

症メカニズムに関して、どのような原因により A20 の機能低下するかについて以下に示す 3 つの仮説を立てている。

- (1) A20がHCV NS3/NS4A proteaseによって切断される。
- (2) HCV感染B細胞で発現亢進したAIDによってA20に変異が導入される。
- (3) HCV感染B細胞で発現亢進したMALT1によってA20が切断される。

以上の仮説を検証するために今後は以下の様な検討を行う。

- (1) HCV protease (NS3/4A)によるA20の分解については、現在 *in vitro* での実験系を構築して検討を始めている。
- (2) AIDによるA20の遺伝子改変の可能性については、NMR法によりA20の cytidine deaminase 活性のリアルタイムモニタリングを行い解析する予定である。
- (3) 興味深いことに、MALT1はCHC-Bで発現が亢進しており、既に他のグループによって報告されているようなMALT1によるA20の20kDaの分解物は、われわれもCHC-B細胞におけるA20分解物として確認している。

E. 結論

HCV感染患者のB細胞 (CHC-B) においては、癌化抑制分子として知られているA20とCYLDの発現が顕著に亢進していることを明らかにした。一方、HCVのfull genomeをB細胞特異的に導入したマウスのB細胞においてはA20の発現が顕著に減少していることを明らかにした。これらの結果から、CHC-Bでは、恒常的に発現亢進

したA20やCYLDが、RIP1やIKK complexの活性を抑えているが、それらの発現/機能が低下あるいは消失することによりNF- κ B経路を阻害する機能を損なうため、無秩序なNF- κ B経路の亢進により癌化を誘導するのではないかと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito M, Kusunoki H, and Mizuochi T: Peripheral B cells as reservoirs for persistent HCV infection. *Frontiers in Microbiology* Volume 2: Article 177, 2011.
- 2) Ito M, Kusunoki H, Mochida K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: HCV infection and B-cell lymphomagenesis. *Advances in Hematology* Volume 2011:Article ID 835314, 2011.

2. 学会発表

- 1) Okuma K, Buonocore L, Fukagawa K, Kohma T, Kusunoki K, Rose JK, Mizuochi T, and Hamaguchi I: Development of a novel infectious HCV surrogate virus based on a recombinant virus expressing HCV envelope glycoproteins. 15th International Congress of Virology (IUMS 2011 Sapporo Congress), Sapporo, 2011.

H. 知的所有権の出願・取得状況

- | | |
|----------|----|
| 1.特許取得 | なし |
| なし | |
| 2.実用新案登録 | |
| なし | |
| 3.その他 | |

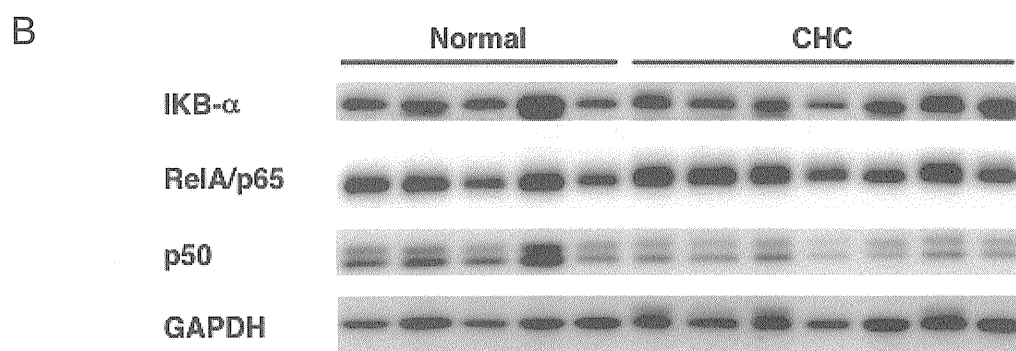
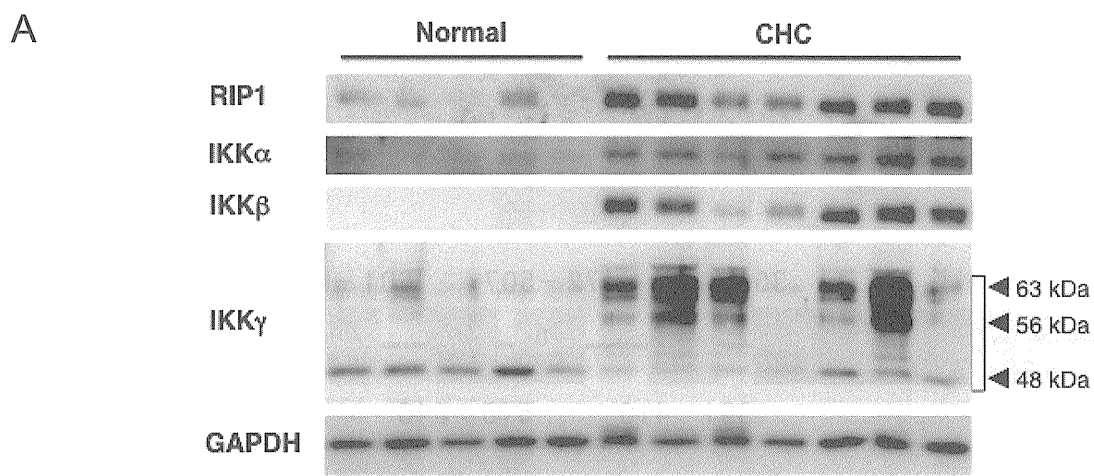


図 1: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞におけるNF κ B経路関連分子の発現

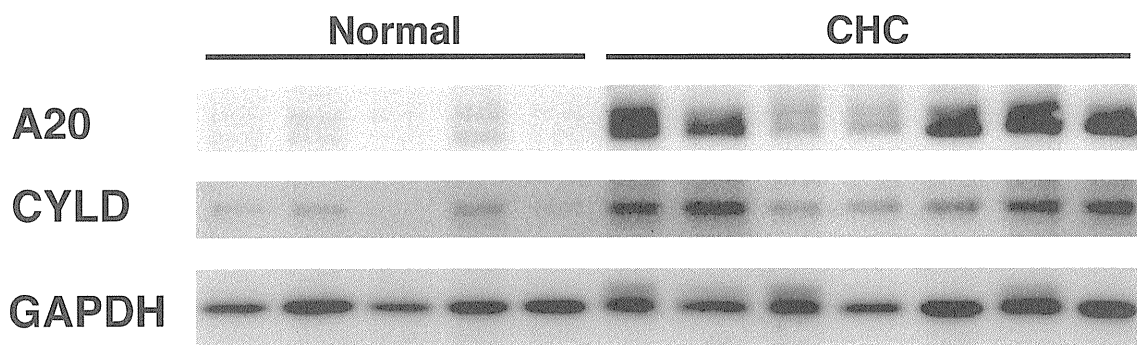


図 2: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞におけるA20とCYLDの発現

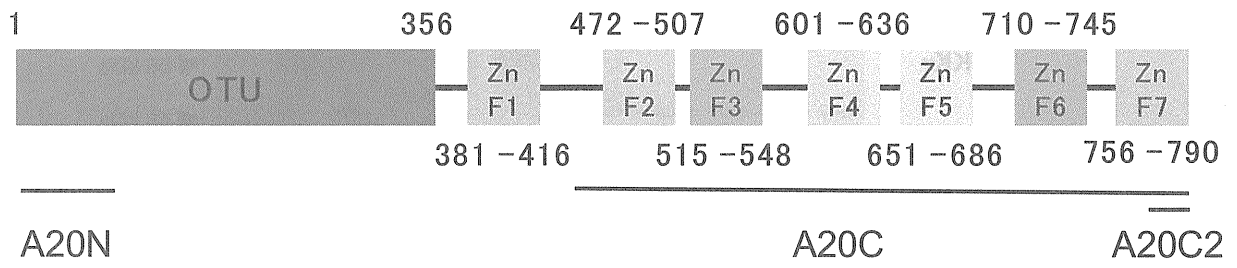


図 3 : HCV-TgマウスB細胞におけるA20の発現

HCVのBリンパ腫発症要因の解明に関する研究

研究分担者 小原 恭子 鹿児島大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）が引き起こす肝臓外の病変であるBリンパ腫の発症機序を解明するためにマウスモデルを樹立して解析を進めてきた。これまでの研究の中で、HCVの構造遺伝子を持続的に発現するマウス(CN2-IRF1-/-)はリンパ性増殖を発症する事を見いだしている。本年度は、HCV全長遺伝子をB細胞で発現するマウス(RzCD19Cre)を樹立してHCV遺伝子のB細胞に対する直接作用を解析した。その結果、600日以上立つと25%のマウスでBリンパ腫を発症する事が明らかとなった。Bリンパ腫の発症に関与する宿主因子をマイクロアレイ解析で網羅的に検索したところ、♂、♀ともHCVによりB細胞で1000種以上の遺伝子の発現変動があり、腫瘍では4000種以上の遺伝子の発現変動が見られた。現在責任遺伝子の解析を行っている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に主に感染して疾患を引き起こす。一方でHCVは肝臓外にも病変を起こし肝外病変として総称されているがその本態は不明な点が多い。本研究では、未だ解明されない肝外病変の中でもBリンパ腫の発生モデル動物を樹立してこれを解析する事を通じてBリンパ腫発症要因を解明する事を目的としている。これまでに、HCV全長遺伝子をB細胞で発現すると約25%のマウスがBリンパ腫を発症する事が明らかとなった。そこで、今年度はHCVの直接作用による宿主因子の変化を網羅的に解析した。

B. 研究方法

RzCD19Cre マウスの樹立：

全長のHCVゲノムRNA（1b型）をリボザ

イム(Rz)で正確切り出す事ができ、またCre/loxP制御下で任意の時期や臓器で発現可能なマウス(Rz)をまず樹立した。その後B細胞のマーカーであるCD19のゲノム遺伝子座にCre酵素がノックインしたマウス(CD19Creマウス；NAR 1997)と交配してB細胞特異的にHCV遺伝子を発現できるRzCD19Creマウスを樹立した。

マイクロアレイ解析：

マウスのB細胞はMACSビーズにより脾臓から分離した。B細胞並びにBリンパ腫からtotal RNAを回収し、電気泳動でクオリティーを確認後Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis

(Agilent)を行った。

(倫理面の配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H18年6月)。動物実験については、「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」(H18.6.1)に従った。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得た (H18年4月)。鹿児島大学でも同様の申請を行っている。

C. 研究結果

マイクロアレイによる網羅的な解析は次の組み合わせで行った。各群は2匹ずつからRNAを抽出して個体差を軽減するように試みた。①♂700日令以上；

RzCD19Cre B細胞 vs Bリンパ腫

②♂一年未満：B細胞 Rz (HCV-) vs

RzCD19Cre (HCV+) ③♀RzCD19Cre B

cell vs Bリンパ腫 ④♀一年未満：B細胞

Rz (HCV-) vs RzCD19Cre (HCV+)の4群

である。変動した宿主遺伝子群は、①上

昇；4067種, 下降 3480種 ②上昇；1680

種, 下降 1337種 ③上昇；4331種, 下降

4218種 ④上昇；1418種, 下降 1961種の

遺伝子の動きが認められた。現在詳細なネットワークを用いて行っている所である。

D. 考察

昨年度までの結果から、マウスの血中 sIL-2R α レベルと Bリンパ腫発生の相関が示唆されていた。今年度は Bリンパ腫発症に関連するシグナル伝達経路を解明するため、HCV存在下で B細胞と Bリンパ腫で異なる発現を示す宿主因子を抽出し、修飾経路の解明を試みた。詳細なネットワーク

解析を現在コンピューター解析で行っている過程であり、未だ最終的な結論は得られていない。しかしながら、これまでのところ Bリンパ腫になるとみ、♀に関わらず発現が大きく変動する因子があり、HCV病原性との関与が示唆される。Bリンパ腫発症との関連については、今後の解析による解明が待たれる。さらに、共同研究者の水落らは、本マウスの Bリンパ腫における A20 の低下を見いだしている。

E. 結論

RzCD19Cre マウスの解析を通じ、HCVによる Bリンパ腫発症機序を解明できると共に、HCV病原性発現に関する新たな知見が得られる可能性も期待できる。これらの知見が今後診断や治療応用に少しでも貢献し、HCV関連疾患が一日でも早く克服される事を念じている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitou M, Kohara, M, Tsukiyama-Kohara K*. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. J Med Virol, 2012 accepted.
- 2) Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Nagla. E. S., Harada S, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3.

- Virus Res 2012;163: 405-409.
- 3) Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Arai M, Sudoh M, Kai C, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*: Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection thorough betaine/GABA transporter-1. J Infect Dis, 2011: 204(8):1172-1180.
 - 4) Takano T, Tsukiyama-Kohara K, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes.. J. Hepatology 2011;55(3) 512-521.
 - 5) Takano T, Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C, Tsukiyama-Kohara K, Translocase of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. J Med Virol. 2011: 83, 801-809.
 - 6) Tsukiyama-Kohara, K., Sekiguchi, S., Kasama, Y., Nagla, E.S., Machida, K., & Kohara, M. Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model. ISRN *Hematology*, 2011: 167501.
 - 7) Kasama Y, Satoh M, Saito M, Okada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. Potential of a recombinant measles virus as expression vector of hepatitis C virus envelope proteins. World J Vaccine. 2011: 1 98-103.
1. 小原恭子、棟方翼、小原道法。HCVの病原性発現に關与するウイルス因子とその機能 II C型肝炎 C型肝炎ウイルス感染における免疫応答と感染防御機構 日本臨床 69 卷増刊4 別刷「新時代のウイルス性肝炎学」 p97-102(2011年5月20日)
 2. 小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる免疫攪乱と炎症発がん BIO Clinica 26 (10) p42-48, 2011
 3. 小原恭子、小原道法。肝臓「疾患モデルマウス：表現型解析指南(中山書店)」 p188-192, 2011.
2. 学会発表
 - 1) Tsukiyama-Kohara K, Kasama Y and Kohara M. Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. “Recent Advances in pathogenic human viruses” in 2011 ASBMB Special symposia series. Guanzhou, China July24-26 2011.
 - 2) Takano T, Tsukiyama-Kohara K, Hirata Y, Tokunaga Y, Tateno C, Sudoh M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The 18th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses Seattle, 2011.
 - 3) Takano T, Kasama Y, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus induces translocase of outer mitochondria membrane 70 which regulates apoptotic response. The 18th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses Seattle, 2011.
 - 4) Tsukiyama-Kohara K, Kasama Y, Sekiguchi S, and Kohara M. The 18th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses Seattle, 2011.

- 5) Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Satoh M, Kuwahara K, Takeya M, Sakaguchi N, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. International Union of Microbiological Societies, Sapporo 2011.
- 6) Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Overexpression of 3beta-Hydroxysterol delta24Reductase is induced by hepatitis C virus infection through oxidative stress mediated Sp1 activation. International Union of Microbiological Societies, Sapporo 2011.
- 7) Nagla ES, Nishimura T, Saito M, Kohara M, Harada S, El-Gohary A, and Tsukiyama-Kohara K. Application of DHCR24 for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). International Union of Microbiological Societies, Sapporo 2011.
- 8) 笠間由里、齊藤誠、西村知裕、佐藤正明、王中志、Salem Nagla Elwy Salem Ali、原田信志、小原道法、小原恭子 Tom70 によるインターフェロン誘導と C 型肝炎ウイルス NS3 による阻害 第 48 回日本ウイルス学会九州支部会 北九州 2011.
- 9) 齊藤誠、小原恭子。新規 C 型肝炎マーカー DHCR24 を利用した分子標的治療の開発 第 48 回日本ウイルス学会九州支部会 北九州 2011.
- 10) 10) Takano K, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Role of DHCR24 in hepatitis C virus replication in hepatocytes. 第 70 回日本癌学会学術総会 大阪 2011.
- 11) 11) Saito M, Tsukiyama-Kohara K. Molecular target therapy for hepatitic C virus-related hepatocellular carcinoma with cell-surface expression of DHCR24 第 70 回日本癌学会学術総会 大阪 2011.
- 12) 12) Kohara M, Kimura K, Tsukiyama-Kohara K. Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructuralprotein cures chronic hepatitis in mouse model. 第 70 回日本癌学会学術総会 大阪 2011.
- 13) 13) Saito M, Tsukiyama-Kohara K. Exploitation of molecular targeting therapy for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma focusing on DHCR24. 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011
- 14) 14) Nishimura T, Kohara M, Kino Y, Tsukiyama-Kohara K. French marine bark extract pycnogenol is a new candidate of Hepatitis C virus therapeutic material. 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」特願2011-125440 出願日 平成23年6月3日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(一般財団法人)化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構
2. 実用新案登録
なし
3. その他
* Nature 474 S14-15, 2011 “The murine candidate” [OUTLOOK HEPATITISC] Tuapia の論文(JV 84 303-311, 2010)の紹

介が掲載される(PDF 添付)

肝培養細胞を用いたHCVによる糖代謝異常の分子機構の研究

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染に2型糖尿病が合併すると肝線維化、治療抵抗性、発がんなど予後を悪化させるため、分子機序を明らかにし臨床的対策を立てる必要がある。我々はHCV感染が肝細胞表面のグルコーストランスポーターGLUT2の発現を抑制し、糖の取り込みを抑制することを報告してきた。今年度はHCV感染によるHNF-1 α の発現抑制の詳細な分子機序について解析した。HCV感染細胞においてHNF-1 α 蛋白質の量が著明に減少するが、Pepstatin Aで回復することからライソソーム系プロテアーゼ、特に酸性プロテアーゼによる分解の関与が示唆された。HCV NS5A蛋白質の単独発現でもHNF-1 α 蛋白質の分解が促進され、同様にPepstatin Aで分解が抑制されたことから、HCV NS5AがライソソームプロテアーゼによるHNF-1 α 分解を誘導することが明らかとなった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変を引き起こすのみならず、2型糖尿病などの肝外病変を引き起こし、予後に悪影響を及ぼすことから、その対策は、厚生労働行政上、重要な課題である。HCVが2型糖尿病を引き起こす機序のひとつとして、肝細胞表面でグルコーストランスポーター(GLUT)2の発現抑制が起こり、糖の取り込み抑制が起こることを我々は報告してきた。今年度はHCV感染によるHNF-1 α 分解誘導の機序について詳細に解析した。

B. 研究方法

1) HCV J6/JFH-1感染細胞と非感染細胞において回収の12時間前にライソゾーム阻害剤(40 μ M E-64d+20 μ M pepstatin Aあるいは

はそれぞれ単独投与) またはプロテアソーム阻害剤(10 μ M clasto-lactacystin)を投与し、内在性HNF-1 α 蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。

2) Huh7.5細胞にHCV NS5A蛋白質発現プラスミドまたはNS5B蛋白質発現プラスミドを各0.5, 1.25, 2.5, 5 μ gずつトランスフェクションし、内在性HNF-1 α 蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。

3) Huh7.5細胞にNS5A発現プラスミドをトランスフェクションし、内在性HNF-1 α 蛋白質の量をウエスタンブロット法で比較した。その際、ライソゾーム阻害剤(40 μ M E-64d+20 μ M pepstatin Aあるいはそれぞれ単独投与) またはプロテアソーム阻害剤

(10 μ M clasto-lactacystin) を投与し、HNF-1 α の蛋白質量を比較した。

4) HCV NS5AとHNF-1 α の相互作用を免疫沈降法で解析した。

(倫理面の配慮)

取り扱うすべてのDNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっていない。

C. 研究結果

1) HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質量の変化をウエスタンブロット法で解析した。ライソゾーム阻害剤とプロテアソーム阻害剤処理を行った。プロテアソーム阻害剤ではHNF-1 α 蛋白質量は回復しなかった。

pepstatin A処理でHNF-1 α 蛋白質量は増加したが、E-64d処理では変化なかった。これらのことにより、HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質量の減少にライソゾーム分解系、特に酸性プロテアーゼの関与が示唆された。

2) Huh7.5細胞にHCV NS5A蛋白質発現プラスミドまたはNS5B蛋白質発現プラスミドを各0.5, 1.25, 2.5, 5 μ gずつトランスフェクションし、内在性HNF-1 α 蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。NS5A発現プラスミドの量を増加するに伴い、内在性HNF-1 α 蛋白質量は著明に減少した。一方、NS5Bプラスミドを増量しても内在性HNF-1 α 蛋白質量は変化しなかったことから、HNF-1 α 蛋白質分解に対するNS5Aの関与が示された。

3) NS5A発現プラスミドのトランスフェクションによるHNF-1 α 蛋白質量の減少に対するライソゾーム阻害剤とプロテアソーム

阻害剤の効果を比較した。プロテアソーム阻害剤ではHNF-1 α 蛋白質量は回復しなかった。pepstatin A処理でHNF-1 α 蛋白質量は増加したが、E-64d処理では変化なかった。

NS5A発現プラスミド単独で、HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質量の減少と同じ傾向を示したことから、HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質のライソゾーム系分解誘導はNS5Aにより引き起こされることが明らかとなった。

4) NS5AとHNF-1 α の相互作用を解析するために、免疫沈降法にて解析した。NS5Aが内在性のHNF-1 α と共沈し、HNF-1 α のトランスフェクトにより沈降するNS5A蛋白質の量が増加することから、両者が相互作用を示すことが示唆された。

D. 考察

本研究において、HCV感染によるHNF-1 α の発現低下にはライソゾーム依存性蛋白分解が関与していることを明らかにした。また、HCV NS5AのみでHNF-1 α のライソゾーム依存性分解が誘導されることを示した。HCVによるHNF-1 α の分解にはPepstatin Aで阻害される酸性プロテアーゼの関与が示唆された。以上のことから、HCV感染細胞では肝細胞表面のGLUT2の発現低下が引き起こされ、糖の輸送が抑制されるが、HCV NS5A蛋白質がHNF-1 α のライソゾーム依存性分解を促進させ、著しくHNF-1 α 蛋白質量が減少することでGLUT2の転写抑制がおり、肝細胞表面の糖輸送に障害が起り、糖代謝異常の原因となると考えられた。NS5A蛋白質とHNF-1 α 蛋白質が相互作用を示すことから

両者の結合が分解誘導に関与している可能性を考えている。

興味深いことに、HNF-1 α の遺伝子変異が常染色体優性遺伝による糖尿病のMaturity-onset diabetes of the young 3 (MODY3)の原因であることが知られている。また、HNF-1 α は様々な標的遺伝子があり、糖・脂質代謝、胆汁酸・コレステロール・リポ蛋白質代謝、急性期蛋白質の発現に関与する。さらにHNF1遺伝子の不活化が肝アデノーマ、肝がんにおいて重要で癌抑制遺伝子として注目されている。本研究で明らかにしたHCV感染によるHNF-1 α 蛋白質の分解誘導が、糖代謝だけでなく脂質代謝、炎症、発がんなどに関与する可能性もあり、今後、病態における意義とその対処法を確立する必要がある。

E. 結論

HCV感染により、HNF-1 α の蛋白質がライソソームプロテアーゼにより分解が促進されてGLUT2転写抑制が引き起こされると考えられた。この際にHCV NS5A蛋白質がHNF-1 α との相互作用を介してライソソーム依存性分解を誘導すると考えられた。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji I., Deng L., and Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Frontiers in Microbiology*, 2012; 2: A278, 1-5.
- 2) Kamada K., Shoji I., Deng L, Wakita T., and Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the

analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes and Infection*, 2012; 14: 69-78.

- 3) El-Shamy A., Ide Y-H., Kim SR., Sasase N., Imoto S., Deng L., Shoji I., and Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *Intervirology*, 2012; 55: 1-11.
- 4) Sasayama M., Shoji I., Ide Y-H., Deng L., and 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. *Journal of Medical Virology*, 2012; 84: 229-234.
- 5) El-Shamy A., Shoji I., Saito T., Watanabe H., Ide Y-H., Deng L., Kawata S., and Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to Pegylated-Interferon/Ribavirin combination therapy. *Microbiology and Immunology*, 2011; 55: 418-26.
- 6) Deng L., Shoji I., Oawa W., Kaneda S., Soga T., Jiang D. P., Ide Y-H., and Hotta H., Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *Journal of Virology*, 2011; 85: 8556-68.
- 7) 勝二郁夫, Ahmed El-Shamy, 堀田博. NS5A-IRRDR 変異数. *医学のあゆみ*, 2011; 239: 1208-1211.
- 8) 勝二郁夫, Ahmed El-Shamy, 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, 2011; 63: 1063-1069.

2.学会発表

- 1) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., El-Shamy A., Deng L., Jang DP., Ide Y-H., and 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. Seattle, September 2011.
- 2) Deng L., Shoji I., Ogawa W., Kaneda S., Soga T., Jang DP., Ide Y-H., and 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. Seattle, September, 2011.
- 3) Matsui C., Shoji I., Kaneda S., Deng L., Jiang DP., Ide Y-H., and Hotta H. HCV-induced suppression of glucose transporter 2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September, 2011.
- 4) Ide Y-H., Maebo T., An C., Jiang DP., Deng L., Shoji I., and Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in NS3 transgenic mice. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September, 2011.
- 5) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., El-Shamy A., Deng L., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 6) Deng L., Shoji I., Ogawa W., Kaneda S., Soga T., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-induced hepatic gluconeogenesis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 7) Matsui C., Shoji I., Kaneda S., Deng L., Jiang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses glucose transporter 2 gene expression by downregulation of hepatocyte nuclear factor 1A. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011.
- 8) Ide Y-H., Maebo T., An C., Jiang DP., Deng L., Shoji I., and Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in NS3 transgenic mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 9) El-Shamy AM., Shoji I., Saito T., Ide Y-H., Deng L., Kawata S., and Hotta H. Polymorphisms of serine protease-domain of NS3 and core protein of hepatitis C virus genotype 1b associated with hepatocellular carcinoma development. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 10) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., Chieko M., Jang DP., Deng L., Ide Y-H., and Hotta H. Identification of an

- E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.
- 11) Ichimura T., Shoji I., and Hachiya N. A regulatory mechanism for tripartite-motif protein 32 revealed by quantitative 14-3-3 interactome analysis in PKA signaling pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.
- 12) Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルスは酸化ストレスを介して糖新生を亢進し糖尿病発症に関与する. (プレナリーセッション). 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 13) 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. HCV NS3 トランスジェニックマウスを用いた肝発癌機構の研究. ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤 (シンポジウム). 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 14) 進藤道子, El-Shamy A, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. 肝癌発生前後における C 型肝炎ウイルス遺伝子 (IRRDR, ISDR とコア蛋白) 多様性の経時的变化の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 15) 金守良, 井本勉, 堀田博, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩. 併用療法無効患者に対する二重濾過血液交換療法 (DFPP) の EVR に関係するウイルスダイナミクス. 宿主因子 (IL28B) とウイルス因子の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 16) 金守良, 井本勉, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, El Shamy A., 勝二郁夫, 林祥剛, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2b+Ribavirin (併用療法) におけるインスリン抵抗性と治療効果、肝組織所見、BMIとの関連. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 17) El-Shamy A., 勝二郁夫, 斎藤貴史, 西瀬雄子, 井出良浩, Deng L., 河田純男, 堀田博. C型肝炎ウイルスのNS3変異 Y56/Q86及びコア蛋白変異Q70は高発癌性ウイルス株の指標となる. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 18) 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 斎藤雅也, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2a/RBV併用療法の EVR・SVRに関与する因子の検討 (神戸肝炎治療研究会). 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 19) 松井千絵子, 勝二郁夫, 兼田崇作, Deng L, 井出良浩, 堀田博, C型肝炎ウイルスによるグルコーストランスポーター GLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会, 大阪, 2011.
- 20) 甘翔, Lin Deng, 陳明, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A の新規結合タンパク質であるヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の同定. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会 2011, 大阪
- H. 知的所有権の出願・取得状況
特になし

HCV増殖と脂質の相互作用に関する研究

研究分担者 相崎 英樹 国立感染研究所 室長

研究要旨：細胞の脂質代謝は糖質・蛋白質・核酸・エネルギー代謝と互いに影響を及ぼしあっていることが知られており、脂質の代謝だけでなく全体の代謝変化をとらえることが重要と考えられる。そこで、HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、表現型に最も近い表現型での変化が観察しやすい代謝物質のメタボローム解析を行い、約900の代謝産物の定量を行った。HCV感染細胞とサブゲノムレプリコン細胞のメタボローム解析の比較で、HCV感染、特に複製でエネルギー産生が低下することが見出された。これはミトコンドリア障害によるものとHCVゲノム複製によるものの可能性が示された。

A. 研究目的

細胞の脂質代謝は糖質・蛋白質・核酸・エネルギー代謝と互いに影響を及ぼしあっていることが知られており、脂質の代謝だけでなく全体の代謝変化をとらえることが重要と考えられる。そこで、HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、遺伝子の網羅的解析（ゲノミクス）やタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）に比べて、ホメロスターシスの影響を受けにくく、表現型に最も近い表現型での変化が観察しやすい代謝物質の網羅的解析（メタボロミクス）を行った。HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を解析することはC型肝炎患者の病態の理解につながると期待できる。

B. 研究方法

(1) HCV感染が宿主代謝に与える影響

HCV感染細胞と非感染細胞で約900の代謝産物について、キューピラリー電気泳動法と質量分析法で定量的に測定し、HCV感染に伴う細胞の代謝変化についてメタボローム解析した。さらに、比較のためHCV構造蛋白質の影響のないサブゲノムレプリコン

細胞のメタボローム解析も行った。

(2) HCV増殖が宿主エネルギー代謝に与える影響

上記(1)の結果、感染細胞およびレプリコン細胞でエネルギー代謝に大きな変化が認められたので、エネルギー産生に重要な役割を果たしているミトコンドリアについて解析するとともに、ATP消費量、ATP局在の解析を行った。

（倫理面の配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

(1) HCV感染が宿主代謝に与える影響

HCV感染またはレプリコン複製に伴い、核酸合成、クエン酸回路、電子伝達系、ATPなどの代謝中間体・産物の減少が認められた。一方、糖新生、解糖系、糖原性アミノ酸に関する代謝産物の増減は、HCV感染とレプリコン複製で全く逆の結果となった。このことから、糖質代謝にはHCVの構

造蛋白が影響を与えている可能性が示唆された。さらに、HCV 感染、レプリコン複製いずれでもエネルギー産生が強く抑制されたので、そのメカニズムについて解析した。(2) HCV 増殖が宿主エネルギー代謝に与える影響

感染細胞を電顕で観察したところ、ミトコンドリアのクリステ構造の破壊が認められ、さらに細胞染色において、HCVコア蛋白発現部位ではミトコンドリアの機能低下が認められたことから、HCV増殖による宿主エネルギー代謝の低下はミトコンドリア障害によるものと考えられた。

さらに、ウイルス複製にエネルギーが使われている可能性について解析した。レプリコン細胞から複製複合体を含む膜画分を分離し、ATPを添加し、その消費量を測定したところ、Huh7細胞と比較して、レプリコン細胞の膜画分におけるATPの消費量が有為に亢進していた。FRET技術を利用し生細胞内のATPレベルを可視化するプローブを用い、HCV複製細胞におけるATPダイナミクスを解析した。ATP濃度とFRETレベルの相関を測定し濃度を算出したところ、細胞質のATP濃度は低下し、一方、複製複合体と考えられる顆粒状の発現部位では大幅にATP濃度が亢進していた。HCV複製細胞では効率的な複製維持のために、細胞質から複製複合体にATPが流入していると考えられた。

D. 考察

HCV 感染細胞とサブゲノムレプリコン細胞のメタボローム解析の比較で、HCV 感染、特に複製でエネルギー産生が低下することが見出された。これはミトコンドリア障害によるエネルギー産生の低下とウイルスゲノム複製によるエネルギー消費の亢進によるものと考えられた。本年度の研究から、細胞質のATP濃度は低下し、複製複合体のATP濃度が亢進していたが、これは我々が2009年度に見出したクリアチンカイネースがNS4Aと結合し、ATPを複製複合体に引き込むこと(Hara et al., J Virol 2009)によるものと考えられた。

E. 結論

HCV 感染に伴う宿主代謝の変化を調べるため、糖新生、解糖系のなどの律速酵素のプロモーターアッセイ、mRNAのtaqmanによる定量、WBによる定量なども行ったものの、時間経過に伴い大きく変動し、再現性が低かった。一方、メタボローム解析の結果は再現性が高く、安定的な結果が得られたことから、細胞内代謝の変化を解析するにはメタボローム解析が有効だということが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. PLOS Pathogen in pres.s.
- 2) 田中純子、小山富子、相崎英樹. C型肝炎ウイルス(HCV)による感染. 日本臨床ウイルス学会、臨床とウイルス、in press.
- 3) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. J Gen.Virol. 2011;92:2082-7.
- 4) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. Biochem Biophys Res Commun. 2011;407:135-40.
- 5) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. Virology. 2011;410:38-47.

- 6) 相崎英樹、脇田隆字、HCV感染における脂質代謝の変化とメタボロミクス解析、肝胆膵、東京、2011:948-953.
- 7) 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV生活環における脂質の役割、日本臨床、日本臨床社、大阪、2011: 59-63.
- 8) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博、C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成、日本ウイルス学会、雑誌ウイルス、東京、2011、60、87-92.
2. 学会発表
- 1) Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 2) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 3) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T. Discovery of full-length HCV genome quasispecies by deep sequencing. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 4) Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 5) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 6) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 7) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. International meeting of molecular biology of hepatitis B virus, Florida, USA 2011.
- 8) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011.
- 9) 坂田幸大郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、井本正哉、脇田隆字、小嶋聡一、HCV NS3 Protease Mimics TGF- β 2 and Activates TGF- β Signals via Type I Receptor. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011.
- 10) 坂田幸大郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、井本正哉、脇田隆字、小嶋聡一、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- β I型受容体を介したTGF- β シグナルの活性化. 第25回肝類洞壁細胞研究会、東京、2011.
- 11) 相崎英樹、C型肝炎ウイルス研究の進歩と展望、第58回日本感染症学会総会・学術講演会・教育講演、東京、2011.
- 12) 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.

- 13) 相崎英樹、多田有希、松本善弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆宇、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
- 14) 加藤考宣、村上麻子、政木隆博、相崎英樹、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルスパネル検体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・シンポジウム、東京、2011.
- 15) 松浦知和、丸島秀樹、前橋はるか、大川清、松本善弘、永妻啓介、田中賢、高木一郎、石井雄二、斎藤勝也、政木隆博、相崎英樹、ヒト肝細胞癌細胞の3次元培養系は“肝臓モデル”なのか、“肝臓モデル”なのか？-glucose代謝からの検討-, 第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

B型肝炎ウイルスと免疫の相互作用

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 肝炎ウイルスに対する免疫反応は、慢性肝炎の発症から進展、がん化に至る一連のプロセスの引き金となっている。本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）に特異的なCTLが引き起こす慢性炎症の病態について *in vitro*、*in vivo* 実験系を併用して検討した。ヒト不死化肝細胞（*in vitro*）において、HBVタンパク HBx と転写因子 c-Myc の共発現が転写因子 STAT3 の活性化を誘導して、がん化に促進的に作用することが観察された。HBVトランスジェニックマウスモデル（*in vivo*）において、慢性肝炎の進展に伴う酸化ストレス経路（NFκB）；p65/RelA の活性化は STAT3 と連動していた。また、進展した慢性肝炎、肝がん組織で NFκB 経路；RelB 経路，p100/52 の活性化を認めた。これより、HBVへの免疫反応によって誘導される酸化ストレス経路や転写因子の相互作用が、形質転換、がん化に促進的に作用することが示唆された。

A. 研究目的

肝炎ウイルスと免疫系を中心とする宿主因子の相互作用において、ウイルス特異的なCTLは、慢性肝炎の発症から進展、がん化に至る過程に深く関わっているが詳細な病態機序は不明である。本研究では、HBV特異的なCTLが誘導する慢性炎症の病態を、独創的な *in vitro*、*in vivo* 実験系を用いて検討した。

B. 研究方法

HBV特異的なCTLによって慢性肝炎から肝がんを発症するトランスジェニックマウスモデル（*in vivo* 系）を用いて、経時的に遺伝子発現プロファイルを観察する

ことによって、酸化ストレスに関連する細胞内シグナルの変化に注目して肝細胞の動態と併せて検討した。さらに、マウスモデル系で活性化が示唆された分子病態とウイルス遺伝子産物（HBxなど）との相互作用に関して、ヒト由来不死化初代細胞（*in vitro* 系）における形質転換能とその分子機構を解析した。

（倫理面の配慮）

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、各法令に基づき当該研究を実施した。また、実施機関の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

1) in vitro 系：ヒト不死化肝細胞 TTNT16 において、HBVタンパク HBx と転写因子 c-Myc の共発現が転写因子 STAT3 の活性化を誘導して、軟寒天培地でのコロニー形成能を亢進した。

2) in vivo 系：HBVトランスジェニックマウスモデルにおいて、DNAチップをはじめとする発現遺伝子プロファイル解析にて、酸化ストレスに関わる NFkB 経路が慢性肝炎の早期からの活性化していた。

3) ウェスタンブロットにて、肝炎発症3ヵ月めから NFkB 経路；p65/RelA の発現亢進を認め、発がんに至るまで持続した。

4) p65/RelA の発現亢進に伴って、肝細胞における STAT3 が増加した。

5) 肝炎発症 18 ヶ月めの肝組織およびがん組織において NFkB 経路；RelB 経路, p100/52 の活性化を認めた。

6) 肝細胞 (TTNT16)、肝がん細胞株 (PLC/PRF/5) を比較したところ、肝がんにおいて RelB 経路, p100 の発現亢進を認め、サイトカイン刺激によってさらに上昇した。

D. 考察

B型慢性肝炎において、ウイルスに対する免疫反応が肝細胞の障害を惹起している。障害された肝細胞は再生性の増殖を示すが、その際の炎症、サイトカインの作用によって肝細胞に ROS (reactive oxygen species) などの酸化ストレスが蓄積することとなる。酸化ストレスが肝細胞のDNA障害を誘導することによって、発現遺伝子プロファイルに変化を生じてがん化に至

るものと示唆されている。

本研究では、慢性肝炎モデルにおいて酸化ストレスに関わる細胞内シグナル経路の変動を検討したところ、肝炎の早期から NFkB 経路；p65/RelA の発現亢進を認めた。さらに RelA は、肝細胞の STAT3 と挙動をともにしており、両者が相互作用してがん化を促進することが示唆された。これに対して、NFkB の RelB 経路は慢性肝炎の後期やがん組織で活性化することから、直接的にがん化に関わっている可能性が考えられた。

E. 結論

HBVへの免疫反応によって誘導される酸化ストレス経路 NFkB や転写因子 STAT3 の相互作用が、形質転換、がん化に促進的に作用することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
- 2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular