

## HCV 感染症における樹状細胞のアポトーシス回避機構の検討

研究分担者 考藤達哉 国立国際医療研究センター  
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

**研究要旨：**HCVは種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。樹状細胞（DC）は、HCVなどのウイルスを感知し、I型、III型IFNを産生することで、ウイルス排除に関与する。C型肝炎患者のDCは他の免疫細胞と比べて定常状態でApoptosisを来しやすい。DCアポトーシス感受性の亢進が、HCVの持続感染や炎症遷延化の機序となっている可能性がある。今年度は、BDCA3+DCのアポトーシスを回復させ免疫活性を賦活化する生理活性物質を同定し、治療への応用可能性を評価することを目的とした。C型慢性肝炎患者、非感染者からBDCA3+DC、PDC、MDCの各サブセットを分離し、培養液に静置し24時間後のアポトーシスを評価した。様々な生理活性物質をDC培養液に加え、アポトーシス抑制能、サイトカイン産生能、遺伝子発現を比較した。DCはいずれのサブセットも他の免疫細胞と比較して、著明にアポトーシスが誘導された。アポトーシス感受性はC型肝炎患者DCで顕著であった。生理活性物質（X）は、DCのアポトーシスを80%抑制し、HCV刺激によるIFN- $\lambda$ 産生能を回復させた。その際のDCにおける遺伝子発現では、アポトーシス誘導系遺伝子群の発現低下とアポトーシス抵抗性遺伝子群の発現亢進が認められた。生理活性物質（X）はDCアポトーシスを軽減し、抗HCV免疫活性を賦活させる効果が期待できることが明らかとなった。

### A.研究目的

HCVは種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。また、IL-28B(IFN- $\lambda$ 3)の遺伝子多型（SNP）が、HCVの自然排除やペグインターフェロン+リバビリン治療の効果に関与することが報告されている。HCVによる免疫系攪乱の機序やIFN- $\lambda$ の生物学的意義が明らかになれば、HCV排除のための免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、BDCA3+DCのアポトーシス感受性の機序を明らかにし、アポトーシス抵抗性を誘導する生理活性物質を同定することを目的とした。

### B.研究方法

C型慢性肝炎患者、非感染者末梢血からDCサブセット（BDCA3+DC、PDC、MDC）を分離し、培養液中に静置し24時間後のアポトーシスを評価した。この際に様々な生理活性物質を添加し、アポトーシス改善効果、HCVやPolyIC刺激によるIFN産生能を評価した。更

にDCでの遺伝子発現プロファイルをPCR-Arrayを用いて比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

### C.研究結果

DCサブセットは他の免疫細胞と比較して著明にアポトーシスが誘導された。このDCアポトーシスの程度はC型慢性肝炎患者では、健康成人と比較して強度であった。特定の生理活性物質（X）は、DCアポトーシスを約80%回復させ、同時にHCV、PolyIC刺激によるIFN産生を亢進させた。DCのアポトーシス関連遺伝子の発現を比較すると、生理活性物質（X）存在によって、アポトーシス誘導遺伝子群が低下し、アポトーシス抵抗遺伝子群が亢進していた。

### D.考察

DC アポトーシスは HCV 感染者において、非感染者より亢進しており、DC 機能の低下を介して HCV 持続感染に関与する可能性が示唆された。生理活性物質 (X) は DC アポトーシス回避効果を発揮し、DC 機能を回復させることで抗 HCV 免疫を賦活化する効果が期待できる。

## E. 結論

生理活性物質 (X) は DC アポトーシス回復効果と免疫賦活効果を持つ Natural DC adjuvant として有用である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Aoki, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Yoshio, S., Kurosaki, M., Hashimoto, S., Yatsushashi, H., Nomura, H., Jong-Hon, K., Takeda, T., Naito, S., Kimura, T., Yamagiwa, Y., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., Izumi, N., Kage, M., Mizokami, M., and Kanto, T. Association of serum IFN-13 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014 (in press)
2. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Miyazaki, M., Iio, S., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Inui, Y., Hijioka, T., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kanto, T., Kasahara, A., Hayashi, N. and Takehara, T., Using early viral kinetics to predict antiviral outcome in response-guided pegylated interferon plus ribavirin therapy among patients with hepatitis C virus genotype 1. *J Gastroenterol* 2014; 49:

737-4.

3. Morishita, N., Hiramatsu, N., Oze, T., Harada, N., Yamada, R., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kanto, T. and Takehara, T., Liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse is useful in predicting the presence of esophageal varices or high-risk esophageal varices among patients with HCV-related cirrhosis. *J Gastroenterol* 2014; 49: 1175-1182.

### 2. 学会発表

1. Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. The 2<sup>nd</sup> Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links. Hiroshima, Japan, 2014.
2. Yoshio S, Kanto T, Shouji H, Mano Y, Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research, Hiroshima, Japan, 2014
3. Yoshio S, Kanto T, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M. Distinct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2014

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

## HCV 感染による肝がん発症機構の解析

研究分担者：森石恆司 山梨大学医学部 教授

**研究要旨：**抗ウイルス剤の開発進展によって、感染者から C 型肝炎ウイルス(HCV)の排除が可能になってきたが、肝移植前後の感染者や肝硬変に進行した患者に対するウイルス排除の有効性に関して問題が残されている。そのため C 型肝炎患者に至る分子機構解明し、そこから肝発癌に対する新規予防治療方法開発が望まれている。本年度は癌化因子として最近注目されている Hox 遺伝子について HCV 感染との関連性について検討した。HoxB9 が肝細胞癌に関連する報告があるが HCV 感染との関連は分かっていないことから、今回、HoxB9 に着目した。HCV 感染させた Huh7 細胞で、HoxB9 の転写レベルの有意な上昇が観察された。また、HoxB9 プロモーター領域のモノユビキチン化ヒストン H2A の低下が認められ、HoxB9 遺伝子の活性化が示唆された。抗ウイルス排除によって、そのモノユビキチン化や HoxB9 発現上昇が解除されたことから可逆的な現象であることが分かった。コア蛋白質の単独発現によってモノユビキチン化ヒストン H2A の低下と HoxB9 発現上昇が認められた。以上の結果から、HCV 感染によってモノユビキチン化ヒストン H2A の低下が誘導され、HoxB9 の発現上昇が誘導されることが示唆された。今後、HCV 感染や肝発癌機構における HoxB9 の役割について解析する予定である。

### A. 研究目的

本邦の肝がんの約 7-8 割は C 型肝炎ウイルス

(HCV) 感染に起因するとされ、先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型 1 の感染者が多く含まれる。C 型肝炎患者および感染者は、世界で二億人、国内で約 200 万人と推定されて、急性感染から持続感染に移行し、慢性肝炎から肝硬変、そして肝細胞癌に至る。

プラス鎖 RNA ゲノムを持つ HCV は、フラビウイルス科に属する。そのウイルスゲノムに 3000 アミノ酸残基からなるポリプロテイン前駆体がコードされ、宿主およびウイルスプロテアーゼによって、10 個のウイルス成熟蛋白質になる。ウイルス増殖過程でウイルス蛋白質を標的にする薬剤開発が進展している。HCV に対する DAA の登場により、高い著効率が報告され、感染者からウイルス排除が可能となっているが、既に肝線維化が進行している方や肝移植前後の方において、ウイルス排除の有効性はそれほど高くないと考えられる。したがって、DAA による治療方法以外に、C 型肝炎患者に対する新規予防治療方法を開発する必要性が残されており、HCV 感染による肝疾患発症機構を早急に解明し、新規治療戦略を立てる必要がある。

ヌクレオキャプシド蛋白質として機能する

HCV コア蛋白質は発がんなどの病原因子としてしられ、C 型肝炎では脂肪肝、肝硬変を経て、高率に肝細胞癌に至ることが知られており、コア蛋白質は脂肪化とがん化を誘導することが多数報告されている。

本年度は、発生および癌化に関連する転写因子 Hox 遺伝子群に着目して解析した。Hox 遺伝子は出生後体細胞でヒストン修飾 (Ub 化、メチル化など) で不活化されており、発生段階あるいは発癌時に活性化していることが知られている。Hox 遺伝子群の 39 遺伝子が 4 つのクラスターにコードされており、臓器や組織の形態形成や発生後は再生などに関与しているとされる。HoxB7、HoxA7、HoxA9、HoxA10 などが乳癌、卵巣癌、白血病などで発現が上昇し、発癌との関連が指摘されている。一方、HoxB9 も白血病、胃がん、乳がんなどで発現上昇しており、肝細胞がんにおいても発現上昇が報告されている。しかしながら、Hox 遺伝子と HCV 感染による発癌の報告は限られている。HoxA13 が HCV あるいは HBV 感染による HCC で発現誘導されされ (BBRC, 2001, 281:1041)、PTX1 が NS5A と結合し、IFN 産生との関連性が指摘されている (Virology, 2003, 306, 51)。また、HoxA6 遺伝子領域が HCV 感染キメラマウス肝臓でメチ

ル化されていることも報告されている

(*Gastroenterology* 2014 146 562)。さらに、HCV 感染によって miR181c の発現抑制され、標的の HoxA1 の発現上昇も報告されている (*J Virol.*2014 88 7929) )。いずれも断片的な報告で更なる解析が必要と思われる。

Hox 遺伝子はヒストンのメチル化およびモノユビキチン化 (mUb 化) によって、通常、体細胞で発現抑制されている。今回我々は、HoxB9 と HCV 感染との関連性について解析し、HoxB9 領域のヒストン H2A の mUb 化を解析し、HCV 感染による HCC 発現における HoxB9 の役割について考察した。

## B. 研究方法

Huh 7 細胞に HCVcc を既報の方法に準じて感染させ、細胞内 RNA を調整し、qRT-PCR によって定量した。また、感染細胞を抗 HCV 剤 (Telaprevir と Daclatasvir) によって処理し、ウイルス排除した。mUb 化 H2 量をウエスタンブロット法によって解析した。クロマチン沈降法によって HoxB9 プロモーター領域の mUb 化 H2A 量を解析した。

(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した。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山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。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、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

## C. 研究結果

HCVcc (JFH1) を Huh7 細胞に感染させたとき、コア蛋白質および NS5A 蛋白質はウエスタンブロットングによって感染細胞で検出され、感染が確認された。感染後 3、6、9 日で細胞を回収し、HoxB9 遺伝子の発現は、非感染細胞と比較

すると上昇していた。また、抗 HCV 剤によって一ヶ月間処理し、感染細胞の HCVcc を排除したとき、ウイルスが 1/100 に低下し、HoxB9 の発現量も 1/10 程度低下した。さらに、HoxB9 プロモーター領域のヒストン H2A の mUb 化の程度をクロマチン IP で解析したとき、HCVcc 感染によって mUb 化 H2A 量は低下していた。抗 mUb 化 H2A 抗体による感染細胞の免疫染色およびウエスタンブロットングによって、mUb 化 H2A 量は低下していた。また、コア蛋白質を強制発現させると細胞内のクロマチン IP で抗 mUb 化 H2A 量は低下した。

## D. 考察

体細胞では HoxB9 遺伝子領域はヒストン H2A の mUb 化によって不活化されている。この mUb 化酵素は Polycomb complex 1 であり、その中の RING1 b と Bmi1 によって酵素活性が担われている。今後感染とこれら酵素の関連性や、Ub の切断との関連性について解析する必要がある。また、コア蛋白質単独の発現によっても mUb 化 H2A の低下が示唆された。しかしながら、他の蛋白質およびウイルス複製とどのように関わっているのか今後明らかにする必要がある。また、mUb 化 H2A の変化や HoxB9 の機能が、感染および C 型肝炎患へどのように関与しているかも明らかにする必要がある。また、他の Hox 遺伝子に対する HCV 感染の影響も検討する必要があると思われる。

## E. 結論

HCV 感染あるいはコア蛋白質発現によって HoxB9 の発現上昇が認められ、プロモーター領域の H2A の mUb 化の低下が認められた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1 論文発表

1. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014
2. Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of

Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014

3. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014
4. Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014
5. Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLOS one*, 9: e85360, 2014

## 2. 学会発表

1. Tomohisa Tanaka, Hirotake Kasai, Atsuya Yamashita, and Kohji Moriishi, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.
2. Kaori Dobashi, Hirotake Kasai, Tomohisa Tanaka, and Kohji Moriishi, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angels, USA.
3. 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物

抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜

4. 安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
5. 田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマへパシウイルス感染第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
6. 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
7. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物の C 型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
8. Kohji Moriishi, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし

## C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

研究分担者 武富紹信 北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I 教授

**研究要旨：**肝臓は脂肪代謝の主要臓器であり、肝細胞内の脂肪滴がC型肝炎ウイルス(HCV)の増殖に重要なことが知られている。また、C型肝炎細胞癌(HCC)では脂肪変性が認められ、HCCの発癌・進展過程における脂肪酸代謝の関与が推測される。われわれはプロテオミクス解析により、HCCにFABP5が高発現していることを見出した。今回HCCの切除肝組織を免疫染色し、FABP5が予後・再発因子であり、脈管侵襲・遠隔転移と相関することを見出した。in vitro 実験でもFABP5の発現と増殖・浸潤・遊走能と相関することを確認した。さらに、FABP5がEMTを誘導することにより転移・浸潤能を獲得することが強く示唆された。

### A. 研究目的

脂肪代謝の主要臓器である肝臓において、NASH、アルコール性肝炎、C型肝炎では肝細胞への脂肪蓄積が認められる。肝の脂肪滴は肝再生に必要な物質だが、HCVの複製にも利用され、C型肝炎HCCでは脂肪変性が高頻度に認められる。C型肝炎からの発癌、進展過程における脂肪酸代謝酵素の関与が推測されるが、その詳細はほとんど解明されていない。われわれはHCC組織のプロテオミクス解析により、脂肪酸結合タンパク(FABP5)が高発現していることを見出した。今回HCV感染HCCの悪性度に関わる因子の解明を目的として、C型肝炎HCC組織におけるFABP5の発現と臨床病理学的所見、予後、再発との関係を検討した。

### B. 研究方法

#### (1) 臨床症例の解析

北海道大学病院・消化器外科学 I で初回肝切除を受けたC型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌90症例を解析した。

#### (2) In Vitro 解析

各種肝癌細胞株を用いてFABP5タンパクの発現レベルを解析し、FABP5発現と肝癌細胞株の増殖・浸潤・遊走能との相関関係を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の全ての担当者は、「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改正、以下

臨床研究倫理指針)」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(厚生科学審議会答申、平成10年12月16日)、

に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会の承認の下に実施した。

書面によるインフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理した。

### C. 研究結果

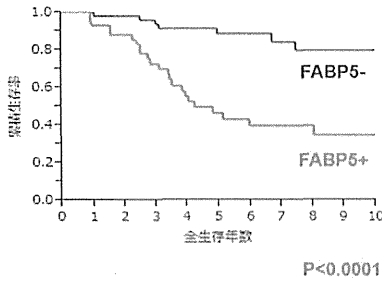
#### 解析対象

1997年1月から2006年12月に北海道大学病院・消化器外科学 I で初回肝切除を受けたC型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌は90症例の内訳は、男73名、女17名、年齢66才(42-82才)、Child-Pugh分類はA:85例、B5例、背景肝は正常:3例(3.3%)、慢性肝炎:54例(60%)、肝硬変:33例(36.7%)であった。

#### 切除肝(癌)組織の抗FABP5抗体染色

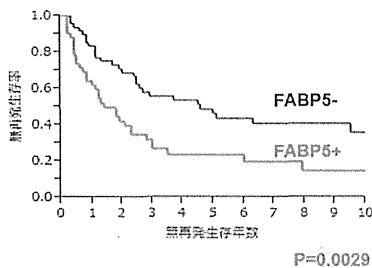
陽性群では累積生存期間、無再発生存期間が有意に短縮した。累積生存における多変量解析では、AFP-L3が10%以上である症例のハザード比(HR)が2.82(p=0.01)であったのに対し、FABP5陽性群ではHRが5.32(p<0.0001)であった。FABP5は肝細胞癌の悪性度に強く関連し、従来のバイオマーカーを凌駕する強力な予後予測因子となることが明らかになった。

### 累積生存



5年 FABP5 - : 88.5%  
FABP5+ : 46.4%

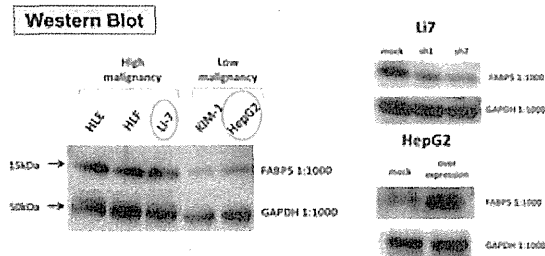
### 無再発生存



5年 FABP5 - : 43.5%  
FABP5+ : 23.3%

肝癌細胞株における FABP5 の発現  
HLE, HLF, Li7 では FABP5 が高発現しており、HepG2, KIM-1, Hep3B で FABP5 の発現が低かった。Cell line においても FABP5 が悪性度と相関した。

### FABP5 expression of HCC cell lines



### FABP5 発現調節による細胞株の性質変化

Li7 に対する shRNA による FABP5 発現抑制株および HepG2 に対する FABP5 過剰発現株を作成した。

Li7 では FABP5 発現抑制株が control 株と比較して増殖・浸潤・遊走能が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。HepG2 においては FABP5 過剰発現株が control 株と比較して増殖・浸潤・遊走能が有意に増強された ( $p < 0.05$ )。FABP5 は HCC において、再発・浸潤と強い相関関係を示した。

### 浸潤に関与する分子の探索

epithelial-mesenchymal transition (EMT) 関連分子と FABP5 の関連を検討するために、mRNA 発現を比較すると、これらの mRNA の発現は正の相関を認めた。

EMT 関連タンパクのウェスタンブロットでは、FABP5 発現抑制株の E-cadherin、ZO-1 の発現増強、N-cadherin、Vimentin、Snail の発現低下が認められ、FABP5 発現と EMT との関連が示唆された。

### D. 考察

HCC において FABP5 が EMT を誘導することで転移・浸潤能を獲得すると考えられた。切除肝組織においても FABP5 が強力な予後再発因子であることが見出された。今後は血清バイオマーカーとして臨床応用の可能性、また、悪性度の駆動力となる分子 (FABP5) を標的とした、新しい分子標的治療の可能性、などを検討する予定である。

### E. 結論

1. HCC 患者の切除肝組織を用いた免疫組織化学染色による FABP5 の発現と予後を解析することにより、FABP5 が強力な予後・再発の予測因子となることを見出した。
2. FABP5 が EMT を誘導することが、HCC の転移・浸潤能を増強させることが明らかになった。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

#### 英文

1. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- $\kappa$ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.
2. Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2013 Mar 2;11:52.

3. Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 2013 Mar;43(3):289-92.
4. Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. Clinical usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res*. 2013 May;43(5):481-7.
5. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Kakisaka T, Tsuruga Y, Todo S, Taketomi A. Analysis of the risk factors for early death due to disease recurrence or progression within 1 year after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2012 Jun 14;10:107. doi: 10.1186/1477-7819-10-107
6. Takeishi K, Taketomi A, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol*, 2012 Jul;57(1):77-83
- イエル薬品).
4. 武富紹信:「HCCに対する肝移植後管理」. 第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山、教育セミナー.
5. 武富紹信:「データベース報告:NCDデータに基づいた肝切除術におけるリスク評価」. 第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山、パネルディスカッション.
6. 武富紹信:「肝胆膵がん」. 第52回日本癌治療学会総会、2014年8月28日、横浜、Meet in PAL.
7. 武富紹信:「肝胆膵癌の標準治療」. 第52回日本癌治療学会総会、2014年8月29日、横浜、教育セッション.
8. 武富紹信:「これからの肝癌外科治療」. 平成26年第5回江別医師会研修会、2014年9月18日、江別、特別講演。(中外製薬)
9. 武富紹信:「肝細胞癌に対する集学的治療」. 宮崎肝癌治療講演会、2014年10月9日、宮崎、特別講演.
10. 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信「肝細胞癌におけるFABP5の新規バイオマーカーとしての有用性」第114回日本外科学会定期学術集会、京都4月3-5日、2014
11. 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信「FABP5はEMTを介し肝細胞癌の進展を促進する」第25回日本消化器癌発生学会総会/第8回国際消化器癌発生会議、福岡11月13-14日、2014

## 邦文

1. 若山 顕治, 神山 俊哉, 武富 紹信.【最新の消化器癌術前術後化学療法】肝細胞癌 消化器外科 (0387-2645)37 巻 4 号 Page447-455(2014. 04)

## 2. 学会発表

### 国内学会・研究会

1. 武富紹信:「肝癌に対するこれからの外科治療」. 県北肝疾患研究会、2014年2月18日、福島、特別講演(第一三共)
2. 武富紹信:「肝癌に対するこれからの外科治療」. 第929回市立札幌病院 学術研修会・がん診療連携拠点病院研修会、2014年3月13日、札幌、特別講演
3. 武富紹信:「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」. 第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都、ランチョンセミナー(バ

### 国際学会

1. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi. Fatty Acid Binding Protein 5 Indicates Poor Prognosis Through Epithelial-Mesenchymal Transition In Hepatocellular Carcinoma International Liver Cancer Association 8th Annual Conference, Kyoto Japan, September 5-7, 2014
2. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi. Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in



hepatocellular carcinoma The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, September 25-27, 2014

3. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi. Fatty Acid Binding Protein 5 promotes tumor

progression through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma AASLD2014, Boston USA, November 7-11, 2014

**H. 知的所有権の出願・登録状況**  
特になし

## HCV 感染による細胞内遺伝子の発現変化と病原性

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）は肝細胞に感染し、様々な細胞内の遺伝子発現を変化させ、HCV複製に有利な環境を構築し、病原性を発現する。従来、HCV感染による1)細胞内のde novo脂肪合成の活性化と2)細胞外への脂肪酸分泌の低下により肝脂肪化を促進させることが報告されている。しかし、HCV感染による細胞内への脂肪酸の取り込みへの影響については詳細が不明であった。本研究においてHCV感染による細胞内への脂肪酸の取り込みへの影響とその分子機構を解析したところ、HCV J6/JFH1の感染細胞では細胞内への遊離脂肪酸の取り込みが増加した。その分子機序としてCD36, FATP1, 3, 5, 6の関与が示唆された。さらに、HCV感染における脂質・胆汁酸代謝関連遺伝子発現への影響を解析したところ、NTCP, OATP-C, OATP-8など胆汁酸輸送経路の遺伝子発現を促進することが示された。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。抗HCV薬によりHCVを排除できてもSVR後肝癌を発症することが、厚生労働行政上、重要な課題となっており、C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の開発は急務である。HCV感染では肝の脂肪化が促進され、ウイルス増殖と病原性において重要である。HCV感染による肝の脂肪化の分子機序として、1)細胞内のde novo脂肪合成の活性化と2)細胞外への脂肪酸分泌の低下が報告されている。しかし、HCV感染による細胞内への脂肪酸の取り込みへの影響については詳細が不明であった。そこで、本研究では、HCV感染の脂肪酸の取り込みへの影響とその分子機構の解明を目的とした。また、HCV感染による細胞内での遺伝子発現変化と細胞内の代謝変化との関係を詳細に解析した。

### B. 研究方法

1) 蛍光レポーター(BODIPY)結合遊離脂肪酸(Free Fatty Acid: FFA)をHuh-7.5細胞培養液中に添加し、HCV J6/JFH1の感染の有無あるいはHCVレプリコンの複製の有無による肝細胞内へのFFA取り込み活性に及ぼす影響をQBT Fatty Acid Transporter Assay kit (Molecular Device)を用いて経時的に解析した。2) HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、FFA取り込み関連分子(FATP1-FATP6, CD36など)のmRNA発現量の経時的変化をreal time PCR法で解析した。

3) HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、コレステロール代謝関連遺伝子および胆汁酸代謝関連遺伝子へmRNA発現量の経時的変化をreal time PCR法で解析した。

(倫理面への配慮)

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。培養細胞による研究でヒトゲノムの遺伝子解析はおこなっていない。

### C. 研究結果

1) HCV J6/JFH1の感染により、細胞FFA取り込み量が増加した。特に感染後5日以降から、FFA取り込み量の増加が顕著であった。形態観察からは、HCVcc感染細胞では、取り込まれたFFAが細胞質の核周囲にdot状に集積した。2) Real-time PCR法によるFFA取り込み関連分子の解析から、HCVccの感染により、CD36, FATP1, 3, 5, 6の発現量が増加し、FATP1の増加が最も顕著であった。3) コレステロール代謝関連遺伝子の解析では、HCV J6/JFH1の感染によりACAT2のmRNA発現量が増加し、Apolipoprotein BやHepatic lipaseの発現量も増加した。しかし、Apolipoprotein CIIIのmRNA発現量は著明に減少していた。胆汁酸代謝関連遺伝子の解析では、NTCP (Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporter), OATP-C (Organic anion transporter protein-C), OATP-8のmRNA発現量が増加していた。

## D. 考察

HCV J6/JFH1 の感染により、細胞内への遊離脂肪酸の取り込みが増加しており、肝脂肪化促進に關与する可能性が示された。HCV 感染により遊離脂肪酸の取り込み機構に關与する CD36, FATP1, 3, 5, 6 の mRNA 量の増加が見られ、これらの關与が示唆された。今後、siRNA によるノックダウンで遊離脂肪酸取り込みの増加が抑制されるか検討する必要がある。

コレステロール代謝關連遺伝子の解析では、HCVcc の感染細胞では ACAT2 の mRNA 発現量が増加し、Apolipoprotein B や Hepatic lipase の発現量も増加した。これは HCV 感染がコレステロールエステル合成を促進し、感染性粒子の産生促進に關与している可能性がある。また、胆汁酸代謝關連遺伝子の解析から、NTCP, OATP-C, OATP-8 の mRNA 発現量が増加しており、感染性粒子産生との關係について明らかにする必要がある。また、HCV 感染により胆汁酸代謝關連遺伝子では、NTCP, OATP-C, OATP-8 の発現が上昇しており、その生理学的意義について今後解明する必要がある。

## E. 結論

1. HCV 感染による細胞内への遊離脂肪酸の取り込みが増加し、肝脂肪化に影響する可能性が示された。その分子機序として CD36, FATP1, 3, 5, 6 の關与が示唆された。
2. HCV 感染によりコレステロール代謝關連遺伝子では ACAT2 や Apolipoprotein B, Hepatic lipase の発現が上昇し、コレステロールエステル合成促進の方向へ向かうことが示唆された。
3. HCV 感染により胆汁酸代謝關連遺伝子では、NTCP, OATP-C, OATP-8 の発現が上昇した。

## 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., Soetjijto, 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.

### 2. 学会発表

1. Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I., Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
2. Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I., Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
3. 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.
4. Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I., Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- $\beta$  superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September

- 7-11, 2014.
5. 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.
  6. Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 $\alpha$  protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
  7. Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 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. 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3の相互作用の解析. 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. 松岡陽子, Deng L, 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- $\beta$  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, 11月10-12日, 2014年.
  10. 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.
  11. 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 $\alpha$  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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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 $\alpha$  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.
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

## HCV コア蛋白質発現マウスにおける肝炎発症機構の解析に関する研究

研究分担者 山本雅裕 大阪大学微生物病研究所 教授

**研究要旨：**C型肝炎ウイルス(HCV)蛋白質の中でもコア蛋白質を肝臓特異的に発現させたマウス(HCV コア発現マウス)は高頻度に肝がんの発症が見られる事から、コア蛋白質がC型肝炎ウイルス感染による肝炎・肝線維化ならびに肝がんの発症の一因である事が示唆されているが、その詳細な作用機序については未解明のままである。HCV コア蛋白質による肝炎・肝がん発症の作用機序の解明を目的として、我々は肝臓に高発現している小胞体ストレス蛋白質 [CrebH] に着目して解析を行った。その結果、C型肝炎ウイルス感染及びコア蛋白質の強制発現により、肝細胞においてCrebHの発現の増加と活性化型 CrebH の蓄積が認められた。また、コア蛋白質発現ヒト肝がん細胞ならびにHCV コア発現マウスの肝細胞ではCrebHにより発現が誘導されるCYP2B遺伝子の発現が顕著に誘導された。これらの結果から、CrebHの恒常的活性化がHCV コア発現マウスにおける肝がん発症に繋がっている可能性が暗示された。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス感染による肝炎は肝ガン発症の主要原因である事が知られているが、その発症メカニズムは未解明な部分が多い。我々はC型肝炎ウイルス感染が起因する肝炎・肝がんの発症メカニズムの解明を目的とし、C型肝炎ウイルス感染による発がんに関与している事が示唆されているHCVコア蛋白質に着目し、解析を行った。これまでの報告によりHCVコア蛋白質が過剰発現されると、①酵母で小胞体ストレスが誘導される事、②小胞体ストレスセンサーであるATF6が活性化される事、③小胞体ストレス応答遺伝子であるATF4が活性化する事、が報告されており、HCVコア蛋白質は小胞体ストレス誘導する事によって肝細胞の線維化ならびに慢性炎症からの肝がんの発症に繋がっている事が暗示された。

小胞体ストレス応答に関与している転写因子の中でもCrebHは肝臓に高発現している分子であり、肝臓での急性期反応蛋白質やヘプシジンの発現を誘導して急性期反応や体内鉄恒常性の維持に関与している事が報告されていたが、肝臓での薬物の解毒および代謝に関与する分子の発現に関与している事を我々は昨年度報告したが、CrebHとC型肝炎ウイルス感染との関係については未解明のままであった。

そこで、C型肝炎ウイルス感染ならびにC

型肝炎ウイルスのコア蛋白質によるCrebHの活性化について検討を行うと共に、生体におけるCrebH活性化と慢性炎症との相関について解析を行う事によって、C型肝炎ウイルス感染による肝炎・肝線維化におけるCrebHの生物学的意義を明らかにする事を目的とした。

### B. 研究方法

ヒト肝がん細胞株であるHuh7.5.1細胞にC型肝炎ウイルスを感染させた際の、肝臓高発現ATF6ファミリー分子[CrebH]の活性化についてIn vitroで解析を行った。また、CrebHの活性化が持続した際の生体内での影響を解析する為、活性化型CrebH(CrebH-DC)発現マウスをCas9/CRISPRを用いたゲノム編集により作成し、CrebH-DCの生体への影響について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト検体は使用していない為、該当しない。

### C. 研究結果

Huh7.5.1細胞にC型肝炎ウイルス(JFH株)を感染させ、細胞内におけるCrebHの活性についてウエスタンブロッティング法を用いて解析を行った結果、C型肝炎ウイルス感染により内在性CrebHの発現量が増加し、また、活性化型CrebHの発現量も増加した。

C型肝炎ウイルス感染による CrebH の発現増加と活性化型の誘導が C型肝炎ウイルスのコア蛋白質によるものであるかを明らかにするため、Huh7.5.1 細胞にコア蛋白質を発現して CrebH の発現量ならびに活性化型の形成について解析を行った。その結果、コア蛋白質発現により、CrebH の発現量ならびに活性化型 CrebH の量が増加した。

次にコア蛋白質発現により CrebH によって制御されている遺伝子のプロモーターの活性化が見られるかを検討するため、Huh7.5.1 細胞にコア蛋白質を発現した際の CYP2B の mRNA 量について解析を行った。その結果、コア蛋白質を発現させる事により CYP2B の mRNA は顕著に発現が誘導された。

また、肝臓での活性化型 CrebH の生体への影響について検討を行うため、CrebH-DC マウスに低濃度の LPS を腹腔内に投与し、血中の炎症性サイトカインについて ELISA 法を用いて解析を行った。その結果、CrebH-DC マウスは低濃度 LPS による炎症が増悪する傾向が見られた。

#### D. 考察

C型肝炎ウイルスは肝細胞に感染すると、コア蛋白質依存的に CrebH の発現を促進して活性化型 CrebH の発現量を増加していることが推察される。活性化型 CrebH は CYP2B10 を含む様々な遺伝子の発現に関与している事が暗示され、慢性炎症に関与する分子が含まれている可能性もある事から、今後は CrebH-DC マウスを用いて CrebH 活性化による慢性炎症・肝線維化・肝がん発症について検討する予定である。

#### E. 結論

1. C型肝炎ウイルス感染によって、ヒト肝がん細胞は CrebH の発現が促進されると共に、活性化型である C末端欠損体の蓄積が見られ、この現象は C型肝炎ウイルスのコア蛋白質によって引き起されている事が示唆された。
2. 培養細胞ならびに Core 蛋白質発現マウス由来の肝臓において、コア蛋白質が発現すると CYP2B10 のプロモーターの活性化が促進される事を証明した。
3. 活性化型 CrebH のみを発現するマウスは低濃度 LPS の腹腔内投与による血中炎症

性サイトカインが増幅する傾向が認められた。

#### 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, Matsuura Y (2014) Amphipathic alpha-Helices in Apolipoproteins Are Crucial to the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathog* **10**: e1004534
2. Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, Yamamoto M (2014) Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J Exp Med* **211**: 2013-2032
3. Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schurmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, Roose-Girma M, Bumann D, Kayagaki N, Takeda K, Yamamoto M, Broz P (2014) Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* **509**: 366-370
4. Haldar AK, Piro AS, Pilla DM, Yamamoto M, Coers J (2014) The E2-like conjugation enzyme Atg3 promotes binding of IRG and Gbp proteins to *Chlamydia*- and *Toxoplasma*-containing vacuoles and host resistance. *PLoS One* **9**: e86684

##### 2. 学会発表

1. 笹井 美和、馬 知秀、大嶋 淳、Youngae Lee、竹田 潔、山本 雅裕、*Toxoplasma gondii* GRA6 selectively activates NFAT4 to induce chemokine CXCL2 and CCL2、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、12 月 10-12 日、2014 年
2. 大嶋 淳、笹井 美和、馬 知秀、Youngae Lee、竹田 潔、山本 雅裕、Role of mouse autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -mediated cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、12 月 10-12 日、2014 年
3. Youngae Lee、大嶋 淳、笹井 美和、馬 知秀、山本 雅裕、Human ATG16L1 and GBPs are dispensable for IFN- $\gamma$ -dependent anti-

- Toxoplasma gondii responses、第43回日本免疫学会学術集会、京都、12月10-12日、2014年
4. 山本 雅裕、大嶋 淳、Youngae Lee、笹井 美和、インターフェロン- $\gamma$ ;誘導性 GTPase によるトキソプラズマ原虫殺傷機構について、第87回日本生化学会大会、京都、10月15-18日、2014年
  5. Masahiro Yamamoto, NFAT4 activation by the Toxoplasma gondii polymorphic effector protein GRA6 maximizes the parasite virulence in a strain-specific manner, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, Japan, September 23-26, 2014
  6. 山本 雅裕、トキソプラズマ原虫と宿主の免疫学的攻防、平成26年度 遺伝子病制御研究所研究集会、北海道、7月3-4日、2014年
  7. Yamamoto M, Ma JS, Ohshima J, Sasai M, Activation of host NFAT by a Toxoplasma gondii polymorphic dense granule protein plays an important role in virulence mediated by the local infection, 18th Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference, MA, USA, April 27-30, 2014
  8. 山本 雅裕、大嶋 淳、馬 知秀、笹井 美和、IFN- $\gamma$  依存的抗トキソプラズマ応答におけるオートファジー蛋白質の役割、第83回日本寄生虫学会大会、愛媛、3月27-28日、2014年

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

## HCV 関連遺伝子発現アデノウイルスベクターシステムの開発及び班員へのベクター供給

研究分担者 鐘ヶ江裕美 東京大学医科学研究所 助教

**研究要旨：**近年の C 型肝炎ウイルス (HCV) 研究の進展により、HCV 感染に伴い変動する細胞内遺伝子が複数同定されている。これらの細胞内遺伝子についての詳細な研究において、肝臓細胞へ遺伝子を効率的に導入することが可能であるアデノウイルスベクター(AdV)は有用性が高い。しかし、従来応用されていた第 1 世代アデノウイルスベクター(FG-AdV)は、細胞遺伝子発現に影響を与えるウイルス随伴 RNA (VA RNA)の発現が残存していたため、HCV 関連細胞遺伝子の検討では VA RNA の影響を考慮する必要があった。本研究では、新規に開発した作製法により初めて作製が可能になった VA RNA 欠失 AdV (VA 欠失 AdV) を用いてベクターから発現する微量の VA RNA によって細胞の遺伝子発現が攪乱されていたことを明らかにし、C 型肝炎の病態解明には VA 欠失 AdV の有用性が極めて高いことを示した。また、昨年度に引き続き、HCV に対する有用性の高い short-hairpin RNA (shRNA) についての解析も加え、shRNA を組み合わせることで相加的な HCV 増殖抑制効果が認められることも明らかにした。更に HCV の複製機構に関する宿主因子を発現する AdV やオートファジーに関連した遺伝子発現ヘルパー依存型 AdV を作製し共同研究者に供与した。

### A. 研究目的

C 型肝炎の病態の解明を行うためには、例えば HCV の複製を促進する miR122 などを発現あるいは細胞での発現をノックアウトする技術が必要である。本研究では肝臓への導入効率が高いアデノウイルスベクター (AdV) を用いた研究目的に則した発現機構を備えた AdV 開発を目的として研究を行う。AdV にはウイルス由来の VA RNA 発現が残存していたが、新規に開発された VA 欠失 AdV を応用することにより RNA 干渉機構を阻害しないシステムの応用が可能となっており、VA 欠失 AdV による shRNA や miRNA 発現を行っていく。また、ZFN や TALEN による細胞遺伝子発現のノックアウトを行うために、ZFN や TALEN を短期間高発現するシステムや CRISPR/Cas9 システムなどの最適化を図る。

### B. 研究方法

AdV から発現する微量の VA RNA による細胞遺伝子発現への影響の検討は、VA 欠失 AdV と従来の AdV を用いたマイクロアレー解析により行った。特に発現が低下していた遺伝子については、VA RNA 量依存的な発現量の推移を qPCR

により定量した。また、昨年度の解析により有用性が示唆されていた、HCV の 5'非翻訳領域に対する 2 種類の short-hairpin RNA (shRNA) を発現する VA 欠失 AdV について、様々な条件で JFH-1 感染細胞に導入し、3 日後に細胞を回収し、HCV ゲノムコピー数を 5'非翻訳領域に設定したプライマー/プローブを用いたリアルタイム PCR (qPCR) で定量するとともに、HCV 蛋白質の発現量を Western Blotting により評価した。他に班員供給用の AdV や Cas9 発現 AdV の作製は既報に従って行うとともに遺伝子サイズの大きな cDNA 発現用には「ヘルパー依存型 AdV」として当研究室オリジナルの方法により作製を行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究に当たっては、既に実用化されているレプリコン細胞を用いた検討や培養細胞内の公表された遺伝子が発現するベクター作製であり、特に倫理面に抵触する検討は行っていない。

### C. 研究結果

VA RNA は、アデノウイルス感染後期に大量に発現している VA RNA についての機能解析のみ



が行われており、ウイルスゲノム量の少ない感染初期における機能は不明な点が多かった。ウイルス感染初期と同程度の VA RNA を発現している AdV においてもこれまでは作製が困難であったため解析は不可能であり、大量に発現している VA RNA で認められていた細胞遺伝子発現攪乱の報告以降、概念的に VA RNA 発現が影響する可能性が示唆されてきた。

本研究では、昨年度までに確立した VA 欠失 AdV 作製法を用いて VA 欠失 AdV 作製が可能になったため、VA 欠失 AdV と従来の AdV を用いたマイクロアレイ解析を行い、微量の VA RNA による細胞遺伝子発現への影響について解析を行い、C 型肝炎病態解明における VA 欠失 AdV の有用性の検証を行った。

その結果、アデノウイルス研究で報告されていた大量の VA RNA により影響を受けていた遺伝子とは異なる複数の細胞遺伝子発現が少量の VA RNA により影響を受けていたこと、特に Hepatoma-derived growth factor (HDGF) の発現低下が著しいことが明らかになった。これらの遺伝子変化はアデノウイルス増殖に対抗する宿主抵抗性の 1 つである可能性が示唆されたが、それ以外にも細胞の増殖や癌化に関連する遺伝子の発現にも影響が認められた。以上の結果から、C 型肝炎の病態解明に応用するベクターとしては VA 欠失 AdV の有用性が極めて高いことが明らかになった。

また、HCV に対する shRNA として昨年度までに有用性が示唆された 2 種類を同時に発現する VA 欠失 AdV を用いた解析から、2 種類の shRNA を同時に感染した場合に有意な HCV 複製抑制効果が認められた。これらの結果から、複数の shRNA や small RNA を発現するベクターとしての VA 欠失 AdV の有用性が示された。現在、複数の shRNA や small RNA をタンデムに挿入する AdV 作製法についての検討も進めている。

また、近年ゲノム編集ツールとして盛んに応用されている CRISPR/Cas9 システムにも small RNA である guide RNA を用いることから VA 欠失 AdV の有用性が示唆された。しかし Cas9 を高度に発現する AdV の報告は少なく、例えばレンチウイルスベクターで応用されている CB プロモーターを用いた AdV の報告はない。そこでこれまでの経験を活かして条件検討を行い、CB プロモーターから Cas9 を発現する AdV の作製に成功した。しかし、Cas9 高度発現 AdV の作製が困難であったと言うことは高発現した Cas9 が細胞へ影響を与えていた可能性も示唆された。

そこで、Cre により Cas9 の高発現が誘導される複数の AdV システムの作製を行い、班員への供給体制を整えた。更に班員からの要請に応じて、HCV 感染にともない高度に発現する遺伝子を発現する AdV や C 型肝炎病態のオートファジーに関連した遺伝子を発現するヘルパー依存型 AdV を作製し班員に供給した。

## E. 結論

これまでは概念的にウイルスベクターにおけるウイルス由来産物を限りなく排除した究極のベクターとして VA 欠失 AdV の有用性が指摘されていたが、本年度の研究により微量の VA RNA でも細胞遺伝子発現がかく乱されていたことが明らかとなり、shRNA や miRNA の発現ベクターとしてだけでなく、VA 欠失 AdV の有用性が高いことを明らかにし、今後の供給体制を整えた。

また Cas9 発現には「Cre 依存型 AdV」の有用性も高いと考えられ、ZFN、TALEN に続いて Cas9 ベクター供給も可能となった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, and Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 2014;15:557-565.
- 2 Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS One* 2014 9:e108627.
- 3 Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I, and Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Ther* 2015:1-9.

### 2. 学会発表

- 1 Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of

- Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 2 Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
  - 3 Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
  - 4 Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
  - 5 Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector expressing pregenome RNA. 2014 International Meetin on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, Sepetember 3-6
  - 6 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、斎藤泉、鐘ヶ江裕美、近藤小貴、アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
  - 7 鈴木まりこ、近藤小貴、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発：cocally closed circular DNA (CCC)の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
  - 8 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11 月 25-27 日、2014
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍  
無し

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
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 $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles.	PLoS Pathog		doi: 10.1371/journal.ppat.1004534	2014
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	88	5578-5594	2014
Ogishi M, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Gatanaga H, Ode H, Sugiura W, Moriya K, Oka S, Kimura S, Koike K	Deconvoluting the composition of low-frequency hepatitis C viral quasispecies: Comparison of genotypes and NS3 resistance-associated variants between HCV/HIV coinfecting hepatocytes and HCV mono-infected patients in Japan	PLOS One	in press		2015
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	282	237-243	2015
Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T.	Effect of the infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells.	Hepato Res	44	E240-252	2014
Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T.	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$ in Infectious Virus Production.	J Virol	88	7541-7555	2014
Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H,	Targeting Cellular Squalene Synthase, an	J Virol	89	2220-2232	2015

Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M.	Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus.				
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol	95	2658-2667	2014
Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC.	Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses	J Virol Method	207	38-44	2014
Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY.	A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus.	Biosens Bioelectron	64	311-317	2014
Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY.	Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection.	Biosens Bioelectron	58	33-39	2014
Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K	Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.	J Virol	88	13352-13366	2014
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N	PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase	Molecules	19	4006-4020	2014
Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H	EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium	J Invest Dermatol	134	1158-1161	2014
Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW,	Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3	Mar Drugs	12	462-476	2014