

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

研究分担者：斎藤貴史 山形大学医学部消化器内科 准教授
共同研究者：西瀬雄子 山形大学医学部消化器内科 助教
共同研究者：河田純男 山形大学医学部消化器内科 教授
(現・兵庫県立西宮病院 院長)

研究要旨： HCV-1b 型、NS3 領域蛋白質 N 末端 120 残基の二次構造に基づく HCV NS3 グループ分類は、後ろ向き患者コホート研究にて、肝細胞がん (HCC) の発生リスクを予測する上で有用であることを報告した (J Infect Dis 2007;196:1006-9)。本研究の目的は、前向き患者コホート研究にて、NS3 グループ分類と HCC 発がんリスクとの関連性を検討することである。

対象は、HCV-1b 型感染かつ高ウイルス量 (100 KIU/ml 以上) の C 型慢性肝炎に対しペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) 併用療法を受けた者で、HCV NS3 グループ分類が可能であった 132 例である。NS3 グループ分類は、既報に従い、グループ A, B, C に分類した。この NS3 グループ分類と肝発がんの関連性について検討した。発がん検討症例の観察期間は、PegIFN・RBV 開始から肝がん発生時 (発がん症例) / 最終受診日 (非発がん症例)、とした。平均観察期間は 5.9±1.2 年である。

HCV NS3 蛋白質の二次構造分類は、グループ A が 43 例 (31%)、グループ B が 71 例 (51%)、グループ C が 15 例 (10%)、混合型 3 例 (7%) であった。グループ A, B, C の 3 群の患者間に、性、年齢、ALT、HCV RNA (アンプリコ法)、線維化ステージ、に有意差はなかった。本コホートにおける HCC 発がんは、グループ A で 1 例 (2.3%)、グループ B で 5 例 (7.4%)、グループ C で 3 例 (20.0%) であった (P=0.075)。NS3 グループ別 HCC 累積発生率の検討では、グループ C>B>A で累積発生率が異なる傾向であった (p=0.06, Log rank test)。発がん症例 9 例のうち、8 例は PegIFN・RBV 療法のウイルス学的無効症例であった。

NS3 グループ A は、非 A と比べて発がんリスクが低い可能性が示唆された。HCV NS3 領域アミノ末端 120 残基の蛋白質二次構造の多型性は、C 型慢性肝炎患者の発がん予測に有用な指標となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) NS3 蛋白質は、感染宿主側の免疫と係わる種々の蛋白質との相互作用により、C 型肝炎の自然経過に影響を与えることが知られている。また、HCV NS3 蛋白質

は p53 依存性アポトーシスを抑制したり、p53 結合領域のアミノ酸配列多型性と p53 結合能に差異があることなどが報告され、HCV NS3 蛋白質と肝発がんリスクの関連性が示唆されている。私たちは、後ろ向き研究により、NS3

アミノ末端120残基の蛋白質二次構造に基づいたHCVグループ分類が、C型慢性肝炎患者の発がんリスクと関連性を有することを報告した (Nishise Y, Saito T, Kawata S, et al. J Infect Dis 2007;196:1006-9)。本研究の目的は、C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン (PegIFN・RBV) 併用療法を受けた患者コホートをを用いて、HCV NS3蛋白質二次構造の差異と発がんリスクについての関連性を前向きに検討することである。

B. 研究方法

対象は、HCV-1b型感染で高ウイルス量 (100 KIU/ml以上) のC型慢性肝炎症例について、HCV NS3蛋白質二次構造が分類可能であった132例である。HCV NS3蛋白質二次構造は、患者血清より直接シーケンス法により得られたHCV NS3領域の推定アミノ酸配列に基づき、コンピューターソフト GENETYX Ver.10.1を用いて、Robson法により決定した。HCV NS3領域は631アミノ酸 (aa1027-1657) よりなるが、N末端側アミノ酸120残基 (aa1027-1146) の蛋白質二次構造を推定することで、HCV NS3蛋白質二次構造多型性をグループA、グループBおよびグループCに分類した。(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、PegIFN・RBV開始から肝がん (HCC) 発生時 (発がん症例) / 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 ± 1.2 年である。

C. 研究結果

1. 患者背景とHCV NS3蛋白質の二次構造分類

対象者132名の性別は男性81名 (59%)、女性51名 (41%)、平均年齢は 56.6 ± 8.8 歳であった。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 (アンプリコ法)、線維化ステージ、に有意差はなかった (表1)。

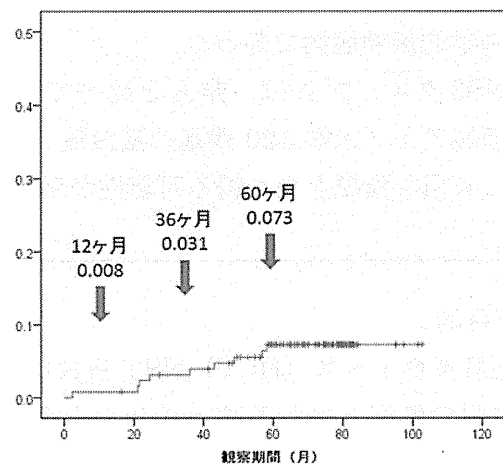
表1 HCV NS3グループ分類と患者背景

| 項目 | NS3グループ | | | P値 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | A | B | C | |
| | N = 43 | N = 71 | N = 15 | |
| 性別 (男性、%) | 27 (63) | 40 (56) | 10 (67) | 0.707 |
| 年齢 (平均値、歳) | 56.3 ± 9.1 | 55.8 ± 8.7 | 60.6 ± 8.1 | 0.163 |
| ALT (中央値、IU/L) | 70 (15 - 241) | 57 (17 - 232) | 59 (26 - 357) | 0.292 |
| BMI (平均値) | 23.4 ± 3.6 | 22.8 ± 4.0 | 23.6 ± 5.9 | 0.802 |
| 線維化 F1/F2/F3 | 6/7/5 | 6/12/3 | 1/4/2 | 0.541 |

2. PegIFN・RBV併用療法症例における前向きHCC累積発生率

PegIFN・RBV併用療法症例における前向きHCC累積発生率は、12ヶ月時点で0.008人、36ヶ月時点で0.031人、60ヶ月時点で0.073人であった (図1)。

図1 PegIFN・RBV治療コホートにおけるHCC累積発生率



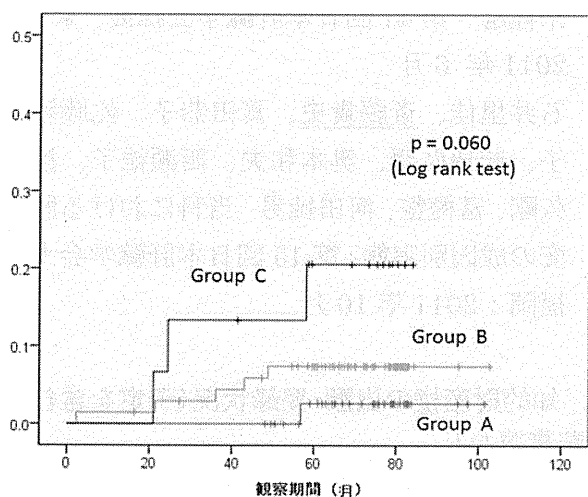
3. HCV NS3 蛋白質の二次構造分類と肝発がんの関連性

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±1.0 年、グループ B が 5.8±1.5 年、グループ C が 5.3±1.7 年であった (表 2)。HCV NS3 グループ別の HCC 累積発生率はグループ C >B>A (p=0.06, Log rank test) であり (図 2)、発がん症例 8 例中 7 例は Peg IFN・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。

表 2 HCV NS3 グループ分類と発がん症例

| | NS3 グループ | | | | p 値 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | A | B | C | mix | |
| | N = 43 | N = 71 | N = 15 | N = 3 | |
| HCC (%) | 1 (2.3) | 5 (7.4) | 3 (20) | 0 | 0.075 |
| 観察期間 (年) | 6.1 ± 1.0 | 5.8 ± 1.5 | 5.3 ± 1.4 | 5.2 ± 1.7 | 0.134 |

図 2 NS3 グループ別 HCC 累積発生率



D. 考 察

高変異ウイルスである HCV のアミノ酸変化は、宿主側の蛋白質との相互作用に影響し、生

体反応の様々な変化から、肝炎の経過や抗ウイルス治療の効果に影響することが推測される。私たちは、HCV NS3 蛋白質の二次構造の多様性に着目し、本多型性と Peg IFN・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、Peg IFN・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 (Sanjo M, Saito T, Nishise Y, Kawata S, et al. J Med Virol 2010;82:1364-70)。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 (Nishise Y, Saito T, Kawata S, et al. J Infect Dis 2007;196:1006-9)。

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 (p<0.05) を得るまでには至らなかった。わが国における肝発がんは 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、明確なエビデンスが得られる可能性があると思われる。

HCV NS3 領域はウイルス株間で変異に富み、宿主蛋白質との重要な相互作用が報告されている。HCV NS3 蛋白質は、宿主 p53 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、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発がんリスクと関連性を有する可能性が示唆された。

研究発表

1.論文発表

- 1) Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M. Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol*, 55: 896-905, 2011.
- 2) Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S. Potential therapeutic application of intravenous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev*, 20: 1503-1510, 2011.
- 3) Ishii R, Togashi H, Iwaba A, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Okada A, Takahashi K, Saito T, Kawata S.

(99m)Tc-GSA SPECT analysis was clinically useful to evaluate the effect of interferon in a patient with interferon non-responsive chronic hepatitis C. *Ann Nucl Med*, 25: 520-523, 2011.

- 4) Ito J, Saito T, Iwaba A, Suzuki Y, Sanjo M, Ishii R, Sato C, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. A case of monocular blindness as the initial presentation of hepatocellular carcinoma with skull metastasis. *Clin J Gastroenterol*, 4: 273-277, 2011.
- 5) 渡辺久剛、斎藤貴史、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、西瀬雄子、河田純男. B 型肝炎ウイルスジェノタイプ B 型感染高浸淫地区における感染実態の変遷. *肝臓* 52: 753-755, 2011.

2.学会発表

- 1) 渡辺久剛、斎藤貴史、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、西瀬雄子、齊藤孝治、富樫 整、河田純男. 急性 B 型肝炎におけるジェノタイプ A 型感染の実態と臨床経過 第 47 回日本肝臓学会総会、東京；2011 年 6 月
- 2) 石井里佳、斎藤貴史、富田恭子、佐藤智佳子、芳賀弘明、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、富樫整、河田純男. 当科における肝硬変の成因別実態：第 15 回日本肝臓学会大会、福岡：2011 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 特記事項なし。

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 講師

研究要旨： C型肝炎ウイルス（HCV）感染とそれに起因する慢性炎症反応により、肝細胞のさまざまなゲノム配列に遺伝子変異が生成することが明らかとなった。そこで次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域の大規模ゲノム解析を行ったところ、HCV 感染を伴ったヒト肝炎・肝硬変組織中にはさまざまな遺伝子への多様な変異が蓄積しているという、慢性炎症によりもたらされたゲノム異常の全体像が明らかとなった。慢性炎症を伴った肝細胞に蓄積した宿主遺伝子へのゲノム異常が、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た。

A. 研究目的

慢性炎症はヒトにおける発癌の大きな背景要因であることが知られている。慢性炎症を発生母地とする消化器癌は数多く存在するが、その中でも、HCV や HBV による慢性肝炎・肝硬変から発生する肝癌は最も頻度の高い疾患の一つである。HCV 感染による慢性肝炎からの肝発癌は年率 0.5~1%、肝硬変からの肝発癌は年率 5~8%にも達するとともに、最初に発見された肝癌を肝切除術やラジオ波焼灼術により完全に治療しても、その後残存する肝臓に新たに肝癌の発生を認める、いわゆる多中心性発癌はよく経験するところである。一方、インターフェロンによる抗 HCV 治療によりウイルス排除を達成することにより肝癌の発生を抑えることができることは、本邦の大規模疫学研究により示されている。しかしながら、インターフェロン治療によるウイルス排除後も発癌を生じる例が少なからず存在することも同時に明らかとなっており、肝臓においての長年の炎症により、肝細胞に不可逆的なゲノムレベルでの変化が生じていることが示唆されている。すなわち、

正常な細胞が癌細胞になるには多様な遺伝子変異が生じることが必要と考えられているが、これらの遺伝子変化は癌の発生母地となった慢性炎症組織の上皮細胞に発癌前の早期から生成・蓄積されていることが、これまでの我々の研究によっても確認されている。

他方、ヒト自身の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。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。しかしながら、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、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も、APOBEC2 を全身発現するトランスジェニックマウスの解析から明らかにしている。

そこで、HCV 感染により惹起された慢性炎症刺激により肝細胞に引き起こされるゲノム異常の全体像を明らかにすることにより、炎症からの肝発癌の鍵を握っている遺

伝子領域を特定することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

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の特性を最大限に活用することにより、1 回のランあたり 30 億塩基以上の遺伝子配列の決定と遺伝子発現プロファイルの解析が可能となり、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、解析対象とするサンプル中の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、whole exome sequencing 技術を用いて、以下の解析を実施した。

(1) 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の deep sequencing 解析

(2) 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

(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を通正に管理保存した。

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)次世代シーケンサー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、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 で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、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確認された。

(2) HCV 感染を伴う肝硬変組織を対象とし、肝癌発症例、肝癌未発症例、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、HCV 感染を伴った肝硬変組織では、HCC 発症例のみならず、HCC 非発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。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、これまでにヒト肝癌組織で報告されている部位と共通しており、発癌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。

(3)HCV 感染による慢性肝疾患を背景として肝癌を発生した 4 例について、肝硬変

組織、癌組織（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、肝癌組織で平均 40.2 coverage の塩基 read 数を達成することができた。この中で、2 つ以上の肝癌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、癌部・非癌部で共通して変異を蓄積している遺伝子が約 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。

D. 考察

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 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 AID 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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takai A, Marusawa H, Minaki Y, Watanabe T, Nakase H, Tsujimoto G, Chiba T. Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer. *Oncogene*, (in press), 2012
- (2) 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*, 130: 1294-1301, 2012.
- (3) Morita S, Matsumoto Y, Okuyama S, Ono K, Kitamura Y, Tomori A, Oyama T, Amano Y, Kinoshita Y, Chiba T, Marusawa H. Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 32: 1706-1712, 2011.
- (4) Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus in Association with Antiviral Therapy Determined by Ultra-deep Sequencing. *PLoS ONE*, 6: e24907, 2011.
- (5) 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.

2.学会発表

- (1) 丸澤宏之. 慢性炎症により誘導されるゲノム異常からの肝癌発生機構. 第70回日本癌学会学術総会. 2011/10/4. 名古屋国際会議場. 愛知.
- (2) 丸澤宏之. Exon CaptureシーケンスとCGHアレイ解析を駆使した消化器癌のゲノム研究. 第70回日本癌学会学術総会. 2011/10/4. 名古屋国際会議場. 愛知.
- (3) 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70回日本癌学会学術総会. 2011/10/4. 名古屋国際会議場. 愛知.
- (4) 奥山俊介、丸澤宏之、千葉勉. 炎症刺激により発現誘導される遺伝子編集酵素ファミリーによる多段階肝発癌モデル

マウスの解析. JDDW (第53回消化器病学会). 2011/10/20. 福岡国際会議場. 福岡.

- (5) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹細胞/前駆細胞への遺伝子異常の蓄積が肝癌の発生に果たす役割. JDDW (第53回消化器病学会). 2011/10/21. 福岡国際会議場. 福岡.
- (6) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 肝癌の発生・進展を規定するゲノム異常の次世代シーケンサー解析. JDDW (第53回消化器病学会). 2011/10/23. 福岡国際会議場. 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願

なし

2.特許取得

なし

プロテオミクスを用いた肝癌における細胞死抵抗性の検討

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

直江秀昭 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学

星田陽明 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学

研究要旨：肝癌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た。その結果、ヒト肝癌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細胞死抵抗性を担う可能性が示された。その中でも核小体に豊富に存在する磷酸化蛋白質である nucleophosmin (NPM)が、磷酸化を介して細胞死抵抗性に関与することを明らかにした。

A. 研究目的

2010年の厚生労働省の人口動態調査では、原発性肝癌の死亡数は、肺、胃、大腸に次いで4番目に多く約3.3万人にも上っている。原発性肝癌の中で94%と大半を占めている肝細胞癌(HCC)は世界的にも主要な悪性疾患の1つであり、約4分の3がアジアに発生していることより、肝炎ウイルス感染の関与が示されている。インターフェロン治療によるHCV排除が肝発癌抑制に有用であることや、HBVキャリアでは高ウイルス量ほど発癌のリスクが高いという臨床的なデータは、HCCと肝炎ウイルスとの関連を支持するものである。一方、近年増加している非B非C型HCCでは、肥満に関連した炎症性サイトカインの活性化とインスリン抵抗性がもたらすシグナル伝達異常が、発癌に関与していることが想定される。

このようなHCCの治療法について、肝切除、ラジオ波熱焼灼療法(RFA)、エタノール注入療法などの局所療法、抗癌剤を使用した肝動脈化学塞栓療法や肝動注化学療法、放射線療法、肝移植などを選択できる時代となった。しかしながらHCCは既に進行した状態で見つかる場合も多く、仮に肝切除やRFAなどの根治的治療を行っても年率15-20%と高率に再発を認めるため、1994-2005年の全国調査の累積生存率は、3年55.0%、5年37.9%、10年16.5%と、依然として予後不良の癌腫である。

従って、肝癌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。

本研究では予後不良なHCCの治療成績を向上するために、HCC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。ここで強調すべ

き点は、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重要であることである。

B. 研究方法

肝細胞癌株(HepG2, Huh7)を用い、細胞死刺激として酸化ストレス(H₂O₂)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、磷酸化を検討するためにProQ Diamondを使用した特殊染色を施行し、刺激前後での蛋白質発現あるいは磷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)にて磷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。

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過剰発現肝細胞株を用いて、NPMの癌細胞の生物学的特性における役割を解析した。

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倫理委員会より承認を受けている。

C. 研究結果

1) 細胞死刺激に対する蛋白質磷酸化の変動についての網羅的解析

HepG2細胞、Huh7細胞、ならびにHc細胞では、細胞死刺激に対する感受性が異なっており、HepG2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、質量分析の結果、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、細胞死刺激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。

2) 細胞死抵抗性を担う責任分子群の絞込み

上述の結果を元に、細胞死抵抗性の異なる肝細胞癌株を比較検討することで、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。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、②p53の活性化を抑えアポトーシスを抑制する、③癌細胞には高発現で癌遺伝子としての働きが示唆されている等の報告がある。

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H₂O₂に対する抵抗性が減弱した。次に内因性のNPMの発現が低い肝細胞癌株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。H₂O₂ 以外の細胞死刺激として、肝癌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 の磷酸化は抑制され、生細胞は減少した。NPM の磷酸化が細胞死抵抗性を担うか否かを解析するために、現在 NPM の磷酸化部位を変異させた非磷酸化型 NPM ベクターを作成し、非磷酸化型 NPM を恒常的に発現する Hep3B 細胞株の樹立を目指している。

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。

D. 考察

蛋白質機能は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、HCC 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 HCC の治療成績の向上に直結すると考えられる。

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を絞りこみ、

今年度は NPM の役割を中心に検討した。

肝癌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 の磷酸化が細胞死抵抗性を担うかが明らかではない。そこで強制発現系である Hep3B-NPM 細胞株を作成し、細胞内の磷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 の磷酸化は抑制され、生細胞は減少した。このことから、NPM の磷酸化の重要性が窺われた。

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、細胞増殖という癌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、磷酸化の制御機構を解析し、癌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。

また昨年度までの検討で、ヒト HCC において NPM の発現ならびに磷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 が肝癌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、細胞死刺激にて磷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。

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 (2011/4/1~2012/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Ishihara Ko, Hirotsue A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y, and Nakao M.
Higher-Order Chromatin Regulation and Differential Gene Expression in the Human Tumor Necrosis Factor/Lymphotoxin Locus in Hepatocellular Carcinoma Cells
Mol Cell Biol in press
- 2) Taura N, Fukushima N, Yatsushashi H, Takami Y, Seike M, Watanabe H, Mizuta T, Sasaki Y, Nagata K, Tabara A, Komorizono Y, Taketomi A, Matsumoto S, Tamai T, Muro T, Nakao K, Fukuizumi K, Maeshiro T, Inoue O and Sata M.
The incidence of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C infection decreased in Kyushu area.
Med Sci Monit 17:7-11, 2011
- 3) 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

2. 学会発表

- 1) 直江秀昭、田中基彦、佐々木 裕
遺伝子解析と蛋白質機能解析による肝癌の細胞死抵抗性の解明
ワークショップ「DNA・マイクロRNA解析からの消化器疾患の診断・治療・病態解明」
第97回日本消化器病学会総会
2011年5月13日、東京
- 2) 瀬戸山博子、田中基彦、南雲恒平、工藤洋子、福林光太郎、立山雅邦、紙屋康之、葦原 浩、永濱裕康、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・機能的変化の検討-特に抗酸化機能について-
ワークショップ「代謝・酸化ストレスの場としての肝臓」
第47回日本肝臓学会総会
2011年6月2日、東京
- 3) 田中基彦、福林光太郎、立山雅邦、葦原 浩、紙屋康之、吉丸洋子、永濱裕康、佐々木 裕
当科における非B非C肝癌の臨床的特徴
ワークショップ「非B非C肝癌の実態と特徴」
第47回日本肝癌研究会

2011年7月29日、静岡

- 4) 瀬戸山博子、田中基彦、佐々木 裕
アルブミンの構造的・機能的変化から
見た分岐鎖アミノ酸治療の意義
シンポジウム「肝硬変患者の栄養マネ
ージメント、治療」
JDDW2011（第15回日本肝臓学会大会・
第53回日本消化器病学会大会・第9回
日本消化器外科学会大会・第42回日本
消化吸収学会総会合同）
2011年10月21日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

分担研究者 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、および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。遺伝子改変マウスの解析の結果、肝臓における PA28 γ ノックアウトによって DNA 修復および細胞増殖能は減弱したが、コア蛋白質発現によって DNA 修復能は減弱し、細胞増殖能は Wild type 同様に促進された。それらの結果から、PA28 γ およびコア蛋白質によってヒストンの翻訳後修飾が影響をうけ、発がんが促進されることが示唆された。

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

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。また、既

に作成しているコア発現 (CoreTg) マウス、PA28 γ ノックアウト (PA28 γ KO) マウス、PA28 γ KO-CoreTg マウスに CCL4 を投与し、6 時間から 12 時間後の肝臓の組織切片を作製し、HE および免疫染色法により組織切片を染色した。

(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

PA28 γ を囲蛋白質と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多く認められた。また、遺伝子改変マウスに CCL4 を投与し、6 および 12 時間後の肝障害を観察したとき、PA28 γ KO、PA28 γ 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

復が減弱されていた。

D. 考察

PA28 γ を囲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。また、PA28 γ 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。CCl₄ 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 γ 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に関与していることが示唆された。

E. 結論

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。本研究により、コアタンパク質発現による細胞増殖能上昇および DNA 修復能低下が PA28 γ 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. PLoS One, 6: e15967, 2011.
 2. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. J Virol, 85:13185-13194, 2011.
 3. Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. Virology, 412: 211-219, 2011.
 4. Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Enomoto N, Matsuura Y, Kusunoki M, Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity. 18th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 8-12, 2011 Seattle. USA.
 5. Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Enomoto N, Matsuura Y, Kusunoki M, Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity. 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜.
 6. 芦沢暁、森石恆司、藤室雅弘. ウイルス感染による細胞内 SUMO 化修飾の動態解析. 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜.
 7. Kataoka C, Tani H, Kaname Y, Taguwa S, Abe T, Fukuhara T, Moriishi K, Matsuura Y. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. 第34回日本分子生物学会総会 2011年12月13日～16日、横浜.
- ### 2. 学会発表
1. Yamashita A, Fujimoto Y, Moriishi K. Marine natural products as a source of the novel antiviral agent targeting to HCV NS3 helicase. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
 2. Fujimoto Y, Yamashita A, Moriishi K. Inhibitory effect of marine natural products on the replication of hepatitis C virus. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011 Sapporo. 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 熊本大学エイズ学研究センター
研究協力者：黒木 美沙緒 熊本大学エイズ学研究センター

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、感染36時間後に宿主細胞内に stress granule の形成が誘導された。(2) HCV 感染により、感染48時間以降、stress granule 因子である G3BP1、Ataxin2 そして poly(A)-binding protein 1 (PABP1)はリング状の構造体を形成し、HCV Core と共局在した。また、このリング状構造体の中心が脂肪滴であり、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観察された。さらに、これら stress granule 因子は HCV 感染に伴い P-body 因子である DDX6 とも共局在した。(3) 外来的なストレス（熱ショックや亜ヒ酸ナトリウム処理）に応答して、HCV 感染細胞内に新規な stress granule の形成が誘導されなかった。(4) stress granule 因子 G3BP1、Ataxin2 及び PABP1 は HCV の生活環に必要な宿主因子であることが判明した。以上の結果より、HCV の持続感染により宿主細胞内にストレス応答が生じ HCV の複製や肝発がんへの関与が示唆された。

A. 研究目的

我が国における肝がんの約8割において、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染が認められているが、HCVによる肝発がんのメカニズムは不明である。これまでの研究により、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、肝発がんが起こるものと考えられている。HCV蛋白質と相互作用する宿主因子の解析と宿主細胞機能に及ぼす影響の解明はHCVによる肝発がん機序の解明のみならず、HCV排除による肝がんの予防や治療薬の開発にもつながることが期待される。

昨年度の本研究により、P-body因子であるDDX6がHCV感染に伴い脂肪滴周辺にハイジャックされること、そしてDDX6がHCVの生活環に必要な宿主因子であることを報告

してきた。そこで、本年度はP-body因子と相互作用することが示唆されている stress granule 因子のHCV感染に伴う局在の変化やHCV生活環における役割について検討した。また、HCV感染に伴い、宿主細胞が熱ショックや薬剤などの外来的ストレスにどのように応答するのかについても検討を行った。

B. 研究方法

(1) HCV感染による stress granule 形成の観察

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 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する。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 fluorescein isothiocyanate (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℃にシフトさせ 30 分間培養を行った。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。

(2) Stress granule 因子の HCV 生活環における役割の検討

Stress Granule 因子である G3BP1、Ataxin2 及び PABP1 に対する siRNA (Dharmacon, 25nM)を HuH-7 由来 RSc 細胞に Oligofectamine (Invitrogen)を用いてトランスフェクションし、各々の stress granule 因子をノックダウンさせた細胞を調製し、HCV-JFH1 株を感染させる。感染 24 時間後の感染細胞内の HCV RNA の複製レベルをリアルタイム RT-PCR (Lightcycler, Roche)法にて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験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、ヒトの臨床材料や実験動物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、本研究は「研究開発等に係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処置等を定める省令」に基づき実施した。特に HCV ウイルスを用いた感染実験の場合は P2 レベル実験室のバイオハザード対策用安全キャビネットを使用し、実験終了後の資料についても、UV 照射、次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素系消毒薬処理およびオートクレーブを用い、適正に廃棄を行った。

C. 研究結果

(1) HCV 感染による stress granule の形成

HCV 非感染細胞においては、stress granule 因子である G3BP1、Ataxin2 そして 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 Core 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 Core 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℃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℃で培養してもリング構造を維持し、HCV Core 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 亜ヒ酸ナトリウムで 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。

(2) Stress granule 因子の HCV 生活環における役割

25nM siRNA を用いて、Stress Granule 因子である 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、各々、約 40%、約 60%、約 60% の HCV RNA の顕著な減少が見出された。

D. 考察

Stress granule 因子は、ポリオウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 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 3 6 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 Core と共局在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 3 6 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。

以上の結果より、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のかもしれない。今後の検討課題である。

E. 結論

(1) HCV 感染により、感染 3 6 時間後に宿主細胞内に stress granule の形成が誘導された。

(2) HCV 感染により、感染 4 8 時間以降、

stress granule 因子はリング状の構造体を形成し、HCV Core 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。

(3) 外来的なストレス (熱ショックや亜ヒ酸ナトリウム処理) 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。

(4) 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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2011/4/1~2012/3/31 発表)

1. 論文発表

- (1) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol*, 85(14): 6882-6892, 2011.
- (2) 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*, 157(1): 61-70, 2011.
- (3) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem Biophys Res Commun*, 409(4): 663-668, 2011.
- (4) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K,