

氏 名	たか はし ひとし 高 橋 仁
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 539 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	C型肝炎ウイルスサブゲノムレプリコン持続複製細胞を用いたウイルス ゲノム複製制御機構の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 伊 藤 信 行 教 授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

C型肝炎ウイルス (HCV) は非A非B型肝炎の主な原因ウイルスとして1989年に同定された。HCVの持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんといった慢性肝疾患の発症と密接に関連していると考えられている。しかしながら、HCVによるこれらの病態の発症機序は現在のところ明らかにされてはいない。その原因のひとつとしてHCVの増殖・複製機構を再現できるような効率の良い培養細胞系が確立されていなかったことが挙げられる。近年HCVゲノムの一部を高効率・持続的に複製させる培養細胞系 (HCV subgenomic replicon 細胞) の構築が報告された。著者は HCV subgenomic replicon 細胞を独自に樹立し、この細胞を用いてウイルス側および細胞側の因子による HCV の複製制御機構を明らかにすることを目的とした研究を行い、以下の研究成果を得た。

第一章 HCV genome RNA 5'末端構造の解析

HCVのゲノムRNAの5'非翻訳領域には、ウイルスタンパク質の翻訳に機能する内部リボソーム挿入部位 (IRES) 構造が存在することが知られている。しかしながら、HCVゲノムRNAの5'末端構造については、その詳細が未だ明らかになっていない。そこで著者は HCV subgenomic replicon 細胞 (レプリコン細胞) 中の、ゲノムRNA 5'末端構造の解析を行った。

レプリコンRNAの5'末端構造の解析は、以下の3種類の方法によって行った。(1) レプリコンRNAの5'末端を修飾し得る酵素で処理した後、5'末端への放射性リン酸の取り込みを検討した。(2) (1)の処理を行った後に、Nuclease P1 処理により HCV RNA を完全に加水分解した後、薄層クロマトグラフィーで展開し、放射標識された5'末端塩基を同定した。(3) OligoRNA ligation RT-PCR 法により5'末端の構造を解析した。これらの結果、レプリコン細胞から精製したサブゲノムRNAを直接リン酸化酵素で処理した場合、リン酸の取り込みはみられなかったが、脱リン酸化酵素による前処理を行うとリン酸の取り込みがみられた。このリン酸化を受けた塩基の解析ならびに OligoRNA ligation RT-PCR 法による解析の結果、5'末端塩としてAとGの両方が検出された。これらの結果から、レプリコン細胞において、少なくとも大部分のサブゲノムRNA 5'末端はリン酸化されており、Cap構造やタンパク質の共有結合などによる修飾を受けておらず、HCVゲノムの複製には5'末端塩基に特別な修飾は必要でない可能性が考えられた。5'末端がGから開始するサブゲノムRNAを導入して樹立したレプリコン細胞を継代後、ウイルスゲノムRNAの5'末端を解析すると、GあるいはAが約半分ずつ検出された。このことから、HCVゲノムの末端構造はレプリコン細胞における複製過程でGからAに変化することが示され、HCV複製の *de novo* の反応機構を考える上で重要な知見を与えた。

第二章 HCV 持続複製阻害に関与する細胞性因子の探索

レプリコン細胞は高効率・持続的にHCVサブゲノムRNAを維持することが知られている。このことは、レプリコン細胞内ではウイルス感染によって惹起されるインターフェロンシグナルの活性化によるHCVサブゲノムRNA複製阻害が生じないことを示唆する。即ち、レプリコン細胞の親株であるHuh-7細胞ではサブゲノムRNAの効率の良い持続複製を阻害する活性が欠損している可能性が考えられた。そこで著者はこの可能性を検討し、そのメカニズムを明らかにすることを目

的とした。

HCV持続複製を阻害する細胞性因子を探索するために、レプリコン細胞およびその親株である Huh-7細胞と、他の肝がん由来細胞である HepG2細胞において、インターフェロンシグナル関連の転写因子の活性を、各種転写因子応答配列を有するレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、HepG2細胞ではインターフェロン産生を誘導する poly I:C 刺激下で転写因子 Interferon regulatory factor-3(IRF-3)の活性は上昇したが、Huh-7ならびにレプリコン細胞ではその活性化はほとんどみられなかった。このことから、Huh-7およびレプリコン細胞ではインターフェロンシグナルの初期過程に欠損がある可能性が考えられた。そこで、この初期過程の中で、Huh-7およびレプリコン細胞内で活性が欠損し、HCV持続複製の阻害に関与する細胞性因子として、二本鎖RNAを認識しIRF-3を活性化するとされる Toll-like receptor 3(TLR3)を候補因子として考えた。Huh-7およびレプリコン細胞での TLR3 mRNA 発現を確認したところ、Huh-7細胞では TLR3 mRNA は発現しているが、レプリコン細胞では樹立クローンによって発現している細胞と、ほとんど発現していない細胞が存在した。これらの細胞に外来的に TLR3を発現させ、レポーターアッセイにより IRF-3の活性化を調べたところ、全ての細胞で poly I:C 刺激による IRF-3の活性が回復することが示された。これらの結果から、Huh-7ならびにレプリコン細胞では TLR3の機能が欠損している可能性が示唆され、その機能欠損の理由として TLR3 mRNA 発現量の低下や TLR3 遺伝子の機能不全が考えられた。また、レプリコン細胞に外来的に TLR3を発現させた時に HCV サブゲノム RNA および HCV タンパク質量は顕著に減少することが示された。これらの結果から、TLR3は HCV のサブゲノム複製を検出しインターフェロンシグナルを活性化する機能を有し、HCV の持続複製阻害に関与することが示唆された。

以上、著者は HCV が細胞内で持続複製する際の分子機構の一端をウイルス側および細胞側の観点から解明した。本研究は HCV が持続複製する分子機構を推察する上で有用な知見であるとともに、HCV の免疫回避機構を解明するための一助となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) は非 A 非 B 型肝炎の主な原因ウイルスとして 1989年に同定された。HCV の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんといった慢性肝疾患の発症と密接に関連していると考えられている。しかしながら、HCV によるこれらの病態の発症機序は現在のところ明らかにされてはいない。その原因のひとつとして HCV の増殖・複製機構を再現できるような効率の良い培養細胞系が確立されていなかったことが挙げられる。近年 HCV ゲノムの一部 (レプリコン) が高効率・持続的に自律複製する培養細胞系 (HCV subgenomic replicon 細胞) の構築が報告された。本論文はこの HCV subgenomic replicon 細胞を独自に樹立し、この細胞を用いてウイルス側および細胞側の因子による HCV の複製制御機構を明らかにすることを目的とした研究であり、得られた成果は以下の通りである。

HCV のゲノム RNA の 5'非翻訳領域には、ウイルスタンパク質の翻訳に機能する内部リボソーム挿入部位 (IRES) 構造が存在することが知られている。しかしながら、HCV ゲノム RNA の 5'末端構造については、その詳細が未だ明らかになっていない。そこで、本論文では HCV subgenomic replicon 細胞 (レプリコン細胞) 中の、ゲノム RNA 5'末端構造の解析を行った。その結果、レプリコン細胞において、少なくとも大部分のサブゲノム RNA 5'末端はリン酸化されており、Cap 構造やタンパク質の共有結合などによる修飾を受けておらず、HCV ゲノムの複製には 5'末端塩基に特別な修飾は必要でない可能性が考えられた。また、5'末端が G から開始するサブゲノム RNA を導入して樹立したレプリコン細胞を継代後、ウイルスゲノム RNA の 5'末端を解析すると、G あるいは A が約半分ずつ検出された。このことから、HCV ゲノムの末端構造はレプリコン細胞における複製過程で G から A に変化することが示され、HCV 複製の *de novo* の反応機構を考える上で重要な知見を与えた。

また、レプリコン細胞は高効率・持続的に HCV サブゲノム RNA を維持することが知られている。このことは、レプリコン細胞内ではウイルス感染によって惹起されるインターフェロンシグナルの活性化による HCV サブゲノム RNA 複製阻害が生じないことを示唆している。即ち、レプリコン細胞の親株である Huh-7細胞ではサブゲノム RNA の効率の良い持続複製を阻害する活性が欠損している可能性が考えられた。本論文ではこの可能性を検討し、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。その結果、Huh-7ならびにレプリコン細胞では二本鎖 RNA を認識しインターフェロンシグナルを活性化す

るとされる Toll-like receptor 3 (TLR3) の機能が欠損している可能性が示唆され、その機能欠損の理由として TLR3 mRNA の発現量の低下や TLR3 遺伝子の機能不全が考えられた。また、レプリコン細胞に外来的に TLR3 を発現させた時に HCV サブゲノム RNA および HCV タンパク質量は顕著に減少することが示された。これらの結果から、TLR3 は HCV のサブゲノム複製を検出しインターフェロンシグナルを活性化する機能を有し、HCV の持続複製阻害に関与することが示唆された。

以上の研究は、HCV が細胞内で持続複製する際の分子機構の一端をウイルス側および細胞側の観点から解明したものである。これらのことは HCV が持続複製する分子機構を推察する上で有用な知見であるとともに、HCV の免疫回避機構を解明するための一助となると点において評価に値すると考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。