

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590350

研究課題名（和文）ミクロプロテオミクスによる細胞内と微小環境におけるC型肝炎ウイルス制御因子の解明

研究課題名（英文）Cellular and microenvironmental factors controlling hepatitis C virus infection, examined by micro-proteomics of human liver tissues.

研究代表者

江角 真理子 (ESUMI MARIKO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10147019

研究成果の概要（和文）：

肝臓がんの主たる原因であるC型肝炎ウイルスについて、治療薬はまだ十分なものがない。本研究ではヒト組織がもたらす抗ウイルス反応をヒントに、新たなヒトに優しいC型肝炎治療法の基盤を探索した。ウイルス量が1000倍も異なる肝臓組織を比較し、どこが違うかを発現しているタンパク質の違いで捉えた。とくにウイルスが増える肝実質細胞とその環境を作り出す間質とにわけて解析した。それぞれから90個と27個のタンパク質を見つけた。ウイルス量が多い組織では、ウイルス有利に働くものとウイルス制御に働くものとの両方が見いだされた。中でもウイルス量が多い組織で発現亢進する機能未知のタンパク質について、ウイルス感染実験で検討した。ウイルス侵入を助けるタンパク質分解酵素や、ウイルスの分泌に関連しそうな細胞内器官ゴルジ体タンパク質の存在が見いだされた。

研究成果の概要（英文）：

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of hepatocellular carcinoma. Anti-HCV drugs developed have still some problems such as side effects and drug-resistant mutant viruses. In this study, we investigated a new strategy of humane anti-HCV therapy based on human-made anti-HCV response. We examined which proteins were differentially produced in liver tissues containing different HCV loads by 1000 folds. When we compared them, we obtained liver tissue samples separately from liver parenchyma and stroma by laser microdissection. Ninety and 27 were differential proteins between the two groups of high and low viral loads, from the liver parenchyma and stroma, respectively. Both pro-viral and anti-viral proteins were up-regulated in the high HCV groups. Proteins which function was unknown in the viral infection were examined by the in vitro HCV infection system using cultured cells. We found two proteins up-regulated in the high HCV groups: a serine protease involved in the entry step of HCV infection and a golgi protein related to the secretion of HCV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：C 型肝炎ウイルス・感染制御・微小環境・レーザーマイクロダイセクション・プロテオミクス・細胞膜セリンプロテアーゼ・ゴルジ体

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス感染は一過性感染で終わることは少なく、70～80%が持続感染する。ほとんどが慢性肝炎、肝硬変を経て、20～30年後には肝細胞癌に進展する。日本人の肝細胞癌の8割はC型慢性肝炎を母地に発生している。近年、C型慢性肝炎の治療法としてペグインターフェロンとリバビリンとの併用療法が認可され、治療効果の向上が認められている。が、副作用もあり有効例は半数にとどまるのが現状である。ウイルスタンパク質をターゲットとする新たな治療薬も開発が進められている。が、耐性ウイルスの出現が問題となってきた。またこれら治療薬の抗ウイルス評価系にも問題がある。C型肝炎ウイルスは、限られたウイルス株と限られた培養細胞との組合せでしか感染増殖できないため、その特殊な実験系で抗ウイルス評価を実施せざるを得ない。果たしてヒト肝臓で同様の抗ウイルス効果が期待できるかは疑問が残る。このような現状で、次のように考える。たとえウイルスを完全に排除できなくともウイルス量を減らすことができれば、病態の進展を食い止めることができるはずである。C型慢性肝炎患者でもそのウイルス量は様々である。肝臓中のウイルスを定量してみると、ほとんど検出限界ギリギリのものから、その1000-10000倍ものウイルスが増殖している症例もある。これが一体何によるのか明らかになれば、C型肝炎ウイルス増殖を抑制し、病態の進展をおさえるような新規治療分子を生体内から明らかにできると考える。本研究では、宿主が本来もちうる抗ウイルス反応に着目し、そのメカニズムを解明することにより、ヒトに優しいC型肝炎治療法の基盤を提供する。

特に本研究では、以下の点に注意した。ヒト肝臓で起こる抗ウイルス反応を捉えるには、肝実質細胞だけでなく、微小環境である間質についても解析する必要がある。組織レベルで抗ウイルス作用を捉える視点から、肝組織を肝実質とそれと取り巻く間質とに分け、それぞれからウイルス量に関連して変化する物質を捉えることにした。

## 2. 研究の目的

本研究では未だ制御機構を確立できていないC型肝炎ウイルス感染制御および病態制御について、関連する因子をヒト組織から見出す。ウイルス量の異なる肝組織を材料と

して、肝実質細胞内で起こる制御と肝実質細胞外で起こる微小環境制御とに分けて解析するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションにて材料を採取する。包括的な解析法をとるが、mRNAレベルではなく、最終機能分子であるタンパク質レベルで解析する。そのため最近技術発展が著しい高感度のLC-ESI-MS/MSを用いる。以上のように、本研究では細胞内だけでなく、微小環境にも注目して感染制御因子の解明を目指す。

一方、以前 mRNA レベルでの包括的発現解析の結果、ウイルス量が多い肝組織で発現亢進している機能未知の分子を見つけていた。その分子のタンパク質局在、およびウイルス制御機能についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝臓組織病理標本の選別

- ① 手術切除組織の新鮮凍結組織からRNAを抽出し、HCV RNAについてリアルタイムPCRにより定量した。
- ② 肝硬変の有無により症例を分け、それぞれについて、ウイルス量が100倍以上異なる高ウイルス群と低ウイルス群に分類した。

### (2) レーザーマイクロダイセクションとプロテオーム解析

- ① ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片のHE染色像から肝小葉内部の肝実質と、小葉周囲の肝実質を含む間質とを顕微鏡下で選別し、レーザーマイクロダイセクションにてサンプルを集めた。
- ② Liquid Tissue を用いて溶解し、トリプシン消化を行った。
- ③ LC-ESI-MS/MSによりペプチドを分離し質量分析を行った。
- ④ Mascot/Swiss-Prot を用いてタンパク質同定を行い、解析ソフトProgenesis-LC/MSを用いて、ペプチドおよびタンパク質定量解析を行った。
- ⑤ 高ウイルス群と低ウイルス群との2群間で有意に発現量が異なるタンパク質を同定した。

(3) ターゲット分子の機能解析

- ① ヒト肝組織における発現の有無や局在を検証するために、ターゲット分子の免疫染色を行った。
- ② HCV 感染におけるターゲット分子の機能を調べるために、Huh7 / JFH1 HCV 培養細胞感染系について、ターゲット分子の発現誘導もしくは発現抑制を行い、HCV 感染への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) C型肝炎ウイルス量に差のある肝組織から見いだされた、発現が異なるタンパク質

肝硬変のない慢性肝炎肝組織について、ウイルス量が1000倍異なる肝組織低ウイルス群3例と高ウイルス群3例を選び、それぞれ肝実質および間質についてプロテオーム比較解析を行った。

- ① 肝組織から2168個のタンパク質が同定され、1536個について定量比較を行った。実質から90個、間質から27個のタンパク質(総タンパク質数の7.6%)が、ウイルス量により2倍以上有意に異なる発現を示した。
- ② 高ウイルス群の肝実質では細胞分裂や抗アポトーシス関連タンパク質などが発現亢進しており、DNA障害や酸化ストレスに対する応答分子が発現低下していた。ウイルス感染によってもたらされる細胞への影響が、細胞がん化への進展と深く結びついていることが示された。
- ③ 間質で発現変化するタンパク質には、ウイルス感染や病態との関連で機能未知のものが散見された。中には、肝小葉周囲の肝実質細胞に局限して発現する肝実質細胞タンパク質もみつかった。

以上より、マイクロプロテオミクスにより、肝臓微小環境や肝臓組織のheterogeneityがウイルス感染や病態に深く関わることが示された。また具体的分子についても提示することができた。

(2) 高ウイルス群で発現亢進するタンパク質: GOLM1 (Golgi membrane protein 1)

GOLM1は、間質および隣接する実質領域で、高ウイルス群に2.3倍発現亢進するタンパク質であった。

- ① ヒト肝組織の免疫染色から、門脈域の胆管が陽性を示す他、高ウイルス群で

は門脈域周囲の肝実質細胞が強陽性を示した。各肝実質細胞内ではapical poleに局限し顕著な極性を示した。

- ② ウイルス産生との関連を調べるためにHuh7 / JFH1 HCVの培養細胞感染系で検討したところ、感染前後で細胞内局在パターンに変化がみられた。

今後、siRNAによるノックダウン実験を計画し、GOLM1タンパク質とゴルジ体との関連、ウイルスタンパク質との関連を解析し、GOLM1とウイルス産生・分泌との関連を明らかにしていく。

(3) 高ウイルス群で発現亢進するmRNA: 細胞膜セリンプロテアーゼTMPRSS2

以前包括的mRNA発現解析で、高ウイルス群の肝組織で細胞膜セリンプロテアーゼTMPRSS2が顕著に発現亢進していることを見いだしていた。

- ① 免疫染色でも、高ウイルス群ヒト肝組織で発現が強く、肝実質細胞のapical membraneに局在する極性を示した。
- ② Huh7 / JFH1 HCVの培養細胞感染系で、以前各種プロテアーゼ阻害剤の影響を検討したところ、 $\alpha$ 1アンチトリプシン、ダイズ由来のトリプシンインヒビターなどセリンプロテアーゼ阻害剤が顕著に感染を阻害することを見いだした。トリプシン添加により、HCV感染性の増強も観察された。トリプシン様セリンプロテアーゼがHCV感染に関与することが示された。

そこで、TMPRSS2がHuh7 / JFH1 HCVの培養細胞感染系で関与するかを検討した。

- ③ TMPRSS2陰性Huh7細胞に野生型と変異型のTMPRSS2を安定発現させたところ、野生型TMPRSS2に依存して、切断部位アミノ酸配列QAR, QGRに対し高い細胞表層プロテアーゼ活性を示した。ウェスタンブロットではQSRで切断された活性型TMPRSS2 24kDaが観察され、インフルエンザウイルスHAも切断し膜融合を起こした。
- ④ HCV感染性を検討したところ、野生型TMPRSS2に依存してはHCV感染は増強し、TMPRSS2 siRNAによりノックダウンすると、その感染亢進が相殺された。
- ⑤ ウイルス結合と侵入とを分けて感染実験を検討したところ、細胞セリンプロテアーゼの主な関与はウイルス侵入段階であった。

TMPRSS2がHCV感染の活性化に関与することが示された。今後、ウイルス侵入に関与する

分解ターゲットタンパク質が何ものかを同定する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Hiromi Yamaguchi, Masahiko Sugitani, Mariko Esumi(計7名、7番目):  $\beta$ -Glucuronidase is a suitable internal control gene for mRNA quantitation in pathophysiological and non-pathological livers. *Experimental and Molecular Pathology*(査読有) in press, 2013  
DOI: 10.1016/j.yexmp.2013.06.05
- ② Hiromi Yamaguchi, Kiyoshi Hasegawa, Mariko Esumi: Protein from the fraction remaining after RNA extraction is useful for proteomics but care must be exercised in its application. *Experimental and Molecular Pathology*(査読有) 95, 46-50, 2013  
DOI: 10.1016/j.yexmp.2013.05.02

〔学会発表〕(計10件)

- ① 山口裕美、杉谷雅彦、江角真理子(計8名、8番目): 組織間質からみた肝炎の分子病理: レーザーマイクロダイセクション組織検体の比較プロテオミクスで捉えた肝臓の間質. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月13日
- ② 江角真理子、山口裕美、脇田隆宇(計6名、1番目): 細胞膜セリンプロテアーゼがC型肝炎ウイルス感染感受性に関与する. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月14日
- ③ Mariko Esumi, Hiromi Yamaguchi, Takaji Wakita(計6名、1番目): Cell surface serine protease is involved in the hepatitis C virus infection. 19th International Symposium in Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October 6, 2012
- ④ 山口裕美、杉谷雅彦、江角真理子(計8名、8番目): C型肝炎ウイルス感染量が異なるヒト非癌部慢性肝炎肝組織で、実質および間質のプロテオミクスから何がわかるか? 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19日
- ⑤ 中島聡美、山口裕美、江角真理子(計5名、5番目): 細胞膜トリプシン様セリンプロテアーゼはC型肝炎ウイルス感染に関与するか? 第34回日本分子生物

学会年会、横浜、2011年12月8日

- ⑥ Mariko Esumi, Hiromi Yamaguchi, Takaji Wakita(計6名、1番目): Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, USA, September 8, 2011

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

江角 真理子 (ESUMI MARIKO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 10147019

##### (2) 研究分担者

杉谷 雅彦 (SUGITANI MASAHIKO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 40187654

##### (3) 研究協力者

山口 裕美 (YAMAGUCHI HIROMI)

日本大学・医学部・専修研究員

研究者番号: 90547118