

厚生労働科学研究研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

**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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成15（2003）年 3月

**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**

**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         |
|    | 下遠野邦忠 | 京都大学ウイルス研究所                     | 教授         |
| 班員 | 加藤宣之  | 岡山大学大学院医歯学総合研究所<br>腫瘍制御学講座分子生物学 | 教授         |
|    | 小原道法  | 東京都臨床医学総合研究所・生体防御研究部門           | 室長         |
| 班友 | 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<br>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二番二号  
Tel: 06-6879-3441  
Fax: 06-6879-3449

## 目 次

### I. 総括研究報告書

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・ 1  
林 紀夫

### II. 分担研究報告

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 ..... 11  
下遠野 邦忠
2. 遺伝子型 2a の C型肝炎ウイルスレプリコンの樹立 ..... 15  
脇田 隆字
3. C型肝炎ウイルス感染系の確立と増殖制御に関する研究 ..... 17  
小原 道法
4. 動物モデルを用いた肝発癌に関する研究 ..... 18  
小池 和彦
5. コホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解明 ..... 21  
坪内 博仁
6. 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 ..... 23  
金子 周一
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 ..... 26  
森脇 久隆
8. 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 ..... 28  
岡本 宏明
9. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の DNA 修復系への影響と  
ISRE の活性化作用に関する研究 ..... 32  
加藤 宣之
10. C型肝炎の病態・治療における樹状細胞サブセットの意義 ..... 37  
林 紀夫
11. C型慢性肝炎への Rib/IFN 投与時の HCV dynamics と  
Th1/Th2 cytokine, chemokine receptor ..... 38  
岡上 武
12. C型肝炎ウイルス感染における樹状細胞機能低下の分子機構：  
1型インターフェロンによる KNG2D 活性化リガンド MICA/B の発現誘導の解析・ 44  
林 紀夫

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 50

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 63

# I .総括研究報告書

厚生労働科学研究費  
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）  
総括研究報告

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

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学 教授

研究要旨：3年計画の2年目にあたる平成14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制御機構の解析、2) HCVを感染あるいは発現する動物モデルの開発とその解析、3) C型肝炎患者における遺伝子発現プロファイルの解析、4) C型肝炎における樹状細胞機能の解析、5) 肝癌の分子生物学的特性の解析等を軸に研究を行った。HCVコア蛋白は核内受容体の modulation、DNA修復機構やβ酸化の抑制を介して多彩な細胞機能に影響を与えることが示された。また、新たなHCV増殖システムとして遺伝子型2aのレプリコンおよびツパイにおける感染系を樹立した。C型肝炎においては樹状細胞機能の多彩な変調が認められ、その一つのメカニズムとして1型IFNによるNKG2D活性化リガンドMICA/Bの発現欠損が関与していることが示された。また、IFN/Riba治療効果とHCV RNA dynamicsとの間には密接な関連があることが示された。肝癌については、遺伝子発現プロファイルの比較検討により、C型肝炎からの発癌はB型肝炎からの発癌とメカニズムが異なることが示された。肝癌ではRXRαのリン酸化がおこっており、これがdominant negativeに働くことにより、レチノイドに対する反応性を低下させ、発癌に関与していることが示唆された。

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型慢性肝炎に対する現在最も有効な治療はIFNとリバビリンの併用療法であるが、C型慢性肝炎の約1/3はこれらの治療法にも抵抗性であり、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癌の発生を抑止するためには、C型肝炎患者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 感染に伴う肝発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発癌は成立しない。言い換えれば、これらの3点はいずれも独立した C 型肝疾患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発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ようとするものである。本研究を遂行することにより、C 型肝炎ならびに肝発癌に対する新しい治療戦略が提唱できるものと考えられる。

## 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

**遺伝子型 2a の HCV 増殖システムの開発：**遺伝子型 2a の HCV cDNA を劇症肝炎および慢性肝炎患者よりクローニングし、これをもとにレプリコン RNA を作製し Huh7 に導入した。

**HCV 複製の細胞内環境の解析：**HCV の部分ゲノムが効率よく自己複製する細胞株を

用いて、ウイルス蛋白質の細胞内局在を検討し、界面活性剤処理後に *in vitro* の検討を行った。

**HCV コア蛋白と DNA 修復に関する検討：**昨年度に開発したマイクロサテライト不安定性を測定できる実験系を用いて、コア蛋白が DNA 修復系に与える影響を解析した。

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

**トランスジェニックマウスを用いた解析：**HCV コア遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いて、肝発癌のメカニズムを解析した。

**ツパイにおける HCV 感染モデルの作成：**HCV の全長 cDNA クローンから再構成したウイルスをツパイに感染させ、感染の様態と病原性の評価を行った。

3) C 型肝炎における遺伝子発現プロファイルの解析

**遺伝子発現プロファイルの解析：**正常肝組織、HCV 感染慢性肝炎、HCV 関連肝細胞癌、HBV 感染慢性肝炎、HBV 関連肝細胞癌について RNA を調整し、SAGE 法を用いて解析した。

4) C 型肝炎における樹状細胞機能の解析  
**HCV dynamics と Th1/Th2 サイトカインの解析：**IFN/Riba 療法を行った C 型慢性肝炎患者について治療開始 1 ヶ月、3 ヶ月後の HCV RNA 陰性化に影響を与える因子について検討した。

**樹状細胞サブセットおよびその機能解析：**C 型慢性肝炎患者の末梢血より lineage marker および HLA-DR を用いて、DC1、DC2 を同定し、FACS 解析および sorting により機能解析を行った。

**樹状細胞の免疫制御機構の解析：**末梢血の単球分画より GM-CSF および IL-4 を用いて樹状細胞を誘導した。各種刺激の上、MICA/B の発現を FACS 解析し、NKG2D 陽性のヒト末梢血 NK 細胞を用いて、活性化能を検討した。

5) その他

**肝癌におけるレチノイン酸に対する反応性に関する研究：**ヒト肝癌細胞株を用いてレチノイドレセプターの一つである RXR $\alpha$  の Erk によるリン酸化、およびその機能におよぼす非環式レチノイドの効果、Ras/Erk 系の活性・MAP kinase phosphatase 1 (MKP1) の発現・RXR $\alpha$  のリン酸化および転写活性・下流遺伝子である STAT1 の発現・細胞増殖・apoptosis 誘導を指標に解析した。

**HCV 粒子に対する抗体に関する研究：**免疫沈降法および HCV RNA 定量測定法を用いて、HCV 感染回復期血清中の HCV 粒子に対する抗体の測定法の特異性について検討した。

**コホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解析：**HCV 抗体陽性 T 町住民 1,083 名を追跡調査し、肝機能持続正常者群と持続異常群に分けて、年齢、性、HCV コア抗原量、HCV 群別および HCV コア領域の quasispecies の比較を行った。

### 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

**遺伝子型 2a の HCV レプリコンの樹立：**遺伝子型 2a の HCV レプリコンの作成に初めて成功した。劇症肝炎患者から作成したレプリコンは高効率に複製したが、慢性肝炎患者から作製したものは複製効率が不良で

あった。今回作成したレプリコンは、今後 1b 型と 2a 型の増殖機構の差異を検討するために有用であり、また高効率なレプリコンと効率の悪いレプリコンの差異を検討することにより 2a 型の増殖に重要な遺伝子配列を明らかにすることができると考えられる。

**HCV 複製の細胞内環境の解析：**ウイルス蛋白質の複製複合体は小胞体膜状に局在しており、細胞膜を界面活性剤で処理して細胞質の可溶性画分を除いても複製が効率よくおこることを見出した。また、HCV コア蛋白が核内受容体依存的な転写を活性化することを明らかにした。

**HCV コア蛋白と DNA 修復に関する検討：**HCV コア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性の増強効果を測定できる実験系がレプリコン細胞などにおいても可能であるかどうかを検討し、培養細胞を用いた塩基除去修復活性を測定できる実験系の構築を行った。HCV コア蛋白質が ISRE を介して IFN により発現誘導される遺伝子を活性化すること、またこの活性化にはコア蛋白質の N 末端 20 アミノ酸が必須であることを明らかにした。また、コア蛋白質は ISRE の consensus 配列よりも 2'-5'-OAS 遺伝子に存在するような variant 配列に対して強く作用することを見出した。

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

**トランスジェニックモデルを用いた解析：**HCV コアトランスジェニックマウスでは  $\beta$  酸化の障害とともに肝細胞からの VLDL の分泌障害が認められた。また、コア蛋白は RXR $\alpha$  と結合し、その機能を修飾していた。本モデルは C 型肝炎コア蛋白、肝脂肪化、そして発癌の密接な関連を個体レベルで解



析していく上で極めて有用であると考えられる。

**ツパイを用いた HCV 感染モデルの作成：**  
HCV の全長 cDNA clone から再構成したウイルスをツパイに感染させることにより、長期にわたってウイルス血症が持続し、慢性肝炎から肝硬変へと進展した。本モデルは HCV の持続感染機序や病態形成を解明する上で、有用なモデルとなることが期待される。

### 3) C 型肝炎における遺伝子発現プロファイルの解析

SAGE を用いて正常肝、HCV および HBV 感染慢性肝炎および関連肝細胞癌の包括的な発現遺伝子プロファイルを作成した。HCV と HBV は、臨床的には慢性肝炎あるいは肝硬変を引き起こし、肝細胞癌を合併するが、その過程で発現している遺伝子は異なっていたことから、発癌にいたる機序も異なっている可能性が示唆された。本研究により、今後 HCV 発癌に関連する遺伝子を解析するためのデータベースが整備された。

### 4) C 型肝炎における樹状細胞機能の解析

**HCV dynamics と Th1/Th2 サイトカインの解析：**IFN/Riba 投与開始 1 ヶ月後に HCV RNA が陰性化した症例では陰性化しなかった症例に比べて 1st phase、2nd phase の HCV RNA の半減期は有意に短かった。IFN/Riba 投与 24 時間後の HCV RNA 量の 1 log 以上の減少は 1 ヶ月後、3 ヶ月後の HCV RNA 陰性化の予測に有用であった。IFN/Riba 療法中の Th1/Th2 バランスの変化は、1 ヶ月後、3 ヶ月後の HCV RNA 陰性化および、3 ヶ月後陽性の 3 群間で明らかな差を認めなかった。

**樹状細胞と Th1/Th2 バランスの解析：**C 型肝炎患者では DC の数と機能が健常者に比し低下していた。また、単球より誘導した樹状細胞を用いて、CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* で刺激し IFN $\gamma$  の産生により Th1 誘導能を検討すると、C 型肝炎患者では健常者に比し樹状細胞の Th1 誘導能が明らかに低下していた。この Th1 誘導能の低下は IFN 添加では改善しなかったが、IFN と Riba の添加により正常者と同レベルまで改善した。今後、Th1/Th2 バランスと IFN 治療効果との関連をより詳細に解析する必要があると考えられる。

### 樹状細胞における MICA/B の発現と 1 型

**IFN に対する低反応性の解析：**ヒトの単球分画より誘導した樹状細胞は 1 型 IFN の刺激により MICA/B を発現し、これが NK 細胞に発現している NKG2D を活性化することを見出した。C 型慢性肝炎患者では 1 型 IFN による MICA/B の発現が特異的に欠損していた。これは C 型慢性肝炎患者にみられる樹状細胞機能の低下の分子機序の一端をはじめ示したものであり、今後この機序を解明することにより C 型肝炎でみられる IFN 低反応性を回復する治療法の開発につながることを期待される。

### 5) その他

**肝癌におけるレチノイン酸に対する反応性に関する研究：**肝癌においては RXR $\alpha$  が Erk によりリン酸化されており、dominant negative に作用していた。非環式レチノイドは Ras/Erk 系の活性を阻害することにより RXR $\alpha$  のリン酸化を抑制し、機能を回復させた。さらにこれにより RXR/RAR の下流にある STAT1 の転写誘導を回復させ、IFN に対する反応性を回復させた。以上の

ことより、非環式レチノイドはレチノイド不応性となった肝細胞癌のレチノイド感受性を回復させることにより治療効果を発揮することが示唆された。

**HCV 粒子に対する抗体に関する研究:** HCV 感染回復期血清中に、HCV の E2 蛋白超可変領域 (HVR) のアミノ酸配列を担うペプチドと反応する抗体が存在すること、そして回復期血清より精製した HVR 抗体が HCV 粒子と結合し得ることを免疫沈降法および免疫電顕法により証明した。このようなことから、免疫沈降法による HCV 粒子に対する抗体測定法は特異的であることが示唆された。

**コホートを用いた HCV による肝細胞障害機序の解析:** HCV による肝細胞障害の要因として、男性、HCV 群別のグループ 1 が関与すると考えられたが、ウイルス量や年齢は影響しなかった。

#### D. 結論

昨年度に引き続き、HCV 感染が宿主細胞におよぼす影響を細胞レベルおよび個体レベルで解析を行った。HCV コア蛋白は、核内受容体に結合し、これが転写活性を抑制する未同定の蛋白質を拮抗阻害することにより、転写活性を亢進することが見出されている。核内転写因子により活性化される細胞側因子は多岐にわたっており、宿主細胞機能に多彩な影響を与えていることが推察される。また、コア蛋白質はβ酸化や VLDL の分泌を阻害することにより肝細胞の脂肪化を引き起こし、また DNA 修復機構に影響を与えることにより癌化に関連することが示唆されている。また、HCV の増殖系としては、新たに遺伝子型 2a のレプリコンとツ

パイにおける感染モデルの作成に成功しており、増殖そのものが細胞や臓器に与える影響をより直接的に検討する際に有用なモデルとなることが期待される。

免疫学的な検討としては、C 型肝炎において樹状細胞の数と機能が低下しているという現象を、昨年度に引き続き、症例数を増やして解析しており、このような変化と病態あるいは IFN 治療効果との関連を明らかにできるレベルに達してきている。注目されるのは、樹状細胞機能低下の一つの要因として、1 型 IFN により誘導される樹状細胞の MICA/B の発現が完全に欠損していることを見出したことである。すなわち、樹状細胞は 1 型 IFN の存在下において MHC class I 関連分子である MICA/B を発現するようになり、これが NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞、γδT 細胞、NKT 細胞などに発現している NKG2D を活性化することにより、多彩な免疫調節作用を示すが、この発現が C 型肝炎患者では完全に欠損していた。これは C 型肝炎における IFN に対する低反応性を考えるうえで興味ある知見であり、より詳細に分子機構を解明することにより、IFN 治療難治例の病態解明や新規の治療法の開発につながることを期待される。

肝癌に関しては遺伝子発現プロファイルのデータベース化がなされており、C 型肝炎関連肝癌の遺伝子発現プロファイルは B 型肝炎ウイルス関連肝癌のそれとは異なることから、発癌のメカニズムそのものも異なることが示唆されている。肝癌細胞では核内受容体である RXRα のリン酸化がおこっており、これが dominant negative に働きレチノイドに対する反応性が低下していることが示されている。臨床応用が期待されて

いる非環式レチノイドはこのリン酸化を抑制することによりその効果を示すと考えられる。その他にも、HCV RNA dynamics より IFN/Riba 治療効果を予測する試み、コホートを用いた HCV の肝細胞障害機序、HCV 中和抗体の研究など数多くの成果が得られている。

#### E. 研究発表

1. Ueda Y., Hijikata M., Takagi S., Takada R., Takada S., Chiba T., and Shimotohno K., Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphological change in rodent fibroblasts, *Int. J. Cancer*, 99: 681-688, 2002.
2. Masui O, Ueda Y, Tsumura A, Koyanagi M, Hijikata M, Shimotohno K. RelA suppresses the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability. *Int. J. Mol. Med.* 9:489-493, 2002.
3. 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.
4. Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation., *J Gastroenterol.* 37: 50-54, 2002.
5. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Takada R, Takada S, Chiba T, Shimotohno K. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int J Cancer.* 99 : 681-688, 2002.
6. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* (2003) in press.
7. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. The replication of subgenomic RNA derived from MT-2C cells infected with hepatitis C virus in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2002) 293, 993-999.
8. Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Res.* (2002) 24, 228-235.
9. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 107-110.
10. Alam, S. S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouse, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 141-147.
11. Yasushi Shimoda, Youichi Tajima, Michinori Kohara, akashi Yutaka Sanai. Pax-6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating 1,3-fucosyltransferase IX expression. *J. Biol. Chem.* (2002) 277:2033-2039.
12. Takahito Kashiwagi, Koyu Hara, Michinori Kohara, and Tetsuya Toyoda. Kinetic analysis of C-terminally truncated

- RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(2002) 290:1188-1194.
13. Okayama, S.O.Stuver, E.Tabor, N.Tachibana, M.Kohara, N.E.Mueller and H.Tsubouchi. Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan. *J. Viral Hepatitis* (2002) 9:43-51.
  14. Takahito Kashiwagi, Koyu Hara, Michinori Kohara, and Tetsuya Toyoda. Promoter/ origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome. *J. Biol.Chem.*(2002) 277:28700-28705.
  15. Yoshiko Mizukawa, Yoshimi Yamazaki, Hideko Nuriya, Michinori Kohara and Tetsuo Shiohara. Direct Evidence for IFN $\gamma$  Production by Effector-Memory-Type Intraepidermal T Cells Residing at an Effector Site of Immunopathology in Fixed Drug Eruption: A Model for Epidermal Injury Mediated by Skin Resident T Cells. *J.Amer.Patho.* (2002) 161:1337-1347.
  16. Takafumi Yoshida, Toshikatsu Hanada, Ken-ichiro Kosai, Michio Sata, Michinori Kohara, and Akihiko Yoshimura. Activation of STAT3 by the Hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J.Exp.Med.* (2002) 196:641-653.
  17. Shun Takaku, Yohko Nakagawa, Isao maruyama, Michinori Kohara and Hidemi Takahashi. Induction of hepatic injury by HCV structural protein-specific CD8 $^{+}$  class I MHC molecule-restricted murine CTLs in transgenic mice expressing the HCV structural genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) in press.
  18. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38(1) 32-38, 2003.
  19. Okanoue T, Itoh Y, Kirishima T, et al. Transient biochemical response in interferon therapy decreases the development of hepatocellular carcinoma for five years and improves the long-term survival of chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 23(1):62-77, 2002.
  20. Itoh Y, Morita A, Nishioji K, et al. 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(5); 341-8, 2001.
  21. Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, et al. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 123(2); 271-279, 2001.
  22. K Kawaguchi, S Kaneko, M Honda, H Kawai, Y Shirota, K Kobayashi. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using a DNA microarray method. *J Clin Microbiol* (in press).
  23. Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A\*2402 peptide tetramers. *J. Med. Virol.* (in press)
  24. Y Nakamoto, S Kaneko, H Fan, T Momoi, H Tsutsui, K Nakanichi, K Kobayashi, T Suda. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp.Med* 198(8): 1105-1111,

- 2002
25. K Masutomi, S Kaneko, M Yasukawa, K Arai, S Murakami, K Kobayashi. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002.
  26. Y Shirota, H Luo, W Qin, S Kaneko, T Yamashita, K Kobayashi, S Murakami. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277: 11149-11155, 2002.
  27. Keiji, S Kaneko, K Kobayashi. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J Hepatol* 37: 231-239, 2002
  28. Y Nakamoto, S Kaneko, K Kobayashi. Increased susceptibility to apoptosis and attenuated Bcl-2 expression in T lymphocytes and monocytes from patients with advanced chronic hepatitis C. *J Leukocyte Biol* 72: 49-55, 2002
  29. K Arai, K Masutomi, S Khurts, S Kaneko, K Kobayashi, S Murakami. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for its oligomerization and telomerase activity. *J Biol Chem* 1-6, 2002.
  30. T Shimazaki, M Honda, S Kaneko, K Kobayashi. Inhibition of Internal ribosomal entry Site-Directed translation of HCV by recombinant IFN- $\alpha$  correlates with a reduced La protein. *Hepatology* 35:199-208, 2002.
  31. Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of Hepatitis C Virus Core Protein is regulated by its C-terminal Sequence. *J Med Virol* 2003; 69:357-366
  32. Zhao Z, Wakita T, Yasui K. Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice *J Virol* 2003 in publication
  33. Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, Takano T, Kohara M, Takahashi H. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes BBRC 2003 in publication
  34. Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S, Sano T, Akita K, Moriwaki H, Friedman SL, Kijima S. Phosphorylation of retinoid X receptor  $\alpha$  at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 61: 7675-7682, 2001.
  35. Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35, 35: 332-340, 2002.
  36. Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H: Acyclic retinoid induces partial differentiation, down-regulates telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derived cell lines. *J Hepatol* 36: 660-671, 2002
  37. Obora A, Shiratori Y, Okuno M, Adachi S, Takano Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I,

- Yamada Y, Akita K, Sano T, Shimada J, Kojima S, Okano Y, Friedman SL, Moriwaki H. Synergistic induction of apoptosis by acyclic retinoid and interferon- $\beta$  in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 36: 1115-1124, 2002
38. Okuno M, Kojima S, Akita K, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Sano T, Takano Y, Takai K, Obora A, Yasuda I, Shiratori Y, Okano Y, Shimada J, Suzuki Y, Muto Y, Moriwaki H. Retinoids in liver fibrosis and cancer. *Front. Biosci.* 7: d204-d218, 2002.
  39. Suzui M, Okuno M, Tanaka T, Nakagama H, Moriwaki H: Enhanced colon carcinogenesis in min mice occurs via a mechanism independent of  $\beta$ -catenin mutation. *Cancer Lett* 183: 31-41, 2002
  40. Suzui M, Sugie S, Mori H, Okuno M, Tanaka T, Moriwaki H: Different mutation status of the  $\beta$ -catenin gene in carcinogen-induced colon, brain, and oral tumors in rats. *Mol Carcinog* 32: 206-212, 2002
  41. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S: Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- $\alpha$ /kallikrein mediated activation of latent TGF- $\beta$ . *Gastroenterology* 123: 352-364, 2002
  42. Okuno M, Kojima S, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma – concept, progress and perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 1329-1335, 2001.
  43. Okuno M, Sano T, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Akita K, Okano Y, Kojima S, Moriwaki H. Apoptosis induction by acyclic retinoid: A molecular basis of 'clonal deletion' therapy for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 31: 359-362, 2001.
  44. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- $\beta$ . *Gastroenterology* 120: 1784-1800, 2001
  45. Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H. Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: Impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic necrosis. *Hepatology* 33: 569-576, 2001
  46. 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.
  47. 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- $\alpha$  Modulates its Transcriptional Activity. *Hepatology* 35:937-946, 2002.
  48. Koike K. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 37:55-64,2002.
  49. Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral

49. hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 17:394-400, 2002.
50. Koike K. Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine. J Gastroenterol 37:988-990, 2002.
51. 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.
52. 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.
53. Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis. Oncology 62: 29-37, 2002.
54. Y.Sugimoto, N.Kuzushita, T.Takehara, T.kanto, T.Tatsumi, T.Miyagi, M.Jimushi, K.Ohkawa, M.Horimoto, A.kasahara, M.Hori,Y.Sasaki, and N.Hayashi. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7geneinfluences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis 2002,9,377-384
55. Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Tatsuya Kanto, Noriyoshi Kuzushita, Yoshiko Sugimoto, Masahisa Jinushi, Akinori Kasahara, Yutaka Sasaki, Masatsugu Hori, and Norio Hayashi. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2003 ,18,32-40
56. Masahisa Jinushi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Veronika Groh, Thomas Spies, Ritsuko Kimura, Takuya Miyagi, Kiyoshi Mochizuki, Yutaka Sasaki, and Norio Hayasih. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. International Journal of Cancer 2003, 104,354-361
57. Takahiro Suzuki, Tetsuo Takehara, kazuyoshi Ohkawa, Hisashi Ishida, Masahisa Jinushi, Takuya Miyagi, Yutaka Sasaki, and Norio Hayshi. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. Biochemical and Biophysical Communications. 2003, 300,784-788
58. Masahisa Jinushi, Tetsuo Takehara, Tatsuya Kanto, Tomohide Tatsumi, Veronika Groh, Thomas Spies, Takuya Miyagi, Takahiro Suzuki, Yutaka Sasaki, and Norio Hayashi. Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN- $\alpha$ -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation :Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection1. The Journal of Immunology 2003, 170,1249-1256

## II. 分担研究報告



厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））  
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ゲノム複製細胞を用いてウイルスゲノムの複製が細胞内のどのような環境で行われるのかについて解析した。その結果、ウイルス蛋白質の複製複合体と考えられるものが小胞体膜状に局在していること、および細胞の膜を界面活性剤で処理して細胞質の可溶性画分を除いても複製が効率よく行われることを見いだした。また、ウイルスRNAは膜成分で保護されていることを見いだした。一方、HCV蛋白質のコアが核内受容体依存的な転写を活性化することを見いだした。

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の部分ゲノムが効率よく自己複製する細胞株を用いて、ウイルスゲノムの複製が細胞内のどのような環境で行われるかを解析するために、まず、本細胞におけるウイルス蛋白質の細胞内局在を調べる。そのためにウイルス蛋白質の各種抗体を用いて indirect immunofluorescent microscopy (IF) により蛋白質の細胞内局在を明らかにする。

(2) HCV蛋白質の細胞内の局在を明らかにした後、細胞膜を界面活性剤で処理し膜の透過性をあげ、細胞質成分を除いた細胞(semi-intact細胞)を用いて複製の反応を解析する。

(3) 上記の実験で合成されるHCV RNAの正常を解析する。

(4) HCV蛋白質の中で細胞の増殖を制御しているものについてその機能を明らかにする。

(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。そのために倫理面への配慮は特に必要がない。

C. 研究成果

(1) HCVゲノム複製は細胞質内の限定された領域で行われる。

HCV部分ゲノム複製細胞内のウイルス蛋白質は細胞質の核膜周辺で小胞体膜と会合して存在することがIFの結果明らかになった。各ウイルス蛋白質が集まり集合体を形成してい

る。

(2) HCV ゲノムの複製は細胞質の可溶画分を取り除いても効率よく生じる。細胞膜をジギトニンで処理すると、膜成分が部分的に溶けて外界との透過性が増す。このような細胞を適当な緩衝液で洗浄することにより細胞質成分は除去され、細胞膜あるいはその他の膜成分に結合している成分は細胞内に保持される。このような状況にした細胞を用いて HCV のゲノム合成が生じるかを調べた。そのためにジギトニン処理した細胞を緩衝液で洗浄後、放射性核酸前駆体の入った反応液に浸して保温すると HCV RNA の合成が観察された。合成された RNA の大きさはゲノムの大きさを反映していた。

(3) 新たに合成された HCV RNA および細胞内に蓄積している HCV RNA はヌクレアーゼに対して抵抗性を示す。

核酸合成の反応後に細胞をヌクレアーゼで処理すると細胞内のリボソーム RNA の崩壊が見られる。この条件でも HCV ゲノム RNA の崩壊は観察されない。一方、この条件下にさらに界面活性剤 NP-40 で処理するとウイルス核酸の崩壊が観察された。

(4) HCV コア蛋白質は核内受容体からの転写活性を増強させる働きを持つ。

HCV 蛋白質が疾患の発症に関与している可能性を明らかにする目的で、ウイルス蛋白質による細胞の増殖変化を解析した。この過程で、コア蛋白質が細胞のアポトーシスを制御していることを既に示した。その研究の延長として、コア発現細胞におけるアポトーシス感受性を種々の因子添加との関連で解析した。その結果

all-trans retinoic acid (ATRA) 添加することにより細胞はアポトーシスを誘導することを見いだした。コアによるこの効果を解析するために酵母の系を用いた two-hybrid 法によりコアと相互作用する蛋白質を解析した。その結果、コアと相互作用するものが約 10 種類ほど単離された。その中の一つが核内受容体とも結合することを見いだした。さらに解析をすすめ本蛋白質は核内受容体と相互作用することにより転写活性を抑制するが、コアが存在するとこの会合が阻害される結果転写活性が亢進することを見いだした。

#### D. 考察

HCV による肝疾患の発症にはウイルス蛋白質による細胞増殖の制御異常が存在すると考えられる。本研究ではコア蛋白質が核内受容体の転写活性を増進させることを明らかにした。核内転写因子により活性化される細胞側因子は多岐に亘り、その結果細胞増殖も種々に制御される。ATRA 添加によるコア発現細胞のアポトーシスの誘導は核内受容体の下流に位置する遺伝子の一つ tissue trans-glutaminase によるものと考えられる。事実、コア発現によりこの遺伝子の発現が亢進される。また、本遺伝子産物の阻害物質で処理するとコアによるアポトーシスが抑制された。

一方、C 型肝炎の発症には HCV の持続的な感染が必要である。C 型肝炎克服のためには HCV 感染を遮断することが必要である。最近、HCV ゲノム自己複製細胞が確立され、ウイルスの複製機構の解析が可能になった。本分担者は独自に開発した HCV

自己複製細胞を用いてウイルス複製の細胞内環境を解析した。その結果、HCV 蛋白質が細胞内の膜成分のトポロジーを変化させ、複製の場を構築していることを示唆する結果を得た。これらの成果は抗ウイルスの標的を明らかにする上で重要な成果であると考えられる。

## E. 結論

HCV の複製機構の解析およびウイルス蛋白質による細胞増殖の制御の両面から解析し、一つには抗ウイルス作用を示す標的の開発、さらには疾患発症の分子機構を明らかにすることを試みた。本研究によりコア蛋白質が細胞の増殖を制御する分子機構の一端が明らかにされた。C型肝炎において核内受容体の関与を明らかにする必要があるが、HCV 感染による細胞傷害性 T 細胞による感染肝細胞の攻撃のみが肝炎の発症に寄与しているのではなく、ウイルス蛋白質が直接に関与している可能性を示唆する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ueda Y., Hijikata M., Takagi S., Takada R., Takada S., Chiba T., and Shimotohno K. Wnt/b-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphological change in rodent fibroblasts, *Int. J. Cancer*, 99 : 681-688, 2002,
2. Masui O, Ueda Y, Tsumura A, Koyanagi M, Hijikata M, Shimotohno K. RelA suppresses the Wnt/beta-catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability. *Int. J. Mol. Med.* 9:489-493, 2002
3. 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.

4. Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation., *J Gastroenterol.* 37 : 50-54, 2002.
5. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Takada R, Takada S, Chiba T, Shimotohno K. Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int J Cancer.* 99 : 681-688, 2002.

### 2. 学会発表

- (1) 高橋 仁、岸根 弘依、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、土方 誠、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(subgenomic replicon)細胞の抗ウイルス剤スクリーニングに対する有効性の検討、平成14年、3月、第12回抗ウイルス化学療法研究会、東京
- (2) 宮成 悠介、土方 誠、岸根弘依、熨斗武志、高橋仁、仁尾泰典、保坂匡洋、杉山和夫、加藤宣之、下遠野邦忠、新規 C型肝炎ウイルス(HCV)Subgenomic Replicon を用いたゲノム複製機構の解析、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (3) 松本美貴子、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14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌
- (4) 保坂匡洋、土方誠、岸根弘依、高橋仁、熨斗武、仁尾泰徳、宮成悠介、杉山和夫、加藤宣之、下遠野邦

忠、C型肝炎ウイルス(HCV)full-genome repliconの構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌

(5) 高橋 仁、土方 誠、岸根 弘依、熨斗 武、仁尾 泰徳、保坂 匡洋、宮成 悠介、杉山 和夫、加藤 宣之、下遠野 邦忠、C型肝炎ウイルス持続複製(full-genome replicon)細胞の構築、平成14年、10月、第50回日本ウイルス学会、札幌

(6) 川田早苗、有海康雄、下遠野邦忠、Tax 発現細胞におけるp21(Waf1/Cip1)の機能、平成14年12月、第25回日本分子生物学会年会、横浜

(7) 宮成悠介、土方 誠、保坂匡洋、山路剛史、高橋 仁、岸根弘依、下遠野邦忠、C型肝炎ウイルス RNA ゲノム複製機構の解析、平成14年、12月、第25回日本分子生物学会年会、横浜