

## HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究

研究分担者 森 正樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学 教授

### 研究要旨

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対して、術後免疫抑制としてステロイドを使用しないステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始する preemptive インターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) を導入し、HCV 肝炎の再発予防を行ってきた。その結果、低用量 preemptive 抗ウイルス療法は肝移植後 HCV 肝炎再発予防に有効であり、さらにステロイドフリー免疫抑制法を併用することでより効果的であることが示された。

### A. 研究目的

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発は必発であり、他の原疾患による肝移植と比較して成績不良である。われわれは術後免疫抑制としてステロイドを使用しないステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始する preemptive インターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) を導入し、HCV 肝炎の再発予防を行ってきた。そこで、LDIR 併用療法の HCV 肝炎再発予防効果と安全性を検討する。

### B. 研究方法

1999 年より 2008 年の間に行われた成

人間生体肝移植 85 例中、HCV 肝炎陽性 31 例のうちで、ABO 不適合肝移植症例、HBV との混合感染症例、ステロイドを術中 1g のみ使用した症例を除く 28 例を対象とした。抗ウイルス治療は、術後肝機能が安定し次第速やかに低用量 (ペグインターフェロン  $\alpha$ -2b 0.5  $\mu$ g/kg/week+ ribavirin 400mg/day) より開始し、副作用に応じて増減を行い、HCVRNA が陰性化してから 48 週間投与を行った。免疫抑制剤はステロイドを全く使用しないステロイドフリー群 (F 群、n=17) とステロイドを漸減し 3 か月で終了するステロイド群 (S 群、n=11) を用いた。HCV 肝炎再発の診断は、肝機能異常、HCVRNA 陽性、および組織学的に A2 あるいは F2 以上と定義した。

## C. 研究結果

LDIR は 14 例 (50%) に施行しえた。LDIR が施行できなかった原因は、HCV 早期再発 6 例 (21.4%)、早期グラフト損失 4 例 (14.3%)、その他 (血小板減少、腎機能障害など) 4 例 (14.3%) であった。LDIR 治療導入率は、免疫抑制法別では F 群: 70.6%、S 群: 18.2% と F 群で高かった。28 例中 HCV 肝炎再発を 8 例 (29.6%) で、SVR は 9 例 (33.3%) に認められた。HCV 肝炎再発危険因子は、LDIR 施行 (P=0.001)、S 群 (P=0.026)、急性拒絶反応 (P<0.001) であった。

## D. 考察

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対する低用量 preemptive 抗ウイルス療法は、安全かつ有効性が期待できるが、今後は既存治療に抵抗性を示す症例についての検討が必要になる。その点より、提供者・移植者の IL28B SNIP に関する検討にくわえて、ITPA 遺伝子、またこれらに關与する分子生物学的な検討が今後の課題となる。

## E. 結論

低用量 preemptive 抗ウイルス療法は肝移植後 HCV 肝炎再発予防に有効であり、さらにステロイドフリー免疫抑制法を併用することでより効果的である。

## F. 研究発表

### [論文発表]

1. Marubashi S, Mori M, et al. Laparoscopy-assisted hybrid left-side donor hepatectomy. *World J Surg* 37(9):2202-2210, 2013
2. Kobayashi S, Mori M, et al. Evaluation of safety parameters and changes in serum concentration in liver transplant recipients treated with doxorubicin during the anhepatic period. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(6):1325-1333, 2013
3. Marubashi S, Mori M, et al. Hepatic artery reconstruction in living donor liver transplantation: risk factor analysis of complication and a role of MDCT scan for detecting anastomotic stricture. *World J Surg* 37(11):2671-2677, 2013

### [学会発表]

国際学会

1. Kobayashi S, Mori M, et al. Liver transplantation for alcoholic liver cirrhosis. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
2. Hama N, Mori M, et al. Protocol and outcome of ABO incompatible living donor liver transplantation. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
3. Wada H, Mori M, et al. Incidence and management of cytomegalovirus infection after living donor liver transplantation. 13th

- Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
4. Okubo K, Mori M et al. A case report of the living donor liver transplantation with difficulty in portal veins and hepatic arterial reconstruction. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  5. Tsuda Y, Mori M, et al. Liver transplantation with modified portal vein anastomosis for the patients with portal vein stenosis (PVS) or thrombosis(PVT). 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.

#### 国内学会

1. 和田浩志, 森 正樹,他. 肝移植後のサイロメガロウイルス感染症対策と現状. 第31回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
2. 小林省吾, 森 正樹,他. 教室におけるアルコール性肝硬変に対する肝移植. 第31回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
3. 濱直樹, 森 正樹,他. 当科の血液型不適合肝移植に対する周術期プロトコールと治療成績. 第31回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
4. 津田雄二郎, 森 正樹,他. 門脈再建困難症例に対する再建方法の適応についての検討. 第31回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
5. 津田雄二郎, 森 正樹,他. 肝移植後のサ

- イトメガロウイルス(CMV)感染症対策と現状. 第49回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
6. 濱直樹, 森 正樹,他. ABO不適合肝移植に対する周術期プロトコールと治療成績. 第49回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  7. 小林省吾, 森 正樹,他. 当施設におけるアルコール性肝硬変に対する肝移植. 第49回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  8. 和田浩志, 森 正樹,他. 門脈再建困難症例に対する再建方法の適応についての検討. 第49回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  9. 和田浩志, 森 正樹,他. 教室における脳死肝移植登録者と肝移植施行症例の検討. 第113回日本外科学会定期学術集会, 2013/4, 福岡.
  10. 濱直樹, 森 正樹,他. 成人肝移植術後長期経過例における腎機能障害の検討. 第113回日本外科学会定期学術集会, 2013/4, 福岡.
  11. 濱直樹, 森 正樹,他. 改正臓器移植法施行後の脳死肝移植の現状. 第68回日本消化器外科学会総会, 2013/7, 宮崎.
  12. 梶原淳, 森 正樹,他. 脳死肝移植における提供肝に関する当院での検討. 第68回日本消化器外科学会総会, 2013/7, 宮崎.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

## C型肝硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部  
プロテオームリサーチプロジェクト  
プロジェクトリーダー

### 研究要旨

定量プロテオミクスの手法を用いて、C型肝硬変、肝癌非発症サンプル5検体、C型肝硬変、肝癌発症サンプル5検体、正常肝サンプル2検体間のタンパク質発現の比較定量を行った結果、1833個のタンパク質が同定された。そのうち肝癌非発症/肝癌発症の発現比が2倍以上のタンパク質が34個、0.5倍以下のタンパク質が8個同定された。これらのマーカー候補タンパク質は、肝移植後C型肝炎に対する治療法の標準化に資する情報になると考えられる。

### A. 研究目的

近年、疾患プロテオミクスという新たな分野が開拓され、様々な疾患の原因やその診断マーカーを探索するために、主に質量分析計を用いたプロテオミクスの手法が取り入れられている。このような動向の背景として、安定同位体標識技術を用いた定量技術の開発、質量分析計の高感度化などの技術開発により、生体試料中のタンパク質を一度に数多く定量することが可能になったことが挙げられる。しかし、臨床サンプルについては、サンプル量に限界があること、サンプル間のばらつきが大きいことなど、代謝標識ができないこと、多検体解析に対

応する必要があること、など培養細胞や実験動物サンプルと比較して、プロテオーム解析に求められる難易度が高い。そこで本研究においては、定量的プロテオミクスの手法を駆使することによって、C型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプル間のタンパク質発現を大規模に比較定量し、肝移植後C型肝炎に対する治療法の標準化に資する情報を得ることを目的とする。

本年度は前年度までに構築した多検体臨床サンプルを用いたプロテオーム解析システムを用いて、C型肝硬変、肝癌非発症サンプル5検体、C型肝硬変、

肝癌発症サンプル5 検体、正常肝サンプル2 検体間のタンパク質発現の比較定量を遂行した。次項にその詳細を記す。

## B. 研究方法

### ① サンプルの破碎・タンパク質抽出・

#### サンプルの品質検査

京都大学病院にて手術を受けたC型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝炎硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプルを、粉末状に破碎後、Phase Transfer Surfactant 法を用いて抽出されたタンパク質に対してトリプシンで消化を行った。また抽出されたタンパク質は SYPRO Ruby 染色を行い、サンプルの品質検査を同時に行った。

### ② タンパク質の消化・安定同位体タグによるサンプルの標識

アミン特異的安定同位体標識タグである iTRAQ 試薬を用いて、タンパク質を消化した各サンプル中のペプチドを標識した。

### ③ 陽イオン交換カラムによる分画

標識ペプチドは、陽イオン交換カラム (ZORBAX 300SCX, Agilent) で 20 分画した後に C18 Stagetip を用いて脱塩濃縮し、液体クロマトグラフ質量分析に供した。

### ④ 液体クロマトグラフ質量分析・データ解析

LC (AMR, Paradigm)-MS/MS (AB Sciex, Qstar Elite) を用いて、各分画

中の標識ペプチドを分析した。データ解析は解析ソフト Mascot Daemon (version 2.3) でピーク情報の取得を行い、同定には Mascot (version 2.4) サーブエンジンを用いた。同定結果の統計処理には Proteome Discoverer (version 1.3) を用いて、ペプチド・蛋白質の偽陽性同定率が 1% 以下となるように解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学医学研究科による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出漏ることがないように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者の手術検体を用いた。

## C. 研究結果

C型肝炎硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝炎硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプルをプロテオーム解析した結果、合計して 1833 タンパク質を同定した。そのうち、C型肝炎硬変・肝癌非発症サンプルとC型肝炎硬変・肝癌発症サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 42 個、C型肝炎硬変・肝癌非発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 165 個、C型肝炎硬変・肝癌発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 223 個同定した。

## D. 考察

予想通り、C型肝硬変サンプルと正常肝サンプルでのプロテオームプロファイルは大きく異なる一方で、C型肝硬変、肝癌非発症・発症サンプル間の差は小さく、2倍以上の発現量の差が見られたタンパク質は42個（全体の2.6%）であった。これらの発現差のあるタンパク質は、肝癌非発症・発症を予測するマーカータンパク質としてのポテンシャルを有するとともに、発症機構解明の手がかりとなりうる。今後解析サンプル数を増やすことで、より精確に変動タンパク質群を特定することが期待される。

## E. 結論

臨床検体を用いたタンパク発現定量解析システムを用いて、C型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプル間で発現変動しているタンパク質群の同定に成功した。本研究で確立された手法は普遍的であり、様々な臨床検体を用いたバイオマーカー探索への貢献が期待される。

## F. 研究発表

### [論文発表]

1. Hideaki Kume, Satoshi Muraoka, Takahisa Kuga, Jun Adachi, Ryohei Narumi, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Yoshio Kodera, Kazuyuki

Matsushita, Junya Fukuoka, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, Hisahiro Matsubara, Fumio Nomura, Takeshi Tomonaga. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. Mol Cell Proteomics in press.

2. Takahisa Kuga, Hideaki Kume, Naoko Kawasaki, Misako Sato, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Isamu Hoshino, Takanori Nishimori, Hisahiro Matsubara and Takeshi Tomonaga. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I $\alpha$  and FAM83H in colorectal cancer. Journal of cell science, 126 (20), 4721-4731, 2013.
3. Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shio Watanabe, Tatsuo Murakami, Takahisa Kuga, Satoshi Muraoka, and Takeshi Tomonaga. Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. Journal of Proteome Research, 12 (6):2414-2421, 2013.
4. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Shio Watanabe, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, and Takeshi Tomonaga. In-depth Membrane Proteomic Study of

Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List.

Journal of Proteome Research, 12 (1), 208–213, 2013.

#### [学会発表]

1. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T, ATP Accessibility Screening (AAS), A High-Throughput and High-Resolution Kinase Analysis Platform for Signaling Research, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
2. Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T, Discovery and subsequent validation of biomarkers for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
3. Shiromizu T, Adachi J, Yagi S, Hoffman RM, Tomonaga T, Proteomic Analysis of Highly Invasive Colorectal Cancer Cells Established by Orthotopic Xenograft Mouse Model, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
4. Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, and Tomonaga T, Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhus Gastric Cancer Biomarker, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
5. Hashiguchi K, Muraoka S, Adachi J, Sato M, Kuga T, Watanabe R, Shiromizu T, Hashimoto Y, Nagano M, Kishida M, Tomonaga T, Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
6. Sato M, Adachi J, Tomonaga T, Quantitative Proteome Analysis with Isotope Dimethyl Labeling to Identify TGF-beta-mediated Tumor Proteins Using the Metastatic Mouse Breast Cancer Model, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
7. Watanabe R, Hashimoto Y, Kishida M, Matsubara M, Adachi J, Tomonaga T, Phospho-profiling of mTOR inhibitor-treated renal cell carcinoma (RCC) cell lines and its application for drug response-efficacy biomarkers, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan,

- 2013年9月14日-18日
8. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T, A Novel Mechanism of Keratin Cytoskeleton Organization Through Casein Kinase I Alpha and FAM83H in Colorectal Cancer: Interactome Analysis of FAM83H, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
  9. Sano S, Tagami S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T, Absolute quantitation of plasma biomarker peptides APL1b for Alzheimer disease at fmol/ml level using SRM, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
  10. Nagano M, Kuga T, Adachi J, Tomonaga T, A Kinase Activity-Estimating Method Using LC-MS/MS, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
  11. 朝長 毅:質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化、第11回 北里疾患プロテオミクス研究会、東京、2014年3月28日
  12. 久家 貴寿, 久米 秀明, 川崎 直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原 久裕, 齊藤 洋平, 中山 祐治, 朝長 毅: 大腸癌細胞における FAM83H と casein kinase I $\alpha$  を介したケラチン骨格制御機構の解明、第36回日本分子生物学会、神戸、2013年12月3-6日
  13. 朝長 毅:質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化への挑戦、第10回 千葉疾患プロテオミクス研究会、東京、2013年11月9日
  14. 白水 崇, 足立 淳, 八木 滋雄, 朝長 毅: マウス同所移植モデルによる大腸癌高浸潤性細胞のプロテオーム解析、第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月3-5日
  15. 村岡 賢, 久米秀明, 西塚 哲, 若林 剛, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅: 自己抗体ファージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索、第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月3-5日
  16. 足立 淳, 朝長 毅: ターゲットプロテオミクス~Beyond SRM~, 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月13日
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む)
- 該当なし



## 移植後ウイルス血症を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発

研究分担者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

### 研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染、増殖を制御する宿主因子を解析して、ウイルス血症が起こる機構を明らかにする事を目指した。ウイルス感染、ゲノム複製、粒子放出の過程で、特にウイルス感染初期過程について解析を進めた。これまでにウイルスの受容体として CD81, Claudin-1, SR-BI, LDLR などが知られているが、VLDLR もウイルス感染を促進する因子である事を見いだした。培養細胞 HuH7.5 では通常の状態では VLDLR を発現していない。しかし、低酸素条件にすると産生が誘導される事を見いだした。低酸素条件下培養で HCV 感染効率が増加した。

VLDLR が HCV 感染に重要である事は、VLDLR を発現する細胞を抗 VLDLR 抗体処理すると感染が阻害される事、VLDLR を発現していない HuH7 細胞に VLDLR を外来的に発現させると感染が増加する事から示された。また、VLDLR を介する感染は抗 CD81 抗体処理によっても低下しない事から、これまで明らかにされているものとは別の感染機構によるものと考えられた。生体内における酸素濃度が HCV の感染性を変化させると考えられる本実験結果は、ウイルス血症を引き起こす要因のひとつになり得ると考えられる。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝疾患増悪の結果肝移植を受けた患者の中には移植後に HCV が再活性化され、慢性肝炎を再発するようになる場合が多い。免疫抑制剤投与によるために、ウイルス増殖が許容される環境に曝されたためと考えられ、ウイル

ス血症を呈するようになる。近年インターフェロン、リバビリン以外にウイルスタンパク質の機能を直接抑制する薬剤(DAA)が上市されてきており、インターフェロンが使用できない場合でもウイルス血症を抑える選択肢が増えつつある。しかし、これらの薬剤も副作用の問題があるために、全て

の患者に有効とはいえないのが現状である。

HCV の感染、増殖には種々の宿主因子が関与している。その中でもウイルスの複製を積極的に抑制する宿主因子が明らかになれば、その因子の活性化を通して、ウイルス血症に対処することができる可能性がある。一方、ウイルス感染細胞の肝組織内環境の変化もウイルス産生に影響を与える可能性が高い。本研究では、生体内の肝組織の酸素暴露条件を培養細胞で模擬し、その条件下における HCV 感染を調べ、酸素分圧がウイルス感染に与える影響を調べた。

## B. 研究方法

HCV はヒト肝臓細胞に特異的に感染する。その際に、細胞膜表面に存在する数種類の蛋白質がウイルスの受容体あるいは感染促進作用を持つ。試験管内での HCV の感染、増殖を解析する方法として、HuH7.5 細胞への HCV クローンのひとつである JFH1 感染実験がある。この系は他の方法に比べ、感染効率、複製効率およびウイルス粒子放出効率が高いために、ウイルスの研究によく用いられているが、生理的条件下での感染、増殖を考える時に、この系が最適であるかは不明である。また、細胞の培養条件の違いでもウイルス感染性は変化すると考えられるので、試験管内での感染の解析には、細胞の培養条件の検討も重要な要因のひ

とつである。本研究では移植後にもたらされる HCV 血症の要因を明らかにする事を念頭においてあるので、試験管内感染系として出来るだけ生体に近い条件でのウイルス感染評価実験が望ましいと考えた。

その中でも、酸素分圧を変化させたときの HCV 感染変化を調べる事にした。生体における肝細胞は外部環境に比べ酸素分圧が低いので、低酸素環境下での培養時における感染の違いを調べる。特に、低酸素条件においたときの細胞表面分子の発現を調べ、その分子の発現と HCV 感染との関連性を調べる。

- (1) HuH7.5 を低酸素条件で培養し、ウイルス感染増殖性の違いを調べる。
- (2) 低酸素時において細胞表面に発現誘導される因子を明らかにする。そのために、マイクロアレイ等の解析を行う。
- (3) その因子と HCV 感染との関連を明らかにする。低酸素条件下で発現誘導される因子を強制的に発現させたときの HCV 感染の変化を調べる。
- (4) 得られる成果とウイルス血症との関連を考察する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

## C. 研究結果

- (1) 低酸素条件下において HCV 感染が亢進した。

HuH7.5 細胞を正常酸素分圧と低酸素分圧で培養し、その後 HCV 感染を行い、その 12 時間及び 24 時間後に細胞を間接免疫抗体染色法により、感染細胞を解析した。その結果、低酸素条件で培養した細胞において有意に感染細胞の増加が見られた。感染を定量的に評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ HCV (HCV/Luc) を感染させて感染評価を行ったところ、低酸素条件下では、通常の酸素分圧条件に比べて、約 3 倍の感染性を示した。

- (2) HuH7.5 を低酸素条件で培養すると VLDLR (very low density lipoprotein receptor) の産生が亢進した。

低酸素条件にする事による感染効率の増加が何に起因するかを調べるために、細胞表面の蛋白質の変化を調べた。これまでに HCV は膜表面のリポ蛋白質受容体と会合して感染するといわれているために、それらの遺伝子候補について低酸素条件で発現促進されるものを探索し、VLDLR を見いだした。VLDLR は正常の酸素分圧下では発現が検出できないが、約 5 % の酸素分圧下で培養すると発現誘導が見られた。

- (3) VLDLR を異所性に発現させた細胞において、HCV 感染は有為に亢進した。

低酸素条件下で発現誘導される VLDLR が HCV 感染を亢進する可

能性を調べるために、これまでに HCV 感染が成立しなく、かつ VLDLR の発現もない HuH7 細胞に VLDLR 遺伝子を外来的に発現させて、HCV 感染が成立するかを調べた。VLDLR を発現させないコントロール細胞に比べ、感染が有意に高くなった。

- (4) VLDLR 遺伝子をノックアウトした細胞では低酸素条件で培養しても HCV 感染の増加は見られない。

HuH7.5 細胞は低酸素条件下で VLDLR を発現誘導する。そこで、VLDLR 遺伝子を CRISPR によりノックアウトした細胞を構築した。この細胞を低酸素条件下で培養し HCV 感染させたが、有為な感染増加は見られなかった。一方、この細胞に VLDLR variant 2 を発現させると感染増加が観察された。

- (5) VLDLR を介した HCV 感染に CD81 は必要ない。

HCV 感染にはウイルス外膜蛋白質 E2 が CD81 と会合し、その後 Claudin1 等の働きにより、感染が成立するといわれている。VLDLR を介する感染においても CD81 が必要か否かを調べるために、CD81 発現のない HuH7.5(-CD81) を作成して、VLDLR による HCV 感染促進を調べた。その結果、VLDLR 依存的な感染には CD81 が必要ない事が分かった。

## D. 考察

低酸素条件下ではウイルスゲノム複製が亢進する。一方、本研究では、感染そのものが亢進する事を明らかにした。その際、低酸素条件下で発現誘導される VLDLR が感染を亢進する事が分かった。HCV 感染には、複数の宿主蛋白質が関与する事が知られている。その中でも SR-BI, LDLR などリポ蛋白質受容体が細胞への吸着に必要とされている。ウイルス粒子にはアポリポ蛋白質 E が会合しており、この蛋白質を除くと培養細胞 HuH7.5 へのウイルス感染性は極端に低下する。従って、SR-BI, LDLR 等は粒子に会合しているアポリポ蛋白質 E を介して吸着し、その後のウイルスの粒子侵入に寄与すると考えられている。一方、アポリポ蛋白質 E は VLDLR のリガンドとしても働く事が知られている。HuH7.5 は通常の培養条件では、VLDLR を発現していない。しかし、低酸素条件で培養すると発現が誘導される。そこで、低酸素条件下での HCV 感染をしらべたところ、感染効率が高くなる事を見いだした。VLDLR 遺伝子を外来的に発現させた細胞では、低酸素条件にしなくても感染の増加が観察された。CRISPR で VLDLR をノックアウトした HuH7.5 では低酸素条件下でも感染の増加は見られなかった。また、VLDLR の細胞質側領域を欠失させた分子を発現する HuH7.5 細胞も HCV 感染の増加は観察されなかった。以上か

ら VLDLR は HCV 感染に重要な宿主因子のひとつであると考えられる。なお、VLDLR 発現による HCV の感染増加には CD81 が必要でない事から、これまで報告された HCV 感染様式とは異なる感染機構が存在するといえる。

生体内における酸素分圧は組織により異なり、肝組織における分圧はおよそ 6% と推定される。培養細胞を用いた通常の酸素分圧下での HCV 感染が生体内にそのまま適用出来るとは限らない。移植後のウイルス血症も、HCV 感染機構の変化によりもたらされる可能性が考えられる。

## E. 結論

HCV 感染の分子機構を解析し、低酸素条件下で誘導される VLDLR 発現が感染促進因子として働いている事を明らかにした。この因子を介した感染は、CD81 を必要としないので、新たな感染経路であると考えられる。このような感染様式が生体内の低酸素条件下で存在し、ウイルス血症の要因のひとつになると考えられる。

## F. 研究発表

### [論文発表]

1. Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized

- Livers. Gastroenterology. 145: 658-667, 2013
2. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. J. Virol 87: 8169-8178, 2013
  3. 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(2) :592-597, 2013.

#### [学会発表]

1. 宇治野 真之、西辻 裕紀、清水 洋子、山本 裕美、鈴木 律子、月本 あつ子、日紫喜 隆行、高久 洋、下遠野 邦忠・低酸素培養条件下における新たな HCV 感染様式・第 61 回日本ウイルス学会学術集会・神戸国際会場・平成 25 年 11 月 10-12 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>上田佳秀</u>	既往感染例におけるHBV再活性化の実態と対策 ①肝移植	持田 智	de novo B型肝炎 - HBV再活性化予防のための基礎知識 -	医薬ジャーナル社	大阪	2013	176 (118-126)

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Muzuguchi A, Shimizu K, Hatano E, <u>Uemoto S</u> , <u>Chiba T</u> , Marusawa H	Leptin receptor somatic mutations are frequent in HCV-infected cirrhotic liver and associated with hepatocellular carcinoma.	Gastroenterology	146	222-232:	2014
<u>Ueda Y</u> , Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, <u>Chiba T</u> , <u>Uemoto S</u> .	Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation.	Transplantation	97	344-350	2014
Kikuchi M, Okuda Y, <u>Ueda Y</u> , Nishioka Y, Uesugi M, Hashimoto E, Takahashi T, Kawai T, Hashi S, Shinke H, Omura T, Yonezawa A, Ito T, Fujimoto Y, Kaido T, <u>Chiba T</u> , <u>Uemoto S</u> , Matsubara K, Masuda S.	Successful Telaprevir Treatment in Combination of Cyclosporine against Recurrence of Hepatitis C in the Japanese Liver	Transplant Patients. Biol Pharm Bull	37	417-423	2014

<u>Ueda Y</u> , Yoshizawa A, Y Ogura, Miyagawa-Haya shino A, Haga H, <u>Chiba T</u> , <u>Uemoto S</u> .	Plasma cell hepatitis induced by the termination of antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation.	Hepatol Res	(in press)		2014
Inuzuka T, <u>Ueda Y</u> , Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, <u>Uemoto S</u> , <u>Chiba T</u> , Marusawa H.	Reactivation from Occult HBV Carrier Status is Characterized by Low Genetic Heterogeneity with the Wild-type or G1896A Variant Prevalence.	J Hepatol.	(in press)		2014
Ohtsuru S, <u>Ueda Y</u> , Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, <u>Uemoto S</u> , <u>Chiba T</u> .	Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis.	J Clin Microbiol	51	3645-3652	2013
<u>Ueda Y</u> , Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Haya shino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, <u>Uemoto S</u> , <u>Chiba T</u>	Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation.	Plos One	8	e58380	2013
<u>Ueda Y</u> , Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, <u>Chiba T</u> , <u>Uemoto S</u>	Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living-donor liver transplantation:	Hepatol Res	43	67-71	2013



Takada Y, Kaido T, Asonuma K, Sakurai H, Kubo S, Kiuchi T, Inomata Y, Isaji S, Tsuruyama H, Teramukai S, Matsubara Y, Sakabayashi S, Uemoto S.	Randomized multicenter trial comparing tacrolimus plus mycophenolate mofetil with tacrolimus plus steroids among HCV-positive recipients of living donor liver transplantation.	Liver Transpl	19	896-906	2013
Takada Y, Uemoto S.	Living donor liver transplantation for hepatitis C.	Surg Today	43	709-714	2013
<u>上田 佳秀</u>	移植とウイルス肝炎	ウイルス肝炎の 新展開	101	1357-1362	2013
Kawaoka T, Takahashi S, Tatsukawa Y, Hiramatsu A, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Ishiyama K, Ide K, Tashiro H, <u>Ohdan H</u> , Chayama K.	Two patients treated with pegylated interferon/ribavirin/telapre vir triple therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation.	Hepatol Res.	In press		2014
Egawa H, Teramukai S, Haga H, Tanabe M, Mori A, Ikegami T, Kawagishi N, <u>Ohdan H</u> , Kasahara M, Umeshita K.	Impact of rituximab desensitization on blood-type-incompatible adult living donor liver transplantation: a Japanese multicenter study.	Am J Transplant.	14(1)	102-14.	2014
<u>Ohdan H</u> .	Is living donor liver transplantation really equivalent to deceased donor liver transplantation?	Transpl Int.	26(8)	778-9.	2013
Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, <u>Ohdan H</u> , Tzakis AG.	Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatis c effects of natural killer cells via interferon- $\gamma$ production.	Transplant Proc.	45(5)	2045-50.	2013

Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Attenuation of portal hypertension by continuous portal infusion of PGE1 and immunologic impact in adult-to-adult living-donor liver transplantation.	Transplantation	95(12)	1521-7.	2013
Morooka Y, Umeshita K, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Yamamoto M, Shimamura T, Oshita A, Kanno K, <u>Ohdan H.</u> , Kawagishi N, Satomi S, Ogawa K, Hagiwara K, Nagano H.	Reliability and validity of a new living liver donor quality of life scale.	Surg Today	43(7)	732-40.	2013
<u>大段秀樹</u>	State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery.	Frontiers in Gastroenterology.	18(3)	203-213.	2013
尾上隆司, 高橋祥一, 茶山一彰, <u>大段秀樹</u>	【肝移植-現状と展望】B型肝炎、肝硬変に対する肝移植	臨床消化器内科.	28(9)	1271-77.	2013
Takamura H, Nakanuma S, Hayashi H, Tajima H, Kakinoki K, Sakai S, Makino I, Nakagawara H, Miyashita T, Okamoto K, Nakamura K, Oyama K, Inokuchi M, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Ohnishi I, Kayahara M, Tani T, Arai K, Yamashita T, Kitamura H, Ikeda H, Kaneko S, Nakanuma Y, Matsui O, <u>Ohta T.</u>	Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by $\alpha$ -SMA positive cancer associated fibroblast.	Oncology Report	30	1561-1574	2013

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S.	Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57	1484-1497	2013
Hodo Y, Honda M, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S.	Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C.	Clin Cancer Res	19	1827-1837	2013
Yamashita T1, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S.	Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma.	Hepatology	In press		2014
Marubashi S, <u>Mori S</u> , et al.	Laparoscopy-assisted hybrid left-side donor hepatectomy.	World J Surg	37 (9)	2202- 2210	2013
Kobayashi S, <u>Mori S</u> , et al.	Evaluation of safety parameters and changes in serum concentration in liver transplant recipients treated with doxorubicin during the anhepatic period.	Cancer Chemother Pharmacol	72(6)	1325-1333	2013

Marubashi S, <u>Mori S</u> , et al.	Hepatic artery reconstruction in living donor liver transplantation: risk factor analysis of complication and a role of MDCT scan for detecting anastomotic stricture.	World J Surg	37(11)	2671-2677	2013
Kume H, Muraoka S, Kuga T, Adachi J, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Kodera Y, Matsushita K, Fukuoka J, Masuda T, Ishihama Y, Matsubara H, Nomura F, <u>Tomonaga T</u> .	Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis.	Mol Cell Proteomics	in press		2014
Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H and <u>Tomonaga T</u> .	A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I $\alpha$ and FAM83H in colorectal cancer.	Journal of cell science	126 (20)	4721-4731	2013
Shiromizu T, Adachi J, Watanabe S, Murakami T, Kuga T, Muraoka S, and <u>Tomonaga T</u> .	Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project.	Journal of Proteome Research	12 (6)	2414-2421	2013
Muraoka S, Kume H, Adachi J, Shiromizu T, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, and <u>Tomonaga T</u>	In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List.	Journal of Proteome Research	12 (1)	208-213	2013
Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, <u>Shimotohno K</u> , Chayama K, Hijikata M	Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers	Gastroenterology	145	658-667	2013