

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※																											
※																											※
※	C型肝炎病毒干擾素抗藥性的分子機轉																										※
※																											※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※																											

執行期間： 88 年 8 月 1 日 至 89 年 7 月 31 日

共同主持人：

賴明陽

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院臨床醫學研究所

中 華 民 國 90 年 7 月 日

一、中英文摘要

C 型肝炎病毒 (HCV) 是最早全世界慢性肝炎、肝硬化、肝細胞癌的重要病因之一。干擾素是被許可用來治療慢性 C 型肝炎的藥物，但是單用干擾素治療的長期療效僅約 10~20%。此種高干擾素抗藥性的現象顯示 HCV 可能如同其他病毒般有對抗干擾素作用的機轉。Katze 等人發現 HCV NS5A 會直接與干擾素引發的蛋白激酶 (PKR) 作用，因而壓抑干擾素的抗病毒作用。NS5A 的 ISDR 區 (IFN sensitivity determining region) 為與 PKR 交互作用的重要位置。然而 NS5A-PKR 的機轉並無法完全解釋 HCV 之高干擾素抗藥性，因不少報告包括我們的實驗室無法証實 ISDR 區突變對干擾素反應的重要性，可能尚有其他抗 IFN 機轉。

本研究的目標就在探討 HCV 對干擾素 α 具有高抗藥性的分子機轉。特定的目的包括 HCV NS5A 在肝細胞內對 PKR, 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2-5A) 與 HLA 第一類抗原表現的影響與探討 HCV 蛋白對干擾素活化 JAK/STAT 蛋白的影響。我們發現在肝細胞內穩定表現 HCV NS5A 並未影響 PKR, 2-5A 與 HLA class I antigen 蛋白之表現，並且未發現 NS5A-PKR 之結合。此外，JAK/STAT 訊息傳導途徑之 STAT 1 與 STAT 3 表現也不受 HCV NS5A 之影響。

Abstract

Chronic HCV infection is an important etiology of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma worldwide. Interferon (IFN) α is the earliest drug for the treatment of chronic hepatitis C. However, the treatment outcome is not satisfactory; the sustained response rate is only 10 to 20 % by a regimen of 3 million thrice weekly for 6 months. It is very likely that HCV may have mechanisms to evade the antiviral actions of IFN, like many other viruses. Katze et al. found that HCV resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the NS5A protein. Interferon sensitivity determining region (ISDR) of the NS5A protein is required for the interaction with PKR. However, many reports from countries other than Japan can not confirm that mutation of ISDR favors IFN response. We hypothesize that multiple mechanisms may enable HCV avoids the antiviral effects of IFN.

The primary goal of this proposal is to elucidate the molecular mechanisms of HCV resistance to IFN α . The specific aims were study the interaction of HCV proteins with PKR, 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2-5A), and HLA class I antigens, as well as the JAK/STAT signaling pathways of interferon α . We found that, in hepatoma cell lines, the stably expressed HCV NS5A did not affect the expressions of PKR, 2-5A and HLA class I antigens, and no complex formation between NS5A and PKR. In addition, expressions of STAT 1 and STAT 3 in the JAK/STAT signaling pathway were not influenced by HCV NS5A.

二、緣由與目的

慢性 C 型肝炎病毒 (HCV) 感染是全世界肝硬化及肝細胞癌的重要成因(1)。目前干擾素 α 是最早被廣泛用來治療慢性 C 型肝炎的藥物，但停藥後復發率高，長期 sustained response 約僅約 10-20%，若用 ribavirin 與干擾素合併療法會比單用干擾素治療慢性 C 型肝炎成效更為優越。Katze 等人發現 HCV NS5A 可壓抑干擾素可誘導的 PKR 蛋白激酶，此可能為 HCV 具有高干擾素抗藥性的理由，而 ISDR 區正是 NS5A 與 PKR 進行交互作用所必需者。但事實上有不少國家的研究無法証實 ISDR 的重要

性，包括我們的實驗室。因此，HCV 為何有高干擾素抗藥性的問題尚待釐清。

干擾素 α 的抗病毒作用主要是經由所誘發的基因產物 2'-5'-oligoadenylate synthetase (2-5A) 及 PKR 蛋白激酶，並增強 HLA 第一類抗原的表現。2-5A 會激活 Rnase L 而 degrade 病毒 RNA。PKR 則經 dsRNA 活化後可磷酸化 eIF2 α ，使 eIF2 α 無法參加 polypeptide chain 的 initiation，致蛋白合成停頓。干擾素 α 在與 IFN α/β 接受器結合後，其訊息傳導途徑 (signal transduction pathway) 乃經由 JAK/STAT pathway，磷酸化三個 STAT 蛋白 (P91, P84, P113)，再進入細胞核與 ISRE (interferon sensitive response element) 結合。

因此，欲較周全瞭解 HCV 之干擾素 α 高抗藥性的機轉，有必要探討 HCV 蛋白在肝細胞內對 PKR, 2-5A 及 JAK/STAT 蛋白分子之交互作用及影響。本研究目的就在探討 HCV 對干擾素 α 具有高抗藥性的分子機轉。

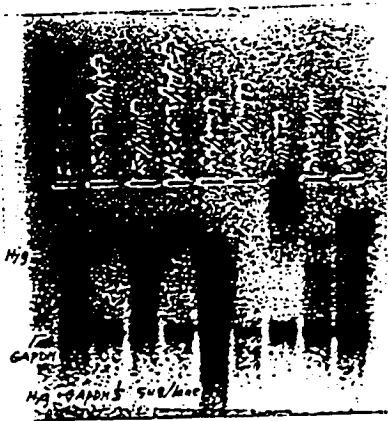
三、結果與討論

我們以 Retroviral vector S2 成功地在肝癌細胞株 Huh-7 表現 HCV NS5A，包括 Northern blotting (圖 1)，與 Western blotting (圖 2)。在能穩定表現 HCV NS5A 之 Huh-7 細胞株中，PKR, 2-5A, HLA class I 抗原與 STAT 1, 3 之表現未受影響。經干擾素 α 刺激後之 whole cell extract，加入 HCV 蛋白之抗體及 PKR, STAT 等抗體，經 immunoprecipitation 及 immunoblotting 分析，未見有結合現象。NS5A 與 PKR 之結合現象未能在肝癌細胞中証實，與 Katze 在酵母菌之觀察不同。原因可能兩者真無互相 interaction，或所用之抗體活性不同所致。

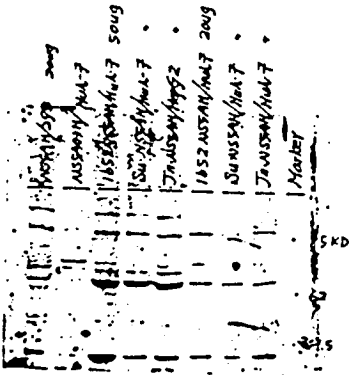
本研究發現 HCV NS5A 未與 PKR 互相結合，也未影響與干擾素作用相關之 2-5A, STATs 之表現，可能其他 HCV 之產物仍扮演角色。Michal Lai 後來發現 HCV E2 與 PKR 有交互作用。

Northern Blot of Huh-7 Cells Expressing HCV NS5A RNA

Western Blot of Huh-7 Cells Expressing HCV NS5A Protein



NA
vector 3.8K
NS5A 5.6K



NS5A Mab (c33c6) 2x SEC-MgE
dil 100X. 2nd w/Marker 2500X

四、成果自評

本研究計畫未能如預期，尚未找到新的分子機轉來解釋 HCV 高抗原干擾素之緣由。仍須進一步研究。

五、參考文獻

1. Roynard T, Leroy V, Cohard M, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* 1996;24:778-789.
2. Lai MY, Kao JH, Yang PM, et al. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1996;111:1307-1312.
3. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b: Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224-230.
4. Gale JR MJ, Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-227.
5. Darnell Jr JE, Kerr IM, and Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421.