

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型肝炎ウイルス感染者における
新たな発がん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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成19（2007）年 3月

B型及びC型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん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 班員	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学	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
	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
	榎本 信幸	山梨大学大学院医学工学総合研究部	教授
	小池 和彦	東京大学医学部・感染制御学	教授
	各務 伸一	愛知医科大学医学部・消化器内科	教授
	井廻 道夫	昭和大学医学部・第二内科	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
	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
	坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人 間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学	教授

[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 型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん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. HCV RNA 複製細胞の長期培養による HCV の遺伝的異変と細胞機能変化	5
加藤 宣之	
2. C 型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 FKBP8 の機能	11
松浦 善治	
3. 脂質制御による C 型肝炎および肝発癌治療戦略の開発	14
榎本 信幸	
4. C 型肝炎と脂質代謝	17
小池 和彦	
5. C 型慢性肝炎から肝癌発生の過程で発現量に変化する肝内遺伝子群の検討	21
各務 伸一	
6. 肝癌患者の治療前後における各種抗原に対する細胞性免疫応答の研究	23
井廻 道夫	
7. 慢性肝疾患における免疫抑制機能分子 soluble MICA/B の解析	27
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	31
金子 周一	
9. Gankyrin と IGFBP5 のヒト肝臓癌における検討	34
伊藤 義人	
10. B 型および C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者血清のプロテオーム解析	38
坪内 博仁	

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
-------------------	----

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	48
----------------	----

I .総括研究報告

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）
総括研究報告書

B型及びC型肝炎ウイルス感染者における新たな発がん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年計画の最終年度に当たる本年度において、HCV増殖に関与する宿主因子FKBP8の同定、脂質合成経路をターゲットとした増殖抑制法の具体的な薬剤候補の提示、HCVコア蛋白による脂肪化のメカニズムの解明、HCV複製に伴う宿主細胞での遺伝子発現変化の網羅的解析、HCV感染・肝がんの特徴的な高発現遺伝子群の同定、血清プロテオーム解析による肝がんの新規診断マーカーとしてのC3aの同定、ガンキリンによる肝細胞のがん化メカニズムの解明、NK細胞機能抑制分子としての可溶性MICA/Bの臨床的意義の解明、CD8免疫モニタリングシステムの臨床応用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起こされる肝がん

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) 肝がん発生に關与する新規宿主遺伝子の同定と標的治療法の探索

HBV・HCV關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關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、発がんとの關連、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・治療経過との關連を明らかにする。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。

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、可溶性 MICB の濃度を ELISA にて測定した。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。

(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

- HCV の NS5A と相互作用する宿主因子として免疫抑制剤 FK506 と結合する FKBP8 を見出した。レプリコン細胞における FKBP8 のノックダウンは HCV 増殖を著明に抑制した。エピトープタグ法を用いた検討により、FKBP8 と相互作用する細胞内因子として Hsp90 が同定され、Hsp90 の阻害も HCV 複製を抑制すること

を見出した。

- スフィンゴミエリン合成経路、コレステロール合成経路の阻害により、HCV レプリコン増殖は抑制され相乗効果が認められた。Nitrogen-containing bisphosphonate である risedronate (ベネット)、alendronate (フォサマック)、zoledronic acid (ゾメタ注) に強い HCV 抑制効果が見られた。メバロン酸代謝経路を介する HCV 増殖抑制効果は蛋白の geranyl-geranylation の阻害に加え、コレステロール自体の低下も関与する可能性が示された。
- コア蛋白は不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性を亢進させた。一価不飽和脂肪酸の増加は細胞質内の NADH の増加によりもたらされた。

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

- 全長 HCV RNA 複製細胞のマイクロアレイ解析により 1 年以上の長期培養が多く宿主遺伝子の発現レベルを変化させることを見出した。
- C 型慢性肝疾患の肝組織のマイクロアレイ解析により、慢性肝炎では代謝・免疫応答に関する遺伝子群、肝がんでは細胞周期・増殖・アポトーシス・シグナル伝達に関する遺伝子群の発現増強がおこることが示された。
- B 型および C 型慢性肝炎の肝組織のマイクロアレイ解析により、両肝炎において種々のがん関連分子経路が活性化されていることが示された。両肝炎で共通して発現している因子として VEGF が注目された。また、B 型および C 型の肝がんでは高

発現している遺伝子の多くは細胞増殖に関連する遺伝子であったが、fatty acid desaturase や steroyl-CoA desaturase といった脂質代謝に関連する分子も抽出された。また、その上流に位置する分子である SREBP1 が同様の挙動をしており、この発現量は肝がん患者の予後の独立した危険因子であった。

- B 型および C 型肝がん患者血清中に発現する蛋白の網羅的解析により、C 型肝がんでの高い蛋白ピークとして C3a fragment を明らかにした。C3a のピークは肝がんの治療後に低下する傾向があった。
- 肝がんでは高発現しているがん遺伝子 gankyrin は早期の肝がんでは陽性率が高かった。Gankyrin の発現は IGFBP5 の発現を誘導し、ヒト肝がん組織でも両者の発現の間に関連があった。

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

- NK 細胞抑制性の機能分子である可溶型 MICA および可溶型 MICB は健常者に比し、慢性肝炎、肝硬変、肝がんでは疾患が進行するに伴い血清中の濃度が上昇した。肝臓の線維化と発がんが可溶型 MICA および可溶型 MICB の上昇に寄与する独立した因子であった。可溶型 MICA あるいは可溶型 MICB の高い肝がん患者の予後は有意に不良であった。
- 肝がんに対する細胞傷害性 T 細胞のがん特異的抗原エピトープ (MAGE 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原) に対する反応性を肝がんの治療前後で ELISPOT 法を用いて検討した。各ペプチ

ドに対して、治療前では 10 例中 5 例が、
治療後でも 10 例中 5 例が反応した。

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 FKBP8 が新規の治療ターゲットになることが示され、また脂質代謝に関連する既存の薬剤が抗 HCV 活性をもつことが示された。また、HCV による発がんのメカニズムとして脂質代謝の重要性が HCV コアによる *in vitro* の解析およびマイクロアレイ解析から示された。肝がんに関連する血清マーカーとして C3a がプロテオーム解析により同定され、また免疫機能分子である可溶性 MICA/B の臨床的意義が明らかにされた。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

「研究成果の刊行に関する一覧表」に記載

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

HCV RNA 複製細胞の長期培養による HCV の遺伝的変異と細胞機能変化

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨:HCV-O 株(1b 遺伝子型)由来の全長 HCVRNA が効率良く複製している5種類の HuH-7 細胞由来のクローン細胞(O, OA, OB, OD および OE 細胞)を長期に培養して、HCV の遺伝的変異の状態と細胞機能における変化を解析した。1-2年の長期培養の結果、5種類の細胞における HCV の遺伝的変異速度は、 $3.7-5.3 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年であることを明らかにした。長期培養の結果、HCV の遺伝的変異の蓄積が観察された。HCV の遺伝的変異が起こる領域は不均一であり、HCVRNA の複製効率を上昇させる適応変異が経時的に出現増加していた。O 細胞と1年間培養した O 細胞とのマイクロアレイ解析により、一部の遺伝子の発現量が変化していることが分り、2倍以上上昇した45遺伝子と1/2以下に低下した69遺伝子を同定した。また、HCVRNA の複製を抑制するインターフェロンに対する感受性は1年培養によっても大きな変化は認められなかったが、インターフェロン耐性細胞の出現頻度が高まってくる可能性が示唆された。

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。

HCV の持続感染は長期に起こることから、肝癌発生までに相当のHCVの遺伝的変異や細胞側の変化が起こるものと推察されているが、実験的にどの程度の変化が起こっているかについての情報は乏しい。

我が国に多い遺伝子型 1b の HCV 粒子産生システムは未だ開発されていないことから、現在でも、細胞内で HCVRNA を効率よく複製させる系を使って多くの実験がなされている。

本研究では、現在までに我々が樹立した HCV-O(1b 型)株由来の5種類の全長 HCVRNA 複製細胞を長期に培養することにより生じる HCV の遺伝的変異や細胞の機能変化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)全長 HCVRNA 複製細胞の長期培養による HCV の遺伝的変異

全長 HCVRNA 複製細胞である O, OA, OB, OD および OE 細胞を G418 (0.3 mg/ml)存在下、DMEM 培地(10%FBS)にて長期に培養した。1週間ごとに 50-70 倍希釈による継代を繰り返し、最長2年間培養した。

培養開始1年後或は2年後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HCVRNA を増幅した。逆転写酵素として

Superscript III を使用して cDNA を作成し、KOD-plus DNA polymerase により PCR を行った。前半部 5.0 kb と後半部 6.1 kb として得られた全長 HCVRNA をカバーする DNA 増幅産物を pBR322MC ベクターの *Xba*I 部位に導入して、O-OE について、それぞれ独立的に得られた3クローンの sequencing により全塩基配列の決定を行い、相互に比較解析した。

(2) 全長 HCVRNA 複製細胞の長期培養による細胞機能変化

O 細胞、O 細胞からインターフェロン (IFN) により HCVRNA を排除した Oc 細胞、O 細胞を1年培養した O1 細胞および Oc 細胞を1年培養した Oc1 細胞の細胞増殖速度を Trypan blue 染色法により測定した。

O 細胞と O1 細胞を IFN- α (1-8 IU/ml) で処理して、3日後にそれぞれの細胞から RNA を抽出し、5'UTR についての real-time RT-PCR (LightCycler 使用) を行い、HCVRNA を定量した。

O 細胞と O1 細胞を4日ごとに IFN- α (50-400 IU/ml) で処理し、G418存在下で3週間培養した後、生じたコロニーについて CBB 染色を行った(コロニーアッセイ)。

O, O1, Oc および Oc1 細胞を同じ培養条件下で培養し、それぞれの細胞より RNA を抽出し、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子)によるマイクロアレイ解析を行い、発現量の比較を行った。

(倫理面への配慮)

既に樹立され汎用されている HuH-7 細胞を用いた実験なので、倫理面における配慮は特にないが、細胞培養実験により生じた廃棄物については、加熱滅菌処理を行った。

C. 研究成果

(1) 全長 HCVRNA 複製細胞の長期培養による HCV の遺伝的変異

O-OE 細胞までの5種類について、1年間培養した後にこれらの細胞内で複製している全長 HCVRNA の塩基配列を決定して(各細胞から3クローンずつ)、培養開始前(樹立時)の塩基配列と比較した。その結果、変異は不均一ながら、全長 HCVRNA 全体に認められ、変異速度として O 細胞では 4.52×10^{-3} 、OA 細胞では 3.67×10^{-3} 、OB 細胞では 5.29×10^{-3} 、OD 細胞では 3.77×10^{-3} 、OE 細胞では 3.71×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年が算出された。平均変異速度は、 4.19×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年であった。

各細胞を2年培養した場合についても非構造領域については、同様に解析し、アミノ酸置換を伴う変異部位を特定して、経時的変化を解析した。その結果、各細胞において、NS3 領域に出現していた適応変異に加えて、経時的に新たな適応変異が NS3 領域に出現してくることが分った。アミノ酸置換を伴う変異は全非構造タンパク質内に経時的に蓄積してくることが確認されたが、それらの部位は不均一で NS5A 内のドメイン I (亜鉛配位領域)や NS5B のポリメラーゼ活性触媒部位においては、ほとんど変異は観察されなかった。これらとは対照的に NS5A の C 末端部では変異部位が集中的に認められた。

(2) 全長 HCVRNA 複製細胞の長期培養による細胞機能変化

1年間培養した O1細胞や Oc1 細胞の増殖速度は O 細胞や Oc 細胞に比べて増加していることが分った。特に Oc1 細胞で

は顕著で、2日で3.5倍になるOc細胞に比較して、Oc1細胞では2日で約6倍に細胞数が上昇していた。O細胞では2日で3倍程度の細胞数の増加であったが、O1細胞では4倍強の増加となっていた。

O細胞とO1細胞における全長HCVRNAの複製がIFN- α によりどの程度影響を受けるかを調べた。その結果、IFN感受性については、両者に大きな差はなく、どちらもIFNに高感受性を示した。1 IU/mlのIFN- α 濃度で3日間処理すると、どちらの細胞においてもHCVRNAの複製レベルは、20~30%に大きく低下したが、両者に差は認められなかった。しかしながら、コロニーアッセイによるIFN- α 感受性の実験では、O1細胞においてIFN- α 処理後、G418耐性を維持して増殖してきたコロニー数が多く観察された。

O1細胞とO細胞におけるマイクロアレイ解析では、O1細胞で2倍以上発現量が上昇する遺伝子として61遺伝子を確認したが、そのうち16遺伝子はOc1細胞でもOc細胞に比較して2倍以上発現量が上昇していたので、O1細胞でのみ発現量が上昇する遺伝子として45を同定した。逆にO1細胞で1/2以下に発現量が低下する遺伝子は、217遺伝子確認されたが、そのうち、142遺伝子はOc1細胞においてもOc細胞と比べて、1/2以下になっていたため、O1細胞でのみ発現量が低下する遺伝子として69を同定した。これらの結果から、全長HCVRNA複製細胞を長期間培養することにより、一部の遺伝子の発現量に変動が起こることが分った。

D. 考察

(1)全長HCVRNA複製細胞の長期培養によるHCVの遺伝的変異

本年度の研究により算出された全HCVRNAの変異速度、 4.19×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年は、以前解析したHCVサブゲノムレプリコンの変異速度 3.0×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年より、若干高めであったが、同レベルの変異速度であると考えられる。この点については、2年培養後のHCVの遺伝子解析によりさらにデータが得られるものと思われる。今回、長期培養によりNS3領域に新たな適応変異が出現蓄積してくる現象を明らかにしたが、これ迄に、NS3領域に出現する適応変異は1種類よりも2種類を組み合わせると最大10倍ほど、さらにHCVRNAの複製効率が增大することを明らかにしていることから、1年、2年と長期に培養することにより、細胞内でのHCVRNAの複製効率は次第に上昇してきているものと思われる。これらの適応変異とNS3プロテアーゼ活性の強さなどとの関係に相関があるかどうかについての解析も必要であると思われる。

(2)全長HCVRNA複製細胞の長期培養による細胞機能変化

今回の解析では、全長HCVRNA細胞を長期に培養すると、HCVRNAの複製を抑制するIFNに対する感受性は、全体としては変化がないが、IFN抵抗性を示す細胞の出現頻度が高まるのではないかという結果を得た。HCVRNAの複製が長期間起こることにより何らかの理由(ウイルス側や細胞側の変化)によりIFNに対して抵抗性になる確率が高まるのではないかということが示唆されたことから、この点をさらに検証していく予定である。

マイクロアレイ解析において、HCVRNAの複製が続く環境下では一部の宿主遺伝子の発現に変化が認められたことから、今後は変化の認められた遺伝子がどのような細胞機能の変化や細胞のがん化と関連しているかについて解析していく予定である。

E. 結論

(1) 長期に継代培養した全長 HCVRNA 複製細胞内では $3-5 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年の頻度で遺伝的変異が起こり、変異の蓄積が観察された。適応変異の出現蓄積も観察された。

(2) 長期培養した全長 HCVRNA 複製細胞では細胞の増殖速度が上昇し、マイクロアレイ解析により一部の遺伝子で発現量に変化をきたしていることが分った。IFN に抵抗性を示す細胞の出現頻度も上昇していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Abe, M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, and N. Kato. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* in press (2007).
- 2) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis

C virus RNA. *Virus Res.* in press (2007).

- 3) K. Abe, A. Nozaki, K. Tamura, M. Ikeda, K. Naka, H. Dansako, H. Hoshino, K. Tanaka, and N. Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol. Immunol.* 51, 117-125 (2007).
- 4) K. Yuasa, A. Naganuma, K. Sato, M. Ikeda, N. Kato, H. Takagi, and M. Mori. Zinc is a negative regulator of hepatitis c virus RNA replication *Liver Int.* 26, 1111-1118 (2006).
- 5) M. Ikeda, K. Abe, M. Yamada, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. Different Anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44, 117-125 (2006).
- 6) N. Ishii, K. Watashi, T. Hishiki, K. Goto, D. Inoue, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, and K. Shimotohno. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J. Virol.* 80, 4510-4520 (2006).
- 7) L. Deng, M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada and H. Hotta. The NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 87, 1703-1710 (2006).
- 8) 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* 346, 348-362 (2006).
- 9) 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. Hepatol.* 44, 869-878 (2006).
2. 学会発表
- 1) 是永 匡紹、安藤 美恵、原 裕一、池田 正徳、加藤 宣之、日野 啓輔、坂井田 功. HCV genomic repliconを用いたミトコンドリア機能解析. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.
- 2) 湯浅 和久、長沼 篤、高木 均、鈴木 秀幸、柿崎 暁、佐藤 賢、市川 武、蘇原 直人、森 昌朋、池田 正徳、加藤 宣之. C型慢性肝炎に対する亜鉛補充療法. 第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月.
- 3) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. HCV-O (1b) とJFH1 (2a)のシスエレメントキメラウイルスの作成とそれらを用いたHCV複製効率規定領域の解析第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 4) 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、加藤 宣之. HCV RNAの複製レベルを生細胞のまま定量できる新しい評価システムの開発. 第65回 日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 5) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之. HCV RNAの複製を著しく亢進させる適応変異の組合せの同定. 第65回日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 6) 渡士 幸一、後藤 覚、土方 誠、脇田 隆字、加藤 宣之、下遠野 邦忠. シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルス複製の抑制.第65回 日本癌学会総会、横浜、2006年9月.
- 7) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, and N. Kato. Combination of cell-adaptive mutations causes the drastic enhancement of genome-length HCV RNA replication. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 8) K. Abe, A. Nozaki, K. Tamura, M. Ikeda, K. Naka, H. Dansako, H. Hoshino, K. Tanaka, and N. Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-HCV peptide enhance the antiviral activity. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 9) H. Dansako, M. Ikeda, K. Abe, and N. Kato. Development of a new cell-based assay for monitoring HCV RNA replication level with living cells. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
- 10) K. Takemoto, H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda, and N. Kato. Comparative analysis of inhibiting activities against IFN-beta production of NS3-4As derived from patients with different hepatic conditions. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia.

- August, 2006.
- 11) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Wakita, and N. Kato. Production and characterization of infectious HCVs from JFH1 (2a) with cis-element of HCV-O. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
 - 12) K. Watashi, N. Ishii, K. Goto, M. Hijikata, T. Wakita, N. Kato, and K. Shimotohno. Cyclophilin B, a cellular cofactor for HCV replication, determines the diverse anti-HCV efficacy of cyclosporine A among strains. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cairns, Australia. August, 2006.
 - 13) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之. 全長HCV RNAの効率的な複製を引き起こすNS3領域の適応変異に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 14) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、加藤 宣之. 全長HCV RNAの複製を長期間維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 15) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 1b型と2a型HCVのシスエレメント領域のキメラウイルスを用いたウイルスの複製および粒子産生に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 16) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスNS3-4A蛋白質のインターフェロン- β 産生阻害メカニズム. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 17) 團迫 浩方 池田 正徳 阿部 健一 加藤 宣之. HCV RNAの複製を生細胞のまま観察できる培養システムの開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 18) 山田 将士、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、加藤 宣之. ヒト肝癌由来の培養細胞におけるC型肝炎ウイルスおよびエタノールのTGF- β 産生に及ぼす影響に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月.
 - 19) 田村 一志、大上 厚志、田中 淳、清水 宣明、加藤 宣之、森川 昭廣、星野 洪郎 .VSV/HCV pseudotype virus 感染系を用いたHCV母子感染症例・小児HCV感染例の感染機構の検討. 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006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 FKBP8 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を検索し、免疫抑制剤であるFK506に結合するイムノフィリンに分類されるFK506結合蛋白質8(FKBP8)がNS5Aと特異的に結合することを見いだした。内在性のFKBP8をノックダウンすると、レプリコン細胞のゲノム複製は顕著に抑制され、その抑制はsiRNAに耐性なサイレント変異を導入したFKBP8の発現で回復した。エピトープタグ法を用いてFKBP8と相互作用する細胞内因子を探索し、分子シャペロンであるheat shock protein 90(Hsp90)を同定した。NS5AはFKBP8を介してHsp90をHCVの複製複合体に取り込む役割を演じており、Hsp90の阻害剤であるゲルダナマイシンはHCVの複製を阻害した。

A. 研究目的

現在、in vitroの複製系を用いてHCVのプロテアーゼやポリメラーゼに対する阻害薬の開発が進行中であるが、エイズウイルスの経験からも明白なように、RNAウイルスの酵素阻害剤に対しては、耐性ウイルスの出現が危惧される。そこで我々は、HCVの複製に必須な宿主因子を同定し、それらを標的とすることによって耐性ウイルスの出現しにくいC型肝炎治療薬の開発を目指して、NS5Aと相互作用する宿主因子を酵母ツーハイブリッド法で探索し、FK506結合蛋白質8(FKBP8)を同定した。

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、FKBP8を同定した。HCVレプリコン細胞やJFH1株を用いたHCV細胞培養系でのノックダウン法と定量的RT-PCRによって、FKBP8のHCV複製への影響を解析した。また、FKBP8の変異体を作製し、NS5AおよびHsp90との相互作用を検討した。

(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

HCVレプリコン細胞やHCV感染細胞からFKBP8をノックダウンすると、顕著に細胞内のウイルスRNAの発現抑制が観察された。エピトープタグ法により、FKBP8はHsp90と複合体を形成することが示された。NS5A蛋白質はHsp90とは直接結合

しないが、FKBP8を介して3つの蛋白質が複合体を形成した。さらに、FKBP8の蛋白質との相互作用を担うTetratricopeptide repeat(TPR)領域の異なる部位で、NS5A蛋白質とHsp90がそれぞれ結合することが示された。特に、Hsp90のC末端のMEEVD配列がFKBP8のTPR領域との結合に重要であった。また、Hsp90のATPase阻害剤であるゲルダナマイシンは濃度依存的にHCVの複製を阻害した。

D. 考察

多くのウイルスの複製に分子シャペロンが関与していることが知られているが、今回我々が見いだしたFKBP8は、Hsp90をHCVの複製複合体にリクルートするコシャペロンとして機能しているものと思われる。NS5AとFKBP8、あるいはFKBP8とHsp90との結合阻害は、慢性C型肝炎の新たな創薬ターゲットと思われる。特に、免疫抑制活性を欠損し、FKBP8に結合可能なFK506誘導体は、HCVの複製阻害剤としての可能性を秘めている。

E. 結論

1. NS5Aの結合蛋白質としてFKBP8を単離した。
2. FKBP8のノックダウンによりHCV RNA複製は抑制された。
3. FKBP8はHsp90と複合体を形成することが示された。
4. FKBP8がTPR領域を介してNS5A蛋白質とHsp90からなる複合体を形成し、HCVの複製に関与していることが示された。
5. Hsp90のATPase阻害剤であるゲルダナマイシンは濃度依存的にHCVの複製を阻害した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
2. Shirakura M., Murakami K., Ichimura T., Suzuki R., Shimoji T., Fukuda K., Abe K., Sato S., Fukasawa M., Yamakawa Y., Nishijima M., Moriishi K., Matsuura Y., Wakita T., Suzuki T., Howley P.M., Miyamura T., and Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 81, 1174-1185 (2007).
3. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T. Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
4. Okamoto T. Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
5. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-105 (2006).

2. 学会発表

1. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
2. Tetsuo Yamashita, Yoshio Mori, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura: Crystal Structure of Catalytic Domain of Japanese Encephalitis

Virus NS3 Helicase/Nucleoside

Trisphosphatase at a Resolution 1.8 Å. 同上。

3. Toru Okamoto, Yorihiro Nishimura, Tohru Ichimura, Kensuke Suzuki, Tatsuo Miyamura, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, August 27-31, 2006.
4. Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Hironobu Miyamoto, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. 同上。
5. Yoshio Mori, Yoshimi Tsuda, Tetsuya Yamashita, Yoshinori Tanaka, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Biological significance of nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein. 同上。
6. Takayuki Abe, Shyu-hei Tagawa, Yuhki Kaname, Kohji Moriishi, Osamu Takeuchi, Kawai Taro, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Shizuo Akira, and Yoshiharu Matsuura: Modulation of Toll-like receptor signaling in immune cells by expression of hepatitis C virus non-structural proteins. 同上。
7. 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型肝炎ウイルスの複製における FKBP8 の役割、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成 18 年 11 月 19-21 日。
8. 阿部隆之、田鍬修平、要 祐喜、森石恒司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C型肝炎ウイルス蛋白質による免疫細胞における自然免疫シグナルの阻害機構の解析、同上。
9. 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恒司、松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子の解析、同上。
10. 森 嘉生、山下哲生、田中佳典、森石恒司、松浦善治: カテプシン L によってコア蛋白質がプロセスされない日本脳炎ウイルスの性状、同上。
11. 津田祥美、森 嘉生、阿部隆之、山下哲生、岡本 徹、市村 徹、森石恒司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は日本脳炎ウイルスのコア蛋白質と結合しウイルス複製に関与する、同上。
12. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恒司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ

だ組換え VSV、同上。

13. 山下哲生、海野英明、森 嘉生、森石恒司、月原富武、吾郷昌信、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの RNA ヘリケースドメインの X 線結晶構造解析、同上。
14. 森石恒司、森屋恭爾、宮本大伸、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割、同上。
15. 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恒司、藤原晴彦、松浦善治: カイコ幼虫へ遺伝子導入

可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、同上。

16. 松浦善治、森屋恭爾、田中啓二、宮村達男、鈴木哲朗、小池和彦、森石恒司: C 型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症における PA28 γ の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 18 年 9 月 28-30 日。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

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

脂質制御による C 型肝炎および肝発癌治療戦略の開発

分担研究者： 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、ウイルス増殖における脂質の重要性が次第に明らかにされているが、HCVでも複製複合体形成の足場として、細胞内小器官膜上の「脂質ラフト」構造が重要であることが明らかにされつつある。我々は、この事実をふまえ、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、スフィンゴ脂質合成阻害薬ミリオシン、さらにコレステロール合成阻害剤スタチンの抗HCV効果について明らかとしてきた。本年度は上記をさらに発展させ、ビスフォスフォネートなどを含む、より効果の高い脂質代謝制御薬剤の探索を行った。

共同研究者：前川 伸哉 山梨大学医学部・肝疾患地域先端医療システム学 講師

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、RNA ウイルス複製時における宿主のオルガネラ膜脂質の重要性が次第に明らかとされてきたが、HCV においても HCV-replicon 増殖細胞において、複製複合体が細胞内小器官上の脂質ラフトに形成されることが報告され、HCV 増殖における脂質

の重要性が俄に注目を集めている。

我々は、昨年度本研究において、脂質ラフト構成成分であるスフィンゴミエリン、およびコレステロールに注目し、これらの合成阻害剤であるミリオシン、スタチン等が特異的な抗HCV作用を有することを報告した。本年度は、この結果をさらに発展させ、脂質代謝制御を通じたHCV増殖と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、さらなる検討を行った。

B. 研究方法（2006年度）

脂質ラフトはスフィンゴミエリン、コレステロール、さらに飽和脂肪酸の3種類の脂質より構成される。昨年度に引き続いて、