

Hepatitis B Virus (HBV) Upregulates TRAIL-R3 Expression in Hepatocytes Resulting in Escape From Both Cell Apoptosis and Suppression of HBV Replication by TRAIL

末廣 洋介

全文要約

【背景】

B型肝炎ウイルス(HBV)感染においてはユニバーサルワクチネーションにより感染予防が進んでいるが、世界保健機関(WHO)は2億5700万人が未だにHBVに罹患していると推定している。一度HBVの持続感染が成立すると、感染肝細胞からウイルスを完全排除することは現状極めて困難であり、その要因の一つとして、HBVの細胞内シグナル制御による宿主免疫回避機構の存在が考えられている。

ヒト肝細胞キメラマウスは、高度な免疫不全を呈するSCIDマウスをベースにマウス肝細胞をヒト肝細胞に置換したマウスであり、宿主免疫の影響を受けず、感染ウイルスの直接的なヒト肝細胞への影響を解析することが可能である。以前、このマウスにHBVを感染させ、得られた肝組織を用いてcDNAマイクロアレイと次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を実施した。得られた遺伝子プロファイルを比較した所、tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 3 (TRAIL-R3)がHBV感染後にヒト肝細胞内で顕著に発現することが示唆された。Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)はT細胞、ナチュラルキラー細胞、単球など活性化された免疫細胞より産生され、様々な腫瘍やウイルス感染細胞に発現する受容体と結合しアポトーシスを誘導する。これまでにTRAILが結合する受容体としてTRAILR1~R5が同定されている。TRAILR1、R2は細胞内ドメインにDeath Domainを持ち、TRAILが結合することでアポトーシスを誘導するが、TRAIL R3~R5は、death domainを有さず、decoyとして働き、TRAILと結合してもアポトーシスを誘導せず、結果としてTRAIL誘導性アポトーシスに対して抑制的に作用するとされている。

悪性腫瘍とTRAIL-R3に対する機能を検討した実験は多く報告されているものの、ウイルスとTRAIL-R3との関連は十分に解析されていないことから、今回、HBV感染におけるTRAIL-R3発現亢進の意義について解析を行った。

【方法】

HBVによるTRAIL-R3の発現制御機構ならびにTRAIL-R3発現亢進による免疫応答への影響を、ヒト肝癌細胞株(HepG2細胞)及びヒト肝細胞キメラマウスを用い解析した。細胞実験には、HepG2細胞に野生型HBVの1.4倍のゲノム長のDNAを含むHBV発現プラスミドをstable transfectionさせて培養上清中にHBV粒子を産生するHBV複製細

胞モデル(HBP25)と、HepG2にHBV感染レセプターであるNTCPをstable transfectionさせ、HBV感染が可能である細胞(HepG2-NTCP-C4)にHBVを感染させたHBV感染細胞モデルを使用した。

また、ヒト肝細胞キメラマウスに 1.0×10^6 コピーのHBVを含有するヒト血清を接種し、マウス血清HBVDNAレベルがプラトーに達したものをHBV感染マウスとして使用した。

【結果】

遺伝子発現解析の結果を確認するため、培養細胞におけるTRAIL-R3のmRNA発現をreal time PCRにより測定した。HBV複製細胞であるHBP25細胞におけるTRAIL-R3発現はHepG2細胞と比して有意に亢進しており、核酸アナログ投与によりHBV増殖を抑制するとHBP25細胞内のTRAIL-R3発現は抑制された。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて同様の解析を実施したところ、HBV感染マウスにおける肝組織内のTRAIL-R3 mRNA発現は非感染マウスよりも有意に高く、エンテカビルを4週間投与し、HBV増殖を抑制したマウスでは、マウス血清HBVDNA量の減少に加え、肝細胞内のTRAIL-R3 mRNA発現の有意な低下を認めた。

次に、HBVによるTRAIL-R3発現制御機構を明らかにするため、様々な長さのTRAIL-R3プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作製し、転写活性をレポーターアッセイにて解析した。HBP25細胞ではHepG2細胞に対してTRAIL-R3の転写活性は有意に亢進しており、特に転写開始点より-479~-969塩基上流の領域を含むレポータープラスミドにおいてTRAIL-R3の転写活性は最も亢進した。

TRAIL-R3の転写活性化にHBV関連蛋白が関与していると考え、各HBV関連蛋白を発現するプラスミドを用いてTRAIL-R3の転写活性を検討した。HBc蛋白やHBs蛋白を発現した場合、TRAIL-R3の転写活性はコントロールとほぼ同等であったのに対し、HBx蛋白の発現によりTRAIL-R3転写の有意な活性化が認められた。そこで、HBx蛋白持続発現細胞を作製し、TRAIL-R3発現の変化を検討したところ、HBx蛋白非発現細胞と比して、有意なTRAIL-R3の発現亢進を認めた。

HBx蛋白はNuclear factor kappa B (NF- κ B)経路を活性化することから、HBx蛋白によるTRAIL-R3転写活性化とNF- κ B経路との関連を解析した。HepG2細胞を用いた検討では、TRAIL-R3の転写活性はtumor necrosis factor- α (TNF- α)用量依存的に亢進した。また、TNF- α 投与下でNF- κ B inhibitor (Bay11-7085)を添加したところ、NF- κ B inhibitor用量依存的に転写活性は低下した。そこで、HBx蛋白持続発現細胞にNF- κ B inhibitorを添加し、TRAIL-R3転写活性、mRNA発現を検討したところ、NF- κ B inhibitor添加によりTRAIL-R3転写活性は抑制され、細胞内のTRAIL-R3 mRNA発現も低下した。

TRAIL-R3 発現亢進が宿主の免疫応答に及ぼす影響を解析するため、HepG2 細胞, HBP25 細胞に TRAIL を添加し、24 時間後の TRAIL 誘導性アポトーシスへの影響を解析した。Cell viability assay では、HepG2 細胞の有意な生細胞数減少を認めたのに対し、HBP25 細胞の有意な生細胞数減少は認められなかった。アポトーシス調整因子の 1 つである short form の cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIPs) mRNA 発現を確認したところ、HepG2 細胞では TRAIL 添加に伴い有意に発現が亢進したのに対し、HBP25 細胞では TRAIL 添加後も cFLIPs の発現変化は認めなかった。

最後に、TRAIL-R3 と HBV 増殖との関連について解析した。HepG2-NTCP-C4 細胞に HBV を感染させたところ、細胞内 TRAIL-R3 mRNA 発現は非感染細胞に比べて有意に亢進した。TRAIL-R3 を過剰発現した HepG2-NTCP-C4 細胞に HBV を感染させ、培養上清中の HBe 抗原の変化を解析したところ、TRAIL-R3 過剰発現により培養上清中の HBe 抗原の有意な増加が認められた。

【結語】

HBV 感染によって細胞内の TRAIL-R3 発現が亢進し、HBV 感染肝細胞における TRAIL 誘導性アポトーシスの回避、HBV 増殖の活性化が誘導され、HBV の宿主免疫回避、感染維持に寄与していることが明らかとなった。この回避機構を抑制することにより、宿主の HBV に対する免疫応答が効果的に誘導できる可能性があり、ヒト肝細胞からの HBV 完全排除に向けた治療標的となる可能性がある。