

外し、HCV- RNA が2年間複製した細胞で発現亢進が起こったと考えられる6種類の miRNA と発現低下が起こったと考えられる2種類の miRNA を今後の研究対象として選択した。

D. 考察

(1) HCV-RNA の長期複製による宿主遺伝子の発現レベルの変動解析

発現レベルが不可逆的に亢進したと考えられる遺伝子として同定した5種類について、HCV と関連するという報告は現在までない。ただ、肝がんと関連という面においては、血管構造の安定化と血管新生の相反する機能を制御する ANGPT1 (Angiopoietin 1) が肝がんで発現上昇しているという報告がある。しかし、その分子機序については不明である。それ以外については、肝がんと関連報告はないが、Wnt1 誘導性の CCN ファミリー分子 (CCN6) である WISP3 は大腸がんで発現上昇が報告されている。しかしながら、乳がんでは発現低下しているという報告もあり、がんとの関係もよく分かっていない。

発現レベルが不可逆的に低下したと考えられる遺伝子として同定した4種類についても、HCV と直接関係するという報告はない。しかしながら、*BASPI* と *ANXA1* については、がん抑制遺伝子候補として報告されており、*BASPI* については、DNA メチル化による発現低下が肝がんで明らかになっており、早期肝がんの臨床マーカーになると提唱されている。この遺伝子のメチル化により今回発現低下がもたらされたか否かについては、現時点では不明である。しかしながら、例えば、OL8 (3.5Y) 細胞に脱メチル化剤を添加して、発現レベルが OL8 (0Y) 細胞にレベルに戻るかどうかの実験は可能であるので、今後調べる予定である。*ANXA1* の発現低下についても同様の分子機構が考えられるので、検討する予定である。線維素溶解を阻害する機能を有す

る CPB2 には最近、C5a や osteopontin などの炎症メディエーターを切断して抗炎症作用を示すことが報告された。CPB2 は主に肝臓で発現されているので、肝炎に対してもこのような抗炎症機能を示す可能性がある。

以上に述べたように、今回得られた遺伝子の機能と HCV 複製との関係は現時点ではあまりよく分からない面が多い。今回得られた遺伝子は HCV-RNA の複製環境を最適化するために機能している可能性もある。従って、まず、これらの遺伝子を強制発現させた場合に HCV RNA の複製レベルがどう変化するかを調べる予定である。また、細胞の増殖性 (アポトーシスも含めて) にどのような変化がもたらされるかも今後、調べていく予定である。

本研究においては、Li23 由来の全長 HCV RNA (HCV 0 株) 複製細胞を用いたが、我々は HuH-7 由来の全長 HCV RNA (HCV 0 株) 複製細胞 (0 細胞) についても2年間長期培養した細胞を保有している。そこで、予備的実験ではあるが、HuH-7 由来の細胞を用いて、今回得られた遺伝子の発現レベルが変動するかどうかを RT-PCR 法により調べた。しかしながら、*TBC1D4*, *ANGPT1*, *CDKN2C*, *BASPI* (メチル化のためか発現レベルが非常に低い) および *CPB2* については特に発現レベルにおける変動は認められなかった。発現が亢進した遺伝子として同定した *WISP3* と *SELIL3* については、逆に発現が低下していたり、発現が低下した遺伝子として同定した *ANXA1* は逆に発現が増加していた。唯一、グルタミン酸/アスパラギン酸トランスポーターである *SLC1A3* が Li23 および HuH-7 細胞系で共通して発現が低下していたが、この発現低下がどのような生物学的意味を有するものであるかについては、現時点では不明である。従って、今回得られた遺伝子の発現変動という現象は、使用する細胞株に依存している可能性がある。10%FBS 存在下の通常培地で増殖性を示す HuH-7 細胞とは異なり、Li23 細胞は初代肝細

胞と同様、EGF に依存した細胞増殖性を示すという違いがあることから、HCV-RNA の長期複製が及ぼす効果も細胞株により異なるということが考えられる。HuH-7 細胞と Li23 細胞における発現レベルや変動の違いについても、今後予定している個々の遺伝子の機能解析を行っていく過程である程度分かってくるのではないかと考えている。

(2) HCV-RNA の長期複製による宿主の miRNA の変動解析

今回のマイクロアレイ解析により、共通して発現が亢進している 6 種類の miRNA と発現が低下している 2 種類の miRNA を得ることができた。miRNA の発現量と標的となる mRNA の発現量とは相関している可能性があるため、今後は今年度同定した遺伝子の発現レベルが発現変動を来たした miRNA に制御されている可能性を検討する予定である。今回得られた miRNA の標的遺伝子を同定することができれば、HCV RNA の長期複製により mRNA レベルやタンパク質レベルで影響を受ける遺伝子のさらなる同定につながる可能性がある。

E. 結論

今年度、以下に示した 3 項目の成果を得た。(1) HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現が亢進したと考えられる 5 種類の宿主遺伝子を同定した

(2) HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現が低下したと考えられる 4 種類の宿主遺伝子を同定した。

(3) HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現が亢進したと考えられる 6 種類の miRNA と発現が低下したと考えられる 2 種類の miRNA を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. *Virus Res.*, 151(1):61-70 (2011).
- 2) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. *Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. Liver Int.*, 31(6):871-880 (2011).
- 3) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. *Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. J. Virol.*, 85(14):6882-6892 (2011).
- 4) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. *Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409(4):663-668 (2011).
- 5) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H., Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S,

Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, DOI 10.1007/s00535-011-0481 - z (2011).

- 6) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, DOI 10.1007/s11262-012-0712-2 (2012)
- 7) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, DOI 10.1128//AAC.05762-11 (2012).

2. 学会発表

- 1) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. IUMS 2011 Sapporo. XV International Congress of Virology. Sapporo, September 2011.
- 2) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita

T, Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems using different human hepatoma cell lines. IUMS 2011 Sapporo. XV International Congress of Virology. Sapporo, September 2011.

- 3) Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Masato Yoneda M, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Hepatitis C virus regulates p62 metabolism. UMS 2011 Sapporo. XV International Congress of Virology. Sapporo, September 2011.
- 4) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, September 2011.
- 5) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, September 2011
- 6) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase II is essential for

- HCV RNA replication. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, September 2011.
- 7) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, September 2011.
- 8) Korenaga M, Ikeda M, Kato N, Sasaki K, Nakashima Y, Tada Y, Kawase T, Nishina S, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Yoshida K, Korenaga K, Hino K. Iron induced oxidative stress interacts with viral replication in full genomic hepatitis C virus replicon cells. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, September 2011.
- 9) Sugiyama K, Murakami Y, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Ujino S, Saito H, Saito S, Kato N, Hibi T, Takaku H. Infectious hepatitis C virus bearing genotype 1b subgenomic replicon by transencapsidation with the structural regions of genotype 1b. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, September 2011.
- 10) Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Shibata W, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Autophagy regulates hepatitis C virus replication. The Liver meeting 2011 (AASLD), San Francisco, November 2011.
- 11) Shinohara Y, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Shibata W, Yoneda M, Kirikoshi H, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. HCV proteins are involved in selective autophagy. The Liver meeting 2011 (AASLD), San Francisco, November 2011.
- 12) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗HCV剤の活性評価には複数の細胞株由来のHCVアッセイ系が必要である. 第47回日本肝臓学会総会、東京、2011年6月.
- 13) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之. 2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発. 第47回日本肝臓学会総会、東京、2011年6月.
- 14) 田中 寅彦、黒田 和道、池田 正徳、加藤 宣之、槇島 誠. C型肝炎ウイルスNS4Bとlipid dropletの相互作用. 第84回日本生化学会大会、京都、2011年9月.
- 15) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたるC型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した遺伝子群の同定. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月.
- 16) 篠原 義康、加藤 真吾、池田 正徳、加藤 宣之、前田 慎、中島 淳、斎藤 聡. HCVにおけるp62の蓄積について. 第70回日本癌学会学術総会、

名古屋、2011年10月.

- 17) 篠原 義康、藤田 浩司、馬渡 弘典、今城 健人、米田 正人、芝田 渉、桐越 博之、船越 健悟、池田 正徳、加藤 宣之、前田 慎、中島 淳、齊藤 聡. HCVレプリコン細胞におけるVLDL, LDL receptorの検討.

第39回日本肝臓学会西部会、岡山、2011年12月.

- 18) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. The role of geranylgeranyl transferase II in hepatitis C virus life cycle. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究
分担研究報告書

持続的な HCV 感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析

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)の持続発現に伴う宿主因子の修飾機序をあきらかにする事により、その病原性発現のメカニズムを探る事を目的に研究を進行している。これまでに、HCV 持続発現細胞を認識する単クローン抗体の中で DHCR24 や Ku70, TOM70 といった宿主因子を認識するものを樹立しており、HCV 陽性肝癌患者組織で DHCR24 は高頻度に発現上昇していた。本年度は DHCR24 が HCV の複製にも関与する事を新たに見いだした。DHCR24 の siRNA はウイルス複製や感染を抑制していた。また、DHCR24 の阻害剤である U18666A も HCV の複製を抑制した。さらに、キメラマウス HCV 感染系を用いて検討したところ、2 週間投与すると U18666A 単剤でもウイルス感染抑制効果が見られ、さらにインターフェロンとの併用効果が観察された。

A. 研究目的

分担研究者らは、C型肝炎ウイルス (HCV) が持続的に発現する事による腫瘍原性亢進を先に見いだしている (*J. Biol. Chem.* 279 (15), 14531-14541, 2004)。この分子機序を解明するため、HCV 持続発現細胞に対する単クローン抗体を多数樹立し、肝癌患者組織と反応するものを得て HCV 病原性発現との関連を解析してきた。これまでに HCV 感染が DHCR24 分子の発現を誘導し酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制する事、p53 活性を低下させる事を見いだしている。

今年度は DHCR24 の HCV 複製における役割を明らかにした。

B. 研究方法

(1) DHCR24 siRNA、阻害剤による解析
DHCR24のHCV複製における役割を明らかにするため、2種のsiRNAを作製して解析した。
siDHCR24-417
5'-GUACAAGAAGACACACAAATT-3'と
siDHCR24-1024
5'-GAGAACUAUCUGAAGACAATT-3'である。

陰性コントロールには、non-target siRNA#3(Dharmacon)を用いた。U18666A は Calbiochem 社より購入した。

(2) 細胞培養

HCV 遺伝子の発現は、RT-PCR, ウェスタンブロット(WB)法、コア ELISA (オーソ社) 法で解析を行った。

宿主因子の解析は WB 法、RTD-PCR 法で行った。蛋白質の発現レベルは LAS1000UVmini (FUJI) で定量した。

HCV 複製細胞は、FLR3-1, R6FLR-N, RepJFH を用いた。HCV 感染系は JFH-1 株を用いた。

(3) キメラマウス HCV 感染系による評価
ヒト肝臓細胞を持つ uPA-SCID マウスに HCV を感染させ (*Nat Med* 2001, *Am J Pathol* 2004)、HCV を感染後 1~2 ヶ月で 1.8×10^7 コピー/mL にウイルス量が達したところで、U18666A は 10mg/kg、PEG-IFN α (中外) は 30 μ g/kg 腹腔内投与を 2 週間行った。血中の HCV 量を定量 PCR (*Gastroenterology* 1999) で測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等に

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承認申請を行っている。

C. 研究結果

(1) HCV複製におけるDHCR24の役割

HCV複製におけるDHCR24の役割を明らかにするために、2種のsiRNA(0.1~3.0 nM)を作製して3種のレプリコン細胞(FLR3-1, R6FLR-N, JFH-1)と反応させた。その結果siRNAの用量依存性にHCVの複製が抑制された。一方これらの濃度では、細胞毒性は認められなかった。

(2) DHCR24の発現と細胞内コレステロールレベル

細胞内コレステロールの濃度とDHCR24の発現レベルの関連を解析したところ、コレステロールの添加によりDHCR24の発現が低下し、メチルβシクロデキストリン投与によりDHCR24の発現が上昇した。また、DHCR24siRNA処理により細胞内コレステロール濃度は低下した。以上の事から、DHCR24の発現は細胞内コレステロール濃度と関連する事が明らかとなった。

(3) DHCR24阻害剤のHCV複製への効果

DHCR24の阻害剤であるU18666AをHCVレプリコン細胞に処理すると250nM以下では細胞毒性なしにHCV複製を抑制した。また、このU18666AによるHCV複製抑制はコレステロールの添加により回復した。また、HCV-JFH-1感染系にもU18666Aを処理したところ、0.5μM以上での抑制効果が観察された。そこで、キメラマウス感染系においてHCVを感染させ、U18666A, PEG-IFNα, U18666A+PEG-IFNαの投与を行った。その結果、2週間後には、PEG-IFNα単独投与よりもU18666A単独投与の方が高いウイルス抑制

効果を示した。さらには、U18666AはIFNαの抗ウイルス活性に対し相乗効果を示した。

D. 考察

DHCR24はコレステロール合成酵素の1つであるが、HCV複製においても役割を果たす事が明らかとなった。DHCR24はHMG-CoAからコレステロールを合成する経路のうち、これまで報告されたlovastatinの標的であるゲラニル化反応よりも下流のステロール中間体のΔ24結合の還元作用し、ゲラニル化には影響を与えない。従ってこれまでの報告にはない新規の標的と考えられる(PNAS2005)。また、U18666Aという阻害剤も抗ウイルス活性を示した事から、新たな抗HCV薬候補である可能性が考えられる。

E. 結論

今年度の研究からDHCR24がHCVの複製に関与する事が明らかとなった。また、阻害剤も有効であり、IFNとの相乗効果も認められる事からこれらを実用化に向けて検討する必要性が生じた。

これまでに見いだしているHCV病原性発現に関与する宿主因子(Tom70, Ku70など)についてもさらに詳細な機能解析を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

[英文]

- 1) Saitou M, Kohara, M, Tsukiyama-Kohara K*. Hepatitis C virus promotes expression of the 3β-hydroxysterol Δ24-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., 163: 405-409 (2012).
- 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.*, 204(8):1172-1180 (2011).
- 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* 55(3) 512-521 (2011).
- 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.*, 83, 801-809 (2011).
- 6) Tsukiyama-Kohara K*, Sekiguchi S, Kasama Y, Nagla ES, Machida K, Kohara M. Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model. *ISRN Hematology*, 2011: 167501 (2011).
- 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*. 1 98-103 (2011).
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.

[和文]

1. 小原恭子、棟方翼、小原道法。HCV の病原性発現に關与するウイルス因子とその機能 II C型肝炎 C型肝炎ウイルス感染における免疫応答と感染防御機構 日本臨床 69 卷増刊 4 別刷「新時代のウイルス性肝炎学」 p97-102(2011年5月20日)

- 6) Saito M, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Overexpression of 3beta-Hydroxysterol delta24Reductase is induced by hepatitis C virus infection through oxidative stress mediated Sp1 activation. International Union of Microbiological Societies, Sapporo 2011.
- 7) Nagla ES, Nishimura T, Saito M, Kohara M, Harada S, El-Gohary A, and Tsukiyama-Kohara K. Application of DHCR24 for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). International Union of Microbiological Societies, Sapporo 2011.
- 8) 笠間由里、齊藤誠、西村知裕、佐藤正明、王中志、Salem Nagla Elwy Salem Ali、原田信志、小原道法、小原恭子 Tom70 によるインターフェロン誘導と C 型肝炎ウイルス NS3 による阻害 第 48 回日本ウイルス学会九州支部会 北九州 2011.
- 9) 齊藤誠、小原恭子。新規 C 型肝炎マーカー DHCR24 を利用した分子標的治療の開発 第 48 回日本ウイルス学会九州支部会 北九州 2011.
- 10) 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 hepatic 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

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」特願 2011-125440 出願日 平成 23 年 6 月 3 日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(一般財団法人) 化学及血清療法研究所、財団法人東京都医学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

* Nature 474 S14-15, 2011 “The murine candidate” [OUTLOOK HEPATITIS C] Tuapia の論文(JV 84 303-311, 2010)の紹介が掲載される。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

遺伝子型1b型の感染性HCVの樹立とその応用

分担研究者 杉山和夫 慶應義塾大学医学部 特任准教授

研究要旨

レプリコンライブラリー法によって少なくとも4種類の新たな1b型HCVサブゲノムレプリコン複製細胞を樹立することができた。そのうちの2細胞に1b型HCV構造領域（コア蛋白質からNS2）をトランスフェクションすることによって、サブゲノムレプリコンをトランスパッケージし感染性ウイルスを作成することができた。今後、これらの構造領域と非構造領域を組みあわせることで、1b型全長HCVゲノム再構築しその複製能を確認することができた。コア蛋白質の放出は認められたが、その感染性をさらに検討する必要がある。

A. 研究目的

2005年、劇症肝炎患者から単離した遺伝子型2aの全長HCV株（JFH-1）が培養肝癌細胞に感染し、さらに感染性ウイルス粒子を産生させることが示された。このことによりHCVの感染サイクルの全体像が明らかになり、HCVに関するウイルス学的研究が飛躍的に発展した。

しかし、HCVには多様な遺伝子型が存在し、JFH-1株によって得られた研究結果が全てのHCVに共通する普遍的なものなのか、あるいはJFH-1固有のものなのかわかっていない。特に、日本で最も頻度の高いHCV遺伝子型は1b型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。また、約半数が治療抵抗性であり、遺伝子型1b型HCVのウイルス学的解明を進める必要がある。これまで1b型HCVに関していくつかのサブゲノムレプリコンの報告はされているが、JFH-1に相当するような感染効率の高い全長株の樹立は少ない。その原因として、これまで樹立されたサブゲノムレプリコンは、複製は可能であるが、効率の良いウイルス粒子への組み込みには適応していなかった可能性が考えられる。

これまでの研究では、まず、1b型感染性HCV

株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能を広げるために、患者血清におけるHCVゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する1b型サブゲノムレプリコン複製細胞の樹立を試みた。さらに、これらのレプリコン複製細胞へHCV構造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされるか確認できた。今回、これらの構造領域と非構造領域を組みあわせることで、1b型全長HCVゲノムを再構築しその複製能と感染性の確認を行った。

B. 研究方法

(1) 遺伝子型1b型HCV患者血清由来のRNAをもとにlong distance RT-PCR法によって、複製に必要なHCVゲノムの非構造領域（NS3からNS5B）を増幅した。そのPCR産物をレプリコンカセットベクターに挿入し大腸菌をトランスフォームした。大量培養後プラスミドを抽出し、サブゲノムレプリコンプラスミドライブラリーを得た。

(2) 次に、得られたライブラリープラスミドを鋳型として、インビトロ転写反応によって

RNA を合成した (サブゲノムレプリコン RNA ライブラリー)。

(3) 合成したライブラリーRNA を培養肝細胞 (Huh7 または Oc 細胞)へトランスフェクションし、ネオマイシン耐性細胞コロニーを形成された。さらに得られた細胞コロニーを単離、増殖させた。

レプリコン複製の確認は long distance RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法、PCR 産物クローニングによる塩基配列の決定によって行った。

(4) 最後に遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域 (コア蛋白質から NS2) を上記で樹立したレプリコン複製細胞へトランスフェクションし、構造領域蛋白質のトランスパッケージにより HCV レプリコン含有感染性ウイルスが形成されるか確認した。

(5) 構造領域のトランスパッケージングによって得られたサブゲノムレプリコン (1b) 複製細胞から、RT-PCR によってその非構造領域 cDNA を増幅した。先の実験ですでにトランスパッケージ能が確認されている HCV 構造領域 (1b) をあらかじめ挿入してあるプラスミドに、上記 cDNA を挿入し HCV 全長 (1b) を再構築した。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

(1) サブゲノムレプリコンライブラリーの作製

60 症例の 1b 型 HCV 患者血清から抽出した RNA を用いて HCV の非構造領域 (NS3 から NS5B) に対する long distance RT-PCR を行った。その結果、32 症例で PCR 増幅が認められた。特に増幅の良かった 9 症例の PCR 産物を用いてサブゲノムレプリコンライブラリーを作製した。1 症例あたりのプラスミドライブラリーの複雑性 (complexity) は計算上 1,600 から 10,000 で

あり、患者血清における HCV ゲノムの多様性を充分反映していると考えられた。

(2) ネオマイシン耐性細胞クローンの作製

次いで、サブゲノムレプリコンライブラリープラスミドを制限酵素 *Xba*I で消化し直線化し、これを鋳型として、インビトロ転写法によりレプリコン RNA ライブラリーを合成した。そのライブラリーRNA を、それぞれ培養肝細胞へトランスフェクションし、ネオマイシン存在下で 3 週間培養した。その結果、5 サンプルのレプリコン RNA ライブラリーからネオマイシン耐性細胞コロニーが得られた。最終的に 21 個のネオマイシン耐性細胞クローンを得ることができた。

(3) サブゲノムレプリコン複製の確認

それぞれのライブラリーにつき最低 1 クローンのネオマイシン耐性細胞に対して、実際にサブゲノムレプリコンが複製しているかどうか確認を行った。

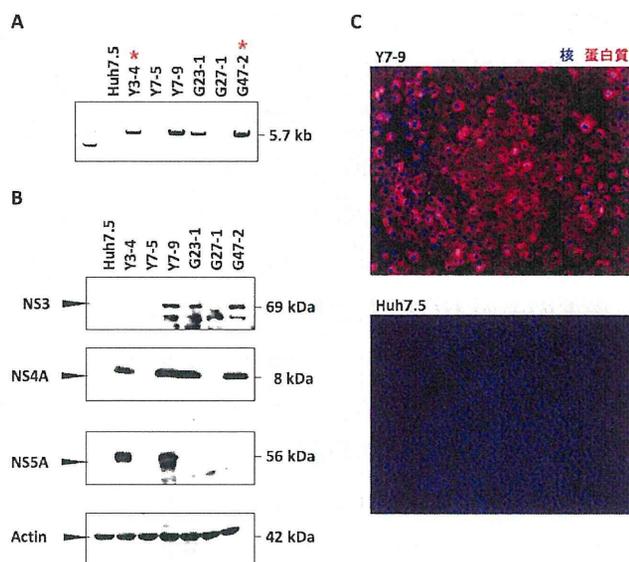


図 1. レプリコン複製細胞における HCV レプリコン RNA 複製と HCV 蛋白質発現の確認

まず、HCV 非構造領域に対して long distance RT-PCR 法を施行した。その結果、4 クローン (Y3-4, Y7-9, G23-1, G47-2) において予想通り

のサイズ (5.7 kb) が増幅され、HCV サブゲノムレプリコン RNA が実際に複製していることが確認された (図 1A)。

次に、サブゲノムレプリコンの複製を蛋白質レベルで確認するために、ネオマイシン耐性細胞における各種 HCV 蛋白質 (NS3、NS4A、NS5A) 発現の確認を行ったところ (図 1B)、少なくとも NS4A 蛋白質は HCV RNA 複製が認められたすべての細胞で発現しており、レプリコン複製とともない HCV 蛋白質が発現していると考えられた。以上から、少なくとも 4 クローンがレプリコン複製細胞であることが確認された。

また、これらの HCV 蛋白質の実際のレプリコン複製細胞における細胞内発現を確認するために、ウェスタンブロッティングにおいて HCV 蛋白質発現が著明であった細胞クローン Y7-9 を用い、HCV 蛋白質に対する蛍光免疫染色を行った。図 1C に示すように、HCV 蛋白質がほぼすべての細胞の細胞質内において認められ、レプリコン複製細胞におけるレプリコン複製が細胞レベルでも確認された。

(4) 得られたサブゲノムレプリコン塩基配列の新規性の確認

上記の結果からレプリコン複製が確認されたレプリコン複製細胞クローンのうち 2 つの細胞クローン (Y3-4 および G47-2) から、HCV の非構造領域 (NS3 から NS5B) を増幅し、それぞれ 1 クローン (Y3-4-1、G47-2-13) の cDNA 塩基配列の決定を行った。これらの配列とこれまでに報告された HCV 塩基配列との相同性はそれぞれ最高で 94%、93% であり、新規の 1b 型配列であることが確認された。

(5) 構造領域蛋白質による HCV レプリコンのトランスパッケージ

遺伝子型 1b 型 HCV の構造領域蛋白質領域 (コア蛋白質から NS2) を上記で樹立した 4 種類の

レプリコン複製細胞へトランスフェクションし、その培養上清を Naive な培養肝細胞へ接種した。2 種類のレプリコン複製細胞由来の培養上清を接種したところ 2 日後に HCV 蛋白質の発現が認められた。また、接種後ネオマイシン存在下で約 3 週間培養したところ同様の培養細胞上清から、実際にネオマイシン耐性細胞コロニーの形成 (それぞれ 4、11 コロニー) が認められた (表 1)。なお、Mock トランスフェクションでは全くコロニーが形成されなかったのでエクソゾームをかいいたレプリコン RNA の転移ではなく、構造領域蛋白質のトランスパッケージにより HCV レプリコン含有感染性ウイルスが産生されたと考えられた。

表 1. トランスパッケージで形成されたレプリコンコロニー

レプリコンライブラリー法で得られたレプリコン複製細胞株	トランスパッケージによって形成されたサブゲノムレプリコン複製コロニー数	Mock トランスフェクションによって形成されたサブゲノムレプリコン複製コロニー数
Y3-4	4	0
Y7-9	11	0
G47-1	0	not examined
G47-2	0	not examined

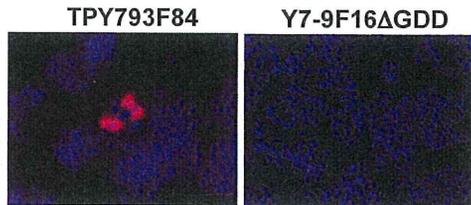
(6) トランスパッケージ可能な構造領域蛋白と HCV レプリコンからの 1b 型全長 HCV ゲノムの再構築とその複製

次に、構造領域のトランスパッケージングによって得られたサブゲノムレプリコン (1b) 複製細胞から、RT-PCR によってその非構造領域 cDNA を増幅した。先の実験ですでにトランスパッケージ

能が確認されている HCV 構造領域(1b)をあらかじめ挿入してあるプラスミドに、上記 cDNA を挿入し HCV 全長(1b)を再構築した(TPY793F84)。

TPY793F84 および、GDD ドメインを欠失させて複製不能にしたコントロール(Y7-9F16dGDD)からインビトロで全長 HCV RNA を作製し培養肝細胞へトランスフェクションさせた。3 日後の免疫染色では TPY793F84 トランスフェクション細胞に HCV コア蛋白質が認められた(図 2A)。また、ウェスタンブロットでみると 3 日、5 日と日数に従ってコア蛋白質、NS5A 蛋白質の発現増加が認められ HCV の複製が確認された。なお、TPY793F84 細胞の培養上清中にも HCV コア蛋白質の放出は認められたが、今までのところ感染性の HCV 粒子は認められなかった。

A. IF (α -core)



B. Western Blotting

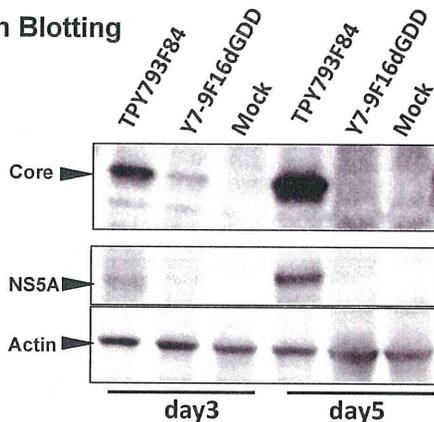


図 2. 再構築された 1b 型全長 HCV ゲノムの HCV 蛋白質発現

D. 考察

最近、遺伝子型 2a 以外の遺伝子型を有する

HCV 感染株の報告はあるが、遺伝子型 1b 型の感染株の感染性、複製能は必ずしも高くない。また、遺伝子型 2a であっても JFH-1 以外は必ずしも感染効率の良い感染株とはならない。一方、日本で最も頻度の高い HCV 遺伝子型は 1b 型であり、慢性化しやすく、肝硬変、肝癌の発症率が高い。したがって遺伝子型 1b 型 HCV のウイルス学的解明を進めるために感染効率の高い HCV 感染株の樹立は必須である。

我々はこれまで数種類の遺伝子型 1b のレプリコンを樹立し報告してきたが、これを利用して全長ゲノムの感染性 HCV 株の樹立には至らなかった。その考えられる原因の 1 つとして、レプリコンは培養肝細胞での複製には適応しているものの、感染性ウイルス粒子への組み立てには必ずしも適応していなかった可能性がある。ウイルス組み立てに必要な要素は JFH-1 株を用いた研究により次第に明らかになりつつあるが、遺伝子型 1b にそのまま当てはまるとは限らない。そこで本研究では、まず、1b 型感染性 HCV 株樹立の前段階として、ウイルス粒子への組み込みの可能性を広げるために、患者血清における HCV ゲノムの多様性を利用し、サブゲノムレプリコンライブラリー法によって多様な遺伝子配列を有する 1b 型サブゲノムレプリコン複製細胞を樹立した。さらに、これらのレプリコン複製細胞のうち 2 種類の細胞へ 1b 型 HCV 構造領域をトランスに供給することで、実際、感染性ウイルス粒子としてパッケージされることを確認した。

さらに、この非構造領域とトランスパッケージに使用した構造領域をつなぐことで感染性の 1b 型全長 HCV を再構築した。少なくとも HCV 蛋白質の発現出見の限り複製能は有していると考えられた。また、培養液中にも HCV コア蛋白質の放出が認められるので、大量の培養液を濃縮するなどして感染性のウイルス粒子の検出を試みる

必要がある。また、トランスパッケージにより産生されたレプリコン含有ウイルスが感染した培養肝細胞における非構造領域の遺伝子配列を解析し、ウイルス組み立てに必要な適応変異を解析する必要がある。また、これまで報告のあった適応変異を導入するなどして構造領域蛋白と非構造領域蛋白との相互作用の解析をすすめ、より感染効率の高い構造領域を作製する予定である。

E. 結論

レプリコンライブラリー法によって少なくとも4種類の新たな1b型HCVサブゲノムレプリコン複製細胞を樹立することができた。そのうちの2細胞に1b型HCV構造領域（コア蛋白からNS2）をトランスフェクションすることによって、サブゲノムレプリコンをトランスパッケージし感染性ウイルスを作成することができた。これらの構造領域と非構造領域を組みあわせることで1b型全長HCVゲノムを再構築し、少なくとも複製可能な1b型全長HCVゲノムを樹立することができた。今後、感染性粒子を確認、さらにその感染効率をあげる工夫が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami

K, Shimotohno K. Lipoprotein component associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology*, 1:19-26 (2011).

Duan H, Yoshimura K, Kobayashi N, Sugiyama K, Sawada JI, Saito Y, Morisseau C, Hammock BD, Akatsuka T. Development of monoclonal antibodies to human microsomal epoxide hydrolase and analysis of "preneoplastic antigen"-like molecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 260:17-26. (2012).

Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 142:152-164 e110. (2012).

Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.*, 163:390-395 (2012).

2. 学会発表

Sugiyama K, Murakami Y, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Ujino S, Saito H, Saito S, Kato N, Hibi T, Takaku H. Infectious hepatitis C virus bearing genotype-1b subgenomic replicon by trans-encapsidation with the structural regions of genotype 1b. 18th International symposium of hepatitis C virus and related viruses, Seattle (2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 ない。
2. 実用新案登録 ない。

厚生労働省難治性疾患対策研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

HCV の宿主応答に関係するマイクロ RNA の同定

研究分担者 村上善基 京都大学・ゲノム医学センター 産学官連携准教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は感染すると高率に慢性化し、年余の経過を経て慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。日本人に多い遺伝子型 1b 感染で高ウイルス量による慢性 C 型肝炎はインターフェロン治療効果が低い。治療前の慢性 C 型肝炎患者肝組織と血中のマイクロ RNA 発現解析を行い、ウイルスの持続感染メカニズムを明らかにし、マイクロ RNA を用いたインターフェロンに代わる新規治療への基盤を構築する。

A. 研究目的

我が国の HCV 感染者は全人口の約 1.6%と推定されており、HCV は感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する。昨年より C 型慢性肝炎治療は HCV の蛋白分解酵素阻害剤を加えたペグインターフェロン α とリバビリン三剤併用療法が開始された、インターフェロン+リバビリン併用療法より奏効率は有効であるが、インターフェロン耐性ウイルスに対する奏効率は期待されたほどではない事、副作用が強く、高齢者など使用の制限がかかってしまう事が治療の問題となっている。さらに本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約 3.4 万人に上り感染対策は急務である。このため HCV の感染防止、慢性 C 型肝炎の制御は保険、医療の向上に直結し、医療

費の削減をもたらす。しかし現状では満足のいく HCV 感染者に対する治療結果が得られていない。この原因としてウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。そのために C 型慢性肝炎において持続感染、特に感染肝細胞から別の肝細胞への伝播、線維化の進展メカニズムを明らかにし有効な治療方法の確立を目標とする。

マイクロ RNA は 20-22bp の蛋白をコードしていない小分子 RNA で現在ヒトマイクロ RNA は約 1400 種類同定されている。マイクロ RNA は生物の発生、細胞の分化など生命現象に深く関与して庵、その発現異常は疾患と深く関係しており、特に発癌、ウイルス感染との関連が注目されている。我々はマイクロアレイ解析を行い、ウイルス性肝炎の線維化の進展、肝

発癌にマイクロ RNA の発現異常が深く関係している事を今までに明らかにした。血清中のエクソソームと呼ばれる直径 50-100nm の小胞体は、non-coding RNA や サイトカインを細胞特異的に伝達する事が知られている。最近ウイルス粒子を含んだエクソソームがウイルス感染の伝播する事、また B、T 細胞や樹状細胞などから放出されるエクソソームはそれぞれ固有のマイクロ RNA 発現プロファイルをもっている事が報告された、これらの知見はエクソソーム中のマイクロ RNA はウイルス感染に関与している可能性を示唆するものである。

本研究では HCV 感染制御の研究を 2 つの観点から行なう。(1)慢性 C 型肝炎の肝組織中における薬剤応答に関与するマイクロ RNA とインターフェロン関連遺伝子を同定し、新たな抗ウイルス治療方法の開発、(2)細胞間情報伝達に関与しているマイクロ RNA を同定し、感染肝細胞から周辺肝細胞の感染防止、線維化に関与している肝星細胞の活性化を防止し、新たな観点からのウイルス感染方法の開発を目標とする。

B. 研究方法

C 型肝炎患者治療応答に関係するマイクロ RNA とその標的遺伝子同定

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織 99 例よりから 470 種のマイクロ RNA 発現とインターフェロン関連遺伝子 237 の解析をマイク

ロアレイにて行ない解析した。標的遺伝子同定のため、miRanda と Targetscan の二種のアプローチを用いてマイクロ RNA が塩基配列上標的として認識する候補遺伝子を絞り込んだ。さらに in vitro で肝癌細胞株にマイクロ RNA を過剰発現した際に標的遺伝子を認識しない RNA(negative control)を導入したときに発現が低下し、マイクロ RNA の機能を低下させた際に発現が亢進する遺伝子を探索した。

マイクロ RNA による HCV 複製コントロール解析

マイクロ RNA の標的遺伝子検索アルゴリズムを用い、HCV レプリコン(OR6: genotype 1b 型レプリコン、1 β R:インターフェロン α/β レセプターを変異させた genotype 1b 型レプリコン)それぞれを標的とするマイクロ RNA を同定した。

末梢血エクソソーム中のマイクロ RNA 発現解析

ヒト C 型肝炎患者血清よりエクソソーム(SBI)を用いエクソソーム濃縮画分を得る。上この画分より total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析によりマイクロ RNA 発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成 18 年、G-188「肝発癌に関与し

ている miRNA をコードしている領域の SNP 解析」承認]、平成 19 年、G-219 「miRNA 発現プロファイルを利用した C 型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換え DNA 実験計画平成 19 年、070102 「マイクロを用いた HCV 複製制御の試み」について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成 19-23)。

この中で肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報をも適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施している。

C. 結果

C 型肝炎治療効果別に同定したマイクロ RNA の代表的遺伝子の同定

SVR (著効例) と NR (無効例) の間に統計的に有意な発現差をもったマイクロ

RNA は 8 種あった。これらのマイクロ RNA の標的遺伝子候補を miRanda と Targetscan の両者のアルゴリズムを用いて数種得られた。肝癌細胞株 2 種 (Huh7、Li7) に (1) マイクロ RNA を過剰発現し control RNA (ヒト遺伝子に対して相補的塩基配列をもたない：標的遺伝子として認識しない小分子 RNA) を導入した際にくらべ発現が抑制される、(2) マイクロ RNA の相補的塩基配列をもった小分子 RNA を導入した際に control RNA より発現の上昇したものの (細胞内のマイクロ RNA と特異的に結合しマイクロ RNA の機能を抑制したものの (Antisense oligonucleotide ((ASO))), の二つの条件を満たしたものに絞り込んだ所、hsa-miR-27b は hect domain and RLD 5 (HERC5) を認識している事が明らかになった。

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (ウイルス側因子の検討)

HCV レプリコン (OR6)、IFN 耐性のある HCV レプリコン (1bR、4bR) を用いて 46 種のマイクロ RNA を過剰発現とそれらの ASO を用いてレプリコン RNA の複製状況を検討した。miR-122 は過剰発現した際にレプリコンの複製は亢進し、機能抑制をした場合には複製を抑制した。

miR-22 を過剰発現した際にレプリコン RNA の複製を抑制し、機能抑制した際には複製能が亢進された。これらのマイクロ RNA は OR6 だけではなく、IFN 耐性のあるレプリコンでも共通の効果が得ら

れ、IFN 耐性株にも影響なくレプリコンを抑制する事を明らかにした。

エクソソーム中のマイクロRNA発現解析

C型慢性肝炎感染患者64例とHCVに感染していない正常人の血清4例を用いた。血清中のエクソソーム画分の濃縮はエクソソームを用いて行った。エクソソーム成分の濃縮はエクソソーム表面に表出しているCD63のウエスタンブロットを行い確認した。

エクソソーム中のマイクロRNA発現解析を包括的にマイクロアレイを用いて行った所、12種のマイクロRNAは正常人4例中4例で発現が確認できたのに対し、C型慢性肝炎では64例中64例とも発現が検出できなかった。この結果をin vitroで確認するために、Huh7細胞にJFH1株を用いてHCV感染実験を行い、HCV感染の有無における細胞上清中のエクソソームのマイクロRNA発現解析をマイクロアレイにて行った。In vivoとin vitroで共通して正常/HCV感染していない、もので検出でき、C形慢性肝炎/HCV感染しているもの、で演出できなかったマイクロRNAは3種類同定できた。

D. 考察

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に応じた遺伝子発現をマイクロRNAとインターフェロン関連遺伝子別に同定する事ができ、またこの中でイ

ンターフェロン関連遺伝子を制御するマイクロRNAを同定した事で、インターフェロンやマイクロRNAによる抗ウイルスメカニズムを明らかにする可能性を示した。

HCVレプリコン治療実験によりインターフェロン耐性株に有効なマイクロRNAを同定した。これらのマイクロRNAは塩基配列上HCVを認識する事、マイクロRNAの機能を抑制した場合過剰発現したときと逆の効果が得られる事より、直接ウイルス複製を抑制すると考えられる。現在DAA (direct acting anti-viral drug)と呼ばれるHCVの蛋白分解酵素阻害剤、RNA依存性RNA polymerase阻害剤などがこれにあたる、その中のNS3蛋白分解酵素阻害剤は昨年より慢性C形肝炎治療に用いられており、また別の数種類の薬剤が治療に入っている、これらは高価で副作用も強いため、安価で開発が出来、生体内に存在しているマイクロRNAは安全な治療方法として有用である。

末梢血エクソソーム中のマイクロRNAは正常人、C形慢性肝炎特異的に発現プロファイルをもっている事を明らかにした。エクソソームはウイルス粒子(HIV)を運ぶ、免疫担当細胞(B細胞、T細胞、樹状細胞)それぞれにマイクロRNA発現プロファイルをもっており、免疫に深く関与している。これらのことは、HCV感染についてもウイルスの感染、細胞間の感染の拡大、持続感染に深く関与していると考えられる、またエクソソームは細胞

特異的に情報伝達を行う事が報告されており、適切なマイクロ RNA を選択する事で、抗ウイルス遺伝子治療ができる事が期待される。またエクソソーム中のマイクロ RNA の発現プロファイルを得る事で慢性ウイルス性肝炎の状態を把握できる新たなバイオマーカーとしての利用が期待される。

E. 結論

各種の肝疾患においてマイクロ RNA 発現プロファイルを得る事により、疾患発現メカニズムの解明の一端となる事がわかった。また細胞間情報伝達を行うエクソソームには C 形慢性肝炎固有のマイクロ RNA 発現プロファイルがある事が明らかになり、ウイルス感染後の持続感染や線維化亢進への役割が示唆され、これらの情報を利用して肝疾患の診断や治療への応用が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the *IL28B* gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med Virol.*84: 61-70 (2012)
2. Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically-resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the *IL28B* gene. *J Med Virol.* 83: 1559-1564 (2011)
3. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C *PLoS One.* 6:e19799 (2011)
4. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Impact of genetic polymorphisms near the *IL28B* gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.*83: 1203-1211(2011)
5. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression

of liver fibrosis. PLoS One. 6:e16081 (2011)

6. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Medical Genomics.3: 48 (2010)
7. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. PNAS 107: 15856-61 (2010)

学会発表

1. 村上善基、豊田秀徳、熊田卓。インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルは慢性 C 型肝炎治療効果予測

に有用なマーカーである 第 15 回 日本肝臓学会大会 シンポジウム・平成 23 年 10 月 20 日 福岡市

2. 村上善基、豊田秀徳、熊田卓。マイクロ RNA 発現プロファイルは慢性肝疾患の病態評価に有用なマーカーである。第 97 回日本消化器病学会総会 平成 23 年 5 月 15 日 東京都

H.知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし