

201423014A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎から発がんに至る病態進展の 解明とその制御に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成27 (2015) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業
(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎から発がんにいたる病態進展の解明と
その制御に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成27(2015)年 3月

C型肝炎から発がんに至る病態進展の解明とその制御に関する研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系	教授
<u>研究分担者</u>		
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	教授
出澤 真理	東北大学大学院医学系研究科	教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部	教授
増富 健吉	国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野	分野長
日野 啓輔	川崎医科大学肝胆膵内科学	教授
加藤 宣之	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
堀田 博	神戸大学大学院医学研究科	教授
齋藤 英胤	慶應義塾大学薬学部	教授

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎から発がんに至る病態進展の解明とその制御に関する研究

金子 周一	-----	01
-------	-------	----

II. 分担研究報告

1. 遺伝子改変マウスの作製と病態解析、制御法の開発

金子 周一	-----	13
-------	-------	----

2. 遺伝子改変マウスの作成と病態解析

本多 政夫	-----	18
-------	-------	----

3. 病態進展と幹細胞との関連解析

出澤 真理	-----	25
-------	-------	----

4. 病態進展の病理学的解析と制御法の開発

坂元 亨宇	-----	29
-------	-------	----

5. ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼを標的としたがん幹細胞研究

増富 健吉	-----	32
-------	-------	----

6. C型肝炎ウイルスコアタンパクによるmitophagyの抑制

日野 啓輔	-----	35
-------	-------	----

7. HCVの長期複製により発現変動した宿主因子の細胞癌化に及ぼす影響 加藤 宣之	41
8. HCV NS5Aと宿主因子の相互作用及び細胞癌化に及ぼす影響の解析 堀田 博	50
9. HCVの長期持続感染により生じた宿主遺伝子異常と 代謝異常の細胞癌化に及ぼす影響 齋藤 英胤	57
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷	71

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

総括研究報告書

C型肝炎から発がんに至る病態進展の解明とその制御に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：本研究は慢性C型肝炎から肝細胞がんに至る病態を明らかにすることによって、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行うことを目的としている。線維化をきたすトランスジェニックマウスの実験から、治療の標的分子としてセマフォリン6a、およびピルビン酸キナーゼPKM2が抽出された。Muse細胞が肝臓の修復に寄与していることが示された。エラスチンは発がんリスクの指標として有用であり、Wnt/ β -catenin, LGR5に着目した典型的肝細胞がんが解析された。TERT-RdRP活性の阻害が抗がん戦略となるかについてRdRP阻害剤の探索が開始された。HCVがparkinを介してmitophagyに影響することが明らかとなった。HCVが長期に複製することによって生じる宿主遺伝子のうちCBP2遺伝子の発現低下とBASP1遺伝子の発現低下の機序が明らかとなった。SMYD3を新規のNS5A結合宿主因子として同定し、HCV NS5AはSMYD3と相互作用することによってMAP3K2のメチル化が増強され、AP1を介した転写を促進した。HCV持続感染培養細胞では代謝亢進状態を認め、Nrf2の標的遺伝子群が恒常的に活性化していた。

A. 研究目的

新しく開発されたC型肝炎ウイルス（HCV）治療薬は安全性と有効性に優れており、治療によって高率にHCVを排除すると考えられる。しかし、我が国におけるHCV感染患者数は多く、これからも多数のHCV関連肝がんの発生が予想される。

本研究は慢性C型肝炎から肝細胞がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

B. 研究方法、研究結果および考察

詳細は各研究者の報告とし、各研究者ごとに総括して記載した。

（倫理面への配慮）

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に従った。倫理面、実験手技に関して申請し承認を得た。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委

員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当該大学の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

・研究代表者（金子周一）

研究方法：線維化進展・肝発がんを示すPDGF-C TgのmiRNAプロファイリングを行い、肝病態の進行に伴って発現変化するmiRNAを同定した。さらに、miRNAのターゲット遺伝子を同定し、その遺伝子を過剰発現させることでPDGF-C Tgの線維化進展・肝発がんに及ぼす効果を解析した。

研究結果：PDGF-C Tgの肝組織のmiRNA発現をTaqManPCRアレイで網羅的に解析し、生後5ヶ月及び12ヶ月でWTマウスと比較し有意に発現上昇するmiRNAを9個、発現低下するmiRNA4個を同定した。そのうち、最も発現上昇する遺伝子はmiR-214であった。miR-214はC型慢性肝炎、及びB型慢性肝炎でも組織学的進展例で有意に高値を示した。miR-214の発現をLNA-antimiR-214を用いてヒト星細胞由来培養細胞（LX-2細胞）内で発現抑制するとpro-fibrogenic遺伝子の有意な発現抑制が認められた。また、LNA-antimiR-214によって、TGF- β 1によるSmad3のリン酸化が有意に抑制された。miR-214のターゲット遺伝子としてSemaphorin 6A（Sema6A）に注目した。miR-214は3' UTRを介してSema6Aの発現を制御していると考えられた。

Sema6Aの発現はPDGF-C Tg及びC型肝がん症例においてがん部において非がん部よりも発現量が低下し、さらに非がん部では正常肝よりも発現量が低下していた。Lx-2細

胞にSema6Aの過剰発現及び発現抑制を行うことにより、COL1A2、COL4A1、 α -SMAの発現が有意に減少及び上昇することを確認した。更に、マウス初代星細胞を分離しSema6Aの精製蛋白を添加することによって、COL1A2、COL4A1、 α -SMAの発現が有意に減少することを確認した。生後11月齢のPDGF-C TgにAAV8-Sema6aを感染させ21日後の肝線維化・肝腫瘍発生を解析した。AAV8-Sema6a感染マウスでは肝線維化の改善、肝重量の低下、腫瘍径、腫瘍数の有意な低下が認められた。また、COL1A2、COL4A1、 α -SMA、TGF- β 、CD34、AFP、Myc及びIL1 β の発現低下を認め、線維化、血管新生、がん化シグナルの低下が示された。Lx-2細胞を用いた検討ではSema6AはPKC α の発現抑制によりTGF- β によるSmad3、PDGFR β 及び α -SMAの発現誘導を抑制していた。またSema6AはHuh-7細胞でのStat3のリン酸化を抑制した。

考察：Sema6Aの線維化抑制・腫瘍発生抑制機序として、星細胞の活性化抑制、肝細胞のがん化シグナルの抑制が示唆される。今後、さらにSema6Aの線維化・腫瘍抑制の機序を明らかにするためには以下のような実験が必要と考えられた。

・研究分担者（本多政夫）

研究方法：動脈硬化高脂肪（Ath+HF）食をC57/B6マウス（WTマウス）及びHCVトランスジェニックマウス（HCV Tg）（Gastroenterology 2002）に与え肝脂肪化・線維化進行の評価を行った。また、筋型ピルビン酸キナーゼ pyruvate kinase, muscle（PKM）の肝線維化・肝がんにおけ

る意義について解析した。ペレチノイン投与前と投与中の肝組織の遺伝子発現から、肝がん再発に関連する遺伝子群を同定した。再発群で発現上昇する遺伝子として PDGF-C、Prom1(CD133) などに加え PKM (pyruvate kinase, muscle) の発現上昇が認められた。食餌性 NASH マウスモデル (Hepatology 2007) の系を用いて、動脈硬化高脂肪 (Ath+HF) 食を HCV Tg に与え、肝炎状態に於ける PKM2 の発現意義を解析した。更に、臨床検体、肝がん培養細胞を用いて肝がん組織に於ける PKM2 の意義を検討した。

研究結果：コントロール食では WT マウス及び HCV Tg 群で炎症・線維化シグナルに差は見られなかった。Ath+HF 食では HCV Tg で WT マウスに比し、TGF- β 、COLA1A、COLA4A1、CCL2、Vimentin 及び TNF の有意な亢進を認めた。PKM1/PKM2 の発現は Ath+HF 食を HCV Tg に投与した群で有意に高発現しており、免疫組織学的染色では肝の間質に多く発現していた。マウス肝がん組織及びヒト臨床検体でのがん部での PKM2 の発現は肝実質細胞や核で発現しており、非がん部とがん部での PKM2 の発現意義が異なっていると考えられた。

マウス初代星細胞を分離し、PKM1/PKM2 の発現をみると筋線維芽様細胞へ形質転換に伴い PKM1/PKM2 の発現上昇が認められた。また、ヒト星細胞由来培養細胞 (Lx-2 細胞) において PKM2 の発現抑制を行うと、線維化関連遺伝子の発現抑制が認められた。以上より、肝星細胞の活性化に伴い PKM1/PKM2 の発現上昇が認められることが明らかとなり、非がん部における

PKM1/PKM2 は肝線維化進行と関連していると考えられた。

がん部における PKM2 の発現は肝実質細胞や核であり、各種、肝がん培養細胞でも同様の知見が得られた。マウス xenograft モデルにて PKM2 の肝がん細胞での発現意義を解析した。PKM2-Sh-RNA を恒常的に発現する Huh-7 細胞を樹立し SOD/SCID マウスに移植した。PKM2 発現抑制により著明な腫瘍形成が認められた。PKM2 発現抑制により EpCAM や CD133 の発現低下が認められ、PKM2 は肝がんの幹細胞性維持に関与していると考えられた。

考察：PKM2 はがん細胞に於ける Warburg effect を担う解糖系の酵素として注目され、各種がん細胞での発現上昇が報告されている。正常肝では PKL の発現が優位であり、炎症・線維化進展に伴い、PKM1/PKM2 の発現が上昇し、肝がんでは PKM2 の発現が上昇すると考えられた。しかしながら、肝がん細胞株のなかでも PKM1 が過剰発現している細胞も認められ、PKM1/PKM2 の肝がんにおける役割について、更に解析する必要があると考えられる。

今回の検討で、炎症・線維化進展に伴い、PKM1/PKM2 の発現が上昇したことから、PKM をターゲットとした抗炎症・線維化治療の可能性が示唆される。また、マウス xenograft モデルの結果から、PKM2 が肝がん細胞に対する新たな治療標的となり得る可能性が示され、更なる検討が必要と考えられた。

・研究分担者 (出澤真理)

研究方法：SCID マウスの急性肝障害モ

デルとして腹腔内に四塩化炭素投与し劇症肝炎を作成する。ヒト骨髄由来 Muse 細胞を尾静脈に投与した。慢性肝障害モデルとして四塩化炭素投与を続け、平行してモデル作成開始からヒト骨髄由来 Muse 細胞を尾静脈から投与した。

研究結果：急性モデル（劇症肝炎モデル）：移植30日後、組織評価を行ったところ Muse 群では肝臓内にヒトゴルジ体、およびヒトミトコンドリア陽性のヒト Muse 細胞を示唆する細胞が $\sim 2\%/1\text{mm}^2$ 視野中の全細胞数として計測された。非 Muse 群では細胞の生着がほとんど見られなかった。Muse 群における生着した Muse 細胞は Hepparl, human albumin 陽性の肝細胞マーカー陽性細胞として肝臓内に生着していた他、Cytokeratin-7 陽性の胆管系細胞としても生着していることが確認された。血液中の総蛋白、アルブミン、ビリルビン、AST, ALT はそもそも、急性モデルでは9日ほどで自然に健常レベルに回復してしまうため、細胞移植による機能回復を計ることができなかった。慢性モデル（肝線維化モデル）：移植8週で評価を行ったところ、 $\sim 6\%/1\text{mm}^2$ 視野中の全細胞数のヒト Muse 細胞生着が確認された。一方非 Muse 細胞の生着はほとんど見られなかった。生着した Muse 細胞は HepPar-1, human albumin, human anti-trypsin を発現し、さらには機能的マーカーである human CYP1A2, human Glc-6-Pase の発現も確認された。機能においても統計的有意差を持って非 Muse 群、PBS 群と比較し Muse 細胞における総ビリルビン、アルブミンの回復が確認された。また Sirius red, Masson

trichrome 染色において線維化の有意な抑制が Muse 群で見られた。

考察：肝組織に生着した Muse 細胞は肝細胞のマーカーである Albumin, Hepparl を発現していた。一方非 Muse 細胞は移植の初期段階から肝臓での生着が見られなかった。このことから、傷害組織を認識する能力に Muse 細胞と非 Muse 細胞の間で差があることが示唆された。また Muse 細胞は多能性を持ち、肝細胞への分化能力を示すが非 Muse 細胞にはそのような能力が無いことが分かっている (PNAS, 2010; PNAS, 2011)。従って間葉系幹細胞の中で数パーセントを占める多能性の Muse 細胞は肝組織再建に直接寄与すると期待される。今後は機能評価がより明確な他のモデル（脂肪肝、慢性肝硬変モデルなど）によって機能的評価を行うことが必要であると考えられた。

・研究分担者（坂元亨宇）

研究方法：肝線維化の定量と発がんリスク評価をする目的で生検標本における膠原線維・弾性線維定量とリスク評価を行った。がん関連遺伝子異常・シグナル伝達異常と発がん・進展を評価する目的で Bmi-1, c-Myc の発現亢進・動態解析を行った。また、幹細胞マーカー発現と発がん・進展をみる目的で、Wnt/ β -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞がんの発生進展機構解析を行った。各種幹細胞マーカーの発現パターンの解析と上記遺伝子変異・シグナル伝達異常との関連性を検討した。

研究結果：C型慢性肝炎肝生検標本を EVG 染色後デジタル化し、コラーゲンとエ

ラスチンの定量的な解析を行った。各線維成分の組織占有率は、F ステージと相関することが示された。特にエラスチンはコラーゲンに比して後期に蓄積を認め、F3, F4 の鑑別に有用である事が示された。さらに、発がんの有無との比較解析を行い、エラスチンが発がんリスクの指標として有用であることを示した。特に線維化進展例においては、独立したリスク因子であることが示された。

Wnt/ β -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞がんの発生進展機構解析では、 β -catenin の遺伝子変異は約 40%と、C 型肝炎を背景とする肝細胞がんでも最も高率に見られる。まず、OATP1B3 が EOB-MRI の肝細胞相における腫瘍の増強効果と最も強く相関するトランスポーターである事を示した。次に、OATP1B3 の発現が、Wnt/ β -catenin 標的遺伝子群の発現との間に強い関連がある事を示した。また、ヒト肝細胞がん株 KYN-2 細胞に LiCl 処理を行う事で、Wnt/ β -catenin signal の活性化が見られると共に OATP1B3 の遺伝子発現が上昇することを *in vitro* において示した。さらに、EOB-MRI の肝細胞相において増強される腫瘍を検出することにより、Wnt/ β -catenin activated HCC を、感度 78.9%、特異度 81.7%で予測できることを示した。

考察：エラスチンは、独立した発がんリスク因子となることが示されたが、SVR 後の発がん予測への有用性の検討など、その意義についてより多数例での解析が望まれる。OATP1B3 陽性肝細胞がんは、Wnt/ β -catenin activated subclass に属することが示され、MRI にてその診断の可能性が

示された。Wnt/ β -catenin activated subclass は、Biliary/stem cell marker positive subclass と異なるサブクラスに分類されることから、悪性度の予測に有用と考えられた。

・研究分担者（増富健吉）

研究方法：既に同定していたRdRP特異的阻害作用を有するエリブリンに対する感受性とTERT発現量の相関の検討を行った。TERTの発現量を規定するとされているTERTプロモーター領域の変異の有無の検討を肝細胞がん株を用いて行った。

研究結果：14種類の卵巣がん細胞株を用いた検討ではTERT発現量が多い細胞のほうがTERT-RdRP活性阻害作用をもつエリブリンに対する感受性が高いことが見出された。5種類の肝細胞がん細胞株を用いた検討では、3種類の細胞株でTERTプロモーター領域の変異が見出された。

TERT発現量とエリブリンに対する感受性に相関が認められたことより、がん種を問わず、TERT高発現群に対するTERT-RdRP阻害剤であるエリブリン投与という治療戦略の可能性が示唆された。肝細胞がん患者では約7割程度にTERTプロモーター領域の変異が同定され、TERTプロモーター領域の変異はTERT発現量の増加に繋がること示唆されていることより、肝細胞がんにおけるTERT-RdRP阻害による治療戦略の展開が有望であることが推測される。本研究でも、肝細胞がん細胞株5種類中3種類にTERTプロモーター領域の変異が見出された。

考察：今後は、これらの細胞株を用いて、hTERT発現量、RdRP活性、RdRP阻害剤への

感受性の検討を行うことで、肝細胞がんにおける TERT-RdRP 活性阻害剤を用いての治療戦略の意義が明確となると考えられた。

・研究分担者（日野啓輔）

研究方法：HCV-JFH1 感染 Huh7 細胞、HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス（HCV TgM）ならびに HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス（HCV-Chimera）を用いて mitophagy 制御分子の解析を行った。

研究結果：ミトコンドリア障害により引き起こされる Type 2 mitophagy では E3 ubiquitin ligase である Parkin が PINK 1 によりリン酸化されてミトコンドリア外膜へ局在し、ミトコンドリアを autophagy 経路により分解する。JFH1 感染細胞ならびに HCV TgM と HCV-Chimera の肝組織では Parkin のミトコンドリア局在が有意に抑制された。更には siRNA で PINK 1 をノックアウトすると Parkin のリン酸化ならびにミトコンドリアへの局在は抑制された。次に、Parkin のミトコンドリアへの局在が抑制された原因を明らかにするために、Parkin と HCV タンパクとの結合を検討したところ共免疫沈降では Parkin と HCV コアタンパクの結合を認めた。HCV コアタンパクは Parkin の N 端側（215 個のアミノ酸）のみと結合した。HCV コアタンパクと Parkin の結合は HCV 増殖に有利に作用していると考えられた。CCCP による mitophagy 誘導後 JFH1 感染細胞は非感染細胞にくらべて VDAC1 ならびに p62 のユビキチン化が明らかに抑制された。JFH1 感染細胞では非感染細胞に比べて LC3-II タ

ンパクの発現が有意に高かった。また、免疫電子顕微鏡による観察では、JFH1 非感染細胞に mitophagy を誘導するとミトコンドリア外膜上に Parkin の局在が確認され、またミトコンドリアを被う隔離膜上に LS3 の局在が確認された。mitophagosome の数は JFH1 感染細胞で有意に少なかった。障害ミトコンドリアの消化の指標として CCCP 処理後の p62 と VDAC1 の発現量を検討した。JFH1 感染細胞および HCV TgM と HCV-Chimera の肝組織においては CCCP 処理後の p62 の減少はコントロールに比べて有意に小さかった。同様に、CCCP 処理後の VDAC1 の減少も有意に小さかった。

考察：今回の成績は、HCV コアタンパクが Parkin の N 端側領域と結合することで Parkin のミトコンドリアへの局在が抑制され、それより下流の mitophagy のシグナル（ミトコンドリアのユビキチン化、mitophagosome の形成、mitophagosome の消化）がすべて抑制されることを示している。障害されたミトコンドリアが mitophagy によって消化されることが抑制されることを意味しており、HCV 感染における持続的な ROS 産生、酸化ストレスの増幅を引き起こす重要な機序と考えられる。Mitophagy はミトコンドリア DNA の変異を抑制することが報告されており、一方ヒト HCV 関連肝細胞がん組織のがん部・非がん部においてミトコンドリア DNA の変異が蓄積されているという報告も考慮すると、HCV コアタンパクによる mitophagy の抑制は酸化ストレスを介した肝発がん機構の観点からも重要な病態であると考えられた。

・研究分担者（加藤宣之）

研究方法：OL8 細胞等に脱メチル化剤である 5-azacytidine (5-azaC) (2.5-10 μ M) を添加して、1 週間後に細胞から Total RNA を調製した。OL8 細胞等から抽出調製した DNA を用いて PCR により調製し BASP1 と CBP2 遺伝子の転写開始点上流約 2 kb と転写開始点下流 100 base ほどを含む DNA フラグメントから、DNA フラグメントを PCR で調製して導入した。DNA の Cytosine を Uracil に変換した。BASP1 と CBP2 遺伝子プロモーター領域近傍を増幅した。増幅産物をクローニングし塩基配列を決定した。それぞれの部位でのメチル化度を算出した。OL8 細胞等から調製した Total RNA とタンパク質抽出物を用いて、目的とする mRNA の定量を RT-PCR 法により、目的とするタンパク質の検出についてはウェスタンブロット法により解析した。

研究結果：5-azaC の濃度を 2.5 μ M と 10 μ M とし、OL8(0Y)、OL8(2Y) および OL8(4Y) 細胞を用いて検討した。その結果、5-azaC で 1 週間処理すると、OL8(2Y) と OL8(4Y) 細胞における CBP2 mRNA のレベルは、OL8(0Y) 細胞におけるレベルの 50% 以上に回復することが分かった。CBP2 の発現低下は、DNA のメチル化により引き起こされていることが示唆された。HNF1 が CBP2 遺伝子プロモーターの制御因子であるかどうかの検討を行った。その結果、CBP2 遺伝子プロモーターは完全に HNF1 により制御されていることが再確認された。CBP2 遺伝子の発現低下に HNF-1 α や HNF-1 β が直接関与していないことが示唆された。

BASP1 遺伝子の発現レベルは OL8 細胞の

培養開始後、経時的に徐々に低下することを示した。BASP1 についても、5-azaC の濃度を上げて 1 週間処理すると、5-azaC で処理された OL8(2Y) と OL8(4Y) 細胞における BASP1 mRNA のレベルは、未処理の細胞における mRNA レベルと比較して、それぞれ 4 倍程度発現レベルの上昇が観察された。BASP1 遺伝子がどのような宿主因子により制御を受けているかを明らかにするために、遺伝子プロモーターの責任領域の同定作業を CBP2 の場合と同様の手法により行った。OL8(2Y) 細胞においても OL8(0Y) 細胞と同様プロモーター活性の大部分は -206 から -50 の間に存在すること、そして、-150、-100、-50 と短くしていくことにより段階的にプロモーター活性が減弱していくことが分かった。

OL8(0Y) と OL8(2Y) 細胞の BASP1 遺伝子プロモーター領域の CpG のメチル化度について、CBP2 の場合と同様に調べた結果、OL8(2Y) 細胞でも、OL8(0Y) 細胞に比べて、このプロモーター近傍のメチル化度は高くなっていることが分かった。OL8(2Y) 細胞に 5-azaC (10 μ M) を添加して 1 週間経過した細胞における BASP1 プロモーター領域のメチル化度についても解析し、メチル化度の低下を確認できた。それにも関わらず、BASP1 の発現レベルの回復が認められなかったことから BASP1 の発現レベルの低下はメチル化以外の分子機序により生じていることが示唆された。

考察：現在までのところ、HCV の長期複製により影響を受けたと思われる細胞の形質変化は見出されていないが、今後は、各種シグナル伝達系（インターフェロン系、

TGF- β 系、IL-6系、EGF系など)における変化について検討する予定である。CBP2遺伝子の発現低下は脱メチル化剤で誘導される HNF1 以外の未知の宿主因子により、この遺伝子の発現低下が引き起こされていることが予想される。

CBP2 遺伝子の発現レベルの低下と肝病態の進展(線維化や脂肪化)に相関関係があることが慢性C型肝炎患者で認められているので、CBP2 が何らかの役割を担っている可能性がある。BASP 遺伝子の発現低下の大部分は、プロモーター領域のメチル化によるものではなく、メチル化以外の分子機序によるものであることが分かった。その1つの可能性としては、ヒストン脱アセチル化による影響が考えられた。

・研究分担者(堀田 博)

研究方法: HCV J6/JFH-1 株を Huh7.5 細胞で長期間継代培養した適応変異株(HCV J6/JFH1-P47 株)を用いた。他に、HCV 全長ゲノム RNA が自律複製する HCV フルゲノムレプリコン細胞も用いた NS5A 及び SMYD3 の全長ならびに欠失変異タンパク質を発現するプラスミドを用いて Huh7.5 細胞に一過性に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により、両者の結合に必要な領域を解析した。NS5A の全長及び欠失変異タンパク質ならびに全長 SMYD3 を発現するプラスミドを用いて Huh7.5 細胞に一過性に共発現させ、NS5A 及び SMYD3 の細胞内局在の変化について、蛍光抗体法により解析した。精製 SMYD3 あるいは SMYD3 過剰発現細胞の抽出液と精製 MAP3K2 を、S-[methyl- ^{14}C]-adenosyl-L-methionine 存在

下で混合し、SMYD3 による MAP3K2 メチル化反応を行った。メチル化 MAP3K2 は特異抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。AP1 応答エレメントをプロモーター配列に有するルシフェラーゼレポータープラスミドを細胞にトランスフェクトし、細胞抽出液を回収して、ルシフェラーゼアッセイにより AP1 を介した転写量を測定した。発現プラスミドにより SMYD3 を過剰発現し、あるいは、siRNA により SMYD3 をノックダウンして、HCV ライフサイクルの各段階について、リアルタイム PCR、免疫ブロット法、培養液中のウイルス感染価測定法により解析した。免疫共沈法により NS5A と SMYD3 の結合領域について検討した。

研究結果: NS5A のドメイン 2+3 は、全長 NS5A と同程度に顕著に SMYD3 と共沈した。一方、NS5A ドメイン 1+2 は SMYD3 とわずかに共沈するのみであった。SMYD3 に関しては、HCV フルゲノムレプリコン細胞を用いた解析により、SMYD3 の N 末端 48 アミノ酸(aa)からなる N-SET ドメインを欠失すると NS5A との共沈が有意に低下した。さらに MYND ドメイン(49~87aa)まで欠失すると、NS5A との共沈はさらに有意に低下し、わずかに共沈が認められるのみであった。

NS5A の欠失変異体を発現させて、SMYD3 の核移行の阻害に NS5A のどのドメインが関与しているかを調べた。その結果、NS5A のドメイン 2+3 及びドメイン 3 単独が、全長 NS5A と同程度に、SMYD3 の核移行を阻害することがわかった。

精製 MAP3K2 を基質として、精製 SMYD3 と S-[methyl- ^{14}C]-adenosyl-L-methionine

(SAM)を加え、SMYD3によるMAP3K2メチル化反応を行った。特異抗体を用いた免疫ブロット法によりメチル化MAP3K2を検出し、本 *in vitro* メチル基転移酵素活性アッセイ系が機能していることを確認した。

次いで、SMYD3あるいはNS5Aをそれぞれ単独で発現する細胞、SMYD3+NS5Aを共発現する細胞及び非発現対照細胞から抽出液を回収し、それを用いてMAP3K2を基質として *in vitro* メチル化反応を行い、免疫ブロット法によりメチル化MAP3K2の量を測定した。その結果、SMYD3によるMAP3K2のメチル化はNS5Aの共存下で有意に増強することが明らかになった。

SMYD3単独、NS5A単独あるいは両者の共発現細胞と非発現対照細胞に、AP1応答エレメントを有するルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクトし、AP1を介した転写の程度を比較検討した。その結果、SMYD3+NS5A共発現細胞では、AP1を介した転写が有意に増強した。

一過性発現プラスミドによるSMYD3過剰発現細胞及びsiRNAによるSMYD3発現低下細胞において、HCV RNA複製、HCVタンパク質合成、HCV粒子形成・放出は、対照細胞に比べて有意な差異は認められなかった。

SMYD3のN末端87aa領域(N-SET+MYNDドメイン)がNS5Aとの結合に重要であることが明らかになった。SMYD3の細胞内局在については、NS5Aのドメイン2+3とドメイン3単独が、全長NS5Aと同程度に、SMYD3の核移行を阻害した。SMYD3のMAP3K2メチル化活性の測定系を構築し、これを用いて、SMYD3によるMAP3K2のメチル化にNS5Aがどのような影響を及ぼし

ているかについて解析した。その結果、NS5AはSMYD3との相互作用を通して、SMYD3によるMAP3K2のメチル化を促進し、その下流に位置するAP1を介した転写を促進することが明らかになった。

考察：MAP3K2はRasがんタンパク質による発がんシグナルを促進することが最近報告された。今回我々が見出したNS5AによるSMYD3介在性MAP3K2メチル化の促進及びAP1を介した転写の促進は、HCVによる肝発がん機構を考える上で興味深い知見であり、今後更に詳細に解析を進める予定である。

・研究分担者（齋藤英胤）

研究方法：Nrf2遺伝子による代謝およびHCV感染の影響を調べるために、Nrf2遺伝子に対するsiRNAを培養肝細胞へトランスフェクションしNrf2のノックダウン実験を行った。RT-PCRを用いたRNAの定量的、判定的測定、及びウエスタンブロットングによる蛋白質の発現解析を行った。また、蛍光免疫染色によって局所的な発現解析を行った。転写産物の包括的な発現解析はマイクロアレイ法で解析した。細胞内の脂質代謝を包括的に解析するためにLC-TOFMS解析(Human metabolome tech.)を行った。また、水溶性代謝産物の代謝を包括的に解析するためにCE-TOFMS解析(Human metabolome tech.)を行った。Nrf2がHCV持続感染と細胞増殖に与える影響をみるために、Nrf2 siRNAによるNrf2標的遺伝子のノックダウンを行った。

研究結果：mRNAレベルでは、Nrf2の減少及びその標的遺伝子、NQO1やG6PD遺伝子の

発現の低下も認められ、ノックダウンの効果を確認された。また、その効果はその標的遺伝子の蛋白レベルの発現低下においても確認された。Nrf2ノックダウンにより全般的に脂肪滴成分の減少が認められ、特に、脂肪滴の主成分であるtriacyl-glycerolの低下が著明であった。Nrf2ノックダウンによる持続感染HCV量への影響を観察したところ、RT-PCRではすべての領域でHCV RNA量の減少が認められた。

Nrf2ノックダウンにより感染HCV (core、NS5A) の減少と脂肪滴の減少とが同時に観察された。以上の結果からNrf2のノックダウンはHCV感染細胞における脂肪滴の減少と持続感染HCV量の低下を来した。

非感染のHuh7. 5細胞でもノックダウンにより細胞増殖が抑制されたが、HPI細胞では有意に増殖抑制が認められた。Nrf2はHCVの複製よりもウイルスの持続感染維持に働いていると考えられた。

Nrf2をノックダウンしてどの遺伝子が変動するかをマイクロアレイ法で解析した。ノックダウンにより全体的に遺伝子発現は低下したが、なかでも代謝に関連した遺伝子が61と最も多かった。また、細胞増殖/アポトーシス、抗酸化ストレスに関与するものも多かった。

代謝異常を背景とした発がんリスクに対する血清の代謝産物マーカーの候補を探索する目的で、HPI細胞の培養上清を用いたメタボローム解析を行った。アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フマル酸、アラニンなどのアミノ酸の量はHPI細胞の細胞内のみならず培養上清においても著明に増加していた。コレステロールの前駆体

であるデスモステロールの量はHPI細胞の細胞内のみならず培養上清においても著明に増加していた。

考察：HPI細胞において、転写因子Nrf2の標的遺伝子の発現が亢進していたことから、この細胞における代謝異常の背景に転写因子Nrf2が関与している可能性が強く示唆された。Nrf2のノックダウンによりHCV持続感染細胞からHCVの著明な減少が認められた。HCVのアセンブリなどが脂肪滴やその周囲で行われることから、Nrf2が脂肪滴の維持に促進的に働きHCVのアセンブリや感染維持に関与していると考えられる。また、これまでの結果から、Nrf2は糖、脂質代謝に関する遺伝子の発現を促進し細胞の全体的な代謝亢進状態にし、過剰なエネルギーの蓄積として脂肪滴として蓄積していると推定される。Nrf2がC型肝炎及びC型肝炎がんの治療標的になる可能性が示された。

C. 結論

- ・線維化関連 miR-214 のターゲット解析から、新たな線維化調節因子 Sema6A を同定した。Sema6A は抗線維化、抗腫瘍効果を有する新たな治療分子である可能性が示唆された。

- ・非がん部に於ける PKM2 の発現上昇は線維化・星細胞の活性化と関連する可能性が示唆された。がん部に於ける PKM2 の発現上昇はがん幹細胞性と関連し、肝がんの悪性度・予後と関連すると考えられた。

- ・Muse 細胞は肝細胞などの肝構成細胞に自発的に分化することによって肝修復に寄与する一方、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞にこのような能力は無いことが急性肝障

害モデル（劇症肝炎）、慢性肝障害モデル（肝線維化モデル）において示唆された。

・背景肝におけるコラーゲン、エラスチン成分の定量的な評価が発がんリスク予測に有用である可能性が示唆された。Wnt/ β -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞がんの発生進展機構解析において、OATP1B3 の発現が、LGR5 を含む Wnt/ β -catenin 標的遺伝子群の発現との間に強い関連がある事、MRI にてサブクラス診断の可能性のあることを示した。

・TERT-RdRP が肝細胞がん発がん過程にどのような関与をしているかあるいは、TERT-RdRP 阻害が新たな肝がん治療戦略となり得るかの検討を引き続き進めることの重要性が示唆された。

・HCV コアタンパクは Type 2 mitophagy の実行分子であり、E3 ubiquitin ligase である Parkin の N 端側領域と結合することで Parkin のミトコンドリアへの局在を阻害し、これにより mitophagy を抑制する。

・CBP2 遺伝子の発現低下は DNA のメチル化によることと、この遺伝子の発現は HNF1 により完全に制御されていることを明らかにした。BASP1 遺伝子の発現低下の大部分は、プロモーター領域のメチル化では説明できずメチル化以外の分子機序によるものであることが分かった。

・HCV NS5A は SMYD3 と相互作用することによって、SMYD3 の核内移行を阻害し、SMYD3 による MAP3K2 のメチル化を増強し、AP1 を介した転写を促進した。一方、SMYD3 の過剰発現あるいはノックダウンは、HCV RNA 複製、HCV タンパク質合成、HCV 粒子形成・放出のいずれにも、有意な影響

を及ぼさなかった。

・Nrf2 が HCV の持続感染及び細胞増殖に対して同時に抑制することができた。Nrf2 及びその標的遺伝子は HCV 及び HCV 肝がんの治療標的となると考えられた。アミノ酸に加え、デスモステロールが HPI 細胞の細胞内のみならず培養上清においても著明に増加していることを示した。これらは、HCV による代謝異常さらに肝発がんのマーカーになり得ると考えられた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

各分担研究報告書を参照

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

分担研究報告書

遺伝子改変マウスの作製と病態解析、制御法の開発

代表研究者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：本研究では、これまで解析してきたHCVトランスジェニックマウス（HCVマウス）に病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウス（IL28B K/0、Lymphotoxin β K/0、PDGF-C Tg等）を交配する動物実験モデルを作製することによって、脂肪化・線維化・肝発がんの関わりを明らかにすることを目的とした。本年度はPDGF-C TgのmiRNAプロファイリングを行い、肝病態の進行に伴って発現変化するmiRNAを同定した。最も発現変動する線維化関連miR-214のターゲット解析から、新たな線維化調節因子Semaphorin (Sema)6Aを同定した。アデノ随伴ウイルス8型（AAV8）を用いたSema6A過剰発現マウスでは肝線維化の改善、肝重量の低下、腫瘍径、腫瘍数の有意な低下が認められた。Sema6AはLx-2細胞にてPKC α 、Smad3、PDGFR β 及び α -SMAの発現を抑制した。またSema6AはHuh-7細胞でのStat3のリン酸化を抑制した。以上よりSema6Aは抗線維化、抗腫瘍効果を有する新たな治療分子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我が国における HCV 感染患者数は多く、ウイルス排除後も肝がんの発生が予想される。本研究は C 型慢性肝炎から肝細胞がん にいたる病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

本研究では、これまで解析してきた HCV 全長トランスジェニックマウスに病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウス（IL28B ノックアウト（K/0）、Lymphotoxin β K/0、PDGF-C トランスジェニックマウス（PDGF-C Tg）等）を交配する動物実験モデルを作製することによって、脂肪化・線維化・肝発がんに関するサイト

カイン・増殖因子の役割やインターフェロン応答と肝発がんの関わりなどを明らかにする。さらにこれら標的分子に対する治療法の開発と実用化を目指す。

B. 研究方法

本年度は線維化進展・肝発がんを示す PDGF-C Tg の miRNA プロファイリングを行い、肝病態の進行に伴って発現変化する miRNA を同定した。さらに、miRNA のターゲット遺伝子を同定し、その遺伝子を過剰発現させることで PDGF-C Tg の線維化進展・肝発がんに及ぼす効果を解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用い

た研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針（平成18年6月1日制定）に従った。倫理面、実験手技に関して金沢大学動物実験施設に申請し承認を得た。

C. 研究結果

PDGF-C Tg は肝臓特異的 Alb プロモーター下に血小板増殖因子 (PDGF-C) を過剰発現させたトランスジェニックマウスであり、生後 4-8 ヶ月で肝線維化、8-12 ヶ月で肝腫瘍を発生する。PDGF-C Tg の肝組織の miRNA 発現を TaqManPCR アレイで網羅的に解析し、生後 5 ヶ月及び 12 ヶ月で WT マウスと比較し有意に発現上昇する miRNA を 9 個、発現低下する miRNA 4 個を同定した。そのうち、最も発現上昇する遺伝子は miR-214 であった (生後 5 ヶ月で 4.17 倍 ($p=8.39 \times 10^{-5}$)、生後 12 ヶ月で 3.7 倍 ($p=8.55 \times 10^{-5}$))。miR-214 は C 型慢性肝炎、及び B 型慢性肝炎でも組織学的進展例で有意に高値を示した。miR-214 の発現を LNA-antimiR-214 を用いてヒト星細胞由来培養細胞 (LX-2 細胞) 内で発現抑制すると、collagen-1a2 (COL1A2)、collagen-4a1 (COL4A1)、N-cadherin 及び PDGFR β などの pro-fibrogenic 遺伝子の有意な発現抑制が認められた。また、LNA-antimiR-214 によって、TGF- β 1 による Smad3 のリン酸化が有意に抑制された。

MiRNA は複数のターゲット遺伝子の発現を制御している。miR-214 のターゲット遺伝子として Semaphorin 6A (Sema6A) に注目した。Sema6A の 3' UTR に miR-214 と相

補的配列が存在し (position 1851-1857)、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' 側に Sema6A の 3' UTR を結合したレポーターアッセイ系を作成した。mimic miR-214 はルシフェラーゼ活性を有意に低下させ、LNA-antimiR-214 は有意に上昇させたことから miR-214 は 3' UTR を介して Sema6A の発現を制御していると考えられた。

Semaphorin 遺伝子ファミリーは神経軸索の伸長などの細胞移動を制御するガイダンス因子であり、標的細胞の受容体であるプレキシンと相互作用し、免疫応答、器官形成、血管新生に関与するとされる。これまでに Sema6A は発生期の小脳顆粒細胞浸潤、細胞骨格の再編成、軸索伸長ガイダンスに重要であるとの報告がある。Sema6A の発現は PDGF-C Tg 及び C 型肝がん症例において癌部において非癌部よりも発現量が低下し、さらに非癌部では正常肝よりも発現量が低下していた (図 1、2)。

図 1 Sema6a の発現：C 型肝癌部と背景肝

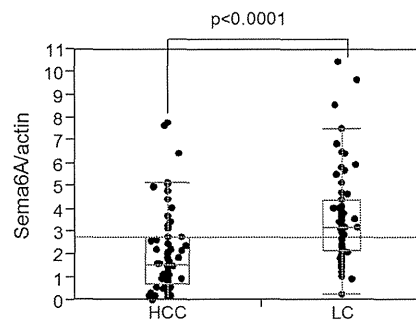


図 2 Sema6a の発現：正常肝と C 型慢性肝炎

