

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24700429
研究課題名(和文) マウスを用いたHCV感染モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of mouse infection model of HCV

研究代表者
小野 慎子(Ono, Chikako)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：30626437
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、不死化マウス肝臓細胞に4つのヒト型HCV受容体分子(hCD81, hSR-B1, hCLDN-1, hOCLN)および肝臓特異的なマイクロRNAであるmiR-122を安定的に発現させることで、HCVに感受性を示すマウス由来培養細胞株を樹立することができた。しかし高効率なHCV増殖や粒子産生は認められなかったため、継代によるマウス細胞への馴化HCVを得ることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We established mouse immortalized hepatocyte cell lines that stably expresses four HCV receptor candidates (hCD81, hSR-B1, hCLDN-1, hOCLN) and liver-specific micro RNA, miR-122. Although this cell line permits HCV entry and slight replication of HCV-RNA and virus protein expression were observed upon infection with HCV, efficient replication of HCV-RNA and production of infectious particles were not detected. Then, we could not obtain mouse-adapted HCV that can propagate efficiently in mouse cell lines.

研究分野：肝炎ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 感染症 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

HCV はいったん感染すると、惹起された肝炎が高率に慢性化し、持続感染したまま肝硬変、肝癌を誘発するヒト発癌ウイルスである。慢性肝炎に対する標準治療として、現在インターフェロンとリバビリンによる併用療法が行われているが、その効果は 50%程度であり決して十分とは言えず、新規治療薬の開発が強く求められている。しかしながら、HCV の感染・増殖機構については不明な点が多く、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌の発症機構はほとんど明らかにされていない。その理由として、HCV 感染の *in vivo*/*in vitro* モデルが長い間存在しなかったことが挙げられる。近年、劇症肝炎患者から分離された JFH-1 株を用いて、ヒト肝由来培養細胞での HCV の *in vitro* 感染系がようやく樹立された。しかしながら、JFH-1 ウイルスは、唯一の HCV 感受性動物であるチンパンジーに接種しても病原性を示さない、非病原性の実験室株である (Wakita *et al.*, 2005)。したがって、チンパンジーと JFH-1 ウイルスの組み合わせでも、HCV 感染による肝病態の発症機構を解析することはできない。

慢性炎症の発症機構の解明には、HCV に感染した肝細胞周辺に浸潤する、免疫担当細胞による免疫応答を *in vivo* で解析できるシステムが不可欠である。ヒトの肝臓細胞をマウスに移植した HCV の *in vivo* 感染モデルも存在するが (Tateno *et al.*, 2004)、このマウスは免疫不全であり、また、感染したヒト由来肝細胞以外はマウス細胞であることから、肝炎発症機構を解析することは不可能である。免疫能の健全なマウスの遺伝子を改変することにより、HCV に感受性を示すマウスモデルを樹立できれば、慢性炎症の発症機構を *in vivo* で詳細に解析することが可能となり、HCV 研究の進展に大きく貢献できるものと思われる。したがって、HCV 感染・増殖を許容するマウスモデルの構築は HCV 研究の最も重要な課題の一つである。

2. 研究の目的

(1) マウス由来肝細胞に HCV の感染、複製、粒子形成、出芽に必要な宿主因子を強制発現することにより、HCV 感染を許容するマウス不死化肝細胞を樹立する。

(2) 樹立したマウス細胞を用いて HCV を継代することで、馴化 HCV を作製する。最終的には HCV の生活環を解析可能なマウスモデルの樹立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) HCV-RNA 複製を許容するマウス不死化肝細胞の樹立

野生型マウス (6~8 週齢) から肝臓細胞を分離し、細胞の不死化を行う。その際、肝臓らしさをできるだけ維持する方法を用いる。HCV の複製に重要な宿主因子である miR-122 や、粒子産生に必須なアポリポタンパク質 ApoE の発現量が十分であることを確認し、樹立したマウス不死化肝細胞を用いて HCV RNA が恒常的に複製するレプリコン細胞を樹立する。レプリコン細胞で複製している HCV ゲノムの配列解析により、導入された適応変異を同定する。そしてそれらの変異を挿入した JFH-1 株の HCV RNA を *in vitro* transcription により合成し、元のマウス由来肝細胞へ導入する。その際、現在 HCVcc を最も効率的に増殖できるヒト肝由来培養細胞である Huh7.5.1 株が樹立された時と同様に、マウスのレプリコン細胞を抗 HCV 薬で治療し HCV RNA を排除した cured 細胞を用いて、効率的なウイルス増殖を試みる。

(2) HCV 感染を許容するマウス不死化肝細胞の樹立

cured 細胞において HCV 感染を成立させるために、現在 HCV の感染・増殖に必須とされているレセプター群等のヒト由来因子を、ウイルスベクターを用いて強制発現させることで、マウス細胞内での感染・増殖に馴化させた HCV 株を分離する。

現在までに、マウス肝細胞に HCV が侵入するためには、4 つのレセプター候補因子のうち少なくとも CD81 と Occludin (OCLN) がヒト由来でなければいけないという報告がある (Ploss *et al.*, 2009)。また、複製が可能であれば、レプリコン細胞にウイルスベクターで HCV の構造タンパク質を遺伝子導入することで粒子を産生させる trans-complementation system (Long *et al.*, 2011) により、ウイルス粒子産生が可能となる。以上の戦略を用いて、*in vitro* でのマウス培養系を確立し、マウス馴化 HCV を得る。

4. 研究成果

(1) マウス不死化肝細胞の樹立

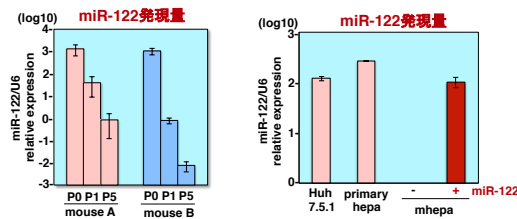
まず、野生型 C57BL/6 および Jcl:ICR マウス (6~8 週齢) の肝臓から、コラゲナーゼを用いた還流法により初代マウス肝細胞を分離した。その後 SV40 T 抗原あるいはヒトパピローマウイルス由来 E6/E7 とテロメラゼ逆転写酵素 hTERT を発現するレンチウイルスベクターを用いて不死化した。レンチウイルスベクターは、初代培養細胞のような細胞増殖が停止している細胞にも遺伝子導入が可能であるが、マウスの初代肝細胞に対しても効率よく遺伝子導入できることを確認した。その結果、SV40 T 抗原よりも E6/E7 と hTERT で不死化することで、肝臓特異的

マーカー遺伝子（アルブミン；alb、 α -1-antitrypsin； α AT、Dipeptidyl peptidase-4；DDP4、Glucose-6-phosphatase；G6Pase等）やアポリポ蛋白質 ApoB、ApoE、脂質輸送に関わる MTTP の発現などの肝機能が保持されている細胞株が得られた。

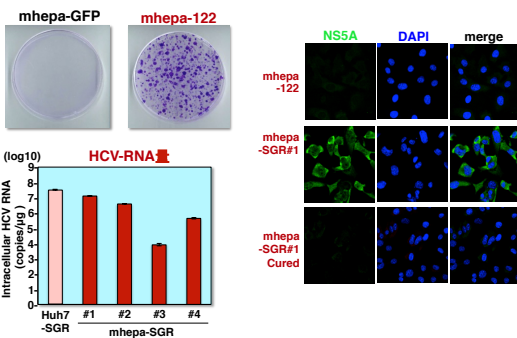
(2) JFH-1 株レプリコン細胞の樹立

マウス肝細胞の不死化の過程で、初代肝細胞と比較し、miR-122 の発現量が継代ごとに大きく減少していたため、miR-122 をレンチウイルスベクターで過剰発現させた。in vitro transcription により合成した HCV JFH-1 株のレプリコン RNA を電ポレーションによりマウス不死化肝細胞に導入したところ、miR-122 の発現を回復させることで、HCV ゲノムが恒常的に複製するレプリコン細胞の樹立が可能であった（図1参照）。得られたレプリコン細胞において、HCV 高感受性であるヒト肝癌由来培養細胞株 Huh7 細胞に匹敵するほど効率的な HCV RNA の複製やウイルスタンパク質の発現が認められた。しかし、レプリコン RNA の配列解析から、マウス肝臓細胞での複製に特異的な適応変異は認められなかった。

図1 miR-122の発現量は不死化過程で減少する



マウス不死化肝細胞由来レプリコン細胞の樹立

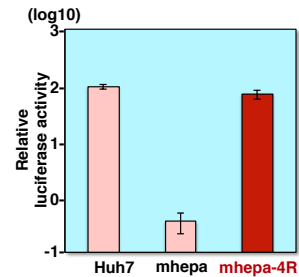


(3) HCV 受容体発現による HCV シュードウイルス侵入許容細胞の樹立

次に、樹立したレプリコン細胞から IFN α および HCV NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 処理により HCV RNA を除去した細胞 (cured 細胞) に対して、4 つのヒト由来感染受容体候補分子 (hCD81, hSR-B1, hCLDN-1, hOCLN) を同時に過剰発現させた。その際、Thosa asigna virus 由来 T2A および豚テシオウイルス (PTV-1) 由来 P2A (Kim et al., 2011) ペプチドを用い、マルチシストロニックなレンチウイルス発現系を作製した。2A ペプチドを挟むことで、ribosomal

skipping により同一の転写産物から複数の翻訳産物を合成できる。異なる抗生物質耐性遺伝子を持つ2つのベクターで2種類ずつ発現させ (hSRB1-T2A-hCLDN1-P2A-ピュロマイシン耐性遺伝子およびhCD81-T2A-hOCLN-P2A-ハイグロマイシン耐性遺伝子)、その後各抗生物質で選択することで安定的に発現している細胞 (mhepa-122/4R 細胞) が得られた。またその細胞に HCV のエンペロータンパク質を持つシュードタイプウイルス (HCVpv) を感染させると、Huh7 細胞と同程度の侵入効率が認められた (図2参照)。

図2 HCVpvの侵入



(4) マウス不死化肝細胞における HCV 感染・増殖

さらに mhepa-122/4R 細胞に HCVcc を接種したところ、低いレベルではあるが HCV のゲノム複製と一部の細胞におけるウイルスタンパク質の発現を確認できた。しかし、培養上清中への感染性粒子の産生は検出できなかった。粒子産生に必須な宿主因子であるアポリポタンパク質の中でも、ApoB は分子量が 500kDa と巨大であるため、ウイルスベクター等を用いた強制発現は難しい。しかし ApoB の持つ粒子産生における機能は ApoE が代償可能であることを我々は最近報告した (Fukuhara et al., 2014)。そのため、mhepa-122/4R 細胞での粒子産生を促進するために ApoE を過剰発現させたが、感染性粒子を検出することはできなかった。

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

以下全て査読有り

①Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Amphipathic α -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* 10(12):e1004534. (2014) doi: 10.1371/journal.ppat.1004534.

② Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y.
Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus.
J Virol. 88(10), pp5578-5594. (2014)
doi: 10.1128/JVI.03839-13

〔学会発表〕（計 6 件）

① Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura
「Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells」
The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity
2014年9月24日
奈良県新公会堂（奈良）

② Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura
「Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells」
33rd American Society for Virology, Annual Meeting
2014年6月21日
コロラド（アメリカ合衆国）

③ 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治
「miR-122ノックアウトHuh7細胞におけるHCV増殖」
第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月10日
神戸国際会議場（神戸）

④ 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治
「C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立」
第35回日本分子生物学会年会
2012年12月13日
マリンメッセ福岡（福岡）

⑤ 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、岡本 徹、松浦善治
「C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立」
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月14日
グランキューブ大阪（大阪）

⑥ Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura
「Establishment of mouse liver cell lines susceptible to hepatitis C virus infection」
The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity
2012年9月12日
徳島、淡路夢舞台国際会議場

6. 研究組織
(1)研究代表者
小野 慎子（ONO, Chikako）
大阪大学・微生物病研究所
特任研究員（常勤）
研究者番号：30626437