

- Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. *Hepatol Res.* 2014;44:837-845.
- 3) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Independent factors associated with altered plasma active ghrelin levels in HCV-infected patients. *Liver Int.* 2013;33:1510-1516.
- 4) Taniguchi E, Kawaguchi T, Sakata M, Itou M, Oriishi T, Sata M. Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: A data-mining analysis. *Hepatol Res.* 2013;43:418-424.
- 5) Sakata M, Kawahara A, Kawaguchi T, Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M. Decreased expression of insulin and increased expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens. *J Gastroenterol.* 2013;48:277-285.
- 6) Otsuka M, Uchida Y, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kawaguchi A, Kitani S, Itou M, Oriishi T, Kakuma T, Tanaka S, Yagi M, Sata M. Fish to meat intake ratio and cooking oils are associated with hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Hepatol Res.* 2012;42:982-989.
- 7) Kawaguchi T, Torimura T, Takata A, Satomi S, Sata M. Valine, a branched-chain amino acid, reduced HCV viral load and led to eradication of HCV by interferon therapy in a decompensated cirrhotic patient. *Case Rep Gastroenterol.* 2012;6:660-667.
2. 学会発表
- 1) 小野正文、川口巧、西原利治. CGMS から見た NAFLD と C 型慢性肝炎の耐糖能異常の特徴と比較検討、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.
- 2) 住江修治、川口巧、佐田通夫. ピオグリタゾンの HCV 関連肝細胞癌再発抑制における有効性の検討、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.
- 3) 天野恵介、川口巧、桑原礼一郎、緒方啓、宮島一郎、有永照子、井出達也、鳥村拓司、佐田通夫. HB s 抗原陽性肝癌患者におけるウイルス・宿主・環境因子の変化：2000 年～2012 年の年次推移、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.
- 4) 谷口英太郎、川口巧、鳥村拓司. NAFLD 患者の肝線維化進展に関連する因子：生活習慣や体組成を含めた包括的検討、第 104 回日本消化器病学会九州支部例会、大分、2014.
- 5) 谷口英太郎、川口巧、佐田通夫. 肝硬変患者における潜在性肝性脳症関連因子の包括的検討：データマイニング解析、第 40 回 日本肝臓学会西部会、岐阜、2013.
- 6) 川口巧、長尾由実子、佐田通夫. C 型慢性肝疾患患者における活性化グレリンの変化および代謝異常との関連、第 50 回日本臨床分子医学会学術集会、東京、2013.

7) 大津山樹理、伊藤実、末継拓郎、今永美波、石井久美子、緒方奨、谷口英太郎、川口巧、居石哲治、大塚百香、後藤恵美子、佐田通夫、三浦比呂子. 持続血糖モニタリングシステムと遊離脂肪酸によるC型肝硬変患者の就寝中栄養評価の有用性、第28回日本静脈経腸栄養学会学術集会、金沢、2013.

8) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Plasma Active Ghrelin Level Was Depleted and Associated With Serum Albumin Level in HCV-Infected Patients. The 10th Japan Society of Hepatology Single Topic Conference. Tokyo, 2012.

9) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Plasma Active Ghrelin Level Was Depleted and Associated With Serum Albumin Level in HCV-Infected Patients. The 63rd Annual

Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, 2012.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

分担研究報告書

HCV の感染性粒子産生に関与するアポリポ蛋白質

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨: VLDL 産生系に関わる宿主因子であるアポリポ蛋白質 A (ApoB) や ApoE 等の肝臓特異的因子が HCV の粒子産生に関わっていることが示唆されてきた。HCV の粒子産生における肝臓特異的因子の発現の意義を明らかにするために、AFP を産生する癌細胞株をスクリーニングし、HCV の感染性を評価した。その結果、肝細胞由来の JHH4 細胞と胃癌由来の FU97 細胞で肝細胞癌株と同等レベルで肝臓特異的な因子を発現しており、高い HCV の粒子産生能を保持していることが示された。さらにアポリポ蛋白質の役割を詳細に解明するために、ApoB と ApoE 遺伝子を同時に欠損させた Huh7 細胞を作製したところ、HCV の感染性粒子産生が顕著に抑制された。肝組織と Huh7 細胞でアポリポ蛋白質の発現を比較すると、Huh7 細胞では ApoB と ApoE 以外のアポリポ蛋白質の発現が肝組織よりも低いことが明らかになった。さらに、ApoB と ApoE 遺伝子のダブルノックアウト細胞に ApoA や ApoC を発現させると HCV 粒子の産生を回復できることから、ApoA や ApoC も粒子産生に関与することが示唆された。アポリポ蛋白質の 2 次構造解析から、HCV の粒子産生を可能にするアポリポ蛋白質には共通した両親媒性の α ヘリックスが存在し、この α ヘリックスの発現によっても、HCV 粒子の産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の α ヘリックスが HCV の粒子産生に関与することが示された。さらに、遺伝子型 1 や 3 と JFH1 とのキメラ HCV を用いても同様の現象が確認されたことから、各遺伝子型に共通して、感染性粒子産生にアポリポ蛋白質が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。HCV の感染環は様々な研究ツールの開発とともに徐々に解明されつつあるが、粒子産生機構については未だ不明な点が多い。HCV の感染環は様々な研究ツールの開発とともに徐々に解明されつつあるが、粒子産生機構については未だ不明な点が多い。これまでに我々は非肝臓系の細胞株である Hec1B や 293T 細胞に HCV-RNA の効率的な複製に必須な宿主因子である miR-122 を発現させることで、Huh7 細胞と同等レ

ベルの HCV-RNA の複製が得られることを示した。しかし、肝臓系の細胞株と異なり、非肝臓系の細胞株からは感染性のウイルス粒子が産生されないことが分かった。過去の報告で VLDL 産生に関わる因子である ApoB や ApoE が HCV の粒子産生に重要な役割を果たしていることが示唆されており、かつ非肝臓系の細胞株では、これらの因子がほとんど発現していないことから、VLDL 産生系が HCV の粒子産生において感染指向性を規定していることが予想された。今回、人工ヌクレアーゼを用いて ApoB および ApoE をノックアウトした Huh7 細胞を樹立し、HCV の粒子産生におけるアポリポ蛋白質の意義を検討した。

B. 研究方法

1) cDNA アレイデータベースを用いて AFP を高発現する癌細胞株を選択し、HCV の増殖と粒子産生能をリアルタイム PCR と感染価で評価した。

2) 人工ヌクレアーゼを In vitro で合成した mRNA を導入することで発現させ、細胞をクローニングし、遺伝子解析することによって ApoB または ApoE のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。同時に、ApoB および ApoE のダブルノックアウト

(DKO) 細胞も樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。

3) レンチウイルスベクターによって、種々のアポリポ蛋白質を発現させ、HCV の粒子産生に対する影響を検討した。アポリポ蛋白質の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 および ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞を作製し、HCV の感染性粒子産生における両親媒性の α ヘリックスの意義を検討した。

4) ウイルス粒子を超遠心によって精製し、アポリポ蛋白質のウイルス粒子への結合を検討した。遺伝子型 1 および遺伝子型 3 のキメラ HCVcc を作製し、アポリポ蛋白質によるキメラウイルスの感染性への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

1) 肝細胞特異的因子を高発現している

細胞株を cDNA アレイデータベースで検索したところ、肝癌由来の JHH4 細胞と胃癌由来の FU97 細胞が同定された。これらの細胞株では Huh7 細胞と同様に miR-122、ApoB、ApoE が高発現していた。さらに、HCV の複製だけでなく、感染性ウイルス粒子が効率よく産生された。以上の成績から、脂質代謝系関連遺伝子の発現によって、HCV の粒子産生が規定されていることが示唆された。

2) ApoE または ApoB のノックアウト細胞はワイルドタイプ (WT) の Huh7 と同等の感染性粒子の産生能を示したが、DKO 細胞では感染性粒子産生能が顕著に抑制されており、ApoB および ApoE が HCV の感染性粒子産生において、相補的な役割を演じていることが示唆された。

3) cDNA マイクロアレイの結果より、肝組織と Huh7 細胞におけるアポリポ蛋白質の発現パターンが大きく異なることが判明した。ApoB および ApoE の発現は同等であるにも関わらず、ApoA や ApoC の発現が Huh7 細胞で抑制されていた。そこで、HCV の粒子産生における ApoA や ApoC の役割を解析するために、DKO 細胞において ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討したところ、ApoE のみならず ApoA および ApoC によっても HCV の感染性粒子の産生が可能になることが明らかになった。

3) 種々のアポリポ蛋白質が共通した機能を保持する機構を明らかにするために、アポリポ蛋白質の 2 次構造を予測した。興味深いことに、HCV の粒子産生を可能にする ApoA、ApoC よび ApoE は共通した両親媒性 α ヘリックスを複数有することが明らかになった。さらに、ApoC1 および ApoE の単一の α ヘリックスを発現させた DKO 細胞においても、HCV の粒子産生能が回復していたことから、アポリポ蛋白質に存在する両親媒性の α ヘリックスが HCV の感染性粒子の産生に関与していることが示唆された。さらに、

超遠心にてウイルスを濃縮し、アポリポ蛋白質を検出したところ、ウイルス粒子とともに濃縮されたことから、ウイルス粒子にアポリポ蛋白質が結合していることが示唆された。

4) 遺伝子型 1 および遺伝子型 3 のキメラウイルスの粒子産生は ApoB および ApoE の共欠損によって、顕著に抑制されたことから、アポリポ蛋白質は JFH1 株のみならず、様々な遺伝子型の HCV 粒子産生に重要な役割を演じていることが示唆された。

D. 考察

1. HCV の完全な増殖を許容する新規細胞株、JHH4 と FU97 細胞を同定した。
2. ApoA、ApoB、ApoC および ApoE が両親媒性の α ヘリックスとウイルス粒子の結合を介して、HCV の感染性粒子の産生を可能にしていることが明らかとなった。
3. ApoA と ApoE はそれぞれ HDL および VLDL に高い特異性を持って結合するが、HCV 粒子産生においては、ApoA も ApoE も同様の機能を保持していた。今後は、アポリポ蛋白質がどのような機構で HCV の粒子産生に関わっているのかを明らかにしたい。

E. 結論

HCV の感染粒子産生にはアポリポ蛋白質に含まれる両親媒性の α ヘリックスが重要な役割を演じている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis

C virus particles. PLoS Pathogens 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. J Virol 2014; 88: 5578-5594
 3. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. J Virol 2013;87:489-502
 4. Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with HCV. J. Virol., 2012, 86, 7918-7933.
 5. Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. J. Virol., 2012, 86, 6159-6170.
 6. Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122. J. Virol. 2012, 86, 1382-1393.
 7. Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. J. Gastroenterol., 2012, doi:10.1007/s00535-012-0661-5.
 8. Moriishi K, and Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. Front. Microbiol., 2012, 3, 54, doi:10.3389/fmicb.2012.00054.
2. 学会発表
 1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada,

- Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
 3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
 4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
 5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
 6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリタンパク質受容体の役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスはHCVの感染性粒子産生に寄与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVのQuasispeciesは増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
 11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
 13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in

- Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014
14. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原 崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義, シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応: 膜内部でのタンパク質切断」、第86回日本生化学会、横浜、2013
 15. Okamoto T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus. Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics. Bethesda, 2013
 16. Matsuura Y. Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links”. Marsala, 2013
 17. Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. Infectious Diseases in Elderly Symposium. Izmir, 2013
 18. Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Tainan, 2013
 19. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、2013
 20. Fukuhara F, Yamamoto S, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University Park, 2013
 21. Okamoto T, Sugiyama Y, Ono C, Aizawa S, Ngoc PD, Kohwaki T, Hirooka E, Fukuhara T, Yamamoto M, Matsuura Y. Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
 22. Fukuhara T, Yamamoto S, Shiokawa M, Wada M, Ono C, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
 23. Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Yamamoto S, Wada M, Okamoto T, Okuzaki D, Matsuura Y. Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
 24. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV感染により誘導されるオートファジーの性状、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
 25. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本 聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7細胞における HCV 増殖、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
 26. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川 舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
 27. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関与する宿主因子第132回日本薬学会年会、札幌、3月28-30日、2012
 28. Yoshiharu Matsuura, Expression of miR122 and lipid metabolism determine the cell tropism of hepatitis C virus, 7th International Virus Assembly Symposium, Menorca, May, 13-17, 2012.
 29. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略～HCVの増殖を制御する宿主側因子について～: 第48回日本肝臓学会総会、金沢、6月7-8日、2012
 30. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Yoshiharu Matsuura, miR122 expression and lipid metabolism

- participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, Madison, July 21-25, 2012.
31. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 32. Mai Shiokawa, Takasuke Fukuhara, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of human liver-specific factors in a complete propagation of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 33. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 9月11日-14日, 2012
 34. Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Masaru Arimoto, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura. miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, October, 5-9, 2012.
 35. Takasuke Fukuhara, Hiroto Kambara, Mai Shiokawa, Yuri Ohara, Chikako Ono, Hiroshi Katoh, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura: miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 36. Yoshiharu Matsuura: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 34th Naito Conference, 札幌, 10月16日-19日, 2012
 37. 塩川 舞、福原崇介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 38. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 39. 福原崇介、塩川 舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性は miR-122 の発現と脂質代謝系によって規定される、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 40. 加藤大志、岡本 徹、福原崇介、寒原裕登、森田英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦善治、日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、11月12日-14日, 2012
 41. Yoshiharu Matsuura, miR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of hepatitis C virus infection: The 10th JSH Single Topic Conference, 東京, 11月21-22日, 2012.
 42. 塩川 舞、福原崇介、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生に関するヒト肝臓特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 43. 福原崇介、本村貴志、塩川 舞、小野慎子、寒原裕登、岡本 徹、調 憲、前原喜彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの細胞親和性における Quasispecies の意義、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日, 2012
 44. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本

徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

分担研究報告書

HCV 感染培養系による C 型肝炎関連肝がんと代謝因子の解析

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染培養系を用い、HCVによる代謝因子の変化とその分子機構を解析した。HCV感染肝細胞ではHNF-1 α の転写抑制とHNF-1 α 蛋白質のライソソーム依存性分解が促進され、1)GLUT2の発現抑制と2)L-FABPの発現抑制が起こり、糖代謝、脂質代謝異常に関与することが示唆された。HCV NS5AとHNF-1 α の結合にはNS5AのVal¹²¹、HNF-1 α のPOUsドメインが必須である。またNS5A阻害剤DaclatasvirがNS5A依存性HNF-1 α 分解を阻害し、HCVによる代謝異常を改善する可能性が示された。メタボローム解析では、HCV感染時には核酸合成の上昇、TCA回路を介したエネルギー獲得経路の抑制、アミノ酸変動を介した有機酸合成の促進が起こることが示された。また、肝細胞内の脂肪滴を調節する宿主因子の発現変化を解析したところ、Itchユビキチンリガーゼの活性化、Adipophilin蛋白質の減少を認めた。脂肪滴の足場蛋白Spartinの切断が脂肪滴増大化に関与す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、肝硬変、肝細胞癌を引き起こすだけでなく、代謝障害を引き起こし、肝がんの進展を促進させる。したがって、HCV感染に伴う代謝障害の対策および発癌抑制は、厚生労働行政上、重要な課題である。しかし、HCV感染による代謝障害の分子機構は未だ不明な点が多く、治療法は確立されていない。そこで、HCV感染培養系を用い、肝細胞の代謝因子の変化を誘導する分子機構を明らかにすることを目的に、1)HCV NS5AによるHNF-1 α の発現抑制機構、2)HCV感染に伴う代謝変化のメタボローム解析、3)脂肪滴増大化の分子機序の解析、4)HCV NS5Aに

よるHNF-1 α 標的遺伝子L-FABPの発現抑制と病態生理学的意義の解析を行った。

B. 研究方法

[平成24年度]

1)GLUT2プロモーターのHNF-1 α 結合モチーフ解析：HCV感染に伴うGLUT2プロモーター抑制における転写因子HNF-1 α 結合モチーフの重要性を解析した。HNF-1 α が結合し得る領域BS1, BS2, BS3に対する変異体MT1, MT2, MT3を作製したレポータープラスミドを作製し、HCV J6/JFH1感染Huh-7.5細胞でプロモーター活性を測定した。

2) NS5A上のHNF-1 α 結合領域の解析

N末端にHA-tagを付加したNS5Aの欠損変異体発現プラスミドを各種作製し、Huh-

7.5細胞に発現させ免疫沈降法によりNS5A上のHNF-1 α 結合領域を解析した。

3) HNF-1 α 蛋白質分解におけるROS産生の関与の解析: 抗酸化剤NACを用い、HCV感染によるHNF-1 α 蛋白質分解におけるROS産生の影響を解析した。

4) ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010 UltraによるHCV感染細胞のメタボローム解析: HCV J6/JFH1感染Huh-7.5細胞を経時的にサンプルを回収し、GCMS-QP2010Ultraで水溶性代謝物を測定した。

[平成 25 年度]

1) HCV感染によるJNK経路とItch活性および脂肪滴結合蛋白の解析: HCV J6/JFH1をヒト肝癌細胞株Huh-7.5細胞に感染させ、JNK, Itch, p-Itch (pT222), adipophilin蛋白質の発現レベルを比較した。

2) HCV感染による脂肪滴形成の変化
HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、脂肪滴形成を解析した。

3) HCV感染によるSpartinのプロセッシング
HCV感染細胞でのSpartinの泳動度の変化をウエスタンブロット法で解析した。

[平成 26 年度]

1) HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞でのLiver-type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP; 肝臓型脂肪酸結合蛋白)の発現レベルをreal time PCR法およびウエスタンブロット法で解析した。

2) HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンし、上清中の HCV 感染価を測定した。

3) HCV NS5A 上の HNF-1 α 結合領域を解析
NS5A 欠失変異体および点変異体を作製し

免疫沈降法で解析した。

4) HNF-1 α 上の NS5A 結合領域を HNF-1 α 欠失変異体を作製し免疫沈降法で解析した。

5) Huh-7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、HNF-1 α 分解誘導に対する NS5A 阻害剤 Daclatasvir の効果を解析した。

(倫理面の配慮)

取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。樹立された培養肝細胞を用いた実験を行っており、ヒトの遺伝子解析は行っていない。

C. 研究結果

[平成 24 年度]

1) HCV 感染による GLUT2 プロモーター抑制には HNF-1 α 結合モチーフ BS3(nt -1096~-1112)が重要であった。

2) HCV 感染により HNF-1 α のライソソーム依存性分解が促進された。この分解には HCV NS5A domain I が関与する。

3) 抗酸化剤の検討から、HCV NS5A による HNF-1 α 分解に ROS の関与が示唆された。

4) ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)でHCV感染細胞のメタボローム解析で、核酸合成上昇、TCA回路を介したエネルギー獲得経路抑制がみられた。糖原性アミノ酸変動を介した有機酸合成促進が示唆された。

[平成 25 年度]

1) HCV J6/JFH1感染に伴うJNK活性化、ユビキチンリガーゼItch活性化が見られた。

2) HCV感染に伴い、脂肪滴の増大傾向が見られた。

3) HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で

Spartinが2本に分かれ、NS3/4Aプロテアーゼによる切断が示唆された。

[平成26年度]

- 1) HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞で L-FABP の mRNA, 蛋白レベルが著明に減少した。
- 2) HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンすると、上清中の HCV 感染価が上昇した。
- 3) HCV NS5A 上の aa 121-126 が HNF-1 α 結合に重要で、NS5A Val¹²¹ が必須であった。
- 4) HNF-1 α 上の POU_s domain が NS5A との結合に重要であることが示唆された。
- 5) HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞に、Daclatasvir を投与すると NS5A による HNF-1 α の分解誘導が阻害された。

D. 考察

本研究において、HCV 感染肝細胞では HNF-1 α の転写抑制と HNF-1 α 蛋白質のライソソーム依存性分解が促進され、1) GLUT2 の発現抑制と 2) L-FABP の発現抑制が起こり、糖代謝、脂質代謝異常に関与することが示唆された。L-FABP は脂肪酸と結合し、脂肪酸を細胞内の脂肪滴、ペロキシソーム、ミトコンドリアに輸送する。L-FABP の発現量が著明に減少すると脂肪酸の輸送に障害が起こり、脂肪滴の貯留や肝脂肪化につながると考えられた。

HCV J6/JFH1 感染に伴う JNK 活性、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch の活性化が見られた。Spartin は脂肪滴にユビキチンリガーゼ (WWP1, WWP2, Itch など) を引き寄せ、Adipophilin をユビキチン依存性に分解して脂肪滴の大きさを制御することが知られており、Spartin の泳動度の変化が脂肪滴

形成に影響する可能性が考えられた。

Spartin のプロセッシングに HCV NS3/4A プロテアーゼが関与しているか今後明らかにする必要はある。

また、NS5A 阻害剤の Daclatasvir は HCV 複製を抑制し、HNF-1 α の量が回復し、NS5A-HNF-1 α を介した代謝異常に Daclatasvir が有効であることが示唆された。今後、臨床的に Daclatasvir 使用で糖脂質代謝が改善するか解析する必要はある。

E. 結論

- 1) HCV 感染による GLUT2 プロモーター抑制には HNF-1 α 結合モチーフ BS3 が重要。
 - 2) HCV による HNF-1 α のライソソーム依存性分解には HCV NS5A 蛋白質の domain I と HNF-1 α の相互作用が必須で、特に NS5A Val¹²¹、HNF-1 α POU_s domain が重要である。
 - 3) HCV NS5A 蛋白質による HNF-1 α 分解に ROS 産生の関与が示唆された。
- HCV 感染肝細胞では L-FABP の mRNA および蛋白レベルが著明に減少した。
- 4) NS5A 阻害剤 Daclatasvir が NS5A による HNF-1 α 分解を阻害した。
 - 5) GCMS-QP2010 Ultra によるメタボローム解析の結果、HCV 感染細胞の核酸合成の上昇、糖原性アミノ酸の変動を介した有機酸合成が促進していた。
 - 6) HCV J6/JFH1 感染に伴う JNK 活性、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch 活性化がみられた。
 - 7) HCV J6/JFH1 感染に伴う NS3/4A プロテアーゼによる Spartin の切断が示唆され、脂肪滴の増大に関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 2014, 9 (6): e98877.
- 2) Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, and Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58 (3): 188-94.
- 3) Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjijpto S, Fuchino H, Kawahara N, and Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58 (3): 180-7.
- 4) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21 (1): 1-16.
- 5) Mawatari S., Uto H., Ido A., Nakashima K., Suzuki T., Kanmura S., Kumagai K., Oda K., Tabu K., Tamai T., Moriuchi A., Oketani M., Shimada Y., Sudoh M., Shoji I, and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.
- 6) El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji, I., Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.
- 7) Matsui, C., Shoji, I., Kaneda, S., Sianipar, IR., Deng, L., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Virology*, 2012, 86 (23): 12903-11.
- 8) Shoji, I. Roles of the two distinct proteasome pathways in hepatitis C virus infection. *World Journal of Virology*, 2012, 1, 44-50.
- 9) El-Shamy, A., Shoji, I., El-Akel, W., Bilasy SE, Deng, L., El-Raziky, M., Jiang, D., Esmat, G., and Hotta, H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clinical Microbiology*, 2012, 50 (12): 3886-92.
- 10) El-Shamy, A., Shoji, I., Kim S-R., Ide, Y-

H., Imoto, S., Deng, L., Yoon, S., Fujisawa, T., Tani, S., Yano, Y., Seo, Y., Azuma, T., and Hotta, H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-Interferon/Ribavirin therapy. *PLoS One*, 2012, 7, e30513, 1-10.

2.学会発表

- 1) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 2) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 3) Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 6) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 7) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 8) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 9) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月25-27日, 2014年.
- 10) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression

- of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 11) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 12) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 13) Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 14) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 15) Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
 - 16) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV 感染による糖代謝障害の分子機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013 年 11 月.
 - 17) DENG Lin, 陳 明, 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
 - 18) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 湊野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) は C 型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
 - 19) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
 - 20) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

- 月.
- 21) 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. Venice, Italy, October 5-9, 2012.
- 22) 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. Venice, Italy, October 5-9, 2012.
- 23) 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. Venice, Italy, October 5-9, 2012.
- 24) 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. 大阪、2012 年 11 月 13-15 日.
- 25) 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構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月 13-15 日.
- 26) 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. 大阪、2012 年 11 月 13-15 日.
- 27) Deng Lin、勝二郁夫、堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機構の解析. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会. 神戸、2012 年 11 月 17 日
- 28) 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, 福岡、2012 年 12 月 11-14 日.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分担研究報告書

C型肝炎関連肝癌と代謝因子

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学医学部感染制御学 教授

研究要旨：C型肝炎とNASH(非アルコール性肝炎)における肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝の重要性が認識されている。今回胆汁酸代謝、腸管分泌ホルモンインクレチンの発癌抑制作用について検討し、UDCAは肝腫瘍マーカーであるSCD mRNAの抑制ならびに膵臓においてGLP1-R mRNA発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチンsignal増強をもたらす可能性が示唆された。一方DPP4 inhibitor はTGR5mRNA増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と補完的作用をもたらす可能性が示された。さらに併用によりVEGF発現抑制がもたらされることが示された。またHCV core蛋白発現細胞の検討からcore蛋白がCa uniporterを介して肝細胞ミトコンドリア内に鉄を輸送しミトコンドリア障害とFenton反応により間接的活性酸素を発生することを示した。

A. 研究目的

C型肝炎とNASH(非アルコール性肝炎)における肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝正常化の重要性が認識されている。特に肝臓で精製される一次胆汁酸はCholesterol代謝経路の一部をなすとともに、腸肝代謝ネットワークを形成するとともに近年腸管内細菌により生成された二次胆汁酸による発癌促進も報告されている。インクレチンも腸管分泌ホルモンであるが膵臓を介しインスリンが肝臓代謝に直接作用する一方、胆汁酸がTGR5を介し直接インクレチン分泌を促進するという報告もなされている(Thomas.Cell Metab. 2009 TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis) がその詳しい機序については不明である。今回

UDCA (ウルソ)、DPP-4inhibitorそれぞれの肝臓、膵臓、筋肉各臓器に対する代謝変化のデータを得ることによってウルソイン代表される日本が古くから有する薬剤による新たな脂肪肝、糖尿病、肝発癌抑制標的の探索を目指した。

またHCV core蛋白発現細胞を中心に鉄投与時酸化ストレス発生メカニズムを検討した。

B. 研究方法

3ヶ月齢C57/bl6 オスに対し通常食及び高カロリー食、また高カロリー食に(UDCA0.05%)、およびDPP-4阻害薬(0.0015%)配合食を3ヶ月間投与6ヶ月齢時にsacrificeし体重、肝臓/体重比、血清脂質、AST/ALT 血糖 インスリン 肝臓 膵臓脂肪細胞 膵臓についてmRNA

発現変化を含め検討した。またHCV core 蛋白発現細胞およびtransgenic mouse モデルを使用し鉄代謝変化と酸化ストレス発生機序を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理規定を順守し苦痛を与えることの無い様に配慮した。

C. 研究結果

高脂肪食で発現増加したFAS SREBP1などの肝臓内脂質代謝関連酵素は2種類の薬剤投与によっても有意な低下は認めないがUDCAのみSCD1mRNAを有意に低下させた。一方TGR5mRNAはDPP-4inhibitor群で増加を認めた。また膵臓においてGLP1-RmRNAがUDCAによって発現増加を認めた。脂肪組織においてはDPP-4inhibitorが高脂肪食で増加したTNF-alpha mRNAを減少させた。併用によって肝臓VEGF 発現抑制が示された。HCV core蛋白はCa uniporterを介してmitochondria 内への鉄輸送をもたらすmitochondria障害(膜電位変化)によりFenton反応を介して酸化ストレスをもたらすことが判明した。Ca uniporterの阻害薬により酸化ストレス産生は抑制された。

D. 考察

UDCAとDPP4inhibitor は併用により肝細胞癌抑制作用を有する可能性が示された。またHCV 発癌抑制薬剤の候補が得られた。

E. 結論

ウルソはTGR5 agonistとしての糖質、脂質の代謝にも関与し腸管循環のほかに

膵臓に対しインクレチン作用を増強する可能性が示唆された。またHCV coreによる酸化ストレス発生を抑制することによる肝発癌抑制の可能性が示された。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2014 Dec 27;282(3):237-243. PMID:25545986
- 2) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. **World J Gastroenterol.** 2014 Mar 21;20(11):3044-9. PMID:24659896
- 3) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. **Hepato Res.** 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID: 24224477
- 4) Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and

skin tumor development in mouse models.

Int Immunol. 2014 15.PMID:24569264

- 5) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. **Int J Cancer.** 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547.PMID:24174293
- 6) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. **Clin Infect Dis.** 2013 Oct;57(7):935-42. doi: 10.1093/cid/cit348. Epub 2013 May 23. PMID:23704123
- 7) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. **J Infect Chemother.** 2012 Dec;18(6):883-90. PMID:227603401.

学会発表

- 1) Hiroshi Yotsuyanagi, Yoshiyuki Watanabe, Hiroyuki Yamamoto, Ritsuko Oikawa, Shinji Tanaka, Masakazu

Yamamoto, Norihiro Kokudo, Kyoji Moriya, Shigeki Arai, Fumio Itoh and Kazuhiko Koike. Integrated hepatitis B virus DNA is epigenomically affected by the methylation status of the human genome. 11th Single Topic conference. Hiroshima 2014.

- 2) Takeya Tsutsumi, Kazuya Okushin, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Hiroshi Yotsuyanagi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike. Expression of Bnip3, a mitochondrial autophagy (mitophagy)-related gene, is decreased in cells expressing the core protein of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Banff, 2014
- 3) Masato Ogishi, Hiroshi Yotsuyanagi, Takeya Tsutsumi, Hiroyuki Gatanaga, Kyoji Moriya & Kazuhiko Koike. Next-generation sequencing revealed the prevalence of multi-genotype/subtypic multiple infection of hepatitis C virus in hemophiliac patients in Japan. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2014, Boston, 2014

ガイドライン

日常生活でウイルス肝炎の伝播を防止するためのガイドライン（一般の人向け）
集団の場における肝炎ウイルス感染予防ガイドライン作成のための研究班

正木尚彦、森兼啓太、森屋恭爾、八橋弘、
四柳宏 厚生労働省 2014年

The 2013 Italy-Japan Liver Workshop
Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular
arcinoma:molecular basis and clinical
links. “BCAA, steatosis and
hepatocarcinogenesis in HCV infection”

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

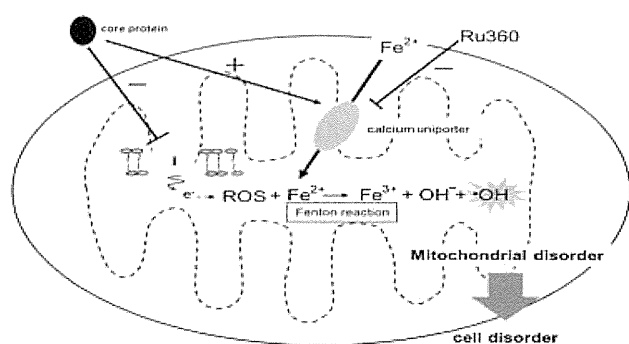
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Mitochondrial iron accumulation exacerbates
hepatic toxicity caused by hepatitisC virus
core protein. Toxicol Appl Pharmacol.より抜粋



肝臓

UDCA SCD1 発抑制

併用 VEGF 抑

制

DPP4 inhibitor TGR5 発現亢進