

2009.

(3) Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer*, 125: 2029-2035, 2009.

(4) Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links inflammation to carcinogenesis. *J Gastroenterology*, 2010 (in press).

## 2.学会発表

(1) 丸澤宏之. 炎症発癌における遺伝子異常の分子機構. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜. 2009/10/02

(2) 高井淳, 丸澤宏之、千葉勉. 肝幹/前駆細胞への遺伝子異常蓄積からの肝発癌機構. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 京都. 2009/10/15

(3) 和田将弥, 丸澤宏之、千葉勉. C型肝炎ウイルス感染により惹起されるインターフェロン関連遺伝子異常. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 京都. 2009/10/15.

(4) 丸澤宏之. 消化器癌の発生過程において炎症が遺伝子異常の生成に果たす役割. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 京都. 2009/10/15.

(5) 千葉勉, 丸澤宏之. 炎症からの発癌における新しい遺伝子変異導入機構. 第82回日本生化学会大会. 神戸. 2009/10/22.

(6) 丸澤宏之、千葉勉. 炎症発癌におけるゲノム不安定性誘導機序の解析とその標的治療. 第37回日本臨床免疫学会総会. 東京. 2009/11/14.

(7) Chiba T, Marusawa H. Activation-induced cytidine deaminase (AID) plays an important role in induction of gene mutations and genomic instability during inflammation-associated carcinogenesis. *THE 25TH RADIATION BIOLOGY CENTER INTERNATIONAL*. 京都. 2009/12/01.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし

2. 特許取得 なし

## プロテオーム解析を用いた肝臓における蛋白質磷酸化の検討

研究分担者：佐々木裕 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学

研究協力者：荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学

藤元治朗 兵庫医科大学第一外科学

**研究要旨** 原発性肝細胞癌(以下、肝臓)に対しては、外科的切除、経皮的凝固療法、経血管的治療法、放射線療法などさまざまな治療法が臨床に導入されているが、同時性異時性多中心性発癌をきたす特性がゆえに十分な治療効果が得られず、予後不良な癌種の一つとして認識されている。本研究ではそのような治療抵抗性の分子基盤の一つである”細胞死抵抗性”に焦点を当て、責任分子群を同定するために、遺伝子・蛋白質発現解析に加え、翻訳後修飾の評価による蛋白質機能解析を行った。その結果、ヒト肝臓細胞株を用いた検討では、細胞骨格や分子シャペロンに分類される蛋白質群が、磷酸化を介して細胞死抵抗性を担う可能性が示された。さらにヒト肝臓組織における検討では、非癌部に比して磷酸化の増強あるいは減弱する蛋白質が同定され、肝臓細胞株との対比検討から、複数の共通した蛋白質が細胞死抵抗性の候補責任分子として絞り込まれた。

### A. 研究目的

本邦における原発性肝細胞癌(以下、肝臓)の年間死亡数は約 3.5 万人にも及び、癌死亡原因の男性では第 3 位、女性では第 4 位を占めている。肝臓の中で約 8 割を占める C 型肝炎ウイルス(以下 HCV)陽性肝臓では多中心性発癌が特徴であり、外科的切除や凝固療法により一旦局所根治が得られても、再発を認める場合が多い。加えて腫瘍の進行度または患者の残肝予備能の低下などの理由で外科的切除が可能な症例は少なく、切除不能肝臓、あるいは再発癌に対しては、TACE (経カテーテル的動脈塞栓術)、ラジオ波熱凝固治療(RFA)、経皮的エタノール注入療法(PEIT)、動注化学療法など内科的治療が主として行われている。しかしながらこれらの治療効果も十分なものとは言えず、このようにさまざまな治療法に抵抗性

を示す肝臓は予後不良な癌種である。従って、肝臓に対する治療成績のさらなる向上は、厚生労働行政上も重要な課題の一つである。

本研究では「治療抵抗性」の原因の一つである”細胞死抵抗性”を担う責任分子群を同定することを目的とする。ここで重要な点は、「治療抵抗性」を担う責任分子群の同定とその機能の解明には、遺伝子・蛋白質発現に加え、翻訳後修飾の評価を用いた蛋白質機能解析が不可欠であることである。さらに肝炎ウイルス感染、肝炎ウイルス蛋白質が、責任分子群の遺伝子発現、蛋白質発現、翻訳後修飾にどのように関与するかを、ヒト肝臓細胞株やヒト肝臓組織を用いて検討する。

### B. 研究方法

1) ヒト肝臓細胞株を用いた蛋白質磷酸化の

解析

肝細胞癌株(HepG2, Huh7)を用い、細胞死を誘導するために酸化ストレス(1mM 過酸化水素)にて刺激し、FACSを用いて細胞死を評価した。コントロールとしてヒト肝細胞株(Hc細胞)を用いた。プロテオーム解析のために刺激前後でcell lysateを調整し、多重蛍光色素標識法(Cy3/5)を用いた2次元ディフレンシャ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、磷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、刺激前後での蛋白質発現あるいは磷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)にて磷酸化蛋白質を同定した。一方、遺伝子発現解析として刺激前後でRNAを抽出した上でcDNAを作製し、Gene Chip(Human genome U133 Plus 2.0 Array)を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。最終的には情報統合プラットフォームを用いて、蛋白質発現・磷酸化解析と遺伝子発現解析との結果を統合するネットワーク解析を行い、酸化ストレスに対する抵抗性を担う分子群の絞込みを行った。

## 2)ヒト肝癌組織を用いた蛋白質発現・磷酸化の解析

兵庫医科大学第一外科にて肝切除術を施行されたHCV陽性肝癌組織とその非癌部組織5症例を対象に、上述と同様の手法にて蛋白質発現・磷酸化の解析、ならびに遺伝子発現解析を行った。

なお、ヒト肝癌組織を用いた解析に関しては、対象となった5名の患者さんに十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得ている。またすべての症例については匿名化し、また患者情報とプライバシーの管理を厳重に行っている。

本研究内容については、熊本大学大学院医学

薬学研究部ならびに兵庫医科大学それぞれの倫理委員会より承認を得ている。

## C.研究結果

### 1)ヒト肝癌細胞株での検討

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り、HepG2細胞が最も抵抗性を示した。蛋白質機能の制御に必要な磷酸化の変化については、刺激後1時間で磷酸化スポットは約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。刺激により磷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磷酸化の変化が、細胞死関連遺伝子を誘導する可能性が示唆された。

細胞死抵抗性を呈するHepG2細胞より得られた上述の結果を元に、アポトーシス感受性の異なる肝癌細胞株と比較検討することで、細胞死抵抗性を担う責任分子群の絞込みを行っている。

### 2)ヒト肝癌組織での検討

HCV陽性肝癌組織では、非癌部組織に比べて磷酸化(活性化)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、癌部・非癌部の間では、有意な遺伝子発現の変化は伴わなかった。肝癌組織・非癌部組織間で磷酸化が変化する蛋白質群と、酸化ストレスにより肝癌細胞株で磷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。

#### D. 考察

蛋白質機能は遺伝子発現に比べ疾患の表現型により近く、またその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。このため翻訳後修飾の一つである磷酸化の解析は、蛋白質機能の解析に繋がり、病態におけるさまざまな分子の役割を的確に把握することが可能となる。一方、肝癌の「治療抵抗性」の分子基盤としては、細胞死抵抗性、無制限な細胞増殖能、血管新生能、転移浸潤能の4つの生物学的特性が関与している。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と考えられる。今回、ヒト肝癌細胞株を用いた *in vitro* の検討では、複数の肝癌細胞株やヒト肝細胞株では細胞死を誘導する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、肝癌細胞に備わる「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。これらの結果を踏まえて、今後、Fas、抗がん剤など種々の細胞死刺激による同様の検討を行い、細胞死抵抗性の責任分子をさらに絞りこみ、そのうえで siRNA 等を用いて機能的な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、肝癌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、ヒト肝癌組織の検討では、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。ヒト肝癌細胞株による *in vitro* の結果と、ヒト肝癌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、肝癌の治療抵抗性の分子基盤が明らかされるも

のと考える。

#### E. 結論

ヒト肝癌細胞株やヒト肝癌組織を対象に、肝癌の治療抵抗性の分子基盤の一つである細胞死抵抗性を、翻訳後修飾による蛋白質機能の観点から解析した。その結果、細胞死抵抗性を担う候補責任分子群が絞りこまれた。

#### G. 研究発表(2009/4/1～2010/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

1) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y and Nishimura Y.:

The Forkhead Box M1 transcriptional factor as a possible immune-therapeutic tumor-associated antigen.

*Int J Cancer* 2009 Aug 17; [Epub ahead of print]

2) Ikeda K, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M and Sasaki Y.:

Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45:60-67, 2010

3) Ikuta Y, Hayashida Y, Hirata K, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H and Nishimura Y.:

Identification of the H2-K<sup>d</sup>-restricted CTL epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate

antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Science* 100:132-137, 2009

4) Yokoo K, Hamada A, Tazoe K, Sasaki Y. and Saito H.:  
Effects of oral administered S-1 on the pharmacokinetics of SN-38, irinotecan active metabolite, in patients with advanced colorectal cancer.  
*Ther. Drug. Monit.* 31:400-403, 2009

5) 佐々木裕  
細胞死と免疫監視機構からの回避  
特集 細胞死をめぐる最近のトピックス  
*Surgery Frontier* 2009年16巻頁60-65

6) 佐々木裕  
知っておきたい肝炎ウイルスと肝発癌  
特集 肝細胞癌の治療 2009~2011  
コンセンサス癌治療 2009年8巻  
頁121-125

7) 紙屋康之、田中基彦、佐々木裕  
分担 アルコールと肝癌  
最新医学 別冊 新しい診断のABC 62  
「アルコール性肝障害」高後裕 編  
頁141-149、2009年  
最新医学社、東京

## 2.学会発表

1) 田中基彦、丸山徹、佐々木裕  
肝疾患におけるアルブミン構造多様性変化の検討 パネルディスカッション「肝硬変の対策～原因療法から合併症の対策～」第38回日本肝臓学会西部会、2009年12月4日、米子

2) 田中基彦、横峯和典、佐々木裕  
肝細胞癌に対する癌ワクチン療法を用いた治療戦略 パネルディスカッション「肝細胞癌の集学的治療の現状と近未来的治療（分子標的治療を含めて）」第13回日本肝臓学会大会 2009年10月15日、京都

3) Tanaka M, Fukubayashi K, Ashihara H, Kamiya Y, Kudo Y, Tateyama M, Nagahama Y and Sasaki Y. Changes in clinical background of patients with hepatocellular carcinoma in Kumamoto. 3<sup>rd</sup> International HCC symposium, May 8, 2009, Kobe, JAPAN

H.知的財産権の出願・登録状況

### 3.その他

チトクロームCの定量による非アルコール性脂肪性肝炎の非侵襲的な検査方法  
(PCT/JP2007/057779) (特許出願中)

## 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

研究分担者 河田純男 山形大学医学部消化器内科 教授  
共同研究者 齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科 准教授

### 研究要旨

【目的】 C 型慢性肝炎患者における肝発がんの抑止は、肝がん撲滅を目指す上で喫緊の課題である。肝発がん予防の最も効果的な治療は、ペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) による抗 HCV 療法であるが、さまざまな治療効果や副反応から、患者個人に適した治療を行う上で、治療前に治療効果を予測することは重要である。本研究の目的は、HCV NS3 蛋白質二次構造多型性と 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 (PegIFN・RBV) 併用療法の治療効果についての関連性を検討し、抗 HCV 療法における新たなウイルス学的治療効果予測マーカーを見いだすことである。

【方法】 対象は、HCV-1b 型感染で高ウイルス量 (100 KIU/ml 以上) の C 型慢性肝炎 139 例である。このうち、PegIFN・RBV 両薬剤ともに、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 症例について検討した。HCV 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 HCV NS3 領域の推定アミノ酸配列に基づき、N 末端側アミノ酸 120 残基の蛋白質二次構造を Robson 法によりグループ A とグループ B に分類した。この HCV NS3 蛋白質二次構造多型性と、PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の関連性について検討を行った。

【成績】 HCV NS3 蛋白質の二次構造分類は、グループ A が 28 例 (37%)、グループ B が 40 例 (53%)、いずれにも属さない型が 7 例 (10%)、であった。グループ A およびグループ B の両群の患者間に、年齢、性、HCV RNA (アンプリコ法)、ALT、肝線維化ステージ、に有意差は見られなかった。このグループ分類と PegIFN・RBV 併用療法の治療成績の検討では、ウイルスを排除できた sustained virological response (SVR) は、グループ A では 18 例 (64%) に対し、グループ B では 15 例 (38%) であり、グループ A に多かった ( $P < 0.05$ )。また治療開始 12 週時点の HCV RNA 定性陰性化を示す early virological response (EVR) 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 に多かった ( $P < 0.05$ )。68 例の治療前のリアルタイム PCR 法測定によるウイルス量は、グループ A とグループ B の患者間に有意差はなかった。

【考案】 本研究により、HCV NS3 領域アミノ末端 120 残基の蛋白質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を予測する上で、有用なウイルス因子の一つとなりうることが示唆された。

## A. 研究目的

C型慢性肝炎患者における肝発がんの抑止は、肝がん撲滅を目指す上で喫緊の課題である。C型慢性肝炎に対する標準治療として、ペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) 併用療法が行われている。本治療の問題点として、HCV-1b型、高ウイルス量の症例におけるウイルス排除率 (sustained virological response: SVR) が48週間の投与では約50%程度に過ぎず、多くの重篤な副反応も見られること、などが挙げられる。したがって、本治療の施行に際して、治療前に抗ウイルス治療効果を予測することは、患者個人に適した効率的な治療を行う上で重要である。C型肝炎ウイルス (HCV) 遺伝子上には抗HCV療法に感受性を有する領域があり、C型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) 併用療法の治療効果を、ウイルス学的差異から予測する試みがなされている。HCV NS3蛋白質は、感染宿主側の免疫と係わる種々の蛋白との相互作用により、C型肝炎の経過に影響を与えることが知られている。本研究の目的は、HCV NS3蛋白質二次構造の差異とC型肝炎のPegIFN・RBV抗HCV療法の治療効果についての関連性を検討し、抗HCV療法における新たなウイルス学的治療効果予測マーカーを見いだすことである。

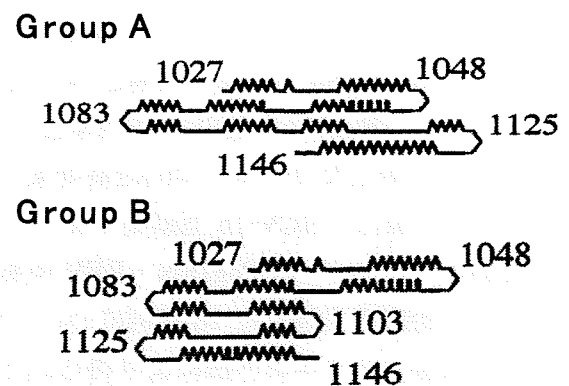
## B. 研究方法

対象は、HCV-1b型感染で高ウイルス量(100 KIU/ml以上)のC型肝炎139例である。治療効果に及ぼすウイルス要因を検討するため、PegIFN・RBV両薬剤ともに、治療開始時の体重により算出された投与予定量の80%以上の投薬がなされ、かつ治療を完遂した75症例について解析を行った。

HCV 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HCV NS3

領域の推定アミノ酸配列に基づき、コンピューターソフト GENETYX Ver.10.1 を用いて、Robson 法により決定した。HCV NS3 領域は631 アミノ酸 (aa1027-1657) よりなるが、N末端側アミノ酸120残基 (aa1027-1146) の蛋白質二次構造を推定することで、HCV NS3蛋白質二次構造多型性をグループAとグループBに分類可能である(図1) (Ogata S, Hotta H, et al. J Clin Microbiol 2003; 41: 2835-41)。HCV NS3蛋白質二次構造の差異が、PegIFN・RBV併用療法の治療効果に及ぼす影響について検討を行った。

図 1



## C. 研究結果

HCV NS3蛋白質の二次構造分類は、グループAが28例(37%)、グループBが40例(53%)、いずれにも属さない型が7例(10%)、であった。グループAおよびグループB症例全体(計68例)の治療成績は、SVR 33例(49%)、non-virological response (NVR) 35例(51%)、であった。またグループAおよびグループBの両群の対象者間に、年齢、性、HCV RNA (7プライア法)、ALT、肝線維化ステージ、に有意差は見られなかった。PegIFNおよびRBV投与量は両群ともに平均95%以上であった。このグループ分類とPegIFN・RBV併用療法の治療成績を示す(表1)。グループAでは、SVR 18例(64%)、NVR 10例(36%)、に対し、グ

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 定性陰性を early virological response (EVR) と定義すると、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 ( $P < 0.05$ )。

表 1

	On-treatment viral response			Final outcome		
	EVR	non-EVR	P	SVR	NVR	P
Group A (n=28)	19 (68%)	9 (32%)	0.04	18 (64%)	10 (36%)	0.03
Group B (n=40)	17 (43%)	23 (57%)		15 (38%)	25 (62%)	

HCV-1b 型感染者における抗 HCV 治療の効果予測に関わるウイルス側要因として、重要な因子は治療前のウイルス量である。したがって、治療効果の予測に際して、この蛋白二次構造の差異とウイルス量の関連を検討することは重要である。68 例の治療前のウイルス量について、保存血清を用いて、リアルタイム PCR 法で検討を行った結果、グループ A 感染者とグループ B 感染者の間に有意差はなかった (表 2)。

表 2

	HCV RNA (LogIU/ml)		P
	Group A	Group B	
SVR (n = 33)	5.78 ± 1.05	6.13 ± 0.71	N.S.
non-SVR (n = 35)	6.33 ± 0.59	6.32 ± 0.55	N.S.
Total (n = 68)	5.98 ± 0.94	6.25 ± 0.62	N.S.

したがって、HCV NS3 蛋白質の N 末端アミノ酸 120 残基の二次構造の差異は、PegIFN・RBV 併用療法における治療効果の予測に有用であることが示唆された。

#### D. 考 察

高変異ウイルスである HCV のアミノ酸変化は、宿主側の蛋白質との相互作用に影響し、生体反応の様々な変化から、肝炎の経過や治療に

影響することが推測される。最近、C 型肝炎の病態形成における HCV 蛋白質と宿主側蛋白質の interaction の重要性について、HCV コア蛋白と PA28 $\gamma$  (Moriishi K, et al. PNAS, 2007)、HCV NS3 蛋白と Cardif (Tasaka M, et al. J Gen Virol, 2007)、などが報告されている。HCV 蛋白と宿主蛋白との接合においては、ウイルス側の個々のアミノ酸の一次構造の変異以上に、複数個のアミノ酸により形成されるウイルス蛋白質の高次構造上の変化により、ウイルス・宿主蛋白間の接合に差異が生じて、相互作用にも多様性が生じることが推定される。

HCV NS3 領域は HCV serine protease をコードし、そのアミノ酸配列はウイルス株間で変異に富み、宿主蛋白質との重要な相互作用が報告されている。既報の中でも、以下の二点が特に注目される。第一に、NS3 蛋白質に存在する serine protease 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、核移行経路を抑えることで、細胞内 IFN シグナル伝達を阻害することである。これは、宿主側の自然免疫能の阻害という形でウイルス側の持続感染成立に有利に作用する。さらに、IRF-3 二量体は、核内へ移行し IFN-stimulated response element (IRSE) に結合して IFN により誘導される種々の宿主側の抗ウイルス蛋白などの誘導に関わるので、IRF-3 の不活化は、自然免疫を抑制するだけでなく、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。第二に、HCV NS3 蛋白は、宿主 p53 蛋白と結合し 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、また、*in vitro* において培養細胞に cell transformation を惹起し、*in vivo* において移植細胞は悪性腫瘍性増殖を示すことが報告されている。したがって、HCV NS3 蛋白は、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。これらの HCV NS3 蛋白と宿主蛋白とのユニークな interaction に着目して、この HCV NS3 蛋白質二次構造の変化が、宿主側の生体制御に関わる重要分子との接合に影響を及ぼし、HCV 感染者の抗ウイルス治療の効果に影響を及ぼす可能性がある。

今回、C 型慢性肝炎患者の標準治療法であるペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) 併用療法において、A 型感染者では、B 型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。今回の臨床研究で明らかとなった事実は、HCV NS3 蛋白質の構造上の差異が、細胞内で宿主側蛋白との interaction に差異を生じせしめていることを類推させる重要なデータであり、その分子メカニズムの解明を今後、発展的に推し進める価値があるものと考えた。

## E. 結 論

本研究により、HCV NS3 領域アミノ末端 120 残基の蛋白質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を予測する上で、有用なウイルス因子の一つとなりうることが示された。HCV コアや HCV NS5A 領域に見られる既知の治療感受性のアミノ酸配列とともに、HCV NS3 領域の蛋白質二次構造の差異を検討することで、治療効果の予測精度の向上が可能となる。HCV 治療法の進歩は目覚ましく、その多様化のなかで、患者個人に最適な治療法を提供するため、治療感受性に係わるウイルス要因を十分に解明して、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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito T, Kawata S: Down-regulation of hepatic stearyl-CoA

desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese *fa/fa* Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 2009; 44 : 583-591

- 2) Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S: Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism* 2009; 58: 1067-1075
- 3) Takeda H, Nishise S, Fukui T, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Kawata S: Plasma Level of Granulocyte-Colony Stimulating Factor during Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis. *Hepato-gastroenterol* 2009; 56: 348-351
- 4) Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Takeda H, Kawata S: Biological effect of anaphylatoxin C5a on the generation of anti-inflammatory substances in leukocyte adsorption. *Ther Apher Dial* 2009; 13: 509-514
- 5) Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M: The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol* 2009; 133: 208-217
- 6) 柄沢 哲、富樫 整、斎藤貴史、河田純男、他： インターフェロン療法が著効した特

発性血小板減少性紫斑病を合併したC型肝炎の1例. 日本消化器病学会雑誌 2009; 106: 405-410

- 7) 斎藤貴史、西瀬雄子、石井里佳、渡辺久剛、鈴木克典、河田純男：HCV NS3蛋白質多型性とC型慢性肝炎の予後・治療効果予測. 日本消化器病学会雑誌 2009 ; 106: 502-507

## 2.学会発表

- 1) 河田純男、佐藤智佳子、斎藤貴史：治療方針のコンセンサス（コンセンサスマーケティング NASH）、第45回日本肝臓学会総会、神戸、2009年6月
- 2) 斎藤貴史、三條麻衣、堀田 博、河田純男、他：HCV NS3蛋白質二次構造の多型性と

HCV RNA量およびペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測の検討. 第45回日本肝臓学会総会、神戸市、2009年6月

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得なし。

2. 実用新案登録なし。

3. その他特記事項なし。

## 肝発がんにおける HCV コア蛋白質の下流因子探索

分担研究者 森石恆司 大阪大学微生物病研究所 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）による発がん機構における HCV 蛋白質及び関連する宿主蛋白質の機能は明らかになっておらず、それらを標的にした予防治療法は確立されていない。本研究では、C型肝炎による病原性発現の分子機構を明らかにし、早期診断および予防治療法の内在性標的因子候補の探索とその可能性を検討することを目的にし、HCV コア蛋白質およびそれら関連宿主蛋白質のうち PA28 $\gamma$ を用いて、ヒト肝臓細胞ライブラリから標的候補蛋白質遺伝子を単離した。HCV コア蛋白質によって 11 種類の遺伝子が単離され、PA28 $\gamma$ によって 3 種類の遺伝子が単離された。コア蛋白質によって単離された遺伝子と関連遺伝子のうち、三遺伝子をノックダウンし、ウイルス感染への影響を調べた。一遺伝子のノックダウンでウイルス増殖に低下が認められ、他遺伝子のノックダウンではウイルス感染への影響は認められなかった。PA28 $\gamma$ によって単離された遺伝子産物は PA28 $\gamma$ との結合や細胞内局在の一致が認められたが、それらをノックダウンしてもウイルス増殖には変化が認められなかった。今後さらにそれら遺伝子の発がんメカニズムへの関与の詳細を解析する予定である。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）のコア蛋白質はヌcleoキャプシドの主要蛋白質因子として機能するだけでなく、発がんなどの病原性因子としての機能も報告されている。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蛋白質である PA28 $\gamma$ による経路で分解されることを明らかにし、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 $\gamma$ が深く関与していることを明らかにした。しかしながら、その分子機構は分かっていない。

本研究では、HCV 感染による発がん機構を明らかにすることを目的に、コア蛋白質と PA28 $\gamma$ をそれぞれプローブにして、酵母 2 ハイブリットによって、宿主蛋白質遺伝子を単離同定し、作用機構の解明を試みた。

### B. 研究方法

Split Ubiquitin 法を用いてコア蛋白質遺伝子を罅蛋白質にして、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 $\gamma$ を罅蛋白質として、Clontech Matchmaker 3 システムを用いて、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 は Ambion から購入し、Huh7OK1 細胞に導入し、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 $\gamma$ 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 $\gamma$ との結合を免疫沈降法によって解析した。

（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、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

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、そのうち三遺伝子のノックダウンを試みた。Ambion で事前設計された siRNA によって有為に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、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、RNA を抽出し、cDNA を合成し、HCVRNA および GAPDH の mRNA 量を測定した。そのうち、 $\alpha$ -Enolase 遺伝子の発現をノックダウンした場合、JFH1 のウイルス RNA 量は細胞内および細胞外において有為に減少したが、他遺伝子発現において影響は認められなかった。また、PA28 $\gamma$  を囲蛋白質としてヒト肝臓ライブラリから三種類の遺伝子が単離された。肺がんマーカー蛋白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 $\gamma$  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、ウイルス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。

### D. 考察

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 遺伝子が単離された。Signal peptide peptidase はコア蛋白質を切断する内在性蛋白質分解酵素として、既知の宿主因子であり、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。したがって、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 $\gamma$  を囲蛋白質としてヒト肝臓ライブラリをスクリーニングした

とき、PA28 $\gamma$  遺伝子自身が単離されてきた。PA28 $\gamma$  はホモ 7 量体を形成することから、PA28 $\gamma$  自身が単離されてことから、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、単離されてきた遺伝子のうち  $\alpha$ -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。 $\alpha$ -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になってくる。また、PA28 $\gamma$  によって単離されてきた宿主遺伝子産物は、細胞内での局在の一致が確認され、免疫沈降法によって結合が認められた。しかしながら、それら遺伝子発現をノックダウンしても何らウイルス増殖に影響を与えなかった。

### E. 結論

コア蛋白質との結合因子として、 $\alpha$ -Enolase が単離され、宿主解糖系とウイルス増殖との関連性が示唆された。今後、コア蛋白質との相互作用など、その機能解析が必要と考えられる。また、PA28 $\gamma$  との結合する蛋白質は結合および細胞内局在が確認されたが、その機能は不明である。次年度以降、活性酸素産生など発がんメカニズムとの関連性を解析する必要がある。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Taguwa, S., H. Kambara, H. Omori, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Yoshimori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.* 83:10427-10436. 2009.
- (2) Suzuki, R., K. Moriishi, K. Fukuda, M. Shirakura, K. Ishii, I. Shoji, T. Wakita, T. Miyamura, Y. Matsuura, and T. Suzuki. Proteasomal turnover of hepatitis C virus

core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism. J. Virol. 83:2389-2392. 2009.

- (3) Kukihara, H., K. Moriishi, S. Taguwa, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Fukuhara, A. Taketomi, Y. Maehara, and Y. Matsuura. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. J. Virol. 83:7959-7969. 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学術集会、2009年10月25-27日、東京
- (2) 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治、ヒyaluron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、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25-27日、東京

- (3) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y, Involvement of PA28gamma and E6AP in the Degradation of HCV Core Protein and the Viral Production. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
- (4) Abe T, Kaname Y, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, Matsuura Y. Hyaluronan Participates in the IP-10 Induction in Cells Infected with HCV through an Engagement of TLR2 and CD44. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
- (5) Wen X, Abe T, Taguwa S, Mori Y, Moriishi K, Matsuura Y. Suppression of HCV Replication in Hepatocytes through a Selective Induction of IRF7. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

## 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

研究分担者：加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究協力者：有海 康雄 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

**研究要旨：**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について明らかにすることを目的として実験を行い、以下のような成果を得た。(1) HCV 感染や複製により、がん抑制因子 PML の局在の変化はみられなかったが、PML が HCV 粒子産生に関与していることを見出した。(2) HCV Core 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。(3) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とそのメカニズムを示し、亜ヒ酸の標的である PML は HCV RNA 複製には関与しないことを見出した。

### A. 研究目的

我が国における肝がんの約 8 割において C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染が認められている。肝がんによる死亡者数は年々増加しており、2005 年には約 3 万 4,000 人が死亡し、肺がん、胃がんに次いでがん死亡の第 3 位を占めるに至っている。HCV による肝がんの発生には、宿主免疫機構を介した肝細胞の長期間に及ぶ炎症性障害が重要であると考えられている。特に肝脂肪化を伴った慢性肝炎患者は肝発がん率が高いので、肝脂肪化は肝発がんの主要な要因の一つである。臨床面においても、インターフェロン治療により、HCV を排除すると肝脂肪化や肝発がんが減少することが判明しているため、HCV 持続感染を伴う慢性肝炎が肝がんの発生に深く関与している。しかしながら、慢性肝炎の中でも自己免疫性肝炎の場合、肝がんの発症は HCV 由来の肝がん に比べ顕著に少ないことから、HCV タンパク質による直接的な発がん機序も関与しているものと考えられている。本研究ではこれらの点を解決することを目指して、HCV タンパク質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞

機能に及ぼす影響について明らかにすることを目的に実験を行った。

### B. 研究方法

#### (1) PML の HCV 感染における役割

Short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスベクターや siRNA (Dharmacon) を用いて、がん抑制因子 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 Core 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 の局在が変化するのの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 Core 抗体及び抗 PML 抗体で処理後、Core は Cy3、PML は fluorescein isothiocyanate により可視化した。

一方、HCV Core 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-RE-Luc)、p53 発現プラスミド、PML 発現プラスミド及び HCV Core 発現プラスミドを FuGene 6 を用いてトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

#### (2) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性の解析

PML の HCV 感染や複製における役割を明らかにするために、PML が分子標的と知られている亜ヒ酸 (三酸化二ヒ素  $As_2O_3$ ) をツールに用いた。全長 HCV-O 株 (1b 遺伝子型) 複製 O 細胞とそのレプリコン sO 細胞、或は HCV-JFH1 感染 RSc 細胞を亜ヒ酸で処理して 72 時間後の細胞内 HCV RNA レベルを real-time RT-PCR 法で定量した。亜ヒ酸の細胞毒性については、MTT アッセイにより解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

### C. 研究結果

#### (1) PML の HCV 感染における役割

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 Core の発現量がコントロール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 Core の量はコントロール細胞の 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 HCV Core の量はコントロール細胞の 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コントロール細胞同様、HCV Core 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 Core 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。

#### (2) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とその分子機構

亜ヒ酸は、少なくとも 1 micro M 以下の濃度においては細胞毒性もなく、HCV RNA 複製を顕著に抑制した (全長 HCV-O 株  $EC_{50}$ : 0.19 micro M、そのレプリコン  $EC_{50}$ : 0.48 micro M、JFH-1 株  $EC_{50}$ : 0.28 micro M)。興味深いことに、亜ヒ酸処理後の PML の細胞内局在を観察した結果、PML が核内の PML nuclear body から細胞質へ移行していることが分かった。しかしながら、亜ヒ酸の抗 HCV 効果は、PML knockdown 細胞とコントロール細胞間で有意な差は認められず、PML は関与しないことが判明した。一方、抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) とビタミン C (VC) の併用により、亜ヒ酸の抗 HCV 効果がキャンセルされた。

### D. 考察

#### (1) PML の HCV 感染における役割

これまで、多くのウイルス感染において、PML が分解されたり、細胞質へトラップされ、その機能が抑制されることが知られているが、HCV の場合、HCV 感染細胞や HCV RNA 複製細胞において、PML の細胞内局在の変化は認められなかった。また、PML は HCV RNA 複製には関与しなかったが、HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。さらに、PML

ノックダウン細胞においても HCV Core は脂肪滴に局在したので、PML は Core 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。一方、HCV Core は PML による p53 の転写機能の活性化をさらに増強させた。JFH1 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。

(2) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とその分子機構  
亜ヒ酸は少なくとも 1 micro M 以下の濃度においては細胞毒性もなく、顕著に HCV RNA 複製を抑制することが認められ、C 型肝炎の治療薬となる可能性が示唆された。また、NAC と VC の併用効果により、亜ヒ酸の抗 HCV 効果がキャンセルされたことから、亜ヒ酸による抗 HCV 活性には、酸化ストレスが関与していることが示唆された。

## E. 結論

(1) HCV 感染や複製により、PML の局在の変化はみられなかった。

(2) PML が HCV 粒子産生に関与していることが示唆された。

(3) HCV Core 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。

(4) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とそのメカニズムを示し、亜ヒ酸の標的である PML は HCV RNA 複製には関与しないことを見出した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new hepatoma cell line. *Virus Res*, 146(1-2): 41-50, 2009.

(2) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b

chimeric replicon with NS5B of JFH1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*, 154(10): 1671-1677, 2009.

(3) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*, 50(3): 678-688, 2009.

(4) Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon gamma-like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology*, 50(2): 585-591, 2009.

(5) Vollmer S, Kappl V, Kaczor J, Flgel D, Rolvering C, Kato N, Kietzman T, Behrmann I, Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 is upregulated by oncostatin M and participates in oncostatin M signaling. *Hepatology*, 50(1): 253-260, 2009.

(6) Kawai Y, Ikeda M, Abe KI, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA-harboring cells possessing the IFN-alpha-resistance phenotype. *Hepatol Res*, 39(9): 898-909, 2009.

(7) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res*, 82(1): 42-50, 2009.

(8) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita

T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol*, 154(5): 801-810, 2009.

(9) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. *FEBS Lett*, 583(9): 1434-1438, 2009.

(10) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N., Ide Y, 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.

(11) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N., Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol*, 44(8): 856-863, 2009.

## 2. 学会発表

(1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(2) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(3) Kawai Y, Ikeda M, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(4) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(5) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(6) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Takazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

(7) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y,

Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Matsuda Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Involvement of the MEK-ERK1/2 Signaling Pathway in the Anti-HCV Mechanism of Oxidative Stress. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.

- (8) 河合 良成、池田 正徳、森 京子、阿部 健一、矢野 雅彦、池田 房雄、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之. 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略—Teprenone (Selbex®)と Plaunotol (Kelnac®)の HCV RNA 複製抑制効果—. 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2009 年 6 月.
- (9) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を解析評価できる Li23 細胞由来の HCV-RNA 複製システム. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
- (10) 池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. オンコスタチン M はインターフェロンの抗 HCV 活性を相乗的に増強する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
- (11) 有海 康雄、黒木 美沙緒、牧 正敏、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
- (12) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 癌抑制因子 PML は HCV 粒子産生に必要である. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

**研究要旨** C型肝炎ウイルス(HCV)に感染している患者では高頻度に肝癌を発生することが知られている。しかし、その分子生物学的メカニズムは明らかにされていない。近年、HCV コア領域のアミノ酸変異が肝発癌に関与するとの報告がなされた。そこで、HCVによる肝発癌機序の解明の第一歩として、これらのコア領域変異がHCV ライフサイクルに与える影響について検討した。その結果、これらの変異はHCVの培養細胞内増殖能に影響を与えず、インターフェロンの感受性も変化しないことが明らかとなった。今後はこれらの変異を持ったウイルスの宿主に与える影響を解析する。

**A. 研究目的**

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は高率に慢性化し、慢性肝炎から肝硬変を経て、高率に肝癌を発生することが知られている。我が国の肝癌の約80%がHCV感染由来であり、HCV感染を制御することが肝癌の発生を減少につながることは疑いの無い事実である。HCVによる肝癌の発生には、長期にわたるこのウイルスの感染とそれに伴う慢性炎症が重要であると考えられているが、その分子生物学的機序は明らかになっていない。

最近、HCV Genotype 1b株に感染している患者で、コア領域の70番目（aa 70）のアルギニン（R）からグルタミン（Q）への変異と、91番目（aa 91）のロイシン（L）からメチオニン（M）への変異が、インターフェロン（IFN）の感受性や肝発癌に関与しているとの報告がなされた。しかしこれらの報告は主に臨床的な知見に基づいており、これらの変異がウイルスのライフサイクルや宿主因子に与える影響は未だ解明されていない。近年、JFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、培養細胞中でこのウイルス

のライフサイクルの観察が可能となった。この系ではHCVの増殖能や宿主因子に与える影響の評価が可能であるが、JFH-1株はGenotype 2aであるため、臨床的にGenotype 1b株に感染している患者の検討で得られた結果を培養細胞系で評価する場合には、Genotypeの違いが得られる結果に影響する可能性がある。そこで本研究では、新たにGenotype 1b株の培養細胞内感染増殖系を構築し、JFH-1株とともに、このコア領域の変異がHCVの細胞内増殖やIFN感受性に与える影響を検討した。

**B. 研究方法**

**1. HCV Genotype 1b株の培養細胞内感染増殖系の構築**

HCV 急性肝炎患者血清より得られた株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。そこで、サブジェノミック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 Genotype 1b 株の複製増殖が可能な系を構築した。

2. JFH-1 株、AHC-1b 株の培養細胞中での増殖にコア領域変異が与える影響の評価

JFH-1 株および AHC-1b 株のコア領域の aa 70 と aa 91 は RL であり、いわゆる wild type であった。そこで IFN 抵抗性や肝発癌性に関与しているといわれる aa 70 が Q のものと aa 91 が M のものそれぞれと、それら両方の変異を持ったものの合計 3 つの変異株 (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。

3. コア領域変異が AHC-1b 株の IFN 感受性に与える影響の評価

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。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトゲノムに関する検討は行っていない。各種組換え DNA を用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認されている。

## C. 研究結果

1. HCV Genotype 1b 株の培養細胞内感染増殖系の構築

HCV 急性肝炎患者血清より得られた株 AHC-1b 株は全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入しても複製増殖は認めなかった。そこで、この株を用いたサブジェノミックレプリコンの長期選択培養で得られた変異の中から、培養細胞での複製増殖が可能な変異を検索

した。その結果、NS5a 領域のセリン (S) からチロシン (Y) への変異を持った株 (5a-S/Y 株) と、S からグリシン (G) への変異を持った株 (5a-S/G 株) が培養細胞内での複製増殖が可能なのがわかり、これらの株を用い以後の実験を行った。

2. JFH-1 株、AHC-1b 株の培養細胞中での増殖にコア領域変異が与える影響の評価

そこで、JFH-1 株と AHC-1b の 5a-S/Y 株、5a-S/G 株を用い、コア領域の aa 70 と aa 91 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、aa 70 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。

3. コア領域変異が AHC-1b 株の IFN 感受性に与える影響の評価

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。これらの株の全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入後、培養上清中に 100 IU/mL の IFN を添加し、培養細胞内および上清中の HCV ウイルス量を測定した。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。