

論文の内容の要旨

論文題目：**Potential Contribution of Tumor Suppressor p53 in the Regulation of Hepatitis C Virus Replication**

和訳：C型肝炎ウイルス複製の制御における癌抑制遺伝子 P53 の

関与について

指導教官：小俣政男教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 15 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名：ナラヤン ダレル (NARAYAN DHAREL)

研究の背景および目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は現在、世界で約 1 億 7000 万人が慢性的に感染しており、慢性肝炎・肝硬変・肝細胞癌 (HCC) の主要な病原因子と考えられている。とりわけ日本では、毎年 3 万人以上が命を失う肝細胞癌患者の約 80% が HCV によるものである。現在、臨床ではその治療法として、主にインターフェロン (IFN) が用いられているが、最も有効とされる「IFN+ribavirin 併用療法」にても、その効果は必ずしも満足できるものではない。

最近、癌抑制遺伝子である p53 蛋白が宿主におけるウイルス感染の防御機構に重要な役割を果たしていることが報告された。しかし、p53 蛋白の HCV 増殖に対する影響については、今まで検討されていない。

近年、HCV の subgenomic replicon system が Huh7 細胞株で樹立され、さらに JFH-1 株の完全長 cDNA を用いることにより、培養細胞でウイルス遺伝子の複製増殖と感染性ウイルス粒子の作

成が可能になった。

そこで今回、我々は p53 蛋白の HCV 増殖に対する影響について、HCV の培養細胞系を用いて検討した。

方法

- 1) p53 を標的とする siRNA 発現ベクター (p53kd ベクター) を作成して Huh7 細胞株に導入し、p53 を stable knock down した細胞株 (p53kd Huh7) を樹立した。同時に空ベクターを Huh7 細胞株に導入した細胞株 (control Huh7) も作成した。その後、p53kd Huh7 と control Huh7 に subgenomic replicon RNA あるいは full-length HCV RNA を導入し、細胞株間の複製効率を real time PCR、western blotting、colony formation assay、luciferase assay、培養上清中の core 抗原定量にて比較した。
- 2) p53 発現ベクター、p53kd ベクター、空ベクターを subgenomic replicon RNA と同時に Huh7 細胞株に導入し、細胞株間の複製効率を colony formation assay にて比較した。
- 3) p53 発現ベクターを replicon harboring Huh7 に導入し、p53 と HCV NS5A 蛋白 (NS5A) の二重免疫染色を行った。
- 4) p53kd Huh7 と control Huh7 に subgenomic replicon RNA あるいは full-length HCV RNA を導入し、その後、インターフェロンを添加して、細胞株間の HCV RNA 量の変化を比較した。
- 5) 内在性インターフェロン産生系を構成する分子である IRF9、STAT1、STAT2 と、p53 との結合の有無を、免疫沈降法により検討した。
- 6) p53kd Huh7 と control Huh7 にインターフェロンを添加し、インターフェロン誘導遺伝子の発現誘導を luciferase assay、realtime PCR にて比較検討した。
- 7) p53 の transactivation domain である N 端や regulatory domain である C 端を欠如した deletion mutant p53 発現ベクターを構築し、subgenomic replicon RNA と同時に Huh7 細胞株に導入して、replication に与える影響を wild type の p53 発現ベクターと比較した。

結果

- 1) subgenomic replicon RNA、full-length HCV RNA とともに、p53kd Huh7 では control Huh7 に比し、高い増殖効率を認めた。

- 2) colony 形成数は、「p53 発現ベクター<空ベクター<p53kd ベクター」の順に多く認められた。
- 3) 個々の細胞について p53、NS5A の発現を検討したところ、p53 が過剰に発現している細胞では NS5A 発現が少なく、逆に p53 があまり発現していない細胞では NS5A 発現が多く認められた。
- 4) インターフェロン添加により、p53kd Huh7、control Huh7 とともに HCV RNA 量の低下が認められたが、p53kd Huh7 では control Huh7 に比し、RNA 量の低下が有意に軽度であった。
- 5) 免疫沈降法により、p53 と IRF9 との結合が認められた。一方、STAT1、STAT2 に関しては、結合は認められなかった。
- 6) p53kd Huh7 では control Huh7 に比し、インターフェロン誘導遺伝子の発現誘導が低下していた。
- 7) regulatory domain である C 端を欠如した p53 では wild type の p53 と同様の HCV 増殖抑制が認められたが、trans-activation domain である N 端を欠如した p53 では HCV 増殖抑制が認められなかった。

考察

本研究では、癌抑制遺伝子として知られている p53 を knock down あるいは強制発現した細胞株を作成し、subgenomic replicon RNA、full-length HCV RNA の増殖効率を比較検討した。その結果、control 細胞株に比し、p53 の knock down 細胞株では増殖効率の上昇を認め、逆に p53 の強制発現細胞株では増殖効率の低下を認めた。これより、p53 は HCV 感染に対する宿主の防御機構において、重要な役割を果たしていることが示唆された。p53 の HCV 増殖に対する直接的な影響についての報告は今までになされておらず、本研究が初と思われる。

さらに、本研究では p53 は IRF9 と結合すること、p53kd Huh7 ではインターフェロン添加によるインターフェロン誘導遺伝子の活性化が減弱することも明らかにした。すなわち、p53 の HCV に対する増殖抑制は、IRF9 との結合を介するインターフェロン誘導遺伝子の活性化によるものと推察された。p53 と IRF9 の結合についての報告も今までになされておらず、本研究が初と思われる。

インターフェロンは臨床、C 型慢性肝炎の治療において有効

な治療法であるが、その治療効果は未だ十分満足できるものとはいえず、インターフェロンの抗 HCV 効果が乏しい症例もしばしば見受けられる。インターフェロンの治療効果を予測する因子として、ウイルス側では **Genotype** やウイルス量、宿主側では年齢、性別、肝線維化の程度などが知られている。本研究の結果をふまえると、**p53** はインターフェロンの治療効果の予測因子となりうる可能性があり、臨床応用が期待される。

しかし、**p53** と **IRF9** の結合によるインターフェロン誘導遺伝子の活性化における詳細なメカニズムについては未だ不明であり、今後、更なる研究を行う必要がある。

結語

p53 は HCV の増殖を抑制し、その抑制機構として、**IRF9** との結合を介するインターフェロン誘導遺伝子の活性化が考えられた。**p53** が宿主の HCV 増殖抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。