

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590756

研究課題名（和文） RNAi スクリーニングによる C 型肝炎ウイルス感染成立に寄与する宿主因子の探索

研究課題名（英文） RNA interference screen for host factors required for HCV replication

研究代表者

邵 力 (SHO RI)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80344787

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）の感染・複製に関与する宿主因子は、未だ完全に解明されていない。本研究では、HCV培養細胞感染系を用いて、RNA干渉スクリーニング法によりそれらを探索した結果、6つの候補遺伝子を見出した。また、遺伝子機能阻害ならびに遺伝子機能促進実験から、Mx遺伝子がHCVの感染に必要であり侵入に重要な役割を有することが確認された。今後、そのメカニズムを明らかにして、新たな創薬探索を目指したい。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of chronic liver disease worldwide. However, our understanding of the molecular interaction between HCV and host cells is limited. To efficiently identify the host factors required for HCV replication, we performed a small-scale RNA interference (RNAi) screen in Huh7.5.1 hepatoma cell during its early stage of HCV infection. RNAi screen showed that two siRNAs against IKK $\beta$  and Mx genes reduced viral infection by 50% or more whereas four siRNAs enhanced infection by 1.5-fold in Huh-7.5.1 cells. Further loss-of-function analysis revealed that silencing of Mx by siRNA or blocking of Mx by mAb caused dose-dependent inhibition of HCV replication, suggesting that Mx plays an important role in HCV infection. Moreover, gain-of-function assay indicated that over-expression of Mx not only enhanced the viral attachment but also increased the viral replication, suggesting that Mx may facilitate HCV infection in vitro through mediating the viral entry. In conclusion, our study provides a novel approach to explore virus-host interaction and to identify potential antiviral targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス, RNAi, HCV replicon, 自然免疫, 脂質代謝

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞で増殖する HCV は、増殖段階で多くの宿主因子を利用しているが、それらの分子の実体はほとんど解明されていない。2005 年にレプリコンによる HCV 細胞培養システムが樹立されたこと、さらに Genome-wide association study や DNA microarray などの網羅的な解析方法ができたことにより HCV の増殖に必要な宿主因子が明らかとなりつつある。

申請者らは当時、HCV 感染に影響を及ぼす宿主因子群の探索のため、HCV 持続感染者と自然排除者のヒト遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を検討し、HCV 感染に係わる候補遺伝子を報告してきた。また、分子疫学的研究から自然免疫における TLR2 の遺伝子多型が C 型肝炎の進展に関与することが明らかになった。しかし、HCV レプリコン培養細胞を用いた機能解析の結果により、TLR2 の発現と HCV 増殖に関連がないことが示唆されていた。よって、自然免疫における HCV 増殖に寄与する宿主因子の解明は、より包括的な視点かつ効率的な方法で捉え直す必要があると考えられる。

ヒトゲノムプロジェクトの進展の過程で開発された、画期的な分子生物技術は RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) 技術である。RNAi 技術は、ある遺伝子と相同な塩基配列をもつ siRNA (small interference RNA) を人工的に細胞に導入し、その遺伝子の発現を抑制する手法である。その応用は遺伝子の機能解明や新薬開発につながる新規遺伝子の探索などに極めて有用であると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、HCV 培養細胞感染系を用いた RNAi スクリーニングにより、HCV 感染成立に寄与する宿主因子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究は、大きく 2 つのステップで進められました (図 1)。①自然免疫応答および脂質代謝の

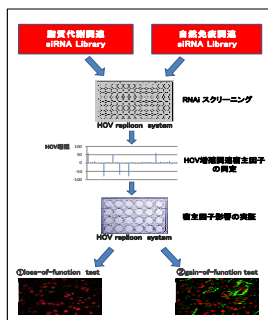


図 1. 研究アプローチ

二つのパスウェイにおける遺伝子群を標的とした RNAi スクリーニングにより、HCV 増殖促進または阻害に影響を及ぼす宿主因子を探索した、②同

定された宿主因子の強制発現 (gain-of-function) または発現抑制 (loss-of-function) 操作より、宿主因子の HCV 増殖に及ぼす影響を検証し機能的に解析した。

具体的な方法について、

- (1) HCV 培養細胞感染系により、高い力価の感染性ウイルス粒子を作製し、また Huh7.5.1 細胞への siRNA の導入及び至適条件を検討した。
- (2) バイオインフォマティクス情報を活用して、自然免疫及び脂質代謝関連遺伝子群を標的とする siRNA ライブラリーを作製した。
- (3) HCV 培養細胞感染系を用いた siRNA によるノックダウン法と定量的 RT-PCR 法によってライブラリーのスクリーニングを行った。
- (4) スクリーニングで得られた宿主因子の発現抑制 (loss-of-function) または強制発現 (gain-of-function) 実験を用いて、宿主因子の HCV 増殖に及ぼす影響を検証し機能的に解析した。

### 4. 研究成果

- (1) バイオインフォマティクスによる自然免疫及び脂質代謝関連遺伝子群を標的とする siRNA ライブラリーの作製

自然免疫及び脂質代謝における HCV 増殖に寄与する宿主因子を探索するために、Bioinformatics 情報を活用して、自然免疫における TLR 依存と非依存二つのパスウェイに関連する候補遺伝子 66 個及び脂質合成に関与する候補遺伝子 18 個を選択した。また、それらの遺伝子を標的にした最大のノックダウン効果および特異性を持つ siRNA をデザインし、セットとして siRNA ライブラリーを作製した (Dharmacon 社)。

- (2) RNAi スクリーニングによる HCV 増殖に影響を及ぼす宿主因子の同定

HCV 培養細胞感染系を用いて、RNA 干渉スクリーニング法により HCV 増殖に影響を及ぼす宿主因子を探索した結果、

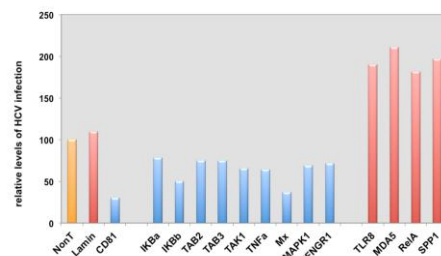


図 2 RNAi スクリーニングによる HCV 増殖に影響を及ぼす宿主因子の同定

6つの候補遺伝子を見出した(図2)。6つの因子のうち、特にMx遺伝子をノックダウンした結果(図3a)、感染細胞内のウイルスRNA、および培養上清中に放出されるウイルス蛋白質の減少は顕著であった。さらに、モノクローナル抗体による機能的な解析実験から(図3a,b)、Mx遺伝子がHCVの侵入に重要な役割を担っていることが示唆された。

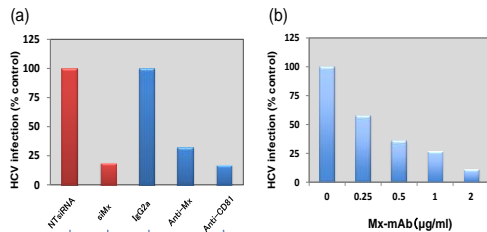


図3 Loss-of-function実験によるMx遺伝子のHCV増殖に及ぼす影響の検証。(a)siRNA;(b)mAb.

### (3) 同定した宿主因子のHCV増殖に及ぼす影響の検証

肝がん細胞株Huh-7.5.1にMxを強制発現させ、遺伝子機能亢進によるHCV感染に及ぼす影響を検討した。Real-time PCRやWestern Blottingの結果から、Mx遺伝子の発現亢進がHCV感染・増殖に促進することが明らかになった。さらに、免疫蛍光染色法を用いてMx蛋白質とHCVの相互作用を調べたところ、MxがHCV粒子の吸着、侵入に関与していることが示された(図4)。

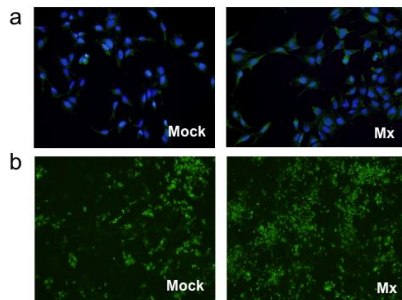


図4 Gain-of-function実験によるMx遺伝子のHCV増殖に及ぼす影響の検証。免疫蛍光染色結果:(a)HCV吸着(4℃,4h);(b)HCV感染(37℃,3d)。

結論として、我々はHCV培養細胞感染系を用いたsiRNAライブラリーによる効率的なHCV感染・複製に関わる宿主因子のスクリーニング法を確立し、その結果、HCV粒子の吸着、侵入に関わる新規宿主因子Mxを同定できた。今後、本因子のHCV感染成立に関わる詳細なメカニズムを明らかにするとともに新たな抗ウイルス剤の標的の探索も目指したい。

## 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5件)

- ① Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S. Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J Virol.* 85(3):1322-9. (2011). 査読あり
- ② Shao L, Takeda H, Fukui T, Mabe K, Han J, Kawata S, Ootani K, Fukao A. Genetic diversity of the *Helicobacter pylori* sialic acid-binding adhesin (sabA) gene. *Biosci Trends.* 4(5): 249-53. (2010). 査読あり
- ③ Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 82(8):1364-70. (2010). 査読あり

[学会発表](計8件)

- ① 張旭紅, 邵力, 深尾彰. RNAiスクリーニングを用いたHCV増殖に関わる宿主因子の探索. 第83回日本生化学会大会. 2010年12月7日. 神戸市・神戸国際会議場
- ② 膝亮, 邵力, 木村理. 肝臓におけるmicroRNAの発現異常と意義. 第14回日本肝臓学会大会. 2010年10月14日. 横浜市・パシフィコ横浜
- ③ 邵力, 渡辺久剛, 齋藤貴史. HCV培養細胞感染系におけるTLRシグナル伝達関連遺伝子の発現解析. 第46回日本肝臓学会総会. 2010年5月27日. 山形市・山形国際ホテル
- ④ Sho R, Zhang XH, Watanabe H. Expression Profiling of TLR Signaling Pathway Genes in Human Hepatocytes Infected with Cell Culture-produced Hepatitis C Virus. The 20<sup>th</sup> Conference of the APASL. March 25-28, 2010. Beijing・China National Convention Center
- ⑤ Teng L, Sho R, Kimura W. Identification and Characterization of a Novel MicroRNA Involved in the Development of Liver Cancer. The 20<sup>th</sup> Conference of the APASL. March 25-28, 2010. Beijing・China National

- Convention Center
- ⑥ 張旭紅, 邵力, 齋藤貴史. HCV 感染培養細胞における Toll-like 受容体とシグナル伝達関連遺伝子の発現. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 25 日. 神戸市・神戸ポートアイランド
  - ⑦ Shao L, Watanabe H, Saito T. Genetic variation in the IKK/NF- $\kappa$ B pathway and the liver fibrosis progression in chronic hepatitis C. The 19<sup>th</sup> Conference of the APASL. February 13-16, 2009. Hong Kong・Hong Kong Convention and Exhibition Center
  - ⑧ Zhang XH, Sho R, Saito T. Profile of Toll-like receptor signaling pathway gene expression in human hepatocytes that carry self-replicating HCV replicons. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008 年 12 月 10 日. 神戸市・神戸ポートアイランド

[図書] (計 1 件)

- ① 渡辺久剛, 齋藤貴史, 邵力等. 山形大学出版社, 「HCV 感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究」. (2010 年). p. 45~50

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PublicHealth/PH-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

邵 力 (SHO RI)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80344787

### (2) 研究分担者

渡辺 久剛 (WATANABE HISAYOSHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 00332536

### (3) 研究分担者

齋藤 貴史 (SAITO TAKAFUMI)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 80250918

### (4) 連携研究者

深尾 彰 (FUKAO AKIRA)

山形大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80156736