

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590746
 研究課題名（和文）C型肝炎ウイルス感染に関連する脂質生合成酵素遺伝子(TM7SF2)の解析
 研究課題名（英文） Analysis of TM7SF2 Gene in Hepatitis C Virus Infection
 研究代表者
 齋藤 貴史（SAITO TAKAFUMI）
 山形大学・医学部・准教授
 研究者番号：80250918

研究成果の概要：C型肝炎ウイルス（HCV）コホート研究にて、コレステロール生合成を制御する TM7SF2 遺伝子の多型として 433 番アミノ酸の Thr から Ile への置換が、HCV 感染成立に影響する遺伝要因の一つであることを見出した。TM7SF2 の HCV 増殖への関与は、TM7SF2 siRNA により TM7SF2 ノックダウン細胞を作成し、HCV レプリコンを導入後に HCV RNA 発現量を測定したところ、HCV RNA の細胞内発現量が、ノックダウン細胞では、非ノックダウン細胞のそれと比較して低下することで証明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型肝炎、TM7SF2、HCV、脂質、脂質ラフト、SNP、感染症

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症において、ウイルス蛋白と宿主側の感染細胞における蛋白や脂質との相互作用は、ウイルスの感染成立や増殖のメカニズムを考える上で重要である。C型肝炎ウイルス（HCV）感染における感染成立やウイルス増殖に影響する宿主因子を明らかにすることは、持続感染成立メカニズムの本質に迫り、将来的にHCV感染経過予測や薬剤感受性予測、あるいは抗HCV分子標的治療の創薬ターゲットを見出すことに繋がるも

のと思われる。HCV感染において、宿主の感染細胞内における脂質代謝の重要性が明らかにされている。HCVの細胞内における増殖は、宿主小胞体膜上で脂質ラフトを基盤としてHCV構造および非構造蛋白により形成されるHCV複製複合体により行われていることが最近の研究で明らかとなった。脂質ラフトの重要な構成物であるコレステロールやスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質は格好の抗HCV分子標的となりえると考えられることから、HMG-CoA還元酵素阻害剤のスタチン製剤やこれら脂質の抑

制物を、HCVレプリコン細胞培養系に添加すると、HCV増殖が抑制されることが報告されている。私たちも、米国の Dr. Rice よりHCVレプリコン (pFL-J6/JFH) の供与を受け、Huh7.5 培養細胞を用いたHCV感染培養系を研究室で立ち上げ、本培養系でロバスタチンを添加したところ、容量依存性にHCV増殖抑制効果を確認した。HCV感染時における細胞内脂質代謝は、ウイルス複製のみならず、ウイルス進入、アポトーシス、ウイルス出芽・放出にも関連する可能性があり、多角的な観点からHCV感染における脂質代謝の役割を解明する試みが今後重要となるものと思われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コレステロール合成を制御するTM7SF2に着目し、本酵素がHCV増殖のために必要な脂質ラフトをはじめとする脂質微小環境の形成に参与していることを実証すること、遺伝子多型性解析によりTM7SF2のHCV感染における意義、およびHCV増殖に影響する遺伝要因の一つであることを、HCV感染細胞培養系を用いて、明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ヒトHCV持続感染者と自然排除者におけるTM7SF2周辺遺伝子の多型性解析
輸血歴を有する者を除外したHCV感染者215名の臨床データベースを構築し、DNAサンプルを既に有している。これらの検体はいずれも政府3省庁の遺伝子研究ガイドラインに従い、大学倫理委員会および遺伝子研究審査委員会の承認を受け、その規定に従い、本人の同意、症例の匿名性、個人データの不開示など倫理面に十分な配慮を行い得られたものである。TM7SF2遺伝子周辺の遺伝子SNP解析を継続して行うことで、HCV感染と関連する宿主遺伝多型の有無を調査する。

(2) HCVレプリコン(pFL-J6/JFH)のHuh7.5へのtransfectionとHCV発現細胞の継代：HCVレプリコンを培養細胞へelectroporation法により導入しHCV産生細胞を継代維持する。レプリコン導入細胞のHCV RNAおよび培養上清のHCV RNAをリアルタイムPCR法で定期的にHCV発現状態をモニターする。

(3) TM7SF2 siRNA導入によるHCV培養系におけるウイルス増殖抑制効果の検討：
TM7SF2 siRNAを1wellあたり 1.0×10^5 個に

調整したHCV発現レプリコン導入細胞に、5nM、10nM、20nM程度の種々の濃度でsiRNA transfectionを行う。TM7SF2 siRNA導入HCV発現細胞におけるTM7SF2 mRNA遺伝子発現ノックダウンおよびHCV RNA発現抑制効果をリアルタイムPCR法で検討する。

4. 研究成果

C型肝炎ウイルス(HCV)多発地区におけるコホート研究において、感染既往者と感染持続者の遺伝子一塩基多型性(SNP)を比較検討した結果、HCV感染における感染防御の候補遺伝子として、コレステロール合成を制御する脂質合成酵素(TM7SF2)遺伝子の遺伝子多型が、HCV感染成立に影響する宿主側の遺伝要因の一つであることを明らかにし、具体的に11番染色体上の433番アミノ酸のThrからIleへの置換により感染排除が起こりやすいことが判明した(図1)。TM7SF2は、HCV増殖に必要な脂質ラフトをはじめとする脂質微小環境の形成に参与することが推察され、TM7SF2のHCV増殖への関与の有無を明らかにするために、in vitroにおけるHCV感染細胞系を用いて、TM7SF2がHCV感染増殖に必須の酵素であるか否か検討した。研究分担者の邵により、HCVレプリコン(pFL-J6/JFH)をHuh7.5細胞へ遺伝子導入を行い、HCV発現細胞を継代し、培養細胞から高力価の感染性ウイルスの作成に成功した。Huh7.5細胞におけるTM7SF2 mRNAの発現状態モニタリング法をcyber greenを用いたリアルタイムPCR法で確立し、細胞内におけるTM7SF2 mRNA発現の定量を行った。TM7SF2のHCV増殖における関与を証明するため、TM7SF2 siRNAをHCV感染培養細胞へ遺伝子導入を行い(図2)、TM7SF2遺伝子発現のノックダウン細胞を作成した。このノックダウン細胞においては、TM7SF2遺伝子の発現が抑制されることをリアルタイムPCRにて証明した(図3)。このTM7SF2遺伝子ノックダウン細胞に、HCVレプリコンを導入してHCV RNA発現量およびHCVコア抗原量を測定したところ、HCV RNAの細胞内発現量が、TM7SF2遺伝子のノックダウン細胞では、非ノックダウンのコントロール細胞のそれと比較して約10%低下することを見出した(図4)。次に、本HCV培養系で作成された感染性ウイルス粒子を用いて、TM7SF2遺伝子ノックダウン細胞にウイルスを感染させた際のウイルス増殖効率を検討したが、この場合はウイルス増殖の有意な抑制は見られなかった。

図1 TM7SF2 遺伝子多型と HCV の排除

Association between the **TM7SF2** C/T cSNP and HCV clearance

Non synonymous coding: Thr433Ile

		Persistent	Self-limiting	odds	<i>p</i> value
Genotype	CC (Thr)	98 (63.6%)	40 (88.9%)		0.001
	CT	53 (34.4%)	4 (8.9%)		
	TT (Ile)	3 (2.0%)	1 (2.2%)		
Allele frequency	C	80.8%	93.30%	3.32	0.003
	T	19.2%	7.70%		

SNP ID: rs1129195, Chr.11 (exon)

図2 TM7SF2 siRNA 導入細胞

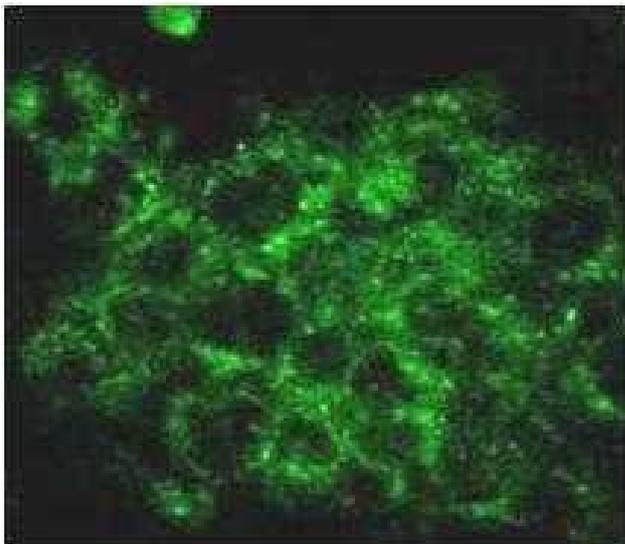


図3 TM7SF2 遺伝子の発現抑制

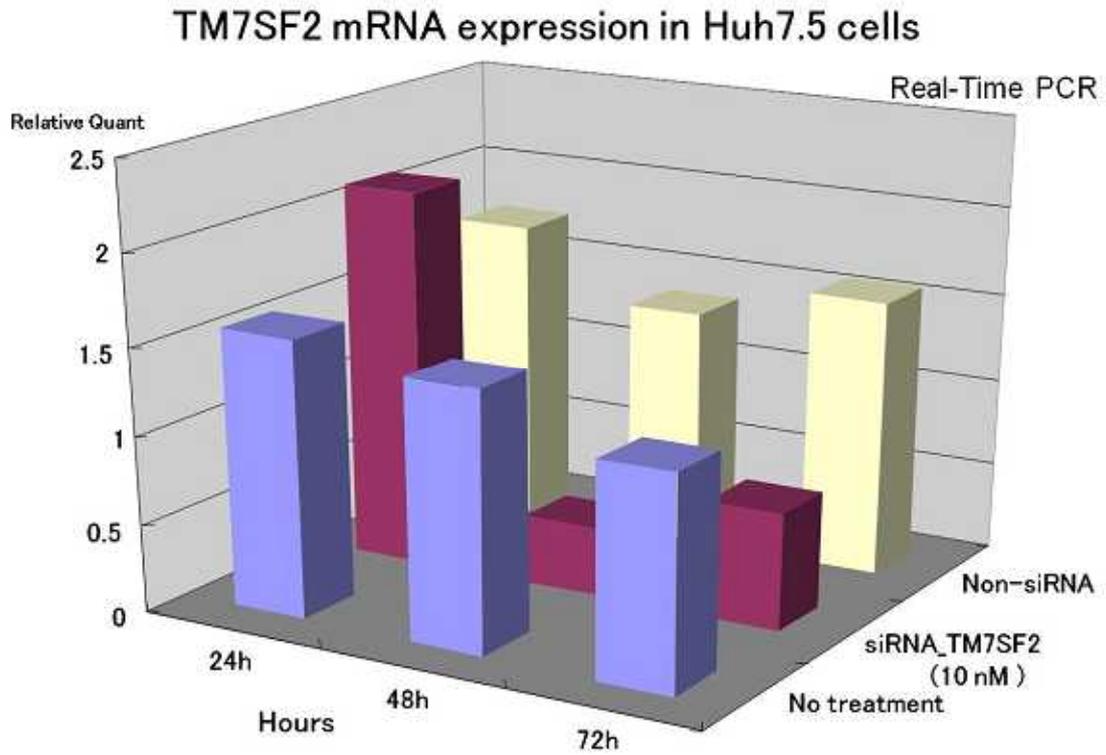
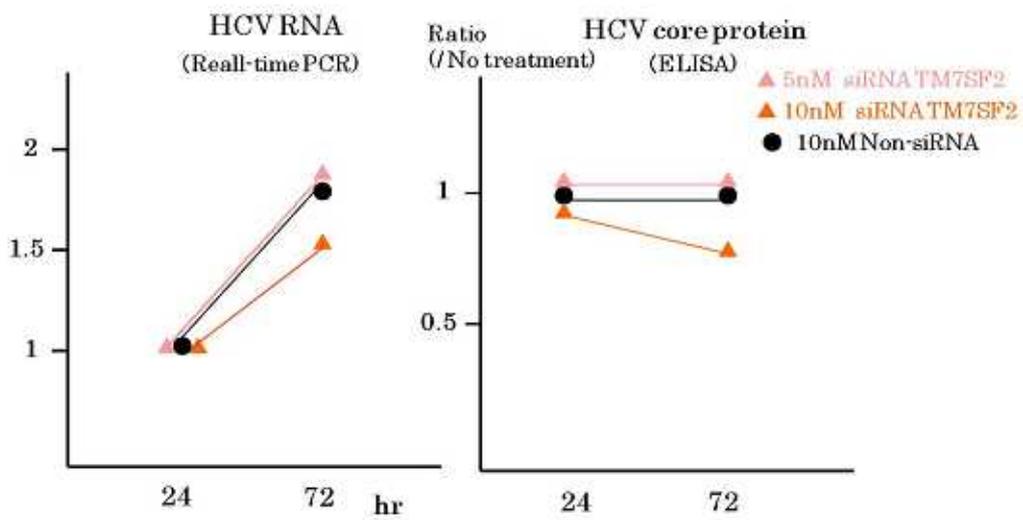


図4 HCV RNA およびコア抗原の発現抑制



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 4 件)

Koyano S, Emi M, Toriyama S, Ishii M, Saito T, Makino N, Kubota I, Kato T, Kawata S: Common null variant, Arg192Stop, in a G-protein coupled receptor, olfactory receptor 1B1, associated with decreased serum cholinesterase activity. Hepatology Research, 38, 696-703, (2008), 査読有

Daimon M, Sato H, Oizumi T, Toriyama S, Saito T, Karasawa S, Jimbu Y, Wada K, Kameda W, Susa S, Yamaguchi H, Emi M, Muramatsu M, Kubota I, Kawata S, Kato T: Association of the PIK3C2G gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. Biochem. Biophys. Res. Commun., 365, 466-471, (2008), 査読有

Togashi H, Hashimoto C, Yokozawa J, Suzuki A, Sugahara K, Saito T, Yamaguchi I, Badawi H, Kainuma N, Aoyama M, Ohya H, Akatsuka T, Tanaka Y, Mizokami M, Kawata S: What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? Journal of Hepatology, 49, 17-24, (2008), 査読有

Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito J, Saito K, Togashi H, Nagano-Fujii M, Hotta H, Kawata S: Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus among patients with HCV subtype 1b. Journal of Infectious Diseases, 196, 1006-1009, (2007), 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

齋藤貴史、HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性とペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測、第12回日本肝臓学会大会、2008年10月2日、東京

齋藤貴史、HCV の感染病態に関するウイルス側および宿主側の要因、第93回

日本消化器病学会総会、2007年4月20日、青森

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 貴史 (SAITO TAKAFUMI)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：80250918

(2) 研究分担者

邵 力 (SHAO LI)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80344787

河田 純男 (KAWATA SUMIO)

山形大学・副学長

研究者番号：90183285

(3) 連携研究者

なし