
トランスジェニックマウスを用いたHCV core 蛋白の機能解析

(11670476)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 今関 文夫

(千葉大学医学部)

千葉大学附属図書館



20002816930



は し が き

研究組織

研究代表者：今関文夫（千葉大学医学部講師）

研究分担者：横須賀収（千葉大学医学部講師）

研究分担者：本多 新（千葉大学医学部医員）

研究分担者：徳久剛史（千葉大学大学院教授）

研究経費

平成11年度 1,900千円

平成12年度 1,700千円

計 3,600千円

研究発表

(1) 学会誌等

Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. J Hepatol 33, 440-447, 2000.

(2) 口頭発表

新井 誠人、今関 文夫、横須賀 収、本多 新、徳久 剛史、税所 宏光。HCV core 蛋白transgenic mouse における遺伝子発現の検討。第37回日本肝臓学会総会 平成13年5月17日発表予定。

(3) 出版物

なし

千葉大学附属図書館



20002816930

研究成果「トランスジェニックマウスを用いたHCV core 蛋白の機能解析」

要旨

生後4週のC型肝炎ウイルス(HCV)コア発現トランスジェニック(Px-core Tg)マウスとコントロールマウス(wild)の肝臓よりRNAを抽出し、SMART RT-PCR法とSuppression Subtractive Hybridization法を用いてPx-core Tgマウスに特異的に発現していると考えられる遺伝子クローンを解析した。雄、雌の対でそれぞれ約80遺伝子を調べたところ、apolipoprotein, mitochondrion, cytochrome関連遺伝子が多く見られ、癌、炎症に直接関連する遺伝子は検出されなかった。また、得られたクローンをスポットし、元の肝抽出RNAをプローブとしてhybridizationを施行したところ、2倍以下の差しか見られなかった。次に、約1000個のcDNAをのせたcDNA array とDNAチップを用いてPx-core Tgとwildでの遺伝子発現に違いのある遺伝子を検索したところ、複数個の遺伝子が認められたが、発癌、炎症に直接関連する遺伝子は認められず、その意義については今後検討する予定である。

今回用いたPx-core Tgは、生後1ヶ月では肝炎は見られておらず長期の経過観察でも肝発癌は見られていない。このPx-core Tg肝臓を用いたnorthern blottingでは、HCVコア遺伝子は約2pg/ μ gRNAの発現が確認されており、以前施行した肝臓のHCVコア蛋白定量でもヒトC型肝炎患者と同等以上の発現が確認されている。従って、このPx-core Tgの生体内におけるHCVcore蛋白の影響は予想に反して軽微なものなのかも知れない。

はじめに

日本における肝細胞癌の年間死亡者は約3万人で、男性では第3位である。その肝細胞癌の90%は肝炎ウイルスの持続感染にともなう慢性肝炎、肝硬変を発生母地としており、C型肝炎ウイルス(HCV)が70%、B型肝炎ウイルス(HBV)が20%を占める。C型肝炎ではB型と異なりウイルス核酸の染色体への組み込みはなく、ウイルスの産生するコア蛋白やNon-structural(NS)3蛋白にTransformation活性が、NS5Aのアミノ端を欠いた蛋白にtransactivation活性が報告されているが、未だ十分解明されていない。最近HCV core 蛋白発現トランスジェニックマウスで高率に肝細胞癌の発生が見られたという報告¹⁾があり、ウイルスの直接的な発癌との関連から注目されている。

我々の作成したHCV core トランスジェニックマウス(Px-core Tg)では肝細胞癌の発生はなかったが、皮下に肉腫の発生が見られたことからHCV core蛋白が発癌に関与している可能性がある。従来、HCV core蛋白の機能解析には主に培養癌細胞へのHCV core 遺伝子発現ベクターのtransfectionが用いられ、Tumor necrosis factor (TNF)- α レセプターとの結合、TNF- α によるapoptosisの促進²⁾、あるいは抑制³⁾、Fasによる

apoptosisの促進、NF- κ Bの活性化⁴⁾あるいは抑制⁵⁾、p53タンパクの転写活性の低下、p21遺伝子のpromotor活性の低下など多彩な機能が報告されている。今回、培養癌細胞ではなくマウス個体の肝細胞中で恒常的に発現するHCV core蛋白の機能を見ることにより、ヒトHCVキャリアの肝細胞で起きている現象により近い変化が同定できると考えた。

肝細胞癌は他の消化器癌と異なり、ウイルスの持続感染にともなう慢性的な肝細胞の変性、壊死、再生により生じ、ウイルス発癌の面を持っている。従ってウイルスの分子生物学的側面からの検討は重要であるが、これまでC型肝炎ではウイルスと発癌との関連は十分解明されていない。また発癌とは、様々な遺伝子異常を生じた細胞が未制御の細胞増殖を起こし、免疫監視機構から逃れapoptosisが起こりにくくなる結果と考えられる。従って、HCV core 蛋白の発現が細胞増殖やapoptosisにどのような作用を有するか、HCV core 蛋白の機能解析を個体マウスで調べることにより肝発癌機構をより深く解明しうると考えられる。

対象および方法

1) トランスジェニックマウス

HCV core 遺伝子の全長を挿入して作製したトランスジェニックマウス (Px-core Tg) ⁶⁾ の4週齢の雄、雌と同じケージで飼育した同週齢の非トランスジェニックマウスをコントロールとして用いた。マウスはエチルエーテル下で麻酔、脱血により屠殺し肝臓は液体窒素にて瞬間凍結後、-80℃に保存した。

2) SMART RT-PCR法とSuppression Subtractive Hybridization法⁷⁾

凍結肝組織よりTRIzol (Gibco BRL) を用いてtotal RNA を抽出した。DNase Iで処理したtotal RNA 1 μ gを用いてoligo-dT primerでcDNAを合成し、cDNAの末端にSMART primerを結合させた。続いてLong distance PCR法で増幅後、Px-core Tg肝由来のTester cDNAに2種類の異なるadaptorを結合し、それぞれを過剰量の非Tgマウス肝由来のdriver cDNAと混合し、Px-core Tg特異的cDNAのみを異なるadaptorを両端に持つ2本鎖cDNAとした。このcDNAをSuppression PCRにより増幅し、plasmidに挿入し塩基配列を決定した。

また、取れたクローンをナイロンメンブレンにスポットし、Px-core Tg肝由来のcDNAおよび非Tg肝由来のcDNAを32P標識プローブとしてhybridization施行し、発現量を検討した。

3) cDNA array

Px-core Tgと非Tgマウスの肝より抽出したRNAを32P標識プローブとしてAtlas

Mouse cDNA Expression Array (クロンテック社) を用いて、マウスCDNA 1176種類の遺伝子発現パターンの差異を検討した。

4) DNA chip

Px-core Tgと非Tgマウスの肝より抽出したmRNAを蛍光標識プローブとして、マウス由来既知遺伝子約600種類、EST約300種類がスライドガラス上に配置されたチップ(IntelliGene Mouse CHIP Set I, 宝酒造) にハイブリダイズさせることにより、その遺伝子発現を解析した。

成績

1) SMART RT-PCR法とSuppression Subtractive Hybridization法

Px-core Tgからwildのサブトラクション、および逆のサブトラクションで得られた、それぞれ約80個の遺伝子の塩基配列を決定した。表1、2に示すようにapolipoprotein, mitochondrion, cytochrome関連遺伝子が多く見られ、癌、炎症に直接関連する遺伝子は検出されなかった。また、これら遺伝子の発現量を肝組織抽出RNAをプローブとしてハイブリダイズさせたところ、Px-core Tgとwild肝で2倍以上発現量に差のある遺伝子は見られなかった。

2) cDNA arrayおよびDNA chip

Px-core Tgとwildマウス肝のmRNAをプローブとしてハイブリダイズさせ、遺伝子発現量の差異を検討したところ、cDNA arrayでは表3、4に示すように2倍以上発現量に差のある遺伝子が複数個確認された。また、DNA chipでも表5、6に示すように発現量に差のある遺伝子が確認されたが、従来HCV core 蛋白と関連の指摘されている遺伝子や特に、癌、炎症に直接関連すると思われる遺伝子は認められなかった。

討論

今回、HCV core 蛋白が肝細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えているか、HCV core 蛋白発現トランスジェニックマウス(Px-core Tg)を用いて検討した。サブトラクション法で得られた遺伝子には、発現量に有意な差異は見られず、cDNA array, DNA chipを用いた解析では、発現量に差異を認める遺伝子が複数個認められたが、炎症あるいは発癌に直接関連した遺伝子は確認できず、これら遺伝子の意義については今後の検討が必要である。我々の用いたトランスジェニックマウスでは肝発癌は見られておらず、4週齢では肝炎の所見も見られていない。従って、肉眼的表現型に差異が見られないこのマウ

スではHCV core 蛋白の細胞内遺伝子に及ぼす影響は軽微なのかも知れない。

このPx-core Tgの肝組織におけるHCV core mRNAの発現およびHCV core 蛋白の発現に関しては、northern blotting法とWestern blotting法, core蛋白定量で確認してある⁸⁾。今回実験に用いたPx-core Tgの肝組織については、northern blotting法で約2 pg/ μ gRNAの発現が確認されており、導入したHCV core遺伝子の発現がメチル化等により抑制されていることはないと考えられる。

今までに種々の培養細胞にHCV core 遺伝子を一時的あるいは恒常的に発現させた系を用いて、HCV core蛋白と細胞内遺伝子発現との関連が検討されている。昨年、TaiらはヒトC型肝炎組織において、肝細胞のNF κ Bが活性化されていることをElectrophoretic mobility shift assayと免疫組織染色で示している⁹⁾。しかしながら、この活性化が炎症に伴う2次的なものなのか、HCV core 蛋白そのものの作用によるのかは明らかでない。また培養細胞の実験系でも、HCV core 蛋白がapoptosisの誘導やNF κ B活性化を起こすのか起こさないのかについても未だ結論が得られていない。今回の実験結果からはHCV core 蛋白によりNF κ Bの下流の遺伝子の発現が高くなっているという明らかな所見は得られていないが、今後我々のPx-core Tg肝においてNF κ Bが活性化しているかどうか直接検討したいと考えている。

文献

1. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mouse. *Nature Medicine* 4: 1065-1067, 1998.
2. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 72: 3691-3697, 1998.
3. Ray RB, Meyer K, Steele R, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 273: 2256-2259, 1998.
4. You LR, Chen CM and Lee YH. Hepatitis C virus core protein enhances NF- κ B signal pathway triggering by lymphotoxin- β receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 73: 1672-1681, 1999.
5. Shrivastava A, Manna SK, Ray R et al. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 72: 9722-9728, 1998.
6. Honda A, Arai Y, Hirota N, et al. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J Med Virol* 59: 281-289, 1999.
7. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 6025-30, 1996.
8. Honda A, et al. HCV core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 33, 440-447, 2000.
9. Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor κ B in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 31: 656-664, 2000.

表1 サブトラクション法によりPx-coreTg 肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	クローン数
mitochondorion	8
apolipoprotein A2	5
cytochrome	4
major urinary protein	4
Serum albumin	3
unknown	26

表2 サブトラクション法によりWild 肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	クローン数
mitochondrion	7
major urinary protein	4
vitamin D binding protein	3
t-complex polypeptide 1	3
unknown	27

表3 cDNA arrayでPx-coreTg肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	wild肝との比率
homeobox protein A3	9.21
vesicle-associated membrane protein 1	6.97
hematopoietically expressed homeobox protein	3.55
antithrombin III	3.09
retinoic acid-inducible E3 protein	2.81
microtubule-associated protein 4	2.14
Friedreich ataxia protein	2.09
prothrombin precursor	2.03

表4 cDNA arrayでwild肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	Px core-Tg肝との比率
POU domain class 2-associating factor 1	4.08
non-muscle myosin light chain 3	3.39
nucleoside diphosphate kinase B	2.32
decorin	2.26
defender against cell death 1 protein	2.04

表5 DNA chipでPx-coreTg肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	wild肝との比率
anticoagulant protein C	3.93
hemopexin	2.99
ESTs (highly similar to glutathion S-transferase P)	2.89
ESTs (highly similar to pulmonary surfactant-associated protein B precursor)	2.76
ESTs (highly similar to interferon-inducible protein)	2.52
pre B cell leukemia transcription factor 1	2.45
cyclin dependent kinase inhibitor 1A	2.23
ESTs (highly similar to alpha-1-antiproteinase F precursor)	2.17

表6 DNA chipでWild 肝に発現の高かった遺伝子

遺伝子	Px-coreTg肝との比率
cytochrome P450	5.94
ATP-binding cassette, subfamily A	4.58
ESTs (highly similar to clathrin coat assembly protein ap47 homologue)	4.45
ubiquitin-activating enzyme E1C	3.90
solute carrier family 2	3.84
ESTs (moderately similar to ribulose-phosphate 3-epimerase)	3.64
ESTs (highly similar to env polyprotein precursor)	3.64
sterol-C5-desaturase homolog	3.54
Mus musculus antizyme inhibitor	3.33
cell division cycle 10 homolog	3.28
ESTs (highly similar to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)	3.19
myosin 1b	3.12
von Hippel-Lindau binding protein 1	3.10
conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	3.06
ESTs (highly similar to hypothetical 45 kD protein)	3.06
DEAD box polypeptide 5	3.03
phenylalanine hydroxylase	3.01
retinoblastoma-like 2	3.00