

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型肝炎ウイルスの新たな感染予防法の
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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成18（2006）年 3月

B型及びC型肝炎ウイルスの新たな感染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	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学	教授
班員	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・消化器内科学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘二番二号
Tel: 06-6879-3621
Fax: 06-6879-3629

目 次

I. 総括研究報告書

B型及びC型肝炎ウイルスの新たな感染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. インターフェロンシステムと HCV との相互作用	11
加藤 宣之	
2. C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能	19
松浦 善治	
3. 脂質ラフト制御による C型肝炎および肝発癌治療戦略の開発	21
榎本 信幸	
4. HCV コア蛋白による癌抑制遺伝子SOCS-1発現の抑制	25
小池 和彦	
5. 肝細胞癌の早期診断のための血清マーカーについての検討	29
各務 伸一	
6. 肝細胞癌患者における MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原に 対する細胞性免疫応答の検討	31
井廻 道夫	
7. 肝癌に対する NK 細胞レセプターとそのリガンドを介した免疫制御	33
林 紀夫	
8. 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	38
金子 周一	
9. Gankyrin と B-Myb のヒト肝臓癌における検討	41
伊藤 義人	
10. HCV 関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析と HCV 抗体陽性者の 10 年間のコホート研究	45
坪内 博仁	

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 49

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 62

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型肝炎ウイルスの新たな感染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発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である。3年計画の2年目に当たる本年度において、HCV増殖に関与する宿主因子VAPの同定、脂質ラフト形成がHCV増殖抑制の新規ターゲットとなる可能性の提示、HCVコア蛋白によるSOCS1の発現抑制機構の解明、HCV感染・肝がんの特徴的な高発現遺伝子群の同定、プロテオーム解析による肝がんの新規診断法の開発、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、肝がんにおけるNK細胞機能抑制分子としての可溶性MICAの同定、CD8免疫モニタリングシステムの開発、SHAP-HA複合体の新規腫瘍マーカーとしての有用性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。

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複製システムとしては replicon 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

レーザーマイクロダイセクションを用いて肝炎における浸潤リンパ球および肝細胞を採取し、両肝炎における発現遺伝子プロファイルの相違を解析した。SELDI-TOF-MS を用いて肝疾患患者血清の蛋白発現解析を行った。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

慢性肝疾患あるいは肝癌患者の血清中の可溶性 MICA (sMICA) の濃度を ELISA にて測定した。末梢血 CD56 陽性細胞の NKG2D 発現を FACS にて解析した。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、NY-ESO-1、Glypican-3 抗原全長を網羅する 20 アミノ酸のペプチドを作成し、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。

(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

VAP は N 末端で NS5B と結合することが示された。VAP 抗体により HCV の複製が抑制され、VAP の過剰発現により HCV の複製が促進された。

NS5B 発現細胞では IFN β が産生されることにより 2 本鎖 DNA 損傷に対してより感受性となった。

脂質ラフトの形成阻害剤であるミリオシンの添加により HCV レプリコンの増殖が抑制された。

SOCS-1 の発現はコア発現 HepG2 細胞、コア Tg マウス、HCV 感染患者肝組織のいずれにおいても低下していた。これはメチル化によるものではなく STAT 結合領域における転写活性の抑制によることが示された。

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・診断法の開発

B 型および C 型肝炎ウイルスによる慢性肝炎では浸潤リンパ球における発現遺伝子は両肝炎で異なり、感染しているウイルスおよび浸潤リンパ球の関与によって肝細胞における遺伝子発現も両肝炎で有意に異なっていた。

SELDI プロテインチップシステムを用いて HCV 感染者の微量の血液から再現性よく低分子蛋白もしくはペプチドの発現プロファイルが得られた。これにより HCV による肝がんを早期に発見できる可能性のある手法の確立が示唆された。

肝がんで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

肝がん患者の血清から可溶型 MICA が検出され、肝がんの進展に伴いその陽性率は上昇した。可溶型 MICA は NK 細胞の NKG2D の発現を低下させ、肝がんに対する傷害活性を低下させた。NKG2D 発現の低下した NK 細胞は肝がんと混合培養しても、その樹状細胞成熟能は低下していた。

肝がん患者において NY-ESO-1、MAGE-1 に特異的に反応する CTL-precursor が検出された。肝がんを TAE で治療することによりこの frequency が低下する傾向が認められた。

SHAP-HA はコントロール群に比べ慢性肝炎、肝硬変、肝がんのいずれの病態においても有意に高値であり、病態の進行とともに増加する傾向が認められた。

D. 考察と結論

肝がん発生を抑止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。本年度の研究により宿主因子である VAP 蛋白やあるいは脂質ラフトの形成が HCV 増殖抑制法の新たなターゲットになることが示された。

慢性肝炎、肝がんにおける肝臓での遺伝子発現および血液蛋白を網羅的に解析することにより病態の理解がすすみ、また疾患の進行を早期に予測する発現パターンを明らかにできる可能性が示された。

肝がんでは可溶型 MICA が分泌されており、これが新たな診断マーカーとなる可能性が示された。可溶型 MICA は免疫抑制活性を示す機能分子であり、肝がんを切除あるいは

は ablation 治療することにより患者の免疫機能を改善させる可能性があることが示された。

肝がんにおける免疫モニタリングシステムが構築され、肝がんに対する特異的免疫動態を詳細に解析する手法が得られた。

E. 研究発表

論文発表

- 1) K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- β via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* (in press)
- 2) K. Naka, K. Abe, K. Takemoto, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J. Hepatology* (in press).
- 3) H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 336, 458-468.
- 4) K. Li, Z. Chen, N. Kato, M. Gale, Jr and S. M. Lemon. Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- β production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 16739-16747.
- 5) K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno, and N. Kato. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.* (2005) 86, 2787-2792.
- 6) K. Naka, M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako and N. Kato. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 330, 871-879.
- 7) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka and N. Kato. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 329, 1350-1359.
- 8) 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) 86, 645-656.
- 9) 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) 7, 29-40.
- 10) 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.* (2005) 107, 73- 81.

- 11) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79:13473-13482, (2005).
- 12) Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, and Cheng RH. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79, 12999-13006, (2005). Abe T, Hemmi H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79, 2847-2858, (2005).
- 13) Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79, 639-3652, (2005).
- 14) Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* 79, 3448-3458, (2005).
- 15) Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki 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).
- 17) Chen CH, Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Sakamoto N, Maekawa S, Kakinuma S, Ikeda T, Izumi N, Sato C, Watanabe M. Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2005 Jan; 31(1):24-30.
- 18) Tanabe Y, Nagayama K, Enomoto N, Izumi N, Tazawa J, Kurosaki M, Sakamoto N, Sato C, Watanabe M. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):251-61.
- 19) Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsu Y, Takeda Y, Chen C-H, Kakinuma S, Oooka S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins *Gastroenterology.* 2005Sep;129(3):1031-41.
- 20) Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Ueda E, Tanabe Y, Maekawa S, Itakura J, Watanabe H, Kakinuma S, Watanabe M. Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;20(9):1401-9.
- 21) Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ,

- Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005 Oct; 42(4): 962-73.
- 22) Nakanishi H, Kurosaki M, Asahina Y, Onuki Y, Ueda K, Nishimura Y, Tsuchiya K, Kitamura T, Uchihara M, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. Polymerase domain B mutation is associated with hepatitis relapse during long-term lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Intervirology*. 2005 Nov-Dec; 48(6): 381-8.
- 23) Asahina, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Miyake S. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2005 Oct;43(4):623-9.
- 24) Maekawa S, Enomoto N. Genetic changes in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus (HCV) during the natural course of infection: an implication for the gene function in the role of chronic infection. *J Gastroenterol*. 2005 Jan; 40(1): 113-5.
- 25) Itakura J, Nagayama K, Enomoto N, Hamano K, Sakamoto N, Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F, Wanatabe M. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-D immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
- 26) Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2005 (in press).
- 27) Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Watanabe H, Tanabe Y, Chen C-H, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2005 (in press).
- 28) Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005;40:329-336.
- 29) Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J Gastroenterol* 2005;40:664-665.
- 30) 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.
- 31) Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005;33:145-150.
- 32) Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:S132-S135.
- 33) Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006; 49:

- 51-57.
- 34) Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatology Res* 2006;34:65-76.
- 35) Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J Gastroenterology* 2006 in press.
- 36) Shen L, Zhuo L, Okumura A, et al. The SHAP-hyaluronan complex in serum from patients with chronic liver diseases caused by hepatitis virus infection. *Hepatology Res* (in press)
- 37) Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, et al. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology Res* (in press)
- 38) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Hiraide A, Imawari M. Dendritic cell therapy with interferon- α synergistically suppresses outgrowth of established tumors in a murine colorectal cancer model. *Gene Therapy* 13 (1): 78-87, 2006.
- 39) C型肝炎の発症機序とHCV持続感染. 広石和正、渡邊豪紀、井廻道夫. *綜合臨牀* 54 (3): 503-511, 2005
- 40) 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* 48: 77-83, 2005.
- 41) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatology* 43: 1013-1020, 2005.
- 42) 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 Hepatology* 44: 267-274, 2006.
- 43) Sakakibara M, Kanto T, Inoue M, Kaimori A, Yakushijin T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Quick generation of fully mature dendritic cells from monocytes with OK432, low-dose prostanoic acid and interferon- α as potent immune enhancers. *J Immunotherapy* 29: 67-77, 2006.
- 44) Takehara T, Hayashi N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3: S78-S81, 2005.
- 45) Hayashi N, Takehara T. Anti-viral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. *J Gastroenterology* (in press)
- 46) Yakushijin T, Kanto T, Inoue M, Oze T, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced expression and functional impairment of Toll-like receptor 2 on dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology Res* (in press)
- 47) K Hayashida, A Daiba, A Sakai, T Tanaka, K Kaji, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Terasaki, A Abe, M Ogasawara, M Kohara, M Harada, T

- Okanoue, S Ito and S Kaneko. Pretreatment prediction of interferon- α efficacy in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(12):1253-9, 2005.
- 48) E Mizukoshi, Y Nakamoto, H Tsuji, T Yamashita and S Kaneko. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 118(5):1194-1204, 2005.
- 49) M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, T Takamura and S Kaneko. cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation. *J Autoimmun* 25(2):133-40, 2005.
- 50) M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, and S Kaneko. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 100(9):2019-30, 2005.
- 51) K Kawaguchi, M Honda, T Yamashita, Y Shiota and S Kaneko. Differential gene alteration among hepatoma cell lines demonstrated by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1):370-80, 2005.
- 52) H Iida, M Honda, H F. Kawai, T Yamashita, Y Shiota, B-C Wang, H Miao, and S Kaneko. Ephrin-A1 Expression Contributes to the Malignant Characteristics of α -Fetoprotein-Producing Hepatocellular Carcinoma. *Gut* 54(6):843-51, 2005.
- 53) M Matsuda, Y Nakamoto, S Suzuki, T Kurata, and S Kaneko. Interferon-gamma-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. *Lab Invest* 85: 655-663, 2005.
- 54) C Fujii, Y Nakamoto, P Lu, K Tsuneyama, BK Popivanova, S Kaneko, and N Mukaida. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 114(2):209-18, 2005.
- 55) 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(2):449-462, 2005.
- 56) Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanoue T. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2005 Jun 23;24(27): 4340-8.
- 57) Nakajima T, Sekoguchi S, Nishikawa T, Takashima H, Watanabe T, Minami M, Itoh Y, Mizuta N, Nakajima H, Mazaki T, Yanagisawa A, Okanoue T. Multifocal intraportal invasion of breast carcinoma diagnosed by laparoscopy-assisted liver

- biopsy. *World J Gastroenterol.* 2005 Apr 21;11(15):2360-3.
- 58) Okanoue T, Makiyama A, Nakayama M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Nakajima T, Yasui K, Minami M, Itoh Y. A follow-up study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for hepatitis C virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):599-605.
- 59) Okanoue T, Minami M, Makiyama A, Sumida Y, Yasui K, Itoh. Natural course of asymptomatic hepatitis C virus-infected patients and hepatocellular carcinoma after interferon therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct;3 (10 Suppl 2):S89-91.
- 60) Nakashima T, Sumida Y, Furutani M, Hirohama A, Okita M, Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanoue T. Elevation of serum thioredoxin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2005 (in press).
- 61) Suruki R, Hayashi K, Kusumoto K, Uto H, Ido A, Tsubouchi H, Stuver SO. Alanine aminotransferase level as a predictor of HCV-associated hepatocellular carcinoma incidence in a community-based population in Japan. *Int J Cancer.* 2005 (in press)
- 62) Uto H, Hayashi K, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kodama M, Ido A, Kohara M, Stuver SO, Tsubouchi H. Spontaneous elimination of hepatitis C virus RNA in individuals with persistent infection in a hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res.* 2006 ; 34 (1) : 28-34
- 63) Kim ID, Azuma T, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Teramukai S, Okamoto J, Tsutsumi S, Tanaka K, Tsubouchi H. Navigator-echo-based MR provides high-resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media. *Liver Transpl.* 2006; 12(1): 72-7.
- 64) Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20(11): 1753-61.
- 65) Uto H, Nakanishi C, Ido A, Hasuike S, Kusumoto K, Abe H, Numata M, Nagata K, Hayashi K, Tsubouchi H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Hepatol Res.* 2005 ; 32 (4) : 235-242
- 66) Nagata-Tsubouchi Y, Ido A, Uto H, Numata M, Moriuchi A, Kim I, Hasuike S, Nagata K, Sekiya T, Hayashi K, Tsubouchi H. Molecular mechanisms of hereditary persistence of alpha-fetoprotein (AFP) in two Japanese families A hepatocyte nuclear factor-1 site mutation leads to induction of the AFP gene expression in adult livers. *Hepatol Res.* 2005 ; 31 (2) : 79-87
- 67) Hayashi K, Hasuike S, Kusumoto K, Ido A, Uto H, Kenji N, Kohara M, Stuver SO, Tsubouchi H. Usefulness of a new immuno-radiometric assay to detect hepatitis

C core antigen in a community-based population. J Viral Hepat. 2005;12(1):106-10.

68) Gao G, Stuver SO, Okayama A, Tsubouchi H, Mueller NE, Tabor E. The minimum number of clones necessary to sequence in order to obtain the maximum information about hepatitis C virus quasispecies: a comparison of subjects with and without liver cancer. J Viral Hepat. 2005;12(1):46-50.

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

インターフェロンシステムと HCV との相互作用

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨:非がん細胞株であるヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を用いて昨年度見出した HCV の NS5B (1b 型) による細胞周期の S 期進行遅延の現象が発がん過程とどのような関わりがあるかを探るために各種 DNA 損傷薬剤に対する感受性に变化があるかどうかを検討した。その結果、NS5B 発現細胞は 2 本鎖 DNA 損傷を引き起こす Adriamycin や neocarzinostatin chromophore に対する感受性が高まることを見出した。この現象は NS5B により TLR3 を介して発現誘導されるインターフェロン-βにより引き起こされることが示唆された。NS5B によるインターフェロン-βの発現誘導は、HCV の NS3/4A により顕著に抑制された。しかしながら、HCV 株の種類により NS3/4A の抑制活性の程度はかなり異なることや 2 本鎖 RNA による細胞外からの刺激によるインターフェロン-βの発現誘導を NS3/4A は抑制できないことを見出した。

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重要な因子として HCV の持続感染が挙げられる。

従って、発がんに至る過程において、HCV が宿主細胞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 が及ぼす影響についての解析がなされているが、肝がん細胞を用いている場合がほとんどで、発がん過程を調べるには適当ではなく、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必要と考え、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。IFN-β産生システムは TLR3 を介した TRIF シグナル系とウイルス感染を介した RIG-I シグナル系より成るが、多くの肝がん細胞株ではこれらのシグナル系がうまく機能していないことが知られている。しかしながら、PH5CH8 細胞はこの 2 つのシグナル系が機能していることが最近明らかにされている。これまでの私達の研究により HCV の NS5B (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) を PH5CH8 細胞で発現させると、NS5B の RNA ポリメラーゼ活性に依存

して Toll-like receptor (TLR) 3 の活性化を介した interferon (IFN)- β の発現誘導が起こり、細胞周期の S 期進行遅延を引き起こすことを明らかにしている。一方、これまでに HCV の NS3-4A がそのセリンプロテアーゼ活性に依存して IFN- β の発現を抑制することも明らかにしている。このような NS5B と NS3-4A の IFN- β 産生システムに対する効果は相反的であるが、HCV の持続感染および HCV による発がん過程に関与している可能性もある。本研究では、NS5B による IFN- β の発現誘導がどのように発がん過程に係り得るかを探ること及び NS3-4A による IFN- β の産生抑制効果はどのくらい強いものなのかを明らかにすることを目的として以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1) DNA 損傷薬剤に対するヒト不死化肝 PH5CH8 細胞の感受性の評価

対数増殖期にある PH5CH8 細胞をプレートあたり 5×10^3 個まき、4 日間培養する。その後、細胞を過酸化水素 (H_2O_2 ; 100 μM まで)、Methylmethane sulfonate (MMS; 2 mM まで)、Adriamycin (ADR; 200 nM まで)、Neocarzinostatin chromophore (NCS; 200 ng/ml まで) で 2 時間処理した。UV-B 処理 (302 nm) は一旦培地を除いてから照射 (100 J/m^2 まで) して PBS で洗った後に新しい培地を加えた。これらの処理をした後、さらに 10 日間培養し、得られた細胞コロニーを Coomassie brilliant

blue にて染色した。50 個以上の細胞を含むコロニーをスコアとしてカウントした。

通常培養した PH5CH8 細胞、NS5B を恒常的に発現している PH5CH8 細胞および IFN- β (20 IU/ml) で処理した PH5CH8 細胞をこれら薬剤の評価に用いた。

(2) 各種病態由来の HCV NS3-4A 遺伝子の単離および解析

各種病態由来 HCV 株の NS3-4A の遺伝子全体を増幅するために、HCV に関するこれまでの遺伝子情報バンクからよく保存された領域にプライマーを設定し、KOD-plus DNA polymerase を用いた RT-nested PCR 法により HCV 陽性の患者血清の RNA から NS3-4A 全体を含む領域 (2,292 塩基対) を増幅した。得られた増幅産物を塩基配列解析用プラスミド pBR322MC の *Xba*I 部位に組み込み、NS3-4A 全領域の塩基配列を決定した。次に、NS3-4A 領域を含む pBR322MC ベクターを鋳型として各 HCV 株ごとに設定したプライマーを用いて NS3-4A 全領域を PCR により増幅し、blasticidin 耐性遺伝子を選択マーカーとするレトロウイルス発現ベクター pCXbsr 組み込み、各種病態由来の NS3-4A の発現ベクターを作成した。作成した発現ベクターはそれぞれ大腸菌に導入し、37°C で 1 晩震盪培養後、plasmid Midi kit (QIAGEN) にてプラスミド DNA を精製した。

(3) PH5CH8 細胞における HCV 蛋白質の発現および NS3-4A の IFN- β 産生抑制能の評価

IFN- β 遺伝子の発現誘導活性に対する NS3-4A の 50%阻害濃度(IC₅₀)については、NS5B および NS3-4A (濃度を変化) を PH5CH8 細胞で一過性に発現させ、NS5B による IFN- β 遺伝子の発現誘導活性に対する NS3-4A の抑制効果を、ルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイにより調べた。この一過性発現システムでは、レポータープラスミド (pIFN- β (-125)-Luc) に加え、各 HCV 蛋白質発現ベクターも同時に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 二本鎖 RNA(dsRNA)の添加および細胞内導入による IFN- β 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイ

レポーターベクター等のトランスフェクション 24 時間前までに、PH5CH8 細胞を 1 ウェルあたり 1.5×10^5 ずつ 6 ウェルプレートに蒔き込んだ。これらの細胞に、pCX bsr 発現ベクター (NS3-4A など) 2 μ g、レポータープラスミド (pIFN- β (-125)-Luc) 0.5 μ g および pRL-CMV internal control ベクター 1 ng を FuGENE6 を用いてトランスフェクションした。培養 42 時間後に dsRNA (polyI:C) 刺激を行った。

細胞外刺激の場合、培地交換後、polyI:C を 50 μ g/ mL となるように、培地中に添加し、反応 6 時間後に Dual-Luciferase Assay System に供した。一方、細胞内刺激の場合、培地交換後、polyI:C 5 μ g を Lipofectamine 2000 を用いて、トランスフェクションし、反応 6 時間後に Dual-Luciferase Assay System に供した。

(5) IRF3 の二量体の検出

NS3-4A 蛋白質を恒常的に発現している PH5CH8 細胞を dsRNA 刺激後(方法はレポーターアッセイの時と同じ)、その粗蛋白質画分を回収した。得られた粗蛋白質画分は、Native-PAGE にて分離後、anti-IRF3 抗体を用いて Immunoblotting を行った。

(倫理面への配慮)

血液サンプル由来の RNA はインフォームドコンセントが既に取得されているものを使用した。

C. 研究成果

(1) NS5B を発現する PH5CH8 細胞は DNA 損傷薬剤に対してより感受性となる

昨年までに HCV の NS5B (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) をヒト不死化肝 PH5CH8 細胞で発現させると、NS5B の RNA ポリメラーゼ活性に依存して TLR3 の活性化を介した IFN- β の発現誘導が起こり、細胞周期の S 期進行遅延を引き起こすことを見出した。TLR3 のリガンドは二本鎖 RNA であることから、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 を基質にして非特異的な二本鎖 RNA を合成できる可能性が考えられた。また、NS5B による S 期進行阻害は細胞の増殖速度を低下させることから、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 DNA 損傷を受ける機会が高まりゲノ

ムの複製異常の原因になるのではないかと考えられた。今年度はその可能性を探るために、PH5CH8 細胞で NS5B が恒常的に発現することにより様々な DNA 損傷薬剤に対する感受性がどのように変化するかを検討した。まず、DNA に対するアルキル化剤である MMS の添加効果、DNA に対する酸化剤である H₂O₂ の添加効果および DNA の 1 本鎖損傷あるいはチミジンダイマー形成を引き起こす UV-B の照射効果を調べた。その結果、NS5B を発現している PH5CH8 細胞とコントロールの PH5CH8 細胞間での生存率の差は認められなかった。2 mM の MMS 添加、100 nM の H₂O₂ の添加および 100 J/m² の UV-B 照射により両細胞はほぼ死滅し、添加量や照射量を低下させても両細胞の生存率に差が生じることはなかった。しかしながら、DNA の 2 本鎖損傷を引き起こす ADR と NCS の添加効果を調べたところ、両細胞の生存率に大きな差が生じることが分かった。100 nM の ADR で処理した場合、10 日後に生存する PH5CH8 細胞は 80% 以上であったが、NS5B を発現している PH5CH8 細胞では 10% 以下の生存率であった。また、NCS についても、100 ng/ml で処理した場合、10 日後に生存する PH5CH8 細胞は 80% 以上であったにもかかわらず、NS5B を発現する PH5CH8 細胞では ADR の場合と同様、10% 以下の生存率であった。NS5B を発現している PH5CH8 細胞で ADR や NCS に対する感受性の亢進が起こる原因として NS5B を発現している PH5CH8 細胞で

産生誘導される IFN-β の効果であることが考えられる。この点を明らかにするために、PH5CH8 細胞を 20 IU/ml の IFN-β で処理した後に ADR や NCS を添加して 10 日後の細胞の生存率を調べ、NS5B を発現している PH5CH8 細胞の場合と比較した。その結果、IFN-β 処理した場合も ADR や NCS に対する感受性の亢進が認められ、感受性の程度も NS5B を発現している細胞と同程度に ADR や NCS に対して高感受性であることが分かった。

(2) NS5B による IFN-β 遺伝子の活性化に対する NS3-4A の抑制効果

HCV 陽性の無症候性キャリアー 5 例、急性肝炎 1 例、慢性肝炎 7 例および肝がん 4 例の患者血清より、HCV の NS3-4A をコードしている遺伝子全体を含む領域を RT-nested PCR 法にて増幅単離し、それらの遺伝子解析を行った。RT-nested PCR で増幅されなかった 1 症例と増幅産物が *Xba*I で切断されてしまった 1 症例(いずれも肝がん由来)を除く 15 症例についての遺伝子情報を得た。すでに報告されているようなアミノ酸置換はどの HCV 株由来のものにおいても散在していたが、L1170P (アミノ酸 1170 番目の L が P に置換されているという意味)や P1172A のような珍しいアミノ酸置換もいくつか認められた。NS3 のセリンプロテアーゼ活性に必須なアミノ酸である H1083, D1107, S1165 はすべての株で完全に保存されていた。また、基質の結合に関係するポケット構造の形成に重要なアミノ酸もすべての HCV 株において完全に保存されていた。今回遺伝子解析