

200933033A

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

肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

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

肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究	-----	1
堀田 博		
II. 分担研究報告		
HCV感染による炎症反応がもたらす宿主のゲノム異常の解明	-----	13
丸澤宏之		
プロテオーム解析を用いた肝癌における蛋白質磷酸化の検討	-----	17
佐々木裕		
HCV NS3蛋白質二次構造多型性とC型慢性肝炎の抗ウイルス治療効果 の予測に関する研究	-----	21
河田純男		
肝発がんにおけるHCVコア蛋白質の下流因子探索	-----	26
森石恆司		
HCV蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響の解明	-----	29
加藤宣之		
HCVコア領域の変異が培養細胞内でのウイルス増殖に与える影響	-----	34
加藤孝宣		
B型肝炎ウイルスによる肝発癌	-----	37
小池和彦		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	55

I. 総括研究報告

肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

研究代表者： 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： C型肝炎ウイルス（HCV）及びB型肝炎ウイルス（HBV）による発がん機構の解明を目的として、動物実験モデルによる発がん機構の検討、HCV感染により変動する宿主因子の網羅的解析とゲノム異常の解析、HCV多様性と臨床的意義の検討、HCV蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響の検討を行い、以下の研究成果を得た。1) HCV NS3 蛋白質を発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作製し、高率に脂肪肝と肝細胞がん及び悪性リンパ腫を発生することを見出した。2) Tg マウスモデルやヒト初代肝培養細胞系を用いて、HCV感染や炎症反応により遺伝子編集酵素 APOBEC2 がヒト肝細胞に誘導されること、その結果 APOBEC2 の有する遺伝子変異導入活性により肝細胞のさまざまな遺伝子の RNA 配列に塩基変化が発生することを明らかにした。3) ヒト肝がん細胞株を用いた検討により、リン酸化を介して細胞死抵抗性を担う宿主因子の候補として細胞骨格や分子シャペロンに分類される蛋白質群を同定した。また、ヒト肝がん組織を用いた検討により、非がん部に比してリン酸化が増強あるいは減弱する宿主蛋白質を同定した。4) HCV NS3 のアミノ末端領域の蛋白質二次構造の多型性が、C型慢性肝炎におけるインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果を予測する上で有用であることを示した。5) HCV 病原性発現に関与する宿主蛋白質の探索として、HCV コア蛋白質及び関連する宿主蛋白質 PA28 γ を用いて、ヒト肝細胞ライブラリーから、合計 14 種類の標的候補蛋白質遺伝子を単離した。コア蛋白質と結合する α -Enolase 遺伝子をノックダウンすることにより HCV 増殖に低下が認められることを見出した。6) がん抑制因子 PML が HCV 粒子産生に関与していることを見出した。また、HCV コア蛋白質が PML による p53 の転写機能の活性化を相乗的に増強させることを明らかにした。7) 発がんへの関与が示唆されている HCV コア蛋白質の 70 位及び 91 位のアミノ酸変異は HCV の培養細胞内増殖能に影響を与えず、インターフェロン感受性にも影響を与えないことを明らかにした。8) HBV の X 遺伝子産物（HBx 蛋白質）が、TGF- β 下流のシグナル伝達分子である Smad3 のリン酸化部位を制御することによって、HBV による肝発がんに関与していることを明らかにした。

研究分担者

小池 和彦 東京大学医学部 教授

加藤 宣之 岡山大学医歯薬学総合研究科

教授

佐々木 裕 熊本大学生命科学研究部 教授

河田 純男 山形大学医学部 教授

森石 恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授

丸澤 宏之 京都大学医学研究科 講師

加藤 孝宣 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

現在我が国に 200 万人の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者が存在し、放置すれば多くの者が肝硬変、肝がんへと進展する。しかし、その発がん機序は未だ不明な点が多い。一方、現在の最善の治療法によっても、HCV 慢性肝炎患者の約半数は治癒できない。肝がんは我が国のがん死亡の第 4 位で、HCV と B 型肝炎ウイルス (HBV) 合わせて年間 3 万数千人の肝がん死亡がみられる。その原因の 80% を占める HCV 感染 (C 型肝炎) は、感染者総数と死亡者数の両面から重要な「国民病」である。従って、HCV による肝発がんの分子機構の解明を通して、HCV 感染者からの肝がん発症を早期診断し、発がん阻止・治療法に資する方策を講じることは喫緊の課題である。

これまでに、HCV による発がんに関与することがトランスジェニック (Tg) マウスを用いた解析により示され、同マウスを用いて様々な解析が進められている。一方、他の多くのがんウイルスの場合と同様に、発がんには複数の HCV 蛋白質が関与することが考えられる。とくに、NS3 蛋白質の関与の可能性が指摘されてきた。NS3 蛋白質は、N 末端側にセリンプロテアーゼ活性を、C 末端側に RNA ヘリカーゼ活性を持ち、ウイルス前駆体蛋白質のプロセッシングやウイルスゲノム複製に重要な役割を担っている。一方、我々は臨床疫学研究により、NS3 蛋白質の N 末端 120 残基の二次構造の多様性が肝細胞がんの発生と相関することを報告した。また、NS3 蛋白質が p53 がん抑制蛋白質と結合しその機能を阻害すること、さらに NS3 蛋白質の N 末端側アミノ酸配列の違いにより p53 との結合能が変化することも報告した。さらに、NS3 蛋白質発現により宿主染色体遺伝子の変異が蓄積する可能性も報告されている。このように、NS3 蛋白質の発がんへの関与が次第に明らかとなりつつある。しかし、NS3 蛋白質を発現する Tg マウスの発がんについては未だ十分に検証されておらず、生体レベ

ルでの NS3 蛋白質の働きを解析する有用なツールは確立されていない。

本研究の目的は、これまでに確立されている HCV コア蛋白質発現 Tg マウスや HBV 蛋白質発現 Tg マウスに加えて、新たに HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスや APOBEC 発現 Tg マウスを作製し、それらの発がん動物モデル、及び肝がん患者から得られた肝組織、ならびに近年開発された細胞培養による HCV 複製増殖系や HCV 蛋白質発現系を用いて、肝がんの発生、進展における HCV あるいは HBV 蛋白質の役割を解明することである。特に、HCV 蛋白質による様々な細胞内シグナル伝達の攪乱を介した病原性発現機構及び肝発がん機構を分子レベルで明らかにする。そして、解明された分子機構に基づいて、HCV 及び HBV の排除、肝がん早期診断及び肝発がん阻止・治療法開発の分子基盤を確立する。

B. 研究方法

1. HCV 発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスにおける発がんの解析: HCV サブタイプ 1b から得られた NS3 遺伝子の全長、あるいはプロテアーゼドメインをコードする遺伝子領域を発現プラスミド pBEPBgIII に組み込み、これをトランスジーンとして C57BL/6N 系統マウスを用いて NS3 発現 Tg マウスを作製した。そして、マウス臓器における NS3 mRNA や NS3 蛋白質の発現を定量的 RT-PCR 法及び Western blot 法により解析した。発生病変については、通常の病理組織学的検査、免疫組織化学検査や分子生物学的手法を用いて、病変の性状や遺伝子異常について解析した。

また、トランスジーン発現に用いた HBx プロモーターの活性を検討するため、そのプロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に組込んだプラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。さらに肝細胞とリンパ球系細胞での比較を行うために、

HuH7 細胞と BJAB 細胞を用いて、プロモーター活性の比較検討を行った。

(2) APOBEC 発現 Tg マウスとヒト初代肝培養細胞を用い HCV と APOBEC に関する解析：HCV 感染により肝細胞に発現誘導される APOBEC ファミリー分子の生理機能と遺伝子異常生成の有無を明らかにする目的で、恒常的に APOBEC 分子を発現する Tg マウスモデルを作成し、その表現型を検討した。同時に、APOBEC 発現により肝組織に遺伝子変化が生じたかどうかを検証するために、APOBEC 発現 Tg マウスの肝組織から抽出した DNA ならびに RNA 中の発がん関連遺伝子群の塩基配列を同定・解析した。

また、HCV 感染やその結果生じる炎症反応により肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素を特定するために、それぞれのヒト APOBEC ファミリー分子に特異的な probe を作成し、ヒト初代肝培養細胞に炎症刺激や HCV タンパク質発現させた前後におけるそれぞれの APOBEC ファミリー分子の発現量の変化を定量評価した。

(3) HCV 陽性肝がん組織と非がん部組織の蛋白質発現とリン酸化の比較解析：プロテオーム解析のために組織抽出液を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた 2 次元ゲル電気泳動を行った。さらに蛋白質検出を高感度に行うために SYPRO Ruby を、リン酸化を検討するために ProQ Diamond を使用して特殊染色を施行し、蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。引き続き蛋白質スポットを切り出し質量分析器 (MS/MS) にてリン酸化蛋白質を同定した。同定した蛋白質それぞれについて、遺伝子発現解析も行った。また、ヒト肝がん細胞株に酸化ストレスを加えて細胞死を誘導し、刺激前後の細胞において、蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。引き続き蛋白質スポットを切り出し MS/MS にて

リン酸化蛋白質を同定し、それらの遺伝子発現解析も行った。

(4) 患者血清から分離した HCV NS3 蛋白質の多様性とインターフェロン (IFN) 抵抗性の解析：HCV-1b 型感染で高ウイルス量の C 型慢性肝炎症例のうち、PegIFN・リバビリン (RBV) とともに投与予定量の 80% 以上の投薬がなされ、かつ治療を完遂した 75 症例を対象に、治療効果に及ぼすウイルス要因について検討を行った。NS3 蛋白質二次構造は、患者血清より直接シーケンス法により得られた NS3 推定アミノ酸配列に基づき、既報の方法により決定した。その多型性により、対象をグループ A とグループ B に分類し、PegIFN・RBV 併用療法の治療効果に及ぼす影響について検討した。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 γ に関する解析：Split Ubiquitin 法を用いてコア蛋白質遺伝子を蛍光蛋白質にして、相互作用する膜蛋白質遺伝子単離を試みた。ライブラリーはヒト肝臓細胞を用いて、Ubiquitin N 末端部分を C 末端あるいは N 末端にもつライブラリーコンストラクトを使用した。また、PA28 γ を蛍光蛋白質として、ヒト肝臓ライブラリーをスクリーニングした。単離されてきた蛋白質遺伝子の siRNA を Huh7OK1 細胞に導入し、HCV JFH1 株を感染させて、上清および細胞内のウイルス RNA を Real time PCR によって測定した。PA28 γ を用いて単離してきた遺伝子は培養細胞に発現させ、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、PA28 γ との結合を免疫沈降法によって解析した。

(6) HCV 感染細胞におけるがん抑制因子 PML 及び p53 の役割の解析：Short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスベクターや合成 siRNA を用いて、PML をノックダウンさせた HuH-7 由来 RSc 細胞株を樹立し、

HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される HCV コア蛋白質の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法と ELISA 法で定量した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV 感染や複製により PML の局在が変化するかどうかについて観察した。HCV-JFH1 感染 RSc 細胞や全長 HCV RNA 複製 O 細胞を抗コア蛋白抗体及び抗 PML 抗体で処理後、コア蛋白質は Cy3、PML は FITC により可視化した。

次いで、HCV コア蛋白質発現細胞におけるがん抑制因子 p53 の転写機能に及ぼす影響を解析するために、RSc 細胞に p53 レポータープラスミド、p53 発現プラスミド、PML 発現プラスミド及びコア蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

(7) HCV-1b 株の培養細胞内感染増殖系の構築と IFN 抵抗性に関する解析：HCV 急性肝炎患者血清より得られた AHC-1b 株を用い培養細胞内での感染増殖系を構築した。この株は患者血清から得られた配列のままでは培養細胞内でほとんど増殖を認めなかったため、HCV RNA レプリコンの長期培養実験で得られた適応変異を導入することで、培養細胞中での HCV-1b 株の複製増殖が可能な系を構築した。

JFH-1 株および AHC-1b 株のコア領域の 70 位と 91 位は Arg (R) と Leu (L) であり、いわゆる wild type であった。そこで IFN 抵抗性や肝発がん性に関与しているといわれる 70 位が Gln (Q)、91 位が Met (M) 及び両方の変異を持つ合計 3 種類の変異株 (RM、QL、QM) を JFH-1 株と AHC-1b 株で作製し、全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、培養細胞での増殖能を評価した。

臨床的には Genotype 2a よりも Genotype 1b 株の方が IFN 抵抗性であることが知られている。そこで、AHC-1b 株およびコア領域変異を持った株を培養細胞に導入し、その後培養上清

中に IFN を投与することでコア領域の変異が IFN 感受性に与える影響を評価した。HCV の複製増殖の評価は、培養上清中および細胞中の HCV コア抗原を測定する事により行った。

2. HBV 発がん分子機序の解析

肝生検施行 HBV 関連慢性肝疾患患者の肝組織を用いて、C 末端リン酸化 Smad3 (pSmad3C) に対する抗体、あるいはリンカー部位リン酸化 Smad3 (pSmad3L) 抗体、c-Myc 抗体、抗 HBx 抗体等によって免疫染色を行った。HBx 蛋白質発現 Tg マウスの肝組織にも同様の免疫染色を行った。また、HBx 蛋白質発現培養細胞において、pSmad3 のリンカー部位リン酸化をブロックして、細胞増殖に及ぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等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した。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」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正) 及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正) 並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正) 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。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関する遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(平成 16 年文部科学

省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. HCV 発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3 発現 Tg マウスの作出と解析 : C57BL/6N 系統マウスを用いて 2 系統 (L189 及び L218) の NS3 Tg マウスラインを樹立した。NS3 遺伝子の全長を組込んだ L189 系統及びプロテアーゼドメインをコードする遺伝子領域のみを組込んだ L218 系統では、RT-PCR 法により NS3 mRNA の発現が確認された。しかしながら、NS3 蛋白質の発現レベルが低く、Western blot 法では発現の確認は明確にはできなかった。

L189 系統、L218 系統いずれの NS3 Tg マウスでも、18 ヶ月齢以降に、約 60%において脂肪肝が発症した。さらに、L189 系統では、約 15%に原発性肝がんの発症が認められた。それらは組織学的には高分化～中分化肝細胞がんであった。また、両系統とも 40%以上の Tg マウスに悪性リンパ腫が見られ、腸管リンパ組織増殖病変を加えると、NS3 Tg マウスの約 70%にリンパ球の異常増殖を認めた。悪性リンパ腫は T 細胞マーカーは陰性で、1 例のみ NK 細胞マーカー陽性を示した。B 細胞マーカーについては現在検討中である。なお、悪性リンパ腫のうち activation induced cytidine deaminase (AID) の過剰発現が認められるものも見出された。

全長 HBx プロモーター及び L189 系統の NS3 Tg マウスに見られる欠損プロモーターの

活性を比較した。ヒト肝がん由来の HuH7 細胞では、L189 欠損プロモーター活性は全長プロモーターと比較して約 50%に低下していた。一方、ヒト B 細胞由来の BJAB 細胞では、L189 欠損プロモーター活性は全長プロモーターと比較して約 20%低下したのみであった。

(2) HCV と APOBEC に関する解析 : APOBEC2 発現 Tg マウスは、生後 1 年以降に、肝細胞がん、肺がん、悪性リンパ腫など全身に高頻度に腫瘍を発生することが明らかとなった。肝細胞がんは、病理組織学的にはヒト高分化型肝がんにくわめてよく類似した像を呈していた。背景となる肝組織には脂肪化は認められなかった。

次に、Tg マウスの腫瘍発生は、APOBEC2 がその遺伝子編集作用を発揮した結果、発がんに関連した遺伝子に塩基変化が生じたことに起因するという可能性を検証するため、APOBEC2 Tg マウスの肝組織から DNA と RNA を抽出し、代表的ながん遺伝子・がん抑制遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて同定した APOBEC2 Tg マウスの肝組織の DNA 配列に認められた塩基置換の頻度は、野生型のコントロールマウスと比較して有意な差を認めなかった。これに対して、APOBEC2 Tg マウスの肝組織から抽出した RNA を検討したところ、さまざまながん遺伝子・がん抑制遺伝子の mRNA 塩基配列が、野生型のコントロールマウスと比較して、顕著に多数の塩基変化が生じていることがわかった。

生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 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 蛋白質や炎症性サイトカインである TNF- α 刺激によりヒト肝細胞に APOBEC2 が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。これらの APOBEC2 誘導刺激因子は、細胞内では転写因子 NF- κ B を活

性化することが共通の特徴であったため、NF- κ B 阻害剤、IKK- α , IKK- β の dominant negative form 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 APOBEC2 発現が減少～消失することが確認された。以上より、HCV 感染やその結果生じる炎症反応による NF- κ B 活性化が、肝細胞において APOBEC2 の転写を誘導・活性化することが明らかとなった。

(3) HCV 陽性肝がん組織と非がん部組織の蛋白質発現とリン酸化の比較解析：HCV 陽性肝がん組織では、非がん部組織に比べてリン酸化が増強、あるいは減弱している蛋白質がそれぞれ約 30 種類同定された。さらにこれら蛋白質の遺伝子発現を確認したところ、がん部・非がん部の間では、有意な遺伝子発現の変化は伴わなかった。

一方、HepG2 細胞、Huh7 細胞、ならびに Hc 細胞では、酸化ストレス刺激に感受性が異なっており、HepG2 細胞が最も抵抗性を示した。蛋白質のリン酸化の変化については、刺激後 1 時間でリン酸化スポットは約 30 個認められ、これらスポットに該当する蛋白質の発現量の変化は 40-180%であった。刺激によりリン酸化が有意に変動する蛋白質は、細胞骨格や分子シャペロンに関連する蛋白質であった。一方、刺激後 1 時間、3 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた細胞死関連遺伝子数は各々 8 遺伝子、14 遺伝子であった。さらにネットワーク解析から、酸化ストレスによるリン酸化の変化が、細胞死関連遺伝子を誘導する可能性が示唆された。

肝がん組織・非がん部組織間でリン酸化が変化する蛋白質群と、酸化ストレスにより肝がん細胞株でリン酸化が変化する蛋白質群との間では、少なくとも 10 種類の蛋白質に一致が認められた。

(4) 患者血清から分離した HCV NS3 蛋白質の多様性と IFN 抵抗性の解析：症例全体の治療成績は、治癒症例 (SVR) 33 例 (49%)、非治癒 (NVR) 35 例 (51%) であった。HCV NS3 蛋白質の二次構造分類によるグループ A では SVR 18 例 (64%)、NVR 10 例 (36%) に対し、グループ B では SVR 15 例 (38%)、NVR 25 例 (62%) であり、グループ A に SVR が、グループ B に NVR が多かった ($P < 0.05$)。また治療開始 12 週時点の HCV RNA 陰性化 (EVR) 症例はグループ A では 19 例 (68%) に対し、グループ B では 17 例 (43%) であり、グループ A に EVR が多かった ($P < 0.05$)。両グループで、年齢、性、HCV RNA 量、ALT、肝線維化ステージに有意差は見られなかった。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 γ に関する解析：コア蛋白質によって単離されてきた宿主蛋白質遺伝子は合計 11 あったが、そのうち 3 遺伝子のノックダウンを試みた。siRNA によって有為な発現レベルが低下したことを Real time PCR によって確認した。遺伝子ノックダウン 24 時間後に、HCV JFH1 を moi=0.5 で感染させて、24 から 120 時間後に細胞および細胞上清を回収し、HCV RNA および GAPDH の mRNA 量を測定した。そのうち、 α -Enolase 遺伝子の発現をノックダウンした場合、JHCV RNA 量は細胞内および細胞外において有為に減少した。他遺伝子発現においては影響を認めなかった。

また、PA28 γ を囚蛋白質としてヒト肝臓ライブラリーから 3 種類の遺伝子が単離された。肺がんマーカー蛋白質遺伝子とポリコム遺伝子が単離され、ともに細胞内の局在が PA28 γ と一致し、免疫沈降による蛋白質間結合が確認された。siRNA による遺伝子ノックダウン後、HCV 感染をさせても細胞内および培養上清中のウイルス RNA 量に差が認められなかった。

(6) HCV 感染細胞におけるがん抑制因子

PML 及び p53 の役割 : HCV-JFH1 感染 (moi=4) 31 時間後の PML ノックダウン RSc 細胞内での HCV コア蛋白質量が対照細胞と同程度であるにも関わらず、培養上清中に分泌された HCV コア蛋白質は対照細胞の 19%まで顕著に減少していることを見出した。さらに、感染 (moi=0.1) 4 日後の培養上清中のコア蛋白質量は対照細胞の 5%までに減少したが、細胞内の HCV RNA 複製レベルは 50%程度の減少に留まっていた。一方、HCV 感染や複製による PML nuclear body の破壊や PML の細胞内局在には大きな変化は観察されなかった。また、HCV 感染 PML ノックダウン細胞も対照細胞同様、HCV コア蛋白質が脂肪滴と共局在していることが観察された。

一方、RSc 細胞において、PML IV は p53 の転写機能を活性化した。さらに HCV コア蛋白質を共発現させても、p53 の転写機能は抑制されず、PML IV による p53 の転写機能の活性化を相乗的に増強させた。

(7) HCV-1b 株の培養細胞内感染増殖系の構築と IFN 抵抗性に関する解析 : HCV 急性肝炎患者血清より得られた AHC-1b 株の NS5A 領域変異株 (5a-S/Y 株及び 5a-S/G 株) が培養細胞内で複製増殖可能であることを明らかにした。そして、これらの株のコア領域の 70 位と 91 位の変異が、HCV の複製増殖能に与える影響を検討した。まず、JFH-1 株の wild type (RL) をコア変異株 (RM、QL、QM) と比較した。その結果、70 位の変異を持った QL、QM 変異株では、遺伝子導入後 24 時間での培養細胞中のコア抗原量が低く、細胞内での増殖がやや遅い傾向を認めた。しかし、培養上清中のコア抗原量には差を認めなかった。さらに AHC-1b の 5a-S/Y 株、5a-S/G 株で wild type (RL) とコア変異株 (RM、QL、QM) を比較した。その結果、5a-S/Y 株、5a-S/G 株ともに培養細胞内、上清中ともに HCV コア抗原量に差を認めなかった。

そこで、さらに AHC-1b の 5a-S/Y 株を用い wild type (RL) とコア変異株 (RM、QL、QM) の IFN 感受性について検討した。その結果、培養上清中の HCV コア抗原量は 92 - 97%の抑制、細胞中の HCV コア抗原量は 90 - 92%の抑制を認め、IFN による AHC-1b 5a-S/Y 株の強い増殖抑制効果が観察された。そしてその抑制効果はコア領域の変異には影響されなかった。

2. HBV 発がん分子機序の解析

B 型慢性肝炎患者の肝組織における pSmad3L と pSmad3C の染色性は互いに相反性を示し、pSmad3L が核に強く染色される症例では pSmad3C の染色性は弱かった。核における pSmad3L の染色性は、患者血中 HBV DNA 量に相関した。その後に肝がんを発生した B 型慢性肝炎患者肝においては、HBx、pSmad3L、cMyc の発現は互いに関連しており、肝硬変、肝がんへの進行とともに染色性は強まった。JNK、pSmad3L、c-Myc の発現パターンは一致しており、肝病変の進行 (肝硬変、肝がん) とともに増加した。対照的に、pSmad3C/p21WAF1 の染色性は減弱した。肝生検時に pSmad3L の染色性が強かった症例においては、28 例中 6 例で肝がんが発生したが、pSmad3L 発現の弱い症例では 32 例中 1 例のみであった。反対に、pSmad3C 発現の弱い例のみで肝がんが発生し、pSmad3C 発現の強い例においては肝がんは認められなかった。なお、HBV 肝がんにおいては TGF β 受容体 (TR β II)、Smad2、Smad4 遺伝子には変異は認められなかった。

HBx 蛋白質発現 Tg マウスにおいても HBx、pSmad3L、c-Myc の染色性はよく一致した。また、正常肝から、前がん病変、肝がんへの進行とともに、染色性は増加した。また、培養細胞において、pSmad3 のリンカー部位リン酸化をブロックすると、HBx 発現細胞における pSmad3L による細胞増殖が抑制された。

D. 考察

1. HCV 発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3 発現 Tg マウスの作出と解析：HCV コア蛋白質発現 Tg マウスの研究から、コア蛋白質が脂肪肝、肝がんの発生に深く関与していることが知られている。一方、NS3 蛋白質は主に培養細胞レベルでの研究、あるいは臨床疫学的研究から発がんへの関与が考えられているが、動物実験による *in vivo* での解析は十分とは言えない。本研究において、新たに NS3 Tg マウスを作出し、それらの Tg マウスが高率に脂肪肝を発症し、さらに肝がんや悪性リンパ腫の発症と関連することが明らかになった。

また、HCV と関連する悪性リンパ腫の存在が臨床的にも知られているが、NS3 Tg マウスでは高率にリンパ球の異常増殖が見られ、NS3 蛋白質がリンパ球の増殖、腫瘍化に何らかの影響を及ぼしていることが推測された。クラススイッチに必須な変異誘導因子とされる AID の過剰発現が悪性リンパ腫の 2 例で免疫組織化学的に確認された。NS3 発現により宿主遺伝子突然変異の導入率が上昇している可能性も考えられるので、定量 PCR 法により各組織、特にリンパ組織での AID 発現を調べ、リンパ球増殖性病変との関連を解析する予定である。

さらに、プロテオーム解析により、発症前の NS3 Tg マウスの蛋白質発現プロファイルの特徴を網羅的に調査し、変化を示す蛋白質、遺伝子を解析することで、NS3 蛋白質の生体への影響、とくに発がんへの関与を明らかにしたい。

(2) HCV と APOBEC に関する解析：遺伝子編集酵素ファミリー分子のひとつである APOBEC2 が、HCV 感染を契機とする慢性肝炎から肝発がんに至る過程において、肝細胞に発現誘導されることがわかった。また、APOBEC2 が肝細胞に発現する結果、発がんに関連した遺伝子の RNA に塩基変化が惹起されること、APOBEC2 が肝組織に恒常的に発現した結果、肝細胞がんが発生することが、

APOBEC2 Tg マウスの解析から明らかとなった。以上の結果から、HCV 感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、遺伝子編集酵素 APOBEC2 の発現が肝細胞に誘導され、宿主肝細胞のさまざまな遺伝子の RNA 配列に異常が惹起されることが、ヒト肝がんの発生に深く関与している可能性が示唆された。

(3) HCV 陽性肝がん組織と非がん部組織の蛋白質発現とリン酸化の比較解析：蛋白質機能は細胞内局在や翻訳後修飾により厳密に制御されている。翻訳後修飾の一つであるリン酸化の解析は、病態におけるさまざまな分子の役割を的確に把握するために重要である。一方、肝がんの治療抵抗性の分子基盤として、細胞死抵抗性、無制限な細胞増殖能、血管新生能、転移浸潤能が関与している。とりわけ細胞死抵抗性は、免疫監視機構からの回避、抗がん剤に対する薬剤耐性などに反映されており、その制御は治療成績の向上に直結する。今回、ヒト肝がん細胞株を用いた *in vitro* での検討では、細胞によって、細胞死誘導刺激に対する反応性が異なっており、細胞株間の蛋白質発現・翻訳後修飾の解析、遺伝子発現解析とネットワーク解析を組み合わせることで、肝がん細胞に備わる細胞死抵抗性を担う候補責任分子群の絞りこみが可能になった。今後、これらの責任分子をさらに絞りこみ、その機能的重要性を明らかにする予定である。また、酸化ストレス刺激前後で誘導される分子群を網羅的に解析することは、肝がん細胞を取り巻く慢性炎症による epigenetic な影響が細胞死抵抗性をどのように修飾するかを明らかにするものとして期待される。

一方、ヒト肝がん組織の検討では、さらに多数症例での検討を行うべく、現在、症例の集積を行っている。ヒト肝がん細胞株による *in vitro* の結果と、ヒト肝がん組織により得られる *in vivo* の結果とを比較検討することで、肝がんの治療抵抗性の分子基盤が明らかにされ

るものと考える。

(4) 患者血清から分離した HCV NS3 蛋白質の多様性と IFN 抵抗性の解析: HCV NS3 蛋白質が担うセリンプロテアーゼが感染細胞内で Cardif 分子を切断不活化することで、interferon regulatory factor-3 (IRF-3) のリン酸化と二量体形成を阻み、核移行を抑えることで、細胞内 IFN シグナル伝達を阻害する。これは、宿主側の自然免疫能の阻害という形でウイルスの持続感染成立に有利に作用する。さらに、IRF-3 二量体は、IFN-stimulated response element (IRSE) に結合して IFN により誘導される宿主側の種々の抗ウイルス蛋白質の誘導に関わるので、IRF-3 の不活化は IFN による抗ウイルス治療の効果にも影響することが予想される。また、NS3 蛋白質は、がん抑制因子 p53 と結合し、p53 依存性アポトーシスや p21 転写活性を抑制することが知られており、培養細胞に悪性形質転換を惹起することが報告されている。従って、NS3 蛋白質は、HCV による発がん機序の一端に関与している可能性がある。

今回、C 型慢性肝炎患者の標準治療法である PegIFN・RBV 併用療法において、NS3 がグループ A の感染者では、グループ B の感染者に比し有意にウイルス排除に成功した者が多いことが示された。今後、より多くの症例でこの事象を確認するとともに、その分子機序を明らかにする必要があると考えられた。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 γ に関する解析: コア蛋白質によるヒト肝臓ライブラリースクリーニングでは Signal peptide peptidase (SPP) 遺伝子が単離された。SPP はコア蛋白質を切断する内在性蛋白質分解酵素であり、ウイルス増殖に必須であることを、我々を含めたグループから多数の報告がある。従って、この遺伝子がコア蛋白質によって単離されたことはこのシステム自体が正常に機能しているこ

とを示している。また、PA28 γ を圈蛋白質としてヒト肝臓ライブラリーをスクリーニングしたとき、PA28 γ 遺伝子自身が単離された。PA28 γ はホモ 7 量体を形成することから、PA28 γ 自身が単離されたことから、このシステムが正常に機能している事を示唆している。

コア蛋白質を用いて単離された α -Enolase がウイルス複製あるいはそれ以外の過程で機能している事が考えられる。 α -Enolase は解糖系の酵素で、2-ホスホグリセリン酸がホスホエノールピルビン酸に変換する。宿主解糖系がウイルス増殖に関与する可能性が示されたが、より詳細な機能解析が今後必要である。また、PA28 γ を用いて単離された宿主遺伝子産物は、細胞内での局在の一致と結合が確認された。しかしながら、それら遺伝子発現をノックダウンしてもウイルス増殖に影響を与えなかった。

(6) HCV 感染細胞におけるがん抑制因子 PML 及び p53 の役割の解析: 多くのウイルス感染において、PML が分解されたり、細胞質にトラップされ、その機能が抑制されることが知られている。HCV 感染細胞や HCV RNA 複製細胞においては、PML の細胞内局在の変化は認められなかった。しかし、PML は HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。一方、PML は HCV RNA 複製には関与しなかった。PML ノックダウン細胞において HCV コア蛋白質は脂肪滴に局在したので、PML はコア蛋白質が脂肪滴に局在した後のステップに関与していることが示唆された。また、コア蛋白質は PML による p53 転写機能の亢進をさらに増強させた。HCV 感染細胞におけるアポトーシスの誘導との関連が示唆された。

(7) HCV-1b 株の培養細胞内感染増殖系の構築と IFN 抵抗性に関する解析: 培養細胞中での複製増殖が可能な 2 種類の HCV 株 (JFH-1 株; Genotype 2a、AHC-1b 株; Genotype 1b) を用い、コア領域 70 位と 91 位の変異のウイル

ス複製に与える影響を評価した。その結果、これらの変異はウイルス複製増殖にほとんど影響を与えていない事が明らかになった。さらに AHC-1b 株については IFN に対する感受性も評価したが、これについてもコア領域の変異による差を認めなかった。これらの結果は、コア領域の変異はウイルス側の因子としてウイルスの増殖能に影響を与えているのではなく、むしろ宿主側の因子に影響を与えることで IFN 感受性や肝発がんに関与している可能性が示唆された。

2. HBV 発がん分子機序の解析

B 型肝炎における肝発がん機序として、HBV ゲノムの組込み、染色体組換え亢進などと並んで、トランス活性化蛋白質である HBx 蛋白質の関与が挙げられる。実験系ではがん遺伝子の発現をも増強する。HBV 自身のエンハンサーを活性化して、HBV の増殖を調節するという働きも持つ。HBx 蛋白質は MAP キナーゼ等の細胞内シグナル伝達を亢進させ、細胞増殖をもたらす働きが示されている。さらに、細胞周期やアポトーシスに影響を与え、細胞増殖と細胞死の双方に影響を与えている。

3 つの独立したグループによる Tg マウスを使った研究で、HBx 蛋白質の肝発癌作用が示されている。HBx はいわゆるがん遺伝子産物ほどの発がん作用は持たないが、細胞増殖/死を調節することで、肝臓におけるがん化に関与していると推測される。この様に、HBx 蛋白質は B 型肝炎における肝発がんにおいて重要な役割を演じていると考えられるが、今回の我々の結果は、HBx による肝発がんにおける下流シグナルの一つの可能性を示すものであり、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

E. 結論

(1) HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスを樹立した。この NS3 Tg マウスは高率に脂肪肝を発症

し、肝細胞がんや悪性リンパ腫を発生した。この NS3 Tg マウスは、肝がんや悪性リンパ腫の発がん分子機序の解明に有用である。

(2) HCV 感染と炎症反応により NF- κ B が活性化され、異所性に遺伝子編集酵素 APOBEC2 が肝細胞に発現誘導されることが判った。APOBEC2 発現 Tg マウスは高率に肝細胞がん、肺がん、悪性リンパ腫など発生することがわかった。

(3) ヒト肝がん細胞株やヒト肝がん組織を対象に、翻訳後修飾による蛋白質機能の観点から解析し、肝がんの治療抵抗性の分子基盤の一つである細胞死抵抗性を担う候補責任分子群を絞りこんだ。

(4) HCV NS3 蛋白質の N 末端領域の二次構造の多型性が、C 型慢性肝炎における PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の予測に有用であることを示した。HCV テーラーメイド医療の確立に向け更に研究を進める必要がある。

(5) HCV コア蛋白質と結合する因子として、 α -Enolase を単離した。宿主解糖系と HCV 増殖との関連性が示唆された。また、PA28 γ と結合する蛋白質の細胞内局在を確認した。活性酸素産生などの機能解析が必要と考えられた。

(6) HCV 粒子産生にがん抑制因子 PML が関与していることが示唆された。HCV 感染や複製による PML の局在の変化はみられなかった。HCV コア蛋白質は PML による p53 の転写機能の活性化を相乗的に増強させた。

(7) 肝発がんに関与する HCV コア蛋白質の変異は、HCV の増殖や IFN 感受性に影響を与えていないことが明らかになった。今後、これらの変異がアポトーシス誘導能や IFN シグナ

ルに与える影響を検討する必要がある。

(8) HBV の肝発がん機序として、HBx から細胞増殖、肝発がんへ至る経路の一つとして、TGF β 下流の Smad3 のリン酸化の分別化による経路が重要であることを示した。今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (研究代表者分)

論文発表

1. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human mcl-1. *J Virol*, Oct; 83 (19): 9993-10006, 2009.
2. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide YH, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol*, 90 : 1681-91, 2009.
3. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 50(5): 883-894, 2009.
4. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*, 83(18):9237-9246, 2009.
5. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem*, 106(6):1123-1135, 2009.
6. Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion*, 79(1): 36-39, 2009.
7. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* (in press).
8. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 53:49-54, 2010.
9. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to

previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology* 53: 44-48, 2010.

国際学会発表

1. Hotta H. Antiviral resistance. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 18-21, 2009. Toronto, Canada.
2. Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Molecular Mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 Diabetes. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
3. Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Activation of JNK, but not P38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
4. Shoji I, Katsutoshi Abe, 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. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
5. Shoji I, Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, October 30-November 3, 2009. Boston, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(研究代表者分)

該当なし

II. 分担研究報告

HCV 感染による炎症反応がもたらす宿主のゲノム異常の解明

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)感染や炎症反応により、遺伝子編集酵素 APOBEC2 がヒト肝細胞に誘導されること、その結果 APOBEC2 の有する遺伝子変異導入活性により肝細胞のさまざまな遺伝子の RNA 配列に塩基変化が発生することが明らかとなった。ヒト自身の RNA に変異を誘導する活性をもつ APOBEC2 の異常発現が、HCV 感染からの肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

A. 研究目的

遺伝子編集機能をもつ Apolipoprotein B 100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family 分子はこれまでヒトでは約 11 種類が同定されている。APOBEC family の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、いくつかの分子についてはその機能が明らかにされつつある。例えば、APOBEC1 は脂質代謝に深く関与しており、ApoB100 遺伝子の RNA の特定の部位に変異を導入する作用を発揮することで、脂質の運搬に異なる役割を果たす 2 種類の遺伝子産物を作り出すことに寄与している。一方、Activation-induced cytidine deaminase (AID) は活性化 B 細胞において免疫グロブリン遺伝子に高頻度に体細胞突然変異を引き起こすと同時に、DNA 2 本鎖切断を誘発することにより抗体のクラススイッチ組み換えを誘導する機能を有する必須の分子であることが示されている。また APOBEC3G や APOBEC3F は、リンパ球に感染したヒト免疫不全ウイルス(HIV)の遺伝子配列に

変異を導入することにより、宿主の免疫応答に際して抗ウイルス分子として機能していることが知られている。このように、遺伝子編集酵素はそれぞれが標的とする特定の RNA や DNA に変異を誘導する作用を介して、免疫系や代謝反応において重要な役割を果たしていることがわかってきた。他方、これらの遺伝子編集酵素が本来の発現部位以外の組織や細胞で異所性に発現誘導すると、さまざまな癌遺伝子・癌抑制遺伝子に体細胞変異が生じることも明らかとなってきた。例えば、AID は通常は活性化 B 細胞にのみ発現しており、正常な肝細胞ではその発現をみることはないと言われてきた。しかしながら、我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染により慢性肝疾患を伴った肝細胞では AID が異所性に過剰発現しており、肝細胞への AID 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てくることが示唆されるようになってきた。

そこで、これらの遺伝子編集酵素による遺伝子異常の導入活性に着目し、HCV 感染

からの肝癌発生過程において惹起される肝細胞への遺伝子変化の全体像をとらえるとともに、その発生機構を検討することにより、HCV感染からの肝発癌の分子機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

- (1) HCV感染やその結果生じる炎症反応により、肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素を特定する。具体的には、それぞれのヒト APOBEC family 分子に特異的な probe を作成し、ヒト初代肝培養細胞に炎症刺激や HCV のコードするウイルスタンパク質の発現を加えた前後におけるそれぞれの APOBEC family 分子の発現量の変化を定量評価する。
- (2) HCV 感染により肝細胞に発現誘導される APOBEC family 分子の生理機能と遺伝子異常生成の有無を明らかにする目的で、恒常的に APOBEC 分子を発現するトランスジェニックマウスモデルを作成し、その表現型を検討する。同時に、APOBEC 発現により肝組織に遺伝子変化が生じたかどうかを検証するために、APOBEC トランスジェニックマウスの肝組織から抽出した DNA ならびに RNA 中の発癌に関連した代表的な遺伝子群の DN 塩基配列を同定・解析する。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針」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) 生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 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 のコードするウイルスタンパク質や炎症性サイトカインである TNF- α 刺激によりヒト肝細胞に APOBEC2 が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。これらの APOBEC2 誘導刺激因子は、細胞内では転写因子 NF- κ B を活性化することが共通の特徴であったため、NF- κ B 阻害剤、IKK- α , IKK- β の dominant negative form 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 APOBEC2 発現が減少～消失することが確認された。以上より、HCV 感染やその結果生じる炎症反応による NF- κ B 活性化が、肝細胞において APOBEC2 の転写を誘導・活性化することが明らかとなった。

- (2) CAG promoter 下に APOBEC2 を発現するベクターを用いて、全身に恒常的に APOBEC2 を発現するトランスジェニックマウスを作成した。APOBEC2 トランスジェニックマウスは発生過程においては目立った異常を認めなかったが、生後1年以降に全身に高頻度に腫瘍を発生することが明らかとなった。APOBEC2 トランスジェニックマウスに発生した腫瘍としては、肝細胞癌、肺癌、悪性リンパ腫などが確認された。APOBEC2 トランスジェニックマウスに発生した肝細胞癌は、病理組織学的には

ヒト高分化型肝癌にきわめてよく類似した像を呈しており、背景となる肝組織には脂肪化などの変化は認められなかった。

次に、トランスジェニックマウスの腫瘍発生は、APOBEC2 がその遺伝子編集作用を発揮した結果、発癌に関連した遺伝子に塩基変化が生じたことに起因するという可能性を検証するため、APOBEC2 トランスジェニックマウスの肝組織から DNA と DNA をそれぞれ抽出し、代表的な癌遺伝子・癌抑制遺伝子の塩基配列を同定した。塩基配列の同定には、多数の遺伝子クローンを同時に大規模解析することが可能となる次世代シーケンサーを用いた。APOBEC2 トランスジェニックマウスの肝組織から抽出した代表的な癌遺伝子・癌抑制遺伝子の DNA 配列に認められた塩基置換の頻度は、野生型のコントロールマウスの肝組織由来の DNA と有意な差を認めなかった。これに対して、APOBEC2 トランスジェニックマウスの肝組織から抽出した RNA を検討したところ、さまざまな癌遺伝子・癌抑制遺伝子の mRNA 塩基配列が、野生型のコントロールマウスの肝組織由来の RNA 配列と比較して顕著に塩基変化が生じていることが明らかとなった。

D. 考察

遺伝子編集酵素ファミリー分子のひとつである APOBEC2 が、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、肝細胞に発現誘導されることがわかった。また、APOBEC2 が肝細胞に発現する結果、発癌に関連した遺伝子の RNA に塩基変化が惹起されること、APOBEC2 が肝組織に恒常的に発現した結果、肝細胞癌が発生す

ること、が APOBEC2 トランスジェニックマウスの詳細な解析から明らかとなった。以上の結果から、HCV 感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、遺伝子編集酵素 APOBEC2 の発現が肝細胞に誘導され、宿主肝細胞のさまざまな遺伝子の RNA 配列に異常が惹起されることが、ヒト肝癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染と炎症反応により NF- κ B が活性化された結果、異所性に遺伝子編集酵素 APOBEC2 が肝細胞に発現誘導されることが明らかとなった。APOBEC2 の遺伝子編集酵素活性により、肝細胞に RNA 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可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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(4):469-478, 2009.
- (2) 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,