

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス core 蛋白は TGF- β 1 の転写を活性化する

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 谷口 博順

[研究の背景および目的]

C型肝炎ウイルス (HCV) に感染した患者は多くが慢性の感染へと移行し、慢性肝炎、肝硬変へと進展する。また肝細胞癌の主要な原因ともなりえる。

HCV RNA は約 10 kb の遺伝子からなり、約 3,000 アミノ酸からなる1つのポリペプチドをコードしており、宿主およびウイルスのプロテアーゼにより、4 つの構造蛋白 (core, E1, E2, p7) と 6 つの非構造蛋白が作られる。近年 HCV が産生する各蛋白が細胞内情報伝達に及ぼす影響に関する報告(HCV core 蛋白による Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の系, nuclear factor κ B (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1), serum responsive element (SRE), p53 の活性化など)が散見される。

一方、慢性肝炎、肝硬変患者で血漿 Transforming growth factor (TGF) - β 1 濃度が上昇することが知られている。TGF- β 1 は一般に細胞増殖において重要なサイトカインであるとされているが、同時に肝星細胞の活性化、コラーゲン産生の亢進などの作用を介して、肝線維化を促進するとされている。現在までに B型肝炎ウイルス (HBV) 蛋白である HBx が TGF- β の系を活性化し、Smad4 と直接結合することについては詳細な報告がなされているが、それに対し HCV 蛋白が TGF- β 1 の産生調節機構についていかなる影響を及ぼすかについては検討はほとんど行われていない。

そこで、今回肝細胞内に持続的に発現され、宿主細胞に様々な影響をあたえる HCV 蛋白が、TGF- β 1 の転写調節に関わるか否かを検討した。HCV 蛋白に加え、5種類の B型肝炎ウイルス蛋白、2種類の D型肝炎ウイルス蛋白の影響についても同時に検討した。

[方法]

ヒト肝芽腫細胞株 HepG2 を用いて検討を行った。

TGF- β 1 のプロモーター領域に CAT 遺伝子が連結したレポータープラスミド pHTG2 を用いて、HBV 蛋白 5 種類 (precore, core, surface, preS2, X)、HCV 蛋白 8 種類 (core, E1, E2/p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)、D 型肝炎ウイルス蛋白 2 種類 (δ -small, δ -large)、計 15 種類を発現するプラスミドとトランスフェクションし、TGF- β 1 プロモーターに対する肝炎ウイルス蛋白の影響を CAT assay にて検討した。その後 TGF- β 1 のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子が連結したレポータープラスミドを作成した上で解析を行った。

実際に TGF- β 1 mRNA の転写が活性化されているかにつき、HCV core 蛋白発現プラスミドをトランスフェクションした細胞より total RNA を抽出し、RNase プロテクションアッセイを用いて検討した。

また TGF- β 1 のプロモーターのいずれの領域が HCV core 蛋白による転写の活性化に関与するかについて塩基配列から予測される転写因子結合部位の前後で 7 種類の deletion mutants (TGF- β 1 プロモーターの-847、-745、-517、-440、-376、-331、-310 から+11 までの配列をもつレポータープラスミド) を作成、HCV core 蛋白側の活性化に必要な部位についても C 端側の deletion mutants 2 種類 (HCV core-173aa, HCV core-151aa) を発現するプラスミドを作成し、検討した。

HCV core 蛋白が活性化する MAPK や NF- κ B などの系が、HCV core 蛋白による TGF- β 1 の活性化にも関与していないか検討するため、mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1 (MEK1) の阻害剤 (PD98059, U0126)、p38 の阻害剤 (SB203580)、I κ B α のスーパーリプレッサーである I κ B α (SS32/36AA) を加えてルシフェラーゼアッセイにて検討した。

TGF- β 1 プロモーターの deletion による検討で-376 から-331 の領域が HCV core 蛋白の TGF- β 1 プロモーター活性化に重要であると考えられたため、TGF- β 1 プロモーターの-398 ~-354、-376~-336、-352~-304 の配列を持つ二本鎖のプローブを構築、pCXN2 または pCXN2-core をトランスフェクションした HepG2 細胞から核抽出物を精製、Gel Shift Assay にて検討した。

RNase プロテクションアッセイ とゲルシフトアッセイ においては pCXN2/pCXN2 core

と同時に細胞表面マーカーH2-K^k発現プラスミドをトランスフェクションし、H-2K^kに対するモノクローナル抗体を用い、トランスフェクションされた細胞を磁氣的に選別、濃縮した上でRNA抽出を核蛋白の抽出を行い検討した。

[結果]

15種類の肝炎ウイルス蛋白のうちHBx蛋白、HCV core蛋白のみがTGF-β1プロモーターをそれぞれ1.63倍、2.4倍まで活性化した。HCV core蛋白は用量依存的にTGF-β1プロモーターを活性化した。

RNaseプロテクションアッセイではHCV core蛋白の発現により約1.5倍のTGF-β1 mRNAの上昇が認められた。

TGF-β1のプロモーター領域を-376まで欠いてもTGF-β1の活性化に有意な変化は認められなかったが、-331まで欠いたところHCV core蛋白による活性化は有意に低下した。promoterの-376から-331が活性化に重要と考えられた。

またHCV core蛋白のC型truncated formであるHCV core (173アミノ酸)ではコントロールと比較して1.84±0.05倍の活性化が見られたものの、HCV core (151アミノ酸)では有意な活性化は見られなかった。

MEK1の阻害剤はいずれも有意にTGF-β1プロモーターの活性化を抑制したことから、HCV core蛋白によるTGF-β1の転写活性化に影響を及ぼさなかった。

ゲルシフトアッセイでは3種類のプローブのうち-398から-354の配列をもつプローブを用いたときのみDNAと結合した核蛋白のバンドが観察された。HCV core蛋白の発現によりこのDNA-蛋白複合体は増加した。この複合体のバンドは100倍量の非標識specific competitorを加えることで減弱した。MEK1の阻害剤がHCV core蛋白によるTGF-β1の活性化を抑制したことから考え、MAPKの下流の核蛋白に対する様々な抗体(anti-pan-Jun, anti-pan-Fos, anti-c-Jun, anti-c-Fos, anti-Ets-1, anti-Ets-1/Ets-2, anti-Sap-Ia, anti-SRF)を加えたが、supershiftはみとめられなかった。

[考察]

HCV に感染している患者の多くは次第に肝線維化が進行する。TGF- β 1 は肝星細胞を活性化、コラーゲン合成亢進により肝線維化を促進するとされており、近年コラーゲンや星細胞の活性化については多くの研究が見られるが、TGF- β 1 自体の発現調節についてはあまり検討されていない。

今回我々の検討では HCV core 蛋白が TGF- β 1 プロモーターを活性化し、TGF- β 1 mRNA の発現も増強するという結果を得た。ゲルシフトアッセイによる検討ではプロモーター領域の一部に核内蛋白が結合し、HCV core 蛋白の発現でこの核内蛋白とプロモーターの結合が増強されることが判明した。

また MEK1 の阻害剤が有意に TGF- β 1 プロモーターの活性化を減弱していることから HCV core 蛋白は MEK1 の活性化を介して TGF- β 1 を活性化すると考えられ、この知見は HCV core 蛋白が MAPK の系を活性化するという知見とも合致している。

全長の HCV core 蛋白(191 アミノ酸)はおもに細胞質に存在し、core 蛋白 (173 アミノ酸) は核周囲に、core 蛋白(151 アミノ酸)は核内に存在すると我々は報告してきたが、今回の検討では細胞質に存在するタイプの HCV core 蛋白のみが TGF- β 1 promoter を活性化しており、HCV core 蛋白が細胞質にある MEK1 を介して TGF- β 1 promoter を活性化するという推論と矛盾しない。

肝においては TGF- β 1 は主に免疫・炎症により活性化された Kupffer 細胞や星細胞から分泌されるといわれているが、肝実質細胞も TGF- β 1 を放出し、肝星細胞にパラクラインに作用して活性化させるという報告がある。よって HCV に感染した実質細胞が TGF- β 1 を産生、分泌、星細胞を活性化しコラーゲン産生を促進させるなどの機序で線維化の促進に働く可能性がある。我々は HCV 蛋白が免疫、炎症を介さずに直接的に肝線維化を誘導する可能性を新たに提議している。