

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460566

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼによる遺伝子改変システムを利用した新たなHCV研究系の確立

研究課題名(英文)Genome Editing system in HCV research

## 研究代表者

福原 崇介 (Fukuhara, Takasuke)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70598739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HCVのIn vitroの感染系が特定の癌細胞株や初代肝細胞に限られており、有用なin vivoモデルの確立も不十分である。そこで本研究では、人工ヌクレアーゼやCRISPR/Cas9系を用いたノックアウト細胞株を作製することにより、ウイルスの感染環や病原性に関する再現性の高い検討を行い、新たな知見を明らかにすることを目的とした。

これらの細胞を用いて、HCVの感染におけるアポリポ蛋白質、miR-122やオートファジーの意義が明らかになった。肝炎ウイルスは狭い感染指向性により、これまで再現性の高い研究を行うことが困難であったが、遺伝子改変技術の革新により、詳細な研究が可能になってきた。

研究成果の概要(英文)：In this study, for the detailed and reliable analyses about the interaction of HCV with host factors, we established gene knockout (KO) Huh7 cells. By using zinc finger nuclease (ZFN), TALEN and CRISPR/Cas9 system, several gene KO Huh7 cells were established. In the analyses about HCV assembly using ApoB, ApoE or MTTP KO cells, we clarified that apolipoproteins participate in the formation of infectious HCV particles. In the analyses about autophagy and HCV infection suggest that HCV-RNA replication inhibits de novo autophagy through the induction of LC3 lipidation around the replication complex. In addition, we revealed that miR-122 expression strongly enhances not replication but translation of viral RNA through the direct interaction with 5'UTR of HCV-RNA. The results in this study will provide clues to the life cycle of HCV and assist in the development of novel antivirals targeting the assembly process of HCV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 遺伝子改変技術 アポリポ蛋白質 オートファジー マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は致死的な肝硬変および肝細胞癌の主要な成因である。ペグ化インターフェロンおよびリビリンの併用に加え、ウイルス蛋白質を標的としたプロテアーゼ阻害剤が標準治療として用いられているが、一定の割合で治療抵抗性の患者が存在し、新たな治療標的の探索が必要である。in vitro の HCV 増殖系の開発によって、HCV の感染環の理解が進展し、新規治療薬の開発も大きく進歩した。1999年に HCV ゲノムの複製を評価できるレプリコンシステム(Lohmann et al. 1999 Science)が、2003年に HCV の細胞侵入を評価できるシュードタイプウイルス(Bartosch et al. 2003 JEM)が、そして2005年に脇田らによって肝臓由来の細胞株である Huh7 細胞で実験室株の HCVcc が確立された(Wakita et al. 2005 Nat Med)。申請者はこれまでに肝臓特異的な microRNA である miR-122 と Apolipoprotein E(ApoE)を非肝臓細胞に強制発現することによって、HCVcc の感染と増殖が可能になることを示してきた。

In vitro の培養系は徐々に発達してきたものの、やはり他のウイルスと比較するとその感染価は非常に低い。さらに HCV の感染域はヒトとチンパンジーに限定されており、免疫不全マウスにヒト肝臓を移植したキメラマウス以外に、HCV に感受性を示す小型実験動物は存在しない。従って、遺伝子欠損マウスを用いた再現性の高い解析が HCV の研究に応用できない。実際、ある宿主因子の HCV 増殖への関与を検討する際も、低力価での感染を siRNA で評価するため、再現性の高い結果を得難く、宿主因子の HCV 増殖に及ぼす影響やその作用機序は、施設間で全く違う形で報告されることも多い。それを打開すべく、多くの研究者が HCV に感受性を示すマウス感染系の樹立を試みてきたが、マウス由来の細胞株に対する HCVcc の感受性は低く、HCVcc の感染増殖を許容するモデルマウスの確立には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の3項目に着目し、人工ヌクレアーゼを用いても遺伝子欠損細胞株を樹立することで、その意義を明らかにしたい。

(1) HCV 感染にともない不完全なオートファゴソームの形成が誘導されることが2008年に報告されて以来、オートファジーが、HCV の複製や粒子産生に、あるいは、自然免疫応答や ER ストレスに関与するといった報告がなされた。最近では、オートファゴソーム膜上で HCV ゲノムが複製しているという報告もなされ、施設間での主張が大きく異なっている。本研究では、人工ヌクレアーゼによって、オートファジー

誘導の要因子である ATG13 と ATG5 遺伝子の欠損 Huh7 細胞株を樹立し、オートファジーが HCV 感染環へ及ぼす影響、特に不完全なオートファゴソーム誘導機構を明らかにしたい。

(2) HCV の効率のよい複製や翻訳に、肝臓特異的に発現する microRNA である miR-122 が重要であることが知られており(Jopling et al. 2005 Science)、miR-122 の特異的な阻害剤は抗 HCV 薬として臨床試験が行われ、その有効性が明らかにされている(Lanford et al. 2010 Science)。申請者らは HCV の感染を許容しない様々なヒト細胞株に miR-122 を強制発現することによって、HCVcc の感染や複製を許容できることを報告してきた。しかしながら、miR-122 が HCV ゲノムの翻訳や複製を強く増強するメカニズムは不明な点が多い。これまでに、miR-122 による HCV ゲノムの安定性亢進には RISC の主要構成因子である Argonaute2(Ago2)が重要であることが報告されている。本研究では、人工ヌクレアーゼを用いて miR-122 と Ago2 の遺伝子欠損 Huh7 細胞株を樹立し、HCV 複製における miR-122 の役割を詳細に解析する。

(3) 患者血清中に存在する HCV 粒子は数種類の Apolipoprotein を含み Lipoviroparticle の状態で存在していると考えられている。In vitro の感染系でも高い感染性を持つ粒子は Apolipoprotein B(ApoB)や ApoE を多く含むことが明らかになっている。これまでに siRNA を用いた検討で、HCV の粒子産生には ApoB や ApoE 等の VLDL 産生に関わる因子が重要であることが報告されてきた。申請者らは、非肝臓系の細胞株では細胞内で HCV が効率よく複製しても、感染性粒子が全く産生されないことを報告している。しかしながら、ApoB や ApoE がどのように HCV 粒子の産生に関与しているかは不明である。本研究では人工ヌクレアーゼを用いて、ApoB と ApoE の遺伝子欠損 Huh7 細胞株を樹立し、両因子の感染性粒子産生への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

HCV 感染を許容しうる細胞株である Huh7 細胞において、様々な遺伝子改変を行った。Zinc Finger Nuclease を用いて、ApoB、ApoE、MTTP、ATG5 および ATG13 の、TALEN を用いて miR-122 の、CRISPR/Cas9 系を用いて p62 および ATG14 の欠損 Huh7 細胞を樹立し、HCV 感染における宿主因子の意義を解析した。

## 4. 研究成果

siRNA による ApoB 及び ApoE の発現抑制によって、siApoB で約 1/2、siApoE では約 1/10 に HCV の粒子産生が低下した。一方、安定的ノックダウン Huh7 細胞では、

粒子産生への影響は認められなかった。さらに、ApoB 及び ApoE のノックアウト Huh7 細胞(Huh7/ApoB 及び Huh7/ApoE)からの HCV の粒子産生は、親株と同程度であり、Huh7/ApoE からの HCV の粒子産生は、ApoB のノックダウンによってより著明に抑制されたことから、ApoB と ApoE は、HCV の粒子産生における機能を互いに代償していることが示唆された。そこで、ApoB 及び ApoE のダブルノックアウト Huh7 細胞(Huh7/DKO)を樹立したところ、Huh7 細胞と比べて、HCV の粒子産生は約 1/100 に抑制された。さらに、ApoE のみならず ApoA や ApoC の発現によっても粒子形成が回復したことから、ApoA や ApoC も相補的な役割を持っていることが明らかになった ( Fukuhara et al. PLoS Pathogens 2014 )。

Huh7-122KO と Huh7-122Exp の両細胞において、HCV のシュードタイプウイルスの侵入効率には差が認められなかった。また、Huh7-122KO において HCV レプリコン細胞のコロニー形成数が顕著に減少していたものの、レプリコン RNA 複製量は miR-122 の有無に関係なく同程度であった。一方、マイクロアレイ解析を行ったところ、Huh7-122KO において既報の通り、脂質代謝関連遺伝子や HCV の粒子産生に重要とされている ApoB、ApoE や MTTP のような VLDL ( very low-density lipoprotein ) 関連遺伝子の発現も減少していた。そして HCVcc 感染 Huh7-122KO 細胞内における HCV-RNA 複製量は経時的に増加し、培養上清への感染性粒子産生も僅かに認められた。また、miR-122 欠損 Huh7.5.1 細胞で HCV を継代培養することで miR-122 非依存的 HCV を得ることができた。変異解析により G28A という miR-122 がない環境でのみ出現する特異的な変異を同定した。

Huh7/ATG5KO および Huh7/ATG13KO 細胞では血清飢餓および Rapamycin の処理によってオートファジーが誘導されないことを確認した。Huh7/ATG5KO 細胞では、HCV 感染に伴う LC3- の誘導と LC3 陽性凝集体の形成が完全に抑制されたが、Huh7/ATG13KO 細胞では抑制されず、HCV 感染に伴う LC3- の誘導は ATG13 非依存的であることが示された。また、Huh7/ATG5KO 細胞と ATG5 回復 Huh7 細胞に対する HCVcc の感染性は同等であり、HCV 感染に伴って誘導される LC3- は HCV の感染性に影響しないことが示唆された。また、免疫蛍光染色および免疫電顕にて LC3 陽性凝集体は HCV の複製複合体と共局在した。HCV 感染による LC3 陽性凝集体の形成は p62 の分解を伴わず、HCV 感染細胞では新たなオートファジーの誘導が抑制されていることから、HCV 感染細胞では新規のオートファジーの誘導が抑制されていることが示唆された。

## 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 4 件 )

1. Aizawa S, Okamoto T, Sugiyama Y, Kouwaki T, Ito A, Suzuki T, Ono C, Fukuhara T, Yamamoto M, Okochi M, Hiraga, M, Imamura M, Chayama K, Suzuki R, Shoji I, Moriishi K, Moriya K, Koike K, and Matsuura Y. TRC8-dependent degradation of the immature core protein regulates propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. **Nat Commun.** 2016; DOI: 10.1038/ncomms11379. 《査読有り》
2. Fukuhara T, Ono C, Puig-Basagoiti F, and Matsuura Y. Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particles Formation of Hepatitis C Virus. **Trends Microbiol.** 2015; DOI: 10.1016/j.tim.2015.07.007. 《査読有り》
3. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. **PLoS Pathogens** 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534. 《査読有り》
4. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. **J. Virol.** 2014; 88: 5578-5594. 《査読有り》

( 学会発表 )( 計 5 件 )

1. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014 年 9 月 24 日
3. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014 年 9 月 10 日

4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014年6月22日
5. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014年6月22日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福原崇介 (FUKUHARA Takasuke)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：70598739

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：