

- of the TGF- β superfamily. The 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 3) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. The 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsui C, Shoji I, Sianipar I R, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. The 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves inhibit hepatitis C virus replication. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara. Nara, Japan. September 23-26, 2014.
- 6) Utsumi T, Lusida M I, Yano Y, Wahyuni R M, Istimagfiroh A, Rinonce H T, Amin M, Juniastuti, Pranawa, Aditiawardana, Tjempakasari A, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Difference in the prevalence of hepatitis B and C virus infections among hemodialysis patients from private hemodialysis units in Surabaya, Indonesia. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara. Nara, Japan, September 23-26, 2014.
- 7) Utsumi T, Meilani, Amin M, Lusida M I, Istimagfiroh A, Wahyuni R M, Yano Y, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Serological markers of hepatitis A, B, C, and E viruses in highlanders of Papua, Indonesia. The 6th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology. Padang, Indonesia. October 16-17, 2014.
- 8) 松岡陽子, DENG Lin, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるTGF- β スーパーファミリーにおけるSmad2/3とSmad1/5/9経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月.
- 9) 甘翔, DENG Lin, 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, 2014年11月.
- 10) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar I R, 南奈苗, DENG Lin, 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, 2014年11月.
- 11) 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, 2014年11月.
- 12) Sianipar IR, 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, 2014年11月.

なし

3. その他

特になし

13) 青木千恵, Muhanmad Hanafi, Leonardus B.S. Kardono, 清水洋子, Pratiwi Sudarmono, 堀田博. *Aspergillus terreus* 抽出液及びその精製物ロバスタチンは高濃度でC型肝炎ウイルス感染性粒子の放出を促進する. 第67回日本細菌学会関西支部総会学術集会, 西宮, 2014年11月. (若手研究者奨励賞受賞)

14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Imelda Rosalyn Sianipar, 南奈苗, Lin Deng, 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, 2014年11月.

15) 青木千恵, Muhanmad Hanafi, Leonardus B.S. Kardono, 清水洋子, Pratiwi Sudarmono, 堀田博. *Aspergillus terreus* からの精製物質ロバスタチンはC型肝炎ウイルス感染性粒子放出を促進する. 日本薬学会第135年会, 神戸, 2015年3月.

16) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Inhibition of hepatitis C virus replication by Chalepin and Pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. 日本薬学会第135年会, 神戸, 2015年3月.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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

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

研究分担者：齋藤 英胤 慶應義塾大学薬学部 教授

研究要旨：本分担研究においては、これまでに、HCV長期感染のモデルとしてHCV持続感染培養細胞を樹立してきた。この細胞では著明な脂肪滴の蓄積が認められ、メタボロームおよびマイクロアレイによる統合的包括的解析の結果、HPI細胞では全体的な代謝亢進状態にあることを示した。さらに、HPI細胞では、糖・脂質代謝に重要な転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)の標的遺伝子群が恒常的に活性化されており、代謝亢進状態を維持するとともに酸化ストレスを抑えることでHCVが持続感染しやすい状態にしていると考えられた。今年度は、Nrf2をノックダウンすることで、Nrf2がHCVの持続感染及び細胞増殖に対して同時に抑制されることを明らかにした。さらに、HPI細胞の培養上清を用いたメタボローム解析の結果、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。

A. 研究目的

HCVを標的とした新たな薬剤が次々と開発され、慢性C型肝炎の治療成績は飛躍的に向上しつつあるが、HCV治癒後も脂質代謝異常及び肝癌の危険が残っている。従って、HCV治癒後の肝発癌高リスク群を同定し、早期に発見、治療を行うことが予後の改善につながると考えられる。

本分担研究においては、これまでに、HCV長期感染のモデルとして始めに1年以上感染持続可能なHCV持続感染培養細胞(HPI細胞)を樹立してきた。次に、この細胞を用いて長期持続感染の結果、肝細胞に起こる代謝異常、遺伝子異常を*in vitro*で

明らかにするために、メタボロームおよびマイクロアレイによる統合的包括的解析を行ってきた。その結果、HPI細胞では脂肪滴の著明な蓄積、コレステロールおよびデスモステロールの増加、脂肪酸の増加、ペントースリン酸経路促進によるNADPHの増加、TCA回路の促進を伴うアミノ酸増加など全体的な代謝亢進状態が認められた。さらに、HPI細胞では、糖・脂質代謝に重要なG6PD、MTHFD2、SCD、PCK2、ASNS、GPT2など、転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)の標的遺伝子群を恒常的に活性化させることで代謝亢進状態を維持するとともに、酸化

ストレスを抑えることでHCVが持続感染しやすい状態にしていると考えた。また、Nrf2のノックダウンがHCVの持続感染を抑える可能性を示唆してきた。

今年度は、Nrf2のノックダウンがHCV持続感染と細胞増殖に与える影響に関してさらに詳細な検討を行った。さらに、今回、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。

B. 研究方法

Nrf2のノックダウン実験

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。

HCV及びNrf2標的遺伝子の発現解析

RT-PCRを用いたRNAの定量的、判定量的測定、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。

メタボロミクス解析

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。

脂質分析

前年度と同様の方法で行った。

(倫理面への配慮)

ウイルス感染実験、DNA組み換え実験に関しては以下のように各種法令にのっとり、適切な施設、および、適切な実験方法(P2レベル)、その安全性に細心の注意を払い行った。組み換えDNA実験については組み換えDNA実験指針に基づき実施した。遺伝子組み換え生物等の第二種使用等については、遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律、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準じて行った。組み換えウイルスの作成と使用に関しては大臣確認をとってある。また、本研究の組換え実験は慶應義塾大学薬学部及び医学部による機関内承認を得ている。なお、本研究はヒトサンプルもしくはヒトを対象とする臨床研究ではないので、人権保護、インフォームドコンセントなど倫理的配慮の問題はないと判断した。

C. 研究結果

(1) Nrf2ノックダウンによるHCV感染と脂質代謝への影響

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。

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(図1A)、ノックダウンの効果が確認された。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(図1B)。

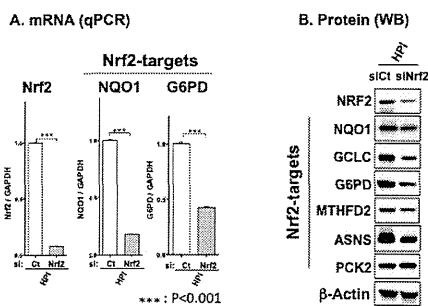


図1. Nrf2 siRNAによるNrf2標的遺伝子のノックダウン

昨年度までの解析において、HPI細胞における脂肪滴の蓄積とその成分の増加が認められたので、Nrf2のノックダウンによる脂質成分の変化を観察した。その結果、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(図2)。

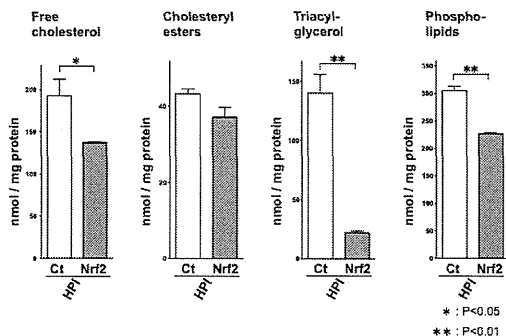


図2. Nrf2ノックダウンによる脂肪滴成分の減少

また、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。また、タンパクレベル(core、NS5A)でも感染HCVの低下が認められた(図3)。

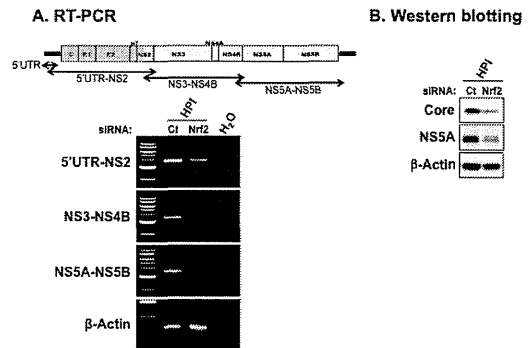


図3. Nrf2ノックダウンによるHCV感染の抑制

これらの事に対して、免疫染色による確認を試みた。その結果、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(図4)。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。

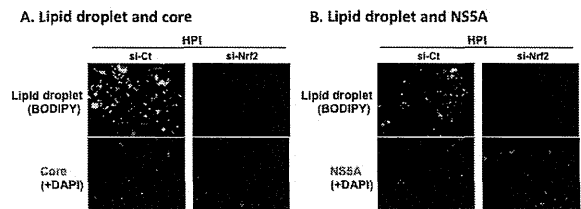


図4. Nrf2ノックダウンによる脂肪滴とHCVの減少

一方、これまでにNrf2は細胞増殖に促進的に働くことが知られているが、Nrf2のノックダウンがHPI細胞の増殖に対してどのような影響があるか観察した。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(図5)。なお、Nrf2ノックダウンにより全長HCVレプリコン複製細胞で細胞増殖は抑制されたが、細胞あたりのHCV複製は変わらなかった。すなわち、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。

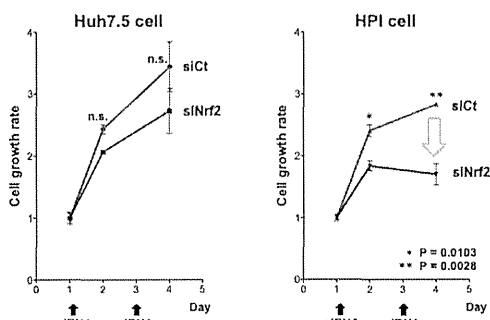


図5. Nrf2ノックダウンによるHPI細胞の増殖抑制

HCV持続感染及び細胞増殖に直接関与する遺伝子を同定するために Nrf2をノックダウンしてどの遺伝子が増減するかをマイクロアレイ法で解析した(図6)。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。

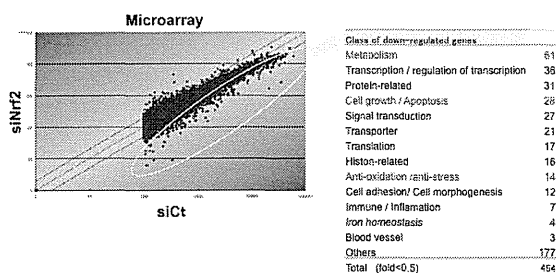


図6. Nrf2ノックダウンによる遺伝子発現変化

(2)HCV持続感染細胞の培養上清を用いたメタボローム解析

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。

まず、CE-MSを用いて可溶性物質について解析した(図7)。図において、横軸は細胞内代謝産物のHPIのHuh7.5に対する比を、縦軸は培養上清の代謝産物HPIのHuh7.5に対する比を示す。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。

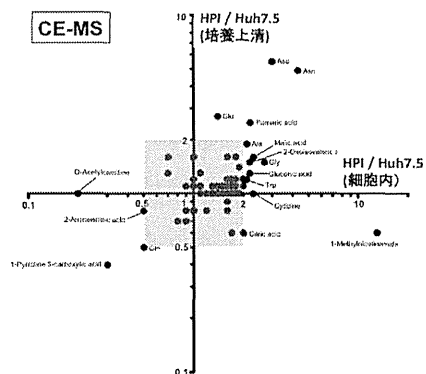


図7. HCV感染細胞の培養上清中の代謝産物 (可溶性物質)

また、LC-MSを用いて脂溶性物質についても解析した(図8)。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。

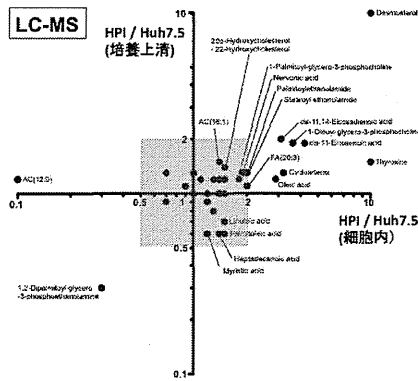


図8. HCV感染細胞の培養上清中の代謝産物（脂溶性物質）

D. 考察

前年度までの本研究の結果、HCV持続感染培養肝細胞（HPI細胞）において、長期培養の結果細胞内脂肪滴の著明な蓄積と糖脂質代謝異常が認められたことから、*in vitro*のHCV持続感染成立のために糖脂質代謝が重要であることを示してきた。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は本来、抗酸化・解毒関連遺伝子や癌細胞増殖関連遺伝子を制御することが知られており、多くの癌でその活性化型であるリン酸化Nrf2 (p-Nrf2) の発現亢進が報告されている。一方、Nrf2が糖・脂質代謝関連遺伝子も制御することが近年示されている。今回、Nrf2をノックダウンすることで、Nrf2がHCVの持続感染及び細胞増殖に対して同時に影響することを明らかにした。

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。全長レプリコンの複製には影響が認められなかったことから、持続感染細胞においてNrf2はHCVの複製に直接関与するのではな

く、感染の持続に関与していると考えられる。また、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のノックダウンにより、HCVの持続感染が抑制されたことから、また、HCV感染細胞の増殖が抑制されたことから、Nrf2がC型肝炎及びC型肝炎の治療標的になる可能性が示された。しかし、Nrf2は多くの標的遺伝子の発現を制御しており、これを抑制することによって副作用が強くなる可能性が高い。したがって、抗HCV、または、細胞増殖抑制に関与する遺伝子をさらに絞り込む必要があると考えられた。今回のマイクロアレイの結果、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。今後、これらの個々の遺伝子に対するsiRNAなどにより、責任遺伝子の同定を行い、新たなC型肝炎、C型肝炎の治療標的を絞る予定である。

HPI細胞の培養上清を用いたメタボローム解析を行った結果、水溶性のものとしてアスパラギン、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が、脂溶性のものとしては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た。すなわち、細胞外でのこれらの増加は細胞内での産生の増加を示すものと考えられる。上記アミノ酸増加は、Nrf2 によるものでこれらをすべて説明は出来ないが、TCA 回路及びその周辺経路の活性化の関与が示唆される。また、デスマステロールはコレステロールの前駆体である。その上流の律速酵素 HMGCR の発現は HPI 細胞で亢進していることが影響していると考えられるが、デスマステロール増加の機構はさらに検討が必要である。

今後、水溶性代謝産物及び脂溶性代謝産物について、HCV 治癒後の代謝異常、発がんなどのリスク予想因子としての有用性を臨床的に検討する予定である。

E. 結論

Nrf2 をノックダウンすることで、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 肝癌の治療標的となると考えられた。

さらに、HPI 細胞の培養上清を用いたメタボローム解析の結果、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に加え、デスマステロールが 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癌のマーカーになり得ると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. PLoS ONE 9:e94460.2014.
- 2) Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNAs in hepatocellular carcinoma. Hepatol Res 44(1), 31-42, 2014.
- 3) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. Hepatology 59(1), 154-69, 2014.
- 4) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Usui S, Furuhashi H, Kimura A, Nishiyama K, Maejima T, Okada Y, Kurihara C, Shimamura K, Ebinuma H, Saito H, Yokoyama Y, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Sugiyama K, Aosasa S, Hatsuse K, Yamamoto J, Hibi K, Miura S, Hokari R, Kanai T. Acyl-CoA: cholesterol acyl-transferase a mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells. J Hepatol 2014; 61(1):98-106
- 5) Hibino S, Saito Y, Muramatsu T, Otani A,

- Kasai Y, Kimura M, Saito H. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis* 2014; 3, e104
- 6) Saito H. Antigen-immunoglobulin M immune complexes: An important biomarker in chronic liver diseases? *Hepatol Res* 2014; 44(9): 940-3.
- 7) Takaki Y, Saito Y, Takasugi A, Toshimitsu K, Yamada S, Muramatsu T, Kimura M, Sugiyama K, Suzuki H, Arai E, Ojima H, Kanai Y, Saito H. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepato carcinogenesis from nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci.* 2014; 105(10): 1254-60.

2. 学会発表

- 1) 杉山和夫、海老沼浩利、村上優子、齋藤義正、金井隆典、齋藤英胤：Nrf2抑制による抗腫瘍および抗HCV効果. 第73回日本癌学会総会、横浜、2014.
- 2) 中本伸宏、海老沼浩利、若山遊子、谷木信仁、村田宏子、三上洋平、楮 柏松、杉山和夫、齋藤英胤、金井隆典. マウス急性肝障害における自然免疫機構を介した肝臓特異的免疫反応・免疫寛容機序の解明. 第50回日本肝臓学会総会 5/29-30/2014 東京
- 3) 齋藤義正、鈴木秀和、齋藤英胤. 腸管腫瘍由来幹細胞に対するDNAメチル化阻害薬の効果. シンポジウム「消化管癌の分子病態学に関する進歩」 第100回日本消化器病学会総会 4/23-26/2014 東京

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
原 裕一、 日野啓輔	C型肝炎における肝 発がんと酸化ストレ ス	内藤裕二、 豊國伸哉	酸化ストレス の医学	診断と治療 社	東京	2014	346-353
仁科惣治、 日野啓輔	ヘモクロマトーシス	竹原徹郎、 持田 智	HEPATOLOG Y PRACTICE 難治性肝疾患 の診療を極め る 基本から 最前線まで	文光堂	東京	2014	326-330
原 裕一、 日野啓輔	IV C型肝炎を理解 するための最前線研 究のトピックス 酸化ストレス	竹原徹郎、 持田 智	HEPATOLOG Y PRACTICE C型肝炎の診 療を極める 基本から最前 線まで	文光堂	東京	2014	287-292

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
T Terashima, (金子、本多)	Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy.	Hepatol Res	-	-	(in press)
K Yamada, (金子、本多)	Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis.	Liver Int	-	-	(in press)
E Iio, (金子、本多、 日野)	Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.	Hum Genet	-	-	(in press)
M Nakamura, (金子、本多)	Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis.	Hepatol Res	-	-	(in press)
Selitsky SR, (金子、本多)	Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C.	Sci Rep	5	7675	2015
T Yamashita, (金子、本多)	Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma.	Hepatology	60(5)	1674-1685	2014

K Ishikura, (金子)	Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells.	Diabetologia	57(9)	1968-1976	2014
T Shirasaki, (金子、本多)	Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway.	Hepatology	60(5)	1519-1530	2014
T Yamashita, (金子)	Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells.	J Gastroenterol	49(7)	1105-1110	2014
M Kitahara, (金子)	Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	Int Immunopharmacol	21(2)	346-353	2014
N Oishi, (金子)	Molecular biology of liver cancer stem cells.	Liver Cancer	3(2)	71-84	2014
F Lan, (金子)	LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance.	Diabetes	63(5)	1649-1664	2014
Y Takeshita, (金子、本多)	The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial.	Diabetologia	57(5)	878-890	2014
T Shimakami, (金子、本多)	The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro.	Sci Rep	4	4688	2014
H Nakagawa, (金子)	In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation.	Cancer Immunol Immunother	63(4)	347-356	2014
K Kato, (金子)	Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease.	PLoS One	9(3)	e92170	2014
T Terashima, (金子、本多)	P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma.	Cancer Immunol Immunother	63(5)	479-489	2014
N Nishida, (金子、本多、日野)	New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia.	PLoS One	9(2)	e86449	2014

Wakao S, (出澤)	Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues.	Spinal Surgery	-	-	(in press)
Okano T, (出澤)	A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research.	Anat Rec (Hoboken)	297(1)	4-5	2014
Albertine KH, (出澤)	A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research.	Anat Rec (Hoboken)	297(1)	1-3	2014
Wakao S, (出澤)	Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues.	Pathology International	64(1)	1-9	2014
Kuroda Y, (出澤)	Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine.	Anat Rec	297(1)	98-110	2014
Ogura F, (出澤)	Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine.	Stem Cells Dev	23(7)	717-728	2014
Ueno A, (坂元)	OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ β -catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma.	J Hepatology	61	1080-1087	2014
Lassmann T, (増富)	TERT regulates microRNAs.	Int J Mol Sci	-	-	(in press)
Yamaguchi S, (増富)	Eribulin mesylate targets human telomerase reverse transcriptase in ovarian cancer cells.	PLoS ONE	9	e112438	2014
Kobayashi T, (増富)	Nucleostemin expression in invasive breast cancer.	BMC Cancer	14	215	2014
Maida Y, (増富)	Involvement of TERT in heterochromatin maintenance.	Mol Cell Biol	34	1576-1593	2014
Abe M, (日野)	Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease.	J Gastroenterol	-	-	(in press)

Korenaga M, (日野)	Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice.	Liver Int	-	-	(in press)
Omata M, (日野)	Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial.	J Viral Hepat	-	-	(in press)
Hara Y, (日野)	Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization.	Am J Pathol	184	3026-3039	2014
Nakamura M, (日野)	Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy for Patients with Advanced Gallbladder Cancer.	Anticancer Res	34	3125-3129	2014
Tomiyama Y, (日野)	Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of AMPK/PGC-1alpha signaling.	Hepatol Res	44	E229-239	2014
Hino K, (日野)	Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C.	Hepatol Res	44	123-132	2014
Matsuda M, (加藤)	Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis C virus.	Journal of General Virology	95(12)	2658-2667	2014
Shimada H, (加藤)	Synthesis of 3',4'-difluoro-3'-deoxyribonucleosides and its evaluation of the biological activities: Discovery of a novel type of anti-HCV agent 3',4'-difluorocordycepin.	Bioorganic & Medicinal Chemistry	22(21)	6174-6182	2014
Hara Y, (加藤)	Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization.	American Journal of Pathology	184(11)	3026-3039	2014
Matsuno K, (加藤)	Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl)aniline analogs.	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	27(17)	4276-4280	2014
Dansako H, (加藤)	Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets.	Virology	462-463	166-174	2014
Ueda Y, (加藤)	Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus <i>Cordyceps militaris</i> .	Biochemical and Biophysical Research Communications	447	341-345	2014

Kato N, (加藤)	Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems.	PLoS ONE	9(3)	e91156	2014
Okamoto M, (加藤)	IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection.	Journal of Immunology	192(6)	2770-2777	2014
Aweya JJ, (堀田)	NS5B induces up-regulation of the BH3-only protein, BIK, essential for the Hepatitis C virus RNA replication and viral release.	Virology	474	41-51	2015
Ratnoglik SL, (堀田)	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	9(6)	e98877	2014
Takei S, (堀田)	Oral administration of genetically modified <i>Bifidobacterium</i> displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice.	Vaccine	32(25)	3066-3074	2014
El-Shamy A, (堀田)	Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview.	World J Gastroenterol	20(24)	7555-7569	2014
Wahyuni TS, (堀田)	Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from <i>Ruta angustifolia</i> leaves.	Fitoterapia	99	276-283	2014
Sugiyama K, (齋藤)	Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus.	PLoS ONE	9	e94460	2014
Saito Y, (齋藤)	Alterations of epigenetics and microRNAs in hepatocellular carcinoma.	Hepatol Res	44(1)	31-42	2014
Tomita K, (齋藤)	Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice.	Hepatology	59(1)	154-160	2014
Tomita K, (齋藤)	Acyl-CoA: cholesterol acyl-transferase a mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells.	J Hepatol	61(1)	98-106	2014

Hibino S, (齋藤)	Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells.	Oncogenesis	3	e104	2014
Saito H.	Antigen-immunoglobulin M immune complexes: An important biomarker in chronic liver diseases?	Hepatol Res	44(9)	940-943	2014
Takaki Y, (齋藤)	Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from nonalcoholic steatohepatitis.	Cancer Sci	105(10)	1254-1260	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Section 13

C型肝炎における肝発がん と酸化ストレス

川崎医科大学肝胆膵内科学 原 裕一
同 白野啓輔

Points

HCV 蛋白、特にコア蛋白はミトコンドリア障害を惹起し、酸化ストレスを増強させる

HCV は様々な代謝障害を引き起こし、それぞれが酸化ストレス、発がんに関連している

Keywords コア蛋白, ミトコンドリア, 代謝異常, メチル化

はじめに

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus ; HCV)に感染すると高率に慢性化し、20～30年かけて肝硬変、肝細胞がんへと移行する。今後、抗HCV薬の飛躍的な進歩によりHCV感染音数はさらに減少することが予想されるが、HCV感染患者の高齢化も進んでいるため、HCV排除前あるいは排除後の肝発がん抑制は喫緊の課題である。

慢性的な炎症とそれに伴う再生の過程を介したDNA変異の蓄積がHCV関連肝発がんには重要であるが、同様な炎症と再生を繰り返す自己免疫性肝炎では肝発がん率がそれほど高くないことを考えると、HCV自体が肝発がん重要な役割を果たしていると考えられる。

本項では、HCVによる肝発がん機構としての酸化ストレスに焦点を当て、HCVがどのように酸化ストレスを引き起こし、どのように肝発がんに関連するのかについて考察する。

HCV と酸化ストレス

C型慢性肝炎患者では、肝内脂質過酸化物の蓄積、肝脂肪化やミトコンドリア形態異常、肝内還元型グルタチオン(GSH)の減少、インスリン抵抗性など、酸化ストレスが亢進した状態がみられる。HCVのゲノムは約9,600ヌクレオチドからなる一本鎖のプラス鎖RNAから構成されており、構造蛋白あるいは非構造蛋白である10種類の蛋白質を産生する。特にコア蛋白はその遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスにおいて肝炎の組織所見は認めないにもかかわらず、GSHの低下、肝脂質過酸化物の増加など、酸化ストレスの亢進が認められ、さらに肝脂肪化、ひいては肝発がんをきたすといったC型慢性肝炎患者と類似した病態が認められることが示された¹⁾。さらにコア蛋白は培養細胞系においても酸化ストレスを亢進することが示された²⁾。コア蛋白存在下でTgマウスと培養細胞のどちらの場合でもミトコンドリアの外膜の損傷や膨化といったミトコンドリア障害が認められていることから、コア蛋白発現による活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の産生には、最大のROS発生器官であるミトコンドリアが関与していることが示唆された。

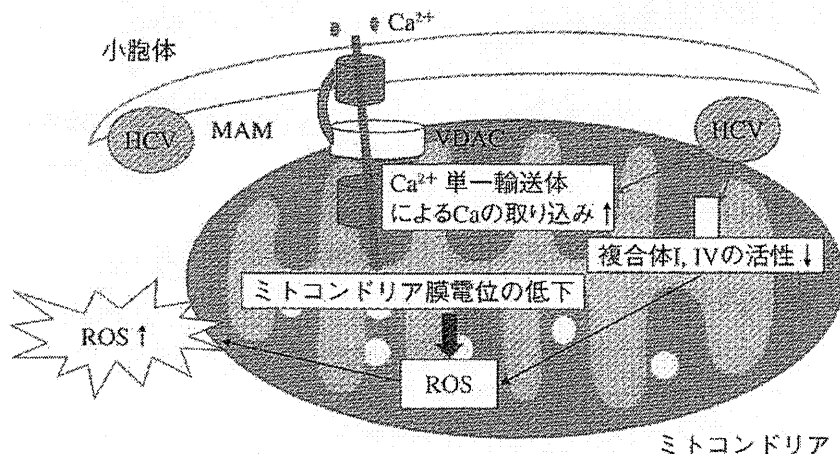
HCV とミトコンドリア

Korenagaらは、HCV構造蛋白を発現するTgマウスから肝ミトコンドリアを分離し、機能解析を行った³⁾。この実験で使用されたTgマウスでは肝炎の組織所見は認めないにもかかわらず、GSHの低下を認め、また電子伝達系複合体Iの活性が低下していた。また、Tsutsumiらはコア蛋白によりミトコンドリアのシャペロン蛋白であるプロヒビチン(prohibitin)とミトコンドリアDNAでコードされる電子伝達系複合体IV(シトクロムcオキシダーゼ)のサブユニットとのinteractionが阻害されることでシトクロムcオキシダーゼの活性が低下することを報告している⁴⁾。

コア蛋白はミトコンドリアの内膜や脂肪滴、ミトコンドリア外膜と小胞体との間のmitochondria-associated membrane(MAM)と結合していると報告されている。こうしたHCVコア蛋白とミトコンドリアとの直接的な結合によりCa²⁺輸送の調節にHCVが関与し、ROSの産生を促す可能性が示唆されている。HCVコア蛋白がミトコンドリア内膜に存在する「Ca²⁺ uniporter」と呼ばれるCa選択的イオンチャネルによるCaの取込みを促進させることがLiらにより報告されている⁵⁾。このCaの

臨床

13



【図1】 ミトコンドリアにおける活性酸素産生機序

VDAC : voltage dependent anion channel. MAM : mitochondria-associated membrane.

- ①コア蛋白によりミトコンドリアの複合体I, IVの活性が低下しROSが産生される。
- ②HCV コア蛋白がミトコンドリア内膜に存在するCa²⁺ uniporterによるCaの取り込みを促進させる。このCaの取り込みの促進によってミトコンドリア内のCa濃度が上昇することで、ミトコンドリア膜電位の低下が引き起こされ、ミトコンドリア内のROSが増加する。

臨床

14

取り込みの促進によりミトコンドリア内のCa濃度が上昇することで、ミトコンドリア膜電位の低下が引き起こされ、ミトコンドリア内のROSが増加することが示されている(図1)。

最近の知見により、障害を受けたミトコンドリアはオートファジー経路により選択的に除去され(マイトファジー)、その品質が管理されている。しかし前述したように基礎的検討においても、またC型慢性肝炎患者においても傷害を受けたミトコンドリアが増加している⁶⁾ことが報告されている。そこで筆者らは「HCVにより傷害を受けたミトコンドリアのマイトファジーが抑制されることでHCV感染下での酸化ストレスの持続・増強が引き起こされるのではないかと考え、HCVがマイトファジーを抑制するか否かについて検討した。マイトファジーはユビキチンリガーゼであるParkinにより制御されているが、筆者らはHCVコア蛋白がParkinのN末端側と結合し、Parkinのミトコンドリアへの局在を抑制することでマイトファジーを抑制し、その結果ROSの産生が亢進していることを明らかにした(論文投稿中)。一方、これとは逆の知見も存在する。Siddiquiら⁷⁾はHCV蛋白がParkin