

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス遺伝子の発現による Fas を介した細胞死抑制機構の動物モデルを用いた解析

指導教官 谷口維紹教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月1日入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 町田圭吾

【本研究の背景と目的】

C型肝炎ウイルス(HCV)はプラス一本鎖 RNA ウイルスで非 A 非 B 型肝炎を発症する。HCV は感染後 80-90%もの高率で持続感染化し、肝硬変、肝癌へと病態が進行する極めて深刻な感染症である。C型肝炎発症を *in vivo* で検証する感染実験動物モデルはチンパンジーに限られており、このことが病原性発現機序に対する研究の進展を遅らせていた。本研究では Cre/*loxP* のスイッチング制御下にある HCV の Core, E1, E2, NS2 遺伝子領域を導入したトランスジェニックマウスを用いて Fas 信号伝達経路に HCV 蛋白質が与える影響について解析した。

これまでに HCV 蛋白質がアポトーシスに影響を与えることが報告されているが、HCV 蛋白質は抗 Fas 抗体や腫瘍壊死因子(TNF- α)誘導性アポトーシスに活性化或いは抑制的に作用するという矛盾した報告があり、HCV 蛋白質が細胞死に与える影響については十分な結論が得られていない。

Fas を介する肝臓細胞傷害は免疫系による肝炎に重要な役割を担っている。Fas リガンド(Fas-L)を細胞膜表面に発現した活性化 T リンパ球が Fas を発現する標的を殺す能力がある事が明らかになっている。Fas 蛋白質(CD95)は三量体であり、Fas-L によって Fas death domain が会合する。FADD と呼ばれるアダプター蛋白質は、Fas death domain に結合する。カスパーゼ 8 が FADD によってリクルートされると、カスパーゼ 8 が活性化される。カスパーゼ 8 は下流のエフェクター・カスパーゼ 3/7 を活性化する。本研究では Cre/*loxP* の系によって HCV の Core, E1, E2, NS2 蛋白質をスイッチング発現するトランスジェニックマウスを用いて Fas 誘導性アポトーシスに HCV 蛋白質が与える

影響について解析した。

【材料と方法】

HCV ジェノタイプ 1b の Core, E1, E2 並びに NS2 を遺伝子導入した Cre/*loxP* スイッチングシステムで制御された 2 系統のトランスジェニックマウス (CN2-8 マウス並びに CN2-29 マウス) に AxCANCre (体内で Cre DNA 組換え酵素を発現するアデノウイルス) 或いは AxCAw1 (Cre を発現しないコントロールアデノウイルス) を静脈内投与し、一定時間で sacrifice して肝臓を取り出し HCV 蛋白質の発現について解析を行った。HCV 蛋白質はトランスジェニックマウスの主に肝臓で一過性に検出された。

AxCANCre 或いは AxCAw1 を投与して 4 日後のマウス(6-10 個体)に、抗 Fas 抗体を $0.14\mu\text{g/g}$ 静脈投与し、24 時間の生死を観察した。さらに、抗 Fas 抗体を投与後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 及び 24 時間後に sacrifice して肝臓を取り出し、組織像の解析並びに生化学的解析を行った (3-5 個体)。

初代肝細胞の細胞膜上での Fas の発現について FACS を用いて解析した。カスパーゼ 8、Bcl-2 ファミリー並びにチトクローム C のウェスタンブロットによる解析、蛍光基質の切断によるカスパーゼ活性の測定、H-E 染色像と免疫組織染色等の解析によって、HCV 蛋白質が Fas 誘導性アポトーシスに与える影響について解析した。

【結果と考察】

HCV トランスジェニックマウスに AxCANCre 或いは AxCAw1 を投与して経日的に sacrifice して肝臓を取った。肝臓中の HCV の Core 蛋白質の定量、血清中の ALT の測定、H-E 染色像の解析と抗 Core 抗体による肝臓切片の免疫染色による結果から、AxCANCre 或いは AxCAw1 投与後 4 日目のマウスを抗 Fas 抗体の投与実験に用いて、Fas 誘導性アポトーシスに対する HCV 蛋白質の影響について解析した。

AxCAw1 を投与後 4 日目の CN2-8 マウスに $0.14\mu\text{g/g}$ の抗 Fas 抗体を投与すると、24 時間後に 50%(3/6)が死亡した。それに対して、AxCANCre を投与して HCV 蛋白質を発現させた CN2-8 マウスは抗 Fas 抗体投与後 24 時間経っても 100%(6/6)が生き残っていた。トランスジーンのインテグレーションサイトの異なる CN2-29 マウスについても同様の解析を行った。AxCAw1 を

投与した CN2-29 マウス 10 匹に抗 Fas 抗体 $0.14\mu\text{g/g}$ を投与して、24 時間の生存時間を観察した結果、50%が死亡したのに対して、AxCANCre を投与して HCV 蛋白質を発現させた CN2-29 マウスの 80%が Fas 抗体投与後生き残った(N=10)。従って、少なくとも 2つの系統で、HCV 蛋白質によって、Fas 誘導性肝細胞破壊に起因するマウス個体の死亡率が低下した。トランスジーンを持っていないマウスに同様の実験を行った結果、AxCANCre を投与した場合でも AxCAw1 を投与した場合でも 50%の死亡率を示したことからアデノウイルスの影響ではないことが示された。

抗 Fas 抗体を投与したマウスの肝細胞では核の凝集や断片化が観察され、アポトーシス様の細胞死を呈していた。HCV 蛋白質の発現したマウスの肝細胞中で核の凝集や断片化が観察された細胞の割合は、抗 Fas 抗体投与後 3 時間後後有意に少なかった。HCV 蛋白質の発現によって DNA の断片化は減弱していたことから、HCV 蛋白質は抗 Fas 抗体による肝細胞のアポトーシスの進行を抑えるということが明らかになった。

HCV 蛋白質の発現の有無に関わらず、抗 Fas 抗体投与後 1 時間以内に活性化カスパーゼ 8 の p18 サブユニットがウェスタンプロットで出現したことから、カスパーゼ 8 の初期の活性化には影響を与えていないことが示唆された。

カスパーゼ 8, 9, 3/7 の基質切断活性を解析するために、蛍光基質を用いて生化学的な解析を行った結果、抗 Fas 抗体投与後 1 時間以内にカスパーゼ 8 は HCV の有無に関わらず活性化されていたが、HCV 蛋白質の発現がない場合には一過性に活性が消失したのに対して、HCV 蛋白質の発現が有ると、活性が消失せずに少なくとも 4 時間後までは持続していた。ところが、カスパーゼ 3/7 並びにカスパーゼ 9 の活性化は抗 Fas 抗体投与後 3 時間後や 4 時間後で HCV 蛋白質が発現している肝臓組織で HCV を発現していない場合に比較して抑えられていた。

HCV 蛋白質の発現による Fas 誘導性アポトーシスの抑制機構についてさらに検討するために、ミトコンドリアに局在してアポトーシスによる細胞死に強く関与している Bcl-2 ファミリー蛋白質の発現レベルを解析した。Bid, Bcl-X_L, Bcl-2, Bad 等の Bcl-2 ファミリーの蛋白質レベルでの解析では、HCV の発現の有無で大きな違いは認められなかった。

HCV によるカスパーゼ 3/7 並びに Apaf-1/カスパーゼ 9 活性化抑制機構を明らかにするために、チトクローム C の分布パターンを免疫染色によって解析

した。HCV タンパク質が発現していない肝臓細胞の細胞質中での抗チトクロームC抗体による染色像は、Fas 抗体刺激前に比べて細胞全体に渡って強く染色像が認められたのに対して、HCV 蛋白質が発現があると Fas 抗体投与後 4 時間経っても細胞質に染色像が認められた細胞は一部に限られており、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出が HCV 蛋白質が発現によって抑えられていることが示唆された。さらにウェスタンブロットによる解析でも HCV 蛋白質が発現していると HCV 蛋白質が発現していない場合に比べて Fas 抗体投与後 3 時間、4 時間で、細胞質へのチトクロームCの放出が抑えられており、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出が HCV 蛋白質の発現によって抑えられていたことが明らかになった。

HCV 蛋白質はミトコンドリアから細胞質へのチトクロームCの放出を抑え、チトクロームC/Apaf-1/カスパーゼ9のシグナル増強経路を抑制し、エフェクター・カスパーゼ3/7の活性化を抑えたために、肝細胞のアポトーシスが抑えられ、抗Fas抗体投与によるマウスの致死率が低下したことが示唆された。

HCV 蛋白質はCTL/Fasレセプターを介したアポトーシスを抑制することにより、CTLによる感染細胞の排除機構を抑え、持続感染化している可能性が示唆された。

アポトーシス信号伝達におけるHCVの機能をさらに解析する事によって、HCVの病原性発現の分子機構或いはHCVによる持続感染成立機序がさらに解明できるだけでなく、アポトーシスの分子機構を更に明らかにできる可能性がある。

【結論】

1. HCV 蛋白質の発現によって抗 Fas 抗体の投与によるマウス個体の死亡率が低下した。
2. HCV 蛋白質の発現によって肝細胞の Fas 誘導性アポトーシスが抑えられた。
3. HCV 蛋白質の発現によってカスパーゼ8の活性化には影響を与えなかったが、ミトコンドリアからの細胞質へのチトクロームCの放出が抑えられ、カスパーゼ3/7とカスパーゼ9の活性化が抑えられた。
4. 本研究の結果から、生体が本来持つ CTL/Fas を介したウイルス感染細胞の排除機構を HCV が抑制する可能性が示唆された。