

	たけだ やすお
氏 名	武田 康 男
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1698号
学位授与の日付	平成18年9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Effect of interferon α and cell cycle progression on translation mediated by the hepatitis C virus 5' untranslated region: a study using a transgenic mouse model (HCV 5' 非翻訳領域によって介される翻訳がインターフェロン α や細胞回転の増加によって受ける影響について:トランスジェニックマウスを用いた研究)
論文審査委員	主査 教授 木 南 凌 副査 教授 青 柳 豊 副査 教授 藤 井 雅 寛

博士論文の要旨

〔目的〕 C型肝炎ウイルス (以下 HCV) は非 A 非 B 型肝炎の主因であり、感染者の半分以上は慢性肝炎に罹患し、肝硬変や肝臓癌をきたす。HCV はフラビウイルス科のプラス一本鎖 RNA ウイルスであり、その 5' 末端には 341 塩基からなる非翻訳領域 (以下 HCV5' UTR) がある。5' UTR には IR ϵ S (internal ribosome entry site) と呼ばれるリボゾームでの蛋白合成開始に必要な部位をもち、HCV ウイルスの複製を司っていると考えられる。本研究では、この HCV 5' UTR を導入したトランスジェニックマウスを用いてその機能を解析することを目的として、インターフェロン (以下 IFN) α と部分肝切除による細胞回転の上昇が 5' UTR に与える影響を検討した。さらに、発癌マウスの肝細胞癌組織における 5' UTR の機能も併せて検討した。

〔方法〕 使用したマウスの導入遺伝子はマウスアルブミンプロモーター、HCV5' UTR、HCV コア遺伝子の 16 アミノ酸分、fusion 蛋白としての β galactosidase (以下 β -gal) で構成した。肝組織中の導入遺伝子の mRNA は RT-PCR 法で検出し、Rnase protection assay で検証した。導入遺伝子による特異的蛋白発現の検出には、ウェスタンブロット法と X-gal による免疫組織染色を行った。IFN はヒトとマウスの両者に感受性のある IFN α B/D を 1MU あるいは 0.1MU 腹腔内投与し、6, 12, 24, 48 時間後に屠殺して得た肝臓を凍結保存しウェスタンブロット法と免疫組織染色を行った。細胞内転写因子 Stat1 とそのリン酸化蛋白を検出する系としてはウェスタンブロット法を用いた。部分肝切除は生後 3 ヶ月のマウスに施行し、肝切除後 24, 48, 72 時間に屠殺し肝臓を検体に用いたが、S 期の細胞を検出するため、屠殺 3 時間前に BrdU を腹腔内投与し、陽性細胞を免疫組織染色で検出した。HCV5' UTR トランスジェニックマウスと HBX 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを交配した発癌マウスからも、3 匹 5 結節の腫瘍組織を得て β -gal 発現の解析を行った。

[結果] (1) 導入遺伝子の検証: トランスジェニックマウスの肝組織を材料として RT-PCR を施行したところ、増幅は 490bp のバンドを示し、HCV の 5' UTR をカバーしており、この導入遺伝子の mRNA に特異的であると考えられた。(2) インターフェロン投与実験: β -gal 蛋白は IFN α 1MU を注射した 6 時間後で有意に抑制されていたが、12 時間後では治療前のレベルまで戻っていることがウエスタンブロット法と免疫組織染色で確認された。なお、アルブミンプロモーターの発現は影響を受けていなかった。また、IFN 投与 20 分後の肝組織で STAT1 蛋白のリン酸化が観察された。(3) 部分肝切除による影響: 免疫組織染色による BrdU 陽性肝細胞は肝切除前でごくわずかしかみられなかったが、部分肝切除後 48 時間で最高となった。肝切除後 24, 48, 72 時間後の肝組織の β -gal 濃度をウエスタンブロット法で測定したが、肝切除後 48 時間でやや増加していたものの、有意とはいえなかった。(4) 肝細胞癌組織内における 5' UTR の活性化について: 腫瘍細胞の組織染色では β -gal は観察されなかったが、導入遺伝子の mRNA は減少しておらず、アルブミン発現も減少していなかった。

[考察] HCV5' UTR のトランスジェニックマウスを作成し、IFN α など HCV を抑制する物質や細胞回転の増加が 5' UTR へ与える影響について調べた。結果は上記のごとく、IFN α 1MU 注射後 6 時間後の肝臓で β -gal 発現が減少しており、IFN が 5' UTR に作用してウイルス複製を抑制する可能性を示した。この結果は IFN の大量投与でのみ得られ、STAT1 蛋白のリン酸化も 0.1MU 投与ではなされず、IFN の用量に依存する可能性が考えられた。部分肝切除の実験では、細胞分裂が盛んとなる肝切除後 48 時間において β -gal 発現に有意な変化はみられず、5' UTR は宿主の細胞周期に依存しない可能性が考えられた。実際、BrdU と β -gal の 2 重染色では S 期の細胞でもそれ以外の細胞でも β -gal 陽性細胞がみられた。また、このマウスと発癌マウスとの交配によるダブルトランスジェニックマウスの肝癌組織では、 β -gal 発現を認めず、肝癌組織において HCV5' UTR が抑制されている可能性が示唆された。以上より、細胞回転の増加や発癌が 5' UTR を活性化し、ウイルス複製の増加へとつながるのではという仮定は否定的であった。しかし、このことはヒトの HCV 感染を考えた場合、高発癌状態の肝硬変となっても必ずしもウイルス量は増加しないことに、むしろ当てはまる現象と思われた。本論文は *in vivo* で、5' UTR の機能をみるという初の試みを示したものであるが、その機能の全貌解明には、さらなる研究が必要と思われる。

(論文審査の要旨)

C型肝炎ウイルスは1本鎖のRNAウイルスであり、ヒトに持続感染し、慢性肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こす。その5'には5'非翻訳領域(5'UTR)という二次構造に富んだ領域がありウイルスタンパク質の翻訳を調節する。申請者はアルブミンのプロモーターに5'UTRをつなぎレポーターとしてLacZをつないだトランスジェニックマウスを作製し、肝臓の小葉、門脈領域などの肝細胞でのLacZ活性を調べている。さらにC型肝炎の治療薬であるIFNの5'UTRに対する影響、肝再生(肝切除後の再生亢進状態)、癌化に際して、申請者はこの5'UTRを介した翻訳が受ける影響について調べている。

申請者は以下のような結果を示し、考察を加えている。「IFN α 1MU/body腹腔内投与後6時間後の肝臓でmRNAレベルに変化がなかったにもかかわらず、 β -gal蛋白発現が低下していた。このことより、IFN α が5'UTRに作用してウイルス蛋白の翻訳を抑制する可能性が考えられた。しかし、この結果はIFN α の大量投与でのみ得られ、STAT1蛋白のリン酸化も0.1MU投与ではなされず、IFN α の用量に依存すると考えられた。(2)部分肝切除の実験では、細胞分裂が盛んとなる肝切除後48時間において β -gal発現は若干上昇していたが有意な変化ではなく、細胞増殖とは明らかな関係が無いと考えられた。一方、肝癌組織では β -gal発現を認めず、肝癌組織においてHCV5'UTRを介した翻訳が抑制されている可能性が示唆された。」

以上の知見を得、十分な考察を加えたところに博士論文としての価値を認める。