

200933001A

厚生労働省科学研究補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発
要因及びウイルス増殖に対する人為的制御
による肝炎征圧

平成21年度 総括・分担研究報告書

総括研究者 下遠野 邦忠

平成22(2010)年5月

目 次

I. 総括研究報告	
肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧 下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) -----	1
II. 分担者研究報告	
1. HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御 下遠野 邦忠(千葉工業大学附属総合研究所) -----	15
2. 肝炎ウイルス増殖及び制御に関与するヒートショックタンパク質の機能解析 高久 洋(千葉工業大学工学部) -----	18
3. ウイルス複製に加えて細胞の増殖を制御する細胞側因子の解明と機能解析 堀田 博(神戸大学大学院医学系研究科) -----	22
4. HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析 加藤 宣之(岡山大大学院医歯薬学総合研究科) -----	27
5. 肝発がんとミトコンドリア異常 西口 修平(兵庫医科大学) -----	32
6. DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得の分子機構解明 小原 恭子(熊本大学大学院医学薬学研究部) -----	39
7. ステム細胞由来肝細胞のウイルス感染研究への応用 落谷 孝広(国立がんセンター研究所) -----	44
8. 肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義 杉山 和夫(慶應義塾大学医学部) -----	47
9. HCV感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析 丸澤 宏之(京都大学大学院医学研究科) -----	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	55
IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----	63

肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及び
ウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧

研究代表者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨

HCV の複製機構の解析、感染細胞の増殖性の変化などについて、ウイルス側と宿主側因子の両方から研究を進めた。また、HCV 感染を評価する新たなヒト肝臓細胞樹立をおこない、感性の開発を行った。主な成果を箇条書きに示す。(1) HCV 感染による細胞の増殖特性に、ROS の過剰生産を介した JNK 活性化が、Bax を活性化しミトコンドリア介在アポトーシスを誘導する。コアタンパク質は別の機構によりやはりミトコンドリア介在性アポトーシスを増強させる。(堀田) (2) HCV 感染により細胞が増殖能を獲得する機構を持つことも明らかにした。3beta-hydroxysterol delta24-reductase (DHCR24) が HCV 感染により亢進され、p53 の活性低下を通して参加ストレス誘導アポトーシスの反応を低下させることを見出した。また、DHCR24 は p53 の種々の機能を抑制することにより細胞に増殖性を賦与する可能性を示した。(小原) (3) HCV 感染と炎症反応により生じた ROS によるミトコンドリア DNA 損傷が、肝細胞の悪性化を引き起こすと考えられる。肝がん患者の非がん部組織においては組織学的重症度が低いにも関わらずミトコンドリア DNA 損傷が生じていた。インターフェロン投与によりミトコンドリア DNA 損傷は軽減した。ミトコンドリア DNA 異常の持続が肝発がん率とある程度の関連があることなどを見出した。(西口) (4) HCV 感染したヒト肝臓細胞において、生理的条件化ではほとんど見られない遺伝子編集酵素 (AID) の発現が誘導されることを見出した。本遺伝子発現により宿主細胞遺伝子に変異を生じたと考えられる成果を得た。(丸澤) (5) HCV 複製を制御する宿主要因として、i) 小胞輸送 (endosomal sorting complex required for transport: ESCRT) 系が必要であることを見出した。ESCRT 関連因子である TSG101, Alix, Vps4B, CHMP4b などを抑制すると HCV の産生が抑制された。(加藤) ii) リポタンパク質成分のひとつであるアポリポタンパク質 E (Apo-E) を阻害すると HCV の感染性が失われること、Apo-E のアイソフォームの違いにより HCV の感染性が異なることを見出した。(下遠野) iii) HCV プロテアーゼ、NS3 が Hsp90 により安定化されることを見出し、Hsp90 の阻害が抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。(高久) (6) エンベロープから NS2 領域に亘り in frame で欠損した HCV ゲノムを持つウイルスが粒子として血流中に存在していることを見出し、疾患、あるいはウイルス増殖性との関連で注目される。(C 型慢性肝炎患者の 22% に検出された) (杉山) (7) 間葉系幹細胞から分化した肝細胞が HCV 感染系として使えることを示し、また、その HCV 感染実験から分化した肝細胞における miRNA122 の発現がウイルス複製に重要であることを確認した。(落谷)

分担研究者

高久 洋 千葉工業大学 教授
堀田 博 神戸大院医学系研究科 教授
加藤 宣之 岡山大院医歯薬学総合研究科 教授
西口 修平 兵庫医科大学 教授
小原 恭子 熊本大院医学薬学研究部 特任教授

落谷 孝広 国立がんセンター研究所 独立室長
杉山 和夫 慶応義塾大医学部 准教授
丸澤 宏之 京都大医学部 助教

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者は世界人口の約 3% を占め、我が国では約 200 万人

が感染していると推定される。キャリアの多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、HCV 感染による肝疾患でなくなる年間死亡者は、我が国では5万人を超えている。インターフェロンなどによる治癒率は50%程度であり、画期的な治療薬が切望されている。そのためには、HCV の増殖機構全体を解明する必要がある。そして、HCV の増殖を効率的に抑制できる人為的制御法の開発が必要である。一方、HCV 感染により引き起こされる肝疾患の予防、診断、治療のためには感染した肝細胞の増殖特性を明らかにし、病態が何に起因しているかを解明する必要がある。そのために感染細胞の増殖特性をアポトーシス、造腫瘍性の獲得、あるいはミトコンドリア機能障害などの立場から解析し、疾患予防および診断に役立てる。

B. 研究方法

(1) 脂肪代謝が HCV 産生に及ぼす影響の解析。(下遠野)

これまでの研究で HCV 感染により脂肪滴が増加する事、その脂肪滴の周辺で HCV 感染細胞が産生されることを示してきた。本研究をさらに進めて、細胞からの感染性粒子の産生を調べる。とくに、脂肪滴から細胞が放出される過程を明らかにした。

これまでに、HCV 感染者の血液中に存在するウイルス粒子はリポタンパク質と会合しているという報告があるが、その会合がウイルス産生のどの段階で生じるのか、リポタンパク質との会合の意義は何かなど不明な点が多い。そこで培養細胞による HCV 感染増殖系を駆使して、HCV 会合リポタンパク質の機能を調べた。

(2) ウイルスに感染性を賦与する要因の解析。(下遠野)

HCV に会合しているリポタンパク質として very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) などが考えられている。これらのいずれが会合しているのか、また、会合がどのように行われているのかなどについては不明である。研究分担者は HCV に会合しているこれらのリポタンパク質

のどの成分が、HCV の機能に重要なかを調べるために、リポタンパク質の成分である各種のアポリポタンパク質遺伝子を siRNA 技術でノックダウンした細胞からのウイルス粒子の産生を調べる事によりこれらリポタンパク質の HCV 増殖における働きを明らかにした。

(3) Hsp90 による HCV NS3 タンパク質の機能解析 (高久)

これまでに Hsp90 阻害剤である 17-AAG 処理により、NS3 タンパク質量が著しく減少することを見出している。この薬剤が HCV RNA 合成に与える影響を、HCV レプリコン細胞を用いて、ウイルス RNA の定量、ウイルスタンパク質の定量により明らかにした。

(4) HCV 増殖を制御する宿主因子の探索。(加藤)

HCV 増殖を制御する宿主因子を明らかにするために、ウイルス輸送系に関わると考えられる遺伝子を中心に short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスベクターや siRNA (Dharmacon) を用いて、ノックダウンを行い、ウイルス複製を抑制する宿主因子を明らかにした。本分担研究者が開発したウイルス複製を簡便に定量できる系、およびウイルス感染・産生形を用いて解析を行った。その中でも、近年注目されている新たな小胞体輸送系である ESCRT に焦点を絞り、その関連因子 TSG101、Alix、Vps4B 或は CHMP4b をノックダウンさせた HuH-7 由来 RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 を感染させる。感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ Real-time RT-PCR 法と ELISA 法で定量し、ウイルスの産生を定量する。さらに ESCRT 関連因子 が Core や NS5A と相互作用するのかなどについても調べた。

(5) HCV 感染による細胞のアポトーシス誘導における分子機序の解析。(堀田)

主として Huh-7.5 細胞を用いて実験を行った。ウイルスは HCV J6/JFH1-P47 株とその変異株を用いた。アポトーシスの解析は WST-1 法による細胞死の定量、Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche) による

DNA断片化、Caspase-Glo 3/7 and 9 Assay (Promega)などのより行った。また、ミトコンドリア superoxide の産生は MitoSOX™ Red (Molecular Probes)を用いて測定した。

(6) DHCR24 の機能解析。(小原)

HCV 発現継代細胞表面に発現している DHCR24 の機能をその遺伝子発現により影響を受けることがわかった p 5 3 とその下流シグナルを中心に解析した。

HCVが誘導するDHCR24の過剰発現が過酸化水素処理後のアポトーシス感受性に及ぼす影響についてはカスパーゼアッセイで定量的に測定して検索した。DHCR24の関与の可能性についてはsiRNAを用いて検討を行った。DHCR24の過剰発現が及ぼす影響も明らかにするため、レンチウイルスベクターやプラスミドベクターでDHCR24を過剰発現する細胞株を樹立した。臓器特異性を検討するため、肝臓由来細胞株である HepG2細胞に加え、肺由来細胞のWI38 (肺2倍体細胞) やA549細胞を用いて実験を行った。

(7) 欠失を持つHCVの解析。(杉山)

C型肝炎患者血清の症例(計74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。

また、欠損ゲノムにおけるコアタンパク領域の意義を明らかにするために、欠損ゲノムからさらにコアタンパク質領域を欠

失させた欠失変異体を作製しその感染性を検討した。

(8) AIDの発現とその意義に関する研究。(丸澤)

これまでにHCVコアタンパク質により遺伝子異常導入(AID)が発現誘導されることをみだした。AIDによる遺伝子異常導入活性に着目し、HCV感染によるAID発現により肝細胞にもたらされる遺伝子異常が、HCV感染の結果生じる病態形成に果たす役割を明らかにすることを調べた。そのために、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明らかにするため、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、レンチウイ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。

(9) 間葉系細胞から分化した肝細胞を用いたHCV感染実験。(落谷)

H20年度までに、岡山大学の加藤班員と共同で、間葉系幹細胞から*in vitro*で分化した肝細胞に、HCVのRNAを遺伝子導入し、ウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系としての基盤作成に取り組んできた。最終年度は、この間葉系幹細胞から分化した幹細胞のHCV複製系に、microRNAの関与があるかどうかの検証を、肝臓に最も豊富に存在し、HCV複製との関連が培養細胞Huh7で指摘されているmRNA122のアンタゴニスト(LNA)によって解析した。さらに下遠野主任研究員との共同研究で、分化誘導した肝細胞の不死化細胞株について、mRNA122の発現解析等を実施した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、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倫理指針」(H16.12.28)に準拠し、各所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針(H14.1.31)に基づき、実施した。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、各機関の遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得て実験を行った。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した。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倫理指針」に準拠し、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等を適正に管理保存する。ヒト組織由来間葉系幹細胞は、インフォームドコンセントのもと、国内の倫理審査を得て採取され、国立がんセンター研究所での倫理審査を経て認可を受けてから使用した。

C. 研究結果

(1) リポタンパク質の産生はウイルス粒子の産生に重要である。

リポタンパク質産生に重要な働きをする酵素、microsomal triglyceride transfer protein (MTP)の活性阻害剤で処理すると、肝臓細胞からのVLDLの産生は強く抑制される。このときにApo-Bの培養上清への放出はApo-Eよりも強く抑制される。すなわち、低濃度の阻害剤でApo-Bの細胞外への放出がApo-Eよりも抑制された。これらの条件下で感染性HCVの培養上清への放出はApo-Bの細胞外への放出と呼応して低下した。従って、Apo-Bはウイルス粒子の細胞外放出に重要な働きを持つといえる。

さらに、Apo-Eについて調べた。既にApo-E産生をノックダウンさせた細胞からは感染性粒子の産生が阻害される事を見いだしている。MTP阻害反応では、Apo-Eの培養上清への放出低下が、Apo-Bよりも高い濃度でしか見られないために、Apo-E低下によるHCV放出効果が見にくい。そこで、Apo-Eの機能を直接解析する方法を考えた。Apo-Eは細胞内で産生され、一部はVLDLと会合し

て細胞外に放出されると考えられる。一方、VLDLの様なりポタンパク質と会合しないApo-Eはオリゴマーを形成して細胞の外に放出される。細胞の外に遊離されないApo-E変異体を用いて、ウイルス粒子の産生と細胞外への放出を調べた。小胞体貯留シグナルである4つのアミノ酸からなるペプチド(KDEL)をApo-E分子のC端に付加すると、このApo-E変異分子(Apo-E KDEL)は細胞の外に放出されなくなる。まず、細胞の内在性Apo-Eの産生が抑制されている細胞を樹立し、それに外来的にApo-E KDELを発現するようにした。この細胞にHCVを感染させ感染性ウイルス粒子の産生を調べた。その結果、この細胞からの感染性ウイルスの産生は強く抑制された。この細胞から放出されるウイルス粒子の量をコアで調べると粒子の量には大きな差が認められない。以上から、感染性を示す粒子の産生が特異的に抑制される事が明らかになった。一方、細胞内の感染性粒子を調べると、野生型のApo-Eを放出する細胞に比べ、高濃度の感染性ウイルス粒子が存在した。この事から、Apo-Eが細胞外に放出されないために、感染性粒子として細胞外に放出されないと考えられた。

(2) HCVはApo-Eと会合している。

上の(1)の実験から、細胞上清のHCVはApo-Eと会合している可能性が考えられた。そこで、Apo-E抗体を用いて培養上清に放出されるウイルスを処理した。次に抗体との複合体をProtein-G Sepharoseで除去した画分の感染性を調べた。その結果その画分には感染性が観察されなかった。対照実験として抗IgG抗体処理した上清からは感染性が認められた。このことからApo-Eと会合しているウイルスが感染性を持つことが示された。

(3) Hsp90阻害剤(17-AAG)によるHCV複製の抑制。

17-AAGによるHCV増殖抑制効果の検討をレプリコン細胞(NNC#2)を用いて行った。細胞毒性を示さない50nM 17-AAGでは99%のHCV増殖抑制効果を示し、IC₅₀は0.3nMであった。また17-AAG、濃度依存的にHCV RNAの減少が見られた。17-AAGの長期投与

による HCV 抑制効果を調べた。15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG で処理した場合は処理期間中、HCV RNA レベルで 1000 分の 1 まで低下した。17-AAG 処理により NS3 の分解が促進したが、プロテアソーム阻害剤、MG132 をでは分解が抑制された。これらの結果から 17-AAG の薬理効果はプロテアソームシステムに依存することが示唆された。

HCV NS3 の活性化における Hsp90 の機能を明らかにする為に pFlag-NS3 を 293T 細胞に導入し、17-AAG の存在また非存在下で解析を行った。NS3 の Helicase 領域に Hsp90 が結合した。

(4) HCV 複製を制御する宿主因子。(加藤) 感染増殖に係わる新規の宿主因子を見つけるために、HCV 粒子産生のために小胞輸送に関与する ESCRT 関連因子が係わっているかどうかに着目して以下の成果を得た。

まず、ESCRT 関連因子である TSG101、Alix、Vps4B 或は CHMP4b をノックダウンさせた RSc 細胞を作成した。RSc 細胞は、HCV-JFH1 の複製が効率よく起こる細胞として我々が得たものである。これらの細胞に HCV-JFH1 を感染させると、細胞内の HCV RNA の複製レベルには影響を受けなかったが、培養上清に放出される Core の量が顕著に低下した。細胞内局在を解析し、Core が FLAG-CHMP4b と共局在すること、そして、Myc-TSG101、FLAG-Alix 或は FLAG-Vps4B とともに部分的に共局在していることが分かった。また、HCV-JFH1 を感染させた RSc 細胞に CHMP4b-GFP を発現させても Core との部分的な共局在が観察された。これらの結果から、ESCRT 小胞輸送システムが HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。

(5) HCV 感染に伴う Bax 活性化の機序解析。

HCV 感染 2 日後から 8 日後まで、JNK のリン酸化と、基質である c-Jun の顕著なリン酸化が観察された。これらの結果は、JNK が活性化されていることを示している。そこで、JNK 阻害剤である SP600125 で HCV 感染細胞を処理すると、JNK 及び c-Jun のリン酸化が阻害され、同時に Bax の活性化とミトコンドリアへの移行も阻害された。

JNK は活性酸素種 (ROS) の過剰産生によ

り活性化されることが知られている。そこで、抗酸化剤である *N*-acetyl cystein (NAC) で処理すると、JNK 及び Bax の活性化はいずれも見られなくなった。一方、p38 MAP キナーゼは、HCV 感染 2 日後に対照細胞に比べて明らかなリン酸化 (活性化) を示したが、4 日後以降は対照細胞と比べて有意なリン酸化の亢進を示さなくなった。p38 阻害剤である SB203580 処理により p38 のリン酸化は著しく抑制されたが、HCV 感染による Bax の活性化はわずかに抑制されたのみであった。以上の結果から、HCV 感染においては、ROS の過剰産生により JNK が活性化され、それが Bax の活性化を惹起して、ミトコンドリア介在性アポトーシスが誘導されると考えられた。

(6) HCV 感染による細胞増殖亢進。

これまでの結果から、DHCR24 過剰発現により p53 の活性化が抑制される可能性が考えられた。この活性抑制機序を明らかにするため、まず p53 の活性化に重要である翻訳後修飾を検討した。p53 の各種セリン残基のリン酸化についてはほとんど影響がないもののリジン残基 (373, 382) の核内でのアセチル化が DHCR24 過剰発現により低下している事が明らかとなった。次に、p53 の活性制御に重要な MDM2 との相互作用を免疫共沈法で解析したところ、DHCR24 過剰発現によりこれらの相互作用が亢進する事が明らかとなった。また、細胞を核と細胞質に分画して検討したところ、細胞質において p53 と MDM2 の相互作用が亢進している事が明らかとなった。さらに、DHCR24 が過剰発現すると p53 のユビキチン化が抑制され、分解が抑えられる事も明らかとなった。その結果 E3 ユビキチンライゲースである MDM2 と p53 の相互作用が亢進しても分解されない可能性も考えられた。p53 と MDM2 の相互作用を肝臓や肺由来の細胞株で比較すると、DHCR24 の発現亢進により、肝臓細胞ではこの相互作用が亢進するのに対し、肺の細胞では、この相互作用の亢進が見られなかった。

(7) ミトコンドリアの機能不全と肝がん C 型慢性肝炎と肝がんの組織内のミトコンドリア DNA 変異 (D-loop 領域) を解析し、

組織所見が悪性であるほど、がん部での変異数の増加が認められた。これはがん化に際して mtDNA 変異が増加・蓄積することを示唆するとともに、背景肝炎組織には、既にごん組織と共通した mtDNA の変異が存在することを示している。また、肝がん症例の非がん部組織では、肝がん合併のない C 型慢性肝炎例に比して mtDNA の変異数は増加していた。

さらに、mtDNA の変異数について、肝炎組織の活動性および線維化との関連を検討すると、炎症や線維化が同程度であっても肝がん症例の非がん部組織では、肝がん合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織に比して D-loop 領域の変異数は増加していた。すなわち肝がん症例の非がん部には、組織学的所見の程度にかかわらず mtDNA 異常がより蓄積していることが推定された。

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

検討した遺伝子多形のうち、活性酸素消去酵素の一つ Mn-SOD 遺伝子では、Val19Ala の変異 (T \rightarrow C) は、薬剤性肝障害のリスクが高まると報告されているが、C 型肝炎ウイルス感染症例において T \rightarrow C の変異症例で mtDNA の多数変異例が多い傾向が認められた。

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

(8) 間葉系細胞から分化させた肝細胞におけるマイクロ RNA の発現変化。

間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞に、HCV の複製に必須であると考えられている non-coding-small RNA の mRNA122 が発現している。本 RNA は未分化間葉系幹細胞では発現が認められなかったが、分化した肝細胞

では 20 倍ほど上昇した。アンタゴニスト LNA を導入することにより、その発現は 75% 抑制された。この状態で複製型 HCV-RNA である JFH-1 株 (2a 型) を細胞にトランスフェクションした結果、HCV のコピー数の上昇は、アンタゴニスト LNA を未導入の幹細胞に比較して顕著に抑制されていた。

HPV の E6E7+hTERT による分化した肝細胞の不死化の試みにおいては、2 株が肝細胞様細胞形態を保持したままの形で増殖してきた。これらの細胞株の mRNA122 の発現をリアルタイム法にて検討した結果、両方の細胞株ともに、その発現を確認することが出来、発現量はヒト初代培養幹細胞の 3 分の 1 程度であることを明らかにした。

(9) 欠失ゲノムを持つ HCV の解析。
74 症例の C 型肝炎患者血清内の欠失 HCV ゲノムを解析した。その結果、その結果、16 症例 (22%) において構造領域のゲノムが広範囲に in frame で欠失したのを確かめた。有意差はなかったが肝炎重症度との関連が示唆された。

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 ゲノム間の分子系統樹解析した結果、欠損型 HCV が発生したのち、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。欠損している領域を外来的に産生させることにより、欠損ゲノムを持つウイルス粒子の産生をみた。このことから、患者血清中の HCV 欠損ゲノム RNA は、完全長の HCV が複製増殖している細胞においては感染性ウイルスとして産生されると考えられた。

(10) HCV 感染肝細胞における宿主遺伝子変異の解析。

HCV 感染からの肝発がん過程において、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明らかにするため、遺伝子異常の生成の網羅的な解析を行った。まず、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たところ、インターフェロン受容体遺伝子を含む遺伝子領域が再現性をもって AID 発現により欠失が誘導されることがわかった。そこで、インターフェロン受容体遺伝子に特異的なプローブを作成し、AID を持続発現したヒト培養肝細胞中のインターフェロン受容体遺伝子のコピー数の変化を、real-time PCR 法により検討した。興味深いことに、インターフェロン受容体遺伝子のコピー数は AID 発現により減少することが確認された。ヒト臨床検体の解析からは、HCV 感染を伴った肝硬変組織中のインターフェロン受容体遺伝子の発現量は、正常肝組織と比較して有意に低下していることがわかった。

D. 考察

HCV 複製の分子機構を解析して、ウイルスは脂肪代謝系、脂肪輸送系をハイジャックして増殖することを明らかにした。C 型慢性肝炎患者は免疫による炎症に加えて、多くの患者に脂肪肝症やインスリン抵抗症が見られる。一方、肝炎ウイルス、炎症、肝臓の自己免疫疾患などが無い個人に、臨床的に non-alcohol fatty liver disease

(NAFLD) と診断されるケースが増えている。これらの患者からある頻度でより悪性化したと考えられる脂肪肝 (non-alcohol steatohepatitis: NASH) の発症が見られるが、その発症には炎症、インスリン抵抗性などの付随的な要因が加わるといわれている。

本研究から HCV による脂肪代謝異常の惹起が明らかになった。HCV 感染は宿主免疫監視により引き起こされる炎症、および高頻度にインスリン抵抗性を惹起する。これらのことから、C 型慢性肝炎で引き起こされる脂肪代謝異常は、その分子機構や病理学的所見が異なるとはいえ脂肪代謝異常を悪性化しうるという点において、NASH による疾患と似ていると考えられる。

最近、脂肪滴が HCV 粒子形成の場であることを示す報告がなされている。本研究において、我々は ESCRT 小胞輸送システムが HCV 粒子産生に必要であることを初めて明らかにした。エンベロープを保持するウイルスの出芽には、ウイルスのキャプシドタンパク質のユビキチン化も必要であることが報告されている。最近、HCV Core も E6-AP E3 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化されることが報告されたことから、Core のユビキチン化が HCV の粒子産生に係わっているかどうかについて今後検討する必要がある。将来的には、ESCRT 因子を分子標的とする新規抗 HCV 剤の開発も期待される。

シャペロンタンパク質のひとつ Hsp90 阻害が抗 HCV 作用を示すことを示した。Hsp90 を標的とした新規低分子化合物の開発が期待される。

HCV 感染による細胞死が何に起因するかについては、きちんとした解析がなされていなかった。本研究で HCV 感染は、ROS の過剰産生を介して JNK を活性化し、それが Bax を活性化して、ミトコンドリア介在性アポトーシスを誘導すると考えられる経路を明らかにした。また、HCV コアタンパク質は、それ自身が持つ BH3 類似ドメインを介して Mc1-1 の抗アポトーシス活性を抑制することによって、ミトコンドリア介在性アポトーシスを増強する可能性が示唆

された。さらに、このコアタンパク質が持つアポトーシス増強能は、感染性ウイルス粒子産生能と相関していることも明らかになった。

HCVによる細胞の持続的な増殖機構のひとつとして、DHCR24遺伝子の関与が考えられる。つまり、DHCR24がp53の活性抑制を促し、アポトーシス抵抗性を獲得すると考えられた。DHCR24による詳細なp53翻訳後修飾制御機構については、今後さらなる検討が必要と考えられる。また、DHCR24過剰発現によるp53とMDM2相互作用の亢進の際、p53の分解抑制がどの様に生じるのかをさらに解明する。以上の検討からHCVの新たな肝臓細胞での病原性発現のメカニズムが明らかになると期待される。

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既にmtDNAに変異が存在し、特に発がん症例では、組織学的所見が軽度であっても非がん部においてmtDNAの異常が多数蓄積していることが示された。また慢性肝炎の段階で生じた変異に加え、さらに肝がん組織では悪性度が増すとmtDNA変異が増加する事も示された。mtDNAの変異蓄積は高がん化状態と密接に関連することが示唆された。

間葉系幹細胞を肝細胞様の細胞に分化誘導させることが可能となった。この細胞が、HCV感染系として有用であることを明らかにした。その際に、HCV複製に必要な因子として、miRNA122の発現が分化に従い誘導され、それがHCV感染増殖に必要なことを見出した。

欠失ゲノムを持つHCVについて解析し、構造領域の欠失がウイルス複製、および病態に何らかの関係を持つと示唆された。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）に関わると考えられるが、この領域を欠くことにより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。

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可能性がある。簡便な欠損型HCV検出法を開発することは、新たなC型肝炎の診断、治療に重要である。

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、肝疾患の病態形成に重要な役割を果たしているものと推定された。今回の解析からは、肝細胞ではAIDが選択的にインターフェロン受容体遺伝子を含む染色体領域の欠失を誘導することが明らかとなった。

E. 結論

感染性HCVの産生には宿主の脂肪関連因子が関与していることを明らかにした。とくにアポリポ蛋白質が感染性の賦与に重要であると考えられた。今後これらの要因を標的にして抗ウイルス剤の開発あるいは、病気進展の予防などが期待される。

Hsp90はHCVの増殖制御に関わっており、本宿主因子の阻害は抗HCV作用を示すので薬剤開発の標的になりうる。

HCVの粒子産生に必要な新規宿主因子として、小胞輸送に関与するESCRT関連因子TSG101、Alix、Vps4BおよびCHMP4bを見出した。HCV CoreがESCRT関連因子と相互作用を示すことを明らかにした。

HCV感染は、ROSの過剰産生を介してJNKを活性化し、それがBaxを活性化して、ミトコンドリア介在性アポトーシスを誘導

すると考えられた。また、HCV コアタンパク質は、それ自身が持つBH3 類似ドメインを介して Mc1-1 の抗アポトーシス活性を抑制することによって、ミトコンドリア介在性アポトーシスを増強することが示唆された。

本年度の研究により、DHCR24 過剰発現による p53 の翻訳後修飾、特に p53 アセチル化抑制と p53 と MDM2 の肝臓細胞・細胞質における相互作用亢進によって p53 活性が低下する可能性が明らかとなった。

C 型慢性肝炎患者では、肝細胞の mtDNA の塩基変異が集積し、IFN 投与により減少する。肝発癌症例では非癌部において組織学的変化が軽度であっても mtDNA の塩基変異が多い。また ROS 産生や消去に関連する遺伝子やインシュリン抵抗性に関連する遺伝子の多型による検討では、Mn-SOD の遺伝子多型と mtDNA の変異蓄積との関連が示唆された。

HCV の感染から肝発がんの経路をより詳細に解析する系として、ヒト脂肪組織に存在する間葉系幹細胞の可塑性に注目して研究を行った。この幹細胞は、内胚葉系の肝細胞に比較的短期間で transdifferentiation する能力を持つことが本研究で明らかとなった。今後、この細胞の HCV 感染、複製能力、あるいは肝がんへの細胞転換をおこすことが出来れば、肝炎、肝がん発生のメカニズムを miRNA レベルで解析することや、あるいは抗ウイルス剤のアッセイ系としても有用であると期待出来る。

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 HCV が感染細胞内で独自に複製、進化していると考えられた。また、欠損 HCV ゲノムは構造領域を供給するヘルパーウイルス（完全長ゲノムを持つウイルス）と共存することにより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。

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、異所性に 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、HCV の慢性持続感染の成立やインターフェロン治療抵抗性の獲得といった病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

C 型慢性肝炎では IFN 著効例であっても、ミトコンドリア障害は残存し、ミトコンドリア遺伝子異常が高度な例は発癌リスクが高いことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. *Antivir Chem Chemother.* 20(1): 47-54, 2009.

2. Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyladenine analogs. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 53: 103-104, 2009

3. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. *Cancer Sci.* 100(10): 1943-1950, 2009

4. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(7): 217-28, 2009

5. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne

6. hepatitis C virus. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. *Hepatology*. 50(3): 689-696, 2009
7. 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
8. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M. Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J*. 28, 440-451, 2009
9. Suzuki H, Matsumoto N, Suzuki T, Chang MO, Takaku H. Stable replication of the EBNA1/OriP-mediated baculovirus vector and its application to anti-HCV gene therapy. *Virol J*. 6:156, 2009
10. Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y, Sugawara T, Okabe N. HIV/AIDS Acquisition and Transmission in Bangladesh: Turning to the Concentrated Epidemic. *Jpn J Infect Dis.*, 62, 111-119, 2009
11. Barnor J. S., Habu Y., Yamamoto N., Miyano-Kurosaki, Nishikawa H., Yamamoto N., Takaku H. (2009) Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA. *Antiviral Res*. 83:156-164, 2009
12. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol*. 83:6922-6928, 2009
13. Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y. Impact of age at marriage and migration on HIV and AIDS epidemics in Japan. *Int J Equity Health*. 8:23, 2009
14. Sugiyama R, Habu Y, Ohnari A, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. RNA interference targeted to the conserved dimerization initiation site (DIS) of HIV-1 restricts virus escape mutation. *J Biochem*. 146:481-489, 2009
15. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M. Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity. *Nucleic Acids Symp Ser* . 53:87-88, 2009
16. Suzuki H, Saitoh H, Suzuki T, Takaku H. Inhibition of influenza virus by baculovirus-mediated shRNA. *Nucleic Acids Symp Ser*. 53:287-288, 2009
17. Suzuki H, Saitoh H, Suzuki T, Takaku H. (2009) Baculovirus-mediated bispecific short-hairpin small-interfering RNAs Have remarkable ability to cope with both influenza viruses A and B. *Oligonucleotides*. 19:307-316, 2009
18. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J Gen Virol*, 90(7), 1681-1691, 2009
19. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus

- core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J Virol*, 83(19):9993-10006, 2009
20. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 50:883-894, 2009
21. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*, 83(18):9237-9246, 2009
22. Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion*, 79(1):36-39, 2009
23. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem*. 106(6):1123-1135, 2009
24. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology*, 53(1):44-48, 2010
25. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010
26. Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, and Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res*. 146:41-50, 2009
27. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, and Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*. 154:1671-1677, 2009
28. Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, and Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol*. 44:856-863, 2009
29. Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, and Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* 50:678-688, 2009
30. Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters* 583: 1434-1438, 2009

31. Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Double-stranded RNA- induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. Arch. Virol. 154:801-810, 2009.
32. Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, and Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon γ -like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. Hepatology 50: 585-591, 2009.
33. Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, and Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA harboring cells possessing the IFN- α -resistance phenotype. Hepatol. Res. 39: 898-909, 2009.
34. Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolvering C, Kato N, Kietzmann T, Behrmann I, and Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 α is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. Hepatology 50:253-260, 2009.
35. Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. Antiviral Res. 82:42-50, 2009.
36. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, and Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. J. Hepatol. 50:883-894, 2009.
37. Nisikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2001.
38. Kobayashi S, Takeda T, Nishiguchi S, et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a Multicenter retrospective cohort study of 1124 patients. Liver Intern. 27: 186-191, 2007
39. M. Satoh, M. Saito, K. Tanaka, S. Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, T. Seki, S. Okada, M. Kohara, S. Harada, C. Kai, and K. Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. in press.
40. Y. Amako, K. Tsukiyama-Kohara, A. Katsume, Y. Hirata, S. Sekiguchi, Y. Tobita, Y. Hayashi, T. Hishima, N. Funata, H. Yonekawa, and M. Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. J. Virology 84 303-311 [Selected in "Spotlight"], 2010
41. T. Nishimura, M. Kohara, K. Izumi, Y. Kasama, Y. Hirata, Y. Huang, M. Shuda, C. Mukaidani, T. Takano, Y. Tokunaga, H. Nuriya, M. Satoh, M. Saito, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS P53 VIA PERSISTENT OVER-EXPRESSION OF 3 β -HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE J. Biol. Chem. 284 36442-36452, 2009

42. K. Saitou, K. Mizumoto, T. Nishimura, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Research* Sep;144(1-2):266-271, 2009
43. K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, S. Sekiguch, E. Seike, S. Tone, Y. Hayashi, Y. Tobita, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, and M. Kohara. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology* 137: 285–296, 2009
44. Y. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* Jan;32(1):29-41, 2009
45. (日本語総説) : 小原恭子・町田圭吾・小原道法「C型肝炎ウイルスとBリンパ腫」「感染・炎症・免疫」第39巻 第2号 p61-63, 2009
46. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238: 265-276, 2009
47. nas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 70-77, 2009
48. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem Cells for Hepatic Regeneration: the Role of Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* in press.
49. Ochiya T, Yamamoto Y., Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, in press
50. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. *Am J Pathol.*, 75: 1975-1983, 2009
51. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro: Sugiyama, K., Suzuki, K., Shimotohno, K et al. *J. Virol*, 6922-6928, 2009
52. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene*, 28(4) :469-478,2009
53. Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat*, 16:388-396,2009
54. Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer*, 125:2029-2035,2009

55. Endo Y, Marusawa H, Chiba T.
Activation-induced cytidine deaminase links
inflammation to carcinogenesis. J
Gastroenterology,2010(in press).

H.知的財産権の出願・登録状況
1.特許出願
なし

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）
分担研究報告書

HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御

分担研究者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所

研究要旨 ウイルス粒子の産生に脂肪代謝が重要な働きをする事をこれまでの研究で明らかにした。本年度は、さらに、感染性ウイルス粒子の産生には、リポタンパク質の構成タンパク質であるアポリポタンパク質が重要であることを明らかにした。他のグループのこれまでの研究から、これらのタンパク質のウイルス感染性への重要性は示唆されてきたが、その詳細は不明であった。本研究ではこれらのタンパク質のウイルス感染性への役割を明らかにした。アポリポタンパク質Bは細胞の外に放出するウイルス粒子量に変化を与え、アポリポタンパク質Eはウイルス粒子に結合して感染性を付与する事を明らかにした。これらの成果は脂肪代謝調節により肝疾患を予防できるばかりでなく、抗ウイルス剤の開発にも新たな情報を提供する。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染者は世界人口の約3%を占め、我が国では約200万人が感染していると推定される。キャリアの多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、HCV感染による肝疾患でなくなる年間死亡者は、我が国では5万人を超えている。インターフェロンなどによる治療率は50%程度であり、画期的な治療薬が切望されている。また、HCV感染による脂肪肝などの発症が何に起因するかなどを明らかにできれば、肝疾患を予防する方策も見いだされると期待される。

B. 研究方法

（1）脂肪代謝がHCV産生に及ぼす影響の解析。

これまでの研究でHCV感染により脂肪滴が増加する事、その脂肪滴の周辺でHCV感染細胞が産生されることを示してきた。本研究をさらに進めて、細胞からの感染性粒子の産生を調べる。とくに、脂肪滴から細胞が放出される過程を明らかにする。

これまでに、HCV感染者の血液中に存在するウイルス粒子はリポタンパク質と会合しているという報告があるが、その会合がウイルス産生のどの段階で生じるのか、

リポタンパク質との会合の意義は何かなど不明な点が多い。そこで培養細胞によるHCV感染増殖系を駆使して、HCV会合リポタンパク質の機能を調べる。

（2）ウイルスに感染性を賦与する要因の解析。

HCVに会合しているリポタンパク質としてvery low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL)などが考えられている。これらのいずれが会合しているのか、また、会合がどのように行われているのかなどについては不明である。研究分担者はHCVに会合しているこれらのリポタンパク質のどの成分が、HCVの機能に重要かを調べるために、リポタンパク質の成分である各種のアポリポタンパク質遺伝子をsiRNA技術でノックダウンした細胞からのウイルス粒子の産生を調べる事によりこれらリポタンパク質のHCV増殖における働きを明らかにする。

（3）感染時におけるHCVの細胞認識。

上の研究を進める過程で、アポリポタンパク質がHCVに会合していることを見だし、その会合がウイルス複製にとり重要な

働きを示す事を見いだした。そこで、アポリポタンパク質と HCV との会合を詳細に調べ、かつその機能を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) リポタンパク質の産生はウイルス粒子の産生に重要である。

リポタンパク質産生に重要な働きをする酵素、microsomal triglyceride transfer protein (MTP)の活性阻害剤で処理すると、肝臓細胞からの VLDL の産生は強く抑制される。このときに Apo-B の培養上清への放出は Apo-E よりも強く抑制される。すなわち、低濃度の阻害剤で Apo-B の細胞外への放出が Apo-E よりも抑制された。これらの条件下で感染性 HCV の培養上清への放出は Apo-B の細胞外への放出と呼応して低下した。従って、Apo-B はウイルス粒子の細胞外放出に重要な働きを持つといえる。

さらに、Apo-E について調べた。既に Apo-E 産生をノックダウンさせた細胞からは感染性粒子の産生が阻害される事を見いだしている。MTP 阻害反応では、Apo-E の培養上清への放出低下が、Apo-B よりも高い濃度でしか見られないために、Apo-E 低下による HCV 放出効果が見にくい。そこで、Apo-E の機能を直接解析する方法を考えた。Apo-E は細胞内で産生され、一部は VLDL と会合して細胞外に放出されると考えられる。一方、VLDL の様なリポタンパク質と会合しない Apo-E はオリゴマーを形成して細胞の外に放出される。細胞の外に遊離されない Apo-E 変異体を用いて、ウイルス粒子の産生と細胞外への放出を調べた。小胞体貯留シグナルである 4 つのアミノ酸からなるペプチド (KDEL) を Apo-E 分子の C 端に付加すると、この Apo-E 変異分子 (Apo-E KDEL) は細胞の外に放出されなくなる。まず、細胞の内在性 Apo-E の産生が抑制されている

細胞を樹立し、それに外来的に Apo-E KDEL を発現するようにした。この細胞に HCV を感染させ感染性ウイルス粒子の産生を調べた。その結果、この細胞からの感染性ウイルスの産生は強く抑制された。この細胞から放出されるウイルス粒子の量をコアで調べると粒子の量には大きな差が認められない。以上から、感染性を示す粒子の産生が特異的に抑制される事が明らかになった。一方、細胞内の感染性粒子を調べると、野生型の Apo-E を放出する細胞に比べ、高濃度の感染性ウイルス粒子が存在した。この事から、Apo-E が細胞外に放出されないために、感染性粒子として細胞外に放出されないと考えられた。

(2) HCV は Apo-E と会合している。

上の (1) の実験から、細胞上清の HCV は Apo-E と会合している可能性が考えられた。そこで、Apo-E 抗体を用いて培養上清に放出されるウイルスを処理した。次に抗体との複合体を Protein-G Sepharose で除去した画分の感染性を調べた。その結果その画分には感染性が観察されなかった。対照実験として抗 IgG 抗体処理した上清からは感染性が認められた。このことから Apo-E と会合しているウイルスが感染性を持つことが示された。

(3) HCV 感染性は Apo-E アイソフォームにより異なる。

これまでの研究から、Apo-E にはアイソフォームが存在する (Apo-E2, -E3, -E4)。これらのアイソフォームの中で、Apo-E3 が正常型で最も多い。Apo-E2 は 5% くらい存在し、心臓疾患と関連する。一方、Apo-E4 はアルツハイマー病と関連するといわれている。これらの異なるアイソフォームが HCV の感染性にどのように関係しているかは、Apo-E の HCV 感染性への重要性を考えるとときに大変重要である。そこで、内在性の Apo-E を産生しなくなっている細胞から、外来的に Apo-E2, -E3, -E4 を産生する細胞

を樹立して、それらからの感染性粒子産生を調べた。その結果、Apo-E3, -E4 を発現する細胞からの感染性粒子の産生は内在性 Apo-E 産生細胞に比して差がなかったが、Apo-E2 を産生する細胞からの感染性粒子の産生は抑制された。

Apo-E2 は LDL 受容体との親和性が低いというこれまでの報告とあわせると、HCV の感染には Apo-E を介して LDL 受容体を認識する機構が存在すると考えられる。

D. 考察

HCV 複製の分子機構を解析して、ウイルスは脂肪代謝系、脂肪輸送系をハイジャックして増殖することを明らかにした。

C 型慢性肝炎患者は免疫による炎症に加えて、多くの患者に肝脂肪症やインスリン抵抗症が見られる。一方、肝炎ウイルス、炎症、肝臓の自己免疫疾患などが個人に、臨床的に non-alcohol fatty liver disease (NAFLD) と診断されるケースが増えている。これらの患者からある頻度でより悪性化したと考えられる脂肪肝 (non-alcohol steatohepatitis: NASH) の発症が見られるが、その発症には炎症、インスリン抵抗性などの付随的な要因が加わるといわれている。

本研究から HCV による脂肪代謝異常の惹起が明らかになった。HCV 感染は宿主免疫監視により引き起こされる炎症、および高頻度にインスリン抵抗性を惹起する。これらのことから、C 型慢性肝炎で引き起こされる脂肪代謝異常は、その分子機構や病理学的所見が異なるとはいえ脂肪代謝異常を悪性化しうるという点において、NASH とよく似ていると思われる。

E. 結論

感染性 HCV の産生には宿主の脂肪関連因子が関与していることを明らかにした。とくにアポリポ蛋白質が感染性の賦与に重要であると考えられた。今後これらの要因

を標的にして抗ウイルス剤の開発あるいは、病気進展の予防などが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. *Antivir Chem Chemother.* 20(1): 47-54, 2009.

2. Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyladenine analogs. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 53: 103-104, 2009

3. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. *Cancer Sci.* 100(10): 1943-1950, 2009

4. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(7): 217-28, 2009

5. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. *Hepatology.* 50(3): 689-696. 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし

本研究では、HCV複製機構と宿主因子Hsp90の関係を明らかにし、分子シャペロンHsp90によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。Hsp90阻害剤であるゲルダマイシン誘導体17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)がNS3とHsp90の相互作用を阻害し、NS3のプロテアソーム分解を誘導することでウイルス増殖を抑制することを明らかにした。また、Hsp90とNS3の相互作用点はNS3のhelicase domainであることが分かった。さらに、プロテアソーム阻害剤MG132を用い17-AAGと併用処理を行うことで、両阻害剤の相乗効果を得ることができ、高いウイルス複製阻害効果が示されることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、HCV複製機構と宿主因子Hsp90の関係を明らかにし、Hsp90によるウイルスの増殖および抑制に関する知見を得ることを目的とする。分子シャペロンHsp90はフォールディングや蛋白質の凝集抑制や活性化などで働く際は、必ず幾つかのコシャペロンと呼ばれる蛋白質と複合体を形成し動いている。さらに、Hsp90阻害剤も近年注目されている薬剤であり、数種類存在する。その多くは、ゲルダマイシンの誘導体である。ゲルダマイシンは抗真菌薬のスクリーニングで見出されたベンゾキノンの低分子化合物であるが臨床試験において高い毒性が問題となっていた。我々は、Hsp90阻害剤で毒性が低いとされているゲルダマイシン誘導体17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin(17-AAG)がHCVの増殖抑制を示すことを見出すとともに、17-AAGによるHCV増殖抑制効果の作用機序を解明する。

B. 研究方法

17-AAGによるHCV増殖抑制効果の検討はHCVフルレングスレプリコン細胞であるNNC#2細胞を17-AAGで濃度依存的に処理したのち、HCV RNAを回収しReal-Time PCR法にてHCV RNAの定量を行った。つぎに、17-AAGのNNC#2細胞に対する細胞障害性の評価をMTS assay法で行った。

17-AAGによる長期HCV抑制効果の検討はNNC#2細胞に初回および3日おきに17-AAG処理した細胞から、HCV RNAを回収し、Real-Time PCR法でHCV RNAの定量を行った。

17-AAGによるHCV増殖抑制への作用機序を解明するため、NNC#2細胞を17-AAGで処理し、全タンパク質を回収し、Hsp90およびその他のコファクターおよびウイルスタンパク質をウエスタンブロット法で分析した。

NNC#2細胞を17-AAGで処理した際のNS3の減少を解析する為、17-AAGで処理したNNC#2細胞にプロテアソーム阻害剤であるMG132を加えたのち、NS3タンパク質をウエスタンブロット法で分析した。

HCV NS3とHsp90の相互作用性の検討はFlagタグ発現NS3ベクター(pFlag-NS3)または、NS3の欠損変異体プラスミドを複製、293T細胞に導入し、数日培養した後にHsp90との相互作用および相互作用領域を決定を免疫沈降法によりHsp90に対するNS3の特定部位を確定した。

NS3に対するHsp90依存的な安定性を検討するためNS3欠損変異体プラスミドを、293T細胞に導入し、細胞を17-AAGで処理し数日培養した後、NS3タンパク質量をウエスタンブロット法で測定した。

17-AAGおよびMG132によるHCV増殖抑制効果の検討はNNC#2細胞を両阻害剤で処理し