

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659371

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスの持続感染に関与するウイルス蛋白の新しい分子機構の解明

研究課題名（英文） Analysis for molecular mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced protein associated with persistent HCV infection

研究代表者

坪内 博仁 (TSUBOUCHI HIROHITO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60145480

研究成果の概要（和文）：本研究では、補体 C4 に C型肝炎ウイルス（HCV）由来 NS3/4A プロテアーゼを混合すると、約 17kDa の 2 つの蛋白と約 15kDa の 1 つの蛋白断片が出現することを見出した。また、NS3/4A プロテアーゼは濃度依存的に C4 活性を阻害し、古典経路活性化を低下させた。以上のことから、HCV NS3/4A プロテアーゼは補体 C4 を直接切断し、補体の古典経路活性化を抑制すると考えられ、HCV 由来蛋白は、補体の宿主免疫応答に対し抑制的に作用し、HCV 持続感染に寄与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms underlying the persistence of Hepatitis C virus (HCV) infection are hypothesized to involve viral proteins abrogating the host immune response. Here, we report that HCV NS3/4A protease is associated with production of the C4 fragment and that this action affects the host immune response. In vitro, HCV NS3/4A protease showed concentration-dependent cleavage of C4 and a HCV NS3/4A protease inhibitor inhibited this cleavage. Functionally, cleavage of C4 by HCV NS3/4A protease inhibited the classical pathway and this inhibition was also abrogated by a HCV NS3/4A protease inhibitor. Our results indicate that HCV NS3/4A protease inhibits complement activation through cleavage of C4, and that C4 cleavage by HCV NS3/4A protease should be one of the mechanisms underlying persistent HCV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）に感染した場合は急性肝炎を発症し、その約 7 割は持続感染の状態を維持し、一部の症例は慢性肝炎から肝硬変、肝癌に進展する。HCV は持続感染を維持するために、さまざまな方法で宿主の自然免疫、獲得免疫システムから逃避することが知られており、HCV 蛋白による自然免疫の阻害は細胞内と細胞外で機能すると報告されている（ウイルス 58 巻、p19-26、2008）。

HCV コア蛋白と HCV NS3 は樹状細胞からの IL-10 産生を誘導し、アロ抗原能を低下させる。また、ウイルス感染排除に働く I 型 IFN 産生経路はいくつかの HCV 蛋白により阻害される。RIG-I や MDA5 は HCV RNA の増幅過程で生じる dsRNA を感知し、ミトコンドリア上の IPS-1/MAVS/Cardif・VISA にシグナルを伝え、TBK1 や IKK ϵ を介して IRF3/IRF7 を活性化させることで I 型 IFN を産生するが、NS3/4A は IPS-1 を分解することで（*Proc Natl Acad Sci*

USA 2005)、NS3 は TBK を阻害することで (*Hepatology* 2005)、I 型 IFN 応答を阻害する。また、NS3/4A は TLR3 のシグナルを、NS5A は MyD88 を阻害する可能性もある (*J Virol* 2007)。このように HCV 蛋白は不十分な宿主免疫応答を誘導することで持続感染を維持していると考えられている。しかし、HCV 持続感染の分子機構はまだ十分解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、HCV 感染者血清のプロテオーム解析で、宿主免疫に重要な補体の断片が HCV 感染者に多く認められることを見出した。さらに、*in vitro* で HCV 蛋白の一つ HCV NS3/4A プロテアーゼが補体 C4 を直接分解することを見出した。しかし、HCV NS3/4A プロテアーゼが補体 C4 を分解する分子機構は十分明らかになっていない。本研究では、補体 C4 断片化と HCV 由来蛋白との関連について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Materials

HCV NS3/4A protease は anaspec 社 (Fremont, CA)、HCV core と HCV NS5 は prospec 社 (Israel) から購入した。単離されたヒト由来補体 (C1、C2) は Hycult 社 (Netherlands)、C4 と C4 deficient guinea pig serum (C4dGPS) は Sigma Aldrich 社 (St. Louis) から購入した。HCV セリンプロテアーゼ阻害剤 VX-950 は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) から購入した。veronal buffer は Wako (Japan)、羊赤血球は Nippon Biotest Laboratories inc (Japan)、hemolysin は DENKA SEIKEN Co. Ltd, (Japan) より購入した。

NS3/4A protease cleavage assay

C4 (3 μ l) に HCV NS3/4A protease、Core もしくは NS5 (3 μ l) と 30mM dithiothreitol (DTT) 含有 Assay buffer (Sensolyte® 490 HCV Protease Assay Kit, anaspec) 9 μ l を混合し、30°C30 分 incubate した。C4、HCV NS3/4A protease、Core もしくは NS5 それぞれ単独の場合は、それぞれ 3 μ l に Assay buffer 12 μ l を混合した。上記混合溶液を一次元 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて分離し、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色した。HCV セリンプロテアーゼ阻害剤は NS3/4A プロテアーゼと 30°C30 分 preincubate した後、C4 と 30°C30 分 incubate した。CBB 染色で検出したタンパクは Nippi inc. (Tokyo, Japan) にて N 末端ペプチドシーケンシングを行った。

Hemolytic analysis

溶血素に感作された羊赤血球 (Ab-sensitized sheep erythrocyte) (EA) に補体の中間体を順次添加する方法を用いた。赤血球や補体の希釈には 2%geratin 含有 veronal buffer (GVB) を使用した。また、すべての操作は氷上で行った。赤血球 (5 \times 10⁸cells/ml)10ml に hemolysin を加え、37°C30 分 incubate し、EA を作成した。EA5ml に 10 μ g の C1 を加え、30°C 15 分 incubate し、2 回 GVB で洗浄した (EAC1)。NS3/4A プロテアーゼは、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20% Glycerol、100 mM KCl、1 mM DTT および 0.2 mM EDTA を含む溶液中に存在し、pH7.5 に調整されていた。C4 活性への影響を均一にするため、反応液は、最終的に全体が 2mM DTT になるように調整した。C4 と NS3/4A プロテアーゼを incubate 後、EAC1 100 μ l と混合し、30°C15 分 incubate した (EAC1-C4)。GVB で 2 回洗浄後、C2 (0.1mg/ml) を 1 μ l 加え、室温で 4 分 incubate した (EAC1-C4-C2)。さらに、GVB で 2 回洗浄後、EAC1-C4-C2 30 μ l に 80 倍希釈した C4dGPS 150 μ l を加え、37°C30 分 incubate した。遠心し、上清を 415nm で吸光度測定し、溶血度を以下の式で計算した。

hemolysis (%) = (sample OD415-GVB OD415) / (total hemolysis by distilled water OD415-GVB OD415)

また、VX-950 は NS3/4A プロテアーゼと 30°C 30 分 preincubate した後、C4 と 30°C30 分 incubate した。

統計解析

Western blot にて検出した約 17kD のバンド濃度は、image J を用いて定量化した (densitometric analysis)。C4 と NS3/4A protease を混合し、得られたバンドの濃度をコントロールとし、約 17kD のバンド濃度の濃度比を比較した。統計解析は SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。Mann Whitney-U test もしくは Tukey's test を用いて検定し、p<0.05 を統計学的に有意差ありとした。

4. 研究成果

HCV NS3/4A protease は C4 を切断する

C4 に HCV NS3/4A プロテアーゼ、HCV core、もしくは HCV NS5 を混合し、C4 が切断されるかを解析した。C4 と NS3/4A プロテアーゼを incubate した溶液には、C4 や NS3/4A protease 単独では見られない 17kD (2つ) と 15kD の合計 3 つのタンパクが検出された (Figure 1A)。一方、C4 と HCV core もしくは NS5 と incubate した溶液には、17kD と 15kD の 3 つのタンパクは検出されなかった (Figure 1A)。

N 末端領域のアミノ酸解析から、約 100kD

のタンパクは C4 α (N 末端は NVNFQKAI)、約 75 kD のタンパクは C4 β (N 末端は KPRLLIFS)、32 kD のタンパクは C4 γ (N 末端は EAPKVVEE) と考えられた。また、17kD のタンパクの N 末端のアミノ酸配列は、C4 のアミノ酸配列 SAEVCQCA (1584-1598)、AEGKCPKQ (1591-1598)、15kD のアミノ酸配列は EAPKVVEE (1454-1461) と同一であった。さらに、同定した 15kD タンパクの N 末端のアミノ酸配列は C4 γ 鎖の N 末端配列とも一致したことから、HCV NS3/4A protease は C4 のアミノ酸配列 1583 番目システインと 1584 番目セリン間、1590 番目のシステインと 1591 番目のアラニンを切断すると考えられた (Figure 1B)。

HCV NS3/4A プロテアーゼは濃度依存性に classical pathway 活性を低下させる。

HCV NS3/4A プロテアーゼが C4 を切断するという事象の機能的意義を解析するため、EA に補体を順に混合し、補体の classical pathway を再現した。C4d GPS には C4 以外の補体成分が含まれるため、C3 と terminal complement component (C5-C9) の source として使用した。C4 や NS3/4A プロテアーゼの濃度を変えて混合し、EAC1-C4-C2 を作成し、C4d-GPS を添加し、赤血球の溶血度を検討した。NS3/4A プロテアーゼ存在下では、非存在下と比較し濃度依存性に溶血度が低下した (Figure 2)。この実験から、NS3/4A プロテアーゼは C4 との相互作用を通じて、classical pathway (古典経路) により引き起こされる赤血球の融解、すなわち溶血、を阻害することが示唆された。

NS3/4A プロテアーゼ阻害剤は NS3/4A プロテアーゼによる C4 切断を抑制し、classical pathway 活性を回復させる

NS3/4A protease 阻害剤が NS3/4A プロテアーゼによる C4 切断に関わるかどうかを検討した。濃度の異なる NS3/4A プロテアーゼにプロテアーゼ阻害剤 (VX-950) を混合したのち、C4 を混合し電気泳動で C4 切断の有無を検討した。VX-950 (10 μ M 以上) を用いて NS3/4A プロテアーゼを前処理することで、NS3/4A プロテアーゼにより出現する C4 由来の 17kD と 15kD の 3 つのタンパクは検出されなくなり、同時に 32kD の C4 γ 鎖の濃度は上昇した (Figure 3A)。すなわち、プロテアーゼ阻害剤は NS3/4A プロテアーゼによる C4 の切断を阻害し、17kD と 15kD のタンパクは C4 γ 鎖由来と考えられた。また、NS3/4A プロテアーゼに VX-950 を混合した後に赤血球溶血試験を行うと、非混合群と比較し C4 の活性が有意に高かった (Figure 3B)。VX950 が NS3/4A プロテアーゼを阻害することにより、classical pathway (古典経路) 活性低下が抑制されることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①馬渡誠一、宇都浩文、坪内博仁：HCV 感染者血清中に出現する補体 C4 断片は抗ウイルス治療効果の分子マーカー候補である。第 99 回日本消化器病学会総会。2013 年 03 月 21 日 (鹿児島市)。

②Mawatari S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Suzuki T, Tsubouchi H: Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation through cleavage of complement component C4. The 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012 年 11 月 09 日～2012 年 11 月 13 日 (Boston, MA, USA)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：血中 HCV 検出方法及び抗 HCV 治療の効果判定方法

発明者：坪内博仁、宇都浩文、馬渡誠一

権利者：国立大学法人 鹿児島大学

種類：特許願

番号：P12-0711 (特願 2012-204395)

出願年月日：平成 24 年 9 月 18 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内博仁

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60145480

(2) 研究分担者

宇都浩文 (講師)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

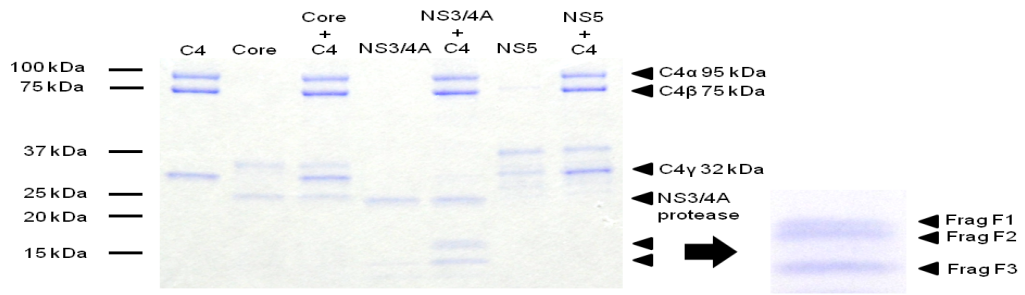
研究者番号：20347058

(3) 研究協力者

馬渡誠一 (大学院生)

Figure 1

(A)



(B)

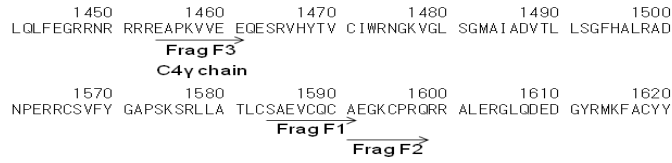


Figure 2

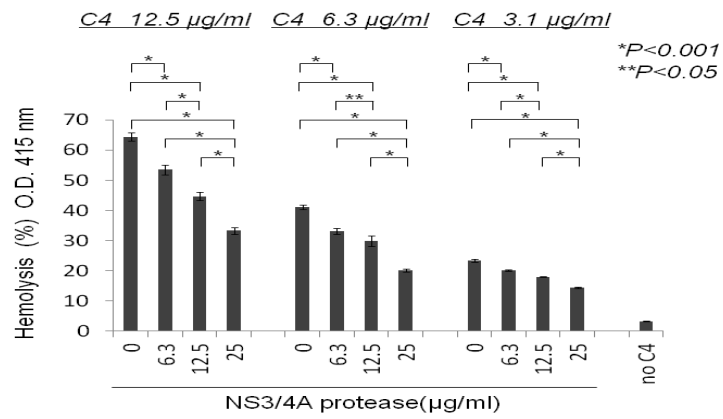
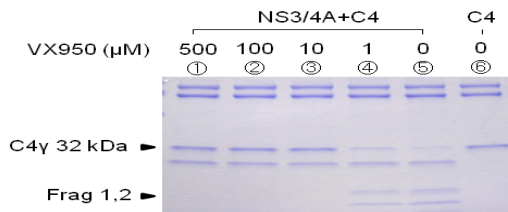
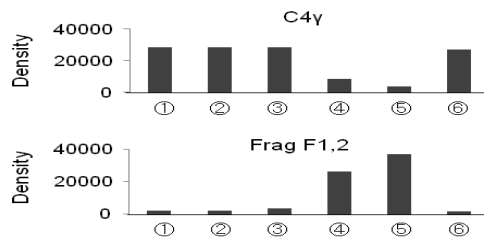


Figure 3

(A)



(B)



(C)

