

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。

### 3. ESCRT 関連因子関係

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。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。

(2) HCV の持続的増殖により機能変化する宿主因子の解析

本研究では、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癌細胞株 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。

### E. 結論

(1) 1. 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。

2. 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。

3. 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。

(2) 1. HCV ゲノム複製細胞を 1 年間培

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。

2. 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。

#### F. 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.

- Hepatol. 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).
  - 12) 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).
  - 13) 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).
  - 14) 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) spotlight
  - 15) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72–79 (2008).
  - 16) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:104–109 (2008).
  - 17) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158–1166 (2008).
  - 18) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors,

- tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292-298 (2008).
- 19) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol.* 80:632-639 (2008)
- 20) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125:88-97 (2007).
- 21) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
- 22) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain 0 of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
- 23) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
- 24) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
- 25) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
- 26) Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2016-2027 (2007).
- 27) Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco Jr, JA, Schreiber SL, Chung RT. Identification of novel epoxide inhibitors of hepatitis C virus replication using a high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3756-3759 (2007).
2. 学会発表

- 1) 中村 光康、齋藤 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 隆字、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 隆字、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.
- 10) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 11) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 12) Ikeda M, Abe K, Kuroki M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Identification of 5-HETE as the anti-HCV molecule among the arachidonic acid metabolites.

- 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 13) Abe K, Ikeda M, Tani H, Ariumi Y, Dansako H, Matsuura Y, Kato N. Low permissive cell lines obtained from a high permissive HCV RNA replication cell line by negative selection system: A new strategy for identification of novel host factors. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 14) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 15) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 16) 有海 康雄、黒木 美沙緒、團迫 浩方、阿部 健一、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之. DNA 損傷センサー ATM 及び Chk2 と HCVNS5B との相互作用. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 17) 池田 正徳、森 京子、西村 剛、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なる 1b 型 HCV 陽性血清由来の全長 HCV-RNA 複製レポーターアッセイ系の開発. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 18) 加藤 宣之、森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆字、池田 正徳. 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 19) 阿部 健一、池田 正徳、谷 秀樹、有海 康雄、團迫 浩方、松浦 善治、加藤 宣之. HCV 複製に關与する宿主因子探索用細胞株の Negative selection 法による樹立. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 20) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2aHCV キメラレプリコン. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 21) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に抑制する. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 22) 森 京子、加藤 宣之、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳. 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 由来の全長 HCV-RNA 複製細胞を用いた薬剤評価システム. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月.
- 23) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, and Kato N. ATM, a DNA damage sensor, is required for hepatitis C virus RNA replication. 第 67 回日本癌学会学

- 術総会、名古屋、2008年10月。
- 24) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
- 25) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication reporter assay systems using various genotype 1b HCV strains. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月。
- 26) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月。
- 27) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA replicating cells. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月。
- 28) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N. DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September 2007.
- 29) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 30) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 31) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September 2007.
- 32) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆字、Didier Trono、加藤 宣之。DNA 損傷センサーATM と Chk2 はHCV の RNA 複製に必要な宿主因子である。第56回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。
- 33) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之。HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ。第55回日本ウイルス

学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.

- 34) 加藤 宣之、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳. 全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養により生じる HCV の遺伝的多様性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願番号：特願 2008-225323 号

(出願日：2008 年 9 月 2 日)

発明の名称：新規 HCV レプリコン

複製細胞および全長 HCV RNA 複製細胞、ならびにこれらの利用

発明人：加藤 宣之、池田 正徳.

出願人：岡山大学

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

肝発がんと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- $\beta$  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、教室の研究者 3 名による blind で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, 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。

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）

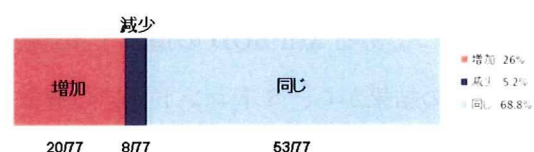


図 1 肝臓非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較

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）

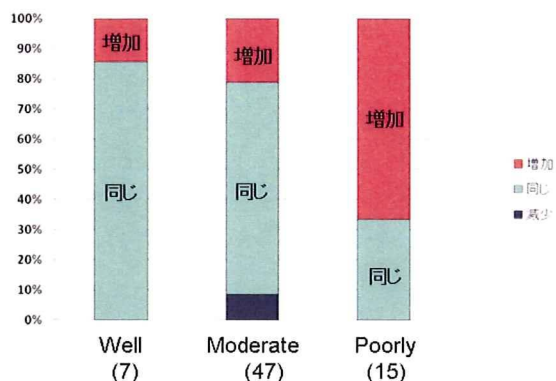


図2 非癌部と癌部における mtDNA 変異数の比較：肝癌の組織所見との関係

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)。

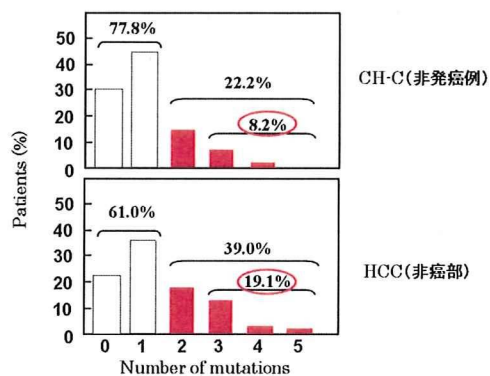


図3：肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の mtDNA の塩基変異数

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)。

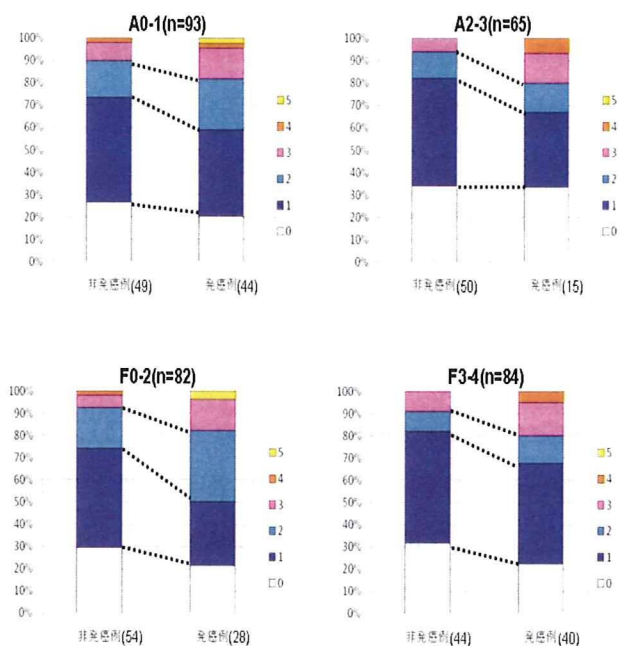


図4 肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の mtDNA の塩基変異数 (肝炎組織の活動性および線維化の程度を揃えての比較)

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)。

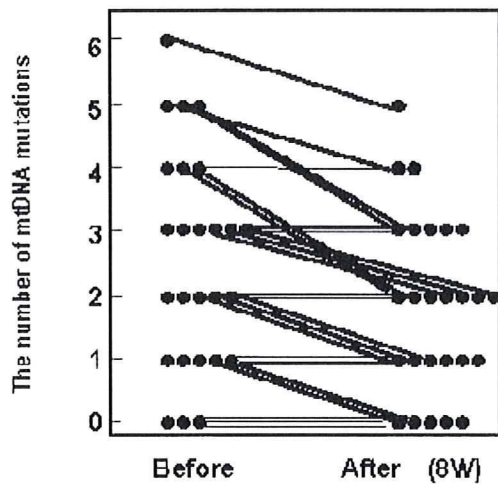


図5 C型慢性肝炎症例のIFN治療前後の肝組織におけるmtDNAの塩基変異数

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)。

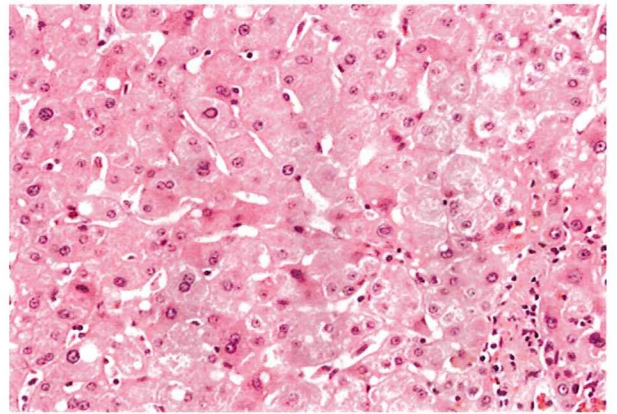


図6: 症例1 光顕像

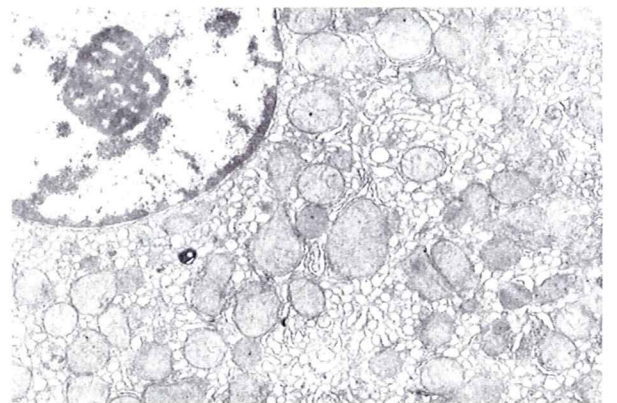


図7: 症例1 電顕像

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。

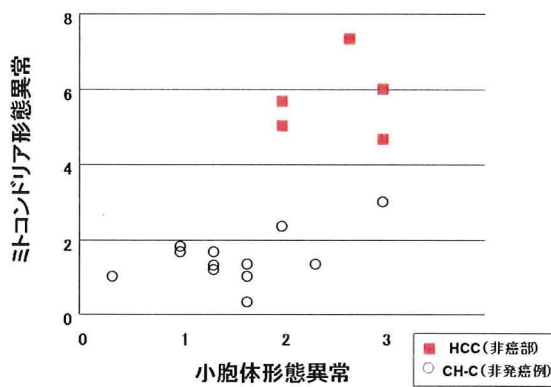


図 8：肝癌合併のない C 型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の電顕での形態異常

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。

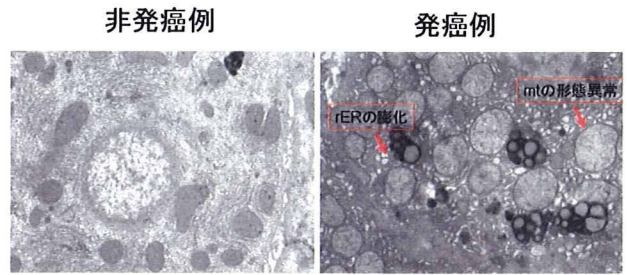


図 9：SVR 症例の電顕像。発癌例では小胞体の膨化やミトコンドリアの形態異常が著明である。

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)。

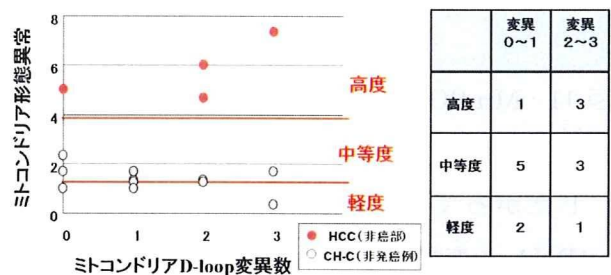


図 10：ミトコンドリアの形態異常と DNA 変異との相関

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)

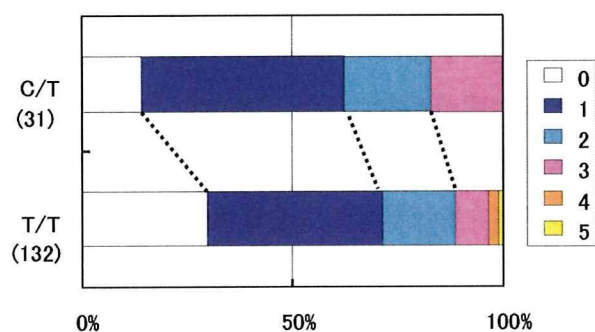


図 11 : Mn-SOD の遺伝子多型と mtDNA 変異数

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

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（総合）報告書（平成19- 21年度）

DHCR24を介したHCVによる細胞増殖性獲得機構の分子機構解明

研究分担者 小原恭子 熊本大学大学院生命科学研究部・特任教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、肝硬変、肝癌に移行する。分担研究者らは、HCVの持続発現に伴い肝細胞の腫瘍原性が亢進する事を見いだしており、この制御因子の1つは3β-HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE (DHCR24)である事を明らかにしてきた。HCV感染はDHCR24の発現を亢進する事をヒト肝臓キメラマウス感染系で明らかにした。HCVによるDHCR24の発現誘導は転写段階で生じていた。プロモーター配列を検索したところ、発現誘導に必要なゲノム領域(28bp)が明らかとなり、ゲルシフト法を用いて検索した結果、この領域に宿主因子が結合している事が明らかとなった。さらに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。p53の活性低下は、DHCR24過剰発現に伴ってp53, MDM2相互作用が亢進する事やp53アセチル化が低下する事による可能性を見いだした。また、DHCR24の発現が亢進するとp53, MDM2相互作用が亢進しても分解系が抑制され、p53レベルが高く維持される事を見いだした。さらに、この様なDHCR24の過剰発現によるp53, MDM2相互作用の亢進は肝臓細胞では生じるが、肺の様な肝臓以外の組織由来細胞では、生じない事も明らかとなり、本経路の肝臓特異性が示唆された。

A. 研究目的

RNAウイルスであり、典型的な癌遺伝子を持たず宿主細胞のゲノムにも組み込まれないHCVが高率に肝癌発症に結びつく機序は未だ不明な点が多い。分担研究者らは、HCV感染がDHCR24分子の発現を誘導しこれがp53の活性を抑制する事を見いだしている。HCVによるDHCR24の発現誘導機序あるいはDHCR24過剰発現によるp53活性抑制機序を解明し、HCVの新たな病原性発現メカニズムに関する知見を得る事を目的に研究を行った。

B. 研究方法

HCVの持続発現により発揮される腫

瘍原性亢進機序を解明するためHCV発現継代細胞(J. Biol. Chem. 279 (15), 14531-14541, 2004)をマウスに免疫して単クローン抗体を樹立した。この中でHCV発現継代細胞やHCV陽性肝癌患者組織で発現が亢進する分子、DHCR24を認識するクローンを得た。

HCVによるDHCR24の発現誘導を細胞で検索したところ、転写レベルで誘導される事が明らかとなった。また、HCV-JFH1株の感染感受性細胞であるHuH-7細胞ではDHCR24の発現量が元来高くウイルス感染による発現誘導を確認する事が困難であった。そこで、HCVをヒト肝臓キメラマウス(uPA-SCIDマウス)に感染させDHCR24の転写誘導



の有無を定量PCRで検索した。

また、HCV感染によるDHCR24の転写誘導機序に関してはDHCR24のゲノムプロモーター領域(約5,000塩基)の遺伝子をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを作製して欠損変異を導入後HCV応答領域を検索した。応答領域内に認識配列を持つ転写因子結合の解析はオリゴヌクレオチドを合成して競合アッセイを行うか、特異抗体を用いたsuper shift assayで検討した。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。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を用いて検討を行った。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した。また、p53やMDM2の細胞内での局在について検索するため、蛍光抗体法や細胞分画法を用いて検索した。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。

(倫理面の配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学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いる(H18年6月)。動物実験については、「研究機関等における動物実

験等の実施に関する基本指針」

(H18.6.1)に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た(H18年4月)。

### C. 研究結果

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遺伝子発現細胞でもDHCR24の発現誘導が転写レベルで確認された事からDHCR24遺伝子の上流5kbpをクローニングし、HCVに応答するプロモーター領域の検索を行った。欠損変異体の解析を行ったところ、プロモーター領域の転写開始点上流200塩基内にある28塩基が必要である事が明らかとなった。またゲルシフト法で解析したところこの領域内に宿主因子が結合している事が明らかとなった。

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。このうちp53蛋白質が持つ各種セリン残基のリン酸化についてはDHCR24過剰発現の影響はほとんどな

かった。一方でp53の転写活性化に重要とされるリジン残基(373, 382)の核内でのアセチル化は、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、細胞質で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、肝臓由来細胞株では相互作用が亢進するのに対し、肺由来細胞株では、相互作用の亢進が見られなかった。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

本研究により、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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 論文発表 (本研究関連10編)  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Sato H, Masuda M, Kanai M, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, and Kai C. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J Virol.* 81(21): 11569-11576, 2007
2. Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N and Oka Y. ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic  $\beta$  Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metabolism* 7(3): 269-276, 2008
3. Nishimura T, Saito M, Takano T, Nomoto A, Kohara M, and

- Tsukiyama-Kohara K. Comparative Aspects on the Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Internal Initiation of Hepatitis C Virus and Picornavirus RNAs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5:435-448, 2008
4. Sato H, Honma R, Yoneda M, Miura R, Tsukiyama-Kohara K., Ikeda F, Seki T, Watanabe S, and Kai C. Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression. *Virology* 2008, 375(2): 321-330
5. Inoue Y, Tsukiyama-Kohara K., Yoneda M, Sato H, and Kai C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32(1): 29-41, 2009
6. Machida K, Tsukiyama-Kohara K., Sekiguchi S, Seike E, Tone S, Hayashi Y, Tobita Y, Kasama Y, Shimizu M, Takahashi H, Taya C, Yonekawa H, Tanaka N, and Kohara M. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology* 137: 285–296, 2009
7. Saitou K, Mizumoto K, Nishimura T, Kai C and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Research* 144(1-2):266-271, 2009
8. Nishimura T, Kohara M, Izumi K, Kasama Y, Hirata Y, Huang Y, Shuda M, Mukaidani C, Takano T, Tokunaga Y, Nuriya H, Satoh M, Saito M, Kai C. and Tsukiyama-Kohara K. HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS P53 VIA PERSISTENT OVER-EXPRESSION OF 3 $\beta$ -HYDROXYSTEROL  $\Delta$ 24-REDUCTASE *J. Biol. Chem.* 284 36442-36452, 2009
9. Amako Y, Tsukiyama-Kohara K., Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virology* 84 303-311, 2010 [Nominated in "Spotlight"].
10. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. 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.*

## 2. 学会発表

### 「国内学会」

- 1) 笠間由里, 田中康介, 佐藤正明, 齊藤誠, 桑原一彦, 阪口薫雄, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルスにおける肝外病変モデルマウスの作製 第44回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎 2007
- 2) 佐藤正明・齊藤誠・田中康介・岩永寿真子・岡田誠治・甲斐知恵子・小原恭子 ヒトリンパ球NOD/SCIDマウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換え麻疹ウイルス評価系の構築 第44回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎 2007
- 3) Saito M, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C Virus-associated Regulatory Mechanism for DHCR24 Gene Expression. (C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子DHCR24遺伝子の発現制御機構) 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007
- 4) Takano T, Kohara M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. The novel regulatory pathway of TOM70 concerning with cell death. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 2007
- 5) 西村知裕, 笠間由里, 齊藤誠, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス誘導蛋白質DHCR24によるp53の修飾制御 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007
- 6) 齊藤 誠, 高野貴士, 笠間由里, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス (HCV) のライフサイクルにおける宿主因子DHCR24の機能解析 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007
- 7) 佐藤正明・笠間由里・小原道法・小原恭子 Dehydrocholesterol reductase 24 (DHCR24) をターゲットとした単クローン抗体処理のC型肝炎ウイルス複製細胞に対する生理学的影響を担う宿主因子の同定 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007
- 8) 高野 貴士, 小原 道法, 甲斐 知恵子, 小原 恭子 HCV関連抗原P70の同定及び解析 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2007
- 9) 西村知裕, 笠間由里, 齊藤誠, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現細胞におけるp53の修飾制御BMB2007  
(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会年会・合同大会) 横浜 2007
- 10) 齊藤 誠, 西村知裕, 高野貴士, 佐藤正明, 徳永優子, 笠間由里, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス (HCV) の腫瘍原性亢進機序およびライフサイクルにおける宿主因子DHCR24の機能解析 The role of DHCR24 in hepatocarcinogenesis and the viral life cycle during hepatitis C virus (HCV) infection BMB2007 ワークショップ5W9\*  
(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会年会・合同大