

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高野 貴士

C型肝炎ウイルス(HCV)は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。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公衆衛生上大きな問題となっている。近年までHCVの感染系が確立していなかったため、申請者らのグループでは細胞内で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。本論文では、M6細胞を用いてHCV遺伝子発現により発現量が変動する宿主因子を新たに同定し、それら宿主因子の腫瘍化やHCV複製への関与機構の解明を試みた。

第1章においてHCV遺伝子発現後に44日以上継代して腫瘍原性が亢進したM6細胞を用いて、HCV発現時及び腫瘍原性亢進時に発現量が変化する約70キログルトン(kDa)分子(P70)、約30kDa分子(P30)分子を認識する抗体(243a, 433d)を樹立した。これら分子は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44日目でも高い発現量を示した。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60%、P30は全体の80%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り、P30はHCV陽性患者の癌部組織の80%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章では、MALDI-TOF-MS解析及び種々の実験からP70がtranslocase outer mitochondrial membrane 70(TOM70)と同定し、細胞増殖制御との関連を検討した。まずTOM70は過剰発現により細胞にTNF- α 誘導性アポトーシスに対する抵抗性を賦与し、腫瘍化に関与する可能性が示唆された。逆にTOM70発現をRNAiで抑制するとカスパーゼ12の活性化を介したアポトーシスを誘導した。これまでに、カスパーゼ12の活性化は小胞体ストレスが関与するとされていたが、TOM70は本経路を介さずに活性化を誘導した。従って本研究により現在まで報告されていない新たなアポトーシス実行経路の存在が明らかとなった。

第3章では、MALDI-TOF-MS解析によりP30がNADH-cytochrome b5 reductase(CYB5R)と同定した。CYB5Rの過剰発現では抗Fas抗体誘導性アポトーシスに抵抗性を賦与し、TOM70とは異なる経路で細胞腫瘍原性亢進に関与する可能性が示された。また、HCV複製能への効果は、レプリコン細胞を用いて検討した。CYB5R過剰発現によりHCV複製能が増加し、RNAiによる発現抑制ではウイルス複製能が顕著に減少することが示された。これらの結果より、CYB5RがHCVの複製に関与している事が示唆され、抗HCV薬の標的分子となる可能性が示唆された。

第4章では、HCV陽性患者癌部組織において高率に発現量が亢進しているDHCR24分子及

び抗 DHCR24 抗体の HCV 治療への有用性について検討を行った。非肝臓細胞、正常肝細胞、肝癌細胞と由来の異なる細胞株 9 種を用いて DHCR24 分子の発現量を検討すると、肝癌由来株を含む癌細胞由来株で発現量が亢進していることを見いだした。本結果により、癌特異的に発現亢進がおこる分子である可能性が示唆され、肝癌共通のマーカーになる可能性が示唆された。また、DHCR24 分子が HCV レプリコン細胞で細胞膜表面上に多く発現している事を明らかにし、抗 HCV 薬の標的分子となる可能性も示唆され、実際に抗 DHCR24 抗体を処理によって DHCR24 分子発現細胞に細胞死を誘導する事を明らかにした。DHCR24 分子は HCV 遺伝子発現細胞の膜表面に多く発現しており、HCV 感染細胞選択的に細胞死を誘導することが可能と考えられ、HCV 感染症に対する治療用ツールとして有用であると考えられた。

本論文では、HCV 複製並びに HCV による腫瘍化に関与する新規分子を発見、同定した。本知見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 複製機構の解明だけでなく、HCV 感染症及び HCV 由来肝癌への治療法開発に寄与する大きな知見与えたと考える。よって審査委員一同は本論文を博士（獣医学）の学位論文として認める。