

C. 研究結果

EpCAM の mRNA をオーバーラップする 4 領域 (R1, R2, R3, R4) に分割して作成した Dicer 切断 siRNA の阻害活性をウエスタンブロット法により検討したところ R3 領域に強い RNAi 活性が認められた。この領域に対して我々が開発して方法を用いて dicer hunting siRNA を 12 種類作成した。このうちの 1 種類は数 pM で Hep3B 細胞の EpCAM を効率よくノックダウンできることが示され、超高効率 siRNA の作成に成功した。さらに siRNA を効率よく肝臓に導入するための DDS として pH 感受性のエンドソームエスケープリポソーム (MEND) の検討を行った。MEND の表面に EpCAM 親和性の特殊環状ペプチドを結合させ、さらに EpCAMsiRNA を内封した。この標的化 MEND で Hep3B の EpCAM をノックダウンしたところ、標的化しないものに比較して数 10 倍の効率の上昇が認められた。

D. 考察

これらの結果から、dicer による dsRNA 切断部位を同定することで、非常に RNAi 活性の高い siRNA を作製できることが示された。これにより、高い RNAi 活性をもつ siRNA と高効率 DDS を組み合わせることにより、細胞表面抗原標的化遺伝子発現抑制を可能にした。

E. 結論

高い RNAi 活性を有する siRNA と EpCAM 標的化高活性修飾リポソームを用いて、in vivo における EpCAM 阻害効果を検討して

いく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. (2013) in press.
- 2) Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. 84:733-746 (2012).
- 3) Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. PLoS Pathog. 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).
- 4) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda¹, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. Biochem Biophys Res Commun. 428(4):494-499 (2012).

- 5) Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. PLoS ONE 7(12):e51656 (2012).
2. 学会発表
- 1) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012.4.18-22 Barcelona (SPAIN)
- 2) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in C cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012.9.11-14. 兵庫
- 3) 小原恭子、佐藤正明、小原道法 : C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌
- 4) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M.: Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)
- 5) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.: Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the Hepatitis C Virus suppresses viral protein level in mouse liver. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012.10.4-11. Venice (Italy)
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

特殊ペプチドを用いたC型肝炎ウイルスに対する創薬研究

菅 裕明 東京大学大学院理学系研究科・化学専攻 教授

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、C型肝炎ウイルスあるいは肝癌の新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指している。本研究期間に、肝臓がん幹細胞に強発現されているEpCAMに強力に結合するリガンド、HCVがヒト細胞に感染する際に重要に役割を果たすグライコタンパク質E2ならびにClaudinタンパク質に結合するリガンド特殊環状ペプチドを発見し、それらの応用研究を進めた。

A. 研究目的

本研究分担班は、C型肝炎ウイルスあるいは肝癌の新規標的や疾患関連因子に対し、本分担者が独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発したRaPID(Random non-standard Peptide Integrated Discovery)システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本年度は、肝臓がん幹細胞に強発現されているEpCAMに結合する特殊ペプチドリガンドを用いた放射線標的化による癌細胞のマウス個体における可視化、ならびにClaudinタンパク質に結合する特殊環状ペプチドの探索法の開発と応用を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全て

P2レベルで実験は行っている。また、共同研究者が行う動物個体を用いた実験については、所属機関のルールに則って行う。

C. 研究結果

EpCAMに結合する特殊ペプチドリガンドは、1 nM解離定数 K_D をもち、抗体に匹敵するタンパク質選択性をもつことがわかり、蛍光化したペプチドを用いてEpCAM発現肝臓がん細胞を選択的に蛍光染色できることもわかった。本年度は、蛍光基の代わりに放射線標識が可能な金属配位子DOTAを付加した特殊ペプチドも合成し、それを用いたマウス個体を用いた癌細胞可視化の初期検討を行った。

Claudinタンパク質に結合する特殊環状ペプチドについては、バキュロ提示による探索（八木・近藤研との共同研究）と細胞を直接用いた探索（深澤研との共同研究）を試み、特殊ペプチドリガンドの発見に成

功した。

D. 考察

EpCAM に結合する DOTA 付加特殊ペプチドリガンドについてのマウス個体を用いた初期検討で、溶解性が低いことに起因する非特異的な臓器標識が起きている可能性が示唆された。現在、新たに水溶性を向上させた DOTA 特殊ペプチドを合成し、検討を進めている。E2 結合特殊ペプチドについて、脇田研にて阻害活性のさらなる検討を進めている。

Claudin 結合特殊ペプチドに関しては、これまでの単離精製標的を介さない探索技術開発に成功した。先行した Claudin-4 結合ペプチドに関しては、可逆的あるいは不可逆的にタイトジャンクション開閉を促進する機能をもつ特殊ペプチドの同定に成功した。Claudin-1 結合ペプチドについては今後も検討を進める予定である。

E. 結論

RaPID システムを用いた特殊ペプチド探索技術により、これまで低分子化合物では標的にすることのできなかつた膜蛋白質を標的とした薬剤探索の可能性を拓いた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) C. J. Hipolito, H. Suga “Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems” **Current Opinion in Chemical Biology** 16 196-203 (2012)

2) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga “In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocylic peptides leading to isoform-selective inhibitors” **ACS Chemical Biology** 7, 607-613 (2012)

3) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga “Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation” **Organic & Biomolecular Chemistry** 10, 5783-5786 (2012)

2. 学会発表

1) Hiroaki Suga 「The nontraditional peptide therapeutics」 AACR Annual Meeting, Chicago, IL USA; 3.31.2011-4.4. 2012

2) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Natural Product-Like Peptides against Therapeutic Targets」 Asia TIDES Oligonucleotide and Peptide Research, Technology and Product Development, Las Vegas, NV USA; 5.20-5.23. 2012

3) Hiroaki Suga 「Non-Traditional Peptide Therapeutic Leads」 Colby-Sawyer College New London, NH USA; 8.5-8.10. 2012

4) Hiroaki Suga 「RaPID system: A new discovery tool of natural product-like peptides from de novo libraries」 3rd International Symposium on DNA-encoded chemical libraries, Zurich, Switzerland; 8.20. 2012

5) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 EFMC-ISMC 2012 22nd International Symposium

on Medicinal Chemistry, Berlin, Germany;
9.2-9.6. 2012

6) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-
Traditional Peptide Drug Leads 」
ICCP2012-International Conference on
Circular Proteins, Heron island, Australia;
10.14-10.17. 2012

7) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-
Traditional Peptide Drug Leads 」 13th
FAOBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology,
Bangkok, Thailand; 11.25-11.27. 2012

8) Hiroaki Suga 「 RaPID Discovery of Non-
Traditional Peptide Drug Leads 」 13th
Tetrahedron Symposium, Taipei, Taiwan;
11.27-11.30. 2012

9) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-
Traditional Peptide Drug Leads 」
Flexizyme, FIT and RaPID: The enabling
technologies for probes discovery, Olmué,
Chile; 12.2-12.6. 2012

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス産生に關与する宿主因子の探索
～細胞内コリンの重要性～

深澤 征義 国立感染症研究所細胞化学部 室長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）生活環に關与する宿主因子については依然不明の点が多い。HCV持続感染細胞を用いた比較メタボローム解析の結果から、持続感染細胞では細胞内コリン含量が顯著に上昇していることが見出された。そこで様々な検討を行った結果、培地中からコリンを除去すると、HCV産生が顯著に抑制されることが明らかとなった。また、細胞内へのコリン取り込み阻害剤を用いた検討から、細胞内へのコリンの取り込みがHCV産生に重要であることが強く示唆された。さらに、各種コリントランスポーターの關与を検討した結果、CTL1を介したコリンの取り込みがHCV産生に重要であることが明らかとなった。本経路は抗HCV薬標的として有用と考えている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は本邦における肝硬変、肝がん発症の主要リスク要因であり、抗HCV対策が強く求められている。C型肝炎ウイルス産生に關与する宿主因子は抗HCV薬標的として有用と考えられるが、未解明のものも多い。我々は網羅的解析手法および遺伝学的解析手法の2つのアプローチにより創薬標的となり得る宿主因子の同定を目指してきている。細胞内脂肪滴や脂質ラフト、網状膜構造といった脂質と密接に關連した部位がHCV生活環に重要な役割を果たしていることがわかってきており、本年度はこれら脂質・脂質代謝關連代謝物に特に注目し、メタボローム解析の結果を利用したHCV産生に關与する宿主因子の探索を行った。

B. 研究方法

（1）メタボローム解析

ヒト肝がん細胞株Huh7細胞由来の細胞株とこれにHCV-JFH1株を持続感染させた細胞株を用い、常法に従い比較メタボローム解析を行い、HCV感染の有無で発現量に大きな差がある因子を同定した。

（2）コリン除去、コリン輸送阻害剤、コリン輸送タンパク質ノックダウンによるHCV感染・増殖への影響の解析

感染実験のための宿主細胞は基本的にHuh7.5.1細胞を用いた。HCVは、HCV-JFH1株を用いた。感染はHuh7.5.1細胞にHCVを37℃、2時間感染することにより行った。また、Huh7.5.1細胞にHCVを持続感染させた細胞も用いた。培養器はコラーゲンコート24あるいは48穴プレートを用いた。コリン除去培地の作製は(株)細胞科学研究

所に依頼した。通常培地（10%FCS/DMEM/penicillin/streptomycin/non-essential amino acids）、コリン除去培地、コリン除去培地にコリンを添加した培地を用いて、各条件にて培養した細胞の HCV 産生を検討した。コリン輸送阻害剤には Hemicholinium-3 を用いた。各濃度（100-400 μ M）にて感染 3 日前からの処理を行った。コリン輸送タンパク質のノックダウンは市販のステルス siRNA を用いて行った。細胞への処理は lipofectamine RNAiMAX を用い 20nM で感染前後に培地へ 2 回添加することにより行った。ウイルス産生能の測定は、培養液中の HCV コア蛋白質量を ELISA で定量することにより行った。また、細胞中のウイルスタンパク質（コアタンパク質及び NS3）および RNA 量もイムノブロットあるいは qRT-PCR により測定した。細胞生存率の測定は XTT アッセイ法により行った。また、各種コリントランスポーター（CTL1, OCT1, OCT2, CHT1）の発現量の測定には qRT-PCR 法を用いた。

（3）HCV 感染細胞におけるコリン代謝の解析

HCV 持続感染細胞、非感染細胞の培地中に放射標識コリン（ ^{14}C choline）を添加し、細胞に取り込まれたコリンの代謝変動を常法に従い解析した。比較のため、放射標識脂肪酸を用いた代謝標識実験も行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト臨床材料・実験動物等を直接用いていない。そのために倫理面での問題はない。

C. 研究結果

（1）メタボローム解析

ヒト肝がん細胞株 Huh7 細胞由来の細胞株とこれに HCV-JFH1 株を持続感染させた細胞株を用い、細胞内低分子の比較メタボローム解析を行った結果、HCV 感染により最も発現量が上昇する（8.3 倍）分子としてコリンが同定された。

（2）HCV 感染・増殖に対するコリン除去の影響の解析

Huh7.5.1 細胞を感染前後の各段階においてコリン除去培地で処理し、HCV 産生を検討した。感染前・中・後すべての期間コリン除去培地で処理した場合が最も HCV 産生低下が大きかったが（90%以上阻害）、どの段階の処理でも HCV 産生阻害が有意に認められた。程度が一番小さいが感染前処理のみでも阻害（70%阻害）が認められ、感染後処理のみで強い阻害（90%阻害）が、感染中及び感染後処理でさらに強い HCV 産生阻害（90%以上阻害）が認められた。また、本条件下でのコリン除去培地による処理では細胞増殖には全く影響がなかった。さらに、コリン除去培地にコリンを添加し、コリン含量を戻すと HCV 産生の回復が見られた。以上の結果から、培地中のコリンが HCV 産生に重要であり、コリン除去をすると HCV 産生が各段階で阻害されることが明らかとなった。

HCV 持続感染細胞を用いた検討においてもコリン除去培地で培養することにより HCV 産生（特に HCV 分泌）が大きく抑制されることが明らかとなった。

（3）HCV 感染・増殖に対するコリントランスポーター阻害剤の影響の解析

Huh7.5.1 細胞をコリントランスポーター阻害剤である Hemicholinium-3 で前処理し、同薬剤存在下で HCV 感染を行い 4 日後に HCV 産生を検討した結果、薬剤の用量依存的に有意な阻害が見られた(85%阻害)。このとき、細胞増殖への影響は認められなかった。以上の結果から、培地中から細胞内へのコリンの取り込みが HCV 産生に重要であることが考えられた。

HCV 持続感染細胞を用いた検討においてもコリントランスポーター阻害剤存在下で培養することにより HCV 放出が大きく抑制されることが明らかとなった(細胞の増殖は HCV 産生が低下するためか、逆に良くなる傾向が見られた)。

(4) 肝培養細胞における各コリントランスポーターの発現量の解析

Huh7 細胞および Huh7.5.1 細胞における各種コリントランスポーターの mRNA 発現量を定量 RT-PCR により測定した結果、CHT1 は検出限界以下であり、OCT2<OCT1<<CTL1 の順に発現が見られた。CTL1 は OCT2 に比べ 100 倍以上の発現量であり、CTL1 がこれら肝細胞における主要なコリントランスポーターであると考えられた。

(5) HCV 感染・増殖に対するコリントランスポーターノックダウンの影響の解析

肝細胞で発現が見られたコリントランスポーター分子 (CTL1, OCT1, OCT2) の siRNA で Huh7.5.1 細胞を 2 回処理後、HCV 感染を行い、4 あるいは 5 日後に HCV 産生を検討した結果、CTL1 siRNA 処理により有意な HCV 産生阻害が見られた。以上の結果から、CTL1 を介した培地中から細胞内への

コリンの取り込みが HCV 産生に重要であることが強く示唆された。

(6) HCV 持続感染細胞におけるコリン含有脂質の代謝

HCV 持続感染細胞、非感染細胞における放射標識コリンを用いた代謝標識実験を行った結果、HCV 持続感染細胞では、コリンの細胞内への取り込みは大きな変化が見られなかったのに対して、コリン含有リン脂質であるホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンへのコリンの取り込みが有意に低下していた。一方、対照として行った、放射標識脂肪酸のホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンへの取り込みは、HCV 感染により変化が見られなかった。以上の結果から、コリン含有脂質の代謝が、HCV 感染細胞では有意に変動している可能性が考えられた。

D. 考察

HCV持続感染／非感染細胞を用いた比較メタボローム解析から、HCV持続感染細胞におけるコリンの細胞内蓄積が見出された。この情報を元に様々な検討を行った結果、培地からコリンを除去することでHCV産生が強く抑制されることを発見した。つまり、細胞外からコリンが取り込まれる(供給される)ことがHCV産生に重要であることがわかった。さらにこのコリンの取り込みにはコリントランスポーターCTL1が関与していることも明らかとなり、以上の検討から、CTL1を介したコリンの取り込み系を標的とした抗HCV創薬の可能性を示すことができたと考えている。

また、細胞内コリン含有脂質代謝を検討

した結果、HCV持続感染細胞でコリン含有脂質へのコリンの取り込みが低下しており、感染細胞内でコリンの代謝変動が生じていることが明らかとなった。脂質代謝の観点から考えると、HCV感染細胞では一種のコリン欠乏状態を呈していると言えるかもしれない。これまでの様々な報告から、コリン欠乏状態では脂肪肝(細胞内脂肪滴の蓄積)が見られることや、発がんが誘導されることが示されている。HCV感染により脂肪滴が誘導されることや、HCV生活環と脂肪滴との密接な関係、さらには発がんとの関連も、HCV感染におけるコリンの代謝変動と連関している可能性があり、大変興味深いと考えている。

E. 結論

本年度はHCV持続感染細胞を用いたメタボローム解析の結果に基づき、細胞内コリンの蓄積に注目した検討を行った。広範な検討から、細胞外から細胞内へのコリンの取り込みがHCV産生に必要であること、Huh7.5.1細胞においてはコリン輸送タンパク質CTL1を介したコリンの細胞内への取り込みが重要であることを明らかとした。本経路のHCV生活環における役割をさらに詳細に解析し、抗HCV創薬研究に結びつけていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, Y.; Fukasawa, M.; Kaneko, Y.; Suzuki, T.; Wakita, T.; and Fukazawa, H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple

steps of the virus lifecycle. *Microbes and Infection*, 2013, 15, 45-55

2. 学会発表

- 1) 深澤征義、Claudin 1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害、日本薬学会第133年会、横浜、2013.3.27-30
- 2) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉 丈、安部 良、深澤征義、高感染能を有するHCV JFH-1適応変異株の性状解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.13-15
- 3) Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada., Isolation and characterization of a mutant hepatitis C virus adapted to mouse CD81, The 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venice, Italy, 2012.10.5-9

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- 1) (発明者) 深澤征義、花田賢太郎「培養細胞、及び、細胞構築方法」(特願2012-154982) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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）
分担研究報告書

肝がんのアポトーシス耐性におけるマイクロRNAの関与

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：肝がんでは40%の症例においてアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白であるBcl-xLの高発現がみられる。本研究では肝がんにおけるBcl-xLの発現増強のメカニズムとしてマイクロRNAの関与について検討した。前年度までの研究により我々はin silico解析およびチップによる網羅的解析を行うことによりBcl-xLを標的にするマイクロRNAとして*let-7*マイクロRNAを同定し、肝がん細胞において*let-7*がBcl-xLの発現を抑制していることを明らかにした。またヒト肝がんの手術標本において*let-7*が低発現している症例では、対照に比し有意にBcl-xLの発現が亢進していた。そこで本年度は肝がん治療時におけるBcl-xLの機能について解析を行った。ソラフェニブにBcl-xL阻害剤であるABT-737を併用することにより肝がん細胞株のアポトーシスが促進され、Bcl-xLのソラフェニブ治療抵抗性への関与が示された。また*let-7*が低発現である肝がん細胞株に*let-7*を導入したところ、ソラフェニブによる抗腫瘍効果が増強された。肝がんではBcl-xLが高発現するメカニズムとして*let-7*マイクロRNAの低発現が関与していることが示され、治療の標的となりうることが示唆された。

共同研究者

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

がんの細胞生物学的な特徴として“無秩序な増殖”と“アポトーシス耐性”をあげることができる。前者はがん遺伝子の活性化などをその分子基盤としており、ソラフェニブなどのoncogenic kinase阻害剤はこれを標的とした薬剤である。一方、後者を標的とした肝がんの分子標的治療剤はいまだ開発されていない。我々はBcl-xLの高発現が肝がんのアポトーシス耐性の分子基盤のひとつであることを報告したが

(Takehara, et al., Hepatology 2001)、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究ではBcl-xLの高発現のメカニズムとしてマイクロRNAによる転写後調節に焦点をあてて、研究を行った。

B. 研究方法

Bcl-xL 阻害剤である ABT-737 を用いることにより肝がん治療時における Bcl-xL の機能について検討した。また in vivo における Bcl-xL 阻害の効果を検討するために肝がん細胞株を用いて皮下腫瘍モデルマウスを作成し解析を行った。

C. 研究結果

前年度までの研究により我々は *in silico* 解析およびチップを用いた網羅的解析により Bcl-xL を標的にするマイクロ RNA として let-7 マイクロ RNA を同定し、肝がん細胞において let-7 が Bcl-xL の発現を抑制していることを明らかにした。またヒト肝がんの手術標本において let-7 が低発現している症例では、対照に比し有意に Bcl-xL の発現が亢進していた。そこで肝がん治療時における Bcl-xL のアポトーシス耐性への影響を検討するため、Bcl-xL 阻害剤である ABT-737 を用いて解析を行った。結果、肝がん細胞株の Bcl-xL を阻害することによりソラフェニブのアポトーシス誘導効果が促進された。肝がん細胞株皮下腫瘍マウスモデルにおいても ABT-737 の併用はソラフェニブの抗腫瘍効果を増強し、Bcl-xL のソラフェニブ治療抵抗性への関与が示された。

D. 考察

肝がんにおいて let-7 マイクロ RNA の低発現が Bcl-xL の発現亢進に関与していることが明らかとなった。また Bcl-xL がソラフェニブ治療におけるアポトーシス耐性に関与していることが示された。

E. 結論

肝がんにおいて Bcl-xL が高発現する分子機序として *let-7* マイクロ RNA の低発現の関与が認められた。*let-7* の導入もしくは Bcl-xL の阻害によりソラフェニブの抗腫瘍効果を増強することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer. 131: 548-57, 2012.**
- 2) Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol. 57: 92-100, 2012.**

2. 学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 63rd Annual Meeting, November 9 - 13, 2012, Boston, MA

Oral; #193 Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. Hikita H, Kodama T, Tanaka S, Saito Y, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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）
分担研究報告書

プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索と臨床的意義の検討

宇都 浩文

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 講師

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染成立には、HCVにより産生されるウイルス蛋白が、HCV感染に対する宿主免疫応答に対し抑制的に作用することがその一因と考えられる。我々は、HCV持続感染者の血清プロテオミクスで、補体C4の断片が血清中に増加していることを見出した。本年度は、補体C4断片化とHCV由来蛋白との関連を明らかにすることを目的とした。補体C4とNS3/4Aプロテアーゼを混合すると、約17kDaと15kDaの蛋白断片が検出され、このC4断片出現は、セリンプロテアーゼ阻害剤（VX-950）により抑制された。また、感作羊赤血球を用いた溶血試験にて、NS3/4Aプロテアーゼは濃度依存的にC4活性を低下させ、この活性低下はVX-950により阻害された。以上のことから、HCV NS3/4A プロテアーゼはC4を切断することにより、補体の活性化を阻害し、宿主免疫応答を減弱させることで持続感染を維持する可能性があると考えられた。生体内でのHCV持続感染と補体との関連はさらなる検討が必要であるが、プロテオーム解析で同定した蛋白やその断片の出現機序の解明が、ウイルス性慢性肝疾患の病態解明につながる可能性がある。

A. 研究目的

新しいバイオマーカーを用いた簡便な診断法の確立は、早期発見・早期治療に結びつく可能性がある。また、病態と関連する新しいバイオマーカーの探索は、慢性肝疾患の病態解明につながり、新しい治療法を創出できる可能性がある。

C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染成立には、HCVにより産生されるウイルス蛋白が、HCV感染に対する宿主免疫応答に対し抑制的に作用することがその一因と考えられる。一方、我々は、HCV持続感染者の血清プロテオミクスで、補体C4の断片が血清

中に増加していることを見出した。本研究では、補体C4断片化とHCV由来蛋白との関連について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 補体C4とHCV NS3/4Aプロテアーゼ、Core、NS5をそれぞれ混合後、SDS-PAGEで分離し、CBB染色を行った。得られた蛋白のN末端アミノ酸を解析した。

2) 感作羊赤血球(EA)に補体C1、C4、C2とC4欠損モルモット血清を順に添加し、溶血度を測定することで補体の古典経路の活性を測定した。EA添加前、C4には各種濃度の

NS3/4Aプロテアーゼを作用させた。

C. 研究結果

- 1) C4とNS3/4Aプロテアーゼ混合液中には、C4とCore、もしくはNS5混合液中やそれぞれの単独にはみられない約17kDaの2つの蛋白と15kDaの1つの蛋白断片を検出した。2つの17kDa蛋白のN末端はそれぞれC4のSer-1584とAla-1591であり、15kDa蛋白のN末端はGlu-1454であった。Glu-1454はC4 γ 鎖のN末端であり、NS3/4Aプロテアーゼは、C4のCys-1583とSer-1584、Cys-1590とAla-1591の間を切断すると考えられた。また、NS3/4Aプロテアーゼにセリンプロテアーゼ阻害剤 (VX-950) を混合後、C4と混合すると、C4断片の出現が抑制された。
- 2) 感作羊赤血球を用いた溶血試験にて、NS3/4Aプロテアーゼは濃度依存的にC4活性を低下させた。また、この活性低下はVX-950により阻止された。

D. 考察

HCV NS3/4A プロテアーゼは IPS-1 や TRIF といった IFN 刺激伝導系に直接作用し、宿主免疫応答を阻害していることが知られている。また、HCV core や NS5A が C4 のプロモーター領域に作用する USF-1 や IRF-1 の発現を阻害することにより、IFN γ 依存性の C4 産生を低下させ、補体活性経路を抑制することが報告されている。さらに、NS5A が IL-1 β 存在下で C3 プロモーター活性を強力に阻害することが報告されている。CD59 が培養細胞や血清由来の HCV 粒子に組み入れられることで、補体の活性化が阻止され、また、CD59 阻害剤

を HCV 患者血清に反応させると、補体が活性化し、血清中の HCV 粒子の溶解が促進されることも報告されている。このように、HCV 構造蛋白が宿主免疫応答に作用し、HCV の持続感染に寄与している可能性が報告されているが、NS3/4A プロテアーゼが C4 を直接切断し、補体の活性化を阻害するという報告はこれまでにない。

今回は、肝細胞内での検討ではなく、また、患者血中 (肝細胞外) で HCV NS3/4A プロテアーゼが補体に直接作用するかは明らかにしていないが、生体内での HCV 持続感染と補体との関連を明らかにする上で本研究結果は意義があると考えられた。

E. 結論

HCV NS3/4A プロテアーゼは C4 を切断することにより、補体の活性化を抑制し、宿主免疫応答を減弱させる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imakiire K, Uto H, Sato Y, Sasaki F, Mawatari S, Ido A, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Ito Y, Okanou T, Tsubouchi H. Difference in serum complement component C4a levels between hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels or chronic hepatitis C. Mol Med Report. 6 (2): 259-64, 2012.
- 2) Uto H, Mawatari S, Kumagai K, Ido A, Tsubouchi H. Clinical features of hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels. Hepat Mon. 12 (2): 77-84, 2012.

2. 学会発表

- 1) Oda K, Uto H, Tsubouchi N, Kumagai K, Sasaki F, Numata M, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver S, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K: Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in subjects positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 2) Mawatari S, Uto H, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Ohno K, Oshige A, Imanaka D, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H, Sato Y, Suzuki T: Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation through cleavage of complement component C4. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 3) Yoshimine Y, Uto H, Kumagai K, Arima S, Ibusuki R, Mera K, Mawatari S, Tabu K, Nosaki T, Oda K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Hepatic gene expression of the SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase is associated with the development of liver cancer in a NASH mouse model. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 4) 有馬志穂、宇都浩文、指宿りえ、隈元亮、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁。高血圧はコリン欠乏アミノ酸置換食による肝線維化を促進する。第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.
- 5) 吉嶺陽造、宇都浩文、熊谷公太郎、米良久美子、有馬志穂、梶 一晃、馬渡

誠一、呉 建、沼田政嗣、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁。非アルコール性脂肪肝炎モデル(STAM)マウスの特徴と肝遺伝子発現。第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.

- 6) 馬渡誠一、宇都浩文、呉 建、梶 一晃、熊谷公太郎、小田耕平、今中 大、最勝寺晶子、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁。C型肝炎ウイルス持続感染者の病態と補体C3、C4との関連の検討。第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.
- 7) 米良久美子、宇都浩文、梶 一晃、馬渡誠一、有馬志穂、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁。C型慢性肝炎患者における血清AIM濃度の検討。第109回日本内科学会講演会、京都市、2012年.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

ウイルス肝炎の治療反応性・病態進展における新規バイオマーカーの検索

前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：C型慢性肝疾患において、病態進展・抗ウイルス治療反応性を予測する正確かつ簡便なバイオマーカーの確立が急務である。本研究では、2011年度までにPEG interferon（PEG-IFN）+ribavirin（RBV）併用療法における治療効治療反応性規定因子としてRANTESの有用性を明らかとしてきた。最終年度である2012年度は、近年肝発癌への関与が報告されたヒトゲノムの領域MICA・DEPDC5 SNPsに注目し、両SNPの肝病態進展におけるバイオマーカーとしての意義について、SNPの有無ごとの肝疾患の臨床的特徴、また実際の肝発癌への関与について検討した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する薬剤治療は、近年大きく進歩し、いわゆるDAA（Direct Acting-antiviral）製剤が開発・導入され、今後はインターフェロンなどの副作用の強い薬剤を用いずに安全にかつ高効率にウイルス排除が可能な治療の確立が期待されつつある。抗ウイルス治療が急速に進歩する一方で、残されている大きな問題は肝発癌であり、肝炎の病態進行、肝発癌そのもの、発癌後の病態の進展、抗がん剤治療に対する反応などに関連するバイオマーカーの確立が望まれている。

一方、近年Genome Wide Association Study (GWAS) 解析研究の広がりにより、さまざまな疾患状態と関連するヒトゲノム領域の存在が次々と明らかとなっている。C型肝炎では治療効果に関連するSNPとしてIL28Bが見出され、その重要性が明らかとなったが、2011年HCVによる肝発癌に関連

するSNPとしてMICAとDEPDC5が報告された。

しかしながらMICAとDEPDC5の本来の分子機能については解明されておらず、肝発癌マーカーとしての両SNPの有用性について未だ十分な追試・検討はされていない。さらにこれらのSNPの有無とC型肝炎の臨床像がどのように関与しているのか、まったく知られていない。そこで本年度は、両SNPが病態進展・肝発癌に対するバイオマーカーの一つとなりうるのか明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

HCVゲノタイプ1b・高ウイルス量389症例(CH N=234/LC N=41/HCC N=84)を対象として、MICA(rs 2596542)、DEPDC5 (rs 1012068)のSNPタイピングをTaqManプローブを用いたrealtime PCRにより決定し、SNPの頻度、臨床背景因子、肝発癌との関連について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

MICA (rs2596542) SNP 毎の臨床背景因子 (Albumin、Platelet、ALT、 γ GTP、AFP、T.Chol、Core 70 non-R、Core 91 M、ISDR、IRRDR) を比較すると、リスクアレルである A を持つ場合 (AA/AG v. s. GG) に、G-GTP が低くなることが (p=0.04) 示された。さらに HCC 発症症例に限って、SNP の有無によって HCC の特徴が異なるのか臨床因子を比較したが、明らかな差は認めなかった。

DEPDC5 (rs1012068) における各種臨床背景因子とリスクアレル G (GG/TG v. s. TT) との間に明らかな関連を認めなかった。

一方、MICA、DEPDC5 の SNP と HCC の関連を検討すると、non-HCC と比較してリスクアレル群が HCC 群にやや頻度が高い傾向を呈したが、明らかな有意差には至らなかった。

D. 考察と結論

発癌に関する SNP として見出された MICA、DEPDC5 について肝病態・肝発癌の関連について検討した。特に MICA については HCC リスクアレル群で G-GTP が低下していたが、既報において MICA のリスクアレル群では、炎症が低下することが報告されており、G-GTP が炎症を反映している可能性も考えられ、HCC 発症と G-GTP の関連を示唆する所見と考えられた。一方、両 SNP は強く肝病態進展、あるいは肝発癌に関与しておらず、バイオマーカーとして用いるには現時点で

は十分でない可能性が考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2012 Nov 29.
- 2) Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1360-8.
- 3) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepatitis* 7 AUG 2012
- 4) Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements

and interleukin-28B polymorphisms in response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in hepatitis C virus 1B infection. Hepatology. 2012 Nov;56(5):1611-21.

2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染による肝線維化発症メカニズムの解析を目的として、HBVを感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて検討した。キメラマウス（10週齢以上）にHBV genotype C（HBV/C, 10^5 copies）を接種し、感染確認後に抗ヒトまたは抗マウスTLR4抗体をそれぞれ16週間投与した。その結果、抗マウスTLR4抗体を投与したマウスの肝組織像のみ肝線維化の抑制傾向が認められた。一方、抗ヒトTLR4抗体により線維化は抑制されなかったことから、抗マウス抗体により中和されたのはマウス由来非実質細胞のTLR4であることが考えられる。以上より、キメラマウスHBV感染モデルにおいて、TLR4が線維化の主な要因である可能性が示唆された。

共同研究者

杉山真也 国立国際医療研究センター
田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科

えられた。

そこで、HBV感染キメラマウスに抗線維化薬物を投与し、線維化に与える影響について検討を試みる。

A. 研究目的

本研究班において、分担研究者はヒト肝細胞キメラマウスにHBVを感染させることで、HBVが肝組織に与える傷害性、特に肝線維化に関して検討を行っている。昨年までに我々は、キメラマウスにHBVを接種後3ヶ月で活性酸素種の産生が亢進すること、感染6ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害が見られることを確認している。

また、感染期間が6ヶ月経過した群において線維化進展群では線維化関連遺伝子の発現亢進が認められた。マイクロアレイによる解析を実施したところTLR4に関わる経路の活性が示され、自然免疫との関連が考

B. 研究方法

HBV感染血清から得られたウイルス（HBV/C）をクローニングしキメラマウスへの感染源とした。HBV/Cを1匹あたり 10^5 copies接種し、接種後1週目から週ごとに血清中のヒトアルブミン値、ウイルス量を測定した。感染確認後、抗線維化薬物として、ヒト型またはマウス型の抗TLR4抗体を投与した。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

HBV 感染 4 ヶ月後の肝組織像において、抗マウス TLR4 抗体投与群で線維化の抑制が認められた。抗ヒト TLR4 抗体により線維化は抑制されなかった。また、ヒト肝細胞の脱落が抗マウス TLR4 抗体投与群で有意に抑制されており、肝障害を抑制する傾向が認められた。

D. 考察

HBV感染キメラマウスの肝線維化は、抗マウスTLR4抗体を投与した場合にのみ進行が抑制された。肝臓において、TLR4は肝細胞と非実質細胞の双方に発現することが知られている。キメラマウス肝において、肝細胞はヒト由来であるが、非実質細胞はレシピエントのマウス細胞であることから、抗マウスTLR4抗体によって中和されたのは、非実質細胞のTLR4活性である可能性が示唆された。以上より、キメラマウスHBV感染モデルにおいて、TLR4は肝線維化の主要因であると考えられる。また、このマウスは免疫不全であるため、TLR4は免疫抑制下での肝線維化にも関与しているかも知れない。

E. 結論

HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスに抗TLR4抗体を投与することにより、肝線維化の抑制が認められた。TLR4は、キメラマウスにおいてHBVの肝線維化に寄与する因子の一つであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, **Murakami S**, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. J Viral Hepat., in press.
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsunashi H, **Murakami S**, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut., 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 3) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, **Murakami S**, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. J Med Virol., 84(4):587-95, 2012.

2. 学会発表

- 1) 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱正, **村上周子**, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人: 核酸アナログを投与したB型慢性肝炎患者におけるinterferoninducible protein-10値の動態. 第20回日本消化器関連学会週間(第16回日本肝臓学会大会), 2012, 神戸市.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし