

HCVRNA の複製が持続的に起こる環境下では一部の宿主遺伝子の発現に変化が認められた。従って、今後は変化の認められた遺伝子がどのような細胞機能の変化を引き起こしているかを調べていく必要がある。今回の解析結果で、注目されたメタロチオネインについては、HCVRNA の複製に対する機能的関与という明かな結果が得られなかったが、2年間継代した細胞も得られているので、その細胞における発現レベルを調べることにより、発現変動の意味あいを探ることができるのではないかと考えられる。1年間培養した細胞において発現変動をきたした遺伝子群について2年培養した細胞と比較することも、遺伝子群の絞り込みには有用な手段となるのではないと思われる。また、HCV 感染増殖レベル (JFH1 株) についても長期培養により変化する可能性があるため、この点についても今後調べる予定である。

E. 結論

(1) HCVRNA の複製レベルが高い細胞群で発現が亢進し、複製レベルの低い細胞群で発現低下している4種類の宿主遺伝子を抽出同定した。(2) HCV コア蛋白質に会合してHCV ゲノムの複製を支持する RNA ヘリケース分子 DDX3 を見出した。(3) 全長 HCVRNA 複製細胞を1年間培養することにより発現レベルレベルが2倍以上亢進するメタロチオネインについてノックダウン細胞を作成して HCVRNA の複製効率に与える影響を解析した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).
- 2) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
- 3) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid- rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162- 168 (2007).
- 4) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
- 5) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
- 6) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
- 7) Yano M, Ikeda, M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of

Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture.

Antimicrob. Agents Chemother.

51:2016-2027(2007).

- 8) Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Rungphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr, JA, Schreiber SL, Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of hepatitis C virus replication using a high-throughput screen. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3756-3759(2007).

2. 学会発表

- 1) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.

- 2) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA replicating cells. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月.

3) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 持続的な全長HCV RNA複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発.

第23回中国四国ウイルス研究会、松山、2007年6月.

- 4) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N. DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C

Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.

- 5) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 6) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 7) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 8) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆字、Didier Trono、加藤 宣之. DNA 損傷センサー ATM と Chk2 は HCV の RNA 複製に必要な宿主因子である. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.
- 9) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之. HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ. 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月.

10)加藤 宣之、阿部 健一、森 京子、有海
康雄、團迫 浩方、池田 正徳、全長 HCV
RNA 複製細胞の長期培養により生じる HCV
の遺伝的多様性、第 55 回日本ウイルス
学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。

細胞を用いたスクリーニング方法およびス
クリーニン
グキット

発明人：加藤 宣之、池田 正徳

特許権者：岡山大学

出願日：2006 年 4 月 3 日

特許原簿登録日：2007 年 9 月 14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許番号：第 4009732 号

出願番号：特願 2006-101483 号 発明の

名称：レポーター遺伝子産物を発現する H

C V 全長ゲノム複製細胞、並びに、当該

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型慢性肝疾患の肝組織におけるミトコンドリア DNA の塩基変異と IFN 治療による修飾

分担研究者 西口修平 兵庫医科大学内科学 肝胆脾科 教授

研究要旨：我々は、肝癌組織のミトコンドリア DNA に塩基変異が集積していること報告し、その際非癌部の肝組織においても変異が存在することに着目してきた。C型慢性肝疾患からの肝発がんには HCV によって生じる持続炎症が大きく関与しているが、その実態はミトコンドリアからの電子のリークが活性酸素種を増加させ染色体に障害をもたらすことに起因すると考えられている。このため、ミトコンドリアの塩基変異数は発がんリスクの指標としての臨床的な有用性が期待できる。一方、臨床研究によって IFN 治療は肝発がんリスクを、特に HCV 消失例(SVR)において減少させることが明らかにされている。今回、我々はC型慢性肝炎の IFN 前後の肝組織におけるミトコンドリア DNA の変異数の変化を検索した。その結果、肝癌を有さない純然たる慢性肝炎の肝組織においても、すでに多数のミトコンドリア DNA に塩基変異が生じていること、さらに IFN 投与期間中にこれらの変異が減少することが判明した。しかし、IFN 後の経過中では SVR 例においてもミトコンドリア DNA の変異は減少せず、一定数を維持した。また、HCV 消失後 13 年と 15 年後に肝癌が発症した症例について組織学的に検討したところ、光顕レベルでは異常がないが、電顕レベルではミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められた。これらの結果は、HCV が消えても長期間発がんの可能性が存続することという臨床的エビデンスを裏付ける成績であった。

A. 研究目的

我々は、肝癌では多数のミトコンドリア DNA に塩基変異が生じており、組織型が悪性度を増すにつれ変異数が増加することを明らかにしてきた¹。さらに、個々の症例における塩基変異数は、非癌部は癌部と良好な相関が認められ、発癌までの過程において非癌部においてもミトコンドリア DNA の異常が蓄積していることが推定された。さらに、我々は臨床的に IFN がC型慢性肝炎からの肝発がんを抑制することを明らかにしたが、その一方で HCV の完全消失例(SVR)であっても、肝癌が長期間発症してくることを報告してきた²。

今回、肝発癌過程におけるミトコンドリア DNA の塩基変異を解析するため、慢性肝炎 27 例の肝組織のミトコンドリア DNA 変異を解析し、本変異に対するインターフェロン(IFN)投与の影響を解析した。さら

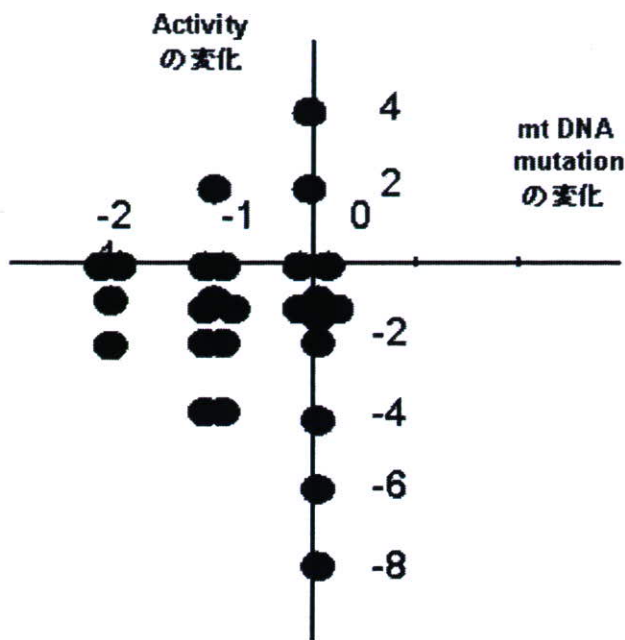
に、SVR からの肝発がん例を対象に非癌部の組織学的な検索を行った。これらの検討をもとに、HCV による肝発がん過程においてミトコンドリアの果たす役割について解明を試みた。

B. 研究方法

大阪市立総合医療センターにて IFN- β の投与前と投与直後に 2 回の経皮的肝生検を実施した慢性肝炎 27 例を対象とした。ミトコンドリア DNA の塩基配列は、特異的な primer を設定して PCR を行い、ABI sequencer を用いて direct sequence 法にて PCR 産物の塩基配列を決定した。一部の症例においては、ミトコンドリア DNA の全配列を決定したが、他の症例については D-loop 領域のみを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学の倫理委員会にて承認を受けている。これらの対象者には事前に研究目的と



IFN によって SVR が得られたが、肝癌が発症した 2 例について、組織学的に検討した。症例 1 は 76 歳、男性。平成 6 年、IFN により SVR。平成 19 年 10 月 (13 年後) 肝癌の手術を受けた。入院時肝機能所見は AST 21 IU, ALT 27 IU, ALB 3.6 g/dl, T. Bil 0.2 mg/dl, PT 88% であり、すべての検査値は正常化していた。非癌部の肝組織も光顕レベルでは、Stage 2 Grade 0 であり、炎症所見は皆無であり、肝細胞の軽度の腫大を認めるのみであった (図 4)。しかし、電顕像では、ミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められた (図 5)。症例 2 は、73 歳、男性。平成 4 年、IFN により SVR。平成 19 年 11 月 (15 年後) に肝癌の手術を受ける。入院時肝機能所見は AST 29 IU, ALT 32 IU, ALB 4.5 g/dl, T. Bil 0.9 mg/dl, PT 100%, PLT 19.9 万であり、すべての検査値は正常であった。組織所見は光顕レベルでは Stage 1 Grade 0: であり、症例 1 と同様炎症所見は認められないが、肝細胞の軽度の腫大と脂肪滴が認められた。電顕像では、ミトコンドリアの増生と形態異常が認められ、粗面小胞体の膨化と脂肪滴が存在した。

図 4 : 症例 1 光顕像

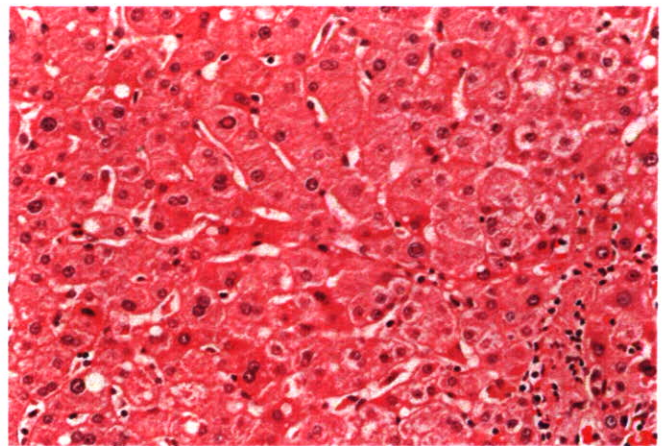
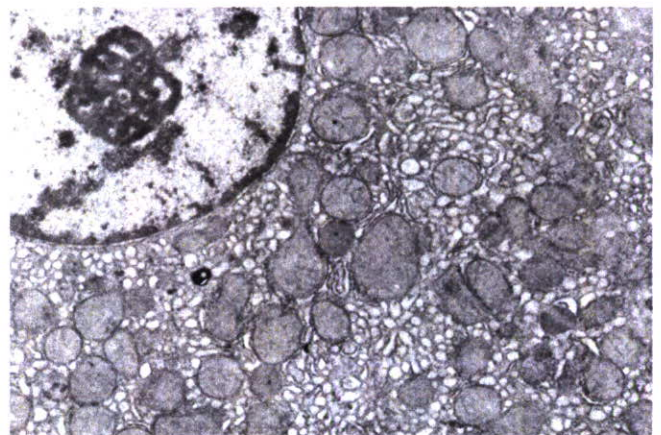


図 5 : 症例 1 電顕像



D 考察

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既に、ミトコンドリア DNA に多くの変異が存在することが明らかとなった。ミトコンドリア DNA の変異は持続する炎症による DNA の不安定化 (高癌化状態) を明確に表しているものと考えられる。さらに、IFN 投与期間中にミトコンドリア DNA 変異は短期間で減少することが判明した。しかし、IFN によるミトコンドリア DNA の改善は IFN の治療効果 (HCV 消失や肝機能の改善の有無) とは関係なく、投与前の組織において変異数の多い症例では無効例であっても減少していた。この結果は、IFN 投与歴のある肝癌症例の検討結果とは乖離した。すなわち、IFN が SVR もしくは肝機能が改善した症例では、発癌時の非癌部のミトコンドリア変異数は低値であるが、IFN 無効例

では変異数が著しく多いことから IFN 終了後無効例では変異数が再び増加していることが推測された。これらの結果から、IFN はその後の治療効果に関わりなくたとえ無効例においても投与中にはミトコンドリア DNA の変異を減少させること、しかし投与後には SVR 例であっても変異数は維持され自然消失は少ないこと、また IFN 投与後肝障害が持続する症例では再び変異の蓄積が始まることなどが推測できた。今後、より多くの症例において複数回の肝生検を行い、再検証が必要である。

IFN によって肝発癌が抑制されることは周知の事実であるが、個々の症例における肝発癌のリスクを評価する指標はなく、IFN によってどの程度リスクが減少したのかは個別には評価できない。ミトコンドリア DNA の変異数の臨床的な意義について、さらに検討が必要である。また、ミトコンドリア DNA の変異数を規定する要因について活性酸素腫の消去酵素の遺伝子多型に関する検討も、HCV 発がんにおけるミトコンドリアの役割を明らかにする上で必要と考えている。

E. 結論

ミトコンドリア DNA 変異は IFN によって投与期間中減少するが、SVR においても消失することはない。SVR 肝癌の非癌部では電顕レベルでミトコンドリア

の異常が認められた。これらの結果から肝発癌においてミトコンドリアが果たす役割を明確にできたわけではないが、密接な関連性が推定される。

F. 健康危険情報

C型慢性肝炎では IFN 著効例であっても、ミトコンドリア障害は残存し、発がんリスクは低下するものの存在することが示唆された。

G. 研究発表

学会発表 なし

論文発表

1. Nisikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2001.

2. Kobayashi S, Takeda T, Nishiguchi S, et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a Multicenter retrospective cohort study of 1124 patients. *Liver Intern.* 2007; 27: 186-191.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

(ア) 特許取得 なし

(イ) 実用新案登録 なし

(ウ) その他

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得機構の分子機構解明

分担研究者 小原恭子 熊本大学大学院医学薬学研究部・特任教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、肝硬変、肝癌に結びつく。研究分担者らは、HCVの持続発現に伴い肝細胞の腫瘍原性が亢進する事を見いだしているがこれに関与する1つの分子を単クローン抗体の樹立という方法でアプローチして見いだした。本分子はDHCR24であり、コレステロール合成に関与すると同時にp53, MDM2との相互作用も報告されていた。分担研究者はHCV感染がDHCR24の発現を亢進し、p53の活性低下を通じて酸化ストレス誘導性アポトーシス反応性が低下する事を見いだした。さらに、HCVによるDHCR24の発現誘導は転写段階で生じておりプロモーター領域をクローニングして解析した結果転写開始点上流200塩基内の32bpが重要である事が明らかとなった。また、DHCR24過剰発現がp53の翻訳後修飾に影響する事も明らかになった。

A. 研究目的

RNAウイルスであり、典型的な癌遺伝子を持たず宿主細胞のゲノムにも組み込まれないHCVが高率に肝癌発症に結びつく機序は未だ不明な点が多い。分担研究者らは、HCV感染がDHCR24分子の発現を誘導しこれがp53の活性を抑制する事を見いだしている。本研究ではHCVによるDHCR24の発現誘導機序あるいはDHCR24過剰発現によるp53活性抑制機序を解明し、HCVの新たな病原性発現メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

HCVの持続発現により発揮される腫瘍原性亢進機序を解明するためHCV発現継代細胞(*J. Biol. Chem.* 279 (15), 14531-14541, 2004).をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。この中でHCV発現継代細胞やHCV陽性肝癌

HCVが誘導するDHCR24の過剰発現が細胞増殖に及ぼす影響については過酸化水素処理後のアポトーシス感受性をカスパーゼアッセイで定量的に測定して

患者組織で発現が亢進する分子、DHCR24を認識するクローンを得た。

DHCR24の発現誘導を細胞で検索したところ、転写レベルで誘導される事が明らかとなった。また、HCV-JFH1株の感染感受性細胞であるHuH-7細胞ではDHCR24の発現量が強くウイルス感染による発現誘導を確認する事が困難であった。そこで、HCVをヒト肝臓キメラマウス(uPA-SCIDマウス)に感染させDHCR24の転写誘導の有無を定量PCRで検索した。

また、HCV感染によるDHCR24の転写誘導機序に関してはDHCR24のゲノムプロモーター領域(5kbp)の遺伝子をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを作製して欠損変異を導入しHCV応答領域を検索した。

た。DHCR24を過剰発現するHCV発現継代細胞に過酸化水素処理を行うとHCV非発現細胞に比べカスパーゼの活性が抑制されている事が明らかとなった。また

検索した。また、DHCR24の過剰発現が及ぼす影響も明らかにするため、レンチウイルスベクターでDHCR24を過剰発現させた。さらに、DHCR24の過剰発現により修飾されるシグナル経路、特にp53制御経路の変化を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H18年6月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た(H18年4月)。

C. 研究結果

HCV感染のDHCR24の発現に及ぼす影響をヒト肝臓キメラマウス感染系で検討した。その結果、HCV非感染マウス群に比べHCV感染マウス群では平均で5倍以上の優位な発現上昇が見られた。HCV遺伝子発現細胞でもDHCR24の発現誘導が転写レベルで確認されたことからDHCR24遺伝子の上流5kbpをクローニングし、HCVに応答するプロモーター領域の検索を行った。欠損変異の解析を行ったところ、プロモーター領域の転写開始点上流200塩基内にある32塩基が必要である事が明らかとなった。またこの領域内にはSP1などの応答配列があるが、ゲルシフト法で解析したところSP1以外の宿主因子が結合している可能性が高い。

HCV感染がDHCR24の発現を誘導する事が明らかとなったが、DHCR24過剰発現による細胞増殖への影響についても検討を行っ

、DHCR24をレンチウイルスベクターで過剰発現しても過酸化水素誘導性アポトーシスに耐性となる事が明らかとなった。過酸化水素処理後のp53誘導分子の発現がHCV発現細胞で低下しており、p21^{WAF1/CIP1}プロモーター活性の誘導も抑制されていたことから、DHCR24過剰発現によりp53の活性が抑制される可能性が考えられた。そこで、細胞内でのp53の局在を蛍光抗体法で観察したところ、HCV発現細胞やDHCR24過剰発現細胞ではp53の核内への局在が抑制されており、過酸化水素処理後の核移行も抑えられている事が明らかとなった。さらに、p53の核内移行に重要な翻訳後修飾、特にアセチル化がDHCR24過剰発現により低下している事が観察された。

D. 考察

HCVの感染がDHCR24の過剰発現を転写レベルで誘導し、これによってp53の活性が抑制されている可能性が明らかとなった。今後はHCVによるDHCR24遺伝子発現誘導の詳細な検討、特に転写因子の同定が必要と考えられる。また、DHCR24過剰発現によるp53の抑制機序についてさらなる検討を要する。これらの検討からHCVの新たな病原性発現のメカニズムが明らかとなると期待される。

E. 結論

本年度の研究により、DHCR24遺伝子のHCV感染による発現誘導が見いだされ、プロモーター領域内のHCV応答配列(32塩基)が明らかとなった。また、HCVによりDHCR24の持続的な過剰発現生じ、これによってp53の活性が低下する事も明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. K.Fujita, R. Miura, M. Yoneda, F. Shimizu, H. Sato, Y. Muto, Y. Endo, and K. Tsukivama-Kohara, and C. Kai. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses:

under Endoplasmic Reticulum Stress.

Cell Metabolism, in press.

6. 小原 恭子 C型肝炎ウイルスの発揮する腫瘍原性 黎明 2007 16: i-ii.

2. 学会発表

(学会名・開催地・開催年等も記入)

1. 笠間由里, 田中康介, 佐藤正明, 斎藤誠, 桑

- Involvement heparin-like molecule in CDV infection. *Virology* 359:324-335, 2007.
2. H. Sato, M. Masuda, M. Kanai, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, and C. Kai. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J Virol.* 81(21):11569-11576, 2007.
 3. M. Matsumura, H. Inoue, T. Matsumoto, T. Nakano, S. Fukuyama, K. Matsumoto, K. Takayama, M. Saito, K. Kawakami, Y. Nakanishi. Endogenous metalloprotease solubilizes IL-13 receptor alpha2 in airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:464-469, 2007.
 4. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, in press.
 5. S. Yamaguchi, H. Ishihara, T. Yamada, A. Tamura, M. Usui, R. Tominaga, Y. Munakata, C. Satake, H. Katagiri, F. Tashiro, H. Aburatani, K. Tsukiyama-Kohara, J. Miyazaki, N. Sonenberg and Y. Oka. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival 札幌 2007.
 7. 佐藤正明・笠間由里・小原道法・小原恭子 Dehydrocholesterol reductase 24 (DHCR24)をターゲットとした単クローン抗体処理のC型肝炎ウイルス複製細胞に対する生理学的影響を担う宿主因子の同定 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.
 8. 高野 貴士、小原 道法、甲斐 知恵子、小原 恭子 HCV 関連抗原 P70 の同定及び解析 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.
 9. 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現細胞にお
- 原一彦, 阪口薫雄, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルスにおける肝外病変モデルマウスの作製 第44回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎 2007.
2. 佐藤正明・斎藤誠・田中康介・岩永寿真子・岡田誠治・甲斐知恵子・小原恭子 ヒトリンパ球 NOD/SCID マウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換え麻疹ウイルス評価系の構築 第44回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎 2007.
 3. M. Saito, K. Tsukiyama-Kohara Hepatitis C Virus-associated Regulatory Mechanism for DHCR24 Gene Expression. (C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 遺伝子の発現制御機構) 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.
 4. T. Takano, M. Kohara, C. Kai, K. Tsukiyama-Kohara. The novel regulatory pathway of TOM70 concerning with cell death. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007.
 5. 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス誘導蛋白質 DHCR24 による p53 の修飾制御 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007.
 6. 齊藤 誠、高野貴士、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス(HCV)のライフサイクルにおける宿主因子DHCR24の機能解析第55回日本ウイルス学会学術集会
1. K. Tsukiyama-Kohara, M. Saito, and M. Kohara. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis aggravated by Hepatitis C virus APASL2007, Kyoto, 2007. [Best Poster Award 受賞]
 2. T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara*, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase. "14th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Glasgow, 2007.
 3. K. Tsukiyama-Kohara Molecular Basis of

る p53 の修飾制御 BMB2007

(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会年会・合同大会) 横浜 2007

10. 齊藤 誠、西村知裕、高野貴士、佐藤正明、徳永優子、笠間由里、小原道法、小原恭子 C 型肝炎ウイルス (HCV) の腫瘍原性亢進機序およびライフサイクルにおける宿主

因子 DHCR24 の機能解析 The role of

DHCR24 in hepatocarcinogenesis and the viral life cycle during hepatitis C virus (HCV) infection BMB2007 ワークショップ 5W9*

(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会年会・合同大会) 横浜 2007

*ワークショップ 5W9 「ウイルス研究から明らかになった宿主因子の新たな機能」 企画 (小原恭子・土方誠)

「国際学会」

Hepatocarcinogenesis elevated by Hepatitis C virus The Asia and Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and the Fourth Liver Care Center Symposium (invited)

Khon Kaen, Thai-land 2008.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「C型肝炎治療用抗体」、特願:2006-49572、発明者:小原恭子、甲斐知恵子、西村友裕、出願日:平成18年2月27日、出願人:国立大学法人 熊本大学、甲斐知恵子、(財)化学及血清療法研究所

2. 「ウイルスの複製に関与する宿主因子」発明者:小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕
出願人:国立大学法人 熊本大学、(財)化学及血清療法研究所

出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

ステム細胞由来肝細胞のウイルス感染研究への応用

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室・独立室長

研究要旨：初年度は脂肪組織に由来するヒト間葉系幹細胞から肝細胞を短期間で分化を誘導する検討を行い、これまでに2週間で肝機能を有する細胞分化誘導に成功した。さらに、肝炎に起因するヒト肝細胞がんが発現が亢進している特定の microRNA の発現が、肝がんと強く相関することを見いだした。

A. 研究目的

間葉系幹細胞等のステム細胞から in vitro においてヒト肝細胞を分化誘導する系を構築し、この細胞を用いて肝炎ウイルスの感染から増殖機構解明のための基盤技術構築に貢献する。

間葉系幹細胞を母体とするヒト肝細胞が肝炎ウイルスの感染系として有用であることがわかれば、抗ウイルス薬の開発に貢献するばかりでなく、ウイルス感染や増殖のメカニズム開明に大きく寄与する。また肝炎ウイルスを背景とする肝がんに関連するmicroRNAの発見は、ウイルス性肝発がんのメカニズム解明に重要な知見となる。

B. 研究方法

脂肪組織から得られたヒト間葉系幹細胞は、これまでの検討から、HIFCという複数のサイトカイン、増殖因子の組み合わせによって、35日ほどで、in vitro で肝細胞様の細胞へと分化誘導が可能出ることがわかっている。本研究の初年度は、この分化培養系を改良することにより、2週間という短期間で肝細胞様の形態、機能を持つ細胞を誘導することに主眼をおく。具体的な方法としては、従来用いたサイトカイン、増殖因子等の添加のタイミングと量を調整し、アルブミン産生能力の出現を指標に分化の

検討を行う。

さらに肝炎ウイルスを背景とする肝がんに関連する microRNA の発見と、microRNA を用いた肝炎ウイルスの増殖機構の解明、肝がん発生のメカニズム解明、抗ウイルス作用を検討するための基盤研究として、正常の肝臓の発生初期に発現の高く、成体肝臓でその発現が抑制されているような microRNA に注目し、それらの肝がん細胞株での発現解析を行った。

（倫理面への配慮）

本報告に関わるヒト組織由来間葉系幹細胞は、インフォームドコンセントのもと、国内の倫理審査を得て採取され、国立がんセンター研究所での倫理審査を経て使用された。

C. 研究結果

（1）肝細胞分化誘導系の改良

従来用いたサイトカイン、増殖因子等の添加のタイミングと量を調整した結果、HGF、FGF1、FGF4、0.5mM、デキサメタゾンをほぼ同時に添加する工夫で、これまで35日以上を要した肝細胞様分化誘導をわずか2週間の期間に短縮することに成功した（図1）。これらの細胞は、アルブミン染色陽性であり、培養液中にもアルブミンの産生が ELISA によって確認された。さらに RT-PCR による検討では、TD02、

CYP3A4, 2C9 などの成熟肝細胞に特徴的な遺伝子の発現も確認された。

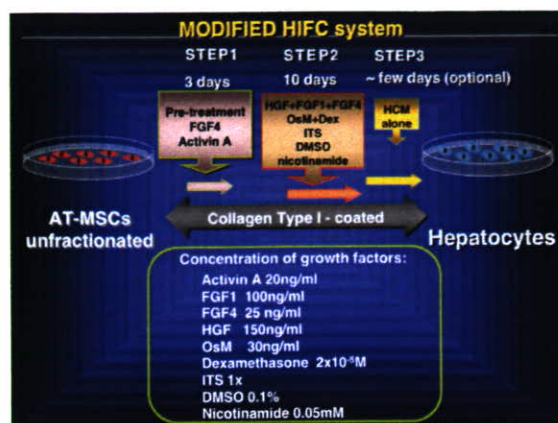


図1 間葉系幹細胞の肝細胞分化

サイトカインや増殖因子の添加の工夫により、2週間で肝細胞様の細胞を誘導する系。

(2) microRNA 解析の方法の確立

肝炎ウイルスを背景とする肝がんに関連する microRNA の発見と、microRNA を用いた肝炎ウイルスの増殖機構の解明、肝がん発生のメカニズム解明、抗ウイルス作用を検討するための基盤研究として、正常の肝臓の発生初期に発現の高く、成体肝臓でその発現が抑制されているような microRNA を、microRNA マイクロアレイ法にて抽出した。その結果、4種類の microRNAs が目的の挙動を示すことが明らかとなり、そのうち1種類については、ヒト肝がん細胞株でも発現が亢進していることが明らかとなった。今後、この microRNA が、肝炎に起因する肝がんとの相関があるかどうかを検証していく。

D. 考察

間葉系幹細胞を2週間ほどの短期間で、肝細胞様の細胞に分化誘導することが可能となった。今後は、この細胞が、HCV 感染系として有用であるかどうかを検証していくことになる。そのためには、まず

HCV 感染に必要な因子、例えば core との会合に必要な DDX3 を発現しているかどうかの検討を行うとともに、実際に JFH-1 株 (2a 型) HCV を細胞に感染させる系を検討する。

また、microRNA については、実際の臨床サンプルを用いて、HCV, HBV と関連性がある microRNA の同定を検討する。

E. 結論

HCV の感染から肝がんの経路をより詳細に解析する系として、ヒト脂肪組織に存在する間葉系幹細胞の可塑性に注目して研究を行っている。この幹細胞は、内胚葉系の肝細胞に比較的短期間で transdifferentiation する能力を持つことが本研究で明らかとなった。今後、この細胞の HCV 感染、複製能力、あるいは肝がんへの細胞転換をおこすことが出来れば、肝炎、肝がん発生のメカニズムを microRNA レベルで解析することや、あるいは抗ウイルス剤のアッセイ系としても有用であると期待出来る。

F. 健康危険情報

本研究では健康を危惧する細胞、方法論、ウイルスなどは特にならない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (欧文)

1. Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:841-845, 2007
2. Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, *Eif2c2* (*Ago2*), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*,

89:687-696, 2007

3. ○Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007
4. Honma K, Miyata T, Ochiya T. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 7, 2007
5. ○Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007
6. Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. In press
7. ○Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, Ochiya T. Plasticity of adult stem cells into liver. *Curr.Res. in Hepatology* 1:1-18, 2007.

(和文)

Honma K, Takeshita F, Ochiya T.
Application of atelocollagen-mediated siRNA delivery for RNAi therapies. *Yakugaku Zasshi*. 127:807-812, 2007.

2. 総説・(欧文と和文、分けて下さい)
(欧文)

Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated drug discovery technology. *Expert Opin Drug Discov*, 2:159-167, 2007

3. 著書・(欧文と和文、分けて下さい)
4. 学会発表

(海外)

- 1) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S. "Optical imaging of RNAi Therapy" SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited
- 2) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T. "MicroRNA expression profile to define mouse liver development" 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)
- 3) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. "CYP's metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells" The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)
- 4) Ochiya T. "RNAi-based anti-cancer strategy" 1st

Internatinal Conference on Drug Design & Discovery.(Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited

- 5) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9. 2007 Seoul, Korea) invited
- 6) Takeshita F, Ochiya T. "MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells." 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada) invited
- 7) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. "Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies" 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)

(国内)

- 1) 光イメージングによるがんの RNAi 治療法の開発、落谷孝広(シンポジウム)、第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 2) がんの分子標的治療モデルにおける分子イメージングの実験、落谷孝広、第 2 回日本分子イメージング学会学術大会 (2007.6.28-29 福井)
- 3) Efficacy of RNAi-based molecular target therapy against metastatic human breast cancer cells. Fumitaka Takeshita, Agnieszka Banas, Naomi Hokaiwado, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 4) MicroRNA therapy against bone metastasis of prostate cancer. Naomi Hokaiwado, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 5) MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. Yusuke Yamamoto, Fumiaki Koizumi, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 6) Genome-wide DNA methylation analysis of cancers. Izuho Hatada, Akira Sakurada, Masami Sato, Takashi Kondo, Akira Horii, Yusuke Yamamoto, Takahiro Ochiya, Riu Yamashita, Kenta Nakai, Katsumi Nakanishi, Ryo Matoba, Kenichi Matsubara 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 7) RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Teruhiko Yoshida, Kasuto Nishio, Shunji Nagahara, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 8) Presence of multiple mechanisms in lymph node metastasis of esophageal cancers. Masayuki Sano, Fumitaka Takeshita, Kazuhiko Aoyagi, Yukihiro Nakanishi, Takahiro Ochiya, Yuji Nimura, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)

- 9) Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. Shinobu Ueda, Takumi Teratani, Hiroyuki Tsuda, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 10) Cancer Patients' Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 11) A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Kana Yanagihara, Satoshi Terada, Takahiro Ochiya 第6回国際動物実験代替法会議 (2007.8.21-25 東京)
- 12) RNA 干渉による発がんの分子標的の同定と治療への応用、落谷孝広 (シンポジウム)、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 13) 合成 microRNA 導入によるヒト転移性前立腺がん細胞における機能解析、竹下文隆、外岩戸尚美、本間紀美、落谷孝広、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 14) 薬剤抵抗性獲得に関与する microRNA の探索、外岩戸尚美、竹下文隆、山本雄介、箕浦加穂、田谷敏貴、本間紀美、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 15) マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる microRNA の同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 16) siRNA による放射線感受性増強、落谷孝広 (シンポジウム)、第37回放射線による制癌シンポジウム (2007.7.20 つくば)
- 17) 画像イメージングと毒性病理学の接点、落谷孝広 (ワークショップ)、第24回日本毒性病理学会学術集会 (2007.2.6-7 名古屋)
- 18) RNAi 創薬とがん治療、落谷孝広 (ワークショップ)、第145回日本獣医学会 (2008.3.30)
- 19) バイオフォトンクスと Non-coding small RNA の融合がもたらすがん研究の革新、落谷孝広、バイオフォトンクス技術研究会 (2007.12.7 神戸)
- 20) がん治療戦略における RNAi 創薬の意義、落谷孝広 (シンポジウム)、ゲノム創薬フォーラム第10回シンポジウム (2008.11.7 東京)
- 21) 再生肝由来の切片担体を利用して ES 細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想、竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明、日本薬学会第128年会 (2008.3.26-28 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

肝移植後再発 HCV 患者における複製 HCV ゲノムの解析および欠損ウイルス の影響

分担研究者 杉山和夫 慶應医学部総合医科学研究所 (H20 年 2 月 1 日から)

埼玉医科大学医学部 (H20 年 1 月 31 日まで)

研究要旨

最近、C 型慢性肝炎患者血清において C 型ウイルス (HCV) の欠損ウイルスが存在することが報告されている。本研究では肝移植後の HCV 再発患者血清において構造領域が大きく欠損した欠損 HCV が存在することを明らかにした。その欠損 HCV をクローニングし塩基配列解析を行った結果、全てのクローンが同じ in-frame breakpoint を有し、かつ、それらのアミノ酸配列に不均一性があることが明らかになった。また、その欠損 HCV を同じ血清から樹立したサブゲノムレプリコンの上流に挿入した RNA を作製し培養肝癌細胞 Huh に導入した。免疫染色の結果、コアタンパクを含めた HCV タンパクの発現が認められた。これらのことから欠損 HCV が HCV の複製、持続感染に役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

最近、C 型慢性肝炎患者血清において C 型ウイルス (HCV) の欠損ウイルスが存在することが報告されている。しかし、そのウイルス学的意義はまだ明らかになっていない。本研究では欠損 HCV の複製、持続感染における影響を明らかにする。また、このような欠損ウイルスが慢性持続感染や肝移植後の HCV 再発がどのように関わるか明らかにすることを目的とする。最終的にはこれらの欠損ウイルスを標的とした肝炎診断マーカーや治療法へ発展させる。

構造領域全体を含むように 5' 非翻訳領域から非構造蛋白領域 3 (NS3) にかけて RT-PCR を行なう。さらにその増幅産物をクローニングしアミノ酸配列を解析する。一方、その下流の非構領域に対しても同様に RT-PCR による増幅を行い、サブゲノムレプリコンライブラリーを作製し、コロニー形成法にて培養肝癌細胞 Huh7 で複製可能なレプリコンを樹立する。構造領域の欠損したクローンをそのレプリコンの下流につないだ RNA を作製し Huh7 へ導入し、HCV 蛋白質の発現を免疫染色にて確認する。

(倫理面への配慮)

B. 研究方法

肝移植後 HCV 再発患者血清をもとに、HCV

患者血清などの臨床サンプルを採取する場合
は患者よりインフォームドコンセントを得

る。また、得られた患者情報は厳重に保護する。

C. 研究結果

慢性C型肝炎に対する肝移植後にHCVを再発した患者血清を用いてRT-PCRを行った結果、広範に構造領域が欠損した(約2kb)ウイルスRNAが検出された。PCR産物をクローニングしそのアミノ酸配列を解析した結果、調べた限りすべてのクローン(10クローン)で同じbreakpointにおける欠損が認められた。欠損領域はエンベロープタンパク1(E1)から非構造蛋白2(NS2)の一部におよんでおり(675アミノ酸)、すべてin-frameであった。また、これらのアミノ酸配列には不均一性があることが明らかになった。一方、同じ血清からサブゲノムレプリコンライブラリーを作製し、コロニー法によりサブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。また、そこから適応変位を有するサブゲノムレプリコンcDNAをクローニングした。欠損HCVにその非構造領域をつないで作製した欠損HCV RNAを培養細胞Huh7に導入した結果、コアタンパクを含めたHCVタンパクの発現が認められ、欠損HCVの複製が示唆された。

D. 考察

肝移植のHCV再発患者血清を用いてRT-PCRを行った結果、広範囲に構造領域が欠損した(約2kb)ウイルスRNAが検出された。すべてのクローン(10クローン)が同じin-frame breakpointを有していた。また、これらのクローンのアミノ酸配列には不均一性がある

ことから、PCRなどによる人工的な産物ではなく、実際にHCVの感染、複製の過程で生じたものであると考えられる。また、欠損HCVが血清より検出されたことから、少なくとも欠損ウイルスが肝臓からビリオンとして放出された可能性が高い。さらに、同じ血清から樹立されたサブゲノムレプリコンの非構造領域をつないだ欠損HCVからHCVコアタンパクが発現することから、肝細胞でも欠損クローンが複製していることが示唆された。また、構造領域の広範な欠損にもかかわらずコアタンパク質領域の欠損は認められず、また、その発現が認められることから、コアタンパク質が全長HCVおよび欠損HCVの複製、持続感染において何らかの役割を担っている可能性がある。

今後、これらの結果をもとに欠損HCVのウイルス学的意を明らかにするとともに、他の肝移植後HCV再発患者やC型慢性肝炎患者血清からも欠損HCVが検出されるかどうか検討する予定である。

E. 結論

肝移植後HCV再発患者血清から構造領域が広範に抜け落ちた欠損HCVが検出された。また、サブゲノムレプリコン由来の非構造領域をつないだ欠損HCVが実際に培養細胞でタンパクを発現させることが示された。今後、これらの欠損HCVが感染可能なビリオンを形成するかどうかを確認し、完全長HCVの複製、持続感染との関係を明らかにする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Kazuo Sugiyama, Toshitaka Akatsuka,
Kunitada Shimotohno. 2007, "Establishment

of a new HCV replicon from the recurrent HCV
patient transplanted with liver". 14th
International Meeting on Hepatitis C Virus
& Related Viruses, Glasgow, England.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCV 感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析に関する研究

分担研究者 丸澤宏之 京都大学医学研究科消化器内科 助教

研究要旨 生理的条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない遺伝子編集酵素 AID が、HCV 感染に伴う慢性炎症の結果、ヒト肝細胞に誘導されることが明らかとなった。遺伝子変異を生成させる活性を有する AID の発現による宿主肝細胞遺伝子への変異の生成が、肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

A. 研究目的

ヒトの発癌過程においては、種々の癌遺伝子・癌抑制遺伝子に変異の蓄積が高頻度に認められることが広く知られている。HCV 感染による慢性肝炎から肝硬変を背景に肝癌が発生するに際しても、宿主肝細胞にさまざまな遺伝子変異が惹起されることが、ヒト肝癌の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。事実、ヒト肝癌組織では癌関連遺伝子である *p53* や *β-catenin* などの遺伝子変異の報告を多数認める。しかしながら、発癌過程における遺伝子変異生成の分子機序に関しては大部分が不明のままであり、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌（Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC）や一部の消化器癌で認められるような DNA 修復遺伝子の異常はヒト肝癌では稀とされている。そこで我々は、DNA 修復系以外の要因が肝発癌過程における遺伝子変異生成に寄与しているものと想定し、遺伝子編集機能をもつ Apolipoprotein B 100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family 分子の一員である Activation-induced cytidine deaminase (AID) に着目した。AID は、活性化 B 細胞において免疫グロブリンの変換領域に高頻度に体

細胞突然変異を引き起こす DNA の編集酵素であり、AID の遺伝子変異導入機能により、ヒトは多種の外来抗原に対応する多様な抗体を産生することができることになる。しかしながら、AID の過剰発現がその遺伝子変異活性を介して、ヒトリンパ系悪性腫瘍の発症と深く関与していることが近年明らかになりつつある。我々はこの AID による遺伝子変異導入活性に着目し、HCV 感染による慢性肝疾患からの肝発癌過程における遺伝子変異の生成と蓄積に AID が関与している可能性を探求することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV 感染細胞における遺伝子編集酵素 AID の発現量の定量評価を行い、HCV の持続感染により AID が発現誘導される分子機序を解析する。

(2) AID transgenic mouse は高率にリンパ系悪性腫瘍を発生することがすでに報告されているが、この AID transgenic mouse の上皮系組織における表現型の詳細な解析を行う。

(3) ヒト臨床検体を用いて、慢性肝炎、肝硬変、肝癌といった各種病態の肝組織中における AID の発現量の解析を real-time RT-PCR 法、

ヒト AID に対する特異抗体を用いた免疫染色法により行い、正常肝組織における発現量との比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」に準拠し、所属機関の研究倫理委員会に申請し承認を得る。動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」や「実験動物の飼育および保管に関する基準」及び「大学における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるように配慮する。

C. 研究結果

(1) 遺伝子に変異を導入する活性を有する cytidine deaminase である遺伝子編集酵素 Apobec family 分子の中で、AID のみがヒト自身の DNA 配列に遺伝子変異を導入する活性を有することが示されている。AID は生理的条件下では肝細胞ではその発現をほとんど認めなかった。しかしながら、HCV 感染や炎症性サイトカイン刺激によりヒト肝細胞に AID が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。この肝細胞における AID の発現は、HCV のコードするウィルスタンパクのひとつである Core タンパク質依存性に生じていることも判明した。

(2) AID transgenic mice はほぼ全例で悪性リンパ腫の発生を認めたが、非リンパ系組織では上皮細胞由来の腫瘍として肝癌や肺癌が発生することが明らかとなった。

(3) ヒト臨床検体を用いた解析からは、慢性肝炎、肝硬変、肝癌を伴った肝組織中では、内在性 AID mRNA の過剰発現が real-time PCR 法により確認された。同時に、特に HCV 感染を

伴った肝組織中において、AID の発現量がより高いことも明らかとなった。ヒト AID 抗体を用いた免疫組織学的な検討からは、慢性炎症を伴ったヒト肝組織中では、組織浸潤リンパ球とともに肝細胞でも AID タンパクが過剰発現していることが確認された。

D. 考察

HCV 感染の結果、遺伝子編集酵素 AID がウィルスタンパクや炎症性サイトカイン依存性にヒト肝細胞に発現誘導されることが明らかとなった。トランスジェニックマウスモデルの解析からは、AID の過剰発現が、悪性リンパ腫のみならず上皮系細胞由来の肝癌を引き起こすことも確認された。以上の結果から、HCV 感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、AID 発現が誘導され宿主細胞にさまざまな遺伝子異常が惹起されることが、ヒト肝癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染からの慢性肝障害を背景とした肝癌の発生に、AID により宿主細胞に遺伝子変異が生成されることが重要な役割を果たしていると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. Expression of