

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860572

研究課題名(和文) ウイルスライフサイクルの破綻によるC型肝炎ウイルス排除

研究課題名(英文) Role of Hrs in life cycle of hepatitis C virus

研究代表者

玉井 恵一 (TAMAI, Keiichi)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：40509262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はESCRT小胞輸送分子であるHrsがHCVのライフサイクルに関与するかどうかを、ヒト化肝臓マウスを用いて検討した。その結果、ヒト化肝臓をアデノウイルスを用いてHrsをノックダウンすると、マウス血清中のHCV量が減少することが判明した。今後は検討回数を増やし、HCVライフサイクルのどの段階が障害されているかを解析する必要がある。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the role of Hrs, known as ESCRT proteins, in HCV life cycle, we check the HCV-RNA in serum of chimeric liver mice. We demonstrate that the decrease of HCV-RNA in mouse serum when hrs is knocked down using adenoviral shRNA vector. Further study will be needed to elucidate the precise mechanisms of hrs-dependent HCV life cycle in humanized mice liver.

研究分野：消化器学

キーワード：HCV

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・肝細胞癌発生を引き起こす。その罹患率は、世界人口の 3% (1 億 7000 万人) 我々国では約 200 万人が感染していると推定される。従って、その克服は全世界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・テラプレビル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存在し、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。

申請者はこの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 (Endosomal-Sorting Complex Required for Transport) 小胞輸送経路の最上流分子である Hrs は、ユビキチン化されたタンパクを multivesicular body を経てリソソームへ輸送する。申請者は、この Hrs がオートファジーにも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研究結果が報告された (J Virol. 2006, 2007, 2008)。そこで、申請者は細胞内小胞輸送の点から、Hrs が HCV 感染増殖に関わると考え検証した結果、Hrs は HCV の放出に必須であること、さらにその放出経路はエクソゾーム放出経路を利用していることを、in vitro 感染実験系にて突き

止めた (図 1) (Tamai, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2010, Virology, 2012)。Hrs は小胞の中に小胞を取り込む multivesicular body を形成するためにも必須の分子であり (図 2)、これらのことから、放出に関わる機構は HCV が multivesicular body でエンベロープタンパクを含むリン脂質二重膜をまとって粒子を形成するためだと考えられた。一方で、HCV の replication は脂肪滴周辺で起こり、粒子形成を行うということも知られている。HCV のライフサイクルはいまだ全容解明には至らず、ライフサイクルには細胞内の複数の輸送経路が必要であると考えられ、その詳細は不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、「ESCRT 小胞輸送系が HCV 感染病態 (C 型肝炎) を制御する」という仮説を in vivo において検討し、創薬につながる詳細なメカニズムを明らかにする。本研究では、ヒト肝細胞に置換されたヒト化マウスを用いて ESCRT の関与する HCV 粒子形成の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

JHCV 株 JFH1 はマウス肝に感染しない。そこで、uPA NOG マウスおよびチロシンキナーゼ (TK) Tg NOG マウス (実験動物中央研究所より購入) にヒト正常肝細胞 (Lonza 社より購入) を移植したヒト化肝臓マウスに JFH1 を接種し、感染が成立することは血清の JFH1-RNA 量を測定して確認した。Hrs あるいは VPS4 に対する shRNA 発現ベクターをアデノウイルスベクターに載せ、マウス尾静脈から接種し、ヒト肝細胞をノックダウンした上で JFH-1 を感染させる。ノックダウン効率は、ヒト Hrs 特異的 real-time

primer を用いて確認する。このヒト化肝臓マウスはマウス肝細胞も混在するため、real-time PCR をかける際は、human GAPDH, human actin を内部コントロールとして補正をかける。HCV 排除が誘導されるかをまず血清中の HCV-RNA を測定することで検討する。血清中の HCV-RNA が Hrs ノックダウンマウスで低下していれば、次に、細胞内の HCV-RNA および感染価 (focus forming unit, ffu) を測定して、HCV ライフサイクルのどの段階が阻害されているかを検討する。これらの解析から、in vivo における HCV 感染状態での ESCRT 経路の役割が明らかとなり、またこの経路を障害することで、HCV ライフサイクルのどのステップが障害されるかが判明する。

4 . 研究成果

はじめに uPA NOG マウスを用いて、ヒト化肝臓マウスの作成を行った。血清中の human albumin 濃度を測定して、ヒト肝細胞への置換率を検討したところ、10 ng/ml 程度のアルブミンが検出された。このヒト化肝臓マウスに JFH1 を感染させたところ、一過性には感染したが、長期にわたる持続感染は観察されなかった。

次に、TK-NOG マウスを用いて、ヒト肝臓マウスの作成を行った。ガンシクロビルを投与し、肝障害を発症させ、正常ヒト肝細胞を経脾臓的に移植した。血清中の human albumin を測定したところ、uPA-NOG マウスの時よりも高いアルブミン濃度が得られた。このマウスに JFH-1 を感染させたところ、長期にわたって HCV 感染が持続した。ここにアデノウイルスベクターに載せた Hrs にたいする shRNA を感染させたところ、血清中の HCV-RNA が減少することが判明した。

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6件)

1. Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling, Z. Watanuki, H. Kosai, N. Osanai, N. Ogama, M. Mochizuki, K. Tamai, K. Yamaguchi, K. Satoh, T. Fukuhara, M. Maemondo, M. Ichinose, T. Nukiwa, N. Tanaka, *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 455 269-276.10.1016/j.bbrc.2014.11.003
2. Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma, K. Tamai, M. Nakamura, M. Mizuma, M. Mochizuki, M. Yokoyama, H. Endo, K. Yamaguchi, T. Nakagawa, M. Shiina, M. Unno, K. Muramoto, I. Sato, K. Satoh, K. Sugamura, N. Tanaka, *Cancer Sci* (2014) 105 667-674.10.1111/cas.12406
3. Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate in the peripheral development and function of B-cells, T. Nagata, K. Murata, R. Murata, S.L. Sun, Y. Saito, S. Yamaga, N. Tanaka, K. Tamai, K. Moriya, N. Kasai, K. Sugamura, N. Ishii, *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 443 351-356.10.1016/j.bbrc.2013.11.029
4. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer, T. Nakagawa, H. Endo, M. Yokoyama, J. Abe, K. Tamai, N. Tanaka, I. Sato, S. Takahashi, T. Kondo, K. Satoh, *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 436 319-324.10.1016/j.bbrc.2013.05.101 S0006-291X(13)00908-X [pii]
5. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer, T. Imai, K. Tamai, S. Oizumi, K. Oyama, K. Yamaguchi, I. Sato, K. Satoh, K. Matsuura, S. Saijo, K. Sugamura, N. Tanaka, *PLoS One* (2013) 8 e62002.10.1371/journal.pone.0062002 PONE-D-12-39257 [pii]
6. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer, H. Endo, T. Shiroki, T. Nakagawa, M. Yokoyama, K. Tamai, H. Yamanami, T. Fujiya, I. Sato, K. Yamaguchi, N. Tanaka, K. Iijima, T. Shimosegawa, K. Sugamura, K. Satoh, *PLoS One* (2013) 8 e77070.10.1371/journal.pone.0077070

〔学会発表〕(計 2 件)

玉井恵一, 菅村和夫, 田中伸幸 CD274(-)細胞分画は胆管癌細胞株においてがん幹細胞様の性質を有する 第 99 回日本消化器病学会総会(シンポジウム) 鹿児島、2013.3.

The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. BEX2 plays critical roles for maintaining dormant cancer stem cells. Keiichi Tamai, Mao Nakamura, Mai Mochizuki, Naoko Ogama, Misa Yokoyama, Kazunori Yamaguchi, Kennichi Satoh, Kazuo Sugamura, Nobuyuki Tanaka. Sep. 25, 2014 Yokohama, Japan.

〔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：
出願年月日：
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・上席主任研究員

研究者番号：40509262

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者