

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670374

研究課題名(和文)肝発癌抑制戦略としてのmitophagy機能回復

研究課題名(英文)Restoration of mitophagy as a strategy for inhibiting hepatocarcinogenesis

## 研究代表者

日野 啓輔(Hino, Keisuke)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228741

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)：酸化ストレスは肝発癌に関連する病態であるが、C型肝炎ではマイトファジーと呼ばれるミトコンドリアの品質管理が障害されて、酸化ストレスが増強することを報告した(Am J Pathol 2014)。本研究ではHCV感染細胞に鉄キレート剤を添加すると、ミトコンドリア内の2価鉄が減少し、マイトファジーが回復することを明らかにした。マイトファジーの回復は肝発癌抑制にも繋がるが、ミトコンドリア内の鉄欠乏がどのようにしてマイトファジーを誘導するかは今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is amplified through the suppression of mitophagy by hepatitis C virus (HCV) and plays an important role in hepatocarcinogenesis. In the present study we investigated whether iron chelation could restore mitophagy suppressed by HCV. Iron chelator, deferiprone (DFP) increased LC3-II expression and mitophagosomes in HCV-infected cells. DFP also decreased mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) production, but not ATP production. In addition, DFP decreased mitochondrial ferrous iron content in dose dependent manner regardless of HCV infection. These results indicated that iron chelation restores mitophagy suppressed by HCV. The mechanisms underlying mitophagy induced by iron chelation remains to be unknown, but decrease in mitochondrial ferrous iron and disrupted mitochondrial function may be critical for inducing mitophagy.

研究分野：肝臓病学

キーワード：酸化ストレス ミトコンドリア 活性酸素種 鉄 C型肝炎ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は他の炎症性肝疾患に比べて肝内での酸化ストレスが亢進しており、病態の進展や肝発癌に密接に関連している。HCV コア蛋白はミトコンドリアを傷害し、活性酸素種 (ROS) を産生するが、その一方でミトコンドリアは豊富な抗酸化物質や抗酸化酵素を含有する。さらに傷害を受けたミトコンドリアはミトコンドリア特異的 autophagy (mitophagy) により排除されるため、コア蛋白によるミトコンドリア傷害のみではC型肝炎における持続的な酸化ストレスの誘導は説明できない。そこで HCV が mitophagy も抑制することでC型肝炎の酸化ストレスは増強、持続するのではないかと仮説を立て、HCV が mitophagy に及ぼす影響について検討した。HCV コア蛋白は Type 2 mitophagy の実行分子である Parkin の N 端側 (215 アミノ酸) と結合し、Parkin のミトコンドリアへの局在を阻害することを明らかにした。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が抑制され、mitophagy の抑制された細胞は ROS 産生が亢進することを明らかにしていた。

一方、細胞内の II 価鉄を減少させることで Parkin 非依存性に mitophagy を亢進させるという論文 (EMBO reports 2013) が英国のグループから発表された。

### 2. 研究の目的

上記の研究成果からC型肝炎におけるミトコンドリアの品質管理障害こそが、酸化ストレス誘導の根幹ではないかと考え、ミトコンドリア品質管理、すなわち mitophagy の回復を目指すことでC型肝炎の病態進展、肝発癌を抑制できるのではないかと考えた。当初 HCV コア蛋白と結合する Parkin の責任領域を決定し、この領域を含む Parkin の decoy 蛋白を発現させることで、内因性の Parkin によるマイトファジーの回復を目指した。しかし、研究過程で細胞内鉄欠乏による Parkin 非依存性 mitophagy の誘導に関する論文を知ったため、鉄キレートが HCV による mitophagy の抑制を解除しうるか否かを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) HCV-JFH1 株感染細胞と非感染細胞にそれぞれ鉄キレート剤、Deferiprone, (DFP) を添加する群としない群の 4 群を設定し、mitophagy の誘導について比較検討する。

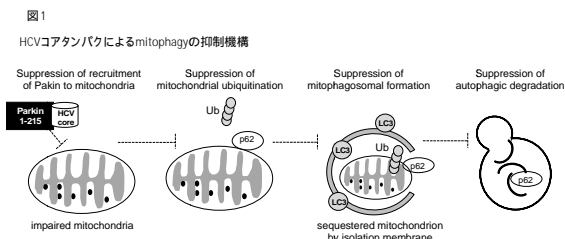
(2) 細胞内 II 価鉄の可視化蛍光プローブを用いて細胞内鉄動態を観察する。具体的には、主としてゴルジ体と小胞体の II 価鉄を検出する蛍光プローブ FeRhoNox<sup>TM</sup>-1 とミトコンドリア内の II 価鉄を検出する蛍光プローブ Ac-MT-FluNox1 (岐阜薬科大学との共同研究) を用いて、DFP 処理後の細胞内の

鉄動態を検討する。

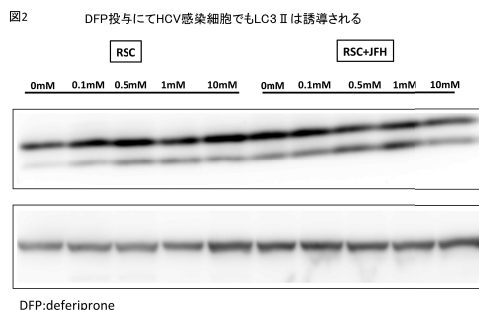
(3) DFP によるミトコンドリア膜電位、ATP 産生量の変化について検討する。

### 4. 研究成果

HCV 感染細胞では図 1 に示すように HCV コア蛋白が Parkin と結合し、mitophagy を抑制することを明らかにした。

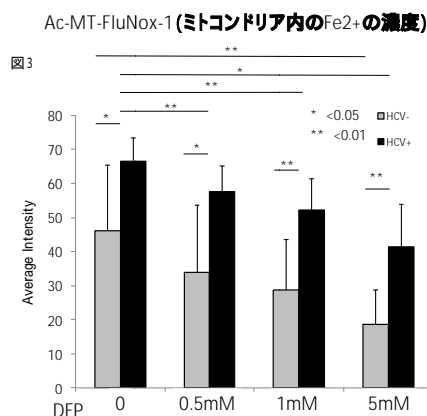


DFP を添加した細胞では HCV 感染の有無に関係なく DFP 容量依存性に microtubule-associated protein light chain 3 の (LC3)-II の発現が増加し (図 2)、autophagy の基質蛋白である p62 の発現が減少した。



また、電子顕微鏡による観察では HCV 感染細胞においても DFP により mitophagosome が有意に増加するのが確認された。以上の成績から、HCV 感染細胞では抑制されている mitophagy が鉄キレートにより回復することが示された。

次に細胞内の鉄動態と mitophagy の関係について検討した。HCV 感染細胞は非感染細胞に比べてミトコンドリア内の II 価鉄量が多く、また HCV の感染の有無に関係なく DFP の用量依存的にミトコンドリア内の II 価鉄量が有意に減少した (図 3)。



一方、ゴルジ体と小胞体の II 価鉄も減少傾向は認めるものの、有意な減少は認めなかった。さらに、DFP は HCV 感染の有無に関係なくミトコンドリア膜電位ならびに ROS 産生が有意に低下したが、ATP 産生量に有意な変化は認められなかった。

以上の成績は鉄キレートによりミトコンドリア内の鉄含有量が低下し、ミトコンドリアの部分的な機能障害を引き起こされる可能性が考えられた。このミトコンドリア内鉄含有量の低下がどのようにして mitophagy を誘導するのかは今後の検討課題と考えられた。

#### 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 15 件)

- ・ Korenaga M, Nishina S (2 番目), Hara Y (6 番目), Hino K (9 番目), 他 5 人. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int* 2015;35:1303-14. 査読有
- ・ Iio E, Matsuura K, Hino K (14 番目) 他 28 人. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet* 2015;134:279-89 査読有
- ・ Hino K, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatology Res* 2014;44:123-32. 査読有
- ・ Hara Y (1 番目), Nishina S (5 番目), Hino K (12 番目), 他 9 人. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Am J Pathol* 2014;184:3026-39. 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. *Hepatology Res* 2014;44:E229-39. 査読有
- ・ Nishida N, Hino K (31 番目), 他 39 人. 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 DOI: 10.1371/journal.pone.0086449 査読有
- ・ Omata M, Hino K (19 番目) 他 28 人. Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial. *J Viral Hepat* 2014;21:762-8. 査読有

- ・ Abe M, Hara Y (7 番目), Hino K (6 番目) 他 12 人. 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 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. 査読有

[学会発表](計 18 件)

- ・ Hara Y, Nishina S, Hino K, et al. 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 2014/10/30 Berlin Germany
- ・ 原 裕一、仁科惣治、日野啓輔 HCV とミトコンドリアのバイオジェネシスとの関連性 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 30 日 ホテルニューオータニ(東京)
- ・ Hara Y, Nishina S, Hino K, et al. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2013/11/4 Washington DC USA
- ・ 原 裕一、仁科惣治、日野啓輔 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 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日 京王プラザホテル(東京)
- ・ Hara Y, Nishina S, Hino K, et al. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by affecting Parkin. Cell Symposium Mitochondria from Signaling to Disease. 2013/5/5 Lisbon Portugal

[図書](計 5 件)

- ・ 原 裕一、日野啓輔 文光堂 HEPATOLOGY PRACTICE 第 3 巻 2014 年 321 頁(287-292)
- ・ 原 裕一、日野啓輔 診断と治療社 酸化ストレスの医学 2014 年 444 頁(346-353)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

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