

201125009A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成24（2012）年 3月



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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成24（2012）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	
HCV NS3蛋白質二次構造多型性と肝細胞がん発生の関連についての臨床研究	17
斎藤貴史	
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	21
丸澤宏之	
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	26
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	31
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	34
有海康雄	
HCVコア領域の変異がウイルスのライフサイクルに与える影響の解析	39
加藤孝宣	
C型肝炎による脂質代謝と肝発癌	44
小池和彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	63

## 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 蛋白質発現 Tg マウスの肝組織では、p53 がん抑制蛋白質ファミリーの一員である p73 のがん化関連アイソフォームである  $\Delta$ Np73 の発現が亢進していること、及び NS3 Tg 由来のマウス胎児線維芽細胞（MEF）や NS3 発現 Huh-7.5 細胞をシスプラチンで処理すると、NS3 蛋白質を発現しない対照細胞に比べて、 $\Delta$ Np73 発現が増強することを明らかにした。2) HCV 感染者の疫学調査により、NS3 蛋白質アミノ末端 120 残基の多型性が、C 型慢性肝炎におけるインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果や発がんリスクと関連性を有する可能性を明らかにした。3) HCV 感染患者の肝組織では、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、この遺伝子編集酵素のもつ genotoxic な作用により、肝細胞中の発がん関連遺伝子にさまざまな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を明らかにした。4) ヒト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、細胞死抵抗性を担う候補責任分子の一つとして Nucleophosmin を同定した。5) HCV コア蛋白質と結合する宿主因子としてホスホピルビン酸ヒドラターゼを同定した。また、PA28 $\gamma$  結合因子としてポリコム複合体蛋白質を同定し、PA28 $\gamma$  およびコア蛋白質の有無によって細胞増殖能及び DNA 修復能が大きく影響されることを明らかにした。6) HCV 感染により stress granule の形成が誘導され、stress granule 因子はリング状の構造体を形成し、HCV コア蛋白質と共局在することを明らかにし、これらが HCV の生活環に必要な宿主因子であることを示した。7) HCV コア蛋白質変異（Core-Q70）により細胞内での感染性ウイルス粒子の生成能が低下し、その結果、HCV 蛋白質が細胞内に蓄積することを明らかにした。8) C 型慢性肝炎における一価不飽和脂肪酸の増加は HCV コア蛋白質による desaturase 活性の増加によること、及びその活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることを明らかにした。

研究分担者

斎藤 貴史 山形大学医学部 准教授

丸澤 宏之 京都大学医学研究科 講師

佐々木 裕 熊本大学生命科学研究部 教授

森石 恆司 山梨大学医学部 教授  
有海 康雄 熊本大学エイズ学研究センター  
准教授  
加藤 孝宣 国立感染症研究所 室長  
小池 和彦 東京大学医学部 教授

## A. 研究目的

我が国には現在約150万人のC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が存在し、毎年多くの者が肝硬変、肝がんを発症している。現在臨床で用いられている最良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。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）を合わせて年間3万数千人の肝がん死亡がみられる。その原因の80%近くを占めるC型肝炎は感染者総数と死亡者数の両面から重要な疾患である。また、HBV持続感染者も約100万人いると推定され、我が国の肝がん発症の約15%を占めている。HCVやHBVの発がん機序は未だ不明な点が多い。従って、これらの肝炎ウイルスによる肝発がんの分子機構の解明を通して、HCV及びHBV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による発がんにはコア蛋白質が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、発がん分子機序について様々な解析が進められている。一方、アデノウイルスや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、HCV発がんには複数のウイルス蛋白質が関与することが考えられ、なかでもNS3蛋白質の関与の可能性が指摘されている。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蛋白質がアポトーシスを阻害すること、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蛋白質発現により細胞の酸化ストレスが増強し、宿主染色体遺伝子の断裂と修復の過程で遺伝子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。我々は昨年度の本研究において、NS3蛋白質を発現するTgマウスが肝がんを発症することを報告した。このTgマウスはNS3による発がん分子機序を解明するためのツールとして有用であると考えられる。

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。

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、HBV複製増殖系、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、及び肝がん発症の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 NS3 蛋白質発現 Tg マウスにおける発がんの解析：我々の研究室で開発した HCV-1b の 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する Tg マウスと対照 Non-Tg マウス及びそれ由来の肝組織、胎児線維芽細胞 (MEF) 並びに NS3 発現 Huh7.5 細胞等を用いて、NS3 蛋白質と宿主因子（とくに発がん関連遺伝子産物並びにがん抑制遺伝子産物）との相互作用について、DNA マイクロアレイ解析、プロテオーム解析、ウエスタンブロット解析等により検討した。

(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：HCV-1b 型感染で高ウイルス量 (100 KIU/ml 以上) の C 型慢性肝炎症例を対象とした。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、GENETYX Ver.10.1 を用いて Robson 法により二次構造を決定した。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 に分類した (Ogata S, Hotta H, et al. J Clin Microbiol 2003; 41: 2835-41)。本患者コホートにおいて、HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性と発がんリスクとの関連性について、前向き検討を行った。発がん検討症例の観察期間は Peg インターフェロン (IFN) / リバビリン (RBV) 併用治療開始から肝がん発生時 (発がん症例)、または 2011 年 11 月までの最終受診日 (非発がん症例) とした。平均観察期間は  $5.9 \pm 1.2$  年である。

(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：遺伝子異常の解析には最新の大量並列シーケンス・テクノロジーを活用した。この次世代シーケンサーにより、従来の方法では得ることができなかった飛躍的な遺伝子情報量を解析することが可能とな

った。また、ゲノムから全エクソン領域のみを選択的に抽出する exon capture technology を併用することにより、アミノ酸に翻訳される遺伝子配列をコードする全ゲノム領域を選択的に効率よく解析することを実現した。この技術を用いて、(i) HCV 感染により肝細胞中の発がん関連遺伝子に惹起されているゲノム異常を明らかにする目的で、肝がん発生前の肝硬変組織から DNA を抽出し、発がん関連遺伝子の deep sequencing 解析、(ii) ヒト肝組織から抽出した DNA サンプルから全エクソン領域のみを選択的に capture した whole exome sequencing 解析を行った。

(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：肝細胞癌株 HepG2 及び Huh7 細胞を酸化ストレス ( $H_2O_2$ ) 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 細胞を用いた。プロテオーム解析のために cell lysate を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた 2 次元ディフュージョン電気泳動を行って、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 を抽出して 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を絞り込んだ。本年度は候補分子の一つとして nucleophosmin (NPM) に注目し、siRNA あるいは NPM 過剰発現肝がん細胞株を用いて、NPM のがん細胞の生物学的特性における役割を解析した。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 $\gamma$  に関する解析：Clontech Matchmaker 3 システムを用いて、

PA28 $\gamma$ を囚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。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。また、既に作成しているコア発現 (CoreTg) マウス、PA28 $\gamma$ ノックアウト (PA28 $\gamma$  KO) マウス、PA28 $\gamma$  KO-CoreTg マウスに CCl<sub>4</sub> を投与し、6~12 時間後の肝臓の組織切片を作製し、HE 染色および免疫染色により解析した。

(6) HCV 感染による Stress granule 形成の観察と Stress granule 因子の HCV 生活環における役割の検討：ヒト肝がん細胞株 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 stress granule 因子 G3BP1、Ataxin2、そして poly(A)-binding protein 1 (PABP1) の局在変化を経時的に観察した。細胞を固定後、抗 HCV Core 抗体および抗 G3BP1 抗体、抗 Ataxin2 抗体あるいは抗 PABP1 抗体で処理後、Core は Cy3 により、G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 は FITC により可視化した。さらに、外来的なストレスに対する評価系として、HCV 感染細胞の培養温度を 42°C にシフトさせ 30 分間培養した。また、HCV 感染細胞を 0.5mM 亜ヒ酸ナトリウムで 30 分間処理した。

また、G3BP1、Ataxin2 及び PABP1 に対する siRNA を RSc 細胞にトランスフェクションして各々の stress granule 因子をノックダウンさせた細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、感染 24 時間後の感染細胞内の HCV RNA 複製レベルをリアルタイム RT-PCR 法にて定量した。

(7) HCV コア蛋白質のアミノ酸変異が HCV の培養細胞中での増殖と IFN 感受性に与える

影響の解析：HCV-1b 株 (TH 株) のコア領域から NS2 領域途中までの遺伝子配列を、HCV-2a である JFH-1 株の該当する部分と置換することにより、HCV-1b 株/2a 株キメラウイルスのコンストラクトを作製した。このキメラウイルスのコア領域は HCV-1b の TH 株由来であり、aa70、aa91 のアミノ酸は RM であったが、変異を導入することにより RL、QM、QL のアミノ酸を持つコンストラクトも作製した。これらを Huh-7.5.1 細胞に導入することによりウイルスの増殖を評価した。増殖の評価は、培養上清と細胞内のコア抗原量を測定により行った。

さらに、HCV のレセプターである CD81 が発現していない Huh7-25 細胞を用いて HCV ライフサイクル各過程の効率を評価した。すなわち、細胞内でのコア抗原量でキメラウイルスの細胞内での複製を、コア抗原量に対する感染力価の比 (Specific Infectivity) により感染性ウイルス粒子の形成効率を評価した。

さらにキメラウイルスの感染が細胞周期に与える影響を評価するため、キメラウイルス全長 RNA を導入した細胞及び非感染細胞に EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を添加して培養した。その後、HCV 蛋白質を抗 HCV 抗体で、DNA を 7-AAD でそれぞれ染色し、FACS により細胞周期の分布を解析した。

(8) HCV コア蛋白質が細胞の脂質代謝に及ぼす影響の解析：HCV コア遺伝子を導入した HepG2 細胞である Hep39 細胞と対照である Hepswx 細胞、及び JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いて、以下のような解析を行なった。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメEDIUM に溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後に細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂肪酸はガスクロマトグラフィーによって解析した。eicosatetraynoic acid、eicosatetraynoic acid (EPA)、arachidonic acid (AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

肝発がんモデルマウスである PIK3CA Tg マ



ウス (PI3K の catalytic subunit である p110 $\alpha$  をアルブミンプロモーターの制御に発現させたもの) を用いて解析を行なった。

#### (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

### 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 HCV 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。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 10% 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。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がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の絞り込みを行った。その結果、p53 がん抑制蛋白質ファミリーの一員である p73 及びそのがん化関連アイソフォームである  $\Delta$ Np73 の関与の可能性が示唆された。そこで、NS3 Tg マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) 及び NS3 発現 Huh-7.5 細胞を用いた培養細胞レベルの検討を行った。NS3 Tg マウス由来の MEF 及び NS3 発現 Huh-7.5 細胞をシスプラチンで処理すると、p53 がん抑制蛋白質ファミリーの一員である p73 のがん化関連アイソフォームである  $\Delta$ Np73 が、NS3 蛋白質を発現しない対照細胞に比べて、強く誘導されることを明らかにした。

(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：(i) 対象者の性別は男性 81 名 (59%)、女性 51 名 (41%)、平均年齢は  $56.6 \pm 8.8$  歳。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%)、混合型 3 例 (7%) 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、性、年齢、ALT、HCV RNA、線維化ステージに有意差はなかった。(ii) PegIFN/RBV 併用療法症例における前向き肝がん累積発生率は、12 カ月時点で 0.008 人、36 カ月時点で 0.031 人、60 カ月時点で 0.073

人であった。(iii) 発がん者の HCV NS3 グループ分類は、グループ A が 1/43 例 (2.3%)、グループ B が 5/71 例 (7.4%)、グループ C が 3/15 (20.0%) 例、混合型 0/3 例であり ( $p=0.075$ )、発がんまでの観察期間はグループ A が  $6.1 \pm 1.0$  年、グループ B が  $5.8 \pm 1.5$  年、グループ C が  $5.3 \pm 1.7$  年であった。HCV NS3 グループ別の肝がん累積発生率はグループ C > B > A ( $p=0.06$ , Log rank test) であり、発がん症例 8 例中 7 例は PegIFN/RBV 併用療法のウイルス学的無効例であった。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 に比し、発がんリスクが低い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：ヒト肝組織より DNA を抽出し、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、ゲノムアナライザー II X (イルミナ社) での解析に必要なアダプター配列タグの付加を行った。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、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確認された。

HCV 感染を伴う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、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、HCV 感染を伴った肝硬変組織では、肝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。特に、HCV 感染を伴った肝硬変組織では、TP53 遺伝子への変異が高頻度に蓄積していることが確認された。肝硬変組織に潜在していた TP53 遺伝子への変異の多くは、

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しており、発がんに関連した遺伝子変異が含まれている可能性が強く示唆された。

HCV 感染による慢性肝疾患を背景として肝がんを発生した 4 例について、肝硬変組織、がん組織 (計 7 結節) から全エクソン領域を抽出し、whole exome sequencing を行った。肝硬変組織で平均 31.9 coverage、肝がん組織で平均 40.2 coverage の塩基 read 数を達成することができた。この中で、2 つ以上の肝がん組織で共通して生じている遺伝子変異が合計約 10 ヶ所同定されるとともに、がん部・非がん部で共通して変異を蓄積している遺伝子を約 15 個、特定することができた。これらの遺伝子のいくつかは、AID を持続発現した培養肝細胞や AID transgenic mice 肝組織において変異が生じていたものと同一であることが判明した。

(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：細胞死抵抗性を担う責任分子として Nucleophosmin (NPM) に注目して解析を行った。実際に 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示唆された。NPM は核小体に豊富に存在する 37kDa のリン酸化蛋白質で、細胞周期関連分子 (p21, p53) の抑制を介する細胞増殖の亢進、p53 の活性化を抑えアポトーシスの抑制、がん細胞に高発現し、がん遺伝子としての作用等が報告されている。そこで HepG2 細胞に siRNA を導入して NPM の発現を抑制すると、細胞死刺激である  $H_2O_2$  に対する抵抗性が減弱した。次に内因性の NPM の発現が低い肝がん細胞株 Hep3B 細胞を見出し、ヒト NPM 発現ベクターを導入することで NPM 強制発現 Hep3B 細胞株 (以下 Hep3B-NPM) を樹立した。細胞死刺激として肝がんの分子標的治療薬である sorafenib にて刺激すると、Hep3B-NPM 細胞では NPM のリン酸化が抑制され、生細胞数が減少した。一

方、Hep3B-NPM 細胞は親株 Hep3B 細胞に比べて増殖が早く、NPM が細胞増殖にも関与していることが確認された。そこで Hep3B 細胞と Hep3B-NPM 細胞を NOD/SKID マウスの皮下に注射すると、40 日後、親株である Hep3B 細胞に比べて、Hep3B-NPM 細胞は有意に大きな腫瘍塊を形成した。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 $\gamma$  に関する解析：PA28 $\gamma$  を胞蛋白質としてヒト肝臓ライブラリから三種類の遺伝子を単離した。肺がんマーカー蛋白遺伝子とポリコム遺伝子は、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を行ったが、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。ユビキチン化ヒストンの細胞内局在は通常細胞核内に局限して認められ、PA28 $\gamma$  ノックダウンによって核周囲に多く認められた。また、遺伝子改変マウスに CCl<sub>4</sub> を投与し、6 および 12 時間後の肝障害を観察したとき、PA28 $\gamma$  KO、PA28 $\gamma$  KO-CoreTg と CoreTg マウスで障害が強く認められた。また、PCNA 免疫染色では、Wild type と CoreTg マウスで強く染色され、細胞増殖誘導能が強く促進されており、Wild type マウス以外で、DNA 修復は減弱していた。

(6) HCV 感染による Stress granule 形成の観察と Stress granule 因子の HCV 生活環における役割の検討：HCV 非感染細胞においては、stress granule 因子である G3BP1、Ataxin2 として PABP1 は細胞質に散在していたが、HCV 感染 36 時間後に stress granule の形成が観察

された。さらに、感染 48 時間後にはリング状の構造体を形成し、HCV コア蛋白質と共局在が観察された。このリング状構造体の中心は脂肪滴であり、HCV 感染に伴い、stress granule 因子が脂肪滴にリクルートされることが明らかとなった。昨年、我々は P-body 因子である DDX6 も HCV 感染後リング状構造を形成し、HCV コア蛋白質と共局在することを報告したので、DDX6 が G3BP1 や Ataxin2 と共局在するのか検討を行った。その結果、DDX6 は G3BP1 や Ataxin2 とリングを形成し共局在することを見出した。一方、細胞の培養温度を 42°C にシフトし 30 分間培養すると HCV 非感染細胞では stress granule の誘導が見られたが、HCV 感染細胞（感染 72 時間）では、42°C で培養してもリング構造を維持し、HCV コア蛋白質と共局在したままで顕著な局在の変化が見られなかった。同様に細胞を 0.5mM 亜硝酸ナトリウムで 30 分間処理しても非感染細胞では stress granule の誘導が見られたが、HCV 感染細胞ではリング構造を維持したままで顕著な局在の変化は観察されなかった。

一方、siRNA を用いて G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させると、感染 24 時間後の細胞内 HCV RNA 量はコントロール細胞に比べて顕著に減少した。

(7) HCV コア蛋白質のアミノ酸変異が HCV の培養細胞中での増殖と IFN 感受性に与える影響の解析：HCV コア蛋白質アミノ酸変異を持つキメラウイルスの RNA を Huh-7.5.1 細胞に導入し、コア抗原量を測定した。その結果、aa70 が R の株の培養上清中コア抗原量は、aa70 が Q の株の約 10 倍高値であることが明らかになった。一方、培養細胞内のコア抗原量には大きな差を認めなかった。そこで Huh7-25 細胞を用いて詳細に検討したところ、細胞内のコア抗原量は aa70 が Q の株で高くこれらの変異がキメラウイルスの細胞内での複製に関与

していると考えられた。また感染力価を比較したところ、aa70がQの株では培養細胞内、上清中とも感染力価が低く、感染性ウイルス粒子生成効率を示す Specific Infectivity 値も低値であった。

次に、これらコア蛋白質の変異を持ったキメラウイルスの培養細胞での感染の広がりをFACSを用いて解析した。その結果、aa70がRのキメラウイルスではHCV陽性細胞の比率や、細胞内でのHCV蛋白質量を表すMFI値は、遺伝子導入後3日目まで大きな変化を認めなかった。しかし、aa70がQのキメラウイルスでは遺伝子導入後、経過とともに徐々にHCV陽性細胞の比率が低下していたが、MFI値は逆に徐々に高くなっていった。

さらに、これらのコア蛋白質アミノ酸変異を持ったキメラウイルスの感染が細胞周期に与える影響も解析した。その結果、キメラウイルスの感染細胞は非感染細胞に比べS期の細胞の割合が減少し、G0/G1期、G2/M期の細胞の割合が増加していた。aa70がQのキメラウイルスでは、Rのものと比較してさらにS期の細胞が現象しており、G0/G1期、G2/M期の細胞が多くなっていた。

(8) HCV コア蛋白質が細胞の脂質代謝に及ぼす影響の解析：HCV コア蛋白質発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた。一価不飽和脂肪酸（オレイン酸、cis-ヴァクセン酸、パルミトオレイン酸）の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 $\delta$ -9、 $\delta$ -6、 $\delta$ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20 : 3(n-9))不飽和脂肪酸が増加していた。なお、 $\delta$ -6 活性の上昇は HepG2 細胞において内因性に存在することが明らかになった。 $\delta$ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraynoic acid (ETYA)によってコア蛋白発現細胞のみで 18 : 1(n-9)が著

増した。この結果から、コア蛋白発現 HepG2 細胞においても  $\delta$ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。多価不飽和脂肪酸である EPA や AA によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種はいずれの細胞でも減少しなかった。

コア蛋白質発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 $\delta$ -9 desaturase の発現が増加していたが、SREBP-1b、SREBP-2 の発現は増加していなかった。

JFH-1増殖 Huh7細胞においても感染4日目の時点で細胞内に中性脂肪が有意に増加することがわかった。

PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase)の catalytic subunitである p110 $\alpha$ をアルブミンプロモーターの制御に発現させた PIK3CA 発現 Tg マウス肝においては PI3K/AKT 経路が活性化されていた。このマウスは肝重量の増加を示し、組織学的検討によって肝脂肪化を呈することが示された。PIK3CA Tg マウスでは PPAR $\gamma$ 、aP2 遺伝子発現が活性化しており中性脂肪の合成が増加して肝脂肪化に至ると考えられた。蓄積した脂肪にはオレイン酸(C18:1)の著明な増加が認められた。このマウスでは肝線維化は生じないが、12か月齢以降に肝腫瘍を高率に発生した。この肝腫瘍においては Pten、Arid5b、Xpo4、Dlc1 などのがん抑制遺伝子の発現が低下していた。蓄積したオレイン酸と肝腫瘍発生の関連性を探るため、不死化肝細胞を用いた検討を行なったところ、オレイン酸は Pten、Arid5b、Xpo4、Dlc1 などのがん抑制遺伝子の発現を低下させること、不死化肝細胞の腫瘍形成性能を増強することが明らかになった。すなわち、肝における一価不飽和脂肪酸、特にオレイン酸の増加は、肝腫瘍発生において有利に作用し、肝がん発生に関与していると考えられた。



## D. 考察

### 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。

上記の Tg マウス系を用いて、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、変化を示す遺伝子、蛋白質を解析することで、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することを試みた。その結果、NS3 Tg マウスの肝組織では、p53 がん抑制蛋白質ファミリーの一員である p73 遺伝子の発現が変化していることが示され、p73 のがん化関連アイソフォームである  $\Delta$ Np73 の発現が増強していることがわかった。また、NS3 Tg マウス由来の MEF 及び NS3 発現 Huh-7.5 細胞をシスプラチンで処理すると、NS3 蛋白質を発現しない対照細胞に比べて、 $\Delta$ Np73 が強く誘導されることがわかった。今後は  $\Delta$ Np73 の肝がん発症における分子機序や臨床的意義についてより詳細に解析を進めると共に、DNA マイクロアレイ解析やプロテオーム解析により見出された  $\Delta$ Np73 以外の分子についても、発がんへの関与を検討する必要があると考えている。

(2) HCV NS3 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：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。我々は、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を前向きに検討し、グループ B 感染症例では、非 B 感染症例に比し、PegIFN/RBV 併用療法の抗ウイルス学的効果が劣ることを報告した。また本多型性と発がんとの関連性について後ろ向きに臨床例の検討を行い、グループ A 感染症例では非 A 感染症例に比し、発がんリスクが低い可能性があることを報告した。今回の研究にて、PegIFN/RBV 併用療法を行った患者コホートを用いて、本多型性と発がんの関連性について前向きに検討を行った結果、前述の後ろ向き研究と同様に、グループ A 感染症例は非 A 感染症例に比較して発がんリスクが低い可能性が示唆されたが、統計学的有意差を得るまでには至らなかった。わが国における肝がんは 65 歳以降に多い傾向にあるが、本コホートにおける患者年齢の平均値は、56.6 歳と若く、引き続き本コホート研究を継続していくことで、明確な結論が得られる可能性があるものと思われる。

HCV NS3 蛋白質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。NS3 蛋白質は、宿主 p53 がん抑制蛋白質と結合し p53 依存性アポトーシスや p21 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 蛋白質は、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、NS3 蛋白質の構造上の差異が、細胞内で宿主側蛋白質との相互作用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も推し進めていく必要がある。

(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

においても高頻度に発がん関連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 whole exome sequencing ならびに発がん関連遺伝子の deep sequencing から明らかとなった。これらの遺伝子変異中、遺伝子編集酵素ファミリー分子である AID による作用であることが示唆される変化が多数含まれていることが確認された。

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 AID 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：肝がん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、その制御は予後不良な肝がんの治療成績の向上に直結すると考えられる。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を絞りこみ、今年度は NPM の役割を中心に検討した。

肝がん細胞株における検討では、siRNA により NPM の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、細胞死が増強することが確認された。しかしながらこの結果からは、NPM 発現そのものか、あるいは NPM のリン酸化が細胞死抵抗性を担うかが明らかではない。そこで NPM 強制発現系である Hep3B-NPM 細胞株を作成し、細胞内のリン酸化の抑制に働く分子標的治療薬 sorafenib にて刺激すると、Hep3B-NPM 細胞では NPM のリン酸化が抑制され、生細胞数が減少した。このことから、NPM のリン酸化の重要性が示唆された。一方、Hep3B-NPM 細胞では、細胞増殖

が *in vitro*、*in vivo* でも亢進しており、NPM が細胞死抵抗性のみならず細胞増殖にも関連している可能性が示唆された。

このように NPM は細胞死抵抗性、細胞増殖というがん細胞の重要な生物学的特性に関与する可能性が示されたが、どのような条件下でそれぞれの特性を担うかは不明である。今後、NPM の発現、リン酸化の制御機構を解析し、がん細胞の生物学的特性における重要性を明らかにし、治療標的になりうるか否かを検討する必要がある。また、ヒト肝がん組織において NPM の発現ならびにリン酸化が有意に亢進していることを明らかにしているが、今後 Laser microdissection を用いて、NPM が肝がん細胞そのものに特異的に発現しているか、それとも間葉系細胞が NPM の発現を担うかを解析していく。加えて、細胞死刺激にてリン酸化が変化したその他の複数の蛋白質についても、同様な機能解析を行い、それらの分子間での細胞死抵抗性における階層性を明らかにしていく予定である。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 $\gamma$  に関する解析：PA28 $\gamma$  を囚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 $\gamma$  遺伝子自身が単離されてきた。PA28 $\gamma$  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。また、PA28 $\gamma$  によって単離されてきた宿主遺伝子産物ポリコム複合体蛋白質 (RING1/2) 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。CCl<sub>4</sub> 投与による肝障害モデルで、Wild type は DNA 修復および細胞増殖誘導能の促進が認められたのに対してそれ以外のマウスでは DNA 修復能は低下し

ていた。しかしながら、CoreTg マウスのみ細胞増殖誘導能が上昇しており、PA28 $\gamma$ によってそれがキャンセルされたことから、コア蛋白質による発がんは PA28 $\gamma$ 機能が関与していることが示唆された。

(6) HCV 感染による Stress granule 形成の観察と Stress granule 因子の HCV 生活環における役割の検討：Stress granule 因子は、ポリオウイルスや HIV など多くのウイルスの標的となり、ウイルス感染により stress granule の形成が誘導されること、逆に stress granule の形成が阻害されることが知られている。本研究により、HCV 感染の場合、感染 36 時間後に stress granule が形成されることを見出した。昨年、我々は stress granule のみならず HCV 感染に伴い DDX6 や Ago2 などの P-body 因子もリング状構造体を形成し、HCV コア蛋白質と共存することを報告している。興味深いことに P-body 因子である DDX6 も HCV 感染 36 時間後に P-body 形成が阻害され始める。HCV 感染に伴い stress granule 因子と P-body 因子の動態が連動していることが示唆された。

G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 をノックダウンすると感染細胞内の HCV RNA の複製レベルが顕著に減少することを見出したので、これら stress granule 因子が HCV の生活環にも必要な宿主因子であることが明らかとなった。しかしながら、HCV RNA ゲノムは 3'poly(A)構造を保持しないので、PABP1 がどのようなメカニズムで HCV 複製に関与するのか解明する必要がある。

HCV の慢性的な持続感染により、宿主細胞内にストレス応答が生じ、このストレスに伴う stress granule 因子の脂肪滴への集積が HCV 生活環への関与のみならず、細胞がん化と何らかの因果関係のあることが示唆される。

(7) HCV コア蛋白質のアミノ酸変異が HCV の培養細胞中での増殖と IFN 感受性に与える

影響の解析：HCV による肝発がんに関与すると考えられるコア蛋白質のアミノ酸変異が HCV のライフサイクルに与える影響を、HCV-1b/2a のキメラウイルスを用いて明らかにした。コア蛋白質の aa70、aa91 の変異導入により、細胞内のコア抗原量には明らかな差を認めなかったが、70 番の変異株である QM、QL では RL、RM の株と比較して培養上清中のコア抗原量が 10 分の 1 に低下した。また、Huh7-25 細胞を用いた解析でも aa70 の変異株である QM、QL では RL、RM と比較すると、細胞内と上清中の感染力価が低く、Specific Infectivity 値も低いことから、aa70 の変異株では感染性ウイルス粒子の生成効率が著しく低下していると考えられた。

これらのキメラウイルスの感染細胞数の推移を FACS を用いて解析したところ、aa70 変異株である QM、QL では HCV 陽性細胞の存在比は経時的に低下したが、HCV 蛋白質の染色シグナルは増加しており、HCV 蛋白質が細胞内に蓄積していると考えられた。さらに、これらのキメラウイルスの感染細胞で細胞周期の比率を検討したところ、aa70 変異株である QM、QL の感染細胞では、RL、RM の感染細胞と比較し G0/G1 期、G2/M 期の細胞が多くなっており、より多くの細胞で細胞周期が停止していることが明らかとなり、この細胞周期に与える影響は細胞内への HCV 蛋白質の蓄積と併に HCV 感染に伴う肝発がんに関与していると考えられた。

(8) HCV コア蛋白質が細胞の脂質代謝に及ぼす影響の解析：HCV 感染における肝発がんの機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白質は動物モデルにおいて肝がんを発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発がんでも重要な役割を果たしていることが示されている。この肝発がんの過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発がんへの関わりが想定されている。

C型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の $\beta$ 酸化の阻害等が明らかになってきている。C型肝炎における肝脂肪化では、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回の我々の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加は HCV コア蛋白質による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。また、SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 $\delta$ -9 desaturase といった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコア蛋白質によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることも重要な所見である。

更に、C型肝炎において増加している C18 モノエン酸であるオレイン酸の肝発がんにおける意義を探るため、肝発がんモデルマウスである PIK3CA Tg マウスを用いて解析を行なった。PIK3CA Tg マウス肝ではオレイン酸を中心とする脂質増加を経て肝腫瘍を発生した。オレイン酸は不死化肝細胞の造腫瘍性を増強した。C型肝炎ウイルスがもたらす脂質代謝異常は、肝における腫瘍形成を増強する作用をもたらすものと考えられた。

## 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 10%の個体に孤発性の高分化～中分化型肝細胞がんを発症した。肝がん発症の分子機序の一つとして、p53 がん抑制蛋白質ファミリーの一員である p73 遺伝子のがん化関連アイソフォームである  $\Delta$ Np73 の発現亢進が関与している可能性が示唆された。この NS3 Tg マウスは、肝がんや悪性リンパ腫

の発がん分子機序の解明に有用である。

(2) HCV NS3 蛋白質アミノ末端 120 残基の二次構造の多型性が、C型慢性肝炎における発がんリスクと関連性を有する可能性が示唆された。

(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 AID が肝細胞に発現誘導され、この遺伝子編集酵素の 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) PA28 $\gamma$  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。本研究により、コア蛋白質発現による細胞増殖能上昇および DNA 修復能低下が PA28 $\gamma$  ノックアウトでキャンセルされた。このことは、C型肝炎による肝発がん分子機構を考える上にも重要な情報であり、より有効な治療法を考えるためにも有用である。

(6) HCV 感染により、感染 36 時間後に宿主細胞内に stress granule の形成が誘導された。感染 48 時間以降、stress granule 因子はリング状の構造体を形成し、HCV コア蛋白質と共局在した。また、P-body 因子である DDX6 と共局在すること、そしてこのリング状構造体の中心が脂肪滴であることが判明した。一方、外来的なストレス（熱ショックや亜硫酸ナトリウム処理）に対して、HCV 感染細胞内に新規な stress granule の形成が誘導されなかった。



stress granule 因子は HCV の生活環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 aa70 の変異により細胞内での感染性ウイルス粒子の生成能が低下し、その結果として HCV 蛋白質が細胞内に蓄積することが明らかになった。この細胞内への HCV 蛋白質の蓄積が肝発がんに関与している可能性が考えられた。

(8) C 型慢性肝炎における一価不飽和脂肪酸の増加は HCV コア蛋白質による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。肝における一価不飽和脂肪酸、特にオレイン酸の増加は、肝腫瘍発生において有利に作用し、肝がん発生に関与していることが示唆された。

## 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. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes Hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol*, 85(17): 8556-8568, 2011.
2. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol Immunol*, 55(11): 774-782, 2011.
3. 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*, 55(6): 418-426, 2011.
4. 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*, 55(1): 1-11, 2012.
5. Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Nakajima T, Ando K, Fukuda K, Otono Y, Kim KI, Ohtani A, Sugimoto K, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hotta H, Maekawa Y, Hayashi Y, Kudo M. Correlation between insulin resistance and outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy, hepatic steatosis, hepatic fibrosis in chronic hepatitis C-1b and high viral load. *Digestion*, 84 Suppl 1: 5-9. 2011.
6. Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Kim KI, Sasase N, Kimura N, Sasatani K, Konishi E, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, El-Shamy A, Tanaka Y, Sugano M, Sakashita M, Nakamura A, Tsuchida S, Makino T, Kawada T, Nakajima T, Morikawa T, Muramatsu A, Kasugai H, Hotta H, Kudo M. Double-filtration plasmapheresis plus interferon- $\beta$  for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy. *Digestion*, 84 Suppl 1: 10-16. 2011.
7. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H,

- Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J Med Virol*, 84(2): 229-234. 2012.
8. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5. 2012.
  9. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect*, 14(1): 69-78. 2012.
  10. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2); e30513. 2012.
  11. Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will there be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology*, 141(1), e1-5, 2011.
  12. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 2012. (in press)
  13. 勝二郁夫, El-Shamy A, 堀田博. NS5A-IRRDR変異数. *医学のあゆみ*, 239 (12-13): 1208-1211, 2011.
  14. 勝二郁夫, El-Shamy A, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5A領域のISDR・IRRDRとインターフェロン治療効果予測. *肝胆膵*, 63(6): 1063-1069, 2011.
- 国際学会発表
1. Ide Y-H, Maebo T, An C, Jiang DP, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in NS3 transgenic mice. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
  2. Ide Y-H, Maebo T, An C, Jiang DP, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the NS3 protein of hepatitis C virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 15, 2011. Sapporo, Japan.
  3. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
  4. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. HCV-induced suppression of glucose transporter 2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1a. 18th International Symposium on Hepatitis C

- Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
5. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that targets hepatitis C virus NS5A protein for ubiquitylation. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011. Seattle, USA.
  6. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediated ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011. Sapporo, Japan.
  7. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Deng L, Jiang DP, Ide Y-H, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses glucose transporter 2 gene expression by downregulation of hepatocyte nuclear factor 1a. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011. Sapporo, Japan.
  8. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 15, 2011. Sapporo, Japan.
  9. Hotta H. Carcinogenesis in hepatitis B and C infection. International Scientific Meeting on Infectious Diseases. Jakarta, September 2011.
  10. Hotta H. Carcinogenesis in hepatitis B and C infection. International Scientific Meeting on Infectious Diseases. Jakarta, September 21, 2011.
  11. Hotta H. Chemoprevention of HCV-associated hepatocellular carcinoma. LIPI-ICIAR Workshop & Focus Group Discussion on Food Health and Medical Sciences. Jakarta, October 10, 2011.
  12. Hotta H. Chemoprevention of virus-mediated cancer. LIPI-ISCC International Seminar on Translational Research in Cancer Chemoprevention. Jakarta, October 11, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(研究代表者分)
- 該当なし

## II. 分担研究報告