

Micro RNA-122 による HCV の翻訳亢進機構の解析

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 肝臓特異的に発現している Micro RNA-122 (miR-122) は HCV の翻訳効率を亢進することが報告されている。唯一の *in vitro* 感染系である HCVcc は Huh7 細胞にしか感染できないが、Huh7 細胞は miR-122 の発現が非常に高いため、翻訳に対する miR-122 の影響を正確に評価するのは困難である。本研究では miR-122 を強制発現することにより、HCVcc 感染を許容する細胞株の検索を試みた。調べた細胞株の中で子宮頸癌由来の Hec1B 細胞は、HCV の感染受容体候補分子を全て発現しており、miR-122 を強制発現させると感染後 48 時間後にはウイルス RNA 量が 100 倍に増加することが明らかになった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は主に血液を介して感染し、世界で約 2 億人、国内でも 200 万人もの感染者が存在する。現行の抗ウイルス療法は先進国に多く認められる遺伝子型が 1 型の HCV 感染者に対して著効率が 50% 程度であり、より有効な治療法の開発は急務である。近年、HCV の複製に重要な因子として肝臓特異的な micro RNA である miR-122 が報告され、その阻害剤が臨床応用されつつある。しかし、その複製亢進のメカニズムは不明なままである。In vitro の感染系である HCVcc の複製を許容する細胞株は Huh7 細胞に限定されているが、Huh7 細胞は miR-122 の発現量が極めて高いため、HCV RNA の翻訳におよぼす miR-122 の影響を正確に評価するのは難しい。そこで本研究では、miR-122 の強制発現によって HCVcc の複製を許容する新たな細胞株を検索し、miR-122 による HCV の増殖亢進機構を解析することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト子宮頸癌由来 Hec1B 細胞における HCV のレセプター候補分子の発現をイムノプロットで検討した。ウイルス感染による自然免疫誘導能は、IFN α 刺激による ISG15 の発現を指標として、また、miR-122 の発現は qPCR で定量した。レンチウイルスベクターを用いて miR-122 を強制発現させた Hec1B 細胞や Claudin を強制発現させた 293T 細胞 (293T-CLDN) への HCVcc の感染性を検

討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

Hec1B 細胞は HCV のレセプター候補分子である CD81、SR-BI、Claudin1、Occludin を全て発現しており、HCV のシュードタイプウイルス (HCVpv) の感染性は Huh7 細胞と同等であった。また、IFN α や IFN λ の刺激による ISG15 の誘導は検出されず、ウイルス複製を阻害する自然免疫誘導能が欠損していた。しかしながら、miR-122 の発現は Hec1B 細胞や 293T-CLDN 細胞ではほとんど認められなかった。Hec1B 細胞に HCVcc を感染させると、HCV RNA 量は 72 時間後までほとんど変化しなかったが、miR-122 を強制発現させると感染 18 時間後より RNA 量が急速に増加し、48 時間後には約 100 倍まで上昇し、miR-122 の発現により Hec1B 細胞内でも HCV の複製が可能となることが示された。一方、293T-CLDN 細胞では miR-122 を強制発現させても HCV のゲノム量に変化は認められなかった。

D. 考察

Hec1B 細胞は Huh7 細胞に比較して、内在性の miR-122 の発現レベルが低いため、HCV 複製にお

ける miR-122 の機構解析に適した細胞であることが示された。今後、miR-122 と結合する HCV の 5'UTR に変異を導入し、翻訳亢進機構の解析を進めたい

E. 結論

ヒト子宮頸癌由来 Hec1B 細胞は miR-122 を強制発現することにより、HCVcc の感染を許容できることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 52, 411-420.
- 2 Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2010; 84, 2798-2807.
- 3 Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010; 84, 5824-5835.
- 4 Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 39, 1577-1585.
- 5 Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihiro H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuoichi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.

- 6 Tripathi LP, Kataoka C, Tagawa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 2010; 6, 2539-2553.

2. 学会発表

- 1 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、5 月 19 日-21 日、2010.
- 2 松浦善治: 温故知新・C 型肝炎ウイルス研究の源流: 第 52 回日本消化器病学会大会、横浜、10 月 13 日-16 日、2010.
- 3 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010.
- 4 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C 依存的なシグナル伝達経路の関与、同上。
- 5 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
- 6 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc 細胞)への患者血清由来 HCV の感染、同上。
- 7 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介した RNA 非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
- 8 森石恆司、松浦善治: HCV による脂質代謝障害の分子機序、同上。
- 9 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、森 嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築、同上。
- 10 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、同上。
- 11 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンは C 型肝炎ウイルスの複製

- を制御する、同上。
- 12 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 13 松浦善治: C型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に関与する宿主因子: 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日、2010。
 - 14 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, , and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
 - 15 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17thth International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜, 9 月 10 日-14 日, 2010.
 - 16 Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
 - 17 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 同上。
 - 18 Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 同上。
 - 19 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 同上。
 - 20 Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for recurrent hepatitis C. 同上。
 - 21 Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 同上。
 - 22 Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 同上。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

高感染性 HCV 適応変異株の性状解析

分担研究者 深澤 征義 国立感染症研究所細胞化学部

研究要旨 宿主細胞内での HCV ライフサイクルの解析に極めて有用な高感染能を有する HCV 適応変異株の分離に成功した。本適応変異株は 2 ヶ所（K74T, I414T）に変異を有し、これらの変異のうち I414T 変異がウイルス産生能の上昇、特にウイルス侵入過程の促進に大きな寄与をしていることが明らかとなった。さらに、両変異導入によりウイルス粒子への HCV ゲノム RNA パッケージング効率が上昇することもわかり、これにより感染性ウイルスの粒子形成が促進されているものと考えられた。また今回、ヒト CD81 にみならずマウス CD81 を宿主への侵入に利用できる HCV 適応変異株を樹立することにも成功した。K74T, I414T 変異に加え、N234D、V293A、T331S 変異の計 5 ヶ所の変異が適応変異株には導入されていた。この成果はマウスで増殖可能な HCV 適応変異株の樹立に向けた第一歩となると考えている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は本邦における肝がん発症の主要リスク要因であり、その克服が強く求められている。宿主細胞内での HCV ライフサイクルについてはいまだ不明の点が多く、有用な治療ターゲットとなり得る宿主因子の情報不足しているのが現状である。この克服に向けてまず、HCV ライフサイクルに関与する宿主因子を探索するための方法論を確立することが重要である。我々は当該方法論に有用な高感染増殖能を有する HCV 適応変異株の分離に成功し、本年度はその性状解析を行った。さらに、HCV 感染動物実験への道を開く一歩として、マウス CD81 を HCV 侵入に利用できる適応変異株の分離も試みた。

B. 研究方法

（1）高感染 HCV 適応変異株 HCV-JFH1 (K74T/I414T) の解析

我々が分離した HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株は K74T/I414T 変異を有することで高感染能を獲得した JFH1 株由来適応変異株である。本株の性状解析は以下のように行った。K74T、I414T 各変異、あるいは両変異を導入したウイルスゲノムを *in vitro* 転写により合成し、Huh7.5.1 細胞に導入することで各変異ウイルスを調製した。ウイルス産生能の測定は、経時的に培養液中の HCV コア蛋白質量を ELISA で定量することにより行った。また、細胞中のウイルスタンパク質（コアタンパク質及び NS3）および RNA 量についてもイムノブロットあるいは qRT-PCR により測定した。宿主細胞への HCV 侵入アッセイは、ルシフェラーゼ遺伝子をパッケージングした HCV 偽ウイルス（HCVpp）を用いて行った。ウイルスの分画は、スクロース非連続密度勾配遠心法により行った。

（2）マウス CD81 を感染に利用できる HCV 適

応変異株の分離と解析

適応変異株樹立のためのHCV親株は、野生型HCV-JFH1(wt)株及び高感染性を有するHCV-JFH1(K74T/I414T)株を用いた。適応変異株分離に用いる宿主細胞株は以下のように樹立した。Huh7.5.1細胞由来のCD81欠損ヒト肝細胞株751rに、ヒト又はマウスCD81発現ベクター(pcDNA3.1由来)を導入し、各CD81を安定発現する細胞株(751r/hCD81及び751r/mCD81)を樹立した。

751r/mCD81に感染する適応変異株の分離は、HCV-JFH1(wt)株あるいはHCV-JFH1(K74T/I414T)株を751r/mCD81、751r/hCD81、及びHuh7.5.1細胞へ感染後6-7日間培養し、培養上清を再度未感染の各細胞へ添加し感染継代することで行った。本操作を複数回繰り返した。HCV感染能の検討は、培養上清を751r/mCD81を含む各細胞に感染後、細胞内HCVコア蛋白質量をイムノブロットで、細胞外への分泌コア蛋白質量をELISAにより測定することで行った。適応変異部位の同定については、適応変異株を感染させた宿主細胞より全RNAを調製し、HCV 3'末配列に相補的なプライマーを用い逆転写後、HCV-JFH1全長をカバーしたプライマーセットを用いPCRを行い、PCR産物の核酸配列をDNAシーケンサーで直接決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は現段階ではヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

(1) HCV適応変異の解析

我々は昨年度までに高感染増殖能を示す適応変異株HCV-JFH1(K74T/I414T)を分離し変異導入部位などを決定した。本年度はさらに本適応変異株の性状解析を進めた。まず、K74T、I414T単独、あるいは両変異を有するHCV-JFH1 RNAゲノムを調製し、Huh7.5.1細胞に導入後、HCV産生について調べた。その結果、ウイルス産生には顕著な差は見られなかった。次に、培養上清に放出された各変異を有するHCVウイルス粒子をHuh7.5.1細胞に感染後、ウイルス産生を調べた。その結果、K74T変異ではわずかなHCV産生の上昇しか見られなかったが、I414T変異では親株に比べ顕著な宿主内でのウイルス蛋白質の経時的な蓄積、HCV RNAの上昇(100倍以上)とHCV粒子の放出促進が見られた。二重変異体(K74T/I414T)ではさらなるウイルス産生上昇がみられた。以上の結果から、I414T変異がHCV産生の上昇、特にウイルス侵入過程促進に主要な寄与をしており、K74T変異もその活性を強める働きがあるものと考えられた。HCV偽ウイルスを用いたHCV侵入アッセイを行った結果からも、I414T変異導入によりウイルス侵入の有意な促進が見られた。また、二重変異ウイルスではHCV RNA/HCVコア蛋白質比が10倍以上高いこともわかった。さらに、スクロース密度勾配遠心による培養上清中HCVの分画実験から、感染性を有するHCV画分の比重が二重変異ウイルスでは非常に幅広くなることがわかった。

(2) マウスCD81を感染に利用できるHCV適応変異株の分離と解析

野生型HCV-JFH1(wt)株は751r/hCD81への感染は見られたが、751r/mCD81には全く感染せず、HCV偽ウイルスを使った他のグループの研究と同様の結果を示した。一方、驚いたこと

に、ヒト肝細胞株に高感染能を示すHCV-JFH1(K74T/I414T)株では、751r/hCD81に比べ効率は悪いながらも751r/mCD81への感染が見られた。このことは、ウイルスがK74T/I414T変異により、(ヒトCD81に比べると弱い)がマウスCD81を受容体として利用できるようなっていることを示している。そこでHCV-JFH1(K74T/I414T)株を親株として751r/mCD81に対してより高い感染能を有する適応変異株の分離をさらに進めた。その結果、4-6回継代を繰り返すことで751r/hCD81と同程度に751r/mCD81にも感染する適応変異株が複数分離された。その中から4バッチについて構造タンパク質領域のゲノム配列を決定した結果、全てで同じ配列を示し、K74T/I414T変異に加え、E1領域ではN234D、V293A、T331S変異が、E2領域ではV402Aの変異が認められた。これらの変異はマウスCD81の認識に重要と考えられた。非構造タンパク質領域にも複数の適応変異が見られることもわかった。

D. 考察

HCV 適応変異の解析から E2 領域の I414T 変異がウイルス産生上昇、特に侵入過程の促進に関与することが明らかになった。HCVpp を用いた解析からもこの結果は支持された。変異導入により感染性粒子の比重が幅広くなっていることから、侵入に有利となるリポタンパク質との相互作用が促進されている可能性が考えられた。また、変異ウイルスでは HCV RNA/HCV コア蛋白比が高く、粒子形成において HCV RNA のパッケージングの効率が上がっている可能性も示唆された。このことも感染能の上昇に寄与しているものと考えられた。

また今回、ヒトCD81と同等にマウスCD81を

侵入に利用できるHCV適応変異株を樹立することができた。この変異株は構造タンパク質であるE1, E2のウイルス表面領域に計5ヶ所の変異を有しており、N234Dによる糖鎖の欠損が一つの特徴と考えられる。これらの変異により、ヒトCD81に加えマウスCD81との高親和性も獲得したものと考えられた。最近、ドイツのグループにより別のHCV親株からマウスCD81を利用できる適応変異株の報告がなされたが、我々の変異株とは異なる変異(L216F, V388G, M405T)を有していた。

E. 結論

我々は従来の 1000 倍以上の高感染性を有する HCV 適応変異株 HCV-JFH1 (K74T/I414T) を樹立した。この株ではウイルス侵入過程および感染性ウイルス粒子形成過程の促進により感染能の上昇を示すことが明らかとなってきた。昨年度までに報告しているように本適応変異株は、HCV ライフサイクルの解析ツールとしても非常に有用である。また、今回マウス CD81 を侵入に利用できる HCV 適応変異株を樹立することもできた。このことはマウスで増殖可能な HCV 適応変異株の樹立に向けた第一歩となる成果である。今後は、本適応変異株を用いマウス細胞でのウイルス複製・粒子形成・放出可能性についてさらに検討していきたい。最終的に、様々な遺伝子改変マウスを HCV 研究に利用できる道を切り開きたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Anne-Sophie Rivier, Guillaume A. Castillon, Laetitia Michon, Masayoshi Fukasawa, Maria Romanova-Michaelides, Nina Jaensch, Kentaro Hanada, Reika Watanabe, Exit of GPI-anchored proteins from the ER differs in yeast and mammalian cells, *Traffic* 11, 1017-33 (2010)
2. 学会発表
- 1) 深澤 征義、C型肝炎ウイルス感染とタイトジャンクション構成タンパク質、日本薬学会第131年会、静岡、2011.3.28-31
- 2) Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Masayoshi Fukasawa, Isolation of highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in hepatic cell culture system, The 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, USA, 2010.12.11-15
- 3) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤 秀輔、鈴木 哲朗、脇田 隆字、花田 賢太郎、西島 正弘、深澤 征義、感染増殖能が上昇したC型肝炎ウイルス変異株の分離と性状解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9
- 4) Kyoko Saito, Tetsuro Suzuki, Hideki Aizaki, Kentaro Hanada, Takaji Wakita, Masahiro Nishijima, Masayoshi Fukasawa, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14
- 5) Isei Tanida, Masayoshi Fukasawa, Takaji Wakita, Kentaro Hanada mTor-signaling pathway and autophagy in in vitro naïve HCV-particle infection system, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14
- 6) Noella M. Arnaud, Stephanie J. Dabo, Patrick Mailard, Agata Budkowska, Katerina I. Kalliampakou, Penelope Mavromara, Dominique Garcin, Jacques Hugon, Anne Gatignol, Fumiko Shinkai-Ouchi, Masayoshi Fukasawa, Daisuke Akazawa, Takaji Wakita, Eliana F. Meurs, Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14
- 7) Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Masahiro Nishijima, Isolation and characterization of a mammalian cell mutant defective in lipid droplet biogenesis, FASEB Summer Research Conference, Lipid Droplets: Metabolic Consequences of the Storage of Neutral Lipids, Steamboat, CO, USA, 2010.7.25-30
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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）
研究分担報告書

ウイルス蛋白-宿主因子相互作用の分子機構に関する研究

研究分担者 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）感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こすのみならず、肝外病変として2型糖尿病の素因にもなる。2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要である。肝細胞は糖を産生し、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。肝臓における糖新生はその律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）及びグルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）と、糖分解に関与するグルコキナーゼ（GK）のバランスによって調節されている。我々は昨年度の本研究で、HCV レプリコン複製細胞や HCV 感染細胞では、対照細胞に比べて、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現が亢進し、その結果、グルコース産生が亢進していることを報告した。PEPCK や G6Pase の遺伝子発現は転写因子 FOXO1 によって制御されているが、HCV 複製・感染細胞では、通常とは異なる Akt 非依存性のシグナル伝達経路を介して FOXO1 のリン酸化が低下し、その転写活性が亢進する可能性が考えられた。本研究では、FOXO1 転写活性の亢進に関わる Akt 非依存性シグナル伝達経路、及びそれに関与する HCV 蛋白質について調べた。その結果、HCV 複製・感染細胞においては、reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進に伴って c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化されることが FOXO1 リン酸化の低下と密接に相関することが明らかになった。また、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現の亢進及びグルコース産生の亢進は HCV 非構造蛋白質 NS5A の単独発現により引き起こされることも明らかになった。このような HCV による糖産生の亢進が高血糖状態の維持、ひいては糖尿病発症の素因になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌を引き起こすのみならず、2型糖尿病発症の背景因子ともなる。また、2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たしている。肝細胞は糖の産生を担い、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。肝臓における糖新生はその律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）及びグルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）と、糖分解に関与するグルコキナーゼ（GK）のバランスによって調節されている。我々は昨年

度の本研究で、HCV レプリコン複製細胞や HCV 感染細胞では、対照細胞に比べて、PEPCK 及び G6Pase の遺伝子発現が亢進し、その結果、グルコース産生が亢進していることを報告した。PEPCK や G6Pase の遺伝子発現は転写因子 FOXO1 によって制御されているが、HCV 複製・感染細胞では、通常とは異なる Akt 非依存性のシグナル伝達経路を介して、FOXO1 のリン酸化が低下し、その転写活性が亢進する可能性が考えられた。本研究では、FOXO1 転写活性の亢進に関わる Akt/PKB 非依存性シグナル伝達経路、及びそれに関与する HCV 蛋白質について調べた。

B. 研究方法

(1) 細胞とウイルス：Huh-7.5 細胞と HCV J6/JFH-1 の P-47 株 (Huh-7.5 細胞適応変異株) を用いた。

(2) 各種阻害剤及び抗体：ミトコンドリア ROS 産生の指標試薬 (MitoSOXTM Red)、reactive oxygen species (ROS) 阻害剤 (N-acetylcysteine [NAC])、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 (SP600125)、及び、JNK、FOXO1、Akt/PKB に対する抗体ならびにそのリン酸化分子に対する特異抗体は、市販のものを購入して実験に用いた。

(3) 免疫染色法及び免疫プロット法：常法により行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えウイルスの作製及び使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。組換え遺伝子を用いた実験は神戸大学組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) HCV 感染により FOXO1 転写活性の亢進 (リン酸化の低下) がみられる：

HCV 感染細胞では FOXO1 の Ser319 リン酸化が抑制され、核外輸送が阻害されて FOXO1 の核内蓄積が認められた。すなわち、HCV 感染により FOXO1 の転写活性が亢進すると考えられた。FOXO1 の転写活性の亢進は、標的遺伝子である PEPCK 遺伝子や G6Pase 遺伝子の発現亢進により確認された。

(2) HCV 感染による FOXO1 転写活性の亢進 (リン酸化の抑制) は Akt/PKB 活性の低下によるものではない：

HCV 感染細胞では Akt/PKB の Ser473 がリン酸化されていた。すなわち、HCV 感染により Akt/PKB は活性化されており、上記の FOXO1

リン酸化の抑制には他のシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。

(3) HCV 感染により JNK が活性化される：

HCV 感染によりリン酸化 JNK が増加することがわかった。そこで、JNK 特異的阻害剤 (SP600125) 処理により JNK 活性化を阻害すると、HCV 感染による FOXO1 リン酸化の抑制が解除された。すなわち、FOXO1 リン酸化の抑制 (転写活性の亢進) に JNK の活性化が関与している可能性が示唆された。

(4) HCV 感染により ROS が過剰産生される：

MitoSOX を用いた解析により、HCV 感染細胞では ROS 産生が亢進していることがわかった。そこで、NAC 処理により ROS 産生を阻害すると、HCV 感染による JNK の活性化が阻害され、FOXO1 リン酸化の抑制が解除された。すなわち、FOXO1 リン酸化の抑制 (転写活性の亢進) にミトコンドリアでの ROS の過剰産生を介した JNK の活性化が関与している可能性が示唆された。

(5) HCV NS5A により糖新生が促進される：

HCV NS5A の単独発現により、FOXO1 のリン酸化が抑制された。それに伴って、PEPCK 遺伝子や G6Pase 遺伝子の転写亢進とグルコース産生の増加が認められた。すなわち、HCV 感染による糖新生系の亢進に NS5A が少なくとも部分的に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

HCV 感染は、酸化ストレスの誘導 (ROS 産生の亢進) を介して JNK を活性化し、この経路が FOXO1 のリン酸化を抑制してその転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素遺伝子 (PEPCK 及び G6Pase) の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。通常のインスリンシグナル経路で FOXO1 の転写活性調節に重要な役割を果たしている Akt/PKB は HCV 感染により逆に活性化さ

れており、HCV 感染による糖新生促進において Akt/PKB シグナル伝達経路は直接には関与していないと考えられた。また、FOXO1 リン酸化の抑制及び糖新生の亢進に HCV NS5A が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染は、酸化ストレスを誘導して JNK を活性化し、FOXO1 の転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素遺伝子の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。また、HCV による糖新生の亢進に NS5A が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, (in press), 2011.
2. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 54(11): 684–690, 2010.
3. 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 of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 82(8):

1364–1370, 2010.

4. 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(1):49–54, 2010.
 5. 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(1):44–48, 2010.
 6. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem.* 111(3): 676–685, 2010.
- ##### 2. 学会発表
1. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10–14, 2010. Yokohama, Japan.
 2. Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced

- suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
3. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
 4. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.
 5. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, 2010. Yokohama.
 6. Deng Lin, 兼田崇作, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博 糖代謝に及ぼすC型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析 日本ウイルス学会学術集会 2010. 徳島
 7. 勝二郁夫, Lin Deng, 堀田博 HCVによる糖代謝障害の分子機序 日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム 2010. 徳島
 8. 笹山美紀子, 勝二郁夫, Adianti Myrna, 井出良浩, 姜大鵬, Lin Deng, 堀田博. 慢性C型肝炎患者血清および非感染者血清を用いたC型肝炎ウイルス中和感受性決定部位の検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島
 9. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a及びHCV-2bのNS5A多様性は治療効果と相関する. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.
 10. El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2aおよび2bのNS5A多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
 11. Shoji I, Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitinligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会、2010. 神戸.
 12. 岡田典子, 勝二郁夫, 甘翔, Lin Deng, 姜大鵬, 井出良浩, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aに結合するユビキチンリガーゼの同定. 第33回日本分子生物学会、2010. 神戸.
- G. 知的所有権の取得状況
該当なし

C型肝炎と脂質代謝

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨 これまで、C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝脂肪化の後に肝発癌を引き起こすことを示してきた。HCV トランスジェニックマウス・モデルおよびC型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸（モノエン酸）が増加している。C型肝炎における肝脂肪化、一価不飽和脂肪酸増加の機序とその意義を知るために、コア蛋白発現 HepG2 細胞と JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いて分析を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。多価不飽和脂肪酸(PUFA)である eicosatetraenoic acid(EPA)や arachidonic acid(AA)の投与によって一価不飽和脂肪酸はコア蛋白非特異的に減少したが、コア蛋白によって誘発されている活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)はPUFAによっては減少しなかった。これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系においてNADHを消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS産生のいずれもがコア蛋白発現細胞で特異的に減少した。コア蛋白発現 HepG2 細胞において、対照細胞に比して発現の増加していた脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な転写因子である SREBP-1c は、ピルビン酸の投与によって低下が認められたが、EPA や AA の投与では低下は認められなかった。また、JFH-1 増殖 Huh-7 細胞にても中性脂肪の増加が認められた。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase)の機能障害が、ROS 産生、脂質代謝異常を含むC型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示され、病態改善薬開発への可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア蛋白がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認し、このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行

ってきた。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後肝細胞癌(肝癌)が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄

積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。今回、我々は、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。

B. 方法

コア遺伝子を導入した HepG2 細胞である Hep39 細胞と対照である Heps wx 細胞を用いて、以下のような解析を行なった。また、JFH-1 増殖 Huh7 細胞も同様に用いて検討を行った。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメディアウムに溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。eicosatetraenoic acid、eicosatetraenoic acid(EPA)、arachidonic acid(AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

C. 結果

(1) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた。

(2) 一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸、cis-ヴァクセン酸、パルミトオレイン酸) の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) 不飽和脂肪酸が増加していた。なお、 δ -6 活性の上昇は HepG2 細胞において内因性に存在することが明らかになった。

(3) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraenoic acid(ETYA)によってコア

蛋白発現細胞のみで 18:1(n-9)が著増した。この結果から、コア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。

(4) 多価不飽和脂肪酸である EPA や AA によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)はいずれの細胞でも減少しなかった。

(5) ピルビン酸の投与により、解糖系において lactate dehydrogenase によって lactate 産生側へ平衡を傾けると、NADH が消費され、細胞内の蓄積中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもが、コア蛋白発現細胞においてのみ特異的に改善された。

(6) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 desaturase の発現が増加していたが、SREBP-1b、SREBP-2 の発現は増加していなかった。

(7) ピルビン酸の投与によって SREBP-1c と FAS の発現低下が認められたが、EPA や AA の投与では低下は認められなかった。

(8) JFH-1 増殖 Huh7 細胞においても感染 4 日目の時点で細胞内に中性脂肪が有意に増加していることが認められた。

D. 考察

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝癌を発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わり

が想定されている。

C型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の阻害等が明らかになってきている。C型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回の我々の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。

また、SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼといった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることも重要な所見である。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、C型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示されたといえる。NADH を減少させる方法によって C型肝炎の病態を改善させる可能性がある。

E. 結論

一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少

によって、それが改善されることも見いだされた。C型肝炎の病態解明と病変進行の予防、病態改善薬の開発に向けて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol* 2010 Sep 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21093950.
- 2) Koike K, Miyoshi H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Authors' reply to the Letters to the Editors. *J Hepatol* 2011 Feb 3. [Epub ahead of print] .
- 3) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2010 Dec 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21170963.
- 4) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of contrast enhanced ultrasonography with sonazoid in

- radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 Nov 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21054516.
- 5) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2010;40:135-44.
 - 6) Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, Koike K. Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J Gastroenterol* 2010;45:876-84.
 - 7) Takaki A, Tatsukawa M, Iwasaki Y, Koike K, Noguchi Y, Shiraha H, Sakaguchi K, Nakayama E, Yamamoto K. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells. *J Viral Hepat* 2010;17:555-62.
 - 8) Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, Koike K, Yamakado M, Ishizaka N. Impact of Changes in Obesity Parameters on Glucose Metabolism and Insulin Resistance Over a One-Year Period. *J Atheroscler Thromb* 2010.
 - 9) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 2010;37:1417-23.
 - 10) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. *J Med Virol* 2010;82:776-92.
 - 11) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of Contrast Enhanced Ultrasonography with Sonazoid in Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010.
 - 12) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010;78 Suppl 1:24-30.
 - 13) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* 2010;40:69-82.
 - 14) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. *J Gen Virol* 2010;91:1207-12.
 - 15) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between

- gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:476-85.
- 16) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. *J Rheumatol* 2010;37:410-6.
- 17) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2010;33:263-8.
- 18) Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Koike K, Yatomi Y. Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2010;411:765-70.
- 19) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 2010;85:520-4.
- 20) Masuzaki R, Tateishi S, Shiina H, Yoshida H, Nakagawa T, Arano K, Uchino K, Enooku E, Goto Y, Kondo T, Goto Y, Sugioka H, Ikeda M, Omata K, Koike. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma recurrence by transient elastography after curative radiofrequency ablation. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
- 21) Uchino K, Tateishi S, Shiina T, Arano K, Enooku E, Goto R, Masuzaki H, Nakagawa Y, Kondo T, Goto M, Omata H, Yoshida K, Koike. Clinical features of advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
- 22) Arano T, Nakagawa H, Yoshida H, Tateishi R, Uchino Y, Enooku K, Sato T, Masuzaki R, Ohki E, Goto R, Masuzaki Y, Kondo T, Goto T, Shiina S, Omata M, Koike. Association between serum adiponectin level and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
- 23) Kojima K, Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kato N, Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. miRNA-122, a liver-specific miRNA, is a key regulator for bridging the clinical phenomena between

2. 学会発表

alpha-feto-protein expression and biologically malignant phenotype in HCC. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

5) Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Shirataki H, Ikeda H, Koike K, Fujiwara K. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and protein production in rat hepatocytes through an mTOR signaling pathway. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

6) Takahashi H, Okuse C, Yamada N, Takatsu Y, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Itoh F. Hepatitis B virus clearance in acute hepatitis is prolonged in genotype A HBV infection. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.

7) Tsutsumi T, Goto K, Fujinaga H, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Suzuki T, Koike K. Association of the substitution of amino acid 75 in the hepatitis virus core region with IL-8 upregulation and hepatocarcinogenesis. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

8) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kawatari N, Goto T, Chang JH, Yoshida H, Omata M, Koike K, Kato N. Amino acid substitutions in genotype 1b HCV core protein and response to PEG-IFN/RBV treatment. 17th International Meeting on

Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

9) Yuhashi K, Kodama T, Koike K, Kanamori H. Identification of hepatic mRNA 3'-untranslated regions that bind to HCV NS5B. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.

10) 工藤洋太郎, 立石敬介, 田中康雄, 山本恵介, 金井文彦, 小俣政男, 小池和彦. 脂肪肝から肝発がんを呈する新たなモデルマウスの作成と解析. 第 47 回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.

11) 大塚基之, 高田朱弥, 小島健太郎, 前田慎, 立石敬介, 池上恒雄, 平田善裕, 建石良介, 椎名秀一朗, 吉田晴彦, 小池和彦. microRNA machinery 構成因子 DDX20 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される肝発癌経路の同定. 第 47 回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

無細胞技術を用いた HCV protease で切断される宿主プロテインカイネースの探索

分担研究者 澤崎達也 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 准教授

研究要旨 HCV 感染・増殖には、細胞内の宿主タンパク質の関与が報告されている。宿主タンパク質の中でも、細胞内シグナル伝達情報制御機構の中心的役割を担うプロテインカイネースは、タンパク質のリン酸化を通じて、タンパク質輸送や転写・複製機構を制御していることから、HCV はそのリン酸化を通じてタンパク質輸送などの宿主細胞内機能を利用しているものと想像されている。本研究では、310 種類からなるヒトプロテインカイネースライブラリーを用いて、HCV プロテアーゼで切断される宿主プロテインカイネースの探索を行い、6 種類のヒトプロテインカイネースが切断されることを見出し、HCV 感染細胞内での切断および HCV プロテアーゼにより切断されたフォームが HCV 複製を亢進することを明らかにした。

A. 研究目的

近年の報告から、ウイルスは細胞内の宿主タンパク質を利用し、複製・増殖を行っていることがわかってきている。その中で、最近、HCV タンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネースによりリン酸化されることがわかってきた。このリン酸化は、HCV 複製機構における重要な働きをしていること、鈴木らの報告から明らかとなった。また、我々の HIV プロテアーゼを用いた最近の研究により、HIV プロテアーゼの宿主プロテインカイネースの切断が活性化を引き起こし、HIV ゲノムの複製を誘導することがわかった。これらの事は、HCV プロテアーゼにより切断されるプロテインカイネースの網羅的な探索は、細胞内での HCV 増殖機構や細胞がもつ抗 HCV 機構の解明につながるものと思われる。しかし、ヒトゲノム上には 518 種類のプロテインカイネースがコー

ドされており、細胞内から HCV プロテアーゼで切断されるプロテインカイネースの探索することは不可能である。そこで、本研究では我々が開発してきた真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を用いてプロテインカイネースライブラリーの構築を行い、in vitro で HCV プロテアーゼにより切断されるプロテインカイネースの探索を可能とする系の開発を行い、HCV プロテアーゼの切断により HCV 感染・複製に利用される宿主プロテインカイネースの同定を目指した。

B. 研究方法

我々が前年に 390 種類のプロテインカイネースライブラリーから同定した 6 種類のプロテインカイネース遺伝子を用いて、動物細胞での発現ベクターに組み込んだ。HCV プロテアーゼによる細胞内切断は、HEK293T 細胞株に、HCV

プロテアーゼと同定したプロテインカイネーゼを共発現させて行った。また、それらの切断部位は、CS 部位を中心にアラニン変異体解析を行って同定した。感染細胞内のプロテインカイネーゼ切断実験には、国立感染症研究所の脇田先生のグループが開発した JFH-1 クローンおよび Huh7 細胞を用いた感染実験系を用いた。また、細胞内タンパク質の検出には、V5 タグに対する抗体を用いたイムノブロットングにより行った。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人情報の管理には万全を期し、本研究はタンパクレベルの研究でありヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年告示）の対象外であるが、それに準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。

C. 研究結果

HCV プロテアーゼで切断される宿主プロテインカイネーゼ6種類が細胞内で HCV プロテアーゼにより切断されることが分かった。また、それらの切断部位を同定することに成功し、それらは HCV プロテアーゼの切断部位として報告されている CS（システインおよびセリン）残基の間であった。また、HCV 感染細胞において、プロテインカイネーゼ SGK495 が切断されることが分かり、HCV 複製細胞において、切断型 SGK495 が HCV 複製を

亢進することがわかった。また、別のプロテインカイネーゼにおいても、細胞内の HCV 複製の“場”である膜マイクロドメインの一種である lipid raft 上に局在することが分かった。

D. 考察

本研究は、網羅的探索技術を基盤に、HCV プロテアーゼにより切断される宿主プロテインカイネーゼタンパク質の同定を試みたものである。その結果、6種類の宿主プロテインカイネーゼが細胞内で HCV プロテアーゼにより切断され、少なくともその中の1つは、HCV 感染細胞内でも切断され、HCV 複製を亢進する結果を得た。これは、HCV が自身のプロテアーゼを用いて、宿主プロテインカイネーゼを切断し、細胞内シグナル伝達系を改変して、複製に利用している可能性を示唆している。またこのプロテインカイネーゼは、lipid raft 上に局在しており、HCV 複製における積極的な役割が注目される。また、見出された6種類のプロテインカイネーゼの中には、インターフェロン産生のレギュレーターである TBK1 が含まれており、切断部位は、カイネーゼドメイン内であったため、HCV は感染後細胞内の TBK1 を切断し、インターフェロン産生に必要なシグナル伝達機構をシャットオフする可能性が考えられる。また、RNA 認識ドメインを別のカイネーゼも、lipid raft に局在することが見出され、カイネーゼドメインと RNA 結合ドメインとの間を切断することが分かり、HCV 複製時における RNA 結合ドメインの関与は興味深いところである。

E. 結論