

研究分担報告書

脂質代謝に関する研究

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学 感染制御部教授

研究要旨：HCV 感染において肝臓脂肪化と不飽和化による脂質組成変化がおきることを我々はマウスおよびヒトで示し肝発癌との関連を示してきた。今回培養細胞系において $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が HCV core 蛋白によってもたらされること、また多価不飽和脂肪酸投与によって HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が抑制され新たな治療のターゲットとなる可能性を示した。また培養細胞系による肝臓脂肪化軽減検討のなかで新たに肝臓脂肪化抑制物質の候補が得られた。

A. 研究目的

肝臓発癌において肝臓の脂肪化、および脂質組成変化、および酸化ストレスが病態の中心であることをC型肝炎マウスモデルで我々は示してきた。また近年問題になっているNASH（非アルコール性脂肪肝）における肝細胞発癌においても共通の病態が存在している報告が積み重ねられつつある。

①今回HCV core蛋白による肝臓脂肪化の中心となる酵素がSCD-1であることをマウスモデルで報告しているが、今回培養細胞において、逆にその酵素活性を抑制する物質をスクリーニングしC型肝炎による発癌抑制物質の検討をはかる。

B. 研究方法

①HCV core 蛋白発現培養細胞系において不飽和酵素の活性、および脂質組成を個々に検討し HCV core 蛋白による活性変化を受けている酵素の確認とその酵素活性を抑制する物質のスクリーニングを行う。

（倫理面の配慮）

培養細胞系の実験であり特別な倫理面の押

領は必要としない

C. 研究結果

HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇がマウスも出るのみでなく培養細胞系脂質組成検討でも示された。またこの $\Delta 9$ 不飽和酵素（Stearoyl CoA desaturase）活性はPUFA 投与によって抑制にされた。

また分枝鎖アミノ酸による肝臓の脂肪化軽減を報告しているが、今回培養細胞においていくつかの物質を検討し有力な肝臓脂肪化抑制物質の同定がおこなわれた。

D. 考察

Stearoyl CoA desaturase は脂質合成において key enzyme であることが我々の研究とともに示されつつある。つまり $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇によって合成された1価の不飽和脂肪酸が他の脂肪酸よりもERにおける脂質合成にとって優位であり、

HCV は自己の増殖に必要な脂質の場を $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇によって獲得している可能性がある。逆に PUFA によって活性抑制が認められ脂質合成も抑制される可能性がある。

E. 結論

培養細胞系においても $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が HCV core 蛋白によってもたらされることから新たな治療薬スクリーニングが可能となることまた多価不飽和脂肪酸投与によって HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が抑制され新たな治療のターゲットとなる可能性がある。またこの検討のなかで新たな肝臓脂肪化抑制物質の候補が得られた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Evaluation of a chromogenic agar medium for the detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae.

Saito R, Koyano S, Nagai R, Okamura N, Moriya K, Koike K.

Lett Appl Microbiol. 2010 Dec;51(6):704-6.

2) Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: Polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein.

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.

J Hepatol. 2010 Sep 22.

3) Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection.

Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K.

Oncology. 2010 Jul;78 Suppl 1:24-30.

4) Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells.

Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K.

J Med Virol. 2010 May;82(5):776-92.

5) Animal models for hepatitis C and related liver disease.

Koike K, Moriya K, Matsuura Y.

Hepatol Res. 2010 Jan;40(1):69-82.

6) Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells.

Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K.

Am J Pathol. 2009 Oct;175(4):1515-24.

2. 学会発表

1) Kyoji Moriya HCV and hepatic steatosis
The JSH single topic conference. Tokyo

Japan.2010

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記なし

研究分担報告書

HCV感染とオートファジー

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)による病態発症に、オートファジーが関連するという報告がなされているが、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、HCV感染におけるオートファジーの生物学的意義を解析することを目的とした。レプリコン細胞やJFH1ウイルスの感染細胞ではオートファジーが誘導されるが、遺伝子型でオートファジーの程度が異なった。ドミナントネガティブでオートファジーを抑制しても、HCV増殖には影響しないが、細胞内にライソソーム由来の空胞が形成され、細胞死が誘導された。これらの成績から、HCVはオートファジーを誘導することによって細胞死を回避し、持続感染を成立させている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染は、脂肪肝、肝硬変、肝細胞癌などの肝病変の発症だけでなく、インスリン抵抗性などの肝外病変にも関与することが知られている。我が国には2百万人もHCV感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。HCVのコア蛋白質を発現するトランスジェニック(コアTg)マウスは、インスリン抵抗性や脂肪肝を経て肝細胞癌を発症する。コア蛋白質はウイルス粒子の構成因子であるが、一部は核やミトコンドリアへ移行する。C型肝炎患者やコアTgマウスの肝臓ではミトコンドリア由来のROSの産生やATP産生阻害が観察される。近年、HCV感染により惹起される種々の病態に、オートファジーが関連するという報告がなされているが、直接的な関与は未だ証明されていない。そこで本研究では、HCV感染におけるオートファジーの生物学的意義を解析することを目的とした。

B. 研究方法

HCVレプリコン細胞やJFH1ウイルスの感染細胞におけるオートファジーを検討するため、オートファゴソームのマーカーであるLC3の性状と局在を、ウェスタンブロット法

と共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、ライソソーム阻害剤を用いたAutophagy flux assayやTandem fluorescent tagged LC3 (tfLC3) assayにより、LC3の蓄積機序を検討した。ATG4Bのプロテアーゼの活性欠損変異体とATG16Lを用いてオートファジーの誘導を阻害した。空胞化した細胞内コンパートメントの性状を各種オルガネラマーカーやデキストランの取り込みを指標にして検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

レプリコン細胞やJFH1ウイルスの感染細胞ではオートファジー誘導のマーカーである、LC3のC末端のグリシンにホスファチジルエタノールアミンが共有結合したLC3-IIが検出され、細胞質内にLC3の蓄積が点状に観察

された。また、レプリコン細胞におけるオートファジーの誘導は遺伝子型で程度が異なっていた。蓄積した LC3 はライソソームマーカーである LAMP1 や、オートファジーにより特異的に分解される p62 と共局在した。

Autophagy flux assay と tfLC3 assay により、蓄積した LC3 の一部はオートファジーの成熟過程で阻害されていることが確認された。Atg4B のドミナントネガティブ体の導入によりオートファジーを抑制しても、HCV 増殖には影響しないが、細胞内に顕著な空胞が形成され、細胞死が誘導された。形成された空胞内には Lamp-1 やカテプシンが存在し、デキストランが取り込まれることから、ライソソーム/後期エンドソームが肥大化したものであること考えられた。空胞にはウイルスの蛋白質や RNA は検出されなかった。

D. 考察

オートファジーは HCV の増殖には直接関与しないことが示された。オートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスでは肝障害が観察されることから、HCV の複製による不完全なオートファジーの誘導が病態発症に関与する可能性が考えられる。HCV 感染細胞でオートファジーの誘導を阻害すると、細胞の空胞化に伴う細胞死が観察されることから、HCV は感染細胞にオートファジーを誘導することによって細胞死を回避し、持続感染を成立させている可能性が示唆された。

E. 結論

- 1 オートファジーは HCV の増殖には直接関与しない。
- 2 オートファジーの誘導は遺伝子型で程度が異なる。
- 3 HCV はオートファジーを利用して細胞死を回避し、持続感染している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表 1.論文発表

- 1 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 Kaname Y, Tani H, Kataoka C, Shiokawa M, Taguwa S, Abe T, Moriishi K, Kinoshita T, and Matsuura Y. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/DAF into viral particles bearing baculovirus GP64. *J Virol* 2010; 84, 3210-3219.
- 5 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.
- 6 Koike K, Moriya K, and Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatology Res* 2010; 40, 69-82.
- 7 Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.
- 8 Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa 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オリパーゼ 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、脇田隆宇、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關与する宿主因子: 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。

研究分担報告書

慢性C型肝炎患者末梢血B細胞におけるHCV持続感染機構の解明

研究分担者 水落 利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
研究協力者 伊藤 昌彦 ウイルス肝炎研究財団リサーチレジデント

研究要旨： HCV 感染による病変として、肝病変以外に B 細胞機能異常に代表される様々な肝外病変が知られている。これまでの研究で、慢性 C 型肝炎患者（CHC）の末梢血 B 細胞に HCV が感染していること、および AID に代表される癌化関連遺伝子の発現亢進が見られることを報告してきた。今年度の研究では、Type I IFN (IFN β) 産生に代表される自然免疫系のシグナル伝達に着目し、HCV が B 細胞に持続感染するメカニズムの解明を試みた。その結果、CHC の B 細胞では、RIG-I、IPS-1、TLR3、TRIF などの自然免疫系に関与するセンサー／アダプター分子の発現が亢進していたが、IFN β 遺伝子の転写に関わる IRF-3 の 2 量体形成および核移行は惹起されていなかった。この原因として、IRF-3 のリン酸化に関与する TBK1/IKK ϵ の活性に着目した結果、CHC の B 細胞では TBK1/IKK ϵ に結合し、IRF-3 のリン酸化を抑制する SIKE の発現が亢進しており、さらに TBK1 を安定化し、IRF-3 のリン酸化を促進する Hsp90 や DDX3X の発現が有意に減少していた。これらの要因が複合的に関与することで、CHC の B 細胞では IFN β 産生が抑制されていることにより HCV が持続感染できる可能性を示した。

A. 研究目的

一般にHCV感染は肝細胞に指向性を持つと考えられていたが、慢性C型肝炎患者（CHC）の末梢血B細胞においても、HCVが感染および増殖していることを示してきた。ではなぜHCVはB細胞特異的に感染するのかという疑問に答えるため、本研究ではIFN β 産生に代表される自然免疫系のシグナル伝達に着目し、HCVがB細胞に持続感染するメカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

瀉血療法の際に採取された CHC 末梢血液、また対照としては健常人末梢血液より Ficoll を用いて PBMC を分離し、さらに磁気ビーズを用いて CD19 陽性細胞（B 細胞）を分離した。得られた細胞から RNA とタンパク質を抽出し、リアルタイム PCR (rt-PCR)、イムノブロテイング (IB)により自然免疫系に関連する遺伝子/タンパク質の発現解析を行った。

(倫理面の配慮)

本研究に供した慢性 C 型肝炎患者血液についてはその譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得ている。

C. 研究結果

rt-PCR および IB により、CHC の B 細胞ではウイルス感染に対する初期防御反応において重要である IFN β の発現亢進が認められなかった (図 1 A, B)。さらに、2 本鎖 RNA である poly I:C 遺伝子を B 細胞に導入したところ、健常人 B 細胞では IFN β 産生が誘導されたが、CHC の B 細胞では誘導されなかった (図 1 C)。このことは、HCV 感染によって B 細胞では自然免疫系が抑制されていることを示唆する。CHC の B 細胞では、RIG-I、IPS-1、TLR3、TRIF などの自然免疫系に関与する分子の発現が顕著に亢進していたが (図 2)、IFN β 遺伝子の転写に関わる IRF-3 蛋白の発現 (図 3 A)、およびその 2 量体形成 (図 3 B) と核移行 (図 3 C) は惹起されていなかった。この原因として、これまでに Huh7 で報告されている HCV 蛋白 NS3/4A による IPS-1 の切断が考えられた。しかしながら、CHC の B 細胞では一部の IPS-1 は切断されていたが大部分は完全長のままであり、シグナル伝達の阻害を説明するには不十分であった (図 4)。そこで次に、IRF-3 のリン酸化に関与する TBK1/IKK ϵ の活性に着目して実験を行った結果、CHC の B 細胞では TBK1/IKK ϵ に結合し、IRF-3 のリン酸化を抑制する SIKE の発現が亢進しており、さらに TBK1 を安定化し、IRF-3 のリン

酸化を促進する Hsp90 や DDX3X の発現が有意に減少していることが明らかになった (図 5)。従って、これらの要因が複合的に関与することで、CHC の B 細胞では IFN β の産生が抑制されていると結論した。

D. 考察

HCV に感染した B 細胞ではウイルス排除・防御に関わる自然免疫系が十分に機能していないことを明らかにした。このことから、B 細胞における HCV の持続感染が可能となり、さらには B 細胞機能異常を誘導することが示唆された。

HCV 陽性である肝移植患者では、ウイルスが高率に移植肝に再感染し、肝硬変などを起こすことが知られている。本研究により、末梢 B 細胞が HCV の貯留細胞になっている可能性が示されたことから、血中の HCV だけでなく、HCV が持続感染している B 細胞の除去が HCV の再感染防止に重要であると考えられる。

E. 結論

B 細胞においては、HCV 感染により IFN β 産生に代表される自然免疫能が抑制されているために、HCV が持続感染できることが示唆された。このような B 細胞における HCV の持続感染は、HCV がその増殖の場を肝細胞以外に保持するだけでなく、B 細胞リンホーマの発症にも関与している可能性があるだろう。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuochi T, Ito M, Takai K, and Yamaguchi K: Resistance of peripheral blood memory B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Virus Research* 155:349-351, 2011.
- 2) Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent infection of hepatitis C virus. *Journal of Innate Immunity* 2:607-617, 2010.
- 3) Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral B cells of chronic hepatitis C patients. *Clinical Immunology* 135:459-465, 2010.
- 4) Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, and Yamaguchi K: Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+ B cells to the liver

of chronic hepatitis C patients. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 30:243-252,2010.

- 5) Mizuochi T, Mizusawa S, Nojima K, Okada Y, and Yamaguchi K: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a” determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. *Clinica Chimica Acta* 411:605-606, 2010.

2. 学会発表

- 1) 水落利明、伊藤昌彦：慢性 C 型肝炎患者末梢 CD5 陽性 B 細胞のアポトーシス抵抗性 第 58 回日本ウイルス学会学術集会（徳島市、2010 年）

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

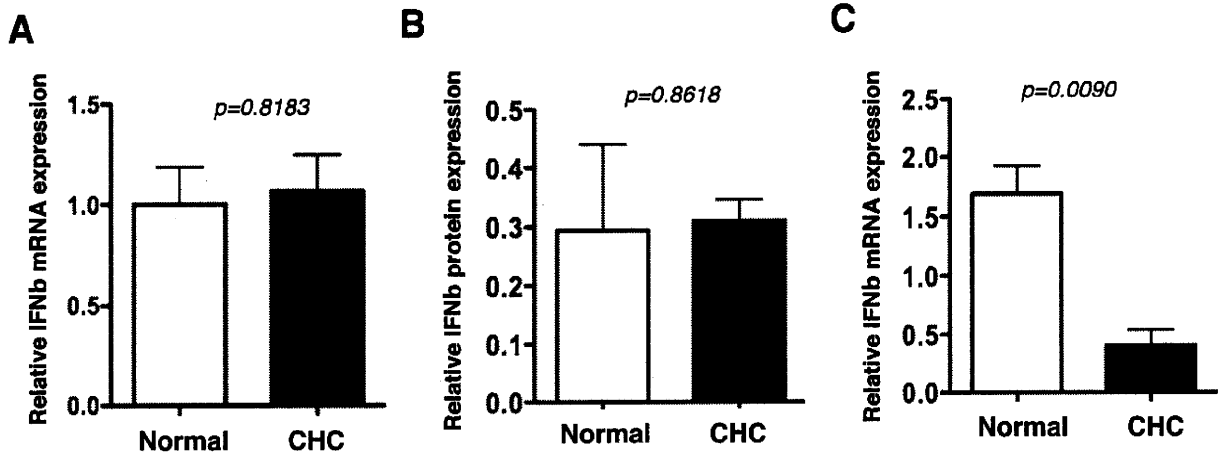


図 1 :慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのIFN β 産生

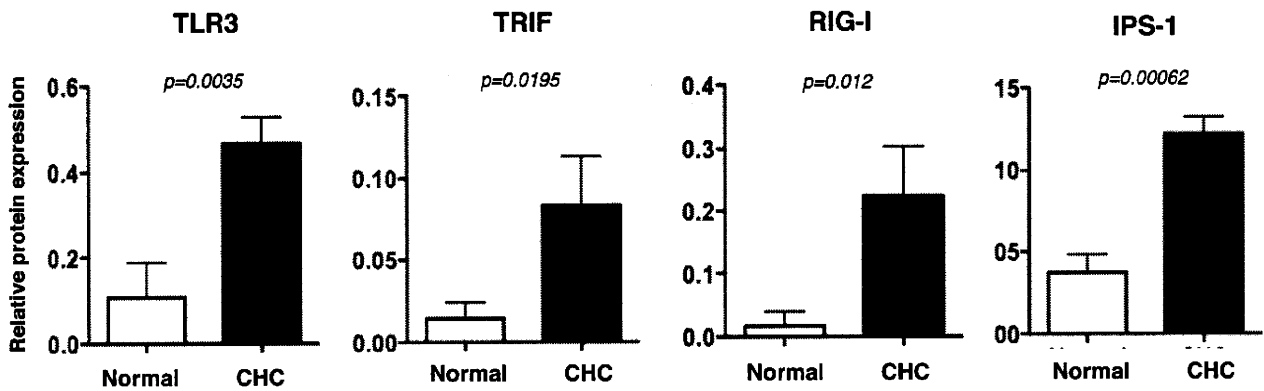


図 2 :慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのウイルスセンサー分子発現

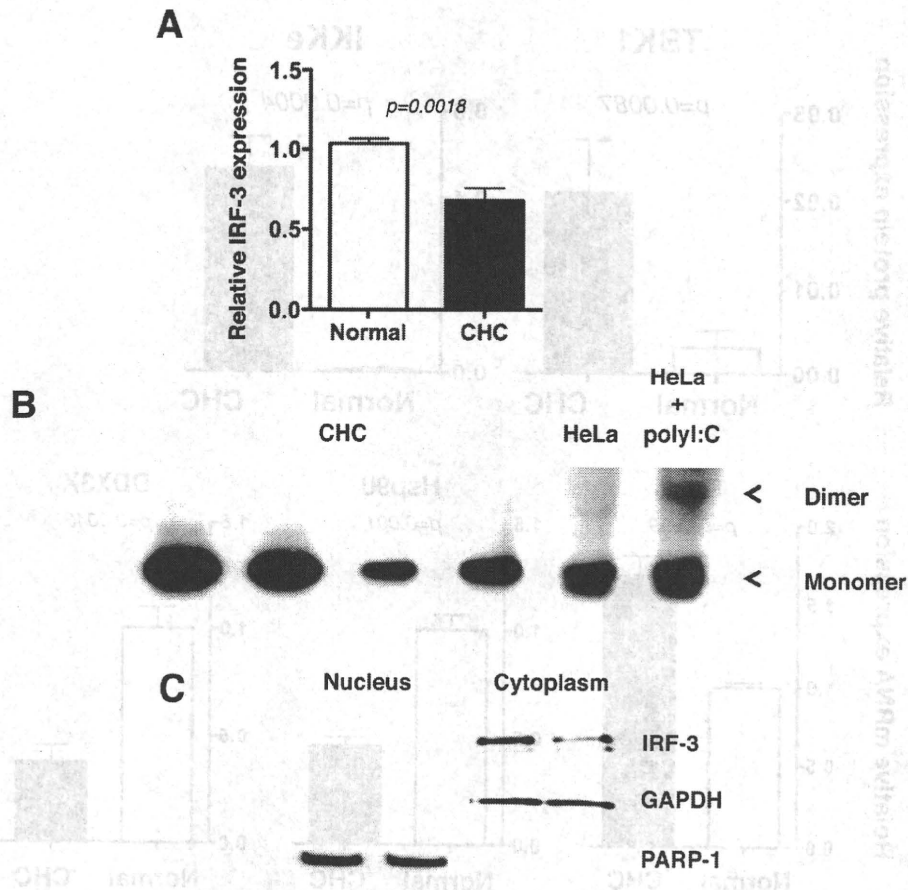


図 3 :慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのIRF-3活性化

Exp.1



Exp.2

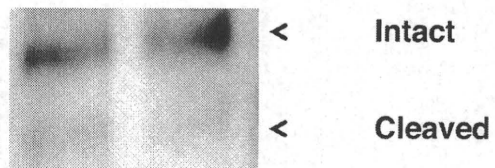


図 4 :慢性C型肝炎患者末梢B細胞におけるIPS-1分子切断

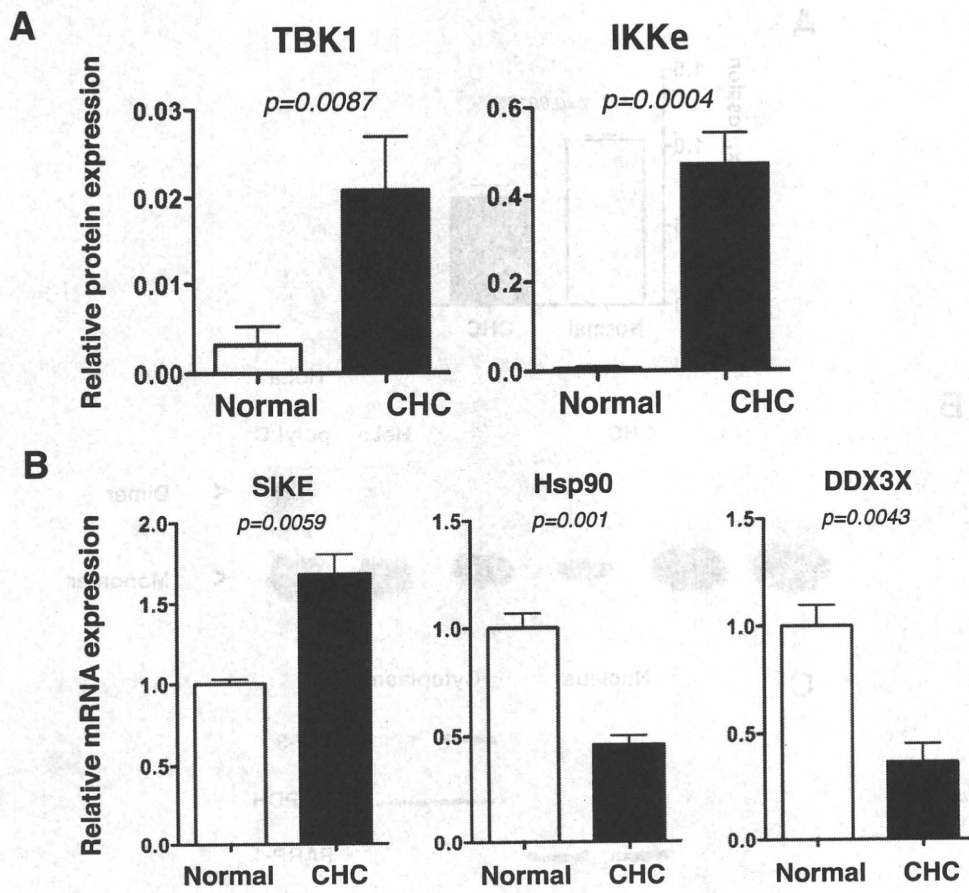


図 5 :慢性C型肝炎患者末梢B細胞におけるTBK1/IKKeの機能抑制

研究分担報告書

HCVのBリンパ腫発症要因の解明に関する研究

研究分担者 小原 恭子 熊本大学 特任教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）が引き起こす肝臓外の病変であるBリンパ腫の発症機序を解明するためにマウスモデルを樹立して解析を進めてきた。これまでの研究の中で、HCVのウイルス粒子を形成する構造蛋白質領域の遺伝子を持続的に発現するマウス（CN2-IRF1-/-）はリンパ性増殖を発症する事を見いだしている。本年度は、HCV全長遺伝子をB細胞で発現するマウス（RzCD19Cre）を樹立してHCV遺伝子のB細胞に対する直接作用を解析した。本マウスは出生前からB細胞でHCV遺伝子を発現するため、これに免疫寛容となっており直接作用の解析が可能と考えられる。その結果、600日以上経過すると約25%のマウスでBリンパ腫を発症する事が明らかとなった。また、このBリンパ腫発症と関連する液性因子として可溶性のIL-2レセプター α （sIL-2R α ）を同定した。さらに、sIL-2R α の産生はBリンパ腫組織であると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に主に感染して疾患を引き起こし肝硬変・肝細胞癌へと進展する。一方でHCVは肝臓外にも病変を起こし肝外病変として総称されているがその本態は不明な点が多い。HCVの慢性感染時にウイルス抗原に反応したB細胞がまずポリクローナルな増殖をし、その後形質変化したB細胞がモノクローナル性に増殖して腫瘍化していくと考えられている。

本研究では、未だ解明されない肝外病変の中でもBリンパ腫の発生モデル動物を樹立してこれを解析する事を通じ、その発症要因を解明する事を目的としている。

これまでに、HCVがB細胞に感染するとい

う報告があるが(JMV 2009他)、HCVがB細胞に及ぼす直接作用については不明な点が多くほとんど解明されていなかった。そこで今年度はHCV全長遺伝子をマウスのB細胞で発現し、その直接作用を解析した。

B. 研究方法

RzCD19Cre マウスの樹立：

全長のHCVゲノムRNA（1b型）をリボザイム(Rz)で正確切り出す事ができ、またCre/loxP制御下で任意の時期や臓器で発現可能なマウス(Rz)をまず樹立した。その後B細胞のマーカーであるCD19のゲノム遺伝子座にCre酵素がノックインしたマウス(CD19Creマウス；NAR 1997)と交配してB細胞特異的にHCV遺伝子を発現できる

RzCD19Cre マウスを樹立した。HCV 遺伝子の発現は、RT-PCR, ウェスタンブロット法、コア ELISA (オーソ社) 法で解析を行った。組織染色は定法に従い HE 染色、抗 CD45R あるいは抗 CD8 抗体を用いた免疫染色を行って B リンパ腫の判定をした。

液性因子の解析：

マウス血清中の ALT/AST 値は ELISA キット(WAKO)で測定した。31種類のサイトカイン、ケモカイン(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α , IL-15, FGF-basic, LIF, M-CSF, MIG, MIP-2, PDGF β and VEGF)の定量は Bio-Plex Pro assay (Bio-Rad 社)で行った。sIL-2R α の測定は ELISA キット (DuoSet ELISA Development System; R&D Systems)で行った。

(倫理面の配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている(H18年6月)。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従った。また、熊本大学 本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た(H18年4月)。

C. 研究結果

HCV 全長を Cre/loxP 制御下で発現できる Rz マウスと CD19Cre マウスを交配して RzCD19Cre マウスを樹立した。樹立したマウスの各組織における HCV 遺伝子の発現を解析したところ、B 細胞の多い脾臓では HCV のコア蛋白質の発現が見られた

が、肝臓や血漿では検出されなかった。

HCV の発現が確認されたため、RzCD19Cre マウスを HCV 非発現コントロールマウス群 (Rz, CD19Cre, WT) と共に 600 日以上観察した。その結果、600 日以上立つと痩せて衰弱する個体が観察されたため剖検を行って病理組織学的な解析を行った。その結果、約 25% (18/72) のマウスでび慢性大細胞型の B リンパ腫の発症が観察された。この発症率は自然発生の腫瘍やコントロール群での腫瘍の発生率よりも有意に高かった。HCV 遺伝子の発現は全ての B リンパ腫で確認された。また、Ig 遺伝子のゲノム遺伝子のクローナリティを genomic PCR で解析したところほとんどの例で単一の遺伝子増幅が見られ腫瘍細胞がモノクローナル性に増殖していた。

B リンパ腫の発症と関連する宿主因子を探索するため、サイトカイン、ケモカイン 31 種並びに ALT,AST 値をマウス血中で測定した。その結果 B リンパ腫の発症と関連して有意な変化が生じたものはなかった。一方で腫瘍マーカーの 1 つである sIL-2R α を測定したところ、RzCD19Cre の B リンパ腫発症群で有意な上昇が観察された。さらに、IL-2R α を産生する組織を解析したところ B リンパ腫の腫瘍組織での産生が正常脾臓組織やリンパ球よりも上昇していた。

D. 考察

RzCD19Cre マウスは出生前より B 細胞で HCV を発現しているため、これに免疫寛容となっており、ウイルスに対する宿主

側の免疫反応がないと考えられる。従って RzCD19Cre マウスで発症した B リンパ腫は HCV の直接作用によって主に誘導された可能性が高いと考えられる。肝臓以外の臓器でも HCV の持続発現が細胞の腫瘍原性を亢進できるという知見は本研究で初めて得る事ができた。

また、RzCD19Cre マウスでは HCV の持続発現によって腫瘍化した B 細胞がモノクローナル性に増殖していると考えられた。

B リンパ腫を発症した個体では sIL-2R α の産生上昇が観察された。リンパ腫の発生の結果と考えられるが、sIL-2R α がリンパ腫の発症誘導に何らかの関与をしているかについては今後の検討が必要である。

また、この他の宿主因子において RzCD19Cre マウスの B リンパ腫発症に関与するものは不明であり、今後の検討が必要である。

E. 結論

HCV を持続的に発現すると B リンパ腫が一定の頻度で発生する事があきらかとなった。HCV の直接作用で B リンパ腫発症を誘導できる事が強く示唆された。B リンパ腫の発症と関連する宿主因子の 1 つとして sIL-2R α が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takano T., Kohara M, Kasama Y,

Nishimura T, Saito M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Translocation of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J Med Virol.* accepted.

2) Takano T, Tsukiyama-Kohara T, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology*, in press.

3) Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo.* *Blood* 116(23): 4926-4933, 2010.

4) Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Salem NE, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp. Immunol. Immunopathol.* 33 E81-88, 2010.

5) Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri.* *J. Virology* 84 303-311, 2010.

2. 学会発表

- 1) Salem NE, K. Tanaka, T. Nishimura, M. Saito, M Kohara, S Harada, A El-Gohary, and K. Tsukiyama-Kohara. Application of DHCR24 for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
- 2) Nishimura, T., M.Kohara, Y. Kasama, Y. Hirata, T. Takano, Y. Tokunaga, M. Satoh, M. Saito, and K. Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysterol delta24-reductase. The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
- 3) Tsukiyama-Kohara, K., and M. Kohara. Hepatitis C virus impairs p53 activity by persistent over-expression of DHCR24. Cell Symposia, Inflammation in Disease Conference, Lisbon 2010.
- 4) Sekiguchi, S., K. Kimura, K. Tsukiyama-Kohara, and M. Kohara. Immunotherapy using recombinant vaccinia virus cures chronic hepatitis. Cell Symposia, Inflammation in Disease Conference, Lisbon 2010.
- 5) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御 第47回日本ウイルス学会九州支部総会 宮崎 2010.
- 6) Kasama, Y., S. Sekiguchi, M. Saito, M. Satoh, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, M. Takeya, Y. Hiasa, M. Kohara, and K. Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010.
- 7) 佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス複製における Betaine/GABA transporter-1 (BGT-1)の役割 日本ウイルス学会 徳島2010.
- 8) 笠間由里、関口敏、齊藤誠、佐藤正明、桑原一彦、阪口薫雄、竹屋元裕、小原道法、小原恭子 マウスモデルを用いた C型肝炎ウイルス誘発性 Bリンパ腫発生機序の解析 日本ウイルス学会 徳島 2010.
- 9) 齊藤誠、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御 BMB2010 神戸 2010.
- 10) 笠間由里、関口敏、齊藤誠、佐藤正明、桑原一彦、竹屋元裕、阪口薫雄、小原道法、小原恭子 全長 HCV の B細胞発現による Bリンパ腫誘導 BMB2010 神戸 2010.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

「RRM2のアンタゴニストを有効成分として含有するC型肝炎治療剤」特願2010-180981
出願日 平成22年8月12日 発明者 小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸
出願人 国立大学法人熊本大学、財団法人東京都医学研究機構、中外製薬株式会社

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

研究分担報告書

肝培養細胞を用いたHCVによる糖代謝異常の分子機構の研究

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすだけでなく、2型糖尿病、脂質代謝異常などの肝外病変を引き起こす。HCV感染が2型糖尿病発症に関与すると示唆されているが、いまだ不明な点が多い。昨年度、本研究課題において、HCV感染がGLUT2転写抑制および糖の取り込み低下を引き起こすこと、転写因子HNF-1 α がHCVによるGLUT2の転写抑制に重要であることを報告した。今年度はHCV感染によるHNF-1 α の発現抑制の分子機序について解析した。HCV感染細胞においてHNF-1 α の蛋白量が著明に減少した。ここにプロテアソーム系阻害剤とライソソーム系阻害剤を投与したところ、プロテアソーム阻害剤では全く影響がなかったが、ライソソーム系阻害剤によりHNF-1 α の蛋白量が回復することを見出した。また、HCV蛋白質の中でNS5AのみがGLUT2プロモーター活性を阻害し、NS5AがHNF-1 α と細胞内で相互作用を示すことを明らかにした。HCV NS5A蛋白質がHNF-1 α と相互作用することによりHNF-1 α のライソソーム依存性分解を誘導する可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病などの肝外病変を引き起こし、肝病態の進行に悪影響を及ぼすことから、その対策は、厚生労働衛生上、重要な課題である。HCVが2型糖尿病を引き起こす機序として我々は昨年、本研究において、HCVレプリコン細胞やHCV感染系を用い、HCV複製/感染によりグルコーストランスポーター(GLUT)2の発現抑制が起こり、糖の取り込み抑制が起こることを報告した。本年はHCV感染によりGLUT2転写抑制が引き起こされ

る分子機序を明らかにするために、GLUT2プロモーター領域に結合する転写調節因子Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α)に注目し、HCV感染によるHNF-1 α 、およびGLUT2プロモーターへの影響を解析した。

B. 研究方法

1) HCV感染培養系にはHCV J6/JFH-1株の適合変異株p47とヒト肝癌細胞株Huh7.5細胞を用いた。RNAレプリコンにはHuh7.5細胞由来のサブゲノムRNAレプリコン複製細胞(SGR)、HCVフルゲノムRNAレプリコン複製細胞(FGR)を用いた。

2) HCV J6/JFH-1をmultiplicity of infection (m. o. i.) 2 でヒト肝がん細胞 (Huh7.5細胞) に感染させ、経時的 (Day1-14) にHNF-1 α mRNA量を quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法で測定した。また、同様にHNF-1 β mRNA量も測定し、HNF-1 α と比較した。

3) HCV J6/JFH-1感染細胞と非感染細胞、及びIFN処理したときのHNF-1 α 蛋白質発現量をWestern blottingで解析した。また感染後6日目の細胞で、回収の12時間前にライソゾーム阻害剤 (40 μ M E-64d+20 μ M pepstatin A) またはプロテアソーム阻害剤 (10 μ M clasto-lactacystin) を投与し、HNF-1 α の蛋白質量を比較した。

次にHCV J6/JFH-1感染細胞と非感染細胞を用いて、回収の12時間前に10 μ M clasto-lactacystin、40 μ M E-64d、20 μ M pepstatin Aの3種類の阻害剤を投与し、HNF-1 α の蛋白質量を比較した。

4) Huh7.5細胞にHCV蛋白質発現プラスミドのcore、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bを各1 μ gずつと、GLUT2発現プラスミド0.5 μ gをコ・トランスフェクションし、それぞれのGLUT2プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

5) Huh7.5細胞にHCV蛋白質の一つであるNS5AとHNF-1 α の発現プラスミドをコ・トランスフェクションし、抗HNF-1 α 抗体で免疫沈降した後に抗NS5A抗体でWestern blottingを行った。その際、negative control抗体でも免疫沈降を行い、NS5Aの結合がHNF-1 α に特異的であるかどうか検討した。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

1) HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質量の変化をWestern blottingで解析した。感染細胞ではHNF-1 α の蛋白質量が著しく低下し、IFNでHCV RNAを排除するとHNF-1 α 蛋白質量は回復した。HNF-1 α 蛋白質量の低下に蛋白質分解が関与しているか明らかにするために、ライソゾーム阻害剤とプロテアソーム阻害剤処理を行った。プロテアソーム阻害剤clasto-lactacystinの処理ではHNF-1 α 蛋白質量に変化はなかったが、E-64dとpepstatin Aの処理によって、HNF-1 α 蛋白質量が著しく増加した。次にシステインプロテアーゼ阻害剤E-64dとアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤pepstatin Aをそれぞれ単独で処理した結果では、pepstatin A処理でHNF-1 α 蛋白質量は増加したが、E-64d処理では変化なかった。これらのことにより、HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質量の減少にライソゾーム分解系、特にアスパラギン酸プロテアーゼの関与が示唆された。

2) HCV感染によるHNF-1 α mRNA転写への影響を明らかにするために、qRT-PCR法でHNF-1 α 、HNF-1 β のmRNA量を定量した。Day1-3ではcontrolと差はみられなかった。しかしDay 5よりHNF-1 α のmRNA量の有意な低下が認められた。一方、HNF-1 β のmRNA量はHCV感染細胞と非感染細胞で有意な差はなかった。この結果から、HCV感染細胞