処理により、その細胞からHCVを完全に除去して治癒可能かを検討する。また、個体レベルでのCDK阻害剤の効果を検討するため、CDK阻害剤の中で安全性試験が既になされている化合物を用いて、ヒト肝臓キメラマウスへのHCV持続感染に対する効果を見る（東京都臨床医学総合研究所 小原道法先生との共同研究）。

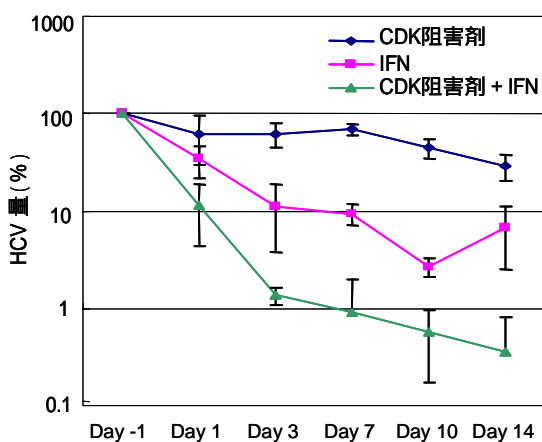
4. 研究成果

(1) CDK阻害剤はジェノタイプ1型とジェノタイプ2型の双方のHCVの複製を抑制した。インターフェロン難治性の患者が多い1b型、新規の抗HCV薬であるシクロスポリン誘導体が効きにくい2a型、それぞれに効果があったことから、CDK阻害剤の抗HCV薬としての可能性が極めて大きいと判断できる。

(2) CDK4の過剰発現を行うとHCV増殖は活性化した。一方、CDK4のsiRNAによるノックダウンを行うとHCV増殖は抑制された。この挙動は、CDK4阻害剤の効果と矛盾しない。阻害剤を用いた実験の場合、本当にその阻害剤が目的とする標的蛋白質を抑えておらず、別の標的を介して効果を発揮する場合も報告されているが、今回のCDK阻害剤の解析では、CDKがその標的であることが明確に示された。

(3) HCVのレプリコン細胞でCDK阻害剤の効果が再現性よく観察されたため、HCVの培養細胞系での持続感染モデルで同様の解析を行ったところ、期待通り抗HCV作用が見出さ

れた。そこでさらに、動物モデルでも検討を行った結果、下に示すように、CDK阻害剤の単独投与でHCV量を1/3以下に抑えたとともに、IFNとの併用投与でIFN単独投与と比較して一桁近くHCV量を低下させた。CDK阻害剤でHCVの複製が阻害されることは新しい知見であり、その分子機構及びモデル動物での薬効を更に解明することで、インターフェロンを中心とした現在の治療法で効果のない感染者の治療が期待できる。



ヒト肝臓キメラマウスでのCDK阻害剤の抗HCV作用の検討

HCVとしては1b型をマウスに感染させた。インターフェロン(IFN)としてはPEG付加したものを使用した。

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 1件)

(1) Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huibregtse J, Nomoto A, Lemon SM. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog* **3**, 1335-1347, 2007. (査読有)

[学会発表](計 9件)

(1) 棟方 翼(代表)
Recognition of hepatitis C virus by TLR3
第31回日本分子生物学会年会
2008年12月11日
神戸ポートアイランド、神戸、日本

(2) 棟方 翼(代表)
TLR3はC型肝炎ウイルス感染を抑制する
第56回日本ウイルス学会学術集会
2008年10月26日
岡山コンベンションセンター、岡山、日本

(3) 棟方 翼(代表)
Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C viral infection
第15回国際HCVシンポジウム
2008年10月07日
マリオット・リバーセンター、サン・アントニオ、アメリカ

(4) 棟方 翼(代表)
Anti-hepatitis C virus effects of cyclin-dependent kinase inhibitors
第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム
2008年9月08日
兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、淡路、日本

(5) 棟方 翼(代表)
Negative feedback regulation of hepatitis C virus replication by TLR3
第14回国際ウイルス会議
2008年8月12日
イスタンブール・コンベンションセンター、イスタンブール、トルコ

(6) 棟方 翼(代表)
Toll-like receptor 3 is a downstream target of Rb/E2F pathway activated by hepatitis C virus
第30回日本分子生物学会年会
2007年12月14日
パシフィコ横浜、横浜、日本

(7) 棟方 翼(代表)
C型肝炎ウイルスのRNAポリメラーゼNS5Bが癌抑制遺伝子産物Rbを分解する時に関与する宿主因子の同定
第55回日本ウイルス学会学術集会
2007年10月23日
札幌コンベンションセンター、札幌、日本

(8) 棟方 翼(代表)
Toll-like receptor 3 is a downstream target of Rb/E2F pathway activated during hepatitis C virus infection and replication
第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム
2007年9月5日
兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、淡路、日本

(9) 棟方 翼(代表)
Regulation of Toll-like receptor 3 expr

ession by hepatitis C virus
第8回国際プラス鎖RNAウイルスシンポジウ
ム
2007年5月27日
ルネッサンス・メイフラワー・ホテル、ワシ
ントンDC、アメリカ

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

CDK 阻害剤による C 型肝炎ウイルスの複製
抑制

発明者： 棟方 翼、稲田 誠、野本 明男

権利者： 東京大学

産業財産権の種類： 特許権（国内）

出願番号： 特願 2008-194237

出願日： 2008 年 7 月 29 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

棟方 翼 (MUNAKATA TSUBASA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50420237

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし