

In vitro での実験で、蛋白質-蛋白質結合が確認されても、artifact であることは十分考え得る。図 4 で示したとおり、核移行シグナル (NLS) の欠損による PA28 γ の細胞内局在の変化にコア蛋白質の細胞内局在は完全に対応している。この変化は HeLa 細胞および 293T 細胞で確認された。これらの結果は PA28 γ とコア蛋白質の結合は培養細胞内でも確認されたことを意味する。

以上の結果から、PA28 γ は HCV コア蛋白質と培養細胞内で結合することが明らかになった。これまでの試験はすべて培養細胞あるいは酵母細胞を用いて行われている。さらに、実際の患者の組織内あるいは HCV コア蛋白質を発現しているマウスの肝臓組織でこの蛋白質間結合を確認する必要がある。また、コア蛋白質内の PA28 γ 結合領域はアミノ酸 38-57 に一部あるいはすべてが含まれることが示された。その結果をさらに掘り下げて、より正確な結合領域を決定する必要がある。さらに、PA28 γ はプロテアソームのペプチダーゼ活性を上昇させるが、コア蛋白質がその活性をどのように変化させるかについても調べる必要がある。一方、コア蛋白質にはアポトーシスを調節する活性があり、細胞の癌化に関連することから、PA28 γ によるその活性の変化も解析しなければならない。以上の問題については今後検討して行きたい。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, Matsuura Y. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 2001 Jan

5;279(1):343-53.

2. Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 2001 Feb 15;280(2):301-9
3. Okuma K, Matsuura Y, Tatsuo H, Inagaki Y, Nakamura M, Yamamoto N, Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukaemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 2001 Apr;82(Pt 4):821-30
4. Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 2001 Jun;33(6):1533-43
5. Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 2001 Aug 1;286(2):263-75
6. Takikawa S, Matsuura Y, Miyamura T. The present studies of the development of HCV vaccine. *Nippon Rinsho* 2001 Jul;59(7):1379-83
7. Moriishi K, Koura M, Matsuura Y. Induction of Bad-Mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology* 2002 Jan 20;292(2):258-71
8. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 2002 Apr;35(4):937-946

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルストランスジェニックマウスにおけるサイトカイン発現と
シグナル伝達制御機構の解析

分担研究者 小池和彦 東京大学医学部 助教授
協力研究者 堤 武也 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨

昨年度、HCV コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスの肝臓において、細胞増殖等に深く関わっている TNF- α , IL-1 β の発現が増加していることを見だし、さらにこれらのサイトカインの下流に位置する転写因子 AP-1 が高い活性化を示すことを報告した。そこでこの細胞内シグナル伝達系に関与する因子の活性化について解析したところ、JNK-AP-1 pathway の活性上昇が認められた。一方で p38 MAPK, ERK, IKK などの kinase 活性、及びその下流の転写因子 (ATF-2, Elk-1, NF- κ B) の活性には変化が認められなかった。また、このトランスジェニックマウスにエタノール含有食事を与えると、ノントランスジェニックマウスと比べて、肝臓内における p38 MAPK, ERK の活性の著明な増加が認められた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、HCV の構造蛋白であるコア蛋白、およびエンベロープ蛋白を恒常的に発現するトランスジェニックマウスが、それぞれ慢性 C 型肝炎の肝臓にしばしば認められる steatosis と肝細胞癌、および肝外合併症として認められるシェーグレン症候群を引き起こすことを報告した。そして HCV による発癌機構を解明するために、コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスの肝臓における遺伝子発現の変化を解析したところ、細胞増殖等に深く関わっている TNF- α , IL-1 β の発現が増加していることを見いだした。さらにこれらのサイトカインの下流に位置する転写因子である AP-1 がトランスジェニック

マウスにおいてより活性化されていた。そこで、これらのサイトカインにより活性化されることが知られている、細胞内シグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinases; MAPK (c-Jun N-terminal kinase; JNK, p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase; ERK) の活性及び I κ B kinase (IKK) の活性を、トランスジェニックマウスの肝臓内について検討した。さらにこれらの MAPK, IKK が活性化する転写因子の活性についても検討を行った。

B. 研究方法

(HCV コアトランスジェニックマウスについては昨年の報告書に記したので省略し

た。) MAPK 活性の検討については、3 カ月齢のトランスジェニックマウス及びノントランスジェニックマウスの肝臓を lysis buffer 内で homogenize し、その上清を assay に用いた。またほぼ同月齢で、5%エタノールを含有した食事を 3 週間投与したマウスからも同様にサンプルを準備した。MAPK assay は、市販のキット (JNK Assay Kit, p38 MAPK Assay Kit, p44/42 MAPK Assay Kit; 全て Cell Signaling 社) を用いて行った。IKK の活性については、大腸菌から発現精製した GST-I κ B- α を基質として、肝臓のライセートから anti-IKK 抗体により免疫沈降法で回収した IKK により in vitro kinase assay を行った。転写因子の活性の検討については、マウス肝臓より核蛋白を抽出し、³²P でラベルした各転写因子の認識配列を含んだオリゴ DNA を用いて、gel shift assay により行った。

C. 研究結果

TNF- α , IL-1 β は細胞表面上のそれぞれの受容体に結合することで、JNK, p38 MAPK, ERK, 及び IKK を活性化する (図 1)。トランスジェニックマウス肝臓内におけるこれらの kinase の活性を調べたところ、JNK 活性の増加 (約 2 倍、図 2A) が認められた。しかし、p38 MAPK, ERK, IKK の活性についてはノントランスジェニックマウスと同程度であった (図 2B, C, 図 3)。興味深いことに、エタノール含有食事を与えたトランスジェニックマウスにおいては、p38 MAPK と ERK 活性の著明な増加が認められた (図 4B, C)。一方で、普通食事では活性に違いが認められた JNK については、ほとんど差が認められ

なかった (図 4A)。MAPK は自らがリン酸化されることで活性化されることが知られている。そこでリン酸化された ERK (p-ERK) を特異的に認識する抗体 anti-phospho ERK、及びリン酸化及び非リン酸化 ERK を非特異的に認識する抗体 anti-ERK を用いて、ウェスタンブロッティング法により発現量を調べたところ、エタノール投与マウスの肝臓内において p-ERK の増加が認められた (図 5)。

D. 考察

HCV のコア蛋白を発現するトランスジェニックマウスにおいて、TNF- α , IL-1 β の肝臓内での発現が増加しているという結果をもとに、これらのサイトカインが活性化する主要なシグナル伝達経路である MAPK 活性の変化、さらにその下流に位置する転写因子の活性の変化を検討したところ、以下のような結果が得られた。

1. HCV コアトランスジェニックマウスの肝臓内で、TNF- α , IL-1 β から AP-1 への経路に位置する JNK の活性が増加していた。一方で p38 MAPK, ERK, IKK、及びその下流の転写因子 (ATF-2, Elk-1, NF- κ B) の活性には変化が認められなかった。
2. HCV コアトランスジェニックマウスにエタノール含有食事を与えると、p38 MAPK, ERK の活性が、同じ食事を与えたノントランスジェニックマウスに比べて著明に増加していた。

これらの結果より、コア蛋白の発現がトランスジェニックマウスの肝臓内において TNF- α , IL-1 β などのサイトカインの発現を増加させ、細胞内シグナル伝達経路に変化を与

え、下流の転写因子の活性を調節することで様々な遺伝子の発現に影響を与えていることが示唆される。実際に AP-1 で発現調節されることが知られている c-jun や collagenase 遺伝子が、トランスジェニックマウスの肝臓内で増加しているというデータも得られている。JNK-AP-1 pathway は、細胞増殖やアポトーシス等にも深く関与しており、トランスジェニックマウスの肝臓内でのこの経路の変化が肝臓の steatosis や肝細胞癌の発生に深く関わっている可能性が考えられる。

アルコール摂取が HCV 肝炎に対して相乗的な作用を与えることが臨床的に報告されているが、今回のこのマウスモデルを用いた研究から、HCV コア蛋白がアルコール摂取下で p38 MAPK と ERK 活性を増加させることがわかった。p38 MAPK と ERK は reactive oxygen species (ROS) の産生と深く関与していることが知られており、実際にエタノール摂取させたトランスジェニックマウスの肝臓内において ROS の量が増加しているという所見も得られている。HCV 患者の肝臓においても、アルコール摂取によりこれらの MAPK が変化し、ROS を発生させ、肝炎の悪化、肝発癌への進展に関与している可能性が考えられる。

E. 結論

1. HCV コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスの肝臓内において TNF- α , IL-1 β のサイトカインが増加し、その下流の JNK-AP-1 pathway の活性の増加が認められた。一方で p38 MAPK, ERK, IKK などの kinase 活性、及びその下流の転写因子 (ATF-2, E1k-1, NF- κ B) の活

性には変化が認められなかった。

2. このコアトランスジェニックマウスにエタノール含有食事を与えると、ノントランスジェニックマウスと比べて、肝臓内における p38 MAPK, ERK の活性の著明な増加が認められた。
3. これらの MAPK 及び転写因子の活性の変化により遺伝子発現が調節され、肝発癌への進展に関与していることが考えられる。今後は、主として癌関連遺伝子に着目して、トランスジェニックマウスの肝臓内における遺伝子発現の変化を検討していきたいと考える。またエタノール長期投与と肝発癌との関係についても調べていきたいと考えている。

F. 研究発表

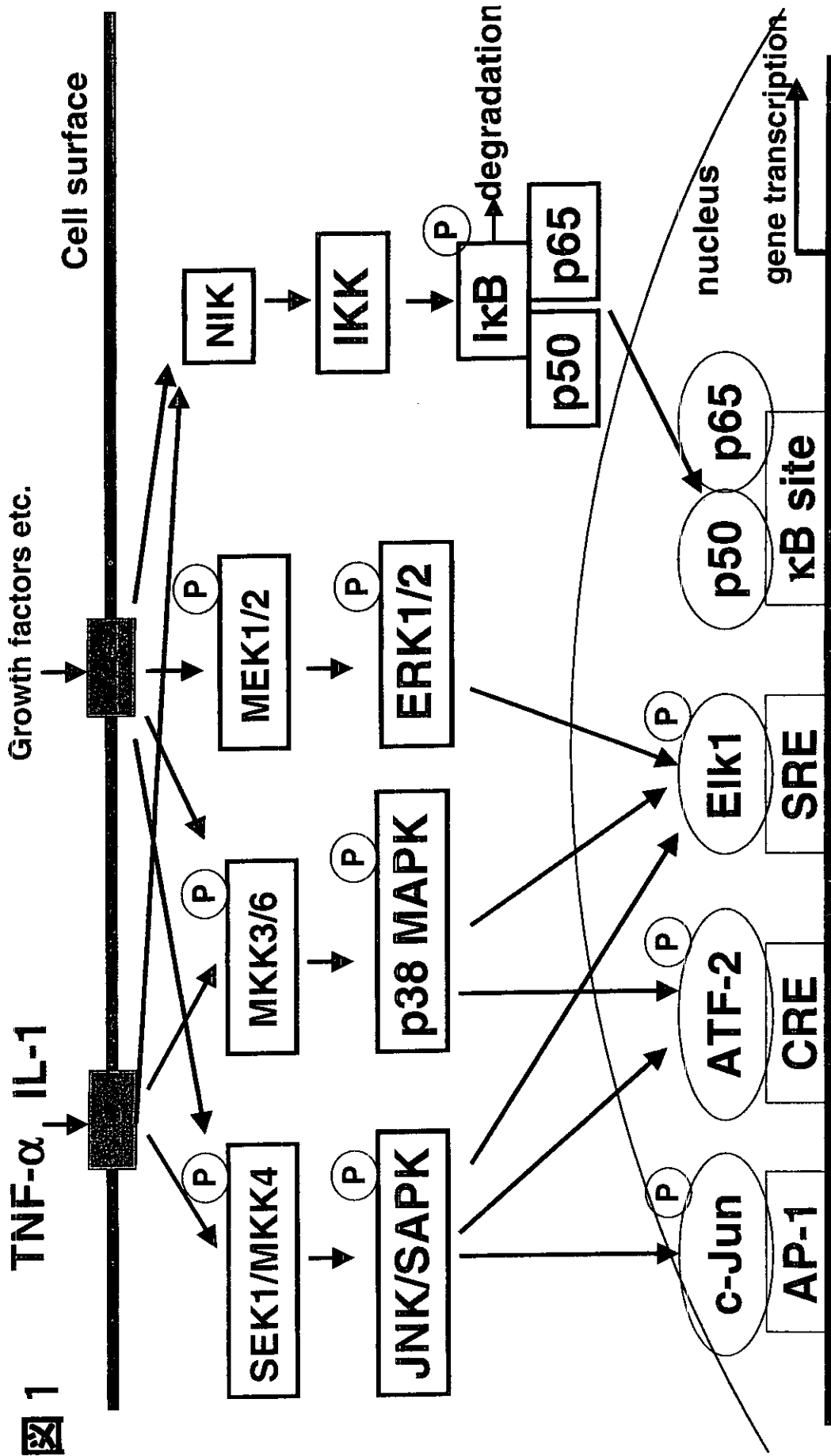
1. 論文発表

4. Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K,
5. Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281(5):1207-1212.
6. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology Res* 2001, 20: 39-51.
7. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H,

- Tsutsumi T,
8. Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Miyamura T, Kimura S, Koike K.
 9. Oxidative stress in the absence of inflammation in the liver of a mouse model for hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001, 61: 4365-4370.
 10. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Iino S, Koike K. Frequent presence of hepatitis B virus in the sera from HBs antigen-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001, 9:1093-1099.
 11. Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N, Koike K, Kimura S, Yasuda K, Iino S, Green J. IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunology* 2001, 126:92-100.
 12. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* 2002, 16:185-194..
 13. Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002, 62: 29-37
 14. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 2002, 35: 937-946.
 15. Koike K. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 2002, in press.
 16. Koike K, Moriya K, Kimura S. The role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to multistep carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002, in press.
2. 学会発表
1. 堤武也、鈴木哲朗、下池貴志、鈴木亮介、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、松浦善治、木村哲、小池和彦、宮村達男: C型肝炎ウイルスコア蛋白は retinoid X receptor- α と結合し、その転写活性を調節する、第37回日本肝臓学会総会、横浜、5月、2001年
 2. 堤武也、鈴木哲朗、下池貴志、鈴木亮介、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、松浦善治、木村哲、小池和彦、宮村達男: C型肝炎ウイルスコア蛋白は retinoid X receptor- α と結合し、その転写活性を調節する、第60回日本癌学会総会、横浜、9月、2001年
 3. 森屋恭爾、仲川清隆、三田智文、新谷良澄、藤江肇、堤武也、宮沢陽夫、等々力徹、堀江利治、今井洋、石橋光太郎、木

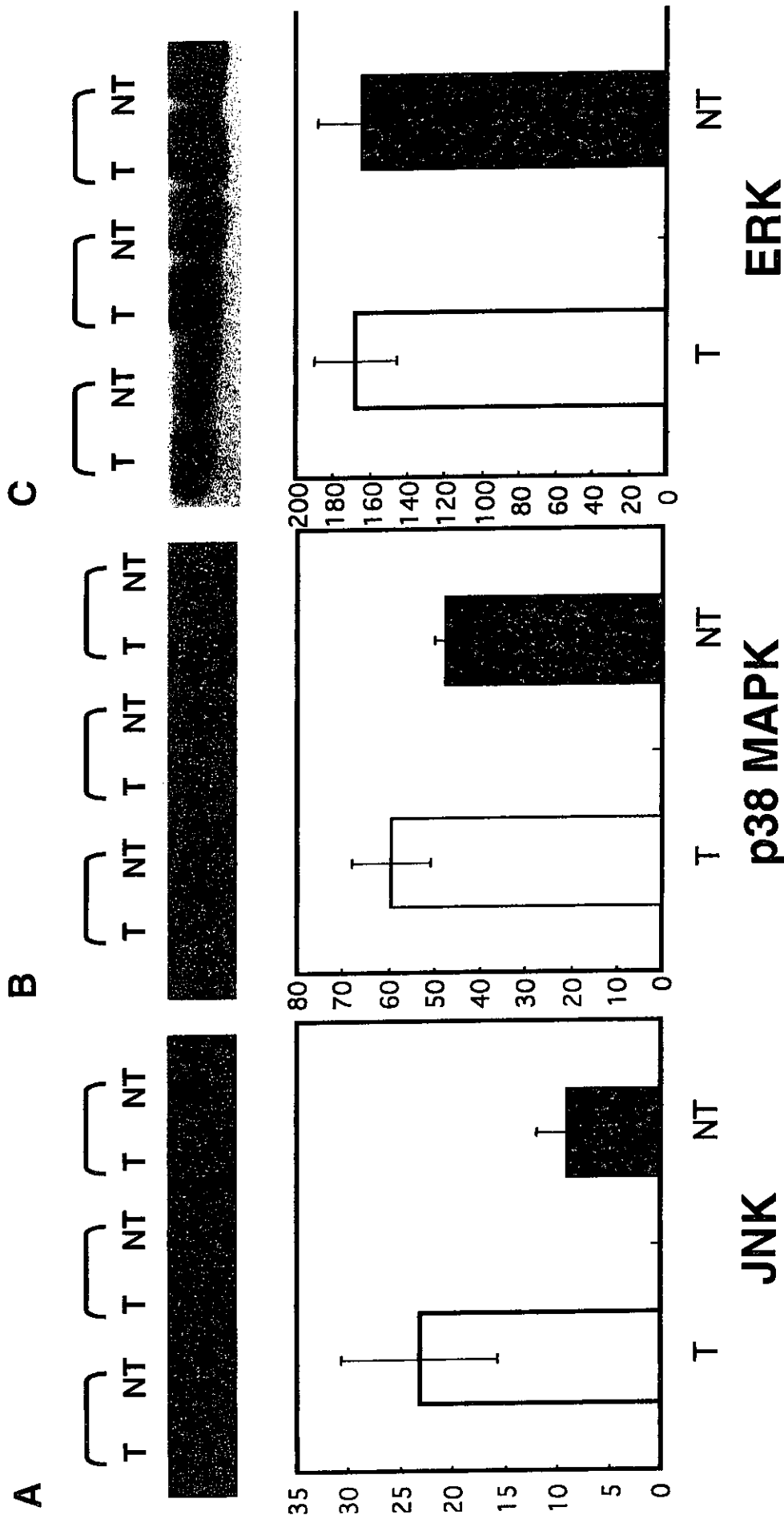
村哲、小池和彦: C型肝炎関連肝発癌モデルマウス肝における炎症不在でのROS発生、第60回日本癌学会総会、横浜、9月、2001年

4. 新谷良澄、森屋恭爾、藤江肇、堤武也、三好秀征、石橋光太郎、木村哲、小池和彦: C型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性の誘発、第60回日本癌学会総会、横浜、9月、2001年
5. Takeya Tsutsumi, Tetsuro Suzuki, Kyoji Moriya, Ken Tomobe, Yoshizumi Shintani, Hajime Fujie, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura: Activation of mitogen-activated protein kinases in the liver of hepatitis C virus core gene transgenic mice. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Paris. September. 2001
6. Kyoji Moriya, Yoshizumi Shintani, Hajime Fujie, Takeya Tsutsumi, Hideyuki Miyoshi, Kotaro Ishibashi, Satoshi Kimura, Kazuhiko Koike: Insulin resistance and diabetes in hepatitis C viral infection: direct evidence by transgenic mice. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Paris. September. 2001
7. 堤武也、鈴木哲朗、友部賢、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、松浦善治、小池和彦、宮村達男: C型肝炎ウイルスコアトランスジェニックマウスの肝臓内におけるMAPKの活性化の検討、第49回日本ウイルス学会学術集会・総会、大阪、11月、2001年



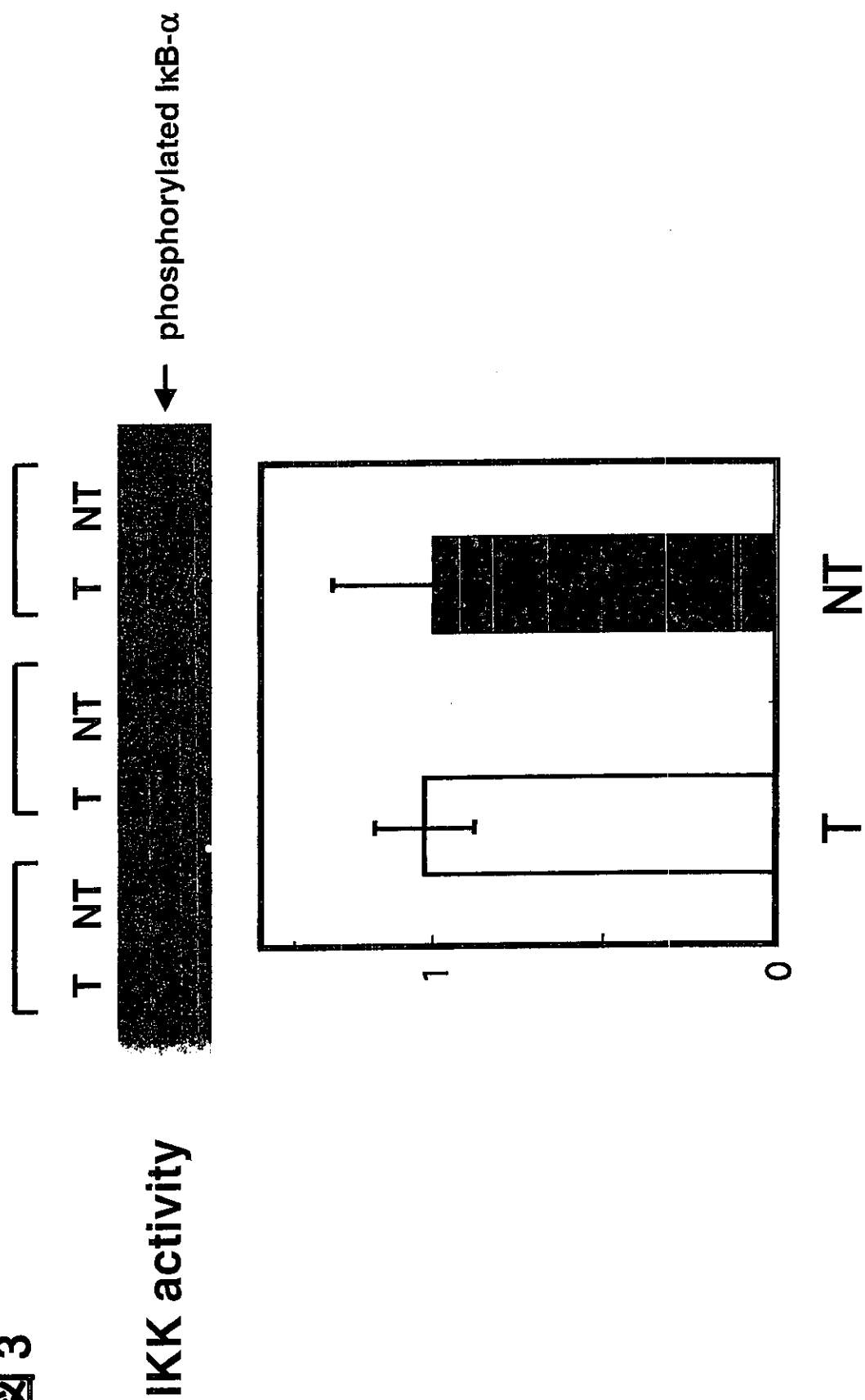
TNF- α , IL-1は、細胞表面の受容体に結合し、細胞内シグナル伝達経路であるMAPKsを活性化する。活性化されたMAPKsは核内転写因子を活性化し、遺伝子発現を調節する。

図2



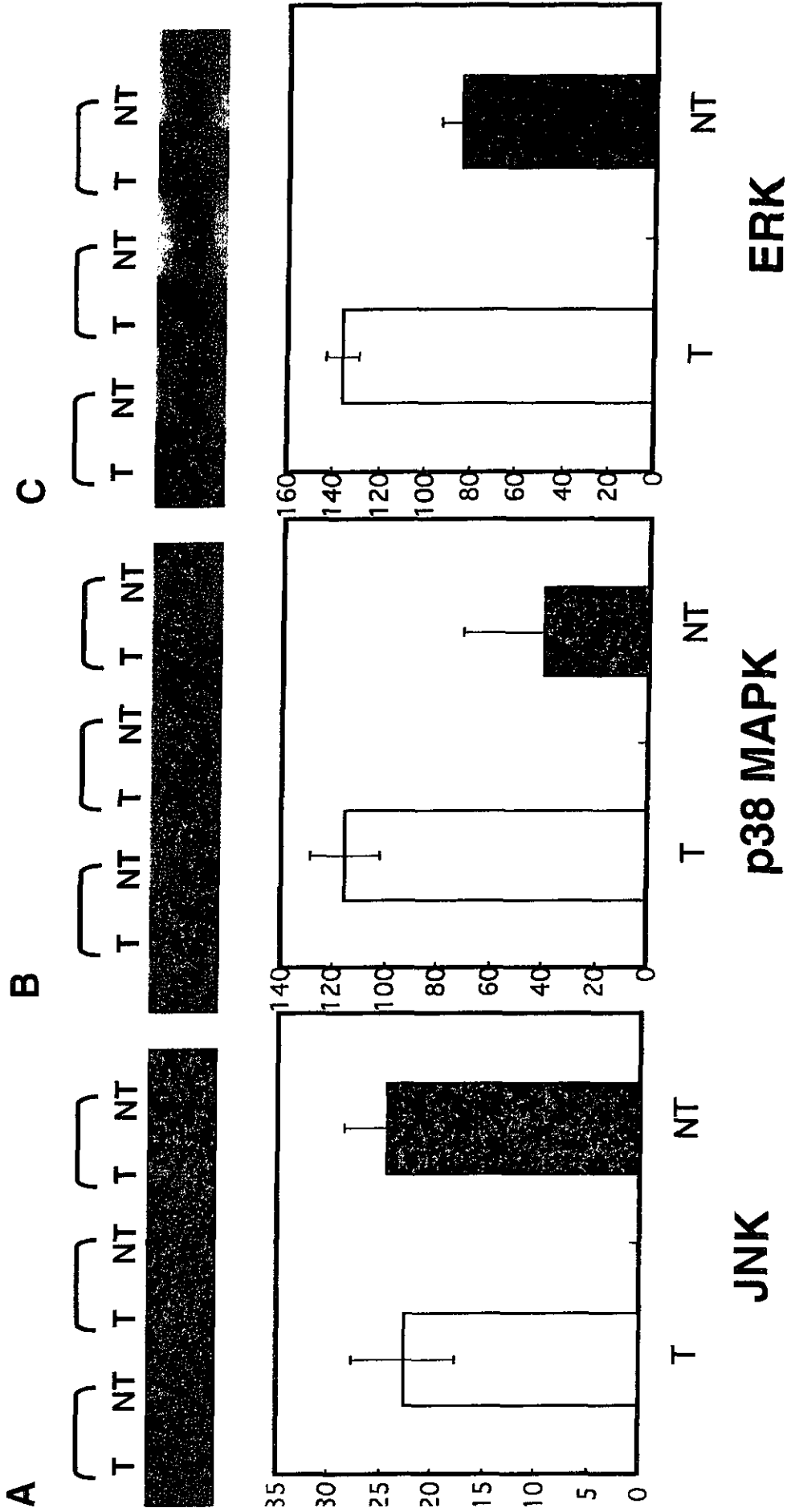
トランスジェニックマウスの肝臓内においてJNKの活性の増加が認められた。Densitometryによる測定（下段グラフ）では、約二倍程度に増加していた。一方、p38 MAPK, ERKの活性には変化が認められなかった。

図 3



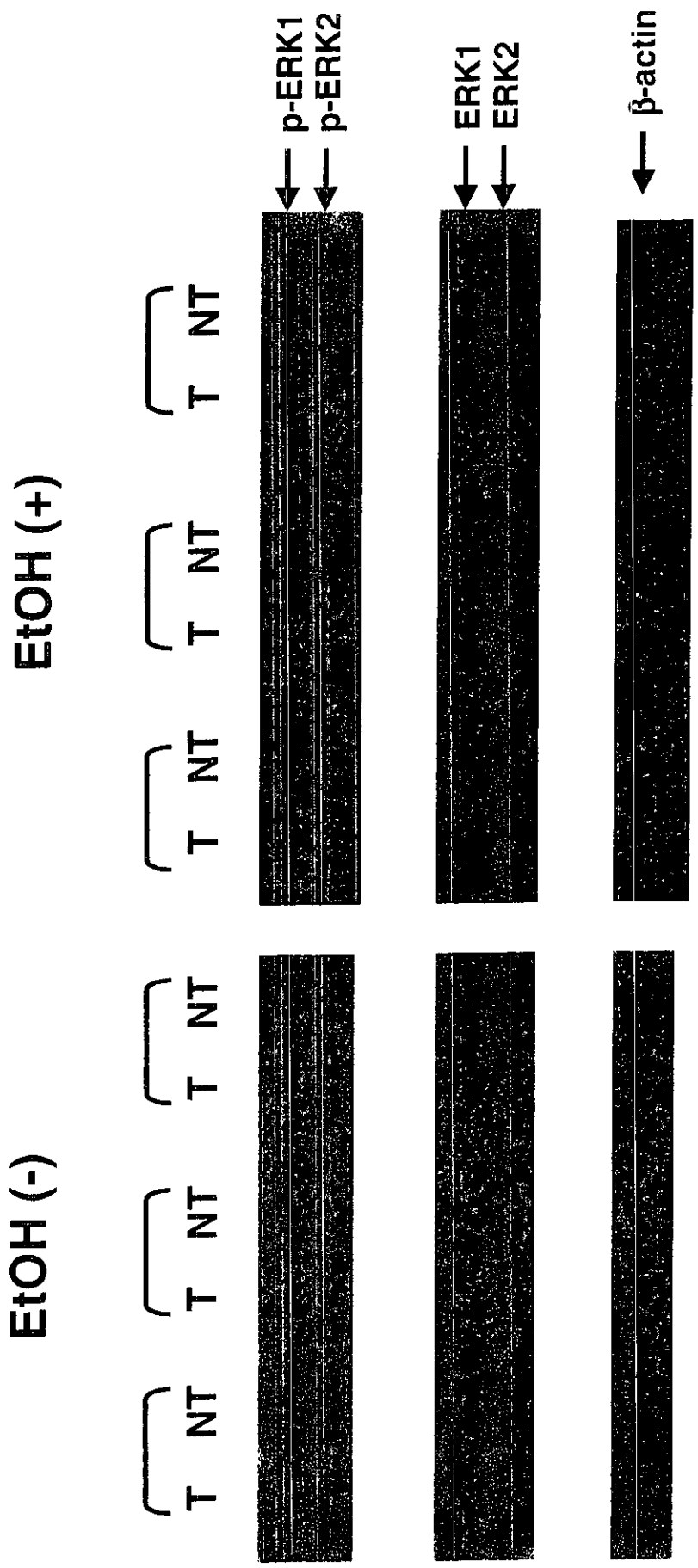
トランスジェニックマウスの肝臓内においてIKKの活性には変化が認められなかった。

図 4



エタノール含有食事を与えたトランスジェニックマウスにおいては、p38 MAPK, ERKの活性が、同様の食事を与えたノントランスジェニックマウスと比較して著明に増加していた。一方、JNKには差が認められなかった。

図 5



エタノール含有食事を与えたトランスジェニックマウスの肝臓において、phosphorylated ERK (p-ERK) の増加が認められた。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

ウイルス性慢性肝疾患の発症に關与する宿主遺伝子の解析

分担研究者 亀岡洋祐 国立感染症研究所 遺伝子資源室主任研究官

本年度は、C型肝炎の発症進行に關与する遺伝子変異のターゲット領域を TNF α および IL1 β のプロモーター領域に限定して解析を行い、IL1 β についてはプロモーター領域の変異がC型肝炎発症に關与する可能性が示された。TNF α プロモーター領域についても変異の頻度は低いが、慢性肝炎から肝細胞がん移行の相対危険度は増加する傾向が觀察され、さらに解析規模を増して、無症候性キャリアーを含めて解析を進めることが重要となった。とりわけ IL1 β プロモーター領域の変異に關する知見はC型肝炎の発症進行機序を解析する上で有用であると考えられる。

A.研究目的

慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの慢性肝疾患は B 型および C 型肝炎ウイルス（HBV, HCV）に起因している。ウイルス性慢性肝炎に対する治療方法はインターフェロン療法であり、この治療に対する個々人の応答の違いが、治療効果に大きく影響するところとなる。本分担研究においてはインターフェロン誘発性の抗ウイルス作用を担うと考えられる宿主要因とその発現を制御する因子における個体差がどのような遺伝子的（genomic）背景を持つかを解析することにより、肝炎ウイルスにより惹起される肝疾患に対する新しい治療法開発に寄与しようとするものである。

B.研究方法

今年度は研究計画 2 年度目ではあるが、収集された患者サンプル数は 63 検体と少ないため、マイクロサテライトを用いた解析はサンプル収集がさらに進んでからおこなうこととし、慢性肝疾患との関連が疑われている炎症性サイトカインの一種である

TNF、及び IL-1 β に着目し、それらのプロモーター領域にある SNP と患者病態との関連を解析した。

TNF α は前炎症性サイトカインで、微生物感染における病原性に関連していることが予想されており、とりわけ HCV 感染における肝炎の慢性化への関与が疑われている。TNF α はそのコード領域上流の遺伝子発現調節領域 1 kb ほどの間に 11 の変異（SNP）が見つかっている（表 1）。コーカソイドにおいては転写開始点上流 - 238 の変異が肝炎の慢性化へ関与していることが疑われており、- 308 の変異とともに、収集できた日本人肝炎患者 63 検体における遺伝子型の偏りをダイレクトシーケンスにより解析した。

IL1 β についても TNF α 同様に炎症制御に關与し、ウイルスのクリアランスに重要な役割を演じていることが考えられる。IL1 β の転写制御領域には転写開始点上流 - 31 と - 511 に SNP が存在しており、これらの遺伝子型が胃の萎縮症から胃がんへの進行に關与しているとの報告もなされている。

わけても-31のT/C変異はTATAボックスに位置し、その転写制御に直接影響を及ぼしている。胃がんと連鎖解析例においては、この位置がT型の場合(TATAが形成される)胃がんへ進行する相対危険度が有意に上昇している。このIL1 β 転写制御領域の変異についても収集できた患者検体についてダイレクトシーケンスにより解析を行った。

(倫理面への配慮)

サンプル収集にあたっては感染研、及び各大学の倫理委員会の承認のもとにインフォームドコンセントを受けたボランティア及び患者から得た試料を材料として使用した。各機関の倫理委員会の承認に関しては主任研究者の報告に詳述されているので、そちらを参照されたい。

C.研究結果

TNF α プロモーター領域

図1にTNF α プロモーター領域のSNPsおよび転写制御に関与すると考えられるモチーフの位置および今回PCRに使用したプライマー配列の概略を示す。HCV感染から慢性肝炎への移行に関与がうかがわれる-308と-238のSNPについて増幅PCR産物のダイレクトシーケンスによる解析結果を表1にまとめた。-307における各遺伝子型の頻度はG型97.6%、A型2.4%、-237における各遺伝子型の頻度はG型97.6%、A型2.4%、-で共にG型がメジャーであった。この2ヶ所におけるA型変異は連鎖しておらず、-308と-238のヘテロ接合体3例づつはいずれも独立していた。解析した63例中臨床症状の明らかな60例において肝硬変(LC)及び肝細胞が

ん(HCC)と両変異点におけるA型保持との相対危険度を求め表1中に示した。肝硬変及び肝細胞がんへの移行の危険度はG型ホモに比べ2.8倍程度を示したが、例数が少なく更なる患者サンプルの集積が必要である。

IL1 β プロモーター領域

図2にIL1 β プロモーター領域のSNPsおよび転写制御に関与すると考えられるモチーフの位置および今回PCRに使用したプライマー配列の概略を示す。2ヶ所のSNPにおいてIL1 β の転写制御に直接影響すると考えられるのは-31のC/T変異でT型はTATAボックスを形成し転写発現が亢進することが考えられるが、-511変異については未知のエLEMENTである。表2にそれぞれの変異点の各遺伝子型の遺伝子頻度を示した。-511のC型、T型はそれぞれ40.8%、59.2%を示し、-31のC型、T型はそれぞれ61.8%、38.2%を示した。各遺伝子型の頻度では健常コーカシアンの遺伝子頻度との有意の差は観察されないが、接合体組合せ頻度は明らかな偏りを示し、-511においてはCC型へ、-31ではTT型への偏りが観察され、 χ^2 乗検定では有意であった(-511:P=0.006、-31:P=0.00005)。また-511のC/C型14例の内13例が-31でT/T型を示し、-511と-31がC-Tの連鎖が大多数であることが示唆された。

D.考察

TNF α プロモーター領域

HCV感染から慢性肝炎への移行に関与がうかがわれる-308と-238の変異の遺伝子頻度は-308のA型で1.7%、-238の

A型で2%と日本人健常者においてもその遺伝子頻度は比較的lowくこの遺伝子座の疾患への関与を解析するにはあまり適していないことが考えられる。さらに現段階におけるサンプル症例数が少ないこともあり、この変異の疾患への関与を判断する統計処理に耐える段階ではない。しかしながら解析した63例中、臨床症状の明らかな60例において肝硬変(LC)及び肝細胞がん(HCC)と両変異点におけるA型保持との相対危険度は-308と-238のそれぞれでA型を持つ場合に2.8倍を示し(95%信頼限界、-308: $0.24 < x < 33.67$ 、-238: $0.24 < x < 34.01$)肝炎進行への関与が全く否定されたわけではない。コーカソイドの慢性肝炎患者の解析においては、-238のA型が有意に上昇しており、日本人における慢性肝炎移行へのこのローカスの関与を明らかにするためには、引き続き患者症例の集積に努力する必要がある。今回解析したC型肝炎患者内の-238のA型遺伝子型頻度は2.4%であり、この割合で解析を行うには少なくとも10倍程度のC型肝炎患者サンプルを必要とすると考えられる。

IL1 β プロモーター領域

現在までのところ、IL1 β プロモーター領域の変異がC型肝炎の発症、病状進行に関与する報告はなされていない。今回得られたデータでは、C型肝炎患者における-511、-31のC型、T型はそれぞれ-511が40.8%、59.2%、-31のC型、T型はそれぞれ61.8%、38.2%と遺伝子頻度自体の有意差は観察されなかったが、C/C、C/T、T/Tの接合型の頻度解析では、-511でC/C型に、-31ではT/T型に有意の偏りを示

した(-511:P=0.006、-31:P=0.00005)。遺伝子頻度及びヘテロ(C/T)出現率から-511ではT/T型、-31ではC/C型が有意に少ないことから、C型肝炎発症にこの変異が関与していることが示唆された。とりわけ-31のT/T型はTATAボックスを完全な形で両ローカスが持つことになり、IL1 β の発現が増強されていることが予想され、今後のC型肝炎の発症機序を解析して行く上で重要な足がかりになると考えられる。現在得られている患者サンプルは無症候性キャリアーを含んでおらず、無症候性キャリアーサンプルの収集がこの解析を成功に導く重要な鍵となることが考えられる。

E.結論

C型肝炎の発症進行に関与する遺伝子変異のターゲット領域をTNF α およびIL1 β のプロモーター領域に限定して解析を行い、IL1 β についてはプロモーター領域の変異がC型肝炎発症に関与する可能性が示された。さらに患者サンプルの収集、とりわけ無症候性キャリアーを含めたサンプルの収集が重要と考えられる。今後この遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーの解析によりこのローカスのC型肝炎発症進行への関与を確定し、IL1 β の関与を確定するには、近傍の遺伝子変異の連鎖解析をおこなわなければならない。

F.研究発表

1. 論文発表

1: Arai Y.T., Takahashi H., Kameoka Y., Shiino T., Wimalaratne O., Lodmell D.L. Characterization of Sri Lanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of

nucleoprotein gene. *Acta Virologica*. 2002, in press.

2: Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T, Endo T. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res*. 2001 Nov;87(11):950-5.

3: Funatsuki K, Hashido K, Matsunami M, Kameoka Y, Iwabuchi K, Tsukeda H, Tsuchida K, Takada N, Nakajima Y and Maekawa H. Rapid identification of *Bombyx mori* cells using PCR amplification following a direct procedure for genomic DNA preparation. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. 2001;70:129-136.

4: 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、組織標本の肺吸虫卵を用いた塩基配列解読による虫種同定の試み、*日本臨床寄生虫学会誌*： 2001、12、No.1、153-156.

5: 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、肺切除により診断を得た肺吸虫症：患者肺組織標本の虫嚢内虫体を材料とした塩基配列解読による虫種同定の試み、*日本臨床寄生虫学会誌*： 2001、12、No.1、59-62.

2. 学会発表

1. 亀岡洋祐、三宅高義、竹中進、鈴木和

男：ミエロペルオキシダーゼ不完全欠損症例の遺伝子解析、第4回肝臓生物学研究会、上総一ノ宮、平成13年12月

2. 大原関利章、橋本ゆき、亀岡洋祐、倉文明、高橋啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎：川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング、第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月

3. 橋本ゆき、亀岡洋祐、倉文明、大原関利章、高橋啓、山田仁美、直江史郎、鈴木和男：CBA/JN と C3H/HeN マウスの系統間較差を示すクロモソームマーカーの検索、第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月

4. 亀岡洋祐、安谷屋正明、鈴木和男：新規 MPO 完全欠損患者の遺伝子構造解析、第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月

5. 高橋-重茂浩美、重茂克彦、坂口雅弘、亀岡洋祐、松下悟、稲田敏樹：乳酸脱水素酵素ウイルスエンベロープ蛋白 VP2 に対する抗体の作製、第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月

6. Dawson W, Ishida M, Kameoka Y, Yamagoe S, Futamura Y, Yamamoto K, Suzuki K, Tanokura M : A combined study of the LECT2 protein using molecular dynamics simulation and NMR chemical shift data、第24回日本分子生物学会総会、横浜、平成13年12月

7 . Kameoka Y, Adaniya M, Suzuki K :
Genomic analysis of myeloperoxidase
locus in a newly found patient with its complete
deficiency. 第7回 MPO 研究会、横浜、平
成 13 年 10 月

図 1. TNF α 遺伝子プロモーター領域の構造と SNP 及びプライマーの位置

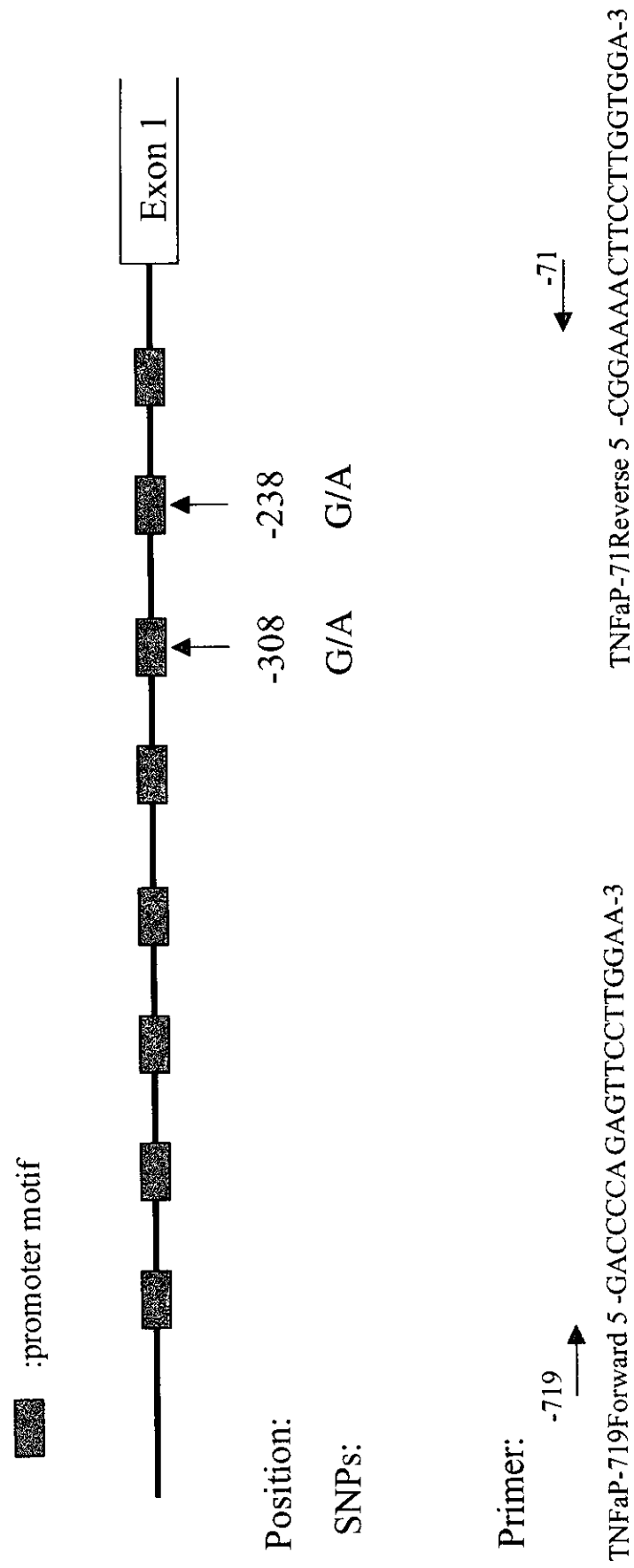


表 1. C型肝炎患者におけるTNF α 遺伝子プロモーター領域のSNP頻度と
肝硬変 (LC)/肝細胞癌 (HCC) 移行の相対危険度

SNP position	- 308			- 238		
Genotype	GG	GA	AA	GG	GA	AA
Number obs. (HCV pat.)	59	3	0	59	3	0
Genotype frequency	G	A		G	A	
Healthy control (Japanese, %)	98.3	1.7		98	2	
HCV patient	97.6	2.4		97.6	2.4	
	Odds for LC/HCC					
GA (95% CI)	2.83 (0.24--33.7)			2.83(0.24--33.7)		
GG (95% CI)	0.34(0.03--4.08)			0.32(0.03--3.79)		

図 2. IL1β 遺伝子プロモーター領域の構造と SNP 及びプライマーの位置

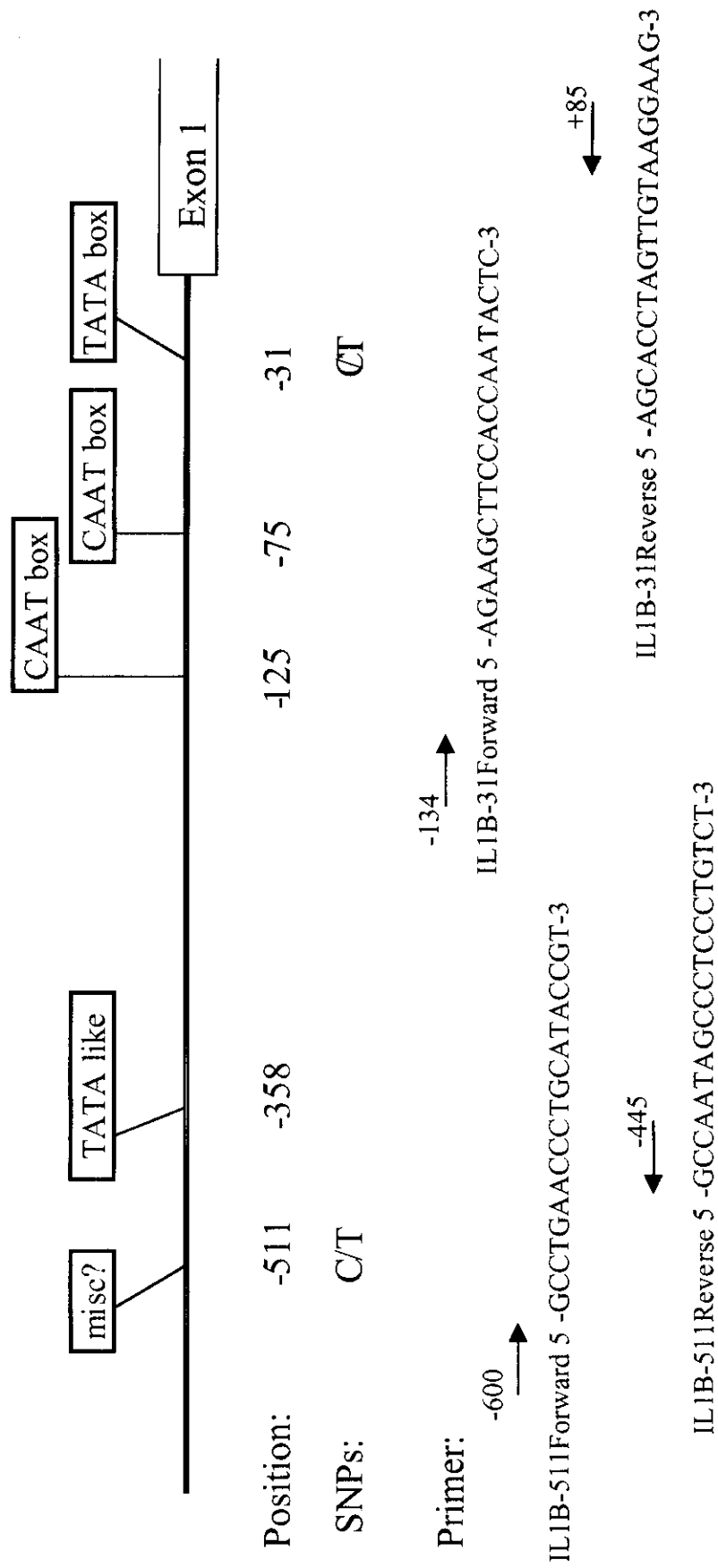


表 2. C型肝炎患者におけるIL1 β 遺伝子プロモーター領域のSNPと
遺伝子頻度

SNP position	-511			-31		
Genotype	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T
HCV pat.	15	38	2	5	30	14
Healthy Cr. (Caucasian)	36	51	13	37	50	13
Genotype frequency	C	T		C	T	
HCV patient	61.8	38.2		40.8	59.2	
Healthy Cr.	61.5	38.5		62.0	38.0	
Chai square test						
χ^2 :	10.2	19.9				
P :	0.0062	0.00004				