

HCVウイルス蛋白質の中でNS5A蛋白質のみがGLUT2プロモーター活性の抑制に関与した。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おり、NS5A蛋白質のみで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。また、HCV NS5A蛋白質とHNF-1 α は結合するが判った。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、オートファジーの関与などを今後解析する必要がある。

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・脂脂肪酸代謝、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、肝がんにとっ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 レプリコン細胞、HCV J6/JFH1 感染細胞の解析から、HCV 感染により GLUT2 の肝細胞表面への発現が抑制され、糖の取り込みが抑制される。これは HCV 感染細胞において HNF-1 α の mRNA および蛋白量が減少することによって生じることが明らかとなった。また、HCV 感染により、HNF-1 α の蛋白質がライソゾームプロテアーゼ（特に酸性プロテアーゼの関与）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。HCV NS5A 蛋白質がライソゾ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.
- 9) Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2010; 410: 38-47.
- 10) Hayashida K, Shoji I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2010; 54: 684-90.
- 11) Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010; 111: 676-85.
- 12) Kim SR., Imoto S., Kudo M., Nakajima T., Ando K., Mita K., Fukuda K., Hong HS., Lee YH., Nakashima K., Shoji I., Nagano-Fujii M., Hotta H., and Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated Interferon α treatment for chronic hepatitis C. *Internal Medicine*, 2010; 49: 1119-1122.
- 13) Moriishi K., Shoji I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010; 52: 411-420.
- 14) Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji I., Hak, H., and Kawata, S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 2010;82: 1364-70.
- 15) Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., Shoji I., and Hotta, H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with peglated-Interferon plus ribavirin. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 2010; 56: E60-E66.
- 16) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double

- filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological response to previous combination therapy: Early viral dynamics. *Intervirology*, 2010; 53: 44-48.
- 17) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 2010; 53: 49-54.
- 18) Bungyoku, Y., Shoji, I., Makine, T., Adachi, T., Hayashida, K., Nagano-Fujii, M., Ide Y., Deng, L., and Hotta, H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *Journal of General Virology*, 2009; 90: 1681-91.
- 19) Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, MMC., 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. *Journal of Virology*, 2009; 83: 5137-47.
- 20) Kasai, D., Adachi, T., Lin, D., Nagano-Fujii, M., Sada, K., Ikeda, M., Kato, N., Ide, Y., Shoji, I., and Hotta, H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *Journal of Hepatology*, 2009; 50: 883-94.
- 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)多様性の経時的変化の検討. 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,福岡, 2011.
- 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,福岡, 2011.
- 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に關与する因子の検討(神戸肝炎治療研究会). 第15回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011.
- 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, 大阪, 2011.
- 21) Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression.17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Sep 10-14, 2010.
- 22) El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, Sep 10-14, 2010.
- 23) Deng L, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Sep 10-14, 2010.
- 24) Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sep 10-14, 2010.
- 25) Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Vienna, April 2010.
- 26) Shoji I, Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会, 神戸, Dec 7-10. 2010.

- 27) 岡田典子、勝二郁夫、甘翔、Lin Deng、姜大鵬、井出良浩、堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A に結合するユビキチンリガーゼの同定. 第 33 回日本分子生物学会、神戸, Dec 7-10, 2010.
- 28) Deng Lin, 兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博. C 型肝炎ウイルス感染は転写因子 FoxO1 を介した糖新生を誘導する. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会、大阪, Nov 20, 2010.
- 29) 勝二郁夫、Lin Deng、堀田博. HCV による糖代謝障害の分子機序 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム、徳島, Nov 7-9, 2010.
- 30) El-Shamy Ahmed, 金守良、井出良浩、Deng Lin, 勝二郁夫、堀田博. HCV genotype 2a および 2b の NS5A 多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島, Nov 7-9, 2010.
- 31) Deng Lin, 兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博. 糖代謝に及ぼす C 型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島, Nov 7-9, 2010.
- 32) 笹山美紀子、勝二郁夫、Adianti M、井出良浩、Da-Peng J、Deng L、堀田博. 慢性 C 型肝炎患者血清および非感染者血清を用いた C 型肝炎ウイルス中和感受性決定部位の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島, Nov 7-9, 2010.
- 33) 堀田博、井出良浩、勝二郁夫. C 型肝炎ウイルス感染は糖新生系を亢進し、糖尿病発症に関与する. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形, May 27-28, 2010.
- 34) 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性 C 型肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a 及び HCV-2b の NS5A 多様性は治療効果と相関する. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形, May 27-28, 2010.
- 35) 金守良, 井本勉, 堀田博, 三田敬二, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良弘. 1b 型高ウイルス C 型慢性肝炎の PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN-β4 週間連続投与の試み. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形, May 27-28, 2010.
- 36) 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFNα-2a/RBV 併用療法の早期治療効果に関与する因子の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜, Oct 13-14, 2010.
- 37) 井本勉, 金守良, 堀田博, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩, 前川陽子. C 型慢性肝炎 1b 型高ウイルス量併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFNβ2~4 週連続投与後 PEG-IFNα-2a+RBV 併用療法の早期ウイルスダイナミクスによる EVR 予測. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜, Oct 13-14, 2010.
- 38) 進藤道子, El-Shamy Ahmed, 森川輝久, 原野雄一, 中島知明, 勝二郁夫, 奥野忠雄,

- 堀田博. C 型慢性肝炎から肝癌発生まで経時的観察が可能であった症例におけるウイルス遺伝子多様性の解析. 第 14 回日本肝臓学会大会, 横浜, Oct 13-14, 2010.
- 39) Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 40) Inubushi S, Kaneda S, Adachi T, Deng L, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-associated predisposition of type 2 diabetes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 41) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma and E6AP in the degradation of HCV core protein and the viral production. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 42) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Nice (France), October 3-7, 2009.
- 43) Shoji I and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. The 60th annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston (USA), October 30-November 3, 2009.
- 44) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. 1b 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN α -2b+RBV 併用療法(併用療法)における治療効果とウイルス dynamics との関係及びウイルス陰性化時期予測式についての検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都, 2009.
- 45) 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. セロタイプ 2 型 C 型慢性肝炎に対する IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の背景因子及び早期ウイルス dynamics の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 京都, 2009.
- 46) 井出良浩, 兼田崇作, 犬伏祥子, 足達哲也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染によるインスリン抵抗性誘導の分子機序について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 47) 森石恆司, 勝二郁夫, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 48) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

49) Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる Bax 活性化の分子機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

50) 林田和美, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス増殖に及ぼすエストロジオールの影響に関する検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

51) 兼田崇作, 足達哲也, Lin Deng, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. グルコーストランスポーター GLUT2 の転写制御に及ぼす C型肝炎ウイルスの影響. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

52) 木村敬郎, 鈴木亮介, 山越智, 鈴木健裕, 堂前直, 勝二郁夫, 松浦善治, 千葉丈, 脇田隆字, 鈴木哲朗. Prohibitin2 は C型肝炎ウイルス(HCV)NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

53) 井出良浩, 上城博宣, 前防達也, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白と相互作用する細胞性キナーゼの解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

54) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

55) 山下亮輔, 福田浩一郎, 犬伏祥子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治, Lin

Deng, 井出良浩, 堀田博, 勝二郁夫. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性調節因子 E6AP 及び PA28 γ の相互作用解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

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

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：HCV感染に伴う肝細胞の脂肪化の分子メカニズムについて、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し、解析を行った。HCVは感染に伴い、肝細胞内での脂質の蓄積と培養上清中の超低比重リポ蛋白(VLDL)の割合の増加という、HCV増殖に好都合な環境が作り出されているものと考えられた。メタボローム解析の結果、感染細胞のエネルギー代謝および蛋白核酸合成は低下し、糖代謝は解糖系の亢進が認められた。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、感染細胞は解糖系を亢進させてエネルギー産生を行っている可能性が示唆された。このように、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。

A. 研究目的

近年、HCV感染が単なる肝炎だけでなくインスリン抵抗性や脂肪肝などの代謝異常も引き起こしていることが明らかになってきており、HCV感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、VLDL分泌低下が報告されている。一方、VLDLはHCVの感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため、HCV感染に伴う肝細胞の脂肪化の分子メカニズムについて解析した。HCV感染が宿主細胞の脂質代謝に与える影響を調べるために、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し解析を行った。

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が宿主リポ蛋白代謝に与える影響
Huh7細胞にJFH1由来HCVを感染させ、経時的に培養上清、細胞を回収し、含まれるウイルスコアタンパク量および脂質の量

を測定した。培養上清をゲル濾過 HPLC 分画し、各分画に含まれる脂質の解析を行った。

(2) 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。

(3) HCV 増殖が宿主エネルギー代謝に与える影響

上記(2)の結果、感染細胞およびサブゲノム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 が宿主リポ蛋白代謝に与える影響

Huh7 細胞に HCV を感染させると、細胞内総コレステロール TC、中性脂肪 TG、リン脂質 PL 等の増加を認め、一方、培養上清中の TC、TG、PL は時間経過とともに減少した。培養上清をゲル濾過 HPLC 分画し、培養上清中のリポ蛋白の割合について解析したところ、感染後時間経過とともに VLDL が増加し、低比重リポ蛋白(LDL)が低下することを見出し、その原因として感染細胞における VLDL 分解酵素である

Hepatic lipase の減少を見出した。

(2) HCV 感染が宿主代謝に与える影響

HCV 感染またはサブゲノム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。

(3) 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は感染に伴い、肝細胞内での脂質の蓄積と培養上清中のVLDLの割合の増加という、HCV増殖に好都合な環境を作り出しているものと考えられた。メタボローム解析の結果、感染細胞のエネルギー代謝および蛋白核酸合成は低下し、糖代謝は解糖系の亢進が認められた。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、感染細胞は解糖系を亢進させてエネルギー産生を行っている可能性が示唆された。

E. 結論

HCV感染に伴い宿主の脂質、糖質、蛋白質、核酸、エネルギー代謝に大きな変化が認められた。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であった。

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.
- 9) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res. 2010;85:520-524.
- 10) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. J Virol. 2010;84:5824-5835.
- 11) 相崎英樹、コレステロールとスフィンゴ脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、Minophagen medical review、ミノファーゲン製薬、東京、2010:1-10.

- 12) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 83;5137-47: 2009.
- 13) Liu HM, Aizaki H, Choi KS, Machida K, Ou JJ, Lai MM. SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009;386:249-256
- 14) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009;50:378-386.
- 15) Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4141-4143.
- 16) 相崎英樹、生体膜脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、膜、日本膜学会、東京、2009:259-265.
2. 学会発表
- 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 press.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, 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.
- 10) 坂田幸太郎、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.
- 11) 坂田幸太郎、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.
- 12)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.
- 13)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.
- 14)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、脇田隆字、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.
- 15)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.
- 16)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“肝癌モデル”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.
- 17)Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
- 18)Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
- 19)相崎英樹、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.
- 20)相崎英樹、HCV粒子形成と脂質の役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 21)渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆字、HCVエンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 22)安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス複製複合体におけるATP制御の可視化と機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 23)山本真民、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 24)Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 25)鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、分割ユビキチン法を利用したHCVNS2と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 26)斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義、Squalene synthase阻害剤のC型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 27)Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009.
- 28)Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Structural requirement of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009.
- 29)Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T: HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16th

International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Nice, France, 2009.

2. 実用新案登録
なし
- 30) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に関する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析、第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
3. その他
なし
- 31) 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野国勝、脇田隆字、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 32) 渡邊則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆字、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNAを複製するヒト肝星細胞株の樹立。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 33) 相崎英樹、山本真民、後藤耕司、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、西島正弘、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子の脂質成分の感染における役割、第16回肝細胞研究会、山形、2009.
- 34) 相崎英樹、脇田隆字、感染性HCV粒子形成における宿主生体膜の役割、第45回日本肝臓学会総会、シンポジウム、神戸、2009.
- 35) 相崎英樹、生体膜脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、第31回日本膜学会、シンポジウム、東京、2009.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

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 はがん抑制遺伝子（p53 および pRb）経路を制御することにより細胞老化を克服し、また c-Myc と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した。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（NFkB）；p65/RelA の活性化は STAT3 と連動していた。これより、肝臓の慢性炎症におけるHBV遺伝子産物と宿主のがん抑制遺伝子、酸化ストレス経路、転写因子との相互作用が、がん化に促進的に作用することが示された。

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 : B 型肝炎ウイルス遺伝子産物 HBx は、ヒト線維芽細胞においてがん抑制遺伝子 (p53 および pRb) 経路を制御することにより、活性型がん遺伝子 (H-RAS^{V12}) が誘導する細胞老化を克服し形質転換に寄与した。

2) ヒト不死化肝細胞において、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。

3) 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。

4) ウェスタンブロットにて、肝炎発症 3 ヶ月めから 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。

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

6) 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。

7) 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

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。慢性肝炎において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を促進するものと示唆されている。

B 型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。

本研究において、宿主側転写因子として広く知られている c-Myc、Stat3 に注目した相互作用の解析結果が得られた。これらの結果は、HBV と免疫反応の相互作用において、宿主の転写活性に関わる因子が形質転換、がん化に促進的に作用することを示唆している。

E. 結論

肝臓の慢性炎症の場における HBV 遺伝子産物と宿主のがん抑制遺伝子 (p53 および pRb) 、酸化ストレス経路 (NFkB) 、転写因子 (STAT3) との相互作用が、がん化に促進的に作用することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1206-1216.
- 3) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.
- 4) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011; 307: 165-173.
- 5) Yamagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashitashita T, Arai K, Suna T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 281-290.
- 6) Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.
- 7) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.
- 8) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y and Kaneko S: Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res.* 2010; 70: 4687-4697.
- 9) Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. *Oncogene* 2010; 29: 2228-2237.
- 10) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 2164-2174.
- 11) Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 2009; 183: 3053-3063.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB

- subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第62回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011
- 2) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, Mukaida N, C M1 Macrophage Filtration Contributes to the Enhancement of Antitumor Effect with the Combination of Suicide Gene Therapy and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Delivery in Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. 第 62 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 981A; 一般; poster: Nov. 7, 2011
- 3) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; 第 61 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010
- 4) 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: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; **International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa “Cancer and Host Response” (Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan):** Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010
- 5) 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: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第 60 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般; poster: Nov. 3, 2009
- 6) Oishi N, Nakamoto Y, Honda M, Murakami S, Kaneko S: #1791; Oncogenic transformation of human hepatocytes with defined cellular oncogenes. ; 第 60 回 **American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 50 (4, Suppl.) 1131A; 一般; poster: Nov. 3, 2009
- 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

肝炎ウイルスに対する遺伝子治療用ベクターの開発に関する研究

研究分担者 齋藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：研究分担者として平成 23 年度から参加した。本研究では肝炎ウイルスの代謝及び免疫系に関与する遺伝子を発現するアデノウイルスベクター (AdV) 及び C 型肝炎ウイルス研究用 AdV を班員に供給するとともに、肝細胞癌に有効性が期待される新規遺伝子治療用 AdV を開発した。また、肝がん播種モデルマウスについても改良を加え、市販化への道筋をつけた。

A. 研究目的

アデノウイルスベクター (AdV) は、肝細胞癌由来の HuH-7 細胞を含む多くの細胞に高効率で遺伝子導入が可能であり、肝炎ウイルス研究には有用性の高いベクターである。また、齋藤は目的遺伝子の発現を標的化する同時のシステムを複数開発している。本研究では、C 型肝炎ウイルス研究に関する最適の AdV を班員の要望に応じて精製ロットで供給し研究を側面的にサポートするとともに、肝細胞癌に対する安全性・有効性の高い遺伝子治療用ベクターを開発し、治療効果の判定のための肝がん播種モデルマウスのシステムを構築する。

B. 研究方法

AdV の作製は、申請者の開発した「完全長ウイルスゲノム導入法」により行った。ウイルスゲノムの全長を有するコスミドカセットに班員より依頼のあった cDNA を挿

入し、Csp45I 調製後 293 細胞を用いて定法により AdV を回収した。AdV の精製は CsCl のステップ勾配により行い、力価測定は新規に開発した real-time PCR 法により行った。

新規遺伝子治療用 AdV は、従来の「切り出し発現法」とは異なり、ウイルスゲノムの左端側に α -フェトプロテイン (AFP) のプロモーターから部位特異的組換え酵素 Cre を発現するスイッチユニットとその下流に目的遺伝子の cDNA のみと loxP、ウイルスゲノムの右端側に loxP と EF1 α プロモーターを持つ（「ミニアデノ」と命名）。Cre と loxP を同一分子上に持つコスミドは作製が不可能であるため、分担者の開発した Cre に対する dominant negative を持つコスミドカセットにより作製し、Cre に対する shRNA を高度に発現している 293 細胞を用いて作製した。ベクターは十分に力価の高いものが得られたため、AFP を発現して

いる HuH-7 細胞による発現効率を「ミニアデノ」と「切り出し発現」で比較した。また HeLa 細胞を用いて特異性の検討を行った。

更に、肝がん播種モデルマウスに関しては、昨年度から止血の方法などを工夫して、マウスの死亡率を軽減した。

(倫理面の配慮)

本研究は遺伝子治療用ベクター作製であり、現時点では倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

班員への AdV の供給は、要望に応じて行った。本年度は 1 件の通常ベクターの要望、VA 欠失ベクターとして 12 件の要望があり、精製ベクターロットとして供給した。

「ミニアデノ」は、肝細胞癌特異的に治療用遺伝子を発現するベクターであり、播種状の癌を手術などで摘出後に肝臓に投与し「目に見えない癌」をサーチしながら治療するベクターである。先に開発した「切り出し発現型ベクター」は未だ予備的な解析ではあるが、治療効果を示す傾向が認められた。「切り出し発現」では治療用遺伝子がウイルスゲノムから切り出された環状分子として存在しているが、詳細な解析から環状分子は細胞内で不安定であることが明らかになり、細胞内で 6 ヶ月安定に存在するウイルスゲノム上に治療用遺伝子を残しながら肝細胞癌特異性を付加するベクター開発の必要性が生じた。そこで、ベクターゲノムの左端側に AFP プロモーターから Cre を発現するスイッチユニット、その下

流に GFP あるいはヘルペスウイルス TK 遺伝子と loxP を、右端に loxP と分担研究者が「低炎症型ベクター」として報告した EF1 α プロモーターを挿入した「ミニアデノ」ベクターを作製した。この「ミニアデノ」ベクターは AFP 発現 HuH-7 細胞に導入された時のみ AFP プロモーターから Cre が発現し、loxP 間のアデノウイルスゲノムの大半を環状に切り出すが、最終的に治療用遺伝子は安定なウイルスゲノム上で機能する。AFP 発現 HuH-7 細胞と AFP 非発現 HeLa 細胞に「切り出し発現」と「ミニアデノ」ベクターを導入しマーカー遺伝子である GFP の発現を比較した結果、3 日目では「切り出し発現」が高いが 6 日目ではほぼ追いついていた。より長期間の観察では「ミニアデノ」が安定に治療用遺伝子を発現すると考えられる。また HeLa 細胞における特異性の検討では両者に違いは認められなかった。

また肝細胞癌の遺伝子治療では肝がん播種モデルマウスの安定供給が必須である。これまで日本クレア(株)との共同研究で、ルシフェラーゼ高度発現 HuH-7 細胞の門脈内投与による in vivo イメージング可能な播種モデルマウスモデルの開発を行ってきたが、門脈投与による死亡率が高いこと、播種が観察されないマウス個体が約半数出現すること、腸管へ投与されてしまう場合があることなどが問題であった。本年度は止血法の改良により死亡率が大幅に低下した。また播種が観察されないマウスの割合も大きく改善し 15%程度留まるようになった。そのため、市販化を目指して現在調整