

## 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：24659603

研究課題名(和文)慢性肝炎モデルマウスの作製—複製因子の同定

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

研究代表者

三浦 直行 (Miura, Naoyuki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40165965

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)： 実験計画では、転写活性が存在しないことを想定していたが、50 bpのPol I promoterでも転写活性があることがわかった。蔗糖密度勾配法でウイルスの密度を測定した所、所定の密度であった。感染性をHuH7.5.1細胞を用いて、測定してみると、ほとんどの細胞で抗Core抗体で陽性を示した結果が得られた。

阻害剤を用いて、HCV genome RNAが複製をするかどうかを検討した結果、RNA copy数が3分の1に減少した。このことは、複製がおこなわれていることを示している。つまり、マウス複製因子でHCV ゲノムRNAの複製は可能であり、ヒト複製因子が必須ではないことが判明した。

研究成果の概要(英文)： Experimental plan expected that short promoter has no transcriptional activity to synthesize HCV genome RNA. Unexpectedly, the transgenic mouse showed that they produce HCV genome RNA in hepatocytes and also viral particles into serum. Using the mouse serum from the transgenic mouse, the virus infected Huh7.5.1 cells and produced Core protein in the cytoplasm. This means that the virus was infectious.

Next we investigated whether the HCV genome RNA can replicate in the mouse hepatocytes. When the replication inhibitor was injected into the abdomen of the mouse, the RNA copy number was decreased by 30% in the hepatocytes and serum. This result showed that mouse replication factor(s) were competent for viral RNA replication as human factor(s) do.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：C型肝炎ウイルス 複製因子 肝細胞癌 慢性炎症

## 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、HCV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小動物がないことがあげられる。

HCV感染は3つのステップから成る。第1ステップはウイルスの細胞への侵入、第2ステップはウイルスゲノムの複製、第3ステップはウイルス粒子形成である。歴史的には、HCV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、つまりウイルス侵入ができないためと信じられた。そこで、HCV受容体が研究されてきた。受容体および侵入に関わる分子を歴史的に並べると、(1) **CD81**, (2) **SCAVRB1** (scavenger receptor class B type I), (3) **Claudin-1**, (4) **Occludin** があげられる。

研究代表者は、HCV侵入に関わるヒト4蛋白をマウス肝細胞に発現させ、HCVが感染するようなトランスジェニックマウスを作製(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)。

2011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)。また、2010年6月には、全長のHCV genome cDNAをPol Iプロモーターにより発現するDNAコンストラクトをJFH-1株だけは感染・複製・粒子形成ができるHuh7.5.1細胞に遺伝子導入したところ、複製して培養液中にウイルス粒子が形成されたという報告(Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. J Virol 84: 5824-35, 2010)があった。

申請者は、感染の第二ステップである複製の重要性に注目し、マウス肝細胞には無いがヒト肝細胞には存在する複製因子を単離するためにconditional HCV genome transgenic mouse(以後、HCV cTgマウスと呼ぶ)を作製した。

## 2. 研究の目的

Huh7.5.1細胞から抽出したRNAでレンチウイルスHuh7.5.1ライブラリーを作製する。Pol Iプロモーター活性型にしたHCV cTgマウスから分離した初代肝細胞にこのレンチウイルスを感染させ、ウイルス複製能を付与するレンチウイルスを選別することで、ヒト肝細胞に存在する複製因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

conditional HCV genome transgenic (HCV cTg) mouseについて説明する(図1)。HCV genome cDNAの前にヒトポリメラーゼIプロモーターを、後にマウスポリメラーゼIターミネーターをつなぐと、HCVゲノムRNA全長が合成される。プロモーター中央部に、余分なDNAの両側にloxPという配列ではさんだDNAを挿入する。すると、余分なDNAがプロモーターの機能を破壊してしまうので、HCVゲノムRNAは作られなくなる。任意な時に、組換え酵素Creを発現する組換えアデノウイルスを静注すると、アデノウイルスのほとんどは肝臓に集まり、肝細胞内でCre蛋白ができる。すると、Cre酵素はloxPではさまれた余分なDNA

を切り出す。その結果、プロモーターは元の状態にもどり、HCV ゲノム RNA を作るようになる。

次に、miR-122 は肝細胞特異的に発現するマイクロ RNA であり、HCV ゲノム RNA の最初の部分に結合して、ゲノム RNA を安定化する (Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific micro RNA. *Science* 309:1577-81, 2005)。この 85 塩基からなる miR-122 を肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスも作製する予定であった。

#### 4. 研究成果

まず、HCV cTg mouse のトランスジーンのコピー数を決定した。A 系統は 200 copies/haploid、D 系統は 25 copies/haploid、J 系統は 1-2 copies/haploid であった。まず、A 系統のマウスの肝臓 RNA および血清中の HCV RNA のコピー数を決定したところ、 $10^4$  copies/ug RNA オーダー、血清は  $10^6$  copies/ml オーダーであった。実験計画では、転写活性が存在しないことを想定していたが、50 bp の Pol I promoter でも転写活性があることが判明した。D 系統は約 10 分の 1、J 系統では約 100 分の 1 のコピー数を示した。

次に、蔗糖密度勾配法でウイルスの密度を測定した所、所定の密度であった。HuH7.5.1 細胞を用いて、感染性を測定してみると、ほとんどの細胞で抗 Core 抗体で陽性を示した結果が得られた。

阻害剤を用いて、Pol I promoter で合成された HCV genome RNA が複製をするかどうかを検討した結果、RNA copy 数が 3 分の 1 減少した。このことは、複製がおこっていることを示している。つまり、マウス複製因子で HCV ゲノム RNA の複製は可能であり、ヒト複製因子が必須ではないことが明らかになった。

また、miR-122 については、マウスにもヒトと配列が保存されている mi-R122 が存在することがゲノムデータベースの検索から明らかになり、マウス因子で複製は起こる。

以上の結果をまとめると、HCV はヒト肝細胞には感染できるが、マウス肝細胞に感染できないのは、ウイルスの侵入に関わる因子がヒトでないといけなないので、必要十分なヒト受容体・感染因子を明らかにすれば、マウスも HCV が感染できるようになると結論づけられる。

#### 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 12 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 Sabine A, Agalarov Y, Hajjami NME, Jaquet M, Hagerling R, Pollmann C, Bebbler D, Pfenniger A, Miura N, Dormond O, Calmes JM, Adams RH, Makinen T, Kiefer F, Kwak BR, Petrova TV: Mechanotransduction, PROX1 and FOXC2 cooperate to control connexin 37 and calcineurin during lymphatic valve formation. **Dev Cell** 22: 430-445, (2012).
- ④ Bouvree K, Brunet I, del Toro R, Gordon E, Prahst C, Cristofaro B, Mathivet T, Xu Y, Soueidi J, Fortuna V, Miura N, Aigrot M-S, Maden CH, Ruhrberg C, Thomas JL, \*Eichmann A: Semaphorin 3A, Neuropilin-1, and PlexinA1 are required for lymphatic valve formation. **Circ Res** 111: 437-445, (2012).
- ⑤ Okano J, Kimura W, Papaionnou VE, Miura N, Yamada G, Shiota K, Sakai Y: The regulation of endogenous retinoic acid level through CYP26B1 is required for elevation of palatal shelves. **Dev Dyn** 241: 1744-1756, (2012).
- ⑥ Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, Evans KW, Taube JH, Sarker TR, Sphyrin N, Shariati M, Kumar SV, Battula VL, Herschkowitz JI, Guerra R, Chang JT, Miura N, Rosen JM, Mani SA: FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. **Cancer Res** 73: 1981-1992, (2013).
- ⑦ 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).
- ⑧ Gozo M, Aspuria P-J, Dong-Joo Cheon, Walts AE, Berel D, Miura N, Karlan BY, Orsulic S: Foxc2 induces Wnt4 and Bmp4 expression

during muscle regeneration and osteogenesis. **Cell Death Differ** 20: 1031-1042, (2013).

⑨ Ivanov IK, Agalarov y, Valmu L, Samuilova O, Houhou N, Hajjami MH, Norrmén C, Jaquet M, Miura N, Zangger N, Ylä-Herttuala S, Delorenzi M, Petrova TV: Phosphorylation regulates FOXC2-mediated transcription in lymphatic endothelial cells. **Mol Cell Biol** 33: 3749-3761, (2013).

⑩ Wu Y-X, Sato E, Kimura W, Miura N: Baicalin and scutellarin are proteasome inhibitors that specifically target chymotrypsin-like catalytic activity. **Phytother Res** 27: 1362-1367, (2013).

⑪ Bowles J, Secker G, Nguyen C, Kazenwadel J, Truong V, Frampton E, Curtis C, Akoczylas R, Davidson T-L, Miura N, Hong Y-K, Koopman P, Harvey NL, Francois M: Control of retinoid levels by CYP26B1 is important for lymphatic vascular development in the mouse embryo. **Dev Biol** 386: 25-33, (2014).

⑫ Noritake H, Amin MB, Nakamura K, Islam MJ, Wu Y-X, Hashimoto S, Uddin MKM, Suda T, Kobayashi Y, Sugimura H, Miura N: TGF $\alpha$ , c-MYC, mutated CTNNB1 and their combinations act distinctly on the Hep3B tumors in nude mice. **Med J Osaka Univ** 56: 11-21, (2014).

〔学会発表〕（計 6件）

① Uddin MKM, Kimura W, Amin MB, Nakamura K, Islam MJ, Yamagishi H, Miura N: The loss of Foxc2 in the outflow tract links the interrupted arch in the conditional Foxc2 knockout mouse. The 7<sup>th</sup> TAKAO international symposium on the etiology and morphogenesis of congenital heart disease. July 13, 2013, Tokyo.

② 木村航、Uddin MKH、山岸敬幸、三浦直行：コンディショナルFoxc2ノックアウトマウスを用いた心臓形成遺伝子のドメイン解析、第11回心臓血管発生研究会、2012年10月14日、磐梯熱海

③ 三浦直行、木村航、ウディン モハマド、中村佳寿美：コンディショナルFoxc2ノックアウトマウスを用いた大血管形成の分子機構の解明、第85回日本生化学会大会、2013年9月11日、横浜（シンポジウム）

④ 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回日本発生生物学会、2013年5月29日、松江

⑤ Islam M、則武秀尚、三浦直行：C型肝炎ウイルスの感染機構の解析、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月、名古屋

⑥ Noritake H, Amin M, Kobayashi Y, Miura N: TGF $\alpha$ , c-MYC, mutated CTNNB1 and their combinations act distinctly on the Hep3B tumors in nude mice. Keystone Symposium on “Developmental pathways and cancer: Wnt, Notch and Hedgehog”, February 4, 2014,

〔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

三浦 直行 (MIURA, Naoyuki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40165965