

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

B型及びC型肝炎ウイルス感染者における
新たな発がん予防法の確立のための肝がん発生等の
病態解明に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成17(2005)年 3月

**B型及びC型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん予防法の
確立のための肝がん発生等の病態解明に関する研究**

班員名簿

班長 班員	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
	井廻 道夫	昭和大学医学部・第二内科	教授
	榎本 信幸	山梨大学大学院医学工学総合研究部	教授
	各務 伸一	愛知医科大学医学部・消化器内科	教授
	加藤 宣之	岡山大学大学院医歯学総合研究科・腫瘍制御学 分子生物学	教授
	金子 周一	金沢大学大学院医学系研究科・がん遺伝子治療学	教授
	小池 和彦	東京大学医学部・感染制御学	教授
	坪内 博仁	宮崎医科大学・第二内科	教授
	松浦 善治	大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター 分子ウイルス学	教授
	伊藤 義人	京都府立医科大学大学院医学研究科・ 消化器病態制御学	講師

[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

- B型及びC型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん予防法の確立のための
肝がん発生等の病態解明に関する研究 1
林 紀夫

II. 分担研究報告

1. C型肝炎ウイルス(HCV)NS5A 遺伝子構造によるインターフェロンシグナル
制御機構の検討 11
榎本 信幸
2. ウイルス発がん機構の解析 15
加藤 宣之
3. シナパブドペプチドによる HCV コア蛋白質のプロセッシング 22
松浦 善治
4. Tacrolimus によるC型肝炎ウイルス感染症病態への介入 25
小池 和彦
5. ガンキリンと DP1 のヒト肝臓癌における検討 29
伊藤 義人
6. 肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変および肝がんの病態解明に関する研究 33
金子 周一
7. 腫瘍マーカーとしての血中 SHAP-HA 複合体の有用性 36
各務 伸一
8. C型慢性肝炎患者樹状細胞の IFN- α 反応性低下機序の解析 38
林 紀夫
9. C型肝炎ウイルス感染患者における NK 細胞レセプターの発現異常とその機能的意義 . . . 39
林 紀夫
10. 肝癌患者における MAGE 抗原に対する細胞性免疫応答の検討 43
井廻 道夫
11. コホートを用いた HCV による肝障害進展機序の解明 45
坪内 博仁

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	61

I .総括研究報告

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

B型及びC型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん予防法の確立のための
肝がん発生等の病態解明に関する研究

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨:ウイルス肝炎からの肝がんにはウイルスによる宿主細胞機能の修飾とウイルス感染に伴う免疫学的な変調が関与している。本研究課題の目的は1) C型肝炎ウイルスによる宿主細胞機能の修飾を培養細胞レベルおよび個体レベルで解析しこれを発がん抑止法の開発に結びつけていくこと、2) 肝がんに見られる特徴的な遺伝子発現を網羅的に明らかにし標的治療法の探索を行うこと、3) 肝がんで見られる自然免疫・獲得免疫応答の特徴を明らかにし免疫治療の開発および新規の診断手法の開発を行うこと、4) HCV 高侵淫地区住民のコホート解析を行うことにより持続感染および発がんに関与する因子を明らかにすることである。3年計画の初年度に当たる本年度において、HCV 感染に伴う自然免疫およびIFN反応性の低下機序およびHCVコア蛋白の成熟機構の解明、HCVコア蛋白による肝脂肪化・インスリン抵抗性に対するミトコンドリア保護剤の有用性、HCV感染・肝がんの特徴的な高発現遺伝子群の同定、ガンキリンを標的とした肝がん遺伝子治療法の基礎的検討、HCV感染におけるNK細胞レセプターの発現異常とそれによる初期免疫および獲得免疫の抑制、肝がん患者における免疫モニタリング法の開発、SHAP-HA複合体の新規腫瘍マーカーとしての有用性、HCV感染における病態進行に関与する因子の解明などの各分野において成果が得られた。

A. 研究目的

わが国において急増している肝がんの発生はB型（HBV）あるいはC型肝炎ウイルス（HCV）の慢性感染を基礎疾患としており、これらの高リスク群からの発がんをいかに抑制するかが重要な課題となっている。また、肝がんは初回に根治的な治療を行っても、再発をきたすことが多く、このことが患者のQOLと生命予後の著しい低下の原因となっている。本研究では、これらのウ

イルス感染によってひきおこされる肝がん発生等の病態を分子生物学的および免疫学的に明らかにし、早期診断マーカーの開発や予防的治療法の確立をめざすことを計画している。具体的な研究内容は以下の通りである。

1) 肝炎ウイルスの発現・増殖に伴う肝細胞のがん化機序の解明とその制御法の確立
HBV・HCV発現培養細胞、トランスジェニックマウスあるいはin vivo遺伝子導入マウ

スを用いて、ウイルスの発現や増殖によって誘導される細胞機能の変化や個体レベルの病態形成（脂肪代謝異常など）がどのような機序でがん化をひきおこすのかを解明し、その制御法を開発する。

2) 肝がん発生に関与する新規宿主遺伝子の同定と標的治療法の探索

HBV・HCV関連肝がんの遺伝子発現を serial analysis of gene expression (SAGE) 法を用いて網羅的に解析し、肝がんの発生や進展に密接に関連する新規遺伝子群および診断に有用なマーカーを同定する。これらの中でがんの形質を与える遺伝子を siRNA 法にて系統的に解析し、発がん抑止のための標的分子を探索する。

3) C型肝炎・肝がんにおける先天免疫応答・獲得免疫応答の解析と診断・治療への応用

HCVの慢性感染では樹状細胞やNK細胞などの初期免疫にかかわる細胞の機能低下がみられる。これらの細胞機能の低下の分子機構を解明し、発がんとの関連、その後の獲得免疫応答の形成に与える影響について解析する。さらに、これらの細胞機能を回復させるサイトカイン治療・細胞治療のデザインを構築する。HCV感染および肝発がん過程において、生体内に誘導される特異的な免疫応答をELISPOTやテトラマーを用いて解析し、肝がんの発生・治療経過との関連を明らかにする。このようなT細胞免疫モニタリングシステムを開発することにより、早期診断への応用や、より適切な治療法の選択のための臨床応用を目指す。

4) HCV感染の病態進行に関与する因子の疫学的解析

HCV高侵淫地区のコホート解析を行うこと

により、ウイルス感染の慢性化やALT持続正常化の成立に関与する因子、肝発がんに関与する因子を疫学的に明らかにする。

B. 研究方法

1) HCVによる宿主細胞機能の修飾とその治療的介入

HCV発現システムとしては replicon システムあるいは HCV の遺伝子発現システムを用いた。個体レベルの解析には HCV コアトランスジェニックマウスを使用した。

2) 肝がんにおける遺伝子発現の網羅的解析と標的治療法の開発

SAGE 法を用いてヒト肝臓における遺伝子発現を解析した。肝がんにおいて高発現のみられるガンキリンに対する siRNA を発現するレトロウイルスベクターを作成し、遺伝子治療に向けた基礎的な検討を行った。

3) 自然免疫・獲得免疫応答の解析とその診断・治療への応用

HCV感染者の末梢血 CD56 陽性細胞の各種 NK レセプターの発現を FACS 解析し、肝がん細胞株に対する感受性および樹状細胞活性化能を解析した。

MAGE-1 抗原全長を網羅し 10 アミノ酸ずつオーバーラップする 20 アミノ酸のペプチドを計 30 種類作成し、これらに対する肝がん患者末梢血の CD8 陽性 T 細胞の反応性を ELISPOT 法にて解析した。

血清由来蛋白である SHAP (serum-derived hyaluronan associated protein) とヒアルロン酸の複合体である SHAP-HA 複合体を慢性肝疾患患者の血清で測定しその診断的意義を検討した。

4) コホートを用いた HCV 感染による病態進行に関与する因子の解析

約 20%の住民が HCV 抗体陽性である地区において、検診を毎年行い、HCV 排除、ALT の正常化、肝発がんに関与する因子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者および健常者からの血液サンプルの採取にあたっては、インフォームドコンセントの取得後に行った。

C. 研究成果

1) HCV 感染に伴う宿主細胞機能の修飾とその治療的介入

ウイルス側の因子である NS5A 内の ISDR および serine cluster region 構造により replicon の細胞内増殖が規定されること、宿主因子として自然免疫分子である IRF-1 とその下流の IFN 誘導遺伝子群の発現抑制が replicon 増殖に必須であることを示した。NS5B はその RNA ポリメラーゼ活性に依存して Toll 様レセプター 3 を活性化し IFN β の発現を誘導し得ることを明らかにした。シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) のドミナントネガティブ変異体の導入により HCV コア蛋白前駆体よりのシグナルペプチドの解裂が抑制された。また、コア蛋白質の変異体を用いた検討から SPP によるプロセッシングには切断部位であるシグナルペプチドのみならず、その上流の少なくとも 3 つのアミノ酸が重要であることが示された。HCV コアトランスジェニックマウスにみられる肝臓の脂肪化とインスリン抵抗性はミトコンドリア保護作用のある FK506 の投与により改善した。

2) HCV 感染・肝がんにおける遺伝子発現の特徴と新規標的治療法の開発

ヒト肝臓における臨床情報とリンクした包括的遺伝子発現プロファイルの整備とその拡大を行った。その過程において肝臓における transcriptome は 10 万種を超える transcript から成り立っていることを明らかにした。また、肝臓において特異的に遺伝子発現が亢進する染色体領域を 6 箇所同定した。HCV の増殖は宿主細胞の細胞回転に伴い亢進するが、この際に発現が増強し HCV-IRES 活性を亢進させる宿主蛋白のひとつが La 蛋白であることを同定した。

肝がんにおいては第 13 番染色体長腕 13q34 領域に遺伝子増幅を高頻度に検出し、その標的遺伝子の 1 つが DP1 遺伝子であることを明らかにした。

肝がんを高発現のみられるガンキリンに対する siRNA を発現するレトロウイルスベクターを作成し、ヒト肝がん細胞株に導入したところアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

3) HCV 感染・肝がんにおける自然免疫応答と獲得免疫応答の解析および血清診断マーカーの開発

HCV 感染者における NK レセプターを解析したところ、CD94/NKG2A 抑制性レセプターの発現が有意に亢進していた。肝細胞や肝がん細胞は CD94/NKG2A のリガンドである HLA-E が陽性であるが、C 型肝炎患者の NK 細胞はこれらの細胞に対する反応性が低下していた。また、肝がん細胞存在下での NK 細胞による樹状細胞の分化誘導および活性化能が C 型肝炎患者では低下していた。このような自然免疫系・獲得免疫系に対する障害は NKG2A をマスクすることにより健常者と同レベルまで回復した。

HCV 感染者の単球由来樹状細胞は IFN α 刺

激による Th1 シフト活性が減弱していた。IFN α /Ribavirin 刺激によりこの減弱が回復する患者群があり、このような患者では IFN α /Ribavirin 治療によるウイルス排除率が高かった。

肝がん患者 8 例中 1 例において MAGE-1 抗原の 200-220 のアミノ酸刺激により CD8 陽性 T 細胞の IFN γ の産生がみられ、TAE 治療後にはその反応性が低下することを見出した。

SHAP-HA は HBV 感染、HCV 感染のいずれにおいても慢性肝炎から肝硬変へと病期が進行するに従い上昇した。また、肝がん患者群では肝硬変に比しそのレベルが有意に増加していた。

4) コホートを用いた HCV による病態進行機序の解析

DRB1*0101 と DQB1*0501 が HCV 持続感染に強く関与していた。2000 年までに 4 回以上検診を受診した HCV 陽性 ALT 持続正常者 162 名から 2001 年以降肝がんは発生せず、肝機能異常者 287 名中の肝がん発生 7 名より少なかった ($P=0.052$)。

D. 考察と結論

肝がん発生を抑制するためのもっとも有効な手段は HCV 感染を終息させることである。しかしながら、HCV 感染においてはウイルスによる宿主細胞機能の修飾として免疫担当分子である IRF-1 の発現低下がおり、また自然免疫の代表的な担当細胞である NK 細胞の抑制型レセプターの発現が亢進し、自然免疫の発動が抑制された状態になっていることが明らかとなった。このような自然免疫の抑制状態を解除する治療法を探索することは現在ウイルス排除のため

の標準的治療法である PEG-IFN/Ribavirin 治療に反応しない患者のウイルス排除を図る上で重要な方策になると考えられる。また、HCV 感染による発がんのメカニズムのひとつとしてコア蛋白が関与していることはトランスジェニックマウスを用いた解析から明らかであるが、その機構のひとつとしてコア蛋白が核に移行し宿主細胞の遺伝子発現を修飾することが重要である。本研究によりコア蛋白の核移行にはコア蛋白の成熟が重要であることが明らかとなったが、この研究成果は HCV 成熟過程を制御するという新しい観点の発がん抑止法の開発につながることを期待できる。また、HCV コアトランスジェニックマウスにおける発がんにはミトコンドリアにおける ROS 産生が関与していると考えられているが、今回ミトコンドリア保護作用のある FK506 の投与によりコアトランスジェニックマウスの肝脂肪化が抑制できることが明らかになった。このことは、肝がんの発生に対しても同剤が有効である可能性を示唆しており重要な成果であると考えられる。

肝臓における遺伝子増幅あるいは発現解析を通じて、HCV の増殖に関与する宿主蛋白である La 蛋白、肝がんに関与するガンキリン、転写因子 DP1 を同定した。ガンキリンについては遺伝子治療の基礎的な検討を開始している。さらに、今後複数の標的分子に対する特異的な治療法を探索する予定である。

一般に微生物由来の情報は樹状細胞に発現する Toll 様レセプターにより認識される。一方、がん化した細胞の異常は NK 細胞に発現する NK 細胞レセプターにより認識され、初期免疫が誘導され、これがその後の

獲得免疫応答の方向性と強さを制御している。本研究課題により、HCV感染者においてNK細胞レセプターの発現異常がありその機能が負に修飾されていることが明らかにされたが、このことはHCV感染からの易発がん性を考える上で重要である。また、肝がんにおいてMAGE-1抗原に対するCD8レスポンスが観察されたという事実は、肝がんにて異質な免疫治療法の開発や免疫モニタリングシステムの開発につながるものである。今後Glypican-3などを含め他の抗原での解析を早急に進める必要がある。SHAP-HAについてはAFP、PIVKA-II、Glypican-3につづく腫瘍マーカーとしての今後の展開が期待される。

HCV感染の自然経過については、今後もコホート研究を継続していくことにより、ALT持続正常者からの発がんリスク等の正確な疫学的エビデンスが蓄積されることが期待される。

E. 研究発表

論文発表

- 1) Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N, Enomoto N, Itsui Y, Yamashiro T, Tanabe Y, Maekawa S, Nakagawa M, Chen CH, Kakinuma S, Oshima S, Nakamura T, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol* 2004; 78(18): 9713-20
- 2) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Ueda E, Kohashi T, Watanabe H, Chen C-H, Yamashiro T, Tanabe Y, Kanazawa N, Nakagawa M, Sato C, Watanabe M. Introduction of NS5A

Mutations Enables Subgenomic HCV-Replicon Derived from Chimpanzee-Infectious HC-J4 Isolate to Replicate Efficiently in Huh-7 Cells. *J Viral Hepat.* 2004;11(5):394-403.

- 3) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen C-H, Itusi Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Com* 2004;313(1):42-7
- 4) Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Ueda E, Maekawa S, Yamashiro T, Nakagawa M, Chen C-H, Kanazawa N, Kakinuma S, Watanabe M. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis* 2004;189(7):1129-39.
- 5) Ueda E, Enomoto N, Sakamoto N, Hamano K, Sato C, Izumi N, Watanabe M. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res.* 2004 Jun;29(2):89-96.
- 6) N. Kato, T. Nakamura, H. Dansako, K. Namba, K. Abe, A. Nozaki, K. Naka, M. Ikeda and K. Shimotohno. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.* (2005) in press.
- 7) K. Tamura, A. Oue, A. Tanaka, N. Shimizu, H. Takagi, N. Kato, A.

- Morikawa and H. Hoshino. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.* (2005) in press.
- 8) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, K. Shimotohno and N. Kato. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.* 107, 73-81 (2005)
- 9) K. Namba, K. Naka, H. Dansako, A. Nozaki, M. Ikeda, Y. Shiratori, K. Shimotohno, and N. Kato. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 299-309 (2004).
- 10) A. Naganuma, H. Dansako, T. Nakamura, A. Nozaki and N. Kato. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.* 64, 1307-1314 (2004).
- 11) Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380 (2004).
- 12) Suzuki T., Suzuki R., Hijikata M., Matsuda M., Li T-C., Matsuura Y., Mishiro S., and Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.* 78, 10820-10824 (2004).
- 13) Kaimori A., Kanto T., Limn C-K., Komoda Y., Oki C., Inoue M., Miyatake H., Itose I., Sakakibara M., Yakushiji T., Takehara T., Matsuura Y., and Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324, 74-83 (2004).
- 14) Watanabe R., Miyazawa T., and Matsuura Y. Comparison of serum sensitivities of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99, 89-93 (2004).
- 15) Migliaccio C.T., Follis K.E., Matsuura Y., and Nunberg J.H. Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 105, 47-57 (2004).
- 16) Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 39:563-569, 2004.
- 17) 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* 126:840-848, 2004.
- 18) Koike K, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Moriya K. Hepatitis C and Diabetes Mellitus: what is the metabolic pathway? *Gastroenterology* 127:1280-1281, 2004.
- 19) Koike K. Hepatitis C presenting as a metabolic disease: HCV induces insulin resistance. *Intervirology* 2005 in press.

- 20) Nakajima T, Katagishi T, Moriguchi M, Sekoguchi S, Nishikawa T, Takashima H, Watanabe T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. Tumor size-independence of telomerase length indicates an aggressive feature of HCC. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 1131-1135, 2004.
- 21) Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPAR alpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(2), 697-704, 2004.
- 22) Makiyama A, Itoh Y, Kasahara A, Imai Y, Kawata S, Yoshioka K, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Kakumu S, Hayashi N, Okanoue T. Characteristics of patients with chronic hepatitis C who develop hepato-cellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. *Cancer*, 101(7), 1616-1622, 2004.
- 23) Fujii H, Itoh Y, Yamaguchi K, Yamauchi N, Harano Y, Nakajima T, Minami M, Okanoue T. Chemokine CCL20 enhances the growth of HuH7 cells via phosphorylation of p44/42 MAPK in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(3), 1052-1058, 2004.
- 24) Itoh Y, Okanoue T. Ribavirin-induced hemolytic anemia in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol*, 39(7), 704-705, 2004.
- 25) Yamaguchi K, Itoh K, Ohnishi N, Itoh Y, Baum C, Tsuji T, Nagao T, Higashitsuji H, Okanoue T, Fujita J. Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepato-cytes in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 8(5), 796-803, 2003.
- 26) M Honda, T Shimazaki, and S Kaneko. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site (IRES) directed translation. *Gastroenterology* 128:449-462, 2005.
- 27) T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, N Hoshino, and S Kaneko. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics* 84(5):867-75, 2004.
- 28) K Kaji, S Yoshida, N Nagata, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Kojima, and S Kaneko. An open-label study of administration of EH0202, a health-food additive, to patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 39: 873-878, 2004.
- 29) T Takamura, M Sakurai, T Ota, H Ando, M Honda, S Kaneko. Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47(4):638-647, 2004.
- 30) Y Nakamoto, T Suda, T Momoi and S Kaneko. Different procarcinogenic

- potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res* 64(9):3326-3333, 2004.
- 31) T Shimakami, M Hijikata, H Luo, Y Y Ma, S Kaneko, K Shimotohno, and S Murakami. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78(6): 2738-2748, 2004.
- 32) A Daiba, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Yatsushashi, H Terasaki, A Ito, M Ogasawara, A Abe, J Yoshioka, K Hayashida, S Kaneko, M Kohara, S Ito. A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. *Biochem Biophys Res Commun* 315(4): 1088-1096, 2004.
- 33) Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279: 11719-11726, 2004.
- 34) Hiramatsu N, Kasahara A, Nakanishi F, Toyama T, Tsujii M, Tsuji S, Kanto T, Takehara T, Kato M, Yoshihara H, Naito M, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Meren H, Masuzawa M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Hayashi N. The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 29: 142-147, 2004.
- 35) Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N. Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 722-727, 2004.
- 36) Toyama T, Sasaki Y, Horimoto M, Iyoda K, Yakushijin T, Ohkawa K, Takehara T, Kasahara A, Araki T, Hori M, Hayashi N. Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. *J Hepatol* 41:637-643, 2004.
- 37) Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker III EB, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127: 1189-1197, 2004.
- 38) Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Kanto T, Tsuji S, Hori M, Hayashi N. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. *Hepatology* 40: 1190-1196, 2004.
- 39) Nakanishi F, Ohkawa K, Ishida H, Hosui A, Sato A, Hiramatsu N, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Alteration in gene expression profile by full-length hepatitis B

- virus genome.
Intervirology (in press).
- 40) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-6081, 2004.
- 41) Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190: 1919-1926, 2004.
- 42) Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Imai Y, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi K, Tamura S, Itoh Y, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *Journal of Viral Hepatitis* 11, 148-156. 2004.
- 43) 堀 剛、永田賢治、坪内博仁:肝細胞癌の経皮的治療(ラジオ波焼灼療法について).宮崎県内科医会誌 2-7, 2004
- 44) Raker AC, Tabor E, Okayama A, Yu WM, Kohara M, Mueller EN, Tsubouchi H, Stuver OS: HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV Viremia. *Transfusion* 44, 307-308, 2004.
- 45) Onaga M, Ido A, Hasuike S, Uto H, Moriuchi A, Kato J, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Enhanced expression of growth factors and imbalance between hepatocyte proliferation and apoptosis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid -defined diet. *Hepatology Research* 28, 94-101, 2004
- 46) 江藤敏治、林克裕、坪内博仁、亀井健二: 学生定期健康診断におけるエコー健診導入の意義 -肥満学生での検討- *CAMPUS HEALTH* 41, 111-116, 2004.
- 47) Okayama Ak, Stuver OS, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, Mueeler N, Hsieh Ch, Tachibana N, Tsubouchi H: Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia /lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 110, 621-625, 2004.
- 48) 井戸章雄、坪内博仁: HGFによる肝再生医療の現況. *ゲノム医学* 4, 61-67, 2004.
- 49) 大工原恭、坪内博仁: 肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor) -その発見の歴史、歯科医学との関連、臨床応用の現状- *生化学* 76, 640-649, 2004.
- 50) Birmann BM, Mueller N, Okayama A, Hsieh CC, Tachibana N, Tsubouchi H, Lennette ET, Harn D, Stuver OS: Serologic assessment of type 1 and type 2 immunity in healthy Japanese adults. *Cancer epidemiol biomarkers prev* 13: 1385-1391, 2004.

- 51) Kato J, Ido A, Hasuike S, Uto H, Hori T, Hayashi K, Murakami K, Terano A, Tsubouchi H. Transforming growth factor- β -induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an in vitro model of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 30, 34-41, 2004.
- 52) Ido A, Moriuchi A, Kim I, Numata M, Nagata Tsubouchi Y, Hasuike S, Uto H, Tsubouchi H: Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res* 30, 175-181, 2004.
- 53) Imai Y, Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Hiramatsu N, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi K, Tamura S, Itoh Y, Sasaki Yj, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N.: Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol* 39, 1069-1077, 2004.
- 54) Tsubouchi Hi: Sustained activation of epidermal growth factor receptor in cholangiocarcinoma: a potent therapeutic target? *Journal of Hepatology* 41, 859-861, 2004.
- 55) Sho Y, Fujisaki K, Sakashita H, Yamaguchi K, Tahara K, Kubozono O, Ido A, Tsubouchi H: Orally administered Kampo medicine, Juzen-taiho-to ameliorates anemia during interferon plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 39, 1202-1204, 2004.
- 56) Takami Y, Kanasaki K, Tsubouchi H, Ishii T, Yamamoto I, Gohda E: Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by interleukin-1 and its prevention by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 676-682, 2004.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費
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（HCV）NS5A遺伝子構造によるインターフェロンシグナル制御機構の検討

分担研究者： 榎本 信幸 山梨大学医学工学総合研究部・教授

研究要旨:近年C型肝炎ウイルス（HCV:hepatitis C virus）増殖系であるHCV replicon系が開発されたが、同システムにおいてはHCV増殖制御におけるウイルス因子のみならず、増殖に伴い変化する細胞側因子も検討可能であることから、肝発癌分子機序の解明にも重要なモデルであると考えられる。一方、repliconの増殖にはNS5A蛋白がkey moleculeであることが示唆されてきた。本研究ではreplicon増殖に影響を与えるウイルス側因子としてNS5A蛋白に焦点を絞り、mutagenesis analysisによる解析を行うと同時に、細胞側因子の変化についてインターフェロンシグナルを中心として検討した。その結果、NS5A蛋白リン酸化に関連するウイルスの遺伝子構造、さらに細胞側因子としてIRF-1および下流のインターフェロン誘導遺伝子群がreplicon増殖を制御していることが明らかになった。今後はこれら分子の直接のターゲット分子を同定することが、HCV増殖制御さらに肝発癌機序の解明につながるものと考えられる。

共同研究者：前川 伸哉 山梨大学医学部附属病院・助手

A. 研究目的

肝臓癌は肝炎ウイルスによって引き起こされる宿主細胞内異常を基盤とする。本研究の目的は新たに開発されたC型肝炎ウイルス（HCV:hepatitis C virus）増殖系であるHCV replicon系を用いてHCV増殖制御機構、さらにHCV増殖に伴い変化するインターフェロンを中心とした宿主細胞内因子の変化を明らかにすることにより、C型肝炎における発癌発症機序を解明することにある。

我々はHCVのNS5A遺伝子内のISDR (interferon sensitivity determining region)の構造が血中HCV量とinterferon (IFN)耐性を規定することを明らかとした (NEJM 1996)。一方、最近、細胞内でHCV RNAを増殖させうる画期的システムであるHCV repliconが開発されたが、国内外の研究によりその増殖にはNS5A-ISDR変異が必須であることが見いだされ、NS5A蛋白がHCV増殖のkey moleculeであることが示唆されてきた。我々は300症例以上のIFN治療成績とNS5A遺伝子に関する臨床データ、NS5A蛋白の転写活性化作用、IFN signal伝達抑制、

apoptosis 抑制等の機能に関する基礎的知見に加え、high throughput の HCV replicon 増殖定量系の開発および siRNA による HCV 治療への応用にも成功 (EMBOrep 2003) しているが、本研究では NS5A 蛋白に焦点を絞り、これまで明らかとした NS5A 蛋白の細胞内機能解析をさらに進展させるとともに、HCV 増殖を制御する細胞性因子を同定、これらの研究成果を統合することにより NS5A 蛋白を基軸とした HCV 増殖機構を明らかにすることを通じて肝臓癌発症機序を解明することを目標とする。

B. 研究方法 (2004年度)

Replicon の細胞内増殖が成り立つ機序を詳細に明らかにするため、ウイルス側および宿主側において必須である因子の検索と検討を行った。ウイルス側因子の解析においては、特に NS5A-ISDR および ISDR 上流に存在する serine cluster region の serine 残基に着目して、系統的な mutagenesis analysis を行い、replicon 増殖に与える影響を解析した。さらに、これら NS5A に多彩な変異を持った replicon に対するインターフェロンの増殖抑制効果について検討した。一方、ナイーブな Huh7 細胞と、replicon の増殖を著明に亢進させるように表現形質の変化した permissive Huh7 細胞を用いて、この両者で発現の変化している遺伝子を cDNA subtraction 等によって検索を行うことにより、replicon 増殖を可能にする宿主側因子について検討した。

C. 研究成果

(1) NS5A 遺伝子構造は replicon 増殖を制御する。

Serine cluster region における特定の 3 serine 残基 (S2197, S2201, S2204) により、また ISDR においてはアミノ酸変異数に応じて、replicon の細胞内増殖は上昇した。一方、これらのアミノ酸変異により NS5A 蛋白のリン酸化は制御されていたが、replicon 増殖亢進と過剰リン酸化型 NS5A 蛋白の発現低下が相関していた。

(2) HCV replicon のインターフェロン反応性は NS5A 蛋白構造によって変化する。

Serine cluster 変異 (S2201del)、あるいは 6 個以上の多数の NS5A-ISDR 変異をもつ replicon は、両領域に変異のない replicon に比してインターフェロンに対する反応が 10-100 倍高く、インターフェロン感受性であった。

(3) IRF-1 は replicon 増殖を制御する。

Replicon 増殖を著明に亢進させる permissive Huh7 細胞では、自然免疫系分子である IRF-1 と、その下流のインターフェロン誘導遺伝子群の発現が強く抑制されていた。一方、IRF-1 を強制発現すると HCV replicon の増殖は強く抑制され、replicon 増殖制御への IRF-1 経路の強い関連が示された。

D. 考察と結論

HCV replicon 増殖制御において、ウイルス側因子として、自身のリン酸化に関与する NS5A 蛋白の遺伝子構造が replicon の増殖のみならずインターフェロン反応性をも制御していることが示された。一方、宿主因子においては自然免疫系分子 IRF-1 とその下流であるインターフェロン誘導遺伝子

群が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。この結果は、HCVの細胞内増殖は、ウイルス・宿主、双方における機能性分子の相互作用において成り立つものであることを意味しており、今後はNS5Aリン酸化蛋白の宿主内ターゲット分子の同定、さらにHCV増殖を直接制御するインターフェロン誘導遺伝子の同定を行っていく予定である。

E. 研究発表 論文発表

- 1) Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N, Enomoto N, Itsui Y, Yamashiro T, Tanabe Y, Maekawa S, Nakagawa M, Chen CH, Kakinuma S, Oshima S, Nakamura T, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol* 2004; 78(18): 9713-20
- 2) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Ueda E, Kohashi T, Watanabe H, Chen C-H, Yamashiro T, Tanabe Y, Kanazawa N, Nakagawa M, Sato C, Watanabe M. Introduction of NS5A Mutations Enables Subgenomic HCV-Replicon Derived from Chimpanzee-Infectious HC-J4 Isolate to Replicate Efficiently in Huh-7 Cells. *J Viral Hepat.* 2004;11(5):394-403.
- 3) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen C-H, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Com* 2004;313(1):42-7
- 4) Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Ueda E, Maekawa S, Yamashiro T, Nakagawa M, Chen C-H, Kanazawa N, Kakinuma S, Watanabe M. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis* 2004;189(7):1129-39.
- 5) Ueda E, Enomoto N, Sakamoto N, Hamano K, Sato C, Izumi N, Watanabe M. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res.* 2004 Jun;29(2):89-96.

学会発表

- 1) Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Nobuhiko Kanazawa, Tsuyoshi Yamashiro, Yoko Tanabe, Yoshie Takeda, Tomoyuki Koyama, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Shinya Maekawa, Masayuki Kurosaki, Mamoru Watanabe, Nobuyuki Enomoto. Expression analysis of interferon-stimulated gene for antiviral activity against hepatitis C virus. (64/Poster) 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses October, 3-7, 2004; Heidelberg (Germany)
- 2) Yoko Tanabe, Naoya Sakamoto, Shinya Maekawa, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Tomoyuki Koyama, Kenichi Saito, Michinori Kohara, Mamoru Watanabe, Nobuyuki Enomoto, Adenoviral vector expressing small hairpin RNA can inhibit hepatitis C in vitro and in vivo. (73/Poster) 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses

October, 3-7, 2004; Heidelberg (Germany)

- 3) Tomoyuki Tomoyuki Koyama, Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Yasuhiro Itsui, Shinya Maekawa, Mina Nakagawa, Yoshie Takeda, Sei Kakinuma, Yoshiaki Yanai, Masashi Kurimoto, Mamoru Watanabe, Nobuyuki Enomoto. Analysis of antiviral effects on HCV replication by interferon alpha subtypes. (75/Poster) 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses October, 3-7, 2004; Heidelberg (Germany)
- 4) Shinya Maekawa, Naoya Sakamoto, Takahiro Kohashi, Yoko Tanabe, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Tomoyuki Koyama, Yoshie Takeda, Mamoru Watanabe, Nobuyuki Enomoto. Replication and interferon response of HCV replicons (184/Poster) 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses October, 3-7, 2004; Heidelberg (Germany)
- 5) Shinya Maekawa, Naoya Sakamoto, Masayuki Kurosaki, Takahiro Kohashi, Cheng-Hsin Chen, Mamoru Watanabe, Nobuyuki Enomoto. Analysis of interferon sensitivity for HCV replicons with different ISDR structures. (102108/Oral; AASLD Topic Forum) Digestive Disease Week May 15-20, 2004; New Orleans, LA (USA)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし