

審査の結果の要旨

氏名 町田圭吾

本研究では Cre/loxP のスイッチング制御下にある C 型肝炎ウイルス(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の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HCV 蛋白質を、Cre/loxP のスイッチング制御によってトランスジェニックマウスの主に肝臓で一過性に発現させることで、*in vivo*での HCV 蛋白質のコンディショナル発現によるアポトーシス信号伝達経路の修飾作用について解析する事を可能にした。
2. HCV 蛋白質の発現によって抗 Fas 抗体の投与に対して Fas 誘導性肝細胞破壊に起因するマウス個体の死亡率が少なくとも 2つの系統で低下した。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、組み換え酵素 Cre を発現するアデノウイルス (AxCANCre) を投与した場合でもコントロール非発現アデノウイルス (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。
3. 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。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 時間後で有意に少なかった。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示された。
4. 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ブ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上昇した後、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。

5. 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 (Bid, Bcl-X_L, Bcl-2, Bad, Bax) 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。

6. 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、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、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示された。

これにより、HCV 蛋白質が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 のシグナル伝達経路を抑制し、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。

以上本研究は、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 が抑制する可能性を示唆し、HCV の病原性発現機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。