

を行った HCV 株由来の NS3 のセリンプロテアーゼ領域のアミノ酸配列は、コンセンサス配列と比較して 1.6~3.8%のアミノ酸置換が認められ、従来から報告されているような遺伝的多様性が確認された。一方、NS3 のヘリカーゼ領域や NS4A 領域のアミノ酸配列は高度に保存されていた。今回の解析結果から各病態に特徴的なアミノ酸配列は存在しないことや NS3-4A の全領域のアミノ酸配列から作成した分子系統樹においても、病態に特徴的な系統は得られないことが分った。

これ迄に、NS3-4A が IFN- β の発現誘導を抑制することが明らかにされていることから、本研究で得られた各種 NS3-4A がどの程度 IFN- β の発現誘導を抑制するのかを定量的に調べた。そのために、本研究では各種 NS3-4A を発現するレトロウイルスベクターを新たに構築して、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。その結果、NS5B (1000 ng) による IFN- β 遺伝子の発現誘導活性に対して、濃度依存的な NS3-4A の抑制効果が観察された。50%抑制するのに必要な NS3-4A の量(IC₅₀)は各種 NS3-4A により異なり、1.0 ng~7.2 ng の間であり HCV 株間で比較すると、約 7 倍の差があることが分った。以上の結果より、NS5B による IFN- β 遺伝子の発現誘導活性に対する NS3-4A の抑制効果は HCV

株により強弱があることが分った。しかしながら、このような抑制効果の差と肝病態との間における相関関係は認められなかった。

次に、IFN-b の代表的発現誘導剤である Poly I:C を用いて、NS3-4A の IFN- β 産生抑制活性を調べた。PH5CH8 細胞に IFN- β 遺伝子プロモーターを有するレポータープラスミドと NS3-4A 発現ベクターを導入した後に polyI:C で刺激を加えてレポーターアッセイを行った。その結果、polyI:C を直接細胞内に導入した場合、IFN- β 遺伝子プロモーターの活性化は NS3-4A のセリンプロテアーゼ活性に依存して顕著に抑制されたが、興味深いことに、polyI:C を細胞の外部から添加した場合にはその後生じる IFN- β 遺伝子プロモーターの活性化を NS3-4A はほとんど抑えられないことを見出した。同様の現象が起きていることは polyI:C 処理により引き続き起こる IRF3 の活性化(IRF3 の 2 量体形成)を Native-PAGE 法により観察することによっても確かめられた。

D. 考察

(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

今回の実験結果から、NS5B を発現している PH5CH8 細胞が 2 本鎖 DNA 損傷を引き起こす薬剤に対して高感受性になることがわかり、その原因がこの細胞で産生誘導される IFN- β によるものであることが示唆された。従って、NS5B により引き起こされる S 期進行遅延が長

い間続く（いわゆる持続感染）ことになりより DNA 損傷が起こりやすくなっているものと推測される。このことは、遺伝子の変異や欠損へと結びつき、細胞ががん化する確率を高めている可能性がある。今後、外から導入した遺伝子の損傷確率が NS5B を発現している細胞で高まるかどうかの実験も必要であると考えられる。

(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

IFN- β 遺伝子の活性化に対する NS3-4A の抑制効果は HCV の持続感染を有利にするものであると考えられるが、今回、NS3-4A では抑制できない場合があることを見出した。polyI:C を細胞内に導入した場合は TRIF シグナル系と RIG-I シグナル系が作用して IFN- β の産生が起こると考えられており、NS3-4A が TRIF や RIG-I 系下流の IPS-1 を切断してシグナルを抑制するというストーリーに今回の実験結果は一致する。また、polyI:C を細胞外から添加した場合には TLR3 を介して TRIF 系のみが作用すると考えられている。しかしながら、本研究では、polyI:C を細胞外から添加した場合、NS3-4A による抑制がまったく認められないという結果を得たことから、従来から考えられているような外部シグナルによる TLR3-TRIF を介したシグナル系が PH5CH8 細胞では成立しておらず別のシグナル系が作用している可能性が考えられる。今後、このメカニズムの解明が必要である。

E. 結論

(1) NS5B を発現する PH5CH8 細胞は 2 本鎖 DNA 損傷を引き起こす薬剤に対してより感受性となり、その原因は NS5B により産生誘導される IFN- β によるものであると考えられた。

(2) NS3-4A プロテアーゼによる IFN- β 産生抑制能は HCV 株により数倍異なる。NS3-4A は dsRNA の細胞内刺激による IFN- β の発現誘導を抑制できるが、dsRNA の細胞外刺激による IFN- β の発現誘導は抑制できない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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.
2. 学会発表
- 1) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之。
 全長HCV RNAレポーター評価システムにより見出したスタチンとインターフェロンの併用による相乗的抗ウイルス効果。第64回 日本癌学会総会、札幌、2005年9月
- 2) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之。
 HCV-O株由来の全長HCV RNA複製細胞群の樹立。第64回 日本癌学会総会、札幌、2005年9月
- 3) K. Naka, K. Takemoto, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, K. Shimotohno and N. Kato. Interferon resistance of HCV replicons

- is caused by functional disruption of type I interferon receptors.
12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
- 4) M. Ikeda, K. Abe, M. Yamada, H. Dansako, K. Naka and N. Kato. HMG-CoA reductase inhibitors as a new class of anti-HCV reagents: their different effects on HCV replication and their applications for combination therapy with IFN.
12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
- 5) H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda and N. Kato. HCV proteins exhibit contradictory effects on interferon system in human hepatocyte cells.
12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada, October, 2005.
- 6) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka and N. Kato. Identification of a cell culture-adaptive mutation in newly established genome-length HCV RNA replicating cell lines.
12th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Montreal, Canada, October, 2005.
- 7) 加藤 宣之, 阿部 健一, 竹本 和憲, 團迫 浩方, 池田 正徳, 下遠野 邦忠. C型肝炎ウイルス レプリコン細胞のインターフェロン抵抗性獲得機構.
第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 8) 池田 正徳, 阿部 健一, 山田 将士, 團迫 浩方, 加藤 宣之. 全長HCV RNA複製抑制効果を示すスタチン：スタチンの種類による抗HCV効果の違いとインターフェロンとの併用による相乗的抗HCV効果. 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 9) 團迫 浩方, 池田 正徳, 加藤 宣之. C型肝炎ウイルス蛋白質のインターフェロン-β産生系に対する相反的效果.
第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 10) 竹本 和憲, 團迫 浩方, 池田 正徳, 加藤 宣之. 各種病態由来のC型肝炎ウイルス NS3-4A: インターフェロンβ産生抑制効果の比較.
第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 11) 阿部 健一, 池田 正徳, 團迫 浩方, 加藤 宣之. HCV-O株由来の全長HCV RNA複製細胞群の樹立と適応変異に関する解析.
第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 12) 田村 一志, 大上 厚志, 清水 宣明, 加藤 宣之, 森川 昭広, 星野 洪郎. VSV/HCV pseudotype virus感染系を用いたHCV母子感染症例の感染機構の検討.
第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月
- 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

C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能

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)のNS5A蛋白質と相互作用する宿主因子として、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP)のサブタイプB (VAP-B)を同定した。VAP-BはNS5AとNS5Bに結合し、膜貫通領域(TMD)でホモダイマーだけでなく、VAP-Aとヘテロダイマーを形成した。NS5AのN末端70アミノ酸とC末端341から344番目までの5アミノ酸がVAP-Bのcoiled-coil領域との結合に必須であった。VAP-BとNS5Aは小胞体とゴルジ体に共局在していた。HCVRNAの無細胞複製系で、抗VAP-B抗体の添加によってウイルスRNAの複製が阻害された。HCVのレプリコン細胞にVAP-Bを過剰発現させるとNS5AとNS5Bの増加が観察されたが、TMDを欠損させたVAP-Bでは発現に影響は認められなかった。また、内在性のVAP-Bをノックダウンさせると、NS5Bの発現およびHCVRNAの複製が抑制された。以上の成績から、VAP-BはNS5AとNS5Bに結合し、TMDを介してダイマーを形成することで複製複合体の安定性を図り、HCVRNAの複製を促進しているものと推測された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)NS5A蛋白質の機能を明らかにするために、NS5Aと相互作用する宿主因子を探索した。これまでに、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP)のサブタイプA(VAP-A)がNS5AとNS5Bに結合し、HCVの複製に重要であることが報告されていた。今回新たに、VAP-AのホノログであるVAP-BもNS5Aと相互作用することを明らかにし、HCV複製での役割について検討した。

B. 研究方法

ヒト脳及びヒト肝臓のcDNAライブラリーを用いてHCVのCon1株(genotype1b)のNS5Aと相互作用する宿主因子をYeast two hybrid法でスクリーニングし、VAP-Bを同定した。NS5AとVAP-Bを細胞内に発現させ、両蛋白質の細胞内での局在と、結合領域を解析した。また、ニワトリ抗VAP-B抗体を作製し、HCVRNAの無細胞複製系を用いてVAP-Bの複製への関与を検討した。HCVレプリコン細胞でのVAP-Bの過剰発現とsiRNAを用いたVAP-Bのノックダウンによる、ウイルス蛋白質の発現と、HCVRNAの複製への影響を検討した。

(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

VAP-BはNS5AとNS5Bに結合し、膜貫通領域(TMD)でホモダイマーだけでなく、VAP-Aとヘテ

ロダイマーを形成した。NS5AのN末端70アミノ酸とC末端341から344番目までの5アミノ酸がVAP-Bのcoiled-coil領域との結合に必須であった。VAP-BとNS5Aは小胞体とゴルジ体に共局在していた。HCVRNAの無細胞複製系で、抗VAP-B抗体の添加によってウイルスRNAの複製が阻害された。HCVのレプリコン細胞にVAP-Bを過剰発現させるとNS5AとNS5Bの増加が観察されたが、TMDを欠損させたVAP-Bでは発現に影響は認められなかった。また、siRNAで内在性のVAP-Bをノックダウンさせると、NS5Bの発現およびHCVRNAの複製が抑制された。

D. 考察

以上の成績から、VAP-BはNS5AとNS5Bに結合し、TMDを介してダイマーを形成することで複製複合体の安定性を図り、HCVRNAの複製を促進していると思われる。

E. 結論

1. NS5Aの結合蛋白質としてhVAP-Bを単離した。
2. hVAP-BとhVAP-Aは膜貫通領域でホモあるいはヘテロ二量体を形成し、hVAP-Bのコイルドコイル領域を介してNS5Aと結合した。
3. In vitro複製系で抗VAP-B抗体添加によりRNA複製は阻害され、hVAP-BのノックダウンによりHCV RNA複製は抑制された。
4. hVAP-Bを過剰発現させるとHCV RNA複製は促進する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).
 2. 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).
 3. 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).
 4. 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**, 3639-3652, (2005).
 5. 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).
 6. 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).
- ### 2. 学会発表
1. Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M.C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
 2. Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
3. Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上。
 4. Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上。
 5. Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上。
 6. 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
 7. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恒司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治: HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
 8. 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
 9. 森 嘉生、山下哲生、森石恒司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上
 10. 宮本大伸、森石恒司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治: C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28 γ の役割、同上。
 11. 岡本貴世子、森石恒司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治: 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とその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。
- ### H. 知的所有権の出願・登録状況
- 特になし。

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

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

主任研究者： 榎本 信幸 山梨大学医学工学総合研究部・教授

研究要旨：原発性肝癌は肝炎ウイルスによって引き起こされる宿主細胞内機能異常を基盤とするが、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染した肝組織においては高頻度に脂肪化が認められ、肝脂肪化と炎症・発癌の関係が示唆されている。近年遺伝学的解析から、RNAウイルス増殖における脂質代謝関連遺伝子の重要性が次第に明らかにされてきたが、HCVにおいても複製複合体の形成において、オルガネラ膜上の微小脂質ドメイン「脂質ラフト」の果たす役割に注目が集まっている。我々は、脂質代謝制御を通じたHCV増殖ならびに発癌制御を目的として、HCV replicon システムを用い、脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成阻害剤のHCV増殖に対する影響について解析した。その結果これらの薬剤によってHCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることが明らかになった。今後、これら薬剤の抗ウイルス機序についてさらに詳細な検討を行い、新たな抗ウイルス療法・発癌制御の可能性について検討してゆく予定である。

共同研究者：前川 伸哉 山梨大学医学部附属病院・助手

A. 研究目的

原発性肝癌は肝炎ウイルスによって引き起こされる宿主細胞内異常を基盤とするが、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染した肝組織においては高頻度に脂肪化が認められ、肝脂肪化と炎症・発癌の関係が示唆されている。

近年、酵母変異体ライブラリーを用いた遺伝学的な網羅的解析等により、RNAウイルス複製における、宿主のオルガネラ膜脂質構造の重要性が次第に明らかとなってきた。すなわち、プラス鎖 RNA ウイルスは脂質二

重層から形成されるオルガネラ膜に複製複合体を形成することによってウイルスゲノムを複製するが、この膜脂質構成の変化が複製複合体形成阻害を通じて、ウイルス増殖を制御することが示されてきた。特に最近では、独自の脂質構成成分からなる”脂質ラフト”と呼ばれる機能ドメイン構造と、ウイルス増殖制御との関連が注目されている。

一方、HCV replicon 増殖細胞において、複製複合体と考えられる membranous web と呼ばれる構造物が細胞内に形成されることが報告され、HCV 増殖におけるオルガネラ膜の重要性が示唆されているが、脂質ラフトが

HCVの複製複合体形成、増殖に対して、どのような役割を持つのか全く明らかとはされていない。

本研究において我々は、HCVの増殖、および複製複合体形成における脂質ラフトの役割を明らかにし、さらに脂質代謝制御を通じたHCV増殖ならびに発癌制御を目的として、脂質代謝関連薬剤のHCV増殖に対する影響について検討を行った。

B. 研究方法 (2005年度)

脂質ラフトは、スフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸より形成されるが、我々はそれぞれの合成阻害剤、すなわちスフィンゴミエリン合成阻害剤であるミリオシン、コレステロール合成阻害剤であるHMG-CoA還元阻害剤(スタチン)、さらに飽和脂肪酸に対しては不飽和脂肪酸を各々もちいて、HCV増殖に対する影響をHCVrepliconシステムを用いて解析した。

C. 研究成果

(1) スフィンゴミエリン合成系路阻害はHCV-replicon増殖を抑制する

ミリオシンは、スフィンゴミエリン合成経路におけるセリンパルミチルトランスフェラーゼの阻害剤である。ミリオシン投与によりHCV replicon増殖は濃度依存性に抑制され、その効果は経時的に増強した。すなわち72hr後から増殖抑制が出現し、120hr後にその効果は最大となった。また、スフィンゴミエリンの直接的な基質であるフィトスフィンゴシンの添加により、ミリオシンで抑制されたレプリコン活性は濃度依存性に回復した。さらにセリンパルミチルトランスフェラーゼに対するsiRNAの投与で

もHCV replicon増殖は抑制された。一方、ミリオシンによるISRE promoterの活性化は認められず、同薬剤による抗HCV作用はインターフェロンによる抗ウイルス機序とは別経路であることが考えられた。

(2) HMG-CoA還元阻害薬、不飽和脂肪酸はHCV増殖を制御する。

シンバスタチンの投与で、HCVrepliconの増殖は濃度依存性に抑制された。脂肪酸の投与においては、飽和度の高いオレイン酸では、増殖抑制が認められなかったが、飽和度の低いアラキドン酸によってHCVreplicon増殖は濃度依存性に抑制された。

D. 考察と結論

脂質ラフトを構成する脂質成分であるスフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成を阻害することによって、HCVレプリコン増殖が特異的に抑制されることが明らかになった。この結果は、複製複合体形成における脂質ラフトの重要性を示唆すると共に、脂質ラフトがHCV増殖制御における重要なターゲットであることを示している。今後さらにHCV複製機における脂質ラフトの関与、これら薬剤の抗ウイルス機序についてさらに詳細な検討を行い、新たな抗ウイルス療法・発癌制御の可能性について検討してゆく予定である。

E. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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.
 3. Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Ito 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.* 2005 Sep;129(3):1031-41.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Itakura J, Nagayama K, Enomoto N, Hamano K, Sakamoto N, Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F, Watanabe 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.
10. 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).
11. 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).
- Sakamoto N, Enomoto N. Identification of viral elements determining hepatitis C virus replication by homologous recombination of the viral genome. *International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6,2005; Montreal (Canada).*

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

学会発表

1. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Itakura J, Yamauchi K, Minoru Sakamoto M, Saito H, Okada H, Sakamoto N, Enomoto N. Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro *International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (12th Annual Meeting) October 2-6,2005; Montreal (Canada).*
2. Maekawa S, Amemiya F, Itakura Y, Itakura J, Sakamoto M, Saitoh H, Okada S, Yamauchi K, Kanayama A,

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

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のみである。我々は、マウスモデルを用いて HCV コア蛋白が肝発癌を引き起こすことを示してきた。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、一方、種々の細胞遺伝子の発現を変化させて、細胞増殖をもたら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型慢性肝炎患者肝において、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. 研究目的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ全く不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア遺伝子がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認している。このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行なう。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行なう。

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、HepG2細胞、ヒトC型肝炎患者肝組織を用いて以下のような解析を行なった。動物の取り扱いにおいては、学内の規定を遵

守って行なわれた。また、ヒト肝組織を用いた研究については、学内倫理委員会の承認を得た後、書面によるインフォームドコンセントを得て行なわれた。

マウス肝においては、インターロイキン(IL)6投与前、投与後に関する肝を採取し、SOCS-1、SOCS-3を始めとする種々の遺伝子の発現を検討した。また、STAT1、3、PIAS-3等の蛋白発現、相互作用をウエスタンブロット、免疫沈降電気泳動等によって検討した。

コア遺伝子を導入したHepG2細胞であるHep39細胞、対照のHepswx細胞も同様に、インターロイキン6投与前、投与後に検討を行なった。ヒトC型肝炎肝組織については、Taqman PCRを用いてmRNAの定量を行なった。

C. 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。

D. 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。

E. 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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of

- hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005;40:329-336.
- 2) Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J Gastroenterol* 2005;40:664-665.
 - 3) 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.
 - 4) Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005;33:145-150.
 - 5) Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:S132-S135.
 - 6) Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006;49:51-57.
 - 7) Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006;34:65-76.
 - 8) Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J Gastroenterology* 2006 in press.
2. 学会発表
- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) K Koike. Pathogenesis of HCV-associated HCC. 4th JSH Single Topic Conference "HCC" .2005 Awajishima.
 - 5) K Koike. Metabolic Aspects of HCV-Associated HCC. International Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology. Tokyo 2005.
 - 6) 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.
 - 7) Koike K. HCV-associated hepatocarcinogenesis. 5th Sino-Japan Hepato- Pancreato- Biliary Symposium. Beijing 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

肝細胞癌早期診断のための血清マーカーについての検討

分担研究者 各務伸一 愛知医科大学 消化器内科教授

研究要旨 肝細胞癌早期診断のための血清マーカーについて検討した。肝硬変患者に比較し、肝癌患者血清において、細胞外マトリクス蛋白の一つである SHAP-HA は有意に増加、サイトカインのうち TNF- α は有意に減少、いずれも血清マーカーの候補になり得ると考えられた。DNA マイクロアレイ解析の結果からも、細胞外マトリクス、サイトカイン関連遺伝子中に血清マーカーの候補となり得るものの存在が示唆された。

共同研究者

石川哲也 愛知医科大学 消化器内科 講師
奥村明彦 愛知医科大学 消化器内科 講師

A. 研究目的

肝細胞癌の早期診断、あるいは悪性度など病態評価のための新規血清マーカーの候補について、発癌、病態に関わると考えられる、サイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白を中心に検討する。

B. 研究方法

1. SHAP-HA (serum derived hyaluronan associated protein-hyaluronan complex) の血清レベルの検討

対象は B 型慢性肝疾患患者 127 例 (慢性肝炎 (CH) : 47 例、肝硬変 (LC) : 47 例、肝細胞癌 (HCC)、C 型慢性肝疾患患者 278 例 (CH : 102 例、LC : 105 例、HCC : 71 例)。保存血清中の SHAP-HA、HA 濃度を ELISA 法にて測定した。

2. サイトカインの血清レベルの検討

対象は C 型慢性肝疾患患者 38 例 (LC : 25 例、HCC : 13 例)。HCC 群については、診断前、診断時、診断後の 3 ポイント (6~12 か月間隔)、LC 群については、それに相当する期間での 3 ポイントを設定し、保存血清中の、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-12 (p40+p70)、IL-12 p70 を ELISA 法にて測定した。

3. DNA マイクロアレイにおける検討

対象は C 型慢性肝疾患患者 25 例 (CH : 12 例、LC : 5 例、HCC : 9 例)。CH、LC 群については肝生検組織より、HCC 群については手術標本 (癌部、非癌部) より、total RNA を抽出、T7 RNA transcription により増幅後、一色法によりラベリング後、スライド上にハイブリットした。DNA chip は Agilent Technologies の Human 1A オリゴ DNA マイクロアレイ (18,716 遺伝子) を用い、サイトカイン、細胞外マトリクス関連遺伝子を中心に結果を解析した。正常ヒト肝組織での発現遺伝子をコントロールとして、サンプル間の発現量の比較を行った。

C. 研究結果

1. SHAP-HA の血清レベルの検討

SHAP-HA は、B-CH : 29 \pm 18、B-LC : 60 \pm 56、B-HCC : 101 \pm 77 ng/ml、C-CH : 36 \pm 25、C-LC : 62 \pm 48、C-HCC : 110 \pm 89 ng/ml であり、それぞれ HCC 群において、CH 群、LC 群に比較し、有意に高値となった。HA においても同様の解析を行ったが、それぞれ、LC 群と HCC 群との間で有意な差は認めなかった。これより、SHAP-HA は HCC の特異的な診断マーカーとなり得ると考えられた。

2. サイトカインの血清レベルの検討

HCC 群における診断前後 3 ポイント (6~12 か月間隔) のサイトカインの動態からは、発癌を予測、反映するような変化は認めなかった。しかし、HCC 群と LC 群間の比較では、TNF- α は LC 群に比較し HCC 群において有意に低く (LC : 382 \pm 341、HCC : 155 \pm 151 pg/ml、 $p < 0.05$)、IL-1 β (LC : 67 \pm 267、HCC : 15 \pm 20 pg/ml) も同様の傾向を認めた。LC 群における 3 ポイント間でも、それぞれのサイトカインレベルに有意な変動はみられなかったが、TNF- α 、IL-1 β は、ともに最後のポイントで低値をとる傾向がみられた。これらより、TNF- α 、IL-1 β は、発癌予測のマーカーとなり得る可能性が考えられた。

3. DNA マイクロアレイにおける検討

癌部、非癌部の比較において、癌部で発現増強 (2 倍以上) を認めたものとしては、サイトカイン関連遺伝子では、IFN α 14、IL-6、IL-8、inhibin β A、TNF- α induced protein 3 など、細胞外マトリクス関連遺伝子では、CD44、collagen-type 1 α 1、-type 12 α 1、integrin- α 10、- β 8 などが挙げられた。また、癌部で発現低下を認めたものとしては、サイトカイン関連では IL-15、IL-1 family member 10、IL-1 receptor accessory protein (IL1RAP) など、細胞外マトリクス関連では cadherin type 1 が挙げられた。CH、LC での解析から、上記遺伝子中、肝線維化の進展に伴って動くのは IL1RAP のみであった。癌部、非癌部での変化が血清蛋白濃度の変化に結びつくか、血清中での測定が可能かなどの問題点はあるものの、血清診断マ

カーの候補になり得ると考えられた。

D. 考察

発癌に至る過程、あるいは担癌状態での免疫環境の変化、細胞外マトリクスの異常などは、種々の報告があることより、サイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白は癌の早期診断のマーカーとなり得ると考えられる。当該研究でも、肝細胞癌において、SHAP-HA、TNF- α などが、前癌状態（慢性肝炎、肝硬変）から連続的に測定することによって、癌の早期診断に有用なマーカーとなる可能性があることが示された。ただし、既存の腫瘍マーカーとの有用性の比較、発癌予測のポイントをどこにおくかなどの問題点もあり、今後の検討が必要である。さらに、診断的有用性を高めるため、DNA マイクロアレイ解析の結果より、マーカー蛋白の候補を選択、複数の蛋白を組み合わせることも必要であると考える。また、発癌の予測のみならず、治療の効果判定、癌の悪性度の判断などに有用なマーカーの構築を考えている。

E. 結論

サイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白の測定が肝細胞癌の早期診断に有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Hepatol Res* (in press)
- 2) Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, et al. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* (in press)

2. 学会発表

なし。

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。

厚生労働科学研究費補助金（平成 17 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝癌患者における MAGE 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

分担研究者 井廻 道夫 昭和大学医学部第二内科 教授

研究要旨

肝癌における細胞障害性 T 細胞の癌特異的抗原エピトープを同定する目的で、MAGE 抗原, Glypican-3 抗原, NY-ESO-1 抗原ペプチドを用いて、末梢リンパ球の各ペプチドに対する免疫応答を ELISpot 法で測定した。肝癌特異的細胞障害性 T 細胞の frequency は低いものの、MAGE-1 抗原で 15 例中 4 例、Glypican-3 で抗原 7 例中 4 例、NY-ESO-1 抗原では 3 例中 3 例で免疫応答がみられた。また、肝癌の治療後に癌特異的細胞障害性 T 細胞の frequency が低下する傾向がみられた。

A. 研究目的

肝癌の治療は、癌の進展度や肝予備能などにより決定されるが、肝予備能を低下させることなく肝癌を効果的に縮小することができる治療法の開発が望まれる。肝癌における免疫療法は、その点で注目されている新規治療法の一つである。MAGE 抗原, Glypican-3 抗原, NY-ESO-1 抗原はいずれも癌特異抗原として知られており、肝癌においてもそれぞれ約 70%, 70%, 30%の症例で発現がみられるとの報告がある。今回我々は、肝癌治療への応用を目的とした癌抗原特異的細胞障害性 T 細胞の有効な誘導法を検討するため、ELISpot 法を用いて、肝癌患者末梢リンパ球の癌抗原ペプチドに対する免疫応答を測定した。

B. 研究方法

MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原、それぞれの全長を網羅し、10 アミノ酸ずつオーバーラップする 20 アミノ酸のペプチドを各 30、57、17 種類作成した。肝癌患者 15 例について肝癌患者末梢リンパ球から CD8 陽性細胞を分離し、 1×10^5 cells/well に $10 \mu\text{g/ml}$ のペプチドを加えて、IFN- γ 産生細胞を算定する ELISpot 法を施行した。

（倫理面への配慮）

「研究への協力のお願ひ」と題する説明文書を本人に渡し、これをもとに、研究の目的、提供していただく試料、試料の採取方法、試料の使用方法、試料の管理と保管、試料提供に伴う利益・不利益、自由意思による同意と同意撤回の自由、研究への参加を断っても診療上の不利益は受けないこと、プライバシーの保護、個人の解析結果は原則的に開示しないこ

と、倫理性の審査、研究に関わる費用、研究結果の公開、知的財産権、質問の自由、に関して説明し十分納得されたことを確認した後に同意を得た。

C. 研究結果

MAGE-1 抗原で 15 例中 4 例、Glypican-3 で抗原 7 例中 4 例、NY-ESO-1 抗原では 3 例中 3 例で各ペプチドの刺激に対して IFN- γ 産生が認められた。3 例に対し肝癌治療後に再度反応のみられたペプチドで刺激を行ったところ、治療後には癌特異的細胞障害性 T 細胞の frequency が低下する傾向がみられた。

D. 考察

NY-ESO-1 ペプチドは MAGE-1 ペプチドと比較し、ELISpot 法が陽性になる率が高い傾向にあり、免疫原性が高い可能性が考えられた。また、治療により癌細胞が破壊されて抗原量が多くなると、それに反応する免疫細胞が、腫瘍組織に浸潤することや、あるいは anergy や deletion をきたすことが考えられた。

E. 結論

肝癌患者において、MAGE 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原に対してリンパ球の応答がみられる症例があり、少ないながらも末梢血中に癌特異的細胞障害性 T 細胞が存在することが確認された。今後、癌特異的細胞障害性 T 細胞の有効な誘導法を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Hiraide A, Imawari M. Dendritic cell therapy with interferon-alpha synergistically suppresses outgrowth of established tumors in a murine colorectal cancer model. *Gene Therapy* 13 (1): 78-87, 2006.

2) 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. *総合臨床* 54 (3): 503-511, 2005

2. 学会発表

広石和正、袴田拓、井廻道夫. C 型肝炎における CTL 応答. 第 41 回日本肝臓学会総会シンポジウム *Liver Immunology 最前線*. (大阪 2005.6.16)

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

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

肝がんに対する NK レセプターとそのリガンドによる免疫制御

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：NK 細胞の機能は種々の活性化レセプターと抑制レセプターのバランスにより制御されている。肝がん患者血清中の遊離型 MICA (sMICA) を測定したところ健常者、慢性肝炎患者に比べ有意に上昇していた。また、進行がん症例においてより高値であった。sMICA 陽性の患者は陰性の患者に比し、NK 細胞における活性化レセプター-NKG2D の発現が有意に低下していた。sMICA 陽性の患者血清は *in vitro* において健常者 NK 細胞の NKG2D の発現を低下させ、これは MICA に対する中和抗体の添加によりブロックされた。sMICA により NKG2D 発現が低下した NK 細胞は肝がん細胞に対する傷害活性が減弱しており、また、樹状細胞に対する成熟誘導能も減弱していた。本研究により、進行肝がん症例では sMICA が分泌されることにより NK 細胞の NKG2D 発現が低下し、腫瘍に対する直接的な細胞傷害活性とともに、獲得免疫の形成において障害がみられる可能性が示唆された。また、sMICA が肝がんに対する新たなバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

共同研究者：竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・助教授

A. 研究目的

Natural killer (NK) 細胞はトランスフォームした細胞を非特異的に傷害する活性を指標に定義された細胞集団である。その活性は多様な活性化レセプターと抑制性レセプターのバランスの上に制御されていることが明らかにされている。また、NK 細胞は初期免疫に関与する代表的な免疫担当細胞であるが、近年その後の獲得免疫応答形成への影響が注目されている。

MIC というのは MHC class I 鎖に関連した遺伝子群の略称であり、ヒト第 6 染色体短腕の *HLA class I* 領域に *A, B, C, D, E, F, G* までの 7 つの遺伝子座の存在が知られている。*C* から *G* までは偽遺伝子であるが、*MICA* と *MICB* は共に 43 kDa の蛋白をコードしている。*MICA/B* は細胞膜上に発現する糖蛋白であり、細胞外領域の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ からなる構造は古典的な *HLA class I* 分子と類似している。しかし、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が形成する溝が狭く構造上ペプチドを載せる領域がないため抗原提示機能を欠くなど機能的には古典的な *MHC class I* とは異なっている。

る。一般に MHC class I 分子はほとんどすべての細胞において恒常的に発現しているが、MICA/B は消化管上皮細胞や一部の胸腺細胞を除いては正常細胞には発現しておらず、ストレスを受けた細胞やトランスフォームした上皮細胞でのみ発現が誘導される。

MICA/B は 1994 年の発見以来その機能は不明であったが、1999 年に NK 活性化レセプター NKG2D のヒトにおけるリガンドであることが明らかにされた。我々はヒトの肝がん組織の約 50% において MICA/B が発現していることを報告した。また、NK 細胞の肝がんに対する反応性は MICA/B からの NKG2D のシグナルに依存しており、これをブロックすることにより減弱することも明らかにした。

近年、膜蛋白である MICA/B は酵素的な切断をうけて培養液中に分泌されることが報告されている。今回、我々は可溶性 MICA/B (sMICA/B) が肝がん患者の血清中に存在するかどうかを検討し、さらにその機能的な意義について検討した。

B. 研究方法

健常者、慢性肝炎患者および肝がん患者の血清より sMICA の検出を ELISA を用いて行った。CD56 陽性細胞を MACS システムにより分離し、肝がん細胞株に対する傷害活性を 4 時間のクロムリリース法により測定した。NK 細胞レセプターの発現は FACS により解析した。健常者より単球を分離し、GM-CSF および IL-4 により樹状細胞を分化誘導した。樹状細胞の成熟は CD86 等の表面抗原により解析した。

(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

sMICA は健常者、慢性肝炎患者では、少数例でわずかに検出されたが、一部の肝癌患者では明らかな上昇を認めた。肝癌患者の sMICA を進行度別に検討すると、進行した肝癌では初期の肝癌に比し明らかに sMICA の陽性の頻度が高かった。

肝癌患者のなかで sMICA が陽性であった患者と陰性であった患者の CD56 陽性細胞における NKG2D の発現を FACS 解析した。sMICA 陰性の肝癌患者の NKG2D の発現レベルは健常者と同程度であったが、sMICA 陽性の肝癌患者ではその発現が低下していた。

そこで、sMICA が NKG2D の発現低下に関与しているのかどうかをみるために、*in vitro* の検討を行った。健常者の CD56 陽性細胞を 10% の患者血清で 48 時間処理し、その後の NKG2D の発現を検討すると、sMICA 陽性の HCC 患者血清で処理することにより NKG2D の発現が有意に低下した。患者血清中の sMICA が NKG2D の低下に関与しているかどうかを検討するために、血清処理時に MICA の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメインを認識する抗体を添加し NKG2D の発現を解析した。MICA 中和抗体の添加により血清処理による NKG2D の低下が解除されたことから、患者血清中の sMICA が NKG2D の発現低下に関与していることが示された。さらに、Cr リリースアッセイにより sMICA 陽性患者の CD56 陽性細胞は陰性患者のそれ