

2009330071B

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19年度～21年度 総合研究報告書

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19年度～21年度 総合研究報告書

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
T e l : 0 6 - 6 8 7 9 - 3 6 2 1
F a x : 0 6 - 6 8 7 9 - 3 6 2 9

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PA28 γ とHCVコア蛋白質の役割	6
松浦 善治	
2. 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	11
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	21
上田 啓次	
4. 慢性C型肝炎の病態進展因子および肝発癌関連因子の解明	23
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	30
中本 安成	
6. 消化器癌に対するサイトカインによる免疫療法	33
広石 和正	
7. 肝癌細胞における可溶性MICA分泌の分子機序	37
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	42
考藤 達哉	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	46
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	64
-----------------	----

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）
（総合）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った。C型肝炎ウイルスコア蛋白による発がんは PA28 γ による核内イベントとミトコンドリアの機能障害が関与することを明らかにした。コア蛋白のアミノ酸置換は宿主細胞に対して多彩な影響をおよぼすことを示した。患者血清の網羅的な解析から C型肝炎における持続的 ALT 正常を特徴づける蛋白ピークとして C4 由来のものを同定した。肝がん患者に対する治療介入により、MICA/NKG2D 経路による NK 細胞機能の回復、制御性 T 細胞の低下、肝がんに対する T 細胞応答が誘導されることを明らかにした。肝がんからの MICA の分泌は NK 細胞による認識を低下させるが、この分子メカニズムとして ADAM9、ADAM10 が関与していることを明らかにした。Sorafenib や epirubicin はこれらの ADAM ファミリー蛋白の発現を抑制し、MICA 分泌抑制を介して NK 認識を回復することが示された。本研究により、HCV コア蛋白による発がんメカニズムが解明され、肝がんに伴う NK 細胞、制御性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の免疫病態が明らかにされた。

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。
- Tg マウスを用いてHCVコア蛋白による発がんメカニズムを解明する。
- HCVコア蛋白によるERストレスとインスリン抵抗性が肝発がんに与える意義について解析し、ER ストレスとインスリンシグナルを標的とした発がん抑止法を開発する。

2) 肝がんのバイオマーカーの開発(井戸)

- 患者血清を網羅的プロテオーム解析し、新規のバイオマーカーを同定する。

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

- 肝がんにおける樹状細胞、NK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の機能を分子レベルで解析し、自然免疫の動態を包括的に明らかにする。自然免疫機能の障害の分子基盤を解明し、自然免疫を活性化する方策について明らかにする。
- 肝がんにおいて検出される特異的 T細胞応答を解析し、がん免疫治療の効果の判定に有用な免疫モニタリングシステムを構築する。

C. 研究成果

1) HCV コア蛋白による発がん機構

HCV コア蛋白による病態形成

コア蛋白質の一部は核へ移行し、PA28 γ と結合してプロテアソームで分解される。コアTgマウスでみられる肝脂肪化と発がんはPA28 γ 欠損により消失した。SREBP-1cの転写は核内受容体型転写因子であるRXR α とLXR α 、および共役転写因子によって制御されている。核へ移行したコア蛋白質は、PA28 γ と相互作用して、RXR α とLXR α 、あるいは共役転写因子に作用して、SREBP-1cの転写を増強させて中性脂肪の発現を上昇させると思われる。HCV コア蛋白質とPA28 γ の核内での相互作用は、SREBP-1cや酸化ストレス(ROS)の発現を亢進させることによって、コアTg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極めて重要な役割を演じていた。

HCV コア蛋白によるミトコンドリア機能障害

ミトコンドリアのプロテオーム解析により、ミトコンドリア蛋白シャペロンであるprohibitinの発現がHCV コア蛋白発現細胞において増加していた。Prohibitinの発現は、コア蛋白発現HepG2細胞の他に、全長HCVレプリコン細胞やコア遺伝子Tgマウス肝臓においても増加していた。コア蛋白とprohibitinはミトコンドリアに共在していた。Prohibitinが発現増加する機序として、コア蛋白との相互作用により蛋白が安定化されていることが示唆された。さらに、コア蛋白との相互作用によりprohibitinのミトコンドリア蛋白シャペロンとしての機能が阻害され、その結果、cytochrome c oxidase

(COX)の中のミトコンドリア DNA 由来のサブユニット蛋白の発現が低下し、COX 活性が低下していることが示された。今回得られた結果から、コア蛋白と prohibitin の相互作用が HCV による酸化ストレス誘導に関与している可能性が示唆される。タクロリムスはミトコンドリア保護作用を有するが HCV コア Tg マウスにタクロリムスを投与することにより、肝脂肪化、酸化ストレスの産生、DNA 損傷が低減した。ミトコンドリアの保護が HCV コアによる病態形成を改善することが示された。

2) C 型肝炎の新規バイオマーカー

肝機能正常者と肝炎患者の血清において異なるタンパクピークを 10 個同定し、そのなかで C4a フラグメントが ALT 持続正常者で高いことを見出した。ELISA にて同タンパクを測定することにより、HCV 感染に伴い上昇し、疾患の進行に伴い低下するバイオマーカーであることが明らかとなった。

3) 肝がんの免疫病態

MICA/NKG2D 経路を介した NK 細胞による免疫制御と ADAM ファミリーの関与

MICA が正常肝細胞では発現していないが、細胞ががん化すると発現が誘導される。NK 細胞に発現する NKG2D は MICA により活性化される。肝がんに対する免疫応答の始動にこの MICA/NKG2D 経路が重要な役割を担っている。肝がん患者の血清では疾患の進行に従い、可溶性 MICA 濃度が上昇し、これに伴い NK 細胞の NKG2D 発現が低下した。肝がんに対する治療介入は可溶性 MICA を低下させ、NKG2D 発現を回復した。このことは、MICA が肝がんから切断を受け血中に分泌され、それにより肝がんに対する免疫応答が減弱することを示唆している。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、ADAM10 と ADAM9 が関与していることを明らかにした。さらに、肝がんに対する TACE 治療で汎用される epirubicin や分子標的治療薬である sorafenib がこれらの ADAM ファミリー分子の発現を転写レベルで低下させ、これにより MICA の分泌を阻害することを明らかにした。

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中の制御性 T 細胞の頻度が増加した。この傾向は Tr1 でより顕著であった。肝がんに対する RFA 治療あるいは TACE 治療は根治的治療がなされた患者では制御性 T 細胞の頻度が低下することが明らかとなった。制御性 T 細胞は肝がんの進展に伴い宿主の獲得免疫応答や自然免疫応答を低下させていると考えられた。肝がん細胞と樹状細胞の混合培養により、naive CD4 T 細胞から Tr1 が誘導されることが示された。

肝がんが発現する腫瘍特異抗原 T 細胞応答

肝がん患者に高発現している MRP3 に対する特異的な T 細胞応答を ELISPOT 法を用いて検討した。肝がんの早期から特異的な T 細胞応答が検出されたが、肝がん組織で MRP3 の発現が増強するに伴い、T 細胞応答が逆に低下することが示された。また、TACE や RFA 治療により T 細胞応答は増強した。

D. 考察と結論

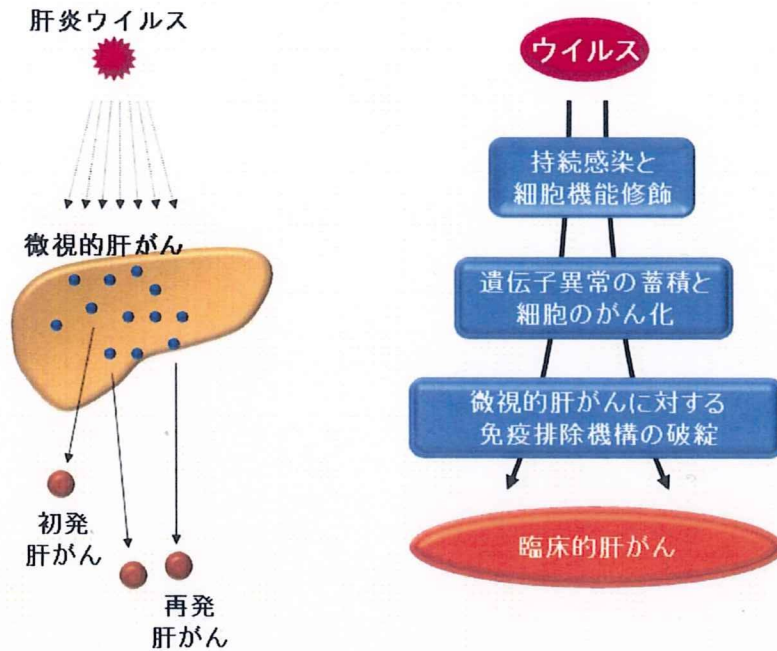
HCV コアによる肝脂肪化や発がんなどの病態形成にはミトコンドリア機能障害が関

与しており、これが病態改善を目指した治療標的になることが動物実験で示された。また、HCV コアによる病態形成に PA28γ による核内イベントが関与していることが示された。HCV コアは細胞内のシグナルや遺伝子発現に影響し、Peg-IFN/RBV 治療効果と密接に関連する 70 番と 91 番のアミノ酸置換は脂肪代謝や STAT3/Smad シグナルに影響することが明らかとなった。

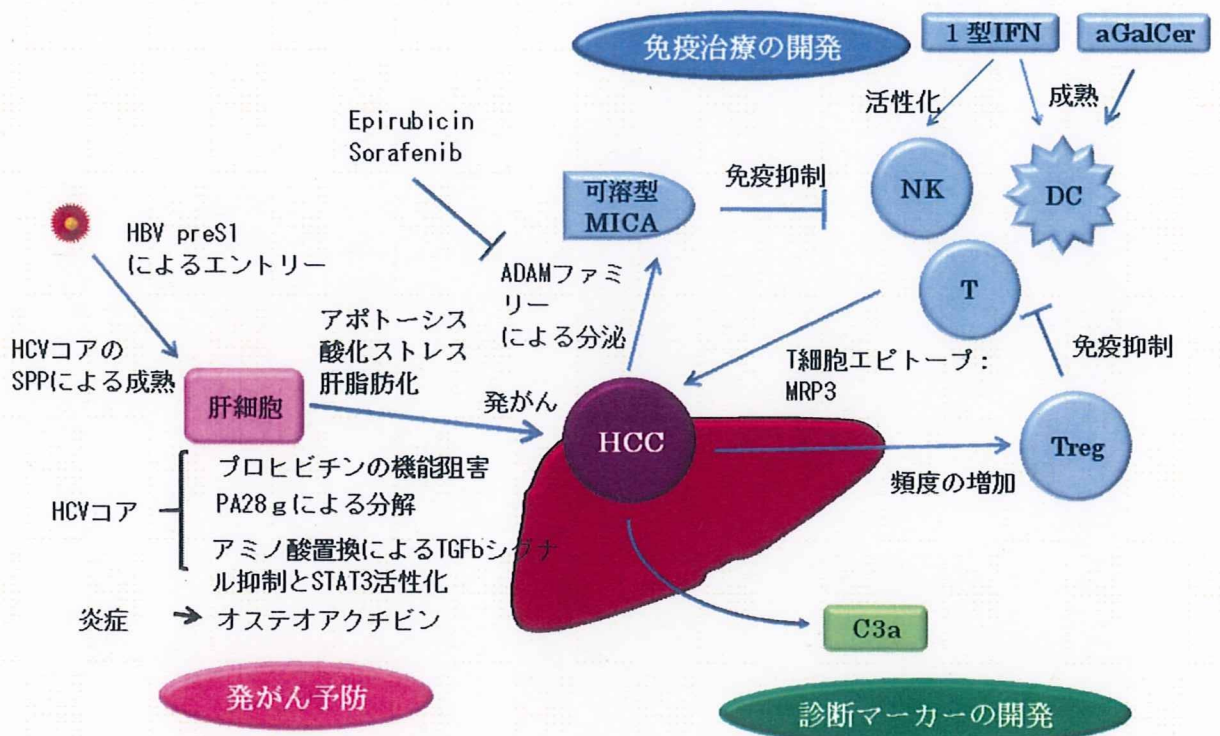
肝がんでは多彩な免疫抑制が起こることが示された。MICA の分泌を介した NK 細胞の機能低下、制御性 T 細胞の頻度の上昇などである。肝がんに対する治療介入はこのような病態を改善し、腫瘍抗原に対する特異的 T 細胞応答を誘導した。

本研究により、HCV による発がんの分子機序の一端が解明され、免疫抑制の細胞・分子レベルでの機序が解明された。

ウイルス性肝炎における肝発がんの発生と進展過程



研究成果



II. 分担研究報告

肝病態と IFN 感受性における PA28 γ と 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) のコア蛋白質を発現するマウス (CoreTg) は肝脂肪化と肝発がんを発症する。本研究では、HCV コア蛋白質の安定性を調節する宿主因子として我々が同定した PA28 γ と、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同定されたコア蛋白質の Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異の IFN 感受性、肝脂肪化、そして肝発がんに及ぼす影響を検討した。PA28 γ 遺伝子のノックアウトにより CoreTg マウスの肝脂肪化および肝発がんは消失した。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かった。また、IFN による ISRE の活性化や STAT1 のリン酸化にもな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 の結合性や STAT3 応答プロモーターの活性化は Arg⁷⁰ と Leu⁹¹ の変異で有為に上昇した。以上の成績から、PA28 γ は HCV によって誘導される病原性に必須な宿主因子であり、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) はフラビウイルス科に属するプラス鎖 RNA ゲノムを持つウイルスである。HCV は主に血液を介して感染し、世界で約 2 億人、国内でも約 200 万人もの感染者が推定されている。HCV は高率に持続感染し、慢性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌に至ることが知られており、本邦の肝癌の約 8 割は HCV 感染に起因するものと考えられている。現行のインターフェロンとリバビリンの併用療法は、先進国に多く認められる遺伝子型 1 の HCV 感染者に対しては 50% 程度の著効率であり、より有効な治療法の開発が求められている。

およそ半数の C 型肝炎患者に肝脂肪化が認められ、それは B 型肝炎患者など他の肝炎患者より高率である。脂肪滴の蓄積によって、肝脂肪化が認められることから、脂肪滴の主成分である中性脂肪の合成促進がその一因として考えられる。たとえば チンパンジーに HCV を感染させた場合、脂肪酸や中性脂肪の合成を調節する遺伝子 SREBP-1c の転写発現上昇が認められる。キャプシド蛋白質である HCV コア蛋白質をマウス肝臓および培養細胞に発現させると脂肪滴の蓄積が認められ、コア蛋白質が肝脂肪化の原因遺伝子として考えられている。また、HCV コア蛋白質が RXR α の活性化を促進することが知られている。SREBP-1c の転写調節因子は RXR α /LXR α のヘテロダイマーであるが、RXR α /LXR α の転写活性化が HCV コア蛋白質によって変化するかは分かっていなかった。

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

PA28 γ (-/-) マウスと CoreTg マウスを交配し、PA28 γ (-/-) CoreTg マウスを作製した。HE 組織染色および Oil Red O 染色によって、マウス肝脂肪化を解析した。定量的 RT-PCR によって脂肪酸およびコレステロール合成遺伝子の発現を解析した。SREBP-1c プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結し、レポーターアッセイを行った。また、LXRE 配列をデオチンラベルし、EMSA アッセイを行った。活性酸素による蛋白質修飾は OxyBlot (ケミコン) によって解析した。

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権、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、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

PA28 γ 遺伝子のノックアウトによって、コア蛋白質は細胞質から核へ集積した局在を示した。6ヶ月齢のマウスで、CoreTg マウスで肝脂肪化が認められたが、PA28 γ 遺伝子のノックアウトによって、肝脂肪化が著しく軽減された。その時の SREBP-1c および脂肪合成遺伝子の発現は CoreTg マウスで有為に上昇しており、PA28 γ 遺伝子のノックアウトで定常状態に戻った。培養細胞およびマウス肝臓で、RXR α /LXR α の活性化による SREBP-1c の発現上昇が認められ、PA28 γ 遺伝子のノックアウトあるいはノックダウンによって有為に低下した。16ヶ月齢の CoreTg マウスで肝細胞癌が認められた、PA28 γ ノックアウトによって肝細胞癌は認められなくなった。

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、野性型、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

HCV コア蛋白質の発現によって、肝脂肪化および肝細胞癌が認められるが、PA28 γ のノックアウトによってそれが消失する結果となった。HCV コア蛋白質の細胞内局在が PA28 γ の発現によって左右されることから、病原性発現には HCV コア蛋白質の細胞内局在が重要かもしれない。また、PA28 γ はコア蛋白質の安定性に関連していることから、コア蛋白質の安定性も、その病原性発現には重要かもしれない。PA28 γ とコア蛋白質が間接的に RXR α /LXR α の活性化を促していることから、その分子機構の解明が今後の課題となるだろう。また、肝臓における活性酸素の上昇は CoreTg マウスで認められるのに対し、PA28 γ ノックアウトによって定常状態に戻ることから、PA28 γ はコア蛋白質による活性酸素上昇にも関与している事が示唆された。

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 PA28 γ がコア蛋白質による病原性発現機構に重要な役割を演じている事が示唆された。マウスとヒトの PA28 γ は同一のアミノ酸配列をもち、ノックアウトしたマウスは軽度の体重軽減以外の表現系を示さないことから、新規 C 型肝炎治療法開発の標的遺伝子として期待できる。
- 2 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。
- 3 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。
- 4 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。
 - 5 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 Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1661-1666 (2007).
 - 2 Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
 - 3 Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8953-8966 (2007).
 - 4 Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
 - 5 Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
 - 6 Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. Moriishi K., and Matsuura Y. *Rev. Med. Virol.*, 17, 343-354 (2007).
 - 7 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
 - 8 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
 - 9 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
 - 10 Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å. Yamashita T., Unno H., Mori Y., Tani H., Moriishi K., Takamizawa A., Agoh M., Tsukihara T., Matsuura Y. *Virology* 373, 426-436 (2008).
 - 11 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).
 - 12 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).
 - 13 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).
 - 14 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).
 2. 学会発表
 - 1 Shuhei Taguwa, Toru Okamoto, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with HCV NS5A and regulates HCV replication. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, September 9-13, 2007.
 - 2 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Xiaoyu Wen, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Enhancement of IP-10 expression via TLR signaling pathway in cells expressing HCV proteins. 同上。
 - 3 Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Eiko Matsuo,

- Kensuke Suzuki, Itsuki Hamamoto, Tetsuo Yamashita, Kohji Moriishi, Kazuhito Fujiyama, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Ania Owsianka, Arvind H. Patel, Michael A. Whitt, and Yoshiharu Matsuura: Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding HCV envelope proteins. 同上。
- 4 Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Toru Okamoto, Yasumasa Komoda, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. 同上。
 - 5 Toru Okamoto, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura : FKBP8 Plays a Crucial Role in the Replication of Hepatitis C Virus, HEP DART 2007, Hawaii, 9-13 December, 2007.
 - 6 森石恆司、森屋恭爾、村田茂穂、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、松浦善治:HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 γ の役割: 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ、東京、5 月 31 日-6 月 1 日, 2007.
 - 7 田鍬修平、岡本 徹、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製に関与する宿主蛋白質 B-md1 の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2007.
 - 8 阿部隆之、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、審良静男、松浦善治: C 型肝炎ウイルスによる TLR シグナル伝達経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
 - 9 谷 英樹、菰田泰正、鈴木健介、山下哲生、稲田大彦、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: シュードタイプと組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた C 型肝炎ウイルスの感染機構の解析、同上。
 - 10 岡本 徹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスゲノム複製における FKBP8 の役割、同上。
 - 11 森 嘉生、岡本貴世子、岡本 徹、菰田泰正、鈴木哲朗、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセッシングの生物学的意義、同上。
 - 12 山下哲生、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析、同上。
 - 13 Hiroshi Kukiwara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
 - 14 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
 - 15 Hideki Tanii, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
 - 16 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tanii, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
 - 17 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
 - 18 松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7 月 9-11 日、2008.
 - 19 Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果: 第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10 月 21 日-23 日, 2008.
 - 20 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治: 分解能 3.5Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析: 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、10 月 26 日-28 日, 2008.
 - 21 田鍬修平、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの複製における hB-md1 のコシャペロン活性、同上。
 - 22 森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上。
 - 23 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
 - 24 谷 英樹、泉 貴之、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細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
 - 25 久木原 博、森石恆司、松浦善治: ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 26 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。

- 27 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: C型肝炎ウイルス感染によるTLR経路を介した炎症性ケモカインIP-10の過剰産生、同上。
- 28 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治: 患者血清中に存在するC型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。
- 29 松浦善治: C型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に關与する宿主因子: 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、シンポジウム、神戸、12月9日-12日、2008。
- 30 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。
- 31 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。
- 32 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。
- 33 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。
- 34 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。
- 35 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。
- 36 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。
- 37 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。
- 38 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粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
- 39 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。
- 40 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。
- 41 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。
- 42 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。
- 43 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。
- 44 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。
- 45 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。
- 46 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。
- 47 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。
- 48 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeo 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。

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消化器内科学・教授

研究分担者： 小池和彦 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学・教授

研究要旨：我々は、マウスモデルを用いて C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白が肝発癌を引き起こすことを示してきた。この動物モデルを用いて、以下の検討を行なった。

(i) HCV コア蛋白発現によって引き起こされる一連の現象に関連した細胞遺伝子発現の変化を、新規プロテオミクスを用いてタンパク質の発現変化を、HCV コア遺伝子トランスジェニックマウス肝で測定することにより検討した。コア蛋白発現初期肝ではアポトーシスに関連するタンパク質の発現量の抑制がみられたが、中期では、呼吸、電子伝達系及び抗酸化に関与するタンパク質の有意な上昇が確認された。さらに、肝癌発症直前では、抗酸化酵素、脂質代謝関連酵素など多くのタンパク質の発現量に減少傾向がみられた。

(ii) コア蛋白は肝細胞内における reactive oxygen species (ROS) の過剰産生に深く関与している。コア蛋白がミトコンドリアの機能に影響を与えていることが示唆される。コア蛋白により変動する遺伝子発現を明らかにするため、コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製しプロテオーム解析を行なった。コア蛋白発現細胞においては、発現量が大きく変化しているミトコンドリア呼吸鎖、蛋白シャペロンに関連した蛋白が複数認められた。これらの中でミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウス肝臓、フルゲノム HCV レプリコン細胞で発現が高く、コア蛋白の存在によって安定性を増していた。詳細な検討によって、チトクローム C オキシダーゼ (COX) のうちミトコンドリア DNA にコードされるサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白のレベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、ROS 過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

(iii) HCV 感染は脂質代謝異常、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。ミトコンドリア保護作用をもつ免疫抑制剤である Tacrolimus 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

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ明らかでない点が多い。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも解明の妨げとなっている。我々は、HCVのコア蛋白がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認している。このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行なう。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行なう。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化 (steatosis) が発生し、その後に肝細胞癌が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。我々は、この脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行なう。

また、C型肝炎と2型糖尿病の間の関連性が、疫学的研究のみならず、実験的なシステムでも確認されてきている。また、脂質代謝異常とC型肝炎の関連性は以前から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慢性C型肝炎患者においては、線維化の進行速度が大きく、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。

慢性C型肝炎の治療は、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。リバビリン併用ベグ・インタ

ーフェロンによって、1型高ウイルス量の患者においても約50%でHCV排除が可能となってきたが、残りの50%の人では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が切望されている。そのような治療法が見いだされれば、慢性C型肝炎の進行、肝癌の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

(I) FD (Fluorogenic Derivatization)-LC (Liquid Chromatography)-MS (Mass Spectrometry)/MS 法法を用いて、バイオマーカーの探索及びC型肝炎から肝癌を発症するまでの病態解明を目的に、HCVのコアタンパク質を発現するTgの肝における、病態及びその進行段階の生理的变化によって影響を受けるタンパク質群のディファレンシャル解析 (差異解析) を行った。

FD-LC-MS/MS 法はサンプル中のタンパク質のシステイン残基と選択的に反応するプロテオーム解析用発蛍光試薬 (DAABD-C1) でタンパク質を蛍光標識 (Fluorogenic Derivatization: FD) した後、HPLCで分離し、蛍光検出することでタンパク質を定量し、LC-MS/MSを用いてタンパク質を同定する手法である。

また、本研究の対象動物として用いたTgは、HCVタンパク質そのものが肝発がん活性を有することを証明する上で重要な動物モデルである。このマウスモデルにおいては、2か月齢でインスリン抵抗性を、3か月齢で肝脂肪化を、16か月齢でHCCを発生する。その時間的経過より、6か月齢をC型肝炎初期、12か月齢を中期及び、16月

齢を HCC 発症直前モデルとし、各々 3 匹ずつを解析し、HCV コア蛋白発現から HCC を発症するまでの細胞遺伝子タンパク質の変動を解析した。

(II) HCV コア蛋白を恒常的に発現する HepG2 (Hep39) 細胞から Nycodenz discontinuous gradient を用いてミトコンドリア分画の精製を行った。ミトコンドリアの purity は以下の様に確認した。すなわち、精製したミトコンドリア蛋白を用いて Western blotting を行なったところ、コア蛋白とミトコンドリア蛋白 (complex I) は検出されたが、ER 蛋白 (OST48) は検出されなかった。

ミトコンドリア蛋白を二次元電気泳動した後、銀染色にて検出し、Image Master 2D Elite ver. 3.1 (Amersham) により発現量の違いを検討した。適当なスポットを切り出し、in-gel trypsin digestion, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry を行い、蛋白の同定を行った。

同定された蛋白については、特異抗体が入手可能なものについては Western blotting を行ない、発現レベルを確認した。

(III) 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) (0.1 mg/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

(I) コア遺伝子マウス肝のプロテオミクス解析

(1) 3 つの異なった月齢について、それぞれ 3 匹ずつのマウスを用いて包括的なタンパク発現を検討した。各月齢 3 匹のマウス間におけるバラツキが少なく、同月齢の対照マウスと比較して、共通して現象あるいは増加しているタンパクが、全体では 106 個見いだされた。

(2) 6 か月齢 (初期) のマウスにおいては、増加しているタンパクが 19 種類、減少しているタンパクが 9 種類と、増加しているタンパクが多数であった。主なものとしては、Major urinary protein (MUP)、Eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (EF-1 α 1) の減少が認められた。これらは negative tumor marker あるいは apoptosis を亢進するタンパクであり、これらのタンパクの減少は細胞増殖を増加する方向へ働く。6 か月齢において増加していたタンパクとしては、Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD)、Glycine N-methyltransferase、Glutathione S-transferase などの抗酸化系タンパク、Fatty acid-binding protein、Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme) などの脂質関連タンパクが

挙げられる。

(3) 12 か月齢では減少していたタンパクが 11 種類であったのに比し、増加していたものが 65 種類と、更に発現増加しているタンパクが増えていた。減少しているものとしては、6 か月齢では増加していた抗酸化系である Glycine *N*-methyltransferase。増加しているものとしては、R-Fetoprotein (肝癌マーカー)、ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit, ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d などのミトコンドリア電子伝達系タンパク、5 種類の SOD、Thioredoxin、Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) などの抗酸化系のタンパクが認められた。また、酸化ストレス賛成と関連し代謝酵素として Cystatin B、Carbonic anhydrase 3、Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)、Aldh2 protein Malate dehydrogenase の増加も認められた。

(4) 16 か月齢となると、これまでとは異なり、蔵していたのは 4 種類のみであり、代わりに 39 種類のタンパクの減少が認められた。特筆すべきこととして、12 か月齢までは増加していた抗酸化系のタンパクが軒並み減少していた点が挙げられる。SOD、Manganese superoxide dismutase、Thioredoxin 1、Glutathione peroxidase (GSHPx-1) (Cellular glutathione peroxidase)、Glycine *N*-methyltransferase、Glutathione S-transferase, mu 1、BHMT、Glutathione S-transferase, alpha 3, Chain B、Glutathione S-transferase などである。すなわち、これまでとは酸化ストレスの増加に対抗して活性化されていた抗酸化系が、16 か月齢という肝癌期に入り減弱して、酸化ストレスをうまく処理できない状況となっていると考えられる。

(II) コア蛋白発現細胞におけるミトコンドリアのプロテオミクス解析

(1) ミトコンドリア蛋白の二次元電気泳動を行い、Hep39 とコア蛋白を発現しないコントロール細胞 (Hepswx) の間で比較したところ、発現量の異なる蛋白がいくつか認められた。その中には、ミトコンドリアの電子伝達系に關与する蛋白、細胞周期に關わる蛋白などが含まれていた。これらの蛋白の発現量の違いを Western blotting により実際に確認した。

① 発現の上昇していた遺伝子

- 1) NAD (H) -specific isocitrate dehydrogenase a subunit precursor
 - 2) succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase
 - 3) GrpE-like protein co-chaperone
 - 4) similar to ATP synthase b polypeptide
 - 5) leucine aminopeptidase
 - 6) pyruvate dehydrogenase E1 component b subunit, precursor
 - 7) CG015alt2
 - 8) HSP70
 - 9) prohibitin
- など。

② 発現の低下していた遺伝子

- 1) aldehyde dehydrogenase 2
- 2) aldehyde dehydrogenase 5 precursor
- 3) BiP protein
- 4) HSP60 precursor

など (順番は発現量によるものではない)。

(2) Prohibitin に関しては、mRNA レベルでは増加していないこと、コア蛋白の存在によって安定性が増加していること、コア蛋白と相互作用すること、などを確認した。ミトコンドリア・シャペロンである prohibitin は、コア蛋白発現細胞、コア遺伝子トランスジェニックマウス肝、フルゲ