

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

B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の
病態解明とその予防・治療法の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 紀夫

平成20（2008）年 3月

**B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究**

班員名簿

班長	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	教授
班員	松浦 善治	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門 分子ウイルス分野	教授
	小池 和彦	東京大学医学部 感染症内科	教授
	上田 啓次	浜松医科大学医学部 感染症学	教授
	中本 安成	金沢大学医学部附属病院 消化器内科学	講師
	坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間 環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学	教授
	井廻 道夫	昭和大学医学部 第二内科	教授
	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	准教授
	考藤 達哉	大阪大学大学院医学系研究科 樹状細胞制御治療学	准教授

[事務局]

大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘二番二号
Tel: 06-6879-3621
Fax: 06-6879-3629

目 次

I. 総括研究報告書

- B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究 1
林 紀夫

II. 分担研究報告

1. HCVによる肝脂肪化と肝発がんにおける PA28 γ の役割 5
松浦善治
2. C型肝炎における肝細胞内代謝と酸化ストレス発生機構の解析 9
小池和彦
3. B型肝炎ウイルスレセプタークローニングによる *in vitro* 及び *in vivo*
感染系の樹立と病態発症機構の解明 16
上田啓次
4. ウイルス性肝炎・肝がんにおける免疫の制御に関する研究 18
中本安成
5. プロテオミクスによる肝炎進展と治療効果を予測するバイオマーカー探索 20
坪内博仁
6. 樹状細胞とインターフェロン- α による消化器癌治療の検討 23
井廻道夫
7. 肝がんにおける MICA の分泌とその機能的意義 25
竹原徹郎
8. C型慢性肝疾患、肝癌における制御性 T 細胞の意義 30
考藤達哉

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 40

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
総括研究報告書

B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標として、1) 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明とその制御法の開発、2) 肝がんの特徴的な遺伝子発現の解明とその診断への応用、3) 微視的な肝がんに対する免疫排除機構の障害の解明とその制御法の開発に焦点をしばって研究を行う。初年度にあたる本年度において、HCV コアに基づく発がんの機序として、PA28 γ による分解とそれによる肝臓の脂肪化、また、脂肪代謝・アポトーシス・抗酸化などに関連する分子の変動が複合的に関与することが示され、このような分子病態を改善させることが発がん抑制につながることを示唆された。C型肝炎患者の血清プロテオームの網羅的解析により、病態に関与する分子マーカーとして C4a フラグメントを同定し、診断への有用性を示唆した。C型肝炎・肝がんの免疫抑制機序として可溶性 MICA や制御性 T 細胞の増加があることを示し、このような免疫病態を改善することが、発がんやがんの進展の抑止に有用であることが示唆された。また、肝がんでは AFP に対する CTL レスポンスが生じており、樹状細胞などを用いてワクチン治療を行う標的として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標とする。ウイルス性肝炎からの肝がんの発生および進展を、1) ウイルスの持続感染と細胞機能の修飾、2) 肝細胞における遺伝子異常の蓄積と細胞のがん化、3) がん化した細胞の免疫応答からの回避と顕性肝がんへの進展の3つのス

テップに分け、それぞれの病態とその成立機序を分子・細胞レベルで解明する。各ステップをターゲットとした制御法を開発し、ウイルス性肝炎から肝がんの発生抑止法と肝がんに対する治療・再発抑止法の構築を図るとともに、肝がんの早期発見と治療に有用な診断マーカーの開発を行うことを目的に研究を行う。

B. 研究方法

1) 肝炎ウイルスの増殖・発がん機構の解明と発がん抑止法の開発(松浦、小池、上田)

- HBV レセプターの全容を解明し、HBV 持続感染に伴う肝がんの発症機構を検討する。
- HCV コア蛋白の成熟と核移行のメカニズムを解明し、HCV コア蛋白による肝発がんを抑制し得る標的分子を明らかにする。
- HCV コア蛋白によるERストレスとインスリン抵抗性が肝発がんに与える意義について解析し、ER ストレスとインスリンシグナルを標的とした発がん抑止法を開発する。

2) 肝がんの分子病態の網羅的解析と新規診断マーカー・治療法の開発(坪内)

- 肝がん患者の血液中に産生される蛋白を網羅的に明らかにし、肝がんの早期発見や治療効果の判定に有用な新規血清マーカーを開発する。

3) 肝がんの免疫病態の解明と再発抑止を目指したがん免疫治療法の探索(中本、井廻、竹原、考藤、林)

- 肝がんにおける樹状細胞、NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の機能を分子レベルで解析し、自然免疫の動態を包括的に明らかにする。自然免疫機能の障害の分子基盤を解明し、自然免疫を活性化する方策について明らかにする。
- 肝がんにおいて検出される特異的 T 細胞応答を解析し、がん免疫治療の効果の判定に有用な免疫モニタリングシステムを構築する。

C. 研究成果

B 型肝炎のレセプターの同定については、HBV preS1 に対する結合活性を指標に発現ライブラリーのスクリーニングを終了し、9 個の候補遺伝子を抽出した。また、同時に HBV の エントリーを評価するシステムとして pseudotype HBV を構築中である。

HCV からの発がんに関して、HCV コア Tg マウスの解析を行った。HCV コア Tg マウスにおける経時的な遺伝子発現を FD-LC-MS/MS 法を用いたプロテオーム解析により網羅的に検討した。肝脂肪化形成期である 6 カ月齢でアポトーシス関連タンパクの低下、前がん期である 12 カ月齢で呼吸・電子伝達系・抗酸化関連タンパクの増加、肝発がん期である 16 カ月齢で抗酸化・脂質代謝関連酵素の低下がみられた。

また、HCV コアによる肝脂肪化と肝発がんは PA28 γ 欠損バックグラウンドにおいて完全に消失した。PA28 γ 欠損において HCV コアは核に集積しており、病態の形成には HCV コアが分解されることが必要である可能性が示唆された。HCV コア Tg では、脂肪酸合成遺伝子の発現を調節する転写因子 SREBP-1c とその下流遺伝子の発現上昇および SREBP-1c 遺伝子の転写を調節する LXR α /RXR α の活性の上昇がみられるが、PA28 γ 欠損ではこれらが消失した。以上のことから、PA28 γ による HCV コアの分解が C 型肝炎の肝脂肪化、肝発がんの病態形成にきわめて重要であることが明らかとなった。

C 型肝炎患者の新規診断マーカーの開発のために、C 型肝炎患者の血清を用いて分子量 3000 以下に焦点をあわせてプロテオーム解析を行った。肝機能正常者と肝炎において異なるタンパクピークを 10 個同定し、その

なかでC4aフラグメントがALT持続正常者で高いことを見出した。ELISAにて同タンパクを測定することにより、HCV感染に伴い上昇し、疾患の進行に伴い低下するバイオマーカーであることが明らかとなった。

HCV感染および肝がんにおける免疫応答の特徴を明らかにするため、自己反応性T細胞の抑制に関与する制御性T細胞および腫瘍に対する免疫活性の中枢をつかさどるNK細胞の機能を抑制する可溶性MICAについての解析を行った。制御性T細胞は末梢血においてHCV感染に伴って増加し、免疫抑制に寄与していることが示唆された。一方、可溶性MICAは肝疾患の進展に伴い血清中で増加し、可溶性MICAがNK細胞の活性化レセプターNKG2Dの発現を低下させることが示された。肝がんに対して治療介入することにより、可溶性MICAの濃度を下げ、結果としてNKG2Dに基づく免疫病態を改善させることができることが示された。肝がんに対する特異的な免疫応答としてHLA-A24に拘束されるAFPのエピトープを5個同定し、肝がん患者において疾患の進行に伴い、そのCTL頻度が増加することを示した。肝がんに対する樹状細胞を用いた治療として、IFN α やCpGをアジュバントとして用いることが効果的であることを動物実験で示した。

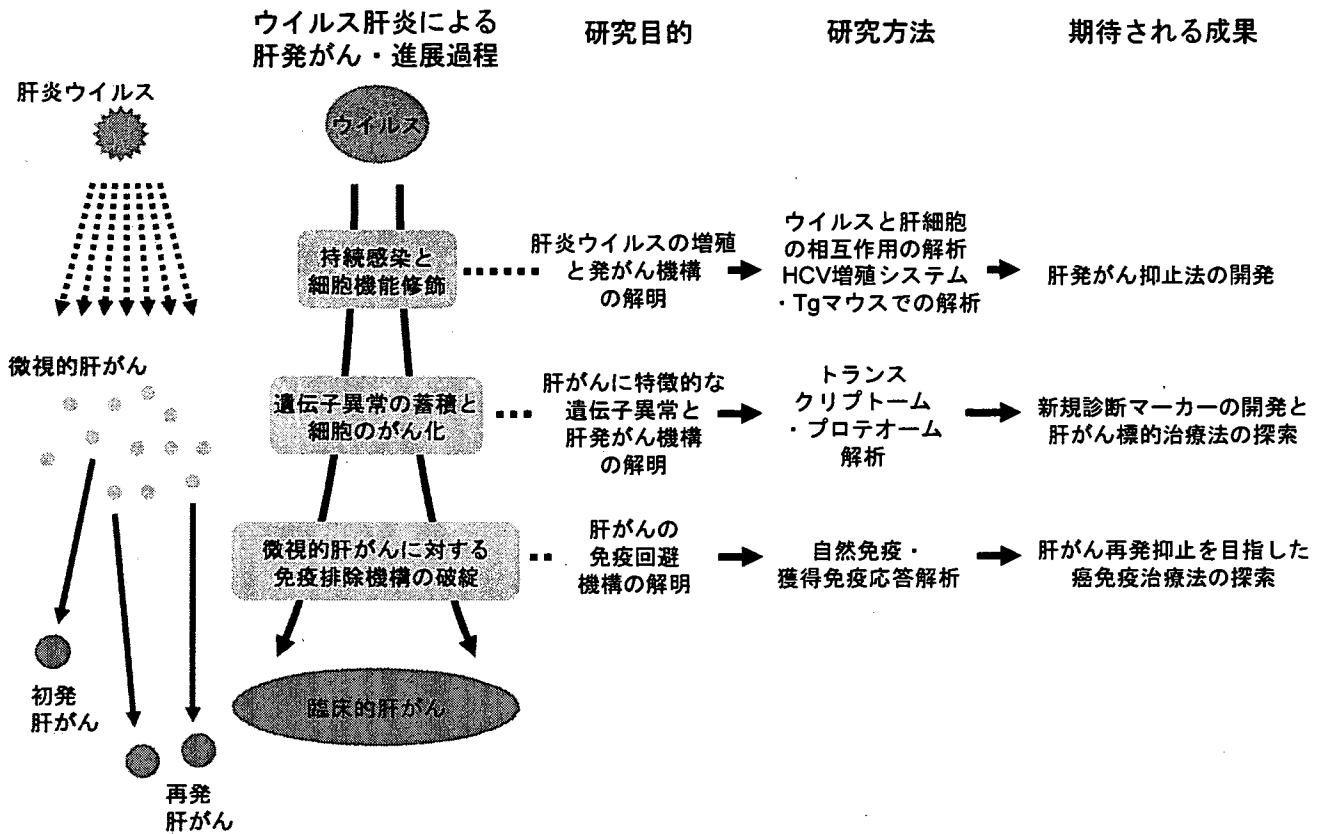
D. 考察と結論

本年度の研究によりHCVコアに基づく発がんに関して、PA28 γ による同分子の分解が関与しており、また肝細胞の脂肪化やそれに関連する分子、アポトーシス制御・抗酸化・電子伝達に関連する分子がその病態に複合的に関与することが解明された。B型肝

炎のレセプターの同定については、研究の進展がみられた。C型肝炎の病態に関連する診断マーカーの候補としてC4aフラグメントをあらたに同定した。C型肝炎・肝がんにおける免疫抑制の機序として可溶性MICAや制御性T細胞の増加があり、とくに前者については治療標的になる可能性が示唆された。肝がんでは特異免疫応答がおこっていることが示され、ワクチン治療の可能性を示すとともに、免疫治療におけるモニタリングシステムにも応用できることが考えられた。また、樹状細胞を用いて肝がん治療を行う際の戦略のひとつを動物モデルで示した。

本年度の研究により、HCVによる発がんの分子機序の一端が解明され、免疫抑制の細胞・分子レベルでの機序の理解が深まった。このような知見を肝発がんの抑制の標的として利用することを目的に次年度以降の研究を展開していく予定である。

ウイルス性肝炎からの肝発がん・進展のメカニズムを解明し
 新規の診断・治療・予防法を探索する
 (研究の目的、方法及び期待される効果の流れ図)



II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCVによる肝脂肪化と肝発がんにおける PA28 γ の役割
分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV コア蛋白質を発現するマウス（CoreTg）は肝脂肪化と肝発がんを発症する。本研究では、HCV コア蛋白質の安定性を調節する宿主因子として我々が同定した PA28 γ の HCV による肝脂肪化と肝発がんにおける役割について解析した。PA28 γ 遺伝子をノックアウトにより CoreTg マウスの肝脂肪化および肝発がんは消失した。脂肪酸合成遺伝子の発現を調節する転写因子 SREBP-1c とその下流遺伝子の発現上昇および SREBP-1c 遺伝子の転写を調節する LXR α /RXR α の活性の上昇がコア蛋白質の発現で個体レベルおよび培養細胞レベル認められ、PA28 γ 遺伝子のノックアウトあるいはノックダウンによってその活性化は著しく軽減された。以上の結果から、PA28 γ は HCV によって誘導される病原性に必須であることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科に属するプラス鎖 RNA ゲノムを持つウイルスである。HCV は主に血液を介して感染し、世界で約 2 億人、国内でも約 200 万人もの感染者が推定されている。HCV は高率に持続感染し、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の肝癌の約 8 割は HCV 感染に起因するものと考えられている。現行のインターフェロン/リバビリンによる抗ウイルス療法は、先進国に多く認められる遺伝子型 1 の HCV 感染者に対しては 50%程度の著効率であり、より有効な治療法の開発が求められている。

およそ半数の C 型肝炎患者に肝脂肪化が認められ、それは B 型肝炎患者など他の肝炎患者より高率である。脂肪滴の蓄積によって、肝脂肪化が認められることから、脂肪滴の主成分である中性脂肪の合成促進がその一因として考えられる。たとえば チンパンジーに HCV を感染させた場合、脂肪酸/中性脂肪の合成を調節する遺伝子

SREBP-1c の転写発現上昇が認められる。キャプシド蛋白質である HCV コア蛋白質をマウス肝臓および培養細胞に発現させると脂肪滴の蓄積が認められ、コア蛋白質が肝脂肪化の原因遺伝子として考えられている。また、HCV コア蛋白質が RXR α の活性化を促進することが知られている。SREBP-1c の転写調節因子は RXR α /LXR α のヘテロダイマーであるが、RXR α /LXR α の転写活性化が HCV コア蛋白質によって変化するかは分かっていなかった。

HCV コア蛋白質はマウス肝臓に肝細胞癌を起こすことから、コア蛋白質は肝脂肪化の原因遺伝子であるとともに肝発がんにも関与している。HCV コア蛋白質の安定性と細胞内局在を規定する宿主蛋白質として PA28 γ を我々は同定していたが、C 型肝炎による病原性との関連性は不明であった。本研究では、コア蛋白質による病原性発現の分子機構解明を目的として、HCV コア蛋白質による病原性発現における PA28 γ の役割を解析した。

B. 研究方法

PA28 γ (-/-) マウスと CoreTg マウスを交配し、PA28 γ (-/-)CoreTg マウスを作製した。HE 組織染色および Oil Red O 染色によって、マウス肝脂肪化を解析した。定量的 RT-PCR によって脂肪酸およびコレステロール合成遺伝子の発現を解析した。SREBP-1c プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結し、レポーターアッセイを行った。また、LXRE 配列をビオチンラベルし、EMSA アッセイを行った。活性酸素による蛋白質修飾は OxyBlot (ケミコン) によって解析した。

(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

PA28 γ 遺伝子のノックアウトによって、コア蛋白質は細胞質から核へ集積した局在を示した。6ヶ月齢のマウスで、CoreTg マウスで肝脂肪化が認められたが、PA28 γ 遺伝子のノックアウトによって、肝脂肪化が著しく軽減された。その時の SREBP-1c および脂肪合成遺伝子の発現は CoreTg マウスで有為の上昇しており、PA28 γ 遺伝子のノックアウトで定常状態に戻った。培養細胞およびマウス肝臓で、RXR α /LXR α の活性化による SREBP-1c の発現上昇が認められ、PA28 γ 遺伝子のノックアウトあるいはノックダウンによって有為に低下した。16ヶ月齢で CoreTg マウスで肝細胞癌が認められた、PA28 γ ノックアウトによって肝細胞癌は認められなくなった。

D. 考察

HCV コア蛋白質の発現によって、肝脂肪化および肝細胞癌が認められるが、PA28 γ のノックアウトによってそれが消失する結果となった。HCV コア蛋白質の細胞内局在が PA28 γ の発現によって左右される事から、病原性発現には HCV コア蛋白質の細胞内局

在が重要かもしれない。また、PA28 γ はコア蛋白質の安定性に関連していることから、コア蛋白質の安定性も、その病原性発現には重要かもしれない。PA28 γ とコア蛋白質が間接的に RXR α /LXR α の活性化を促している事から、その分子機構の解明が今後の課題となるだろう。また、肝臓における活性酸素の上昇は CoreTg マウスで認められるのに対し、PA28 γ ノックアウトによって定常状態に戻ることから、PA28 γ はコア蛋白質による活性酸素上昇にも関与している事が示唆された。

E. 結論

以上の結果から、PA28 γ がコア蛋白質による病原性発現機構に重要な役割を演じている事が示唆された。マウスとヒトの PA28 γ は同一のアミノ酸配列をもち、ノックアウトしたマウスは軽度の体重軽減以外の表現系を示さないことから、新規 C 型肝炎治療法開発の標的遺伝子として期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. PNAS, 2007, 104, 1661-1666.
- 2 Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. J. Virol., 2007, 81, 8953-8966.
- 3 Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda

- Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *J. Virol.*, 2007, 81, 8477-8487.
- 4 Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 2007, 81, 8601-8612.
- 5 Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.*, 2007, 204, 2233-2239.
- 6 Moriishi K., and Matsuura Y. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17, 343-354.
2. 学会発表
- 1 Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
- 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo, Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
- 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
- 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、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: 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日, 2007.
- 7 田鋏修平、岡本 徹、阿部隆之、森嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関与する宿主蛋白質 B-ind1 の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2007.
- 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。

- 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いたC型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
- 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスゲノム複製におけるFKBP8の役割、同上。
- 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
- 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治：E型肝炎ウイルス様粒子の結晶化とX線結晶構造解析、同上。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

新規プロテオミクスを用いた

C 型肝炎における肝細胞内代謝と酸化ストレス発生機構の解析

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部 (病) 教授

研究要旨：我々は、マウスモデルを用いて C 型肝炎ウイルス(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、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。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、オレイン酸などの C18 一価不飽和脂肪酸が増加しており、HCV 感染により脂質代謝異常が引き起こされることが明らかになっている。また、インスリン抵抗性も HCV により惹起されることが示され、HCV による代謝への影響が HCV による病原性発現において重要な役割を果たす可能性が示唆される。今回我々は、HCV コア蛋白発現によって引き起こされる一連の現象に関連した細胞遺伝子発現の変化を、新規プロテオミクスを用いてタンパク質の発現変化を、HCV コア遺伝子トランスジェニックマウス肝で測定することにより検討した。コア蛋白発現初期肝ではアポトーシスに関連するタンパク質の発現量の抑制がみられたが、中期では、呼吸、電子伝達系及び抗酸化に関与するタンパク質の有意な上昇が確認された。さらに、肝癌発症直前では、抗酸化酵素、脂質代謝関連酵素など多くのタンパク質の発現量に減少傾向がみられた。これらのタンパク発現の変化は、本 HCV 関連肝発癌モデルにおける表現型の発現と極めてよく合致しており、C 型肝炎における病態の分子的理解を深め、新規薬剤の開発に資するものと考えられる。

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不明である。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(Tg)において肝細胞を誘発することを確認し、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ってきた。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ってきた。

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(肝癌)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。また、インスリン抵抗性も HCV により惹起されることが示され、HCV による代謝への影響が HCV による病原性発現において重要な役割を果たす可能性が示唆される。

これまで、我々のモデルマウスやヒト C 型肝炎患者において、DNA アレイを用いた細胞遺伝子発現の網羅的解析が行なわれてきた。その結果は、臨床的な観察や動物モデルにおける表現型から推測して、ある程度まではその機序をうまく説明するものと考えられる。しかしながら、一部には説明がつかないパターンが存在し、特に「発現低下」パターンを示す結果が得られた際には解釈が難しい例が多い。それは、細胞遺伝子産物のほとんどはタンパクとして機能するものであり、例えばタンパクの安定性が増してタンパク量が増加し機能が亢進した場合には、逆に発現が抑制されて mRNA 量としては減少するためであると推定される。

タンパク質は発現遺伝子の最終産物であり、その発現量や局在は、疾患の原因や発症のメカニズムの解明に重要な情報を提供するため、高感度で定量的なタンパク質の解析が更に必要性を増している。我々は先に、これまでのプロテオーム解析法とは全

く異なる新しい手法の解析法(FD-LC-MS/MS法)を考案し、基礎的研究を行ってきた。今回、我々は HCV コア蛋白発現によって引き起こされる一連の現象と関連する細胞遺伝子発現の変化を、新規プロテオミクスを用いてタンパク質の発現変化を測定することにより検討した。

B. 方法

今回、FD (Fluorogenic Derivatization)-LC (Liquid Chromatography)-MS (Mass Spectrometry)/MS 法法を用いて、バイオマーカーの探索及び C 型肝炎から肝癌を発症するまでの病態解明を目的に、HCV のコアタンパク質を発現する Tg の肝における、病態及びその進行段階の生理的变化によって影響を受けるタンパク質群のディフレンシャル解析(差異解析)を行った。

FD-LC-MS/MS 法はサンプル中のタンパク質のシステイン残基と選択的に反応するプロテオーム解析用発蛍光試薬(DAABD-Cl)でタンパク質を蛍光標識(Fluorogenic Derivatization: FD)した後、HPLC で分離し、蛍光検出することでタンパク質を定量し、LC-MS/MS を用いてタンパク質を同定する手法である。

また、本研究の対象動物として用いた Tg は、HCV タンパク質そのものが肝発がん活性を有することを証明する上で重要な動物モデルである。このマウスモデルにおいては、2 か月齢でインスリン抵抗性を、3 か月齢で肝脂肪化を、16 か月齢で HCC を発生する。その時間的経過より、6 月齢を C

型肝炎初期、12 月齢を中期及び、16 月齢を HCC 発症直前モデルとし、各々 3 匹ずつを解析し、HCV コア蛋白発現から HCC を発症するまでの細胞遺伝子タンパク質の変動を解析した。

C. 結果

(1) 3 つの異なった月齢について、それぞれ 3 匹ずつのマウスを用いて包括的なタンパク発現を検討した。各月齢 3 匹のマウス間におけるバラツキが少なく、同月齢の対照マウスと比較して、共通して現象あるいは増加しているタンパクが、全体では 106 個見いだされた。

(2) 6 か月齢 (初期) のマウスにおいては、増加しているタンパクが 19 種類、減少しているタンパクが 9 種類と、増加しているタンパクが多数であった。主なものとしては、Major urinary protein (MUP)、Eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (EF-1 α 1) の減少が認められた。これらは negative tumor marker あるいは apoptosis を亢進するタンパクであり、これらのタンパクの減少は細胞増殖を増加する方向へ働く。6 か月齢において増加していたタンパクとしては、Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD)、Glycine *N*-methyltransferase、Glutathione S-transferase などの抗酸化系タンパク、Fatty acid-binding protein、Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme) などの脂質関連タンパクが挙げられる。

(3) 12 か月齢では減少していたタンパク

が 11 種類であったのに比し、増加していたものが 65 種類と、更に発現増加しているタンパクが増えていた。減少しているものとしては、6 か月齢では増加していた抗酸化系である Glycine *N*-methyltransferase。増加しているものとしては、R-Fetoprotein (肝癌 マーカー)、ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit、ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d などのミトコンドリア電子伝達系タンパク、5 種類の SOD、Thioredoxin、Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) などの抗酸化系のタンパクが認められた。また、酸化ストレス賛成と関連し代謝酵素として Cystatin B、Carbonic anhydrase 3、Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)、Aldh2 protein Malate dehydrogenase の増加も認められた。

(4) 16 か月齢となると、これまでとは異なり、蔵していたのは 4 種類のみであり、代わりに 39 種類のタンパクの減少が認められた。特筆すべきこととして、12 か月齢までは増加していた抗酸化系のタンパクが軒並み減少していた点が挙げられる。SOD、Manganese superoxide dismutase、Thioredoxin 1、Glutathione peroxidase (GSHPx-1) (Cellular glutathione peroxidase)、Glycine *N*-methyltransferase、Glutathione S-transferase, mu 1、BHMT、Glutathione S-transferase, α 3、Chain B、Glutathione S-Transferase などである。す

なわち、これまでは酸化ストレスの増加に対抗して活性化されていた抗酸化系が、16 か月齢という肝癌期に入り減弱して、酸化ストレスをうまく処理できない状況となっていると考えられる。

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。この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。

今回の我々の検討によって、6 か月齢、12 か月齢、16 か月齢において、それぞれ増加あるいは減少するタンパクが経時的に変化している事が示された。これが転写 (mRNA) レベルではなく、タンパクレベルで確認されたことが、今回の研究における重要なポイントである。

6 か月齢のコア遺伝子トランスジェニックマウス肝ではアポトーシスに関連するタンパクが有意に低下しており、12 か月齢では呼吸、電子伝達系、抗酸化に関連するタンパクが有意に増加していた。更に、肝発癌期である 16 か月齢においては、抗酸化系、脂質代謝関連酵素などのタンパクが有意に減少していた。

これらのプロテオミクスによる検討結果は、これまでにこのマウスモデルを用いて

検討してきた組織学的、生化学的な表現型とよく合致、あるいはよく説明するものである。本システムを用いる事で HCV 感染が正常肝細胞にどのような変化、特に代謝性の変化をもたらす、肝疾患の進展、肝癌の発生につながって行くのかを明らかにできる可能性があり、新薬の開発においても、本システムは有力な手段となる可能性があるといえる。

E. 結論

C 型肝炎発症初期ではアポトーシスに関連するタンパク質の発現量の抑制がみられたが、中期では、呼吸、電子伝達系及び抗酸化に関与するタンパク質の有意な上昇が確認された。さらに、HCC 発症直前では、抗酸化酵素、脂質代謝関連酵素など多くのタンパク質の発現量に減少傾向がみられた。今回用いた新規プロテオミクスによる C 型肝炎の病態解析は、肝線維化、肝発癌を防ぐ手だてを開発する上で重要な知見をもたらした。今後の検討において極めて有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. **Hepato Res** 2007;37:2-5.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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;13:964-969.
 - 5) Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. **J Gastroenterol** 2007;42:329-335.
 - 6) Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. **J Gastroenterol Hepatol** 2007;22:S108-111.
 - 7) Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. **Hepato Res** 2007;37:S38-S43.
 - 8) Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in S region of hepatitis B virus in the sera from patients with acute hepatitis. **Hepato Res** 2007;37:731-739.
 - 9) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. A novel proteomics method revealed disease-related proteins in the liver of hepatitis C mouse model. **J Proteome Res** 2007;6:2841-2849.
 - 10) Okuse C, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C as a Systemic Disease: Virus and Host Immunologic Responses Underlie Hepatic and Extrahepatic Manifestations. **J Gastroenterol** 2007;42:857-865.
 - 11) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Impact of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage postoperatively after living donor liver transplantation. **Transplant Proc** 2007;39:3271-3275.
 - 12) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. **Int J Cancer** 2008;122:124-131.

- 13) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. **Hep Res** 2008;38:310-314.
- 14) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. **J Clin Invest** 2008 118:683-694.
- 15) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. **Hepatol Res** 2008;38:252-258.
- 16) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living-donor liver transplantation in adults. **Transpl Infect Dis** 2008 in press.
- 17) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. **J Gastroenterol Hepatol** 2008 in press.
- 18) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. **Hepatol Res** 2008 in press.
- 19) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2008 in press.

2. 学会発表

- 1) Koike K. Oxidative stress and iron in HCV-associated hepatocarcinogenesis. **BioIron** 2007. 2nd Congress of the International BioIron Society, Kyoto 2007.
- 2) K Moriya, H Miyoshi, S Shinzawa T Tsutsumi, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Suzuki, T Miyamura, Y. Matsuura, K Koike. FK506 ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress in hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, Barcelona, 2007.
- 3) K Moriya, H Miyoshi, S Shinzawa T Tsutsumi, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Suzuki, T Miyamura, Y. Matsuura, K Koike. Amelioration of Metabolic Disturbances and Oxidative Stress in Hepatitis C Viral Infection by FK506 (Tacrolimus). **HepDart**, Maui, 2007.
- 4) Koike K. Molecular Basis for Synergy between HCV Infection and Alcohol in Hepatocarcinogenesis. 2nd International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis (ALPD), Kobe, 2007.
- 5) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H,

Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Iino S, Koike K. Nucleoside and amino acid sequences determining the fate of persistent hepatitis B virus infection with seroconversion to anti-HBe antibody. Asian Pacific Digestive Week (APDW), Kobe, 2007.

- 6) Takeya Tsutsumi, Mami Matsuda, Kyoji Moriya, Hideyuki Miyoshi, Hajime Fujie, Yoshizumi Shintani, Hiroshi Yotsuyanagi, Tetsuro Suzuki, Tatsuo Miyamura, Kazuhiko Koike. Proteomics Analysis Reveals Overexpression of Prohibitin in Cultured Cell and Mouse Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. International Liver Cancer Association, 1st annual Meeting, Barcelona, 2007.
- 7) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in HCV Infection. Hepatic Inflammation and Immunity 2008, Galveston, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし