

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390183

研究課題名(和文) C型肝炎におけるウイルスと炎症による肝発癌スパイラルのmiRNA解析による解明

研究課題名(英文) Elucidation of spiral interactions of virus and inflammation in hepatitis C-associated hepatocarcinogenesis as revealed by microRNA analysis

研究代表者

小池 和彦 (KOIKE, KAZUHIKO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80240703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：HCV関連肝発癌モデルであるコア遺伝子Tgマウスを、肝特異的AID遺伝子KOマウス、及び肝特異的activation-induced cytidine deaminase(AID)遺伝子強制発現マウスとかけあわせ検討した。HCV-Tg/AID^{-/-}マウスでは、HCV-Tg/AID^{+/+}と比較し肝発癌頻度には違いがなかった。HCV関連肝発癌においてAIDは直接的な役割を果たさないと考えられた。肝特異的AID遺伝子発現マウスとのダブル・TgであるHCV-Tg/AID^{+/+/+}では90%のマウスに肝癌を生じ、炎症による遺伝子傷害がHCVタンパクと肝発癌において相乗作用を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：To determine the roles of viral proteins and inflammation in hepatocarcinogenesis, the HCV core gene transgenic mice were mated with liver-specific AID-KO mice, and liver-specific activation-induced cytidine deaminase (AID) Tg mice. In HCV-Tg/AID^{-/-} mice, the incidence of HCC was not different from that in HCV-Tg/AID^{+/+} mice, showing that AID does not play a central role in HCV-associated hepatocarcinogenesis. On the other hand, in HCV-Tg/AID^{+/+/+} mice, 90% of those mice developed HCC, showing a synergy of inflammation-induced genetic aberrations and the viral oncoprotein in hepatocarcinogenesis.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝癌 肝炎ウイルス 炎症

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し肝細胞癌(肝癌)を合併する。我が国には約200万人の、世界では約1億7千万人のHCV感染者がおり肝癌発生の脅威に曝されている。インターフェロンを含む治療によってHCVの排除が可能となってきたが、感染者における肝癌発生の制御を行なうためには、C型肝炎における肝癌発生の機序の解明が必須である。しかしながら、その発癌の分子医学的機序は充分には解明されているとは言えない。

2. 研究の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し肝細胞癌を合併するが、その発癌の分子医学的機序は充分には解明されていない。我々はこれまでに、マウスをモデルとしてHCV自身に肝発癌作用があることを示し、HCV関連肝発癌におけるウイルス因子の重要性を示してきた。しかし、臨床的観察からはC型肝炎肝発癌においては炎症因子の重要性も示唆される。そこで、炎症により誘発されてリンパ腫を含む悪性腫瘍を誘発することが動物モデルで示されている activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子を用いて、C型肝炎肝発癌におけるウイルス因子と炎症因子の競合と相互作用について検討することとした。また、最近我々は、肝臓に豊富に存在する microRNA である miR122 が肝癌において減少することが肝腫瘍の悪性化と関連していることを示している。本モデルを用いて、C型肝炎肝発癌における microRNA を巻き込んだウイルスと炎症の役割と相互作用について明らかにする。

3. 研究の方法

HCV 関連肝発癌モデルであるコア遺伝子 Tg マウスを中心として研究を行なう。このマウスではC型慢性肝炎患者肝臓と同レベルのコア蛋白を肝臓で発現しており、組織学的な炎症の不在の下に早期の肝脂肪化を経て肝細胞癌を発生する。この肝癌モデルマウスに、肝特異的 AID 遺伝子発現マウスとのかけあわせ、マウス AID 遺伝子 KO マウスとのかけあわせを行なう。細胞遺伝子傷害の促進、肝発癌におけるウイルス因子との相互作用、相加・相乗作用について解析する。解析は、酸化ストレス産生に対する両者の作用の解析、microRNA を含む肝細胞遺伝子発現の包括的解析からなる。

4. 研究成果

HCV 関連肝発癌モデルであるコア遺伝子 Tg マウスを主に用いて、C型肝炎肝発癌におけるウイルスと炎症のスパイラルに関して研究を行なった。肝特異的 activation-induced cytidine

deaminase(AID)遺伝子強制発現マウス、及び肝特異的 AID 遺伝子 KO マウスとのかけあわせを行ない、肝発癌におけるウイルス因子と炎症因子との相互作用、相加・相乗作用について解析した。HCV-Tg/AID^{-/-}マウスでは、HCV-Tg/AID^{+/+}と比較し、20か月齢での肝発癌頻度には違いがなかった。HCV-Tg/AID^{+/+}では、AID^{-/-}マウスに比して肝脂肪化がより強く、肝内サイトカイン発現も高度であった。また、AID 遺伝子 mRNA は正常マウス肝組織では発現が軽度であり、肝実質細胞ではなく非実質細胞(免疫細胞)で発現していた。HCV 関連肝発癌において AID は直接的な役割を演じてはいないと考えられた(Nguyen T, Moriya K, Koike K, et al., *Int Immunol* 2014;26(7):397-406.)。一方、肝特異的 AID 遺伝子発現マウスとのかけあわせで得られたダブル・トランスジェニックマウス HCV-Tg/AID^{+/+/+}では90%のマウスに肝癌を含む肝腫瘍を生じており、炎症による遺伝子傷害が HCV タンパクと肝発癌において相乗作用を持つことが示された。

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 16件)

- 1) Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, Tateishi R, Taguri M, Watadani T, Nakagomi R, Kondo M, Nakatsuka T, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Tanaka Y, Ohtomo K, Shiina S, Koike K, Sarcopenia, Intramuscular Fat Deposition, and Visceral Adiposity Independently Predict the Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol* 2015 Feb 24. pii: S0168-8278(15)00141-5. Doi:10.1016/j.jhep.2015.02.031. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25724366.
- 2) Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015 Feb 1;282(3):237-43. doi:10.1016/j.taap.2014.12.004. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25545986.
- 3) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Slight elevation of high sensitivity C-reactive protein to predict recurrence

- and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. **Hepato Res** 2014 Jul 29. doi: 10.1111/hepr.12398. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25070147.
- 4) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. **J Gastroenterol Hepatol** 2015;30(2):379-388.
 - 5) Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular carcinoma undergoing percutaneous radiofrequency ablation. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2014;26(9):1039-1046.
 - 6) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. **Oncotarget** 2014 Jul 30;5(14):5581-90.
 - 7) Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Amphipathic α -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis c virus particles. **PLoS Pathog** 2014 Dec 11;10(12):e1004534. doi: 10.1371/journal.ppat.1004534. eCollection 2014 Dec..
 - 8) Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, Koike K, Kaufman RJ, Karin M. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. **Cancer Cell** 2014;26(3):331-343.
 - 9) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. **Hepato Res** 2014;44(10):E240-E252.
 - 10) Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. **Virology** 2014;462-463:42-48.
 - 11) Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. **Int Immunol** 2014;26(7):397-406.
 - 12) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. **Int J Cancer** 2014;135(4):871-879.
 - 13) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B Genetic Variation on HCV-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis. **PLoS One** 2014 Mar 17;9(3):e91822. doi: 10.1371/journal.pone.0091822. eCollection 2014.
 - 14) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. **J Gastroenterol** 2014;49(2):173-184. PubMed PMID:24258409.
 - 15) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. **Biochem Biophys Res Commun** 2013;438(1):230-235.
 - 16) Yuhashi K, Ohnishi S, Kodama T, Koike K, Kanamori H. In vitro selection of the 3'-untranslated regions of the human liver mRNA that bind to the HCV nonstructural protein 5B. **Virology** 2014 Feb;450-451:13-23.
- [学会発表](計 件)
略
[図書](計 件)
略
[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池和彦 (KOIKE, Kazuhiko)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80240703

(2) 研究分担者

森屋恭爾 (MORIYA, Kyoji)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：00272550