

FIG. 1. HCV core protein associates with E6AP in vivo. (A) 293T cells were transfected with pcDNA3-MEF-core or empty plasmid, incubated for 48 h, and then harvested. The expressed MEF-core and binding proteins were recovered using the MEF purification procedure. Proteins bound to the MEF-core immobilized on anti-FLAG beads were dissociated with FLAG peptides, resolved by 9% SDS-PAGE, and visualized by silver staining. Control experiments were performed using 293T cells transfected with vector alone. The positions of E6AP, DDX3, and PA28 γ are indicated by arrows. (B to E) The proteins detected in panel A were confirmed by immunoblotting with appropriate antibodies: E6AP (B), DDX3 (C), PA28 γ (D), and MEF-core (E).

ability of GST-E6AP (418–517) to bind to the HCV core protein was confirmatory (Fig. 2C, lane N) and led to the conclusion that the HCV core-binding domain of E6AP was aa 418 to aa 517.

The HCV core-binding domain for E6AP. By use of a panel of HCV core deletion mutants (Fig. 3A), GST-E6AP was found to coimmunoprecipitate with all of the FLAG-core proteins (Fig. 3A, lanes A to H) except FLAG-core (72–191) or FLAG-core (92–191) (Fig. 3A, lanes I and J). No association of control GST protein with any FLAG-core proteins was observed (data not shown). These data suggest that the aa-58-to-aa-71 segment of the HCV core binds to E6AP. The ability of GST-core (58–71) to associate with purified MEF-E6AP confirmed that the core (aa 58–71) was the site for E6AP binding on the HCV core protein (Fig. 3B).

E6AP decreases steady-state levels of HCV core protein in 293T cells and HepG2 cells. One of the features of HECT domain ubiquitin ligases is direct association with their substrates (50). Thus, we hypothesized that E6AP would function as an E3 ubiquitin ligase for the HCV core protein. We as-

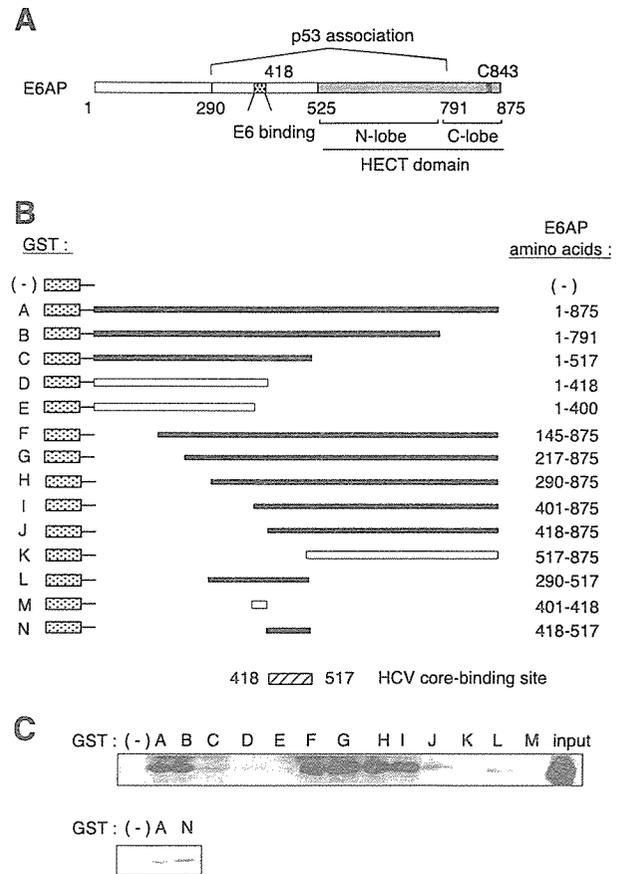


FIG. 2. Mapping of the HCV core-binding domain for E6AP. (A) Structure of E6AP. Shown is a schematic representation of the regions of E6AP isoform II that mediate E6 binding (aa 401 to 418), E6-dependent association with p53 (aa 290 to 791), and the HECT catalytic domain (aa 525 to 875). The catalytic cysteine residue is located at aa 843. (B) Schematic representation of GST-E6AP proteins. GST proteins A through N contain the E6AP amino acids indicated to the right. The shaded region of each represents the GST sequence. Closed boxes represent proteins that are bound specifically to HCV core protein, and open boxes represent those that are not bound. (C) Binding of HCV core protein to GST-E6AP proteins A through N. In vitro-translated core protein (aa 1 to 173) was assayed for association with GST (-) or the GST-E6AP fusion proteins A through N. Association of core protein was detected by immunoblotting with anti-core MAb.

essed the effects of E6AP on the HCV core protein in 293T cells. FLAG-core (1–191) together with HA-tagged wild-type E6AP, catalytically inactive mutant E6AP, E6AP C-A (19), or WWP1 (another HECT domain ubiquitin ligase) (22) was introduced into 293T cells, and the levels of the core protein were examined by immunoblotting. The steady-state levels of the core protein decreased with an increase in the amount of E6AP plasmids (Fig. 4A and B). However, neither E6AP C-A mutant nor WWP1 decreased the steady-state levels of the core protein, suggesting that E6AP enhances degradation of the core protein.

To verify the critical need for endogenous E6AP in the core degradation, expression of E6AP was knocked down by siRNA and the expression of the core protein and E6AP was assayed by immunoblotting. Transfection of the E6AP-specific siRNA

TABLE 1. Identification of E6AP by tandem mass spectrometry^a

Peptide m/z	Sequence determined	Residues
720.9	VFSSAEALVQSFR	156–168
922.4	AACSAAMEEDSEASSR	196–213
774.9	MMETFQQLITYK	339–350
1,053.1	ITVLYSLVQGGQLNPYLR	507–524
809.4	EFVISYSDYILNK	712–724

^a The protein was ubiquitin protein ligase E3A (E6AP) isoform 2 (GenBank accession no. NP_000453).

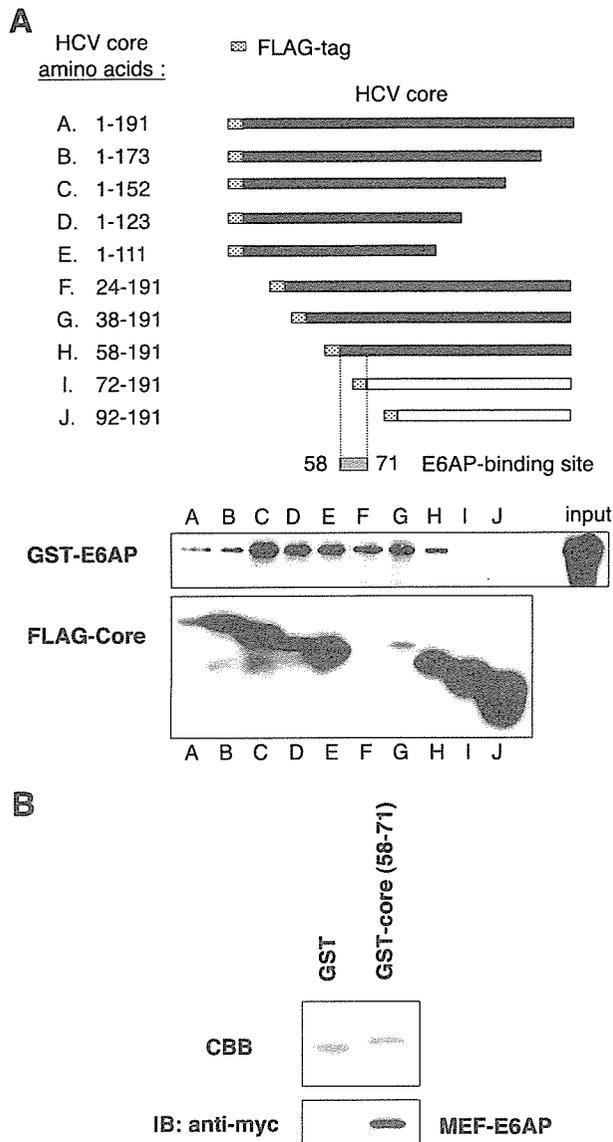


FIG. 3. Mapping of the E6AP binding domain for HCV core protein. (A) In vitro binding of E6AP to HCV core protein. 293T cells were transfected with each plasmid indicated in the upper panel. At 48 h posttransfection, cell lysates were mixed with purified GST-E6AP, immunoprecipitated with anti-FLAG beads, and then immunoblotted with anti-GST PAb (middle panel) or anti-FLAG MAb (bottom panel). The last lane (input) represents GST-E6AP used in this assay (middle panel). (B) Binding of GST-core (aa 58 to aa 71) to purified MEF-E6AP. GST served as a negative control for binding. Upper panel, Coomassie blue-stained SDS-PAGE of GST and GST-core (58–71). Lower panel, results of the GST pull-down assay. MEF-E6AP was detected by anti-myc MAb. CBB, Coomassie brilliant blue; IB, immunoblot.

duplex reduced the protein level of E6AP by 90% at 48 h posttransfection (Fig. 4C, middle panel). Immunoblotting revealed a 4.1-fold increase in the level of the core protein in the cells transfected with E6AP siRNA (Fig. 4C, top panel), suggesting that endogenous E6AP plays a role in the proteolysis of the HCV core protein.

Then we examined whether E6AP reduces the steady-state

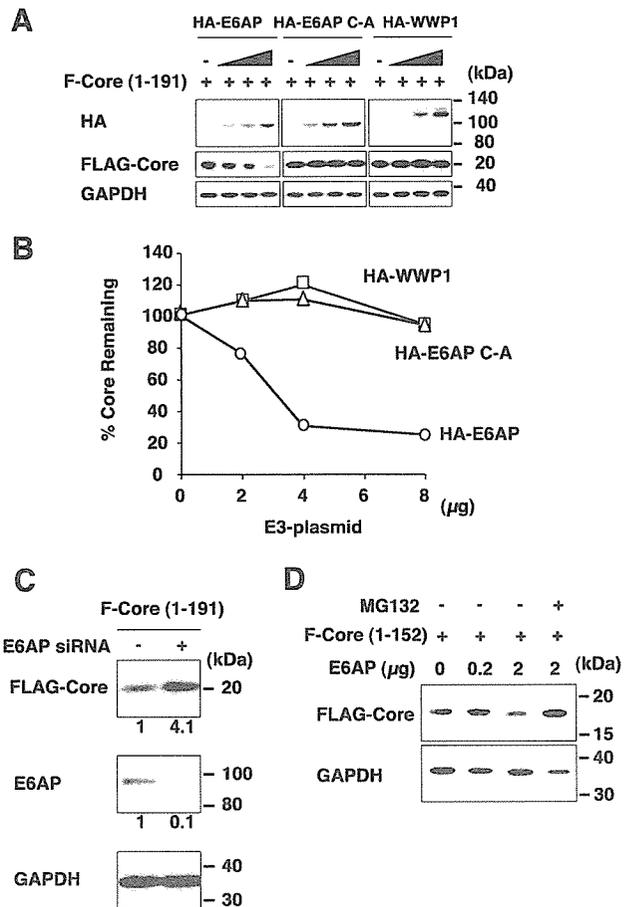


FIG. 4. E6AP decreases steady-state levels of HCV core protein in 293T cells and in HepG2 cells. (A) 293T cells (1×10^6 cells/10-cm dish) were transfected with 1 μg of pCAG FLAG-core (1–191) along with either pCAG-HA-E6AP, pCAG-HA-E6AP C-A, or pCAG-HA-WWP1 as indicated. At 48 h posttransfection, protein extracts were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-HA PAb (top panel), anti-FLAG MAb (middle panel), and anti-GAPDH MAb (bottom panel). (B) Quantitation of data shown in panel A. Intensities of the gel bands were quantitated using the NIH Image 1.62 program. The level of GAPDH served as a loading control. Circles, E6AP; triangles, E6AP C-A; squares, WWP1. (C) Knockdown of endogenous E6AP by siRNA inhibits degradation of HCV core protein in 293T cells. 293T cells (3×10^5 cells/six-well plate) were transfected with 40 pmol of E6AP-specific duplex siRNA (or control siRNA) as described in Materials and Methods. The cells were transfected with 2 μg of FLAG-core (1–191) expression plasmid and cultured for 24 h, harvested, and analyzed by immunoblotting. Shown is immunoblot detection of FLAG-tagged core protein (top panel), E6AP protein (middle panel), and GAPDH (bottom panel) in control siRNA-treated 293T cells or E6AP-siRNA-treated 293T cells. The relative levels of protein expression were quantitated by densitometry and indicated below in the respective lanes. GAPDH served as a loading control. (D) HepG2 cells (2×10^5 cells/six-well plate) were transfected with pCAG FLAG-core (1–152) along with either empty vector or pCMV E6AP as indicated. The cells were harvested at 44 h posttransfection. Where indicated, cells were treated with 25 μM MG132 or with dimethyl sulfoxide control 14 h prior to collection. Equivalent amounts of the whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-FLAG MAb (upper panel) or anti-GAPDH MAb (lower panel).

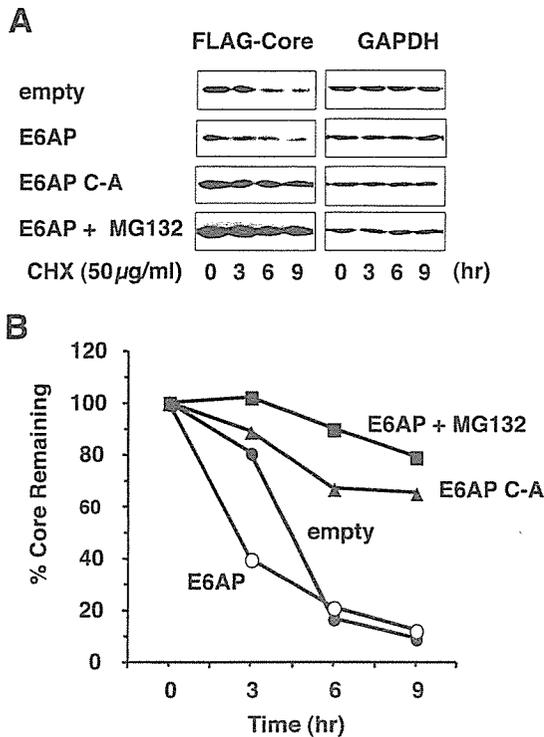


FIG. 5. Kinetic analysis of E6AP-dependent degradation of HCV core protein. (A) 293T cells (1×10^6 cells/10-cm dish) were transfected with 1 μ g of pCAG-FLAG core (1–152) plus 4 μ g of empty vector, pCMV-HA-E6AP, or pCMV-HA-E6AP C-A. The cells were treated with 50 μ g/ml CHX at 44 h after transfection. Cell extracts were collected at 0, 3, 6, and 9 h after treatment with CHX, followed by immunoblotting. (B) Specific signals were quantitated by densitometry, and the percent remaining core at each time was compared with that at the starting point. The level of GAPDH served as a loading control. Open circles, E6AP; closed circles, empty plasmid; closed triangles, E6AP C-A; closed squares, E6AP with MG132 treatment. Data are representative of three independent experimental determinations.

levels of the core protein in hepatic cells as well as in 293T cells. Exogenous expression of E6AP resulted in reduction of the core protein in human hepatoblastoma HepG2 cells (Fig. 4D). Treatment of the cells with the proteasome inhibitor MG132 increased the core protein level, suggesting that the core protein was degraded through the ubiquitin-proteasome pathway. These results indicate that E6AP enhances proteasomal degradation of the HCV core protein in both hepatic cells and nonhepatic cells.

Kinetic analysis of E6AP-dependent degradation of HCV core protein. To determine whether the E6AP-induced reduction of the core protein is due to an increase in the rate of core degradation, we performed kinetic analysis using the protein synthesis inhibitor CHX. HCV core protein together with wild-type E6AP or inactive mutant E6AP C-A was expressed in 293T cells. At 44 h after transfection, cells were treated with either 50 μ g/ml CHX alone or 50 μ g/ml CHX plus 25 μ M MG132 to inhibit proteasome function. Cells were collected at 0, 3, 6, and 9 h following treatment and analyzed by immunoblotting (Fig. 5A). Overexpression of E6AP resulted in rapid degradation of the core protein, whereas inactive mutant

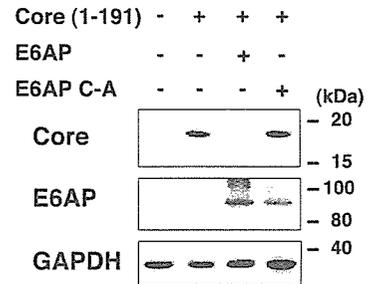


FIG. 6. E6AP promotes degradation of full-length HCV core protein in Huh-7 cells. Huh-7 cells (2×10^5 cells/six-well plate) were transfected with 0.5 μ g of pCAG-core (1–191) together with 2 μ g of pCMV-HA-E6AP or pCMV-HA-E6AP C-A. At 48 h posttransfection, cells were harvested and analyzed by immunoblotting with anticore MAb (top panel), anti-E6AP PAb (middle panel), or anti-GAPDH MAb (bottom panel).

E6AP C-A increased the half-life of the core protein (Fig. 5B), suggesting that the inactive E6AP inhibited degradation of the core protein in a dominant-negative manner, which is in agreement with previous studies (19, 55). Treatment of the cells with MG132 inhibited the degradation of the core protein (Fig. 5B). Reverse transcription-PCR to determine mRNA levels of the HCV core gene and GAPDH gene found that neither wild-type E6AP nor inactive E6AP changed mRNA levels of the HCV core gene and GAPDH gene (data not shown). These results indicate that E6AP enhances proteasomal degradation of the core protein.

E6AP promotes degradation of the full-length core protein in Huh-7 cells. To determine whether the full-length HCV core protein expressed in hepatic cells is degraded through an E6AP-dependent pathway, human hepatoma Huh-7 cells were transfected with pCAG HCV core (1–191) along with either E6AP or E6AP C-A. To rule out the effects of N-terminal FLAG tag on the core degradation, HCV core protein was expressed as untagged protein. Expression of wild-type E6AP resulted in reduction of the core protein (Fig. 6). On the other hand, HCV core protein was not decreased after transfection of inactive E6AP, indicating that the full-length core protein expressed in Huh-7 cells is also degraded through an E6AP-dependent pathway.

E6AP mediates ubiquitylation of HCV core protein in vivo. To determine whether E6AP can induce ubiquitylation of HCV core protein in cells, we performed in vivo ubiquitylation assays. 293T cells were cotransfected with FLAG-core (1–191) and either E6AP or empty plasmid, together with a plasmid encoding HA-tagged ubiquitin to facilitate detection of ubiquitylated core protein. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG MAb and immunoblotted with anti-HA PAb to detect ubiquitylated core protein (Fig. 7A). Only a little ubiquitin signal was observed on the core protein in the absence of cotransfected E6AP (Fig. 7A, lane 3). In contrast, coexpression of E6AP led to readily detectable ubiquitylated forms of the core protein as a ladder and a smear of higher-molecular-weight bands (Fig. 7A, compare lane 3 with lane 4). Immunoblot analysis with anticore PAb confirmed that FLAG-core proteins were immunoprecipitated (Fig. 7B, lanes 2 to 4, short exposure) and that higher-molecular-weight bands con-

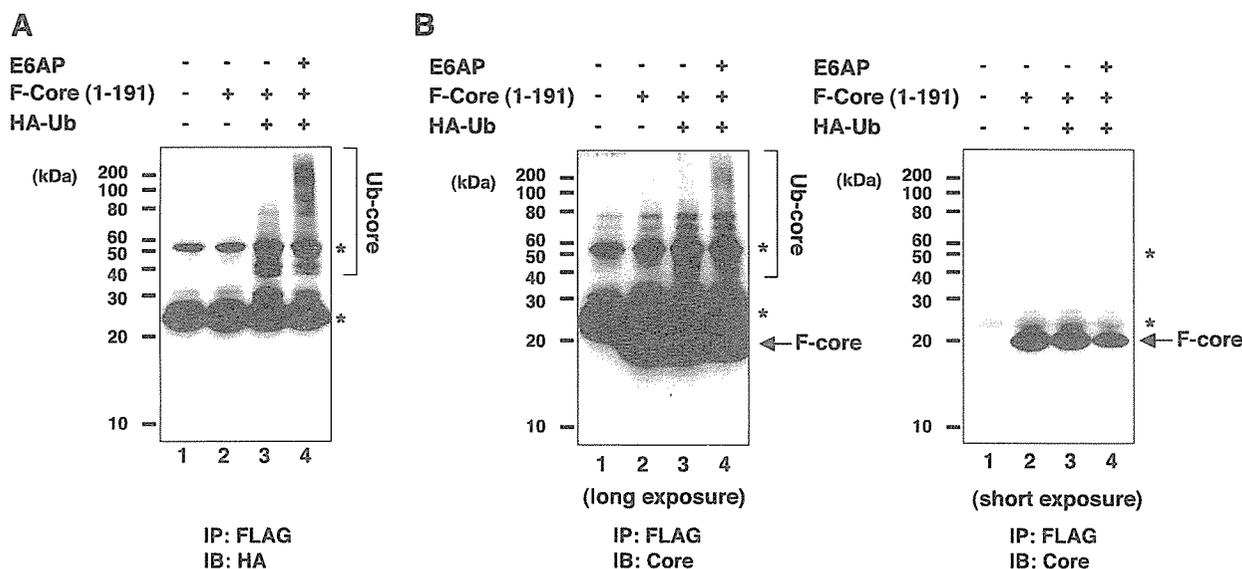


FIG. 7. E6AP-dependent ubiquitylation of HCV core protein in vivo. 293T cells (1×10^6 cells/10-cm dish) were transfected with 1 μ g of pCAG FLAG-core (1-191) together with 2 μ g of plasmid encoding E6AP as indicated. Each transfection also included 2 μ g of plasmid encoding HA-ubiquitin. The cell lysates were immunoprecipitated with FLAG beads and analyzed by immunoblotting with anti-HA PAb (A) or anticore PAb (B). A shorter exposure of the core blot shows immunoprecipitated FLAG-core protein (B, right panel). A longer exposure of the core blot shows the presence of a ubiquitin smear (B, left panel). Asterisks indicate cross-reacting immunoglobulin light chain or heavy chain. Arrows indicate FLAG-core. IB, immunoblot; IP, immunoprecipitation.

jugated with HA-ubiquitin were indeed ubiquitylated forms of the core protein (Fig. 7B, lanes 3 and 4, long exposure).

E6AP mediates ubiquitylation of HCV core protein in vitro.

To rule out the possibility that E6AP contributes to core protein degradation by inducing degradation of inhibitors of core turnover, we determined whether E6AP functions directly as a ubiquitin ligase by testing the ability of purified MEF-E6AP to mediate in vitro ubiquitylation of the purified recombinant HCV core protein. HCV core protein was expressed as a fusion protein containing N-terminal GST tag and C-terminal His tag and purified as described in Materials and Methods. GST-C173HT (aa 1-173) and GST-C152HT (aa 1-152) (see Materials and Methods) were used to determine whether the mature core protein and the C-terminally truncated core protein are targeted for ubiquitylation in vitro. The validity of this assay was established by demonstrating that E6AP but not E6AP C-A induced ATP-dependent ubiquitylation of GST-core protein. When in vitro ubiquitylation reactions were carried out either in the absence of MEF-E6AP or in the presence of MEF-E6AP C-A, no ubiquitylation signal was detected (Fig. 8A, lanes 4 and 5). However, inclusion of purified MEF-E6AP in the reaction mixture resulted in marked ubiquitylation of GST-C173HT (Fig. 8A, lane 6), while no ubiquitylation was observed in the absence of ATP (Fig. 8A, lane 7). No signal was detected when GST-HT was used as a substrate (Fig. 8A, lane 8). The higher-molecular-weight species of GST-core proteins were reactive with both anti-ubiquitin MAb (Fig. 8B, right panel, lanes 2 and 4) and anti-GST MAb (Fig. 8B, left panel, lanes 2 and 4). Both GST-C152HT and GST-C173HT were polyubiquitylated by E6AP in vitro (Fig. 8B), indicating that both the C-terminally truncated core and the mature core are polyubiquitylated by E6AP in vitro. These results revealed

that E6AP directly mediated ubiquitylation of HCV core proteins in an ATP-dependent manner.

Exogenous expression of E6AP reduces intracellular HCV core protein levels and supernatant infectivity titers in HCV-infected Huh-7 cells.

We used a recently developed system for the production of infectious HCV particles using the HCV JFH1 strain (28, 56, 61) to examine whether E6AP can promote degradation of HCV core protein expressed from infectious HCV. E6AP-dependent core degradation was assessed in Huh-7 cells inoculated with the culture supernatant containing HCV JFH1. Levels of HCV core protein were detectable at day 3 postinfection and increased with time. Immunofluorescence staining for the core protein indicated that the percentage of HCV core-positive cells in the Huh-7 cells was almost 100 at day 7 postinfection. Transfection efficiency was 50 to 60% as measured with GFP-expressing plasmid. At day 7 postinfection, exogenous expression of E6AP reduced the intracellular core protein level by about 60% compared to the empty plasmid-transfected control cells (Fig. 9A). Inactive E6AP had little effect on the core protein levels. Total protein levels in the cells (Fig. 9B) and intracellular HCV RNA levels (Fig. 9C) did not change after transfection of wild-type E6AP or inactive E6AP. The immunofluorescence study revealed that HCV core protein was variably detected and the intensity of core staining was reduced in the cells staining positive for wild-type E6AP compared with neighboring cells staining negative for E6AP (Fig. 9E). Using inactive E6AP revealed colocalization of the core protein and E6AP in the perinuclear region (Fig. 9F) of HCV-infected cells. These results suggest that E6AP enhanced degradation of HCV core protein expressed from infectious HCV. Then we titrated HCV infectivity in the culture supernatant at day 7 postinfection by limiting

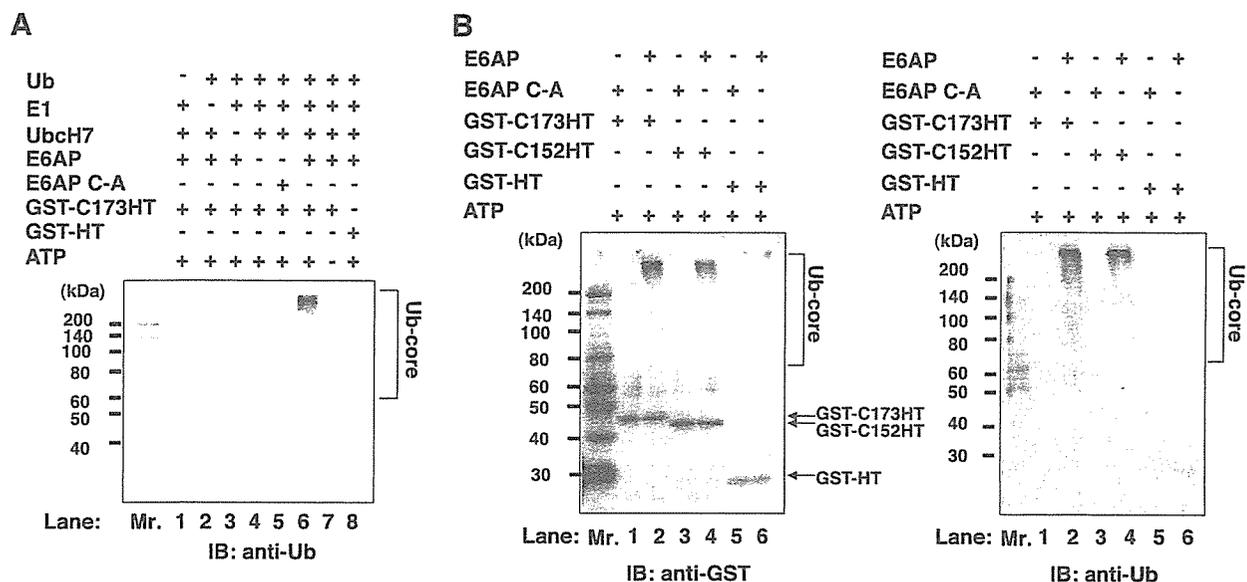


FIG. 8. In vitro ubiquitylation of HCV core protein by recombinant E6AP. For in vitro ubiquitylation of HCV core protein, purified GST-C173HT and GST-C152HT were used as substrates. Purified GST-HT was used as a negative control. Assays were done in 40- μ l volumes containing each component as indicated. The reaction mixture is described in Materials and Methods. The reaction was carried out at 37°C for 120 min followed by purification with glutathione-Sepharose beads and analysis by immunoblotting with the indicated antibodies. Arrows indicate GST-C173HT, GST-C152HT, and GST-HT, respectively. Ubiquitylated species of GST-core proteins are marked by brackets. IB, immunoblot.

dilution assays. Exogenous expression of E6AP reduced the supernatant infectivity titer, whereas inactive E6AP had no effect on its infectivity titer (Fig. 9D), suggesting that the E6AP-dependent ubiquitin proteasome pathway affects the production of HCV particles through downregulation of the core protein.

E6AP silencing increases the levels of intracellular HCV core protein and supernatant infectivity titers in HCV-infected Huh-7 cells. Finally, to further validate the role of E6AP in HCV production, expression of endogenous E6AP was knocked down by siRNA and the HCV infectivity titers released from HCV JFH1-infected cells were examined. Knockdown of E6AP by siRNA led to an increase in intracellular core protein levels (Fig. 10A) and supernatant HCV infectivity titers (Fig. 10B). Taken together, our results suggest that E6AP mediates ubiquitylation and degradation of HCV core protein in HCV-infected cells, thereby affecting the production of HCV particles.

DISCUSSION

HCV core protein is a major component of viral nucleocapsid, plays a central role in viral assembly (25, 40), and contributes to viral pathogenesis and hepatocarcinogenesis (9). Therefore, it is important to clarify the molecular mechanisms that govern the cellular stability of this viral protein. We have previously reported that processing at the C-terminal hydrophobic domain of the core protein leads to efficient polyubiquitylation of the core protein (52). In this study, we identified E6AP as an HCV core-binding protein and showed that HCV core protein interacts with E6AP *in vivo* and *in vitro*, that E6AP enhances ubiquitylation and degradation of the mature core protein as well as the C-terminally truncated core protein, and that HCV core protein expressed from infectious HCV is

degraded via E6AP-dependent proteolysis. HCV core protein and E6AP were found to colocalize in the cytoplasm, especially in the perinuclear region. Moreover, exogenous expression of E6AP reduces intracellular core protein levels and supernatant HCV infectivity titers in HCV-infected Huh-7 cells. Knockdown of endogenous E6AP by siRNA increases intracellular core protein levels and supernatant infectivity titers in HCV-infected cells. These findings suggest that E6AP mediates ubiquitylation and degradation of HCV core protein, thereby affecting the production of HCV particles.

HCV core protein interacts with E6AP through the region of the core protein between aa 58 and aa 71. These 14 amino acids are highly conserved, with the first nine amino acids (PRGRRQPIP) present in the core protein of all the HCV genotypes (3). This result suggests that E6AP-dependent degradation of HCV core protein is common to all HCV genotypes and plays an important role in the HCV life cycle or viral pathogenesis. Our data indicated that HCV core proteins of genotypes 1b and 2a are subjected to proteolysis through an E6AP-mediated degradation pathway. We are currently examining whether E6AP promotes degradation of HCV core proteins of other genotypes.

Studies in addition to ours have reported that other HCV proteins, such as NS5B (8), the unglycosylated cytosolic form of E2 (39), NS2 (7), and F protein (58), are degraded through the ubiquitin-proteasome pathway. These studies suggest that the ubiquitin-proteasome pathway plays a role in the HCV life cycle or viral pathogenesis. To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that the ubiquitin-proteasome pathway affects the HCV life cycle.

PA28 γ was found to interact with HCV core protein in hepatocytes and promote proteasomal degradation of HCV core protein (30). PA28 γ , however, has been shown to function

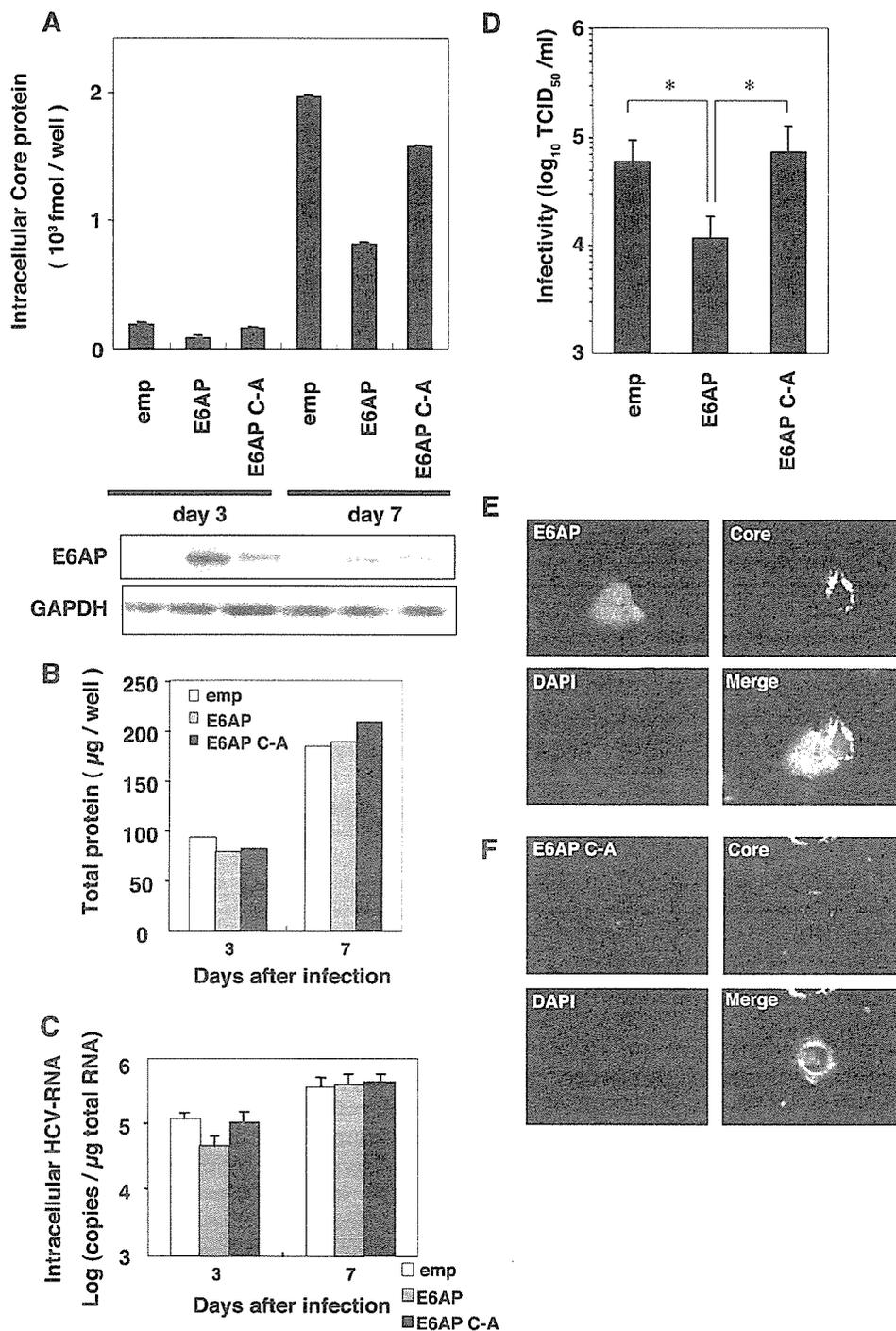


FIG. 9. Exogenous expression of E6AP reduces intracellular HCV core protein levels and supernatant infectivity titers in HCV-infected Huh-7 cells. Naïve Huh-7 cells were seeded as described in Materials and Methods; inoculated with 2.5 ml of the inoculum including infectious HCV JFH1 (6.5×10^3 TCID₅₀/ml); and transfected with 6 μ g of empty plasmid, pCAG-HA-E6AP, or pCAG-HA-E6AP C-A. The culture supernatant and the cells were collected at days 3 and 7 postinfection. (A) Intracellular HCV core protein levels. (B) Levels of total protein. (C) Levels of intracellular HCV RNA in HCV-infected Huh-7 cells. Data represent the averages of three experiments with error bars. (D) Supernatant infectivity titers. At day 7 postinfection, culture supernatants were collected and assayed for TCID₅₀ determinations. The difference between empty vector and E6AP or between E6AP and E6AP C-A was significant (*, $P < 0.05$, Student's t test). (E and F) HCV JFH1-infected Huh-7 cells were transfected with either MEF-E6AP plasmid or MEF-E6AP C-A plasmid, grown on coverslips, fixed, and processed for double-label immunofluorescence for HCV core and MEF-E6AP (E) or MEF-E6AP C-A (F). Anticore MAb (2H9) and anti-FLAG PAb were used as primary antibodies. Nuclei were visualized by staining the cells with DAPI. All the samples were examined with a BZ-8000 microscope. Representative images of individual cells are shown with merge images. emp, empty vector.

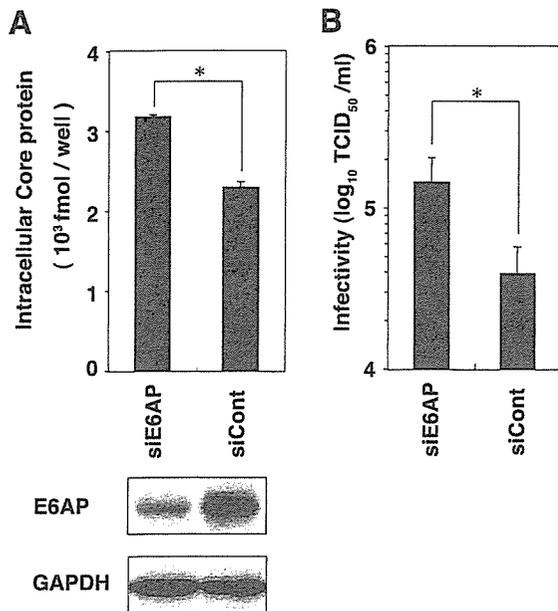


FIG. 10. E6AP silencing leads to an increase in the level of intracellular HCV core protein and supernatant infectivity titer in HCV-infected Huh-7 cells. (A) HCV JFH1-infected cells were replated in a six-well plate at 3×10^5 cells/well and transfected with 40 pmol of E6AP siRNA or control siRNA. The culture medium was changed at 24 h after transfection, and the cells were harvested at day 2 after transfection, and the intracellular core protein levels were quantitated using the HCV core antigen ELISA. Equivalent amounts of the whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-E6AP MAb or anti-GAPDH MAb. (B) Culture supernatants were collected at day 2 after transfection and assayed for TCID₅₀ determinations. For both panels, the difference between E6AP siRNA and control siRNA was significant (*, $P < 0.05$, Student's *t* test).

in a ubiquitin-independent, ATP-independent, and 20S proteasome-dependent pathway (27). There have been reports that several cellular factors, such as p53 (2), p73 (2), and RPN4 (18), are degraded through two alternative pathways, the ubiquitin-dependent 26S proteasome-dependent pathway and the ubiquitin-independent 20S proteasome-dependent pathway. Here we provide evidence that E6AP mediates ubiquitylation of HCV core protein. Still unclear is whether the PA28 γ -dependent pathway requires polyubiquitylation of HCV core protein. HCV core protein is predominantly localized in the cytoplasm, especially at the endoplasmic reticulum membrane, on the surface of lipid droplets, and on mitochondria and mitochondrion-associated membranes (51). In HCV JFH1-infected cells, HCV core was found to localize in the cytoplasm and frequently to accumulate in the perinuclear region and the lipid droplets (44). Our results indicated that E6AP colocalized with HCV core protein especially in the perinuclear region. PA28 γ was found to colocalize with HCV core protein in the nucleus. Functional differences may exist between the E6AP-dependent pathway and the PA28 γ -dependent pathway in the stability control of HCV core protein. The functional role of the E6AP-dependent pathway and the PA28 γ -dependent pathway remains to be elucidated.

The HCV core-binding region of E6AP was mapped to the region between aa 418 and aa 517. The multicopy maintenance protein 7, Mcm7, interacts with E6AP through a short motif,

termed the L2G box (aa 412 to 414), that lies within the E6 binding site of E6AP (23). Our data indicated that the E6 binding region containing the L2G motif is not required for interaction between HCV core protein and E6AP (Fig. 2C, lane M).

We propose here that E6AP may affect the production of HCV particles through controlling the amounts of HCV core protein. This mechanism may contribute to persistent infection. The E6AP binding domain of the core protein resides in the RNA-binding domain and binding domains for many host factors (40). These factors may affect the binding between E6AP and HCV core protein, resulting in control of E6AP-dependent core degradation. Another possibility is that HCV core protein may affect the normal function of E6AP, thereby contributing to pathogenesis. It will be intriguing to investigate whether HCV core protein has any effect on E6AP-dependent degradation of host factors. The other intriguing possibility is that HCV core-E6AP complex may function as an E3 ligase-like E6-E6AP complex to target host factors for proteasomal degradation and contribute to viral pathogenesis.

In conclusion, we have demonstrated that E6AP interacts with HCV core protein in vitro and in vivo and mediates ubiquitin-dependent degradation of the core protein, leading to downregulation of HCV particles. We propose that the E6AP-mediated ubiquitin-proteasome pathway may play a role in affecting the production of HCV particles through controlling the amounts of viral nucleocapsid protein. Identification of the specific E3 ubiquitin ligase may contribute to gaining a better understanding of the biology of the HCV life cycle as well as molecular details of the ubiquitin-dependent degradation of HCV core protein.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Bohmann (EMBL) for providing pMT123, K. Miyazono (University of Tokyo) for pcDEF3-6Myc-WWP1, and K. Iwai (Osaka City University) for recombinant baculovirus carrying His 6-mouse E1. Huh-7.5.1 cells and Huh-7 cells were kindly provided by F. V. Chisari (Scripps Research Institute). We also thank P. Zhou (Weill Medical College of Cornell University), S. I. Wells (Cincinnati Children's Hospital Medical Center), and A. W. Hudson (Medical College of Wisconsin) for critical readings of the manuscript; M. Matsuda, S. Yoshizaki, M. Ikeda, and M. Sasaki for technical assistance; Y. Sugiyama and S. Senzui for plasmid construction; and T. Mizoguchi for secretarial work.

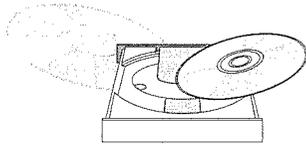
This work was supported in part by a grant for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation; by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare; by grants-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and by the program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan. T.I. was supported in part by a grant from Novartis Foundation (Japan) for the Promotion of Science and by the Tokyo Metropolitan University President's Fund, Special Emphasis Research Project of Japan.

REFERENCES

- Aizaki, H., Y. Aoki, T. Harada, K. Ishii, T. Suzuki, S. Nagamori, G. Toda, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1998. Full-length complementary DNA of hepatitis C virus genome from an infectious blood sample. *Hepatology* 27: 621-627.
- Asher, G., P. Tsvetkov, C. Kahana, and Y. Shaul. 2005. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 19:316-321.
- Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1994. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8239-8243.

4. Chen, C., and H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752.
5. Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
6. Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr, et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455.
7. Franck, N., J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo, and L. Erdtmann. 2005. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J. Virol.* 79:2700-2708.
8. Gao, L., H. Tu, S. T. Shi, K. J. Lee, M. Asanaka, S. B. Hwang, and M. M. Lai. 2003. Interaction with a ubiquitin-like protein enhances the ubiquitination and degradation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 77:4149-4159.
9. Giannini, C., and C. Brechot. 2003. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ.* 10(Suppl. 1):S27-S38.
10. Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* 67:2832-2843.
11. Harris, K. F., I. Shoji, E. M. Cooper, S. Kumar, H. Oda, and P. M. Howley. 1999. Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13738-13743.
12. Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 67:4665-4675.
13. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2563-2567.
14. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* 13:775-784.
15. Hussy, P., H. Langen, J. Mous, and H. Jacobsen. 1996. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 224:93-104.
16. Ichimura, T., H. Yamamura, K. Sasamoto, Y. Tominaga, M. Taoka, K. Kakiuchi, T. Shinkawa, N. Takahashi, S. Shimada, and T. Isobe. 2005. 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280:13187-13194.
17. Iwai, K., K. Yamanaka, T. Kamura, N. Minato, R. C. Conaway, J. W. Conaway, R. D. Klausner, and A. Pause. 1999. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12436-12441.
18. Ju, D., and Y. Xie. 2004. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J. Biol. Chem.* 279:23851-23854.
19. Kao, W. H., S. L. Beaudenon, A. L. Talis, J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J. Virol.* 74:6408-6417.
20. Kato, T., M. Miyamoto, A. Furusaka, T. Date, K. Yasui, J. Kato, S. Matsushima, T. Komatsu, and T. Wakita. 2003. Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J. Med. Virol.* 69:357-366.
21. Kishino, T., M. Lalonde, and J. Wagstaff. 1997. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15:70-73.
22. Komuro, A., T. Imamura, M. Saitoh, Y. Yoshida, T. Yamori, K. Miyazono, and K. Miyazawa. 2004. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23:6914-6923.
23. Kuhne, C., and L. Banks. 1998. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J. Biol. Chem.* 273:34302-34309.
24. Kumar, S., A. L. Talis, and P. M. Howley. 1999. Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 274:18785-18792.
25. Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijbrand, S. M. Lemon, and S. J. Watowich. 2001. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 75:2119-2129.
26. Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens, et al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244:362-364.
27. Li, X., D. M. Lonard, S. Y. Jung, A. Malovannaya, Q. Feng, J. Qin, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 2006. The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGγ proteasome. *Cell* 124:381-392.
28. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
29. McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* 21:3980-3988.
30. Moriishi, K., T. Okabayashi, K. Nakai, K. Moriya, K. Koike, S. Murata, T. Chiba, K. Tanaka, R. Suzuki, T. Suzuki, T. Miyamura, and Y. Matsuura. 2003. Proteasome activator PA28γ-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 77:10237-10249.
31. Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* 4:1065-1067.
32. Moriya, K., H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, and K. Koike. 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 78:1527-1531.
33. Natsume, T., Y. Yamauchi, H. Nakayama, T. Shinkawa, M. Yanagida, N. Takahashi, and T. Isobe. 2002. A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal. Chem.* 74:4725-4733.
34. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199.
35. Oda, H., S. Kumar, and P. M. Howley. 1999. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9557-9562.
36. Ogino, T., H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, M. Kohara, and A. Nomoto. 2004. Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *J. Virol.* 78:11766-11777.
37. Okamoto, K., K. Moriishi, T. Miyamura, and Y. Matsuura. 2004. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 78:6370-6380.
38. Owsianka, A. M., and A. H. Patel. 1999. Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* 257:330-340.
39. Pavo, N., D. R. Taylor, and M. M. Lai. 2002. Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *J. Virol.* 76:1265-1272.
40. Polyak, S. J., K. C. Klein, I. Shoji, T. Miyamura, and J. R. Lingappa. 2006. Assemble and interact: pleiotropic functions of the HCV core protein, p. 89-119. *In* S.-L. Tan (ed.), *Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology*. Horizon Bioscience, Norwich, United Kingdom.
41. Poynard, T., M. F. Yuen, V. Ratzu, and C. L. Lai. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.
42. Ravaggi, A., G. Natoli, D. Primi, A. Albertini, M. Levrero, and E. Cariani. 1994. Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells. *J. Hepatol.* 20:833-836.
43. Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer, and R. Ray. 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with *ras* and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* 70:4438-4443.
44. Rouille, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A. H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* 80:2832-2841.
45. Saito, I., T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji, Y. Ohta, et al. 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6547-6549.
46. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 68:3631-3641.
47. Sato, S., M. Fukasawa, Y. Yamakawa, T. Natsume, T. Suzuki, I. Shoji, H. Aizaki, T. Miyamura, and M. Nishijima. 2006. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 139:921-930.
48. Scheffner, M., J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 1994. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8797-8801.
49. Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
50. Scheffner, M., U. Nuber, and J. M. Huibregtse. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373:81-83.
51. Suzuki, R., S. Sakamoto, T. Tsutsumi, A. Rikimaru, K. Tanaka, T. Shimoike, K. Moriishi, T. Iwasaki, K. Mizumoto, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Suzuki. 2005. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 79:1271-1281.
52. Suzuki, R., K. Tamura, J. Li, K. Ishii, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Suzuki. 2001. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core pro-

- tein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280:301–309.
53. Suzuki, T., K. Omata, T. Satoh, T. Miyasaka, C. Arai, M. Maeda, T. Matsuno, and T. Miyamura. 2005. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 43:4413–4417.
 54. Takamizawa, A., C. Mori, I. Fuke, S. Manabe, S. Murakami, J. Fujita, E. Onishi, T. Andoh, I. Yoshida, and H. Okayama. 1991. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65:1105–1113.
 55. Talis, A. L., J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 1998. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J. Biol. Chem.* 273:6439–6445.
 56. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11:791–796.
 57. Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, Z. Zhang, D. Dornan, D. Arnott, R. J. Deshaies, and V. M. Dixit. 2004. Human de-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* 303:1371–1374.
 58. Xu, Z., J. Choi, W. Lu, and J. Ou. 2003. Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 77:1578–1583.
 59. Yamaguchi, R., S. Momosaki, G. Gao, C. C. Hsia, M. Kojiro, C. Scudamore, and E. Tabor. 2004. Truncated hepatitis C virus core protein encoded in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* 14:1097–1100.
 60. Yasui, K., T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S. I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J. R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72:6048–6055.
 61. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9294–9299.



学術

肝癌の発症予防—その対策と治療—

久留米大学医学部第二内科・消化器疾患情報講座

長尾由実子・佐田通夫

はじめに

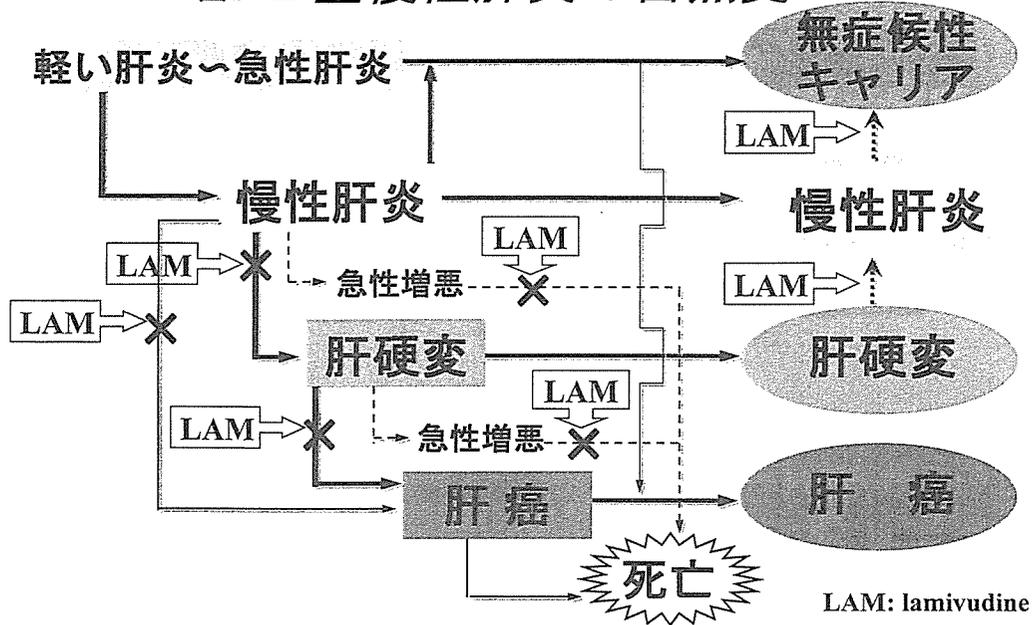
わが国の肝細胞がんによる死亡者数は増加の一途をたどり、この傾向は2015年まで続くと推測されている。よく知られているように肝細胞がん（以下肝がん）の原因の約80%がC型肝炎ウイルス（HCV）に起因するものであり、HCVによる肝がん患者の増加がわが国における肝がん死亡者数の増加の原因である。一方、B型肝炎ウイルス（HBV）による肝がんは約10%を占めているが、患者数は決して減少傾向を示してはいない。むしろ若年者で進行した状態で発見されるHBV起因の肝がん患者が、HCV起因の肝がんよりも多いことが問題となっている。

近年、C型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）療法の導入が肝がんの発症予防と長期予後の改善に寄与することが明らかになった。C型慢性肝炎に対する新たな治療法としてリバビリンと持続型インターフェロン（Peg IFN）との1年間の併用投与が保険適応になり、治療効果の向上が期待されている。

B型肝炎の自然経過（図1）

治療の導入、治療法の選択に際してはHBVやHCV感染後の自然経過を十分に理解しておくことが肝要である。HBVは、HBVの母子感染、幼少児期の感染によって高率に持続感染状態を成立させる。即ちHBVキャリアに移行することが知られている。しかし、HBVワクチン、高力価HBs抗体含有グロブリン（HBIG）の投与や医療環境の整備により、母子間感染や幼少児期の感染によるキャリア化の例はあまりみられなくなった。一方、HBVキャリアの自然経過をみると、一般的に30-35歳までに80-90%のキャリアは生体の免疫反応によって“臨床的治癒”と呼ばれる状態に移行する。このような例の多くがウイルス健康保菌者として生涯を送ることになる。残りの10-20%が、慢性肝炎、肝硬変あるいは肝がんに移行するとされている。この移行を阻止する治療として経口の抗ウイルス薬であるラミブジンやインターフェロンの投与が行われている。

図1 B型慢性肝炎の自然史

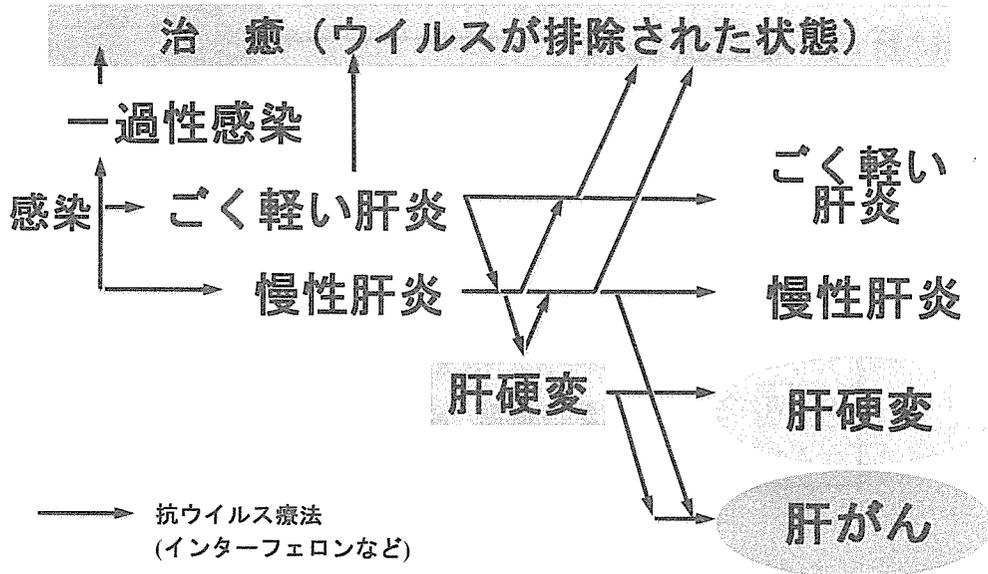


C型肝炎の自然経過 (図2)

HCV感染の場合、B型肝炎ウイルス (HBV) の感染とは異なり、どの年代においても初感染例から約60-70%の確率でキャリア化が成立する。HCVワクチンや抗HCV抗体高力価γ-グロブリンがない現状では、C型急性肝炎の慢性化を阻止する治療法を確立する必要があるが、幸いにもインターフェロン療法が慢性化の阻止に有効であることが明らかになった。C型慢性肝炎から肝硬変への移行率は40-50%と推測されている。C型肝炎の場合、B型慢性肝炎にみられるような自然経過の中で肝炎の増悪を契機に起こる“臨床的治癒”と言われるような無症候性キャリアへの移行はみられない。またC型慢性肝炎の肝線維化の進行や肝硬変への進展によって起こる肝細胞がんの併発は、最も重大な合併症である。慢性肝炎の段階では年率1-3%の率で、肝硬変では年率7%の率で肝がんが発生することが知られている。一方、慢性肝炎でも線維化がみられないか、あっても軽度の状態そしてAST・ALT値が正常の状態からの肝がんの発症は稀であることがわかっている。我々の行ったHCV高感染地区における住民検診の結果からも肝がんや肝硬変死亡に寄与する重要な因子は、HCVの持続感染とALT値の異常であることも明らかになった。

このような事実から推測すると、HCVの持続感染を絶つこと、そして肝炎を鎮静化させ肝硬変への進展を阻止し、慢性肝炎を治癒させることこそが、肝がんの発症予防や肝

図2 C型慢性肝炎の自然史



がんの撲滅手段として、如何に重要であるかがわかる。実際インターフェロン療法を受けた慢性肝炎や肝硬変患者では、HCVの駆除やALT値の正常化が得られた例において、明らかに肝がんの発生頻度は低く、長期生命予後も良好であることが明らかにされている。

わが国のC型肝炎ウイルスの抗体陽性率

わが国におけるHCV抗体陽性者は、一体どのくらい存在するのであろうか。このことを知ることは肝がん患者の今後の発生状況や予防、治療対策を立てる上で重要である。広島県赤十字血液センター（1992.2月～2000.6月）の調査によると、出生年別にみた献血者のHCV抗体陽性率は平均1.05%、40歳未満では1.0%以下で、40歳以上になると抗体陽性率が上昇傾向を示し、60～64歳代では4.0%、70歳以上になると約7.0%の陽性率であることが示されている。これらの事実は40歳以降の年代にC型慢性肝疾患が多く、肝がん患者が高齢者層に多発するであろうということ、そしてこれらの中高齢者層を中心としたC型肝炎ならびに肝がん撲滅対策が急務であることを我々に示しているのである。我々の検診結果では、肝がん患者発生のピークは60～70歳代であり、10年前に比較すると患者発生のピークがさらに高齢者層にシフトしている現象が観察される。

治療

B型肝炎の治療

現在、「自然経過によって臨床的治癒状態に移行することが困難である」あるいは

「慢性肝炎から肝硬変に移行する可能性が高いと判断される例」「慢性肝炎や肝硬変の状況が長期に持続している例」に対しては、経口抗ウイルス剤であるラミブジン投与が実施されている。ラミブジンの効果がみられなくなった例に対しては、ラミブジンとアデフォビルの併用投与が実施されている。また最近では、インターフェロンの長期投与が効果的であるという報告やラミブジンやインターフェロンの投与による肝発がん阻止を示す報告も行われている。

C型肝炎の治療

C型肝炎の治療目的は肝組織進展と肝発がんの阻止である。この2つの目標を目指して肝炎の鎮静化とウイルス駆除をめざした治療が行われている。HCVの駆除が可能な治療法としてインターフェロン単独療法、インターフェロン・リバビリン併用療法が行われる。最近では、持続型インターフェロン・リバビリン併用療法が標準的な治療法になった。この併用療法を1年間施行すると、今まで難治例とされていたgenotype1b、高ウイルス量症例を含めた全ての治療対象者に対して半数に著効が得られることが明らかにされている。ただ最近、治療の対象となる患者の平均年齢が次第に高齢化しており、抗ウイルス療法を行う場合、副作用の発現や治療脱落例の増加など解決すべき問題点もいくつか指摘されるようになってきている。HCV感染者は、肝疾患だけでなく肝臓以外の障害や疾患を合併していることが知られている（いわゆる肝外病変）。肝外病変の中には、皮膚や粘膜に出現する扁平苔癬^{へんぺいたいせん}や糖尿病、またシェーグレン症候群など種々の病変があるが、このような肝外病変合併者にインターフェロン治療を行うと、肝外病変がさらに増悪する可能性があることが知られているため、治療前には全身疾患の把握と専門医との連携が重要である。

一方、インターフェロンには抗ウイルス効果と共に抗腫瘍効果があることもよく知られている。この効果に注目して肝がんの再発阻止あるいは肝発がん阻止を主体としたインターフェロンの少量長期投与が試みられている。一方、肝炎の鎮静化を主目的とする治療法として強力ネオミノファーゲンCの静注、ウルソや小柴胡湯^{しょうさいことう}の経口投与、さらに瀉血療法^{しゃけつりょうほう}が行われている。肝臓に蓄積した鉄を取り除くために行われる瀉血療法^{しゃけつりょうほう}では肝臓内の炎症所見が改善し、さらには肝がんの発生も抑えられる報告がなされている。この治療においては鉄の摂取を制限することも重要とされており、従来肝疾患患者に多く摂取することが勧められた食物中には鉄含有量が多いものがあり「昔常識、今非常識」という観点から療養の方法を見直すことの必要性が論じられている。

肝臓がん

肝臓がんの早期発見と早期治療が重要であり、そのためには専門医による定期画像検

査が重要である。種々の治療法があるが、肝がんの大きさ、発生部位、生物学的悪性度、背景肝病変などを十分に考慮した上での治療法の選択、集学的治療が最も重要である。また病一診、病一病連携のもとでの経過観察や治療を忘れてはならない。

まとめ

わが国では平成14年度より肝がん撲滅を目指したB型とC型肝炎に対する国家レベルでの検診事業が開始された。HCVやHBVキャリアとして発見された者に対して、どのような治療対策や指導を行っていくかが日本の肝がん死亡を減少するためのkey pointである。

もっと詳しくお知りになりたい方へ

「B型肝炎について（一般的なQ&A）」「C型肝炎について（一般的なQ&A）」
「E型肝炎について（一般的なQ&A）」は、下記ホームページに掲載されている。

参考資料

1. 財団法人ウイルス肝炎研究財団 <http://www.vhfj.or.jp/06.qanda/index.html>
2. 厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp/>
3. 社団法人日本医師会 <http://www.med.or.jp/kansen/>
4. 久留米大学医学部消化器疾患情報講座（佐田通夫）
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/joho/index.html>

C型肝炎ウイルス持続感染者に対する薬物療法 —インターフェロン療法の普及とその現状—

久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 助教授 長尾由実子
 久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 教授 佐田 通夫
 医薬産業政策研究所 主任研究員 鈴木 史雄
 医薬産業政策研究所 主任研究員 野林 晴彦
 医薬産業政策研究所 前主任研究員 川上 裕

優れた新しい医薬品や薬物療法は、広く医療現場に普及し患者に用いられることによって、初めて大きな価値を持つ。しかし、それらが普及していくのは、必ずしも容易なことではない。

人口動態統計によれば、2003年時点で日本人の死因のトップは悪性新生物（がん）によるもので、その数は年々増加の傾向にある。1990年頃までは胃がんがトップを占めていたが、最近では肺がんや肝がんの増加が目立っている。わが国では、2003年に第3次対がん10ヵ年総合戦略が策定されるなど、これらのがんの予防や治療法の開発・普及が唱えられている。

肝がんと肝炎ウイルス

日本における肝がん患者は3万人を超えている。その死亡率は他のアジア諸国とほぼ同等だが、欧米と比較するとかなり高い水準にある¹⁾。この主な原因はB型あるいはC型肝炎ウイルス（それぞれHBV、HCV）といわれており、これらのウイルスに感染した患者は、将来肝がん発症のリスクを背負うことになる。

日本では肝がんの原因の約80%はHCVの持続感染に起因するものである。HCVに感染した場合、そのまま放置すると70%前後が持続感染の状

態となり、さらに慢性肝炎へと進展する。その後20~30年を経て、さらにその半数が肝硬変、肝がんへと進展する。

かつては、持続感染したHCVを排除する手段はなく、慢性肝炎へ進行すると殆ど場合は自然治癒が望めず、肝がんへの進行を阻止することもできなかった。しかし、1980年代後半になり、HCVを患者の身体から排除し、肝炎の治癒、あるいは肝硬変への進展や肝がん発症に対しての抑制効果をもたらす画期的な薬剤として、インターフェロン（IFN）が使われはじめた。当初は、B型慢性肝炎だけの適応であったが、1989年にHCVが発見され、1992年にはC型肝炎の治療薬としても使用されるようになった。また、2001年には経口抗ウイルス薬リバビリンとIFNの併用、2003年には効果の持続性に優れるペグインターフェロンなど新たな治療法が保険適用とされており、これらの治療によるウイルス駆除例や肝炎鎮静例では、肝線維化の改善、肝がん発生の抑止、さらに生命予後の改善が明らかにされるなど治療成果をあげている。

現在わが国では、HCVに持続感染している人は、150万人以上存在すると推測されている。HCV持続感染者（HCVキャリア）は、自覚症状がない

1) 国立がんセンター「がんの統計'05」における2001年の肝および肝内胆管の悪性新生物による死亡率（人口10万人当たり）は、日本で男性38.3、女性16.7、以下それぞれ米国：5.8、3.4、イギリス：2.0、0.8、フランス：13.9、3.1、ドイツ8.2、5.0、中国35.7、14.9、韓国32.5、10.0となっている。

ことが多いため、感染していることを自覚しないままに慢性肝炎から肝硬変や肝がんに進展する例が多くみられ、適切な時期に治療を受ける機会のない感染者が存在することが問題となっている^{2,3)}。そのため、厚生労働省では、平成14年度より「C型肝炎等緊急総合対策」の一環として、地域住民を対象とした「肝炎ウイルス検診」(HCV並びにHBV)を開始した。この検診には、40歳から70歳までの老人保健法に基づく健康診査の受診者に対し5歳刻みに実施する節目検診と、過去に肝機能異常を指摘されたなど、早期に検査を受ける必要のある人を対象とした節目外検診⁴⁾がある。

普及していないインターフェロン (IFN) 療法

IFNがC型肝炎の治療薬として承認されてから13年が経過している。IFN療法は、インフルエンザ様症状やうつ症状が発現しやすいなどの副作用が伴うことによる制約があるものの、徐々に製剤の改良や治療法の改善が図られ、有効性が向上し、使用し易くなった結果、現在ではC型慢性肝炎の第一選択薬として肝臓専門医では高く評価されるに至っている。

ところが、平成15年度のアンケート調査から得られた全国調査(節目検診、節目外検診)によると、HCV陽性で要精密検査者数20,364名のうち二次医療機関へ受診した者7,769名の中で、何らかの治療を受けた者の割合は24%であり、このうちIFN治療が行われた割合は13%であったと報告されている。約半数は専門医への受診をしておらず、専門医への受診率向上が課題と考えられている⁵⁾。

現在われわれが行っている調査では、ある地域のHCV感染患者と医師を対象にアンケートを実施し、IFN療法が医療現場にどの程度普及してい

るのか、患者と医師とのIFN療法に対する認識はどの程度違いがあるのか、そしてあるべき治療と現実の間にギャップを生んでいる要因は何かを明らかにしようとしている。

本アンケート調査は現在実施中の段階にあるが、2006年1月6日までに回答の得られた患者および医師108例分のデータから、医療現場におけるIFN療法の実状の一部を紹介したい。

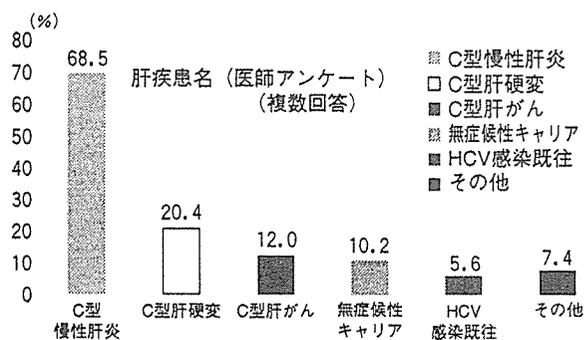
調査の対象と方法

ある地域の医療機関8施設(診療所7、病院1)において、通院患者の中でHCV感染者とその患者を診療している医師に対してそれぞれアンケート調査を実施した。

調査項目としては、患者、医師それぞれに、①患者背景、②IFN療法について、③IFN療法を行わなかった場合はその理由、などを尋ねている。

この度集計した段階では、対象患者108名の通院先は、診療所102名、病院6名であり、年代別では、約7割が60歳以上であった。図1に示すように、診断名はC型慢性肝炎が7割近くを占めていた。

図1 対象患者の診断名



2) 厚生労働省「C型肝炎について(一般的なQ&A)」(2003年8月)(改訂V版)

3) 厚生労働省「C型肝炎対策等の一層の推進について」(2005年8月2日)C型肝炎対策等に関する専門家会議

4) 節目外検診: 上記以外の節目検診の対象とならない者のうち、以下の人に対して実施する検診

・過去に肝機能異常を指摘されたことのある者

・広範な外科的処置を受けたことのある者又は妊娠・分娩時に多量に出血したことのある者であって定期的に肝機能検査を受けていない者

・基本健康診査の結果、ALT (GPT) 値により要指導とされた者

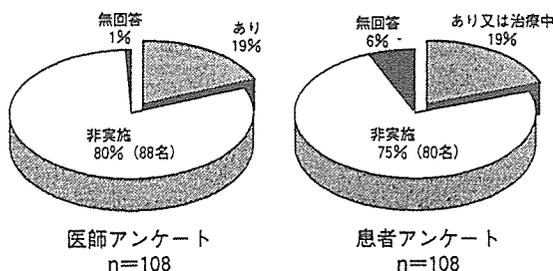
5) 沖田極「厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業(肝炎分野)肝炎ウイルス検診要精密検査者の二次医療機関への受診状況に関する全国調査」

これまでの集計結果

(1) IFN 療法の実施状況

IFN 療法については、図 2 に示されるように、多くの患者で実施されていなかった。

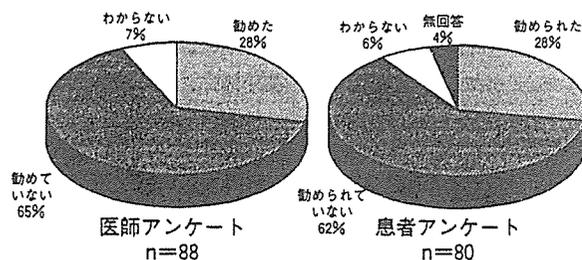
図 2 IFN 療法の実施状況



(2) IFN 療法の推奨について

多くの患者に IFN 療法は実施されていなかったが、背景にどのような経緯があったのだろうか。図 3 は、IFN 非実施患者に対する、医師から患者への IFN 療法の推奨状況を示したものである。これによると、6 割以上の患者に対し、医師は IFN 療法を勧めていなかった。

図 3 IFN 療法非実施患者への IFN 推奨状況



また、図 4 には、IFN 療法を受けていない患者が、IFN 療法を推奨された際にどのような判断をしたかを示している。ここでは、IFN 療法が勧められているにも拘らず、8 割を超える患者が受療を断っていた。なお、IFN 療法を受けた患者については医師からの推奨の有無を尋ねていないが、これらの患者は推奨を受けこの治療を受けるに至ったと考えられ、これを併せて集計すると、IFN 療法を

断った患者は、それを勧められた患者全体の 4 割強であった (図 5)。

図 4 IFN 療法推奨に対する患者の判断 (IFN 療法非実施患者のみ)

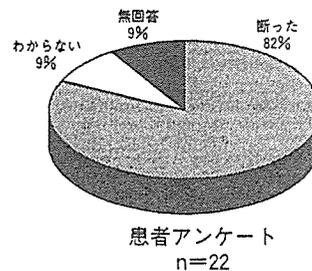
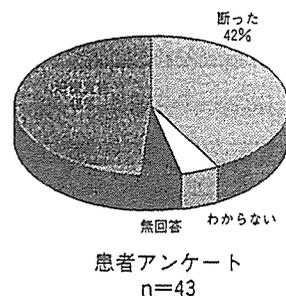


図 5 IFN 療法推奨に対する患者の判断 (IFN 療法実施者を含めた場合)



今後の集計・解析に向けて

以上はあくまで途中経過であり、今後回収が進む予定の病院 (専門医) による回答があまり反映されていない。しかし、現時点まで得られたデータからも IFN 療法を実施された患者は少ないこと、また多くの場合、医師からも勧められていないことが明らかになっている。今後さらに集計を進め、何故医師が IFN 療法を勧めなかったのか、何故患者は勧められても断ったのか、IFN 療法についての理解が医師と患者の双方において進んでいるのか、などについて、医師が専門医か一般医か、患者の診断名は何か、といった様々な属性別分析も加えることにより、解析していく。新しい医薬品や薬物療法が普及しにくい原因を考察し、その対応策について何らかの示唆が得られるのではないかと考える。

優れた薬物療法のさらなる普及をめざして
—C型肝炎ウイルス感染者におけるインターフェロン療法受療の現状と考察—

長尾由実子 (久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 助教授)	鈴木史雄 (医薬産業政策研究所 主任研究員)
佐田通夫 (久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 教授)	野林晴彦 (医薬産業政策研究所 前主任研究員)
	川上裕 (医薬産業政策研究所 前主任研究員)

医薬産業政策研究所
リサーチペーパー・シリーズ
No. 32
(2006年8月)

本リサーチペーパーは研究上の討論のために配布するものであり、著者の承諾なしに引用、複写することを禁ずる。

本リサーチペーパーに記された意見や考えは著者の個人的なものであり、日本製薬工業協会及び医薬産業政策研究所の公式な見解ではない。

内容照会先:

長尾由実子
久留米大学医学部 消化器疾患情報講座
〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67
TEL: 0942-31-7902 FAX: 0942-31-7747
URL: <http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/joho/index.html>

鈴木史雄
日本製薬工業協会 医薬産業政策研究所
〒103-0023 東京都中央区日本橋本町 3-4-1
トリエ日本橋ビル 5F
TEL: 03-5200-2681 FAX: 03-5200-2684
E-mail: suzukifumio-opir@jpma.or.jp
URL: <http://www.jpma.or.jp/opir/>

優れた薬物療法のさらなる普及をめざして
—C型肝炎ウイルス感染者におけるインターフェロン療法受療の現状と考察—

—目次—

—要旨—	1
第1章 はじめに（研究の背景・目的・先行研究）	3
第2章 調査概要	10
第3章 アンケート結果と解析	14
1. アンケート結果の概要	14
1.1. 医師アンケート	14
1.1.1. IFN治療の受療概況	14
1.1.2. IFN療法説明の実施状況	15
1.1.3. IFN療法説明の直近の実施時期	15
1.1.4. IFN療法の推奨状況	16
1.1.5. IFN療法説明有無別にみたIFN療法推奨状況	16
1.1.6. IFN療法非推奨例の患者背景	17
1.1.7. IFN治療の受療状況	18
1.1.8. IFN治療実施後の効果	18
1.2. 患者アンケート	19
1.2.1. IFN治療の受療概況	19
1.2.2. IFN療法説明の状況	20
1.2.3. IFN療法の推奨と患者の同意	20
1.2.4. IFN治療経験の有無	21
1.2.5. IFN治療に同意しなかった理由	22
1.3. 結果のまとめ	23
2. 患者通院先別集計結果（医師アンケート）	24
2.1. IFN治療の受療率	24
2.2. IFN治療の実施場所	25
2.3. IFN療法説明の実施状況	26
2.4. IFN療法の推奨状況	27
2.5. IFN療法を推奨しなかった患者の背景【診療所と病院の比較】	31
2.6. IFN療法を推奨しなかった理由【診療所】	32
2.7. 栄養指導の実施や民間薬・健康食品の服用状況について	33
2.8. 結果のまとめ【患者通院先別集計結果】	34

3. IFN治療に至らない理由の分析.....	35
3.1. 患者アンケートからみた分析.....	35
3.1.1. IFN治療に至らなかった過程.....	35
3.1.2. IFN治療に同意しなかった理由【診療所】.....	36
3.2. 患者と医師との認識の一致率からみた分析.....	37
3.2.1. IFN療法説明の有無に対する認識の一致率.....	37
3.2.2. IFN療法推奨の有無に対する認識の一致率.....	39
3.2.3. IFN治療に同意しなかった理由に対する認識の一致率.....	41
3.3. 結果のまとめ【IFN治療に至らない理由の分析】.....	42
 第4章 考察と提言	 43
 付表	 45
1. 医師用アンケート調査票	
2. 患者用アンケート調査票	
3. アンケート概略図・全体単純集計表	
4. 医師がIFN療法を推奨しなかった「その他」の理由	
5. IFN療法を推奨されたが受諾しなかった「その他」の理由	
6. 「その他」の肝臓病の診断名および合併症、IFN療法を推奨した「その他」の理由	
7. アンケート自由回答	
8. アンケートデータ判別方針	