

比較検討した。

3) 新規肝癌マーカーの探索

SELDI および MALDI で検出した 7770m/z ピークタンパクおよび 2861m/z ピークタンパクの同定および臨床的意義を検討した。

C. 研究結果

1) 肝癌診断において、既存の肝癌マーカーである AFP、AFP レクチン分画、PIVKA-II と比較して、C3a-8100 のピーク値は感度が最も高く、ROC AUC も最も高値であり、肝癌診断に有用であった。

2) 血清 MnSOD 濃度は健常者もしくは慢性肝炎患者と比較し、肝癌患者で高く、肝癌患者の中では Child A よりも Child B もしくは C の患者で、Liver Damage A よりも Liver Damage B もしくは C の患者で有意に高く、肝予備能と関連していた。

3) 7770m/z タンパクはケモカイン関連分子である可能性が示唆され、培養肝癌細胞で発現していた。また、2861m/z ピークタンパクは同定できていないが、慢性肝炎よりも肝癌で有意に高値を示した。これらの 2 つのタンパクは新規の肝癌マーカーである可能性がある。

D. 考察

これまでの検討で、肝疾患に関連する可能性のあるタンパク質・ペプチドを数種類同定した。肝癌患者血清中に出現する C3a 断片 (約 8100Da) は、既存の肝癌マーカーよりも肝癌の診断能が高いことを明らかにした。また、今までの検討で、この C3a 断片は肝癌治療後に低下することを明らか

にしている。我々が同定した C3a 断片は肝癌細胞が直接産生するわけではないが、肝癌の診断や治療効果判定に有用なマーカー候補であると考えられた。今後、前向き検証が必要である。

酸化ストレスが C 型慢性肝炎の病態進展に関与することから、酸化ストレスマーカーを探索している。*in vitro* の検討で、その酸化ストレスマーカー候補として MnSOD を見出し、昨年度に血清 MnSOD 濃度は慢性肝炎患者と比較し肝癌患者で高値となることを明らかにした。しかし、MnSOD 濃度は肝癌の腫瘍サイズや病期とは関連しないことから、本年度は肝癌患者における臨床的意義をさらに検討した。肝癌患者では、MnSOD は背景肝の予備能と関連し、肝予備能低下に伴い MnSOD は高値となった。今後、MnSOD の肝癌患者における予後との関連についても検討が必要である。

肝癌マーカー C3a f-8100 と同じように、SELDI で肝癌マーカー候補である 7770m/z のピークタンパクを検出し、ケモカイン関連タンパクが候補タンパクである。現時点では、十分な確証はないが、7770m/z ピークの候補タンパクが肝癌細胞で産生されることを明らかにしており、候補タンパクを確定させるとともに、臨床的意義のさらなる検証が必要である。同じように、MALDI で肝癌マーカー候補として 2861m/z ピークタンパクを検出したが、タンパク同定および臨床的意義の解明が必要である。

E. 結論

プロテオーム解析により同定した C3af-

8100 もしくは MnSOD は、それぞれ新しい血清肝癌マーカーもしくは肝癌の病態と関連する血清マーカー候補である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2009 (in press).
- 2) Takami Y, Uto H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatology Res* 2009 (in press).
- 3) Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2009 (in press).
- 4) Takami Y, Uto H, Takeshita M, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatology Res* 2009 (in press).

5) Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 2009;50: 393-9.

6) Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J Biol Chem.* 2009;284: 21165-76.

2. 学会発表

- 1) 長谷川将、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、玉井 努、重信秀峰、山崎成博、森内昭博、宇都浩文、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁；初回または再発時に根治療法を選択する意義～当科 HCC466 症例での検討。第 95 回日本消化器病学会総会。2009 年 5 月（札幌）
- 2) 高見陽一郎、宇都浩文、竹下正彦、甲斐久博、赤松絵奈、森内昭博、長谷川 将、桶谷 真、井戸章雄、片岡寛章、坪内博仁：Proanthocyanidin は platelet-derived growth factor による肝星細胞の活性化を抑制する。第 45 回日本肝臓学会総会。2009 年 6 月（神戸）
- 3) 西田知夏、宇都浩文、森内昭博、長谷川将、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁：C 型慢性肝炎合併透析患者の ALT 値と UDCA の効果。第 45 回日本肝臓学会総会。2009 年 6 月（神戸）

- 4) 玉井 努、熊谷公太郎、馬渡誠一、呉 建、森内昭博、長谷川 将、宇都浩文、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁、藤崎邦夫:ソナゾイド造影超音波を用いた TACE 後の肝細胞癌における内部血流の検討. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009 年 6 月(神戸)
- 5) 熊谷公太郎、井戸章雄、馬渡誠一、呉 建、玉井 努、森内昭博、長谷川 将、宇都浩文、桶谷 真、田原憲治、堀 剛、藤崎邦夫、黒木和男、重信秀峰、小森園康二、岩満章浩、坪内博仁:3 年以上の核酸アナログ製剤投与例における長期成績. 第 93 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009 年 6 月(福岡市)
- 6) 玉井 努、宇都浩文、高見陽一郎、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、森内昭博、長谷川 将、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁: HCV 関連慢性肝疾患における血清 MnSOD 濃度の臨床的意義. JDDW(第 13 回日本肝臓学会大会) 2009 年 10 月(京都市)
- 7) 熊谷公太郎、馬渡誠一、井戸章雄、最勝寺晶子、橋口正史、呉 建、玉井 努、森内昭博、宇都浩文、桶谷 真、田原憲治、堀剛、藤崎邦夫、黒木和男、重信秀峰、小森園康二、岩満章浩、坪内博仁: 3 年以上ラミブジン投与可能であった非代償性 B 型肝炎硬変における治療後の肝予備能評価. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009 年 11 月(熊本市)
- 8) 今中 大、山崎成博、長谷川将、藤崎邦夫、宇都浩文、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁: 肝細胞癌初回治療後長期生存症例の検討. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009 年 11 月(熊本市)備能評価. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009 年 11 月(熊本市)
- 9) 橋口正史、熊谷公太郎、玉井 努、最勝寺晶子、馬渡誠一、呉 建、森内昭博、宇都浩文、桶谷 真、井戸章雄、坂元秀壮、岩満章浩、稲田由起子、村田光宏、堀 剛、坪内博仁:当科における TACE+RFA 併用療法と RFA 単独療法についての検討. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009 年 11 月(熊本市)
- 10) 玉井 努、宇都浩文、最勝寺晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁:C 型慢性肝炎に対する IFN 治療後の肝発癌症例における IFN 治療効果の臨床的意義. 第 38 回日本肝臓学会西部会. 2009 年 12 月(米子市)
- 11) Nishida C, Uto H, Tokunaga K, Fukumoto M, Sogabe A, Nosaki T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical Significance of Alanine Aminotransferase Levels and Effect of Ursodeoxycholic Acid in Hemodialysis Patients with Chronic Hepatitis C. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). 2009 年 2 月(香港、中国)
- 12) Kumagai K, Uto H, Kure T, Mawatari S, Tamai T, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver S, Tsubouchi H: Clinical Features of Patients Aged 75 years or Older with Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma in Japanese Areas Hyperendemic for Hepatitis C Infection. 19th Conference of the Asian

Pacific Association for the Study of the Liver
(APASL). 2009年2月(香港、中国)

13) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y,
Moriuchi A, Funakawa K, Sakiyama T,
Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue t,
Tsubouchi H: The serum levels of
manganese superoxide dismutase
(MNSOD) are elevated in patient with non-
alcoholic steatohepatitis (NASH). The 60 th
Annual Meeting of the American Association
for the Study of the Live Disease (AASLD).
2009年10月(ボストン、米国)

14) Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K,
Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A,
Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H: Clinical
significance of hepatitis C virus infection and
the effect of ursodeoxycholic acid in
hemodialysis patients. ANS Renal Week
2009. 2009年10月(サンディエゴ、米国)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部

肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：C型慢性肝炎に対するPEG-interferon (PEG-IFN)+ribavirin (RBV) 併用療法における治療反応性に関する宿主側因子として、血中サイトカインと治療反応性の関連は未だ十分に明らかとなっていない。本年度、我々はHCV genotype 1bのPEG-IFN+RBV併用療法の治療反応性に関連するサイトカインを網羅的に明らかとすることを目的として治療開始前の血清を用い、36種類のサイトカインの発現をsandwich ELISA法により定量的に測定した。その結果SVR群において、治療前IL-8が有意に低く ($p=0.035$)、治療前RANTESは有意に高いことが明らかになった ($p=0.042$)。また、NS5A領域のアミノ酸変異数が0または1個である症例に限定して解析した場合、SVR群では治療前RANTESは有意に高く ($p=0.017$)、治療前sICAM-1も高い傾向にあった ($p=0.056$)。抗ウイルス治療前血清を用いたサイトカイン解析により、HCV genotype 1bにおけるPEG-IFN+RBV併用療法では、特にIL-8、RANTESの測定によって治療反応性を予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の導入によって、治療効果は以前に比して格段に上昇している。しかしながら、治療反応性には非常な違いが個々の症例ごとに認められ、正確にかつ簡便に治療反応性を予測できるマーカーの開発が急務となっている。

一方で、治療反応性に関与する宿主側因子の一つとして、IFN α 単独療法において種々のサイトカインと治療反応性の関連が

報告されている。しかし、これらの解析は十分に網羅的な解析は行われておらず、結果については十分なコンセンサスが未だ得られていないのが現状である。最新のPEG-IFN+RBV併用療法での治療反応性とサイトカインに関する報告となると、さらに報告は少なく、その意義も明らかとは言えない。

そこで、今回我々はHCV genotype 1bのPEG-IFN+RBV併用療法の治療反応性に関連するサイトカインを網羅的に明らかとすることを目的として、同療治療開始前の血清を用いてサイトカインの網羅的発現解析を

行った。

B. 研究方法

2004年12月から2007年12月の間にPEG-IFN+RBV併用療法を受けたHCV genotype 1b・高ウイルス量症例のうち、特に初期の治療反応性が大きく異なる2群50症例（SVR群25例、non SVR群25例）を対象に、治療開始前の血清を用いて網羅的に36種類のcytokineの発現をsandwich ELISA法により定量的に測定した。

C. 研究結果

測定した36種類のcytokineについてROC曲線下面積を計算し、最適カットオフ値を求めた。その結果SVR群において、治療前IL-8が有意に低く（ $p=0.035$ ）、治療前RANTESは有意に高かった（ $p=0.042$ ）。また、NS5A領域のアミノ酸変異数が0または1個である症例に限定して解析した場合、SVR群では治療前RANTESは有意に高く（ $p=0.017$ ）、治療前sICAM-1も高い傾向にあった（ $p=0.056$ ）。

D. 考察と結論

治療前血清を用いた網羅的サイトカイン発現解析により、HCV genotype 1bにおけるPEG-IFN+RBV併用療法では、IL-8高値・RANTES低値が治療抵抗性と関連する可能性が示唆された。IL-8はNS5A蛋白がその分泌を促し治療抵抗性に関与するという報告があり、今回NS5A領域のアミノ酸変異数により治療反応性との関連の強さが

変化したことは示唆に富むと考えられた。RANTESに関してはそのreceptorであるCCR5に変異が存在すると治療抵抗性が高くなる報告、あるいはRANTES遺伝子のSNPsと治療抵抗性との関連も報告されており、その発現と治療反応性が関連する可能性がある。今後さらに症例を積み重ねることにより、関連をより明らかにしていくことが必要ではあるが、肝炎の病態解明・診断に治療開始前の血中サイトカイン解析は有用であることが考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology* 2010;53(1):66-9.
- 2) Maekawa S, Enomoto N. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2009;44(10):1009-15.
- 3) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. *Biosystems* 2010;99(1):70-8.
- 4) Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M. Two flavonoids extracts from *Glycyrrhizae radix*

inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

Hepatol Res 2009;39(1):60-9.

2. 学会発表

- 1) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. ワークショップ 3: HCV ゲノム多型は抗ウイルス治療効果を規定する. 第 45 回 日本肝臓学会総会. 神戸. 平成 21 年 6 月 4 日-6 月 5 日.
- 2) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. シンポジウム 7: 肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討. 第 13 回 日本肝臓学会大会. 京都. 平成 21 年 10 月 14 日-10 月 16 日.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析

田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学 教授

研究要旨：平成21年度においては、特定のB型肝炎ウイルス（HBV）遺伝子型を感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスにおいて観察される肝線維化の発症メカニズムについて検討した。前年度で実施したマイクロアレイによる遺伝子発現解析で得られた候補遺伝子を詳細に解析したところ、自然免疫関連の遺伝子発現経路が見出された。Toll様受容体（TLR）4とその下流の経路の活性化が線維化群で観察され、その経路の主たる好中球やマクロファージの浸潤も認められ活性酸素種の産生が顕著であった。IL6の発現も高値であり、その下流に位置するTIMP1の発現が上昇していたことから、これら一連の経路がHBV感染下における線維化亢進の原因であると推測された。

A. 研究背景・目的

本研究班において、分担研究者はヒト肝細胞置換キメラマウス（キメラマウス）を用いて、各HBV遺伝子型や変異株を感染させることで、HBVが肝組織へ与える傷害性の違いに関して検討してきた。前年までに、キメラマウスでの肝線維化の進展を確認し、感染早期から持続した肝傷害が発生していることを報告してきた。また、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、非線維化群との比較解析により線維化進展に関与する遺伝子群とその経路の候補を同定してきた。

本年度では、発現解析により抽出された変動遺伝子群と遺伝子経路について確認を行い、実際の線維化に対する関連の有無について検討することで、B型肝炎からの肝

線維化の発症と進展に根源的に関与する遺伝子とその経路の同定を試みた。

B. 研究方法

前年までで明らかとした肝線維化発症に関与するHBV遺伝子型（HBV/C）と寄与しない遺伝子型（HBV/A）に感染したキメラマウス肝臓からRNAを抽出し、逆転写酵素を使用してcDNAを合成した。マイクロアレイ解析で上げられた候補遺伝子に対して、リアルタイムPCRを実施し、線維化の有無で比較解析を実施した。TLR3, 4, 9, TIMP1, IL6に対するプライマーを用意し、内在性コントロールを利用した相対定量法で解析を行った。

TLRの肝組織中での発現と産生細胞を確認するため、各種抗体を利用して蛍光染色

を実施した。

また、肝組織への浸潤細胞を同定するために、各自然免疫単相細胞に対する免疫染色を行った。

(倫理面の配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

HBV 感染による線維化が亢進した群 (HBV/C 感染群) では、リアルタイム PCR による解析により TLR4 の発現が亢進していた。TLR4 の下流に位置する IL6 を確認したところ、TLR4 発現が亢進した群において高値を示した。さらに、IL6 が発現を誘導することが知られている TIMP1 の発現についても亢進していることが明らかとなっており、TLR4 からの一連の経路が線維化に関与していると考えられた。一方で、TLR3, 9 の発現量を確認したところ線維化の有無では違いが無く、これらの遺伝子経路は肝線維化には関与していないと考えられた。

蛍光染色により肝組織を染色した結果、単核球のマーカーである CD163 と TLR4 の強い発現が一致して観察され、単核球で主に TLR が誘導されていると考えられた。ウイルス感染後も線維化が認められない HBV/A 感染群では、単核球の浸潤はある程度認められるものの TLR4 の強い誘導は認められなかった。

その他に、肝組織に浸潤している細胞について解析を行ったところ、ミエロペルオキシダーゼで強く染色が認められる細胞が多数観察され、好中球であることがわかった。活性酸素種の産生を担当しており、線維化亢進群において非線維化群の 15 倍程度の発現が認められていることから好中球が主に産生していると考えられた。

D. 考察

キメラマウスの組織を使って遺伝子の発現について確認を行い、実際に TLR4 の経路が活性化していることが明らかとなった。TLR3, 9 については HBV 感染後の線維化の発症の有無に差は認められなかったが、TLR3 は HBV 非感染群と比較すると HBV 感染群で低下していた。これは、臨床検体での検討でも類似の結果が報告されている。また、単核球や好中球の浸潤が感染早期から認められたことは、以前にチンパンジーによる実験でも報告されているため、HBV 感染による病態に進展に自然免疫系の関与が疑われた。以上より、キメラマウスの実験系が臨床像の一部を再現していることが示唆された。

E. 結論

HBV 感染により惹起される肝線維化には、単核球や好中球の浸潤と活性化による活性酸素種を介した TLR4 経路の活性化が関与していることが示唆された。したがって、活性酸素種を標的とした抗線維化治療戦略が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusakabe A, Tanaka Y, Mizokami M. et al.
Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. Hepatol Res. 2009;39(7) :648-656.

2. その他の発表

- 1) 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史. HBV遺伝子型間における細胞障害性の違い. 第45回日本肝臓学会総会. 平成21年6月4日—5日. 神戸. WS4-1. 会長奨励賞, 優秀演題賞.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究

花田 賢太郎 国立感染症研究所細胞化学部長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）による難治性ウイルス肝炎の新規治療薬の開発が強く求められている。オートファジーは肝臓における脂肪滴産生・脂肪滴特異的分解（リポファジー）に関与している。また肝臓におけるオートファジー機能欠損は炎症をともなう肝肥大を引き起こす。HCVをはじめとする肝炎ウイルスは肝臓で頻繁に引き起こされるオートファジー分子機構を利用して、自己増殖を有利にしている可能性がある。今回、我々は、培養細胞系を用いて、オートファジー関連分子ノックダウンにより、細胞外に放出されるHCV粒子が減少することを見いだした。

A. 研究目的

難治性ウイルス肝炎の新規治療法の開発が強く求められている。C型肝炎ウイルス（HCV）粒子産生には脂肪滴が重要な役割を果たしており、オートファジーの分子機構は脂肪滴産生・脂肪滴特異的分解（リポファジー）に関与していることが示唆されている。オートファジーはPTEN-mTorシグナル経路により制御される。肝臓特異的オートファジー欠損マウスは肝炎を伴う肝肥大をひきおこし、肝臓特異的PTENノックアウトマウスはオートファジー不全を引き起こし、脂肪肝が惹起される。従って、HCVがオートファジー分子機構を巧みに利用して、HCV粒子産生を行っている可能性がある。そこで、HCV（JFH-1株）-Huh7.5.1細胞感染実験系においてオートファジー関連分子がHCV粒子産生に影響を与えるかどうか

を調べた。

B. 研究方法

本年度は、脂肪滴産生・リポファジーに関与するオートファジー関連分子のHCV産生に対する影響について、RNAiによるオートファジー分子のノックダウンによる細胞内HCV mRNA・HCV関連タンパク質産生およびHCV粒子産生への影響を調べた。またオートファジーのマーカーであるLC3抗体を用いた間接蛍光抗体法により、細胞生物学的解析を行った。

評価系としては培養細胞を用いたHCV産生系を利用することとした。そのためにもまず、培養細胞を用いたHCV産生の評価系を構築した。細胞はヒト肝細胞由来のHuh7.5.1細胞を用いた。HCVは、ヒト劇症肝炎患者から分離されたJFH-1株を用いた。

Huh7.5.1 細胞に HCV を 37°C 2 時間感染後、6 日後まで対数的にウイルス蛋白は増加した。この実験系を用いて、HCV 感染 1 日後および 3 日後にノックダウンを行い、HCV 感染 5 日後に HCV 粒子産生を評価した。

(倫理面の配慮)

本研究ではヒト臨床材料・実験動物等を用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

HCV 感染によるオートファジーへの影響

HCV 感染細胞においてオートファジー関連遺伝子産物の経時変化を調べたところ、HCV 関連タンパク質が顕著に増加する感染 5 日後、6 日後において、オートファゴソームのマーカ分子である LC3-リン脂質結合体(LC3-II)の蓄積が認められた。この蓄積はオートファジーが亢進した場合とオートファジー不全が起こった時に認められる。そこで、リソソームの主要タンパク質分解酵素群(カテプシン B、D、L)の阻害剤を用いて LC3-II のリソソーム分解を調べたところ、リソソームにおける LC3-II 分解が抑制されていた。従って、HCV 感染によりリソソーム・オートファゴソーム融合が阻害され、オートファゴソームが異常蓄積した形でオートファジー不全が引き起こされていることが、明らかになった。オートファジー分子ノックダウンにおける HCV 粒子産生への影響

Atg7 (オートファジーの鍵酵素) のノックダウンによる HCV 産生の影響について調

べた。Atg7 ノックダウンにより、培地中に放出される HCV 粒子の量が減少していた。このとき、細胞内 HCV mRNA 量および細胞内 HCV core, NS5A, NS3 産生量はほとんど影響がなかった。また、細胞の生存率もほとんど影響が無く、ノックダウンによるインターフェロン mRNA の誘導もほとんど起こらなかった。このとき、ヒトアルブミンの分泌を指標に分泌経路に異常があるかどうかを調べたが、コントロール HCV 感染細胞とノックダウン HCV 感染細胞において、アルブミンの分泌にはほとんど差がなかった。オートファジーに関連するクラス III PI3 キナーゼ複合体のコンポーネントである Beclin 1 のノックダウンによっても同様の結果が得られた。従って、オートファジー関連分子は分泌経路には影響せず、HCV 粒子細胞外放出に特異的に影響することが示唆された。

オートファゴソームマーカ LC3 と HCV core・NS5A・脂肪滴の細胞内挙動

HCV 感染によりオートファジー不全・オートファゴソームが異常蓄積していることから、HCV core・NS5A や脂肪滴とオートファゴソームが共局在する可能性が考えられたが、顕著な共局在は認められなかった。

D. 考察

本研究により、オートファジー関連分子が HCV 粒子の細胞外放出に関与していることが示された。細胞内 HCV mRNA 量、細胞内 HCV 関連タンパク質量にはほとんど影響がなかった。HCV 感染によりオートファゴソームが異常蓄積しており、リソソーム・

オートファゴソーム融合が阻害されていた。このことから、オートファジー分子機構が mRNA 合成・タンパク合成より後の HCV 粒子アセンブリから放出における過程に関与していることが考えられる。

これは、昨年、HCV レプリコン Huh7 細胞を用いて、細胞内 HCV mRNA 量がオートファジー関連分子のノックダウンにより減少するという報告と異なるが、レプリコンを用いた場合は HCV 粒子放出が適宜行われず、過剰な小胞体ストレスが誘導されるため、実験系の違いによるものに由来すると考えられる。

オートファジーはタンパク質分解のみならず脂質代謝・脂肪滴形成・リポファジーと密接な関連があり、今後、オートファジー分子に注目した HCV 治療法・薬剤の研究はきわめてユニークなものになる可能性がある。

E. 結論

培養細胞を用いた HCV 感染系を用い、オートファジー関連分子が HCV のアセンブリ以降の過程に関与していることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 2009;5(7):937-45.

2. 学会発表

1) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、上野 隆。

木南英紀、花田賢太郎: オートファジー関連遺伝子のノックダウンは HCV 粒子産生を抑制する。第 82 回日本生化学会大会

2) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎: オートファジーは HCV 粒子産生に関与している。第 57 回日本ウイルス学会学術集会

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究

菅 裕明 東京大学・先端科学技術研究センター 教授

研究要旨：独自に開発した特殊ペプチド合成法 (RaPIDシステム) を用いて、本研究班で新規に同定された標的に対する阻害剤を探索する。本年度も昨年度に引き続き、HCV関連の新規標的蛋白質 3 種の調製とそれらに対する環状特殊ペプチドの探索を行った。

A. 研究目的

本研究班では、ウイルス性肝炎および肝癌における病態を網羅的なジェノミクス手法を用いて解析し、新規標的もしくは疾患関連因子の同定を目標としている。本研究分担班は、それらの新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指し、関連技術を開発し実施することを目的としている。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発した RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本技術の特筆すべき点は、フレキシザイム (tRNA アミノアシル化 RNA 触媒) を用いて、普遍遺伝暗号表を初期化し、通常アミノ酸を異常アミノ酸に対応させた改変遺伝暗号表を作成し、それに沿った形で mRNA を翻訳することで特殊アミノ酸を合成する手法である。また、平成 19 年度に

開発に成功した RaPID ディスプレイ法を用い、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行う。

(倫理面の配慮)

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮は特に必要ないが、全て P2 レベルで実験は行っている。

C. 研究結果

本年度は、RaPID ディスプレイ法を用いて、HCV 関連標的 NS5A (His)、LEL (GST-biotin) ドメイン (括弧内は固定タグを示す) への特殊環状ペプチド阻害剤探索の継続、および La 蛋白質 (His) の発現・精製を行った。NS5A に対しては特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、特殊ペプチドの配列情報を取得した。代表的なペプチドに関して化学合成を行い、ヴィトロでの結合活性を観測した結果、最も良い結合能力をもつもので、約 50nM の解離定数をもっていることが判明した。現在、HCV リプリコンを

用いて、複製阻害活性の阻害評価を開始している。LEL に関しては、強い結合能をもつ特殊ペプチドが獲得できておらずセレクションを継続中、また La 蛋白質については発現と精製が完了しセレクションを行う準備中である。

D. 考察

RaPID ディスプレイ法を用いることで、HCV 関連標的への環状特殊ペプチドの探索が可能であることが示された。その一方で、蛋白質の種類によっては、かならずしも結合能の高いものが得られておらず、タグの変更を含め、検討が必要である。

E. 結論

目標の技術開発に成功し、1つの標的蛋白質に対しての環状特殊ペプチドを獲得することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawakami T, Ohta A, Ohuchi M, Ashigai H, Murakami H, Suga H. Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming. *Nature Chemical Biology* 2009;5:888-890.
- 2) Niwa N, Yamagishi Y, Murakami H, Suga H. A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter* 2009;19:3892-3894.
- 3) Goto Y, Iwasaki K, Torikai K, Murakami H, Suga H. Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methyllanthionine-

containing peptides. *Chemical Communication* 2009;3419-3421.

- 4) Yamagishi Y, Ashigai H, Goto Y, Murakami H, Suga H. Ribosomal synthesis of cyclic peptides with a fluorogenic oxidative coupling reaction. *ChemBioChem* 2009;10:1469-1472.
 - 5) Nakajima E, Goto Y, Sako Y, Murakami H, Suga H. Ribosomal synthesis of peptides with C-terminal lactams, thiolactones, and alkylamides. *ChemBioChem* 2009;10:1186-1192.
 - 6) Goto Y, Suga H. Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides. *Journal of the American Chemical Society* 2009;131:5040-5041.
 - 7) Murakami H, Ohta A, Suga H. Bases in the anticodon loop of tRNA(GGC)(Ala) prevent misreading. *Nature Structural & Molecular Biology* 2009;16:353-358
- ##### 2. 学会発表
- 1) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. Naito Foundation Conference in Chemical Biology, Sapporo, Japan, 2009.
 - 2) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides: The 1st International Conference for Circular Protein, Heron Island, Australia, 2009.
 - 3) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. Peptide Engineering: Therapeutic Peptide" Fifth Peptide

Engineering Meeting, Barcelona, Spain, 2009.

4) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. Nottingham 'New Horizons' meeting 2009, Nottingham, UK, 2009.

5) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, Jeju Island, Korea, 2009.

6) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. The 75th Israel Chemical Society Meeting, Israel, 2009.

7) Suga H: Genetic code reprogramming: Ribosomal synthesis of natural product-like non-standard peptides. 2010 Chemistry & Biology of Peptides Gordon Research Conference, 2009.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究

堀本 勝久 産業技術総合研究所 研究チーム長

研究要旨：グラフィカル連鎖モデルに基づく統計的なネットワーク解析手法を肝硬変及び肝がん細胞において計測されたデータについて適用し、肝がん進展の要因となるネットワーク候補群を同定することで、疾患機序の解明のための実験支援を行う。

A. 研究目的

統計的手法に基づき、ネットワーク推定及び評価の方法をマイクロアレイデータなどの計測データに適用し、肝がん進展の要因となる特異的遺伝子ネットワークを推定する。

B. 研究方法

グラフィカル連鎖モデル及び経路整合性アルゴリズムに基づくネットワーク推定法を肝がんについて計測されたデータに適用し、遺伝子間の関連性をグラフ表現する。

（倫理面の配慮）

当機関においては、理論研究のみを実施するため、動物実験は該当無し。

C. 研究結果

既開発のグラフィカル連鎖モデルに基づくネットワーク推定法を、経路整合性アルゴリズムに基づく推定法と組み合わせることで、クラスター間の関係性から遺伝子間

の関係性を推定する方法に改良した。肝硬変及び肝がん細胞において計測されたデータに適用し進展要因遺伝子ネットワーク群を同定することに成功した。

D. 考察

従来、グラフィカル連鎖モデルに基づく推定法では定性的な進展要因遺伝子群の推定のみ可能であったが、経路整合性アルゴリズムの適用により、遺伝子群の推定が可能になった。具体的な要因遺伝子ネットワーク候補の推定により、推定結果の実験的検証が可能となり、より具体的な実験支援が実現できた。

E. 結論

具体的な要因遺伝子ネットワーク候補群の推定は、実験研究との連携により疾患機序の解明を加速する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K.
Detection of network structure changes by graphical chain modeling: a case study of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. The Institute of Electrical and Electronics Engineers 2009:5624-5630.
- 2) Tokumoto Y, Horimoto K, Miyake J.
TRAIL inhibited the cyclic AMP responsible element mediated gene expression. Biochem Biophys Res Commun 2009;381:533-536.

2. 学会発表

- 1) Nakatsui M, Horimoto K: Parameter Optimization in the network dynamics including unmeasured variables by the symbolic-numeric approach. 3rd OSB, Zhangjiajie, China, Sep. 22, 2009
- 2) Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K:
Detection of network structure changes by graphical chain modeling: a case study of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. IEEE SMC, San Antonio, USA, Oct. 11, 2009

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宇都浩文、上村修司、坪内博仁	肝疾患の血清プロテオミクスを用いた診断	林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹	Annual Review 消化器	中外医学社	東京	2009	200-208
Nakatsui M, (堀本)	Parameter Optimization in network dynamics including unmeasured variables by the symbolic-numeric approach.	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2009 (Lecture Notes in Operation Research 11)	World Publishing Corporation	Beijing	2009	245-253
Saito S, (堀本)	Detection of network structure changes by graphical chain modeling: a case study of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	C. L. Philip Chen & Yo-Ping Huang	2009 IEEE International Conference on Systems, Man& Cybernetics	The Institute of Electrical and Electronics Engineers	New York	2009	5624-5630

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S Ura, (金子、堀本)	Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma.	Hepatology	49(4)	1098-1112	2009
T Yamashita, (金子)	EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features.	Gastroenterology	136(3)	1012-1024	2009
T Yamashita, (金子)	Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.	J Hepatology	50(1)	100-110	2009
Itose I, (竹原)	Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis.	J Viral Hepat	16	844-852	2009
Kohga K, (竹原)	Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma.	Cancer Res	69(20)	8050-8057	2009