

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659585

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス侵入可能マウスの作製とその応用—感染癌のモデル動物作製に向けて

研究課題名(英文) generation of the HCV-infectable mouse-an animal model for inflammation cancer

研究代表者

上里 忠良 (Uezato, Tadayoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40115465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： in vitroの実験として、Huh7.5.1細胞にマウスCd81、あるいはOcln cDNAを高発現した細胞株を樹立して検討した結果、マウスCd81やマウスOcln蛋白質がウイルスの侵入を阻害していることは考えにくい。次に、作製したCCSO/CCSO;Cd81-/-;Ocln-/-マウスにHCVウイルスを静脈注射しても、感染はおこらなかった。以上のことから、マウス肝細胞がもつHCV侵入阻害因子はCd81でもOclnでもないことが明らかになった。

そこで、大量に4因子をマウス肝細胞で発現するために、ヒトCD81、OCLN、CLDN1、SCAVRB1をノックインするマウスを作製中である。

研究成果の概要(英文)： To investigate whether mouse Cd81, or Ocln inhibited the entry of HCV into mouse hepatocytes, we established the Cd81-expressing Huh7.5.1 cells and the Ocln-expressing Huh7.5.1 cells. HCV pp assay showed that no significant differences the infectivity of the virus among the parental, Cd81- and Ocln-Huh7.5.1 cells. This means that mouse Cd81 or mouse Ocln protein does not inhibit the entry process of HCV into mouse hepatocytes.

Next we planned to express the large amounts of human CD81, OCLN, CLDN1 and SCAVRB1 and made the targeting vectors to obtain the homologously recombined ES cells. We obtained 4 ES clones for CD81/OCLN expression and one clone for CLDN1/SCAVRB1.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：実験外科学

キーワード：C型肝炎ウイルス 感染モデルマウス ウイルス受容体 ヒト感染因子

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の原因は不明だが、肝細胞癌患者の80%がC型肝炎(HCV)ウイルスに感染している事実がある。特に、C型肝炎ウイルス持続感染患者が多いにもかかわらず、有効な治療法が見出せない原因の一つには、効率よくウイルス感染をおこす培養細胞がないことがあげられる。

C型肝炎ウイルスがマウスやラットの肝臓に感染しないのは、ヒト肝細胞はウイルス受容体を持つが、ネズミ肝細胞は受容体をもたないためと信じられている。そこで、C型肝炎ウイルス(HCV)受容体が研究されてきている。受容体の候補分子を歴史的に並べると、(1) **CD81** (Pileri et al.: Science 1998), (2) **SCARB1** (scavenger receptor class B type I) (Scarselli et al: EMBO J. 2002), (3) **Claudin-1** (Evans et al.: Nature 2007), (4) **Occludin** (Ploss et al.: Nature 2009) などがあげられる(図1)。

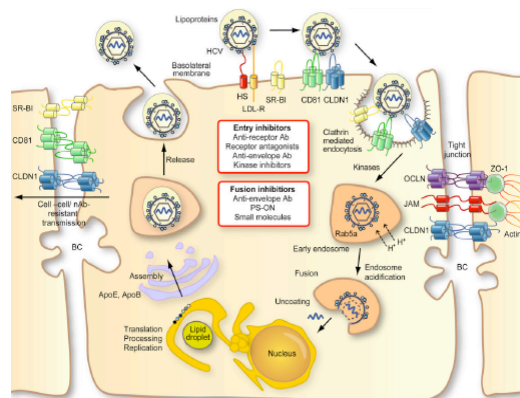


図1. C型肝炎ウイルスの感染関連分子

研究代表者は、HCV受容体タンパクをマウス肝臓に発現させ、マウス肝細胞にHCVが感染するような遺伝子操作マウスを作製(以後、CCSOマウスと呼ぶ)した。マウス肝細胞膜上に4つのヒト蛋白が発現していることはFACS(セルソーター)による解析で確認した。そこで、HCVを含んだ患者血清をCCSOマウスに静脈注射したが、マウス血清中にはウイルスは確認できなかった。そこで、CCSOマウスから初代肝細胞を分離して、この細胞にHCV偽粒子であるHCVpp(ウイルス膜にはHCVのE1/E2蛋白をもち、ウイルス粒子内には細胞侵入すると判定できるようにLuciferase遺伝子を組み込んだレトロウイルスゲノムがある)を感染させてみたが、ウイルスの侵入は認められなかった。しかし、同じCCSO4蛋白を発現させたマウス線維芽細胞NIH3T3細胞では、HCVppが侵入できた。このことは、申請者の作ったCCSO4蛋白は

機能をもっていることを証明しており、CCSOマウス肝細胞にHCVウイルスが侵入できないのはマウスの肝細胞にはHCV侵入を阻害する蛋白が存在している可能性があることを示唆している。そこで、HCVppが感染できるヒト肝細胞株Huh7.5にマウス初代肝細胞を細胞融合させた細胞では、著明なウイルス侵入阻害が観察された(Biomed Res 2011)。

本年6月に、マウスにアデノウイルスベクターを用いて100倍量のCCSO蛋白を一過性に発現させたマウスではHCVウイルスの侵入があること、それとマウス肝細胞内では侵入したウイルスRNAは複製されず、ただ壊されるだけであることが報告された(A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection, Nature 474: 208-211, 2011)。彼らの報告では、ヒトCD81とOccludinを過剰発現したマウスではほんのわずかなウイルス侵入があり、ヒト4蛋白を過剰発現させた時と、ヒトCD81とOccludin、マウスScarb1とClaudin1を過剰発現した時は著明なウイルス侵入がおこるという結果であった。

申請者は、自分たちのデータと合わせて、マウス肝細胞にはウイルス侵入阻害蛋白が存在し、それに打ち勝つために100倍という過剰なヒト2蛋白の発現が必須であると解釈した。その阻害蛋白はマウスCd81とマウスOccludinではないかという仮説をいだいた。また、アデノウイルスでは一過性発現にすぎないので、他の方法で常時100倍という過剰発現を維持するマウスを作製すればウイルス侵入は可能になるので、そのようなマウスを作製することにした。

### 2. 研究の目的

CCSOホモトランスジェニックマウスのかつCd81<sup>-/-</sup>;Occludin<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスを作製し、HCVウイルス侵入が可能かどうかを検討する。また、ヒトCCSO4蛋白を常時100倍過剰発現するマウスを作製する。

### 3. 研究の方法

CCSOマウスとCd81<sup>-/-</sup>マウスを交配し、一方CCSOマウスとOccludin<sup>-/-</sup>マウスを交配し、CCSO<sup>+/+</sup>;Cd81<sup>+/+</sup>マウスとCCSO<sup>+/+</sup>;Occludin<sup>+/+</sup>マウスを交配し、CCSO/CCSO;Cd81<sup>+/+</sup>;Occludin<sup>+/+</sup>マウスを得る。この雌雄マウスを交配して、CCSO/CCSO;Cd81<sup>-/-</sup>;Occludin<sup>-/-</sup>マウスを得る。

また、高発現マウスを得るため、アルブミン遺伝子座位にCD81/OCLNを、別のマウスのアルブミン遺伝子座位に

SCAVRB1/CLDN1 をノックインしたマウスを作製する (図2)。

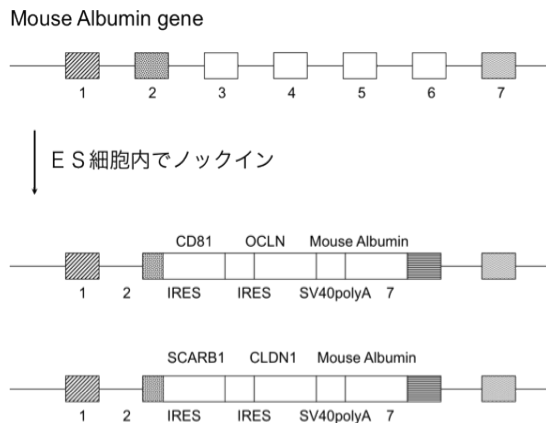


図2. ノックインマウスの作製

#### 4. 研究成果

in vitro の実験として、HCV が感染可能な Huh7.5.1 細胞にマウス Cd81cDNA を高発現した細胞株、OclncDNA を高発現した細胞株、Cd81cDNA と Ocln cDNA の両方を高発現した細胞株を樹立した。これらの細胞に HCVpp を感染させて、ウイルスの侵入を計測したところ、Cd81 高発現細胞では 25%、Ocln 高発現細胞では 15%、両方の高発現細胞では 15% の感染高率の低下を認めた (図3) のみであり、マウス Cd81 やマウス Ocln 蛋白質がウイルスの侵入を阻害していることは考えにくい。

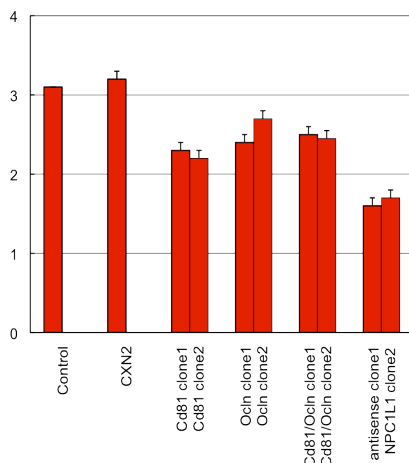


図3. マウス Cd81, Ocln 蛋白質の影響

次に、作製した CCSO/CCSO;Cd81<sup>-/-</sup>;Ocln<sup>-/-</sup>マウスに HCV ウイルスを静脈注射しても、感染はおこらなかった。以上のことから、マウス肝細胞がもつ HCV 侵入阻害因子は Cd81

でも Ocln でもないことが明らかになった。

最後に、以前の検討で CCSO トランスジェニックマウスの 4 因子の発現量を Huh7.5.1 細胞と比較してみると、特に CD81 と CLDN1 蛋白質の発現量が 10%以下であることがわかった (図4)。

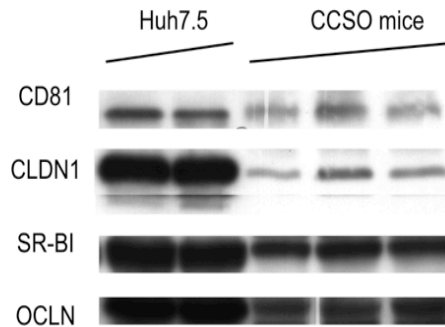


図4. CCSO マウスの 4 因子の発現量

そこで、大量に 4 因子をマウス肝細胞で発現するために、ヒト CD81、OCLN、CLDN1、SCAVRB1 をノックインするマウスを作製するための targeting vector を作製した。CD81/OCLN では、相同的組み換えをおこした ES 細胞が 4 個得られた。また、SCAVRB1/CLDN1 では、相同的組み換えをおこした ES 細胞が 1 個とれた。前者からキメラマウスを作製し、ActFLPe mouse と交配し、ノックインアレルを持ったヘテロマウスが 2 系統から得られている。このマウスと Irf7<sup>-/-</sup>マウスを交配し、Alb<sup>CD81/OCLN</sup>;Irf7<sup>+/-</sup>マウスが得られている。次はこのマウスと CCSO<sup>+/+</sup>;Irf7<sup>+/-</sup>マウスを交配し、CCSO<sup>+/+</sup>;Alb<sup>CD81/OCLN</sup>;Irf7<sup>-/-</sup>マウスを得る。このマウスに患者からの C 型肝炎ウイルスを静脈注射して、感染するかどうか検討する予定である。

また、SCAVRB1/CLDN1 を組換えた ES 細胞は間もなくキメラマウスを作製し、Irf7<sup>-/-</sup>マウスと交配し、最終的に Alb<sup>CD81-OCLN/CLDN1-SCAVRB1</sup>;Irf7<sup>-/-</sup>マウスを作る。このマウスにウイルスを注射して感染がおこるかどうか検討する。

#### 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 3 件)

① Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MTK, Noritake H, Kimura W, Wu Y-X, Kobayashi Y, Uezato T, Miura N: Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an up-regulation of c-Myc target genes. **Biochem Biophys Res Commun** 417: 601-606, (2012).

② Uezato T, Sato E, Miura N: Screening of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium. **Biomed Res** 33: 25-33, (2012)

③ Kimura W, Sharkar MTK, Sultana N, Islam MJ, Uezato T, Miura N: Generation and characterization of Tbx1-AmCyan1 transgenic reporter mouse line that selectively labels developing thymus primordium. **Transgenic Res** 22: 659-666, (2013).

〔学会発表〕（計 1 件）

① Sato E, Onuma Y, Fujie M, Adati N, Uezato T, Miura N, Ito Y : アフリカツメが得る次胚形成における遺伝子発現—その2、第46回日本発生物学会、2013年5月29日、松江

〔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〕

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/bio2/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上里 忠良 (UEZATO, Tadayoshi)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40115465