

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790678

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス感染による肝発癌メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma pathogenesis

研究代表者

中本 晋吾 (Nakamoto, Shingo)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90586596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)による肝発癌は年齢と関連することが知られ、加齢関連疾患の一面も有していることから本研究では加齢抵抗遺伝子SIRTに注目し、HCV感染による病態、発癌との関連を解析することを目的として臨床検体、培養細胞を用いた検討を行った。肝癌組織では非癌組織と比べてSIRTの発現が低下している傾向を認めた。一方性別や年齢はSIRT発現量に影響しなかった。HCV発現肝癌細胞株を用いた検討ではSIRT遺伝子の活性化、抑制はウイルス複製に影響を与えなかった。老化細胞染色では細胞密度と細胞老化との関連が示唆された。詳細な機序は更なる検討を要するが肝癌とSIRT遺伝子との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that hepatitis C virus (HCV)-related hepatocellular carcinoma development is associated with age. In this study, the effect of sirtuin (SIRT) gene, considered age-related, on HCV-related liver pathogenesis was examined. SIRT gene was down-regulated in the human liver cancerous tissue compared to the non-cancerous tissue. There was no effect of SIRT expression on patients age or gender. HCV replication was independent of SIRT gene inhibition or activation in HCV-replicating liver cancer cells. Cellular senescence determined by beta-galactosidase staining is affected by cellular density and possibly by HCV. Although precise mechanisms remain to be elucidated, there might be a relationship between SIRT gene expression and HCV-related hepatocellular carcinoma.

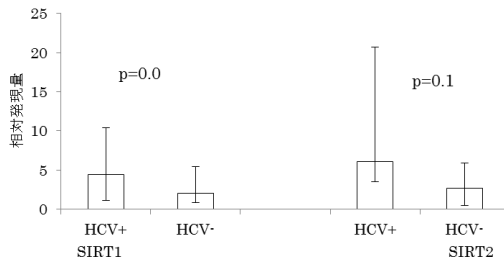
研究分野：医歯薬学

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：ウイルス性肝疾患



図5 HCV感染によるSIRT発現変化



#### 培養細胞株を用いた検討

肝癌細胞株を用いて感染免疫関連シグナルおよび癌関連シグナル経路、細胞老化関連経路についての基礎的検討を行った。HepG2 細胞を用いた HDAC 阻害剤 Sodium phenylbutyrate 処理による検討では細胞骨格、接着に関連する遺伝子に変動が見られた。次にウイルス感染と関連した検討のため HCV レプリコン発現肝癌細胞株および HCV 感染肝細胞を用いた検討を行った。HCV 陽性肝癌細胞と陰性肝癌細胞における SIRT 遺伝子の発現量を比較した。SIRT1, SIRT2 発現は HCV 感染細胞において有意差はなかったが高発現している傾向がみられた(図5)。一方 HBV 産生肝癌細胞と非産生細胞の比較では SIRT1, 2 発現に差はみられなかった。SIRT 遺伝子の活性化、抑制は今回の検討ではウイルス複製に影響を与えなかった。非腫瘍肝細胞を用いた検討として不死化肝細胞を用いて HCV 感染の検討をおこなったが HCV 感受性を認めなかった。SIRT 遺伝子のウイルス複製に与える影響についてさらに HBV 産生肝癌細胞株および一過性発現系を用いて検討したところ、SIRT 遺伝子の活性誘導あるいは抑制は HBV 複製に影響しなかった。血液悪性腫瘍など悪性腫瘍に対する化学療法や造血幹細胞移植における免疫抑制治療により非活動性キャリア、occult 感染、あるいは HBs 抗体陽性臨床的治癒症例においても時に HBV 活性化が起こりうる。In vitro において薬剤に対する HBV 増殖への影響について検討を行うため HBV 感染非腫瘍肝細胞系を用いた。同細胞系を用いて抗ウイルス薬 entecavir および interferon alpha 添加により HBV 産生が抑制されることを確認した。SIRT 活性化剤の検討では SIRT1720 1uM による処理は2週間の経過で HBV 産生に影響しなかった。また SIRT 阻害剤による検討においても HBV 産生に対する明らかな影響は確認されなかった。クラス III の HDAC である SIRT の検討に加えてクラス I,II の HDAC について検討した。HBV 感染細胞について肝細胞老化を検討したところ、HDAC 阻害剤処理により8週間の経過で老化細胞数が減少している傾向がみられた。一方細胞密度と老化細胞数との相関が示唆されたことから、

薬剤は細胞密度と関連して老化細胞数に影響した可能性が考えられ詳細については今後検討を行っていく予定である。HBV 産生肝癌細胞株を用いた検討では細胞凝集塊形成により老化細胞数は増加した。阻害剤を用いた検討では HDAC 阻害処理は HDAC および SIRT 遺伝子の発現量に影響しなかった。一方 HDAC 阻害活性の検討では HBV は肝細胞における HDAC 阻害剤の活性に影響することが示唆された。Trichostatin (TSA)は HBV 複製肝癌細胞株におけるウイルス複製量に影響した。肝癌細胞における検討ではウイルスは増加した一方、非癌細胞における検討ではウイルスは抑制されたがその機序は現時点で明らかではなく今後の検討を要する。HDAC 阻害剤により HBV 陽性肝癌細胞の増殖抑制および細胞周期関連遺伝子の変動が見られた。今回用いた in vitro 実験系において SIRT 経路はウイルス複製に対して明らかな影響を及ぼさなかったが、臨床検体を用いた検討では SIRT 遺伝子発現が肝癌と関連する可能性が示唆されており今後詳細な機序について細胞老化に与える影響を含めて検討を続けていく予定である。

#### 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 5 件)

Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoi T, Yokosuka O. Prevalence of Hepatitis C Virus Subgenotypes 1a and 1b in Japanese Patients: Ultra-Deep Sequencing Analysis of HCV NS5B Genotype-Specific Region. PLoS One. 2013 Sep 17;8(9):e73615. doi:10.1371/journal.pone.0073615. (査読有)

Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. Cytokine. 2013 Nov;64(2):577-83. doi:10.1016/j.cyto.2013.08.010. Epub 2013 Sep 13. (査読有)

Nakano M, Kawaguchi T, Nakamoto S, Kawaguchi A, Kanda T, Imazeki F, Kuromatsu R, Sumie S, Satani M, Yamada S, Torimura T, Kakuma T, Yokosuka O, Sata M. Effect of occult hepatitis B virus infection on the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. Oncol Rep. 2013 Nov;30(5):2049-55. doi:10.3892/or.2013.2700. Epub 2013 Aug 27. (査読有)

Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. Immunol Lett. 2013Apr;152(1):8-15. doi:10.1016/j.imlet.2013.03.006. Epub 2013 Apr 8. (査読有)

Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. Anticancer Res. 2012 Sep;32(9):3775-83. http://ar.iiarjournals.org/content/32/9/3775.long (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Chiaki Nakaseko, Osamu Yokosuka. Reactivation of hepatitis B after hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy. The liver meeting 2013, Nov, 3th, Washington D.C. USA

中本晋吾 神田達郎 中世古知昭 造血幹細胞移植における HBV 再活性化に関する検討 第 21 回 日本消化器関連学会週間 2013 年 10 月 9 日、東京

中本晋吾、呉霜、神田達郎、姜霞、宮村達雄、新井誠人、藤原慶一、今関文夫、齋藤謙悟、白澤浩、横須賀収

B 型慢性肝炎核酸アナログ製剤反応不良例に対する Ultra Deep Sequence の解析 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 7 日、東京

Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Makoto Arai, Keiichi Fujiwara, Kengo Saito, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Osamu Yokosuka Prevalence of resistance mutations against NS5A inhibitors in DAA-treatment-naïve patients infected with HCV G1 in Japan Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013, June, 7th, Singapore

Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Makoto Arai, Keiichi Fujiwara, Kengo Saito, Fumio Imazeki, Hiroshi Shirasawa, Osamu Yokosuka The association between DEPDC5 polymorphism and the development of

hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012, Nov. 11th, Boston, MA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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

中本 晋吾 (Nakamoto Shingo)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号： 90586596

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：