

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

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・  
治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 周一

平成20(2008)年 3月

## ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

### 研究組織

<u>主任研究者</u>		
金子 周一	金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学	教授
<u>分担研究者</u>		
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
坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患生活習慣病学	教授
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座	講師
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学	准教授
花田 賢太郎	国立感染症研究所細胞化学部	部長
菅 裕明	東京大学先端科学技術研究センター	教授
堀本 勝久	産業技術総合研究所生命情報工学研究センター	研究チーム長

# 目 次

## I. 総括研究報告

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

金子 周一 ----- 1

## II. 分担研究報告

1. C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

竹原 徹郎 ----- 5

2. ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発

坪内 博仁 ----- 8

3. 末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

前川 伸哉 ----- 11

4. B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析

田中 靖人 ----- 14

5. 脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究

花田 賢太郎 ----- 17

6. ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究

菅 裕明 ----- 19

7. 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究 堀本 勝久	-----21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----29

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書(平成 19 年度)

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

主任研究者：金子周一 金沢大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨：**

ウイルス性肝炎における包括的転写産物および蛋白解析、包括的脂質解析、包括的薬物探索、統計的ジェノミクス解析を実施した。研究の技術的要素は、1) トランスクリプトーム（翻訳）研究、2) プロテオームおよびリポドーム研究、3) ジェノミクス情報処理の研究に分類され、解析対象は治療前後のウイルス肝炎肝組織（肝細胞）、キメラマウス肝臓、肝細胞がん、血液、および免疫系を用いた。

金子は、IFN + Rib療法に対する抵抗性の要因を明らかにするため、治療開始前の肝生検組織と治療中に得られた肝生検組織の網羅的遺伝子発現解析を実施した。早期にHCV-RNAが陰性化するセロタイプI型IFN反応群(10例)では24週でもHCV-RNAが陰性化しないセロタイプI型IFN不応群(13例)に比し肝組織内IFN誘導遺伝子の発現誘導が顕著であることを明らかにした。竹原は、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に解析した。抗phospho-STAT(pSTAT)抗体にて細胞内染色しフローサイトメトリーによって定量化する系を確立することによって、pSTATの発現量により示されるIFN反応性の程度と、その下流にある遺伝子発現の程度との関係を、免疫細胞サブセット間および個体間で検討することを可能とした。坪内は、プロテオミクスを用いて、肝炎進展に関連する肝細胞酸化ストレスのバイオマーカーを網羅的に探索し、新しい肝細胞酸化ストレスマーカーを見出した。前川は、宿主因子、あるいはウイルス因子の一方のみではなく、双方の情報を統合することによって真に有用な臨床マーカーの同定を試みた。田中は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染キメラマウスの肝病態を解析した。花田は、HCVの産生及び病原性発現に関与する宿主脂質関連因子を探索するために、HCVコアタンパク質に注目した。宿主脂質ラフト（界面活性剤不溶性画分）蛋白質の網羅的解析を培養肝細胞系を用い、vimentinはコアタンパク質の制御を介してHCV産生にも影響を与えることが明らかとした。菅は、独自に開発した特殊ペプチド合成法（RaPIDシステム）を用いて、標的に対する阻害剤を探索するため、ライブラリー合成に向けた技術基盤の確立をおこなった。堀本は、グラフィカルモデルに基づく統計的なネットワーク解析手法を肝がん細胞において計測されたデータについて適用し、肝がん特異的関連ネットワーク及び進展過程におけるネットワーク変化の同定することで、疾患機序の解明のための実験支援を行った。

**A. 研究目的**

ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きい。しかるにその治療効果は限られており、個々の患者に適した治療法を選択することはむずかしい。そこで本研究は、最新の科学技術を用い、1) 最適の治療法を選択するための分子指標を用いた診断法の開発、2) 治療効果の正確な予測を行うための分子を用いた診断法の開発、3) 分子を用いた新

たな治療法の研究開発を行うことを目的とした。

各分担研究者毎の目的を以下に記載した。

金子は、IFN + Rib療法に対する抵抗性の要因を、治療開始前の肝生検組織と治療中に得られた肝生検組織の網羅的遺伝子発現解析から明らかにすることを目的とした。竹原は、C型肝炎ウイルス感染による慢性化の成立機序および抗ウイルス治療に対する抵抗性のメカニズムを解明することを目的とした。坪内は、



この系により、サブセット毎におけるシグナルの程度が検出可能となり、その誘導パターンや程度にサブセット間で違いがあることが明らかになった。個体間での相違も検出可能であり、患者間および患者群と健康者群との比較が可能となった。伝達されるシグナルだけでなく、シグナル下流にある IFN 誘導遺伝子の発現を、細胞内 STAT1 の発現量としてサブセット毎に検出可能となった(竹原)。

過酸化水素処理群で発現が増加するペアピークを 44 個見出した。ペアピークのうち、1705-1711m/z、1783-1789m/z、1902-1908 m/z、及び 2790-2796 m/z の計 4 種のペアピークについて MS/MS イオンサーチ法により同定した。2790-2796 m/z は superoxide dismutase [Mn] mitochondrial precursor (以下、MnSOD)であった。その他のペアピークは薬物代謝、アンモニア代謝あるいはエネルギー変換に関連したタンパク質であった(坪内)。

2種類の HCV レプリコン(HCV-N レプリコン、HC-J4 レプリコン)から各々の NS3 蛋白を発現させるプラスミドを作成し、阻害活性について調べ、増殖の弱いレプリコンはシグナル阻害活性も弱いことを明らかにした。74 症例の治療開始前に採取した末梢リンパ球からの解析において、無効例では ISG15、USP18 の末梢リンパ球での発現が有意に亢進しており、一方 RIG-I/IPS-1 比は逆に、無効例で低下していた。自然免疫系分子の発現と治療反応性の関連が明らかとなった(前川)。

HBV/G は単独では複製効率が悪く、他の genotype、特に HBV/Ae と共感染することで効率的な複製が可能となった。HBV/A2 と B1\_wild は肝障害性が低かったものの、それ以外のクローン群では星細胞が活性化しており、肝線維化が進行(stage F1-2)していた。さらに、線維化進行群では ground glass appearance がみられ HBV 抗原の細胞内への蓄積が見られ、強い肝障害が見られた(田中)。

Uc39-6 細胞 (コアタンパク質発現細胞) において vimentin の顕著な減少、ケラチン 19 の増加を見いだした。vimentin 量の減少は Uc39-2、Hep39 など複数のコア蛋白発現細胞系でも再現された。vimentin 発現抑制細胞ではプロテアソーム依存的なコアタンパク質の分解が強く阻害されていることが明らかとなった。vimentin 発現量を siRNA により抑制すると、ウイルス産生量が上昇し、ベクターにより vimentin を過剰発現した細胞ではウイルス産生量が低下していることが明らかとなった(花田)。

特色を持った環状化特殊ペプチドの合成法を 3 手法開発した。そのうちの 1 つの手法に関しては、GPCR ファミリーのウロテンシンレセプターに結合するウロテンシン II の特殊ペプチド化に応用し、活性を保持しながらプロテアーゼ耐性を植え付けることに成功した(菅)。

遺伝子発現計測データと文献情報に基づく既知ネットワーク構造との整合性を見積もる方法をグラフィカルモデルに基づいて開発した(堀本)。

#### D. 考察

今後、IFN 誘導遺伝子の発現誘導を規定する因子の同定を LCM を用いた解析により明らかにする必要があると考えられた。IFN 誘導遺伝子の発現を、今回定量可能となった STAT1 も含めて網羅的に解析することにより、治療効果の予測が可能となることが期待される。

同定した MnSOD は酸化ストレスにより誘導されることが知られており、酸化ストレスマーカーの一つとされており、本法が酸化ストレスなどのバイオマーカー探索に有用であることを示している。また、これらは簡便に測定できるバイオマーカーとして非常に有用である可能性がある。

末梢血リンパ球における自然免疫分子の発現は、治療効果予測の重要な指標と考えられた。HCV ゲノム情報をここに加えることにより、さらなる詳細な予測が可能とな



ることが推定され、今後さらなる解析を行ってゆく予定である。

ヒト肝臓を用いた肝炎ウイルス病態モデルを新規に樹立した。これをさらに解析することで、肝癌などの肝病態進展に寄与する新たな病因や診断マーカーを探る手立てとなりうる。

vimentin、vimentin-コアタンパク質相互作用部位が抗 HCV 薬の標的となりうることを示唆された。HCV 感染系を用いた検討から vimentin はコアタンパク質量の制御を介して HCV 産生に影響を与えることが明らかとなった。

ライブラリー合成の迅速性であり、そのパイロットして320種類の特殊ペプチド合成を既に検討し、準備期間も含め1週間という短期間で達成できた。平成20年度は、より高い多様性をもったライブラリー構築を行い、ウィルス性肝炎および肝癌の新規標的もしくは疾患関連因子に対する薬剤開発に移行したい。

特異的な条件下で計測されたデータを用いて活性化ネットワークを推定する手法を、疾患細胞について計測されたデータに適用することで、疾患特異的な活性化ネットワークの同定が可能であることを示唆する。計測データに関して整合性を見積もる既知ネットワークデータの整備を広く行い、漏れのない評価を実施することが肝要である。

## E. 結論

- 1) C 型慢性肝炎患者の肝組織を用いて、遺伝子の変動を解析し、多数の遺伝子がウイルス感染および治療と関連して変動することを示した。
- 2) C 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療抵抗性を測定するため、抗 phospho-STAT 抗体を用いてインターフェロンシグナル伝達の程度を定量化する系を確立した。
- 3) ウィルス性慢性患者における蛋白を用いた血液診断法を開発した。

- 4) C 型肝炎ウイルス蛋白、および C 型慢性肝炎ウイルスの複製を制御する脂質を明らかにした。
- 5) キメラマウスを用いて B 型肝炎ウイルスの複製および細胞障害を解析した。
- 6) C 型肝炎ウイルス感染で発現が変動する脂質代謝系遺伝子を解析し、ウイルス複製に関連する脂質を解析する系を作製した。
- 7) 特殊ペプチド合成法(RaPID)を用いた標的阻害薬の探索法を確立した。
- 8) graphical Gaussian model を用いて肝癌において変動しているネットワークを解析した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

## II. 分担研究報告

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）  
分担研究報告書

C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

分担研究者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス感染による慢性化の成立機序および抗ウイルス治療に対する抵抗性のメカニズムの解明には、宿主側の因子として、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。今回我々は、免疫細胞内における IFN- $\alpha$ により伝達されるシグナルの程度を、抗 phospho-STAT(pSTAT)抗体にて細胞内染色しフローサイトメトリーによって定量化する系を確立した。この系を用いることにより、免疫細胞のある集団、すなわち T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞（さらに CD56 bright NK 細胞、CD56 dim NK 細胞）といったサブセット毎におけるシグナルの程度が検出可能となった。pSTAT1/pSTAT4 の発現量において、その誘導パターンや程度に、免疫細胞サブセット間および個体間で違いがあることが明らかとなった。培養系での IFN 刺激によるシグナルだけでなく、治療として投与された IFN の生体内でのシグナルの程度も定量でき、この両者に有意な相関関係を認めたことから、IFN の反応性が治療前に予測可能となることが示唆された。IFN によって誘導されるタンパク質として細胞内 STAT1 の発現も定量できたことから、pSTAT の発現量により示される IFN 反応性の程度と、その下流にある遺伝子発現の程度との関係を、免疫細胞サブセット間および個体間で検討することが可能となった。患者間での相違と治療効果との関連をみることにより、今回の系を用いた治療効果予測の可能性が期待される。

共同研究者

林 紀夫 大阪大学消化器内科学 教授

宮城琢也 大阪大学消化器内科学 医員

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス感染による慢性化の成立機序および抗ウイルス治療に対する抵抗性のメカニズムの解明には、宿主側の因子

として、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。本研究においては、免疫細胞、特に NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞といったエフェクター細胞における IFN- $\alpha$ により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析することとした。

## B. 研究方法

PEG-IFN- $\alpha$  2b/Ribavirin による治療を受ける C 型肝炎患者 (genotype 1, high viral titer) を対象とした。治療開始前、治療開始後 1 日、4 週、12 週、24 週、48 週 (治療終了時)、治療終了後 24 週の時点で末梢血単核球を単離した。治療開始前の時点では、対照として健常者由来の末梢血単核球を用いた。細胞表面マーカーとして CD56、CD3 により免疫細胞をサブセット毎に区別し、IFN- $\alpha$  によって伝達される細胞内シグナルを phospho-STAT1 (pSTAT1)、pSTAT4 の発現量で、IFN- $\alpha$  により誘導される遺伝子発現の程度を STAT1 の発現量で、FACS 解析にて評価した。

## C. 研究成果

IFN- $\alpha$  により伝達されるシグナルの程度を、細胞内 pSTAT1/pSTAT4 の発現量として FACS 解析で定量できる系が確立された。この系により、免疫細胞全体としてだけでなく、ある集団、すなわち T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞 (さらに CD56 dim NK 細胞、CD56 bright NK 細胞) といったサブセット毎におけるシグナルの程度が検出可能となり、その誘導パターンや程度にサブセット間で違いがあることが明らかになった。また、サブセット間での相違だけでなく、個体間での相違も検出可能であり、患者間および患者群と健常者群との比較が可能となった。

培養系での IFN- $\alpha$  刺激によるシグナルだけでなく、治療として投与された IFN- $\alpha$  の生体内でのシグナルも定量可能であった。治療前の時点における培養系での刺激で誘導されたシグナルの程度と、治療後 1 日の

時点で生体内に誘導されたシグナルの程度との間に、有意な相関関係を認めた。

さらに、伝達されるシグナルだけでなく、シグナル下流にある IFN 誘導遺伝子の発現を、細胞内 STAT1 の発現量としてサブセット毎に検出可能となった。

## D. 考察と結論

治療前の時点における培養系での IFN- $\alpha$  刺激で誘導されるシグナルの程度と、治療後 1 日の時点での生体内で誘導されたシグナルの程度との間に、有意な相関関係を認めたことより、治療によって誘導されるシグナルの程度が治療前に予測可能となることが示唆された。

IFN 誘導遺伝子の発現を、今回定量可能となった STAT1 も含めて網羅的に解析することにより、phospho-STAT の発現量により示される IFN 反応性の程度と、その下流にある遺伝子発現の程度との関連を、免疫細胞サブセット間および個体間で検討していく予定である。

今回確立した系を用いて、患者間での相違と治療効果との関連をみることによって、治療効果の予測が可能となることが期待される。

## E. 研究発表

### 論文発表

1. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, Kanto T, Ohkawa K, Hayashi N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4+ CD25+ T cells with

- PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 120: 73-82, 2007.
2. Sakamori R, Takehara T, Ohnishi C, Tatsumi T, Ohkawa K, Takeda K, Akira S, Hayashi N. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46: 1564-1573, 2007.
  3. Hiramatsu N, Kurashige N, Oze T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Kawata S, Tsubocuhi H, Kumada H, Okanoue T, Kakumu S, Hayashi N. Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 52-59, 2008.
- Hijioka T, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Minami Y, Ohkawa K, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Tamura S, Hayashi N.
- #309 Impact of reducing peginterferon alfa-2b and ribavirin on early viral response in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. Oze T, Hiramatsu N, Inoue Y, Kurashige N, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Imanaka K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Katayama K, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Nishikawa M, Minami Y, Tatsumi T, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Tamura S, Hayashi N.
  - #1222 Hepatic STAT3 attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. Sakamori R, Takehara T, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Yamaguchi S, Tatsumi T, Ohkawa K, Hayashi N.

学会発表

**The American Association for the Study of Liver Diseases**

**58th Annual Meeting AASLD**

November 2-6, 2007, Boston

- #308 High predictive value of early viral kinetics in peginterferon plus ribavirin combination therapy of genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. Oze T, Hiramatsu N, Inoue Y, Kurashige N, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Imanaka K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T,

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発

分担研究者 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

研究要旨: プロテオミクスを用いて、肝炎進展に関連する肝細胞酸化ストレスのバイオマーカーを網羅的に探索した。NBS試薬およびMALDI TOF/MSシステムを用いて、分子量約3000以下の領域に着目した。過酸化水素処理ヒト初代培養肝細胞から抽出したタンパク質を比較したところ、肝細胞中のタンパク質発現パターンが無処理肝細胞と異なっており、有意差のあるタンパク質ピークを44個検出し、4つのタンパク質は同定した。このうち酸化ストレスにより発現が亢進する一つのピークタンパク質は酸化ストレスマーカーとして広く知られているMnSODであった。他の3つは薬物代謝、アンモニア代謝あるいはエネルギー変換に関連したタンパク質で、酸化ストレスとの関連は十分明らかになっていないタンパク質であった。以上のことから、NBS試薬を用いた酸化ストレスマーカー探索は、新しい肝細胞酸化ストレスマーカーを見出し、肝疾患の病態進展に関連する分子を同定できる可能性があると思われた。

#### A. 研究目的

C型慢性肝炎の病態進展には、酸化ストレスが大きく関与し、その酸化ストレスはC型肝炎ウイルスなどにより誘導されることが知られている。しかし、このような酸化ストレスを反映する血清マーカーはほとんど無い。近年、新規の疾患バイオマーカーを網羅的に探索するために、プロテインチップシステムなどを用いたプロテオーム解析法が行われるようになってきている。本研究では新規の安定同位体標識法である $[^{13}\text{C}]$ -nitrobenzenesulfenyl chloride (NBS) 安定同位体標識法 (NBS標識法) を用いて、肝細胞の酸化ストレスマーカーの探索を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) 細胞培養

高密度の初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素 (終濃度  $200 \mu\text{M}$ ) あるいはPBSを添加し、24時間培養後に1% CHAPS 含有 50 mM リン酸緩衝液を用いて細胞質タンパク質を抽出した。

##### 2) NBS ラベル化ペプチドの精製とペアピークの同定

抽出した細胞層タンパク質 (PBS 処理群と過酸化水素処理群) を  $[^{12}\text{C}]$ -NBS と  $[^{13}\text{C}]$ -NBS でそれぞれ標識し、還元・アルキル化した後にトリプシン消化した。フェニルカラムで精製したNBS標識ペプチドを試料としてMALDI-TOF/MS解析を行った。6 Da 差のペアピークの同定はMS/MSイオンサーチ法にて行った。

また、同定したタンパク質の発現をWestern blot法で確認した。

#### C. 研究結果

1) 酸化ストレスを負荷するために、初代培養ヒト肝細胞の培養上清中に過酸化水素を添加した。過酸化水素  $200 \mu\text{M}$ 、24時間の処理では、培養中の肝細胞に顕著な変化は見られなかった。MALDI-TOF/MS解析では1000から3000 m/zの範囲で73個の6 Da差のあるペアピークを検出した。またこれらのペアピークのうち、過酸化水素処理群で発現が増加するペアピークを44個見出した。

2) 過酸化水素処理により発現上昇する44個のペアピークのうち、1705-1711 m/z、1783-1789 m/z、1902-1908 m/z、及び2790-2796 m/zの計4種のペアピークについてMS/MSイオンサーチ法により同定した。 $[^{12}\text{C}]$ -NBS と  $[^{13}\text{C}]$ -NBS のピーク強度比で表される相対発現比はそれぞれ1.724、1.478、1.618、及び2.485で、上記4種のペアピークのうち、2790-2796 m/z は superoxide dismutase [Mn] mitochondrial precursor (以下、MnSOD) であった。その他のペアピークは薬物代謝、アンモニア代謝あるいはエネルギー変換に関連したタンパク質であった。

3) Western blot法により同定した2種類のタンパク質 (MnSODを含む) の過酸化水素処理による発現増加を確認した。

#### D. 考察

種々の疾患のバイオマーカー探索にプロテオーム解析が重要な手段となっており、プロテインチップシステムなどを用いたディファレンシャル解析においては、比較サンプルを標識後に混合し、同じスポット上で解析する手法が行われるようになってきている。今回用いた NBS 標識法は新しいタンパク標識法であるが、MALDI TOF/MS を用いた解析で再現性よく同じタンパク質を6Daの差で検出できた。

今回の検討では、肝細胞の酸化ストレスマーカーの探索を行い、酸化ストレスで上昇する 44 個のペアピークを検出し、さらに 4 種類のマーカー候補を同定した。同定した 4 つのタンパク質のうち MnSOD はミトコンドリアに局在し、電子伝達系で近傍の酸素が電子を捕獲した際に生じるスーパーオキシドを捕獲する酵素である。MnSOD は酸化ストレスにより誘導されることが知られており、酸化ストレスマーカーの一つとされている。今回、NBS 標識法で既知のマーカーである MnSOD を同定できたことは、本法が酸化ストレスなどのバイオマーカー探索に有用であることを示している。また、MnSOD の他に、2つのペアピークから同定されたタンパク質はいずれもミトコンドリア由来のタンパク質であることが知られており、酸化ストレスによるミトコンドリア障害の指標になる可能性がある。さらに 2 つのタンパク質は細胞内だけでなく、細胞外へ分泌され血中でも検出できることが知られており、これらは簡便に測定できるバイオマーカーとして非常に有用である可能性がある。

#### E. 結論

新規タンパク質標識法である NBS 標識法を用いて、4 種類の肝細胞酸化ストレスマーカー候補を同定した。その中の一つは MnSOD であり、他の 3 種類はミトコンドリア障害の指標になると思われるもの、血中に分泌され疾患バイオマーカーになる可能性があるものであった。本法で同定したバイオマーカーの有用性を臨床検体で検証していくことで、酸化ストレスを基盤とする C 型慢性肝炎の新しい病態把握法を確立できる可能性がある。

#### F. 研究発表

##### ・論文発表

1. Matsumoto Y, Motoki T, et al. Inhibition of tumor-stromal interaction through HGF/Met signaling by valproic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:110-69.
2. Sakiyama T, Fujita H, Tsubouchi H. Autoantibodies against ubiquitination factor E4A (UBE4A) are associated with severity of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 (In press).
3. Uto H, Kurogi J, et al. Alanine aminotransferase

flare-up in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol.* 2007; 42: 673-680.

4. Kanmura S, Uto H, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology.* 2007; 45: 948-956.
5. Abe H, Uto H, et al. Transgenic expression of osteoactivin in the liver attenuates hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356: 610-615.

##### ・学会/研究会発表

1. 重信秀峰、宇都浩文、他:HCV 抗体陽性者のインスリン抵抗性に関連する因子の検討. 第 104 回日本内科学会総会・講演会(2007年4月)
2. 小原一憲、宇都浩文、他:C型型肝炎ウイルス感染者における ENPPI 遺伝子 K121Q-塩基多型の意義. 第 93 回日本消化器病学会総会(2007年4月)
3. 熊谷公太郎、宇都浩文、他:ALT 持続正常者におけるチオレドキシニン濃度. 第 43 回日本肝臓学会総会(2007年5月)
4. 安倍弘生、蓮池悟、他:コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットの肝線維化に対してオステオアクチビン強発現が及ぼす影響の解析. 第 43 回日本肝臓学会総会(2007年5月)
5. 柴藤俊彦、迫勝巳、他:肝細胞癌合併非アルコール性脂肪性肝炎および C 型慢性肝炎患者の肝組織における P62 発現の比較検討. 第 43 回日本肝臓学会総会(2007年5月)
6. 王宇清、堀内正久、他:低蛋白質・高脂肪食および低蛋白質・高フルクトース食によるマウス脂肪肝モデルにおける肝障害感受性の検討. 第 43 回日本肝臓学会総会(2007年5月)
7. 森内昭博、井戸章雄、他:網羅的遺伝子発現解析を用いた HGF の抗アポトーシス機構の解明. 第 43 回日本肝臓学会総会(2007年5月)東京
8. 立野太郎、上野真一、他:HCC 初回治療 1771 例に基づく 10 年生存症例の検討. 第 43 回日本肝癌研究会(2007年6月)
9. 高見陽一郎、宇都浩文、他:オステオアクチビンの肝線維化抑制作用機序の解析. 第 14 回肝細胞研究会(2007年6月)
10. 高濱由香、宇都浩文、他:ヒト初代培養間細胞の遺伝子発現に及ぼすリバビリンとインターフェロンの影響. 第 14 回肝細胞研究会(2007年6月)
11. 赤松絵奈、森永浩通、他:ブルーベリーの葉は C 型肝炎ウイルスのレプリコン RNA 複製を抑制

- する. 第 14 回肝細胞研究会(2007 年 6 月)
12. 大西智和、柿元協子、他:メタボリックシンドロームに伴う非アルコール性脂肪性肝疾患における Th1 ケモカインの発現. 第 14 回肝細胞研究会(2007 年 6 月)
  13. 王宇清、堀内正久、他:異なる食餌による 2 種類の脂肪肝マウスモデルにおける薬物性肝障害感受性の検討. 第 14 回肝細胞研究会(2007 年 6 月)
  14. 宇都浩文、岡上武、坪内博仁:プロテオミクスを用いた NASH の新しい診断マーカー探索の試み. 第 11 回肝臓学会大会(2007 年 10 月)
  15. 上村修司、宇都浩文、他:肝細胞癌のバイオマーカーとして同定した血清中 Complement Component 3a(C3a) fragment の臨床的意義. 第 9 回九州肝癌研究会学術講演会(2007 年 10 月)
  16. 佐々木文郷、宇都浩文、他:肝細胞癌のバイオマーカーとして同定した血清中 Complement Component 3a(C3a)fragment の臨床的意義. 第 37 回日本肝臓学会西部会(2007 年 12 月)
  17. 桶谷真、桶谷薫、他:人間ドック受診者における性別からみた脂肪肝の背景. 第 37 回日本肝臓学会西部会(2007 年 12 月)
  18. Wang Y, Oketani M, et al: Differential acetaminophen-induced hepatotoxicity between two types of dietary steatosis of the liver in mice. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD)(2007.9)
  19. Uto H, Sato Y, et al:Proteomic analysis of serum biomarkers in patients with nonalcoholic steatohepatitis using SEDI-TOF/MS or MALDI-TOF/MS. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD) (2007.9)
- G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)なし。



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）  
分担研究報告書

末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

主任研究者： 前川 伸哉

山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：ウイルス性肝炎における病態、あるいは治療効果は、宿主因子とウイルス因子の両因子によって規定される。宿主因子において、近年理解が進歩し、病像との関連が予測されるものに宿主の自然免疫、あるいは脂質代謝システムなどがあげられる。一方、ウイルス因子においても、ウイルスのゲノム多型と病像が関連することが次第に明らかとされつつある。一方、従来これらの知見は *in vitro* の観察にとどまっております、実際の臨床の場において十分に応用されるには至っていない。本研究では、これら研究の進展を背景に、宿主因子、あるいはウイルス因子の一方のみではなく、双方の情報を統合することによって、真に有用な臨床マーカーを同定することを目指してゆく。すなわち、臨床情報が明らかな症例における末梢血ジェノミクスの包括的解析（宿主因子）、これに対応するウイルス全ゲノム解析（ウイルス因子）を行い、臨床情報、宿主、ウイルス因子の情報を統合させて、ウイルス肝炎における詳細、かつ正確な病態と治療効果予測を可能にしてゆく。

A. 研究目的

ウイルス性慢性肝炎においては、近年の進歩によって、治療が奏功する症例は着実に増加している。しかしながら、例えば C 型慢性肝炎においては、未だ最新の治療であるペグインターフェロンとリバビリンの併用療法によっても、約半数の症例では無効となっており、症例毎に治療効果、あるいは病像を正確に予測できるマーカーの開発が急務となっている。

近年、C 型肝炎ウイルス（HCV）レプリコン・システムなど培養細胞系を用いた系、

あるいはトランスジェニックマウスを用いた研究等により、HCV 増殖を制御する因子として様々なものが明らかにされてきた。このなかでも特に、自然免疫系分子、あるいは脂質代謝関連分子などがウイルス増殖、あるいは肝炎の病態形成に重要な役割を担うことが解明されつつある。一方、変異に富む HCV ゲノムにおける多型によって、病態、あるいは抗ウイルス治療の反応性に違いが生ずることも、次第に明らかになりつつある。

本研究では、これらの知見を背景に、宿

主因子、あるいはウイルス因子の一方のみではなく、双方の情報を統合することによって、真に有用な臨床マーカーを同定することを目標とする。

## B. 研究方法

- 1) HCVレプリコン系を用い、ウイルスゲノムの多型とウイルス増殖、宿主自然免疫分子の関連を明らかにする。
- 2) PEG-IFN/RBV併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量症例における末梢血リンパ球内自然免疫遺伝子の発現と治療奏効率との関連について検討する。
- 3) 自然免疫遺伝子の発現とウイルスゲノム多型、治療奏功性との関連を検討する。

## C. 研究成果

### (1) RIG-I 経路を介したインターフェロン発現誘導は、HCV 遺伝子構造に依存して制御される

RIG-I 経路は、ウイルス感染に際し活性化してインターフェロンを誘導する主要な自然免疫経路であり、一方では、HCV の NS3 蛋白はこの経路のシグナル伝達を阻害して自身の増殖に有利に働く。しかしながら、ウイルスゲノム多型によるシグナルの阻害活性の変化については知られていなかった。我々は、細胞内増殖能の著しく異なる2種類の HCV レプリコン(HCV-N レプリコン、HC-J4 レプリコン)から各々の NS3 蛋白を発現させるプラスミドを作成し、阻害活性について調べ、増殖の弱いレプリコンはシグナル阻害活性も弱いことを明らかにした。すなわち、宿主因子である自然免疫系を検討する上でも、ウイルス多型を考慮する必要のあることが明らかとなった。

### (2) PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した

### Genotype 1b、高ウイルス量症例における末梢血リンパ球内自然免疫遺伝子発現治療の奏効率との関連

74 症例の治療開始前に採取した末梢血リンパ球からの解析において、無効例では ISG15、USP18 の末梢血リンパ球での発現が有意に亢進しており、一方 RIG-I/IPS-1 比は逆に、無効例で低下していた。すなわち、治療開始前におけるこれらの発現解析から、治療反応性が予見できる可能性が明らかとなった。

### (3) 宿主の自然免疫遺伝子発現とウイルスゲノム多型との関連の検討

前項の治療群において、自然免疫系分子の発現と治療反応性の関連が明らかとなった。一方、一部において、治療が無効でありながら ISG15 の発現量が大きく異なる症例が存在した。現在これら2群における HCV の多型について、HCV 全ゲノムの解析を行い、ISG15 発現に対する HCV ゲノムの関与を明らかにすることを試みている。

## D. 考察と結論

末梢血リンパ球における自然免疫分子の発現は、治療効果予測の重要な指標と考えられた。HCV ゲノム情報をここに加えることにより、さらなる詳細な予測が可能となることが推定され、今後さらなる解析を行うべく予定である。

## E. 研究発表

### 論文発表

1. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T,

- Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M  
HCV nonstructural proteins responsible  
for suppression of RIG-I/Cardif-induced  
interferon response. *J Gen Virol.* 2007  
Dec;88(Pt 12):3323-33.
2. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh  
K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M,  
Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y,  
Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S,  
Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N,  
Kohara M, Watanabe M. Inhibition of  
hepatitis C virus infection and  
expression in vitro and in vivo by  
recombinant adenovirus expressing  
short hairpin RNA. *J Gastroenterol  
Hepatol.* 2007 Aug 7; [Epub ahead of  
print]
3. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y,  
Kanayama A, Matsui S, Takano S,  
Yamaguchi T, Itakura T, Kitamura T,  
Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K,  
Okada S, Yamashita S, Sakamoto N,  
Itoh M, Enomoto N.  
Targeting lipid metabolism in the  
treatment of hepatitis C. *J Infect Dis.*  
2008 Feb 1;197(3):361-70.
4. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang  
P, He L, Takayanagi S, Wakita T,  
Sakamoto N, Enomoto N, and Ito M  
Griseofulvin, an oral antifungal agent,  
suppresses HCV replication in vitro.  
*Hepatol. Res.* 2008; in press.
- Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M,  
Okada H, Enomoto N. Molecular  
evolution of hepatitis C virus in a  
patient with liver transplantation.  
*International Symposium on Hepatitis  
C Virus and Related Viruses (14th  
Annual Meeting) September 9-13, 2006;  
Glasgow (Scotland).*

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

学会発表

1. Maekawa S, Amemiya F, Takano S,  
Matsu A, Kanayama A, Miyazaki C,

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（平成 19 年度）

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

分担研究者： 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学分野 准教授

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いた  
ジェノミクス解析

研究要旨：平成19年度においては、B型肝炎ウイルス(HBV)感染キメラマウスの肝病態を詳細に解析し、HBV感染病態モデルとしての有用性を検討した。免疫不全の状態ではあるが、HBV genotypeや変異、さらには共感染によるウイルス複製や肝組織進展に与える影響を明らかにすることができた。この結果を、来年度のジーンチップを用いた検討の基盤とする。

共同研究者氏名

杉山真也、溝上雅史

名古屋市立大学大学院医学研究科

臨床分子情報医学分野

A. 研究背景・目的

1) 2000年に米国・フランスの症例で報告されたHBV genotype G (HBV/G) は、他の genotype と共感染していることが多く、我々の検討でもこれまでにHBV/Ae, C, H との共感染を認めている。今回我々は、HBV/Gの複製メカニズムを検討するため肝細胞置換キメラマウスを用い感染実験を試みた  
2) HBV genotype や肝発癌に寄与する点変異による肝組織への障害性の違いに関してヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて検討する。来年度以降、HBV感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析により肝病態進展に寄与する宿主因子を明らかにする。

B. 研究方法

1) HBV/G感染患者からG型クローンを分離し、1.24倍長のHBVクローンを作成した。*in vitro*複製モデルを用いてG型粒子を作成後、その粒子を含む培養上清をキメラマウスに経静脈的に接種し感染を試みた。HBV/G特異的real-time PCR法を開発し、ウイルス量の推移を検討した。  
2) HBV感染血清(HBV/B1\_wild・B1\_PC; プレコア変異)や血清から得られたウイルス(HBV/A2・C2・B1\_wild・B1\_PC)をクローニングしキメラマウスへの感染源とした。HBV感染後のキメラマウス肝臓組織を病理学的・分子生物学的に解析し、HBV genotypeや点変異が肝臓に及ぼす影響を検討する。

(倫理面への配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。