

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460974

研究課題名(和文)メタボローム解析を用いたC型肝炎ウイルス増殖に関する宿主代謝物質群の網羅的解析

研究課題名(英文)Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes

研究代表者

渡辺 久剛 (Watanabe, Hisayoshi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00332536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルスの増殖に関する代謝物質群をメタボローム解析を用いて網羅的に検討したところ、ウイルス感染に伴い変化するおよそ500種の代謝物を網羅的に同定可能であった。その結果、C型肝炎ウイルス感染細胞ではほぼすべてのアミノ酸の低下を認め、感染によって細胞内のアミノ酸合成が障害されている可能性が示唆された。また、TCAサイクル前半に位置するクエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸も感染細胞では著明に減少していたことから、C型肝炎ウイルス感染によって細胞内エネルギー代謝が阻害されている実態が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) infection causes dramatic changes within infected hepatocytes. The aim of this study was to analyze the effect HCV infection has on the hepatocyte metabolome between HCVcc-infected and uninfected Huh7.5.1 cells in vitro using mass spectrometer for metabolomic analysis. More than 500 metabolites were identified and quantified by comparison of the uninfected hepatocytes. In total, 63 metabolites were significantly increased, 3 (citrate, cis-aconitate and iso-citrate) decreased relative to control. Based on the findings of this study, it would appear that many different metabolomics pathways are disrupted as a result of HCV infection, most notably glycolysis and TCA cycle metabolism. These results highlight a number of previously unreported metabolic interactions and give a more in depth into the effect that HCV has on host cell biochemical processes.

研究分野：消化器内科

キーワード：HCV メタボローム 細胞内代謝 感染

1. 研究開始当初の背景

日本における C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者に対する治療効果は未だ満足できるものではなく、宿主因子を分子標的とする新たな創薬が求められている。しかしながら HCV 感染・増殖に伴う感染細胞全体の代謝動態については解明されていない。

HCV 細胞培養感染系 (Wakita et al. Nat Med, 2005) は、HCV の感染から分泌までのすべてのステップを *in vitro* において観察可能にしたが、HCV 感染時の細胞内における分解・代謝の観点から、メタボローム解析 (メタボロミクス) を用いて HCV 増殖に関わる代謝物質群を包括的に同定・解析することで、HCV 感染増殖に影響する宿主因子を解明できないかと考えた。

メタボローム解析はすべての細胞由来の代謝物質群の発現レベルを網羅的に同定・定量できることから、新たな低分子バイオマーカー発見のための有力な手法として最近注目されている。本手法は 100 種以上の代謝物質を一度に検出できること、それらの全体的な変動を把握できること、各代謝経路中の連続した一つ一つの間体の変動を把握できることより、生体内の情報を包括的に取得し、生体応答のバイオマーカー探索やメカニズム解明に力を発揮できると考えられる。すでに前立腺癌やパーキンソン病、2 型糖尿病などにおいては本手法を用いた新しいバイオマーカーが同定され、近い将来、これらを標的とした治療への応用も期待されている。

2. 研究の目的

従来のプロテオーム解析等に比べ実際の表現型に最も近いとされるメタボローム解析を応用し、HCV 培養細胞感染系を用いて、メタボローム解析による、HCV 増殖機序に関する宿主代謝物質経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1). HCV 感染性クローンを用いた感染培養系

の樹立

HCV 遺伝子型 2a である JFH-1 株を backbone とし、core、E1、E2、p7 領域を 1a あるいは 1b 型に置き換えたキメラを構築し、遺伝子型 2a については、J6/JFH-1 キメラウイルスを用い、これらの全長感染性クローン RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、導入した HCV の増殖を観察した。

(2). 感染性ウイルスストックの作製および Huh7.5.1 細胞へのキメラ HCV 粒子の感染

データの再現性を得やすくするため、同じ感染力を示すウイルスストックを大量に作製した。作製したウイルスストックを Huh7.5.1 細胞に接種し、細胞と培養上清を 72 時間培養後に回収した。

(3). HCV 感染培養細胞におけるメタボローム解析

キャピラリー電気泳動 - 質量分析装置 (CE-MS) および液体クロマトグラフィー (LC)-MS により細胞内のメタボロームを測定し、非感染細胞と比較した。細胞内の代謝は dynamic なものと予想されるので、再現性のある代謝物質群のみを標的とし、bioinformatics 情報を活用して MS にて検出された HCV 感染・増殖に関わる候補代謝経路を絞り込んだ。

(4). ヒト血清サンプルにおける候補代謝経路の発現解析

4. 研究成果

平成 25 - 26 年度において、80 - 90% 近い感染効率と培養上清中への高力価の HCV ウイルス分泌が確認できる HCV 感染培養系を構築した。平成 26 - 27 年度はこの系を用いてキメラ HCV 感染前および感染後の感染細胞および培養上清を用いたメタボローム解析を行った。

その結果、細胞内および上清中代謝物において、陰イオン・陽イオン代謝物各 240 種を網羅的に同定できた。HCV 感染細胞では非感染細胞と比べ、アルギニン以外のすべてのア

ミノ酸の有意な低下を認め、解糖系の低下も認めた。一方培養上清では、アミノ酸量は HCV 非感染細胞と比べ同程度かむしろ HCV 感染細胞で増加していたところから、HCV キメラウイルス感染により細胞内のアミノ酸合成が障害されている可能性が示唆された。また、TCA サイクル前半に位置するクエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸も HCV 感染細胞では著明に減少しており、HCV 感染細胞では細胞内エネルギー代謝が阻害されている可能性が考えられた。

実際の HCV 感染患者について、これらエネルギー代謝経路の発現解析を行ったところ、TCA サイクルに関連する複数の代謝物が有意に減少していた。血中 HCV RNA 量が高値であるほどこれらの減少量は大きい傾向にあり、ウイルス増殖と細胞内エネルギー代謝が関連している可能性が示された。

以上より HCV 感染は、感染した細胞内のエネルギー代謝経路を阻害する可能性があることが示唆され、これらの細胞内エネルギー代謝経路をバイオマーカーとして用いることによる、将来的な新たな創薬につながる可能性があると考えられた。

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 9 件)

Hiramane S, Watanabe H(他 11 名、7 番目): A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 50 (10): 1069-1077, 2015. 査読有

Tomita K, Watanabe H(他 7 名、8 番目): Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307 (1): G50-57, 2014. 査読有

奥本和夫、渡辺久剛(他 7 名、7 番目): 脾

摘 6 か月後に食道静脈瘤出血を来した胆道閉鎖症術後の 1 小児例. *日本門脈圧亢進症学会雑誌* 20 (2), 142-146, 2014. 査読有
渡辺久剛(他 7 名、1 番目): ジェノタイプの感染実態の変遷と B 型肝炎キャリアおよび急性肝炎例におけるジェノタイプの臨床的意義. *消化器内科* 58 (2): 213-219, 2014. 査読有

Saito T, Watanabe H(他 11 名、11 番目): Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis. *Metabolism* 62 (11): 1577-1586, 2013. 査読有

Sato C, Watanabe H(他 9 名、6 番目): Impaired mitochondrial β -oxidation in patients with chronic hepatitis C: relation with viral load and insulin resistance. *BMC Gastroenterol* 13: 112-119, 2013. 査読有

Ishii R, Watanabe H(他 9 名、6 番目): Serum prolactin levels and prolactin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 85 (7): 1199-1205, 2013. 査読有

Ito J, Watanabe H(他 13 名、11 番目): A case of adult type 1 Gaucher disease complicated by temporal intestinal hemorrhage. *Case Rep Gastroenterol* 7 (2): 340-346, 2013. 査読有

奥本和夫、渡辺久剛(他 7 名、8 番目): アポ型 ALT により ALT が異常低値を示した C 型慢性肝炎に対して抗ウイルス療法を行った一例. *肝臓* 54 (8), 543-547, 2013. 査読有

[学会発表](計 36 件)

Watanabe H: Glyco-isomer of serum Mac-2-binding protein is associated with the risk of developing hepatocellular

carcinoma after achieving sustained viral response in Japanese chronic hepatitis C patients. DDW2016, San Diego, USA, May 24, 2016

渡辺久剛 : HCV キャリアコホートにおける M2BPGi の肝線維化および肝発がん予測に対する有用性 . 第 52 回日本肝臓学会総会、東京ベイ幕張ホール (千葉県幕張市); 2016 年 5 月 19 日

渡辺久剛 : DAA 製剤を用いた IFN-free 治療における治療成績と難治要因 . 第 19 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区); 2015 年 10 月 8 日

渡辺久剛 : 当県の肝炎ネットワークにおける HCV 薬剤耐性変異スクリーニングとインターフェロンフリー治療導入アウトカム . 第 51 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、鶴屋東館 (熊本県熊本市); 2015 年 5 月 21 日

渡辺久剛 : インターフェロンフリー治療における薬剤耐性変異と治療効果への影響 . 第 51 回日本肝臓学会総会、鶴屋東館 (熊本県熊本市); 2015 年 5 月 21 日

渡辺久剛 : HBV 核酸アナログ治療例における線維化マーカーの推移と肝発癌 . 第 101 回日本消化器病学会総会 (プレナリーセッション)、仙台国際センター (宮城県仙台市); 2015 年 4 月 24 日

渡辺久剛 : C 型慢性肝炎 SVR 後の線維化マーカーの推移と肝発癌リスクの検討 . 第 40 回日本肝臓学会東部会 (パネルディスカッション)、京王プラザホテル (東京都新宿区); 2014 年 11 月 28 日

奥本和夫、渡辺久剛 : 再燃を繰り返す自己免疫性肝炎に対する免疫抑制剤投与に関する検討 . 第 40 回日本肝臓学会東部会、京王プラザホテル (東京都新宿区); 2014 年 11 月 28 日

Sugiyama M, Watanabe H : Association between (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene and HCV spontaneous clearance

in Japanese and African American. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 7, 2014.

Watanabe H : Genetic polymorphism in interferon-4 gene and treatment response to peginterferon and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 6, 2014.

渡辺久剛 : 生活習慣からみた非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴と囲い込みのためのリスクファクター . 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市); 2014 年 10 月 23 日

渡辺久剛 : 本県における肝炎対策の現状と課題をふまえた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築と肝疾患診療連携体制 . 第 50 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、ホテルニューオータニ (東京都千代田区); 2014 年 5 月 30 日

奥本和夫、渡辺久剛 : 肝動脈化学塞栓療法におけるシスプラチン製剤とアドリアマイシンによるランダム化比較試験 (RCT) に基づいた有効性、安全性の検討 . 第 50 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ)、ホテルニューオータニ (東京都千代田区); 2014 年 5 月 30 日

渡辺久剛 : HBV 遺伝子型からみた自然経過観察例および核酸アナログ治療例の HBs 抗原陰性化と肝発癌予後 . 第 50 回日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ (東京都千代田区); 2014 年 5 月 29 日

富田恭子、渡辺久剛 : 高度肝障害時に Epipegulin は肝前駆細胞を誘導・増殖させることにより肝再生に寄与する . 第 50 回日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ (東京都千代田区); 2014 年 5 月 29 日

佐藤智佳子、渡辺久剛 : 糖尿病患者では潜

的 NASH が混在し、NASH では肝病態進展に糖尿病が促進的役割を果たす。第 50 回日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ（東京都千代田区）；2014 年 5 月 29 日

西瀬雄子、渡辺久剛：C 型肝炎患者の肝関連イベントおよび生命予後の予測には ARFI による肝硬度および血清肝線維化スコアが有用である。第 50 回日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ（東京都千代田区）；2014 年 5 月 29 日

水野 恵、渡辺久剛：当科における肝硬変の成因別実態と合併症の臨床的特徴。第 50 回日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ（東京都千代田区）；2014 年 5 月 29 日

渡辺久剛：日本人 C 型肝炎患者におけるインターフェロン 4 遺伝子多型性の検討。第 100 回日本消化器病学会総会（シンポジウム）東京国際フォーラム（東京都千代田区）；2014 年 4 月 26 日

Watanabe H： Predictive Value of hepatitis B Virus Genotypes on the Responses to Long-term Nucleoside Analogue Therapy in Patients with Chronic Hepatitis B. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 6, 2013.

21 Sugiyama M, Watanabe H： Polymorphisms consisting of (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV spontaneous clearance with IL28B SNPs. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 6, 2013.

22 Kawata S, Watanabe H： CRM197, an inhibitor of HB-EGF, can suppress the growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. The 64th Annual Meeting of the American Association for

the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 6, 2013.

23 Katsumi T, Watanabe H： Ability of miRNA profiling to distinguish the clinical course of patients with primary biliary cirrhosis: comprehensive analysis with deep sequencing. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 5, 2013.

24 Tomita K, Watanabe H： Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA, November 4, 2013.

25 西瀬雄子、渡辺久剛：ゲノタイプ B 高浸淫地区における免疫抑制・化学療法を受けた HBV 既往感染者の HBV 再活性化の検討。第 17 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）；2013 年 10 月 10 日

26 佐藤智佳子、渡辺久剛：アルコール性肝障害と非アルコール性脂肪性肝炎を背景とした肝癌症例の臨床的特徴。第 17 回日本肝臓学会大会（ワークショップ）、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）；2013 年 10 月 10 日

27 勝見智大、渡辺久剛：PBC の臨床病型による定型例・非定型例の予後の検討。第 17 回日本肝臓学会大会（ワークショップ）、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）；2013 年 10 月 10 日

28 渡辺久剛：Telaprevir (TVR) 3 剤療法での TVR 用量別治療効果と安全性。第 17 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）；2013 年 10 月 9 日

29 奥本和夫、渡辺久剛：ウイルソン病肝硬変患者に対する酢酸亜鉛製剤の有用性について。第 55 回日本消化器病学会大会、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川

区); 2013年10月9日

30 渡辺久剛: ジェノタイプの感染実態の変遷とB型肝炎キャリアおよび急性肝炎例におけるジェノタイプの臨床的意義(シンポジウム) 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月7日

31 勝見智大、渡辺久剛: 原発性胆汁性肝硬変における血清内microRNAの発現とバイオマーカーとしての可能性 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月6日

32 富田恭子、渡辺久剛: 肝再生におけるエピレグリンの役割と機能解析 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月6日

33 西瀬雄子、渡辺久剛: C型肝炎ウイルス1bのNS3領域蛋白質2次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連に関する前向き研究 第3報 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月6日

34 奥本和夫、渡辺久剛: ソラフェニブ治療例における効果のある症例と増悪症例の検討 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月6日

35 佐藤智佳子、渡辺久剛: HBV遺伝子型からみたB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療反応性とウイルス抗原量スコア化による中止可能性の検討 第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区); 2013年6月7日

36 渡辺久剛: HBVジェノタイプB型高浸淫地域における、ジェノタイプの感染実態の変遷および臨床経過との関連(ワークショップ) 第99回日本消化器病学会総会、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市); 2013年3月23日

〔図書〕(計 7 件)

渡辺久剛 他、日本臨床社、新ウイルス性肝炎学: 2015、459-465.

渡辺久剛: ウイルス性肝炎に対する応答性

を規定する宿主因子を含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究(厚生労働省科学研究費補助金・肝炎等克服緊急対策事業平成 26 年度総括・分担研究報告書): 2015、35-37.

渡辺久剛 他、文光堂、Hepatology Practice: 2014、23-31.

渡辺久剛: ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子を含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究(厚生労働省科学研究費補助金・肝炎等克服緊急対策事業平成 25 年度総括・分担研究報告書): 2014、57-62.

渡辺久剛 他、メディカルレビュー、コホート研究からみたウイルス性肝炎の解明: 2013、130-139.

渡辺久剛 他、メディカル・サイエンス・インターナショナル、ハリソン内科学第 4 版: 2013、2224-2242.

渡辺久剛 他、アークメディア、肝胆膵疾患: 「予後」の変遷: 2013、399-407.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺久剛 (WATANABE, Hisayoshi)
山形大学・医学部非常勤講師
研究者番号: 00332536

(2) 研究分担者

邵力 (SHO Li)
山形大学・医学(系)研究科・助教
研究者番号: 80344787