

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659177
 研究課題名（和文）
 C型肝炎ウイルス感染B細胞でのA20分子異常による癌化メカニズムに関する研究
 研究課題名（英文）
 Research on the mechanism of tumorigenesis by A20 dysfunction in HCV-infected B cells
 研究代表者
 楠 英樹（KUSUNOKI HIDEKI）
 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官
 研究者番号：90334060

研究成果の概要（和文）：本研究では、HCV感染B細胞でのA20分子異常によるB細胞リンパ腫発症メカニズムに関して検討した。HCV感染B細胞において、NF-κB抑制因子であるA20が発現亢進していること、更に、A20の一部が分解されていることを見いだした。HCV NS3プロテアーゼによるA20分解の可能性を検討したところ、HCV NS3プロテアーゼによるA20分解を示す直接的な結果は得られなかった。一方で、HCV感染B細胞において、A20を分解することが知られるMALT1が発現亢進していることから、MALT1がA20を分解している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of tumorigenesis by A20 dysfunction in HCV-infected B cells. We found that A20, a negative regulator of the canonical NF-κB pathway, was dramatically enhanced and partially cleaved in HCV-infected B cells. When the possibility of A20 cleavage by HCV NS3 protease was examined, the direct result, which shows the A20 cleavage by its protease, was not obtained. We also found that MALT1 was enhanced in CHC B cells. Thus, this observation suggests that enhanced expression of MALT1 in HCV-infected B cells may cleave A20.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	0	2,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：A20 B細胞リンパ腫 HCV感染 分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

全世界で約1.7億人、国内でも約200万人がHCVのキャリア（持続感染者）と推定されている。そのなかで、慢性肝炎から肝硬変へ移行し、さらには肝癌となり年間約3万人が死亡している。肝癌発症の約8割はHCV感染

が原因であることを考えると、HCV感染による肝癌の発症機序を明らかにすることは非常に重要であるが、未だにその糸口すら見つかっていない。申請者らはこれまでの研究で、慢性C型肝炎（CHC）患者においては、HCVが肝細胞のみならずB細胞にも感染し増殖する

こと、そしてBリンパ腫発症への関与が示唆されている AID(Activation-induced cytidine deaminase)の発現が、CHCのB細胞で顕著に亢進していることを報告してきた (Ito, M. et al. (2010) Clin. Immunol. 153: 459-465. ; Ito, M. et al. (2010) J. Innate Immun. 2: 607-617.). 一方ではごく最近、B細胞リンパ腫においてユビキチン化修飾酵素である TNFAIP3(Tumor necrosis factor alpha-inducing protein 3: 別名 A20) 遺伝子が改変され機能の消失が起きていることが報告され注目を集めている (Honma, K. et al. (2009) Blood 114: 2467-2475. ; Kato, M. et al. (2009) Nature 459: 712-716.). A20 は NF- κ B 活性を抑制することから、これらの結果は、A20 分子機能の阻害が癌化を誘導するというこれまでの仮説とよく合致している。非常に興味あることに、申請者らの最近の研究結果から、CHC-B 細胞では A20 分子の一部が N 末側約 60kDa (A20-p60) と C 末側約 30kDa (A20-p30) に切断されていることが明らかになった。さらには、A20 の配列中に HCV NS3/4A プロテアーゼが認識し A20-p60 と A20-p30 に切断可能なサイトの存在を予測することができた。つまり、HCV のプロテアーゼによる A20 機能不活性化と B 細胞リンパ腫の発症との関連が強く示唆されるに至った。

2. 研究の目的

本研究は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染が原因で誘発される様々な病変のなかで、特に B 細胞リンパ腫発症メカニズムの解明に焦点を当てている。HCV 感染と B 細胞リンパ腫は疫学的観点からその相関が強く示唆されているものの、リンパ腫発症メカニズムの研究および考察は未だ十分になされていない。慢性 C 型肝炎 B 細胞内での A20 分子と NF- κ B 関連蛋白質群の発現解析を行い、HCV 感染と B 細胞リンパ腫発症との関連性を明らかにすることを研究目的とした。

また、申請者らのこれまでの研究成果から、HCV プロテアーゼが、NF- κ B 抑制因子 (癌抑制因子) の 1 つである A20 分子の機能消失を引き起こすこと、慢性 C 型肝炎 B 細胞で顕著に発現亢進している AID (Activation induced cytidine deaminase) が A20 分子に遺伝子改変を引き起こしていることをそれぞれ調べ、HCV 感染による A20 分子の機能不活性化と B 細胞リンパ腫発症との関連性に関して検討することとした。

3. 研究の方法

(1) B 細胞群の分離

瀉血療法の際に採取された慢性 C 型肝炎

(CHC) 患者末梢血液、また対照としては健康人末梢血液より Ficoll を用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離し、さらには抗体結合磁気ビーズを用いて CD19 陽性細胞 (B 細胞) を分離した。

(倫理面の配慮) 本研究に用いた CHC 患者血液においては、その譲渡側、受領側の双方にて、倫理委員会からの承諾を得て実験に使用した。

(2) B 細胞内の蛋白質解析

得られた細胞から蛋白質を抽出し、A20、HCV NS3、NF- κ B 関連蛋白質分子、MALT1 の発現解析をウエスタンブロット法で実施した。

(3) HCV NS3 蛋白質と A20 蛋白質発現系の作製と調製

A20 全長と A20 ZnF1-7 (1 番目から 7 番目の Zn フィンガー領域) の培養細胞発現系を作製した。また、HCV NS3/4A 細胞培養発現系を用意した。

(4) HCV NS3/4A 蛋白質による A20 蛋白質の切断の検討

HCV NS3/4A と A20 全長、HCV NS3/4A と A20 ZnF1-7 を 293T 細胞に共発現して 1~3 日培養した後、細胞を回収し蛋白質を抽出した。A20 の N 末側及び C 末側抗体を用いて A20 の切断が行われているかをウエスタンブロット法で解析した。

(5) AID (Activation-induced cytidine deaminase) の発現系作製と調製

AID の大腸菌発現系を作製し、リコンビナント AID 蛋白質の調製を実施した。

4. 研究成果

(1) CHC 患者末梢 B 細胞 (CHC-B 細胞) における NF- κ B 関連蛋白質群の解析

NF- κ B 活性化シグナルに関わる分子である RIP1 (Receptor-interacting protein 1)、IKK (I κ B kinase) complex (IKK α , IKK β , IKK γ) の発現レベルを CHC-B 細胞と健康者 B 細胞で比較検討した。その結果、これら全ての分子の発現亢進が明らかになった。このことから、CHC-B 細胞では、NF- κ B が恒常的に活性化されている状態にあると考えられた。次に、NF- κ B を細胞質に留めておくのに重要な I κ B- α と NF- κ B p105 (p50 の前駆体)、更に、NF- κ B p65 の発現レベルを調べたところ、健康者 B 細胞と CHC-B 細胞の間での差はほとんど見られなかった。NF- κ B p50 の発現量は CHC-B 細胞で減少していた。これらの結果から、CHC-B 細胞内において、NF- κ B p65 と p50 は細胞質に留まっている可能性が高いと予想された。そこで、NF- κ B 活性化シグナルを

抑制する分子である A20 の CHC-B 細胞内での発現量を調べた。その結果、CHC-B 細胞内で A20 が発現亢進していることが明らかになった。CHC-B 細胞内で恒常的に発現亢進した A20 は、おそらく、同様に発現亢進している RIP1 や IKK complex の活性を抑えることにより、部分的に NF- κ B の活性を抑制している可能性が示唆された。

B 細胞リンパ腫では A20 の機能不活化が報告されている。HCV 感染 B 細胞リンパ腫においても A20 の機能低下や機能消失が生じていると考えられる。つまり、CHC-B 細胞内では、発現亢進した A20 が RIP1 や IKK complex の活性を抑え、部分的に NF- κ B の活性を抑制しているが、A20 の機能低下や消失により、NF- κ B は恒常的に活性化され、その結果、癌化を誘導する可能性が考えられる。

(2) CHC 患者末梢 B 細胞 (CHC-B 細胞) における HCV NS3 プロテアーゼ及び MALT1 分子の発現解析と A20 分解との関連性

CHC-B 細胞において、A20 分子の一部が N 末側約 60kDa (A20-p60) と C 末側約 30kDa (A20-p30) に切断されている可能性が示唆された。そこで、CHC-B 細胞における HCV NS3 及び MALT1 の発現レベルと A20 分子切断の関係を調べた。その結果、HCV NS3 プロテアーゼは CHC-B 細胞で発現を確認することができなかった。一方、MALT1 分子は CHC-B 細胞で顕著な発現亢進していることが明らかになった。興味深いことに、MALT1 は A20 を C 末側 37kDa や C 末側 30 kDa に分解することが他のグループから報告されている。C 末側 30 kDa は、私達が CHC-B 細胞内で確認した C 末側約 30kDa と一致しているようである。それ故、CHC-B 細胞内で発現亢進した MALT1 が、同様に発現亢進している A20 を一部切断している可能性が示唆された。

(3) HCV NS3 プロテアーゼによる A20 切断の検討

本研究では CHC-B 細胞での HCV NS3 の発現を確認できなかったが、以前、CHC-B 細胞での HCV NS3 プロテアーゼの発現を検出している (Ito, M. et al. (2010) Clin. Immunol. 153: 459-465.)。そこで、培養細胞内に HCV NS3/4A 蛋白質と A20 全長、HCV NS3/4A 蛋白質と A20 ZnF1-7 を 293T 細胞に共発現し、A20 が切断されるかどうか検討した。その結果、どちらにおいても A20 の N 末側 60kDa 及び C 末側 30kDa のバンドを観測することができなかった。今後、更なる条件検討を実施し、HCV NS3/4A 蛋白質による A20 分子切断の可能性に関して結論を出したいと考えている。

(4) AID による A20 遺伝子変異導入の検討

慢性 C 型肝炎 B 細胞で顕著に発現亢進している AID (Activation-induced cytidine deaminase) が A20 分子に遺伝子改変を引き起こしていることを NMR 解析から明らかにするため、AID の大腸菌発現系を作製し、大量調製を試みた。しかしながら、NMR 解析に必要な純度及び十分量の AID を調製するのが困難であり、NMR 解析まで到達するまでには至らなかった。現在、更なる AID 調製の条件検討を実施している。

(5) まとめ

本研究は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染が原因で誘発される B 細胞リンパ腫発症において、特に A20 分子異常によるリンパ腫発症メカニズムの解明に焦点を当てた。まず、慢性 C 型肝炎 B 細胞 (CHC-B 細胞) 内での A20 分子と NF- κ B 関連蛋白質群の発現解析を行い、A20 分子が CHC-B 細胞で発現亢進していることを明らかにすると共に、恒常的に発現亢進した A20 が NF- κ B 活性化シグナルを抑制している可能性が示唆された。CHC-B 細胞内で A20 分子が部分的に分解されている可能性を検討したが、現在までに A20 が HCV プロテアーゼにより切断されている直接的な結果は得られていない。今後、更なる検討が必要だと思われる。一方で、CHC-B 細胞内で発現亢進した MALT1 が、同様に発現亢進している A20 を一部切断している可能性が高い。

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) M. Ito, H. Kusunoki, K. Mochida, K. Yamaguchi, and T. Mizuochi
HCV infection and B-cell lymphomagenesis. Advanced in Hematology Volume 2011: Article ID 835314, 2011.
- (2) M. Ito, H. Kusunoki, and T. Mizuochi
Peripheral B cells as reservoirs for persistent HCV infection. Frontiers in Microbiology Volume 2: Article 177, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠 英樹 (KUSUNOKI HIDEKI)
国立感染症研究所 血液・安全性研究部
主任研究官
研究者番号：90334060

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

水落 利明 (MIZUOCHI TOSHIKI)
国立感染症研究所 血液・安全性研究部
室長
研究者番号：30135701

大隈 和 (OKUMA KAZU)
国立感染症研究所 血液・安全性研究部
室長
研究者番号：80315085