

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790446

研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解明

研究課題名 (英文) Study on the mechanism of hepatitis C virus infection-induced apoptosis

研究代表者

デン リン (DENG LIN)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバル COE 研究員

研究者番号：40437497

研究成果の概要 (和文)：本研究では、HCV clone J6/JFH1 株と Huh7.5 細胞を用いて、HCV 感染によるアポトーシス促進タンパク質である Bax 活性化の分子機序及び HCV タンパク質の役割について検討した。HCV 感染は、ROS 産生を亢進し、JNK 活性化、Bax 活性化を介して、アポトーシスを誘導することを明らかにした。また、core タンパク質によるアポトーシス誘導の関与も示した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, by using the J6/JFH1 strain of HCV and Huh7.5 cells, I demonstrated that HCV-induced ROS production triggers JNK activation, which leads to Bax activation and apoptosis. I also found that HCV core plays a role in HCV-induced apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス、アポトーシス、ミトコンドリア、Bax

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝臓に慢性の炎症を起こし、高率に肝細胞癌を引き起こすが、その一方で、C型慢性肝炎患者の肝臓においては、肝細胞のアポトーシスの亢進が認

められている。

私は、平成19-20年度科学研究費補助金若手研究 (B)「C型肝炎ウイルス培養細胞感染系における細胞障害誘導機構の解明」では、HCV clone J6/JFH1株とHuh7.5細胞を用いて、

HCV感染により、アポトーシス促進タンパク質であるBaxの活性化及びBaxのミトコンドリアへの移行が亢進され、ミトコンドリア障害を介してcaspase-3依存的なアポトーシスが誘導されること及びミトコンドリアにおける活性酸素種 (ROS) の産生が増加することを明らかにした。しかしながら、HCV感染によるBax活性化の分子機構は、現在のところまだ明らかではない。

2. 研究の目的

近年、c-Jun N-terminal kinase (JNK)及び p38 MAPK (p38) は、Bax の活性化に関与することが報告された。そこで、本研究では、HCV clone J6/JFH1 株と Huh7.5 細胞を用いて、HCV 感染による Bax 活性化に及ぼす JNK 及び p38 の影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

HCV J6/JFH1 を Huh7.5 細胞に感染させ、感染後 2、4、6、8 日目に、特異的抗体を用いた免疫ブロット法によって、JNK、p38、ERK1/2 及び JNK の下流タンパク質である c-Jun の発現量、ならびにそれぞれのタンパク質のリン酸化状態を調べた。また、蛍光抗体法にて活性型 Bax を検出した。

4. 研究成果

(1) HCV 感染により、トータルの JNK 発現量は、変化しなかったが、JNK のリン酸化 (活性化) の増加が認められた。JNK の活性化に伴い、その下流の c-Jun のリン酸化の亢進及びトータル c-Jun の発現量の増強も確認された。

(2) JNK の活性化が、HCV 感染による Bax の活性化に必要であるかどうかを調べるために、JNK 特異的阻害剤 SP600125 を用いて、

解析した。その結果、JNK 阻害剤により、感染後 6 日目において、HCV 感染による Bax の構造変化 (活性化) 及びミトコンドリアへの移行が抑制された。このことから、Bax 活性化に JNK 経路が重要であることが示唆された。

(3) HCV 感染により産生される ROS が、JNK の活性化を誘導するのではないかと考え、この可能性について検討した。抗酸化剤である NAC を用いて、ROS を除いたところ、HCV 感染による JNK の活性化は顕著に抑制され、それに伴い、HCV による Bax の活性化及びアポトーシス誘導は解除された。これらの結果から、HCV 感染による ROS 産生が、JNK と Bax の活性化を介して、アポトーシスを誘導することが示唆された。

(4) HCV 感染により、トータルの p38 発現量は、変化しなかったが、p38 のリン酸化 (活性化) の程度は、感染後 2 日目に、一過性に増加した。しかしながら、感染後 4 日目、6 日目においては、差が見られなかった。

HCV 感染による一過性の p38 の活性化が、Bax の活性化に重要であるかどうかを調べるために、p38 の特異的阻害剤 SB203580 を用いて解析した。その結果、p38 阻害剤は Bax の活性化を抑制しないことから、p38 の関与は低いと考えられた。

(5) またアポトーシス抑制キナーゼとして知られている ERK1/2 の活性化について検討した。その結果、HCV 感染により、トータルの ERK1/2 発現レベルは、変化しなかったが、感染後 4 日目から、ERK1/2 のリン酸化 (活性化) の程度は、顕著に増加した。このことから、HCV 感染細胞において、抗アポトーシス作用も同時に起きていることが示唆され

た。

(6) HCV のどのウイルスタンパク質がアポトーシス誘導に関与しているのかを検討した。HCV 感染細胞において、HCV core タンパク質がアポトーシス抑制タンパク質 Mcl-1 と結合し、Mcl-1 の機能抑制を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

以上の結果から、HCV は肝細胞に感染し、ミトコンドリアからの ROS 産生を亢進し、JNK 活性化、Bax 活性化を介して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。一方、HCV 感染はアポトーシス抑制キナーゼである ERK1/2 を活性化し、細胞生存の方向にも作用することも見出した。HCV 感染細胞の運命は pro-apoptotic シグナルと anti-apoptotic シグナルのバランスにより制御されていると考えられた。

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 6 件)

(1) El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol. Immunol.*, 2011 in press 査読あり

(2) El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of Hepatitis C Virus NS5A and Core Protein and Clinical Outcome of Pegylated-Interferon/ /Ribavirin Combination Therapy. *Intervirology*, 2011 in press 査読あり

(3) Sasayama M, Deng L, Kim SR, Ide YH, Shoji I, Hotta H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-interferon plus ribavirin. *Kobe J. Med. Sci.*, 2010 Sep 28;56(2): E60-66. 査読あり

(4) Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. 17 β -estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.*, 2010 Nov;54(11):684-689 査読あり

(5) Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.*, 2010 Aug;82(8):1364-1370. 査読あり

(6) Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human Mcl-1. *J. Virol.*, 2009 Oct; 83(19):9993-10006. 査読あり

[学会発表] (計 16 件)

(1) Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway.

17th international symposium on hepatitis c virus

& related virus

September 11, 2010, Yokohama, Japan

(2) **Deng Lin**、兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博

糖代謝に及ぼすC型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会

2010年11月7日 徳島

(3) **Deng Lin**、兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博

C型肝炎ウイルス感染は転写因子FoxO1を介した糖新生を誘導する

第63回日本細菌学会関西支部総会

2010年11月20日 枚方

(4) **Deng L**, Ide YH, Shoji I, Hotta H.

Activation of JNK, but not p38 MAPK, is involved in HCV-induced, Bax-mediated apoptosis.

16th international symposium on hepatitis c virus

& related virus

October 4, 2009, Nice, France

(5) **Deng Lin**、井出良浩、勝二郁夫、堀田博

C型肝炎ウイルス感染によるBax活性化の分子機序の解析

第57回日本ウイルス学会学術集会

2009年10月26日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

デン リン (DENG LIN)

神戸大学・大学院医学研究科・

グローバルCOE 研究員

研究者番号：40437497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし