

5. 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).
6. 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).
7. 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 under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism* 7(3):269-276 (2008).
8. 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.* 5:435-448 (2008).
9. Y. Terao-Muto, M. Yoneda, T. Seki, A. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Fujita, and C. Kai. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.* 80(3):370-376 (2008).
10. H. Sato, R. Honma, M. Yoneda, R. Miura, K. Tsukiyama-Kohara, F. Ikeda, T. Seki, S. Watanabe, and C. Kai. Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression. *Virology* 375(2):321-330 (2008).
11. Y. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32(1): 29-41(2009).
(その他)
1. 小原 恭子 C型肝炎ウイルスの発揮する腫瘍原性 黎明 16: i-ii (2007).
紀要:
2. T. Nishimura, M. Satoh, M. Saito, Y. Kasama, M. Kohara, and K. Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ -24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 78 A54 (2008).
- In revise:*
3. K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, S. Sekiguchi, E. Seike, S. Tóne, Y. Hayashi, Y. Tobita, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, and M. Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology*
- In review:*
4. M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, T. Nishimura, K. Tanaka, Y. Nishito, Y. Hirata, M. Arai, M. Sudo, C. Kai, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Antibody against 3 β -hydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24)

suppresses hepatitis C virus infection through
BGT-1

J. Virology

2. 学会発表

「国内学会」

1. 西村知裕、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現継代細胞における p53 の翻訳後修飾 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月
2. 笠間由里、高野貴士、西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス複製抑制抗体の樹立 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月
3. 齊藤誠、小原恭子 HCVによる DHCR24発現誘導機序の解明:DHCR24 遺伝子の転写制御機構の解析 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月
4. 高野貴士、小原恭子、関貴弘、黄瑛、甲斐知恵子 肝癌治療用麻疹ウイルスベクター特異性の検討 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月
5. 小原恭子、西村知裕、齊藤誠、甲斐知恵子、小原道法 C型肝炎ウイルスによる酸化ストレス応答因子の修飾 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006年9月
6. 小原道法、習田昌祐、塗谷秀子、小原恭子 C型肝炎ウイルスと肝臓がん シンポジウム 感染発がんの共通性と特異性 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006年9月
7. 高野貴士、齊藤誠、甲斐知恵子、小原恭子 C型肝炎ウイルス関連腫瘍抗原 p70 の解析 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006年9月
8. 西村知裕、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現継代細胞における p53 の翻訳後修飾 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月
9. 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 の発現誘導機序の解明 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月
10. 高野貴士、甲斐知恵子、小原恭子 肝癌関連抗原 P30 の解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月
11. 佐藤宏樹、本間玲子、関貴弘、米田美佐子、三浦竜一、池田房子、小原恭子、渡辺慎哉、甲斐知恵子 麻疹ウイルス感染後の宿主細胞遺伝子発現の包括的解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月
12. 井上義久、佐藤宏樹、米田美佐子、小原恭子、甲斐知恵子 麻疹ウイルスN遺伝子 mRNA の5'非翻訳領域を介した翻訳制御機構の解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月
13. 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 の発現誘導機序の解明 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006年11月
14. 笠間由里、田中康介、佐藤正明、齊藤誠、桑原一彦、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.

15. 佐藤正明・齊藤誠・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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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 札幌 2007.

20. 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.

21. 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.

22. 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ける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

23. 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)

24. T. Nishimura, M. Sato, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Significance of 3b-dehydroxysterol- Δ 24-reductase

(DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus."

第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 2008

25. 佐藤正明、齊藤誠、田中康介、岩永寿真子、岡田誠治、甲斐知恵子、小原恭子 「ヒトリンパ球移入 NOD/SCID マウス(huPBL NOD/SCID)を用いた組換麻疹ウイルス評価系の構築」 第61回 日本細菌学会九州

- 支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
26. 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子「DHCR24を介したHCVのp53 活性抑制」第 61 回 日本細菌学会九州支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
27. 齊藤誠、小原恭子「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」第 61 回 日本細菌学会九州支部会 第 45 回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
28. 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子「抗 DHCR24 単クローン抗体の C 型肝炎ウイルス複製抑制作用を担う宿主因子」第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
29. 齊藤 誠、小原恭子「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
30. 徳永 優子、齊藤 誠、小原 道法、小原恭子「C 型肝炎ウイルスが誘導する宿主因子 DHCR24 の相互作用分子の探索」第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
31. T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." 第67 回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
32. 高野貴士、林 昌弘、榎原琢也、平田雄一、小原恭子、小原道法「DHCR24 による HCV 複製能制御の検討」Characterization of HCV replication regulatory by DHCR24 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
33. T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus suppres p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase." BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会・合同大会)神戸 2008
34. 齊藤 誠、小原恭子「C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析」Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会・合同大会)神戸 2008
- 「国際学会」
1. Tsukiyama-Kohara, K., Izumi, K., Huang, Y., Takano, T., Nishimura, T., Kohara, M., and Kai, C. HEPATITIS C VIRUS POSITIVE HEPATOCELULAR CARCINOMA ASSOCIATED ANTIGEN. "20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress" Kyoto 2006
2. Tsukiyama-Kohara, K., Nishimura, T., Kasama, Y., Shuda, M., and Kohara, M. 24-dehydrocholesterol reductase; a novel target

- of Hepatitis C virus and oxygen stress in hepatocytes. "13th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Australia, 2006
3. Tsukiyama-Kohara, K. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis aggravated by Hepatitis C. "13th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Australia, 2006
 4. 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]
 5. 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.
 6. K. Tsukiyama-Kohara Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis elevated by Hepatitis C virus The Asia and Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and the Fourth LiverCare Center Symposium (invited) Khon Kaen, Thai-land 2008.
 7. T. Nishimura, M. Satoh, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. 21th International Congress of Antiviral Research, Montreal, 2008.
 8. T. Nishimura, Y. Kasama, T. Takano, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus abrogates p53 activity by over-expression of 3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase (Oral presentation). IUMS (XIVth International Congress of Virology), Turkey, 2008.
 9. M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, Y. Hirata, T. Nishimura, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Significance of DHCR24 in life cycle of Hepatitis C virus. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.
 10. T. Takano, Y. Hirata, K. Tsukiyama-Kohara, M. Sudoh, and M. Kohara. Regulation of HCV replication by DHCR24. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008.

その他セミナー等

1. 小原恭子 C型肝炎制圧のための基礎研究；肝発癌分子機序解明とワクチン開発へのアプローチ KIKUCHI バイオセミナー三風会 熊本 平成 18 年 3 月
2. Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Yuri Kasama and Kyoko Kohara Fundamental Study for Overcoming Chronic Hepatitis C, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma The 4th Kumamoto University Forum in Daejeon, Korea September 26-27, 2006
3. 小原恭子 C型肝炎の克服に向けて 第 8 回イブニングセミナー 熊本大学リエゾンオフィス (東京) 平成 18 年 12 月

G.知的所有権の取得状況

1. 「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、西村知裕、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」

特願：2008-66158、発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕、出願日：平成20年3月14日、出願人：国立大学法人 熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCV非肝細胞培養系の樹立と肝外病変

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨: C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は肝だけでなく肝臓以外の臓器にも病変を引き起こす。その分子機序を解明する目的で以下の検討を行った。1) ヒト B 細胞株で持続的に HCV コア蛋白を発現する Bjab-core 細胞株を樹立し、表面分子を FACS 解析した。core 蛋白の発現により CD48 プロモーター活性が抑制され、CD48 mRNA の量が減少することを明らかにした。2) HCV JFH1 株と 8 種類のヒト B 細胞株と 1 種類のヒト T 細胞株を用い、感染、複製、蛋白翻訳、プロセッシング過程を解析した。解析した細胞系では効率の良い感染、複製は見られなかったが、蛋白翻訳、プロセッシングは Huh7 細胞と同等のレベルで起こった。3) 肝細胞および B 細胞に共通に発現している宿主因子の中から HCV コア蛋白および HCV RNA の IRES 領域に結合する宿主因子 hnRNPH を同定した。hnRNPH の過剰発現で HCV 産生は増加し、hnRNPH のノックダウンで HCV 産生は減少したことから、hnRNPH は HCV 産生を制御している可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝臓で複製し、肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こすウイルスである。また、HCV は肝臓以外の臓器（血液、心臓、腎臓、代謝性疾患など）で混合型クリオグロブリン血症、Bリンパ腫、心筋症、糸球体腎炎、耐糖能異常などの多様な病態を引き起こすことが知られており、慢性C型肝炎の制圧とともに肝外病変への対策は社会的要請が極めて高く、厚生労働行政の重要課題である。HCV は肝臓のみでなく Bリンパ球、Tリンパ球などの血球系細胞や心筋、腎細胞に感染増殖することが示唆されているが、肝以外の細胞で効率良く HCV が増殖する実験系がないため、肝外病変発現機序の解明が進んでいない。そこで、HCV

非肝臓細胞での効率の良い HCV 蛋白発現系、HCV RNA レプリコン細胞、および HCV 培養系の構築を図り、肝外病変の分子機序および HCV の増殖機構を明らかにし、治療法開発へとつなげることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

I. HCV コア蛋白質を発現する B 細胞株の樹立と機能解析

(1) HCV コア蛋白を恒常的に発現する B 細胞リンパ腫細胞 Bjab-core 株の樹立: pEF- α に HCV core 遺伝子 (aa 1-191) を挿入し、Bjab 細胞に Bio-Rad cell electroporator で遺伝子導入した。G418 含有の RPMI1640+10%FCS で培養、選別し、恒常的に core 蛋白を発現する細胞株 Bjab-core を樹立した。Vector control

としてBjab-neoを樹立した。

(2) Bjab-coreの表面分子のFACS解析

Bjab-coreとvector controlのBjab-neoの細胞表面分子104種類について発現レベルをFACSCalibur Flow Cytometerで解析しCellQuest Pro softwareでプロファイリングした。

(3) 一過性HCVコア蛋白発現によるCD48の発現変化の解析：B細胞にHCVコア蛋白遺伝子を導入し、細胞表面分子CD48の発現レベルをFACS解析した。

(4) Bjab-core細胞でのCD48 mRNAのreal-time RT-PCR解析：Bjab-core細胞とBjab-neo細胞からRNAを抽出し、CD48 mRNA量をTaqman Chemistryによるreal time RT-PCR法で定量した。

(5) CD48 promoter活性の比較

Bjab-core細胞とBjab-neo細胞において、CD48プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定し比較した。

(6) 培養B細胞株によるHCV RNAレプリコン細胞の作製：HCV subgenomic replicon luciferaseを培養B細胞株に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標にHCV RNAレプリコンが複製可能な細胞をスクリーニングした。細胞はB細胞株(Raji, C1R, P3HR1など)、T細胞株(Jurkat細胞)などを用いた。

(7) Subgenomic GFPNeo-JFH1 repliconの構築：HCV RNAレプリコンが複製可能な細胞を可視化し、効率よくスクリーニングするためにGFP遺伝子を挿入したSubgenomic GFPNeo-JFH1 repliconプラスミドを作製した。P3HR1細胞にelectroporationで導入し、蛍光顕微鏡

で発現を検討した。

II. HCV JFH1株によるリンパ球細胞感染系の検討

(1) HCV JFH1のリンパ球培養細胞への吸着：8種類のBリンパ球系細胞(Bjab, BL41, C1R, IB4, Namalwa, P3HR1, Raji, Ramos)と1種類のTリンパ球系細胞

(Jurkat)を用い、近年、開発されたHCV JFH1株の吸着効率について検討した。Huh-7細胞で産生させたHCV JFH1ウイルス液を 5×10^3 TCID₅₀/mLまたは 5×10^4 TCID₅₀/mLで各細胞に接種し、37°C、3時間インキュベートしたのち、PBSで3回washし、細胞を回収、HCV core ELISAでコアタンパク量を測定し、吸着したウイルス量を評価した。

(2) HCV JFH1のリンパ球培養細胞への感染：(1)と同様にリンパ球系細胞にウイルス液を接種し、0, 4, 8日目に細胞を回収し、HCV core ELISAでコアタンパク量を測定し、細胞内での発現量を比較した。

(3) サブゲノムレプリコンによるHCV複製の検討：HCV JFH1株由来のサブゲノムレプリコンRNAをin vitro合成し、各リンパ球系細胞内にエレクトロポレーション法で導入、ルシフェラーゼ活性を測定し、複製効率を比較した。

(4) HCV IRES依存性蛋白翻訳効率の検討：HCV IRES下にfirefly-luciferase遺伝子を挿入し、EMCV IRES下にHCV NS3-NS5B遺伝子を挿入したダイシストロニックRNAを作製した。in vitro合成したRNAを各リンパ球系細胞内にエレクトロポレーション法で導入し、ルシフェラーゼ活性を測定して、IRES依存性蛋白翻訳の効

率を比較検討した。

(5)HCV ポリプロテインの NS3/4A プロテアーゼによるプロセッシング: HCV ポリプロテインのプロセッシングを解析するために、pSGR-JFH1/luc を各細胞にトランスフェクトし、T7 ワクチニアウイルスを感染させ蛋白発現させ、ウエスタンブロット法で HCV ポリプロテインのプロセッシングを解析した。

III. HCV 産生を調節する宿主因子の同定と機能解析

(1)HCV core 蛋白質に結合する宿主因子のスクリーニングと同定: myc-TEV-Flag-tag を N 末端に付加した HCV core 遺伝子をヒト胎児腎臓細胞にトランスフェクトし、tandem affinity purification 法で HCV core 蛋白に結合する宿主因子を分離し、質量分析法にて同定した。

(2)HCV RNA IRES IIIId 領域に結合する宿主因子のスクリーニングと同定: ピオチン化した HCV RNA IRES IIIId 領域とアンチセンスコントロールに Huh-7 細胞抽出液を混じ、アビジンビーズで結合因子を分離し、質量分析法で結合因子を同定した。

(3)同定された結合因子のうち肝細胞および B 細胞系で発現する宿主因子をプロテオームデータベースで検索した。

(4)HCV core 蛋白質と hnRNPH1/H2 の細胞内での結合を免疫沈降法で解析した。

(5)HCV RNA IRES IIIId 領域と hnRNPH との結合をアビジンビーズで pull down し、その後、anti-hnRNP 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

(6)HCV core 蛋白質と hnRNPH1 の結合が RNA を介した間接結合なのか、蛋白同士の間接結合なのか解析した。

(7)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞に hnRNPH1 を発現するプラスミドをトランスフェクトし、培養上清中に産生される HCV 粒子量を解析した。

(8)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で内在性の hnRNPH1 をノックダウンし、培養上清中の HCV 粒子量を解析した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。患者試料を用いる際は当研究所の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行う。

C. 研究結果

I. HCV コア蛋白質を発現する B 細胞株の樹立と機能解析

(1)HCV コア蛋白を恒常的に発現する B 細胞 Bjab-core の樹立: 恒常的に HCV core 蛋白を発現する細胞株 Bjab-core を樹立した。コア蛋白の発現をイムノブロット法、免疫蛍光染色法で確認した。樹立した Bjab-core 細胞とベクターコントロールの Bjab-neo で以下の検討を進めた。

(2)Bjab-core の表面分子の FACS 解析
B 細胞表面分子の FACS 解析を行ったところ、104 種類の CD 抗原の中で Bjab-core で発現が上昇しているもの 55 種、減少しているもの 11 種、変化のないものが 38 種あった。CD2 の主要リガンドである CD48 抗原の発現低下が最も顕著であった。

(3)一過性 HCV コア蛋白発現による CD48 の発現変化の解析：一過性 HCV コア蛋白の発現においても CD48 の発現が低下することが FACS 解析により示された。

(4)Bjab-core 細胞での CD48 mRNA の real-time RT-PCR 解析：Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞から RNA を抽出し、CD48 mRNA 量を real-time RT-PCR 法で比較したところ、core 発現細胞で CD48 mRNA の量が減少していた。

(5)CD48 promoter 活性の比較：Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞で CD48 プロモーター活性を測定したところ、Bjab-core で CD48 プロモーター活性が低下していた。

(6)培養 B 細胞株による HCV RNA レプリコン細胞の作製：HCV subgenomic replicon luciferase RNA を Nucleofector で導入し、HCV RNA レプリコンが複製可能な細胞のスクリーニングを行った。C1R, P3HR1, Raji 細胞では HCV RNA レプリコンの複製活性は Huh7 細胞に比べ非常に低かった。

(7)Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon の構築：GFP 遺伝子を挿入した Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon を作製し、P3HR1 細胞に導入し、顕微鏡で観察したところ GFP の蛍光発色陽性の細胞が確認できた。

II. HCV JFH1 株によるリンパ球細胞感染系の検討

(1)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への吸着：回収した細胞のライセートを用い、core ELISA で core タンパク量を比較したところ、IB4, Jurkat, Ramos 細胞では検出感度以下であり、ほとんど細胞表面

に HCV 粒子が吸着していないことが示唆された。Bjab, Namalwa 細胞では高力価のウイルスを接種しても core 蛋白量に変化がなく吸着効率が低かった。一方、BL41, C1R, P3HR1, Raji 細胞では高力価で感染させた方が core 蛋白量は増加し、ウイルス粒子が細胞表面に効率良く吸着していることが示唆された。

(2)HCV JFH1 のリンパ球培養細胞への感染：ウイルス液接種後、0, 4, 8 日目に細胞を回収し、HCV core ELISA で core タンパク量を測定し、細胞内での core タンパク発現量を JFH1 感染 Huh-7 細胞と比較したところ、Huh-7 細胞より発現が著しく低く、感染効率が悪いことが示唆された。

(3)サブゲノムレプリコンによる HCV RNA 複製の検討：そこで、HCV の生活環のどのステップに問題があるか調べるためサブゲノムレプリコンで複製活性を検討した。C1R, P3HR1, Raji 細胞でわずかにルシフェラーゼ活性を検出できたが、増加傾向がなく経時的に減少しており、リンパ球系培養細胞での HCV JFH1-SGR の複製効率は低いものと考えられた。

(4)HCV IRES 依存性蛋白翻訳効率の検討 HCV IRES 依存性の蛋白翻訳は C1R, IB4, Namalwa, P3HR1 で Huh-7 細胞と同等に高かった。それ以外の細胞株でも Huh-7 の 25-50%程度の IRES 活性が検出できた。

(5)HCV ポリプロテインの NS3/4A プロテアーゼによるプロセッシング：HCV ポリプロテインのプロセッシングをウエスタンブロット法で解析したところ、いずれの細胞においても Huh-7 細胞と同じ大きさに

プロセスされた NS3, NS5A, NS5B 蛋白を検出できた。このことから、リンパ球系細胞においても NS3/4A プロテアーゼのプロセスが適切に起こることが示された。III. HCV 産生を調節する宿主因子の同定と機能解析

(1)HCV core 蛋白質に結合する新規宿主因子 hnRNPH1 を同定した。hnRNPH1 は分子量 49kDa の細胞内蛋白であり、448 アミノ酸からなり、三カ所の RNA 結合領域を有する。

(2)HCV RNA IRES IIIId 領域に結合する新規宿主因子 hnRNPH1 を同定した。

(3)hnRNPH1 は HCV コア蛋白質と HCV RNA に結合し、肝細胞および B 細胞に発現している。

(4)HCV core 蛋白質は hnRNPH1/H2 のいずれとも Huh7 細胞内で特異的に結合することが分かった。HCV コア上の aa 1-43 が結合に重要であった。

(5)HCV RNA IRES IIIId 領域と hnRNPH との結合をアビジンビーズで pull down し、その後、anti-hnRNP 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析したところ、特異的に結合した。

(6)HCV core 蛋白と hnRNPH1 の結合に HCV RNA は阻害的に働いた。

(7)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞に hnRNPH1 を発現するプラスミドをトランスフェクトしたところ、培養上清中に産生される HCV 粒子量が 2 倍以上に増加した。

(8)HCV JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で内在性の hnRNPH1 をノックダウンしたところ、培養上清中に産生される HCV 粒子量が減少した。

D. 考察

本研究では I. HCV コア蛋白質を発現する B 細胞株の樹立と機能解析、II HCV JFH1 株によるリンパ球細胞感染系の検討、III. HCV 産生を調節する宿主因子の同定と機能解析をおこなった。

ヒト B 細胞株 Bjab 細胞に HCV コア蛋白発現プラスミドを導入し、持続的に HCV コア蛋白を発現する Bjab-core 細胞を樹立した。Bjab-core 細胞とコントロール細胞 Bjab-neo について B 細胞表面分子の FACS 解析を行った。104 種類の CD 抗原の中で Bjab-core で発現が上昇しているもの 55 種、減少しているもの 11 種、変化のないものが 38 種あった。HCV コア蛋白の発現により B 細胞表面分子の発現に著明な変化が起こることが示された。これらの表面抗原分子の中で顕著に変化が認められたのは CD48 の発現低下であった。コア蛋白の発現により CD48 の発現が低下する分子機序を解析したところ、HCV コア蛋白の発現により CD48 プロモーター活性が抑制され、CD48 mRNA の量が減少することが分かり、CD48 の転写抑制により発現が低下していると考えられた。

CD48 は CD2 との相互作用を介して T 細胞や NK 細胞の活性化、IL-2、IFN- γ の産生に関与している。HCV コア蛋白発現による CD48 の発現抑制は IL-2、IFN- γ の産生低下につながると考えられ、HCV 感染細胞の免疫系による排除からのがれる機構となっている可能性が考えられた。このことが B 細胞での HCV の持続感染機構になっている可能性が考えられ、HCV 感染者からの HCV 排除のためのターゲットになる可能性が

考えられた。

次に、B細胞系におけるHCV RNAレプリコン細胞の樹立を図った。NucleofectorはB細胞系へも効率よく遺伝子導入できることが条件検討により明らかになった。Huh7細胞と比較するとまだ十分なHCV RNAの複製がみられていないが、Subgenomic GFPNeo-JFH1 repliconにより発現細胞が可視化できるようになったので、効率よくスクリーニングできるようになった。

次に、HCV JFH1株と8種類のBリンパ球系細胞および1種類のTリンパ球系細胞を用い、感染、複製、IRES依存性翻訳、ポリプロテインのプロセッシングを解析した。HCV JFH1株のリンパ球系細胞への吸着は細胞により効率が異なり、BL41, C1R, P3HR1, Raji細胞で比較的効率が良いことがわかった。

HCV JFH1株による感染を解析したところ、Huh-7細胞に比べて著しく感染効率が低かった。この原因を明らかにするためにサブゲノムレプリコンRNAをもちいて複製効率を解析した。いずれの細胞においても複製効率は低かった。次にHCV IRES依存性翻訳を解析したところ、C1R, IB4, Namalwa, P3HR1でHuh-7細胞と同等の高い翻訳効率が認められた。また、HCV NS3/4Aプロテアーゼによるウイルス蛋白のプロセッシングはHuh-7細胞と同様に効率よく予想されたサイズのバンドが検出された。この解析でHCV粒子の吸着、IRES依存性翻訳の効率がよい細胞にC1R, P3HR1があることが分かった。

続いてHCVウイルス産生に関与する宿主因子を解析した。HCV core蛋白質および

HCV RNAに結合する宿主因子としてhnRNPHを同定した。これらは肝細胞およびB細胞系に発現している。hnRNPHがHCV core蛋白質と結合する際、core蛋白質のaa 1-43が重要であることが分かった。HCV core蛋白質とhnRNPHは共にRNA結合蛋白質であるため、両者の結合がRNAを介した間接結合なのか、蛋白同士の直接結合なのか二通りの可能性が考えられた。両蛋白同士の結合にRNAが阻害的に機能したことから、蛋白同士の直接結合であることが示唆された。

HCVの生活環におけるhnRNPH1の機能を明らかにするためにHCV JFH1株が感染した肝細胞にhnRNPH1を強制発現させた場合と内在性のhnRNPH1をノックダウンさせた場合でウイルス産生への影響を解析した。hnRNPH1を強制発現させるとウイルス産生が増加し、hnRNPH1をノックダウンさせるとウイルス産生が減少することから、hnRNPH1はウイルス産生を調節している可能性が考えられた。ウイルス複製への影響を解析したところ、有意な変化が認められなかったことから、ウイルス複製ではなくウイルスの粒子形成や成熟機構に関与している可能性が考えられた。

E. 結論

1) ヒトB細胞株Bjab細胞で持続的にHCVコア蛋白を発現するBjab-core細胞株を樹立した。B細胞表面分子のFACS解析により、104種類のCD抗原の中でBjab-coreで発現が上昇しているもの55種、減少しているもの11種、変化のないものが38種あった。CD2の主要リガンドであるCD48抗原の発現低下が著明であった。コア蛋白の発現によりCD48プロモーター活性が抑制され、CD48

mRNAの量が減少するために発現が低下すると考えられた。

2) B細胞系、T細胞系の細胞株でHCV RNAレプリコン細胞の樹立するために遺伝子導入条件を検討し、効率良く遺伝子導入できる条件を見出した。GFP遺伝子を発現するサブジェノミックレプリコンRNAを用いてレプリコン発現細胞を可視化することにより、効率よく感受性細胞をスクリーニングできるようになった。

3) HCV JFH1株を用いた検討ではBリンパ球系培養細胞、Tリンパ球系培養細胞ではIRES依存性翻訳、ウイルス蛋白のプロセッシングは効率よく起こるが、吸着、複製の効率が低かった。HCV JFH1株のリンパ球系細胞への吸着は細胞により効率が異なり、BL41, C1R, P3HR1, Raji細胞で比較的効率が良いことがわかった。

4) hnRNPHはHCV core蛋白質とHCV IRESへの結合を介してHCVウイルス産生を調節していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology*, 2006, 351:381-92.
- 2) Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y,

Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *Journal of Biochemistry*, 2006, 139: 921-30.

- 3) Polyak SJ, Kevin C. Klein, Shoji I, Miyamura T, Lingappa JR. Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. (Seng-Lai Tan ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 89-119, 2006.
- 4) The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein.: Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. *Journal of Virology*, 2007, 81:1174-1185.
- 5) Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *Journal of Gastroenterology.*, 2007, 42: 411-423.
- 6) Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., and Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological Methods*, **148**, 174-181, 2008.

- 7) Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., and Shoji, I. Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *Journal of General Virology*, **89**, 1587-92, 2008.
- 8) Sasase, N., Kim, S.R., Kim, K.I., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hotta, H., Shoji, I., El-Shamy, A., Kawada, N., Kudo, M., and Hayashi, Y. Usefulness of a new immunoradiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, **51**, 70-5, 2008.
- 9) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent pathway. *Journal of Virology*, **82**, 10375-85, 2008.
- 10) Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by dual mechanisms, ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *Journal of Virology*, [epub ahead of print], 2008.
- 11) Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., and Shoji, I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
- 12) 金守良、井本勉、婦木秀一、金啓二、谷口美幸、長野基子、堀田博、勝二郁夫、
- 13) 寒原芳浩、前川陽子、工藤正俊、林祥剛。1b型高ウイルス量高齢者C型慢性肝炎に対するPEG IFN α -2b/リバビリン治療（併用療法）の検討。肝臓，**49**, 145-152, 2008.
2. 学会発表
- 1) Shoji I., Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Suzuki T, Fukuda K, Shimoji T, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, and Miyamura T. E6AP-mediated ubiquitylation and degradation of HCV core protein. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, July 1-5, 2006.
- 2) Fukuda K, Shoji I., Shirakura M, Murakami K, Suzuki T, Wakita T, Mizumoto K, and Miyamura T. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia, August 27 - 31, 2006
- 3) E6AP依存性HCV core蛋白分解の分子認識機構の解析。福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、阿部克俊、

- 奈須純一、高橋由利絵、鈴木哲朗、脇田隆字、水本清久、宮村達男、第54回日本ウイルス学会、名古屋、2006。
- 4) E6AP依存性HCV core蛋白分解によるウイルス産生調節機構。勝二郁夫、村上恭子、白倉雅之、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、脇田隆字、日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006。
 - 5) Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes. Murakami K, Shoji I., Hamamoto I, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Glasgow, UK, September 9-13, 2007
 - 6) Shoji I., Murakami K, Fukuda K, Osaki M, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. AASLD, Boston, November 2-6, 2007.
 - 7) 血球系細胞におけるHCV JFH-1株の感染および複製の検討。村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字。第55回日本ウイルス学会、札幌、2007。
 - 8) HCVコア蛋白と結合する新規宿主因子hnRNPH1/H2の同定と相互作用解析。阿部克俊、村上恭子、市村徹、高宮智史、大崎一直、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫。第55回日本ウイルス学会、札幌、2007。
 - 9) Shoji I., Osaki, M., Fukuda, K., Murakami, K., Hotta, H., Suzuki, T., Wakita, T., and Miyamura T. Molecular mechanism of E6Ap-mediated regulation of hepatitis C virus production. Keyston Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis, Victoria, Canada, 2008.
 - 10) Murakami, K., Abe, K., Shoji I., Takamiya, S., Kimura, T., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Wakita, T. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. International Union of Microbiology 2008, Istanbul, Turkey, 2008.
 - 11) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Murakami, K., Shoji I., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatinine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 12) Hamamoto, I., Murakami, K., Suzuki, T., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Wakita, T., and Shoji I., ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
 - 13) El-Shamy, A.M., Apichartpiyakul, C., Kim, S.R., Adachi, T., Shoji I., and Hotta, H. Polymorphism of HCV-1b core protein

- and interferon/ribavirin resistance -determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 14) Abe, K., Murakami, K., Takamiya, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Shoji, I. Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 15) Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 16) Hotta, H., Kitayama, K., Yabuki, R., Deng, L., Nagano-Fujii, M., and Shoji, I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 17) Shoji, I., Osaki, M., Murakami, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Wakita, T., and Hotta, H. Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- 18) 原弘道、相崎英樹、松田麻未、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 19) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCVコア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2のHCV生活環における役割、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 20) Deng Lin、足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤莊平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博、C型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008
- 21) 堀田博、北山喜久美、矢吹玲子、Lin Deng、長野基子、勝二郁夫、C型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大、アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 22) 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、勝二郁夫、C型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53の機能、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、

- 2008.
- 23) エルシャーミーアメード、足達哲也、犬伏祥子、勝二郁夫、堀田博、ペグインターフェロン/リバビリン併用療法における HCV core および NS5A の多様性による SVR 予測因子と Non-SVR 予測因子の検討、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 24) 内海孝子、ルシダマリア、長野基子、笹山美紀子、勝二郁夫、堀田博、インドネシア・パプア州の B 型肝炎ウイルス (HBV) の分子系統樹解析と新規 subgenotype の同定、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 25) 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.
- 26) 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究

分担研究報告書

研究1：C型慢性肝疾患患者におけるインスリン抵抗性と扁平苔癬
研究2：HCV陽性者における末梢血Bリンパ球のclonality解析

研究分担者	(平成18～19年度)	佐田 通夫	久留米大学医学部消化器疾患情報講座 教授
	(平成20年度)	岡村 孝	久留米大学医学部内科学講座血液内科学部門 教授
研究協力者		長尾由実子	久留米大学医学部消化器疾患情報講座 准教授
		大坪 維範	久留米大学医学部内科学講座血液内科学部門 助教

研究要旨： **研究1** C型肝炎ウイルス（HCV）は、扁平苔癬の発症に関与する。本研究では、C型慢性肝疾患患者における肝外病変発現者と非発現者について耐糖能異常の合併率を調査し、扁平苔癬を中心とする肝外病変の発症機序におけるインスリン抵抗性との関連を検討した。久留米大学病院に通院するHCV感染患者87名のうち、扁平苔癬の有病率は19.5%、糖尿病21.8%、高血圧28.8%、甲状腺機能異常症20.7%、肝外悪性腫瘍9.2%であった。扁平苔癬合併群（グループA 17名）は、非合併群（グループB 80名）に比べ、喫煙歴、高血圧、肝外悪性腫瘍の罹患率が有意に高率であった。さらに、グループAはグループBに比べて、インスリン値、HOMA-IRが有意に高かった。HCVがインスリン抵抗性を引き起こし、このことが扁平苔癬の発症に関与している可能性を示唆した。HCV感染者には、インスリン抵抗性の測定が必要であり、種々の肝外病変のチェックが必要である。C型慢性肝疾患に高頻度に認められる扁平苔癬を早期発見し、早期治療を行うことは、患者や住民の生活のQOLを向上させることにも繋がる。一方、扁平苔癬の認識を深める啓発活動の一環として、小冊子を作成した（肝外病変シリーズ No1.「C型肝炎ウイルスは、肝臓以外の病気も起こします-扁平苔癬とC型肝炎ウイルス-」）。

研究2 HCV陽性者とコントロール群において、末梢血中にclonal Bリンパ球が存在する頻度をフローサイトメトリー（FCM）を用いて解析し、その細胞の特性について検討した。結果、clonalなBリンパ球のみられる症例はHCV陽性者に有意に多く存在することが示され、HCVがリンパ球をclonalに（腫瘍性に）増殖させる作用があることが示唆された。Clonalに増殖するBリンパ球のCD5発現は均一ではなく、これらの細胞はクローン内の多様性をもつ細胞集団であると考えられる。

研究 1 C型慢性肝疾患におけるインスリン抵抗性と扁平苔癬

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、肝疾患だけではなく肝疾患以外の重篤な疾患の発症にも関与している。扁平苔癬やシェーグレン症候群も HCV の肝外合併症の一つである。本研究では、C型慢性肝疾患患者における肝外病変発現者と非発現者について耐糖能異常の合併率を調査し、扁平苔癬を中心とする肝外病変の発症機序におけるインスリン抵抗性との関連を検討した。

一方で、患者や医療従事者における HCV が引き起こす肝外病変の認識は低い。そこで、国民への啓発活動のために、小冊子作成を目的とした。

B. 研究方法

1988年4月～2005年8月までの間に、慢性肝疾患として久留米大学病院を初めて受診した105,984名のうち、一名の肝臓専門医が診察した9,396名の患者で、その後2006年4月までに定期的に通院を続けているHCV抗体陽性患者は522名であった。522名のうち肝外病変(扁平苔癬、糖尿病、甲状腺機能異常、肝外悪性腫瘍)の精査が可能であった87名の患者を対象とした。

ただし、HBs抗原陽性者、インターフェロン治療歴のある者や治療中の患者、自己免疫肝炎患者は除外した。

対象患者に対し血液生化学検査、肝炎ウイルスマーカーの測定、腹部エコー、肝生検、腹部CT検査、上部消化管、下部消化管の検査、甲状腺精査、口腔粘膜精査、皮膚の精査を行なった。

(倫理面への配慮)

対象患者へは、調査の目的と方法について説明し、同意と承諾の下で調査を実施した。

C. 研究結果

(1) HCV感染とインスリン抵抗性

HCV感染患者における精査では、肝外病変の有病率は各々下記の結果であった。扁平苔癬の有病率:19.5%、糖尿病の有病率:21.8%、高血圧症の有病率:28.8%、甲状腺機能異常症の有病率:20.7%、肝外悪性腫瘍の有病率:9.2%。

対象患者87名のうち、扁平苔癬の合併を認めた患者は17名(グループA)、合併のない患者は70名(グループB)であった。グループAにおいて、喫煙歴、高血圧、肝外悪性腫瘍罹患率に有意差を認めた(表1)。さらに、グループAはグループBに比べて、インスリン値、HOMA-IRが有意に高かった(表2)。

対象患者87名のうち扁平苔癬を認めた17名における発現部位は表3に示す通り、口腔が24部位(頬粘膜76.5%、下唇35.3%、上唇11.8%、歯肉5.9%、舌5.9%)に及び下肢皮膚23.5%、上腕皮膚5.9%、体幹皮膚11.8%、咽頭粘膜5.9%、膣粘膜5.9%であった。

表 1

結果2				
	Total	グループA n=17名	グループB n=70名	P値
年齢	60.0±11.5	63.7±10.6	59.1±11.6	NS
性別	44/43	11/6	33/37	NS
BMI	22.9±2.9	23.9±2.8	22.5±2.9	NS
喫煙歴	36.8%	58.8%	31.4%	0.0356
飲酒歴	57.5%	58.0%	57.1%	NS
HCV肝疾患				
感染済	1	0	1	
慢性肝炎	69	11	58	NS
肝硬変	9	3	6	
肝癌	8	3	3	
糖尿病	21.8%	23.5%	21.4%	NS
高血圧	28.7%	58.8%	21.4%	0.0022
甲状腺機能異常	20.7%	29.4%	18.6%	NS
肝外悪性腫瘍	9.2%	29.4%	4.3%	0.0013

表 2

結果3				
	Total	グループA 27名(17名)	グループB 27名(10名)	P値
AST _{U/L}	61.1±38.1	60.9±33.5	61.2±39.5	NS
ALT _{U/L}	68.2±46.7	62.4±39.6	69.6±48.5	NS
LDH _{U/L}	216.8±62.8	205.8±72.1	219.6±60.6	NS
γ-GTP _{U/L}	64.1±68.4	63.5±50.0	64.2±72.5	NS
TP _{g/L}	7.7±0.5	7.7±0.5	7.7±0.5	NS
Alb _{g/L}	4.1±0.5	3.9±0.5	4.2±0.5	NS
PLT _{10³/μL}	13.8±5.1	12.5±5.0	14.1±5.09	NS
T.Bil _{mg/dL}	1.1±0.6	1.2±0.9	1.0±0.5	NS
D.Bil _{mg/dL}	0.2±0.2	0.2±0.3	0.2±0.2	NS
TTT	16.2±6.7	18.4±4.7	15.8±7.0	NS
TC _{mg/dL}	172.3±35.8	164.3±41.9	174.1±34.4	NS
インスリン _{μU/mL}	23.3±42.0	47.3±87.8	17.4±15.4	0.0076
血糖値 _{mg/dL}	97.4±30.1	103±33.2	96.1±29.5	NS
HOMA IR	7.1±18.8	17.4±44.0	4.6±6.0	0.0113
H.pylori抗体	66.7%	58.8%	68.6%	NS

表 3

結果4						
No.	性別	年齢	肝疾患	皮膚	口腔	その他
1	M	71	CH	上肢		
2	M	60	CH	体幹		
3	F	70	LC		歯肉	
4	M	72	LC		下唇	
5	F	64	LC	下肢	頬粘膜、上下唇	
6	M	66	CH	下肢	頬粘膜、上下唇	
7	M	89	CH		頬粘膜	咽頭
8	M	66	CH	下肢	頬粘膜、下唇	
9	M	57	CH		頬粘膜	
10	M	50	CH		頬粘膜、下唇、舌	
11	F	77	CH		頬粘膜	
12	F	75	CH		頬粘膜	
13	M	62	HCC		頬粘膜、下唇	
14	F	83	HCC	下肢	頬粘膜	鼻
15	M	41	CH		頬粘膜	
16	M	58	HCC	下肢	頬粘膜、口腔	
17	F	53	CH		頬粘膜	

(2) 小冊子作成

扁平苔癬の認識を深める啓発活動の一環として小冊子を作成した(肝外病変シリーズ No1。「C型肝炎ウイルスは、肝臓以外の病気も起こします-扁平苔癬とC型肝炎ウイルス-」)(写真1)。さらに、小冊子を用いて、一般市民、患者、医療従事者を対象として平成19年度に説明会を実施した(2007年12月9日)。

写真1



D. 考察

HCVは、慢性肝疾患や肝臓に起因しているだけでなく、肝外病変を引き起こすことが知られている。HCV感染患者で扁平苔癬合併者は、非合併者に比べて有意にインスリン抵抗性が高い。C型慢性肝疾患患者に高頻度に認められる扁平苔癬を早期発見し、早期治療を行うことは、患者や住民の生活のQOLを向上させることにも繋がるが予想される。

E. 結論

HCVは、肝疾患だけでなく肝外病変を引き起こす。HCV感染者には、インスリン抵抗性の測定を実施すると共に、さまざまな肝外病変のチェックが必要である。

研究2

A. 研究目的

HCV陽性者における末梢血Bリンパ球のclonality(単一性、つまり腫瘍性)をフローサイトメトリー(FCM)を用いて解析する。さらに、clonalな増殖を示すB細胞の性状について精査することにより、HCVとリンパ増殖性疾患との関連について検討する。

B. 研究方法

HCV(+)患者240例(インターフェロン治療、化学療法、免疫療法を施行中、また、リンパ系腫瘍、血液疾患を有する患者は除く)とコントロール(HCV(-)肝疾患患者)150例の末梢血リンパ球をCD19、κ、λの3種の抗体を用いて染色し、Bリンパ球のκ、λの発現比率を解析し、clonalityの有無を検討した。clonality陽性例では、CD5、CD20染色を追加し、免疫グロブリン重鎖遺伝子の再構成(IgH