

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790636

研究課題名（和文） 難治性 C 型肝炎の完全治癒を目指した新規ウイルス制御機構の解明

研究課題名（英文） Identification of novel anti-viral mechanism as a therapeutic strategy against intractable hepatitis C

研究代表者

矢野 雅彦（YANO MASAHIKO）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70529693

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、肝臓細胞内での肝炎ウイルス複製に対する新たなる抑制機構を解明するために、B型肝炎ウイルス蛋白を導入させたマウスや培養細胞モデルを用いて解析した。その結果、発癌抑制分子の一つであるサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白（p21）の細胞内局在を核内へ誘導コントロールすることにより、発癌抑制作用だけでなく抗ウイルス作用も発揮されることが示唆された。このことが、新規の抗ウイルス療法の開発に寄与し得るものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to find the novel inhibitory mechanism against hepatitis viral replication in hepatocytes, the mouse and cultured cells expressing the protein of hepatitis B virus were utilized. As a result, it was suggested that the controlled induction of nuclear cyclin-dependent kinase inhibitor (p21), one of the anti-cancerous molecules, might exhibit the anti-hepatocarcinogenic and further anti-viral effects. The current result could contribute to the development of novel therapy against intractable viral hepatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝炎ウイルス、新規ウイルス抑制機構、肝細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床の場において、ペグ化インターフェロン（IFN）＋リバビリン併用療法は、C型慢性肝炎に対する最も有効な治療法とされている。しかしながら、遺伝子 1b 型の C 型肝炎については未だ十分な治療成績が得られず、肝硬変や肝癌といった生命を脅かす疾患に至る症例も少なくない。つまり 1b 型感染者が約 7 割を占め、さらに罹患者の高齢化が進んでいる我が国では、より強力かつ安全な新規の抗ウイルス療法が求

められていた。

(2) 申請者は以前に、日常的な栄養成分に C 型肝炎ウイルス（HCV）を抑制する成分を見出し、これらが酸化ストレスによって抗ウイルス作用を示すことを明らかにした。しかしながら、詳細な分子学的抑制機構は不明であったため、この解明の着手に至った。そして本研究の成果が、新規の抗肝炎ウイルス療法の開発に貢献し得ると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、肝炎ウイルス蛋白または遺伝子を導入させたマウスや培養細胞を用いて、新たなウイルス複製抑制機構を解析し、臨床応用可能な HCV などの肝炎ウイルス感染症の治療薬開発に役立てることを目的とした。

(2) 具体的には、申請者が以前に見出した酸化ストレス誘導性の細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK ; extracellular signal-regulated kinase) が強力に HCV 複製を抑制することに着目し、そのウイルス複製抑制機構を詳細に解析して、最終的に新規抗ウイルス剤の発見に繋げられることを目標とした。

3. 研究の方法

肝炎ウイルスから発現される各種ウイルス蛋白は、肝細胞内の自己免疫応答機構を攪乱することにより、IFN システムなどの免疫応答から回避しようとするのが知られている。また、ERK シグナル等の細胞内の様々なシグナル伝達系を修飾することで、肝発癌へと導くことも知られている。

HCV からの発現蛋白のうち、特にコア蛋白は、細胞内の酸化ストレス発生と密接に関連している。この HCV コア蛋白と同様に、B 型肝炎ウイルス (HBV) の X 蛋白 (HBX) も酸化ストレスや HBV 誘導性発癌との関わりが多数報告され、HBV 複製にとっても必須蛋白であると示唆されている。

そこで申請者は、酸化ストレスを介した抗ウイルス機構を解明するために、下記の様な研究を行った。

(1) HBX を恒常的に発現し肝内発癌が高率に誘発される HBX 遺伝子導入マウス (Xg) の肝臓検体を用いて、野生マウス (WM) との肝臓内での遺伝子発現の相違をマイクロアレイや PCR 法によって解析した。

(2) 既に Xg に強力な抗ウイルス剤でもある IFN- β を処理すると、肝発癌が完全に抑えられることを見出していた。そこで、この IFN 処理 Xg と未処理 Xg の遺伝子発現を比較することにより、HBX によって修飾された遺伝子発現のうち IFN 処理によって制御されるものを抽出した。

(3) (2) で抽出された遺伝子発現が培養細胞内でも同様の発現挙動を示すのか再現性を確認するために、ヒト肝癌細胞株に HBX を強制または安定発現させ、更にこれらに IFN- β 処理を行いその分子学的影響を調べた。この様な細胞検体を用いて、ウエスタンブロットや免疫蛍光抗体染色法等によって解析した。

(4) また、HBX によって修飾された遺伝子発現が細胞内のどの様なシグナル伝達系によって誘導されたか解明するために、酸化ストレスに関連した各シグナルキナーゼ活性の抑制剤を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Xg 肝臓内では p21 が最も高度に発現増強し、IFN- β 処理によって抑制されていた。

① 各マウス群の遺伝子発現の相違をマイクロアレイによって網羅的に解析した結果、WM 肝臓検体に比べて Xg 肝臓内では、細胞分化・増殖に関係した遺伝子等の発現が多数増強していた。これらの中で、IFN- β 処理 Xg では負に制御されていたものを抽出したところ、発癌抑制分子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白 (p21 ; cyclin-dependent kinase inhibitor) の発現が最も顕著な影響を受けていた。

② マイクロアレイによって抽出された、Xg で増強され IFN 処理によって抑制される遺伝子群の再現性を PCR やウエスタンブロット法で改めて確認したところ、p21 発現だけが遺伝子のみならず蛋白レベルでも有意な影響を受けることが確認された。(図 1A、B)

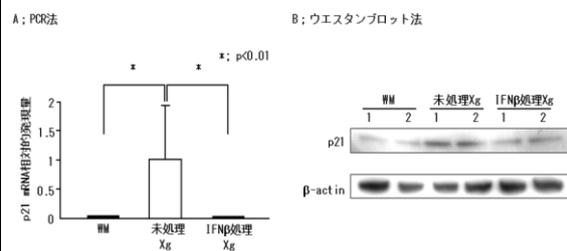


図1: HBXトランスジェニックマウス (Xg) 肝臓内のp21発現増強

③ p21 によって制御される細胞増殖関連の cyclin D や retinoblastoma 蛋白 (pRb) を調べたところ、一般的に p21 によって抑制されるこれら蛋白発現やリン酸不活化が、マウス肝内で p21 と伴に同様の発現挙動で制御されているのが認められた。

(2) HBX 蛋白を発現させた培養細胞でも、マウスモデルと同様に p21 発現に対する影響が認められた。

① HBX 蛋白を培養細胞内で強力に発現させることが可能な発現プラスミドを構築し、これをヒト肝癌細胞株へ強制発現させたところ、発現量依存的に p21 が増強された。

② ①を IFN- β で処理すると p21 発現は濃度依存的に抑制され、この様な p21 の影響は HBX 安定発現細胞株でも確認された。(図 2)

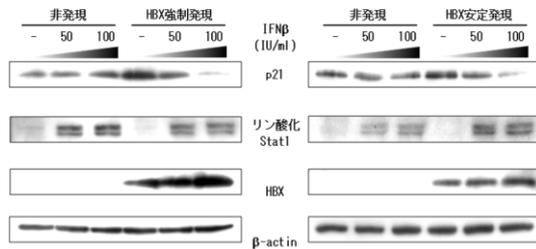


図2: HBX発現培養細胞におけるp21発現とIFN β の効果

③ 培養細胞系でも、マウスモデルと同様の cyclin D 発現やリン酸不活化 pRb への影響が認められた。(図 4A)

更に細胞モデルで、siRNA を用いて p21 発現をノックアウトしたところ、p21 と共に認められたこの様な影響は解消され、HBX 発現細胞の増殖は有意に抑えられた。

以上より、HBX 誘導性の p21 発現は、HBX による細胞増殖促進作用に関与しているとともに、ウイルス複製にとって有利に働いていることが示唆された。

(3) HBXによって増強されたp21は優位に細胞質内に局在していた。

① これまでの報告によれば、p21 は細胞内の局在 (核内または細胞質内) によって細胞に与える影響が全く異なるとされている。そこで、核・細胞質蛋白分画抽出法を用いて各々の分画蛋白を抽出し、HBX による p21 発現局在への影響をマウスおよび培養細胞系の両方で調べた。その結果、何れの系においても HBX によって増強された p21 は、細胞質内で優位に増強していた。(図 3A、B)

② 更に IFN で処理した検体では、HBX によって誘導された細胞質内 p21 は著しく減衰し、核内 p21 が優位となる様な影響が認められた。(図 3A、B) この様な影響は、免疫蛍光抗体染色法でも確認された。

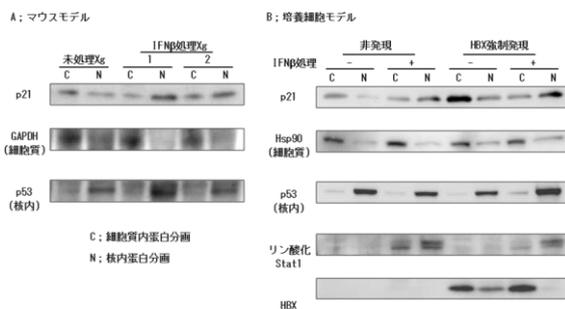


図3: HBX発現によるp21発現の細胞内局在とIFN β の効果

(4) HBXによるp21増強は、活性化ERKまたはprotein kinase C (PKC) α を介して誘導されることが示唆された。

① HBX 安定発現細胞株を、酸化ストレスと関わりのある幾つかのキナーゼ活性の特異的阻害剤で処理したところ、ERK および PKC に対する阻害剤処理で p21 の発現が抑制された。(図 4A)

② Xg および HBX 発現培養細胞では、ERK と PKC 特に PKC α の活性化が確認された。しかしながら、IFN- β で処理した検体では PKC α の活性化は消退していたが、ERK 活性化は更に増強していた。

以上より、HBX 誘導性 p21 において活性化 PKC を介したものは、ウイルス複製や細胞増殖を促進させるのではないかと示唆された。一方、ERK 活性を介したものは、その反対の影響を与えるものと考えられた。

(5) HBXによる細胞質内 p21 発現増強は PKC 活性を介し、一方 ERK 活性を介した p21 増強は主に核内発現であることが示唆された。

① (4)-①で認められた様に ERK、PKC 阻害剤ともに p21 発現を抑制したことから、核・細胞質分画蛋白を用いて各阻害剤による p21 の局在への影響を調べた。その結果、PKC 阻害剤処理によって HBX による細胞質内 p21 発現は減衰され、核内 p21 が優位となる影響が認められた。

② 一方、ERK 阻害剤処理細胞では細胞質内 p21 発現量は影響を受けることなく細胞質優位な状況は変わらなかったが、核内 p21 の発現減少がさらに観察された。(図 4B)

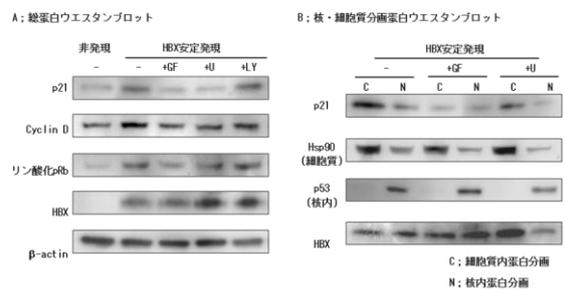


図4: HBXによるp21発現および局在に対するキナーゼ阻害剤の影響 (GF: PKC阻害剤, U: ERK阻害剤, LY: Akt阻害剤)

以上より、活性化 PKC または ERK が介在した p21 発現の局在の違いが、ウイルス複製や細胞増殖に全く異なった影響を与えるものと示唆された。

考察&総括；HBX 発現モデルで認められた発癌抑制分子 p21 の発現増強は細胞質内に優位に局在することが認められ、これは活性化 PKC、とりわけ PKC α 介して誘導されることが示唆された。

IFN- β 処理によってこれらの HBX による影響は抑制されたが、特に興味深いのは HBX によって増強していた活性化 ERK がさらに促進され、p21 発現局在は核内優位へと変化していたことである。一方で、HBX 発現モデルでも相当の ERK 活性が示されていたにもかかわらず、p21 がほとんど細胞質内に局在していたことは、HBX 誘導性 ERK と IFN 誘導性 ERK との p21 局在に対する影響に相違があるものと示唆された。しかしながら、HBX 発現細胞を ERK 阻害剤で処理した時、細胞質内 p21 は影響を受けず核内発現が減少したことから、HBX 発現によって活性化された ERK を介しても核内 p21 が多少なりとも増強していることが考えられる。この様な ERK 活性は、IFN と同様の働きとしてウイルス蛋白が発現されたことで、細胞内に何らかの防御反応が誘発された可能性も示唆される。

そこで今後の展開・課題として、p21 同様活性化 ERK もその細胞内局在によって作用が異なることが報告されており、今後ウイルス蛋白による ERK と、IFN や以前申請者が見出した抗 HCV 作用を発揮する酸化ストレス誘導性 ERK の細胞内局在を、肝炎ウイルス遺伝子複製細胞も用いた解析を行う必要があるだろう。この解明によって、より詳細な酸化ストレスによる活性化 ERK を介した抗肝炎ウイルス抑制機構、即ちこの ERK によって制御される p21 の核内への誘導機構が明らかになることが期待される。

最終的に今回の研究で、発癌抑制分子である p21 の細胞内局在を制御することで、本来の細胞増殖を抑制する作用を示すことが明らかとなった。さらに、この様な細胞内局在の制御によって、肝炎ウイルス複製の抑制にも関与していることが示唆され、今後抗ウイルスとともに発癌予防も癒合した目的の治療法開発の可能性が期待される。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① Masahiko Yano、IFN- β prevents HBX-triggered hepatocarcinogenesis by down-regulating cytoplasmic p21 overexpression、第 46 回欧州肝臓学会(EASL)、

2011 年 4 月 1 日、ベルリン国際会議場(ドイツ)

② Masahiko Yano、Molecular mechanism of IFN- β on prevention of HBx-induced hepatocarcinogenesis、第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場(大阪府)

③ 矢野 雅彦、HBx 誘導性肝発癌に対する IFN- β の制御機構の分子学的解析、第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 28 日、山形テルサ(山形県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 雅彦 (YANO MASAHIKO)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：70529693

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし