

2005000997

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 三代 俊治

平成 18 年 (2006) 4 月

まえがき

此の研究班は新しい班であるが、実際には、約半世紀前から存在する日米醫學協力研究会という（厚労・文科・外務三省合同の）組織の中の肝炎部會のことを指す。我々はこれを『日米肝炎』という名前呼び、日米間で逐年交互開催する合同會議を毎年楽しみにしていた。平成 17 年度より其の財源が厚労科研費の枠組に入ることになったので、『日米肝炎』は『主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための日米合作的肝炎ウイルス基礎研究』という長ったらしい名前に變化した。しかし、變化は名前だけではなかった。

本班の班員や班友の殆んど全ては、厚労科研費によって助成される別の班（複数）にも所属している。しかも、……。一寸待て、此處に新たに作文するよりは、吉川展代女史（厚労省）相手にこぼしたグチを引用する方が手取り早い。

……正直に申せば、主任研究者の私も分担研究者四人も厚労科研費による研究班を持っていて、申請書に記載したテーマの殆んどは他申請とダブる部分を持っています。そうならざるを得ない理由を以下に述べます。本研究班の特殊性：本件に関する厚労科研費の申請は、従来から存在する日米醫學協力研究事業肝炎部會（以下『日米肝炎』）の研究活動をサポートして頂く為の財源を確保する目的で行うものと私は理解しています。日米肝炎は、特定の学術的課題の解決の為に結成される通常の厚労省研究班と異なり、日米間の科学協力によりアジア地域の肝炎・肝癌に関する諸問題に対処するという目的で存在する国際協力事業（based on Johnson-Sato communique）ですから、従前その活動の主な部分は米国やアジアの研究者との共同研究に当てられてきました（具体的には出張や招聘や合同會議開催）。ところが、昨年来、「国際交流に使用可能な研究費は全体の 20% 以下」という制限が生じ、従来の活動を継続することが困難になりつつあります。80% を使って実施することが可能なのは、部會員夫々の専門研究であって、その専門研究の大半に対しては既に別の財源から研究費が支給されていますから、ダブリが生ずるのは無理からぬところです（専門家は専門バカであって専門以外のことは出来ませぬから）。日米肝炎の活動の特殊性に鑑みて、20% という枠を撤廃して頂くのが最良の解決策であると愚考致します。さすれば、専門バカ集団をオーケストレートした學際的國際的研究事業が可能になると思います……

そのような次第で、本報告書に記載されている研究成果の殆んどは、別班の報告書にも記載されている。投下される研究費が多ければ多いほど研究は進むから、それはそれでよいとする考え方もあるだろうが、頭と金は使い方次第である。目的に応じた研究費使用を可能にすべく、杓子定規的使用枠を撤廃して頂きたいと切に思う。

主任研究者 三代 俊治

総括研究報告書&分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
平成 17 年度
総括研究報告書

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

主任研究者 三代 俊治 東芝病院研究部長

研究要旨：本研究は、日米醫學協力研究会（United States - Japan Cooperative Medical Science Program, USJCMSP）肝炎部會（Hepatitis Panel）の研究活動を全く継承する形で実施された。USJCMSP の理念が「アジア地域住民を疾病苦から解放する為に日米が協力して醫學研究を行う」という点にあることに鑑みて、我々は、予てよりアジア地域肝疾患の主原因であり続けて来た B 型肝炎ウイルス（hepatitis B virus, HBV）と E 型肝炎ウイルス（hepatitis E virus, HEV）は勿論のこと、同地域で現在 emerging の様相を見せつつある C 型肝炎ウイルス（hepatitis C virus, HCV）についても、日米共同で基礎研究を行った。本年度の主な研究成果は以下の如くである。(I) HCV : i) 本班の班員・班友によって開発された高複製能レプリコン JFH-1 が日米両国の研究者によって共有され、抗ウイルス剤の評価や持続感染機構の解明に寄与した ; ii) TGFbeta が Smad 経路を介して HCV ゲノム複製を強く抑制することが示された ; iii) HCV 肝發癌に非メチル化機序の関与が示唆された。(II) HBV : i) 非トランスジェニック型 HBV 発現モデルが開発された ; ii) 世界各地（特にアジア）の HBV genotype に関する豊富なデータが得られた。(III) HEV : i) 我國のみならずインドネシアに於いても zoonotic transmission が重要な感染経路であることが示唆された ; ii) 新たな animal reservoir としてマンガースが同定された ; iii) 分子時計解析により HEV が我國に上陸した年代と経路が推定された。

<分担研究者（USJCMSP『部會員』）>

下遠野邦忠	京都大学ウイルス研究所教授
林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学教授
溝上雅史	名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学分野教授
小池和彦	東京大学大学院医学系研究科 生体防御感染症学教授

<研究協力者（同左『研究員』）> abc 順

茶山一彰	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子病態制御内科学教授
榎本信幸	山梨大学医学部第一内科学教室 教授
樋野興夫	順天堂大学医学部病理学教授
飯野四郎	静山会清川病院病院長
井廻道夫	昭和大学医学部第二内科学教室 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
小原道法	東京都臨床医学総合研究所感染生体防御研究部門室長
工藤正俊	近畿大学医学部消化器内科学教室教授
熊田博光	虎の門病院副院長
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教授
宮村達男	国立感染症研究所所長
岡本宏明	自治医科大学感染免疫学講座ウイルス学部門教授
岡上 武	京都府立医科大学大学院医学研究科消化器病態制御学教授
小俣政男	東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教室教授
恩地森一	愛媛大学医学部第三内科学教室教授
佐田通夫	久留米大学医学部第二内科学教室教授
田中榮司	信州大学医学部第二内科学教室助教授
脇田隆字	東京都神経科学総合研究所微生物研究部門
吉澤浩司	広島大学大学院医歯薬学総合研究科疫学・疾病制御学教室教授

<USJCMSP Hepatitis Panel-US> abc 順

Michael Gale	University of Texas Southwestern
Stanley Lemon	University of Texas Medical Branch Galveston
Rajen Koshy	NIH
Anna Lok	University of Michigan
Christopher Walker	The Ohio State University

<班長研究協力者> abc 順

安倍夏生	東芝病院研究部
新井雅裕	同上
高橋和明	同上
津田文男	同上

A. 研究目的

USJCMSP Hepatitis Panel が日米で共有した研究目的は

1. Establish authentic and relevant model systems for the study of HCV infection in cultured cells (培養細胞を用いた HCV 増殖系の確立)。
2. Gain insight into innate and adaptive immunological responses to HBV and HCV (HBV と HCV に対する自然免疫及び獲得免疫の研究)。
3. Using cell and tissue-based approaches, unravel molecular mechanisms of cancer caused by HCV and HBV (HCV 及び HBV による肝発癌機序の解明)。
4. Define more precisely the epidemiology of viral hepatitis in Asia/Pacific regions with an emphasis on HBV and HEV (特に HBV と HEV に力点を置いた形でのアジア・環太平洋地域に於けるウイルス肝炎の疫学研究)。

にあったが、本年度の本班の研究は、そのうちの主に 1, 3, 4 に於いて成果を得た。2 については米国側の成果が顕著であったが、その成果を齎すには我國で作製された感染モデル系が多量の貢献を為した。

B. 研究方法

研究方法については以下 C. 研究結果及び考察に於いて個別に記載する。

<倫理面への配慮>

行った全ての研究は、個人情報保護を旨とする倫理規定を厳守しつつ行われた。

C. 研究結果及び考察

以下に、本研究班の班員が単独あるいは班

友と協力して行った研究の成果について述べる。

I. HCV

[I-i] HCV 感染モデル系の作製（脇田隆字班友 & 溝上雅史班員）

劇症肝炎患者の急性期血清から分離しウイルス全長遺伝子 cDNA を RT-PCR 法で回収した genotype 2a の HCV 株 (JFH-1) は、慢性肝炎から分離した複数の株 (JCH-1 等) と比較して、コアタンパク質のプロセシングの効率が高いことがわかった。

更に、JFH-1 株の複製能力の解析をサブジェノミックレプリコンにより試みたところ、既成のレプリコン (Con1NK5.1) と比較して JFH-1 は、コロニー形成率が約 90 倍高いことも判明した。

剩え、JFH-1 株のレプリコンは、Huh7 細胞のみならず、これまで他のレプリコンが複製することのできなかつた HepG2 細胞や IMY-N9 細胞等の肝細胞由来培養細胞や、HeLa 細胞や HEK293 細胞といった非肝細胞由来培養細胞でも複製が可能であった [ref-1]。

[1] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-6.

JFH-1 レプリコンの保有する此の性質（高複製能と細胞株非依存性）は、俄然世界中の研究者からの注目を集め、多くの基礎研究で JFH-1 を用いた実験が行われたが、就中、

USJCMSP Hepatitis Panel の米国側メンバーであるところの Michael Gale と Stanley Lemon は、HCV に対する自然免疫の分子機構を解析する目的の実験に此の JFH-1 を用い、HCV が immune evasion する mechanism の一旦を解明することに成功した [ref-2]。

[2] Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005; 79: 2689-99.

[I-ii] HCV の複製機序及びその阻害剤に関する研究（下遠野邦忠班員）

HCV ゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノム複製を制御する細胞側因子の解析を行った結果、TGF-beta が強く HCV ゲノム複製を阻害し、この阻害には Smad 経路が重要であることが明らかになった [ref-3]。

[3] Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology* 2005; 331: 407-417.

また、シクロスポリン A による HCV ゲノム複製阻害の分子機構を解析し、シクロスポリンの標的タンパク質のひとつであるサイクロフィリン B が HCV ポリメラーゼの活性化に重要な働きをすること、その働きをシクロスポリンが阻害するために抗 HCV 作用を示すことが明らかになった [ref-4]。

[4] Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K.

Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005; 19: 111-122.

[I-iii] HCV コア蛋白による癌抑制遺伝子 SOCS-1 発現の抑制 (小池和彦班員)

詳細は小池和彦班員からの分担研究報告書 (後出) を御参照頂きたいが、要は、HCV の肝発癌に「メチル化によらない」遺伝子抑制機序が関与することを示唆する興味深い仕事である [ref-5]。

[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;43:757-763.

II. HBV

[II-i] 非トランスジェニック型 HBV 発現モデルの開発 (林紀夫班員)

HBV はヒト以外にはチンパンジーとタマリンにしか感染が成立せず、このきわめて狭い宿主特異性が生体内における HBV 増殖の解析を困難にしている。林班員等は HBV 遺伝子を野生型マウスに *in vivo* 遺伝子導入することにより、約1ヶ月間にわたってウイルス血症が持続しその後 HBs 抗体が陽性化するモデルを開発した [ref-6]。以下、免疫不全マウスに HBV 遺伝子を導入し、HBV 増殖およびウイルス血症の動態について行った検討を紹介する。

<方法>1.5 倍長の HBV 遺伝子を組み込ん

だプラスミド pHBV1.5 をヌードマウスの尾静脈より注入した。ノーザンブロット、HBc 抗原の免疫染色、血清 HBs 抗原価により遺伝子発現を解析した。血中への HBV 粒子の産生は、DNase I 処理後の血清を用いたリアルタイム PCR 法により定量し、粒子性の証明は蔗糖密度勾配法を用いて行った。HBV CCC DNA 特異的 PCR により肝臓内の HBV CCC DNA の検出を行った。

<成績>ヌードマウスに pHBV1.5 を静注することにより3日後に肝臓特異的な HBV RNA の発現が認められた。免疫染色により約3%の肝細胞が HBc 抗原陽性となり、高力価の HBs 抗原が血清中で検出された。浮遊密度 1.21 g/mL の血清分画から HBV DNA が検出され、界面活性剤処理により 1.28 g/mL に陽性分画が移動した。血清 HBs 抗原陽性とウイルス血症は1年以上にわたって持続した。マウスの肝臓から HBV CCC DNA が検出され、さらに *pol* 遺伝子にストップコドン挿入した変異遺伝子を用いた場合には HBs 抗原の産生が2ヶ月で消失したことから、マウス肝臓内で HBV CCC DNA 産生に依存した増幅サイクルが再現されていることが示唆された。

<結論>pHBV1.5 を免疫不全マウスに尾静脈より投与することにより、HBV CCC DNA の産生に依存したウイルス複製がおこり、ヒトの HBV 慢性感染に類似したモデルの作成が可能であった。本モデルは種々の遺伝的背景を有するマウスに簡便に遺伝子導入ができること、また移入する遺伝子に容易に変異を導入することができることから、HBV 増殖を生体レベルで解析する上で有用なモデルであると考えられる。また、HBV の完全排除を目的とした薬剤のスクリーニン

グにも有用性があるものと考えられる。

[6] Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, Housui A, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication. *J Hepatol* 2006; 44: 267-274.

[II-ii] アジア諸国における HBV genotype B と C の subtype の分子進化学的検討 (溝上雅史班員)

詳細は溝上雅史班員からの分担研究報告書(後出)を御参照頂きたいが、要は、地域によっても病態によっても HBV の遺伝子型が異なっていることを、分子進化学的に解明した仕事である [ref-7,8,9,10,11]。

[7] Orito E, Sugauchi F, Tanaka Y, Ichida T, Sata M, Tanaka E, Okanou T, Sakugawa H, Watanabe H, Miyakawa H, Nishiguchi S, Kumada H, Ueda R, Mizokami M. Differences of hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B virus genotypes of Ba, Bj or C in Japan. *Intervirology* 2005; 48: 239-45.

[8] Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembu N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 2005; 86: 2047-56.

[9] Bae SH, Yoon SK, Jang JW, Kim CW, Nam SW, Choi JY, Kim BS, Park YM, Suzuki S, Sugauchi F, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype C prevails

among chronic carriers of the virus in Korea. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 816-20.

[10] Kato H, Fujiwara K, Gish RG, Sakugawa H, Yoshizawa H, Sugauchi F, Orito E, Ueda R, Tanaka Y, Kato T, Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6295-304.

[11] Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, Hasegawa I, Sakurai M, Ito K, Ozasa A, Sakamoto Y, Arita I, El-Gohary A, Benoit A, Ogrounde-Akplogan SI, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6410-5.

[II-iii] 世界 8 カ国の blood donor に由来する HBV の塩基配列解析 (高橋和明班員 & 三代俊治班員)

三代等は、ニューヨークに基点を置く International Consortium for Blood Safety (ICBS : 代表 Alfred M Prince) との協力の元に、世界 8 カ国の献血者から蒐集された血清から HBV DNA を抽出し塩基配列を決定する作業に着手し、現時点で既に 444 本の検体について S-gene のシーケンシングが達成されている(成績は次年度に報告する予定)。

この仕事は、HBV genotype (and subgenotype) の地理的分布に関する我々の知識を増加させるという学問的興味のみから

為されているのではない。様々な genotype / subgenotype を組み合わせた血清パネルを用意し、それを世界中に広く供給し、世界各国で使用されているアッセイ系（抗原検出 & DNA 検出）のバリデーションに用いようという目的を兼ねている。

III. HEV

[III-i] 日本以外の地域に於ける HEV の zoonotic transmission に関する研究（津田文男班友 & 三代俊治班員）

HEV の主要感染経路の一つとして動物由来感染（zoonotic transmission）があることを指摘したのは主に我國の仕事であり、実際、我國の散発性 E 型肝炎のうちの約 25% が其れで説明出来る。一方、アジア・アフリカの endemic areas では、水系感染による集団発生が専ら注目され、zoonotic transmission が起こっている可能性については全くデータがなかった。

三代等は、HEV-endemic area の一つであるインドネシアで調査を行い、ヒンズー教徒とイスラム教徒の間に、HEV 抗体陽性率の極端な差異があるという成績を得た（前者が 20% であるのに対し後者は 2.0%）。両群ともにバリ島内の同一地域の住民から構成され、しかも全て女性で、且つ年齢構成も同等であった（要するに妊婦を調査した）ので、地域差・性差・年齢差を無視することが可能であり、此の HEV 抗体陽性率の差異は「ヒンズー教徒であってブタを食べる」か「イスラム教徒であってブタを食べることも接触することすらも禁じられている」かの差に由来すると考えられた。結句、endemic areas では water-borne transmission が強調されて

来たが、zoonotic transmission をも重要視すべきであるとの示唆が得られた [12]。

[12] Surya IGP, Kornia K, Suwardewa TGA, Mulyanto, Tsuda F, Mishiro S. Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immuno-deficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. J Med Virol 2005; 75: 499-503.

[III-ii] HEV reservoir animal として新たにマンガースが追加された（高橋和明班友 & 三代俊治班員 & 宮村達男班友）

従前、ブタ、イノシシ、シカ、ウマ、ネズミから HEV が採取されており、これらの動物が reservoir animals であると認識されて来たが、宮村班友等は沖縄のマンガースを調査し、HEV 抗体陽性の個体が多数存在することを見いだした [ref-13]。

[13] Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. Am J Trop Med Hyg 2006: in press.

これとは独立に、三代班員等も沖縄のマンガースを調査し、HEV 抗体のみならず HEV RNA をも検出し、そのゲノム全長塩基配列を決定した。その塩基配列は、同じ沖縄県のブタから採れた配列に近似していたので、ブタ・マンガース間の「種の壁を超えた感染」が起こっている可能性が示唆された。ヒトはマンガースを食べないので、マンガースがヒトへの直接の感染源となる可能性は低いが、マンガースの行動半径は広いので、各種動物に対する HEV spreader として振る舞うことによって、間接的にヒトへの感染源となっ

ている可能性はある [ref-14]。

[14] Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 2006; 34: 137-140.

[III-iii] 分子進化的解析により HEV の日本上陸年代が推定された（溝上雅史班員 & 三代俊治班員）

日本国内で採取され配列決定された HEV 株及び諸外国からのそれを対象とし、分子時計法で解析することにより、HEV genotype 3 も 4 も西暦 1900 年前後に我國に上陸し以後土着化したことが推定された。Genotype 4 は英国から、genotype 4 は台湾乃至中国本土から渡来したものと思われる [ref-15]。

[15] Tanaka Y, Takahashi K, Orito E, Karino Y, Kang JH, Suzuki K, Matsui A, Hori A, Matsuda H, Sakugawa H, Asahina Y, Kitamura T, Mizokami M, Mishiro S. Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. *J Gen Virol* 2006; 87: 949-54.

IV. 日米間の研究打合せ

USJCMSP Hepatitis Panel の平成 17 年度日米合同會議（The 27th Joint Hepatitis Panel Meeting）を 2005 年 12 月 10-15 日に Fairmont Orchid Hotel Hawaii, Hawaii Island, USA で HEP DART Meeting と平行開催し、日本側からは三代班員・溝上班員・小池班員・脇田班友が参加し、両国の研究成

果に関する情報交換が行われたと同時に、向こう 5 ケ年の研究計画について討議された結果、＜A. 研究目的＞に記載した 4 項目の research objectives に追加して、「5. Evaluate rates of HBV and HCV mutants that are resistant to new and established antiviral drugs in regions of Asia（抗ウイルス剤耐性 HBV/HCV 株に関する研究）」を新たに設置することが決定された。これに関して特に日本側が分担することになったのは、drug-resistant mutants の database の作成であり、主に溝上雅史班員がこれを担当する。

V. 次年度研究の課題／計畫

下遠野班員：「HCV の複製を制御する細胞側因子を明らかにする。また、複製を阻害する低分子化合物をスクリーニングする。これらの両者を併せることにより、効果的な抗 HCV 剤の開発に寄与できる研究を行う。」

溝上雅史班員：「これまで我々が臨床的に検討してきた HBV genotype と病態との関係を、これからは in vitro, in vivo 複製モデルを用いて検証したいと考えている。特に、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験により、ウイルス学的特徴の検討だけでなく、新規薬剤の可能性を探りたい。」

林紀夫班員：「増殖可能型 HBV DNA をマウスに静注することによりヒトの HBV 急性感染に類似したモデルの作成が可能である。次年度は、種々の免疫関連遺伝子をノックアウトしたマウスに HBV 遺伝子を導入し、HBV 排除に関与する免疫応答を明らかにすることを目的に研究を行う。また、持続 HBV 増殖モデルであるヌードマウスに種々の抗ウ

ウイルス剤を投与することにより in vivo での抗ウイルス剤の評価法の確立を行う予定である。」

小池和彦班員：「C 型慢性肝炎はリバビリン併用ペグ・インターフェロン療法によって、半数強で sustained virological response (SVR)を得られるようになってきているが、残りの半数では慢性肝炎の肝硬変への進展、肝細胞癌の発生を阻止することができない。私たちは、HCV を排除できなくても、肝細胞癌の発生を抑制するために、C 型肝炎の進展に強く関わっていることが判明しつつある、酸化ストレスを改善させるための方策の開発を目指す。」

三代俊治班員：「我々は『専門バカ』だから、夫々の専門領域の仕事は他人から云われなくても自然に進む。その一方で、USJCMSP が掲げた『アジア地域住民の健康の為に』という理念に沿った研究活動は（苦手だから）努力しなければ達成できない。アジア諸国夫々の地域地域で研究活動を営む医師・研究者達との交流と共同研究を、次年度以降は益々推進させて行きたい。」

D. 結論

本年度研究の特筆すべき成果の結論を以下に箇条書きする。

- 極めて有用な HCV 感染モデル系が作

製された

- HCV の複製機序及びその阻害剤に関する研究が進んだ
- HCV 肝発癌に非メチル化機序の関与することが示された
- 非トランスジェニック型 HBV 発現モデルが作製された
- Genotype 4 の相対的病原性の強さが一層明確になった
- HBV genotype/subgenotype の地理病理学的解析が進んだ
- HEV の zoonotic transmission に関する理解が深まった
- HEV の疫学的歴史が分子進化学的手法で初めて理解された

E. 健康危険情報

発信せず。

F. 研究発表

主要論文は本文中に記載したので此處では省略する。その他の論文を含めた全体は、後出の研究成果刊行一覧を参照されたい。

G. 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.

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための
日米合作的肝炎ウイルス基礎 究

平成 17 年度
分担研究報告書

アジア諸国における HBV genotype B と C の subtype の分子進化学的検討

分担研究者 溝上雅史 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学

研究要旨：肝炎ウイルス(HBV)は世界中に分布し分子進化学的に A から H までの 8 つの遺伝子型(genotype)に分けられる。興味深いことは各々の genotype で臨床像が異なり、地域特異性があることである。一方、アジア諸国では HBV genotype は B と C が主である。そこで、今回我々は HBV genotype B と C のアジア諸国の塩基配列を決定しその亜型(subtype)とその分布について検討した。その結果、HBV genotype B は B1 から B5 に、HBV genotype C も C1 から C5 の各々 5 つの subtype に分類された。さらに興味深いことは各々の subtype に地域特異性が認められた。この subtype と地域特異性の違いがアジア諸国内における HBV の臨床像の違いに関与している可能性が認められた。

<研究協力者>

田中靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学
折戸悦朗	同上
伊藤清顕	同上

A. 研究目的

HBV は A から H の 8 つの genotype に分類される。最近この genotype の subtype が報告された。そこで、アジア諸国に多い HBV genotype B と C の subtype について分子進化学的に分類し、その地域特異性について検討した。

B. 研究方法

対象は、ベトナム 19 例、日本 13 例、中国 6 例、香港 4 例、ミャンマー 2 例、韓国 2 例、フィリピン 7 例、インドネシア 3 例、台湾 2 例、ポリネシア 2 例、オーストラリア原住民 2 例、タイ 1 例の合計 63 例の全塩基配列を使用した。この内 40 例は全塩基配列を決定したが、残り 23 例は GenBank/DDBJ/EMBL から取り出した。

解析は全塩基配列を alignment 後、6-parameter 法で各塩基配列の塩基置換数を推定し、その後 neighbor-joining 法で分子系統樹を作成した。その後、その分子系統樹を Bootstrap 法で 1000 回解析し 90.0%以上

の時 subtype に分類した。

C. 研究結果

HBV genotype B は、B1 から B5 までの 5 つに分類可能であった。B1 は従来日本に多い B_j 型と同じで、7 例全例日本の配列であった。B2 は従来アジアに多い型で、ヴェトナム 2 例、香港 2 例、中国 2 例、台湾 2 例、タイ 1 例であった。B3 は 3 例全例ヴェトナム、B4 はインドネシア 2 例、B5 はオーストラリア原住民の配列 2 例であった。

一方、HBV genotype C は、C1 はヴェトナム 12 例、南部中国 2 例、香港 2 例、ミャンマー 2 例であった。C2 は日本 6 例、北部中国 2 例、韓国 2 例であった。C3 はポリネシア 2 例、C4 はオーストラリア原住民 2 例、C5 はフィリピン 2 例であった。

D. 考察

今回の検討の結果、アジアに多い HBV genotype B も C も各々 5 つの subtype に分類可能であった。さらに、各々の subtype は地域特性が認められた。HBV genotype B1 は日本に、B2 は東南アジア地域に、B3 はヴェトナムに、B4 はインドネシアに、B5 はフィリピンに、存在していると思われた。一方 HBV genotype C1 は南アジア地域に、C2 は北部中国、日本、韓国の北部アジアに、C3 はポリネシア地域に、C4 はオーストラリア原住民に、C5 はフィリピンに、存在していると思われた。このことは HBV genotype B と C は主に母児感染で代々継代されてきたことから、アジア諸国における過去の民族移動と関係していることが推察される。一方これらの subtype と臨床像との関係も推察される。例えば、すでに報告されているが、地

理的に非常に近い台湾と沖縄では同じように HBV の carrier rate は高いが肝がんの発生率は台湾の方が約 20 倍も高い。この原因として、沖縄と台湾の HBV subtype の違いが考えられ、沖縄は subtype B2 (B_j)、台湾は B1 (B_a)であると指摘されている。

以上より、異なった genotype 及び subtype が異なった臨床像を示す可能性が示唆される。今後この差異をウイルス学的にさらに検討する必要がある。

また、今後 HCV についても検討する必要があると思われる。

E. 結論

アジア諸国における HBV subtype の分類と分布を検討し、HBV genotype B は B1 から B5 までの 5 つの subtype に、HBV genotype C の C1 から C5 の subtype に分類されることを明らかにした。またこれらの subtype に地域特異性があり、今後病態との関係を検討する必要があると思われた。

F. 研究発表

<論文>

●Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, Co J, Clavio J, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Quino A, Ueda R, Mizokami M, Sollano J. Novel subgenotypes of hepatitis B virus among chronic liver disease patients in the Philippines. *J Gen Virol in press.*

<学会発表>

●Tanaka Y et al. Difference of viral replication and protein production by hepatitis B virus

genotypes using replication model in vitro and in vivo. 2005 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses. Heidelberg, Germany, September 18-21, 2005.

●Sugiyama M et al. Difference of viral replication and protein production by hepatitis B virus genotypes using replication model in vitro and in vivo. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. SanFrancisco, November 11-15, 2005.

●Ito K et al. T1653 Mutation in the Box Alpha Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. SanFrancisco, November 11-15, 2005.

●Fujiwara K et al. Novel type of

hepatitis B virus mutation – “replacement mutation” involving hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B genotype E. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. SanFrancisco, November 11-15, 2005.

●Wong DKH, Tanaka Y, Lai CL, Kwok CL. Correlation between hepatitis B virus core-related antigens and intrahepatic covalently closed circular DNA levels. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. SanFrancisco, November 11-15, 2005.

G. 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。

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

平成 17 年度
分担研究報告書

HCV コア蛋白による癌抑制遺伝子 SOCS-1 発現の抑制

分担研究者 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

成果概要：C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと到る一連の事象を引き起こすが、その発生機序は複雑であり、まだ一部が解明されただけである。我々が確立した肝発癌を引き起こす HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスモデルでは、炎症の不在下に酸化ストレスの産生が増加し肝発癌に関与しているが、一方、コア蛋白が種々の細胞遺伝子の発現を変化させて、細胞増殖を誘発して肝発癌に寄与することも明らかになってきている。今回、我々は、マウスモデル、培養細胞、ヒトC型慢性肝炎患者肝組織を用いて、癌抑制遺伝子である SOCS (suppressor of cytokine signaling)-1 遺伝子がコア蛋白によって発現を抑制されていることを見いだした。癌抑制遺伝子 SOCS-1 は、肝癌組織の一部において、遺伝子のメチル化によって発現の低下していることが示されてきているが、HCV 感染そのものが癌抑制遺伝子の発現を低下させるという新たなメカニズムにより肝発癌に寄与していることが明らかとなった。

A. 研究結果

(1) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスでは、IL-6 投与後に SOCS-1 遺伝子の発現が著明に低下していた。一方、SOCS-3 遺伝子については、全く低下は認められなかった。コア蛋白を発現している HepG2 細胞においては IL-6 投与前後において、SOCS-1 遺伝子の発現が著明に低下していた。SOCS-3 遺伝子については、全く低下は認められなかった。ヒトC型慢性肝炎肝組織においては、

SOCS-1 遺伝子 mRNA レベルが 0.494 ± 0.352 (n=9) 対 0.862 ± 0.465 (n=9) と有意に低下していた(p=0.0345)。

(2) コア遺伝子導入トランスジェニックマウス肝における SOCS-1 遺伝子のメチル化状態には全く変化が認められなかった。

(3) STAT によって発現の変化する細胞遺伝子を検討したところ、STAT1 により発現を調節される遺伝子群の発現低下が確認され

た。そこで、Jak-STAT 経路の活性化、細胞内移行、抑制因子である PIAS3 との相互作用等を検討した。コア蛋白によって、STAT1、STAT3 のリン酸化は IL-6 投与後に対照に比べて活性化されていること、活性化 STAT1、STAT3 は核内に正常に移行していること、PIAS3 との相互作用はコア蛋白によって妨げられないことが判明した。

(4) ルシフェラーゼ・アッセイにより、コア蛋白の転写プロモーター活性への影響を検討したところ、STAT1 結合領域をもつ遺伝子において転写が低下していることが明らかとなった。

B. 考察

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝細胞癌を発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。

SOCS-1 遺伝子は、Jak-STAT システムの発現抑制フィードバックシステムであるが、その発現が低下することによって細胞増殖をもたらすことが示され、癌抑制遺伝子としての役割を果たすことが知られてきている。また、ヒト肝癌組織においては、SOCS-1 遺伝子の発現制御領域のメチル化によって、その発現が抑制されていることが示されている。

今回、我々は、C 型肝炎においては肝癌発生前に既に SOCS-1 遺伝子の発現が低下していること、その低下は HCV コア蛋白の働きによることを明確に示した。メチル化によらない新たな SOCS-1 遺伝子発現の抑制機構に

よって、C 型肝炎においては細胞の癌化しやすい状況がもたらされていることが示されたといえる。この発見によって、C 型慢性肝炎における、高頻度かつ多中心性の肝発癌が、より説明しやすくなったと考える。

C. 結論

遺伝子のメチル化によらない新たな癌抑制遺伝子 SOCS-1 発現の抑制機構が示された。C 型肝炎における肝細胞の癌化を説明する新しい知見である。本発見によって、C 型慢性肝炎における、高頻度かつ多中心性の肝発癌が、より説明しやすくなったと考える。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. 研究発表

<論文>

- Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005; 40: 329-336.
- Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J Gastroenterol* 2005; 40: 664-665.
- 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; 43: 757-763.
- Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33: 145-150.

- Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S132-S135.
- Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirolgy* 2006; 49: 51-57.
- Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006; 34: 65-76.
- Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J Gastroenterology* 2006 in press.
- <學會発表>
- Matsuura, Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Suzuki T, Koike K, Miyamura T.: Involvement of PA28gamma-in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. P18, 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, 2005.
- Miyoshi H, Moriya K, Shinzawa S, Fujie H, Todoroki T, Tsutsumi T, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Alteration in fatty acid enzyme activities induced by HCV core protein: analysis using HepG2 cells, p130, 12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Montreal, 2005.
- Koike K, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Shinzawa S: Treatment of HCV-associated progressive liver disease with Tacrolimus: Trial using a mouse model. P540A, 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, 2005.
- K Koike. Pathogenesis of HCV-associated HCC. 4th JSH Single Topic Conference "HCC". Awajishima 2005.
- K Koike. Metabolic Aspects of HCV-Associated HCC. International Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology. Tokyo 2005.
- Koike K. Molecular Basis of HCV-associated hepatocarcinogenesis: Lessons from Animal Model Studies. 2nd AGA-JSGE Joint Meeting "Hepatitis C: Clinic-Basic Interface" Tokyo 2005.
- Koike K. HCV-associated hepatocarcinogenesis. 5th Sino-Japan Hepato-Pancreato-Biliary Symposium. Beijing 2005.

研究成果刊行一覽

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

『主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資するための日米合作的肝炎ウイルス基礎研究』

研究成果の刊行に関する一覧表

1. HCV: (班員・班友を下線で示す)

- Kato T, Date T, Miyamoto M, Sugiyama M, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Sugihara K, Hasegawa I, Fujiwara K, Ito K, Ozasa A, Mizokami M, Wakita T. Detection of anti-hepatitis C virus effects of interferon and ribavirin by a sensitive replicon system. J Clin Microbiol 2005; 43: 5679-84.
- Kato N, Nakamura T, Dansako H, Namba K, Abe K, Nozaki A, Naka K, Ikeda M, Shimotohno K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. J Gen Virol. 86:645-656, 2005.
- Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. Hepatol Res 2006; 34: 65-76.
- Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: steatohepatitis resembling but distinct from NASH. J Gastroenterol 2005; 40: 329-336.
- Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. Hepatol Res 2005; 33: 145-150.
- Koike K. Hepatitis C virus infection can present with metabolic disease by inducing insulin resistance. Intervirology 2006; 49: 51-57.
- Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. Clin Gastroenterol Hepatol 2005; 3: S132-S135.
- Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. J Gastroenterology 2006 in press.
- Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? J Gastroenterol 2005; 40: 664-665.
- 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; 43: 757-763.
- Murata T, Hijikata M, Shimotohno K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. Virology. 340 :105-115, 2005.
- Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. Virology 2005; 331: 407-417.
- Naka K, Takemoto K, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. J Gen Virol. 86: 2787-2792, 2005.
- Sugihara K, Orito E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M. Variations of the Viral NS5B Region in Japanese Patients with Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1b Infection: No specific amino acid substitution was identified as determinants to treatment response to Interferon/Ribavirin Combination Therapy. Intervirology *in press*

Takahashi H, Yamaji M, Hosaka M, Kishine H, Hijikata M, Shimotohno K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology*. 48:104-111, 2005.

Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, Orito E, Varga V, Esteban JI, Yuen MF, Lai CL, Kranvis A., Kew MC, Smuts HE, Netesov SV, Alter HJ, Mizokami M. Molecular Tracing of Global Hepatitis C Virus Epidemic Predicts Regional Patterns of Hepatocellular Carcinoma Mortality. *Gastroenterology* 2006; in press

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-6.

Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005; 19: 111-122.

Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Araki H, Shimotohno K. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J Virol*. 79:5923-5932, 2005.

2. HBV: (班員・班友を下線で示す)

Bae SH, Yoon SK, Jang JW, Kim CW, Nam SW, Choi JY, Kim BS, Park YM, Suzuki S, Sugauchi F, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype C prevails among chronic carriers of the virus in Korea. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 816-20.

Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, Hasegawa I, Sakurai M, Ito K, Ozasa A, Sakamoto Y, Arita I, El-Gohary A, Benoit A, Ogroundele-Akplogan SI, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6410-5.

Fujiwara K, Tanaka Y, Paulon E, Orito E, Sugiyama M, Ito K, Ueda R, Mizokami M, Naoumov NV. Novel type of hepatitis B virus mutation - "replacement mutation" involving hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B genotype E. *J Virol* 2005; 79: 14404-14410.

Ito K, Tanaka Y, Ozasa A, Sugiyama M, Ozasa A, Fujiwara K, Sugauchi F, Kato T, Yuen MF, Lai CL, Gish R, Orito E, Ueda R, Mizokami M. T1653 Mutation in the Box Alpha Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Genotype C. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1-7.

Kato H, Fujiwara K, Gish RG, Sakugawa H, Yoshizawa H, Sugauchi F, Orito E, Ueda R, Tanaka Y, Kato T, Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6295-304.

Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembi N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 2005; 86: 2047-56.

Orito E, Sugauchi F, Tanaka Y, Ichida T, Sata M, Tanaka E, Okanoue T, Sakugawa H, Watanabe H, Miyakawa H, Nishiguchi S, Kumada H, Ueda R, Mizokami M. Differences of hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B virus genotypes of Ba, Bj or C in Japan. *Intervirology* 2005; 48: 239-45.