

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590419

研究課題名（和文）C型肝炎におけるDNA傷害及び遺伝子修復機構の解析

研究課題名（英文）The analysis of the DNA damage and genetic repair mechanism in Hepatitis C

研究代表者

塗谷 秀子（NURIYA HIDEKO）

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：80270685

研究成果の概要：HCVによる遺伝子傷害または遺伝子修復機能に与える影響を解析するため、DNA二本鎖切断（DSB）を導入後に相同組換え（修復）が起こるとGFPの蛍光を発生する特徴を持つヒト繊維肉腫細胞株に、レンチウイルスでHCV各蛋白を発現させ35日間培養した。この各HCV蛋白発現細胞を用いて、経日的なFACS解析によりGFPの蛍光を生じた細胞数の割合から相同組換え（修復）の異常の有無を確認した。強制的にDNA傷害を誘導する系と誘導しない系の両者で実施した。

各実験系でGFP陽性細胞の割合がEmpと差があるHCV蛋白が存在し、HCV蛋白によるDNA修復異常の可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
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・基礎医学 細目：実験病理学

キーワード：細胞、HCV

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）は、感染後、80～90%もの効率で持続感染し、慢性肝炎、肝硬変を引き起こし、さらに年率7%もの高率で肝細胞癌を発生させる。

本研究者はHCV感染肝癌患者組織のHCV-RNA量を定量し、癌部では非癌部に較べ少ないことを報告した。その事実から、HCVは発癌前の肝細胞に何らかの影響を与え、肝癌発生初期に寄与することを推測した（Tanaka T. et al: Virological

Significance of low-level hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus associated liver disease. J of Medical Virology 72.p223-229(2004)。

またHCV感染肝癌組織切片について、DNA二本鎖切断を引き起こすDNA傷害の組織学的マーカーである γ H2AXの検出を実施したところ、HCV感染肝組織で非癌部と癌部両方で γ H2AXが検出された。これはHCV陰性の肝組織の非癌部に較べて広範囲に検出された。この結果からHCVの感染によるDNA傷害の蓄積

が遺伝子不安定化を誘導し、発癌に寄与する可能性が示唆された。

一方、培養細胞系を用いた実験において、トポイソメラーゼ阻害剤や γ 線照射により誘導される DNA 傷害の修復過程を γ H2AX や断裂 DNA をアルカリ処理により物理的に検出する事で経時的に解析した結果、HCV Core 蛋白発現細胞において断裂 DNA の修復が遅延化している事が示唆されていた。

我々は以上の結果により、感染肝臓組織内の HCV 遺伝子発現細胞では、HCV が宿主 DNA 修復機構に関与し、DNA 修復が抑制される可能性を考えた。

2. 研究の目的

我々は、HCV 感染組織によって認められる DNA 傷害が、どのような機序で起こされるのかを解明することを目指し、HCV による DNA 傷害または DNA 修復機能の影響について、DNA 修復関連蛋白の機能に焦点を当て、解析することを目的として研究を進め、まず HCV 各蛋白発現細胞における DNA 修復反応（相同組み換え）を検出可能な培養細胞系を構築した。この培養系を用いて、(1) 強制的に DNA 傷害を起こし HCV 蛋白発現による DNA 修復機能に与える影響を調べること、また (2) HCV 発現細胞を長期に培養することで、HCV 蛋白発現自体の影響で遺伝子傷害を蓄積し、遺伝子修復機能に影響を与えるかどうかを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 傷害強制導入系

① Sce-1 発現アデノウイルスによる DSB 導入

Sce-1 発現アデノウイルスにより DNA 二本鎖切断 (DSB) を導入し、その後相同組換え (修復) が起こると GFP の蛍光を発生する特徴を持つヒト繊維肉腫細胞株 (pDR-GFP/HT1080) にレンチウイルスで HCV 各蛋白を発現させ 35 日間培養した。この各 HCV 蛋白発現細胞に、経時的に Sce-1 発現アデノウイルスを感染させ、72 時間後に FACS 解析を用いて GFP の蛍光を生じた細胞数の割合から相同組換え (修復) の異常の有無を確認した。Sce-1 発現の Control として、LacZ 発現アデノウイルスを用いた。

② HIV-1 Vpr 蛋白による DNA 傷害の導入

HIV と HCV の両者のウイルスに感染している患者では、HCV 単独感染者より早く肝癌が進展するという報告が存在する (Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in HIV-Infected Veterans With and Without the Hepatitis C virus. ARTH INTERN MED/VOL 164, NOV

22, 2004)。このメカニズムに HIV-1 ウイルスによる遺伝子傷害が関与しているのではないかと推測し、DNA 傷害を誘導することが報告されている HIV-1 ウイルスのリコンビナント Vpr 蛋白を HCV の各蛋白を発現させた pDR-GFP/HT1080 細胞の培養液中に添加し、2 日後の FACS 解析により GFP の蛍光を生じた細胞数の割合から相同組換え (修復) の異常の有無を確認した。

(2) HCV 発現細胞における Spontaneous な DNA 修復異常の検出

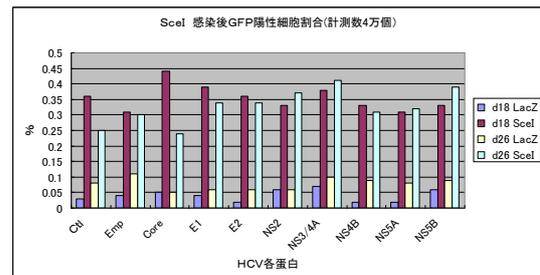
また HCV 蛋白発現自体が DNA 傷害を蓄積し、DNA 修復異常を起こしている可能性を考え、HCV 発現細胞における Spontaneous な DNA 修復異常も解析するため、上記の pDR-GFP/1080 に HCV 各蛋白を発現させた細胞を 35 日間培養し、強制的に DNA 傷害を起こすことなしに、FACS 解析により GFP の蛍光を生じた細胞数の割合から相同組換え (修復) の異常の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) DNA 傷害強制導入系

① Sce-1 発現アデノウイルスによる DSB 導入

SceI により強制的に DSB を導入した場合、E1、NS2、NS3/4A、NS5B 発現細胞において、レンチウイルス感染後 18 日、および 26 日目の相同組換えを起こした GFP 陽性細胞の割合が Emp より高かったがその差はわずかだった。しかし core 蛋白発現細胞では 18 日目に GFP 陽性細胞の割合が Emp と比較して一番高かったのにもかかわらず、26 日目には Emp より低値だった。

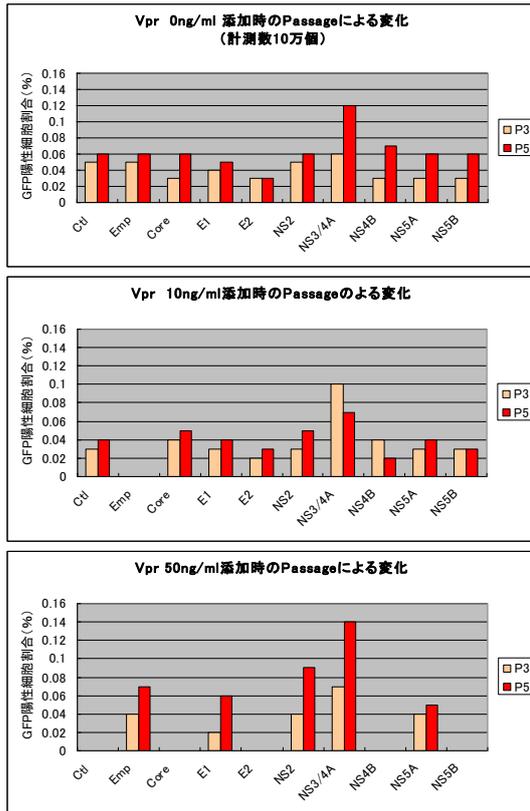


② HIV-1 Vpr 蛋白による DNA 傷害の導入

培地中にリコンビナント Vpr を、HIV-1 感染患者の血中濃度に近い 10ng/ml の濃度を含む、0、10、50ng/ml を添加後、継代を 3 回および 5 回実施した。Vpr 添加は継代 2 回目には継代時に添加したが、継代 1 回目と 3 回目以降は各継代時の一日後に添加した。

継代を 3 回実施した Vpr 10ng/ml 添加時の NS3/4A 発現細胞の GFP 陽性細胞の出現率が、Ctl または Emp に比較して Vpr 0、50ng/ml より高かった。しかし継代を 5 回実施した場合、

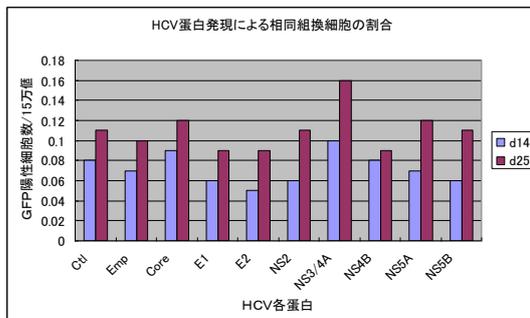
反対に Vpr 0、50ng/ml より低かった。



リコンビナント Vpr を 2 回目継代時に添加した時、10ng/ml 添加時の Emp と 50ng/ml 添加時の Ct1、HCV core、E2、NS4B、NS5B 発現細胞では、細胞がほとんど死んでいたが、50ng/ml 添加時の Emp、E1、NS2、NS3/4A、NS5A 発現細胞では死細胞はほとんど見られなかった。

(2) HCV 発現細胞における Spontaneous な DNA 修復異常の検出

HCV 蛋白発現細胞を持続的に培養した場合、Spontaneous に相同組換えを起こした GFP 陽性細胞の割合は、レンチウイルスによる感染後 14 日で、Core、NS3/4A、NS4B 発現細胞で Emp より高かったがその差はわずかだった。25 日目では core、NS3/4A、NS5A 発現細胞で高く、その中で NS3/4A の割合が特に高値だった。E1、E2 は反対に両日ともわずかに低かった。

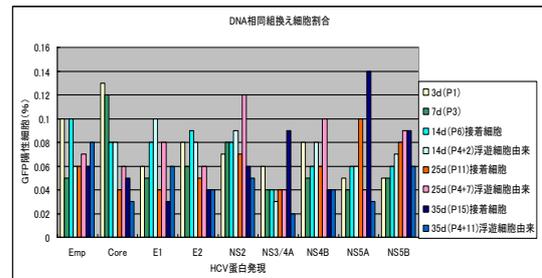


再現性を確認するため、2 回目にレンチウイ

ルスで HCV 各蛋白を発現させ、相同組換えの頻度を調べたところ、NS3/4 蛋白発現細胞では、それほど高くなかった。

また継代を続けると浮遊細胞の出現数が増加したため、21 日目 (Passage N0(P.)10) から浮遊細胞由来の細胞を分離して解析した。

3 回目の実験実施時には HCV 発現レンチウイルスを感染させて 7 日目 (P4) に浮遊細胞由来と接着細胞を分離して培養した。



それぞれ Emp と比較して、GFP 陽性細胞の割合が 0.04% の差があったものを下記に示した。

- Emp より 0.04% 以上高かった細胞：
Core 7d (7 日)、NS2 25d (浮遊)、NS5A 35d (接着)
- Emp より 0.04% 以上低かった細胞：
Core 35d (浮遊)、E2 35d (浮遊)、NS3/4A 14d (接着)、35d (浮遊)、NS4B 35d (浮遊)、NS5A 35d (浮遊)

<結論>

(1) DNA 傷害強制導入系

① Sce-1 発現アデノウイルスによる DSB 導入

Sce-I で強制的に DSB を起こした場合、Emp と比較して相同組換えを起こした細胞の割合が一番高かったのが 18 日後の Core 発現細胞だったが、26 日目には反対に低値だった。これは HCV core 発現細胞が発現後 26 日後では Sce-I により細胞死を起こしやすくなり、生き残った細胞群に修復されない細胞の割合が多くなったのではないかと推測した。

② HIV-1 Vpr 蛋白による DNA 傷害の導入

リコンビナント Vpr 添加実験では、NS3/4A 発現細胞で Vpr 濃度が 0 および 50ng/ml では Ct1 または Emp と比較して、継代 3 回、継代 5 回で相同組換えを起こした GFP 陽性細胞の割合は高値だったが、HIV-1 感染患者に近い Vpr 濃度 10ng/ml では 5 回目の継代時には継代 3 回目より GFP 陽性細胞の割合は低かった。このことから、添加した Vpr の濃度の違いで、DNA 修復される細胞とされない細胞の割合が培養を続けることで、変化する可能性が示唆された。

また、50ng/ml の Vpr 添加により、死んだ細胞群に関しては、過剰の DNA 傷害によりアポトーシスを起こした可能性を考え、また生き残った細胞群に関しては、アポトーシス機構が阻害されている可能性が示唆された。

(2) HCV 発現細胞における Spontaneous な DNA 修復異常の検出

① 強制的に DSB を導入しない HCV 発現細胞で、一回目に実施した NS3/4A 発現細胞では、相同組み換えを起こした細胞の割合が Emp に比べて高値であったため、HCV NS3/4A 発現細胞では NS3/4A 発現が DNA 傷害を誘導または蓄積して修復効率が上昇している可能性を考えられた。

② Emp と比較して GFP 陽性細胞の割合が低かった細胞群は、HCV 蛋白発現により DNA 修復されない細胞の割合が高い可能性が考えられ、それは 3 回目の実験結果では浮遊細胞由来の細胞群に多かった。この結果から、浮遊細胞の性質獲得と DNA 修復抑制には何らかの関係がある可能性が考えられた。

Emp に比較して GFP 陽性細胞の割合が 0.04% 以上低かった細胞のうち、Core、NS3/4A、NS4B、NS5A について (E2 以外) は、足場非依存性に関与していることが、報告されていた。

- Core: Cell Oncol. 2006;28(4):177-90.
J Exp Med. 2002 Sep 2;196(5):641-53.
- NS3: Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2007 Oct;39(10):751-62
- NS4B: Biochem Biophys Res Commun. 2000 Jan 19;267(2):581-7
- NS5A: J Interferon Cytokine Res. 2005 Mar;25(3):152-64.

③ 接着細胞で GFP 陽性細胞の割合が Emp より高値で、さらに浮遊細胞で低い場合は、HCV 蛋白発現により、DNA 傷害を受けて修復された細胞が接着細胞に多く存在する一方で、浮遊細胞には修復されない細胞の割合が高くなっている可能性が考えられた。
→NS3/4A 35d、NS5A 35d。

この結果から、この pDR-GFP/HT1080 細胞系では NS3/4A、NS5A 蛋白発現細胞を長期に培養することで、DNA 傷害が蓄積し修復される細胞が増加する中で、足場非依存性を獲得した修復機能異常を示す細胞が増加することが示唆された。

<今後の展望>

(1) HCV 蛋白発現強度における GFP 陽性率を調べる。

今回の実験は、Lenti HCV 発現システムと pDR-GFP/HT1080 のセレクションマーカーがピューロマイシンで同一な為、HCV 蛋白発現量の細胞による違いが見られた (免疫染色法とイムノブロットイング (IB) で確認。) そこで浮遊細胞由来の細胞および接着由来細胞について、HCV 各蛋白に対する抗体と GFP 抗体で 2 重染色し FACS 解析し、HCV 各蛋白発現の強弱において GFP 陽性細胞の割合に差があるか確認する。または GFP 陽性、陰性でソーティングして細胞の HCV 蛋白発現の差を免疫染色法で確認する。

(2) (1) で調べた細胞群について p53 の機能を解析する。

多くの浮遊細胞の細胞膜上に多数のスパイク状の構造が見られたことから、顕微鏡下で生細胞を観察し filopodia の形成を確認した。細胞運動は Rho ファミリー GTPase により制御されていることが報告されているが、このうち Cdc42 による filopodia 形成を p53 が阻害することが報告されている。

(Gadea, G. et. al.: EMBOJ. 21:2373-2382, 2002) そこで、浮遊由来細胞について p53 の機能異常を調べるため、それぞれ接着細胞、浮遊由来細胞の p53、リン酸化 p53 の発現量を免疫染色法およびウエスタンブロットイング法で調べる。その際、浮遊細胞と接着細胞を分けて、HCV 蛋白強発現群と弱発現群をソーティングし、p53 の発現および機能に HCV 蛋白発現の程度によって差があるかどうか確認する。

(3) DNA 修復関連蛋白の発現量および活性化型 (リン酸化型) の発現量に差がみられるかどうか、ウエスタンブロットイング法と免疫染色法で確認する。γH2AX、ATM、ATR、Chk2、など。その際、HCV 蛋白強発現群と弱発現群をソーティングして分離して調べる。

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 13 件)

① 著者: Leiyun Weng Jiamu Du Jingling Zhou Jianping Ding Takaji Wakita Michinori Kohara Tetsuya Toyoda.

論文表題: Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly

- active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain
雑誌名 : Arch Virol.
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2009. in press.
- ② 著者 : Keigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tóne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara.
論文表題 : Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins.
雑誌名 : Gastroenterology
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2009. in press.
- ③ 著者 : Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade.
論文表題 : Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs.
雑誌名 : Bioorganic & Medicinal Chemistry
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2009. in press.
- ④ 著者 : Kei Ogata, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Haruhito Honda, Tatsuya Ide, Ryukichi Kumashiro, Michinori Kohara, Michio Sata, and Nobuyuki Hamada.
論文表題 : A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy.
雑誌名 : Arch Virol.
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2008. 153(8):1575-9
- ⑤ 著者 : Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Takanori Yokota, Kenichi Satoh, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Megumi Tasaka, Yuki Sakurai, Chen Cheng-Hsin, Masahiko Yano, Shogo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Michinori Kohara, and Mamoru Watanabe.
論文表題 : Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.
雑誌名 : J. Gastroenterology Hepatology.
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2008. 23(9):1437-47
- ⑥ 著者 : T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara.
論文表題 : Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs.
雑誌名 : Compara. Immu. Microbio. Infect. Dises.
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2008. 31: 435-448
- ⑦ 著者 : Sachiko Inubushi, Motoko Nagano-Fujii, Kikumi Kitayama, Motofumi Tanaka, Chunying An, Hiroshi Yokozaki, Hirohei Yamamura, Hideko Nuriya, Michinori Kohara, Kiyano Sada, and Hak Hotta.
論文表題 : Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk.
雑誌名 : J. Gen. Virology
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2008. 89: 1231-1242
- ⑧ 著者 : Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Michinori Kohara.
論文表題 : Therapeutic application of RNA interference for Hepatitis C Virus.
雑誌名 : Advanced Drug Delivery Reviews
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2007. 59:1263-1276
- ⑨ 著者 : Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Fumihiko Yasui, Shin-ichiro Nakagawa, Junichi Yano, Tadaaki Ohgi, Satoru Sonoke, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshida and Michinori Kohara.
論文表題 : Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome.
雑誌名 : J. Hepatology
査読 : 有
発行年・巻・ページ : 2007. 47:744-750
- ⑩ 著者 : Totsugawa T, Yong C,

Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Noguchi H, Okitsu T, Westerman KA, Kohara M, Reth M, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N.

論文表題: Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination.

雑誌名: J. Hepatology

査読: 有

発行年・巻・ページ: 2007. 47: 74-82

- ⑪著者: Toshie Mashiba, Keiko Uda, Yasuko Hirachi, Yoichi Hiasa, Tomoya Miyakawa, Yoko Satta, Tsutomu Osoda, Sayo Kataoka, Michinori Kohara and Morikazu Onji.

論文表題: Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine.

雑誌名: Immunogenetics

査読: 有

発行年・巻・ページ: 2007. 59: 197-209

- ⑫著者: Kazuaki Inoue, Takuya Umehara, Urs T. Ruegg, Fumihiko Yasui, Tsunamasa Watanabe, Hiroshi Yasuda, Makoto Yoshida, Jean-Maurice Dumont, Pietro Scalfaro, Michinori Kohara.

論文表題: Evaluation of a Cyclophilin Inhibitor in Hepatitis C Virus-Infected Chimeric Mice In Vivo.

雑誌名: Hepatology

査読: 有

発行年・巻・ページ: 2007. 45: 921-928

- ⑬著者: Shin-ichiro Nakagawa, Takuya Umehara, Chiho Matsuda, Shusuke Kuge, Masayuki Sudoh and Michinori Kohara.

論文表題: Inhibition of Hsp90 suppresses HCV replication in replicon cell lines and in chimeric mice with humanized liver.

雑誌名: Biochem. Biophys. Res. Commun.

査読: 有

発行年・巻・ページ: 2007. 353: 882-888

[学会発表] (計4件)

- ①Hirata Y., Umehara T., Sudoh M., Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse

model. XIV International Congress of Virology 2008. 8. 10 -15 Istanbul

- ②Hirata Y., Umehara T., Sudoh M., Yasui F., Kohara M.:

Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Suppresses HCV Replication in a Mouse Model. 21th International Conference on Antiviral Research 2008. 4. 13-17 Montreal

- ③Takano T., Hayashi M., Umehara T., Hirata Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M.:

Characterization of HCV Replication regulatory by DHCR24. 第30回日本分子生物学会 2007. 12. 11-15. 横浜

- ④Takano T., Kohara M., Kai C., Tsukiyama-Kohara K.:

The novel regulatory pathway of TOM70 concerning with cell death. 第66回日本癌学会学術総会 2007. 10. 3-5. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塗谷 秀子 (NURIYA HIDEKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号: 80270685

(2) 研究分担者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員

研究者番号: 10250218

(3) 連携研究者

なし