

た後、HCV RNA を回収し Real-Time PCR 法にて HCV RNA の定量を行った。また、阻害剤処理時における細胞障害性の評価は MTS assay 法で行った。

(倫理面への配慮)  
特になし

### C. 研究結果

17-AAG による HCV 増殖抑制効果の検討ではレプリコン細胞 (NNC# 2) を用いて行ったところ、細胞毒性を示さない 50nM 17-AAG で 99% の HCV 増殖抑制効果を示し、 $IC_{50}$  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。つぎに、17-AAG による長期 HCV 抑制効果をレプリコン細胞 (NNC# 2) で検討したところ、最初に 1 回だけ 50nM 17-AAG で処理した場合 3 日間、HCV RNA レベルで 2log まで抑制していたが、12 日目ではコントロールレベルまで増加した。一方、15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG で処理した場合は 15 日間、HCV RNA レベルで 3log まで抑制した。さらに、17-AAG による HCV 増殖抑制への作用機序を解明するため、レプリコン細胞 (NNC# 2) を 17-AAG で処理し、HCV core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質をウエスタンブロット法で検証した。NS5A と NS3 の発現の減少が見られたが、NS3 は NS5A よりも著しく減少した。また、17-AAG で処理したレプリコン細胞 (NNC# 2) は Hsp70 の発現が増加した。すなわち、17-AAG による Hsp90 の阻害は HSF-1 を活性化する。さらに、17-AAG が NS3 の分解を促進するのかをプロテアソーム阻害剤、MG132 を用いて検討したところ、NS3 の分解が抑制された。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反応を行った。17-AAG 存在下では NS3 の発現

は著しく減少した。また、pFlag-NS3 を用い Hsp90 との相互作用の検討を免疫沈降法で確認したところ、NS3 に Hsp90 の両  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットとも相互作用しており、NS3 の全長 Helicase 領域にのみ Hsp90 が結合していることを明らかにした。一方、NS3 に対する Hsp90 依存的な安定性の検討では、Hsp90 と結合するタンパク質のみ、減少が見られた。最後に 17-AAG と MG132 を NNC#2 細胞に併用処理を行った結果、NNC#2 細胞に細胞障害性はほぼ見られず、単剤時には約 20% まで複製が低下するが、併用時にはさらに高い 10% 以下まで複製が阻害されることを明らかにした。また、相乗効果を示す Combination index (CI) を算出した結果  $CI=0.42$  となり  $CI < 1$  となったため相乗効果が得られるという結果となった。

### D. 考察

Hsp90 阻害剤 17-AAG は腫瘍細胞に対して高い親和性をもつことが知られており、Hsp90 に依存するクライアント腫瘍タンパク質に対して高い親和性を示した。17-AAG は細胞毒性も低く、臨床試験においてその効果が期待されている。本研究では 15 日間 3 日おきに 50nM 17-AAG でレプリコン細胞 (NNC# 2) を処理した際には長期抑制効果を示し、薬剤耐性ウイルスの出現も見られなかった。また、 $IC_{50}$  は 0.3nM であった。つぎに、HCV core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B タンパク質の中で最も 17-AAG 処理でタンパク質の発現が減少していた NS3 と Hsp90 の相互作用を検討した結果、NS3 と Hsp90 は相互作用していることが明らかとなった。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いてプロテアソームの分解機能を阻害したところ、NS3 は 17-AAG で処理した細胞でもタンパク質発現は減少しない結果が得られた。これらの結果から Hsp90 が阻害されると NS3 はプロテアソームで分解されることが分かった。また、NS3 helicase 領域と protease 領域の欠損変異体を作成しそれぞれ Hsp90 との

相互作用を検討すると、全長の NS3 helicase 領域のみ Hsp90 との相互作用が確認されたため、Hsp90 と NS3 の相互作用は NS3 helicase 領域を経て起こることが明らかとなった。一方、Hsp90 とプロテアソームを阻害すると NNC#2 細胞ではほぼ細胞毒性は無く、単剤時に比べ併用では高い抑制効果を示し、CI 値が 0.42 を示したことから 17-AAG と MG132 の併用処理は相乗効果があり、高いウイルス複製阻害効果があることを解明した。

#### E. 結論

Hsp90 阻害剤である 17-AAG は HCV の増殖抑制効果があり、HCV の複製には Hsp90 が NS3 と相互作用し安定化させることが必須である。また、17-AAG はプロテアソーム阻害剤 MG132 と併用することで高いウイルス複製阻害効果を示し相乗効果があることを明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. (2009) Heat-shock Protein 90 Is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3. *J Biol Chem.* 284, 6841-6846.
2. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M. (2009) Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J.* 28, 440-451.
3. Suzuki H, Matsumoto N, Suzuki T, Chang MO, Takaku H. (2009) Stable replication of the EBNA1/OriP-mediated baculovirus vector and its application to anti-HCV gene therapy. *Virology* 6:156.
4. Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y, Sugawara T, Okabe N. (2009) HIV/AIDS Acquisition and Transmission in Bangladesh: Turning to the Concentrated Epidemic. *Jpn J Infect Dis.*, 62, 111-119.
5. 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.

6. 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. (2009) Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J Virol.* 83:6922-6928.
7. Mondal NI, Takaku H, Ohkusa Y. (2009) Impact of age at marriage and migration on HIV and AIDS epidemics in Japan. *Int J Equity Health.* 8:23.
8. Sugiyama R, Habu Y, Ohnari A, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. (2009) RNA interference targeted to the conserved dimerization initiation site (DIS) of HIV-1 restricts virus escape mutation. *J Biochem.* 146:481-489.
9. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, Katahira M. (2009) 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.
10. Suzuki H, Saitoh H, Suzuki T, Takaku H. (2009) Inhibition of influenza virus by baculovirus-mediated shRNA. *Nucleic Acids Symp Ser.* 53:287-288.
11. 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.

##### 2. 学会発表

###### 国内

1. 清水裕子、日紫喜隆行、小川和也、椎名律子、飛田怜里、舟見健児、山本祐美、高久 洋、杉山和夫、下遠野邦忠： C 型肝炎ウイルス粒子の感染性とリポ蛋白質第 57 回日本ウイルス学会 東京 (2009. 10)
2. 日紫喜隆行、飛田怜里、清水裕子、小川和也、舟見健児、山本祐美、椎名律子、高久 洋、杉山和夫、下遠野邦忠： HCV

のウイルス粒子産生における VLDL および  
アポリポ蛋白質の機能解析 第 57 回  
日本ウイルス学会 東京(2009.10)

3. 宇治野真之、山口紗央莉、日紫喜隆行、  
下遠野邦忠、高久 洋： C 型肝炎ウイル  
スの翻訳における Hsp90 の役割 第 57 回  
日本ウイルス学会 東京(2009.10)

4. 杉山和夫、中澤貴秀、齊藤 聡、飛田  
怜里、清水裕子、小川和也、日紫喜隆行、  
舟見健児、高久 洋、下遠野邦忠： C 型  
肝炎ウイルス欠損ゲノムの遺伝子解析と  
その感染性 第 57 回日本ウイルス学会  
東京(2009.10)

5. 鈴木等、君塚圭亮、日紫喜隆行、下遠  
野邦忠、高久洋：C型肝炎ウイルス (HCV)

コア蛋白質による肝星細胞 (LI90 細胞) 活  
性化の検討。第 57 回日本ウイルス学会  
東京(2009.10)

6. 飛田怜里、日紫喜隆行、清水裕子、小  
川和也、舟見健児、山本祐美、椎名律子、  
宮成悠介、杉山和夫、高久 洋、下遠野邦  
忠： HCV のウイルス粒子の感染性に関わ  
るアポリポたんぱく質 E の機能解析 第 5  
7 回日本ウイルス学会 東京(2009.10)

#### G.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許出願 なし
- 2.特許取得 なし

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

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

研究分担者 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科

**研究要旨** C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染により慢性炎症と肝細胞障害・細胞死が観察される。HCV感染に伴う肝細胞死はHCV特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきた。一方、ウイルス感染においては、細胞変性効果とよばれるウイルスによる直接の細胞障害が引き起こされることもしばしば観察される。我々はこれまでに、HCV感染培養細胞系を用いて、HCV感染によりBaxが活性化され、ミトコンドリア介在性アポトーシスが誘導されることを報告した。本研究において、HCV感染2日後から8日後まで、JNKのリン酸化（活性化）と、基質であるc-Junの顕著なリン酸化が観察された。JNK阻害剤SP600125で処理することにより、HCV感染によるBaxの活性化は認められなくなった。また、JNKの活性化はROS阻害剤NACで処理することにより認められなくなった。これらの結果より、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。一方、p38 MAPキナーゼ阻害剤SB203580を用いた実験結果より、HCV感染の早期に惹起されるp38 MAPキナーゼの活性化は、Bax活性化には重要な役割を果たしていないことが示唆された。さらに、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Mcl-1の抗アポトーシス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。また、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関連していることも明らかになった。

#### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は長期間の持続感染により慢性肝炎、肝硬変の原因となり、高率に肝細胞がんを引き起こす。HCV持続感染に伴って、慢性炎症と肝細胞障害・細胞死がほぼ例外なく観察される。HCV感染に伴う肝細胞死はHCV特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を介した宿主免疫応答によるものと考えられてきた。一方、ウイルス感染においては、

細胞変性効果（cytotoxic effect; CPE）とよばれるウイルスによる直接の細胞障害が引き起こされることもしばしば観察される。我々はこれまでに、HCV J6/JFH-1感染Huh-7.5細胞系を用いて、HCV感染によりBaxが活性化され、ミトコンドリア介在性アポトーシスが誘導されることを報告した。しかし、Bax活性化の分子機序は明らかではない。一方、HCVコアタンパク質にはBaxを含むBcl-2ファミリーに共

通して保存され、アポトーシス誘導活性を担う BH-3 ドメインに類似したアミノ酸配列が存在することを我々は見出した。本研究では、HCV コアタンパク質に存在する BH3 類似ドメインに着目し、アポトーシス誘導への直接関与を検討するとともに、Bax 活性化のシグナル伝達経路について解析した。

## B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス：Huh-7.5 細胞及び HCV J6/JFH1-P47 株とその変異株を用いた。リバーシジェネティクス法により、HCV コアタンパク質の BH3 類似ドメインに変異を導入した。

(2) アポトーシスの解析：アポトーシスの程度は、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) を用いた caspase-3 活性の定量、及び caspase-3 の基質である PARP の切断により測定した。

(3) 様々なシグナル伝達経路の解析：ミトコンドリア superoxide の産生は MitoSOX™ Red (Molecular Probes) を用いて測定した。c-Jun N terminal kinase (JNK)、ERK、p38MAP kinase については、それぞれのリン酸化抗体を用いた免疫ブロット法により、その活性化の程度を調べた。また、それぞれのキナーゼの阻害剤を用いて、下流のシグナル伝達にどのような影響を及ぼすかについて解析した。

(4) 免疫染色法及び免疫ブロット法：HCV 抗原の検出には HCV 感染患者血清（予め高力価を確認済）及び市販の抗 NS3 抗体、抗 NS5A 抗体を用いた。Bax、活性化 Bax、JNK、リン酸化 JNK、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、p38、リン酸化 p38 に対する抗体は市販のものを用いた。免疫染色法及び免疫ブロット法は定法により行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え HCV を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得て行った。

## C. 研究結果

(1) HCV 感染に伴う Bax 活性化の機序：

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。

(2) HCV 介在性アポトーシスにおけるコアタンパク質の役割：

HCV コアタンパク質のアミノ酸配列内に、Bcl-2 ファミリーに共通し、アポトーシス誘導に必須の BH3 ドメインに類似の配列を見出した (aa 119~126)。BH3 ドメインは抗アポトーシス活性を有する Mcl-1 に結合し、その抗ア

ポトーシス活性を阻害することが知られている。そこで、この BH3 類似ドメインにある 3 ヶ所の疎水性残基 (h2-h4) のいずれか一つを Ala に置換すると、コアタンパク質のアポトーシス誘導活性とウイルス複製能はいずれも著しく低下した。119 位の疎水性残基 (h2) は BH3 ドメインでは Leu である。コアタンパク質では、HCV-1b では Leu で、HCV-2a では Val であるので、HCV-2a J6/JFH1 株のこの部位を Leu に置換した。その結果、アポトーシス誘導活性とウイルス複製能はいずれも増強し、培養液中への感染性遊離ウイルスの放出も増加した。同時に、この変異ウイルスでは、コアタンパク質と Mcl-1 の結合が増強することがわかった。以上の結果から、HCV コアタンパク質はアポトーシス誘導、ウイルス複製、感染性ウイルス粒子産生に関与し、なかでも、BH3 類似ドメインが、抗アポトーシスタンパク質である Mcl-1 との相互作用を介して、ミトコンドリア介在性アポトーシスの増強に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### D. 考察

我々はこれまでに、HCV が Huh-7.5 細胞に対して明らかな細胞障害性を示すこと、及びその細胞障害はミトコンドリア介在性アポトーシスに基づくものであることを報告した。本研究により、HCV 感染 2 日後から 8 日後まで、JNK のリン酸化 (活性化) と、基質である c-Jun の顕著なリン酸化が観察された。JNK 阻害剤 SP600125 で処理することにより、HCV 感染による Bax の活性化は認められなくなった。また、JNK の活性化は ROS 阻害剤 NAC で処理することにより認められなくなった。これらの結果より、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。一方、p38 MAP キナーゼ阻

害剤 SB203580 を用いた実験結果より、HCV 感染の早期に惹起される p38 MAP キナーゼの活性化は、Bax 活性化には重要な役割を果たしていないことが示唆された。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 Mcl-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関連していることも明らかになった。

#### E. 結論

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 Mcl-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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
2. 学会発表
    1. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
    2. Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
    3. Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
    4. Shoji I, Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core

protein and HCV IRES RNA. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston (USA), October 30-November 3, 2009.

5. Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる Bax 活性化の分子機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
6. 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
7. 井出良浩, 兼田崇作, 犬伏祥子, 足達哲也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染によるインスリン抵抗性誘導の分子機序について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
8. 兼田崇作, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. グルコーストランスポーター GLUT2 の転写制御に及ぼす C 型肝炎ウイルスの影響. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
9. 林田和美, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖に及ぼすエストロジオールの影響に関する検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
10. 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
11. 山下亮輔, 福田浩一郎, 犬伏祥子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治, Lin Deng, 井出良浩, 堀田博, 勝二郁夫. C 型

肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性調節因子 E6AP 及び PA28  $\gamma$  の相互作用解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

12. 井出良浩, 上城博宣, 前防達也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質と相互作用する細胞性キナーゼの解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

#### F. 知的所有権の取得状況

該当なし



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増殖制御に関与する宿主因子の解析

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の感染増殖に必要な細胞因子を明らかにすることを目的として実験を行い、以下のような成果を得た。HCV-JFH1株を用いたHCV感染増殖システムによりHCV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（Endosomal Sorting Complex Required for Transport）関連因子TSG101、Alix、Vps4BおよびCHMP4bを見出した。さらに、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。

A. 研究目的

我が国における肝がんによる犠牲者は毎年3万人を超えており、その8割にはC型肝炎ウイルス（HCV）の感染が認められている。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須であることが明らかになっている。しかしながら、現時点で最も有効なペグインターフェロン（ペグIFN）とリバビリンとの併用療法によっても、なお、半数の患者ではHCVを体内から排除できない状況が続いている。

HCVキャリアーの体内からHCVを排除することがHCV感染症による犠牲者の激減をもたらすものと予想されるが、画期的な治療法の開発が遅れている。その背景にはHCVの増殖機構の理解が不足していることが挙げられる。従って、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。

本年度は、HCV-JFH1株を用いたHCV粒

子産生システムにおいて、どのような宿主因子がHCV粒子産生に係わっているかを解析した。

B. 研究方法

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、ESCRT関連因子TSG101、Alix、Vps4Bまたは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を感染させた。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法で定量した。さらにESCRT関連因子がCoreやNS5Aと相互作用するかどうかについても調べた。Mycタグを有するTSG101 (Myc-TSG101)またはFLAGタグを有するAlix (FLAG-Alix)、Vps4B (FLAG-Vps4B)およびCHMP4b (FLAG-CHMP4b)発現ベクターを作成し、各々、293FT細胞内に導入した。これらの293FT細胞とHCV-JFH1を感染させたRSc細胞を0.5% NP-40を含むlysis

buffer で可溶化させ、抗 Myc 抗体あるいは抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物を Western blot 解析により調べた。また、Core と Myc-TSG101、FLAG-Alix、FLAG-Vps4B 或は CHMP4b-GFP を 293FT 細胞で共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察し、それらの局在を調べた。細胞を抗 Core 抗体、抗 Myc 抗体或は抗 FLAG 抗体で処理後、Core は Cy3、Myc-TSG101、FLAG-Alix、FLAG-Vps4B 或は FLAG-CHMP4b は fluorescein isothiocyanate により可視化した。さらに HCV-JFH1 を感染させた RSc 細胞に CHMP4b-GFP を発現させ、Core と共局在するかどうかについて観察した。

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

本研究では、これまでに HCV ゲノムの複製に関与する宿主因子として RNA ヘリケース活性を有する DDX3 や DNA 損傷センサーである ATM を見出した。感染増殖に係わる新規の宿主因子を見つけるために、今年度は HCV 粒子産生のために小胞輸送に関与する ESCRT 関連因子に係わっているかどうかの点に着

目して、以下に示す実験を行った。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。作成した RSc 細胞内で ESCRT 関連因子がそれぞれノックダウンされていることを確認した後、これらの細胞に HCV-JFH1 を感染させた。その結果、どの細胞内の HCV RNA の複製レベルもそれほど影響を受けなかったにも関わらず、培養上清に放出される Core の量が顕著に低下していることを見出した。次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて ESCRT 因子と Core の細胞内局在を観察した。その結果、Core が FLAG-CHMP4b と共局在すること、そして、Myc-TSG101、FLAG-Alix 或は FLAG-Vps4B とも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。さらに HCV-JFH1 を感染させた RSc 細胞と Myc-TSG101、FLAG-Vps4B 或は FLAG-CHMP4b を各々発現させた 293FT 細胞ライゼートを用いた免疫沈降法により、Core と TSG101、Vps4B 或は CHMP4b との相互作用が確認された。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。

#### D. 考察

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。さらに、我々は ESCRT 関連因子が Core と部分的に共局在すること、そして ESCRT 関連因子と Core とが結合することも明らかにした。エンベロープを保持するウイルスの出芽には、ウイルスの構造タンパク質に存在する Late (L-) ドメインと呼ばれるシスエレメントが必要である。現在までに P(T/S)AP、YPXnL、そして PPXY の 3 種類が知られている。興味深い事に Blanchard らは HCV Core の 111 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換すると PTAP L-ドメインモチーフが生じ、Core の培養上清への放出が約 2.5 倍増加することを見出している。しかしながら HCV の場合、少なくともこれら 3 種類の L-ドメインモチーフは Core に保存されていないので、新規の L-ドメインモチーフが存在しているのではないかと考えられる。HCV における L-ドメインの同定が今後の研究課題である。

一方、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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
  - 5) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, and Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- $\alpha$ . *FEBS Letters* 583: 1434-1438 (2009).
  - 6) 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).
  - 7) 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  $\gamma$  -like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 50: 585-591 (2009).
  - 8) 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- $\alpha$ -resistance phenotype. *Hepatology Res.* 39: 898-909 (2009).
  - 9) Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolvering C, Kato N, Kietzmann T, Behrmann I, and Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. *Hepatology* 50:253-260 (2009).
  - 10) 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).
  - 11) 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).
2. 学会発表
- 1) 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文. 各種抗酸化剤のC型肝炎ウイルス複製についての影響. 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW 2009)/第13回日本肝臓学会大会、京都、2009年10月.

- 2) 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦. C型肝炎ウイルス非構造タンパク質NS3とNS4Bの相互作用における責任部位の解析. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009年10月.
- 3) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 4) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 5) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, and Kato N. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October, 2009.
- 6) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. リバビリンの抗HCV活性を解析評価できるLi23細胞由来のHCV-RNA複製システム. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- 7) 有海 康雄、黒木 美沙緒、牧 正敏、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. ESCRT 小胞輸送系のHCV産生への関与. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- 8) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 癌抑制因子 PML は HCV 粒子産生に必要である. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- 9) 齋藤 誠、池田 正徳、加藤 宣之、田中 寅彦. 1b 型 C 型肝炎ウイルス非構造タンパク質NS3とNS4Bの相互作用の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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

肝発がんミトコンドリア異常

分担研究者 西口修平 兵庫医科大学内科学 肝胆膵科 教授

**研究要旨：** C型慢性肝疾患では HCV によって生じる持続炎症により発癌がもたらされるが、その機序としてミトコンドリアからの電子のリークが活性酸素（ROS）を増加させて染色体障害を生じることが重要と考えられている。我々は肝癌組織においてミトコンドリア DNA に塩基変異が集積していること、その組織型が悪性度を増すにつれて変異数が増加することを明らかにしてきた。今回我々は C 型慢性肝炎と肝癌症例を対象として肝組織の形態観察を行い、またミトコンドリア DNA の塩基変異に関して比較を行った。

その結果、肝癌症例の多くは非癌部の組織学的重症度（活動性および線維化、すなわち新犬山分類における F 因子・A 因子）が軽度な例であってもミトコンドリア DNA に多数の塩基変異が生じていること、また C 型慢性肝炎に対する IFN 投与によって肝組織のミトコンドリア DNA 変異は減少することが判明した。これらの結果からは、ミトコンドリア DNA の異常は肝癌の発症、あるいは IFN による発癌抑制と関連することが示唆された。

一方 IFN によって HCV が消失した SVR 症例でも、肝発癌は年率 0.5% に低下するものの決して 0% にはならないことが知られている。今回の検討では、光顕レベルでの異常が軽度である SVR 症例においても、電顕レベルでの観察では小胞体やミトコンドリアの形態異常が持続することが判明し、特に発癌症例ではミトコンドリアの異常が著明に認められた。更にこの電顕での形態異常の程度は、ミトコンドリア DNA の遺伝子変異の程度に相関していた。以上のことからミトコンドリア DNA の塩基異常は電顕レベルでの形態異常を反映しており、肝発癌リスクの指標となる可能性が示唆された。

そこでミトコンドリア DNA に塩基変異を生じやすくする要因の検索のため、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を行ったところ、ROS 消去酵素の一つである Mn-SOD の遺伝子多形性の関与が示唆された。

以上の結果から、ミトコンドリアの遺伝子異常が肝発癌に関与すること、またミトコンドリアの遺伝子の変異の程度には ROS 産生・消去に関連する遺伝子の多型が影響することが示唆された。

共同研究者

榎本平之 兵庫医科大学 肝胆膵科 講師  
辻村 亨 兵庫医科大学 分子病理部門 教授  
中西 徹 就実大学 薬学部 教授

研究目的

我々は、肝癌では多数のミトコンドリア DNA（以下 mtDNA）に塩基変異が生じており、組織

型が悪性度を増すにつれ変異数が増加することを明らかにしてきた<sup>1</sup>。また我々は臨床的に IFN が C 型慢性肝炎からの肝発癌を抑制することを明らかにしたが、その一方で HCV の完全消失例（SVR）であっても、肝癌が長期間発症してくることを報告してきた<sup>2</sup>。

肝発癌過程における mtDNA 塩基変異を解析するため、C 型慢性肝炎と肝癌症例を対象として肝 mtDNA 変異を解析し、本変異に対するインターフェロン(IFN)投与の影響を解析した。また SVR からの肝発癌例を対象に非癌部について組織学的な検索を行い、ミトコンドリアを含む微細形態を観察した。これらの検討をもとに、HCV による肝発癌過程においてミトコンドリアの果たす役割について解明を試みた。

一方 C 型肝炎の進展や発癌には活性酸素の産生やインシュリン抵抗性の関与が指摘されているため、活性酸素の消去酵素やインシュリン抵抗性・脂肪代謝に関連する遺伝子の遺伝子多型と mtDNA の変異数との関連について検討を行った。

#### A. 研究方法

mtDNA の変異については、最も変異の集積する D-loop 領域の塩基配列について、特異的な primer を設計して PCR により増幅後、ABI sequencer を用いて direct sequence 法にて塩基配列の決定を行った。

大阪市立大学および兵庫医科大学にて手術された肝癌の切除組織 77 例の癌部および非癌部の組織と兵庫医科大学にて肝生検により採取した C 型慢性肝炎（非発癌症例）の組織 99 例を対象に mtDNA 変異の検討を行った。また大阪市立総合医療センターにて IFN-β の投与前と投与直後（2 ヶ月後）に 2 回の経皮的肝生検を実施した慢性肝炎 27 例を対象とし、mtDNA 変異に対するインターフェロン(IFN)投与の影響を解析した。

また IFN 投与によりウイルスの持続陰性化 (SVR) が得られた症例に関し、肝癌発症例と非発症例とに分けて組織学的所見と mtDNA 変異についての検討を行った。組織所見の評価方法には電顕像に対する、教室の研究員 3 名による blind の観察により行った。小胞体膨化を 0～3 点の 3 段階とした。またミトコンドリアの形態異常の程度について、C 型慢性肝炎で認められる 5 つの電顕像（顆粒構造、硝子様封入体、空砲、異型、膜

消失) に対して各々 0～2 点で点数化し、合計点数 0～10 点の範囲で点数化して定量化した。

また C 型肝炎の進展や発癌には活性酸素(ROS)の産生やインシュリン抵抗性の関与が指摘されているため、活性酸素の消去酵素である Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, EC-SOD、さらにインシュリン抵抗性・脂肪代謝に関連する ADRB3, PPARγ 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。

本研究は、大阪市立大学および兵庫医科大学の倫理委員会にて承認を受けている。これらの対象者には事前に研究目的と内容について説明を行い、文書同意を得た。研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守した。

#### C 研究結果

C 型慢性肝炎に肝癌を合併した症例について、肝癌組織と非癌部肝組織（肝癌発症の背景肝である慢性肝疾患部位）で各々の mtDNA の D-loop 領域の変異数を決定・比較したところ、同数のものが 68.6%、非癌部で増加が 27.4%、減少が 3.9% だった。（図 1）



図 1 肝臓非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較

さらに、肝癌組織の所見により非癌部の mtDNA 変異数を比較したところ、組織所見が悪性であるほど、癌部での変異数の増加が認められた。（図 2）

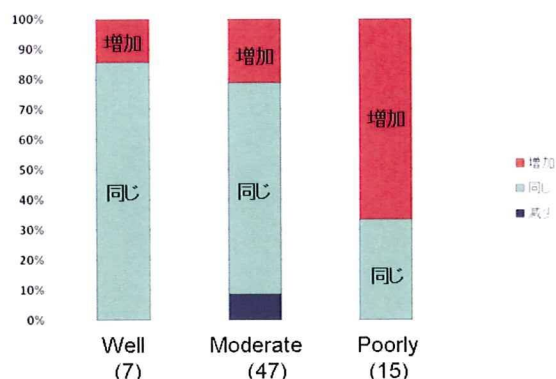


図2 非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較：肝癌の組織所見との関係

これは癌化に際して 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、既に癌組織と共通した mtDNA の変異が存在することを示している。

この肝癌合併例の背景慢性肝炎組織に見られる mtDNA の変異が、肝癌合併のない C 型慢性肝炎の組織でも認められるか比較した。すると肝癌症例の非癌部組織では、肝癌合併のない C 型慢性肝炎例に比して mtDNA の変異数は増加していた (図 3)。

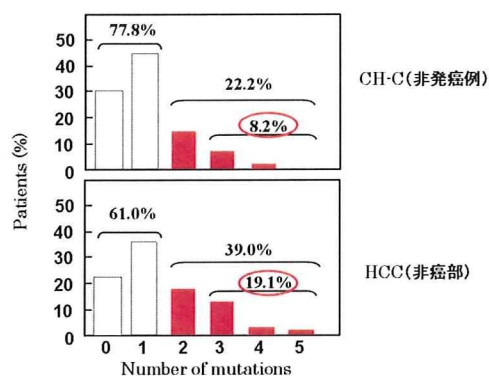


図3：肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の mtDNA の塩基変異数

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癌症例の非癌部組織では、肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織に比して D-loop 領域の変異数は増加していた。すなわち肝癌症例の非癌部には、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 (図 4)。

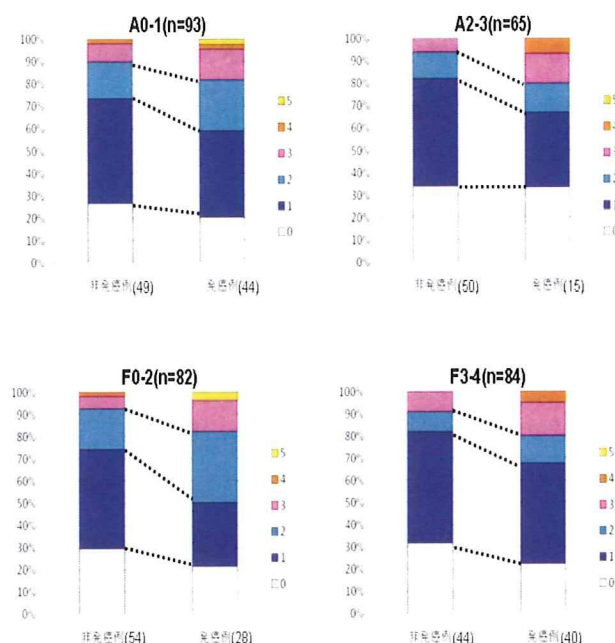


図4 肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の mtDNA の塩基変異数 (肝炎組織の活動性および線維化の程度を揃えての比較)

次に IFN 治療を受けた C 型慢性肝炎症例に対するミトコンドリアの変異数の検討を行うと、IFN 投与前後で不変が 10 例、1 塩基減少 10 例、2 塩基減少 4 例であった。特に、投与前のミトコンドリア変異数が 3 塩基以上 (D-loop 領域) の症例では IFN によって変異数の減少が 14 例中 10 例に認められた (図 5)。



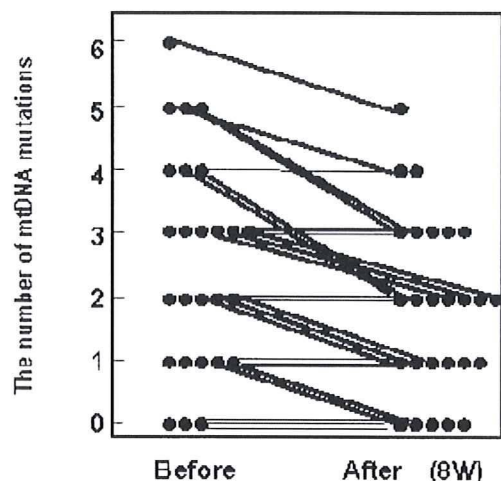


図5 C型慢性肝炎症例のIFN治療前後の肝組織におけるmtDNAの塩基変異数

C型慢性肝炎へのIFN投与によってSVRが得られると肝癌発症率は大幅に低下するが、それでも年率約0.5%で発癌が認められる。上記の如くC型慢性肝炎症例において肝発癌とmtDNA変異蓄積との関連が示唆されたため(図1-4)、SVRが得られた症例についても肝癌発症例と非発症例とで、組織学的所見とmtDNA変異について比較・検討を行った。

まずIFNによってSVRが得られたが、肝癌が発症した2例について、組織学的に検討した。症例1は76歳、男性。平成6年IFNによりSVRとなるも、平成19年10月(13年後)肝癌発症し手術となった。入院時肝機能所見はAST 21 IU, ALT 27 IU, ALB 3.6 g/dl, T. Bil 0.2 mg/dl, PT 88%であり、すべての検査値は正常化していた。非癌部の肝組織も光顕レベルでは、Stage 2 Grade 0であり、炎症所見は皆無であり、肝細胞の軽度の腫大を認めるのみであった(図6)。しかし、電顕像では、ミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められた(図7)。

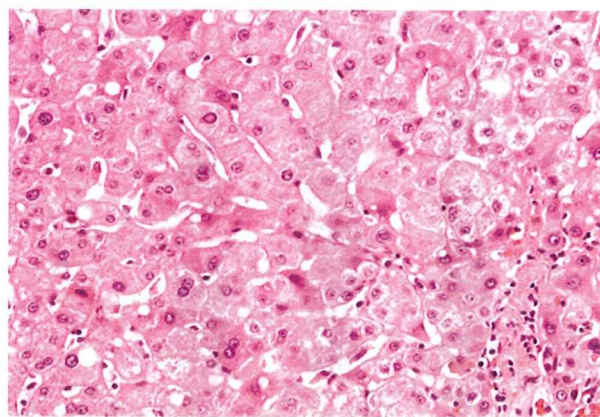


図6: 症例1 光顕像

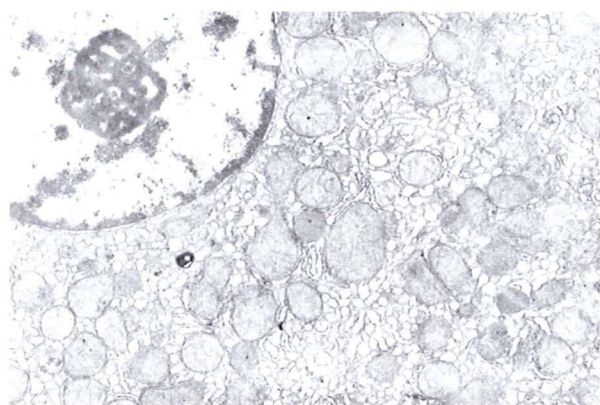


図7: 症例1 電顕像

症例2は、73歳、男性。平成4年、IFNによりSVR。平成19年11月(15年後)に肝癌の手術を受ける。入院時肝機能所見はAST 29 IU, ALT 32 IU, ALB 4.5 g/dl, T. Bil 0.9 mg/dl, PT 100%, PLT 19.9万でありすべての検査値は正常であった。組織所見は光顕レベルではStage 1 Grade 0:であり、炎症所見は皆無であるが、肝細胞の軽度の腫大と脂肪滴が認められた。電顕像では、ミトコンドリアの増生と形態異常が認められ、粗面小胞体の膨化と脂肪滴が存在した。

これら2つのSVRからの発癌例では、光顕レベルでの形態的な異常はわずかであっても電顕レベルでの異常は持続していた。そこでSVRが得られた症例について、肝癌発症例の非癌部組織と、非発癌例の組織との電顕像について比較した。

方法としては先に述べたように電顕像について教室の研究者 3 名によって blind で評価し、小胞体膨化は 0~3 点、ミトコンドリアの形態異常の程度は 0~10 点で点数化した。小胞体膨化は 1 点未満を軽度、2 点未満を中等度、2 点以上を高度と判定した。またミトコンドリア形態異常の点数では全体の分布を基に 1.66 点未満を軽度、1.66 点以上 4 点未満を中等度、4 点以上を高度と判定した。

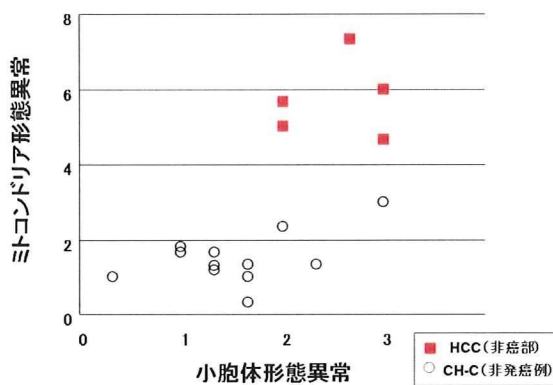


図 8 : 肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の電顕での形態異常

図 8 に示すように、非発癌例での小胞体の膨化は、多くは中等度以下であるが、一部は高度異常の例も含まれていた。一方ミトコンドリアの形態異常に関しては、全例中等度以下であった。それに対して発癌症例の非癌部では、小胞体の膨化は全例中等度以上であり、またミトコンドリアの形態異常も全例中等度以上であった。すなわち発癌症例では小胞体の異常に加えて、ミトコンドリアの形態異常を強く認めるという特徴があった。

図 9 に SVR 症例のうち、発癌例と非発癌例について典型的な例を示す。

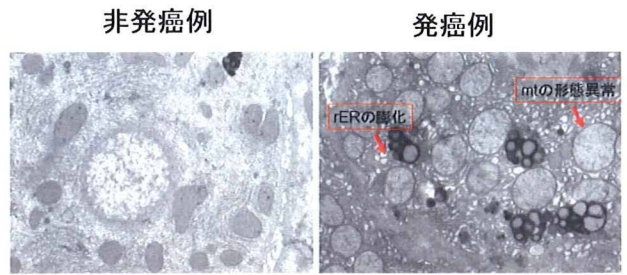


図 9 : SVR 症例の電顕像。発癌例では小胞体の膨化やミトコンドリアの形態異常が著明である。

次いでこのミトコンドリアの形態異常と遺伝子変異 (D-loop の変異数) との関係について検討した。すると D-loop 領域の遺伝子変異が 2 個以上の異常例では、ほとんどが高度な形態異常を伴っていた。すなわち D-loop の異常と形態的な異常との相関が推測された。したがって mtDNA の塩基異常は電顕レベルでの形態異常と相関し、発癌のリスクを反映することが示唆された (図 10)。

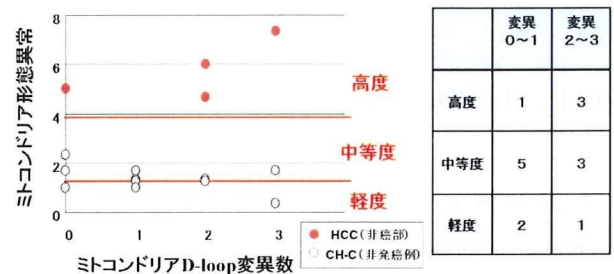


図 10 : ミトコンドリアの形態異常と DNA 変異との相関

以上の結果から、ミトコンドリアの形態異常は発癌リスクと関係すること、さらにこの形態異常の程度は mtDNA の変異数を測定することによってある程度の推察が可能であると判明した。

そこで 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 型肝炎の進展や発癌には活性酸素(ROS)の産生やインシュリン抵抗性の

関与が指摘されているため、活性酸素の消去酵素である Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, EC-SOD、さらにインシュリン抵抗性・脂肪代謝に関連する ADRB3, PPAR $\gamma$  の遺伝子多型を TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法で解析し、mtDNA の変異数との関連について検討を行った。

検討した遺伝子多形のうち、活性酸素消去酵素の一つ Mn-SOD 遺伝子では、Val9Ala の変異(T $\rightarrow$ C)は、薬剤性肝障害のリスクが高まると報告されているが、C 型肝炎ウイルス感染症例において 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。(図 11)

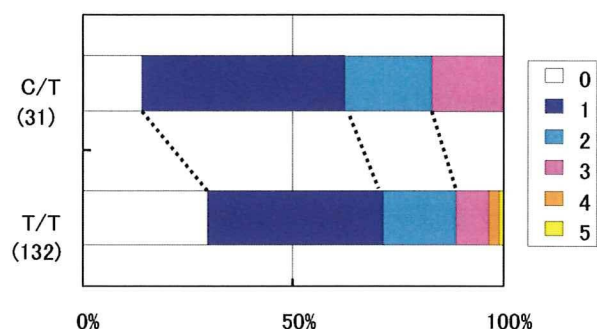


図 11 : Mn-SOD の遺伝子多型と mtDNA 変異数

したがって 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。

#### D 考察

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既に mtDNA に変異が存在し、特に発癌症例では、組織学的所見が軽度であっても非癌部において mtDNA の異常が多数蓄積していることが示された。また慢性肝炎の段階で生じた変異に加え、さらに肝癌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。一方組織学的検討から、IFN

の著効例においては、光顕レベルでは改善が得られるものの電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の異常が存在することが判明した。そして SVR 症例であっても、肝癌を合併した症例の非癌部の組織では、粗面小胞体の膨化に加えて、硝子様封入体や空胞形成といったミトコンドリアの形態異常が顕著であった。以上の結果より、mtDNA の変異蓄積は高癌化状態と密接に関連することが示唆される。

また、mtDNA の変異数を規定する要因について検討し、ROS 消去酵素 Mn-SOD の遺伝子多形性の関与が示唆された。今後は ROS 産生やインシュリン抵抗性に関連する遺伝子の多型とミトコンドリアの変異との関係につき、さらに症例数を増やして検討するとともに、多数の遺伝子の多型を簡便に同時解析するシステムの構築を行う。さらに電顕で認められたミトコンドリアや ER の微細形態の異常の意義を明らかにし、加えて電顕以外の評価法を考案する。また以上の検討を通じて、臨床的な肝発癌の予測因子を明らかにすることを旨とする。

#### E. 結論

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

さらに IFN の著効例においても、電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の形態異常が存在した。特に、SVR 肝癌の非癌部組織では粗面小胞体やミトコンドリアの形態異常が顕著であった。そして mtDNA の塩基変異は組織学的な異常を反映する。

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。以上の結果からは、mtDNA の変異は発癌リスクの評価に有用であること、また mtDNA の変異の生じやすさには ROS 産生・消去に関連する遺伝子の多型が関連することが示唆された。

### 健康危険情報

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

### F. 研究発表

#### 学会発表

(1) 榎本平之, 会澤信弘, 西口修平. C型慢性肝組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と発癌についての検討. 肝臓 50 卷 Suppl. 2: A439, 2009

(2) 下村壯治, 榎本平之, 西口修平, 山田大輔, 石井昭生, 坂井良行, 吉川昌平, 会澤信弘, 山本晃久, 岩田恵典, 田中弘教, 康典利, 齋藤正紀, 今西宏安, 中村秀次, 飯島尋子. 肝組織ミトコンドリア異常からみた C型関連肝癌に対するインターフェロン治療の意義. 肝臓 50 卷 Suppl. 2: A569, 2009

#### 論文発表

1. Nisikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2001.

2. Kobayashi S, Takeda T, Nishiguchi S, et al. Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a Multicenter retrospective cohort study of 1124 patients. *Liver Intern.* 2007; 27: 186-191.

### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- (ア) 特許取得 なし
- (イ) 実用新案登録 なし
- (ウ) その他 なし