

2. C型肝炎ウイルスの病原性発現機構

森石 恆司, 松浦 善治

大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

C型肝炎ウイルス (HCV) の感染者は、日本で200万人、全世界で2億人と推定されている。インターフェロンとリバビリンの併用療法により、これまで治療が困難であった1型でウイルス量が高いC型肝炎患者の約5割で著効が期待できるようになってきた。現在、新規の抗ウイルス剤との併用効果が検討されているが、耐性株の出現や副作用等の問題が指摘されている。HCVは慢性持続感染に移行する確率が高く、脂肪肝化から肝線維化を経て高率に肝細胞癌へと進行する。ウイルス感染による炎症反応とウイルス蛋白質の生物活性により病原性を発揮するものと考えられているが、その分子機能は明らかにされていない。HCVのヌクレオキャプシドの構成因子であるコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスでは、脂肪肝や肝細胞癌を発症することが報告されている。本稿では、HCV感染による脂肪肝および肝癌の発症機構を、我々の成績を中心に検証する。

はじめに

HCVはフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、メッセンジャーRNAとして機能できる(プラス鎖)の一本鎖RNAをゲノムとしている。このRNAにコードされる約3000アミノ酸からなる一本のポリプロテインは、宿主およびウイルスのプロテアーゼによって切断を受け、10個のウイルス蛋白質が生成される(図1A)。アミノ末端から四分の一の領域にウイルスの粒子を構成する構造蛋白質が、残りの領域にはウイルス粒子には組み込まれない非構造蛋白質(NS)がコードされている。コア蛋白質はキャプシド蛋白質として、二つのエンベロープ蛋白質E1およびE2はウイルス粒子表面のスパイク蛋白質として³¹⁾、NS2およびNS3はプロテアーゼとして^{7, 10)}、NS4AはNS3のコファクターとして、NS4Bはゲノム複製に重要なmembranous webを誘導する活性因子として¹¹⁾、NS5Aは免疫回避やゲノムの複製複合体因子として^{1, 6)}、NS5Bはウイルスの複製に必須なRNA依存性RNAポリメラーゼとして機能する⁵⁾。

全人類の約3%がHCVに感染しており、その約7割が持続感染に移行し、さらに、その約半数が肝臓に脂肪化が認められ、肝線維化から肝硬変に進行して、その数%が肝細胞癌に至る^{25, 47, 55)}。病原性を保持したウイルスの培養法や小型実験動物の欠如などから、未だ有効な予防法は確立されていない。現在、リバビリンとペグインターフェロンによる併用療法によって、約半数の感染者からウイルスを排除することが可能となってきたが、より有効な治療法の開発が切望されている。近年、遺伝子型が2aの特殊なHCV(JFH1株)を培養細胞で増殖させる技術が確立されたが^{23, 53, 60)}、欧米や日本で最も重要なHCV(遺伝子型1aと1b)の培養は未だ成功していない。免疫不全マウスにヒト肝臓細胞を移植することによりHCVの感染実験が可能となった²⁶⁾。しかしながら、免疫不全マウスであるため、病原性を検討するには適当な実験系とは言えず、未だに信頼できる感受性動物はチンパンジーしかいない。チンパンジーを感染実験に供することは倫理上難しく、HCV感染による病原性発現機構は未だ多くは謎に包まれたままである。

HCVのスパイク蛋白質を被ったレトロウイルスや水疱性口内炎ウイルスによるシュードウイルスや、JFH1株の開発によって^{4, 23, 49, 53, 60)}、HCVのウイルス感染機構に関して多くの知見が得られている。また、HCVゲノムが自己複製している細胞系のHCVレプリコンが確立されており、ウイルス複製もその詳細が明らかになりつつある。HCVゲノムの複製には宿主の蛋白質因子と脂質成分が必須であり、ウイルス蛋白質と共に複製複合体を形成している。これまで

連絡先

〒565-0871 吹田市山田丘3-1
大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野
TEL: 06-6879-8343
FAX: 06-6879-8269
E-mail: kohji@biken.osaka-u.ac.jp

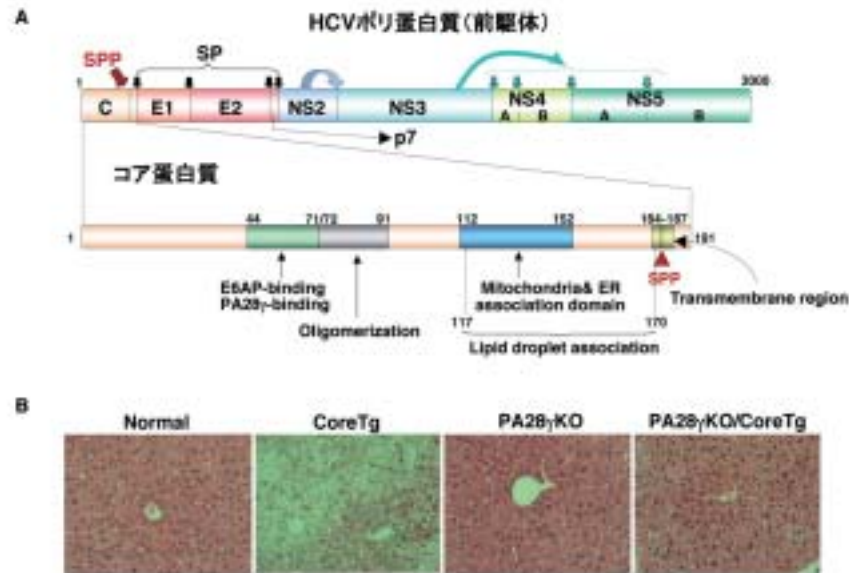


図1 HCV コア蛋白質の構造と脂肪化誘導

(A) HCV コア蛋白質は前駆蛋白質から SP および SPP で切断されて成熟する。(B) コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウス(CoreTg)では、6ヶ月齢で脂肪化が誘導され、PA28 γ 遺伝子を欠損すると(PA28 γ KO/CoreTg)マウスでは脂肪肝は観察されない。(6ヶ月齢肝臓組織, HE 染色)

に、HCV の複製に関与する宿主蛋白質として同定されており、VAP-A⁵²⁾、VAP-B¹²⁾、CyclophilinB⁵⁷⁾、および FKBP8³⁹⁾ はウイルス蛋白質のアンカーリングやホールディングへの関与が示唆されている。また、FBL2 はゲラニルゲラニル化されて複製複体に組み込まれることから、コレステロールの生合成に関与するメバロン酸合成経路の重要性が指摘されている⁵⁴⁾。また、飽和あるいは一価の不飽和脂肪酸の添加によって HCV RNA の複製が上昇することから、これらの脂肪成分が複製複体の形成に関与するものと考えられている¹⁶⁾。

HCV 感染による肝細胞の発癌機構は謎に包まれたままであるが、HCV 蛋白質のなかで、特にコア蛋白質の肝発癌への関与を示唆する報告が増えてきている。本稿では HCV コア蛋白質による脂肪肝と肝臓の発癌機構を中心に、HCV の病原性発現機構について概説したい。

C 型肝炎の病理

我が国における癌死の中で、肝癌は男性で第三位、女性で第五位に位置し、その約 8 割が HCV 感染に起因している。HCV の感染経路は血液や血液製剤を介したものが主で、母子感染や性交渉による感染も低い確率であるが存在する。1992 年に第二世代の HCV 抗体のスクリーニング系が導入されてから、輸血による HCV 感染は激減し、1999 年に HCV の核酸検出系が導入されてから、輸血や血液製剤の安全性は飛躍的に向上した。しかしながら、本邦では既に 200 万人もの HCV キャリアーが存在し、新たな感染

者も報告されている。HCV に感染すると、高率に慢性感染に移行し、脂肪肝を経て肝硬変・肝癌へと移行する。B 型肝炎および自己免疫性疾患も慢性化し、共通する組織像として線維化、炎症細胞の浸潤、肝実質の巣状壊死等が上げられる。また、慢性化 C 型肝炎の特徴としては、B 型肝炎や自己免疫疾患性肝炎に比べて、門脈域付近のリンパ濾胞の形成頻度が高く、壊死性炎症が軽度であることや、肝実質の脂肪変性の頻度が高い点などが上げられる⁶²⁾。激しい炎症像を示す自己免疫性肝炎に比べても、慢性 C 型肝炎の発癌率が有意に高いことから、慢性的な炎症によって繰り返される細胞死と再生で誘導される遺伝子異常の蓄積のみで肝細胞癌の発症を説明ができないことから、HCV の構成因子や感染によって誘導される何らかの因子が、HCV による肝発癌に関与しているものと推測されている¹⁷⁾。

HCV 感染と脂肪酸合成

肝炎患者で観察される肝実質の脂肪変性は、B 型肝炎や自己免疫性肝炎では 20% 程度であるのに対し、C 型肝炎患者では 50% 程度と明らかに高い^{2, 19)}。HCV の遺伝子型や人種で脂肪変性の出現頻度に差があるとの報告もある⁹⁾。また、脂肪酸の蓄積は HCV の増殖にも影響を及ぼし、脂肪酸やゲラニルゲラニル酸の添加によって HCV の感染や複製が上昇することが報告されている^{16, 29)}。コア蛋白質のみを発現するトランスジェニック (CoreTg) マウスでは 4 ヶ月齢から肝臓の脂肪化が認められることから (図 1B)、コア蛋白質は HCV 感染による肝脂肪化の原因因子として

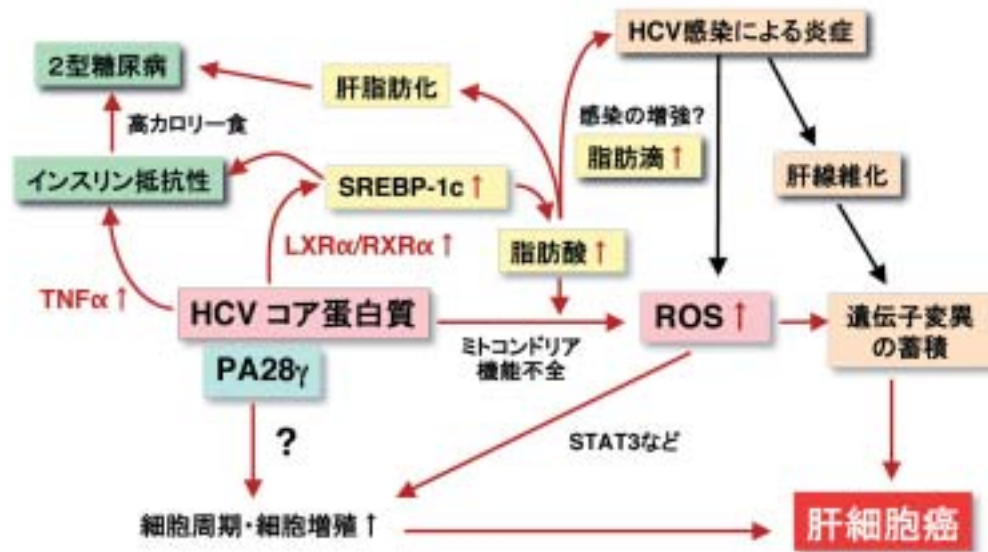


図2 HCV コア蛋白質と PA28 γ の相互作用によるインスリン抵抗性, 脂肪肝, および肝細胞癌の誘導

注目されるようになった³⁶⁾。

脂肪合成経路に関わる酵素群の発現は, 転写因子である sterol regulatory element-binding protein (SREBP) によって調節されている. SREBP の支配下には 30 種以上の酵素があり, それぞれコレステロール, 中性脂肪, および脂肪酸の合成および取り込みに関与している¹⁴⁾. SREBP には 3 種のアイソフォームがあり, SREBP-1a と -1c はスプライシングバリエーションで, マウスで第 11, ヒトで第 17 染色体に, SREBP-2 はマウスで第 15, ヒトで第 22 染色体にコードされている (Ensembl data base, <http://www.ensembl.org/index.html>). SREBP はその応答配列 sterol response element (SRE) を認識し, SRE の下流にある遺伝子の転写を調節している. SREBP-1a は広範な臓器で微量に発現しており, コレステロール合成経路や脂肪酸・中性脂肪合成経路にかかわる遺伝子群を制御している⁴²⁾. SREBP-1c と SREBP-2 は肝臓や脂肪組織で多く発現しており⁴⁴⁾, SREBP-1c は脂肪酸・中性脂肪合成経路に関わる遺伝子群を, SREBP-2 はコレステロール合成経路に関わる遺伝子群を制御している^{42, 43)}. 遺伝子型 1b 型の HCV をチンパンジーに感染させると, 肝臓内の SREBP-1c の転写上昇が観察された⁴⁸⁾. 核内受容体型転写因子である, RXR α と LXR α のヘテロダイマーが, SREBP-1c 遺伝子の 5' 上流に存在する応答配列 liver X receptor response element (LXRE) に結合して SREBP-1c の転写が調節されている⁵⁹⁾. HCV コア蛋白質を発現する培養細胞やマウスの肝細胞内で脂肪滴の形成が亢進し^{3, 13, 36)}, さらに, コア蛋白質が RXR α のホモダイマー形成を上昇させていた⁵¹⁾. しかしながら, HCV コア蛋白質の LXR α , RXR α , および SREBP-1c への影響はこれまでに報告されていなかった.

我々はこの点に着目し, HCV コア蛋白質による SREBP-1c の発現調節について解析した (図 2). 培養細胞に HCV コア蛋白質を発現させると, LXR α /RXR α のヘテロダイマーの応答配列 (LXRE) への結合が強まり, SREBP-1c プロモーターの活性が上昇した³²⁾. また, CoreTg マウスの肝臓内でも LXR α /RXR α の LXRE 配列への結合が増強されていた³²⁾. SREBP-1c によって転写を調節される遺伝子には一価の不飽和脂肪酸の合成を促進する stearoyl-CoA desaturase も含まれており¹⁴⁾, CoreTg マウスでは一価の不飽和脂肪酸 (C18:1, オレイン酸) の産生亢進が既に報告されていた³⁵⁾. CoreTg マウスでは, SREBP-1c 遺伝子の発現が有意に上昇していたが, SREBP-2 や SREBP-1a の発現は正常マウスと同等であった³²⁾. さらに, SREBP-1c の制御下にある acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, stearoyl-CoA desaturase の発現上昇が認められたが, SREBP-2 の制御下の HMG-CoA reductase や HMG-CoA synthase の発現には差は認められなかった³²⁾. 活性化 SREBP-1c を発現するトランスジェニックマウスでは, その制御下にある脂肪合成酵素の発現上昇と脂肪肝が誘導される⁴²⁾. 以上のことから, HCV コア蛋白質によって SREBP-1c の発現が転写レベルで増強され, 肝細胞の脂肪酸と中性脂肪の合成が亢進することが, HCV 感染による脂肪肝の発症の一因であることが示唆される.

HCV コア蛋白質による癌化誘導

HCV に感受性を示す唯一の実験動物としてチンパンジーが知られているが, 倫理面での制約もあり, 限られた施設でしか利用できない. 最近, ヒトの肝臓細胞を移植された免疫不全マウスを使って, HCV の感染実験が可能となった²⁶⁾. し

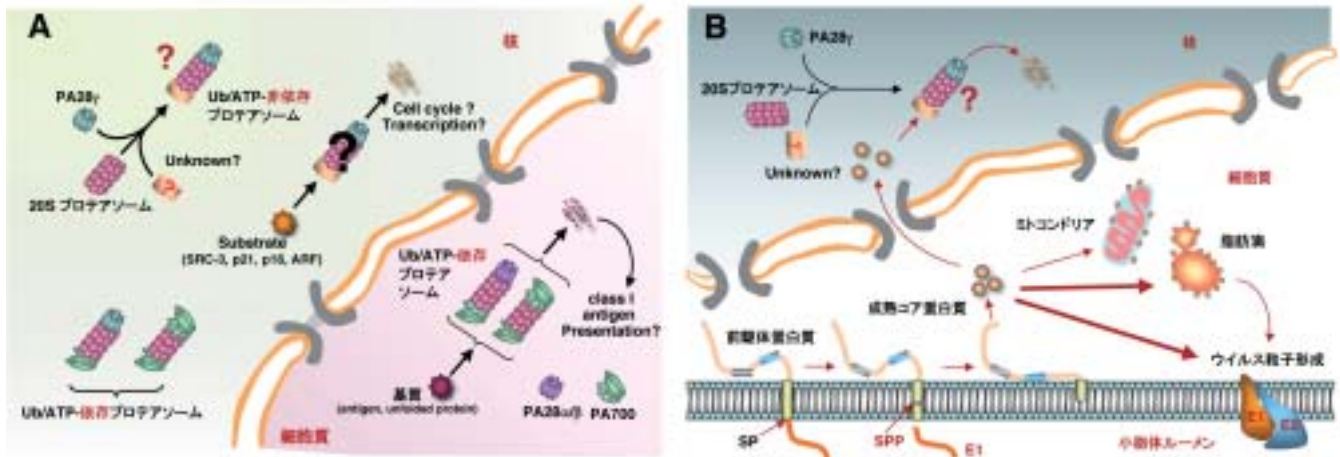


図3 HCV コア蛋白質の局在と PA28 γ による分解

(A) HCV コア蛋白質と親和性がある宿主蛋白質 PA28 γ は核に局在し、プロテアソームに結合して、特定の基質の分解に関わる。(B) HCV コア蛋白質は SP および SPP によってプロセスされ、主に小胞体や脂肪滴、一部はミトコンドリアや核に局在する。核へ移行したコア蛋白質は PA28 γ /プロテアソーム系によって分解される。

かしながら、免疫不全の動物であることから、HCV 感染による病原性の解析には自ずと限界がある。HCV 蛋白質を発現するトランスジェニックマウスの中で、エンベロープ蛋白質を発現するマウスは自己免疫性疾患（シェーグレン症候群）を発症し¹⁸⁾、一方、CoreTg マウスでは、肝脂肪化を経て、肝細胞癌を発症したことから^{20, 24, 34)}、コア蛋白質による発癌に関する報告が1998年のMoriyaらの報告以降、数多く発表されている。CoreTg マウスでは、4ヶ月齢で肝脂肪化が観察され、16ヶ月齢以上で肝細胞癌が認められる。これらの発症には性差があり、雄で30%、雌で10%程度の発症率である。肝細胞癌の発症にはヒトでも性差があり、肝発癌にはエストロゲンが関与しているのかも知れないが³⁸⁾、C型肝炎による肝発癌の性差は明らかではない。CoreTg マウスの肝臓では一価の不飽和脂肪酸 C18 : 1 が有為に上昇しており、活性酸素の誘導も認められている³⁵⁾。C型肝炎患者でもオレイン酸の上昇が認められ、単純な肥満では C18 : 1 不飽和脂肪酸の増加は認められないことから³⁵⁾、C型肝炎に特異的な兆候と考えられる。コア蛋白質が肝臓に僅かに発現しているときでも、ジエチルニトロサミンによって発癌率が有為に上昇し、STAT3の活性化が認められた⁵⁸⁾。しかしながら、マウスに発癌を誘導しない E1 や NS3 によっても活性酸素の産生増強と STAT3 の活性化が認められることから²⁴⁾、コア蛋白質の活性酸素産生の増強や STAT3 の活性化以外の機能が、肝発癌を誘導するものと考えられる。CoreTg マウスでは C 型肝炎で報告されている肝炎像や線維化は認められないことから、HCV コア蛋白質の単独発現によって炎症や線維化を介さずに、マウスに脂肪肝や肝細胞癌を誘発できる経路の存在を示唆するものである。脂肪の蓄積が間接的に活性酸素誘導

に関連するとも考えられるが、脂肪化が癌化と直結するのではなく、脂肪化と癌化はある程度分けて考える必要がある。CoreTg マウスでは、JNK, AP-1 の活性化や SOCS-1 の低下が認められ^{30, 50)}、それらが肝細胞の増殖を促し、癌化に関与しているのかもしれない。以上の結果を図2にまとめた。

PA28 γ /プロテアソーム系による HCV コア蛋白質の分解と病原性発現

我々は HCV コア蛋白質が宿主蛋白質 PA28 γ と特異的に結合することを報告している³³⁾。PA28 γ は節足動物からヒトまで非常によく保存されている蛋白質で、特にマウスとヒトは同一のアミノ酸配列を有している。インターフェロンで誘導される PA28 α と β はヘテロ7量体として細胞質内に存在し、プロテアソームの活性を促進して MHC クラス I による抗原提示に関与している (図3A)。一方、PA28 γ は α と β に40%程度の相同性しか示さず、ホモ7量体として核に局在している。PA28 は PA700 と共に 20S プロテアソームに結合してプロテアソームの活性を調節しているものと考えられているが、その機能に関しては不明な点が多い。

PA28 γ は HCV のコア蛋白質に特異的に結合し、近縁のフラビウイルス属の日本脳炎ウイルスやデングウイルスのコア蛋白質とも結合せず³³⁾、また、PA28 α や PA28 β と HCV コア蛋白質の相互作用も認められない³³⁾。PA28 γ の過剰発現で HCV コア蛋白質の分解が促進され、プロテソームの阻害剤 (MG-132) の処理によって、核内のコア蛋白質が検出できるようになる³³⁾。また、CoreTg マウスの肝臓では、コア蛋白質は細胞質に瀰漫性に検出されるが、

PA28 γ 遺伝子をノックアウトするとコア蛋白質の核内での蓄積が観察される³²⁾。したがって、HCV コア蛋白質の一部は核に移行し、PA28 γ /プロテアソーム系によって処理されることが明らかになった。PA28 γ は 20S プロテアソームに結合してペプチダーゼ活性を上昇させることが報告されていたが、特定の基質に対してプロテアーゼ活性を示すことは知られていなかった^{40, 61)}。ユビキチン非依存プロテアソームの分子機能はオルニチン脱炭酸酵素のアンチザイムによる分解が知られているが⁴⁰⁾、その他の経路は解析が進んでいなかった。最近、PA28 γ /プロテアソーム系は特定の基質 (SRC-3 など) をユビキチン/ATP 非依存的に分解することが報告されている (図 3A)^{8, 21, 22)}。外来蛋白質ではあるが、PA28 γ /プロテアソーム系で分解される基質としては HCV コア蛋白質が最初の報告である³³⁾。

PA28 γ 遺伝子のノックアウト (PA28 γ KO) マウスでは僅かな体重減少しか認められないことから³⁷⁾、PA28 γ /プロテアソーム系の代替経路が生体の恒常性を補完しているものと思われる。当初、PA28 γ 遺伝子をノックアウトした CoreTg マウスではコア蛋白質の発現上昇が予想されたが、CoreTg マウスとの差は認められなかった³²⁾。培養細胞で PA28 γ 遺伝子をノックダウンするとコア蛋白質のユビキチン化が亢進する³²⁾。また、E6AP がコア蛋白質を基質とする E3 ligase として機能することが報告されている⁴⁶⁾。E6AP と PA28 γ はコア蛋白質の同一領域に結合することから (図 1A)、PA28 γ の欠損によって E6AP のコア蛋白質への結合が亢進し、ユビキチン化されたコア蛋白質の分解が細胞質で促進されることにより、PA28 γ KO/CoreTg マウスにおいても、コア蛋白質の発現量に変化が見られないのかも知れない。コア蛋白質による SREBP-1c のプロモーターの活性化および核内受容体型転写因子 LXR α /RXR α の LXRE 配列への結合が PA28 γ のノックアウトあるいはノックダウンによって軽減され、PA28 γ KO/CoreTg マウスでは SREBP-1c やその制御遺伝子の発現亢進は回復し、脂肪肝の発症も消失した (図 1B)³²⁾。また、CoreTg マウスで観察される活性酸素の増加は、PA28 γ KO/CoreTg マウスでは認められなくなり、さらに驚くべきことに、肝細胞癌の発症も全く観察されなかった (図 2)³²⁾。以上の成績から、PA28 γ によるコア蛋白質の分解が脂肪肝と肝細胞癌の発症に必須であることが示唆された。また、HCV 感染との相関が示唆されているインスリン抵抗性は、CoreTg マウスが脂肪肝を発症する前から観察されるが⁴⁵⁾、PA28 γ KO/CoreTg マウスでは、インスリン抵抗性が寛解することから²⁸⁾、PA28 γ の発現はコア蛋白質が関与する病原性の発現に極めて重要な役割を演じていることが示唆される (図 2)。

C 型肝炎の発症病理における PA28 γ /プロテアソーム系の詳細な役割は不明であるが、PA28 γ 遺伝子の欠損によってコア蛋白質の細胞内局在が大きく変化することは興味

深い点である。コア蛋白質はシグナルペプチダーゼ (SP) により前駆体蛋白質から切り出され、さらにその膜貫通領域がシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) で切断される。多くは小胞体と脂肪滴に検出されるが、一部はミトコンドリアと核に移行する (図 3B)。核に移行した HCV コア蛋白質は PA28 γ と結合し、プロテアソームによって分解されることは先に述べた (図 3B)。コア蛋白質が病原性を発揮するには、細胞内での局在が重要なポイントであるのかも知れない。HCV コア蛋白質と PA28 γ は LXRE 配列に結合している LXR α /RXR α 複合体に含まれていないことから³²⁾、HCV コア蛋白質は SREBP-1c 遺伝子の転写を間接的に活性化するものと思われる。上述のように PA28 γ を欠損させてもコア蛋白質の発現量に大きな変化が認められない。核内のコア蛋白質量は明らかに増加することから、細胞質のコア蛋白質は相対的に減少しているものと考えられる。細胞質に局在するコア蛋白質が RXR α と同じ核内受容体型転写因子 RAR α の共役転写抑制因子 (コレプレッサー) である Sp110b に結合して、その核移行を阻止することにより、核内の RAR α の転写活性を促進しているとの報告もある⁵⁶⁾。従って、細胞質のコア蛋白質が未同定の RXR α /LXR α のコレプレッサーに結合することによって SREBP-1c の転写を亢進させる可能性も考えられる。その場合には、PA28 γ KO による細胞質のコア蛋白質の減少は SREBP-1c の転写を抑制すると考えられる。また、PA28 γ にはプロテアソーム活性化だけでなく、コシヤペロン活性があることが知られており²⁷⁾、核へ移行したコア蛋白質が PA28 γ を介して構造変換をきたし、分解直前に別の因子を介して LXR α /RXR α を活性化する可能性もある。さらに、コア蛋白質の分解産物が病原性発現に直接関与している可能性も考えられるが、今後、詳細な検証が必須な領域である。

おわりに

HCV コア蛋白質が脂肪滴の周りに存在していることが古くから知られていたが、その意義は不明であった。最近、脂肪滴は HCV の粒子形成に関与し、小胞体近傍に局在する複製複合体から供給されたウイルス RNA と脂肪滴上のコア蛋白質がヌクレオキャプシドを形成し、エンベロープ蛋白質を発現している小胞体膜から小胞体内腔へウイルス粒子が放出されるモデルが提唱された (図 3B)²⁹⁾。オレイン酸 (C18 : 1) の添加で、脂肪滴形成が誘導されることが知られており、コア蛋白質による stearyl-CoA desaturase の発現上昇が脂肪酸の産生のみならず、脂肪滴の形成にも関与することが示唆されている²⁹⁾。したがって、脂質成分は HCV の複製や粒子形成に必須な因子であり、脂肪の生合成や分解を標的とする新規抗 HCV 薬の開発も可能と思われる。実際、スタチン類の薬剤やスフィンゴ脂質合成抑制剤などが HCV ゲノムの複製にある程度有効であ

ることが報告されている^{15,41)}。PA28 γ をノックアウトしてもマウスは若干の体重減少が認められるだけで、重篤な異常は全く認められていない³⁷⁾。将来、PA28 γ と HCV コア蛋白質との相互作用、あるいは PA28 γ の機能を調節することにより、HCV 感染による病原性発現、特に肝細胞癌の発症を制御、あるいは遷延化できる治療法の開発が可能となるかも知れない。

文献

- 1) Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S., and Matsuura, Y.: Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J. Virol.* 81(17), 8953-8966, 2007.
- 2) Bach, N., Thung, S. N., and Schaffner, F.: The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 15(4), 572-577, 1992.
- 3) Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., and Brechot, C.: Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4), 1200-1205, 1997.
- 4) Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F. L.: Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197(5), 633-642, 2003.
- 5) Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R.: Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* 15(1), 12-22, 1996.
- 6) Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., and Rice, C. M.: Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290(5498), 1972-1974, 2000.
- 7) Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J.: Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* 76(8), 3720-3730, 2002.
- 8) Chen, X., Barton, L. F., Chi, Y., Clurman, B. E., and Roberts, J. M.: Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol. Cell* 26(6), 843-852, 2007.
- 9) Conjeevaram, H. S., Kleiner, D. E., Everhart, J. E., Hoofnagle, J. H., Zacks, S., Afdhal, N. H., and Wahed, A. S.: Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 45(1), 80-87, 2007.
- 10) Dubuisson, J., Penin, F., and Moradpour, D.: Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell. Biol.* 12(11), 517-523, 2002.
- 11) Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K.: Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76(12), 5974-5984, 2002.
- 12) Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M. M., Miyamura, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y.: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* 79(21), 13473-13482, 2005.
- 13) Hope, R. G., and McLauchlan, J.: Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J. Gen. Virol.* 8, 1913-1925, 2000.
- 14) Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S.: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109(9), 1125-1131, 2002.
- 15) Ikeda, M., Abe, K., Yamada, M., Dansako, H., Naka, K., and Kato, N.: Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44(1), 117-125, 2006.
- 16) Kapadia, S. B., and Chisari, F. V.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(7), 2561-2566, 2005.
- 17) Koike, K.: Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J. Gastroenterol.* 37 Suppl 13, 55-64, 2002.
- 18) Koike, K., Moriya, K., Ishibashi, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Kurokawa, K., Matsuura, Y., and Miyamura, T.: Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1), 233-236, 1997.
- 19) Lefkowitz, J. H., Schiff, E. R., Davis, G. L., Perrillo, R. P., Lindsay, K., Bodenheimer, H. C., Jr., Balart, L. A., Ortego, T. J., Payne, J., Dienstag, J. L., Jacobson, I. M., Tamburro, C. H., Carey, W., O'Brien, C., Sampliner, R., Van Thiel, D. H., Feit, D., Albrecht, J., Meschievitz, C., Sanghvi, B., Vaughan, R. D., and Group, H. I. T.: Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 104(2), 595-603, 1993.
- 20) Lerat, H., Honda, M., Beard, M. R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S. Y., Weinman, S. A., and Lemon, S. M.: Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and non-structural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122(2), 352-365, 2002.
- 21) Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D. M., Monaco, J. J., and O'Malley, B. W.: Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma proteasome pathway. *Mol. Cell* 26(6), 831-842, 2007.
- 22) Li, X., Lonard, D. M., Jung, S. Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W.: The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 124(2), 381-392, 2006.
- 23) Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes,

- R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., and Rice, C. M.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309(5734), 623-626, 2005.
- 24) Machida, K., Cheng, K. T., Lai, C. K., Jeng, K. S., Sung, V. M., and Lai, M. M.: Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J. Virol.* 80(14), 7199-7207, 2006.
 - 25) Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., and Albrecht, J. K.: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358(9286), 958-965, 2001.
 - 26) Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., and Kneteman, N. M.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 7(8), 927-933, 2001.
 - 27) Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Yahara, I.: A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J. Biol. Chem.* 275(12), 9055-9061, 2000.
 - 28) Miyamoto, H., Moriishi, K., Moriya, K., Murata, S., Tanaka, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., and Matsuura, Y.: Involvement of the PA28[gamma]-Dependent Pathway in Insulin Resistance Induced by Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Virol.* 81(4), 1727-1735, 2007.
 - 29) Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9(9), 1089-1097, 2007.
 - 30) Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Tsutsumi, T., Shinzawa, S., Makuuchi, M., Kokudo, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Miyamura, T., Moriya, K., and Koike, K.: Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J. Hepatol.* 43(5), 757-763, 2005.
 - 31) Moriishi, K., and Matsuura, Y.: Mechanisms of hepatitis C virus infection. *Antivir. Chem. Chemother.* 14(6), 285-297, 2003.
 - 32) Moriishi, K., Mochizuki, R., Moriya, K., Miyamoto, H., Mori, Y., Abe, T., Murata, S., Tanaka, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Koike, K., and Matsuura, Y.: Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5), 1661-1666, 2007.
 - 33) Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y.: Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 77(19), 10237-10249, 2003.
 - 34) Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K.: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* 4(9), 1065-1067, 1998.
 - 35) Moriya, K., Todoroki, T., Tsutsumi, T., Fujie, H., Shintani, Y., Miyoshi, H., Ishibashi, K., Takayama, T., Makuuchi, M., Watanabe, K., Miyamura, T., Kimura, S., and Koike, K.: Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281(5), 1207-1212, 2001.
 - 36) Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Koike, K.: Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 78(Pt 7), 1527-1531, 1997.
 - 37) Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., and Chiba, T.: Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J. Biol. Chem.* 274(53), 38211-38215, 1999.
 - 38) Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., and Karin, M.: Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317(5834), 121-124, 2007.
 - 39) Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *Embo J* 25(20), 5015-5025, 2006.
 - 40) Rechsteiner, M., and Hill, C. P.: Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 15(1), 27-33, 2005.
 - 41) Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., Kohara, M., and Sudoh, M.: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat. Chem. Biol.* 1(6), 333-337, 2005.
 - 42) Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S., and Goldstein, J. L.: Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99(5), 846-854, 1997.
 - 43) Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Horton, J. D.: Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J. Clin. Invest.* 100(8), 2115-2124, 1997.
 - 44) Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S.: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99(5), 838-845, 1997.
 - 45) Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Tsukamoto, K., Kimura, S., Moriya, K., and Koike, K.: Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126(3), 840-848, 2004.
 - 46) Shirakura, M., Murakami, K., Ichimura, T., Suzuki, R., Shimoji, T., Fukuda, K., Abe, K., Sato, S., Fukasawa,

- M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Moriishi, K., Matsuura, Y., Wakita, T., Suzuki, T., Howley, P. M., Miyamura, T., and Shoji, I.:E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81(3), 1174-1185, 2007.
- 47) Strader, D. B., Wright, T., Thomas, D. L., and Seeff, L. B.:Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 39(4), 1147-1171, 2004.
- 48) Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G., and Chisari, F. V.:Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(24), 15669-15674, 2002.
- 49) Tani, H., Komoda, Y., Matsuo, E., Suzuki, K., Hamamoto, I., Yamashita, T., Moriishi, K., Fujiyama, K., Kanto, T., Hayashi, N., Owsianka, A., Patel, A. H., Whitt, M. A., and Matsuura, Y.:Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* 81(16), 8601-8612, 2007.
- 50) Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Kimura, S., Koike, K., and Miyamura, T.:Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 304(2), 415-424, 2002.
- 51) Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T.:Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35(4), 937-946, 2002.
- 52) Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M.:Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263(1), 30-41, 1999.
- 53) Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J.:Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11(7), 791-796, 2005.
- 54) Wang, C., Gale, M., Jr., Keller, B. C., Huang, H., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Ye, J.:Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol. Cell* 18(4), 425-434, 2005.
- 55) Wasley, A., and Alter, M. J.:Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin. Liver Dis.* 20(1), 1-16, 2000.
- 56) Watashi, K., Hijikata, M., Tagawa, A., Doi, T., Marusawa, H., and Shimotohno, K.:Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 23(21), 7498-7509, 2003.
- 57) Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K.:Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19(1), 111-122, 2005.
- 58) Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M., and Yoshimura, A.:Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J. Exp. Med.* 196(5), 641-653, 2002.
- 59) Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hastay, A. H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N.:Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21(9), 2991-3000, 2001.
- 60) Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V.:Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(26), 9294-9299, 2005.
- 61) Zhou, P.:REGgamma: a shortcut to destruction. *Cell* 124(2), 256-257, 2006.
- 62) 志賀淳治, 福里利夫, 福島純一, C型慢性肝炎の病型と病理組織学的特徴, 2004, 日本臨床(ウイルス性肝炎上巻)第62巻増刊号7, 408-411頁, 日本臨床社

Pathogenesis of hepatitis C virus

Kohji MORIISHI and Yoshiharu MATSUURA

Department of Molecular Virology
Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University
3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
kohji@biken.osaka-u.ac.jp

Hepatitis C virus (HCV) infects approximately 170 million people worldwide including 2 million in Japan and induces serious chronic hepatitis that results in the development of steatosis, cirrhosis and ultimately hepatocellular carcinoma. The current combination therapy using pegylated interferon alpha and a nucleotide analogue ribavirin achieved a sustained virological response in about half population of individuals infected with HCV genotypes 1a and 1b. More than two-thirds of the HCV-positive population has been chronically infected with genotype 1 in Western countries and Japan. Therefore, more effective therapeutics and preventative measures are needed for the treatment of hepatitis C patients who are not responsive to the current chemotherapy. HCV core protein is well known to be the viral capsid protein as well as the pathogenic factor that induces steatosis and hepatocellular carcinoma in the transgenic mice. In this review, we summarize the current status of our knowledge regarding the molecular mechanism by which HCV core protein induces liver steatosis and hepatocellular carcinoma and discuss on a future perspective for the development of novel therapeutics for chronic hepatitis C.

