

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）  
分担研究報告書

ウイルス発がん機構の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)蛋白質が細胞周期の進行にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは、HCVの持続感染による肝発がん機構を理解する上で重要であるが、これまでの研究では、がん細胞株が頻用されている。そこで、我々は、非がん不死化肝細胞であるPH5CH8細胞に各種HCV蛋白質を安定的に発現させ、細胞周期の進行に対する影響を解析した。その結果、NS5Bが細胞周期のS期の進行を遅延させる現象を見出した。この現象をさらに解析した結果、ヒト不死化肝細胞における細胞周期の遅延は、NS5BのRNAポリメラーゼ活性に依存したToll-like receptor (TLR) 3の活性化を介したInterferon-βの発現誘導によるものであることを明らかにした。NS3/4Aはそのプロテアーゼ活性に依存してNS5BによるInterferon-βの発現誘導をほぼ完全に抑制したが、コアとNS5Bの共発現によるInterferon-βの発現高進を完全に抑制することはできないことが分かった。今後の実験モデル系として期待される全長HCV RNA複製細胞やルシフェラーゼを発現する全長HCV RNA複製細胞の樹立に成功し、それらの有用性を確認した。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者の約8割はC型肝炎ウイルス(HCV)の感染に起因していることが分かっているが、HCVによる肝発がん機構は未だよく分かっていない。HCV感染から肝発がんに至る特徴の一つとして、HCVの持続感染が長期間維持されることが挙げられる。

従って、発がんに至る過程において、HCVが宿主側因子に影響を与え続けているものと推定される。これまで多くの研究者により、各種ヒト培養細胞(肝細胞以外もあり)に対してHCVが与え

る影響についての解析がなされているが、既にごん化してしまった肝細胞を用いている場合がほとんどで、相反する結果が得られている場合も多い。

我々は以前より、HCVによる肝発がん機構の解析には、非がん細胞を用いることが重要と考え、クローン化したヒト不死化肝PH5CH8細胞を実験に用いている。本研究では、HCVが細胞増殖にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的として、PH5CH8細胞に各種HCV蛋白質を発現させ、細胞周期の進行を詳しく解析した。また、今年度は今後の実験に有用と考えられ

る HCV の増殖実験モデルの開発も試みた。

## B. 研究方法

(1) ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

PH5CH8 細胞にレトロウイルス遺伝子導入法により各種 HCV 蛋白質(core, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, 及び NS5B) を導入し、恒常的に発現させた。別のヒト不死化肝細胞である NKNT-3 細胞、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa, 並びにヒト肝細胞がん細胞 HuH-7 においても同様に NS5B を発現させた。それぞれの細胞株をチミジン・アフィジコリン二重ブロック法により細胞周期の G1-S 期境界に同調させた後、通常培養液に戻して S 期にリリースすることで、細胞周期の進行を FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest ソフトウェアを用いて解析した。

プロモデオキシウリジン(BrdU)による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、S 期進行遅延の定量的解析を行った。

RT-PCR は通常行われている標準的な方法により行った。培養細胞から抽出した総 RNA を用いて、オリゴ dT をプライマーとして逆転写酵素により cDNA を作成し、各種遺伝子特異的プライマーにより PCR を行い、mRNA の発現レベルを解析した。

RNA 干渉法による Toll-like Receptor (TLR) family の発現抑制は TLR3 と TLR4 特異的 siRNA により行った。コントロールとしてはルシフェラーゼ遺伝子の GL2 用に化学合成した

siRNA を用いた。

HCV NS5B 蛋白質などを発現するレトロウイルスベクター pCXbsr とホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に IRF3 の標的配列 (AGTTTCACTTTCCC) の 5 回繰り返し配列を有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) をヒト肝 PH5CH8 細胞に導入した。2 日後にそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定した。

(2) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

昨年度樹立した HCV-O 株由来の HCV subgenomic レプリコン, sO (旧名、IB-2R1) の上流に HCV-O 株由来の core から NS2 領域までの部分(新たに単離)を結合させ、HCV IRES で drive される G418 抵抗性遺伝子 (Neo<sup>R</sup>) と内部の EMCV IRES で drive される全長 HCV 遺伝子を有する dicistronic な全長 HCV RNA を作成した。この RNA を sO 細胞から IFN 処理により sO subgenomic レプリコンを排除した sOc cured 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

細胞内で複製可能な全長 HCV-O RNA の Neo<sup>R</sup> 遺伝子上流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、HCV-O 細胞を IFN 処理により HCV-O RNA を排除した Oc cured 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究成果

(1) ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

コントロールベクターを導入した PH5CH8 細胞では、リリース後 4 時間で S 期にそして、8 時間で G2-M 期に至り、12 時間では再び G1 期に戻ることから、正常に進行すると考えられた。同様の細胞周期の進行は core, NS3, NS4B, NS5A 発現細胞でも確認され、細胞周期の進行に影響は認められなかった。しかし、これとは対照的に、NS5B 発現細胞では、リリース後 8 時間で多くの細胞が S 期に残っており、12 時間でも G1 期に至っていないものが多く、細胞周期の S 期の進行が遅れていることが示唆された。

次に、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、NS5B 発現 PH5CH8 細胞における S 期進行遅延の定量的解析を行った。その結果、コントロールベクター導入細胞ではリリース後 12 時間で 77% の細胞が G2-M 期に達し、S 期残存細胞は僅か 5% であった。これに対して、NS5B 発現 PH5CH8 細胞では 12 時間で G2-M 期に達した細胞は 37% に低下し、未だ S 期に残存する細胞も 49% にのぼることが分かった。

これらの結果により、NS5B を発現させるとヒト PH5CH8 細胞における S 期の進行が遅れることが明らかとなった。

このような S 期進行の遅延効果は別のヒト不死化肝細胞である NKNT-3 細胞でも認められたが、がん細胞株である HeLa や HuH-7 では認められなかった。

S 期の進行遅延の原因として、IFN- $\beta$  の発現が考えられたことから、次にこの点について検討した。NS5B を発現させた PH5CH8, NKNT-3, HuH-7, 並びに HeLa 細胞における IFN- $\beta$  の mRNA の発現レベルを RT-PCR 法により解析した結果、NS5B を発現する PH5CH8 細胞と NKNT-3 細胞のみで IFN- $\beta$  の mRNA の発現誘導が起こっていることが分かった。NS5B による細胞周期の進行阻害と IFN- $\beta$  の mRNA の発現誘導とに相関がみられたことから、次に、抗-IFN- $\beta$  中和抗体処理によって NS5B による細胞周期の進行阻害が回復するかどうかを検討した。その結果、抗-IFN- $\beta$  中和抗体処理した NS5B 発現 PH5CH8 細胞では未処理の NS5B 発現 PH5CH8 細胞で見られる細胞周期の進行阻害が回復することが明らかとなった。以上の結果から、NS5B による PH5CH8 細胞の細胞周期進行阻害は IFN- $\beta$  の発現誘導が関与していることが明らかになった。

PH5CH8 や NKNT-3 細胞ではウイルスゲノムの複製が起こっていないにも関わらず、IFN- $\beta$  mRNA の発現誘導が認められたことから、NS5B が TLR family を活性化した結果である可能性

が考えられた。そこで、RNA 干渉法により TLR3 と TLR4 の発現を抑制させ、この可能性を検討した。その結果、TLR4 を抑制した細胞の IFN- $\beta$  の発現レベルはコントロール細胞と同等レベルであったのに対して、TLR3 を抑制した NS5B 発現細胞では IFN- $\beta$  の著しい発現低下が確認された。従って、NS5B による IFN- $\beta$  の誘導には TLR3 シグナル経路が関与していることが示唆された。この可能性は、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルによる定量的解析によっても支持された。

NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり細胞内の ER 膜へ局在することから、これらの性質が IFN- $\beta$  の誘導に必要であるかどうかを検討した。その結果、NS5B による IFN- $\beta$  の誘導には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性が必須であり、かつ ER 膜への局在も必要であることが分かった。

IFN- $\beta$  遺伝子のプロモーター領域には TLR3 からのシグナルにより活性化される IRF3 の標的配列が存在することから、この標的配列が 5 回繰り返された配列を有するプラスミドを PH5CH8 細胞に導入して NS5B がこの配列を活性化するかどうかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、NS5B がルシフェラーゼ活性を数倍上昇させることが分かった。しかし、この活性化は NS3/4A を発現させるとほぼ完全に抑制された。この抑制は、NS3 や NS4A 単独では起こらず、NS3 プロテアーゼ活性を欠く NS3 変異体/4A でも起こらないことから、プロ

テアーゼ活性に強く関連した効果であることが示唆された。しかしながら、新たに見出したコアと NS5B の共発現による IFN- $\beta$  の発現高進現象に対しては、NS3/4A の抑制効果は完全ではないことが明らかとなった。

(2) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

HCV-O 株由来の全長 HCV RNA が細胞内で効率良く複製している G418 耐性細胞 (O 細胞) の樹立に成功した。複製している全長 HCV RNA の遺伝子解析により、NS3 のヘリカーゼ領域内の 1609 番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に変化していることが分かり、このアミノ酸変化により HCV RNA の複製効率が著しく上昇することを実験的に明らかにした。

得られた HCV-O RNA の Neo<sup>r</sup> 遺伝子上流にルシフェラーゼ遺伝子を追加的に組み込んだ HCV-O RNA が効率よく複製している細胞の樹立に成功した。その結果、HCV-O RNA の複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより簡便にモニターできる初めての実験システムとなった。このアッセイシステムを用いて、HCV-O RNA の複製に対する IFN 感受性の定量化を行い、その有用性を確認した。

#### D. 考察

(1) ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

NS5B による TLR3 を介した IFN- $\beta$  の発現誘導の分子機構として、今回の実験結果から、IFN- $\beta$  の発現誘導には ER 膜に局在した RNA ポリメラーゼ活性が必須であることが示された。TLR3 のリガンドは 2 本鎖 RNA であることが知られていることから、HCV RNA の複製が起こらない状態においても NS5B が宿主由来の RNA を基質にして 2 本鎖 RNA を合成できる可能性が示唆された。

今回、見出した NS5B による S 期進行阻害により、細胞の増殖速度は低下し、一見がん細胞の性質とは逆のようにも思われるが、正確な DNA 複製が要求される S 期に多くの時間を要するようになることは、結果的に変異が生じる頻度が高まりゲノムの複製異常の原因になるのではないかと考えられる。今後はそのようなことが実際に起こりうるかどうかを実験的に評価していく予定である。

(2) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

今年度、国産の全長 HCV RNA 複製細胞 HCV-O およびその複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより定量化できるシステム系を確立できたことから、今後このシステムをフルに活用することにより HCV RNA の複製増殖状態における様々な発がん因子の活性評価が行えるものと考えられる。また、今回得られた細胞系は全 HCV 蛋白質の細胞内機能を解析するための有用な実験ツールになるものと思われる。さらに、これらの

細胞系は HCV RNA の複製阻害剤の探索や迅速な評価にも非常に有用なものになると考えられる。

## E. 結論

(1) NS5B の RNA ポリメラーゼ活性に依存した TLR3 の活性化に引き続いて IFN- $\beta$  の発現誘導が起こり、S 期の進行阻害が引き起こされることを明らかにした。

(2) 全長 HCV RNA 複製細胞 HCV-O およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞を樹立した。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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)
- 4) 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).
- 5) 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).
2. 学会発表
- 1) K. Naka, H. Dansako, N.  
Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato.  
Hepatitis C virus NS5B activates  
TLR3 signaling pathway in non-  
cancerous hepatocytes. p59,  
11th International Meeting on  
Hepatitis C Virus and Related  
Viruses, Heidelberg, Germany,  
2004.
- 2) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T.  
Nakamura, K. Naka and N. Kato.  
Characterization of cured cells  
derived from clonal Huh-7 cell line  
carrying replicating a newly  
established genome-length HCV  
RNA (HCV-O). p114, 11th  
International Meeting on Hepatitis  
C Virus and Related Viruses,  
Heidelberg, Germany, 2004.
- 3) H. Dansako, K. Naka, N.  
Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato.  
Distraction of interferon signaling  
pathway in non-cancerous  
hepatocytes by HCV Proteins,  
p190, 11th International Meeting  
on Hepatitis C Virus and Related  
Viruses, Heidelberg, Germany,  
2004
- 4) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K.  
Naka, K. Shimotohno and N. Kato.  
cDNA microarray analysis to  
compare HCV subgenomic and  
genome-length RNA replicating  
cells with their cured cells. p110,  
11th International Meeting on  
Hepatitis C Virus and Related  
Viruses, Heidelberg, Germany,  
2004
- 5) 仲 一仁、團迫浩方、小林直哉、  
池田正徳、加藤宣之. C型肝炎ウイルス  
NS5B蛋白質によるTLR3シグナル  
経路の活性化. 第52回日本ウイル  
ス学会学術集会. 2004年 横浜
- 6) 池田正徳、阿部健一、團迫浩方、  
中村孝志、仲 一仁、加藤宣之.  
HCV-O(1B-2)株由来の全長HCV  
RNA複製系の開発. 第52回日本ウイ  
ルス学会学術集会. 2004年 横浜
- 7) 田村一志、大上厚志、清水宣明、  
加藤宣之、星野洪郎. Native formの  
HCV envelopeを持つVSV  
pseudotype virusの作製、およびそ

の感染性についての検討. 第52回  
日本ウイルス学会学術集会. 2004年  
横浜

- 8) 阿部健一、池田正徳、團迫浩方、  
仲 一仁、下遠野邦忠、加藤宣之.  
C型肝炎ウイルス (HCV) レプリコン  
細胞および全長HCV RNA複製細胞を  
用いたcDNAマイクロアレイ解析.  
第52回日本ウイルス学会学術集会  
2004年 横浜

H. 知的財産権の出願・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

## シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシング

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨:C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白質はウイルス粒子の構造蛋白質としてだけでなく、宿主細胞の機能を多様に調節して、脂肪肝や肝癌の発症に深く関与している。本年度は、コア蛋白質の成熟とその細胞内局在に関するシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)の機能を解析した。SPP 遺伝子を肝臓よりクローニングし、コア蛋白質との結合様式と細胞内局在を解析した。SPP はコア蛋白質と共沈し、酵素活性を失活させた変異体はコア蛋白質の成熟を阻害した。SPP の切断に必須な領域はコア蛋白質の C 末端膜貫通領域のみならず、その上流の少なくとも3つのアミノ酸であることが示され、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。

### A. 研究目的

HCVに感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌へと移行する。HCV コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスが肝細胞癌を発症することから、コア蛋白質が HCV 感染による肝細胞癌発症に中心的な役割を演じていると考えられている。しかしながら、HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV コア蛋白質のプロセッシング、細胞内局在、そして肝癌発症の分子メカニズムは不明な点が多い。コア蛋白質は HCV 前駆体蛋白質から宿主のシグナルペプチダーゼ(SP)によって切り出された後、さらに C 末端が切断されて成熟型になると考えられている。この C 末端膜貫通領域の切断に膜内蛋白質分解酵素、SPP が関与している。本研究では、SPP によるコア蛋白質のプロセッシング機構を解析した。

### B. 研究方法

1) SPP のクローニング:ヒト肝臓 mRNA より SPP 遺伝子をクローニングし、その活性中心の二つの Asp を Ala に置換した変異体を作製した。  
2) SPP によるコア蛋白質のプロセッシング機構の解析:エピトプタグを付加した HCV コア蛋白質とその変異体を準備した。これらを培養細胞に発現させ、イムノブロット法と免疫沈降法により、コア蛋白質のプロセッシングならびに両者の相互作用を解析した。また、コア蛋白質と E1 蛋白質をシスに発現させ、E1 蛋白質の糖鎖付加の有無によって、コア蛋白質 C 末端膜貫通領域のシグナル活性を評価した。

### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

### C. 研究結果

1) コア蛋白質の細胞内局在:N 末端に EGFP を融合させた N 末端欠損変異体と ER マーカーとして作製した ER-DsRed ベクターを HeLa 細胞に発現させて共焦点レーザー顕微鏡で細胞内局在を観察した。N 末端から 128 番目までのアミノ酸を欠損した変異体では天然型と同じ局在を示したのに対し、151 番目まで欠損させると diffuse な局在を示したことから、コア蛋白質が小胞体に局在するためには C 末端以外に 128-151 アミノ酸領域が必要であることが示唆された。

2) 128-151 aa 領域内に存在する Leu<sup>139</sup>, Val<sup>140</sup>, Leu<sup>144</sup> の疎水性アミノ酸は SPP によるプロセスに重要である:Core 蛋白質の Leu<sup>139</sup>, Val<sup>140</sup>, Leu<sup>144</sup> を Ala に置換し、N 端に Flag-tag、C 端に HA-tag をつけて 293T 細胞に発現させた。天然型のコア蛋白質では C 末端がプロセスされたバンドが検出されたが、変異体では若干大きな C 末端がプロセスされていないバンドが検出されたことから、Leu<sup>139</sup>, Val<sup>140</sup>, Leu<sup>144</sup> の疎水性アミノ酸が SPP によるプロセスに重要であることが示唆された。

3) シグナル配列内の Ile<sup>176</sup> と Phe<sup>177</sup> は SPP によるプロセスに重要である:コア蛋白質の膜貫通領域に変異を入れると SPP によりプロセスされなくなることが報告されている。そこで、コア蛋白質の膜貫通領域に種々の変異を入れた変異体を作製し 293T 細胞に発現させた。Ile<sup>176</sup> と Phe<sup>177</sup> をそれぞれ、Ala と Leu に置換すると、プロセスされていないバンドが検出されたことから、シグナル配列内の Ile<sup>176</sup> と Phe<sup>177</sup> が SPP によるプロセスに重要であることが示唆された。

4) SPP とコア蛋白質の相互作用:シグナルペプチダーゼによる蛋白質のシグナル配列の切断後にそのシグナルペプチドをさらに小胞体の膜内で切断する膜内蛋白質分解酵素として SPP が同定され、HCV コア蛋白質の C 末端膜貫通領域の切



断に参与していることが報告された。SPP は7回膜貫通型の蛋白質であり、その活性部位は隣り合う膜貫通ドメインにある2つの Asp であると考えられている。ヒト肝臓の mRNA より SPP をクローニングし、活性中心である 219 番目と 265 番目の Asp を Ala に置換して C 末端に HA-tag をつけた変異体を作製した。N 末端に Flag-tag、C 末端に myc/His-tag をつけた Core-E1 の基質を作製し、SPP の変異体と共に 293T 細胞に発現させたところ、プロセスされていないバンドが共沈したことから、SPP と HCV コア蛋白質が相互作用していることを初めて直接的に証明できた。

5) 128-151aa 領域のコア蛋白質変異体は、シグナル配列がプロセスされないにもかかわらず、核に移行する。SPP により C 端がプロセスされるコア蛋白質は小胞体に局在し、シグナル配列のないコア 179 では小胞体膜に移行できず、ほとんど核に局在する。膜貫通領域変異体は小胞体周辺に局在するが、小胞体と局在は一致しなかった。139-144 アミノ酸変異体と 128-151 領域を欠損させた変異体では C 末端にシグナルペプチドがあるにもかかわらず核に局在した。したがって、SPP によりプロセスされることがコア蛋白質の小胞体膜局在に重要であると考えられた。さらに、139-144 アミノ酸領域変異体が核に移行したことから、この領域がコア蛋白質の小胞体局在を規定していることが示唆された。

#### D. 考察

SPP は SP による蛋白質のシグナル配列切断後、小胞体膜内でさらにシグナルペプチドを切断する膜内蛋白質分解酵素であり、アルツハイマー病の原因蛋白質と考えられている  $\beta$ -アミロイド蛋白質前駆蛋白質を切断するプレセニンと相同性を有している。SPP はプレプロラクチンや MHC class I のシグナルペプチドを切断することも報告されており、各種蛋白質の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細はまだ不明な部分が多い。培養細胞に SPP と HCV コア蛋白質を発現させたところ、SPP とコア蛋白質は共沈し、さらに、SPP の活性変異体はコア蛋白質のプロセッシングを抑制したことから、コア蛋白質は SPP と結合してプロセスを受けることを確認した。また、コア蛋白質の変異体を用いた解析から、SPP の切断に必須な領域は既報の成績と異なっており、コア蛋白質の C 末端膜貫通領域のみならず、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。また、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。さらに、SPP でプロセスされないコア蛋白質の変異体でも、E1 蛋白質のシグナル活性を保持していたことから、SPP によるプロセスとシグナル活性に必須な領域は異なることが示された。

#### E. 結論

1. HCV コア蛋白質の SPP によるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域を同定した。
2. 139-144aa の疎水性領域が、コア蛋白質の C 末端領域のプロセスと細胞内局在に重要な役割を演じていることが示された。
3. SPP の変異体はコア蛋白質の C 末端領域のプロセスを阻害した。
4. SPP 変異体とプロセスされないコア蛋白質が共沈した。
5. SPP によってプロセスされないコア蛋白質の変異体は安定性が低い傾向が認められた。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370-6380 (2004).
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).

##### 2. 学会発表

1. Moriishi K., Mochizuki R., Abe T., Mori Y., Moriya K., Koike K., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28g-dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 2-7, 2004.
2. Matsuo E., Limn C.K., Komoda Y., Kitagawa Y., Miyamoto H., Yagi S., Moriishi K., and

- Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line. 同上
3. Limn C.K., Komoda Y., Suzuki K., Otsubaki T., Tani H., Matsuo E., Tsuda Y., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Human fibroblast growth factor receptor 4 is a novel binding receptor for HCV. 同上
  4. Okamoto T., Kimura-Someya T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 同上
  5. Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 同上
  6. 森石恒司、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治:HCV コア蛋白質の成熟および分解の分解機構、第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、平成 16 年 9 月 29-10 月 2 日
  7. 松尾栄子、林 昌宏、菟田泰正、森石恒司、八木慎太郎、松浦善治:ヒト肝癌由来細胞で作製した HCV 様粒子の性状、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 16 年 11 月 21-23 日
  8. 林 昌宏、菟田泰正、鈴木健介、谷 英樹、大椿朋子、松尾栄子、津田祥美、森石恒司、宮村達男、松浦善治:HCV 感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の役割、同上
  9. 谷 英樹、Michael A. Whitt、森石恒司、松浦善治:HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV の作製、同上
  10. 森石恒司、中村 理加、宮本 大伸、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治:HCV コア蛋白質の局在および病原性発現における PA28  $\gamma$  の役割、同上
  11. 森 嘉生、脇田隆宇、小西英二、山下哲生、森石恒司、松浦善治:コア蛋白質が核に移行しない変異日本脳炎ウイルスの性状、同上
  12. 岡本貴世子、森石恒司、松浦善治:シグナルペプチドペプチダーゼによる C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 16 年 12 月 8-11 日
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

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

Tacrolimus による C 型肝炎ウイルス感染症病態への介入

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと到る一連の事象以外に、脂肪肝ならびに脂質代謝異常、糖代謝異常といった代謝異常を引き起こし、肝発癌等の病態への影響も示唆されている。我々は、マウスモデルを用いて脂質や糖の代謝異常が起こることを示してきた。この動物モデルでは、明らかな炎症の不在下に酸化ストレスの産生が増加しており肝発癌に関与しているが、この酸化ストレス発生はミトコンドリアの機能異常によることが推察されている。今回我々は、ミトコンドリア保護作用をもつ Tacrolimus (FK506)を HCV コア遺伝子発現トランスジェニックマウスに投与し、脂質および糖代謝への影響を検討した。3ヶ月間の Tacrolimus の投与によって、コアマウスにおける肝脂肪化、インスリン抵抗性は著明に改善された。免疫低下作用を有しない Tacrolimus アナログ等を投与することによって、HCV 感染症における肝脂肪化やインスリン抵抗性発現が抑制され、C 型肝炎における肝を含む病態の改善あるいは病態進行の抑制が期待される。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎と 2 型糖尿病の間の関連性が、疫学的研究のみならず、実験的なシステムにても確認されてきている。また、脂質代謝異常と C 型肝炎の関連性は以前から指摘されてきている。これらの代謝異常で注目すべきことは、慢性肝炎すなわち肝の線維化速度との関係である。すなわち、肝脂肪化やインスリン抵抗性の強い慢性 C 型肝炎患者においては、線維化の進行速度が大きく、これらの代謝異常が C 型肝炎の悪化因子であることが指摘されてきている。

慢性 C 型肝炎の治療は、現在のところインターフェロンを中心とした抗ウイルス薬

によって行なわれてきている。リバビリン併用ペグ・インターフェロンによって、1 型高ウイルス量の患者の 50% 近くで HCV 排除が可能となってきたが、残りの 50% の人では HCV 排除は現在不可能である。したがって、ウイルス排除できない状態で慢性肝炎の病態を改善させる方法が切望されている。そのような治療法が見いだされれば、慢性 C 型肝炎の進行、肝癌の発生の予防が可能となり、厚生労働行政上、経済上の意義は極めて大きいと考えられる。

B. 方法

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを用いて以下のような解析を行なった。

マウスはSPF下で通常の餌を与えられた。対照として正常littermateが用いられた。必要に応じて高カロリー（脂肪）食（Oriental Yeast Co, Ltd. Tokyo, Japan）を2ヶ月間与えた。カロリーは高カロリー食では4.70 kcal/g、普通食は3.56 kcal/gであった。なお、動物実験にあたっては、当施設のガイドラインに則り動物愛護上の配慮を十分に払い、倫理面で問題が生じないように行なった。

HCV コア遺伝子導入トランスジェニックマウス（3ヶ月齢♂）に対し、Tacrolimus（FK506）（0.1mg/kg）ならびに placebo を週3回、筋肉注射にて投与を行なった。同様に非トランスジェニック兄弟マウスについても、3ヶ月齢♂に対しTacrolimus あるいは placebo の投与を行った後、肝臓の脂質量、構成脂肪酸量、血糖値、インスリン値を検討した。なお、Tacrolimus あるいは placebo の投与期間は3ヶ月間である。

### C. 結果

（1）コア遺伝子導入トランスジェニックマウスに認められた、①肝組織中の脂肪量の増加、②構成脂肪酸に占める C16:1、C18:1 などの不飽和脂肪酸の増加、③インスリン抵抗性増強、のいずれもが、Tacrolimus 投与によって、placebo 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで改善した。

Tacrolimus 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスでは、血清インスリン値が

低下していた。

### D. 考察

HCV コア蛋白による肝臓の脂肪化にはミトコンドリア障害が関与していることが強く示唆されている。Tacrolimus は核カルシニューリンへの作用とともにミトコンドリア機能保護作用をもち、広く臨床への応用が行われつつある。今回の我々のデータから、Tacrolimus の有するミトコンドリア保護作用により HCV コア蛋白による脂質代謝異常（今回の検討では肝脂肪化）が改善していることが初めて示された。又、インスリン分泌低下作用については、コア蛋白存在の有無にかかわらず Tacrolimus が有している事が示唆された。

### E. 結論

Tacrolimus によって肝臓の脂肪化が抑制されることが示された。ミトコンドリア保護作用によることが推測された。免疫抑制作用を有しない Tacrolimus の誘導体によって、HCV 感染症により引き起こされる肝脂肪化の抑制が可能であることが示された。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防に極めて重要な発見といえる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) Koike K. Hepatitis C presenting as a metabolic disease: HCV induces insulin resistance. **Intervirolgy** 2005 in press.

## 2. 学会発表

1) K. Moriishi, R. Mochizuki, T. Abe, Y. Mori, K. Moriya, K. Koike, T. Suzuki, T. Miyamura, Y. Matsuura: PA28GAMMA-DEPENDENT DEGRADATION OF HCV CORE PROTEIN IN THE NUCLEUS IN VIVO, p57, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004

2) H. Fujie, S. Shinzawa, H. Miyoshi, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Moriya, K. Koike: HIGH-THROUGHPUT IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF THE LIVER IN A MOUSE MODEL FOR HCV-ASSOCIATED HEPATOCARCINOGENESIS: EFFECTS OF ALCOHOL AND HIGH-FAT DIET, p234, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004

3) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: INTERVENTION TO HEPATITIS C VIRUS-INDUCED PROGRESSIVE LIVER DISEASE WITH TACROLIMUS: A TRIAL ON IN A MOUSE MODEL, p238, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004

4) K. Koike, H. Miyoshi, K. Moriya, H. Fujie, T. Tsutsumi, Y. Shintani, A. Tajima, T. Horie: Oxidative stress in hepatitis c viral infection has its origin in disruption of the mitochondrial ETS function. p445A, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2004

5) K. Koike. JSH Single Topic Conference "NASH" "Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH", 2004 Kochi.

6) K. Koike. 40<sup>th</sup> Anniversary US-Japan Co-operative Medical Science Program Symposium Environmental/Hepatitis Joint Panel "HCV-associated hepatocarcinogenesis: Lessons from Animal Models", 2004 Kyoto.

7) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike. TACROLIMUS MAY PROTECT LIPID AND GLUCOSE METABOLISM FROM DIRECT EFFECT OF HCV CORE PROTEIN IN VIVO. The 3rd International Congress on Immunosuppression, 2004 San Diego

1) 畠山修司、森川 茂、西條政幸、森澤雄司、倉根一朗、小池和彦、木村 哲、森

屋恭爾, 種痘廃止後 26 年以上が経過した現在における抗天然痘免疫の保有状況 ; 78 回日本感染症学会総会, Vol 78, p158, 2004.4, 東京

2) 奥川 周、北沢貴利、中山久仁子、塚田訓久、川田真幹、柳元伸太郎、小池和彦、藤田敏郎、木村 哲、太田康男, マクロファージにおける TLR4 を介する細胞内シグナル伝達における Jak2 ; 78 回日本感染症学会総会, Vol 78, p186, 2004.4, 東京

3) 柳元伸太郎、太田康男、塚田訓久、福島篤仁、川田真幹、奥川 周、北沢貴利、森澤雄司、小池和彦、藤田敏郎、木村 哲, 敗血症患者の胆汁うっ滞に関する臨床病理学的検討 ; 78 回日本感染症学会総会, Vol 78, p188, 2004.4, 東京

4) 森屋恭爾、田島 藍、堤 武也、伊藤晃成、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、下池貴志、鈴木哲郎、宮村達夫、堀江利治、小池和彦, HCVcore 蛋白質はミトコンドリア電子伝達系 complex1 機能を障害する ; 40 回日本肝臓学会総会, Vol 45 suppl(1), A15, 2004.6 東京

5) 三好秀征、森屋恭爾、藤江 肇、新谷良澄、田島藍、堀江利治、小池和彦, C 型肝炎ウイルス関連肝発がんにおける酸化ストレスとミトコンドリア機能異常 ; 63 回日本癌学会総会, Vol 95 suppl, P73, 2004.9.福岡

6) 松浦善治、森屋恭爾、小池和彦、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達夫、森石恆司, HCV コア蛋白質の成熟および分解の分子機構 ; 63 回日本癌学会総会, Vol 95 suppl, p132, 2004.9.福岡

7) 森屋恭爾、三好秀征、小池和彦, C

型肝炎における酸化ストレス産生とミトコンドリア機能異常 ; 8 回日本肝臓学会大会, Vol 45 suppl(2), p44, 2004.10, 福岡

8) 貫井陽子、鈴木理恵、内田美保、畠山修司、糸山 智、新谷良澄、森澤雄司、森屋恭爾、小池和彦, 当院における使用器材別針刺し発生率の検討--安全器材導入による効果-- ; 第 53 回日本感染症学会東日本地方総会, 2004 合同学会, p153, 2004.10, 新潟

9) 小池和彦, 脂肪肝と肝発癌 : C 型肝炎からの考察 ; 35 回日本肝臓学会東部会, V45 suppl(3), p15, 2004.12, 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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）  
分担研究報告書

ガンキリンと DP1 のヒト肝臓癌における検討

分担研究者 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

**研究要旨：**ガンキリンは肝細胞癌(HCC)より単離された癌遺伝子である。ヒト・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、そのサイレンシングが肝癌細胞株に与える影響を検討した。ヒト肝癌細胞株を標的とした実験で、ベクターに感染した細胞がアポトーシスを起こすことを明らかにした。現在、アポトーシスの機序の解析を進めている。また、ガンキリンの ELISA の系による肝細胞癌の診断（腫瘍マーカー）への応用を目的とし、モノクローナル抗体のスクリーニングを進めている。

HCC において第 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(TFDP1)であることを明らかにした。転写因子 DP1 は転写因子 E2F ファミリーと heterodimer を形成し、細胞周期の進行に必要な遺伝子群を活性化する。TFDP1 の発現量は腫瘍径増大と有意に相関し、TFDP1 の発現を抑制すると肝癌細胞株の増殖が抑制された。

共同研究者

J Biol Chem 278: 10668 '03)。

京都府立医科大学大学院医学研究科  
消化器病態制御学

(1) Gankyrin が、検索した全ての HCC 例で過剰発現している。

助手 安居幸一郎

(2) Gankyrin を過剰発現させることで、線維芽細胞を癌化させることができる。また、Gankyrin の機能を阻害することで、癌化した線維芽細胞を死滅させることができる。

助手 山口寛二

教授 岡上 武

A. 研究目的

1. 肝癌の撲滅を目指す研究の一端として、共同研究者の藤田らは肝細胞癌より癌遺伝子 Gankyrin を単離し、肝細胞癌(HCC)の発癌機構の解明を目指し現在までに以下の点を明らかにしている (Nat Med 6:96 '00、

近年の分子生物学的手法の導入により、発癌を遺伝子の異常な発現と理解することが可能となり、異常な遺伝子を標的とした分子標的療法が提唱されている。この分

子標的療法の標的分子の候補は、  
(1) 癌で特異的に発現し、(2)  
機能を修飾されることで癌細胞の  
死滅をきたす分子であることが肝  
要であると考えられる。以上のこ  
とは、Gankyrin が分子標的療法の  
標的分子として有力な候補である  
ことを示唆している。

我々は、肝臓で導入遺伝子の発現に  
優れたレトロウイルスベクターの基本  
骨格を検討しており (Gene Ther 9: 303  
'00)、Gankyrin の siRNA を産生するベ  
クター(レトロウイルス)を用いれば、  
Gankyrin を標的分子とした分子標的療  
法の基礎的検討が可能であると考えた。  
また、Gankyrin が検索した全ての HCC  
例で過剰発現していることより、  
Gankyrin の腫瘍マーカーとしての可能  
性を検討するため、血清中の Gankyrin  
蛋白の測定を試みた。

2. CGH(comparative genomic hybridi-  
zation) 法は、複雑な染色体異常を呈す  
る固形腫瘍でも、全染色体を鳥瞰して、  
染色体の特定領域の欠失あるいは増幅  
を検出できる。とりわけ、遺伝子増幅  
領域の検出に優れている。

現在、分子標的治療薬として臨床応  
用されている乳癌治療の抗 ERBB2 抗体  
(Herceptin)や肺癌治療の EGRF チロシ  
ンキナーゼ阻害薬(Iressa)の標的であ

る ERBB2 や EGRF は、いずれも遺伝子増  
幅によって活性化を受けることが知ら  
れている。よって、閾値を越えた活性化  
を導く変異である遺伝子増幅の標的を  
同定することは、癌発生の分子機構の解  
明に寄与するだけでなく、癌細胞を選択  
的に傷害する分子標的治療薬の開発と  
いう側面からも重要である。

そこで、HCC の病態解明と治療標的  
分子の検索を目的に、HCC に生じたゲ  
ノム異常に基づく癌関連遺伝子の同定  
とその機能解析を行った。

## B. 研究方法

1. Gankyrin に対する特異的 siRNA  
の塩基配列を検討し、Gankyrin の  
siRNA (siGankyrin) を産生するレト  
ロウイルスベクターを作成した。ヒト  
肝癌細胞株にこのベクターを感染  
させ、siGankyrin のヒト肝癌細胞株  
の細胞周期やアポトーシスに与える  
影響を in vitro の実験系で行った。  
血清中の Gankyrin 蛋白の測定を目  
的とした ELISA の系を作成するため、  
モノクローナル抗体の作成、および、  
スクリーニングを行った。

2. HCC に生じたゲノム異常を  
CGH 法で網羅的にスクリーニングし、  
新規の遺伝子増幅領域について、共通  
増幅の最小単位(amplicon)を局限化し、  
amplicon 内の増幅標的遺伝子を同定



した。それら標的遺伝子の増幅あるいは発現亢進の程度を、サザン・ノザン法や real-time RT-PCR 法で測定し、種々の臨床病理学的因子との相関を検討した。

本研究においては、協力者に研究の目的、医学的意義、侵襲の程度を十分に説明する。さらに、研究結果の匿名性のみならず、いつでも同意を撤回できること、研究への同意は診療内容には一切関係しないこと、研究終了後は検体を破棄することについても説明し、予め、同意書に署名・捺印を得た後、研究を始めることとしている。

### C. 研究結果

1. siGankyrin を感染させた肝癌細胞株 HuH7 では、感染4日後にはコントロールの HuH7 細胞と比べて細胞数が有意に減少した。siGankyrin に感染した細胞では、コントロールの HuH7 細胞に比べて細胞内の Gankyrin が有意に減少することが Western blotting で示された。

フローサイトメトリーによる検討では、siGankyrin を感染させた HuH7 細胞では、subG1 期の細胞が 4.5% から 28% に増加していた。さらに、Annexin V 染色で HuH7 細胞のアポトーシスを検討したところ、Annexin V 陽性細胞が

2.4% から 37% に増加していることが示された。

Gankyrin に対するモノクローナル抗体の作成し、スクリーニングを行った結果、2種類の抗体が得られた。

2. 第13番染色体長腕 13q34 領域に新たな遺伝子増幅を検出した。

その標的遺伝子の1つは DP1 遺伝子 (*TFDP1*) であった。*TFDP1* の発現量は腫瘍径増大と有意に相関した。*TFDP1* を発現亢進している肝癌細胞株で *TFDP1* の発現をアンチセンス法で抑制すると、肝癌細胞株の増殖が抑制された。

また、*E2F1* と *TFDP1* の発現量は7種類の下流遺伝子 (*TYMS*, *DHFR*, *PCNA*, *RRM1*, *CCNE1*, *CDC2*, *MYBL2*) の発現量と有意に相関した。

### D. 考案

1. 肝癌細胞株において Gankyrin を抑制することによりポトーシスが誘導されることが明らかになった。

今後、HCC において、Gankyrin がどのようなメカニズムでアポトーシスの回避に関わっているかを検討する必要がある。

Gankyrin 測定用の ELISA の系は、現在、作成中である。

2. HCC における 13q34 遺伝子増幅の標的遺伝子 *TFDP1* は、増幅によっ

て発現亢進を受ける。転写因子 DP1 は E2F ファミリ heterodimer を形成し、細胞周期の進行に必要な遺伝子群を活性化する。DP1 は *E2F1* と協調して下流遺伝子を活性化することで HCC 細胞の増殖に関与することが示唆された。

今後、E2F/DP1 の下流遺伝子が肝発癌に及ぼす機能を解明することが、HCC の病態解明と治療標的分子同定のために重要と考えられた。

#### E. 結論

肝癌細胞株において、Gankyrin を抑制することによりポトースが誘導されることが明らかになった。

*TFDP1* は、HCC の増殖に関与することが示唆された。

(ガンキリンのヒト肝臓癌における検討は、京都大学大学院医学研究科分子病診療学講座との共同研究である)

#### F. 研究発表

1) 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.

2) 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.

3) 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 hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. *Cancer*, 101(7), 1616-1622, 2004.

4) 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.

5) Itoh Y, Okanoue T. Ribavirin-induced hemolytic anemia in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol*, 39(7), 704-705, 2004.

6) 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 hepatocytes in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 8(5), 796-803, 2003.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（分担）研究報告書

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  
（分担） 研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 包括的で網羅的な発現遺伝子情報としてB型、C型、非B非C型肝硬変および肝がんを含む17SAGEライブラリーを構築した。解析により約80万発現遺伝子よりなる世界最大の系統的な肝臓病における現遺伝子データベースを作製した。肝臓における固有のtranscriptは10万種を超えると予想された。また、これらの包括的な遺伝子情報を利用して、細胞回転が亢進した時期にC型肝炎ウイルスの増殖を亢進させる宿主蛋白Laを同定した。

A. 研究目的

我が国における肝細胞がんの多くは、肝炎ウイルスの持続感染によって引き起こされる慢性肝炎を背景として発症することが明らかにされている。しかし、その発症にいたる分子機序は十分に解明されていない。本研究では包括的に発現遺伝子解析を行い、慢性肝炎から肝発がんにいたる分子機序を解析する。

B. 研究方法

serial gene expression analysis (SAGE)法およびDNAチップ法を用いて、包括的な発現遺伝子解析を行い、得られた情報をデータベース化した。このデータベースを用いて肝臓、肝炎および肝細胞癌の特徴を求めた。また包括的に得られた結果から個々の遺伝子にもどり、肝炎ウイルスの増殖と肝細胞の関連を解析した。科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指

針」を遵守し、研究を行った。

C. 研究結果

これまでに合わせて17のSAGEライブラリーを作製し、約80万におよぶ発現遺伝子の情報を得た。現時点では系統的でかつ正確な世界最大の発現遺伝子情報となった。3'側の固有の転写物は10万種に達しようとしている。肝臓におけるtranscriptomeは優に10万種を超えるtranscriptからなっていると考えられた。

以前に、C型肝炎ウイルスの増殖が細胞回転にあわせて亢進することを報告した（Gastroenterology 2000）。今回、包括的発現遺伝子解析を用いることにより、この細胞回転が亢進する際に発現が上昇し、HCV-IRES活性を亢進させる宿主蛋白の重要なひとつがLa蛋白であることを同定した。

D. 考察

これまでの包括的な遺伝子解析から、世界で最大の正確で系統的な包

括的発現遺伝子情報をデータベース化した。これにより従来の病理学分類と異なるウイルス性慢性肝炎、および肝がんの分類が可能であり、複雑な肝炎・肝がんの臨床病態を分子レベルで解析することを試みた。

今回はさらに発現遺伝子情報を蓄積し、ヒト肝臓の transcriptome がヒト遺伝子数の少なくとも3倍以上あることを示した。今後さらに、これら transcript の発現機序、各 transcript と臨床的意義付けが重要な課題であると思われた。

また包括的に発現遺伝子を解析することによって複雑な細胞とウイルスとの関連を示すことが可能となり、HCVの増殖に重要な宿主蛋白が同定された。この蛋白は肝炎に伴う肝再生時に発現が亢進することから、肝炎と肝炎ウイルスとの関連を考える。あるいは治療を行う上で重要であると思われた。

#### E. 結論

SAGE および DNA チップを用いて正常肝、HCV および HBV 感染慢性肝炎および関連肝細胞がんの包括的な発現遺伝子情報を整備した。それをもとにした肝臓病学および肝炎・癌化の研究を行った。

#### F. 研究発表

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.