

平成30年6月15日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21346

研究課題名(和文) C型肝炎とポルフィリン症の分子的関連性の解明

研究課題名(英文) Investigation of the link between hepatitis C and porphyria cutanea tarda

研究代表者

中埜 貴文 (Nakano, Takafumi)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：40720793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポルフィリン症の一形態である晩発性皮膚ポルフィリン症(PCT)の誘発因子としてのC型肝炎ウイルス(HCV)感染の役割が注目されているが、その因果関係は明らかになっていない。本研究で、HCVコア蛋白質がヘム生合成関連蛋白質の発現変動を介して細胞内ポルフィリン代謝を変動させることが示され、HCVコア蛋白質により惹起されるポルフィリン代謝変動は、ポルフィリンの生合成回転の上昇とコプロポルフィリンの細胞外排泄の亢進という側面を持つ可能性を見出した。さらに、HCVコア蛋白質が、ポルフィリン症誘発因子の一つであるエタノールによるヘム生合成の律速酵素であるALAS1の発現上昇を増強することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Earlier reports have shown a high prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection in patients with PCT. While these observations implicate HCV infection as a risk factor for PCT pathogenesis, the mechanism of interaction between the virus and porphyrin metabolism is unknown. Here, we showed that HCV core protein triggers abnormal porphyrin metabolism, expressed by excess coproporphyrin excretion and higher porphyrins synthesis rate, via the change in the expression of enzymes and transporters involved in heme synthesis pathway. In addition, we confirmed that HCV core protein strengthen the ethanol-induced increase in ALAS1 protein expression that is a rate-limiting enzyme in heme synthesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：C型肝炎 晩発性皮膚ポルフィリン症 ヘム生合成 ポルフィリン Ethanol

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染することで発症するC型肝炎は高率で慢性化し、慢性肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌へと進展する。C型肝炎では肝臓における病変だけではなく、種々の肝外病変を示すことがこれまでに報告されている。

ヘム生合成過程の酵素反応が先天的あるいは後天的に傷害されることで、中間生成物であるポルフィリンが、肝臓や皮膚に蓄積して引き起こされる疾患をポルフィリン症と呼ぶ。近年になりC型慢性肝炎時において肝内にポルフィリン蓄積が起こっていることが報告され、疫学的調査からポルフィリン症の一形態である晩発性皮膚ポルフィリン症(PCT)は、C型肝炎と高い合併率を示すことが見出された。ポルフィリンはポルフィン環骨格を持つ化合物の総称であり、ヘムの生合成はポルフィリン中間体が合成され、最後に鉄イオンが配位されるという8つの酵素反応により完成される。PCTの発症因子として、ヘム生合成経路の中で、uroporphyrinogenからcoproporphyrinogen(Cp_{gen})への変換反応を触媒するURODの機能低下が原因の一つとして考えられているが、HCV感染者においては肝内ポルフィリン量の上昇とUROD活性の低下は必ずしも相関しないため、C型肝炎とPCTの直接的な関係性は見出されていない(Brudieux et al. J Viral Hepat, 2001)。

その中で、申請者らはHCVの構造蛋白質であるコア蛋白質を発現させたヒト肝細胞株において、ミトコンドリアへの鉄の取り込みが亢進し、鉄起因性の酸化ストレスが増強されることを報告した(Sekine et al. Toxicol. App. Pharmacol., 2015)。ミトコンドリアは細胞内鉄代謝およびヘムの生合成の主たる場となるオルガネラであることから、HCVコア蛋白質が細胞内ポルフィリン代謝に影響を与えている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究ではC型肝炎時のポルフィリン代謝攪乱のメカニズムを明らかにすることで、C型肝炎とPCTの分子レベルでの関連性を解明することを目的とした。HCVゲノム由来蛋白質のうち、肝細胞機能に影響を与える中心的蛋白質とされているHCVコア蛋白質が肝細胞内のヘム-ポルフィリン代謝に影響を与えていることが、C型肝炎とPCTの高合併率の背景因子として存在していると仮説を立て検討を行った。

3. 研究の方法

HCVの構造蛋白質であるコア蛋白質を安定発現させた肝由来細胞を用いて、ヘムの前駆体であるアミノレブリン酸(ALA)を曝露後、細胞内及び細胞外培地中のポルフィリン及びヘムを抽出し解析した。さらに、RNAおよび細胞内蛋白質を抽出し、ヘム生合成関連

遺伝子および蛋白質の発現を解析した。

4. 研究成果

(1)HCVコア蛋白質が細胞内ポルフィリン代謝に与える影響:

ALAを曝露し、細胞内へのポルフィリンの蓄積および細胞外への排泄を解析したところ、HCVコア蛋白質発現細胞においてCoproporphyrin(Cp)の細胞外排泄量が増加しており、一方でProtoporphyrin(Pp)の細胞内蓄積量および排泄量が減少していた。さらに、最終産物であるHemeの細胞内含量が減少していることが明らかになった。肝細胞内ヘム生合成経路は、ALA生合成より始まり、Cp_{gen}、Ppの順に変換され、最終的に鉄イオンが配位されヘム生合成が完了する。このことから、コア蛋白質発現細胞ではCp_{gen}以降の過程が阻害され、細胞内のPp量が減少するとともに細胞内に蓄積したCpが細胞外に排泄されていることが考えられた。さらに、Cpの細胞内量に比べ、細胞外排泄がHCVコア蛋白質発現細胞において大きく増加していたことから、Cpの積極的な輸送系が存在していることが示唆された。

(2)HCVコア蛋白質がヘム生合成関連遺伝子および蛋白質発現に与える影響:

HCVコア蛋白質安定発現細胞を用いて、ポルフィリン代謝に関わる酵素群、及びトランスポーター群の遺伝子発現をReal-time PCRにより解析を行ったところ、HCVコア蛋白質発現細胞においてURODのmRNA発現が亢進している一方で、CPOXの発現が低下していた。また、ポルフィリンのトランスポーターであるABCG2、FLVCR1の発現が亢進している一方で、ミトコンドリア内にCp_{gen}を取り込む働きを持つABCB6の発現に若干の低下が観察された。

さらにFLVCR1、ABCG2、ABCB6およびALAS1の蛋白質発現をWestern blotにて比較検討したところ、蛋白質レベルではFLVCR1の著しい発現上昇が見られる一方で、ABCG2の発現には変化が見られなかった。またヘム生合成の律速酵素であるALAS1発現の上昇が認められた。これらのことから、HCVコア蛋白質により惹起されるポルフィリン代謝異常は、ポルフィリンの生合成回転の上昇とポルフィリンの細胞内輸送機能の変動という側面を持つ可能性が見出された。

さらに、ヘムの排泄輸送体であるFLVCR1をsiRNAによりノックダウンした結果、Cpの細胞外への排泄が低下しUroporphyrinの細胞外排泄およびPpの生成量が増加することが見出された。このことから、FLVCR1が細胞内Cpの排泄輸送体としてヘムの生合成経路に関与している可能性が示唆された。本研究の結果より、HCVコア蛋白質が、ヘム生合成関連蛋白質の発現変動を介して細胞内ポルフィリン代謝に影響を

与えることが明らかになった。

(3) HCV コア蛋白質発現細胞におけるヘム合成経路への Ethanol の影響：
HCV コア蛋白質により細胞内のヘム合成が阻害され Cp の細胞外への排出が亢進することが見出されたが、一方でこの変化は PCT の病態の特徴を完全に説明しうるものではなく、HCV 感染に伴うポルフィリン代謝変動単独では PCT の発症には不十分である可能性が示唆された。そこで C 型肝炎モデル細胞におけるポルフィリン症誘発因子のヘム合成経路に与える影響について検討を行ったところ、ポルフィリン症誘発因子の一つである Ethanol 曝露下で HCV コア蛋白質発現細胞特異的に、ALAS1 の発現が Ethanol の濃度に比例して増加していることが明らかとなった。一方で ALAS1 の mRNA 発現には HCV コア蛋白質は影響を及ぼさなかった。また、免疫染色法により ALAS1 の細胞内局在を検討した所、HCV コア蛋白質発現細胞において Ethanol を曝露したことにより ALAS1 がミトコンドリアにより局在化する傾向が観察された。これらのことから、HCV コア蛋白質発現細胞においては、Ethanol が ALAS1 の翻訳後の過程でその発現量を上昇させる影響を及ぼしており、Ethanol 処置によりヘムの前駆体であるポルフィリンの合成が加速していることが示唆された。

引用文献

Brudieux E, de Lédighen V, Moran MJ, Fontanellas A, Oui B, Trimoulet P, Belleannée G, Piton A, Raymond JM, Doutre MS, Amouretti M, de Verneuil H, Couzigou P. Hepatic porphyrin concentration and uroporphyrinogen decarboxylase activity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2001 Jan;8(1):41-7.

Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Feb 1;282(3):237-43.

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 1 件)

Nakano T, Moriya K, Koike K, Horie T., Hepatitis C virus core protein triggers abnormal porphyrin metabolism in human hepatocellular

carcinoma cells., *PLoS One.*(査読有)
2018 Jun 1;13(6):e0198345. doi:
10.1371/journal.pone.0198345.

〔学会発表〕(計 4 件)

C型肝炎モデル細胞におけるエタノールのヘム合成経路への影響の検討
中埜 貴文, 磯崎泰也, 三浦美香, 濱田和真, 森屋恭爾, 小池和彦, 堀江利治
日本薬学会第 138 年会(金沢) 2018 年 3 月 25-28 日

The effect of HCV core protein on heme synthesis pathway in human hepatocellular carcinoma cells
Takafumi Nakano, Kazuma Hamada, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike and Toshiharu Horie
日本薬物動態学会 第 31 回年会(松本) 2016 年 10 月 13-15 日

HCV コア蛋白質が惹起する細胞内ポルフィリン代謝異常に関する検討
中埜貴文, 濱田和真, 森屋恭爾, 小池和彦, 堀江利治
日本薬学会第 136 年回(横浜) 2016 年 3 月 26-29 日

Takafumi Nakano, Kazuma Hamada, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Toshiharu Horie
Hepatitis C virus core protein triggers abnormal porphyrin metabolism in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells.
日本薬物動態学会第 30 回年会(東京) 2015 年 11 月 12-14 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/yakubutsudoutaigaku.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

中埜 貴文 (NAKANO, Takafumi)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：40720793