

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17427

研究課題名(和文) RIP-Seq法を用いたRIG-IのRNA decoy探索と核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Identification of a host RNA decoy to RIG-I using RIP-Seq method and application to oligonucleotide therapeutics

研究代表者

村居 和寿 (Murai, Kazuhisa)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：10828099

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)：Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) は、細胞内に侵入したウイルスを認識して免疫応答をスタートさせる司令塔分子である。B型肝炎ウイルス (HBV) や C型肝炎ウイルス (HCV) は、RIG-I による免疫応答を巧みに回避して持続感染を成立させるが、その逃避機構の全容は解明されていない。本研究では、RIG-Iによるウイルス認識を制御する宿主因子としてSelenoprotein P (SeP) mRNAを同定し、ウイルス感染時の免疫逃避機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RIG-IはHBVやHCVだけでなく、インフルエンザウイルスやセンダイウイルスをはじめとした広範なRNAウイルスを認識して、抗ウイルス効果を発揮することが知られている。また、肝内のRIG-Iの発現が、肝細胞がんに対する治療効果や生存率に関連していることも報告されている。宿主mRNAによるRIG-Iの制御メカニズムを明らかにした本研究は、ウイルス学・免疫学・腫瘍学といった幅広い研究領域において重要な知見を提供すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) is a key molecule that recognizes the virus RNA in the cytoplasm and initiates an immune response. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) skillfully evade the immune response by RIG-I to establish a persistent infection, but the entire escape mechanism has not been elucidated.

In this study, we identified Selenoprotein P (SeP) mRNA as a host factor that controls virus recognition by RIG-I, and clarified the mechanism of immune escape during virus infection.

研究分野：消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス 自然免疫 感染症

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) や C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症は、放置すると肝硬変、肝細胞がんに行進する重大な感染症である。現在、HBV や HCV 感染による肝病態の進展を防ぐための有効な治療法は確立されておらず、新規治療法の開発が急務である。ウイルスによってもたらされる病態の体系的理解や、ウイルス生活環の分子レベルでの解明が、新規治療法考案のカギを握る。

Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) は、細胞質内に侵入したウイルスを認識して免疫応答をスタートさせる司令塔分子である。HBV や HCV は、RIG-I による免疫応答を巧みに回避して感染を成立させるが、その逃避機構の全容は解明されていない。

2. 研究の目的

近年、生体由来の核酸リガンドが宿主免疫を制御するという新たな概念が提唱され、その研究が重要視されて始めている。しかしながら、RIG-I の機能を制御する生体由来の核酸リガンドパターンを詳細に解析し報告した論文はほとんど存在しない。私たちは、RIG-I によるウイルス認識を制御する宿主因子として Selenoprotein P (SeP) の mRNA を同定した。本研究では、SeP mRNA による RIG-I の機能制御メカニズムを明らかにし、これらを治療標的とした核酸医薬の考案を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肝癌細胞株である Huh7.5 細胞および KH 細胞 (Sci Rep. 2019 May 28;9(1):7943. doi: 10.1038/s41598-019-44257-5.) に SeP に対する shRNA (short hairpin RNA) を導入し、SeP 発現抑制細胞を作成した。これらの細胞に分泌型ルシフェラーゼ (Gaussia Luciferase: GLuc) 産生 HCV クローンゲノタイプ 1a 型 (H77S.3/GLuc2A)、ゲノタイプ 2a 型 (JFH-1/GLuc2A)、ゲノタイプ 1a・2a キメラ型 (HJ3-5/GLuc2A) を感染させ、HCV 複製・インターフェロン (IFN) 誘導を評価した。HepG2 細胞 (ヒト肝芽腫細胞株) に shRNA を導入して SeP の遺伝子発現を抑制した。これらの細胞に HCV-RNA 及び PolyI:C (Polyinosinic-polycytidylic acid) を投与して IFN 誘導を評価した。SeP mRNA と RIG-I タンパクの細胞内局在を、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法および蛍光免疫染色法により評価した。SeP mRNA と RIG-I タンパクの結合を RIP (RNA-immunoprecipitation) assay および RNA pull-down assay により評価した。SeP mRNA の欠失変異体を作成し、結合部位の探索をおこなった。また、SeP mRNA の欠失変異体が IFN 誘導能に与える影響を評価した。

4. 研究成果

SeP が HCV 感染に与える影響を評価するため、Huh7.5 細胞、KH 細胞に SeP の shRNA を導入した細胞を作成し、HCV 感染実験をおこなった。Huh7.5 細胞は RIG-I 遺伝子に変異が入りシグナル伝達能が失われていることが報告されている。一方、KH 細胞は RIG-I 遺伝子が正常な細胞株であり、シグナル伝達能が保たれている細胞株である。興味深いことに、KH 細胞では Huh7.5 細胞に比べ、SeP の発現抑制による HCV 複製の顕著な抑制が認められた (図 1)。また、SeP の発現抑制細胞では、HCV 感染による IFN 誘導遺伝子群 (ISGs) の有意な上昇が認められた (図 2)。RIG-I KO KH 細胞では、SeP の発現抑制による HCV 複製の抑制および ISGs の上昇がキャンセルされた (図 1)。これらの結果から、SeP は HCV に対する RIG-I 介在性の自然免疫応答を制御している可能性が示唆された。

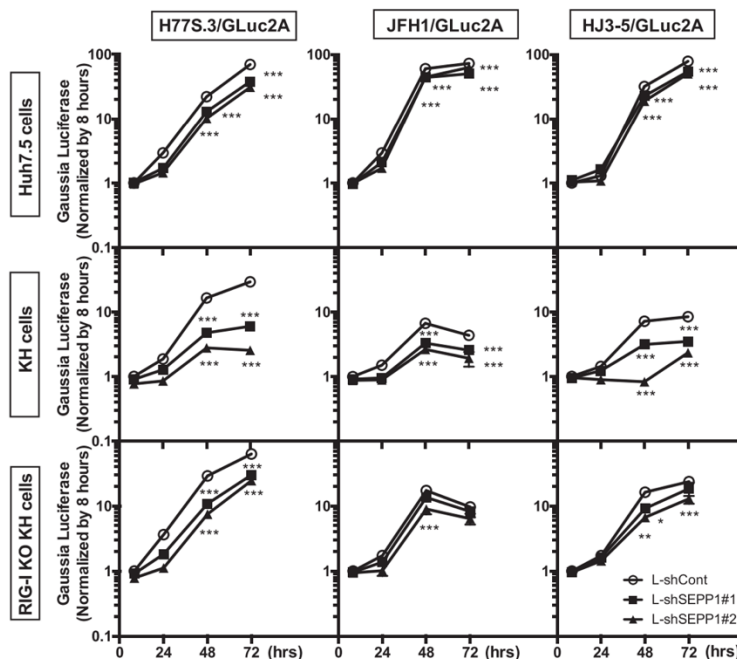


図 1. SeP が HCV 感染に与える影響

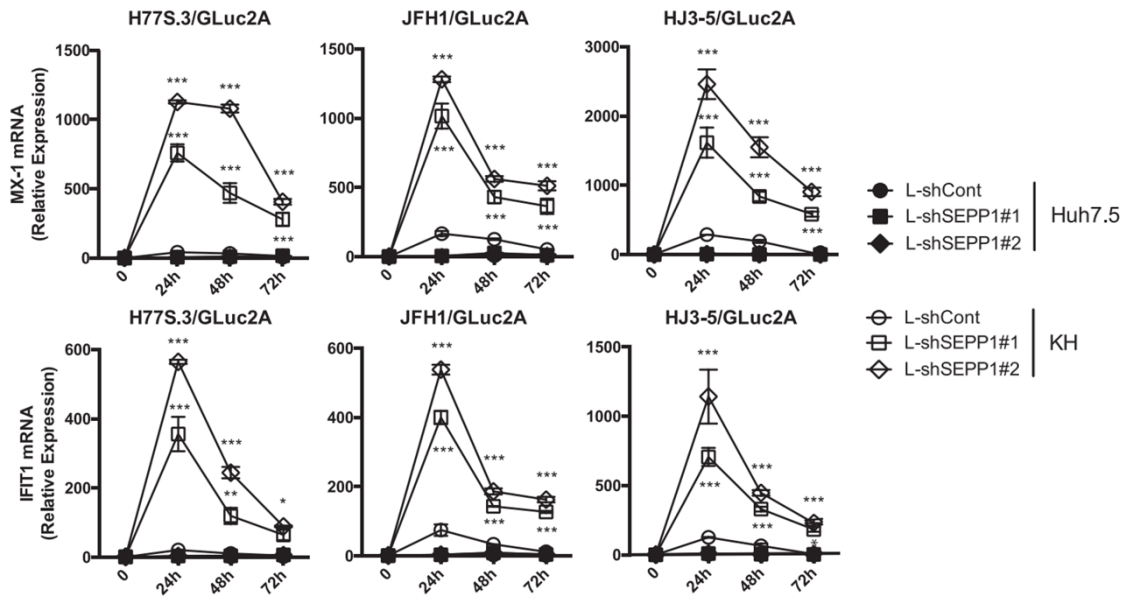


図 2. SeP が IFN 誘導に与える影響

SeP による RIG-I 介在性の自然免疫応答制御メカニズムに迫るため、SeP mRNA と RIG-I タンパクの細胞内局在を FISH 法および蛍光免疫染色法により評価した。興味深いことに、SeP mRNA と RIG-I タンパクは細胞質において共局在することが明らかになった(図 3)。次に、RIP assay および RNA pull-down assay により SeP mRNA と RIG-I タンパクが結合しているかを検討したところ、SeP mRNA は RIG-I タンパクに結合していることが明らかになった(図 4, 5)。また、RIG-I の RNA 認識に重要な K888 アミノ酸部位の変異体では、SeP mRNA の結合は認められなくなった(図 4, 5)。以上の結果から、SeP mRNA は RIG-I タンパクの RNA 認識領域と結合している可能性が示唆された。

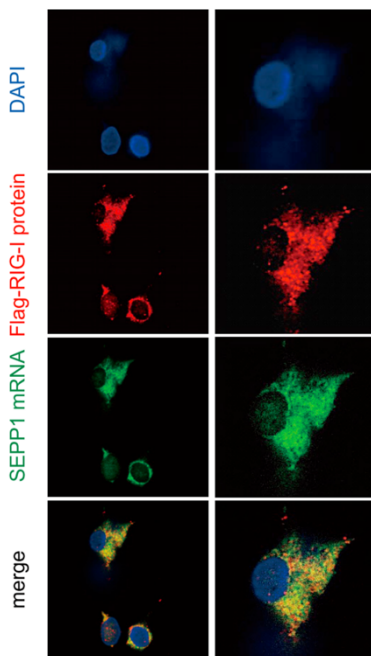


図 3. SeP mRNA と RIG-I タンパクの細胞内局在

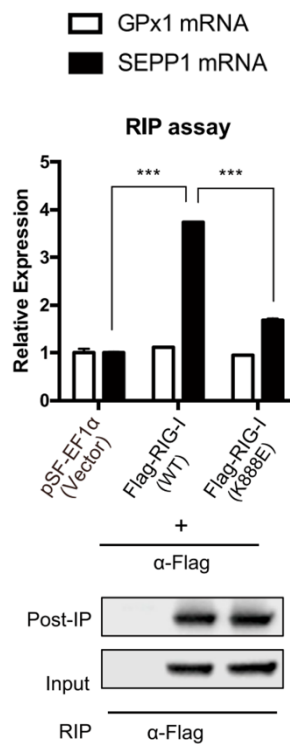


図 4. SeP mRNA と RIG-I タンパクの RIP assay

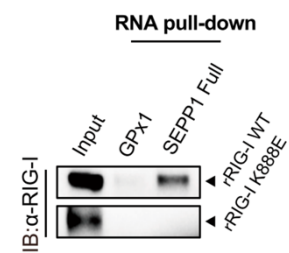


図 5. SeP mRNA と RIG-I タンパクの RNA pull-down assay

次に、SeP mRNA の欠失変異体を作成し、RIG-I タンパクとの結合部位の探索をおこなった。SeP は RNA の 3' UTR に SECIS (selenocysteine insertion sequence: セレノシステイン挿入配列) と呼ばれるヘアピン構造を 2 つ保持しており、RIG-I が認識し得るリガンドパターンと類似していた。図 5 のように、SECIS の欠損や 5' UTR、ORF 部分の欠損 RNA を作成し、RIG-I タンパクとの結合を RNA pull-down assay により評価した。この検討から、SeP の ORF の前半部分の RNA 構造 (ORF-1) が RIG-I タンパクと結合していることが明らかになった (図 5)。また、ORF-1 mRNA は RIG-I タンパクと HCV-RNA および Poly (I:C) との結合を競合的に阻害することが示された (図 5)。

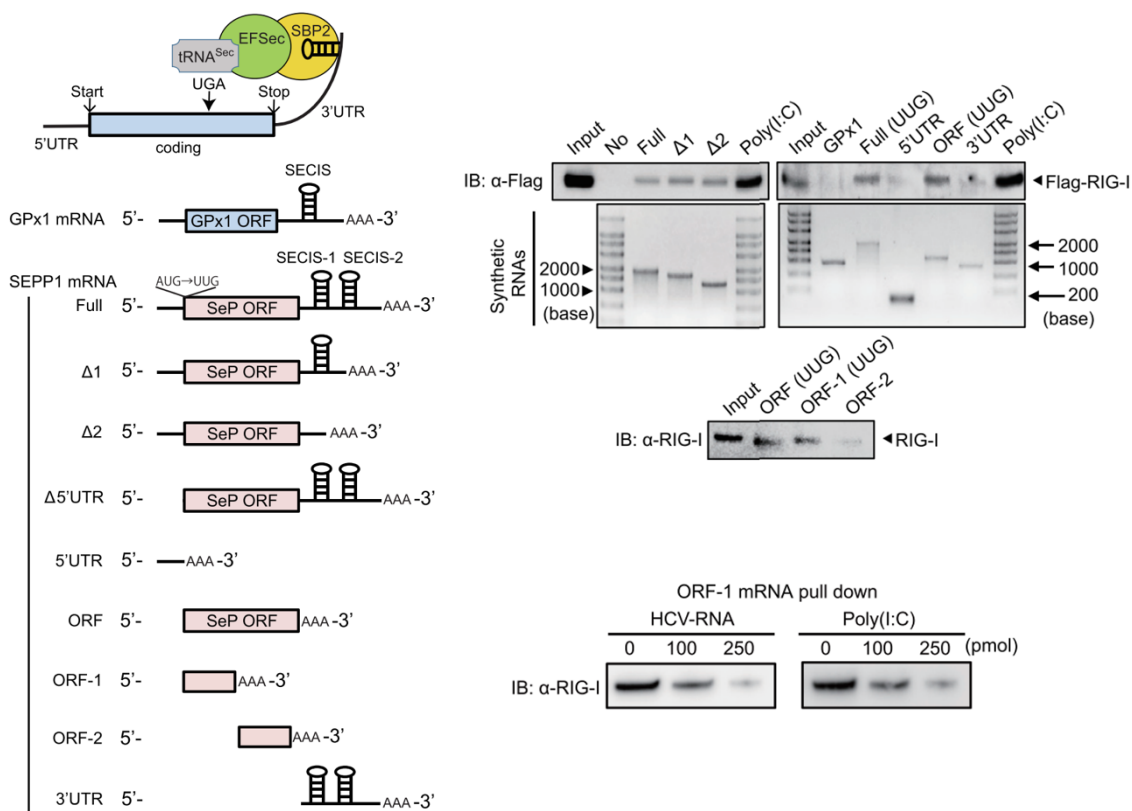


図 6. SeP mRNA と RIG-I タンパクとの結合部位の同定

本研究では、HCV が宿主の自然免疫応答から逃れる機序を明らかにした。SeP の mRNA は、リガンドの結合を阻害する部分断片 (Decoy RNA) としての機能を有しており、RIG-I のタンパクと結合し相互作用することでウイルス認識能を著しく低下させ、免疫応答を負に制御していた。RIG-I は HBV や HCV だけでなく、インフルエンザウイルスやセンダイウイルスをはじめとした広範な RNA ウイルスを認識して、抗ウイルス効果を発揮することが知られている。また、肝内の RIG-I の発現が、肝細胞がんに対する治療効果や生存率に関連していることも報告されている。宿主 mRNA による RIG-I の制御メカニズムを明らかにした本研究は、ウイルス学・免疫学・腫瘍学といった幅広い研究領域において重要な知見となると考える。また、RIG-I を標的とした核酸医薬への応用に向けた基礎データを提供すると考える。

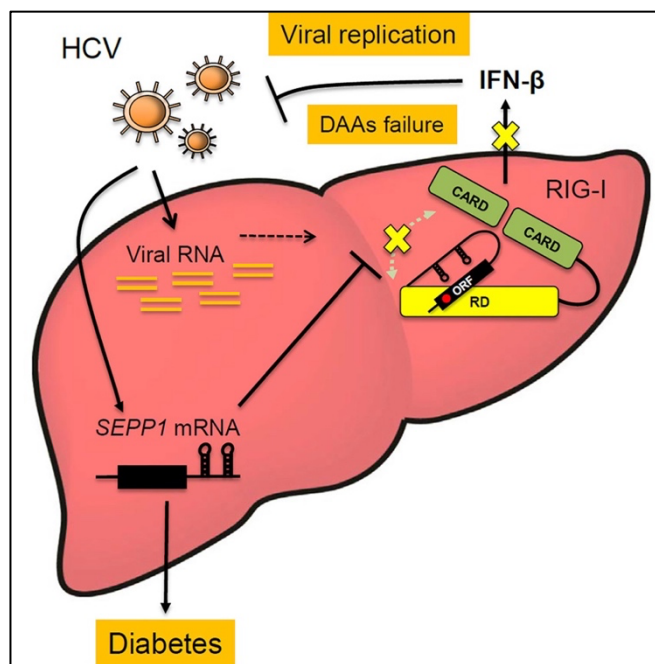


図 7. SeP mRNA による RIG-I を介した自然免疫応答の制御メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murai K, Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Omura H, Misu H, Kita Y, Takeshita Y, Ishii KA, Takamura T, Urabe T, Shimizu R, Okada H, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Induction of Selenoprotein P mRNA during Hepatitis C Virus Infection Inhibits RIG-I-Mediated Antiviral Immunity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 588-601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2019.02.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhisa Murai, Masao Honda, Tetsuro Shimakami, Takayoshi Shirasaki, Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Seishi Murakami, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Induction of selenoprotein P mRNA during hepatitis C virus infection inhibits RIG-I-mediated antiviral immunity
3. 学会等名 AASLD2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------