

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15085

研究課題名（和文）タイト結合分子オクルディンを標的とした新規C型肝炎阻害薬の作用機序解明

研究課題名（英文）Mechanisms for the prevention of HCV infection to mammals under a occludin-targeting antibody

研究代表者

齋藤 明 (Saito, Akira)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70791010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HCVの感染を阻害する抗ヒトオクルディン単クローン抗体の作用機序を解明するために、ヒト肝癌由来細胞株のオクルディンの第二細胞外ループの一部に変異を加えた安定発現株を樹立した。そのうちシステインをアラニンに置換した細胞株においてオクルディンが細胞膜領域から消失する様子が見られた。また、オクルディンとトリセルリンをダブルノックアウトしたMDCK II細胞では、野生型と比較してイオンやマクロ分子の透過性が大幅に上昇する様子が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トリセルリンとオクルディンをダブルノックアウトした細胞株において、野生型と比較してバリア機能が大幅に低下し、且つタイトジャンクションストランドの構造に変化が生じることを見出した。この知見により、長らく謎に包まれていたオクルディンやトリセルリンの分子機能解明の端緒を掴んだ。本研究は、TAMPファミリーのバリア機能やTJ構造形成、生体への真の役割を解明する基盤的な研究として位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanisms for the suppressing of HCV infection under the Occludin-targeting monoclonal antibody, we established cell lines stably expressing mutant Occludin in part of second extracellular loop. In the Occludin-mutant cell which replaced cysteine with alanine, we detected the distribution of Occludin. The paracellular permeability of ions and small molecules was increased in Occludin/Tricellulin double knockout MDCK II cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション オクルディン トリセルリン ダブルノックアウト バリア機能 TJストラ  
ンド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

タイト結合 (tight junction; TJ) と呼ばれる細胞間接着構造は、細胞間隙を通過する分子の種類や量を制御し、バリア機能を維持している。TJ の膜貫通分子は主としてクローディン (CLDN) ファミリーと TAMP (TJ-associated MARVEL protein) ファミリーから成る。CLDN ファミリーは水やイオンに対するバリア機能を担うが、オクルディン (OCLN)、トリセルリン (TRIC)、MARVELD3 (MD3) から成る TAMP ファミリーの具体的な分子機能は明らかになっていない。OCLN は、初めて発見された二細胞間 TJ 膜貫通分子であり、CLDN と協調して TJ の基本構造を形成すると考えられている [Furuse et al., *J Cell Biol*, 1998]。ヒト *Ocln* の変異は発達遅滞や大脳灰白質の石灰化を伴う先天性の難病である偽 TORCH 症候群を引き起こすため、OCLN は生体において重要な役割を担っていると考えられている [O'Driscoll et al., *AM J Hum Genet*, 2010]。しかし *Ocln* ノックアウト (KO) マウスではバリア機能や TJ の構造に大きな変化は見出せず、生体で示す表現型にどう影響するのか理解が進んでいない。またヒト OCLN は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染成立に必要な不可欠な宿主因子であり、OCLN のヒト特異的な HCV 感受性はその第二細胞外ドメインによって規定されているが [Ploss et al., *Nature*, 2009; Liu et al., *Virology*, 2010]、HCV 侵入における OCLN の具体的な役割は不明である。

#### 2. 研究の目的

(1) ヒト由来の細胞へ HCV が侵入する過程において、OCLN がどのように関与しているかを明らかにすること。

(2) OCLN および TRIC が生体・細胞レベルでバリア機能や TJ の形成に果たす役割を明らかにすること。

#### 3. 研究の方法

(1) hOCLN は HCV と直接結合しないが、hOCLN-EC2 (第二細胞外ドメイン) は別の HCV 宿主因子である CLDN1 と相互作用することが示唆されている [Nusrat et al., *Mol Biol Cell*, 2005]。我々は、hOCLN-EC2 のヒト特異的なアミノ酸が CLDN1 との結合に必要で、HCV 感受性を規定しているという仮説を立て、これら 4 つのヒト特異的なアミノ酸をマウス型に置換したヒト肝癌由来細胞株 (Huh7.5.1): *Ocln* KO 株 (10 種類) を樹立し、蛍光免疫染色法を用いてタンパク質の局在を確かめた。

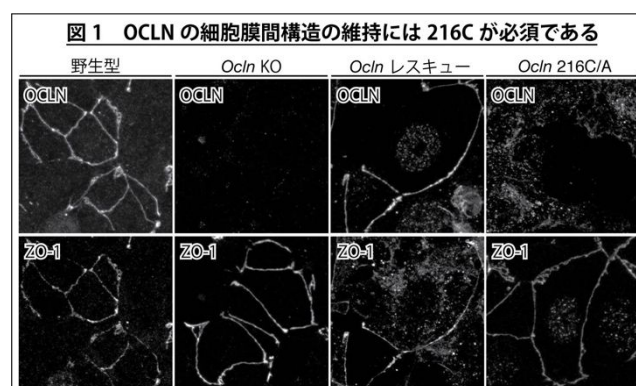
(2) 従来の野生型 (WT) イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来細胞株 (MDCK II) は、経上皮電気抵抗 (TER) の値が低値であるためバリア機能の比較が困難であった。CLDN2 は、選択的にイオンを通す細胞間チャネルとしての役割を果たす TJ 分子のため、KO するとバリア機能が格段に上昇する [Tokuda and Furuse, *PLoS One*, 2015]。我々はこのことに着目し、*Cldn2* KO 細胞を親株にすることにより、バリア機能の軽微な変化を検出する系を立ち上げた。この *Cldn2* KO 株に対して、CRISPR/Cas9 系を用いて、*Tric*、*Ocln* のシングル KO、並びに *Tric/Ocln* のダブルノックアウト (dKO) 細胞株を樹立した。なお、*Tric* と *Ocln* はゲノム上で隣り合っていることから、両遺伝子に対応する CRISPR を 1 度に導入し、両遺伝子の大部分を含む大きい遺伝子断片 (約 51 kbp) を欠失させた。

(3) TJ の選択的透過性 (電解質やマクロ分子など) に対する OCLN、TRIC 分子の寄与を明らかにするために、MDCK II 細胞の野生型、*Ocln* KO 細胞、*Tric* KO 細胞、*Tric/Ocln* dKO 細胞のバリア機能を TER 法 (電解質の透過性)、蛍光デキストラン法 (マクロ分子に対する透過性) を用いて検討した。

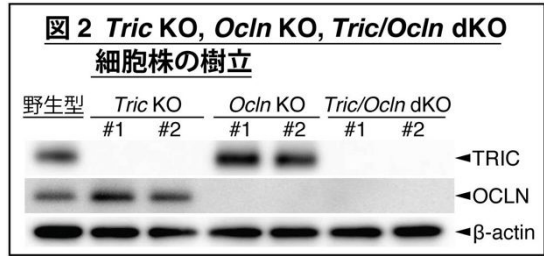
(4) TJ は CLDN が膜内で網目状に重合した構造をとり、OCLN と TRIC が網目の連結部位形成に寄与するという仮説がある [Ikenouchi et al., *Mol Biol Cell*, 2008, Van Itallie et al., *Mol Biol Cell*, 2017]。我々は凍結割断レプリカ法を用いて、MDCK II 細胞で樹立した KO 株と、野生型細胞株の TJ 構造を比較観察し、この仮説を検証した。

#### 4. 研究成果

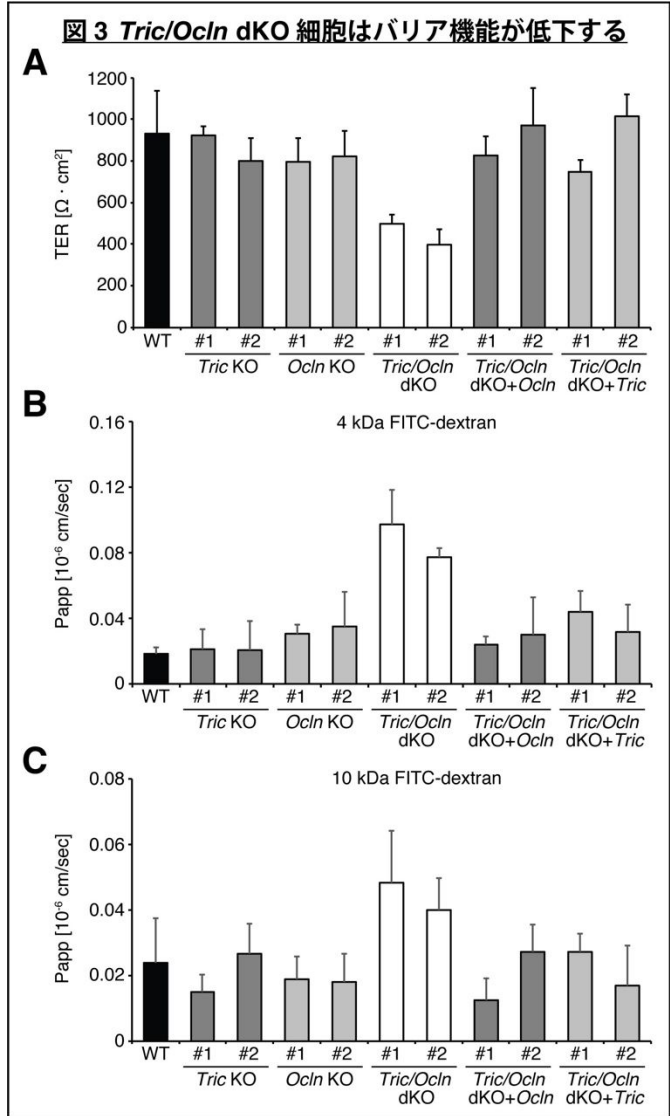
(1) HCV 感受性の高いヒト肝癌由来細胞株 Huh7.5.1 細胞を親株として、*Ocln* KO 細胞を樹立するとともに、野生型 *Ocln* レスキュー細胞株や、OCLN-EC2 アミノ酸変異株 10 種類を樹立した。その結果、アミノ酸配列 216 番目のシステインに変異を加えると、OCLN が細胞膜領域から消失することを見出し、OCLN が細胞膜構造を保つために必要な部位を同定した (図 1)。



(2) *Cldn2* KO MDCK II 細胞を親株とし、CRISPR/Cas9 系を用いて *Tric* KO, *Ocln* KO, および *Tric/Ocln* dKO 株をそれぞれ複数クローン樹立した。ウエスタンブロット法と(図 2)、蛍光免疫染色法を用いて、TRIC、OCLN 分子の発現が完全に消失したことを各 KO 細胞株で確認した。

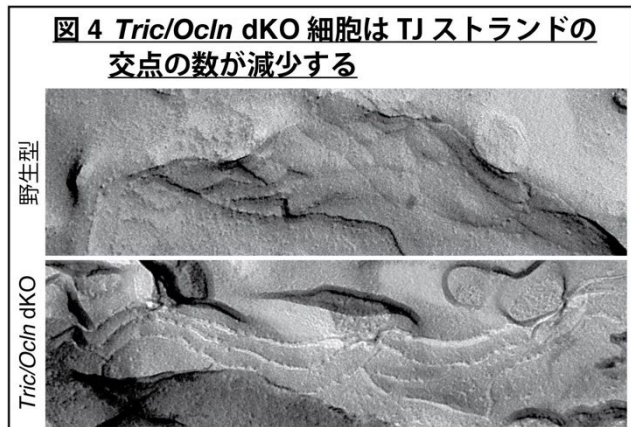


(3) トランスウェルに培養した MDCK II 細胞に対し、TER 法を用いて各細胞層の電気抵抗値を計測した。*Tric*, *Ocln* の単独の KO では電気抵抗値が変化しなかったのに対し、*Tric/Ocln* dKO 細胞では野生型の半分程度まで低下する様子が見られた(図 3A)。また、*Tric/Ocln* dKO 細胞から *Ocln*, *Tric* をレスキューした細胞株では抵抗値が野生型とほぼ同等のレベルまで上昇した(図 3A)。本データは、OCLN と TRIC が互いに協調してバリア機能の上昇に寄与することを強く示しており、長らく未解明であった TAMP ファミリーの分子機能解明の端緒を掴んだ。



(4) トランスウェルに培養した MDCK II 細胞に対し、蛍光デキストラン法を用いて細胞層のマクロ分子に対する透過性について調べた。比較的分子量の小さいデキストラン(3-5kDa, 10kDa)において、*Tric*, *Ocln* の単独の KO ではマクロ分子に対する透過性が変化しなかったのに対し、*Tric/Ocln* dKO 細胞では上昇する様子が見られた(図 3B,C)。加えて、*Tric/Ocln* dKO 細胞から *Ocln*, *Tric* をレスキューした細胞株では野生型細胞株とほぼ同等のレベルまで透過性が低下した。本データは、OCLN、TRIC はマクロ分子に対するバリア機能についても協調して貢献していることを示しており、電解質とマクロ分子を非選択的に透過していることも示唆されている。

(5) 凍結割断レプリカ法を用いて、野生型、*Ocln* KO、*Tric* KO および *Tric/Ocln* dKO 細胞株の TJ ストランドを電子顕微鏡で観察した。野生型、*Ocln* KO、*Tric* KO 細胞株の間では TJ ストランドの構造にほとんど変化は無かったが、*Tric/Ocln* dKO 細胞株においては TJ ストランド同士がクロスリンクする数が大幅に減少する様子が見られた。これは、TRIC と OCLN が協調して複雑な TJ ストランドの構築に貢献していることが示されており、これが上記のバリア機能の変化に起因していると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken Okai, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Akira C. Saito, Tetsuya Watabe, Kotaro Sugimoto, Daiki Fujita, Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, Hiromasa Ohira and Hideki Chiba	4. 巻 9(24)
2. 論文標題 A novel occludin-targeting monoclonal antibody prevents hepatitis C virus infection in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 16588-16598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 明、富川 直樹、杉本 幸太郎、千葉 英樹
2. 発表標題 HCV感染を阻害する新規オクルディン抗体の作用機序解明
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 明、東 智仁、杉本 幸太郎、東 淳子、菅野 雄耶、千葉 英樹
2. 発表標題 タイト結合分子オクルディン / トリセルリン のノックアウト細胞株樹立と機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢吹 峻也、齋藤 明、東 智仁、橋本 知樹、杉本 幸太郎、東 淳子、菅野 雄耶、千葉 英樹
2. 発表標題 CingulinおよびParacingulinノックアウト細胞のPhenotypeについて
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公立大学法人 福島県立医科大学基礎病理学講座  
<https://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----