

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07520

研究課題名(和文) 腸管オルガノイド培養系を用いたヒトノロウイルス感染制御因子の探索

研究課題名(英文) Studies on host factors involved in human norovirus infection using human intestinal organoid

研究代表者

林 豪士 (Hayashi, Tsuyoshi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：80824648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年確立された腸管オルガノイド培養系を駆使してヒトノロウイルス(HuNoV)感染を規定する宿主因子の探索を行った。HuNoV感染腸管オルガノイドのRNAseq解析により、宿主抗ウイルス応答に重要な遺伝子群(JAK/STATシグナル伝達経路、インターフェロン誘導遺伝子など)の発現が感染により上昇することを明らかとした。さらに、当該応答に関わる主要構成因子の一つであるSTAT1遺伝子を欠損させた腸管オルガノイド(CRISPR-Cas9法により樹立)を用いた解析から、JAK-STAT経路依存的な抗ウイルス応答がHuNoV増殖の抑制に寄与していない可能性を示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HuNoVは公衆衛生上重要な病原体として認知されているものの、近年までin vitroでの感染培養系が確立されていなかったこともあり、その病原機構は良く分かっていない。本研究において、HuNoV感染制御因子の同定には至らなかったものの、宿主抗ウイルス応答に主要な役割を担うJAK-STAT経路がHuNoV増殖に抑制に寄与していない可能性を示したことは、HuNoVの増殖メカニズム解明に向けた重要な第一歩となった。さらに、宿主因子解析に必須のツールであるCRISPR-Cas9法による遺伝子欠損腸管オルガノイドを作製する系を確立したことは、今後さらに研究を発展させる上で大きな成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed host factors underlying human norovirus (HuNoV) infection using human intestinal organoid (HIO) being developed recently. By means of RNAseq analysis, I found that HuNoV infection induced host genes associated with anti-viral responses (e.g., JAK-STAT signaling pathway and interferon stimulation genes). Moreover, knockout of STAT1 gene in HIOs does not affect viral replication, suggesting that host antiviral responses governed by JAK-STAT signaling pathway do not play a role in inhibition of HuNoV replication in HIOs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトノロウイルス 腸管オルガノイド 宿主因子 自然免疫 CRISPR-Cas9

1. 研究開始当初の背景

ヒトノロウイルス(Human norovirus, HuNoV)は、嘔吐、下痢、腹痛などを主症状とするウイルス性の感染性胃腸炎及び食中毒を引き起こす。世界中で毎年 6 億人以上が罹患し、また発展途上国を中心に 20 万人以上が死亡すると推定されている。このように公衆衛生上重要な病原体であるが、有効な治療薬・予防薬は未だ確立されていない現状にある。また、HuNoV の *in vitro* 培養系が長らく確立されていなかったことから、HuNoV の感染メカニズムは良く分かっていない。

近年村上(協力研究者)は、米国ベイラー医科大学 Estes 博士との共同研究により、幹細胞由来腸管上皮オルガノイド(Human intestinal organoid, HIO)培養系により HuNoV を *in vitro* で安定的に増殖させることに世界で初めて成功した [Science, 2016]。これはノロウイルス研究分野において画期的なブレイクスルーとなり、発見以来 50 年不可能であった HuNoV 感染機構の解析が可能となった。

2. 研究の目的

本研究は、HIO 培養系を駆使して HuNoV 感染を規定する宿主因子を探索・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HuNoV 感染阻害候補因子を選別することを目的として、HuNoV 感染および未感染 HIO における遺伝子発現変動を RNAseq 法により評価した。

(2) 宿主抗ウイルス応答に関わる遺伝子に対する siRNA をリポフェクション法により HIO へ導入した後(遺伝子ロックダウン)、HuNoV を感染させ、24 時間後のウイルス増殖をリアルタイム PCR により測定した。

(3) STAT1 遺伝子に対する sgRNA および Cas9 を発現したレンチウイルスを HIO へ導入することで、STAT1 遺伝子をロックアウトした HIO を樹立した。次に、当該細胞内での HuNoV 増殖を評価した。

4. 研究成果

(1) RNAseq 解析により、HuNoV 感染に伴い、宿主抗ウイルス応答に重要なパターン認識受容体及びその下流のインターフェロン(IFN)誘導性 JAK/STAT シグナル伝達経路に関わる遺伝子群の発現が上昇することを明らかとした。

(2) 当該経路に関わる遺伝子(RIG-I, MDA5, MAVS)に対する siRNA をリポフェクション法により HIO に導入したところ、65%程度ロックダウンすることに成功した。しかしながら、遺伝子ロックダウンにより HuNoV の増殖効率が上昇するといった知見は得られず、より効率の良い遺

伝子ノックダウン系の確立が必要であることが示唆された。

(3) 宿主抗ウイルス応答に主要な役割を担う JAK/STAT 経路の主要な構成因子である STAT1 遺伝子を欠損した HIO の樹立を CRISPR-Cas9 法を用いて行った。Cas9 及び STAT1 遺伝子に対する sgRNA を導入した細胞内での STAT1 発現をウエスタンブロットにより評価したところ、当該タンパク質の発現が消失していたことから、STAT1 遺伝子が欠損した HIO の樹立に成功した。しかしながら、当該細胞内での HuNoV の増殖は、親株と比較して有意な差は認められなかった。よって、JAK-STAT 経路は HuNoV 感染制御因子として機能していない可能性が示唆された。

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 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Tsuyoshi, Murakami Kosuke, Hirano Junki, Fujii Yoshiki, Yamaoka Yoko, Ohashi Hirofumi, Watashi Koichi, Estes Mary K., Muramatsu Masamichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00623-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00623-21	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

1. 著者名 Hirano Junki, Murakami Kosuke, Hayashi Tsuyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 CRISPR-Cas9-Based Technology for Studying Enteric Virus Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genome Editing	6. 最初と最後の頁 888878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgeed.2022.888878	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

1. 著者名 Hayashi Tsuyoshi, Murakami Kosuke, Ando Hirokazu, Ueno Sayuri, Kobayashi Sakura, Muramatsu Masamichi, Tanikawa Takashi, Kitamura Masashi	4. 巻 671
2. 論文標題 Inhibitory effect of Ephedra herba on human norovirus infection in human intestinal organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 200 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.127	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林豪士, 村上耕介, 平野順紀, 藤井克樹, 山岡曜子, 大橋啓史, 渡士幸一, Mary K. Estes, 村松正道.
2. 発表標題 Screening of an antiviral compound library identifies dasabuvir as a novel anti-human norovirus inhibitor.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林豪士, 村上耕介, 平野順紀, 松田 麻未, 鈴木 亮介, 村松正道.
2. 発表標題 腸管オルガノイド培養系を用いたヒトノロウイルス感染に対する宿主免疫機構の解析.
3. 学会等名 第7回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林豪士, 村上耕介, 藤井克樹
2. 発表標題 腸管オルガノイド培養系を利用した新規抗ヒトノロウイルス阻害剤の探索
3. 学会等名 第63回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 豪士
2. 発表標題 ヒト腸管オルガノイドを用いた下痢症ウイルス研究の展開状況
3. 学会等名 ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 豪士, 村上 耕介, 平野 順紀, 松田 麻未, 鈴木亮介, 村松 正道
2. 発表標題 ヒトノロウイルス感染に対する宿主自然免疫応答の解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林豪士, 村上耕介, 小林さくら, 上野小百合, 松田麻未, 鈴木亮介, 村松正道
2. 発表標題 ヒトノロウイルス感染を制御する宿主因子の探索研究
3. 学会等名 第8回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsuyoshi Hayashi, Kosuke Murakami, Takashi Tanikawa, Hirokazu Ando, Sayuri Ueno, Sakura Kobayashi, Mary K. Estes, Masashi Kitamura, Masamichi Muramatsu
2. 発表標題 Screening of antiviral compounds and crude drugs for identifying inhibitors of human norovirus using human intestinal enteroids
3. 学会等名 8th International Calicivirus Conference (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------