

- therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
- 52 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。
- 53 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。
- 54 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。
- 55 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。
- 56 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。
- 57 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。

G. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

高感染性HCV適応変異株の分離とHCVライフサイクル解析への応用

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 C型肝炎の治療とキャリアからの発症予防に向けた対策には未だ不明の点の多いHCVライフサイクルの理解が必須である。そのためには有用な解析ツールの導入が重要であり、我々は従来の約1000倍高感染能を示すHCV適応変異株HCV-JFH1 (K74T/I414T)の分離に成功した。さらにヒトのみならずマウスCD81を侵入に利用できる広汎用性を有するHCV適応変異株の分離にも成功した。実際に、高感染性HCV-JFH1 (K74T/I414T)株を利用し、遺伝学的手法を用いたHCVの産生に関与する宿主因子の探索系も構築し、広範にスクリーニングも行った。その結果、複数のHCV非感染Huh7.5.1由来の変異株を樹立することができた。これら変異株の解析から、CD81、Claudin1、MPDZなどがHCV感染増殖に必須の因子であり、特にClaudin1、MPDZが有用な抗HCV薬標的になり得ることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

宿主細胞内でのC型肝炎ウイルス（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は不足している。そこで、HCVライフサイクルに関与する宿主因子を探索し明らかにすることを本研究の最終目的とした。このための方法論の確立には、まず有用な解析ツールの導入が重要であると考え、高感染・増殖能を有するHCV株の分離等を第一に目指すことにした。次の段階であるライフサイクルに関わる宿主因子の探索には、宿主細胞変異株の分離を通じた遺伝学的手法を用いた。本研究により、

HCVライフサイクルの一端が明らかにされることが期待され、これにより治療薬開発へ展望を開きたいと考えている。

B. 研究方法

（1）高感染HCV適応変異株の樹立と性状解析

HCV親株には、劇症肝炎患者より分離されたHCV-JFH1株を用いた。in vitro転写により合成したHCV-JFH1ゲノムをHuh7.5.1細胞に導入することで親株ウイルス液を調製した。本ウイルスをHuh7.5.1細胞へ感染後約1週間培養し、培養上清を再度未感染の細胞へ感染・継代（数回）することで適応

変異株の分離を行った。HCV産生・感染能の検討は、培養上清をHuh7.5.1細胞に感染後、細胞内HCVタンパク質(コアタンパク質及びNS3)をイムノプロットで、細胞内ウイルスRNA量をqRT-PCR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。

次に、変異が見られた各部位に変異を導入したリコンビナントウイルスを作製し、そのウイルス産生能・感染能を同様に検討した。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超配遠心法により行った。

## (2) マウスCD81を利用できるHCV適応変異株の分離と解析

HCV親株は、野生型HCV-JFH1株及び高感染性を有するHCV-JFH1(K74T/I414T)株を用いた。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細胞及び751r/mCD81細胞)を樹立した。751r/mCD81細胞に感染する適応変異株の分離は、HCV-JFH1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(数回)することで行った。HCV感染能の検討は、培養上清を751r/mCD81細胞を含む各細胞に感染後、前項で述べた方法で行った。適応変異部位の同定についても、前項と同様に行った。

## (3) HCV非感染Huh7.5.1細胞由来変異株の分離と性状解析

高感染性を示すHCV-JFH1(K74T/I414T)株の感染により宿主細胞死が起こることを利用し、HCV感染能を欠損した宿主肝細胞変異株を分離する系を構築した。具体的には、親株Huh7.5.1細胞をHCV-JFH1(K74T/I414T)株で繰り返し感染処理し、長時間(〜3ヶ月)培養後、生き残ってくる細胞をクローニングすることで各種HCV非感染細胞株を樹立した。また、この条件ではCD81欠損株が主にとれることがわかり、親株としてCD81を一過性あるいは恒常的に発現したHuh7.5.1細胞を用いたスクリーニングも行った。

細胞-細胞間のHCV感染を顕微鏡下で観察する系の構築は、核がGFPで染色されたHuh7.5.1細胞株(pAcGFP1-Nuc恒常発現株)を樹立し、HCVに感染させた後、これをドナー細胞として、各非感染レシピエント細胞と共培養することで行った。

MPDZのノックダウンはステルスsiRNAを用いた。細胞への処理はlipofectamine RNAiMAXを用い20nMで感染前後に2回処理することにより行った。

(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。従って倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

#### (1) 高感染HCV適応変異株の樹立と性状解析

HCV-JFH1親株を用い、感染・継代を数回繰り返すことで感染能が約1,000倍上昇した適応変異株が分離された。ウイルスゲノム配列の解析から、a1994c (K74T)、u3014c (I414T) の2カ所に変異が見られた。それぞれ、Capsid形成に関わるコア蛋白質、エンベロープを構成するE2蛋白質部分の変異であった。次に、K74Tおよび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。そこで、培養上清に放出された各変異を有するHCV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と考えられた。HCVppを用いたHCV侵入アッセイでも、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。一

方、二重変異ウイルスではHCV RNA/コア蛋白質比が親株より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もわかった。

#### (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株は751r/hCD81細胞への感染は見られるものの、751r/mCD81細胞には全く感染せず、HCVppを用いた他のグループの研究と同様の結果を示した。一方、興味深いことに、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細胞への感染も見られた。この結果は、K74T/I414T変異により、ウイルスがマウスCD81を受容体として利用できるように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細胞に対してより高い感染能を有する適応変異株の分離を試みた。その結果、751r/hCD81細胞と同程度に751r/mCD81細胞にも感染する適応変異株が複数分離できた。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た。K74T/I414T変異に加え、E1タンパク質領域ではN234D、V293A、T331S変異が、E2タンパク質領域ではV402Aの変異が認められた。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。

#### (3) HCV非感染Huh7.5.1細胞由来変異株の分離と性状解析

15回以上のスクリーニングを繰り返し、ウイルス複製過程に欠損を示さない多数のHCV非感染Huh7.5.1由来変異株を分離した。分子生物学的・生化学的解析から、変異株群にはウイルス侵入過程に関与すると考えられるCD81分子、Claudin1分子、MPDZ分子の各欠損変異株が（それぞれ複数）含まれていることが明らかとなった。CD81、Claudin1遺伝子をこれら欠損株に戻すとHCV感染能が回復することから、CD81、Claudin1分子がHCV感染（侵入過程）に必須の因子であることも遺伝学的に示された。HCV侵入過程には、培養液中のHCVが細胞表面に結合し侵入する経路と細胞-細胞間で直接感染する経路があると考えられている。CD81およびClaudin1の欠損細胞を用い細胞-細胞間の感染について検討を行った結果、CD81欠損株では細胞-細胞間感染が見られたが、Claudin1の欠損株では感染が全く見られなかった。以上より、Claudin1分子が細胞-細胞間感染にも必須の因子であることが明らかとなり、よりよい抗HCV薬標的であると考えられた。そこで、Claudin1の細胞外ドメインの中でHCV感染に重要と考えられる第1ループのPQWRIYSYAGDNIVTAQ(28-44aa)に対するウサギポリクローナル抗体を作製した。本抗体存在下でウイルス感染は強く阻害されることが明らかとなり、抗Claudin1抗体の有用性が示された。MPDZはClaudin1の裏打ちタンパク質として知られる分子である。MPDZ欠損株からHCV感染が回復する株を分離するとMPDZの発現が復帰していること、MPDZ siRNAによりHCV感染が抑制されるこ

とから、MPDZがHCV感染に重要であることが明らかとなった。

#### D. 考察

高感染性を示す HCV-JFH1 (K74T/I414T) 株では 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主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。本変異により宿主受容体タンパク質等との相互作用が増強したものと考えられた。また、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も考えられた。さらに、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。

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、N234D による糖鎖の欠損が一つの特徴である。これら変異により、ヒト CD81 に加えマウス CD81 との高親和性をも獲得したものと考えられた。最近、独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。

MPDZ 欠損株では、タイトジャンクションに存在する Claudin1 や Occludin、ZO-1

分子の細胞内分布に大きな変動が見られ、この異常がウイルス感染能の欠損に関与していることが考えられた。

#### E. 結論

本研究により、高感染性や広汎用性を有する HCV 適応変異株の分離に成功した。この高感染性を示す HCV-JFH1(K74T/I414T) 株を用いて HCV 感染に耐性を示す宿主肝細胞変異株の分離を行い、CD81 欠損株、Claudin1 欠損株、MPDZ 欠損株など複数の HCV 非感染株を樹立し、これら分子の抗 HCV 薬標的としての可能性を提示した。今後さらにこれらの系を用い、HCV ライフサイクルに必須な宿主因子が同定されれば、抗 HCV 薬標的として極めて有用な知見が得られるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. "Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection." *J. Virol.* **82(12):5715-24**, 2008
- 2) Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. "Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells." *Virology* **383**, 319-327, 2009
- 3) Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K.

"Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles." *Autophagy* **5**, 937-45, 2009

- 4) Fukasawa M "Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle" *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 355-359, 2010

- 5) Rivier AS, Castillon GA, Michon L, Fukasawa M, Romanova-Michaelides M, Jaensch N, Hanada K, Watanabe R. "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) Masayoshi Fukasawa, Shigeo Nakamura, Yuko Nitahara-Kasahara, Kumiko Shimotohno, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, and Masahiro Nishijima, Tadahiko Mashino. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, USA, October, 2008

- 2) Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki. The role of the host membrane in the infectious HCV particle formation. 第9回淡路感染症免疫国際フォーラム、淡路、2009.9.8-11

- 3) Masayoshi FUKASAWA、Yoshitaka SHIRASAGO、Kentaro HANADA、Tetsuro SUZUKI、Takaji WAKITA、Masahiro Nishijima. Isolation of Huh7.5.1 cell mutants resistant to hepatitis C virus infection. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.10.3-7

- 4) 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 production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.10.3-7

- 5) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤 征義、花田賢太



- 郎、松浦善治、宮村達男、脇田 隆宇、鈴木哲朗. HCV粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009. 10. 25-27
- 6) 谷田以誠、深澤 征義、脇田 隆宇、花田賢太郎. オートファジーはHCV粒子產生に關与している. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009. 10. 25-27
- 7) 深澤 征義、白砂圭崇、花田賢太郎、鈴木哲朗、脇田 隆宇、西島 正弘. C型肝炎ウイルスに感染しないHuh7細胞株の分離と性状解析. 第82回日本生化学会大会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- 8) 齋藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田 隆宇、西島 正弘、深澤 征義. Squalene synthaseを標的としたC型肝炎ウイルス產生阻害. 第82回日本生化学会大会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- 9) 谷田以誠、深澤 征義、脇田 隆宇、上野隆、小南英紀、花田賢太郎. オートファジー関連遺伝子のノックダウンはHCV粒子產生を抑制する. 第82回日本生化学会大会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- 10) 田丸友裕、森裕美子、笠原優子、深澤 征義、下遠野久美子、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦. HCV-RNAポリメラーゼ阻害活性を有するスルホンアミド型フラレン誘導体. 創薬懇話会2009、岐阜、2009. 12. 10-11
- 11) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤 秀輔、鈴木 哲朗、脇田 隆宇、花田 賢太郎、西島 正弘、深澤 征義. C型肝炎ウイルスJFH1株変異体におけるウイルス產生の上昇. 日本薬学会第130年会、岡山、2010. 3. 28-30
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤 秀輔、鈴木 哲朗、脇田 隆宇、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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- G. 知的所有權の出願・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）  
分担研究報告書

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。本研究において、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明らかにした。また、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。そこで、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。さらに、グルコースの細胞内外への出入りを司るグルコーストランスポーター (GLUT) ファミリーの発現に及ぼす HCV 複製・感染の影響について解析した。その結果、HCV 複製・感染は、肝細胞の主要な GLUT である GLUT2 の発現を抑制すること、及び HCV による GLUT2 mRNA 発現抑制には GLUT2 プロモーター上の hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) 結合領域が関与していることを明らかにした。このように、HCV は複数の異なる分子機序により、糖代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。



## A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌等の肝内病変を引き起こすのみならず、2 型糖尿病等の肝外病変を引き起こすことが知られている。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すことも知られている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。肝臓における糖産生は糖新生とグリコーゲン分解の 2 経路があり、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。そして、それらの酵素発現は、主に遺伝子転写レベルで制御を受けている。本研究では、肝がん由来培養細胞である Huh7.5 細胞を用いて、糖新生系酵素発現やグルコース産生に及ぼす HCV 複製・感染の影響について検討した。また、PEPCK 遺伝子や G6Pase 遺伝子の発現は転写因子 FOXO1 によって制御されているが、HCV 複製・感染細胞ではどのようなシグナル伝達経路を介して制御されているかは明らかではない。そこで、HCV 複製・感染細胞における FOXO1 の動態、及びそれに影響を及ぼす HCV 蛋白質について調べた。さらに、産生されたグルコースの細胞外への放出や細胞外グルコースの細胞内への取込みに重要な役割を果たしているグルコーストランスポーター 2 (GLUT2) の遺伝子発現制御機構についても併せて解析した。

## B. 研究方法

(1) 細胞及び HCV RNA レプリコン、感染性ウイルス：Huh-7.5 細胞、及びそれ由

来の HCV サブゲノム RNA レプリコン複製細胞 (SGR)、HCV 全長ゲノム RNA レプリコン複製細胞 (FGR)、並びに HCV J6/JFH-1 の P-47 株 (Huh-7.5 細胞適応変異株) を感染させた細胞を用いた。

(2) 遺伝子発現量は定量 RT-PCR により、また、タンパク質発現及びそのリン酸化の程度はそれぞれの特異抗体を用いた免疫ブロット法により測定した。グルコース及びグルコース-6-リン酸の産生量の測定は既報の方法によった。

(3) 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-acetyl cysteine [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。

(4) HCV 複製・感染により影響を受ける GLUT2 プロモーター領域の解析：GLUT2 プロモーター領域の転写因子結合配列欠失変異体についてルシフェラーゼをレポーターとしたプロモーターアッセイを行った。(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 複製・感染により肝糖新生律速酵素の遺伝子発現が亢進する：

HCV レプリコン複製細胞 (SGR、FGR) では PEPCK 遺伝子及び G6Pase 遺伝子の発現亢進が認められた。また、HCV 感

染細胞でも上記遺伝子の発現亢進が認められた。一方、G6Paseの糖新生作用と拮抗するGKの遺伝子発現はSGR、FGR及びHCV感染細胞において抑制された。

(2) HCV複製・感染によりグルコース産生が亢進する：

SGR、FGR及びHCV感染細胞では、対照細胞に比べて約2倍量のグルコースが産生され、培養液中に放出された。

また、グルコース-6-リン酸の産生量も、SGR、FGR及びHCV感染細胞では、対照細胞に比べて約2-3倍多かった。

(3) HCV複製・感染により転写因子FOXO1の遺伝子発現量は変化しない：

PEPCKやG6Paseの遺伝子発現は転写促進因子FOXO1によって制御されることが知られている。しかし、HCV複製・感染によるFOXO1遺伝子の発現量の変化は認められなかった。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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レプリコン複製細胞（SGR、FGR）やHCV感染細胞では、対照細胞に比べて、肝糖新生の律速酵素であるPEPCK及びG6PaseのmRNA発現の亢進が認められ、一方、G6Paseの糖新生作用と拮抗するGKの遺伝子発現は抑制されていた。その結果、

SGR、FGR 及び HCV 感染細胞では、グルコースの産生が亢進していることがわかった。

PEPCK や G6Pase の遺伝子発現の亢進は転写因子 FOXO1 によって制御されることが知られている。SGR、FGR 及び HCV 感染細胞では FOXO1 遺伝子の転写促進は認められなかったが、FOXO1 のリン酸化が低下（転写活性が亢進）していることがわかった。しかし、FOXO1 のリン酸化を担う Akt 活性化（リン酸化）の低下は認められなかった。すなわち、SGR、FGR 及び HCV 感染細胞では、Akt/PKB 非依存性に FOXO1 の転写活性が脱制御を受け、その結果、糖新生の律速酵素 PEPCK 及び G6Pase が亢進し、糖産生が亢進する可能性が示唆された。

Akt/PKB 非依存性の FOXO1 転写活性の脱制御について検討した。その結果、HCV 複製・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ることが明らかになった。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. Deng L, Adachi T, Kitayama K,

Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered,

mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol*, 82(21): 10375-10385, 2008.

2. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H.

Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol*, 89(5): 1231-1242, 2008.

3. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H.

Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology*, 48: 38-47, 2008.

4. Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hotta H, Shoji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y. Usefulness of new immuno-radiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 51(Suppl 1):70-75, 2008.

5. 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*, 50:883-894, 2009
6. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J Gen Virol*, 90(7): 1681-1691, 2009.
  7. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection. *J Virol*, 83(18): 9237-9246, 2009.
  8. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J Virol*, 83(19): 9993-10006, 2009.
  9. Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion*, 79(1): 36-39, 2009.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem*, 106(6): 1123-1135, 2009.
  13. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684-690, 2010.
  14. 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.
15. 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.
  16. 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. 学会発表
1. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas, USA. October 5-9, 2008.
  2. Hotta H, Kitayama K, Yabuki R, Deng L, Nagano-Fujii M, Shoji I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas, USA. October 5-9, 2008.
  3. Hotta H. Recent advances in the pathogenesis and treatment of hepatitis C virus infections. Joint Meeting of International Society of Chemotherapy for Infection and Cancer and Western Pacific Society of Chemotherapy. Hangzhou, China. September 11, 2008.
  4. Hotta H. Sequence variation of the hepatitis C virus genome and its correlation with viral pathogenicity. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology. Hong Kong. February 26-28, 2009.
  5. Adachi T, Kasai D, Deng L, Nagano-Fujii M, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Down-regulation of glucose transporter expression and glucose uptake by hepatitis c virus replication. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology. Hong Kong. February 26-28, 2009.
  6. 足達哲也、笠井大介、長野基子、勝二郁夫、堀田博 グルコーストランスポーターGLUT2の発現と肝臓グルコース取り込みにおけるC型肝炎ウイルスの影響に関する検討 第51回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008.
  7. Deng Lin、足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤莊平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博 C型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析 第

- 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
8. 堀田博、北山喜久美、矢吹玲子、Deng Lin、長野基子、勝二郁夫 C型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大、アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
  9. Deng Lin、足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤荘平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博 C型肝炎ウイルス感染はミトコンドリア障害を介するアポトーシスを誘導する 第61回日本細菌学会関西支部総会、京都、2008.
  10. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
  11. Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
  12. 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.
  13. Shoji I, Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston (USA), October 30-November 3, 2009.
  14. 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.
  15. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
20. 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.
  21. 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 $\gamma$  の相互作用解析. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
  22. 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. Yokohama, Japan. Sep 10-14, 2010.
  23. 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. Yokohama, Japan. Sep 10-14, 2010.
  24. 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, Vienna. April 2010,
  25. 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, Yokohama, Japan. Sep 10-14, 2010.
  26. 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. Yokohama, Japan. Sep 10-14, 2010.
  27. 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 徳島 2010.
  28. 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 徳島 2010.
  29. 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, 徳島 2010.
  30. 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, 山形. 2010.

31. 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, 徳島. 2010.

32. 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, 神戸. 2010.

33. 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, 神戸. 2010.

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎と脂質代謝、抗酸化系、酸化ストレス

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨 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。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現 HepG2 細胞において  $\delta$ -9、 $\delta$ -6、 $\delta$ -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、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)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、EPA や AA の投与によって低下が認められた。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た。一方、C 型肝炎患者にみられる鉄過剰状態を、マウスへの腹腔内鉄投与によりシミュレートしたところ、鉄増加時に誘導される抗酸化系酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 と NADH dehydrogenase, quinone (NQO)-1 が HCV コア蛋白存在下では誘導が阻害され、酸化ストレス消去能が低下することが見いだされた。この現象は培養細胞においても確認された。HO-1 制御因子として知られている転写因子 Nrf2 は、この現象に関与していなかった。HCV は酸化ストレス産生を増加させるだけでなく、抗酸化系を阻害し、酸化ストレスをより増悪させることが明らかになった。

本結果によって、C 型肝炎における病態の解明に近づくとともに、この誘導阻害を解除することにより肝硬変進展・発癌を阻止する方法の開発が可能と考えられる。

## 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、その後に肝細胞癌(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。また、コア遺伝子発現トランスジェニックマウスの腹腔内に鉄を投与することによる酸化ストレスの増加、肝臓内鉄含有量変化、H0-1発現変化を検討した。

## 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Hepswx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に細胞を回収し、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。eicosatetraynoic acid、eicosatetraynoic acid(EPA)、arachidonic acid(AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

同一月齢雄のコア遺伝子トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し、経腹腔的に硫酸鉄を体重100g当たり同一量投与3日連続投与し、24時間後に肝臓を摘出し、肝臓内鉄量、血清ALT値、酸化ストレス(TBARS)、H0-1発現量を蛋白レベルで検討した。

また同一月齢雄のコア遺伝子トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスに対し同様に週1回3ヶ月間にわたり鉄を投与し、肝臓内鉄量、血清ALT値、酸化ストレス(TBARS)、H0-1発現量を蛋白レベルで検討した。

コア蛋白発現HepG2細胞、コントロールHepG2細胞培養液中に鉄を添加し、同様の検討を行った。

倫理面の配慮：薬剤の投与はマウス苦痛を与えぬよう細針でおこない、苦痛を与えぬよう配慮して処理を行った。

## 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、 $\delta$ -9、 $\delta$ -6、 $\delta$ -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、 $\delta$ -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)  $\delta$ -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  $\delta$ -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)、 $\delta$ -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。

(9) 3 日間の鉄連続投与によって、肝内の H0-1 発現はコア遺伝子トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスにおいて差異を認めなかった。一方、3 ヶ月投与群においては、コア遺伝子トランスジェニックマウスでの肝内鉄含有量増加は認められたが、H0-1 発現の鉄による誘導はコントロールマウスに比して有意に軽度であった。NADH dehydrogenase, quinone 1 の鉄による誘導がコア蛋白によって阻害されていた。一方、カタラーゼ、グルタチオン合成酵素などその他の抗酸化系の鉄長期投与による誘導は、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおいて抑制を受けていなかった。

(10) コア蛋白発現培養細胞においても同様に、H0-1 発現の鉄による誘導はコントロールに比して有意に抑制されていた。

(11) H0-1 遺伝子発現制御因子として知られている Nrf2 の発現、鉄投与による核内への移行には変化を認めなかった。コア蛋白発現培養細胞による検討から、と core 蛋白の相互作用は認められなかった。その他、H0-1 遺伝子発現の制御因子として最近示されて来ている AP-1、NF- $\kappa$ B、Bach1 の発現はコア遺伝子トランスジェニックマウス肝とコントロールマウスの間で差を認めなかった。

#### 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 $\beta$ 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)、 $\delta$ -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。

HO-1によって分解されたヘムの反応産物

である一酸化炭素、ビリルビンは、抗酸化作用を有する。したがって、酸化ストレスによって誘導されたHO-1は酸化促進剤である遊離ヘムを除去し、かつ一酸化炭素、ビリルビンを介して細胞保護的に機能する。

一方、HO-1の発現抑制やHO活性の阻害は酸化ストレスによる組織障害を悪化させる。HCVコア蛋白による、鉄によるHO-1発現誘導の抑制メカニズムの解明が重要である。肝臓特異的なHO-1発現を亢進させることにより、肝細胞保護作用がもたらされ、肝細胞の保護・回復がもたらされる可能性が高い。また、最近、HO-1はHCV複製を抑制することが示されてきており、C型肝炎治療の面からも意義は大きいと考えられる。

## 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。HCVコア蛋白は、肝臓における鉄蓄積による酸化ストレス発生時のHO-1誘導を阻害する。抗酸化系HO-1の活性誘導阻害がC型肝炎酸化ストレス異常亢進病態の一因である可能性が示唆された。HO-1誘導薬剤の開発がC型肝炎治療の新しい候補として期待される。

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。