

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82610

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22114004

研究課題名（和文）肝炎ウイルスによる代謝修飾・炎症による肝発がんとその予防

研究課題名（英文）Prevention of cancer development by hepatitis C virus

研究代表者

下遠野 邦忠（Shimotohno, Kunitada）

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：10000259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 120,000,000 円

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）感染では持続的炎症が発がん率を高める。しかし、HCV感染による持続的炎症の機構には不明な点が多い。本研究では炎症惹起に重要な働きをするサイトカインの産生がHCVによりどのように制御されているか、また、HCV感染のどのような環境下においてこれらのサイトカインが産生されるかを明らかにする目的で研究を行った。その結果、HCV感染においては既に報告されている免疫担当細胞以外に、HCV感染肝実質細胞と星細胞とのクロストーク、炎症状態で惹起されるAPOBEC1によるサイトカイン産生変化等が存在する事を見だし、これらが持続感染状態における炎症の維持に寄与する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Persistent inflammation is one of the major causes of onset of cancer development. Tumor virus infection plays significant roles in the process together with functions of virus-coded oncogenes. Hepatitis C virus (HCV) infection, despite of absence of a definitive viral oncogene, causes hepatocellular carcinoma (HCC) at high risk. Prevalence of the development of HCC by HCV infection is high when ALT level is kept high. This suggests that inflammatory cytopathic effect by HCV infection plays a role in cancer development. By analyzing HCV infected cells, presence of 2 new pathways were disclosed from which various cytokines and chemokines were produced; by cross talk with HCV infected hepatocytes and liver stellate cells, and by function of Apobec1 induced under aberrant physiological condition. These 2 mechanisms may be involved in altering inflammatory response that promotes cancer spiral.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：肝炎ウイルス HCV 炎症 発がん サイトカイン 免疫 悪性腫瘍 持続感染

1. 研究開始当初の背景

HCV 感染による慢性肝炎の発症は高率に肝硬変、肝がんを発症する。HCV 感染者間の発がん率を調べると、細胞障害の程度が高く、かつ持続する場合に発がんする割合が高い。HCV による発がん機構は、ウイルス性がん遺伝子を持つ他のがんウイルスとは異なる機構によると考えられる。HCV 感染による炎症は発がん性が高い（発がんスパイラル状態）特徴を持つが、それには持続性以外に、他の炎症とは異なる機構も存在すると考えられる。本研究者は HCV 感染が細胞に及ぼす特徴として、脂肪代謝を亢進し感染細胞内に脂肪滴が大量に蓄積する事を見いだした。肝発がんに至る肝疾患のひとつに、脂肪肝と呼ばれる概念が存在するので、HCV 感染による脂肪代謝異常は肝発がんを惹起する要因のひとつと考えられる。炎症惹起には宿主免疫機構が働く。その過程で細胞が産生する各種炎症性サイトカイン、ケモカインなどが炎症の質、持続性に関わると考えられる。HCV 感染によるサイトカイン・ケモカイン産生変化を把握するために、これらの産生制御の解明が重要であると考えられた。

一方、感染性因子による発がんである事を考えれば、HCV を制御する事による発がん予防法の確立も重要になる。HCV は特にインターフェロンに対して高感受性を示すので、インターフェロン(IFN)シグナルによる新たな作用機序を明らかにする事により、副作用の少ない IFN 治療に向けた知見の蓄積も重要である。

2. 研究の目的

HCV 感染による慢性肝炎の発症は高率に肝硬変、肝がんを発症する。HCV 感染者間の発がん率を調べると、細胞障害の程度が高く、かつ持続する場合に発がんする割合が高い。HCV による発がん機構は、ウイルス性がん遺伝子を持つ他のがんウイルスとは異なる機構によると考えられる。慢性 C 型肝炎を炎症の度合いで区別すると、炎症が高く持続する場合に発がん率が高い事が知られている。すなわち、HCV 感染は炎症反応の持続を通して肝組織を発がんスパイラル状態に導き、がんを誘発すると考えられる。HCV 感染やアルコール消費とは関係しない肝疾患のひとつに

non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) があるが、この疾患は脂肪代謝異常や、インスリン抵抗性等と関連するといわれている。NAFLD の疾患に何らかのストレス(炎症、活性酸素など)が伴い、NASH (non-alcoholic steatohepatitis)を発症するといわれているが、その結果、肝硬変、肝がん発症の頻度が高くなる。本研究者は HCV 感染が細胞に及ぼす特徴として、脂肪代謝を亢進し感染細胞内に脂肪滴が大量に蓄積する事を見いだしていた。一方、HCV 感染によるラジカル放出の存在なども明らかにされており、HCV に感染した肝組織では NASH と似た疾患背景がみられる。このような環境下で炎症を惹起し、持続させる要因を明らかにできれば発がんスパイラルに至る過程を解明できると期待された。

そのために、HCV 感染により産生される各種炎症性サイトカイン、ケモカインなどを明らかにする事を目的とし、産生過程を解析する。一般的にサイトカイン、ケモカインの産生は主として免疫担当細胞が関与するが、本研究ではそれ以外の産生系の存在を探ることにより、これらの因子産生の多様性と持続炎症との関連を明らかにする事を試みた。そのために、肝実質細胞と星細胞のコミュニケーションの問題、および炎症により誘導発現される APOBEC1 とサイトカイン産生などに焦点を絞った。

一方、ウイルス性因子による発がんの場合、ウイルス感染を排除する事により、発がん予防が可能になる。HCV は特にインターフェロンに対して高感受性を示すので、インターフェロン(IFN)シグナルによる新たな抗 HCV 作用機序を明らかにする事により、副作用の少ない IFN 治療に向けた知見を蓄積することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異所性に発現誘導される遺伝子編集酵素によるサイトカイン mRNA の安定化および機能変化。

炎症などにより、本来発現すべき組織以外で発現誘導される遺伝子編集酵素の存在が認められている。Activation-induced cytidine deaminase (AID)は本来 B 細胞において発現する遺伝子であるが、炎症により他の組織でも発現が惹起される。また、HCV 感染肝細胞に

において AID の発現が認められている。この異所性の AID 発現は遺伝子変異を誘導する。このことが持続的な炎症による発がん要因のひとつになる可能性が考えられる。

Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide 1 (APOBEC1:本稿では API と略する)は分化した小腸で発現し、本来 ApoB 100 を産生する Apolipoprotein B 100 mRNA を遺伝子編集して、読み枠内に終止コドンを導入して ApoB100 よりもアミノ酸数が少ない ApoB 48 が産生されるようにする。ApoB 48 は細胞内の脂肪酸を取り込みカイロミクロンとして血流中に放出され、肝臓に吸収される。小腸以外の組織での発現は通常は観察されないが、炎症組織において異所性に発現が観察される。また、ある種のがんにおいても発現が認められている。API は RNA 編集酵素であるために AID のように遺伝子を直接編集する機能を持たないが、細胞内の mRNA の機能に影響を与えられるために、API と相互作用する mRNA を探索しその機能変化を調べた。

(2) HCV 感染肝細胞と肝星細胞のクロストークによるサイトカイン産生制御。

HCV 感染肝実質細胞を取り巻く微小環境が炎症持続とどのように関連するかについて調べるために HCV 感染肝実質細胞と星細胞の混合培養を行い、肝組織内の微小環境を模擬した。この混合培養条件下でのサイトカイン産生を調べる事により HCV 感染が微小環境に及ぼす影響を調べた。肝実質細胞として HCV が感染する HuH7.5 を、星細胞として不死化細胞である LX-2 を用いた。

(3) IFN 下流シグナルを制御する新規機構の探索。

インターフェロン (IFN) は HCV 複製を効率よく抑えるために、臨床では抗 HCV 剤のひとつとして使用されている。しかし、副作用が強いために適応範囲が限られている。IFN は種々の遺伝子 (interferon stimulated genes; ISGs) 発現を制御し、その中のある種の遺伝子が抗 HCV 作用を示すと考えられる。そこで、抗 HCV 作用を示す ISG の種類を特定すること、あるいは ISG 発現を IFN とは関係なく制御する方法が見いだせれば、IFN の副作用を超えた抗 HCV 治療に道が拓かれると考えられる。

近年、long non-coding RNA (lncRNA)による各種遺伝子発現制御が明らかになりつつあるので、ISG についても同様の機構が存在する可能性がある。そこで、IFN 処理により発現変化する lncRNA を探索し、その中に ISG 産生を制御する lncRNA が見いだせれば、抗 HCV 作用を示す ISG 発現を IFN 投与に頼らずに可能になると考えた。そのために、ISG 発現を制御する lncRNA の探索を行い、その機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)異所性に発現誘導される遺伝子編集酵素によるサイトカイン mRNA の安定化および機能変化。

API を肝細胞に一過性に発現させ、API との複合体の中に存在する mRNA をアレイ解析で調べた。その結果、複合体の中に IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 などの mRNA が存在する事が分かった。HuH7 を用いた解析では、IL-8 mRNA の量が突出していたので、IL-8 mRNA について重点的に解析した。API との会合に必要な IL-8 mRNA の領域は 3'非翻訳領域(3'UTR)であり、AU に富む配列を欠失させると会合が弱くなった。これらの配列は API に会合するその他のサイトカインにも存在する事から、API と mRNA の会合には 3'UTR 領域を介していると推定された。HEK293T 細胞においては API を発現させても IL-8 mRNA との複合体形成は見られない。細胞の違いによる複合体形成の有無が、別の宿主因子の存在によると考え、API と会合する宿主因子を酵母 two-hybrid 法を用いて解析し、API と結合するが、HEK293T では発現していない因子を解析した。その結果 hnRNP Q isoform 6 (hnRNPQ6)を API と IL-8 mRNA の会合に必要な因子として同定した。ヒト肝細胞 HuH7 においては IL-8 mRNA が API と会合する事により安定化され、IL-8 の産生を上げた。API 発現細胞では IL-8 mRNA の 3'UTR に有意に変異が観察され、mRNA の機能が変化している可能性が示唆された。これらのことから炎症等で異所性に発現する API はサイトカイン類の発現の制御因子として働く可能性が考えられた。

(2) HCV 感染肝細胞と肝星細胞のクロストークによるサイトカイン産生制御。

HCV 感染,あるいは非感染 HuH7.5 細胞を星細胞、LX-2 と混合培養し上清に産生されるサイトカインを、抗体を用いたアレイ解析で探索した。その結果、MIP-1beta の産生が HCV 感染 HuH7.5 と混合培養した場合に観察された。混合培養の条件を検討した結果、MIP-1beta の産生は LX-2 細胞上清中の因子が HCV 感染 HuH7.5 に作用し、HuH7.5 からおこなわれる事が分かった。HCV 非感染細胞の場合には LX-2 培養上清液を添加しても MIP-1beta の産生は見られない。HCV 感染 HuH7.5 で MIP-1beta を産生する要因を調べたところ、感染細胞で発現する MIP-1beta 産生因子のひとつとして C/EBP-beta を明らかにした。なお、LX-2 から産生される液性因子は IL-1alpha であった。C/EBP-beta により転写活性化される MIP-1beta 以外のサイトカイン、ケモカインについても HCV 感染細胞 HuH7.5 と LX-2 との混合培養で産生されるかを調べたところ、MIP1 α 、IL-8、IL-6、CXCL1、CXCL2 なども明らかになった。以上から、HCV 感染肝細胞は星細胞とのクロストークにおいて、各種サイトカイン、ケモカインの産生を行う事が明らかになり、これらの因子の産生が発現スパイラルに向けた炎症反応に関与している可能性が考えられた。

(3) IFN 下流シグナルを制御する新規 long non-coding RNA (lncRNA) とその作用。
IFN 処理により発現変化する lncRNA を解析し、その中に特定の ISG 産生を制御する lncRNA(lncRNA#32 と呼ぶ)を見いだした。詳細な解析から、本 lncRNA#32 は肝臓あるいはその他の組織において恒常的に発現している事が分かった。しかし、IFN 投与によりその産生が抑制された。この事から、LncRNA#32 は ISG 産生のバランスを維持する働きを持つと考えられる。また、lncRNA#32 産生細胞においては IFN と関係なく ISG 産生が見られる事から、ISG 産生のホメオスタシスに重要な働きをしている可能性も考えられた。lncRNA#32 を HCV 感染培養細胞に発現させると HCV 複製が抑制されたので、lncRNA#32 産生の制御は抗 HCV に繋がると考えられた。lncRNA#32 の ISG 遺伝子発現制御について解析した結果、lncRNA#32 は ATF2 と結合して ISG 遺伝子の発現を制御することがわかった。

近年、ウイルス蛋白質の機能を直接標的とした抗 HCV 剤(DAA)が上市されてきたので、副作用の強い IFN を用いた治療が減少する傾向にある。しかし、DAA の場合、ウイルス変異を誘導する可能性があるのに対して IFN 治療ではその可能性が極めて少ない。また、IFN による他の感染症への利用を考えると、ISG 産生の機序解析は波及効果が大きいといえる。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Tsukimoto A, Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Shimizu Y, Shimotohno K, Kawai G, Takaku H. A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors. *Antiviral Res.* 17:1-9. 2015
2. Arimoto KI, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan JB, Futakuchi M, Tsuda H, Murakami Y, Suzuki H, Zhang DE, Shimotohno K. Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles. *J Interferon Cytokine Res.* 35(5): 351-358. 2015
3. Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA. *J Biol Chem.* 289(38): 26226-26238, 2014
4. Kuo YC, Chen IY, Chang SC, Wu SC, Hung TM, Lee PH, Shimotohno K, Chang MF. Hepatitis C virus NS5A protein enhances gluconeogenesis through upregulation of Akt-/JNK-PEPCK signalling pathways. *Liver Int.* 34(9): 1358-1368 2014
5. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 Strain of Hepatitis C Virus Infects Human B-Cells with Low Replication Efficacy. *Viral Immunol.* 27(6):285-294 2014

6. Tsugawa Y, Kato H, Fujita T, [Shimotohno K](#), Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection. *PLoS One*. 2014 Feb 26;9(2):e89869.
7. Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, [Shimotohno K](#), Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology*. 145: 658-667 2013
8. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, [Seya T](#), Takaku H, [Shimotohno K](#). Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013
9. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, [Shimotohno K](#), Kato N., PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun*. 430(2):592-597, 2013.
10. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, [Shimotohno K](#), Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12):1886-1892, 2012
11. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, [Shimotohno K](#), Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*. 8(8):e1002860, 2012
12. Aly HH, [Shimotohno K](#), Hijikata M, [Seya T](#). In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol*. 56(1):1-9. 2012
13. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, [Shimotohno K](#), Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res*. 163(1):390-395, 2012
14. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funmi K, [Shimotohno K](#). Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology*. 1: 19-26, 2011
15. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, [Shimotohno K](#), [Seya T](#). Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 6(6): e21284, 2011
16. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, [Shimotohno K](#), Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6(5): e19799, 2011
17. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, [Shimotohno K](#), Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS One*. 6(4): e18285. 2011
18. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, [Shimotohno K](#). The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. *PLoS One*. Jan 24;6(1): e16081, 2011

〔学会発表〕(計 14件)

1. 西辻 裕紀、下遠野 邦忠 Induction of inflammatory cytokines by novel mechanisms may contribute to trigger the development of inflammation in HCV-infected liver. 第38回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成26年11月25-27日
2. 清水 裕子 西辻 裕紀、宇治野 真之。APOBEC1によるIL8 mRNAとの会合にはhnRNP Q isoform 6が必要である。第38回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成26年11月25-27日
3. Nishitsuji H and Shimotohno K. Anti-HCV function of non-coding RNA through interferon stimulated gene production. 5th Carcinogenic Spiral International Meeting. Kobe, February 25-27, 2015
4. Shimotohno K. HCV infected hepatocyte augments production of various cytokines and chemokines through cross talk with hepatic stellate cells, 4th International Symposium on Carcinogenic spiral, Sapporo. February 10-11, 2014
5. 西辻 裕紀、舟見 健児、清水 裕子、宇治野 真之、山本 祐美、鈴木 律子、川上 志、瀬谷 司、高久 洋、下遠野 邦忠 HCV感染肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta産生をあげる」第60回日本ウイルス学会学術集会、平成24年11月13日、大阪
6. 西辻 裕紀、清水 裕子、宇治野 真之、舟見 健児、川上 志保、瀬谷 司、下遠野 邦忠 HCV感染培養肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta産生を誘導する。平成24年度 文部科学省新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、平成25年1月30日、東京
7. Shimizu Y, Ujino S, Nishitsuji H, Takaku H and Shimotohno K Hepatitis C virus sustains the level of APOBEC1. 19th international symposium on hepatitis C virus and related virus. 平成24年10月8日、ベネチア(イタリア)
8. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、高久 洋、下遠野 邦忠 C型肝炎ウイルスによるAPOBEC1 mRNAの安定化 第60回日本ウイルス学会学術集会、平成24年11月14日、大阪
9. 清水 裕子、宇治野 真之、西辻 裕紀、椎名 律子、山本 祐美、高久 洋、下遠野 邦忠 C型肝炎ウイルスによるAPOBEC1 mRNA安定化とIL-8産生 第35回日本分子生物学会年会、平成24年12月12日、福岡
10. Shimotohno K. Versatile mechanisms of HCV to modify host function to maintain inflammatory state. Department of Microbiology & Immunology Program Seminar. Nov. 5th 2013, Singapore
11. Shimotohno K., Marusawa, H, Funami K, Seya T., Induction of inflammatory cytokines by novel mechanisms may contribute to trigger the development of inflammation in HCV-infected liver. The 3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral & International Symposium of Tumor Biology in Kanazawa. Kanazawa, Jan 24-25, 2013

〔図書〕(計 1件)

生命科学のためのウイルス学「感染と宿主応答のしくみ、医療への応用」下遠野 邦忠，瀬谷司 監訳，南江堂 平成27年

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホ ム ペ ジ :
<http://www.viral-oncology.jp/member/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

下遠野 邦忠 (Shimotohno Kunitada)

国立国際医療研究センター・肝炎免疫センター研究センター・特任部長

研究者番号： 10000259