

- 会) 横浜 2007
- *ワークショップ 5W9 「ウイルス研究から明らかになった宿主因子の新たな機能」 企画 (小原恭子・土方誠)
- 11) Nishimura T, Sato M, Kasama Y, Shuda M, Nakagawa S, Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. “Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus.” 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 2008
- 12) 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 「ヒトリンパ球移入 NOD/SCIDマウス (huPBL NOD/SCID) を用いた組換麻疹ウイルス評価系の構築」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 13) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 「DHCR24を介したHCVのp53活性抑制」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 14) 齊藤誠、小原恭子 「C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24の転写制御機構の解析」 第61回 日本細菌学会九州支部会 第45回日本ウイルス学会九州支部会合同大会 熊本 2008
- 15) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 「抗DHCR24単クローン抗体のC型肝炎ウイルス複製抑制作用を担う宿主因子」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 16) 齊藤 誠、小原恭子 「C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24の転写制御機構の解析」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 17) 徳永 優子、齊藤 誠、小原 道法、小原 恭子 「C型肝炎ウイルスが誘導する宿主因子DHCR24の相互作用分子の探索」 第56回 日本ウイルス学会学術集会 岡山 2008
- 18) Nishimura T, Kasama Y, Shuda M, Arai M, Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. “Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase.” 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
- 19) 高野貴士、林 昌弘、榎原琢也、平田雄一、小原恭子、小原道法 「DHCR24によるHCV複製能制御の検討」 Characterization of HCV replication regulatory by DHCR24 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008
- 20) Nishimura T, Kasama Y, Shuda M, Arai M, Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. “Hepatitis C virus suppresses p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase.” BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日

- 本生化学会年会・合同大会) 神戸
2008
- 21) 齊藤 誠、小原恭子 「C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24の転写制御機構の解析」
Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会・合同大会) 神戸 2008
- 22) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子 Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3 beta-hydroxysterol delta24-reductase. 第68回日本癌学会学術総会 横浜 2009
- 23) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子DHCR24の転写制御機構の解析
第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009
- 24) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 Betaine/GABA transporter1 (BGT-1)のC型肝炎ウイルス複製における役割
第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009
- 25) 小原恭子、町田圭吾、笠間由里、関口敏、小原道法 C型肝炎ウイルスとBリンパ腫 ワークショップ6 病原性発現とモデルシステム 第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009
- 26) 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 (HCV) が誘導するDHCR24(3 β hydroxysterol Δ 24 reductase)過剰発現によるp53機能抑制 ワークショップ2 ウイルス発癌 第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009
- 27) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子 HCV誘導性3 β -Hydroxysterol δ -24 reductase 持続発現による p53転写因子機能の抑制 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009
- 28) Tsukiyama-Kohara K, Machida K, Kasama Y, Sekiguch S, and Kohara M. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. ワークショップ2W11 サイトカイン制御因子による多様な生体調節 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009
- 「国際学会」
1. Tsukiyama-Kohara K, Saito M, and Kohara M. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis aggravated by Hepatitis C virus APASL2007, Kyoto, 2007. [Best Poster Award受賞]
2. Nishimura T, Kasama Y, Shuda M, Nakagawa S, Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K.

- Hepatitis C virus abrogates p53 activity through 24-dehydrocholesterol reductase."14th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Glasgow, 2007
3. Tsukiyama-Kohara K. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis elevated by Hepatitis C virus The Asia and Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and the Fourth LiverCare Center Symposium (invited) Khon Kaen, Thai-land 2008
 4. Nishimura T, Satoh M, Kasama Y, Shuda M, Nakagawa S, Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Significance of 3 β -dehydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) in life cycle of Hepatitis C virus. 21th International Congress of Antiviral Research, Montreal, 2008
 5. Nishimura T, Kasama Y, Takano T, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus abrogates p53 activity by over-expression of 3-beta-hydroxysterol delta-24-reductase (Oral presentation). IUMS (XIVth International Congress of Virology), Turkey, 2008
 6. Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Hirata Y, Nishimura T, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Significance of DHCR24 in life cycle of Hepatitis C virus. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008
 7. Takano T, Hirata Y, Tsukiyama-Kohara K., Sudoh M, and Kohara M. Regulation of HCV replication by DHCR24. "15th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Texas, 2008
 8. Saito M, and Tsukiyama-Kohara K. Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009, Nice, France.
 9. Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Antibody raised against 3 β -hydroxysterol- Δ 24-reductase (DHCR24) suppresses hepatitis C virus infection through BGT-1. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. Nice, France 2009

10. Tsukiyama-Kohara K. The novel pathway for impairment of p53 and oxidative stress response by hepatitis C virus 4th Medical Biotech Forum. Dalian, China 2009
11. Tsukiyama-Kohara K and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus *in vitro* and *in vivo* (1. Chronic hepatitis induced by hepatitis C virus 2. The novel pathway for impairment of p53 by hepatitis C virus) (招待講演) International Symposium of “Infection-associated Cancers” Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University 2-3, March 2010

その他セミナー等

1. 小原恭子 C型肝炎制圧のための基礎研究；肝発癌分子機序解明とワクチン開発へのアプローチ KIKUCHIバイオセミナー三風会 熊本 平成18年3月
2. Saito M, Takano T, Nishimura T, Kasama Y and Kohara K. Fundamental Study for Overcoming Chronic Hepatitis C, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma The

4th Kumamoto University Forum in Daejeon, Korea September 26-27, 2006

3. 小原恭子 C型肝炎の克服に向けて 第8回イブニングセミナー 熊本大学リエゾンオフィス (東京) 平成18年12月

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許

- 1) 「C型肝炎治療用抗体」、特願：2006-49572、発明者：小原恭子、甲斐知恵子、西村知裕、出願日：平成18年2月27日、出願人：国立大学法人 熊本大学、甲斐知恵子、(財)化学及血清療法研究所
- 2) 「ウイルスの複製に関与する宿主因子」特願：2008-66158、発明者：小原恭子、小原道法、佐藤正明、西村知裕、出願日：平成20年3月14日、出願人：国立大学法人 熊本大学、(財)東京都医学研究機構、(財)化学及血清療法研究所

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

ステム細胞由来肝細胞のウイルス感染研究への応用

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室・独立室長

研究要旨：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 ウイルスの複製系を立ち上げた。肝細胞分化に伴って発現する non-coding-small RNA である microRNA122 の発現が、ウイルスの複製に重要であることを microRNA122 のアンタゴニストを用いることで証明した。これらの結果から、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞から分化した肝細胞様細胞には HCV ウイルス複製能があり、その性質の一部は microRNA によって制御されていることを証明した。この培養系を HCV ウイルスの複製研究や治療薬開発に用いる基礎情報を得ることが出来た。

A. 研究目的

間葉系幹細胞等のステム細胞から in vitro においてヒト肝細胞を分化誘導する系を構築し、この細胞を用いて肝炎ウイルスの感染から増殖機構解明のための基盤技術構築に貢献する。

間葉系幹細胞を母体とするヒト肝細胞が肝炎ウイルスの感染系として有用であることがわかれば、抗ウイルス薬の開発に貢献するばかりでなく、ウイルス感染や増殖のメカニズム開明に大きく寄与する。また肝炎ウイルスを背景とする肝がんに関連する microRNA の発見は、ウイルス性肝発がんのメカニズム解明に重要な知見となる。

B. 研究方法

岡山大学の加藤班員と共同で、間葉系幹細胞から in vitro で分化した肝細胞に、HCV の RNA を遺伝子導入し、ウイルスの複製系を確立し、さらに抗ウイルス薬のスクリーニング系としての基盤作成に取り組んできた。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)によって解析した。さらに下遠野主任研究員との共同研究で、分化誘導した肝細胞の不死化細胞株について、

microRNA122 の発現解析等を実施した。

(倫理面への配慮)

本報告に関わ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使用された。

C. 研究結果

1) 肝細胞分化誘導系の改良

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。

(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

3 年間の研究で脂肪組織由来の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が証明された。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

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。

F. 健康危険情報

本研究では健康を危惧する細胞、方法論などはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

1. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn*, 238: 265-276, 2009

2. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 70-77, 2009

3. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. *Stem Cells for Hepatic Regeneration:*

the Role of Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* in press.

4. Ochiya T., Yamamoto Y., Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, in press

5. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T., Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. *Am J Pathol.*, 75: 1975-1983, 2009

6. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26: 2705-2712, 2008

7. Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275:1260-1273, 2008

8. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007

9. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007

2. 学会発表

(海外)

1. Ochiya T. microRNAi-meeting. RNAi World Congress 2009, Boston, USA. May 12-13
2. Ochiya T. CRS (Controlled Release Society). 36TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen, Denmark. July 16-24
3. Ochiya T. SRC. 9th Jenner Glycobiology and medicine symposium, Brussels, Belgium. September 12-18
4. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in liver disease. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
5. Yamamoto Y, Ochiya T. Global expression

profiling of miRNA in liver development. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA

6. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose derived stem cells on liver failure. The 2nd International Symposium on Regenerative Medicine and Stem Cell Research. 2008, Seoul, Korea
7. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. The Right RNAi Meeting in 2008, Brussels, Belgium

(国内)

8. 「間葉系幹細胞肝細胞による再生医療」、落谷孝広、第 10 回 日本肝臓医生物研究会 (2009.4.18-19 金沢)
9. 「幹細胞由来肝細胞の定義づけに関する勉強会」、落谷孝広、The Okayama 2009 Joint Conference of CTS & JSOPMB 会議 (2009.4.20-21 岡山)
10. 「small RNA の drug delivery system の開発」(先端技術シンポジウム)、落谷孝広、第 82 回日本内分泌学会・招待講演 (2009.4.24 群馬)
11. 「ヒト間葉系幹細胞を用いた薬物の安全性・毒性試験」、落谷孝広、日本薬物動態学会 第 2 回ビジョンシンポジウム (2009.6.5-6 東京大学)
12. 「micro RNA as a Novel Modality for Cancer Therapy」、落谷孝広、第 2 回 DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo (2009.7.7-9 がんセンター研究所)
13. 「核酸デリバリーが拓く non-coding small RNA による疾患解明」、落谷孝広、遺伝子・デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム (2009.7.9-11 大阪)
14. 「microRNA によるがんの診断治療」、落谷孝広、第 1 回日本 RNAi 研究会 (2009.8.28-29 広島大学)
15. 「マイクロ RNA によるがんの診断と治療」、落谷孝広、第 68 回日本癌学会学術総会 (がんにおける microRNA 制御異常シンポジウム/講演) (2009.10.1-3 横浜)
16. 「RPN2 による糖鎖修飾を介した薬剤耐性、浸潤転移の制御機構」、落谷孝広、第 82 回日本生化学会学会 (/講演) (2009.10.21-25 神戸)
17. 「RNAi-based oligonucleotides therapy」、落谷孝広、Kashiwa Symposium on Cancer

Biology 2009 (2009.11.13 がんセンター東病院)

18. 「microRNA による Cancer Stem Cell Therapy の可能性」、落谷孝広、第 32 回日本分子生物学会 (講演) (2009.12.9-12 横浜)
19. 幹細胞の持つ肝細胞分化能と肝疾患治療効果、落谷孝広、第 15 回肝細胞研究会総会 (2008. 6. 27-28 静岡)
20. Transgenic Rat for Establishment of Embryonic Stem Cells. Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
21. 「Organ Biology における再生医学の役割」 - ヒト間葉系幹細胞による肝再生医療の実現に向けて -、落谷孝広、(シンポジウム) 第 35 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 (2008. 11. 22-23 東京)
22. 脂肪に由来する間葉系幹細胞の創薬・治療研究への応用、落谷孝広、第 8 回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー (2009. 1. 27 大阪)
23. マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる microRNA の同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特に無し

分担者研究課題名：「肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義」

分担研究者 機関名 所属： 杉山和夫 慶應義塾大学 医学部

研究要旨

近年 C 型肝炎ウイルス (HCV) の欠損ゲノムが報告されているが、その臨床的、ウイルス学的意義は不明である。本研究においては肝炎患者に存在する HCV ゲノム多様性のひとつとして HCV 欠損ゲノムの臨床的、ウイルス学的意義の解明を行った。52 例の慢性 C 型肝炎患者血清のうち 14 例 (27%) に欠損ゲノムが存在することがわかった。欠損ゲノムは高ウイルス血症 (2000KIU/ml 以上) において有意に頻度が高く、インターフェロン治療抵抗性との関連が認められた。欠損ゲノムでは構造領域が広範囲に欠失していたが、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なかった。本研究で解析した限り全ての欠損クローン (4 症例 38 クローン) において、欠失は *in-frame* で欠損ゲノムは翻訳可能であり、また、分子系統樹的にも欠損ゲノムが独自に複製、進化していることが示された。また、*in vitro* の感染培養実験系の結果、HCV 欠損ゲノム RNA に構造領域をトランスに供給することで、複製可能な HCV 欠損ゲノム感染性ウイルス粒子が産生されることが明らかとなった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムは著しい多様性を有しているが、近年、C 型肝炎ウイルス (HCV) の欠損ゲノムが C 型肝炎患者血清に存在することが報告されている。しかし、これらが肝臓で増殖しうるのか、また、感染性のウイルス粒子を形成するのかは不明である。また、C 型肝炎の病態との関連も不明である。本研究では HCV 欠損ゲノムと臨床的因子との関連を明らかにするとともに、HCV 欠損ゲノムの遺伝子解析および培養細胞感染実験によって HCV 欠損ゲノムが *in vitro* で感染、複製を行うかどうかをウイルス学的に明らかにしようとした。

B. 研究方法

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た。増幅は (i) 5' 非翻訳領域から NS3、(ii) NS3 から NS5B、(iii) 5' 非翻訳領域から NS5B の 3 領域に対して行った。まず 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・肝細胞癌合併、インターフェロン治療効果など) との関連を検討した。

次に、欠失領域を正確に同定するために、欠損ゲノムの PCR 産物をクローニングし、その塩基配列を分子系統樹法などにより解

析し、遺伝子変異、分子進化などから個体内での欠損ウイルス複製の可能性を検討した。また、実際の患者から得られた欠失 HCV RNA を合成し、培養肝細胞 Huh7 にトランスフェクションすることでその複製能を *in vitro* で検討した。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 HCV RNA に構造領域をトランスに供給させることにより Huh7 細胞で欠損 HCV ウイルス粒子を産生させ、Huh 細胞に感染し、複製を行うかどうかを確認した。

(倫理面への配慮)

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する。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、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。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した。

C. 研究結果

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) があった。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損を導入し欠損変異体を作製した。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。

D. 考察

ウイルスゲノムの欠損は defective interfering (DI) として 1970 年に初めて報告された。DI とは部分的に欠損したゲノムをもつウイルスが、野生型の全長 (ヘルパー) ウイルスとの共存によりウイルス粒

子を形成し、全長ウイルスの複製を抑制 (interfering) する現象である。DI ウイルスは主に培養細胞系において高タイトーのウイルスを持続的に感染させることによって自然発生してくる。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。

DI ウイルスは上述のようにウイルス感染培養系における *in vitro* の現象であったが、一部のウイルスでヒトにおいても欠損ゲノムが検出されている。しかし、それらの臨床的意義は明らかになっていない。今回、臨床的に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損変異が起こ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生もある。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 箇所のは 1 クローン報告されているが、3 箇所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かと推定される。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。

E. 結論

欠損ゲノムがC型慢性肝炎患者血清から比較的高頻度(27%)に検出された。欠損ゲノムでは構造領域が広範囲に欠損していたが、コアタンパク領域および非構造タンパク領域は常に保存されていた。欠損ゲノムと高ウイルス血症およびインターフェロン感受性に関連が認められた。本研究で調べた限り、全ての欠損クローンの欠損は

in-frame であった。また、分子系統樹的解析により、欠損ゲノムが独自に複製、進化していると考えられた。また、欠損 HCV ゲノム RNA に構造領域が供給されることで、欠損 HCV ゲノムが複製可能な感染性ウイルス粒子として産生されることがウイルス学的に明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno K W, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku, H and Shimotohno K. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. J Virol. 83(13): 6922-6928, 2009
- 2) Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, and Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85: 217-228, 2009
- 3) 日紫喜隆行, 杉山和夫. C 型肝炎ウイルスの増幅機構. The CELL 細胞 41:226-229, 2009

2. 学会発表

- 1) Sugiyama K, Hishiki T, Ogawa K, Shimizu Y, Funami K, Nakazawa T, Saito S, Saito H, Takaku H and Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro._16th International symposium of hepatitis C virus and related viruses, Nice, France, 2009
- 2) Hishiki T, Tobita R, Shimizu Y, Ogawa K, Funami K, Miyanari Y, Osaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Sugiyama K and Shimotohno

K. Apolipoprotein E is essential for infectivity of hepatitis C virus.

16th International symposium of hepatitis C virus and related viruses, Nice, France, 2009

- 3) Shimizu Y, Hishiki T, Ogawa K, Funami K, Osaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Sugiyama K and Shimotohno K. Lipoproteins are involved in infectivity of the HCV particle. 16th International symposium, Nice, France, 2009
- 4) Sugiyama K, Saito S, Nishiguchi S, Saito, H and Shimotohno K. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus with Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. The 68th annual meeting of the Japan cancer association, Yokohama, Japan, 2009
- 5) 杉山和夫, 中澤貴秀, 斉藤 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学術集会, 東京, 2009
- 6) 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学術集会, 東京, 2009
- 7) 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, 宮成悠介, 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 およびアポリポプロテインの機能解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

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

分担者研究課題名
HCV 感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析

分担研究者
丸澤宏之 京都大学医学研究科消化器内科 講師

研究要旨 C型肝炎ウイルス(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が明らかとなった。AID の発現の結果、さまざまな発癌関連遺伝子に体細胞変異が生じることが、肝癌の発生に重要な役割を果たしているものと推定された。同時に、宿主肝細胞に生じる染色体の欠失領域にはインターフェロンのシグナル伝達に關与する遺伝子が含まれていることが明らかとなり、HCV の慢性感染後の病態形成、ならびにウイルス排除への抵抗性獲得に AID 発現が深く關与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトの発癌過程においては、種々の癌遺伝子・癌抑制遺伝子に体細胞変異の蓄積が高頻度に生じることが広く知られている。C 型肝炎ウイルス(HCV)感染による慢性肝炎や肝硬変を背景に肝癌が発生する過程に際しても、宿主肝細胞にさまざまな遺伝子変異が惹起されることが腫瘍細胞の発生に重要な役割を果たしていると思定されている。事実、ヒト肝癌組織の臨床検体の解析からは、*p53* や *β-catenin* などのさまざまな癌抑制遺伝子や癌遺伝子を含む領域の染色体欠失や遺伝子変異が存在することが示されており、HCV 感染とその結果生じる炎症反応を契機に、宿主肝細胞にさまざまな遺伝子異常が惹起されているものと想定されている。しかしながら、HCV 感染からの発癌過程における遺伝子異

常生成の分子機序に関しては大部分が不明のままであり、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌 (Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)や一部の消化器癌で認められるような DNA 修復遺伝子の異常はヒト肝癌では稀とされている。

我々は、DNA 修復系以外の要因が肝発癌過程における遺伝子変異生成に寄与しているものと想定し、遺伝子編集機能をもつ Apolipoprotein B 100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family 分子の一員である Activation-induced cytidine deaminase (AID)に着目した。AID は、活性化 B 細胞において免疫グロブリンの可変領域に高頻度に体細胞突然変異を引き起こす DNA の編集酵素である。AID の遺伝子変異導入機能により、ヒトは多種の外来抗原に対応する多様な抗体

を産生することができることが可能となっている。しかしながら、AID の過剰発現がその遺伝子変異の導入活性を介して、ヒトリンパ系悪性腫瘍の発症と深く関与していることが近年明らかになってきた。また、これまでのわれわれの検討からは、ヒト癌の発生過程における遺伝子異常の生成にこのAIDのもつ遺伝子編集活性が重要な役割を果たしている可能性が高いことがわかってきた。そこで本研究では、このAIDによる遺伝子変異導入活性に着目し、HCV感染による慢性肝疾患からの肝発癌過程における遺伝子変異の生成と蓄積にAIDが関与している可能性を探求することを目的とした。

B. 研究方法

(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、ウィ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)AID transgenic mouse は高率にリンパ系悪性腫瘍を発生することがすでに報告されているが、このAID transgenic mouse の上皮系組織における表現型の詳細な解析を行う。

(4)ヒト臨床検体を用いて、慢性肝炎、肝硬変、肝癌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。

(5)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。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」に準拠し、所属機関の研究倫理委員会に申請し承認を得る。動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」や「実験動物の飼育および保管に関する基準」及び「大学における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるように配慮する。

C. 研究結果

(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- α はともに、細胞内で転写因子 NF- κ B を活性化することが共通の特徴である。そこで、NF- κ B 阻害剤、IKK- α , IKK- β の dominant negative form や IKK- γ に特異的な siRNA を用いて細胞内 NF- κ 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、胃に肝癌や肺癌、胃癌を発生することが明らかとなった。また、これらの発癌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、肝癌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) ヒト肝癌の発生過程において、癌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癌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 感染からの肝発癌過程において、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、レンチウィ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癌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、著明に減少してく

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、インターフェロニンシグナル伝達に関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ニ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。

D. 考察

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、さまざまな発癌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癌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癌に至る過程において、体細胞変異とともに染色体レベルでの遺伝子異常（転座、欠失など）の生成にも、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癌と関連した病的状況になると発現誘導され、細胞内でさまざまな遺伝子異常を引き起こすことで、肝癌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

癌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ニ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、肝癌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、インターフェロニ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ニ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。

E. 結論

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- κ B が活性化された結果、異所性に AID が発現誘導されることが明らかとなった。AID の遺伝子編集酵素活性により、肝細胞に塩基レベルとともに染色体レベルでの遺伝子異常が生成されることが、ヒト肝癌の発生、ならびに HCV の慢性持続感染の成立やインターフェロニン治療抵抗性の獲得といった病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Chiba T and Marusawa H. A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction. J Mol Med. 87(10):1023-1027,2009

- (2) Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene*. 28: 469-478, 2009
- (3) Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat*. 16: 388-396, 2009
- (4) Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer*. 123: 2735-2740, 2008
- (5) Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*. 135: 889-898, 2008
- (6) Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 27: 6002-6011, 2008
- (7) Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 1399-1402, 2008
- (8) Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Uemoto S, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 47: 888-896, 2008
- (9) Kou T, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Okazaki IM, Ueda Y, Kodama Y, Haga H, Ikai I, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 120: 469-476, 2007
- (10) Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*. 13: 470-476, 2007
- (11) Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. *Oncogene*. 26: 5587-5595, 2007

2.学会発表

- (1) 丸澤宏之、千葉勉.炎症発癌におけるゲノム不安定性誘導機序の解析とその標的治療.第 37 回日本臨床免疫学会総会.東京. 2009/11/14
- (2) 千葉勉、丸澤宏之.炎症からの発癌における新しい遺伝子変異導入機構.第 82 回日本生化学会大会.神戸. 2009/10/22
- (3) 丸澤宏之.消化器癌の発生過程において炎症が遺伝子異常の生成に果たす役割.第 51 回日本消化器病学会大会・第 13 回日本肝臓学会大会 合同.京都. 2009/10/15
- (4) 和田将弥、丸澤宏之、千葉勉.C 型肝炎ウイルス感染により惹起されるインターフェロン関連遺伝子異常.第 51 回日本消化器病学会大会・第 13 回日本肝臓学会大会 合同.京都.2009/10/15
- (5) 高井淳、丸澤宏之、千葉勉.肝幹/前駆細胞への遺伝子異常蓄積からの肝発癌機序.第 51 回日本消化器病学会大会・第 13 回日本肝臓学会大会 合同.京都.2009/10/15
- (6) 丸澤宏之.炎症発癌における遺伝子異常の分子機構.第 68 回日本癌学会学術総会.横浜.2009/10/02
- (7) 森澤利之、丸澤宏之、岡崎一美、本庶佑、千葉勉.AID による遺伝子変異生成を介した消化器発癌機構.第 81 回日本薬理学会年会・学術集会.横浜.2008/3/17-19
- (8) 丸澤宏之.炎症からの消化器癌発生機序－AID による遺伝子変異導入機構－.第 185 回日本消化器病学会東北支部例会.秋田.2008/7/11
- (9) 森澤利之、丸澤宏之、千葉勉. AID による遺伝子変異生成を介した消化器発癌機構.第 50 回日本消化器病学会大会.東京. 2008/10/1-4
- (10) 高井淳、丸澤宏之、千葉勉.肝前駆細胞における遺伝子変異の蓄積が肝発癌に果たす役割.第 12 回日本肝臓学会大会.東京. 2008/10/1-3
- (11) 丸澤宏之.慢性肝疾患からの肝癌発生の分子機序～遺伝子変異が出現する普遍的な仕組みの探求～.第 12 回日本肝臓学会大会.東京. 2008/10/1-3
- (12) 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、高忠之、藤井茂彦、藤盛孝博、千葉勉. Activation-induced cytidine deaminase serves as a link between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. 第 67 回日本癌学会総会・学術集会.名古屋. 2008/10/28-30
- (13) 高井淳、丸澤宏之、日合弘、千葉勉、木下和生. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by activation-induced cytidine deaminase(AID). 第 67 回日本癌学会総会・学術集会.名古屋. 2008/10/28-30
- (14) 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、本庶佑、千葉勉.発癌過程における遺伝子異常の生成への Activation-induced cytidine deaminase(AID)の関与.第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会.神戸. 2008/12/9-12.
- (15) 森澤利之、丸澤宏之、岡崎一美、本庶佑、千葉勉. AID による遺伝子変異生成を介した消化器発癌機構.第 81 回日本薬理学会年会・学術集会.横浜. 2008/3/17-19.
- (16) 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、高忠之、千葉勉. C型慢性肝疾患からの肝発癌における遺伝子変異蓄積の分子機序.第 15 回日本消化器病関連学会週間.神戸. 2007/10/18-21.

- (17) 森澤利之、丸澤宏之、岩井晃男、木下和生、千葉勉. Organ-specific genetic alterations in the liver, stomach and lung cancers caused by the mutagenic activity of AID. 第66回日本癌学会総会・学術集会. 横浜. 2007/10/3-5.
- (18) 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、高忠之、千葉勉. Hepatitis C virus triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in human hepatocytes. 第66回日本癌学会総会・学術集会. 横浜. 2007/10/3-5.
- (19) 丸澤宏之、遠藤容子、千葉勉. The AID transgenic mouse, a model for inflammation-associated carcinogenesis in digestive organs. 第66回日本癌学会総会・学術集会. 横浜. 2007/10/3-5.
- (20) Marusawa H, Matsumoto Y, Kinoshita K, Endo Y, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase contributes to gastric carcinogenesis through the accumulation of genetic alterations. Annual Meeting of American Association of Cancer Research. San Diego, USA, 2008.4.12-16
- (21) Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase serves as a link between inflammation to colitis - associated colorectal cancers. Annual Meeting of American Association of Cancer Research. San Diego, USA, 2008/4/12-16
- (22) Takai A, Marusawa H, Endo Y, Hiai H, Chiba T, Kinoshita K. A new mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by activation-induced cytidine deaminase. Annual Meeting of American Association of Cancer Research. San Diego, USA, 2008/4/12-16
- (23) Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links liver inflammation to human hepatocarcinogenesis. Keystone Symposia, Beijing, China, 2007/10/14-19
- (24) Marusawa H. Activation-induced cytidine deaminase links liver inflammation to human hepatocarcinogenesis. Keystone Symposia, Beijing, China, 2007/10/14-19.
- (25) Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Kou T, Morisawa T, Okazaki IM, Hiai H, Honjo T, Chiba T. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. 100th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, Los Angeles, USA, 2007/4/14-18.

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