

Fig. 3. Representative CLDN4 Western blots and immunohistochemical data. (A) CLDN4 (25 kDa) expression was strong in the intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) samples. The molecular mass marker (kDa) is indicated. (B) Intense membrane staining in intrahepatic cholangiocarcinoma. (C) Hepatocellular carcinoma showing no CLDN4 expression. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CLDN4, claudin-4; NL, normal liver; HCC, hepatocellular carcinoma; KMBC, a human extrahepatic bile duct carcinoma cell line [21]. [This figure appears in colour on the web.]

#### 4. Discussion

Using gene expression profiling, we identified a distinct gene signature for ICC. We chose the SAGE technique, which is used to comprehensively identify and quantify the expression of known and unknown genes to analyse the gene expression in ICC. In SAGE methods, gene expressions of different organs or tissues are comparable because the tag sequence directly reflects RNA copy number, and the global standardised methods of SAGE enable the analysis and comparison of the data obtained from different laboratories through

SAGE maps (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>). Another advantage of SAGE is that it allows the identification of genes not previously reported, including expressed sequence tags (ESTs). In fact, we detected some ESTs that were overexpressed in ICC compared to HCC (data not shown) and these novel sequences may represent new tumour markers for ICC.

When we compared the ICC and HCC libraries, *KRT7* and *KRT19* were amongst the genes showing overexpression in ICC. Both are expressed in bile duct epithelium, indicating that ICC arises from bile duct epithelial cells. In addition, we observed highly abundant

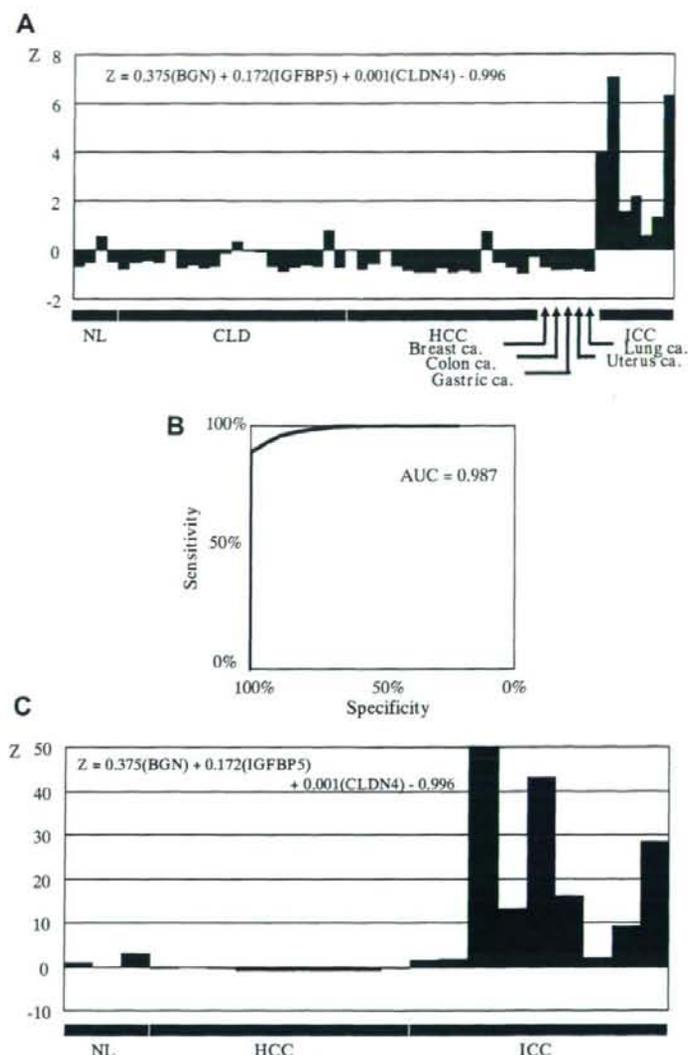


Fig. 4. Discrimination analysis of gene expression data. From the coefficient obtained for each gene, the Z-score was calculated as  $Z = 0.375(\text{BGN}) + 0.172(\text{IGFBP5}) + 0.001(\text{CLDN4}) - 0.996$ . This score was positive for the intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) sample but negative for the other samples. (A) Results from the samples of training group. (B) Prediction performance of Z-score using the ROC curve. (C) Results from samples of the test group. BGN, biglycan; IGFBP5, insulin-like growth factor-binding protein 5; CLDN4, claudin-4; NL, normal liver; CLD, chronic liver disease; HCC, hepatocellular carcinoma; AUC, area under the curve.

expression in ICC of the genes encoding S100A6 and matrix metalloproteinase 7 [22–24], both previously reported in ICC. Therefore, our findings confirm the expression patterns reported previously for ICC.

We also analysed the molecular functions of the genes showing an over fivefold higher expression in ICC than in HCC and found that many of them were associated with the regulation of cell adhesion molecules, translation initiation and the regulation of Wnt signalling. Conversely, amongst the genes with an over fivefold

overexpression in HCC than in ICC, the majority were associated with immunity and inflammation. These findings indicate that the characteristic gene expression patterns in ICC differ from those in HCC.

In addition to tissue-specific genes, cancer-associated genes, such as those encoding annexin A2 [25–27], S100 calcium-binding protein A11 [28], glutathione-S-transferase pi [29], transmembrane, prostate androgen-induced RNA [30] and CD24 antigen [31] (Table 3), were also overexpressed in ICC compared to HCC.

Thus, genes that were differentially expressed between ICC and HCC do not merely reflect differences in the cell types or tissue types from which the tumours arise, but differences in the ICC and HCC tumours themselves.

Analyses using SAGE libraries showed that nine genes, which were not previously well characterised as expressed in ICC, were overexpressed in ICC than in HCC. By comparing the mean transcript abundance in ICC with those in other libraries, including gastric, colon, prostate and breast cancer, we found that eight genes were overexpressed in ICC than in the other organs: *CITED4*, *BGN*, *IGFBP5*, *CLDN4*, *PFKP*, *TM4SF1*, *CAPN1* and *CLDN10*. As these findings were based on one ICC sample, we confirmed their validity using RT-PCR and found that the expression of *BGN*, *IGFBP5* and *CLDN4* was higher in ICC than in HCC, NL, CLD or adenocarcinomas originating from other organs.

*BGN* encodes a matrix proteoglycan involved in the metabolism of connective tissue by binding to collagen and TGF- $\beta$ . It is expressed in the lung, spleen and liver of mice [32]. Immunohistochemically, the BGN protein has been shown to be expressed in Disse's space, cholangioles and the vascular wall, but not in normal liver [33].

*IGFBP5* encodes a protein that binds to IGF-I and -II, but its precise function is not yet known. This protein has been reported to promote osteoblast mitosis [34] and to cause the involution of mammary gland cells by inducing apoptosis via IGF-dependent and -independent pathways [35]. However, its function in liver and bile duct cells is unknown.

*CLDN4* encodes an essential membrane protein of the claudin family. This protein is a component of tight junctions, a membrane receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin, and is thought to be involved in organogenesis. In addition, *CLDN4* is highly expressed in the small intestine, but only weakly expressed in mouse liver [36]. Whilst our study was under way, Lodi et al. [14] reported that the level of *CLDN4* expression was higher in biliary tract cancers than in HCC.

Other candidate genes more suitable for the differentiation of ICC from HCC and metastatic liver cancers may exist, but our three genes – *BGN*, *IGFBP5* and *CLDN4* – were not previously reported to be overexpressed in ICC, although *CLDN4* was cited whilst our study was under way.

Moreover, the prediction performance of ICC discrimination analysis using these three genes showed an efficient ROC curve (AUC = 0.987) and the equation allowed us to completely distinguish ICC from HCC, CLD and NL, although further evaluation is needed using, for example, metastatic liver cancers. The ROC curve was also generated for the test group and the AUC (0.963) was as high as that generated using the

training set (data not shown). The discrimination of ICC using the known markers such as CEA and CA19-9 was less effective than this model. The AUC for CEA and CA19-9 was 0.676 and 0.722, respectively (data not shown).

However, the inclusion of other ICC markers will enhance the sensitivity and specificity; for example, both CEA and CA19-9 were enhanced in 50% and 62% of patients with ICC, respectively (Table 2). In addition, we found no correlation between the level of CEA or CA19-9 and the expression of the three genes, suggesting that they are independent markers of ICC. Thus, a combined evaluation of these markers could enhance sensitivity and specificity.

Despite the limited numbers of patients with ICC and SAGE libraries examined, this is the first report of ICC-specific, novel candidate tumour-marker genes. Further validation using a larger cohort is needed to confirm the expression of these genes in more patients with ICC and to examine the functional relevance of these genes in the development and prognosis of ICC.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhep.2008.03.025.

#### References

- [1] Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:115–125.
- [2] Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001;33:1353–1357.
- [3] Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Arora S, Keegan TJ, Hargreaves S, Beck A, et al. Increase in mortality rates from intrahepatic cholangiocarcinoma in England and Wales 1968–1998. *Gut* 2001;48:816–820.
- [4] Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002;37:806–813.
- [5] Davila JA, El-Serag HB. Cholangiocarcinoma: the “other” liver cancer on the rise. *Am J Gastroenterol* 2002;97:3199–3200.
- [6] Marrero JA, Lok AS. Newer markers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S113–S119.
- [7] Johnson DE, Herndier BG, Medeiros LJ, Warnke RA, Rouse RV. The diagnostic utility of the keratin profiles of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1988;12:187–197.
- [8] Lai YS, Thung SN, Gerber MA, Chen ML, Schaffner F. Expression of cytokeratins in normal and diseased livers and in primary liver carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:134–138.
- [9] Maeda T, Adachi E, Kajiyama K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analyses of clinicopathologic features. *Hum Pathol* 1995;26:956–964.
- [10] Altmannsberger M, Weber K, Holscher A, Schauer A, Osborn M. Antibodies to intermediate filaments as diagnostic tools: human

- gastrointestinal carcinomas express prekeratin. *Lab Invest* 1982;46:520–526.
- [11] Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, Ricci S, Martinot E, Danel C, et al. Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:777–782.
- [12] Khan SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WM, Taylor-Robinson SD, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002;51:V11–V19.
- [13] Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 2003;37:961–969.
- [14] Lódi C, Szabó E, Holczbauer A, Batmunkh E, Sziártó A, Kupcsulik P, et al. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Modern Pathol* 2006;19:460–469.
- [15] Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:484–487.
- [16] Yamashita T, Hashimoto S, Kaneko S, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, et al. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:110–116.
- [17] Yamashita T, Kaneko S, Hashimoto S, Sato T, Nagai S, Toyoda N, et al. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:647–654.
- [18] Kawai HF, Kaneko S, Honda M, Shirota Y, Kobayashi K. Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. *Hepatology* 2001;33:676–691.
- [19] Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001;33:832–840.
- [20] Makuuchi M, Belghiti J, Belli G, Fan ST, Lau JW, Ringe B, et al. IHPBA concordant classification of primary liver cancer: working group report. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:26–30.
- [21] Yano H, Maruiwa M, Iemura A, Mizoguchi A, Kojiro M. Establishment and characterization of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (KMBC). *Cancer* 1992;69:1664–1673.
- [22] Kim J, Kim J, Yoon S, Joo J, Lee Y, Lee K, et al. S100A6 protein as a marker for differential diagnosis of cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2002;23:274–286.
- [23] Lichtinghagen R, Helmbrecht T, Arndt B, Böker KH. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:65–71.
- [24] Miwa S, Miyagawa S, Soeda J, Kawasaki S. Matrix metalloproteinase-7 expression and biologic aggressiveness of cholangiocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:428–434.
- [25] Kumble KD, Hirota M, Pour PM, Vishwanatha JK. Enhanced levels of annexins in pancreatic carcinoma cells of Syrian hamsters and their intrapancreatic allografts. *Cancer Res* 1992;52:163–167.
- [26] Emoto K, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:1339–1345.
- [27] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, et al. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001;92:1419–1426.
- [28] Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, et al. S100A11, a putative tumour suppressor gene, is overexpressed in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2006;12:5417–5422.
- [29] Cai L, Mu LN, Lu H, Lu QY, You NC, Yu SZ, et al. Dietary selenium intake and genetic polymorphisms of the GSTP1 and p53 genes on the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Bio Prev* 2006;15:294–300.
- [30] Xu LL, Shi Y, Petrovics G, Sun C, Makarem M, Zhang W, et al. PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Res* 2003;63:4299–4304.
- [31] Karahan N, Güney M, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. CD24 expression is a poor prognostic marker in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27:500–504.
- [32] Wegrowski Y, Pillarisetti J, Danielson KG, Suzuki S, Iozzo RV. The murine biglycan: complete cDNA cloning, genomic organization, promoter function, and expression. *Genomics* 1995;30:8–17.
- [33] Hogemann B, Edel G, Schwarz K, Krech R, Kresse H. Expression of biglycan, decorin and proteoglycan-100/CSF-1 in normal and fibrotic human liver. *Pathol Res Pract* 1997;193:747–751.
- [34] Schneider MR, Wolf E, Hoefflich A, Lahm H. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol* 2002;172:423–440.
- [35] Butt AJ, Dickson KA, McDougall F, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2003;278:29676–29685.
- [36] Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:26652–26658.



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

Hussein Hassan Aly<sup>a</sup>, Kunitada Shimotohno<sup>b</sup>, Makoto Hijikata<sup>a,c,\*</sup>

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

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

<sup>c</sup>Laboratory of Viral Oncology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Konocho, Yoshida, Sakyo, 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 $\alpha$ ) signaling. Furthermore, using PPAR $\alpha$  agonists and antagonists, we also analyzed the effect of PPAR $\alpha$  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 proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 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,  $1 \times 10^5$  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 Research, Kyoto University, Department of Viral Oncology, 53 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo, Kyoto 606-8507, Japan. Fax: +81 75 751 3998.  
E-mail address: mhijikat@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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  HCV-containing patient serum with a titer of  $1 \times 10^5$  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 $\alpha$  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.

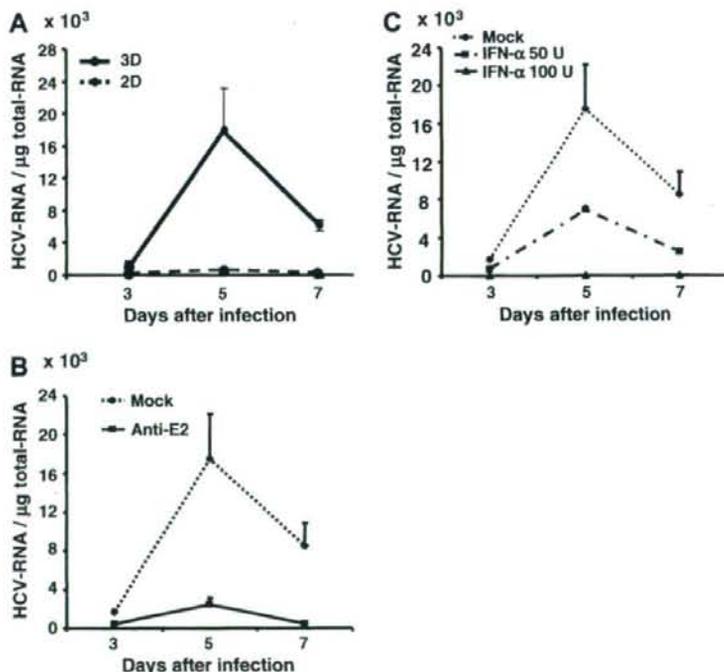
## Results

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

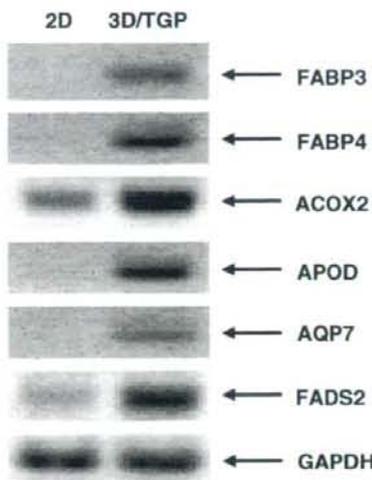
Infection and proliferation of the HCV genotype 1b (HCV-RC5) derived from the serum of patient RC5 in HuS-E/2 cells cultured in 3D/TGP (3D/TGP-HuS-E/2 cells) was investigated and compared with that of HuS-E/2 cells cultured in 2D (2D-HuS-E/2). As outlined in Fig. 1A, the HCV-RNA levels in the 3D/TGP-HuS-E/2 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 ( $\alpha$ -E2) or with anti-tubulin (negative control) was also performed. Pre-incubation of the serum with  $\alpha$ -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 $\alpha$  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  $\mu\text{g}$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  overlaid on the gel containing the cells and HCV proliferation measured as described above.

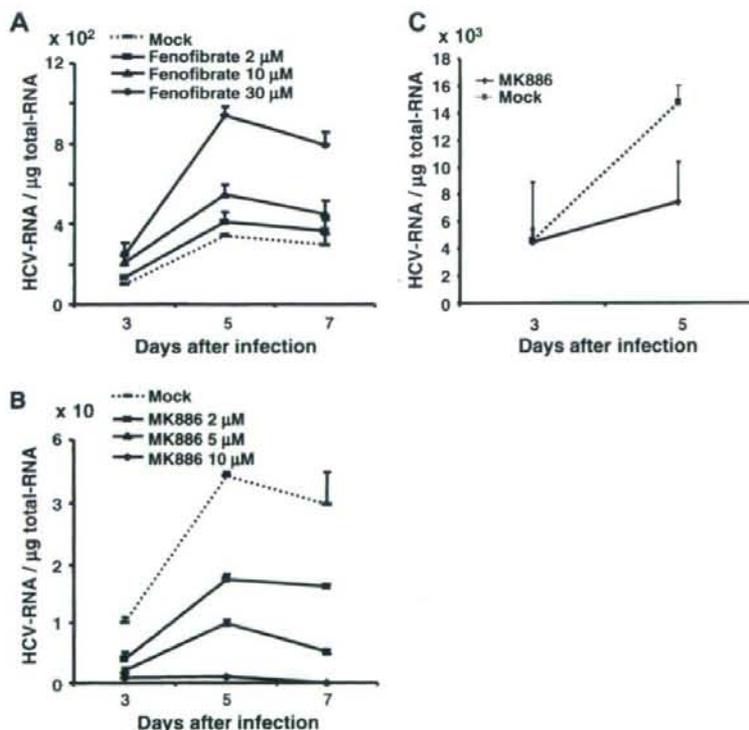


**Fig. 2.** RT-PCR analysis of the expression of genes identified by microarray. The PPAR $\alpha$  regulated genes were increased in 3D/TGP-HuS-E/2 cells (3D-TGP) and their expression levels measured by RT-PCR. 2D represents RNA samples from 2D-HuS-E/2 cells. Twenty cycles of amplification were undertaken 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 $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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  $\mu$ M of fenofibrate overlaid on the cells. (B) Medium supplemented with or without (Mock), 2, 5, or 10  $\mu$ 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  $\mu$ M of MK886 was overlaid on 3D/TGP-HuS-E/2 cells infected with HCV. HCV proliferation following treatment was measured by Q-PCR.

PPAR $\alpha$  signaling affects HCV replication

We next examined the potential role of PPAR $\alpha$  signaling on HCV proliferation by monitoring HCV replication in 2D-HuS-E/2 cells that had been infected with HCV-RC5 and subsequently treated with the PPAR $\alpha$  agonist fenofibrate [14] or the PPAR $\alpha$  antagonist MK886 [14] (Fig. 3B). As outlined in Fig. 3A, a dose-dependent increase in HCV replication was observed in fenofibrate-treated cells. In contrast, a dose-dependent decrease in HCV proliferation was observed in the presence of MK886. Similarly, treatment with MK886 reduced HCV proliferation in 3D/TGP-HuS-E/2 cells (Fig. 3C). The response of HCV proliferation in response to fenofibrate and MK886 treatment was also analyzed in LucNeo#2 cells that contained HCV replicon RNA (LNMH14) derived from the HCV-1b genome (Fig. 4A). Luciferase expression in these cells represented replication of the HCV replicon [6] and, as shown in Fig. 4A, luciferase activity in the cells treated with fenofibrate or MK886 also showed either enhancement or suppression of replicon proliferation, respectively. In addition, the increased HCV replication following fenofibrate treatment was completely abolished when treated with MK886 simultaneously. As MK886 is known to induce apoptosis when administered in high doses [15], the cell viability

was examined using the XTT assay. There were no significant effects on cell viability after treatment with fenofibrate. Although MK886 resulted in a minor reduction in XTT values when high doses (10–15  $\mu$ M) were administered, this reduction was not statistically significant when compared to its effect on HCV replication (Fig. 4B). This result suggests that PPAR $\alpha$  signaling is required for HCV replication and that suppression of PPAR $\alpha$  signaling has an anti-HCV effect.

## Discussion

In the current study, we demonstrated that immortalized hepatocyte HuS-E/2 cells cultured in 3D/TGP support the infection and replication of natural HCV derived from patient sera. Unlike recombinant HCVs, which have been required to adapt to sublines of HuH-7 cells [16], the population of the natural HCV is fairly polymorphic, demonstrating different responses to a variety of anti-viral agents [17,18]. The 3D/TGP-HuS-E/2 cells have the advantage of being a small-scale 3D cultured cells, which are cultured in 12-well plates at a density of  $1 \times 10^5$ /well, that allow the study of both viral and cellular events. In the current study, it demonstrated a 2 log increase in susceptibility to natural HCV infection and replication when compared to conventional 2D culture systems. Thus it offers an important advantage in the study of natural HCV infection and replication, and the response of natural HCV to anti-HCV drugs.

As the ability of HuS-E/2 cells to support infection and replication of natural HCV was greatly altered by the culture conditions, it is likely that the culture system described in our study will provide important information in regards to the cellular factors that support the HCV life cycle. The microarray study showed that the expression of some genes related to the PPAR $\alpha$  signaling pathway were upregulated in the 3D cultured HuS-E/2 cells. Using both PPAR $\alpha$  signaling agonists and antagonists, PPAR $\alpha$  signaling was shown to affect infection and proliferation of natural HCV. PPAR $\alpha$  is a ligand-activated transcription factor that is primarily expressed in tissues with high lipid metabolism including the liver, where it functions as one of three major nuclear receptors and is essential for its normal function [19]. Similar to a part of our data, a negative effect on HCV replication was previously observed in the replicon-bearing cells treated with siRNA for PPAR $\alpha$ , with only 50% reduction of HCV-RNA [20]. In this study, even a large dose of PPAR $\alpha$  agonist enhanced natural HCV replication in the 2D-HuS-E/2 cells for three times, despite the 2 logs enhancement of HCV proliferation in 3D/TGP culture. This implies that additional factors activated in 3D/TGP-HuS-E/2 cells may be required for the efficient HCV proliferation. Further analysis of the microarray data may provide us with further information on factors that may prove useful in the development of anti-HCV drugs.

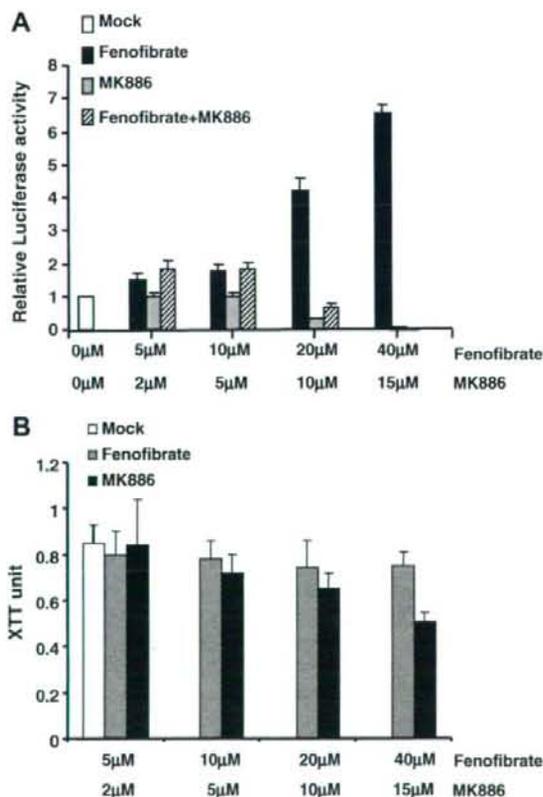
In conclusion, the novel *in vitro* culture system combining TGP and immortalized hepatocytes described in this study demonstrated efficient support of natural HCV infection and replication. This system may be used in future virological studies to define new anti-HCV strategies. It may also prove useful for the specific design of effective individual therapy according to patient-specific strains.

## Acknowledgments

This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; and for scientific research from Ministry of Education, Sports, Culture, and Technology of Japan.

## References

- [1] Z. Younossi, J. Kallman, J. Kincaid, The effects of HCV infection and management on health-related quality of life, *Hepatology* 45 (2007) 806–816.



**Fig. 4.** The effects of PPAR $\alpha$  agonists and antagonists on the replication of HCV subgenomic replicons. (A) LucNeo#2 cells containing a HCV subgenomic replicon termed LNMH14, were mock treated or treated with fenofibrate, MK886, or a combination of both fenofibrate and MK886 at the indicated concentrations for 2 days. Luciferase activity derived from the replicon was then measured as an indicator of HCV replication [7]. (B) Following treatment with fenofibrate and MK886, LucNeo#2 cells were cultured for 2 days and cell viability measured using the XTT assay (Roche, Mannheim, Germany).

- [2] M.W. Fried, M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Goncales Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, J. Yu, Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 975–982.
- [3] K. Murakami, K. Ishii, Y. Ishihara, S. Yoshizaki, K. Tanaka, Y. Gotoh, H. Aizaki, M. Kohara, H. Yoshioka, Y. Mori, N. Manabe, I. Shoji, T. Sata, R. Bartenschlager, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Suzuki, 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* 351 (2006) 381–392.
- [4] G. Andrei, Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development, *Antiviral Res.* 71 (2006) 96–107.
- [5] H.H. Aly, K. Watashi, M. Hijikata, H. Kaneko, Y. Takada, H. Egawa, S. Uemoto, K. Shimotohno, Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes, *J. Hepatol.* 46 (2007) 26–36.
- [6] K. Goto, K. Watashi, T. Murata, T. Hishiki, M. Hijikata, K. Shimotohno, Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 879–884.
- [7] T. Murata, M. Hijikata, K. Shimotohno, Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059, *Virology* 340 (2005) 105–115.
- [8] M.A. El-Farrash, H.H. Aly, K. Watashi, M. Hijikata, H. Egawa, K. Shimotohno, In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin, *Microbiol. Immunol.* 51 (2007) 127–133.
- [9] J. Samulin, I. Berget, S. Lien, H. Sundvold, Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 151 (2008) 147–152.
- [10] S. Hummasti, B.A. Laffitte, M.A. Watson, C. Galardi, L.C. Chao, L. Ramamurthy, J.T. Moore, P. Tontonoz, Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 616–625.
- [11] C.G. Walker, M.J. Holness, G.F. Gibbons, M.C. Sugden, Fasting-induced increases in aquaporin 7 and adipose triglyceride lipase mRNA expression in adipose tissue are attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency, *Int. J. Obes. (Lond.)* 31 (2007) 1165–1171.
- [12] D.G. Jump, D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, B. Christian, O. Demeure, Fatty acid regulation of hepatic gene transcription, *J. Nutr.* 135 (2005) 2503–2506.
- [13] D.W. Crabb, S. Liangpunsakul, Alcohol and lipid metabolism, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21 (Suppl. 3) (2006) S56–S60.
- [14] D. Panigrahy, A. Kaipainen, S. Huang, C.E. Butterfield, C.M. Barnes, M. Fannon, A.M. Laforme, D.M. Chaponis, J. Folkman, M.W. Kieran, PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 985–990.
- [15] V.S. Deshpande, J.P. Kehrer, Mechanisms of N-acetylcysteine-driven enhancement of MK886-induced apoptosis, *Cell Biol. Toxicol.* 22 (2006) 303–311.
- [16] K.J. Blight, A.A. Kolykhalov, C.M. Rice, Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture, *Science* 290 (2000) 1972–1974.
- [17] R.C. Dickson, Clinical manifestations of hepatitis C, *Clin. Liver Dis.* 1 (1997) 569–585.
- [18] E.J. Heathcote, Antiviral therapy: chronic hepatitis C, *J. Viral Hepat.* 14 (Suppl. 1) (2007) 82–88.
- [19] C.N. Palmer, M.H. Hsu, K.J. Griffin, J.L. Raucy, E.F. Johnson, Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver, *Mol. Pharmacol.* 53 (1998) 14–22.
- [20] B. Rakic, S.M. Sagan, M. Noestheden, S. Belanger, X. Nan, C.L. Evans, X.S. Xie, J.P. Pezacki, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha antagonism inhibits hepatitis C virus replication, *Chem. Biol.* 13 (2006) 23–30.

# HCVと肝発癌

—HCVの感染性ウイルス粒子産生と細胞内環境  
Hepatocellular carcinogenesis caused by HCV infection



土方 誠

Makoto HUIIKATA

京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門ヒトがんウイルス研究分野

○HCV 感染による肝癌発症には、長期にわたる慢性肝炎による継続的な細胞増殖がその原因のひとつとしてあげられる。HCV 感染細胞の癌化には、HCV 蛋白質が感染した細胞に対して何らかの影響を与えたと考えられる。HCV 蛋白質のなかではコアが、現時点ではもっとも肝発癌と関連した蛋白質と考えられている。最近、培養細胞を用いた組換え体 HCV 産生実験系が確立され、著者らはこの実験系を用いて HCV のウイルス粒子産生機構について解析した。その結果、感染性 HCV 粒子の産生には細胞内の脂肪滴が重要な役割をもつことを明らかにした。このようなコアを発現している細胞では細胞内の脂肪滴の量が上昇し、中性脂肪量が上昇していることが確認された。このことは C 型肝炎肝組織中における脂肪の蓄積が感染性ウイルス粒子産生と密接に関連する可能性を示している。近年、脂肪滴の多機能性が示されているため、コアの局在化が脂肪滴の機能修飾を誘導し、細胞の機能を変化させる可能性が考えられる。



Key word : C型肝炎ウイルス, 感染性ウイルス粒子産生, 脂肪滴, コア蛋白質

1989年にアメリカのベンチャー企業であるカIRON社によって、それまで非A非B型肝炎ウイルスとよばれていたウイルスの遺伝子がはじめてクローニングされ、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)と命名された<sup>1)</sup>。これまでの疫学的研究から現在、世界保健機構(WHO)によって世界人口の3%以上がすでにこのウイルスに感染していると報告されている。この感染者人口の多さに加えて、このウイルスに感染することによっては長期にわたる慢性肝炎が引き起こされ、それは20~30年後に肝硬変から肝癌へと進行する可能性が高いことから、このウイルスは人類に対する大きな脅威のひとつであると認識されている。

残念ながらHCV感染による肝癌発症のメカニズムの詳細についてはいまだに明らかになっていないわけではないが、多くの研究者の努力によりこれまでにさまざまな重要な知見が蓄積されてきている。本稿ではウイルス学的な見地から、HCV感染による肝発癌機構について考察したいと思う。

## HCV感染と肝発癌

HCVの遺伝子構造の概要が明らかとなり、このウイルスがフラビウイルス科に分類される一本鎖RNAウイルスであることがわかった。このウイルスの近縁種には日本脳炎ウイルスや黄熱病ウイルスなどがあり、これまでにみつまっている癌ウイルスつまりB型肝炎ウイルスなどのDNAウイルスや、ヒトT細胞白血病ウイルスのようなレトロウイルスとはまったく異なるウイルスであった。

発癌ウイルスとして知られるこれらのウイルスに共通する特徴のひとつは、これらのウイルス遺伝子全体あるいはその一部が、感染した宿主細胞の染色体に組み込まれる、あるいはEpstein-Barr virusのようにエピソードとして細胞内に存在するという点である。したがって、これらのウイルスによって癌化した細胞の場合、染色体上にウイルス感染の証拠としてウイルス遺伝子全体あるいは一部が検出されるか、細胞内にウイルスゲノ



図 1 HCV蛋白質とその機能

ムが存在する。しかし、HCV を含むフラビウイルスの生活環にはその遺伝子が DNA となるステップは存在せず、実際に HCV 感染と密接に関連する肝癌組織のなかに HCV 由来 DNA はこれまでのところ見出されていない。そして肝癌組織から HCV の感染増殖を維持している細胞株を樹立することにも成功していない。また、肝癌組織のなかの HCV の RNA 遺伝子量ですら非癌部の組織よりもむしろ少ない。

このことはすくなくとも、HCV が感染した肝のなかで、癌化する細胞がどのような細胞に由来するのか正確にはわかっていないということを意味している。つまり HCV 感染と肝癌発症は密接に関連することは明らかであるにもかかわらず、癌化した細胞が実際に HCV の感染を受けたことがあるのかどうかについてさえ、なんら確証はないことになる。そこで、HCV 感染による肝癌発症には、①HCV に感染した肝細胞の癌化と、②非感染細胞の癌化、という 2 つの可能性を考える必要があるように思われる。

### ● HCV蛋白質による細胞機能の変化

HCV 感染による肝発症の場合、前述したようにウイルス遺伝子断片が感染細胞の染色体に挿入されることにより細胞の遺伝子発現異常が引き起こされている可能性はきわめて低い。したがって、HCV 感染細胞が癌化すると考えた場合、その遺伝

子産物つまり HCV 蛋白質が感染した細胞に対して何らかの影響を与える可能性が考えられる。このことから、その細胞に対する影響を同定するために、培養細胞やマウスのような実験動物に各種 HCV 蛋白質を発現させて、その結果どのような変化が現れるのかを解析するという研究方法が用いられている。また、各 HCV 蛋白質と相互作用する細胞因子の候補分子を同定し、分子レベルからこの問題にアプローチする方法も用いられている。

図 1 に HCV 遺伝子とその産物の概略を示した。HCV は一本鎖 RNA ウイルスであり、その増殖は細胞質で行われていると考えられる。約 9,500 ヌクレオチド長の RNA ゲノムの大部分は、1 つの蛋白質読み枠(open reading frame: ORF)で占められている。ウイルス蛋白質はすべてここにコードされており、主要なウイルス蛋白質はその ORF から翻訳される前駆体ポリ蛋白質から、宿主側あるいはそのポリ蛋白質に存在するプロテアーゼ活性によってプロセッシングされて産生されてくる<sup>2)</sup>。この ORF の 5'末端側からウイルス粒子の中心を形成するコア(C)、ウイルス粒子表面に存在するエンベロープ 1 そして 2(E1, E2)といったウイルス粒子を構成する構造蛋白質群、その C 末端側からは、p7 とよばれるイオンチャネルを形成する分子、さらにゲノム複製などに関与すると考えられる 6 種の非構造(nonstructural: NS)蛋白質

(NS2~NS5B)が産生されることがわかっている(図1)。

そのいくつかの蛋白質について培養細胞を用いたその形質転換やアポトーシスに対する影響の解析,そしてその効果を裏打ちする細胞内シグナルの修飾に関する研究が行われてきている<sup>3)</sup>。しかし, HCV蛋白質に関するこうした研究の結果には相反するさまざまな報告がなされ,一定の見解が得られていない場合があり, HCV蛋白質の感染細胞に対する機能を明らかにするうえで大きな問題となっている。こうした問題は, HCVの多様性,つまり用いた HCV蛋白質の一次構造上の多様性やそれぞれの実験で使用した細胞種あるいは HCV蛋白質の発現方法や発現量,生理活性の検出系といった実験条件の相違に起因するのかもしれない。今後, HCVの感染増殖過程のどのような場面でこれまでに得られた結果が再現されるのか,正常な肝細胞を用いて HCVの生活環を再現する実験系を構築し,研究を進めていく必要があると思われる。

### ● HCVコア蛋白質による形質転換

HCV蛋白質のなかでコアが現時点でもっとも肝発癌と関連した蛋白質と考えられている。まず,コアは癌遺伝子のひとつである活性型 Ras と同時に発現されることによって,ラット胎仔線維芽細胞を形質転換するということが最初に報告された<sup>4)</sup>。このことは形質転換実験でよく用いられるマウス BALB/c 3T3 A31-1-1 細胞を用いて著者らの研究室でも再現された<sup>5)</sup>。さらに,コアを発現するトランスジェニックマウス(コア Tg マウス)には長期間の飼育の後に肝発癌するものが出てくるということが報告された<sup>6)</sup>。このコア Tg マウスの詳細な解析は本誌他稿に紹介されているので参照されたい。

これらの結果はすべて,コアによる細胞の形質転換能が比較的弱いものであることを示唆している。つまりコア単独では細胞の形質転換を誘導できず,コア Tg マウスでもすべての系統における早期の肝発癌が観察されないからである。それではコアは何をしているのか。このコア Tg マウス肝組織には,コントロールマウスに比較して 1.8

倍の過酸化脂質が存在することが検出されたが<sup>7)</sup>,培養細胞においてコアを発現させた場合でも同様に過酸化脂質産生の上昇や抗酸化反応因子の遺伝子発現誘導が観察されていることから,コアの発現により遺伝子傷害性をもつ活性酸素の産生が上昇する可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。このどちらの場合でもミトコンドリアの損傷が認められていることから,コア発現による活性酸素の産生にはミトコンドリアの関与が示唆されている。ここでコアの細胞内局在は主として小胞体や脂肪滴であり,ミトコンドリアに局在するコアは量的に限られることから,どのようなメカニズムでコアがミトコンドリアに障害を引き起こしているのかさらに慎重に解析を進める必要があると思われる。

### ● HCVコア蛋白質と脂肪滴

最近,培養細胞を用いた組換え体 HCV の産生実験系が確立された<sup>9)</sup>。これは劇症肝炎患者由来の HCV 遺伝子 JFH-1(遺伝子型 2a)を試験管内で合成し,これを肝癌由来細胞 HuH-7 細胞に導入すると,その培養上清中に組換え体ウイルスが産生されるものである。この組換え体ウイルスはこの HuH-7 細胞からクローン化された HuH-7.5 細胞や HuH-7.5.1 細胞によく感染増殖し,ふたたびその上清に感染性 HCV を産生することができるのである。

著者らはこの実験系を用いて HCV のウイルス粒子産生機構について解析し,感染性 HCV 粒子の産生には細胞内の脂肪滴(「サイドメモ 1」参照)が重要な役割をもつことを明らかにした(図 2)<sup>10)</sup>。この感染性 HCV 粒子を産生している細胞では脂

#### サイド メモ 1 脂肪滴

小胞体膜に由来する脂質単層膜で包まれた構造をもつ,細胞内小器官のひとつである。トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂肪を含むことが知られている。これまでこれら脂肪の蓄積や供給にかかわることが知られていたが,近年,種々の細胞内小器官への脂質輸送や蛋白質の緊留や分解の場として機能することが示されてきている。

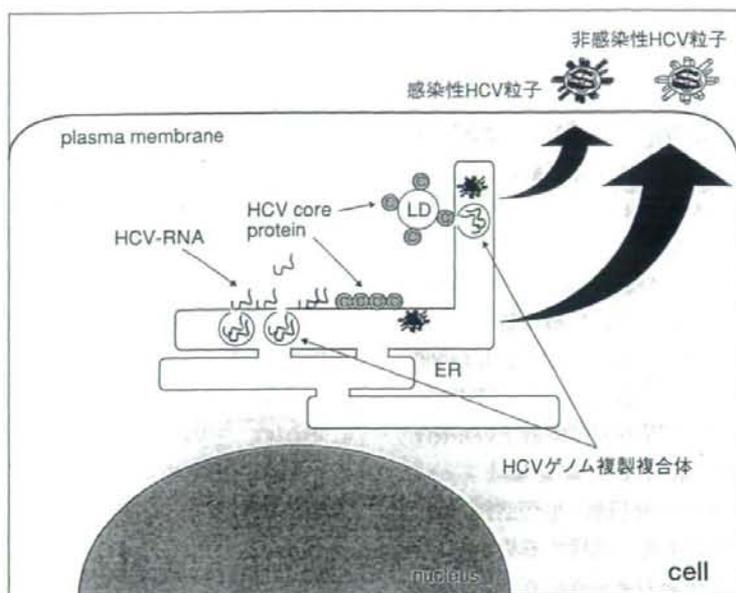


図 2 脂肪滴が関与する感染性HCV粒子産生機構の概要  
ER: endoplasmic reticulum (小胞体), LD: lipid droplet (脂肪滴).

脂肪滴膜上にコアが局在化しており、その周囲の膜構造にエンベロープ蛋白質や複製活性のあるHCV 遺伝子複製複合体を含むNS蛋白質群が存在している。電子顕微鏡で観察するとウイルス粒子はその脂肪滴の周囲にある膜構造のなかに認められる。上清に含まれるHCV粒子には浮遊密度1.12をピークとする感染性粒子と1.15をピークとする非感染性粒子とが存在し、その双方にコアと遺伝子RNAが含まれていることがわかった。しかもコアや遺伝子RNA量でみれば非感染性粒子に比べて感染粒子の量はきわめて少ないことがわかった。組換え体HCV遺伝子において脂肪滴に局在化しない点突然変異をコアに導入すると、HCV遺伝子の複製は正常であるが、他のHCV蛋白質は脂肪滴周囲には存在せず、感染性ウイルスの産生は認められない。また、同様にNS5Aにコアと相互作用しないアミノ酸変異を導入した場合には、コアは脂肪滴上に存在しHCV遺伝子複製は認められるにもかかわらず、他のHCV蛋白質は脂肪滴周囲には存在せず、感染性ウイルスの産生はほとんど認められない。ただし、このNS5A変異型JFH-1の場合でも培養上清にはHCVコアとHCVRNAを含む非感染性粒子の産生は認めら

れるため、この系は脂肪滴とは重要な関係を有しないものであると考えられる。このような感染性ウイルス産生系においてコアを発現している細胞で可視化できる脂肪滴の数量が上昇していた(図3)。

そして感染性粒子産生細胞では、中性脂肪量が上昇していることが認められた(図4)。このことは、上述したコアTgマウスにおいて全例脂肪肝が認められ、コアの発現により肝に脂肪が蓄積することや慢性C型肝炎患者の肝に脂肪肝がよく認められることと一致すると思われる。つまり、HCV感染肝細胞中における脂肪の蓄積は感染性ウイルス粒子産生のために必然的なものなのかもしれない。

近年、脂肪滴の機能が細胞内における中性脂肪の貯蔵であるだけでなく、細胞内膜系や種々のオルガネラへの脂質輸送や蛋白質の繫留や分解の場として機能することが示されてきている<sup>11,12)</sup>。つまり脂肪滴にコアが局在化することがこうした脂肪滴の機能障害が活性化を引き起こし、その結果、細胞内のシグナル経路の修飾や上述したミトコンドリア損傷に関与する可能性もあるかもしれない。

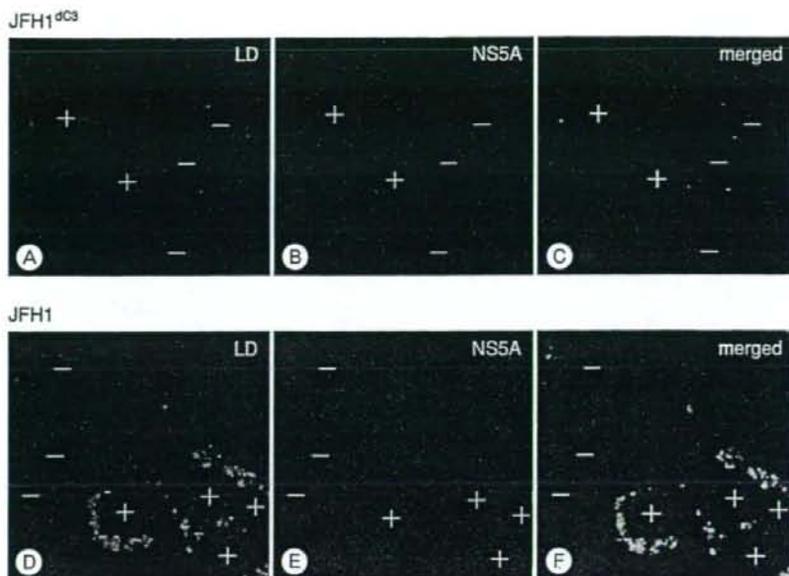


図3 HCVコア蛋白質発現感染性HCV産生細胞における脂肪滴の誘導  
 コア領域を欠損したJFH1dC3遺伝子RNAあるいは野生型同等以上に感染性の高いウイルスをつくるJFH1E2FL RNAを導入したHuh-7細胞の脂肪滴の検出, RNAが導入された細胞はHCV NS5Aの発現で確認される。

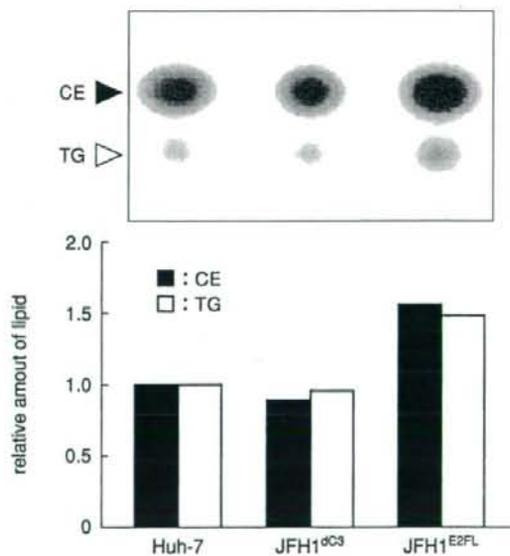


図4 中性脂肪の蓄積<sup>10)</sup>

未処理Huh-7細胞と図3で用いたRNAを導入した細胞内の中性脂肪を薄層クロマトグラフィーで分離定量した。CE: コレステロールエステル, TG: トリアシルグリセロール。

## 肝炎と肝発癌

HCV感染による肝発癌の発症は20~30年という長い慢性肝炎を経過した後に起こることが知られている。ウイルス性肝炎は一般的にウイルスが感染した細胞を宿主の免疫系が攻撃し、これを破壊するという生体反応であると考えられている。肝ではこうして排除された肝細胞は再生によって補われる。したがって、慢性C型肝炎で長期にわたって継続的な肝細胞の破壊と再生が繰り返されることは、肝細胞の増殖活性化と同じ意味をもつことになるのかもしれない。

初代培養細胞の形質転換の前段階に細胞の不死化(「サイドメモ2」参照)という継続的な細胞増殖の段階が存在するように、継続的な細胞増殖は遺伝子変異の蓄積を引き起こす原因と考えられている。さらに、肝細胞は恒常的に免疫系細胞群からの種々の炎症性サイトカインや遺伝子変異を引き起こす活性酸素に曝されることになると思われる。つまりHCV感染による肝発癌の原因のひとつが慢性肝炎そのものである可能性が考えられる。このことは、かならずしも癌化する細胞にHCVが感染する必要がないことを意味するかも

しれない。

しかし、慢性肝炎のなかでも自己免疫性肝炎症例の場合、肝硬変へと進行するが、肝癌の発症はウイルス性肝炎ほどではないことが知られている。自己免疫性肝炎とC型慢性肝炎の肝細胞に及ぼす影響の質的な相違は明らかではないが、すくなくともHCV感染による慢性肝炎が肝発癌への重要な要因となっており、HCVの何らかの要因がさらにその進行を加速する可能性は否定できないと考えられる。

## ● おわりに

HCV感染による肝発癌には長期の慢性肝炎が重要な原因となっていると思われる。HCV感染が果たす役割は肝炎を誘導する以外にも、感染した細胞自体に癌化を促す作用がある可能性が考えられる。これには、HCVの感染が細胞の癌化に必要ないくつかのステップにかかわる宿主細胞の遺伝子変化を誘導することによって正常細胞を癌化させるというメカニズムが考えられている。

今回、著者らの研究から、HCVの感染性粒子産生機構そのものがヒトの肝細胞のとくに脂肪滴に変化を及ぼすことが明らかとなった。近年、脂肪滴の機能が単に中性脂肪の蓄積にとどまらず、さ

サイド  
メモ  
2

### 不死化

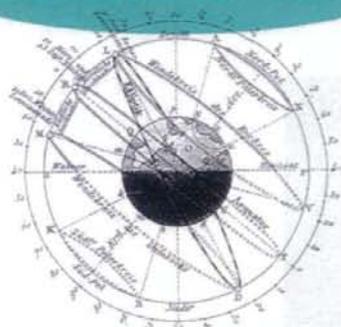
正常な体細胞は通常寿命をもっており、分裂を繰り返すと死ぬ場合がほとんどである。このことは細胞が分裂限界を有するというを意味するが、不死化とは細胞の分裂限界がなくなり、半永久的に分裂可能な状態になることである。癌化または形質転換とは異なり、無軌道に分裂するわけではなく、分裂には増殖因子刺激が必要であったり細胞密度が上昇しすぎると分裂を停止するなど、ある一定の秩序をもった増殖を行う。通常細胞の癌化への全段階と考えられている。

まざまな生命現象と関連することが示されてきている。このことから、たとえばHCVコア蛋白質の脂肪滴への局在化を抑制する方法が確立すれば、HCVの感染性粒子産生を阻害するのみならず、脂肪滴を介した細胞への影響を抑えることになるため、HCVによる肝発癌に対して効果の高い予防戦略となる可能性があると考えられる。

## 文献

- 1) Choo, Q. L. et al.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral-hepatitis genome. *Science*, **244**: 359-362, 1989.
- 2) 土方 誠, 下遠野邦忠: HCV 前駆体ポリ蛋白質のプロセッシング機構, ウイルス性肝炎—基礎・臨床研究の進歩, 日本臨床増刊, **62**(増刊7): 54-58, 2004.
- 3) 土方 誠: HCV による肝発癌発症機序, ウイルス, **56**: 231-240, 2006.
- 4) Ray, R. B. et al.: Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.*, **70**: 4438-4443, 1996.
- 5) Tsuchihara, K. et al.: Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology*, **258**: 100-107, 1999.
- 6) Moriya, K. et al.: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.*, **4**: 1065-1067, 1998.
- 7) Moriya, K. et al.: Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **61**: 4365-4370, 2001.
- 8) Okuda, M. et al.: Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, **122**: 366-375, 2002.
- 9) Wakita, T. et al.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.*, **11**: 791-456, 1995.
- 10) Miyanari, Y. et al.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.*, **9**: 1089-1097, 2007.
- 11) Beckman, M.: Great balls of fat. *Science*, **311**: 1232-1234, 2006.
- 12) Welte, M. A.: Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.*, **17**: 363-369, 2007.

化学と生物  
Vol. 46, No. 12 (2008)



# C型肝炎ウイルスの生活環と発がん

宮成悠介\*1, 臼田信光\*2, 土方 誠\*3, 下遠野邦忠\*4,5

C型肝炎ウイルス (HCV) は、持続感染して慢性肝炎を発症する。慢性肝炎から肝硬変を発症。肝がんに至る場合が多い。病態の進展にはウイルスが持続的に感染していることが重要である。つまり、ウイルス複製そのものが何らかの形で病態進行に関与していると考えられる。ウイルス複製の分子機構を理解することは、病気の発症の原因を理解するために重要である。さらには持続感染を遮断して、HCV 感染を除去することによる病気の発症予防にもウイルス複製機構の解明は重要である。ここでは、HCV 複製の生活環について最近明らかにされた点を中心に概説し、最後に肝発がんとうイルス複製との関連について述べる。

C型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると最初急性肝炎を発症するが、そのうちの約2割がウイルスを排除して回復するものの、8割の感染者ではウイルスが持続感染する結果慢性肝炎状態になる。慢性肝炎患者の約4分の1が肝硬変へと病態が進み、その半数が肝臓がんを発症する。HCV 感染により肝硬変を患う患者の約4分の1が本疾患のために命を落とすので、全体的ではHCV 感染者の15~20% が肝疾患の犠牲になると推定される。

C型肝炎の治療にインターフェロンとリビリン(核酸類似体)の併用療法が功を奏している。治療を完了した約半数の患者からウイルスが消えており、それらのヒトではその後の肝障害も見られない。一般に、ヒトにがんをひき起こすウイルスは排除するのが困難であることを考えると、半数近くの患者からHCVを排除できるというこれまでの成績は、今後抗HCV剤の開発が進めばさらに効果的にウイルスを排除できる可能性を示唆する。また、ウイルス複製の持続性が疾患の維持および慢性化に関わるので、複製そのものが細胞の増殖に影響を及ぼしており、そのことが疾患と関連すると考えられる。したがって、HCV複製の分子機構およびその過程に宿主がどのように関係してくるのかを理解することは、病気の発症の分子機構解明の一助になると期待できる。そのような期待を抱いて、以下にHCVの複製の分子機構を中心に概説し、最後に疾患との関連を推測したい。

## HCV ゲノムとタンパク質

HCVはフラビウイルス科に属する。本科のウイルスはプラス鎖からなるRNAをゲノムにもち、ウイルス粒子はエンベロープに覆われている。ゲノム内にある最も大きいタンパク質の読み枠からすべてのウイルスタンパ

### HCV Life Cycle and Its Pathogenesis

Yusuke MIYANARI, Nobuteru USUDA, Makoto HIJIKATA, Kunitada SHIMOTOHNO. \*1国立遺伝学研究所, \*2藤田保健衛生大学医学部, \*3京都大学ウイルス研究所, \*4慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター, \*5千葉工業大学総合研究所



図1 ■ HCV ゲノムの構造 (上) と産生されるタンパク質 (下)

ゲノムは約 10,000 ヌクレオチドからなるプラス鎖 RNA である。ゲノム全体の 9 割を占めるタンパク質読み種の N 端から前駆体ウイルスタンパク質が翻訳され、それが切断されて個々のタンパク質になる。Core: コア、Env: 外膜タンパク質、NS: 非構造タンパク質 (non-structural proteins の略)

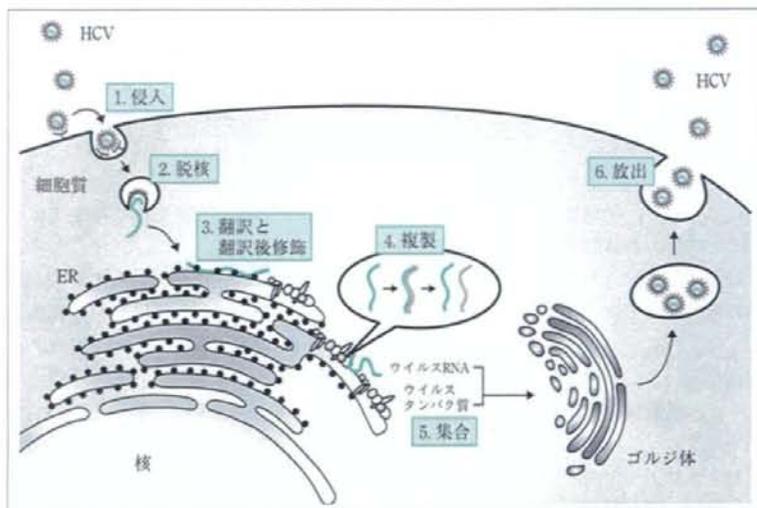


図2 ■ HCV の複製サイクル

HCV は細胞表面の受容体を介して細胞に取り込まれると考えられる。それらの細胞タンパク質のうち、侵入の後期には、Claudin 1 や CD81 が関与すると考えられる。細胞内に入ったウイルス核膜体内のゲノム RNA が mRNA として働き、図 1 に示したタンパク質が産生される。ウイルスゲノム複製は本文で述べるように、小胞体膜内の複製複合体体内で行なわれる。ER: 小胞体

質が産生される。ウイルスタンパク質は、ウイルス自身のペプチダーゼによる切断あるいは宿主のシグナルペプチダーゼによる切断、糖鎖付加などの翻訳後修飾を経て最終的に機能する成熟タンパク質になる (図 1)。

HCV は感染細胞内の細胞質で複製する (図 2)。感染に際しては細胞表面に存在する受容体を介すると考えられる。これまでのところ、複数の候補遺伝子が報告されているが、それらが細胞に接触し感染が成立する過程でどのように機能しているかについては、十分に理解されているとはいえない。しかし、それらの中で、CD81、Claudin 1 などは、ウイルス侵入後期に関わる重要な細胞側因子であると考えられる<sup>(1)</sup>。

ウイルスタンパク質としては約 10 種類産生されるが、それらを 2 つのグループに分けることができる。1 つは粒子構成タンパク質 (構造タンパク質) であり、もう 1 つは感染細胞内でウイルス複製に関与するタンパク質 (非構造タンパク質) である。構造タンパク質は、コア、外被膜タンパク質 (E1、E2) などがある (もう 1 つのタ

ンパク質、p7 についてもウイルス粒子構成タンパク質であると示唆されるが、まだ決定的ではない)。非構造タンパク質は約 5~6 種類からなり、それぞれのタンパク質は独立した機能をもつが、非構造タンパク質全体としての最も重要な機能は、それらが複合体を形成してウイルスゲノムの複製および mRNA を合成する場 (複製複合体) を構築することである。

#### ■ ウイルスゲノム複製は小胞体周辺に感染して新たに構築される特殊な構造体の中で行なわれる<sup>(2-4)</sup>

ウイルス粒子産生にまでは至らないがゲノム自身は細胞内で自立的に複製できる欠失ウイルスゲノムの存在が知られている<sup>(5)</sup>。そのゲノムを導入した細胞においては常時ウイルスゲノムの複製が見られ、細胞が分裂すると同時にウイルスゲノムも娘細胞に分配され、そこで複製を繰り返すようになる。このような細胞の切片を電子顕微鏡で観察すると、小胞体膜の一部の膜構造が著しく変形した像が見られる<sup>(6)</sup>。正常細胞にはこのような像は観

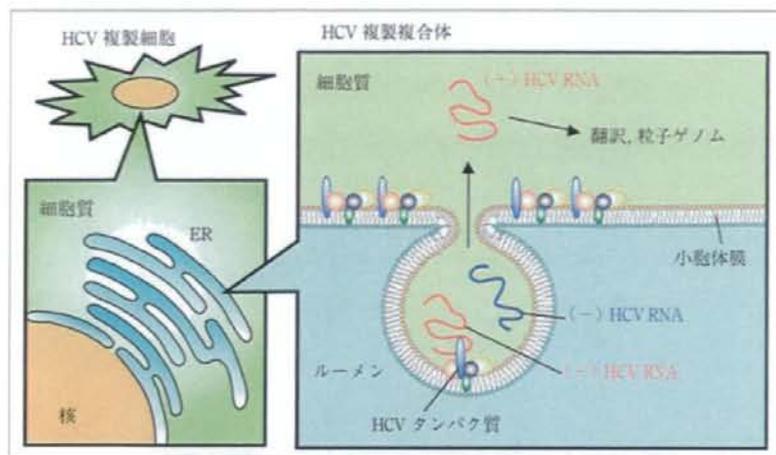


図3 ● HCV 複製複合体の模式図

HCV 複製細胞 (左図) の小胞体膜部分を拡大 (右図) し、その中に存在する HCV 複製複合体のイメージを記載した。小胞体ルーメン内に突き出した形の膜構造体 (図で円形の形で示した) 内でウイルスの核酸合成が行なわれる。核酸合成に関与するウイルスタンパク質は細胞内の全ウイルスタンパク質のうちわずかの量である。ほかのウイルスタンパク質は細胞質側に露出していると考えられる。合成されたウイルス RNA は細胞質に放出され、mRNA やゲノム RNA として機能する。

察されない。生化学的手法を用いた解析から、膜構造が変化したこの本体は、その中で HCV ゲノムが複製する活性をもった膜構造体 (ゲノム複製複合体) であると考えられる<sup>(4)</sup>。ゲノム複製複合体の特徴として次のようなことがあげられる。

- ①細胞質内の不溶性画分として存在する。
- ②NP40 などの界面活性剤で処理すると複製能が失われるので、膜様構造が機能的に重要である。
- ③細胞膜を部分的に破壊したあとでスクレーパー液の入った緩衝液で処理すると、リボソーム RNA が破壊される条件下でも HCV RNA は壊れない。しかし、このとき、界面活性剤を共存させると速やかに壊れるので、HCV RNA は膜成分に保護された状態として存在している。
- ④細胞質に外来的にプロテアーゼを導入し、細胞質内の多くのタンパク質が加水分解を受ける条件下で処理しても、わずかのウイルスタンパク質は分解されずに残る。しかし、界面活性剤共存下ではすべてのウイルスタンパク質が消える。つまり、一部のタンパク質は膜成分に覆われた中に存在していると考えられる。
- ⑤界面活性剤を加えないで、大部分のウイルスタンパク質がプロテアーゼで加水分解された環境下でも、ウイルス RNA の合成には影響を受けない。

これらのことから、HCV RNA 合成は小胞体膜構造に覆われてつくられた複製複合体の中で行なわれると考えられる<sup>(4)</sup> (図3)。ウイルスタンパク質の中で、NS4B が小胞体膜に作用して膜の構造を変化させることが知られている<sup>(7)</sup>。

### HCV のウイルス粒子産生には細胞質に存在する油滴が重要な役割を果たす<sup>(8)</sup>

HCV タンパク質の多くは、細胞内の小胞体膜タンパク質マーカーと局在が一致することから、小胞体膜周辺に局在するといえる。一方、HCV 構造タンパク質コアを単独に発現させると、細胞質に浮遊して存在する油滴の周りに局在する<sup>(9,10)</sup>。ウイルスタンパク質の細胞内局在とウイルス増殖との関連については不明である。感染性ウイルスを産生させる培養細胞系で個々のウイルスタンパク質の局在を調べ、その局在を人為的に変化させたときにウイルス産生にどのような影響を与えるかを調べることで、ウイルスタンパク質の細胞内局在がウイルス複製能に与える影響を調べることが可能である。

2年ほど前に樹立された感染性 HCV ゲノム (JFH1 と呼ばれている) RNA を培養細胞 (HuH7: ヒト肝臓がん由来細胞株) に導入すると、ウイルス粒子が産生される<sup>(11)</sup>。これまで、培養細胞を用いた HCV 感染・増殖系がなかったため、この系の樹立はウイルスの増殖を解析するうえで大変重要である。HCV ゲノム RNA を導入した細胞内でのコアタンパク質の細胞内局在を調べると、これまでの報告通りに、油滴の周りに局在が見られる。また、非構造タンパク質 (NS3-NS5B) の多くは小胞体に局在している。しかし、詳細に調べると、小胞体近辺の油滴の周りにも NS タンパク質の局在が観察される<sup>(8)</sup>。この細胞培養液からウイルス粒子を回収して、シロ糖密度勾配遠心により浮遊密度を調べると、密度 1.15 (g/ml) の画分に大部分のウイルスが検出される。しかし、この画分のウイルスには感染性がない。一方、密度 1.12 (g/ml) の画分には、わずかな粒子しか検出され

ないが、それは感染性を示す(図4)。油滴の周りに非構造タンパク質が集まってくるのは、この周りにウイルスRNAの複製複合体が構築されていることを示唆しており、膜成分も油滴の周りに集合しているのが観察される。

油滴と会合できないHCV コアタンパク質を産生する

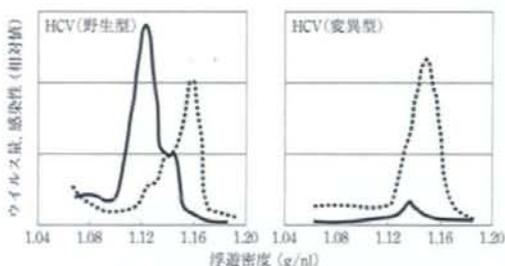


図4 ■ 細胞上清に産生されるウイルス粒子の性状と感染性  
HCVが複製する細胞から放出されるウイルス粒子の性状を、シロ糖密度勾配遠心で調べた(左)。また、ウイルスタンパク質が油滴に会合できない変異ウイルスが複製している細胞から産生されるウイルスの性状を右図に示した。破線はウイルス粒子の量をウイルスコアタンパク質で測定した値、実線は感染性を示す。

変異ゲノムを作製して、それを細胞に導入した場合、油滴周辺にコアの局在が見られなくなるが、同時に非構造タンパク質の油滴への局在も観察されなくなる<sup>(8)</sup>。この条件では細胞培養上清にはウイルス粒子の産生が見られない。このことは、コアが他のウイルスタンパク質を油滴周辺に引き寄せる働きをしていることを示している。さらに、ウイルス粒子が産生されない理由としては、粒子産生に油滴周辺の環境が必要である可能性、あるいは変異コアでは粒子の形態形成が起こらない可能性が考えられる。

上の2つの可能性のいずれが正しいかを調べるために、非構造タンパク質(特にNS5Aに注目した)に変異を入れて、コアが油滴と会合できても非構造タンパク質が会合できない状態にした場合にウイルス粒子産生がどうなるかを調べた。その結果、この状態ではウイルス粒子の産生は見られたが、粒子の浮遊密度は1.15であり、感染性を示さなかった<sup>(8)</sup>(図4)。

これら一連の実験から、油滴は感染性HCVウイルス粒子産生に重要な働きをしているといえる。それでは、油滴は感染性ウイルス粒子産生にどのような役割を担っているのだろうか? 考えられることとして、①感染性

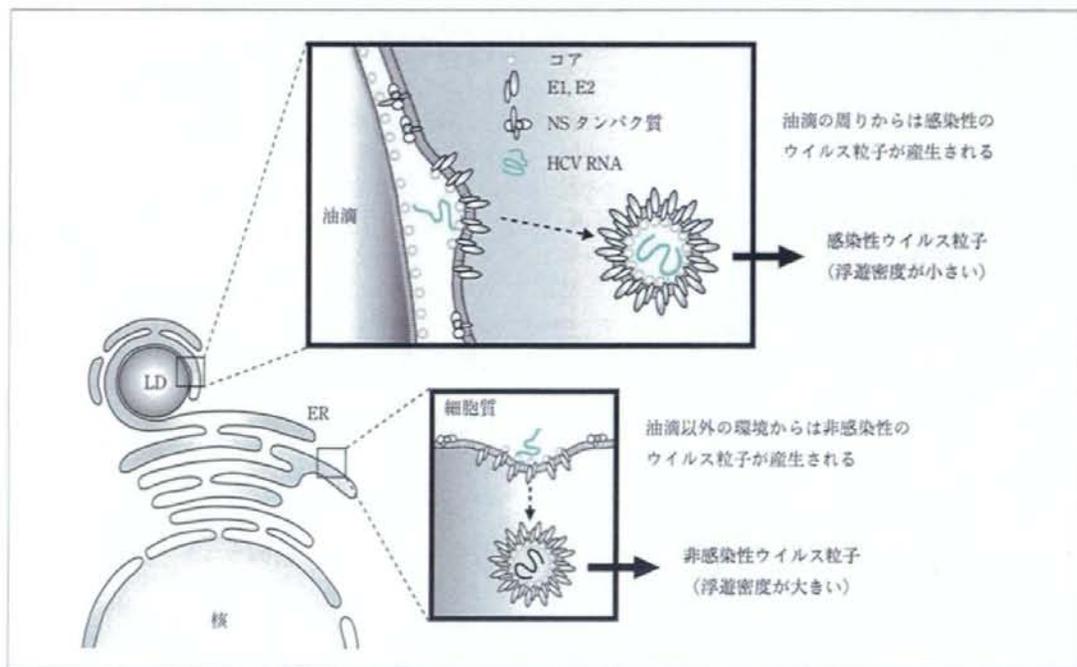


図5 ■ HCVは油滴とその周辺的环境を利用して感染性ウイルス粒子を産生する(モデル)  
上の図は油滴環境から産生される粒子で、この場合、感染性を示し浮遊密度は小さい。一方、油滴との接触がない環境からもウイルス粒子の産生は見られる(下の図)が、この場合には感染性はなく、密度が大きい。