

博士(医学) 彦坂圭介

論文題目

Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry.

(ヒト CD81、claudin-1、scavenger receptor、occludin の発現はマウス肝細胞に C 型肝炎ウイルスの感染性を付与しない)

論文の内容の要旨

[はじめに]

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、肝炎、肝癌の発症の主な原因である。現在の化学療法は、約半数の患者には有効でなく、未だ根本的な治療法が確立されていない。HCV に感染するのはチンパンジーなど飼育やコスト面で障壁をもつ動物に限られる。実験動物として一般的に普及しているマウスは HCV に感染しない。ヒト CD81、claudin-1 (CLDN1)、scavenger receptor class B type I (SR-BI)、occludin (OCLN) をマウス由来の培養細胞で発現させると HCV シュードタイプ粒子 (HCVpp) に感染するようになるという報告がなされた。そこで、HCV 感染モデルマウスを作製するために、ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN を肝臓特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、HCV の感染性について検討した。

[材料ならびに方法]

ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN の cDNA をヒト肝臓の total RNA よりクローニングし、アルブミンエンハンサー・プロモーターの制御下で発現する発現ベクターに組み込んだ。この発現ベクターを受精卵に微小注射し Tg マウスを得た。ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN 遺伝子を持つ個体を識別するために、サザンブロット解析と PCR を行った。また、遺伝子を持つマウスを用いてウェスタンブロット法によって、ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN タンパク質の肝臓での発現を調べた。

ヒト CD81 や SR-BI との結合が知られている HCV エンベロープタンパク質 E2 のリコンビナントタンパク質を作製するために、遺伝型 1b の HCV タンパク質発現ベクター pCAGGSc60-p7 から E2 のアミノ酸領域 (384-660) をクローニングし N 末から tPA-E2-6×His というリコンビナントタンパク質を発現するベクターを作製した。このベクターを HepG2 細胞にポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションし、E2 タンパク質を培養上清から精製した。E2 タンパク質と Tg マウスの肝臓切片を反応させ、E2 タンパク質との結合を調べた。

C 型肝炎患者血清をマウスに尾静注し、2 週間後のマウス血清を採取、real-time RT-PCR 法を用い HCV の RNA ゲノムを検出した。HCVpp は murine leukemia virus gag-pol 発現ベクターとトランスファーベクター (レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現する)、HCV エンベロープタンパク質 (E1E2) 発現ベクターを 293T 細胞にリン酸カルシウム沈殿法を用

いてコトランスフェクションして得た。マウス初代肝細胞は、コラーゲナーゼ溶液を門脈より灌流させることによって得た。Hep3B とマウス初代肝細胞の融合細胞はポリエチレングリコール 4000 を用いて作製した。

[結果]

ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN タンパク質を肝臓で発現する Tg マウスを得た。このマウスの肝臓の切片に対して、リコンビナント E2 タンパク質を反応させると野生型マウスに比べて強く結合することが分かった。E2 タンパク質の結合部位は CD81 タンパク質と SR-BI タンパク質の局在とよく似ていた。

次に C 型肝炎患者より採取した血清を Tg マウスと野生型マウス (各 5 匹) に尾静注し、2 週間後にマウス血清を採取し、血清中の HCV RNA を real-time RT-PCR 法によって測定すると、Tg マウス、野生型マウスともに HCV RNA を検出しなかった。そこで、マウスから初代肝細胞を採取し、in vitro での HCV 感染性について検討を行った。HCVpp に感染すると分かっているヒト肝癌細胞 Hep3B と Tg マウス初代肝細胞に HCVpp を感染させ、72 時間後にそれぞれの細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を調べたところ、Hep3B 細胞ではルシフェラーゼ活性が高値を示したが、Tg マウスからの初代肝細胞では野生型と同じくルシフェラーゼ活性を示さなかった。

HCVpp 感染が Tg マウスで起こらない理由を調べるために、Hep3B 細胞と野生型マウス初代肝細胞の融合細胞を作製し、感染効率を調べたところ、Hep3B 細胞の感染効率に比べて約 35 倍低い感染効率を示した。

[考察]

ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN をマウス由来の培養細胞にトランスフェクションし HCVpp の感染効率を検討した研究が報告されている。その中で、NIH3T3 細胞 (マウス線維芽細胞) では高効率に感染するが、L929 細胞 (マウス線維芽細胞) や Hepa1.6 細胞 (マウス肝癌細胞) などでは感染効率が低い。我々の実験でも、L 細胞 (マウス線維芽細胞) ではヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN をトランスフェクションしても感染効率を上げなかった。よってマウス肝細胞において、ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN タンパク質の発現が必ずしも HCV の感染には十分ではないことが示唆された。また野生型マウスの初代肝細胞とヒト由来の Hep3B 細胞の融合細胞の結果より、感染経路において感染を阻害するような因子がマウスの肝細胞に存在する可能性があることが考えられる。さらに、感染効率を上げない細胞には感染に必須なさらなる別の因子が必要である可能性も否定できない。

[結論]

ヒト CD81、CLDN1、SR-BI、OCLN タンパク質の発現はマウスの肝細胞において HCV の感染性を付与するには不十分であり、マウスが HCV の感染性を獲得するにはさらなる工夫をすることが必要である。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝疾患の主要な原因ウイルスである。汎用性の高い小動物での感染モデルが確立していないことが、HCVの感染増殖機構、病原性発現機構の研究を進める上で大きな障害となっている。近年、培養細胞系での解析から、HCVの感染受容体分子としてCD81、claudin-1（CLDN1）、scavenger receptor class B type I（SR-BI）、occludin（OCLN）が見出され、これらのヒト由来蛋白質をマウス細胞株に発現させることにより、HCVシールドタイプ粒子（HCVpp）が感染性を示すことが報告された。そこで、申請者はHCV感染モデルマウスを樹立するため、ヒトCD81、CLDN1、SR-BI、OCLNを肝臓特異的に発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作製しHCVの感染性を検討した。

ヒト肝臓RNAよりCD81、CLDN1、SR-BI、OCLNのcDNAをクローン化し、アルブミンプロモーター・エンハンサーの支配下でこれらを発現するベクターを構築した。発現ベクターを受精卵へ導入しTgマウスを作出した。目的遺伝子の組み込みをサザンブロット法等で、さらに蛋白発現をウエスタンブロット法で解析し、ヒトCD81、CLDN1、SR-BI、OCLNを肝臓で発現するTgマウスを取得することに成功した。本TgマウスへC型肝炎患者血清を静注することによりマウス肝臓でHCVが感染増殖しうるかを検討したが、これまでのところHCV感染を示す知見は得られていない。しかしながら、Tgマウス肝臓切片とHCV蛋白質との結合解析から、HCV感染に重要な役割を有するエンベロープE2蛋白質がTgマウスの肝組織と結合しうることを示した。このような結合は野生型マウスでは観察されておらず、本Tgマウスに特徴的であると示唆された。

本研究は極めて挑戦的であり、HCV受容体4蛋白質を発現するTgマウスを樹立した初めての研究である点、また、マウス肝臓においてHCVの感染、侵入を許容するためには、ヒトCD81、CLDN1、SR-BI、OCLNの発現では十分でないことを見出した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 鈴木 哲朗
副査 梶村 春彦 副査 小杉 伊三夫