

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659480

研究課題名(和文) 宿主因子の網羅的同定によるC型肝炎ウイルスの新規創薬ターゲットの模索

研究課題名(英文) Screening of novel host factors related to HCV lifecycle for developing useful drugs

研究代表者

伊藤 昌彦 (Ito, Masahiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50385423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：これまでC型肝炎ウイルス(HCV)の感染、複製、粒子形成に関わる宿主遺伝子は数多く報告されているが、いまだその全容は明らかになっていない。そこで、新規遺伝子発現抑制法shRNAmirを用いて、35,000の宿主遺伝子の網羅的ノックダウンを試みた。期間内にスクリーニングに必要なベクターの構築、安定発現細胞株の樹立、発現の確認を行った。また網羅的スクリーニングを現在行っている。本研究により、HCV感染や粒子形成などこれまで創薬ターゲットとされていない新規宿主遺伝子の同定が可能となり、HCVの生活環の解明だけでなくより有効な治療につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：A lot of host factors related to infection, replication and release of the hepatitis C virus (HCV) have been reported. However, the whole aspect does not yet become clear. Therefore, using novel gene knockdown method 'shRNAmir', I tried the exhaustive knockingdown of 35,000 host genes. In this period, I did construction of the required plasmid, establishment of stable cell line, confirmation of plasmid expression. In addition, I do the exhaustive screening at present. This study allows the identification of the novel host factors of HCV and useful knowledgement for the elucidation of HCV life cycle as well as more effective treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス 生活環 感染・複製 粒子形成 宿主遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

国内における C 型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約 200 万人とされ、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行する。これまで HCV の感染、複製、粒子形成に関わる宿主遺伝子は数多く報告されているが、いまだその全容はいまだ明らかになっていない。HCV に関連する宿主遺伝子の網羅的スクリーニングは、siRNA を導入した細胞の HCV の感染性、複製能を指標に行われている(Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 106: 16410-16415, 2009; Randall *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 104: 12884-12889, 2007)。しかしながら、これまで粒子形成を指標にしたスクリーニングはされておらず、また siRNA によって遺伝子発現が効果的に抑制されているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たな手法として shRNAmir を用いて遺伝子発現の抑制を行い、粒子形成を含む HCV 生活環に必須な宿主遺伝子を同定する。そのために以下の項目を行う。

shRNAmir により網羅的に遺伝子発現を抑制した Huh-7.5.1 細胞を HCV 粒子を含む培養液(HCVcc)に暴露することにより、HCV 感染および複製に必須な遺伝子を同定する。

粒子形成に必須な遺伝子を同定する。

同定した遺伝子のうち新規遺伝子に関して、遺伝子抑制実験、過剰発現を行い解析することで作用機序を明らかにする。最終的に、阻害剤による HCV を抑制する効果を検証する。

本研究により、既知の遺伝子のみならず HCV の生活環に関わる新規の遺伝子を数多く同定することができる。このことはウイルス学研究的の進展に寄与するだけな

く、C 型肝炎を克服するための新規治療薬の開発において有用な基盤となる。

## 3. 研究の方法

これまで HCV の感染、複製に関する遺伝子の網羅的探索には、siRNA プールをトランスフェクションまたはエレクトロポレーションすることで細胞導入されているため必ずしも効率はよくない。本研究ではレンチウイルス感染により、高効率で遺伝子発現抑制細胞を得ることが出来る。また siRNA ではオフターゲット効果が、shRNA では特異的プロセッシングが起きないことがある。これを回避するために、特異的プロセッシングにより効果的、安定的に遺伝子発現の抑制ができる shRNAmir プールを用いた (Silva *et al.*, Nature Genetics 37: 1281 - 1288, 2005)。 (図 1)



図 1. shRNAmir の構造の模式図

実験全体の概要として、はじめに HCV を感染・複製し、感染性粒子を産生できる肝癌細胞由来細胞株 Huh7.5.1 に 35,000 種類のヒト遺伝子を抑制することのできる shRNAmir 発現組換え体レンチウイルスを 1 つの細胞に 1 コピー導入されるように感染させる。次にレンチベクターのマーカであるピューロマイシンにより選抜することで安定的に遺伝子発現が抑制された Huh7.5.1 細胞を得る。これらの細胞に HCV 粒子を含む培養液(HCVcc)を暴露することで HCV を感染させる。

HCV 感染・複製に関連する遺伝子を同定するために、HCVcc に含まれる HCV RNA にはヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子を有するサブゲノム

レプリコン RNA をパッケージングする。パッケージングの手法には、当講座の鈴木ら (Biochem. Biophys. Res. Commun. 371: 446-450, 2008)により開発されたトランスパッケージングシステムを用いる。このシステムを用いて、HCV JFH-1 株の Core~NS2 発現プラスミドと HSV-TK を有する同株サブゲノムレプリコン RNA を Huh-7 細胞に共導入することで、レプリコン RNA が取り込まれたウイルス様粒子を産生する。この粒子が Huh7.5.1 細胞に感染しレプリコン RNA が複製され、HSV-TK が発現することを確認する。HCV 感染・複製細胞は HSV-TK を発現することにより薬剤感受性 (ガンシクロビル) となる (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 78: 1441-1445, 1981)。この獲得薬剤感受性を利用して選抜を行い、遺伝子発現抑制によって HCV の感染・複製能が欠損した細胞を得る。また感染は高い感染多重度 (MOI, multiplicity of infection) の HCVcc に暴露することでを行い、偽陽性を排除する。

次に、HCV 粒子形成に關与する遺伝子の同定を行う。感染にはネオマイシン耐性遺伝子と JFH-1 株フルゲノムレプリコン RNA を含む HCVcc を用いる。shRNAmir により遺伝子発現抑制した細胞をこの HCVcc に暴露したのちに、G418 による選抜を行い、HCV 非感染細胞を除く。そののちシングルコロニーとなるように 384 プレートに細胞を播種する。1 週間後に上清を回収し、上清中に含まれる HCV Core 抗原の量を ELISA により明らかにする。これにより HCVcore が発現しない遺伝子発現抑制細胞を得たのち、その shRNAmir 配列を決定、粒子形成に必須な遺伝子を明らかにする。

各々のスクリーニングにより選抜された細胞はゲノム DNA を抽出し、PCR により shRNAmir 配列を増幅し、配列を決定す

る。これにより HCV の感染、複製に必須である遺伝子を同定する。

### (1) Gluc 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製

スクリーニングに必要な Gluc 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製を試みた。pEF6V5HisA (Invitrogen) の EF1a promoter を PCR で増幅し、NheI および RsrII (NEB) による制限酵素処理後に切り出し、pCMV/Zeo (Invitrogen) の NheI-RsrII サイトに挿入した。このベクターを EcoRV、PvuII で制限酵素処理することで得た EF1a-Zeo カセットを pHH/SGR-JFH1/Gluc の SspI サイトに blunt で挿入した。作成したベクターを HuH7.5.1 に Lipofectamin LTX (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、2 日目から 0.3mg/mL Zeocin で選抜した。2 週間後に 96well plate に播種し、シングルコロニーからコロニーを得た。それぞれの培養上清を BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England Biolabs) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。細胞内 HCV コピーは TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents (ABI) を使用し、5'UTR に特異的なプローブを用いて測定した。

### (2) TK 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製

スクリーニングに必要な TK 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製を試みた。pxCATK (東大医科研斎藤泉先生から分与) のチミジンキナーゼをコードする領域を PCR で増幅し、pHH/SGR-JFH1/Luc の MluI-PmeI サイトに挿入した。その後 EF1a-Zeo カセットを SspI サイトに挿入することで pHH/SGR-JFH1/TK/EF1a-Zeo を構築した。作成したベクターを HuH7.5.1 に

Lipofectamin LTX を用いてトランスフェクションし、2日目から 0.3mg/mL Zeocin で選抜した。2週間後に 96well plate に播種し、シングルコロニーからコロニーを得た。得られた細胞の TK の発現を免疫染色法により確認した。また、細胞内 HCV コピーは TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents(ABI) を使用し、5'UTR に特異的なプローブを用いて測定した。

### (3) pEBmulti-Neo/Core-NS2 ベクターの作製

感染性ウイルス粒子を産生するために HCV の構造遺伝子領域である Core から E1 を発現するベクターの構築を試みた。pcDNA-core-ns2 の Core-NS2 領域を PCR で増幅し、pEBmutli-Neo ベクターの Sall-BamHI 領域に挿入した。発現を Core ELISA により確認した。

### (4) 宿主遺伝子欠損細胞株プールの樹立

HCV を感染・複製し、感染性粒子を産生できる肝癌細胞由来細胞株 Huh7.5.1 および JFH1/Gluc を安定的に発現する Huh7.5.1 細胞株に 35,000 種類のヒト遺伝子を抑制することのできる shRNAmir 発現組換え体レンチウイルスを 1 つの細胞に 1 コピー導入されるように感染させ、スクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) Gluc 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製

これまでに当研究室で構築した pHH/SGR-JFH1/Gluc に EF1a プロモーター誘導の Zeocin カセットを挿入し、これを HuH7.5.1 にトランスフェクションすることで安定発現株を 17 クローン得た。得られたクローンの培地に含まれるルシフェラーゼ活性を Table1 に示す。1<sup>st</sup> スクリーニングで得られたクローン(A2, A5, B6) を 6cm dish で培養し、再びルシフェラーゼ活

性を測定した結果(2<sup>nd</sup>)でも、B6 が最も活性が高かった。また HCV コピーも同様に B6 が最も多かった(Table2)。以上から、Gluc 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株を樹立することができた(Fig.1)。

Gluc活性(1st)	1	2	3	4	5	6
A	100	3362	620	987	7848	897
B	543	466	107	592	787	16338
C	917	884	123	347	119	

	A2	A5	B6
Gluc活性(2nd)	9403	24252	43406

Table1. SGR-JFH1/Gluc 安定発現細胞株の培地中に含まれる Luc 活性

	copies/ ug total RNA
A2	7.19E+04
A5	6.43E+04
B6	1.53E+05

Table 2. SGR-JFH1/Gluc 安定発現細胞株の HCV コピー

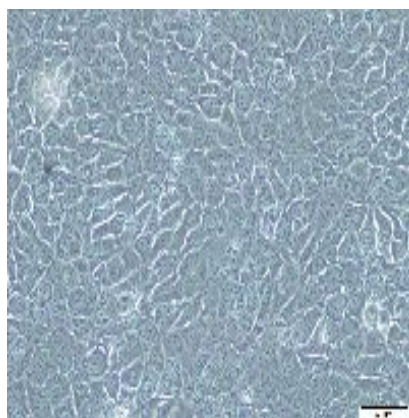


Fig1. SGR-JFH1/Gluc 安定発現細胞株 (B6)

### (2) TK 発現 HCV サブゲノムレプリコン安定発現株の作製

pHH/SGR-JFH1/TK/EF1a-Zeo を構築した。作成したベクターを HuH7.5.1 に Lipofectamin LTX を用いてトランスフェクションすることで安定発現株を 16 クローン得た。得られたクローンの TK の発現を免疫染色法により確認した(Fig.2)。1<sup>st</sup> スクリーニングで得られたクローン(#2, #6) を 10cm dish で培養し、HCV コピーを測定した結果、#2 が高く維持されていることが分かった(Table 3)。以上から、TK 発現

HCV サブゲノムレプリコン安定発現株を樹立することができた。

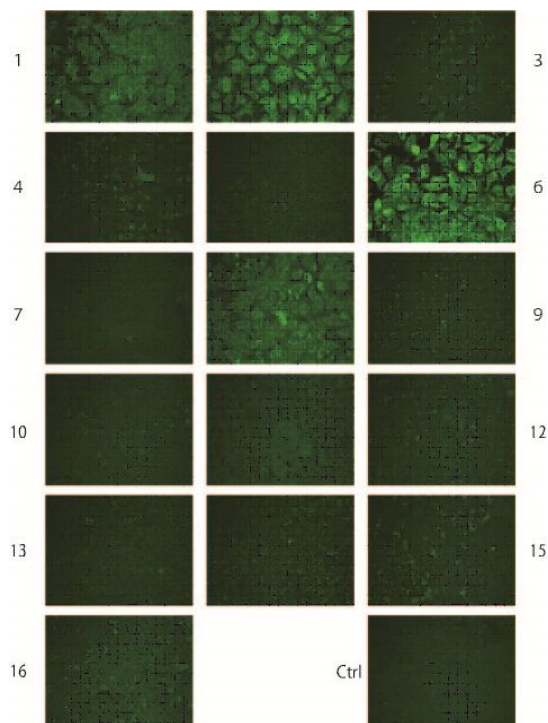


Fig.2. SGR-JFH1/TK 安定発現細胞株における TK の発現

Cell	HCV copy
#2	3658
#6	2784
copies/ug total RNA	

Table 3. SGR-JFH1/TK 安定発現細胞株の HCV コピー

### (3) pEBmulti-Neo/Core-NS2 ベクターの作製

スクリーニングに必要なマーカー遺伝子を含む一過性感染 HCV ウイルス(HCV<sub>tcp</sub>)を産生するために、エピソードに複製可能なプラスミドに HCV 構造遺伝子 Core-NS2 領域を挿入したベクターを構築した(pEB/c-ns2)。Core の発現を ELISA により確認した。

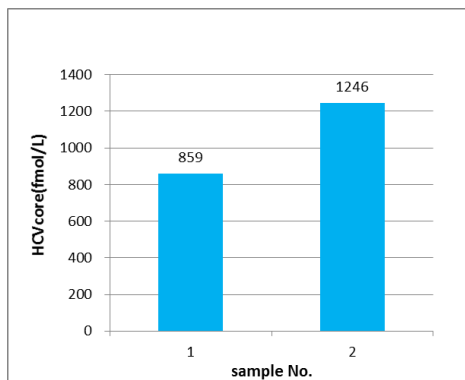


Fig.3. pEB/c-ns2 持続細胞株における HCV core の発現量

### (4) 宿主遺伝子欠損細胞株プールの樹立

肝癌細胞由来細胞株 Huh7.5.1 および JFH1/Gluc を安定的に発現する Huh7.5.1 細胞株に 35,000 種類のヒト遺伝子を抑制することのできる shRNAmir 発現組換え体レンチウイルスを 1つの細胞に 1 コピー導入されるように感染させ、HCV 感染・複製・粒子形成能が欠損した細胞株の単離を行っている。得られた候補遺伝子について、今後、遺伝子の発現抑制、過剰発現による HCV 生活環への影響、作用機序を明らかにする。

HCV 治療に関して、今後、HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤や NS5A 阻害剤の高い有効性が期待されているが、多剤による多段階で副作用がない組み合わせがますます重要になってくると考えられる。肝硬変、肝癌の発症を予防するためには、慢性肝炎の段階で HCV を体内から排除することが重要である。本研究は、HCV 感染や粒子形成などこれまで創薬ターゲットとされていない新規宿主遺伝子を同定することができ、HCV の生活環の解明だけでなく創薬につながると成果を挙げることができる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. S. Ahn, M. Tamai, K. Nakashima, M. Ito, T. Suzuki, Y. Tagawa. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication., 査読有, **J. Biosci. Bioeng.**, 2014, in press, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.
2. Z. Pei, G. Shi, S. Kondo, M. Ito, A. Maekawa, M. Suzuki, I. Saito, T. Suzuki, Y. Kanegae. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. **Sci. Rep.**, 査読有, 3, 3575, 2013. doi: 10.1038/srep03575.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) M. Ito, R. Suzuki, T. Wakita, T. Suzuki, Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication, 第 19 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2012)、2012 年 10 月、イタリア・ヴェネツィア、ポスター発表
- 2) M. Ito, R. Suzuki, T. Wakita, T. Suzuki, Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV, The 10th JSH Single Topic Conference Hepatitis C, 2012 年 11 月、東京、ポスター発表
- 3) 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗、HuH-7 由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪市、口頭発表

- 4) M. Ito, N. Ito, T. Fukuhara, R. Suzuki, Y. Matsuura, T. Wakita, T. Suzuki, Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells, 第 20 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議(HCV2013)、2013 年 10 月、オーストラリア・メルボルン、ポスター発表
- 5) 伊藤昌彦、伊藤徳臣、福原崇介、鈴木亮介、田川陽一、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗、肝細胞癌株のリプログラミングによる HCV 感受性および腫瘍原性の低下、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸市、口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_education\\_igakubu\\_igaku\\_kansen.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_kansen.html)

## 6 . 研究組織

- (1) 研究代表者  
浜松医科大学・医学部・助教  
伊藤 昌彦 (Ito Masahiko)  
研究者番号 : 50385423