

sequencing からは、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わかった。

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: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リン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、がん細胞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、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、生細胞数は減少した。このことから、NPM のリン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、治療標的になり得るか否かを検討する。また、これまでの検討で、ヒト肝がんにおいて 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: HCV コア蛋白質を用いて単離されてきた遺伝子のうち、ホスホピルビン酸ヒドラーターゼがウイルス複製あるいはそれ以外の過程で機能している事が考えられる。ホスホピルビン酸ヒドラーターゼは解糖系の酵素で、2-ホスホグリセリン酸がホスホエノールピルビン酸に変換する。宿主解糖系がウイルス増殖に関与する可能性が示されたが、より詳細な機能解析が今後必要である。

PA28 $\gamma$  を囚蛋白質としてヒト肝臓ライブラリー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ーム群複合体のコンポーネントは、細胞内での局在の一致が認められ、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ロックダウンしても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 では DNA 修復および細胞増殖誘導能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いたことから、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 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：これまで多くのウイルス感染において、PML が分解されることや細胞質へトラップされ、その機能が抑制されることが知られているが、HCV の場合、HCV 感染細胞や HCV RNA 複製細胞において、PML の細胞内局在の変化は認められなかった。また、PML は HCV RNA 複製には関与しなかったが、HCV 粒子産生に必要であることが示唆された。さらに PML ノックダウン細胞においても HCV コア蛋白質は脂肪滴に局在したので、PML はコア蛋白質が脂肪滴にリクルートされた後のステップに関与していることが示唆された。一方、コア蛋白質は PML による p53 の転写機能の活性化をさらに増強させた。HCV JFH1 感染細胞におけるアポトーシスの誘導との関連が示唆された。

亜ヒ酸は少なくとも 1 mM 以下の濃度においては細胞毒性もなく、顕著に HCV RNA 複製を抑制することが認められ、C 型肝炎の治療薬と

なる可能性が示唆された。また、NAC と VC の併用効果により、亜ヒ酸による抗 HCV 活性には、酸化ストレスが関与していることが示唆された。

P-body は宿主 mRNA の分解、翻訳制御、そして貯蔵の場でもあり、RNA ウイルスの標的としても知られている。本研究により、HCV 感染の結果、P-body 因子である DDX6、Lsm1、Xrn1、PATL1 そして Ago2 の P-body 形成が阻害され、脂肪滴周辺にリクルートされ、リングを形成して 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。HCV RNA ゲノムは宿主 mRNA や HIV-1 mRNA と異なり、5'cap 構造を保持しないことと一致する。

さらに DDX6 をロックダウンすると HCV RNA 複製や感染性が顕著に抑制されることを見出した。この結果、DDX6 が HCV 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。最近、肝特異的な microRNA miR-122 が HCV RNA 5'UTR に結合し、HCV の翻訳及び RNA 合成を促進することが報告されたので、DDX6 の miR-122 による HCV 複製促進にも関与していることが考えられる。一般に DDX6 は宿主 mRNA や HIV-1 mRNA に対しては抑制的に作用するが、何故 HCV 複製に対しては促進的に作用するのかその相反する分子機序については、今後の検討課題である。

これまで HCV 生活環を再現できる培養細胞系は唯一ヒト肝がん細胞株 HuH-7 のみであった。HuH-7 細胞におけるがん抑制因子 p53 はすでに変異しているため機能しないので、p53 の HCV 生活環における役割や HCV による細胞がん化機構の解明には HuH-7 細胞は適していなかった。一方、ヒト不死化肝細胞は不死化の際に p53 の機能抑制する SV40 T 抗原やパピローマウイルス E6 を強制発現させているため、p53 の機能解析には都合が悪かった。最近、我々は、HCV 生活環の再現可能な新しいヒト肝がん細胞株 Li23 システムを開発したので、この

細胞株が p53 の機能解析に有効であるか検討したが、調べた全てのクローンにおいて、p53 遺伝子は変異型で p53 の機能が失活していることがレポーターアッセイより判明した。今後、HCV 生活環を再現可能な p53 が野生型であるヒト肝細胞の探索が課題である。

Stress granule 因子は、ポリオウイルスや 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 36 時間後に stress granule が形成されることを見出した。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 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。

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。

(7) HCV コア蛋白質及び NS5A 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

がんや IFN 感受性に関与しているコア蛋白質アミノ酸変異が、HCV のライフサイクルに与える影響を解析した。genotype 1b/2a のキメラウイルスである TH/JFH-1 株で、aa70 のアミノ酸変異(R/Q)により感染性ウイルス粒子形成効率の低下と、それに伴い HCV 蛋白質の細胞内への蓄積が認められるようになった。またこの aa70 のアミノ酸変異(R/Q)をもつキメラウイルスの感染により細胞周期が停止している細胞が増加していた。これらの事象が HCV 感染に関与する肝発がんに関与している可能性が示唆された。しかし、これらの現象は genotype 2a の JFH-1 株の感染では確認できず、また全長が genotype 1b 株由来である AHC-1b 株感染でも観察されなかったことから、このコア蛋白質アミノ酸変異の影響は、HCV の株依存性である可能性が考えられた。しかしその一方で、AHC-1b 株が JFH-1 株や TH/JFH-1 株に比べ細胞内での複製能が低い事が影響している可能性も考えられ、この点については他の genotype 1b 株を用いた培養系、もしくは他の genotype 1b/2a キメラウイルスを用いた培養系による今後の検討が必要と考えられた。

同様に JFH-1 株と AHC-1b 株を用い、NS5A 蛋白質の ISDR のアミノ酸変異数が HCV のライフサイクルに与える影響を解析した。genotype 2a である JFH-1 株の ISDR を 10 アミノ酸が異なっている J6 株のものと置換し比較したところ、ウイルスの複製や感染にほとんど影響を与えなかった。そこで genotype 1b である AHC-1b 株を用い、その ISDR を 7 つのアミノ酸が異なる 1b 野生型に置換し比較したところ、ウイルス増殖能の低下が認められた。これは、臨床的に観察される ISDR の変異数が多いほど血中ウイルス量が少なく、IFN 治療に対する感受性が良くなるという事象と矛盾するように見える。またこの ISDR の置換の効果が、AHC-1b 株でのみ観察可能で JFH-1 株では見られなかったことから、ISDR の効果もコア蛋白質の変異と同様に遺伝子型もしくは株に特

異的である可能性が考えられた。今後、コア蛋白質変異と同様に、JFH-1 株の NS5A 領域すべてを genotype 1b 株のものに置換し、さらに ISDR を変化させる事でウイルスのライフサイクルに与える影響を解析する事が必要と考えられた。

(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。

## 2. HBV 発がん分子機序の解析

B 型肝炎における肝発がん機序として、HBV ゲノムの組込み、染色体組換え亢進などと並んで、トランス活性化蛋白である HBx 蛋白質の転写活性化が挙げられる。実験系ではがん遺伝子の発現をも増強する。HBV 自身のエンハンサーを活性化して、HBV の増殖を調節するという働きも持つ。HBx 蛋白質は MAP キナーゼ等の細胞内のシグナル伝達を亢進させ、細胞増殖をもたらす働きが示されている。さらに、細胞周期やアポトーシスに影響を与え、細胞増殖と細胞死の双方に影響を与えている。

3つの独立したグループによる Tg マウスを使った研究で、HBx 蛋白質の肝発がん作用が示されている。HBx 蛋白質はいわゆるがん遺伝子産物ほどの発がん作用はもたないが、細胞増殖/死を調節することで、肝臓におけるがん化にウイルス因子として関与していると推測される。

この様に、HBx 蛋白質は B 型肝炎における肝発がんにおいて重要な役割を演じていると考えられるが、今回の我々の結果は、HBx 蛋白質による肝発がんにおける下流シグナルの一つの可能性を示すものであり、今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

## E. 結論

(1) HCV NS3 蛋白質発現 Tg マウスを樹立した。この NS3 Tg マウスは高率に悪性リンパ腫や脂肪肝を発症し、約 10%の個体に孤発性の高分化～中分化型肝細胞がん発生した。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 残基の蛋白質二次構造の多型性が、C 型慢性肝炎における PegIFN/RBV 併用療法の治療効果に影響を及ぼし、発がんリスクと関連性を有する可能性が示唆された。治療効果の予測や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。

また、NS3-Y56/Q86 変異及び Core-Q70 変異は、いずれも独立して肝がん発症と有意の相関を示した。NS3-Y56/Q86 及び Core-Q70 を併せ持つウイルス株は最も早期から肝がんを発症する傾向が見られた。このような高発がん性 HCV 株に対してより積極的なウイルス排除の治療を行い、肝がん発症を予防する必要がある。

(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込まれ、そのうちの一つとして Nucleophosmin を同定した。

(5) HCV コア蛋白質との結合因子として、ホスホピルビン酸ヒドラターゼが単離され、宿主解糖系とウイルス増殖との関連性が示唆された。今後、コア蛋白質との相互作用など、そ

の機能解析が必要と考えられる。また、PA28  $\gamma$  と結合するポリコム複合体蛋白質は結合および細胞内局在が確認され、遺伝子改変マウスによる肝障害試験によって、PA28  $\gamma$  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がわかった。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で重要な情報である。

(6) HCV 感染や複製により PML の局在の変化はみられなかったが、PML が HCV 粒子産生に関与していることが示唆された。HCV コア蛋白質は PML による p53 の転写機能の活性化を相乗的に増強させた。亜ヒ酸の抗 HCV 活性とそのメカニズムを示し、亜ヒ酸の分子標的である PML は HCV RNA 複製には関与しないことを見出した。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。HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。DDX6 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。

HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝がん細胞株 Li23 も HuH-7 同様、がん抑制因子 p53 に変異を検出した。

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が判明した。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を明らかにした。この細胞内での 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。また ISDR のアミノ酸変異数を増加すると、ウイルスの増殖能の低下が観察された。

(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。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防、病態改善薬の開発に向けて重要な発見といえる。

(9) B 型肝炎における肝発がん機序として HBx 蛋白質による働きが明らかになってきている。HBx 蛋白質から細胞増殖、肝発がんに至る経路の一つとして、TGF $\beta$  下流の Smad3 のリン酸化の分別化による経路が今回示されたと考えられる。今後、この系の抑制等、治療に関連した方策の開発が期待される。

## 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. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human mcl-1. *J Virol*, Oct; 83 (19): 9993-10006, 2009.
2. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide YH, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol*, 90 : 1681-1691, 2009.
3. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 50(5): 883-894, 2009.
4. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*, 83(18):9237-9246, 2009.
5. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem*, 106(6):1123-1135, 2009.
6. Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion*, 79(1): 36-39, 2009.

7. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology* 53: 44-48, 2010.
8. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 53:49-54, 2010.
9. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, 54(11): 684–690, 2010.
10. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 82(8): 1364–1370, 2010.
11. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*, 111(3): 676–685, 2010.
12. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, Hotta H, Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. *Intern Med*, 49(12): 1119-1122. 2010.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. 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.
20. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5. 2012.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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)
25. 勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 堀田博. NS5A-IRRDR変異数. *医学のあゆみ*, 239 (12-13): 1208-1211, 2011.
26. 勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 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. Hotta H. Antiviral resistance. 26th International Congress of Chemotherapy



- and Infection. June 18-21, 2009, Toronto, Canada.
2. Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Molecular Mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 Diabetes. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009, Nice, France.
  3. Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Activation of JNK, but not P38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009, Nice, France.
  4. Shoji I, Katsutoshi Abe, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009, Nice, France.
  5. Shoji I, Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, October 30-November 3, 2009, Boston, USA.
  6. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y-H, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 14-18, 2010, Vienna, Austria.
  7. Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  8. Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  9. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y-H, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  10. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
  11. Hotta H. An overview of hepatitis C virus infection and clinical significance of viral sequence variations. International Seminar on Viral Diseases: Control and Prevention, September 28-29, 2010, Jakarta, Indonesia.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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 1 $\alpha$ . 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8, 2011, Seattle, USA.
16. 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.
17. 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.
18. 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 1 $\alpha$ . International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011, Sapporo, Japan.
19. 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.
20. Hotta H. Carcinogenesis in hepatitis B and C infection. International Scientific Meeting on Infectious Diseases. September 2011, Jakarta, Indonesia.
21. Hotta H. Carcinogenesis in hepatitis B and C infection. International Scientific Meeting on Infectious Diseases. Jakarta, September 21, 2011, Jakarta, Indonesia.
22. Hotta H. Chemoprevention of HCV-associated hepatocellular carcinoma. LIPI-ICIAR Workshop & Focus Group Discussion on Food Health and Medical Sciences. October 10, 2011, Jakarta, Indonesia.

23. Hotta H. Chemoprevention of virus-mediated cancer. LIPI-ISCC International Seminar on Translational Research in Cancer Chemoprevention. October 11, 2011, Jakarta, Indonesia.

**H. 知的財産権の出願・登録状況  
(研究代表者分)**

1. 堀田博. 特許第4565180号 p53 癌抑制蛋白との結合に關与するC型肝炎ウイルス非構造蛋白NS3のアミノ酸残基の同定と、医薬開發への利用 平成22年8月13日
2. 堀田博. 特願 2010-206800 C型肝炎ウイルス株の評価方法及びその利用

## 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 の関連の検討

研究分担者 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

**研究要旨:** 本研究の目的は、HCV-1b 型の NS3 領域蛋白質 N 末端 120 残基の二次構造に基づき HCV NS3 グループ分類を行い、この NS3 グループ分類と 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) 併用療法の治療効果および肝がん (HCC) の発生リスクとの関連性を、前向き患者コホート研究にて検討することである。

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 132 例である。HCV NS3 グループ分類は既報に従い、Robson 法によりグループ A, B, C に分類した。これら 3 グループに分類可能であった 129 例を解析対象とした。(1) NS3 グループ分類と PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の関連性、(2) HCV NS3 グループ分類と肝がんの関連性、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  $5.9 \pm 1.2$  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%)、混合型が 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 (アプリア法)、線維化ステージ、に有意差は見られなかった。NS3 グループ分類と PegIFN・RBV 併用療法の治療成績の検討では、sustained virological response (SVR) となった症例は、グループ A/C に多く (52%)、グループ B に少なかった (32%) ( $P < 0.05$ )。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。

本研究により、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 PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の予測に有効であり、また、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) 遺伝子上には抗 HCV 療法に感受性を有する領域があり、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) 併用療法の治療効果を、ウイルス学的差異から予測する試み

がなされている。また、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 型慢性肝疾患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、(1) HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性と C 型慢性肝炎の PegIFN・RBV 併用療法の治療効果についての関連性、(2) HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性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 に分類可能である (Ogata S, Hotta H, et al. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2835-41)。HCV NS3 蛋白質二次構造の差異が、PegIFN・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 (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 (アプリア法)、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. HCV 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

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 (図 1)。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 (p=0.08)。グループ B とグループ A/C に分類して検討を行った (図 2)。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 と関連性を有するすることが示唆された。

図1. グループ別SVR率 (ITT解析)

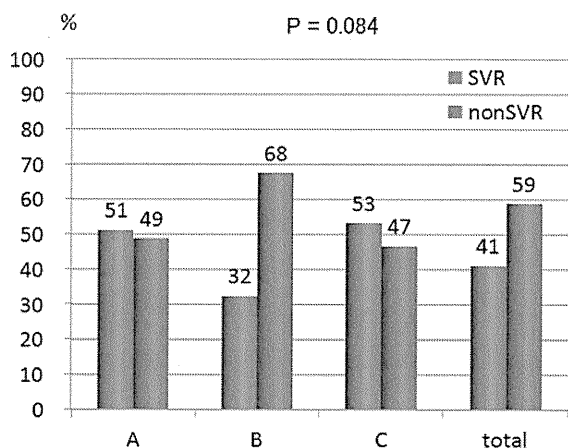
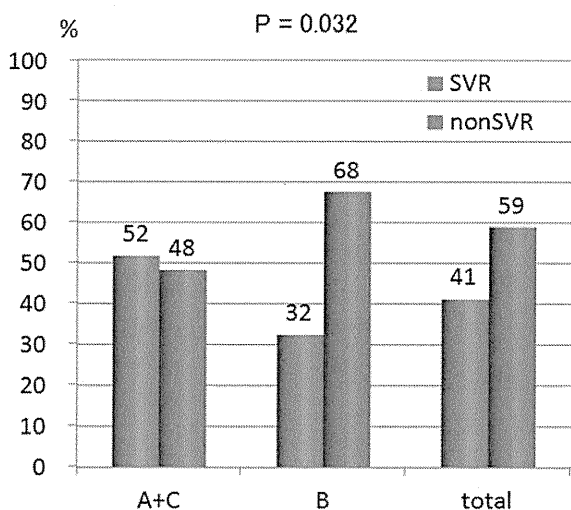


図2. グループ別SVR率 (ITT解析)

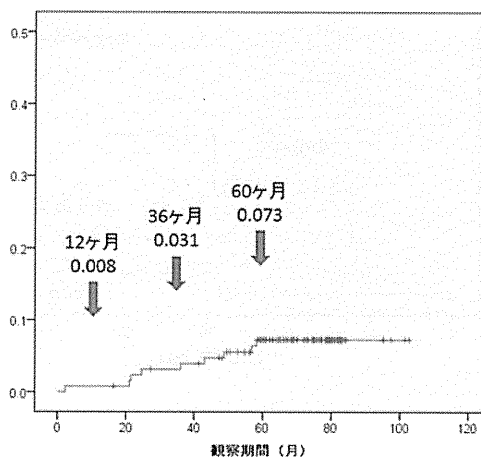


### 3. PegIFN・RBV併用療法症例における前向き HCC 累積発生率

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 3)。

図 3 PegIFN・RBV治療コホートにおけるHCC累積発生率



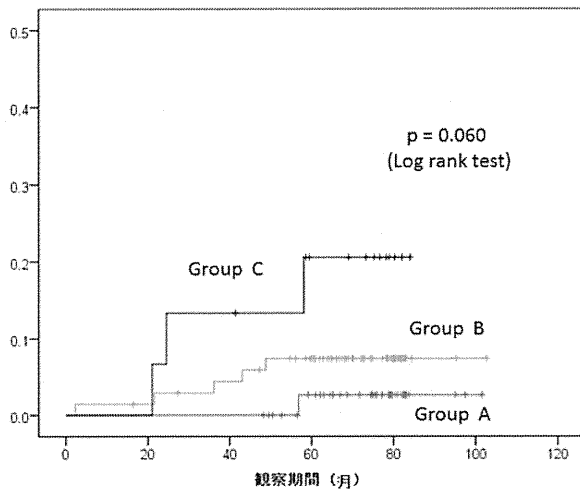
### 4. HCV NS3 蛋白質の二次構造分類と肝発がんの関連性

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 4)、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。

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4 NS3グループ別HCC累積発生率



#### D. 考 察

私たちは、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を示した。

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。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 P

egIFN・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る。

第二に、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参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、引き継ぎ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、HCV NS3 蛋白質の構造上の差異が、細胞内で宿主側蛋白質との 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 PegIFN・RBV 併用療法の治療効果に影響を及ぼし、発がんリスクと関連性を有する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が、C 型慢性肝炎における PegIFN・RBV 併用療法の治療効果の



予測に有効であり、また、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。

## 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito T, Kawata S. Down-regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese *fa/fa* Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol*, 44 : 583-591, 2009.
- 2) Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S. Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism*, 58: 1067-1075, 2009.
- 3) Takeda H, Nishise S, Fukui T, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Kawata S. Plasma Level of Granulocyte-Colony Stimulating Factor during Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis. *Hepato-gastroenterol*, 56: 348-351, 2009.
- 4) Nishise S, Takeda Y, Nishise Y, Fujishima S, Orii T, Otake S, Sato T, Sasaki Y, Takeda H, Kawata S. Biological effect of anaphylatoxin C5a on the generation of anti-inflammatory substances in leukocyte adsorption. *Ther Apher Dial*, 13: 509-514, 2009.
- 5) Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol*, 133: 208-217, 2009.
- 6) 柄沢 哲、富樫 整、斎藤貴史、河田純男、他： インターフェロン療法が著効した特発性血小板減少性紫斑病を合併したC型肝炎の1例。 *日本消化器病学会雑誌*, 106: 405-410, 2009.
- 7) 斎藤貴史、西瀬雄子、石井里佳、渡辺久剛、鈴木克典、河田純男：HCV NS3蛋白質多型性とC型肝炎の予後・治療効果予測。 *日本消化器病学会雑誌*. 106: 502-507, 2009.
- 8) Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 82: 1364-1370, 2010.
- 9) Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S. Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata Study - A cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 3828-3835, 2010.
- 10) Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Expression of the RNA-binding protein

- Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepatology*, 40: 432-437, 2010.
- 11) Nishise S, Takeda Y, Fujishima S, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise Y, Takeda H, Kawata S. Release of interleukin 1 receptor antagonist by combining a leukocyte adsorption carrier with ulinastatin. *Ther Apher Dial*, 14: 386-391, 2010.
  - 12) 伊藤純一、鈴木明彦、宇賀神智、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、三條麻衣、奥本和夫、西瀬雄子、渡辺久剛、齋藤孝治、齋藤貴史、河田純男：高齢者に発症した肝動脈化学塞栓療法(TACE)後のガス産生肝膿瘍の1例。日本高齢消化器病学会誌, 12: 83-87, 2010.
  - 13) 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  $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol*, 55: 896-905, 2011.
  - 14) 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.
  - 15) Ishii R, Togashi H, Iwaba A, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, 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.
  - 16) 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.
  - 17) 渡辺久剛、齋藤貴史、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) 河田純男、佐藤智佳子、齋藤貴史。治療方針のコンセンサス（コンセンサスマーケティング NASH）、第45回日本肝臓学会総会、神戸、2009年6月
  - 2) 齋藤貴史、三條麻衣、堀田博、河田純男、他。HCV NS3蛋白質二次構造の多型性とHCV RNA量およびペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測の検討。第45回日本肝臓学会総会、神戸市、2009年6月
  - 3) Ishii R, Saito T, Watanabe H, Shao L, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Togashi H, Kawata S. Induction of Prolactin in Hepatitis C Virus Infection and expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by cell-cultured hepatitis C virus. 17<sup>th</sup> International meeting on hepatitis C

- virus and related viruses, Yokohama, Japan: September 2010
- 4) Ishii R, Saito T, Watanabe H, Ugajin S, Sato T, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Togashi H, Kawata S. Occurrence of hepatocellular carcinoma after achieving sustained virological response to interferon therapy for chronic hepatitis C. Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Beijing, China: March 2010
- 5) Nishise Y, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Relationship between an Increased Bright Echo Pattern of the Liver on Ultrasonography and Metabolic Syndrome in a Japanese Population. The 20<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Beijing, China: March 2010
- 6) 石井里佳、斎藤貴史、河田純男、他. HCV NS3 アミノ末端領域蛋白質二次構造の多型性と治療効果予測. 第 190 回日本消化器病学会東北支部例会シンポジウム
- 7) 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
- 8) 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

**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、遺伝子編集酵素 AID や APOBEC2 がヒト肝細胞に誘導される。その結果、これらの酵素の有する遺伝子変異導入活性をして肝細胞のさまざまな遺伝子のゲノム配列に塩基変化が発生することが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析からは、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

遺伝子編集機能をもつ、遺伝子編集酵素 Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリーは、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、上皮細胞においてもゲノム異常が生成・蓄積することとなり、AID 発現が癌の発生につながるという可能性が示唆されるようになった。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いること、肝細胞への AID 発現により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、が明らかとなってきた。