

ミトコンドリア蛋白質前駆体の移行阻害実験は、NDUFS2 あるいはコア蛋白質を発現するプラスミドを Huh7 細胞に導入し 24 時間後にミトコンドリアを分画しイムノブロット法で解析した。

(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、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

- (1) 酵母膜ツーハイブリッド法を用いて、HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を 11 種同定した。そのうちの 3 種がミトコンドリア蛋白質（外膜に局在する Tom20、電子伝達系複合体 I のサブユニット NDUFS2、FADH2 や NADH2 を運ぶフラビン蛋白質のサブユニット ETFB）であった。
- (2) コア蛋白質発現細胞からミトコンドリアを分画し、そのシトクロム C オキシダーゼ活性を測定したところ、対照細胞に比べて有意な低下が見られたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。
- (3) コア蛋白質と NDUFS2 を発現した細胞または NDUFS2 のみを発現した細胞からミトコンドリアを分画して NDUFS2 の取り込みを比較すると、コア蛋白質存在下では NDUFS2 のミトコンドリアへ取り込み量の低下が見られた。これらの成績からコア蛋白質の発現によりミトコンドリア蛋白質の輸送障害が示唆された。
- (4) ミトコンドリアへの蛋白質輸送に関わる因子（ミトコンドリア輸送促進因子;MSF や Hsc70）とコア蛋白質の相互作用は免疫沈降法では確認できなかったこ

とから、他の輸送経路の存在が示唆された。

D. 考察

酵母膜ツーハイブリッド法を用いて、HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子として 3 種のミトコンドリア蛋白質を同定した。コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼ活性の低下が観察されたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。また、コア蛋白質とミトコンドリア蛋白質を発現させた細胞において、ミトコンドリア蛋白質の移行が阻害されていた。この結果は外膜への障害によるものか、あるいはコア蛋白質が特異的にミトコンドリア蛋白質の移行を阻害しているのかは不明である。

今後はコア蛋白質とミトコンドリア蛋白質との相互作用による輸送や機能への影響を検討するとともに、コア蛋白質のミトコンドリアへの輸送に関する宿主因子の同定を試みる。HCV のプロテアーゼやポリメラーゼを標的とした抗ウイルス剤が開発され、臨床試験が進行中であるが、ウイルスの酵素を標的とした薬剤に対しては耐性株の出現が大きな問題となっている。宿主因子との相互作用を標的とした抗 HCV 剤の開発が今後の重要な課題である。コア蛋白質のミトコンドリアへの輸送機構とミトコンドリア機能の障害機序の解明により、慢性 C 型肝炎から肝細胞癌への進展を阻止できる新規治療法の開発が期待される。

E. 結論

- 1 酵母膜ツーハイブリッド法を用いて、HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を 11 種同定した。
- 2 コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼ活性の低下が観察された。
- 3 コア蛋白質を発現している細胞ではミ

トコンドリア蛋白質の移行阻害が観察された。

- 4) ミトコンドリアへの蛋白質輸送に関わる因子とコア蛋白質の相互作用は免疫沈降法では確認できなかったことから、他の輸送経路の存在が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
 - 2) Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12986-12991 (2009).
 - 3) Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
 - 4) Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7629-7640 (2009).
 - 5) Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
 - 6) Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
 - 7) Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
 - 8) Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
 - 9) Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Brecht D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
2. 学会発表
- 1) 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、10 月 25 日-27 日、2009.
 - 2) 谷 英樹、塩川 舞、寒原裕登、要祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割、同上。
 - 3) 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血

- 清由来 HCV の細胞内導入法、同上。
- 4) 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、森嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上。
 - 5) 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
 - 6) 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。
 - 7) 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、同上。
 - 8) 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
 - 9) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白質の同定と機能解析、同上。
 - 10) 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日-12 日, 2009.
 - 11) 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21 日-24 日, 2009.
 - 12) Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第 15 回日本遺伝子治療学会、大阪、6 月 10 日-12 日, 2009.
 - 13) Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
 - 14) Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
 - 15) Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
 - 16) Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
 - 17) Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
 - 18) Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of *trans*-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
 - 19) Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid

droplet-associated membrane proteins
that are involved in HCV replication. 同
上。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

慢性C型肝炎患者末梢血B細胞のアポトーシス感受性に関する研究

研究分担者 水落 利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究協力者 伊藤 昌彦 ウイルス肝炎研究財団リサーチレジデント

研究要旨：慢性C型肝炎患者（CHC）末梢血中のCD5陽性B細胞とCD5陰性B細胞とでは、アポトーシス感受性（抵抗性）に大きな差があることが示された。この原因としてCD5陽性B細胞のアポトーシスを抑制するサイトカインレベルの上昇が考えられた。CHC末梢血CD5陰性B細胞がアポトーシスにより破壊されることで自己抗原を放出し、アポトーシス抵抗性のCD5陽性B細胞が相対的に増加して自己抗原に対する自己抗体を産生することにより、自己免疫疾患発症へとつながることが予想される。このような知見はHCV感染と自己免疫疾患、さらには非ホジキン型B細胞リンパ腫（B-NHL）発症との関連を考えるうえで非常に重要である。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝細胞のみならずB細胞にも感染することが示唆されている。また以前よりHCV慢性感染者においてはMixed Cryoglobulinemia、Rheumatoid Factor産生、あるいはSjogren-like Syndromeといった自己免疫様疾患の発症が多く報告されている。興味あることに、これらすべての疾患においてはB細胞がその病態に深く関与している。さらに疫学調査においてHCV感染と非ホジキン型B細胞リンパ腫（B-NHL）発症との相関が報告されている。B細胞サブセットのひとつであるCD5陽性B細胞が自己免疫疾患において増加することが以前より知られており、それらの発症に深く関与している可能性が高い。本研究は、慢性C型肝炎患者（CHC）末梢血B細胞に

ついて細胞表面抗原およびアポトーシス感受性の解析を目的とした。

B. 研究方法

1. 瀉血療法により採取された慢性C型肝炎患者（CHC）血液（譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得ている）、また対照としては健康人血液を用いて、血中HCV RNA定量、Flow cytometryによる細胞表面抗原の解析、およびアポトーシス解析のため、Annexin V分子との結合能を調べた。
2. 検体血漿中の様々なサイトカインを、蛍光抗体ビーズを用いた染色、およびLuminex Systemを用いて定量した。（倫理面の配慮）
本研究に供した慢性C型肝炎患者血液

についてはその譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得ている。

C. 研究結果

1. CHC 末梢血中 CD5 陽性 B 細胞数の増加：CD5 分子は元来 T 細胞マーカーであるが、一部の B 細胞サブセットにも発現されている。CHC の末梢血細胞について CD19 分子（B 細胞マーカー）および CD5 分子の発現を Flow cytometry で解析したところ、健常人と比較して有意な差は見られなかった（図 1 A, B）。そこで、B 細胞(CD19 陽性)における CD5 陽性細胞の比率を調べたところ、明らかに CHC ではその増加が見られた（図 1C）。CD19 陽性かつ CD5 陽性細胞数も CHC では有意に増加していることが確認された（図 1 D）。
2. B 細胞のアポトーシス感受性：CHC において CD5 陽性 B 細胞が相対的に増加する原因としてアポトーシス抵抗性を考え、Flow cytometry により CD19+CD5+細胞群と CD19+CD5-細胞群での Annexin V 結合能を比較した。健常人では両者に差は見られなかったが、CHC では明らかに CD19+CD5-細胞群での Annexin V 結合能が上昇しており、アポトーシスが促進していることが示された（図 2 A, B）。図 2 C では、CHC 患者 10 検体の結果から、CD19+CD5+細胞群と CD19+CD5-細胞群との間では、アポトーシス感受性に有意差があることを確認した。
3. CHC におけるアポトーシス抵抗性サイ

トカインレベルの上昇：CD5 陽性 B-CLL (chronic lymphocytic leukemia)は、何種類かのサイトカインによってアポトーシスが抑制されているという報告がある。そこで、CHC 血漿中の各種サイトカインのレベルを健常人と比較したところ、それらサイトカインのなかで、IL-4, IL-10, IL-12 のレベルが CHC では有意に上昇していることが明らかになった（図 3）。

D. 考察

CHC血漿中のIL-10量の増加は非常に興味深い（図2B）。なぜならCD5陽性B細胞自身がIL-10を産生し、それによってCD5陽性B細胞がさらに増加することが知られているからである（Eur J Immunol. 22:711-717, 1992）。またIL-5もCD5陽性B細胞の長期生存をサポートする働きがあることが知られている。しかし、われわれの結果ではCHCでの血漿中IL-5のレベルに上昇は見られなかったことから、CD5陽性B細胞の増加に対してIL-5の関与は少ないと結論した（図2H）。

アポトーシスに対する抵抗性にはBcl-2の発現レベルが関係していることが知られている。Kesselらは臍帯血B細胞でのBcl-2発現が末梢血B細胞に比較して低いことがアポトーシス高感受性の原因であると結論している（Clin. Exp. Immunol. 145:563-570, 2006）。そこでPBMCにおけるBcl-2発現を健常人とCHCで比較したところ、両者の間には有意な差は見られなかった（data not shown）。この結果はToubiらの報告（J. Virol. 78 :11379-11384, 2004）とも一致す

ることから、Bcl-2の発現上昇のみがCD5陽性B細胞のアポトーシス抵抗性を説明するものではないと結論した。

CHC末梢血B細胞（CD5陰性）がアポトーシスにより破壊されることで「自己抗原」を放出し、アポトーシス抵抗性のCD5陽性B細胞が相対的に増加し、「自己抗体」を産生するという図式（図4）は、自己免疫疾患の発症という観点から容易に想像できるものであろう。このHCV感染によるB細胞アポトーシス感受性の差がどのような原因によるものなのか、HCV感染と自己免疫疾患発症との関連を考えるうえで今後更なる研究が求められるだろう。

E. 結論

本研究において、CHC末梢血中のCD5陽性B細胞とCD5陰性B細胞とでは、両者の間にアポトーシス感受性（抵抗性）に大きな差があることが示された。この原因として、CHCにおいてはCD5陽性B細胞のアポトーシスを抑制するサイトカインレベルの上昇が考えられた。このようなCHCにおけるCD5陽性B細胞数の相対的な増加が、自己免疫疾患の発症誘導に、さらにはB-NHL発症にも関与している可能性があり興味深い。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H,

- Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, and Yamaguchi K: Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. Journal of Interferon and Cytokine Research (in press)
- 2) Mizuochi T, Mizusawa S, Nojima K, Okada Y, and Yamaguchi K: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a” determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. Clinica Chimica Acta (Jan.11 Epub ahead of print)
- 3) Mohsan S, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, and Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays for detecting recombinant viral antigens derived from various genotypes. Journal of Clinical Microbiology 47:4141-4143, 2009.
- 4) Ito M, Mizoroki F, Takai K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Functional phenotypes and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients who developed non-Hodgkin’s B-cell lymphoma. Biochemical and Biophysical Research Communications 390 : 269-272, 2009.
- 5) Mizuochi T, Ito M, Takai K, and Yamaguchi K: Differential susceptibility of peripheral blood CD5⁺ and CD5⁻ B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. Biochemical and Biophysical Research Communications 389:512-515, 2009.

2. 学会発表

- 1) 伊藤昌彦、益見厚子、持田恵子、久木原 博、森石 恆司、松浦 善治、山口一成、水落利明：C型肝炎ウイルス慢性感染患者 B 細胞における HCV 持続感染機構の解明 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 東京
- 2) 水落利明、笠井道之：慢性 C 型肝炎患者末梢血 B 細胞の動態および腫瘍化関連遺伝子発現 第 38 回日本免疫学会学術集会 2009 大阪

H. 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

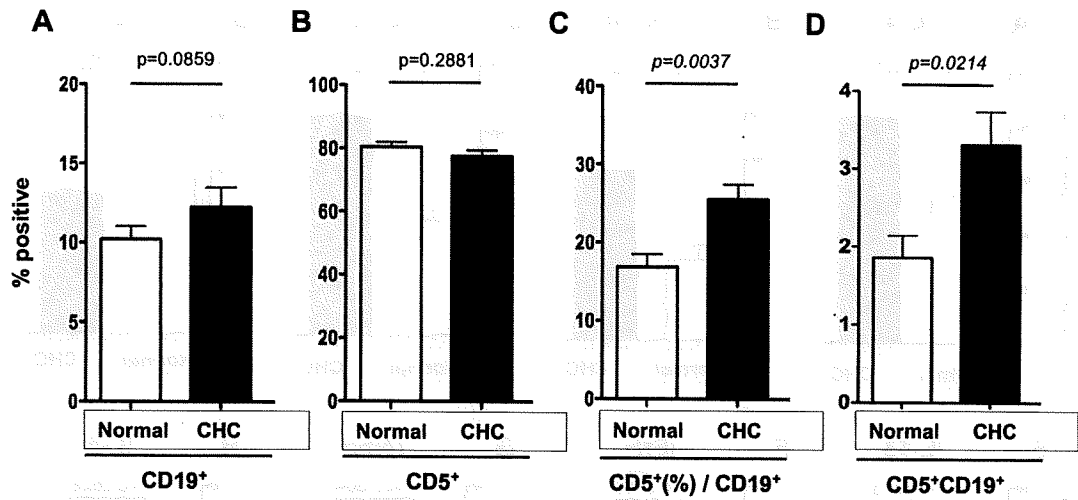


図 1: 慢性C型肝炎患者末梢血中におけるCD5陽性B細胞の増加

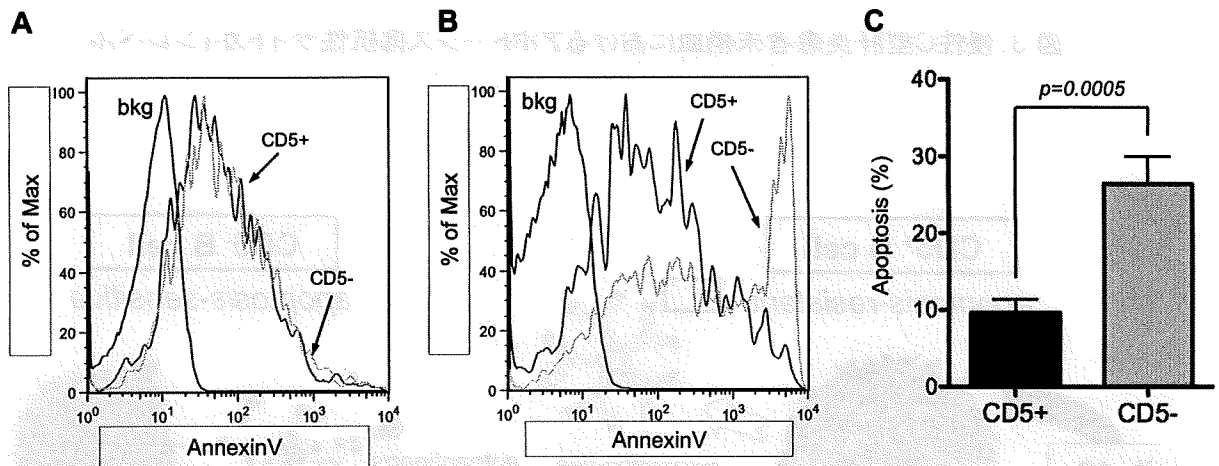


図 2: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞のアポトーシス感受性

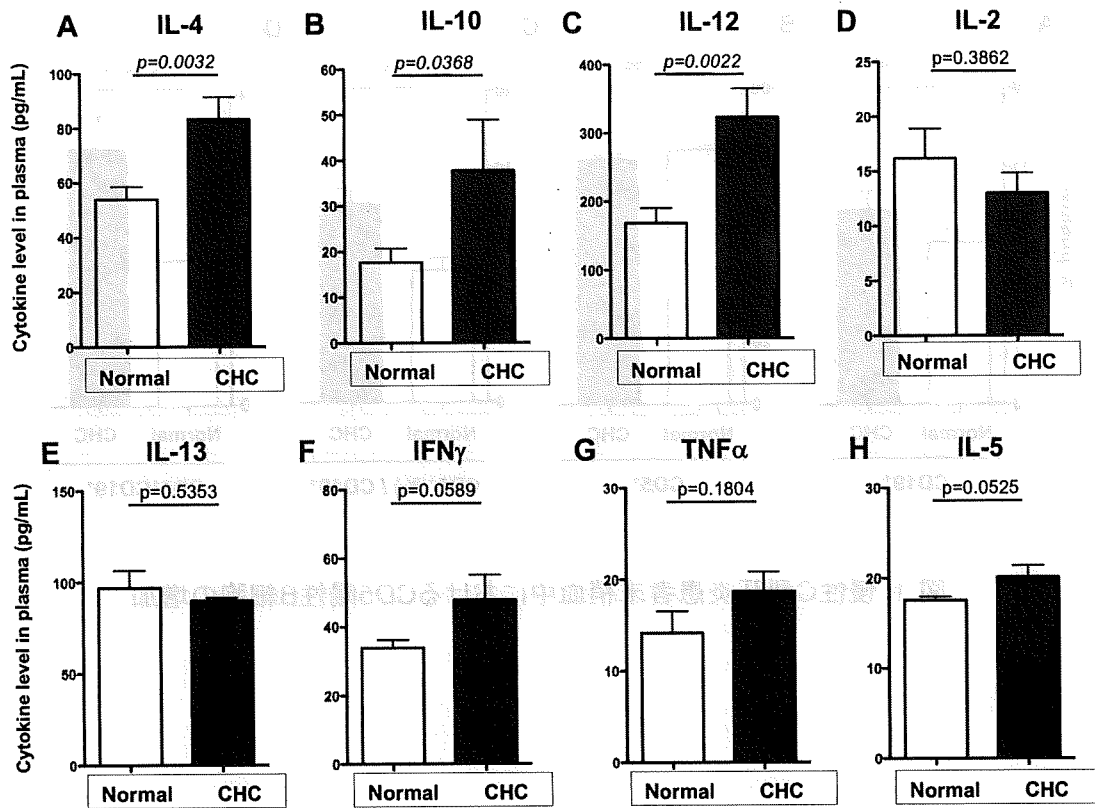


図 3: 慢性C型肝炎患者末梢血におけるアポトーシス抵抗性サイトカインレベル

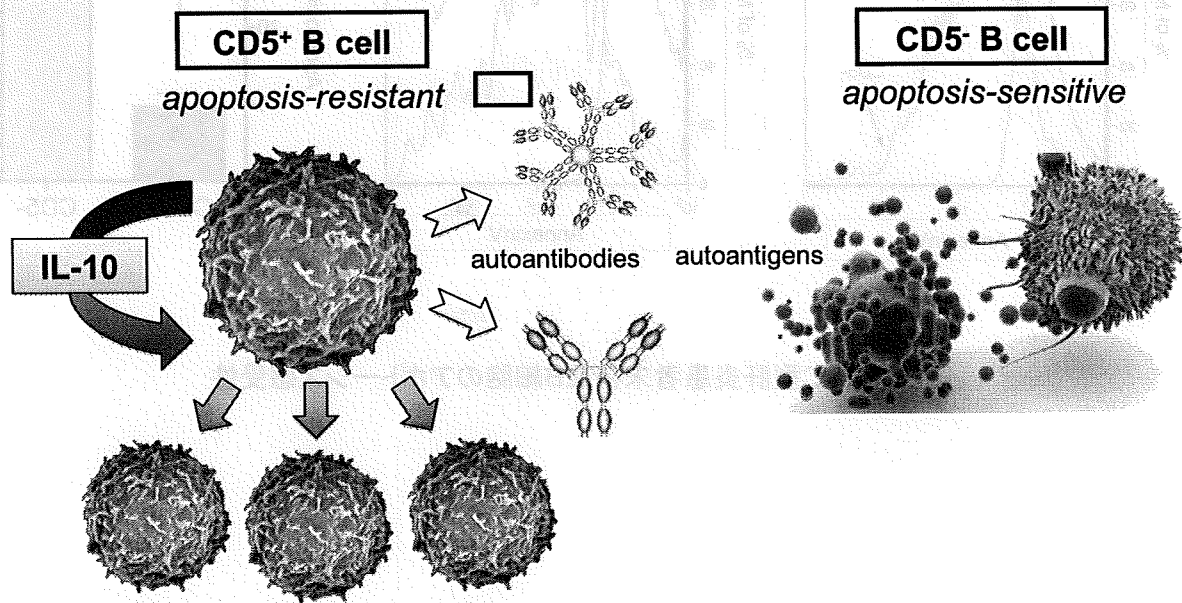


図 4: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞のアポトーシス感受性(仮説)

HCVのBリンパ腫発症要因の解明に関する研究

研究分担者 小原 恭子 熊本大学 特任教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）が引き起こす肝外病変の1つであるBリンパ腫の発症には不明な点が多く残されているが、HCVの慢性感染時にウイルス抗原に反応したB細胞がまずポリクローナルな増殖をし、その後形質変化したB細胞がモノクローナル性に増殖して腫瘍化していくと考えられている。研究分担者らが樹立したモデルマウスのうち、HCV構造蛋白質を持続発現するIRF-1欠損マウスはリンパ性増殖を発症し、HCV発現野生型マウス並びにB細胞でHCVを発現するマウスはBリンパ腫を発症している。HCV遺伝子発現後、CN2マウスでの体内ではIL-2, IL-10, IL-12が発現上昇するのに対しCN2-IRF-1^{-/-}マウスではIL-2, IL-10の上昇は見られたがIL-12の発現上昇は見られなかった。これらマウスの脾臓細胞を用いた試験管内での解析から、リンパ球の増殖形質獲得に重要なのはHCVのコア蛋白質並びにIL-2, IL-10である事が明らかとなった。また、CN2-IRF-1^{-/-}マウスではリンパ性増殖からBリンパ腫に移行しない事から、この段階ではIRF-1並びにIL-12が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に主に感染して疾患を引き起こしその解析が急速に進められている。一方でHCVは肝臓外にも病変を起こし肝外病変として総称されているがその本態は不明な点が多い。本研究では、未だ解明されない肝外病変の中でもBリンパ腫の発生モデル動物を樹立してこれを解析する事を通じてBリンパ腫発症要因を解明する事を目的としている。

B. 研究方法

HCV持続発現マウス；HCV構造蛋白質遺伝子(CN2)をCre/loxPシステムで生後任意の時期に発現するマウスに、CTLやNK活性の低下したIRF-1^{-/-}マウスを交配して樹立した(CN2 IRF-1^{-/-}マウス)。CN2 IRF-1^{-/-}マウスの尾静脈からCre-adenovirus (2x10⁹

PFU)を投与後

HCVコア蛋白質を500日以上に渡って測定した。また、これらマウスの生存率を測定し、リンパ腫形成の有無を観察した。リンパ腫については病理組織切片の観察、及びこれらを構成する細胞種についてはCD3, CD45R, CD4, CD8などに対する抗体を用いたFACS解析で同定を試みた。Fas抗体投与によるアポトーシス感受性については、TUNELアッセイやカスパーゼの測定で検索した。肝炎の指標は血中ALTを測定(nissui)し、組織はHE染色によって検索した。血清中のIL-2, 4, 10, 12のレベルはELISAキット(R&D Systems)を用いて測定した。Bcl-2蛋白質は特異抗体(SantaCruz社)

を用いて検出した。リンパ球のコロニー形成能はメチルセルロースを用いて解析した。カスパーゼ3/7や9の活性はAc-LEHD-AFCかAc-DEVD-AFCを基質として測定した。IL-2, 4, 10, 12, bcl-2のmRNA量は定量PCR法で測定した。

HCV 構造蛋白質を Mx1-Cre システムで誘導発現する場合は poly(IC)を 300 μ g、48時間ごとに腹腔内投与して誘導発現を行った。RzCD19Cre マウスでは全長 HCV 遺伝子を CD19Cre 酵素により B リンパ球で持続発現させた。

(倫理面の配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H18年6月)。動物実験については、「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」(H18.6.1)に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た (H18年4月)。

C. 研究結果

HCV 構造蛋白質を持続発現する IRF-1 欠損マウスはリンパ性増殖を発症し、HCV 発現野生型マウス並びに B 細胞で HCV を発現するマウスは B リンパ腫を発症している。HCV 遺伝子発現後、CN2 マウスの体内では IL-2, IL-10, IL-12 が発現上昇するのに対し CN2-IRF-1^{-/-}マウスでは IL-2, IL-10 の上昇は見られたが IL-12 の発現上昇は見られなかった。そこで、IRF-1 が欠損する事による細胞増殖制御への影響を明らかにするため、Fas 抗体を投与した結果 IRF-1^{-/-}マウスでは Fas 誘導性アポ

トーシスに耐性である事が明らかとなった。これらマウスの脾臓細胞を用いた試験管内での解析から、この増殖形質獲得に重要なのは HCV の構造蛋白質並びに IL-2, IL-10 であり、さらに IL-12 を添加すると脾臓細胞のコロニー形成能が抑制された。また、これらの形質は IRF-1 欠損下でさらに増強された。HCV の構造蛋白質並びに IL-2, IL-10 の同時処理は脾臓細胞に Fas 誘導性アポトーシス抵抗性を賦与し Bcl-2 の発現も誘導した。これらの傾向は IRF-1 の欠損でさらに強まった。また、Bcl-2 の発現誘導は HCV 蛋白質のうちコア蛋白質が最も強く、IL-2 よりも IL-10 がより強かった。これらは IRF-1 の欠損でさらに増強された。

D. 考察

本研究結果より、リンパ球に増殖形質やアポトーシス抵抗性を賦与するのは、(IL-2), IL-10 と HCV コア蛋白質である可能性が強く示唆された。また、これらの作用は IRF-1 の欠損でさらに促進された。IRF-1^{-/-}マウスではリンパ種に移行せずにリンパ性増殖を発症する1つの可能性としては、HCV コア蛋白質と IL-2, IL-10 の共役により B 細胞のみならず、T 細胞にも増殖性を賦与し、双方の細胞が増殖してしまうためではないかと考えている。さらにリンパ性増殖の状態から一種の増殖能を獲得した B 細胞が B リンパ腫へと移行する段階で、IRF-1 並びに IL-12 が関与する可能性を考えており、今後検討を要する。

E. 結論

本研究結果から、リンパ球に増殖形質やアポトーシス抵抗性を賦与してリンパ性増殖

を誘発するのに重要な因子は、(IL-2), IL-10 と HCV コア蛋白質である事が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Amako, K. Tsukiyama-Kohara, A. Katsume, Y. Hirata, S. Sekiguchi, Y. Tobita, Y. Hayashi, T. Hishima, N. Funata, H. Yonekawa, and M. Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. **J. Virology** (2010) 84 303-311 [Selected in "Spotlight"].
- 2) T. Nishimura, M. Kohara, K. Izumi, Y. Kasama, Y. Hirata, Y. Huang, M. Shuda, C. Mukaidani, T. Takano, Y. Tokunaga, H. Nuriya, M. Satoh, M. Saito, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS P53 VIA PERSISTENT OVER-EXPRESSION OF 3 β -HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE. **J. Biol. Chem.** (2009) 284 36442-36452.
- 3) K. Saitou, K. Mizumoto, T. Nishimura, C. Kai and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. **Virus Research** (2009) Sep;144(1-2):266-271.
- 4) K. Machida, K. Tsukiyama-Kohara, S. Sekiguchi, E. Seike, S. Tone, Y. Hayashi, Y. Tobita, Y. Kasama, M. Shimizu, H. Takahashi, C. Taya, H. Yonekawa, N. Tanaka, and M. Kohara. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and

interleukins. **Gastroenterology** (2009) 137: 285-296.

- 5) Y. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, M. Yoneda, H. Sato, and C. Kai. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** (2009) Jan;32(1):29-41.

(日本語総説) :

1. 小原恭子・町田圭吾・小原道法「C型肝炎ウイルスとBリンパ腫」「感染・炎症・免疫」第39巻 第2号 p61-63, 2009

2. 学会発表

- 1) M. Saito, and K. Tsukiyama-Kohara. Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009, Nice, France.
- 2) M. Satoh, M. Saito, T. Takano, Y. Kasama, T. Nishimura, Y. Nishito, Y. Hirata, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Antibody raised against 3 β -hydroxysterol-D24-reductase (DHCR24) suppresses hepatitis C virus infection through BGT-1. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009. Nice, France.
- 3) K. Tsukiyama-Kohara. The novel pathway for impairment of p53 and oxidative stress response by hepatitis C virus 4th Medical Biotech Forum. 2009 Dalian, China.
- 4) K. Tsukiyama-Kohara, K. Machida, Y. Kasama, S. Sekiguchi, and M. Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. ワークショップ2W11 サイトカイン

制御因子による多様な生体調節 第32回日本分子生物学会年会 2009年 横浜

- 5) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子
HCV 誘導性 3β -Hydroxysterol δ -24 reductase 持続発現による p53 転写因子機能の抑制 第 32 回日本分子生物学会年会 2009年 横浜
- 6) 西村知裕、笠間由里、齊藤誠、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス(HCV)が誘導する DHCR24(3β hydroxysterol Δ 24 reductase)過剰発現によるp53機能抑制 ワークショップ2 ウイルス発癌 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年東京
- 7) 小原恭子、町田圭吾、笠間由里、関口敏、小原道法 C型肝炎ウイルスとBリンパ腫 ワークショップ6 病原性発現とモデルシステム 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京
- 8) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 Betaine/GABA transporter1(BGT-1)の C型肝炎ウイルス複製における役割 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京
- 9) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京
- 10) 西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子 Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3β -hydroxysterol δ -24-reductase. 第68回日本癌学会学術総会 2009年 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし (出願準備中 1 件)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

肝培養細胞系を用いたHCVによる糖代謝異常に関する研究

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすだけでなく、2型糖尿病、脂質代謝異常などの肝外病変を引き起こす。HCV感染による2型糖尿病の発症にインスリン抵抗性の関与が示唆されているが、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではHCVレプリコン細胞およびHCV J6/JFH1感染系を用いて、HCVによる糖代謝異常の発症機序を解析した。HCVレプリコン細胞および感染細胞において培養上清からの糖の取り込みが抑制されていた。FACS解析により細胞表面上のGLUT2発現抑制が認められた。GLUT2プロモーター領域欠損変異体のレポーターアッセイの結果、転写因子HNF-1 α がHCVによるGLUT2の転写抑制に重要であることが示唆された。HCVレプリコン細胞、感染細胞いずれにおいてもHNF-1 α のmRNA量、蛋白量がともに減少しており、特に感染細胞においてその傾向が著しかった。IFN α で細胞を処理し、HCV複製を阻害するとHNF-1 α の量が回復することから、HCV感染に特異的であると考えられた。これらの結果からHCVはHNF-1 α の発現抑制、GLUT2の転写抑制を介して糖の取り込みを抑制し、糖代謝異常の一因となっている可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病などの肝外病変を引き起こし、病態の進行に悪影響を及ぼす。HCVが2型糖尿病を引き起こす機序としてインスリン抵抗性の関与が示唆されているが、その発症機序は不明な点が多い。本研究ではHCVレプリコン細胞やHCV感染系を用いて、HCVによる糖代謝異常の発症機序を解明することを目的とし、糖の取り込み、グルコーストランスポーター(GLUT)2の発現、GLUT2の転写調節への影響について解析し

た。

B. 研究方法

- 1) ヒト肝がん細胞(Huh7.5細胞)と同細胞由来のHCVサブゲノムRNAレプリコン複製細胞(SGR)、HCVフルゲノムRNAレプリコン複製細胞(FGR)及びHCV J6/JFH-1感染細胞を用いて、2-deoxy-D-[1,2-³H]glucoseの取り込みを測定した。また、細胞表面でのGLUT2の発現をflow cytometryで解析した。
- 2) ルシフェラーゼをレポーターとし、GLUT2プロモーター領域の8種類の欠失変異体(全長、 Δ C/EBP、 Δ CRE、 Δ AP-1、 Δ HNF-1 α 、 Δ CAAT、

Δ TATA、転写開始) プラスミドを作製した。その欠失変異体プラスミドを各細胞にトランスフェクションし、GLUT2プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

- 3) GLUT2発現に関連する転写因子 HNF-1 α について mRNA 発現量を Real-time quantitative PCR (qRT-PCR)、タンパク発現量を Western blot 法により測定した。また、上記細胞を IFN 処理した後に、HNF-1 α の mRNA 発現量を qRT-PCR、タンパク発現量を Western blot 法により測定し比較した。

(倫理面の配慮)

取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっていない。

C. 研究結果

1) HCV複製細胞 (SGR、FGR、J6/JFH-1感染細胞) において 2-deoxy-D-[1,2-³H]glucose の取り込みを測定したところ、コントロール細胞に比し、いずれの細胞でも 50-60% の糖の取り込み抑制が認められた。また、細胞表面での GLUT2 の発現がいずれの HCV複製細胞においても抑制されていた。細胞を IFN (1000 IU/ml) で処理し、HCV複製を阻害すると GLUT2 の発現は回復した。

2) SGR、FGR、J6/JFH-1 感染細胞において GLUT2 プロモーター活性に対し影響を及ぼす転写因子について解析した。転写因子結合配列欠失変異体プラスミドを用いて、GLUT2 のプロモーター活性を測定した。HCV RNA レプリコン細胞及び感染細胞において GLUT2-全長、 Δ C/EBP、 Δ CRE、 Δ AP-1 の GLUT2 プロモーター活性は抑制されていたが、GLUT2- Δ HNF-1 α 、 Δ CAAT、 Δ TATA、転写開始では GLUT2 プロモーター活性の抑制は認

められなくなった。このことから HNF-1 α 結合領域付近が重要であることが示唆された。

3) qRT-PCR 解析により、SGR、FGR、感染細胞において HNF-1 α の mRNA 発現量は抑制されていた。HNF-1 α のタンパク発現量も SGR、FGR、感染細胞において低下しており、感染細胞において顕著に抑制されていた。さらに、SGR、FGR、感染細胞において IFN 処理により HCV 複製を阻害することで HNF-1 α の発現量は回復した。

D. 考察

HCV RNA 複製細胞での GLUT2 プロモーター活性の抑制は HNF-1 α 結合領域を欠損させると認められなくなったことから、HCV による GLUT2 の転写抑制には、HNF-1 α が関与していると考えられた。また、HCV 感染によって HNF-1 α の mRNA 量、蛋白量共に減少することが見出された。また IFN 処理により HNF-1 α の発現は回復し、GLUT2 の発現量も回復することから、HNF-1 α の発現低下が GLUT2 発現抑制に関与している可能性が示された。

HCV ゲノムの複製が起こると HNF-1 α が減少することが示されたが、HCV 複製により誘導されるシグナル伝達やサイトカインの発現が関与しているのか、あるいは特定の HCV 蛋白質による直接作用により HNF-1 α の発現が抑制されるのかを明らかにする必要がある。また、糖の取り込み抑制が肝細胞内の糖代謝、脂質代謝に及ぼす影響を明らかにする必要があり、今後解析を進めていく予定である。

E. 結論

HCV レプリコン細胞、HCV J6/JFH1 感染細胞において GLUT2 の細胞表面への発現が抑制され、糖の取り込みが抑制される。

これは HCV 感染細胞において HNF-1 α の mRNA および蛋白発現が抑制されることによって生じることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological responders with genotype 1b and high viral load previously treated with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy -focus on early viral dynamics. *Intervirology*, 2010; 53, 49-54.
- 2) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral dynamics of viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 2010; 53, 44-48.
- 3) Bungyoku, Y., Shoji, I., Makine, T., Adachi, T., Hayashida, K., Nagano-Fujii, M., Ide Y., Deng, L., and Hotta, H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *Journal of General Virology*, 2009; 90, 1681-91.
- 4) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, MMC., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *Journal of Virology*, 2009; 83, 5137-47.
- 5) Kasai, D., Adachi, T., Lin, D., Nagano-Fujii, M., Sada, K., Ikeda, M., Kato, N., Ide, Y., Shoji, I., and Hotta, H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *Journal of Hepatology*, 2009; 50, 883-94.

2. 学会発表

- 1) Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and 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, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 2) Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 3) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, and 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, Nice (France), October

- 3-7, 2009.
- 4) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, and 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, Nice (France), October 3-7, 2009.
 - 5) Shoji I and 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, Boston (USA), October 30-November 3, 2009.
 - 6) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. 1b型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN α -2b+RBV 併用療法(併用療法)における治療効果とウイルス dynamics との関係及びウイルス陰性化時期予測式についての検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 2009.
 - 7) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. セロタイプ 2 型 C 型慢性肝炎に対する IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の背景因子及び早期ウイルス dynamics の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都 2009.
 - 8) 井出良浩, 兼田崇作, 犬伏祥子, 足達哲也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染によるインスリン抵抗性誘導の分子機序について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 9) 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, 東京, 2009.
 - 10) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 11) Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる Bax 活性化の分子機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 12) 林田和美, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖に及ぼすエストロジオールの影響に関する検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 13) 兼田崇作, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. グルコーストランスポーター GLUT2 の転写制御に及ぼす C 型肝炎ウイルスの影響. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 14) 木村敬郎, 鈴木亮介, 山越智, 鈴木健裕, 堂前直, 勝二郁夫, 松浦善治, 千葉丈, 脇田隆字, 鈴木哲朗. Prohibitin2 は C 型肝炎ウイルス(HCV)NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 - 15) 井出良浩, 上城博宣, 前防達也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質と相互作用する細胞性キナーゼの解析. 第 32 回日本分子生物学会

年会, 横浜, 2009.

16) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

17) 山下亮輔, 福田浩一郎, 犬伏祥子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治, Lin Deng, 井出良浩, 堀田博, 勝二郁夫. C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性調節因子 E6AP 及び PA28 γ の相互作用解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

C型肝炎ウイルス増殖と脂質の相互作用の検討

研究分担者 相崎 英樹 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨： C型肝炎ウイルス(HCV)感染増殖が宿主細胞の脂質代謝に与える影響について、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し、解析した。JFH1、J6キメラウイルスをHuh7細胞に感染させると、いずれの場合にもウイルス増殖に伴い、培養上清中のリポ蛋白は、超低比重リポ蛋白(VLDL: Very Low Density Lipoprotein)が増加し、低比重リポ蛋白(LDL: Low Density Lipoprotein)、高比重リポ蛋白(HDL: High Density Lipoprotein)が低下することを見出した。今後、リポ蛋白に影響を与えるウイルス因子の同定およびその変化のメカニズムを解析する。更に、HCV感染に伴う細胞の代謝の変化についてメタボローム解析を行う。

A. 研究目的

近年、HCV感染が単なる肝炎だけでなくインスリン抵抗性や脂肪肝などの代謝異常も引き起こしていることが明らかになってきている。これらの代謝異常はウイルス感染による炎症よりも、ウイルスそのものの宿主細胞への直接作用が深く関わっているものと考えられている。食物として取り入れられた脂質は脂質代謝の流れに載って全身の必要な臓器に移行する。その中で肝臓は最大の代謝臓器であり、糖尿病や高脂血症などの代謝疾患をみるうえでも肝臓の役割を抜きに考えることは出来ない。そして、この脂質輸送の中心を担っているのがリポ蛋白である。更に、HCV粒子はリポ蛋白に内包される形でその感染性を発揮し、リポ蛋白の分泌経路を通して分泌される可能性が示唆されており、HCVとリポ蛋白の関係

が注目されている。そこで、本研究では肝炎ウイルス感染が肝細胞の脂質代謝に与える影響について、特にリポ蛋白に注目して、解析を行った。

B. 研究方法

Huh7細胞にJFH1由来HCVを感染させ、経時的に培養上清、細胞を回収し、含まれるウイルスコアタンパク量および脂質の量を測定した。更に、培養上清をゲル濾過HPLC分画し、各分画に含まれる脂質の解析を行った。HCV感染細胞と非感染細胞間で脂質代謝関連遺伝子、蛋白の発現の変化をマイクロアレー法、イムノブロット法で解析した。

(倫理面の配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク