

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いた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いた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



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/  $\beta$ -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・肝発がんおよびC型慢性肝炎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- $\beta$ 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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、CD34、AFP、Myc及びIL1 $\beta$ 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 $\delta$ の発現抑制によりTGF- $\beta$ によるSmad3、PDGFR $\alpha$ 及び $\alpha$ -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- $\beta$ 、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 Heppar1, 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, Heppar1 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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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、 $\beta$ -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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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が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  $\mu$  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  $\mu$  M と 10  $\mu$  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 CBP2mRNA 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 や HNF-1 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  $\mu$  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- 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-<sup>14</sup>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プ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、免疫プロット法、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 の核移行の障害に 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-<sup>14</sup>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。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生が強く示唆された。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型肝炎肝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/  $\beta$ -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/  $\beta$ -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



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/O、Lymphotoxin K/O、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、Smad3、PDGFR 及び  $\alpha$ -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/O )、Lymphotoxin K/O、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・肝発がんに於けるサイト

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 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- $\beta$  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

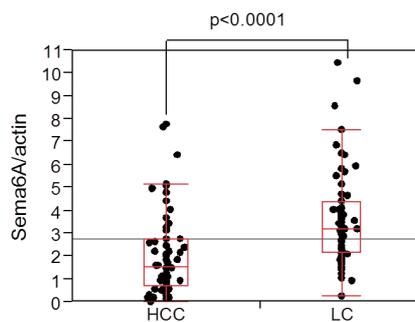
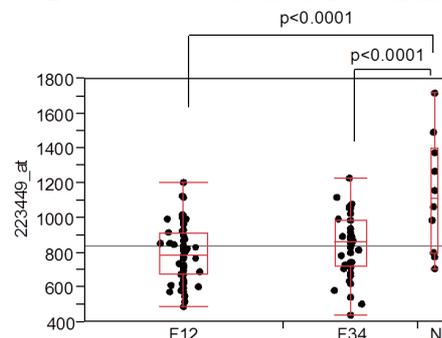


図 2 Sema6a の発現：正常肝と C 型慢性肝炎



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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -SMA の発現が有意に減少することを確認した。

次に、肝特異的感染を示すアデノ随伴ウイルス 8 型の Sema6A 組み換えウイルス (AAV8-Sema6a) を作成し PDGF-C Tg への感染実験を行った。AAV8-Sema6a-GFP では感染後 21 日間にわたり、肝内での Sema6A の発現が確認された (図 3)。

図3. 肝特異的アデノ随伴ウイルス(8型)によるSema6Aの過剰発現

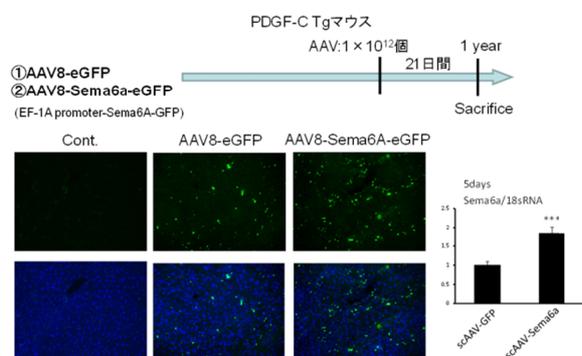
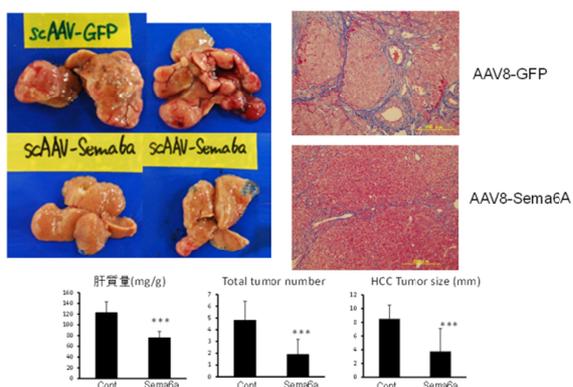


図4. AAV8-Sema6Aによる線維化抑制効果



次に、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 (図 4)。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、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、CD34、AFP、Myc 及び IL1 の発現低下を認め、線維化、血管新生、癌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 の発現抑制により TGF- $\beta$  による Smad3、PDGFR 及び  $\alpha$ -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。

#### D. 考察

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。また、Sema6A は発生期の小脳細胞骨格の再編成、軸索伸長ガイダンスに重要であるとの報告がある。これまでに、Semaphorin 遺伝子と線維化進展に関する報告は無い。今回、Sema6A の肝に於ける線維形成に及ぼす影響を検討した。

Sema6A の Lx-2 細胞での過剰発現や初代星細胞への精製蛋白の添加により、線維化発現遺伝子の発現低下が認められた。さらに肝特異的 AAV8 型による Sema6A の遺伝子導入により PDGF-C Tg の肝線維化と腫瘍形成を有意に抑制した。Sema6A は Lx-2 細胞での PKC、Smad3、PDGFR 及び  $\alpha$ -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。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、肝細胞の癌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る。

1) AAV8-Sema6A-GFP 組み替えウイルスをマウス肝に感染させ、肝細胞・肝星細胞・マクロファージを分画し、各分画での導入効率の解析を行う。2) 肝細胞及び肝星細胞(Lx-2細胞)のそれぞれのSema6A過剰発現細胞を樹立し、抗線維化シグナルの解析を行う。3) Sema6A トランスジェニックマウスを作成し、肝臓での線維化シグナルの解析を行う。4) Sema6A の細胞外ドメインを精製し、創薬としての可能性を検証する。

## E. 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T Terashima, T Yamashita, N Iida, T Yamashita, H Nakagawa, K Arai, K Kitamura, T Kagaya, Y Sakai, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Hepatol Res (in press)
- 2) K Yamada, E Mizukoshi, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, Y Takeshita, H Misu, T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko.

Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int (in press)

- 3) T Yamashita, A Kitao, O Matsui, T Hayashi, K Nio, M Kondo, N Ohno, T Miyati, H Okada, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Nakanuma, H Takamura, T Ohta, Y Nakamoto, M Yamamoto, T Takayama, S Arai, XW Wang, S Kaneko. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Hepatology 60(5):1674-85, 2014.
- 4) K Ishikura, H Misu, M Kumazaki, H Takayama, N Matsuzawa-Nagata, N Tajima, K Chikamoto, F Lan, H Ando, T Ota, M Sakurai, Y Takeshita, K Kato, A Fujimura, KI Miyamoto, Y Saito, S Kameo, Y Okamoto, Y Takuwa, K Takahashi, H Kidoya, N Takakura, S Kaneko, T Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. Diabetologia 57(9):1968-76, 2014.
- 5) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, K Murai, T Shiimoto, H Okada, R Takabatake, A Tokumaru, Y Sakai, T Yamashita, SM Lemon, S Murakami, S Kaneko. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway. Hepatology 60(5):1519-30, 2014
- 6) T Yamashita, S Kaneko. Orchestration of hepatocellular carcinoma development by

- diverse liver cancer stem cells. J Gastroenterol 49(7):1105-10, 2014.
- 7) M Kitahara, E Mizukoshi, Y Nakamoto, N Mukaida, K Matsushima, S Kaneko. 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.
- 8) N Oishi, T Yamashita, S Kaneko. Molecular biology of liver cancer stem cells. Liver Cancer 3(2):71-84, 2014.
- 9) F Lan, H Misu, K Chikamoto, H Takayama, A Kikuchi, K Mohri, N Takata, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, Y Takeshita, H Noda, Y Matsumoto, T Ota, T Nagano, M Nakagen, KI Miyamoto, K Takatsuki, T Seo, K Iwayama, K Tokuyama, S Matsugo, H Tang, Y Saito, S Yamagoe, S Kaneko, T Takamura. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes 63(5):1649-64, 2014.
- 10) Y Takeshita, T Takamura, M Honda, Y Kita, Y Zen, KI Kato, H Misu, T Ota, M Nakamura, K Yamada, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia 57(5):878-90, 2014.
- 11) T Shimakami, M Honda, T Shirasaki, R Takabatake, F Liu, K Murai, T Shiimoto, M Funaki, D Yamane, S Murakami, SM Lemon, S Kaneko. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Sci Rep 4:4688, 2014.
- 12) H Nakagawa, E Mizukoshi, N Iida, T Terashima, M Kitahara, Y Marukawa, K Kitamura, Y Nakamoto, K Hiroishi, M Imawari, S Kaneko. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. Cancer Immunol Immunother 63(4):347-56, 2014.
- 13) K Kato, T Takamura, Y Takeshita, Y Ryu, H Misu, T Ota, K Tokuyama, S Nagasaka, M Matsuhisa, O Matsui, S Kaneko. Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease. PLoS One 9(3): e92170, 2014.
- 2.学会発表  
なし
- 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

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成と病態解析

研究分担者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

**研究要旨：**C型慢性肝は炎症・脂肪化・線維化を特徴とし肝がんを発症する。これまでに、非環式レチノイド (NIK-333,ペレチノイン) の肝発がん抑制機構として肝線維化抑制・脂肪抑制作用を有することを報告した (Cancer Research 2012)。本年度は動脈硬化高脂肪 (Ath+HF) 食NASHマウスモデルの系を用いて、HCVトランスジェニックマウス (HCV Tg) にAth+HF食を投与し、肝炎・肝がんにおけるPKM (pyruvate kinase, muscle) の発現意義について解析した。また、臨床検体PKL/PKM1/PKM2の発現を比較した。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の発現が上昇した。非がん部に於けるPKM2の発現上昇は肝星細胞の活性化と関連していた。また、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。以上よりPKM2は、肝線維化・肝がんの新たな標的分子となり得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。

本研究は動物モデルを用いてC型慢性肝炎から肝がん 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。

B. 研究方法

本年度は、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。

(倫理面への配慮)

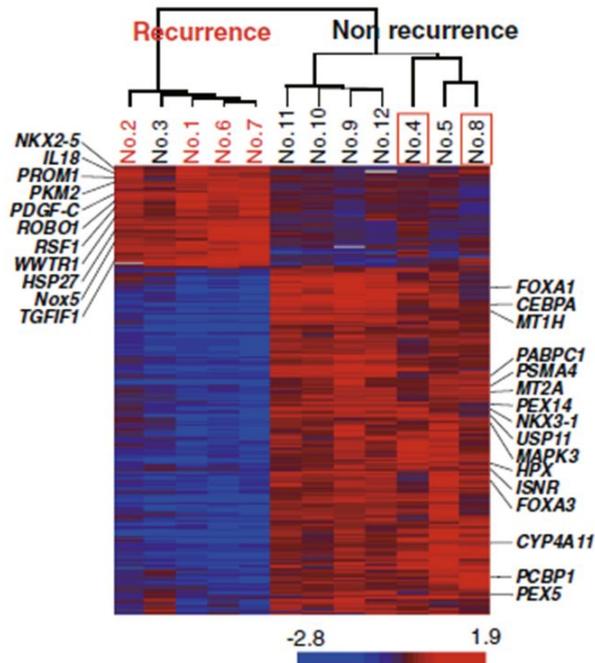
遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針 (平成 18 年 6 月 1 日制定) に従った。倫理面、実験手技に関して金沢大学動物実験施設に申請し承認を得た。

### C. 研究結果

現在、HCV関連肝がんの再発抑制を目的として非環式レチノイド（NIK-333,ペレチノイン）の臨床試験が行われている。これまでに肝線維化からの肝発がんモデルマウスであるPDGF-C Tg マウスを用い、ペレチノインの肝線維化・肝発がん抑制効果を明らかにした。（Cancer Research 2012）。さらに、ペレチノインはオートファジーを活性化させることで肝脂肪化・炎症を抑制し肝発がんを抑制することを昨年度の班会議で報告した（論文投稿中）。

また、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（BMC Cancer 2013）（図1）。

図1 ペレチノイン投与中の肝内遺伝子発現再発群と非再発群で遺伝子発現が異なる。



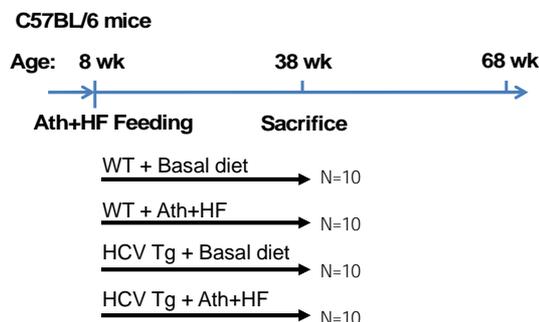
再発群で発現上昇する遺伝子としてPDGF-C、Prom1(CD133)などに加えPKM (pyruvate kinase, muscle) の発現上昇が認められた。PKM は解糖系の最終段階の

律速酵素(ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸の反応)であり、選択的スプライシングにより Exon10 を欠損した PKM1 と Exon9 を欠損した PKM2 の2種類のアイソフォームを形成する。正常肝組織は、PKMではなくPKL(liver)が発現している。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。また、PKM2 は解糖系酵素としての役割の他に転写因子としての機能を有し、Wnt/-cateninの活性化、STAT3の活性化を介しがん化シグナルの一翼を担っている。これまでに、肝炎・肝がんにおけるPKM2の意義は明らかではない。

今回、以前に報告した食餌性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。

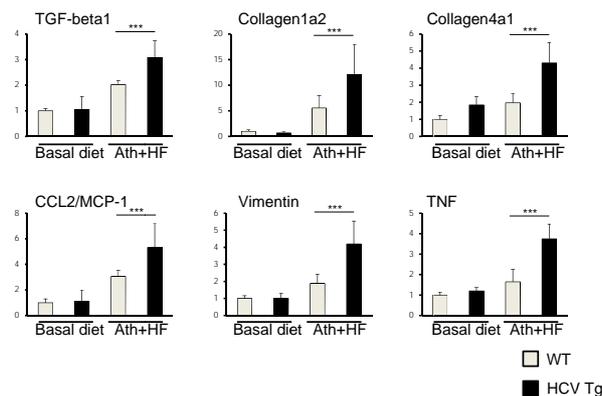
マウス実験プロトコルを図2に示した。Ath+HF食をHCV Tgに投与すると、劇症肝炎を発症し、死亡するマウスが認められた(詳細につき解析中)。今回、生存したマウスを用いて解析を行った。

図2 実験プロトコル



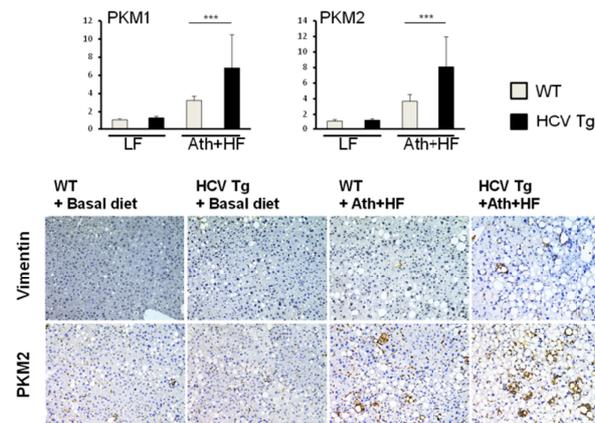
コントロール食では WT マウス及び HCV Tg 群で炎症・線維化シグナルに差は見られなかった。Ath+HF 食では HCV Tg で WT マウスに比し、TGF- $\beta$ 、COLA1A、COLA4A1、CCL2、Vimentin 及び TNF の有意な亢進を認めた(図3)。

図3 線維化関連シグナルの遺伝子発現



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(図4)。

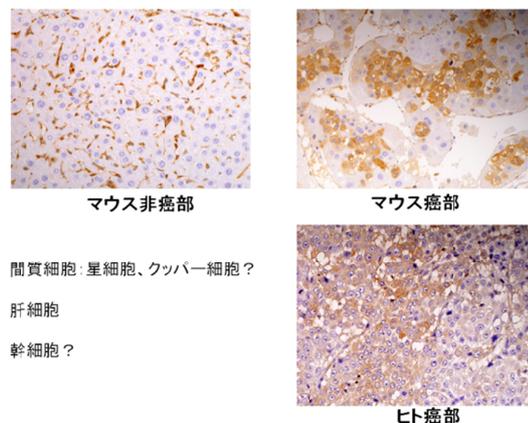
図4 肝線維化進展とPKM2発現



一方、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(図5)。

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

図5 非癌部・癌部におけるPKM2発現の意義

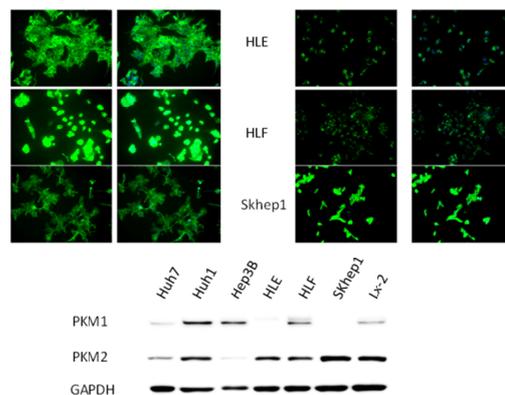


間質細胞・星細胞、クッパー細胞?  
肝細胞  
幹細胞?

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(図6)。

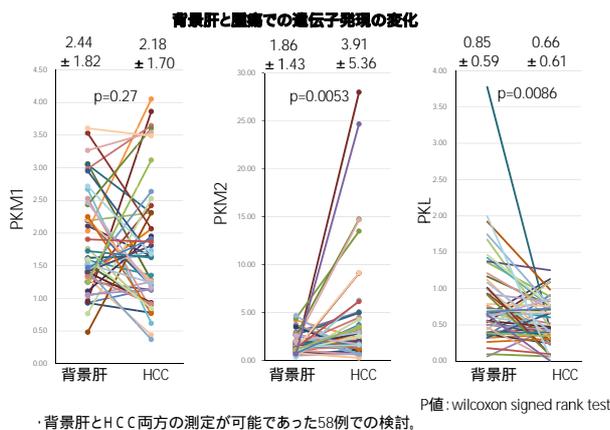
図6 肝癌細胞株におけるPKMの発現



58 例の C 型肝がん症例のがん部と非がん部で PKM1/PKM2/PKL の遺伝子発現を比較した。PKM2 はがん部で有意に発現亢進し、PKL はがん部で有意な発現の低下を認めた。

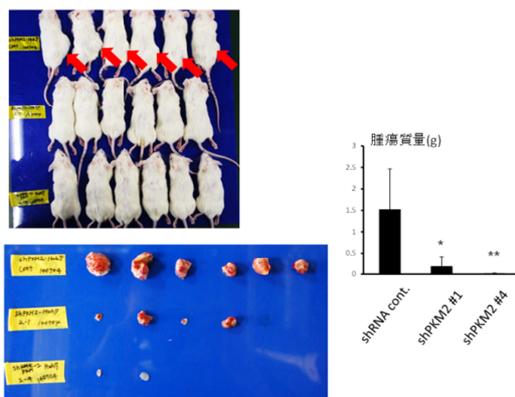
また、PKM2 高発現群では予後不良であった。一方、PKM1 の発現はがん部・非がん部で有意差を認めなかった（図7）。

図7 肝癌組織に於けるPKM2の意義



次に、マウス xenograft モデルにて PKM2 の肝癌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（図8）。

図8 PKM2ノックダウンによる腫瘍形成能の低下



また、PKM2発現抑制によりEpCAMやCD133の発現低下が認められ、PKM2は肝癌の幹細胞性維持に関与していると考えられた。

#### D. 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。また、PKM2 は解糖系酵素としての役割の他に転写因子としての機能を有し、Wnt/ -catenin の活性化、STAT3 の活性化を介したがん化シグナルの一翼を担っている。今回、肝炎・肝癌における PKM2 の意義を解析した。

Ath+HF 食を HCV Tg に投与すると、WT マウスに比し、より強い脂肪化・線維化の進行が認められ、TGF- $\beta$ 、COLA1A、TNF などの有意な発現亢進を認めた(図3)。また、PKM1/PKM2 の発現は Ath+HF 食を HCV Tg に投与した群で有意に高値であり、肝の間質に多く発現していた(図4)。さらに、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。臨床サンプルを用いた解析では、がん部で PKL の発現低下、PKM2 の発現上昇を認め、PKM1 はがん部・非がん部で差を認めなかった。これらのことから、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、肝癌では PKM2 の発現が上昇すると考えられた。しかしながら、肝癌細胞株のなかでも PKM1 が過剰発現している細胞も認められ、PKM1/PKM2 の肝癌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 が肝癌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。

## E. 結論

PKM2 の肝炎・肝がんにおける意義について検討した。

1) 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。

2) 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。

3) PKM2 は、肝線維化・肝がんの標的分子となり得る可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Selitsky SR, Baran-Gale J, **Honda M**, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. *Sci Rep*. 2015 Jan 8;5:7675. doi: 10.1038/srep07675.

2) Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. Hum Genet. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, **Honda M**, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I,

Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. 2014 Dec 17. [Epub ahead of print]

3) Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2014 Oct 16. doi:10.1111/hepr.12436. [Epub ahead of print]

4) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. *Hepatology*. 2014. Nov;60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.

5) Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, **Honda M**, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Taniai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. *Hepatol Res*. 2014 Sep 14. doi:

- 10.1111/hepr.12423. [Epub ahead of print]
- 6) Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int.* 2014 Sep 15. doi: 10.1111/liv.12685. [Epub ahead of print]
- 7) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Diabetologia.* 2014 May;57(5):878-90. doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.
- 8) P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, **Honda M**, Kaneko S. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 May;63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
- 9) The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, **Honda M**, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. *Sci Rep.* 2014 Apr 15;4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
- 10) Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi M, **Honda M**, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.
- 11) New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, **Honda M**, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One.* 2014 Feb 10;9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
2. 学会発表  
なし
- 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

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

病態進展と幹細胞との関連解析

研究分担者：出澤 真理 東北大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨：**我々の研究グループは間葉系幹細胞の数パーセントの比率で多能性幹細胞 Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞が含まれていることを見出した。この細胞は1細胞から3胚葉性の細胞への分化能と自己複製能を有し、かつ腫瘍性を持たない。骨髄や脂肪、皮膚、臍帯などの間葉系組織から多能性 (SSEA-3) と間葉系 (CD105) マーカー二重陽性細胞として精製可能である。すなわち生体に存在する腫瘍性を持たない多能性幹細胞である。本プロジェクトでは急性および慢性肝障害モデルにおけるMuse細胞の有効性を検討し、さらに生体内に投与したときの体内動態や分化能を探る。

A. 研究目的

幹細胞の解析を行い新規治療法の開発を目指す。ヒト臨床サンプルを用いて標的分子、および幹細胞の動態を解析し、実験モデルから得られた結果の検証を行う。

B. 研究方法

SCID マウス (10-12 週齢, 雄) の急性肝障害モデルとして腹腔内に四塩化炭素 1.5 ml/Kg 投与し劇症肝炎を作成する。投与 1 日後にヒト骨髄由来 Muse 細胞と 2 万細胞、尾静脈に投与した。慢性肝障害モデルとして四塩化炭素 0.5 ml/Kg を週に 2 回腹腔内投与を 8 週間続け、平行してモデル作成開始から 2 週、4 週、6 週でそれぞれ 5 万細胞のヒト骨髄由来 Muse 細胞と尾静脈から投与した。Muse 細胞は GFP-lentivirus で標識したヒト骨髄間葉系幹

細胞を SSEA-3 を用いて FACS で Muse 細胞を陽性細胞として、また陰性細胞を Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 (非 Muse 細胞) として分けて投与した。動物の体重等一般状態の他、肝機能酵素を計測し、組織学的検討を行う。

(倫理面への配慮)

実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「ヒト骨髄および臍帯組織由来間葉系細胞の解析研究 (2008 - 82 号)」で承認をすでに受けている。遺伝子導入実験は「東北大学遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている (研研 76 - 20 - 35 号)。また動物実験委員会の承認に関しては 2011 医動 - 282、2011 医動 - 283、2011 医動 - 284、2011 医動 - 285 にて承認を得た上で実験を行っている。

### C. 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~2%/1mm<sup>2</sup>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Heppar1, 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。これらのパラメーターはMuse群、非Muse群、PBS群間で有意差が無かった。このことからMuse細胞は血管に投与されたのち、傷害された肝組織を認識し、生着の後、胚葉を超えて中胚葉から内胚葉系の自発的分化を行い、肝組織を構成する細胞に分化すると考えられた。

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、~6%/1mm<sup>2</sup>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。このことから傷害肝臓に生着したMuse細胞は自発的に肝細胞に分化し、機能回復をもたらすことができることが示唆された。

### D. 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, Heppar1 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る。

### E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. Spinal Surgery (in press).
- 2) Okano T, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. Anat. Rec (Hoboken). 297(1):4-5, 2014.
- 3) Albertine KH, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. Anat. Rec (Hoboken). 297(1):1-3, 2014.
- 4) Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. Pathology International. 64(1):1-9, 2014.
- 5) Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. Anat Rec. 297(1):98-110, 2014.
- 6) Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. 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):717-28, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Mari Dezawa Discovery of Muse Cells

shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, 日仏再生医学シンポジウム, 2014年11月20日, 東京

- 2) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第56回日本先天代謝異常学会, 2014年11月14日, 仙台
- 3) 出澤真理, 再生医学の現状とMuse細胞の将来展望, 弘前大学整形外科学講義, 2014年11月11日, 弘前大学
- 4) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 弘前再生医療講演会, 2014年11月10日, 弘前大学
- 5) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第31回細胞療法研究会, 2014年11月4日, 愛知医科大学
- 6) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 未来医療開発プロジェクト(MIAST)シンポジウム, 2014年8月8日, 岩手医科大学
- 7) 出澤真理, 腫瘍性の無い生体由来多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第14回日本外傷歯学会, 2014年7月26日, 大阪歯科大学
- 8) 出澤真理, 再生医療研究の現状とMuse細胞の将来展望, 特許庁 平成26年度先端技術研修, 2014年6月20日, 東京
- 9) 出澤真理, 腫瘍性の無い新しい多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 経和会総会, 2014年6月14日, 東京
- 10) 出澤真理, 生体に内在する多能性幹細胞

- 胞 Muse細胞の担う機能 ; Regenerative homeostasisとstem cell failureの提唱, 第20回神戸全体会議, 2014年6月13日, 神戸
- 11) 出澤真理, 骨髄と結合組織を足場とする多能性幹細胞 Muse細胞の担う生体内修復機能, 第46回日本結合組織学会学術大会/第61回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2014年6月6日, 名古屋
- 12) 出澤真理, Muse細胞発見のもたらす間葉系幹細胞のパラダイムシフト, 第55回日本神経学会, 2014年5月24日, 福岡
- 13) 出澤真理, 腫瘍性の無い新しい多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, Medical Cooperation Meeting of Hepatitis (MCH), 2014年5月14日, 宮城県石巻市
- 14) Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure, Seminar at Nelson Biological Labs in Rutgers, 2014年4月30日, Rutgers, The State University of New Jersey, USA

- 15) Mari Dezawa Making three dimensional human colored skin by using Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, Stem Cells and Tissue Injury Platform Session at EB 2014, 2014年4月28日, San Diego, USA
- 16) Mari Dezawa Discovery of Muse Cells, Novel Pluripotent Stem Cells That Reside in Human Mesenchymal Tissues: Implications for New Concepts of Regenerative Homeostasis and Stem Cell Failure, PPSSC 2014, 2014年4月12日, 台北 (台湾)

#### 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

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

病態進展の病理学的解析と制御法の開発

研究分担者：坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部 教授

**研究要旨**：肝細胞癌並びに背景肝の分子病理学的多様性を解明することで、発癌初期の分子異常を明らかにする。具体的には、背景肝障害の定量的評価、癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常・幹細胞マーカー発現に着目した解析を行う。本年度は、背景肝における線維成分の定量解析を行い、エラスチンはコラーゲンに比して後期に蓄積を認め、線維化進展例における独立した発癌リスク因子となることが示された。Wnt/  $\beta$ -catenin, LGR5に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析において、OATP1B3の発現が、Wnt/  $\beta$ -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。EOB-MRIの肝細胞相において、Wnt/  $\beta$ -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。

A. 研究目的

肝細胞癌の多くは肝炎ウイルスの持続感染による慢性障害肝を背景に生じるが、中でもHCVからの発癌の多くが、前癌病変の異型結節ないし血管新生を伴わない早期肝細胞癌、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞癌、そして転移能を有する進行肝細胞癌へと多段階的に発生・進展することが示されてきている。しかし、その詳細な分子機構、特に発癌初期の分子異常についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、そのような肝細胞癌の分子病理学的多様性を解明することで、ウイルス陰性化後も肝細胞癌が顕在化することをより正確に予測、診断し、さらには適切な予防、治療を可能とすることを旨とする。

B. 研究方法

1) 背景肝障害の定量と発癌リスク評価

1. 生検標本における膠原線維・弾性線維定量とリスク評価

2) がん関連遺伝子異常・シグナル伝達異常と発癌・進展

1. Bmi-1、c-Myc の発現亢進・動態解析
2. その他癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常の分子病理学的検討

3) 幹細胞マーカー発現と発癌・進展

1. Wnt/  $\beta$ -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析
2. 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の検討

(倫理面への配慮)

本研究計画では、癌組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。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、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号16-34-4）。

### C. 研究結果

#### 1) 肝線維化の定量と発癌リスク評価

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（武蔵野赤十字病院との共同研究）。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、発癌の有無との比較解析を行い、エラスチンが発癌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。

#### 2) Wnt/ $\beta$ -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析

$\beta$ -catenin の遺伝子変異は約40%と、C型肝炎を背景とする肝細胞癌で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/ $\beta$ -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、ヒト肝細胞癌株KYN-2細胞にLiCl処理を行う事で、Wnt/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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。

### D. 考察

・エラスチンは、独立した発癌リスク因子となることが示されたが、SVR後の発癌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陽性肝細胞癌は、Wnt/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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る。

### E. 結論

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癌リスク予測に有用である可能性が示唆された。Wnt/ $\beta$ -catenin, LGR5に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析において、OATP1B3の発現が、LGR5を含むWnt/ $\beta$ -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を示した。来年度は、発癌早期における

遺伝子変異、癌関連分子発現異常の詳細な病理学的解析、LGR5 の機能解析を含めた、Wnt/ $\beta$ -catenin activated HCC と、Biliary/stem マーカー陽性 HCC との関連性の検討を行う。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ueno A, Masugi Y, Yamazaki K, Komuta M, Effendi K, Tanami Y, Tsujikawa H, Tanimoto A, Okuda S, Itano O, Kitagawa Y, Kuribayashi S, Sakamoto M. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 61; 1080-1087, 2014.

### 2. 学会発表

なし

## 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

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

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

研究分担者：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

**研究要旨**：最近の報告によると、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase:以下TERT)は肝細胞がんにおけるドライバー遺伝子の中でも最も重要な分子であることが明らかとなった (Nature Genetics 2014, Totoki *et al.*)。我々のグループは、これまでに、TERTが従来から知られていた逆転写酵素活性以外に、RNA dependent RNA Polymerase (RdRP)活性を有することを見出し、TERTのRdRP活性ががん幹細胞の機能維持に関わることを報告してきた。本研究では、肝細胞がん発がんプロセスにおけるTERT-RdRP活性の役割を解明しTERT-RdRPの新たな治療標的としての可能性を検討することを目的とした。

A. 研究目的

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase:以下TERT)が肝がん発がんにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。本分担研究では肝細胞がん発がんプロセスにおけるTERT-RdRP活性の意義の検討を行うことにより、肝細胞がん治療戦略としてTERT-RdRP標的治療の可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 本分担研究開始前に既に同定していた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。(細胞株入手の手配が迅速に進んだ卵巣がん細胞株を用いての検討を行った。)

2. 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。

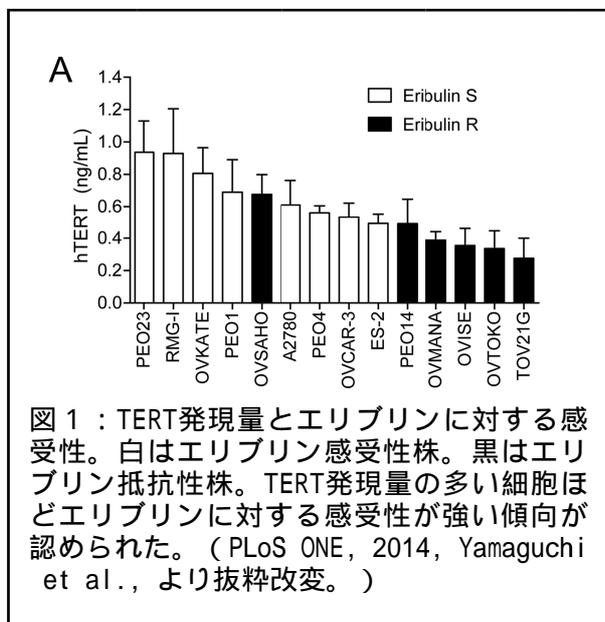
(倫理面への配慮)

該当事項なしのため特記なし

C. 研究結果

1. 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 (図 1)。

2. 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。



#### D. 考察

TERT 発現量とエリ布林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 阻害剤であるエリ布林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が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。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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Lassmann T, Maida Y, Tomaru Y, Yasukawa M, Ando Y, Kojima M, Kasim V, Simon C, Daub C, Carninci P, Hayashizaki Y, Masutomi K. TERT regulates microRNAs; Int J Mol Sci, in press
  - 2) Yamaguchi S, Maida Y, Yasukawa M, Kato T, Yoshida M, Masutomi K. Eribulin mesylate targets human telomerase reverse transcriptase in ovarian cancer cells; PLoS ONE, 9: e112438, 2014
  - 3) Kobayashi T, Masutomi K, Tamura K, Moriya T, Yamasaki T, Fujiwara Y, Takahashi S, Yamamoto J, Tsuda H. Nucleostemin expression in invasive breast cancer; BMC Cancer, 14: 215, 2014
  - 4) Maida Y, Yasukawa M, Okamoto N, Ohka S, Kinoshita K, Totoki Y, Ito TK, Minamino T, Nakamura H, Yamaguchi S, Shibata T, Masutomi K. Involvement of TERT in heterochromatin maintenance; Mol Cell Biol, 34: 1576-1593, 2014
- ##### 2. 学会発表
- 1) Analysis of human RNA dependent RNA polymerase JSTさきがけ国際シンポジウム「哺乳類における小分子RNA」 増富健吉 2014年2月21日 JST東京本部
  - 2) hTERT regulates heterochromatin maintenance via its RNA-dependent RNA

polymerase activity. Maida Y, Yasukawa M, Yamaguchi S, Masutomi K. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日-27日 パシフィコ横浜

3) hTERT contributes to heterochromatin maintenance via its RNA-dependent RNA polymerase activity. Maida Y, Yasukawa M, Yamaguchi S, Masutomi K. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日 パシフィコ横浜

#### 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

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

C型肝炎ウイルスコアタンパクによるmitophagyの抑制

研究分担者：日野 啓輔 川崎医科大学肝胆膵内科学 教授

研究協力者：原 裕一 川崎医科大学肝胆膵内科学 講師

**研究要旨**：C型肝炎ではミトコンドリア障害が存在し、ミトコンドリア由来の活性酸素種 ( ROS ) 産生や酸化ストレスの誘導に関連している。一方、ミトコンドリアには低分子抗酸化物質や抗酸化酵素が豊富に存在し、さらには機能が低下したミトコンドリアはミトコンドリア特異的autophagy ( mitophagy ) で消化される。そこで本分担研究ではC型肝炎ウイルス ( HCV ) がmitophagyに及ぼす影響について検討した。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。HCV-JFH1株感染Huh7細胞、HCVトランスジェニックマウス、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討したところ、HCV感染下ではParkinのリン酸化は抑制されないもののミトコンドリアへの局在が抑制された。ParkinとHCVの共免疫沈降ではコア蛋白とParkinの結合が確認され、さらにyeast two hybrid assayではParkinのN端側 ( 215 アミノ酸 ) とコア蛋白の特異的結合が認められた。これによりミトコンドリア外膜のユビキチン化、mitophagosomeの形成ならびに消化はすべて抑制された。Mitophagyが抑制された細胞はROSの産生が亢進することも確認された。さらに興味深いことにParkinをsiRNAでノックアウトするとHCVコア蛋白の発現が抑制され、HCVの増殖にParkinとコア蛋白の結合が何らかの役割を果たしていると推測された。以上の成績はC型肝炎の病態や肝発癌における酸化ストレスの発現・持続機構として、コア蛋白によるmitophagyの抑制が極めて重要であることを示すものである。

A. 研究目的

HCV 感染は肝発癌の主要原因であり、HCV 起因性肝発癌機構の解明は喫緊の課題である。C 型肝炎は他の炎症性肝疾患にくらべて肝内での酸化ストレスが亢進しており、酸化ストレスは病態の進展や肝発癌に深く関与していることが明らかにされてい

る。HCV コア蛋白はミトコンドリア電子伝達系への障害を介して ROS を産生しミトコンドリア障害を惹起する。一方、ミトコンドリアにはグルタチオンなどの抗酸化物質や MnSOD などの抗酸化酵素が豊富に存在し、障害されたミトコンドリアはミトコンドリア特異的 autophagy ( mitophagy ) により排

除されてその品質管理がなされる。このように HCV に起因する酸化ストレスは HCV コア蛋白による直接的なミトコンドリア障害だけでは説明できない。そこで HCV が mitophagy に及ぼす影響について検討した。

## B. 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。なお、*in vitro* での mitophagy の誘導には carbonyl cyanine *m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) (10 μmol/L) を使用した。

(倫理面への配慮)

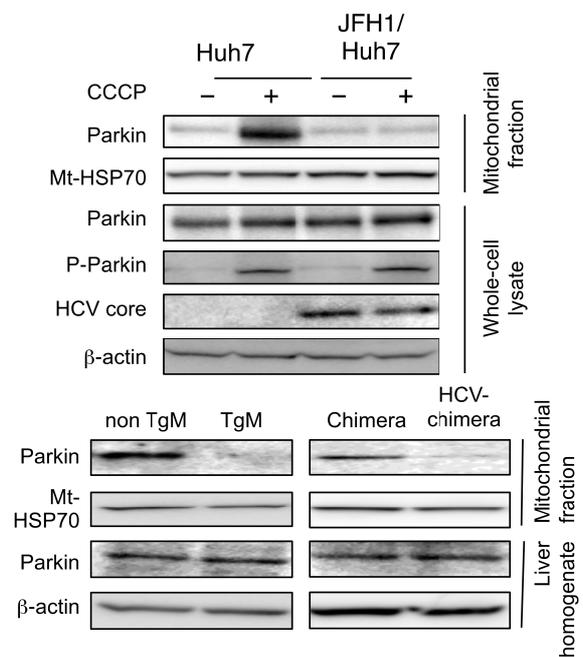
本研究は川崎医科大学動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

## C. 研究結果

### 1. Parkin のミトコンドリア局在の抑制

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 (図 1)。しかし、PINK 1 のミトコンドリアへの局在は HCV 感染に関係なく障害されなかった。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。

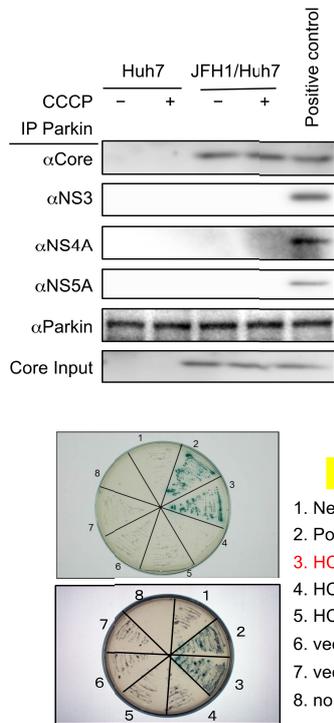
図 1



### 2. Parkin と HCV コアタンパクの結合

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、図 2 に示すように、共免疫沈降では Parkin と HCV コアタンパクの結合を認められた。さらに Parkin のどの部分と結合するのか yeast two hybrid assay で検討した (図 2) ところ、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。

図 2

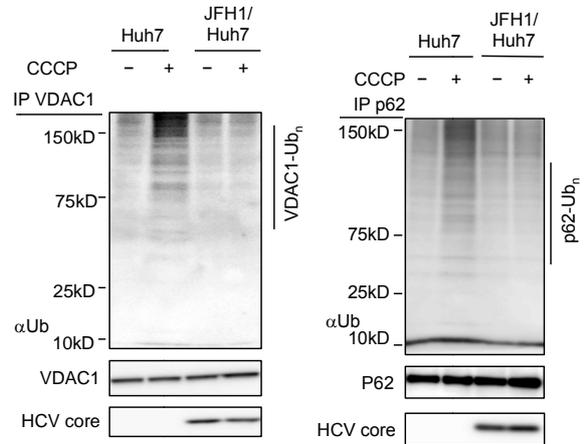


興味深いことにParkinをsiRNAでノックアウトするとParkinの発現が有意に低下したことから、HCVコアタンパクとParkinの結合はHCV増殖に有利に作用していると考えられた。

### 3 . ミトコンドリア外膜タンパクのユビキチン化抑制

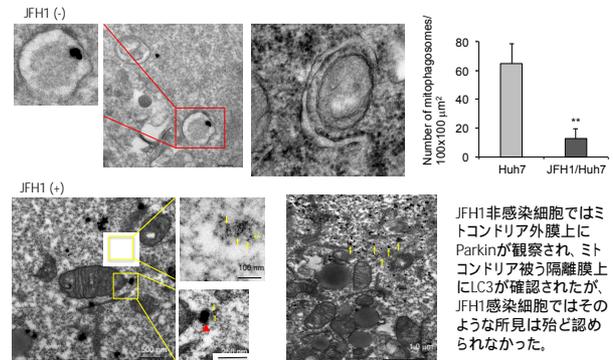
Parkinのミトコンドリアへの局在に引き続いて起こるのはミトコンドリア外膜タンパクのユビキチン化である。CCCPによるmitophagy誘導後JFH1感染細胞は非感染細胞にくらべて図3に示すようにVDAC1ならびにp62のユビキチン化が明らかに抑制された。

図 3



### 4 . Mitophagosome形成の抑制

図 4

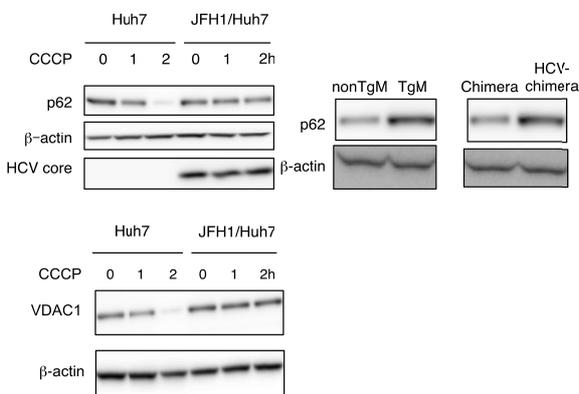


JFH1感染細胞では非感染細胞に比べてLC3-IIタンパクの発現が有意に高かった。また、免疫電子顕微鏡による観察では、図4に示すようにJFH1非感染細胞にmitophagyを誘導するとミトコンドリア外膜上にParkinの局在が確認され、またミトコンドリアを被う隔離膜上にLC3の局在が確認された。一方、JFH1感染細胞ではそのような所見が殆ど観察されなかった。さらに100 μm<sup>2</sup>あたりのmitophagosomeの数はJFH1感染細胞で有意に少なかった。

## 5. 障害ミトコンドリアの消化抑制

MitophagyにおいてMitophagosome形成後はlysosomeと融合してmitophagosomeに内包される障害ミトコンドリアは消化される。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。図5に示すように、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。

図5



### D. 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。つまり、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関連肝細胞癌組織の癌部・非癌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癌機構の観点からも重要な病態であると考えられる。

### E. 結論

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。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Am J Pathol* 2014;184:3026-39.
- 2) Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, **Hino K**. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int* 2014;doi 10.1111/liv.12675.
- 3) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, **Hino K**. Hepatic oxidative stress in

ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of adenosine monophosphate-activated protein kinase/proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha signaling. *Hepatol Res* 2014;44:E229-39.

- 4) **Hino K**, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;44:123-32.
- 5) Abe M, Miyake T, Huno A, Imai Y, Sawai Y, **Hino K**, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2014:doi 10.1007/s00535-014-1007-2.
- 6) Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, **Hino K**, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum genet* 2014:doi 10.1007/s00439-014-1520-7.
- 7) Nishida N, **Hino K**, et al. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified

by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014;9:e86449

- 8) Omata M, Nishiguchi S, Ueno Y, Mochizuki H, Izumi N, Ikeda F, Toyoda H, Yokosuka O, Nirei K, Gneda T, Umemura T, Takehara T, Sakamoto N, Nishigaki Y, Nakane K, Toda N, Ide T, Yanase M, **Hino K**, Gao B, Garrison KL, Dvory-Sobol H, Ishizaki A, Omote M, Brainard D, Knox S, Symonds WT, McHutchison JG, Yatsushashi H, Mizokami M. Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial. *J Viral Hepat* 2014:doi 10.1111/jvh.12312
- 9) Nakamura M, Nakashima H, Abe T, Ensako T, Yoshida K, **Hino K**. Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy for Patients with Advanced Gallbladder Cancer. *Anticancer Res* 2014;34:3125-9.

## 2. 学会発表

- 1) Nishina S, Hyogo H, Kawanaka M, Miyake T, Abe M, Yamashita S, Tobita H, Sato S, Hoasa Y, Chayama K, **Hino K**. Oral glucose tolerance test predicts hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease patient without overt diabetes mellitus. AASLD The liver Meeting Boston 2014.
- 2) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. 5<sup>th</sup> World Congress on Targeting Mitochondria. Berlin 2014.

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

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

研究分担者：加藤 宣之 岡山大学 教授

**研究要旨：**C型肝炎ウイルス (HCV) の複製が細胞内で長期に及んだ場合において、細胞機能、特に細胞癌化にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。具体的には、HCV研究に汎用されているヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すヒト肝癌細胞株Li23由来の細胞を用いて、HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化の解明とともに、長期のHCV-RNAの複製により顕著に発現低下し肝病態の悪化に関与していると考えられる2つの宿主遺伝子CPB2とBASP1に焦点を当て、それらの発現低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。昨年度、これらの遺伝子の発現低下とDNAのメチル化度との関連性を示唆する結果を得たため、今年度はさらに詳細に解析を行い、以下に示すような研究成果を得た (1) CPB2遺伝子の発現低下はDNAのメチル化によることが示唆された。プロモーター領域の詳細な解析によりCPB2遺伝子の発現は肝特異的転写因子HNF1により完全に制御されていることを明らかにした。しかしながら、HNF1結合領域のメチル化度でこの遺伝子の発現低下を説明できず、脱メチル化剤で誘導されるHNF1以外の未知の宿主因子が、この遺伝子の発現低下を引き起こすことが示唆された。(2) 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。以上の結果、両遺伝子の発現低下は異なる分子機序により引き起こされていると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) の感染は肝がん患者の約7割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する治療もペグ化インターフェロン、リバビリンおよびシメプレビル (HCVプロテアーゼ阻害剤) による三剤併

用療法などにより患者の80-90%は治癒するようになった。しかしながら、治癒しても、一定の確率で発がんが起こるものと予想されている。さらに、HCVの持続感染による発がん機構については、諸説あるものの未だ解明されていない。それは、HCVが宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく理解されていないためである。これまで、多くの研究者が、この問題の解明を試みて来

たが、HCVが増殖する培養細胞株はヒト肝癌由来のHuH-7細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換キメラマウスも実験系として使われているものの、費用がかかるうえにHCVの増殖に個体差があることから発がんに関する研究にはあまり適していない。

2009年、我々は、HuH-7細胞株とは遺伝子発現プロファイルが異なるヒト肝癌細胞株Li23がHCVの増殖を許容することを見出し報告した。そして、このLi23由来の細胞を用いることによりHCV 1b遺伝子型（0株）のHCV-RNA複製細胞株として4種類（OL, OL8, OL11およびOL14細胞と名付けた）樹立することに成功した。

我々は、樹立したこれらのHCV-RNA複製細胞を用いることにより、これまでのHuH-7由来の細胞を用いた研究では得られなかった知見が新たに見出されるのではないかと考えた。また、これまでは、HCVの短期的な複製増殖に関与する多くの宿主因子の同定がなされて来た。我々は、このような方向の研究ではなく、HCVの複製増殖が長期に及んだ場合に宿主側に何らかの変化が生じ、それが蓄積して結果的には不可逆的な大きな変化になるのではないかという仮説を立てた。その背景には、HCVの複製が長期に及ぶとHCVの遺伝的変異が蓄積され、それに伴い宿主因子の機能にも影響が出るのではないかという考えがある。事実、4年間、細胞を培養した場合には、細胞の増殖能が亢進し、HCVの遺伝的変異も時間に比例して蓄積し（4年間で1.3-3.2%塩基が変異する）、HCVの遺伝的多様性も時間に比例して増大（HCVのクローン間で0.2-

1.9%塩基が異なる）することを明らかにして報告した(Kato et al, PLoS ONE e91156, 2014)。

我々は、上記の仮説の検証を試み、HCV-RNAの長期複製（2年以上）により不可逆的に発現変動した9種類の宿主遺伝子（発現亢進した *WISP3*, *TBC1D4*, *ANGPT1*, *SEL1L3*および*CDKN2C*遺伝子と発現低下した *BASP1*, *CPB2*, *ANXA1*および*SLC1A3*遺伝子）を2012年に同定した。同定した9種類の宿主遺伝子の発現変動と肝病態との関係をC型慢性肝炎91症例で調査した（金沢大学の金子周一先生と本多政夫先生に依頼）。その結果、幾つかの遺伝子の発現変動と肝線維化や脂肪化と相関関係にあることが分かった。その中でも顕著な発現低下（2年間で数十分の1に低下）が観察された*CPB2*遺伝子については、その発現低下と肝線維化や脂肪化との間に相関関係があることが分かった。そこで、本研究ではHCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化を明らかにするとともに、顕著な発現抑制が観察され肝病態の進行への関与の可能性が示唆された*CPB2* (Carboxypeptidase B2)と*CPB2*以上に顕著な発現低下が認められた*BASP1* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1)に焦点を当て、これらの遺伝子の発現低下がどのような分子機序により起こったのかを明らかにすることを目指した。昨年度から継続して研究を遂行し今年度は、以下に示すような研究成果を得た。

## B. 研究方法

### *CPB2*と*BASP1*遺伝子の発現変動解析

OL8細胞等に脱メチル化剤である5-

azacytidine (5-azaC)(2.5-10  $\mu$ M)を添加して、1週間後に細胞からTotal RNAを調製した。このRNAを用いて、*BASP 1*と*CPB2*のmRNAの発現レベルをLightCyclerを用いた定量的RT-PCR法により調べた。

#### CPB2とBASP1遺伝子のプロモーター解析

OL8細胞等から抽出調製したDNAを用いてPCRにより調製した*BASP1*と*CPB2*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、適時必要な領域や一部の配列に変異を加えたDNAフラグメントをPCRで調製して、市販のpGL4.10[luc2]ベクター(ホテルルシフェラーゼをコードしている)の*NheI*と*HindIII*サイトに導入した。得られたプラスミドベクター(0.4  $\mu$ g)を内部コントロール(レニラルシフェラーゼをコードしている)として用いたpRL-SV40(0.4 ng)或はpRL-CMV (0.4 ng)とともにFuGENE HDにてOL8(OY)細胞(樹立時のOL8細胞であることを示す)或はOL8(2Y)細胞(2年継代培養したことを示す)に導入した。48時間後に、ホテルルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼを測定して、ホテルルシフェラーゼ値を補正した。このルシフェラーゼアッセイ系においてsiRNAを使用する場合には、レポータープラスミドを導入する前日にsiRNAをRNAiMAXを用いて細胞に導入して、以後同様にアッセイを行った。

#### CPB2とBASP1遺伝子のプロモーター近傍のDNAメチル化解析

OL8細胞等から抽出調製したDNAをMethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit(タカラバイオ)を用いてbisulfite(重亜硫酸塩)処理してDNAの

CytosineをUracilに変換した。処理したDNAを鋳型として、*BASP1*と*CPB2*遺伝子プロモーター領域近傍(数百bp)をTaKaRa EpiTaq™ HS(タカラバイオ)を用いてPCRを行い増幅した。増幅産物をT-ベクターpMD19(タカラバイオ)にクローニングし、それぞれ得られた30クローン程度について塩基配列を決定した。これにより、どのCpGのCがメチル化されているかを決定し、それぞれの部位でのメチル化度を算出した。定量的RT-PCR解析とウェスタンブロット解析

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LightCyclerを用いた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。(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

### C. 研究結果

#### (1) HCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化

昨年度までにHCV-RNAの長期複製細胞では、細胞の倍加時間が短くなることを明らかにした。しかし、この現象はHCV-RNAが排除された治癒細胞を長期に培養継代した場合においても観察される現象であったことから、HCVの長期複製による効果ではなかった。

同様に、アポトーシス感受性(TNF- $\alpha$ と

Cycloheximideによるアポトーシス)もHCV-RNA複製細胞で上昇する現象が認められたが、これについても、HCV特異的な現象とは言えないことが分かった。また、足場非依存性については、HCV-RNA複製細胞および治癒細胞ともに長期培養によっても形質上の差は認められなかった。

## (2) CPB2遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

昨年度までの解析で、CPB2遺伝子の発現レベルはOL8細胞の培養開始後、0.5年から1年の間に大きく低下すると、OL8(2Y)細胞を脱メチル化剤である5-azaC(2.5 μM)で2日ほど処理することで発現レベルがある程度回復する現象を見出していたので、今年度はさらにこの現象を詳細に解析した。

今回は、5-azaCの濃度を2.5 μMと10 μMとし、処理時間も1週間に延ばして、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 2.5 μM(10 μMでも同様)で1週間処理すると、OL8(2Y)とOL8(4Y)細胞におけるCPB2 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。5-azaC処理によってもOL8(0Y)細胞での発現上昇は認められないことから、CPB2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。このメチル化はCPB2遺伝子のプロモーター領域で起こっていると予想されたことから、次に、この遺伝子のプロモーター活性の責任領域の同定を試みた。

昨年度、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりCPB2プロモーター活性が転写開

始点上流-100から-25の間に存在していることを示した。この範囲にはHNF1(Hepatocyte Nuclear Factor 1;肝細胞転写制御因子)結合配列(コンセンサス配列はGTTAATNWTTAAC)に類似の配列(GTTATATTTTAAAC)が存在していたので、今年度は、HNF1がCPB2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。プロモーター領域(-100から+76まで含む)の中でHNF1結合配列の5'側に存在するGTをCAに変えた変異体1、同配列の3'側に存在するTAACをATTGに変えた変異体2、同配列の中央部に存在するTAをコンセンサス配列に合うようにATに変えた変異体3を作成して、それらをOL8(0Y)細胞に導入してレポーターアッセイを行った。その結果、変異体1と2ではプロモーター活性が完全に消失し、変異体3では、逆に2倍程度活性が上昇した。この結果から、CPB2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示唆された。次にHNF1のsiRNA(HNF1にはHNF1とHNF1が存在することが知られているので、2種類のsiRNAを使用)を用いて、HNF1の発現を抑制した状態で、同様にレポーターアッセイを行った。この際、念のため、CPB2遺伝子上流-2600から+76までを含むようにして上記の3種類の変異体を作成してアッセイを行った。その結果、変異のないものでも、siRNAでHNF1をノックダウンさせると、プロモーター活性は著しく低下し、-100から+76までの領域で行った結果と同様、変異体1と2については、まったくプロモーター活性が検出されなくなった。これらの結果から、CPB2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。変異体3についても、-100から+76までの領域を含むプラスミドを導入して行ったアッセイ結果と同様、プロモーター活性は2倍程度上昇した。しかしながら、HNF1のsiRNAを使用した場合においても、プロモーター活性がまったく低下しないという予想とは逆の結果を得た。この結果からコンセンサス配列に変えることにより、HNF1以外の未知の宿主因子が相補的に結合して、転写活性を維持していることが示唆された。

次に、*CPB2*の遺伝子プロモーター近傍（-500から+300）について、DNAのメチル化度がどの程度変化しているかについて解析した。OL8(0Y)とOL8(2Y)細胞から調製したDNAをバイサルファイトで処理してCpGにおけるメチル化度を解析した。解析した領域におけるCpG配列はそもそも5カ所と少なく、プロモーターとして同定した-100から-25の間には1カ所しか存在していない。その部位は、-31(G)から始まるHNF1の結合配列にかかる-32(C)である。今回のメチル化解析では、-32(C)のメチル化度は、OL8(0Y)で10%、OL8(2Y)で20%であることが分かった。つまり、*CPB2*遺伝子の顕著な発現低下は、*CPB2*遺伝子プロモーター部位のメチル化では説明できないことが分かった。

次に、HNF1の発現レベルの低下により*CPB2*遺伝子の発現低下が引き起こされている可能性について検討した。まず、*HNF-1*と*HNF1*のmRNAレベルをOL8(0Y)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)細胞で定量的RT-PCR法により比較したところ、まったく低下していないことが分かった。同様にウエスタ

ンプロット解析によってもHNF-1とHNF-1タンパク質の量が、OL8(0Y)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)間でほとんど差がないことが分かった。これらの結果から、*CPB2*遺伝子の発現低下にHNF-1やHNF-1が直接関与していないことが示唆された。

### (3) *BASP1*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

昨年度までの解析で、*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。しかしながら、OL8(2Y)細胞を脱メチル化剤である5-azaC(2.5  $\mu$ M)で2日ほど処理しても、発現レベルの回復はわずかしか見られないことに示した。今年度は、まず、これまでの5-azaCの処理が不十分であったのではないかという可能性について検討を行った。

*BASP1*についても、*CPB2*の場合と同様、5-azaCの濃度を2.5  $\mu$ Mと10  $\mu$ Mとし、処理時間も1週間に延ばして、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。しかしながら、OL8(0Y)細胞を5-azaCで処理した際にも2倍程度発現レベルが上昇したことから、OL8(2Y)やOL8(4Y)細胞における発現レベルの回復は極めて限定的であることが分かった。OL8(2Y)細胞の場合は、10  $\mu$ Mでの5-azaC処理によっても、OL8(0Y)と比較して、未だ60分の1程度と発現レベルが低く、

OL8(4Y)細胞にいたっては、100分の1以下であった。これらの結果から、この遺伝子の発現低下は、DNAのメチル化では説明できないことが分かった。次に、*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*CPB2*の場合と同様の手法により行った。昨年度はOL8(0Y)細胞を用いて、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を示していたので、今回は、まず、OL8(2Y)細胞でも同じ現象が認められるかどうかを検討した。その結果、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。-206から-50の間は、GCに富む配列が特徴的であり、転写因子Sp1等が結合するGCボックスのコンセンサス配列(GGGCGG或いはGGCGGG)が計5カ所存在することから、これらの配列に結合する宿主因子により*BASP1*の転写制御が行われていることが示唆された。しかしながら、OL8(0Y)やOL8(2Y)細胞におけるSp1の発現レベルには大きな差は認められなかったため、OL8細胞系では、Sp1以外のGCボックス結合因子の関与が示唆された。

このような解析と並行して、*BASP1*遺伝子プロモーター近傍(-400から+300)におけるCpG部位のメチル化解析も昨年度から継続して行った。昨年度、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、*CPB2*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。しかしながら、レポーターアッセイで判明した-206から-50の領域におけるメチル化度はOL8(0Y)細胞では0-10%程度で、OL8(2Y)細胞でも20-30%程度であった。そのため、今年度は再現性も確かめるため、再度実験を行い、クローン数も10クローンから30クローン程度に増やして解析した。その結果、昨年度に得られた実験結果が再現され、やはりOL8(2Y)細胞ではメチル化がそれほど進んでいないことが確かめられた。OL8(2Y)細胞に5-azaC(10  $\mu$ 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。

#### D. 考察

(1) HCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化

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-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。

(2) *CPB2*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

これまでの解析により、HCV-RNAが長期に複製した細胞で起こる*CPB2*遺伝子の発現

低下はDNAのメチル化によることが明らかとなった。しかしながら、この遺伝子のプロモーター活性をコントロールするHNF1結合部位のメチル化では説明できず、HNF1の発現低下が原因でもなかった。HNF1の局在変化による機能低下の可能性は残るものの、これまでに得られた結果から、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。そのような因子は、OL8(0Y)細胞と比較して、OL8(2Y)細胞で発現が低下して、OL8(2Y)細胞を5-azaCで処理した際に発現レベルが大きく亢進すると予想される。OL8(0Y)とOL8(2Y)細胞を用いて、これまでに得られたDNAメチル化に関する現象が別系統の細胞系列であるOL11(0Y)とOL11(2Y)細胞でも得られるかどうかを検討し、OL8とOL11の両細胞系列を用いたcDNAマイクロアレイ解析で目的の未知宿主因子の絞り込みが可能であると考えられる。次年度はこの点を検討する予定である。

CPB2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、CPB2が何らかの役割を担っている可能性がある。具体的にはCPB2の発現が低下したOL8(2Y)細胞にCPB2遺伝子を過剰発現させると、線維化シグナル（コラゲーン等）や脂肪化シグナル（SRBP-1やFASN等）の抑制が引き起こされる可能性がある。現在、このような方向の研究を進めており、予備的な実験では、予想どおりの傾向を認めているので、次年度はこの方面の研究を推進する予定である。

（3）BASP1遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

これまでの解析により、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る。しかしながら、この可能性については、昨年度に引き続いて今年度もHDAC阻害剤を用いて詳細に検討したが、発現回復効果はほとんど認められなかった。従って、現時点においては、この可能性はほとんどないと考えている。今年度のプロモーター解析で、プロモーター活性はGCボックス配列で制御されている可能性が高いことが明らかになったので、普遍的に発現しており2年間の培養では発現変動のなかったSp1以外のGCボックス結合因子（促進的に作用するKLF5や抑制的に作用するG10BPやSp3）がこの遺伝子の転写制御に関与している可能性について今後、調べる予定である。それ以外には、転写開始点から2kb以上上流の領域（2kbまでは変異がないことを確認済み）やmRNAの3'側下流における遺伝子変異の有無、この遺伝子の発現に関与するmiRNAの変動の有無についても検討する予定である。

## E. 結論

今年度、以下に示した2項目の成果を得た。(1) CPB2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。しかし、HNF1結合領域のメチル化度ではこの遺伝子の発現低下を説明できず、脱メチル化剤で誘導されるHNF1以外の未知の宿主因子が、この遺伝子の発現低下を引き起こしていることが示唆された。(2) 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 95(12):2658-2667 (2014).
- 2) Shimada H, Haraguchi K, Hotta K, Miyaike T, Kitagawa Y, Tanaka H, Kaneda R, Abe H, Shuto S, Mori K, Ueda Y, Kato N, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J. 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. *Bioorg Med Chem*, 22(21):6174-6182 (2014).
- 3) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Amer J Pathol*, 184(11):3026-3039 (2014).
- 4) Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. 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. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(17): 4276-4280 (2014).
- 5) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita

- T, Kato N. 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).
  - 6) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 447(2):341-345 (2014).
  - 7) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 9(3): e91156 (2014).
  - 8) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 192(6): 2770-2777 (2014).
- ### 2. 学会発表
- 1) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたるHCV-RNA複製によるBASP1とCPB2遺伝子の発現低下の分子機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.
  - 2) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのライフサイクルにおけるRab13の重要性. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月.
  - 3) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. HCV-RNAの長期複製によって発現低下したBASP1とCPB2

遺伝子の発現制御機構の解析. 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014年10月.

4) 瀬島 寛恵 佐藤 伸哉 團迫 浩方 池田 正徳 加藤 宣之. C型肝炎ウイルスRNAの長期細胞内複製によって発現低下した遺伝子の発現制御機構の解析. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月.

5) Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on transcriptional regulatory mechanisms of genes whose expressions were reduced during long-term intracellular HCV-RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September, 2014.

6) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates HCV RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September, 2014.

#### 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

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 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

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

**研究要旨：**C型肝炎ウイルス(HCV)感染において、宿主細胞の様々なシグナル経路が攪乱・脱制御されており、このことがHCVによる癌化、代謝異常等の多彩な病原性発現の根底にある。HCVの非構造タンパク質NS5Aは多機能タンパク質であり、多数の宿主因子と相互作用することが知られている。我々はこれまでに、タンデムアフィニティー精製/質量分析法を用いて、新規NS5A結合宿主因子として、ヒストンメチル基転移酵素SMYD3を同定した。SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現している。SMYD3はヒストンのメチル化を介してクロマチンの構造変換を引き起し、様々な遺伝子の発現制御に関与すると報告されたが、他に、Ras癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが最近報告された。

本研究では、NS5AとSMYD3の相互作用がSMYD3によるMAP3K2のメチル化及び下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べるとともに、HCVのライフサイクルに及ぼす影響について解析した。その結果、NS5AがSMYD3によるMAP3K2のメチル化を増強することを明らかにした。さらに、NS5AとSMYD3の相互作用により、Ras癌遺伝子シグナル伝達経路の下流に位置するAP1を介した転写が亢進することも明らかにした。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・放出に有意な影響を及ぼさなかった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染において、宿主細胞の様々なシグナル経路が攪乱・脱制御されており、このことがHCVによる癌化、代謝異常等の多彩な病原性発現の根底にある。HCV非構造タンパク質NS5Aは多機能タンパク質であり、多数の宿主因子と相互作用して細胞内シグナル伝達経路を脱制御することが知られている。

我々はこれまでに、タンデムアフィニ

ティー精製/質量分析法を用いて、新規NS5A結合宿主因子として、ヒストンメチル基転移酵素SMYD3を同定した。SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることが知られている。SMYD3はヒストンH3のK4やヒストンH4のK5、K20等をメチル化し、クロマチンの構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子及び癌細胞の浸潤・転移に係る遺伝子の発現制御に関与

している。また、SMYD3がRas癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが最近報告された。

本研究では、HCV NS5AとSMYD3の相互作用がMAP3K2のメチル化及び下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べるとともに、HCVのライフサイクルに及ぼす影響について解析した。

## B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞：ウイルスはHCV J6/JFH-1株（ロックフェラー大学 C. Rice 教授より分与）をHuh7.5細胞（Rice教授より分与）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（0株；岡山大学・加藤宣之教授より分与）が自律複製するHCVフルゲノムレプリコン細胞も用いた。

(2) NS5AとSMYD3の結合の解析：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。

(3) SMYD3の細胞内局在に及ぼすNS5Aの責任ドメインの解析：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。

(4) MAP3K2を基質としたSMYD3の *in vitro*メチル基転移酵素活性の測定：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-<sup>14</sup>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。

(5) AP1を介した転写活性の測定：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。

(6) HCV ライフサイクルに及ぼす SMYD3 の影響の解析：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（HCV RNA複製、HCVタンパク質合成、HCV粒子形成・放出）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。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換えHCVの使用は文部科学大臣の確認及び神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。ウイルス感染実験は、微生物学研究室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令・規則及び指針等に準拠して実施した。

## C. 研究結果

（1）NS5AとSMYD3の結合領域の同定

免疫共沈法によりNS5AとSMYD3の結合領域について検討した。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。ドメイン

1単独あるいはドメイン3単独はSMYD3と全く共沈しなかった。以上の結果より、NS5Aのドメイン2+3がSMYD3との結合に重要であると推測された。

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。以上の結果から、HCVフルゲノムレプリコン細胞において、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。

(2) SMYD3の細胞内局在に及ぼすNS5Aの責任ドメインの同定

我々はこれまでに、発現プラスミドを用いた一過性発現系において、全長NS5Aは全長SMYD3の核移行を阻害することを観察している。今回の解析では、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。

(3) SMYD3によるMAP3K2メチル化に及ぼすNS5Aの影響

精製MAP3K2を基質として、精製SMYD3とS-[methyl-<sup>14</sup>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プ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、免疫プ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。

(4) AP1を介した転写活性に及ぼすNS5A/SMYD3相互作用の影響

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。

(5) HCVのライフサイクルに及ぼすSMYD3の影響

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。

## D. 考察

SMYD3はヒストンH3やH4の特定部位のリジン(K)残基をメチル化し、クロマチン構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子等の発現制御に関与している。また、最近、SMYD3がRas癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが報告され注目されて

いる。臨床的にも、SMYD3 は乳癌や大腸癌、肝細胞癌、前立腺癌等で発現亢進していることが知られている。

今回の HCV フルゲノムレプリコン細胞を用いた解析で、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。NS5A に関しては、ドメイン 2+3 が SMYD3 と強く結合するが、ドメイン 3 単独では全く結合せず、また、ドメイン 1+2 ではわずかな結合が見られるのみであった。一方、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。NS5A と SMYD3 との相互作用 (結合、核移行阻害、MAP3K2 メチル化など) に係る NS5A の責任領域について、より詳細な解析が必要であると思われる。

本研究において、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。MAP3K2 は Ras 癌タンパク質による発癌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 による肝発癌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。

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・放出に有意な影響を及ぼさないことが示された。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Aweya JJ, Sze CW, Bayega A, Mohd-Ismail NK, Deng L, Hotta H, Tan YJ. 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.
- 2) Wahyuni TS, Widyawaruyanti A, Lusida MI, 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. *Fitoterapia*, 99: 276-283, 2014.
- 3) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, 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*, 9(6): e98877,

- 2014.
- 4) Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, Fujisawa M, Kawabata M, Hotta H, Shirakawa T. Oral administration of genetically modified Bifidobacterium displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. *Vaccine*, 32(25): 3066-3074, 2014.
  - 5) El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview. *World J Gastroenterol*, 20(24): 7555-7569, 2014.
  - 6) Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T S, Lusida M I, Soetjipo, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol*, 58(3): 180-187, 2014.
  - 7) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, 58(3): 188-194, 2014.
  - 8) Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa IDN, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated Interferon/Ribavirin treatment. *J Clin Microbiol*, 52(6): 2193-2195, 2014.
  - 9) Aoki C, Hartati S, Santi MR, Lydwina, Firdaus R, Hanafi M, Kardono LB, Shimizu Y, Sudarmono P, Hotta H. Isolation and identification of substances with anti-hepatitis C virus activities from *Kalanchoe pinnata*. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, 6(2): 211-215, 2014.
  - 10) Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Momose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- $\alpha$  2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med*, 33(6): 1652-1656, 2014.
  - 11) Juniastuti, Utsumi T, Nasronudin, Alimsardjono L, Amin M, Adianti M, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida MI. High rate of seronegative HCV infection in HIV-positive patients. *Biomed Rep*, 2(1): 79-84, 2014.
- ## 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. The 21st 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- $\beta$  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 $\alpha$  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 13<sup>th</sup> 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 13<sup>th</sup> 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- $\beta$ 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, 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 $\alpha$ 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, 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.

2. 実用新案登録  
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 $\alpha$ 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, 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

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を培養肝細胞ヘ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ティ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)。

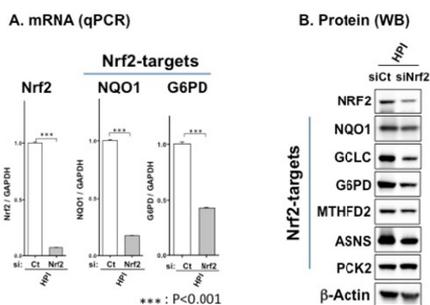


図1. Nrf2 siRNAによるNrf2標的遺伝子のノックダウン

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)。

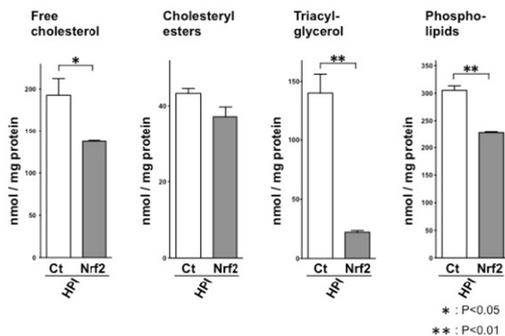


図2. Nrf2ノックダウンによる脂肪滴成分の減少

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)。

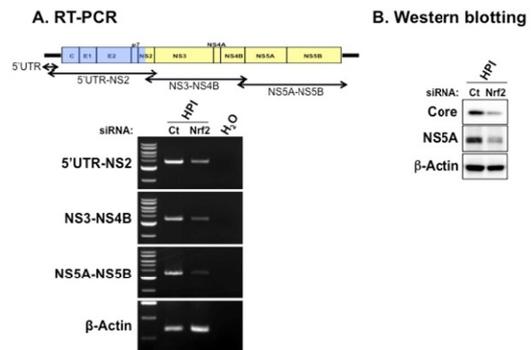


図3. Nrf2ノックダウンによるHCV感染の抑制

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。

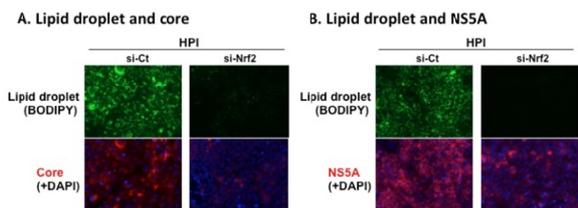


図4. Nrf2ノックダウンによる脂肪滴とHCVの減少

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。

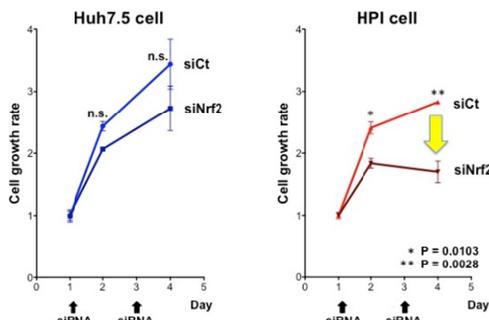


図5. Nrf2ノックダウンによるHPI細胞の増殖抑制

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。

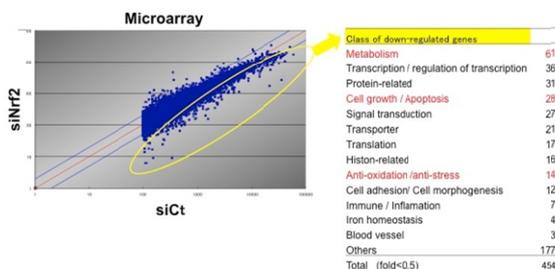


図6. Nrf2ノックダウンによる遺伝子発現変化

## (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。

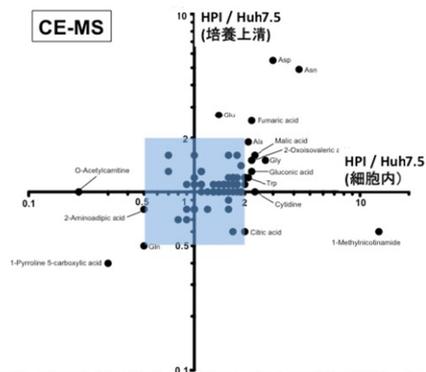


図7. HCV感染細胞の培養上清中の代謝産物(可溶性物質)

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。

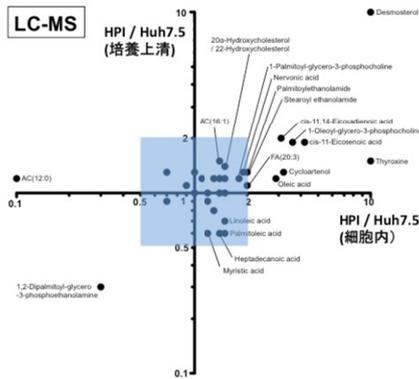


図8. HCV感染細胞の培養上清中の代謝産物 (脂溶性物質)

#### 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、感染の持続に關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關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、細胞増殖抑制に關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、なかでも代謝に關連した遺伝子が61と最も多かった。また、細胞増殖/アポトーシス、抗酸化ストレスに關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? *Hepato 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



## 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- $\beta$ 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/ $\beta$ -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.	Hepato Res	44	E229-239	2014
Hino K, (日野)	Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C.	Hepato 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?	Hepato 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