

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460383

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスによるB細胞チロシンキナーゼ活性制御の意義

研究課題名(英文) Role of the regulation of B cell protein-tyrosine kinase by hepatitis C virus

研究代表者

定 清直 (SADA, Kiyonao)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10273765

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)：C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎や肝細胞癌のほかに、Bリンパ腫などの疾患を引き起こすが、その発症機構は不明であった。HCVはB細胞でチロシンキナーゼと相互作用するために、本研究ではチロシンキナーゼによるHCVのライフサイクルへの影響について解析した。その結果、HCVのウイルス粒子形成過程はチロシンキナーゼc-Ablによって制御されていることを見出した。

さらに並行して感染免疫応答の新しいメカニズムについての研究を進め、Dectin-1とSykを介するマスト細胞の新たな抗真菌免疫応答のメカニズムや、Sykの基質である3BP2のB細胞における新しい調節メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) infects B lymphocytes and induces B cell lymphoma, in addition to chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. However, molecular mechanism for the pathogenesis of HCV infection-mediated disorders remains unclear. In this study, we investigated the role of protein-tyrosine kinases on HCV lifecycle, because HCV interacts with protein-tyrosine kinases in B cells. As a result, we found that HCV particle assembly involves phosphorylation of NS5A (non-structural protein of HCV) by the c-Abl protein-tyrosine kinase.

In parallel with this study, we investigated the molecular mechanism of infection immunity. We identified the novel mast cell anti-fungal immunity through Dectin-1 and Syk, and novel regulatory mechanism of Syk substrate 3BP2 (c-Abl SH3 domain-binding protein-2) in B cells.

研究分野：ウイルス学、生化学

キーワード：C型肝炎ウイルス チロシンキナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎や肝細胞癌のほかに、Bリンパ腫(non-Hodgkin's lymphoma)や混合型クリオグロブリン血症などの疾患を引き起こすが、その発症機構は不明であった。我々は以前、HCVのウイルス蛋白質の一つであるNS5A(nonstructural 5A)がB細胞チロシンキナーゼ Sykと Fynに会合することを見出し、報告を行った(Inubushi et al. J. Gen. Virol. 2008、Nakashima et al. PLoS One 2012)。またHCV感染によるプロテオーム解析を行い、AMPキナーゼやグルコース濃度によるHCV複製の調節機構を明らかにした(Nakashima et al. Microbiol. Immunol. 2011)。

(2) Syk(Spleen Tyrosine Kinase)は脾臓から単離された非受容体型チロシンキナーゼで、B細胞受容体やFc受容体に会合し、感染免疫応答に重要な役割を担っている。最近では臨床医学の分野で、エピジェネティックな調節異常による網膜芽細胞腫の発症や(Zhang et al. Nature 2012)や、前骨髄球形白血病の分化誘導療法(Hahn et al. Cancer Cell 2009)、関節リウマチ(Weinblatt et al. New Eng. J. Med. 2010)に対するSyk阻害薬の有効性が報告されている。我々は、Sykの基質としてアダプター蛋白質3BP2を同定し、B細胞やマスト細胞における新しいシグナル調節メカニズムを報告した(Shukla et al. J. Biol. Chem. 2009、Chihara et al. Genes Cells 2011)。

### 2. 研究の目的

これらの背景をもとに、本研究ではHCVがチロシンキナーゼを介するシグナル伝達経路にどのような影響を及ぼしているのか、またチロシンキナーゼによるHCVの感染と複製への影響を解析し、HCVによる様々な疾患の発症機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では様々なウイルス学的・生化学的研究手法が用いられた。具体例としては以下の通りである。

- (1) 感染性のHCVを用いた感染実験
- (2) 分子標的治療薬を用いた阻害実験
- (3) RNA干渉法によるロックダウン実験
- (4) 蛍光顕微鏡による細胞内局在の解析
- (5) 遺伝子クローニング、点突然変異の導入
- (6) 安定発現株の樹立
- (7) FACSによる発現解析
- (8) 免疫沈降実験などの生化学的解析実験
- (9) DNAマイクロアレイ
- (10) real-time PCR
- (11) ELISA

組換えDNA実験はP1レベル、組換えHCVを

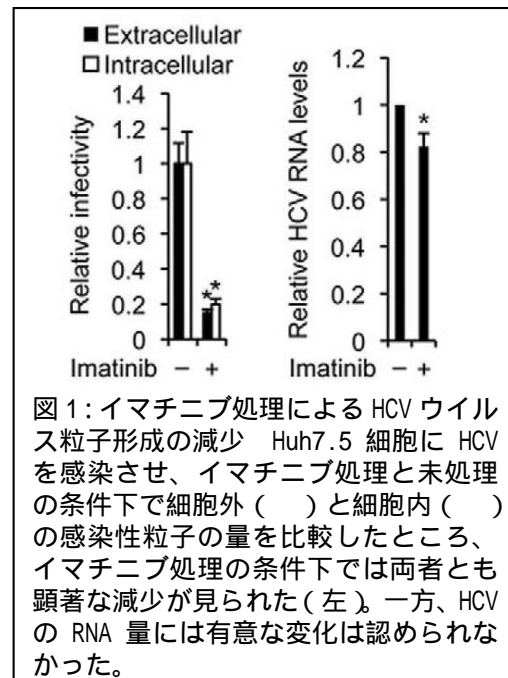
用いた実験はP2レベルの拡散防止措置をとって行った。また本研究は福井大学遺伝子組換え実験安全管理規定・共同利用施設放射線障害予防規定に基づく届出と承認を得て行った。研究試料についてのMTA(Material Transfer Agreement)は事前に全て締結済みであり、組換えHCVを用いた実験は大臣確認実験の承認済みである。また本研究には患者から直接提供を受けた試料は含まれない。

### 4. 研究成果

#### (1) HCVの粒子形成過程にはチロシンキナーゼc-Ablが含まれる。

従来HCVの非構造タンパク質NS5Aはそのセリン/スレオニンリン酸化依存性にウイルスゲノムRNAの複製とウイルス粒子形成を調節すると考えられてきた。ところが、そのリン酸化を担う宿主のキナーゼは完全には同定されていなかった。

本研究ではウイルスの粒子形成にc-AblチロシンキナーゼによるNS5Aのリン酸化が含まれることを新たに見出した。白血病治療薬としても用いられるc-Ablの分子標的阻害薬であるイマチニブを用いた実験やRNA干渉法によるロックダウンによりc-Ablの発現量を減少させると、HCVの感染性粒子産生が顕著に減少するが、その際RNAの翻訳や複製には影響が見られなかった(図1)。



実際にNS5AはHCVに感染した細胞でチロシンリン酸化されており、この現象はc-Ablのロックダウンにより同様に減少することが確認された。

部位特異的な点突然変異を用いた実験では、NS5A全体のチロシンリン酸化にはチロシン330が、少なくとも部分的には、関与するこ

とが明らかとなった。このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した組換えウイルスを用いた実験では、HCV 粒子形成は抑制されるが、ウイルス全体ではなく、一部のゲノムを有するサブプレリコン (HCV の構造蛋白質部分のゲノムは欠失するが、宿主細胞内での複製能は有する) では複製に影響しなかった。

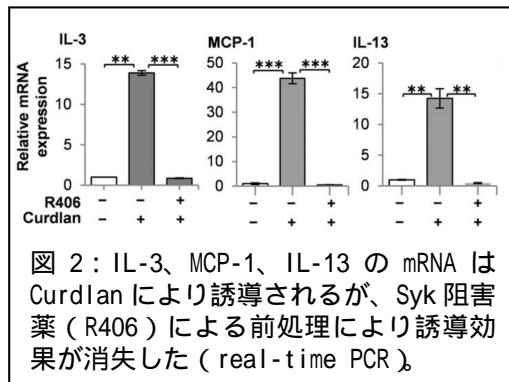
以上の結果は、c-Abl が NS5A のチロシン 330 をリン酸化することにより HCV ウイルス粒子形成を促進することを示唆するものである。(雑誌論文業績 1)

(2) マスト細胞では、Dectin-1 を介するシグナルが、Syk を介して特徴的な遺伝子発現やサイトカイン産生を誘導する。

HCV の研究と並行し、我々は新しい抗真菌免疫の分子メカニズムを見出した。Dectin-1 は真菌の細胞劇成分である  $\beta$ -グルカンを認識し、樹状細胞やマクロファージにおいてはチロシンキナーゼ Syk の活性化を介する抗真菌免疫に重要な役割を担っていることが知られている。近年、ヒトやマウスのマスト細胞においても Dectin-1 の発現が報告されたが、その生理的役割は不明のままであった。

本研究ではマスト細胞株 RBL-2H3 を用いて、Dectin-1 を介するマスト細胞の活性化と応答の分子メカニズムを詳細に解析した。マスト細胞を Dectin-1 特異的なアゴニストである Curdlan で処理すると、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化、Dectin-1 と Syk の SH2 ドメインの会合が誘導された。この現象は Dectin-1 の細胞内テール領域にある hemi 型 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) のチロシンリン酸化に依存するが、高親和性 IgE 受容体のサブユニットには無関係であった。

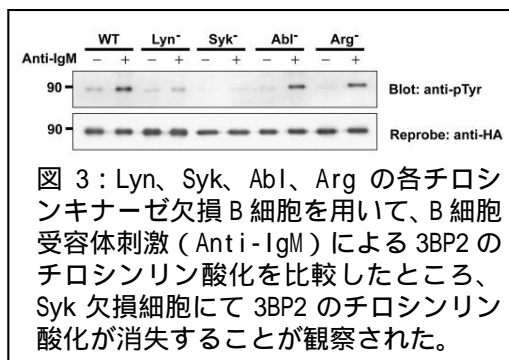
DNA マイクロアレイ解析や real-time PCR を用いた解析から Dectin-1 を介するシグナルは転写因子 Nfkbiz や MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)、IL-3、IL-4、IL-13、tumor necrosis factor (TNF)- などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を増強した。この反応は Syk 阻害薬を用いて細胞を前処理することにより消失した (図 2)。



これらの結果は Syk が Dectin-1 を介するマスト細胞の活性化に不可欠であることや、Dectin-1 を介するシグナルが、高親和性 IgE 受容体を介するものとは異なることを示唆するものである。Curdlan によるこれらの遺伝子発現はマスト細胞に特異的に観察されるものである。よって、Dectin-1 によるマスト細胞シグナルの発現は、新たな抗真菌免疫の仕組みを解明するものである。(雑誌論文業績 2)

(3) DT40 細胞では 3BP2 のチロシンリン酸化に Vav3 との相互作用が不可欠である。

我々がチロシンキナーゼ Syk の基質と同一したアダプター蛋白質 3BP2 (c-Abl SH3 domain-binding protein-2) について新たな知見を見出した。3BP2 は免疫系のシグナル伝達を調節することが知られている。従来我々は 3BP2 のチロシン 174、183、446 (マウス 3BP2) が Syk によりリン酸化され、チロシン 183 と SH2 ドメインが B 細胞受容体を介する NFAT の活性化に重要であることを報告した。本研究では様々なチロシンキナーゼ欠損 B 細胞を用いて Syk が 3BP2 のチロシンリン酸化に必須であることを見出した。(図 3)



点突然変異を用いた解析によりチロシン 174、183、426 (ニワトリ 3BP2) が Syk によりリン酸化されることや、SH2 ドメインがリン酸化に必要であることを明らかにした。さらにチロシン 426 のリン酸化が Vav3 の SH2 ドメインとの会合に必要であることを見出した。チロシン 426 をフェニルアラニンに置換した 3BP2 の発現は、野生型に比して B 細胞受容体を介する Rac1 の活性化を減弱させることが明らかとなった。

これらの結果から、3BP2 の Syk 依存性の 3BP2 チロシン 426 のリン酸化は、Vav3 との会合を通じて Rac1 の活性化を調節することが明らかとなり、3BP2 を介する新しい免疫応答調節メカニズムが明らかとなった。(雑誌論文業績 3)

(4) Syk 阻害薬について報告を行った。  
関節リウマチの新しい分子標的治療薬としての期待が高まっていた Syk 阻害薬についての和文総説を発表した。(雑誌論文業績 4-6)

<引用文献>

主な発表論文等の雑誌論文 No.1~3.

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 6 件)

1. Yamauchi, S., Takeuchi, K., Chihara, K., Sun, X., Honjoh, C., Yoshiki, H., Hotta, H., and Sada, K. Hepatitis C virus particle assembly involves phosphorylation of NS5A by the c-Abl tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 査読有, 290(36)巻, 21857-21864, 2015.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.666859.

2. Kimura, Y., Chihara, K., Honjoh, C., Takeuchi, K., Yamauchi, S., Yoshiki, H., Fujieda, S., and Sada, K. Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via Syk in rat mast cells. J. Biol. Chem. 査読有, 289(45)巻, 31565-31575, 2014.  
DOI: 10.1074/jbc.M114.581322.

3. Chihara, K., Kimura, Y., Honjoh, C., Yamauchi, S., Takeuchi, K., and Sada, K. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 is indispensable for the interaction with Vav3 in chicken DT40 cells. Exp. Cell Res. 査読有, 322(1)巻, 99-107, 2014.  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.12.026.

4. 本定 千知, 千原 一泰, 木村 幸弘, 竹内 健司, 定 清直. 関最新節リウマチ学 寛解・治癒を目指した研究と最新治療 Syk 阻害薬. 日本臨牀増刊号「最新関節リウマチ学 寛解・治癒を目指した研究と最新治療」 査読無, 521-524, 2014.

出版社 URL:

[http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z\\_mokuji/7204riumati.html](http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7204riumati.html)

5. 千原 一泰, 木村 幸弘, 本定 千知, 竹内 健司, 定 清直. チロシンキナーゼ Syk の生理機能とその阻害薬 分子標的治療からみた病態へのアプローチ. 日本臨床免疫学会会誌 査読無, 36(4)巻, 197-202, 2013.

DOI:10.2177/jsci.36.197

機関リポジトリ URL

<http://hdl.handle.net/10098/8452>

6. 木村 幸弘, 千原 一泰, 竹内 健司, 定 清直. 関節リウマチ ケアからキュアを目指した治療: Syk 阻害薬. 日本臨牀 査読無, 71(7)巻, 1248-1252, 2013.

リポジトリ URL:

機関 <http://hdl.handle.net/10098/8451>

出版社 URL:

[http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/g\\_mokuji/7107.html](http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/g_mokuji/7107.html)

[学会発表](計 10 件)

1. 山内 翔太, 竹内 健司, 千原 一泰, 孫 雪東, 本定 千知, 吉木 はつみ, 堀田 博, 定 清直. C 型肝炎ウイルス粒子形成における c-Abl の役割. BMB2015, 2015 年 12 月 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

2. 千原 一泰, 吉木 はつみ, 加藤 雄士, 本定 千知, 山内 翔太, 竹内 健司, 定 清直. アダプター蛋白質 3BP2 は分化した AML 細胞において Src 型チロシンキナーゼの活性化を促進する. BMB2015, 2015 年 12 月 3 日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

3. 本定 千知, 千原 一泰, 吉木 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 飛田 征男, 岩野 正之, 石塚 全, 定 清直. マスト細胞における C 型レクチン Mincle の機能解析. BMB2015, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

4. 山内 翔太, 竹内 健司, 千原 一泰, 孫 雪東, 本定 千知, 吉木 はつみ, 堀田 博, 定 清直. チロシンキナーゼによる HCV 複製の制御機構. 日本生化学会北陸支部第 33 回大会, シンポジウム「病原性ウイルス・免疫応答研究の最前線」, 2015 年 5 月 23 日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県・富山市).

5. 本定 千知, 千原 一泰, 吉木 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 飛田 征男, 岩野 正之, 石塚 全, 定 清直. マスト細胞における C 型レクチン Mincle の機能解析. 日本生化学会北陸支部第 33 回大会, 2015 年 5 月 23 日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県・富山市).

6. 千原 一泰, 木村 幸弘, 本定 千知, 吉木 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 定 清直. マスト細胞における Dectin-1 の機能解析: 真菌感染防御におけるマスト細胞の新たな役割. 日本生化学会北陸支部第 32 回大会, 2014 年 5 月 24 日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県・富山市).

7. 木村 幸弘, 千原 一泰, 竹内 健司, 本定 千知, 藤枝 重治, 定 清直. C 型レクチン Dectin-1 を介するマスト細胞の活性化機構. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

8. 千原 一泰, 木村 幸弘, 本定 千知, 竹内 健司, 定 清直. ニワトリ DT40 細胞

におけるアダプター蛋白質 3BP2 のチロシンリン酸化とVav3との会合メカニズム. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

9. 竹内 健司, 孫 雪東, 千原 一泰, Lin Deng, 勝二 郁夫, 堀田 博, 定 清直. C型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A におけるFyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月11日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市).

10. 定 清直. Syk 阻害薬. 第57回日本リウマチ学会・学術集会, シンポジウム「低分子化合物 - 新しい傾向抗リウマチ薬 - 」, 2013年4月18日, 国立京都国際会館(京都府・京都市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://biseibutu.labos.ac/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

定 清直(SADA, Kiyonao)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10273765

### (2)研究分担者

千原 一泰(CHIHARA, Kazuyasu)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00314948

竹内 健司(TAKEUCHI, Kenji)  
福井大学・医学部・助教(学内講師)  
研究者番号: 40236419

山内 翔太(YAMAUCHI, Shota)  
福井大学・医学部・特命助教  
研究者番号: 00728941

### (3)連携研究者

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