

【平成24年4月-12月授与分】博士學位論文内容の要旨及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/26197>

出版情報：2013-03-29. 九州大学
バージョン：
権利関係：

究はこれらの問題解決を目的とした。

GD15 の妊娠ラットに 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD を経口投与し、GD18~生後 7 日目 (PND7) の児を解析した結果、性ステロイド合成の律速過程に関わる steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) が出生前後に一過性に低下した (Fig. 1A)。さらに、脳下垂体ゴナドトロピン [LH および follicle-stimulating hormone (FSH)] も出生前後に β サブユニット特異的に低下した (Fig. 1B)。

StAR と LH/FSH の低下時期が一致すること、ならびに低下するゴナドトロピンを equine chorionic gonadotropin (eCG) として児に補給することで StAR 等の合成系低下が完全に回復することから、TCDD は出生前後に特異的にゴナドトロピンを低下させ、これを起点として生殖腺ステロイド合成障害を惹起することが強く示唆された。周産期児の性ステロイド刺激は脳の性分化に必須であるため、TCDD による上記の障害は、脳の性特異的の形質形成に深刻な影響を及ぼすと推定される。この検証のため、低下するゴナドトロピンを eCG として胎児期に補充し、成長後の性特異的の行動能力を調べた結果、TCDD 依存的性行動障害および甘味料嗜好性低下がほぼ正常水準にまで回復した (Fig. 2)。

さらに、eCG 補給は、TCDD によって誘発される生殖系の形態変化に対しても一部改善作用を示した。これらの成果から、TCDD による性行動障害等の性特異的の形質の未成熟は、周産期における脳下垂体ゴナドトロピン低下が主たる要因であることが実証された。

TCDD によるゴナドトロピン合成障害が、脳下垂体に対する直接作用に起因するか否かを検証するため、培養脳下垂体実験系を構築し、TCDD がゴナドトロピン遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果、TCDD はゴナドトロピン合成の制御因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 存在下でのゴナドトロピン刺激合成を、胎児特異的かつ β サブユニット特異的に抑制した。この結果は、*in vivo* での結果と一致し (Fig. 1)、TCDD は胎児脳下垂体に対して直接作用し、GnRH の下流で働く LH β /FSH β 特異的な制御因子の発現/活性を修飾し、ゴナドトロピン発現低下を招くことが強く示唆された。次に、TCDD 標的因子の更なる探索のため、胎児脳下垂体および

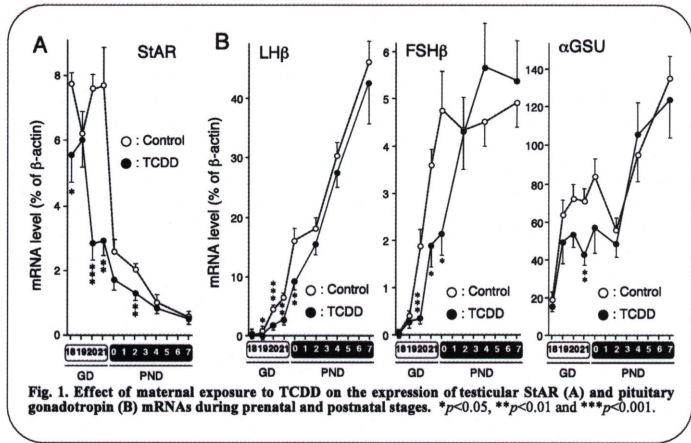


Fig. 1. Effect of maternal exposure to TCDD on the expression of testicular StAR (A) and pituitary gonadotropin (B) mRNAs during prenatal and postnatal stages. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

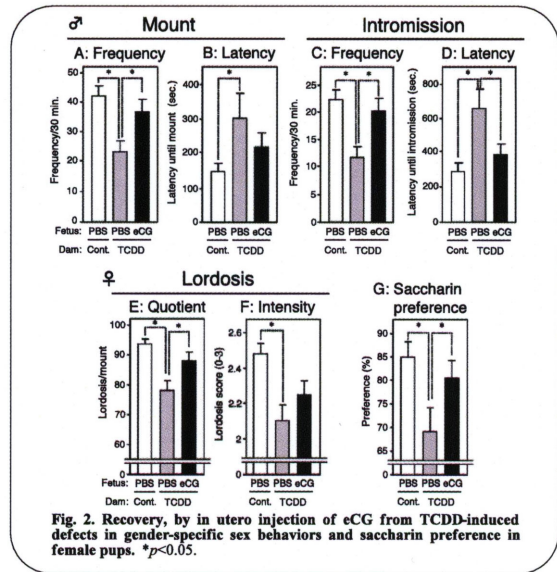


Fig. 2. Recovery, by in utero injection of eCG from TCDD-induced defects in gender-specific sex behaviors and saccharin preference in female pups. * $p < 0.05$.

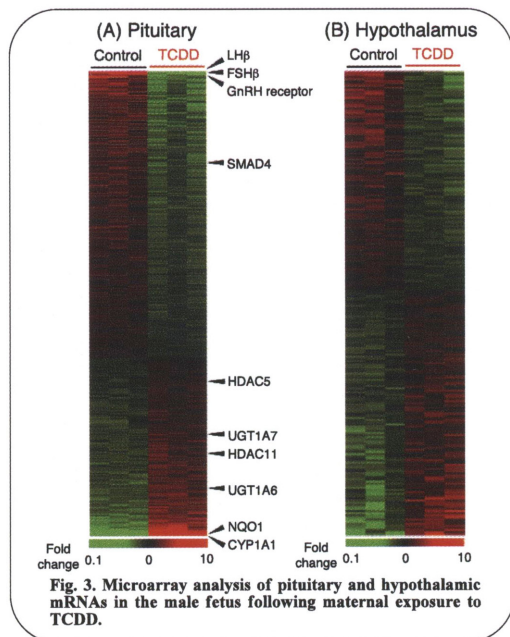


Fig. 3. Microarray analysis of pituitary and hypothalamic mRNAs in the male fetus following maternal exposure to TCDD.

び視床下部を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、TCDD 依存的に変動した遺伝子数は、脳下垂体では 641 遺伝子、視床下部では 220 遺伝子存在し、脳下垂体の方が遺伝子数、変動度ともに大きいことが確認された (Fig. 3)。胎児脳下垂体では主要な転写抑制因子であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の誘導が見出された。HDAC は、LH β /FSH β の発現制御に重要であることが示されており、この誘導はヒストン脱アセチル化 (転写抑制シグナル) の亢進を介して LH β /FSH β 発現を低下させる有力候補と考えられた。クロマチン免疫沈降法を用いて、胎児脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子プロモーターに会合するヒストンのアセチル化状況を検討したところ、LH β 遺伝子会合性ヒストンが脱アセチル化の亢進を受けることが判明した (Fig. 4A and B)。一方、他の脳下垂体ホルモン遺伝子においては同様の変動は観察されず、HDAC は LH β 特異的にヒストン脱アセチル化を亢進し、結果として当該遺伝子の発現を抑制する機構が推定された。さらに、TCDD により誘導される HDAC 活性を阻害剤により抑制した場合に、LH β 発現低下が回復するか否かを検証するため、胎児移行性の高い HDAC 阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用いて検討を行った。その結果、TCDD 依存的な LH β の発現低下は、VPA の併用により正常レベルにまで回復した (Fig. 4C)。以上の成果から、TCDD は脳下垂体内で HDAC 誘導を介して胎児 LH β 遺伝子会合性のヒストン脱アセチル化を亢進し、LH β 発現を抑制する機構が強く示唆された。一方、FSH β 低下は HDAC 誘導で説明することができなかったが、マイクロアレイにおいて FSH β の転写因子である SMAD4 の低下が観察されており (Fig. 3A)、これが寄与する可能性が見出された。

本研究は、ダイオキシンによる性未成熟が、出生前後の一過性のゴナドトロピン低下によってインプリントされることを明らかとするとともに、その低下が HDAC 誘導を介した脳下垂体内での転写抑制に基づくという新規機構を明らかにした。HDAC 誘導機構については今後の課題であるが、本遺伝子誘導は LH β に止まらず多数の遺伝子転写を抑制し、様々な障害の原因となる可能性もある。

論文審査の結果の要旨

ダイオキシン (TCDD) による次世代の健康障害は、妊娠期の低用量曝露により発現するが、その発現機構は殆ど理解されていない。これまでに、申請者が所属する研究室では、妊娠 Wistar ラット (妊娠 15 日目:GD15) への TCDD 曝露 (1 μ g/kg、経口) により、胎児 (GD20) 脳下垂体においてゴナドトロピンの一種である luteinizing hormone (LH) の合成が β サブユニット特異的に低下し、これを起点として生殖腺の性ステロイドホルモン合成系タンパク質の発現が低下することを見出している。しかし、この障害の発生時期やこれが毒性に直結するか否か、さらには LH β 低下の機構は不明であった。本研究はこれらの問題解決を目的として実施された。

GD15 の妊娠ラットに 1 μ g/kg TCDD を経口投与し、GD18~生後 7 日目 (PND7) の児が解析された結果、性ステロイド合成の律速過程に関わる steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) や性ステロイド合成に必須な cytochrome P450 (CYP)17 の発現が出生前後に一過性に低下することが見出された (図 1)。また、脳下垂体ゴナドトロピン [LH および follicle-stimulating hormone (FSH)] も出生前後に β サブユニット特異的に低下することが確認されている。StAR と LH/FSH の低下時期が一致すること、ならびに低下するゴナドトロピンを equine chorionic gonadotropin (eCG) として児に補給することで StAR 等の合成系低下が完全に回復するこ

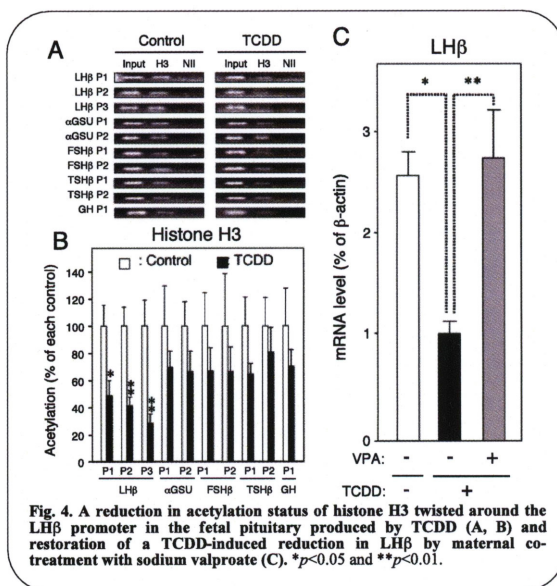


Fig. 4. A reduction in acetylation status of histone H3 twisted around the LH β promoter in the fetal pituitary produced by TCDD (A, B) and restoration of a TCDD-induced reduction in LH β by maternal treatment with sodium valproate (C). * p <0.05 and ** p <0.01.

とから、TCDD は出生前後に特異的にゴナドトロピンを低下させ、これを起点として生殖腺ステロイド合成障害を惹起することが強く示唆されている。周産期児の性ステロイド刺激は脳の性分化に必須であるため、TCDD による上記の障害は、脳の性特異的形質形成に深刻な影響を及ぼすと推定される。この検証のため、低下するゴナドトロピンを eCG として胎児期に補充し、成長後の性特異的行動能力が調べられた結果、予想通りに TCDD 依存的性行動障害および甘味料嗜好性低下がほぼ正常水準にまで回復することが確認されている。さらに、eCG 補給は、TCDD によって誘発される生殖系の形態変化に対しても一部改善作用を示すという。これらの成果は、TCDD による性行動障害等の性特異的形質の未成熟が、周産期における脳下垂体ゴナドトロピン低下を主たる要因として生起することをよく支持する。

TCDD によるゴナドトロピン合成障害が、脳下垂体に対する直接作用に起因するか否かを検証するため、培養脳下垂体実験系を構築し、TCDD がゴナドトロピン遺伝子発現に及ぼす影響が検討された。その結果、TCDD はゴナドトロピン合成の制御因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 存在下でのゴナドトロピン刺激合成を、胎児期特異的かつ β サブユニット特異的に抑制することが見い出された。

この結果は、*in vivo* での結果と一致し、TCDD は胎児脳下垂体に対して直接作用し、GnRH の下流で働く LH β /FSH β 特異的な制御因子の発現/活性を修飾し、ゴナドトロピン発現低下を招くことが強く示唆されている。次に、TCDD 標的因子の更なる探索のため、胎児脳下垂体および視床下部を用いて DNA マイクロアレイ解析が実行された。その結果、TCDD 依存的に変動する遺伝子数は、脳下垂体では 641 遺伝子、視床下部では 220 遺伝子存在し、脳下垂体の方が遺伝子数、

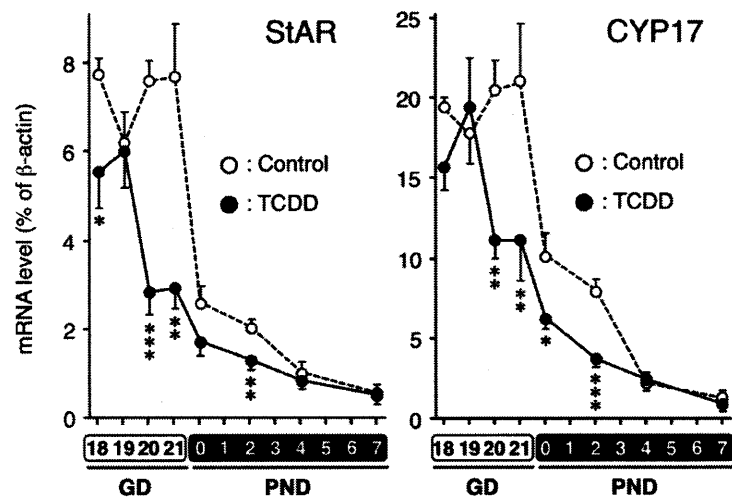


図1. TCDD 母体曝露が周産期児の StAR と CYP17 mRNA 発現に及ぼす影響
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

変動度ともに大きいことが確認された。特記すべき点として、胎児脳下垂体では主要な転写抑制因子であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の誘導が見出された。HDAC は、LH β /FSH β の発現制御に重要であることが知られており、これの誘導はヒストン脱アセチル化 (転写抑制シグナル) の亢進を介して LH β /FSH β 発現を低下させる有力候補と考えられた。引き続き、クロマチン免疫沈降法を用いて、胎児脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子プロモーターに会合するヒストンのアセチル化状況が検討され、LH β 遺伝子会合性ヒストンが脱アセチル化の亢進を受けることが明らかにされた。一方、他の脳下垂体ホルモン遺伝子においては同様の変動は観察されず、HDAC は LH β 特異的にヒストン脱アセチル化を亢進し、同遺伝子の発現を抑制する機構が推定されている (図2)。このことは、胎児移行性の高い HDAC 阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用いて更なる検証も行われている。その結果、TCDD 依存的な LH β の発現低下は、VPA の併用により正常レベルにまで回復し、TCDD は脳下垂体内で HDAC 誘導を介して胎児 LH β 遺伝子会合性のヒストン脱アセチル化

を亢進し、LHβ 発現を抑制する機構が支持されている。FSHβ 低下は HDAC 誘導では説明困難と思われるが、マイクロアレイにおいて FSHβ の転写因子である SMAD4 の低下が観察されており、これが寄与する可能性が考察されている。

本研究は、ダイオキシンによる性未成熟が、出生前後の一過性のゴナドトロピン低下によってインプリントされることを明らかとするとともに、その低下が HDAC 誘導を介した脳下垂体内での転写抑制に基づくという新規機構を明らかにしている。得られた成果によりダイオキシンの次世代影響機構はかなり解明が進み、博士学位論文に相応しいと評価する。

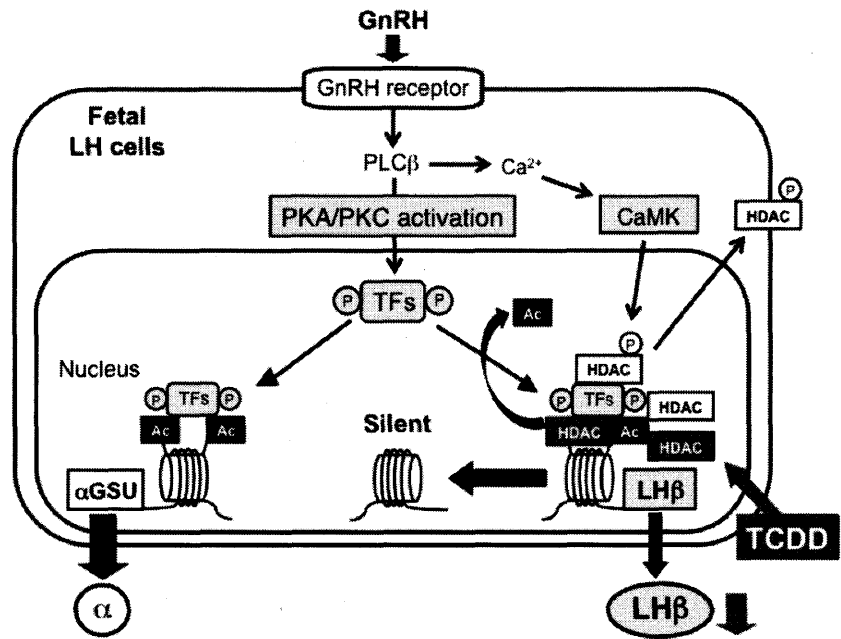


図2. TCDDによる胎児 LHβ 発現抑制の機構：HDAC 誘導によるヒストンの脱アセチル化亢進の寄与
略記：PLC, phospholipase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; CaMK, calcium/calmodulin-dependent kinase; TF, transcription factor; Ac, acetyl group; αGSU, α-glycoprotein hormone subunit

氏名・(本籍・国籍)	あかざわ だいすけ 赤澤 大輔 (長崎県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博乙第566号
学位授与の日付	平成24年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	培養細胞由来感染性C型肝炎ウイルス粒子を用いたウイルス感染に関する宿主因子の探索および感染性粒子の性状解析
論文調査委員	(主査) 教授 山田 英之 (副査) 教授 植田 正 教授 田中 嘉孝 准教授 石井 祐次

論文内容の要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)はC型肝炎の原因ウイルスであり、全世界で約1億7千万人、日本においても約200万人の感染患者が存在すると言われている。C型肝炎は、現在の治療法で十分な効果が得られない患者も存在し、より効果的な治療法の開発が望まれている。効果的な治療薬の開発が進まなかった理由として、*in vitro*でHCVを効率良く増殖できる系が存在しなかったことが挙げられる。2005年に脇田等により、遺伝子型2aのC型劇症肝炎の患者よりJFH-1株が単離された。このHCV株はヒト肝がん細胞株であるHuh7細胞に感染・複製後、ウイルス粒子を形成および分泌し、一連の生活環を再現することが示された。本研究では、この培養細

胞由来の HCV 感染性粒子 (cell-cultured HCV: HCVcc) を用いて、感染に関与する宿主因子の同定、並びに HCVcc の感染性粒子としての性状解析を目的として検討を行い、以下の結果を得た。

1. HCV の感染に関与する宿主因子の同定

Huh7 は HCVcc の感染許容性を示す細胞であるが、高ウイルス価の HCVcc を感染させても感染が拡大しなかった。これには、被感染細胞の不均一性に原因があると考え、クローン化した細胞を調製し、HCV 擬似粒子 (HCVpp) を用いた感染能、HCV サブゲノムレプリコンを用いた複製効率、更には受容体候補である CD81、Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) および LDL receptor の細胞表面における発現をそれぞれフローサイトメトリーで解析した。細胞クローンによって HCV の感染許容性が異なり、感染許容性を全く示さないクローンも認められた。細胞クローン間で HCV 複製能も異なっていたが、複製能は HCVcc 感染許容性とは関連しなかった。受容体候補の発現解析の結果、感染許容性を示さない細胞クローンでは、細胞表面の CD81 発現が認められなかった。CD81 陰性細胞に CD81 を発現させた場合、CD81 陽性細胞の CD81 発現を RNAi で抑制した場合のいずれも、CD81 の発現に応じて感染許容性が関連した。従って、CD81 の発現の有無によって感染許容性が規定されていることが示唆された。SR-BI および LDL receptor の発現は、CD81 のような被感染性との関連性は見い出されなかった。

2. Huh7 細胞以外の培養細胞を用いた感染性 HCV 粒子の作製および粒子性状解析

HCVcc が作製可能な培養細胞は Huh7 とその類縁細胞株に限られており、HCVcc の一連の生活環は限定された条件でしか再現できていない。そこで、Huh7 以外の培養細胞を用いて HCVcc を作製することを試みた。ヒト肝がん由来である HepG2 および IMY-N9 細胞に HCV JFH-1 株の全長ゲノムの上流に、ネオマイシン耐性遺伝子を挿入した全長レプリコン RNA を導入し、ネオマイシン耐性を指標として HCV 複製性細胞を選択したところ、感染性 HCVcc の分泌能を有する細胞を得ることに成功した。Huh7 と HepG2 から分泌された HCVcc は感染性が同等であったのに対し、IMY-N9 から分泌された HCVcc は感染性が高かった。また、IMY-N9 由来の HCVcc を密度勾配超遠心で分画すると、低比重領域に感染性を示さない HCV 成分が多く認められ、性状が異なることも明らかとなった。HCV の低比重化には細胞の脂質が寄与するものと考えられた。

3. 無血清培養による感染性 HCV 粒子の作製と性状解析

HCV は表面抗原としてエンベロープタンパク質を有する。HCVcc はこの表面抗原の立体構造を良く再現していると考えられ、これをワクチンや抗体作製のための抗原として利用できることが期待される。ワクチンとして利用する場合、血清存在下の培養で調製したものをを用いると、製剤へ混入する血清タンパク質が抗原として非意図的有害反応を惹起する可能性が否定できない。従って、ワクチンとして利用するためには、安全性確保の観点から無血清培養化が必要となる。そこで本研究では、無血清培養の検討と、それにより作製された HCVcc の性状解析

を行った。Insulin/Transferrin/Selenium を添加した無血清培養液に Huh7 を馴化することで、培養上清に効率良く HCVcc が分泌されることが明らかとなった。この無血清培養で得られた HCVcc は、密度勾配超遠心で分画すると感染性が低下すること、抗 CD81 や抗 SR-BI および抗 HCV エンベロープ抗体による感染阻害を受けやすい点で、血清存在下での培養で作製した HCVcc と異なっていた。無血清培養で作製した HCVcc における脂質タンパク質の影響を調べたところ、ApoB および ApoE の相互作用に違いが認められるとともに、これら脂質タンパク質に非依存的な感染経路を有することが明らかとなった。

以上の研究結果より、HCV 感染においては宿主の CD81 発現の有無が重要な役割を果たすこと、および作製する細胞種や無血清培養によって HCVcc の性状が異なり、それには脂質タンパク質が寄与することが明らかとなった。HCVcc はワクチンや感染阻害抗体作製のための抗原としての利用が期待できる。本研究での成果を基盤として、HCVcc の精製方法を確立し、精製 HCVcc の免疫原性を確認することによって、新規抗 HCV 薬の創出が期待される。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) は C 型肝炎の原因ウイルスであり、全世界で約 1 億 7 千万人、日本においても約 200 万人の感染患者が存在すると言われている。C 型肝炎は、現在の治療法で十分な効果が得られない患者も存在し、より効果的な治療法の開発が望まれている。効果的な治療薬の開発が進まなかった理由として、*in vitro* で HCV を効率良く増殖できる系が存在しなかったことが挙げられる。2005 年に脇田等により、遺伝子型 2a の C 型劇症肝炎の患者より JFH-1 株が単離された。この HCV 株はヒト肝がん細胞株である Huh7 細胞に感染・複製後、ウイルス粒子を形成および分泌し、一連の生活環を再現することが示された。本研究では、この培養細胞由来の HCV 感染性粒子 (cell-cultured HCV; HCVcc) を用いて、感染に関与する宿主因子の同定、並びに HCVcc の感染性粒子としての性状解析を目的として検討が行われ、以下の成績が得られている。

1. HCV の感染に関与する宿主因子の同定

Huh7 は HCVcc の感染許容性を示す細胞であるが、高ウイルス価の HCVcc を感染させても感染が拡大しない。これには、被感染細胞の不均一性に原因があるとの推定から、クローン化した細胞が調製され、HCV 擬似粒子 (HCVpp) を用いた感染能、HCV サブゲノムレプリコンを用いた複製効率、更には受容体候補である CD81、Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) および low-density lipoprotein (LDL) receptor の細胞表面における発現がフローサイトメトリーで解析された。その結果、細胞クローンによって HCV の感染許容性が異なり (Table 1)、感染許容性を全く示さないクローンの存在が見い出された。細胞クローン間で HCV 複製能も異なっていたが、複製能は HCVcc 感染許容性とは相関しないと言う。受容体候補の発現解析の結果、感染許容性を示さない細胞クローンでは、細胞表面の CD81 発現も認められていない。また、CD81 陰性細胞に CD81 を発現させた場合や CD81 陽性細胞の CD81 発現を RNAi で抑制した場合のいずれも、CD81 の発現に応じた感染許容性の変化が観察されている。従って、CD81 の発現の有無によって感染許容性が規定されていることが示唆されている。SR-BI および LDL receptor の発現については、CD81 のような被感染性との関連性は見い出されていない。

Table I Huh7 細胞クローンにおける HCV 複製、感染および受容体候補の発現

cell	Replication	CD81	SR-BI	LDLR	HCVpp infectivity	JFH-1 infectivity
Huh7(parental)	+++	++	++	+	+	+
clone 1	++	+	++	+	+	+++
clone 2	+	-	+	+	±	-
clone 4	-	-	+	+	±	-
clone 11	+++	-	++	+	-	-
clone 25	+++	-	++	+	±	-
clone 28	±	+++	++	++	+	±
clone 31	±	+	++	+	+	++
clone 35	+++	-	++	++	±	-
clone 49	±	++	+	++	+	++
clone 50	-	++	+	+	+	±
clone 54	+	+	++	++	++	++
clone 70	±	++	++	+	++	++
Huh7-25-CD81	+++	+++	++	+	+++	+++

2. Huh7 細胞以外の培養細胞を用いた感染性 HCV 粒子の作製および粒子性状解析

HCVcc が作製可能な培養細胞は Huh7 とその類縁細胞株に限られており、HCVcc の一連の生活環は限定された条件でしか再現できていない。そこで本研究では、Huh7 以外の培養細胞を用いて HCVcc を作製することが試みられている。すなわち、ヒト肝がん由来である HepG2 および IMY-N9 細胞に HCV JFH-1 株の全長ゲノムの上流にネオマイシン耐性遺伝子を挿入した全長レプリコン RNA を導入し、ネオマイシン耐性を指標として HCV 複製性細胞が選択され、感染性 HCVcc の分泌能を有する細胞を得ることに成功している。Huh7 と HepG2 から分泌された HCVcc は感染性が同等であったのに対し、IMY-N9 から分泌された HCVcc は感染性が高いと言う。また、IMY-N9 由来の HCVcc を密度勾配超遠心で分画すると、低比重領域に感染性を示さない HCV 成分が多く認められ、性状が異なることも明らかにされている。HCV の低比重化には細胞の脂質が寄与するものと考察されている。

3. 無血清培養による感染性 HCV 粒子の作製と性状解析

HCV は表面抗原としてエンベロープタンパク質を有する。HCVcc はこの表面抗原の立体構造を良く再現していると考えられ、これをワクチンや抗体作製のための抗原として利用できることが期待される。ワクチンとして利用する場合、血清存在下の培養で調製したものをを用いると、製剤へ混入する血清タンパク質が抗原として非意図的有害反応を惹起する可能性が否定できない。従って、ワクチンとして利用するためには、安全性確保の観点から無血清培養化が必要となる。そこで本研究では、無血清培養の検討と、それにより作製された HCVcc の性状解析が行われた。Insulin/Transferrin/Selenium を添加した無血清培養液に Huh7 を馴化することで、培養上清に効率良く HCVcc が分泌されることが見いだされた。この無血清培養で得られた HCVcc は、密度勾配超遠心で分画すると感染性が低下すること、並びに抗 CD81 や抗 SR-BI および抗 HCV エンベロープ抗体による感染阻害を受けやすい点で、血清存在下での培養で作製した HCVcc と異なっていた。無血清培養で作製した HCVcc に対する脂質タンパク質の影響の解析から、ApoB および ApoE との相互作用に違いが認められ、これらの脂質タンパク質に非依存的な感染経路が存在すると推定されている。

以上の研究結果より、HCV 感染においては宿主の CD81 発現の有無が重要な役割を果たすこと、および作製する細胞種や無血清培養によって HCVcc の性状が異なり、それには脂質タンパク質が寄与することが解明

された。HCVcc はワクチンや感染阻害抗体作製のための抗原としての利用が期待できる。本研究での成果を基盤として、HCVcc の精製方法を確立し、精製 HCVcc の免疫原性を確認することによって、新規抗 HCV 薬の創出が期待される。このように、本研究では HCV の感染機構の一端が解明されたのに加え、HCV 培養技術の改善も実現されており、博士論文として十分に価値がある研究内容であると評価された。