

201125009B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 堀田 博

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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（総合）研究報告	
C型慢性肝炎・肝がん臨床例の解析及び HCV NS3蛋白質二次構造多型性との相関の検討 -----	29
河田純男・斎藤貴史	
HCV感染による炎症反応をもたらす宿主のゲノム異常の解明 -----	36
丸澤宏之	
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 -----	43
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 -----	49
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 -----	53
加藤宣之・有海康雄	
HCV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 -----	65
加藤孝宣	
B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスと肝発癌 -----	71
小池和彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	81
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	109

I. 総合研究報告

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： 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 及び HBV の発がん機構の検討、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 蛋白質を発現する Tg マウスは孤発性の高分化～中等度分化型の肝細胞がんを発症すること、及びそ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を明らかにした。また、NS3 Tg マウスは高率に脂肪肝及び悪性リンパ腫を発症することも明らかにした。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。また、特有の NS3 蛋白質変異（NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶）及びコア蛋白質変異（Core-Q⁷⁰）はそれぞれ独立して肝がん発症と密接に相関することを明らかにした。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 AID や APOBEC2 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た。その結果、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 γ との結合因子としてポリコム複合体蛋白質を同定し、PA28 γ およびコア蛋白質の有無によって細胞増殖能および 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 の形成が誘導されること、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、及び P-body 因子である DDX6 とも共局在すること、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。この細胞内 HCV 蛋白質の蓄積が肝発がんに関与している可能性を示した。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。肝における一価不飽和脂肪酸、特にオレイン酸の増加が肝がん発生に関与している可能性を示した。9) HBV の X 遺伝子産物 (HBx 蛋白質) によるがん遺伝子産物様蛋白質 pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) の安定化と蛋白質発現量の増加、及び TGF β 下流の Smad3 のリン酸化の分別化によるシグナル伝達経路が、HBV による肝発がん・悪性化に関与していることを明らかにした。

研究分担者

河田 純男 山形大学医学部 教授
(現兵庫県立西宮病院 院長)
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
加藤 宣之 岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科 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きた。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。しかし、NS3 蛋白質を発現する Tg マウスの発がんについては未だ十分に検証されておらず、生体レベルでの NS3 蛋白質の働きを解析する有用なツールは確立されていない。

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。従って、HCV 発がんの場合と同様に、HBV 感染からの肝がん発症リスクの予測・発がん早期診断・発がん阻止・治療法に資する方策を講じることも強く求められている。

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 複製増殖系及び HBV 複製増殖系並びに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 発がん分子機序の解析

(1) HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスにおける発がんの解析：HCV genotype 1b (HCV-1b) 臨床分離株から得られた 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プラスミド pBEPBgIII に組み込み、これをトランスジェーンとして C57BL/6N 系統マウスを用いて NS3 発現 Tg マウスを作製した。そして、マウス臓器における NS3 mRNA や NS3 蛋白質の発現を定量的 RT-PCR 法及び Western blot 法により解析した。発生病変については、通常の病理組織学的検査、免疫組織化学検査を用いて解析した。また、トランスジェーン発現に用いた HBx プロモ

ーターの活性を検討するため、そのプロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に組込んだプラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。さらに肝細胞とリンパ球系細胞での比較を行うために、HuH7 細胞と BJAB 細胞を用いて、プロモーター活性の比較検討を行った。

DNA マイクロアレイ解析により、NS3 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比較検討を行った。そして、宿主因子として種々の発がん関連遺伝子産物並びにがん抑制遺伝子産物の mRNA や蛋白質の発現を、定量的 RT-PCR 法及び Western blot 法等を用いて解析した。さらに、NS3 Tg マウス由来の胎児線維芽細胞 (MEF) や 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解析した。

(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 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 例を解析対象とした。NS3 蛋白質二次構造は、患者血清より直接シークエ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。NS3 蛋白質は 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 に分類可能である (Ogata S, Hotta H, et al. J Clin Microbiol 2003; 41: 2835-41)。NS3 蛋白質二次構造の差異が、Peg インターフェロン (IFN) /リバビリン (RBV) 併用療法の治療効果に及ぼす影響および本患者コホートにおける発がんリスクとの関連性について、臨床症例の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 ± 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：HCV 感染やその結果生じる炎症反応により、肝細胞に発現誘導される遺伝子編集酵素について検討した。具体的には、それぞれのヒト APOBEC family 分子に特異的な probe を作成し、ヒト初代肝培養細胞に炎症刺激や HCV のコードするウイルスタンパク質の発現を加えた前後におけるそれぞれの APOBEC family 分子の発現量の変化を定量評価した。

また、HCV 感染により肝細胞に発現誘導される APOBEC family 分子の生理機能と遺伝子異常生成の有無を明らかにする目的で、恒常的に APOBEC 分子を発現する Tg マウスモデルを作成し、その表現型を検討した。同時に、APOBEC 発現により肝組織に遺伝子変化が生じたかどうかを検証するために、APOBEC Tg マウスの肝組織から抽出した DNA ならびに RNA 中の発がんに関連した代表的な遺伝子群の塩基配列を同定・解析した。

さらに、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塩基配列を選択的に増幅し、次世代シーケンサーによる deep sequencing を実施した。また、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症例について、肝硬変組織、がん組織から抽出した DNA サンプル中のゲノムから全エクソン領域のみを exon capture により選択的に抽出した。引き続き、次世代シーケンサーを用いた whole exome sequencing 解析を行うことによりアミノ酸をコードする全エクソン領域の遺伝子変異の有無を決定した。

(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：ヒト肝がん細胞株(HepG2, Huh7)を用い、細胞死刺激として酸化ストレス (H_2O_2) にて刺激し、FACS を用いて細胞死を評価した。コントロールとしてヒト肝細胞株(Hc 細胞)を用いた。プロテオーム解析のために刺激前後で cell lysate を調整し、多重蛍光色素標識法 (Cy3/5) を用いた 2 次元ディファレンシャル電気泳動を行った。さらに蛋白質検出を高感度に行うために SYPRO Ruby を、リン酸化を検討するために ProQ Diamond を使用した特殊染色を施行し、刺激前後での蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。引き続き蛋白質スポットを切り出し質量分析器(MS/MS)にてリン酸化蛋白質を同定した。一方、遺伝子発現解析として刺激前後で RNA を抽出した上で cDNA を作製し、Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array) を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。

最終的には情報統合プラットフォームを用いて、蛋白質発現・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の絞り込みを行った。候補分子の一つとして nucleophosmin (NPM) に注目し、siRNA による NPM ノックダウン細胞あるいは 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。

また、肝切除術を施行された HCV 陽性肝がん組織とその非がん部組織 23 症例を対象に、蛋白質発現・リン酸化の解析、及び遺伝子発現解析を行った。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 γ に関する解析：Split Ubiquitin 法を用いて HCV コア蛋白質を囚蛋白質にして、相互作用する膜蛋白質の遺伝子単離を試みた。ライブラリーはヒト肝臓細胞を用いて、Ubiquitin N 末端部分を C 末端あるいは N 末端にもつライブラリーコンストラクトを使用した。また、PA28 γ を囚蛋白質

として、Clontech Matchmaker 3 システムを用いて、ヒト肝臓ライブラリー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、HCV 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蛋白質発現 (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、投与後 6 時間から 12 時間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。

(6) HCV 感染による P-body 及び Stress granule 形成の観察とそれらに関わる因子の HCV 生活環における役割の検討: shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて PML をノックダウンさせた HuH-7 由来 RSc 細胞株を樹立し、HCV-JFH1 株を感染させ、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌される Core の発現量をそれぞれ real-time RT-PCR 法と ELISA 法で定量した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV 感染や複製により、PML の局在が変化するのかどうかについて観察した。HCV-JFH1 感染 RSc 細胞や全長 HCV RNA 複製細胞を抗 HCV コア蛋白質抗体及び抗 PML 抗体で処理後、コア蛋白質は Cy3、PML は FITC により可視化した。

一方、コア蛋白質発現細胞におけるがん抑制因子 p53 の転写機能に及ぼす影響を解析するために、RSc 細胞に p53 レポータープラスミド (p53-RE-Luc)、p53 発現プラスミド、PML IV 発現プラスミド及びコア蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

PML の HCV 感染や複製における役割を明ら

かにするために、PML が分子標的として知られている亜ヒ酸 (三酸化二ヒ素 As₂O₃) をツールに用いた。全長 HCV-O 株 (1b 遺伝子型) 複製 O 細胞とそのレプリコン sO 細胞、あるいは HCV-JFH1 感染 RSc 細胞を亜ヒ酸で処理して 72 時間後の細胞内 HCV RNA レベルを real-time RT-PCR 法で定量した。亜ヒ酸の細胞毒性は MTT アッセイにより解析した。

HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV 感染に伴う P-body 因子の局在変化を詳細に観察した。細胞を固定後、抗コア蛋白質抗体及び抗 DDX6 抗体、抗 Lsm1 抗体、抗 Ago2 抗体、抗 Xrn1 抗体、抗 Dcp2 抗体、あるいは抗 PATL1 抗体で処理後、コア蛋白質は Cy3、P-body 因子は FITC により可視化した。

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

RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて、Li23 由来細胞株より total RNA を単離し、p53 cDNA をクローニング後、塩基配列を決定した。さらに p53 結合配列を有する p21^{waf1} のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポーターを用いて、内在性 p53 の転写機能の解析を行った。

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、コア蛋白質は Cy3 により、G3BP1、Ataxin2 あるいは

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。

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 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：培養細胞での感染増殖系で用いられる HCV JFH-1 株 (genotype 2a) および新規に開発した感染増殖系である AHC-1b 株 (genotype 1b)、さらに genotype 1b/2a のキメラウイルスである TH/JFH-1 株を用いて検討を行った。JFH-1 株および AHC-1b 株のコア蛋白質の aa70・aa91 は RL であり、いわゆる wild type であった。TH/JFH-1 株の aa70・aa91 は RM であり、aa91 が変異型であった。そこでこれらの株の aa70 と aa91 に変異を導入し、4 種類の変異株 (RL・RM・QL・QM) のプラスミドをそれぞれの株で作製した。構築したプラスミドから全長 RNA を合成し、Huh7.5.1 細胞に導入した後に、培養上清中と細胞内のコア抗原量を測定することで増殖能を評価した。また、HCV のレセプターである CD81 が発現していない Huh7-25 細胞に、これらの HCV 株の RNA を導入することで詳細な検討を行った。この細胞では HCV ゲノムの複製と感染性ウイルス粒子の生成は可能であるが、生成されたウイルス粒子はこの細胞に再感染できない。そこで、RNA 導入後の細胞内コア抗原量で複製を、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。

NS5A 領域 ISDR の変異が HCV の増殖に与える影響について解析した。JFH-1 株と AHC-1b 株を用いて検討を行った。JFH-1 株は genotype 2a のプロトタイプ株である J6 株と比較すると 10 のアミノ酸が異なっている。また、AHC-1b 株は genotype 1b の ISDR 野生型の配列と比べると 7 つ変異がある。そこで、まず JFH-1 株の ISDR を genotype 1b 野生型、AHC-1b 株、genotype 2a プロトタイプである J6 株それぞれの ISDR に置換し、培養細胞内での増殖複製への影響を検討した。さらに AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 株野生型に置き換え、その影響も検討した。

(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 Heps wx 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。脱脂脂肪酸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によって解析した。eicosatetraenoic acid、eicosatetraenoic 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 α 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。

2. HBV 発がん分子機序の解析

肝生検施行HBV関連慢性肝疾患を臨床・病理・分子医学的に検討した。肝組織はC末端リン酸化Smad3 (pSmad3C)に対する抗体、あるいはリンカー部位リン酸化Smad3 (pSmad3L) 抗体、Pituitary tumor-transforming gene1(PTTG1)に対する抗体、HBxに対する抗体、c-Myc抗体、抗X遺

伝子産物 (HBx) 抗体等によって免疫染色を行った。ユビキチン化、cell cycle等の解析も行った。動物モデルとしてHBV-X遺伝子導入Tgマウスを用い、同様の解析を行った。培養細胞 Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)、AML12 4p、AML12 4pX cells (4pX) も用いた。

(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

1. 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 2 系統の NS3 Tg マウスライン (L189 系統及び L218 系統) を樹立した。NS3 遺伝子の全長を組込んだ L189 系統及びプロテアーゼドメインをコードする遺伝子領域のみを組込んだ L218 系統はいずれも、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。NS3 mRNA 発現量には個体差があるものの、トランスジーンをホモに持つ個体の NS3 mRNA 発現量はヘテロの個体に比べて約 2 倍であることが確認された。全長 HBx プロモーター及び L189 系統の NS3 Tg マウスに見られる欠損プロモーターの活性を比較した。ヒト肝がん由来の HuH7 細胞では、L189 欠損プロモーター活性は全長プロモーターと比較して約 50% に低下していた。一方、ヒト B 細胞由来の BJAB 細胞では、L189 欠損プロモーター活性は全長プロモーターと比較して約 20% 低下したのみであった。また、Western blot 法により、L189 系統の肝組織における NS3 蛋白質の発現を低レベルながら確認した。

L189 系統、L218 系統いずれの NS3 Tg マウスでも、18 ヶ月齢以降に、約 10% に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。また、両系統とも、約 60% において脂肪肝が発症した。両系統とも 40% 以上の Tg マウスに悪性リンパ腫が見られ、腸管リンパ組織増殖病変を加えると、NS3 Tg マウスの約 70% にリンパ球の異常増殖を認めた。悪性リンパ腫は T 細胞マーカーは陰性で、1 例のみ NK 細胞マーカー陽性を示した。なお、悪性リンパ腫のうち activation induced cytidine deaminase (AID) の過剰発現が認められるものも見出された。

また、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、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た。Western blot 解析により、NS3 Tg マウスの肝組織では p73 のがん化関連アイソフォームである Δ Np73 の発現が増強していることがわかった。そこで、NS3 Tg マウス由来の 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、NS3 蛋白質を発現しない対照細胞に比べて、 Δ Np73 が強く誘導されることがわかった。

(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：患者背景と HCV NS3 蛋白質の二次構造分類について、まず、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 量、線維化ステージに有意差はなかった。

NS3 蛋白質の二次構造分類と PegIFN/RBV 併用療法の治療効果の関連性について解析を行った。本患者コホートにおける ITT 解析による全体の sustained virological response (SVR) 率は 41%、non-SVR 率は 59% であった。このグループ分類と PegIFN/RBV 併用療法の ITT 解析による治療成績を示す。グループ A では、SVR 51%、non-SVR 49%、グループ B では、SVR 32%、non-SVR 68%、グループ C では、SVR 53%、non-SVR 47%、であった。グループ B とグループ A/C に分類して検討を行った。グループ A/C における SVR 52%、

non-SVR 48% に対し、グループ B では SVR 32%、non-SVR 68%、であり、両グループ間での治療効果には有意差が認められた ($P < 0.05$)。以上から、グループ B は、グループ A/C に比し、non-SVR と関連性を有することが示唆された。

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 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。

HCV NS3 蛋白質の二次構造分類と肝発がんの関連性について調べた。発がん者の 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。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。

一方、NS3 蛋白質及びコア蛋白質の点突然変異に基づいて解析すると、NS3 の 56 位が Tyr で 86 位が Gln の HCV 株 (NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶) は、肝がん患者の 76%、非がん患者の 42% に見られ、有意に肝がん患者に多かった ($p = 0.002$)。また、コア蛋白質の 70 位が Gln の HCV 株 (Core-Q⁷⁰) は、肝がん患者の 51%、非がん患者の 20% に見られ、有意に肝がん患者に多かった ($p = 0.005$)。さらに、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 及び Core-Q⁷⁰ の両方あるいはどちらか一方を有する HCV 株は肝がん患者の 86%、非がん患者の 57% に見られ、有意に肝がん患者に多かった ($p = 0.007$)。Kaplan-Meier 解析により、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 変異株の累積肝がん発症率は、それ以外のウイルス株に比べて、有意

に早期から高率であった ($p=0.0007$)。また、Core-Q⁷⁰ 変異株の累積肝がん発症率も、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった ($p=0.03$)。一方、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 変異及び Core-Q⁷⁰ 変異のいずれも持たない HCV 株の累積肝がん発症率は、それらの変異を持つ HCV 株に比べて有意に低率であった。

(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：生理機能や遺伝子編集酵素活性の有無について不明の分子である APOBEC2 は、生理的条件下では肝細胞ではその発現をほとんど認めない。しかしながら、HCV のコードするウイルス蛋白質や炎症性サイトカインである TNF- α 刺激によりヒト肝細胞に APOBEC2 が異所性に発現誘導されることが明らかとなった。これらの APOBEC2 誘導刺激因子は、細胞内では転写因子 NF- κ B を活性化することが共通の特徴であったため、NF- κ B 阻害剤、IKK- α 、IKK- β の dominant negative form を用いて細胞内 NF- κ B 活性化シグナルを阻害したところ、肝細胞における APOBEC2 発現が減少～消失することが確認された。以上より、HCV 感染やその結果生じる炎症反応による NF- κ B 活性化が、肝細胞において APOBEC2 の転写を誘導・活性化することが明らかとなった。

APOBEC2 を発現する Tg マウスを作成した。APOBEC2 Tg マウスは生後 1 年以降に全身に高頻度に腫瘍を発生することが明らかとなった。APOBEC2 Tg マウスに発生した腫瘍としては、肝細胞がん、肺がん、悪性リンパ腫などが確認された。APOBEC2 Tg マウスに発生した肝細胞がんは、病理組織学的にはヒト高分化型肝がんにかわめてよく類似した像を呈しており、背景となる肝組織には脂肪化などの変化は認められなかった。

次に Tg マウスの腫瘍発生は、APOBEC2 がその遺伝子編集作用を発揮した結果、発がんに関連した遺伝子に塩基変化が生じたことに起

因するという可能性を検証するため、APOBEC2 Tg マウスの肝組織から DNA と DNA をそれぞれ抽出し、代表的ながん遺伝子・がん抑制遺伝子の塩基配列を同定した。APOBEC2 Tg マウスの肝組織から抽出した代表的ながん遺伝子・がん抑制遺伝子の DNA 配列に認められた塩基置換の頻度は、野生型のコントロールマウスの肝組織由来の DNA と有意な差を認めなかった。これに対して、APOBEC2 Tg マウスの肝組織から抽出した RNA を検討したところ、さまざまな発がん関連遺伝子の mRNA 塩基配列が、野生型のコントロールマウスの肝組織由来の RNA 配列と比較して顕著に塩基変化が生じていることが明らかとなった。

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、 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、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 Tg マウス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：HepG2 細胞、Huh7 細胞、ならびに Hc 細胞では、H₂O₂ による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リン酸化の変化については、刺激後 1 時間でリン酸化スポットは約 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。刺激によりリン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、細胞死刺激によるリン酸化の変化が、細胞死関連遺伝子を誘導する可能性が示唆された。

上述の結果を元に、細胞死抵抗性の異なる肝がん細胞株を比較検討することで、責任分子群の絞り込みを行った。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作用すること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 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。NPM のリン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 のリン酸化部位を変異させた非リン酸化型 NPM ベクターを作成し、非リン酸化型 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。

さらに、23 症例（HBV 陽性 5 例、HCV 陽性 13 例、非 B 非 C 5 例）の肝がん組織・非がん部組織を用いて NPM の発現を検討すると、NPM ならびにリン酸化 NPM (p-NPM) は、がん部において非がん部より発現が有意に亢進していた。また p-NPM は、腫瘍径の大きい例、多結節例、単結節周囲増殖型/多結節癒合型でがん部の発現が高い傾向があった。加えて NPM は、非がん部肝組織の活動性の高い例において有意に高値であった。さらに p-NPM 高値例は、再発までの期間が有意に短縮されていた。このように NPM、とりわけ p-NPM はヒト肝がん組織の形質と密接な関連が示唆された。

(5) HCV コア蛋白質と PA28 γ に関する解析：HCV コア蛋白質によって単離されてきた宿主蛋白質遺伝子は合計 11 あったが、そのうち 3 種類の遺伝子のノックダウンを試みた。Ambion で事前設計された siRNA によって有為に発現レベルが低下したことを Real time PCR によって確認した。遺伝子ノックダウン 24 時間後に、HCV JFH1 を moi=0.5 で感染させて、24 から 120 時間後に細胞および細胞上清を回収し、RNA を抽出し、cDNA を合成し、HCV RNA および GAPDH の mRNA 量を測定した。そのうち、 α -Enolase 遺伝子の発現をノックダウンした場合、JFH1 のウイルス RNA 量は細胞内および細胞外において有為に減少したが、他遺伝子発現において影響は認められなかった。

PA28 γ を阻害蛋白質としてヒト肝臓ライブラリーから 3 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の変化は認められなかった。ヒストンのユビキチン化を解析したところ、PA28 γ 発現によってユビキチン化ヒストンが減少し、PA28 γ ノックダウンによってユビキチン化ヒストンの量は増加した。また、コア蛋白質の発現によって、ユビキチン化ヒストン量は減少したことから、標的遺伝子発現プロモーターの調節に関与している可能性が考えられた。ユビキチン化ヒストンの細胞内局在は通常細胞核内に限局して認められ、PA28 γ ノックダウンによって核周囲にも認められた。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 マウスで細胞増殖誘導能が強く観察され、Wild type マウス以

外で、DNA 修復が著しく減弱されていた。

(6) HCV 感染による P-body 及び Stress granule 形成の観察とそれらに関わる因子の HCV 生活環における役割の検討：HCV-JFH1 感染(MOI:4)31 時間後の PML ノックダウン RSc 細胞内での HCV コア蛋白質の発現量がコントロール細胞と同程度であるにも関わらず、培養上清中に分泌されたコア蛋白質の量はコントロール細胞の 19%まで顕著に減少していることを見出した。さらに、感染(MOI: 0.1) 4 日後の培養上清中のコア蛋白質の量はコントロール細胞の 5%までに減少したが、細胞内の HCV RNA 複製レベルは 50%程度の減少に留まっていた。また、HCV 感染や複製による PML nuclear body の破壊や PML の細胞内局在には大きな変化が観察されなかった。そして、HCV 感染 PML ノックダウン細胞もコントロール細胞同様、コア蛋白質が脂肪滴と共局在していることが観察された。

一方、RSc 細胞において、PML IV はがん抑制因子 p53 の転写機能を活性化した。さらに HCV コア蛋白質を共発現させても、p53 の転写機能は抑制されず、PML IV による p53 の転写機能の活性化を相乗的に増強させた。

亜ヒ酸は、少なくとも 1 μ M 以下の濃度においては細胞毒性もなく、HCV RNA 複製を顕著に抑制した (全長 HCV-O 株 EC₅₀: 0.19 μ M、そのレプリコン EC₅₀: 0.48 μ M、JFH1 株: EC₅₀: 0.28 μ M)。興味深いことに、亜ヒ酸処理後の PML の細胞内局在を観察した結果、PML が核内の PML nuclear body から細胞質へ移行していることが分かった。しかしながら、亜ヒ酸の抗 HCV 効果は、PML knockdown 細胞とコントロール細胞間で有為な差が認められず、PML は関与しないことが判明した。一方、抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) とビタミン C (VC) の併用により、亜ヒ酸の抗 HCV 効果がキャンセルされた。

HCV 感染により P-body 形成が阻害され、

P-body に蓄積していた DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 がウイルス産生の際である脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV コア蛋白質と共局在した。一方、HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。経時的な観察の結果、HCV 感染 12 時間後や 24 時間後においては、HCV 感染による P-body 形成の阻害はみられなかったが、HCV 感染 36 時間後より P-body 形成の阻害が始まり、48 時間後では顕著となった。

DDX6 をノックダウンした RSc 細胞に HCV-JFH1 株 (遺伝子型 2a) を感染させると、コントロール細胞に比べて、感染細胞内の HCV RNA の複製レベルと培養上清中に分泌されるコア蛋白質の発現量が顕著に抑制された。これに相関して、DDX6 ノックダウン細胞の培養上清に産生された HCV の感染性もコントロール細胞由来のものに比べて顕著に減少した。さらに全長 HCV-O 株 (遺伝子型 1b) 複製細胞の DDX6 をノックダウンしても、細胞内の HCV RNA レベルとコア蛋白質の発現量がコントロール細胞に比べて、顕著に減少した。

HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝がん細胞株 Li23 のがん抑制因子 p53 cDNA をクローニングして、塩基配列を決定した結果、72 番目のアミノ酸はアルギニンタイプ (P72R) であり、HuH-7 細胞における p53 と同じ多型性であった。さらに調べた全てのクローンにおいて、A138P あるいは R342P の変異も検出した。一方、Li23 細胞における内在性 p53 の転写機能をルシフェラーゼアッセイにより解析したが、p21^{waf1} のプロモーター活性は HuH-7 細胞と同様、活性化がみられなかった。

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。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°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。

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。

(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：まず HCV JFH-1 株でコア蛋白質のアミノ酸変異の影響を評価した。コア蛋白質アミノ酸が RL・RM・QL・QM の 4 種類の JFH-1 株を準備し、Huh7.5.1 細胞で細胞内および培養上清中のコア抗原量を測定した。その結果、細胞内と培養上清中のコア抗原量に大きな差はなく、コア蛋白質の変異は培養細胞での JFH-1 株の複製とウイルス粒子形成にほとんど影響を与えないと考えられた。

次に、genotype 1b の AHC-1b 株を用い検討を行った。コア蛋白質アミノ酸が RL・RM・QL・QM の 4 種類の株を用い、Huh7.5.1 細胞

で増殖を検討したところ、細胞内と上清中のコア抗原量にほとんど差を認めず、これらのコア蛋白質の変異は AHC-1b 株においても増殖複製に影響を与えないと考えられた。

さらに、HCV の構造領域が genotype 1b の TH 株で非構造領域が JFH-1 株であるキメラウイルスを用い同様の検討を行った。コア蛋白質アミノ酸が RL・RM・QL・QM の 4 種類の株の RNA を Huh7.5.1 細胞に導入しコア抗原量を測定した。コア蛋白質のアミノ酸が RL・RM の株では培養上清中のコア抗原量が QL・QM の株に比べ約 10 倍高値であった。しかし、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 QL・QM の株で高値であった。また、感染力価を比較したところ、QL・QM 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。

さらに FACS を用いてこれらの株の感染細胞での広がりや HCV 蛋白質の蓄積を評価した。その結果、QL・QM の株では遺伝子導入後、徐々に感染細胞数が低下していたが、HCV 蛋白質の蓄積を表す MFI 値は徐々に高くなっていった。また、細胞周期に与える影響も解析した。QL・QM の株では、RL・RM の株と比較して S 期の細胞がより少なく、G0/G1 期、G2/M 期の細胞が多くなっていた。

NS5A 蛋白質の ISDR の変異が HCV の培養細胞内での増殖複製に与える影響についても検討を行った。まず、JFH-1 株のサブジェノミックレポーターレプリコンを用いて増殖能への影響を検討した。JFH-1 株の ISDR を genotype 2a の野生型に置換した株を通常の JFH-1 株と比較したが、その増殖能に差を認めなかった。次に ISDR を野生型に置換した全長の JFH-1 株でも検討を行った。それぞれの全長 RNA を導入した細胞で細胞内、上清中のコア抗原量を測定したところ、やはり ISDR の置換

により差を認めなかった。

次に、AHC-1b 株を用い genotype 1b 株での検討を行った。AHC-1b 株の ISDR を genotype 1b 株野生型に置換し、通常の AHC-1b 株と比較する事でその影響を検討した。その結果、ISDR を genotype 1b 株野生型に置換した株では、細胞内と上清中のコア抗原量が低下し、ISDR 野生型配列は genotype 1b の株でのみ培養細胞内での増殖を抑制すると考えられた。

(8) HCV コア蛋白質が細胞の脂質代謝に及ぼす影響の解析：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 活性はコア蛋白質発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -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、 δ -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。 δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraenoic acid (ETYA) によってコア蛋白質発現細胞のみで 18:1(n-9) が著増した。この結果から、コア蛋白質発現 HepG2 細胞においても δ -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、コア蛋白質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)、 δ -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。

HCV 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

加していることが認められた。

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) の catalytic subunit である p110 α 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 γ 、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ことが示唆された。

2. HBV 発がん分子機序の解析

・HBV 関連肝がんにおいては、TGF β 受容体(TR β II)、Smad2、Smad4 遺伝子には変異は認められなかった。

・B 型慢性肝炎患者の肝組織における pSmad3L と pSmad3C の染色性は互いに相反性を示した。すなわち、pSmad3L が核に強く染色される症例では pSmad3C の染色性は弱かった。C 型慢性肝炎では pSmad3L の染色性は肝線維の進行とともに増加したが、B 型慢性肝炎では、線維化の軽い症例でも pSmad3L が核に強く染色されるものが多数認められた。

・核における pSmad3L の染色性は、患者血

中 HBV DNA 量に相関していた。

・その後肝がんを発生した B 型慢性肝炎患者肝においては、HBx、pSmad3L、cMyc の発現は互いに関連しており、肝硬変、肝がんへの進行とともに染色性は強まった。

・JNK、pSmad3L、c-Myc の発現パターンは一致しており、B 型慢性肝炎の進行(肝硬変、肝がん)とともに増加した。対照的に、pSmad3C/p21WAF1 の染色性は減弱した。

・培養細胞において、pSmad3 のリンカー部位リン酸化をブロックすると、HBx を発現する細胞における pSmad3L による細胞増殖が抑制された。

・X 遺伝子導入 Tg マウスにおいても HBx、pSmad3L、c-Myc の染色性はよく一致した。また、正常肝から、前がん病変、肝がんへの進行とともに、染色性は増加した。

・肝生検時に pSmad3L の染色性が強かった症例においては、28 例中 6 例で肝がんが発生したが、pSmad3L 発現の弱い症例では 32 例中 1 例のみで肝がんが発生した。反対に、pSmad3C 発現の弱い例のみで肝がんが発生し、pSmad3C 発現の強い例においては肝がんの発生は認められなかった。

・HBV 関連肝がんにおいては、PTTG1 染色性が増強していた。B 型慢性肝炎では染色性は弱く、肝硬変、肝がんへと進展するにつれて増強した。二重染色では、PTTG1 と HBx の分布は一致していた。

・X 遺伝子 Tg マウス肝においても PTTG1 タンパク量は前がん病変、肝がんへと進展するにつれて増強した。二重染色では、PTTG1 と HBx の分布は一致していた。

・培養細胞 Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x) を用いた検討で、HBx が PTTG1 の発現を増強することが確認された。HBx による PTTG1 タンパクの増加は、転写後に起こっていた。

・PTTG1 はリン酸化後にユビキチン化され、プロテアソームで分解される。HBx はリン酸

化された PTTG1 のユビキチン化を阻害していた。リン酸化 PTTG1 は、PP2A 阻害後 (okadaic acid) に、HBx 発現下にものみ MG132 (プロテアソーム阻害薬) 存在下で検出された。すなわち、HBx はリン酸化 PTTG1 の分解を阻害する。また、PTTG1 と HBx は共局在していた。HBx 発現細胞を MG132 で処理してもユビキチン化 PTTG1 は増加しなかった。対照である Occludin のユビキチン化は HBx の影響を受けなかった。

・HBx は PTTG1 と SCF (Skp1-Cull-F-box) protein complex との相互作用を阻害した。

HBx は Cull と相互作用・共在していた。

・HBx による PTTG1 のユビキチン化の阻害を介した PTTG1 量の増加は、肝腫瘍の悪性化、転移性の獲得等に関与していると考えられる。

D. 考察

1. 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、それらの Tg マウスが高率に脂肪肝を発症し、さらに肝がんの発症と関連することが明らかになった。また、HCV と関連する悪性リンパ腫の存在が臨床的にも知られているが、NS3 Tg マウスでは高率にリンパ球の異常増殖が見られ、NS3 蛋白質がリンパ球の増殖、腫瘍化に何らかの影響を及ぼしていることが推測された。クラススイッチに必須な変異誘導因子とされる AID の過剰発現が悪性リンパ腫の 2 例で免疫組織化学的に確認された。NS3 発現により宿主遺伝子突然変異の導入率が上昇している可能性も考えられるので、定量

PCR 法により各組織、特にリンパ組織での AID 発現を調べ、リンパ球増殖性病変との関連を解析する必要がある。

DNA マイクロアレイ解析により、発症前の NS3 Tg マウスの遺伝子発現プロファイルの特徴を網羅的に調査し、変化を示す蛋白質、遺伝子を解析することで、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 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 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 Δ 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、 Δ Np73 が強く誘導されることがわかった。今後は Δ 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 Δ 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られる。

(2) HCV NS3 蛋白質の多様性及びコア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：我々は、HCV NS3 蛋白質 N 末端 120 残基の二次構造の多型性に着目し、本多型性と C 型慢性肝炎に対する PegIFN/RBV 併用療法の治療効果ならびに肝発がんとの関連性について前向きに臨床例の検討を行った。その結果、グループ B とグループ A/C では、PegIFN/RBV 併用療法の治療効果に差異があること、グループ A とグループ B/C では発がんリスクが異なる可能性があることが明らかになった。

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。第一に、NS3 蛋白質に存在する serine protease が感染細胞内で Cardif 分子を切断不活化することで、interferon regulatory

factor-3 (IRF-3)のリン酸化と二量体形成を阻み、核移行経路を抑えることで、細胞内 IFN シグナル伝達を阻害することである。IRF-3 二量体は、核内へ移行し IFN-stimulated response element (IRSE)に結合して IFN により誘導される種々の宿主側の抗ウイルス蛋白質などの誘導に関わるので、IRF-3 の不活化は IFN による抗ウイルス治療の効果にも影響することが予想される。本研究で、グループ B 感染症例では、非 B 感染症例に比し、C 型慢性肝炎に対する PegIFN/RBV 併用療法の抗ウイルス学的効果が劣ることが示された。PegIFN/RBV 併用療法の治療効果予測のウイルス因子の一つとして有用であると思われた。

第二に、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、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。今回の研究にて、PegIFN/RBV 併用療法を行った患者コホートをを用いて、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ものと思われる。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は推し進めていく必要がある。

一方、NS3 蛋白質の特定のアミノ酸変異

(NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶) は、非がん患者に比べて、肝がん患者に有意に多く見られた。また、コア蛋白質の特定の変異 (Core-Q⁷⁰) も肝がん患者に有意に多く見られた。さらに、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 及び Core-Q⁷⁰ の両方あるいはどちらか一方を有する HCV 株は肝がん患者の約 90%、非がん患者の約半数に見られ、有意に肝がん患者に多かった。Kaplan-Meier 解析により、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 変異株の累積肝がん発症率は、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった。また、Core-Q⁷⁰ 変異株の累積肝がん発症率も、それ以外のウイルス株に比べて、有意に早期から高率であった。一方、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 変異及び Core-Q⁷⁰ 変異のいずれも持たない HCV 株の累積肝がん発症率は、それらの変異を持つ HCV 株に比べて、有意に低率であった。以上の成績より、NS3-Y⁵⁶/Q⁸⁶ 変異株及び Core-Q⁷⁰ 変異株は高発がん性 HCV 株であると考えられ、肝がん発症リスクの予測診断の指標として有用である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：遺伝子編集酵素ファミリー分子のひとつである APOBEC2 が、HCV 感染を契機とする慢性肝炎から肝発がんに至る過程において、肝細胞に発現誘導されることがわかった。また、APOBEC2 が肝細胞に発現する結果、発がん関連遺伝子の RNA に塩基変化が惹起されること、APOBEC2 が肝組織に恒常的に発現した結果、肝細胞がんが発生することが APOBEC2 Tg マウスの詳細な解析から明らかとなった。以上の結果から、HCV 感染に起因する肝細胞における持続的な炎症の結果、遺伝子編集酵素 APOBEC2 の発現が肝細胞に誘導され、宿主肝細胞のさまざまな発がん関連遺伝子の RNA 配列に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。

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