

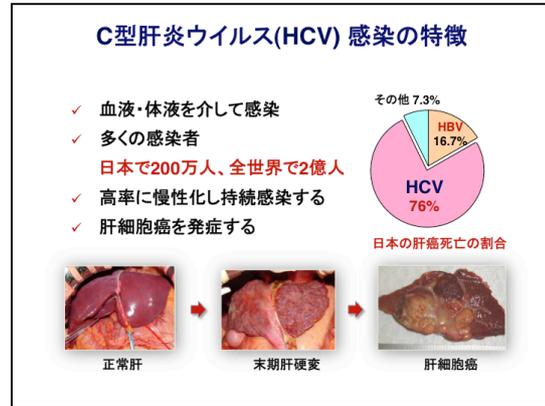
「C型肝炎ウイルス増殖の制御方法開発のための基盤研究」

神戸大学大学院医学研究科 勝二 郁夫

1 研究の背景と目的

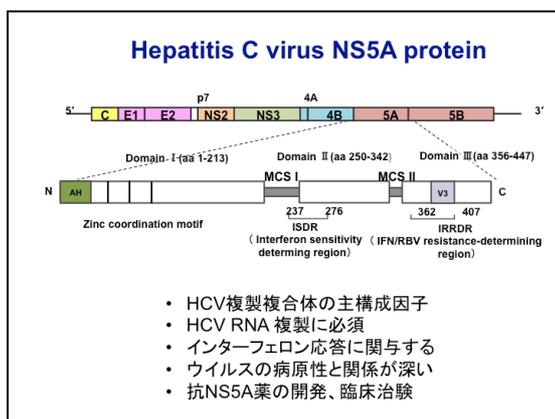
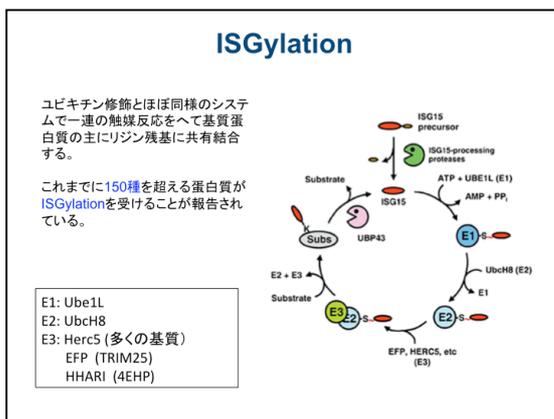
C型肝炎ウイルス(HCV) 感染は高率に慢性化し、肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。

世界に2億人、我が国に200万人のHCV感染者が存在する。我が国では年間3万人の肝臓死があり、その約80%がHCV感染によるものである。C型慢性肝炎の新規治療薬NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤が実用化され、ペグインターフェロン・リバビリン(PEG-IFN/RBV)療法との併用療法が2011年に認可された。申請者らはPEG-IFN/RBV併用療法が有効な症例と無効な症例のウイルスゲノム配列を



比較し、HCV NS5A蛋白質のdomain IIIのaa 356-447領域にPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績と高い相関を示す配列 Interferon/ribavirin resistance-determining region (IRRDR)を見出し、治療効果予測因子としての臨床的有用性をこれまで報告してきた。しかし、なぜIRRDR領域のアミノ酸配列がIFN応答性とよく相関するのか、その分子機序はまったく分かっていない。近年、HCV NS5A蛋白質がIFN依存性にISG15修飾 (ISGylation)され、HCV複製が抑制されることが報告された。ISG15が結合する部位はNS5AのLys379と報告されており、IRRDR領域内に含まれており、IRRDR変異がISGylationに影響する可能性がある。

本研究では HCV-NS5A の ISGylation に必要な E1, E2, E3 リガーゼを同定し、HCV-NS5A の ISGylation に必須の Lys 残基、NS5A 上の結合部位を明らかにする。さらに HCV NS5A が ISGylation を受ける分子機構と HCV の生活環における生理学的意義を解明することを目的とした。そして、この解析を通して IFN 抵抗性 HCV 克服のための分子基盤の構築を目指した。



2 研究方法・研究内容

1) HCV-NS5A の ISGylation を制御する E3 リガーゼの同定

ISGylation の E3 リガーゼとして HERC5, TRIM25 等が報告されている。Huh-7 細胞に HERC5 または TRIM25 を強制発現させ、コ・トランスフェクトした NS5A-Myc-His₆ への ISGylation を免疫沈降およびウエスタンブロット法で解析した。

2) HCV NS5A-E3 リガーゼの相互作用解析

同定された E3 リガーゼと NS5A を Huh-7 細胞にコ・トランスフェクトし、相互作用を免疫沈降法により解析した。また、NS5A と ISG15 の結合領域を解析した。

3) E1, E2, E3, ISG15 の発現誘導の解析

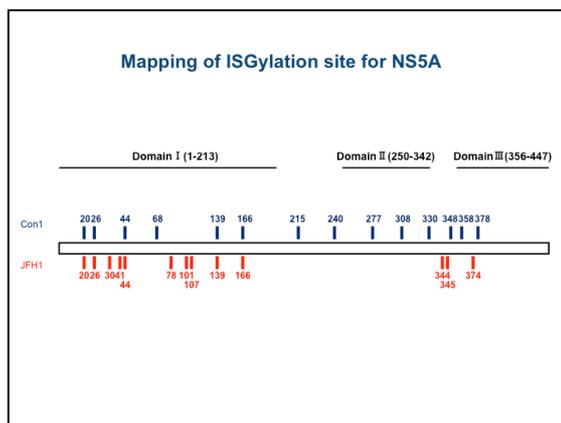
Huh7 細胞に IFN- α または IFN- β を投与し、24 時間後に細胞を回収し、E1, E2, E3, ISG15 の発現を real time PCR 法およびウエスタンブロット法で解析した。

4) 各 genotype の NS5A の ISGylation の解析

Con1 (genotype 1b), O (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a)株の NS5A を Huh-7 細胞にトランスフェクトし、E1, E2, E3, ISG15 を強発現させ、NS5A への ISGylation を解析した。

5) HCV NS5A 上での ISGylation 部位の同定

HCV Con 1 (genotype 1b) の NS5A 上には 14 個の Lys 残基、JFH1 (genotype 2a)が存在する。まず、JFH1 株のそれぞれの Lys 残基を Arg 残基に置換した NS5A 変異体発現プラスミドを作製した。Huh-7 細胞に各 NS5A 変異体発現プラスミドをトランスフェクトし、ISG15 が付加される部位を解析した。



3 研究成果

1) HCV-NS5A の ISGylation を制御する E3 リガーゼの同定

HERC5 を強制発現させたときに NS5A が ISGylation を受けるが、TRIM125 では ISGylation を受けないことから、HERC5 が E3 リガーゼとして機能することが示唆された。

2) HCV NS5A-ISG15 の相互作用解析

同定された E3 リガーゼと NS5A を Huh-7 細胞にコ・トランスフェクトし、ISG15 と NS5A の相互作用を免疫沈降法により解析した。NS5A は ISGylation を受けるだけでなく、ISG15 と相互作用することが示唆された。

3) E1, E2, E3, ISG15 の発現誘導の解析

投与前に E2 のみ若干の発現が検出されたが、他の因子は検出レベル以下だった。Huh7 細胞に IFN- α または IFN- β を投与すると E1, E2, E3, ISG15 の発現が著しく高いレベルで誘導された。

4) 各 genotype の NS5A の ISGylation の解析

Con1 (genotype 1b), O (genotype 1b), JFH1 (genotype 2a)株の NS5A を Huh-7 細胞にトランスフェクトし、E1, E2, E3, ISG15 を強発現させ、NS5A への ISGylation を解析したところ、Con1, O, JFH1 株いずれの NS5A も ISGylation を受けることが示唆された。

5) HCV NS5A 上での ISGylation 部位の同定

HCV Con 1 (genotype 1b) の NS5A 上には 13 個の Lys 残基が存在する。それぞれの Lys 残基を Arg 残基に置換した NS5A 変異体発現プラスミドを作製した。Huh-7 細胞に各発現プラスミドをトランスフェクトし、ISG15 が付加される部位を免疫沈降およびウエスタンブロット法で解析した。その結果、Lys379 に変異を導入しても ISGylation は消失せず、他の 1 箇所のみの変異導入でも ISGylation が消失せず、複数箇所 ISGylation を受けることが示された。Lys 残基をすべて Arg 残基に置換すると ISGylation は消失することから、Lys 残基が重要であることは確認できた。Lys 残基を一カ所だけ残した変異体を作製した。これらの変異体を用いて更に ISGylation 部位を同定する必要がある。

4 生活や産業への貢献および波及効果

HCV 感染者は世界で 2 億人、日本に 200 万人存在し、本邦での肝臓死は 3 万人/年で癌死亡原因の 3 位である。そして、肝臓の約 80%が HCV 感染によるものである。新規抗 HCV 薬が今後も登場するが、NS3 プロテアーゼ阻害剤ではエスケープ変異の出現が報告されており、各症例の治療応答性規定因子(宿主、ウイルス、治療)を考慮したきめ

こまかな医療が必要とされている。

NS5AはHCV複製の複製複合体を構成する因子であり、NS5Aに対するISGylationは複製に影響すると考えられる。今回の解析でHCV NS5A蛋白質はHERC 5によりISGylationされることが明らかになった。また、1b, 2a いずれのHCV genotypeでもISGylationを受けることが示された。また、NS5Aの13-14箇所存在するLys残基の複数箇所ISGylationされることが示唆された。更に研究を進め、HCVのNS5A蛋白質のISGylationの分子機序が明らかになれば、IFN応答を賦活化するような創薬への応用につながる可能性が期待できる。