

## HCV感染における脂肪蓄積とカンナビノイド系活性化との関連 ～ HCV 遺伝子導入幹細胞を用いた検討～

豊田 真子

Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh 7 cells expressing HCV genes

Mako Toyoda

Department of Immunological and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science,  
Fukuoka University, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

Evidence from clinical and laboratory studies has accumulated indicating that the activation of the cannabinoid system is crucial for steatosis, especially in non-alcoholic fatty liver disease. However, the association between hepatitis C virus (HCV) infection and the cannabinoid system has not been well investigated and it is unclear whether steatosis in chronic hepatitis C develops via activation of the endocannabinoid/cannabinoid receptor signaling pathway. In this study, we examined the expression of a cannabinoid receptor (CB1) and the lipid accumulation in the hepatic Huh7 cell line, expressing HCV genes. We utilized Huh7/Rep-Feo-1b cells stably expressing HCV non-structural proteins (NS) 3, NS4, NS5A, and NS5B, as well as Tet-On Core-2 cells, in which the HCV core protein expression is inducible. Significantly higher levels of stored triglycerides were found in Huh7/Rep-Feo-1b cells compared to Huh7 cells. Also, triglyceride accumulation and CB1 receptor expression were down-regulated in Huh7/Rep-Feo-1b cells after HCV reduction by IFN  $\alpha$ . Moreover, lipid accumulation appeared to increase after CB1 agonist treatment, while it decreased after CB1 antagonist treatment, although significant differences were not found compared to untreated cells. In Tet-On Core-2 cells, induction of HCV core protein expression did not affect CB1 expression or triglyceride accumulation. The results of this study in cultured cells suggest that HCV infection may activate the cannabinoid system and precede steatosis, but the core protein by itself may not have any effect on the cannabinoid system.

### 1. 序論

#### 1.1 HCV感染と脂肪肝

C型慢性肝炎は、C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus : HCV) 感染による肝臓での炎症が、少なくとも6ヶ月以上持続した状態と定義される。HCVは主に血液を介して感染し、感染初期の急性期には全身倦怠感と共に食欲不振・悪心・嘔吐などの症状や黄疸などが出現することもあるが、慢性期ではほとんどの場合自覚症状がないまま経過し、本人が自覚せぬうちに肝硬変・肝細胞癌へと進展することが臨床的に問題である。慢性肝炎患者で観察される肝細胞内脂肪蓄積は、B型肝炎や自己免疫性肝炎患者では20%程度であるのに対し、C型肝炎患者では50%程度と高い頻度で認められる<sup>1),2)</sup>。HCVの遺伝子型 (genotype) や宿主の人種によって脂肪蓄積の出現頻度に差があり、特にgenotype 3のHCV感染と肝脂肪化との相関が強調されてきた<sup>3)</sup>。しかしながら、genotype 3以外のHCV感染でも、酸化ストレスおよびインスリン抵抗性を介して肝脂肪化が誘導されると報告されている<sup>4)</sup>。肝脂肪化はC型慢性肝炎におけ

る肝線維化伸展, 肝細胞癌発生に関与していると考えられている。Casteraらは, C型慢性肝炎患者における肝組織を検討した結果, 肝脂肪化が肝線維化促進の有意な因子であることを<sup>5)</sup>, Ohataらは, 肝脂肪化がC型慢性肝炎患者における肝細胞癌のリスクファクターであることを報告している<sup>6)</sup>。また, Poynardらは, 肝脂肪化がウイルスの genotype, ウイルス量, BMI, 年齢にかかわらずIFN治療効果を抑制する因子であることを示しており<sup>7)</sup>, 肝脂肪化はC型慢性肝炎におけるIFN治療効果へ悪影響を及ぼす一因ともされている。

近年, 感染性粒子の産生はないHCV repliconの開発および感染性HCV粒子産生株の樹立によってHCVの感染や複製が培養細胞レベルで観察できるようになり, HCVの感染や複製機構が分子レベルで解析されるようになった。その結果, ウイルス侵入や複製に関連する種々の宿主側因子が同定され, ウイルスの感染過程から粒子の放出までの感染環の概要が明らかになりつつある。HCVの複製や病原性発現には, 脂質成分やその合成酵素の介在も示されており, なかでもcoreタンパクと肝脂肪化との関与を示唆する報告が多い。例えば, HCV coreタンパクを発現するトランスジェニックマウスでは, 肝細胞に脂肪の蓄積が認められ脂肪肝に至ることから, coreタンパクはHCV感染による肝脂肪化の原因因子として注目されるようになった<sup>8)</sup>。

## 1.2 C型肝炎ウイルス

HCVは, 約9600塩基の一本鎖のプラス鎖RNAをゲノムとし, フラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類される。このRNAにコードされる約3000アミノ酸からなる前駆体タンパク質が, 小胞体に存在するシグナルペプチダーゼとシグナルペプチドペプチダーゼおよびウイルスのプロテアーゼによって切断され, 10個のウイルスタンパク質が生成される。ポリペプチドのN末端側はウイルス粒子を構成する構造タンパク質(core, E1, E2, p7)となり, C末端側はウイルスゲノムの複製に必須な非構造タンパク質(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B: 図1)となる。

構造タンパク質には, ウイルスゲノムを包むキャプシドを構成するcoreタンパク質, ウイルス粒子表面のスパイクタンパク質であるE1およびE2, イオンチャネル活性を有したp7タンパク質が存在する<sup>9),10)</sup>。非構造タンパク質NS2からNS3のN末端側にかけてはメタロプロテアーゼ活性を有し, NS2-NS3間を自己切断する<sup>11)</sup>。NS3のN末端側1/3にはセリンプロテアーゼ活性があり, NS3-NS4A間を切断し, さらに残りのNSタンパクを切断する。また, NS3のC末端側1/2にはヘリカーゼ活性があり, NS5BによるRNA複製の働きを助けている。NS4AはNS3のcofactorとして, NS4BはRNA複製の場と考えられているmembranous webを誘導する活性因子として機能する<sup>12)</sup>。NS5Aはウイルス複製, 感染に重要な働きをしており, インターフェロン感受性決定領域 (ISDR) が存在する<sup>13),14)</sup>。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している<sup>15)</sup>。

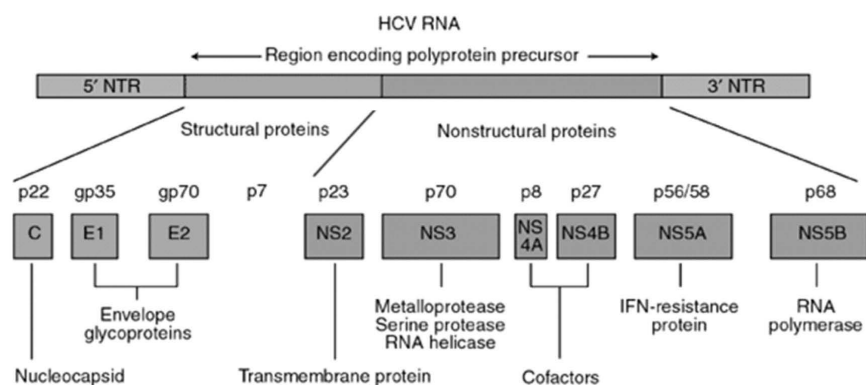


図1: HCV RNAの構造

(Anzola M. et al. Expert Rev Mol Med 2003; 5: 1-16より改変)

### 1.3 カンナビノイドとは

マリワナを体内に摂取すると、時間感覚・空間感覚の混乱、視覚や聴覚の鋭敏化、陶酔感、幻覚、食欲亢進などさまざまな反応が引き起こされる。マリワナが有するこれらの作用は、 $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) を初めとするカンナビノイド (cannabinoids) と総称される化合物によるものである。カンナビノイドがどのようにそれらの作用を発揮するのか、その機序は長い間不明であったが、1988年にDevaneらが、ラットの脳シナプトソームにカンナビノイドに対する受容体が存在することを初めて明らかにした<sup>16)</sup>。カンナビノイド受容体としては、7回膜貫通Gタンパク質 (Gi/Go) 共役型の受容体であるCB1 receptorとCB2 receptorの2つがこれまでに同定・遺伝子クローニングされている<sup>17), 18)</sup>。ヒトの場合、CB1 receptorは472個のアミノ酸から、CB2 receptorは360個のアミノ酸から構成されており、両者の間には44%の相同性がある。CB1 receptorは脳などで多量に発現しており、神経伝達の抑制的制御に関与していると考えられている<sup>19)</sup>。また、末梢においては肝臓や小腸などに発現が見られ、脂質代謝や糖代謝に関与していると考えられている<sup>20), 21)</sup>。一方、CB2 receptorは脾臓や扁桃腺など免疫系の臓器や細胞に多く発現しており、炎症反応や免疫応答の調節に関与すると考えられている<sup>22)</sup>。受容体の存在が明らかになったことから、内在性リガンドの検索が行われた。まずDevaneらによって、アラキドン酸とエタノールアミンが酸アミド結合した物質N-アラキドノイルエタノールアミン (別名アナンダミド, anandamide) がその候補物質としてブタの脳から抽出され<sup>23)</sup>、次いでSugiuraおよびMechoulamらによって、それぞれラット脳およびイヌ小腸から2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoylglycerol; 2-AG) が発見されており<sup>24), 25)</sup>、現在では5種類ほどが同定されている。

### 1.4 脂肪肝とカンナビノイド

非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、肝障害を惹起する程度のアルコール摂取歴がなく、ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎等原因の明らかなものを除外した肝への脂肪沈着を認める肝疾患である。昨今の食生活の欧米化や生活様式の変化・運動不足などによりメタボリック症候群が激増しており、それに伴いNAFLD罹患者も増加している。非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) はNAFLDの重症型で、アルコール性肝炎に類似した炎症、線維化を認め、肝硬変から肝細胞癌へ進展し得る疾患概念である。近年、NAFLD/NASHの発症・進展にカンナビノイド系の活性化が関与しているという実験結果が多数報告されており、肝CB1 receptorを介した刺激伝達が、肝臓の脂肪化や線維化、炎症の促進に関わっていることが示された<sup>26)-28)</sup>。例えば、高脂肪食を与えたマウスにおいては、肝臓でのCB1 receptorの発現増加がみられ、内因性カンナビノイドの一つであるanandamideの合成量も増加していた<sup>26)</sup>。一方、CB1 receptorのノックアウトマウスでは、高脂肪食による肥満の誘導に対して抵抗性が示されている<sup>26)</sup>。これらのことより、高脂肪食摂取による肝CB1 receptorの発現増加が、脂肪肝や肥満に関連していることが示唆される。また、CB1 agonistを投与したマウスにおいては、CB1 receptorを介したシグナルが脂肪酸合成酵素の転写を促進するsterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) の発現増強及びSREBP1-cにより転写制御されているacetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1) やfatty acid synthase (FASN) の発現を誘導し、新規 (de novo) の脂肪酸合成を増強させた<sup>29)</sup>。また、一方でcarnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) の発現を減少させ、脂肪酸の $\beta$ 酸化を抑制していた<sup>30)</sup>。このように、CB1 receptorが活性化されると、脂肪酸合成が促進、脂肪酸酸化が抑制され、結果として中性脂肪 (脂肪滴) 蓄積が誘導されるものと考えられる。また、臨床においても、CB1 antagonistであるrimonabantを投与したNAFLD患者において、肝機能 (ALT値) が改善したと報告されている<sup>31)</sup>。

## 1.5 目的

近年、NAFLDにおいてはカンナビノイド系の活性化が肝脂肪化の一因であることが示されてきた。しかしながら、肝脂肪化をひとつの特徴とするHCV感染とカンナビノイド系との関連は未だ十分に解析されていない。そこで今回我々は、NAFLDと類似した病理所見を示すC型慢性肝炎におけるカンナビノイド系の活性化と肝脂肪化との関連性を検討する目的で、HCV replicon細胞株であるHuh7/Rep-Feo細胞とHCV coreタンパク発現誘導形質転換細胞株であるHuh7/Tet-On core2細胞を用いて実験を行った。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 細胞株

<培養関連試薬>

- ・ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)
- ・ FCS (Bio west)
- ・ G418 (Nacalai tesque)
- ・ Hygromycin B (Wako)

<細胞株>

DMEMを基本培地として用い、非働化したFCSを10%になるように加えた。細胞株はすべて37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。細胞株として、以下の3種類の細胞株を用いた。

- 1) ヒト肝癌細胞株Huh7：DMEM/10% FCSにて継代培養した。
- 2) Huh7/Rep-Feo細胞（東京医科歯科大学，坂本直哉先生より供与）：Huh7細胞にHCV subgenomic replicon plasmidからT7 RNAポリメラーゼによりin vitroで合成したreplicon RNAを導入したHCV replicon細胞株。HCV subgenomic replicon plasmidは、HCV genotype 1bの非構造遺伝子（NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B）を含み、HCVの構造遺伝子領域をルシフェラーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子Feoに置換した構造である（図2）。選択培地にはDMEM/10% FCS/G418（250µg/mL）を用いて継代培養した。

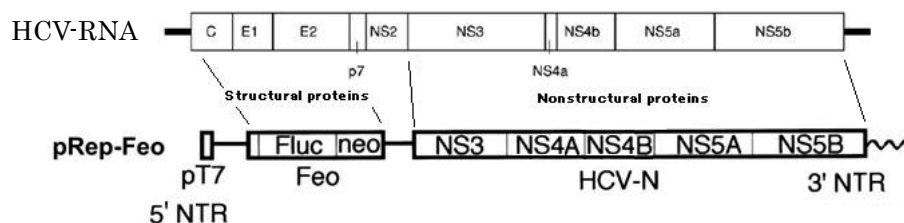


図2：HCV subgenomic replicon plasmid

(Tanabe et al. J Infect Dis 2004; 189: 1129-39より改変)

- 3) Huh7/Tet-On core2細胞（鳥取大学，汐田剛志先生より供与）：Huh7細胞にHCV genotype 1bのcore遺伝子を導入したdoxycycline誘導型HCV core protein発現形質転換細胞株。Huh7にpTet-On Advanced vectorをトランスフェクションしてTet-On Advanced cellを作製後、さらにHCV genotype 1b core遺伝

子を組み込んだpTRE-Tight vectorとpTK-Hyg vectorをコトランスフェクションして樹立された細胞株である。選択培地としてDMEM/10% FCS/G418 (400 $\mu$ g/mL) /Hygromycin B (75 $\mu$ g/mL)にて継代培養し、coreタンパク発現誘導にはdoxycycline (5 $\mu$ g/mL)を添加した。

## 2.2 調整試薬

- ・ CB 1 agonist (ACEA, Tocris Bioscience)
- ・ CB 1 antagonist (AM251, Tocris Bioscience)
- \* CB 1 agonist および CB 1 antagonist は DMSO にて溶解し stock 溶液 (10mM) を作製し、-20 $^{\circ}$ C に保存した。
- ・ IFN-  $\alpha$  (大日本住友製薬)

## 2.3 細胞内脂質測定法：Oil Red O 染色および細胞内TG定量

### 2.3.1 Oil Red O 染色

<試薬・器具>

- ・ Adipogenesis Assay Kit (Cayman)
- \* Kit 内容は Wash Solution, Oil Red O Solution, Dye Extraction Solution
- ・ 10% 中性ホルマリン (Wako)
- ・ EVOS (AMG)

<実験方法>

Oil Red O 染色用の細胞培養には、48well plate を使用した。Huh7細胞又はHuh7/Rep-Feo細胞を $0.8 \times 10^4$  cells/well/250 $\mu$ Lにて播種し、一晚培養後、CB1 agonist および CB1 antagonist の最終濃度が100nMになるように培地に添加し48hr培養した。また、IFN-  $\alpha$  は最終濃度が100U/mLになるように培地に添加し72hrまで培養した。

Huh7/Tet-On core2細胞は $1.25 \times 10^4$  cells/well/250 $\mu$ Lにて播種し、一晚培養後、doxycycline (5 $\mu$ g/mL) 添加し96hr後までcoreタンパク発現誘導を行った。

以下に実験操作を示す。

1. 刺激処理細胞を1 $\times$  PBS にて2回洗浄後、10% 中性ホルマリンを添加し15分間固定した。
2. 固定後、Wash Solution にて2回洗浄 (各5分間) した。
3. Oil Red O Solution を添加し、20分間静置して染色を行った。
4. Oil Red O Solution を除去後、1 $\times$  PBS にて数回すすぎ、Wash Solution にて2回洗浄 (各5分間) した。
5. Wash Solution を完全に除去し細胞を乾燥させた後、EVOS にて観察した。

### 2.3.2 細胞内 TG 定量法

<試薬>

- ・ トリグリセライドE-テストワコー (Wako)
- ・ BCA Protein Assay kit (Thermo scientific)

<実験方法>

細胞内 triglyceride (TG) 量の測定は、培養細胞よりTGをFolch法 (メタノール・クロロホルム抽出)



で抽出し、トリグリセライドE-テストワコーを用いて測定した(総タンパク量で補正)。総タンパク量の測定には、BCA Protein Assay kitを用いた。細胞内TG定量用の細胞培養には、12well plateを使用した。Huh7細胞、Huh7/Rep-Feo細胞は $1 \times 10^5$  cells/well/1 mLにて播種し、一晚培養後にそれぞれの試料を回収した。Huh7/Tet-On core2細胞は $5 \times 10^4$  cells/well/1 mLにて播種し、一晚培養後、doxycycline (5  $\mu$ g/mL) 添加し96hr後までcoreタンパク発現誘導を行い、それぞれの試料を回収した。

以下に実験操作を示す。

1. 刺激処理細胞を1  $\times$  PBSにて2回洗浄後、Lysis Buffer (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.5) 150  $\mu$ Lにて溶解し、15分間vortexした。各試料150  $\mu$ Lのうち100  $\mu$ LをTG量の測定に用いた。
2. 試料100  $\mu$ Lにクロロホルム/メタノール(1:2) 375  $\mu$ Lを加え、室温で5分間放置した。
3. クロロホルムおよびdH<sub>2</sub>Oを各125  $\mu$ Lずつ添加し、4 $^{\circ}$ C, 12000rpmで5分間遠心し、下層(クロロホルム層)を別のチューブに回収した。
4. 残った上層にクロロホルム100  $\mu$ Lを加え、4 $^{\circ}$ C, 12000 rpmで5分間遠心し、下層を先に分取したクロロホルム層と混合した。
5. 上記の分取したクロロホルム層をコールドトラップにて乾固化した。
6. 残渣にイソプロパノール30  $\mu$ Lを加え懸濁し、測定用の試料とした。
7. 96wellプレートに発色試薬150  $\mu$ L, 測定用の試料8  $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した(測定波長: 610nm)。

## 2.4 細胞内脂質代謝関連遺伝子発現量の測定

### 2.4.1 Quantitative RT-PCR法によるmRNAの定量

<試薬・器具>

- ・ TRIzol 試薬 (Invitrogen)
- ・ QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)
- \* Kit内容はgDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Preimer Mix
- ・ 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)
- ・ CFX96 (Bio-Rad)

<実験方法>

Quantitative RT-PCR法によるmRNA発現定量用の細胞培養には、12well plateを使用した。Huh7/Rep-Feo細胞は $6 \times 10^4$  cells/well/1 mLにて播種し、一晚培養後、IFN- $\alpha$ の最終濃度が100U/mLとなるよう培地に添加し、48hr培養後に試料を回収した。Huh7細胞は $8 \times 10^4$  cells/well/1 mLにて播種し、一晚培養後に試料を回収した。

#### 1) total RNAの抽出

1. 各々の細胞を1  $\times$  PBSにて2回洗浄後、TRIzol試薬1 mLを添加して溶解し、1.5 mLチューブに回収した。
2. クロロホルム200  $\mu$ Lを加え2-3分間室温に放置後、4 $^{\circ}$ C, 16000rpmにて15分間遠心し、上層を回収した。
3. 回収した上層にイソプロパノール500  $\mu$ Lを加え、軽く転倒混和し10分間室温に静置後、4 $^{\circ}$ C, 16000 rpmにて10分遠心した。

4. 上清を除き，得られたペレットに75%エタノール1mLを加え，4℃，16000rpmで5分間遠心した。
5. 上清を除き，ペレットを乾燥させた後，dH<sub>2</sub>O 30μLにて溶解した。抽出したRNA濃度はスペクトロフォトメーターにて測定した。

## 2) cDNA の合成

QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を使用した。

1. 抽出したRNA 1μgを全量が12μLになるようにdH<sub>2</sub>Oにて適宜希釈した。
2. 希釈したRNAに，ゲノムDNA除去のためにgDNA Wipeout Buffer 2μLを加え，42℃で2分間放置し，直ちに氷上にて冷却した。
3. Reverse Transcription master mix 6μL (Quantiscript Reverse Transcriptase 1μL, 5 × Quantiscript RT Buffer 4μL, RT Preimer Mix 1μL)を加え，全量20μLとした。
4. 42℃で30分間反応後，95℃，3分間処理にて反応を停止させた。作製したcDNA 10μLにdH<sub>2</sub>Oを40μL添加し，cDNAの濃度を10ng/μLとした。

## 3) Quantitative RT-PCR

cDNA 1μLに2 × SYBR Premix Ex Taq 10μLとforward primer (final conc : 0.5μM) およびreverse primer (final conc : 0.5μM)を添加し，dH<sub>2</sub>Oにて最終volumeを20μLにしたPCR reaction mixtureを作製し，CFX96により解析を行った。内標準遺伝子としてβ-actinを用い，検量線を用いた定量解析を行った。表1，表2にprimer構成およびPCRの温度設定を示す。

表1. Primer 配列

genes	5'	forward	3'	5'	reverse	3'
HCV (5'NTR)		CCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTA			TCGCGGGGGCACGCCCAA	
LXRα		GCCGAGTTTGCCTTGCTCA			TCCGGAGGCTCACCAGTTTC	
SREBP-1c		GGCTCCTGCCTACAGCTTCT			CAGCCAGTGGATCACCACA	
FASN		GAACCTCCTGGCGGAAGAGA			GGACCCCGTGAATGTCA	
LDLR		CAACGGCTCAGACGAGCAAG			AGTCACAGACGAACTGCCGAGA	
HMGR		GCCTGGCTCGAAACATCTGAA			CTGACCTGGACTGAAACGGATA	
ApoB		TCAAGAGTTACAGCAGATCCATCAA			TCAGAATGGAAGTCCTTAAGAGCAA	
MTTP		AGCACCTCAGGACTGCGAAGA			CAGAGGTGACAGCATCCACCA	
β-actin		TGGCACCCAGCACAAATGAA			CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	

LXR, liver X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; FASN, fatty acid synthase; LDLR, LDL-receptor; HMGR, HMG-CoA reductase; ApoB, apolipoprotein B; MTTP, microsomal triglyceride transfer protein

表2. PCR 温度設定

		アニーリング温度
熱変性	95°C 3 min	<b>HCV</b> 63°C
熱変性	95°C 10 sec	<b>LXRα</b> 55°C
アニーリング	各 primer で温度設定 10 sec	<b>SREBP-1c</b> 63°C
伸長反応	72°C 30 sec	<b>FASN</b> 59°C
熱変性	95°C 10 sec	<b>LDLR</b> 59°C
解離反応	65°C ~95°C (1 cycle で0.5°C 上昇) 61 cycle	<b>HMGR</b> 59°C
保存	4°C ∞	<b>ApoB</b> 63°C
		<b>MTTP</b> 63°C
		<b>β-actin</b> 63°C

## 2.5 CB1 receptor および HCV core タンパク発現量の測定

### <試薬・器具>

- ・ 2-ME (Wako)
- ・ Blocking one (Nacalai tesque)
- ・ ECL advance (GE Healthcare)
- ・ Fluor chem™ 8900 (Alpha Inotech)
- ・ 4 × SDS sample buffer は 1 M Tris-HCl (pH6.8) 2.5 mL, SDS 0.8 g, Glycerol 4 mL および BPB 適量を dH<sub>2</sub>O にて 10 mL にメスアップして作製した。
- ・ TBST は NaCl 87.75 g, Tris 24.22 g, Tween 20 5 mL, conc. HCl 14.4 mL を dH<sub>2</sub>O にて 1000 mL にメスアップして調製した (10 × TBST)。10 × TBST を 10 倍希釈した 1 × TBST を用いた。
- ・ 一次抗体：Anti-cannabinoid receptor 1 rabbit polyclonal antibody (Affinity BioReagents)  
Anti-HCV core protein mouse monoclonal antibody (AbD Serotec)
- ・ 二次抗体：Peroxidase-conjugate AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (γ-chain) (Jackson Lab)  
Anti-Rabbit Antibody HRP-linked IgG (H+L) (Cell signaling)

### <実験方法>

タンパク発現検討用の細胞培養には、12 well plate を使用した。Huh7細胞、Huh7/Rep-Feo細胞は  $1 \times 10^5$  cells/well/1 mL にて播種し、一晩培養後にそれぞれの試料を回収した。Huh7/Tet-On core2細胞は  $5 \times 10^4$  cells/well/1 mL にて播種し、一晩培養後、doxycycline (5 μg/mL) 添加し 96 hr 後まで core タンパク発現誘導を行った。

#### 1) 試料調整

1. 各々の細胞を PBS にて 2 回洗浄後、RIPA buffer (0.5% NP-40, 0.25% Sodium Deoxycholate, 0.05% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4) 30 μL を添加して細胞を溶解し、チューブに回収した。
2. 回収した細胞溶解液を氷上にて 15 分間インキュベート後、4°C, 16000 rpm で 20 分間遠心し、上清をタンパク抽出液として回収した。
3. BCA Protein Assay kit を用いて抽出液中のタンパク質濃度を測定し、各抽出液中のタンパク濃度が等しくなるよう dH<sub>2</sub>O にて希釈調整した。希釈した抽出液に 2-ME を最終濃度 5%, 4 × SDS sample buffer を 1 × となるように加え、95°C, 5 分間加熱し western blot の試料とした。



## 2) Western blot法

1. 10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて試料を電気泳動後（定電流：ゲル1枚当たり30mA），セミドライ方式にてPVDF膜に転写（膜の面積  $\text{cm}^2 \times 0.8 \text{mA}$  で90分間転写）した。
2. 転写後，PVDF膜は1×Blocking oneにて室温で30分間ブロッキングし，TBSTで5分間洗浄後，一次抗体と4℃で一晩反応させた。
3. TBSTにて10分間，3回洗浄後，一次抗体に対応するペルオキシダーゼ標識の二次抗体を室温で1時間反応させた。
4. TBSTにて10分間，3回洗浄後，目的タンパク質をECL advanceにより発光させ，Fluor chem<sup>TM</sup> 8900で検出した。画像処理及び解析はFluor chem<sup>TM</sup> 付属ソフトを用いた。

## 2.6 統計解析

2群間の比較には，Mann-Whitney U testを用いた。多群間の比較には一元配置分散分析を行い，Dunnnett法を用いて各群間の比較を行った。データは平均値±標準誤差で表し，有意水準は5%とした。

## 3. 結果

### 3.1 Huh7/Rep-Feo細胞を用いた各種検討結果

#### 3.1.1 Huh7/Rep-Feo細胞におけるHCV遺伝子発現の確認

Huh7/Rep-Feo細胞におけるHCV遺伝子の発現をHCV 5'NTR primer pairsを用いたQuantitative RT-PCR法にて確認した(図3)。

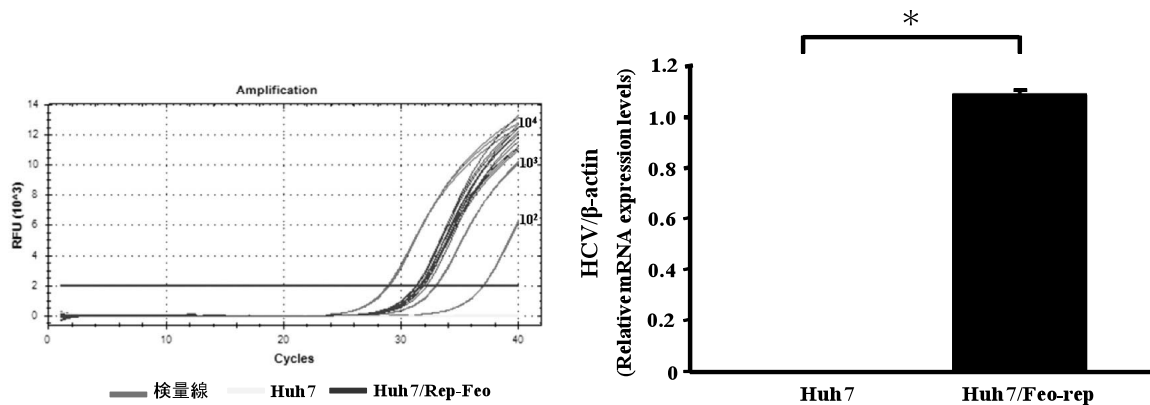


図3. HCV gene expression was detected by Quantitative RT-PCR.  $\beta$ -actin was amplified as internal control. \* $p < 0.05$ , significant difference from Huh7.

#### 3.1.2 Huh7/Rep-Feo細胞におけるCB1 receptor発現量の検討

HCV replicon発現に伴うCB1 receptor発現の量的変化を調べる目的で，親株であるHuh7細胞およびHuh7/Rep-Feo細胞におけるCB1 receptorの発現をwestern blotting法により解析した。その結果，Huh7/Rep-Feo細胞では，Huh7細胞に比してCB1 receptor発現量の有意な増加が認められた(図4)。

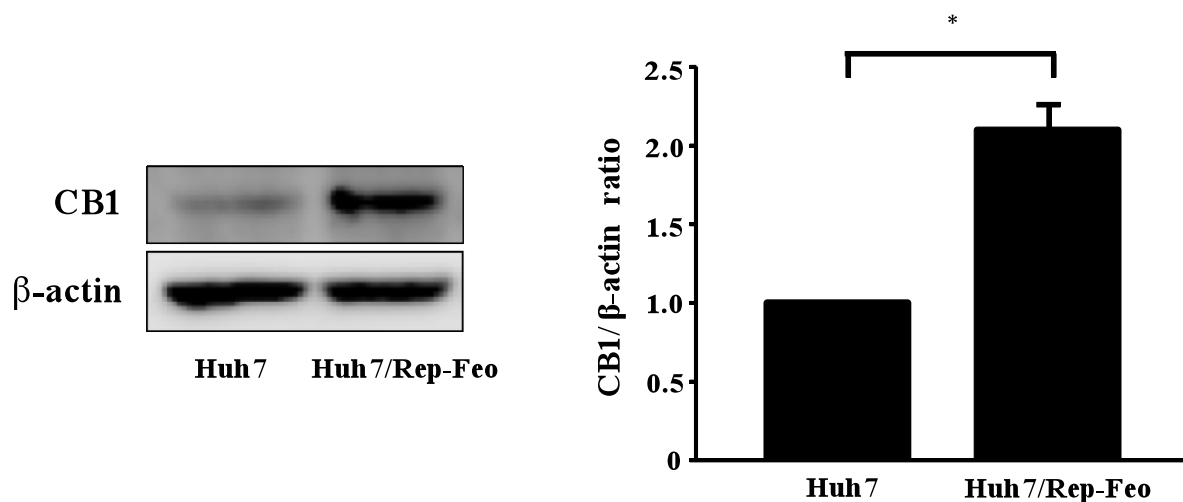


図4. Analysis of CB1 receptor by western blotting. \*p<0.05, significant difference from Huh7.

### 3.1.3 Huh7/Rep-Feo細胞における脂肪蓄積量の検討

HCV replicon 発現に伴う脂肪蓄積量の変化を検討するために、Huh7細胞およびHuh7/Rep-Feo細胞の、Oil red O染色および各細胞内TGの定量を行った。その結果、Huh7/Rep-Feo細胞において強い脂肪染色性が確認され(図5A)、細胞内TG量も増加傾向が認められた(図5B)。

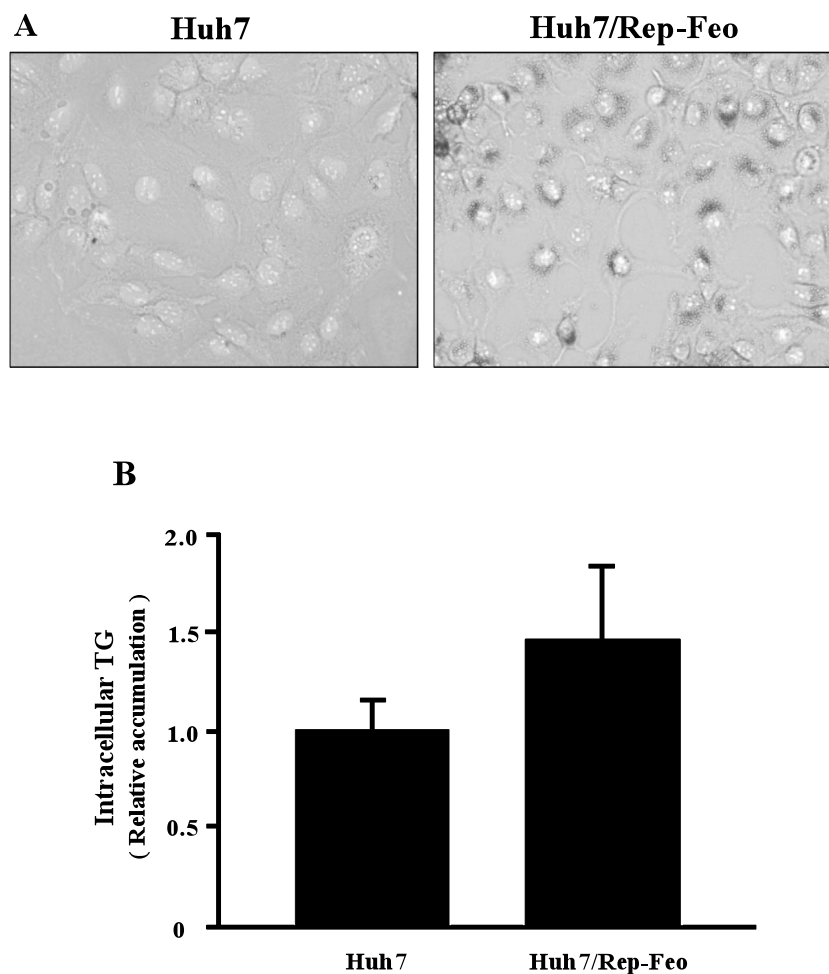
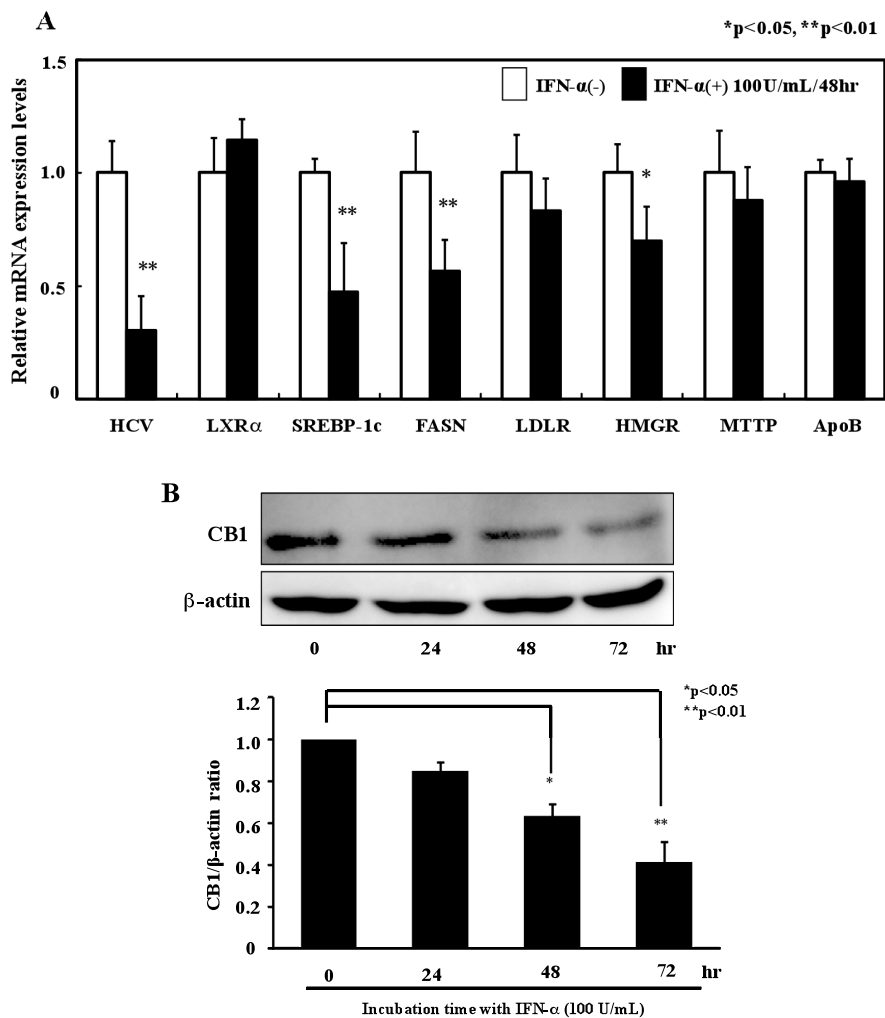


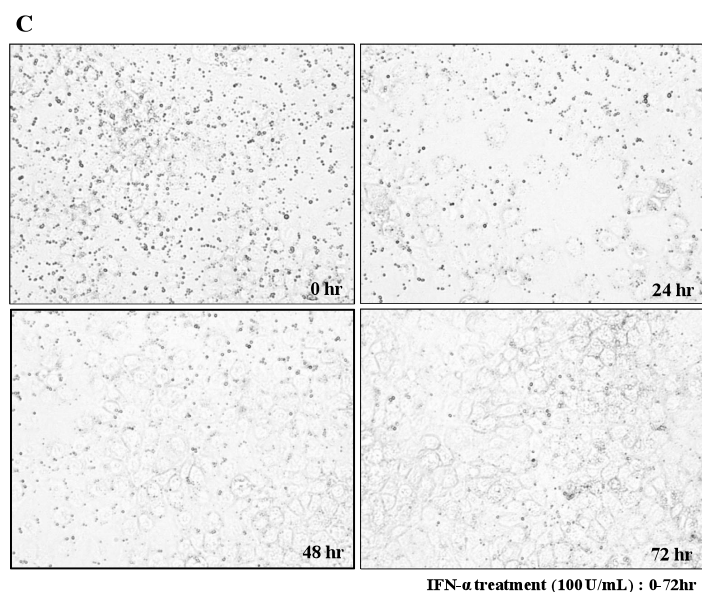
図5. (A) Oil Red O staining images ( $\times 200$ ). (B) Triglyceride quantification assay.

### 3.1.4 Huh7/Rep-Feo細胞に対するIFN- $\alpha$ の効果

IFN- $\alpha$ はHCVに対して抗ウイルス効果を示し、その複製を抑制することが知られている。そこで、Huh7/Rep-Feo細胞のIFN- $\alpha$ 処理による、脂質代謝関連遺伝子の発現量および脂肪蓄積量を検討した。また、IFN- $\alpha$ 処理によるCB1 receptor発現量を、western blotting法により経時的に解析した。

IFN- $\alpha$  (100U/mL)によって48hr処理した結果、導入されたHCV replicon発現は有意に抑制され、同時にSREBP1-c、FASN、HMGRのmRNA発現も処理前に比べて有意に抑制された(図6A)。さらに、IFN- $\alpha$ 処理(100U/mL)によって、Huh7/Rep-Feo細胞ではCB1 receptor発現に経時的な減少傾向が認められた(図6B)。また、IFN- $\alpha$  (100U/mL)を0-72 hr作用させた際のOil Red O染色による脂肪蓄積量の検討では、IFN- $\alpha$ 処理により経時的な染色性の減弱化が確認された(図6C)。

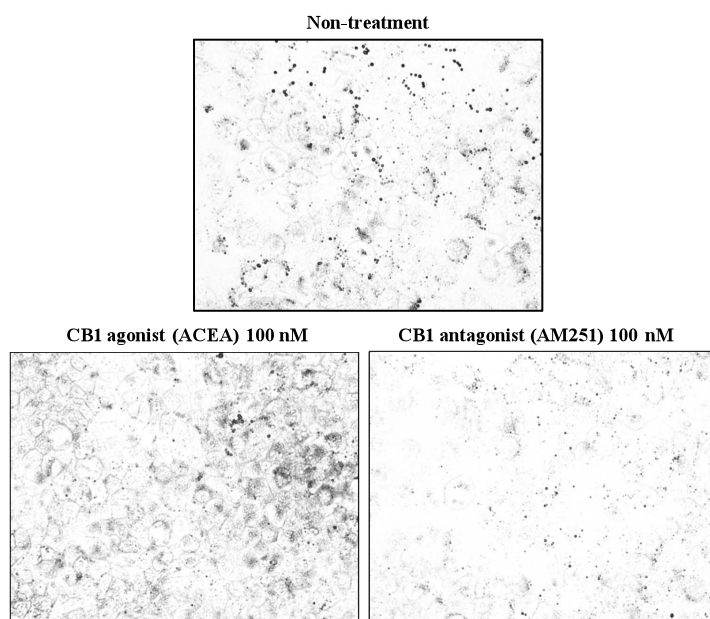




**図6.** (A) Quantitative RT-PCR for HCV and lipid metabolism-related genes. Expression levels in Huh7/Rep-Feo cells after 48 hr treatment with IFN- $\alpha$  (100 U/ml) were compared with untreated cells. LXR, liver X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; FASN, fatty acid synthase; LDLR, LDL-receptor; HMGR, HMG-CoA reductase; MTTP, microsomal triglyceride transfer protein; ApoB, apolipoprotein B. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (B) Western blot for CB1 receptor. The expression levels in Huh7/Rep-Feo cells were determined after treatment with 100 U/ml IFN- $\alpha$  for 0, 24, 48 and 72 hr. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significant difference from control. (C) Oil Red O staining images ( $\times 100$ ). Huh7/Rep-Feo cells treated with 100 U/ml IFN- $\alpha$  for 0, 24, 48 and 72 hr.

### 3.1.5 Huh7/Rep-Feo細胞内脂肪蓄積に対するCB1 agonist, CB1 antagonistの効果

Huh7/Rep-Feo細胞に対して、CB1 agonist, CB1 antagonistが脂肪蓄積に与える効果を検討した。CB1 agonist処理(100 nM, 48 h)によってOil Red Oの染色性が増強し、脂肪蓄積量の増大が認められた。一方、CB1 antagonist処理(100 nM, 48 h)によってOil Red Oの染色性が減少し、脂肪蓄積量の低下が認められた(図7)。



**図7.** Oil Red O staining images ( $\times 200$ ). Huh7/Rep-Feo cells after 48 hr incubation with CB1 agonist(100 nM) and CB1 antagonist (100 nM) were compared with non-untreated cells in oil red staining.

### 3.2 Huh7/Tet-On core2細胞を用いた各種検討結果

#### 3.2.1 Huh7/Tet-On core2細胞におけるCB1 receptor発現量の検討

Huh7/Tet-On core2細胞は、Huh7細胞にHCV genotype 1bのcore遺伝子を導入したdoxycycline誘導型HCV coreタンパク発現形質転換細胞株である。Huh7/Tet-On core2細胞では、doxycycline (5 $\mu$ g/mL)添加によって経時的(0, 24, 48, 72, 96 hr)にcoreタンパクの発現増強が認められた(western blot法, 図8A)。しかしながら、CB1 receptorの発現量には変化は認められなかった(western blot法, 図8B)。

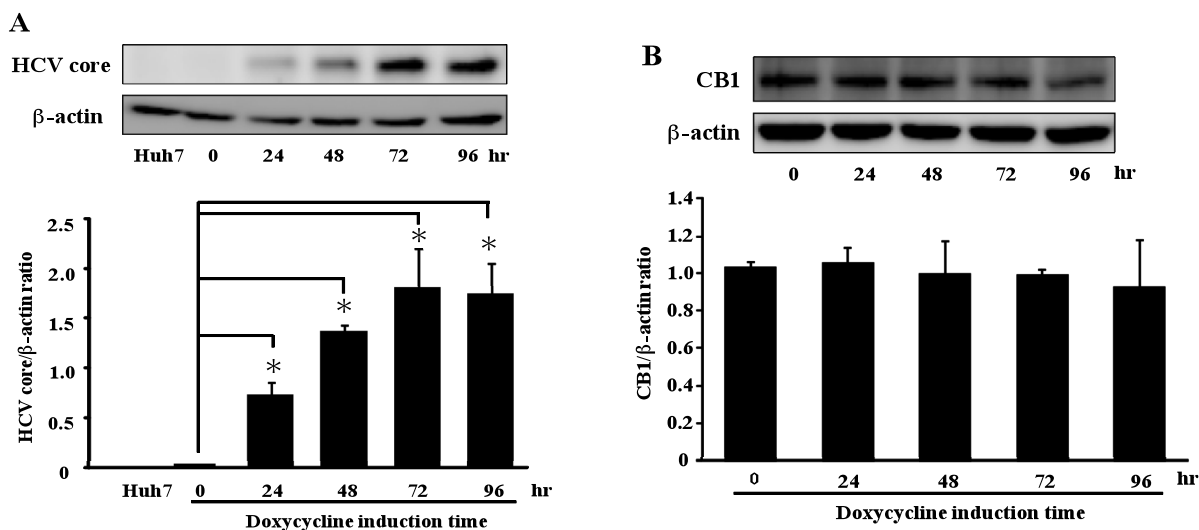


図8. Western blot for HCV core protein (A) and CB1 receptor (B). Expression levels in Huh7/Tet-On core2 cells were analyzed before and after core protein induction with doxycycline (5  $\mu$ g/ml). \* $p$ <0.05, significant difference from control.



### 3.2.2 Huh7/Tet-On core2細胞における脂肪蓄積量の検討

次に、Huh7/Tet-On core2細胞を用いて、HCV coreタンパク発現による脂肪蓄積量の変化を、Oil Red O染色およびTG定量により経時的に検討した。Doxycycline (5 $\mu$ g/mL)添加後、経時的(0, 24, 48, 72, 96 hr)なcoreタンパクの発現誘導を行っても、Oil Red O染色による染色性に変化は認められず(図9A)、TGの蓄積量にも変化は認められなかった(図9B)。

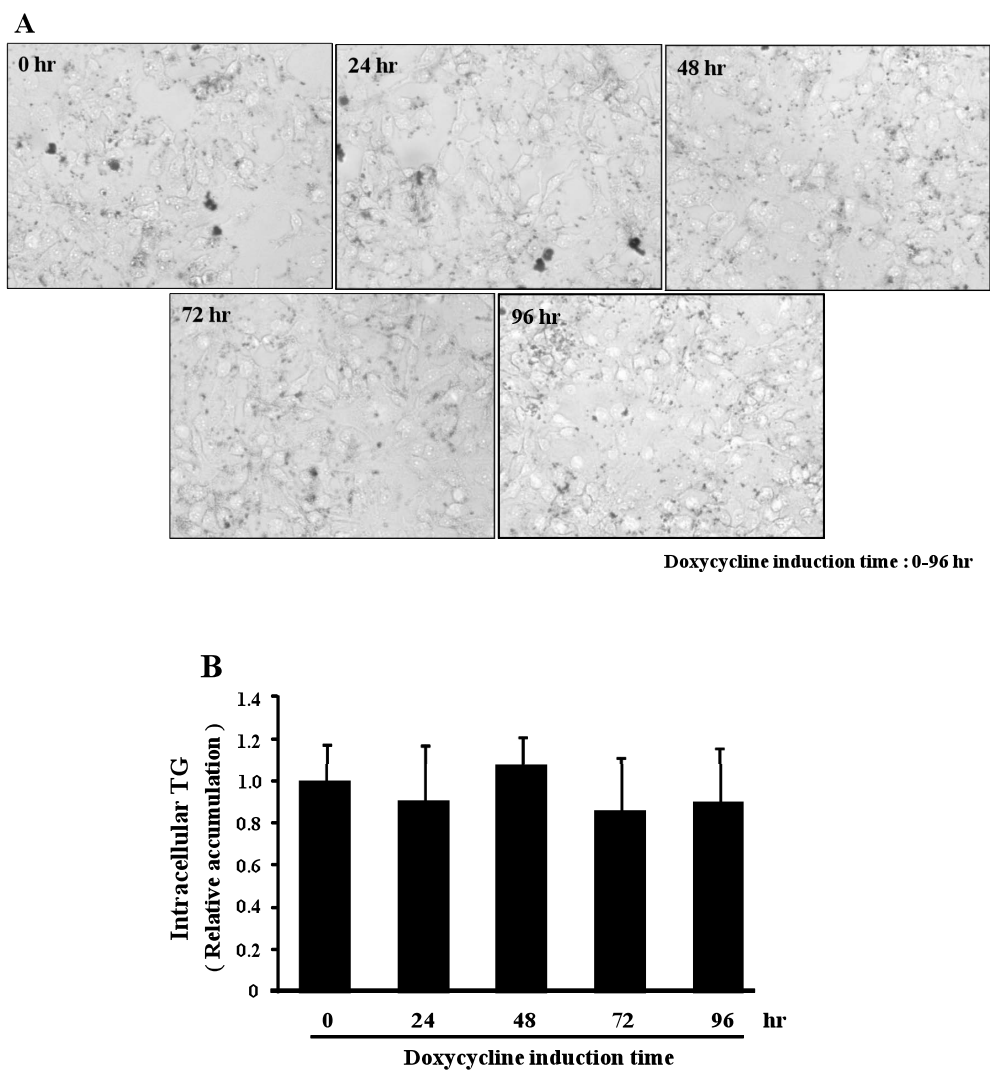


図9. (A) Oil Red O staining images ( $\times 200$ ). (B) Triglyceride quantification assay.

#### 4. 考察

C型慢性肝炎では脂肪肝の合併頻度が高く、肝細胞脂肪蓄積が肝硬変・肝癌発症と深く関連し、IFN治療の著効率を低下させる一因とも考えられている。つまり、HCV感染後の肝細胞脂肪蓄積機序を解明し、脂肪肝伸展の予防や抑制方法を確立することは、肝癌発症の抑制・IFN治療の著効率を上昇させ、C型肝炎の予後を改善すると期待される。現在までに、肝硬変や肝線維化が認められる肝組織において、正常肝臓組織と比較してCB1 receptor発現量の増加と内因性カンナビノイドの増加が報告されている<sup>32),33)</sup>。また、HCV感染によるcoreタンパク発現と肝脂肪化との関与を示唆する報告がある<sup>8)</sup>。我々の研究室でも、HCV感染肝における細胞内脂肪蓄積については、患者肝生検組織を用いた解析で、HCV感染に伴う脂質代謝制御機構の破綻(抑制できないコレステロールおよび脂肪酸合成亢進)を問題点として指摘してきた<sup>34-36)</sup>。

近年、肝細胞脂肪蓄積→肝炎(NASH)→肝線維化→肝硬変→肝癌発症とC型肝炎の組織学的変化と同様の経過を示す非アルコール性脂肪肝(NAFLD)における肝脂肪化にカンナビノイド系の活性化が関与していることが、Osei-Hyiamanらによって報告されている<sup>29)</sup>。彼らは、高脂肪食を与えたマウスの肝臓ではCB1 receptorの発現の増強と内因性カンナビノイドであるanandamideの含有量の増加、さらにCB1 antagonistであるrimonabant投与が肝脂肪蓄積を抑制し、逆にCB1 agonist投与が脂肪肝形成を促進することからCB1 receptorシグナル系の活性化が脂肪酸合成促進に関与していることを明らかにしている。

しかしながら、C型慢性肝炎における肝脂肪蓄積とカンナビノイド系シグナル活性化との関連性については、いまだ十分に解析されていないのが現状である。

そこで、我々はC型慢性肝炎における肝脂肪化の発生機序をカンナビノイド系シグナル活性化という面から解析する目的で、HCV replicon 遺伝子導入細胞株(Huh7/Rep-Feo)および誘導型HCV coreタンパク発現形質転換細胞株(Huh7/Tet-On core2)によるin vitroの実験系を用いて検討をし、以下の結果を示した。

- ① Huh7/Rep-Feo細胞と親株Huh7細胞の比較検討にて、Huh7/Rep-Feo細胞でCB1 receptor発現量の増加と細胞内TG蓄積増大が認められた(図4, 図5)。
- ② IFN- $\alpha$ 処理にてHuh7/Rep-Feo細胞におけるHCV replicon発現を抑制すると、CB1 receptor発現量およびSREBP1-c, FASN, HMGCRなどの脂質代謝に関連した遺伝子発現が抑制され、細胞内TGの蓄積の減少も認められた(図6)。
- ③ Huh7/Rep-Feo細胞をCB1 agonist, CB1 antagonistで刺激したところ、CB1 agonist処理では脂肪蓄積量が増加し、CB1 antagonist処理にて脂肪蓄積量の減少が認められた(図7)。
- ④ Huh7/Tet-On core2細胞にdoxycycline (5 $\mu$ g/mL)を添加し、coreタンパクの発現の誘導を行っても、CB1 receptor発現および細胞内TG蓄積に変化は認められなかった(図8, 図9)。

以上より、

I : Huh7/Rep-Feo細胞における脂肪蓄積量増加には、Osei-Hyiamanらの報告と同様にCB1シグナル伝達経路を介する刺激が関与している。さらに、CB1活性化シグナルは、脂質代謝関連酵素遺伝子群の発現制御を介して、脂肪蓄積の増加につながった可能性が考えられた。

II : CB1 receptor発現増強にはHCV nonstructural遺伝子の発現が必要であり、coreタンパクの発現のみでは誘導されないと考えられた。

本実験にてC型慢性肝炎患者における肝炎や肝線維化は、HCV感染によって誘導されるCB1 receptorの発現増強とカンナビノイド系の活性化による脂質代謝関連酵素遺伝子群の発現制御を介して、肝脂肪化が促進されることが示唆された。しかしながら、HCV感染によって引き起こされる肝細胞内脂質代謝

異常は、個々のウイルスタンパクや細胞側因子が共同し、様々な経路を介して惹起される可能性も考慮する必要がある。CB1 receptorの活性化に関しても、Huh7/Rep-Feo細胞培養上清中のanandamideの測定では検出限界以下であったが（データ未掲載）、anandamide以外にも2-AG（2-Arachidonoyl glycerol）やNADA（N-arachidonoyl dopamine）などや、未確認の内因性カンナビノイドの存在も想定されているため、今後の検討が必要である。また、HCV感染がCB1 receptor発現増強を誘導するメカニズム、およびカンナビノイド系が肝脂肪化に関与する度合いなどについても、今後さらに詳細に検討していく必要がある。

## 5. 参考文献

- 1) Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 1992; 15: 572-7.
- 2) Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 1993; 104: 595-603.
- 3) Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, Hoofnagle JH, Zacks S, Afdhal NH, Wahed AS; Virahep-C Study Group. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 80-87.
- 4) Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, Sutti S, Marrone A, Ruggiero G, Albano E, Adinolfi LE. Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 48: 399-406.
- 5) Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 2003; 97: 3036-43.
- 6) Castéra L, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003; 52: 288-92.
- 7) Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, Younossi Z, Albrecht J. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 75-85.
- 8) Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997; 78: 1527-31.
- 9) Moriishi K, Matsuura Y. Mechanisms of hepatitis C virus infection. *Antivir Chem Chemother.* 2003; 14: 285-97.
- 10) Pavlović D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6104-8.
- 11) Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 517-23.
- 12) Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;

76: 5974-84.

- 13) Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, Matsuura Y. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007; 81: 8953-66.
- 14) Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-4.
- 15) Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996; 15: 12-22.
- 16) Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605-13.
- 17) Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-4.
- 18) Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-5.
- 19) Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 161-202.
- 20) Woods SC. Role of the endocannabinoid system in regulating cardiovascular and metabolic risk factors. *Am J Med* 2007; 120: S19-25.
- 21) Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie SH, Velásquez DA, Tschöp J, López M, Cadwell CC, Diéguez C, Tschöp MH. The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol Res* 2009; 60: 93-8.
- 22) Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232: 54-61.
- 23) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-9.
- 24) Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89-97.
- 25) Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83-90.
- 26) Parfieniuk A, Flisiak R. Role of cannabinoids in chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6109-14.
- 27) Mallat A, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as novel therapeutic targets for the management of non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 2008; 34: 680-4.
- 28) Caraceni P, Domenicali M, Giannone F, Bernardi M. The role of the endocannabinoid system in liver diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 65-77.

- 29) Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-305.
- 30) Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3160-9.
- 31) Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després JP, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008; 31: S229-40.
- 32) Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G9-G12.
- 33) Fernández-Rodríguez CM, Romero J, Petros TJ, Bradshaw H, Gasalla JM, Gutiérrez ML, Lledó JL, Santander C, Fernández TP, Tomás E, Cacho G, Walker JM. Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 477-83.
- 34) Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. Expression profiles of genes associated with viral entry in HCV-infected human liver. *J Med Virol* 2011; 83: 921-7.
- 35) Fujino T, Nakamuta M, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. Expression profile of lipid metabolism-associated genes in HCV-infected human liver. *Hepatol Res* 2010; 40: 923-9.
- 36) Nakamuta M, Yada R, Fujino T, Yada M, Higuchi N, Tanaka M, Miyazaki M, Kohjima M, Kato M, Yoshimoto T, Harada N, Taketomi A, Maehara Y, Koga M, Nishinakagawa T, Nakashima M, Kotoh K, Enjoji M. Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in the HCV-infected liver: A novel target for therapy? *Int J Mol Med* 2009; 24: 825-8.