

論文の内容の要旨

論文題目 インターフェロン生化学的著効例における C 型肝炎ウイルスコア蛋白に関する検討

指導教官 小俣政男

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 星田有人

[研究の背景および目的]

C型肝炎ウイルス (HCV) 慢性感染は血清 alanine aminotransferase (ALT) 値の上昇に代表される肝細胞炎症を惹起し、その持続により肝線維化を進行させ肝細胞癌のリスクを増加させる。一方、持続するウイルス血症にも関わらず血清 ALT 値が正常である無症候性キャリアが存在する。

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン (IFN) 治療後に無症候性キャリアと同様の状態を示す生化学的著効 (BR) 例が認められる。BR は体内に存在する複数の HCV クローン (quasispecies) の中で、肝炎を惹起する力が強いクローンから弱いクローンへの交代が生じている状態であると推察される。IFN 治療前後で宿主側に変化が生じるとは考えにくいことから、肝細胞炎症が認められる状態でドミナントな HCV クローンと、BR の状態でドミナントな HCV クローンを比較することにより、肝細胞炎症の惹起に関与する HCV の特徴を明らかにできる可能性があると考えられる。

C 型肝炎と炎症性サイトカインの関連は複数報告されているが、我々が BR 症例および IFN 無効例の血清サイトカイン濃度 (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) を測定したところ、BR 症例において ALT 正常化に伴い IL-8 が低下していることが明らかとなり、IL-8 と血清 ALT 値、すなわち肝炎の重症度との相関が示唆された。

一方、HCV 蛋白であるコア、NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 蛋白による、5 つのシスエレメント、nuclear factor kappa B (NF- κ B), CRE, SRE, AP-1, SRF の活性化能のスクリーニングを行ったところ、HCV コアは NF- κ B 経路を最も強く活性化し、NF- κ B サイトをプロモーターに持つ IL-8 遺伝子の発現を増強することが明らかになっている。

以上から HCV コアが IL-8 活性化を介して、肝炎惹起に関与する可能性が示唆される。HCV コア (191 アミノ酸)は 1-122、123-174、175-191 残基の 3 つのドメインに分けられる。C 末端疎水性領域であるドメイン 3 の欠失により細胞内局在が変化し NF- κ B 活性化は消失する。

本研究では、BR 症例および NR 症例の IFN 治療前後の血清から得られた HCV コアのアミノ酸配列、IL-8 活性化能を検討した。

[方法]

HCV ジェノタイプ 1b 型単独感染による慢性肝炎に対する IFN 治療にて、BR を示した 10 例 (BR1~10、男:女=4:6)、無効であった 10 例 (non-response, NR1~10、男:女=5:5) の治療前後の血清を採取した。全例で IFN 投与前に、経皮的肝生検を施行した。IFN 治療前後の血清 IL-8 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay にて測定した。血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて、HCV コア領域の cDNA を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。更に症例 BR1~6、NR1~5、9 の PCR 産物を GATEWAY cloning system を用いて、CAG プロモーターを持つ哺乳細胞発現プラスミドベクター pCXN2 にサブクローニングし HCV コア発現プラスミド pCXN2-core を構築した。すべての症例で少なくとも 5 クローンのシーケンスを行い、ダイレクトシーケンスで得られた配列が主要なクローンであることを確認した。HCV コアの蛋白発現は抗 HCV コア・モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法にて検出した。

各 pCXN2-core を肝癌細胞 Huh7 にトランスフェクションし、IL-8 誘導能について検討した。IL-8 誘導の検出には、IL-8 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を持つ IL-8-Luc およびその 3 つの転写調節領域、NF- κ B、AP-1、NF-IL6 サイトにそれぞれ変異を持つ IL-8- Δ NF- κ B、IL-8- Δ AP-1、IL-8- Δ NF-IL6 を用いたルシフェラーゼアッセイを用いた。トランスフェクション効率は内部コントロールを用いて補正した。各 pCXN2-core をトランスフェクションした Huh7 細胞を用いた免疫蛍光染色にて HCV コアの細胞内局在を確認した。

[結果]

BR 群、NR 群間で、性 ($p = 0.50$)、年齢 ($p = 0.25$)、IFN 投与前の血清 ALT 値 ($p = 0.15$)、IL-8 値 ($p = 0.89$)、IFN 投与量 ($p = 0.67$)、組織学的な肝線維化の進行度 ($p = 0.17$) に有意差を認めなかったが、F3 の症例は、BR 群 (1 例) に比し NR 群 (3 例) で多い傾向にあった ($p = 0.58$)。BR 群では IFN 治療後に血清 IL-8 濃度が有意に低下していたが ($p = 0.04$)、NR 群においては有意差を認めなかった ($p = 0.59$)。血清ウイルス量は NR 群に比し BR 群で高値であった (治療前: $p = 0.004$ 、治療後: $p = 0.04$)。各群内での IFN 前後のウイルス量は BR 群 ($p = 0.11$)、NR 群 ($p = 0.18$) とも有意差を認めなかった。症例 BR1 においては、IFN 終了後 2 年の時点で 血清 ALT 110 IU/l、IL-8 150 pg/ml に再上昇していた。

BR 群では全例で IFN 治療前後の主要クローンのアミノ酸配列が異なっているのに対し、

NR 群では 5 例で同一であった。BR 群においては C 末端疎水性領域であるドメイン 2,3 にアミノ酸残基の相違が多く認められた。症例 BR1 において肝炎再燃時の主要なクローンのアミノ酸配列は IFN 治療前と同一であった。

症例 BR1~6 および NR1~5,9 から得られた HCV コアをサブクローニングした pCXN2-core を Huh7 細胞にトランスフェクションし、各症例において IFN 治療前後で、蛋白発現量に明らかな相違がないことを確認した。BR 群では、ALT 上昇時に比し ALT 正常化時の HCV コアによる IL-8 活性化が低かった ($p = 0.04$)、NR 群においては有意差を認めなかった ($p = 0.17$)。IL-8 の転写活性化は IL-8- Δ NF- κ B を用いた際に減弱し、NF- κ B サイトを介したものであることが示されたが、各クローン間で明らかな相違を認めなかった。

BR1~3 の pCXN2-core において、C 末端 69 アミノ酸を IFN 治療前後で置換した pCXN2-core を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行ったが、C 末端 69 アミノ酸のみによる IL-8 転写活性化への寄与は認められなかった。BR2 の ALT 正常化時の HCV コアを鋳型とし、C 末端疎水性領域の 3 アミノ酸残基を 1 つずつ ALT 上昇時のクローンと同じ残基に改変した pCXN2-core (BR2-W156R, BR2-T170P, BR2-T187I) を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行ったが、いずれも ALT 上昇時のクローンと同程度の IL-8 活性化は示さなかった。

間接免疫蛍光染色では、HCV コアは IFN 治療前後とも細胞質に局在しており、差異を認めなかった。

[考察]

C 型慢性肝炎の病態は、ウイルス側および宿主側の因子間の複雑な相互作用により成立していると考えられる。免疫機能は宿主側の主要な因子であるが、その個体差が症例間の比較を困難にしている。本研究においては同一症例内での比較を行うことにより、個体差の影響を排除することを試みた。

我々の検討では IL-8 は BR 症例の血清で ALT 正常化時に低下していた。また既報の臨床研究においても C 型肝炎の重症度と IL-8 の相関が報告されている。我々の教室の過去の検討では、HCV コアは C 末端疎水性領域による細胞内局在の制御のもとに NF- κ B 経路を活性化し、IL-8 を誘導する。以上から HCV コアは IL-8 活性化を介し C 型肝炎における肝細胞炎症の惹起に何らかの関与を持つことが示唆される。

本研究においては、BR 症例の ALT 上昇時、正常化時の間で HCV コア主要クローンの C 末端疎水性領域アミノ酸残基に相違が多く認められた。また明瞭ではないが ALT 上昇時、正常化時の間で、HCV コアによる IL-8 転写活性化能に相違があることが示唆された。HCV コアの C 末端側が NF- κ B 活性化に重要であるという過去の検討による知見を基に、BR 症例における HCV コア C 末端のアミノ酸残基の相違と IL-8 活性化の関連を検討したが、明らかな関与は認められなかった。

本研究においては、HCV コア領域の増幅のために、変異が集積する傾向にあるエンベロープ蛋白のコード領域に PCR プライマーを設定しており、また発現解析にはサブクローニング可能であったクローンのみを用いているため、クローンの選択バイアスが存在する可能性が考えられる。

近年 NS5A 蛋白による IL-8 誘導なども報告されており、HCV コアによる肝炎惹起への寄与は部分的なものと考えられる。しかし IL-8 誘導能を変化させる HCV コアのアミノ酸残基、もしくはその組み合わせを明らかにすることができれば、C 型肝炎惹起のメカニズムの一部を説明できるかもしれない。今後、他のウイルス蛋白や非翻訳領域も含めて検討する必要があると考えられる。

[結論]

1. C 型慢性肝炎に対する IFN 治療後、ウイルス血症の持続にも関わらず血清 ALT 値の正常化が認められた生化学的著効例では、ALT 正常化に伴い血清 IL-8 値が低下していた。
2. 生化学的著効例では ALT 上昇時、正常化時の間で HCV コア主要クローンの C 末端疎水性領域のアミノ酸配列に相違が多く認められた。
3. 生化学的著効例の ALT 上昇時、正常化時の間で HCV コアによる IL-8 活性化能が異なることが示唆されたが、明瞭なものではなかった。
4. HCV コアの C 末端疎水性領域のアミノ酸配列の相違と IL-8 活性化能の差異との関連は明らかではなかった。