



Critical role of CREBH-mediated induction of TGF- β 2 by HCV infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-01-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 千田, 剛士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3209

博士(医学) 千田 剛士

論文題目

Critical role of CREBH-mediated induction of TGF- β 2 by HCV infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells

(HCV 感染に起因する CREBH 関連 TGF- β 2 誘導は肝星細胞での線維化応答に重要な役割を果たす)

論文の内容の要旨

[はじめに]

C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は肝臓の慢性炎症を引き起こす。慢性肝炎により細胞破壊と再生が繰り返される過程で徐々に正常な肝組織が失われる一方で、細胞外マトリックスのコラーゲン線維が増生し肝線維化が惹起される。肝線維化が進行して肝硬変に至ると、肝機能の低下と肝細胞がんの発生が問題となる。肝臓の線維化においては、肝細胞と類洞内皮細胞の間隙に存在する肝星細胞が transforming growth factor-beta (TGF- β)をはじめとしたサイトカインの刺激によって活性化し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌することが知られている。しかし HCV 感染に起因する肝線維化の分子機構は必ずしも十分に解明されていない。本研究では、HCV 感染細胞における TGF- β 発現亢進の分子機構、また HCV 感染細胞との共存下での肝星細胞の活性化、線維化促進の分子機構の解明を目的とした。

[材料ならびに方法]

細胞はヒト肝がん細胞株 Huh7.5.1、HepG2、ヒト肝星細胞株 TWNT4、ヒト胚腎臓細胞株 293T を用いた。HCV J6/JFH-1 株由来ウイルスを Huh7.5.1 細胞へ添加することで感染実験を行った。プラスミドベクターはリポフェクション法により細胞へ導入した。プロモーター活性はルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。転写因子 cyclic-AMP responsive element-binding protein hepatocyte specific (CREBH)のプロモーターへの結合はクロマチン免疫沈降法、ゲルシフトアッセイにより解析した。遺伝子ノックダウンには siRNA および shRNA を、CREBH ノックアウト細胞作製には CRISPR-Cas9 システムを利用した。HCV 感染または非感染 Huh7.5.1 細胞と TWNT4 を混和し共培養系を作製した。20 週齢の C57/BL6J マウス(野生型)及び同系 CREBH ホモノックアウトマウスに緑色蛍光タンパク質または HCV タンパク質(Core-E1-E2-p7-NS2)を発現する非増殖型アデノウイルスベクターを接種し、肝組織中の mRNA、タンパク質発現を解析した。ヒト肝細胞を有するキメラマウスに HCV 患者血清を接種し、肝組織中のタンパク質解析を行った。遺伝子導入実験は組換え DNA 実験安全委員会、動物実験は浜松医科大学動物実験委員会の承認のもと行われた。培養細胞またマウス組織中の mRNA 発現は定量 RT-PCR で、タンパク質発現はウェスタンブロット法、免疫染色法で解析した。HCV 感染患者の血清と肝組織を用いた解析は医の倫理委員会の承認のもとで行われた。肝組織は METAVIR スコアにより肝線

維化の程度を F0 から F4 に分類した。

[結果]

細胞への HCV 感染に伴う TGF- β 発現変化は、TGF- β 2 mRNA の上昇が感染後速やかに見られまた発現上昇も TGF- β 1 に比べ顕著であった。HCV 感染または HCV タンパク質発現により TGF- β 2 プロモーター活性の亢進が示された。配列解析から、TGF- β 2 プロモーター領域に CREBH の結合配列が存在することを見出し、CREBH は TGF- β 2 プロモーターと直接結合すること、TGF- β 2 プロモーター活性には CREBH 結合配列が重要であることを実験的に示した。CREBH はプロテアーゼ切断され N 末端側の活性型 CREBH (CREBH-N) が核移行して転写因子として働く。TGF- β 2 プロモーター活性は CREBH ノックダウンで減弱、CREBH-N の強制発現で上昇することを示した。また、HCV タンパク質発現によって、細胞内での CREBH 切断が亢進することをウエスタンブロット法で、CREBH-TGF- β 2 プロモーター複合体が増加することをクロマチン免疫沈降法でそれぞれ示した。野生型のマウスにアデノウイルスベクターを用いて HCV タンパク質を強制発現させると、肝臓での TGF- β 2、TGF- β 1 の mRNA レベルが HCV タンパク質発現によって上昇したが、CREBH ノックアウトマウスではこの上昇は見られなかった。以上から HCV 感染により CREBH が活性化され TGF- β 2 発現を誘導するものと示唆された。HCV 感染細胞単独、TWNT4 細胞単独に比べ、両細胞の共培養系で顕著なコラーゲンの発現亢進を認めた。この共培養系では HCV 感染によるコラーゲンの誘導と共に TGF- β 2、TGF- β 1 発現も誘導され、Huh7.5.1 細胞の TGF- β 2 ノックダウンによりコラーゲン、TGF- β 1 発現は減弱し、TGF- β 2 強制発現によりコラーゲン、TGF- β 1 の発現が回復した。臨床検体の解析から、血清 TGF- β 2 濃度は健常人に比べ HCV 感染患者で有意に高いこと、患者肝組織中の TGF- β 2 mRNA を HCV 感染時と抗 HCV 治療によるウイルス排除後で比較したところ HCV 排除後の方が低下傾向にあることを見出した。

[考察]

CREBH は肝臓特異的に発現し小胞体ストレスによって活性化され、肝臓における糖新生、脂質代謝等に関わることが報告されているが肝線維化への関与は本研究で初めて示された。得られた結果から HCV 感染に起因する肝線維化誘導として以下の分子モデルが考えられる。すなわち、1) HCV 感染が引き金となって感染細胞で小胞体ストレスが惹起され CREBH が活性化する。2) 活性型 CREBH は TGF- β 2 プロモーターを認識し TGF- β 2 の転写亢進に働く。3) HCV 感染肝細胞から放出された TGF- β 2 は肝細胞での TGF- β 1 および TGF- β 2 のクロスインダクションを起こすとともに、近傍の肝星細胞での TGF- β シグナル刺激に寄与し、線維化関連遺伝子の発現が誘導される。

[結論]

HCV 感染に伴う CREBH 活性化を介した TGF- β 2 誘導の分子機構を明らかにした。HCV 感染肝細胞と肝星細胞の共培養系を用いて、CREBH および TGF- β 2 が肝星細胞

胞における線維化関連遺伝子の発現誘導に重要な役割を果たしていることを示した。