

13. 肝細胞死の研究の進歩

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 疋田隼人
同 教授 竹原徹郎

key words apoptosis, necrosis, necroptosis, autophagy, hepatocyte cell death

動 向

慢性肝炎や急性肝炎，劇症肝炎といった肝障害を伴う各種肝炎では肝細胞死を認める。この肝細胞死を抑制すれば，肝障害の程度は改善するため，肝細胞死の機構を解明することは，各種肝炎の治療につながる。また，肝細胞死の持続は，肝線維化や癌化を誘発することも明らかになってきている¹⁻⁴⁾。すなわち，肝細胞死の抑制により，慢性肝疾患からの肝硬変への進展や発癌をも抑制できる可能性がある。

一方で，癌細胞では自己増殖速度も速く，虚血状態でもあることから，細胞死のシグナルは通常よりも強く誘発されている。しかし，癌細胞は細胞死を抑制する機構を獲得することで，細胞死から逃れ，生存・増殖を続けている⁵⁾。そのため，肝癌細胞においては細胞死を積極的に誘導することで，癌治療に繋げることができる。

肝細胞死の研究は，肝疾患に対する新しい治療法を考える上でも極めて重要である。細胞死の機構として，大きく分けて3つの機構が知られている。アポトーシス，ネクローシス，オートファジーによる細胞死である⁶⁾。肝細胞においても，この3つの細胞死制御機構が種々の肝疾患の形成に重要であることが明らかになってきている。本稿では，これら3つの肝細胞死機構を簡単に説明し，

各種肝疾患の形成にどのように関わっているのか近年解明された研究を中心に概説する。

A. 肝細胞死の形態

1. アポトーシス

Type 1細胞死として知られるアポトーシスは，ATP依存的なカスパーゼの活性，DNA切断酵素の活性によって細胞死を誘導する機構として知られている。形態学的には，核の断片化やクロマチンの凝集，細胞質の縮小などを伴う。アポトーシスの機構として，デスレセプターを介するExtrinsic pathwayと介さないIntrinsic pathwayに分けられる。Extrinsic pathwayとしてはミトコンドリアからのCytochrome cの放出を介して下流のカスパーゼ3/7を活性化するミトコンドリア依存経路と，デスレセプターの活性が直接下流のカスパーゼ3/7を活性化するミトコンドリア非依存経路の存在が知られている⁷⁻⁹⁾(図1)。ミトコンドリア依存経路か非依存経路のどちらの経路を通るかは，細胞の種類によって異なる。肝細胞のExtrinsic pathwayはミトコンドリア経路が重要であると知られているが¹⁰⁾，ミトコンドリア非依存経路もバックアップシステムとして機能していることが明らかとなってい

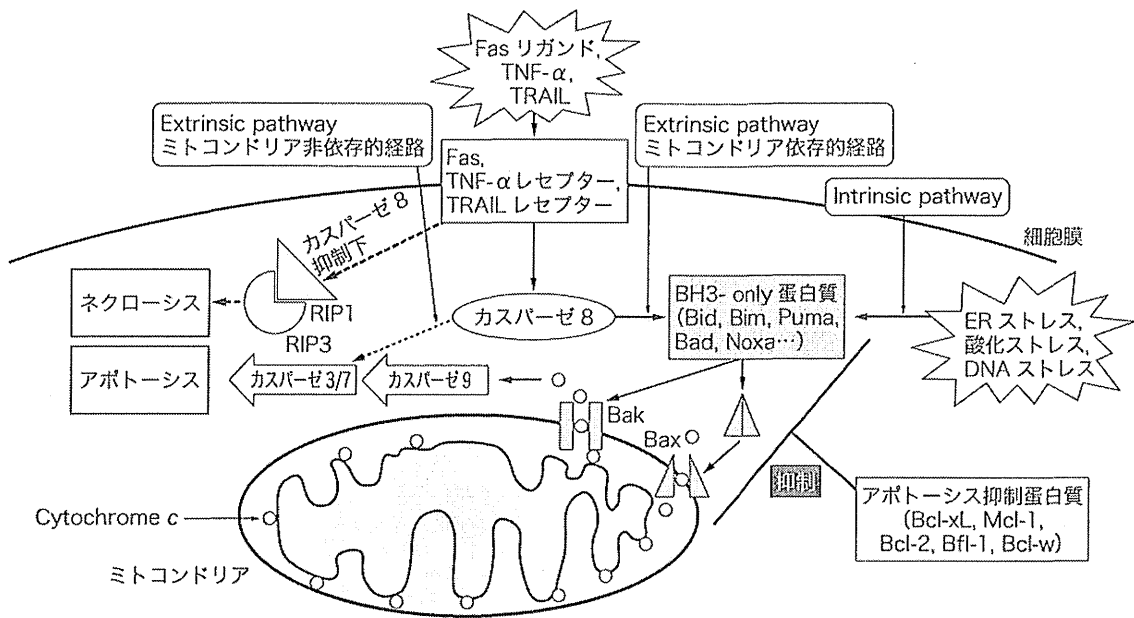


図1 各種細胞死刺激による肝細胞死の遂行経路

る¹¹⁾。

ミトコンドリア経路のアポトーシス機構は、Bcl-2ファミリー蛋白質によって制御を受けている。Bcl-2ファミリー蛋白質はアポトーシス抑制蛋白質と促進蛋白質に大別される。アポトーシス抑制蛋白質として、Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, Bfl-1, Bcl-wの5つが知られているが、この中で、Bcl-xLとMcl-1が肝細胞のアポトーシス制御に大きくかかわっていることが明らかとなっている^{1,2,7)}。一方、アポトーシス促進蛋白質はさらに、エフェクター分子であるBak, Baxと、センサー分子である数多くのBH3-only蛋白質 (Bid, Bim, Puma, Bad, Noxaなど) に分けられる。これらアポトーシス抑制蛋白質と促進蛋白質のバランスで、肝細胞のアポトーシスは制御されている^{2,11,12)} (図1)。ウイルス性肝炎や劇症肝炎などではこのアポトーシスによる細胞死が多数認められる¹³⁾。

2. ネクローシス

Type 3細胞死として知られるネクローシスは、アポトーシスが能動的な細胞死と考えられてきたのに対して、ATPの枯渇などによる受動的な細胞死

としてとらえられてきた。形態学的にも細胞内小器官の膨潤とともに細胞質の膨化を認める。しかし近年能動的にネクローシスを起こす経路がいくつか報告されている。その1つがRIP (receptor interacting protein) キナーゼ依存的なネクローシス経路であり¹⁴⁾、RIP1の阻害剤などで抑制される¹⁵⁾。デスレセプターの活性によって通常であればアポトーシスに陥るが、カスパーゼ8の抑制下ではRIPキナーゼ依存的なミトコンドリアを介したネクローシス経路が亢進する (図1)¹⁶⁾。ほかにも能動的なネクローシスの経路が存在する可能性もあり、現在解明が進められている。このような能動的なネクローシスを、受動的な細胞死というネクローシスから区別するためネクロプトーシスと呼ぶこともある¹⁷⁾。虚血・再灌流による肝障害や、アセトアミノフェンによる肝障害では、このネクローシスによる肝細胞死が多数認められる^{13,18-21)}。

3. オートファジー

自己消化を意味するオートファジー (本稿ではシャペロン介在性オートファジー、マイクロオート

ファジー, マクロオートファジーの中のマクロオートファジーのことを指してオートファジーと表記している)は, 細胞内の小器官や蛋白質のバルクの分解を行うシステムとして知られてきた. 近年は劣化したミトコンドリアやリソソームの選択的なオートファジーの存在も明らかとなってきた²²⁾. オートファジーは2重隔離膜が分解対象物を包み込むように成長することから始まる. そしてこの2重隔離膜によって完全に細胞質から隔離されたオートファゴゾームを形成される. このオートファゴゾームが, リソソームと融合することでオートリソソームとなり内容物は分解される. これがオートファジー遂行の一連の流れである. オートファジーにより蛋白質はアミノ酸に分解されるため, 細胞が飢餓に陥った時のエネルギー産生機構として重要な役割を担っている²³⁾. また, 肝細胞の脂肪滴の分解にも関わっているとの報告²⁴⁾や, 運動負荷(エクササイズ)により誘導されるとの報告²⁵⁾もある. 一方で飢餓に陥らなくとも常に一定のレベルで肝細胞のオートファジーは認められる. この常時認められるオートファジーは, 劣化したミトコンドリアなどの小器官の排除や, 異常な蛋白質を排除する機構として重要である²⁶⁾. 一方で, アポトーシスでもネクローシスでもないオートファジーの亢進を伴った細胞死の形態が報告されたことから, オートファジーは細胞死機構としても重要であると認識され, type 2細胞死としてオートファジー性細胞死と呼ばれている²⁷⁾. オートファジーの亢進だけでは特殊な状況下(アポトーシスやネクローシスを抑制した状態下など)でしか細胞死に陥らないとの報告もあるが⁹⁾, 現在では細胞死の際にオートファジーが亢進しており, オートファジーの抑制によってその細胞死が抑制される細胞死機構を広く「オートファジー性細胞死」と呼ぶことが多い. 種々の肝疾患においてオートファジー性細胞死がどれくらい関わっているのかは今後さら

なる研究が必要である.

B. 肝疾患と細胞死機構

1. ウイルス・自己免疫性肝障害と肝細胞死

ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎などでは, リンパ球の活性化による肝細胞アポトーシスの誘導が認められる. T細胞やNK細胞はデスレセプターであるFasやTRAILレセプターを, 単球やマクロファージはTNF- α レセプターを活性化することで肝細胞アポトーシスを誘導することが知られている⁶⁾. 肝細胞ではこれらのデスレセプターはBH3-only蛋白質であるBidやBim依存的に肝細胞アポトーシスを誘導する^{10,28,29)}. 近年, 自己免疫性肝炎マウスモデルではTRAILがIL-33発現を亢進させ, 肝細胞死の増悪に寄与しているという報告や³⁰⁾, マウスB型急性肝炎モデルでは活性化したNK細胞がFasを刺激して肝細胞死を惹起しているという報告がなされた³¹⁾. また, マウスモデルを用いたFas経路の活性化による劇症肝炎では, カスパーゼ活性に依存的に進行するが, Bak/Bax非依存的にも進行しうること¹¹⁾, マイクロRNAの1つで肝再生促進効果のあるmiR-221で改善すること^{32,33)}が明らかになった. 興味深いことにTNF- α 経路の肝細胞アポトーシスはオートファジー誘導やグルココルチコイドによって抑制されることが報告された³⁴⁻³⁶⁾. 現在アポトーシス抑制を標的とした薬剤の可能性も多数報告されており³⁷⁻⁴⁰⁾, 免疫担当細胞が数多く存在する肝臓ではデスレセプター刺激による肝細胞死誘導機構の解明が, 今後の慢性肝炎や急性肝炎, さらには劇症肝炎といった疾患の治療につながると思われる. また, 肝細胞死の持続は, 肝の線維化も誘導するが^{1,2)}, 肝の線維化はさらなる肝細胞死に対して保護的に働くとの研究結果も報告された⁴¹⁾. 慢性肝疾患からの肝硬変への進展は臨床上重要な問題であり, 今後線維化と肝細

胞死の関連も検討すべき課題である。

2. 脂肪性肝障害と肝細胞死

過栄養による肝臓への脂肪の蓄積は、ALTの上昇を伴う肝細胞死を誘導し、非アルコール性脂肪肝炎を含む脂肪性肝障害が形成される。脂肪性肝障害では、脂肪酸負荷自体による細胞毒性の他、腸内細菌叢からのLPS刺激の増加やリンパ球の活性化などによりデスレセプターが活性化されることでアポトーシスに陥る機序などが報告されている⁴²⁻⁴⁵⁾。脂肪酸による直接的な細胞障害作用としては、飽和脂肪酸の一種であるパルミチン酸は細胞毒性が強く、TRAILレセプターであるDR5の活性化や、小胞体 (ER) ストレス・酸化ストレスの上昇を介したBimなどのBH3-only蛋白質の活性化によりアポトーシスを誘導させる機序が報告されている^{46,47)}。この脂肪酸による細胞毒性をlipotoxicityと呼び、脂肪酸負荷によるアポトーシスをlipoapoptosisと呼ぶ。最近では、脂肪酸負荷は肝細胞においてオートファジーを抑制すること⁴⁸⁾、オートファジーの抑制は脂肪性肝障害を増悪させることも報告されている⁴⁹⁾。アポトーシス抑制蛋白質であるBcl-2やBcl-xLはBH3結合領域を介してオートファジーに必須の蛋白質であるBeclin-1と結合しオートファジーを阻害することが明らかとなり^{50,51)}、アポトーシスとオートファジー機構は密接に関連していると考えられる。今後は脂肪性肝障害の形成におけるアポトーシスとオートファジー機構の相互作用を解明することも、脂肪性肝障害の病態解明と新規治療法の開発には重要なテーマであると考え

3. アセトアミノフェン肝障害と肝細胞死

アセトアミノフェンの大量摂取は中毒性肝障害を惹起する。特にアメリカでは、急性肝不全の原因薬剤の約4割を占める⁵²⁾。アセトアミノフェ

ンの中間代謝物であるN-アセチルベンゾキノニンイミン (NAPQI) は強力な肝毒性を有するため肝細胞死が誘導されるが、NAPQIによる肝細胞死の誘導機構は未だ明らかになっていない¹³⁾。酸化ストレスやERストレスの上昇が認められ、アポトーシス経路の関与も報告されているが^{53,54)}、アセトアミノフェンによる肝障害では組織学的に大半がネクロトーシスによる肝細胞死である²¹⁾。また、ミトコンドリア膜透過性遷移によるミトコンドリア障害を認め、肝障害の原因となっているとの報告もあるが^{21,55)}、ミトコンドリア障害の詳細な機構は依然明らかでない。近年ミトコンドリアの膜透過性遷移孔形成を制御しているサイクロフィリンDの欠損が、アセトアミノフェンによるネクロトーシスを軽減するとの報告もなされたが⁵⁶⁾、軽減しないとの報告もなされ⁵⁷⁾、サイクロフィリンDの関与は不明である。一方でRIPキナーゼであるRIP3の欠損によりアセトアミノフェン肝障害は改善され、ネクロトーシスの関与が報告されている⁵⁸⁾。またマクロファージの欠損で肝障害がさらに増悪するという報告もなされ⁵⁹⁾、免疫系も肝障害の形成に関与していると考えられる。興味深いことに、アセトアミノフェン肝障害では肝細胞オートファジーの促進が認められ、オートファジーの阻害は肝細胞死をさらに増悪させることも報告された⁶⁰⁾。オートファジーはネクロトーシス経路との関連も報告されており⁶¹⁾、障害されたミトコンドリアの排除にはオートファジーが重要な役割を担っていることを考えあわせる²⁶⁾、アセトアミノフェン肝障害細胞死におけるオートファジー機構の検討も興味の持たれるところである。

4. 肝細胞癌と肝細胞死

肝細胞癌の高リスク群である慢性肝疾患患者では持続的な肝細胞アポトーシスを認めるが、肝細胞アポトーシスの亢進が肝発癌に与える影響は明

らかではなかった。すなわちアポトーシスの亢進は癌化した細胞の排除に有利に働くため、慢性肝疾患患者で認められる肝細胞アポトーシスは癌化を抑制している可能性も考えられる。しかし、近年アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL や Mcl-1 を欠損させアポトーシスを持続的に惹起させたマウスでは肝発癌を認めるとの報告がなされ、アポトーシスの持続だけでも肝発癌が誘導されることが明らかとなった^{3,4)}。また、様々な化学発癌モデルにおいても肝細胞アポトーシスの誘導が肝発癌を促進させると報告された⁶²⁾。これらの研究結果は、慢性肝疾患では肝細胞アポトーシスの抑制が発癌抑制につながるということを基礎的に裏付けている。

一方で癌細胞は、genotoxic なストレスなどによって種々のアポトーシス促進蛋白質が増強しており、自身の細胞をアポトーシスから回避させるためにアポトーシス抑制蛋白質を発現増強させていることが知られている⁵⁾。実際に肝癌細胞でも Bcl-xL や Mcl-1 といったアポトーシス抑制蛋白質の発現増強が報告されている⁶³⁾。またアポトーシス抑制蛋白質の発現増強は、主要増殖スピードを直接的に上昇させることが報告され、癌細胞におけるアポトーシスの制御が治療標的となりうるということが明らかとなっている⁶⁴⁾。現在はアポトーシスを促進させるため TRAIL を活性化させる治療も報告されている⁶⁵⁾。このように、アポトーシスの抑制は肝発癌を抑制する一方で、癌細胞増殖を促進させるという2面性を持っていることが明らかとなってきた。今後はこの2面性をうまく使い分けながら、肝発癌抑制と肝癌治療の両方向の研究展開が期待される。

むすび

肝細胞死の制御機構としてアポトーシス、ネクローシス、オートファジーが存在し、それぞれの機構の詳細なるシグナル解明が進んでいる。一方

で、肝疾患ではそれぞれの肝細胞死の制御機構が複雑に影響し病態形成に関与している。現在化合物スクリーニングなどの研究成果により、それぞれの細胞死経路を特異的に制御する薬剤候補化合物が次々と開発されている。今後これらの化合物を臨床応用するためにも、肝疾患における肝細胞死のメカニズムのさらなる解明が期待される。

文献

- 1) Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, et al. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology*. 2004; 127: 1189-97.
- 2) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, et al. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology*. 2009; 50: 1217-26.
- 3) Weber A, Boger R, Vick B, et al. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2010; 51: 1226-36.
- 4) Hikita H, Kodama T, Shimizu S, et al. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol*. 2012; 57: 92-100.
- 5) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-74.
- 6) Malhi H, Guicciardi M, Gores G. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev*. 2010; 90: 1165-94.
- 7) Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*. 2003; 195: 158-67.
- 8) Tait S, Green D. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 621-32.
- 9) Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012; 19: 107-20.
- 10) Yin X, Wang K, Gross A, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 1999; 400: 886-91.
- 11) Hikita H, Takehara T, Kodama T, et al. Delayed-

- onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology*. 2011; 54: 240-51.
- 12) Hikita H, Takehara T, Kodama T, et al. BH3-only protein bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology*. 2009; 50: 1972-80.
 - 13) Malhi H, Gores G, Lemasters J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*. 2006; 43: S31-44.
 - 14) Festjens N, Vanden Berghe T, Vandennebeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 1371-87.
 - 15) Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 313-21.
 - 16) Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008; 135: 1311-23.
 - 17) Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008; 135: 1161-3.
 - 18) Lehwald N, Tao GZ, Jang KY, et al. Wnt- β -catenin signaling protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Gastroenterology*. 2011; 141: 707-18, 718. e1-5.
 - 19) Duarte S, Hamada T, Kuriyama N, et al. TIMP-1 deficiency leads to lethal partial hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2012; 56: 1074-85.
 - 20) Zhang M, Ueki S, Kimura S, et al. Roles of dendritic cells in murine hepatic warm and liver transplantation-induced cold ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2013; 57: 1585-96.
 - 21) McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest*. 2012; 122: 1574-83.
 - 22) Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147: 728-41.
 - 23) Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008; 451: 1069-75.
 - 24) Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458: 1131-5.
 - 25) He C, Bassik MC, Moresi V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012; 481: 511-5.
 - 26) Czaja MJ, Ding WX, Donohue TM, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy*. 2013; 9: 1131-58.
 - 27) Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 1004-10.
 - 28) Kaufmann T, Jost PJ, Pellegrini M, et al. Fatal hepatitis mediated by tumor necrosis factor TNF α requires caspase-8 and involves the BH3-only proteins Bid and Bim. *Immunity*. 2009; 30: 56-66.
 - 29) Schmich K, Schlatter R, Corazza N, et al. Tumor necrosis factor α sensitizes primary murine hepatocytes to Fas/CD95-induced apoptosis in a Bim- and Bid-dependent manner. *Hepatology*. 2011; 53: 282-92.
 - 30) Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, et al. TRAIL but not FasL and TNF α , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology*. 2012; 56: 2353-62.
 - 31) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, et al. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012; 56: 555-66.
 - 32) Sharma AD, Narain N, Händel EM, et al. MicroRNA-221 regulates FAS-induced fulminant liver failure. *Hepatology*. 2011; 53: 1651-61.
 - 33) Yuan Q, Loya K, Rani B, et al. MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. 2013; 57: 299-310.
 - 34) Carchman EH, Rao J, Loughran PA, et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology*. 2011; 53: 2053-62.
 - 35) Amir M, Zhao E, Fontana L, et al. Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis

- factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation. *Cell Death Differ.* 2013; 20: 878-87.
- 36) Vandevyver S, Dejager L, Van Bogaert T, et al. Glucocorticoid receptor dimerization induces MKPI to protect against TNF-induced inflammation. *J Clin Invest.* 2012; 122: 2130-40.
- 37) Fredriksson L, Herpers B, Benedetti G, et al. Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. *Hepatology.* 2011; 53: 2027-41.
- 38) An J, Harms C, Lättig-Tünnemann G, et al. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure. *Hepatology.* 2012; 56: 715-26.
- 39) Moriya K, Sakai K, Yan MH, et al. Fibronectin is essential for survival but is dispensable for proliferation of hepatocytes in acute liver injury in mice. *Hepatology.* 2012; 56: 311-21.
- 40) González-Terán B, Cortés JR, Manieri E, et al. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- α translation in LPS-induced hepatitis. *J Clin Invest.* 2013; 123: 164-78.
- 41) Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, et al. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology.* 2012; 142: 130-9.e4.
- 42) Csak T, Ganz M, Pespisa J, et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology.* 2011; 54: 133-44.
- 43) Leroux A, Ferrere G, Godie V, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol.* 2012; 57: 141-9.
- 44) Aparicio-Vergara M, Hommelberg PP, Schreurs M, et al. Tumor necrosis factor receptor 1 gain-of-function mutation aggravates nonalcoholic fatty liver disease but does not cause insulin resistance in a murine model. *Hepatology.* 2013; 57: 566-76.
- 45) Hatting M, Zhao G, Schumacher F, et al. Hepatocyte caspase-8 is an essential modulator of steatohepatitis in rodents. *Hepatology.* 2013; 57: 2189-201.
- 46) Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, et al. Palmitate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol.* 2010; 52: 586-93.
- 47) Cazanave SC, Mott JL, Bronk SF, et al. Death receptor 5 signaling promotes hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* 2011; 286: 39336-48.
- 48) Mei S, Ni HM, Manley S, et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 339: 487-98.
- 49) Lin CW, Zhang H, Li M, et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol.* 2013; 58: 993-9.
- 50) Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122: 927-39.
- 51) Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* 2011; 278: 403-13.
- 52) Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology.* 2005; 42: 1364-72.
- 53) Nakagawa H, Maeda S, Hikiba Y, et al. Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology.* 2008; 135: 1311-21.
- 54) Uzi D, Barda L, Scaiewicz V, et al. CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Hepatol.* 2013.
- 55) Masubuchi Y, Suda C, Horie T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol.* 2005; 42: 110-6.
- 56) Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, et al. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic Res.* 2011; 45: 156-64.
- 57) LoGuidice A, Boelsterli UA. Acetaminophen overdose-induced liver injury in mice is mediated by peroxynitrite independently of the cyclophilin D-regulated permeability transition. *Hepatology.* 2011; 54: 969-78.
- 58) Ramachandran A, McGill MR, Xie Y, et al. Receptor interacting protein kinase 3 is a critical

- early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology*. 2013; 58: 2099-108.
- 59) Connolly MK, Ayo D, Malhotra A, et al. Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2011; 54: 959-68.
- 60) Ni HM, Bockus A, Boggess N, et al. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*. 2012; 55: 222-32.
- 61) Wang JH, Ahn IS, Fischer TD, et al. Autophagy suppresses age-dependent ischemia and reperfusion injury in livers of mice. *Gastroenterology*. 2011; 141: 2188-99. e6.
- 62) Qiu W, Wang X, Leibowitz B, et al. PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2011; 54: 1249-58.
- 63) Takehara T, Liu X, Fujimoto J, et al. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 2001; 34: 55-61.
- 64) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology*. 2010; 52: 1310-21.
- 65) Wahl K, Siegemund M, Lehner F, et al. Increased apoptosis induction in hepatocellular carcinoma by a novel tumor-targeted TRAIL fusion protein combined with bortezomib. *Hepatology*. 2013; 57: 625-36.

I 基本編～B型肝炎を診る前の基礎知識～

1 HBV 遺伝子と関連抗原

要点

- HBVは3.2kb程の環状不完全2本鎖DNAゲノムをもつ、逆転写を複製過程にもつウイルスである。
- 脂質二重膜と内殻のコア粒子で構成された粒子(Dane粒子)が感染性HBV粒子である。
- 転写産物には3.5kb, 2.4kb, 2.1～2.2kb, 0.8kbのmRNAがある。
- 3.5kb mRNAのうち、プレコア(preC)翻訳開始コドンを含まないプレゲノムRNAはHBV逆転写複製の鋳型になるとともにコア(C)およびpol遺伝子産物の発現に関わる。
- preC-C遺伝子はpreC翻訳開始コドンを含む3.5kbのmRNAから翻訳された全長preC-C(p25)と、翻訳後修飾を受けた分泌性HBe抗原(p17)およびp22を発現する。
- C粒子を形成するC遺伝子産物はp21である。
- S遺伝子は、2.4kb mRNAから翻訳されるpreS1-preS2領域を含むlarge S(LS), 2.2kb mRNAから翻訳され、preS2領域を含むmiddle S(MS), small S(SS)翻訳開始コドン(もしくは単にHBs)から翻訳される3つの膜蛋白を発現し、HBs抗原として検出される。

はじめに

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)は、1965年にBlumbergらによって発見された¹⁾。当初は白血病の発症との関わりが注目されたが、その後間もなく輸血後血清肝炎との関わりが確立された。急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝癌などの発症に起因する。HBs抗原陽性者の地理的分布と肝がん発生率と疫学的関連は密接である。つまり、HBV感染と関連病態発症との因果関係は比較的よく理解されているが、HBV生活環や病態発症機構には不明な点が少なくない。一つには、HBVには簡便な*in vitro*あるいは個体レベルでの感染系が存在しないことがその理由に挙げられる。基本的な生活環は、付着・侵入→cccDNA(covalently closed circular DNA)形成→転写→パッケージング/逆転写・複製→粒子形成/成熟→放出であるが(図1)、それぞれのステップにおいてその詳細は不明である。特に付着・侵入→cccDNA形成、粒子形成/成熟→放出の過程は治療法開発の格好の標的になると思われるので今後の解明が待たれる。HBVポリメラーゼのアクセシ系も確立されていない。

HBV慢性肝炎に対する治療として、近年ほとんど耐性変異の出ない核酸アナログ製剤(エンテカビル、テノホビル)が開発され臨床応用されている。しかし、長期的展望に立つと、human immunodeficiency virus-1(HIV-1)の逆転写酵素阻害薬としての開発ではなくHBVポリメラーゼ

の特性に基づいた開発が必要と思われる。HBV は余りにコンパクトすぎて、逆に抗ウイルス分子標的を定めることが困難ということもあり、HBV ポリメラーゼが今後も治療標的の中心になるとと思われる。

本稿では、HBV 感染と病態発症機構の理解を深めるべく、また今後の研究の進展により浮かび上がってくるかもしれない新たな抗 HBV 分子標的の理解を踏まえて、3.2kb というきわめてコンパクトに組織された HBV ゲノム・遺伝子とその遺伝子発現機構、その産物(抗原)、機能を中心に概説する。

HBV 粒子・ゲノム

HBV はヘパドナウイルス属に属するきわめて特徴的なウイルスである。ヘパドナウイルスは鳥類、哺乳類の限定的な種に発見されている。鳥類では duck hepatitis B virus (DHBV), heron hepatitis B virus (HHBV) がよく知られているが、ツルやガチョウでも報告されている。哺乳類では本稿で解説する HBV はもちろんであるが、霊長類ではチンパンジー (chimpanzee hepatitis B virus), オランウータン (orangutan hepatitis B virus), テナガザル (gibbon ape hepatitis B virus) などで報告されている。げっ歯類ではウッドチャック (woodchuck hepatitis virus; WHV), 地リス (grand squirrel hepatitis virus; GSHV) のヘパドナウイルスが古くから研究されている²⁾。霊長類を除く動物モデルは HBV 自然生活環を研究するには格好のモデルであるが、飼育が面倒なことや遺伝的均一性に問題があり、HBV 研究者の間で広く用いられるに至らなかった。

HBV は約 3.2kb の環状不完全 2 本鎖 DNA をゲノムとする(図 2)が、複製過程に逆転写過程をもつ異例のウイルスである³⁾。⊖鎖 DNA には末端蛋白 (HBVpol の機能ドメインの一つ) がゲノム核酸と共有結合している。⊕鎖 DNA の 5' は、⊕鎖 DNA 合成開始にプライマーとして使われた RNA が付着している。

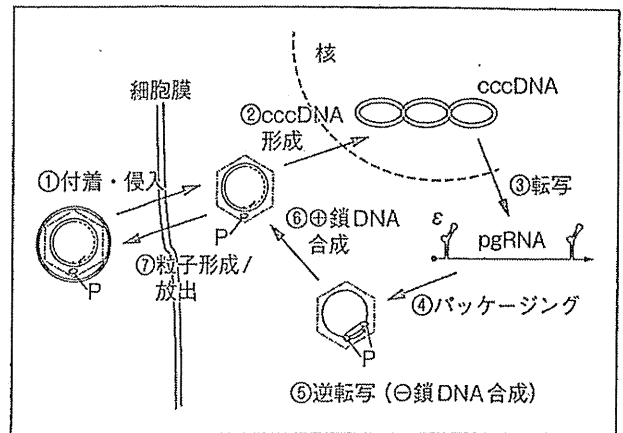


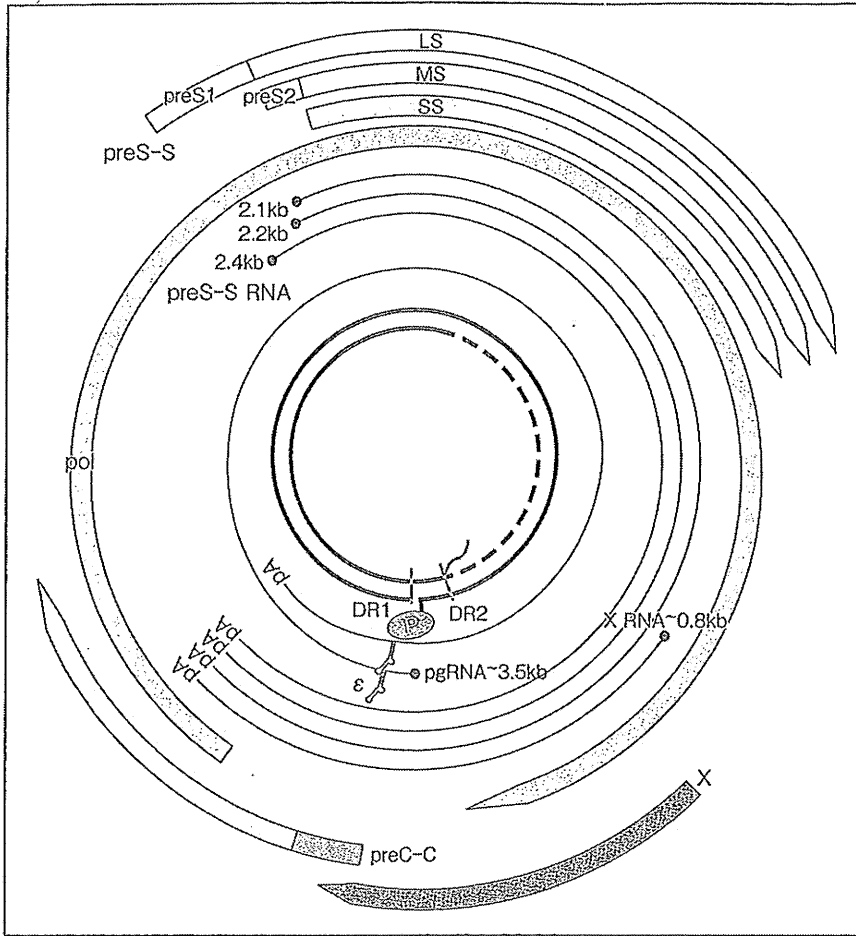
図2 HBV の基本的な生活環

①付着・侵入→②cccDNA 形成→③転写(遺伝子発現)→④コア粒子へのパッケージング→⑤逆転写(⊖鎖 DNA 合成)→⑥⊕鎖 DNA 合成→⑦粒子形成(HBV 膜粒子への内包)と放出が HBV の一般的な生活環と考えられている。HBV 複製活性が高いとき、②→③→④→⑤→⑥→⑦→②のサイクルが回るという報告もある。この活性は DHBV の初代培養肝細胞への感染系(効率が低い)では確認されているが、HBV では一般的にはこの活性は低いと考えられる。

HBV ゲノムの機能単位は、複製過程に関わる direct repeat 1 および 2 (DR1 および DR2), mRNA 発現に関わる core, preS-S, S, X それぞれのプロモーター(Cp, preSp, Sp, Xp), 組織特異性の弱いエンハンサー I (EnI), 肝細胞特異性の高いエンハンサー II (EnII) などである(図 2)。また HBs ORF 内にグルココルチコイド反応配列 (glucocorticoid responsive element; GRE) が存在する(図 2)。さらに precore ORF 内~core 翻訳開始コドンにかけて、プレゲノム RNA (pgRNA, 後述)のパッケージングシグナルとしてはたらく ϵ 配列がある(図 2)。 ϵ 配列がとる 2 次~3 次構造が HBVpol に認識され、pgRNA のパッケージング、逆転写の開始反応に重要であると考えられている。

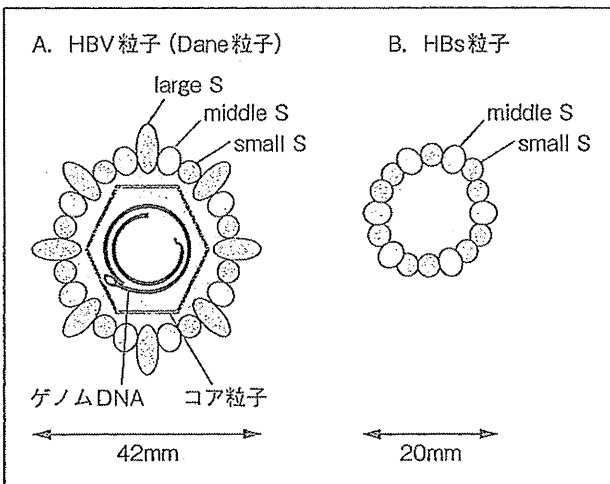
HBV のヒト末梢血単核球への取込みは、HBV に対する免疫機序を考察するうえでは重要であると考えられるが、HBV 感染・増殖はほぼ特異的に肝実質細胞で行われる。受容体(レセプター)の特性と遺伝子発現に関わる宿主因子が肝実質細胞で発現されることによると思われる。

HBV 膜蛋白粒子で内包されたコア粒子をもつ



【図2】HBVのゲノム構造と関連転写産物、遺伝子産物

最も内側にHBVのゲノム構造、その外側に転写産物 (splice mRNA は示していない)、遺伝子産物を示した。HBVゲノムは①鎖DNA 5'にHBVpolが共有結合したオーバーラップした領域である。



【図3】HBVの粒子構造

A. 感染性粒子 (Dane 粒子) の構造の模式図。コア粒子を内包するHBV膜粒子で覆われる。本粒子の産生には程よいLS, MS, HBs (SS) のバランスが必要と考えられている。

B. HBs 粒子の構造。MS+SS もしくは SS のみから構成される小粒子。

ウイルスが径約42nm程の感染性HBV粒子 (Dane 粒子) (図3A) が、肝実質細胞膜上の受容体と結合することから一連の感染過程が始まると考えられる (HBV受容体は本ウイルスの発見から半世紀もの間未知であったが、2012年11月に突然ある候補因子が発表された⁴⁾)。肝細胞内へ放出されたコア粒子内では、末端蛋白を外し不完全2本鎖の修復しつつ核内へ移行して、最終的には、2本鎖閉鎖環状DNA (cccDNA) が構築される。

cccDNAは被転写活性が高く、HBV遺伝子関連の種々のmRNAが産生されると考えられている。HBVの肝実質細胞特異性は、内在するエンハンサーやプロモーターが高分化肝実質細胞で特異的に発現している転写因子による影響も大きいと思われる⁵⁾。

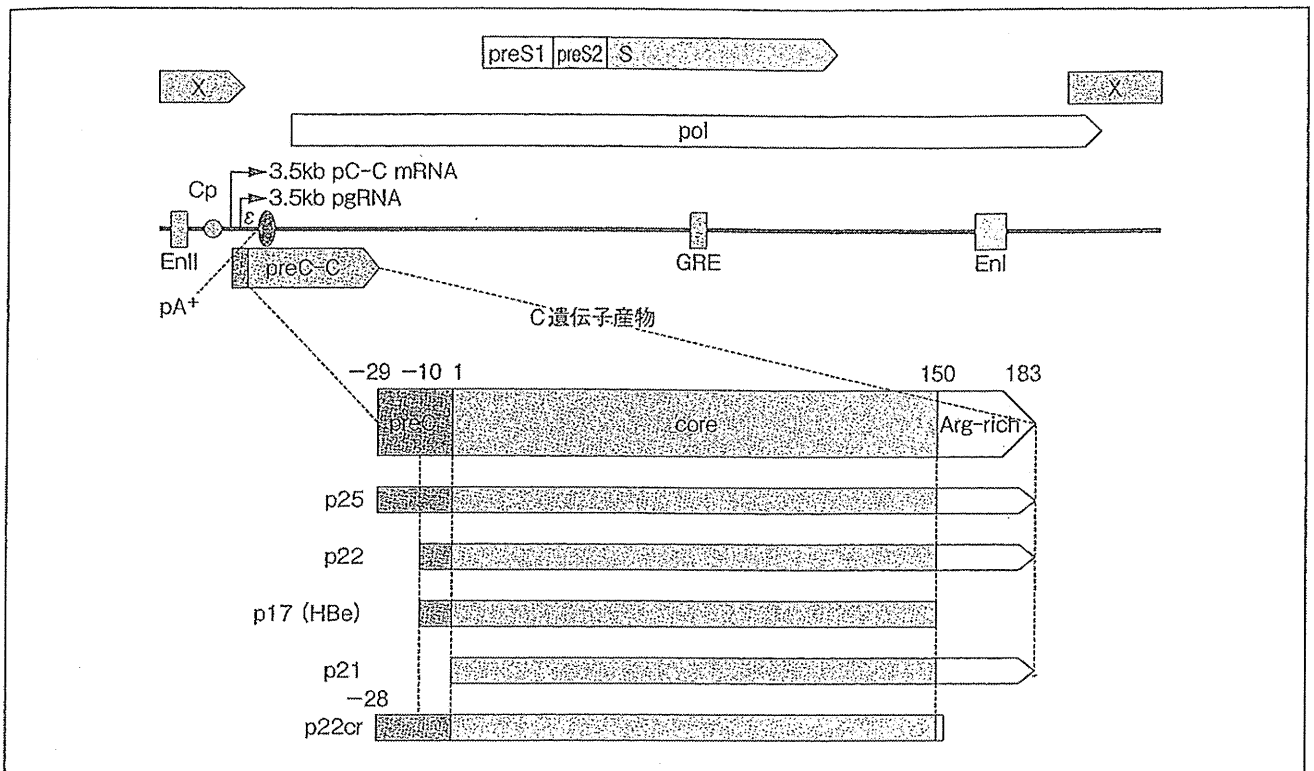


図4 プレコア - コア遺伝子関連産物

プレコア - コア ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。

Cp ; コアプロモーター, EnI ; エンハンサー-I, EnII ; エンハンサー-II, pA⁺ ; polyA 付加シグナル, GRE ; glucocorticoid responsive element, ε ; パッケージングシグナル配列。

II HBV 転写産物と遺伝子

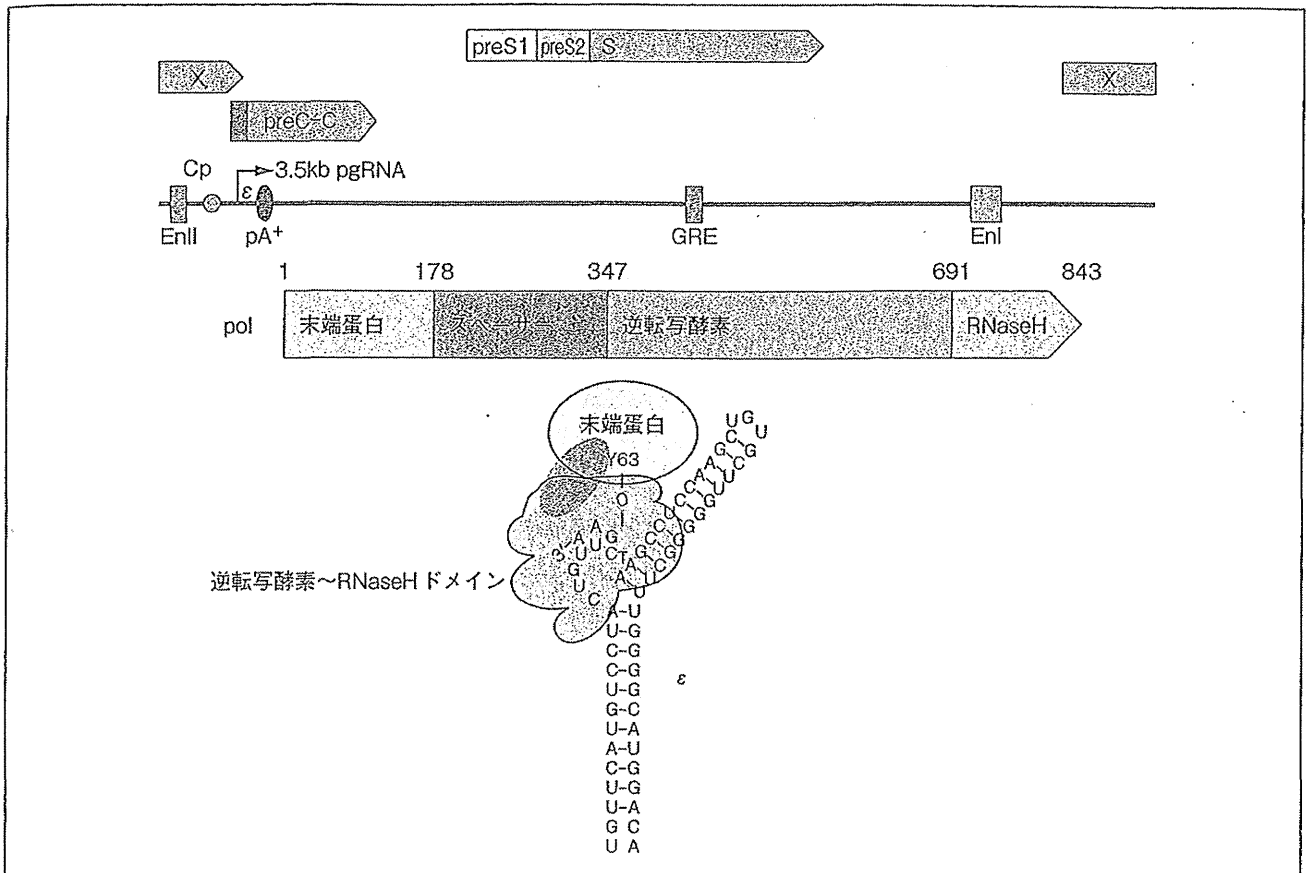
ウイルスの転写機構は複雑なことが多く、特に HBV の転写産物 (転写単位もしくは遺伝子) は全長をカバーするものやオーバーラップしていて、常識的な遺伝子として記載することは難しい—いわば、ゲノム全長が遺伝子である。そこで特に HBV の遺伝子について語るとき、多くはその産物について記載することが多い。その HBV がコードする蛋白は大まかに precore-core, pol, preS-S, X の4つである。

ゲノム全長をカバーする転写産物として 3.5kb mRNA がある。この転写産物は、precore-core 蛋白の ATG 付近から転写され、5' と 3' がオーバーラップしている (図2)。プレコア ATG を含むものと含まないものがあり、前者はプレコア-コアの翻訳に寄与されと考えられている。一方、プレコア ATG を含まないものは core, pol の発

現に関わると同時に、pgRNA として逆転写の鋳型として機能するという重要な機能をもっている。pol の翻訳機構は不明な点も多いが、レトロウイルスにみられる終止コドンの抑止ではなく、一般的にはコア ATG の read-through (leaky scanning) 機構により翻訳されと考えられ、したがって、レトロウイルスの gag-pol 融合蛋白ではなく独立した pol として翻訳される。

subgenomic な転写産物としては、S 関連遺伝子の翻訳に関わる 2.4kb, 2.1~2.1kb の mRNA, X 遺伝子固有の 0.8kb の mRNA がある。また全長をカバーする 3.5kb の mRNA のうち、コア ORF の終止コドン手前から、HBs ORF の中程までスプライシングを受けた機能不明の 2.2kb の mRNA として産生されるものがある。

すべての HBV 関連転写産物は同一方向 (この方向を現時点での ⊕鎖と定義する) であり、⊖鎖をコードする遺伝子は今のところ同定されていない。また、転写はコア ATG の直下流にある poly A⁺ シグナル



HBVpol 遺伝子産物

HBVpol ORF のゲノム上の位置関係を示した。HBVpol はコア蛋白と同様に pgRNA から翻訳されると考えられている。末端蛋白の 63 番目のチロシン (Y) からプライミングが起こると考えられている。

Cp ; コアプロモーター。EnI ; エンハンサー-I。EnII ; エンハンサー-II。pA+ ; polyA 付加シグナル。GRE ; glucocorticoid responsive element。ε ; パッケージングシグナル配列。

付加されている (図 5)。preS1 (108~119 アミノ酸)-preS2 (55 アミノ酸)-HBs (226 アミノ酸) のすべての領域を含む蛋白, large S (LS ; p39, gp42) は約 2.4kb, preS2-HBs を含む middle S (MS ; gp33, gp36) は約 2.2kb, HBs (もしくは small S [SS] ; p24, gp27) の基本的に 3 つの蛋白がある。この蛋白の発現に関わる mRNA は 3.5kb mRNA とオーバーラップする形で発現する。LS は約 2.4kb, MS は約 2.2kb, HBs は 2.1kb の mRNA から翻訳される。臨床的には HBs 抗原-抗体系として検出される。

HBs +/-MS はそれ自体で小粒子を形成し, HBV 感染患者血中に分泌される。HBV 粒子の 99.9% はこの 20nm の小 HBs 粒子であり (図 3B), 感染性 HBV (Dane 粒子) はごくわずかである。Dane 粒子の形成には LS+MS+HBs (も

しくは LS+HBs) が必要であり, これら 3 つの膜蛋白がバランスよくブレンドされることでコア粒子を内包できる Dane 粒子が形成されると考えられている。したがって, HBV 産生蛋白 (抗原) のうちでは, preS1 抗原量が血中のウイルス量を最も反映すると考えられる (臨床的には HBV DNA 量を測定する系が確立され汎用されている)。

肝実質細胞への付着・侵入という初期過程に preS-S が関わることで, HBV の肝実質細胞への特異性を第一義的に決定している。HBV の受容体はウイルス発見から半世紀足らず不明であったが, 2012 年 11 月に sodium taurocholate cotransport cotransporting peptide (NTCP) がそれであるという報告があったが, 付着・侵入に関わる HBV 側の因子 (すなわち HBV 受容体のウイルス側リガンド) は preS1 領域にあるというコンセン

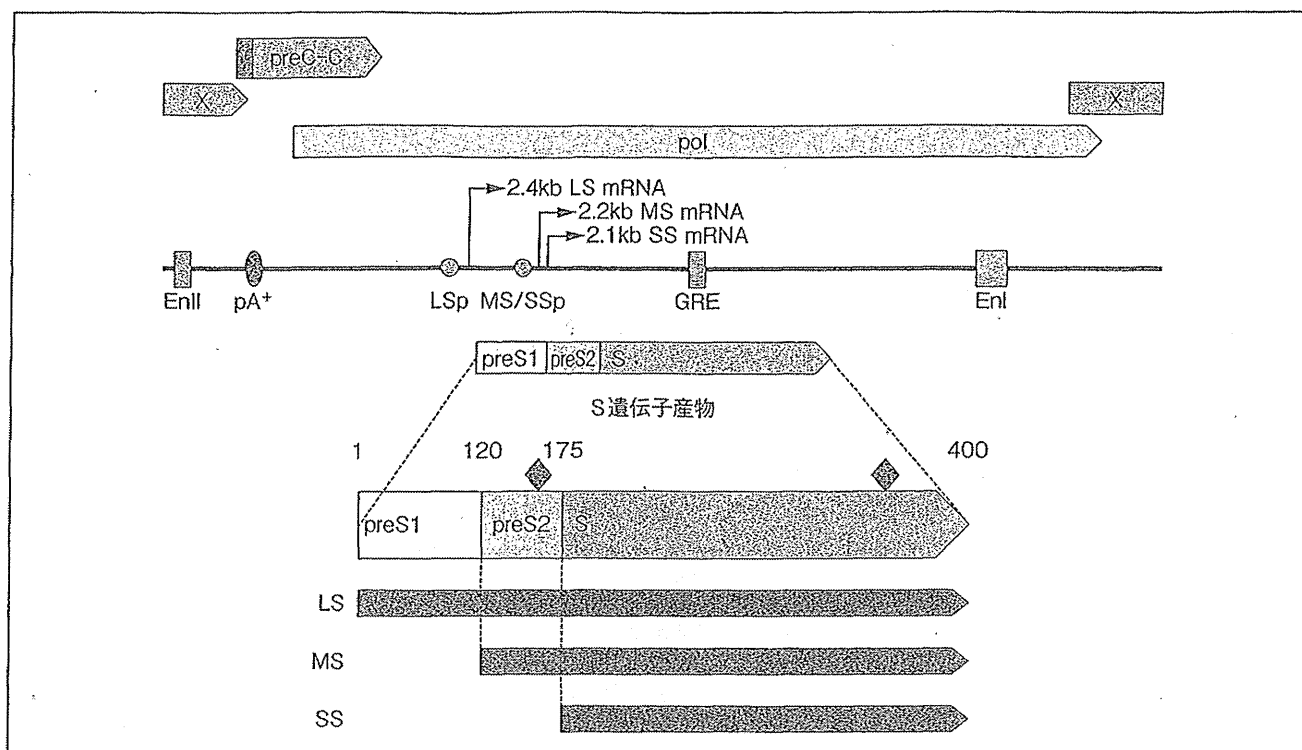


図15 preS-S 遺伝子関連産物

preS-S ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。

LSp; LS プロモーター。 MS/SSp; MS/SS プロモーター。 EnI; エンハンサーI。 EnII; エンハンサーII。 pA⁺; polyA 付加シグナル。 GRE; glucocorticoid responsive element。 ε; パッケージングシグナル配列。

により終結すると考えられている。

III プレコア-コア遺伝子産物

プレコアは文字通りコア ORF の前に位置するコア ORF と連続する 29 アミノ酸からなる領域で(図 4), コア ORF と連続して翻訳される(183~185 アミノ酸: p25)。 p25 は翻訳後プロセスを受け, N 末と 19 アミノ酸と C 末 151 アミノ酸以降が切り取られて HBe 抗原 (p17) の産生に関わる。 N 末のみがプロセスされた p22 が中間体として検出される。 N 末 19 アミノ酸は疎水性が高く HBe 抗原の分泌に賦与されると考えられている。血清中の HBe 抗原量は感染性 HBV の量を反映し, HBV 複製活性と相関が高い。基本的に抗 HBe 抗体は既感染者(持続感染者を含む)には存在するが, HBV 複製活性が上がり抗 HBe 抗体量を相対的に上回ってくることで検出されなくなる。

HBV のコア粒子はコア ORF 産物となる HBc

抗原 (p21) から構成される T (triangulation number) = 4 の正 20 面体構造をとる。 5' と 3' がオーバーラップした全長強の 3.5kb mRNA のうちプレコア ATG を含まない mRNA (プレゲノム RNA, pgRNA) から翻訳されると考えられている。 HBc の抗原性は強く HBV 感染者では抗 HBc 抗体として検出され, やはり HBV 複製活性と相関が高い。 また, プレコア-コア遺伝子産物として p22cr 抗原が報告されています。 プレコア領域と C 末縮の Arg-rich の部分が切断され, HBV DNA をもたない中空粒子を形成すると考えられています⁵⁾。 近年開発された HB コア関連抗原測定系では e 抗原やコア抗原とともに p22cr 抗原も検出されます。

IV preS-S 遺伝子産物

preS-S 蛋白は膜粒子を構成する HBV 膜蛋白であり, 多くの分泌蛋白や膜蛋白のように糖鎖が

サスは20年以上も前から得られていた。このことはLSがDane粒子形成に必須であることも合致する。

V HBVポリメラーゼ (HBVpol)

HBVが発現する最大の蛋白(832~845アミノ酸)で、HBVの複製過程(逆転写, ⊕鎖DNA合成)に関わる。末端蛋白領域(terminal protein: TP), スペーサー領域(spacer, SP), 逆転写および+鎖DNA合成酵素領域(reverse transcriptase: RT)とRNaseH活性領域(RNaseH, RNH)といったドメイン構造で構成される(図6)。末端蛋白領域はHBV pgRNAのパッケージングに関わるεを認識し、蛋白プライマーとして⊖鎖合成を開始する。⊖鎖DNA合成(逆転写)と+鎖DNA合成そのものの活性はRTドメインによる。RNaseHドメインは逆転写過程が終了した鋳型RNA(RNA:DNAハイブリッドになったところ)の分解に関与する。HBV感染患者でHBVpolを認識する抗原・抗体系は確立されていないが、Dane粒子内の⊕鎖DNA合成活性を測定する系は存在する。ただし、操作は煩雑で検出感度が高い系とはいえない。

核酸アナログ製剤を中心とした抗HBV剤はHBVpolの活性を抑える薬物であるが、HBVpolの特性に基づいて開発された薬物は一つもない。これは本蛋白を発現・精製して活性をhigh-throughputで測定する系が確立されていないことが最も大きな理由と思われる。立体構造ももちろん解明されていない。したがって、HIVなど逆転写過程を複製過程にもつレトロウイルスの逆転写酵素に類似することを想定した活性阻害薬が抗HBVpol薬として応用されている。

今後はHBVpolの特性に基づいた抗HBV薬の開発が望まれる。そのためには簡便な発現・精製系の樹立と活性測定系の開発が不可欠である。これまでの研究によると、HBVpolそのものが比較的大きな蛋白で、大腸菌などの微生物系での発現そのものが困難であったり、可溶化が難しかった

り、克服すべきいくつかの問題点がある⁷⁾。また逆転写過程が蛋白プライミングという特性やεを認識する鋳型特異性など考慮すべき問題が単純な逆転写酵素に比べると多くある。立体構造解明を含め、全長の大量発現・精製、アッセイ系の確立が望ましいが、最低限RTドメインの発現・精製と活性測定系の早期確立によるhigh-throughput薬物探索システムの開発が望まれる。

VI X遺伝子産物

X遺伝子産物は、そのORFの存在が示されてから種々のウイルスあるいは宿主の遺伝子と相同性が乏しく、機能が推定できなかったことから、X遺伝子と名付けられた。X遺伝子に固有の0.8kb mRNAから翻訳される154アミノ酸からなる16~17kdの蛋白である。定まった立体構造をとらず、そのため逆に多機能性を示すと思われる(図7)。種々の宿主細胞内シグナル伝達系へ影響を与え、HBV増殖促進にはたらいたり、肝発癌に関与することが報告されている⁸⁾。

まとめ

日本に約100~150万人、世界的には3.6億人の感染患者がいるHBV感染症の治療は難航をきわめており、これは主にHBVのウイルス学が実際上ほとんど解明されていないことによると思われる。最初に述べた付着・侵入→cccDNA形成→転写→パッケージング/逆転写・複製→粒子形成/成熟→放出という基本的な生活環は正しいとしても、本来の感染サイクルのなかでどのような機構でこの営みが行われているのかは未だ不明な点が多い。

新規のHBV関連遺伝子産物⁹⁾やHBVの感染サイクルを制御するmicroRNA(miRNA)に関してもいくつかの報告があるようであるが¹⁰⁾、確固とした機能性miRNAはみつかっていない。今後、⊖鎖をコードする未知の遺伝子(産物)、HBVがコードするantisense RNA、miRNAの探索を含めた新たな発見が、HBV学を推し進め、HBV感

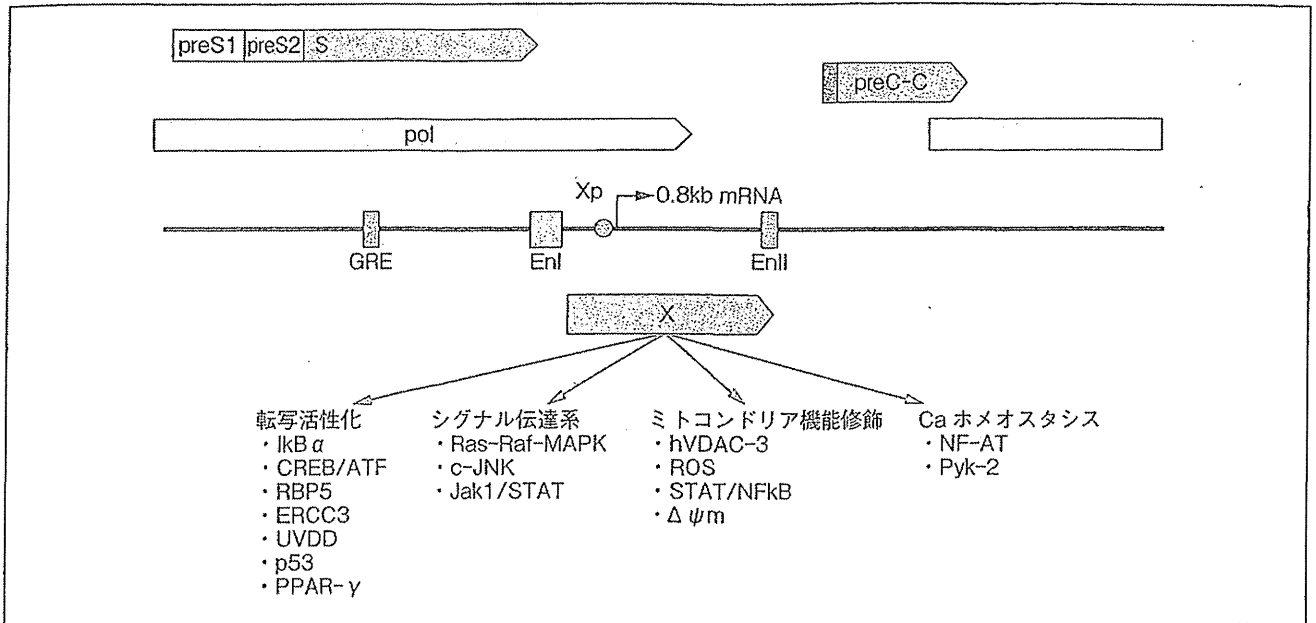


図7 X 遺伝子産物とその機能

X ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。下段には、想定されている機能の概略と標的とされる宿主遺伝子産物を示している。

Xp: X プロモーター。 EnI: エンハンサー-I。 EnII: エンハンサー-II。 pA⁺: polyA 付加シグナル。 GRE: glucocorticoid responsive element。 ε : パッケージングシグナル配列。

感染症治療法の開発・確立に多大な貢献を果たすものと思われる。

(上田啓次)

文献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S: A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541-546, 1965
- 2) Seeger C, Zoulim F, Mason WS: Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, p2977-3029, 2007
- 3) Summers J, Mason W S.: Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403-415, 1982
- 4) Yan H, Zhong G, Xu G, et al.: Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* 1: e00049, 2012
- 5) Kimura T, Ohno N, Terada, N, et al.: Hepatitis B virus DNA-negative Dane Particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J. Biol. Chem* 280: 21713-21719, 2005
- 6) Quasdorff M, Protzer U.: Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Viral Hepat* 17: 527-536, 2010
- 7) Yu Y, Pandeya DR, Liu ML, et al.: Expression and purification of a functional human hepatitis B virus polymerase. *World J Gastroenterol* 16: 5752-5758, 2010
- 8) Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al.: Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)* 58: 267-272, 2010
- 9) Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, et al.: The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol* 38: 343-348, 2003
- 10) Liu WH, Yeh SH, Chen PJ.: Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1809: 678-685, 2011

グルココルチコイド(副腎皮質ステロイド)感受性領域

I グルココルチコイドによる遺伝子発現修飾

グルココルチコイド (glucocorticoid : G) は生体における代謝, 免疫機能や行動などさまざまな事象に関わる。これらの事象はグルココルチコイドが細胞質に存在するグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor : GR あるいは GR α) と結合し G-GR 複合体が核内へ移行し, G-GR がホモダイマーもしくは宿主転写因子 jun や GR β とヘテロダイマーを形成することによる標的遺伝子の発現調節によってもたらされると考えられている。G-GR のホモダイマーは転写活性化に, G-GR と jun や GR β などのヘテロダイマーは転写抑制/不活化に関わるとされる (図 1A)¹⁾。

II グルココルチコイド受容体の構造

GR は性ホルモン受容体やミネラルコルチコイド受容体 (MR) と基本的に同様な機能構造をとっていると考えられている。N 末の転写活性化ドメイン (transactivation domain 1 : TAD1), DNA 結合/二量体形成ドメイン (DNA binding domain/dimerization domain : DBD), リガンド (グルココルチコイドや性ホルモン, アルドステロン) 結合ドメイン (ligand binding domain : LBD) となる。C 末の LBD には核移行シグナル (nu-

clear localization signal : NLS) や Stat5 などの付随転写因子相互作用領域があり, またグルココルチコイド依存性に転写活性化に関わる領域がある (図 1B)²⁾。

III HBV の GRE

G-GR 系による転写制御は, 遺伝子発現制御上の glucocorticoid responsive element (GRE) を介して行われるエンハンサー作用である。HBV は genotype を問わず, S 蛋白 ORF (open reading frame) 内に GRE コアコンセンサス配列 (TGTCCT) が 2 コピー近接して存在し (図 2A, B), グルココルチコイドの存在により転写が増強されると考えられている³⁾。一般に副腎皮質ステロイドはウイルスの増殖を上昇させ, 免疫機能を抑制するが, 副腎皮質ステロイドによる B 型慢性肝炎治療 (ステロイド離脱療法) はこの原理を巧みに利用したものと言える。

HBV にはエンハンサー I (EnI) とエンハンサー II (EnII) により感染細胞内での基本的な転写調節が行われていると考えられるが, グルココルチコイドの有無により, EnI, EnII, GRE が相乗的に作用して, HBV 関連転写産物の発現調節に関わると思われる。特に, HBV ゲノムは 3.2 kb で環状 DNA であり, 転写の際にはこれらのエンハンサーエレメントが密接に相互作用し合うことが想像される (図 2A)。

(上田啓次)

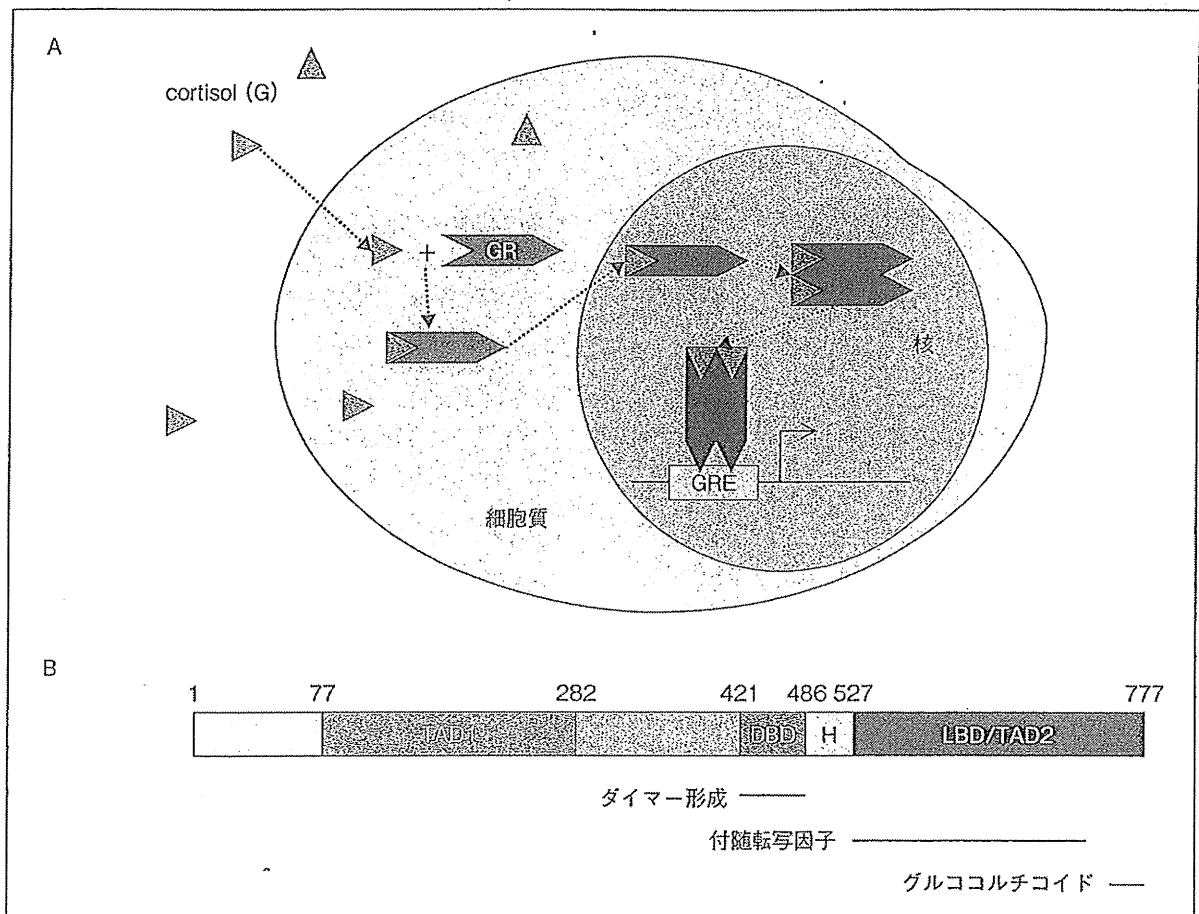


図1 グルココルチコイド(G)の作用様式とグルココルチコイド受容体(GR)

A: グルココルチコイドの作用様式。本図ではGが細胞質に入り、細胞質内に存在するGRと結合、結合したG-GR複合体が核に移行し、二量体を形成して、GREに結合、最終的に標的遺伝子発現を活性化の様子を模式的に示した。

B: GRの基本構造。詳細は本文あるいは参考文献を参照されたい。

TAD1: transactivation domain 1, 転写活性化領域。DBD: DNA binding domain, DNA結合領域。本領域は二量体形成に関わる。H: hinge領域、グルココルチコイドとの結合によりGRに構造変化をもたらすが、その構造変化に関わる領域。LBD/TAD2: ligand binding domain/transactivation domain 2, リガンド結合領域/転写活性化領域2。グルココルチコイドと結合する領域でグルココルチコイド結合に依存して転写の活性化にも関わる。付随転写因子(coactivator)との相互作用領域でもある。

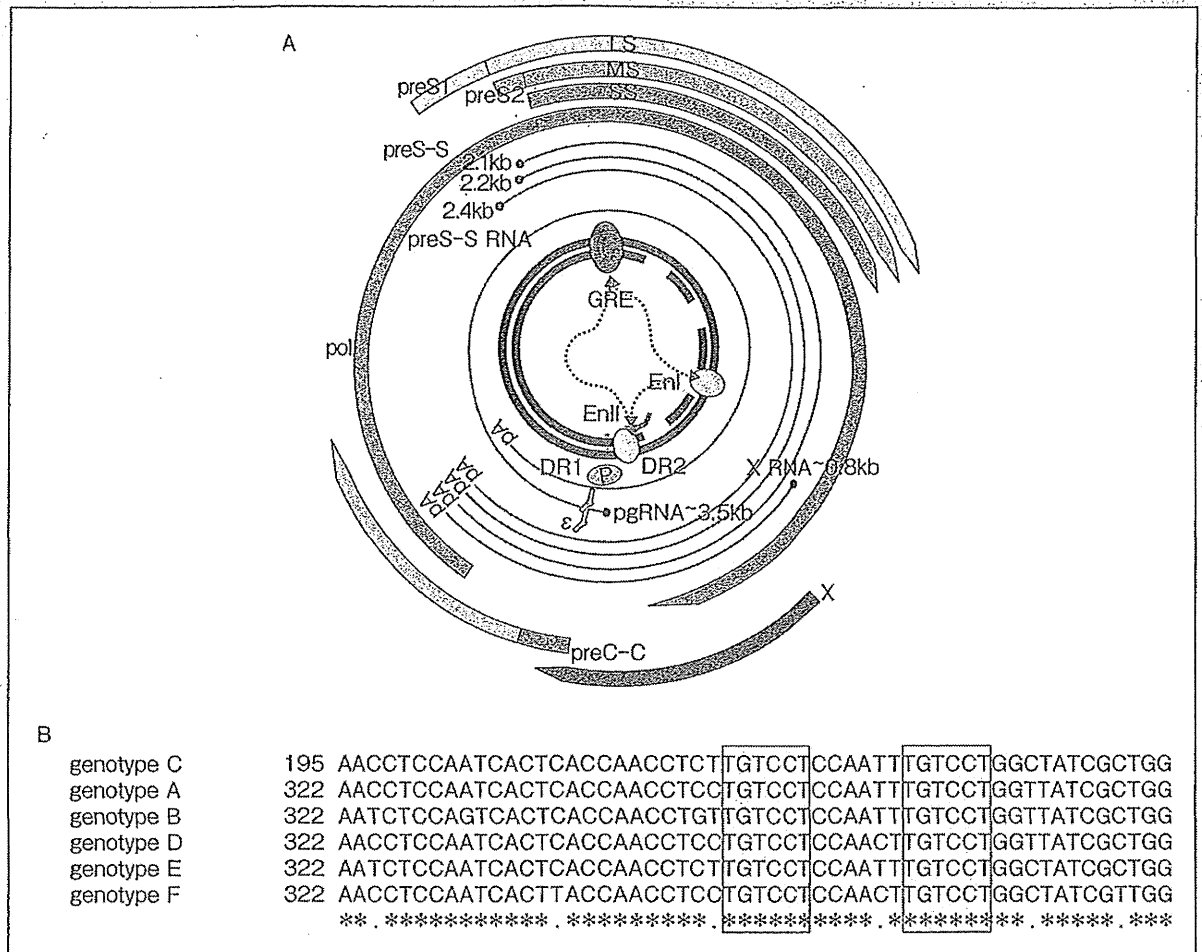


図2 HBVゲノムの構造と転写産物、遺伝子産物(抗原)、エンハンサーエレメント
 A: HBVゲノムの構造と転写産物、遺伝子産物(抗原)、エンハンサーエレメントの位置を示した。HBVが感染後に形成するcccDNA (covalently closed circular DNA) ではEnI, EnII, GREは近接した位置に配座すると予想され、さらに各プロモーターと相互作用することによって全体としてのHBV転写活性が生じるものと考えられる。
 B: HBVのGRE. GR結合コンセンサス配列(TGTCCT)が2コピー近接して存在する。genotype間で保存され、GREによる遺伝子発現調節はHBVで一般的に存在する調節機構と思われる。各配列は代表的なGenBank登録配列を参照した(adr4: X01587, adw2: X02763, genotype B: JN406371, genotype D: JQ687531, genotype E: JQ000008, genotype F: AF223965)。

1) Silverman MN, Sternberg EM. : Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates : form HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. Ann NY Acad Sci 1261 : 55-63, 2012

2) Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. : Glu-

cocorticoid receptor signaling in bone cells. Trends Mol Med 18 : 348-359, 2012

3) T-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, et al. : Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid responsive element. Proc Natl Acad Sci USA 83 : 1627-1631, 1986

第4章 ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた 毒性評価

水口裕之*¹, 高山和雄*², 川端健二*³

1 はじめに

現在の創薬プロセスにおいては、一つの医薬品が製品化されるまでに10～15年程度の期間及び1,000億円を超える開発費が必要であるといわれており、研究開発費のうちの七割強は臨床試験以前の探索研究から前臨床研究までに投入されている。その過程で数万～100万件の候補化合物の中から薬効、毒性などの評価を経て一つが医薬品として承認を受ける。ここでしばしば問題となるのが薬物誘発性肝障害（肝毒性）であるが、医薬品の開発プロセスの早期に肝毒性を確度良く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらし、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。ヒト初代培養肝細胞（本稿では、ヒト凍結肝細胞を含めてヒト初代培養肝細胞と表記する）の利用により肝毒性評価技術の向上が見込まれるものの、我が国においては入手が困難であり、安定供給や継続性の観点からその利用には限界がある為、より安定かつ容易に使用できる肝毒性評価系の確立が望まれている。近年、ヒト体細胞から分化多能性を有したiPS (induced pluripotent stem) 細胞の樹立が報告され、iPS細胞由来分化誘導肝細胞は上記の問題点の克服が期待できることから大きな注目を集めている。本稿では、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導法に関する知見を概説するとともに、それを利用した毒性評価系への応用の可能性について著者らの最新の結果を含めて紹介する。

2 肝細胞の培養

肝臓は、炭水化物や脂質の代謝、グリコーゲンの貯蔵とグルコースの合成、尿素の生合成等、多くの機能を有する内胚葉由来の臓器である。肝臓を構成する細胞のうち、肝実質細胞（肝細胞）がこれらの主要な機能を担っており、*in vitro*で培養された肝細胞は、生物医学的研究だけでなく再生医療や薬物の毒性評価系への応用も強く期待されている。これまで肝組織の*in vitro*モデルとしてヒト初代培養肝細胞がしばしば用いられてきた。ヒト初代培養肝細胞は薬物代謝酵素や

*1 Hiroyuki Mizuguchi 大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授

*2 Kazuo Takayama 大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野

*3 Kenji Kawabata ㈱医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー