

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590551

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス持続感染培養肝細胞を用いた持続感染と代謝異常の機構解明

研究課題名(英文) Metabolic Analysis of the Cultured Hepatic Cell Persistently Infected with Hepatitis C Virus

研究代表者

杉山 和夫 (Sugiyama, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10242520

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)：本研究ではHCVの持続感染による代謝異常を解明するために、HCV持続感染培養肝細胞(HPI細胞)を樹立した。この細胞では著しい脂肪滴の蓄積が認められたので、マイクロアレイとメタボロームの統合的解析を試みた。その結果、HPI細胞では律速酵素の発現亢進を伴うコレステロール、脂肪酸の増加が認められた。また、ペントースリン酸経路が亢進し、NADPHの産生亢進も認められた。TCA回路も亢進しており著しい代謝亢進状態にあった。また、転写因子Nrf2の恒常的リン酸化が糖脂質代謝を恒常的に亢進させていると考えられた。以上よりHPI細胞はHCVのウイルス学的解析および肝代謝解析のツールとして有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, to explore the mechanism for metabolic alteration by hepatitis C virus (HCV), we established a hepatic cell line, HPI cell, persistently infected with HCV. This cell line accumulated massive lipid droplets showing prominent steatosis. Thus we performed integrated analysis by combining microarray and metabolomics. As a result, enhanced production of cholesterol and fatty acids by up-regulation of the rate limiting enzymes. Pentose phosphate pathway was enhanced with production of NADPH. Moreover, TCA cycle was also enhanced indicating hypermetabolic status of the HPI cell. It was speculated that constitutively activated Nrf2, which is a key transcription factor for metabolism, was attributed to the hypermetabolism of HPI cell. In conclusion, HPI cell is a useful tool for research of not only HCV but also liver metabolism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス ペントースリン酸経路 コレステロール 脂肪酸 Nrf2 メタボローム 脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン・リバビリン療法などによりC型肝炎の治癒率は改善した。しかし、治療抵抗性の症例も多く、HCVによる持続感染を制御し、肝硬変、肝癌の発症を抑える必要がある。一方、HCVに関するウイルス学的研究は感染性株 JFH1(遺伝子型2a)の樹立により飛躍的に進んだ。特にHCVの感染サイクルと脂質代謝が密接に関連することが明らかになってきた。また、慢性炎症と糖、脂質代謝異常、発癌とが相互に関連することが明らかになり、代謝の中心臓器である肝臓に感染するHCVの持続感染を解明する意義は大きい。しかし、HCVの持続感染機構やその代謝異常との関連は充分解明されていない。

これまでに申請者らは遺伝子型 1b 型と 2a 型からなるキメラ HCV を樹立した (Sugiyama, J. Virol, 2009)。予備的研究において、これを培養肝細胞 Huh7.5 へ感染させ、長期培養と細胞クローン化により HCV 持続感染培養肝細胞を樹立した。

この持続感染細胞は以下のような特徴を有していた。(1) キメラ HCV に感染した状態で長期間増殖し続け、感染性キメラ HCV 粒子を安定的に産生し続けた。(2) 細胞内には脂肪滴が著明に貯留しており、HCV 蛋白との共局在が顕著であった。(3) 急性感染細胞と持続感染細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ解析した結果、代謝関連を含め多くの遺伝子に発現差を認めた。

JFH-1 など HCV 感染培養細胞は、通常、感染後ほとんど死滅する(急性感染)。今回樹立したキメラ HCV 持続感染培養肝細胞から産生された HCV も親株の Huh7.5 細胞に対しては同様に細胞死を誘導する。したがって、この持続感染細胞は、ウイルスの変異によるものではなく、長期の培養中に生じた宿主細胞ゲノム変異またはエピゲノム変化によってアポトーシス抵抗性になり、HCV に感染したまま長期間生存し続けていると推定された。また、著しい脂肪滴の貯留と HCV 蛋白との共局在、代謝関連遺伝子発現の変化からみて、糖、脂質代謝異常と HCV 持続感染が相互に作用しながら持続感染が成立していると推定された。

2. 研究の目的

本研究では、今回樹立したキメラ HCV 持続感染培養肝細胞をウイルス学的、分子生物学的に解析することによって、HCV の持続感染機構、すなわち、細胞が死滅することなく、持続的に感染性ウイルスを産生する機構を、脂質などの代謝異常との相互関連において明らかにすることを目的とし

た。特に以下の項目について明らかにしていくこととした。

- (1) HCV 持続感染培養肝細胞の特性を把握するために、その細胞動態を把握する。また、実際に持続感染培養肝細胞で起きている脂質など代謝の変化を把握するためにメタボローム解析を行う。
- (2) 予備的研究で得られたマイクロアレイ解析の結果をもとに、変化が起きている代謝パスウェイを分析し、メタボローム解析の結果も含め統合的に、代謝異常、持続感染を成立させている原因遺伝子(群)を絞り込む。また、持続感染に必要な宿主遺伝子を同定する。
- (3) これまでの急性感染系では捕らえにくかったウイルス形成とアポリポ蛋白形成の過程とウイルス粒子出芽の過程を持続感染細胞に対する免疫染色などでとらえる。また、培養細胞中へ放出されたウイルス粒子を分離し、脂質などの会合を分析し、ウイルス感染サイクル(特に持続感染)における脂質との関連を明らかにする。
- (4) さらにこの細胞を利用して、抗 HCV 薬スクリーニング系、薬剤感受性および抵抗性細胞の樹立などへの応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) 持続感染細胞の樹立

予備的研究で以下のように HCV 持続感染細胞の樹立を行った。すなわち、キメラ HCV の RNA を培養肝細胞 Huh7.5 へトランスフェクションし HCV の複製と感染を行った。トランスフェクション後の溶解感染で生き残った細胞を継続的に培養した。さらに、HCV 産生能の高い細胞を限界希釈法にてクローン化することによって HCV 持続感染培養肝細胞とした。

(2) HCV 持続感染培養肝細胞の脂質解析

HCV 持続感染培養肝細胞における脂肪滴の細胞化学的確認は Oil Red O 染色及び BODIPY 染色で行った。脂質成分の生化学的分析は Bligh and Dyer の方法に従って行った。

(3) マイクロアレイ解析、メタボローム解析、及び、それらの統合的解析

HCV 持続感染培養肝細胞および非感染細胞から抽出した total RNA を用いてマイクロアレイ解析(約 24000 遺伝、東レ社)による遺伝子発現解析を行った。また、脂溶性物質及び水溶性物質に対してそれぞれ LC-TOFMS、CE-TOFMS (Human metabolome 社)を用いてメタボローム解析を行った。KEGG pathway の代謝マップ(コレステロール合成系、脂肪酸・トリアシルグリセロール合成系、解糖系・ペントースリン酸系、TCA 回路)に従って、上記

データを配置することでこれらの統合的解析を試みた。発現差の確認は蛋白質レベル (Western Blotting) で行った。

(4) Nrf2 及びその標的遺伝子の発現解析

転写因子 Nrf2 は多くの抗酸化関連遺伝子、細胞増殖促進遺伝子以外に、代謝関連遺伝子を制御することが最近報告されている (Mitsuishi, Cancer Cell, 2012)。HCV 持続感染培養肝細胞での Nrf2 の関与をみるために Western Blotting によって転写因子 Nrf2、Nrf2 関連因子、及び、その標的遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) HCV 持続感染細胞の樹立と脂肪滴の著明な蓄積

キメラ HCV の RNA を培養肝癌細胞 Huh7.5 へトランスフェクションし HCV の複製と感染を行った。大部分の細胞は細胞死を来したが (溶解感染) ごくわずかな細胞が生き残った。その細胞の培養を継続し、コンフルエントになるたびにパッセージを続け [約 500 日 (155 パッセージ)], トランスフェクション後約 400 日に限界希釈法を 3 回連続して行うことによって、安定的に HCV を産生する細胞をクローニングできた。この細胞クローンをさらに約 500 日間、培養を継続した。この細胞からは持続的に感染性 HCV の産生が認められたので、我々はこの細胞を HCV 持続感染培養肝細胞とみなし HPI 細胞と名付けた。

予備的研究で示されたように、HPI 細胞においては脂肪滴の著明な蓄積が認められた (図 1A)。また、実際に細胞内の脂質成分を分析してみると、脂肪滴の主成分であるコレステロールエステル及びトリアシルグリセロールの含量が非感染細胞に比べて有意に増加していた (図 1B)。これまで、脂肪滴の蓄積は *in vitro* の溶解感染でも報告されているが (Miyanari, Nature Cell Biol, 2007)、本研究のように長期間の持続感染培養細胞で安定的に示されたのは世界的にも本研究が初めてである。また、臨床的にも脂肪滴蓄積は C 型慢性肝炎の特徴であり、HPI 細胞は C 型肝炎における脂肪滴蓄積に対する基礎研究ルールとして非常に有用であると考えられた。

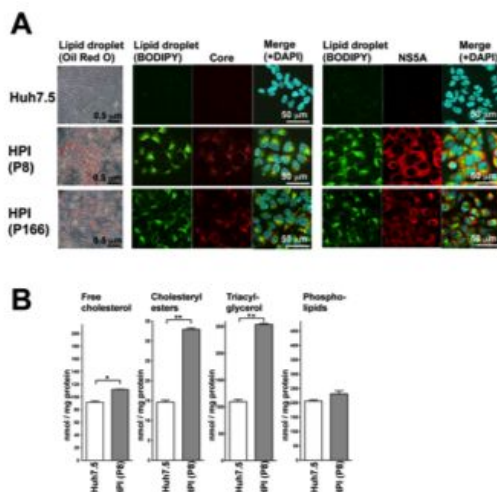


図 1. HPI細胞ではHuh7.5細胞に比べて脂肪滴が増加し(A)、コレステロールとトリアシルグリセロールの含有量が増加していた。

(2) メタボロームとマイクロアレイ解析を用いた代謝の統合的解析

HPI 細胞の有用性を利用して、実際に HPI 細胞における脂肪滴蓄積機構の解明を試みた。そのために LC-TOFMS 及び CE-TOFMS によるメタボローム解析及びマイクロアレイによる遺伝子発現解析を併せた総合的解析を行い、以下のような結果が得られた。

コレステロール合成系

コレステロール合成における律速酵素 HMGCR の発現亢進がみとめられた。また、コレステロールの増加ばかりではなくその前駆物質デスモステロールの増加も認められた。これまでもデスモステロールが HCV 感染細胞内で増加していることが *in vitro* で示されており (Rodgers, J Am Chem Soc, 2012)、デスモステロールは脂肪肝のバイオマーカーとなる可能性が示された。また、デスモステロールはアルツハイマー病のバイオマーカーであることも報告されており (Sato, J Lipid Res, 2012)、今後、我々も C 型肝炎血清を用いてデスモステロールの測定を予定している。

脂肪酸、トリアシルグリセロール合成系

脂肪酸合成経路ではその律速酵素 ACACA とともに脂肪酸不飽和化酵素 SCD、脂肪酸鎖合成酵素 EVOVL5 などの発現亢進が認められ、実際多くの種類の脂肪酸が増えており、コレステロール合成系の亢進とともに脂肪滴蓄積に貢献していると考えられた。

解糖系、ペントースリン酸系、セリン合成系

解糖系の酵素の発現亢進は認められなかった。また、解糖系の代謝産物の増加は F6P 以外に認められなかった。しかし、解糖系の alternative pathway であるペントースリン

酸経路の律速酵素 G6PD の発現亢進が著明で、その代謝産物 6PG の増加が認められた。G6PD は NADP を NADPH へ転換させる反応を促進している。NADPH はその還元作用により酸化ストレスを中和させるとともに、コレステロール、脂肪酸の還元的合成に利用される。HCV 感染によって生じた酸化ストレスを中和することで細胞死を抑制し、コレステロール、脂肪酸を増やすことで脂肪滴を蓄積させ HCV の増殖、感染を促進していると考えられた。また、その下流でプリン合成系の産物 PRPP の増加が認められ、実際、プリン関連の代謝産物の増加が著明であった。また、セリン合成系の代謝産物も増加していた。これらのことは、HPI 細胞では単に細胞死が抑制されているだけではなく、積極的に細胞増殖が促進され、HCV 持続感染における発癌要因になっていると推察された。

TCA 回路

解糖系とは対照的にほとんどの TCA 回路の産物が増加しており、ATP の増加も認められた。また、これに関連してほとんどのアミノ酸が増加していた。すなわち、HPI 細胞は TCA 回路の亢進により代謝亢進状態にあると考えられた。一般的に、癌細胞では解糖系が優位に働き ATP を産生していると考えられてきたが (Warburg 効果) (Warburg, Science, 1956)、HCV 肝癌では TCA 回路が優位であることが示唆された。なお、非必須アミノ酸の細胞内含量が増えていることから、アミノ酸の取り込みが亢進していると考えられた。興味深いことに、実際、マイクロアレイ解析では多くのアミノ酸トランスポーター遺伝子の発現が認められた。アミノ酸を含め多くの栄養素の過剰取り込みがエネルギーの過剰産生をきたし、その蓄積として脂肪滴の増加となっている可能性が示唆された。

(3)HCV 持続感染細胞における転写因子 Nrf2 及びその標的遺伝子の発現解析

上述の統合解析で発現亢進が認められた遺伝子のうちいくつか (G6PD、MTH2、ASNA、PCK2 など) は、転写因子 Nrf2 に制御されていることが報告されている。HPI 細胞では Nrf2 自体の発現亢進は認められなかったものの核内における活性型 Nrf2 (リン酸化型) が増加していた。

実際、Nrf2 をノックダウンさせると、これらの標的遺伝子の発現は抑制された。また、脂肪滴の減少とその主成分であるコレステロールエステルおよびトリアシルグリセロールの減少が認められた (図 2)。この際、興味深いことに HCV 複製、感染も抑制されていた。すなわち、抗 Nrf2 薬などにより、Nrf2 を抑制することで脂肪蓄積、代謝亢進の抑制を介して HCV 持続感染を抑えることができると考えられた。また、HPI 細胞から HCV を排除しても Nrf2 標的の遺伝子の過剰発現が認められたことから、長期感染及び長期培養に

よってゲノムまたはエピゲノムに恒常的な変化が起きていると考えられた。

Nrf2 は臨床的な癌におけるドライバー遺伝子のひとつとして知られている (Kandoth, Nature, 2013)。今後、肝癌特に HCV 肝癌における Nrf2 発現を解析する必要がある。また、これまで抗 Nrf2 薬は実験的に癌細胞の発育を抑制することが報告されているが、HCV 治癒後の発がん抑制に抗 Nrf2 薬が有効である可能性があり、今後 HPI 細胞を用いてこれらの効果を検討した上で、モデル実験での研究に発展させる予定である。

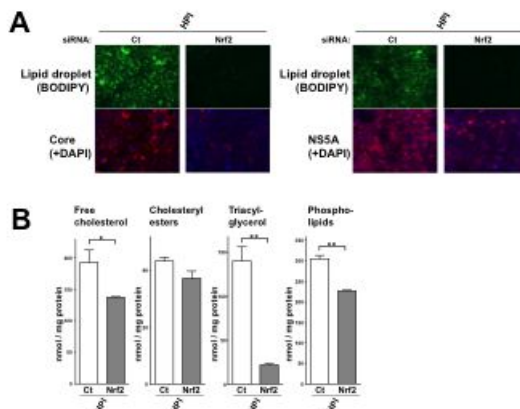


図2. Nrf2をノックダウンするとHPI細胞の脂肪滴が減少し(A)、コレステロールとトリアシルグリセロールの含有量が減少した(B)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu P, 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. 2014. 10.1371/journal.pone.0094460 (査読あり)
2. 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.
10.1002/hep.26604 (査読あり)
3. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. HCV infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross-talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol* 87: 8169-8178, 2013.
10.1128/JVI.00974-13 (査読あり)
 4. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Nishiyama K, Mataka N, Irie R, Minamino T, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Shimizu I, Yoshida Y, Hokari R, Sugiyama K, Hatsuse K, Yamamoto J, Kanai T, Miura S, Hibi T. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol* 57: 837-843, 2012. 10.1016/j.jhep.2012.05.013 (査読あり)
 5. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 142: 152-164, 2012. 10.1053/j.gastro.2011.09.049 (査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

1. Sugiyama K, Saito H, Sakasegawa N, Murakami Y, Ebinuma H, Nakamoto N, Usui S, Ishibashi Y, Chu P, Wakayama Y, Saito Y, Kanai T, Hibi T. Usefulness of A Long-term (Over 2 years) Cultured Cell Clone Persistently and Productively Infected with HCV. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA, 11/9-13 2012.
2. Usui S, Chu P, Wakayama Y, Ishibashi Y, Nakamoto N, Yamagishi Y, Masugi Y, Ebinuma H, Sugiyama K, Tanimoto A, Kanai T, Saito H, Hibi T. New Insights on Hepatic Inflammatory Pseudotumor by Gd-EOB-DTPA MR Imaging. ACG 2012 Annual Scientific Meeting. Las Vegas, USA, 10/19-24.2012.
3. 杉山和夫, 齋藤英胤, 酒瀬川典子, 村上優子, 海老沼浩利, 中本伸宏, 梅田瑠美子, 碓井真吾, 石橋由佳, ちよ柏松, 若山遊子, 齋藤義正, 日比紀文: 新たな HCV

- 研究ツールとしての HCV 持続感染培養肝細胞およびその治癒細胞の樹立. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワークショップ), 金沢, 2012 年, 6 月 7-8 日.
4. 杉山和夫, 齋藤英胤, 日比紀文: HCV 研究私の研究と Serendipity, C 型肝炎ウイルス持続感染培養肝細胞の樹立と応用. 第 39 回日本肝臓学会東部会(シンポジウム), 東京, 2012 年 12 月 6-7 日.
 5. 杉山和夫, 齋藤英胤, 日比紀文: メタボローム・トランスクリプトーム統合的解析による C 型肝炎肝脂肪蓄積の機構解明. 第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW 2013), 東京, 2013 年, 10 月 9-12 日.
 6. Ishibashi Y, Ebinuma H, Sugiyama K, Nakamoto N, Yamagishi Y, Usui S, Cho HS, Umeda R, Wakayama Y, Takaishi H, Kanai T, Sakamoto M, Saito H, Hibi T. Age and the liver stiffness measured by Fibroscan are significant predictive values for hepatoma development in chronic liver diseases. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, USA, 11/4-8. 2011.
 7. Ebinuma H, Saito H, Sugiyama K, Nakamoto N, Yamagishi Y, Usui S, Cho HS, Umeda R, Ishibashi Y, Wakayama Y, Kanai T, Hibi T. Significant and continuous elevation of serum total cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C who achieved sustained virological response by peginterferon and ribavirin treatment. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, USA, 11/4-8. 2011.
 8. 杉山和夫, 齋藤英胤, 海老沼浩利, 高久洋, 日比紀文: キメラ HCV(1b/2a)持続感染細胞のメタボローム解析(Metabolome analysis of the cultured hepatocytes persistently infected with Chimeric HCV (1b/2a)). 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 2011, 10 月 3-5 日.
 9. 杉山和夫, 海老沼浩利, 酒瀬川典子, 齋藤義正, 金井隆典, 日比紀文, 齋藤英胤: Nrf2/sMaf 転写因子複合体は HCV による肝細胞脂肪蓄積に關与する. 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 2011, 10 月 3-5 日.

〔図書〕(計1件)

1. 杉山和夫: 腫瘍ウイルス(肝炎ウイルス)がん生物学イラストレイテッド(渋谷正史, 湯浅保仁編), 羊土社, 2011: 32-42

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

杉山 和夫 (SUGIYAMA, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10242520

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

齋藤 英胤 (SAITO, Hidetsugu)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：80186949