

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659377

研究課題名(和文) HCVとミトファジーの関連性

研究課題名(英文) Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization.

研究代表者

原 裕一 (Hara, Yuichi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60550952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HCVはミトコンドリアを傷害し、活性酸素種(ROS)を産生する。傷害を受けたミトコンドリアはmitophagyにより排除されるため、ミトコンドリア傷害のみでは持続的なROSの誘導は説明できない。そこでHCVがmitophagyも抑制するのではないかという仮説のもとに本研究を行った。本研究では、コア蛋白がParkinのN端側(215アミノ酸)と特異的に結合し、Parkinのミトコンドリアへの局在を阻害することを証明した。これによりmitophagyは抑制され、mitophagyの抑制された細胞はROS産生が亢進した。さらに興味深いことにParkinをノックアウトするとコア蛋白の発現が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Background and aim: Hepatitis C virus (HCV) causes mitochondrial injury and oxidative stress, and impaired mitochondria are selectively eliminated through autophagy-dependent degradation (mitophagy). The basis of the hypothesis that if the impaired mitochondria was not removed by mitophagy which causes further oxidative stress and promotes hepatocarcinogenesis. Results: Translocation of the Parkin to the mitochondria was impaired in the presence of HCV infection both in vitro and in vivo. Parkin associated with the HCV core protein. Furthermore, a specific interaction between the HCV core protein and an N-terminal Parkin fragment. The suppressed Parkin translocation to the mitochondria inhibited autophagic degradation. Production of ROS was reinforced after mitophagy had been inhibited by HCV. Conclusion: Through a direct interaction with Parkin, the HCV core protein suppressed mitophagy by inhibiting Parkin translocation to the mitochondria.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：HCV ミトファジー ミトコンドリア 肝発癌

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)による肝病変の進展、肝発癌において酸化ストレスは重要な病態である。われわれはこれまでにHCVコア蛋白による鉄代謝障害(Gastroenterology 2008)や鉄過剰とHCVコア蛋白による相乗的酸化ストレスによる肝発癌(Gastroenterology 2006)について報告してきた。HCVコア蛋白によるミトコンドリア電子伝達系の障害が活性酸素種(ROS)の産生を亢進することが明らかにされ、HCVに起因する酸化ストレスの根幹にはミトコンドリア障害が存在する。

2. 研究の目的

一方、このミトコンドリアに起因する酸化ストレスが持続、増幅されることが肝発癌過程には重要であると推測される。細胞内小器官の品質管理を行う機構としてオートファジーが注目されているが、障害されたミトコンドリアも同様にオートファジーによって処理(マイトファジー)され、レドックス制御の一端を担うと考えられている。本研究ではHCV関連肝発癌過程においてマイトファジーの機能異常が存在するか否かを明らかにし、さらにはその分子機構を解明することを目的とした。

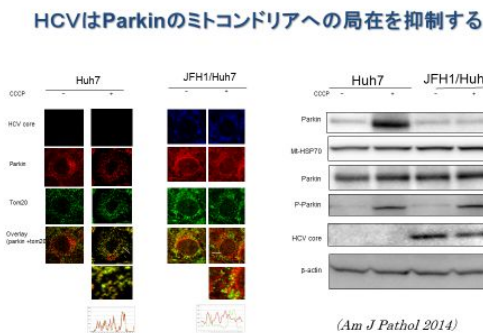
3. 研究の方法

(1)HCVクローンであるJFH1感染Huh-7細胞を用いてmitophagy制御分子の解析を行った。さらにHCV全遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(HCV-TgM)、HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて同様の解析を行った。

4. 研究成果

Mitophagyではミトコンドリア膜電位の低下に伴い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移動し、ミトコンドリアをautophagy経路により分解する。HCV感染下ではParkinのリン酸化は障害されないもののミトコンドリアへの局在が抑制された(図1)。

図1

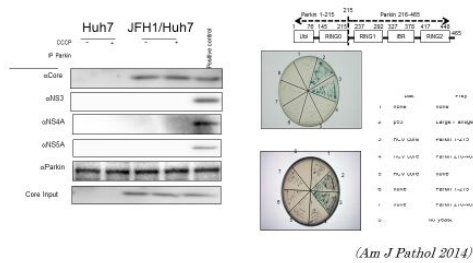


ParkinとHCVの共免疫沈降ではコア蛋白とParkinの結合が確認され、さらにyeast two hybrid assayではParkinのN端側(215アミノ酸)とコア蛋白の特異的結合が認められた(図2)。

これによりミトコンドリア外膜のコピキチ

図2

HCVcore蛋白はParkinと結合する

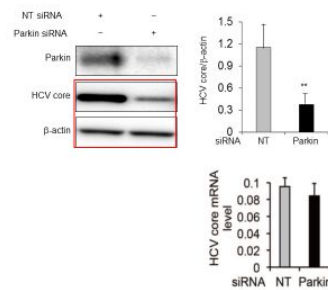


(Am J Pathol 2014)

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考えられた(図3)。以上の成績は、C型肝炎の病

図3

ParkinのKOでHCVコアタンパクの発現は抑制される



Am J Pathol 2014

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、HCVコア蛋白によるミトコンドリア障害のみならず、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と同時に、ウイルス蛋白がParkinと結合してmitophagyを抑制することを世界で始めて明らかにした。在は本研究成果を肝発癌抑制のための治療に発展させるべくコア蛋白によるmitophagyの抑制を解除し、酸化ストレスの軽減、ひいては肝発癌抑制に繋がるのではないという発想のもと研究を行っている。

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 7件)

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.* 2015 ;35:1303-1314. doi: 10.1111/liv.12675. Epub 2014 Sep 18. S
査読有

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 ;184:3026-3039. doi: 10.3892/mmr.2015.3707. Epub 2015 Apr 30. 査読有

Hino K, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatol Res.* 2014;44:123-32. doi: 10.1111/hepr.12247. Epub 2014 Jan 8. 査読有

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. doi: 10.1111/hepr.12254. Epub 2013 Nov 14. 査読有

Hino K, Nishina S, Hara Y. Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 28 Suppl 4:93-8. doi: 10.1111/jgh.12243. Review. 査読有

[学会発表](計9件)

HCV コアタンパクによる mitophagy の抑制、原裕一、2015/02/28、西部肝臓フォーラム(大阪、ワシントンホテル)

卵巣摘出 HCV トランスジェニックマウスの肝内酸化ストレス増強機構の解析、原裕一、富山恭行、仁科惣治、日野啓輔、2014/07/05、第10回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム(広島、ホテルグランピア)

HCV とミトコンドリアのバイオジェネシスとの関連性、原裕一、仁科惣治、日野啓輔、2014/05/30、第50回日本肝臓学会総会(東京、ホテルニューオータニ)

HCV コア蛋白と Parkin との相互作用による mitophagy の制御及び HCV 増殖に対する影響、原裕一、2013/12/06、第40回日本肝臓学会西部会(岐阜、岐阜都ホテル) Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin、Yuhichi Hara, Izumi Yanatori, Emi Kiyokage, Sohji Nishina, Yasuyuki Tomiyama, Kazunori Toida, Masanori Ikeda, Fumio Kishi, Nobuyuki Kato, Keisuke Hino、2013/11、The 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(Washington, DC, USA, sheraton) C型肝炎の脂質代謝障害におけるミトコンドリア異常の意義、原裕一、仁科惣治、日野啓輔、2013/10/9、JDDW 2013 第17回日本肝臓学会大会(東京、プリンスホテル)

HCV コア蛋白と Parkin との相互作用によるマイトファジーの抑制、原裕一、仁科惣治、日野啓輔、2013/06/06、第49回日本肝臓学会総会(東京、京王プラザホテル)

The hepatitis C virus core protein

suppresses mitophagy by affecting Parkin、Yuichi Hara, Izumi Yanatori , Masanori Ikeda, Sohji Nishina, Yasuyuki Tomiyama, Fumio Kishi, Kazunori Toida, Nobuyuki Kato, Kazuaki Chayama , Keisuke Hino、2013/05/05、Mitochondria:from Signaling to Disease (Lisbon, Portugal、The Ritz Carlton)
Suppressed Mitophagy in Transgenic Mice Expressing Hepatitis C Virus Polyprotein 、Yuichi Hara, Sohji Nishina, Yasuyuki Tomiyama, Keisuke Hino、2013/03/22 、The 2nd JSGE International Topic Conference 、(Kagoshima, Japan, Shiroyama Kanko Hotel)

〔図書〕(計 4 件)

日野啓輔, 原 裕一、メディカルレビュー社、The Liver Cancer Journal、2015、76 (32-37)
原裕一, 日野啓輔、診断と治療社、酸化ストレスの医学、2014、456 (346-353)
原裕一, 日野啓輔、文光堂、HEPATOLOGY PRACTICE(第3巻)、2014、321(287-292)
原裕一, 日野啓輔、診断と治療社、診断と治療、2013、261 (1325-1331)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 裕一 (Hara Yuichi)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：60550952

(2)研究分担者

仁科惣治 (Nishina Sohji)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70550961

日野啓輔 (Hino Keisuke)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80228741