

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業(肝炎分野)

トランスジェニック・マウスを用いた
肝発がんメカニズムの解析

平成14年度 総括・分担研究報告書

東京大学 医学部

主任研究者 小池 和彦

平成15(2003)年4月

目 次

I. 総括研究報告

トランスジェニック・マウスを用いた肝発がんメカニズムの解析 -----	1
小池和彦	

II. 分担研究報告

1. C型肝炎ウイルストランスジェニックマウスの肝臓内シグナル伝達機構の 解析 -----	7
鈴木哲朗	
2. 肝炎・肝細胞癌における酸化ストレスの関与の解析 -----	15
塚本和久	
3. C型肝炎における脂質代謝異常と肝発癌機序の関連性の解析 -----	19
森屋恭爾	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	22
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	24
-----------------------	----

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

トランスジェニック・マウスを用いた肝発がんメカニズムの解析

主任研究者 小池和彦 東京大学医学部感染内科 助教授

研究要旨 肝脂肪化に引き続いて肝細胞癌を発生するC型肝炎ウイルス（HCV）コア遺伝子トランスジェニックマウスをモデルとして、肝発癌のメカニズムを検討した。C型肝炎における肝脂肪化の原因は、 β 酸化の障害に加えて肝細胞からのVLDLの分泌障害も要因であることが明らかとなった。ヒト患者においても、アポリポ蛋白を中心とした脂質代謝異常が存在することも明らかになった。また、コア蛋白はレチノイドX受容体 α と結合し、その機能を修飾していることも証明した。この現象はコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいても確認され、C型肝炎における脂質代謝異常から肝発癌へと至る病態のひとつの経路であることが示唆された。

分担研究者

鈴木哲朗 国立感染症研究所 主任研究官

塚本和久 東京大学医学部 助手

森屋恭爾 東京大学医学部 講師

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎、肝硬変そして肝細胞癌（肝癌）を引き起こし、我が国における肝癌発生の最大の原因であり、国民にとっての大きな脅威であるとともに、医療社会経済学的にも多大の負担をもたらしている。HCV感染症における肝発癌機序としては、肝炎による炎症説と肝炎ウイルスそのものによる直接発癌作用説の二つが考えられている。しかし、HCV感染症における肝発癌の特徴は、極めて高率な発癌率と多中心性発癌であるが、このことは炎症のみではHCV感染症における肝発癌

が説明できないことを示している。

私たちは、HCVが肝発癌に直接的に関与しているとの仮説のもとに、HCVのコードする蛋白が持つ肝発癌活性をトランスジェニックマウスの系を用いて検証してきた。これまでに樹立したHCV遺伝子導入トランスジェニックマウスのうち、コア遺伝子トランスジェニックマウスは、若齢においてヒト慢性C型肝炎の組織像の特徴の一つである肝脂肪化（steatosis）を呈した後、寿命の2/3を経て肝癌が発生し、ヒトにおける肝癌発生に酷似した病像を示している（Nature Med 4:1065-1068,1998）。すなわち、HCVの直接的な肝発癌活性を証明している。HCVコア蛋白のもつ肝発癌作用を中心として、HCVのもつ肝発癌作用、その機序を明らかにし、慢性C型肝炎患者における肝発癌抑制法の開発を目指す。

B. 研究方法

トランスジェニックマウス肝における組織学的変化をさらに詳細に、免疫組織染色、電子顕微鏡、免疫電顕により検討する。コア遺伝子トランスジェニックマウスにおける脂肪化について、小胞体、ゴルジ装置との関わりから特に詳細に検討する。

コア遺伝子マウス肝における活性酸素、抗酸化系の産生を検討し、さらに肝細胞内のミトコンドリア DNA および核 DNA 障害との関連を明らかにする。

トランスジェニックマウスの肝臓における細胞遺伝子発現の変化をマイクロアレイで検討する。また、サイトカイン、サイトカイン受容体、癌遺伝子、増殖因子、増殖因子受容体の発現も経時的に検討する。

ウイルス肝炎、肝発癌において酸化ストレスが重要な役割を果たすことが提唱されている。PAF (platelet activating factor)-AH (acetylhydrolase)は活性型の過酸化脂質を水解することにより酸化ストレスを軽減すると考えられている酵素であるが、一方その水解産物であるリゾリン脂質・酸化脂肪酸が酸化ストレスを惹起する可能性も示唆されている。PAF-AH、SOD などの抗酸化作用を有する酵素が肝炎・肝細胞癌発癌にどのような効果をもたらすか、を検討する前の準備研究として、本年度は PAF-AH の酸化ストレスに関する役割を詳細に検討した。

C. 結果

肝脂肪化を経て肝細胞癌を発生するC

型肝炎ウイルス・コア遺伝子導入トランスジェニックマウス (以下、コアマウス) を用いて研究を行なった。

(1) マウスとヒトのサンプルの解析によって、C型肝炎時に肝に蓄積する脂肪は、単純性脂肪肝の際に蓄積する脂肪とは組成が異なることが判明した。C型肝炎と脂肪代謝との関連性を示し、C型肝炎の病態の解明に繋がる結果といえる。

(2) コアマウスにおける肝脂肪化の原因のひとつは、肝からのVLDL(very low density lipoprotein)の分泌の低下にあることが明らかになった。これは、肝内のMTP(microsomal triglyceride transfer protein)活性の低下によることも明らかになった。

(3) コアマウスにおいては、組織学的な炎症像なしに活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) の発生が増加していることが判明した。C型肝炎における肝発癌のメカニズムのひとつと考えられる。また、コアマウス肝とヒト患者肝において、サイトカインTNF- α とIL-1 β の発現が増加していることもこの病態に関与していることも明らかとなった。

(4) コアマウスとヒトアポA2遺伝子トランスジェニックマウスを交配することにより、コアマウス肝中の脂肪が減少し、肝における活性酸素(ROS)の産生も減少した。コア蛋白がアポA2蛋白と結合して、肝からのコア蛋白の分泌を促すことが原因である。このことは、C型肝炎の肝病変と脂質の強い関連性を示すとともに、活性酸素発生の低下による肝発癌抑制という治療への道を切り拓くものである。

(5) C型肝炎ウイルス・コア蛋白によ

るレチノイドX受容体 α (RXR- α)への結合とその機能修飾が明らかになった。RXR- α のC型肝炎病態への関与が推定される。

(6) PAF-AHを過剰発現させたマウスの血清から精製したPAF-AHに富んだりポ蛋白を用いて、PAF-AHの1)酸化ストレスによる脂質過酸化に及ぼす効果、2)過酸化脂質によるマクロファージ泡沫化・脱泡沫化に及ぼす効果、を検討したところ、PAF-AHを過剰に含有するリポ蛋白は酸化ストレスに抵抗性を有し過酸化脂質の産生が抑制されること、過酸化脂質によるマクロファージの泡沫化を低下させること、が判明した。以上より、PAF-AHは、酸化ストレスによる生物学的作用を減弱させることが確認された。

D. 考察

HCVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては初期より脂肪肝が発生し、ヒトC型肝炎における肝細胞癌と同様に、マウスの寿命の後半において肝細胞癌が発生した。コア蛋白の発現によって、脂肪化と相まって肝内における活性酸素の発生が増強されていた。活性酸素の発生は、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝発癌の少なくとも一部には関与していると考えられる。

肝脂肪化すなわち脂質代謝障害は、肝発癌を含むC型肝炎の病態と密接に関連していることが推測される。VLDL分泌障害のみならず、 β 酸化障害、核内受容体との関わりがC型肝炎における脂質代謝障害を引き起こし、ひいてはC型肝炎の病態をもたらしていると考えられる。

E. 結論

肝脂肪化すなわち脂質代謝障害は、肝発癌を含むC型肝炎の病態と密接に関連していることが推測される。VLDL分泌障害のみならず、 β 酸化障害、核内受容体との関わりがC型肝炎における脂質代謝障害を引き起こし、ひいてはC型肝炎の病態をもたらしていると考えられる。C型慢性肝炎における肝発癌の機序解明に一步近づいたものと考えられる。なかでも、脂肪代謝とC型肝炎の病態の関連性は重要であり、C型慢性肝炎患者への栄養指導・服薬等によって、C型肝炎による肝不全・肝癌等の合併症の発生を減少させる可能性が示された。また、RXR- α への拮抗薬の開発によってC型肝炎の治療薬が開発され、肝癌患者の発生を減少させる可能性が示された。PAF-AHは、酸化ストレスによる生物学的作用を減弱させることが確認された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 16: 185-194, 2002.

2. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Retinoid X Receptor- α Modulates its Transcriptional Activity. *Hepatology* 35:937-946, 2002.
3. Koike K. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 37:55-64, 2002.
4. Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 17:394-400, 2002.
5. Koike K. Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine. *J Gastroenterol* 37:988-990, 2002.
6. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K. HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 42:1616-1617, 2002.
7. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice transgenic for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304:415-424, 2002.
8. Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis. *Oncology* 62: 29-37, 2002.
9. Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T. CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* 37: 665-673, 2003.
10. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 443-447, 2003.
11. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T., Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* 36: 1431-1438, 2002.
12. Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Kimura S, Koike K. Serum Lipid

- Profile of Patients with Genotype 1b Hepatitis C Viral Infection in Japan. *Hepatology* 25: 369-374, 2003.
13. Noto H. Hara M. Karasawa K. Iso-O N. Satoh H. Togo M. Hashimoto Y. Yamada Y. Kosaka T. Kimura S. Tsukamoto K. Human plasma platelet activating factor-acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* in press
 2. 学会発表
 1. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway. 9th Molecular biology of HCV and related viruses. San Diego 2002.
 2. Tsutsumi, T., Matsuda M., Moriya, K., Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Koike, K., Suzuki, T., and Miyamura, T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein. 9th Molecular biology of HCV and related viruses. San Diego 2002.
 3. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会, 2002 年 6 月, 大阪.
 4. 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子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 61 回日本癌学会総会. 2002 年 10 月, 東京.
 5. 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 肇, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上
 6. 新谷良澄、森屋恭爾、藤江 肇、堤 武也、三好秀征、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 38 回日本肝臓学会総会 (大阪) 2002.
 7. 新谷良澄、四柳 宏、森屋恭爾、木村 哲、小池和彦. HBs 抗原陰性 抗 Hbc 抗体陽性献血者の血清中には高率に HBV が存在する. 第 76 回日本感染症学会総会 (東京) 2002.4
 8. 堤武也、松田麻未、森屋恭爾、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、新谷良澄、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2002.1
 9. 小池和彦. モデル動物を用いた肝炎研究の話題. 第 6 回日本肝臓学会大会 (東京) 2002.10

- 1 0. 新谷良澄、四柳 宏、森屋恭爾、木村 哲、小池和彦. HBs 抗原陰性 抗 HBc 抗体陽性献血者の血清中には高率に HBV が存在する第 76 回日本感染症学会総会 (東京) 2002.4
- 1 1. 畠山修司、森澤雄司、大野信彦、塚田訓久、新谷良澄、太田康男、小池和彦、木村 哲. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の原因における大腸菌感染の意義に関する考察—大腸菌による腎盂腎炎に伴って一過性に PBC 様の病態を呈した 1 症例を通じて—第 76 回日本感染症学会総会 (東京) 2002.4
- 1 2. 糸山 智、畠山修司、森澤雄司、奥川 周、北沢貴利、塚田訓久、山口史子、上田久仁子、新谷良澄、太田康男、小池和彦、木村 哲. サイトロメガウイルス感染症による全身関節性痔疹を合併した HIV-1 感染症の 1 例. 第 76 回日本感染症学会総会 (東京) 2002.4
- 1 3. 小池和彦. B 型肝炎. 第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋) 2002.11
- 1 4. 貫井陽子、畠山修司、森澤雄司、塚田訓久、太田康男、小池和彦、木村 哲. サイトメガロウイルスによる AIDS cholangiopathy の 1 例. 第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋) 2002.11.
- 1 5. 菊池 嘉、小池和彦、矢崎博久、田沼順子、吉田久仁子、上田晃弘、川田真幹、本田美和子、源河いくみ、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、安岡 彰、岡 慎一、木村 哲. HIV, HCV 合併血友病患者に対する REG-ING α 2a とリバビリンの併用療法. 第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋) 2002.11
- 1 6. 能登洋, 唐沢健, 佐藤博亮, 東郷眞子, 原眞純, 磯尾直之, 橋本佳明, 木村 哲, 塚本和久. Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH) の抗動脈硬化作用に関する検討 第 34 回日本動脈硬化学会総会 2002 年 7 月, 神戸
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得なし。
 2. 実用新案登録なし。
 3. その他なし。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
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の肝臓内シグナル伝達機構の解析

分担研究者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部室長
協力研究者 堤 武也 東京大学医学部附属病院感染症内科
国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 C型肝炎患者はアルコール摂取によって肝炎の増悪、発癌率の上昇を引き起こすことが臨床的に知られているが、その分子機序は解明されていない。本研究では、エタノール含有食を3週間与えた HCV コア蛋白トランスジェニックマウスを用いて、肝臓内のシグナル伝達系に対するコア蛋白とエタノールの協調的影響を解析した。その結果、トランスジェニックマウスにエタノール含有食を与えると、正常食の場合に比べ、肝臓中の p38 MAPK, ERK が活性化され、その下流の転写因子である ATF-2, Elk-1 が結合する cyclic responsive element (CRE), serum responsive element (SRE)の活性化も認められた。C型肝炎患者の肝臓では、コア蛋白とエタノール刺激が協調的に MAPK 経路の活性化に働き、ROS の発生を昂進させ、肝疾患の進展に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

我々は、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ける細胞遺伝子発現の変化をサブトラクション法およびマイクロアレイ法で解析し、細胞増殖等に深く関わっている TNF α 、IL1 β の発現の増加を観察した。さらに、これらのサイトカインによって誘導される JNK-AP1-pathway がトランスジェニックマウスで活性化されていることを明らかにした。本年度は、エタノール含有食を3週間与えたトランスジェニックマウスを用いて、肝臓内のシグナル伝達系に対するコア蛋白とエタノールの協調的影響を解析した。

B. 研究方法

3カ月齢のトランスジェニックマウス

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、その上清を蛋白キナーゼ活性の測定に用いた。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調製した。各 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。定量的 PCR は TaqMan PCR を用い、primer, probe は Applied Biosystems 社の検索結果をもとに作製した。

C. 研究結果

まず、TNF- α , IL-1 β の発現量がトランスジェニックマウスにおいてどの程度増加しているかを詳細に検討するために、TaqMan PCR, ELISA によりそれぞれの mRNA 量、蛋白量を定量した。その結果、mRNA レベルで TNF- α は 2.4 倍、IL-1 β は 1.8 倍増加、蛋白レベルでは TNF- α は 1.9 倍、IL-1 β は 2.3 倍増加していることがわかった (表 1)。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 を活性化することが知られている。

そこで、正常食またはエタノール含有食を与えたマウスの肝臓内におけるこれらの蛋白キナーゼ活性を調べた。正常食摂取トランスジェニックマウスでは、JNK 活性の昂進が認められたが、p38 MAPK, ERK の活性はノントランスジェニックマウスと同程度であった (図 1)。一方、エタノール投与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。JNK 活性はノントランスジェニックマウスにおいてエタノール含有食を与えることにより活性の上昇が観察されるが、その活性レベルは、エタノール投与トランスジェニックマウスにおける活性と同等であった。すなわち、コア蛋白とエタノールの協調的な活性化効果は、p38 MAPK と ERK では認められ、JNK では認められなかった。

次にエタノール投与マウスにおいて p38 MAPK, ERK の下流に位置する転

写因子である ATF-2, Elk-1 の活性化を検討した。ATF-2 は CRE, Elk-1 は SRE と呼ばれる配列を認識し結合するため、これらの配列を含むオリゴ DNA をプローブとして gel shift assay を行った。その結果、エタノール投与マウスの肝臓において CRE, SRE の活性化の上昇が認められた (図 2)。一方、IKK-NF- κ B pathway についても検討を行ったが、エタノール投与マウスにおいても通常食マウス同様、IKK 活性、NF- κ B の活性化に変化は認められなかった。

D. 考察

HCV 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。さらに今回、このマウスモデルを用いた解析から、コア蛋白とエタノールが協調的に p38MAPK と ERK の活性化に働く可能性が示された。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。

臨床的に、C 型肝炎患者はアルコール摂取によって肝炎の増悪、発癌率の上昇を引き起こすことが知られているが、その分子機序は解明されていない。C 型肝炎患者の肝臓では、コア蛋白とエタノ

ール刺激が協調的に MAPK 経路の活性化に働き、ROS の発生を昂進させ、肝疾患の進展に関与しているのかもしれない。

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 が、mRNA レベル、蛋白レベルにおいていずれも有意に (約 2 倍程度) 増加していた。
2. 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、p38 MAPK, ERK の活性化、さらにその下流の転写因子である ATF-2, Elk-1 が結合する CRE, SRE の活性化が認められた。一方で IKK-NF- κ B pathway には変化が認められなかった。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T. CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* 37: 665-673 (2003).
2. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 443-

447 (2003).

3. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* 36: 1431-1438 (2002).
 4. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., and Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304: 415-424 (2002).
 5. Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35: 937-946 (2002).
- ##### 2. 学会発表
1. Suzuki T., Suzuki, R., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Molecular Determinants for the Subcellular Localization of HCV Core Protein. The 24th Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels, Tokyo, 2003.
 2. Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T. Production and release of

- infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.
3. Sasano, T., Shimoike, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Characteristic bases in HCV 5'UTR among genotypes identified by principal component and multidimensional scaling analyses.
 4. Suzuki R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Shimoike, T., Machida, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein.
 5. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway.
 6. Tsutsumi, T., Matsuda M., Moriya, K., Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Koike, K., Suzuki, T., and Miyamura, T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein.
 7. 堤武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会, 2002 年 6 月, 大阪.
 8. 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子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 61 回日本癌学会総会. 2002 年 10 月, 東京.
 9. 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男. 弱毒ワクシニアウイルス DIs を用いた C 型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 第 50 回日本ウイルス学会総会. 2002 年 10 月, 札幌.
 10. 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男. HCV レプリコン活性に關与する宿主因子の検索. 同上.
 11. 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.
 12. 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 肇, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上
 13. 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治. PA28 γ によるC型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 第 25 回日本分子生物学会. 2002 年 12 月, 横浜.
 14. 亀岡洋祐, Persad Amanda, 小池和彦, 堤 武也, 松浦知和, 須藤 勉, 井出達也, 田中一雄, 佐田通夫, 日野邦彦, 神代正道, 橋本雄之, 宮村

- 達男、鈴木哲朗. G型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索. 同上.
15. Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway. 9th Molecular biology of HCV and related viruses. San Diego 2002.
16. Tsutsumi, T., Matsuda M., Moriya, K., Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Koike, K., Suzuki, T., and Miyamura, T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein. 9th Molecular biology of HCV and related viruses. San Diego 2002.
17. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会, 2002 年 6 月, 大阪.
18. 堤 武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江 肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子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 61 回日本癌学会総会. 2002 年 10 月, 東京.
19. 堤 武也、松田麻未、森屋恭爾、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上
20. 新谷良澄、森屋恭爾、藤江 肇、堤 武也、三好秀征、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 38 回日本肝臓学会総会 (大阪) 2002.
7. 新谷良澄、四柳 宏、森屋恭爾、木村 哲、小池和彦. HBs 抗原陰性 抗 HBc 抗体陽性献血者の血清中には高率に HBV が存在する. 第 76 回日本感染症学会総会 (東京) 2002.4
8. 堤武也、松田麻未、森屋恭爾、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、新谷良澄、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男. C 型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2002.10
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

表1. トランスジェニックマウスの肝臓における TNF- α 、IL-1 β の発現量の比較

mRNA

	Transgenic mice (n=6)	Nontransgenic mice (n=6)	p*
TNF- α	1.30 (± 0.74) $\times 10^{-2}$ †	0.54 (± 0.13) $\times 10^{-2}$	<0.05
IL-1 β	2.25 (± 0.72) $\times 10^{-2}$	1.24 (± 0.24) $\times 10^{-2}$	<0.05

* Mann-Whitney's *U* test.

values are expressed in mRNA copy numbers quantified by real-time PCR, followed by normalization against levels of GAPDH (mean \pm SE).

protein

	Transgenic mice (n=7)	Nontransgenic mice (n=7)	p*
TNF- α	600.5 (± 311.0) †	323.4 (± 114.6)	<0.05
IL-1 β	1387.3 (± 565.8)	610.6 (± 160.6)	<0.05

* Mann-Whitney's *U* test.

† pg/mg total proteins (mean \pm SE).

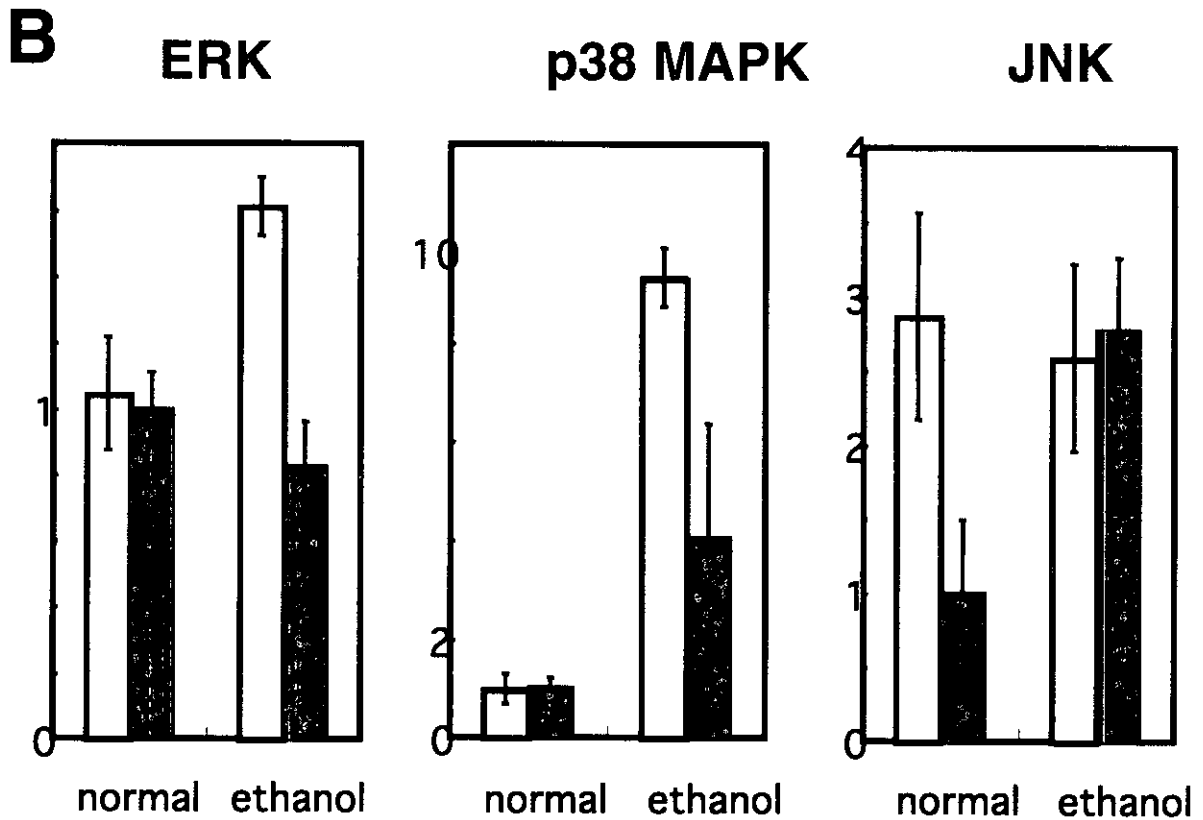
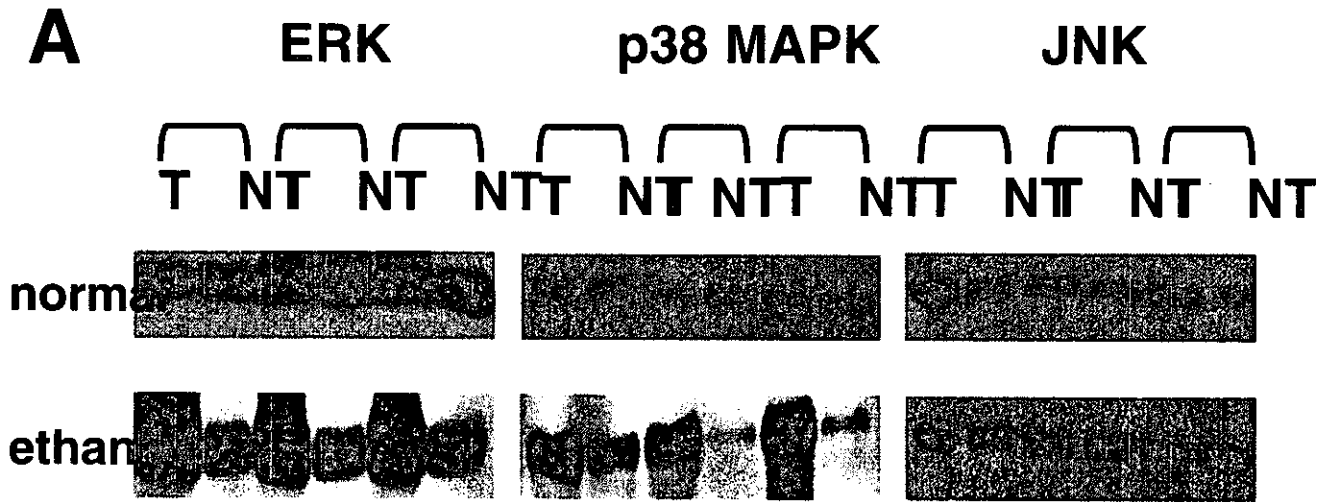


図 1 .コア蛋白トランスジェニックマウスの肝臓中でのMAPK活性

(A) T: トランスジェニック, NT: ノントランスジェニック, normal: 正常, ethanol: エタノール食. (B) white box: トランスジェニック, black box: ノントランスジェニック. Means ± SE.

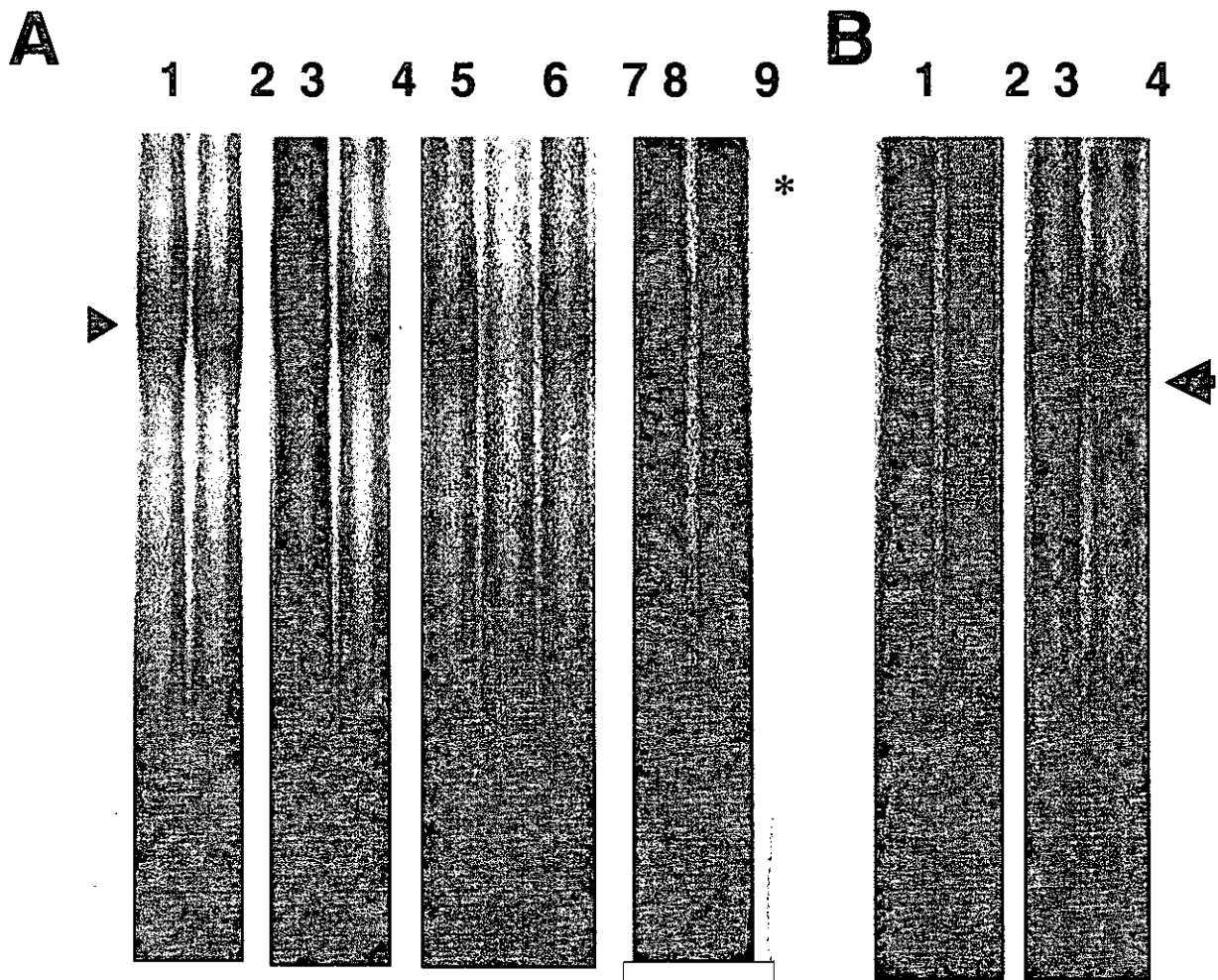


図 2. トランスジェニックマウス肝臓中での転写因子の活性化

(A) CRE activity. Lane 1: 正常食／トランスジェニック. 2: 正常食／ノントランスジェニック. 3: エタノール食／トランスジェニック. 4: エタノール食／ノントランスジェニック. 5-7: competition assay. 8, 9: supershift assay. (B) SRE activity. Lane 1: 正常食／トランスジェニック. 2: 正常食／ノントランスジェニック. 3: エタノール食／トランスジェニック. 4: エタノール食／ノントランスジェニック

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝炎・肝細胞癌における酸化ストレスの関与の解析

分担研究者 塚本 和久 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 助手

研究要旨 発癌、ウイルス肝炎など、様々な疾患において酸化ストレスが重要な役割を果たすことが提唱されている。PAF-AHは活性型の過酸化脂質を水解することにより酸化ストレスを軽減すると考えられている酵素であるが、一方その水解産物であるリゾリン脂質・酸化脂肪酸が酸化ストレスを惹起する可能性も示唆されている。PAF-AH、SODなどの抗酸化作用を有する酵素が肝炎・肝細胞癌発癌にどのような効果をもたらすか、を検討する前の準備研究として、本年度はPAF-AHの酸化ストレスに関する役割を詳細に検討した。PAF-AHを過剰発現させたマウスの血清から精製したPAF-AHに富んだりポ蛋白を用いて、PAF-AHの1)酸化ストレスによる脂質過酸化に及ぼす効果、2)過酸化脂質によるマクロファージ泡沫化・脱泡沫化に及ぼす効果、を検討したところ、PAF-AHを過剰に含有するリポ蛋白は酸化ストレスに抵抗性を有し過酸化脂質の産生が抑制されること、過酸化脂質によるマクロファージの泡沫化を低下させること、が判明した。以上より、PAF-AHは、酸化ストレスによる生物学的作用を減弱させることが確認された。これらの知見を踏まえ、肝炎・肝細胞癌発癌に対する効果を検討していく予定である。

A. 研究目的

発癌、炎症、動脈硬化症、腎疾患など、様々な疾患において酸化ストレスは重要な役割を果たすことが提唱されている。

スーパーオキシドをはじめ、酸化ストレスを引き起こす物質は各種存在するが、その中でも過酸化脂質は強力なメディエーターであることが知られている。PAF-AH (PAF acetylhydrolase)は、元来炎症のメディエーターであるPAFを水解して不活化する酵素として発見され

た酵素である。近年、PAF-AHは過酸化脂質をも水解して生物学的に活性のある過酸化脂質を不活化することが明らかとなっており、SOD (super-oxide dismutase)などと並んで酸化ストレス改善に重要であることが唱えられている。しかし、一方でPAF-AHの作用で生じるリゾリン脂質や酸化遊離脂肪酸は、酸化ストレスを惹起する可能性がある。

本年度は、最終研究目的である肝炎・肝細胞癌発癌に対する効果を検討する準備研究として、PAF-AHが生理学的に

酸化ストレスをどのように修飾するのかを検討した。

B. 研究方法

野生型マウスおよび高脂血症のモデル動物であるアポ E 欠損マウスに、PAF-AH をコードするアデノウイルスベクター (AdPAFAH) あるいはコントロールアデノウイルス (AdLacZ: β -galactosidase をコードするベクター) を尾静脈より投与 (3×10^9 pfu/個体) し、蛋白発現が最大となるウイルス投与後 3 日目の血清を採取して各リポ蛋白を超遠心法で分離・精製した。野生型マウスからは HDL を精製し、マウスマクロファージ系 RAW 264.7 細胞に対する泡沫化・脱泡沫化実験に用いた。マクロファージ泡沫化には、ヒトから精製した LDL を酸化して酸化 LDL を作成して行った。アポ E 欠損マウスからは VLDL, IDL, LDL, HDL を精製した後、 CuSO_4 含有溶液と孵置してジエンの形成をモニターして lag time を計測し、各リポ蛋白の被酸化能を検討した。

C. 研究結果

ウイルス投与後 3 日目に、血中の PAF-AH 活性はベースラインの約 70-140 倍に上昇した。PAF-AH 蛋白はすべてのリポ蛋白分画に存在していた。

PAF-AH を過剰に含有するリポ蛋白は CuSO_4 による酸化刺激反応に対して抵抗性であり、酸化の指標となる lag time の延長がすべてのリポ蛋白で認められた (図 1)。

マクロファージに酸化 LDL および HDL を同時に添加してその泡沫化を検討したところ、PAF-AH を過剰

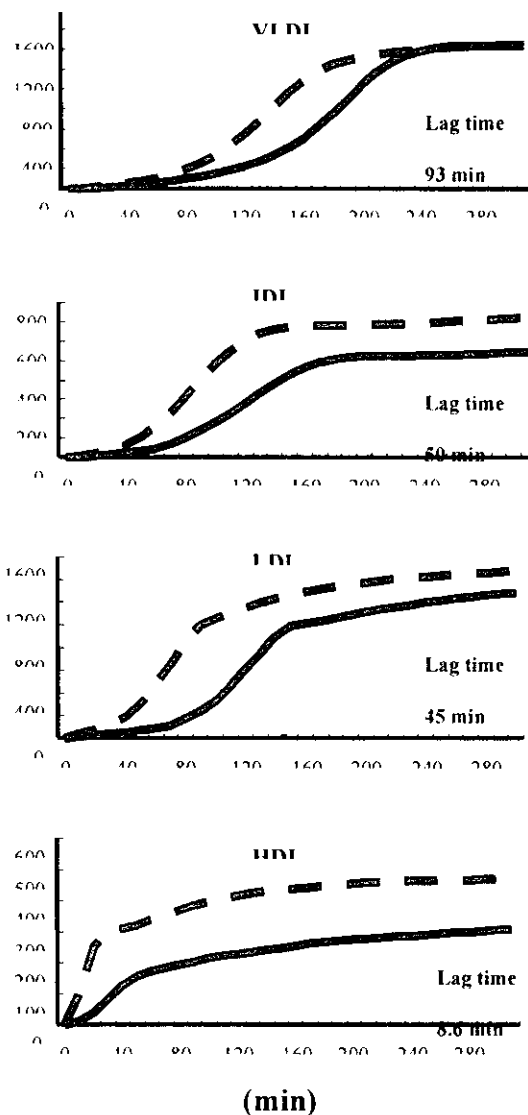


図 1. アポ E 欠損マウスから精製した各リポ蛋白を CuSO_4 含有溶液と孵置し、形成されてくるジエンを OD でモニターした。X 軸は mOD を示す。破線がコントロールリポ蛋白、実線が PAF-AH を含有するリポ蛋白。Lag time の値は、上段に正常コントロール、下段に PAF-AH 含有リポ蛋白の値を示す。

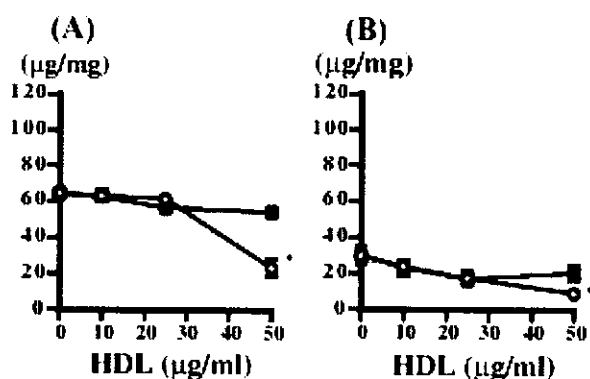


図2. PAF-AH 含有 HDL による RAW264.7 細胞の泡沫化および脱泡沫化。■: コントロール HDL; ○: PAF-AH 含有 HDL。(A) 泡沫化実験、酸化 LDL と HDL (濃度をふって検討) を同時に添加して、細胞内コレステロールエステル量を検討した。(B) 脱泡沫化実験、酸化 LDL にて泡沫化させた後、HDL を添加して細胞内コレステロールエステル量を検討した。X 軸は添加した HDL 量。Y 軸は、細胞内コレステロールエステル量。_: $P < 0.05$ 。

に含有する HDL はコントロールの HDL と比較してマクロファージの泡沫化を抑制した (図 2(A))。さらに、マクロファージを酸化 LDL にて泡沫化後、HDL を添加して脱泡沫化を検討したところ、PAF-AH を過剰に含有する HDL はコントロール HDL と比較して細胞内コレステロールエステル量を有意に減少させた (図 2(B))。なお、コレステロール引き抜きに参与する ABCA1 の発現を亢進させる β -DX を添加しない条件下では、PAF-AH 過剰含有 HDL でも細胞内コレステロール量の減少は見られなかった。

D. 考察

酸化ストレスは、肝炎、発癌のみならず、腎炎、動脈硬化発症・進展に重要な役割を担うと考えられている。今回の研究は、PAF-AH の生理学的機能の解

明を行う目的で、その脂質過酸化に対する効果を検討するとともに、細胞レベルでの検討を行う目的に動脈硬化発症のきっかけとなるマクロファージ泡沫化を指標として検討を行った。

リポ蛋白を CuSO_4 含有溶液にて孵置した酸化刺激実験から、PAF-AH は現在まで言われてきた過酸化脂質を水解する作用以外に、脂質の酸化自体をも抑制する作用を有することが判明した。また、酸化 LDL と同時に HDL を孵置してマクロファージの泡沫化を検討する実験を行ったところ、PAF-AH を過剰に含有する HDL はコントロール HDL と比較して泡沫化を抑制した。このことから、PAF-AH が過酸化脂質を水解して不活性の脂質に変えることにより酸化ストレスを軽減する作用の方が、PAF-AH の作用にて出現するリゾリン脂質や酸化遊離脂肪酸による酸化ストレス増強作用よりも強力であることが推察された。さらに、泡沫化細胞からのコレステロール引き抜き作用が PAF-AH 過剰含有 HDL において強力であることより、PAF-AH が HDL を保護して、泡沫化マクロファージから受ける酸化ストレスによる HDL の機能低下を抑制することが判明した。

これらのことは、PAF-AH が酸化ストレスに対して抗する作用を発揮することを示している。この研究結果を踏まえ、次年度は PAF-AH 発現による肝炎保護作用、及び肝細胞癌発癌に対する作用を検討していく予定である。さらに、SOD を過剰発現させることによる肝炎・肝細胞癌発癌に対する作用も検討することとしている。

E. 結論

PAF-AH は、過酸化脂質水解による

酸化ストレス減弱作用を有するのみならず、酸化ストレスによる脂質過酸化抑制作用をも有しており、さらには HDL の抗動脈硬化的作用も保護する機能があることが判明した。これらの事実を踏まえ、肝炎・発癌に対する作用を今後検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Noto H. Hara M. Karasawa K. Iso-O N. Satoh H. Togo M. Hashimoto Y. Yamada Y. Kosaka T. Kimura S. Tsukamoto K. Human plasma platelet activating factor-acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* in press

2. 学会発表

1. 能登洋, 唐沢健, 佐藤博亮, 東郷眞子, 原眞純, 磯尾直之, 橋本佳明, 木村哲, 塚本和久 Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH)の抗動脈硬化作用に関する検討 第34回日本動脈硬化学会総会 2002年7月, 神戸

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。