

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659645

研究課題名（和文） 小動物モデルとしての HCV 感染性マウスの作製とその応用

研究課題名（英文） Creation of the HCV-infectable mouse as a small animal model

研究代表者

呉 一心 (GO ISSHIN)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60283363

研究成果の概要（和文）：C 型肝炎ウイルス（HCV）が感染できるマウスを作成するため、知られているヒト受容体の CD81, SRB1, CLDN1, OCLN をマウス肝細胞で発現するトランスジェニックマウス（Tg）を作成した。Tg マウス肝臓切片に HCV E2 蛋白質を反応させると、結合する。そこで、患者の血清に含まれる HCV を野生型マウス、Tg マウス各 5 匹に静脈注射したが、Tg マウスの血液中には HCV のゲノム RNA は検出されなかった。その原因を検討した結果、ウイルスの侵入過程がうまくいっていないことが判明した。マウス肝細胞に存在する阻害蛋白質の検索と他のヒト感染因子の検討を行った結果、マウス Cd81 と Ocln 蛋白質が阻害的に、ヒト NPC1L1 蛋白質が促進的に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to make the transgenic mouse to be infected by HCV, we created the transgenic (Tg) mouse in which human four factors were expressed in the mouse hepatocytes. After confirming that HCV E2 protein bound to the hepatocytes of Tg mouse, we injected HCV from the patient serum. We measured the viral genome RNA copy number in the blood by the qRT-PCR method. Result showed that HCV cannot infect to the hepatocytes of Tg mouse. We investigated whether mouse inhibitory proteins inhibit the entry of HCV into hepatocytes and/or another essential human factor is necessary for the entry of HCV. Results suggest that the mouse Cd81 and Ocln proteins inhibit the entry process and that human NPC1L1 protein enhances the entry of the virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：C 型肝炎ウイルス、HCV 感染性マウス、ウイルス受容体、感染因子

1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルス（HCV）はヒト肝臓に感染するが、マウス肝臓には感染しない。2011 年までに、ヒトの HCV 感染に関わる 4 因子、CD81, OCLN (occludin), SRB1 (scavenger receptor class B, type 1), CLDN1 (claudin1) が必須であり、最初の 2 因子はヒト蛋白質でなければならず、後の 2 因子はマウス蛋白質でも代用できることがわかっていた。

2. 研究の目的

マウス肝細胞特異的にヒト 4 因子を発現させ、HCV が感染できるマウスを作成する。

3. 研究の方法

ヒト CD81 cDNA, OCLN cDNA, SRB1 cDNA, CLDN1 cDNA, NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor) cDNA

はヒト肝臓 RNA を、マウス Cd81 cDNA, Ocln cDNA はマウス肝臓 RNA を用いて、RT-PCR 法にてクローニングした。

ヒトの 5 個の cDNA は CX-N2 発現ベクターに組み込み、リン酸カルシウム沈殿法にて、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 に遺伝子導入し、G418 含有培養液中で永久株をクローニングした。また、マウス Cd81 cDNA, Ocln cDNA は正の方向で、ヒト NPC1L1 cDNA はアンチセンスの方向で CX-N2 発現ベクターに組み込み、ヒト肝臓細胞株 Huh7.5.2 細胞にリポフェクトアミン法で遺伝子導入し、G418 含有培養液中で永久株をクローニングした。

ヒト CD81 cDNA, SRB1 cDNA, CLDN1 cDNA をアルブミンエンハンサー/プロモーターに連結した 3 つのコンストラクトをマウス受精卵に微小注射してトランスジェニック (Tg3) マウスを作成した。同様に、OCLN cDNA をアルブミンエンハンサー/プロモーターに連結した 1 つのコンストラクトをマウス受精卵に微小注射してトランスジェニック (Tg1) マウスを作成した。この両者を交配し、4 つのトランスジーンをもつマウス Tg4 (別名、CCSO マウス) を得た。

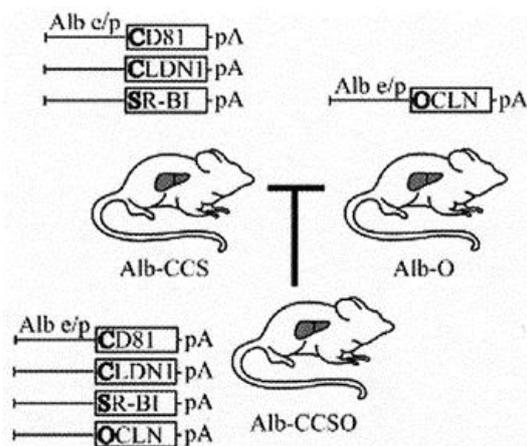


図 1. Tg4 (CCSO) トランスジェニックマウスの作成

Tg4 マウスでの 4 因子の発現は、マウス肝細胞抽出液をウエスタンブロット法にて解析し、4 因子とも発現していることを確認した (図 2)。

血液中のウイルス RNA は定量的 RT-PCR 法を用いた。初代肝細胞の分離は collagenase 灌流法を用いた。細胞融合はポリエチレン

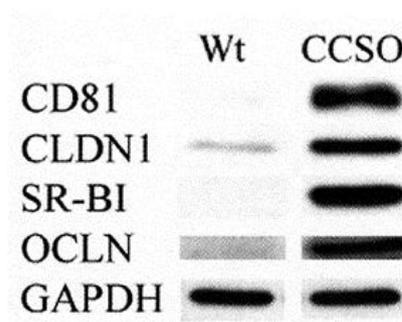


図 2. Tg4 マウスでのヒト 4 因子の発現

リコールにより行い、Hep3B 細胞は前もって EGFP 遺伝子を発現させた細胞を樹立していた。初代肝細胞は CAG-DsRed2 トランスジェニックマウスから分離した。融合した細胞は EGFP 陽性/DsRed2 陽性であり、セルソーターを用いて分離した。

HCV の肝細胞侵入は HCVpp を用いて、luciferase 活性により判定した。

4. 研究成果

(1) 用いた 4 因子の cDNA の検定は NIH/3T3 細胞にヒト 4 因子を発現する永久株を樹立して、この細胞に HCVpp が侵入できることで確認した。

(2) 次に、マウスにおける CD81 の検定として、HCV E2 蛋白質を培養細胞で作成し、Tg4 マウス肝臓切片にこの E2 蛋白質を結合させる実験を行ったところ、野生型マウス肝臓切片には E2 蛋白質は結合しなかったが、Tg4 マウス肝臓切片には E2 蛋白質が結合した (図 3)。

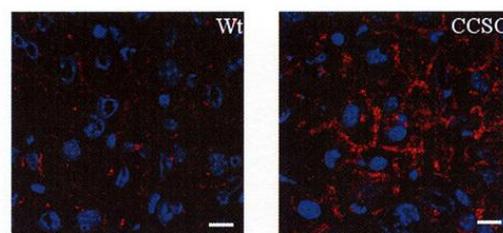


図 3. Tg4 (CCSO) マウス肝臓切片への HCV E2 蛋白質の結合。右図中、赤が E2 蛋白質が肝細胞表面にしていることを示す。左図は野生型マウス肝臓切片で、結合なし。

(3) そこで、この Tg4 マウスに、患者血清に

含まれる HCV を静脈注射した。2週間後に Tg4 (CCSO) マウスの血液を取り、ウイルスゲノム RNA を測定したところ、感度以下であり、ウイルス感染は認められなかった (Table 1)。

Wild-type mice (n = 5)	< 10 copies/100 μ L
CCSO mice (n = 5)	< 10 copies/100 μ L
Injected human serum	1.2×10^5 copies/250 μ L

(4) HCV 感染はウイルスの侵入・ウイルスゲノムの複製・ウイルス粒子形成の3段階に分類できる。Tg4 マウスではどの段階がおこらないかを検討した。Tg4 マウスから初代肝細胞を分離して、それに HCVpp を感染させたところ、ウイルス侵入が起こっていないことが判明した (図4)。

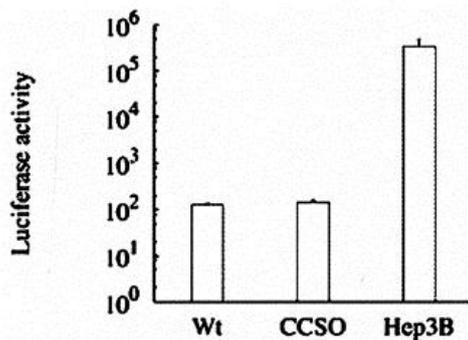


図4. マウス初代肝細胞へのウイルス侵入
右はポジティブコントロールの Hep3B 細胞。

(5) HCV が侵入できない原因として、(a) 4 因子だけでは不十分で、さらに別のヒト因子を必要とする、(b) マウス肝細胞には、侵入を阻害する蛋白質が存在する、可能性がある。(b) の可能性を検討するため、HCV が侵入可能な Hep3B 細胞 (EGFP でラベル) と CAG-DsRed2 マウスからの初代肝細胞 (DsRed2 でラベル) を細胞融合させ、セルソーターで、EGFP 陽性/DsRed2 陽性の細胞を集めた。融合細胞の HCVpp 感染能はコントロールの Hep3B 細胞に比し約 30 分の 1 と低下した (図5)。

(6) マウス肝細胞に存在する阻害蛋白質の候補者として、マウス Cd81, Ocln が考えられた

ので、HCV JFH-1 株が感染可能なヒト肝細胞

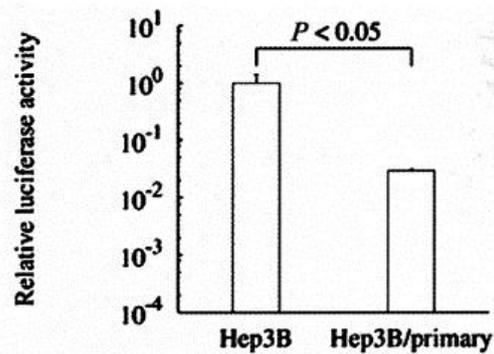


図5. 野生型初代肝細胞との融合
マウス肝細胞と融合させると、ウイルス侵入能が著明に低下する。

胞癌細胞 Huh7.5.1 に Cd81 と Ocln を遺伝子導入して、永久株を樹立した。また、同時に新規な感染因子としてヒト NPC1L1 をノックダウンさせるベクターを遺伝子導入し永久株を樹立した。これらの細胞に、HCVpp を感染させると、マウス Cd81 では 30%、マウス Ocln では 20% のウイルス侵入能が低下し、ヒト NPC1L1 のノックダウン株では 50% の侵入低下が観察された (図6)。ウイルスの侵入にマウス Cd81 や Ocln 蛋白質は阻害的に働き、ヒト NPC1L1 蛋白質は促進的に働くことが示唆された。現在、Huh7.5.1 細胞から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成中である。

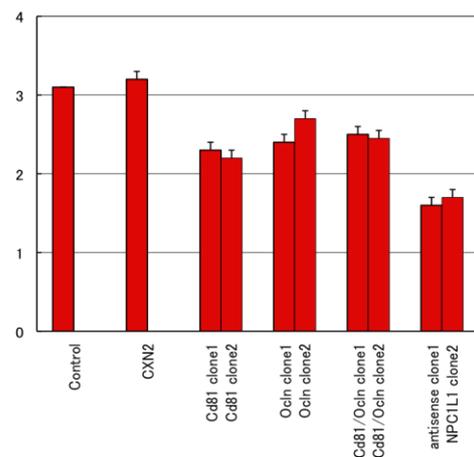


図6. マウス Cd81, Ocln, ヒト NPC1L1 蛋白質のウイルス侵入過程への影響

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Wu YX, Sato E, Kimura W, Miura N.

Phytother Res. 2013, in press.

DOI: 10.1002/ptr.4878.

(2) Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MT, Noritake H, Kimura W, Wu YX, Kobayashi Y,

Uezato T, Miura N: Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an upregulation of c-Myc target genes. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012, 417:601-6.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.014. Epub 2011 Dec 11.

(3) Wang BL, Zhang WJ, Zhao J, Wang FJ, Fan LQ, Wu YX, Hu ZB: Gene cloning and

expression of a novel hypoglycaemic peptide from *Momordica charantia*. **J Sci Food Agric.**

2011, 91:2443-8.

DOI i: 10.1002/jsfa.4485.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

呉 一心 (GO ISSHIN)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60283363