

200400683A

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16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17(2005)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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小池 和彦

平成17（2005）年3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 蛋白発現細胞を用いたミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析及びコア蛋白のミ  
トコンドリア局在化機構-----12  
鈴木哲朗
2. 肝炎・肝細胞癌における酸化ストレスの関与----- 21  
塚本和久
3. モデルを用いた C 型肝炎治療法の開発-----25  
森屋恭爾

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

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）  
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  
総括研究報告書

トランスジェニック・マウスを用いた肝発がんメカニズムの解析

主任研究者 小池和彦 東京大学医学部感染内科 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を用いて研究を行なった。

- (1) HCV コア蛋白により肝細胞癌が発生するマウスモデルを用いて、C型肝炎における肝発がんの機序が相当程度解明された。
- (2) HCVコア蛋白は、肝に組織学的な炎症なしに酸化ストレスを増加させて、肝発がんに関与していると推測された。HCVによる酸化ストレス産生の起源としては、ミトコンドリア電子伝達系が推定された。ミトコンドリアのプロテオーム解析を行ったところ、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Mn SOD、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) コア蛋白のミトコンドリア局在シグナルとしてアミノ酸112-152番領域を同定した。この領域はヘリックス構造をとり両親媒性領域を含むことが推定される。これは膜局在蛋白に特徴的な構造であり、ミトコンドリア外膜への局在化に働くことを裏付けている。
- (4) コア遺伝子マウスモデルを用いて、アルコールとHCVの肝発がんにおける相乗作用とその機序を明らかにした。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。
- (5) C型慢性肝炎とインスリン抵抗性の関連性が確立された。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のチロシン酸化の抑制が認められ、肝におけるインスリンシグナル伝達が障害されていることが示された。肝線維化、肝発がん等の慢性C型肝炎の肝病態に強く関わっていると推定される。
- (6) 免疫抑制剤であるFK506は、ミトコンドリア保護作用も併せ持つ。この薬剤によって、HCVコア蛋白による肝病態が改善されることが明らかになった。C型肝炎病態改善薬としてお効果が期待される。

## 分担研究者

鈴木哲朗 国立感染症研究所主任研究官  
塚本和久 東京大学医学部 助手  
森屋恭爾 東京大学医学部 講師  
堀江利治 千葉大学薬学部 教授

### 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感染症における肝癌が説明できないことを示している。

私たちは、HCVが肝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の直接的な肝癌活性を証明している。

HCVコア蛋白のもつ肝癌作用を中心として、HCVのもつ肝癌作用、その機序を明らかにし、慢性C型肝炎患者における肝癌抑制法の開発を目指す。

### B. 研究方法

(1) ヒトHCV関連肝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感染症における肝癌機序の解明を検討した。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した。

(2) 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した。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した。

#### (3) 8週齢の野生型マウス

(C57BL6/J) に、PAF-AHをコードするアデノウイルスベクター (AdPAFAH) あるいはコントロールアデノウイルスベクター (AdLacZ: b-galactosidaseをコードするベクター)、およびPBSを尾静脈より投与 ( $3 \times 10^9$  pfu/個体) し、投与前、投与後3日目、7日目、14日目、21日目の血漿を採取してトランスアミナーゼの経時的变化を検討した。

8週齢のC57BL6/JマウスにAdPAFAH、AdLacZ、あるいはAdHO1 (ヘムオキシゲナーゼ1をコードするアデノウイルスベクター) を尾静脈より投与 ( $4 \times 10^9$  pfu/個体) した後、翌日より四塩化炭素を連日10日間、以降の3週間は2回/週で、一回あたり0.6ml/kg BWで腹腔内投与した (総投与量9.6ml/kg BW)。投与の際には、四塩化炭素はオリーブ油で1:2に希釈した。各群8頭を用いた。これらのマウスの生存率

を観察した。

8週齢の C57BL6/J マウスに AdPAFAH、AdLacZ ( $3 \times 10^9$  pfu/個体)、あるいは PBS を尾静脈より投与し、その翌日に PBS にて 500 倍希釈した N-ニトロソジメチルアミン(N-NDMA)を 1 頭あたり 300ml 腹腔内投与した。各アデノウイルス投与群は 4 頭、PBS 群には 3 頭を用いた。N-NDMA 投与後の生存率を観察した。

(4) 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検討した。

(5) コア蛋白の発現と細胞内局在解析：コア蛋白の種々の部分欠損変異体と GFP との融合蛋白を発現するプラスミドを構築した。これらをヒト胎児腎臓由来 293T 細胞に導入し、蛍光顕微鏡観察によって発現する融合蛋白の細胞内局在を解析した。また、細胞の核、小胞体、ミトコンドリアなどを分画しウエスタンブロット解析を行った。Protease protection assay では、コア蛋白発現細胞のミトコンドリア分画を 30 mg/ml Proteinase K で 0°C、30 分間処理した後、ウエスタンブロット解析を行った。

## 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。

(2) コア蛋白の発現によってミトコンドリ

アの電子伝達系の障害が観察された。ROS 産生の起源として、このミトコンドリアの電子伝達系の障害、特にコンプレックス I の機能障害が想定された。

(3) 全 HCV 蛋白発現細胞を用いたミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析：

全 HCV 蛋白発現細胞 Hep394 及びコントロール細胞 Heps wx から調製したミトコンドリア画分の精製度、小胞体の混入がないことはウエスタンブロット法で確認した。蛋白発現のディファレンシャル解析は蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) システムによって行った。両細胞サンプルとも約 800 スポットが検出され、各 3 ロットのデータを統計的に解析することにより、蛋白量が Hep394 細胞で 1.5 倍以上 ( $p \leq 0.05$ ) に増加している 4 スポット、0.7 倍以下 ( $p \leq 0.05$ ) に減少している 3 スポットを選択した。全 HCV 蛋白の発現によって有意に増加した蛋白は prohibitin であり、低下した蛋白は、short/branched chain acyl-coA dehydrogenase (SBCAD) 及び alpha enolase であった。

(4) コア蛋白のミトコンドリア局在化機構：

コア蛋白の N 末端側及び C 末端側部分欠損変異体を用いた発現解析から、コア蛋白のミトコンドリア局在にはアミノ酸 112-152 番領域が重要であることがわかった。この領域はコア蛋白の小胞体局在化も規定していた。ミトコンドリアは外膜、膜間腔、内膜、マトリックスから形成されているが、コア蛋白はミトコンドリアのどの部分に局在するのかを調べるため、Protease protection assay

を行った。ミトコンドリア分画のコア蛋白は Proteinase K 処理により完全に消失した。これはミトコンドリア外膜蛋白である Tom20 と同じパターンであり、内膜蛋白 Tim17 はこの消化条件では全く影響を受けなかった。

(5) 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。

(6) 正常マウスにおいては、PAF-AH 過剰発現はアデノウイルス投与による肝障害を、ラットにおける検討の場合と同様に、有意に抑制した。しかし、四塩化炭素および N-NDMA による肝障害モデルに PAF-AH あるいは HO-1 を発現させても、今回検討した用量ではその生存率には大きな効果を有さなかった。現在、投与四塩化炭素および N-NDMA 投与量を変更して更なる検討を行っているところである。

(7) 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。肝線維化、肝発癌等の慢性 C 型肝炎の肝病態に強く関わっていると推定される。

#### 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が、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り、肝発がんの主要な経路の一つと考えられた。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推定された。また、コア蛋白のミトコンドリアへの移行も確認された。すなわち HCV 感染症は、炎症不在のもとで、すでに ROS の産生過剰状態にあるといえる。そこへさらに炎症やアルコールが加わることで、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)- $\alpha$  や インターロイキン (IL)-1 $\beta$  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、cyclin D1, CDK4 等の発現亢進をきたして癌化等の病原性をもたらしていると考えられる。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れ、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。

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、組織学的な炎症像(histological inflammation)は無いが、生化学的には炎症が既に起こっている(biochemical inflammation)とも言える。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。

先に述べたごとく、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。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。

さらに、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進行に一定の作用をもつことが示されている。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され、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・シグナル伝達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。

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) 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 as a metabolic disease: HCV induces insulin resistance. *Intervirology* 2005 in press.
- 5) Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K. Hepatitis C Virus Core Protein Exerts an Inhibitory Effect on Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1 Gene Expression. *J Hepatol* 2005 in press.
- 6) Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005 in press.
- 7) Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005 in press.
- 8) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immun* 2005 in press.
- 9) Masubuchi Y, Suda C, Horie T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Hepatol.* 42 (1), 110-116, 2005.
- 10) Iso-O N, Noto H, Hara M, Togo M, Karasawa K, Ohashi N, Noiri E, Hashimoto Y, Kadowaki T, Kimura S, Watanabe T, Tsukamoto K. Adenovirus-mediated gene transfer and lipoprotein-mediated protein delivery of plasma PAF-AH ameliorates proteinuria in rat model of glomerulosclerosis. *Molecular Therapy* (in press)

- 11) Ishikawa T., Fukushima Y., Shiobara Y., Kishimoto T., Tanno S., Shoji I., Suzuki T., Matsui T., Shimada Y., Ohyama T., Nagai R., and Miyamura T. An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, (2005) (in press).
- 12) Suzuki T., and Suzuki, R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. *In: FLAVIVIRIDAE: Pathogenesis, Molecular Biology and genetics.* (2005) (in press).
- 13) Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 79: 1271-1281 (2005).
- 14) Suzuki T., Suzuki R., Li J., 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).
- 15) 小池和彦. B型肝炎 内科外来診療実践ガイド MP 21:150-160, 2004.
- 16) 小池和彦. 性感染症診断・治療ガイドライン B型肝炎 日本性感染症学会雑誌 15:52-54, 2004.
- 17) 三好秀征、小池和彦. C型肝炎ウイルス感染と酸化ストレスについて 肝臓 45: 285-294, 2004.
- 18) 小池和彦. HIV・HCV重複感染時の診療ガイドラインについて. 日本病院薬剤師会雑誌 40:941-944, 2004.
- 19) 小池和彦. 三好秀征. C型肝炎ウイルスと他のウイルスの重複感染症感染とその病態的意義. 臨床とウイルス 32: 163-169, 2004.
- 20) 小池和彦. HCV コア蛋白トランスジェニックマウスによる肝発癌機構の解明. ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 62: 131-134, 2004.
- 21) 森屋恭爾. 小池和彦. C型肝炎感染はどうして高率に慢性化するのか(ウイルス因子と宿主因子). ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 62: 405-407, 2004.
- 22) 小池和彦. A型肝炎. 感染症 竹田美文、木村哲編集. 朝倉書店 2004、p98-99.
- 23) 小池和彦. E型肝炎. 感染症 竹田美文、木村哲編集. 朝倉書店 2004、p100-102.
- 24) 小池和彦. 急性ウイルス肝炎(A型とE型を除く). 感染症 竹田美文、木村哲編集. 朝倉書店 2004、p198-201.
- 25) 森屋恭爾. 小池和彦. 肝炎ウイルス感染の予防. *Medicina* 41:1687-1689, 2004.
- 26) 小池和彦. C型慢性肝炎. ドクターサロン 48: 817-820, 2004.
- 27) 宮村達男、河岡義裕、小池和彦. 感染症新時代. 現代医療 36: 2154-2173, 2004.

- 28) 塚田訓久、小池和彦. HIV・HCV 重複感染症の現状. 現代医療 36: 2294-2298, 2004.
- 29) 鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスと肝発癌 臨床とウイルス 32: 156-162 (2004).
- 30) 村上恭子、鈴木哲朗. HCV の新たな感染系及び HCV-RNA 複製系の開発動向. ウイルス性肝炎 (上) 日本臨床 増刊号, 62: 111-115 (2004).
- 31) 相崎英樹、鈴木哲朗. HCV-RNA 複製および HCV 増殖の分子メカニズム. ウイルス性肝炎 (上) 日本臨床 増刊号, 62: 81-84 (2004).
- 32) 鈴木哲朗、松浦善治. HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004. 117-120 (2004).

## 2. 学会発表

- 1) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures. 40<sup>th</sup> Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 2004 年 12 月.
- 2) 勝二郁夫、白倉雅之、市村 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、梶山裕一、下地 徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男. MEF タグ精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 3) 鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、松田麻未、森石恆司、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 4) 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男. ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連. 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月.
- 5) 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文. C 型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 6) 白倉雅之、勝二郁夫、市村 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、梶山裕一、下地 徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男. MEF tag 精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 7) 森石恆司、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 PA28g の役割. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 8) 鈴木亮介、坂本真一郎、下池貴志、森石恆司、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の小胞体、ミトコンドリア、核への局在を規定するシグナルの解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.

- 9) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、勝二郁夫、佐多徹太郎、鈴木哲朗、宮村達男。三次元肝細胞培養システムによるC型肝炎ウイルス(HCV)粒子形成。第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月。
- 10) 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆。HCV envelope E1 (signal peptide)-E2をコードするDNAを用いたHCV E2特異的CTLの誘導。第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月。
- 11) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男。高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsのSARS生ワクチンとしての応用。第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月。
- 12) Shirakura, M., Shoji, I., Ichimura, T., Suzuki, R., Suzuki, T., Sugiyama, Y., Shimoji, T., Murakami, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., and Miyamura, T. Proteomic analysis of hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月。
- 13) Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Moriishi, K., Watanabe, R., Ishii, K., Numberg, J.H., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月。
- 14) Fukasawa, M., Sato, S., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing hepatoma cell lines. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月。
- 15) 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. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月。
- 16) Moriishi, K., Mochizuki, R., Abe, T., Mori, Y., Moriya, K., Koike, K., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. PA28gamma-dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月。

- 17) Murakami, K., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Tanaka, K., Shoji, I., Sata, T., Suzuki, T., Bartenshlarger, R., and Miyamura, T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 18) 松浦善治、森屋恭爾、小池和彦、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司. HCV コア蛋白質の成熟および分解の分子機構. 第63回日本癌学会学術総会, 2004年9月.
- 19) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures of human hepatoma cells. Fuji Forum 2004. 2004年8月.
- 20) 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、鈴木哲朗、宮村達男、堀江利治、小池和彦. HCV core 蛋白質はミトコンドリア電子伝達系 complex I 機能を障害する. 第40回日本肝臓学会総会, 2004年6月.
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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 ON THE MITOCHONDRIAL ETS FUNCTOIN, p445A, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2004
- 24) K Koike. JSH Single Topic Conference “NASH” “Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH” , 2004 Kochi.
- 25) 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.

- 26) 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、 HCV core 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 2004 東京
- 27) 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 2004 福岡
- 28) 松浦善治、森屋恭爾、小池和彦、  
田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、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 2004 福岡
- 29) 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 2004 福岡

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
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  
分担研究報告書

HCV 蛋白発現細胞を用いたミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析  
及びコア蛋白のミトコンドリア局在化機構

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

研究要旨

昨年度、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について報告した。今回は全 HCV 蛋白を産生する細胞系でミトコンドリアのプロテオーム解析を行い、細胞増殖に関連するミトコンドリアシャペロン prohibitin の発現亢進、アミノ酸代謝に関連する short/branched chain acyl-coA dehydrogenase の発現低下などを見出した。prohibitin の変化はコアトランスジェニックマウス肝組織での結果が再現された。

コア蛋白のミトコンドリア局在シグナルとしてアミノ酸 112-152 番領域を同定した。この領域はヘリックス構造をとり両親媒性領域を含むことが推定される。これは膜局在蛋白に特徴的な構造であり、ミトコンドリア外膜への局在化に働くことを裏付けている。

A. 研究目的

HCV コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスの肝臓においては、酸化還元状態が変化していることが知られ、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。

昨年度、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い、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、及び 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。そこで今回は、コア蛋白を含む全

HCV 蛋白を産生する細胞株について同様の手法でミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析を行った。また、種々のコア蛋白変異体を作製しミトコンドリア局在化に重要なコア蛋白領域の同定を試みた。

## B. 研究方法

### プロテオーム解析：

全 HCV 蛋白を恒常的に発現する細胞はヒト肝癌 HepG2 細胞由来株

(Hep394) 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 (Aizaki et al., *Hepatology* 36: 1431-1437 (2002))。各細胞懸濁液から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し CyDye 色素 (Hep394: Cy5, Heps wx: Cy3) で標識した。等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動により蛋白分離を行った。一次元目の泳動には Immobiline Dry Strip gel, pH 4-7 linear, 13 cm (Pharmacia 社) を用い、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。泳動終了後のゲルは、画像取り込み装置 (Typhoon 9400: Amersham Bioscience 社) によりイメージのデジタル化を行った。DeCyder ソフトウェアを用いてスポット解析を行

い、別々に調製したサンプルによる 3 回の実験から再現性よく発現変動を示した蛋白スポットを選抜した。これらの蛋白スポットをゲルから切り出し、トリプシンあるいはリジルエンドペプチダーゼによる in-gel digestion を行った後、MALDI-TOF MS を用いた質量分析で蛋白を同定した。

### コア蛋白の発現と細胞内局在解析：

コア蛋白の種々の部分欠損変異体と GFP との融合蛋白を発現するプラスミドを構築した。これらをヒト胎児腎臓由来 293T 細胞に導入し、蛍光顕微鏡観察によって発現する融合蛋白の細胞内局在を解析した。また、細胞の核、小胞体、ミトコンドリアなどを分画しウエスタンブロット解析を行った。Protease protection assay では、コア蛋白発現細胞のミトコンドリア分画を 30 mg/ml Proteinase K で 0℃、30 分間処理した後、ウエスタンブロット解析を行った。

## C. 研究結果

全 HCV 蛋白発現細胞を用いたミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析：

全 HCV 蛋白発現細胞 Hep394 及びコントロール細胞 Heps wx から調製したミトコンドリア画分の精製度、小胞体の混入がないことはウエスタンブロット法で確認した。蛋白発現のディファレンシャル解析は蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) システムによって行った。両細胞サンプルとも約 800



スポットが検出され (図 1)、各 3 ロットのデータを統計的に解析することにより、蛋白量が Hep394 細胞で 1.5 倍以上 ( $p \leq 0.05$ ) に増加している 4 スポット、0.7 倍以下 ( $p \leq 0.05$ ) に減少している 3 スポットを選択した。このうち、質量分析によって蛋白の同定に至ったものを表 1 にまとめた。全 HCV 蛋白の発現によって有意に増加した蛋白は prohibitin であり、低下した蛋白は、short/branched chain acyl-coA dehydrogenase (SBCAD) 及び alpha enolase であった。コア蛋白のミトコンドリア局在化機構：

コア蛋白の N 末端側及び C 末端側部分欠損変異体を用いた発現解析から、コア蛋白のミトコンドリア局在にはアミノ酸 112-152 番領域が重要であることがわかった。この領域はコア蛋白の小胞体局在化も規定していた。ミトコンドリアは外膜、膜間腔、内膜、マトリックスから形成されているが、コア蛋白はミトコンドリアのどの部分に局在するのかを調べるため、Protease protection assay を行った (図 2A)。ミトコンドリア分画のコア蛋白は Proteinase K 処理により完全に消失した。これはミトコンドリア外膜蛋白である Tom20 と同じパターンであり、内膜蛋白 Tim17 はこの消化条件では全く影響を受けなかった。

#### D. 考察

今年度、発現プロテオミクスの新技術である 2D-DIGE システムを導入した。

このシステムでは、多重蛍光標識した複数 (~3 種類) のサンプルを同一ゲル上で泳動することができる。これにより従来の二次元電気泳動法の主な問題点であるゲル間での変動を回避することができ、統計学的な裏付けがあり定量性の高いデータを得ることが可能となった。この手法で Hep394 細胞を解析した結果、量的変動の最も顕著であったのは SBCAD の低下であった。SBCAD は、アミノ酸 (イソロイシン、バリン) の代謝に重要な酵素であることが知られていると同時に、脂肪酸の  $\beta$  酸化の初期反応を触媒する働きがある。SBCAD は、short-straight chain と short-branched chain acyl-CoA 誘導体を基質とするが、アミノ酸代謝に関わる (S)-2-methylbutyryl-CoA を最も効率よく分解することが報告されており、主に分枝脂肪酸の分解を介したアミノ酸代謝を担っている可能性が高い。分枝脂肪酸は動物細胞ではほとんど生合成されないものの、植物性の食品などを通じて体内に取り込まれている。HCV 感染に伴って肝臓中で分枝脂肪酸の蓄積が進むのか、アミノ酸代謝が変化をうけるのかなど今後の検討である。

Hep394 細胞で発現が亢進していたミトコンドリア蛋白は prohibitin であった。prohibitin の発現が、コア蛋白発現細胞株、コアトランスジェニックマウスの肝臓で亢進することを昨年度報告した。今回の結果は、コア蛋白発現に起因するミトコンドリア prohibitin 量の増加が

HCV 全蛋白を産生する細胞中でも認められることを示している。prohibitin はミトコンドリアシャペロンとして働くだけでなく細胞増殖にも関与することが知られており、HCV の感染あるいは蛋白発現に伴ってprohibitinを介したミトコンドリア機能及び細胞増殖の制御がどのように変化するかを検討する予定である。

コア蛋白の細胞内局在化機構を調べ、ミトコンドリア局在にはアミノ酸112-152番領域が重要であることを示した。多くのミトコンドリア蛋白はN末端シグナル配列を有し、ミトコンドリアへの標的に伴ってシグナル部位が切断される。一方、ある種のミトコンドリア外膜蛋白ではこのような配列を持たず、内部またはC末端側の配列を介してミトコンドリアへ移行することが報告されている。HCV コア蛋白は後者の一つと考えられる。コア蛋白のミトコンドリア標的配列から推定される二次構造と $\alpha$ -Helical plotをそれぞれ図2Bと2Cに示した。この領域はヘリックス構造をとり、立体的に極性アミノ酸が一端に疎水性アミノ酸が他端に配置されることから両親媒性(amphipathic)を示すことが示唆された。これは膜局在蛋白に特徴的な構造であり、ミトコンドリア外膜、小胞体への局在化に働くことを裏付けている。両オルガネラへの移行シグナルが共通であることから、新たに産生されたコア蛋白は、小胞体由来でミトコンドリア膜に接して存在する

mitochondria-associated membraneを介して小胞体膜からミトコンドリアへ移行していくというモデルが考えられる。

## E. 結論

ミトコンドリアのプロテオーム解析から、全 HCV 蛋白産生細胞においてprohibitin の発現が亢進すること、short/branched chain acyl-coA dehydrogenase 及び alpha enolase が低下することを見出した。

コア蛋白のミトコンドリア局在シグナルとして、両親媒性領域を含むアミノ酸112-152番領域を同定した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa T., Fukushima Y., Shiobara Y., Kishimoto T., Tanno S., Shoji I., Suzuki T., Matsui T., Shimada Y., Ohyama T., Nagai R., and Miyamura T. An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, (2005) (in press).
- 2) Suzuki, T., and Suzuki, R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. *In: FLAVIVIRIDAE: Pathogenesis, Molecular Biology and genetics.* (2005) (in press).
- 3) Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T.,

- Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 79: 1271-1281 (2005).
- 4) Suzuki T., Suzuki R., Li J., 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).
- 5) 鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスと肝発癌 臨床とウイルス 32: 156-162 (2004).
- 6) 村上恭子, 鈴木哲朗. HCV の新たな感染系及びHCV-RNA複製系の開発動向. ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 増刊号, 62: 111-115 (2004).
- 7) 相崎英樹, 鈴木哲朗. HCV-RNA複製およびHCV増殖の分子メカニズム. ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 増刊号, 62: 81-84 (2004).
- 8) 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV感染レセプター. 肝疾患 Review 2004. 117-120 (2004).
2. 学会発表
- 1) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures. 40<sup>th</sup> Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 2004年12月.
- 2) 勝二郁夫, 白倉雅之, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 梶山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男. MEFタグ精製-プロテオーム解析によるC型肝炎ウイルスCore蛋白新規結合因子の同定. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.
- 3) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 松田麻未, 森石恆司, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.
- 4) 亀岡洋祐, 伊東玲子, 笠間 毅, 鈴木哲朗, 猪原登志子, 武曾恵理, 橋本雄之, 鈴木和男. ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.
- 5) 飯島沙幸, 石井孝司, 李 永仲, 岩田奈織子, 八木慎太郎, 山口健次郎, 槇昇, 吉崎佐矢香, 町田早苗, 木村展之, 鈴木哲朗, 佐多徹太郎, 宮村達男, 明里宏文. C型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.
- 6) 白倉雅之, 勝二郁夫, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 梶山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男. MEF tag精製-プロテオーム解析によるC型肝炎

- 炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 7) 森石恆司、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 PA28g の役割. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 8) 鈴木亮介、坂本真一郎、下池貴志、森石恆司、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の小胞体、ミトコンドリア、核への局在を規定するシグナルの解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 9) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、勝二郁夫、佐多徹太郎、鈴木哲朗、宮村達男. 三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 10) 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆. HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 11) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男. 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の SARS 生ワクチンとしての応用. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月.
- 12) Shirakura, M., Shoji, I., Ichimura, T., Suzuki, R., Suzuki, T., Sugiyama, Y., Shimoji, T., Murakami, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., and Miyamura, T. Proteomic analysis of hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月.
- 13) Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Moriishi, K., Watanabe, R., Ishii, K., Numberg, J.H., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004 年 10 月.
- 14) Fukasawa, M., Sato, S., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing