

させた全長 HCV RNA 複製細胞株(遺伝子型 1b の 0 株由来の HCV RNA が複製している 0 細胞)及びレプリコン複製細胞株(0 株由来のレプリコン RNA が複製している s0 細胞)を樹立するために、レンチウイルスベクター内に ATM、ATR、Chk2 あるいは PARP-1 に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードする配列を導入し(pLV-shRNA)、VSV-G 及び packaging construct とともに 293FT 細胞に導入した。得られたレンチウイルスを HuH-7 由来の 0 細胞、s0 細胞、Oc 細胞(0 細胞を IFN 処理により HCV RNA を排除した治癒細胞)や RSc 細胞(RS 細胞から作成した治癒細胞)に感染させ、それぞれの細胞において DNA 損傷センサーノックダウン細胞を作成した。ノックダウンされているかどうかについては、抗 ATM 抗体、抗 ATR 抗体、抗 Chk2 抗体及び抗 PARP-1 抗体を用いた Western blot 解析により確認した。LightCycler PCR を用いた HCV RNA の定量や適応変異(K1609E)が挿入された 0 株由来の全長 HCV RNA (ON/C-5B/KE RNA)を導入した細胞のコロニー形成能は、これまでに報告している常法に従った。次に JFH1 株(遺伝子型 2a)の感染性 HCV を DNA 損傷センサーがノックダウンされた RSc 細胞に感染させ、感染 4 日目の細胞内の HCV RNA の複製レベルは定量的 RT-PCR 法により調べ、培養上清中に放出される HCV コアタンパク質については ELISA 法で定量した。一方、ATM キナーゼ阻害剤(2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one)を全長 HCV RNA 複製

細胞(0 細胞やルシフェラーゼアッセイが可能な OR6 細胞)に作用させ、その抗 HCV 活性を評価した。

さらに ATM 又は Chk2 が HCV NS5B と相互作用するかどうかについても調べた。0 細胞を 0.5% NP-40 を含む lysis buffer で可溶化させ、抗 ATM 抗体、抗 Chk2 抗体および抗 NS5B 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を Western blot 法により調べた。また、HCV NS5B、FLAG タグを有する ATM (FLAG-ATM) あるいは HA タグを有する Chk2 (HA-Chk2) 発現ベクターを 293FT 細胞に導入して、抗 FLAG 抗体あるいは抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を Western blot 解析により調べた。一方、HCV NS5B と FLAG-ATM あるいは HA-Chk2 を 293FT 細胞に共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察して、それらの局在を調べた。細胞を抗 ATM 抗体、抗 HA 抗体や抗 NS5B 抗体で処理後、NS5B は Cy3、FLAG-ATM や HA-Chk2 は fluorescein isothiocyanate により可視化した。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析

2年間培養した全長 HCV RNA 複製細胞(O2 細胞)から total RNA を調製し、メタロチオネイン遺伝子(1E, 1F, 1M, 1X, 2A など)の発現量を RT-PCR 法により調べ、樹立時の細胞(0 と Oc)や 1年間培養した細胞(O1 と O1c)における発現量と比較した。

メタロチオネイン 1E と 2A について、ノックダウン細胞を昨年度示した方法

により作成した。方法の概略を以下に示す。レンチウイルスベクター内にメタロチオネイン 1E と 2A に特異的な short hairpin RNA (shRNA) をコードする配列を導入し、pVSV-G packaging construct とともに 293FT 細胞に導入した。産生されたレンチウイルスを Oe 細胞に感染させ、メタロチオネインのノックダウン細胞の作成を行った。ノックダウンの程度は、定量的 RT-PCR 法によりメタロチオネイン mRNA 量を測定することにより調べた。

G418 耐性コロニーの形成効率を調べる定性的アッセイ (ECF アッセイ) は細胞にエレクトロポレーション法により全長 HCV RNA (ON/C-5B/KE RNA) を導入し、G418 存在下で約 3 週間培養することにより出現してくるコロニー数を測定することにより行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

昨年度は、HCV ゲノムの複製に関与する宿主因子として RNA ヘリケース活性を有する DDX3 を見出したが、今年度は

新規の宿主因子を見つけるため、さらに探索を続行した。HCV は RNA ウイルスでゲノムの複製は細胞質内で行われることが分かっているが、これまでに HCV 感染や HCV NS3 およびコアタンパク質の発現により、宿主ゲノムに二重鎖切断が誘導され、宿主ゲノムの不安定性が増すことも報告されている。我々も HCV NS5B が発現したヒト不死化肝 PH5CH8 細胞においては二重鎖切断を誘導する DNA 損傷に対し、感受性が高くなっていることを報告している。しかしながら、DNA 損傷応答と HCV 複製がどのように結び付くのか、或は DNA 損傷応答が HCV 複製にどのような影響を及ぼしているのかについてはよく分かっていない。そこで、今年度は、DNA 損傷センサーが HCV の複製にどんな影響を与えるのかを詳細に検討した。

その結果、以下に示すような新たな事実が明らかとなった。全長 HCV RNA (0 株) 及びそのレプリコン RNA の複製レベルは、ATR 及び PARP-1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と同様高いレベルに維持されていたが、ATM 及び Chk2 ノックダウン細胞においては顕著に抑制されていることが分かった。また、全長 HCV RNA (0 株) を導入した Oe 細胞のコロニー形成能を比較した結果、ATM 及び Chk2 ノックダウン細胞におけるコロニー形成能がコントロール、ATR 及び PARP-1 ノックダウン細胞に比べ著しく抑制されていた。感染性 HCV (JFH1 株) を ATM 及び Chk2 ノックダウン細胞に感染させた場合においても、4 日目の感染細胞内の HCV RNA の複製

レベルと培養上清中に放出された HCV コアタンパク質の量は顕著に減少していた。一方、ATM キナーゼ阻害剤 (2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) を全長 HCV RNA 複製細胞株である O 細胞や OR6 細胞に作用させると強い抗 HCV 活性が認められた (EC₅₀: 1.9 μM)。さらに免疫沈降法により、内在性 ATM 及び Chk2 と HCV NS5B との相互作用が明らかとなった。同様に 293FT 細胞に HCV NS5B と FLAG-ATM あるいは HA-Chk2 を共発現させ、免疫沈降を行っても ATM 及び Chk2 と HCV NS5B との相互作用が認められた。また、ATM 及び Chk2 と HCV NS5B との細胞内局在が、核と細胞質との境界部分及び細胞質においてドット状に部分的に一致していることも判明した。以上の結果から、DNA 損傷センサーである ATM とその直接のターゲットである Chk2 が RNA ゲノムしか保持しない HCV の RNA 複製に必要な宿主因子であること、そして、抗 HCV NS5B という面での標的は ATM と Chk2 であることが示唆された。さらに ATM キナーゼ阻害剤が新規抗 HCV 剤として、治療に応用できる可能性も示唆された。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析

昨年度、全長 HCV RNA 複製細胞 (O 細胞) と 1 年間培養した細胞 (O1 細胞) を用いた cDNA マイクロアレイ解析によって見出したメタロチオネイン遺伝子の発現量亢進という現象について、さらに解析を加えた。今年度は、この現

象が 2 年間培養した細胞 (O2 細胞) においても認められるかどうかを RT-PCR 法により検討した。その結果、O2 細胞においては、O 細胞よりはメタロチオネイン (1E, 1F, 1M, 1X, 2A など) の発現が亢進していたが、O1 細胞とは有意な差はなかったことから、培養時間に依存して、発現量が高まることはないことが分かった。

ECF アッセイについては、昨年度、メタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A) をノックダウンさせた 5 種類の細胞 (すべてのメタロチオネイン遺伝子をノックダウンさせることはなく、それぞれ一部がノックダウンされている) を用いた実験により 3 種類の細胞でコロニー数の減少を観察した。しかしながら、これらの細胞におけるメタロチオネイン遺伝子のノックダウン率はメタロチオネインの種類によりまちまちであったことから、今年度は昨年度の再現性を確かめることも目的の 1 つとして、HCV RNA の複製との関与が示唆されたメタロチオネイン 1E と 2A に焦点を絞り、再度ノックダウン細胞の作成を行った。その結果、1E と 2A の mRNA 量とともに 80-90% 低下した細胞を得ることができた。これらの細胞に *in vitro* で合成した全長 HCV RNA (ON/C-5B/KE RNA) をエレクトロポレーションにより導入して G418 選択を行った (ECF アッセイ)。その結果、メタロチオネイン 1E と 2A の発現量が低下していない O_c 細胞においては、約 3 週間の G418 選択により数十個のコロニーが出現したが、ノックダウン細胞においては、わずか 2-3 個

の G418 耐性コロニーしか得られなかった。これらの結果は、昨年度の結果を支持しており、少なくともメタロチオネインの 1E 或は 2A が HCV の RNA 複製に必要であることが示唆された。

D. 考察

(1) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析

HCV ゲノムの複製が細胞質で行われるために、HCV RNA の複製増殖機構には DNA 損傷センサー関連分子の積極的な関与はないのではないかと予想されていた。しかしながら、今回の解析により DNA 損傷センサー分子である ATM や Chk2 が RNA 複製の中心的役割を担い RNA polymerase 活性を有する NS5B と相互作用を示して HCV RNA の複製効率を維持するために積極的に関与していることが明らかになった。これらはかなり意外性のある結果であり、ATM や chk2 分子の未知の機能とも結び付く可能性もある。そのため、今後、HCV NS5B と ATM や Chk2 との相互作用に必要な結合ドメインの同定や HCV NS5B が ATM や Chk2 に結合することにより宿主の DNA 損傷応答や細胞周期に与える影響について検討していく必要がある。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析

今年度の解析により、メタロチオネインの発現レベルが培養期間が長くなるほど上昇するということはないことが分かったが、ノックダウン細胞を用いた解析からは少なくともメタロチオ

ネイン 1E 或は 2A が HCV RNA の複製効率に影響を与えていることを示唆する結果を得た。この点については、細胞への導入直後の HCV RNA の複製効率を調べることができる Transient assay (ルシフェラーゼ活性で定量的に測定する方法)によりさらに検討する必要がある。

最近、我々はこれまで使用してきた HuH-7 株由来の細胞とは異なる性質を有するヒト肝癌細胞株 Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株 (クローン株) を幾つか樹立した。今後は、これらの細胞株についても長期培養により発現変動する遺伝子群の同定を進め、HuH-7 由来の細胞を用いた解析結果との比較を行う予定である。これと並行して今回得られたメタロチオネイン遺伝子の RNA 複製への関与についても Li23 細胞由来の細胞株を用いて今後調べる予定である。

E. 結論

(1) HCV ゲノムの複製に必要な新規宿主因子として DNA 損傷センサーである (ATM) と (Chk2) を見出した。HCV NS5B が ATM および Chk2 と相互作用を示すことを明らかにした。(2) 長期培養により発現上昇するメタロチオネイン 1E 或は 2A が HCV RNA の複製に必要なことを示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J. Hepatol.* in press (2009).
 - 2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J. Virol.* 83, 2338-2348 (2009).
 - 3) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* 154:77-85 (2009).
 - 4) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82:9639-9646 (2008). *J. Virol.* 82, 9305 (2008) spotlight
 - 5) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72-79 (2008).
 - 6) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:104-109 (2008).
 - 7) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158-1166 (2008).
 - 8) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292-298 (2008).
 - 9) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol.* 80:632-639 (2008)
2. 学会発表
- 1) 河合 良成、池田 正徳、阿部

- 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之、山本 和秀。全長HCV-RNA複製細胞を基に作成したIFN治療後再発モデルによる有効な治療法に検討・評価。第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月。
- 2) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 3) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 3) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- α resistant phenotype for the development of relapse model. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 4) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 5) Ikeda M, Abe K, Kuroki M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 6) Abe K, Ikeda M, Tani H, Ariumi Y, Dansako H, Matsuura Y, Kato N. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 7) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 8) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
 - 9) 有海 康雄、黒木 美沙緒、團迫 浩方、阿部 健一、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之。DNA損傷センサー-ATM及びChk2とHCVNS5Bとの相互作用。第56回日本ウイルス

- 学会学術集会、岡山、2008年10月。
- 10) 池田 正徳、森 京子、西村 剛、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之。異なる1b型HCV陽性血清由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 11) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之。IFN抵抗性全長HCV-RNA複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 12) 西村 剛、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之。異なるHCV陽性血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 13) 加藤 宣之、森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆宇、池田正徳。新しいヒト肝癌細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 14) 池田 正徳、阿部 健一、黒木 美沙緒、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。抗HCV活性を示すアラキドン酸代謝産物5-HETEの同定。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 15) 阿部 健一、池田 正徳、谷 秀樹、有海 康雄、團迫 浩方、松浦 善治、加藤 宣之。HCV複製に關与する宿主因子探索用細胞株のNegative selection法による樹立。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 16) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之。Cyclosporine Aに対し抵抗性を示す1b/2aHCVキメラレプリコン。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 17) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之。亜ヒ酸は酸化ストレスを介してHCV RNAの複製を顕著に抑制する。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 18) 森 京子、加藤 宣之、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳。新しいヒト肝癌細胞株Li23由来の全長HCV-RNA複製細胞を用いた薬剤評価システム。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月。
 - 19) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, and Kato N. ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
 - 20) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
 - 21) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication reporter assay systems using various genotype 1b HCV strains. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願番号：特願 2008-225323 号

(出願日：2008 年 9 月 2 日)

発明の名称：新規 HCV レプリコン

複製細胞および全長 HCV RNA 複

製細胞、ならびにこれらの利用

発明人：加藤 宣之、池田 正

徳.

出願人：岡山大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝発がんミトコンドリア異常

分担研究者 西口修平 兵庫医科大学内科学 肝胆膵科 教授

研究要旨：我々は、肝臓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を報告し、その際非癌部の肝臓組織においても変異が存在することに着目していた。C型慢性肝炎患者では HCV によって生じる持続炎症により発癌がもたらされるが、その機序としてミトコンドリアからの電子のリークが活性酸素（ROS）を増加させて染色体障害を生じることが重要と考えられている。今回、我々は C 型慢性肝炎と肝臓症例を対象として肝ミトコンドリア 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。その結果、IFN 投与によりミトコンドリア DNA の変異は減少すること、また肝臓症例では非癌部での組織学的変化が軽度であっても、ミトコンドリア DNA に多数の塩基変異が生じていることが判明した。また ROS 産生や消去に関連する遺伝子やインシュリン抵抗性に関連する遺伝子の多型による検討では、Mn-SOD の C/T 型や EC-SOD の C/G 型にミトコンドリア DNA の変異が多い傾向が認められた。さらに IFN の著効例においても電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の異常が存在し、特に SVR 肝臓の非癌部の組織では粗面小胞体やミトコンドリアの形態異常が顕著であり、細胞質のグリコーゲンの蓄積も乏しかった。これらの結果から、ミトコンドリアの遺伝子異常が肝発癌に関与すること、またミトコンドリアの遺伝子の変異の程度には ROS 産生・消去に関連する複数の遺伝子の多型が影響することが示唆された。

A. 研究目的

我々は、肝臓では多数のミトコンドリア DNA（以下 mtDNA）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、非癌部は癌部と強い相関が認められ、発癌までの過程において非癌部においても mtDNA 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癌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、肝臓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 mtDNA 塩基変異を解析するため、C 型慢性肝炎と肝臓症例を対象として肝 mtDNA 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。ま

た C 型慢性肝炎の進展や発癌には活性酸素の産生やインシュリン抵抗性の関与が指摘されているため、活性酸素の消去酵素やインシュリン抵抗性・脂肪代謝に関連する遺伝子の多型と mtDNA の変異数との関連について検討を行った。また SVR からの肝発癌例を対象に非癌部について組織学的な検索を行い、ミトコンドリアを含む微細形態を観察した。これらの検討をもとに、HCV による肝発癌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

大阪市立大学にて手術された肝臓の切除組織 48 例の癌部および非癌部の組織と兵庫医科大学にて肝生検により採取した C 型慢性肝炎（非発癌症例）の組織を用いて検討を行った。mtDNA のうちの D-loop 領域の塩基配列につき、特異的な

primer を設計して PCR により増幅後、ABI sequencer を用いて direct sequence 法にて PCR 産物の塩基配列を決定した。

本研究は、大阪市立大学および兵庫医科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内容について説明を行い、文書同意を得た。研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守した。

C 研究結果

肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌合併症例の非癌部肝組織（肝癌発症の背景肝である慢性肝疾患部位）とを用い、それぞれ mtDNA の D-loop 領域の変異数を決定・比較した。すると肝癌症例の非癌部組織では、肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織に比して D-loop 領域の変異数は増加していた。したがって肝癌症例における非癌部組織では、より mtDNA の異常が蓄積している可能性が示唆された。

さらに、mtDNA の変異数について、肝炎組織の活動性および線維化との関連を検討した。すると肝癌非合併例では、組織学的所見が軽度な症例、すなわち A0-A1 といった肝炎の活動性が低い、あるいは F0-F2 といった線維化の軽度な症例では、mtDNA 変異数は全例とも 2 箇所以下であったが、炎症あるいは線維化の強い症例では変異が増加する傾向にあった。

一方肝癌合併症例の非癌部では、組織学的所見が軽度な症例（A0-A1 あるいは F0-F2）であっても、一般に mtDNA の変異において多数変異とされる 3 箇所以上の変異を生じた例が認められた。すなわち発癌症例においては、組織学的所見が軽度であっても非癌部における mtDNA 異常が蓄積していることが推定された。（図 1）

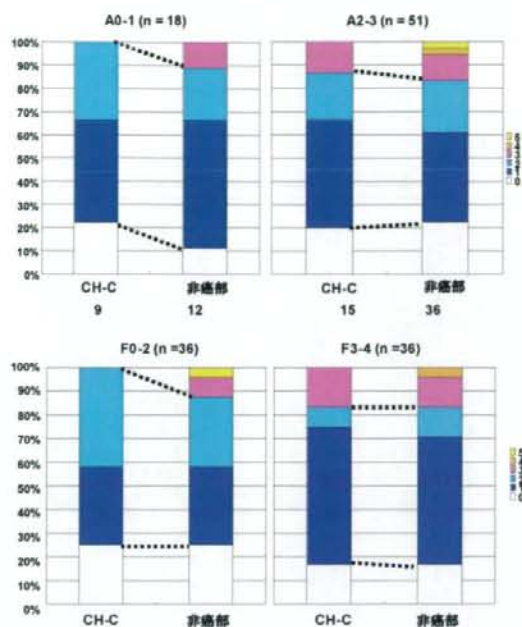


図 1 肝炎組織の活動性および線維化における肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と肝癌合併症例の非癌部肝組織の mtDNA の塩基変異数

また、肝臓非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較を行ったところ、同数のものが 68.6%、非癌部で増加が 27.4%、減少が 3.9%だった。（図 2）

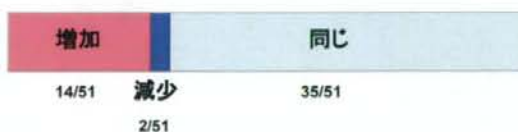


図 2 肝臓非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較

さらに、肝癌組織所見により非癌部の mtDNA 変異数を比較したところ、組織所見が悪性であるほど、癌部での変異数の増加が認められた。（図 3）

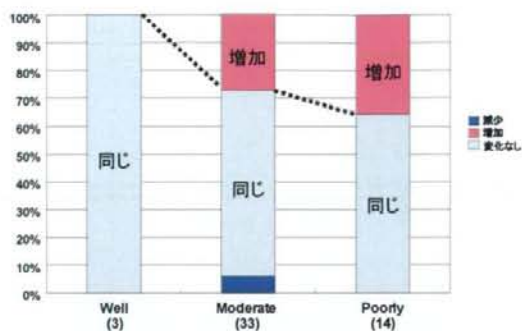


図3 非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較：肝癌の組織所見との関係

これは、慢性肝炎の肝組織において、すでに mtDNA に塩基変異が生じているおり、さらに変異の増加・蓄積が癌化に関与することを示唆している。

次に C 型肝炎の進展や発癌には活性酸素(ROS)の産生やインシュリン抵抗性の関与が指摘されているため、活性酸素の消去酵素である Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, EC-SOD、さらにインシュリン抵抗性・脂肪代謝に関連する ADRB3, PPAR γ の遺伝子多型を TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法で解析し、mtDNA の変異数との関連について検討を行った。

検討した遺伝子多形のうち、活性酸素消去酵素の一つ Mn-SOD 遺伝子では、Val9Ala の変異(T \rightarrow C)は、薬剤性肝障害のリスクが高まると報告されているが、C 型肝炎ウイルス感染症例においては Val9Ala の変異例において mtDNA の多数変異例が多い傾向が認められた。(図4)

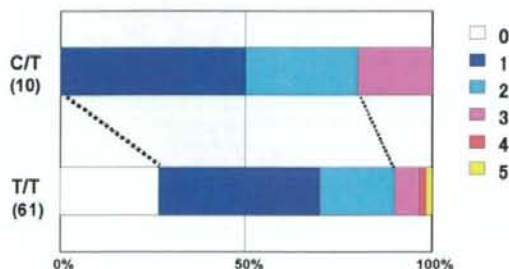


図4 : Mn-SOD の遺伝子多型と mtDNA 変異数

また別の活性酸素消去酵素 EC-SOD 遺伝子において、Arg213Gly の変異(C \rightarrow G)は血中脂質高値と心血管疾患のリスクに関連するといわれているが、C 型肝炎ウイルス感染症例においては Arg213Gly 変異例において mtDNA の多数変異例が多い傾向が認められた。(図5)

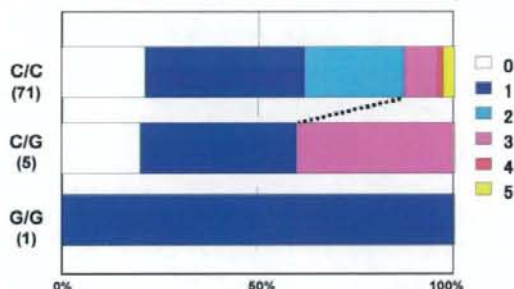


図5 : EC-SOD の遺伝子多型と mtDNA 変異数

以上の結果より、C 型肝炎ウイルス感染による mtDNA の変異の生じやすさに、ROS 消去酵素 Mn-SOD や EC-SOD と酵素の遺伝子多形性の関与することが示唆された。

一方組織学的検討から、IFN の著効例においては、光顕レベルでは改善が得られるものの電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の異常が存在する。特に、肝癌の非癌部の組織では、SVR 症例であっても硝子様封入体や空胞の形成というミトコンドリアの形態異常に加えて、粗面小胞体でも膨化などの形態異常が顕著であり、細胞質のグリコーゲンの蓄積も乏しいことが判明した。

| 症例 | 光顕所見 | 小胞体蓄積 | ミトコンドリア異常 | | | | Gly顆粒 |
|----|------|-------|-----------|---------|----|-----|-------|
| | | | 顆粒 | 電子線超微構造 | 異常 | 膜消失 | |
| 1 | A1F2 | + | 2+ | - | - | - | 2+ |
| 2 | A1F2 | + | + | - | - | + | 2+ |
| 3 | A0F0 | + | + | - | - | + | 2+ |
| 4 | A2F4 | 2+ | + | + | + | + | + |
| 5 | A0F2 | 3+ | + | 2+ | + | + | - |
| 6 | A0F1 | 2+ | - | + | + | 2+ | + |
| 7 | A2F4 | 2+ | - | + | 2+ | + | - |
| 8 | A1F2 | + | + | 2+ | + | 2+ | + |

D 考察

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既に mtDNA に変異が存在し、特に発癌症例では、組織学的所見が軽度であっても非癌部において mtDNA の異常が多数蓄積していることが推定された。また慢性肝炎の段階で生じた変異に加え、さらに癌化組織では mtDNA 変異が増加している事も示された。以上の結果より、mtDNA の変異蓄積が高癌化状態に関連することが強く示唆される。

また、mtDNA の変異数を規定する要因について検討し、ROS 消去酵素 Mn-SOD や EC-SOD の遺伝子多形性の関与が示唆された。今後、ROS 産生やインシュリン抵抗性に関連する遺伝子の多型とミトコンドリアの変異との関係につき、症例数を増やして検討するとともに、多数の遺伝子の多型を簡便に同時解析するシステムの構築を行う。さらに電顕で認められたミトコンドリアや ER の微細形態の異常の意義を明らかにし、加えて電顕以外の評価法を考案する。ER ストレスに関しては、 ^{2+}Ca 依存性分子シャペロン (Bip/GRP78, gp96/GRP94 など) に注目して検討する。また以上の検討を通じて、臨床的な肝発がん予測因子を明らかにする。

E. 結論

C 型慢性肝疾患では、肝細胞の mtDNA の塩基変異が集積し、IFN 投与により減少する。肝発癌症例では非癌部において組織学的変化が軽度

であっても mtDNA の塩基変異が多い。また ROS 産生や消去に関連する遺伝子やインシュリン抵抗性に関連する遺伝子の多型による検討では、Mn-SOD および EC-SOD の遺伝子多型と MtDNA の変異蓄積との関連が示唆された。さらに IFN の著効例においても、電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の形態異常が存在した。特に、SVR 肝癌の非癌部の組織では、粗面小胞体やミトコンドリアの異常が顕著であり、細胞質のグリコーゲンの蓄積が乏しかった。以上の結果からは、mtDNA の変異が発癌に関与すること、また mtDNA の変異の生じやすさには ROS 産生・消去に関連する複数の遺伝子の多型が関連することが示唆された。

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、ミトコンドリア遺伝子異常が高度な例は発癌リスクが高いことが示唆された。

F. 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.

G. 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 なし

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、肝癌に移行する。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分子の1つはDHCR24であり、コレステロール合成酵素であると同時に酸化ストレス応答の役割も報告されている。分担研究者らは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の反応を低下させる事を見いだした。さらに、p53の活性低下はDHCR24過剰発現に伴ってp53、MDM2相互作用が亢進する事やp53アセチル化が低下する事による可能性を見いだした。また、HCVによるDHCR24の発現誘導には転写開始点上流200塩基内の32bpが重要である事が明らかとなった。この領域中にSp1、MZF1の認識可能配列があったが、ゲルシフト法を用いて検索した結果これらの転写因子は結合していない可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

昨年度までに分担研究者らは、HCV感染がDHCR24分子の発現を誘導しこれが酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制する事を見いだした。本年度はさらにHCVによるDHCR24の発現誘導機序特に転写制御に関わる宿主因子の検索、あるいはDHCR24過剰発現によるp53活性抑制機序を検索し、HCVの新たな病原性発現経路の解明を目的に研究を進行した。

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。

HCVによる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の発現量が元来高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(約5,000塩基)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後HCV応答領域を検索した。応答領域内に認識配列を持つSp1やMZF1の結合の解析はオリゴヌクレオチドを合成して競合アッセイを行うか、特異抗体を用いたsuper shift assayで検討した。HCVが誘導するDHCR24の過剰発現が過酸化水素処理後のアポトーシス感受性に及ぼす影響についてはカスパーゼアッセイで定量的に測定して検索した。p53の活性はp21^{WAF1/CIP1}プロモーターアッセイで検索した。DHCR24の関与の可能性についてはsiRNAを用いて検討を行った。p53の翻訳後修飾等は特異抗体を用いたウェスタンブロット法や免疫沈降法で検索した。また、p53やMDM2の細胞内での局在について検索するため、蛍光抗体法や細胞分画を行って検索した。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やプラスミドベクターでDHCR24を過剰発現する細胞株を樹立した。

(倫理面への配慮)

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針

(H16.12.28)、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針

(H14.1.31)に基づき、実施した。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)。患者検体の使用に関する承認は熊本大学医学薬学研究部等倫理委員会で既に得た(倫理第235号)。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ている(H18年4月)。

C. 研究結果

これまでにヒト肝臓キメラマウス感染系でDHCR24の発現誘導が、HCV非感染マウス群に比べHCV感染マウス群では平均で5倍以上の有意な発現上昇である事を明らかにしている。また、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事からDHCR24遺伝子の上流約5,000塩基をクローニングし、HCVに反応するプロモーター領域の検索を行ったところ、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。抗体や特異配列の合成オリゴヌクレオチドを用いたゲルシフト法で解析したところSp1やMZF1が結合する可能性は低くこれら以外の宿主因子が結合している可能性が強く示唆された。

HCV発現継代細胞や、DHCR24の過剰発現細胞では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。さらに過酸化水素処理による p21^{WAF1/CIP1} プロモーター活性化も HCV 発現継代細胞や DHCR24 過剰発現細胞で低下していた。また、DHCR24 過剰発現により酸化ストレス誘導性アポトーシスで p53 により誘導される事が知られている Bax や Puma の発現が抑制されていた。以上の結果から、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、この活性抑制機序を明らかにするため、p53 の活性制御に重要な MDM2 との相互作用を解析したところ、DHCR24 過剰発現により亢進する事を見いだした。さらに、p53 の活性化に重要である翻訳後修飾のうち各種セリンのリン酸化についてはほとんど影響がないもののリジン残基(373, 382)の核内でのアセチル化が DHCR24 過剰発現により低下している事が明らかとなった。

D. 考察

HCV が DHCR24 遺伝子を転写誘導するゲノムプロモーター領域を同定し、作用する宿主因子の解析を行ったが、未知の転写因子が結合している可能性が示唆された。これらの転写因子を同定する事により HCV による DHCR24 転写誘導の特性が明らかになると期待される。また、DHCR24 過剰発現による過酸化水素誘導性アポトーシスへの抵抗性獲得は p53 の活性抑制による可能性が明らかとなった。今後は DHCR24 過剰発現による p53 の活性抑制機序、特に p53 と MDM2 相互作用の亢進機序や p53 ア

セチル化抑制機構に關与するシグナル経路についてさらなる検討を要する。以上の検討から HCV の新たな病原性発現のメカニズムが明らかになると期待される。

E. 結論

本年度の研究により、DHCR24 ゲノムプロモーター領域内の HCV 応答配列 (32 塩基) に Sp1, MZF1 以外の宿主因子が結合する可能性が明らかとなった。また、HCV による DHCR24 の持続的な過剰発現が生じると p53 と MDM2 の相互作用が増加し、p53 のアセチル化が抑制されてその活性が低下する可能性が明らかとなった。

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. 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* 2008, 7(3):269-276.
2. 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.* 2008, 31:435-448.
3. 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.* 2008, 80(3):370-376.
 4. 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* 2008, 375(2):321-330.
 5. 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.* 2009, 32(1):29-41.
 6. T. Nishimura, M. Satoh, M. Saito, Y. Kasama, M. Kohara, and K. Kohara. Significance of 3β -dehydroxysterol- Δ -24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2008, 78 A45.

2. 学会発表

「国内学会」

1. T. Nishimura, M. Sato, Y. Kasama, M. Shuda, S. Nakagawa, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Significance of 3β -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
2. 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) を用いた組換え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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. T. Nishimura, Y. Kasama, M. Shuda, M. Arai, M. Saito, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. "Hepatitis C virus suppresses 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
11. 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. 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 Liver Care Center Symposium (invited) Khon Kaen, Thai-land, 2008.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
- G. 知的所有権の取得状況
- 1.特許取得
「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

研究要旨:本年度は、まず岡山大学の加藤班員と共同で、間葉系幹細胞から分化した肝細胞に、HCV の RNA を遺伝子導入し、ウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系としての基盤作成に取り組んだ。さらに下遠野主任研究員との共同研究で、分化誘導した肝細胞の不活化細胞株を樹立し、その性状解析を、HCV の複製能を中心に検討した。研究成果として、HCV 複製に重要な microRNA122 の発現を、分化誘導した肝細胞に見だし、HCV の複製の可能性を明らかにした。

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、ウイルス性肝がんのメカニズム解明に重要な知見となる。

B. 研究方法

本年度は、まず岡山大学の加藤班員と共同で、間葉系幹細胞から分化した肝細胞に、HCV の RNA を遺伝子導入し、ウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系としての基盤作成に取り組む。さらに下遠野主任研究員との共同研究で、分化誘導した肝細胞の不活化細胞株を樹立し、その性状解析を、HCV の複製能を中心に検討する。さらに肝硬変、肝がんの進行に関与する microRNA の機能解析を進め、ウイルス感染との関連を検討する。(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) microRNA122 の発現解析

間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞に、HCV の複製に必須であると考えられている non-coding-small RNA の microRNA122 が発現しているかどうかをまず検討した。リアルタイム PCR にて解析したところ、未分化間葉系幹細胞では発現が認められなかったが、分化した肝細胞では microRNA122 の発現が 2 0 倍ほど上昇していることが判明した。

(2) 間葉系幹細胞由来肝細胞での HCV 複製の検討
microRNA122 が発現していることから、複製型 HCV-RNA である JFH-1 株 (2a 型) を細胞にトランスフェクションした。その結果、HCV のコピー数がトランスフェクション 7 日後に増加していることが明らかとなり、複製の可能性が示唆された。

(3) 不活化の試み

HPV の E6E7+hTERT による不活化の試みにおいては、2 株が肝細胞様細胞形態を保持したままの形で増殖してきた。2 0 0 9 年 1 月の時点で継代数は 7 である。現在までのところ広範な細胞死は認められな

いが、今後のクライシスへの対応を検討している。

D. 考察

前年度までの検討で間葉系幹細胞を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。本年度は、この細胞が、HCV 感染系として有用であるかどうかの検証を開始した。そのために、まず HCV 複製に必要な因子として、microRNA122 の発現を分化誘導した肝細胞に見いだした。実際に JFH-1 株 (2a 型) HCV を細胞に導入した予備実験では HCV のコピー数の増加を確認できた。さらにこの分化誘導した肝細胞の不死化の系も動き出したことから、培養の工夫等を行うことで、安定な細胞株を得るための方策を検討する必要がある。

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。本年度の研究成果は、班内での共同研究の成果であり、今後も主任研究者の指導のもとに、間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞の HCV 感染、複製系への応用を検討していく。

F. 健康危険情報

本研究では健康を危惧する細胞、方法論などは特

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

1. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238:265-276, 2009

2. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 70-77, 2009

3. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26: 2705-2712, 2008

4. Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275:1260-1273, 2008

2. 学会発表

(海外)

1. Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. RNAi World Congress 2008, Boston, USA

2. Ochiya T, Honma K, takeshita F, Nagahara