



Title	Hepatitis C Virus Core Protein Differently Regulates the JAK-STAT Signaling Pathway under Interleukin-6 and Interferon- γ Stimuli
Author(s)	法水, 淳
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45354
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ほうすい あつし 法 水 淳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 1 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 9 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Hepatitis C Virus Core Protein Differently Regulates the JAK-STAT Signaling Pathway under Interleukin-6 and Interferon- γ Stimuli (HCV コア蛋白は IL-6 及び IFN- γ 刺激下において JAK-STAT 経路に対して異なった影響を及ぼす)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 松浦 善治 教 授 川瀬 一郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こす主要な原因ウイルスである。最近、HCV core 蛋白の発現が宿主細胞の増殖やアポトーシス、あるいはシグナル伝達などに影響を及ぼし、宿主細胞機能に様々な修飾を与えることが明らかになりつつあり、このことが C 型肝炎の病態形成に深く関与していると考えられている。一方、JAK-STAT シグナル伝達経路は、各種インターフェロン (IFN) やインターロイキン (IL) などのサイトカイン刺激下における情報をレセプターから核に伝える主要なカスケードである。そこで本研究においては、HCV core 蛋白の恒常的発現が宿主細胞の JAK-STAT 経路にどのような影響を及ぼすかについて、IL-6 及び IFN- γ 各々の刺激下において検討を行った。

【方法ならびに成績】

マウス正常肝細胞株 BNL CL 2 (CL2) 細胞に遺伝子導入を行い、HCV core 蛋白を恒常的に発現する細胞 (core 細胞) を樹立した。一方、陰性コントロールとして空ベクターを導入した細胞を用いた (mock 細胞)。最初に IL-6、IFN- γ 刺激下における JAK-STAT シグナル伝達を mock、core 両細胞間で比較した。すなわち、IL-6、IFN- γ 刺激後の細胞溶解液を用いて、Western blot にて JAK、STAT のリン酸化レベルを検討した。また、STAT3 結合配列 APRE、STAT1 結合配列 GAS のそれぞれの下流に luciferase 遺伝子を有するレポーターベクター (pAPRE-luci、pGAS-luci) を細胞に導入し、IL-6 または IFN- γ 刺激後 luciferase assay を行うことで STAT 依存性転写活性を検討した。その結果、IL-6 刺激下においては JAK1、STAT3 のリン酸化レベル、STAT3 依存性転写活性のいずれも mock 細胞に比し core 細胞で低下していた。一方、IFN- γ 刺激下では JAK1/2、STAT1 のリン酸化レベル、STAT1 依存性転写活性のいずれも mock 細胞に比し、core 細胞で増強していた。次に、core 細胞の細胞溶解液を用いて免疫沈降 / Western blot 法にて HCV core 蛋白と JAK、STAT との直接結合を検討したところ、core 蛋白と JAK1/2 との結合が認められた。HCV core 蛋白は 79-84 番目のアミノ酸に、JAK 結合モチーフである PXXPPX 配列を有しているため、この部が本来の配列である wild-type、PXXPPX を AXXAXA に置き換えた mutant、この 6 アミノ酸を欠失する deletion の 3 種類の HCV core 発現ベクターを構築した。これらのベクターを用いて in vitro translation にて各種

HCV core 蛋白を合成し、CL2 もしくはヒト肝癌細胞株 HepG2 の細胞溶解液と混合した後、JAK1/2 抗体で免疫沈降を行ったところ、wild-type core 蛋白は JAK1/2 と共沈したが、mutant もしくは deletion core 蛋白は共沈しなかった。この結果より、core 蛋白の PXXPPX 配列が JAK 蛋白との結合部位であることが示された。さらに、core 蛋白と JAK との結合がシグナル伝達に及ぼす直接影響について、各種 HCV 発現ベクターとレポーターベクター (pAPRE-luci または pGAS-luci) を CL2 もしくは HepG2 細胞に contransfection し、サイトカイン刺激後に luciferase assay を行うことで検討を行った。IL-6 刺激下の JAK-STAT 経路に対する抑制効果はこの PGYPWP を欠如させたときに消失する、つまり HCV core 蛋白と JAK との結合により抑制が引き起こされることが示された。逆に IFN- γ における増強効果はこの PGYPWP の有無にかかわらず認められた。そこで mock、core 両細胞におけるサイトカイン受容体発現レベルを flow cytometry および Northern blot にて検討したところ、core 細胞では mock 細胞に比し、IFN- γ receptor 2 (IFNGR2) の発現上昇が認められ、このことが IFN- γ 刺激下におけるシグナル伝達増強効果の原因であると考えられた。

【総括】

HCV core 蛋白が、IL-6 刺激下においては JAK-STAT シグナル伝達に抑制的に働き、逆に IFN- γ 刺激下では促進的に働くことが示され、これは core 蛋白と JAK 蛋白との結合による JAK 活性の直接的阻害、および IFNGR2 の発現レベルの上昇といった2つの独立したメカニズムによってもたらされることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（以下 HCV）が産生するウイルス蛋白の中でも、コア蛋白が最近注目されており、HCV 関連肝疾患の病態形成に深く関わっていると考えられている。本研究はこの HCV コア蛋白が、IL-6 刺激下および IFN- γ 刺激下における JAK-STAT 経路に対して及ぼす影響を検討したものである。その結果、HCV コア蛋白が JAK 蛋白との結合及び受容体発現レベルの上昇といった2つの異なったメカニズムにより IL-6 及び IFN- γ 刺激に対して影響を及ぼすことを明らかにした。HCV コア蛋白の標的分子として JAK 蛋白が指摘されたのは本報告が初めてである。臨床的には IL-6 が肝細胞の増殖、再生などに重要な役割を果たすこと、HCV 関連肝疾患が持続的な肝細胞壊死と再生を繰り返すことによりその病態が形成されることを考えると、HCV コア蛋白の持続的な発現により IL-6 に対する反応を抑制して肝細胞再生を遅延させ、持続的な肝障害へと導かれることが考えられる。また、IFN- γ も感染細胞からの肝炎ウイルスの排除に中心的な役割を果たすことを考えると、HCV コア蛋白が宿主細胞の IFN- γ の感受性を促進することで宿主での HCV 増殖を低レベルに保つことに寄与しており、結果的に慢性化を引き起こす可能性を示唆する。以上のように、本研究は HCV 関連肝疾患の病態解明の糸口となることが考えられ、本論文は、学位に値するものと認める。