

論文の内容の要旨

論文題目 Double-stranded RNA-activated protein kinase
inhibits hepatitis C virus replication but may be not
essential in interferon treatment

和訳 C型肝炎ウイルス増殖抑制における二重鎖 RNA 依存的

プロテインキナーゼ PKR の役割

指導教員 小池 和彦 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成17年4月入学
医学博士課程
内科学専攻
常 金海

C型肝炎ウイルスは現在、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・肝臓癌の主要な病原因子であると考えられている。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C型肝炎ウイルスによるものである。現在、臨床ではその治療法として、主にインターフェロンが用いられているが、最も有効とされる「インターフェロン+リバビリン併用療法」にても、その効果は必ずしも満足できるものではない。そのため、インターフェロンによるC型肝炎ウイルス抑制機序は分子肝炎ウイルス病学の重要な課題である。

インターフェロンにより誘導される遺伝子、すなわちインターフェロン作動系の主要な抗ウイルス分子としては、PKR、OAS、MxAなどが知られており、ウイルス増幅を抑制する重要な役割があると考えられている。しかし、各分子が実際に抗C型肝炎ウイルス効果を有するか否かについては不明である。

C型肝炎ウイルスの研究分野において、C型肝炎ウイルスの培養細胞系での研究は長らく試みられてきたが、効率よく安定的なC型肝炎ウイルスが増殖する系の開発は難しく、この人類にとって重要な病原体の研究の進行を遅らせる

原因であった。しかし、近年の分子細胞生物学の進歩により、1999年にC型肝炎ウイルスサブゲノムレプリコンシステムが Huh7 細胞株を用いて樹立され、さらに 2005年にはC型肝炎ウイルス JFH-1 株の完全長 cDNA を用いて Huh7 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。また、ある特定分子を knockdown する方法として RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) が注目されており、迅速、簡便、かつ特異的に標的分子を knockdown することが可能となっている。

このような背景を受け、私はまず、PKR の抗 C 型肝炎ウイルス効果における重要性を明らかにすることを目的とし、研究を開始した。

手順としては、まず、PKR に対する short interference RNA (siRNA) 発現ベクターをデザインし、Huh7 細胞に導入した後、ピューロマイシンにて「PKR stable knock down (PKR SKD) 細胞株」を作成した。また、同時に parent vector のみを導入した「control 細胞株」も作成した。PKR が knockdown された効果は Western blotting にて確認した。次に、作成された PKR stable knockdown 細胞株と control 細胞株に対し、Electroporation により Feo レプリコン (複製をルシフェラーゼ活性で測定できるサブゲノムレプリコン) を導入し、ネオマイシンにてセレクションを行い、「レプリコンの stable colony」を作成した。その後、PKR stable knockdown 細胞株と control 細胞株における baseline のレプリコンの増殖程度を、経時的にルシフェラーゼ活性を測定することにより、比較検討した。またインターフェロンに対する反応性を評価するために、インターフェロン添加後のレプリコンの増殖程度についても比較検討した。さらに JFH-1 も PKR stable knockdown 細胞株および control 細胞株に導入し、その上清中の Core 抗原を定量することによって、JFH-1 増殖程度を比較検討した。

Western blotting を行ったところ、control 細胞株ではインターフェロン刺激により PKR およびリン酸化 PKR の発現が強く認められるが、stable knockdown 細胞株では減弱していることより、PKR がほぼ完全に knockdown されていることを確認した (Fig. 1)。

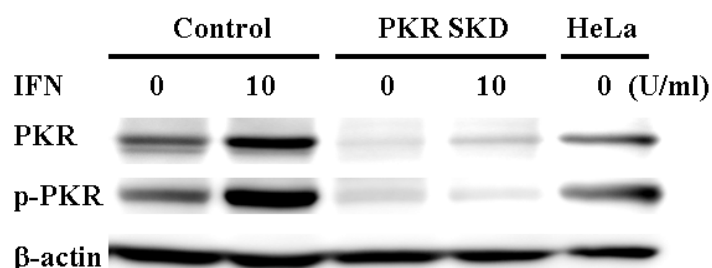


Fig.1

PKR stable knockdown 細胞株と control 細胞株でレプリコン増殖を比較したところ、PKR stable knockdown 細胞株において、ルシフェラーゼ活性が control 細胞株の約 3-4 倍に上昇しており、base line におけるレプリコン増殖に著明な差が認められた(Fig. 2)。

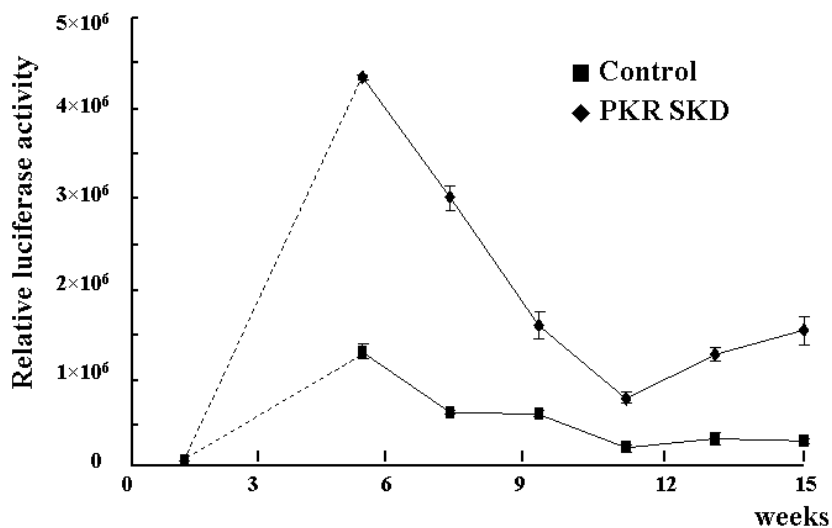


Fig.2

JFH-1 導入後、上清に分泌された Core 抗原の定量でも、PKR stable knockdown 細胞株では control 細胞株の約 3-4 倍に上昇していた(Fig. 3)。

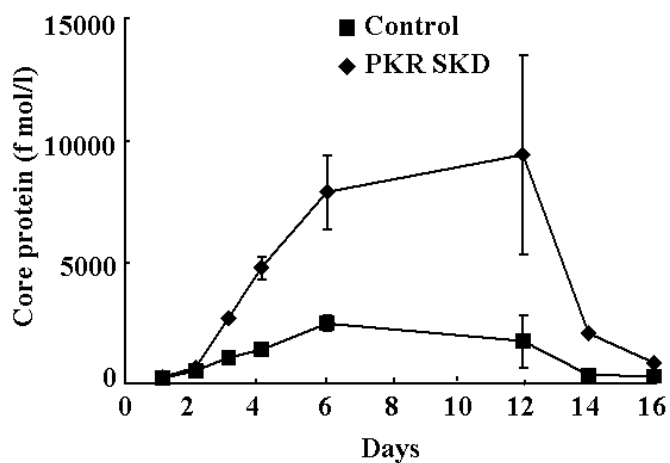


Fig.3

また、インターフェロン添加により、レプリコンの増殖は抑制された。PKR stable knockdown 細胞では、インターフェロンの抗レプリコン活性が control 細胞株に比し、有意に減弱していた。しかし、臨床的なヒトでの治療濃度 (10 U/ml) で PKR stable knockdown 細胞においてもレプリコンの増殖はほとんど抑制された (>98%) (Fig. 4)。

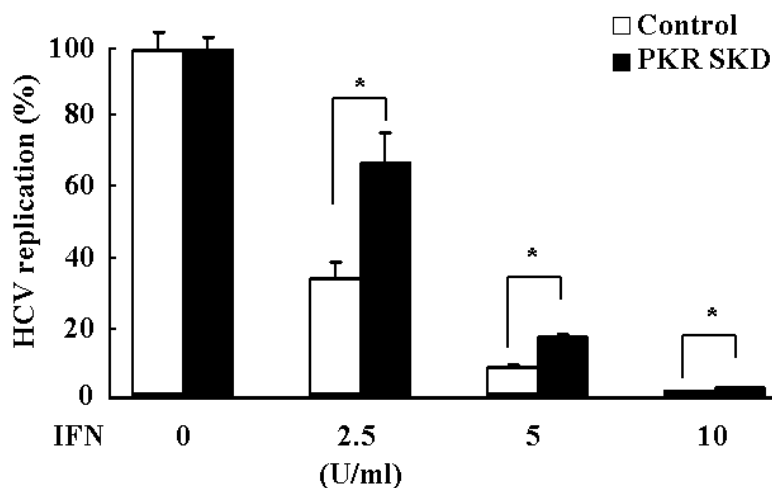


Fig.4

以上より、インターフェロンにより誘導される PKR は、生理的に C 型肝炎ウイルス増殖抑制において重要な役割を担うことが示唆されたが、インターフェロン治療には必須ではない可能性があると考えられた。

インターフェロンにより誘導される遺伝子は数多く存在するが、それぞれの分子が実際に抗 C 型肝炎ウイルスに働くかどうかについては不明であることがほとんどである。本研究では、代表的なインターフェロン誘導遺伝子である PKR が生理的に抗 C 型肝炎ウイルス効果を有するが、インターフェロン治療においては必須ではないことを明らかにした。

インターフェロンは临床上、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 C 型肝炎ウイルス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、IL-28B の遺伝子型などが知られている。本研究の結果をふまえると、インターフェロン作動系の抗ウイルス分子の量的あるいは質的違いにより、インターフェロン治療効果が異なる可能性がある。そのためには、まずインターフェロン治療時に効率的に機能している抗 C

型肝炎ウイルス分子の同定が必要である。インターフェロン治療時に必須のインターフェロン誘導遺伝子を同定することができれば、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、また、より効率的なインターフェロン治療法の開発につながることを期待される。