

論文の内容の要旨

論文題目 Establishment and Characterization of A Human Hepatoma
Cell Line Expressing Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins

(C型肝炎ウイルス非構造蛋白のヒト培養肝癌細胞での発現及び解析)

氏名： 黄 瑛

C型肝炎ウイルス(HCV)は、非A非B型肝炎の最大の原因ウイルスであり、ウイルスゲノムには9,500塩基のプラス1本鎖RNAからなるオープンリーディングフレーム(ORF, open reading frame)が存在し、そこから約3,010アミノ酸からなる前駆体蛋白質が生成する。個々の構造蛋白質と非構造蛋白質(Nonstructural Protein, NS)は、この大きな前駆体蛋白質からそれぞれプロセッシングされて産生される。また、非構造蛋白質はプロテアーゼ、ヘリカーゼ活性(NS3)とRNAポリメラーゼ活性(NS5B)を有することが示されており、遺伝子複製に中心的な役割を果たすと考えられる。ウイルス阻害剤の開発においては、これらのHCVの複製に重要な非構造蛋白質の機能的発現法が開発されていないことが大きな障壁になっている。本研究は、テトラサイクリン(Tet)で誘導されるヒト培養肝癌細胞(HepG2)を用いて、HCV非構造蛋白質を機能的に発現する系を樹立することを目的とした。

まず野性型培養肝癌細胞(HepG2)を用いてテトラサイクリンで誘導される

細胞系(HY-Toff と HY-Ton)を作製した。HY-Toff 細胞ではテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン(Dox)の存在下で目的遺伝子の発現がほとんど抑制された。Dox の非存在下では、目的遺伝子の発現が Dox 存在下にくらべほぼ 300 倍の誘導倍率が得られた。同様に、HY-Ton 細胞は Dox の存在下で 50 倍の誘導倍率が得られた。この結果は HY-Toff と HY-Ton 細胞系が高い誘導レベルを持ち、目的遺伝子発現を正確に調節することのできる、特に細胞毒性遺伝子の発現に有効な、安定的な細胞系であることを示している。

双方向性テトラサイクリン誘導ベクターは、Tet オペレーター配列を含むテトラサイクリン応答因子(TRE)と、それに隣接する CMV プロモーターが逆方向に 2 箇所含まれている。今回この双方向性ベクターを用いて、HCV 非構造蛋白質と Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) の 2 種類の遺伝子を同時に発現できるようにコンストラクトを構築し、HY-Toff 細胞に導入した。抗生物質で選択した 48 クローン中最も蛍光の強いクローン(HY-Toff-NS)は、全長の NS mRNA と蛋白質が大量に発現していることを認めた。Dox の非存在下で、NS3, NS4A, NS5A および NS5B の発現をイムノプロットと免疫蛍光染色により確認した。この結果は、細胞内転写、翻訳が行われ、ウイルス自身がコードするプロテアーゼによってプロセッシングされた蛋白質が生成されることを示している。

この C 型肝炎ウイルス非構造蛋白質を発現する細胞系(HY-Toff-NS)は現在まで約 8 が月培養されており、しかも細胞の形は正常なままである。プロテアーゼ阻害剤 N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN) は NS3 蛋白質のデグラデーションを抑制することが分かったが、プロテアソーム阻害剤 N-Acetyl-L-Cysteine (Lactacystin) と cathepsin B 阻害剤 L-Isoleucyl-L-Proline (CA-074) はこの影響が見られなかった。この結果より、NS3 蛋白質のデグラデーションにはプロテアソームや cathepsin B 以外の経路が重要と考えられる。

C 型肝炎は高率に肝癌を併発することが知られており、HCV による肝癌

発症機構の解析は治療や予防法を開発する上で重要である。このため上記の機能的なウイルス蛋白質発現が樹立された細胞を用いて、HCV NS 蛋白質の発現によるトランスクリプトームプロファイルの変化を調べた。HY-Toff-NS 細胞を用いて Dox 存在下および非存在下で RNA を調整し、DNA マイクロアレイにより mRNA 発現プロファイルを解析した。NS 蛋白質発現により、細胞増殖や代謝関連の遺伝子が比較的強く誘導され、特にウイルス感染と発がんに関する遺伝子、例えば、alpha- antitrypsin, C-src tyrosin kinase, mammalian suppressor of sv-1(MSS1), と cytochrome P450 等の発現レベルが明らかに増加した。

これまで述べてきた結果より、HCV 非構造蛋白質を発現するテトラサイクリンにより誘導されるヒト培養肝癌細胞系の樹立は、HCV 蛋白質のプロセッシングや成熟機構および複製機構の解明といった基礎研究面だけでなく、治療薬の開発やスクリーニングなどにも寄与できるものと思われる。