

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 7 2 時間)では、42°C で培養してもリング構造を維持し、HCV Core と共局在したままで顕著な局在の変化が見られなかった。同様に細胞を 0.5mM 亜ヒ酸ナトリウムで 30 分間処理しても非感染細胞では stress granule の誘導が見られたが、HCV 感染細胞ではリング構造を維持したままで顕著な局在の変化は観察されなかった。

(7) Stress granule 因子の HCV 生活環における役割

25nM siRNA を用いて、Stress Granule 因子である G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させると、感染 2 4 時間後の細胞内 HCV RNA 量はコントロール細胞に比べて、各々、約 40%、約 60%、約 60% の HCV RNA の顕著な減少が見出された。

D. 考察

(1) PML の HCV 感染における役割

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 Core は脂肪滴に局在したので、PML は Core 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、HCV Core は PML による p53 の転写機能の活性化をさらに増強させた。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。

(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 μ M 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。

(3) P-body と HCV との相互作用

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 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。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 をノックダウンすると 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。

(4) 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

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癌細胞株 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 による細胞癌化機構の解明には 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癌細胞株 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。

(5) Stress granule と HCV との相互作用

Stress granule 因子は、ポリオウイルスやヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)など多くのウイルスの標的となり、ウイルス感染により stress granule の形成が誘導されること、逆に stress granule の形成が阻害されることが知られている。本研究により、HCV 感染の場合、感染 3 6 時間後に stress granule が形成されることを見出した。昨年、我々は stress granule のみならず HCV 感染に伴い DDX6 や Ago2 などの P-body 因子もリング状構造体を形成し、HCV Core と共局在することを報告している。興味深いことに P-body 因子である DDX6 も HCV 感染 3 6 時間後に P-body 形成が阻害され始める。HCV 感染に伴い stress granule 因子と P-body 因子の動態が連動していることが示唆された。

G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 をノックダウンすると感染細胞内の HCV RNA の複

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

以上の結果より、HCV の慢性的な持続感染により、宿主細胞内にストレス応答が生じ、このストレスに伴う stress granule 因子の脂肪滴への集積が HCV 生活環への関与のみならず、細胞がん化と何らかの因果関係のあるのかもしれない。今後の検討課題である。

E. 結論

(1) HCV 感染や複製により、PML の局在の変化はみられなかった。

(2) PML が HCV 粒子産生に関与していることが示唆された。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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 がウイルス産生の場合である脂肪滴周辺にハイジャックされ、HCV Core と共局在した。

(6) HCV 感染により、decapping enzyme Dcp2 の P-body 形成は阻害されなかった。

(7) 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。

(8) 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。

(9) 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。

(10) HCV 感染により、感染 4 8 時間以降、stress granule 因子はリング状の構造体を形成し、HCV Core と共局在した。また、P-body 因子である DDX6 と共局在すること、そしてこのリング状構造体の中心が脂肪滴であることが判明した。

(11) 外来的なストレス（熱ショックや亜硫酸ナトリウム処理）に対して、HCV 感染細胞内に新規な stress granule の形成が誘導されなかった。

(12) stress granule 因子は HCV の生活環に必要な宿主因子であることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J Virol*, 83(5): 2338-2348, 2009.

(2) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new hepatoma cell line. *Virus Res*, 146(1-2): 41-50, 2009.

(3) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*, 154(10): 1671-1677, 2009.

(4) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N.

Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*, 50(3): 678-688, 2009.

(5) Kawai Y, Ikeda M, Abe KI, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA-harboring cells possessing the IFN-alpha-resistance phenotype. *Hepatology Res*, 39(9): 898-909, 2009.

(6) Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon gamma-like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology*, 50(2): 585-591, 2009.

(7) Vollmer S, Kappl V, Kaczor J, Flgel D, Rolvering C, Kato N, Kietzman T, Behrmann I, Haan C. Hypoxia-inducible factor 1 is upregulated by oncostatin M and participates in oncostatin M signaling. *Hepatology*, 50(1): 253-260, 2009.

(8) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res*, 82(1): 42-50, 2009.

(9) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol*, 154(5): 801-810, 2009.

- (10) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. *FEBS Lett*, 583(9): 1434-1438, 2009.
- (11) 有海 康雄、加藤 宣之. HCV による発癌メカニズム 慢性肝炎から肝癌にいたるパスウェイ. *日本臨床*、67 巻増刊号 3 : 138-142, 2009.
- (12) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatitic cell lines. *Hepatol Res*, 40(12): 1248-1253, 2010.
- (13) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro. *Liver Int*, 30(9): 1324-1331, 2010.
- (14) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆宇, 加藤宣之. DNA 損傷センサー ATM キナーゼと Chk2 は C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である. *岡山医学会雑誌* 122(1): 9-16, 2010.
- (15) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One*, 6(1): e14517, 2011.
- (16) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol*, 85(14): 6882-6892, 2011.
- (17) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res*, 157(1): 61-70, 2011.
- (18) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem Biophys Res Commun*, 409(4): 663-668, 2011.
- (19) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 31(6): 871-880, 2011.
- (20) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, in press.
- (21) Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body components PATL1 as a novel ALG2-interacting protein by in silico and Far-Western screening of proline-rich proteins. *J Biochem*, in press.
- (22) 有海康雄、加藤宣之. HCV による肝発癌機構、*日本臨床* (日本臨床社) 増刊号 新時代のウイルス性肝炎学 -基礎・臨床研

2. 学会発表

- (1) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (3) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (4) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (5) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Takazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (6) Kawai Y, Ikeda M, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 3-7, 2009. Nice, France.
- (7) 河合 良成、池田 正徳、森 京子、阿部 健一、矢野 雅彦、池田 房雄、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之. 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略—Teprenone (Selbex®)と Plaunotol (Kelnac®)の HCV RNA 複製抑制効果—. 第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2009 年 6 月.
- (8) 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C 型急性肝炎患者由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株の樹立とその応用. 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、2009 年 7 月.
- (9) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. 亜ヒ酸は酸化ストレスとグルタチオンレドックスシステムを介して C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA 複製を抑制する. 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、2009 年 7 月.
- (10) 河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、山本 和秀、加藤 宣之. 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略—Teprenone (Selbex)と Plaunotol (Kelnac)の HCV RNA 複製抑制効果. 第 24 回中国四国ウイルス研究会、岡山、2009 年 7 月.
- (11) 池田 房雄、團迫 浩方、西村 剛、

- 河合 良成、有海 康雄、池田 正徳、高木 章乃夫、岩崎 良章、加藤 宣之、山本 和秀. HCV コア蛋白質のアミノ酸の違いとIFN応答性との関係についての培養細胞を用いた解析. 第17回日本消化器関連学会週間(JDDW)、第13回日本肝臓学会大会、京都、2009年10月.
- (12) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. リバビリンの抗HCV活性を解析評価できるLi23細胞由来のHCV-RNA複製システム. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- (13) 池田 正徳、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. オンコスタチンMはインターフェロンの抗HCV活性を相乗的に増強する. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- (14) 河合 良成、池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、西村 剛、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆字、山本 和秀、加藤 宣之. 抗潰瘍剤によるC型慢性肝炎の新たな治療戦略-TeprenoneはStatinのゲラニルゲラニル化阻害を増強しHCV複製抑制効果を増強する-. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- (15) 有海 康雄、黒木 美沙緒、牧 正敏、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. ESCRT小胞輸送系のHCV産生への関与. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- (16) 黒木 美沙緒、有海 康雄、池田 正徳、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 癌抑制因子PMLはHCV粒子産生に必要である. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月.
- (17) Ariumi Y, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Role of distinct DDX DEAD-box RNA helicases in HCV RNA replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (18) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (19) Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- (20) 有海康雄. 癌抑制因子とHCVのクロストーク. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島.
- (21) 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆字、加藤宣之. がん抑制因子PMLはHCVのライフサイクルに必須である. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島.
- (22) 上田優輝、森京子、池田正徳、有海康雄、加藤宣之. 異なる細胞株を用いて開発した全長HCV-RNA複製系による抗HCV活性が報告されている薬剤等の再評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島.
- (23) 池田正徳、森京子、武田緑、中澤貴英、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. 異なるHCV株、細胞株を用いたHCV RNA複製培養細胞での薬剤評価. 第58回日本ウ

- ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日-9日, 徳島.
- (24) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. リバビリンの抗HCV活性を決定する因子の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日-9日, 徳島.
- (25) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宣之. がん抑制因子PMLはHCVの生活環に必須である. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日-24日, 大阪.
- (26) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 新しいHCV-RNA複製系を用いたリバビリンの抗HCVメカニズム. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日-24日, 大阪.
- (27) 森京子, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. 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リバビリンの作用機序の解明. 第14回日本肝臓学会大会, 2010年10月13日-14日, 横浜.
- (28) 池田正徳, 森京子, 中澤貴英, 有海康雄, 團迫浩方, 加藤宣之. C型肝炎ウイルスに対する新しい抗ウイルス剤スクリーニング系の開発. 第14回日本肝臓学会大会, 2010年10月13日-14日, 横浜.
- (29) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (30) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (31) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (32) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (33) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase II is essential for HCV RNA replication. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (34) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, Japan, 2011 Sep.
- (35) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems

using different human hepatoma cell lines. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, Japan, 2011 Sep.

showing differential expression profiles in cell-based long-term HCV RNA replication. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011. Oct

(36) 大杉 桂奈江、有海 康雄、人見 清隆、柴田 秀樹、牧 正敏. ALG-2 と P-body 構成因子 PATL1 の細胞内局在に与える HCV 感染の影響. 第 3 4 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

(37) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之. 異なるヒト肝細胞株 (HuH-7 と Li23) を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月

(38) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗 HCV 活性の客観的な評価には複数の細胞株と複数の HCV 株由来のアッセイ系が必要である. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月

(39) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたる C 型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した遺伝子群の同定. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月

(40) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗 HCV 剤の活性評価には複数の細胞株由来のアッセイ系が必要である. 第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011 年 6 月

(41) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. A host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011. Oct

(42) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes

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

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) に感染している患者では高頻度に肝癌を発生し、現状のインターフェロンを中心とした治療ではそのウイルス排除率は十分ではない。これまでHCVコア領域のアミノ酸変異やNS5A領域のアミノ酸変異数が肝発癌やIFN治療の感受性に関与するとの報告がなされている。そこで、これらの変異が肝発癌や薬剤感受性に与える影響の解明のため、培養細胞のHCV感染複製系を用い、ウイルスのライフサイクルに与える影響について検討を行った。その結果、コア領域のアミノ酸変異がウイルス粒子の生成能に、ISDRアミノ酸変異数がウイルスの増殖に関与している事が明らかになった。また、コア領域のアミノ酸変異により培養細胞内にHCV蛋白質が蓄積するようになり、それが肝発癌に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高率に慢性化し、肝癌の原因となることが知られている。我が国の肝癌の約80%がHCV感染に起因するものであり、HCVの感染とそれに伴う慢性炎症が肝発癌を引き起こすと考えられているが、その機序は未だ明らかではない。

現在、C型慢性肝炎にはインターフェロン (IFN) とリバビリンを中心とした治療が行われている。これらの治療に対する反応性を規定するウイルス側の因子として、コア領域の70番目 (aa70) と91番目 (aa91) のアミノ酸変異や、NS5A領域にあるISDRやIRRDRの変異数の関与が報告されている。しかし、これらの変異がどのような機序でHCVの薬剤感受性に影響を与えているかは依然不明であり、薬剤耐性の生じる機序も明らかになっていない。またコア領域のアミノ酸変異については、肝発癌に関与しているとの報告もある。

近年、HCV JFH-1株を用いた感染増殖系が開発され、培養細胞での感染と複製の観察が可能となった。そこで本研究では、この系を用いこれらのウイルス変異がHCVのライフサイクルに与える影響の検討を行った。

B. 研究方法

1. コア領域アミノ酸変異がHCVの増殖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 (Genotype 1b) のコア領域の 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。

2. NS5a領域ISDRの変異がHCVの増殖に与える影響の解析

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。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はない。各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1. コア領域アミノ酸変異が培養細胞中での増殖に与える影響の解析

まずJFH-1株でコア領域アミノ酸変異の影響を評価した。コア領域アミノ酸が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、コア領域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株を用いて検討を行った。コア領域アミノ酸が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、これらのコア領域の変異は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て同様の検討を行った。コア領域アミノ酸が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。コア領域のアミノ酸が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った。

2. NS5a領域ISDRの変異が培養細胞中での増殖に与える影響の解析

NS5a領域の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。

D. 考察

HCVによる肝発癌やIFN感受性に関与しているコア領域アミノ酸変異が、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癌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、このコア領域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領域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IFN治療に対する感受性が良くなるという事象と異なっているように見える。この点について今後の検討が必要と考えられた。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の効果もコア領域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、コア領域変異と同様に、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。

E. 結論

HCVコア領域の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癌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やす事で、ウイルスの増殖能の低下が観察された。これは臨床的に観察されるIFN感受性と異なっているように見える。この点についてさらに詳細な解析が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol.* 86(4): 2143-2152, 2012.

- 2) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles. *J Biol Chem*, 286: 37264-37273, 2011.
- 3) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.
- 4) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of Genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 404-409, 2011.
- 5) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*, 395, 565-571, 2010.
- 6) Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6, e1000885, 2010.
2. 学会発表
- 1) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of Genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 2) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 3) Moriyama M, Yokokawa H, Akazawa D, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.
- 4) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Kato T, Ishii T, Wakita T. Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.

- 5) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 6) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 7) Watanabe N, Murayama M, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T. Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 8) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.
- 9) Murayama A, Date T, Kato T, Wakita T. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 10) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 11) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T. Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 12) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T. Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 13) Watanabe N, Murayama A, Saeed M, Date T, Kato T, Wakita T. Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 14) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回 日本肝臓学会総会、2011年6月、東京.

- 15) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5A阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.
- 16) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫. Vitamin D とその代謝産物の抗HCV作用の検討. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.
- 17) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆字. HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析. パネルディスカッション4: 肝疾患動物モデルとTranslational Research 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.
- 18) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定. 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡.
- 19) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. クロマトグラフィー法を用いたC型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月、横浜.
- 20) 加藤孝宣、脇田隆字. C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能. 第46回日本肝臓学会総会、2010年5月、山形.
- 21) 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字. HCVの増殖適応変異とその意義. シンポジウム6: ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.
- 22) 村山麻子、伊達朋子、加藤孝宣、脇田隆字: C型肝炎ウイルスJ6CF株の培養細胞での増殖に必要なウイルス遺伝子変異の同定. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.
- 23) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV NS5A蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.
- 24) 加藤孝宣、Saeed Mohsan、脇田隆字: C型肝炎ウイルスJFH-1株患者血清のチンパンジーへの感染実験. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.
- 25) 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、渡邊治雄、脇田隆字: HCV JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.
- 26) Saeed Mohsan、鈴木亮介、渡邊則幸、政木隆博、加藤孝宣、脇田隆字、鈴木哲朗: Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島.

G. 知的所有権の出願・登録状況

脇田隆字、村山麻子、加藤孝宣. 培養細胞で感染性ウイルス粒子産生可能なC型肝炎ウイルスJ6CF株変異体
2011年5月出願済み
出願番号: 2011-122795

B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスと肝発癌

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）感染症における肝発癌機序は、まだ完全に明らかではない。ウイルス肝炎における肝発癌機序として、免疫を介した持続性炎症とウイルス自体の発癌作用が想定されている。持続性炎症はウイルス肝炎における肝発癌において重要な因子であるが、B 型肝炎における肝発癌は炎症のみでは説明し難い。また、近年には患者において、血中 HBV 量が発癌の有意なリスクであることも示されてきている。肝発癌機序としては、HBV ゲノムの宿主遺伝子への組込み、HBV 蛋白の働きなどが想定されてきているが、中でも HBV の X 遺伝子産物（HBx 蛋白）は発癌への関与が実験的に示されている。我々は、HBx 蛋白が TGF- β 下流のシグナル伝達分子である Smad3 のリン酸化部位を制御すること、および HBx 蛋白が癌遺伝子産物様タンパク Pituitary tumor-transforming gene1(PTTG1) /Securin を安定化させることによって肝発癌・悪性化に関与していることを明らかにした。発癌活性をもつウイルス蛋白の存在は、多段階発癌の 1 ステップを進展させ、高頻度かつ多中心性の肝発癌をもたらすと考えられる。一方、C 型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸（モノエン酸）が増加している。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性は HCV コア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。JFH-1 増殖 Huh-7 細胞にても中性脂肪の増加が認められた。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、ROS 産生、脂質代謝異常を含む C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示された。更に、C 型肝炎において増加しているオレイン酸の肝発癌における意義を探るため、肝発癌モデルマウスである PIK3CA トランスジェニックマウス（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。PIK3CA トランスジェニック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。

A. 研究目的

肝発癌と HBV 感染症との関連性は、ヒトにおける臨床データによって強固に裏付けられている。これらのウイルス肝炎における肝発癌機序としては、ふたつの仮説が存在する。

ひとつは、HBV に対する免疫によって引き起こされる持続性炎症（肝炎）によって、肝細胞の壊死とそれに引き続く肝細胞再生が繰り返される課程で、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの細胞遺伝子変異

の発生が促進され、それらが蓄積することによって癌細胞が出現して肝発癌に至るという考え方である。この仮説では、HBV は間接的にのみ肝発癌に関わっていることになる。しかしながら、B 型肝炎に発生する肝癌は、他の臓器の癌に比べて「高頻度かつ多中心性」という特徴をもつ。むろん、炎症は肝発癌に大きな役割を果たしているであろうが、炎症だけで、この「高頻度かつ多中心性の発癌」を説明できるかは疑問といえる。炎症の

強い肝炎である自己免疫性肝炎においては、たとえ肝硬変へと至った後でも肝癌の発生は稀である。また、肝癌においては、炎症によってどの様な細胞遺伝子に変異が蓄積していくのかも不明である。肝癌では、他の多くの臓器の癌とは異なり、共通の細胞遺伝子変異が見つからないことも「炎症肝発癌説」の弱みである。また、B型慢性肝炎においては、肝硬変に至らない初期の慢性肝炎や若年者においても肝癌が発生するという特徴が存在する。

すなわち、炎症のみでB型肝炎における肝発癌を単純に説明することは困難である。これが、ふたつ目の仮説である

「HBVの直接的肝発癌作用」の登場する理由である。「直接関与説」では、HBVゲノムの宿主遺伝子への組込みや肝炎ウイルス蛋白の肝発癌作用が想定されている。本研究においては、B型肝炎における肝発癌機序をウイルスの面から解析し、発癌抑制法の開発を目指す。

一方、C型慢性肝炎における肝発癌の機序はまだ不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア蛋白がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認し、このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行ってきた。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化 (steatosis) が発生し、その後に肝細胞癌 (肝癌) が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。今回、我々は、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。また、増加している脂質の生物

学的作用をマウス、培養細胞を用いて検討した。

B. 方法

90人の肝生検施行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、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。動物モデルとしてHBV-X遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いた。

15人の肝生検施行HBV関連慢性肝疾患を臨床・病理・分子医学的に検討した。HBV-X遺伝子トランスジェニックマウスを免疫組織学的に検討した。

培養細胞Chang liver、Chang liver pX-34 (p34x)、AML12 4p、AML12 4pX cells (4pX) も用いられた。

肝組織はPituitary tumor-transforming gene1 (PTTG1) に対する抗体、HBxに対する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。

コア遺伝子を導入したHepG2細胞であるHep39細胞と対照であるHepswx細胞を用いて、以下のような解析を行なった。また、JFH-1増殖Huh7細胞も同様に用いて検討を行った。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメディウム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。

肝発癌モデルマウスであるPIK3CAトランスジェニックマウス (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。

C. 結果

1) HBV関連HCC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。
- 2) 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。
 - 3) 核における pSmad3L の染色性は、患者血中 HBVDNA 量に相関していた。
 - 4) その後に肝癌を発生した 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、肝癌への進行とともに染色性は強まった。
 - 5) 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、肝癌)とともに増加した。対照的に、pSmad3C/p21WAF1 の染色性は減弱した。
 - 6) 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。7) X 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいても HBx、pSmad3L、c-Myc の染色性はよく一致した。また、正常肝から、前癌病変、肝癌への進行とともに、染色性は増加した。
 - 7) 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 例で肝癌が発生したが、pSmad3L 発現の弱い症例では 32 例中 1 例のみで肝癌が発生した。反対に、pSmad3C 発現の弱い例のみで肝癌が発生し、pSmad3C 発現の強い例においては肝癌の発生は認められなかった。
 - 8) HBV 関連 HCC 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、肝癌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。
 - 9) X 遺伝子トランスジェニックマウス肝においても PTTG1 タンパク量は前癌病変、肝癌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。
 - 10) 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。
 - 11) HBx による PTTG1 タンパクの増加は、posttranscriptional に起こっていた。
 - 12) PTTG1 はリン酸化後にユビキチン化され、プロテアゾームで分解される。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 (プロテアゾーム阻害薬) 不在下で検出された。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。対照タンパクである Occludin のユビキチン化は HBx の影響を受けなかった。
 - 13) 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。
 - 14) B 型肝炎ウイルスの HBx は、癌遺伝子 PTTG1 タンパクのユビキチン化を阻害し PTTG1 量を増加させ、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。
 - 15) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた。一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸、cis-ヴァクセン酸、パルミトオレイン酸) の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 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。

- 16) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraenoic acid(ETYA)によってコア蛋白発現細胞のみで 18 : 1(n-9)が著増した。この結果から、コア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。
- 17) コア蛋白発現 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。
- 18) PI3K (phosphatidyl inositol 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 トランスジェニック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。
- 19) PIK3CA トランスジェニックマウスでは 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。
- 20) 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 などの癌抑制遺伝子の発現が低下していた。
- 21) 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 などの癌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、肝癌発生に関与していることが示唆された。

D. 考察

B 型肝炎における肝発癌機序として、HBV ゲノムの組込み、染色体組替え亢進などと並んで、トランス活性化蛋白であ

る X 遺伝子産物 (HBx 蛋白) が挙げられる。HBx 蛋白の働きとして、他の遺伝子の発現を上げるトランス活性化機能がある。実験系では癌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もつ。HBx 蛋白は 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トランスジェニックマウスを使った研究で、HBx 蛋白の肝発癌作用が示されている。HBx 蛋白はいわゆる癌遺伝子産物ほどの発癌作用はもたないが、細胞増殖/死を調節することで、肝臓における癌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 蛋白は B 型肝炎における肝発癌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 による肝発癌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。

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝癌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癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌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 β 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、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂

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)、 δ -9 デサチュラーゼ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癌における意義を探るため、肝発癌モデルマウスである PIK3CA トランスジェニックマウス (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。PIK3CA トランスジェニックマウス肝ではオレイン酸を中心とする脂質増加を経て肝腫瘍を発生した。オレイン酸は不死化肝細胞の造腫瘍性を増強した。C 型肝炎ウイルスがもたらす脂質代謝異常は、肝における腫瘍形成を増強する作用をもたらすものと考えられた。

E. 結論

B 型肝炎における肝発癌機序として HBx 蛋白による働きが明らかになってきている。HBx から細胞増殖、肝発癌へ至る経路の一つとして、TGF β 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。

一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による 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、肝癌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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimi A, Yamamoto G, Goto T, Koike K, Kurokawa M. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver with graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22314841.
- 2) Inoue H, Yamazaki S, Shimizu M, Uozaki H, Goto T, Ohnishi S, Koike K. Liver injury induced by the Japanese herbal drug kamishoyosan. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2011;7(10):692-695. PubMed PMID: 22298964.
- 3) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2011 Dec 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22200940.
- 4) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec 13. doi: 10.1038/ajg.2011.425. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22158026.
- 5) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Shiina S, Yamashiki N, Mikami S, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Inoo S, Ohtomo K, Omata M, Yoshida

- H, Koike K. Characteristics of hepatocellular carcinoma nodules newly detected by computed tomography during arteriography and arterial portography: preliminary report of a randomized controlled trial. *Hepatol Int* 2011 Aug 31. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22020826.
- 6) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. *J Gastroenterol*. 2011 Sep 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21935635.
- 7) Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. *Hepatol Int* 2011 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21484132.
- 8) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2010 Dec 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21170963.
- 9) Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, Koike K, Omata M. Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.
- 10) 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* 2011;85:13185-13194.
- 11) Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol* 2011;55(6):1400-1408.
- 12) Ishizaka N, Hongo M, Sakamoto A, Saito K, Furuta K, Koike K. Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12(4):462-468.
- 13) Bertot LC, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: a systematic review. *Eur Radiol* 2011;21(12):2584-2596.
- 14) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yoshida H, Aoki T, Hasegawa K, Akahane M, Ohtomo K, Fukayama M, Koike K, Kokudo N. Diagnostic accuracy of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in screening for hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Hepatol Res* 2011;41(12):1199-1207.
- 15) Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology* 2011;81 Suppl 1:11-7.