

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15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16(2004)年3月

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小池 和彦

平成16（2004）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. HCV コア蛋白発現細胞およびトランスジェニックマウスのミトコンドリア蛋白のプロ
テオーム解析----- 9
鈴木哲朗
2. 肝炎・肝細胞癌における酸化ストレスの関与----- 15
塚本和久
3. C型肝炎と糖代謝異常に関する研究----- 19
森屋恭爾

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 27

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) 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がん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。
- (2) ROS産生の起源としてミトコンドリアが想定される。ミトコンドリアのプロテオーム解析を行った。細胞増殖への関与やミトコンドリアシャペロンとして働くprohibitinのコア蛋白による発現亢進が明らかとなった。また、antioxidantに関わるMnSOD、電子伝達系を担うcomplex III, ATP synthaseなどの発現変化を見出した。
- (3) コアマウスにエタノールを投与し、細胞遺伝子発現、肝発がんに与える影響を検討した。エタノール投与によりROSの産生が著増した。また、細胞増殖に関連する伝達経路であるMAPKの系のうちp38とERKがエタノール投与によって有意に活性化された。
- (4) PAF-AH (PAF acetylhydrolase)を肝臓に強発現させることが、ウイルスによる肝障害に対してどのような効果を及ぼすかを検討した。その結果、アデノウイルスベクターの感染により一般に惹起される肝障害が、PAF-AHを発現させることによりほとんど消失することが判明した。
- (5) C型慢性肝炎と2型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満や肝硬変といった要素の存在のため、C型肝炎とDMの明確な関連性は示されていない。コアマウスでは、1～2ヶ月齢の若齢から正常マウスに比べて有意なインスリン抵抗性を示した。インスリン抵抗性は主として肝由来であり、インスリン受容体基質(IRS)-1のチロシンリン酸化の抑制が認められた。HCV蛋白とインスリン抵抗性のダイレクトな関連性が示された。

分担研究者

鈴木哲郎 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（以下、コアマウス）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

ヒトHCV関連肝発癌の動物モデルであるコアマウスおよび他のHCV遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、HCV感染症における肝発癌機序の解明を

目指し、その結果を応用して慢性C型肝炎患者における肝発癌抑制法の開発を目指す。また、マウスで得られた結果をC型肝炎患者においても検討する。

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。

肝のミトコンドリア分画を精製し、プロテオーム解析を行ない、HCV感染症における肝細胞ミトコンドリアの異常について明らかにする。

ヒトC型肝炎患者におけるアポリポ蛋白を含めた脂質代謝異常について詳細な検討を行なう。

C. 結果

肝脂肪化を経て肝細胞癌を発生するコアマウスを用いて研究を行なった。

(1) 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。

(2) 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。ROS産生の起源としてミトコンドリアが想定される。ミトコンドリアのプロテオーム解析を行った。細胞増殖への関与やミトコンドリアシャペロンとして働くprohibitinのコア蛋白による発現亢進が明らかとなった。また、antioxidantに関わるMnSOD、電子伝達系を担うcomplex III, ATP synthaseなどの発現変化を見出した。

(3) コアマウスにエタノールを投与し、細胞遺伝子発現、肝発がんに与える影響を検討した。エタノール投与によりROSの産生が著増した。また、細胞増殖に関連する伝達経路であるMAPKの系のうちp38とERKがエタノール投与によって有意に活性化された。

(4) 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。PAF-AH (PAF acetylhydrolase)を肝臓に強発現させることが、ウイルスによる肝障害に対してどのような効果を及ぼすかを検討した。その結果、アデノウイルスベクターの感染により一般に惹起される肝障害が、PAF-AHを発現させることによりほとんど消失することが判明した。

(5) C型慢性肝炎と2型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満や肝硬変といった要素の存在のため、C型肝炎とDMの明確な関連性は示されていない。コアマウスでは、1~2ヶ月齢の若齢から正常マウスに比べて有意なインスリン抵抗性を示した。インスリン抵抗性は主として肝由来であり、インスリン受容体基質(IRS)-1のチロシンリン酸化の抑制が認められた。HCV蛋白とインスリン抵抗性のダイレクトな関連性が示された。

D. 考察

コア遺伝子トランスジェニックマウスでは、肝において活性酸素 (ROS) の産生が増加していた。このROS産生が、肝炎という炎症無しにコア蛋白によって惹起されていることは非常に重要である。コア遺伝子マウスにおけるROS産生の機序としては、ミトコンドリアの機能異常が想定されている。すなわちHCV感染症は、炎症不在のもとで、すでにROSの産生過剰状態なのである。ここへさらに炎症やアルコールが加わると、ROSの更なる過剰発生が起これ、抗酸化系によっても十分にスカベンジされなくなる。このことはC型肝炎における炎症が、他の肝炎、例えば自己免疫性肝炎における

炎症とは ROS の産生において異なっている可能性を示している。

一方では、コア蛋白は肝細胞核内へも一部が移行し、細胞遺伝子の発現を攪乱している。発現の変化した細胞遺伝子の例としては、腫瘍壊死因子(TNF)- α やインターロイキン(IL)- 1β が挙げられる。この下流にある3つのシグナル伝達経路(JNK, p38, ERK)のうち、JNKだけが活性化されている。さらに、最終的に転写因子 AP-1 による転写を活性化し、癌化等の病原性をもたらしていると考えられる。興味深いことに、ヒトC型慢性肝炎で見られ、培養細胞へのコア蛋白の一過性発現によっても惹起される NF- κ B 活性化は全く認められなかった。ヒトC型慢性肝炎での NF- κ B 活性化は炎症に付随するものと考えられる。培養細胞においても、持続的にコア蛋白を発現させると NF- κ B 活性化は認められないことから、NF- κ B 活性化はコア蛋白による作用ではなく、急性ストレスに対する細胞の反応と考えるのが妥当であろう。また、アルコール投与によって、これらの細胞内シグナル伝達の変化が起こり、先の ROS の産生と相まって HCV とアルコールの肝発がんにおける相乗作用を説明しているのだと考えられる。

また、コア蛋白は核内レセプター RXR- α とその DNA 結合部位で結合して、RXR- α による転写活性化を促進することが示されている。これらの「核内」でのコア蛋白の働きも、また肝発癌へステップにおいて大きな役割を果たしている。

このように、HCVコア蛋白は、特異

的な肝脂肪化、ROS の産生、細胞遺伝子の転写亢進、細胞内シグナルや転写因子の活性化、等の一連の現象を引き起こす。コアマウスにおいては、組織学的には炎症像は無いが(histological inflammation)、生化学的には炎症が既に起こっている(biochemical inflammation)とも言えよう。すなわち、HCVが感染した時点において、C型肝炎における炎症の質は、B型肝炎や自己免疫性肝炎とは、既に異なったものとなっている。これによって、C型慢性肝炎における高頻度かつ多中心性の肝発癌が説明可能となる。

また、疫学的研究によってC型慢性肝炎と2型糖尿病の関連性が示唆されているが、肥満、加齢、肝硬変といった要素の存在のため、HCVとDMの明確な関連性は示されていない。今回の私達の検討によって、HCV蛋白とインスリン抵抗性のダイレクトな関連性が示された。最近のNASH(非アルコール性脂肪性肝炎)の研究などから、インスリン抵抗性が肝線維化に一定の作用をもつことが推定されている。また、慢性C型肝炎においてもインスリン抵抗性と肝線維化の間に関連性があるとする報告もあり、インスリン抵抗性とC型肝炎の問題は病態に密接に関連した重要な事象と考えられる。肝発がんを含めたC型慢性肝炎患者の病態解明において極めて重要な所見と考えられ、今後の更なる検討が待たれるところである。

E. 結論

HCVは、ROSの産生と細胞内遺伝子発

現の修飾という二つの経路を介して、肝発がんに直接的に（ウイルス側の因子として）関与していることが明らかとなった。前者においては、肝細胞のミトコンドリアがROS産生において主要な役割を演じることも明らかになってきている。ミトコンドリアを保護する方策をとることによって、C型肝炎における肝発がんを抑制できる可能性が示されたといえる。

また、細胞内遺伝子発現、細胞内シグナル伝達の変化も肝発がんにおいて大きな役割を演じることも次第に明らかになってきている。さらに、C型肝炎における糖尿病との関わりについてダイレクトに証拠が示されたことから、今後はこのインスリン抵抗性と肝病変進行・肝発がんとの関連性を検討して行く必要があるといえる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Hepatol Res* 25: 369-374, 2003.
- 2) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatitis C virus core protein

activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38:820-828, 2003.

- 3) Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Miyamura T, Matsuura Y. PA28g-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J Virol* 77:10237-10249, 2003.
- 4) Kitazawa T, Ota Y, Suzuki M, Morisawa Y, Shintani Y, Koike K, Kimura S. Acute hepatitis E with elevated creatine phosphokinase. *Intern Med* 42:899-902, 2003.
- 5) Ohno N, Ota Y, Hatakeyama S, Yanagimoto S, Morisawa Y, Tsukada K, Koike K, Kimura S. A patient with E. coli-induced pyelonephritis and sepsis who transiently exhibited symptoms associated with primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 42:1144-1148, 2003.
- 6) Noto H, Kawamura M, Hashimoto Y, Satoh H, Hara M, Iso-O N, Togo M, Kimura S, Tsukamoto K. Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 171:131-136, 2003.
- 7) Hasegawa H, Fukushima T, Lee JA, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, Imai K. Determination of

- serum d-lactic and l-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377:886-891, 2003.
- 8) 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* 23:829-835, 2003.
- 9) Suzuki M. Iso-o N. Takeshita S. Tsukamoto K. Mori I. Sato T. Ohno M. Nagai R. Ishizaka N. Facilitated angiogenesis induced by heme oxygenase-1 gene transfer in a rat model of hindlimb ischemia. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 302:138-143. 2003.
- 10) Hara M. Matsushima T. Satoh H. Iso-O N. Noto H. Togo M. Kimura S. Hashimoto Y. Tsukamoto K. Isoform-dependent cholesterol efflux from macrophages by apolipoprotein E is modulated by cell surface proteoglycans. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 23:269-274, 2003.
- 11) Ishizaka N. Ishizaka Y. Takahashi E. Unuma T. Tooda E. Nagai R. Togo M. Tsukamoto K. Hashimoto H. Yamakado M. Association between insulin resistance and carotid arteriosclerosis in subjects with normal fasting glucose and normal glucose tolerance. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 23:295-301, 2003.
- 12) Satoh H. Moriyama N. Hara C. Yamada H. Horita S. Kunimi M. Tsukamoto K. Iso-O N. Inatomi J. Kawakami H. Kudo A. Endou H. Igarashi T. Goto A. Fujita T. Seki G. Localization of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 284:C729-C737, 2003.
- 13) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology*. 2003 Dec 5; 317(1): 24-35.

- 14) Brunetti CR, Amano H, Ueda Y, Qin J, Miyamura T, Suzuki T, Li X, Barrett JW, McFadden G. Complete genomic sequence and comparative analysis of the tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J Virol*. 2003 Dec; 77(24): 13335-47.
- 15) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*. 2003 Sep 15; 314(1): 16-25.
- 16) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 10;300(2):443-7.
- 17) Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Methylation Status of Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS-1) Gene in Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol* 2004 in press.
- 18) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus and diabetes: direct involvement of the

virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004 126:840-848, 2004.

2. 学会発表

- 1) Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Yoshiharu Matsuura: PA28y-Dependent Nuclear Retention and Degradation of HCV Core Protein, p41, 10th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003
- 2) Kyoji Moriya, Ai Tajima, Takeya Tsutsumi, Kousei Ito, Toshiharu Horie, Kazuhiko Koike: Hepatitis C Virus Core Protein Insults Mitochondrial Function Through Reducing the ETS Complex 1 Activity, p73, 10th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003
- 3) Hideyuki Miyoshi, Hajime Fujie, Kyoji Moriya, Yoshizumi Shintani, Takeya Tsutsumi, Seiko Shinzawa, Kazuhiko Koike: Hepatitis C Virus Core Protein Selectively Exerts an Inhibitory Effect on Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1 Gene Expression, p190, 10th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, Kyoto, 2003.
- 4) Naoyuki Iso-O, Akihide Nakao, Masako Togo, Masumi Hara,

Hiroshi Noto, Eisei Noiri, Tsuyoshi Watanabe, Kazuhisa Tsukamoto Liver-directed gene transfer and lipoprotein-mediated protein delivery of plasma PAF acetylhydrolase ameliorates proteinuria in SHC rats: a novel therapeutic approach for glomerulosclerosis ASN 2003 San Diego.

なし。
3. その他
なし。

- 5) 磯尾直之、能登洋、原眞純、東郷眞子、塚本和久 リポ蛋白の新しい役割：PAF-アセチルヒドロラーゼの輸送担体として 第35回日本動脈硬化学会 2003年9月 京都
- 6) 小池和彦 シンポジウム HIV・HCV 重複感染症の治療 第17回日本エイズ学会 2003年 神戸
- 7) 三好秀征、藤江 肇、森屋恭爾、新谷良澄、堤武也、小池和彦、木村 哲. HCV コア蛋白の SOC-1 遺伝子発現への関与についての検討. 39回日本肝臓学会総会 2003年 福岡
- 8) 藤江 肇、森屋恭爾、新谷良澄、三好秀征、堤武也、小池和彦. C型肝炎ウイルスコア遺伝子によるインスリン抵抗性の検討. 第7回日本肝臓学会大会 2003年 大阪
- 9) 小池和彦. HCVによる肝発がん機構. 62回日本癌学会総会 2003年 名古屋

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

HCV コア蛋白発現細胞およびトランスジェニックマウスのミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析

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：HCV コア蛋白によって発現が変化するミトコンドリア蛋白を明らかにする目的で、ミトコンドリアのプロテオーム解析を行った。その結果、細胞増殖への関与やミトコンドリアシャペロンとして働く prohibitin の発現亢進が明らかとなった。また、antioxidant に関わる MnSOD、電子伝達系を担う complex III, ATP synthase などの発現変化を見出した。これらの結果は、コア蛋白が細胞増殖やアポトーシスを調節すること、トランスジェニックマウスにおいて oxidative stress を惹起することを支持しており、コア蛋白、ひいては HCV による病態を考える上で非常に興味深い。

A. 研究目的

本研究班ではコアトランスジェニックマウスの肝臓において、酸化還元状態が変化していることを報告している。また、コア蛋白は細胞のアポトーシスを調節することも知られている。細胞内オルガネラの一つであるミトコンドリアは、酸化還元やアポトーシスの調節に重要な役割を果たしている。また興味深いことに、トランスジェニックマウスにおいてコア蛋白の局在がミトコンドリアに認められ、またその二重膜構造が変化していることが示された。そこで今回、コア蛋白の発現に伴うミトコンドリア蛋白の発現変動を明らかにするため、コア発現培養細胞およびトランスジェニックマウス

肝組織のプロテオーム解析を行うこととした。

B. 方法

細胞は、HCV コア蛋白を恒常的に発現しているヒト肝癌由来 HepG2 細胞株 (Hep39) を、コントロールとしてはベクターのみを発現させた細胞株 Heps wx を用いた。また、コアトランスジェニックマウス (雄、3ヶ月齢) および littermate より肝組織を採取した。細胞ペレットあるいは肝組織を homogenate 後、通常の遠心操作によりミトコンドリアの粗分画を沈殿させ、Nycodenz による密度勾配遠心法により、ミトコンドリアを精製した。精製したミト

コンドリアをサンプルバッファーに溶解後、二次元電気泳動を行った。一次元目の泳動はImmobiline Dry Strip gel, pH 4-7 linear, 13 cm (Pharmacia社)を用いた。一次元目泳動終了後、SDS含バッファーによりゲルを平衡化し、12.5% SDS-PAGEにより二次元目の泳動を行った。泳動終了後、CBBまたは銀染色を行い、ImageMaster 2D Elite software (Pharmacia社)によりスポット解析を行った。発現に差が認められた蛋白スポットを切り出し、トリプシンによるin-gel digestionを行った後、質量分析により蛋白を同定した。

C. 結果

コア発現細胞株 Hep39 およびトランスジェニックマウス組織より精製したミトコンドリアにコア蛋白が存在すること、およびこの分画に ER 蛋白が混入していないことをウエスタンブロッティングで確認した。

次に Hep39 細胞およびコントロールの HepSWX 細胞より精製したミトコンドリアの二次元電気泳動を行った。各細胞株からミトコンドリア分画を3ロット調製し、二次元電気泳動のスポットパターンの再現性を確認した。両細胞とも銀染色により約1000個のスポットが検出され、ゲル間のスポットマッチング、volume 比較解析から両細胞間で明らかに発現量が異なるスポットを同定した。これらについて質量分析による蛋白の同定を試み、コア発現細胞で増加する蛋白14種類と低下する蛋白6種類を同定した(表1)。この中には、細胞増殖に関与することが知られている

prohibitin や、酸化還元反応に関わる MnSOD、また電子伝達系の構成蛋白 (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase core I protein, similar to ATP synthase β polypeptide)、アルコール代謝に関わる aldehyde dehydrogenase などが含まれていた。

これらの蛋白のうち、抗体が利用できるものについて Hep39、Hepswx およびマウス肝臓よりそれぞれ精製したミトコンドリアのウエスタンブロッティングを行った。二次元電気泳動の結果を反映した結果が得られ、また prohibitin、MnSOD、BiP protein についてはトランスジェニックマウスでの発現変動を確認することができた(図1)。

現在、コア発現細胞およびトランスジェニックマウスで発現が亢進する prohibitin についてさらに詳細な解析を行っている。これまでに、1) prohibitin の発現はコア蛋白の発現量依存的に増加すること、2) コア発現によって prohibitin mRNA レベルは変化しないこと、3) prohibitin の N 末端約 90 アミノ酸領域がコア蛋白と結合しうること、などが明らかとなった。これらの結果より、コア蛋白はミトコンドリアで prohibitin と相互作用することにより安定化させ、その蛋白レベルを増加させている可能性が考えられる。

D. 考察

HCV コア蛋白が培養細胞やトランスジェニックマウスにおいて、ミトコンドリアの機能に影響を与えている可能性があるというこれまでの知見に基づき、ミトコンド

リアのプロテオミクス解析を行った。その結果、細胞増殖への関与やミトコンドリアシャペロンの役割が報告されている prohibitin の発現亢進が明らかとなった。さらに antioxidant に関わる MnSOD、ミトコンドリアの重要な機能である電子伝達系を担う complex III, ATP synthase などの発現が変化しているという結果も得られた。これらの結果は、コア蛋白が細胞増殖やアポトーシスを調節すること、トランスジェニックマウスにおいて oxidative stress を惹起することを支持している。prohibitin の発現が増加する機序については不明であるが、これまでの結果から転写後修飾の可能性が考えられ、現在コア蛋白が prohibitin 蛋白の安定性へ及ぼす影響について解析中である。またこれまでの報告によると、ミトコンドリア電子伝達系蛋白の発現バランス (complex I, IV などは核由来の DNA とミトコンドリア DNA 由来の構成蛋白からなる) が乱れると prohibitin の発現が増加することが示されている。よってコア蛋白により電子伝達系の蛋白発現が変化した結果、間接的に prohibitin の発現変化が生じている可能性も考えられる。

E. 結論

ミトコンドリアのプロテオーム解析から、HCV コア蛋白によって 1) 発現が亢進する蛋白: prohibitin, MnSOD など 14 種類、2) 発現が低下する蛋白: aldehyde dehydrogenase など 6 種類、を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology*. 2003 Dec 5; 317(1): 24-35.
- 2) Brunetti CR, Amano H, Ueda Y, Qin J, Miyamura T, Suzuki T, Li X, Barrett JW, McFadden G. Complete genomic sequence and comparative analysis of the tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J Virol*. 2003 Dec; 77(24): 13335-47.
- 3) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*. 2003 Sep 15; 314(1): 16-25.
- 4) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology*. 2003

Oct; 38(4): 820-8.

- 5) Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y. Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. J Virol. 2003 Oct; 77(19): 10237-49.
- 6) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Alteration of Intrahepatic Cytokine Expression and AP-1 Activation in Transgenic Mice Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. Virology. 2002 Dec 20;304(2):415-24.
- 7) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 10;300(2):443-7.

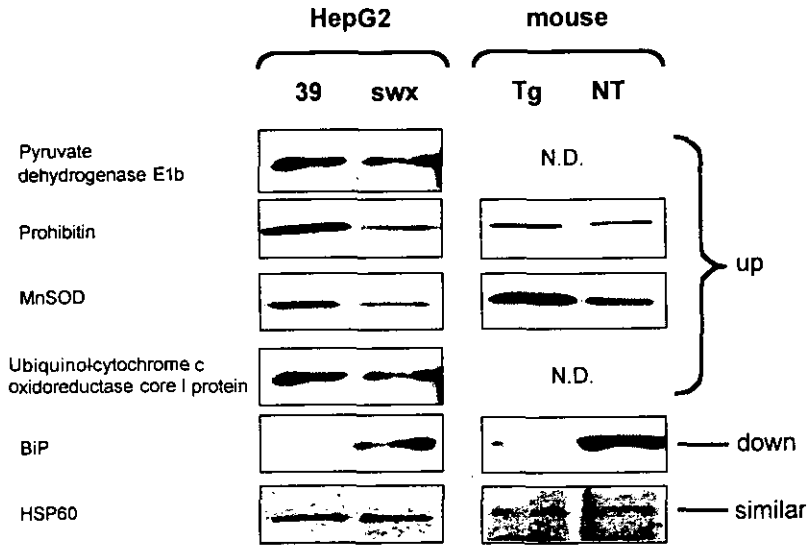
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. コア発現肝癌細胞 Hep39 のミトコンドリアで発現が変化している蛋白の
同定

Protein	Fold
Increase	
NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase α subunit precursor	>10
Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase	>10
Unknown	>10
GrpE-like protein cochaperone	6.6
Similar to ATP synthase β polypeptide	5.7
Leucine aminopeptidase	4.8
Pyruvate dehydrogenase E1 component β subunit, precursor	3.6
CG015alt2	3.2
HSP70	3.0
Prohibitin	2.6
Similar to 3 hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2.3
HSPC108	2.2
Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase core I protein	2.1
MnSOD	2.1
Decrease	
Aldehyde dehydrogenase 2	<0.1
Aldehyde dehydrogenase 5 precursor	0.22
BiP protein	0.35
HSP60 precursor	0.42
Triosephosphate isomerase	0.44
Similar to ATP synthase α subunit isoform1	0.50

図1. HepG2由来細胞株およびトランスジェニックマウスのミトコンドリア分画のウエスタンブロッティング



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

分担研究者 塚本 和久 東京大学医学部糖尿病・代謝内科

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。昨年度、本分担者は、PAF-AH、SODなどの抗酸化作用を有すると考えられる酵素が肝炎・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、PAF-AHの酸化ストレスに関する役割を検討し、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、を証明してきた。本年度は、PAF-AHを肝臓に強発現させることが、ウイルスによる肝障害に対してどのような効果を及ぼすかを検討した。さらに、その発症に酸化ストレスが関与していると考えられる糸球体腎炎のモデル動物を用いることで、蛋白尿に対する効果も同時に検討した。その結果、アデノウイルスベクターの感染により一般に惹起される肝障害は、PAF-AHを発現させることによりほとんど消失すること、さらには糸球体腎炎の指標である蛋白尿にも良好な効果をもたらすこと、が判明した。今後、肝障害モデル動物に対するPAF-AHの効果の検討を行うとともに、モデル動物における肝ガンに対する効果を評価するための目的蛋白を長期に発現するアデノウイルスベクターの開発に取り組む。

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が、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 (superoxide dismutase)などと並んで酸化ストレス改善に重要であることが判明しつつある。

昨年、本分担者は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、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でありリポ蛋白内で過酸化脂質の産

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、を観察してきた。

げっ歯類にアデノウイルスベクターを用いて目的蛋白を発現させた場合に、ウイルス投与後7日目に最大となる肝炎が惹起されることが知られている。本年度は、アデノウイルスベクターを用いてPAF-AHをラットに発現させた場合に、その肝障害にどのような効果が見られるかを検討した。また、酸化ストレスが重要な役割を果たすと考えられている糸球体腎炎に対する効果も観察した。

B. 研究方法

12週齢のSHC(spontaneous hypercholesterolemic)ラットに、ヒトPAF-AH cDNAをコードするアデノウイルスベクター(AdPAFAH)を一頭あたり 5×10^{10} pfuの量にて尾静脈から投与し、経時的に採血を行った。コントロールとして、PBS投与群、AdLacZ(LacZをコードするアデノウイルスベクター)投与群をおいた。肝臓におけるPAF-AHの発現は、肝臓組織をOCTにて包埋した後、PAF-AHに対する抗体で免疫組織学的に検討した。血中のPAF-AHの活性は分光測定法にて検討した。肝逸脱酵素として血清GPT値をJFCC法にて測定した。また、メタボリックケージを用いて蓄尿を行うことで一日尿中蛋白量を測定した。

C. 研究結果

ウイルス投与後3日目および7日目の血中PAF-AH活性は、AdPAFAH投与群にて投与前の約420倍および12倍に上昇していた。PBS群では変化は見られず、一方、AdLacZ投与群では3日目の活性は投与前と変化はなかったが、投与後7日目に約3倍に上昇した(図1)。

肝臓組織を用いた免疫組織染色にて、3日目の肝臓においてAdPAFAH投与群で非常に強いPAF-AH蛋白発現が確認でき、また7日目にも3日目と比較してその強さこそ弱くはなっているものの、PAF-AH蛋白の持続発現が確認された。投与前のGPTには各群で相違は認められなかったが、投与後7日目

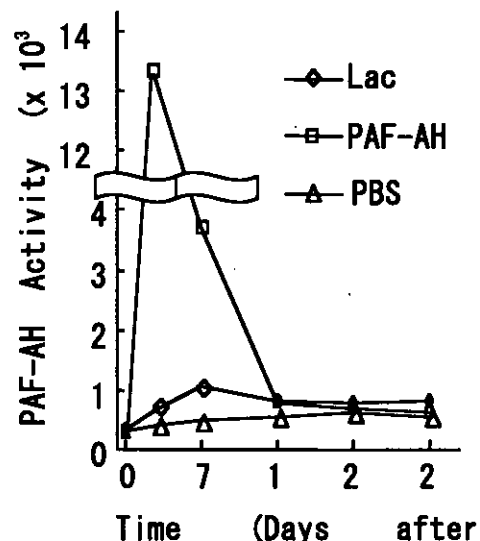


図1. SHCラットに各種アデノウイルスベクター投与後の血中PAF-AH活性の経時的経過を示す。

の検討では各群間に有意な相違が認められた(AdPAFAH群: 25.1 ± 4.6 IU; AdLacZ群: 200 ± 72.4 IU; PBS群: 17.9 ± 6.0 IU; 平均 \pm SDにて表示)(一元配置の分散分析にて、 $p=0.000016$)。Tukey-Kramerの多重解析にて検討したところ、有意水準1%にてAdLacZ群とAdPAFAH群、AdLacZ群とPBS群の間には有意差が認められたが、PBS群とAdPAFAH群の間には有意差はなかった。

SHCラットは、糸球体腎炎のモデル動物としても用いられているラットである。それゆえ、このラットにおけるPAF-AH強発現による尿中蛋白量の変化も検討し

たところ、図2に示すとおり、AdPAFAH群において有意に尿中蛋白量の減少を観察することが可能であった。

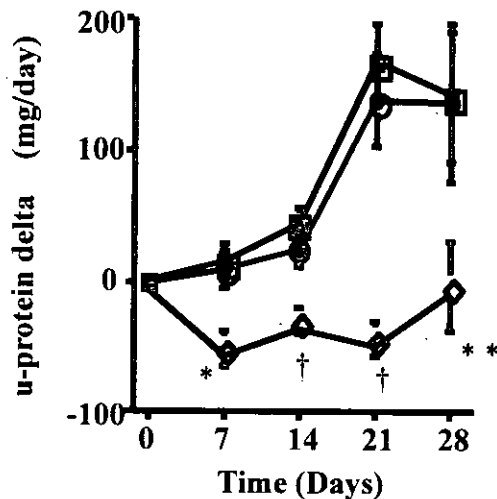


図2. SHCラットにおける一日尿蛋白量の変化。n=9 (day 0, 7,14) n=6 (day 21,28)。◇: AdPAFAH、○: PBS、□: AdLacZ。†; p<0.001, *; p<0.01, **; p<0.05 (PBSおよびAdLacZ群に対して)

D. 考察

酸化ストレスは、活性酸素、フリーラジカル、ヒドロペルオキシドなどが複雑に絡み合い、お互いに vicious cycle を形成することで細胞障害を引き起こす。それゆえ、そのサイクルのいずれかの過程を遮断することにより、一連の増幅されたサイクルを断ち切ることが可能であろうと考えられる。

今回の研究では、酸化ストレス起因物質のうち、もっとも強力なファクターと考えられている過酸化脂質発生を抑制することが、アデノウイルスによる肝障害を抑制することに有効であることが判明した。また、このような肝障害のみならず、酸化ストレスが関与すると考えられ

ている腎障害に対しても、PAF-AH 過剰発現が有効であることが示され、各種疾患に対する抗酸化療法の有効性が示唆された。

E. 結論

PAF-AH が、本来アデノウイルス投与により惹起される肝障害を抑制することを証明できた。今後、薬剤あるいは特殊抗体による肝障害に対して PAF-AH が有効であるか、の検討を開始する。さらに、肝細胞癌に対する有効性を遺伝子導入法で検討するには、長期に蛋白発現が可能であるベクターの開発が必要であるが、現在、そのベクターの開発にとりかかっている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shintani Y. Fujie H. Miyoshi H. Tsutsumi T. Tsukamoto K. Kimura S. Moriya K. Koike K. Hepatitis C Virus Infection and Diabetes: Direct Involvement of the Virus in the Development of Insulin Resistance. *Gastroenterology in press*
- Noto H. Kawamura M. Hashimoto Y. Satoh H. Hara M. Iso-O N. Togo M. Kimura S. Tsukamoto K. Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 171:131-136, 2003
- Hasegawa H. Fukushima T. Lee JA. Tsukamoto K. Moriya K. Ono Y. Imai K. Determination of serum d-lactic and l-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377:886-891, 2003