

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為の
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 三代 俊治

平成 19 年(2007)4 月

目次

I. 総括研究報告		頁
1. 班長報告: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為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究	(三代俊治)	5
2. 班友報告:Epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus infections in Sangihe-Talaud archipelago, Indonesia	(W Achwan)	11
II. 分担研究報告		
1. C型肝炎ウイルス複製の分子機構	(下遠野邦忠)	17
2. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析	(小池和彦)	19
3. 劇症肝炎由来B型肝炎ウイルス株の特徴:ウイルス全長の塩基配列解析による検討	(林 紀夫)	22
4. B型肝炎ウイルス genotype B の新種 subgenotype	(溝上雅史)	23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

I. 総括研究報告

班長からの報告

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

平成 18 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為の 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

要旨：本研究は、日米医学協力研究会(USJCMSP)肝炎部会(以下『日米肝炎』と略す)の活動の一環として実施された。日米肝炎が、亜細亜に特に蔓延する肝炎ウイルスとして B 型と E 型(HBV, HEV)を、将来の感染拡大が懸念される肝炎ウイルスとして C 型(HCV)を主要標的として定めたことに呼応し、本研究班の今年度の研究活動も主に此の三種に関するものであった。また、亜細亜諸国研究者達との連携を更に強化する為に、日米合同会議を APASL (Asia-Pacific Association for Study of the Liver)と合同で開催した。

<分担研究者(USJCMSP『部会員』)>

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(同上『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 国立感染症研究所ウイルス第二部部長
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

<研究協力者(同上『米國部会員』)> abc 順

Adrian Di Saint Louis University School of
Bisceglie Medicine
Michael Gale University of Texas Southwestern
Rajen Koshy NIAID, NIH
Anna Lok University of Michigan
Christopher The Ohio State University
Walker

<班長研究協力者(所謂『班友』)> 順不同

安倍夏生、新井雅裕、高橋和明、津田文男、Wenny Astuti(東芝病院)、Fazle Akbar(愛媛大)、田中靖人、Avazova Dildora、Fuat Kurbanov(名古屋市大)、Tian-Cheng Li(国立感染研)、宮川侑三(宮川財団)、Bira Tsatsralt-Od(自治医大)、矢野公士(国立長崎)、大西三朗(高知大学)

A. 研究目的

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御。

B. 研究方法

上記した目的の達成に向けて、下記3段階の方法を選択した。

B-1. 基礎研究: 本研究に参画する班員と研究協力者が、夫々の専門領域に於ける基礎研究の深化に努力する。具体的には、HBV と HCV と HEV に関する疫学的、ウイルス学的、免疫学的、分子生物学的研究を行う。

B-2. 米国研究者との研究協力: 従来からの日米医学協力研究事業肝炎部会の日米両パネル間の研究協力体制を維持し、先端情報の速やかな相互開示によって、当該領域の知識と技術の増進に努力する。

B-3. アジア諸国研究者との研究協力: 日米間の合同会議等にアジア諸国から専門家を招き、肝炎・肝癌の制御に向けた日米両国の共同研究努力の成果を彼等に披瀝し、以って自国に於ける肝炎肝癌対策の自助努力が進展することを期すると同時に、彼等と日本あるいは米国との間の共同研究の可能性を模索する。

<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

C-1. 基礎研究: 上記 B-1.に對應する主な成果としては、HCV 感受性ヒト肝細胞の樹立(下遠野班員等)、HCV NS5B の蛋白質レベルでの構造と機能が viral genotypes により異なる可能性の示唆(下遠野班員等)、HCV コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾が HCV の病原性発現に深く關與している可能性の示唆(小池班員)、フィリピン・タンザニア・インド・モンゴル・中国・ソロモン諸島等に於ける HBV 感染の分子疫學の実態の解明(溝上班員)、HEV の病原性が viral genotypes により有意に異なっている可能性の示唆(三代班員)を挙げる。

C-2. 米国研究者との研究協力: 上記 B-2.に對應す

る成果としては、HBV の薬剤耐性に關與する viral genome mutations のライブラリーを日米共同で構築する努力(溝上班員)、HCV NS3/4A protease による宿主蛋白切断に拘る遺傳的多型を模索する為の日米間の共同研究(三代班員)を挙げる。

C-3. アジア諸国研究者との研究協力: 上記 B-3.に對應する成果としては、第 28 回日米合同肝炎部會會議を、1,000 名を越える参加者がアジア諸國から参集することが見込まれた APASL (Asia-Pacific Association for Study of the Liver) 年次會議と共同開催したことにより、アジア諸國のヘパトロジスト達との接点を更に強化する成果が今後得られるものと期待される。此の會議のプログラムの一部を以下に示す。

The United States-Japan Cooperative
Medical Science Program
(USJCMSP)
日米醫學協力研究會
(日米醫學)

The 28th U.S.-Japan Joint Hepatitis Panel Meeting

(第二十八回肝炎部會日米合同會議)

**Mar 30 (Friday), 2007
Kyoto**

In conjunction with
APASL2007

Venue:

**Kyoto International
Conference Hall**
(國立京都國際會館)

Mar 30, 2007
10:00-13:00 (with lunch)
Business Meeting

6th floor, Room 668

Participants

Christopher Walker
 Rajen Koshy
 Anna Lok
 Adrian Di Bisceglie
 Anand Mehta
 Young Hahn
 Shiv Sarin*
 Shunji Mishiro
 Kunitada Shimotohno
 Masashi Mizokami
 Kazuhiko Koike
 Takaji Wakita

(*Dr Sarin is invited *ad hoc* for his perspective on agenda-1)
 n=12

Agenda

1. HCV vaccine and antiviral drug trials in Asia-Pacific countries
2. Plans for a co-ordinating surveillance/databases for HBV drug resistance mutants
3. Updates on the format of the meeting in Galveston
et cetera

Mar 30, 2007
13:30-16:00
Scientific Meeting
2nd floor, Room B-2

Mishiro *What is the USJCMSP Hepatitis Panel? - a prehistory for future*

Koshy *Regional versus global problems - similar but distinct*

Li *Recent topics on HEV - its omnipresence in our environment and vaccine development*

Hahn *HCV host cell interactions and immune evasion*

Kurbanov *Prevalence of 2k/1b natural recombinant HCV strain in Asia*

Mehta *HBV antiviral agents/glucosidase inhibitors*

Lok *Antiviral drug-resistant HBV*

Akbar *Can monotherapy with antiviral agent against HBV stand the test of time? - designing combination therapy with immune modulators*

Tsatsralt-Od *Molecular epidemiological and virological studies on hepatitis virus infections in Mongolia*

Astuti *Epidemiology of HBV/HCV/HEV/HIV infections in Sangihe-Talaud archipelago, an outlier of Indonesia*

Walker *What do you want US to do? - a dialogue with the audience*

D. 健康危険情報

通報なし。

E. 研究発表

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. *Hepato Res.* 2006;34(3):137-40.

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(Pt 4):949-54.

Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepato Res.* 2006;36(4):301-7.

Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro S, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepato Res.* 2007;37(2):113-20.

Koike M, Takahashi K, Mishiro S, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Ohno A, Mochida S, Fujiwara K. Full-length sequences of two hepatitis E virus isolates representing an Eastern China-indigenous subgroup of genotype 4. *Intervirology.* 2007 26;50(3):181-189

Fujiyama Y, Yamagishi Y, Kikuchi M, Shimoji K, Kato S, Nagata H, Saito H, Hibi T, Mishiro S. A case of fulminant hepatitis E treated with artificial liver support. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* 2007; 104(2): 219-25.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許:あり。

出願番号:特願 2006-350363

発明の名称:E型肝炎ウイルスを検出するための
 LAMP増幅用核酸プライマーセット

発明者:橋本みちえ、三代俊治、太田裕彦、高橋和明、安倍夏生

発明の概要:LAMP法の原理を応用して、ヒトや家畜、ペット等の動物の体内に感染したE型肝炎ウイルスを検出するための迅速かつ正確な方法を提供する

2. 実用新案登録:なし。
3. その他:なし。

班長研究協力者(班友)からの報告

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

平成 18 年度

班友研究報告書

Epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus infections in Sangihe-Talaud archipelago, Indonesia

班友 Wenny Astuti Achwan 東芝病院研究部客員研究員

Summary: We undertook serological surveys for HBV/HCV/HEV/HIV infections in general population of Tahuna, the capital city of Sangihe-Talaud archipelago, an outlier in northeastern part of Indonesia. Of 581 sera collected in April 2005, 8 (1.4%) were positive for HBsAg, 1 (0.2%) for anti-HCV, 34 (5.9%) for anti-HEV, but none for anti-HIV. All the HBsAg-positive sera were also positive for HBV DNA, nucleotide sequence of which segregated to a unique branch within subgenotype C5. Pre-school children were highly positive for anti-HBs (80%) as a result of HB immunization initiated in 1997. The titer of anti-HCV detected in only one individual was very low, with negative result of HCV RNA detection, suggesting non-specific reaction. Anti-HEV was significantly more frequent in those over 30 years of age (24.0%) than younger age group (24% vs 1.9%, $P < 0.0001$) *. Thus, it seems that HCV and HIV have not made inroad to the Sangihe-Talaud archipelago, fortunately. Although HBV infection remains a major problem in adults (with HBsAg positive rate at 4.9%), HB immunization has begun to protect younger generation.

＜研究協力者＞

Didacus Sumarsidi	Gajamada University Medical School, Yogyakarta, Indonesia
Mulyanto	Mataram University, Mataram, Lombok, Indonesia
Suwignyo Sumoharjo	Mataram General Hospital, Mataram, Lombok, Indonesia
津田文男	東芝病院研究部
高橋和明	同上
安倍夏生	同上
三代俊治	同上

A. 研究目的

疫学的データが従前皆無であった、インドネシア国内の或る離島に於ける肝炎ウイルス(及び AIDS ウイルス)感染実態の調査。

B. 研究方法

スラウェシ島(インドネシア)とミンダナオ島(フィリピン)の間に存在するサンギヘ・タラウド諸島のタフナ市(Figure 1)の住民から採取した 581 本の血清について、HBV, HCV, HEV, HIV の感染マーカーを調べ、陽性検体については viral genome analyses を行った。

C. 研究結果及び考察

上記 summary 及び別紙 Table/Figures の如し。

D. 健康危険情報

通報なし。

E. 研究発表

(1) 論文発表:なし。

(2) 學會発表:

Wenny A. Achwan. Epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus infections in Sangihe-Talaud archipelago, Indonesia. The 28th US-Japan Hepatitis Panel Joint Meeting, Mar 30, 2007. Kyoto

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許:なし.
2. 実用新案登録:なし.
3. その他:なし.

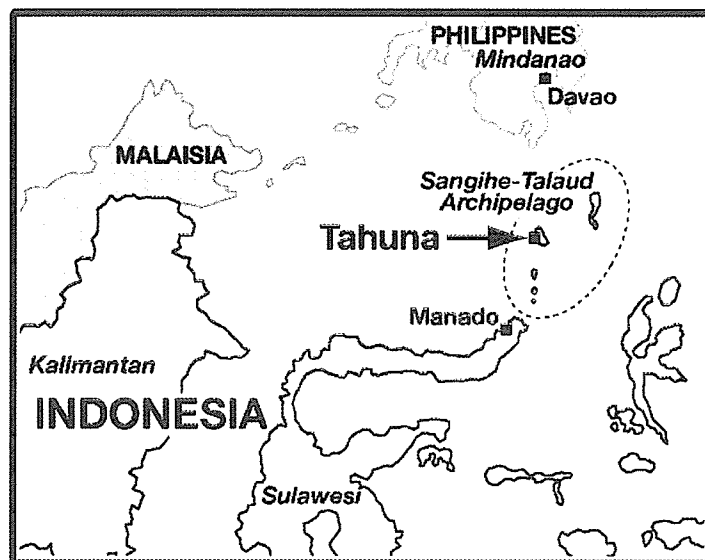


Figure 1

Table 1. Prevalence of the serum markers for HBV, HCV, HEV, and HIV infections, compared between different age groups.

Age in years	No. (female, male)	HBsAg +	Anti-HCV +	Anti-HEV +	Anti-HIV +
1-6 ^a	15 (6, 9)	0	0	0	0
7-12 ^b	204 (98, 106)	0	1 (0.49%) ^g	3 (1.5%)	0
13-15 ^c	198 (112, 86)	0	0	3 (1.5%)	0
16-30 ^d	60 (38, 22)	3 (5.0%)	0	3 (5.0%)	0
31-50 ^e	62 (39, 23)	2 (3.2%)	0	14 (23%)	0
51-86 ^f	42 (29, 13)	3 (7.1%)	0	11 (26%)	0

^a Pre-school children; ^b Primary school children; ^c Secondary school children; ^d Young adults; ^e Middle aged; ^f The elderly

^g Titer of the anti-HCV detected in this subject was very low, with a negative result of HCV RNA detection.

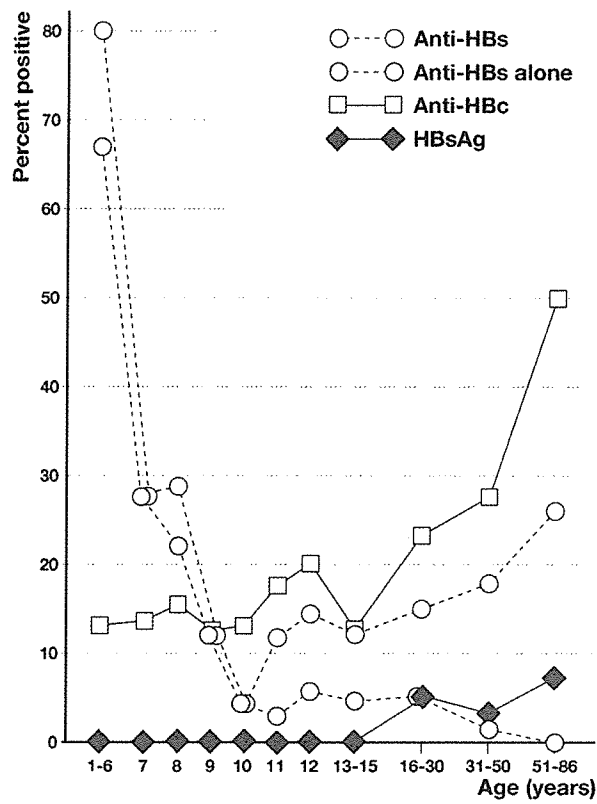


Figure 2. Age-related prevalence of HBV markers

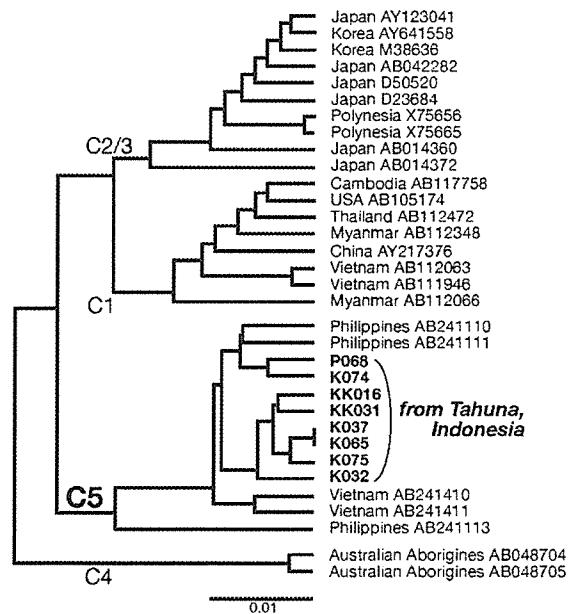


Figure 3. HBV phylogenetic tree

II. 分担研究報告

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為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

平成 18 年度
分担研究報告書

C 型肝炎ウイルス複製の分子機構

分担研究者 下遠野邦忠 京都大学ウイルス研究所教授

A. 研究目的

HCV の複製の分子機構を理解して、抗 HCV 開発に役立てる。

B. 研究方法

HCV ゲノム自立複製細胞を用いて、ウイルス複製に関与する宿主因子を明らかにすると同時に、これまでに知られている HCV ゲノム複製に係る宿主因子の働きを評価する。ウイルスゲノムをルシフェラーゼ活性で評価できる系を構築して作業を容易にする。本年は特にサイクロスポリンおよび免疫抑制作用のないサイクロスポリンので誘導体について、HCV-1b, HCV-2a ゲノム複製細胞を用いて評価する。

C. 研究成果

サイクロスポリン、その誘導体 (NIM811) とともに HCV-1b、-2a に対して、抗 HCV 作用を示した。しかしその効果は、HCV-1b に対して高かった。HCV-2a ゲノム複製細胞に対しては、サイクロフィリン B を抑制しても抗 HCV 作用は顕著に見られなかった。このことは、HCV-2a の場合、サイクロフィリン B と NS5B との結合が、活性化には必須でないと考えられ、NS5B の蛋白質レベルでの構造と機能が、ウイルスの遺伝子型により、少しずつ異なる可能性が示唆された。一方、サイクロスポリン、あるいは NIM811 による抗 HCV 効果はインターフェロンと共に処理することにより、高まることが分かった。一方、HCV 感染に感受性を示すヒト肝細胞の樹立を試みた。ヒト正常肝臓細胞を不死化して細胞株と

して樹立した。それを用いて HCV の感染実験を行い、(1)患者由来の血清中の HCV が感染する系を樹立した。(2)自然免疫系の中でインターフェロングナル活性化に働く IRF7 を抑制するとウイルス複製が増加するが、IRF3 を抑制しても複製の増加は見られなかった。このことから、HCV の自然免疫系の抑制には、他の RNA ウイルス以外による機構が働いている可能性が示唆された。

D. 研究発表

- Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
- Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):879-884, 2006.
- Hamazaki H, Takahashi H, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of hcv replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(7):801-805, 2006.
- Hamazaki H, Ujino S, Abe E, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. RNAi expression mediated inhibition of HCV replication. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 48:307-308, 2006.
- Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.
- Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.
- Komohara Y, Yano H, Shichijo S, Shimotohno K, Itoh K, Yamada A. High expression of APOBEC3G in

- patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol.* 37(8-9):327-332, 2006.
- Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 :869-878, 2006
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* 80 :3332-3340, 2006
- Suzuki H, Kaneko H, Tamai N, Miyano-Kurosaki N, Hashimoto K, Shimotohno K, Takaku H. Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 49:339-340, 2005.
- Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007
-

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為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究
平成 18 年度
分担研究報告書

C 型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア 蛋白のプロテオミクス解析

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)のコア蛋白がトランスジェニックマウスで肝発癌を惹起すること、肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の増加に深く関与していること、そして ROS の産生に関連が深いミトコンドリアにおいて、二重膜構造の変化ならびにコア蛋白の局在が認められることなどを報告してきた。これらの結果より、コア蛋白がミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにするため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白の発現の変化を解析した。ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、コア蛋白を発現する細胞と発現しないコントロール細胞を比較したところ、発現量が大きく変化する蛋白が複数認められた。これらの中でミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞で発現が高く、コア蛋白の存在によって安定性を増していた。今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、prohibitin を含むこれらの蛋白の発現変化が、ROS の増加、肝発癌に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV コア蛋白による遺伝子発現変動の解明。

B. 研究方法

HCV コア蛋白を恒常的に発現する HepG2 (Hep39)細胞から、Nycodenz discontinuous gradient を用いてミトコンドリア分画の精製を行った。ミトコンドリアの purity は以下の様に確認した。すなわち、精製したミトコンドリア蛋白を用いて Western blotting を行なったところ、コア蛋白とミトコンドリア蛋白 (complex I) は検出されたが、ER 蛋白 (OST48) は検出されなかった。

ミトコンドリア蛋白を二次元電気泳動した後、銀染色にて検出し、Image Master 2D Elite ver.3.1

(Amersham) により発現量の違いを検討した。適当なスポットを切り出し、in-gel trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry を行い、蛋白の同定を行った。

同定された蛋白については、特異抗体が入手可能なものについては Western blotting を行ない、発現レベルを確認した。

C. 研究結果

ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、Hep39 とコア蛋白を発現しないコントロール細胞 (Hepswx) の間で比較したところ、発現量の違う蛋白がいくつか認められた。その中には、ミトコンドリアの電子伝達系に関与する蛋白、細胞周期に関わる蛋

白などが含まれていた。これらの蛋白の発現量の違いを Western blotting により実際に確認した。

① 発現の上昇していた遺伝子

- 1) NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase a subunit precursor
- 2) succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase
- 3) GrpE-like protein co-chaperone
- 4) similar to ATP synthase b polypeptide
- 5) leucine aminopeptidase
- 6) pyruvate dehydrogenase E1 component b subunit, precursor
- 7) CGO15alt2
- 8) HSP70
- 9) prohibitin

など。

② 発現の低下していた遺伝子

- 1) aldehyde dehydrogenase 2
- 2) aldehyde dehydrogenase 5 precursor
- 3) BiP protein
- 4) HSP60 precursor

など。

Prohibitin に関しては、mRNA レベルでは増加していないこと、コア蛋白の存在によって安定性が増加していること、コア蛋白と相互作用すること、などを確認した。

D. 考察

今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、これらの蛋白の発現変化が、ROSの増加、ひいては肝発癌に寄与している可能性が示唆される。

Prohibitinに関しては、最近、ミトコンドリアに局在するだけでなく、核にも存在してステロイド受容体などの転写因子の発現を制御していることが明らかになってきており、細胞増殖との強い関連性が注目されてきている。今後は、この面からの詳細な検討を予定している。

E. 結論

コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにして、コア蛋白発現後の細胞の変化を知るため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。いくつかのミトコンドリア蛋白がコア蛋白によって発現に影響を受けていることが明らかになった。

HCVによる病原性発現において、コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾が大きな意義を保持していることが示唆された。C型肝炎における病態解明と病変進行の予防に重要な発見と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 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;41:292-294.

Okuse C, Yotsuyanagi H, Nagase Y, Kobayashi Y, Yasuda Y, Koike K., Iino S, Suzuki M, Itoh F. Risk Factors for Retinopathy Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:3759-3759.

Koike K. Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J Infect Chemother* 2006;12:227-232.

Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K., Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan. *J Gastroenterol* 2006;41:981-986.

Koike K., Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan. *Hepatol Res* 2007;37:2-5.

Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007 in press.

Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 in press.

- Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 γ -Dependent Pathway. *J Virol* 2007;81:1727-1735.
- Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1661-1666.
- Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. *J Gastroenterol* 2007 in press.
- Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report. *World J Gastroenterol* 2007 in press.
- Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Moriya K, Shinzawa S, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Iron-reactive overexpression of anti-oxidative heme oxygenase-1 is spoiled by the effect of HCV core protein in vivo. p131, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Miyoshi H, Moriya K, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Mitochondrial dysfunction by HCV core protein and its restoration by tacrolimus. p118, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- Tsutsumi T, Tomobe K, Suzuki T, Mizumoto K, Miyamura T, Koike K: HCV core protein transactivates IL-8 via ATF-6 pathway. p188, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.

2. 學會発表

- Moriishi K, Moriya K, Miyamoto H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatosis and hepatocarcinogenesis. p130, 13th International

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許: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為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

平成 18 年度

分担研究報告書

劇症肝炎由来 B 型肝炎ウイルス株の特徴:ウイルス全長の塩基配列解析による検討

分担研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教授

A. 研究目的

B 型劇症肝炎(FH-B)は B 型急性肝炎(AH-B)の約 1-2%に起こり非常に致命率が高い。従来より FH と AH の患者にそれぞれ感染する HBV の塩基配列の相違が論じられてきた。特に FH をきたす HBV 株では AH をきたす株に比較してより変異が高率に認められる hot-spot が存在し、現在までに A1896、T1762T/A1764、V1753 (V = not T)が FH に関連する hot-spot 変異として同定されている。しかしながら、上記の変異だけで FH-B の発症メカニズムの説明はつかず、加えて HBV の他の領域における FH に関連した変異については完全には明らかになっていない。そこで本研究においては AH-B および FH-B 双方の患者血清から得られた HBV 株の全塩基配列の比較を行い、FH に関連する HBV ゲノム変化の総括的な検討を行った。

B. 研究方法

対象は AH-B 9 例、FH-B 6 例の計 15 例で、男女比は 12:3、年齢は 17-72(中央値 49 歳)であった。患者血清より HBV 全長を nested PCR にて増幅し、direct sequencing にて HBV 全塩基配列を決定した。各症例より得られた HBV それぞれについて各領域ごとの塩基置換数(進化距離)を計算することで変異の程度を検討した。この際、各 subgenotype 毎に基準 HBV 株を設定し、同一の subgenotype の基準

HBV 株との比較を行うことで標準化を行った。

C. 研究成果

15 例の subgenotype は A2/Ae 2 例、B1/Bj 2 例、B2/Ba 1 例、C1/Cs 1 例、C2/Ce 9 例であった。hot-spot 変異については従来との報告と同様に A1896 変異($p = 0.09$)、T1762T/A1764 変異($p < 0.05$)、V1753 変異($p = 0.09$)が FH 群において AH 群に比し高率に検出される傾向にあったが、HBV 全体においてこれら以外に hot-spot site は同定されなかった。次にゲノム全体および各領域ごとの塩基置換数の比較を行ったところ、preS/S($p < 0.05$)、precore/core($p < 0.01$)、polymerase($p < 0.05$)の各遺伝子および転写調節領域である BCP/CURS 領域($p < 0.01$)にて、塩基置換数が FH 群において AH 群に比し有意に高値であった。さらに各領域について非同義塩基置換数と同義塩基置換数の検討を行ったところ、preS/S、precore/core 遺伝子については AH、FH 両群間での塩基置換数の差は非同義置換においてより顕著であり、一方 polymerase 遺伝子については同義置換において顕著な傾向を示した。以上の結果より、FH-B は高変異 HBV 株によってもたらされている可能性が示唆された。特に BCP/CURS 領域における変異と構造蛋白におけるアミノ酸置換が高頻度に生じることが、FH-B の発症と密接な関連を有することが考えられた。

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為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究
 平成 18 年度
 分担研究報告書

B 型肝炎ウイルス genotype B の新種 subgenotype

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

背景: 現在 B 型肝炎ウイルス(HBV)は、A-H までの 8 つの genotype に分類することができる。最近では同じ genotype の中でもその亜型(subgenotype)の存在が明らかとなり、これまでに HBV/B は、B1-B5 の 5 種の subgenotype に分類されている。**方法:** 今回我々は、極北地域に住む原住民から HBV/B を分離したので、その系統解析を行い HBV/B subgenotype の地理的分布とその臨床的特徴を比較検討した。**結果:** 極北原住民の HBV/B は、B1-5 とは異なる新しい subgenotype (HBV/B6) を形成し、臨床的にもウイルス学的にも HBV/Bj (B1) と非常に類似した subgenotype であることを発見した。**結語:** HBV/B は recombination の有無によりウイルス学・臨床的に大きく二つのグループに分類できると考えられた。

共同研究者氏名

坂本知行、田中靖人、Fuat Kurbanov

A. 研究目的

現在 B 型肝炎ウイルス(HBV)は、A-H までの 8 つの genotype に分類することができる。最近では同じ genotype の中でもその亜型(subgenotype)が明らかになりつつあり、全塩基配列を比較することで HBV/B が B1-B5 の 5 種の subgenotype に分類されている。一方で、これまでに我々は Genotype B (HBV/B) を Ba, Bj の二つのグループに分類できることを報告した。この二つのグループの間には大きなウイルス学的・臨床的相異があることがわかってきている。主に日本を除くアジアに多い HBV/Ba は、本来の HBV/B のプレコアからコア領域の部分が HBV/C と recombination (ウイルス遺伝子組換え) を起こしており、遺伝子組換えが見られない genotype Bj と大きな相違を認めることができる。臨床的にもアジアにおいては HBV/Ba は若年肝癌(HCC)の発生病リスクへの関与が示唆されているのに対し、HBV/Bj

(B1) は HCC との関連も少なく、また HBV/Ba や C と比べて HBe 抗原陽性率も低いと報告され、臨床的特徴にも大きな差が認められる。今回我々は極北原住民の B 型慢性肝炎患者に新しい HBV/B を発見したので、その系統解析を行いウイルス学的・臨床的特徴を他の HBV/B subgenotype と比較検討した。

B. 研究方法

対象は極北原住民の慢性 B 型肝炎患者のうち HBV/B と診断されたアラスカの HBV/B 31 例、グリーンランドの HBV/B 11 例にこれまでに報告のあったカナダの BakerLake の HBV/B 8 例を加え計 50 例を検討した。ウイルス塩基配列は、PCR および直接塩基決定法で決定し、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されているこれまで報告された HBV/B の配列と比較し、系統解析を行った。また、臨床的特徴を明らかにするため、今回対象とした 50 例の HBV/B と、これまで報告のあった各 50 例の HBV/Ba, Bj 患者において年齢、性別をマッチさせた患者一対照研究を行った。

C. 研究結果

全 50 例の内 20 例で全塩基配列を決定し、これまでに報告のあった DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている HBV/B と比較し系統解析を行ったところ、極北原住民で認めた HBV/B はこれまで報告された HBV/B(B1-B5)と異なる 6 番目のクラスターを形成し、HBV/B6 と命名した。HBV/B6 は系統解析から HBV/Bj (B1)に近く、最も古いグループである可能性が示唆された。

今回発見されたHBV/B6に、HBV/Ba (B2-B5)のようなrecombinationが存在するか否かを検討するため、全塩基配列においてSimplot解析を行ったが、明らかなrecombinationを認めなかった。また、検証のためrecombination領域(1774-2443)における系統解析を行ったところ、HBV/Ba (B2-B5)がHBV/Cに分類されるのに対しHBV/B6はHBV/Bj (B1)と近似のクラスターを形成した(Fig. 2)。

最後に HBV/B6 50 例と各 50 例の HBV/Bj (B1), Ba(B2-B5)と年齢と性別をマッチさせた患者一対照研究では、HBV/B6 と HBV/Bj (B1)は HBV/Ba に比べて有意に HBe 抗原陽性率が低く($P<0.02$)、また HBV/Ba は HBV/Bj (B1)あるいは HBV/B6 に比べて有意に DNA 量と ALT 値が高い傾向にあり($P<0.001$)、肝癌または肝硬変患者の割合が有意に多かった($P<0.03$)。一方、HBV/B6 は無症候性キャリアが有意に多かった($P=0.0001$)。

D. 考察

極北原住民で認めたHBV/Bは系統解析とSimplot解析から、recombinationを持たないHBV/Bj (B1)と類似したsubgenotypeであることがわかった。また、患者一対照研究の結果から、HBV/B6は臨床的にも

HBV/Bj (B1)と共に比較的予後の良いsubgenotypeであることがわかった。これまでHBV/Bは遺伝子の相違性よりB1-5の5つに分類されているが、今回の結果よりウイルス学的にも臨床的にもrecombinationグループとnon-recombinationグループの二つのグループに大別できる可能性が示唆された。

また、興味深いことに極北原住民は北日本人と同じモンゴロイドに属し、身体的特徴がよく似ている。今回の結果から、日本人と極北原住民は人類学的に似ているだけではなく、HBウイルスという観点でも関連性があると考えられた。

E. 結論

これまでに報告されたHBV/Bの5種のsubgenotypeとは異なる新しいsubgenotypeを発見した。アラスカのHBV/B6は臨床的にもウイルス学的にもHBV/Bj (B1)に類似したsubgenotypeであり、HBV/Bはrecombinationの有無により二つのグループに大別できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

坂本知行、田中靖人、Fuat Kurbanov、目下部篤宣、新海登、菅内文中、折戸悦朗、上田龍三、溝上雅史。B型肝炎ウイルス Genotype B の分布とその起源。第42回日本肝臓病学会総会 2006

Tomoyuki Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Simonetti Josephine, Carla Osiowy, Malene L. Børresen, Fuat Kurbanov, Gerald Y. Minuk, Brian J McMahon, Masashi Mizokami. Cincial and viral characteristics of a novel HBV genotype B among indigenous people in the Arctic. 17th Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Kyoto, March, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。