

2009 3300 7A

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

B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の
病態解明とその予防・治療法の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成22(2010)年 3月

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

B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の
病態解明とその予防・治療法の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成22(2010)年 3月

B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究

班員名簿

班長	林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	教授
班員	松浦 善治	大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野	教授
	小池 和彦	東京大学医学部 消化器内科学	教授
	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科 感染免疫医学講座ウイルス学	教授
	井戸 章雄	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学	准教授
	中本 安成	金沢大学医学部附属病院 消化器内科学	講師
	広石 和正	昭和大学医学部 消化器内科学	准教授
	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	准教授
	考藤 達哉	大阪大学大学院医学系研究科 樹状細胞制御治療学	寄附講座准教授

[事務局]

大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘二番二号

Tel: 06-6879-3621

Fax: 06-6879-3629

目 次

I. 総括研究報告書

- B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究 1
林 紀夫

II. 分担研究報告

1. 肝病態とIFN感受性におけるHCVコア蛋白質の役割 4
松浦 善治
2. C型肝炎における代謝障害と酸化ストレスのTacrolimus(FK506)による改善 8
小池 和彦
3. B型肝炎ウイルスレセプターの分離・同定とその応用に関する研究 14
上田 啓次
4. オステオアクチピンの肝障害、肝線維化における役割の解析 16
井戸 章雄
5. ウイルス性肝炎・肝がんにおける免疫制御に関する研究 21
中本 安成
6. サイトカインを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討 23
広石 和正
7. 肝癌細胞に対するSorafenibによるMICA sheddingの制御機構 25
竹原 徹郎
8. C型慢性肝疾患、肝癌における制御性T細胞の意義 28
考藤 達哉

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 42

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
総括研究報告書

B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明と
その予防・治療法の開発に関する研究

研究代表者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標として、1) 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明とその制御法の開発、2) 肝がんの特徴的な遺伝子発現の解明とその診断への応用、3) 微視的な肝がんに対する免疫排除機構の障害の解明とその制御法の開発に焦点をしばって研究を行う。3年計画の3年目にあたる本年度において、HCV コア蛋白のアミノ酸置換が遺伝子発現とシグナル伝達に与える影響の解析、HCV コア蛋白の病態形成に対するタクロリムスの効果の検討、C型肝炎・肝がんの免疫抑制機序として可溶性 MICA の shedding の分子機構の解明、肝がん治療における制御性 T 細胞やがん抗原特異的 T 細胞の動態の解明等に進展がみられた。

A. 研究目的

わが国において増加しているウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡の抑止を目標とする。ウイルス性肝炎からの肝がんの発生および進展を、1) ウイルスの持続感染と細胞機能の修飾、2) 肝細胞における遺伝子異常の蓄積と細胞のがん化、3) がん化した細胞の免疫応答からの回避と顕性肝がんへの進展の3つのステップに分け、それぞれの病態とその成立機序を分子・細胞レベルで解明する。各ステップをターゲットとした制御法を開発し、ウイルス性肝炎から肝がんの発生抑止法と肝がんに対する治療・再発抑止法の構築を

図るとともに、肝がんの早期発見と治療に有用な診断マーカーの開発を行うことを目的に研究を行う。

B. 研究方法

1) 肝炎ウイルスの増殖・発がん機構の解明と発がん抑止法の開発(松浦、小池、上田)

- HBV レセプターの全容を解明し、HBV 持続感染に伴う肝がんの発症機構を検討する。
- 培養細胞系を用いて HCV コア蛋白のアミノ酸置換のシグナル伝達への影響を検討する。
- HCV コア蛋白による酸化ストレス、発

がんに対するミトコンドリア保護の効果を Tg マウスを用いて検討する。

2) 肝がんの免疫病態の解明と再発抑制を目指したがん免疫治療法の探索(井戸、中本、広石、竹原、考藤、林)

- C型肝炎におけるオステオアクチビンの影響を血清濃度の測定、SNP 解析により検討する。
- 肝がん細胞株における MICA 分泌機序を ADAM ファミリー分子のノックダウンおよび各種抗癌剤の影響の視点から解析する。
- 肝がんにおける腫瘍標的抗原に対する T 細胞応答を治療介入の前後で ELISPOT 法にて検討する。
- 肝がんに対する IL-4、CpG の治療効果を動物モデルで検討する。
- 肝がんに対する制御性 T 細胞の動態を治療の前後で検討する。

C. 研究成果

HBV レセプターの分離・同定

HBV の preS1 領域に対する *in vitro* 結合性を指標にしていくつかの候補結合遺伝子を同定した。

HCV コア蛋白のアミノ酸置換と細胞内シグナル伝達

コア蛋白質の 70 番と 91 番のアミノ酸置換は SREBP-1c の転写活性を低下させたが、PA28 γ のプロテアソーム活性化能は関与しないことが示された。また、IFN による IRSE の活性化および STAT1 のリン酸化には影響を示さなかった。コア蛋白質の発現により TGF β 刺激による Smad 応答転写の活性化が認められたが、アミノ酸置換によりその活性は消失した。コア蛋白と STAT3 の結合性および STAT3 応答プロモーターの活性化

がアミノ酸置換で有意に上昇した。

HCV コア蛋白の病態形成におけるタクロリムスの効果

HCV コア Tg マウスにおける発がんにはミトコンドリア機能障害に基づく酸化ストレスが関与している。Tg マウスにミトコンドリア保護効果のあるタクロリムス (FK506) を投与しその効果を検討した。タクロリムスの投与により Tg マウスの肝脂肪化、インスリン抵抗性は著明に改善した。酸化ストレス、DNA 損傷発生も著明に改善した。培養細胞系においてもタクロリムスの同様の効果が確認された。

オステオアクチビンの肝障害、肝線維化における役割

HCV 感染者において血清オステオアクチビン濃度は有意に上昇していた。また、病態の進展に伴い上昇する傾向がみられた。オステオアクチビンの SNP は肝疾患進展の血清マーカーと関連していた。マクロファージ細胞株にてオステオアクチビンの発現を抑制するとサイトカインの産生が低下した。

MICA sheddase の同定とその発現制御

MICA の肝がん細胞からの分泌は細胞膜上の MICA 発現の低下と免疫細胞の NKG2D 発現の低下の両面から肝がんに対する生体の認識機構を障害する。これを媒介する MICA sheddase についてその実態が十分理解されていなかったが、肝がん細胞を用いたノックダウン実験により、ADAM9 が関与していることを明らかにした。ADAM9 は *in vitro* において MICA の細胞質ドメインに対する切断活性を有していた。Sorafenib は ADAM9 の発現を低下させ、これにより肝がんからの MICA の分泌を低下させた。

肝がんにおける制御性 T 細胞の動態

C 型肝炎・肝がんでは疾患が進展するに従い末梢血の中の制御性 T 細胞の頻度が増加した。その傾向は Tr1 でより顕著であった。RFA により完全に腫瘍壊死が得られた患者では Tr1 頻度が低下し再発例では再増加した。肝がん細胞と DC の混合培養により naive CD4 T 細胞から Tr1 が誘導され、その機序にサイトカインと細胞間の接触が関与していた。

肝がんに対する腫瘍抗原特異的 T 細胞応答

肝がん患者に対して TAE+DC 治療を行うと肝がん組織で高発現している腫瘍標的抗原 (AFP, hTERT, MRP3) に対する HLA-A24 拘束性抗原エピープの反応性が高率に誘導された。しかし、抗腫瘍免疫反応の誘導と肝がんの再発抑制効果には明らかな相関は認めなかった。

消化器癌に対する遺伝子治療

IL-4 を遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株と CpG を、野生株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに接種したところ、野生株腫瘍に対する抗腫瘍効果が認められた。腫瘍の縮小には CD8 陽性 T 細胞が関与していた。

D. 考察と結論

HCV コアによる発がんにはミトコンドリア機能の変調に伴う酸化ストレスの増加が関与しているが、これが治療標的になることがタクロリムスの投与実験により明らかとなった。Peg-IFN/RBV 治療効果に影響するコアアミノ酸置換は IFN のシグナル経路には影響を与えなかったが、SREBP-1c 転写活性の低下、TGFβ 効果の減弱、STAT3

の活性化など多彩な生物効果を誘導することが示された。

肝がん患者においては NK 細胞活性の低下や制御性 T 細胞の頻度の上昇がみられ、腫瘍抗原に対する特異的な T 細胞応答は減弱している。肝がんに対する治療は MICA の分泌低下や Tr1 頻度の低下をもたらし、また腫瘍抗原に対する T 細胞応答を誘導することが示された。今後、このような知見を治療法の開発や患者の予後マーカーとして活用していく研究が必要である。

II. 分担研究報告

肝病態と IFN 感受性における HCV コア蛋白質の役割

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染によるインスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症にコア蛋白質が深く関与している。また、ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法における治療効果の予測因子として、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが報告されている。本研究では、コア蛋白質にこれらの変異を導入し、病原性に関与する転写因子である SREBP-1c、TGF β 、STAT3、および、IFN 応答因子の転写活性化の影響を検討した。その結果、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させたが、PA28 γ のプロテアソーム活性化能は関与しないことが示された。また、IFN による ISRE の活性化、および、STAT1 のリン酸化にはなんら影響を示さなかった。コア蛋白質の発現により、TGF β 刺激による Smad 応答転写の活性化が認められるが、Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ のいずれかの変異でその活性は消失した。一方、コア蛋白質と STAT3 の結合性、および、STAT3 応答プロモーターの活性化が Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異で有為に上昇した。以上の結果から、コア蛋白質 Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は感染細胞の転写応答に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）のコア蛋白質はヌクレオキャプシドの構成因子としてではなく、病原性因子としても機能することが知られている。我々はこれまでに、コア蛋白質の一部が核へ移行し、プロテアソームの活性化因である PA28 γ に依存した経路で分解されることを明らかにした。また、コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスで観察される、インスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症に、PA28 γ が深く関与していることを報告してきた。一方、ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法による治療効果の予測因子として、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが報告されている。本研究では、コア蛋白質と PA28 γ に変異を導入し、脂肪酸合成遺伝子の発現を調節する転写因子である SREBP-1c、TGF β 、STAT3、および、IFN 応答因子（ISRE）の転写活性化に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

HCV コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ に変異を

導入した発現プラスミドを構築し、SREBP-1c プロモーター、STAT3、Smad 応答エレメントあるいは ISRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポータープラスミドと共に、JFH-1 ウイルスが増殖可能な Huh7-OK1 細胞に導入して活性を評価した。また、PA28 γ のプロテアソームの活性化を変化させた変異体を導入し、PA28 γ のプロテアソームの活性化能とコア蛋白質の転写活性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人權、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCV コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、

SREBP-1c の転写活性を低下させた。しかしながら、これらの変異コア蛋白質は PA28 γ との結合性には変化は認められなかった。また、PA28 γ の発現抑制細胞株にプロテアソーム活性化能を変化させた PA28 γ の変異体をコア蛋白質と共に導入した結果、SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性化能は関与しないことが示された。PA28 γ はコシャペロン活性を保持しており、コア蛋白質による SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性ではなく、コシャペロン活性が関与している可能性が示唆された。次に、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異と IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化を検討したが、コア蛋白質への変異の導入は、IFN 経路に影響を示さなかった。コア蛋白質の発現により、TGF β の刺激による Smad 応答プロモーターの活性化が認められたが、コア蛋白質の Arg⁷⁰ か Leu⁹¹ のいずれかに変異を導入するとその活性化が消失した。また、既報のごとくコア蛋白質と STAT3 の結合が認められたが、コア蛋白質に Arg⁷⁰、あるいは Leu⁹¹ のいずれかの変異を導入することにより、より強固な結合が観察され、さらに、両方の変異を導入することにより結合が強化された。STAT3 応答プロモーターの活性化は、野生型、および Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ のいずれかに変異を導入したコア蛋白質で僅かに上昇したが、Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の両方に変異を導入したコア蛋白質で有為な上昇が認められた。

D. 考察

ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法による治療効果の予測因子として、HCV コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が重要であることが示唆されている。今回の検討では、コア蛋白質の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させることが示された。しかしながら、IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化には影響は認められなかった。また、SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性ではなく、コシャペロン活性が関与している可能性が示

唆された。さらに TGF β に対する Smad の応答がコア蛋白質発現によって強まり、Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異によってそれが解消された。したがって、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異導入によって TGF β による細胞障害作用が減弱されることが考えられる。一方、Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の二つの変異は、STAT3 とコア蛋白質との結合を上昇させるとともに、STAT3 応答プロモーターの有意な活性化を誘導した。このことは STAT3 による細胞の癌化誘導を Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異が強められることを示唆している。今後、コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異と STAT3 との相互作用の詳細な検討が必要と考えられる。

E. 結論

1. コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、SREBP-1c の転写活性を低下させた。
2. コア蛋白質による SREBP-1c の転写活性化には、PA28 γ のプロテアソーム活性は関与しない。
3. コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は、IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化には影響しない。
4. コア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異は TGF β に対する応答を弱め、STAT3 に対する応答を強めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
2. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12986-12991 (2009).
3. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H.,

- Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
- 4 Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7629-7640 (2009).
- 5 Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
- 6 Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
- 7 Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
- 8 Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
- 9 Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Brecht D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
2. 学会発表
- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、10 月 25 日-27 日、2009.
- 2 谷 英樹、塩川 舞、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割、同上。
- 3 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、同上。
- 4 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上。
- 5 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
- 6 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。
- 7 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、同上。
- 8 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
- 9 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
- 10 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日-12 日、2009.
- 11 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21 日-24 日、2009.
- 12 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第 15 回日本遺伝子治療学会、大阪、6 月 10 日-12 日、2009.
- 13 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British

- Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
- 14 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
 - 15 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 16 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
 - 17 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
 - 18 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of *trans*-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
 - 19 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎における代謝障害と酸化ストレスの Tacrolimus (FK506) による改善

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は酸化ストレスの過剰産生を誘発し、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと到る一連の事象を引き起こす。それ以外に、脂質代謝異常、糖代謝異常といった代謝異常を誘発し、その肝発癌への関与も示唆されている。我々は、マウスモデルを用いて、HCVが脂質や糖の代謝異常を起こすことを示してきた。この動物モデルでは、炎症不在下に酸化ストレスの産生が増加しており肝発癌に関与しているが、この酸化ストレス発生にはミトコンドリア機能異常の関与が推察されている。今回我々は、ミトコンドリア保護作用をもつ免疫抑制剤である Tacrolimus (FK506) を HCV コア遺伝子発現トランスジェニックマウスに投与し、酸化ストレスを含む代謝への影響を検討した。3ヶ月間の Tacrolimus の投与によって、コアマウスにおける肝脂肪化、インスリン抵抗性は著明に改善された。さらに、酸化ストレス産生、DNA 損傷発生も著明に改善させた。これらの作用は HepG2 細胞を用いた系においても再現された。Tacrolimus のもつこの作用は C型肝炎における代謝異常、酸化ストレス産生を改善させる手立てとなり、C型肝炎における肝を含む病態の改善あるいは病態進行の抑制のための新たな治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎慢性肝炎と糖代謝異常との関連性は疫学的研究や実験的なシステムによって確認されてきている。また、肝脂肪化等の脂質代謝異常と C型肝炎の関連性も以前より指摘されてきている。これらの代謝異常で注目すべきことは、慢性肝炎すなわち肝の線維化速度との関係である。すなわち、肝脂肪化やインスリン抵抗性の強い C型肝炎慢性肝炎患者においては、線維化の進行が速く短時間で肝硬変になり、これらの代謝異常が C型肝炎の悪化因子であることが指摘されてきている。

C型肝炎慢性肝炎の治療は、現在のところインターフェロンを中心とした抗ウイルス薬によって行なわれてきている。リバビリン併用ペグ・インターフェロンによって、1型高ウイルス量の患者の 50% 近くに HCV 排除が可能となってきているが、残りの 50% の人においては、HCV 排除は現在不可能である。したがって、ウイルス排除できない状態で慢性肝炎の病態を改善させる方法の開発が切望されている。そのような治療法が見いだされれば、C型肝炎慢性肝炎の進行、肝細胞癌発生の予防が可能となり、厚生労働行政上、経済上の意義は極めて大きいと

考えられる。

B. 方法

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスとHCVコア蛋白を発現するHepG2細胞を用いて以下のような解析を行なった。

マウスはSPF下で通常の餌を与えられた。対照として非トランスジェニック兄弟マウスが用いられた。なお、動物実験にあたっては、当施設のガイドラインに則り動物愛護上の配慮を十分に払い、倫理面で問題が生じないように行なった。

HCVコア遺伝子導入トランスジェニックマウス(3ヶ月齢♂)に対し、Tacrolimus(FK506、以下FK)(0.1mg/kg)ならびにplaceboを週3回、腹腔内注射にて投与を行なった。同様に非トランスジェニック兄弟マウスについても、3ヶ月齢♂に対しFKあるいはplaceboの投与を行った後、肝臓の脂質量、構成脂肪酸量、血糖値、インスリン値、細胞遺伝子発現等を検討した。なお、FKあるいはplaceboの投与期間は3ヶ月間である。また、一部のマウスにおいては1/5量のFKの投与を3か月齢から1か月間行なった。

コア蛋白発現HepG2細胞あるいは対照のHepG2細胞株にFKあるいはcyclosporine A(以下、CyA)を投与し、脂質、酸化ストレス産生の状況を解析した。

C. 結果

(1) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスに認められた、①肝組織中の脂肪量の増加(肝脂肪化)、②構成脂肪酸に占める

C16:1(パルミトオレイン酸)、C18:1(オレイン酸)などの一価不飽和脂肪酸の増加、③インスリン抵抗性増強のいずれもが、FK投与によって、placebo投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで有意に改善した。FK投与群の非トランスジェニック兄弟マウスでは、血清インスリン値がやや低下していた。

(2) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいて認められる感染症内科酸化ストレス増加はFK投与によって有意に改善した。肝におけるDNA障害も改善した。

(3) コア蛋白発現HepG2細胞では、FK投与によって細胞内脂質量、一価不飽和脂肪酸が有意に減少した。これに対して、CyAの投与では減少は認められず、むしろ増加傾向を示した。

(4) コア蛋白発現HepG2細胞では、FK投与によって酸化ストレス産生が有意に減少した。これに対して、CyAの投与では減少は認められず、むしろ増加傾向を示した。

(5) 酸化ストレス産生の機序としてミトコンドリア障害、これによる細胞内へのNADHの蓄積が考えられている。FKの投与はコア遺伝子トランスジェニックマウス肝、コア蛋白発現HepG2細胞内のNADH/NAD⁺比を有意に改善させた。

(6) FK投与はコア遺伝子トランスジェニックマウス肝におけるTNF- α 、SREBP(sterol regulatory element binding protein)-1c、SCD(stearoyl Co-A desaturase)-1などの原因(介在)遺伝子の発現レベルを改善させた。すなわち、HCVコア蛋白のC型肝炎病態を惹起する作用をFKは打ち消す様に働くことが推定された。

D. 考察

HCV コア蛋白による肝臓の脂肪化にはミトコンドリア障害が関与していることが強く示唆されている。FK は核カルシニューリンへの作用とともにミトコンドリア機能保護作用をもち、広く臨床への応用が行われつつある。今回の我々のデータから、FK の有するミトコンドリア保護作用を介して、HCV コア蛋白によって誘発される脂質代謝異常、インスリン抵抗性、酸化ストレス過剰産生のいずれもが改善することが示された。さらに、酸化ストレス産生、DNA 損傷発生も著明に改善させたことは重要であり、HCV 排除のできないC型慢性肝炎患者における病態改善、肝細胞癌発生の抑制の可能性が示唆された。

E. 結論

FK によってHCV感染症における代謝異常が改善されることが示された。ミトコンドリア保護作用によることが推測された。少量のFKでも同様な効果が得られ、HCV感染症により引き起こされる肝脂肪化、インスリン抵抗性、酸化ストレス過剰産生の抑制が可能であることが示された。C型肝炎の病態解明と病変進行の予防に極めて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi

T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. J Med Virol 2010 in press.

- 2) Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Okamoto M, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Nagase Y, Suzuki Y, Matsunaga K, Ishii T, Matsumoto N, Koike K, Suzuki M, and Itoh F. Effect of nucleoside analogue-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B. Hepatol Res 2010 in press.
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. J Atheroscler Thromb 2010 in press.
- 4) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. J Gen Virol 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 5) Hmwe SS, Aizakia H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]
- 6) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K,

- Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]
- 7) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Impact of changes in waist circumference and BMI over one-year period on serum lipid data in Japanese individuals. *J Atheroscler Thromb* 2009 Dec 22. [Epub ahead of print].
- 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. *J Rheumatol* 2009 Dec 23. [Epub ahead of print].
- 9) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Impacts of changes in obesity parameters for the prediction of blood pressure change in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:421-427.
- 10) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M, PERFECT STUDY GROUP. Prolonged treatment with PEG-IFN α -2b and ribavirin can improve SVR in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2009 Sep 25. [Epub ahead of print].
- 11) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and pathogenesis of liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010 in press.
- 12) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* 2010 in press.
- 13) Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: Analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol* 2009;175:1515-1524.
- 14) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009;50:378-386.
- 15) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res* 2009;39:657-663.
- 16) Ishizaka Y, Ishizaka N, Tani M, Toda A, Toda EI, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney

- disease in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:141-149.
- 17) Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts hepatic Smad3-mediated signaling from tumor-suppression to oncogenesis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:1203-1217.
- 18) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2009;284:3513-3520.
- 19) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2009;204:619-623.
- 20) Koike K. Steatosis, Liver injury and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 21) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2009;23:480-487.
2. 学会発表
- 1) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H. The HNRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. p177, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009.
- 2) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: Branched chain amino acids ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance in hepatitis C mouse model, p125, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009
- 3) Ohki T, Akahane M, Yamashiki N, Goto E, Enooku K, Sata T, Masuzaki R, Kondo Y, Tateishi R, Inoo S, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Ortomo K, Koike K, Omata M. A prospective randomized study to elucidate the efficacy of computed tomography with hepatic arteriography and arterial portography (CTA/P) as a pre-treatment examination among patients with small hepatocellular carcinoma: a preliminary report. #926, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 4) Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Goto E, Enooku K, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Ortomo K, Koike K, Omata M. Proposal of surveillance program for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C using comprehensive scoring system and stratum specific likelihood ratio. #1756, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 5) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inue Y,

Nishkawa T, Watanabe N, Ikeda H, Koike K,
Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Shirataki
H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin
may reflect malignant potential of
hepatocellular carcinoma. #1776, 60th
Annual Meeting of the American
Association for the Study of Liver Diseases,
Boston, 2009.

6) K Koike. Animal models in HCC research.
3rd International Kobe Liver Symposium on
HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific
Session, Kobe, 2009.

7) K Koike. HIV and HCV co-infection in
Japan. US-Japan Joint AIDS-Hepatitis
Meeting, Portland, USA, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

B 型肝炎ウイルスレセプターの分離・同定とその応用に関する研究

研究分担者 上田 啓次 大阪大学院医ウイルス学 教授

研究要旨：B 型肝炎ウイルス（HBV）の感染受容体の実態を解明し感染系を樹立することで病態の解明、治療法の開発に役立てるべく HBV 膜蛋白結合因子の同定を試みた

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）はそのウイルスの発見から既に 40 年余が経過するが、その感染受容体の実態は全く不明である。このことは本ウイルスの感染・増殖機構の解明はもちろんのこと本ウイルス感染がもたらす病態発症の機構の解明やそれに根ざした治療法の開発の大きな障壁となっている。

そこで本計画では以下の方法によりその分離・同定と感染系樹立への応用を試みた。

B. 研究方法

- 1) HBV 感染受容体のリガンドとしての可能性の高い preS1 領域を GST-preS1-His6 の構築で大腸菌において大量発現、高度精製する。
- 2) 上記精製タンパクを用い、ヒト肝臓、胎盤などの cDNA フェージ発現ライブラリーを結合性を指標にスクリーニングする。
- 3) 候補因子の全長 cDNA を獲得し、哺乳類培養細胞発現させ、受容体としての活性を検定する。
- 4) 受容体としての活性が確認されたら、培養細胞系、マウス個体レベルでの感染系を樹立する。

C. 研究結果

pGEX5 に GST-preS1-His6 を構築し、大腸菌で発現、Glutathion-Sepharose と Ni-NTA アガースを用いて二段階精製を行い、純度 90%以上とした。本評品を用いて 150 万 200 万個のヒト胎盤 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、膜系遺伝

子産物をコードする 4 つの候補因子 cDNA（HBV-R1、-R2、-R3 及び R4）を得た。さらにそれらの全長 cDNA を獲得し、哺乳類培養細胞発現系に構築した。現在、肝癌由来の培養肝がん細胞（HepG2 や Huh7）を用いてトランスフェクションによる発現実験と感染性について検討中である。

D. 考察

HBV 感染受容体の HBV 側リガンドは preS1 にあるとされ、それに基づいて研究を進めたが、今後はその他の領域も考慮する必要があると必要と思われる

E. 結論

HBV の preS1 領域に対する *in vitro* 結合性を指標にして幾つかの候補結合遺伝子を同定した。本遺伝子産物が真の HBV 受容体であるかどうかをまずは培養細胞系を用いて慎重に検討していく

F. 研究発表

1. 論文発表

上田啓次 ヘルペスウイルス学のエッセンス 化学療法の領域（印刷中）

2. 学会発表

上田啓次、大崎恵理子、鈴木 亨、
B 型肝炎ウイルス（HBV）pseudotype の作製の試みと感染系樹立への応用