

千葉工業大学
博士学位論文

C型肝炎の治療における
生理活性物質の利用とその作用機序の解析

2022年3月

工学研究科 工学専攻 博士後期課程

月本 あつ子

アブストラクト

本論文第1章では、HCV複製とHCV複製を制御する宿主因子について記述した。

近年、日本における死亡率の第一位となっているがんは、2人にひとり罹患するとされ、約3人にひとりは何らかのがんにより死に至る疾患である。このうち肝臓がんは、常に上位6番目以内に位置しており年間約2.5万人が肝臓がんで死亡しているが、原因の70~80%がC型肝炎ウイルスの感染によるものである。C型肝炎ウイルスの治療は、当初大変副作用の大きいインターフェロン治療を1年間続けても、ウイルスを排除できる可能性は5%未満であった。これには、HCVの遺伝子タイプ (genotype) が7種類存在し、変異しやすいということが大きくかかわっている。2014年から開始されたインターフェロンフリー経口剤治療は、血液中のRNAが長期にわたり陰性化となる率が95%以上という画期的な治療である。しかし、この治療法は慢性肝炎と初期の肝硬変 (代償性肝硬変) の患者に限られており、肝機能に負担がかかることがあるため、肝機能の良くない人では使用できず、またHCV遺伝子に変異があると治療効果が低下することがわかっている。これらのことから、耐性株出現の問題やgenotypeの違いに起因する効果の減弱など、さまざまな問題が克服できることが期待される宿主因子を標的にする治療法や治療薬剤が注目されている。そこで本研究では、HCV複製に関与する宿主因子及び宿主の生存シグナリングを標的にした生理活性物質の利用と、その作用機序の解析を目的とした。

本論文第2章では、宿主内因子及びプロスタグランジン A₁ (PGA₁) による抗HCV活性と作用機序の解明について検討した。

PGA₁は生体内に存在する生理活性物質であり、その作用は多岐にわたっている。宿主となるヒト細胞の膜リン脂質は細胞壁を健全に保ち、炎症、痛み、腫れの調整やアレルギー反応、各種ホルモンの産生などに関係しており、近年では、APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G ; アポリポプロテイン B mRNA 編集酵素) という、一本鎖DNAに作用してシチジンをウリジンに変換 (脱アミノ化) する反応を触媒する酵素が活性化することにより、HIVの複製を酵素活性依存的に抑制することが報告されている。これらのことから、PGA₁がHCVの翻訳制御にかかわる機能を有するかを検討した。その結果、PGA₁は細胞毒性を

伴うことなく HCV 株の JFH1 感染細胞で抗 HCV 活性を示し、その抗 HCV 活性は翻訳開始となる HCV-IRES 依存的な翻訳制御をすることを見出した。さらに、HCV 翻訳に関わる翻訳開始因子への影響を検討したところ、PGA₁は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子、eIF3s, r40S と結合することを見出した。この結合は HCV-IRES RNA 上において PGA₁/eIF3s-r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成することで、HCV-IRES 依存的な翻訳阻害が起切れることを本章で明らかとした。

本論文第 3 章では、天然色素であるビオラセインによる抗 HCV 及び抗腫瘍活性とその作用機序の解明について検討した。

天然色素であるビオラセインは、微生物が産生する鮮やかな青紫の色素として知られ、天然の青色素では数少ない染料として繊維に吸着する性質を有している。この青紫色素は通常 2 つの物質の混合物として存在し、主成分がビオラセイン、少量含まれる物質がデオキシビオラセインと名付けられて化学構造が決定されている。デオキシビオラセインは生物活性や生理的活性は確認されていないが、ビオラセインは抗菌活性などの幅広い生理的活性を持っており機能性色素として注目されている物質である。2013 年に当研究室は、茨城県の土壌から青紫色のコロニーを形成する細菌 *C. violaceum* VP2 株を分離することに成功した。その *C. violaceum* VP2 株から抽出した青紫色素を、溶出時間や分子量の違いから数種類のサンプル分離を行って得られた分画について構造決定を行った結果、デオキシビオラセインとビオラセインであることを報告している。

そこで本章では、細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインの抗 HCV ならびに抗腫瘍活性とその作用機序の解析を試みた。

はじめに、ビオラセインの HCV に対する抗ウイルス作用の有無について検討を行った。その結果、ビオラセインは HCV-IRES と HCV タンパク質の NS5A タンパク質の増殖を抑制した。ビオラセインが HCV-IRES と NS5A タンパク質を抑制したことからその作用機序の解析を行うこととした。

ビオラセインの細胞毒性について、培養標的細胞である Huh7 細胞（ヒト肝癌由来細胞株）と NNC#2 細胞（HCV RNA 持続感染 Huh7 細胞）を用いて行ったところ、両細胞で細胞死を誘導す

ることを見出した。すなわち、ビオラセインは Huh7 細胞に対して抗腫瘍効果、一方、NNC#2 細胞に対しては抗 HCV 効果を示した。

細胞死には、大きくアポトーシスとネクローシスの 2 種があり、システインプロテアーゼであるカスパーゼが関与している。ビオラセインによって誘導される細胞死がこの 2 種類のどちらかを検証するため、細胞染色と細胞内での活性化カスパーゼの出現について解析した。ビオラセイン処理細胞を生細胞染色色素、及び死細胞染色色素を同時に用いることにより蛍光顕微鏡下での観察を行った結果、細胞死はビオラセイン濃度依存的なアポトーシスの誘導によって起こることを明らかにした。さらに、活性化カスパーゼの検出では、TNFR ファミリーが誘導するカスパーゼ 3 によるアポトーシスであることを証明した。以上のことから細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインは、抗 HCV 活性と抗腫瘍活性を有することを明らかにした。

以上本研究において、PGA₁ は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子である eIF3s, r40S と結合することを見出した。この結合は HCV-IRES RNA 上で PGA1/eIF3s-r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成し、この複合体は HCV-IRES 依存的な翻訳阻害であることを明らかにした。さらに、細菌 *C. violaceum* VP2 株が産生するビオラセインは Huh7 細胞に対して抗腫瘍効果を、NNC#2 細胞においては抗 HCV 効果を示すことを見出した。その作用機序は TNFR ファミリーに誘導されるカスパーゼ 3 によりアポトーシスを誘導して、その機能を発揮することを明らかにした。

これらの知見は、宿主因子及び宿主細胞の生存シグナリングを標的とするような、新たな肝炎ウイルス治療の開発につながると期待される。

目次

第1章 HCV複製と宿主因子の関係	3
第1節 Hepatitis C virus (HCV)について	3
1-1 HCVの研究	3
1-2 HCV genotype と増殖	4
1-3 ウイルスの構造タンパク質と非構造タンパク質	6
第2節 HCV複製に関与する宿主因子のはたらき	9
2-1 eukaryotic initiation factor (eIFs)	9
2-2 プロスタグランジン A ₁ (Prostaglandin A ₁ : PGA ₁)	9
2-3 カスパーゼ (Cysteine Aspartate-specific Proteases: Caspase)	10
第3節 HCV治療の現状と課題	11
3-1 HCV治療の世界の現状	11
3-2 HCV治療の日本の現状	12
3-3 HCV治療の課題	14
3-4 HCVと宿主因子の相互作用解析の意義	14
第4節 本研究の目的および本論の構成	16
第2章 プロスタグランジン A ₁ の抗HCV活性と作用機序の解明	22
第1節 PGA ₁ の抗ウイルス効果の解析	22
第2節 PGA ₁ の長期抗HCV活性の評価	24
第3節 HCV-IRESを介した翻訳阻害効果の解析	26
第4節 HCV翻訳に関わる翻訳開始因子への影響	29
第5節 まとめ	34
第3章 ビオラセインの抗HCV及び抗腫瘍活性と作用機序の解明	51
第1節 <i>C. violaceum</i> VP2株産生ビオラセインによる抗HCV活性	51
第2節 ビオラセインとデオキシビオラセインの細胞毒性	53

第3節	Hoechst と PI によるビオラセイン処理細胞の染色と細胞死の解析	55
第4節	ビオラセインに誘導された細胞死の解析	57
第5節	TNFR ファミリーにより誘導されるアポトーシス細胞死	58
第6節	まとめ	60
第4章	総括	69
第1節	本研究により得られた知見	69
参考文献	70
研究業績	80
謝辞	83

第1章 HCV複製と宿主因子の関係

第1節 Hepatitis C virus (HCV)について

1-1 HCVの研究

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus: HCV) は、発見が比較的新しい病原ウイルスで、1989年に Houghuton ら米国カイロン社の研究グループによって、非A非B型ウイルス性肝炎の原因として分子生物学的手法から同定された [1] 一本鎖 RNA ウイルスである。今日、一般的とされる HCV ゲノムの RNA 構造を図 1-1 に示した。ウイルス由来の RNA dependent RNA polymerases が、複製時の変異修復機構を持っていないことから、HIV などと同様に遺伝子塩基配列の変異が蓄積していくウイルスである。HCV は、従来知られていた A 型肝炎ウイルス (HAV) [2] や、B 型肝炎ウイルス (HBV) [3] のように、免疫血清学的手法や免疫電子顕微鏡により確認されたウイルスではなく、ウイルスの RNA ゲノムの断片をクローニングするという技術の進歩と共に発見されることとなった。現在確認されている A, B, C, D, E の 5 種類の肝炎ウイルスの中で、血液感染が主な伝播経路であるのは HBV, HDV, HCV である。これらは往々にして慢性肝炎に移行して肝硬変から肝細胞がんを発生させる。特に HCV は種特異性が高く、感染宿主はチンパンジーとヒトにのみであるとされ、ウイルスが発見されて 10 年後の 1999 年によようやく、HCV サブレプリコンシステムが報告され、培養細胞を用いたウイルスゲノム複製機構の解析が可能となって以降、HCV の研究は飛躍的に進歩した [4]。2005 年には感染性ウイルスである JFH-1 株の RNA を肝がん細胞由来の Huh-7 細胞に導入する手法が確立された [5]。これら培養細胞系による技術の進歩から HCV の複製増殖に関わる宿主側の因子が次々と明らかにされてきているが、いまだすべてが解明されてはいない。

1-2 HCV genotype と増殖

HCV は長らく、6 種類の genotype であると報告されていたが[6]、2016 年頃より 7 つの genotype が特定され [7]、現在は国際ウイルス分類委員会 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) より、2019 年に分子系統解析によって 7 つの genotype と 90 の subtype に分類されている。しかし現在も割り当てられていない genotype も存在すると言われている。HCV は地域によって異なっており、世界の主な地域における HCV genotype は、1 型および、2 型は世界中に分布する最も主要なタイプで、3 型は主に静脈注射による麻薬使用者 (IDU) の注射針を共有する行為によって感染拡大が示唆されており、欧米 (南米含む)、オーストラリアやタイで多く報告されている。また、特定の地域のみで見出される地域限局型とされるのは、4 型のエジプトや中近東、5 型の南アフリカ、6 型は香港、ベトナム、タイ、カンボジア、ミャンマーなどの南アジアで広く報告され、最も多くの subtype が存在すると言われている。こうした地理的分布の異なる遺伝子型により予後や治療効果に相違がみられ、現在では遺伝子型分類は臨床的にも必須と考えられている。

宿主内における HCV は、肝臓において吸着、侵入・脱殻、翻訳・切断、複製、粒子形成、分泌というサイクルで、ヒト体内の因子を利用し、かつ、ヒトの免疫機構をすり抜けて増殖している。細胞吸着においては、CD81, Claudin 1, などのレセプター因子を介して細胞内に侵入する。脱殻後、ゲノム RNA から 5' 末端の配列内リボソーム進入部位 (Internal Ribosome Entry Site: IRES) 依存的に、約 3000 アミノ酸からなるウイルス前駆体タンパク質が翻訳される。図 1-2 に示すように HCV IRES 依存的な翻訳には、mRNA の遺伝情報からタンパク質へ変換する機構の翻訳が行われる場である 40S リボソームと、翻訳開始因子である eIF3 が IRES に結合する。この時、eIF3c は Hsp90 と相互作用してより安定した複合体を形成する。その後 tRNA, eIF2 を含む ternary complex (TC) や eIF4, PTP, La タンパク質などの因子が複雑な複合体を形成しウイルスタンパク質の翻訳を開始させる。つぎに宿主細胞およびウイルス自身のプロテアーゼにより前駆体タンパク質が切断され、図 1-1 に示すように構造タンパク質

(Core, E1, E2)と非構造タンパク質(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)の機能的な 10 種類のタンパク質が産生される[8, 9]. ウイルス RNA の 5'末端, 3'末端にはそれぞれ約 340 塩基, 約 50 塩基よりなる非翻訳領域が存在し, 5'末端の IRES は, HCV の前駆体タンパク質の翻訳に関与する. 3'末端にはその翻訳の終止コドンがある. 構造タンパク質 E2 と非構造タンパク質 NS2 の間には p7 タンパク質が存在しているが, このタンパク質は構造タンパク質と非構造タンパク質のどちらに属するタンパク質か明らかになっていない.

複製においては, phosphatidylinositol-4 kinase-III β (PI4KIII β) が IP をリン酸化して PI4-phosphate (PI4P)の産生を行い, 膜の湾曲や安定性に関与し, さらに NS5A と結合して活性化し RNA 複製複合体を形成している. また, 粒子形成においては, 脂肪滴上に局在する core タンパク質は diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)が関与しており, NS5A を介した複製複合体の脂肪滴への移行には DGAT1 と Rab18 の 2つの宿主内因子が関与しているとの報告がある[10].

HCV の機能に関して最も重要なのは両末端の非翻訳領域で, その 5'UTR 側の約 341 塩基の配列は HCV 株間でよく保存されている. この領域は多くのステムループ構造を持った 4 つの主なドメイン (domain I-IV) 及び pseudoknot と呼ばれる特徴的な二次構造からなり, 5'末端キャップ構造非依存的な翻訳に関わる IRES を有する. また, 5'UTR の IRES 上流遺伝子配列はウイルス複製に, IRES 領域の配列は複製の効率に関与し, 特に IRES のステムループ II が複製に必須ということが判明している[11]. ウイルスの 5'UTR には肝臓特異的マイクロ RNA (miR-122)が結合し, HCV RNA 複製調節に関与している[12]. 3'UTR は短い可変領域, 約 80 塩基長の poly(U/UC) stretch, 及び 98 塩基長の 3'X 領域から構成され, その長さは 200-235 塩基とウイルス株により大きく異なっている[13]が, レプリコンシステムを用いた実験から poly(U/UC) stretch 及び 3'X 領域がゲノム複製に必須であることが示されている[14]. 細胞内に放出されたウイルスゲノムは, タンパク質翻訳の鋳型となるとともにウイルスゲノム複製

の鋳型となることから、翻訳と複製は適切に調節されていると考えられているが、詳細には明らかになっていないのが現状である。

1-3 ウイルスの構造タンパク質と非構造タンパク質

(1) Core

HCV-IRES から続く前駆体タンパク質の N 末端に位置するコアタンパク質(Core)は、その遺伝子配列の異なる 7 つの遺伝子型のウイルス間で高く保存されている。コアタンパク質は宿主細胞の小胞体 (endoplasmic reticulum: ER)、脂肪滴、ミトコンドリアに結合して細胞質に局在しており、ウイルス粒子形成だけでなく、アポトーシス、脂質代謝、細胞内情報伝達系、細胞やウイルス遺伝子発現、細胞のトランスフォーメーションなどにも影響を与えていることが知られている [15].

(2) E1, E2

ウイルスが細胞膜への吸着において重要な役割を果たす E1 と E2 は、糖鎖タンパク質であり宿主細胞の脂質膜とともにウイルス粒子の外被 (エンベロープ) を構成する。E1 と E2 の C 末端膜貫通領域にはヘアピン構造が形成されており、宿主の ER 膜を二度貫通していることから ER 内腔に存在するシグナルペプチダーゼで切断される。膜貫通領域はウイルス内にある ER 貯留シグナルによって、ER と複合体を形成する [16, 17].

(3) p7

膜の透過性に関与する 63 残基の小さいタンパク質の p7 タンパクは、2 回膜を貫通し、感染性を有するウイルス粒子産生に重要な分子である。また、イオンチャンネルとしての機能も有している [18-20].

(4) NS2

N 末端の膜貫通性のヘリカーゼ構造を持つ NS2 タンパク質は、ER 膜へと侵入している。NS2 タンパクの C 末端側は NS3 の N 末端領域とともに細胞質側に存在し、金属要求性プロテアーゼ

活性を有している。NS2は、二量体のシステインプロテアーゼを形成する部分を含んでおり、ウイルスタンパク質をプロセシングする機構であると考えられている[21-23]。

(5) NS3-4A 結合体

NS3はやや疎水性のタンパク質で、N末端3分の1がセリンプロテアーゼ活性を持っており、プロセシングに重要とされる分子である。補因子としてNS4Aと結合して、HCVタンパク質のプロセシングとRNA複製に働いている[24]。また、NS4AのN末端は膜貫通性ヘリックス構造を取っていることから、NS3-4A複合体はこのNS4AのN末端で宿主の膜に固定されていると考えられている[25]。

NS3のC末端から442残基のアミノ酸はヘリカーゼ、NTPase (nucleoside triphosphatase) 活性を有する部位であり、二本鎖のRNAを3'末端から5'末端へ解く作用がある。RNA複製時には、NS3ヘリカーゼはNTPの加水分解によりタンパク質の形を変えながら、核酸に沿って移動しているものと思われ、そのヘリカーゼ活性は、NS3プロテアーゼおよびNS4Aタンパク質によって亢進させられている[26-28]。

(6) NS4B

NS4Bは4つの膜貫通部位を持ち、N末端ヘリックス構造が膜との固定に重要な役割を果たしていると考えられている。また、NS4Bは、ゲノム複製複合体が細胞膜上で形成されるための特殊な膜構造で、membranous webと呼ばれる膜構造を作る可能性が考えられている[29-31]。

(7) NS5A

宿主細胞の膜に結合するリン酸タンパクであるNS5Aは、56 kDaの基礎リン酸化型と58 kDaの超リン酸化型の2つ形態をとっている。この形態の1つは、膜に固定するための α -ヘリックス構造であり、膜やRNAだけでなく、ウイルスや宿主タンパク質と結合しているものと思われる。一方、NS5A領域に集中してみられる細胞培養上の適応性変異はRNA複製に寄与しており、また他の非構造タンパク質や宿主細胞由来のタンパク質と結合することから、複製複合体の形成に重要でウイルス複製を制御しているものと考えられている[32-35]。

(8) NS5B

NS5B は、ゲノム RNA の複製に必須な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase: RdRp) として機能している。これは翻訳後の NS5B タンパク質が、ER の細胞質側へ結合するのに重要であることがわかっており、RNA 合成が始まるように RNA テンプレートの 3' 末端の伸長反応を開始させてテンプレート自身の伸長反応を抑えるはたらきがある [36-38]。

第2節 HCV複製に関与する宿主因子のはたらき

2-1 eukaryotic initiation factor (eIFs)

RNAの翻訳には、原核生物と真核生物における開始因子である eukaryotic initiation factor (eIFs) が働く。真核生物の生物学的過程である翻訳は、開始、伸長、終結と再生の4つの段階から構成され、メッセンジャーRNA (mRNA) からタンパク質が合成される。翻訳開始には、eIFs が関与し、組織化され律速段階によって行われている[39]。これには、キャップ依存的な翻訳開始とキャップ非依存的な翻訳開始の2つが知られており、HCVにおける翻訳は、キャップ非依存的な翻訳、つまりIRES依存的な翻訳であり、ゲノム1本鎖RNAがそのまま mRNA として機能する。翻訳開始因子には eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5, eIF6 の大きく6種類の因子が知られ、その中の数種類はサブユニットを有して、複合体の形成と繊細な機構によってリボソームによる厳密な開始コドンを選択制御している[40-41]。

主な eIFs の機能を表 1-1 に示した[42]。翻訳開始にかかわる 80S リボソームは、40S と 60S の2つのサブユニットから構成されており、40S は 18S rRNA と 30 個のリボソームタンパク質、60S は 3 種類の rRNA と 50 個のタンパク質から構成されている。翻訳機能にかかわる RNA 領域は完全に保存されており、mRNA の特異構造と関係して翻訳開始因子と開始反応は著しく複雑になっている[41-44]。過剰発現、ダウンレギュレーション、やリン酸化の形態における翻訳開始因子の調節不全は、癌細胞の生存、転移、および腫瘍血管新生及び老化関連機能に関連している[45, 46]。

2-2 プロスタグランジン A₁ (Prostaglandin A₁: PGA₁)

PGA₁ は、生理活性を有する Prostanoid family のひとつで (図 1-3)、炎症、腎機能と流動調節や血液凝固と血小板凝集等、生体内のいたるところに存在して生理活性を有する脂質である。生体外においての PGA₁ 自身は、エンドクリンホルモンであることから標的受容体に速やかに結合して作用する比較的不安定な物質である。治療薬としては投与後速やかに PGA₁ と変化する前駆

体の PGE₁ 製剤が用いられており、慢性動脈閉塞症 (バージャー病, 閉塞性動脈硬化症) における四肢潰瘍ならびに安静時疼痛の改善, 進行性全身性硬化症・全身性エリテマトーデス・糖尿病における皮膚潰瘍の改善, 振動病における末梢血行障害の改善などに使用されている[47].

PGE₁ 製剤はウイルスに対する効果として, ヘルペスウイルスなどの感染時は宿主内因子に作用して翻訳を抑制し, 同時に二重鎖 RNA の合成の阻害や, NF-κB のリン酸化を阻害することで, RNA ウイルスである HIV-1 の転写を抑制することが知られている. また, PGE₁ で誘導される宿主因子の熱ショックタンパク質 (heat shock protein: Hsp) 70 は, APOBEC3G 分解を抑制して HIV-1 複製を抑制することが報告されているが[48], ウイルス感染における治療薬としては使用されていない.

2-3 カスパーゼ (Cysteine Aspartate-specific Proteases: Caspase)

カスパーゼは細胞死に関連する宿主因子として知られているが, 基質を限定的に切断し, タンパク質の成熟, 活性化, 不活性化を引き起こす細胞内システインプロテアーゼである[49]. その生体内での作用は器官形成や臓器形成といった発生過程や, 生体防御, 恒常性の維持, さらに老化などに関与する. このシステムの異常により, 免疫不全, 自己免疫疾患やがんなどの重篤な疾患が起こるが, 生物において必須の生命現象であり, 厳密な制御機構が存在する.

カスパーゼは哺乳類では 18 種が知られており[50], ヒトではカスパーゼ 1~10, 12 と 14 の 12 種類がクローニング分離されている. これらカスパーゼにはアポトーシス関連カスパーゼとして, アポトーシス実行型のカスパーゼ-3, -6, -7, アポトーシス誘導型としてのカスパーゼ-2, -8, -9, -10, -12 が知られ, 炎症関連カスパーゼとしてのカスパーゼ-1, -4, さらにまだ機能の解明されていないカスパーゼ-5, -14 の構造が知られる.

アポトーシス関連カスパーゼは, 発生過程で過剰に作られた細胞やストレスを受けて傷害された細胞を生体から取り除くためのアポトーシスを誘導し, その一方で, 死につつある細胞から周りの細胞に増殖シグナルを発する代償性増殖の過程にも関わっている [51]. また, カスパーゼの

細胞内での局所的な活性化や、一過性の活性化によってアポトーシス実行から回避されることで、細胞分化、移動、増殖、細胞形態形成、シナプス機能調節といった様々な生命現象に関わる非細胞死機能を有している[52].

炎症関連型カスパーゼ 1 は IL-1 β や IL-18 といった直接基質となるサイトカインの成熟・分泌に関わるだけではなく、線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖を促す塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF: basic fibroblast growth factor) のようなシグナル配列を持たないシグナル因子の分泌にも関わっている[53]. また、哺乳類において神経細胞間の情報伝達を長期抑制 (LTD) をしたり、記憶や学習に大きく関与する AMPA 型グルタミン酸受容体の内在化にカスパーゼ 3 活性が使われている[52].

カスパーゼ活性化の機構は、外因性の細菌やウイルスなどの種々の因子により炎症や感染症への応答としてカスパーゼ 8 が活性化され、細胞死シグナルを受けた細胞のミトコンドリアからシトクロム c が細胞質に放出される内因性と、Fas や TNF 受容体に代表される細胞死誘導リガンドとされるシトクロム c と APAF1 (アポトーシスプロテアーゼ活性化因子) の結合によりカスパーゼ 9 が誘導される細胞死受容体に関わる外因性の 2 つに分類されている[54]. この 2 つの経路から、カスパーゼ 3 が活性化される[55-58]. 図 1-4 に TNF ファミリーに誘導されるアポトーシス経路として、カスパーゼ 3 活性化の模式図を示した.

リンパ球やリンパ球系の培養細胞では、外因性の経路が使われ[59], 肝細胞や HeLa 細胞株ではミトコンドリアに関わる内因性の経路が活性化すると云われている[60].

第 3 節 HCV 治療の現状と課題

3-1 HCV 治療の世界の現状

C 型肝炎は、HCV によって引き起こされる肝疾患で、急性および慢性の両方の肝炎を引き起こす可能性があり、10 年~20 年という長いタームで肝硬変へ移行し肝臓癌を発症する.

WHO による 2017 年の Global hepatitis report (Global hepatitis report, 2017, ISBN: 978-92-4-

156545-5)によると、2015年の世界の死亡原因は、ウイルス性肝炎に続発する急性肝不全、肝硬変、肝細胞癌が、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、結核（TB）、マラリアよりも多く、HCV感染による肝炎での死亡率が29.7%であったと報告している。この時点で、推定7,100万人がHCVによる慢性肝炎と診断されており、ヨーロッパ地域は最も多く430万人、アフリカ地域は最も少なく582,000人であったと報告している[61]。2016年5月、世界保健総会は最初の「ウイルス性肝炎に関するグローバルヘルスセクター戦略、2016-2021」を採択し、国民皆保険の重要な役割を強調し、持続可能な開発目標として、2030年までに新たなウイルス性肝炎感染を90%削減し、ウイルス性肝炎による死亡を65%削減するということを設定した。WHOの2018年ガイドラインでは、12歳以上の慢性HCV感染者すべてを直接作用型抗ウイルス薬（Direct acting antivirals ; DAA）での12～24週間の治療が推奨されているが、多くの低中所得国では、治療にかかる費用は高額であり、さらに、早期かつ適切な医療管理と慢性肝疾患の早期診断のための定期的なモニタリングが必要とされる。

3-2 HCV治療の日本の現状

HCVは1989年に発見され、それまで非A非B型肝炎やアルコール性肝障害と診断されていた症例の大部分がHCVによる肝障害であることが明らかとなった。HCV感染者は現在、全世界に1億7,000万人、日本では約150万人存在すると推定されている。HCV感染が成立すると、高率に感染が持続して慢性肝炎へと移行し、HCV感染による炎症の持続により肝線維化が惹起されて、肝硬変や肝細胞がんへと進展する。このことから、HCVは、公衆衛生上極めて問題のある病原ウイルスの1つとして位置づけられている。

日本における抗ウイルス療法は、HCVの増殖を阻害する宿主因子のインターフェロン（Interferon ; IFN）製剤を用いた治療法と、HCVを駆除し完全に治癒することを目的としたペグインターフェロン/リバビリン(pegylated: PEG)-IFN + Ribavirin 併用投与する治療法に加え、抗ウイルス薬として最初にFDAにより認可されたテラプレビルなど、ウイルスの有するプロテアーゼ

の活性を抑制する薬剤の開発により、それまでのペグインターフェロン+リバビリンによる治癒率を一気に 80%以上に上昇させた。その後もシメプレビル (Simeprevir) , バニプレビル

(vaniprevir) などのプロテアーゼ阻害剤の開発が相次いだ。プロテアーゼ阻害剤は耐性のウイルスが生じやすいことからインターフェロンやリバビリン併用が必須である。その後 2014 年より、ウイルスタンパクを直接標的とした IFN-free の経口治療薬である DAA が使用可能となった。この IFN-free の経口治療薬である DAAs は、患者 QOL を考えた治療法であり HCV の genotype 1b に対して、高い確率で 2 剤の経口併用により血液検査の結果において HCV 陰性

(一) (Sustained Virological Response; SVR) を達成できるようになってきた。しかし、IFN 関連療法の時代には問題とならなかった抗ウイルス剤に対する耐性変異が散見されるようになった。第一世代テラプレビル (telaprevir) などの使用後に DAAs を使用するとウイルス量の再上昇が起こり HCV RNA がいったん消失していても肝炎の再燃が確認され、RNA が再上昇してくることが判明している。さらに DAAs のみの併用治療にあっても耐性ウイルスの有無によりその治療効果が大きく異なることが明らかとなっている[62-64]。

現在 DAAs は 3 種類に分類され、NS3/NS4A セリンプロテアーゼ阻害薬、NS5A 阻害薬、NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (ポリメラーゼ阻害薬) がある。DAAs 単剤治療では早期に耐性変異が出現することが多いことがわかり、DAAs を組み合わせることで耐性の獲得に必要な変異が起きにくくなりその結果、HCV 駆除が可能とされている。これら 3 剤の組み合わせ方によっては耐性変異の獲得率が高くなることから、genotype に応じて、最適な組み合わせを選択して耐性リスクを最小限にすることが重要と考えられている。抗ウイルス療法で効果をなさなかった場合や治療法が適応できない場合は、ウイルス自体に対する作用はないが C 型肝炎の進行を食い止め、肝細胞癌を予防する肝庇護法として、内服薬のウルソデオキシコール酸、小柴胡湯や注射薬のグリチルリチン製剤を使用することがある。

これら治療の指針については、日本肝臓学会が 2012 年より『C 型肝炎治療ガイドライン』が公表されているが、毎年のように改訂を余儀なくされている。このことは、HCV が RNA ウイル

スであること、合併する慢性疾患により治療効果が一定でないことから、現在の治療法では完治できない感染があることを示唆している。

3-3 HCV 治療の課題

1-1 で述べた通り、C型肝炎ウイルスは血液媒介性ウイルスであり、注射薬の使用、安全でない注射の慣行、安全でないヘルスケア、血液および血液製剤の輸血、および血液への曝露につながる性行為によって発生する可能性がある。治療薬はまだまだ高価であり、世界的に見ると治療率は非常に低い状況となっている。HCV 感染症は初期感染では無症状であり、個々人の状態により HCV 治療薬の選択には多くの懸念事項がある。予防法としてはワクチンの開発が一番であるが、現在においても C 型肝炎に対する効果的なワクチンは開発されていない。また治療においては、誰でも入手できるような、安価で、治療期間の短い、より効果的な治療薬の開発が望まれる。

3-4 HCV と宿主因子の相互作用解析の意義

RNA ウイルスは、ウイルス RNA の複製時には、DNA 複製時にある複製エラーをチェックする機構が働かないため、突然変異を起こしやすい特徴を持っており、ヒトに加えコウモリ、ブタ、トリなどに存在するウイルスが、異種間あるいは同種間で他の宿主に伝搬する際にも突然変異のリスクが高まることが知られている。また、ウイルスタンパク質を直接的に標的とした従来の抗ウイルス薬では、投与により一定の確率で突然変異が起こり、その抗ウイルス薬に対する薬剤耐性ウイルス発生のリスクが伴うことも知られている。RNA ウイルスである HCV の複製過程においては、いまだ全てが解明されているわけではない。このことから、ウイルス増殖に必要なメカニズムを担う宿主因子とこれらの宿主因子を標的とすることで、成熟ウイルス粒子を生産させないようにウイルス複製や翻訳の場を阻害する抗ウイルス剤や、RNA ウイルスに対してウイルスの突然変異による薬剤耐性が起こりにくい新規治療薬を開発することが望まれる。

本研究で着目した PGA_1 は新しいアルドケト還元酵素 (aldo-keto reductase; AKR) 阻害剤であり [64], 癌の化学療法抵抗性を潜在的に打ち消す化合物の開発のための応用研究を提供できることを示唆されており [65], キムらの研究では HCV-IRES の翻訳は 15-デオキシ-D12,14-プロスタグランジン J2 (15d-PGJ2) によって阻害されなかったと報告されている [66]. いまだ HCV 複製の PGA_1 を介した阻害は現在わかっていないことから, HCV-IRES を介した翻訳を阻害する PGA_1 の新しい役割をこの研究で特定した.

また, 近年, 合成薬剤製造や薬剤そのものに対する安全性や環境中での残留が問題視されてきており, 昔から利用されていた天然物質が注目されている. 特に微生物が生産する色素は, 生理的活性を持つ物質として期待されている. 然物は長い間医薬品開発の基礎となっており注目すべき例としては, 抗生物質のペニシリン G とストレプトマイシン, 抗がん剤のパクリタキセル 8 などがある. 近年, 天然物のシキミ酸は, オセルタミビル (タミフルのブランド名で販売) などのインフルエンザノイラミニダーゼ阻害剤の製造に使用されており, また, 放線菌が産生するアベルメクチン誘導体であるイベルメクチンは, 駆虫薬として使用されている.

今回, 当研究室で発見した茨城県の土壌から採取した青紫色のコロニーを形成する細菌 *C. violaceum* VP2 株から分離発見したビオラセインは, 抗菌活性などの幅広い生理的活性を持っており機能性色素として注目されている物質である. ビオラセインの生物学的生産には, 周囲反応条件, 低コスト, 大量生産の容易さ, 複雑で多様な天然産物の合成のための生体触媒の位置選択性および立体選択性など多くの利点が知られており, その独特の色と幅広い抗菌および抗ウイルス活性は興味深い研究対象となっている [67, 68].

しかしビオラセインの抗ウイルス薬としての検討は進んでおらず, HCV に対する効果については報告されていない. このような背景から, 第 3 章では細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインの抗 HCV ならびに抗腫瘍活性とその作用機序の解明について検討した.

第4節 本研究の目的および本論の構成

本研究は、1992年からC型肝炎治療に使われている治療薬のIFNが、ウイルスの排除を目的とした体内合成タンパク質であることから、生体内の生理活性物質であるPGA₁と、アポトーシスを誘導する天然色素Violacein(ビオラセイン)に着目し、その抗HCV活性と作用機序の解明を目的とした。

本論文は、第1章においてHCVと宿主因子の関係性について、ならびに本研究を行うに至った経緯や既往研究について記した。実際の研究内容は、2章構成となっており、第2章は、プロスタグランジンA₁(PGA₁)の抗HCV活性とその作用機序の解明として、PGA₁がHIV-1に対する効果と同様に、HCV増殖抑制能を有するかを検討するとともに、その作用機序の解明を目的とした。第3章は、ビオラセインの抗HCV及び抗腫瘍活性とその作用機序の解明であり、近年注目されている自然界に存在する生理的活性を持つ機能性色素であるビオラセインに着目し、その抗HCV及び抗腫瘍活性とその作用機序についての解明について研究を行った。最後に、第4章では、本研究の結果の総括について論じた。

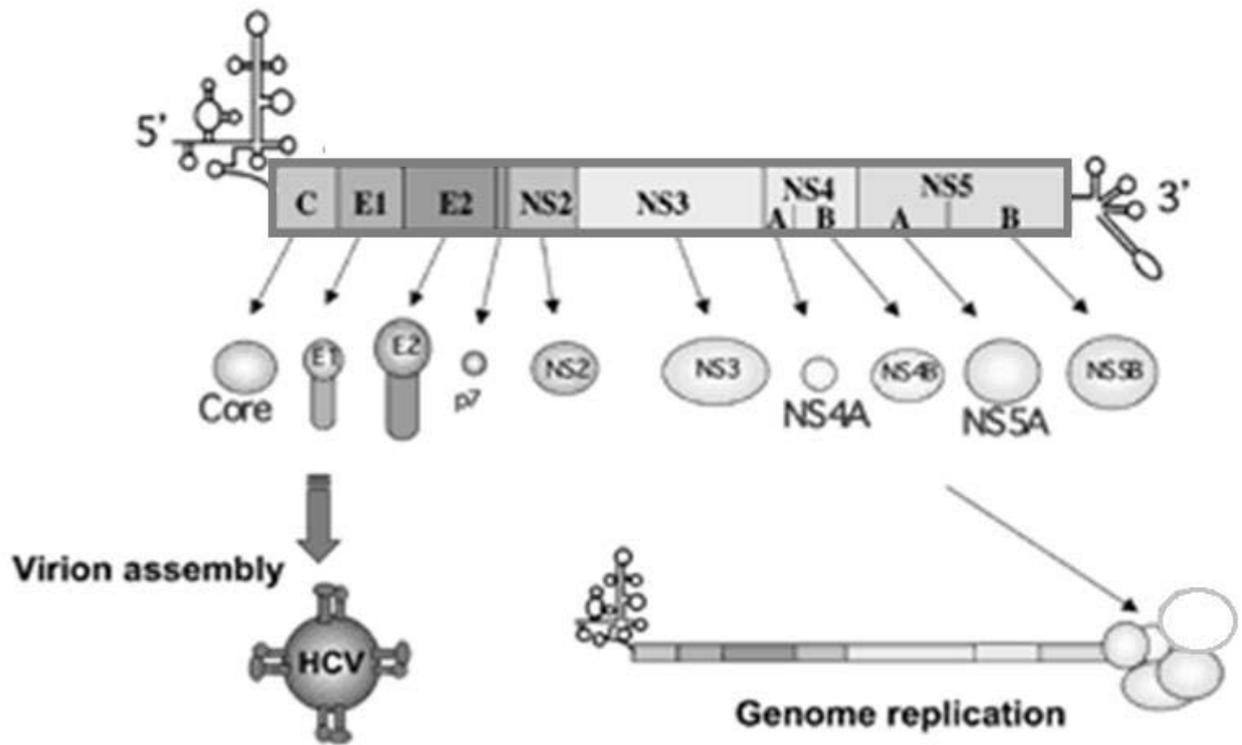


図 1-1 HCV 遺伝子構造 (HCV RNA と HCV タンパク質)

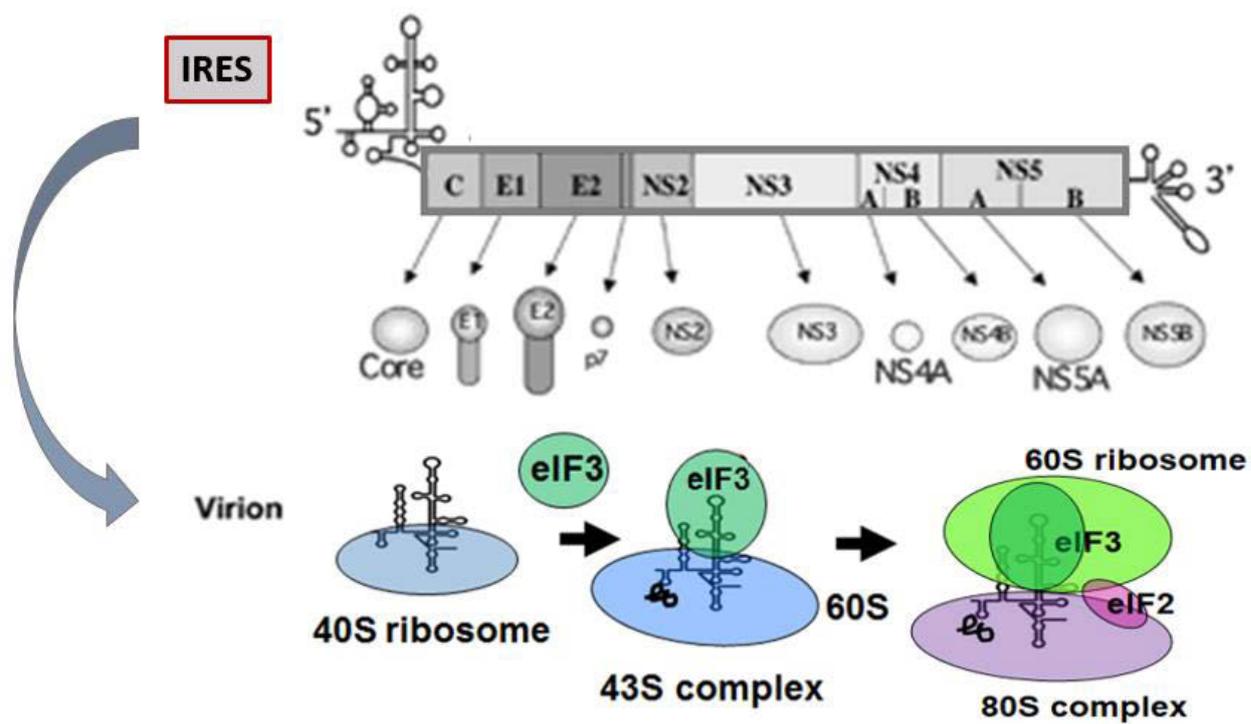


図 1-2 HCV 遺伝子構造と翻訳機構

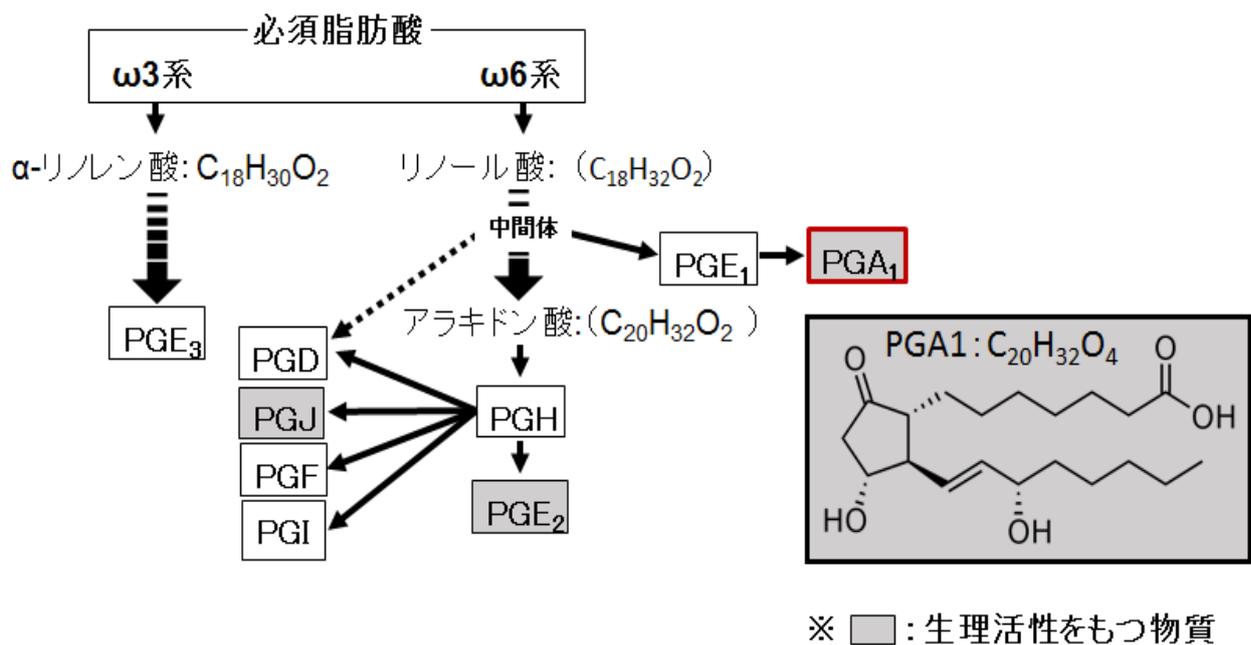


図 1-3 プロスタノイドファミリーと prostaglandinA₁

表 1-1 eukaryotic initiation factor (eIFs)の主な機能 [42]

種類	eIF の機能
eIF1	mRNA のスクリーニングと tRNA の送達.
eIF2	開始コドンの認識と次の翻訳開始を指示する.
eIF3	翻訳開始因子と 40 S リボソームサブユニットを mRNA に動員する,
eIF4	CAP 結合活性を持ち複合体として機能する律速因子. ATP 依存のヘリカーゼ活性で複合体形成時の mRNA の二次構造をほどく.
eIF5	翻訳の進展と結合体の形成を行う.
eIF6	mRNA がない場合, 40 S サブユニットとの 60 S サブユニットの会合防御を行う.

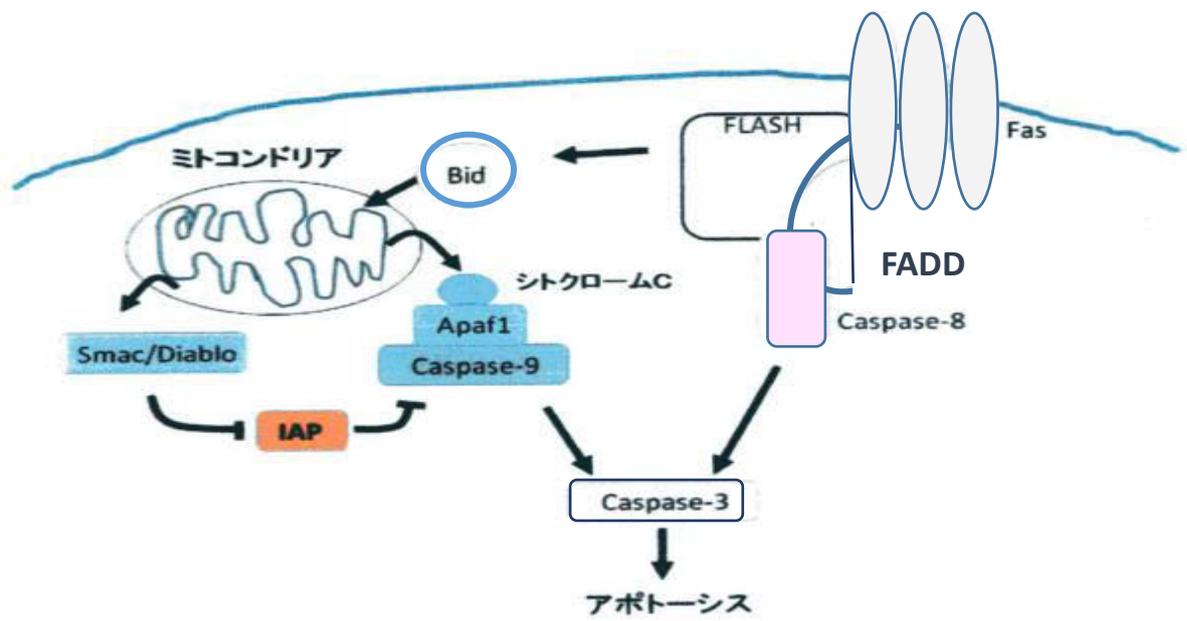


図 1-4 TNF ファミリーに誘導されるアポトーシス経路[57]

第2章 プロスタグランジン A₁の抗 HCV 活性と作用機序の解明

第1節 PGA₁の抗ウイルス効果の解析

1-1 はじめに

本章第1節では、まず PGA₁は宿主内因子ではあるが、高濃度になった場合、どの程度の細胞毒性があるかについて、培養肝がん細胞系である Huh7, Huh7.5 細胞と、NNC#2, #50-1 細胞を用いて検討した。図 2-1 に HCV が自立複製した細胞株の概略図を示した。NNC#2 細胞は HCV フルゲノムレプリコン細胞であり、下遠野忠邦氏によって構築された Huh-7 細胞由来のレプリコンシステムであり[69]、HCV-IRES によりネオマイシン耐性遺伝子と全長 HCV タンパク質を発現する細胞である。また、#50-1 細胞は、Huh-7 由来の HCV-IRES の下流にルシフェラーゼ発現遺伝子と NS3~NS5B までを含んだ HCV サブゲノムレプリコン細胞であり、加藤宣之氏によって構築された、特徴的なレプリコンシステムである[70]。

1-2 方法

1-2-1 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、テトラゾリウムベースの MTS アッセイ[71]を用いた MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] は淡黄色の基質で、生細胞のミトコンドリアにより開裂して青色のホルマザン (Formazan) を生成する。このホルマザンの生成量は生細胞数と相関することから、PGA₁または DMSO で処理 72 時間後に比色定量により細胞増殖能・生存率・毒性評価を行った。データは、独立した実験からの平均±SD として表し、各実験は 3 回行った。

1-2-2 HCV コアタンパク質の測定

コアタンパク質レベルの測定は、2種類の細胞を用いて、CLEIA法であるFUJIREBIO社のLumipulse f機器[72]、専用試薬であるHCV コアタンパク質抗原測定試薬を用いて測定した。3回の独立した実験からの平均±SD 各実験は3回実施した。

1種類の細胞種はNNC #2 細胞（24wellプレートで 2×10^5 細胞/well）で、PGA₁またはDMSOで処理後、48時間作用後にライセート液として回収してコアタンパク質抗原を測定した。さらにHuh7.5細胞（48wellプレート、 1×10^5 細胞/well）にJFH-1（MOI 0.1）（国立感染研究所所長、脇田博士から提供された）を感染させ、37°Cで4時間インキュベートした後、細胞をPBSで3回洗浄し、PGA₁またはDMSOで処理した。72時間後、上清中のHCV コアタンパク質レベルを、完全に自動化されたHCV コアタンパク質抗原CLEIAを使用して測定した。データは、独立した実験からの平均±SDとして表し、各実験は3回行った。

1-3 結果

MTSアッセイによる細胞毒性試験では、80~100%の細胞生存率で判定し、NNC #2、#50-1（HCVサブゲノムレプリコン（NN/1b/SG））、Huh7およびHuh7.5細胞において、PGA₁処理3日間のインキュベーション後の濃度2~8 µg/mLにおいて、濃度依存的な細胞毒性は観察されなかった（図2-2）。次に、NNC #2細胞におけるHCV コアタンパク質抗原検査の結果では、濃度依存的にHCV コアタンパク質が減少し6 µg/mLのPGA₁で処理したNNC #2細胞では93%、HCV コアタンパク質の発現が抑制された（図2-3）。

さらに、図2-4に示すようにJFH1感染Huh7.5細胞においても同様にPGA₁の用量依存的なHCV コアタンパク質抗原の減少が確認できた。

1-4 考察

PGA₁は、MTS アッセイによる細胞毒性試験の結果から培養肝細胞系の Huh7, Huh7.5, NNC #2, #50-1 細胞において 2~8 µg/mL 濃度では細胞毒性を示さず、濃度依存的な HCV コアタンパク質抗原の減少が認められた。これらの結果から、PGA₁は細胞毒性を伴うことなく、有効な抗 HCV 剤となることが示唆された。

第 2 節 PGA₁ の長期抗 HCV 活性の評価

2-1 はじめに

PGA₁は HCV replicon 細胞を用いた実験により抗 HCV 効果を示した。そこで、実際に抗 HCV 剤としての有効性を実証するには薬剤の長期的抗ウイルス活性の持続性試験が要求される。そこで、本研究でも PGA₁の長期的抗 HCV 活性の持続性試験の評価を試みるため、15 日間の細胞障害性ならびに HCV 増殖阻害効果についての評価を行った。

2-2 方法

2-2-1 MTS アッセイによる長期細胞毒性試験

15 日間の細胞毒性試験は、MTT 法を用いた。NNC#2 細胞に 4 µg/mL 作用させた後 3 日間培養し、その後継代培養したサンプルと、15 日間 3 日置きに PGA₁を 4 µg/mL 再添加し PGA₁存在下で培養したサンプル用いて 15 日後 MTT アッセイで細胞増殖能、生存率と毒性評価を行った。データは、独立した実験からの平均±SD として表し、各実験は 3 回行った。

2-2-3 長期培養細胞における HCV コアタンパク質測定

コアタンパク質レベルの測定は、CLEIA 法の HCV コアタンパク質抗原測定試薬を用いて NNC#2 細胞に 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用させた後 3 日間培養し、その後継代培養したサンプルと、15 日間 3 日置きに PGA_1 を 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 再添加し PGA_1 存在下で培養したサンプル用いて 15 日後に測定した。3 回の独立した実験からの平均 \pm SD として表し、各実験は 3 回実施した。

2-3 結果

結果を図 2-5 に示す。 PGA_1 を 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 15 日間、単一および反復処理した NNC#2 細胞のコアタンパク質抗原は PGA_1 を 3 日目のみ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGA_1 で作用させて培養した場合はグレーの棒グラフ、3 日置きに PGA_1 を 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 再添加し PGA_1 存在下で 15 日間培養した場合は黒の棒グラフで示し、対照として PGA_1 無添加の NNC#2 細胞を白の棒グラフで示した。 PGA_1 を 3 日目のみ単一で作用させて培養した場合、HCV コアタンパク質レベルは 3 日目で 72%減少したが、9 日目までにリバウンドし上昇傾向を示した（図 2-5、グレーの棒グラフ）。対照的に、 PGA_1 を反復処理した細胞では細胞毒性を伴うことなく、HCV コアタンパク質は 6 日目から 97%以上減少し 15 日目まで持続した。

2-4 考察

PGA_1 を 15 日間、単一および反復処理した NNC#2 細胞のコアタンパク質抗原について、3 日目のみ単一で作用させた場合は、9 日目からリバウンドし上昇傾向を示した（図 2-5、灰色の棒グラフ）。このことは PGA_1 の単一の効果は 5 日までの HCV 抑制効果であったことを示しており、対照的に、 PGA_1 を反復作用させた細胞では HCV コアタンパク質は 6 日目から 97%以上減少し 15 日目まで持続した。さらに、 PGA_1 の反復作用では、細胞毒性を誘発しなかった。 PGA_1 を治療薬剤として使用した場合は、継続して投薬する必要がある結果となった。 PGA_1 の反復治

療において、長期に HCV 増殖を抑制できる可能性が示されたことから、PGA₁ が有効な抗 HCV 薬剤となることが期待される。

第 3 節 HCV-IRES を介した翻訳阻害効果の解析

3-1 はじめに

前節の結果から、PGA₁ は細胞毒性を伴うことなく、濃度依存的に抗 HCV 活性を示したことから、PGA₁ が有効な抗 HCV 薬剤となることが明らかとなった。しかし、PGA₁ による HCV の複製阻害に対する詳細な作用機序は不明である。そこで、本節では HCV 複製阻害が翻訳開始に関与する HCV-IRES RNA について検討した。

3-2 方法

3-2-1 HCV-IRES 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼ活性の測定

Huh7 細胞 (24 well プレートで 2×10^5 細胞/well) に導入したプラスミドの概略図を図 2-6 に示した。これらは、pSV40/HCV-IRES-ホタルルシフェラーゼ (pHCV-IRES/Fluc)、pSV40/EMCV-IRES-ホタルルシフェラーゼ (pEMCV-IRES/F-luc)、pSV40-レニラルシフェラーゼ (pSV40/R-luc) および pSV40-ホタル (pSV40/L-luc) である。

100 ng のホタルルシフェラーゼ (Firefly luciferase) を標識した pHCV-IRES/F-luc または 100 ng の pEMCV-IRES/F-luc と 100 ng のウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla luciferase) を標識した pSV40/L-luc で Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使用してコトランスフェクトした [73]。対照として pSV40-ホタルルシフェラーゼ (pSV40/L-luc) を 100 ng トランスフェクトした。その後 37°C で 4 時間インキュベートした後、細胞を PBS で洗浄し、2 μ g/mL、4 μ g/mL の PGA₁ と DMSO で処理した。その後、遺伝子を導入した細胞の培養液を除き各 well に 1×PBS(-)を加え培養プレートを軽く揺らして細胞を洗浄した後、1×PBS(-)を取り除いた。この操作を 2 回行

った。1×PBS(-)を除去後、細胞へ 100 μ L の Passive lysis buffer (Promega)を加え、培養プレートをやすり室温で 15 分間静置し、細胞を溶解した。細胞溶解液を 1.5 ml チューブに移して、12,000 rpm, 3 分、室温にて遠心分離することで細胞膜等の不純物を分離し、上清を別の 1.5 ml チューブに移した。これを細胞内タンパク質精製溶液とした。その上清のうち 10 μ L と Luciferase Assay Systems kit (Promega)のルシフェラーゼ発光基質を 100 μ L 混和して Luminometer (LUMAT LB9507;BERTHOLD)により、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ルシフェラーゼ活性は、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を使用して測定した。この時のサンプルの体積は 110 μ L, 測定時間は 5 秒とした。

データは、独立した実験からの平均 \pm SD として表した。また、各実験は 3 回行い、スチューデント t 検定により $p < 0.05$ で有意差を求めた。

3-2-2 ウェスタンブロット法

NNC#2 細胞 (6well プレートで 8×10^5 細胞/well) を播種後 24 時間培養した後、PGA1 を 2 μ g / mL, 4 μ g / mL と DMSO で処理した。48 時間後に細胞を 1×PBS(-)で 2 回洗浄した後、ライセート液として回収してウェスタンブロット法を行い、HCV タンパク質である Core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A と NS5B の検出を行った。

HCV タンパク質一次抗体※：core 抗体, E1 抗体, E2 抗体, NS3 抗体, NS4A 抗体,

NS4B 抗体, NS5A 抗体, NS5B 抗体, anti- β actin (SIGMA),

二次抗体：Anti-biotin HRP-linked Ab (Cell Signaling Technology, Inc.),

Anti-mouse IgG 抗体, Anti-rabbit IgG 抗体.

※ウイルスタンパク質の検出で用いたウイルスタンパク質抗体は、東京都臨床医学総合研究所：小原先生、大阪大学微生物病研究所：松浦教授、本学研究所：下遠野教授から分与された。

3-2-3 Protein assay

3-2-2 でウエスタンブロット法を行う場合のサンプルは、すべて BCA 法によりタンパク濃度を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整して行った。BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) により 10 μL の細胞溶解液と 200 μL の BCA 試薬を混和し 37°C で 30 分インキュベートを行った。540 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (LabSystems) で測定し、検量線はキット内のウシ血清アルブミン標準液を使用した。

3-3 結果

ルシフェラーゼ活性の結果は、図 2-7 に示した。4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGA_1 で処理された細胞では、HCV-IRES 依存性、pHCV-IRES / F-luc のルシフェラーゼ活性が低下した。pSV40 / L-luc のキャップ依存性ルシフェラーゼ活性に対して 90% R-luc は維持された。HCV の代わりに EMCV-IRES / F-luc でトランスフェクトした細胞では、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGA_1 においてホタルルシフェラーゼ活性は約 63% 減少し、レニルルシフェラーゼ活性はほぼ変化は見られなかった。さらに、キャップ依存性ホタルルシフェラーゼの阻害活性 (pSV40 / F-luc) は PGA_1 の影響を受けなかった。したがって、 PGA_1 はキャップ依存の翻訳にはほとんど作用せず IRES を介した開始において何らかの影響を与え、抑制効果を示している可能性が見出された。

次に、NNC #2 細胞のライセート液をウエスタンブロットティングにより HCV タンパク質の発現コア、E1、E2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A および NS5B で分析した結果は、図 2-8 である。 PGA_1 の濃度を徐々に増加させて作用させると、HCV の各タンパク質は減少した。

3-4 考察

図 2-6 に示した pHCV- PGA_1 / Fluc., pEMCV-IRES / F-luc と pSV40 / L-luc を導入した Huh7 細胞に PGA_1 を作用させた結果から、細胞の CAP 依存的な翻訳には干渉することなく、HCV-IRES

を介した翻訳を阻害することで、HCV タンパク質の core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A および NS5B が減少した。これらのことから PGA_1 は、HCV-IRES Luc の評価系において Luc の発現を抑制すると共に、HCV タンパク質の発現においても濃度依存的な抑制が確認されたことから HCV-IRES RNA を介した翻訳に関わる宿主因子に影響を与えている可能性があると考えられた。

第 4 節 HCV 翻訳に関わる翻訳開始因子への影響

4-1 はじめに

前節で PGA_1 の抗 HCV 活性は HCV-IRES RNA を介した翻訳抑制が明らかとなった。そこで本節では PGA_1 は HCV-IRES に関わる宿主因子に影響を与えている可能性があると考え、 PGA_1 による HCV-IRES 翻訳に関与する宿主側の翻訳因子への影響について検討した。HCV は IRES に ribosome と宿主因子 eIF3 の結合により翻訳を開始する。特にこの eIF3 にはいくつかのファミリーが存在し、a, b, c, h, i, j, k の 7 種類の subtype が HCV-IRES RNA に直接結合する (図 2-9)。

4-2 方法

4-2-1 ウェスタンブロット法による HCV-IRES 結合宿主因子の解析

Huh7 および NNC #2 細胞 (12well プレートで 5×10^5 細胞/well) を播種し、24 時間後に PGA_1 (2 および 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で処理した。さらに 48 時間後、細胞抽出物を溶解緩衝液で 300 μL に調製した。10 μg の総タンパク質を含む細胞溶解物を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、5%スキムでブロッキング操作を 1 時間行った後、各タンパク質を検出するために 1,000 倍希釈した抗体を作用させ、その後対応する二次抗体で 1 時間作用させて検出を行った。

使用した一次抗体は、eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3i, eIF3j (Santa Cruz Biotechnology) ,

eIF3h, eIF3k, rpS3, および rpS6 (Cell Signaling Technologies) であり, 二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体 (Sigma-AldrichChemical) を使用した.

4-2-2 eIF3 および 40S ノックダウンした NNC#2 細胞におけるコアタンパク質の発現

NNC#2 細胞の eIF3 ファミリーである eIF3-a, -c, -h, -k, または rpS3 および rpS6 の 40S をそれぞれの 50 nM 容量 siRNA で処理し, 24 時間後に細胞上清を回収して HCV コアタンパク質の発現をウエスタンブロット法により測定した. NNC#2 細胞と対照として用いた Huh7 細胞に対する siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (invitrogen) を使用し, 50 nM のコントロール siRNA (siControl) を用いた.

また, ウエスタンブロットにおけるコントロールは β アクチンタンパク質とした.

4-2-3 免疫沈降法による HCV-IRES に作用する宿主内因子と PGA₁ の結合に関する解析

Huh7 および NNC #2 細胞 (6 well プレートで 1×10^6 細胞/well) を播種し, 24 時間後に 500 μ L の NP-40 リシス緩衝液で細胞を溶解した. その後, 4°C, 10,000 g で 10 分の遠心分離により細胞上清を回収した. 400 μ L 細胞上清を 37°C で 30 分間, 60 μ M のビオチン標識 PGA₁ (フナコシ) で処理した[76]. インキュベーション後, 反応液を 5,000 g, 4°C で 5 分間遠心分離した後, 50 μ L の DynabeadsM-280 ストレプトアビジン (Life Technologies) 標識ビーズにて室温で 30 分間作用させ, ビオチン標識 PGA₁-ストレプトアビジン結合物を生じさせた. 次に PBS-T 緩衝液で 3 回洗浄したものをサンプルとして, SDS-PAGE により分離してからニトロセルロース (Roche) に転写した. 転写後, 5% スキムミルクでブロッキング処理を行い, 目的とする eIF3-a, -c, -h, -k, rpS3 および rpS6 の抗体を用いて分析を行った.

使用した一次抗体は, eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3i, eIF3j (Santa Cruz Biotechnology), eIF3h, eIF3k, rpS3, および rpS6 (Cell Signaling Technologies) であり, 二次抗体として西洋ワサ

ビペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体 (Sigma-Aldrich Chemical) を使用した。

4-2-4 HCV-IRES / 宿主内因子/ PGA₁ の複合体形成状況の解析

PGA₁ の効果について、HCV-IRES 上において起こる作用によるものかどうかを確認するため、Huh7 細胞に pHCV-IRES/F-luc を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションし、24 時間後に PGA₁ を作用させて 48 時間後に細胞溶解し、細胞上清を回収してウエスタンブロット法を行い、eIF3c と rpS6 抗体による 40S タンパク質の検出を行った。

さらに、RNaseA 酵素を作用させてリボ核酸を分解しこの複合体が形成されるかどうかについて解析するため、10 cm ディッシュで培養した NNC#2 細胞を回収して 400 μL の細胞溶解液として RNase A で 1 時間処理した。その後、細胞溶解液をビオチン標識 PGA₁ とストレプトアビジンで処理して免疫沈降法を用いて PGA₁ に結合しているタンパク質を分離しウエスタンブロット法を行い、eIF3c と rpS6 のタンパク量を測定した。

4-2-4 HCV-IRES 導入による HCV-IRES / 宿主内因子/ PGA₁ の複合体形成状況の解析

PGA₁ の効果について、HCV-IRES 上において起こる作用によるものかどうかを確認するため、Huh7 細胞に pHCV-IRES/F-luc をトランスフェクションした Huh7 細胞で、eIF3c と rpS6 抗体による 40S タンパク質の検出を行った。

Huh7 細胞 (24 well プレートで 2×10^5 細胞/well) を播種し、24 時間後に 3-2 で使用した pHCV-IRES/F-luc を Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使用してトランスフェクションし、24 時間後に細胞を洗浄した。次に 4 μg / mL の PGA₁ または DMSO で処理し 48 時間、37°C でインキュベートを行い細胞上清を回収した。対照として pHCV-IRES/F-luc の導入をしていない Huh7 細胞に PGA₁ または DMSO を同様に処理して、細胞上清を得た。次にウエスタンブロット法を行い、eIF3c と rpS6 抗体による 40S タンパク質の検出を行った。

4-2-5 リボ核酸分解酵素による HCV-IRES / 宿主内因子/ PGA₁ の複合体形成状況の解析

次に RNaseA 酵素を作用させてリボ核酸を分解しこの複合体が形成されるかどうかについて解析を行った。

10 cm ディッシュで培養した NNC#2 細胞を回収して 400 μ L の細胞溶解液とし、5 μ L の RNase A を作用させ 1 時間、37°C でインキュベートを行った。その後細胞上清を 37°C で 30 分間、60 μ M のビオチン標識 PGA₁ (フナコシ) で処理した[74]。インキュベーション後、反応液を 5,000 g, 4°C で 5 分間遠心分離した後、50 μ L の DynabeadsM-280 ストレプトアビジン (Life Technologies) 標識ビーズにて室温で 30 分間作用させ、ビオチン標識 PGA₁-ストレプトアビジン結合物を生じさせた。次に PBS-T 緩衝液で 3 回洗浄し、サンプルとして SDS-PAGE により分離してからニトロセルロース (Roche) に転写した。転写後、5% スキムミルクでブロッキング処理を行い、目的とする eIF3-c と rpS6 の抗体を用いて解析を行った。

4-2-6 Protein assay

4-2-1, 4-2-2 および 4-2-4 でウエスタンブロット法を行う場合のサンプルは、すべて BCA 法によりタンパク濃度を 10 μ g/mL に調整して行った。BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) により 10 μ L の細胞溶解液と 200 μ L の BCA 試薬を混和し、37°C で 30 分インキュベートを行った。540 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (LabSystems) で測定し、検量線はキット内のウシ血清アルブミン標準液を使用した。

4-3 結果

図 2-10 に HCV-IRES に直接結合する宿主因子である eIF3 ファミリーの a, b, c, h, i, j, k ならびに ribosome が PGA₁ 処理によってどのように変化するかについて NNC#2 細胞を用いて測定した結果を示した。この結果、eIF3-a, -c, -h, -k, rpS3 および rpS6 の 6 種類のタンパク質減少

が確認された。また、対照として同時に測定した Huh7 細胞においては、宿主因子のタンパク質への影響はみられなかった。これらの結果から次に siRNA で処理した eIF3 および 40S のノックダウンを行った (図 2-11)。

図 2-11 の (i) には、NNC #2 細胞内の標的タンパク質が siRNA 処理により影響を受けて減少しているかの確認データを示した。図 2-11 の (ii) に siRNA 処理による HCV コアタンパク質を示した。この結果は、eIF3 ファミリーの a, c, h, k, rpS3 および rpS6 のどのタンパク質をノックダウンしても、HCV コアタンパク質は減少することが確認された。この時の β -アクチンタンパク質の発現には影響は見られなかった。

免疫沈降法による HCV-IRES に作用する宿主内因子と PGA₁ の結合確認を図 2-12 に示した。HCV-IRES を介した PGA₁ の作用についてさらに解析するために行ったこのビオチンストレプトアビジン免疫沈降法では、eIF3a, eIF3c, eIF3h, eIF3k, rpS3 および rpS6 サブユニットにおいてウェスタンブロット法によるタンパク質が検出された。また、PGA₁ に対して、eIF3b, eIF3i, および eIF3j は結合せず、タンパク質は検出されなかった。

さらに PGA₁ が HCV-IRES 上で作用しているかについて確認した結果を、図 2-13 に示した。この結果、Huh7 にトランスフェクションにより HCV-IRES 導入した細胞に PGA₁ を作用させると、eIF3c と rpS6 タンパク質の減少がみられた。ことより、IRES と PGA₁ が直接結合することによるものと示唆された。さらに、図 2-14 に示したように RNaseA 酵素を作用させて形成された複合体が分解されるかどうかを免疫沈降法で確認した結果、RNaseA 酵素を作用しなかった NNC#2 細胞においては HCV-IRES / 宿主内因子 / PGA₁ の複合体が形成されたまま分解することなく、eIF3c と rpS6 タンパク質のバンドが検出された。RNaseA を作用させたことによって分解された eIF3c ならびに rpS6 のタンパク質の検出はされなかった。

4-4 考察

PGA₁の効果は、図 2-10 で HCV-IRES に直接結合する宿主因子である eIF3 ファミリーの eIF3-a, -c, -h, -k, rpS3 および rpS6 の 6 種類のタンパク質の減少が確認されたことより、これらの宿主因子に作用していることがわかった。さらに eIF3 および 40S を siRNA でノックダウンを行い非特異的な結果かどうかを検証した結果（図 2-11）, HCV コアタンパク質の減少が確認でき、PGA₁の効果は、HCV-IRES に直接結合する宿主因子である eIF3 ファミリーの eIF3-a, -c, -h, -k, rpS3 および rpS6 の 6 種類のタンパク質に作用することで、HCV の翻訳に影響を及ぼすことが確認された。

これら 6 種類のタンパク質にのみ作用する理由として、一つは、eIF3b, eIF3i, および eIF3j に存在する PGA₁ が結合しうる認識部位が複合体形成時の接合部位と同じであり、結合力が PGA₁ よりも eIF3 ファミリーと HCV-IRES の方が大きい可能性、2 つ目は複合体形成時の立体構造により、PGA₁ が結合しうる認識部位が表在しないもしくは結合できない可能性、3 つ目は、eIF3b, eIF3i, および eIF3j には結合部位が存在しないという 3 つが考えられる。

PGA₁の宿主因子に対する作用は、HCV-IRES RNA 上で直接起こっていることを初めて解明した。このことから eIF3 および 40S サブユニットは、HCV-IRES を介した翻訳に非常に重要な働きをしていることが示唆された。

第 5 節 まとめ

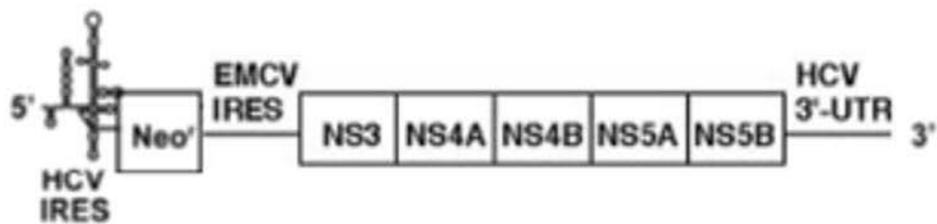
HCV-IRES RNA は、タンパク質合成を開始するために eIF3 を必要とし、IRES によるウイルスの翻訳は、重複感染時に、そして非相同的組換えによって、発生する可能性が示されていた [75,76]。また、HCV-IRES を介した翻訳阻害は、Hsp90 阻害剤によって引き起こされる eIF3c 発現の減少でも起こることが示されていた [71]。

本論文では、PGA₁と eIF3 または 40S サブユニット間の相互作用が HCV-IRES RNA 結合に依存することを示唆している。つまり、つまり図 2-15 に示すように PGA₁/eIF3-40S サブユニット/

HCV-IRES RNA 複合体は, HCV-IRES を介した翻訳阻害することを見出した.

PGA₁ の HCV-IRES を介した翻訳の阻害は, PGA₁ / eIF3-40S サブユニット / HCV-IRES RNA 複合体の形成により起きる新しい阻害メカニズムで, PGA₁ は新規抗 HCV 薬となる可能性が示唆された.

#50-1 (NN / 1b / SG)



NNC #2 (NN / 1b / FL)

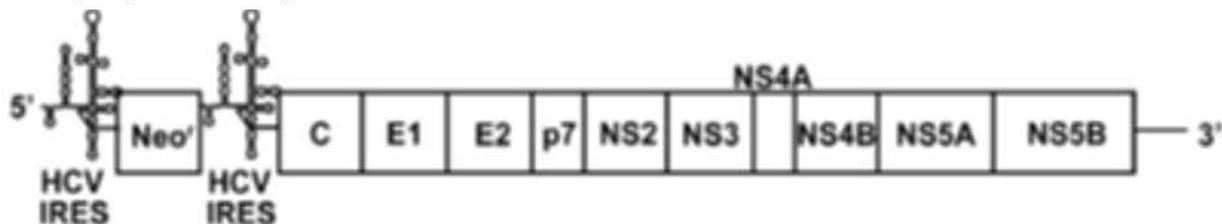


図 2-1 HCV レプリコン RNA の概略図

※概略図は、名称(レプリコンコンストラクトの株/遺伝子型/長さ)で表記される。

長さ; SG; subgenome replicons. FL; full genome replicons.

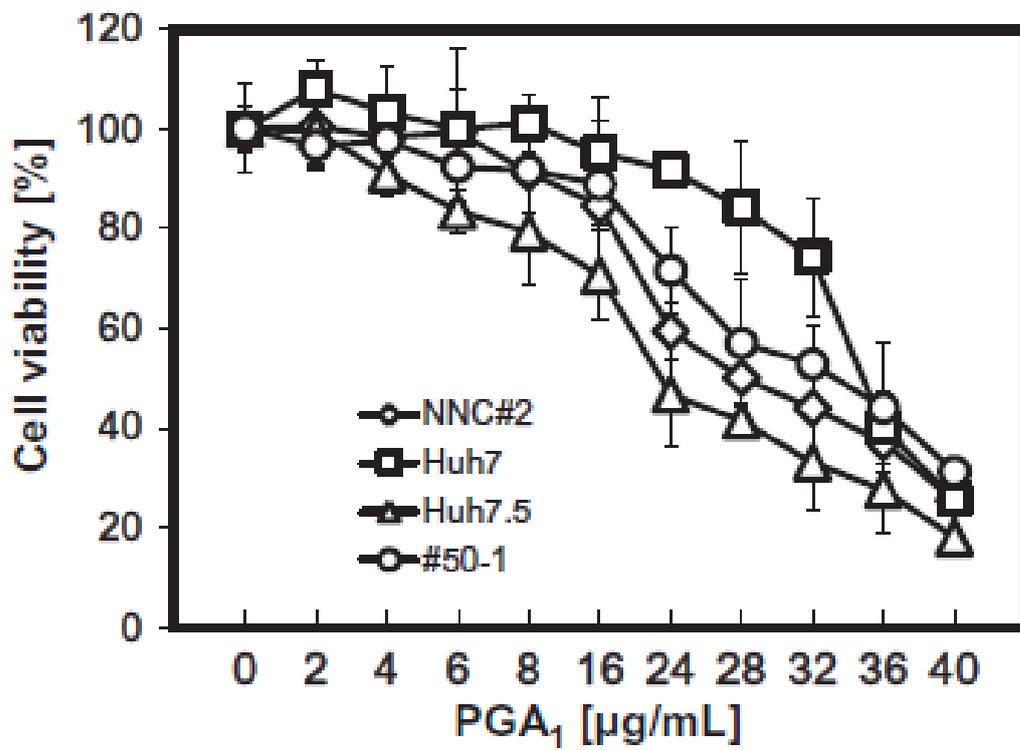


図 2-2 PGA₁ の細胞毒性効果

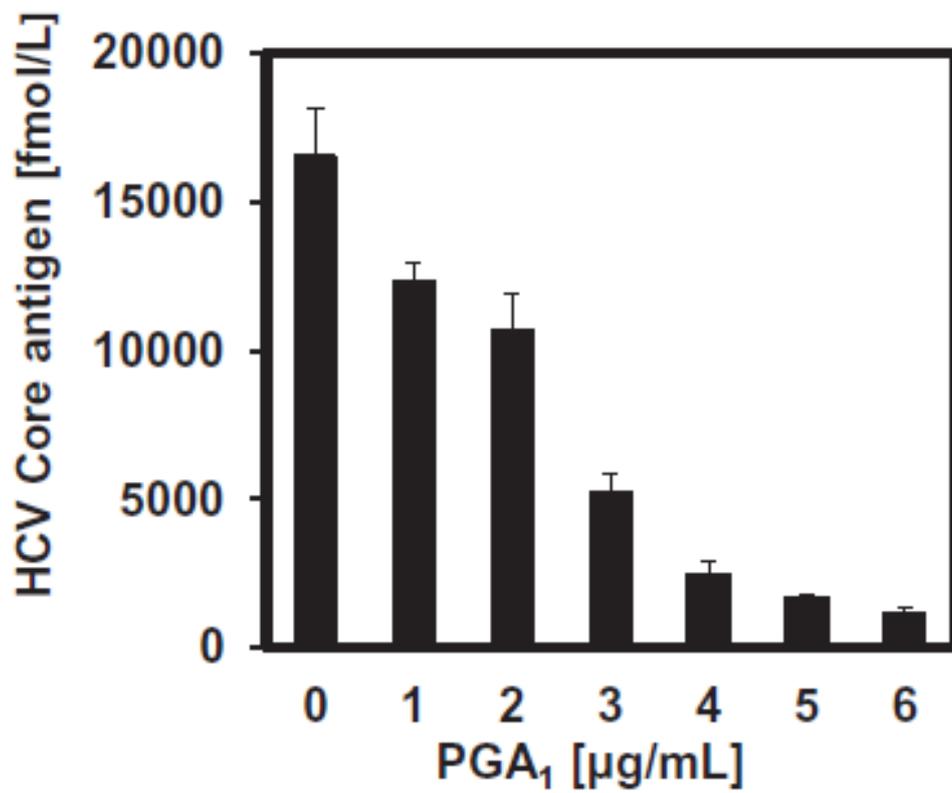


図 2-3 PGA₁による NNC #2 細胞内 HCV コアタンパク質抗原の発現

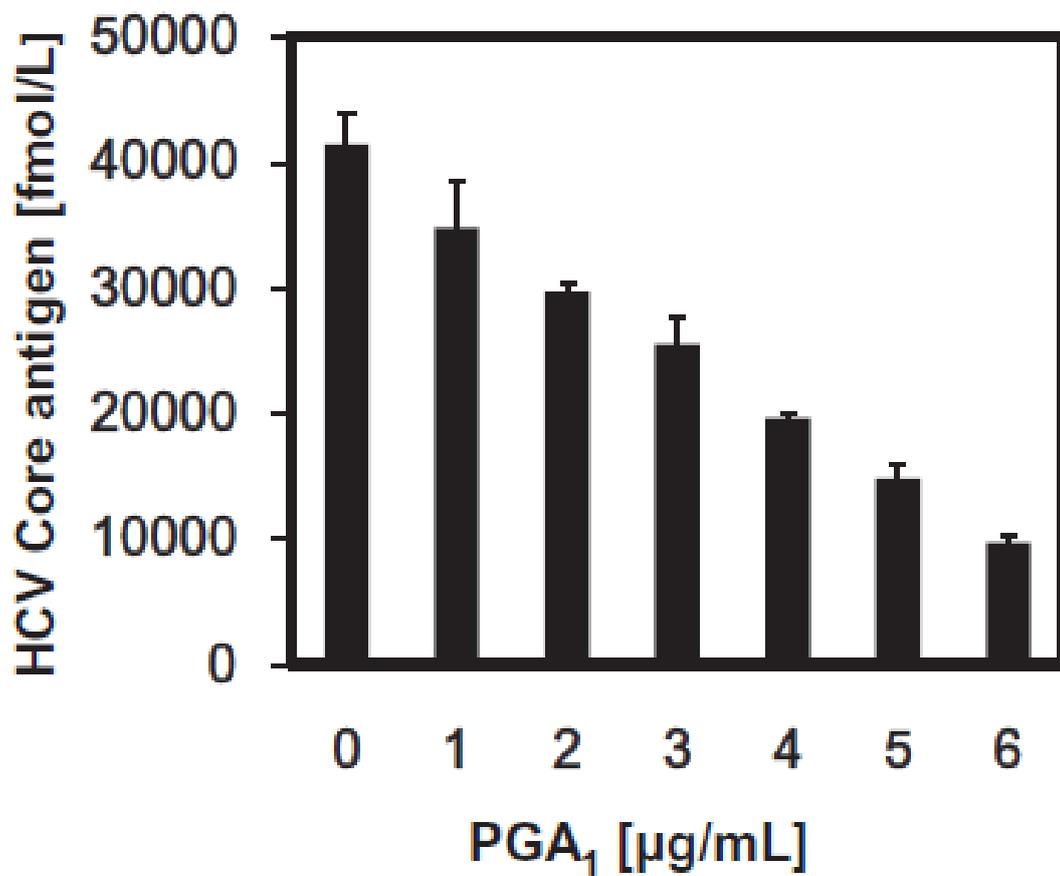


図 2-4 PGA₁による JFH1 感染 Huh7.5 細胞内 HCV コアタンパク質抗原の発現

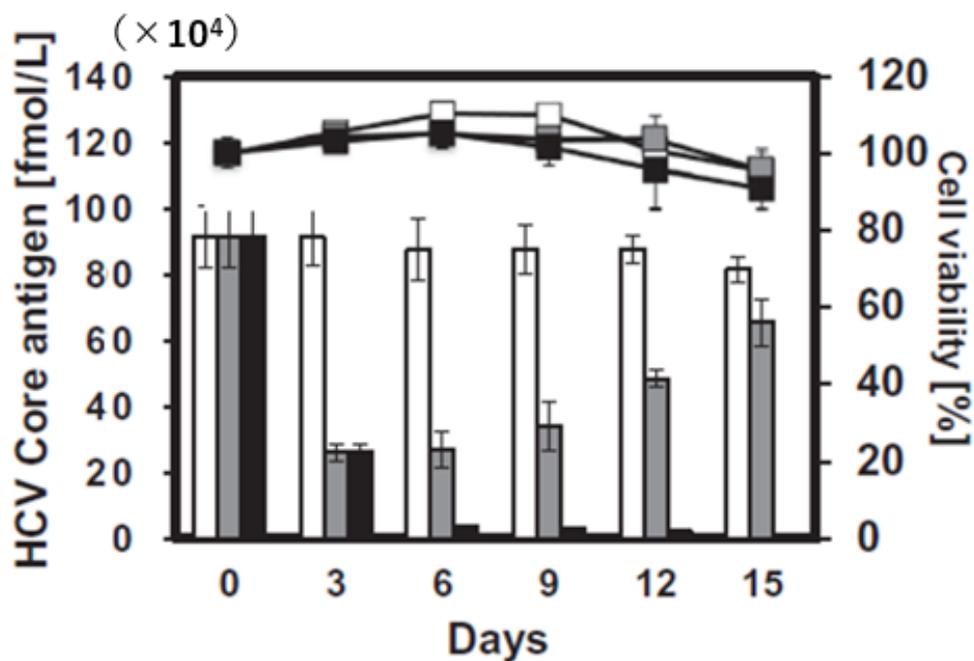
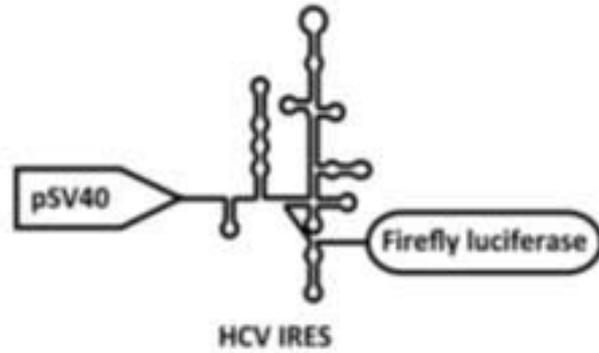


図 2-5 HCV 翻訳に対する単一および反復 PGA₁ 治療の効果の比較

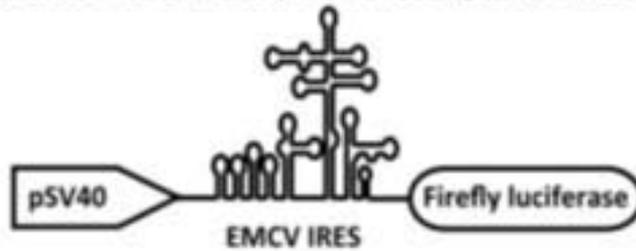
※ 折れ線グラフ ; Cell viability, 棒グラフ ; HCV Core antigen

□ ; PGA₁ 未処理 (対照), ■ ; 4 μ g/mL の PGA₁ を開始日のみ単一処理,
 ■ ; 4 μ g/mL の PGA₁ を 3 日ごとに反復処理

pSV40/HCV-IRES/Firefly-luciferase (pHCV-IRES/F-luc)



pSV40/EMCV-IRES/Firefly-luciferase (pEMCV-IRES/F-luc)



pSV40/Renilla-luciferase (pSV40/R-luc)



pSV40/Firefly-luciferase (pSV40/F-luc)



図 2-6 ルシフェラーゼ活性をもったプラスミドの概略図

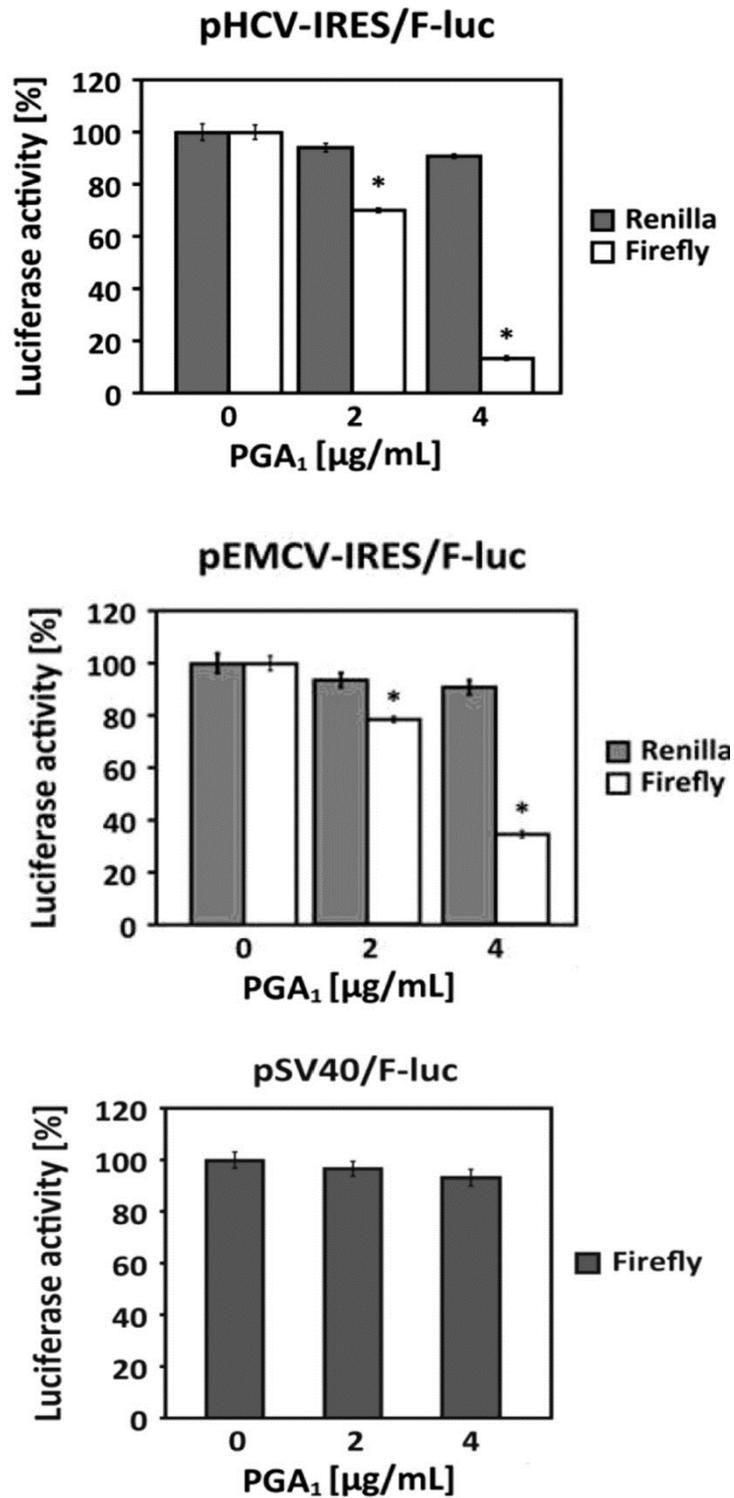


図 2-7 ルシフェラーゼによる IRES 発現の確認

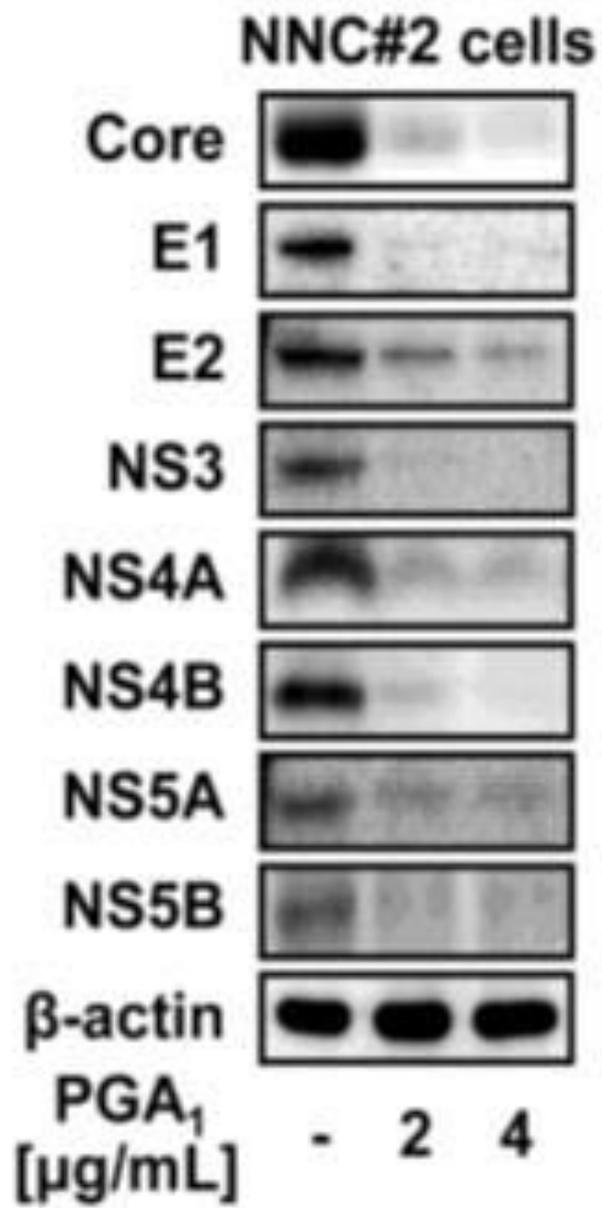


図 2-8 HCV タンパク質の発現確認

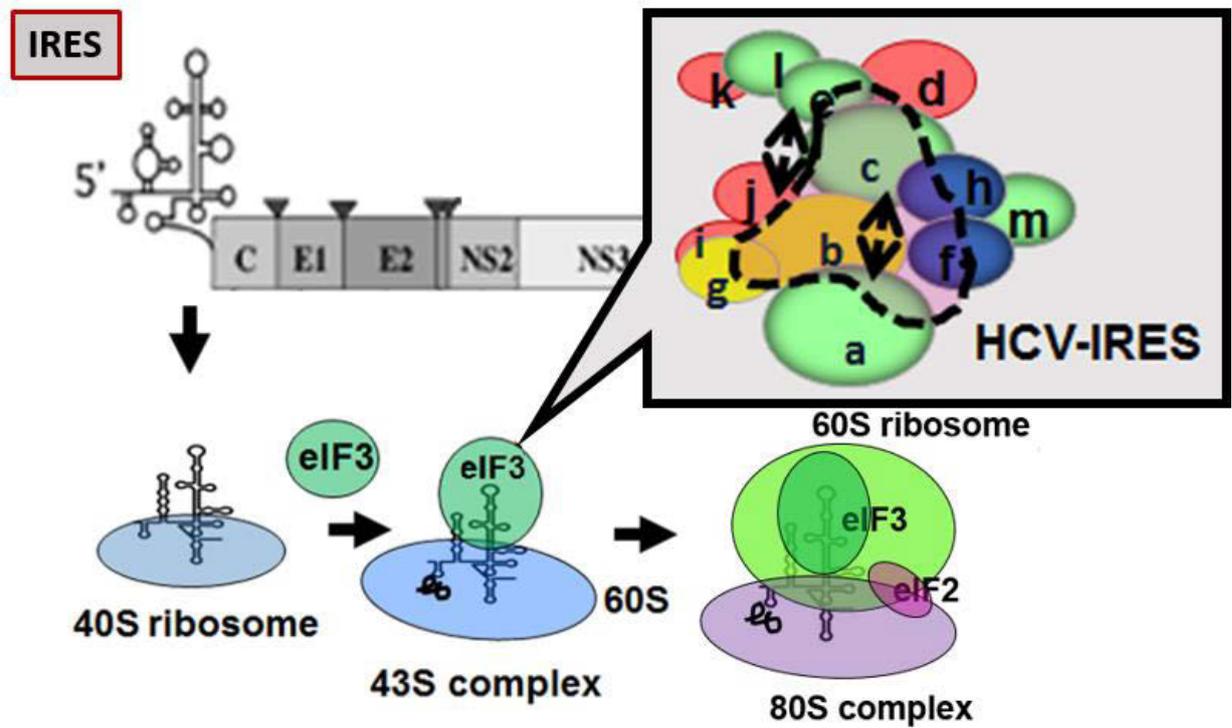


図 2-9 HCV-IRES に結合する ribosome と宿主因子 eIF3s の関係

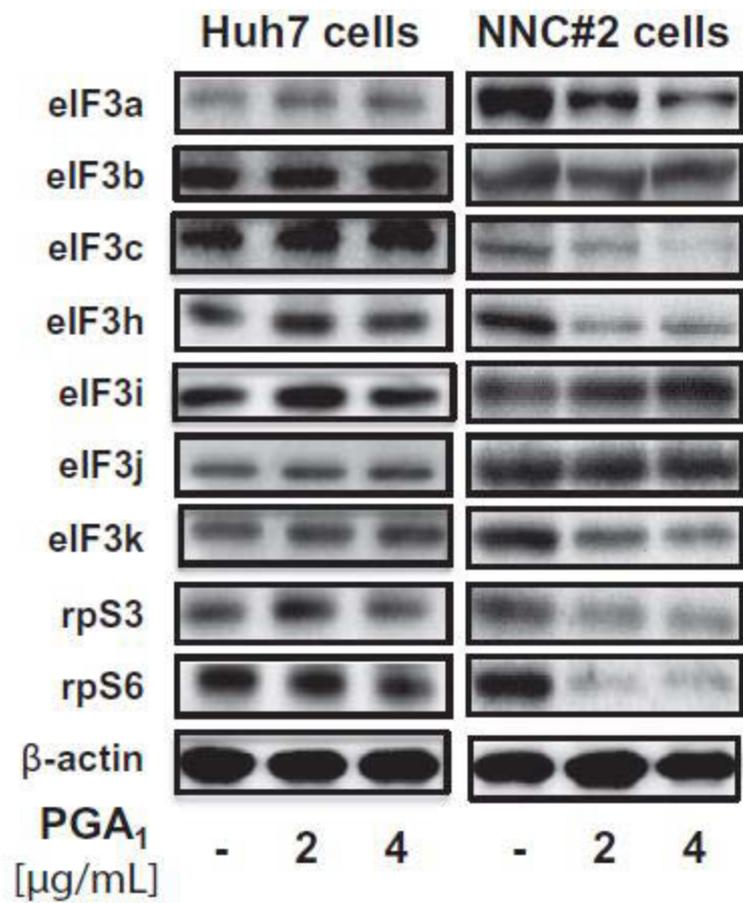


図 2-10 HCV-IRES 翻訳に関わる宿主内因子の発現抑制

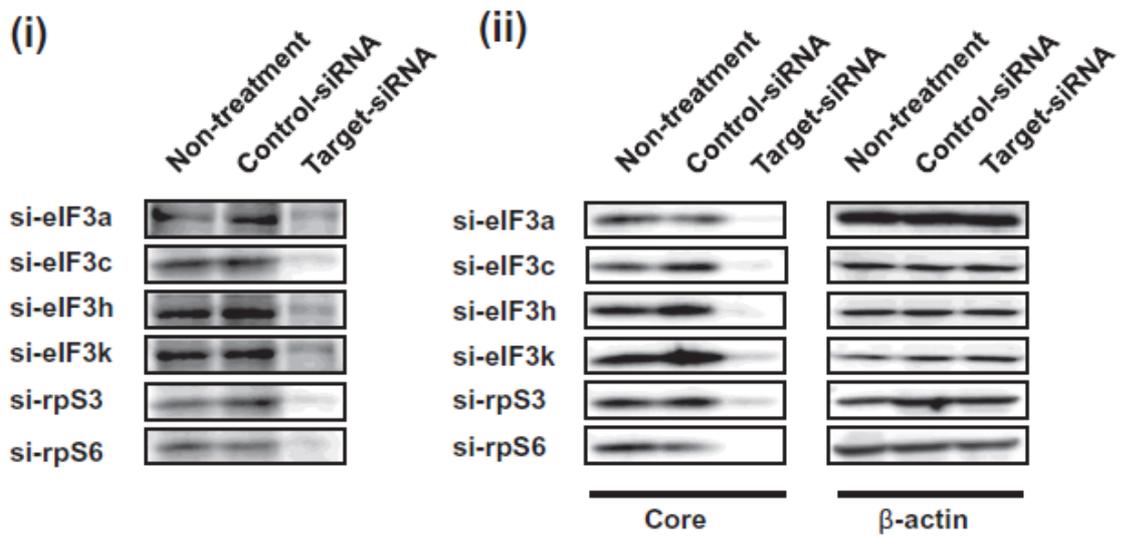


図 2-11 標的宿主因子を抑制後の HCV コアタンパク質の発現

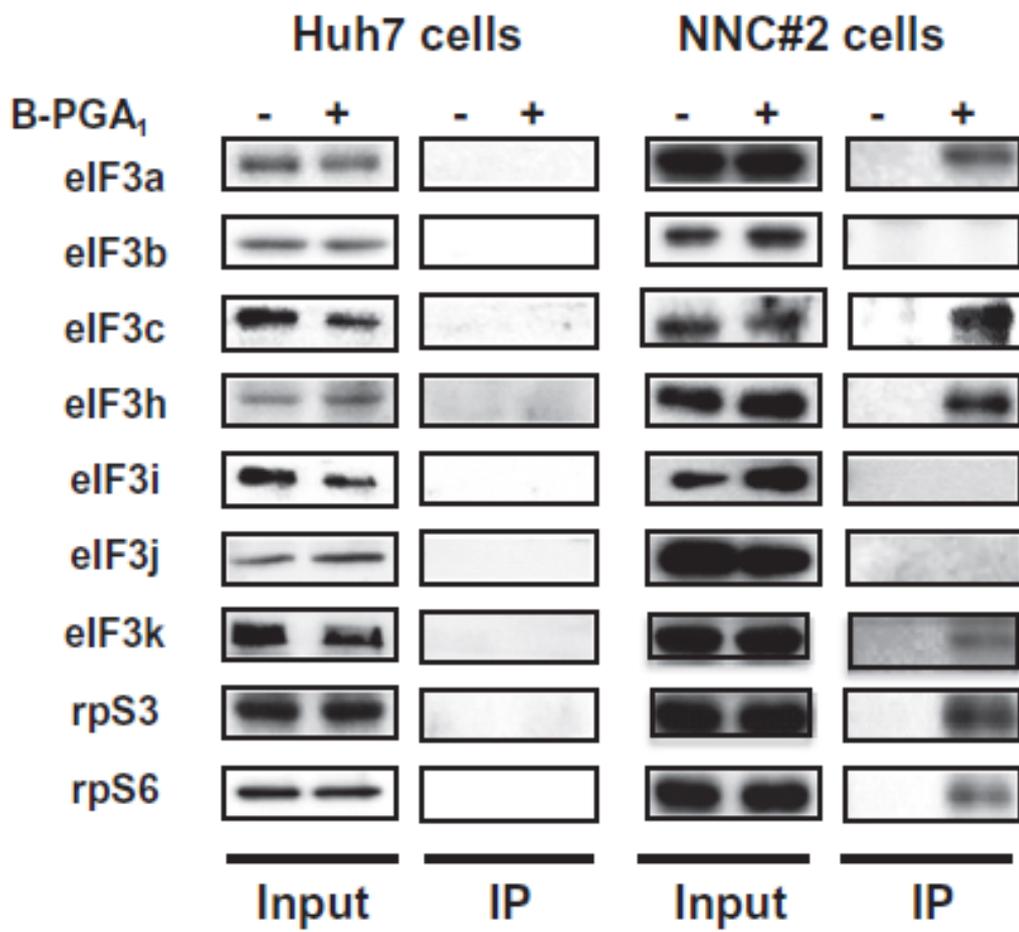


図 2-12 宿主内因子と PGA₁ の結合確認

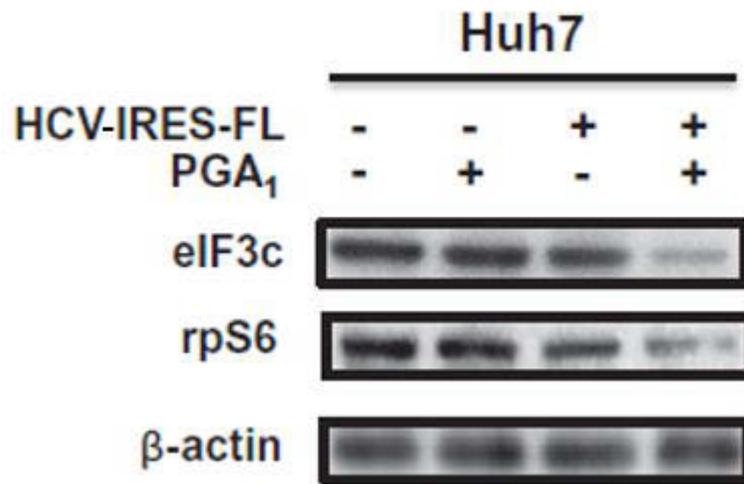


図 2-13 PGA₁における複合体形成

NNC#2 cells

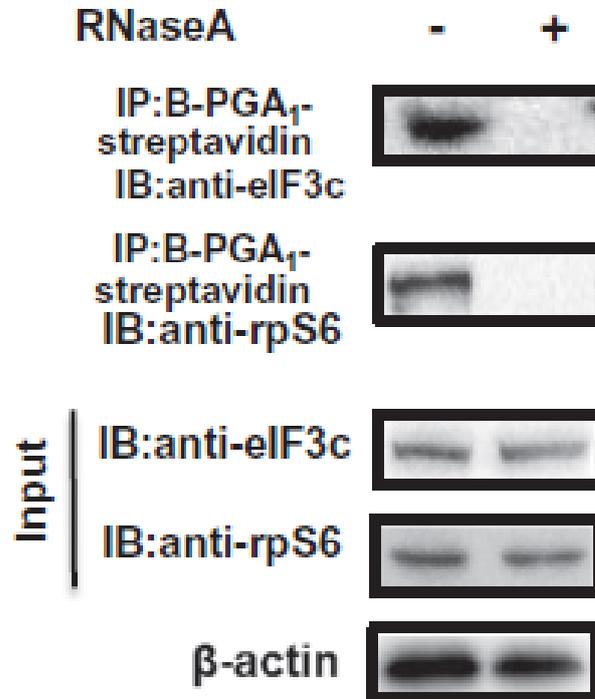


図 2-14 RNaseA による複合体への影響

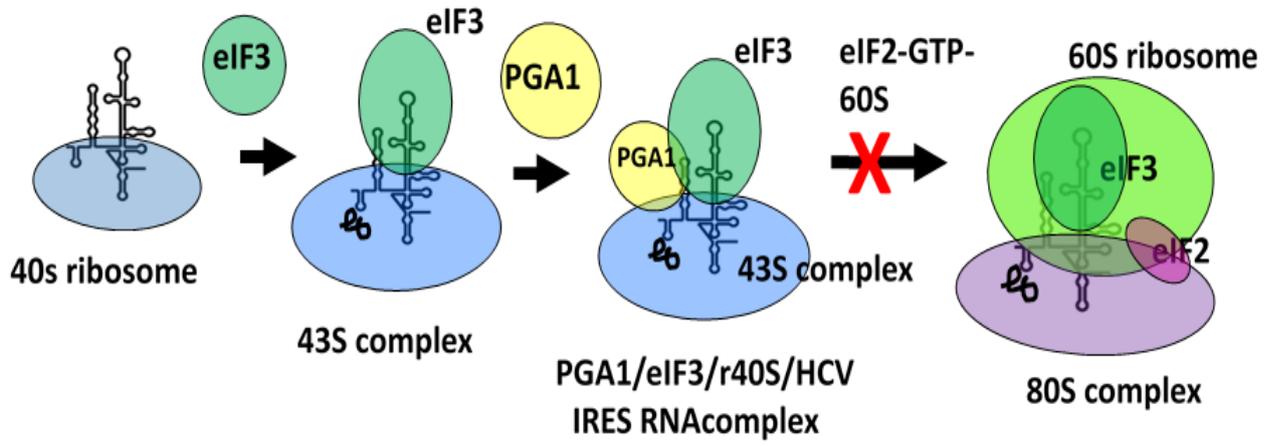


図 2-15 PGA₁ における翻訳阻害

第3章 ビオラセインの抗HCV及び抗腫瘍活性と作用機序の解明

第1節 *C. violaceum* VP2株産生ビオラセインによる抗HCV活性

1-1 はじめに

天然色素のビオラセインは、抗菌活性を有することや、白血病細胞[79]やMCF-7乳癌細胞に抗腫瘍効果[78, 79]があることが知られているが、HCVに対する効果はいまだ報告されていない。そこで、当研究室が茨城県の土壌より発見した *C. violaceum* VP2株の産生するビオラセインについて、初めてHCVに対する増殖阻害効果について検討した。

1-2 薬剤の調整

本研究では使用したビオラセインは、茨城県の土壌から分離したグラム陰性桿菌の *C. violaceum* のビオラセイン産生細菌 (VP) 2から単離精製したものを使用した。凍結乾燥した100%ビオラセインと100%デオキシビオラセインの粉末をジメチルスルホキシド (DMSO; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) に溶解し、試験するまで暗所に4℃で保存した[80]。DMSOの最終濃度は0.1%として使用した。

1-3 方法

1-3-1 細胞培養と試薬

用いた培養系肝細胞のHuh7は、10%ウシ胎児血清 (FBS) , 100 µg/ mL ペニシリン G および 10,000 µg/ mL ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) 必須アミノ酸 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) で培養した。NNC # 2細胞は、800 µmol/ L の L-グルタミン, 10%FBS, 100 U/ mL の非必須アミノ酸, 100 µg/ mL のペニシリン G, 10,000 µg/ mL のストレプトマイシン, および 300 µg/ mL の G418 (Nacalai

Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を添加した DMEM 培地で培養した。これらの細胞の培養温度は 37°C, 5%CO₂ とした。

1-3-2 ルシフェラーゼ活性による HCV 抑制効果の確認

Huh7 細胞 (96well プレートで 1×10^4 細胞/well) に播種し 24 時間培養後, それぞれ 30 ng の pHCV-IRES / Fluc と pSV40 / R-luc を Lipofectamine 3000 (Life Technologies) を使用してコトランスフェクトした。その後 37°C で 24 時間インキュベートした後細胞を PBS で洗浄し, ビオラセイン濃度, 0.156 μ M, 0.312 μ M, 0.625 μ M, 1.25 μ M と DMSO を作用させ, 48 時間培養を行った。次に培養液を除き各 well に 1×PBS(-)を加え培養プレートを軽く揺らして細胞を 2 回洗浄した。1×PBS(-)を除去後, 50 μ L の Passive lysis buffer (Promega)を加え, 培養プレートをゆすり室温で 15 分間静置し細胞を溶解した。細胞溶解液を 1.5 ml チューブに移し, 12,000 rpm, 3 min, 室温にて遠心分離することで細胞膜等の不純物を分離し, 上清を別の 1.5 ml チューブに移した。これを細胞内タンパク質精製溶液とした。その上清のうち 10 μ L と Luciferase Assay Systems kit (Promega) のルシフェラーゼ発光基質を 100 μ L 混和して Luminometer (LUMAT LB9507; BERTHOLD) により, ルシフェラーゼ活性を測定した。

ルシフェラーゼ活性は, デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を使用して測定した。この時のサンプルの体積は 110 μ L, 測定時間は 5 秒とした。データは, 独立した実験からの平均 \pm SD として表した。また, 各実験は 3 回行い, スチューデント t 検定により $p < 0.05$ で有意差を求めた。

1-3-3 HCV タンパク質の抑制効果の確認

NNC#2 細胞 (6well プレートで 8×10^5 細胞/well) を播種後 24 時間培養し, ビオラセイン濃度, 0.156 μ M, 0.312 μ M, 0.625 μ M, 1.25 μ M と DMSO を作用させ, 48 時間培養を行った。次に細胞

を 1×PBS(-)で 2 回洗浄した後、細胞溶解液で処理したものをライセート液とした。そのライセート液を用いてウエスタンブロット法を行った。検出には HCV RNA の複製に必要な HCV 非構造タンパク質である NS5A，ならびに対照として β アクチンの検出を行った。

1-4 結果

Huh7 細胞に導入した HCV-IRES に対するビオラセインの作用についてルシフェラーゼ測定の結果を図 3-1 に示した。このルシフェラーゼの活性結果から、ビオラセインはビオラセイン濃度、0.156 μ M, 0.312 μ M, 0.625 μ M, 1.25 μ M において HCV-IRES を濃度依存的に抑制することが確認できた。また、図 3-2 に示すように HCV タンパク質である非構造タンパク NS5A にたいして抑制効果を示した。

1-5 考察

ビオラセインは、ルシフェラーゼ測定の結果から、ビオラセイン濃度依存的に HCV-IRES に作用して減少させ、ウエスタンブロット法により HCV RNA の複製に必須である HCV NS5A タンパク質の発現抑制を確認した。これらの結果は、今後ビオラセインが新たな HCV 抑制剤となりうる可能性を示唆しており、継続して検討するに値する物質と判断して解析を進めることとした。

第 2 節 ビオラセインとデオキシビオラセインの細胞毒性

2-1 はじめに

図 3-1, 図 3-2 に示したように、低濃度のビオラセインが HCV-IRES RNA の活性ならびに非構造タンパク質の NS5A の抑制効果を示したことから、ビオラセインの細胞毒性[81]について検討

を行った。また、ビオラセインは、*C. violaceum* VP2 株内では、デオキシビオラセインとの混合色素として産生されることから、このデオキシビオラセインについても一緒に解析を行った。

2-2 方法

細胞毒性を示す MTS 測定は、Huh7 細胞ならびに NNC#2 細胞は well あたり 4×10^4 個を 96well プレートに播種し、24 時間後にビオラセイン濃度およびデオキシビオラセイン濃度、0.156 μM , 0.312 μM , 0.625 μM , 1.25 μM , 2.50 μM , 5.00 μM , 10.0 μM , 20.0 μM の各濃度と DMSO を作用させ、4 時間または 24 時間培養を行った。次に培養薬剤液を除き各 well に 1×PBS(-)を加え細胞を洗浄した後、MTS 測定により生細胞数の確認を行った。これらのデータは、3 回の独立した実験からの平均 \pm 標準偏差として表され、各実験は 3 回実施しての細胞生存率をえた。

2-3 結果

ビオラセイン濃度およびデオキシビオラセインの MTS 測定による、Huh7 細胞ならびに NNC#2 細胞の細胞毒性試験の結果を図 3-3 に示した。図 3-3 A はビオラセインおよびデオキシビオラセインを 4 時間作用させ、B は 24 時間作用させたときの細胞毒性を示している。ビオラセインは 4 時間の作用では、Huh7 細胞において 0.312 $\mu\text{mol/L}$ 濃度で 11.1%抑制し、NNC#2 細胞では 0.625 $\mu\text{mol/L}$ 濃度で 9.7%抑制することが明らかになった。24 時間後における、Huh7 細胞の増殖は 0.31 $\mu\text{mol/L}$ で 32.2%抑制され、NNC#2 細胞の増殖は 0.63 $\mu\text{mol/L}$ で 14.3%抑制された。また、デオキシビオラセインは、調べた濃度では、Huh7 細胞および NNC#2 細胞に対して毒性は有していなかった。

プロビット分析[82]によって計算された Huh7 細胞のビオラセインの EC₅₀ は、4 時間で 1.53 $\mu\text{mol/L}$, 24 時間で 0.47 $\mu\text{mol/L}$ であり、NNC#2 細胞での EC₅₀ は 4 時間の作用で 6.11 $\mu\text{mol/L}$, 24 時間の曝露においては、2.48 $\mu\text{mol/L}$ を示した。

2-4 考察

図 3-3 の 4 時間ならびに 24 時間ビオラセインを作用させた細胞毒性試験結果で、MTS 測定によるビオラセインの Huh7 および NNC #2 細胞の増殖に対する効果は、用量依存的な阻害効果であることが確認できたことより、肝がん細胞と HCV 感染細胞の治療という観点では、細胞を死滅させるという手法により治療が成立すると考えられた。また、その効果は Huh7 細胞よりも NNC #2 細胞で弱い作用であると確認されたことから、HCV の感染により誘導される宿主因子もしくは、HCV そのものの RNA およびタンパク質が何らかの作用をしているものと示唆された。

また、デオキシビオラセインについては、細胞毒性が確認できなかったことから、以降の解析においては除外することとした。

第 3 節 Hoechst と PI によるビオラセイン処理細胞の染色と細胞死の解析

3-1 はじめに

これまでの解析により、ビオラセインは濃度依存的に培養系肝がん細胞に細胞毒性を示すことが示されたことから、プロビット分析によって計算された NNC #2 細胞での EC50 が 4 時間の作用で 6.11 $\mu\text{mol/L}$ だったことから、NNC #2 細胞の EC50 に近い濃度までの細胞の形態学的変化を観察することとした。

3-2 方法

Huh7 および NNC #2 細胞 (4×10⁴ 細胞/well) を 96well プレートに播種し、24 時間のインキュベーション後、0.625 $\mu\text{mol/L}$ 、1.25 $\mu\text{mol/L}$ 、2.50 $\mu\text{mol/L}$ 、5.00 $\mu\text{mol/L}$ の各濃度のビオラセインまたは DMSO を 4 時間作用させた。次に培養液を取り除き最終濃度 10,000 倍に希釈したヨウ化プロピジウム (PI; Dojindo Laboratories) および 1,000 倍に希釈した Hoechst 33258 (Hoechst)

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で、37°C で 30 分作用させた。この 96well プレートを BZ-

X800 蛍光顕微鏡 (Keyence Corporation, Osaka, Japan) を使用して細胞膜を透過して核酸に結合し、PI 染色された死細胞[83]と膜透過性の Hoechst に染色された細胞の観察を行った。

3-3 結果

ビオラセイン処理による細胞死の解析を、細胞膜透過性を利用した生細胞と死細胞染色を実施して蛍光顕微鏡で確認した結果を図 3-4 の Huh7 細胞、図 3-5 に NNC#2 細胞を示した。PI は一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内の DNA に結合してし赤色蛍光を発する。Hoechst は細胞に取り込まれ、DNA の AT 配列の副溝に結合する蛍光色素明るい青色を呈する。観察の結果は、ビオラセイン濃度依存的に細胞数が減少し死細胞を示す PI での染色が多く見受けられた。また、ビオラセイン濃度が高くなるにつれ、細胞膜の変化によりプレートへの接着状態を保持できず浮遊する細胞が多くみられ、これは NNC#2 細胞よりも Huh7 細胞でより顕著であった。Huh7 細胞と NNC#2 細胞ともに、アポトーシスと判断できる細胞質の膨張がみられるものが観察されたが、ビオラセインが細胞に取り込まれ明らかにビオラセイン色素と判断できる細胞も存在した。さらに細胞が壊れたと考えられる細胞膜残渣と判断できる浮遊物が観察された。

3-4 考察

図 3-4 の Huh7 細胞と図 3-5 NNC#2 細胞の細胞膜透過性を利用した。PI と Hoechst による生細胞と死細胞染色により、ビオラセインは濃度依存的に Huh7 細胞と NNC#2 細胞に対して細胞死を誘導することが確認された。また、この傾向は、NNC#2 細胞よりも Huh7 細胞でより顕著であり、がん細胞に対しての効果が大きいと考えられた。NNC#2 細胞は、HCV が持続感染している細胞株のため、HCV 感染による宿主内因子の変化やウイルスタンパク質が何らかの影響をして

いるものと考えられる。以上の結果から、Huh7細胞とNNC#2細胞の死がどのような死であるのか解析することとした。

第4節 ビオラセインに誘導された細胞死の解析

4-1 はじめに

Huh7細胞とNNC#2細胞に対しビオラセインは、細胞膜透過性を利用した生細胞と死細胞染色によりアポトーシスもしくはネクローシスによる細胞死を誘導していることが確認できた。このことより、ビオラセインが誘導する細胞死のタイプについて細胞膜のリン脂質変化を利用した細胞死の解析により分析することとした。

4-2 方法

Huh7およびNNC#2細胞 (4×10^4 細胞/well) を96wellプレートに播種し、24時間のインキュベーション後、 $0.625 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.50 \mu\text{mol/L}$ 、 $5.00 \mu\text{mol/L}$ の各濃度のビオラセインまたはDMSOを4時間作用させた。次に培養液を取り除き apoptotic/necrotic/healthy cell detection kit (Promoter Cell Inc., Heidelberg, Germany) を用いて製造元のプロトコルに従って蛍光顕微鏡でアポトーシス細胞と壊死細胞を検出した。このキットは3種類の試薬から構成されており、アネキシンV (フルオレセインイソチオシアネート (FITC; $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 492/514 \text{ nm}$) で標識) は、アポトーシス細胞の外小葉に露出したホスファチジルセリン(PS) に特異的に結合し、明るい緑色に染色する。エチジウムホモ二量体 III (EthD-III) は、生細胞やアポトーシス細胞に浸透せず、ネクローシス細胞(後期アポトーシスを含む)にのみ浸透して、赤い蛍光を発する ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 528/617 \text{ nm}$)。膜透過性 Hoechst33342 (Hoechst-k) は、DNAに結合すると明るい青色に蛍光を発し、アポトーシス細胞とネクローシス細胞の両方の核を染色する ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 350/461 \text{ nm}$) 実験は3回行った。

4-3 結果

図 3-6, 図 3-7 に apoptotic/necrotic/healthy cell detection kit による細胞膜のリン脂質変化を利用した細胞死の解析結果を示した. 図 3-6 の Huh7 細胞および図 3-7 の NNC#2 細胞ともに, ビオラセイン濃度が低濃度の $0.625 \mu\text{mol/L}$, $1.25 \mu\text{mol/L}$ から初期アポトーシス細胞が観察され, ビオラセイン濃度が高濃度になるにつれ細胞の剥離と EthD-III による染色細胞が増加しており, 後期アポトーシスもしくはネクローシス細胞が増加していた. また, ビオラセイン濃度が高くなるにつれ, 細胞膜の変化によりプレートへの接着状態を保持できず浮遊する細胞が多くみられる傾向あり, さらに細胞が壊れたと考えられる細胞膜残渣と判断できる浮遊物が観察された. これは NNC#2 細胞よりも Huh7 細胞でより顕著であった.

4-4 考察

Huh7 細胞と NNC#2 細胞ともに, アポトーシスによる細胞死が誘導された. その後ビオラセインの濃度依存的に二次アポトーシスならびにネクローシスが誘導されること確認できた. また, ビオラセイン濃度が高くなるにつれ, 細胞膜のリン脂質変化が急激に起こることで細胞破解が起こり, 観察時には細胞数が減少した. この事実は, ビオラセインの濃度を適切にコントロールできれば抗がん剤として有効な生理活性物質になる事を示唆している.

第 5 節 TNFR ファミリーにより誘導されるアポトーシス細胞死

5-1 はじめに

ビオラセインは Huh7 細胞と NNC#2 細胞に対してアポトーシスによる細胞死を誘導することが図 3-6 および図 3-7 で細胞形態学的に観察されたことから, アポトーシス細胞におけるカスパーゼ-3 活性を確認する事とした.

5-2 方法

Huh7 および NNC #2 細胞 (2×10^4 細胞/well) を 96well プレートに播種し、 37°C 、24 時間培養後、ビオラセインを作用させて 4 時間のインキュベーションした。ビオラセイン濃度は $0.625 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.50 \mu\text{mol/L}$ 、またはコントロール DMSO とした。その後細胞を $1 \times \text{PBS}(-)$ を加え洗浄した後、カスパーゼ-3 阻害剤 DEVD-FMK (Cleaved Caspase-3 Staining Kit (FITC), Abcam, Tokyo, Japan) で反応させた。FITC によるカスパーゼ 3 は、フローサイトメトリー (FACS Calibur TM Flow Cytometer; BD Biosciences) を用いて検出した。データは、3 回の独立した実験からの平均 \pm 標準偏差として表され、各実験は 3 回行った。統計分析は、スチューデントの t 検定を使用した。

5-3 結果

ビオラセインが誘導するアポトーシスにより調節因子であるカスパーゼ 3 活性の変化を図 3-7 に示した。図 3-8 A はフローサイトメトリー測定による解析の結果である。カスパーゼ 3 活性を有するアポトーシス細胞は、 $0 \mu\text{mol/L}$ 濃度のビオラセインと比較して Huh7 細胞で $4.90 \pm 2.04 \%$ 、 $13.34 \pm 1.34 \%$ 、 $12.02 \pm 1.79 \%$ 、 $16.36 \pm 3.60 \%$ であり、NNC #2 細胞においては $3.10 \pm 0.05 \%$ 、 $21.62 \pm 2.08 \%$ 、 $19.86 \pm 1.36 \%$ および $30.17 \pm 4.34 \%$ であった。このようにビオラセインの濃度が高くなるにつれカスパーゼ 3 活性を有する細胞が右側にシフトしてカスパーゼ 3 活性が高くなっていることが確認できた。

図 3-8 B はこのカスパーゼ 3 活性を数値化して解析したグラフである。アポトーシス細胞の割合は、 $0 \mu\text{mol/L}$ 濃度のビオラセインと比較して、HuH7 細胞で約 2.45~3.3 倍、NNC #2 細胞で約 6.4~9.7 倍高かった。t 検定による統計学的解析により、 $p < 0.05$ で統計的に有意であることを示された。

5-4 考察

これらの解析の結果、ビオラセインは濃度依存的に Huh7 および NNC #2 細胞においてカスパーゼ 3 の活性化が誘導され、この経路を介してアポトーシスを誘導されることを確認した。また、NNC#2 細胞における形態学的な結果は、Huh7 細胞と比較すると HCV の存在がアポトーシスを抑制しているようにも観察された。以前の報告では、HCV コアと E1 および E2 構造タンパク質がアポトーシスを促進し、NS3, NS4A, NS5A, および NS5B 非構造タンパク質がアポトーシスを抑制することが示されている[83-86].

細胞死は、以前はアポトーシス、オートファジー、角質化、壊死に分類されていた[85, 86]が現在は 13 種類に分類され[87, 89], 関与する分子シグナルが解明されてきている。また、癌細胞の増殖は、細胞死を防ぐアポトーシスに関連する遺伝子の突然変異から生じるという報告がある[87].

本研究では、ビオラセインが Huh7 と NNC #2 細胞において濃度依存的にアポトーシスを引き起こし、さらに高濃度のビオラセインは、アポトーシス以外のメカニズムを介して細胞死が起こる可能性があることを示した。これらのことはビオラセインが、HCV に感染した肝細胞癌細胞の有望な治療薬になりうること、さらに細胞死のタイプを調査するための有用な化合物である可能性が示唆された。

第 6 節 まとめ

今回の解析により、ビオラセインは、Huh7 および NNC #2 細胞において TNFR ファミリーに誘導されるカスパーゼ 3 の活性化によりアポトーシスを誘導することで、抗 HCV 活性ならびに抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。さらに、形態学的観察から、アポトーシス以外の種類の細胞死を引き起こしている可能性が示唆され、細胞死のタイプを調査するための有用な化合物である可能性が示唆された。

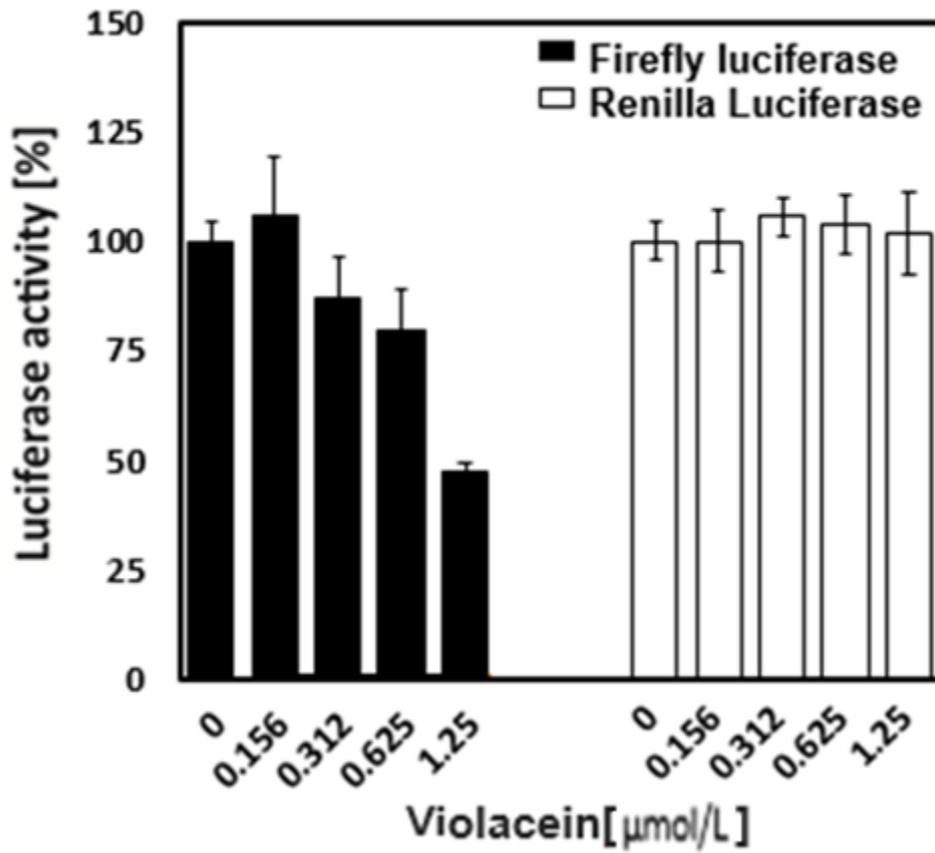


図 3-1 HCV-IRES の抑制効果の確認

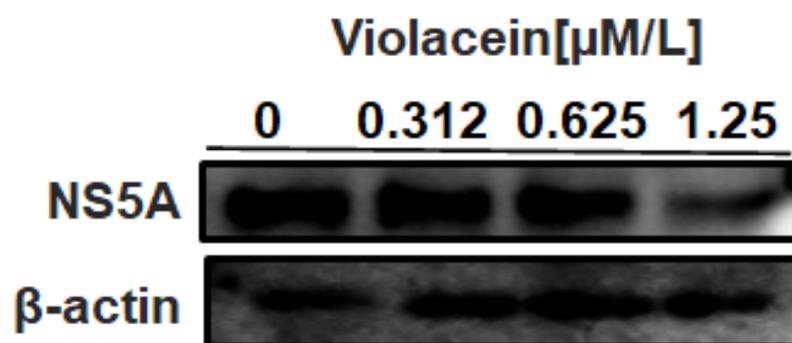


図 3-2 HCV NS5A タンパク質の発現確認

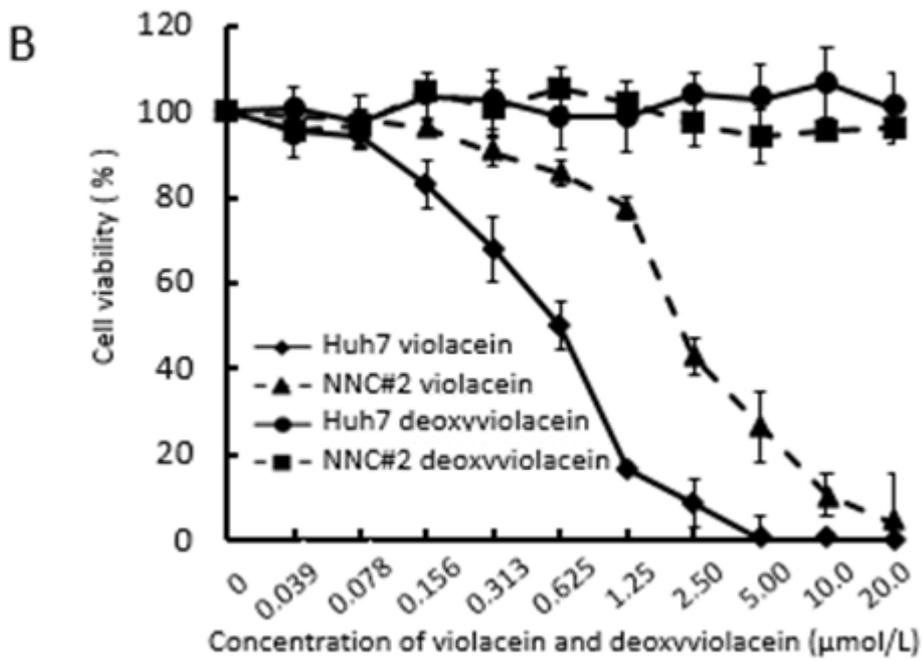
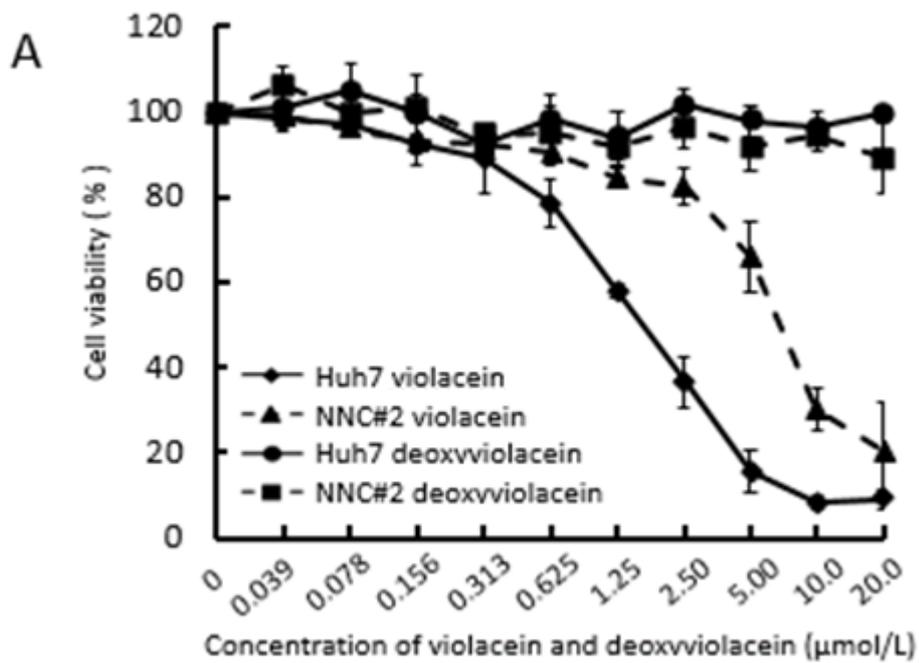


図 3-3 ビオラセインとデオキシビオラセインの細胞毒性

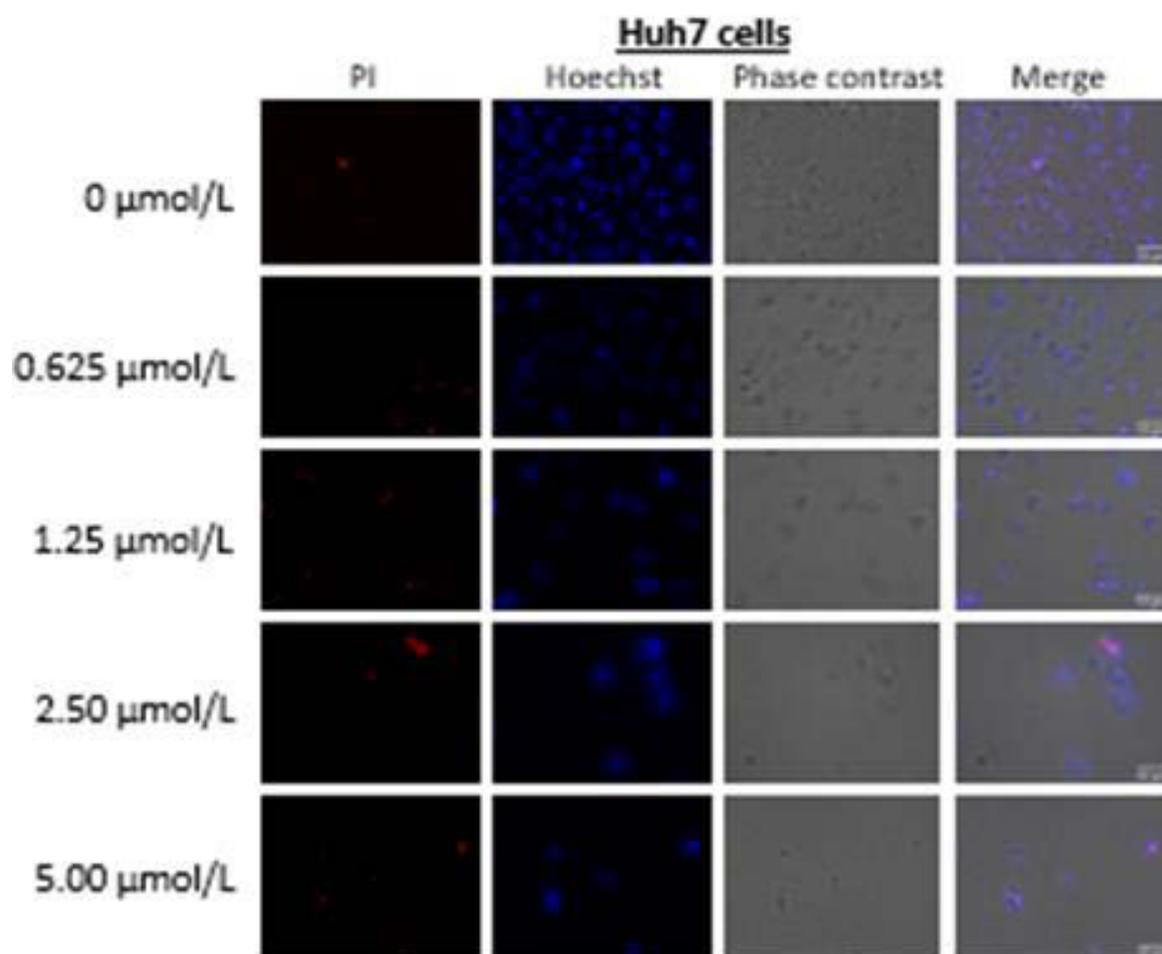


図 3-4 Huh7 細胞の細胞膜透過性を利用した生細胞 と死細胞染色

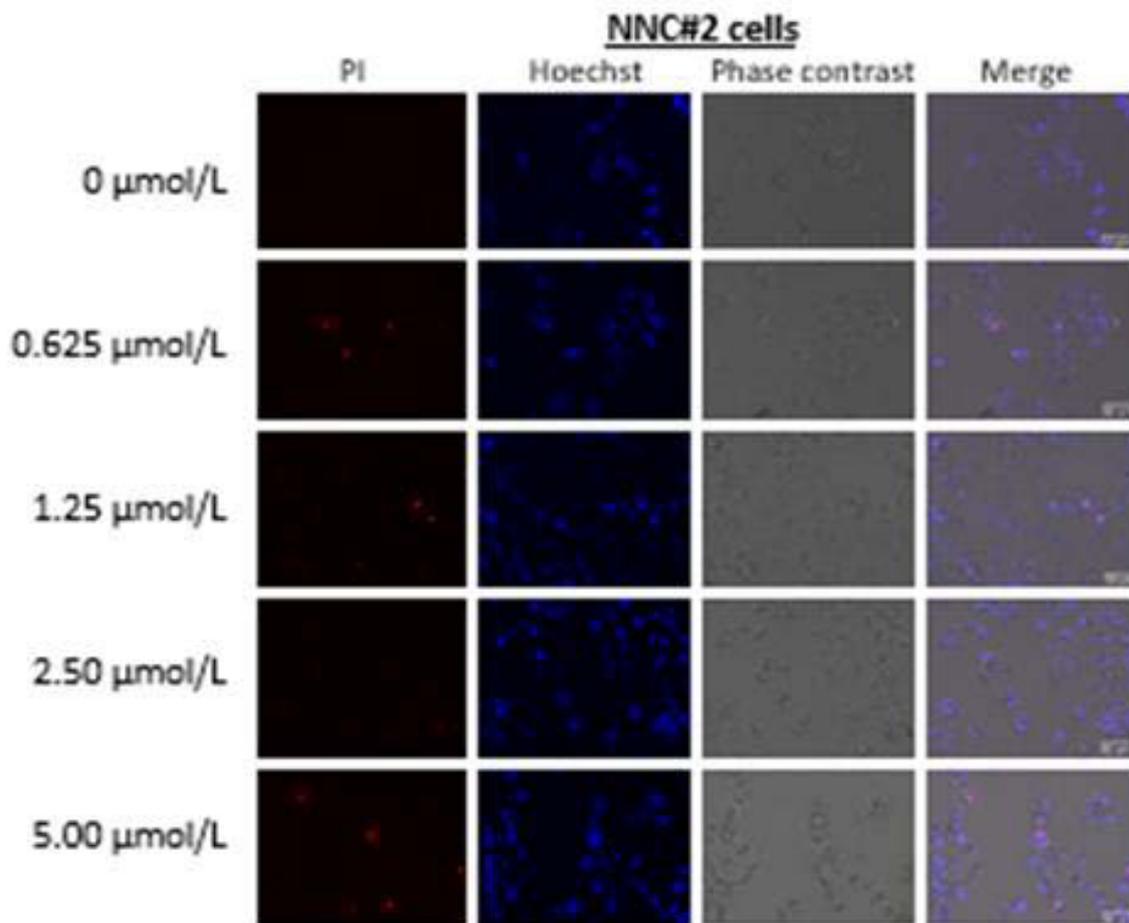


図 3-5 NNC#2 細胞の細胞膜透過性を利用した生細胞 と死細胞染色

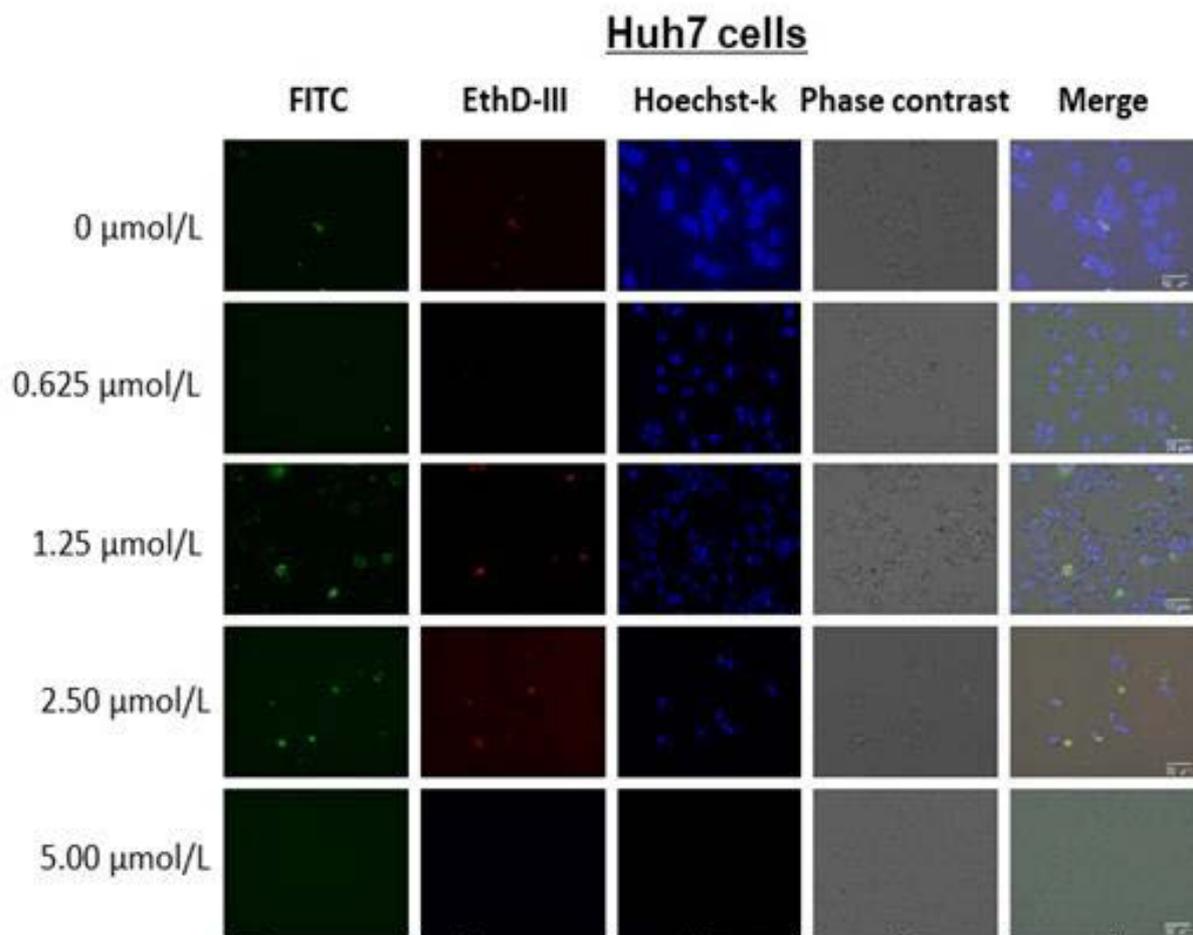


図 3-6 Huh7 細胞の細胞膜リン脂質変化を利用した細胞死の解析

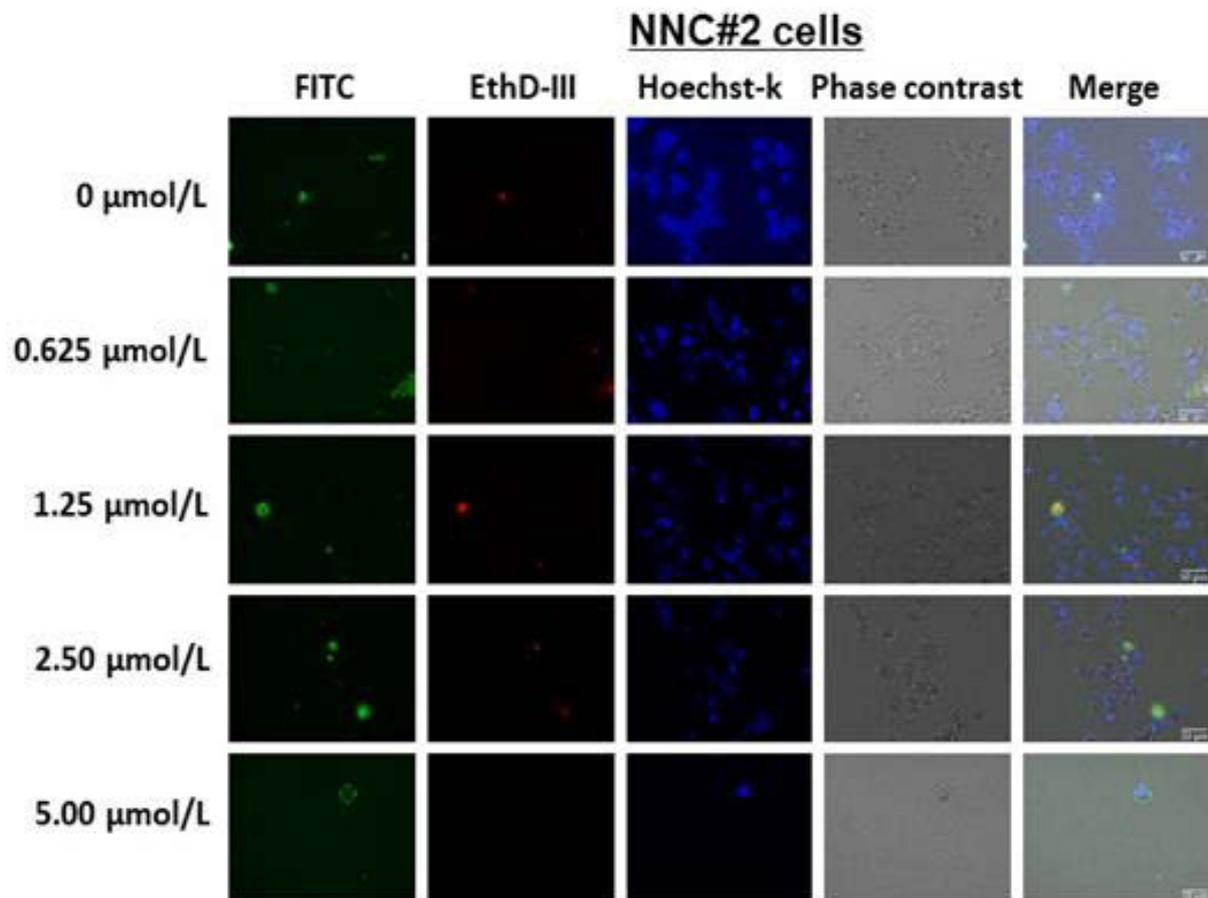
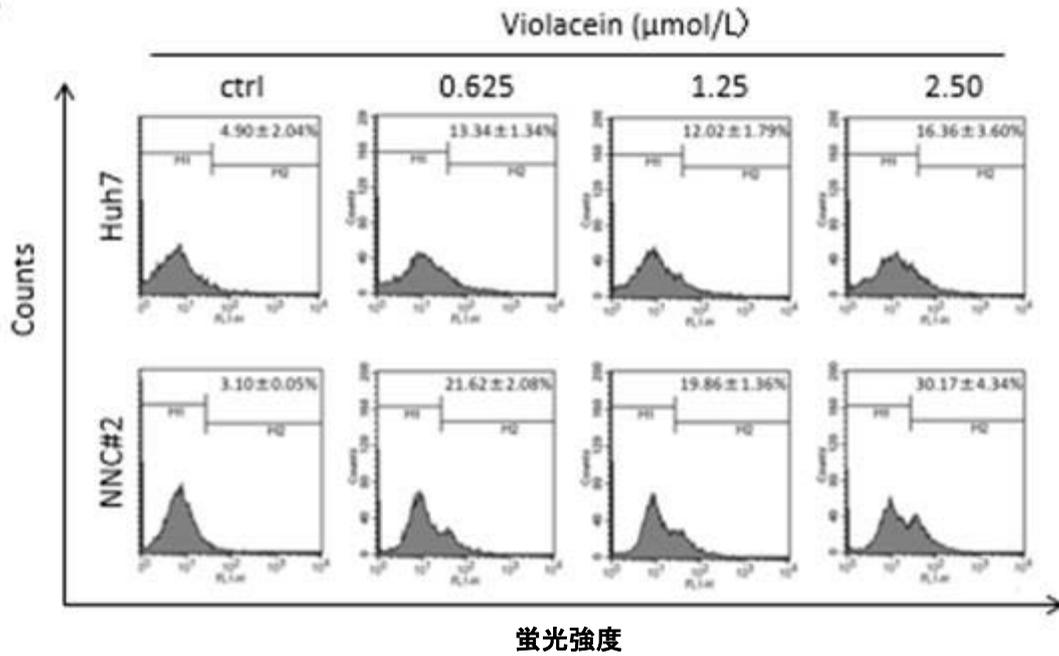


図 3-7 NNC#2 細胞の細胞膜リン脂質変化を利用した細胞死の解析

A



B

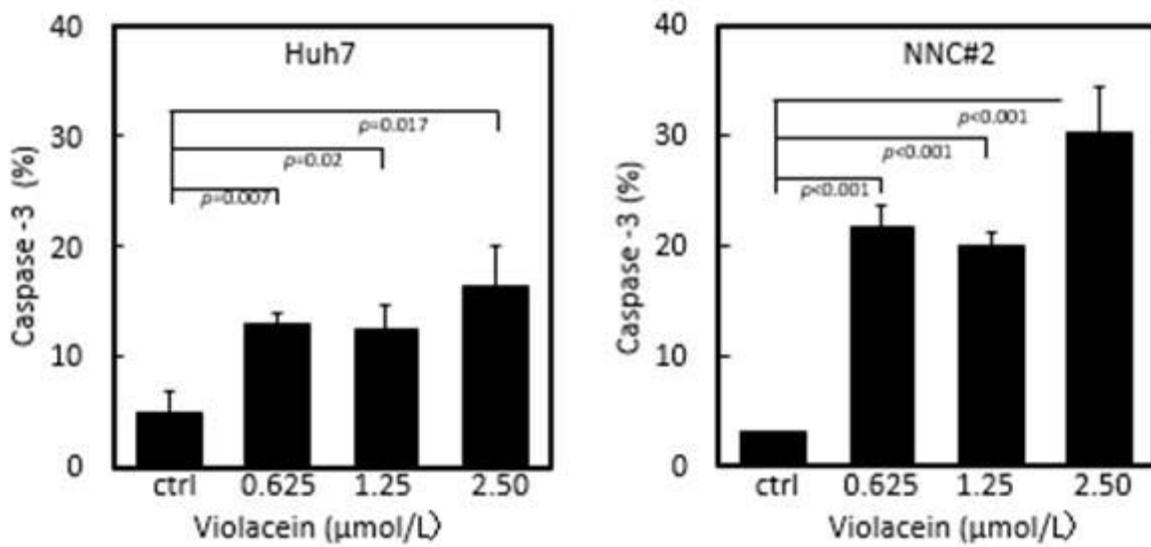


図 3-8 アポトーシス調節因子カスパーゼ 3 の解析

第4章 総括

第1節 本研究により得られた知見

HCV感染による慢性肝炎とその予後は決して良好とは言えず、20年、30年といつの間にか進行して肝癌を発症してしまう状況がある。海外に先行して充実した治療が行われている日本において、近年採用されている治療法は、インターフェロンフリー経口剤治療ではほぼ100%以上のウイルスを消失させることのできる治療となっている。しかしこの治療法は、直接作用型抗ウイルス薬のため、健常者に比べて発がんリスクが高いこと、治療不成功だった場合に高度耐性変異株の出現すること、血中のHCV抗原が陰性になった後でふたたび陽性となる事等が問題となっている。これらのことから、耐性株出現の問題や genotype の違いに起因する効果の減弱など、様々な問題を克服できることが期待される宿主因子を標的とする治療法は、非常に注目されている。そこで本研究では、HCV複製に関与する宿主因子を明らかにし、これらの知見を基に新たなHCV治療薬の研究開発を目的とした。

第2章では、PGA₁による抗HCV活性と作用機序の解明をおこない、PGA₁が宿主因子に影響を与えることでHCVの増殖を制御することを発見した。PGA₁のHCV-IRESを介した翻訳の阻害は、PGA₁/eIF3-40Sサブユニット/HCV-IRES RNA複合体の形成により起きる新しい阻害メカニズムであり、新規抗HCV薬となりうる可能性が示唆された。

第3章は、ビオラセインの抗HCV及び抗腫瘍活性と作用機序の解明について研究を行い、茨城県から発見した *C. violaceum* VP2株が産生するビオラセインは、Huh7細胞とNNC#2細胞に対して細胞死を誘導することを見出した。このことは、ビオラセインが生存シグナルに影響を与えることで、抗HCV活性と抗腫瘍活性を誘導することを示している。また今回の解析の副産物として、高濃度のビオラセインが、細胞死のタイプを調査するための有用な化合物になりうることを示唆された。これらの研究から、宿主因子に作用するPGA₁と生存シグナルに作用するビオラセインは副作用の少ない新たなHCVの治療薬の開発につながると期待できる。

参考文献

1. Qui-Lim Choo, George Kuo, Amy J. Weiner, Lacy R. Overby, Daniel W. Bradley, Michael Houghton. Isolation of a Cdna clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362, 1989.
2. Feinstone, S. M., Kapikian, A.Z., Purcell, R. H. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, 182, 1026-1028, 1973.
3. Baruch S. Blumberg, Harvey J. Alter. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*, 191, 541-546, 1965.
4. Volker Lohmann. Hepatitis C Virus RNA Replication. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. 369, 167–198, 2013.
5. V Lohmann, F Körner, J Koch, U Herian, L. Theilmann, R Bartenschlager. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285, 110–113, 1999.
6. Simmonds P, *et al*. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42, 962-973, 2005.
7. Donald B S, *et al*. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology*, 59; 318–327, 2014.
8. Q.L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362, 1989.
9. Herker E, Ott M. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends Endocrinol Metab*. 22, 241-248, 2011.

10. Eva Herker, Charles Harris, Céline Hernandez, Arnaud Carpentier, Katrin Kaehlcke, Arielle R Rosenberg, Robert V Farese Jr, Melanie Ott. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med.*, 16, 1295-1298, 2010.
11. P. Friebe, V. Lohmann, N. Krieger, R. Bartenschlager. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.*, 75, 12047-12057, 2001.
12. L. Jopling, M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, P. Sarnow. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309, 1577-1581, 2005.
13. T. Tanaka, N. Kato, M.-J. Cho, K. Shimotohno. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215, 744-749, 1995.
14. P. Friebe, R. Bartenschlager. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.*, 76, 5326-5338, 2002.
15. S. Harada, Y. Watanabe, K. Takeuchi, T. Suzuki, T. Katayama, Y. Takebe, I. Saito, T. Miyamura. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J. Virol.*, 65, 3015-3021, 1991.
16. A. Op De Beeck, L. Cocquerel, J. Dubuisson. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 82, 2589-2595, 2001.
17. L. Cocquerel, A. Op de Beeck, M. Lambot, J. Roussel, D. Delgrange, A. Pillez, C. Wychowski, F. Penin, J. Dubuisson. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.*, 21, 2893-2902, 2002.
18. A. Sakai, M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell, J. Bukh. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 11646-11651, 2003.

19. D. Pavlovic, D. C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R. A. Dwek, W. B. Fischer, N. Zitzmann.: The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6104-6108, 2003.
20. S. D. Griffin, L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris, D. J. Rowlands. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug. Amantadine, *FEBS Lett.* , 535, 34-38, 2003.
21. V. Lohmann, F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann R. Bartenschlager. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285, 110-113, 1999.
22. A. Kolykhalov, K. Mihalik, S. M. Feinstone, C. M. Rice. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.* , 74, 2046-2051, 2000.
23. C. Lorenz, J. Marcotrigiano, T. G. Dentzer, C. M. Rice. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, 442, 831-835, 2006.
24. R. De Francesco, G. Migliaccio.: Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, 436, 953-960, 2005.
25. B. Wolk, D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum, D. Moradpour. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J. Virol.* , 74, 2293-2304, 2000.
26. D. J. L. Kim, C. Lin. Structure and function of hepatitis C virus NS3 helicase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 242, 171-196, 2000.
27. V. Serebrov, A. M. Pyle. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature*, 430, 476-480, 2004.

28. D. N. Frick, R. S. Rypma, A. M. Lam, B. Gu. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J. Biol. Chem.*, 279, 1269-1280, 2004.
29. M. Lundin, M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne, M. A. Persson. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol.* , 77 , 5428-5438, 2003.
30. D. Egger, B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, K. Bienz. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.*, 76, 5974-5984, 2002.
31. L. Gao, H. Aizaki, J. W. He, M. M. Lai. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.*, 78, 3480-3488, 2004.
32. T. L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, A. E. Gorbalenya, C. M. Rice. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.*, 279, 48576-48587, 2004.
33. T. L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, C. M. Rice. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*, 435, 374-379, 2005.
34. K. J. Blight, A. A. Kolykhalov, C. M. Rice. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 290, 1972-1974, 2000.
35. T. Shimakami, M. Hijikata, H. Luo, Y. Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, S. Murakami. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.*, 78, 2738-2748, 2004.
36. J. Schmidt-Mende, E. Bieck, T. Hogle, F. Penin, C. M. Rice, H. E. Blum, D. Moradpour. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 276, 44052-44063, 2001.

37. H. Ago, T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami, M. Miyano. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure Fold Des.* 7, 1417-1426, 1999.
38. S. J. Butcher, J. M. Grimes, E. V. Makeyev, D. H. Bamford, D. I. Stuart. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 410, 235-240, 2001.
39. Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal.* , 5, 9–19, 2012.
40. Ali M. U., Ur Rahman M. S., Jia Z., Jiang C. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biology.* , 39, p. 1010428317709805. 2017.
41. Spilka R., Ernst C., Mehta A. K., Haybaeck J. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Letters.* , 340, 9–21. 2013.
42. Sonenberg N., Hinnebusch A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* , 136, 731–745, 2009.
43. Chu J., Cargnello M., Topisirovic I., Pelletier J. Translation initiation factors: reprogramming protein synthesis in cancer. *Trends in Cell Biology.* , 26, 918–933, 2016.
44. Jackson R. J., Hellen C. U., Pestova T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* , 11, 113–127, 2010.
45. Ali M. U., Ur Rahman M. S., Jia Z., Jiang C. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biology.* , 39, p. 1010428317709805, 2017.
46. de la Parra C., Walters B. A., Getter P., Schneider R. J. Translation initiation factors and their relevance in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development.*, 48, 82–88, 2018.

47. プロスタグランジン E 1 製剤添付文書(2009 年 6 月改訂) ;
<https://pins.japic.or.jp/pdf/newPINS/00056726.pdf>
48. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem.*, 286, 10051-10057, 2011.
49. Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A. and Tschachler, E. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular biology and evolution*, 25, 831-841, 2008.
50. Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. A decade of caspases. *Oncogene.* , 22, 8543-8567, 2003.
51. Martín, F. A., Pérez-Garijo, A., & Morata, G. Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cell. *The International journal of developmental biology*, 53, 1341-1347, 2009.
52. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. Old., new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*, 22, 526-539, 2015.
53. Zheng Li, Jihoon Jo, Jie-Min Jia, Shih-Ching Lo, Daniel J Whitcomb, Song Jiao, Kwangwook Cho, Morgan Sheng. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*, 141, 859-871, 2010.
54. Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 231-241, 2008.
55. Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Identification of genes that function in the TNF α -mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol.*, 20, 376-380, 2002.

56. Englaro W, Bahadoran P, Bertolotto C, Busca R, Derijard B, Livolsi A, Peyron JF, Ortonne JP, Ballotti R. Tumor necrosis factor α -mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor κ B activation. *発癌遺伝子*, 18, 1553-1559, 1999.
57. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.*, 11, 372-377, 2001.
58. Kai-Li He and Adrian T. Ting. A20 Inhibits Tumor Necrosis Factor (TNF) α -Induced Apoptosis by Disrupting Recruitment of TRADD and RIP to the TNF Receptor 1 Complex in Jurkat T Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 6034-6045, 2002.
59. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell*, 9, 423–432, 2002.
60. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME. *EMBO J.*, 17, 1675–1687, 1998.
61. WHO. Hepatitis C Fact sheet N°164. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/ 2015 (accessed 2 March 2016).
62. 辻 孝夫. ウイルス肝炎 —病態・治療の最新の考え方—. 南江堂. pp.40-229. 1993.
63. Krino Yoshiyasu. Treatment choice of the antiviral agent for the hepatitis C. *Hepatitis Viruses-New Aspects of Basic and Clinical Virology, Nihon Rinsho, Suppl 9*, 269-273, 2015.
64. Diez-Dacal, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Timms, J.F., Coderch, C., Gago, F., Perez-Sala, D., Identification of aldo-keto reductase AKR1B10 as a selective target for modification and inhibition by prostaglandin A (1): implications for antitumoral activity. *Cancer Res.*, 71, 4161–4171, 2011.
65. Diez-Dacal, B., Perez-Sala, D., A-class prostaglandins: early findings and new perspectives for overcoming tumor chemoresistance. *Cancer Lett.* , 320, 150–157, 2012.

66. Kim, W.J., Kim, J.H., Jang, S.K., Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J.*, 26, 5020–5032, 2007.
67. Liu Y Nielsen J: Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol.* , 60, 188-197, 2019.
68. Gua Y, Maa J, Zhub Y, Dingb X and Peng X. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for de novo synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals. *ACS Synth Biol*, 9, 2096-2106, 2020.
69. Ishii, N., Watashi, K., Hishiki, T., Goto, K., Inoue, D., Hijikata, M., Wakita, T., Kato, N., Shimotohno, K., Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.*, 80, 4510–4520. 2006.
70. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y., Shimotohno, K., Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 293, 993–999, 2002.
71. Ujino, S., Yamaguchi, S., Shimotohno, K., Takaku, H., Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. *J. Biol. Chem.*, 284, 6841–6846. 2009.
72. Aoyagi, K., Ohue, C., Iida, K., Kimura, T., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Yagi, S., Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J. Clin. Microbiol.* , 37, 1802–1808, 1999.
73. Pisarev, A.V., Shirokikh, N.E., Hellen, C.U., Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C. R. Biol.*, 328, 589–605, 2005.

74. Gayarre, J., Stamatakis, K., Renedo, M., Pérez-Sala, D., Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12, 14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett.*, 579, 5803-5808, 2005.
75. Kim, W.J., Kim, J.H., Jang, S.K., Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J.*, 262005, 5020–5032, 2007.
76. Pisarev, A.V., Shirokikh, N.E., Hellen, C.U., Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C. R. Biol.*, 3282005. 589–605. 2005.
77. Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Durán N, Peppelenbosch MP. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood.* , 104, 1459-64. 2004.
78. Platt D, Amara S, Mehta T, Vercuyssee K, Myles EL, Johnson T, Tiriveedhi V. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* , 455, 107-112. 2014.
79. Alshatwi A A, Subash-Babu P, Antonisamy P. Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. *Exp Toxicol Pathol.* , 68, 89-97. 2016.
80. Rettori D and Durán N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J Microb Biotechnol.*, 14, 685-688, 1998.
81. Vollenweider I and Groscurth P. Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *J Immunol Methods*, 149, 133-135. 1992.
82. Robertson JL, Jones MM, Olguin E and Alberts B: *Bioassays with Arthropods*, 3rd ed. 21-33, CRC Press, USA (2017)

83. Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, Thompson P, Major ME and Cohen JI: The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology*, 329, 53-67, 2004.
84. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I and Hotta H: Hepatitis C Virus Infection Induces Apoptosis through a Bax-Triggered, Mitochondrion-Mediated, Caspase 3-Dependent Pathway. *J Virol.* , 82, 10375-1085, 2008.
85. Berg CP, Schlosser SF, Neukirchen DKH, Papadakis C, Gregor M, Wesselborg S. and Stein GM: Hepatitis C virus core protein induces apoptosis-like caspase independent cell death. *Virol J.*, 6, 1-13, 2009.
86. Tsukatani T, Higuchi T, Suenaga H, Akao T, Ishiyama M, Ezoe T and Matsumoto K: Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Anal Biochem.* , 393, 117-125, 2009.
87. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke ES, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, et al.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 16, 3-11, 2009.
88. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 19, 107-120, 2012.
89. Tait SWG, Ichim G and Green DR: Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci.*, 127, 2135-2144, 2014.

研究業績

発表論文

- 1) **Atsuko Tsukimoto**, Ryuichi Sugiyama, Makoto Abe, Hironori Nishitsuji, Yuko Shimizu, Kunitada Shimotohno, Gota Kawai and Hiroshi Takaku. A new role for PGA₁ in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors. *Antiviral Reseach*. 117:1-9, 2015.

本論文第 2 章全体に相当

- 2) **Atsuko Tsukimoto**, Rumiko Saito, Kahoko Hashimoto, Yasuyuki Takiguchi, and Naoko Miyano-Kurosaki. Violacein induces various types of cell death in highly differentiated human hepatocellular carcinoma and hepatitis C virus replicon cell lines. *Int J Anal Bio-Sci*. 9, 2021.

本論文第 3 章全体に相当

学会発表

国際会議発表 (2 件)

1. **Atsuko Tsukimoto**, Ryuichi Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Kunitada Shimotohno, Yasuyuki Takiguchi, Naoko Miyano-Kurosaki, Hiroshi Takaku.
PGA1 in inhibiting HCV-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors.
HEP DART 2015, Hawaii USA Wailea, December 2015. [POSTER]

2. Atsuko Tsukimoto, Ryuichi Sugiyama, Hisanao Ogra, Kunitada Shimotohno, Hiroshi Takaku, Yasuyuki Takiguchi, Naoko Miyano-Kurosaki.

Hsp70 inhibitor, KNK437 inhibits HCV IRRES-mediated translation.

23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, October 2016.

[POSTER]

国内学会発表 (6 件)

1. 月本あつ子, 杉山隆一, 小倉久直, 下遠野邦忠, 滝口泰之, 黒崎直子, 高久 洋

Hsp70 阻害剤, KNK437 による C 型肝炎ウイルス複製制御の解析とその抗ウイルス活性評価

第 25 回抗ウイルス療法学会総会, 東京 2015 年 5 月 [口頭]

2. Atsuko Tsukimoto, Ryuichi Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Yuko Shimizu, Kunitada Shimotohno, Naoko Miyano-Kurosaki, Yasuyuki Takiguchi, Hiroshi Takaku.

A new role for PGA₁ in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors.

第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 2015 年 11 月 [ポスター]

3. Atsuko Tsukimoto, Ryuichi Sugiyama, Hisanao Ogra, Kunitada Shimotohno, Hiroshi Takaku, Yasuyuki Takiguchi, Naoko Miyano-Kurosaki.

A new role for the Hsp70 inhibitor, KNK437 in inhibiting HCV replication by targeting viral translation factor.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 北海道 2016 年 10 月 [ポスター]

4. 月本あつ子, 杉山隆一, 小倉大直, 滝口泰之, 下遠野邦忠, 黒崎直子, 高久 洋

HCV-IRES を介した翻訳機構における Hsp70 の機能解析.

第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会, 熊本 2017 年 5 月 [口頭]

5. Atsuko Tsukimoto, Ryuichi Sugiyama, Hisanao Ogra, Kunitada Shimotohno, Hiroshi Takaku,
Yasuyuki Takiguchi, Naoko Miyano-Kurosaki.

Hsp70 inhibitor, KNK437 inhibits HCV IRRES-mediated translation via the degradation of eIF3c.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2017 年 10 月 [ポスター]

6. 松井常勝, 月本あつ子, 橋本香保子, 滝口泰之, 黒崎直子.

ビオラセインの大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果

Antitumor effect of violacein in colorectal cancer cells, International Student Symposium 2021, 2021
年 8 月 [オンライン 口頭]

謝辞

本研究を行うにあたり、温かくご指導くださいました、本学教授の滝口泰之博士に心より深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、様々なご指導、ご助言をくださいました本学教授の黒崎直子博士、本学准教授の橋本佳保子博士には心より感謝いたします。

この研究において、本学修士から今日に至るまで様々なご指導、サポートをくださいました本学の高久洋名誉教授には大変お世話になりました。心より感謝いたします。

博士学位審査の折に、副査をしていただきました本学教授の坂本泰一博士、黒崎直子博士、寺本直純博士、本学准教授の橋本佳保子博士に深く感謝いたします。

また、貴重なサポート、助言やご指導をしてくださいました、国立研究開発法人国立国際医療研究センターの特任部長、下遠野 邦忠博士に深く感謝いたします。

本研究を共に進め、様々な実験の技術についてご指導くださいました、国立感染症研究所 ウイルス第二部の杉山隆一博士、また博士課程の学生生活を共にした齋藤るみ子さん、山崎大樹さん、枝勝太郎さん、佐藤勇佐さん、星雅典さん、君塚圭亮さん、小倉久直さん、多くの仲間たちに深く感謝いたします。

最後に、千葉工業大学に入学してからの約8年間、経済面や健康を気遣ってくれ、温かい目で見守ってくれた家族、博士の学位取得までに出会った全ての方々に心より深く感謝いたします。