

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670378

研究課題名(和文) 肝炎ウイルス複製を支持する新規肝癌由来培養細胞の樹立

研究課題名(英文) Establishment new HCC derived cell lines that support efficient hepatitis virus replication.

研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00272980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノタイプ1b型HCV感染症例の肝細胞癌手術検体から癌幹細胞マーカーEpCAM陽性細胞分画を単離し、培養皿で継代が可能な細胞株(KH)を樹立した。KH細胞はJFH-1株やHJ3-5株のHCVの感染・複製を効率良く支持した。KH細胞はRIG-Iの変異を認めず、IFN誘導が保たれ、HCVの増殖は感染直後一端漸減し、再上昇を求めた。KH細胞はp53野生型であり、NOD-SCIDマウスに効率よく腫瘍を形成した。以上より、HCV感染・複製を支持する新規肝癌培養細胞株KH細胞を樹立した。KH細胞のゲノタイプ1bのHCV複製の確立には更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a new cell line that is positive for cancer stem cell marker, EpCAM and supports efficient HCV replication and infection (JFH-1 and HJ3-5), from HCC tissue infected with genotype 1b HCV. KH cells have intact RIG-I sequence and produce IFN signaling, therefore, HCV replication once decline and increased again after infection. TP53 status of KH is wild and established tumor formation in NOD-SCID mice. Thus, we established a new HCC cell line that support efficient HCV replication and infection. Further studies should be needed to establish KH derived cells that support an efficient genotype 1b HCV replication.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ウイルス培養細胞 幹細胞マーカー 自然免疫 癌 感染症

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性肝炎を惹起し、肝硬変・肝細胞癌の誘因となる。我が国における肝細胞癌の約60%がHCV感染に起因している。現在C型慢性肝炎に対する治療法が格段に進歩し、従来のペグインターフェロン(PEG-IFN)+リバビリン(RBV)の2剤(PEG-IFN+RBV)に加え、直接抗ウイルス剤(Direct Anti viral Drug; DAA)を加えた3剤併用療法が開始され、治療成績の改善が認められている。数年後にはHCV非構造領域蛋白NS3やNS5A、NS5Bに対する2種類のDAA剤(±RBV)を組み合わせないIFNを使用しない治療法が中心となるものと考えられる。DAA使用に際し問題視されるのが薬剤耐性変異ウイルスの出現である。特にIFNを使用しないDAA剤のみによる治療法へ移行した場合、薬剤耐性ウイルスの出現が治療効果と直接関連することが予想され、適切なDAA剤を選択するためモニター・システムの構築が望まれる。

### 2. 研究の目的

我が国のHCVの多くを占めるゲノタイプ1b型の有用な培養細胞系は存在せず、薬剤耐性ウイルスの解析や薬剤耐性ウイルスに対する効果的なDAA選択の基盤となる*in vitro*での実験系が存在しないことが問題である。本研究目的は、困難とされているゲノタイプ1b型HCVの培養系を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ゲノタイプ1b型HCV感染症例の肝細胞癌手術検体から癌幹細胞マーカー陽性細胞分画を単離し、培養皿で継代が可能な細胞株を樹立する。新たに樹立された新規肝癌培養細胞株を用いてゲノタイプ1b型HCV培養系を確立する。これまでに、肝細胞癌手術検体から癌幹細胞マーカーであるEpCAM陽性細胞分画及びCD90陽性細胞分画を単離し、NOD/SCIDマウスに移植モデルを作成した

(Hepatology. 2013 Apr;57(4):1484-97)。

### 4. 研究成果

ゲノタイプ1b型HCV感染症例の肝細胞癌手術検体から癌幹細胞マーカーEpCAM陽性細胞分画を単離し、培養皿で継代が可能な細胞株を樹立した(KH細胞)。KH細胞は当初HCV-RNA陽性を示したが、継体を続けるごとにHCV-RNAは減少し、検出されなくなった。しかしながら、JFH-1株やHJ3-5株(構造領域がH77由来、非構造領域がJFH株由来)のRNAを導入するとHCVが効率よく複製することが確認された。ウイルス蛋白の発現も免疫染色やウエスタンブロットで検出された。また、KH細胞に対するHCV感染の成立も確認した。RNAトランスフェ

クション96時間後のHCV-RNAはHuh7.5細胞の1/5程度で有り、Huh7細胞と同等であった。興味深いことにKH細胞でのHCV増殖は特異なパターンを取り、RNAトランスフェクション48時間後まで、HCV-RNAは漸減を認め、48時間以降にHCVの再上昇が認められた。RNAセンサーであるRIG-Iの塩基配列解析ではKH細胞は変異を認めず、RNA導入直後のIFN-β、MX1、OASの発現はRIG-I nullのHuh7.5細胞と比較し数十倍の発現を示した。従って、KH細胞におけるHCVの漸減と再上昇は自然免疫によるインターフェロンシグナルによるHCV複製抑制とそこからの回避現象を見ているものと考えられた。遺伝子発現プロファイルの検討ではHuh-7、Huh-7.5細胞とKH細胞は全く異なる遺伝子発現を有し、染色体型もHuh-7、Huh-7.5細胞と異なっていた。また、KH細胞はp53野生型であり、NOD-SCIDマウスに効率よく腫瘍を形成した。以上より、HCV感染・複製を支持する新規肝癌培養細胞株KH細胞の樹立に成功した。現在まで、HCV感染を支持する細胞株はHuh-7細胞とそれに由来するHuh-7.5細胞に限られており、我々が樹立したKH細胞はそれらに次ぐ細胞と言える。興味深いことにKH細胞は自然免疫機能を保持しておりHCV感染制御の新たな研究展開に繋がると考えられる。また、自然免疫の抗腫瘍効果に及ぼす研究も展開できると考えられ、有用性に富む細胞と考えられた。

KH細胞にゲノタイプ1b型HCV感染者3例から得られた血清を用いて様々な条件下で感染実験を行った。ビタミンEはHCV感染・複製効率を飛躍的に亢進させることが報告されているが、ビタミンE存在下に於いてもKH細胞でのHCV複製は確認されなかった。さらに、多数血清を用いた検討が必要と考えられる。ゲノタイプ1b感染クローンの樹立はワクチン開発にも有用と考えられ、更なる研究の進展が望まれる。

### 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19件)

すべて査読「有」

1. Transcriptomic Analysis of Chronic Hepatitis B and C and Liver Cancer Reveals MicroRNA-Mediated Control of Cholesterol Synthesis Programs. Selitsky SR, Dinh TA, Toth CL, Kurtz CL, Honda M, Struck BR, Kaneko S, Vickers KC, Lemon SM, Sethupathy P. MBio. 2015;6(6):e01500-15. doi:

- 10.1128/mBio.01500-15.
2. Defeating EpCAM(+) liver cancer stem cells by targeting chromatin remodeling enzyme CHD4 in human hepatocellular carcinoma. Nio K, Yamashita T, Okada H, Kondo M, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Zeng SS, Yoshida M, Hayashi T, Sunagozaka H, Oishi N, Honda M, Kaneko S. *J Hepatol*. 2015;63(5):1164-72. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.009.
  3. Post-progression survival and progression-free survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated by sorafenib. Terashima T, Yamashita T, Takata N, Nakagawa H, Toyama T, Arai K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2015 in press. doi: 10.1111/hepr.12601.
  4. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2015;45(9):949-59. doi: 10.1111/hepr.12436.
  5. Inhibition of microRNA-214 ameliorates hepatic fibrosis and tumor incidence in platelet-derived growth factor C transgenic mice. Okada H, Honda M, Campbell JS, Takegoshi K, Sakai Y, Yamashita T, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Tanaka T, Kaneko S. *Cancer Sci*. 2015;106(9):1143-52. doi: 10.1111/cas.12730.
  6. Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, Honda M, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Tani ai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. *Hepatol Res*. 2015;45(8):846-55. doi: 10.1111/hepr.12423.
  7. Response to Importance of confounding factors in assessing fatty acid compositions in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, Honda M, Kaneko S. *Liver Int*. 2015;35(6):1773. doi: 10.1111/liv.12755.
  8. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and CD4+ T cells with clinical impact. Komura T, Sakai Y, Harada K, Kawaguchi K, Takabatake H, Kitagawa H, Wada T, Honda M, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. *Cancer Sci*. 2015;106(6):672-86. doi: 10.1111/cas.12663.
  9. TSU-68 Ameliorates Hepatocellular Carcinoma Growth by Inhibiting Microenvironmental Platelet-derived Growth Factor Signaling. Hara Y, Yamashita T, Oishi N, Nio K, Hayashi T, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T,

- Hashiba T, Asahina Y, Kondo M, Okada H, Sunagozaka H, Honda M, Kaneko S. *Anticancer Res.* 2015;35(3):1423-31. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/3/1423.long>
10. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsunashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. *Hum Genet.* 2015;134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7.
  11. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, Honda M, Kaneko S. *Liver Int.* 2015;35(2):582-90. doi: 10.1111/liv.12685.
  12. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. *Sci Rep.* 2015;5:7675. doi: 10.1038/srep07675.
  13. Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. *Hepatology.* 2014.;60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.
  14. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. *Hepatol Res.* 2014;44(12):1179-85. doi: 10.1111/hepr.12266.
  15. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi M, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology.* 2014;60(5):1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.
  16. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Takeshita Y, Takamura T, Honda M, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Diabetologia.* 2014 May;57(5):878-90.

doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.

17. P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
18. The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. *Sci Rep.* 2014;4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
19. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E and Kaneko S. *Hepatology.* 2014;59(3):828-38. doi: 10.1002/hep.26788.

〔学会発表〕(計4件)

1. Naoki Oishi, Xuyang Wang, Kazunori Kawaguchi, Masao Honda, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, Hepatitis B virus X protein stimulates HBV replication by regulating transcription factors associated with DNA or histone methylation, AASLD The Liver Meeting 2015, 2015年11月16日、

サンフランシスコ(アメリカ)

2. Hikari Okada, Masao Honda, Kai Takegoshi, Taro Yamashita, Naoto Matsuzawa, Toshinari Takamura, Takuji Tanaka, Shuichi Kaneko, Peretinoin, an acyclic retinoid, suppresses steatohepatitis and development of tumorigenesis by activated Atg16L1-dependent autophagy in mice fed an atherogenic high-fat diet, AASLD The Liver Meeting 2015, 2015年11月16日、サンフランシスコ(アメリカ)
3. Fanwei Liu, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai, Takayoshi Shirasaki, Masaya Funaki, Masao Honda, Hong Tang, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, Effective prevention of direct-acting antiviral-resistant hepatitis C virus by combination with LNA-anti-miR-122 therapy in cell culture, 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2015年10月9日、ストラスブール(フランス)
4. Takayoshi Shirasaki, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa, Murai, Takayuki Shiimoto, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Stanley M. Lemon, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko, LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication, 21st International Symposium on Hepatitis C Viruses, 2014年9月9日、バンフ(カナダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 00272980

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

山下 太郎 (YAMASHITA, Taro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：9 0 3 7 7 4 3 2

島上 哲朗 (SHIMAKAMI, Tetsuro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：5 0 4 3 6 8 2 0

白崎 尚芳 (SHIRASAKI Takayoshi)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：5 0 5 4 7 1 8 0