

201030020A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

## 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成23（2011）年 3月

<正誤表>

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業  
「肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究  
(研究代表者 堀田 博)」

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

- ・表紙；<誤>平成 23 年 3 月、<正>平成 23 年 7 月
- ・ページ 1；<誤>平成 23 年 3 月、<正>平成 23 年 7 月
- ・背表紙；<誤>平成 23 年 3 月、<正>平成 23 年 7 月

以上

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

## 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成23（2011）年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究 -----	1
堀田 博	
II. 分担研究報告	
C型肝炎・肝がん臨床例の解析及びHCV多様性との相関の検討 -----	13
河田純男	
HCV感染による炎症反応がもたらす宿主のゲノム異常の解明 -----	18
丸澤宏之	
プロテオミクスを用いた肝癌における細胞死抵抗性の検討 -----	23
佐々木裕	
肝発がんにおけるHCVコア蛋白質の下流因子探索 -----	27
森石恆司	
HCV蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響の解明 -----	30
有海康雄	
HCV変異が培養細胞内での増殖と薬剤耐性に与える影響 -----	35
加藤孝宣	
B型肝炎ウイルスによる肝発癌 -----	39
小池和彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	53

## I. 総括研究報告

## 肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究

研究代表者： 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

**研究要旨：** 前年度に引き続き、C型肝炎ウイルス（HCV）及びB型肝炎ウイルス（HBV）による発がん機構の解明を目的として、発がんに関与するウイルス蛋白質の機能及び宿主因子の性状の変動に焦点を当て、トランスジェニック（Tg）マウスモデルによる HCV 発がん機構の検討、HCV 多様性と臨床的意義の検討、HCV 蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響、HCV 及び HBV 感染により変動する宿主因子の網羅的解析とゲノム異常の解析の検討を行い、以下の研究成果を得た。1) HCV NS3 蛋白質を発現する Tg マウスは孤発性の高分化～中等度分化型の肝細胞がんを発生することを明らかにした。2) HCV 感染者の疫学調査により、特有の NS3 蛋白質変異（NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>）及びコア蛋白質変異（Core-Q<sup>70</sup>）はそれぞれ肝がん発症と密接に相関することを明らかにした。3) HCV 感染患者の肝組織では遺伝子編集酵素 AID や APOBEC2 の発現誘導を介して発がん関連遺伝子の塩基配列変異が導入されることを明らかにした。4) ヒト肝がん細胞株及びヒト肝がん組織並びに非がん組織を用いた比較検討により、リン酸化・脱リン酸化により細胞死抵抗性やがん化形質に関与する宿主因子の候補として、細胞骨格や分子シャペロンに分類される複数の候補責任分子を絞り込み、その一つとしてヌクレオフォスミンを同定した。5) HCV 病原性発現に関与する宿主蛋白質の一つとして、HCV コア蛋白質と結合し HCV RNA 複製に及ぼすホスホピルビン酸ヒドラターゼを同定した。また、コア蛋白質と結合する宿主蛋白質 PA28 $\gamma$  に結合する宿主因子として肺がんマーカー蛋白遺伝子産物とポリコム遺伝子産物を同定した。6) HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた DDX6 等の発がん関連因子がウイルス産生の際である脂肪滴周辺にハイジャックされ、そこで HCV コア蛋白質と共局在すること、及び DDX6 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることを見出した。7) 発がんへの関与が示唆されている HCV コア蛋白質変異（Core-Q<sup>70</sup> 及び Core-M<sup>91</sup>）は HCV の培養細胞内増殖能やインターフェロン感受性に影響を与えないことを明らかにした。8) HBV の X 遺伝子産物（HBx 蛋白質）が、がん遺伝子産物様蛋白質 pituitary tumor-transforming gene 1（PTTG1）を安定化させ蛋白質発現量を増加させることによって、HBV による肝発がん・悪性化に関与していることを見出した。

### 研究分担者

河田 純男	山形大学医学部	教授	有海 康雄	岡山大学医歯薬学総合研究科	
丸澤 宏之	京都大学医学研究科	講師		助教	
佐々木 裕	熊本大学生命科学研究部	教授	加藤 孝宣	国立感染症研究所	室長
森石 恆司	山梨大学医学部	教授	小池 和彦	東京大学医学部	教授

## A. 研究目的

我が国には現在200万人のC型肝炎ウイルス(HCV)感染者が存在し、適切に治療しなければ多くの者が肝硬変、肝がんへと進展する。現在のインターフェロン(IFN)をベースにした最善の治療法によっても、HCV慢性肝炎患者の約半数近くは治癒できず、肝がん発症のリスクが持続する。また、その発がん機序は未だ不明な点が多い。肝がんは我が国のがん死亡の第4位で、HCVとB型肝炎ウイルス(HBV)合わせて年間3万数千人の肝がん死亡がみられる。その原因の80%を占めるHCV感染(C型肝炎)は、感染者総数と死亡者数の両面から重要な「国民病」である。従って、HCVによる肝発がんの分子機構の解明を通して、HCV感染者からの肝がん発症リスクを的確に予測し、肝がん発症を可及的早期に診断し、発がん阻止・治療法に資する方策を講じることは喫緊の課題である。

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

も報告されている。このように、NS3蛋白質の発がんへの関与が次第に明らかとなりつつある。しかし、NS3蛋白質を発現するTgマウスの発がんについては未だ十分に検証されており、生体レベルでのNS3蛋白質の働きを解析する有用なツールは確立されていない。

また、前述のようにHBVも肝がんの原因ウイルスであり、HBx蛋白質発現Tgマウスが肝がんを発症することが報告されているが、その発がん機序も未だ不明な点が多い。従って、HCV発がんの場合と同様に、HBV感染からの肝がん発症リスクの予測・発がん早期診断・発がん阻止・治療法に資する方策を講じることも強く求められている。

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

## B. 研究方法

### 1. HCV発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3蛋白質発現Tgマウスにおける発がんの解析：HCV genotype 1b (HCV-1b)臨床分離株から得られたNS3遺伝子の全長、あるいはプロテアーゼドメインをコードする遺伝子領域を発現プラスミドpBEPBgIIIに組

み込み、これをトランスジーンとして C57BL/6N 系統マウスを用いて NS3 発現 Tg マウスを作製した。そして、マウス臓器における NS3 mRNA や NS3 蛋白質の発現、及び宿主因子として種々の発がん関連遺伝子産物並びにがん抑制遺伝子産物の mRNA や蛋白質の発現を、定量的 RT-PCR 法及び Western blot 法により解析した。発生病変については、通常の病理組織学的検査及び免疫組織化学検査法を用いて解析した。また、DNA マイクロアレイ解析により、NS3 発現 Tg マウスと対照マウスの肝組織における遺伝子発現量の比較検討を行った。

(2) HCV NS3 蛋白質及びコア蛋白質の多様性と肝がん発症との関連の臨床疫学的解析：10 年以上経過観察が可能であった HCV-1b 感染 C 型慢性肝炎患者で、経過観察中に肝がん発症を認めた症例、及び対照として肝がんを発症しなかった症例の血清を用いた。血清中 HCV のゲノムから NS3 及びコア遺伝子領域を RT-PCR 法にて増幅し、その塩基配列と推定アミノ酸配列を求めた。そして、NS3 蛋白質及びコア蛋白質のアミノ酸変異と肝がん発症の関連の有無について検討した。

(3) HCV 感染による宿主肝組織のゲノム変異の有無に関する解析：ヒト肝組織から抽出した核酸サンプルを対象とし、マルチプレックス・タグ法を用いた次世代シーケンサーの解析基盤を確立した。そして、HCV 感染により肝細胞に惹起されているゲノム異常を明らかにする目的で、肝癌発生前の肝硬変組織から DNA を抽出し、発癌関連遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて同定・解析した。

(4) ヒト肝がん細胞株及びヒト肝がん組織とその非がん部組織を用いた蛋白質リン酸化の解析：肝がん細胞株 (HepG2 及び Huh7) を過酸化水素 (1 mM) にて刺激し、FACS を用い

て細胞死を評価した。対照としてヒト肝細胞株 (Hc) を用いた。プロテオーム解析のために刺激前後で cell lysate を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた 2 次元ダイファレンシャル電気泳動を行った。さらに蛋白質検出を高感度に行うために SYPRO Ruby を、リン酸化を検討するために ProQ Diamond を使用して特殊染色を施行し、刺激前後での蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。引き続き蛋白質スポットを切り出し質量分析器 (MS/MS) にてリン酸化蛋白質を同定した。一方、遺伝子発現解析として刺激前後で RNA を抽出した上で cDNA を作製し、Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array) を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。最終的には情報統合プラットフォームを用いて、蛋白質発現・リン酸化解析と遺伝子発現解析との結果を統合するネットワーク解析を行い、細胞死抵抗性を担う分子群の絞込みを行った。また、肝切除術を施行された HCV 陽性肝がん組織とその非がん部組織 23 症例を対象に、蛋白質発現・リン酸化の解析、及び遺伝子発現解析を行った。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 $\gamma$  に関する解析：Split Ubiquitin 法を用いてコア蛋白質遺伝子を囚蛋白質にして、相互作用する膜蛋白質遺伝子単離を試みた。ライブラリーはヒト肝臓細胞を用いて、Ubiquitin N 末端部分を C 末端あるいは N 末端にもつライブラリーコンストラクトを使用した。また、PA28 $\gamma$  を囚蛋白質として、Clontech Matchmaker 3 システムを用いて、ヒト肝臓ライブラリーをスクリーニングした。単離されてきた蛋白質遺伝子の siRNA は Ambion から購入し、Huh7OK1 細胞に導入し、JFH1 株を感染させて、上清および細胞内のウイルス RNA を Real time PCR によって測定した。PA28 $\gamma$  を用いて単離してきた遺伝子は培養細胞に発現させ、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、PA28 $\gamma$  との結合を免疫沈降法によって解析した。

(6) HCV 感染による P-body 形成への影響及び DDX6 の HCV 感染における役割の解析：ヒト肝がん細胞株 Huh7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV 感染に伴う P-body 因子の局在変化を観察した。細胞を固定後、抗 HCV コア蛋白質抗体及び抗 DDX6 抗体、抗 Lsm1 抗体、抗 Ago2 抗体、抗 Xrn1 抗体、抗 Dcp2 抗体、あるいは抗 PATL1 抗体で処理後、Core は Cy3、P-body 因子は FITC により可視化した。また、short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、DDX6 をノックダウンさせ RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌されるコア蛋白質の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法と ELISA 法で定量した。さらに培養上清中に分泌された HCV の感染性を細胞免疫染色法により解析した。

(7) HCV JFH-1 株、AHC-1b 株のコア蛋白質のアミノ変異が培養細胞中での増殖と IFN 感受性に与える影響の解析：HCV JFH-1 株 (Genotype 2a) 及び新規に開発した AHC-1b 株 (Genotype 1b) のコア蛋白質の 70 位と 91 位はそれぞれ R と L であり、いわゆる wild type であった。そこで IFN 抵抗性や肝発癌性に関与しているといわれる Core-Q<sup>70</sup> 及び Core-M<sup>91</sup> のものそれぞれと、それら両方の変異を持ったものの合計 3 つの変異株を JFH-1 株と AHC-1b 株で作製し、全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、培養細胞での増殖能を評価した。また、HCV NS5A 領域について、JFH-1 株の ISDR を genotype 1b 野生型、AHC-1b 株、J6 株それぞれの ISDR に置換し、培養細胞内での増殖複製への影響を検討した。さらに AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 株野生型に置き換え、その影響も検討した。

## 2. HBV 発がん分子機序の解析

HBV 関連慢性肝疾患患者の肝生検組織を病理学的・分子医学的に解析した。また、HBV-X 蛋白質発現 Tg マウスの肝組織や培養細胞 Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)、AML12 4p、AML12 4pX cells (4pX) も用いて解析した。肝組織は Pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) に対する抗体、HBx 蛋白質に対する抗体等によって免疫染色を行った。ユビキチン化、cell cycle 等の解析も行った。

### (倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正) 及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正) 並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正) に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報 を適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等におけ

る動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

## C. 研究結果

### 1. HCV 発がん分子機序の解析

#### (1) HCV NS3 発現 Tg マウスの解析：

C57BL/6N 系統マウスを用いて、全長 NS3 遺伝子を組込んだ NS3 Tg マウスライン (L189 系統) を樹立した。Real-time RT-PCR 法により、肝組織における NS3 mRNA の発現を確認した。NS3 mRNA 発現量には個体差があるものの、トランスジーンをホモに持つ個体の NS3 mRNA 発現量はヘテロの個体に比べて約 2 倍であることが確認された。また、Western blot 法により、肝組織における NS3 蛋白質の発現を低レベルながら確認した。この L189 系統では、20 月齢以上において約 15% に孤発性の原発性肝がんの発症が認められた。それらは組織学的には高分化～中分化肝細胞がんであった。

また、NS3 発現 Tg マウスと対照マウスの肝組織における遺伝子発現量の DNA マイクロアレイ解析を行い、肝発がんに関連する癌遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の絞り込みを行った。

(2) HCV NS3 蛋白質及びコア蛋白質の多様性と肝がん発症との相関の臨床疫学的解析：NS3 の 56 位が Tyr で 86 位が Gln の HCV 株 (NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>) は、肝がん患者の 76%、非がん患者の 42% に見られ、有意に肝がん患者に多かった ( $P=0.002$ )。また、コア蛋白質の 70 位が Gln の HCV 株 (Core-Q<sup>70</sup>) は、肝がん患者の 51%、非がん患者の 20% に見られ、有意に肝がん患者に多かった ( $P=0.005$ )。さらに、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup> 及び Core-Q<sup>70</sup> の両方あるいはどちらか一方を有する HCV 株は肝がん患者の 86%、非がん患者の 57% に見られ、有意に肝がん患者

に多かった ( $P=0.007$ )。Kaplan-Meier 解析により、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup> 変異株の累積肝癌発症率は、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった ( $P=0.0007$ )。また、Core-Q<sup>70</sup> 変異株の累積肝癌発症率も、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった ( $P=0.03$ )。一方、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup> 変異及び Core-Q<sup>70</sup> 変異のいずれも持たない HCV 株の累積肝癌発症率は、それらの変異を持つ HCV 株に比べて、有意に低率であった。

(3) HCV 感染による宿主肝組織のゲノム変異の有無に関する解析：HCV 感染患者の肝硬変組織を対象とし、肝がん発生例、肝がん未発生例、それぞれの症例の末梢血リンパ球をコントロールとしてゲノム解析を行った。それぞれの組織より核酸を抽出し、発がん関連遺伝子 (TP53、C-Myc、 $\beta$  カタニンなど) の塩基配列を high-fidelity PCR にて増幅した後、マルチプレックス・タグ法を用いた次世代シーケンサー解析を行った。

HCV 感染を伴った肝硬変組織では、発がん症例のみならず、非がん症例でも発がんに関連した遺伝子配列上に変異が高頻度に潜在していることが明らかとなった。すなわち、HCV 感染を伴った肝硬変組織では、同一症例の末梢血リンパ球に比べ有意に遺伝子変異が存在していることが確認された。また、肝がん発生例の肝硬変組織では非がん症例の肝硬変組織に比べて、発がん関連遺伝子により多くの変異を認める傾向があることもわかった。肝硬変組織に潜在していた遺伝子変異の多くは、これまでにヒト肝がん組織で報告されている部位と共通の変化であり、発がんに関連した遺伝子変異である可能性が強く示唆された。

(4) ヒト肝がん細胞株及びヒト肝がん組織とその非がん部組織を用いた蛋白質リン酸化の解析：HepG2 細胞、Huh7 細胞、Hc 細胞のうち、HepG2 細胞が酸化ストレス刺激に最も

強い抵抗性を示した。蛋白質機能の制御に必要なリン酸化の変化については、刺激後 1 時間でリン酸化スポットは約 30 個認められ、これらスポットに該当する蛋白質の発現量の変化は 40~180%であった。刺激によりリン酸化が有意に変動する蛋白質は細胞骨格や分子シャペロンに関連する蛋白質であった。一方、刺激後 1 時間、3 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた細胞死関連遺伝子数は各々 8 遺伝子、14 遺伝子であった。さらにネットワーク解析から、酸化ストレスによるリン酸化の変化が細胞死関連遺伝子を誘導する可能性が示唆された。

細胞死抵抗性を呈する HepG2 細胞より得られた上述の結果を元に、アポトーシス感受性の異なる肝癌細胞株と比較検討することで、細胞死抵抗性を担う責任分子群の絞込みを行った。その中で今回はヌクレオフォスミン (NPM) に注目した。NPM は核小体に豊富に存在する 37kDa のリン酸化蛋白質で、①細胞周期関連分子 (p21, p53) の抑制を介する細胞増殖の亢進する、②p53 の活性化を抑えアポトーシスを抑制する、③癌細胞には高発現で癌遺伝子としての働きが示唆されている。HepG2 細胞を用いて細胞死刺激下の遺伝子発現の変化を cDNA microarray にて解析し、その結果を用いて NPM を起点としたネットワーク解析を行うと、NPM が細胞死誘導遺伝子の発現を抑制していることが明らかになった。そこで HepG2 細胞に siRNA を導入して NPM の発現を抑制すると、細胞死刺激に対する抵抗性が減弱した。

23 症例 (HBV 陽性 5 例、HCV 陽性 13 例、非 B 非 C 5 例) の肝がん組織・非がん部組織を用いて NPM の発現を検討すると、NPM ならびにリン酸化 NPM (p-NPM) は、がん部において非がん部より発現が有意に亢進していた。また p-NPM は、腫瘍径の大きい例、多結節例、単結節周囲増殖型/多結節癒合型でがん部の発現が高い傾向があった。加えて NPM は、非がん部肝組織の活動性の高い例において有

意に高値であった。さらに p-NPM 高値例は、再発までの期間が有意に短縮されていた。このように NPM、とりわけ p-NPM はヒト肝がん組織の形質と密接な関連が示唆された。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 $\gamma$  に関する解析：コア蛋白質によって単離されてきた宿主蛋白質遺伝子は合計 11 あったが、そのうち三遺伝子のノックダウンを行い、HCV RNA 複製に及ぼす影響を検討した。ホスホピルビン酸ヒドラーターゼ遺伝子の発現をノックダウンした場合、JFH1 のウイルス RNA 量は細胞内および細胞外において有為に減少したが、他遺伝子発現において影響は認められなかった。

また、PA28 $\gamma$  を囚蛋白質としてヒト肝臓ライブラリーから三種類の遺伝子を単離した。肺がんマーカー蛋白質遺伝子とポリコム遺伝子が単離され、ともに細胞内の局在が PA28 $\gamma$  と核で一致し、免疫沈降による蛋白質間結合が確認された。siRNA による遺伝子ノックダウンによるウイルス増殖に変化は認められなかった。ヒストンのユビキチン化を解析したところ、PA28 $\gamma$  発現によってユビキチン化ヒストンが減少し、PA28 $\gamma$  ノックダウンによってユビキチン化ヒストンの量は増加した。また、コア蛋白質の発現によって、ユビキチン化ヒストン量は減少したことから、標的遺伝子発現プロモーターの調節に関与している可能性が考えられた。

(6) HCV 感染による P-body 形成への影響及び DDX6 の HCV 感染における役割の解析：HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 がウイルス産生の際である脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV Core と共局在した。

DDX6 をノックダウンした RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させると、コントロール細胞に比べて、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌されるコア蛋白質

の発現量が顕著に抑制された。これに相関して、DDX6ノックダウン細胞の培養上清に産生されたHCVの感染性も対照細胞由来のものに比べて、顕著に減少した。さらに全長HCV-O株複製細胞のDDX6をノックダウンしても、細胞内のHCV RNAレベルとコア蛋白質の発現量が対照細胞に比べて、顕著に減少した。

(7) HCV JFH-1株、AHC-1b株のコア蛋白質のアミノ変異が培養細胞中での増殖とIFN感受性に与える影響の解析：コア蛋白質の特定領域のアミノ酸変異 (Core-Q<sup>70</sup> 及び Core-M<sup>91</sup>) が、IFNリバビリン併用療法に対する抵抗性と高い相関を示し、また肝発がんにも関与していることが報告されている。そこで、両変異のウイルス増殖に与える影響を明らかにするため、HCV JFH-1株にこれらの変異を導入し、増殖に与える影響について検討した。その結果、コア蛋白質のこれらの変異はHCV JFH-1株の増殖及び培養上清中へのウイルス放出並びにIFN感受性にほとんど影響を与えないことが示された。

## 2. HBV 発がん分子機序の解析

HBV関連肝がん組織においては、PTTG1染色性が増強していた。HBV慢性肝炎では染色性は弱く、肝硬変、肝がんへと進展するにつれて増強した。二重染色では、PTTG1とHBxの分布は一致していた。

HBx蛋白質発現Tgマウスの肝組織においても、PTTG1蛋白質量は前がん病変、肝がんへと進展するにつれて増加した。二重染色では、PTTG1とHBxの分布は一致していた。

培養細胞 Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)を用いた検討で、HBxがPTTG1の発現を増強することが確認された。HBxによるPTTG1タンパクの増加は、posttranscriptionalに起こっていた。PTTG1はリン酸化後にユビキチン化され、プロテアゾームで分解される。HBxはリン酸化されたPTTG1のユビキチン化

を阻害していた。リン酸化PTTG1は、PP2A阻害後(okadaic acid)に、HBx発現下でのみMG132(プロテアソーム阻害薬)不在下で検出された。すなわち、HBxはリン酸化PTTG1の分解を阻害する。また、PTTG1とHBxは共局在していた。HBx発現細胞をMG132で処理してもユビキチン化PTTG1は増加しなかった。対照タンパクであるOccludinのユビキチン化はHBxの影響を受けなかった。

## D. 考察

### 1. HCV 発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3発現Tgマウスの解析：HCVコア蛋白質発現Tgマウスの研究から、コア蛋白質が脂肪肝、肝がんの発生に深く関与していることが知られている。一方、NS3蛋白質は主に培養細胞レベルでの研究、あるいは臨床疫学的研究から発がんへの関与が考えられているが、動物実験による*in vivo*での解析は十分とは言えない。本研究において、新たにNS3 Tgマウスを作出し、有意に高率に肝がんを発症することを明らかにした。

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

(2) HCV NS3蛋白質の多様性及びコア蛋白質の多様性と肝がん発症との相関の臨床疫学的解析：NS3蛋白質の特定のアミノ酸変異(NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>)は、非がん患者に比べて、肝がん患者に有意に多く見られた。また、コア蛋白質の特定の変異(Core-Q<sup>70</sup>)も肝がん患者に有意に多く見られた。さらに、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>及びCore-Q<sup>70</sup>の両方あるいはどちらか一方を有するHCV株は肝がん患者の約90%、非がん患者の約半数に見られ、有意に肝がん患者に多かった。Kaplan-Meier解析により、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>

変異株の累積肝癌発症率は、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった。また、Core-Q<sup>70</sup>変異株の累積肝癌発症率も、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった。一方、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>変異及びCore-Q<sup>70</sup>変異のいずれも持たないHCV株の累積肝癌発症率は、それらの変異を持つHCV株に比べて、有意に低率であった。以上の成績より、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup>変異株及びCore-Q<sup>70</sup>変異株は高発がん性HCV株であると考えられ、肝がん発症リスクの予測診断の指標として有用である可能性が示唆された。

(3) HCV感染による宿主肝組織のゲノム変異の有無に関する解析：遺伝子編集酵素ファミリー分子であるAIDやAPOBEC2が、HCV感染を契機とする慢性肝炎から肝がんに至る過程において、肝細胞に発現誘導されていることがわかった。事実、HCV感染を伴ったヒト肝硬変組織では、がん部のみならず非がん部においても高頻度に発がんに関連した遺伝子に変異が潜在していることが、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析から明らかとなった。以上の結果から、HCV感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、遺伝子編集酵素の発現が肝細胞に誘導され、宿主肝細胞のさまざまな遺伝子配列にゲノム異常が惹起されることが、ヒト肝がんの発生に深く関与している可能性が示唆された。

(4) ヒト肝がん細胞株及びヒト肝がん組織とその非がん部組織を用いた蛋白質リン酸化の解析：ヒト肝がん細胞株を用いた *in vitro* での検討で、蛋白質発現・翻訳後修飾の解析、遺伝子発現解析とネットワーク解析を組み合わせることで、肝がん細胞に備わる「細胞死抵抗性」を担う候補責任分子群の絞りこみが可能になった。その中でも今回、肝がん細胞の細胞死抵抗性におけるNPMの役割を検討した。従来の報告では、NPMは細胞増殖や細

胞死抑制に働くと考えられているが、肝がん細胞株における検討でも、siRNAにより発現を低下させると細胞死刺激に対する感受性が亢進し、細胞死が増強した。一方、ヒト肝がん組織における検討からは、がん部組織でのp-NPMの発現増強と再発への関与が明らかになった。以上の結果を合わせると、NPMは肝がん細胞においても、細胞死抵抗性や増殖能に関与することが示唆された。

(5) HCVコア蛋白質とPA28γに関する解析：コア蛋白質を用いて、単離されてきた遺伝子のうちホスホピルビン酸ヒドラーターゼがウイルス複製あるいはそれ以外の過程で機能している事が考えられる。ホスホピルビン酸ヒドラーターゼは解糖系の酵素で、2-ホスホグリセリン酸がホスホエノールピルビン酸に変換する。宿主解糖系がウイルス増殖に関与する可能性が示されたが、より詳細な機能解析が今後必要になってくる。

また、PA28γによって単離されてきた宿主遺伝子産物は、細胞内での局在の一致が確認され、免疫沈降法によって両者の結合が認められた。しかしながら、それら遺伝子発現をノックダウンしても何らウイルス増殖に影響を与えなかった。コア蛋白質の発現によってユビキチン化ヒストン量が低下したことから、ある種の遺伝子発現制御に関与した機能であることが示唆された。

(6) HCV感染によるP-body形成への影響及びDDX6のHCV感染における役割の解析：P-bodyは宿主mRNAの分解、翻訳制御、そして貯蔵の場でもあり、RNAウイルスの標的としても知られている。本研究により、HCV感染の結果、P-body因子であるDDX6、Lsm1、Xrn1、PATL1そしてAgo2のP-body形成が阻害され、脂肪滴周辺にリクルートされ、リングを形成してHCVコア蛋白質と共局在することがわかった。

さらに DDX6 をノックダウンすると HCV RNA 複製や感染性が顕著に抑制されることを見出した。この結果、DDX6 が HCV 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。最近、肝特異的な microRNA miR-122 が HCV RNA 5'UTR に結合し、HCV の翻訳及び RNA 合成を促進することが報告されたので、DDX6 の miR-122 による HCV 複製促進にも関与していることが考えられる。一般に DDX6 は宿主 mRNA や HIV-1 mRNA に対しては抑制的に作用するが、何故 HCV 複製に対しては促進的に作用するのかその相反する分子機序については、今後の検討課題である。

(7) HCV JFH-1 株、AHC-1b 株のコア蛋白質のアミノ変異が培養細胞中での増殖と IFN 感受性に与える影響の解析：培養細胞中での複製増殖が可能な 2 種類の HCV 株 (JFH-1 株； Genotype 2a、AHC-1b 株； Genotype 1b) を用い、コア領域と NS5a 領域 ISDR の変異が培養細胞内ウイルス複製と IFN 感受性に与える影響について評価した。その結果、コア領域の変異はこのウイルスの複製増殖にほとんど影響を与えず、IFN に対する感受性も変異による差を認めなかった。

## 2. HBV 発がん分子機序の解析

3 つの独立したグループによる Tg マウスを使った研究で、HBx 蛋白質の肝発がん作用が示されている。HBx 蛋白質は細胞増殖/死を調節することで、肝臓におけるがん化に関与していると推測される。今回の研究結果より、HBx 蛋白質は、がん遺伝子産物 PTTG1 のユビキチン化を阻害し PTTG1 量を増加させ、肝腫瘍の悪性化、転移性の獲得等に関与していると考えられる。この結果は、HBx 蛋白質による肝発がんにおける下流シグナルの一つの可能性を示すものであり、今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

## E. 結論

(1) HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスを樹立した。この NS3 Tg マウスは約 15% の個体に孤発性の高分化～中分化型肝細胞がん発生した。この NS3 Tg マウスは、肝発がん分子機序の解明に有用である。

(2) HCV-1b 感染において、NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup> 変異及び Core-Q<sup>70</sup> 変異は、いずれも肝がん発症と有意の相関を示した。NS3-Y<sup>56</sup>/Q<sup>86</sup> 及び Core-Q<sup>70</sup> を併せ持つウイルス株は最も早期から肝がんを発症する傾向が見られた。このような高発がん性 HCV 株に対してより積極的なウイルス排除の治療を行い、肝がん発症を予防する必要がある。

(3) HCV 感染とその結果生じた炎症反応により、遺伝子編集酵素が肝細胞に発現誘導されることが明らかとなった。この遺伝子編集酵素のもつ genotoxic な変異活性により、肝細胞の発がん関連遺伝子にゲノム異常が生成されることが、肝がんの発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(4) ヒト肝がん細胞株やヒト肝がん組織を対象に、肝がんの治療抵抗性の分子基盤の一つである細胞死抵抗性を、翻訳後修飾による蛋白質機能の観点から解析した。その結果、細胞死抵抗性を担う候補責任分子群が絞りこまれ、そのうちの一つとして NPM を同定した。

(5) HCV コア蛋白質との結合因子として、ホスホピルビン酸ヒドラターゼが単離され、宿主解糖系とウイルス増殖との関連性が示唆された。今後、コア蛋白質との相互作用など、その機能解析が必要と考えられる。また、PA28γ と結合する蛋白質は結合および細胞内局在が確認されたが、その機能は不明である。次年度以降、活性酸素産生など発がんメカニズムとの関連性を解析する必要がある。

(6) HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 がウイルス産生の際である脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV Core と共局在することを明らかにした。また、DDX6 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。

(7) HCV コア蛋白質の変異 (Core-Q<sup>70</sup> 及び Core-M<sup>91</sup>) は HCV の増殖や IFN 感受性に影響を与えないことが示された。

(8) HBV による肝発がん機序として HBx 蛋白質の役割が重要であるが、HBx から細胞増殖、肝発がんへ至る経路の一つとして、PTTG1 分解の阻害による蓄積という経路が今回示されたと考えられる。今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (研究代表者分)

##### 論文発表

1. El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol*, (in press), 2011
2. 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
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, Hotta H, Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. *Intern Med*, 49(12): 1119-1122. 2010.
7. 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
8. 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

#### 国際学会発表

1. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y-H, 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 14-18, 2010, Vienna, Austria.
  2. 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 NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  3. 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, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  4. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y-H, 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, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  5. 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, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  6. Hotta H. An overview of hepatitis C virus infection and clinical significance of viral sequence variations. International Seminar on Viral Diseases: Control and Prevention, September 28-29, 2010, Jakarta, Indonesia.
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況 (研究代表者分)
1. 堀田博. 特許第4565180号 p53 癌抑制蛋白との結合に関するC型肝炎ウイルス非構造蛋白NS3のアミノ酸残基の同定と、医薬開発への利用 平成22年8月13日
  2. 堀田博. 特願 2010-206800 C型肝炎ウイルス株の評価方法及びその利用

## II. 分担研究報告

### C型肝炎・肝がん臨床例の解析及びHCV多様性との相関の検討

研究分担者	河田純男	山形大学医学部消化器内科	教授
研究協力者	齋藤貴史	山形大学医学部消化器内科	准教授
研究協力者	西瀬雄子	山形大学医学部消化器内科	助教

**研究要旨：**私達は、HCV-1b型のNS3領域蛋白N末端120残基の二次構造に基づきHCV NS3グループ分類を行い、後ろ向き患者コホート研究にて、NS3グループと肝細胞がん(HCC)の発がんリスクとの関連性について報告した(J Infect Dis 2007;196:1006-9)。本研究の目的は、このNS3グループ分類とC型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン(PegIFN・RBV)併用療法の治療効果およびHCC発がんリスクとの関連性を、前向き患者コホート研究にて検討することである。対象は、HCV-1b型感染で高ウイルス量(100 KIU/ml以上)のC型慢性肝炎140例である。HCV NS3グループ分類は既報に従い、Robson法によりグループA, B, Cに分類した。これら3グループに分類可能であった129例を解析対象とした。

(1) NS3グループ分類とPegIFN・RBV併用療法の治療効果の関連性、(2) NS3グループ分類と肝発がんの関連性について検討した。発がん検討症例の観察期間は、PegIFN・RBV開始から肝がん発生時(発がん症例)／最終受診日(非発がん症例)、とした。平均観察期間は4.8±1.4年である。

HCV NS3蛋白質の二次構造分類は、グループAが43例(31%)、グループBが71例(51%)、グループCが15例(10%)、いずれにも属さない型が11例(8%)であった。グループA, B, Cの3群の患者間に、年齢、性、HCV RNA(アンプリア法)、ALT、に有意差は見られなかった。NS3グループ分類とPegIFN・RBV併用療法の治療成績の検討では、sustained virological response (SVR)となった症例は、グループA/Cに多く(52%)、グループBに少なかった(32%) (P<0.05)。本コホートにおけるHCC発がんは、グループAで1例(2.3%)、グループB/Cで7例(8.4%)であった(P=0.26)。発がんまでの観察期間は、グループAで5.2±1.0年、グループB/Cで4.6±1.6年、であり、グループA感染の症例では、発がんまでの期間が有意に長かった(P<0.05)。発がん症例8例のうち、7例はnon-SVR症例からの発がんであった。本研究により、HCV NS3領域アミノ末端120残基の蛋白質二次構造の多型性が、C型慢性肝炎におけるPegIFN・RBV併用療法の治療効果に関連し、また、発がんリスクにも影響を与える可能性が示唆された。

## A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) 遺伝子上には抗HCV療法に感受性を有する領域があり、C型肝炎に対するペグインターフェロン・リビリン (PegIFN・RBV) 併用療法の治療効果を、ウイルス学的差異から予測する試みがなされている。また、HCV NS3 蛋白は、感染宿主側の免疫と係わる種々の蛋白との相互作用により、C型肝炎の自然経過に影響を与えることが知られている。私たちは、後ろ向き研究により、NS3 アミノ末端 120 残基の蛋白質二次構造に基づいたHCVグループ分類が、C型肝炎患者の発がんリスクと関連性を有することを報告した (Nishise Y, Kawata S, et al. J Infect Dis 2007;196:1006-9)。本研究の目的は、(1) HCV NS3 蛋白質二次構造の差異とC型肝炎の PegIFN・RBV 併用療法の治療効果についての関連性を検討すること、(2) 本患者コホートをを用いて HCV NS3 蛋白質二次構造の差異と発がんリスクについての関連性を前向きに検討することである。

## B. 研究方法

対象は、HCV-1b 型感染で高ウイルス量 (100 KIU/ml 以上) の C 型肝炎 140 例である。HCV NS3 蛋白質二次構造は、患者血清より直接シーケンス法により得られた HCV NS3 領域の推定アミノ酸配列に基づき、コンピューターソフト GENETYX Ver.10.1 を用いて、Robson 法により決定した。HCV NS3 領域は 631 アミノ酸 (aa1027-1657) よりなるが、N 末端側アミノ酸 120 残基 (aa1027-1146) の蛋白質二次構造を推定することで、HCV NS3 蛋白質二次構造多型性をグループ A、グループ B およびグループ C に分類可能である (Ogata S, Hotta H, et al. J Clin Microbiol 2003; 41: 2835-41)。HCV NS3 蛋白質二次構造の差異が、PegIFN・RBV 併用療法の治療効果に及ぼす影響および本患者コホートにおける発がんリスクとの関連性について、臨床症例の前向き検討

を行った。

## C. 研究結果

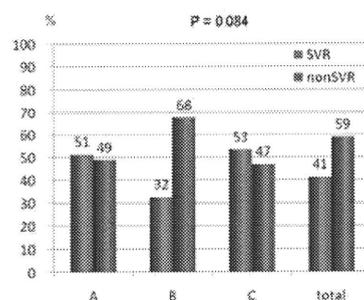
### 1. HCV NS3 蛋白質の二次構造分類

HCV NS3 蛋白質の二次構造分類は、グループ A が 43 例 (31%)、グループ B が 71 例 (51%)、グループ C が 15 例 (10%)、いずれにも属さないが 11 例 (8%)、であった。グループ A、グループ B、グループ C の 3 群の対象者間に、年齢、性、HCV RNA (アンプリコ法)、ALT、に有意差は見られなかった。

2. HCV NS3 蛋白質の二次構造分類と PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の関連性  
本患者コホートにおける ITT 解析による全体の sustained virological response (SVR) 率は 41%、non-SVR 率は 59% であった。このグループ分類と PegIFN・RBV 併用療法の ITT 解析による治療成績を示す (図 1)。グループ A では、SVR 51%、non-SVR 49%、グループ B では、SVR 32%、non-SVR 68%、グループ C では、SVR 53%、non-SVR 47%、であった

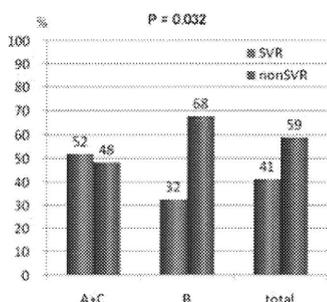
( $p=0.08$ )。グループ B とグループ A/C に分類して検討を行った (図 2)。グループ A/C における SVR 52%、non-SVR 48% に対し、グループ B では SVR 32%、non-SVR 68%、であり、両グループ間での治療効果には有意差が認められた ( $P<0.05$ )。以上から、グループ B は、グループ A/C に比し、non-SVR と関連性を有することが示唆された。

図 1. グループ別SVR率 (ITT解析)



に比し、発がんリスクが低い可能性が示唆された。

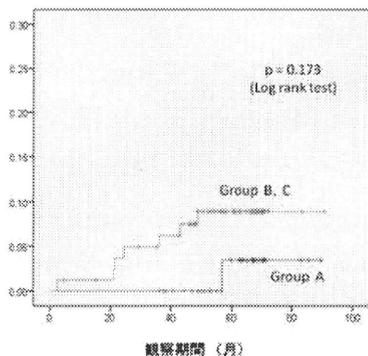
図2. グループ別SVR率(ITT解析)



### 3. HCV NS3 蛋白質の二次構造分類と肝発がんの関連性

PegIFN・RBV併用療法を行った本コホートの平均観察期間は4.8±1.4年であった。PegIFN・RBV併用療法症例における前向きHCC累積発生率は、12ヵ月時点で0.01人、36ヵ月時点で0.04人、60ヵ月時点で0.07人であった。発がん者のNS3グループ分類は、グループAが1例、グループBが5例、グループCが2例であった。HCC発生率を、グループAとグループB/Cに分類して検討した。

図3. NS3グループ別、HCC累積発生率



NS3グループ別のHCC累積発生率を図3に示した。HCC発生率は、グループAが2.3%、グループB/Cが8.4% (p=0.26)、発がんまでの観察期間はグループAが5.2±1.0年、グループB/Cが4.6±1.6年であった (P<0.05) (表1)。発がん症例8例中7例はnon-SVRからの発がんであった。今後、更なる長期間の観察が必要であるが、グループAは、グループB/C

表1. NS3グループ別HCC発生

	グループ		P値
	A	Non-A (B+C)	
	N = 43	N = 83	
HCC (%)	1 (2.3)	7 (8.4)	0.263
観察期間(年)	5.2 ± 1.0年	4.6 ± 1.6年	0.049

### D. 考察

高変異ウイルスであるHCVのアミノ酸変化は、宿主側の蛋白質との相互作用に影響し、生体反応の様々な変化から、肝炎の経過や抗ウイルス治療の効果に影響することが推測される。私たちは、HCV NS3蛋白質の二次構造の多様性に着目し、本多型性とPegIFN・RBV併用療法の治療効果ならびに発がんとの関連性について前向きに臨床例の検討を行った。その結果、グループBとグループA/Cでは、PegIFN・RBV併用療法の治療効果に差異があること、グループAとグループB/Cでは発がんリスクが異なる可能性があることを示した。

HCV NS3領域はウイルス株間で変異に富み、宿主蛋白質との重要な相互作用が報告されている。第一に、NS3蛋白質に存在するserine proteaseが感染細胞内でCardif分子を切断不活化することで、interferon regulatory factor-3 (IRF-3)のリン酸化と二量体形成を阻み、核移行経路を抑えることで、細胞内IFNシグナル伝達を阻害することである。IRF-3二量体は、核内へ移行しIFN-stimulated response element (IRSE)に結合してIFNにより誘導される種々の宿主側の抗ウイルス蛋白などの誘導に関わるので、IRF-3の不活化はIFNによる抗ウイルス治療の効果にも影響することが予想される。第二に、HCV NS3蛋白質は、宿主p53