

- Ikeda and N. Kato. Distraction of interferon signaling pathway in non-cancerous hepatocytes by HCV Proteins, p190, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
- 4) K. Abe, M. Ikeda, H. Dansako, K. Naka, K. Shimotohno and N. Kato. cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic and genome-length RNA replicating cells with their cured cells. p110, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, 2004
- 5) 仲 一仁、團迫 浩方、小林 直哉、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスNS5B蛋白質によるTLR3シグナル経路の活性化. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月.
- 6) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、中村 孝志、仲 一仁、加藤 宣之. HCV-0(1B-2)株由来の全長HCV RNA複製系の開発. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月.
- 7) 田村 一志、大上 厚志、清水 宣明、加藤 宣之、星野 洪郎. Native form of the HCV envelope を持つ VSV pseudotype virusの作製、およびその感染性についての検討. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月.
- 8) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、下遠野 邦忠、加藤 宣之. C型肝炎ウイルス(HCV)レプリコン細胞および全長HCV RNA複製細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月.
- 9) 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.
- 10) 阿部 健一、池田 正徳、團迫 浩方、仲 一仁、加藤 宣之. HCV-0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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) K. Takemoto, H. Dansako, K. Naka, M. Ikeda, and N. Kato. Comparative analysis of inhibiting activities against IFN- β 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、脇田 隆宇、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.
- 36) 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ナー 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.
- 37) 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.

38) 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.

39) 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.

G. 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型肝炎ウイルスの成熟・複製に関する宿主因子の解析

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)のコア蛋白質はウイルス粒子の構造蛋白質としてだけでなく、宿主細胞の機能を多様に調節して、脂肪肝や肝癌の発症に深く関与している。そこで、コア蛋白質の成熟に関するシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)とコア蛋白質の相互作用を解析した。SPPによる切断に必須な領域はコア蛋白質のC末端膜貫通領域のみならず、その上流の少なくとも3つのアミノ酸であることが示され、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。次に、HCVのNS5A蛋白質と相互作用する宿主因子を検索し、細胞内の膜輸送に関与するVAP-BとFKBP8結合蛋白質8(FKBP8)を同定した。内在性のVAP-BをノックダウンさせるとHCV RNAの複製が抑制された。また、同様に内在性の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。以上の成績から、VAP-BやFKBP8はNS5Aに結合し、HCV RNAの複製に必須な宿主因子であると推測された。

分担研究者 : 松浦 善治
大阪大学微生物病研究所 教授

A. 研究目的

HCVに感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。しかしながら、HCVを効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCVの感染様式や発癌機構は依然として謎に包まれたままである。本研究はHCVの感染、成熟、そして複製過程に関する宿主因子を解析し、これらの宿主因子をターゲットとした新しいC型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト肝臓 mRNA より SPP 遺伝子をクローニングし、その活性中心の二つの Asp を Ala に置換した変異体を作製した。エピトープタグを付加した HCV コア蛋白質とその変異体を準備した。これらを培養細胞に発現させ、イムノブロット法と免疫沈降法により、コア蛋白質のプロセッシングならびに両者の相互作用を解析した。また、コア蛋白質と E1 蛋白質をシスに発現させ、E1 蛋白質の糖鎖付加の有無によって、コア蛋白質 C 末端膜貫通領域のシグナル活性を評価した。

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 (genotype 1b) 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、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) のサブタイプ B (VAP-B) と免疫抑制剤である 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) 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、VAP-B と 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

1) Core 蛋白質の Leu¹³⁹, Val¹⁴⁰, Leu¹⁴⁴ を Ala に置換し、N 端に Flag-tag、C 端に HA-tag をつけて 293T 細胞に発現させた。天然型のコア蛋白質では C 末端がプロセッシングされたバンドが検出されたが、変異体では若干大きな C 末端がプロセッシングされていないバンドが検出されたことから、Leu¹³⁹, Val¹⁴⁰, Leu¹⁴⁴ の疎水性アミノ酸が SPP によるプロセスに重要であることが示唆された。

2) コア蛋白質の Ile¹⁷⁶ と Phe¹⁷⁷ をそれぞれ、Ala と Leu に置換すると、プロセッシングされていないバンドが

検出されたことから、シグナル配列内の Ile¹⁷⁶ と Phe¹⁷⁷ が SPP によるプロセスに重要であることが示唆された。SPP は7回膜貫通型の蛋白質であり、その活性部位は隣り合う膜貫通ドメインにある2つの Asp であると考えられている。N 末端に Flag-tag、C 末端に myc/His-tag をつけた Core-E1 の基質を作製し、SPP の変異体と共に 293T 細胞に発現させたところ、プロセスされていないバンドが共沈したことから、SPP と HCV コア蛋白質が相互作用していることを初めて直接的に証明できた。

3) 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存していた。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。

4) 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

培養細胞に SPP と HCV コア蛋白質を発現させたところ、SPP とコア蛋白質は共沈し、さらに、SPP の活性変異体はコア蛋白質のプロセッシングを抑制したことから、コア蛋白質は SPP と結合してプロセスを受けることを確認した。また、コア蛋白質の変異体を用いた解析から、SPP の切断に必須な領域は既報の成績と異なっており、コア蛋白質の C 末端膜貫通領域のみならず、その上流の少なくとも3つのアミノ酸が重要であることが示された。また、その領域はコア蛋白質の小胞体局在にも関与していた。

VAP-B は NS5A と NS5B に結合し、膜貫通領域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異が示唆された。

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。

E. 結論

1. HCV コア蛋白質の SPP によるプロセス、ならびにコア蛋白質の小胞体局在を規定する領域を同定した。
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。hVAP-B のノックダウンにより HCV RNA 複製は抑制された。
3. FKBP8 のノックダウンにより HCV RNA 複製は抑制された。FKBP8 は Hsp90 と複合体を形成することが示された。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。

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., 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).
 6. 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).
 7. 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).
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. Okamoto K., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein. *J. Virol.* 78, 6370–6380 (2004).
 13. Suzuki T., Suzuki R., Hijikata M., Matsuda M., Li T-C., Matsuura Y., Mishiro S., and Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.* 78, 10820–10824 (2004).
 14. Kaimori A., Kanto T., Limn C-K., Komoda Y., Oki C., Inoue M., Miyatake H., Itose I., Sakakibara M., Yakushiji T., Takehara T., Matsuura Y., and Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324, 74–83 (2004).
 15. Watanabe R., Miyazawa T., and Matsuura Y. Comparison of serum sensitivities of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99, 89–93 (2004).
 16. Migliaccio C.T., Follis K.E., Matsuura Y., and Nunberg J.H. Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 105, 47–57 (2004).
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 Taguwa, 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シ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、菟田泰正、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。
17. 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.
18. Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28 γ in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上。
19. 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。
20. 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。
21. 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。
22. 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。
23. 谷 英樹、菟田泰正、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。
24. 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。
25. 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
26. 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。
27. 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。
28. Moriishi K., Mochizuki R., Abe T., Mori Y., Moriya K., Koike K., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. PA28 γ -dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 2-7, 2004.
29. Matsuo E., Limn C.K., Komoda Y., Kitagawa Y., Miyamoto H., Yagi S., Moriishi K., and Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line. 同上

30. Limn C.K., Komoda Y., Suzuki K., Otsubaki T., Tani H., Matsuo E., Tsuda Y., Moriishi K., Miyamura T., and Matsuura Y. Human fibroblast growth factor receptor 4 is a novel binding receptor for HCV. 同上
31. Okamoto T., Kimura-Someya T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 同上
32. Sakamoto S., Shiroki K., Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., and Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 同上
33. 森石恒司、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治: HCV コア蛋白質の成熟および分解の分解機構、第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、平成 16 年 9 月 29-10 月 2 日
34. 松尾栄子、林 昌宏、菰田泰正、森石恒司、八木慎太郎、松浦善治: ヒト肝癌由来細胞で作製した HCV 様粒子の性状、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 16 年 11 月 21-23 日
35. 林 昌宏、菰田泰正、鈴木健介、谷 英樹、大椿朋子、松尾栄子、津田祥美、森石恒司、宮村達男、松浦善治: HCV 感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の役割、同上
36. 谷 英樹、Michael A. Whitt、森石恒司、松浦善治: HCV エンベロープ遺伝子を組み込んだ組換え VSV の作製、同上
37. 森石恒司、中村 理加、宮本 大伸、鈴木哲朗、森屋恭爾、小池和彦、宮村達男、松浦善治: HCV コア蛋白質の局在および病原性発現における PA28 γ の役割、同上
38. 森 嘉生、脇田隆宇、小西英二、山下哲生、森石恒司、松浦善治: コア蛋白質が核に移行しない変異日本脳炎ウイルスの性状、同上
39. 岡本貴世子、森石恒司、松浦善治: シグナルペプチドペプチダーゼによる C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 16 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

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

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：近年C型肝炎ウイルス（HCV:hepatitis C virus）増殖系であるHCV replicon系が開発され、HCV増殖におけるウイルス因子、細胞側因子の検討が可能となり、肝炎および肝発癌の分子機序解析に重要なモデルとなっている。我々はH16年度、ウイルス増殖を可能とする両側因子の関連を明らかにするため、ウイルス側因子としてHCV-NS5Aの遺伝子構造、および細胞側因子としてインターフェロンシグナルに注目して解析を行い、NS5A蛋白のリン酸化を制御するウイルスの遺伝子構造、さらにIRF-1と下流のインターフェロン誘導遺伝子群がHCV replicon増殖を制御していることを明らかとした。

H17年度において我々は同repliconシステムを用い、近年ウイルス増殖に重要な役割を果たすことが解明されつつある宿主の脂質代謝に注目し、脂質代謝阻害剤の抗HCV治療効果について検討した。その結果、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特異的な抗HCV効果が明らかとなった。H18年度は検討をさらに進め、より抗HCV効果の高いビスホスフォネートの存在、さらにこれらの薬剤の作用機序を明らかとし、脂質代謝阻害剤による新たなHCV治療の可能性を示した。

分担研究者： 榎本 信幸
山梨大学医学工学総合研究部・教授

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。本研究の目的は新たに開発されたC型肝炎ウイルス（HCV:hepatitis C virus）増殖系であるHCV replicon系を用いて、HCV増殖

を可能とするウイルス側因子、宿主側因子について明らかにし、さらにはC型肝炎における発癌発症メカニズムを解明することである。またこれらの解析を通じて新たな抗HCV治療戦略を確立することが最終的な目標である。

我々はHCVのNS5A遺伝子内のISDR(interferon sensitivity determining region)の構造が血中HCV量とインターフェロン耐性を規定することを示し(NEJM 1996)、NS5A遺伝子構造がHCV増殖制御のkey moleculeであることを臨床検体から明らか

にしてきたが、これを検証する培養細胞系が長らく存在しなかった。1999年にHCV replicon系が開発され、これらの検討が可能となったことから、本研究ではまずH16年度、同システムを用いてウイルスのNS5A遺伝子構造、ならびに宿主のインターフェロンシステムとHCV増殖制御についての解析を試みた。

一方、近年、細胞内ウイルス複製における脂質の重要性が次第に明らかとされてきているが、HCV replicon増殖細胞においても、複製複合体が細胞内小器官の脂質膜“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示唆されることから、続くH17、H18年度には、脂質代謝制御剤の抗HCV治療剤としての可能性について解析を行った。

B. 研究方法

(2004年度)

HCV repliconのNS5A-ISDR遺伝子に、mutagenesisによって系統的に変異を導入し、HCV増殖に与える影響について検討した。また、HCV replicon高増殖性および低増殖細胞について発現の異なる遺伝子をsubtraction法などで網羅的に探索した。

(2005、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、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を用いて、HCV増殖に対する影響を解析した。

C. 研究成果

(1) NS5A 遺伝子構造は replicon 増殖を制御する。

Serine cluster region における特定の

3 serine 残基 (S2197、S2201、S2204) により、また ISDR においてはアミノ酸変異数に応じて、replicon の細胞内増殖は亢進した。一方、これらのアミノ酸変異により NS5A 蛋白のリン酸化は制御されていたが、replicon 増殖亢進と過剰リン酸化型 NS5A 蛋白の発現低下が相関していた。

(2) IRF-1 は replicon 増殖を制御する。

Replicon 増殖を著明に亢進させる permissive Huh7 細胞では、自然免疫系分子である IRF-1 と、その下流のインターフェロン誘導遺伝子群の発現が強く抑制されていた。一方、IRF-1 を強制発現すると HCV replicon の増殖は強く抑制され、replicon 増殖制御への IRF-1 経路の強い関連が示された。

(3) 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。

(4) コレステロール合成系路 Mevalonate pathway 阻害剤は HCV 増殖を強力に抑制する

Mevalonate pathway 阻害剤であるスタチンについて、シンバスタチンを HCV replicon 細胞に投与したところ、HCV replicon 増殖は濃度依存性に抑制された。但しシンバスタチンの selectivity index は 10 程度で必ずしも高くはなかったが、Mevalonate pathway 下流のファルネシル酸シンテターゼに対して強い阻害効果をもつビスフォス

フォネート製剤に注目し、抗 HCV 活性の有無について検討したところ、Nitrogen-containing Bisphosphonate である Risedronate、Alendronat、Zoledronic acid において、スタチンを遙かに凌ぐ著明な抗 HCV 効果を持つこと (selectivity index 300~400) が明らかとなった。

D. 考察と結論

HCV 増殖制御において、ウイルス側因子として NS5A 蛋白リン酸化が、また宿主因子として IRF-1 とその下流のインターフェロン誘導遺伝子群が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

脂質ラフト構成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 増殖が特異的に抑制されることが示され、脂質代謝制御が重要な抗HCV治療戦略のターゲットとなることが示された。

E. 研究発表

論文発表

- 1) Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N, Enomoto N, Itsui Y, Yamashiro T, Tanabe Y, Maekawa S, Nakagawa M, Chen CH, Kakinuma S, Oshima S, Nakamura T, Kato T, Wakita T, Watanabe M.. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol* 2004; 78(18): 9713-20
- 2) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Ueda E, Kohashi T, Watanabe H, Chen C-H, Yamashiro T, Tanabe Y, Kanazawa N, Nakagawa M, Sato C, Watanabe M. Introduction of NS5A Mutations Enables Subgenomic HCV-Replicon Derived from Chimpanzee-Infectious HC-J4 Isolate to Replicate Efficiently in Huh-7 Cells. *J Viral Hepat.* 2004;11(5):394-403.
- 3) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen C-H, Itusi Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Com* 2004;313(1):42-7
- 4) 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.
- 5) Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsu Y, Takeda Y, Chen C-H, Kakinuma S, Oooka S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins *Gastroenterology* 2005 Sep;129(3):1031-41.
- 6) 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.

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消化器内科学・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、トランスジェニック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細胞増殖をもたらすという経路によっても肝発癌に寄与することが明らかになってきている。

本研究班において、我々はまず、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って肝発癌に関与していることが明らかとなった。

また、C型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP(microsome triglyceride transfer protein)活性低下による肝からの VLDL(very low density lipoprotein)分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の阻害等が明らかになってきている。蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加している。この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義を検討した。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性は、コア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していた。多価不飽和脂肪酸は一価不飽和脂肪酸をコア蛋白非特異的に減少させたが、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)は減少させなかった。これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系において NADH を消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもが改善した。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase)の機能障害が、脂質代謝異常を含む C型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示され、病態改善薬開発への可能性が示唆された。

さらに、病態改善薬の候補として、ミトコンドリア保護作用をもつ Tacrolimus (FK506) をコア遺伝子発現トランスジェニックマウスに投与して、脂質および糖代謝への影響を検討した。3ヶ月間の Tacrolimus の投与によって、コアマウスにおける肝脂肪化、インスリン抵抗性が著明に改善された。Tacrolimus は、免疫低下作用を介さずに、HCV 感染症にお

ける肝脂肪化やインスリン抵抗性発現を抑制する可能性が示された。C 型肝炎における肝を含む病態の改善あるいは病態進行の抑制が期待される。

この様に、HCV 感染による細胞遺伝子発現の変化、肝脂肪化、インスリン抵抗性等の発生機序を明らかにして、その発症に介入する方法を見出すことによって、C 型肝炎における病態、特に肝発癌を抑制する治療法の開発が可能になると考えられる。

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部
(病)・教授

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明らかでない点が多い。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のコア蛋白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。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。我々は、この脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行なう。

また、C型慢性肝炎と2型糖尿病の間の関連性が、疫学的研究のみならず、実験的

なシステムにても確認されてきている。また、脂質代謝異常とC型肝炎の関連性は以前から指摘されてきている。これらの代謝異常で注目すべきことは、慢性肝炎すなわち肝の線維化速度との関係である。すなわち、肝脂肪化やインスリン抵抗性の強い慢性C型肝炎患者においては、線維化の進行速度が大きく、これらの代謝異常がC型肝炎の悪化因子であることが指摘されてきている。

慢性C型肝炎の治療は、現在のところインターフェロンを中心とした抗ウイルス薬によって行なわれてきている。リバビリン併用PEG・インターフェロンによって、1型高ウイルス量の患者においても約50%でHCV排除が可能となってきているが、残りの50%の人ではHCV排除は現在不可能である。したがって、ウイルス排除できない状態で慢性肝炎の病態を改善させる方法が切望されている。そのような治療法が見いだされれば、慢性C型肝炎の進行、肝癌の発生の予防が可能となり、厚生労働行政上、経済上の意義は極めて大きいと考えられる。

B. 方法

(1) 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型慢性肝炎患者肝組織を用いて以下のような解析を行なった。マウスはSPF下で通常の餌を与えられた。対照として正常 littermate が用いられた。必要に応じて高カロリー（脂肪）食を2ヶ月間与えた。カロリーは高カロリー食では4.70 kcal/g、普通食は3.56 kcal/gであった。

なお、動物実験にあたっては、当施設のガイドラインに則り動物愛護上の配慮を十分に払い、倫理面で問題が生じないように行なった。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。

(2) マウス肝においては、インターロイキン(IL)6投与前、投与後にマウス肝を採取し、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型慢性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。

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を用いて以下のような解析を行なった。

(3) コア遺伝子を導入したHepG2細胞であるHep39細胞と対照のHepswx細胞を用いて以下のような解析を行なった。脱脂脂肪化ウシアルブミンを含むメディアウムに溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂

肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。eicosatetraenoic acid、eicosatetraenoic acid、arachidonic acid、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

(4) HCV コア遺伝子導入トランスジェニックマウス(3ヶ月齢♂)に対し、Tacrolimus (FK506) (0.1mg/kg) ならびに placebo を週3回、筋肉注射にて投与を行なった。同様に非トランスジェニック兄弟マウスについても、3ヶ月齢♂に対し Tacrolimus あるいは placebo の投与を行った後、肝臓の脂質量、構成脂肪酸量、血糖値、インスリン値を検討した。なお、Tacrolimus あるいは placebo の投与期間は3ヶ月間である。

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。

(5) コア蛋白発現培養細胞では対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた (5.56 ± 0.33 vs. $2.92 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg cell}$, $p < 0.01$)。

(6) 一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸、バクセン酸、パルミトオレイン酸) の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) 不飽和脂肪酸が増加していた。

(7) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraynoic acid (ETYA) によってコア蛋白発現細胞のみで 18:1(n-9) が著増した。このことからコア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。

(8) 多価不飽和脂肪酸である eicosatetraynoic acid や arachidonic acid によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種 (ROS, reactive

oxygen species) はいずれの細胞でも減少しなかった。

(9) これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系において lactate dehydrogenase によって lactate 産生側へ平衡を傾けると NADH が消費され、細胞内の蓄積中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもが、コア蛋白発現細胞においてのみ特異的に改善された。

(10) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスに認められた、①肝組織中の脂肪量の増加、②構成脂肪酸に占める C16:1、C18:1 などの不飽和脂肪酸の増加、③インスリン抵抗性増強、のいずれもが、Tacrolimus 投与によって、placebo 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで改善した。Tacrolimus 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスでは、血清インスリン値が低下していた。

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 型慢性肝炎における、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。

一方、C 型肝炎における肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わりが想定されている。C 型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の阻害等が明らかになってきている。C 型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、バクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回の我々の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積 (= 過還元状態) にあることが明らかになった。すなわち、一価不飽和脂肪酸増加は膜の流動性を増加させ細胞増殖へ有利に働くが、少なくとも酸化ストレス増加には直接的には関与していない可能性が高いといえる。

やはり、HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示された。NADH を減少させる方法によって C 型肝炎の病態を改善させる可能性があるといえる。

この様に、HCV コア蛋白による肝臓の脂肪化にはミトコンドリア障害が関与していることが強く示唆されている。Tacrolimus は核カルシニューリンへの作用とともにミトコンドリア機能保護作用をもち、広く臨床への応用が行われつつある。今回の我々のデータから、Tacrolimus の有するミトコンドリア保護作用により HCV コア蛋白による脂質代謝異常 (今回の検討では肝脂肪化) が改善していることが初めて示された。又、インスリン分泌低下作用については、コア蛋白存在の有無にかかわらず Tacrolimus が有している事が示唆された。

この様に、HCV 感染による細胞遺伝子発現の変化、肝脂肪化、インスリン抵抗性等の発生機序を明らかにして、その発症に介入する方法を見いだすことによって、C 型肝炎における病態、特に肝発癌を抑制する治療法の開発が可能になると考えられる。

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 型慢性肝炎における、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。一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によるこ

と、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積 (=過還元状態) にあることが明らかになった。Tacrolimus によって肝臓の脂肪化が抑制されることが示された。ミトコンドリア保護作用によることが推測された。免疫抑制作用を介さない Tacrolimus の作用によって、HCV 感染症により引き起こされる肝脂肪化の抑制が可能であることが示された。

この様に、HCV 感染による細胞遺伝子発現の変化、肝脂肪化、インスリン抵抗性等の発生機序を明らかにして、その発症に介入する方法を見いだすことによって、C 型肝炎における病態、特に肝発癌を抑制する治療法の開発が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 39:563-569, 2004.
- 2) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126:840-848, 2004.
- 3) Koike K, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Moriya K. Hepatitis C and Diabetes Mellitus: what is the metabolic pathway? *Gastroenterology* 127:1280-1281, 2004.
- 4) Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005;40:329-336.
- 5) Koike K. Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress? *J Gastroenterol* 2005;40:664-665.
- 6) 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.
- 7) Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005;33:145-150.
- 8) Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:S132-S135.
- 9) Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006;49:51-57.
- 10) Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006;34:65-76.
- 11) Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J*

- Gastroenterology 2006;41:292-294.
- 12) 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.
 - 13) Koike K. Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J Infect Chemother* 2006;12:227-232.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007 in press.
 - 17) Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 in press.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. *J Gastroenterol* 2007 in press.
 - 21) 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.
2. 学会発表
 - 1) K. Moriishi, R. Mochizuki, T. Abe, Y. Mori, K. Moriya, K. Koike, T. Suzuki, T. Miyamura, Y. Matsuura: PA28 γ -dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. p57, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004.

- 2) H. Fujie, S. Shinzawa, H. Miyoshi, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Moriya, K. Koike: High-throughput immunoblotting analysis of the liver in a mouse model for HCV-associated hepatocarcinogenesis. p234, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004.
- 3) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: Intervention to hepatitis C virus-induced progressive liver disease with tacrolimus: a trial in a mouse model. p238, 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, 2004.
- 4) K. Koike, H. Miyoshi, K. Moriya, H. Fujie, T. Tsutsumi, Y. Shintani, A. Tajima, T. Horie: oxidative stress in hepatitis C viral infection has its origin in disruption of the mitochondrial ETS function. p445A, 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2004.
- 5) K Koike. JSH Single Topic Conference "NASH" "Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH", Kochi, 2004.
- 6) K Koike. 40th Anniversary US-Japan Co-operative Medical Science Program Symposium Environmental/Hepatitis Joint Panel "HCV-associated hepatocarcinogenesis: Lessons from Animal Models", Kyoto, 2004.
- 7) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike. Tacrolimus may protect lipid and glucose metabolism from direct effect of HCV core protein in vivo. The 3rd International Congress on Immunosuppression, San Diego, 2004.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) K Koike. Pathogenesis of HCV-associated HCC. 4th JSH Single Topic Conference "HCC". Awajishima, 2005.