

200/0448

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ウイルス性慢性疾患の発症に關与する宿主遺伝子の解析

平成 13 年度 研究報告書

主任研究者 鈴木 哲朗
国立感染症研究所ウイルス第三部

平成 14 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書

- ウイルス性慢性疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析----- 1
主任研究者 鈴木哲朗

II. 分担研究報告書

- 肝細胞癌および非癌組織での遺伝子発現様式の病理学的解析-----10
神代正道

- C型肝炎ウイルスによるアポトーシス調節に関与する
細胞遺伝子の解析-----13
松浦善治

- C型肝炎ウイルストランスジェニックマウスにおける
サイトカイン発現とシグナル伝達制御機構の解析-----20
小池和彦

- ウイルス性慢性肝疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析-----30
亀岡洋祐

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----39

IV. 主な研究成果の刊行物・別刷-----42

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

ウイルス性慢性疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析

主任研究者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨

本研究では、ウイルス性慢性肝疾患特にC型肝炎の発症、進展に関わる宿主遺伝子、またインターフェロン（IFN）感受性に関連する宿主遺伝子を同定し、その情報を基に新たな予防法、個々の患者に最適な治療法を提供することを目的とする。本年度は以下の成績を得た。

1. C型肝炎ウイルス（HCV）コア遺伝子のトランスジェニック（TG）マウスの肝臓でTNF α 、IL1 β の発現上昇とそれに伴う JNK-AP-1 pathway の活性化を明らかにした。そこで、肝疾患関連遺伝子として IL1 β 、TNF α を選択し C型肝炎患者検体について SNP 解析を行った。その結果、両サイトカインのプロモーター領域にC型肝炎の発症あるいは進展に関与する可能性のある SNP を2ヶ所ずつ同定した。
2. HCV 全蛋白を持続的に発現するヒト肝細胞株の遺伝子発現プロファイリングから、発現が亢進する 17 遺伝子、低下する 5 遺伝子を同定した。HCV コア蛋白と細胞蛋白との相互作用を解析し、RXR α 、proteasome subunit PA28 γ との細胞内結合を明らかにした。さらに、種々の肝細胞癌症例に関する病理組織学的解析から、IFN- α レセプター AR-2 鎖の発現に個人差があることを明らかにした。これらの成績を基に疾患関連、IFN 感受性関連候補遺伝子を選抜し患者検体による多型解析を実施する予定である。

分担研究者

神代正道 久留米大学医学部 教授
松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授
小池和彦 東京大学医学部 助教授
亀岡洋祐 国立感染症研究所遺伝子資源室
主任研究官

協力研究者

松浦知和 東京慈恵会医科大学 講師
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
堤 武也 国立感染症研究所ウイルス第二部
協力研究員

A. 研究目的

我が国における肝臓病の大部分は肝炎ウイルス感染に起因する。ウイルス肝炎のうち、B型およびC型肝炎は各々B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染により、肝炎が慢性化し、さらに感染後20～30年を経て、肝硬変へ進展すること、および肝細胞癌が合併する。一般に慢性肝炎患者は10年から30年の経過で30～40%が肝硬変さらには肝細胞癌へ移行するが、慢性肝疾患の進行には個人差が大きいことが知られている。感染ウイルス量の違いがその主要な原因

となる症例は限られており、宿主細胞側の要因に左右されるケースが数多く存在すると考えられる。ウイルス慢性肝炎に対する、現在最も有効な治療法は IFN 療法であるが、効果の期待できる C 型肝炎の場合でも著効を示すのは 20~30% であり、その治療効果は個人差が大きい。また、B 型肝炎では、IFN 投与による HBV の完全排除は困難であるとされている。

本研究では、ウイルス性慢性肝疾患の発症、進展に関わる宿主遺伝子、また IFN 感受性に関連する宿主遺伝子をそれぞれ同定し、その情報を基に新たな予防法、個々の患者に最適な治療法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 遺伝子発現プロファイリング

HCV 発現細胞、非発現細胞より ISOGEN 試薬を用いてトータル RNA を抽出し、さらに Oligotex-dT30 mRNA purification kit により poly(A) RNA を調製した。逆転写反応の際、Cy3-dUTP あるいは Cy5-dUTP を取り込ませプローブを作製した。ヒト 2304 遺伝子からなるマイクロアレイスライドとハイブリダイズさせた後、スライドスキャナーでスキャンし蛍光強度を定量した。

(2) 酵母ツーハイブリッド法による HCV コア結合蛋白質遺伝子の単離

コア結合蛋白質 N 末端から 173 個のアミノ酸をコードする遺伝子を pGBKT7 に組み込み、これを罠蛋白質 (bait) として用いて、pACT2 で作製したヒト肝臓 cDNA ライブラリーおよびヒト胎児脳 cDNA ライブラリーからクロンテックのプロトコールにしたがって bait と結合する蛋白質遺伝子の単離をおこなった。DO プレート上で増殖したコロニーを単離し、X-gal を含む agarose ゲルを加え、beta-galactosidase 活性の強いものを陽性クローンとした。単離された陽性クローンから全 DNA

を抽出し、大腸菌に遺伝子導入したのち、プラスミドをもつ菌を選択し、回収して塩基配列を決定した。

(3) コア蛋白が細胞内シグナル伝達系へ及ぼす影響の検討

転写因子の活性の検討は、マウス肝臓より核蛋白を抽出し、³²P でラベルした各転写因子の認識配列を含んだオリゴ DNA を用いて、ゲルシフト法により行った。MAPK assay は、市販のキット (JNK Assay Kit, p38 MAPK Assay Kit, p44/42 MAPK Assay Kit; 全て Cell Signaling 社) を用いて行った。IKK の活性については、大腸菌から発現精製した GST-IκB-α を基質として、肝臓のライセートから anti-IKK 抗体により免疫沈降法で回収した IKK により in vitro kinase assay を行った。

(4) タイプ I-IFN レセプターの発現

久留米大病理学教室で独自に樹立された 11 種類の分化度の異なる肝細胞癌細胞株と 2 種類の混合型肝癌株の合計 13 株の肝癌の細胞株について、I 型 IFN レセプター AR-2 鎖遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析した。RNA 抽出試薬 RNAzol を用いて各細胞株よりトータル RNA を調製した。PCR プライマーは既報 (EMBO J. 14: 5100-5108. 1995) に従った。細胞表面の AR-2 鎖の蛋白レベルでの発現を flow cytometry 法で検討を行った。また、肝癌組織における AR-2 鎖の発現に関しても免疫組織学的検討を行なった。一次抗体としては、抗ウサギ抗 Hu-IFN-αR2 細胞外領域抗体を用いた。

(5) サイトカインプロモーターの SNP 解析

TNF α はそのコード領域上流の遺伝子発現調節領域 1kb ほどの間に 11 の SNP が見つかっている。コーカソイドにおいては転写開始点上流 - 238 の変異が肝炎の慢性化へ関与していることが疑われており、- 308 の変異とともに、日本人 C 型肝炎患者における遺伝子

型の偏りをダイレクトシーケンスにより解析した。一方、IL1 β の転写制御領域には転写開始点上流-31と-511にSNPが存在しており、わけても-31のT/C変異はTATAボックスに位置し、その転写制御に直接影響を及ぼしている。このIL1 β 転写制御領域の変異についても患者検体についてダイレクトシーケンスにより解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該試験研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。次項(C. 結果と考察)を参照されたい。

C. 結果と考察

(1) HCV 蛋白を発現する培養肝細胞、TG マウス及び患者組織を用いた肝疾患関連遺伝子の探索

1-1. HCV 発現培養肝細胞を用いた疾患関連遺伝子の探索

これまで、HCV 全蛋白を持続的に発現する細胞株は human osteosarcoma cell を用いた報告があるのみで、ヒト肝臓由来細胞では確立されていなかった。本研究では、human EF1 α プロモーター支配下で HCV 遺伝子を発現させ、薬剤選択することにより HCV 全蛋白を持続的に発現するヒト肝細胞株 Hep394 を作製した。この細胞株は少なくとも3ヶ月以上、HCV 蛋白を安定に産生、プロセスすることを確認した(図1)。

Hep394 細胞及び対照細胞株を用いて cDNA

マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行い、さらに RT-PCR 法により確認を行い発現が亢進する遺伝子を17種類、低下する遺伝子を5種類同定した(表1、図2)。細胞増殖に関わる遺伝子としては、forkhead 転写因子 FREAC-1、RNA 結合蛋白 PABP2、Ras suppressor Rsu-1 が up-regulate し、Rb-associated protein RbAp48 が down-regulate していた。また、形質転換能など細胞環境への影響が知られている HCV コア蛋白と細胞蛋白との相互作用を two-hybrid 法、免疫沈降法、pull-down 法などで解析し、コア蛋白と RXR α 、proteasome subunit PA28 γ との細胞内結合を明らかにした。コア蛋白と PA28 γ の局在が核で一致し、PA28 γ の局在を変化させたときコア蛋白の局在も PA28 γ の局在と常に一致することを見出した。

1-2. HCV TG マウスを用いた遺伝子発現プロファイリング

昨年度、HCV コア遺伝子 TG マウスの肝組織を用いた遺伝子発現解析から、TNF α 、IL1 β の発現上昇を観察したが、本年度これらのサイトカインによって調節されている細胞内シグナル伝達系の解析を行いゲルシフト法、kinase assay などにより JNK-AP-1 pathway の活性上昇を明らかにした。一方、p38 MAPK, ERK, IKK などの kinase 活性、及びその下流の転写因子(ATF-2, Elk-1, NF- κ B)の活性には変化が認められなかった。これらの結果より、コア蛋白の発現が TG マウスの肝臓内において TNF- α 、IL-1 β などのサイトカインの発現を増加させ、細胞内シグナル伝達経路に変化を与え、下流の転写因子の活性を調節することで様々な遺伝子の発現に影響を与えていることが示唆される。実際に AP-1 で発現調節されることが知られている c-jun や collagenase 遺伝子が、トランスジェニックマウスの肝臓内で

増加しているというデータも得られている。JNK-AP-1 pathway は、細胞増殖やアポトーシス等にも深く関与しており、トランスジェニックマウスの肝臓内でのこの経路の変化が肝臓の steatosis や肝細胞癌の発生に深く関わっている可能性が考えられる。

1-3. 肝癌組織および肝癌細胞株における IFN 関連遺伝子の発現解析

IFN- α の作用は、細胞表面の特異的なレセプターである I 型 IFN レセプターを介して伝達される。このレセプターは、AR-1 鎖と AR-2 鎖の 2 つから構成され、後者が、IFN との結合ユニットであり、IFN の作用発現に最も重要であると報告されている。そこで、種々の肝細胞癌症例について、IFN- α レセプター AR-2 鎖の発現、IFN- α の細胞増殖抑制作用を検討しこの IFN レセプター AR-2 鎖の発現に個人差があることを明らかにした。また、11 種類の分化度の異なる肝細胞癌細胞株と 2 種類の混合型肝癌株を用いた解析から、IFN- α が、肝癌細胞株に対しアポトーシスや細胞周期の進行停止などを誘導し直接的に増殖を抑制することが示された。また、レセプターの発現レベル、アポトーシス誘導能、細胞周期の進行停止誘導で細胞間較差が観察された。

(2) ヒト遺伝子解析用試料の収集

厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、インフォームドコンセントのための説明文書及び同意文書をそれぞれ作成した。個人識別情報の匿名化プログラムをつくり、本プロジェクトのゲノム解析研究に用いる試料を収集するためのプロトコルを確立した。研究実施機関である国立感染症研究所、東京大学医学部附属病院、東京慈恵会医科大学病院において医学研究倫理委員会に申請し承認された。ウイルス性慢性肝疾患患者検体の収

集を開始した（東京大学病院：平成 13 年 8 月、慈恵医科大学病院：平成 13 年 12 月）。採取した検体連結不可能匿名化を行った後、感染症研究所へ移送し遺伝子解析を実施している。これまでに 110 検体が収集され、個人情報ともそれぞれの管理責任者によって厳格に管理されている。

(3) 遺伝子多型解析

HCV コア蛋白を肝臓で持続的に発現し肝細胞癌を発症する TG マウスで IL1 β 、TNF α の発現亢進とそれに伴う JNK-AP1 経路の活性化を認められたことから、これらのサイトカイン遺伝子のプロモーター領域について C 型肝炎の発症進行に関与する遺伝子変異の解析を行った。IL1 β についてはプロモーター領域の 2 ケ所の変異 (SNP) が C 型肝炎発症に関与する可能性が示された。TNF α プロモーター領域についても変異の頻度は低いが、慢性肝炎から肝硬変/肝細胞がんへの移行の相対危険度は増加する傾向が観察された。IL1 β 、TNF α は前炎症性サイトカインとして炎症制御に関与し、ウイルスのクリアランスに重要な役割を演じていることが考えられる。両サイトカインプロモーターに見い出された SNP は、C 型肝炎の発症機序を解析する上で重要な足がかりになると考えられる。現在得られている患者検体は無症候性キャリアーを含んでおらず、今後、無症候性キャリアー検体の収集がこの解析を成功に導く重要な鍵となると思われる。

D. 結論

(1) HCV コア TG マウスの遺伝子発現プロファイリングから、肝疾患関連遺伝子として IL1 β 、TNF α を選択し C 型肝炎患者検体について SNP 解析を行った。両サイトカインのプロモーター領域に C 型肝炎の発症あるいは進展に関与する可能性のある SNP を 2 ケ所ずつ同定した。

(2) HCV 蛋白を持続的に産生する細胞株、分化度の異なる種々の肝癌細胞を用いた遺伝子発現プロファイリング、ツーハイブリッド法による HCV 蛋白結合因子の検索などから、肝疾患の発症、進展に関わる候補遺伝子あるいは IFN 感受性に関連する候補遺伝子が 20 数種類選択し、これらの遺伝子について、患者検体による多型解析を実施する。

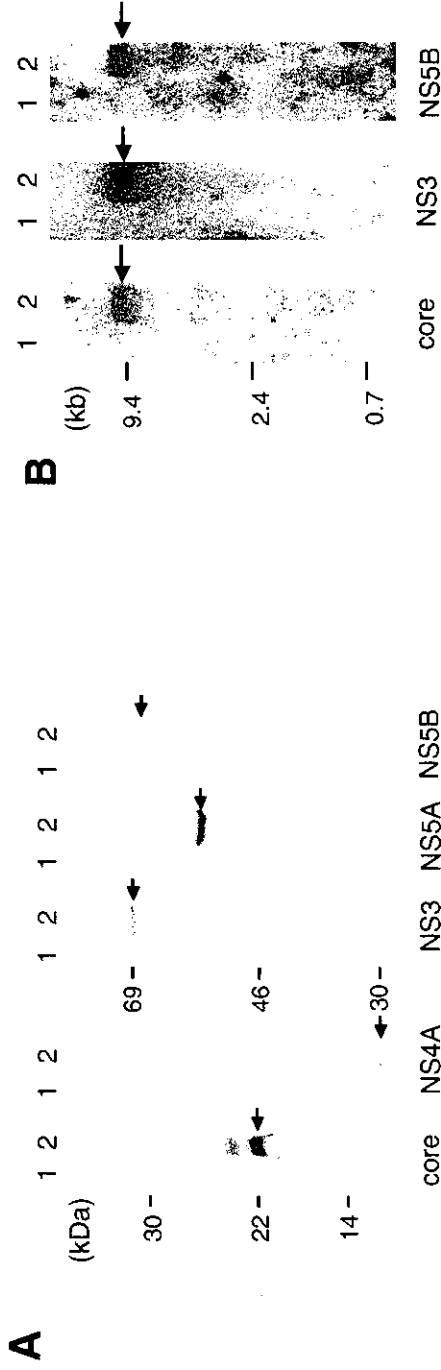
E. 研究発表

論文発表

1. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (2002) 35: 937-946.
2. Suzuki, R., Tamura, K., Li, J., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* (2001) 280: 301-309.
3. Suzuki, T. The ubiquitin system and oocyte maturation. *In Reproductive Biotechnology* (2001) 53-57.
4. 相崎英樹、鈴木哲朗、永森静志、宮村達男、ヒト肝細胞と肝炎ウイルス、細胞 (2001) 33: 418-421.
5. Ogasawara, S., Yano, H., Higaki, K., Takayama, A., Akiba, J., Shiota, K. and Kojiro, M. Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines. *Hepatol. Res.* (2001) 20: 97-113.
6. Akiba, J., Yano, H., Ogasawara, S., Higaki, K. and Kojiro, M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* (2001) 18 : 257-264.
7. Takayama, A., Yano, H., Ogasawara, S., Higaki, K. and Kojiro M. Expression of Hu-IFN- α R2 chain of type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous tissues. *Int. J. Molecular Med.* (2000) 6: 621-627.
8. Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, Matsuura Y. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* (2001) 279: 343-53.
9. Okuma K, Matsuura Y, Tatsuo H, Inagaki Y, Nakamura M, Yamamoto N, Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukaemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J Gen Virol* (2001) 82: 821-30
10. Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* (2001) 33: 1533-43
11. Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* (2001) 286: 263-75
12. Moriishi K, Koura M, Matsuura Y. Induction of Bad-Mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology* (2002) 292: 258-71
13. Koike K. Hepatitis C virus and

- hepatocarcinogenesis. *J. Gastroenterol* (2002). in press.
14. Koike K, Moriya K, Kimura S. The role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to multistep carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* (2002). in press.
 15. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* (2002) 16:185-194..
 16. Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* (2002) 62: 29-37
 17. Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N, Koike K, Kimura S, Yasuda K, Iino S, Green J. IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol.* (2001) 126:92-100.
 18. Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H, Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Miyamura, T., Kimura, S., and Koike, K. Oxidative stress in the absence of inflammation in the liver of a mouse model for hepatitis C virus -associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* (2001) 61: 4365-4370.
 19. Yotsuyanagi, H., Yasuda, K., Shintani, Y., Moriya, K., Fujie, H., Tsutsumi, T., Nojiri, N., Juji, T., Hoshino, H., Shimoda, K., Hino, K., Iino, S., and Koike, K. Frequent presence of hepatitis B virus in the sera from HBs antigen-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* (2001) 9:1093-1099.
 20. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* (2001) 20: 39-51.
 21. Arai Y.T., Takahashi H., Kameoka Y, Shiino T., Wimalaratne O., Lodmell D.L. Characterization of Sri Lanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of nucleoprotein gene. *Acta Virologica.* (2002), in press.
 22. Funatsuki, K., Hashido, K., Matsunami, M., Kameoka, Y., Iwabuchi, K., Tsukeda, H., Tsuchida, K., Takada, N., Nakajima, Y., and Maekawa H. Rapid identification of *Bombyx mori* cells using PCR amplification following a direct procedure for genomic DNA preparation. *J. Insect Biotech. Sericol.* (2001) 70:129-136.
 23. Yagita K, Izumiyama S, Tachibana Y, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka, Y., Kuroki, T., and Endo, T. Molecular-characterization of cryptosporidium isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.* (2001) 87:950-5.
 24. 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、組織標本の肺吸虫卵を用いた塩基配列解読による虫種同定の試み、日本臨床寄生虫学会誌: (2001) 12: 153-156.
 25. 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、肺切除により診断を得た肺吸虫症: 患者肺組織標本の虫嚢内虫体を材料とした塩基配列解読による虫種同定の試み、日本臨床寄生虫学会誌: (2001) 12: 59.

図1. HCV全蛋白を持続的に発現する細胞株Hep394の解析



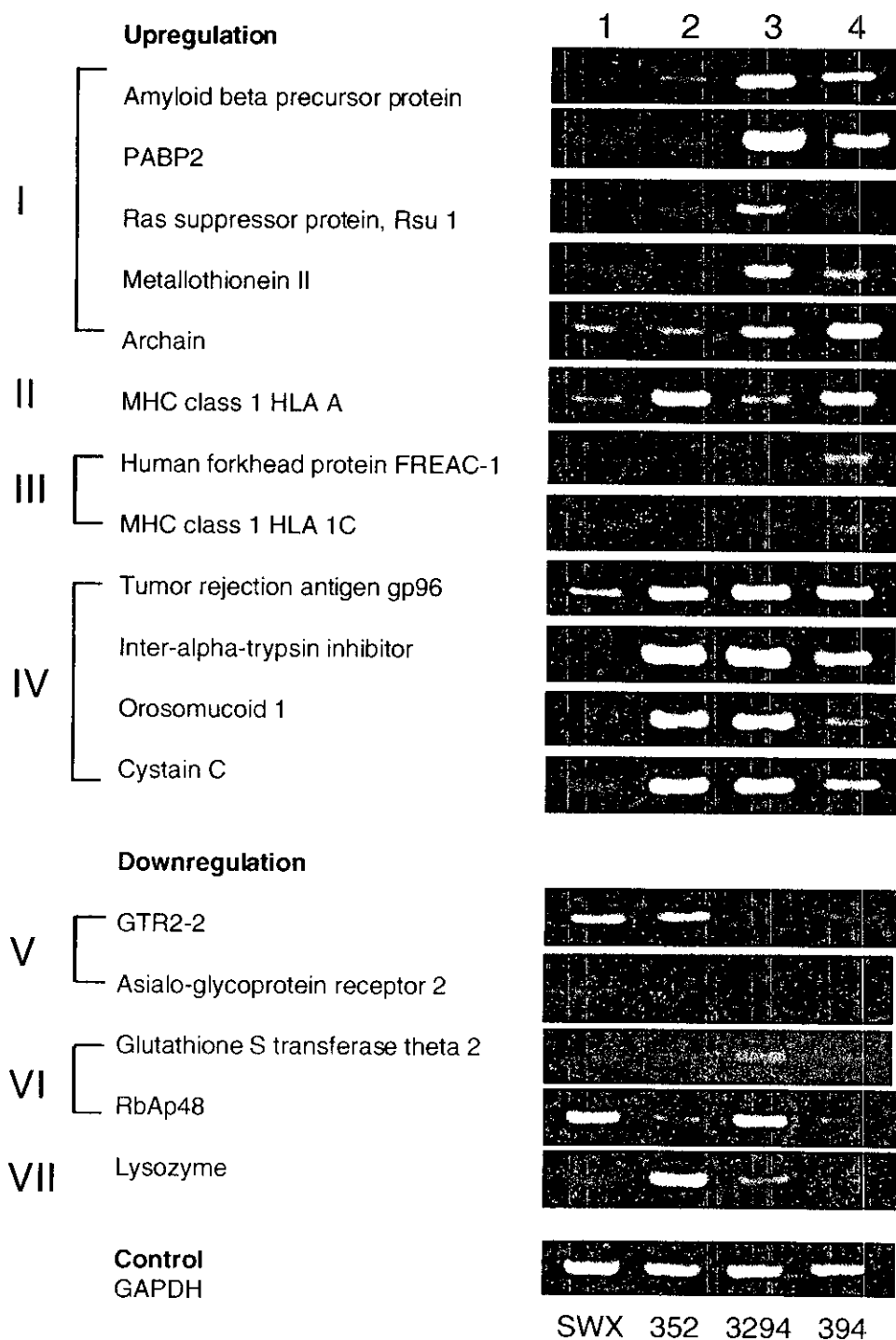
A. ウエスタンブロット法による発現蛋白の同定； HCV 全長の翻訳領域を組み込んだヒト肝細胞株 Hep394 (lanes 2)およびベクターのみの HepSWX (lanes 1)を溶解し、15 % および12.5 % SDS-PAGE で泳動し、HCV の core, NS3, NS4A, NS5A, NS5B 蛋白にたいするモノクローナル抗体でウエスタンブロット法を施行した。矢印で示したようにそれぞれの抗体と特異的に反応する適切なサイズのバンドが確認された。このことにより間接蛍光抗体法による観察も含めて、この HCV 全長の翻訳領域を組み込んだヒト肝細胞株ではプロセッシングを受けた全ての HCV 蛋白が産生していることが確かめられた。**B.** ノーザンブロット法による発現遺伝子の解析； HepSWX (lanes 1) および Hep394 (lanes 2) 細胞から全 RNA を抽出し、5'末をラベルしたHCV の core, NS3, NS5B 領域の遺伝子に対するプローベを用いて、ノーザンブロット法を施行した。矢印で示したようにそれぞれのプローベと特異的に反応する適切なサイズのバンドが確認された。このことから、スプライスを受けていない全長の RNA が産生していることが確認できた。**C.** コア蛋白発現量の解析； ヒト肝細胞株 HepSWX (lanes 1), Hep394 (lanes 2) (コア領域のみ), Hep352 (lanes 3) (コアから NS3 領域まで), Hep394 (lanes 4) の細胞中の HCV コア蛋白の量を fluorescence enzyme immunoassay 法にて測定した。Hep394 のコア蛋白の量は Hep39, Hep352 に比較して少ないものの、この値は慢性肝炎患者肝細胞中のコア蛋白量に相当するものであった。

表 1. Hep 394細胞のcDNAマイクロアレイとRT-PCR用プライマー

Gene	Accession No.	Sense primer	Antisense primer	Size of PCR product (bp)	Ratio (range)
Up-regulation					
Cyr61	AA777187	TAAATGGTTAATTCACATA	TGTAGCTTTTGGGGAGGG	95	2.7 (2.1-3.3)
Tumor rejection antigen gp96	AA598758	ACCCACATTTTCTCTGTGACCCA	CACCATTTGGATCCTGTGTGGA	140	2.4 (2.3-2.5)
Inter-alpha-trypsin inhibitor	R06580	CATTGCTCGGAATGTTCAAGTT	TCCTGCAAAAGTCTCCCATCTG	206	1.5 (0.9-2.1)
Amyloid beta precursor like protein 2	H89517	GCGATCTTTGTTCTCAGCACG	GCTTTAGAGAAGGAAGCAGCCC	202	1.9 (1.3-2.5)
Metallothionein 1B	M13485	GCTGTGCTGCAAAAGGCTCAT	GAATGTAGCAAAACCGTCAAG	130	2.1 (1.1-3.2)
Orosomucoid 1	AA700876	TCTCTGTCTGTGATCCAAGGCTG	ATGCTGACAAGCCAGAGACGAC	202	2.0 (1.2-2.5)
Cystatin C	AA599177	AGCCCTGTGTGAGCAACAAA	GGCCTGTGCTAATTCACCTCTTA	154	1.7 (0.9-2.1)
PABP2	AA040742	TACCATGATGTGGTCTAGCCC	CCTTGGCCTTAGATGAGTCCCT	223	1.6 (1.2-1.9)
TGF-beta superfamily protein	AA450062	AAGTGACCATGTGCATCGG	TCTTGTATCTGCGGTGCAT	68	1.9 (1.7-2.1)
Ras suppressor protein, Rsu 1	L12535	AAACCAATGCTGCGTGTGA	AAGCCAGAGCCCACTATGGAA	202	2.0 (1.7-2.3)
Human forkhead protein FREAC-1	AA112660	GTCAAAAATGCTGCACCTTAGCA	TAATCAAAAACACCCGGTAGGC	232	1.9 (1.6-2.3)
MHC class1 HLA 1C	AA464246	AGGCACCATGAAGTTGAGAC	GACCTCTGGCATCTCTTCTGC	205	2.3 (1.3-3.7)
Metallothionein II	AA872383	GCAATGGCTCAGTGTTG	GAACAGCTCTTCTCCACAGAT	92	2.0 (1.1-2.9)
Cardiac gap junction	AA487623	CACATGATCTGATGGACTAGG	AAACTACGGTCAATGTTACAGC	61	2.1 (1.7-2.8)
Archain	AA598401	TTACCCCAAAAAGTAATCTCA	GGACAAGAAGTCTGTTCATGT	46	1.9 (1.5-2.2)
MHC class1 HLA-A	AA644657	TCATCAACCTCTCATGGCAAG	ATGTCCACCATGACCCCTCTTC	201	1.7 (1.6-1.8)
Down-regulation					
RbAp48	X74262	TGATCGCAGACTGAATGTCTGG	TGCCATTTGCCACACACTTGC	200	0.8 (0.5-1.5)
Lysozyme	M19045	GGAAATCAGCCTAGCAAACCTGGA	CAGCGATGTTATCTTGCAGCAA	208	0.5 (0.3-0.7)
Glutathione S transferase theta 2	AF240786	GGCAAGTCTTAAGCAAGCCAT	AGGTCAATCTGAAGGCCAAGG	201	0.5 (0.4-0.7)
GTR2-2	AA775872	TCTACTTTCATGGCTGGAGGAGG	TCATTTCCCGCTGAAGCTT	202	0.5 (0.3-1.0)
Ubiquitinol cytochrome c reductase complex subunit VI requiring protein	AL136663	GGTGTCTTCTCTGCAAGA	CTTTCTCCCGCTGTCTGGAAT	200	0.6 (0.5-0.7)
Asialoglycoprotein receptor 2	R98050	CTCTCTTTGCTCAGCTCTTCCC	TGGAACGATGACTTCTTGCCCTG	200	0.3 (0.2-0.5)
Control					
GAPDH	M33197	ACCACAGCTCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTGTGCTGTA	452	

Sense- and anti-sense primers of the genes selected as up-regulated and down-regulated by the results of cDNA microarray are shown. Their accession numbers and the expected sizes of the specific PCR products are also indicated.

図 2. 3 種類の HCV 発現細胞株における遺伝子発現の変化



ヒト肝細胞株 HepSWX (ベクターのみを組み込んだもの), Hep352 (コアから NS3 まで), Hep3294 (NS3 から NS5B まで), Hep394 (全翻訳領域) より抽出した全 RNA について半定量 RT-PCR 法で解析した。解析した遺伝子はマイクロアレーの結果を参照した。GAPDH 遺伝子はコントロールである。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担報告書

肝細胞癌および非癌肝組織での遺伝子発現様式の病理学的解析
(主に肝細胞癌培養株におけるインターフェロンの増殖抑制効果について)

分担研究者 神代正道 久留米大学病理学 教授

研究要旨

ヒト肝癌組織より分離した細胞株及び肝組織についてインターフェロン- α レセプターの発現、インターフェロン- α の細胞増殖抑制作用を検討した。その結果、多くの肝癌細胞がインターフェロン- α の作用発現に重要なI型インターフェロンレセプターのAR-2鎖を発現していることや、インターフェロン- α が、肝癌細胞株に対しアポトーシスや細胞周期の進行停止などを誘導し直接的に増殖を抑制することが示された。解析した11種類の分化度の異なる肝細胞癌細胞株と2種類の混合型肝癌株においては、レセプターの発現レベル、アポトーシス誘導能、細胞周期の進行停止誘導で細胞間較差が観察された。

A. 研究目的

インターフェロン- α は、抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、免疫応答調節作用、MHC抗原発現調節作用など、多彩な生物活性を有するサイトカインである。インターフェロンの肝癌細胞に対する直接的な作用を明らかにすることは、肝発癌予防や肝癌治療の観点から重要である。本研究では、インターフェロン- α のレセプターの発現、インターフェロン- α の細胞増殖抑制作用やその機序解明を目的とした。

B. 研究方法

I. 肝癌におけるタイプIインターフェロンレセプターの発現

インターフェロン- α の作用発現にはレセプターの発現が必須である。インターフ

ェロン- α の作用は、細胞表面の特異的なレセプターであるI型インターフェロンレセプターを介して伝達される。I型インターフェロンのレセプターは、AR-1鎖とAR-2鎖の2つから構成されており、後者が、インターフェロンとの結合ユニットであり、前者は、高親和性のレセプターを形成するために必要なユニットであるといわれている。AR-2鎖には、更に、細胞膜表面に結合しているshort form (AR-2b)とlong form (AR-2c)、細胞外に分泌されるsoluble form (AR-2a)の3種類がある。これらは同一遺伝子のexon skipping, alternative splicing, 異なったpolyadenylation部位の使用により作られる。インターフェロンの作用発現にはAR-2cが最も重要であると報告されてい

ることから肝癌細胞における AR-2 鎖の発現を検討した。

使用した細胞株は、当教室で独自に樹立された 11 種類の分化度の異なる肝細胞癌細胞株と 2 種類の混合型肝癌株の合計 13 株の肝癌の細胞株である。まず、細胞表面の AR-2 鎖の蛋白レベルでの発現を flow cytometry 法で検討を行った。また、細胞株のみではなく肝癌組織における AR-2 鎖の発現についても免疫組織学的検討を行なった。

2. INF- α による増殖抑制効果

インターフェロン- α による肝癌培養細胞の増殖抑制効果を見るため、インターフェロン- α (1-1024 U/ml, OIF, 大塚製薬) を 13 種類の肝癌細胞株に添加し 96 時間培養した。

C. 研究結果

1. 肝癌におけるタイプ I インターフェロンレセプターの発現

12 株で検出可能であったが、全体的に低いレベルの発現であった。陽性細胞率が 10%を超えていたのは、その内 2 株だけであった。次に、RT-PCR 法を用いて mRNA レベルの AR-2 のレセプターの発現を検討したところ long form と soluble form はすべての細胞株で発現を認め、short form は、1 株を除きすべての株で発現を認めた。long form (AR-2c) のバンドの発現がもっとも強く認められ、細胞表面には short form (AR-2b) よりも long form (AR-2c) がより強く発現している事が示唆された。AR-1 鎖の発現も RT-PCR 法を用いて検討したが、全ての細胞

株で発現を確認した。

免疫組織学的検討：

69 例の外科切除肝細胞癌組織及びその非癌部組織を用いて AR-2 鎖の発現に関して免疫組織化学的に検討を行ったところ、癌部では 53 例 (77%) で、非癌部では 61 例 (88%) で陽性所見を認めた。癌部も非癌部も、どちらも膜表面に主に陽性像を認めたが、細胞質にも若干陽性像が認められた。また、非癌部において門脈域の炎症細胞浸潤のより強い部分でより強い染色性を認めた。12 例の正常肝組織も同様に染色を行ったが全ての症例で発現を確認できなかった。肝細胞癌の分化度・被膜侵襲・肝内転移などのを病理学的なパラメーターと AR-2 鎖の発現との間に関連性は認めず、非癌部に関しても慢性肝炎と肝硬変で発現の差を認めなかった。

2. インターフェロン- α による増殖抑制効果の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用

大部分の細胞株で時間依存性の細胞増殖抑制作用が認められた。また、インターフェロン- α 接触後 96 時間目では、すべての細胞株で種々の程度に濃度依存性に細胞増殖が抑制された。13 株中 5 株では、インターフェロン- α 接触後 96 時間目で非添加のコントロールと比べ生細胞数が 50%以下まで低下し、これらの細胞株の 50%増殖抑制濃度 (IC50) は、86.3 U/ml から 465.5 U/ml の範囲内であった。インターフェロン- α の増殖抑制作用に対する感受性と細胞株のオリジナル腫瘍の組織学的異型度との間に関連性は認めなかった。また、細胞表面の AR-2 鎖の発現は、インターフェロン- α による増殖抑制作用と必

ずしも相関していなかった。

3. インターフェロン- α の増殖抑制のメカニズム

インターフェロン- α を肝癌細胞の培地に添加し、48 から 72 時間培養し細胞形態を観察すると細胞質の縮小や核の濃縮・核の断片化など、アポトーシスに特徴的な細胞像の出現が認められた。またこのような細胞から DNA を採取しアガロースゲル内で電気泳動すると、アポトーシスの生化学的なマーカーである DNA ladder の形成が認められた。このようなアポトーシスの誘導は細胞間で程度の差をみとめるものの 13 株中 10 株で認められた。アポトーシス誘導が認められなかった 3 株の増殖抑制の機序を解明するため、インターフェロン α の細胞周期に及ぼす作用の検討を行うと、すべての細胞株で細胞周期の進行停止誘導が認められ、S 期での停止誘導が 11 株、G₂/M 期での停止誘導が 1 株、G₁ 期での停止誘導が 1 株で認められた。

D. 考察

今回の検討により、肝癌細胞がインターフェロン- α の作用発現に重要な I 型インターフェロンのレセプターの AR-2 鎖を発現していることや、インターフェロン- α が、肝癌細胞株に対しアポトーシスや細胞周期の進行停止などを誘導し直接的に増殖を抑制することが示された。近年、インターフェロン治療が C 型肝炎ウイルスの排除に有効でなくとも、C 型慢性肝炎患者の肝細胞癌発症を有意に抑制すると言う報告が複数の施設からなされ注目されている。その肝発癌抑制のメカニズムは、未だ詳細には解明されていないが、今回

の我々の検討結果は、インターフェロン投与が直接的に肝癌細胞のアポトーシスを誘導したり、細胞周期の進行停止を通じて肝発癌を抑制している可能性を示唆するものと言える。

さらに、インターフェロンレセプターに関しては、全ての肝癌細胞でインターフェロンの作用発現に重要な AR-2 鎖が発現されていること、肝細胞癌組織では非癌部と同程度の高い頻度で AR-2 鎖を発現しており、発現量は症例によりばらつきが強い傾向にあることがわかった。また、AR-2c 鎖の発現は、炎症と関連している可能性が示唆された。

以上、本研究で明らかにした種々の肝癌増殖抑制効果の機序の存在は、インターフェロン投与が前癌病変あるいは微小な早期肝癌に対し、直接的増殖抑制作用を示し、臨床的な肝癌への進展を遅延あるいは阻止している可能性を示唆するものであると言える。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yano H, Iemura A, Haramaki M, et al: Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. *Hepatology*. 29: 1708-1717, 1999
2. Takayama A, Yano H, Ogasawara S, et al: Expression of Hu-IFN- α R2 chain of Type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous tissues. *Int. J. Mol. Med*. 6: 621-627, 2000

C型肝炎ウイルスによるアポトーシス調節に関与する細胞遺伝子の解析

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター 教授

協力研究者 森石恆司 大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター 助教授

研究要旨

前年度、我々はC型肝炎ウイルスによるアポトーシス調節に関与する細胞遺伝子を同定するため、アポトーシス調節活性をもつHCVコア蛋白質を餌蛋白質として用いた酵母2ハイブリットシステムにより、PA28 γ 遺伝子を単離したことを報告している。今年度は、哺乳類細胞内におけるコア蛋白質とPA28 γ との結合を確認した。免疫沈降法によってHCVコア蛋白質は過剰発現および内在性PA28 γ と結合することが示された。さらに、HCVコア蛋白質とPA28 γ の局在が核で一致し、PA28 γ の局在を変化させたときHCVコア蛋白質の局在もPA28 γ の局在と常に一致していた。また、コア蛋白質内アミノ酸38-57の領域はPA28 γ 結合に必須であった。以上の結果から、コア蛋白質とPA28 γ は培養細胞内で結合することが明らかになった。

A. 研究目的

高齢（50歳以上の年齢）で発症する肝細胞癌患者のほとんどがC型肝炎ウイルス（HCV）に感染している。実際、トランスジェニックマウスの実験結果からHCVのウイルス構造蛋白質であるコア蛋白質の肝細胞癌誘導能が示され、HCV蛋白質の発現によって肝細胞癌が発症すると考えられている。コア蛋白質遺伝子は慢性肝炎患者から高頻度に検出され、持続感染においても重要な役割を担う。コア蛋白質を単独で発現させたとき、アポトーシスが誘導あるいは抑制されることから、コア蛋白質は直接あるいは間接的にアポトーシス関連蛋白質を調節し、癌化あるい

は細胞死を誘導しているとも考えられているが、未だ正確な細胞内機能ははっきりしていない。そのようなことから我々はコア蛋白質が直接作用する宿主細胞内の標的蛋白質の同定を試みている。

昨年度、コア蛋白質を餌蛋白質（bait）とした酵母Two-hybridシステムを用いてコア結合蛋白質遺伝子の単離を試みた。ヒト肝臓cDNAライブラリーおよびヒト胎児脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、PA28 γ 遺伝子（前回はCi-24と仮称されている）を単離した。昨年度、単離した過剰発現したPA28 γ がHCVコア蛋白質に結合することおよび酵母2ハイブリットによって酵

母内で結合することを報告した。酵母 2 ハイブリット法では、疑陽性が多くみられることから、細胞内の局在が一致すること、内在性蛋白質で結合すること、哺乳類細胞内で結合することなどの証拠が蛋白質間結合を証明するためには必要になる。今年度は、PA28 γ と HCV コア蛋白質が *in vitro* および培養細胞内で結合することを報告する。

B. 研究方法

・コア結合蛋白質遺伝子の単離

コア結合蛋白質 N 末端から 173 個のアミノ酸をコードする領域を *Pfu turbo DNA* ポリメラーゼ (Stratagene) で増幅し、pGBKT7 (クロンテック) の *EcoRI* と *BamHI* サイトに組み込んだ (pGBKT7 HCVcore 173)。これを餌蛋白質 (bait) として用いて、pACT2 で作製したヒト肝臓 cDNA ライブラリーおよびヒト胎児脳 cDNA ライブラリー (クロンテック) からクロンテックのプロトコールにしたがって bait と結合する蛋白質遺伝子の単離をおこなった。DO プレート上で増殖したコロニーを単離し、X-gal を含む agarose ゲルを加え、beta-galactosidase 活性の強いものを陽性クローンとした。単離された陽性クローンから全 DNA を抽出し、大腸菌 JM109 に遺伝子導入したのち、アンピシリンによってプラスミドをもつ菌を選択し、回収して塩基配列を決定した。

・培養細胞への遺伝子導入

細胞へのプラスミド DNA の導入は lipofectamine (ライフテック) を使って行われた。トランスフェクト前日に、HEK293T 細胞 (5×10^5 細胞) を 10cm プレートに撒き、

トータル 2.5ugDNA をトランスフェクトした。48 時間後、細胞を回収し、Lysis buffer (20mM Tris-HCl pH7.5、135mM NaCl、1% Triton X-100、10%グリセロール、protease inhibitors) で溶解し、使用するまで -80°C で保存した。

・免疫沈降法による蛋白質間結合の解析

免疫沈降法は既報に準じた方法によって行われた。トランスフェクト 48 時間後、細胞 (10^7 個) に 0.5ml の Lysis buffer を加え、4°C 30 分で溶解し、遠心分離後の上清を免疫沈降に使用した。20ul の 50% Sepharose 4B で 4°C で 90 分間反応することで、非特異的に沈降してくる蛋白質を遠心分離した。上清に抗-HA 抗体 HA11 (Babco) を 1ug を加えて、4°C で 5h 反応した。それに 20ul の 50% Protein G Sepharose 4B (Amersham-pharmacia) を加えて、4°C で 90 分間反応した。Lysis buffer で 5 回、遠心洗浄を行い、沈殿した蛋白質を loading buffer 中に煮沸し溶出した。SDS-12% アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって蛋白質を分離したのち、Hybond C super (Amersham-pharmacia) に転写し、抗 Flag 抗体 M2 (シグマ) と Super Signal WestDura (Pierce) によって Kodak X-omat フィルム上に免疫沈降した蛋白質を検出した。

C. 研究結果と考察

コア蛋白質のコード領域には 191 アミノ酸がコードされているが、173 アミノ酸にプロセッシングされ、核と細胞質に局在する。成熟したコア蛋白質に結合する標的蛋白質を同定する目的から、コア蛋白質 173 アミノ酸を餌蛋白質として pGBKT7 ベクターに組み込みヒト肝臓ライブラリーおよびヒト胎児脳

ライブラリーから目的遺伝子の単離を試みた。ヒト肝臓 cDNA ライブラリーからは 10 万個スクリーニングしたところコア蛋白質と強く結合する陽性クローンを単離することはできなかったが、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーから 20 万個スクリーニングしたところ PA28 γ をコードする遺伝子をもった強い陽性クローンを単離した。昨年度、酵母 2 ハイブリット法および哺乳類細胞に強制発現した蛋白質による免疫沈降法によって、PA28 γ と HCV コア蛋白質が結合することを報告している。

過剰発現条件下、コア蛋白質が PA28 γ と結合したが、過剰発現による非特異的な結合による可能性も否定できない。そこで、内

在性の PA28 γ との結合を解析した。293T 細胞にコア蛋白質あるいはコア蛋白質の C 末端 deletion 変異体を発現し、内在性 PA28 γ との結合を免疫沈降によって判定した。コア蛋白質には HA エピトプタグを付加し、抗 HA 抗体によってコア蛋白質を免疫沈降し、共沈した PA28 γ をウサギ抗 PA28 γ 抗体で検出した。コア蛋白質 3 フォーム (1-191 全長、1-173、1-151) が内在性コア蛋白質と結合した (図 1)。また、様々なコア蛋白質 deletion 変異体との結合を同様の免疫沈降法および酵母 2 ハイブリット法によって PA28 γ との結合を解析したところ、コア蛋白質のアミノ酸 38-57 の領域が PA28 γ との結合に重要であることが明らかになった (表 1)。

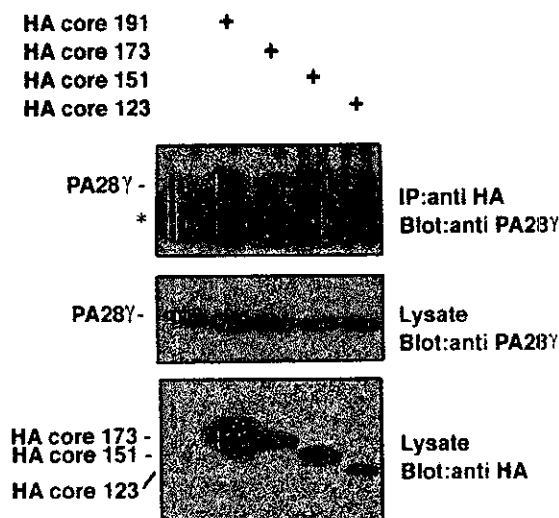


図 1 HCV コア蛋白質と内在性 PA28 γ との結合

HA タグを N 末端に付加した HCV コア蛋白質を 293T 細胞に発現させて、抗 HA 抗体で免疫沈降し、共沈した内在性 PA28 γ をウサギ抗 PA28 γ 抗体によって検出を試みた。

表I PA28 γ と HCV コア蛋白質との結合試験

No. amino acid	Tag	Mammalian	Yeast
1-191	FLAG/HA	+	
1-173	HA	+	+
1-151	HA	+	+
24-191	FLAG	+	
38-191	FLAG	+	
58-191	FLAG	-	
72-191	FLAG	-	
92-191	FLAG	-	
1-123	HA	+	
1-111	HA	+	
1-91	HA	+	
38-123	HA	+	
38-151	HA	+	
38-173	HA	+	
13-123	HA	+	
24-123	HA	+	
1-25	DNA BD		+
1-100	DNA BD		+

EGFP 融合コア蛋白質を発現させた HeLa 細胞をウサギ抗 PA28 γ 抗体で処理し、コア蛋白質と PA28 γ との細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。全長の 1-191 コア蛋白質は細胞質に、1-173 は細胞質と核に、そして 1-151 は核に限局して発現していた (図 2)。PA28 γ はいずれも核にのみ発現しており、コア蛋白質 1-173 および 1-151 の局在が PA28 γ と核で一致した。PA28 には α 、 β 、 γ の相同蛋白質があり、PA28 γ との相

同性が 33.6% から 41.3% である。次に HCV コア蛋白質と内在性 PA28 α との結合性を検討した。HCV コア蛋白質 (1-191、1-173、1-151 アミノ酸) を 293T 細胞で発現し、内在性の PA28 α との結合を免疫沈降によって解析した。PA28 γ は HCV コア蛋白質とともに沈降したが、PA28 α との共沈は確認できなかった (図 3)。PA28 β ついても同様の試験を行ったが、HCV コア蛋白質との結合は認められなかった (未発表)。

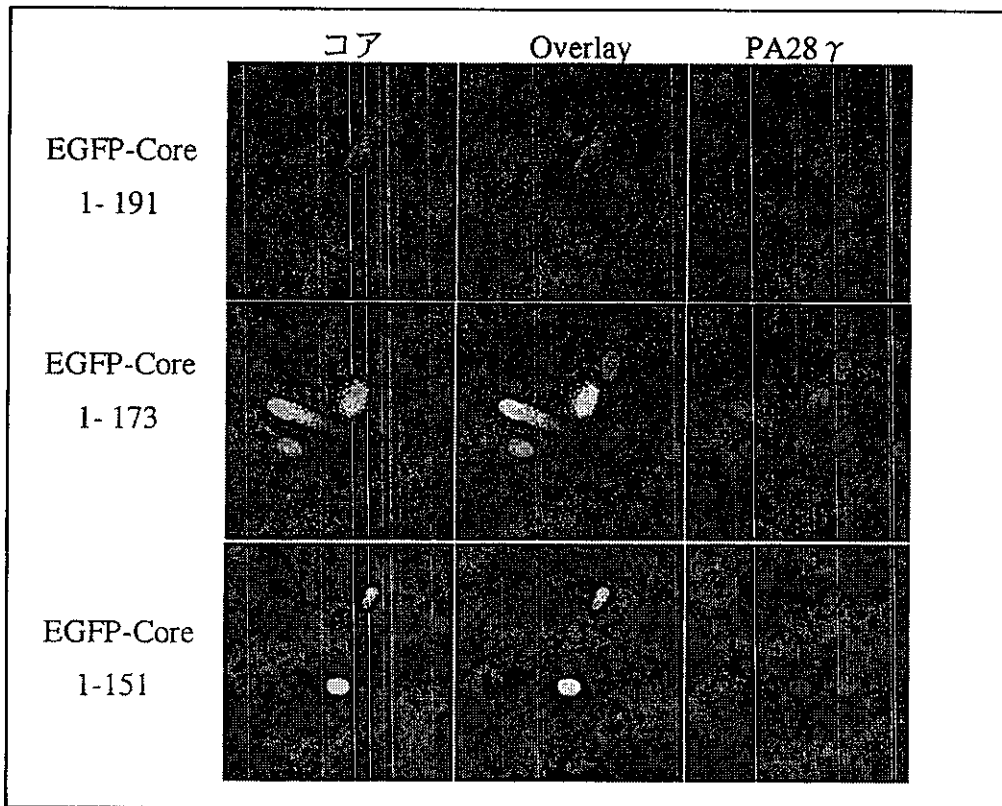


図 2 HCV コア蛋白質と内在性 PA28 γ との細胞内局在

EGFP 融合 HCV コア蛋白質を HeLa 細胞に発現させ、内在性 PA28 γ をウサギ抗 PA28 γ 抗体・AlexaFluor588 抗ウサギ IgG 抗体によって染色し、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

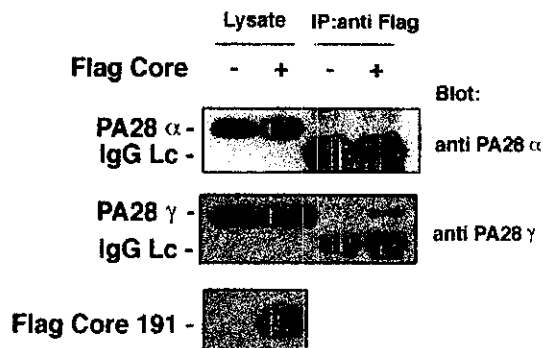


図 3 HCV コア蛋白質と内在性 PA28 α ・ γ との結合

Flag タグを N 末端に付加した HCV コア蛋白質を 293T 細胞に発現させて、抗 Flag 抗体で免疫沈降し、共沈した内在性 PA28 α ・ γ をウサギ抗 PA28 α ・ γ 抗体によって検出を試みた。

細胞内における結合を確認するため、核移行シグナルを欠損させることによって PA28 γ の局在を核から細胞質に変化させ、

そのときコア蛋白質の局在の変化を観察した。コア蛋白質と PA28 γ との局在が常に一致する場合、細胞内でコア蛋白質と PA28 γ とが

結合していると考えられる。核移行シグナルが欠損した PA28 γ を HeLa 細胞で発現させると、局在は細胞質に変化した (図 4)。核移行シグナル欠損 PA28 γ をコア蛋白質 1-151 と発現させると、通常核に存在するコア蛋白質の局在が、細胞質に変化した。293 T 細胞でも同様の結果が得られた (未発表)。したがって、コア蛋白質は PA28 γ と細胞内で結合することが示唆された。

今回、HCV コア蛋白質と結合する蛋白質と PA28 γ を単離し、コア蛋白質と PA28 γ との結合を培養細胞で確認した。用いた培養細胞 (HeLa および 293T 細胞) では過剰発現および内在性 PA28 γ に対してもコア蛋白質は結合した (図 1 および表 1)。また、結合している細胞内局在は核に限られ細胞質に局在する全長コア蛋白質は PA28 γ と結合しないと思われる (図 2)。前回の報告で、PA28 γ は

過剰発現した HCV コア蛋白質に結合したが、同様に過剰発現した他の蛋白質 (Bad,FKBPr38) には全く結合しなかった。したがって、PA28 γ は HCV コア蛋白質に結合特異性を持つものと思われる。今回は HCV コア蛋白質の結合特異性を確認するために、PA28 γ のサブタイプ PA28 α あるいは β とコア蛋白質の結合を免疫沈降により試験した (図 3)。HCV コア蛋白質が PA28 γ と結合する条件では、PA28 α および β はコア蛋白質と結合しなかった。細胞質に局在する PA28 α および β は 293T および HeLa 細胞でも発現している。しかしながら、それら細胞で発現させてもコア蛋白質 1-173 あるいは 1-151 の局在は主に核で、細胞質にはほとんどない (図 2)。これらの結果は、コア蛋白質は PA28 α および β と結合しないことを示唆している。

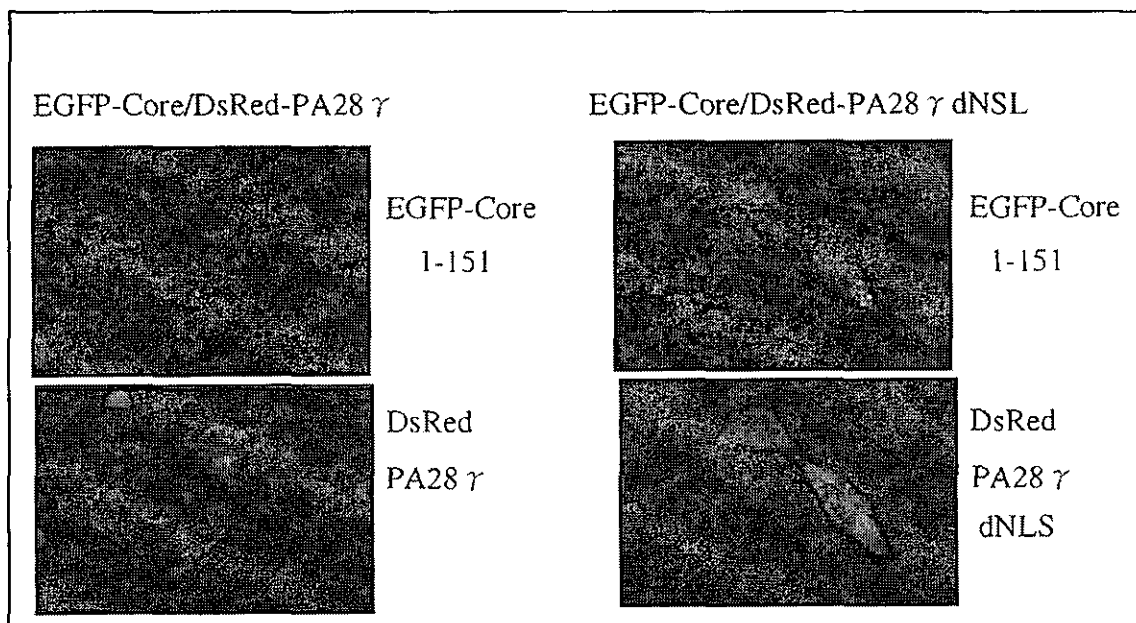


図 4 HCV コア蛋白質と核移行シグナル欠損 PA28 γ との細胞内局在

EGFP 融合 HCV コア蛋白質と DsRed 融合 PA28 γ を HeLa 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡によって観察した。