

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790339
 研究課題名（和文） C型肝炎ウイルス培養細胞系における細胞障害誘導機構の解明
 研究課題名（英文） Study on the mechanism of hepatitis C virus infection-induced cytopathic effect
 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
 研究員番号：40437497

研究成果の概要：本研究では、HCV clone J6/JFH1 株と Huh7.5 細胞を用いて、HCV 感染初期における肝細胞の細胞障害の分子機序について検討した。HCV 感染により、ミトコンドリアにおける活性酸素種 (ROS) の産生が増加し、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し、ミトコンドリア障害を介する caspase-3 依存的なアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

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

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型慢性肝炎患者において肝細胞のアポトーシスの亢進が認められている。一般にウイルス感染に伴うアポトーシスは、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) やナチュラルキラー細胞を介した宿主免疫応答もしくはウイルス蛋白質により生じるミトコンドリア障害、小胞体ストレスによって誘導されると考えられる。HCV 蛋白質には構造、非構造の 10 個の蛋白質があり、それぞれがウイル

ス粒子形成と肝組織におけるウイルスゲノムの複製を行うとともに、肝細胞障害に深く関与している。しかし、HCV 蛋白質がどのように協力的に働き、ミトコンドリア障害あるいは小胞体ストレスを誘導するのかが明確ではない。一方、これまでの HCV 研究の制約となっていたのは実験系であったが、近年になり、劇症肝炎患者由来の HCV ゲノムを用いることにより、培養細胞中での HCV 感染実験が可能になった。

2. 研究の目的

本研究ではロックフェラー大学 Rice 博士より分与を受けた HCV clone J6/JFH-1 株と Huh7.5 細胞を用いて、HCV 感染初期による肝細胞の細胞障害の分子機序について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシスの解析：生細胞数は WST-1 法により測定し、アポトーシスの確認は ELISA 法による細胞内ヒストン/DNA 断片複合体の検出により行った。Caspase-3、8、9 の活性は市販のキットにより測定し、免疫ブロット法及び蛍光抗体法にて活性化型 caspase-3 を検出した。

(2) ミトコンドリア障害の解析：Bax の発現量、Bid の活性化及び cytochrome *c* の放出は免疫ブロット法により、また、活性化型 Bax は蛍光抗体法により調べた。ミトコンドリア膜電位は rhodamine-123 を用いて FACS 解析にて調べた。ミトコンドリアの形態変化を蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡により観察した。

(3) ミトコンドリアにおける酸化ストレスの解析：MitoSox を用いてミトコンドリアにおける reactive oxygen species (ROS) の産生を調べた。

(4) ER ストレスの解析：GRP78 及び GRP94 の発現誘導を免疫ブロット法により調べた。

4. 研究成果

(1) HCV 感染により、感染細胞の生細胞数は、非感染細胞と比較し、有意に減少した (図 1A)。また、HCV 感染後、4 日目及び 6 日目に、感染細胞における DNA 断片の量は非感染細胞と比較し、顕著に増加した (図 1B)。これらの結果より、HCV 感染は細胞死を誘導することにより細胞増殖を抑制すると考えられた。

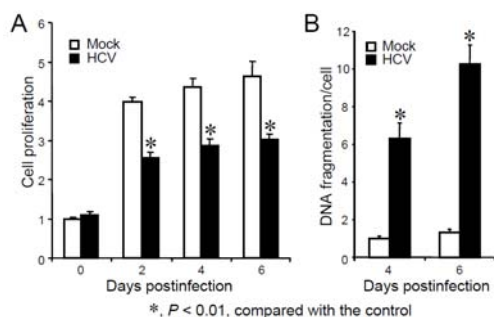


図 1. HCV 感染による Huh7.5 細胞の細胞死の誘導。

(2) HCV 感染により、caspase-3 が活性化され、感染後 4 日目及び 6 日目の感染細胞の caspase-3 の活性は非感染細胞のそれぞれ 6 倍、12 倍であった (図 2A)。また、感染後 6 日目に、procaspase-3 の切断及び caspase-3 の基質である PARP の切断が認められた (図 2B)。さらに、活性化型 caspase-3 を認識する特異的抗体を用いて HCV 感染による caspase-3 の活性化を検討した。その結果、感染後 6 日目に、感染細胞の約 20%において、caspase-3 の活性化が見られた (図 2C)。また、活性化型 caspase-3 の核への移行も観察された。これらの結果から、HCV 感染は caspase-3 の活性化及び核への移行を促進し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

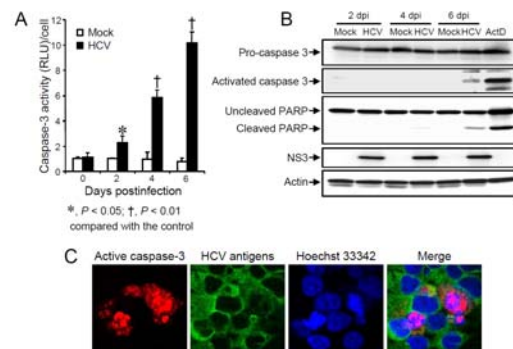


図 2. HCV 感染による caspase-3 の活性化。

(3) HCV 感染により、アポトーシス促進蛋白質である Bax が、ミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア上での蓄積が見られた (図 3A)。これに対して、アポトーシスを制御する蛋白質である Bak 及び Bcl-2 の発現量の変化は認められなかった。また、アポトーシスの刺激を受けると、Bax の構造変化が起こり、N 末端及び C 末端が露出することが報告されており、我々は、構造変化した Bax の N 末端を認識する特異的抗体を用いて、HCV 感染による Bax の構造変化を検討した。その結果、感染後 6 日目に、感染細胞の約 15%において、Bax の構造変化が認められた (図 3B)。これらの結果から、HCV 感染は Bax の活性化を促進することが明らかとなった。

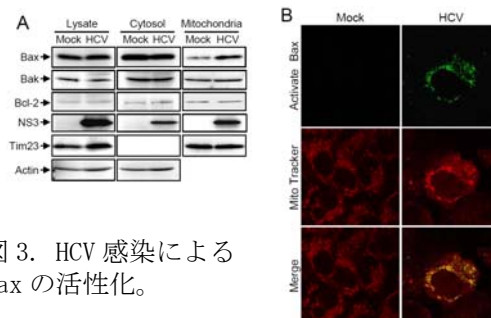


図 3. HCV 感染による Bax の活性化。

(4) HCV 感染後 4 日目及び 6 日目に、感染細胞のミトコンドリア膜電位は非感染細胞と比較し、顕著に低下した (図 4)。

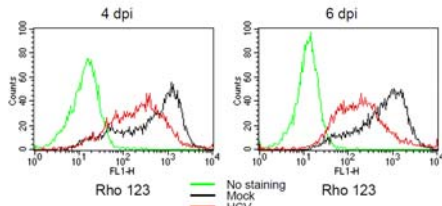


図 4. HCV 感染によるミトコンドリア膜電位の低下。

(5) 蛍光顕微鏡 (図 5A) 及び電子顕微鏡 (図 5B) により、HCV 感染によるミトコンドリアの形態の変化について調べた。その結果、感染後 6 日目に、非感染細胞と比較したところ、感染細胞の約 40% でミトコンドリアの膨化及び凝集が見られた。

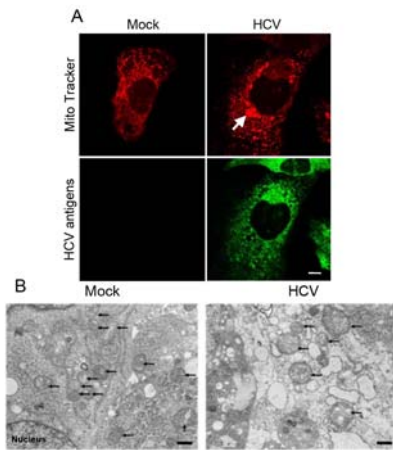


図 5. HCV 感染によるミトコンドリアの膨化。

(6) HCV 感染により、感染細胞におけるミトコンドリア内の cytochrome *c* の細胞質への放出 (図 6A)、及び caspase-9 の活性化 (図 6B) が確認された。これらの結果から、HCV 感染はミトコンドリア障害を介するアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

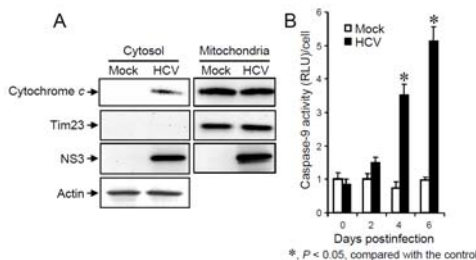


図 6. HCV 感染による cytochrome *c* の放出及び caspase-9 の活性化。

(7) アポトーシスの誘導は、ミトコンドリア経路以外に、caspase-8 を介する経路も存在することが知られている。従って、HCV 感染による caspase-8 の活性化を調べた。その結果、HCV 感染により、caspase-8 の活性が若干増加した (図 7A)。また、アポトーシス促進タンパク質である Bid が、caspase-8 によって分解され、その断片 tBid が Bax の活性化及び cytochrome *c* の放出を促進することも知られている。従って、HCV 感染による Bid の切断の有無を調べた。その結果、感染細胞において、Bid の切断は認められなかった (図 7B)。これらの結果から、我々の実験系においては、caspase-8 を介するアポトーシス誘導経路は重要な役割を果たしてない可能性が示唆された。

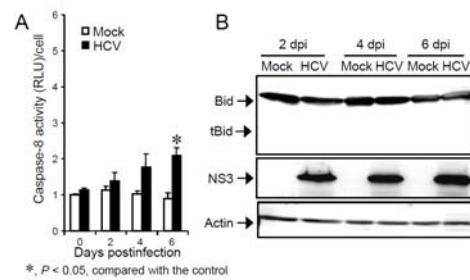


図 7. HCV 感染による caspase-8 の活性化

(8) HCV 感染により、ミトコンドリアに酸化ストレスが誘導されるか、どうかについて、MitoSOX を指標にして検討した。その結果、HCV 感染後 6 日目に、感染細胞の約 25% において、ミトコンドリアにおける ROS の産生が認められた (図 8)。この結果より、HCV 感染はミトコンドリアの酸化ストレスを誘導することが明らかとなった。

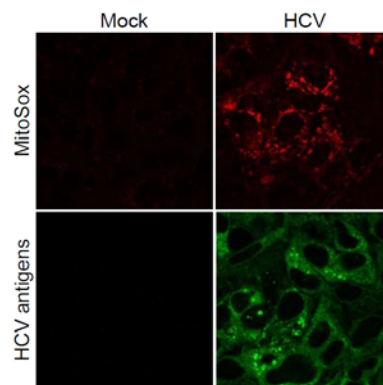


図 8. HCV 感染によるミトコンドリア内の ROS の産生。

(9) HCV 感染により、ER ストレスが誘導されるか、どうかについて GRP78 及び GRP94 この二つの蛋白質の発現を指標にして検討した。その結果、HCV 感染により、GRP78 及び GRP94、いずれも発現量の変化は見られなかった(図 9)。この結果から、我々の実験系においては、HCV 感染による ER ストレスの誘導は認められなかった。

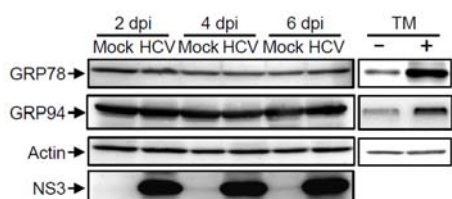


図 9. HCV 感染は ER ストレスを誘導しない。

以上の結果から、本実験系においては、HCV 感染により、caspase-8 及び ER ストレスを介するアポトーシス誘導経路より、むしろ Bax を介するミトコンドリア経路のアポトーシス誘導が細胞障害に重要な役割を果たすことと考えられた。今後、HCV 感染細胞における Bax の活性化の分子機序を解明する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* 2009 in press 査読あり

(2) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters.

J. Hepatol. 50 (5): 883-894, 2009

査読あり

(3) Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J. Virol.* 82 (21): 10375-10385, 2008 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

(1) Deng Lin, 足達哲也、北山喜九美、分玉泰彰、北澤荘平、石戸総、勝二郁夫、堀田博 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析

第 56 回日本ウイルス学会学術集会

2008 年 10 月 26 日 岡山

(2) Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis.

15th international symposium on hepatitis c virus & related virus

October 7, 2008

San Antonio, USA

(3) Deng Lin, 長野基子、北山喜九美、安春英、分玉泰彰、堀田博 C 型肝炎ウイルス感染による細胞変性効果の分子機序の解析

第 55 回日本ウイルス学会学術集会

2007 年 10 月 22 日 札幌

(4) Deng L, Nagano-Fujii M, Kitayama K, An C, Bungyoku Y, Hotta H.

Hepatitis C virus infection induces apoptosis via a mitochondrial-related caspase pathway.

14th international symposium on hepatitis c virus & related virus

September 11, 2007

Glasgow, United Kingdom

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

研究員番号: 40437497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし