

化率(%dBMI)と各パラメータの変化率について検討した。肝炎症例、非肝炎症例のいずれにおいても、散布図において、%dBMIと%dHOMA-IRの間には正の相関を認め、回帰直線の傾きに差を認めなかった計算上は、10%のBMIの増加(減少)は、肝炎症例では29%の、非肝炎症例では30%のHOMA-IRの増加(減少)に反映される可能性があることが明らかになった。

■IgG4 関連疾患と冠動脈疾患の関連についての検討

血清学的・組織学的にIgG4関連の冠動脈病変と判断された2症例について詳細な検討を行った。1例目は、68歳男性。不安定狭心症で来院し、血清IgG4値は564 mg/dL。冠動脈狭窄部周囲に線維性肥厚をともなっていたが、生検により、リンパ濾胞の形成とIgG4陽性の形質細胞の浸潤が認められた。本症例では、冠動脈周囲の偽性瘤へのfeeding arteryが冠動脈造影により認められた。2例目は、自己免疫性膵炎の既往のある75歳の男性。右冠動脈の末梢は瘤化しており、血清IgG4値は2510 mg/dLと上昇。冠動脈瘤径が持続的に増大するため、バイパス術を施行。冠動脈周囲組織からは、おびただしいIgG4陽性の形質細胞の浸潤が認められた。

冠動脈造影が施行された286症例における血清中IgG4値の測定では、冠動脈狭窄症例では、有意に血清IgG4値は高かった。なお、IgG4値と年齢、あるいは、IgG4値と推定糸球体濾過率(eGFR)の間に有意な相関はなかった。年齢、性別に加えて、他の冠動脈疾患の危険因子で調整したロジス

ティック回帰分析では、血清IgG4値17.8 mg/dLと比較して、IgG4値57.7 mg/dL以上の症例では、オッズ比3.75で有意に冠動脈狭窄症例が多いことが明らかになった。

D.考察

2年連続で健診を受診した症例のデータの解析により、BMIの増減が、インスリン抵抗性指数HOMA-IRに反映される程度が、肝炎ウイルスの有無によって異なるかどうかについて検討した。その結果、BMIの増減がHOMA-IRの増減の関連パターンはC型肝炎の慢性感染の有無の両群において類似し、いずれも10%のBMIの増減がHOMA-IRの約30%の増減に反映されることが明らかになった。このことは、C型慢性肝炎症例においても、体重減少によるインスリン抵抗性の改善が、非肝炎症例と同程度に期待できることを意味している。対象となった慢性C型肝炎症例は33例と少ないが、類似の検討はなく、また、C型慢性肝炎症例では、インスリン抵抗性が、rGTPやHDLコレステロール値に反映されにくく、いわゆる「隠れインスリン抵抗性」の状態を呈する点を考慮すると、C型慢性肝炎症例の肥満管理の考え方について有用なデータ提示ができたのではないかと考えている。

冠動脈疾患におけるIgG4関連の自己免疫を検討した検討では、IgG4関連冠動脈周囲炎の病態を呈する症例が存在することが明らかになり、また、IgG4関連の免疫・炎症機転が、冠動脈瘤のみならず冠動脈狭窄病変の形成に関与する可能性が示唆された。さらに、冠動脈造影が施行された

症例の血清 IgG4 値の測定から IgG4 高値が、他の動脈硬化の危険因子と独立した冠動脈狭窄のプレディクターであることを明らかにすることができた。

E. 結論

C 型慢性肝炎症例と、冠動脈疾患を含めた動脈硬化病変をむすびつける可能性のある病態として、代謝異常、自己免疫の両面から検討を行った。BMI とインスリン抵抗性の関連や、体重の増減がインスリン抵抗性の増減に反映される程度は、C 型慢性肝炎症例でも、非肝炎症例と差を認めなかった。C 型慢性肝炎症例では、インスリン抵抗性の亢進は、血糖や血清の中性脂肪や HDL コレステロール値に反映されにくいものの、非肝炎症例同様に肥満対策が重要であることを示唆していると考えられた。

後半の検討では、IgG4 関連の冠動脈周囲炎を呈する存在すること、IgG 4 関連の免疫・炎症機転が冠動脈瘤や冠動脈狭窄の病態形成に関与する可能性について、明らかにすることができた。IgG4 関連を含めた免疫学的異常が C 型慢性肝炎症例と動脈硬化病変の間に介在する可能性については、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【論文発表】

1) 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 in press.

- 2) Terasaki F, Tsuji M, Kizawa H, Fujita S, Kanzaki Y, Kitaura Y, Ishizaka N. Sarcoidosis does not belong to or overlap the IgG4 related diseases based on the assessment of serum IgG4 levels in cardiac and noncardiac sarcoidosis. Human Pathology, 2011 in press.
- 3) Sakamoto A, Nagai R, Saito K, Imai Y, Takahashi M, Hosoya Y, Takeda N, Hirano K, Koike K, Enomoto Y, Kume H, Homma Y, Maeda D, Yamada H, Fukayama M, Hirata Y, Ishizaka N. Idiopathic retroperitoneal fibrosis, inflammatory aortic aneurysm, and inflammatory pericarditis - Retrospective analysis of 11 case histories. Journal of Cardiology, 2011 in press.
- 4) Tanigawa J, Daimon M, Murai M, Katsumata T, Tsuji M, Ishizaka N. IgG4-related coronary periarteritis in patients presenting with myocardial ischemia. Human Pathology, 2011 in press.
- 5) Kanzaki Y, Yamauchi Y, Okabe M, Terasaki F, Ishizaka N. Three-dimensional architecture of cardiomyocytes and connective tissues in hypertrophic cardiomyopathy--- a scanning electron microscopic observation. Circulation, 2011 in press.
- 6) Ishizaka N, Sakamoto A, Imai Y, Terasaki F, Nagai R. Multifocal fibrosclerosis and IgG4-related disease involving the cardiovascular system. Journal of

- Cardiology, 2011 in press.
- 7) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Koike K, Kohro T, Nagai R. Serum levels of IgG4 and soluble interleukin-2 receptor in patients with coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta* 2012.;413(5-6):577-581.
 - 8) Takahashi M, Shimizu T, Inajima T, Hosoya Y, Takeda N, Ishizaka N, Yamashita H, Hirata Y, Nagai R. A case of localized IgG4-related thoracic periarteritis and recurrent nerve palsy. *Am J Med Sci*. 2011;341(2):166-169.
 - 9) Ishizaka N. Association between changes in waist circumference versus those in body mass index, and changes in cardiometabolic risk factors. *Ningen Dock* 2011;25:1-5.
 - 10) Ikutomi M, Matsumura T, Iwata H, Nishimura G, Ishizaka N, Hirata Y, Ono M, Nagai R. Giant tumorous lesions surrounding the right coronary artery associated with immunoglobulin-G4-related systemic disease. *Cardiology*. 2011;116(1):22-26.
 - 11) Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Koike K, Yamakado M, Ishizaka N. Impact of changes in obesity parameters on glucose metabolism and insulin resistance over a one-year period. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(12):1246-1255.
 - 12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma- glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(5):476-485.
 - 13) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta H, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT1 receptor blocker, losartan and calcium channel blocker, benidipine, on accumulation of lipid in the kidney of rat model of metabolic syndrome. *Hypertension Research* 2010;33(3): 263-268.
 - 14) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. *J Rheumatol* 2010;37(2): 410-416.
 - 15) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Impact of changes waist circumference and BMI over one-year period on serum lipid data in Japanese individuals. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009;16(6):764-771.
 - 16) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Impacts of changes in obesity parameters for the prediction of blood pressure change in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32(6):421-427.
 - 17) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose

tolerance test. *Atherosclerosis*

2009;204(2):619-623.

- 18) Ishizaka Y, Ishizaka N, Tani M, Toda A, Toda E, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney disease in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32(2):141-149.

【学会発表】

- 1) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Serum immunoglobulin G4 levels is increased in patients with coronary artery disease but not in atherosclerotic aortic aneurysm. American Heart Association Scientific Sessions-2011, Orlando, FL, USA, 2011.
- 2) Sakamoto A, Ishizaka Y, Yamakado M, Koike K, Nagai R Ishizaka N. Does gain or loss in obesity parameters have significant association with the extent of progression of carotid intima-media thickening during one-year period? 第43回日本動脈硬化学会・学術集会、2011.
- 3) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Association between serum IgG4 levels and abdominal aortic aneurysm in patients suspected to have coronary artery disease. 第75回日本循環器学会総会・学術集会、横浜、2011.
- 4) Sakamoto A, Ishizaka N, Saito K, Imai Y, Morita H, Nagai R. Relationship between serum levels of IgG4 and soluble Interleukin-2 receptor and the history of bypass surgery and percutaneous coronary intervention. 第75回日本循環器学会総会・学術集会、横浜、2011.
- 5) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 胸・腹部大動脈症例における血清 IgG4、sIL-2R の検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 6) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 320列冠動脈 CT 施行症例における石灰化スコアと血清 sIL-2R、IgG4 値との関連の検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 7) 坂本愛子、石坂信和、齋藤 幹、今井 靖、永井良三. 心電図同期 320列 CT 施行症例における上行大動脈掲載と血清 sIL-2R、IgG4 値の関連の検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 8) 寺崎文生、木澤 隼、藤田修一、神崎裕美子、石坂信和. 心サルコイドーシス症例における血清 IgG4 値、組織 IgG4 陽性リンパ球に関する検討. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 9) 谷川 淳、石坂信和、星賀正明、勝間田敬弘、花房俊昭. 急性大動脈症候群および非急性大動脈疾患における冠動脈疾患の合併. 第59回日本心臓病学会学術集会、神戸、2011.
- 10) Ishizaka N. An unrecognized etiology of cardiovascular diseases: hepatitis C virus infection. World Congress of Cardiology-Scientific Sessions 2010, Beijing, China, 2010.
- 11) 石坂信和. 肥満と動脈硬化／メタボリックシンドロームの再検証. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、岐阜、2010.

- 12) Sakamoto A, Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Impact of changes in obesity parameters over one-year period on insulin resistance in Japanese individuals. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 岐阜, 2010.
- 13) 石坂信和, 永井良三. 健診データからのアセスメント:メタボリックシンドロームの診断と各構成因子の個別の評価. 第 58 回日本心臓病学会学術集会, 東京, 2010.
- 14) 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 腹囲・BMI の変化率と収縮期、拡張期血圧の変化率の関連. 第 57 回日本心臓病学会学術集会, 札幌, 2009.
- 15) 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 1 年間の腹囲・BMI の変化は糖・脂質データをどのように改善するか. 第 57 回日本心臓病学会学術集会, 札幌, 2009.
- 16) 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 腹囲・BMI の変化率はマイクロ/マクロアルブミン尿の状況にどのように関連しているのか—1 年間のインターバルでの検討. 第 57 回日本心臓病学会学術集会, 札幌, 2009.
- 17) 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 肥満のパラメータの変化と eGFR 低下の解消、新出の関連についての検討. 第 57 回日本心臓病学会学術集会, 札幌, 2009.
- 18) 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 喫煙、飲酒と高血圧の関連について. 第 32 回日本高血圧学会総会, 大津, 2009.

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

脂質代謝に関する研究

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学 教授

研究要旨：HBV, HCV, NASHいずれにも共通する肝発癌の病態として代謝変化、特に脂質代謝変化を検討し、HCV core蛋白発現系でSCD-1発現抑制によって肝臓の脂肪化、不飽和化抑制を認める物質としてピルビン酸、多価不飽和脂肪酸、FK506, スタチン、分枝鎖アミノ酸を同定するとともに、HCV core蛋白と鉄が長期共存在により抗酸化作用を持つヘムオキシゲナーゼ1の誘導が抑制されることから瀉血による治療効果の基礎的データを得た。

A. 研究目的

我々は肝臓の脂肪化、および脂質組成変化、および酸化ストレスが病態の中心であることをC型肝炎マウスモデルで我々は示してきた。またHBV, HCV, NASHいずれにも共通する肝発癌の病態として脂質代謝変化が存在することが広く知られてきた。この脂質代謝異常におけるメカニズムを解析し代謝改善薬による発癌抑制について検討を行った。

B. 研究方法

①HCV core 蛋白発現培養細胞系において不飽和酵素の活性、および脂質組成を個々に検討しHCV core 蛋白による活性変化を受けている酵素の確認とその酵素活性を抑制する物質のスクリーニングを行う。

（倫理面の配慮）

培養細胞系の実験であり特別な倫理面の押領は必要としない

C. 研究結果

HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇がマ培養細胞系脂質組成検討でも示された。またこの $\Delta 9$ 不飽和酵素（Stearoyl CoA desaturase）活性はPUFA など複数の物質投与によって抑制にされることを確認し有力な肝発癌抑制物質の同定が可能となった。また分枝鎖アミノ酸による肝臓の脂肪化およびSCD-1 発現抑制を報告しているが、長期マウス投与による発癌抑制効果を検討した。

D. 考察

HCV は自己の増殖に必要な脂質の場を脂肪酸合成酵素および $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇によって獲得している。逆にSCD-1 活性抑制によって肝細胞内脂肪化抑制が認められ肝発癌、さらにインスリン抵抗性発現も抑制される可能性がある。

E. 結論

培養細胞系においても $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が HCV core 蛋白によってもたらされることから新たな治療薬スクリーニングが可能となることまた多価不飽和脂肪酸投与によって HCV core 蛋白による $\Delta 9$ 不飽和酵素活性上昇が抑制され新たな治療のターゲットとなる可能性がある。またこの検討のなかで新たな肝臓脂肪化抑制物質の候補が得られた。分枝鎖アミノ酸長期投与により肝腫瘍サイズ縮小が認められ時間的遅延がもたらされていることが示された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. Kurano M, Iso-O N, Hara M, Ishizaka N, Moriya K, Koike K, Tsukamoto K. *Lipids Health Dis.* 2011 Aug 5;10:134
- 2) Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis. Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K. *J Chromatogr A.* 2011 Jun 3;1218(22):3447-52. Epub 2011 Apr 4.
- 3) Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core

protein. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):432-8.
Dec;51(6):704-6.

- 4) Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. *Oncology.* 2010 Jul;78 Suppl 1:24-30.
- 5) Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. *J Med Virol.* 2010 May;82(5):776-92.
- 6) Animal models for hepatitis C and related liver disease. Koike K, Moriya K, Matsuura *Hepatol Res.* 2010 Jan;40(1):69-82.
- 7) Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. *Am J Pathol.* 2009 Oct;175(4):1515-24.
- 8) Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core

protein. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H,
Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y,
Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T,
Koike K. *Hepatology*. 2009 Aug;50(2):378-
86.

2. 学会発表

- 1) Kyoji Moriya HCV and hepatic steatosis
The JSH single topic conference. Tokyo
Japan.2010

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

特記なし

miR122と脂質代謝系遺伝子の発現がHCVの肝臓特異性を規定する

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を解析し、3種のリソソーム由来のタンパク質を同定した。コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロムCオキシダーゼ活性の低下が観察されたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。HCVが複製する細胞ではオートファジーが誘導されるが、遺伝子型でオートファジーの程度が異なった。オートファジーを抑制してもHCVの増殖には影響はなく、細胞内にライソソーム由来の空胞が形成されて細胞死が誘導されたことから、HCVはオートファジーを利用して細胞死を回避して持続感染する可能性が示唆された。また、種々の非肝臓系細胞株に肝臓特異的なマイクロRNAを発現させたところ、いくつかの細胞でHCVの複製が認められた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染は、脂肪肝、肝硬変、肝細胞癌などの肝臓病の発症だけでなく、リンパ腫やクリオグロブリン血症などの肝外病変にも関与することが知られている。また、C型肝炎患者やコア蛋白質を発現するマウスの肝臓ではミトコンドリア由来のROSの産生やATP産生阻害が観察される。本研究では、HCVコア蛋白質によるミトコンドリアの機能障害の分子機構を解析した。また、HCV感染により惹起される種々の病態に、オートファジーが関連するという報告がなされているが、直接的な関与は未だ証明されていない。そこで、HCV感染におけるオートファジーの生物学的意義を解析した。さらに、肝臓特異的なmicroRNAであるmiR122がHCVゲノムの翻訳および複製を増強することが明らかになってきた。そこで、miR122を発現させることによってHCVの増殖を許容する非肝臓細胞株を樹立し、肝臓系細胞株との感染性の違いを検討することにより、HCVの感染指向性を規定する因子を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

コア蛋白質のN末端側にユビキチン蛋白質のC末端を付加した融合蛋白質をbaitとして、ユビキチン蛋白質のN末端を付加したヒト肝臓のcDNAライブラリーを酵母膜ツーハイブリッド法でスクリーニングした。HCVレプリコン細胞やJFH1ウイルスの感染細胞におけるオートファジーを検討するため、オートファゴソームのマーカーであるLC3の性状と局在を、ウェスタンブロット法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、ライソソーム阻害剤を用いたAutophagy flux assayやTandem fluorescent tagged LC3 (tfLC3) assayにより、LC3の蓄積機序を検討した。ATG4Bのプロテアーゼの活性欠損変異体とATG16Lを用いてオートファジーの誘導を阻害した。空胞化した細胞内コンパートメントの性状を各種オルガネラマーカーやデキストランの取り込みを指標にして検討した。HCVのレセプターを発現する10種類の非肝臓系細胞株にレンチウイルスベクターにてmiR122を強制発現した。HCVccの感染性はHCV-RNAの定量およびウイルス蛋白質の発現を検討した。miR122とHCV-RNAの結合部位の遺伝子

特異性の検討には、変異を導入した mt-miR122 と mt-HCVcc を用いた。HCVcc の感染性の違いとして、上清中の感染価を肝臓系と非肝臓系細胞株の間で比較した。細胞株の検索には cDNA array データベースを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の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に係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

1) 酵母膜ツーハイブリッド法を用いて、HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子を 11 種同定した。そのうちの 3 種がミトコンドリア蛋白質 (外膜に局在する Tom20、電子伝達系複合体 I のサブユニット NDUFS2、FADH2 や NADH2 を運ぶフラビン蛋白質のサブユニット ETFB) であった。

2) コア蛋白質発現細胞からミトコンドリアを分画し、そのシトクロム C オキシダーゼ活性を測定したところ、対照細胞に比べて有意な低下が見られたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。

3) コア蛋白質と NDUFS2 を発現した細胞または NDUFS2 のみを発現した細胞からミトコンドリアを分画して NDUFS2 の取り込みを比較すると、コア蛋白質存在下では NDUFS2 のミトコンドリアへ取り込み量の低下が見られた。これらの成績からコア蛋白質の発現によりミトコンドリア蛋白質の輸送障害が示唆された。

4) ミトコンドリアへの蛋白質輸送に関わる因子とコア蛋白質の相互作用は免疫沈降法では確認できなかったことから、他の輸送経路の存在が示唆された。

5) レプリコン細胞や JFH1 ウイルスの感染細胞ではオートファジー誘導のマーカーである、LC3 の C 末端のグリシンにホスファチジルエタノールアミンが共有結合した LC3-II が検出され、細胞質内に LC3 の蓄積が点状に観察された。また、レプリコン細胞におけるオートファジーの誘導は遺伝子型で程度が異なった。蓄積した LC3 はライソソームマーカーである LAMP1 や、オートファジーにより特異的に分解される p62 と共局在した。

6) Autophagy flux assay と tfLC3 assay により、蓄積した LC3 の一部はオートファジーの成熟過程で阻害されていることが確認された。

7) Atg4B のドミナントネガティブ体の導入によりオートファジーを抑制しても、HCV 増殖には影響しないが、細胞内に顕著な空胞が形成され、細胞死が誘導された。形成された空胞内には Lamp-1 やカテプシンが存在し、デキストランが取り込まれることから、ライソソーム/後期エンドソームが肥大化したものであること考えられた。空胞にはウイルスの蛋白質や RNA は検出されなかった。

8) 検討した 10 種類の細胞株のうち、5 種類の細胞株で感染後、HCV-RNA の複製を認めた。特に子宮由来の Hec1B 細胞、腎臓由来の 293T 細胞で高い複製効率が確認された。

9) Hec1B 細胞に対し、mt-miR122 を発現させ、mt-HCVcc を感染させることによって、miR122 の発現による HCV-RNA の複製亢進には miR122 の高い遺伝子特異性が必要であった。また、非肝臓系細胞株では高効率に HCV-RNA が複製するにも関わらず、上清中に感染性粒子が産生されなかった。

10) cDNA array および定量 PCR によって、非肝臓系細胞株には HCV の粒子産生に必須とされている apolipoprotein などの VLDL 関連蛋白質の発現が認められなかった。そこで、非肝臓系細胞株のうち、VLDL 関連蛋白質を発現する細胞株を cDNA array データベースで検索したところ、胃癌由来の FU97 細胞が同定された。この細胞では HCV-RNA の複製のみならず、感染性のウイルス粒子が高効率に産生された。

D. 考察

- 1) コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼ活性の低下が観察されたことから、コア蛋白質の発現によるミトコンドリア外膜への何らかの障害が示唆された。コア蛋白質のミトコンドリアへの輸送機構とミトコンドリア機能の障害機序の解明により、慢性 C 型肝炎から肝細胞癌への進展を阻止できる新規治療法の開発が期待される。
- 2) オートファジーは HCV の増殖には直接関与しないことが示された。オートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスでは肝障害が観察されることから、HCV の複製による不完全なオートファジーの誘導が病態発症に関与する可能性が考えられる。HCV 感染細胞でオートファジーの誘導を阻害すると、細胞の空胞化に伴う細胞死が観察されることから、HCV は感染細胞にオートファジーを誘導することによって細胞死を回避し、持続感染を成立させている可能性が示唆された。
- 3) ウイルス感染の指向性はレセプターで規定されていることが多いが、HCV 感染の臓器特異性はレセプターではなく、miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現により規定されていることが明らかになった。今回、HCVcc の感染が可能になった様々な非肝臓系細胞株は肝外病変の発症メカニズムの解明に用いることのできる有用なツールになりうる。

E. 結論

- 1) コア蛋白質を発現している細胞では、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼ活性の低下が観察された。
- 2) コア蛋白質を発現している細胞ではミトコンドリア蛋白質の移行障害が観察された。
- 3) オートファジーは HCV の増殖には直接関与しない。
- 4) オートファジーの誘導は遺伝子型で程度が異なる。
- 5) HCV はオートファジーを利用して細胞死を回避し、持続感染している可能性が示唆

された。

- 6) HCV 感染の肝臓指向性は miR122 と脂質代謝系遺伝子の発現によって規定されている。

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, and Matsuura Y. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.*, 2009; 83, 10427-10436.
- 2) Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng H.R, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li T.C, Takeda N, Miyamura T, and Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106, 12986-12991.
- 3) Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, and Matsuura Y. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.*, 83, 2009; 7959-7969.
- 4) Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, Ishii K.J, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. *J. Virol.*, 83, 2009; 7629-7640.
- 5) Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y. Suzuki T, Miyamura T, and Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis

- using mouse model and cultured cells. *Am. J. Pathol.* 175, 2009; 1515-1524.
- 6) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai M.M, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.*, 83, 2009; 5137-5147.
 - 7) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, and 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 PA28-Dependent Mechanism. *J. Virol.*, 83, 2009; 2389-2392.
 - 8) Mori K, Amano M, Takefuji M, Kato K, Morita Y, Nishioka T, Matsuura Y, Murohara T, Kaibuchi K. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284, 5067-5076.
 - 9) Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht D.S, Hamakubo T, Fukata M. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J. Cell Biol.*, 2009; 186, 147-160.
 - 10) Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 52, 411-420.
 - 11) Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2010; 84, 2798-2807.
 - 12) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010; 84, 5824-5835.
 - 13) Kaname Y, Tani H, Kataoka C, Shiokawa M, Taguwa S, Abe T, Moriishi K, Kinoshita T, and Matsuura Y. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/DAF into viral particles bearing baculovirus GP64. *J Virol* 2010; 84, 3210-3219.
 - 14) Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 39,1577-1585.
 - 15) Koike K, Moriya K, and Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatology Res* 2010; 40, 69-82.
 - 16) Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.
 - 17) Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 2010; 6, 2539-2553.
 - 18) Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. *J. Virol.*, (in press).
 - 19) Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 2011; 85, 13185-13194.
 - 20) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, and Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope

- proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.*, 2011; 286, 37264-37273.
- 21)Kato H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J. Virol.*, 2011; 85, 10976-10988.
- 22)Mori Y, and Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.*, 2011; 61, 59-64.
- 23)Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Kato H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 2011; 412, 211-219.
- 24)Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*, 2011; 6, e15967.
- 25)Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect.*, 2011; 13, 405-412.
- 26)Motomura T, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Takeishi K, Toshima T, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. The Impact of IL28B Genetic Variants on Recurrent Hepatitis C in Liver Transplantation : Significant Lessons from a Dual Graft Case. *Am. J. Transplant.*, 2011; 11, 1325-1329.
- 27)Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol.*, 2011; 54, 432-438.
- 28)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., and 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.
- 29)Yamamoto M, Ma J.S, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, Kimura T, Okamoto T, Okuyama M, Kayama H, Nagamune K, Takashima S, Matsuura Y, Soldati-Favre D, and Takeda K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.*, 2011; 208, 1533-1546.

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総会、東京、10月25日-27日、2009.
- 2)谷 英樹、塩川 舞、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割、同上。
- 3)福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来 HCV の細胞内導入法、同上。
- 4)寒原裕登、田鋏修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCV の増殖とオートファジー、同上。
- 5)片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
- 6)要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。
- 7)阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒア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、同上。
- 8)鈴木亮介、齋藤憲司、安東友美、石井

- 孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルスの trans-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
- 9) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗：HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
- 10) 田鍬修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治：C型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義：第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日-12 日、2009。
- 11) 松浦善治：バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入：第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21 日-24 日、2009。
- 12) Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第 15 回日本遺伝子治療学会、大阪、6 月 10 日-12 日、2009。
- 13) Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009。
- 14) Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
- 15) Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009。
- 16) Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
- 17) Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
- 18) Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
- 19) Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。
- 20) 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、5 月 19 日-21 日、2010。
- 21) 松浦善治: 温故知新・C型肝炎ウイルス研究の源流：第 52 回日本消化器病学会大会、横浜、10 月 13 日-16 日、2010。
- 22) 寒原裕登、田鍬修平、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総会、徳島、11 月 7 日-9 日、2010。
- 23) 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C 依存的なシグナル伝達経路の關与、同上。
- 24) 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治：IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
- 25) 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、

- 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc 細胞)への患者血清由来 HCV の感染、同上。
- 26) 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介したRNA非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
- 27) 森石恆司、松浦善治: HCV による脂質代謝障害の分子機序、同上。
- 28) 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鋏修平、森 嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築、同上。
- 29) 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、同上。
- 30) 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンは C 型肝炎ウイルスの複製を制御する、同上。
- 31) 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 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 32) 松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に関する宿主因子: 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日、2010。
- 33) Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, , and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
- 34) Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17thth International Meeting on HCV and Related Viruses. 横浜, 9 月 10 日-14 日, 2010.
- 35) Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
- 36) Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 同上。
- 37) Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 同上。
- 38) Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 同上。
- 39) Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for recurrent hepatitis C. 同上。
- 40) Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 同上。
- 41) Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 同上。
- 42) 松浦善治: 基調講演: C 型肝炎・肝癌制圧の分子基盤: 第 47 回日本肝臓学会総会、東京、6 月 2 日-3 日、2011。
- 43) 松浦善治: 特別講演: C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関する宿主因子: 第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会、門司、8 月 26 日-27 日、2011。
- 44) 松浦善治: 特別講演: C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に関する宿主因子 ―細胞内蛋白質分解システムの関与について―: 第 10 回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8 月 27 日、2011。
- 45) Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Katoh H, Morita E, Wataru

- Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. : 第 59 回日本ウイルス学会総会、札幌、9 月 12 日-16 日、2011.
- 46)Ninomiya A, Abe T, and Matsuura Y. Induction of IFN by inoculation of recombinant baculovirus in mouse embryonic fibroblasts suppresses transgene expression. 同上
- 47)Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. 同上
- 48)Kato H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 13 日-16 日、2011.
- 49)Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ohara Y, Ono C, and Matsuura Y. miR122 participates in the determination of cell tropism of hepatitis C virus. 同上
- 50)Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. 同上
- 51)Tanaka T, Matsuura Y, and Kamitani W. Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA. The American Society for Virology, 30th Annual Meeting, University of Minnesota, Minnesota, July 16-20, 2011.
- 52)Kato H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, and Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through the interaction with viral proteins and RNA. 同上
- 53)Fukuhara T, Shiokawa M, Ninomiya A, Kambara H, Kato H, Mori E, Wataru Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
- 54)Abe T, Fukuhara T, Morita E, and Matsuura Y. Annexins negatively regulate HCV RNA replication. 18th International Meeting on HCV and Related Viruses, Seattle, September, 8-12, 2011.
- 55)Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Morita E, Kamitani W, and Matsuura Y. miR122 facilitates replication of hepatitis C virus in non-hepatic cells. 同上
- 56)Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of HCV through an interaction with NS2. Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, and Aizaki H. 同上
- 57)Kawakami K, Kasai H, Yamashita A, Kato I, Matsuura Y, Kusunoki M, and Moriishi K. Regulation of HCV replication by Hsp90 through FKBP8-dependent and -independent pathways. 同上
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

慢性C型肝炎患者末梢血B細胞における TNFAIP3 (A20) の発現解析

研究分担者 水落 利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
研究協力者 楠 英樹 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨：（平成21年度）慢性C型肝炎（CHC）患者末梢血中のCD5陰性B細胞がアポトーシスにより破壊されることで自己抗原を放出し、アポトーシス抵抗性のCD5陽性B細胞が相対的に増加して自己抗原に対する自己抗体を産生することにより、自己免疫疾患発症へとつながる可能性を示した。（平成22年度）CHC患者の末梢血B細胞（CHC-B）にHCVが感染していること、および遺伝子改変に関与するAID（activation-induced cytidine deaminase）や種々の癌化関連遺伝子の発現亢進が見られることを明らかにした。一方で、なぜHCVがB細胞に持続感染するのかという疑問が生じた。CHC-Bでは、自然免疫系に関与するセンサー／アダプター分子の発現が亢進していたが、IFN β 遺伝子の転写に関わるIRF-3の2量体形成および核移行は惹起されていなかった。この原因として、CHC-BではIRF-3のリン酸化が抑制され、従ってIFN β 産生が抑制されていることによりHCVが持続感染できる可能性を示した。（平成23年度）A20は腫瘍壊死因子- α 刺激後急速に誘導されるタンパク質として同定されたtumor necrosis factor- α induced protein 3 (TNFAIP3)の別名で、NF- κ B経路の負の調節因子である。最近、成熟B細胞腫瘍において、A20遺伝子が体細胞変異ないし遺伝子欠失によって高度に不活化されていることが報告され、A20の機能欠損によって引き起こされるNF- κ Bシグナル伝達の制御異常が、一部の成熟B細胞リンパ腫の病因に関与していることが示唆されている。そこで本研究ではCHC-B細胞におけるA20分子の発現動態を解析し、B細胞リンパ腫発症機序について考察した。

A. 研究目的

一般にC型肝炎ウイルス（HCV）感染は肝細胞に指向性を持つと考えられていたがHCVは肝細胞のみならずB細胞にも感染することが示唆されていた。また以前より

HCV慢性感染者においてはMixed Cryoglobulinemia、Rheumatoid Factor産生、あるいはSjogren-like Syndromeといった自己免疫様疾患の発症が多く報告されている。興味あることに、これらすべての疾患にお

いてはB細胞がその病態に深く関与しており、さらに疫学調査においてHCV感染と非ホジキン型B細胞リンパ腫 (B-NHL) 発症との関連が報告されている。そこで本研究の目的は

(1) B細胞サブセットのなかでもCD5陽性B細胞が自己免疫疾患において増加することが知られており、それらの発症に深く関与している可能性が高いことから、慢性C型肝炎CHC-Bについて細胞表面抗原およびアポトーシス感受性を解析する。

(2) HCVがB細胞特異的に感染する理由を探るため、IFN β 産生に代表される自然免疫系のシグナル伝達に着目し、HCVがB細胞に持続感染するメカニズムの解明を試みる。

(3) NF- κ Bシグナル伝達の制御異常がB細胞の癌化を誘導する可能性に注目し、NF- κ B経路の負の調節因子であるA20に焦点をあて、CHC患者末梢血B細胞におけるA20分子および、NF- κ B経路関連蛋白分子の発現を解析することにより、HCV感染によるB細胞リンパ腫発症機序について考察する。

以上である。

B. 研究方法

瀉血療法の際に採取された CHC 患者末梢血液、また対照としては健常人末梢血液より Ficoll を用いて PBMC を分離し、さらに抗体結合磁気ビーズを用いて CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した。

(1) 血中 HCV RNA 定量、Flow cytometry による細胞表面抗原の解析、およびアポトーシス解析のため、Annexin V

分子との結合能を調べた。

(2) 検体血漿中の様々なサイトカインを、蛍光抗体ビーズを用いた染色、および Luminex System を用いて定量した。

(3) B 細胞から RNA とタンパク質を抽出し、リアルタイム PCR (rt-PCR)、イムノブロッキング(IB)により自然免疫系に関連する遺伝子/タンパク質の発現解析を行った。また Western Blotting 法により A20 分子および NF- κ B 経路関連蛋白分子の発現解析を行った。

(倫理面の配慮)

本研究に用いた CHC 患者血液についてはその譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得て実験に使用した。

C. 研究結果

(1) CHC 末梢血中 CD5 陽性 B 細胞数の増加：CHC の末梢血細胞について CD19 分子 (B 細胞マーカー) および CD5 分子の発現を Flow cytometry で解析したところ、健常人と比較して有意な差は見られなかった (図 1 A, B)。そこで、B 細胞(CD19 陽性)における CD5 陽性細胞の比率を調べたところ、明らかに CHC ではその増加が見られた (図 1C)。CD19 陽性かつ CD5 陽性細胞数も CHC では有意に増加していることが確認された (図 1D)。

(2) B 細胞のアポトーシス感受性：CHC において CD5 陽性 B 細胞が相対的に増加する原因としてアポトーシス抵抗性を考え、Flow cytometry により CD19+CD5+細胞群と CD19+CD5-細胞群での Annexin V 結合能を比較した。健常人では両者に差は見られなかったが (図 2A)、CHC では明らか

に CD19+CD5-細胞群での Annexin V 結合能が上昇しており、アポトーシスが促進していることが示された (図 2B)。さらに CHC 患者 10 検体の結果から、CD19+CD5+細胞群と CD19+CD5-細胞群との間では、アポトーシス感受性に有意差があることを確認した (図 2C)。

(3) CHC におけるアポトーシス抵抗性サイトカインレベルの上昇: CD5 陽性 B-CLL (chronic lymphocytic leukemia)は、何種類かのサイトカインによってアポトーシスが抑制されているという報告がある。そこで、CHC 血漿中の各種サイトカインのレベルを健常人と比較したところ、それらサイトカインのなかで、IL-4, IL-10, IL-12 のレベルが CHC では有意に上昇していることが明らかになった (図 3)。

(4) CHC-B ではウイルス感染に対する初期防御反応において重要である Type I IFN である IFN β の発現亢進が認められなかった (図 4 A, B)。さらに poly I:C 遺伝子を B 細胞に導入したところ、健常人 B 細胞では IFN β 産生が誘導されたが、CHC の B 細胞では誘導されなかった (図 4 C)。このことは、HCV 感染によって B 細胞では自然免疫系が抑制されていることを示唆する。CHC-B では、RIG-I、IPS-1、TLR3、TRIF などの自然免疫系に関与する分子の発現が顕著に亢進していたが (図 5)、IFN β 遺伝子の転写に関わる IRF-3 蛋白の発現 (図 6 A)、およびその 2 量体形成 (図 6 B) と核移行 (図 6 C) は惹起されていなかった。この原因として、HCV 蛋白 NS3/4A プロテアーゼによ

る IPS-1 の切断が考えられた。しかしながら、CHC-B では一部の IPS-1 は切断されていたが大部分は完全長のままであり、シグナル伝達の阻害を説明するには不十分であった (図 7)。そこで次に、IRF-3 のリン酸化に関与する TBK1/IKK ϵ の活性に着目して実験を行った結果、CHC-B では TBK1/IKK ϵ に結合し、IRF-3 のリン酸化を抑制する SIKE の発現が亢進しており、さらに TBK1 を安定化し、IRF-3 のリン酸化を促進する Hsp90 や DDX3X の発現が有意に減少していることが明らかになった (図 8)。従って、これらの要因が複合的に関与することで、CHC-B では IFN β の産生が抑制されていると結論した。

(5) CHC-B で NF- κ B 活性化シグナルに関わる分子の発現レベルについて検討した。その結果、RIP1 (Receptor-interacting protein 1), IKK (I κ B kinase) complex はいずれも CHC-B で発現が亢進していることが明らかになった (図 9A)。この結果から、CHC-B では、NF- κ B は恒常的に活性化される状態にあると考えられた。次に、IKB- α と p65 の発現レベルを調べたところ、健常者と CHC 患者との間での差はほとんど見られなかった (図 9B)。さらに、p50 に関しては CHC-B ではその発現量は減少していた。現在、p65 と p50 の核移行に関して調べている。また一方で、IKB- α の発現量が健常者と CHC 患者の間でほとんど差がなかったことから (図 9B)、p65 と p50 は細胞質に留まっている可能性が高いと思われた。そこで、この理由として、NF- κ B 活性化シグナルを抑制する分子で

ある A20 および、同様の機能を持つ事が知られている CYLD (Cylindromatosis)に関して CHC-B での発現レベルを調べた。その結果、A20 と CYLD は共に、CHC-B で恒常的に発現亢進していることが明らかになった (図 10)。おそらく、CHC-B では、恒常的に発現亢進した A20 や CYLD が、同様に発現亢進している RIP1 や IKK complex の活性を抑えていると考えられる。

(6) HCVのfull genomeをB細胞特異的に導入したマウス(HCV-Tg)が小原先生 (鹿児島大学) の研究室において作製され、約 1/4のマウスでBリンホーマが発症することが示されている。そこで小原先生との共同研究により、HCV-Tgマウス B細胞におけるA20の発現動態を調べた。その結果、Bリンホーマを発症したHCV-Tgマウスでは、未発症マウスと比較してA20の発現が極度に低下していることが明らかになった (図 11)。A20はNF- κ B経路を阻害する役割を担っていることから、その機能低下が無秩序なNF- κ B経路の促進、つまり癌化へと誘導することを考えると、本結果は非常に興味深い。

D. 考察

アポトーシスに対する抵抗性にはBcl-2の発現レベルが関係していることが知られている。Kesselらは (Clin. Exp. Immunol. 145:563–570, 2006) 臍帯血B細胞でのBcl-2発現が末梢血B細胞に比較して低いことがアポトーシス高感受性の原因であると結論している。そこでPBMCにおけるBcl-2発現を健常人とCHCで比較したところ、両者の間には有意な差は見られなかった (未

発表データ)。この結果はToubiらの報告 (J. Virol. 78 :11379–11384, 2004) とも一致することから、Bcl-2の発現上昇のみがCD5陽性B細胞のアポトーシス抵抗性を説明するものではないと考えられる。

HCVに感染したB細胞ではウイルス排除・防御に関わる自然免疫系が十分に機能していないことを明らかにしたが、このことから、B細胞におけるHCVの持続感染が可能となり、さらにはB細胞機能異常を誘導することが示唆される。HCV陽性である肝移植患者では、ウイルスが高率に移植肝に再感染し、肝硬変などを起こすことが知られている。本研究により、末梢B細胞がHCVの貯留細胞になっている可能性が示されたことから、血中のHCVだけでなく、HCVが持続感染しているB細胞の除去がHCVの再感染防止に重要であると考えられる

CHC-BにおいてはA20が恒常的に発現亢進しているが、このA20の機能消失がBリンホーマ発症を誘導するのではないかと考えている。HCV-Tgマウスで得られた結果 (Bリンホーマを発症したHCV-TgマウスではA20の発現が極度に低下している) はこの仮説を支持するものであり、今後のHCV感染Bリンホーマ発症患者検体の解析が待たれる。

E. 結論

(1) 本研究において、CHC末梢血中のCD5陽性B細胞とCD5陰性B細胞とでは、両者の間にアポトーシス感受性 (抵抗性) に大きな差があることが示された。この原因として、CHCにおいてはCD5陽性B細胞