

- S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. Progress in Biomedical Optics and Imaging - SPIE 2008, San Jose, CA, USA
3. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in liver disease. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
 4. Yamamoto Y, Ochiya T. Global expression profiling of miRNA in liver development. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
 5. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose derived stem cells on liver failure. The 2nd International Symposium on Regenerative Medicine and Stem Cell Research. 2008, Seoul, Korea
 6. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. The Right RNAi Meeting in 2008, Brussels, Belgium

(国内)

1. 幹細胞の持つ肝細胞分化能と肝疾患治療効果、落谷孝広、第 15 回肝細胞研究会総会 (2008. 6. 27-28 静岡)
2. Transgenic Rat for Establishment of Embryonic Stem Cells. Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
3. 「Organ Biology における再生医学の役割」- ヒト間葉系幹細胞による肝再生医療の実現に向けて-、落谷孝広、(シンポジウム) 第 35 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会 (2008. 11. 22-23 東京)
4. 未分化ラット ES 細胞の樹立を目指した Oct4/Venus トランスジェニックラットの作成。川又理樹, 清水卓, 玉井淑貴, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008. 12. 9-12 神戸)
5. 脂肪に由来する間葉系幹細胞の創薬・治療研究への応用. 落谷孝広. 第 8 回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー (2009. 1. 27 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特に無し

分担者研究課題名：「肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義」

分担研究者 機関名 所属： 杉山和夫 慶應義塾大学 医学部

研究要旨

欠損型 C 型肝炎ウイルス (HCV) が C 型慢性肝炎患者血清から比較的高頻度に検出された (24%)。欠損型 HCV では構造領域が広範囲に欠損していたが、コアタンパク領域および非構造タンパク領域は常に保存されていた。本研究で解析した限り全ての欠損クローン (38 クローン) において、欠損は *in-frame* で翻訳可能であると考えられた。また、これらの分子系統樹的解析により欠損型 HCV が独自に複製、進化していることが示された。また、*in vitro* の感染培養実験系で、欠損 HCV ゲノム RNA に構造領域を供給することで、複製可能な欠損 HCV ゲノム感染性ウイルス粒子を産生させることができた。

A. 研究目的

近年、欠損型 C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムが C 型肝炎患者血清に存在することが報告された。また、分担研究者らもこれまでの本研究において、肝移植後 HCV 再発患者血清に欠損型 HCV ゲノムが検出されることを報告した。しかし、これらが本当に肝臓で増殖しているのか、あるいは、単なる分解産物なのかは不明である。本研究では欠損型 HCV が翻訳、複製を行っている可能性をその遺伝子解析によって検討する。また、感染培養細胞系を用いて欠損型 HCV ゲノムが *in vitro* で感染、複製を行うことを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

C 型肝炎患者血清の症例 (18 症例) に対して、long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。long distance RT-PCR は (i) 5' 非翻訳領域 (5' UTR) から NS3、(ii) NS3 から NS5B、(iii) 5' UTR から NS5B の 3 領域に

関して行った。さらに、欠損領域を正確に決定するために、欠損型 HCV の PCR 産物をクローニングし (計 38 クローン)、その塩基配列を分子系統樹当により解析し、遺伝子変異、分子進化などから個体内での欠損ウイルス複製の可能性を検討した。

次に、欠損型ウイルス RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションし、その複製能を *in vitro* で検討した。また、欠損型ウイルス RNA に構造領域をトランスに発現、供給させることにより Huh7 細胞で欠損型 HCV ウイルス粒子を産生させ、naïve な Huh 細胞へ感染し、複製を行うことの確認を行った。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する

る倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得る。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報を適正に管理保存する。

C. 研究結果

まず、欠損型 HCV が実際に存在することを確かめるために、18 症例の C 型肝炎患者血清に対して long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を行った。その結果、4 症例 (28%) において構造領域のゲノムが広範囲に欠失した HCV が検出された。その欠損幅は約 1.3kb から 2.0kb であった。一方、全ての症例において非構造領域における欠失は認められず、この領域が欠損型 HCV の複製において必須であることが示唆された。

さらに、欠損領域を正確に決定するために、欠損型 HCV の PCR 産物をクローニングし塩基配列の解析を行った (計 31 クローン)。3 症例とも構造領域が広範囲 (E1 から p7 または NS2) に欠損していた。欠損領域の型が 1 種類だけの症例 (1 症例) と複数種類の症例 (2 症例) があった。また、ほとんどのクローンで breakpoint は 1 箇所であったが、breakpoint が 2 箇所 (1 症例 1 クローン)、または、3 箇所あるクローン (1 症例 5 クローン) も存在した。これらも含め、全ての欠損が読み枠のずれを生じない in-frame deletion であった。このことにより肝細胞内で欠損型 HCV から実際にタンパクが翻訳されている可能性が示唆された。また、全ての欠損 HCV クローンにおいてコアタンパク領域が保存されており、コアタンパクが非構造領域と同様にその複製またはウイルス粒子形成 (パッケージング) などに重要な役割を持っている可能性が

示唆された。

同一症例における欠損型 HCV において全く同じ塩基配列をもつクローンは存在せず、その遺伝的多様性が認められた。そこで、これら多様なクローンを分子系統樹解析しその分子進化の推定を行った。その結果、同じ欠損領域の型に属するクローンは同じクラスターを形成しており、欠損のないクローンからも独立して分岐していた。すなわち、欠損型 HCV が自然発生したのち、それらが独自に肝細胞内で複製、分子進化してきたことが推察された。

次に、実際の患者血清から得られた欠損型ウイルス cDNA を鋳型に RNA を合成し培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションしその複製能を調べた。その結果、トランスフェクションされた Huh7 細胞で欠損型ウイルスが複製することが明らかになった。

さらに、HCV 欠損ゲノム RNA に、構造領域タンパクをトランスに供給することによって、欠損ゲノムがパッケージされ感染性のウイルスが産生されるかどうかをみた。キャップ構造を付加した mRNA として構造領域をトランス供給すると、HCV 欠損ゲノム RNA がパッケージされたウイルス粒子が Huh7 細胞へ感染し複製することが確認された。また、構造領域を安定的に発現するパッケージング細胞を樹立し、これに HCV 欠損ゲノム RNA をトランスフェクションすることによっても同様の結果が得られた。これらのことから、患者血清中の HCV 欠損ゲノム RNA は、構造領域が供給されることでパッケージされ感染性ウイルスとして産生されると考えられた。

D. 考察

ウイルスゲノムの欠損は defective interfering (DI)として1970年に初めて報告された。DIとは部分的に欠損したゲノムをもつウイルスが、野生型の全長(ヘルパー)ウイルスとの共存によりウイルス粒子を形成し、全長ウイルスの複製を抑制(interfering)する現象である。DIウイルスは主に培養細胞系において高タイトーのウイルスを持続的に感染させることによって自然発生してくる。近年、欠損型HCVゲノムが実際のC型肝炎患者血清にも存在することが報告された。本研究でも18例のC型肝炎患者症例のうち4症例(24%)において構造領域のゲノムが広範囲に欠失したHCVが検出された。DIウイルスは上述のようにウイルス感染培養系における現象であったが、ヒトにおいて検出されたのはこれまでの報告を含め初めてである。

ほとんどのクローンでbreakpointは1箇所であったが、breakpointが2箇所、または、3箇所のクローンも存在した。breakpointが2箇所のもは1クローン報告されているが、3箇所のもは今回が初めての報告である。また、これまでの報告ではin-frameの欠損例が多いものの、out-of-frameのものも存在し、実際に欠損ゲノムが翻訳されているかどうかは不明であった。本研究においては、4症例からクローニングされたすべての欠損型HCVクローン(計38クローン)の欠損がin-frameであり、肝細胞内でこれらの欠損型HCVから実際にタンパクが翻訳されている可能性を示した。

これまでの報告と同様、欠損型HCVにおいては構造領域が広範囲に欠損していた。その範囲はE1からp7またはNS2領域に及んでいた。構造領域のタンパクはウイルス粒子の構

成成分で、免疫(特に液性免疫)に関わるが、この領域を欠くことによって宿主の免疫監視から逃れている可能性がある。一方、コアタンパク領域と非構造領域はすべての欠損クローンにおいて保存され、これらの領域のRNAもしくはそのタンパクがウイルスのパッケージングや複製など欠損ウイルスのライフサイクルに必須であると考えられた。

今回採取された欠損クローン全てがin-frame deletionであったことから、欠損型HCVも翻訳を行っていると考えられる。遺伝子配列の多様性、および系統樹解析の結果より、欠損型HCVは複製し、分子進化も生じている可能性が示唆される。また、ゲノムRNAが単なるRNAの状態では存在しているとは考えにくく、血清試料から欠損型HCVが検出できるという事実から、欠損型HCVもウイルス粒子としてパッケージングされて細胞から放出されていると考えられた。また、本研究では実際に欠損型HCVが複製能、感染能を有することを欠損型HCVを用いた感染培養細胞実験によって初めて明らかにすることができた。実際のHCV感染肝細胞では、野生型のHCVがヘルパーとなり構造領域タンパクを供給し感染性の欠損型HCVを血液中に放出していると考えられた。

現在、臨床的にインターフェロン治療法の選択や効果判定にはアンプリコアなどのHCV RNAの定量検査が用いられている。その際の増幅領域としては5'非翻訳領域が用いられるが、この領域が欠損型でも保存されているとすれば、欠損型HCVと全長HCVが区別して増幅することは不可能である。したがって、症例によっては測定された血清中HCV量が必ずしも全長HCV量を反映していないという臨床的に重大な問題が生ずる可能性がある。こ

の後、簡便な欠損型 HCV 検出法を開発し、新たな C 型肝炎の診断、治療に応用すべきである。

E. 結論

欠損型 HCV が C 型慢性肝炎患者血清から比較的高頻度に検出された。欠損型 HCV では構造領域が広範囲に欠損していたが、コアタンパク領域および非構造タンパク領域は常に保存されていた。本研究で調べた限り、全ての欠損クローン(38 クローン)の欠損は *in-frame* であった。また、分子系統樹的解析により、欠損 HCV が独自に複製、進化していると考えられた。また、*in vitro* の感染培養実験系で、欠損 HCV ゲノム RNA に構造

領域が供給されることで、欠損 HCV ゲノムが複製可能な感染性ウイルス粒子として産生されることが明らかになった。

F. 研究発表

1.論文発表

Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro: Sugiyama, K., Suzuki, K., Shimotohno, K et al. J. Virol, 2009 (in submission).

G.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許出願
- 2.特許取得

HCV 感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析に関する研究

分担研究者

丸澤宏之 京都大学医学研究科消化器内科 助教

研究要旨 C 型肝炎ウイルス(HCV)の Core タンパク質の作用により、生理的条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない遺伝子編集酵素 AID が、ヒト肝細胞に誘導されることが明らかとなった。AID の発現の結果、宿主肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルで遺伝子異常が生成することが、肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

A. 研究目的

癌細胞の発生過程においては、種々の癌遺伝子・癌抑制遺伝子に体細胞変異や染色体異常といったさまざまな遺伝子異常が生じることが広く知られている。事実、ヒト肝癌組織では、さまざまな癌遺伝子・癌抑制遺伝子を含む領域の染色体欠失や遺伝子変異が存在することが示されており、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染による慢性肝炎から肝硬変を背景に肝癌が発生する過程において、宿主肝細胞にさまざまな遺伝子異常が惹起されることが、ヒト肝癌の発生に重要な役割を果たしていると思定されている。しかしながら、発癌過程における遺伝子変異生成の分子機序に関しては大部分が不明のままであり、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌(Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC) や一部の消化器癌で認められるような DNA 修復遺伝子の異常はヒト肝癌では稀とされている。これまでの我々の研究成果から、遺伝子編集機能をもつ Apolipoprotein B 100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family 分子の一員である Activation-induced cytidine deaminase

(AID)が、肝癌の発生過程における遺伝子異常の生成に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなってきた。AID は、活性化B細胞において免疫グロブリン遺伝子に高頻度に体細胞突然変異を引き起こすと同時に、DNA 2本鎖切断を誘発することにより抗体のクラススイッチ組み換えを誘導する機能を有する必須の分子である。AID は通常は活性化B細胞にのみ発現しており、正常な肝細胞ではその発現をみることはないと言われてきた。しかしながら、我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染により慢性肝疾患を伴った肝細胞では AID が異所性に過剰発現しており、肝細胞への AID 発現の結果、さまざまな発癌関連遺伝子に体細胞変異が生じてくることが明らかとなってきた。そこで、この AID による遺伝子異常導入活性に着目し、HCV 感染による AID 発現誘導の分子機構を明らかにするとともに、AID 発現により肝細胞にもたらされる遺伝子異常の全体像を明らかにすることで、HCV 感染からの肝発癌の分子機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV 感染の結果、AID が発現誘導される分子機序を明らかにする目的で、さまざまなウイルスタンパク質や炎症性サイトカイン刺激を肝培養細胞に加え、細胞内シグナル伝達の変化と AID 発現の有無の定量的評価を行う。

(2) HCV の非構造領域、全長ウイルス遺伝子を発現するレプリコン細胞を用い、ウイルスタンパク質による AID 発現に関与する細胞内シグナル伝達経路を探索する。

(3) ヒト肝培養細胞において持続的に AID を発現した結果生じる遺伝子異常の全体像を明らかにする目的で、AID を発現した肝培養細胞から抽出した核酸を用いて Comparative genomic hybridization (CGH) 法によるゲノムワイドな遺伝子異常の網羅的解析を行う。従来の CGH 法では 5-10Mb バンドレベルの大きな異常しか検出できないため、本研究では数 Kb の微細ゲノム異常をゲノムワイドに俯瞰的に分析する目的で CGH microarray 法による解析方法を活用する。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 活性化 B リンパ球において、免疫グロブ

リン遺伝子への体細胞突然変異やクラススイッチ組み替えを導入する活性を有する AID は、生理的条件下では肝細胞ではその発現をほとんど認めない。しかしながら、HCV のコードするウイルスタンパク質のひとつである Core タンパク質や炎症性サイトカインである TNF- α 刺激によりヒト肝細胞に AID が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。これらの AID 誘導刺激因子は、細胞内で転写因子 NF- κ B を活性化することが共通の特徴であったため、NF- κ B 阻害剤、IKK- α 、IKK- β の dominant negative form や IKK- γ に特異的な siRNA を用いて細胞内 NF- κ B 活性化シグナルを阻害したところ、肝細胞における AID 発現が減少～消失することが確認された。

(2) 全長 HCV を発現するレプリコン細胞では高いレベルでの AID 発現を認めるのに対して、インターフェロン処理によりウイルス排除を行ったレプリコン (Cured) 細胞では AID 発現が減弱～消失することがわかった。また、レプリコン細胞内の NF- κ B 活性化シグナルを NF- κ B 阻害剤、IKK- α 、IKK- β の dominant negative form や IKK- γ に特異的な siRNA を用いて阻害したところ、AID 発現が減少することが確認された。以上より、HCV のコードする Core タンパク質による NF- κ B 活性化が AID 発現に関与している可能性が示唆された。

(3) ヒト肝癌の発生過程において、癌関連遺伝子への点突然変異とともに染色体異常 (転座、欠失など) が重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに、リンパ系腫瘍の発生過程においては、AID が特定の染色体に発癌に関与すると想定されている染色体転座を誘導する活性を有することが報告さ

れている。したがって、HCV 感染からの肝発癌過程において、AID が体細胞変異の生成のみならず、転座・欠失・増幅といった染色体レベルでの異常の出現に関与している可能性が十分考えられた。そこで、肝細胞における AID の標的遺伝子領域を同定するとともに、AID 発現によりどのような染色体レベルでの遺伝子異常が生じているかを検討する目的で、CGH 法を用いて AID 発現下のヒト肝細胞における遺伝子異常の生成の網羅的な解析を行った。まず、レンチウィルスベクターを用いて AID を持続的に活性化誘導した肝培養細胞、AID 発現のないコントロール細胞、それぞれからゲノム DNA を抽出し、CGH microarray 法を用いて、AID 活性化の有無により既知の約 43,000 箇所の遺伝子領域において減少や増幅が生じているか否かを解析した。興味深いことに、AID 発現 8 週間後のヒト肝細胞から抽出したゲノムでは、ほぼすべての染色体領域にわたって散在性に、多様な染色体異常が生じており、その大部分は一定の染色体領域の欠失として生じていることが明らかとなった。次に、CGH microarray 法で検出された染色体レベルでの欠失領域に含まれる遺伝子群をゲノムデータベースから同定し、それぞれの遺伝子に特異的なプローブを作成し、real-time PCR 法により染色体異常出現領域における遺伝子量の定量評価を行った。興味深いことに、AID 発現により欠失の生じた染色体領域にはいくつかの既知の癌抑制遺伝子が含まれており、これらの遺伝子発現が AID による染色体欠失の結果、著明に減少して行くことが明らかとなった。

D. 考察

HCV 感染を契機とする慢性肝炎から肝発癌

に至る過程において、体細胞変異とともに染色体レベルでの遺伝子異常（転座、欠失など）の生成に、肝細胞における AID の異所性発現が深く関与している可能性が示唆された。このように AID は、本来は発現していない臓器でも、炎症や感染症といった発癌と関連した病的状況になると発現誘導され、細胞内でさまざまな遺伝子異常を引き起こすことで、肝癌細胞の発生や進展に重要な役割を果たしているものと推定された。以上の結果から、HCV 感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、AID 発現が誘導され宿主細胞にさまざまな遺伝子異常が惹起されることが、ヒト肝癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV のコードする Core タンパク質により肝細胞に NF- κ B が活性化された結果、異所性 AID が発現誘導されることが明らかとなった。AID の遺伝子編集酵素活性により、肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルでの遺伝子異常が生成されることが、肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1399-1404; 2008.

2. Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression.

Int J Cancer. 123: 2735-2740; 2008.

3. Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, and Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47: 888-896: 2008.

4. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, and Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*. 135(3) : 889-898; 2008.

2.学会発表

1. 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、本庶佑、千葉勉:発癌過程における遺伝子異常の生成への Activation-induced cytidine deaminase(AID)の関与、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008.12.9-12.

2. 高井淳、丸澤宏之、日合弘、千葉勉、木下和生 : A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by activation-induced cytidine deaminase(AID)、第 67 回日本癌学会総会・学術集会、名古屋、2008.10.28-30

3. 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、高忠之、藤井茂彦、藤盛孝博、千葉勉 : Activation-induced cytidine deaminase serves as a link between inflammation to colitis-associated colorectal cancers、第 67 回日本癌学会総会・学術集会、名古屋、

2008.10.28-30

4. 丸澤宏之:慢性肝炎患からの肝癌発生の分子機序～遺伝子変異が出現する普遍的な仕組みの探求～、第 12 回日本肝臓学会大会、東京、2008.10.1-3

5. 高井淳、丸澤宏之、千葉勉 : 肝前駆細胞における遺伝子変異の蓄積が肝発癌に果たす役割、第 12 回日本肝臓学会大会、東京、2008.10.1-3

6. 森澤利之、丸澤宏之、千葉勉 : AID による遺伝子変異生成を介した消化器発癌機構、第 50 回日本消化器病学会大会、東京、2008.10.1-4

7. 丸澤宏之:炎症からの消化器癌発生機序—AID による遺伝子変異導入機構—、第 185 回日本消化器病学会東北支部例会、秋田、2008.7.11

8. 森澤利之、丸澤宏之、岡崎一美、本庶佑、千葉勉 : AID による遺伝子変異生成を介した消化器発癌機構、第 81 回日本薬理学会年会・学術集会、横浜、2008.3.17-19

9. Takai A, Marusawa H, Endo Y, Hiai H, Chiba T, Kinoshita K. A new mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by activation-induced cytidine deaminase. Annual Meeting of American Association of Cancer Research. San Diego, USA, 2008.4.12-16

10. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deminase serves as a link between in-flammation to colitis - associated colorectal cancers. Annual Meeting of American Association of Cancer Research. San Diego, USA, 2008.4.12-16

11. Marusawa H, Matsumoto Y, Kinoshita K,

Endo Y, Honjo T, Chiba T.
Activation-induced cytidine deminase
contributes to gastric carcinogenesis through
the accumulation of genetic alterations.
Annual Meeting of American Association of
Cancer Research. San Diego, USA,
2008.4.12-16

G 知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

なし

2.特許取得

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮成悠介、 臼田信光、 下遠野邦忠	C型肝炎ウイルス の増殖戦略		蛋白質核酸 酵素	共立出版株式 会社	東京	2008	666-672
宮成悠介、 臼田信光、 土方誠、 下遠野邦忠	C型肝炎ウイルスの 生活環と発がん		化学と生物	日本農芸学会	東京	2008	826-831

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.	Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*)	J Hepatol.	50(3)	453-460	2009
Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M.	3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV.	Biochem Biophys Res Commun.	379	330-334	2009
Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K.	Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination.	J Biol Chem.	283	34273-34282	2008
Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K	Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300	Virology.	379	306-313-	2008
Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H.	Heat-shock Protein 90 is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3.	J. Biol. Chem.	284	6841-6846	2009,.
Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO,	Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus	FEBS Lett.	582	3085-3089.	2008,

Takaku H.	vector-mediated short-hairpin RNA expression.				
Nishibe Y, Kaneko H, Suzuki H, Abe T, Matsuura Y, Takaku	Baculovirus-mediated interferon alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine model.	Gene Ther.	15	990-997.	2008,
Kitajima M, Abe T, Miyano-Kurosaki N, Taniguchi M, Nakayama T, Takaku H.	Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the <i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus.	Mol. Ther.	16	261-268.	2008
Kitajima M, Takaku H.	.Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus <i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice.	.Clin. Vaccine Immunol.	15	376-378.	2008
Gondai T, Yamaguchi K, Miyano-Kurosaki N, Habu Y, Takaku H..	Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon.	Nucleic Acids Res.	36	e18	2008
. Furukawa A, Nagata T, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M.	NMR assignments and the identification of the secondary structure of the anti-retroviral cytidine deaminase.	Nucleic Acids Symp Ser.	52	183-184	2008
Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, <u>Hotta H.</u>	Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells.	J Gen Virol	(in press)		2009
Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, <u>Hotta H.</u>	HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.	J Hepatol	(in press)		2009

Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, <u>Hotta H.</u>	Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway.	J Virol	82(21)	10375-10385	2008
Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, <u>Hotta H</u>	Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk.	J Gen Virol	89(5)	1231-1242	2008
El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, <u>Hotta H.</u>	Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ ribavirin combination therapy.	Hepatology	48(1)	38-47	2008
Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, <u>Hotta H</u> , Shoji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y.	Usefulness of new immuno-radiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b.	Intervirology	51(Suppl 1)	70-75	2008
Kuroki M,	Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress.	Journal of Virology	83	2338-2348	2009
Kato N,	Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture.	Archives of Virology	154	77-85	2009
Ariumi Y,	The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication.	Journal of Virology	82	9639-9646	2008

Dansako H,	A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication.	Virus Research	137	72-79	2008
Mori K,	New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C.	Biochemical and Biophysical Research Communications	371	104-109	2008
Ando M,	Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication.	Liver International	28	1158-1166	2008
Hirano K,	Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells.	Liver Transplantation	14	292-298	2008
Nakamura M	Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment.	Journal of Medical Virology	80	632-639	2008
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.	<i>Cell Metabolism</i>	7 (3)	269-276	2008

T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, and <u>K. Tsukiyama-Kohara</u>	Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs.	<i>Comp Immunol Microbiol Infect Dis</i>	31	435-448	2008
Y. Terao-Muto, M. Yoneda, T. Seki, A. Watanabe, <u>K. Tsukiyama-Kohara</u> , K.Fujita, and C. Kai.	Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines.	<i>Antiviral Res.</i>	80 (3)	370-376	2008
H. Sato, R. Honma, M.Yoneda, R. Miura, <u>K. Tsukiyama-Kohara</u> , F. Ikeda, T. Seki, S.Watanabe, and C. Kai.	Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression.	<i>Virology</i>	375 (2)	321-330	2008
T. Nishimura, M. Satoh, M. Saito, Y. Kasama, M. Kohara, and <u>K. Kohara</u> .	Significance of 3 β -dehydroxysterol-D-24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus.	<i>Antiviral Res</i>	78	A45	2008
Y. Inoue, <u>K. Tsukiyama-Kohara</u> , M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai and Y. Oka.	Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus.	<i>Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.</i>	32 (1)	29-41	2009
Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells.	<i>Dev. Dyn.</i>	238	265-276	2009
Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H., <u>Ochiya T.</u>	Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure.	<i>J Gastroenterol Hepatol,</i>	24	70-77	2009

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
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
Marusawa H.	Aberrant AID expression and human cancer development.	International Journal of Biochemistry and Cell Biology	40	1399-1404	2008
Morisawa T, <u>Marusawa H</u> , Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T.	Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression.	Int J Cancer	123	2735-2740	2008
Komori J, <u>Marusawa H</u> , Machimoto T, Endo Y, and Chiba T.	Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma.	Hepatology	47	888-896	2008
Endo Y, <u>Marusawa H</u> , Kou T, Nakase H, and Chiba T..	Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation to colitis-associated colorectal cancers.	Gastroenterology	135	889-898	2008

研究成果の刊行物・別刷り



3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV

Hussein Hassan Aly^a, Kunitada Shimotohno^b, Makoto Hijikata^{a,c,*}

^a Laboratory of Human Tumor Viruses, The Institute for Virus Research, Kyoto University, Department of Viral Oncology, 53 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^b Center for Human Metabolomic Systems Biology, Keio University, 35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^c Laboratory of Viral Oncology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Konocho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2008

Available online 25 December 2008

Keywords:

Hepatitis C virus

Infection

Replication

3D culture

PPAR

Immortalized hepatocytes

Blood-borne HCV

ABSTRACT

Due to the high polymorphism of natural hepatitis C virus (HCV) variants, existing recombinant HCV replication models have failed to be effective in developing effective anti-HCV agents. In the current study, we describe an *in vitro* system that supports the infection and replication of natural HCV from patient blood using an immortalized primary human hepatocyte cell line cultured in a three-dimensional (3D) culture system. Comparison of the gene expression profile of cells cultured in the 3D system to those cultured in the existing 2D system demonstrated an up-regulation of several genes activated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) signaling. Furthermore, using PPAR α agonists and antagonists, we also analyzed the effect of PPAR α signaling on the modulation of HCV replication using this system. The 3D *in vitro* system described in this study provides significant insight into the search for novel anti-HCV strategies that are specific to various strains of HCV.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Infection with Hepatitis C virus (HCV) is a serious health problem worldwide and leads to high rates of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. Given that the standard HCV therapy remains insufficient for the successful treatment of many patients [2], the development of more effective and less toxic anti-HCV agents is required. *In vitro* systems like the HCV replicon-bearing cells and the infectious particle-producing JFH1 system, has contributed to the discovery of new targets for anti-HCV therapy. However, these recombinant HCV genomes only proliferate in sublines of HuH-7 cells, which do not permit infection or proliferation of blood-borne HCV. Due to the high polymorphism of natural HCV, data from recombinant HCV systems could be evaluated by studying the therapeutic response of a variety of naturally occurring HCVs. However, the current systems available for such study remain insufficient due to the low infection and replication efficiency of the natural HCV strains.

More recently, production and secretion of infectious HCV particles has been reported in two independent three-dimensional (3D) cell culture systems, termed the radial-flow bioreactor (3D/RFB) and the thermoreversible gelatin polymer (3D/TGP) systems. These results were not observed in monolayer cultures [3],

suggesting that hepatocytes cultured in 3D more closely resemble liver cells *in vivo* [4] and thus support HCV proliferation. In addition, analysis of gene expression levels in 3D cultured cells revealed that the newly established immortalized human hepatocyte (HuS-E/2 cells) gene profile was altered to more closely resemble that of human liver tissue when the cells were cultured in 3D/TGP [5].

In the current study, we cultured HuS-E/2 cells in 3D/TGP and demonstrated efficient proliferation of natural HCV. Furthermore, gene expression analysis of these cells demonstrated the activation of the peroxisome proliferators-activated receptor α (PPAR α) signaling pathway, suggesting an important role for this pathway in the replication of natural HCV. Thus, the *in vitro* system described appears to be a useful tool for the study of HCV infection and proliferation as well as for the development of effective anti-viral agents against various natural HCVs.

Materials and methods

Cell culture. Immortalized human hepatocytes (HuS-E/2) and LucNeo#2 replicon cells [6] were cultured as previously described [5,7]. For the 3D-TGP culture system, 1×10^5 HuS-E/2 cells were cultured in 1 ml Mebiol gel (Mebiol Inc., Kanagawa, Japan)/well in 12-well plates. Five hundred microliters of fresh medium was overlaid on the solidified gel, and was changed every 2 days. Cell

* Corresponding author. Address: Laboratory of Human Tumor Viruses, The Institute for Virus, Kyoto University, Department of Viral Oncology, 53 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Fax: +81 75 751 3998. E-mail address: mhijikata@virus.kyoto-u.ac.jp (M. Hijikata).

extraction from the gel was done at the designated time points according to the manufacturer's protocol.

RNA extraction, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time RT-PCR (Q-PCR). At the designated time points, total cellular RNA was extracted and 1 μ g of total RNA was used as a template for RT-PCR and for the quantitative detection of HCV-RNA using real-time RT-PCR (Q-PCR) as previously described [10].

HCV infection experiment. HCV infection experiments were carried out using sera from patients infected with HCV. Infection in 2D culture was undertaken as previously described [5]. For 3D/TGP cultured cells, the gel was solidified, and 50 μ l HCV-containing patient serum with a titer of 1×10^6 HCV-RNA/ml was added to the culture and mixed. The culture was continued until the cells were extracted. Following extraction from 3D-TGP, cells were centrifuged and washed three times thoroughly with PBS. RNA was then extracted from the cells as described above. HCV infection into HuS-E/2 cells was also examined in the presence of anti-E2 mouse monoclonal antibody (917) as outlined previously [8].

Treatment of cells with PPAR α signaling agonists and antagonists. Fenofibrate or MK886 (Sigma-Aldrich, USA) were added to the culture medium of HuS-E/2 (2D-HuS-E/2) cells from day 0 of HCV infection; or the culture medium of LucNeo#2 replicon harboring cells. The cells were then cultured to the designated time point.

Microarray analysis. Gene expression profiles of 3D/TGP cultured HuS-E/2 cells were obtained by microarray analysis (3D-Genes Human 25, Toray, Tokyo, Japan) and compared to those of cells cultured in 2D.

Results

3D/TGP cultures enhance HCV proliferation in HuS-E/2 cells

Infection and proliferation of the HCV genotype 1b (HCV-RC5) derived from the serum of patient RC5 in HuS-E/2 cells cultured in 3D/TGP (3D/TGP-HuS-E/2 cells) was investigated and compared with that of HuS-E/2 cells cultured in 2D (2D-HuS-E/2). As outlined in Fig. 1A, the HCV-RNA levels in the 3D/TGP-HuS-E/2 cells were significantly higher at all of the time points examined following infection than in the 2D-HuS-E/2 cells, suggesting that the 3D/TGP system greatly enhances the proliferation of naturally occurring HCV in HuS-E/2 cells. Similar results were also obtained for sera from additional patients (data not shown). To examine whether the infection is viral envelope-receptor mediated, the infection experiments using serum treated with anti-HCV-E2 antibody (α -E2) or with anti-tubulin (negative control) was also performed. Pre-incubation of the serum with α -E2 significantly reduced the total amount of HCV-RNA in the cells upon infection (Fig. 1B). This result suggested that the infection of natural HCV into 3D/TGP-HuS-E/2 cells was HCV-E2-dependent.

Inhibition of natural HCV replication in HuS-E/2 cells by Interferon

In order to test the effects of anti-viral agents on natural HCV replication in 3D/TGP HuS-E/2 cells, 50–100 U/ml of IFN α was added to the medium overlaying the HCV-RC5 infected 3D/TGP-HuS-E/2 cells. The two treatment concentrations resulted in the inhibition of HCV-RNA replication in 3D-HuS-E/2 cells by

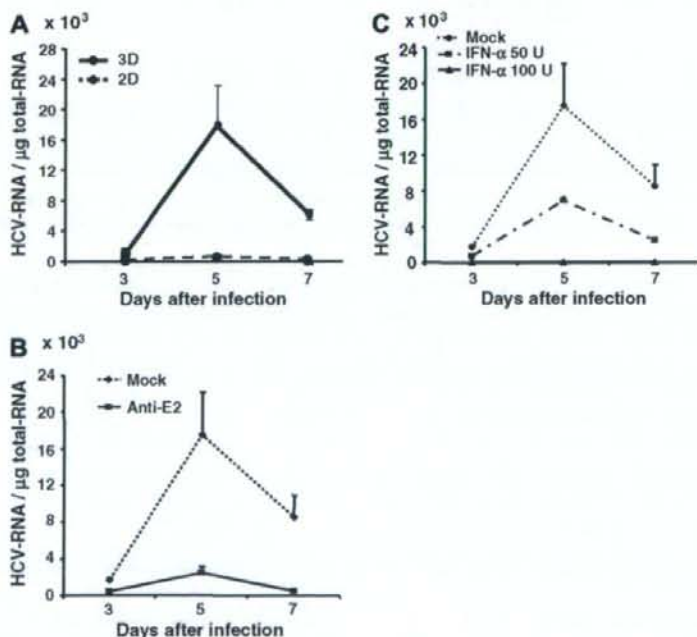


Fig. 1. HCV infection into 3D/TGP-HuS-E/2 cells. (A) 3D/TGP significantly enhanced HCV proliferation in HuS-E/2 cells. HCV patient serum was used to infect a similar number of HuS-E/2 cells cultured in 2D (hashed line) or 3D/TGP (solid line) culture for 24 h. Cells were then harvested and lysed at the indicated time points (3–7 days). The quantity of genomic HCV-RNA per 1 μ g total RNA was determined by Q-PCR analysis. (B) Anti-E2 antibodies blocked HCV infection. HCV infection was performed as described in panel A in the presence of Anti-E2 specific or anti-tubulin (control) antibodies. (C) IFN α inhibits HCV replication in 3D/TGP-HuS-E/2 cells. HuS-E/2 cells were infected with HCV and fresh medium supplemented with or without (Mock), 50 U/ml, or 100 U/ml IFN α overlaid on the gel containing the cells and HCV proliferation measured as described above.

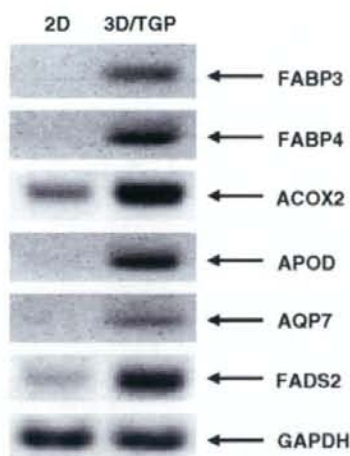


Fig. 2. RT-PCR analysis of the expression of genes identified by microarray. The PPAR α regulated genes were increased in 3D/TGP-HuS-E/2 cells (3D-TGP) and their expression levels measured by RT-PCR. 2D represents RNA samples from 2D-HuS-E/2 cells. Twenty cycles of amplification were undertaken for the RT-PCR analysis. GAPDH expression served as an internal control. Abbreviations: FABP3, fatty acid binding proteins 3; FABP4, fatty acid binding proteins 4; ACOX2, acyl-coenzyme A oxidase 2; APOD, apolipoprotein D; AQP7, aquaporin 7; FADS2, fatty acid desaturase 2; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

approximately 50–60% and almost completely, respectively, when compared to the replication in cells receiving mock treatment (Fig. 1C). These results demonstrate that the IFN α treatment was effective on HCV derived from RC5 and that 3D/TGP-HuS-E/2 cells may be useful for the screening of anti-HCV drugs for the treatment of natural HCV.

Increased activation of the PPAR α signaling pathway in 3D cultured HuS-E/2 cells

Given that 3D/TGP-HuS-E/2 cells demonstrated enhanced proliferation of natural HCV, the gene expression profiles of these cells was compared with that of cells cultured under normal 2D conditions using microarray analysis in order to identify the factors required for the enhanced proliferation. Among the 24,268 genes compared in this analysis, 212 genes demonstrated a greater than four folds index increase in expression in 3D/TGP than standard cultured cells. Cell signaling pathway analysis of these 212 genes showed that six genes, including fatty acid binding proteins 4 and 3 (FABP4 and 3), apolipoprotein D (APOD), aquaporin 7 (AQP7), acyl-coenzyme A oxidase 2 (ACOX2), and fatty acid desaturase 2 (FADS2), were targets of PPAR α signaling [9–12]. The increased expression of these genes in the 3D/TGP-HuS-E/2 cells was further confirmed by RT-PCR analysis (Fig. 2). Given that PPAR α is an essential factor for normal hepatocyte function [13], these results indicate that 3D/TGP culture enhances the hepatocyte-specific characteristics of HuS-E/2 cells.

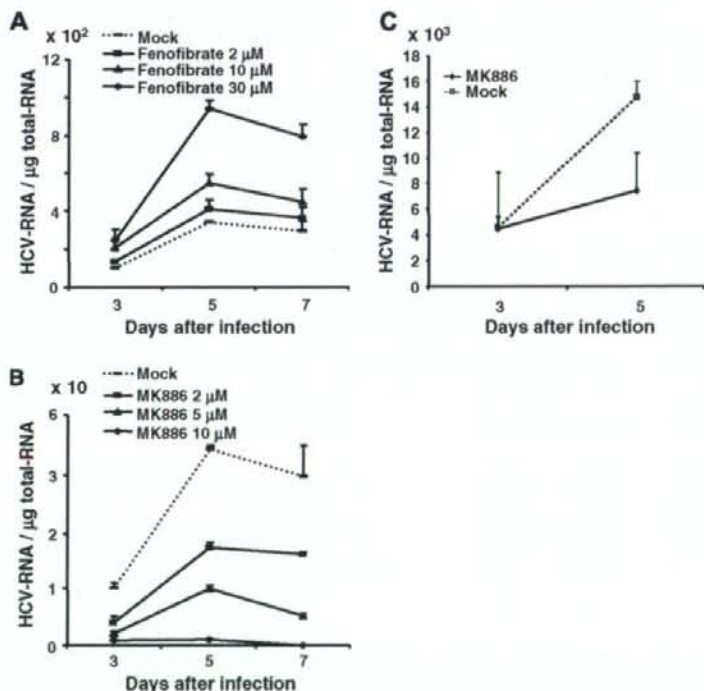


Fig. 3. The effects of PPAR α agonists and antagonists on natural HCV proliferation. (A) HuS-E/2 cells were infected with HCV and fresh medium supplemented with or without (Mock) 2, 10, or 30 μ M of fenofibrate overlaid on the cells. (B) Medium supplemented with or without (Mock), 2, 5, or 10 μ M of MK886 was overlaid on 2D-HuS-E/2 cells infected with HCV. HCV proliferation following treatment was measured by Q-PCR. (C) Medium supplemented with or without (Mock), 10 μ M of MK886 was overlaid on 3D/TGP-HuS-E/2 cells infected with HCV. HCV proliferation following treatment was measured by Q-PCR.