

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻
平成 15 年度博士課程入学
氏 名：高野 貴士
指導教員名：甲斐 知恵子

論文題目

Characterization of the host factors concerning with the hepatocarcinogenesis upregulated by hepatitis C virus

(C 型肝炎ウイルスによる腫瘍原性亢進に関連する宿主因子の解析)

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は世界で 1 億 7 千万人、我が国においても 200 万人以上の感染者があると推定されている。HCV に感染するとウイルスが肝細胞に持続感染し、慢性肝炎を起こす。その後、肝硬変へ移行し、20~30 年という長い経過を経て高率に肝癌へと進行することが知られている。日本での肝癌による死亡者数は、男性で 3 位、女性で 4 位と男女ともに高位に位置する疾患である。肝癌患者の約 70%は HCV 陽性と言われており、感染者が多いことから社会的にも大きな問題となっている。

HCV は *in vitro* 及び *in vivo* での感染系が近年まで十分に確立しておらず、感染が成立する実験動物もチンパンジーのみであったため、感染実験が困難であったため、HCV 感染による病態は不明な部分が多く残されていた。しかし、近年になり *in vitro* での感染系が確立し、さらに、マウス体内の肝臓をヒトの肝臓細胞に置換可能なキメラマウスも開発され、今後 HCV の解明は急速に進展することが期待される。

我々は、HCV 感染系が確立していなかったため細胞内で HCV 全長遺伝子を発現させる事により擬似的に HCV 持続感染状態にした細胞 (M6 細胞) を樹立して宿主因子の動態を調べてきた。本研究では、HCV 感染症及び HCV による肝癌への治療薬開発への基盤研究として、M6 細胞を用いて HCV 遺伝子発現により変動する宿主因子を新たに同定し、それら宿主因子を解析して腫瘍化機構の解明及び HCV 複製機構の解明を試みた。

第1章：C型肝炎ウイルス関連抗原の探索および抗体の樹立

任意の時期に細胞内で全長 HCV 遺伝子を発現可能なスイッチングシステムを組み込んだ M6 細胞は、HCV 遺伝子発現後、44 日以上継代すると腫瘍原性が亢進することを見いだしている。この 44 日以上継代して、腫瘍原性が亢進した細胞をマウスに免疫し、複数のモノクローナル抗体を得た。これら複数のクローンのうち、HCV 遺伝子発現前後で発現量が変化する分子を認識するクローン 243a と 433d を得た。これら抗体が認識する分子の発現様式を検討した結果、243a 抗体は約 70 キロダルトン (kDa.) 分子 (P70) を、433d 抗体は約 30kDa. の分子 (P30) を認識していた。また、これら分子は HCV 非発現細胞と比べて HCV 遺伝子発現後 8 日目から発現量が上昇し、腫瘍原性が亢進した 48 日目でも高い発現量を示した。さらに、HCV 陽性患者の癌部組織を用いてこれら分子の発現量を検討した結果、非癌部組織と比較して P70 では全体の 6 割、P30 は全体の 8 割で発現が上昇していた。以上の結果より、HCV 発現により発現量が変動する分子 P70 と P30 の存在が明らかになった。また、P30 は HCV 陽性患者の癌部組織の 8 割で上昇していることから HCV による腫瘍化機構により強く関与している可能性が推察された。

第2章：C型肝炎ウイルス関連分子 P70 の解析

第1章で樹立した HCV によって発現量が上昇する分子 P70 を認識する抗体を用いて抗体カラム作成後、細胞のライセートから P70 分子を抽出し、MALDI-TOF-MS 解析を行い、P70 が translocase outer mitochondrial membrane 70 (TOM70) であると同定した。次に、TOM70 過剰発現状態の細胞の増殖特性をアポトーシス感受性、細胞増殖能を指標にして検討した。TOM70 過剰発現細胞に対し、TNF- α を処理したところ、TOM70 過剰発現細胞ではコントロールと比較してアポトーシス感受性が低下した。次いで、細胞増殖能への効果を検討したところ、p53 遺伝子が不活化された細胞に過剰発現しても変化は見られなかったが、p53 遺伝子不活化細胞に TOM70 発現プラスミドと共に p53 発現プラスミドをトランスフェクションして p53 遺伝子を活性化すると細胞増殖能が増加した。以上の知見から、正常な肝細胞では TOM70 過剰発現は細胞の腫瘍原性亢進に寄与する事が示唆された。

次に、RNAi を用いて TOM70 発現低下の細胞増殖への影響を検討した。市販されている siRNA 作成キットを使用して、TOM70 遺伝子上に設定した領域に対する siRNA を作成して実験を行った。siRNA をトランスフェクション後、48 時間で TOM70 の発現抑制が確認された。また、それと同時に細胞死が観察された。そこで、この細胞死が TOM70siRNA により特異的に誘導されるか確認するために、前述とは異なる領域を使用して再度 siRNA を作成した (前者との相同性は 45%)。そして、同様に実験を行った結果、前述の siRNA を使用した時と同様の結果が得られた。そこで、このアポトーシス実行経路を解明するためにカスパーゼ活性を検討した結果、カスパーゼ 3 又は 7 の活性上昇が確認されたが、カスパーゼ 8 及び 9 は活性化していなかった。さらに、カスパーゼ 12 が活性化していることを見いだした。これまでの知見からカスパーゼ 12 は小胞体ストレスにより誘導されること

が知られているが、TOM70 発現抑制時は GRP78 蛋白の発現上昇が見られないため、小胞体ストレスは起きていないことが示唆された。以上の知見より TOM70 によるカスパーゼ 12 活性化経路は小胞体ストレスを介さない新たな経路によるカスパーゼ 12 活性化経路を経ている事が示唆された。

第3章：C型肝炎ウイルス関連分子 P30 の解析

第2章と同様の手順で抗体カラム作成後、P30 分子を抽出して MALDI-TOF-MS 解析を行い、P30 が NADH-cytochrome b5 reductase (CYB5R) であることを同定した。CYB5R に対しても同様な手法で腫瘍細胞の特徴を獲得するか検討した。CYB5R 過剰発現細胞は Fas 誘導性アポトーシスに抵抗性を示した。本結果から CYB5R は TOM70 とは異なる経路に影響を及ぼすことが推察された。また、細胞増殖能に対する CYB5R 過剰発現の影響も、p53 遺伝子活性化時に増殖能が亢進している事を見いだした。

次に CYB5R と HCV との関係を検討するために、HCV 遺伝子の NS 領域とルシフェラーゼ遺伝子を組込んで HCV の複製活性を定量可能なレプリコン細胞を用いて、ルシフェラーゼの発光量により HCV 複製能を検討した。レプリコン細胞を CYB5R 過剰発現状態時のウイルス複製能は 1.3~1.6 倍に上昇した。しかし、western blotting (WB) では HCV 蛋白発現量の変化を検出出来なかった。一方、siRNA により CYB5R を発現抑制し、ウイルス複製能を検討した結果、約 10%程度まで減少した。WB でも HCV 蛋白発現量の減少していた。

以上の結果から、CYB5R 過剰発現はアポトーシス感受性の低下、細胞増殖能亢進といった腫瘍原性亢進を誘導した。また、過剰発現によりウイルス複製能の上昇、抑制によりウイルス複製能の減少を示した。本知見より、CYB5R が HCV による腫瘍化及びウイルス複製に関与する分子であることが推察された。

第4章：C型肝炎ウイルス関連分子 DHCR24 及び DHCR24 抗体の検討

第1章で樹立された複数の抗体の中に DHCR24 に対する抗体が存在していた。本分子は HCV 陽性患者癌部組織の全症例で非癌部より発現量が亢進している事が確認されている。本知見より DHCR24 と本抗体が HCV と密接な関連があることが推察されたので、様々な細胞株での DHCR24 の発現様式及び、本抗体による HCV への影響を検討した。肝細胞由来株 (3 種)、肝癌由来株 (4 種)、非肝臓由来株 (HEK293、HeLa 細胞) を用いて各細胞株での DHCR24 の発現量を比較した結果、肝癌由来細胞株及び HeLa 細胞 (子宮頸癌由来) の癌由来細胞株で発現量の上昇が見られた。次にフローサイトメトリーにより細胞表面上への出現を検討した。HCV 非発現細胞では細胞表面上に DHCR24 の発現は認められなかったが、レプリコン細胞では多くの DHCR24 が細胞表面上に発現していた。次に、HCV-NS 領域の各遺伝子を発現させた細胞を用いて解析を行うと、HCV-NS3/4A 又は HCV-NS4B 遺伝子発現細胞で細胞表面上に DHCR24 が発現していた。本知見から HCV により細胞表

面上に DHCR24 が発現している事が明らかになったので、DHCR24 抗体を用いて細胞障害性を検討した。レプリコン細胞を用いて検討を行った結果、抗体処理後 72 時間で細胞死が誘導された。また、ウイルス複製能をルシフェラーゼにより測定したところ、抗体処理後 48 時間でウイルス複製が抑制された。本結果より、DHCR24 は癌細胞で発現量が上昇、さらに HCV により細胞膜表面上に発現し、本抗体により細胞死が誘導されることが明らかとなった。本結果より、DHCR24 は癌の共通マーカーになりうる可能性が示唆された。また、DHCR24 抗体は抗 HCV 薬としての可能性を持ち、HCV 陽性患者の肝癌治療に対しても有用なツールになりうる事が示唆された。

本研究では、HCV 複製に関与する新規分子並びに、HCV による腫瘍化に関連する分子を同定した。本研究では現在まで未知であった HCV による腫瘍化機構の解明及び HCV 複製機構の解明、HCV による肝癌への治療法開発に寄与する大きな知見を与えたと考える。