

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390201

研究課題名(和文)性差とミトコンドリアbiogenesisからみた肝発癌機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of hepatocarcinogenesis based on gender and mitochondrial biogenesis

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) 12,200,000円、(間接経費) 3,660,000円

研究成果の概要(和文)：肝発がんの原因のひとつである酸化ストレスを引き起こす活性酸素種(ROS)は主にミトコンドリアという細胞内器官で産生されるが、C型肝炎ウイルス(HCV)はミトコンドリアを傷害するだけでなく、ミトコンドリアの品質管理(mitophagy)も傷害して恒常的な酸化ストレスを引き起こすことを明らかにした。また、卵巣摘出(閉経モデル)のHCV遺伝子導入マウスでは卵巣摘出という酸化ストレスに対する代償的な抗酸化機構が抑制されることを明らかにした。一連の成績はHCV感染女性が高齢になると肝発がん率が上昇し、男性と差を認めなくなる臨床的事実を説明する機序のひとつと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress plays an important role in hepatocarcinogenesis. Hepatitis C virus (HCV) is well known to induce the production of reactive oxygen species (ROS). In the present study we have shown that hepatitis C virus (HCV) core protein suppresses mitophagy (mitochondrial quality control), which may lead to continuous induction of ROS production and inhibition of mitochondrial biogenesis. We also demonstrated that hepatic oxidative stress was augmented in ovariectomized transgenic mice expressing the HCV polyprotein by attenuation of antioxidant potential through inhibition of AMPK/PGC-1alpha signaling. These results may account in part for the mechanisms by which HCV-infected women are at high risk for HCC development when some period had passed after menopause.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・消化器内科学

キーワード：ミトコンドリア 酸化ストレス 肝発がん C型肝炎ウイルス 性差

1. 研究開始当初の背景

肝細胞の発生には男性優位という性差が存在する。この点においてエストロゲンが肝臓のクッパ-細胞からの IL-6 分泌を抑制することが肝発がん抑制機序のひとつとして報告されている。しかし、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染者においては女性も高齢化するにつれて肝発がん率が上昇し、閉経後数十年経過するとその肝発がん率は男性とさほど差を認めないようになる。しかし、どのような機序で閉経後女性はその後肝発がん率が上昇するのかその機序については不明である。一方、HCV 関連肝発がんにおいては酸化ストレスが重要な役割を果たすことが知られている。この機序として HCV コアタンパクによるミトコンドリア傷害が活性酸素種 (ROS) の産生を亢進することも報告されているが、一方でミトコンドリアには強力な抗酸化機構が存在することもよく知られた事実であり、HCV 持続感染下でどのようにして酸化ストレスが維持されるかについては解明されていない。

2. 研究の目的

上記に記載した研究背景から、まず肝発がん機序のひとつである酸化ストレスの維持機構について HCV がミトコンドリアに対してどのような影響をもたらすかを明らかにすることを目的とした。その上で持続的な酸化ストレスと高齢女性の肝発がん率上昇との関係を明らかにすることを目的とした。

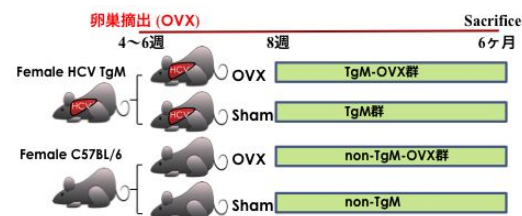
3. 研究の方法

(1) HCV がミトコンドリアの品質管理に及ぼす影響について

傷害を受けたミトコンドリアは十分な抗酸化機能を発揮できないため ROS 産生が亢進し、細胞障害を起こしやすくなる。このため傷害されたミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) によって除去される。そこで HCV がマイトファジーに及ぼす影響について検討した。具体的には HCV 感染細胞ならびにヒト肝細胞移植キメラマウスを用いて HCV 感染がマイトファジーを抑制するか否かについて検討した。

(2) 卵巣摘出 HCV トランスジェニックマウスを用いた肝内酸化ストレス増強機構についての解析

図 1



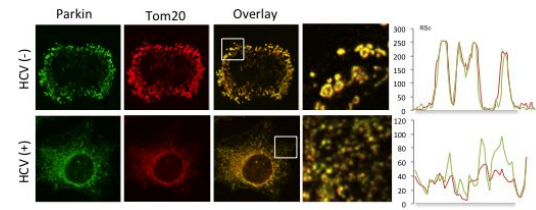
閉経後モデルとして生後 4~6 週の HCV トランスジェニックマウスならびに C57BL/6 マウスに卵巣摘出あるいは Sham 手術を行い、6 ヶ月後の肝内酸化ストレスを評価するととも

に、酸化ストレス増強機構について解析した (図 1)。

4. 研究成果

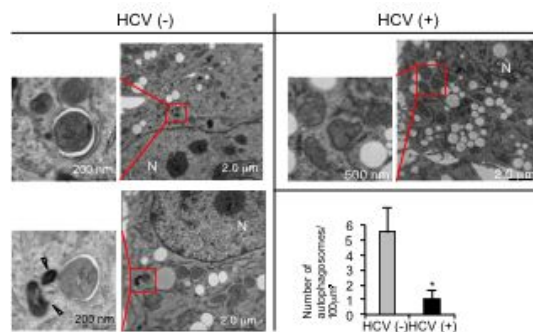
(1) HCV がマイトファジーに及ぼす影響
HCV-JFH1 株を感染させた Huh7 細胞ではマイトファジーの初期機構であるパーキン (ユビキチン結合酵素) のミトコンドリアへの局在が抑制された。脱分極剤 (CCCp) によりマイトファジーを誘導したところ HCV 非感染細胞はパーキンがミトコンドリアに局在したが、HCV 感染細胞では明らかに抑制された (図 2 ; 蛍光免疫染色)。同様の結果はウェスタンブロットティングでも得られた。

図 2



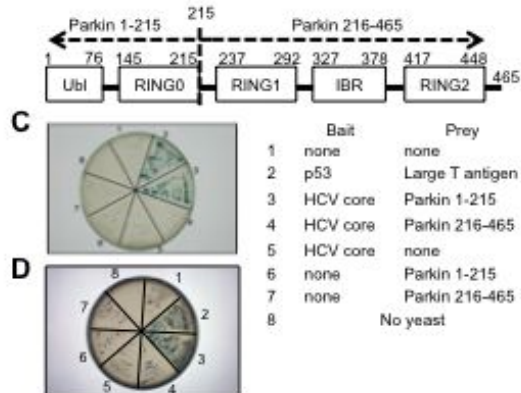
パーキンのミトコンドリアへの局在が抑制された結果、下流のマイトファジーが抑制され、電子顕微鏡観察においても HCV 非感染細胞では隔離膜に被われたミトコンドリアが容易に観察されるのに対し、HCV 感染細胞ではそのようなミトコンドリアは殆ど確認されず、形態的にもマイトファジーが抑制されていることが確認された (図 3)。

図 3



さらにパーキンのミトコンドリアへの局在が阻害される機序として、HCV コアタンパク

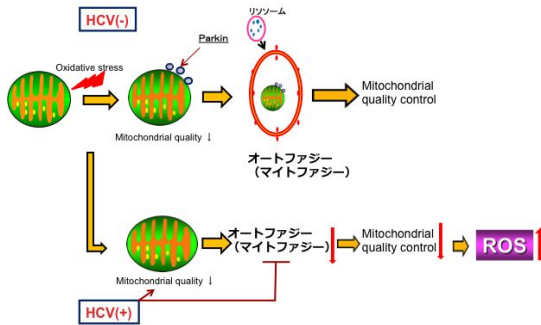
図 4



がN端側のパーキン(215アミノ酸)と結合することが免疫沈降ならびに酵母ツーハイブリッド法(図4)によって明らかとなった。

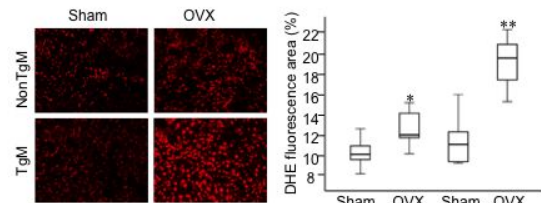
以上の成績はHCVがミトコンドリアを傷害するのみならず、ミトコンドリアの品質管理であるマイトファジーも抑制することで、ROS産生を増幅し、持続的な酸化ストレスを引き起こしていることを支持する重要な知見と考えられた(図5)

図5



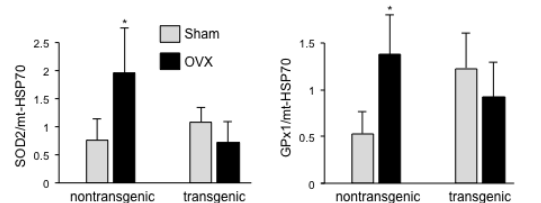
(2) 卵巣摘出 HCV トランスジェニックマウスを用いた肝内酸化ストレス増強機構について

図6に示すように卵巣摘出 HCV トランスジェニックマウスの肝内 ROS 産生量は卵巣摘出したコントロールマウスより有意に高かった。図6



卵巣摘出はNADPHオキシダーゼを活性化し酸化ストレスを引き起こすことは既に報告されている。そこで上記の原因検索のためミトコンドリア分画における抗酸化酵素(SOD2、グルタチオンペルオキシダーゼ)の発現量を比較検討したところコントロールマウスに卵巣摘出を行うと代償性に抗酸化酵素の上昇が認められたが、卵巣摘出 HCV トランスジェニックマウスでは有意な抗酸化酵素の発現上昇は認められなかった(図7)

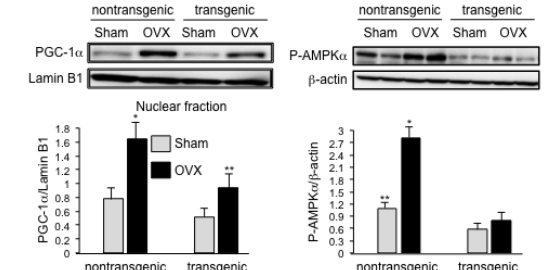
図7



そこで抗酸化酵素の発現を調整する転写調節因子であるperoxisome proliferator-activated receptor-co-activator-1 (PGC-1)の核内局在とそ

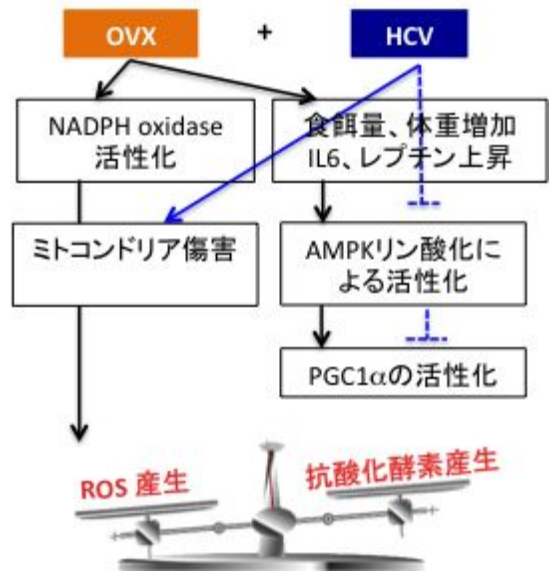
の上流に位置するリン酸化酵素である adenosine monophosphate-activated protein kinase- (AMPK) の活性化状態(リン酸化)を比較検討したところ、卵巣摘出コントロールマウスにくらべて卵巣摘出HCVトランスジェニックマウスはPGC-1の発現は有意に低く、卵巣摘出によるAMPKのリン酸化の上昇も殆ど認められなかった(図8)。

図8



文献的には既にHCV感染によりAMPKのリン酸化が抑制されることは報告されており、今回の結果と一致した。すなわち卵巣摘出はひとつの酸化ストレスであるがHCVタンパクが存在しない状況では代償性の抗酸化機構が活性化され、それほど酸化ストレスが増強されることはない。一方、HCVタンパクが存在すると抗酸化機構を制御するPGC-1-AMPKシグナルが抑制されることで十分な抗酸化機構が発揮されず、それに加えてHCV自体のミトコンドリア傷害ならびにマイトファジー抑制によるミトコンドリアの品質管理が障害され酸化ストレスが増強されると考えられた。

図9



以上の成績からHCV感染高齢女性の肝発がん率が上昇する機構を酸化ストレスの点からは次のように考察した。エストロゲンは従来の報告にあるように肝発がん予防的に作用するため、閉経は一種の酸化ストレスと考えられる。しかし、HCV非感染者であればエストロゲンの低下に伴う酸化ストレスに対して代償性に抗酸化機構が発動し、酸化ストレスの増幅が大きくなりないと

考えられる。しかしHCV感染者においてはこの代償性の酸化機構が抑制されており、加えてHCVによる直接的ミトコンドリア傷害とミトコンドリア品質管理の抑制が引き起こされ、このため閉経後には持続的な酸化ストレスならびに酸化ストレスの増幅が予想され、肝発がん率が上昇するのではないかと考えられた。本研究の研究成果のひとつであるHCVコアタンパクによるミトファジーの抑制ならびにその機構解明は世界で初めてであり、国際的にみてもこの領域にインパクトを与える研究成果だと考えている。また、卵巣摘出HCVトランスジェニックマウスを用いた肝内酸化ストレス増強機構の解明は、本来性差を認めるHCV関連肝発がんがなぜ女性の高齢化とともにその差を認めなくなるのか動物モデルを用いて解明した仕事であり、臨床的に重要な課題の解明に繋がる研究成果と考えられる。今後はHCVによるミトコンドリアの品質管理傷害機構がミトコンドリアのbiogenesisとどのように関わっているのか更に明らかにしていくとともに、HCVによるPGC-1 α -AMPKシグナル抑制に示されるようにHCV感染下における酸化ストレス応答シグナルの網羅的解析を進めてより肝発がんにおける重要な分子を明らかにしていきたいと考えている。

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15件)

- ・ 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 AMPK/PGC-1 α signaling. *Hepatology* 査読有り、2014 (in press) DOI: 10.1111/hepr.12254
- ・ Nishida N, Sawai H, Hino K他 38名 (31番目). New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One* 査読有り、2014、DOI:10.1371/journal.pone.0086449
- ・ Hino K, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatology* 査読有り、2014: 44; 123-32
- ・ Hino K, Nishina S, Hara Y. Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C. Mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 査読有り、2013: 28 Suppl 4; 93-8.
- ・ Korenaga K, Korenaga M, Hino K他 9名 (12番目) *Clinical usefulness of*

non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 査読有り、2013: 43; 1284-94.

- ・ Nishida N, Sawai H, Hino K他 33名 (25番目) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One* 査読有り 2012: e39175; DOI: 10.1371/journal.pone.0039175.
- ・ Tanaka Y, Kurosaki M, Hino K他 19名 (10番目) Genome-wide association study identified ITPA/DDRGG1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. 査読有り、2011: 20; 3507-16.
- ・ Korenaga M, Hidaka I, Nishina S, Sakai A, Shinozaki A, Gondo T, Furutani T, Kawano H, sakaida I, Hino K. A glycyrrhizin-containing preparation reduces hepatic steatosis induced by hepatitis C virus protein and iron in mice. *Liver Int* 査読有り 2011: 31; 552-60.

[学会発表](計180件)

- ・ 原 裕一、仁科惣治、日野啓輔 HCVとミトコンドリア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 東京
- ・ Hara Y, Nishina S, Hino K, et al. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013/11/2 Washington DC
- ・ Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Hino K. Ovariectomized transgenic mice expressing hepatitis C virus polyprotein develop hepatic steatosis through suppression of AMPK/PGC signaling. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013/11/2 Washington DC
- ・ Hara Y, Nishina S, Hino K et al. The hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin. Cell symposium Mitochondria: from signaling to disease. 2013/5/5 Lisbon

[図書](計5件)

- ・ 原 裕一、日野啓輔 C型肝炎の診療を極める 基本から最前線まで 文光堂 2014年、287-292

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計1件）

名称：C型慢性肝炎治療効果予測のための検査方法及び検査用キット

発明者：加藤宣之、池田正徳、是永匡紹、日野啓輔

権利者：国立大学法人 岡山大学、学校法人川崎学園

種類：特許

番号：特許第5070552号

取得年月日：平成24年8月31日

国内外の別：国内

〔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

池田 正徳 (IKEDA, Masanori)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30315767

岸 文雄 (KISHI, Fumio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40153077

是永 匡紹 (KORENAGA, Masaaki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70420536

仁科 惣治 (NISHINA, Sohji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70550961

原 裕一 (HARA, Yuichi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60550952