

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルスcore蛋白によるNF- κ B pathway 活性化機構

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 吉田英雄

〔研究の背景および目的〕

C型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus, HCV)は我が国において慢性肝炎の主要な原因となっており、慢性肝炎は肝硬変へと進展し最終的には肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)へと至る。しかしながら、HCVの慢性感染における肝発癌の分子生物学的機構は現在ほとんど分かっていない。

HCVの構造蛋白の一つであるcore蛋白は1-191アミノ酸からなり分子量は21kDaである。これまでcore蛋白に関して、アポトーシスや細胞増殖との関与を含む生物学的特性が数多く報告されており、HCV core蛋白がアポトーシスや細胞増殖に関与する細胞内シグナル伝達系に重要かつ様々な役割を担っていることが推測される。

一方、転写因子NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) はRel ファミリーの一員であり、炎症、細胞の分化・増殖、アポトーシス等との関連が深いシグナル伝達系の支配する転写因子として知られている。TNFレセプターからのNF- κ B pathwayは、Ligand がレセプター(TNF Receptor 1, TNFR1) に結合するとレセプターは三量体を形成し、TNFR1には、TNF receptor-associated death domain (TRADD), Receptor interacting protein (RIP), TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) が結合し、TRAF2はNF- κ B-inducing kinase (NIK), MAP kinase/ ERK kinase kinase-1 (MEKK1) を活性化、この両蛋白はIKK kinase (IKK) を、IKKはInhibitory factor kappa B (I κ B) をそれぞれリン酸化により活性化する。リン酸化をうけたI κ Bは分解され、NF- κ Bは細胞質から核内に移行し転写因子として働く。

NF- κ B pathway は多種の刺激、すなわちサイトカイン、各種ウイルス蛋白、T・B cell マイトジェン、紫外線照射、酸化刺激などにより活性化される。また、NF- κ Bは細胞の増殖、活性化に関わる遺伝子を含む多様な遺伝子発現を調節している。すなわち、サイトカイン、増殖因子、転写因子、免疫調節分子などである。

今回、HCV 各蛋白の細胞内シグナル伝達系に対する機能的影響について検討する中で、

core蛋白がNF- κ B pathway を活性化することを見出した。そこで、core蛋白による pathwayの活性化機構について解明を試みた。

【方法】

培養細胞としてヒト子宮頸部癌細胞 (HeLa)、ヒト肝癌細胞(HepG2)、サル腎細胞 (Cos7)を用いた。

HCV RNAはジェノタイプ1bのC型慢性肝炎患者の血清からRT-PCR法を用いて抽出した。HCV core領域 (amino acid 1-191) はRT-PCR法により増幅、増幅産物は制限酵素 *Xho*-Iにより切断し、ベクター pCXN2 (β アクチンプロモーター, CMV エンハンサー) の *Xho*-Iサイトにサブクローニングした。pCXN2-core を鋳型として、一部タグ付きの core蛋白のdeletion mutant (core1-173, HA-1-151, HA-92-191) を発現するプラスミドをpCXN2を用いて作成した。発現ベクターの遺伝子配列およびcore各蛋白の発現を確認した。Tetracyclineの有無でcore蛋白の発現を調節できる細胞 (HeTOC cell) を構築し (Tet-off gene expression regulating system; Tet-off system) core蛋白の発現の有無による細胞内シグナル伝達系への影響を検討した。

Core全長、deletion mutant 1-173,1-151, 92-191の細胞内局在を間接蛍光抗体染色法にて確認した。

NF- κ B pathway 活性化の検出には、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)、ルシフェラーゼアッセイを実施した。EMSAでは、Tet-off systemでcore蛋白の発現を調節したHeTOC細胞の核抽出液を用い、 32 Pで標識した κ B specific oligoをプローブとしてNF- κ B-DNA結合の変化を検討した。ルシフェラーゼアッセイではレポータープラスミドとして、NF- κ B binding siteの下流にLuciferase遺伝子をもつpNF- κ B-Luc を用いた。トランスフェクション効率を内部コントロールを用いて補正した。Core全長、1-173、1-151、92-191をHeLa細胞内でtransientに発現し、NF- κ B pathwayに与える影響を検討した。

IKK α , IKK β , TRAF2, IL-1 β receptorからのNF- κ B活性化に關与するTRAF6, TAK1のcore蛋白によるNF- κ B pathway 活性化における役割を検証するため、それぞれ、dominant negativeとして働く変異体蛋白を発現するプラスミドを共発現しcore蛋白によるNF- κ B pathway活性化に与える影響を調べた。また、IKK β の特異的阻害剤であるアセチルサリチル酸を加え、活性化への影響をみた。

【結果】

HCV core全長、1-173、Tet-off systemにて発現されたcore全長、HA tagのついたHA-core 1-151、HA-core 92-191の発現を、それぞれ抗core抗体、抗HA抗体を用いた Western blotting にて確認できた。

ルシフェラーゼアッセイの結果、HCV core蛋白はHeLa細胞においてNF- κ B pathway をコントロールと比較し、 6.2 ± 3.4 倍活性化した。この活性化はHepG2細胞においても

同様にみとめられた。また、この活性化はcore蛋白の発現量(0~0.8 μ g transfection)により容量依存性に増強した。Tet-off systemを用いて発現を調節した細胞においても、同様の結果を得た。TNF α で活性化状態にあるNF- κ B pathwayに対してはcore蛋白は影響を与えなかった。Coreのdeletion mutantを用いた実験では、C端を欠いたcore1-173, core 1-151, N端を欠いたcore92-191のいずれでも、全長で見られたNF- κ B 活性化を認めなかった。これらのdeletion mutantは免疫染色による細胞内局在の検討の結果、全長は細胞質内に均一に、core1-173は核周囲に、core1-151は核内に、core92-191は細胞質内と核周囲に局在することが確認された。 κ B site を含むIL-8 promoterをレポーターとして用いたアッセイでも、coreによるpathwayの活性化をみとめ、この活性化は κ B siteに変異を入れたreporter plasmidを用いると消失した。

Core蛋白を発現した細胞では、NF- κ B-DNA結合がコントロールと比較し約3倍増強することがEMSAを用いて確認された。

TNF-R1を起点とするNF- κ B pathway上でcore蛋白がどの点に作用するかを調べるためdominant negative formのIKK α , IKK β , TRAF2, TRAF6の各dominant negative form を発現させ、core蛋白によるpathway 活性化に与える影響を調べた。この中でIKK α , IKK β , TRAF2, TRAF6のdominant negative formがcore蛋白による活性化を抑制する働きを示した。IKK α とIKK β を比較すると、IKK α のdominant negativeの方がより顕著に活性化を抑制した。

Core蛋白によるNF- κ B pathway の活性化はIKK β の特異的阻害剤であるアセチルサリチル酸によって抑制された。TNFR1からのNF- κ B pathwayとIL-1 β Rからのpathwayの合流点の、IL-1 β R側の一段階前のTAK1のdominant negative の発現では、この活性化は抑制されなかった。

[考察]

HCV core 蛋白については、これまで、細胞の分化・増殖、アポトーシスなどに関係する機能的役割が報告されてきた。それらの中には core 蛋白の NF- κ B pathway への影響を報告したものも含まれるが、この点ではこれまで、相反する報告がされている。

今回の研究で、C型肝炎ウイルスの core 蛋白が NF- κ B pathway を活性化し得ることが示された。本研究では、複数の細胞で、HCV の産生する他の蛋白および、他のシグナル伝達経路をコントロールとして、活性化機構の解明、Tet-off system による同一クローンでの core 蛋白発現調節を可能とすることにより、この問題に結論をもたらした。NF- κ B pathway の main stream である TNFR1 からの経路上のどの段階で core 蛋白が作用しているかを検証するため、経路上の各蛋白の dominant negative form 及び、特異的阻害剤を用いて活性化に与える影響を検討したところ、core 蛋白の作用点は TRAF2 より上流であろうということ、IKK の構成蛋白である IKK α と IKK β とでは、主に IKK β を介してシグナルが伝達されているということが示された。主に IKK β を介して pathway を活性化するという点では、proinflammatory cytokine による NF- κ B pathway の活性

化を mimic している。

Core 蛋白の deletion mutant を用いた実験から、この活性化には C 端 18 アミノ酸と N 端 91 アミノ酸が必要であることが分かった。N 端の deletion では、core 蛋白は細胞質内の均一な局在から、核周囲あるいは核内に細胞内局在の変化が認められ、細胞膜付近で作用しているという、活性化機構解明の実験の結果と矛盾しない結果が得られた。

これまで、ウイルス蛋白による NF- κ B の活性化については HTLV-1-Tax の I κ B α , IKK γ あるいは MEKK1 への結合、EBV-LMP-1 の TRAF2 あるいは I κ B α への作用、HBV-HBX の I κ B のリン酸化など多様なメカニズムが報告されており、作用点が単一でない可能性も考えられる。今回、HCV core による活性化の作用点は TRAF の上流にあると考えられ、LMP1 と同じか、あるいは既知のメカニズムとは異なった作用で pathway を活性化している可能性が示唆された。

今回の研究の結果と、NF- κ B の活性化が IL-1 や IL-8 等の炎症に関与するサイトカインの発現を誘導することを考え併せると、C 型肝炎ウイルスが炎症性サイトカインの産生を介して直接炎症反応を惹起している可能性が考えられるようになった。HCV core 蛋白と炎症の関係を考えると、将来、core 蛋白が活性化する NF- κ B pathway をブロックすることにより、HCV 感染における炎症の惹起を緩和し、C 型慢性肝炎の治療法に応用できる可能性がある。

NF- κ B pathway を伝わる signal は "survival signal" として知られており、TNF α の誘導する細胞死に対して、抗アポトーシス作用を持つことがわかっている。core 蛋白は NF- κ B pathway の活性化を介して TNF α により誘導されるアポトーシスを抑制している可能性がある。

Core 蛋白は細胞の分化増殖に関与していることも報告されており、ウイルス発癌と NF- κ B との関連を考慮すると、core 蛋白による分化増殖への関与が NF- κ B pathway を介して行われている可能性が考えられた。今回の研究で C 型肝炎ウイルスの発現する core 蛋白が細胞の生と死に強く関わる細胞内シグナル伝達系に影響を与えているという興味深い結果が得られた。この現象がウイルスの持続感染、炎症惹起、さらには肝発癌にどのように関わっているかを今後究明していかなくてはならない。

[結論]

1. C 型肝炎ウイルスの core 蛋白が細胞の分化、増殖、アポトーシスに関与する NF- κ B pathway を、細胞の種類やクローンによらず活性化した。
2. この活性化は TNF α による NF- κ B pathway 活性化に類似しており IKK α より IKK β を主に介して、また、TRAF2 を介して伝達された。
3. 活性化には core 蛋白の C 端 18 アミノ酸および N 端 91 アミノ酸が必要であった。