

## C型慢性肝炎患者の肝組織内における遺伝子発現

島原 将精

本研究の目的はC型慢性肝炎において肝機能の正常な群 (asymptomatic carrier : ASC) とALTの変動のみられる群 (chronic active hepatitis : CAH) の遺伝子発現の違いを明らかにすることで、慢性肝炎の進展過程にどのような遺伝子が関与しているかを明らかにすることである。2群間の遺伝子発現の違いは differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction (DDRT-PCR) 法を用いて比較検討した。4種類のアンカープライマーと12種類任意のプライマーを用いて行ったDDRT-PCRによりえられたcDNA産物は、100組であった。これらのcDNAの中から、gene specific RT-PCRで最終的に5個のcDNAが候補として選ばれた。BLAST analysisで検索した結果、ASC群に共通して過剰発現されたものは human STS WI-8782であった。また、CAH群に共通して過剰発現されたものは human mitochondrion, human beta 2 gene for beta-tubulin, human retinoic acid-induced gene G (RIG-G), human STS WI-8930の4種類であった。

候補として選ばれたcDNAの1つであるRIG-Gは細胞分化に重要な役割を演じている可能性が報告されており、肝障害の進展に関与している可能性が示唆された。

(平成10年8月31日受理)

### Differential Display Analysis of RNA in Liver Tissues of Chronic Hepatitis C Patients

Masakiyo SHIMABARA

To analyze the differences in gene expression between asymptomatic carrier (ASC) and chronic active hepatitis (CAH) patients with elevated transaminases, total RNAs were extracted from liver biopsy specimens from two patients with ASC, and three patients with CAH, using the acid guanidine phenol chloroform (AGPC) method.

The differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction (DD-PCR) was used to examine differences in mRNA composition between the two groups. Enhanced expressions of four cDNAs and one cDNA were observed from CAH and ASC, respectively. Enhanced expressions of the human retinoic acid-induced gene G (RIG-G), human mitochondrion, the human beta 2 gene for beta-tubulin, and human STS WI-8930 was noted in the CAH groups, while human STS WI-8782 was enhanced in the ASC groups. Enhanced expression of human mitochondrion and the human beta 2 gene for beta tubulin may reflect exaggerated mitosis accompanied with necrosis and regeneration. RIG-G is said to be a gene induced by interferon (IFN) and all-trans-retinoic acid (ATRA), which is known to be associated with antiviral activity and cell differentiation. Therefore,









成した。全 RNA から、これらの gene specific primer を用いて、gene specific RT-PCR を行い、DD と同様に differential expression したバンドに対応する cDNA を最終的に候補とした結果、共通して発現したバンドは 1 組であった。ALT 異常群で決定した共通の 22 塩基配列をもとに 21 組の gene specific primer を作成した。総 RNA から、これらの gene specific primer を用いて、gene specific RT-PCR を行い ASC 群に enhanced expression する cDNA を 1 組、CAH 群に enhanced expression する cDNA を 4 組決定した (Fig. 2)。

#### 4. データベース検索

gene specific RT-PCR 決定した cDNA シークエンスを DNA BLAST program を用いて相同性を検索した。ASC 群に enhanced expression する cDNA シークエンスは #1 human STS WI-8782 であった。CAH 群に enhanced expression する cDNA シークエンスは、#2 human retinoic acid induced gene G mRNA, #3 human mitochondrion, #4 human beta 2 gene for beta-tubulin, #5 human STS WI-8930 の 4 種類であった。決定した cDNA は mRNA ポリ A 末端と DD で使用した AP プライマーのシークエンス保持していた。cDNA#1 はポリ A 末端をもつ 283 塩基で、AP-4 と GT15MG プライマーの配列に対応し human STS WI-8782 と 100% (266/266) の homology を持っていた。cDNA#2 はポリ A 末端をもつ 194 塩基で、AP-4 と GT15MC プライマーの配列に対応し human retinoic acid induced gene G mRNA, completecds と 100% (182/182) の相同性を持っていた。cDNA#3 はポリ A 末端をもつ 380 塩基で、AP-5 と GT15MG プライマーの配列に対応し human mitochondrion, complete genome と 100% (352/352) の相同性を持っていた。この部位は、human mitochondrion, complete genome の 12S ribosomal RNA をコードする部位であった。cDNA#4 はポリ A 末端をもつ 286 塩基で、AP-4 と GT15MA プライマーの配列に対応し human beta 2 gene for beta-tubulin と 100% (239/239) の相同性を持っていた。cDNA#5 はポリ

A 末端をもつ 95 塩基で、AP-3 と GT15MC プライマーの配列に対応し human STS WI-8930 と 100% (43/43) の相同性を持っていた。

## 考 察

今回の検討により、CAH 群の肝組織では、human mitochondrion, human beta 2 gene for beta-tubulin, human RIG-G, human STS WI-8930 の mRNA の 4 種類の遺伝子が強く発現されていた。

human mitochondrion の 12S リボゾームは、ミトコンドリアの独自の蛋白合成の場であり、ATPase やチトクロム酸化酵素などのエネルギー合成酵素を産生している。そして、細胞新生が活発な状況下では、12S ribosomal RNA の合成が上昇することが知られている<sup>10)</sup>。また、human beta 2 gene for beta-tubulin は、新しい beta-tubulin の 1 つとして分離された。tubulin の主な機能は、細胞骨格の core としての構造体、分裂装置の主役、あるいは細胞内輸送である。特に細胞分裂に関与することから、細胞分裂が活発に行われている細胞に強く発現されていることが示唆されている<sup>11)</sup>。これらのことから、human mitochondrion, human beta 2 gene for beta-tubulin とともに、ALT 上昇群に強く発現されていたことは、絶えず肝細胞の破壊と再生をくり返しているため、常に、高いエネルギー産生を要求し、肝細胞の再生過程で起こる細胞分裂に対応した結果と考えられる。

RIG-G (for retinoic acid-induced gene G) は、1997年に Yu ら<sup>12)</sup>によって、a new member of (ISG) Interferon-stimulated genes として分離された遺伝子であり、all-transretinoic acid (ATRA) によっても誘導される遺伝子である。また、RIG-G は IFN, ATRA 各々単独よりも、両者が共存することで、RIG-G の誘導時間は短縮し発現量が増加するという協調誘導のあることが示唆されている<sup>12)</sup>。

インターフェロン (IFN) は、抗ウイルス、抗腫瘍効果、そして細胞分化誘導能をもつことが知られている<sup>13)</sup>。IFN はレセプターと結合す

ることによってJAK-STAT pathwayを介したJanus-type tyrosine kinasesが活性化されると、ISG3を形成し、ISG3は、IFN-stimulated responsive elements (ISRE)と結合し、RIG-GあるいはInterferon-stimulated genes (ISG)を発現させる<sup>14)</sup>。ISGは、RNA dependent protein kinase (PKR)、2-5A dependent Rnase、Mx proteinなどの抗ウイルス蛋白の発現に関与し、これらが、ウイルスRNAを分解し、抗ウイルス作用を発現すると考えられている<sup>15)~18)</sup>。

一方レチノイドの代謝産物であるATRAは、細胞分化に関与することが知られている<sup>19)~23)</sup>。ATRAは、RAR (retinoic acid receptor)に結合すると、それらが核内に移行し、RXR (retinoid X receptor)とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のRetinoic acid responsive element (RARE)に結合する。その結果、転写基本因子複合体が形成され、retinoic acid-induced genesを発現させ<sup>24)</sup>、細胞分化の作用に関与していると考えられる。ATRAの細胞分化作用に着目し、急性前骨髄性白血病 (APL)、小児癌や頭頸部腫瘍患者に対する再発予防に対して、ATRA投与による臨床効果が報告されている<sup>25)、26)</sup>。また、肝細胞癌発生の予防に対しても、ATRA投与による有効性が示されている<sup>27)</sup>。

RIG-Gが、持続的にALTの異常値を示し、肝組織像は炎症と線維化が見られるC型慢性肝炎患者の肝組織中に強く発現されたことは、HCVに対する生理的な反応として、内因性IFNが誘導されていたものと考えられる。抗ウイルス作用はIFN単独でも誘導されるが、ATRAとの共同作用によってHCVに対しより効果的に誘導されているのかもしれない。一方、持続的に慢性の炎症をくり返している肝組織は、絶えず壊死と再生が惹起されておりその結果、分化度の低い肝細胞が出現する<sup>28)</sup>。RIG-Gは細胞分化に重要な役割を持つATRAにより発現が刺激されることから抗ウイルスおよび細胞分化の促進に関与しているのかもしれない。

C型慢性肝炎では、線維化の程度と発癌率は、密接な関係があることが知られている<sup>29)</sup>。すな

わち、線維化が進行するにつれ、発癌率は増加する。

肝組織における線維化に中心的な働きをしている伊東細胞は、肝組織に炎症が起こると細胞外マトリックスを産生し、線維化する際、伊東細胞内の脂肪滴が減少し、myofibroblastic transformationといわれる形態変化を起こすことが知られており<sup>30)、31)</sup>、肝硬変患者の肝組織にはこの脂肪滴が減少している<sup>32)</sup>。ATRAの材料となるレチノールは、主に伊東細胞内の脂肪滴に含まれている<sup>33)</sup>。肝細胞の破壊と再生が長期間にわたって繰り返された肝組織では、ATRAの前駆体であるレチノールが減少し伊東細胞の形態変化を引き起こし、コラーゲンが増生し肝硬変へ至ると考えられる。従って、線維化が進んだ肝組織では、ATRAは減少、あるいは欠乏状態に陥っていると思われる。ATRAの投与が肝細胞癌発生の予防に有効であった<sup>27)</sup>という事実は、局所的なATRAの減少、あるいは欠乏状態が未分化な肝細胞への分化誘導作用の欠如の結果、発癌に至るという可能性を示唆しているのかも知れない。

シグナル伝達経路は、近年飛躍的に解明されており、現象としてのみ捕えているIFNの分化誘導能や、抗ウイルス効果、また、ATRAの分化誘導の作用機序は、その詳細が明らかになりつつある<sup>16)</sup>。ATRAやIFNによって誘導されるRIG-Gの機能が解明されれば、IFNやATRA抵抗性の病態に対する治療に応用が可能であるかもしれない。IFNの作用を促進するものとして、臨床応用が期待されているものが、ATRAであり<sup>34)</sup>、IFNとの共同作用によって作られる物質、RIG-GがC型肝炎患者の肝組織から見つかったことは、C型肝炎の進展のメカニズムの解明に1つの手がかりを与えるものとなるかもしれない。今後さらにHCV感染早期から肝細胞癌に至るまでのさまざまな段階で肝組織内のRIG-Gの動態を検討する必要があると思われる。

## ま と め

肝機能正常群 (ASC) と異常群 (CAH) との間に遺伝子発現の相違を検討した。C型慢性肝炎患者の肝生検組織から得られた mRNA を DDRT-PCR 法を用い、ASC 群と CAH 群間で発現の程度の異なる 5 つの mRNA を同定した。とくに、これらのうち RIG-G は C 型慢性肝炎の進行における抗ウイルス効果や細胞の分化に関与していることが知られており肝炎の進

展に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った山本晋一郎教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に直接指導をいただいた久保木真講師に感謝いたします。また、研究に御協力いただいた消化器 I 内科教室員各位、大塚アッセイ研究所 木下盛敏氏、福井高文氏に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (9-302) の援助によって行われたものである。

## 文 献

- 1) 松島 喬, 菅原 俊, 豊田成司, 狩野吉康: 非 A 非 B 型肝炎の新しい展開。第16回大山シンポジウム刊行会編。東京, 中外医学社。1990, pp 2-8
- 2) 日本肝癌研究会: 第11回全国原発性肝癌追跡調査報告 (1990-1991), 1994
- 3) Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A: Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 340: 697-698, 1992
- 4) 日野邦彦: HBV キャリアと HCV キャリアの肝組織所見。第19回大山シンポジウム刊行会編。東京, 中外医学社。1994, pp 42-47
- 5) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, Alter H: Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12: 671-675, 1990
- 6) 市田文弘, 小俣政男, 辻 孝夫, 市田隆文, 井上恭一, 上村朝輝, 山田剛太郎, 横須賀取, 鈴木 宏: 慢性肝炎の肝組織診断基準-新犬山分類-。第19回大山シンポジウム刊行会編。東京, 中外医学社。1996, pp 183-188
- 7) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 8) Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992
- 9) Ikononov OC, Jacob MH: Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate-to low-abundance in a microscopic system. *Biotechniques* 20: 1030-1034, 1996
- 10) Saulea J, Garcia-Palmer F, Wiesner RJ, Tarraga S, Harting I, Tomas P, Gomez C, Saus C, Palou A, Agusti AG: Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1413-1417, 1998
- 11) Dumontet C, Duran GE, Steger KA, Murphy GL, Sussman HH, Sikic BI: Differential expression of tubulin isotypes during the cell cycle. *Cell Motil Cytoskeleton* 35: 49-58, 1996
- 12) Yu M, Tong JH, Mao M, Kan LX, Liu MM, Sun YW, Fu G, Jing YK, Yu L, Lepaslier D, Lanotte M, Wang ZY, Chen Z, Waxman S, Wang YX, Tan JZ, Chen SJ: Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7406-7411, 1997
- 13) Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE: Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777, 1987



- 14) Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR : Transcriptional and post-transcriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38 : 745-755, 1984
- 15) Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG : Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62 : 379-390, 1990
- 16) Meurs EF, Watanabe Y, Kadereit S, Barber GN, Katze MG, Chong K, Williams BR, Hovanessian AG : Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J Virol* 66 : 5804-5814, 1992
- 17) Hassel BA, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH : A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J* 12 : 3297-3304, 1993
- 18) Arnheiter H, Skuntz S, Noteborn M, Chang S, Meier E : Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* 62 : 51-61, 1990
- 19) Hong WK, Itri LM : Retinoids : Human cancer. *In* The retinoid : Biology, Chemistry and Medicine, ed by Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, 2nd ed. New York, NY Raven. 1994, pp 597-630
- 20) Ross AC : Vitamin A : Current understanding of the mechanisms of action. *Nutr Today* 26 : 6, 1991
- 21) De Luca L : Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 5 : 2924, 1991
- 22) Eichele G : Retinoids in embryonic development. *Ann NY Acad Sci* 678 : 22, 1993
- 23) Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, Rasmussen AM, Skrede B, Skjonsberg C, Blomhoff R : Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J Biol Chem* 267 : 23988, 1992
- 24) Mao M, Yu M, Tong JH, Ye J, Zhu J, Huang QH, Fu G, Yu L, Zhao SY, Waxman S, Lanotte M, Wang ZY, Tan JZ, Chan SJ, Chen Z : RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 5910-5914, 1996
- 25) Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL : Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (part II). *Cancer Treat Rep* 71 : 391-405, 1987
- 26) Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL : Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat Rep* 71 : 493-515, 1987
- 27) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, Tanaka T, Tsurumi K, Okuno M, Tomita E, Nakamura T, Kojima T : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 334 : 1561-1567, 1996
- 28) Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N : Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 139 : 535-552, 1991
- 29) Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Fukuda M, Chayama K, Murashima N, Kumada H : Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis : A prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 28 : 930-938, 1998
- 30) Gressner AM : Liver fibrosis : Perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29 : 293-311, 1991
- 31) Friedman SL : Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 24 : 1828-1835, 1993
- 32) Schuppan D : Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver : Collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 10 : 1-10, 1990
- 33) Hirotsawa K, Yamada E : The localization of the vitamin A in the mouse liver as revealed by electron microscope radioautography. *J Electron Microsc* 22 : 337-346, 1973
- 34) Ransohoff RM : Cellular responses to interferons and other cytokines : The JAK-STAT paradigm. *N Engl J Med* 26 : 616-618, 1998