

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390202

研究課題名(和文) HCV NS3によるTGF-β擬似活性発現を標的とした肝硬変治療の基礎研究

研究課題名(英文) Studies on a role of TGF-beta mimetic activity of HCV NS3 protease in pathogenesis of liver cirrhosis

研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA, SOICHI)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別ユニットリーダー

研究者番号：10202061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維症は、C型肝炎ウイルス(HCV)が主原因であるが、HCVが肝線維化を進行させる仕組みはわかっていない。我々は、HCVのNS3プロテアーゼが、TGF-βを真似て直接TGF-β受容体に結合、肝臓内コラーゲン産生を増加させるsmadシグナルを活性化し、肝線維化が進行するという新たな分子機構を見つけた。TNF-αは、HCV感染肝細胞表面上でNS3と共局在するTGF-β受容体の発現を促進、これを亢進した。コンピュータシミュレーションにより推測されたTGF-β受容体結合部位に対するNS3抗体は、HCV感染肝細胞のsmadシグナル、HCV感染によるヒト肝細胞移植キメラマウスにおける肝線維化を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Viruses sometimes mimic host proteins and hijack the host cell machinery. Hepatitis C virus (HCV) causes liver fibrosis, a process largely mediated by the overexpression of TGF-beta and collagen, although the precise underlying mechanism is unknown. We found that HCV non-structural protein 3 (NS3) protease affects the antigenicity and bioactivity of TGF-beta2 in (CAGA)9-Luc CCL64 cells and in human hepatic cell lines via binding to TGF-beta type I receptor (TbetaRI). TNF-alpha facilitates this mechanism by increasing the colocalization of TbetaRI with NS3 protease on the surface of HCV-infected cells. An anti-NS3 antibody against computationally predicted binding sites for TbetaRI blocked the TGF-beta mimetic activities of NS3 in vitro and attenuated liver fibrosis in HCV-infected chimeric mice. These data suggest that HCV NS3 protease mimics TGF-beta2 and functions, at least in part, via directly binding to and activating TbetaRI, thereby enhancing liver fibrosis.

研究分野：生化学・細胞生物学

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：C型肝炎ウイルス(HCV) NS3 TGF-β受容体 肝硬変 キメラマウス コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、コラーゲンを始めとする細胞外マトリックス蛋白質の異常蓄積により肝組織が硬化していく難病である。肝障害と再生が繰り返される過程で線維化が起こり、肝細胞がアポトーシスに陥り、肝不全になる一連の病態を呈する。

肝線維化を引き起こすのがサイトカイン TGF- β である (Gastroenterol. 134:215, 2008)。肝硬変に陥った肝臓からは年率 5%の頻度で肝癌が発症し死に至る。ここでも TGF- β による EMT の誘導、制御性 T 細胞誘導を介する癌免疫の低下が一因であると言われている (Cell 134:215, 2008)。我が国では、肝硬変の原因の約 70%が C 型肝炎ウイルス (HCV) であり、HCV 患者は国内だけでも推定 300 万人おり、大きな社会問題となっている。しかし、どのように HCV が肝硬変を引き起こすか？その分子機構は不明であり (Gastroenterol. 134:1699, 2008) 研究開始当初の PEG インターフェロン+リバビリン併用療法は、40-50%の患者さんにしか有効でなかった (Nature Rev. Drug Discov. 8:11, 2009)。

小嶋は、高分子潜在型分子として産生される TGF- β が肝臓では、セリンプロテアーゼにより活性化され、肝星細胞に作用することを見出し (Gastroenterol. 120:1784, 2001; Ibid. 123:352, 2002) TGF- β 活性化反応を認識する特異抗体や同反応を阻害するデコイペプチドを作製し、新しい肝線維化検出、治療予防技術を開発していた (平成 19 年度保健医療分野における基礎研究推進事業)。その一環として、HCV が産生する NS3 プロテアーゼがセリンプロテアーゼである点に着目し、相崎と共同研究を開始し、NS3 プロテアーゼと潜在型 TGF- β 2 とをインキュベートすると活性型 TGF- β 2 が生じるという結果を得た。しかし、その後のコントロール実験から、NS3 による TGF- β 2 活性発現には、潜在型 TGF- β 2 は必要ではなく、実は、NS3 プロテアーゼそのものが TGF- β 2 の ELISA で検出される抗原性と TGF- β 疑似活性を有しており、さらに、松本のドッキングシミュレーションから NS3 プロテアーゼが TGF- β 受容体に結合するという驚きの事実が明らかとなった。これを証明するために、ドッキングシミュレーションから示された NS3 と TGF- β 受容体との予測結合ポリクローナル抗体を作製し、これらの抗体が NS3 による TGF- β 疑似活性を阻害する結果を得、特許出願した。

2. 研究の目的

それまでの研究成果に基づき、HCV NS3 の TGF- β 受容体結合・活性化を介する TGF- β 疑似活性発現による肝硬変促進の分子機構の基盤を解明し、これを患者検体で実証して、その制御機構を見出す。

- (1) NS3 による TGF- β 疑似活性を介する肝線維化誘導の検証
- (2) HCV 肝疾患モデル系 (ヒト肝キメラマウス) を用いた検証
- (3) NS3 の TGF- β 受容体結合・活性化機構、TGF- β 様シグナル伝達機構の解析
- (4) HCV 肝疾患患者検体における確認
- (5) NS3-TGF- β 結合阻害物質のスクリーニング

3. 研究の方法

ミンク肺上皮細胞株等の TGF- β シグナル解析モデル細胞、及びヒト肝細胞株培養系を用い、NS3 による TGF- β 受容体結合・活性化の分子機構、コラーゲン発現促進機構、炎症性サイトカインやアルコールと NS3 との相乗効果の分子機構を、Smad 標的プロモーターリポーター遺伝子、組換え融合蛋白質などのツールを用いた分子細胞生物学的解析により検証する。HCV 感染肝細胞表面におけるウイルス由来 NS3 の発現、並びに TGF- β 受容体との相互作用については、NS3 抗体、リン酸化 Smad 抗体などのツールを用いた免疫学的解析により検証する。NS3 誘発 TGF- β シグナル経路活性化など上記結果の HCV 肝疾患モデル系 (ヒト肝キメラマウス)、ヒトにおける検証は、肝組織の免疫組織学的解析、肝組織抽出液の生化学的解析、NS3-TGF- β 受容体結合阻害抗体を用いた動物モデル線維化解析により行う。同機構の制御方法は、分子機構の解析結果に基づきスクリーニングを行い、有望な阻害剤を得たら、その効果を HCV 肝疾患モデルで検証する。

4. 研究成果

- (1) NS3 による TGF- β 疑似活性を介する肝線維化誘導の検証

ヒト肝細胞株 Hc、ヒト肝星細胞株 LX-2 において、組換え NS3 が線維症に關与する標的遺伝子群 (TGF- β 1, collagen 1 1) の遺伝子発現を亢進することを見出した。さらに炎症性サイトカインの一つであり HCV 感染患者において高い血中濃度を示す TNF- α 、あるいはエタノールを前処理したとき、上記遺伝子発現ならびに TGF- β 1 型受容体下流でリン

酸化される Smad3 のレベルを相乗的に亢進することを発見し、その分子機構の一つとして TNF- α による TGF- β I 型受容体発現上昇により、NS3 に対する感受性を亢進していることが示唆された。

HCV 感染肝癌細胞株 Huh-7.5.1 細胞を用いて、感染したウイルス由来の NS3 が細胞表面上で TGF- β I 型受容体と相互作用することを見出した。

(2) HCV 肝疾患モデル系(ヒト肝キメラマウス)を用いた検証

まず、ヒト肝細胞移植キメラマウスに感染させる高純度遺伝子組換え HCV 粒子 (J6/JFH-1 キメラウイルス)調製のため、スケールアップが容易な限外濾過・クロマトグラフィー法を検討、細胞培養上清から感染性を維持した HCV 粒子の高効率濃縮精製に成功した。

ヒト肝置換キメラマウスに上記 HCV を感染させ、4 週間後から NS3-TGF- β 受容体結合阻害抗体を 11 週間、2 回/週 (0.5 mg/kg, 5 mg/kg) 投与した。感染 2 週間後、HCV RNA 濃度は $2 \sim 10 \times 10^5$ copies/ml に達し、その後もウイルス量はほぼ一定であった。16 週間後に解剖し解析を行い、HCV 感染によって蓄積された肝臓中のコラーゲン量、ならびに上昇した TGF- β 1, collagen 1 1 遺伝子発現は、NS3-TGF- β 受容体結合阻害抗体投与により半分以上に低下したことから、同抗体によって肝線維化の病態形成が抑制されることが示された。

(3) NS3 の TGF- β 受容体結合・活性化機構、TGF- β 様シグナル伝達機構の解析

大腸菌で発現した組換え融合タンパク質を用い、native PAGE法ならびに共免疫沈降法により、NS3がTGF- β の I 型受容体だけでなく、II 型受容体とも相互作用することを見いだした。さらにこの結合は、ドッキングシミュレーションにより予測された結合サイトのペプチドフラグメントにより競合的に阻害された。通常TGF- β は、親和性の高いII型受容体と結合した後、I型受容体 (TGF- β 単独では親和性の低い) をリクルートし複合体を形成させる。しかし、II 型および III 型受容体の共存によるNS3への結合の増強作用は見いだされず、TGF- β によるリガンド受容体複合体の形成とはメカニズムが異なる可能性が示唆された。

以上(1)-(3)より、少なくとも細胞・動物レベルにおいて、HCV NS3はTGF- β を模倣し、そのI型受容体と結合してSmadリン酸化を亢進する結果、コラーゲンならびにTGF- β の遺伝子発現を誘導し、肝線維化が促進されること

を発見した (Sci Rep 3:3243, 2013)。

(4) HCV 肝疾患患者検体における確認

患者肝切片において非実質細胞、特に肝星細胞が、NS3 と同じ非構造タンパク質の NS5A を発現が認められた。

血中の NS3 濃度を測定するため、 μ g/ml オーダーの検出感度をもつ ELISA を構築した。現在、NS3 抗体の選択を再検討し、より高感度な系の構築を進めている。

(5) NS3-TGF- β 結合阻害物質のスクリーニング

Smad 標的プロモーターリポーター遺伝子を導入したミンク肺上皮細胞株を用いたレポーターアッセイ実施をし、NS3 の結合を阻害するモノクローナル抗体を得た。同抗体は、HCV 感染により上昇した肝癌細胞株 Huh-7.5.1 細胞におけるリン酸化 Smad3 のレベルを顕著に抑制した。

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 2 件)

1. Sakata, K., Hara, M., Terada, T., Watanabe, N., Takaya, D., Yaguchi, S., Matsumoto, T., Matsuura, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamaguchi, T., Miyazawa, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Wakita, T., Imoto, M., Kojima, S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor., *Sci. Rep.*, 3:3243, 2013 査読有
doi:10.1038/srep03243
2. Watanabe, N., Aizaki, H., Matsuura, T., Kojima, S., Wakita, T., Suzuki, T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1):135-140, 2011 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.125

[学会発表] (計 9 件)

1. 坂田幸太郎ほか、C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β 疑似活性を介した肝線維化誘導機構 - TNF- α との協調作用による肝細胞の感受性亢進 -、第 40 回日本肝臓学会西部会、2013 年 12 月 6 日、長良川国際会議場、岐阜
2. Sakata, K. *et al.*, HCV NS3 protease plus TNF- α promotes liver fibrosis

via stimulating expression and activation of TGF- type I receptor., *The 20th Annual Meeting of The Japanese Society for the Research of Hepatic Cells*, 2013年9月27日、大阪国際会議場、大阪

3. 坂田幸太郎ほか、C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- シグナル活性化を介した肝線維化誘導機構の検討、*第39回日本肝臓学会東部会*、2012年12月7日、グランドプリンスホテル新高輪、東京
4. 小嶋聡一ほか、C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- 疑似活性を介する肝線維化、*第19回肝細胞研究会*、2012年6月29日、北海道大学、北海道
5. 坂田幸太郎ほか、C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- 疑似活性の発現、*第48回日本肝臓学会総会*、2012年6月8日、ホテル日航金沢、石川
6. 坂田幸太郎ほか、HCV NS3 Protease Mimics TGF- and Activates TGF- Signals via Type I Receptor, *The 1st Int Symp on Latent TGF- Activation*, 2012年2月25日、理研神戸研究所、神戸
7. 坂田幸太郎ほか、C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- I型受容体を介した TGF- シグナルの活性化、*第25回肝細胞研究会学術集会*、2011年12月17日、東京ガーデンパレス、東京
8. Kojima, S. et al., HCV NS3 protease mimics TGF- and activates TGF- signals via Type I Receptor., *The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2011*, 2011年11月8日、Boston, MA, USA
9. Kojima, S. et al., HCV NS3 protease mimics TGF- and activates TGF- signals via Type I Receptor., *16th Int Symp on Cells of the Hepatic Sinusoid*, 2011年9月22日、Firenze, Italy

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：TGF- 受容体の活性化を抑制する活性を有する化合物、そのスクリーニング方法、並びに C 型肝炎ウイルスに起因する疾患の予防又は治療のための組成物

発明者：小嶋聡一、原詳子、松本武久、高谷大輔

権利者：理化学研究所

種類：PCT

番号：JP2011/069620

出願年月日：2011年8月30日
国内外の別：国内&海外(PCT出願)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131127_1/

理研報道発表資料「C型肝炎ウイルス(HCV)が肝線維化を進行させるメカニズムを解明」2013年11月27日

日刊工業新聞「理研 線維化の仕組み解明 C型肝炎ウイルス 結合組織を増加」2013年12月5日

科学新聞 「C型肝炎ウイルスが肝線維化進行 理研 新たな分子メカニズム解明」2014年1月1日

NHK 総合テレビ ニュース「C型肝炎ウイルス(HCV)が肝線維化を進行させるメカニズムを解明」2014年1月4日

フジサンケイビジネスアイ「Science View C型肝炎ウイルスが肝線維化を進行させる仕組み解明」2014年2月12日

6. 研究組織

(1)研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA SOICHI)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別ユニットリーダー

研究者番号：10202061

(2)研究分担者

宮澤 恵二 (MIYAZAWA KEIJI)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：40209896

相崎 英樹 (AIZAKI HIDEKI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：00333360

(3)連携研究者

松本 武久 (MATSUMOTO TAKEHISA)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・上級研究員

研究者番号：20342652

松浦 知和 (MATSUURA TOMOKAZU)

東京慈恵会医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30199749