



Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus and leads to severe hepatic steatosis in transgenic mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Mohammod, Johirul Islam メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2817

博士(医学) Islam Mohammad Johirul

論文題目

Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus and leads to severe hepatic steatosis in transgenic mice

(トランスジェニックマウスでは、Pol I 転写による C 型肝炎ウイルスゲノム RNA が複製し、感染性ウイルスを生成して高度の肝臓脂肪症を発症する)

論文の内容の要旨

C 型肝炎ウイルス(HCV)に感染した慢性患者は、末期肝臓病および肝細胞癌を高頻度に発症する。HCV に対する肝細胞の損傷を抑制する薬剤とワクチンの開発には C 型肝炎モデルマウスが必要不可欠である。これまで、慢性 HCV 感染症患者に見られるウイルス構造および非構造の細胞変性の役割を調べるため、3 つのグループが、マウスの作成に挑戦した。それぞれヒトアミロイド P 成分のプロモーター、アルブミンエンハンサー/プロモーターおよび α 1-アンチトリプシンプロモーターの制御下で、全長 HCV ゲノムからなる cDNA を用いたトランスジェニックマウスであった。しかしながら、3 つのグループのトランスジェニックマウスでは、導入遺伝子は完全な 5'および 3'非翻訳領域(UTR)が含まれていなかったため、3 グループのトランスジェニックマウスのいずれにも、ウイルス粒子は生成されなかった。そこで我々は、HCV ポリタンパク質プロセッシング、ゲノム RNA 複製およびウイルス粒子の形成がおこるトランスジェニックマウスを作成することに挑戦した。

[材料ならびに方法]

HCV JFH-1 ゲノムからなる cDNA の 5'末端に Pol I プロモーターを、3'末端に Pol I ターミネーターを配置したコンストラクトを作成した。この DNA フラグメントを C57BL/6 系統の受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作成した。マウスの遺伝子判定は PCR によって行った。マウスは浜松医科大学の実験動物委員会の承認のもと作成された。

トランスジェニックマウスの解析として、Huh7.5.1 細胞を用いた感染実験、マウスの肝臓で HCV core 蛋白質の免疫染色による検出、HCV RNA の確認のための PCR を行った。

[結果]

Pol I プロモーターの制御下のもと完全長 HCV ゲノムを発現する 17 系統のトランスジェニックマウスの作出に成功した。作成したマウスでは既に HCV のウイルスゲノム RNA が、マウスの肝細胞内に発現していた。この 17 系統のマウスの中で、一倍体あたり導入遺伝子のコピー数が多い(A から D 系統)4 系統と、一倍体あたり 2 コピーの導入遺伝子のトランスジェニックマウス(J 系統)を解析に使うために維持した。本研究では、これらの系統の中で最も HCV のウイルスゲノム RNA 最高頻度で発現した A 系統のマウスを用いて多くの実験を行った。面白いことに HCV RNA コピー数は肝臓組織

で最も高かった。A 系統マウスは、一倍体あたり HCV 導入遺伝子で最多のコピー数 (~200)を持っていた。このマウスでは、全肝臓 RNA でマイクログラムあたり $\sim 3 \times 10^4$ の HCV の RNA コピー数が発現していた。A 系統のマウスは慢性 HCV 感染患者と同程度のミリリットルのあたり $\sim 3 \times 10^6$ の HCV の RNA コピー数の血清を産生した。この結果は、Pol I ポリメラーゼによって転写された HCV ゲノム RNA が複製し、マウスで感染性ウイルスを産生することができることを示した。さらに、HCV に対する抗体を用いた免疫染色結果から、6 ヶ月齢での壊死性炎症や、15 ヶ月齢での肝細胞癌を伴わず、重度の肝脂肪変性のみを示した。

[考察]

野生型 1a、1b および 2b 亜型の全ゲノム cDNA を JFH1 (2a 亜型) cDNA の遺伝子導入位置と置き換えたときに、多くの各 HCV 亜型感染性ウイルスがマウスで作られる。これは肝細胞癌の培養細胞を使ってはできないことである。よって、トランスジェニックマウスは、ヒトでの HCV 亜型感染に対する薬物をスクリーニングするためのよいモデルとなる。さらに、牛や馬などの大型動物にこのシステムを応用すれば、ワクチン作成のためのウイルスを大量に作ることができる。その他、感染した肝細胞の代謝およびシグナル伝達の異常と、HCV に関連した異常を治療する薬剤開発の研究に生かせる。

[結論]

この解析結果から、我々は、Pol I プロモーターを使い、感染性のウイルス作成能をもつ HCV モデルマウスの作成に成功した。加えて、慢性 C 肝炎の代謝異常の指標である重度の肝脂肪変性を示した。この A 系統マウスは、慢性 HCV 感染症のモデル動物として使用することができる。また、感染した肝細胞における代謝およびシグナル伝達の異常と、HCV に関連した異常を治療する薬剤の開発の研究に生かせる。