

蛋白と結合し p53 依存性アポトーシスや p 21 転写活性を抑制することが知られており、また、*in vitro*において培養細胞に cell transformation を惹起し、*in vivo*において移植細胞は悪性腫瘍性増殖を示すことが報告されている。したがって、HCV NS3 蛋白は、HCV による発がん機序の一端に関与している可能性がある。今回の臨床研究で得られた結果は、HCV NS3 蛋白質の構造上の差異が、細胞内で宿主側蛋白との interaction に差異を生じせしめていることを類推させるデータであり、その分子メカニズムの解明を今後は推し進めていく必要がある。

E. 結 論

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影響を及ぼし、発がんリスクと関連性を有する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) 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 2010; 82: 1364-1370
- 2) Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S: Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata Study - A cross-sectional study of a healthy

Japanese population. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 3828-3835

- 3) Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. Hepatol Res 2010; 40: 432-437
 - 4) Nishise S, Takeda Y, Fujishima S, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise Y, Takeda H, Kawata S: Release of interleukin 1 receptor antagonist by combining a leukocyte adsorption carrier with ulinastatin. Ther Apher Dial 2010; 14: 386-391
 - 5) 伊藤純一、鈴木明彦、宇賀神智、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、三條麻衣、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、齋藤孝治、齋藤貴史、河田純男：高齢者に発症した肝動脈化学塞栓療法(TACE)後のガス産生肝膿瘍の1例。日本高齢消化器病学会誌 2010; 12: 83-87
- ### 2.学会発表
- 1) Ishii R, Saito T, Watanabe H, Shao L, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Togashi H, Kawata S: Induction of Prolactin in Hepatitis C Virus Infection and expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by cell-cultured hepatitis C virus. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Japan: September 2010
 - 2) Ishii R, Saito T, Watanabe H, Ugajin S, Sato T, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Togashi H, Kawata S: Occurrence of hepatocellular carcinoma after achieving sustained

virological response to interferon therapy for chronic hepatitis C .Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Beijing, China: March 2010

- 3) Nishise Y, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Relationship between an Increased Bright Echo Pattern of the Liver on Ultrasonography and Metabolic Syndrome in a Japanese Population. The 20th Conference of the Asian Pacific

Association for the Study of the Liver, Beijing, China: March 2010

- 4) 石井里佳、齋藤貴史、河田純男、他：HCV NS3 アミノ末端領域蛋白質二次構造の多型性と治療効果予測。第190回日本消化器病学会東北支部例会シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)なし。

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

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染とそれに起因する炎症反応により、遺伝子編集酵素 AID や APOBEC2 がヒト肝細胞に誘導される。その結果これらの酵素の有する遺伝子変異導入活性をして肝細胞のさまざまな遺伝子のゲノム配列に塩基変化が発生することが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析からは、HCV 感染を伴ったヒト肝炎・肝硬変組織中には発癌に関連した遺伝子への変異が高頻度に潜在することが確認された。慢性炎症を伴った肝細胞に蓄積したゲノム異常が、HCV 感染からの肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

A. 研究目的

近年、遺伝子に変異を導入する分子として、さまざまな遺伝子編集酵素が同定されている。これらの遺伝子編集酵素の大部分は、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC)ファミリー群に属しており、その生理的作用としては様々な遺伝子を標的とした遺伝子変異の誘導機能をもつことが知られている。これらの遺伝子編集酵素は、さまざまな遺伝情報をコードしている DNA もしくは RNA の配列を変えることにより、生体の恒常性を保つことに貢献している特異な作用をもつ分子群であると考えられている。ヒト APOBEC family 分子はこれまで約 11 種類が同定されている。APOBEC family の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、いくつかの分子についてはその具体的な機能が明らかにされつつある。APOBEC1 は脂質代謝に深く関与しており、ApoB100 遺伝子の RNA の特定の部位に変異を導入する作用を発揮することで、脂質の運搬に異なる役割を果たす 2 種類の遺伝子産物を作り出すことに

寄与している。APOBEC3G や APOBEC3F は、リンパ球に感染したヒト免疫不全ウイルス(HIV)の遺伝子配列に変異を導入することにより、宿主の免疫応答に際して抗ウイルス分子として機能していることが知られている。これらの APOBEC ファミリー群の中で、唯一宿主 DNA を標的とする活性をもつ分子が Activation induced cytidine deaminase (AID)である。AID は生理的条件下では活性化された B 細胞にのみ発現し、免疫グロブリン遺伝子の可変領域に高頻度に体細胞遺伝子変異(somatic mutation)を導入する機能をもつ。AID はその cytidine deaminase 活性により、免疫グロブリン遺伝子の DNA 塩基配列上の C (シトシン) を U (ウラシル) を介して T (チミン) に変化 (=塩基置換)する反応を誘導することができる。AID は免疫グロブリン遺伝子の DNA の「塩基配列を変える = 遺伝子変異を入れる」ことにより、多種多様な抗体分子を作り出し、我々の体を無数の外敵から守ってくれている、生体の感染防御においてはなくてはならない分子

である。しかし、逆にもし AID が他の細胞に恒常的に発現するようなことになれば、その細胞に遺伝子変異がどんどん蓄積し、細胞が癌化してしまうことは容易に想像できる。このため、AID の遺伝子変異導入機能は、活性化された B 細胞内の免疫グロブリン遺伝子においてのみ発揮されるものであると考えられていた。しかしながら、近年、ヒトの悪性リンパ腫やリンパ系白血病における AID の異常発現が相次いで報告されるようになった。リンパ球系の腫瘍細胞に AID が異常発現し、発癌に関連した遺伝子に変異を導入することが示唆されたため、AID がその遺伝子変異活性を介してヒトリンパ系悪性腫瘍の発生から進展に深く関与しているものと想定されるようになった。さらに、AID を全身に恒常的に発現するマウス(AID トランスジェニックマウス)には、リンパ系悪性腫瘍が高頻度に発生し、腫瘍細胞には様々な遺伝子変異が蓄積していることが明らかとなり、ヒトの臨床検体の解析から推定されたリンパ系腫瘍の発生機序における AID の役割をさらに裏付けることとなった。一方、非常に興味深いことに、この AID トランスジェニックマウスでは、リンパ腫の発生に加えて、肝癌、肺腺腫などの上皮細胞由来の腫瘍も同時に発生することが明らかとなった。したがって、もし AID が上皮系細胞において恒常的に発現するようなことがあれば、遺伝子への変異が蓄積することにより、上皮系悪性腫瘍＝癌が発生する可能性が示唆されたのである。我々のこれまでの検討結果から、HCV 感染により慢性肝疾患を伴った肝細胞では AID が異所性に過剰発現しており、肝細胞への AID 発現の結果、さまざまな発癌関連遺伝子に体細胞変異が生じてくることが示唆されるようになってきた。また、AID と同様に、HCV 感染を契機とした炎症反応により APOBEC2 が肝細胞に発現誘導

され、宿主細胞の RNA 配列に塩基変化を誘導していることが、APOBEC2 を全身発現するトランスジェニックマウスの解析により明らかとなった。

そこで、これらの遺伝子編集酵素による遺伝子異常の導入活性に着目し、HCV 感染からの肝癌発生過程において惹起される肝細胞への遺伝子変化の全体像をとらえることにより、HCV 感染からの肝発癌の分子機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1)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する。

(2)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・解析する。

(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に十分に配慮した。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に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核酸防止措置などを定める省令」(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、「動物の保護およ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)解析にはゲノムアナライザー II X(イルミナ社)を使用した。サンプルとしては、肝切除術時に採取した肝組織より核酸を抽出し、専用カラムを用いて精製した後に、超音波発生器を用いて核酸を約 100 bps から 500bps の長さに断片化した。断片化した核酸の両側断端を酵素処理により修復した後、その断端に、ゲノムアナライザー II X の解析に必要なアダプター配列タグの付加を行った。引き続き、アダプターを付けたサンプルを電気泳動した後、ゲル切り出しを行うことにより、ゲノムアナライザー解析に適した約 200-300bps の長さの核酸のみを選別・抽出した。次に、抽出されたそれぞれの核酸サンプルに、全 6 塩基配列で構成されている 12 種類のインデックス・タグのいずれかを付加し、サンプルの調整を行った。これらの調整済サンプルを、ゲノムアナライザー II X を用いたペアエンド法により両端 76 塩基を読み取る大規模並列シーケンス解析を実施した。

このマルチプレックス・タグ法を用いた次世代シーケンサー解析により、各レーンにおいて 12 サンプルの解析が実現し、合計で最大 96 サンプルの塩基配列情報を入手することが実施可能であることが確認された。また、コントロールサンプルを用いた基礎的検討からは、各サンプルにおいて、約 1000 万から 3000 万塩基という膨大な量の塩基配列情報を得られることがわかった。

(2) HCV 感染を伴う肝硬変組織を対象とし、肝癌発生例、肝癌未発生例、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、発癌関連遺伝子 (TP53、C-Myc、β カテニンなど) の塩基配列を high-fidelity PCR にて増幅した後、上記のマルチプレックス・タグ法を用いた次世代シーケンサー解析を行った。

その結果、各遺伝子につき 100 万から 200 万におよぶ塩基情報を入手することが実現できた。HCV 感染を伴った肝硬変組織では、HCC 発癌症例のみならず、HCC 非発癌症例でも発癌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、肝癌発生例の肝硬変組織では非発癌症例の肝硬変組織に比べて、発癌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、これまでにヒト肝癌組織で報告されている部位と共通の変化であり、発癌に関連した遺伝子変異である可能性が強く示唆された。

D. 考察

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発癌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、癌部のみならず非癌部においても高頻度に発癌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、ヒト肝癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

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、肝細胞の発癌関連遺伝子にゲノム異常が生成されることが、肝癌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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of APOBEC2 contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer*, 2011 (in press).
- (2) Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J Gastroenterol*, 46: 6-10, 2011.
- (3) Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Niwa Y, Sakai Y, Chiba T.

Upregulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer. *Gastroenterology*, 139(6): 1984-1994, 2010.

- (4) Marusawa H, Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol*, 22(4): 442-447, 2010.

2. 学会発表

- (1) 丸澤宏之. AIDによる発癌関連遺伝子への変異生成と炎症発癌. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪.
- (2) 奥山俊介、丸澤宏之、千葉勉. 遺伝子編集酵素APOBEC2による発癌関連遺伝子へのRNA変異導入を介した肝癌発生の分子機構. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪.
- (3) 高井淳、丸澤宏之、千葉勉. 炎症性大腸発癌プロセスにおけるAIDの役割. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪.
- (4) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 肝癌の発生母地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会合同. 2010/10/13. 横浜.
- (5) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹細胞への遺伝子異常の蓄積による肝癌発生の分子機構. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/14. 横浜.
- (6) Nonaka T, Takai A, Marusawa H, Uemura M, Chiba T, Hiai H, Honjo T, Kinoshita K. Carcinogenesis by activation-induced cytidine deaminase. 14th International Congress of Immunology. 2010/8/22. 神戸.
- (7) Marusawa H, Chiba T. Genetic

aberration in hepatic stem cells leads to hepatocarcinogenesis. The 1st JSGE International Topic Conference “Stem cells in digestive organs”. 2010/9/25. 鎌倉.

(8) Marusawa H. Molecular mechanisms linking inflammation, genetic

alterations, and cancer development. BMB2010. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同. 2010/12/7. 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

プロテオミクスを用いた肝臓における細胞死抵抗性の検討

研究分担者：佐々木裕 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学

研究協力者：荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学

藤元治朗 兵庫医科大学第一外科学

研究要旨：肝臓細胞の生物学的特性の1つである”細胞死抵抗性”に焦点を当て、責任分子群を同定するために、遺伝子・蛋白質発現解析に加え、翻訳後修飾の評価による蛋白質機能解析を行っている。ヒト肝臓細胞株を用いた検討では、細胞骨格や分子シャペロンに分類される蛋白質群が、リン酸化を介して細胞死抵抗性を担う可能性が示された。さらにヒト肝臓組織における検討では、非癌部に比してリン酸化の増強あるいは減弱する蛋白質が同定され、肝臓細胞株との対比検討から、複数の共通した蛋白質が細胞死抵抗性の候補責任分子として絞り込まれた。

A. 研究目的

原発性肝細胞癌(以下、肝臓)に対する治療法の進歩により、肝切除術、TACE (経カテーテル的動脈塞栓術)や動注化学療法などの経血管的治療法、ラジオ波熱凝固治療(RFA)や経皮的エタノール注入療法(PEIT)などの局所療法、放射線療法、さらには肝移植が選択できる時代となった。しかしながらすでに進行した肝臓で見つかる場合も多く、また仮に肝切除やラジオ波凝固法(RFA)などの根治的治療を行っても、同時性異時性多中心性発癌をきたす特性がゆえに年率 15-20%と高再発率が高く、肝臓は依然として予後不良の癌腫の一つである。実際には、本邦における肝臓の年間死亡数は約 3.5 万人にも及び、癌死亡原因の男性では第 3 位、女性では第 4 位を占めている。従って、肝臓に対する治療成績のさらなる向上は、厚生労働行政上も重要な課題の一つである。

本研究では肝臓の「治療抵抗性」の分子機構を担う”細胞死抵抗性”の責任分子群を同定することを目的とする。ここで重要な点は、責任分

子群の同定とその機能の解明には、遺伝子・蛋白質発現に加え、翻訳後修飾の評価を用いた蛋白質機能解析が不可欠であることである。

B. 研究方法

1) ヒト肝臓細胞株を用いた蛋白質リン酸化の解析

肝細胞癌株(HepG2, Huh7)を用い、細胞死を誘導するために酸化ストレス (1mM 過酸化水素) にて刺激し、FACS を用いて細胞死を評価した。コントロールとしてヒト肝細胞株(Hc 細胞)を用いた。プロテオーム解析のために刺激前後で cell lysate を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた 2 次元ディフ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・磷酸化解析と遺伝子発現解析との結果を統合するネットワーク解析を行い、細胞死抵抗性を担う分子群の絞込みを行った。

2) ヒト肝癌組織を用いた蛋白質発現・磷酸化の解析

兵庫医科大学第一外科にて肝切除術を施行された HCV 陽性肝癌組織とその非癌部組織 23 症例を対象に、上述と同様の手法にて蛋白質発現・磷酸化の解析、ならびに遺伝子発現解析を行った。

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

本研究内容については、熊本大学大学院生命科学研究部ならびに兵庫医科大学のそれぞれの倫理委員会より承認を受けている。

C. 研究結果

1) ヒト肝癌細胞株での検討

HepG2 細胞、Huh7 細胞、ならびに Hc 細胞では、酸化ストレス刺激に感受性が異なっており、HepG2 細胞が最も抵抗性を示した。蛋白質機能の制御に必要な磷酸化の変化については、刺激後 1 時間で磷酸化スポットは約 30 個認められ、これらスポットに該当する蛋白質の発現量の変化は 40-180%であった。刺激により磷酸化が有意に変動する蛋白質は、細胞骨格や分子シャペロンに関連する蛋白質であった。一方、刺激後 1 時間、3 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた細胞死関連遺伝子数は各々 8 遺伝子、14 遺伝子であった。さらにネットワーク解析から、酸化ストレスによる磷酸

化の変化が、細胞死関連遺伝子を誘導する可能性が示唆された。

細胞死抵抗性を呈する HepG2 細胞より得られた上述の結果を元に、アポトーシス感受性の異なる肝癌細胞株と比較検討することで、細胞死抵抗性を担う責任分子群の絞込みを行った。その中で今回は nucleophosmin (NPM) に注目した。NPM は核小体に豊富に存在する 37kDa の磷酸化蛋白質で、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、② p53 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、等の報告がある。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。

2) ヒト肝癌組織での検討

23 症例 (内訳は HBV 陽性 5 例、HCV 陽性 13 例、非 B 非 C 5 例) の肝癌組織・非癌部組織を用いて NPM の発現を検討すると、NPM ならびに p-NPM (磷酸化 NPM) は、癌部において非癌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/多結節癒合型で癌部の発現が高い傾向があった。加えて NPM は、非癌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 はヒト肝癌組織の形質と密接な関連が示唆された。

D. 考察

蛋白質機能は遺伝子発現に比べ疾患の表現型をより強く反映しており、またその機能は細胞内局在や翻訳後修飾により厳密に制御され

ている。従って、翻訳後修飾の一つである磷酸化を解析することで蛋白質機能を評価することが可能になり、病態におけるさまざまな分子の役割を的確に把握することに結び付く。一方、肝癌の有する細胞死抵抗性は、「免疫監視機構からの回避」、「抗がん剤に対する薬剤耐性」などに反映されており、その制御は治療成績の向上に直結すると考えられる。

今回、ヒト肝癌細胞株を用いた *in vitro* 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、肝癌細胞に備わる「細胞死抵抗性」を担う候補責任分子群の絞りこみが可能になった。その中でも今回、肝癌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されているが、肝癌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、ヒト肝癌組織における検討からは、癌部組織での 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 は肝癌細胞においても、細胞死抵抗性や増殖能に関与することが示唆された。

今後、強制発現系などを用いてより詳細な解析を加えると共に、Fas、抗がん剤など種々の細胞死刺激による NPM の細胞死抵抗性の責任分子としての役割を確認していく。また NPM の発現、磷酸化を制御する上流の event を解析し、細胞死抵抗性を担う候補分子群の更なる絞り込みを行う。また Laser Microdissection を用いて、NPM がヒト肝癌細胞に特異的に発現しているか否かを検討する。加えて、細胞死刺激下にて磷酸化が変化したその他の蛋白質についても、同様に機能制御を行い、細胞死抵抗性を担うか否かを検討するとともに、それらの分子間での細胞死抵抗性における階層性を解析する。

E. 結論

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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda K, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M and Sasaki Y. Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45(1):60-67, 2010
- 2) Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, Tanaka M, Suzu S, Sasaki Y and Okada S. Chronic hepatitis C viral infection reduced NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 393:331-337, 2010
- 3) Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T, Yamamura K, Sasaki Y, Saya H and Kuninaka S. The anaphase-promoting complex /cyclosome activator cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* 30(16): 3994-4005, 2010
- 4) Sasaki Y. Insulin resistance and hepatocarcinogenesis. *Clin J Gastroenterol*, 3: 271-278, 2010
- 5) Tateyama M, Yatsushashi H, Taura N, Motoyoshi Y, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Nagahama H, Sasaki Y, Miyakawa Y and Ishibashi H. Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma

in patients infected with hepatitis C virus.

J Gastroenterol 46:92-100, 2011

- 6) 福林光太郎、田中基彦、佐々木裕
特集 肝胆膵 薬物治療学の進歩 - この 30
年 低用量 CDDP/5-FU 肝動注化学療法
肝胆膵 61:1125-1130, 2010

2. 学会発表

- 1) 田中 基彦、丸山 徹、佐々木 裕 慢性肝疾
患におけるアルブミンの構造的・機能的変
化と病態への関与についての検討 第 46 回
日本肝臓学会総会 一般演題 2010 年 5 月
28 日、山形
- 2) 田中 基彦、葦原 浩、福林 光太郎、紙屋康
之、工藤 洋子、立山 雅邦、永濱 裕康、佐々
木 裕 当科初回治療例における非 B 非 C 肝
癌の臨床的特徴 ワークショップ 2 「非 B
非 C 肝癌の現況」 第 46 回日本肝癌研究会、
2010 年 7 月 8 日、大阪

- 3) Sasaki Y, Dessouki O, Tanaka M,
Nagahama H, Kamiya Y, Tateyama M,
Suzu S and Okada S. Chronic hepatitis
C viral infection reduces NK cell
frequency and suppresses cytokine
secretion. HCV 2010, Sep 12, 2010,
Yokohama, JAPAN

- 4) 田中 基彦、永濱 裕康、佐々木 裕 蛋白質
翻訳後修飾解析による肝癌の治療抵抗性の
解明 シンポジウム 17「肝がんのメカニズム
と治療戦略」 第 52 回日本消化器病学会大
会、2010 年 10 月 15 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

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

肝発がんにおける HCV コア蛋白質の下流因子探索

研究分担者 森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨： C 型肝炎ウイルス（HCV）による肝発がんの誘導機序の詳細は明らかになっていない。本研究では、C 型肝炎による病原性発現の分子機構を明らかにすることと、早期診断および予防治療法の対象となる内在性標的因子候補の探索とその応用を目的とし、HCV コア蛋白質および関連宿主蛋白質 PA28 γ を用いて、ヒト肝臓細胞ライブラリから標的蛋白質遺伝子の単離を試みた。PA28 γ によって単離された E3 ligase はヒストンのユビキチン化を促進し、PA28 γ の発現によってユビキチン化ヒストンが減少した。また、コア蛋白質の発現によって、そのユビキチン化ヒストン量は減少し、PA28 γ の発現によって更に減少した。それらの結果から、宿主蛋白質発現調節による発がん調節へのコア蛋白質の関与が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）は RNA ゲノムをもつエンベロープウイルスで、フラビウイルスに属する。このウイルスゲノムには 3000 アミノ酸からなる前駆蛋白質がコードされており、そのアミノ末端にウイルスキャプシド蛋白質であるコア蛋白質がコードされている。コア蛋白質はヌクレオキャプシド蛋白質として機能するだけでなく、発がんなどの病原性因子としての機能も報告されている。C 型肝炎では脂肪肝、肝硬変を経て、高率に肝細胞癌に至ることが知られており、コア蛋白質は脂肪化とがん化を誘導する活性があることが多数報告されている。我々はこれまでに、コア蛋白質の一部が核へ移行し、プロテアソームの活性化蛋白質である PA28 γ による経路で分解されことを明らかにし、コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスで観察されるインスリン抵抗性、脂肪肝、そして肝細胞癌の発症に、PA28 γ が深く関与していることを明らかにした。しかしながら、その分子機構は分かっていない。

本研究では、HCV 感染による発がん機構を明らかにすることを目的に、コア蛋白質と PA28 γ をそれぞれプローブにして、酵母 2ハ

イブリットによって、宿主蛋白質遺伝子を単離同定し、作用機構の解明を試みた。

B. 研究方法

Split Ubiquitin 法を用いてコア蛋白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 γ 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 γ 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 γ との結合を免疫沈降法によって解析した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、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

コア蛋白質によって単離されてきた宿主蛋白質遺伝子は合計 11 あったが、そのうち三遺伝子のノックダウンを試みた。Ambion で事前設計された siRNA によって有為に発現レベルが低下したことを Real time PCR によって確認した。遺伝子ノックダウン 24 時間後に、JFH1 を $\text{moi}=0.5$ で感染させて、24 から 120 時間後に細胞および細胞上清を回収し、RNA を抽出し、cDNA を合成し、HCVRNA および GAPDH の mRNA 量を測定した。そのうち、ホスホピルビン酸ヒドラ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 γ を圈蛋白質してヒト肝臓ライブラリから三種類の遺伝子が単離された。肺がんマーカー蛋白遺伝子とポリコム遺伝子が単離され、ともに細胞内の局在が PA28 γ 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 γ 発現によってユビキチン化ヒストンが減少し、PA28 γ 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。ユビキチン化ヒストンの細胞内局在は通常細胞核内に限局して認められ、PA28 γ ノックダウンによって核周囲にも認められた。

D. 考察

コア蛋白質によるヒト肝臓ライブラリースクリーニングでは Signal peptide peptidase 遺伝子が単離された。Signal peptide peptidase は

コア蛋白質を切断する内在性蛋白質分解酵素として、既知の宿主因子であり、ウイルス増殖に必須であることを、我々を含めたグループで確認されている。したがって、この遺伝子がコア蛋白質によって単離されたことはこのシステム自体が生理的な状態をある程度保持していることを示唆している。また、PA28 γ を圈蛋白質としてヒト肝臓ライブラリをスクリーニングしたとき、PA28 γ 遺伝子自身が単離されてきた。PA28 γ はホモ 7 量体を形成することから、この方法が正常に機能している事を示唆している。コア蛋白質を用いて、単離されてきた遺伝子のうちホスホピルビン酸ヒドラ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、PA28 γ 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、次年度同定を試みたい。

E. 結論

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、PA28 γ との結合する蛋白質は結合および細胞内局在が確認されたが、その機能は不明である。次年度以降、活性酸素産生など発がんメカニズムとの関連性を解析する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tripathi, L. P., C. Kataoka, S. Taguwa, K. Moriishi, Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi. 2010. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.* 6:2539-2553.
2. Tanaka, Y., Y. Mori, H. Tani, T. Abe, K. Moriishi, H. Kojima, T. Nagano, T. Okabe, T. Suzuki, M. Tatsumi, and Y. Matsuura. 2010. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.* 54:206-220.
3. Moriishi, K., I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura. 2010. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52:411-420.

2. 学会発表

1. 森石恆司、松浦善治、HCVによる脂質代謝障害の分子機序、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
2. 寒原裕登、田鋏修平、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学術集会、2010年11月7-9日、徳島

3. 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型肝炎ウイルス複製を抑制する第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
4. Kambara H., Taguwa S., Fujia N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
5. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K., Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
6. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. . 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.

H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

HCV 蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響の解明

研究分担者：有海 康雄 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究協力者：黒木 美沙緒 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨：HCV 蛋白質と結合する宿主因子の同定と宿主細胞機能に及ぼす影響について明らかにすることを目的として実験を行い、以下のような成果を得た。(1) HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた発がん関連因子 DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 などの microRNA effector がウイルス産生の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見出した。(2) HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。(3) DDX6 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることを見出した。(4) HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝癌細胞株 Li23 も HuH-7 同様、がん抑制因子 p53 に変異を検出した。

A. 研究目的

現在、我が国の C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染者は約 200 万人いると推定される。我が国における肝がんの約 80% において、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染が認められている。2009 年には約 3 万 3000 人が肝がんにより死亡し、肺がん、胃がん、大腸がんについてがん死亡の第 4 位を占めるに至っている。B 型肝炎とは異なり、HCV 感染者の多くは持続感染が成立し、慢性肝炎となり、肝線維化を伴う肝硬変を経て、さらに肝がんへと進展する。特に肝脂肪化を伴った慢性肝炎患者は肝がんリスクが高いため、肝脂肪化は肝がんの主要な要因の一つである。HCV 感染による長期間に及ぶ持続的な炎症反応と HCV 蛋白質と宿主の発がん関連因子との相互作用により、肝がんが起るものと考えられている。

本研究では、これらの点を解決すること

を目指して、HCV 蛋白質と結合する宿主因子と宿主細胞機能に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。特に HCV 蛋白質による種々の細胞内シグナル伝達経路の攪乱を介した肝発がんの分子機構を明らかにし、HCV の排除、肝発がんの予防及び治療法開発の分子基盤の確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

(1) HCV 感染による P-body 形成への影響

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 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 因子の局在変化を詳細に観察する。細胞を固定後、抗 HCV Core 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 fluorescein isothiocyanate (FITC) により可視化した。

(2) DDX6 の HCV 感染における役割

short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて、DDX6 をノックダウンさせた HuH-7 由来 RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法と ELISA 法で定量した。さらに抗 Core 抗体を用いた細胞免疫染色法により培養上清中に分泌された HCV の感染性を解析した。

(3) ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたがん抑制因子 p53 の解析

RNeasy mini kit を用いて、Li23 由来細胞株より total RNA を単離し、p53 cDNA をクローニング後、塩基配列を決定した。さらに p53 結合配列を有する p21^{waf1} のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターを用いて、内在性 p53 の転写機能の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究には、ヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞、HCV-JFH1 株、及び核酸については高圧蒸気滅菌を施した後に廃棄した。また、HCV 感染実験はバイオハザード P2 レベル実験室にて行い、感染防止対策を行った。

C. 研究結果

(1) HCV 感染による P-body 形成への影響

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 がウイルス産生の場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。一方、HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。経時的な観察の結果、HCV 感染 12 時間後や 24 時間後においては、HCV 感染による P-body 形成の阻害はみられなかったが、HCV 感染 36 時間後より P-body 形成の阻害が始まり、48 時間後では顕著となった。

(2) DDX6 をノックダウンした RSc 細胞に HCV-JFH1 株 (遺伝子型 2a) 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 Core 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 の感染性もコントロール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 (遺伝子型 1b) 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 HCV Core の発現量がコントロール細胞に比べて、顕著に減少した。

(3) HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝癌細胞株 Li23 のがん抑制因子 p53 cDNA をクローニングして、塩基配列を決定した結果、72 番目のアミノ酸はアルギンタイプ (P72R) であり、HuH-7 細胞における p53 と同じ多型性であった。さらに調べた全てのクローンにおいて、A138P あるいは R342P の変異も検出した。一方、Li23 細胞における内在性 p53 の転写機能

をルシフェラーゼアッセイにより解析したが、p21^{waf1}のプロモーター活性はHuH-7細胞と同様、活性化がみられなかった。

D. 考察

(1) P-body と HCV との相互作用

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 Core と共局在した。一方、HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。HCV RNA ゲノムは宿主 mRNA や HIV-1 mRNA と異なり、5'cap 構造を保持しないことと一致する。

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。

(2) ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたがん抑制因子 p53 の解析

これまで HCV 生活環を再現できる培養

細胞系は唯一ヒト肝癌細胞株 HuH-7 のみであった。HuH-7 細胞におけるがん抑制因子 p53 はすでに変異しているため機能しないので、p53 の HCV 生活環における役割や HCV による細胞癌化機構の解明には HuH-7 細胞は適していなかった。一方、ヒト不死化肝細胞は不死化の際に p53 の機能抑制する SV40 T 抗原やパピローマウイルス E6 を強制発現させているため、p53 の機能解析には都合が悪かった。最近、我々は、HCV 生活環の再現可能な新しいヒト肝癌細胞株 Li23 システムを開発したので、この細胞株が p53 の機能解析に有効であるか検討したが、調べた全てのクローンにおいて、p53 遺伝子は変異型で p53 の機能が失活していることがレポーターアッセイより判明した。今後、HCV 生活環を再現可能な p53 が野生型であるヒト肝細胞の探索が課題である。

E. 結論

(1) 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 がウイルス産生の場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。

(2) HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。

(3) 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。

(4) HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝癌細胞株 Li23 も HuH-7 同様、がん抑制因子 p53 に変異を検出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N.

The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. PLoS One, 6(1): e14517, 2011.

- (2) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatitis C cell lines. Hepatol. Res., 40(12): 1248-1253, 2010.
- (3) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro. Liver Int., 30(9): 1324-1331, 2010.
- (4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. Virus Res., in press.
- (5) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent Teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. Liver Int., in press.
- (6) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宣之. DNA 損傷センサー ATM キナーゼと Chk2 は C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である. 岡山医学会雑誌 122(1): 9-16, 2010.

2. 学会発表

- (1) Ariumi Y, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (2) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (3) Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (4) 有海康雄. 癌抑制因子と HCV のクロストーク. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島.
- (5) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. がん抑制因子 PML は HCV のライフサイクルに必須である. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島.
- (6) 上田優輝, 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 加藤宣之. 異なる細胞株を用いて

開発した全長 HCV-RNA 複製系による抗 HCV 活性が報告されている薬剤等の再評価。第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島。

- (7) 池田正徳, 森京子, 武田緑, 中澤貴英, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 異なる HCV 株、細胞株を用いた HCV RNA 複製培養細胞での薬剤評価。第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島。
- (8) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を決定する因子の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日-9 日, 徳島。
- (9) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. がん抑制因子 PML は HCV の生活環に必須である。第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日-24 日, 大阪。
- (10) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 新しい HCV-RNA 複製系を用いたリバビリンの抗 HCV メカニズム。第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日-24 日, 大阪。

- (11) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたリバビリンの作用機序の解明。第 14 回日本肝臓学会大会, 2010 年 10 月 13 日-14 日, 横浜。

- (12) 池田正徳, 森京子, 中澤貴英, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. C 型肝炎ウイルスに対する新しい抗ウイルス剤スクリーニング系の開発。第 14 回日本肝臓学会大会, 2010 年 10 月 13 日-14 日, 横浜。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

HCV 変異が培養細胞内での増殖と薬剤耐性に与える影響

研究分担者 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

研究要旨: C型肝炎ウイルス(HCV)に感染は肝癌の危険因子として知られている。そしてこのウイルスの変異が治療反応性や肝発癌に関与しているとの報告が多くなされているが、その分子生物学的メカニズムは明らかにされていない。そこで、これまで治療反応性への影響が報告されているコア領域と NS5a 領域 ISDR の変異が HCV の培養細胞内での増殖に与える影響について検討した。その結果、コア領域の変異は HCV の培養細胞内増殖能やインターフェロンの感受性に影響を与えず、ISDR の変異については、genotype 1b 株野生型で増殖能の低下を認めたが、IFN の感受性については明らかな差を認めなかった。

A. 研究目的

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

現在、C型慢性肝炎にはインターフェロン (IFN) とリバビリンを中心とした治療が行われている。治療に対する反応性を規定するウイルス側の因子として、NS5A領域のISDRやIRRDRの変異数が報告されている。また、近年臨床症例での検討によりコア領域の70番目と91番目のアミノ酸変異が関与しているとの報告もなされている。しかし、これらの変異がどのような機序でHCVの薬剤感受性に影響を与えているかは依然不明であり、薬剤耐性の生じる機序も明らかになっていない。最近、HCV JFH-1 株の全長RNAを培養細胞に導入することでウイルスの増殖複製と生成されたウイル

スの感染をみることができるようになった。そこで、この実験系を用いて、これらの変異のHCV増殖複製に与える影響について検討を行った。

B. 研究方法

1. HCV JFH-1 株、AHC-1b 株のコア領域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評価

通常培養細胞での感染増殖系で用いられる JFH-1 株 (Genotype 2a) および新規に開発した感染増殖系 AHC-1b 株 (Genotype 1b) のコア領域の aa 70 と aa 91 は RL であり、いわゆる wild type であった。そこで IFN 抵抗性や肝発癌性に関与しているといわれる aa 70 が Q のものと aa 91 が M のものそれぞれと、それら両方の変異を持ったものの合計 3 つの変異株 (RM、QL、QM) を JFH-1 株と AHC-1b 株で作製し、全長 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、培養細胞での増殖能を評価した。

2. JFH-1 株と AHC-1b 株の NS5a 領域 ISDR の変異が培養細胞中での増殖と IFN 感受性に