

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790783

研究課題名(和文) ヒトC型肝炎ウイルスコアタンパクの宿主ヒストン修飾に対する影響

研究課題名(英文) the effect of HCV-Core protein on histone-modification system of host cell

研究代表者

葛西 宏威 (KASAI, Hirotake)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：20324189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：HCV感染は全世界人口の3%約170万人に蔓延しており、肝細胞癌発がんを引き起こします。抗ウイルス薬の開発は精力的に勤められていますが、ウイルス排除後も発がんのリスクは高く、HCV感染による発がんの初期に何が起きているのかという理解は治療法の確立に重要な知見となります。本研究はHCV発がんにおいて重要な役割を担うCoreタンパクが遺伝子の発現制御にどのような影響をもたらすかを検討しました。その結果、Coreタンパクの発現は遺伝子発現を調整しているヒストンタンパクの修飾を置き換える事によって発がんへ向かう事が予想される結果となりました。

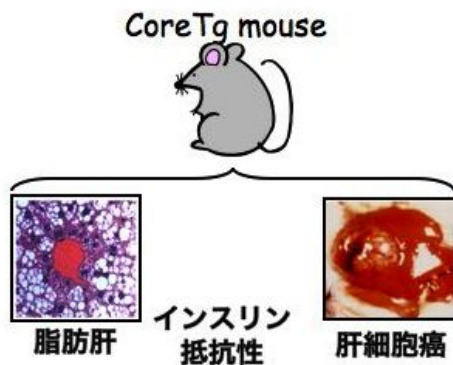
研究成果の概要(英文)：Infection with hepatitis C virus (HCV) affects 3% of the human population, or roughly 170 million individuals worldwide, and it leads to severe liver disorders, such as liver cancer, hepatocellular carcinoma (HCC). Recently, high efficient drugs against HCV have been developed. However, the risk of carcinogenesis is still high after the virus exclusion. It is important to understand what is taking place early in carcinogenesis by the HCV infection. In this study, I focused on the effect of HCV-Core protein on regulation of gene expression. The Core protein was known as important protein for HCV-oncogenesis. As a result, it followed that it was expected that the expression of Core protein went to the carcinogenesis by rearranging modification of the histone protein which coordinated gene expression.

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：HCV 肝がん ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景
- (1) C型肝炎ウイルス(以下 HCV)は、高率に持続感染を引き起こし肝硬変、肝細胞癌へと推移する。本邦の肝疾患による死亡例のうち75%が HCV 感染による慢性肝疾患である。この事は本邦における HCV 感染のインパクトを端的に表している。HCV に起因する肝臓疾患の病態の解明は急務であると考えられ、精力的に研究が押し進められている。しかしながら、HCV による発がんの機構は明らかにされていない。
- (2) 近年、HCV による病態における Core タンパクの重要性が報告されている。Core タンパクはウイルス粒子を形成する構造タンパクの一つである。Core タンパクをマウス感細胞内で強制発現する transgenic mouse(以下、Core-Tg)においては、肝細胞における脂肪的の蓄積、インスリン抵抗性の獲得、そして肝細胞癌発症といった複合的な症状を呈する。これは HCV 持続感染時の症状と一致する。このことは、HCVB 感染の引き起こす多様な現象の中で、Core タンパク単独の存在が病態発症に必要な十分な一つの因子である事を意味する。
- (3) そこで、研究代表者は Core タンパク単独による肝発がん発症の経緯意を解析する事により、HCV に起因する肝癌発症の重要な側面を明らかに出来るのではないかと考えた。



- (4) DNA 繊維は核内においてヒストンタンパク (H2A,H2B,H3,H4、特にこれらをコアヒストンとよぶ) の8量体と結合しクロマチンの基本単位を構成している。近年、コアヒストンの分子修飾の変化がクロマチン構造の変化を介して、転写活性化を制御する事が明らかとなって来た。ヒストンタンパクの分子修飾系の破綻は発がんにおいても重要なイベントであると考えられている。実験的に誘導した肝癌の解析に

おいてもヒストン修飾の関与が指摘されている。

## 2. 研究の目的

本研究では次の二点を目的とした

- (1) ヒトC型肝炎ウイルス Core タンパク依存的な肝細胞癌発症における、Core タンパクのヒストンタンパクの分子修飾への影響を明らかにする。
- (2) また、その分子機構の解明と肝細胞癌発症における役割を検討し HCV 関連発がんにおける分子機構の一例を提示する。

上記の目的を果たすために特に、ヒストンタンパクの分子修飾への Core タンパク発現の影響に着目した。

## 3. 研究の方法

細胞株およびマウスを用い解析を行った。

- (1) ヒストン修飾における Core タンパクの影響および作用点についての検討  
ヒト肝細胞株 Huh7 に Core タンパクを発現し、核分画を硫酸抽出後、抗修飾ヒストン特異的抗体を用い、ウエスタンブロッティング法により Core タンパク発現の影響を検討した。

同様に 293 細胞を用い、ヒストンおよび Core の一過性発現系を用いヒストン修飾への影響を検討した。

- (2) HCV Core transgenic mouse (Core-Tg) 用いた in vivo における影響の検討

Core-Tg および対照群である野生型マウスより肝組織を調整しウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学染色によりヒストンの各種修飾を検討した。

- (3) In vitro および in vivo における DNA 障害に対する反応性の検討。Core を発現させた Huh7 を Doxorubicine(Doxo) 処理により DNA 障害を誘導し感受性を検討した。Doxo 処理後経時的に MTS アッセイにより細胞毒性を評価した。同時に薬剤処理群から核分画を抽出しウエスタンブロッティングによりヒストン修飾を解析した。

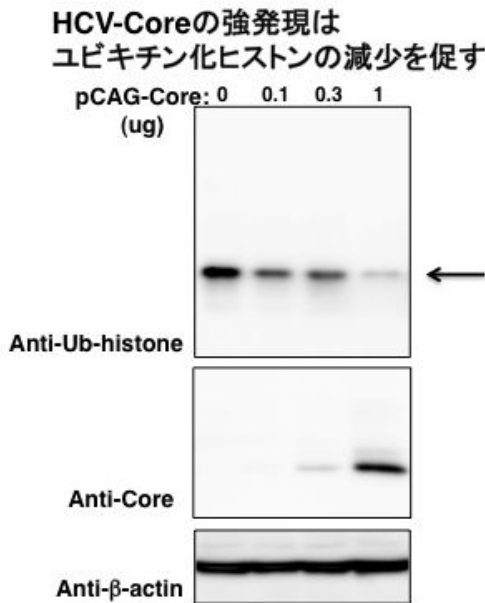
X 線照射および四塩化炭素に対する感受性を Core-Tg および対照群の野生型マウスで検討した。

- (4) 標的遺伝子群の解析

予測される標的遺伝子の発現量を PCR 法により、定量した。

## 4. 研究成果

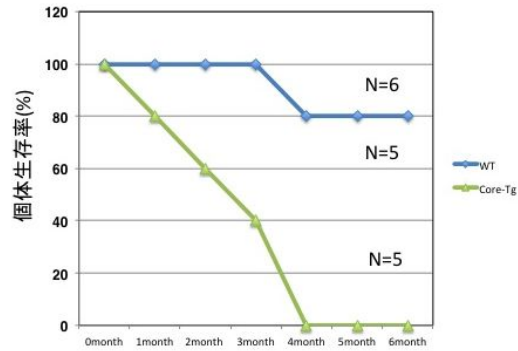
(1) ヒト肝細胞株において、Core タンパク発現の影響を検討した結果、Core タンパクの一過性発現においても、モノユビキチン化ヒストンの減少が観察された。293 細胞を用いた一過性発現系においても同様の観察が認められた。さらに、モデルマウスを用いた解析からも Core タンパク存在下ではユビキチン化ヒストンの量の減少が確認された(下図)。



(2) モノユビキチン化はDNA損傷時の修復に必要な修飾である事が明らかとなっている。細胞株においてDNA障害に対し易感受性を検討した所、Core発現群では対照群で致死を示さない量において細胞毒性を示した。さらに、モデルマウスにおいても、X線照射、四塩化炭素投与ではCore-Tgにおいて野生型マウスに比べ強い肝障害像が得られ、血中の肝障害マーカーの値も高値を示した。さらに、長期観察による生存率の比較においても、X線照射(8Gy)後4ヶ月以内に対照群が80%の生存率であったのに対しCore-Tg群では全個体が死亡するという結果となった(下図)。

(3) モノユビキチン化は遺伝子発現の負の制御因子で明らかになっている。そこで、モノユビキチン化H2Aによって、発現が負に制御される事が明らかな遺伝子群の発現を検討した。四塩化炭素やX線照射による細胞障害時に、肝臓のユビキチン化H2Aの急激な減少が観察され、同時にモノユビキチン化の標的遺伝子群の再活性化が誘導されうるといふ成果が得られた。

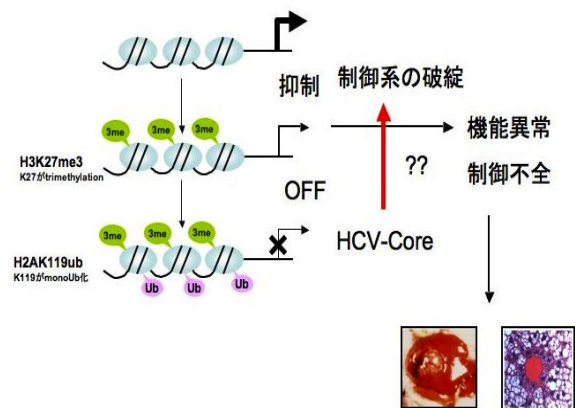
照射後の個体生存率  
(8Gy)



(4) これらの成果はHCV感染時においてCoreタンパクの発現が誘導される事によって異常な遺伝子発現の誘導やDNA修復の不全による変異の導入がされやすくなっている可能性を示すものである。Coreタンパクのヒストン修飾への影響としては新規な記載であり、発がんに至る行程において重要な位置を占めるものであると考えられた。

(5) モノユビキチン化は遺伝子発現の負の制御因子で明らかになっている。そこで、モノユビキチン化H2Aによって、発現が負に制御される事が明らかな遺伝子群の発現を検討した。四塩化炭素やX線照射による細胞障害時に、肝臓のユビキチン化H2Aの急激な減少が観察され、同時にモノユビキチン化の標的遺伝子群の再活性化が誘導されうるといふ成果が得られた。

(6) 成果まとめ: これらの成果はHCV感染時においてCoreタンパクの発現が誘導される事によって異常な遺伝子発現の誘導やDNA修復の不全による変異の導入がされやすくなっている可能性を示すものである。Coreタンパクのヒストン修飾への影響としては新規な記載であり、発がんに至る行程において重要な位置を占めるものであると考えられた。



(7) 今後の展望: 今後は未だ公表に至っ

ていない上記の成果について論文としての成果公表を目指す。また、本研究期間では到達できなかったが、ユビキチン化ヒストンの標的遺伝子やその制御因子群を中心として、HCV 発がんにおける意義を追求し、新たな治療等標的を提案してゆきたい。アセチル化やメチル化といった既に阻害剤をはじめとした、化合物による制御の可能性についても検討し、方法論の開発も視野に入れて展開してゆきたい。

#### 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2件)

1. Microglia release ATP by exocytosis.

Glia. 2013 Aug;61(8)

Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S.(査読有り)

2. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. PLoS One. 2013 Dec 17;8(12)

Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, (他10名) (査読有り)

[学会発表](計5件)

2013年度

1. probe Electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いた HCV 感染細胞内脂質組成の解析

葛西宏威、吉村健太郎 (他5名)

第61回日本ウイルス学会総会 (2013年)

2013年 11月12日 神戸国際会議場

2. Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害

山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、

森石 恆司

年)

2013年 11月12日 神戸国際会議場

2012年度

3. 新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析

葛西宏威、河上國洋 (他8名)

第60回日本ウイルス学会総会 (2012年)

2013年 11月13日 グランキューブ大阪

4. Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討

山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、森石恆司

第60回日本ウイルス学会総会 (2012年)

2013年 11月13日 グランキューブ大阪

5. HCV 複製に関わる新規宿主因子 FKBP6

葛西宏威、河上國洋 (他8名)

第35回日本分子生物学会年会 (2012年)

2012年12月14日 福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 宏威 (KASAI, Hirotake)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：20324189