

2. 学会発表

1. 西辻 裕紀、舟見 健児、清水 裕子、宇治野 真之、山本 祐美、鈴木 律子、川上 志保、瀬谷 司、高久 洋、下遠野 邦忠「HCV感染肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta産生をあげる」第60回日本ウイルス学会学術集会、平成24年11月13日、大阪
2. 西辻 裕紀、清水 裕子、宇治野 真之、舟見 健児、川上 志保、瀬谷 司、下遠野 邦忠「HCV感染培養肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta産生を誘導する。平成24年度 文部科学省新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、平成25年1月30日、東京
3. Yuko SHIMIZU, Saneyuki UJINO, Hironori NISHITSUJI, Hiroshi TAKAKU and Kunitada SHIMOTOHNO Hepatitis C virus sustains the level of APOBEC1 19th international symposium on hepatitis C virus and related virus、平成24年10月8日、ベネチア（イタリア）
4. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、高久 洋、下遠野 邦忠 C型肝炎ウイルスによるAPOBEC1 mRNAの安定化 第60回日本ウイルス学会学術集会、平成24年11月14日、大阪
5. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、椎名 律子、山本 祐美、高久 洋、下遠野 邦忠 C型肝炎ウイルスによるAPOBEC1 mRNA安定化とIL-8産生 第35回日本分子生物学会年会、平成24年12月12日、福岡
6. Yuko Shimizu, Hironori Nishitsuji, Hiroyuki Murasawa, Kenji Funami, Tsukasa Seya, Saneyuki Ujino, Ritsuko Shina, Hiromi Yamamoto, Atsuko Tsukimoto, Kunitada Shimotohno Augmented productions of inflammatory cytokines by novel mechanisms in HCV-infected liver. The 3rd international symposium on carcinogenic spiral and international symposium on tumor biology, 平成25年1月24日、金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究要旨

HCV 複製を制御する宿主要因を明らかにし、HCV の複製を人為的に制御する方法を見出すことは治療効果の向上を目指した抗HCV薬の創薬研究につながることを期待される。本研究では、HCV 複製を正また負に制御する宿主因子の探索とその解析を目的とした。前年度は HCV RNA の翻訳には Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成が必須である。また、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質でプロテアソーム依存的分解が起こることを見出した。本年度は Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成を実証することが出来た。また、Hsp70 も Hsp90 と同様に HCV RNA 翻訳制御に係わっていることを明らかにした。以上のことから Hsp90 および Hsp70 は HCV 複製を正に制御する宿主要因因子であることが強く示唆された。最終的には新しいタイプの抗 HCV 剤、17-AAG (IC₅₀:0.82nM) の開発につながった。

A. 研究目的

慢性C型肝炎患者に対する治療成績は約50%程度に留まり、また副作用の点を考えると新たな治療法の開発が切望される。新規抗HCV薬の開発には、ウイルス複製を詳細に解明する必要があり、それにはHCVの複製を正また負に制御する新たな宿主因子を同定する必要がある。HCVの複製は宿主因子由来タンパク質により正または負に制御される。本研究では、HCV複製を正また負に制御する宿主因子の探索とその解析を目的とした。これまでに我々は、宿主因子Hsp90がHCV複製を正に制御にすることを明らかにしてきた。分子シャペロンHsp90はフォールディングやタンパク質の凝集抑制や活性化などで働く際は、必ず幾つかのコシャペロンと呼ばれる蛋白質と複合体を形成し動いている。一方、Hsp90の機能を阻害する、Hsp90阻害剤(17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG))を用いることで、Hsp90によるHCV複製を抑制出来ることも報

告した。近年、Hsp90阻害剤も注目されている薬剤であり、数種類存在する。すでに低毒性のゲルダナマイシン誘導体17-AAGは癌に対する臨床治療も開始されている。一方、多様な機能を発揮するHsp70は細胞質内、核内と全ての領域に存在しておりその働きは様々であることが広く知られている。そこで、本研究では宿主因子Hsp90およびHsp70によるHCV複製制御とその作用機序の解明を目指した。

B. 研究方法

- 1) Hsp90 と eIF3c との相互作用の検討は、Huh-7 細胞および NNC#2 細胞に pFLAG-eIF3c 発現 vector を導入し、1×CAT ELISA buffer により細胞を溶解した。細胞溶解物を回収し、anti-FLAG Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90Ab と anti-FLAG Ab を用い Western blot 法によりタンパク質を検出した。
- 2) JFH1 株感染 Huh7.5 細胞系での Hsp70 阻害剤 (KNK437) による HCV 複製への影響は

Huh7.5細胞にHsp70阻害剤(KNK437)を添加した後24時間培養した後、JFH1株をMOI 1となる様に感染させ、4時間後にウイルス液を除去し、細胞を洗浄した。洗浄後は10%のFBSを含むDMEMを用いて24時間培養した。培養上清を回収し、化学発光酵素免疫測定法(Chemiluminescent Enzyme Immuno Assay; CLEIA)によりHCV-coreタンパク質濃度を測定した、

3) Hsp70 knockdownによるHCV複製制御への影響を調べるため、JFH1株感染Huh7.5細胞をHsp70-siRNAで処理し、24時間後、培養上清を回収し、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によりHCV-coreタンパク質濃度を測定した、

4) Hsp70阻害剤KによるHCV複製制御の検討はHCV full genome replicon cells (NNC#2細胞)をHsp70阻害剤(KNK437)濃度依存的に処理した後、全タンパク質を回収し、ウイルスタンパク質をWestern blot法で検出した。

5) Hsp70阻害剤(KNK437)によるHCV RNA 翻訳機構への関与について解析するため、Huh-7、NNC#2細胞をKNK437で処理し、72時間後にタンパク質を回収後、各eIF3 subunit (IF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i)およびribosomal subunit (40S, 60S)をsubunit特異的抗体を用いてWestern blot法で検出した

(理面への配慮)

組み換えDNA実験および遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号;平成16年2月18日施行)、同施行規則

(平成15年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組み換え生物等第二種使用等安全管理規則に基づき実施する

C. 研究結果

前年度までの研究ではHsp90がHCV RNAの翻訳制御に係わる宿主因子であることを見出した。また、HCV RNAの翻訳にはHsp90/eIF3c/HCV IRES複合体形成が必須で、eIF3cとHsp90の相互作用にはHCV IRES RNAが要求されることが示唆された。さらに、eIF3cはHsp90依存的クライアントタンパク質で、Hsp90阻害剤でHsp90の活性を阻害したところ、Hsp90/eIF3c/HCV IRES複合体よりeIF3cが遊離し、プロテアソーム依存的分解が起こることを見出した。

本年度は、HCV IRESの存在下でeIF3cとHsp90の分子間相互作用の解析およびHsp70によるHCV複製制御とその作用機序の解明を目指した。

前年度eIF3cがHsp90依存的クライアントタンパク質であることが実証されたので、実際にeIF3cとHsp90が相互作用しているか検討した。はじめに、eIF3c全長が発現するpFLAG-eIF3c発現vectorを制限酵素ClaIとSmaIで処理したpFLAG-CMV2 vectorにeIF3c全長を挿入することでpFLAG-CMV2eIF3cを作成しHsp90との相互作用を検討した。Huh-7細胞およびNNC#2細胞にpFLAG-CMV2eIF3cを導入し、1×CAT ELISA bufferにより細胞を溶解した。細胞溶解物を

回収し、anti-FLAG Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90Ab と anti-FLAG Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行った。その結果、Huh-7 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドは検出できなかったが、NNC#2 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドが検出されたことから Hsp90 と eIF3c が相互作用していることが示唆された。また Huh-7 細胞では eIF3c と Hsp90 との相互作用が認められなかった。NNC#2 細胞と Huh-7 細胞との異なる主なる要因は、細胞内で HCV replicon RNA および HCV のウイルスタンパク質存在の有無である。また、ウイルスタンパク質は HCV replicon RNA から翻訳されることや、eIF3 が翻訳開始因子であり HCV IRES に直接結合することを考慮すると、HCV replicon RNA が Hsp90 と eIF3c の会合に係わっていると考えた。そこで、HCV replicon RNA で翻訳に最も重要な部位である HCV IRES を Huh-7 細胞で発現させ、Hsp90 と eIF3c の相互作用を検討した。はじめに、HCV IRES を発現させ 17-AAG 処理をすることで、NNC#2 細胞と同様に 17-AAG が eIF3c の発現に影響を及ぼすかを検討するために、Huh-7 細胞に HCV IRES/Luc である pC5' IL-II vector を導入し、17-AAG で処理した。培養タンパク質を回収し、eIF3c を Western blot 法により検出を試みた。eIF3c は Huh-7 細胞を 17-AAG 単独処理または pC5' IL-II vector を単独導入した場合には、タンパク質量の減少は全く見られなかった。しかし、HCV IRES 発現細胞を 17-AAG 処理させた場合は、eIF3c が減少した。すなわち、HCV IRES を細胞内で発現させることで、Hsp90 と eIF3c が相互作用するようになり、その状態で Hsp90 を阻害した場合に eIF3c が

減少するのではないかと考えられる。さらに、Hsp90 と eIF3c が相互作用に HCV IRES が関与していることを実証するために、NNC#2 細胞を RNase A で処理し、細胞溶解物を回収し、anti-eIF3c Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp90 Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行った。その結果、Hsp90 と eIF3c の会合が消失したことから、Hsp90 と eIF3c が相互作用には HCV IRES が必須であることが分かった。そこで、Hsp90 と eIF3c の会合に HCV IRES が係わっているかを詳細にするため、pC5' IL-II vector を Huh-7 細胞に導入した。Co-IP と Reverse-IP で Hsp90 と eIF3c の会合を確認したところ、Hsp90 と eIF3c の相互作用が認められた。これらの結果から、Hsp90 と eIF3c の相互作用に HCV IRES が係わったであることを実証することが出来た。さらに、上記の系を 17-AAG 処理することで Hsp90 と eIF3c の相互作用への影響を検討したところ、eIF3c の減少傾向が認められた。一方、プロテアソーム阻害剤、MG132 で上記の系に添加した場合、eIF3c 発現が回復した。

つぎに、Hsp70 による HCV 複製制御とその作用機序の解明を目指した。はじめに、HCV full length レプリコン細胞である NNC#2 細胞を Hsp70 阻害剤 KNK437 で処理した。この際に KNK437 の濃度 50 μ M において Hsp70 の発現が減少したことを Western blot 法により確認した。その結果 HCV の core, E1, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NA5B が著しく減少したことから宿主内因子 Hsp70 は HCV 翻訳制御やウイルスタンパク質の安定化に関与している可能性がより強く示唆された。そこで、実際に JFH1 株感染 Huh7.5 細胞系での Hsp70 阻害剤 (KNK437) による HCV 複製への影響を検

討した。その結果 Hsp70 阻 害剤 (KNK437) 濃度依存的に HCV-core タンパク質が減少したことから、Hsp70 は HCV の翻訳関与している可能性が示唆された。対照的に、JFH1 株感染 Huh7.5 細胞へ pFLAG-Hsp70 を導入した Hsp70 過剰発現系では HCV の複製が確認されたことから、Hsp70 は HCV の複製を正に制御することが分かった。

これまでの結果から、Hsp70 は HCV 翻訳やウイルスタンパク質の安定化に関与している可能性が示唆された。そこで、Hsp70 による HCV の複製制御機能を詳細にするため下記の実験を遂行した。はじめに、ウイルスタンパク質の安定化に寄与している否かを検証するために NNC#2 細胞中の Hsp70 と HCV の core, E1, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NA5B の相互作用を共免疫沈降を行い、Western blot 法で解析した。その結果、Hsp70 とウイルスタンパク質との相互作用は認められなかった。最近、Gonzalez (2012. *Hepatology*, 55, 1662- 1672) らは Hsp70 と NS5A が結合することで、HCV IRES の活性が上昇すると報告している。しかし本研究では、Hsp70 と NS5A の相互作用は確認できなかつた。これらの結果の相違点を検証するために、NNC#2 細胞へ pFLAG-Hsp70 を導入し、Hsp70 過剰発現させたところ、Hsp70 と core, および NS5A の相互作用は確認できず NNC#2 細胞単独の際の結果と同じであった。これらの結果から hsp70 とウイルスタンパク質との相互作用の可能性は否定された。

そこで、Hsp70 は翻訳開始因子に係わる宿主因子であると考え、NNC#2 細胞を Hsp70 阻害剤 (KNK437) で処理し、各翻訳開始因子 eIF2 (2a, b), eIF3 (a, b, c, h, j, k) と 40S ribosomal subunit (rpS3, S6) をサブユニット

特異的抗体を用いて Western blot 法で解析した。その結果、訳開始因子 eIF3c と 40S ribosomal subunit (rpS3, S6) が減少した。さらに Hsp70 と eIF3c と相互作用を実証するために、NNC#2 細胞溶解物を回収し、anti-eIF3c Ab を用いて免疫沈降を行い、anti-Hsp70 Ab を用い Western blot 法によりタンパク質の検出を行ったところ、Hsp70 と eIF3c の会合が確認した。

上記の結果より Hsp70 は Hsp90 と同様に HCV 複製制御に係わりがあることが明らかとなった。

D. 考察

前年度、eIF3c は Hsp90 依存的クライアントタンパク質で、eIF3c と Hsp90 の相互作用には HCV IRES RNA が必須であることが判明した。また HCV RNA の翻訳には Hsp90/eIF3c/HCV IRES 複合体形成が要求されることを明らかにすることが出来たので、実際に eIF3c と Hsp90 が相互作用しているか検討した。その結果、Huh-7 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドは検出できなかったが、NNC#2 細胞で免疫沈降した細胞溶解液では、Hsp90 のバンドが検出され Hsp90 と eIF3c が相互作用していることが示唆された。また、eIF3c は Huh-7 細胞を 17-AAG 単独処理または pC5' IL-II vector を単独導入した場合においては、タンパク質量の減少は全く見られなかった。しかし、HCV IRES 発現細胞を 17-AAG 処理させた場合は、eIF3c が減少した。すなわち、HCV IRES を細胞内で発現させることで、Hsp90 と eIF3c の相互作用が回復する傾向が見られた。さらに、Hsp90 と eIF3c が相互作用に HCV IRES が関与していることを実証するために、NNC#2 細胞

を RNase A で処理したところ、Hsp90 と eIF3c の会合が消失したことから、Hsp90 と eIF3c が相互作用には HCV IRES が必須であることが示唆された。

一方では宿主内因子 Hsp70 による HC 複製制御とその作用機序の解明を目指した。NNC#2 細胞を Hsp70 阻害剤 KNK437 で処理したところ、Hsp70 は HCV ウイルスの翻訳やウイルスタンパク質の安定化に関与していることを明らかにした。そこで実際に、JFH1 株感染 Huh7.5 細胞系でも同様な結果が得られたことから、ウイルスタンパク質の安定化に寄与している否かを検証した。その結果、Hsp70 とウイルスタンパク質との相互作用は確認できなかった。対照的に訳開始因子 eIF3c と 40S ribosomal subunit (rpS3, S6) が Hsp70 と相互作用をしており、HCV 翻訳機構に強く関与していることを見出した。

最終的には HCV 複製を制御する宿主要因を探索する過程で、新しいタイプの抗 HCV 剤、17-AAG (IC₅₀:0.82nM) の開発につながった。

宿主因子である Hsp90 および Hsp70 は HCV 複製を正に制御する必須因子であることから、HCV の複製を Hsp90 および Hsp70 阻害剤で人為的に制御することは可能であり、治療効果の向上を目指した抗 HCV 薬の創薬研究につながることを期待できる。

E. 結論

HCV 複製を正また負に制御する宿主因子の探索を試みたところ、分子シャペロン・宿主因子である Hsp90 および Hsp70 が HCV RNA の翻訳制御に係わることを見出した。特に eIF3c と Hsp90 の分子間相互作用の解析および HCV RNA の翻訳過程での Hsp90 の分子メカニズムを詳細にすることが出来た。一方、

Hsp70 による HCV 翻訳制御機構については、更に詳細な検討が必要である。ここで得られた知見は、HCV 複製制御の解明と宿主因子である Hsp90 および Hsp70 を標的とした新たな治療薬の開発に貢献するものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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**(1):390-395. 2012.
2. Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production. *PLoS One*, **7**(12):e51393, 2012.
3. Nishitsuji H, Abe M, Sawada R, Takaku H. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. *FEBS Lett.*, 2012, **586**(20): 3562-3568.

2. 学会発表

(国内学会)

1. 小倉 大直、君塚 圭亮、杉山 隆一、日紫喜 隆行、下遠野 邦忠、杉山 和夫、高久洋:C型肝炎ウイルス(HCV)複製制御に係わる宿主因子 Hsp70 の機能解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
2. 月本 あつ子、杉山 隆一、鈴木 等、清水裕子、下遠野 邦忠、高久 洋: Prostaglandin A1 を用いた抗 HCV 活性とその作用機序の解明。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
3. 村上 優子、杉山 和夫、斉藤 英胤、海老

- 沼 浩利、中本 伸宏、酒瀬川 典子、斎藤 聡、金井 隆典、日比 紀文、高久 洋:1b 型 HCV レプリコン複製細胞のレプリコン RNA を効率よく感染性粒子として **transpackaging** する方法。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
4. 西辻 裕紀、舟見 健児、清水 裕子、宇治野 真之、山本 祐美、椎名 律子、川上 志保、瀬谷 司、高久 洋、下遠野 邦忠: HCV 感染肝細胞は肝星状細胞と共培養する事により MIP-1 beta 産生をあげる。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
 5. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、高久 洋、下遠野 邦忠:C 型肝炎ウイルスによる APOBEC1 mRNA の安定化。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
 6. 杉山 和夫、齋藤 英胤、酒瀬川 典子、村上 優子、海老沼 浩利、中本 伸宏、梅田 瑠美子、碓井 真吾、石橋 由佳、楮柏松、若山 遊子、齋藤 義正、高久 洋、日比 紀文:新たなHCV 研究ツールとしての HCV 持続感染培養肝細胞およびその治癒細胞の樹立。第48回日本肝臓学会総会、2012年、金沢。
 7. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、椎名 律子、山本 祐美、高久 洋、下遠野 邦忠:Hepatitis C virus Upregulates IL-8 Production Through Stabilizing APOBEC1 mRNA「C 型肝炎ウイルスによる APOBEC1mRNA の安定化と IL-8 産生」、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年、大阪。
 8. 杉山 隆一、西辻 裕紀、長沼 晴樹、脇田 隆宇、高久 洋;HI V-1 Nef は HSP70 を介した Tat 活性化を抑制する。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年、大阪。
- (国際学会)
1. Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Makoto Abe, Masato Katahira, Hiroaki Takeuchi, Yuichiro Habu, Akihide Ryo, Hiroshi Takaku: Heat Shock Protein 70 Inhibits HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination and Degradation of APOBEC3G. The Twenty-Fifth International Conference on Antiviral Research (ICAR) 2012, 4.16 - 19, Sapporo, Japan
 2. Yuko Shimizu □ Saneyuki Ujino □ Hironori Nishitsuji □ Hiroshi Takaku □ Kunitada Shimotohno □ Hepatitis C virus sustains the level of APOBEC1 □ The 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses □ 2012 □ 10.5-9 □ Venice, Italy.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

C型肝炎ウイルス感染による転写因子 FoxO1 の転写活性脱制御の分子機序

分担研究者 堀田 博 神戸大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス (HCV) 感染はしばしば2型糖尿病を合併するが、その素因として高血糖の維持があげられる。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、HCV感染はミトコンドリア reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進による酸化ストレスを介して c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化し、これが転写因子 FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、肝臓における糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 及びグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) の遺伝子発現を促進し、糖新生を亢進させることを報告した。本研究では、HCV J6/JFH1 感染 Huh7.5 細胞を用いて、HCV が FoxO1 のリン酸化を抑制する分子機序、とくに脱リン酸化酵素 MAPK phosphatase-3 (MKP3) の関与について検討した。その結果、HCV 感染は MKP3 遺伝子の転写を亢進させ、MKP3 蛋白質発現を促進させることがわかった。HCV 感染細胞を抗酸化剤 *N*-acetyl cysteine (NAC) で処理して ROS の作用を阻害したり、JNK 阻害剤 SP600125 で処理して JNK の作用を阻害すると、MKP3 蛋白質発現の亢進は解除された。発現プラスミドを用いて MKP3 を強制発現させると、FoxO1 のリン酸化の程度が減弱した。また、強制発現させた MKP3 は内在性 FoxO1 と結合することが確認された。以上の結果より、HCV 感染は、ミトコンドリア ROS 産生→JNK 活性化→MKP3 発現促進を介して FoxO1 のリン酸化を阻害し、FoxO1 を核内貯留させてその転写活性を維持することにより、糖新生系律速酵素遺伝子の転写を促進し、糖新生を亢進させることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌の他に、肝外病変としてしばしば2型糖尿病を引き起こす。2型糖尿病の素因として高血糖の持続が重要な役割を果たしている。肝細胞は糖の産生を担っており、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、HCV感染は、(1)ミトコンドリア reactive oxygen species (ROS) 産生の亢進による酸化ストレスを介して c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化し、(2)これが転写因子 FoxO1 のリン酸化を抑制して核内蓄積を維持してその転写活性を亢進させ、(3)肝臓

における糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 及びグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) の遺伝子発現を促進し、(4)糖新生を亢進させることを報告した。本研究では、HCV J6/JFH1 感染 Huh7.5 細胞を用いて、HCV が FoxO1 のリン酸化を抑制する分子機序、とくに脱リン酸化酵素 MAPK phosphatase-3 (MKP3) の関与、及びそれに及ぼす ROS 並びに JNK の影響について検討した。

B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞：ウイルスは HCV

J6/JFH-1 株、細胞は Huh-7.5 細胞を用いた。

(2) MKP3 発現の解析:MKP3 遺伝子発現量は MKP3 mRNA を特異的プライマーを用いた定量的 qRT-PCR 法により定量した。MKP3 タンパク質発現量は特異抗体を用いたウエスタンブロット法により測定した。MKP3 の細胞内局在は特異抗体を用いた蛍光抗体法により解析した。

(3) MKP3 と FoxO1 の結合の解析: Huh7.5 細胞に MKP3 発現プラスミドをトランスフェクトして一過性に MKP3 を強制発現させ、細胞抽出液から抗 FoxO1 抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、MKP3 に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、MKP3 と FoxO1 の結合を解析した。

(4) 転写因子 FoxO1 の解析: 抗リン酸化 FoxO1 抗体及び抗 FoxO1 抗体を用いたウエスタンブロット法によりリン酸化 FoxO1 の量及び FoxO1 総量を測定した。各レーンのタンパク質量の均等性を示す指標として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の量を測定した。

(5) MKP3 発現における ROS 産生及び JNK 活性化の関与の検討: ROS の影響を解析するために、抗酸化剤である *N*-acetyl cysteine (NAC) で細胞を処理して、MKP3 発現及び FoxO1 のリン酸化の程度を調べた。また、JNK 活性化の影響を解析するために、JNK 特異的阻害剤 SP600125 で細胞を処理して、MKP3 発現及び FoxO1 のリン酸化の程度を調べた。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験および遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号;平成 16

年 2 月 18 日施行)、同施行規則(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、研究開発などに関わる遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置などを定める省令(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び神戸大学の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に基づいて実施した。

C. 研究結果

(1) HCV 感染による MKP3 mRNA 量及び MKP3 タンパク質発現量の増加:

定量的 qRT-PCR 法により、HCV 感染細胞では対照細胞に比べて、感染 4 日後(4 dpi)以降に、MKP3 mRNA 量の増加することが認められた。また、ウエスタンブロット法により、MKP3 蛋白質発現量が 4 dpi 以降に増加することも確認された。

(2) Huh7.5 細胞における MKP3 と FoxO1 の結合:

Huh7.5 細胞に発現プラスミドを用いて MKP3 を一過性に強制発現させ、免疫共沈法により内在性 FoxO1 と MKP3 の結合の有無について解析した。その結果、MKP3 は内在性 FoxO1 と結合することがわかった。

(3) MKP3 発現による FoxO1 リン酸化の低下:

Huh7.5 細胞に MKP3 を一過性に発現させると、トランスフェクション後 2 日及び 3 日後に、対照細胞に比べて、内在性 FoxO1 のリン酸化の程度が低下することがリン酸化 FoxO1 に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により明らかになった。

(4) HCV 感染細胞における ROS 産生及び JNK 活性化による MKP3 発現の促進:

我々はこれまでに、HCV 感染により ROS 産生が亢進し、それに伴って

JNK が活性化し、FoxO1 のリン酸化の程度が低下することを報告した。そこで、HCV 感染細胞における MKP3 発現の亢進に ROS 産生及び JNK 活性化が関与しているか否かについて検討した。その結果、HCV 感染細胞を抗酸化剤 NAC あるいは JNK 阻害剤 SP600125 で処理すると、MKP3 蛋白質の発現量は非感染対照細胞における発現量に近い程度まで減少することがわかった。この時、FoxO1 のリン酸化の程度も非感染対照細胞と同程度まで回復していた。

D. 考察

HCV 感染細胞では、非感染対照細胞に比べて、MKP3 mRNA 量と MKP3 蛋白質発現量が 4 dpi 以降に増加することが明らかになった。また、MKP3 は内在性 FoxO1 と結合すること、及び MKP3 発現により FoxO1 リン酸化が低下することもわかった。

我々はこれまでに、HCV 感染により ROS 産生の亢進や JNK 活性化が惹起され、FoxO1 のリン酸化の程度が低下することを観察しているので、HCV 感染細胞における MKP3 発現の亢進に ROS 産生及び JNK 活性化が関与しているか否かについて検討した。その結果、HCV 感染細胞における MKP3 発現の亢進は、抗酸化剤 NAC や JNK 阻害剤で解除されることが明らかになった。すなわち、HCV 感染による ROS 産生の亢進や JNK 活性化に伴って MKP3 発現が亢進することが示唆された。そして、MKP3 発現が増加しホスファターゼ機能が增强することが、HCV 感染に伴う FoxO1 リン酸化低下の一因になっている可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染は、ROS 産生亢進→JNK 活性化→MKP3 発現促進を介して FoxO1

のリン酸化を阻害し、FoxO1 を核内貯留させてその転写活性を維持することにより、糖新生の律速酵素遺伝子の転写を促進し、糖新生を亢進させることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Virol*, 86(23): 12903-12911, 2012.
2. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.
3. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect*, 14(1): 69-78. 2012.
4. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, 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. *J Med Virol*, 84(2): 229-234, 2012.
5. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 55(1): 1-11, 2012.
6. El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, Hotta H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus

- genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clin Microbiol*, 50(12): 3886-3892, 2012.
7. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS ONE*, 7(2): e30513, 2012.
 8. Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, 30(5): 1048-1052, 2012.
 9. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 47(10): 1143-51, 2012.
 10. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE*, 7(10): e46634, 2012.
 11. Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization. *PLoS ONE*, 8(2):e55874, 2013.
 12. El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, (in press)
 13. Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia. *Hepatol Res*, (in press)
2. 学会発表
 1. Deng L, Chen M, Jiang DP, Shoji I, Hotta H. Up-regulation of MAPK phosphatase 3 is involved in HCV-induced suppression of FoxO1 phosphorylation. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 2. Jiang DP, Ratnoglik SL, Aoki C, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of therapeutic and preventive vaccines against Hepatitis C virus. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 3. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. Identification and characterization of a novel NS5A-interacting protein, SMYD3. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 4. Matsui C, Shoji I, Deng L, Hotta H. HCV infection induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via interaction with HCV NS5A protein. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 5. Deng Lin, 金子昌裕, 河本真理, 姜大鵬, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による転写因子 FoxO1 脱リン酸化の分子機序の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
 6. 陳明, 甘翔, DENG Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋

- 白質の新規結合因子ヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の同定と機能解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
7. 松井千絵子, 勝二郁夫, DENG Lin, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる GLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
 8. 姜大鵬, Ratnoglik Lulut Suratno, 青木千恵, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルスに対する予防および治療ワクチン開発に関する研究. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪
 9. 勝二郁夫, 松井千絵子, 兼田崇作, Imelda Rosalyn Sianipar, Deng Lin, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染は HNF-1 α の発現を負に制御し GLUT2 遺伝子発現を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.
 10. 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀口朋子, 孫雪東, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質の Src homology 2/3 ドメイン結合能と B 細胞での発現による Src ファミリーキナーゼ Fyn の活性化. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.
 11. DENG Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会. 2012. 神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許関係
 1. 「C 型肝炎ウイルス粒子形成促進剤及び株の評価方法及び C 型肝炎ウイルス粒子の産生方法」特願 2012-215474.平成 24 年 9 月 28 日 発明者 堀田博.
 2. 「NS3 蛋白を発現するピフィズス菌、経口 C 型肝炎ワクチン」特願 2013-30477.平成 25 年 2 月 19 日 発明者 白川利朗, 堀田博, 片山高嶺.

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

持続的な HCV 複製による細胞機能変化の解析に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）RNAの複製が細胞内で長期に及んだ場合において、HCV-RNAがどのような遺伝的多様性を獲得し、細胞機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。HCV研究にこれまで汎用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すヒト肝癌細胞株 Li23 由来の細胞株を用いて本研究を行った。全長 HCV-RNA 複製細胞（OL8 や OL11 など）とそれらの細胞から HCV-RNA を排除した治癒細胞（OL8c と OL11c）を2年以上継代培養した細胞を用いたマイクロアレイ解析や RT-PCR 解析により、HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現変動した幾つかの宿主遺伝子を昨年度までに同定した。これらの遺伝子について引き続き研究を行い、今年度は以下に示した2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レベルが低下する遺伝子として同定した *BASP1* と *CPB2* について、それらの発現レベルが低下する時期を明らかにし、発現低下が DNA のメチル化によるものであることを明らかにした（2）HCV-RNA の長期培養により不可逆的に発現レベルが亢進する遺伝子として同定した *SEL1L3* について、その発現レベル（既報）の亢進と肝線維化の進展や肥満度に相関関係があることが分かった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する治療もペグ化インターフェロン（IFN）とリバビリンとの併用療法により患者の半数程度は治癒するようになっている。しかしながら、HCVの持続感染による発がん機構については、諸説

あるものの未だ解明されていない。それは、HCVが宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく分かっていないためである。これまで、多くの研究者がHCVの複製増殖系を用いてこの問題にアプローチして来たものの、HCVが複製増殖する培養細胞株はヒト肝がん由来のHuH-7細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換マウスも実験系として登場しているものの、高価な上にHCVの複製増殖に個体間で差があることから発がんに関する研究には

あまり適していない。

2008 から 2009 年にかけて、我々はこれまでの HCV 研究に汎用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは遺伝的発現プロファイルも異なるヒト肝癌細胞株 Li23 が HCV の複製増殖を許容することを見出した。そして、この Li23 由来の細胞を用いることにより HCV 1b 遺伝子型で O 株由来の全長 HCV-RNA 複製細胞株 (OL, OL8, OL11 および OL14 細胞) を樹立することに成功した。

我々は、樹立したこれらの全長 HCV-RNA 複製細胞を用いることにより、これまでの HuH-7 由来の細胞を用いた研究では得られなかった知見が新たに見出されるのではないかと考えた。また、これまで、HCV が存在するかしないかでの差を見出すことを目的とした研究がなされ、HCV の複製増殖に関与する多くの宿主因子の同定がなされて来た。しかし、本研究ではこのような方向の研究ではなく、HCV の複製が長期間に及んだ場合に宿主側に生じた微細な変化が蓄積して結果的には不可逆的な大きな変化になるのではないかという仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証して捉えることを目指した。昨年度から継続して研究を行い、今年度は以下に示すような研究成果を得た。

B. 研究方法

(1) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現レベルの変動解析

長期継代培養を施した OL8 細胞について、セルバンカーにて-80 度で保存し

てあった樹立時の細胞[OL8(OY)], 0.5 年、1 年、1.5 年および 2 年間培養後の細胞[それぞれ OL8(0.5Y)、OL8(1Y)、OL8(1.5Y)および OL8(2Y)と表記]を再培養し、70-80% confluent になった時点において、それぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現量が低下する遺伝子として同定した *BASP1* と *CPB2* についてこれらの mRNA の発現レベルを LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により調べた。

OL8(OY)細胞や 3.5 年間培養した OL(3.5Y)細胞に脱メチル化剤である 5-azacytidine (5-azaC)(2.5 μ M)やヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤である 4-phenylbutyric acid (4-PBA)(1 mM)を添加して、48 時間後にそれぞれの細胞から Total RNA を調製した。これらの RNA を用いて、*BASP1* と *CPB2* の mRNA の発現レベルを LightCycler を用いた定量的 RT-PCR 法により調べた。

(2) HCV-RNA の長期複製により発現亢進した遺伝子と肝病態の進展との関係

C 型慢性肝炎患者 91 名 (いずれも HCV 遺伝子型 1b) の cDNA マイクロアレイの data (Honda et al. Gastroenterology, 139:499-509, 2010 で公表済み; 金沢大学の金子周一先生と本多政夫先生との共同研究) を用いて、本研究により得られた HCV-RNA の長期複製により発現が亢進した遺伝

子の発現レベルがどの程度なのか、そして肝病態の進行との相関関係がないかどうかを検討した。

得られた結果については、Student の t 検定を行い、有意差があるかを検討した。P が 0.05 以下になった場合を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。本年度の研究に用いたヒトの臨床材料から得られた cDNA マイクロアレイの解析結果は、既に公表されているものである。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現レベルの変動解析

本研究により発現レベルが低下する遺伝子として同定した *BASP1* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1) と *CPB2* (Carboxypeptidase B2) 遺伝子は、HCV RNA の複製が 2 年間継続する間に顕著に低下し、3.5 年間細胞を継代させるとさらに発現レベルが低下する。このような発現レベルの低下を引き起こす原因を明らかにすることを目的として、今年度は、まず、OL8 細胞の継代の際に経時的に保存してあった細胞を再度培養をして、このような発現低下が 2 年間の培養のどの時期で起こったのかを調べ

ることとした。再培養には、培養開始時、半年後、1 年後、1.5 年後および 2 年後に保存してあった細胞 [それぞれ OL8(0Y)、OL8(0.5Y)、OL8(1Y)、OL8(1.5Y) および OL8(2Y) と呼ぶ] を用いた。それぞれの細胞から調製した Total RNA を用いて、*BASP1* と *CPB2* mRNA のレベルを定量的 RT-PCR 法により調べた。

その結果、*BASP1* の mRNA レベルは、培養開始半年後で既に 1/16 程度に低下し、その後も時間とともに徐々に低下していくことが分かった。従って、HCV RNA の複製増殖による影響が加算的に生じていることが分かった。このような発現低下の経時的パターンとは異なり、*CPB2* の mRNA レベルは、培養開始半年後においては、ほとんど低下していないにも関わらず、半年～1 年後の間に急激に低下し、その後の低下はないという発現レベルの変動パターンが得られた。従って、*CPB2* 遺伝子の発現においては、HCV RNA の複製増殖が特定の時期のみ大きく影響を与えた結果ではないかと推測された。

このような発現低下はそれぞれの遺伝子 promoter 領域におけるメチル化や脱アセチル化による可能性が考えられる。この可能性を調べるために、OL8(3.5Y) 細胞に脱メチル化剤である 5-azaC を添加し、添加後 48 時間における両遺伝子の発現レベルの変化を定量的 RT-PCR 法により調べた。これと並行して、HDAC 阻害剤である 4-PBA でも処理し、その効果も同様に調べた。また、5-azaC と 4-PBA を併用した効果に

についても同様に調べた。その結果、*BASP1* 遺伝子の発現レベルは 5-azaC で処理した場合のみ、4 倍程度上昇して部分的に回復することが分かった。対照として用いた OL(OY)細胞においては、5-azaC による発現レベルの上昇は認められなかった。4-PBA 添加による発現上昇は 2 倍程度認められたものの、OL8(OY)や OL8(3.5Y)細胞で共に認められたので、OL8(3.5Y)細胞における発現低下を説明できるものではなかった。また、5-azaC や 4-PBA を併用した場合でも 5-azaC の効果のみが観察されたので、4-PBA の効果はほとんどないと判断した。

CPB2 遺伝子の発現レベルも 5-azaC の添加により 4 倍程度上昇して部分的に回復することが分かった。対照として用いた OL(OY)細胞においては、5-azaC 添加により発現レベルは逆に若干低下する傾向が認められた。4-PBA 添加による発現上昇は認められず、OL8(OY)細胞では発現低下傾向にあった。また、5-azaC や 4-PBA を併用した場合でも 5-azaC の効果のみが観察されたので、4-PBA の効果はほとんどないと判断した。従って、今回の解析では、両遺伝子の promoter 領域のメチル化が発現レベルの低下に関わっていることが示唆された。

(2) HCV-RNA の長期複製により発現亢進した遺伝子と肝病態の進展との関係

これまでの研究により発現レベルが不可逆的に変動するとして同定した遺

伝子が C 型慢性肝炎患者の肝病態の進展と何らかの関係があるのではないかと考え、今年度は発現亢進した 4 遺伝子について、その可能性を探った。過去の論文を検索した結果、C 型慢性肝炎患者 91 名 (いずれも HCV 遺伝子型 1b) の cDNA マイクロアレイの data (Honda et al. Gastroenterology, 139:499-509, 2010)が論文として報告されていることが分かった。そこで、この論文の著者である金沢大学医学部の金子周一先生と本多政夫先生との共同研究を行った。本研究によりこれまでに得られた HCV-RNA の長期複製で発現亢進した 4 遺伝子の発現レベルが、これら C 型慢性肝炎患者ではどの程度なのか、そして肝病態の進行との相関関係がないかどうかを検討した。

その結果、Misfold タンパク質の輸送に関与することが報告されている *SEL1L3*(Sel-1 suppressor of lin-12-like 3)の発現レベルが肝炎患者の肝線維化のステージが進むに従って上昇していることが分かった ($P < 0.001$)。また、肥満度を示す BMI についても、25 以上では、25 未満と比較して有意に発現レベルが高いことが分かった ($P = 0.0025$)。これらの結果から、*SEL1L3* 遺伝子の発現亢進は、肝の線維化や肥満化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

D. 考察

(1) *BASP1* と *CPB2* 遺伝子の発現レベルの変動解析

今回の解析により *BASP1* と *CPB2* 遺

伝子に生じた顕著な発現低下は DNA メチル化が少なくとも原因の 1 つであることが示唆される結果を得た。今回は 5-azaC の処理時間が 48 時間と比較的短時間であったので、今後、5-azaC の濃度や処理時間を変えて、さらに検討することにより発現レベルの回復がどの程度まで進むかを明らかにできるものと思われる。また、直接的証拠を得るために、OL8(0Y)と OL8(3.5Y)細胞から得た DNA にバイサルファイト処理を施し、両遺伝子の promoter 領域の sequencing によりどの位置のシトシン残基がメチル化を受けているかを明らかにする実験を行う予定である。これらの結果から、HCV-RNA の複製が長期に及ぶと転写に関わる特定の位置のメチル化が起こってくることを示すことができると思われる。このような遺伝子の発現低下が及ぼす影響(細胞増殖やがん化)については、両遺伝子が発現しているヒト不死化肝細胞を用いた解析モデルを今後構築する予定である。このようなモデルを用いることにより、HCV-RNA の持続的複製がどのような分子機序により特定の位置のメチル化を引き起こすかを明らかにできるのではないかとと思われる。

(2) HCV-RNA の長期複製により発現亢進した遺伝子と肝病態の進展との関係

今回の解析においては、HCV-RNA の持続的複製により発現が亢進する *SEL1L3* の発現レベルと肝の線維化ステージとの相関関係を明らかにした。今

後は、この遺伝子の発現亢進がどのような分子機序により起こるのかを解析する必要がある。また、この遺伝子の機能はあまりよく分かっていないので、過剰発現させた場合に細胞にどのような影響が生じるのかについても解析する必要がある。ヒト不死化肝細胞株を用いることにより、これらの解析が可能であると思われる。具体的には、細胞に過剰発現させた場合における肝線維化マーカー(コラーゲンなど)の量的変動の有無を調べることが可能であると考えられる。今後は、HCV-RNA の長期複製により発現が低下した遺伝子についても今回と同じような検討をして、肝病態の進行との関係を探る予定である。

E. 結論

今年度、以下に示した 2 項目の成果を得た。(1) Li23 由来の細胞において HCV-RNA の長期複製により不可逆的に発現レベルが低下する遺伝子として同定した *BASP1* と *CPB2* について、それらの発現が低下する時期を明らかにし、発現低下が DNA のメチル化によるものであることを明らかにした。

(2) HCV-RNA の長期培養により不可逆的に発現レベルが亢進する遺伝子として同定した *SEL1L3* について、その発現レベルの亢進と肝線維化の進展や肥満度に相関関係があることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 44:374-381 (2012).
- 2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85 (2012).
- 3) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431 (2012).
- 4) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio*, 2:279-283 (2012).
- 5) Marozin S, Altomonte J, Apfel S, Dinh P, Toni ED, Rizzani A, Nüssler A, Kato N, Schmid R, Pattnaik A, Ebert, O. Post-translational modification of VSV glycoprotein, but not JNK inhibition, is the antiviral mechanism of SP600125. *J. Virol.* 86:4844-4855 (2012).
- 6) 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.*, 56:1407-1413 (2012).
- 7) Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar. Drugs* 10: 744-761(2012).
- 8) 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.*, 47:195-202 (2012).
- 9) Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N,

Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis 1 C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge Amphimedon sp. PLoS One, 7:e48685 (2012).

10) Koike K, Takaki A, Kato N, Ouchida M, Kanzaki H, Yasunak T, Shiraha H, Miyake Y, Yamamoto K. Eradication of hepatitis C virus subgenomic replicon by interferon results in aberrant retinol related protein expression. Acta Med. Okayama, 66:461-468 (2012).

11) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 430:592-597 (2013).

2. 学会発表

1) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのゲノム複製が長期間に及ぶことで発現レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定. 第48回 日本肝臓学会総会、金沢、2012年6月.

2) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. 3年半にわた

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9個の宿主遺伝子の同定. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月.

3) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with Li23 cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

4) Hara Y, Yanatori I, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Ikeda M, Kishi F, Kato N, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

5) Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N, Ariumi Y. Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

6) Ariumi Y, Kuroki M, Inoue M, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. Dynamic regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV

systems. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

- 7) 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レベルに変動を来した宿主遺伝子の同定。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月。
- 8) 有海 康雄、黒木 美沙緒、井上 万里子、土方 誠、池田 正徳、脇田 隆字、下遠野 邦忠、加藤 宣之。P-body因子とHCVのクロストーク。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月。
- 9) 田中 寅彦、黒田 和道、豊澤 恵子、榎島 誠、池田 正徳、加藤 宣之。C型肝炎ウイルスNS4Bと脂肪滴との相互作用の分子機構。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月。
- 10) 葛西 宏威、河上 國洋、平田 有佳理、山下 篤哉、池田 正徳、加藤 宣之、岡本 徹、松浦 善治、森石恆司。HCV複製に関わる新規宿主因子FKBP6 : FKBP6はNS5Aと結合しHCV複製を制御する。第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
- 11) 田中 寅彦、黒田 和道、豊澤 恵子、脇田 隆字、池田 正徳、加藤 宣之、榎島 誠。C型肝炎ウイルスNS4Bと脂肪滴との相互作用。第85回日本生化学会大会、福岡、2012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