

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2008~2009

課題番号:20790487

研究課題名(和文) 分子シャペロン、小胞体(ER)ストレスとHCV複製増殖動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of effects of molecular chaperone and ER stress on HCV replication

研究代表者

中川 美奈(NAKAGAWA MINA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号:30401342

研究成果の概要(和文):

当該研究期間において我々は、HCV 増殖により誘導されるシャペロン蛋白と HCV 増殖との関連性および HCV の持続感染や炎症、発癌に関して、これらのシャペロン蛋白や小胞体ストレスが病態に与える影響の解析を遂行し、以下の結果を得た。1) シャペロン蛋白の一種であるサイクロフィリン A, B, C を siRNA により発現抑制することでレプリコン増殖は有意な抑制効果を認め、これらのサイクロフィリンが HCV 増殖に関与していると考えられた。2) 免疫抑制能の弱いサイクロスポリン D も同様の HCV レプリコン増殖抑制効果がみられ、サイクロスポリンの抗ウイルス効果はサイクロフィリンの活性阻害を介することが確認された。3) Two hybrid 法を用いて HCV 蛋白とサイクロフィリン A, B および C の相互作用を確認したが、いずれの組み合わせでもシグナルは検出されず、HCV 蛋白とサイクロフィリンの直接会合は認めなかった。4) ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを対象に Two Hybrid 法による網羅的探索を行い宿主蛋白の網羅的スクリーニングを行ったところ、サイクロフィリンと会合する蛋白として Fumarylacetoacetate hydrolase (FAH)、Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP) が同定された。siRNA による発現抑制によりウイルス増殖を確認したところ FAH により HCV レプリコン増殖が抑制されることを確認した。

今後これらの知見を統合し、宿主蛋白を標的とした新たな抗ウイルス分子標的の同定・新規治療開発をめざし臨床応用への基盤を築くことにつながると思われる。

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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 肝臓学

キーワード:C 型肝炎ウイルス、分子シャペロン、小胞体ストレス、サイクロフィリン、HCV レプリコン

1. 研究開始当初の背景

慢性 HCV 感染症は、現在我が国だけでも 150 万人の患者がおり、肝病態進展の阻止にウイルス排除は不可欠である。持続的なウイルス排除を目的としてインターフェロン (IFN) を基軸とした治療が行われており、現時点で効果的な治療は Peg-IFN と ribavirin の併用療法であり、難治例に対しても著効率は約 50% まで期待できるようになったが、その効果は未だ十分とはいえず新たな治療法の開発が望まれている。

これまで我々は HCV レプリコンシステムを改変したキメラリポーター発現レプリコン (Feo レプリコン) による HCV 発現定量系を用いて、免疫抑制剤であるサイクロスポリン A (CsA) が HCV 増殖を強力かつ特異的に抑制する作用があること、またその作用は CsA の細胞内受容体であるサイクロフィリンの関与が示唆されることを見だし報告した (Nakagawa, 2005 Gastroenterology)。タンパク質の高次構造形成や転写制御、ウイルス感染などに重要な役割を担っていることで知られるイムノフィリンの一つであるサイクロフィリンは、ウイルス感染や増殖に関与することが報告されているが、HCV に関してもサイクロフィリンとの関連性が国内の他グループからもほぼ同時期に報告され、サイクロフィリンを新たなターゲットとした HCV 治療戦略が期待されている。

2. 研究の目的

本研究において我々は、HCV 増殖に関連する宿主蛋白 (サイクロフィリン) および相互作用するウイルス蛋白・エピトープを同定するため Two hybrid system を用いたスクリーニング、および特定を行い、ウイルス増殖抑制のための新たな分子標的探索を目指し、以下の技術的課題の達成を目標とする。すなわち、

- (1) サイクロフィリンを標的とした抗ウイルス療法の確立
- (2) 分子シャペロンを標的とした抗ウイルス療法の確立
- (3) HCV 感染増殖に関連する宿主因子、および抗ウイルス薬剤・化合物・ペプチドの網羅的スクリーニング

これらの知見を統合し、HCV 感染におけるウイルスおよび宿主蛋白相互作用の細胞・分子レベルでの理解を深め、新規クラス抗 HCV 療法薬剤の開発・実用化に必要な基盤情報の蓄積を到達目標とし研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) サイクロフィリンを標的とした抗ウイルス療法の確立

HCV 増殖に関連する宿主蛋白 (サイクロフィリン) および相互作用するウイルス蛋白・エピトープ同定するためヒト肝臓 cDNA ライブラリーを対象に Two Hybrid 法による網羅的探索を行い、ウイルス増殖抑制のための新たな分子標的の特定を目指す。HCV レプリコン発現細胞・および HCV-JFH1 感染細胞において、これらの個々のサイクロフィリンの発現を siRNA ベクターにより抑制し HCV 発現増殖動態を解析し、ウイルス感染に必須のサブタイプを同定する。さらに realtime PCR 法による細胞内・培地中の HCV 粒子のコピー数の定量、個々の HCV 構造・非構造蛋白の検出により、ウイルス感染サイクルのどのステップに関連するかを明らかにする。

(2) 分子シャペロンを標的とした抗ウイルス療法の確立

HCV 増殖抑制における小胞体ストレス関連蛋白の機能をさらに解析し、HCV 複製増殖への関与について解析し、新たな治療標的と成りうるかを探索する。

(3) HCV 感染増殖に関連する宿主因子、および抗ウイルス薬剤・化合物・ペプチドの網羅的スクリーニング

我々は RNA 干渉 (RNAi) の応用により HCV 増殖を特異的に抑制できることを報告し (Sakamoto, *EMBO Reports* 2003)、また、安定した形状の siRNA を発現することが可能なタンデム型 siRNA 発現プラスミドベクターを独自に構築している。本研究ではこの siRNA 発現ライブラリー、及び遺伝子発現ライブラリーとキメラリポーターレプリコンシステムを使用し、細胞内のすべてのトランスクリプトームを対象としたウイルス増殖に関わる宿主遺伝子の包括的スクリーニングを行う。また、ランダムな配列の短鎖ペプチドを発現するレトロウイルスライブラリーにより、HCV 遺伝子複製増殖に関連する宿主蛋白の機能を阻害するペプチド配列をスクリーニングする。これらの結果より創薬研究プロセスの第一段階である宿主蛋白を標的とした抗ウイルス物質のリード化合物の探索を進め、臨床応用への基盤を築く。

4. 研究成果

(1) Two hybrid法を用いてHCV 蛋白とサイクロフィリンA,BおよびCの相互作用を確認したが、いずれの組み合わせでもシグナルは検出されず、HCV 蛋白とサイクロフィリンの直接会合は認めなかった。そこで、第3の蛋白と複合体を形成している可能性を考え、サイクロフィリンと会合する宿主蛋白を同定するため、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを対象にTwo Hybrid法による網羅的探索を行い宿主蛋白の網羅的スクリーニングを行ったところ、7種の宿主蛋白が同定された。これらのうち

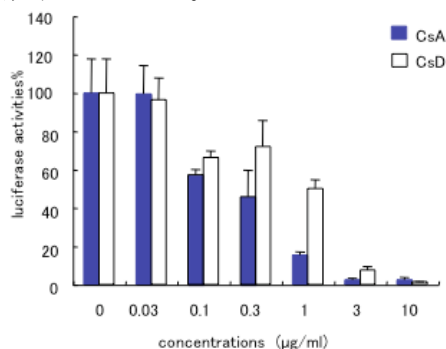
Fumarylacetate hydroxylase の発現を siRNA により knock down したところ HCV レプリコンの発現が有意に低下した。

Sequence analysis of screened clones

Name	No. of appearance
G protein (GNB2L1)	1
• Fumarylacetoacetate hydrolase (FAH)	1
Mitochondrion	3
kelch domain containing 3	2
• IGF-binding protein 2 (IGFBP2)	1
Albumin	1
Unidentified	9

シクロスポリン A の抗ウイルス効果はサイクロフィリンへの特異的結合・機能阻害によって発現することがわかっており、HCV-NS5B 蛋白がその標的分子との報告があるが、依然不明な点が多い。今回の結果より、同定されたサイクロフィリン結合蛋白のいくつかはウイルス増殖に関連することが発現解析により明らかになった。これらの蛋白の機能解析を進めることによりウイルス増殖の新たな機構が明らかになる可能性がある。

(2) シクロスポリン A の誘導体であるシクロスポリン D は免疫抑制能は弱いですがサイクロフィリンの活性阻害は残存していることが知られているが、同様の HCV レプリコン増殖抑制効果がみられた。

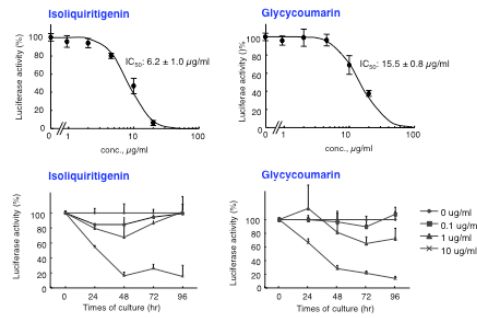


HCV 感染症に対するサイクロフィリンをターゲットとした治療法は、宿主因子を標的にしていることから薬剤耐性が出にくく、今後の

薬剤開発に期待できると思われる。

(3) 漢方生薬成分化合物の細胞内 HCV 増殖に対する効果に関して、HCV レプリコンシステムを用いて解析を行い、甘草由来の 2 種の化合物、isoliquiritigenin、及び glycycomarin に HCV replicon 増殖抑制作用を見出した。これらの薬剤は、HCV-JFH1 培養系においてもウイルス感染増殖を抑制することを確認した。

2種の甘草由来精製化合物のHCV Replicon増殖抑制効果



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 3 件)

1. Tanaka Y, Nakagawa M, et al; Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* 2009; 41: 1105-1109 (査読有り)
2. Itsui Y, Nakagawa M, et al; Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 2009; 50: 1727-1737 (査読有り)
3. Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, et al; Two flavonoids extracts from a herb, Glycyrrhizae radix, inhibit in-vitro hepatitis C virus replication. *Hepatology Res* 2009; 39: 60-69 (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

1. Funaoka Y, Sakamoto N, Mina Nakagawa, et al; In-vitro replication and interferon sensitivity of core aa 70 and 91 mutant HCV cell culture. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Oct-30-2009, Boston, MA.
2. Suda G, Sakamoto N, Mina Nakagawa, et al; In-vitro and in-vivo Characterization of a new genotype 2b HCV clone and 2b/JFH1 intergenotypic chimera and analyses of the factor that regulate interferon sensitivity. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Oct-30-2009,

Boston, MA.

3. Itsui Y, Sakamoto N, Mina Nakagawa, et al; Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. Oct-30-2009, Boston, MA.
4. Mishima K, Sakamoto N, Mina Nakagawa, et al; Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 16th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-3-2009, Nice, France.
5. 中川美奈ほか; HCV コアおよび NS5A 変異からみた難治性 C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の効果予測. 第 95 回日本消化器病学会総会パネルディスカッション. 2009 年 5 月 7 日, 札幌
6. 中川美奈ほか; C 型慢性肝炎のインターフェロン治療における男女差とウイルス側因子の関係. 第 44 回日本肝臓学会総会シンポジウム. 2009 年 6 月 4 日, 神戸
7. 中川美奈ほか; HCV コアおよび NS5A 変異からみた PEG インターフェロン治療の効果予測. 第 13 回日本肝臓学会大会シンポジウム(JDDW). 2009 年 10 月 14 日, 京都

[図書] (計 2 件)

1. 中川美奈ほか; 消化器病の進歩-原点から未来への情報発信-第 9 4 回日本消化器病学会総会記念誌~高齢者 C 型慢性肝炎に対する治療法の選択; 医学書院 2009, 90-93
2. 箆島裕子, 中川美奈ほか; medicina ウイルス肝炎 日常診療のポイント~C 型肝炎の日常診療~治療の適応、選択の実際; 医学書院 2010, 437-441

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 美奈 (NAKAGAWA MINA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号 : 30401342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし