

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460181

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスとマラリア原虫の肝特異的発現蛋白質が相互の増殖に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of influence of hepatitis C virus and Plasmodium falciparum proteins specifically expressed at liver on growth of HCV and P. falciparum.

研究代表者

長野 基子 (Nagano-Fujii, Motoko)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：90304089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマラリア原虫が肝細胞寄生期には明確な肝細胞変性を起こさず、臨床症状を引き起こさない事実に着目し、マラリア原虫肝細胞期タンパク質発現により、C型肝炎ウイルス(HCV)の増殖やHCVによる肝細胞障害が減弱されるかどうかを検討した。マラリア原虫Circumsporozoite proteinは細胞毒性をほとんど示さないが、HCV非構造タンパク質領域を自律増殖するサブレプリコン細胞の増殖を抑制することや同細胞において炎症性サイトカインIL-8 mRNA量を増加させる傾向を持つことが示され、抗HCV薬剤としての可能性を検討するに値するものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：While Plasmodium is at the liver stages, clinically symptom is silent and do not cause obvious cytopathy to hepatocytes. We examined if Plasmodium proteins specifically expressed at the liver stages have potential to inhibit hepatitis C virus (HCV) replication and to reduce cytopathy of hepatocytes caused by HCV infection. P. falciparum circumsporozoite protein showed almost no cytotoxicity against control cells whose HCV subgenomic RNA replicon was eliminated by interferon- treatment. Cell viability was reduced compared to control cells when circumsporozoite protein was transiently expressed in Huh7.5-derived cell lines harbouring an HCV subgenomic RNA replicon. Inflammatory cytokine IL-8 mRNA level was increased in circumsporozoite protein-expressing cells harbouring an HCV subgenomic RNA replicon. We concluded that P. falciparum circumsporozoite protein is one of the candidates as the anti-HCV drug.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス マラリア原虫 Circumsporozoite protein ETRAMP13 細胞増殖 IL-8

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者は世界で1億3000万人、国内で約200万人と推定され、その多くが慢性肝炎の症状を呈し、高率に肝硬変、肝細胞がんへと進行する。HCV感染の治療にはインターフェロンとリバビリンの併用療法があるが、著効率は約60%に留まっている。治療にはDAA (直接作用型抗ウイルス薬) が使用され始め、著効率も改善されつつあるが、薬剤耐性の問題や価格の問題などがあるため、HCV感染に有効な抗ウイルス薬の開発はまだ終わりを迎えていないと考えられる。これまで、我々も含め多くの研究者が、HCVに有効な治療薬の標的分子探索を念頭に、HCVのタンパク質と相互作用しHCV複製及び粒子産生に関与する宿主タンパク質や、感染細胞のがん化や細胞障害発症に関わる宿主タンパク質を、ヒト肝臓や肝培養細胞のcDNAライブラリーからスクリーニングすることにより見出してきた。このようなアプローチでは、HCVの肝細胞感染機構の解明すなわち感染細胞内で誘発されている現象の解明は進んだが、治療薬の開発につながる可能性の高い(宿主の)標的タンパク質を見出すことには必ずしも直結しなかった。治療薬開発につながるような新しいアプローチによる研究が必要であると考えた。

今までにないアプローチによる抗HCV薬を模索する中で、マラリア原虫がヒトへの感染初期に肝細胞に進入し多数に分裂しメロゾイトに成熟するにも関わらず、肝細胞に明確な細胞変性を起こさないことを改めて認識した。最近、マラリア原虫の肝細胞期発現タンパク質、Circumsporozoite protein [特にPEXEL (plasmodium export element) /VTS (vacuolar translocation signal)モチーフ]が自身や宿主タンパク質の発現抑制や細胞内局在に重要な役割を果たしており、肝細胞障害を軽減している可能性が報告された。また、p36p、SPECT、SPECT2や、肝細胞内でのマラリア原虫成熟に必須のUIS3、UIS4、成熟した原虫の放出に関わるMSP1、LISP1などの肝細胞期に関与するタンパク質が次々と同定されている(Amino *et al.*, Cell Host Microbe. 3:88-96, 2008; Menard *et al.*, Trends Parasitol. 24:564-569, 2008; Ishino *et al.*, Cell Microbiol. 11:1329-1339, 2009)。マラリア原虫が肝細胞内で多数増殖し成熟しても肝細胞障害が明白でないのは、これらマラリア原虫の肝細胞期発現タンバ

ク質/ペプチドが強力な肝細胞環境修飾作用を有しているからだと考えられる。マラリア原虫肝細胞期発現タンパク質/ペプチドが、HCVの増殖ならびに、HCVによる肝細胞障害に影響を及ぼす可能性が高く、これらタンパク質/ペプチドがHCV感染時の治療薬の候補となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、マラリア原虫の肝細胞環境修飾作用に着目し、肝細胞におけるHCV増殖やHCVによる肝細胞障害が、マラリア原虫肝細胞期タンパク質およびペプチドの発現により、減弱されるかどうかを検討することを目的とした。反対に、HCVタンパク質がマラリア原虫の肝細胞内寄生に及ぼす影響についても調べることを目的とした。本研究は、異種微生物由来のタンパク質/ペプチドを利用する新しい創薬の視点からの抗感染症薬の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) Circumsporozoite protein は *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) K-1株、ETRAMP (Early TRANscribed Membrane Protein) 13は *P. falciparum* 3D7株のゲノムを鋳型にしてそれぞれのタンパク質特異的なプライマーを用いてシグナルペプチド配列部分を除いた領域を増幅しpcDNA3.1/hygro(+)に組み込み、実験に供した。またこれらタンパク質の遺伝子配列をヒト型コドンに変換したものを人工合成し、それぞれpcDNA3.1/hygro(+)に組み込み、実験に供した。

(2) HCV非構造タンパク質領域のゲノムを自律的に増殖するHuh7.5細胞(HCVサブレプリコン細胞: HCV-1b Con1株由来)に一過性にCircumsporozoite protein、ETRAMP 13を発現させ、細胞増殖能に及ぼす影響をテトラゾリウム塩(WST-1)の分解を指標に解析した。

(3) 一過性にCircumsporozoite proteinを発現させたHCVサブレプリコン細胞および非発現レプリコン細胞にhuman TNF- α を添加し、NF- κ Bの細胞内局在の変化について細胞を細胞質分画と核分画に分けてウェスタンブロッティング法を行い、解析した。さらに、それらの細胞においてcaspase 3の活性化状態に違いがあるかを間接蛍光抗体法により検討した。さらに、HCVサブレプリ

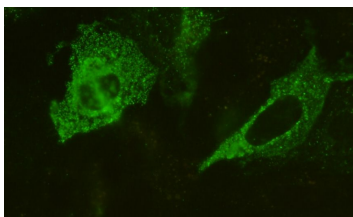
コン細胞と対照細胞 (cured 細胞) と比較して HCV サプレプリコン細胞で分泌亢進が認められた IL-8 の産生が Circumsporozoite protein により影響を受けるかどうかを real time PCR 法にて IL-8 の mRNA の発現量の変化を指標に解析した。

(4) HCV サプレプリコン細胞に一過性に Circumsporozoite protein を発現させ、Circumsporozoite protein が HCV 遺伝子の複製および HCV タンパク質合成に及ぼす影響を real time PCR 法および間接蛍光抗体法により解析した。

4. 研究成果

(1) Circumsporozoite protein を *P. falciparum* のゲノムから PCR 法によりクローニングした際、本タンパク質の中央部分に存在するアミノ酸の繰り返し配列が一因のせいか、アミノ酸変異を伴う遺伝子が増幅されることが続き、アミノ酸変異のない遺伝子を得るのにかなりの時間を要した。最終的には変異のない遺伝子を得ることができた。

クローニングできたアミノ酸変異のない Circumsporozoite protein あるいは ETRAMP 13 遺伝子を HCV サプレプリコン細胞および cured 細胞に遺伝子導入したが、発現が非常に弱く間接蛍光抗体法でもウエスタンブロッティング法でもほとんど発現を確認することができなかった。ヒト由来細胞に原虫コドンでアミノ酸発現させていることが弱い発現の原因である可能性を考え、ヒトコドンに置換して発現させたところ、強い発現が確認できた (図: Circumsporozoite protein)。



(2) Circumsporozoite protein 発現 HCV サプレプリコン細胞と非発現レプリコン細胞について細胞増殖能を比較したところ、Circumsporozoite protein 発現 HCV サプレプリコン細胞の方が有意に増殖抑制されていた。Circumsporozoite protein の細胞に対する毒性が考えられたが、cured 細胞に Circumsporozoite protein を発現させた場合には、非発現 cured 細胞との間で細胞増殖に有意な差は認められなかったため、明確な

細胞毒性によるものではないと考えられた。一方、ETRAMP13 発現細胞については、cured 細胞、HCV サプレプリコン細胞ともに非発現細胞に比べて増殖抑制が顕著で、ETRAMP13 は、細胞に強い毒性を示す可能性が示唆された。よって、以下 Circumsporozoite protein の抗 HCV 効果について検討することとした。

(3) Circumsporozoite protein 発現 HCV サプレプリコン細胞および非発現レプリコン細胞に human TNF- α を添加すると、NF- κ B が細胞質から核へ一部移行することは確認したが、Circumsporozoite protein による有意な核移行阻害は現時点では確認できていない。Circumsporozoite protein による HCV サプレプリコン細胞増殖阻害に活性型 caspase3 の亢進が関与する可能性を検討したが、抗活性型 caspase3 抗体を用いた間接蛍光抗体法では、明確な亢進は認められなかった。IL-8 mRNA 量は Circumsporozoite protein 発現により増加傾向が認められた。

(4) HCV サプレプリコン細胞において Circumsporozoite protein 発現による細胞内 HCV RNA 量及び HCV タンパク質量の明らかな変化は認められなかった。

以上のことから *P. falciparum* Circumsporozoite protein は、細胞毒性をほとんど示さないことが予想され、今後抗 HCV 薬剤としての可能性を検討するに値するものであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計48件)

- (1) [Saito-Ito A](#), [Kawai A](#), [Ohmori S](#), [Nagano-Fujii M](#). Continuous in vivo culture and indirect fluorescent antibody test for zoonotic protozoa of *Babesia microti*. Parasitol Int. 査読有, 65(5), 2016, 526-531. doi: 10.1016/j.parint.2016.03.007.
- (2) [Ohmori S](#), [Nagano-Fujii M](#), [Saito-Ito A](#). Development of absolute quantification method for genotype-specific *Babesia microti* using real-time PCR and practical experimental tips of real-time PCR. Parasitol Int. 査読有, 65(5), 2016, 567-571. doi: 10.1016/j.parint.2016.03.003.
- (3) [Deng L](#), [Chen M](#), [Tanaka M](#), [Ku Y](#), [Itoh T](#), [Shoji I](#), [Hotta H](#). HCV upregulates Bim through the ROS/JNK signalling pathway, leading to Bax-mediated apoptosis. J Gen

- Virol. 査読有, 96(9), 2015, 2670-2683. doi: 10.1099/jgv.0.000221.
- (4) Chen M, Gan X, Deng L, Hotta H. The NS5A protein of Hepatitis C virus transcriptionally upregulates the AGR3 gene expression. Kobe J Med Sci. 査読有, 61(1), 2015, E27-E35.
- (5) Iyori M, Nakaya H, Inagaki K, Pichyangkul S, Yamamoto DS, Kawasaki M, Kwak K, Mizukoshi M, Goto Y, Matsuoka H, Matsumoto M, Yoshida S. Protective efficacy of baculovirus dual expression system vaccine expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. PLoS One. 査読有, 8(8), 2013, e70819. doi: 10.1371/journal.pone.0070819.

〔学会発表〕(計 3 8 件)

- (1) 大森志保, 長野基子, 斎藤あつ子. 兵庫県捕獲マダニについてのバベシア属原虫感染調査. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 2016.3.19-20. 宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市)
- (2) 斎藤あつ子, 河合敦子, 大森志保, 長野基子, 蔡季君, 陳彦旭, 余明隆, 陳榮霖. ヒトバベシア症発生国台湾(高雄県)のヒトバベシア症疫学調査結果続報. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 2016.3.19-20. 宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市)
- (3) 大森志保, 河合敦子, 長野基子, 佐藤—美甘江利子, 富田茉莉, 増山敦子, 榊久実, 荻野慶隆, 今村京子, 鈴木和男, 是永正敬, 斎藤あつ子. 高知県のイノシシに寄生が認められたイノシシ特有のバベシア属原虫について. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 2015.3.21-22. 杏林大学三鷹キャンパス (東京都三鷹市)
- (4) 斎藤あつ子, 河合敦子, 大森志保, 長野基子, 栗山卓也, 浅海裕, 蔡季君, 陳彦旭, 余明隆, 陳榮霖. ヒトバベシア症発生国台湾のヒトバベシア症疫学調査結果. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 2015.3.21-22. 杏林大学三鷹キャンパス (東京都三鷹市)
- (5) 大森志保, 河合敦子, 長野基子, 佐藤—美甘江利子, 富田茉莉, 増山敦子, 榊久実, 荻野慶隆, 今村京子, 鈴木和男, 是永正敬, 斎藤あつ子. 和歌山県に続き高知県のイノシシに寄生が認

- められたイノシシ特有のバベシア属原虫について. 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2014.10.18-19. 兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)
- (6) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. The 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 7-11, 2014, Banff, Canada
- (7) 松岡裕之, 山本大介, 島田瑞穂, 早川枝李, 富田奨. 蚊の刺咬により皮膚に侵入したスホロソイトを皮膚内で殺滅できないか? 第 83 回日本寄生虫学会大会. 2014.3.27-28. 愛媛大学城北キャンパス (愛媛県松山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 基子 (NAGANO-FUJII MOTOKO)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号: 90304089

(2) 研究分担者

斎藤 あつ子 (SAITO-ITO ATSUKO)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 00223131

大森 志保 (OHMORI SHIHO)
兵庫医療大学・薬学部・助教
研究者番号: 90379488

(3) 連携研究者

堀田 博 (HOTTA HAK)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 40116249

松岡 裕之 (MATSUOKA HIROYUKI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10173816
(平成 25 年度～平成 27 年度)
(平成 28 年度より研究協力者: 長野県伊那保健所・所長)