

のアポトーシスを抑制するサイトカインレベルの上昇が考えられた。このようなCHCにおけるCD5陽性B細胞数の相対的な増加が、自己免疫疾患の発症誘導に、さらにはB-NHL発症にも関与している可能性があり興味深い。

(2) B細胞においては、HCV感染によりIFN β 産生に代表される自然免疫能が抑制されているために、HCVが持続感染できることが示唆された。このようなB細胞におけるHCVの持続感染は、HCVがその増殖の場を肝細胞以外に保持するだけでなく、B細胞リンホーマの発症にも関与している可能性があるだろう。

(3) 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、無秩序なNF- κ B経路の亢進がCHC-Bの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.
- 3) Mizuochi T, Ito M, Takai K, and Yamaguchi K: Resistance of peripheral blood memory B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Virus Research* 155:349-351, 2011.
- 4) 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 infection of hepatitis C virus. *Journal of Innate Immunity* 2:607-617, 2010.
- 5) Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral B cells of chronic hepatitis C patients. *Clinical Immunology* 135:459-465, 2010.
- 6) Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, and Yamaguchi K: Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 30:243-252,2010.
- 7) Mizuochi T, Mizusawa S, Nojima K, Okada Y, and Yamaguchi K: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a”

determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit.

Clinica Chimica Acta 411:605-606, 2010.

- 8) Mohsan S, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, and Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays for detecting recombinant viral antigens derived from various genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 47:4141-4143, 2009.
- 9) Ito M, Mizoroki F, Takai K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Functional phenotypes and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients who developed non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 : 269-272, 2009.
- 10) Mizuochi T, Ito M, Takai K, and Yamaguchi K: Differential susceptibility of peripheral blood CD5⁺ and CD5⁻ B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389:512-515, 2009.

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.

- 2) 水落利明、伊藤昌彦：慢性 C 型肝炎患者末梢 CD5 陽性 B 細胞のアポトーシス抵抗性 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会（徳島市、2010 年）
- 3) 伊藤昌彦、益見厚子、持田恵子、久木原 博、森石 恆司、松浦 善治、山口一成、水落利明：C 型肝炎ウイルス慢性感染患者 B 細胞における HCV 持続感染機構の解明 第 5 7 回日本ウイルス学会学術集会（東京都、2009 年）
- 4) 水落利明、笠井道之：慢性 C 型肝炎患者末梢血 B 細胞の動態および腫瘍化関連遺伝子発現 第 3 8 回日本免疫学会学術集会（大阪市、2009 年）

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

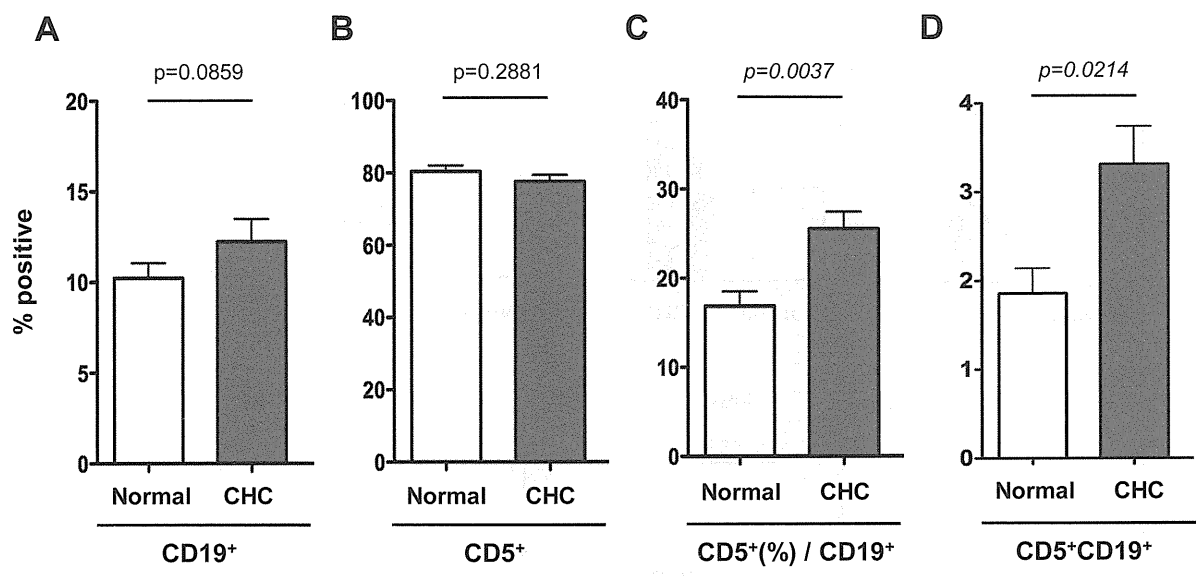


図 1: 慢性C型肝炎患者末梢血中におけるCD5陽性B細胞の増加

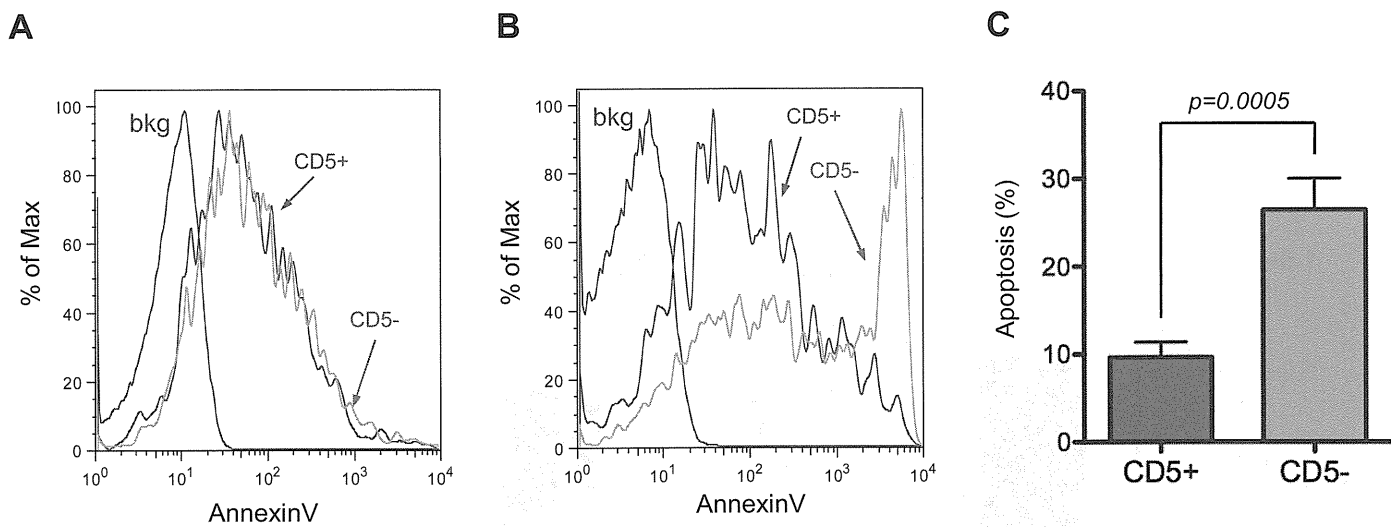


図 2: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞のアポトーシス感受性

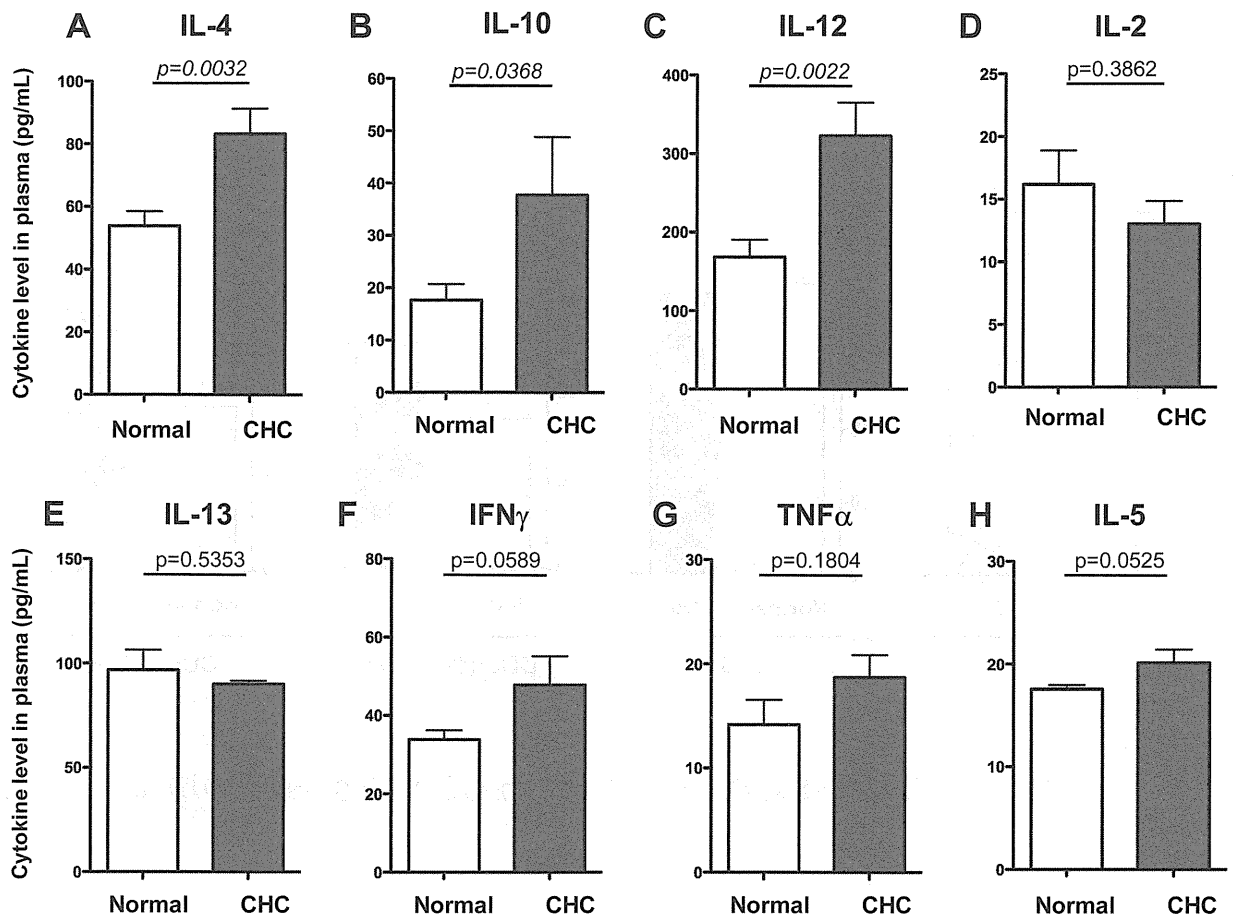


図 3: 慢性C型肝炎患者末梢血におけるアポトーシス抵抗性サイトカインレベル

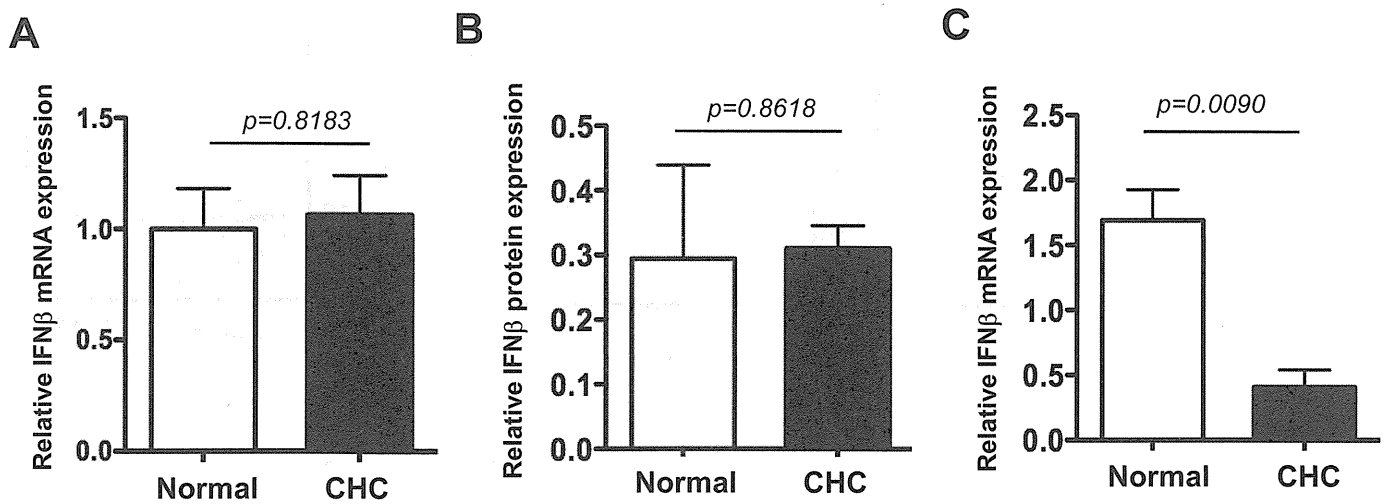


図 4: 慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのIFN β 産生

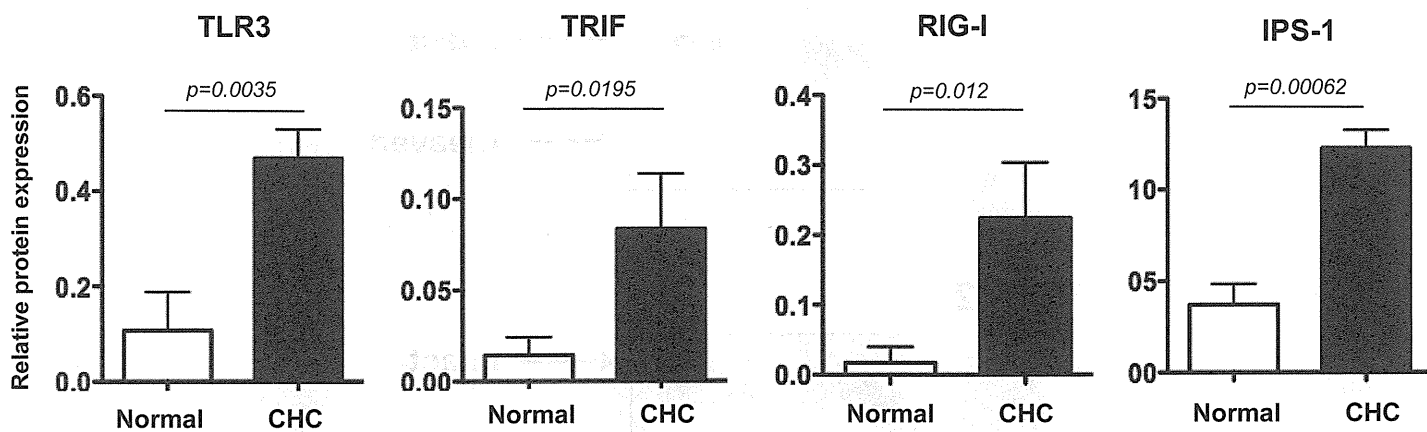


図 5 : 慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのウイルスセンサー分子発現

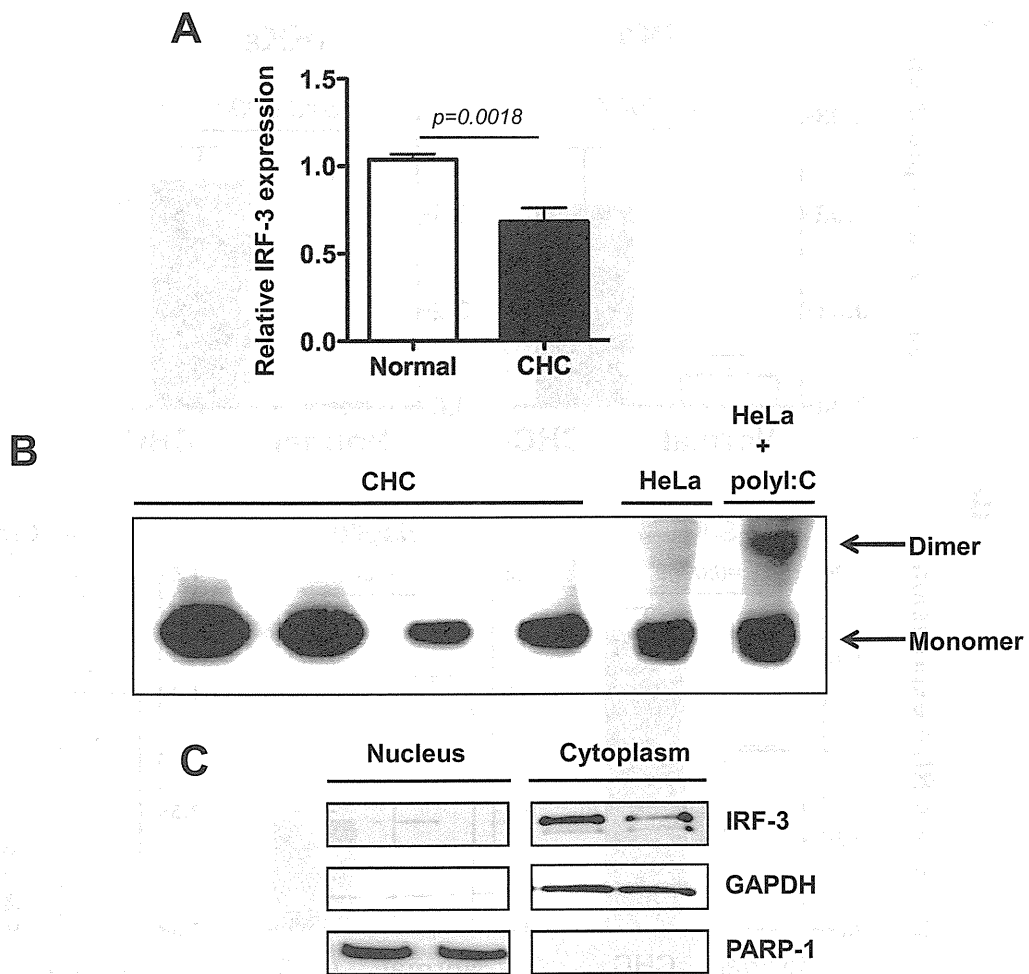


図 6 : 慢性C型肝炎患者末梢B細胞でのIRF-3活性化

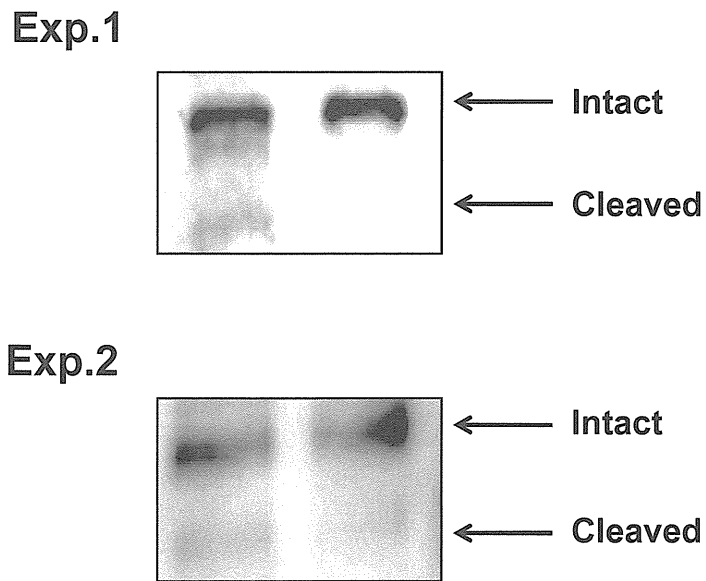


図 7 : 慢性C型肝炎患者末梢B細胞におけるIPS-1分子切断

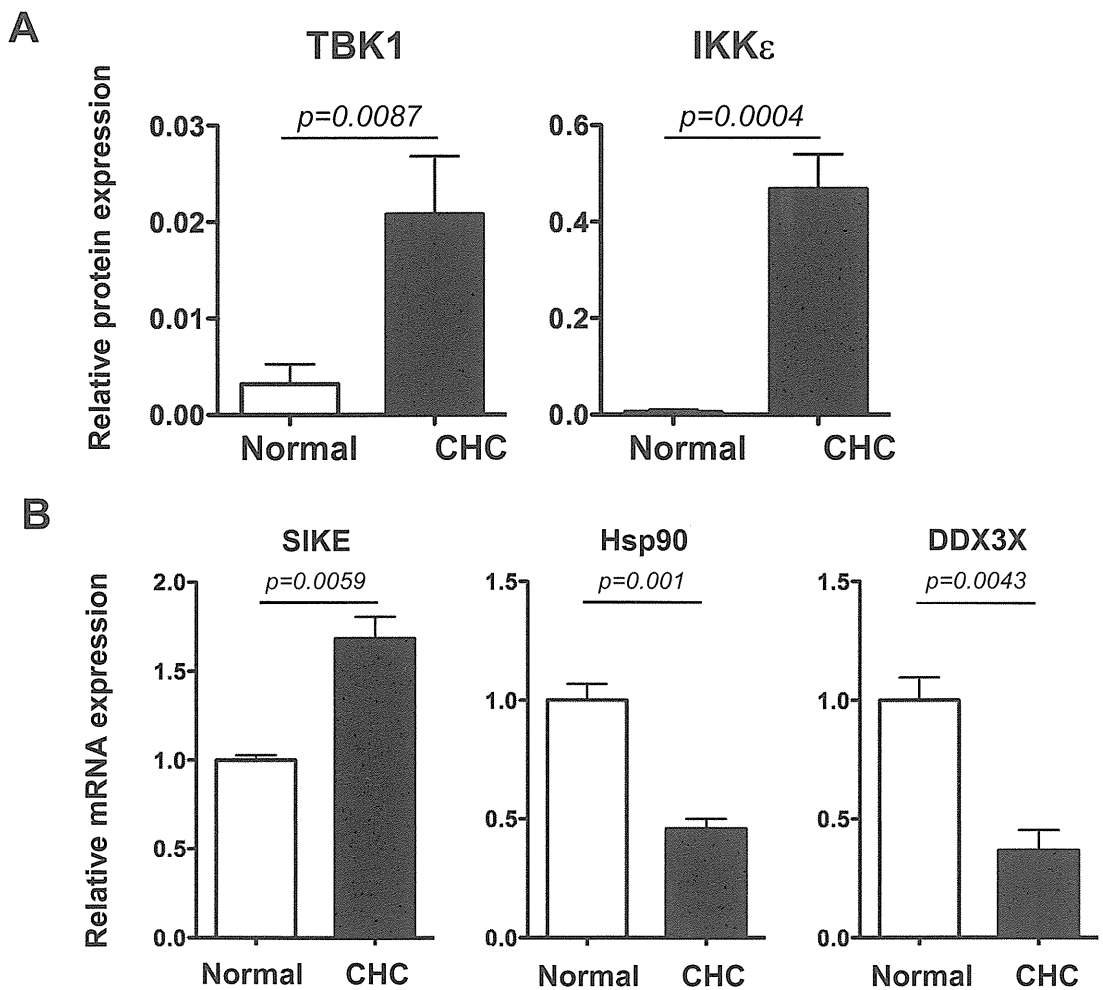


図 8 : 慢性C型肝炎患者末梢B細胞におけるTBK1/IKK ϵ の機能抑制

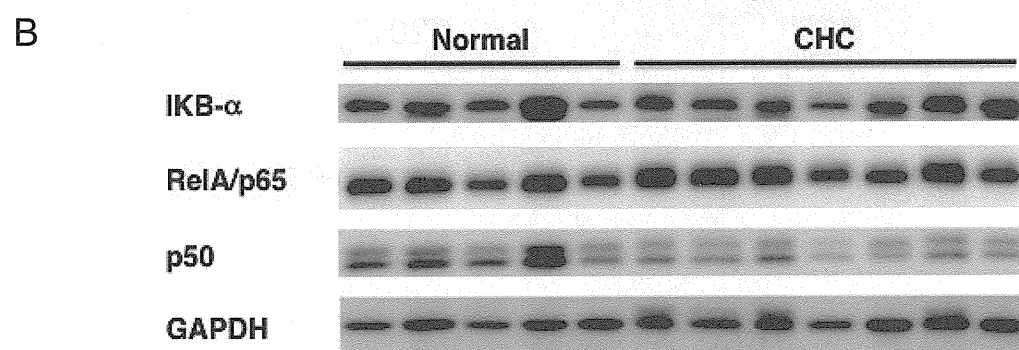
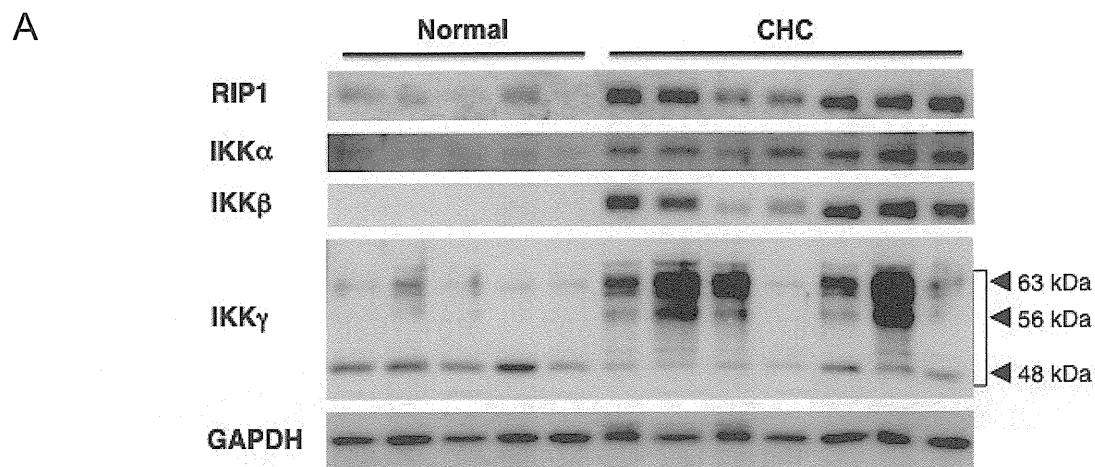


図 9: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞におけるNF κ B経路関連分子の発現

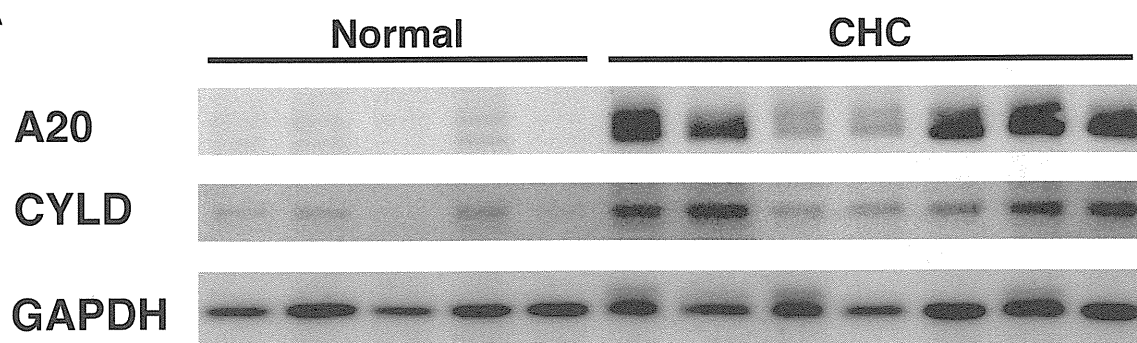


図 10: 慢性C型肝炎患者末梢血B細胞におけるA20とCYLDの発現

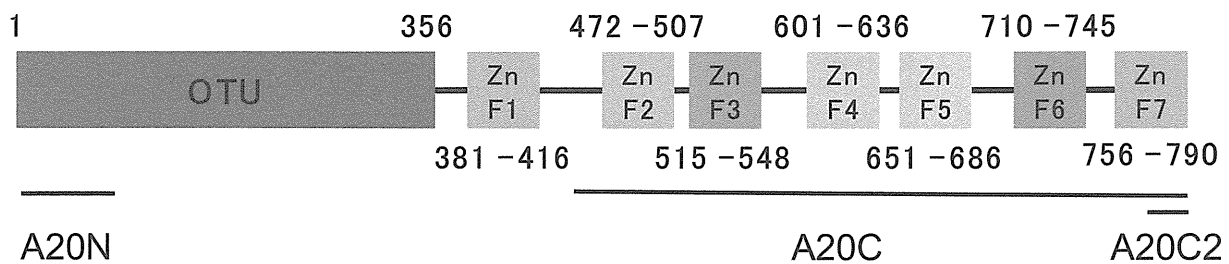


図 11 :HCV-TgマウスB細胞におけるA20の発現

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）が引き起こす肝外病変の1つであるBリンパ腫の発症には不明な点が多く残されていた。研究分担者らは、モデルマウスを樹立して解析を行った。このうち、HCV構造蛋白質を持続発現するIRF-1欠損マウス(CN2-IRF-1^{-/-})はリンパ性増殖を発症した。HCV遺伝子発現後、CN2マウスの体内ではIL-2, IL-10, IL-12が発現上昇するのに対しCN2-IRF-1^{-/-}マウスではIL-2, IL-10の上昇は見られたがIL-12の発現上昇は見られなかった。これらマウスの脾臓細胞を用いた試験管内での解析から、リンパ球の増殖形質獲得に重要なのはHCVのコア蛋白質並びにIL-2, IL-10である事が明らかとなった。また、CN2-IRF-1^{-/-}マウスではリンパ性増殖からBリンパ腫に移行しない事から、この段階ではIRF-1並びにIL-12が関与する可能性が示唆された。さらに、HCV全長遺伝子をB細胞で発現するマウス(RzCD19Cre)も樹立し、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。このBリンパ腫発症と関連する液性因子として可溶性のIL-2レセプター α (sIL-2R α)を同定した。sIL-2R α の産生はBリンパ腫組織であると考えられた。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。

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しその解析が急速に進められている。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。このうちBリンパ腫はHCVの慢性感染時にウイルス抗原に反応したB細胞がまずポリクローナルな増殖をし、その後形質変化したB細胞がモノクローナル性に増殖して腫瘍化していくとも言われている。本研究では、未だ解明されない肝外病変の中でもリンパ性増殖

やBリンパ腫の発生モデル動物を樹立してこれらを解析する事を通じて発症要因を解明する事を目的とした。これまでに、HCVがB細胞に感染するという報告があるが(JMV 2009他)、HCVがB細胞に及ぼす直接作用については不明な点が多い。HCV全長遺伝子をB細胞で発現してその直接作用を解析した。

B. 研究方法

HCV持続発現マウス；HCV構造蛋白質遺伝子(CN2)をCre/loxPシステムで生後任意の時

期に発現するマウスに、CTLやNK活性の低下したIRF-1^{-/-}マウスを交配して樹立した(CN2 IRF-1^{-/-}マウス)。CN2 IRF-1^{-/-}マウスの尾静脈からCre-adenovirus (2x10⁹ PFU)を投与後HCVコア蛋白質を500日以上に渡って測定した。また、これらマウスの生存率を測定し、リンパ腫形成の有無を観察した。リンパ腫については病理組織切片の観察、及びこれらを構成する細胞種についてはCD3, CD45R, CD4, CD8などに対する抗体を用いたFACS解析で同定を試みた。Fas抗体投与によるアポトーシス感受性については、TUNELアッセイやカスパーゼの測定で検索した。肝炎の指標は血中ALTを測定(nissui)し、組織はHE染色によって検索した。血清中のIL-2, 4, 10, 12のレベルはELISAキット(R&D Systems)を用いて測定した。Bcl-2蛋白質は特異抗体(SantaCruz社)を用いて検出した。リンパ球のコロニー形成能はメチルセルロースを用いて解析した。カスパーゼ3/7や9の活性はAc-LEHD-AFCかAc-DEVD-AFCを基質として測定した。IL-2, 4, 10, 12, bcl-2のmRNA量は定量PCR法で測定した。HCV構造蛋白質をMx1-Creシステムで誘導発現する場合はpoly(IC)を300μg、48時間ごとに腹腔内投与して誘導発現を行った。

RzCD19Creマウスの樹立：全長のHCVゲノムRNA(1b型)をリボザイム(Rz)で正確に切り出す事ができ、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。HCV遺伝子の発現は、RT-PCR, ウェスタンブロット法、コアELISA(オーソ

社)法で解析を行った。組織染色は定法に従いHE染色、CD45RまたはCD8抗体を用いた免疫染色を行ってBリンパ腫の判定をした。

液性因子の解析：

マウス血清中のALT/AST値はELISAキット(WAKO)で測定した。31種類のサイトカイン、ケモカイン(IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, KC, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α, IL-15, FGF-basic, LIF, M-CSF, MIG, MIP-2, PDGFβ and VEGF)の定量はBio-Plex Pro assay (Bio-Rad社)で行った。sIL-2Rαの測定はELISAキット(DuoSet ELISA Development System; R&D Systems)で行った。

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

1. リンパ性増殖モデルマウス：

HCV 構造蛋白質を持続発現する IRF-1 欠損マウスはリンパ性増殖を発症した。

HCV 遺伝子発現後、CN2 マウスの体内では IL-2, IL-10, IL-12 が発現上昇するのに対し CN2-IRF-1^{-/-}マウスでは IL-2, IL-10 の上昇は見られたが IL-12 の発現上昇は見られなかった。そこで、IRF-1 が欠損する事による細胞増殖制御への影響を明らかにするため、Fas 抗体を投与した結果 IRF-1^{-/-}マウスでは Fas 誘導性アポトーシスに耐性である事が明らかとなった。これらマウスの脾臓細胞を用いた試験管内での解析から、この増殖形質獲得に重要なのは HCV の構造蛋白質並びに IL-2, IL-10 であり、さらに IL-12 を添加すると脾臓細胞のコロニー形成能が抑制された。また、これらの形質は IRF-1 欠損下でさらに増強された。HCV の構造蛋白質並びに IL-2, IL-10 の同時処理は脾臓細胞に Fas 誘導性アポトーシス抵抗性を賦与し Bcl-2 の発現も誘導した。これらの傾向は IRF-1 の欠損でさらに強まった。また、Bcl-2 の発現誘導は HCV 蛋白質のうちコア蛋白質が最も強く、IL-2 よりも IL-10 がより強かった。これらは IRF-1 の欠損でさらに増強された。

2. B リンパ腫マウス

HCV 全長を Cre/loxP 制御下で発現できる Rz マウスと CD19Cre マウスを交配して RzCD19Cre マウスを樹立した。樹立したマウスの各組織における HCV 遺伝子の発現を解析したところ、B 細胞の多い脾臓では HCV のコア蛋白質の発現が見られたが、肝臓や血症では検出されなかった。HCV

の発現が確認されたため、RzCD19Cre マウスを HCV を発現していないコントロールマウス群 (Rz, CD19Cre, WT) と共に 600 日以上観察した。その結果、600 日以上立つと痩せて衰弱する個体が観察されたため剖検を行って免疫病理学的な解析を行った。その結果、約 25% (18/72) のマウスで瀰漫性大細胞型の B リンパ腫の発症が観察された。この発症率は自然発生の腫瘍やコントロール群での腫瘍の発生率よりも有意に高かった。HCV 遺伝子の発現は全ての B リンパ腫で確認された。また、Ig 遺伝子のゲノム遺伝子を解析したところほとんどの例で単一の遺伝子増幅が見られ腫瘍細胞がモノクローナル性に増殖していた。

B リンパ腫の発症と関連するサイトカイン、ケモカイン 31 種並びに ALT, AST 値をマウス血中で測定した。その結果 B リンパ腫の発症と関連して有意な変化が生じたものはなかった。一方で腫瘍マーカーの 1 つである sIL-2R α を測定したところ、

RzCD19Cre の B リンパ腫発症群で有意な上昇が観察された。さらに、sIL-2R α を産生する組織を解析したところ B リンパ腫の腫瘍組織からの産生が上昇していた。

また、B リンパ腫発生に関与する宿主因子をマイクロアレイで網羅的に行った。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種の動きが認められた。現在詳細なネットワーク解析ソフトを用いて行っている所である。

D. 考察

本研究結果より、リンパ球に増殖形質やアポトーシス抵抗性を賦与するのは、(IL-2), IL-10 と HCV コア蛋白質である可能性が強く示唆された。また、これらの作用は IRF-1 の欠損でさらに促進された。IRF-1^{-/-}マウスではリンパ種に移行せずにリンパ性増殖を発症する。これは、HCV コア蛋白質と IL-2, IL-10 の共役により B 細胞のみならず、T 細胞にも増殖性を賦与し、双方の細胞が増殖してしまうためではないかと考えている。さらにリンパ性増殖の状態から増殖能を獲得した B 細胞が B リンパ腫へと移行する段階で、IRF-1 並びに IL-12 が関与する可能性を考えており、今後検討を要する。

RzCD19Cre マウスは生前より B 細胞で HCV を発現しているため、HCV の直接作用によって B リンパ腫の発症が誘導されていると考えられた。

また、HCV の持続発現によって腫瘍化した B 細胞がモノクローナル性に増殖していると考えられた。

B リンパ腫を発症した個体では sIL-2R α の産生上昇が観察された。リンパ腫の発生

の結果と考えられるが、sIL-2R α 自体がリンパ腫を引き起こす事に直接関与しているかについては今後の検討が必要である。また、マイクロアレイによる解析の詳細なネットワーク分析を現在コンピューター解析で行っている。これまでのところ B リンパ腫になると、♀に関わらず大きく発現変動する宿主因子が存在し、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

本研究結果から、リンパ球に増殖形質やアポトーシス抵抗性を賦与してリンパ性増殖を誘発するのに重要な因子は、(IL-2), IL-10 と HCV コア蛋白質である事が明らかとなった。

HCV を持続的に発現すると B リンパ腫が一定の頻度で発生する事があきらかとなった。HCV の直接作用で B リンパ腫発症を誘導できる事が強く示唆された。B リンパ腫の発症に関連する宿主因子の1つとして sIL-2R α が明らかとなった。

CN2-IRF1^{-/-}マウス、RzCD19Cre マウスの解析を通じ、HCV によるリンパ性増殖、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.
- 8) Kasama Y, Sekiguchi S, Saito M, Tanaka K, Satoh M, Kuwahara K, Sakaguchi N, Takeya M, Hiasa Y, Kohara M, and 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*. Blood 2010: 116(23): 4926-4933.
- 9) Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Nagla SA, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. Comp. Immunol. Immunopathol. 2010: 33 E81-88.
- 10) Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. J. Virology 2010: 84 303-311, [Selected in "Spotlight"].

- 11) Nishimura T, Kohara M, Izumi K, Kasama Y, Hirata Y, Huang Y, Shuda M, Mukaidani C, Takano T, Tokunaga Y, Nuriya H, Satoh M, Saito M, Kai C and Tsukiyama-Kohara K. HEPATITIS C VIRUS IMPAIRS P53 VIA PERSISTENT OVER-EXPRESSION OF 3 β -HYDROXYSTEROL Δ 24-REDUCTASE. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:36442-36452.
- 12) Saitou K, Mizumoto K, Nishimura T, Kai C and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Research* 2009;144(1-2):266-271.
- 13) Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Sekiguchi S, Seike E, Tone' S, Hayashi Y, Tobita Y, Kasama Y, Shimizu M, Takahashi H, Taya C, Yonekawa H, Tanaka N, and Kohara M. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology* 2009; 137: :285–296.
- 14) Inoue Y, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, Sato H, and Kai C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with the HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; Jan;32(1):29-41.
- [和文]
1. 小原恭子、棟方翼、小原道法。HCVの病原性発現に関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 巻増刊 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週支部会 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) 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) Saito M, Tsukiyama-Kohara K, Molecular target therapy for hepatitis 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) Kohara M, Kimura K, Tsukiyama-Kohara K. Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein cures chronic hepatitis in mouse model. 第 70 回日本癌学会学術総会 大阪 2011.
- 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) 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
- 15) Nagla, E.S., Tanaka, K., Nishimura, T., Saito, M., Kohara, Harada, S., El-Gohary, A., and Tsukiyama-Kohara, K. Application of DHCR24 for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
- 16) Nishimura, T., Kohara, M., Kasama, Y., Hirata, Y., Takano T., Tokunaga, Y., Satoh, M., Saito, M., and Tsukiyama-Kohara, K. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysterol delta24-reductase. The 17th international meeting on Hepatitis C virus and related viruses YOKOHAMA, 2010
- 17) Tsukiyama-Kohara, K, and Kohara, M. Hepatitis C virus impairs p53 activity by persistent over-expression of DHCR24. Cell Symposia, Inflammation in Disease

- Conference, Lisbon 2010.
- 18) Sekiguchi, S., Kimura, K., Tsukiyama-Kohara, K., and Kohara, M.
Immunotherapy using recombinant vaccinia virus cures chronic hepatitis. Cell Symposia, Inflammation in Disease Conference, Lisbon 2010.
- 19) Kasama, Y., Sekiguchi, S., Saito, M., Satoh, M., Kuwahara, K., Sakaguchi, N., Takeya, M., Hiasa, Y., Kohara, M., and Tsukiyama-Kohara, K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010.
- 20) 佐藤 正明、笠間 由里、小原 道法、小原 恭子 C型肝炎ウイルス複製における Betaine/GABA transporter-1 (BGT-1)の役割 日本ウイルス学会 徳島2010.
- 21) 笠間 由里、関口 敏、齊藤 誠、佐藤 正明、桑原 一彦、阪口 薫雄、竹屋 元裕、小原 道法、小原 恭子 マウスモデルを用いた C型肝炎ウイルス誘発性 Bリンパ腫発生機序の解析 日本ウイルス学会 徳島 2010.
- 22) 齊藤 誠、小原 恭子 C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24の転写制御 BMB2010 神戸 2010.
- 23) 笠間 由里、関口 敏、齊藤 誠、佐藤 正明、桑原 一彦、竹屋 元裕、阪口 薫雄、小原 道法、小原 恭子 全長 HCVの B細胞発現による Bリンパ腫誘導 BMB2010 神戸 2010.
- 24) Saito M, and Tsukiyama-Kohara K.
Molecular mechanism of DHCR24 over-expression induced by hepatitis C virus. 16th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009, Nice, France.
- 25) Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K.
Antibody raised against 3 β -hydroxysterol-D24-reductase (DHCR24) suppresses hepatitis C virus infection through BGT-1. 6th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses. 2009. Nice, France. Tsukiyama-Kohara K.
The novel pathway for impairment of p53 and oxidative stress response by hepatitis C virus. 4th Medical Biotech Forum. 2009 Dalian, China.
- 26) Tsukiyama-Kohara K, Machida K, Kasama Y, Sekiguchi S, and Kohara M.
Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. ワークショップ2W11 サイトカイン制御因子による多様な生体調節 第32回日本分子生物学会年会 2009年 横浜
- 27) 西村 知裕、齊藤 誠、小原 道法、小原 恭子
HCV 誘導性 3 β -Hydroxysterol δ -24 reductase 持続発現による p53 転写因子機能の抑制 第 32 回日本分子生物学会年会 2009年 横浜
- 28) 西村 知裕、笠間 由里、齊藤 誠、小原 道法、小原 恭子 C型肝炎ウイルス(HCV)が誘導

するDHCR24(3 β hydroxysterol Δ 24 reductase)過剰発現によるp53機能抑制 ワークショップ² ウイルス発癌 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年東京

29) 小原恭子、町田圭吾、笠間由里、関口敏、小原道法 C型肝炎ウイルスとBリンパ腫 ワークショップ⁶ 病原性発現とモデルシステム 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京

30)佐藤正明、笠間由里、小原道法、小原恭子
Betaine/GABA transporter1(BGT-1)のC型肝炎ウイルス複製における役割
第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京

31)齊藤誠、小原恭子
C型肝炎ウイルスによる腫瘍原性関連分子 DHCR24 の転写制御機構の解析
第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年 東京

32)西村知裕、齊藤誠、小原道法、小原恭子
Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3 β ;-hydroxysterol Δ 24-reductase.
第68回日本癌学会学術総会 2009年 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

1.「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. 「RRM2のアンタゴニストを有効成分として含有するC型肝炎治療剤」特願2010-180981 出願日 平成22年8月12日 発明者 小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸 出願人 国立大学法人熊本大学、財団法人東京都医学研究機構、中外製薬株式会社

2.実用新案登録

なし

3.その他

* Nature 474 S14-15, 2011 “The murine candidate” [OUTLOOK HEPATITIS] 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型糖尿病が有意に高率に合併することが臨床
上、知られている。HCV感染に2型糖尿病が合併すると肝線維化、IFN治療抵抗性、発が
んなど病態に悪影響を及ぼすため、HCV感染による糖代謝異常の分子機序を明らかにし、
治療法開発のための分子基盤を構築することを目的とした。HCVレプリコン細胞および
HCV J6/JFH1感染系を用い、HCV感染が肝細胞でのグルコーストランスポーターGLUT2発
現抑制、それに伴う糖の取り込み低下を引き起こすことを明らかにした。それはHCVによ
り転写因子 Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) の発現が転写および翻訳後におい
て抑制されることが原因であることを見出した。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、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
の関与が示された。HCV蛋白質の中でも NS5A が HNF-1 α との相互作用を介して分解を誘導
することを明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎、肝
硬変、肝細胞癌などの肝病変を引き起こす
だけでなく、2型糖尿病などの肝外病変を
引き起こし、肝病態に悪影響を及ぼす。そ
の対策は、厚生労働行政上、重要な課題で
ある。HCV感染に伴う糖代謝異常の機序に
ついてはいくつか報告があるが、いまだ不
明な点が多い。そこで、本研究ではHCVが
2型糖尿病を引き起こす新たな機序を明ら
かにし、治療法開発のための分子基盤を構
築することを目的とした。

B. 研究方法

1) ヒト肝がん細胞（Huh7.5細胞）と同細胞由来の
HCVサブゲノムRNAレプリコン複製細胞（SGR）、

HCVフルゲノムRNAレプリコン複製細胞（FGR）及
びHCV J6/JFH1感染細胞を用いて、2-deoxy-D-[1,
2-3H]glucoseの取り込みを測定した。また、細
胞表面でのGLUT2の発現をフローサイトメーター
で解析した。

2) ルンフェラーゼをレポーターとし、GLUT2プロモ
ーター領域の8種類の欠失変異体（全長、 Δ C/EBP、
 Δ CRE、 Δ AP-1、 Δ HNF-1 α 、 Δ CAAT、 Δ TATA、転
写開始）プラスミドを作製した。その欠失変異体
プラスミドを各細胞にトランスフェクションし、
GLUT2プロモーター活性をルンフェラーゼアッセ
イにて測定した。

3) GLUT2発現に関連する転写因子 HNF-1 α について
mRNA発現量をReal-time quantitative PCR (qRT-

PCR)、タンパク発現量をウエスタンブロット法により測定した。また、上記細胞をIFN処理した後、HNF-1 α のmRNA発現量、タンパク発現量を測定し比較検討した。

4) GLUT2プロモーターの抑制にいずれのHCV蛋白質が関与しているか明らかにするために、GLUT2プロモーター活性測定を行った。Huh7.5細胞にHCV蛋白質発現プラスミドのcore、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bを各1 μ gずつと、GLUT2発現プラスミド0.5 μ gをコ・トランスフェクションし、それぞれのGLUT2プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

5) 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。

6) 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。

7) 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。

8) 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複製細胞 (SGR、FGR、J6/JFH-1感染細胞) において2-deoxy-D-[1, 2-³H]glucoseの取り込みを測定したところ、コントロール細胞に比し、いずれの細胞でも50-60%の糖の取り込み抑制が認められた。また、細胞表面でのGLUT2の発現がいずれのHCV複製細胞においても抑制されていた。細胞をIFN- α (1000IU/ml) で処理しHCV複製を阻害するとGLUT2の発現は回復した。

2) SGR、FGR、J6/JFH-1感染細胞においてGLUT2プロモーター活性に対し影響を及ぼす転写因子について解析した。転写因子結合配列欠変異体プラスミドを用いて、GLUT2のプロモーター活性を測定した。HCV RNA レプリコン細胞及び感染細胞においてGLUT2-全長、 Δ C/EBP、 Δ CRE、 Δ AP-1のGLUT2プロモーター活性は抑制されていたが、GLUT2- Δ HNF-1 α 、 Δ CAAT、 Δ TATA、転写開始ではGLUT2プロモーター活性の抑制は認められなくなった。このことからHNF-1 α 結合領域付近が重要であることが示唆された。

3) qRT-PCR解析により、SGR、FGR、感染細胞においてHNF-1 α のmRNA発現量は抑制されていた。HNF-1 α のタンパク発現量もSGR、FGR、感染細胞において低下しており、感染細胞において顕著に抑制されていた。さらに、SGR、FGR、感染細胞にお

いて IFN- α 処理により HCV 複製を阻害することで HNF-1 α の発現量は回復した。

4) HCV 蛋白質 core、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B をそれぞれ共発現させ、GLUT2 プロモーター活性を測定したところ、NS5A の発現では GLUT2 プロモーター活性が著しく抑制された。一方、core、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5B では control と比べてプロモーター活性が抑制されるものはなかった。

5) 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。感染細胞では HNF-1 α の蛋白質量が著しく低下し、IFN- α で HCV RNA を排除すると HNF-1 α 蛋白質量が回復した。HNF-1 α 蛋白質量の低下に蛋白質分解が関与しているか明らかにするために、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 clasto-lactacystin の処理では HNF-1 α 蛋白質量に変化はなかったが、E-64d と pepstatin A の処理によって、HNF-1 α 蛋白質量が著しく増加した。次にシステインプロテアーゼ阻害剤 E-64d と酸性プロテアーゼ阻害剤 pepstatin A をそれぞれ単独で処理した結果では、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。

6) 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。

7) 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。

8) 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 感染肝細胞では細胞表面の GLUT2 の発現低下が引き起こされ、糖の輸送が抑制され、高血糖状態になる可能性が示された。HCV 感染により、HNF-1 α の発現が抑制される。HNF-1 α の転写は若干低下し、さらに著しい HNF-1 α 蛋白質量の減少があった。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。HNF-1 α の発現抑制により GLUT2 の転写抑制が起こり、肝細胞表面の糖輸送に障害が起こり、糖代謝異常の原因となると考えられた。