

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590788

研究課題名（和文）：HCV 感染者の肝炎活動性を規定する宿主要因：オステオポンチンの発現調節機構

研究課題名（英文）：The regulatory mechanisms of osteopontin expression in as a genetic factor to determine inflammatory grading in the liver of HCV infected patients

研究代表者：

持田 智(SATOSHI MOCHIDA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：21219968

研究成果の概要：

C 型慢性肝炎では男性に比して女性で肝炎活動性が軽微な症例が多いなど、肝病態には性差が認められる。肝炎は Th1 系免疫応答により発症するが、オステオポンチンはその開始に必須のサイトカインであり、肝細胞にその発現が見られる。従って、肝炎活動性は肝細胞の発現するオステオポンチンによって調節されていると推定され、これが肝病態における性差も規定している可能性がある。我々は、オステオポンチン遺伝子プロモーター領域の塩基配列を解析し、ほぼ 100% の連鎖不平衡を呈する nt -155, -616, -1,748 の 3SNPs と、これと独立した nt -443 の SNP を見出した。これら SNPs に関して、調節機構を解明するために PC 解析したところ、nt -443 は allele が T の場合に CdxA が、nt -155 は何れの allele でも Y 染色体にコードされる SRY が、deletion mutation の場合は FoxD3 が結合することが明らかになった。そこで、これら SNPs の結合領域を含む 30 塩基からなる oligonucleotide を allele ごとに合成し、ビオチン標識した。一方、雄性の Hep 細胞、雌性の Hela 細胞に dexamethasone を添加した後に核蛋白質を抽出し、雄性および雌性の活性化核蛋白抽出分画を作成した。標識 oligonucleotide と活性化核蛋白抽出分画の混合液を電気泳動して gel-shift アッセイを行ったところ、HepG2 細胞の核抽出物を用いた検討では CdxA, SRY, FoxD3 と、Hela 細胞での場合には CdxA, FoxD3 と oligonucleotide の結合を示すビオチンシグナルが検出され、オステオポンチンの発現調節に性差があることが確認された。更に、これら一連の検討の過程で、nt -155 の近傍に結合する未知の転写因子が存在することを見出したが、同因子は女性由来の培養細胞には発現しているが、男性由来の細胞には認められないことを発見した。従って、C 型慢性肝炎における病態の性差は、nt -155 の SNP と男性固有の SRY および女性固有の未知の転写因子によって規定されている可能性があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：肝・胆・膵

キーワード：オステオポンチン、遺伝子多型、転写因子、C 型慢性肝炎、性差プロモーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、Th1 系免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

我国には約150万人のC型肝炎ウイルス(HCV)感染者が存在する。その多くは慢性肝炎から肝硬変へと肝線維化が進展し、肝硬変に至ると高率に肝癌を併発する。しかし一部にはHCVが持続感染していても肝炎の程度が軽微で肝線維化が進展しない症例も存在する。これら肝炎活動性の低い症例は女性に多いが、HCV感染に対する免疫応答に性差が生じる原因は明らかでない。

OsteopontinはRGD配列を有する細胞外matrixであるが、Th1系免疫応答の開始に必須のcytokineとしても作用する。急性肝疾患では壊死巣内で活性化したKupffer細胞、macrophageでosteopontin発現が増強する。一方、C型慢性肝疾患では肝細胞もosteopontinを発現し、その程度は肝炎活動性と相関していた。また、申請者らはamyloid P蛋白promoterを用いる事で、肝細胞のみにosteopontinを発現するtransgenicマウスを作成したところ、肝にはリンパ球浸潤が高度となり、肝壊死を生じることが判明した。HCV感染後に生じる肝炎の重症度も、肝に発現するosteopontinによって調節されている可能性がある。

そこで、ヒトosteopontin遺伝子promoter領域の遺伝子配列を解析したところ、nt -155, -443, -616, -1,748の4ヶ所に単塩基変異(SNPs)を発見した<sup>3)</sup>。これらSNPsのうち、nt -155, -616, -1,748の3SNPsは高度の連鎖不平衡を呈しており、C型慢性肝炎の活動性とそのalleleとの間に関連は認められなかった。しかし、nt -443のSNPはC型慢性肝炎の活動性と関連しており、多変量解析でも肝炎活動性を規定する要

因として同SNPと性(男or女)が抽出された。

次いで申請者らはosteopontin遺伝子promoter SNPsの機能解析を実施した。nt 0から-658までの領域をPCRで増幅して、cDNAをpGL3-Basic vectorに挿入、THP-1細胞を用いたdual-luciferase reporter assayを行なうと、nt -443のSNPはallele CがTに比して転写活性が高度であった。また、nt -155とnt -616のSNPsに関しても、alleleが夫々deletion mutationおよびGのcDNAは、G及びTのものに比して転写活性が高度であった。又、各SNPsと転写因子の結合部位との関連をコンピューターで解析すると、nt -433はalleleがTの場合にのみCdxAが結合すると推定された。一方、nt -155はallele G, deletion mutationの何れの場合もSRYが結合するが、deletion mutationに対してはHFH-2も結合する可能性が明らかになった。SRYの遺伝子はY染色体に存在する。従って、男性ではnt -155がdeletion mutation, allele Gの何れの宿主でもSRYを介してosteopontin転写が促進されるが、女性ではdeletion mutationの場合にのみHFH-2によりosteopontin転写が調節されると推定される。従って、nt -155, -443のSNPsとこれら転写因子の相互作用を解析することで、HCV感染者における肝炎活動性の調節機構と性差との関連を明らかにできると考えられるが、一般に行われているゲルシフトアッセイでは1塩基の差異による転写因子の結合性の違いを解析するのは困難であるのが現状であった。

## 2. 研究の目的

Osteopontin遺伝子promoter SNPsのうち, nt -155, -443のalleleの差異がCdxA, SRY, HFH-2などの転写因子との結合性および転写活性に及ぼす影響を明らかにするために, ゲルシフトアッセイの精度をより向上させた競合アッセイ系を確立する。これによって, osteopontin遺伝子promoter SNPs を介する転写調節機構を性差との関連で解明し, HCV感染者の肝炎活動性を規定する宿主要因としてのこれらSNPsの意義を明らかにすることが, 本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) nt -155, -443のSNPsに関して, コンピューターで解析したCdxA, SRY, HFH-2の結合領域を含む30塩基からなるoligonucleotideを alleleごとに合成する。
- (2) 雄性のHepG2細胞, 雌性のMCF細胞に dexamethasone, TPAなどを添加した後核蛋白質を抽出し, 雄性および雌性の活性化核蛋白抽出分画を作成する。
- (3) 各SNPsのoligonucleotideを alleleごとにビオチン標識する。標識oligonucleotideと活性化核蛋白抽出分画の混合液に, alleleの異なる非標識oligonucleotideを, 量を変えて添加した後にゲルシフトアッセイを実施する(競合アッセイ)。標識および非標識oligonucleotideの alleleの組み合わせを交換した場合のゲルシフトアッセイも実施する。
- (4) SNPsごとに2通りの競合アッセイの成績をデンシトメトリーで定量化し, 各alleleと当該転写因子との結合能を数理的に解析する。
- (5) nt -155のSNPsに関しては, 雄性および雌性核蛋白抽出分画を用いた競合アッセイの成績の差異から, 各alleleとSRY, HFH-2の結合能を解析する。

## 4. 研究成果

(1) HepG2細胞から抽出した核蛋白質と nt -443 近傍の 30 塩基からなる oligonucleotide を用いて実施した競合ゲルシフトアッセイ系では, 非標識 oligonucleotide の濃度が 0.5 ~ 1.0 mM の範囲で nt -443 の allele が T の場合が C に比して結合シグナルが高度であることが明らかになった。プロモーターアッセイでは同 allele は C が T に比して転写活性が高度であり, CdxA と推定される同部位に結合する転写因子は抑制的に作用していると推定された。

(2) nt -155 近傍の 30 塩基からなる oligonucleotide を用いてゲルシフトアッセイでは, 雄性の HepG2 細胞と雌性に MCF 細胞の核抽出蛋白で異なる結合シグナルが観察された。両細胞の核抽出蛋白に共通した結合シグナルは FoxD3 のものと推定された。MCF 細胞を用いた競合ゲルシフトアッセイでは, 同結合シグナルは nt -155 が deletion mutation の場合が allele G に比して高度であった。なお, ゲルシフトアッセイでは HepG2 細胞にのみ検出される結合シグナルが認められ, SRY によるものと推定された。このシグナルは nt -155 が deletion mutation, allele G の何れの場合でも差異が認められなかった。また, MCF 細胞にのみ検出される結合シグナルも観察されており, これは雌性細胞に固有の未知の転写因子に由来するものと推定された。

以上の成績から, C 型慢性肝炎患者における病態の性差は, nt -155 の SNP と雄性固有の SRY および雌性固有の未知の転写因子によって規定されている可能性があると考えられた。今後は雌性固有の新たな転写因子とクローニングし, これを介する調節機構を解明することが課題となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
〔雑誌論文〕(計9件)

Koike K, Takahashi K, Mishiro S, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Ohno A, Mochida S, Fujiwara K. Full-Length Sequences of Two Hepatitis E Virus Isolates Representing an Eastern China-Indigenous Subgroup of Genotype 4. Intervirology 2007; 50:

181-189.

Fujiwara K, Kaneko S, Kakumu S, Sata M, Hige S, Tomita E, Mochida S, The Virus Reduction Therapy Study Group. Double Filtration Plasmapheresis and Interferon Combination Therapy for Chronic Hepatitis C Patients with Genotype 1 and High Viral Load. *Hepatol Res* 2007; 37: 701-710.

Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida M, Mizokami M. Influences on Hepatitis B Virus Replication by a Naturally Occurring Mutation in the Core Gene. *Virology* 2007; 365: 285-291.

Fujiwara K, Mochida S, Matsui A, Nakayama N, Nagoshi S, Toda G; Intractable Liver Diseases Study Group of Japan. Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan: Summary of 698 patients between 1998 and 2003 analyzed by the annual nationwide survey. *Hepatology Res* 2008; 38: 646-657.

Mochida S, Nakayama N, Matsui A, Nagoshi S, Fujiwara K. Re-evaluation of the Guideline published by the Acute Liver Failure Study Group of Japan in 1996 to determine the indications of liver transplantation in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology Res* 2008; 38: 970-979.

Nakashima S, Ota S, Arai S, Yoshino K, Inao M, Ishikawa K, Nakayama N, Imai Y, Nagoshi S, Mochida S. Usefulness of anti-ulcer drugs for

the prevention and treatment of peptic ulcers induced by low doses of aspirin. *World J Gastroenterol* 2008; 15: 727-731.

Mochida S. Indication criteria for liver transplantation for acute liver failure in Japan. *Hepatol Res* 2008; 38: S52-S55.

Takahashi K, Okamoto H, Abe N, Kawakami M, Matsuda H, Mochida S, Sakugawa H, Sugino Y, Watanabe S, Yamamoto K, Miyazaki Y, Mishi S. A virulent strain (J10) of hepatitis E virus genotype 3 emerging and spreading in Japan: analysis of complete or near-complete sequences of eight human and five swine isolates. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 704-709.

Hashikura Y, Ichida T, Umeshita K, Kawasaki S, Mizokami M, Mochida S, Yanaga K, Monden M, Kiyosawa K, The Japanese Liver Transplantation Society. Donor complications associated with living donor liver transplantation in Japan. *Transplantation* (in press)

〔学会発表〕(計4件)

Sugawara K, Nagoshi S, Hamaoka K, Inao M, Naiki K, Nakayama N, Fujiwara K, Mochida S. Hepatic Inflammatory Reaction may be Regulated in Patients with Hepatitis Virus Infection through Osteopontin Expression in Hepatic Macrophages and Hepatocytes Determined by the Genetic

Polymorphisms. Asian Pacific Digestive Diseases Week (APDW) 2007. 2007 October, Kobe, Japan.

Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Inao M, Naiki K, Naito M, Nakayama M, Fujiwara K, Mochida S. The Significance of Osteopontin Promoter SNPs at nt -155 and FoxD3 as Host Factors to Regulate the Development of Hepatocellular Carcinoma in Female Patients with HCV Infection. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2007 November, Boston, USA.

菅原通子, 名越澄子, 内木佳代子, 濱岡和宏, 稲生実枝, 中山伸朗, 藤原研司, 持田 智. 肝病態の性差を規定する宿主主要因：Osteopontin 遺伝子 promoter SNPs nt -155 の意義. 第8回オステオポンチン研究会, 2008年9月, 札幌.

濱岡和宏, 名越澄子, 菅原通子, 内木佳代子, 稲生実枝, 中山伸朗, 藤原研司, 持田 智. 肝病態の性差を規定する宿主主要因：Osteopontin 遺伝子 promoter SNPs と新規転写因子の意義. 第45回日本肝臓学会総会, 2009年6月, 神戸.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

持田 智 (SATOSHI MOCHIDA)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20219968

### (2) 連携研究者

稲生 実枝 (INAO MIE)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70286038

菅原 通子 (SUGAWARA KAYOKO)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20406458