

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16年度～18年度 総合研究報告書

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	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	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. ウイルス発がん機構の解析	6
加藤 宣之	
2. C型肝炎ウイルスの成熟・複製に関与する宿主因子の解析	19
松浦 善治	
3. C型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 遺伝子構造によるインターフェロンシグナル制御機構の 検討、および脂質代謝制御による C型肝炎治療戦略の開発	24
榎本 信幸	
4. 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	27
小池 和彦	
5. 肝細胞癌の発症メカニズム解明および早期診断法確立のための研究	36
各務 伸一	
6. 肝癌患者の各種癌抗原に対する細胞性免疫応答の研究	38
井廻 道夫	
7. C型肝炎・肝がんにおける NK 細胞レセプターを介した免疫制御	43
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	48
金子 周一	
9. Gankyrin と DP1/B-MYB のヒト肝臓癌における検討	53
伊藤 義人	
10. HCV 抗体陽性者の 10 年間のコホート研究と HVC 関連肝疾患患者血清のプロテオーム 解析	59
坪内 博仁	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	78
-----------------	----

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）
（総合）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) 肝がんにもみられる特徴的な遺伝子発現を網羅的に明らかにし新規の診断マーカーや標的治療法の探索を行うこと、3) 肝がんでもみられる自然免疫・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年間の研究により、HCV NS5A と相互作用する宿主因子として VAP-B と FKBP8 の同定、同分子の抗 HCV 治療の新規標的としての可能性の提示、脂質合成経路をターゲットとした HCV 増殖抑制法の具体的な薬剤候補の提示、HCV コア蛋白のがん抑制遺伝子 SOCS-1 抑制能の発見、HCV コア蛋白による脂肪化のメカニズムの解明、HCV 感染・肝がんにも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 レセプターを介した肝がん認識制御システムの解明、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。このような研究成果により、新規の抗 HCV 治療法の開発、新規の肝がん治療法と診断法の開発、HCV 感染からの肝発がんメカニズムの解明などに関して多大な知見が集積された。

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機能修飾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関連肝がんのトランスクリプトームあるいはプロテオーム解析により、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。

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。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。

4) HCV高侵淫地区でのコホート解析

HCV感染者の臨床経過を明らかにし、肝発がんに関連する因子を抽出する。

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

NKレセプターのFACS解析、可溶性MICA/BのELISA測定、NK機能、DC機能の解析を行った。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コアによる機能修飾

- シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)によるHCVコア蛋白の成熟メカニズムを解明した。
- HCVコア蛋白ががん抑制遺伝子SOCS-1の機能を阻害することを個体レベルで明

らかにした。

- HCV コア蛋白による脂肪化の新規のメカニズムとして、不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性の亢進、NADH の蓄積が関与することを示した。

HCV NS5 による機能修飾

- HCV NS5A と相互作用する宿主因子として細胞内の膜輸送に関与する VAP-B を同定し、VAP-B のノックダウンが HCV 増殖を抑制することを示した。
- HCV NS5A と相互作用する宿主因子として FK506 結合蛋白 8 (FKBP8) を同定し、FKBP8 のノックダウンが HCV 増殖を抑制することを示した。
- HCV NS5B がその RNA ポリメラーゼ活性に依存して細胞周期の S 期の進行を遅延させることを示した。

HCV と脂質代謝

- 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。
- ミトコンドリア保護作用のある FK506 が HCV コア Tg マウスの肝脂肪化、インスリン抵抗性を改善することを示した。
- B 型および C 型の肝がんで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、個の発現良は肝がん患者の予後の独立した危険因子であった。

2) HCV 感染・肝がんにおけるトランスクリプトーム/プロテオーム解析と新規標的治療法・診断法の開発

トランスクリプトーム解析

- 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の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。VEGF の活性化経路は両肝炎で異なることが示唆された。

プロテオーム解析

- SELDI プロテインチップシステムを用いて、HCV 関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析を行い感度・特異度がすぐれた肝がん判別法を確立した。この方法は肝がんの早期診断に有用であった。

肝がんに対する治療標的としての遺伝子発現異常

- 肝がんで高発現しているがん遺伝子

gankyrin は早期の肝がんで陽性率が高かった。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。Gankyrin をノックダウンすることにより肝がん細胞はアポトーシスをおこした。

- 肝がんにおいて細胞周期の進行に関与する DP1 遺伝子が増幅していることを見出した。

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 レセプターを介した自然免疫応答

- 肝がん細胞の NK 細胞に対する感受性は MICA/B-NKG2D 活性化経路、HLA-E-NKG2A 抑制経路のバランスにより規定されていることを明らかにした。
- C 型肝炎では NKG2A レセプターの発現頻度が増加しており NK 細胞の機能が負に制御されていた。
- 肝硬変・肝がんでは可溶性 MICA/B の血清中の濃度が増加し、NKG2D 活性化経路が抑制されることを見出した。
- NK 細胞の機能は樹状細胞の成熟を制御し、獲得免疫応答の形成に影響することを示した。

血清診断マーカー

- NK 細胞抑制性の機能分子である可溶性 MICA および可溶性 MICB は健常者に比し、慢性肝炎、肝硬変、肝がん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性 MICA および可溶性 MICB の上昇に寄与する独立した因子であった。可溶性 MICA あるいは可溶性 MICB の高い肝がん患者の予後は

有意に不良であった。

- プロテオーム解析により、HCV 関連肝がんの血清マーカーとして C3a を同定した。
- 肝硬変患者に比較して肝がん患者血清において、細胞外マトリックス蛋白のひとつである SHAP-A が有意に増加し、診断マーカーとしての有用性が示唆された。

免疫モニタリングシステム

- 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、治療後も 10 例中 5 例が反応し、治療前後でダイナミックな変動がみられた。

4) HCV 高侵淫地区でのコホート研究

- ALT 高値は肝がん発症を予測する因子であることを示した。
- ALT 値の上昇にはフェリチン値、HFE (H63D) が関連する可能性を示した。

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。本研究により宿主因子である VAP-B や 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 活性を有することが示された。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ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析や HCV コア Tg マウスの解析から示された。脂質代謝の異常にはミトコンドリアの機能障害が関与しており、ミトコンドリアを保護する薬剤に

より脂質代謝が改善されることが示された。脂質代謝の改善は肝発がんを抑制する可能性があると考えられる。

HBV 感染と HCV 感染は肝臓において異なる遺伝子群の発現を誘導するが、肝がんで発現する遺伝子には共通性がみられる。このような遺伝子をターゲットにすることにより新規標的治療法の開発が可能となる。

Gankyrin は肝がんで高発現するがん遺伝子であるが、このノックダウンによりがん細胞をアポトーシスに導くことができる。

C 型慢性肝疾患では NK レセプターの発現異常がみられ、肝がんに対する認識制御機構に異常がみられる。このことは C 型肝炎からの高率な肝発がんに関与している可能性があり、自然免疫細胞の機能修復を目指した免疫治療法の開発が望まれる。肝がんに対する免疫モニタリングシステムの開発はいままで不明であった肝がんに対する特異免疫応答が実際に生体内で存在することを示したものである。今後、がん免疫治療を開発していく上での surrogate marker としての有用性もあり重要な研究である。

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)
(総合)研究報告書

ウイルス発がん機構の解析

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:C型肝炎ウイルス(HCV)の非構造タンパク質 NS5B がヒト不死化肝細胞である PH5CH8 細胞において、NS5B がその RNA ポリメラーゼ活性に依存して細胞周期の S 期の進行を遅延させる現象を見出した。この現象は NS5B による Toll-like receptor 3 の活性化を介した Interferon- β の発現誘導によるものであることを明らかにした。NS3/4A は NS5B による Interferon- β の発現誘導を顕著に抑制した。細胞周期の S 期進行遅延の現象と発がん過程との関わりあいとして、NS5B 発現細胞が二本鎖 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。全長 HCVRNA 複製細胞やルシフェラーゼを発現する HCVRNA 複製細胞の樹立に成功した。これらの細胞を長期に培養することにより HCV の遺伝的変異や細胞機能変化の解析を行い、HCV の変異速度は $3.7\text{--}5.3 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年であること、および長期培養により2倍以上発現量が増加する 45 遺伝子と 2 分の 1 以下に低下する 69 遺伝子を同定した。

分担研究者:加藤 宣之・岡山大学教授

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特徴の一つとして、HCV の持続感染が長期間維持されることが挙げられる。

従って、発がんに至る過程において、HCV が宿主側因子に何らかの持続的影響を与えているものと考えられる。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 が与える影響についての解析がなされているが、肝がん細胞株を用いている場合がほとんどで、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重要であると考え、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。本研究では、HCV が細胞にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的として、PH5CH8 細胞に各種 HCV 蛋白質を発現させ、細胞増殖性に関して詳しく解析した。これと並行して本研究では、HCV の複製増殖モデルとして有用と考えられる遺伝子型 1b の HCVRNA 複製細胞を樹立し、HCV の遺伝的変異や細胞変化に関する解析を行った。

B. 研究方法

(1)ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

PH5CH8 細胞にレトロウイルス遺伝子導入法により各種 HCV 蛋白質(core, NS3,

NS4A, NS4B, NS5A, 及び NS5B)を導入し、恒常的に発現させた。それぞれの細胞株をチミジン・アフィジコリン二重ブロック法により細胞周期の G1-S 期境界に同調させた後、通常培養液に戻して S 期にリリースすることで、細胞周期の進行を FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest ソフトウェアを用いて解析した。

プロモデオキシウリジン(BrdU)による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、S 期進行遅延の定量的解析を行った。

RT-PCR は通常行われている標準的な方法により行った。培養細胞から抽出した総 RNA を用いて、オリゴ dT をプライマーとして逆転写酵素により cDNA を作成し、各種遺伝子特異的プライマーにより PCR を行い、mRNA の発現レベルを解析した。

RNA 干渉法による Toll-like Receptor (TLR) family の発現抑制は TLR3 と TLR4 特異的 siRNA により行った。コントロールとしてはルシフェラーゼ遺伝子の GL2 用に化学合成した siRNA を用いた。

HCV NS5B 蛋白質などを発現するレトロウイルスベクター pCXbsr とホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に IRF3 の標的配列 (AGTTTCACTTTCCC) の 5 回繰り返し配列を有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) をヒト肝 PH5CH8 細胞に導入した。2 日後にそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定した。

(2) 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 個播き、4 日間培養する。その後、細胞を過酸化水素 (H_2O_2 ; 100 μ M 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/m²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。

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。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

HCV-O 株(1b 型)由来の HCV サブゲノムレプリコン, sO (旧名、IB-2R1)の上流に HCV-O 株由来の core から NS2 領域までの部分(新たに単離)を結合させ、HCV IRES で drive される G418 抵抗性遺伝子 (Neo^R)と内部の EMCV IRES で drive される全長 HCV 遺伝子を有する dicistronic な全長 HCV RNA を作成した。この RNA を sO 細胞から IFN 処理により sO レプリコンを排除した sOc 治癒細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

細胞内で複製可能な全長 HCV-O RNA の Neo^R 遺伝子上流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、HCV-O 細胞を IFN 処理により HCV-O RNA を排除した Oc 治癒細胞にエレクトロポレーションにより導入し、G418 耐性細胞の選択を行った。

(4) 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 複製細胞として樹立した O, OA, OB, OD および OE 細胞を G418 (0.3 mg/ml) 存在下、長期に培養した。1 週間ごとの継代を繰り返し、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、Superscript III と KOD-plus DNA polymerase を用いた RT-PCR 法にて HCVRNA を増幅した。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。

(5) 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)

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) ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

コントロールベクターを導入した PH5CH8 細胞では、リリース後 4 時間で S 期にそして、8 時間で G2-M 期に至り、12 時間では再び G1 期に戻ることから、正常に進行すると考えられた。同様の細胞周期の進行は core, NS3, NS4B, NS5A 発現細胞でも確認され、細胞周期の進行に影響は認められなかった。しかし、これとは対照的に、NS5B 発現細胞では、リリース後 8 時間で多くの細胞が S 期に残っており、12 時間でも G1 期に至っていないものが多く、細胞周期の S 期の進行が遅れていることが示唆された。

次に、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルを行い、NS5B 発現 PH5CH8 細胞における S 期進行遅延の定量的解析を行った。その結果、コントロールベクター導入細胞ではリリース後 12 時間で 77% の細胞が G2-M 期に達し、S 期残存細胞は僅か 5% であった。これに対して、NS5B 発現 PH5CH8 細胞では 12 時間で G2-M 期に達した細胞は 37% に低下し、未だ S 期に残存する細胞も 49% にのぼることが分かった。これらの結果により、NS5B を発現させるとヒト PH5CH8 細胞における S 期の進行が遅れることが明らかとなった。

S 期の進行遅延の原因として、IFN- β の発現が考えられた。解析の結果、ことから、次にこの点について検討した。NS5B を発現する PH5CH8 細胞でのみ IFN- β の mRNA の発現誘導が起こっていることが分かった。NS5B による細胞周期の進行阻害と IFN- β の mRNA の発現誘導とに相関が

みられたことから、次に、抗-IFN- β 中和抗体処理によって NS5B による細胞周期の進行阻害が回復するかどうかを検討した。その結果、抗-IFN- β 中和抗体処理した NS5B 発現 PH5CH8 細胞では未処理の NS5B 発現 PH5CH8 細胞で見られる細胞周期の進行阻害が回復することが明らかとなった。以上の結果から、NS5B による PH5CH8 細胞の細胞周期進行阻害は IFN- β の発現誘導が関与していることが明らかになった。

PH5CH8 細胞ではウイルスゲノムの複製が起こっていないにも関わらず、IFN- β mRNA の発現誘導が認められたことから、NS5B が TLR family を活性化した結果である可能性が考えられた。そこで、RNA 干渉法により TLR3 と TLR4 の発現を抑制させ、この可能性を検討した。その結果、TLR4 を抑制した細胞の IFN- β の発現レベルはコントロール細胞と同等レベルであったのに対して、TLR3 を抑制した NS5B 発現細胞では IFN- β の著しい発現低下が確認された。従って、NS5Bによる IFN- β の誘導には TLR3 シグナル経路が関与していることが示唆された。この可能性は、BrdU による新規合成 DNA のパルスラベルによる定量的解析によっても支持された。

NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり細胞内の ER 膜へ局在することから、これらの性質が IFN- β の誘導に必要であるかどうかを検討した。その結果、NS5B による IFN- β の誘導には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性が必須であり、かつ ER 膜への局在も必要であることが分かった。

IFN- β 遺伝子のプロモーター領域には TLR3 からのシグナルにより活性化される IRF3 の標的配列が存在することから、この標的配列が5回繰り返された配列を有するプラスミドを PH5CH8 細胞に導入して NS5B がこの配列を活性化するかどうかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、NS5B がルシフェラーゼ活性を数倍上昇させることが分かった。しかし、この活性化は NS3/4A を発現

させるとほぼ完全に抑制された。この抑制は、NS3 や NS4A 単独では起こらず、NS3 プロテアーゼ活性を欠く NS3 変異体/4A でも起こらないことから、プロテアーゼ活性に強く関連した効果であることが示唆された。しかしながら、新たに見出したコアと NS5B の共発現による IFN- β の発現高進現象に対しては、NS3/4A の抑制効果は完全ではないことが明らかとなった。

(2) 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

NS5B による肝細胞の S 期進行阻害は、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を意味し、結果的には 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る。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。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

HCV-O 株由来の全長 HCV RNA が細胞内で効率良く複製している G418 耐性細胞(O 細胞)の樹立に成功した。複製している全長 HCV RNA の遺伝子解析により、NS3 のヘリカーゼ領域内の 1609 番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に変化していることが分かり、このアミノ酸変化により HCV RNA の複製効率が著しく上昇することを実験的に明らかにした。

得られた HCV-O RNA の Neo^R 遺伝子上流にルシフェラーゼ遺伝子を追加的に組み込んだ HCV-O RNA が効率よく複製し

ている細胞の樹立に成功した。その結果、HCV-O RNA の複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより簡便にモニターできる初めての実験システムとなった。このアッセイシステムを用いて、HCV-O RNA の複製に対する IFN 感受性の定量化を行い、その有用性を確認した。

(4) 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かった。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。

(5) 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) ヒト不死化肝細胞の細胞周期における HCV 蛋白質の影響について

NS5B による TLR3 を介した IFN- β の発現誘導の分子機構として、IFN- β の発現誘導には ER 膜に局在した RNA ポリメラーゼ活性が必須であることが示された。TLR3 のリガンドは2本鎖 RNA であることが知られていることから、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2本鎖 RNA を合成できる可能性が示唆された。

(2) 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

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が必要であると考えられる。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞の樹立について

全長 HCV RNA 複製細胞 HCV-O およびその複製レベルをルシフェラーゼアッセイにより定量化できるシステム系を確立できたことから、今後このシステムをフルに活用することにより HCV RNA の複製増殖状態における様々な発がん因子の活性評価が行えるものと考えられる。また、これらの細胞系は全 HCV 蛋白質の細胞内機能を解析するための有用な実験ツールになるものと思われる。さらに、これらの細胞系は HCV RNA の複製阻害剤の探索や迅速な評価にも非常に有用なものになると考えられる。

(4) 全長 HCV RNA 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 HCV RNA 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。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 HCV RNA 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 HCV RNA 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が必要である。

(5) 全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養による細胞機能変化

全長 HCV RNA 細胞を長期に培養すると、HCV RNA 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ことを示唆する結果を得た。HCV RNA 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する必要がある。

マイクロアレイ解析において、HCV RNA 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、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を解析する必要がある。

E. 結論

(1) NS5B の RNA ポリメラーゼ活性に依存した TLR3 の活性化に引き続いて IFN- β の発現誘導が起り、S 期の進行阻害が引き起こされることを明らかにした。

(2) 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。

(3) 全長 HCV RNA 複製細胞 HCV-O およびルシフェラーゼ遺伝子をコードしている全長 HCV RNA 複製細胞を樹立した。

(4) 長期に継代培養した全長 HCV RNA 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。

(5)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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K.Namba, K. Naka, H. Dansako, A. Nozaki, M. Ikeda, Y. Shiratori, K. Shimotohno, and N. Kato. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 299-309 (2004).
- 2) A. Naganuma, H. Dansako, T. Nakamura, A. Nozaki and N. Kato. Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells. *Cancer Res.* 64, 1307-1314 (2004).
- 3) 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.* 107, 73-81 (2005)
- 4) 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 .
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
2. 学会発表
- 1) K. Naka, H. Dansako, N. Kobayashi, M. Ikeda and N. Kato. Hepatitis C virus NS5B activates TLR3 signaling pathway in non-cancerous hepatocytes. p59, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004.
- 2) M. Ikeda, K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka and N. Kato. Characterization of cured cells derived from clonal Huh-7 cell line carrying replicating a newly established genome-length HCV RNA (HCV-O). p114, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004.
- 3) H. Dansako, K. Naka, N. Kobayashi, M.