

他方、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。HCV 感染による慢性肝炎・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根治的に制御しても、その後残存する肝組織に新たに肝癌の発生を認めるといふ、いわゆる多中心性発癌はヒト肝癌の最大の特徴である。また、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きた。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、肝細胞には不可逆的なゲノム異常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ためには多様な遺伝子異常の生成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・蓄積されているものと推定できる。

そこで、HCV 感染により惹起された慢性炎症刺激が肝細胞に引き起こすゲノム異常生成の分子機構、ならびにその全体像を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) 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を特定する。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する。

(2) 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 分子を発現するトランスジェニックマウスモデルを作成し、その表現型を検討する。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 トランスジェニックマウスの肝組織から抽出した DNA ならびに RNA 中の発癌に関連した代表的な遺伝子群の塩基配列を同定・解析する。

(3) HCV 感染により肝細胞中の発癌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 を実施する。

(4) HCV 感染による慢性肝疾患を背景として肝癌を発生した症例について、肝硬変組織、癌組織から抽出した 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する。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する。

(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に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)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タンパク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。

(2)CAG promoter下にAPOBEC2を発現するベクターを用いて、全身に恒常的にAPOBEC2を発現するトランスジェニックマウスを作成した。APOBEC2トランスジェニックマウスは発生過程においては目立った異常を認めなかったが、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トランスジェニックマウスに発生した腫瘍としては、肝細胞癌、肺癌、悪性リンパ腫などが確認された。APOBEC2トランスジェニックマウスに発生した肝細胞癌は、病理組織学的にはヒト高分化型肝癌にき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、トランスジェニック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、発癌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トランスジェニックマウスの肝組織からDNAとDNAをそれぞれ抽出し、代表的な癌遺伝子・癌抑制遺伝子の塩基配列を同定した。APOBEC2トランスジェニックマウスの肝組織から抽出した代表的な癌遺伝子・癌抑制遺伝子の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トランスジェニック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

癌関連遺伝子の 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。

(3)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、肝切除術時に採取した肝組織より 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。

(4) HCV 感染を伴う肝硬変組織を対象とし、肝癌発生例、肝癌未発生例、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 発癌症例のみならず、HCC 非発癌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。

(5) 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

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癌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、発癌に関連した遺伝子の 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、肝細胞癌が発生すること、が APOBEC2 トランスジェニック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癌関連遺伝子の RNA 配列に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。

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 からは、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、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、肝細胞中の発癌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.
- (6) Matsumoto Y, Marusawa H,

- Kinoshita K, Niwa Y, Sakai Y, Chiba T. Upregulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer. *Gastroenterology*, 139: 1984-1994, 2010.
- (7) Marusawa H, Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol*, 22: 442-447, 2010.
- (8) Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene*, 28(4): 469-478, 2009.
- (9) Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabeshima M, Fukuda Y, Chiba T, Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat*, 16:388-396, 2009.
- (10) Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer*, 125 : 2029-2035, 2009.
- 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.
- (7) Nonaka T, Takai A, Marusawa H, Uemura M, Chiba T, Hiai H, Honjo T, Kinoshita K. Carcinogenesis by activation-induced cytidine deaminase. 14th International Congress of Immunology, August 22, 2010, Kobe, Japan.
- (8) 丸澤宏之. AIDによる発癌関連遺伝子への変異生成と炎症発癌. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪国際会議場. 大阪.
- (9) 奥山俊介、丸澤宏之、千葉勉. 遺伝子編集酵素APOBEC2による発癌関連遺伝子へのRNA変異導入を介した肝癌発生

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

- の分子機構. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪国際会議場. 大阪.
- (10) 高井淳、丸澤宏之、千葉勉. 炎症性大腸発癌プロセスにおけるAIDの役割. 第69回日本癌学会学術総会. 2010/9/22. 大阪国際会議場. 大阪.
- (11) Marusawa H, Chiba T. Genetic aberration in hepatic stem cells leads to hepatocarcinogenesis. The 1st JSGE International Topic Conference “Stem cells in digestive organs”, September 25, 2010, Kamakura, Japan.
- (12) 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 肝癌の発生源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52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/13. パシフィコ横浜. 横浜.
- (13) 那須章洋、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹細胞への遺伝子異常の蓄積による肝癌発生の分子機構. 第52回日本消化器病学会大会・第14回日本肝臓学会大会 合同. 2010/10/14. パシフィコ横浜. 横浜.
- (14) Marusawa H. Molecular mechanisms linking inflammation, genetic alterations, and cancer development. BMB2010. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同. 2010/12/7. 神戸ポートピアアイランド. 神戸.
- (15) 丸澤宏之、千葉勉. 発癌過程における遺伝子異常生成の分子機構. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 BMB2010. 2010/12/07. 神戸国際会議場. 神戸.
- (16) 丸澤宏之. 炎症発癌における遺伝子異常の分子機構. 第68回日本癌学会学術総会. 2009/10/02. パシフィコ横浜. 横浜.
- (17) 高井淳、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹/前駆細胞への遺伝子異常蓄積からの肝発癌機序. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 2009/10/15. 国立京都国際会館. 京都.
- (18) 和田将弥、丸澤宏之、千葉勉. C型肝炎ウイルス感染により惹起されるインターフェロン関連遺伝子異常. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 2009/10/15. 国立京都国際会館. 京都.
- (19) 丸澤宏之. 消化器癌の発生過程において炎症が遺伝子異常の生成に果たす役割. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 合同. 2009/10/15. 国立京都国際会館. 京都.
- (20) 千葉勉、丸澤宏之. 炎症からの発癌における新しい遺伝子変異導入機構. 第82回日本生化学会大会. 2009/10/22. 神戸ポートアイランド. 神戸.
- (21) 丸澤宏之、千葉勉. 炎症発癌におけるゲノム不安定性誘導機序の解析とその標的治療. 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009/11/14. 東京ステーションコンファレンス. 東京.
- (22) Chiba T, Marusawa H. Activation-induced cytidine deaminase (AID) plays an important role in induction of gene mutations and genomic instability during inflammation-associated carcinogenesis. THE 25TH RADIATION BIOLOGY CENTER INTERNATIONAL, December 1, 2009, Kyoto, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

プロテオミクスを用いた肝臓における細胞死抵抗性の検討

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：肝臓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、ヒト肝臓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可能性を、肝臓細胞株やヒト肝臓組織を用いた解析から明らかにした。

A. 研究目的

2010年の厚生労働省の人口動態調査では、原発性肝臓の死亡数は、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。原発性肝臓の中で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排除が肝臓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、肝臓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

1) ヒト肝臓細胞株での検討

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次元ディフュゼ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。

2) ヒト肝癌組織を用いた蛋白質発現・磷酸化の解析

兵庫医科大学第一外科にて肝切除術を施行された HCV 陽性肝癌組織とその非癌部組織 23 症例を対象に、上述と同様の手法にて蛋白質発現・磷酸化の解析、ならびに遺伝子発現解析を行った。なお、ヒト肝癌組織を用いた解析に関しては、患者さんに十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得た。またすべての症例は匿名化し、また患者情報とプライバシーの管理を厳重に行った。

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それぞれ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癌細胞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 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。

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 の発現が低い肝癌細胞株 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。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。

3) ヒト肝癌組織での検討

HCV 陽性肝癌組織では、非癌部組織に比べて磷酸化(活性化)が増強、あるいは減弱している蛋白質がそれぞれ約 30 種類同定された。さらにこれら分子の遺伝子発現を確認したが、癌部・非癌部の間では、有意な遺伝子発現の変化は伴わなかった。さらに肝癌組織・非癌部組織間で磷酸化が変化する蛋白質群と、酸化ストレスにより肝癌細胞株で磷酸化が変化する上述の蛋白質群との間では、少なくとも 10 種類の蛋白質に一致が認められた。

また肝癌組織・非癌部組織を用いて NPM の発現を検討すると、NPM ならびに p-NPM (磷酸化 NPM) は、癌部において非癌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/多結節癒合型で癌部の発現が高い傾向があった。加えて NPM は、非癌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 はヒト肝癌組織の形質と密接な関連が示唆された。

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と考える。

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」、「抗癌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、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んだ。その中で NPM の役割を中心に検討した。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。

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、ヒト肝癌組織における検討からは、癌部組織での p-NPM の発現増強と再発への関与が明らかになった。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予定である。

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責任分子群が絞りこまれた。

G. 研究発表 (2009/4/1~2012/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ikuta Y, Hayashida Y, Hirata K, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H and Nishimura Y.: Identification of the H2-K^d-restricted CTL epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Science* 100:132-137, 2009
- 2) Yokoo K, Hamada A, Tazoe K, Sasaki Y, and Saito H.: Effects of oral administered S-1 on the pharmacokinetics of SN-38, irinotecan active metabolite, in patients with advanced colorectal

- cancer.
Ther Drug Monit 31:400-403,
2009
- 3) 佐々木裕
細胞死と免疫監視機構からの回避
特集 細胞死をめぐる最近の
トピックス
Surgery Frontier 2009年 16巻頁 60-65
- 4) 佐々木裕
知っておきたい肝炎ウイルスと肝発癌
特集 肝細胞癌の治療 2009~2011
コンセンサス癌治療 2009年 8巻
頁 121-125
- 5) 紙屋康之、田中基彦、佐々木裕
分担 アルコールと肝癌
最新医学 別冊 新しい診断の ABC 62
「アルコール性肝障害」高後裕 編
頁 141-149、2009年
最新医学社、東京
- 6) Yokomine K, Senju S, Nakatsura
T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y,
Harao M, Imai K, Baba H, Iwase
H, Nomori H, Takahashi K, Daigo
Y, Tsunoda T, Nakamura Y,
Sasaki Y and Nishimura Y.
The Forkhead Box M1
transcriptional factor as a
possible immune-therapeutic
tumor-associated antigen.
Int J Cancer 126:2153-63,2010
- 7) Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H,
Tanaka M, Suzu S, Sasaki Y and
Okada S.
Chronic hepatitis C viral infection
reduced NK cell frequency and
suppresses cytokine secretion:
Reversion by anti-viral treatment.
Biochem Biophys Res Commun
393:331-337, 2010
- 8) Ikeda K, Maeda S, Ashihara H,
Nagahama H, Tanaka M and
Sasaki Y.:
Transcatheter arterial infusion
chemotherapy with
cisplatin-lipiodol
suspension in patients with
hepatocellular carcinoma.
J Gastroenterol 45:60-67, 2010
- 9) Naoe H, Araki K, Nagano, Kobayashi
Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T,
Yamamura K, Sasaki Y, Saya H and
Kuninaka S.
The anaphase-promoting complex
/cyclosome activator cdh1 modulates
Rho GTPase by targeting p190
RhoGAP for degradation.
Mol Cell Biol 30: 3994-4005, 2010
- 10) Sasaki Y.
Insulin resistance and
hepatocarcinogenesis
Clin J Gastroenterol 3:271-278,
2010
- 11) 福林光太郎、田中基彦、佐々木裕
特集 肝胆膵 薬物治療学の進歩
- この30年
低用量 CDDP/5-FU 肝動注化学療法
肝胆膵 61:1125-1130, 2010
- 12) 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
- 13) 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

- 14) Watanabe T, Ishihara Ko, Hirose 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.学会発表

- 1) 田中基彦、丸山徹、佐々木裕
肝疾患におけるアルブミン構造多様性変化の検討 パネルディスカッション
「肝硬変の対策～原因療法から合併症の対策～」第 38 回日本肝臓学会西部会、2009 年 12 月 4 日、米子
- 2) 田中基彦、横峯和典、佐々木裕
肝細胞癌に対する癌ワクチン療法を用いた治療戦略 パネルディスカッション
「肝細胞癌の集学的治療の現状と近未来的治療(分子標的治療を含めて)」第 13 回日本肝臓学会大会
2009 年 10 月 15 日、京都
- 3) Tanaka M, Fukubayashi K, Ashihara H, Kamiya Y, Kudo Y, Tateyama M, Nagahama Y and Sasaki Y. Changes in clinical background of patients with hepatocellular carcinoma in Kumamoto.
3rd International HCC symposium, May 8, 2009, Kobe, JAPAN
- 4) 田中基彦、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・機能的変化と病態への関与についての検討
第 46 回日本肝臓学会総会 一般演題
- 2010 年 5 月 28 日、山形
- 5) 田中基彦、葦原 浩、福林光太郎、紙屋康之、工藤洋子、立山雅邦、永濱裕康、佐々木 裕
当科初回治療例における非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴
ワークショップ 2「非 B 非 C 肝癌の現況」
第 46 回日本肝癌研究会、2010 年 7 月 8 日、大阪
- 6) Sasaki Y, Dessouki O, Tanaka M, Nagahama H, Kamiya Y, Tateyama M, Suzu S and Okada S.
Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion
HCV 2010, Sep 12, 2010, Yokohama, JAPAN
- 7) 田中基彦、永濱裕康、佐々木 裕
蛋白質翻訳後修飾解析による肝癌の治療抵抗性の解明
シンポジウム 17「肝がんのメカニズムと治療戦略」
第 52 回日本消化器病学会大会、2010 年 10 月 15 日、横浜
- 8) 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
- 9) 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

- 10) 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

- 11) 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。HCV コア蛋白質によって 11 種類の遺伝子が単離され、PA28 γ によって 3 種類の遺伝子が単離された。 α -Enolase 遺伝子のノックダウンでウイルス増殖に低下が認められ、他遺伝子のノックダウンではウイルス感染への影響は認められなかった。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、その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増加した。それらの結果から、PA28 γ およびコア蛋白質によって宿主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

Split Ubiquitin 法を用いてコア蛋白質遺伝子を囚蛋白質にして、相互作用する膜蛋白質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、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、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。

(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

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、そのうち三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、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、HCVRNA および GAPDH の mRNA 量を測定した。そのうち、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局限して認められ、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。

D. 考察

PA28 γ を阻害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ノ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。CCl₄ 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には PA28 γ 機能が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 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 修復能は大きく影響されることがわかった。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る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol*, 83: 10427-10436, 2009.
 2. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism. *J Virol*, 83: 2389-2392, 2009.
 3. Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol*, 83: 7959-7969, 2009.
 4. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 6: 2539-2553, 2010.
 5. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, 54:206-220, 2010.
 6. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52: 411-420, 2010.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
2. 学会発表
1. 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治、HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
 2. 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治、ヒラルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
 3. Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma and E6AP in the Degradation of HCV Core Protein and the Viral Production. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
 4. Abe T, Kaname Y, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, Matsuura Y. Hyaluronan Participates in the IP-10 Induction in Cells Infected with HCV through an Engagement of TLR2 and CD44. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
 5. Wen X, Abe T, Taguwa S, Mori Y,

- Moriishi K, Matsuura Y. Suppression of HCV Replication in Hepatocytes through a Selective Induction of IRF7. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
6. 森石恆司、松浦善治、HCVによる脂質代謝障害の分子機序、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
 7. 寒原裕登、田畝修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森保、松浦善治、C型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
 8. 加藤大志、森嘉生、寒原裕登、要祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷亘、森石恆司、松浦善治、核小体蛋白質B23はC型肝炎ウイルス複製を抑制する第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
 9. Kambara H, Taguwa S, Fujia N, Noda T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 10. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 11. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
 15. 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.
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 - 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：加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
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 感染や複製により、がん抑制因子 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を見出した。(2) HCV Core 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。(3) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とそのメカニズムを示し、亜ヒ酸の標的である PML は HCV RNA 複製には関与しないことを見出した。(4) HCV 感染により P-body 形成が阻害され、P-body に蓄積していた発がん関連因子 DDX6、Lsm1、Xrn1、Ago2 及び PATL1 などの microRNA effector 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 Core と共局在することを見出した。(5) HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。(6) DDX6 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることを見出した。(7) HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝癌細胞株 Li23 も HuH-7 同様、がん抑制因子 p53 に変異を検出した。(8) 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。(9) HCV 感染により、感染 4 8 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 と共局在した。(10) 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ตอบสนอง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。(11) 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。

以上の研究成果より、HCV 蛋白質と宿主の発がん関連因子との相互作用や HCV の持続感染により誘導される宿主細胞内のストレス応答などの宿主要因が HCV 増殖や肝発がんに関与していることが示唆された。

A. 研究目的

現在、我が国の C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染者は約 200 万人いると推定される。我が国における肝がんの約 80%

において、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染が認められている。2009 年には約 3 万 3000 人が肝がんにより死亡し、肺がん、胃がん、大腸がんについてがん死亡の第 4 位を占めるに

至っている。B型肝炎とは異なり、HCV感染者の多くは持続感染が成立し、慢性肝炎となり、肝線維化を伴う肝硬変を経て、さらに肝がんへと進展する。特に肝脂肪化を伴った慢性肝炎患者は肝発がんリスクが高いため、肝脂肪化は肝発がんの主要な要因の一つである。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。

本研究では、これらの点を解決することを目指して、HCV蛋白質と結合する宿主因子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する。特にHCV蛋白質による種々の細胞内シグナル伝達経路の攪乱を介した肝発がんの分子機構を明らかにし、HCVの排除、肝発がんの予防及び治療法開発の分子基盤の確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

(1) PMLのHCV感染における役割

short hairpin (sh) RNA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 (Lightcycler, Roche)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O細胞を抗HCV Core抗体及び抗PML抗体で処理後、CoreはCy3、PMLはfluorescein isothiocyanate (FITC)により可視化した。

一方、HCV Core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HCV Core発現プラスミドをFuGene 6 (Roche)を用いて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。

(2) 亜ヒ酸の抗HCV活性の解析

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。亜ヒ酸の細胞毒性については、MTTアッセイにより解析した。

(3) HCV感染によるP-body形成への影響

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P-body因子の局在変化を詳細に観察する。細胞を固定後、抗HCV Core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、CoreはCy3、P-body因子はFITCにより可視化した。

(4) DDX6のHCV感染における役割

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Core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Core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。

アルタイム RT-PCR 法にて定量した。

(5) ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたがん抑制因子 p53 の解析

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。

(6) HCV 感染による stress granule 形成の観察

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 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。

(7) 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

(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) PML の HCV 感染における役割

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 Core 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 HCV Core 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 HCV Core 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、HCV Core 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 Core 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。

(2) 亜ヒ酸の抗 HCV 活性とその分子機構

亜ヒ酸は、少なくとも $1 \mu\text{M}$ 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 EC_{50} : $0.19 \mu\text{M}$ 、そのレプリコン EC_{50} : $0.48 \mu\text{M}$ 、JFH1 株: EC_{50} : $0.28 \mu\text{M}$)。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意な差が認められず、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。

(3) HCV 感染による P-body 形成への影響

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 がウイルス産生のある脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV Core 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。

(4) 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 Core の発現量が顕著に抑制された。これに関連して、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 HCV Core の発現量がコントロール細胞に比べて、顕著に減少した。

(5) HCV 感染や複製が可能な新しいヒト肝癌細胞株 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。

(6) 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 3 6 時間後に stress granule の形成が観察された。さらに、感染 4 8 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°C にシフトし 30 分間培養すると HCV