

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

新たな発がんメカニズム仮説の検証： RNA ゲノムと薬物代謝酵素の相互作用の解明

研究代表者 赤塚 俊隆（埼玉医科大学 微生物学）

研究分担者 菰田 二一¹⁾，小林 信春²⁾，Bruce D. Hammock³⁾

【緒 言】

C型肝炎ウイルス（HCV）感染者はわが国では約200万人，世界では実に1.7億人も存在するといわれ，その高齢化と共に肝硬変・肝癌で死亡する患者が急激に増加している．その治療としては，PEG-インターフェロンとリバビリン併用療法が一定の効果を示しているが，治癒率は約30%にとどまり，副作用も強い．また日本で最も多い1bタイプのウイルスは特に効果が低いことも知られている．この慢性感染者の救済が急務であり，我々はC型肝炎の発症・発がんのメカニズムを解明し，その知見に基づいた治療法を開発したいと願って本研究に取り組んだ．

今回の研究計画は，HCV感染が薬物代謝酵素の1つであるmicrosomal epoxide hydrolase (mEH)の存在形態に影響を及ぼすという，これまでのわれわれの研究成果に基づいて立てられた．研究代表者の赤塚は，C型肝炎患者の肝臓から精製されたAN6520抗原に対する抗体が，C型肝炎患者の血清中に高率に検出され，他のタイプの肝炎患者の血清中には検出されないことをかつて報告した¹⁻³⁾が，われわれは最近そのAN6520抗原のcDNAをクローニングし，本体がmEHであることを見出した．mEHを組換えバキュロウイルスで発現し，その精製タンパクを抗原として抗体測定を行うと，AN6520抗原で抗体を測定した結果とは違って，C型肝炎の他にA型肝炎患者の血清でも高率に抗体が検出され，一方B型肝炎，薬剤性肝障害等では全く出現しないことも分かった⁴⁾．抗体反応だけでなく，mEHそのものも，C型肝炎急性期において血中に出現し，感染チンパンジー肝臓の生検材料でmEHの局在変化が認められた．このことは肝細胞のmEHが特定のウイルス感染によって，その性質が変化し，

発現形態のみならず抗原性も変化を受けることを示している．ウイルス肝炎の中でもC型とA型肝炎でのみこの変化が見られ，B型肝炎や薬剤性肝障害では全く変化が認められないことは，これが非特異的な肝細胞障害やウイルス増殖一般に共通して起こる変化ではなく，もしかしたらRNAウイルスの増殖にのみ共通の出来事であることを示唆した．

そこで本研究では，我々の仮説どおりにRNAウイルス感染がmEHに変化を及ぼし，それに伴いmEHが関与する解毒機能にも影響が及ぶことを直接証明することを目的として行った．培養細胞でのウイルス感染が容易なA型肝炎ウイルス（HAV）を用いた実験からスタートし，その結果について他のRNAウイルスによる感染実験を用いて検証を進めることにした．またHAVを培養肝細胞株に感染させると，細胞内に局在しているmEHが細胞表面に出現することを予備実験で得ていたので，mEHの膜上でのトポロジー変化の解析手段として，mEHの異なる部分を認識する複数種のモノクローナル抗体を作成し，それを用いて詳細に検討した．

【材料と方法】

mEH断片の発現

図1に示す9種のmEH断片をGST融合タンパクとして大腸菌に発現させた．mEH cDNAの作成はすでに報告した⁴⁾．それをテンプレートとし，表1のプライマーを用いてPCRを行い，pGEX-2Tベクターに組み込んで大腸菌BL21で発現させた．タンパク発現の確認は菌体抽出液をSDS-PAGE後にCoomassie Blue stainingを行ってバンドのサイズを確認することと，western blotting後に抗GST抗体でGST融合タンパクを検出することにより行った．

抗mEHモノクローナル抗体の作成

免疫原としては，組換えバキュロウイルスを感染

1) 埼玉医科大学 生化学， 2) 埼玉医科大学 微生物学

3) Entomology & Cancer Research Center, Univ. of California Davis

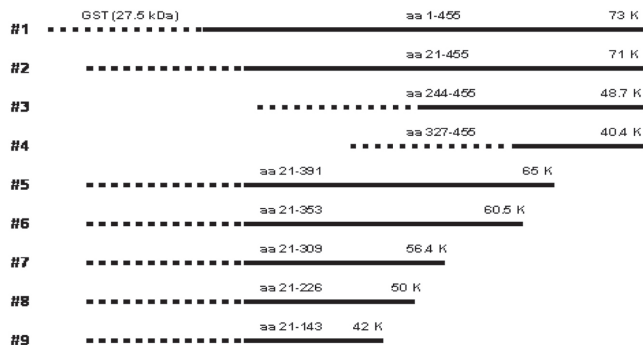


図 1. GST融合タンパクとして発現させた9種類のmEH断片（#1-#9）. 点線はGSTタンパク部分を示す.

させたSf9細胞の抽出液からイオン交換法で精製したmEH全長タンパク⁴⁾を用いた. BALB/cマウスに精製mEH 40 µgをフロイント完全アジュバントと共に皮下に免疫後, 同量のmEHを不完全アジュバントと共に皮下に(2回目), あるいはアジュバントなしに腹腔に注射した(3, 4回目). 脾細胞をNS-1と45% polyethylene glycol (ATCC)を用いて融合してハイブリドーマを作成した. 抗体の検出は精製mEHを固相化したELISAで行い, 3回以上のlimiting dilutionにより抗体産生ハイブリドーマを単クローン化した. 抗体のアイソタイプの決定はAmershamのisotyping kitを用いて行った.

mEH断片を用いたELISAとcompetitive antibody binding assay (CBA)

mEH断片は大腸菌菌体をSDS sample bufferで処理し可溶化後PBSで希釈し, ELISA plateにcoatingしてELISAに用いた. CBA⁵⁾には精製mEHタンパクをさらにpreparative SDS-PAGE (Prep Cell, Bio-Rad)で精製したものを固相化し, radioimmunoassayで行った. モノクローナル抗体を腹水からProtein G-agaroseで精製し¹²⁵IラベルしたIgGと, 非ラベルIgGとを固相化した抗原と反応させ, その競合率をγ-counterで測定した.

DMBA cytotoxicity assay

THLE-5b, Huh7, Huh7.5を96穴プレートで培養し, poly(I:C)処理またはウイルス感染後, M. Miyataらの方法⁶⁾でDMBAに対する感受性を測定した. 細胞数の測定はCell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて行った.

【結 果】

抗mEHモノクローナル抗体の作成

mEHを発現するバキュロウイルスをSf9細胞に感染させ, 既に報告した方法⁴⁾, すなわち界面活性剤による溶解, 超遠心, Q-sepharoseを用いたイオン交換法によりmEHを精製した. これをBALB/cマウスにFCAと共に免疫した. 抗体のスクリーニングはこの

表 1. mEH断片（#1-#9）発現用プライマー

Name	Sequence
#1 forward	CGGGATCCATGTGGCTAGAAATCCTCCTCAC
#2 forward	CGGGATCCCGGGACAAAGAGGAACTTTGCC
#3 forward	CGGGATCCAAAGGCCTGCACTTGAACATGGC
#4 forward	CGGGATCCGAGAAGTTTTCCACCTGGACC
#1 reverse	CGGGATCCTTGCCGCTCCAGCACCGACAGG
#2-#4 reverse	TCCCCCGGGTTGCCGCTCCAGCACCGACAGG
#5 reverse	TCCCCCGGGCTTCATCCGCTCAGCCTTCTG
#6 reverse	TCCCCCGGGTGCCTCAGGGAGAACTTCC
#7 reverse	TCCCCCGGGGTGTCAGGCTTGTCGACTG
#8 reverse	TCCCCCGGGTCCCCTCCTTGAATGTAGAA
#9 reverse	TCCCCCGGGGGGCTTCGGGGTATGGCCTGC

mEHを固相化したELISAで行った. 抗体のエピトープ解析のため, mEHの異なる部分の断片をGST融合タンパクとして発現するプラスミドを構築した. 全長を発現する#1からN末を次第に短くした#2-#4と, C末から次第に短くした#5-#9の9種類を作成した(図1). これらのプラスミドで大腸菌をトランスフォームし, IPTGでタンパク発現を誘導し, 菌体をSDS処理して抗原を可溶化し, これを固相化したELISA法を作成した. #1-#4の抗原を用いたELISAで免疫マウス血清を測定してみると, 2回目の免疫までは#1と#2に対する抗体のみ出現したが, 免疫を3回繰り返すことにより#3と#4に対する抗体も出現した. このことからmEHのN末側の方がC末側より免疫原性が強いことが示唆された(data not shown).

次に得られた65種のハイブリドーマ上清についてこのELISAを行った. (代表的な7種の抗体の結果を図2a, bに示す). その反応パターンから1) N末(aa.21-143)を認識するもの(#1, #2, #5~#9と反応), 2) C末(aa.327-455)を認識するもの(#1~#4, #5, #6と反応), および3) 精製mEHとは反応するが, #1-#9のいずれとも反応しないものの3種に分けられた. ELISAの抗原として精製mEHをSDS処理したもの, しないものの2種類を用いて比較してみると, 1)と2)の抗体はSDS処理したmEHとも反応するのに対して, 3)の抗体はSDS処理したmEHとは全く反応しない(図2c)ことから, 1)と2)の抗体はmEHのlinear structureを認識し, 3)のグループはmEH分子が形成する高次構造を認識していると考えられた.

mEHのlinear structureを認識する1)と2)のグループの抗体はwestern blottingを行った抗原と反応するので, 以下の3種類のmEH発現細胞の抽出液を用いて行ってみた. 1) 組換えバキュロウイルスでmEHを発現しているSf9細胞の抽出液を抗原とした場合, 全長49KDaのmEHのバンド以外の小さなバンドの出現のパターンに3種類(A-C)あり, 1)のグループはAまたはCの2タイプ, 2)はBのタイプを示した(図3a).

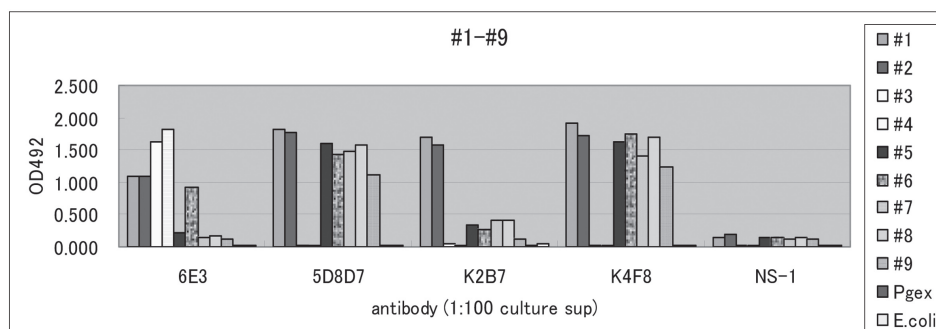
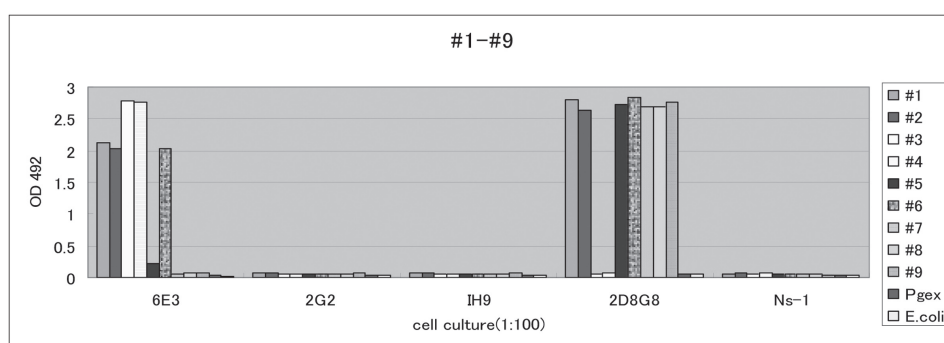
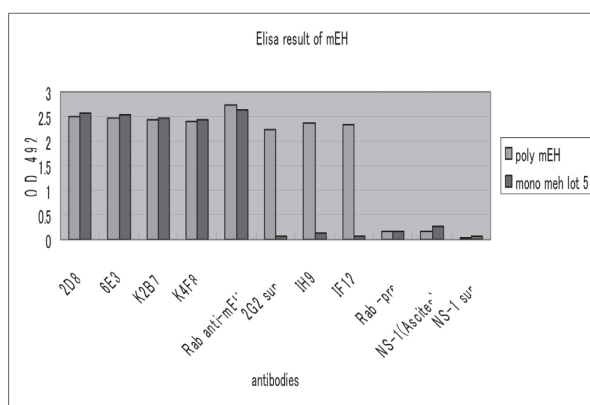


図 2. ELISAによるモノクローナル抗体のエピトープ解析.

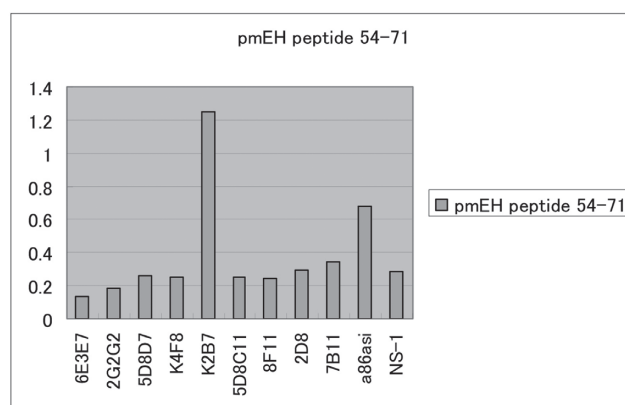
(a) 4種の抗体(6E3, 5D8, K2B7, K4F8)と陰性対象のNS-1培養上清の#1-#9との反応.



(b) 4種の抗体(6E3, 2G2, 1H9, 2D8)と陰性対象のNS-1培養上清の#1-#9との反応.



(c)精製mEH(poly mEH)とそれをpreparative SDS-PAGEで精製し, SDSにより高次構造を失ったmEH(mono mEH)に対する各種モノクローナル抗体の反応.



(d)Peptide aa54-71を固相化したELISA.

2) mEHを発現しているヒト肝細胞株 THLE-5b を用いたwestern blottingを行ったところ, 1) のタイプの抗体の一部で49KDaのmEH以外に52KDaのバンドとも反応するものが見つかった(図3b). 3) mEHを発現するヒト肝細胞癌由来株 Huh1を用いた結果も2)と同じであった(data not shown). 以上の結果と各グループの代表的な抗体の免疫グロブリンアイソタイプの結果をまとめると, 表2のようにIからVまでの5つのタイプに分類することが出来た.

この5種類の抗体のうちI~IVが認識する各々のエピトープのmEH分子上での位置関係を調べるために, 抗体同士のcompetitive binding assayを行った. 固相化した精製 mEHに対し, 各種抗体を精製後 125 Iで標

識した抗体と非標識抗体とを混合して反応させ, 互いの競合度を測定した(表3). この測定にエピトープが分かっている抗ペプチド(aa54-71) mEHウサギ抗体も加えた. その結果, IとIIの間では有意な競合が見られ, 互いのエピトープが近傍に存在することが示唆された. 同じようにN末部分を認識するIIIはI, IIとの競合が殆んどないが, 抗aa54-71ペプチドウサギ抗体と競合することが分かった. このタイプIIIの抗体の特異性を確認するためにaa54-71ペプチドを固相化したELISAを行ったところ, タイプIIIの抗体のみが反応した(図2d)ので, タイプIII抗体のエピトープはaa54-71の配列内に存在するものと思われた. タイプV抗体については高次構造を保持したmEH抗原を用い

てcompetitive binding assayを行ったところ、同じVに属する2種の抗体同士でのみ競合が見られた(表3)。以上の結果から、5つのタイプの抗体が認識するエピトープは表4に示したように結論することが出来た。

正常肝細胞表面のmEH発現

次に以上のタイプI～Vの抗体を用いて正常肝細胞表面のmEHの存在形態について調べた。mEHは主として小胞体膜上に存在するが、細胞膜表面にも発現していることが知られている⁷⁾。そのどちらの膜においても、mEHがどのようなトポロジーで存在するかはまだ定かでない。ラットのmEH遺伝子に

N glycosylation siteを導入し、細胞にトランスフェクションしてmEHの膜上のトポロジーを調べたD.Levyの実験に基づく説⁸⁾では、図4に示すように細胞表面膜上ではN末が細胞質側を向き、C末が細胞外に表出して(type II topology) Na⁺イオン依存性に胆汁酸をトランスポートしている。一方小胞体膜上では大半(約80%)のmEHがtype I topologyを示し、一部(約20%)のみがtype II topologyを示すという。そこでわれわれは手術と剖検で得られたヒトの肝臓を用い、collagenase 処理で細胞を分散後、5つのタイプのモノクローナル抗体と反応させてFCAS解析を行い、細胞表面におけるmEHのエピトープ発現を調べた。図5

表 2.

Clones	Isotype	L-chain	ELISA					Western blotting			Type
			#1	#2	#3	#4	polymer	Bac-Sf9	T5b	Huh1	
2D8	G2a	k	+	+	-	-	+	A	54K, 49K	54K, 49K	I
5D8	G1	k	+	+	-	-	+	A	54K, 49K	54K, 49K	I
K4F8	G1	k	+	+	-	-	+	A	49K	49K	III
K2B7	G1	k	+	+	-	-	+	C	49K	49K	II
6E3	G1	k	+	+	+	+	+	B	49K	49K	IV
2G2	G1	k	-	-	-	-	+	-	-	-	V

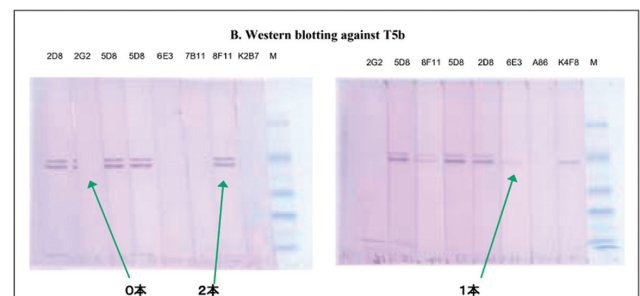
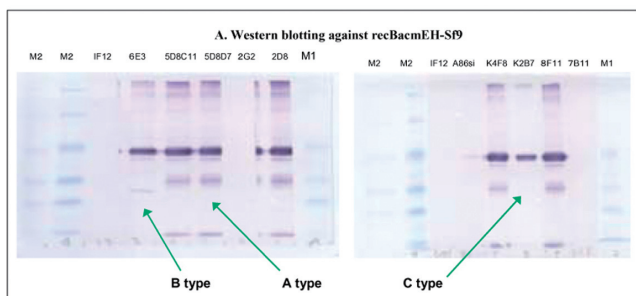


図 3. mEH発現細胞抽出液に対する各種モノクローナル抗体のimmunoblotting.

(a) 組換えバキュロウイルス感染でmEHを発現したSf9細胞.

(b) ヒト正常肝細胞由来細胞株THLE-5b.

表 3. Competitive binding assay

		Competitor Ab								
		Type I		Type III	Type II	Type IV	Type V		Rabbit	
		2D8	5D8	K4F8	K2B7	6E3	2G2	1H9	anti-aa54-71	
¹²⁵ I-Ab	Type I	5D8	96.1	100.0	62.6	30.9	38.0	1.4	1.4	4.2
	Type II	K4F8	93.9	94.7	100.0	16.9	10.5	15.5	15.5	25.9
	Type III	K2B7	28.4	54.2	72.0	100.0	39.7	0.0	0.0	99.3
	Type IV	6E3	30.0	26.2	43.4	44.0	100.0	43.0	43.0	51.6
	Type V	2G2	N.D.	17.9	N.D.	N.D.	9.1	100.0	100.0	N.D.
	Type V	1H9	N.D.	14.1	N.D.	N.D.	10.7	87.8	100.0	N.D.

表 4.

Type I: Anti-N-terminus (aa.21-143) linear epitope, Cross-reacts with 54-KDa protein
Type II: Anti-N-terminus (aa.21-143) linear epitope
Type III: Anti-N-terminus (aa.54-71) linear epitope
Type IV: Anti-C-terminus (aa.327-455) linear epitope
Type V: Anti-conformational epitope

に示すように, 3例の正常肝, 1例の脂肪肝のいずれにおいてもType I, II, III, Vのエピトープが細胞表面に発現していたが, Type IVだけは全く検出されなかった. これらの結果は肝細胞表面でのmEHはC末が表出せずにN末が出ているtype I topologyをとっていることを示唆し, かつその多くは分子内あるいは分子同士が特定の高次構造をとっていることを示唆している.

正常リンパ球でのmEH発現

次に別の種類の正常細胞でのmEHの発現を調べた. mEHは肝臓以外にも多くの組織で発現している⁹⁾. 我々はヒト肝細胞で得られたmEHのエピトープ解析の結果が, 他の細胞についても同じであることを確かめることにした. そこで正常人の抹消血リンパ球2例について同様にFCAS解析を行ったところ, 肝細胞と大きく異なり, 細胞表面ではいずれの抗体とも反応が全く見られなかった(図6a, c). 細胞内でのmEH発現を確認するために, 細胞をdetergentでpermealize処理し, 細胞内の抗原を調べたところ5つのタイプのうちtype Vを除く4種の抗体のいずれとも反応を示し, 細

胞内では肝細胞同様にmEHが発現していることが確認された(図6b, d). 以上よりリンパ球ではmEHは細胞内でのみ発現し, しかも肝細胞と大きく異なり, 細胞内外いずれにおいてもそれがtype V抗体が認識するような高次構造をとることなく, 殆どの分子はおそ

Bile Acid Transport by mEH (Daniel Levy)

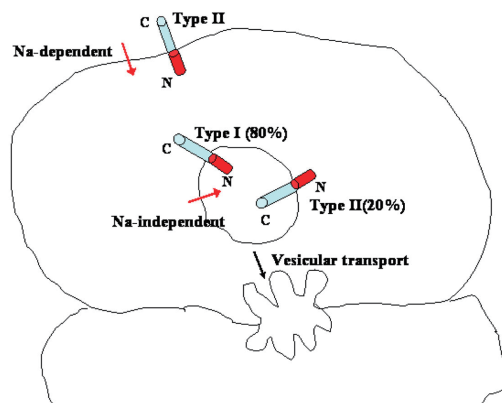


図 4. mEHのmembrane topologyに関するDaniel Levyらの説を模式図にしたもの.

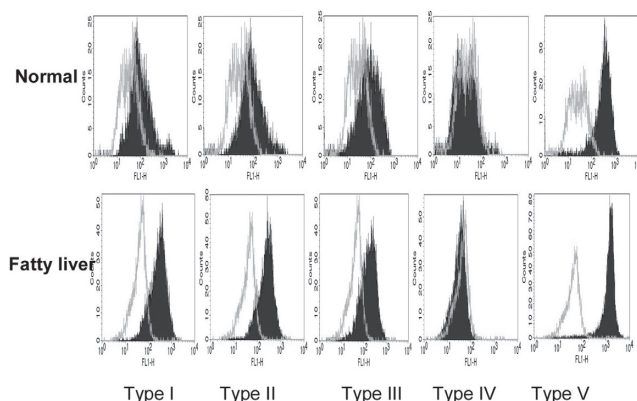
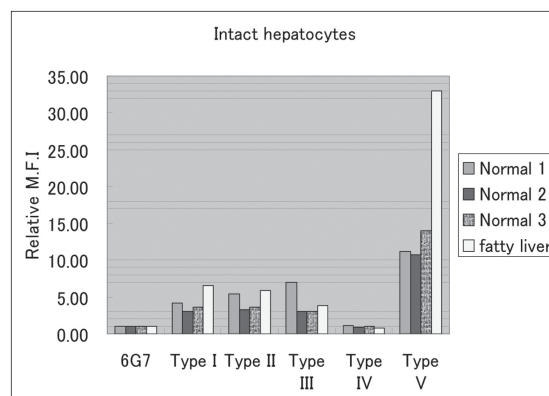


図 5. 正常人肝細胞表面のmEHエピトープ発現解析. 手術または剖検時に採取したヒト肝臓をコラゲナーゼ処理で処理後, 5種の抗体と反応させてflow cytometryを行った. (a)2つの代表例を示す.



(b) 調べた4例それぞれの結果をmean fluorescence intensityで示す.

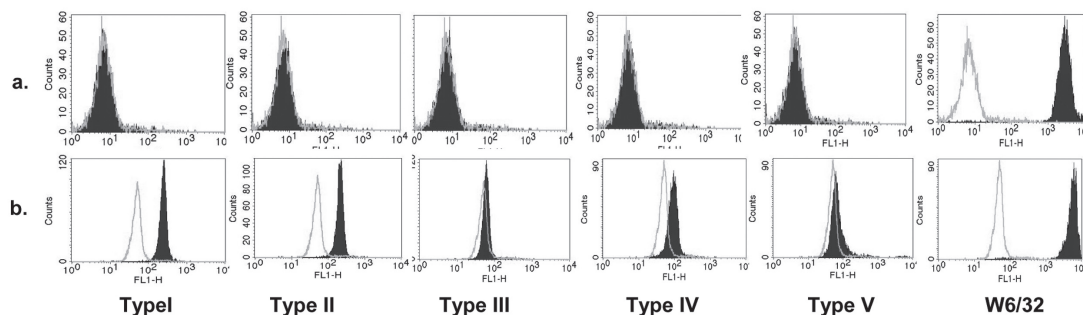
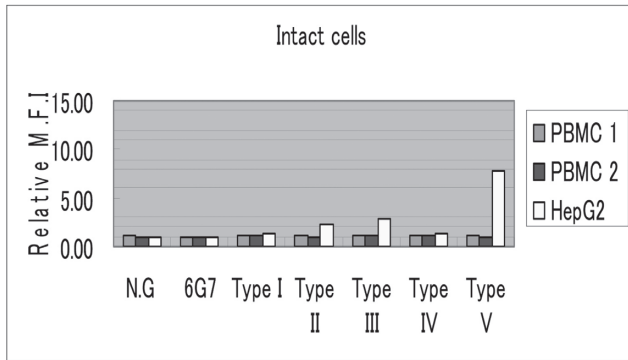


図 6. 正常人リンパ球でのmEH発現の解析.

(a) 正常人リンパ球を分離後5種の抗体と反応させてflow cytometryを行った. (b) 同じ細胞をBD Cytofix/Cytopermを用いてpermealizeし, 同じ抗体と反応させた.

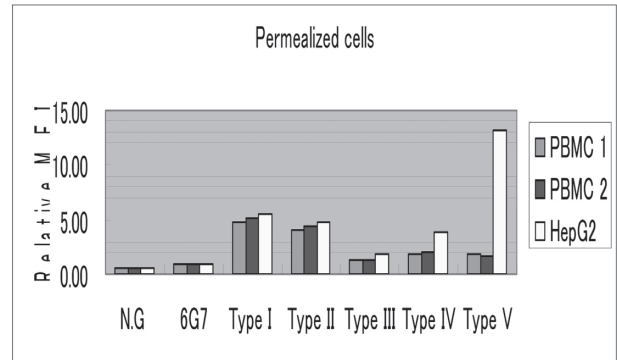


(c)4検体の結果を陰性コントロール抗体 (6G7: 抗HCV core 抗体)と比較したrelative mean fluorescence intensityで示した。W6/32: anti-MHC class I monoclonal antibody (陽性コントロール)。

らくモノマーの形で存在しているものと推測された。mEHの発現量が組織間で異なることは知られているが、このように存在形態が大きく異なることは知られていなかったの、とても価値のある知見であると思われる。

肝細胞株でのmEH発現

mEHはその遺伝子に多型性があり、特定の遺伝子型が種々の癌や慢性疾患の発生と相関があることが知られている¹⁰⁻¹³。またある種の癌細胞で過剰発現したり、ラットの化学発癌実験における肝細胞癌発生において癌発生に先立ってmEHが血中で検出され、preneoplastic antigenとも呼ばれた¹⁴。このようにmEHは肝細胞癌を含む多くの癌の発生に関連していることが知られている。そこでmEHの存在形態が発がんの過程で変化を受けていないかを知るために、正常肝細胞および肝細胞癌由来の細胞株3種について、今回得られたモノクローナル抗体を用いて調べてみた。1) 正常肝細胞をSV40 T抗原遺伝子の導入により不死化したTHLE-5b (T5b) 細胞では5種のエピトープのいずれも細胞表面では検出されなかった(図7a, c)。正常肝細胞は培養後短時間でmEHの細胞表面発現が失われることが知られており、THLE-5bのこの所見は培養状態にある正常肝細胞とよく似ていると思われた。2) 一方比較的分化した状態にあり、 α -fetoproteinの発現能も保持しているHuh-7ではtype Vの顕著な発現が認められ、type I, II, IIIもわずかであるが一部の細胞で認められた(図7a, c)。3) 未分化な肝細胞癌由来のHuh-1では全てのエピトープが細胞表面に発現しており、フレッシュな正常肝細胞やリンパ球では認められなかったtype IVのエピトープの発現も認められた(図7a, c)。いずれの細胞においても細胞内ではすべてのエピトープが発現していることは、細胞をpermealizeした後に抗体と反応させる実験で確認された(図7b, d)。今回の結果はtype IVのエ



(d)

ピトープの細胞表面発現が癌細胞特異的である可能性を示唆しており、非常に興味深い。

RNAウイルス感染が肝細胞株のmEH発現に及ぼす影響

肝炎患者血清中の抗mEH抗体出現がHCVとHAV感染でのみみられ、HBV感染や薬剤肝障害ではみられないことから、mEHの抗原変化がRNAウイルス感染に共通して起こることが1つの可能性として考えられた。そこで培養肝細胞にウイルスを感染させ、mEHの発現変化をタイプI-Vの抗体を用いて調べた。THLE-5bにRNAウイルスの1種であるSendai virusまたはDNAウイルスの1種であるワクシニアウイルスを感染させ、mEHの発現量をwestern blottingによる定量と、アセトン固定して蛍光抗体法を行って局在変化の検討を行ったが、全く差は認められなかった(data not shown)。そこで細胞をEDTA処理により単離し、細胞表面におけるmEH発現をflow cytometryで調べてみると、Sendai virus感染細胞でのみtype Vエピトープが細胞表面に出現することが認められた(図8)。肝炎ウイルスHCVとHAVのうちHAVは、それまでにmEHの発現を検討した細胞株中のHuh7に感染が可能であるので、その細胞についても検討を行った(図9)。その結果タイプVに加えタイプIIIのエピトープが細胞表面に出現すること、細胞内では全てのエピトープが検出され、ウイルス感染による変化はないことが分かった。

Poly(I:C)処理でRNAウイルス感染と同じ変化を引き起こすことができる

RNAウイルスが感染するとインターフェロン産生につながる非特異免疫系のシグナル伝達が誘導され、そのトリガーとしてPoly(I:C)がRNAゲノムの代用にしばしば用いられる。THLE-5bの培養液にこれを加えると、Sendai virusやLCMウイルス感染時と同様にtype Vエピトープの細胞表面発現が見られた(図10)。Poly(I:C)をトランスフェクションにより細胞内に導入

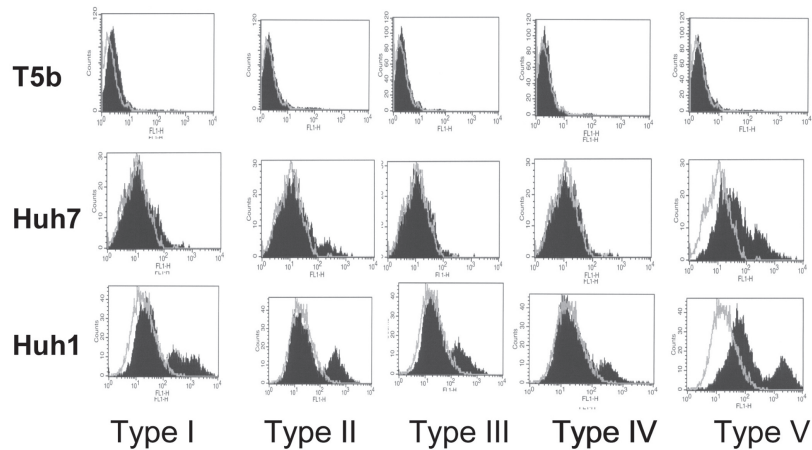
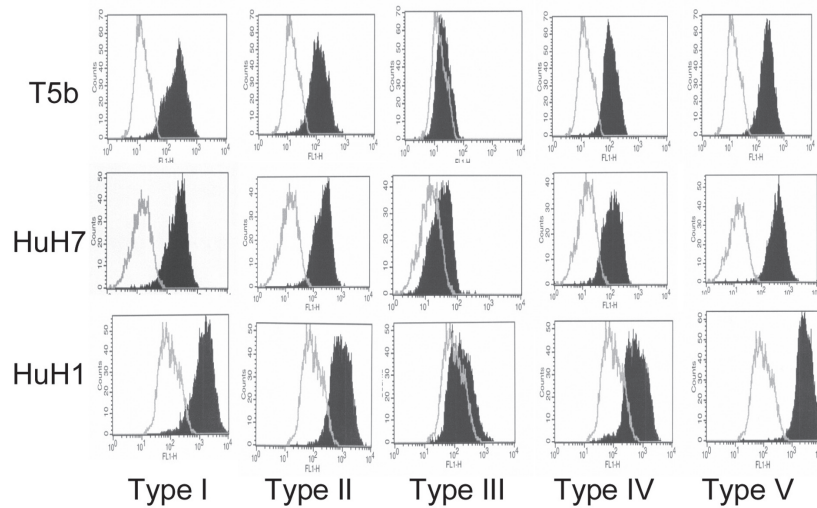
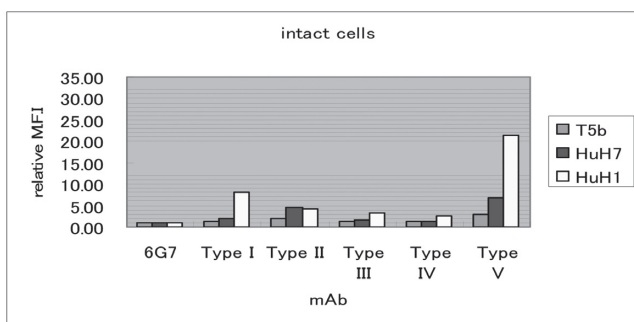


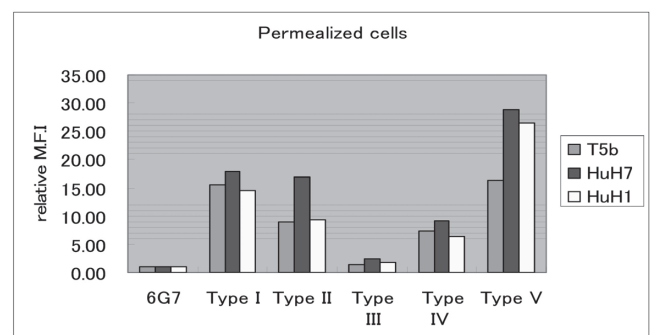
図 7. (a)3種の肝細胞株 (THLE-5b, Huh7, Huh1) の表面でのmEH発現解析.



(b)同じ3種の細胞の内側でのmEH発現解析.



(c) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの.



(d) bの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの.

しても同様な変化が認められた (data not shown).

RNAウイルス感染によりmEHが介在する代謝系に変化が起こる

Phase II 解毒酵素の1種であるmEHは, CYP450 等の phase I 解毒酵素との共同作業で生体異物の代謝

を行う. その機能を発揮するためには細胞の膜上で P450 などと正しい位置関係を取る必要がある¹⁵⁾. もしこれが RNAウイルス感染により変化を受けるとすると, mEH が関与する代謝機能にも障害がおきると予想された. 発がん有機物質である DMBA は CYP1A1 または CYP1B1 と mEH との共同作業で酸化と加水分解を受け, DNA と結合して変異原性を発揮する DMBA-

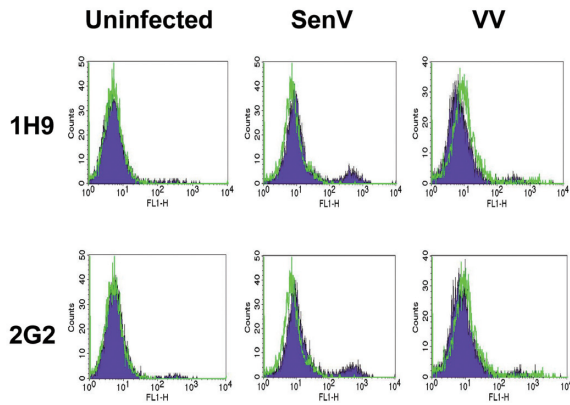
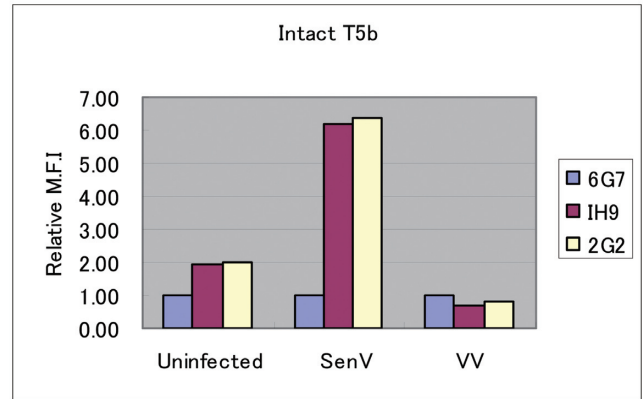


図 8. THLE-5b(T5b)細胞表面でのmEH type Vエピトープ発現.
(a)Uninfected: 未感染細胞, SenV: Sendai virus感染細胞, VV: ワクシニアウイルス感染細胞 それぞれのflow cytometry.



(b)aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

a. Intact cells

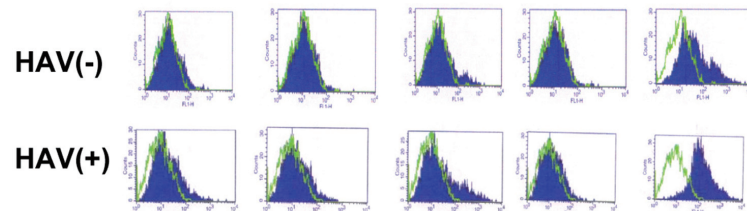
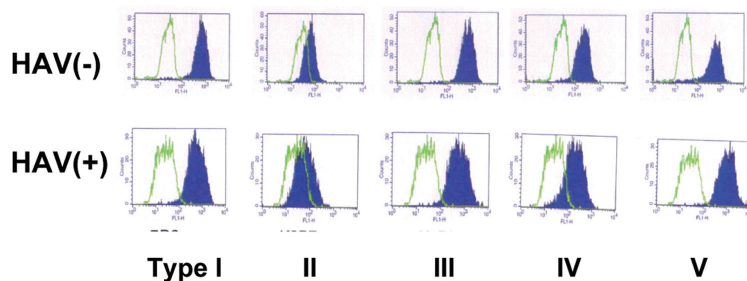


図 9. Huh7細胞表面でのmEH type Vエピトープ発現.

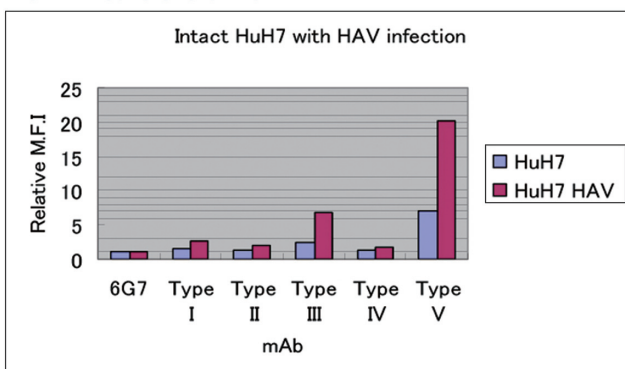
(a) HAV感染細胞 (HAV(+)) と未感染細胞 (HAV(-)) を生きたまま抗体と反応させたものの。

b. Permealized cells



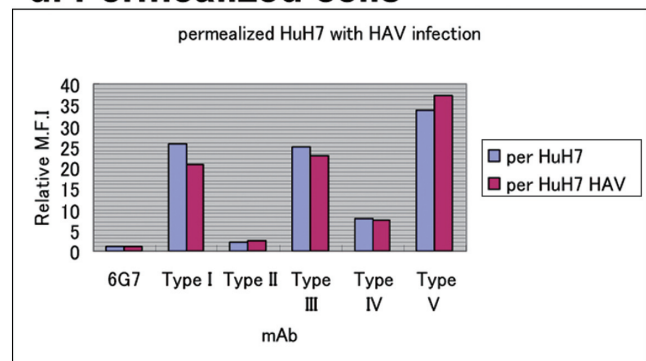
(b) HAV感染細胞 (HAV(+)) と未感染細胞 (HAV(-)) の細胞膜をpermealize後抗体と反応させたものの。

c. Intact cells



(c) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

d. Permealized cells



(d) bの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

3,4-diol-1,2-epoxideへと代謝される。これが細胞内に蓄積すると細胞傷害や発がんを引き起こされる⁹⁾。われわれはRNAウイルス感染によるmEHの発現変化がこの代謝過程にも影響を及ぼすと予想し、THLE-5bにPoly(I:C)を処理またはRNAウイルスを感染させ、DMBAによる細胞傷害性を測定して未処理細胞と比較した。結果は予想どおりで、図11に示すように、RNAウイルス感染 (SenV), あるいはpoly(I:C)を培養液に加えても (M-pIC), 細胞内にtransfectionで導入しても (T-pIC) いずれにおいても20倍以上の感受性の増加が認められ、代謝産物で変異原性・細胞毒性をもつDMBA-3,4-diol-1,2-epoxideが蓄積していると思われる。

RNAウイルスゲノムによるmEHへの影響にはRIG-Iを介したインターフェロン誘導経路が介在する

RNAウイルスが感染すると、細胞外にある2本鎖RNA分子はエンドソームに取り込まれ、そこで細胞のtoll-like receptorに結合し、IRF-3を介したシグ

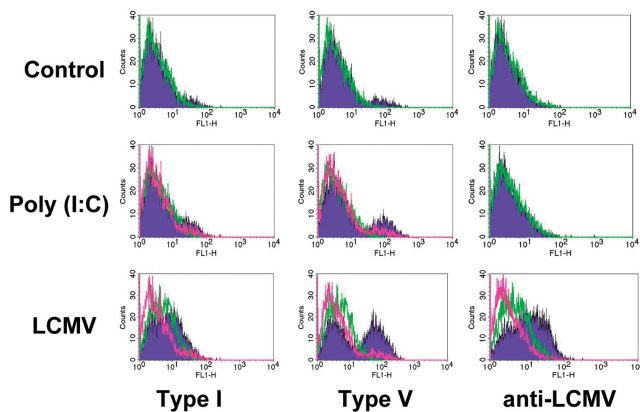
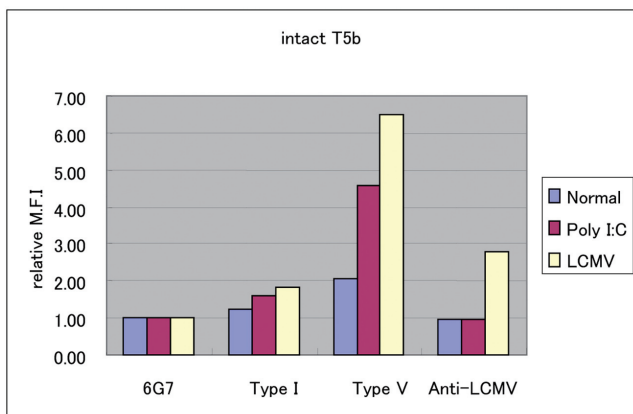


図 10. (a) 未処理 (Control), poly(I:C) 処理 (Poly(I:C)), LCMV 感染 (LCMV) THLE-5b(T5b) 細胞の膜表面でのmEH発現をtype I と type V 抗体エпитープについて調べたもの。



(b) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したもの。

ナル伝達系によりインターフェロン α 遺伝子の発現にいたる。一方細胞内では2本鎖RNA分子はRIG-Iと結合した後、IPS-1を介した経路でシグナルが伝えられる¹⁶⁾。RNAウイルス感染がmEHに及ぼす変化もこの経路のいずれかが関与している可能性があると考えられた。Huh7細胞の変異株でRIG-Iに欠損を持つHuh7.5細胞とHuh7細胞にSendai virusを感染させ

a. T5b-M-pIC

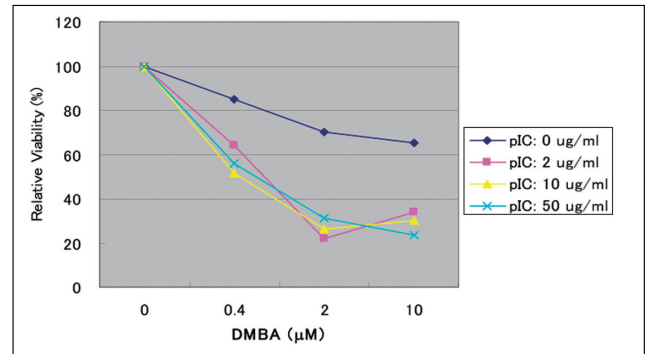
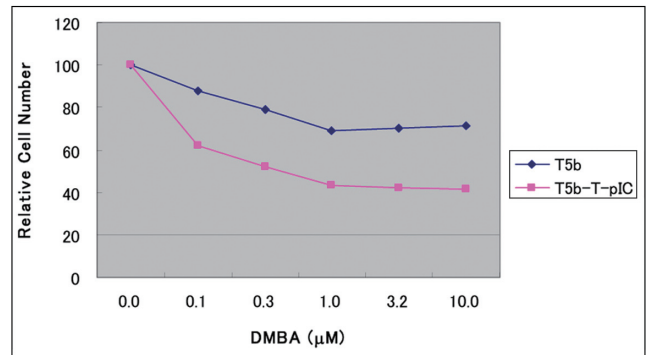


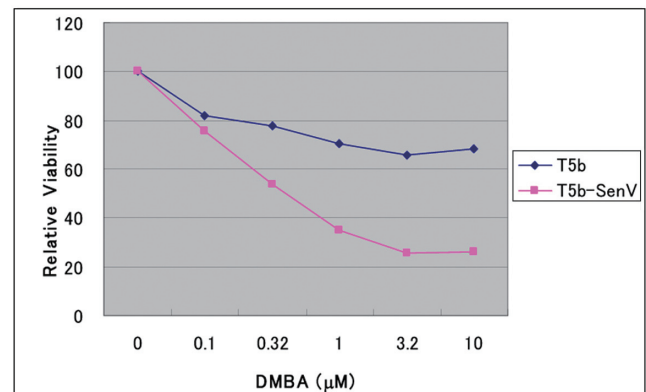
図 11. THLE-5b(T5b)細胞のDMBA細胞傷害試験。
(a) Poly(I:C)を種々の濃度で培地に加えたもの。

b. T5b-T-pIC



(b) Poly(I:C)をtransfectionして細胞内に導入したもの。

c. T5b-SenV



(c) Sendai virus感染細胞と未感染細胞の比較。

てDMBA感受性テストを行った。図12に示すようにRIG-Iに欠損のあるHuh7.5ではDMBAによる細胞傷害性が殆ど認められず、Sendai virus感染によるmEHへの影響にはRIG-Iが介在していることが示唆された。Huh7細胞はTLR3を発現していないので、poly(I:C)を培養液中に加えた実験では差が認められなかった。

マウスモデルでの実験

以上の実験は全てヒトのmEHに関するものであるが、RNAウイルス感染によるmEH機能の変化をin vivoで確認するためにマウスをモデルにした実験を行っている。上記のTHLE-5bを用いたDMBA cytotoxicity assayの結果から、RNAウイルスに持続感染したマウスでもmEHの局在変化と共に、それが関与する解毒機能にも変化が起こると予想される。そのようなマウスにDMBAを投与すれば、それに対する感受性が高まり、肝細胞障害や癌の発生頻度も上昇すると予想される。そこでLCMウイルスの変異株でマウスに持続感染を引き起こすclone-13をC56BL/6マウスに接種し、その3日後からDMBAを投与する実験を行った。その結果予想以上に激しい症状を引き起こし、低体温とショック症状で2週以内に半数近くが死亡した(data not shown)。

【考 察】

今回mEHの異なるエピトープに対する5種のモノクローナル抗体を得ることが出来、これを使用することにより、生理的・病的状態におけるmEHの存在形態を詳しく調べることが可能となった。肝細胞膜表面でC末のエピトープが表出していないことは新しい知見であるが、それが肝癌細胞で出現することも、mEHと発がんとの関連を推察するうえでとても興味深い。ラットの化学発癌実験の過程でmEHが血中に検出され、“preneoplastic antigen”と呼ばれ腫瘍特異抗原として注目されたこともあるが¹⁴⁾、今回得られた結果はやはりmEHが腫瘍細胞で特異な存在形態をとることを示している。

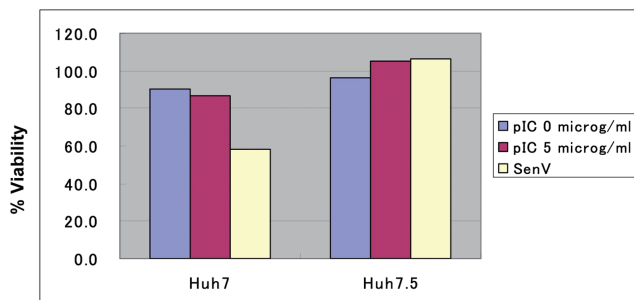


図12. Huh7とHuh7.5のDMBA細胞傷害試験、Poly(I:C)を培地に加えるかSendai virusを感染させ、DMBAを3.2 μM加えた時の生存細胞数を示す。

mEHの存在形態が正常細胞でも、その種類によって大きく異なることも新しい発見である。mEHはepoxideを加水分解する触媒作用を行うだけでなく、肝細胞表面ではoligomeric structureをとってNa⁺-dependent bile acid transporterとして、そして小胞体膜上ではNa⁺-independent bile acid transporterとして働いていると考えられている¹⁷⁾。今回得られた抗体の内、Type Vはそのような数分子からなる高次構造を認識すると思われる。そのエピトープがリンパ球では細胞内外共に殆んど検出できなかったことから、2種の細胞の間でのmEHの発現の違いは単に量的な差ではなく、図13のように基本的な形態の違いが存在すると思われる。

Type V抗体が認識するmEHのoligomeric structureがウイルス感染により増加するという知見も今回得られたが、そのような細胞でもmEHの量自体に変化は認められなかったことから、ウイルス感染によりmEHによる触媒反応にはおそらく影響を受けることはないと思われる。それにもかかわらずDMBAにたいして感受性が10倍以上も高まったのは、変異原性をもつ代謝産物、DMBA-3,4-diol-1,2-epoxideの生成量が増えるためではなく、膜上のoligomeric structureがこの産物もトランスポートする機能も持っていて、その機能に差がでるためではないかと想像される。DMBAを処理したTHLE-5b細胞中のどこにDMBA-3,4-diol-1,2-epoxideがどれだけ存在するのか調べたかったが、それを測定する実験には、前駆体(DMBA-5-ブロム体)を還元してトリチウム化する必要がある、その前駆体がアメリカで製造中止となり手に入らないことが分かり、断念せざるを得なかった。このためDMBAに対する感受性更新のメカニズムは分からないが、マウスにおける実験でも予想通り、ウイルス感染によりDMBAに対する感受性が更新したことから、今後慢

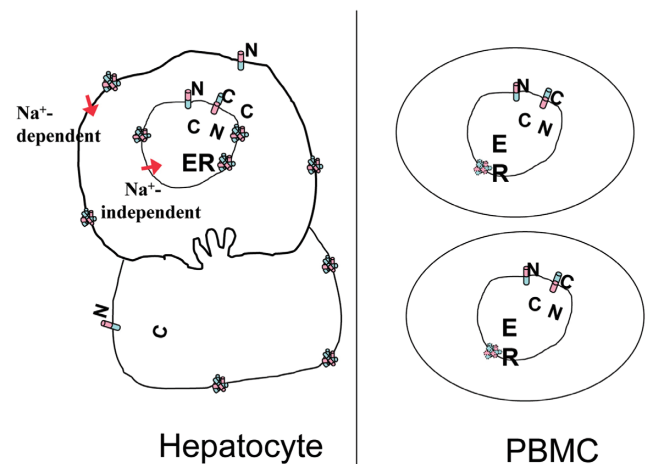


図13. 正常ヒト肝細胞(Hepatocyte)とリンパ球(PBMC)におけるmEHの存在形態の違いに関する仮説。

性ウイルス感染症における肝細胞障害や肝癌発生に、mEHの受ける変化が深く関わっていることが示唆された。今回の実験結果は発がん仮説の検証には強すぎる効果であったので、現在投与量を変えたりして実験条件を検討している。最終報告までにmEHの機能異常に関するデータをそろえたい。

Reference List

- 1) Tohmatsu J, Morimoto T, Katsuhara N, Abe K, Shikata T. AN6520 Ag: An Antigen Purified From Liver With Non-A, Non-B Hepatitis. *J Med Virol* 1985;15:357-71.
- 2) Akatsuka T, Tohmatsu J, Abe K et al. Non-A, Non-B Hepatitis Related AN6520 Ag Is a Normal Cellular Protein Mainly Expressed in Liver. II. *J Med Virol* 1986;20:43-56.
- 3) Akatsuka T, Tohmatsu J, Yoshihara N et al. Detection of an Antigen (AN6520) Possibly Related to Non-A, Non-B Hepatitis, by Monoclonal Antibodies. I. *J Med Virol* 1986;20:33-42.
- 4) Akatsuka T, Kobayashi N, Ishikawa T et al. Autoantibody response to microsomal epoxide hydrolase in hepatitis C and A. *Journal of Autoimmunity* 2007;28(1):7-18.
- 5) Stone MR, Nowinski RC. Topological Mapping of Murine Leukemia Virus Proteins by Competition-Binding Assays with Monoclonal Antibodies. *Virology* 1980;100:370-81.
- 6) Miyata M, Kudo G, Lee YH et al. Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. MICROSOMAL EPOXIDE HYDROLASE IS REQUIRED FOR THE CARCINOGENIC ACTIVITY OF 7,12-DIMETHYLBENZ[a]ANTHRACENE. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(34):23963-8.
- 7) Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Inter* 2000;129:41-599.
- 8) Alves C, von Dippe P, Amoui M, Levy D. Bile Acid Transport into Hepatocyte Smooth Endoplasmic Reticulum Vesicles Is Mediated by Microsomal Epoxide Hydrolase, a Membrane Protein Exhibiting Two Distinct Topological Orientations. *J Biol Chem* 1993;268:20148-55.
- 9) Lu AYH, Miwa GT. Molecular Properties and Biological Functions of Microsomal Epoxide Hydrolase. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20:513-31.
- 10) Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res* 1998;58(23):5291-3.
- 11) Park JY, Chen L, Wadhwa N, Tockman MS. Polymorphisms for microsomal epoxide hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med* 2005;15(3):443-8.
- 12) Tranah GJ, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ. Epoxide hydrolase polymorphisms, cigarette smoking and risk of colorectal adenoma in the Nurses' Health Study and the Health Professionals Follow-up Study. *Carcinogenesis* 2004;Vol 25,Iss 7:1211-8.
- 13) Tiemersma EW, Omer E, Bunschoten A et al. Role of Genetic Polymorphism of Glutathione-S-Transferase T1 and Microsomal Epoxide Hydrolase in Aflatoxin-associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:785-91.
- 14) Levin W, Lu AYH, Thomas PE, Ryan D, Kizer DE, Griffin MJ. Identification of epoxide hydrolase as the preneoplastic antigen in rat liver hyperplastic nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3240-3.
- 15) Ishii Y, Takeda S, Yamada H, Oguri K. Functional protein-protein interaction of drug metabolizing enzymes. *Front Biosci* 2005;10:887-95.
- 16) Sen GC, Sarkar SN. Hitching RIG to action. *Nat Immunol* 2005;6(11):1074-6.
- 17) von Dippe P, Amoui M, Alves C, Levy D. Na⁺-dependent bile acid transport by hepatocytes is mediated by a protein similar to microsomal epoxide hydrolase. *Am J Physiol* 1993;264:G528-34.

【研究成果リスト】

論文

Monoclonal antibodies reveal differential expression of human microsomal epoxide hydrolase in hepatocytes and lymphocytes. Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Kazuo Sugiyama, Tugikazu Komoda, Isamu Koyama, Hidekazu Kayano, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka.
(in preparation)

学会発表

- 1) Akatsuka T, Ishikawa T, Kobayashi N, Duan H, Feinstein SM and Hammock BD. Autoantibody response to a drug-metabolizing enzyme, microsomal epoxide hydrolase in hepatitis C and A. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, Jul.1-5, 2006.
- 2) Akatsuka T, Kobayashi N, Sugiyama T, Duan H,

- Takagi A and Feinstone SM. Hepatitis C virus affects the location and function of a drug-metabolizing enzyme, microsomal epoxide hydrolase. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Cairns, Australia, Aug. 27-31, 2006.
- 3) 赤塚俊隆, 小林信春, 段洪英, 高木徹, 石川隆, 斎藤貴史, 進藤道子, 黒河内和貴, 杉山和夫. C型肝炎ウイルス複製に伴う薬物代謝酵素機能異常の解析. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, May, 2007.
 - 4) 段洪英, 小林信春, 高木徹, 杉山和夫, 赤塚俊隆. 薬物代謝酵素 microsomal epoxide hydrolase (mEH) のエピトープ解析. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, May, 2007.
 - 5) Analysis of the effect of HCV on the topology of the microsomal epoxide hydrolase with monoclonal antibodies with different epitope specificities. Hongying Duan, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Kazuo Sugiyama, Satoshi Ohno, Masanori Matsui, Masaru Nawa, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, Scotland UK, Sep. 9-13, 2007.
 - 6) RNA virus infection affects the location and possibly the function of microsomal epoxide hydrolase. Hongying Duan, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, Apr. 5-9, 2008.
 - 7) Analysis of the topology of microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities. Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Kazuo Sugiyama, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, Apr. 5-9, 2008.