

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成21（2009）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成21(2009)年 3月

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

班員名簿

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

[事務局]

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

目 次

I. 総括研究報告書

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

II. 分担研究報告

1. HCV コア蛋白質の肝脂肪化と IFN 感受性における役割 7
松浦 善治
2. HCV による病原性発現とミトコンドリア 11
小池 和彦
3. B型肝炎ウイルスレセプターの分離・同定とその応用に関する研究 17
上田 啓次
4. オステオアクチビンの肝障害、肝繊維化における役割の解析 19
井戸 章雄
5. ウイルス性肝炎・肝がんにおける免疫制御に関する研究 23
中本 安成
6. 消化器癌に対するインターフェロン α と樹状細胞による免疫療法 25
広石 和正
7. 肝がんの MICA shedding における ADAM10 の意義 29
竹原 徹郎
8. C型慢性肝疾患、肝癌における制御性 T 細胞の意義 33
考藤 達哉

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 43

I. 総括研究報告

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

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

研究代表者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標として、1) 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明とその制御法の開発、2) 肝がんの特徴的な遺伝子発現の解明とその診断への応用、3) 微視的な肝がんに対する免疫排除機構の障害の解明とその制御法の開発に焦点をしばって研究を行う。3年計画の2年目にあたる本年度において、HCV コア蛋白の成熟と分解を基盤とした病態形成（脂肪化およびがん化）の理解に進展がみられ、C型肝炎・肝がんの免疫抑制機序として可溶性 MICA の shedding の分子機構の解明、病態における制御性 T 細胞やがん抗原特異的 T 細胞の動態の解明に進展がみられた。

A. 研究目的

わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標とする。ウイルス性肝炎からの肝がんの発生および進展を、1) ウイルスの持続感染と細胞機能の修飾、2) 肝細胞における遺伝子異常の蓄積と細胞のがん化、3) がん化した細胞の免疫応答からの回避と顕性肝がんへの進展の3つのステップに分け、それぞれの病態とその成立機序を分子・細胞レベルで解明する。各ステップをターゲットとした制御法を開発し、ウイルス性肝炎から肝がんの発生抑止法と肝がんに対する治療・再発抑止法の構築を図るとともに、肝がんの早期発見と治療に

有用な診断マーカーの開発を行うことを目的に研究を行う。

B. 研究方法

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

- HBV レセプターの全容を解明し、HBV 持続感染に伴う肝がんの発症機構を検討する。
- HCV コア蛋白の成熟と核移行のメカニズムを解明し、HCV コア蛋白による肝発がんを抑制し得る標的分子を明らかにする。
- HCV コア蛋白によるERストレスとイン

スリン抵抗性が肝発がんに与える意義について解析し、ER ストレスとインスリンシグナルを標的とした発がん抑止法を開発する。

- オステオアクチビンによる肝臓の線維化抑制機序を解明し、ウイルス性肝炎にみられる肝臓の線維化をターゲットとした発がん抑止戦略を探索する。

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

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

C. 研究成果

HCV コア蛋白の成熟・分解と病態形成

コア蛋白質は SP により前駆体蛋白質から切り出され、さらに SPP によって切断されて成熟する。成熟したコア蛋白質はゲノム RNA とヌクレオキャプシドを形成し、エンベロープ蛋白質に包まれて HCV 粒子として小胞体内腔へ出芽する。一部のコア蛋白質は核へ移行し、PA28 γ と結合してプロテアソームで分解される。SREBP-1c の転写は核内受容体型転写因子である RXR α と LXR α 、および共役転写因子によって制御されている。核へ移行したコア蛋白質は、

PA28 γ と相互作用して、RXR α と LXR α 、あるいは共役転写因子に作用して、SREBP-1c の転写を増強させて中性脂肪の発現を上昇させると思われる。CoreTg マウスでは SREBP-1c 遺伝子の発現が有意に上昇しているが、CoreTg/PA28 γ KO マウスでは発現の亢進は回復した。HCV コア蛋白質と PA28 γ の核内での相互作用は、SREBP-1c や酸化ストレス(ROS)の発現を亢進させることによって、CoreTg マウスで観察されるインスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症に極めて重要な役割を演じていた。PEG-IFN/RBV 治療における HCV の排除には Core70 /91 のアミノ酸置換が重要な意義を持っていることが臨床的に明らかにされている。コア遺伝子にアミノ酸置換を導入することにより、SREBP-1c の転写活性が低下した。このことから同部のアミノ酸置換は宿主細胞の機能を修飾することが明らかとなった。

HCV コア蛋白によるミトコンドリア機能障害

ミトコンドリアのプロテオーム解析により、ミトコンドリア蛋白シャペロンである prohibitin の発現が HCV コア蛋白発現細胞において増加していた。Prohibitin の発現は、コア蛋白発現 HepG2 細胞の他に、全長 HCV レプリコン細胞やコア遺伝子トランスジェニックマウス肝臓においても増加していた。コア蛋白と prohibitin はミトコンドリアに共在していた。Prohibitin が発現増加する機序として、コア蛋白との相互作用により蛋白が安定化されていることが示唆された。さらに、コア蛋白との相互作用により prohibitin のミトコンドリア蛋白シャペロンとしての機能が阻害され、その結果、

cytochrome c oxidase (COX)の中のミトコンドリア DNA 由来のサブユニット蛋白の発現が低下し、COX 活性が低下していることが示された。今回得られた結果から、コア蛋白と prohibitin の相互作用が HCV による酸化ストレス誘導に関与している可能性が示唆される。

MICA sheddase の同定とその発現制御

MICA の肝がん細胞からの分泌は細胞膜上の MICA 発現の低下と免疫細胞の NKG2D 発現の低下の両面から肝がんに対する生体の認識機構を障害する。これを媒介する MICA sheddase についてその実態が十分理解されていなかったが、肝がん細胞を用いたノックダウン実験により、ADAM10 が関与していることを明らかにした。さらに、肝がんに対する TACE 治療で汎用される epirubicin が ADAM10 の発現を転写レベルで低下させ、これにより MICA の分泌を阻害することを明らかにした。

肝がんにおける制御性 T 細胞の動態

C 型肝炎・肝がんでは疾患が進展するに従い末梢血の中の制御性 T 細胞の頻度が増加した。肝がんに対する RFA 治療あるいは TACE 治療は根治的治療がなされた患者では制御性 T 細胞の頻度が低下することが明らかとなった。制御性 T 細胞は肝がんの進展に伴い宿主の獲得免疫応答や自然免疫応答を低下させていると考えられた。

肝がんが発現する MRP3 に対する特異的 T 細胞応答

肝がん患者に高発現している MRP3 に対する特異的な T 細胞応答を ELISPOT 法を用いて検討した。肝がんの早期から特異的な T 細胞応答が検出されたが、肝がん組織で MRP3 の発現が増強するに伴い、T 細胞

応答が逆に低下することが示された。また、TACE や RFA 治療により T 細胞応答は増強した。

D. 考察と結論

HCV 感染に伴う発がんにはコア蛋白が重要な意義を持っていることが知られている。コア蛋白がどのようなメカニズムで HCV 感染に伴う各種病態（酸化ストレスの増強、肝脂肪化、発がん）を引き起こすかは十分には理解されていなかった。本年度の研究により HCV コア蛋白は肝脂肪化のマスター遺伝子のひとつである SREBP-1c の転写活性を核内プロテアソーム系である PA28 γ と結合することにより活性化することが明らかとなった。この活性化は最近臨床的に注目されているコア 70/91 番のアミノ酸置換により低下したが、この現象はプロテアソーム活性とは独立した現象であった。また、コア蛋白はミトコンドリア上でシャペロンであるプロヒピチンと結合し、ミトコンドリア機能の障害、酸化ストレスの蓄積につながる事が明らかとなった。コア蛋白は細胞質でのウイルスの形成だけではなく、ミトコンドリアや核に移行し、宿主由来の種々の蛋白と相互作用することにより、各種病態を形成することが明らかとなった。このような分子レベルでの理解は、その各ステップを標的とした治療につながる可能性がある。

肝がんはがんの進展に伴い、免疫応答が低下していくことが示唆されている。本年度の研究により、この分子機序や免疫機序が明らかになってきている。分子機序として注目されるのが、ADAM ファミリー蛋白による肝がん細胞からの MICA の shedding

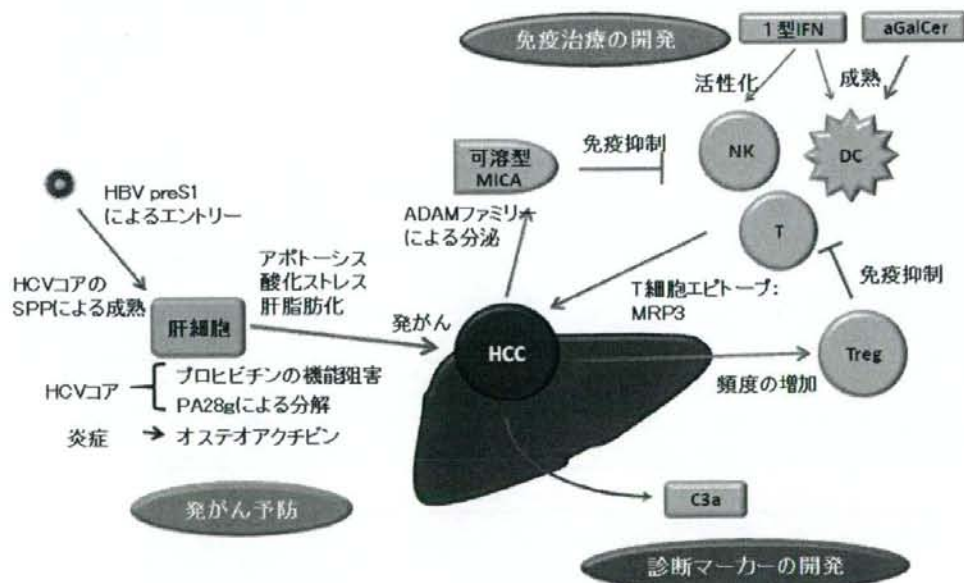
である。可溶性 MICA の産生は、NK 細胞の機能を障害するだけではなく、その後の獲得免疫の形成にも負に作用する可能性がある。既存の抗がん剤治療が MICA shedding を標的とした治療につながるという知見であり注目される。また、免疫抑制の機序として、可溶性 MICA とともに制御性 T 細胞の頻度の上昇がみられることが示された。実際に、肝がんに対する T 細胞応答ががんの進展に伴い低下することが明らかになっている。肝がんに対する治療は可溶性 MICA の低下、制御性 T 細胞頻度の低下をおこし、がんに対する特異的 T 細胞応答を向上させることが示された。肝がんの治療はこのような免疫病態を改善しているという視点でのとらえかたも重要であると考えられる。

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

ウイルス性肝炎における肝発がんの発生と進展過程



研究成果



II. 分担研究報告

HCV コア蛋白質の肝脂肪化と IFN 感受性における役割

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスで観察される、インスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症にコア蛋白質とプロテアソームの調節因子である PA28 γ の相互作用が深く関与している。また、ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法による治療効果の予測因子として、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが報告されている。本研究では、コア蛋白質と PA28 γ に変異を導入し、脂肪酸合成遺伝子の発現を調節する転写因子である SREBP-1c と IFN 応答因子の転写活性化の影響を検討した。その結果、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させたが、PA28 γ のプロテアソーム活性化能は関与しないことが示された。また、コア蛋白質の変異は IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化にはなんら影響を示さなかった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白質はヌクレオキャプシドの構成因子としてではなく、病原性因子としても機能することが知られている。我々はこれまでに、コア蛋白質の一部が核へ移行し、プロテアソームの活性化因子である PA28 γ に依存した経路で分解されることを明らかにした。また、コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスで観察される、インスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症に、PA28 γ が深く関与していることを報告してきた。一方、ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法による治療効果の予測因子として、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが示唆されている。本研究では、コア蛋白質と PA28 γ に変異を導入して、脂肪酸合成遺伝子の発現を調節する転写因子である SREBP-1c と IFN 応答因子の転写活性化に及ぼす、コア蛋白質と PA28 γ の相互作用を検討した。

B. 研究方法

コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ に変異を導入した発現プラスミドを構築し、SREBP-1c プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーター

プラスミドと共に、JFH-1 株が増殖可能な Huh7-OK1 細胞に導入して活性を評価した。また、PA28 γ のプロテアソームの活性化を変化させた変異体を導入し、PA28 γ のプロテアソームの活性化能とコア蛋白質の転写活性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人權、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させた。しかしながら、これらの変異コア蛋白質は PA28 γ との結合性には変化は認められなかった。また、PA28 γ の発現抑制細胞株にプロテアソーム活性化能を変化させた PA28 γ の変異体をコア蛋白質と共に導入した結果、SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム

活性化能は関与しないことが示された。この成績はコア蛋白質による SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性ではなく、コシャペロン活性が関与している可能性が示唆される。次に、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異と IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化を検討したが、これらのコア蛋白質の変異は、IFN 経路には直接影響を及ぼさなかった。

D. 考察

ベグ化 IFN とリバビリンの併用療法による治療効果の予測因子として、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが示唆されている。今回の検討では、コア蛋白質の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させることが示された。しかしながら、IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化には影響は認められなかった。また、SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性ではなく、コシャペロン活性が関与している可能性が示唆された。今後、PA28 γ とコア蛋白質の相互作用の詳細な検討が必要と考えられる。

E. 結論

1. コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させた。
2. コア蛋白質による SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性は関与しない。
3. コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化には影響しない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M.,

Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).

- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M. M. C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
- 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).

2. 学会発表

- 1 Hiroshi Kukihiro, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.

- 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
 - 3 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
 - 4 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
 - 5 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
 - 6 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ, 東京, 7月9-11日, 2008.
 - 7 Xiaoyu Wen, 阿部隆之, 森石恆司, 松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会, 札幌, 10月21日-23日, 2008.
 - 8 山下哲生, 宮崎直幸, 森嘉生, 森石恆司, 李天成, 宮村達男, 武田直和, 吉村政人, 月原富武, 松浦善治: 分解能 3.5Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第 56 回日本ウイルス学会総会, 岡山, 10月26日-28日, 2008.
 - 9 田鋏修平, 阿部隆之, 森嘉生, 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシヤペロン活性, 同上。
 - 10 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割, 同上。
 - 11 森嘉生, 山下哲生, 嶋亮一, 森石恆司, 李天成, 武田直和, 松浦善治: E型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製, 同上。
 - 12 谷英樹, 泉貴之, 寒原裕登, 要祐喜, 森嘉生, 森石恆司, 松浦善治: 日本脳炎ウイルスの細胞侵入におけるセラミドの関与, 同上。
 - 13 久木原博, 森石恆司, 松浦善治: ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する, 同上。
 - 14 阿部隆之, 温小玉, 田中佳典, 寒原裕登, 谷英樹, 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築, 同上。
 - 15 阿部隆之, 要祐喜, 森石恆司, 考藤達哉, 林紀夫, 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生, 同上。
 - 16 田中佳典, 森嘉生, 谷英樹, 阿部隆之, 森石恆司, 巽正志, 松浦善治: 患者血清中に存在する C型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立, 同上。
 - 17 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に關与する宿主因子: 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, シンポジウム, 神戸, 12月9日-12日, 2008.
- H. 知的所有權の出願・登録狀況
特になし。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

HCVによる病原性発現とミトコンドリア
研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： C 型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白がトランスジェニックマウスで肝発癌を誘発すること、肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の過剰産生に深く関与していること、そして ROS の産生に関連が深いミトコンドリアにおいて、二重膜構造の変化ならびにコア蛋白の局在が認められることなどを報告してきた。これらの結果より、コア蛋白がミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにするため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白の発現の変化を解析した。コア蛋白発現細胞においては、発現量が大きく変化しているミトコンドリア呼吸鎖、蛋白シャペロンに関連した蛋白が複数認められた。これらの中でミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウス肝臓、フルゲノム HCV レプリコン細胞で発現が高く、コア蛋白の存在によって安定性を増していた。詳細な検討によって、チトクローム C オキシダーゼ (COX) のうちミトコンドリア DNA にコードされるサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白のレベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、ROS 過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白は、アポトーシスや細胞増殖などに関与していることが知られている。我々はこれまでに、コア蛋白を発現するトランスジェニックマウスに肝発癌が認められたこと、コア蛋白が肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の増加に深く関与していること、そしてこの ROS の産生に深く関与しているミトコンドリアにおいて、二重膜構造の変化ならびにコア蛋白の局在が認められることなどを報告してきた。これらの結

果から、コア蛋白が直接的もしくは間接的にミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。そこで、コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにして、コア蛋白発現後の細胞の変化を知るため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。

B. 方法

HCV コア蛋白を恒常的に発現する HepG2 (Hep39) 細胞から Nycodenz discontinuous

gradient を用いてミトコンドリア分画の精製を行った。ミトコンドリアの purity は以下の様に確認した。すなわち、精製したミトコンドリア蛋白を用いて Western blotting を行なったところ、コア蛋白とミトコンドリア蛋白 (complex I) は検出されたが、ER 蛋白 (OST48) は検出されなかった。

ミトコンドリア蛋白を二次元電気泳動した後、銀染色にて検出し、Image Master 2D Elite ver. 3.1 (Amersham) により発現量の違いを検討した。適当なスポットを切り出し、in-gel trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry を行い、蛋白の同定を行った。

同定された蛋白については、特異抗体が入手可能なものについては Western blotting を行ない、発現レベルを確認した。

C. 結果

ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、Hep39 とコア蛋白を発現しないコントロール細胞 (Hepswx) の間で比較したところ、発現量の異なる蛋白がいくつか認められた。その中には、ミトコンドリアの電子伝達系に関与する蛋白、細胞周期に関わる蛋白などが含まれていた。これらの蛋白の発現量の違いを Western blotting により実際に確認した。

① 発現の上昇していた遺伝子

- 1) NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase a subunit precursor
- 2) succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase
- 3) GrpE-like protein co-chaperone

- 4) similar to ATP synthase b polypeptide
 - 5) leucine aminopeptidase
 - 6) pyruvate dehydrogenase E1 component b subunit, precursor
 - 7) CGO15alt2
 - 8) HSP70
 - 9) prohibitin
- など。

② 発現の低下していた遺伝子

- 1) aldehyde dehydrogenase 2
- 2) aldehyde dehydrogenase 5 precursor
- 3) BiP protein
- 4) HSP60 precursor

など (順番は発現量によるものではない)。

Prohibitin に関しては、mRNA レベルでは増加していないこと、コア蛋白の存在によって安定性が増加していること、コア蛋白と相互作用すること、などを確認した。ミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウス肝、フルゲノム HCV レプリコン細胞で発現が高かった。詳細な検討により、ミトコンドリアのコンプレックス IV の成分であるチトクローム C オキシダーゼ (COX) のミトコンドリア DNA にコードされたサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白レベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

D. 考察

今回の研究において、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、なかでも、Prohibitin の増加によって、チトクローム C オキシダーゼ (COX) のミトコンドリア DNA にコードされたサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。

HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白レベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

E. 結論

コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにして、コア蛋白発現後の細胞の変化、特にミトコンドリア機能の変化を知るため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。いくつかのミトコンドリア蛋白がコア蛋白によって発現に影響を受けていることが明らかになった。

HCV による病原性発現において、コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾が大きな意義を有していることが示唆された。C 型肝炎における病態解明と病変進行の予防に重要な発見と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Koike K, Nagai R. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 4) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008

Nov 27. [Epub ahead of print]

- 6) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
 - 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
 - 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hepatol Res* 2008;38:310-314.
 - 9) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
 - 10) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.
 - 11) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
 - 12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.
2. 学会発表
- 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
 - 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, 2008.
 - 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.
 - 4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T,

Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59TH Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（平成 20 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

B 型肝炎ウイルスレセプターの分離・同定とその応用に関する研究
研究分担者 上田 啓次 浜松医科大学感染症学 教授

研究要旨

ヒト胎盤の発現ライブラリーを大腸菌で発現・精製した GST-HBPS-HIS6 を用いて結合活性を指標に生化学的にスクリーニングし 1-3-2、4-2-1、9-6-1、9-6-2 のクローンを得た。

A. 研究目的

HBV レセプターは未だ不明で有効な *in vitro*、*in vivo* 感染系が樹立できずにいる。本レセプターを分離・同定し感染系を構築し、病態解明、治療法の開発に役立てる。

B. 研究方法

大腸菌で発現・精製した GST-HBPS-HIS6 を用いて結合活性を指標にヒト胎盤の発現ライブラリーをスクリーニングし 1-3-2、4-2-1、9-6-1、9-6-2 の 4 クローンを得た。全長 cDNA を得た後培養細胞での HBV 感染性を検討した。

（倫理面への配慮）

現在のところ特に関係しないものと思われる。

C. 研究結果

ヒト胎盤の発現ライブラリーを大腸菌で発現・精製した GST-HBPS-HIS6 を用いて結合活性を指標にスクリーニングし 1-3-2、4-2-1、9-6-1、9-6-2 のクローンを

を得た。

D. 考察

塩基配列解析から、いずれも膜型蛋白であると判明したため全長 cDNA を得た後培養細胞での HBV 感染性を検討する必要がある。

E. 結論

HBV 感染性は検討中であるが今のところ感染性は認められていない。今後、候補遺伝子の釣上げが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

今のところなし

2. 学会発表

第 56 回日本ウイルス学会 平成 20 年 10 月岡山

B 型肝炎 pseudotype の作製と感染系樹立への応用