

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 3 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究 B

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22790630

研究課題名（和文）小胞輸送分子 ESCRT を介した C 型肝炎ウイルスの感染制御

研究課題名（英文）Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway

研究代表者

玉井 恵一 (Tamai Keiichi)

宮城県立がんセンター研究所 がん先進治療開発研究部 主任研究員

研究者番号：40509262

研究成果の概要（和文）：我々は、エクソゾーム分泌とウイルス動態は酷似していることから、ESCRT経路とHCVとの関係を解析した。ESCRT構成分子の機能低下Huh7細胞を樹立し、JFH1を感染させたところ、上清に放出される感染性HCV粒子は減少した。免疫電顕をおこなうと、HCVコアタンパクとmultivesicular body内のintraluminal vesicleは共局在していた。以上のことからHCVはHrs依存性エクソゾーム経路を利用してアセンブリを行っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated that Hrs, an ESCRT-0 component, is critical for the budding of HCV through the exosomal secretion pathway. Hrs depletion caused reduced exosome production, which paralleled with the decrease of HCV replication in the host cell, and that in the culture supernatant. Furthermore, both the core protein and an envelope protein of HCV were detected in the intraluminal vesicles of MVBs. These results suggested that HCV secretion from host cells requires Hrs-dependent exosomal pathway in which the viral assembly is also involved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
平成 23 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000 円	900,000 円	3,900,000 円

研究分野：医歯薬学

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：ESCRT, Hrs, exosomes, HCV

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎はC型肝炎ウイルス（HCV）を原因とする慢性疾患であり高頻度に肝硬変・肝細胞癌を発生を起こすことから、その克服は社会的にも喫緊の課題である。C型慢性肝炎の治療にはペグインターフェロン・リバビリン併用療法による治療が施行されているものの治療抵抗性の症例も多く、HCV感染の病態をさらに詳細に解明することが急務となっている。多くのウイルス感染病態における細胞内小胞輸送系の重要性が明らかになるにつれて、HCV感染と小胞輸送の関係が注目されている。

我々は小胞輸送に関する仕事をサイトカイン受容体の研究から続けている。ESCRT小胞輸送経路の一分子であるHrsはユビキチン化されたタンパクをリソソームへ輸送する。申請者は哺乳類でのHrsの機能を明らかにするためにヒト細胞株を用い、Hrsがオートファジーに重要な分子であることを見いだした(Tamai, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007)。また、Hrsの臓器特異的ノックアウトマウスを世界に先駆けて作成し、*in vivo*においてもHrsが細胞の生存に必須な分子であることを見いだした(Tamai, et al. *Am J Pathol*, 2008)。近年、HCVコアタンパクはE6APによりユビキチン化されることやHCV感染がオートファジーを誘導することなど、HCVと小胞輸送の関係を示唆する実験結果が報告された(*J Virol*. 2006, 2007, 2008)。また、オートファジーはHCVのライフサイクルに重要な役割を果たしているとの報告もある(*Autophagy*. 2009, *PNAS*. 2009, *J Gastroenterol*. 2009)。

申請者は脇田博士（国立感染症研究所）より分与されたHCV全長を含むウイルス株JFH1を、Hrs特異的にノックダウンしたHuh7細胞に感染させ、上清に産生されるウイルス量が明らかに減少することを確認した。同様の現象をESCRT下流であるVPS4Bに関して確認した。また、ESCRT経路を阻害することでHCVコアタンパクの輸送が止まることも共焦点顕微鏡で確認しており、MVB形成不全によりHCVのアセンブリあるいは出芽が障害されている可

能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、「ESCRT小胞輸送系がHCV感染病態を制御する」という仮説を立て、その検証を進める。申請者の仮説が正しければ、HCVのアセンブリ・出芽が小胞輸送系によって制御されるのみならず、持続感染の原因となっている可能性もある。本研究では、誘導系ESCRT分子ノックダウン細胞を用いて上記可能性を検証し、ESCRT依存的な小胞輸送系-HCV感染の関連性について明らかにする。

### 3. 研究の方法

レトロウイルスベクターを用いて、Huh7細胞にESCRTタンパクHrs(ESCRT-0)、CHMP3(ESCRT-3)、VPS4B(ESCRT最下流)のsiRNA発現ベクターを安定に組み込むことにより、ESCRTタンパクを約1週間にわたってノックダウンすることが可能である。一方、これら分子のドミナントネガティブ変異体を発現誘導する細胞株も作成することで、*in vitro*においてESCRT経路を阻害しHCVの細胞内動態・増殖・出芽との関連を明らかにする。また、HCVの構造タンパクがユビキチン化されることでESCRT小胞輸送系路に認識され、感染増殖に関わることを証明する。

### 4. 研究成果

(1) ESCRT分子のHCVにおける役割を検討するために、まず、HCVが含まれるとされるエクソゾームとHrsの関連性を検討した。Hrsノックアウト樹状細胞においては、エクソゾームの放出量が抑制されており、ovalbuminによって刺激を行い、そのエクソゾームを回収したところ、OT-IトランスジェニックマウスのT細胞に対する抗原提示能も減少していた。以上のことからHrsはエクソゾーム放出に必須の分子であり、エクソゾームを介した抗原提示能にも関わっている可能性が示唆された。(BBRC, 2010)

(2) HrsノックダウンHuh7細胞にHCV株JFH1を感染させると、上清中に放出されるHCV-RNAは有意に減少した。細胞内

HCV-RNA やコアタンパク発現量には変化がなかったが、細胞内の感染性 HCV 粒子は Hrs ノックダウン細胞において減少していた。以上のことから、Hrs は HCV アセンブリに関与している可能性が示唆された。(3) HCV 感染細胞の上清を精製し、ショ糖密度勾配遠心にて分画すると、HCV コアタンパクとエクソゾームマーカーである CD63 はほぼ同じ分画に存在した。共焦点顕微鏡を用いて観察すると、multivesicular body と HCV コアタンパクは部分的に共局在しており、免疫電顕をおこなうと、HCV コアタンパクおよびエンベロープタンパクは multivesicular body 内の intraluminal vesicle にも存在していた。MVB 形成に必須とされる VPS4 ノックダウン細胞においても、HCV 放出の減少がみられた。エクソゾーム放出に必須の Rab27b ノックダウン細胞においても、HCV 放出の減少がみられた。以上のことから HCV は Hrs 依存性エクソゾーム経路を利用している可能性が示唆された。(Virology, 2012)

#### 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 9 件)

- [1] K. Tamai, M. Shiina, N. Tanaka, T. Nakano, A. Yamamoto, Y. Kondo, E. Kakazu, J. Inoue, K. Fukushima, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway, *Virology* 422 (2012) 377-385. 10.1016/j.virol.2011.11.009
- [2] Takafumi Hasegawa, M. Konno, T. Baba, N. Sugeno, A. Kikuchi, M. Kobayashi, E. Miura, N. Tanaka, K. Tamai, K. Furukawa, H. Arai, F. Mori, K. Wakabayashi, M. Aoki, Y. Itoyama, A. Takeda, Powered, The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of  $\alpha$ -Synuclein, *PLoS One* (2011).
- [3] S. Suzuki, K. Tamai, M. Watanabe, M. Kyuuma, M. Ono, K. Sugamura, N. Tanaka, AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system, *Biochem Biophys Res Commun* 408 (2011) 582-588. 10.1016/j.bbrc.2011.04.065
- [4] Y. Kondo, Y. Ueno, E. Kakazu, K. Kobayashi, M. Shiina, K. Tamai, K. Machida, J. Inoue, Y. Wakui, K. Fukushima, N. Obara, O. Kimura, T. Shimosegawa, Lymphotropic

HCV strain can infect human primary naive CD4+ cells and affect their proliferation and IFN-gamma secretion activity, *J Gastroenterol* 46 (2011) 232-241. 10.1007/s00535-010-0297-2

[5] E. Kakazu, Y. Ueno, Y. Kondo, J. Inoue, M. Ninomiya, O. Kimura, Y. Wakui, K. Fukushima, K. Tamai, T. Shimosegawa, Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor- $\alpha$  from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis, *PLoS One* 6 (2011) e23402. 10.1371/journal.pone.0023402

[6] J. Inoue, Y. Ueno, Y. Wakui, H. Niitsuma, K. Fukushima, Y. Yamagiwa, M. Shiina, Y. Kondo, E. Kakazu, K. Tamai, N. Obara, T. Iwasaki, T. Shimosegawa, Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern, *J Viral Hepat* 18 (2011) 206-215. 10.1111/j.1365-2893.2010.01301.x

[7] K. Tamai, N. Tanaka, T. Nakano, E. Kakazu, Y. Kondo, J. Inoue, M. Shiina, K. Fukushima, T. Hoshino, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein, *Biochem Biophys Res Commun* 399 (2010) 384-390. 10.1016/j.bbrc.2010.07.083

[8] N. Obara, K. Fukushima, Y. Ueno, Y. Wakui, O. Kimura, K. Tamai, E. Kakazu, J. Inoue, Y. Kondo, N. Ogawa, K. Sato, T. Tsuduki, K. Ishida, T. Shimosegawa, Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice, *J Hepatol* 53 (2010) 326-334. 10.1016/j.jhep.2010.02.029

[9] Y. Kondo, Y. Ueno, K. Kobayashi, E. Kakazu, M. Shiina, J. Inoue, K. Tamai, Y. Wakui, Y. Tanaka, M. Ninomiya, N. Obara, K. Fukushima, M. Ishii, T. Kobayashi, H. Niitsuma, S. Kon, T. Shimosegawa, Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes, *J Infect Dis* 202 (2010) 202-213. 10.1086/653496

[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

玉井恵一 (TAMAI KEIICHI)

宮城県立がんセンター研究所

研究者番号：40509262

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：