

2009 33001B

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19年度-平成21年度  
総合研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成22(2010)年5月

## 目 次

I. 総合研究報告	
1. 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
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) -----	22
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) -----	26
4. HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析 HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析に関する研究 加藤 宣之(岡山大大学院医歯薬学総合研究科) -----	33
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) -----	47
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) -----	54
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) -----	63
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) -----	67
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) -----	72
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	79
III. 研究成果の刊行物・別刷り -----	87

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）  
（総合）研究報告書

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 教授

研究要旨： HCV 感染により引き起こされる細胞の異常増殖の分子機構を解明することにより、病気の発症を予防する方策を見出すための基礎的研究を行うとともに、ウイルス複製を制御する宿主因子を明らかにして、感染予防および感染者からのウイルスの排除に向けた研究を行うことを目的として研究を進め以下の成果を得た。まず、（1）HCV 複製により、細胞内の脂肪代謝が変化することを見出し、その変化とウイルス増殖との関連について以下のことを明らかにした。（i）HCV 感染により、細胞内の脂肪滴が増加する。（ii）HCV の産生には脂肪滴が必要であることを明らかにした。（iii）培養細胞から放出される HCV はリポタンパク質複合体を形成している。（iv）培養上清に放出される粒子はアポリポタンパク質 B (Apo-B)、アポリポタンパク質 E (Apo-E) などリポタンパク質構成タンパク質と会合しているが、その中でも Apo-E がウイルスの感染性に重要な働きをしている。（v）Apo-E には 3 種類のアイソフォームが知られているが、その中で Apo-E2 産生する細胞からの感染性ウイルスの放出は低い。（vi）HCV の感染には LDL 受容体が重要である。（2）HCV 感染者血清中には構造領域が欠失したゲノムが存在すること、その欠失ゲノムは粒子として存在し得て、細胞に感染することを明らかにした。（3）HCV 複製を制御する宿主因子の探索とその機能解析から、（i）分子シャペロン Hsp90 が HCV の NS3 と相互作用し、NS3 を安定化することを見出した。（ii）HCV Core に会合して HCV ゲノムの複製を支持する RNA ヘリケース分子 DDX3 を見出した。（iii）DNA 損傷センサーである ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) と checkpoint kinase 2 (Chk2) が HCV ゲノムの複製に必要であることを見出し、それらが HCV NS5B と相互作用を示すことを明らかにした。（iv）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 が HCV 粒子産生に必要な宿主因子であることを見出し、HCV Core が ESCRT 関連因子と相互作用することを明らかにした。（3）HCV 感染が細胞に増殖変化を引き起こし、その結果細胞死を引き起こしたり、細胞の増殖性を高めたりして最終的にはがんを引き起こす。本研究では、（i）HCV 感染により引き起こされるアポトーシスが、ミトコンドリア介在性アポトーシスによる。（ii）この機構の初期に ROS の過剰産生を介した JNK 活性化が存在する。（iii）HCV 感染後期においては、ERK1/2 の活性化によるアポトーシス抵抗性ならびに Rb ががん抑制タンパク質蓄積阻害を介した細胞周期脱制御により、細胞がん化を誘導する可能性が示唆する結果を得た。（iv）さらに、HCV 感染により 3 $\beta$ -HYDROXYSTEROL  $\Delta$  24-REDUCTASE (DHCR24) が誘導されることを見出した。DHCR24 は p53 の活性低下を通じて酸化ストレス誘導性アポトーシスの反応を低下させる事を見いだした。（v）HCV の Core タンパク質の作用により、生理的条件下では肝細胞にその発現をほとんど認めない遺伝子編集酵素 AID がヒト肝細胞に誘導され、さまざまな遺伝子を標的として点突然変異や染色体欠失を引き起こすことを明らかにした。（vi）肝がん症例の多くは非がん部の組織学的重症度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 の異常は肝がんの発症、あるいは IFN による発がん抑制と関連することが示

唆された。(4) HCV 複製増殖を培養細胞で解析する系は現在限られている。そこで、新たな系として、間葉系幹細胞から肝細胞を分化誘導する系を確立し、この分化した肝細胞を用いて HCV の複製系を樹立した。

#### 研究分担者

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	独立室長
杉山 和夫	慶応義塾大医	准教授
丸澤 宏之	京都大医学部	講師

#### 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、肝細胞がんへと移行し、HCV 感染による肝疾患で亡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 増殖機構を明らかにし、それに関係する宿主因子も解明も解明して新規な抗 HCV 剤開発に道を開くことが必要である。また、HCV 感染による細胞の増殖変化の分子機構が明らかにして、肝疾患を予防するための知見を得ることを目的とする。

#### 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)。

HCV 慢性肝炎患者では脂肪肝などを呈する患者が多い。脂肪代謝と HCV 増殖の関連を培養細胞系を用いて解析する。培養細胞に HCV を感染させ、細胞内の脂肪量を解析すると同時に、変化した脂肪とウイルス複製との関連を調べる。

(2) ウイルスに感染性を賦与する要因の解析 (下遠野)

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ので、培養細胞へのウイルス感

染系を用いて、HCV と脂肪 (リポタンパク質) 会合についても解析する。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。そこで、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。

(3) 培養細胞を持ちた HCV 感染による培養細胞の増殖特性の解析 (堀田)

Huh-7.5 細胞に、ウイルスとして HCV J6/JFH1-P1 株、P47 株を感染させて以下の手法を用いて解析を行う。アポトーシスの解析は DNA 断片化、caspase-3 の基質である PARP の切断により測定する。ミトコンドリアの解析はミトコンドリア膜電位測定、形態学的解析により行い、superoxide の産生は MitoSOX™ Red (Molecular Probes) を用いて測定する。ER ストレスは GRP78 の誘導を指標にする。シグナル伝達経路として、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、およびそれぞれのキナーゼ阻害剤を用いて解析する。

(4) HCV により誘導され、細胞増殖を促進させる働きを示す宿主因子の解析 (小原)

これまでに、HCV の持続発現細胞、および HCV 発現継代細胞で発現が亢進する分子、DHCR24 を認識するクローンを得た。本遺伝子発現が HCV 感染とどのように対応するかについて遺伝子のプロモーターを単離して転写活性を解析する。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する。p53 の活性は p21<sup>WAF1/CIP1</sup> プロモーターアッセイで検索した。DHCR24 関与の可能性については siRNA を用いて検討を行う。p53 の翻訳後修飾等は特異抗体を用いたウェスタンブロット法や免疫沈降法で検索する。

(5) HCV 増殖制御に関与する宿主因子の解析 (加藤、高久)

1. Hsp90 による HCV ゲノム複製の制御に関する研究 (高久)。

これまでに Hsp90 阻害剤である 17-AAG 投与により、HCV ゲノム複製がよくいされることを見出した。そこで、Hsp90 による HCV ゲノム複製制御の分子機序を HCV ゲノム自立複製細胞 (NNC#2) を用いて解析する。ゲノム複製はウイルス RNA の定量、およびウイルスタンパク質のウエスタンブロットによる解析で行う。また、本阻害剤投与による細胞増殖性テストを HCV ゲノム複製のコントロールとして行う。

2. DDX3 関係 (加藤)

HCV-0 株由来の Core の発現ベクターを 293T 細胞に導入して Conforcal laser scanning microscopy によりその細胞内局在を調べる。

DDX3 ノックダウン細胞を作成した。抗 DDX3 抗体を用いた Western blot 解析によりノックダウンされていることを確認する。それらの細胞におけるウイルス複製を LightCycler を用いた HCV ゲノムの定量や、各種抗体を用いた Western blot 解析で行う。

3. ATM および Chk2 関係 (加藤)

DNA 損傷センサー ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM)、ATM- and Rad3-related kinase (ATR)、checkpoint kinase 2 (Chk2) および poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) をノックダウンさせた全ゲノム複製細胞株 (遺伝子型 1b の 0 株由来の HCV RNA が複製している 0 細胞) 及びレプリコン複製細胞株 (0 株由来のレプリコン RNA が複製している s0 細胞) を樹立し、ゲノム複製を解析する。およびこれらの遺伝子をノックダウンさせた細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染 4 日目の細胞内の HCV ゲノムの複製レベルを定量的 RT-PCR 法により、また培養上清中の HCV Core については ELISA 法で定量する。なお、ATM キナーゼ阻害剤 (2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) の抗 HCV 活性を評価する。

4. ESCRT 関連因子 TSG101、Alix、Vps4B 或は CHMP4b のノックダウン細胞を用いた HCV 産生の解析 (加藤)。

2 に記載の方法によりノックダウン細胞を樹立する。ESCRT 関連因子と Core や NS5A との相互作用や各種因子の細胞内局在についても前項で述べた方法に準じ

て行う。

5. HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析 (加藤)

HCV ゲノム複製する樹立細胞 (0 細胞, 01 細胞 (0 細胞を 1 年間継代培養した細胞), 0c 細胞および 0c1 細胞 (0c 細胞を 1 年間継代培養した細胞)) を同じ培養条件下で継代培養し、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子) による cDNA マイクロアレイ解析を行う。

(6) 肝炎、肝がんとミトコンドリア異常との関連 (西口)

肝がん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。また臨床的に IFN が C 型慢性肝炎からの肝発がん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、肝がんが長期間発症してくることを報告してきた。

そこで、肝発がん過程における mtDNA 塩基変異を解析するため、C 型慢性肝炎と肝がん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) 投与の影響を解析する。また SVR からの肝発がん例を対象に非がん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する。これらの検討をもとに、HCV による肝発がん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る。

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、塩基配列の決定を行う。

(7) HCV による遺伝子編集酵素 AID の発現 (丸澤)

1. 炎症性サイトカイン刺激を加えた培養肝細胞、HCV レプリコン細胞における遺伝子編集酵素 AID の発現量の定量評価を行い、HCV 感染とその結果生じる炎症刺激により AID が発現誘導される分子機序を解析する。

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

3. ヒト臨床検体を用いて、慢性肝炎、肝硬変、肝がんといった各種病態の肝組

織中における AID の発現量の解析を real-time RT-PCR 法、ヒト AID に対する特異抗体を用いた免疫染色法により行い、正常肝組織における発現量との比較検討を行う。

4. ヒト肝培養細胞において持続的に AID を発現した結果生じる遺伝子異常の全体像を明らかにする目的で、AID を発現した肝培養細胞から抽出した核酸を用いて Comparative genomic hybridization (CGH) 法によるゲノムワイドな遺伝子異常の網羅的解析を行う。従来の CGH 法では 5-10Mb バンドレベルの大きな異常しか検出できないため、本研究では数 Kb の微細ゲノム異常をゲノムワイドに俯瞰的に分析する目的で CGH microarray 法による解析方法を活用する。引き続き、CGH 法により同定された染色体異常領域に含まれる遺伝子群を同定し、慢性肝疾患の病態形成に重要な遺伝子を選別する。これらの遺伝子のコピー数が AID 発現の結果、変動するかどうかの検証を定量 PCR 法により検討を行う。

(8) 慢性肝炎患者血液内の HCV ゲノムの解析 (杉山)  
遺伝子型 1b の C 型肝炎患者血清の症例 (計 52 症例) に対して、long distance RT-PCR 法による HCV の増幅と検出を試み、ウイルスゲノムの性状解析を行う。その long distance RT-PCR 法の結果をもとに欠損ゲノム群と非欠損ゲノム群に分けて、それぞれ臨床的因子 (年齢、性別、HCV RNA 量、AST、ALT、Plt、肝生検所見、肝硬変・肝細胞がん合併、インターフェロン治療効果など) との関連を検討する。

次に、欠損領域の確定、分子進化解析などから個体内での欠損ウイルス複製の可能性を検討する。また、これらの欠失ゲノムの複製能、ウイルス産生能を *in vitro* で検討する。

(9) 間葉系幹細胞から肝細胞への分化とその性質の解析および HCV 感染系への応用 (落谷)

これまでに、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。この間葉系幹細胞から分化した幹細胞の HCV 複製系に、マイクロ RNA 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 microRNA122 のアンタゴニスト (LNA) によって解析する。また、分化誘導した肝細胞の不活化細胞株について、microRNA122 の発現解析等をおこなう。

(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 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. 研究成果

(1) HCV は脂肪代謝系をハイジャックして増殖する (下遠野)。

1. HCV 複製による感染細胞内の脂肪滴の増加

HCV 感染培養細胞内の脂肪滴を顕微鏡下に観察した。その結果、ウイルス感染細胞では脂肪滴の量が増えていることを見出した。ウイルスの何が脂肪滴の増加に働いているかを調べるために、ウイルス遺伝子を欠失させたゲノムを細胞内に入れて調べた。その結果、コアタンパク質を欠失させると脂肪滴の産生増加が見られなくなった。従って、細胞内の脂肪滴の増加はコアタンパク質に依存していることが明らかになった。

2. 脂肪滴は感染性粒子産生に重要である

HCV 感染により増加した脂肪滴の役割をウイルス複製との関連で調べた。脂肪滴周辺のウイルスのタンパク質および、周辺の環境変化を調べた。

まず、脂肪滴にコアタンパク質が会合して存在した。さらに、その周辺に他のウイルスタンパク質が局在していた。これらの脂肪滴の周辺には膜様構造が集積していた。これらの構造とウイルス粒子産生との関連を調べるために、ウイルスタンパク質が脂肪滴周辺に局在できない変異体を構築して調べたところ、それらの細胞からは感染性粒子の産生は見られなかった。

以上から、脂肪滴およびその周辺の環境がウイルス感染により構築され、それが感染性粒子の産生に重要であることが明らかになった。

3. 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だしている。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。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。このことから、Apo-Eが細胞外に放出されな

いたために、感染性粒子が細胞内に蓄積されると考えられた。

4. 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。

5. 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。

(2) HCV増殖制御に関与する宿主因子の解析

1. Hsp90によるHCVゲノム複製制御(高久)

Hsp90阻害剤である17-AAGによるHCV増殖制御の検討をレプリコン細胞(NNC#2)を用いて行ったところ、細胞毒性を示さない濃度(50nM)の阻害剤で99%のHCVゲノム複製抑制効果を示し、IC<sub>50</sub>は0.3nMであった。

また17-AAGの濃度依存的にHCV RNA量の減少が見られた。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。その結果 NS5A と NS3 の発現の減少が見られたが、特に NS3 は NS5A よりも著しく減少した。17-AAG 処理により NS3 の分解が促進された。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。

pFlag-NS3 を用い Hsp90 との相互作用の検討を免疫沈降法で調べた。Hsp90 の  $\alpha$  と  $\beta$  の両サブユニットが NS3 に相互作用すること、NS3 の Helicase 領域と Hsp90 が会合することを明らかにした。

## 2. DDX3 による HCV 複製制御 (加藤)

HCV Core に結合することが知られている RNA ヘリケース分子 DDX3 が HCV ゲノムの複製効率に影響を及ぼすかどうかを検討した。HCV ゲノム複製を許容する s0 細胞や 0 細胞で DDX3 をノックダウンさせると、HCV ゲノムの複製レベルが低下した。また、全長 HCV ゲノムを導入して G418 存在下でのコロニー形成能を測定する ECF アッセイにおいても、DDX3 をノックダウンさせた 0c 細胞では、著しくコロニー形成数が低下した。以上の結果から、DDX3 は全長 HCV ゲノムの複製効率を高める役割を担っていることが示唆された。

次に、HCV-JFH1 を用いた感染増殖系における DDX3 の影響を調べた。HCV-JFH1 が効率よく感染する RSc 細胞株を用いて DDX3 のノックダウン細胞 (#3 と #7 の 2 クローン) を作成した。これらのクローン化細胞に HCV-JFH1 を感染させ、感染後 4 日目の細胞内 HCV ゲノム量と培養上清中の Core の量を定量した。その結果、両クローン化細胞とも、細胞内の HCV ゲノムと Core の量が著しく低下していることが分った。これらの結果から、2a 遺伝子型の JFH1 株についても DDX3 は RNA 複製の効率を高める分子であることが示唆された。

## 3. ATM および Chk2 による HCV ゲノム複製制御 (加藤)

これまでに HCV 感染や Core および NS3 の発現により、宿主ゲノムに二重鎖切断が誘導され、宿主ゲノムの不安定性が増すことが報告されている。我々も HCV の NS5B が発現したヒト不死化肝 PH5CH8 細胞では二重鎖切断を誘導する DNA 損傷に対して感受性が高まることを以前報告している。そこで、DNA 損傷センサーが HCV の複製にどのような影響を与えるのかを各種 DNA 損傷センサーのノックダウン細胞を用いて詳細に検討した。

その結果、以下に示すことが新たに分った。全長 HCV ゲノム (0 株) とそのレプリコン RNA の複製レベルは、ATR や PARP-1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と同様、高い複製レベルが維持されていたが、ATM や Chk2 ノックダウン細胞においては顕著に複製が抑制された。また、全長 HCV ゲノム (0 株) を導入した 0c 細胞のコロニー形成能 (ECF アッセイ) を比較した結果、ATM や Chk2 ノックダウン細胞におけるコロニー形成能がコントロール細胞、ATR および PARP-1 ノックダウン細胞に比べ著しく抑制された。HCV-JFH1 を ATM や Chk2 ノックダウン細胞に感染させた場合においても、HCV ゲノムの複製レベルと培養上清中の Core の量は顕著に減少した。また、ATM キナーゼ阻害剤 (2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one) には強い抗 HCV 活性が認められた ( $EC_{50}$ : 1.9  $\mu$ M)。

## 4. ESCRT 関連因子による感染性 HCV 粒子産生の制御 (加藤)

HCV 粒子産生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を明らかにするために HCV-JFH1 感染増殖システムを用いて、以下の実験を行った。

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、それぞれの細胞に HCV-JFH1 を感染させた。その結果、いずれの細胞でも細胞内の HCV RNA の複製レベルは影響を受けなかったにも係わらず、培養上清中の Core の量が顕著に低下した。共焦点レーザー顕微鏡により 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。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



テムが HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。

#### 5. HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析 (加藤)

HCV が感染する O 細胞と O 細胞を 1 年間継代培養した O1 細胞および、同じく HCV 感染を許容する Oc 細胞と Oc 細胞を 1 年間継代培養した Oc1 細胞を cDNA マイクロアレイ解析により相互に比較した。

O 細胞と比較して O1 細胞で 2 倍以上発現量が上昇する 61 遺伝子のうち 16 遺伝子は Oc1 細胞でも Oc 細胞と比較して 2 倍以上発現量が上昇していたので、O1 細胞でのみ発現量が上昇する遺伝子として 45 個を抽出した。逆に O 細胞に比べて O1 細胞で 1/2 以下に発現量が低下する遺伝子は、217 遺伝子確認されたが、そのうち、142 遺伝子は Oc1 細胞においても Oc 細胞と比べて、1/2 以下になっていたため、O1 細胞でのみ発現量が低下する遺伝子として 69 個を抽出した。これらの結果から、HCV ゲノムの複製が長期間起こると、発現量に変動が生じる遺伝子が存在することが示唆された。

発現量に変動をきたす遺伝子群は特定のグループに入るといような傾向は特に認められなかったが、O1 細胞でのみ発現が上昇している遺伝子群 (45 遺伝子) の中にメタロチオネイン遺伝子 (1E, 1F, 1M, 1X, 2A) が 5 種類含まれていることに注目した。これらメタロチオネインの中でメタロチオネイン 1E と 2A が HCV 複製と関連することを確かめた。

#### (3) HCV 感染による細胞の増殖様式

##### 1. HCV 急性感染期におけるミトコンドリア介在性 caspase-3 依存性アポトーシスの誘導 (堀田)

まず、Huh-7.5 細胞を用いた培養細胞感染実験系を用いて、m. o. i. = 2 でほぼすべての細胞に HCV を感染させ、感染 2 日後にはウイルス増殖がピークに達する HCV 一段増殖感染実験系を確立した。感染後 6 日目の生細胞数は非感染細胞数の約半数であった。感染後 4 日及び 6 日目の細胞 DNA 断片化の量は非感染細胞のそれぞれ 2.6 倍、5.2 倍であった。caspase-3 の活性は、感染後 4 日及び 6 日目で、非感染細胞の 4.1 倍及び 5.9 倍に増加した。また、感染後 6 日目に、caspase-3 の基質である PARP の切断が確認された。同じ時期に、Bax の活性化とミトコンドリア外膜への蓄積及びミトコンドリアにおける superoxide の産生が観察された。また、

ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出が認められた。ミトコンドリアの膨化等の形態変化も観察された。一方、本実験系では HCV 感染による ER ストレス誘導は認めなかった。

##### 2. HCV 急性感染期における Bax 活性化の機序 (堀田)

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。以上の結果から、HCV 感染において、ROS の過剰産生により JNK が活性化され、それが Bax 活性化を引き起こす可能性が示唆された。そして、この Bax 活性化が HCV によるミトコンドリア介在性アポトーシスを引き起こすと考えられた。

##### 3. HCV 介在性アポトーシスにおけるコアタンパク質の役割 (堀田)

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 ヲ所の疎水性残基 (h2~h4) のいずれかひとつを 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 P-47 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 Mc1-1 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 Mc1-1 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。

#### 4. HCV 持続感染期における ERK1/2 のリン酸化（活性化）（堀田）

ERK1/2 のリン酸化は、HCV 感染の初期（～3 日後）には非感染対照細胞と同程度であった。しかし持続感染期（感染 7～20 日後）には、非感染対照より強い ERK1/2 のリン酸化が見られた。この HCV 感染細胞の ERK1/2 リン酸化の亢進は、IFN 処理でウイルスを排除することにより、見られなくなった。

#### 5. HCV 感染に伴う Rb がん抑制タンパク質の減少（堀田）

細胞内 Rb 量は、HCV 感染の初期～持続感染期を通じて（感染 3～20 日後）、非感染対照に比べて有意に減少した。この HCV 感染細胞の Rb 量の減少は、IFN 処理でウイルスを排除することにより、見られなくなった。

#### 5. HCV により誘導される DHCR24 およびその機能（小原）

HCV 感染が DHCR24 mRNA の発現に及ぼす影響をヒト肝臓キメラマウス感染系で検討した。その結果、HCV 非感染マウス群に比べ HCV 感染マウス群では平均で 5 倍以上の有意な発現上昇が見られた。HCV 発現継代細胞や、DHCR24 の過剰発現細胞では過酸化水素誘導性アポトーシスに耐性となる事が明らかとなった。さらに過酸化水素処理による p21<sup>WAF1/CIP1</sup> プロモーター活性化も HCV 発現継代細胞や DHCR24 過剰発現細胞で低下していた。また、p53 により発現誘導される事が知られている Bax や Puma の発現が DHCR24 過剰発現により抑制されていた。以上の結果から、DHCR24 過剰発現により p53 の活性が抑制される可能性が考えられた。そこで、p53 の活性制御に重要である翻訳後修飾の解析を行ったところ、リン酸化には変化がないものの、リジン残基 (373, 382) のアセチル化は、DHCR24 過剰発現により低下していた。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。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。

#### (4) C 型慢性肝炎とミトコンドリア異常（西口）

C 型慢性肝炎に肝がんを合併した症例について、肝がん組織と非がん部肝組織（肝がん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%、非がん部で増加が 27.4%、減少が 3.9% だった。さらに、肝がん組織の所見により非がん部の mtDNA 変異数を比較したところ、組織所見が悪性であるほど、がん部での変異数の増加が認められた。このことはがん化に際して 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、既にがん組織と共通した mtDNA の変異が存在することを示している。

この肝がん合併例の背景慢性肝炎組織に見られる mtDNA の変異が、肝がん合併のない C 型慢性肝炎の組織でも認められるか比較したところ、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。また、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。

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。

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 $\alpha$  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→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→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。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。

(5) 慢性肝炎患者血清中の欠失 HCV ゲノムとその機能 (杉山)

HCV 欠損ゲノムが実際に存在することを確かめるために、52 症例の C 型慢性肝炎患者血清に対して long distance RT-PCR 法により HCV ゲノム全体をほぼカバーするように増幅と検出を行った。その結果、14 例 (27%) において構造領域のゲノムが広範囲に欠失した HCV が検出された。その欠失幅は約 1.3kb から 2.0kb であった。

臨床的検討の結果、欠損ゲノム群 (14 例) では非欠損ゲノム群 (38 例) に比較して有意に高ウイルス血症 (2000KIU/ml 以上) が認められた ( $p=0.003$ )。また、インターフェロン治療が施行された 30 例のうち、欠損ゲノム群では SVR (sustained viral response) 率が 13% (1/8) で、全長ゲノム群の 41% (9/22) より低かった ( $p=0.144$ )。他の臨床的因子とは明らかな関連性は認められなかった。

一方、欠損領域を正確に同定するために、欠失が認められた症例のうち 4 症例に対して欠損型ゲノムの PCR 産物をクローニングし塩基配列の解析を行った (計 38 クローン)。4 症例とも構造領域が広範囲 (E1 から p7 または NS2) に欠失していた。欠損領域が 1 種類だけの症例 (1 症例) と複数種類の症例 (2 症例) があつた。また、ほとんどのクローンで切断点は 1 箇所であったが、切断点が 2 箇所 (1 症例 1 クローン)、または、3 箇所あるもの (1 症例 5 クローン) も存在した。これらも含め、全ての欠失が読み枠のずれを生じない in-frame deletion であった。このことにより肝細胞内で欠損ゲノムから実際にタンパクが翻訳されている可能性が示唆された。一方、5' 翻訳領域、コアタンパク領域および非構造タンパク領域に明らかな欠失は認められず、これらの領域が欠損ゲノムの複製においてシス因子として必須であることが示唆された。特にコアタンパクは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ある。

同一症例における欠損ゲノムの塩基配列を比較してみると、全く同じ塩基配列

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

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

さらに、感染性キメラ HCV (1b/2a) に患者血清に認められた欠失を導入し欠失変異体を作製した。その欠損ゲノム RNA に、キャップ構造とポリ A を付加した mRNA として構造領域をトランス供給すると、欠損ゲノム RNA がパッケージされたウイルス粒子が Huh7 細胞へ感染し複製することが確認された。また、構造領域を安定的に発現するパッケージング細胞を樹立し、これに欠損ゲノム RNA をトランスフェクションすることによっても同様の結果が得られた。これらのことから、患者血清中の HCV 欠損ゲノム RNA は、構造領域が供給されることでパッケージされ感染性ウイルスとして産生されると考えられた。

(6) HCV による遺伝子編集酵素の一つ AID 誘導とその機能解析 (丸澤)

1. 遺伝子に変異を導入する活性を有する cytidine deaminase である遺伝子編集酵素 Apobec family 分子の中で、AID のみがヒト自身の DNA 配列に遺伝子変異を導入する活性を有することが示されている。AID は生理的条件下では肝細胞ではその発現をほとんど認めない。しかしながら、HCV 感染や炎症性サイトカイン刺激によりヒト肝細胞に AID が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。この肝細胞における AID の発現は、HCV のコードするウイルスタンパクのひとつである Core タンパク質依存性に生じていることも判明した。

2. ヒト肝細胞に AID を異所性に発現誘導する活性を示す HCV の Core タンパク質、ならびに炎症性サイトカインである

TNF- $\alpha$ はともに、細胞内で転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することが共通の特徴である。そこで、NF- $\kappa$ B 阻害剤、IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  の dominant negative form や IKK- $\beta$  に特異的な siRNA を用いて細胞内 NF- $\kappa$ B 活性化シグナルを阻害したところ、肝細胞における AID 発現誘導が減少～消失することが確認された。

3. AID transgenic mice はほぼ全例で悪性リンパ腫の発生を認めることがすでに報告されていた。しかしながら、上皮系組織の詳細な解析からは、非リンパ系組織である肝臓や肺、胃に肝がんや肺がん、胃がんを発生することが明らかとなった。また、これらの発がんの発生母地となった各臓器では、AID の持続発現によりさまざまな遺伝子に体細胞変異が生じていることも確認された。

4. ヒト臨床検体を用いた解析からは、慢性肝炎、肝硬変、肝がんを伴った肝組織中では、内在性 AID mRNA の過剰発現が real-time PCR 法により確認された。同時に、特に HCV 感染を伴った肝組織中において、AID の発現量がより高いことも明らかとなった。ヒト AID 抗体を用いた免疫組織学的な検討からは、慢性炎症を伴ったヒト肝組織中では、組織浸潤リンパ球とともに肝細胞でも AID タンパクが過剰発現していることが確認された。

5. ヒト肝がんの発生過程において、がん関連遺伝子への点突然変異とともに染色体異常（転座、欠失など）が重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに、リンパ系腫瘍の発生過程においては、AID が特定の染色体に発がんに関与すると想定されている染色体転座を誘導する活性を有することが報告されている。したがって、HCV 感染からの肝発がん過程において、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検討する目的で、CGH 法を用いて AID 発現下のヒト肝細胞における遺伝子異常の生成の網羅的な解析を行った。まず、レンチウ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。興味深いことに、AID 発現 8 週間後のヒト肝細胞から抽出したゲノムでは、ほぼすべての染色体領域にわたって散在性に、多様な染色体異常が生じており、その大部分は一定の染色体領域の欠失として生じていることが明らかとなった。次に、CGH microarray 法で検出された染色体レベルでの欠失領域に含まれる遺伝子群をゲノムデータベースから同定し、それぞれの遺伝子に特異的なプローブを作成し、real-time PCR 法により染色体異常出現領域における遺伝子量の定量評価を行った。興味深いことに、AID 発現により欠失の生じた染色体領域にはいくつかの既知のがん抑制遺伝子が含まれており、これらの遺伝子発現が AID による染色体欠失の結果、著明に減少してることが明らかとなった。また、AID 発現肝細胞に 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、インターフェロンシグナル伝達に参与する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、このインターフェロンシグナル伝達関連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コピー数の変化を、real-time PCR 法により検討したところ、遺伝子のコピー数は AID 発現により有意に減少することが確認された。

(7) 間葉系幹細胞からの肝細胞分化誘導とそれを用いた HCV 感染系（落谷）従来用いたサイトカイン、増殖因子等の添加のタイミングと量を調整した結果、HGF, FGF1, FGF4, OsM, デキサメタゾン をほぼ同時に添加する工夫で、これまで 35 日以上を要した肝細胞様分化誘導をわずか 2 週間の期間に短縮することに成功した。これらの細胞は、アルブミン染色陽性であり、培養液中にもアルブミンの産生が ELISA によって確認された。さらに RT-PCR による検討では、TD02, CYP3A4, 2C9 などの成熟肝細胞に特徴的な遺伝子の発現も確認された。それらの細胞を用いて以下の成果を得た。

1. microRNA122 の発現解析  
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 microRNA122 が発現している。リアルタイム PCR に

て解析したところ、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 microRNA122 の発現が 20 倍ほど上昇しているが、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。

2. HPV の E6E7+hTERT による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。これらの継代初期の細胞株の microRNA122 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それと比較して 1/3 程度であることを明らかにした。

#### 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いえ脂肪代謝異常を悪性化しようという点において、NASH とよく似ていると思われる。

Hsp90 阻害剤 17-AAG が抗 HCV 作用を示すことを明らかにした。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、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。NS3 と Hsp90 は相互作用す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。

HCV を Huh-7.5 細胞に感染させると、感染 2 日後には 90% 以上の細胞が HCV 陽性を示し、少なくとも 3 週間以上にわたって HCV の持続感染が認められた。急性期である感染 4 日後には細胞の小型円形化が認められ、HCV が直接的に細胞死を誘導することがわかった。この細胞死は、ミトコンドリアへの活性化 Bax の蓄積、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出、及び、caspase-3 の活性化を伴っていた。従って、HCV は急性感染期に、Bax 誘導性ミトコンドリア介在性 caspase-3 依存性アポトーシスを引き起こすと考えられた。また、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。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。

一方、HCV 感染後 2~3 週間経過した持続感染期には、感染細胞の caspase-3 活性が低下し、HCV によるアポトーシスに対して抵抗性が認められた。そして、HCV 感染細胞の核小体の肥大も観察された。

アポトーシス抵抗性は細胞がん化に不可欠の事象であり、また、核小体の肥大は病理学的にがん細胞の指標の一つと考えられている。そこで、アポトーシス抵抗性や細胞がん化に関連する宿主因子の発現や機能に対する HCV 感染の影響について検討した。その結果、HCV 持続感染により ERK1/2 のリン酸化が増加する(活性化される)ことが明らかになった。ERK1/2 は細胞増殖促進やアポトーシス抵抗性に重要な役割を果たすことが知られている。HCV 感染初期(～3 日後)には非感染対照に比べて有意な ERK1/2 のリン酸化(活性化)は見られなかったが、持続感染期には有意の ERK1/2 リン酸化の亢進が認められた。この ERK1/2 活性化によるアポトーシス抵抗性の誘導が HCV 持続感染の成立に関与している可能性が示唆された。

また、非感染細胞では培養日数の増加とともに Rb が抑制タンパク質の蓄積が増加したが、HCV 感染細胞ではほとんど増加は認められなかった。Rb が抑制タンパク質は E2F 転写因子との結合・解離を介して細胞周期を制御することが知られている。従って、本研究結果は、HCV 持続感染により細胞周期が脱制御される可能性を示唆していると考えられた。

本研究では HCV ゲノムの複製効率に影響を与える新規宿主因子として DDX3 を見出した。ほぼ同時期に別の研究グループにより、HCV-JFH1 の感染増殖系に様々な遺伝子の siRNA を作用させて、HCV の複製に影響を与える分子の同定がなされた(Randall et al., PNAS 104:12884, 2007)。この論文において、最も大きな影響を与える分子として DDX3 が同定された。実験系が異なるにも関わらず、同じ宿主因子が同定されたことから、DDX3 は HCV の複製に重要な宿主因子であると考えられる。

HCV ゲノムの複製が細胞質で行われるために、HCV の複製増殖機構には DNA 損傷センサー関連分子の積極的な関与はないのではないかと予想されていたが、本研究により DNA 損傷センサー分子である ATM と Chk2 が RNA 複製の中心的役割を担い RNA polymerase 活性を有する NS5B と相互作用を示し HCV の複製効率を維持するために関与していることが明らかになった。これらは予想外の結果であったことから、ATM や chk2 分子のこれまでに知られていない機能が明らかになる可能性もある。そのため、今後、NS5B と ATM や Chk2 との相互作用に必要な結合ドメインの同定や NS5B が ATM や Chk2 に結合す

ることによる宿主の DNA 損傷応答や細胞周期に与える影響について検討する必要がある。

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。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。

将来的には、ESCRT 因子を分子標的とする新規抗 HCV 剤の開発も可能ではないかと思われる。

マイクロアレイ解析から抽出されたメタロチオネインに焦点を絞って解析した。その結果、少なくともメタロチオネイン 1E と 2A が HCV ゲノムの複製効率を上げる役割を担っていることが示唆された。この点については、細胞への導入直後の HCV ゲノムの複製効率を調べることができる Transient assay (ルシフェラーゼ活性で定量的に測定する方法)によりさらに検討する必要がある。

最近、我々はこれまで使用してきた HuH-7 株由来の細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを有するヒト肝がん細胞株 Li23 由来の全長 HCV ゲノム複製細胞株を複数樹立した。今後は、これらの細胞株についても長期培養により発現変動する遺伝子群の同定を進め、HuH-7 由来の細胞を用いた場合の結果と比較を行う予定である。これと並行してメタロチオネイン遺伝子の RNA 複製への関与についても Li23 細胞由来の細胞株を用いて今後調べる予定である。

HCV の感染が DHCR24 の過剰発現を転写レベルで誘導し、これによって p53 の活性が抑制されている事が明らかとなった。また、HCV が DHCR24 遺伝子を転写誘導するゲノムプロモーター領域を同定し、作用する宿主因子の結合活性が HCV 発現に伴い亢進している可能性が示唆された。DHCR24 による p53 活性制御機構は肝臓細胞特異的である可能性が考えられる。

近年、HCV 欠損ゲノムが C 型肝炎患者血清に存在することが臨床的に報告されている。本研究でも 52 例の C 型肝炎患者症例のうち 14 症例 (27%) において構造領域のゲノムが広範囲に欠失した欠損ゲノムが検出された。

今回、臨床的に HCV 欠損ゲノムと高ウイルス血症 (2000KIU/ml 以上) および SVR 率との関連が認められた。ウイルス複製率が高いほど欠失変異が起りやすいと考えられるが、欠損ゲノムが存在することで、コアタンパクの発現量が増加し、逆にウイルス複製や持続感染の効率が高まっている可能性もある。本来、臨床的に高ウイルス血症の場合、インターフェロン感受性の低下がみられるので、欠損ゲノムにおける SVR の低下は高ウイルス血症を介したものかもしれない。今後、本研究で樹立した欠損ゲノム感染系を用いてこれらの問題点をウイルス学的に解決していく必要がある。

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

これまでの報告と同様、欠損ゲノムにおいては構造領域が広範囲に欠失していた。その範囲は E1 から p7 または NS2 領域に及んでいた。構造領域のタンパクはウイルス粒子の構成成分で、免疫 (特に液性免疫) に関わるが、この領域を欠くことによって宿主の免疫監視から逃れている可能性がある。一方、コアタンパク領域と非構造領域はすべての欠損

クローンにおいて保存され、これらの領域の RNA もしくはそのタンパクがウイルスのパッケージングや複製など欠損ウイルスのライフサイクルに必須であると考えられた。

実際、コアタンパク領域を欠失させると感染性粒子産生が著しく低下しこの領域が完成性粒子産生における重要なシス因子であると考えられた。この領域がタンパクとして重要なのか RNA 構造として重要なのか明らかにしなければならない。また、今後、この欠損ゲノムにおけるタンパク質領域の全長ゲノムの複製、感染に対する影響を検討しなければならない。

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

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、この領域が欠損ゲノムでも保存されているとすれば、欠損ゲノムと全長ゲノムが区別して増幅することは不可能である。したがって、症例によっては測定された血清中 HCV 量が必ずしも全長 HCV 量を反映していないという臨床的に重大な問題が生ずる可能性

がある。この後、簡便な HCV 欠損ゲノム検出法を開発し、新たな C 型肝炎の診断、治療に応用すべきである。

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。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、肝がんを合併した症例の非がん部の組織では、粗面小胞体の膨化に加えて、硝子様封入体や空泡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 の変異蓄積は高がん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、臨床的な肝発がんの予測因子を明らかにすることを目指す。

HCV 感染の結果、遺伝子編集酵素 AID がウイルスがコードするタンパク質や炎症性サイトカイン依存性にヒト肝細胞に発現誘導されること、その結果、さまざまな発がんに関連した遺伝子に体細胞変異が生じることが明らかとなった。AID を全身に発現したトランスジェニックマウスモデルの解析からは、AID の過剰発現が、悪性リンパ腫のみならず上皮系細胞由来の肝がんを引き起こすことも確認された。また、HCV 感染を契機とする慢性肝炎から肝発がん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)の生成にも、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。以上より、AID は、本来は発現していない肝細胞でも、炎症や感染症といった発がん

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、肝がんの発生や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。また本研究により、肝細胞では AID は発がんに関連した遺伝子を標的とするとともに、選択的にインターフェロンシグナル伝達に関与する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。以上の知見を総合すると、AID の遺伝子編集酵素活性により、肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルでの遺伝子異常が生成されることが、肝がんの発生に重要な役割を果たしているとともに、HCV の持続感染の結果、インターフェロン関連遺伝子のコピー数が減少することが、ウイルス排除を困難にすることにつながり、HCV 持続感染の成立やインターフェロン治療抵抗性の出現に深く関与している可能性が示唆された。

ヒト間葉系幹細胞を 2 週間ほどの短期間で、肝細胞の性質を持つ細胞に分化誘導す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かどうかの検証を開始したが、そのために、まず HCV 複製に必要な因子として、microRNA122 の発現を分化誘導した肝細胞に見いだした。実際に同班の分担研究者の加藤教授から分与いただいた JFH-1 株(2a 型) HCV を細胞に導入した実験では HCV のコピー数の増加を確認できた。microRNA122 の発現をアンタゴニストによって阻害する実験では、HCV の複製能も低下したことから、間葉系幹細胞に由来する肝細胞は、HCV 複製に適した細胞であることか証明された。さらにこの分化誘導した肝細胞の不死化の系も microRNA 122 を発現していることから、HCV 複製系に用いる細胞としての有用性が示唆された。こうした有用な間葉系幹細胞から分化した肝細胞様の細胞を長期間にわたって機能維持する工夫に s ついては、残念ながら十分な成果を上げることは不可能であった。HPV の E6E7+hTERT による不死化の試みは、数代の細胞培養は可能であり、形態も microRNA122 の発現も有る程度維持されたが、継代が多くなるにつれてその機能や microRNA122 の発現も失われ、HCV の複製能力も失われた。

#### 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 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。また、17-AAG と MG132 剤はすでに米国でがんの臨床治験に用いられている事からも HCV に対しても治験の可能性に期待が持てる。

HCV は急性感染期に ROS の過剰産生を介して JNK を活性化し、Bax 誘導性ミトコンドリア介在性アポトーシスを引き起こすことがわかった。また、慢性持続感染期には、核小体肥大、ERK1/2 活性化及び Rb が抑制タンパク質蓄積阻害を引き起こし、これらによるアポトーシス抵抗性や細胞周期脱制御を介して細胞がん化を誘導する可能性が示唆された。

HCV Core に会合して HCV ゲノムの複製を支持する RNA ヘリケース分子 DDX3 を見出した。HCV ゲノムの複製に必要な宿主因子として DNA 損傷センサーである ATM と Chk2 を見出した。HCV 粒子の産生に必要な宿主因子として、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 ゲノム複製細胞を長期間培養することによりメタロチオネイン遺伝子群の発現レベルが 2 倍以上亢進することを見出した。

ノックダウン細胞を作成して解析した結果、メタロチオネイン 1E と 2A が HCV ゲノムの複製効率に影響を与えることを見出した。

DHCR24 遺伝子の HCV 感染による発現誘導が見いだされ、プロモーター領域内の HCV 応答配列 (28 塩基) が同定できた。また、HCV により DHCR24 の持続的な過剰発現が生じ、これによって肝臓細胞中で p53 と MDM2 の細胞質における相互作用が増加し、p53 のアセチル化が抑制されてその活性が低下すると考えられた。

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。肝発がん症例では非がん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 肝がんの非がん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 の変異は発がん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。

HCV のコードする Core タンパク質や炎症性サイトカイン刺激により肝細胞に NF- $\kappa$ 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、ヒト肝がんの発生、ならびに 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。

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てきた。この幹細胞は、内胚葉系の肝細胞に比較的短期間で分化する可塑性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 microRNA 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。本研究成果は、班内での共同研究の成果である。

## 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がんリスクが高いことが示唆された。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase

- inhibitor SC-560. *Antivir Chem Chemother.* 20(1): 47-54, 2009.
2. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyladenine analogs. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 53: 103-104, 2009
  3. Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci.* 100(10): 1943-1950, 2009
  4. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(7): 217-28, 2009
  5. Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Hepatology. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *50(3):* 689-696. 2009
  6. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(\*). *J Hepatol.* 50(3):453-460, 2009.
  7. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):330-334, 2009.
  8. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(16):4638-4641, 2008.
  9. Watashi K, Shimotohno K. Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol.* 17: 245, 2007
  10. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282: 32765, 2007
  11. Arimoto KI, Konishi H, Shimotohno K. Ubch8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Mol Immunol.* 45: 1078, 2008
  12. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
  13. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007
  14. Takao Y, Yamada A, Yutani S, Takedatsu H, Ono T, Etoh K, Wang Y, Suzuki S, Ide T, Shimotohno K, Sata M, Itoh K. Identification of new immunogenic peptides in conserved regions of hepatitis C virus (HCV) 1b with the potentiality to generate cytotoxic T lymphocytes in HCV1b(+) HLA-A24(+) patients. *Hepatol Res.* 2007 37(3):186-195, 2007
  15. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K. In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by

- cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):127-133, 2007
16. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-9710, 2007
  17. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, and Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J Gen Virol.* 90(7), 1681-1691, 2009.
  18. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H. and 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.
  19. 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.
  20. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H., Yates J 3rd, and Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 83(18): 9237-9246, 2009.
  21. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H., Miyamura T, and Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem.* 106(6): 1123-1135, 2009.
  22. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, and Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol.* 82(21): 10375-10385, 2008.
  23. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, and Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol.* 89(5): 1231-1242, 2008.
  24. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, and Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48(1): 38-47, 2008.
  25. Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Nagano-Fujii M, Hotta H. and Kawata S. Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b. *J Infect Dis.* 196(7): 1006-1009, 2007.
  26. Lu L, Li C, Fu Y, Thaikruea L, Thongswat S, Maneekarn N, Apichartpiyakul C, Hotta H., Okamoto H, Netski D, Pybus OG, Murphy D, Hagedorn CH, and Nelson KE. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J Gen Virol.* 88(5): 1505-1518, 2007.
  27. 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).
  28. 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).
29. 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).
  30. 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).
  31. 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).
  32. 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).
  33. 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-like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 50: 585-591 (2009).
  34. 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-a-resistance phenotype. *Hepatology Res.* 39: 898-909 (2009).
  35. Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolvering C, Kato N, Kietzmann T, Behrmann I, and Haan C. Hypoxia-inducible factor 1a is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. *Hepatology* 50:253-260 (2009).
  36. 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).
  37. 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).
  38. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA Replication Through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J. Virol.* 83:2338-2348(2009).
  39. Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* 154:77-85(2009).
  40. Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82:9639-9646 (2008). *J. Virol.* 82:9305 (2008)
  41. Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for