

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590547

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスがB細胞を介して発揮する病原性のインパクト

研究課題名(英文) Impact of hepatitis C virus infection in B cells on pathogenesis

研究代表者

小原 恭子 (Kohara, Kyoko)

鹿児島大学・獣医学部・教授

研究者番号：20225478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)によるBリンパ腫発症機序を解明するため、B細胞でHCV全長を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを用いて解析した。本マウスの約25%でBリンパ腫が発症する。マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行った結果、Bリンパ腫発症群では、Fos, C3, Lymphotoxin R, A20, NF- κ Bの発現が強く修飾されていた。Bリンパ腫組織ではNF- κ Bが核に移行して活性化されている事が明らかとなった。さらに、肝がんや肺がんなどでの発現低下も報告され、腫瘍抑制効果があるとされるmiR-26bの発現がBリンパ腫組織では低下している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) infection leads to the development of hepatic diseases, as well as extra hepatic disorders such as B-cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL). To reveal the molecular signaling pathways responsible for HCV-associated B-NHL development, we utilized transgenic (Tg) mice that express the full-length HCV genome specifically in B cells and develop non-Hodgkin type B-cell lymphomas (BCLs). The gene expression profiles in B cells from BCL-developing HCV-Tg mice, from BCL-non-developing HCV-Tg mice, and from BCL-non-developing HCV-negative mice were analyzed by genome-wide microarray. Markedly modified genes such as Fos, C3, LTbR, A20, NF- κ B and miR-26b in BCLs were further characterized using specific assays. We propose that activation of both canonical and alternative NF- κ B signaling pathways and down-regulation of miR-26b contribute to the development of HCV-associated B-NHL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス Bリンパ腫 microarray A20 NF- κ B miR-26b

1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)は、RNAウイルスであり、宿主ゲノム遺伝子に組み込まれる事なく高率に持続感染を成立させる。

これまでに、HCVが積極的に細胞性免疫等の免疫監視系に異常を引き起こし、ウイルスが持続感染を成立して慢性炎症を引き起こす可能性が示唆されてきた。一方でHCV感染者の多くでは、ウイルスに対する抗体を産生しているにも関わらずウイルスが持続感染しており、液性免疫系における異常がウイルスの排除効率を低下させている可能性も考えられる。

(2)HCVの主要感染標的組織は肝臓であるがB細胞にも感染し、クリオグロブリン血症やBリンパ腫等肝外病変と総称される疾病を引き起こす。HCVによるBリンパ腫発症機序は不明であったため、申請者らはCre/loxPシステムを用いてBリンパ球でHCV全長遺伝子を発現するマウス(RzCD19Creマウス)を樹立して解析した。その結果、生後600日のマウスの約25%でびまん性大細胞Bリンパ腫が発生する事を明らかにした(Blood 2010)。

(3) Cre/loxPシステムを用いて生後任意の時期にHCV遺伝子を発現させる事もできるが、このマウスではHCVに免疫寛容になっておらず肝炎を起こす。MxCre-HCVマウスでは、肝炎・肝硬変・肝癌を発症すると同時にBリンパ腫の発症も生後12ヶ月で30%のマウスで見られる。炎症反応とBリンパ腫発症との関連をRzCD19Creマウスとの比較から解析可能となった。

(4)肝癌発生に関連する微小環境の整備に関して、B細胞が分泌するLymphotoxin等が関与する事が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

(1)HCV全長遺伝子をB細胞で発現する事により、HCV遺伝子の直接作用を解明する。B細胞の増殖形質(増殖速度・アポトーシス反応・腫瘍原性)、B細胞の免疫監視能の攪乱、サイトカイン産生がどのように修飾されるかを明らかにする。

(2) Bリンパ腫発症に関与する宿主因子を網羅的解析により解明する。Bリンパ腫発症マウスで見られたsoluble IL-2 receptor α の上昇と免疫抑制との関連を明らかにする。

(3)MxCreマウスとの比較により、慢性炎症とBリンパ腫発症との関連を明らかにする。また、MxCreマウスではBリンパ腫が多いがRzCD19Creマウスでは有意差がない。性別による発症率の違いを担うものに関し考察する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスのB細胞あるいはB細胞株(A20)は10%FCS添加RPMI培地(Invitrogen)で培養した。

(2) 動物実験

HCV全長遺伝子をCre/loxP制御下で発現するマウス(Rz)をCD19Creマウスと交配してB細胞でHCV遺伝子を発現するRzCD19Creマウスを樹立している

(Blood2010)。動物実験計画は熊本大学 (A22-136)ならびに鹿児島大学 (H24-008)において承認されている。

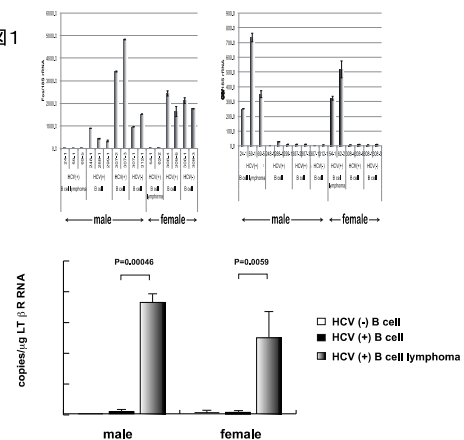
- (3) マウスのB細胞はMACSビーズで精製 (Milteny社) し、95%以上をB細胞にした。また、FACS解析は常法に基づいて行った(Beckton Dickinson社)。RNAはグアニジン塩酸塩を用いて精製し、Bioabalyzer(Agilent)でRNA integrity numberが8.0以上のものをマイクロアレイ解析に用いた。
- (4) マイクロアレイ解析はWhole Mouse Genome Microarray(アジレント社)を用いて解析を行った。またデータ解析にはMetaCoreソフトウェアを使用した。定量PCRはCFX96(BioRad)を用いて測定し、ウェスタンブロット解析は定法に従った。
- (5) マウス組織の解析はパラフィン切片を特異抗体で免疫染色して行った。2次抗体はAlexa Fluor488やCy3でラベルしたものをを用いた。組織の観察は共焦点顕微鏡(Olympus FV100)で行った。
- (6) miR-26bは、パラフィンで固定された組織からRNAをRNeasy FFPEキット(ライフテクノロジー社)で抽出後、定量PCR法によって測定した。

4. 研究成果

- (1) HCVのB細胞への効果
HCV全長遺伝子を発現するB細胞(A20細胞株)株を樹立した。
- (2) 全長HCV発現マウスの解析

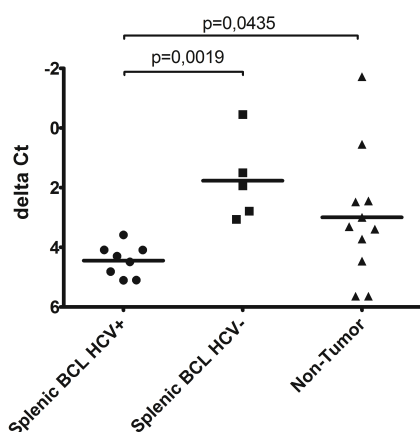
HCV遺伝子発現(RzCD19Cre)マウスにおいてIgG産生量や抗体親和性を解析したが、HCV陰性コントロール群に比べ顕著な上昇は認められなかった。また、CD19+, CD27+のメモリーB細胞をFACSで解析したが、RzCD19Creマウスでの有意な変化はなかった。また、Bリンパ腫発症前のRzCD19CreマウスにおいてsIL-2Rαの血中濃度を測定したが、顕著な上昇は見られなかった。Bリンパ腫発症に関連する宿主因子を解析するため、HCV発現マウスと非発現マウスの腫瘍発症、非発症群を と に分け、Bリンパ腫あるいはB細胞からRNAを精製し(RIN>8.0)マイクロアレイ解析を行った後定量PCRで確認した。その結果、 共にBリンパ腫組織においてFos, IL-2R, Lymphotoxin βRの発現低下や、腫瘍抑制因子A20, C3の発現上昇が顕著に見られた(図1)。

図1



マイクロアレイの解析から、NF- κ B経路の活性化が予測されたため、国立感染症研究所の水落博士らとの共同研究で腫瘍組織の免疫染色を行った。その結果、Bリンパ腫組織ではNF- κ Bが顕著に多く核内で検出され、活性化されていると考えられた。

d) ドイツのGoethe-University HospitalのPeveling-Oberhag博士はHCV陽性患者の脾臓周辺帯リンパ腫(SMZL)におけるmiR-26bの発現低下を見いだしていた。共同研究によって解析した結果、RzCD19CreマウスのBリンパ腫においてmiR-26bの発現低下が明らかとなった(図2)。



[図2]

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計17件)

*corresponding author, 全て原著論文で査読あり。2重下線は申請者。

1) Kasama Y, Mizukami T, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M,

Kohara M, Mizuochi T, Tsukiyama-Kohara K*. B-cell-intrinsic hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signalling. *PLoS One*. Mar 20;9(3):e91373, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091373.

2) Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K*. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol*. Jun;86(6):925-32, 2014. doi: 10.1002/jmv.23916.

3) Katsume A, Tokunaga Y, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K, El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M*. A serine palmitoyltransferase inhibitor inhibits hepatitis C virus replication in human hepatocytes. *Gastroenterology* Oct;145(4):865-73, 2013. doi:pii:S0016-5085(13)00914-1. 10.1053.

4) Tsukiyama-Kohara K*, Katsume A, Kimura K, Saito M, Kohara M. 4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue. *Genes Cells* Jul;18(7):602-607, 2013. doi: 10.1111/gtc.12059.

5) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshida M, Takaoka A, Kohara M*. Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS One* 8(3) e59611, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0059611.

6) Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K*. Genomic polymorphisms in 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol* Mar;57(3) 179-184, 2013. doi: 10.1111/1348-0421.12025.

7) Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F,

- Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K and Kohara M*. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One* 7(12) e51656, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051656.
- 8) Tsukiyama-Kohara K*. Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int J Mol Sci* 13, 15271-15278, 2012. doi: 10.3390/ijms131115271.
- 9) Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Matsuda C, Yoneyama M, Fujita T, Kuge S, Yoshida M, and Kohara M*. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1. *Biochem Biophys Res Com* 30;428(4) 494-499, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.079.
- 10) Saito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*. Hepatitis C virus promotes expression of the 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1. *J Med Virol* 84 (5) 733-746, 2012. doi: 10.1002/jmv.23250.
- 11) Kasama Y, Saito M, Takano T, Nishimura T, Satoh M, Wang Z, Ali S.N. E. S., Harada S, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K*. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Research* 163 405-409, 2012. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.009.
- 12) Inoue Y, Sato H, Fujita K, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, Kai C. Selective translation of the measles virus nucleocapsid mRNA by la protein. *Front Microbiol.* 2011 Aug 23;2:173. doi: 10.3389/fmicb.2011.00173.
- 13) Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y, Arai M, Sudoh M, Kai C, Kohara M and Tsukiyama-Kohara K*. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis* 204(8) 1172-1180, 2011. doi: 10.1093/infdis/jir501.
- 14) Takano T, Tsukiyama-Kohara K*, Hayashi M, Hirata Y, Satoh M, Tateno C, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Sudo M, and Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J Hepatology* 55(3) 512-521, 2011. doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.011.
- 15) Takano T, Kohara M, Kasama Y, Nishimura T, Saito M, Kai C and Tsukiyama-Kohara K*. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 expression is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J Med Virol* 83, 801-809, 2011. doi: 10.1002/jmv.22046.
- 16) Tsukiyama-Kohara K*, Sekiguchi S, Kasama Y, Salem NE, Machida K, Kohara M. Hepatitis C virus-related lymphomagenesis in a mouse model. *ISRN Hematology* 2011; 2011; 167501 doi: 10.5402/2011/167501.
- 17) Kasama Y, Satoh M, Saito M, Okada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K*. Potential of a recombinant measles virus as expression vector of hepatitis C virus envelope proteins. *World J Vaccine* 1: 98-103, 2011. doi: 10.4236/wjv.2011.13010.
- [学会発表] (計6件) いずれも招待講演
1. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Tumorigenicity induced by hepatitis C virus. 第4回新学術領域 発がんスバイラル国際シンポジウム 2014年2月11日 札幌
 2. 小原恭子 C型肝炎ウイルス誘導性酸化ストレスによる肝細胞腫瘍原性更新

第24回日本生体防御学会 2013年7月12日 熊本

3. Tsukiyama-Kohara K, Amako Y, Kohara M. Chronic hepatitis C virus model in Tupaia belangeri.
In SIMPOSIUM “HCV animal models and vaccine development” Tallinn, Estonia.
2013年5月17日
4. Tsukiyama-Kohara K, Kimuara K, Kohara M. Inflammation and cancer in hepatitis C virus infection. 3rd IGAKUKEN International Symposium on Control of Influenza and Hepatitis. Tokyo. 2013年2月15日
5. Tsukiyama-Kohara K, Kimuara K, Kohara M. Inflammation and Cancer in Hepatitis C virus Infection. International symposium: Infection, immunity and cancer. Kyoto.
2012年1月17日
6. 笠間由里 C型肝炎ウイルス誘発性リンパ腫モデルマウスの樹立と解析 第7回麒麟塾 東京 2011年6月4日

[図書] (計3件)

- 1) 小原恭子、棟方翼、小原道法。HCVの病原性発現に關与するウイルス因子とその機能II C型肝炎 C型肝炎ウイルス感染における免疫応答と感染防御機構 日本臨床69巻増刊4別刷「新時代のウイルス性肝炎学」p97-102(2011年5月20日)
- 2) 小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルスによる免疫攪乱と炎症発がん BIO Clinica 26 (10) p42-48, 2011

- 3) 小原恭子、小原道法。肝臓「疾患モデルマウス：表現型解析指南(中山書店)」p188-192, 2011

[産業財産権] (計3件)

- 1) 「C型肝炎ウイルス阻害剤」 出願番号12/241868 出願国 アメリカ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人)化学及血清療法研究所、(公財)東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学.
- 2) 「Hepatitis C virus inhibitors」 出願番号 CA2640954 出願国 カナダ 発明者 小原恭子、小原道法 他 出願人 (一般財団法人)化学及血清療法研究所、(公財)東京都医学研究機構、国立大学法人熊本大学
- 3) 「C型肝炎の予防、治療又は改善用組成物」特願2011-125440 出願日 平成23年6月3日 発明者 小原恭子、松森昭、西村知裕、小原道法 出願人 国立大学法人熊本大学、松森昭、(一般財団法人)化学及血清療法研究所、(公財)東京都医学研究機構

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-douei/douei/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 恭子(KOHARA, Kyoko)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：20225478