



## Inhibition of p21/Waf1/Cip1/Sdi1 Expression by Hepatitis C Virus Core Protein

吉田, 熊

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2431

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002431>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【72】

氏名・(本籍) 吉田 熊 (長崎県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1394号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年2月28日

【学位論文題目】

**Inhibition of p21Waf1/Cip1/Sdi1 Expression by Hepatitis C Virus Core Protein**

(C型肝炎ウイルスコア蛋白による  
p21Waf1/Cip1/Sdi1 の発現阻害)

審査委員

主査 教授 堀田 博

教授 黒田 嘉和 教授 前田 盛

# 学位論文の内容要旨

## 【はじめに】

ヒト新生児の低酸素虚血性脳障害 (hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE と略) の脳組織では、大脳皮質の梗塞に代表される急性の神経細胞死に加えて、海馬組織や線条体組織において受傷から数日間レベルの時間経過で遅発性に生じる神経細胞死 (delayed neuronal cell death) がしばしば観察され、その生化学的および組織学的検討から、アポトーシスの関与が唱えられている。最近のアポトーシスの病態解明の進歩は著しく、各種アポトーシス実行因子が発見されそれらに対する抗因子が合成され、*in vitro* や一部動物実験レベルの *in vivo* で使用されている。そこで今回、アポトーシス実行因子の代表である caspase family の inhibitor を使用し、新生仔 HIE モデルラットにおけるアポトーシス関連脳神経細胞障害の軽減効果を検討した。一方、以前より脳神経細胞障害とくに海馬神経細胞に対する HIE は特に温度の影響を受けやすいことが知られてきた。そこで同様に新生仔 HIE モデルラットにおける低体温処置が海馬神経細胞に与える影響 (アポトーシスかネクローシスか) とその臨床的效果を酵素学的、組織学的に検討した。最後に caspase inhibitor 投与と低体温処置の併用治療 (combination therapy) の有効性について検討した。

## 【方法】

Rice の手法に基づいて日齢 7 の Sprague-Dawley ラットを、左総頸動脈結紮切断後 8 %酸素(hypoxia and ischemia; HI と略)に 1 時間 (変法)曝露させ、軽症新生仔 HIE モデル (mild HIE) を作成した。負荷中の環境温度は 37°C(常温群)と 29°C(低体温群)の 2 段階とし、加湿した 8%酸素を流した 500ML のプラスチック製 chamber をそれぞれ水温 37°C、29°C の恒温槽に浮かべ、その中に直腸温をモニタリングした結紮ラットを無麻酔、非拘束で静置した。一方、アポトーシスの実行酵素である caspase の汎阻害剤 (pan-caspase inhibitor) である Boc-aspartyl(OMe)-fluoromethylketone (以下 BAF と略; Enzyme Systems Products 社) を HI 負荷直前に 100nmol/個体ずつ、結紮側 (左側) の対側である右側脳室内へ定位的に注入したものを BAF 群とした。この条件設定により、HI 37°C群、HI 37°C+BAF 群、HI 29°C群、HI 29°C+BAF 群の 4 群に分類し、sham operation 群 (CTL 群)、生食注入のみ群 (VEH 群) と比較を試みた (Figure 1)。①HI 負荷後、結紮側海馬組織中 caspase-3 活性を経時的 (0, 8, 16, 24, 40 時間, 4, 7 日後) に測定しその頂値を求めた。さらに上記 4 群において負荷後のある定点 (結果的には負荷後 16 時間; 後述) での値を比較検討した (個体数 N=9)。②さらにこれらの処置による *in vivo* での神経細胞保護効果を検討するため、日齢 14 (HI 負荷後 7 日目) にバラフォルムアルデヒドにより還流固定しヘマトキシリン・エオジン染色にて標本を作製、結紮側海馬 CA1 領域の神経細胞数を算定し比較

した。これは光学顕微鏡下で ×400 倍での 1 視野あたりの残存神経細胞数をカウントし、各個体で 3 視野の平均細胞数として算出した (N=6) ③またアポトーシスの細胞遺伝学的特徴である、炎症反応を伴わない核の断片化に対する効果を見るため、アガロース電気泳動法を用いて、断片化された DNA を同定し、同様に定点において 4 群間で比較検討した (N=3X 各 3 回検討)。

## 【結果】

①Sham operation 施行群に比して、HI 37°C 群では caspase-3 活性が負荷後 16 時間に急峻な頂値をとり、以後速やかに baseline まで下降した。(Figure 2) ②負荷後 16 時間の caspase-3 活性 (Unit/mg protein/min) は、HI 37°C 群 8.32±1.72、HI 37°C+BAF 群 3.88±0.41、HI 29°C 群 4.62±0.23、HI 29°C+BAF 群 2.65±0.37 であり、低体温および BAF により上昇が抑制された ( $p < 0.01$ ) (Table 1)。③無処置群 (100%) に対する残存神経細胞の割合は、HI 37°C 群 62.9%、HI 37°C+BAF 群 82.7%、HI 29°C 群 78.7%、HI 29°C+BAF 群 95.2% で、低体温および BAF により組織学的にも有意な ( $p < 0.01$ ) 細胞保護作用が認められた (Figure 3)。④DNA 電気泳動法では、細胞障害により負荷後数時間より DNA のびまん性破壊 (ネクローシス) を示唆する smear 様パターン (SP) が出現し、負荷後 3.5 日をピークとして核の断片化 (アポトーシス) を示唆する ladder 様パターン (LP と略) の DNA バンドが検出された (Figure 4)。さらに、負荷後 4 日の定点における各負荷が DNA 変性に与える影響を観察したところ、HI 29°C 群では SP、LP 共に抑制し、HI 37°C+BAF 群では主に LP を抑制した。すなわち、低体温はアポトーシス、ネクローシスの両者を、caspase-inhibitor はアポトーシスのみを抑制する結果となった。さらに、両者の combination therapy (HI 29°C+BAF 群) では、相乗相加効果を示し、電気泳動上、SP、LP どもに消失し、細胞遺伝学的にもその効果が証明された (Figure 5)。

## 【結論】

①海馬 caspase-3 活性と神経細胞死 (DNA の変性含む) は、ともに低体温および BAF にて抑制された。また、低体温と BAF の併用がさらに著明な保護効果を示し、両者の併用療法の可能性が示唆された。②今回用いた、mild な HIE モデル (低酸素 1 時間モデル) において低体温負荷のみで caspase-3 の活性低下を伴う細胞保護効果を示した点は、これまで海馬 CA1 細胞が受けやすいとされてきた温度による障害にはネクローシスのみならずアポトーシスも関与していることを示唆した。この病態は、低体温が初期傷害の程度を軽減することにより caspase-3 の活性化を抑制し、結果的に遅発性神経細胞死をも防止すると推測された。今回用いた BAF は脂溶性ペプチドであり脳血流閥門の通過が期待される。静脈内投与や腹腔内投与にても髓液移行を認め神経細胞保護効果を示す可能性を秘めており、将来的にヒトへの応用の可能性を示唆するものである。

## 神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1393 号	氏名	吉田 熊
論文題目			Inhibition of p21/Waf1/Cip1/Sdi1 Expression by Hepatitis C Virus Core Protein C型肝炎ウイルスコア蛋白によるp21/Waf1/Cip1/Sdi1の発現阻害
審査委員	主査	堀田 博(	
	副査	黒田嘉和	
	副査	前田 盛	
審査終了日	平成 13 年 12 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

C型肝炎ウイルス（HCV）は持続感染をおこし、肝発癌に関与している。ウイルス蛋白は約3,000 アミノ酸残基からなるポリプロテインとして產生され、プロセシングにより10種類の成熟ウイルス蛋白（コア蛋白、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B）となる。コア蛋白はウイルス粒子を構成するのみならず、宿主細胞の遺伝子転写やアボトーシスを制御している。このことを通して、コア蛋白は直接または間接的に肝発癌に関与している可能性が指摘されているが、詳細な分子メカニズムはほとんどわかっていない。

細胞周期の調節にはサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ（Cdk）から成る蛋白キナーゼ複合体が密接に関与し、CdkはCdkインヒビターと呼ばれる蛋白質と結合することで負の制御を受ける。p21/Waf1はCdkインヒビターの一つでDNA傷害時にp53によって誘導され、蛋白キナーゼ複合体と結合してRb蛋白のリン酸化を阻害することで、G1/S期において細胞周期を停止するという機能をもち、またDNAポリメラーゼδ反応促進因子でありDNA修復と複製に必要なPCNA（細胞核増殖因子）と結合することでG1/S期とG2/M期において細胞周期を抑制することが知られている。このようにp21/Waf1は二つの独立したメカニズムで細胞周期を抑制する機能を持ち、癌抑制遺伝子と考えられている。

申請者らはこれまでにGST融合蛋白を用いたin vitro ブルダウンアッセイにより、コア蛋白がp21/Waf1のC末端にあるPCNA結合領域近傍に結合することを示したが、本研究では、p21/Waf1の発現量と機能に及ぼすコア蛋白の影響について検討した。まず、コア蛋白とp21/Waf1の発現系を確立して培養細胞での発現を解析し、コア蛋白はp21/Waf1の発現を著しく抑制することを見い出した。ノーザンプロット法によりp21/Waf1 mRNA量はコア蛋白に影響されることを示し、コア蛋白によるp21/Waf1発現の抑制は転写後におこることを明らかにした。この発現抑制の特異性を検討するために、他のHCV蛋白であるNS3、NS5Bを共発現させp21/Waf1および2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素の発現レベルの変化を調べ、発現抑制はコア蛋白とp21/Waf1の組み合わせの時にのみ特異的にみられることを示した。

次いで、コア蛋白によるp21/Waf1蛋白発現抑制のメカニズムを検討するために、p21/Waf1を発現させた後、サイクロヘキシミド処理により*de novo*蛋白合成をブロックし、その後のp21/Waf1の分解を経時的に測定した。最初の発現レベルに差を認めたが、p21/Waf1の分解速度はコア蛋白による影響を受けていないことがわかった。また、種々の蛋白分解酵素阻害剤を用いた実験で、p21/Waf1はユビキチン-プロテアソーム系およびカルパイン系により分解されることが示されたが、それらの分解に対するコア蛋白の特異的な影響は明らかではなかった。従って、コア蛋白によるp21/Waf1発現の抑制は、主としてp21/Waf1蛋白の*de novo*合成の低下、および合成直後の蛋白成熟の阻害と未成熟蛋白の分解促進の可能性が推察された。

さらに、p21/Waf1のCdk阻害作用に及ぼすコア蛋白の影響について*in vitro*キナーゼアッセイ法を用いて調べた。p21/Waf1を一過性に共発現させるとCdk2キナーゼ活性は著しく抑制されるが、p21/Waf1とともにコア蛋白を発現させると用量依存性にp21/Waf1の阻害作用が減弱し、Cdk2キナーゼ活性が回復することが明らかになった。

以上、本研究は、宿主細胞に及ぼすC型肝炎ウイルス蛋白の影響について調べたものであるが、従来ほとんど行われていなかった細胞周期調節蛋白p21/Waf1とコア蛋白の相互作用に着目し、コア蛋白がp21/Waf1の発現を転写後に抑制し、その細胞周期調節機能を阻害することを明らかにしたものであり、C型肝炎ウイルスの病原性発現機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。