

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：18790454

研究課題名（和文）Claudin-WNK 系による消化器上皮タイトジャンクションの制御機構

研究課題名（英文）Regulation of tight-junction in gastrointestinal epithelia by claudin-WNK system

研究代表者 山内 小津枝 (YAMAUCHI KOZUE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：80397299

研究成果の概要：

消化器上皮、特に C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染レセプターとして働く肝細胞のタイトジャンクション蛋白が HCV 増殖に与える影響を解析した。occludin, claudin family および claudin のリン酸化によりその機能を制御している WNK family の発現により培養細胞での HCV の増殖は変化した、その反応は claudin および WNK の種類により異なっていた。肝細胞における claudin-1 以外の claudin と HCV 感染との関連について今後さらに検討する必要があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：claudin, HCV, 肝臓、WNK

## 1. 研究開始当初の背景

近年、tight junction 機能の破綻が様々な消化器疾患に関与することが示されその分子基盤の解明が必要となっている。最近、

claudin-1 が HCV の感染過程に重要な役割を担っていることが明らかにされたが、tight junction およびそれを形成する 20 種類以上の claudin family ならびに関連分子の肝細

胞における機能およびその制御の全体像は不明であり、さらにそれらが HCV 感染、薬剤耐性などどのように関わっているかは今後の大きな問題である。

## 2. 研究の目的

Claudin を中心とした tight-junction 蛋白の HCV 感染における役割を、特に WNK による機能制御の面から解析する。申請者は、claudin および WNK によるその制御研究において先駆的研究実績 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, Biochem Biophys Res Commun. 2005, Biochem Biophys Res Commun. 2005) を挙げてきた。Huh-7 細胞において tight junction 蛋白である、ZO-1、occludin、特に claudin 分子群の発現パターンと存在様式を、mRNA、蛋白、および共焦点レーザー顕微鏡で検討してそれぞれの分子の発現様式および HCV 感染・増殖との関連を明らかにする。また Huh-7 細胞での WNK family の発現を、mRNA、splicing、蛋白、細胞内発現などについて検討する。WNK kinase はすくなくとも 4 種類存在し、WNK1 は全身に、WNK4 は主として腎臓に発現、WNK2, WNK3 の機能は未知であり、これらの WNK 発現の claudin のリン酸化、局在、発現量および HCV 感染に対する影響を検討する。また、tight junction 機能を修飾する薬物、細菌毒素、増殖因子、サイトカインなどの tight junction 制御因子による HCV 感染・増殖制御および WNK、claudin

の役割を解明するため、WNK の強制発現、dominant negative および active form の WNK、siRNA による WNK および claudin の knockdown により、これらの因子の tight junction 制御能の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

HCV replicon 増殖細胞 (HCV-Feo, luciferase と neomycin phosphotransferase の癒合蛋白を reporter として発現する HCV-1b replicon を導入した Huh7 細胞、細胞中の luciferase 活性を測定することにより、HCV replicon の細胞内増殖をモニターすることが可能)、および HCV 粒子産生細胞 (HCV-2a 由来の JFH-1 株を産生する Huh7 細胞であり、培養液中の HCV core 蛋白量、および細胞内 HCV-RNA 量により HCV 増殖をモニターすることが可能) を用いた。これらの細胞での各種 claudin, occludin および WNK family の mRNA 発現を RT-PCR および realtime PCR で検討した。さらに、これらの細胞に interferon-alpha を作用させた場合の claudin および WNK 発現量の変化と HCV 増殖の関連を検討した。一方、HCV 増殖細胞に claudin, occludin, WNK を発現させた場合の HCV 増殖の変化を検討した。

## 4. 研究成果

Huh7 細胞においては、既報のごとく claudin-1 が最も強く発現していたが、他に claudin-6, -9 の発現が認められた。一方、

WNK family は WNK-1 および WNK-4 の発現が確認された。Interferon の添加により JFH-1 細胞からの HCV core 蛋白の放出は著明に抑制された。このとき、HCV receptor と考えられる claudin-1 および他の claudin family の発現は interferon によりむしろ増強した。WNK1, WNK3, および WNK4 の発現も interferon により増強した。Claudin-1 を JFH-1 細胞に強制発現させると培養上清中への HCV core 蛋白の放出は増加したが claudin-1 とともに WNK4 を強制発現させると培養上清中の HCV core 蛋白の増加は消失した。この WNK4 の効果は、kinase 活性を無くした mutant WNK4 の発現では認められず、claudin-1 の HCV 増殖増強の阻害は WNK4 の kinase 活性によっていることが示唆された。Claudin-2, -3, -5, -8 さらに occludin の発現では、HCV core 蛋白の放出の増加は生じず、HCV 増殖に主として claudin-1 が関与していると考えられた。

一方、replicon assay で評価した HCV の細胞内増殖は、各種 claudin、occludin、WNK 発現で変化がなく、claudin-1, WNK4 は HCV の細胞内増殖ではなく、ウイルス粒子の放出あるいは感染に関与していると思われた。

以上の研究の結果より claudin-1 の発現上昇は培養細胞系での HCV 増殖の亢進と関連しており、HCV の receptor として働くなど、HCV 増殖の密接な関連があることが示唆さ

れた。一方、Huh-7 細胞には claudin-1 以外に複数の claudin family が発現していることが確認された。一般に上皮細胞の tight junction においては異なる claudin の組み合わせにより形成される tight junction が多様な機能を発揮していると考えられており、肝細胞における claudin-1 以外の claudin と HCV 感染との関連について今後さらに検討する必要あると考えられた。Claudin-1 の強制発現により培養細胞における HCV 増殖が増強したにも関わらず、replicon assay で評価した細胞内 HCV 増殖に変化が認められなかったことは、既報のごとく claudin-1 が HCV receptor の一部として働きその細胞内侵入に深く関与していることを確認する結果であった。

また今回の検討により claudin をリン酸化しその機能を修飾することが知られている WNK4 の発現により claudin-1 による HCV 増殖促進効果が阻害された。これまで、claudin-1 の機能制御機構、特に HCV 感染における調節機構はほとんど知られておらず、今回の結果は WNK が claudin を介して HCV 増殖に関与する可能性を示した点で今後の詳細な検討が必要と考えられる。Interferon は著明に HCV 増殖を抑制するがその詳細な機序は依然明らかとはなっていない。Interferon は claudin の発現をむしろ増強させたことから、少なくとも claudin の発現抑制が interferon の抗 HCV 効果に直接関与し

ているとは考えられなかった。しかし、**claudin** をリン酸化させその機能を修飾し、上記のように **HCV** 増殖抑制作用を持つ可能性のある **WNK** の発現が **interferon** によって増強したことから、**interferon** の抗 **HCV** 効果の一部が **WNK** 発現増強による **claudin** の機能修飾である可能性が示唆された。

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 小津枝 (YAMAUCHI KOZUE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・  
医学研究員

研究者番号 : 80397299