

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

特殊ペプチドを用いたC型肝炎ウイルスに対する創薬研究

菅 裕明 東京大学大学院理学系研究科・化学専攻 教授

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、C型肝炎ウイルスあるいは肝臓の新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指している。本年度は、HCVがヒト細胞に感染する際に重要な役割を果たすグライコタンパク質E2、ならびに肝臓癌のマーカーであるEpCAMに結合する特殊環状ペプチドの探索を行い、高生理活性を有する特殊環状ペプチドの発見に至った。

A. 研究目的

本研究分担班は、C型肝炎ウイルスあるいは肝臓の新規標的や疾患関連因子に対し、本分担者が独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。

行った。

（倫理面への配慮）

本研究はウイルスを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全てP2レベルで実験は行っている。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発したRaPID(Random Peptide Integrated Discovery)システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本技術の特筆すべき点は、フレキシザイム(tRNAアミノアシル化RNA触媒)を用いて、遺伝暗号表を初期化し、通常アミノ酸を異常アミノ酸に対応させた改変遺伝暗号表を作成し、それに沿った形でmRNAを翻訳することで特殊アミノ酸を合成する手法である。また、その技術をディスプレイ法と組み合わせたRaPIDディスプレイ法を開発し、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を

C. 研究結果

HCVがヒト細胞に感染する際に重要な役割を果たすグライコタンパク質E2、ならびに肝臓癌のマーカーであるEpCAMに結合する特殊環状ペプチドの探索を行った。前者においては数種の抗E2ペプチドが同定され、そのうち2種類についてHCVのヒト細胞への感染阻害活性が認められた。一方、後者についても特殊環状ペプチドの探索が終了し、抗EpCAMペプチドが3種同定された。そのうち、2種類については解離定数が数nMレベルの高活性を示した。さらにそのうち1種類のペプチドについては、C末端に蛍光ラベルを施し、EpCAMが発現さ

れたヒト乳癌細胞に結合する事が共焦点顕微鏡をつかって観測できた。現在、診断薬開発に向けた検討を進めている。

D. 考察

抗 E2 特殊環状ペプチドについては、解離定数の決定、およびその感染阻害効果についてより詳細な検討が必要とされる。抗 EpCAM 特殊環状ペプチドについては、蛍光ラベルの種類、あるいは PET への応用等を含め検討が必要とされる。

E. 結論

RaPID システムは、期待通り高い生理活性をもった特殊環状ペプチドの発見に多大な力を発揮することが明らかとなった。今後より高い活性をもち、経口性をもちうる薬剤への開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Goto, T. Katoh, H. Suga "Flexizymes for genetic code reprogramming" Nature Protocols in press (2011)
- 2) T.-J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga "Synthesis of a Backbone-cyclic Peptide SFTI-1 Promoted by the Induced Peptidyl-tRNA Drop-off" Angewandte Chemie International Edition in press (2011)
- 3) G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga "Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*" Chemistry&Biology 17, 320-321 (2010)
- 4) 「RaPIDシステムによる特殊ペプチド

薬剤の探索」飯田健夫・菅裕明 フロンティア22：生命現象を理解する分子ツール (化学同人) 71-76 (2010)

- 5) 「擬天然物特殊ペプチドのプログラム合成と応用」樋口岳、菅裕明 有機合成化学協会誌 68, 217-227 (2010)
- 6) 「特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開」林剛介、大城幸紀、菅裕明 生化学 6, 505-514 (2010)
- 7) 「RaPIDシステムが拓く新創薬戦略」後藤佑樹、伊東利紗、菅裕明 MEDCHEM NEWS No.4 26-31 (2010)

2. 学会発表

- 1) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming 」 22nd Enzyme Mechanisms Conference, Jan 2-6th, 2011, Florida, USA
- 2) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」PacifiChem, Dec 16-20th, 2010, Honolulu, USA
- 3) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」5th International Peptide Symposium, Dec 4-9th, 2010, Kyoto, Japan
- 4) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」第29回メディシナルケミストリーシンポジウム Nov 17, 2010, 京都
- 5) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」日本RNA学会年会, July 27th, 2010, 東京
- 6) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」万有シンポジウム仙台, June 5th, 2010, 仙台
- 7) 菅裕明 「特殊ペプチド創薬」日本分子生物学会春期シンポジウム, June 7th, 2010, 松島

8) Hiroaki Suga 「 Genetic Code reprogramming」 Annual Meeting of the American Society for Biochem. and Mol. Biol., Apr 24-28th, 2010, Anaheim, USA

G. 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

C型肝炎ウイルス産生に関与する宿主因子の探索と創薬への応用

深澤 征義 国立感染症研究所細胞化学部 室長

研究要旨： HCVライフサイクルの特徴として細胞内脂肪滴や脂質ラフトといった脂質と密接に関連した部位が重要な役割を果たしていることがわかってきている。しかしこれら部位におけるHCV産生に関与する宿主因子や詳細な分子メカニズムは依然として不明の点が多い。今回我々は細胞内脂肪滴に注目し、培養細胞を用いたHCV産生系を利用してHCVの産生に関与する宿主因子の探索を行った。HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析により100種以上の脂肪滴タンパク質を同定し、10種以上の感染細胞特異的なタンパク質を同定した。興味深いことに感染細胞特異的な脂肪滴タンパク質の多くがRNA結合能を有する分子であった。遺伝子ノックダウンあるいは遺伝子過剰発現実験の結果、DDX3、PABP1およびPABP4はウイルス産生に重要である一方で、DDX1、IMP1およびIMP3の存在はHCV産生に阻害的に働くことが明らかとなった。これら分子の役割の違いは興味深くさらに詳細に解析していく予定である。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は本邦における肝がん発症の主要リスク要因であり、その克服が強く求められている。宿主肝細胞内でのC型肝炎ウイルス産生には細胞内脂肪滴や脂質ラフト、網状膜構造といった脂質と密接に関連した部位が重要な役割を果たしていることがわかってきており、HCV感染における治療・創薬の面からも注目に値する点である。そこで、我々はこれら脂質関連部位に注目し、HCVの産生に関与する宿主因子の探索を行い、それらのHCVライフサイクルにおける分子メカニズムを明らかにすること、最終的には治療・創薬における標的として提示できることを目的

とする。

B. 研究方法

（1）HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析

HCV感染・増殖能が非常によいことが知られる肝細胞株Huh7由来のHuh7.5.1細胞を宿主細胞として用いた。HCV感染はHCV-JFH1株を用いた。HCV感染後、全ての細胞が感染していることは、HCVコア蛋白質抗体を用いた細胞蛍光抗体染色により確認した。HCV感染及び非感染細胞より、超遠心分離法等を用い脂肪滴画分を生化学的に分離・精製した。脂肪滴の精製度は、各オルガネラマーカー抗体を用いたイム

ノブロットにより確認した。脂肪滴画分より脂質を有機溶媒により脱脂・除去し、トリプシン限定分解後、直接LC-MS/MSで網羅的にタンパク質を同定した。同定タンパク質の脂肪滴画分における存在を確認するために各蛋白質の抗体によるイムノブロットを行うとともに、細胞蛍光抗体染色も行った。

(2) 同定タンパク質のHCV感染・増殖に対する影響の解析

一過性感染実験のための宿主細胞はHuh7.5.1細胞を用いた。HCVは、HCV-JFH-1株を用いた。感染はHuh7.5.1細胞にHCVを37°C、2時間感染することにより行った。HCV持続感染細胞はHuh7(FVC)細胞にHCV-JFH1株を感染し2週間以上長期培養したものを用いた。培養器はコラーゲンコート24あるいは48穴プレートを用いた。同定タンパク質のノックダウンは市販のステルスsiRNAを用い、各タンパク質につき3種のコンストラクトで行った。細胞への処理はlipofectamine RNAiMAXを用い20nMで感染前後に培地へ2回添加することにより行った。過剰発現は、pcDNA3.1ベクターに遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いた。細胞への導入はHCV持続感染細胞にFugene 6を用い0.4 μg/24穴で1回処理することにより行った。ノックダウン及び過剰発現がなされていることは各抗体を用いた細胞画分のイムノブロットにより確認した。ウイルス産生能の測定は、経時的に培養液中のHCVコア蛋白質量をELISAで定量することにより行った。また、細胞中のウイルスタンパク質(コアタンパ

ク質及びNS3)およびRNA量もイムノブロットあるいはqRT-PCRにより測定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析

HCV複製及びウイルス粒子形成が宿主細胞内脂肪滴周辺で起こることが示唆されており、関与する宿主因子やそのメカニズムが注目されている。今回我々はこの脂肪滴画分に注目し、HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分の比較プロテオーム解析を行った。

HCV感染・非感染培養細胞の脂肪滴画分より計118種類の宿主タンパク質を同定した。HCV由来タンパク質としてはコア蛋白質のみが同定された。脂肪滴の主要タンパク質であるADRPは感染細胞脂肪滴画分で相対的に少ないことがわかった。脂肪滴タンパク質には従来から知られているように、ADRP等の構造タンパク質以外に、脂質代謝関連分子、膜輸送関連分子等が多く認められたが、機能未知の分子も多数含まれていた。感染細胞特異的に脂肪滴に局在するタンパク質として、12種類のタンパク質が同定された。ほとんどがRNA結合能を有する分子であった。この中で抗体が手に入ったPABP1及びPABP4、IMP1及びIMP3、DDX1及びDDX3については免疫化学的にも脂肪滴への

局在を確認された。細胞の蛍光抗体染色によっても抗体が使用可能であったPABP4、IMP1/IMP3、DDX3について脂肪滴との共局在が確認された。

(2) 同定タンパク質のHCV感染・増殖に対する影響の解析

感染細胞脂肪滴特異的に同定されたタンパク質群について遺伝子ノックダウンあるいは遺伝子過剰発現を行い、HCV産生への影響を検討した。HCV産生の抑制が、従来より報告のあったDDX3の遺伝子ノックダウンで見られただけでなく、PABP1/4ダブルノックダウンでも見られた。PABP1あるいはPABP4単独のノックダウンではダブルノックダウンほどの有意な低下が見られず両者には機能的相補性があることが考えられた。一方、IMP1及びIMP3では、遺伝子ノックダウンによりHCV産生が有意に上昇することがわかった。IMP1/3ダブルノックダウンでは相加的効果を示すこともわかった。DDX1ノックダウンではHCV産生に対し有意な変化は見られなかったが、DDX1過剰発現によりHCV産生が有意に阻害された。よって、DDX1、IMP1及びIMP3の(過剰な)存在はHCV産生に阻害的に働くことがわかった。以上の結果から、HCV感染により脂肪滴に局在するようになるRNA結合タンパク質にはHCV産生に対して正負両方の作用を有する分子が含まれることがわかった。

D. 考察

脂肪滴の主要(構造)タンパク質であるADRPは感染細胞脂肪滴画分で相対的に有意に少ないことがわかったが、この結果は

以前我々が行ったHCVコア蛋白質のみを発現した細胞由来の脂肪滴画分での結果(*J. Biochem.* 139, 921, 2006)と同じ傾向を示した。HCVコア蛋白質は脂肪滴に局在することから、感染細胞においても本現象にHCVコア蛋白質の関与が考えられ、脂肪滴の構造・代謝に大きな影響を与えていることが示唆される。

感染細胞特異的に脂肪滴に局在するタンパク質として12種類のタンパク質が同定され、多くのものがRNA代謝に関わるもので興味深い。これらの分子には、HCV産生に対して正負両方の作用を持つものが存在し、HCV RNA複製や粒子形成(HCVゲノムRNAパッケージング)あるいはHCV RNA分解系への関与が想定される。これらメカニズムを明らかにするために、系の構築も含めさらに検討を進めていきたいと考えている。

また、抗体が手に入らなかった6種についてもタグ付き遺伝子コンストラクトを作成するなどしてHCV産生における重要性・感染細胞脂肪滴での機能を検討していきたい。

E. 結論

宿主細胞内でのHCV生活環において、特徴的な脂質構造が重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。本年度はHCV感染培養細胞及び非感染細胞の脂肪滴タンパク質のプロテオーム解析を行い、118種類のタンパク質を同定した。特に、感染細胞特異的に脂肪滴に局在するタンパク質として12種類のタンパク質を同定し

た。興味深いことにその多くが RNA 結合能を有するものであり、HCV 産生に正負両方の作用を有する分子が含まれていた。HCV 生活環を理解する上でこれら分子の役割の違いは大変興味深くさらに詳細に解析していく必要があり、創薬研究に結びつけていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Anne-Sophie Rivier, Guillaume A. Castillon, Laetitia Michon, Masayoshi Fukasawa, Maria Romanova-Michaelides, Nina Jaensch, Kentaro Hanada, Reika Watanabe, Exit of GPI-anchored proteins from the ER differs in yeast and mammalian cells, *Traffic* 11, 1017-33 (2010)

2. 学会発表

1) 深澤 征義、C型肝炎ウイルス感染とタイトジャンクション構成タンパク質、日本薬学会第131年会、静岡、2011.3.28-31

2) Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Jo Chiba, Masayoshi Fukasawa, Isolation of highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in hepatic cell culture system, The 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, USA, 2010.12.11-15

3) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、

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

4) Kyoko Saito, Tetsuro Suzuki, Hideki Aizaki, Kentaro Hanada, Takaji Wakita, Masahiro Nishijima, Masayoshi Fukasawa, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14

5) Isei Tanida, Masayoshi Fukasawa, Takaji Wakita, Kentaro Hanada mTor-signaling pathway and autophagy in *in vitro* naïve HCV-particle infection system, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14

6) Noella M. Arnaud, Stephanie J. Dabo, Patrick Mailard, Agata Budkowska, Katerina I. Kalliampakou, Penelope Mavromara, Dominique Garcin, Jacques Hugon, Anne Gatignol, Fumiko Shinkai-Ouchi, Masayoshi Fukasawa, Daisuke Akazawa, Takaji Wakita, Eliana F. Meurs, Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation, 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Tokyo, 2010.9.10-14

7) Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Masahiro Nishijima, Isolation and

characterization of a mammalian cell mutant defective in lipid droplet biogenesis, FASEB Summer Research Conference, Lipid Droplets: Metabolic Consequences of the Storage of Neutral Lipids, Steamboat, CO, USA, 2010.7.25-30

G. 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

肝がんにおけるマイクロRNA発現変化とアポトーシス耐性

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 准教授

研究要旨：肝がんの40%の症例においてアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白であるBcl-xLの高発現がみられるが、その分子メカニズムは明らかではない。本研究では肝がんにおけるBcl-xLの発現増強にマイクロRNAが関与しているかどうかを検討した。In silico解析においてBcl-xLの発現を抑制する可能性があり、かつHuh7肝がん細胞株に正常肝細胞より発現が低下しているマイクロRNAとして*let7*が抽出された。肝がん細胞株に*let7*をトランスフェクションするとBcl-xLの発現が低下した。レポーター遺伝子の発現実験により*let7*が*bcl-xl*の3'非翻訳領域の遺伝子配列を直接標的としていることが示された。*let7*のトランスフェクションにより肝がん細胞株のスタウロsporin誘導性アポトーシスが促進された。ヒト肝がん試料において*let7*が低発現している肝がん組織ではBcl-xLの発現が亢進していた。肝がんではBcl-xLが高発現するメカニズムとして*let7*マイクロRNAの低発現が関与していることが示された。

共同研究者

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

がんの細胞生物学的な特徴として“無秩序な増殖”と“アポトーシス耐性”をあげることができる。前者はがん遺伝子の活性化などをその分子基盤としており、ソラフェニブなどのoncogenic kinase阻害剤はこれを標的とした薬剤である。一方、後者を標的とした肝がんの分子標的治療剤はいまだ開発されていない。我々はBcl-xLの高発現が肝がんのアポトーシス耐性の分子基盤のひとつであることを報告したが

(Takehara, et al., Hepatology 2001)、

そのメカニズムは明らかにされていない。本研究ではBcl-xLの高発現のメカニズムとしてマイクロRNAによる転写後調節に焦点をあてて、研究を行った。

B. 研究方法

Bcl-xL を標的とする可能性のあるマイクロRNAをmiRandaを用いてin silico解析を行った。Huh7肝がん細胞株とヒト肝細胞のマイクロRNA発現をチップを用いて網羅的に解析した。ルシフェラーゼ発現ベクターの3'非翻訳領域に*bcl-xl mRNA*の3'非翻訳領域を挿入し、マイクロRNA存在下の遺伝子発現を検討した。肝がん切除時のがん部と非がん部20ペアについてマ

マイクロ RNA 発現、Bcl-xL 発現をそれぞれ PCR、ウエスタンブロットで解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料は研究目的での使用に関する同意が得られているものを使用した。

C. 研究結果

In silico 解析により Bcl-xL の翻訳を抑制する可能性のあるマイクロ RNA として 28 種類を抽出した。このなかで正常肝細胞に比し Huh7 で低発現しているマイクロ RNA は *let7* であった。*let7* を肝がん細胞株にトランスフェクションすることにより Bcl-xL の発現は低下した。ルシフェラーゼを用いたレポーター解析により、*let7* は *bcl-xl mRNA* の 3' 非翻訳領域を直接標的としていることが示された。ヒト肝がんの 20 例中 12 例においてがん部は非がん部に比し *let7* が低発現していたが、このような症例では、対照の 8 例に比し、有意に Bcl-xL の発現が亢進していた。

D. 考察

我々は Bcl-xL が肝がんにおいて機能亢進するメカニズムのひとつとして脱アミド化の抑制が関与することを報告したが

(Takehara T, et al., Cancer Res 2003)、発現亢進についてはマイクロ RNA が関与することを明らかにした。

E. 結論

肝がんで Bcl-xL が高発現する分子機序として *let7* マイクロ RNA の低発現が関与

することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol 52: 698-704, 2010.**

2. 学会発表

なし

G. 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

プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索

宇都 浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 講師

研究要旨：我々が肝細胞の酸化ストレスマーカー候補としてプロテオミクスから同定したmanganese superoxide dismutase (MnSOD)の血清濃度と、既知の酸化ストレスマーカーである血清thioredoxin (TRX)の臨床的意義について解析した。MnSODおよびTRXは健常者と比較しC型肝炎ウイルス (HCV) 関連慢性肝疾患やHCV関連肝癌患者血清中では高値であった。しかし、MnSODとTRX濃度は相関せず、MnSODはHCV関連慢性肝疾患の肝予備能と相関し、TRXは血小板数と相関した。一方、HCV関連肝癌では血清MnSODが低い方が、TRXは高い方が予後は良好であり、血清MnSODとTRXは、HCV関連肝癌の予後予測マーカー候補であることを明らかにした。さらに、プロテオミクスによりHCV関連肝癌患者血清中に増加するタンパクとして、CD5 like protein (CD5L)などを同定し、ELISAで測定したCD5Lは、健常者や肝癌の無いHCV関連慢性肝疾患と比較しHCV関連肝癌で最も高く、肝予備能とは相関しなかったが、血小板数と逆相関した。同定したタンパクの肝癌における発現機序の解明や関連する分子を標的とした治療法の創出が今後の課題である。

A. 研究目的

肝疾患、特にC型慢性肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進展には酸化ストレスが関与することから、酸化ストレスの状態を反映するバイオマーカーの臨床的意義は極めて高い。我々は肝細胞の酸化ストレスマーカー候補探索の過程で、プロテオミクスにより manganese superoxide dismutase (MnSOD)が酸化ストレスで発現増加し、血液中にも分泌されることに着目した。また、Thioredoxin (TRX)も肝細胞の酸化ストレスマーカーのひとつで、血中にも分泌されることはすでに知られている。

しかし、C型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝疾患におけるこれら酸化ストレスマーカーの臨床的意義は十分明らかになっていない。

本研究では、MnSODとTRXのHCV関連肝疾患における臨床的意義を明らかにする。また、HCV関連肝疾患患者の血清を用いて、新規のバイオマーカー候補を探索する。本研究により得られた結果や新規に同定した分子の発現解析は慢性肝疾患の病態解明につながり、診断や新しい視点からの治療法を創出できる可能性がある。さらに、簡便な診断法や新しい治療法は慢性肝疾患の早期発見・早期治療に結びつく可能性があり、

医療費抑制への貢献も期待できる。

B. 研究方法

1) MnSOD と TRX の HCV 関連肝疾患患者における臨床的意義の検討

血清 MnSOD 濃度と TRX は ELISA 法で測定し、臨床データや予後との関連を検討する。

2) 新規肝癌マーカーの探索

HCV 関連肝癌もしくは非肝癌患者血清を Proteominor Kit を用いて前処理し、2 次元電気泳動後に比較解析する。さらに、同定したタンパクの血清中濃度を ELISA 法で測定し、その臨床的意義を検討する。

(倫理面への配慮)

患者から血液などの試料を得る場合は、「試料提供者用の説明資料」を作製し、研究の内容や方法等を十分説明した後、研究協力依頼をする。個人の自由意志を尊重し、「同意書」に書面で意思を記載してもらい同意が得られた場合のみ、試料採取等を行う。試料や臨床情報は匿名化し、個人情報保護に努める。解析結果や臨床情報等は厳重に保管し、解析はネットワークから遮断されたコンピュータを用いる。

C. 研究結果

1) ①HCV 関連慢性肝疾患患者では、MnSOD と TRX は相関しなかったが、MnSOD と TRX はいずれも、HCV 関連肝癌、非肝癌、健常者の順で有意に高かった。②HCV 関連肝癌では MnSOD は、AST、LDH と正の相関を示し、ChE とアルブミンと負の相関を示

した。TRX は血小板とのみ正の相関を示した。③HCV 関連肝癌では、MnSOD は、Child-Pugh、肝障害度のスコアが高い方が有意に高値を呈したが、TRX はこれらのスコアと有意な関連はなかった。④MnSOD が 110 ng/ml 以上の症例では、それ以下の症例よりも、累積生存率が有意に低かった ($P=0.01$)。また、TRX が 80ng/ml 未満の症例ではそれ以上の症例よりも累積生存率が低くなる傾向であった ($P=0.05$)。さらに、両者を組み合わせた場合、TRX 80ng/ml 以上であれば MnSOD 値にかかわらず経過良好で、TRX 80ng/ml 未満の場合には MnSOD 110 ng/ml 以上の症例は、それ未満の症例よりも予後不良であった。

2) ①HCV 関連肝癌患者血清と非肝癌患者血清中のタンパクを比較した。PMF 解析により肝癌患者血清で増加していたタンパクの一つが CD5 like protein (CD5L) (別名 AIM もしくは Sp α) であると同定した。②HCV 関連肝癌患者と肝癌のない HCV 関連慢性肝疾患患者血清中の CD5L 濃度を比較すると、HCV 関連肝癌患者で明らかにその濃度が高値であった。また、血清 CD5L 濃度は ALT、アルブミンや腫瘍マーカーなどとは相関しなかったが、血小板と有意に逆相関した。

D. 考察

本研究では、酸化ストレス負荷により初代培養ヒト肝細胞の培養上清中に過剰に分泌されるタンパクとして同定した MnSOD に着目し、検討した。また、MnSOD は抗酸化物質として知られているが、TRX も抗酸化

物質であることから、TRX も合わせて患者血清中濃度を測定し、HCV 関連慢性肝疾患、特に HCV 関連肝癌での臨床的意義を解析した。

原発性胆汁性肝硬変では MnSOD と TRX は相関すると報告されている。一方、我々の検討では、MnSOD と TRX は有意な相関はなかった。また、MnSOD と TRX では関連する臨床データも異なっていた。健常人ではフリーラジカルや活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による酸化ストレスに対しては、酸化還元バランスを保つように、防御機構が存在する。しかし、種々の疾患では ROS が過剰に産生され、細胞内のタンパク質や核酸が変性・障害を受け、細胞内情報伝達や核内転写の変化が、病態の形成と密接に関連するといわれている。我々が対象とした HCV 関連肝癌患者では、HCV 感染、肝線維化、肝細胞機能低下、肝発癌など種々の病態が複合し、原発性胆汁性肝硬変よりも病態はより複雑で、同じ抗酸化物質である MnSOD と TRX が、病態に応じて、異なる調節を受け、両者は HCV 肝癌では相関しなかった可能性が考えられた。

本研究では、MnSOD と TRX は予後と関連することを明らかにし、MnSOD は低い方が、TRX は高い方が予後は良好であった。これは、MnSOD と肝予備能が逆相関すること、TRX は血小板数と正相関することと関連していると考えられたが、肝癌で増加する MnSOD と TRX 濃度が、予後と関連する機序は今後の検討課題である。

本研究では、肝癌のバイオマーカー候補の一つとして、新たに CD5L を同定した。

CD5L が肝硬変で増加することはすでに報告されており、われわれの検討でも CD5L が血小板と逆相関したことは、肝癌の背景肝である肝線維化と関連している可能性は十分考えられた。しかし、肝線維化マーカーとは相関しなかったことから、肝癌における CD5L の発現機序や臨床的意義については、さらに解析が必要である。

E. 結論

MnSOD および TRX は HCV 関連肝癌の診断マーカー候補であるとともに、HCV 関連肝癌の予後予測マーカー候補である。さらに、HCV 関連肝癌患者血清中から同定した CD5L も、HCV 関連肝癌のバイオマーカー候補と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. *J Gastroenterol* 2011 [in press]
- 2) Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. *Proteome Sci* 2010; 8: 70.
- 3) 平峯靖也、今村也寸志、宇都浩文、馬場芳郎、樋脇卓也、庄幸彦、田原憲治、坪内博仁. 高度進行肝細胞癌に対する肝動脈化学療法 of 検討. *日消誌* 2010; 107: 1127-38.
- 4) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida

- Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 2010; 40: 438-45.
- 5) Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45: 459-67.
2. 学会発表
- 1) Tamai T, Uto H, Takami Y, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical significance of serum MnSOD levels in patients with hepatitis C virus (HCV)-related chronic liver disease. The 7th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- 2) Hiramane Y, Uto H, Imamura Y, Tamai T, Baba Y, Hiwaki T, Sho Y, Tahara N, Ido A, Tsubouchi H: A comparative study of sorafenib and hepatic arterial infusion chemotherapy for unresectable advanced hepatocellular. The 7th APASL Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- 3) Kumagai K, Ido A, Takami Y, Sasaki F, Kure K, Tamai T, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H: Association of a genetic polymorphism in osteoactivin with hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. The 7th APASL Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- 4) Kumamoto R, Uto H, Tanoue S, Arima S, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Dietary fructose rather than dietary fat affects liver tumor incidence induced by diethylnitrosamina administration. The 61th liver meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). ボストン, 2010年10月.
- 5) Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H: Alcohol drinking patterns and risk of fatty liver in Japanese men. The 61th liver meeting of AASLD. ボストン, 2010年10月.
- 6) 佐藤悠子, 宇都浩文, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 熊谷公太郎, 最勝寺晶子, 小田耕平, 呉建, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 桶谷眞, 井戸章雄, 中島知明, 岡上武, 坪内博仁: ALTが正常を維持するC型肝炎ウイルス持続感染者の血清プロテオミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会. 浦安市, 2010年7月.

- 7) 宇都浩文. HCV抗体陽性者多発地区における疫学調査から学んだもの. 第46回日本肝臓学会総会 サテライトシンポジウム. 山形市, 2010年6月.

G. 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

Cytokine Array解析を用いたHCVの
PEG-IFN+ribavirin治療効果と関連する宿主因子の同定

前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：我々はC型慢性肝炎に対するPEG-interferon (PEG-IFN)+ribavirin (RBV) 併用療法における治療反応性に関する宿主側因子として、血清中のサイトカインに着目し、Sandwich ELIZA法を用いた網羅的半定量解析により治療反応性と関連のある因子を検討、genotype 1b-HCVにおける治療開始前血清のRANTES、IL-8濃度とPEG-IFN+RBV併用療法の治療反応性について報告してきた。本年度は、両因子においてさらにBeads Array法により精密定量を行い、他の症例群も加えて両因子と治療反応性の関連について検証するとともに、特にRANTESにおいては治療開始前の肝生検検体からサイトカインmRNAの発現レベルをRT-real time PCR法にて解析、一方、RANTESのレセプターであるCCR5について遺伝子解析を行い、治療反応性との関連についてさらなる検討を加えた。

A. 研究目的

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 (PEG-IFN/RBV) 併用療法によって、治療効果は以前に比して格段に上昇している。しかしながら、治療反応性には非常な違いが個々の症例ごとに認められ、正確にかつ簡便に治療反応性を予測できるマーカーの開発が急務となっている。

一方で、治療反応性に関与する宿主側因子の一つとして、IFN α 単独療法において種々のサイトカインと治療反応性の関連が報告されている。しかし、これらの解析は十分に網羅的な解析は行われておらず、結果については十分なコンセンサスが未だ得られていないのが現状である。最新のPEG-

IFN+RBV併用療法での治療反応性とサイトカインに関する報告となると、さらに報告は少なく、その意義も明らかとは言えない。

我々はHCV genotype 1bのPEG-IFN+RBV併用療法の治療反応性に関連する因子としてサイトカインに着目し、Sandwich ELIZA法を用いた網羅的半定量解析により治療反応性と関連のある因子を検討、治療開始前血清のRANTES、IL-8濃度とPEG-IFN+RBV併用療法の治療反応性について報告してきた。本年度は上記についてさらなる検討を加えて検証し、明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

2004年12月から2008年7月の間に治

療を行った HCV genotype 1b・高ウイルス量症例を対象とした。まず 50 症例（症例群 1）の治療開始前血清を用いて網羅的に 36 種類のサイトカインの発現を sandwich ELISA 法により測定し、各サイトカインの ROC 曲線より最適カットオフ値を求め解析した。その結果 SVR 率に有意差が認められた RANTES と IL-8 について、Beads Array 法を用いて精密定量を行い、さらに別の 53 症例（症例群 2）でも検証した。一方、ホルマリン固定された治療開始前の肝生検検体から total RNA を抽出し、RANTES に関して mRNA 発現レベルを RT-real time PCR 法で解析した。一方、RANTES のレセプターである CCR5 の遺伝子多型について genomic DNA を用いた PCR により検討した。

C. 研究結果

症例群1のcytokine解析の結果、IL-8低値群とRANTES高値群でSVR率が有意に高かった（それぞれ $p=0.035$ 、 $p=0.042$ ）。そのうち45症例でIL-8とRANTESの精密定量を行ったところ、やはりIL-8低値群とRANTES高値群でSVR率が有意に高いことを検証した（それぞれ $p=0.016$ 、 $p=0.049$ ）。症例群2で精密定量を行ったところ、IL-8では有意差がなかったが（ $p=0.490$ ）、RANTES高値群はSVR率が有意に高かった（ $p=0.019$ ）。全98症例の結果は、SVR率はIL-8低値群で高い傾向にあり（ $p=0.054$ ）、RANTES高値群では有意に高かった（ $p=0.005$ ）。RANTESは治療抵抗性のウイルス因子を含めた多変量解析においても独立し

た因子として抽出された。また、肝内mRNA発現レベル（45症例で解析）は血清RANTES高値群ではSVR例で低く（ $p=0.08$ ）、血清RANTES低値群ではSVR例で高い（ $p=0.07$ ）という傾向が見られた。一方、RANTESのレセプターであるCCR5にはレセプターの一部が欠損する $\Delta 32$ という多型の存在が知られているが、本検討症例において解析したところ、本症例群において $\Delta 32$ を有する症例は認められなかった。

D. 考察と結論

治療前血清を用いた網羅的サイトカイン発現解析により、HCV genotype 1b における PEG-IFN+RBV 併用療法において、血清 RANTES 濃度が治療反応性と関連する因子であることが明らかとなった。今後はさらに他のウイルス、宿主因子と合わせた解析によって、血清および肝内 RANTES の変動の機序について検討を加えるとともに、その臨床的意義について詳細に明らかにする必要があるものと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Mackawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K,

Izumi N, Mizokami M. J Hepatol. 2010 Sep 19.

2) HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. Enomoto N, Maekawa S. Intervirology. 2010;53(1):66-9.

3) Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Biosystems. 2010 Jan;99(1):70-8.

2. 学会発表

1) Kazuki Komase, Shinya Maekawa, Hiroko Shindo, Makoto Kadokura, Ryota Sueki, Mika Miura, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Sakamoto Minoru, Nobuyuki Enomoto Extensive analysis of Serum Cytokines Associated to The Response in The PEG-IFN+RBV Combination Therapy in Genotype 1b HCV Infection. 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Virus (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.

2) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸。口演：HCV genotype 1b に対するPEG-IFN+ribavirin併用療法症例におけるCytokine 発現の網羅的解析 第46回 日本肝臓学会総会。山形。平成22年5月27日 - 5月28日。

3) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門

倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸。ポスター：Cytokine Array解析を用いたHCVのPEG-IFN+ribavirin治療効果と関連する宿主因子の同定 第14回 日本肝臓学会大会。横浜。平成22年10月13日 - 10月14日。

G. 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

B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染による肝線維化発症メカニズムの解析にあたり、初年度である平成22年度においては、マウスモデルの予備実験として、ヒト肝細胞置換キメラマウス（キメラマウス）のHBV感染における肝傷害と線維化の関係を検討した。キメラマウスに高濃度HBV genotype C（HBV/C, 10^7 copies）を接種し、接種後1週目にはHBV-DNAの複製、その後急激なALTの上昇を認めた。接種3ヶ月後の肝線維化は軽度であったが、活性酸素種の産生が亢進し、肝傷害の発生が示唆された。この結果より、次年度はHBV感染キメラマウスに抗線維化薬物を投与し検討する。

共同研究者

杉山真也、田中靖人

名古屋市立大学大学院医学研究科

A. 研究目的

本研究班において、分担研究者はキメラマウスを用いて、HBVを感染させることで、HBVが肝組織に与える傷害性、特に肝線維化に関して検討している。次年度以降、HBV感染キメラマウスに抗線維化薬物を投与することにより、線維化に寄与する分子種について明らかにする。

我々は既に、キメラマウスにHBVを接種後6ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害が見られることを確認している。本年度は、抗線維化薬物の投与試験にあたり、予備実験としてHBV感染における肝傷害と線維化の関係について感染後3ヶ月間の観察を行った。

B. 研究方法

HBV 感染血清から得られたウイルス（HBV/C）をクローニングしキメラマウスへの感染源とした。HBV/C を 1 匹あたり 10^7 copies 接種し、接種後 1 週目から週ごとに血清中のヒトアルブミン値、ウイルス量、ALT 値を測定した。接種 3 ヶ月後に解剖し、採取した肝臓の組織像を病理学的に解析した。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

HBV 接種後 1 週目にはキメラマウス血清

中の HBV-DNA は 10^5 copies 以上となり、1 ヶ月後には 10^9 copies まで達し、その後急激な ALT 値の上昇を認めた。接種 3 ヶ月後に解剖し、採取した肝臓の連続切片を用いて肝組織像を解析したところ、肝細胞の傷害像が観察され軽度の線維化 (stage F1) を認めた。また、活性酸素種の産生が亢進しており、感染 3 ヶ月での肝傷害の発生が考えられた。

D. 考察

キメラマウスに HBV/C を感染させることにより、ウイルス複製の増加とそれに続く肝傷害の惹起が示された。

我々はキメラマウスにおいて HBV/C (10^5 copies) 感染後 6 ヶ月での肝線維化を確認しているが、今回の予備実験では接種ウイルス量を 10^7 copies に増量し短期間での線維化進行を試みた。その結果、感染初期からウイルスの複製量が高く、 10^5 copies 接種時と比較して早期に感染が成立した。さらに、ALT 値の上昇および活性酸素種の産生亢進から肝傷害も早期に発生することが示唆された。しかしながら感染後 3 ヶ月の肝組織像において線維化は軽度であったことから、感染時のウイルス量は線維化の進展の早さとの関係がないことが考えられる。

E. 結論

HBV 感染による肝線維化には、感染時のウイルス量よりも、感染に起因する肝傷害の期間が影響することが示された。したがって、次年度より HBV 感染マウスモデルを

用いた抗線維化薬物の投与試験においては HBV 感染後 6 ヶ月間での検討を行うこととする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sa-nguanmoo P, Tanaka Y, Sugiyama M, Murakami S et al. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. 投稿中

2. 学会発表

1) 杉山真也, 田中靖人, 本多政夫, 中西真, 溝上雅史. ヒト肝細胞置換キメラマウスでの HBV 感染による酸化傷害と線維化. 第46回日本肝臓学会総会. 平成22年 5月27日—28日. 山形. WS7-11.

G. 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

特になし