

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07146

研究課題名(和文) 非肝臓細胞におけるHCV持続感染機構の解析

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of persistent infection of HCV in non-hepatic cells

研究代表者

小野 慎子 (Ono, Chikako)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30626437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)の主要標的臓器は肝臓であるが、肝臓以外の組織にも病変を引き起こすことが臨床的に報告されている。本研究では、非肝臓細胞でHCVが持続感染する過程で、肝臓特異的なmiR-122以外のマイクロRNAがHCV-RNAの複製亢進に寄与しうることを示した。また今回得られた様々なmiRNAがHCV-RNAの5'UTRと相互作用することで活性型IRES構造の二次構造のみならず三次構造の安定性を高めており、それが翻訳・複製亢進に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCV患者で高率に見られる肝外病変の発症メカニズムについて、これまであまり注目されてこなかった、非肝臓細胞でのHCV複製に注目して研究を行った。非肝臓細胞でのHCVの持続感染には変異ウイルスの出現も関与しているが、それに加えて本研究では、肝臓以外でも発現しているマイクロRNAによるウイルス複製のサポートがあることを示し、新たな知見を得た。今後効果的なウイルスの排除法の検討と、肝外病変の発症やウイルス排除後の再燃を制御する有効な治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The main target organ for hepatitis C virus (HCV) is the liver, but it has been clinically reported to cause lesions in tissues other than the liver. In this study, we showed that liver-specific microRNAs other than miR-122 can contribute to the enhancement of HCV-RNA replication in the process of persistent HCV infection in non-liver cells. In addition, the various miRNAs obtained in this study interact with the 5'UTR of HCV-RNA to enhance the stability of not only the secondary structure but also the tertiary structure of the active IRES structure, which leads to enhanced translation and replication. It turned out to be important.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス miRNA 肝外病変

## 1. 研究開始当初の背景

HCVは高率に慢性感染し、持続的な炎症を経て、肝硬変や肝癌を引き起こす病原ウイルスである。近年、ウイルスタンパク質を標的とした有効な抗HCV薬(DAA)が開発され、著効率は劇的に改善されたが、患者血清中にウイルスRNAが検出されなくなった後でも、肝癌や肝外病変の発症が報告されている。一方で、非肝臓組織でも非常に低いレベルでHCVが複製しており、肝炎の再燃や肝発癌との関連が示唆されている。実際、リンパ腫を併発していたC型肝炎患者に抗ウイルス治療を行ったところ、リンパ腫の改善が認められたという報告もある(Maciocia et al., *N Engl J Med*, 2016)。HCVの非肝臓細胞での複製機構はほとんど明らかにされていないが、我々の研究室では、miR-122が発現していない種々の非肝臓由来細胞にHCVは侵入し、ゲノムを複製できることを見出している(Fukuhara et al., 2012)。さらに、miR-122を欠損させた肝臓由来培養細胞を樹立し、ウイルスを継代することで、miR-122非依存的に複製可能な変異型HCVを得た(Ono and Fukuhara et al., 2017)。この変異型HCVは、miR-122阻害剤に抵抗性を示し、また、HCVの5'非翻訳領域(5'UTR)の28番目のグアニンがアデニン(G28A)に変異することで、miR-122非依存下でもウイルスの複製複合体が効率良く形成されることが明らかとなった。このG28A変異は、miR-122の発現を抑制させた細胞株で継代しても得られることから、発現レベルの減少によっても誘導される変異であることが示されている。また、C型肝炎患者から、血清(=肝臓由来のウイルスが含まれる)と末梢血単核球(PBMC)(=非肝臓細胞であるPBMCで維持されているウイルスが含まれる)を分離し、ウイルスRNAの配列を比較したところ、およそ42%のPBMC検体でG28A変異が検出された。血清中でG28A変異体が得られた検体の約8割が重複していたことから、G28A変異はPBMCなどの非肝臓組織で有意に出現すると考えられる。以上の成績から、miR-122が豊富にある肝臓細胞内では出現しない変異ウイルスが、miR-122阻害剤処理や非肝臓細胞のような、miR-122の発現が低下あるいは無い環境下で出現しうる可能性が生体内でも示唆された。

## 2. 研究の目的

臨床試験が進行中のmiR-122阻害剤は、miR-122非依存性を獲得した変異ウイルスを排除することはできず、さらに、DAAによるHCV治療は肝臓では有効であるが、非肝臓細胞においては不明である。今後慢性C型肝炎の治療が進む中で、非肝臓細胞がリザーバーとなり、HCVゲノムが維持されることは、肝外病変や肝炎再燃の重要な問題である。また、HCVには小動物を用いた動物モデルがないため、非肝臓組織でHCVが維持される機序を明らかにすることはできなかった。我々は、miR-122欠損肝臓細胞や非肝臓細胞を用いて、HCVの感染と複製を再現する実験系を樹立し、馴化ウイルスを既に得ている。本研究では、これまであまり注目されてこなかった非肝臓細胞におけるHCVの持続感染と、miR-122非依存性を獲得するような変異導入に関与する宿主因子を同定し、HCVの肝外病変とウイルス排除後の再燃について新たな知見を得る。

## 3. 研究の方法

### ①非肝臓細胞におけるマイクロRNA依存的な持続感染：他のマイクロRNAの関与

非肝臓細胞でHCVが持続感染する過程で、miR-122以外のマイクロRNAが関与している可能性がある。そこで様々なmiR-122変異体を作製してmiR-122欠損細胞で発現させ、HCV感染後にウイルスRNA量を測定することで複製亢進に重要な領域を同定する。更に、miRBASEというデータベースを用い、その領域と相同性の高い配列を保有するマイクロRNAを探索し、そのHCV-RNA複製亢進能を先述と同様に検討する。さらに、通常のマイクロRNAの機能は宿主遺伝子発現を抑制することであるため、その候補マイクロRNAの標的に発がん関連遺伝子が含まれるかについてデータベースおよび過去の文献から情報を得る。

### ②非肝臓細胞におけるマイクロRNA非依存的な持続感染：宿主因子によるウイルスゲノムの安定化

G28A変異によりmiR-122非依存性を獲得した変異型HCVは、複製複合体形成に必要な宿主因子との結合様式やRNAの二次構造が変化し、miR-122非依存的に効率良く複製可能になったと考えられる。そこで、miR-122存在下および非存在下で野生型と変異型HCV-RNAにそれぞれ相互作用する宿主因子をRNA免疫沈降法(RIP)と質量分析により同定し、比較する。miR-122非存在下で野生型RNAに結合しないが、変異型およびmiR-122存在下では結合する候補分子が得られた場合、その因子をノックアウトした肝臓細胞を樹立し、HCVの増殖性がmiR-122欠損細胞と同レベルまで低下するかを検討する。

## 4. 研究成果

まず、miR-122以外のマイクロRNAがHCV-RNAの複製亢進に寄与している可能性について検討

した。miR-122 をベースとした様々な変異体を用いて、HCV-RNA 複製亢進に重要なマイクロ RNA の領域およびモチーフ配列を検索した。すると、①miR-122 と同様に GAGUG モチーフを含むもの、②miR-122 とは異なる様式で複製亢進が可能なマイクロ RNA のモチーフ配列が存在した。さらに、in silico スクリーニングによりそれらのモチーフを保有するマイクロ RNA を探索し検討したところ、①GAGUG モチーフを含み 2 箇所でウイルスゲノムと相互作用する miR-122 型と、②ウイルスゲノムの 28、29 番目の塩基を含む 7 塩基以上で 1 箇所のみ結合する non-miR-122 型 (図 1 参照) の結合様式で HCV-RNA 複製を亢進しうるマイクロ RNA を新たに計 9 つ同定した。



図1. Ago2を介したmiRNA/HCV-RNA相互作用

また、得られた候補マイクロ RNA のヒト正常組織中における発現量を定量したところ、肝外組織での発現が認められたため、それらは生体内でも HCV ゲノム複製をサポートしている可能性が示唆された。

現在考えられている HCV の感染環における miR-122 の役割は、その結合により HCV の IRES 構造を翻訳開始複合体が形成しやすくなる活性型へと変化させることであると、近年他研究グループより報告された。よって、野生型 HCV-IRES は miR-122 が結合することによって、40S リボソームと相互作用するのに必要なステムループ II (SLII) 構造を形成できるが、G28A 変異により miR-122 非依存性を獲得した変異型 HCV は miR-122 がなくとも SLII を形成でき、miR-122 非依存的に効率良く複製可能になったと考えられる。そこで、miR-122 型、non-miR-122 型の結合様式で HCV-RNA 複製を亢進しうるマイクロ RNA の機能についてより詳細なメカニズムを明らかにするために、Ago2/miRNA/HCV-RNA 複合体の 3D モデリングとシミュレーションを共同研究により行った。すると、今回得られた様々な miRNA が HCV-RNA の 5' UTR と相互作用することで活性型 IRES 構造の二次構造のみならず三次構造の安定性を高めており (図 2 参照)、それが翻訳・複製亢進に重要であることが明らかとなった。以上の得られた成績をまとめ、PLOS Pathogens 誌にて報告した (Ono et al., 2020)。

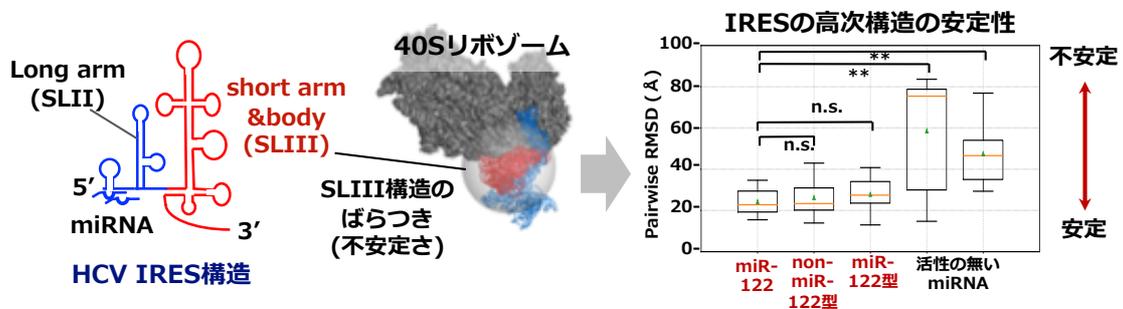


図2. HCV IRES:miR-122複合体の3Dモデリング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kusakabe S, Suzuki T, Sugiyama Y, Haga S, Horike K, Tokunaga M, Hirano J, Zhang H, Chen DV, Ishiga H, Komoda Y, Ono C, Fukuhara T, Yamamoto M, Ikawa M, Satoh T, Akira S, Tanaka T, Moriishi Ki, Fukai M, Taketomi A, Yoshio S, Kanto T, Suzuki T, Okamoto T, Matsuura Y	4. 巻 93
2. 論文標題 USP15 Participates in Hepatitis C Virus Propagation through Regulation of Viral RNA Translation and Lipid Droplet Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01708 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01708-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Hiroyuki, Fukuhara Takasuke, Ono Chikako, Tamura Tomokazu, Sato Asuka, Fauzyah Yuzy, Wada Masami, Okamoto Toru, Noda Takeshi, Yoshimori Tamotsu, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 99
2. 論文標題 Induction of selective autophagy in cells replicating hepatitis C virus genome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1643 ~ 1657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono C, Fukuhara T, Li S, Wang J, Sato A, Izumi T, Fauzyah Y, Yamamoto T, Morioka Y, Dokholyan NV, Standley DM, Matsuura Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 Various miRNAs compensate the role of miR-122 on HCV replication.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008308	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Yuzy Fauzyah, Shiho Torii, Asuka Sato, Takuma Izumi, Takuya Yamamoto, Yuhei Morioka, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Characterization of mutation in the 5' UTR of HCV in miR-122-dependent propagation
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Yuzy Fauzyah, Shiho Torii, Asuka Sato, Takuma Izumi, Takuya Yamamoto, Yuhei Morioka, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Involvement of various miRNAs for an efficient replication of HCV
3. 学会等名 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Takuma Izumi, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Involvement of various miRNAs for an efficient replication of HCV
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Takuma Izumi, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Involvement of various miRNAs for an efficient replication of HCV
3. 学会等名 The 38th American Society of Virology 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono, C., Fukuhara, T., Tamura, T., Mori, H., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T., Chayama, K., Koike, K. and Matsuura, Y.
2. 発表標題 Identification of comparable miRNAs with miR-122 on the propagation of hepatitis C virus.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono, C., Fukuhara, T., Okuzaki, D., Tamura, T., Mori, H., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T., Koike, K. and Matsuura, Y.
2. 発表標題 miRNAs comparable with miR-122 on the propagation of hepatitis C virus.
3. 学会等名 The 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018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		
米国	Penn State University		