

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

C型肝炎ウイルスの感染による肝炎・肝硬変及び
肝がん発生等の病態の解明に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成14（2002）年 3月

C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究

班員名簿

班長	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科・分子制御治療学	教授
班員	下遠野邦忠	京都大学ウイルス研究所	教授
	加藤宣之	岡山大学大学院医歯学総合研究所 腫瘍制御学分子生物学	教授
班友	小原道法	東京都臨床医学総合研究所・感染生体防御研究部門	室長
	岡本宏明	自治医科大学予防生態学・分子ウイルス学研究部	助教授
	岡上 武	京都府立医科大学第三内科	助教授
	坪内博仁	宮崎医科大学第二内科	教授
	金子周一	金沢大学医学部第一内科	助教授
	小池和彦	東京大学大学院医学系研究科・生体防御感染症学	助教授
	森脇久隆	岐阜大学医学部第一内科	教授
	脇田隆字	東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門	副参事 研究員

〔事務局〕

大阪大学大学院医学系研究科・分子制御治療学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2
Tel : 06-6879-3440
Fax : 06-6879-3449

目次

I. 総括研究所報告書

C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究 1

林 紀夫

II. 分担研究報告書

1. C型肝炎ウイルスタンパク質の複製および細胞増殖に及ぼす機能解析 9

下遠野 邦忠

2. C型肝炎ウイルスの DNA 修復系への影響に関する研究 13

加藤 宣之

3. C型肝炎ウイルス感染性 cDNA クローンに関する研究 16

小原 道法

4. HCV 感染回復期血清中の HCV 粒子に対する抗体に関する研究 17

岡本 宏明

5. C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法時の HCV dynamics,
Th1/Th2 cytokine chemokine receptor の検討 20

岡上 武

6. CDAA 食飼育ラット肝より単離した osteoactivin の意義 26

コーホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解明 27

坪内 博仁

7. C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究 . . 29

金子 周一

8. C型肝炎における樹状細胞サブセットの解析 31

林 紀夫

9. C型肝炎ウイルスマウスモデルにおける細胞障害性 T 細胞の誘導と
その標的抗原に関する研究 32

脇田 隆字

10. 動物モデルを用いた肝発癌に関する研究 38

小池 和彦

11. C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究 . . 41

森脇 久隆

12. 肝癌における MICA/B の発現と NK 細胞感受性の制御 43

林 紀夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	54

I .総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告

C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学 教授

研究要旨：3年計画の1年目にあたる平成13年度は、1) 培養細胞における HCV 増殖システムの開発と HCV 関連蛋白による宿主細胞機能の解析、2) C型肝炎ウイルス (HCV) による肝炎および肝発癌の動物モデルの作製とそれらを用いた免疫応答、酸化ストレス応答の解析、3) 患者サンプルを用いた C型肝炎における遺伝子発現プロファイル、サイトカイン、樹状細胞分画の解析と肝炎回復期血清の中和抗体についての解析、4) 肝癌におけるオステオアクチビンの検討、レチノイドに対する反応性の解析、レチノイドによる肝癌の NK 感受性の制御の解明を軸に研究を行った。培養細胞での HCV 増殖システムの開発については、HCV の全長遺伝子を cDNA のかたちで培養細胞に導入することにより、HCV の複製とウイルスの産生が確認された。HCV 関連蛋白の機能解析については、特に HCV コア蛋白が宿主細胞のアポトーシスおよび DNA 修復能を低下させ、また酸化ストレスを誘導することにより、発癌に寄与している可能性が示された。また、NS5A 蛋白と PKR との相互作用が示唆された。動物モデルに関しては HCV による肝炎あるいは肝癌を発症するトランスジェニックモデルが樹立され、これを用いることにより CTL のターゲットとなるエピトープの特徴、発癌にかかわる酸化ストレスの意義が明らかとなった。患者サンプルを用いた検討では、HCV 感染による肝臓での遺伝子発現プロファイルが他の肝疾患とは異なる特徴を持つこと、HCV 感染者では末梢血の樹状細胞分画が減少し機能低下が認められること、HCV 感染の回復期血清中には HCV 粒子と結合する多様な抗体が存在すること、HCV 感染者ではケモカインやそのレセプター陽性細胞が増加することを明らかにした。肝癌に関する検討では、肝癌の進展あるいは増殖制御の破綻にオステオアクチビン遺伝子の発現やレチノイドレセプターの翻訳後修飾の異常が関与していることを示した。また、肝癌における NK 細胞感受性に MICA/B の発現が関与していることを明らかにし、MICA/B の発現および NK 感受性をレチノイドにより増強し得ることを示した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は持続感染をきたし、慢性肝炎、肝硬変を経て高率に肝癌を引き起こす。わが国における HCV 感染者は 200 万人以上と推定されており、年間約

3万人の新規肝発癌が認められている。C型肝炎に対する現在最も有効な治療はインターフェロン(IFN)治療あるいは IFN とリバビリンの併用療法である。また、最近 PEG-IFN 療法の有効性が報告され期待が

持たれている。しかしながら、C型慢性肝炎の約1/2はこれらの治療法に抵抗性であると予想されており、現行のIFNを中心としたC型肝炎の治療のみでは限界があると言わざるを得ない。かかる現状から、今後本邦にて急増が予想される肝臓癌の発生を抑止するためには、C型肝炎疾患に対する新しい治療戦略の開発が急務となっており、このためにはHCV感染がもたらす各種病態の詳細な分子機構を解明することが重要である。HCVによって引き起こされる病態の要点をまとめると、1)HCVによって惹起される肝細胞死（肝炎）は、HCV感染に伴う宿主の免疫反応によって肝細胞障害機構が働くことに加え、肝細胞自身が持続的なウイルス蛋白の発現に曝されることにより肝細胞死に対する感受性に変化が生じる結果もたらされること、2)HCVが高率に持続感染を引き起こすのは、HCV自身の抗原性が低いことに加え、HCV感染に伴い宿主の免疫反応に異常が生じ、十分なウイルス排除機構が働かない結果であること、3)HCV感染に伴う肝臓癌は肝細胞が持続的なウイルス蛋白の発現により細胞応答性の変化を起こすことに加え、繰り返す肝細胞死と肝再生により肝細胞が高癌化状態におかれ、これらの総和として肝細胞が悪性形質転換をきたし、さらに肝臓での免疫監視機構を逃れて画像上認識される肝臓癌にまで生育すること、の3点が挙げられ、これらのいずれが欠けてもHCV感染の終末像である肝臓癌は成立しない。言い換えれば、これらの3点はいずれも独立したC型肝炎治療のターゲットであり、このうち1つでも制御することができれば肝臓癌に対する有効な治療法となりうる。本研究はこの観点に基づき、C型

肝疾患の病態を多面的に解明し、このような理解をもとに、C型肝炎ならびに肝臓癌に対する新しい治療戦略を開発することを目的としている。

B. 研究方法

1) 培養細胞でのHCV増殖システムとHCV関連蛋白の機能解析

HCV増殖システムの開発：チンパンジーにHCV感染者の血清を接種し、PCR価が高く、かつ感染価との差の小さい検体を選び、HCV全遺伝子のクローニングを行い、このHCV全遺伝子のcDNAを動物細胞に導入した。HCV複製に関しては、マイナス鎖の検出および培養上清中の密度勾配遠心と免疫電顕により行った。

HCV蛋白質の宿主細胞に与える影響：HCVコア抗原をコードする遺伝子をHepG2細胞に導入し細胞増殖、アポトーシスに与える影響を検討した。各種HCV蛋白質を発現する肝細胞を用いて、マイクロサテライト不安定性を検討した。

2) HCVによる肝炎および肝臓癌の動物モデルの作製とその解析

コンディショナルモデルを用いた解析：HCVコア～NS2蛋白をコードする遺伝子の5'上流にloxPにはさまれたneo-polyAを有するトランスジーンを導入したトランスジェニックマウスを作製した。戻し交配によりこのトランスジーンを発現する種々の免疫学的バックグラウンドを有するマウスを作製し、CTLの標的について解析した。

トランスジェニックモデルを用いた解析：HCVコア遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。またこのモデルにおける肝脂肪化、肝臓癌の分子機構につい

て酸化ストレスの観点から解析した。

3) C型肝炎における遺伝子発現と樹状細胞分画の解析および中和抗体、サイトカイン産生の検討

遺伝子発現プロファイルの解析: C型慢性肝疾患の肝組織を対象に SAGE 法および DNA チップを用いて、発現遺伝子解析を行った。

樹状細胞サブセットの解析: C型慢性肝炎患者の末梢血単核球から、Lineage 陰性かつ HLA-DR 陽性の細胞群を樹状細胞とし、さらに CD11c と CD123 の染色性から preDC1 と preDC2 を決定した。機能解析は各分画をソーティングした細胞を用いて naïve CD4 T細胞の刺激能と CpG オリゴの刺激による IFN α の産生能により評価した。

中和抗体に関する解析: 遊離型の HCV 粒子を用いて HCV の回復期血清に含まれる HCV に結合する抗体を免疫沈降法を用いて解析した。

サイトカインに関する解析: C型慢性肝炎患者の末梢血リンパ球中の CXCR3 陽性細胞を FACS を用いて解析した。

4) 肝癌におけるオステオアクチビンの発現、レチノイン酸に対する不応答性、NK細胞感受性に関する検討

オステオアクチビンの発現: CDAA 食飼育ラット肝で発現亢進する遺伝子を suppression subtraction hybridization 法にて単離した。オステオアクチビン遺伝子の発現をラットおよびヒトの肝臓で解析し、オステオアクチビン遺伝子の強制発現系を用いてその機能を培養細胞レベルで検討した。

レチノイン酸に対する反応性: 肝癌組織および Huh7 細胞を用いて、レチノイドレセ

プターの一つである RXR α の遺伝子変異と翻訳後修飾について解析した。

NK細胞感受性とその制御: 肝癌細胞株の MICA/B、HLA class I の発現を FACS を用いて解析した。ヒト末梢血より NK 細胞を分離し、肝癌細胞に対する細胞障害性をクロムリリース法にて解析した。肝癌の NK 感受性における MICA/B の発現の関与をモノクロナル抗体を用いて解析した。

C. 研究成果と考案

1) 培養細胞での HCV 増殖システムと HCV 関連蛋白の機能解析

HCV の全長遺伝子を cDNA のかたちで細胞に導入することにより、培養液中にウイルスの産生が認められ、HCV の増殖系が樹立された。

HCV コア蛋白にはアポトーシス抑制作用があり、またマイクロサテライトに関するミスマッチ修復能を低下させる効果があることが明らかとなった。NS5A には PKR 抑制作用が認められた。

2) HCV による肝炎および肝発癌の動物モデルの作製とその解析

コア遺伝子トランスジェニックモデルでは肝脂肪化と肝発癌が認められた。脂肪化の原因として β 酸化の障害がひとつの要因であり活性酸素の増加が認められた。

コンディショナルモデルを用いて肝炎の誘導が可能であった。この HCV 肝炎モデルではコア蛋白は H2 にかかわらず CTL の標的にはならなかったが、NS2 はどの H2 でも標的となった。

3) C型肝炎における遺伝子発現、樹状細胞分画、抗体、サイトカインの解析

HCV による慢性肝炎の発現遺伝子プロファ

イルは、HBVによる慢性肝炎をはじめとする他の病態とは異なる特徴を有していた。C型慢性肝炎では健常者に比べ DC サブセットが減少しており、preDC2の機能低下が認められた。HCV感染後の回復期血清中にはHCV粒子と結合する多様な抗体が存在した。C型慢性肝炎の増悪時には、血清IP-10が増加し末梢血リンパ球のCXCR3陽性細胞が増加した。

4) 肝癌におけるオステオアクチビン発現の意義、レチノイン酸に対する反応性およびNK細胞感受性の制御機構解析

ヒト肝癌組織および肝癌細胞株ではRXR α がErkによってリン酸化を受け、転写活性が低下し、かつ分解が遅延して dominant negative な効果をもっていた。

肝癌に発現しているMICAはそのNK細胞感受性を規定する主要な分子であった。ATRAはRAR α を介して肝癌のMICAの発現を亢進させ、NK細胞に対する感受性を増強した。

CDA食飼育ラット肝にて発現が亢進している遺伝子としてオステオアクチビン遺伝子を単離した。同遺伝子はヒト肝硬変、肝癌組織でも発現しており、培養肝癌細胞での浸潤、転移能を亢進させた。

D. 結論

培養細胞におけるHCVcDNA導入による増殖システムを開発した。今後、このモデルを用いることにより、HCVのウイルス学的な解析が促進されることが期待される。HCVコア蛋は宿主細胞のアポトーシスおよびDNA修復能を低下させ、また酸化ストレスを誘導することにより、発癌に寄与している可能性が示された。

HCVにおける肝炎の発症および発癌を解析し得る動物モデルが樹立された。これらを用いることにより、CTLのターゲットとなるエピトープの特徴、発癌にかかわる酸化ストレスの意義が明らかとなった。

C型慢性肝炎における肝臓での遺伝子発現、血液中樹状細胞分画、サイトカインの特徴を明らかにした。このような解析を続けることにより、C型慢性肝炎の分子生物学的あるいは免疫学的な病態解析からさらに進むことが予想される。またHCV回復期血清中にHCVに結合する抗体が存在することを明らかにしたが、今後、受動免疫療法の開発につながることを期待される。

肝癌の進展あるいは増殖制御の破綻にオステオアクチビン遺伝子の発現やレチノイドレセプターの翻訳後修飾の異常が関与していることが示された。一方、肝癌におけるNK細胞感受性の分子機構が明らかとなり、これをターゲットとした免疫療法の開発に取り組む計画である。

E. 研究発表

1. Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyuki Marusawa, Takahiro Doi and Kunitada Shimotohno. Cytoplasmic Localization Is Important for Transcription Factor Nuclear Factor- κ B Activation by Hepatitis C Virus Core Protein through Its Amino Terminal Region. *Virology* 286: 391-402, 2001
2. Tohru Noguchi, Shinya Satoh, Takeshi Noshi, Eriko Hatada, Ryuhi Fukuda, Akihiko Kawai, Satoru Ikeda, Makoto Hijikata and Kunitada Shimotohno. Effects of Mutation in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A on Interferon

- Resistance Mediated by Inhibition of PKR Kinase Activity in Mammalian Cells. *Microbiol.Immunol* 45: 829-840, 2001
3. Katuhiko Fukuda, Katsuya Tsuchihara, Makoto Hijikata, Shuhei Nishigushi, Tetsuo Kuroki and Kunitada Shimotohno. Hepatitis C Virus Core Protein Enhances the Activation of the Transcription Factor, Elk1, in Response to Mitogenic Stimuli. *Hepatology*. 33: 159-165, 2001
 4. Nobuyuki Kato. Molecular Virology of Hepatitis C Virus. *Acta Med. Okayama*, 55: 133-159, 2001
 5. Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Toue, Futoshi Shibasaki Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Yukiko Hayashi, Nobuaki Funata, Choji Taya, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Inhibition of Cytochrome c Release in Fas-mediated Signaling Pathway in Transgenic Mice Induced to Express Hapatitis C Viral Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 12140-12146, 2001
 6. Takayoshi Ito, Kotaro Yasui, Jun Mukaigawa, Asao Katsume, Michinori Kohara and Keiji Mitamura. Acquisition of Susceptibility to Hepatitis C Virus Replication in HepG2 Cells by Fusion With Primary Human Hepatocytes: Establishment of a Quantitative Assay for Hepatitis C Virus Infectivity in a Cell Culture System. *Hepatology* 34: 566-572, 2001
 7. Takao Shibayama, Gohta Masuda, Atsushi Ajisawa, Masaharu Takahashi, Tsutomu Nishizawa, Fumio Tsuda, and Hiroaki Okamoto. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in Patients infected with HIV. *AIDS*, 15: 563-570, 2001
 8. Hiroaki Okamoto, Tsutomu Nishizawa, Masaharu Takahashi, Shinichi Asada, Fumio Tsuda, and Akira Yoshikawa. Heterogeneous Distribution of TT Virus of Distinct Genotypes in Multiple Tissues from Infected Humans. *Virology* 288: 58-368, 2001
 9. Hiroaki Okamoto, Tsutomu Nishizawa, Masaharu Takahashi, Akio Tawara, Yihong Peng, Junichi Kishimoto and Yu Wang. Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *Journal of General Virology* 82: 2041-2050, 2001
 10. Hiroaki Okamoto, Masaharu Takahashi, Tsutomu Ishizawa, Katsuhiko Fukai, Umetaro Muramatsu and Akira Yoshikawa. Analysis of the Complete Genome of Indigenous Swine Hepatitis E Virus Isolated in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 929-936, 2001
 11. Shin-ichi Asabe, Tsutomu Nishizawa, Hiroko Iwanari and Hiroaki Okamoto. Phosphorylation of Serine-Rich Protein Encoded by Open Reading Frame 3 of the TT Virus Genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 298-304, 2001
 12. D.H. Muljono, T. Ishizawa, F. Tsuda, M.

- Takahashi, and H. Okamoto. Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol* 146: 1249-1266, 2001
13. Y.H. Peng, T. Nishizawa, M. Takahashi, T. Ishikawa, A. Yoshikawa and H. Okamoto. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 147: 21-41, 2002
 14. Masaharu Takahashi, Shinichi Asabe, Yuhko Gotanda, Junishi Kishimoto, Fumio Tsuda and Hiroaki Okamoto. TT Virus Is Distributed in Various Leukocyte Subpopulations at Distinct Levels, with the Highest Viral Load in Granulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 242-248, 2001
 15. Y. Ito, A. Morita, K. Nishioji, H. Fjii, H. Nakamura, T. Kirishima, T. Toyama, N. Yamauchi, Y. Nagao, S. Narumi & T. Okamoto. Time Course Profile and Cell-Type-Specific Production of Monokine Induced by Interferon- γ in Concanavalin A- Induced Hepatic Injury in Mice: Comparative Study with Interferon-Inducible Protein-10. *Scand J Gastroenterol* 36: 1344- 1351, 2001
 16. Y. Ito, A. Morita, K. Nishioji, S. Narumi, Y. Daimon, H. Nakamura, T. Kirishima and T. Okanoue. Clinical Significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. *J Viral Hepat* 8: 341-348, 2001
 17. K. Nishioji, T. Okanoue, Y. Itoh, S. Narumi, M. Sakamaoto, H. Nakamura, A. Morita & K. Kashima. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 123: 271-279, 2001
 18. Hirofumi Uto, Akio Ido, Akihiro Mouriuchi, Yukiko Onaga, Kenji Nagata, Masaki Onaga, Yoshihiro Tahara, Takeshi Hori, Shuichi Hirono, Katsuhiko Hayashi and Hirohito Tsubouchi. Transduction of Antisense Cyclin D1 Using Two-step Gene Transfer Inhibits the Growth of Rat Hepatoma Cells. *Cancer Research* 61: 4779- 4783, 2001
 19. Akio Ido, Hirofumi Uto, Akihiro Moriuchi, Kenji Nagata, Yukiko Onaga, Masaaki Onaga, Takeshi Hori, Shuichi Hirono, Katsuhiko Hayashi, Taiki Tamaoki, and Hirohito Tsubouchi. Gene Therapy Targeting For Hepatocellular Carcinoma: Selective and Enhanced Suicide Gene Expression Regulated by a Hypoxia-inducible Enhancer Linked to a Human α -Fetoprotein Promoter. *Cancer Research* 61: 3016- 3021, 2001
 20. Taro Yamashita, Shuichi Kaneko, Shin-ichi Hashimoto, Taku Sato, Shigenori Nagai, Nobuaki Toyoda, Takuji Suzuki, Kenichi Kobayashi and Kouji Matsushima. Serial Analysis of Gene Expression in Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *Biochem Bioph Res Co* 282: 647-654, 2001

21. Yukihiro Shirota, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Hiroshi F. Kawai and Kenichi Kobayashi. Identification of Differentially Expressed Genes in Hepatocellular Carcinoma With cDNA Microarrays. *Hepatology* 33: 832-840, 2001
22. Masao Honda, Shuichi Kaneko, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota and Kenichi Kobayashi. Differential Gene Expression Between Chronic Hepatitis B And C Hepatic Lesion. *Gastroenterology* 120: 955-966, 2001
23. Hiroshi F. Kawai, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Yukihiro Shirota and Kenichi Kobayashi. α -Fetoprotein-Producing Hepatoma Cell Lines Share Common Expression Profiles of Genes in Various Categories Demonstrated by cDNA Microarray Analysis. *Hepatology* 33: 676-691, 2001
24. Takanobu Kato, Akihiro Furusaka, Michiko Miyamoto, Tomoko Date, Kotaro Yasui, Jun Hiramoto, Kazuo Nagayama, Teruji Tanaka and Takaji Wakita. Sequence Analysis of Hepatitis C Virus Isolated From a Fulminant Hepatitis Patient. *Journal of Medical Virology* 64: 334-339, 2001
25. Kazuhiko Koike, Takeya Tsutsumi Hajime Fujie Yoshizumi Shintani, Kyoji Moriya. Molecular Mechanism of Viral Hepatocarcinogenesis. *Oncology* 62 suppl 1: 29-37, 2002
26. Kyouji Moriya, Toru Todoroki, Takeya Tsutsumi, Hajime Fujie, Yoshizumi Shintani, Hideyuki Miyoshi, Kotaro Ishibashi, Tadatoshi Takayama, Masatoshi Makuuchi, Kiyooki Watanabe, Tatsuo Miyamura, Satoshi Kimura and Kazuhiko Koike. Increase in the Concentration of Carbon 18 Monounsaturated Fatty Acids in the Liver with Hepatitis C: Analysis in Transgenic Mice and Humans. *Biophys Biochem Res Commun* 281: 1207-1212, 2001
27. K.Koike. Role of hepatitis viruses In multistep hepatocarcinogenesis. *Digest Liver Dis* 33: 2-6, 2001
28. Kyouji Moriya, Kiyotaka Nakagawa, Tomofumi Santa, Yoshizumi Shintani, Hajime Fujie, Hideyuki Miyoshi, Takeya Tsutsumi, Teruo Miyazawa, Kotaro Ishibashi, Toshiharu Horie, Kazahiro Imai, Toru Todoroki, Satoshi Kimura and Kazuhiko Koike. Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C Virus-associated Hepatocarcinogenesis *Cancer Research* 61: 4365-4370, 2001
29. Rie Matsushima-Nisiwaki, Masataka Okuno, Seiji Adachi, Tetsuro Sano, Kuniharu Akita, Hisataka Moriwaki, Scott L.Friedman and Soichi Kojima. Phosphorylation of Retinoid X Receptor α at Serine 260 Impairs Its Metabolism and Function in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 61: 7675-7682, 2001
30. Masataka Okuno, Tetsuro Sano, Rie Matsushima-Nisiwaki, Seiji Adachi, Kuniharu Akita, Yukio Okano, Soichi Kojima and Hisataka Morwaki. Apoptosis Induction by Acyclic Retinoid: a Molecular

- Basis of 'Clonal Deletion' Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Jpn. J Clin. Oncol* 31: 359-362, 2001
31. Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Tatuya Kanto, Takuya Miyagi, Noriyoshi Kuzushita, Yoshiko Sugimoto, Masahisa Jinushi, Akinori Kasahara, Yutaka Sasaki, Masatsugu Hori and Norio Hayashi. Administration of Interleukin-12 Enhances the Therapeutic Efficacy of Dendritic Cell-based Tumor Vaccines in Mouse Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 61: 7563- 7567, 2001
32. Yoshimichi Haruna, Tsutomu Kanda, Masaharu Honda, Tetsuto Takao, and Norio Hyashi. Detection of Hepatitis C Virus in the Bile and Bile Duct Epithelial Cells of Hepatitis C Virus-Infected Patients. *Hepatology* 33: 977-980, 2001

Ⅱ.分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスタンパク質の複製および細胞増殖に及ぼす機能解析

分担研究者 下遠野 邦忠 京都大学ウイルス研究所

研究要旨：HCV タンパク質のうちでコアタンパク質および非構造タンパク質（NS5A）について細胞増殖に対する影響の観点から解析を行った。コアタンパク質はアポトーシスを抑制するがそれには転写因子 NF- κ B の活性化が必要である。この活性化にはコアが細胞質内、特に小胞体膜上に存在することが必要である。NS5A による二本鎖 RNA 依存タンパク質キナーゼ（PKR）の活性抑制効果は PKR の働きにより逆に抑えられる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝臓の疾患には宿主の免疫機構の活性化による感染細胞の監視による細胞死とそれにとまなう細胞の再生以外にウイルスタンパク質が直接関与する可能性が考えられる。また、ウイルスタンパク質はウイルス自身の複製に果たす役割を持つ。本研究ではウイルスタンパク質の両方の性質を明らかにしつつ、HCV 感染による病気発症の予防およびウイルス感染予防に向けての新たな切り口を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV コアタンパク質を産生する細胞におけるアポトーシス誘導に対する効果と NF- κ B の活性化。

HepG2 細胞にコアを発現させた細胞をアポトーシス誘導させ、生存する細胞数を計数することにより、アポトーシスの効果を判定する。同時に細胞抽出液を調製して転写因子 NF- κ B の転写活性をレポーターアッセイにより測定する。

(2) HCV コアタンパク質の種々の変異体を作成し、それらの細胞内局在と

NF- κ B の活性を比較する。

(3) NS5A による PKR の機能抑制制御を試験管内翻訳反応を用いて定量する。また、NS5A の欠失変異体についても同様の実験を行う。

(4) NS5A のセリン残基の点変異体を構築し、それらによる PKR への効果を試験管内翻訳反応系を用いて解析する。（倫理面への配慮）

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究成果

(1) アポトーシスの誘導と転写因子の活性化

コアタンパク質による細胞増殖制御のうち、NF- κ B 活性化機構を明らかにするために、各種コアタンパク質の変異体を構築してそれらと NF- κ B の活性化との関連を調べた。まず、コアタンパク質を発現する細胞ではアポトーシスの誘導に対して抑制的に働くこと、その際に転写因子 NF- κ B が活性化され

ていることを見だし、両者が機能的に会合している可能性を示した。このことをさらに調べるために NF- κ B 阻害因子を強制発現させるとアポトーシスも抑制されなくなる事から、そのことが強く示唆された。すなわちコアは NF- κ B を活性化することによりアポトーシスから免れるように働くことと推定される。コアによる NF- κ B の活性化についてその機構を解析するためにコアタンパク質の C 端側の欠失変異体を構築してそれらの NF- κ B 活性化能を調べた。その結果、コアが細胞質に局在するときに活性が最大になった。細胞質内局剤と NF- κ B 活性化との関連をさらに調べるために次にコアに細胞内の局在を変化させるペプチドを融合させたものを各種作成して解析した。その結果、コアが細胞質に局在することが NF- κ B の活性化に重要であることを見いだした。さらにコアが最大の NF- κ B 活性を示すには小胞体膜に会合していることが必要であることも見いだした。

(3) NS5A による PKR の機能抑制

NS5A が PKR の機能を抑制するがその抑制は NS5A が PKR と会合するためであると考えられている。筆者はこれまでに NS5A の中で PKR と会合する領域を決め、それが NS5A 分子の C 端側 3 分の 2 に亘る領域であることを示した。さらに責任領域を決めるために C 端側の欠失変異体を構築して PKR に対する阻害効果を PKR による試験管内翻訳反応の抑制を指標にして調べた。その結果、これまでに会合に重要であると報告されている ISDR 領域の欠失 NS5A でも PKR と会合すること、また C 端を除いた NS5A では PKR の機能を抑制しなくなる事が分かった。このことはこれまでに報告されているように ISDR とその下流領域が PKR との会合

に必要であるということと符合しない。そこで我々の結果をさらに検証するために、欠失した NS5A C 端側の意義を調べた。この領域には HCV の型を越えて保存されているセリン残基と HCV-1b 型に保存されているセリン残基が存在する。まず、PKR が NS5A のこれらの領域をリン酸化するか否かについて調べたところ、PKR によりリン酸が取り込まれることが判明した。保存されているセリン残基がリン酸化の標的である可能性を調べるためにこれらのアミノ酸をアラニンに変異させた NS5A を作成してそれらのリン酸化を PKR 存在下で調べた。その結果、各三カ所のセリンを変異させたものでは PKR によるリン酸の取り込みを失った。一方、他の二つのセリン残基を変異させたものでは、PKR によるリン酸化に変化はなかった。以上から NS5A は PKR でリン酸化されるタンパク質であることを明らかにした。

(4) PKR による NS5A のリン酸化は NS5A が PKR の機能を抑制する機能を低下させる

PKR による NS5A のリン酸化がどのような意味を持つかについては、NS5A の本来の機能が不明なので明らかでない。しかし、これまでに NS5A は PKR の機能を抑制することが知られている。そこで、リン酸化されない NS5A が PKR の機能に対してどのように働くかを試験管内の翻訳反応を用いて解析した。その結果、リン酸化されない NS5A による PKR の翻訳抑制が著しく解除された。

D. 考察

コアタンパク質および NS5A が細胞の増殖に対してプラスに働いていることを示した。コアはアポトーシス抑制

作用を小胞体膜上に局在し、NF- κ B を活性化することにより働く。コアによる NF- κ B 活性化が HCV 感染による肝炎などの疾患とどのように関連するかは明らかでないが、本転写因子の活性化は細胞を増殖の方向にむけるので、ウイルスの持続感染と関連するかも知れない。肝がん細胞などでは NF- κ B が活性化されている場合が多いので、HCV の感染が病態の変化に NF- κ B の活性化を通して寄与している可能性が考えられる。もしそうだとしたら、NF- κ B の活性を肝がん特異的に抑制させることは病気の治癒あるいは緩和に役立つかも知れない。

NS5A が PKR の機能を抑制する反面 PKR が NS5A の機能をリン酸化を通して逆に抑えていることを示唆する成果は、インターフェロンによる治療を考えると重要である。インターフェロンを中心にした慢性肝炎の治療は今後もしばらくの間継続すると考えられるが PKR が NS5A を機能的抑制するとするならば、この抑制作用を抑える働きを持つ薬剤の開発が有効であると期待される。そのためには PKR によりどのようにして NS5A の機能が抑制されるかについての解析が必要になる。

E. 結論

HCV たんぱく質コアおよび NS5A が細胞の増殖に及ぼす影響を調べて、異なるルートを使って細胞の増殖にプラスに働いていることを示した。また、これらの経路を遮断あるいは抑制することができれば疾患の予防あるいはある程度の治療効果を上げる可能性があると考えられる。これらの情報を蓄積することにより疾患に対する予防、治療の開発に道が拓かれるようになると期待されるので、HCV の他のタンパク

質についても細胞増殖との関連で解析を進めてゆく必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, elk1, in response to mitogenic stimuli, *Hepatology*. 33:159-65, 2001
3. Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K., Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease., *Biochem Biophys Res Commun*. 279:557-562, 2000
4. Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K. Inhibitory effects of sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease, *Phytother Res*. 14:510-516, 2000
5. Marusawa H, Hijikata M, Watashi K, Chiba T, Shimotohno K. Regulation of Fas-mediated apoptosis by NF- κ B activity in human hepatocyte derived cell lines. *Microbiol Immunol*. 45:483-489, 2001.
6. Watashi K, Hijikata M, Marusawa H, Doi T, Shimotohno K. Cytoplasmic localization is important for transcription factor nuclear factor- κ B activation by hepatitis C virus core protein through its amino terminal region. *Virology*. 286:391-402, 2001.

2. 学会発表

1. 土井 崇広、土方 誠、渡士 幸一、丸沢 宏、下遠野 邦忠、C 型肝炎ウイルスコアタンパク質による転写因子 NF- κ B 活性化の分子機構、平成13年、11月、第49回日本ウイルス学会、大阪
2. 松本美貴子、佐藤 伸哉、木岡 紀幸、天地 輝夫、土方 誠、下遠野 邦忠、HCVNS5A タンパク質と相互作用する宿主細胞因子

の検索、平成13年、11月、第
49回日本ウイルス学会、大阪

3. 下遠野 邦忠、他、HCVによる
細胞増殖変化、平成13年9月、
第60回日本癌学会総会、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請

C型肝炎ウイルスNS5Aタンパク
質の変異体、およびその利用、

発明者：下遠野 邦忠 他、

整理番号：J 1-A0102

特願：2001-225613

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスのDNA修復系への影響に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：癌化の要因の一つとしてDNA修復機能の低下を考え、HCV蛋白質がDNA修復能を抑制して発癌リスクを高めている可能性について検討した。最もよく研究されているミスマッチ修復系について培養細胞を用いた実験系を新たに構築してHCV蛋白質による影響を調べた。(CA)_nのマイクロサテライト配列をpuromycin耐性遺伝子のATG直下に挿入し、通常では耐性蛋白質が読めないレトロウイルスベクターを構築した。このベクター導入細胞内でframe shiftが起こり、frameが一致した場合のみ、puromycin耐性になるように設計した。ミスマッチ修復系が破綻しているヒト大腸癌由来の細胞では、多くのpuromycin耐性コロニーが得られたが、ミスマッチ修復系に異常のないヒト培養細胞では耐性コロニーはほとんど得られなかったことから、このアッセイ系の有用性を確認した。各種HCV蛋白質を安定的に発現しているヒト肝PH5CH8細胞を用いて同様に検討した結果、コア蛋白質発現細胞においてのみ、耐性コロニーがコントロールと比較して数倍程度多く出現することが判った。コア蛋白質のミスマッチ修復系に対するこのような抑制効果は、遺伝子型により異なり1b型で最も顕著な効果を示した。

A. 研究目的

肝発がんにはC型肝炎ウイルス（HCV）の感染により生じる慢性肝炎とHCVの持続感染が重要であると考えられている。HCV陽性の早期肝癌においては特定の癌関連遺伝子の異常がほとんど検出されないことから、HCVによる肝発がんには未知の発がん機構が存在している可能性があり、そのような機構にHCVが直接的に作用している可能性がある。肝発がん機構を解明することができれば、どこを抑えることが発がんの予防につながるかを明らかにすることができることから、新たな発がん予防法の開発が期待される。従って、現在、発がん予備群である慢性肝炎や肝硬変患者に対する社会的貢献は非常に大きいものと考えられる。このような観点から、現在、HCV蛋白質の細胞に対する機能修飾については盛んに研究がなされており、これまでに、転写調節やアポトーシスに影響を与えることなどが報告されている。また、免疫機構にも影響を与えていることが示唆されている。我々は、癌化の要因の一つとして、これまでにまったく検討されていないDNA修復機能に着目し、HCV蛋白質が及ぼす影響について検討することにした。

DNA損傷に対しては様々な修復経路が存在していることが現在までに分っており、それらの分子機構についても急速に研究が進展している。しかしながら、これらの修復系を定量的に扱うことのできる実験系、特に培養細胞を用いたアッセイ系はミスマッチ修復系以外はほとんどないのが現状である。また、ミスマッチ修復系についても、特殊な細胞クローンを用いた系を使用していたり、実験に長期間要するなどの欠点がある。これらの現状から、我々は、独自に新たなアッセイ系を構築してHCV蛋白質のDNA修復能に対する影響を検討した。

胞を用いたアッセイ系はミスマッチ修復系以外はほとんどないのが現状である。また、ミスマッチ修復系についても、特殊な細胞クローンを用いた系を使用していたり、実験に長期間要するなどの欠点がある。これらの現状から、我々は、独自に新たなアッセイ系を構築してHCV蛋白質のDNA修復能に対する影響を検討した。

B. 研究方法

(1) マイクロサテライト配列を含む発現ベクターの構築。pCXpurレトロウイルスベクターのピューロマイシンresistant geneの5'側にCAの17回繰り返し配列をPCR法を利用して挿入した。この挿入によりピューロマイシンresistant geneのATGからの翻訳がすぐstopしてしまうようにアレンジされ、out of frameの状態になるようにした。従ってCA repeatのどこかで欠損や挿入が起こると、in frameとなりpuromycin resistant gene productが産生されるようになる予想される。このような原理を利用して以下に示すミスマッチ修復活性を培養細胞レベルでassayした。

(2) 培養細胞を用いたマイクロサテライト不安定性のアッセイ系。2 x 10⁵程度のヒト培養細胞に、前項で(CA) repeatを含むように作成したレトロウイルスベクターとパッケージング細胞としてBOSC23細胞を使う通常の方法によりRetrovirusを作成し、培養細胞に感染

させた。陽性コントロールとしては本来の pCXpur から作成したレトロウイルスを感染させ、陰性コントロールとして Mock infection を行った。レトロウイルス感染後 5 日程で confluent となることから、この時点でそれぞれの well に 1×10^5 細胞を分注して濃度が 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように Puromycin を添加した。さらにその後 14 日間培養し、Puromycin 抵抗性のコロニーの数を測定した。(CA) repeat を含むように作成したレトロウイルスベクターを使用した場合、複製エラーが正確にすべて修復されれば、すべての細胞が死滅するが、ある頻度で修復エラーが生じると、puromycin 抵抗性のコロニーが出現してくると予想され、その出現頻度は replication error + と - の細胞では異なるものと予想される。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いているので、特段の配慮はしていないが、レトロウイルス感染細胞については塩素系薬剤処理、UV 処理および高圧滅菌処理によりウイルスの不活化を行っている。

C. 研究結果

今回新たに構築したマイクロサテライト不安定性のアッセイ系の妥当性について検討した。(CA) repeat を含むように作成したレトロウイルスベクターを使用してマイクロサテライト不安定性のアッセイを行った場合、複製エラーが正確にすべて修復されれば、すべての細胞が死滅するが、ある頻度で修復エラーが生じると、puromycin 抵抗性のコロニーが出現してくると予想され、その出現頻度は replication error (RER) + と - の細胞では違ってくるかと予想されます。そこで、RER - とされるヒト大腸癌 SW480 細胞、ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞と RER+ とされるヒト大腸癌 LS174T 細胞や HCT116 細胞を用いてマイクロサテライト不安定性アッセイを行った。その結果、予想どおり、SW480 や HeLa 細胞では out of frame の pCXpur を用いた場合からの puromycin 耐性コロニーはほとんど得られなかったのに対して、LS174T や HCT116 細胞からは puromycin の濃度依存的に 10^2 レベルの耐性コロニーが得られた。

得られたこれらの colony が mismatches 修復エラーにより生じたものであるかどうかについても検討した。LS174T や HCT116 細胞を用いた場合に得られたコロニーを 10 個程度ランダムに選択して、これらのコロニーを 6-wells plate レベルまで増殖させ、ゲノム DNA 上に組み込まれた CA repeat の部分を高い proofreading

活性を有する KOD-plus polymerase を用いた PCR で増幅して、plasmid vector に cloning して sequencing を行い CA repeat の部分の塩基配列を解析した。その結果、LS174T 細胞の場合には解析した全 10 colony (各 colony につき最低 4 clone を解析) において、CA の 2 塩基が欠けたものが major になっていることが判った。まったく変わっていないものも 4 clone 得られたが、これはおそらく Retrovirus の Titer が高く、2 copy 感染したものと考えられた。1 clone のみであるが、(CA)13 の in frame になっているものも得られた。HCT116 細胞の場合にも、2 塩基欠失している colony が major であったが、20 塩基欠失例や逆に 4 塩基挿入例など多彩な in frame への変異パターンが確認された。これらの結果から、今回構築したマイクロサテライトアッセイ系がうまく機能していることを確認した。

このアッセイ系を用いて HCV 蛋白質存在時における影響を調べた。まず、ヒト不死化肝細胞株で HCV に感受性を示す PH5CH8 細胞に HCV のコアや NS5A 蛋白質を発現するように構築されたレトロウイルスベクター pCXbsr から作成したレトロウイルスを感染させ、プラストサイジンで 1 週間ほど selection して、恒常的にコア蛋白質や NS5A 蛋白質を発現している細胞をそれぞれ得た。Mock infection も含めて得られた 3 種類の細胞の増殖には違いがなかったことから、これらの細胞を使って、同様にマイクロサテライトアッセイを行った。その結果、コア蛋白質を発現している PH5CH8 細胞では NS5A 蛋白質を発現している細胞や Mock infection を行った細胞と比較して 2-3 倍多くの puromycin 耐性コロニーが得られた。

次に遺伝子型の異なるコア蛋白質についても同様の現象が起こるかどうかについて検討した。その結果、1b 型や 2a 型のコア蛋白質を発現させた場合のみ puromycin 耐性コロニーがコントロールより多く得られ、1a 型、2b 型、3a 型のコア蛋白質ではコントロールと同じであった。また、HCV の他の蛋白質である E1, E2, NS5A ではコア蛋白質のような作用は認められなかった。

D. 考察

肝発がんの要因の一つとして DNA 修復機能の低下があるのではないかと考え、HCV 蛋白質が DNA 修復能を抑制して発癌リスクを高めている可能性について検討した。我々が独自に開発したアッセイ系を用いて検討した結果、ヒト不死化肝細胞株 (PH5CH8) では、コア蛋白質が mismatches 修復系を抑制する効果があ