

## CRISPR/Cas9 システムを用いた肝細胞インターフェロン応答の解析

研究代表者： 竹内健司（医学系部門・学内講師）

共同研究者： 千原一泰（医学系部門・准教授）、定清直（医学系部門・教授）

<b>概 要</b>	I 型インターフェロン (IFN) (IFN- $\alpha/\beta$ など) と III 型 IFN (IFN- $\lambda$ ) はどちらも強力な抗ウイルス活性を有するサイトカインである。両 IFN の細胞内シグナル伝達機構はよく似ており、STAT1、STAT2、IRF9 からなる蛋白質複合体 ISGF3 が主要なシグナル伝達因子且つ転写活性化因子だと考えられている。本研究では、ヒト肝細胞癌由来培養細胞株 Huh7.5 の IFN 応答における ISGF3 構成蛋白質の重要性を検討するため、CRISPR/Cas9 システムの活用により細胞の STAT1 遺伝子等をノックアウト (KO) し、樹立した KO 細胞株の IFN 応答能を調べた。C 型肝炎ウイルス複製抑制効果と IFN 刺激遺伝子転写誘導効果を指標に検討した結果、IFN- $\alpha$ に対する細胞の応答は STAT1 がなくても起こるのに対し、IFN- $\lambda$ に対する応答は STAT1 依存性であることが分かった。この違いは、それぞれの IFN が生体防御において果たす役割の違いと何らかの形で関連している可能性がある。
<b>関連キーワード</b>	インターフェロン、細胞内シグナル伝達、C 型肝炎ウイルス、CRISPR/Cas9

### 研究の背景および目的

I 型 IFN と III 型 IFN は強力な抗ウイルス活性を有するサイトカインである。前者の受容体が様々な細胞種で発現しているのに対し、後者の受容体の発現は粘膜・皮膚の上皮細胞や肝細胞などに限られている。このため、それぞれの型の IFN に応答可能な細胞種には大きな違いがある。その一方、両 IFN の細胞内シグナル伝達機構はよく似ており、STAT1、STAT2、IRF9 からなる蛋白質複合体 ISGF3 が主要なシグナル伝達因子且つ転写活性化因子だと考えられている。

細胞表面の IFN 受容体に IFN が結合すると、受容体の細胞質側ドメインに会合しているキナーゼが活性化し、これが STAT1/2 の特定チロシン残基

をリン酸化する。すると、ISGF3 が形成されて核内に移行、抗ウイルス蛋白質などをコードする IFN 刺激遺伝子 (ISG) 群の転写を誘導する。どちらの IFN 刺激でも主たる転写活性化因子が同じであるため、ISG の多くは両者で共通することになる。

しかしながら、STAT1-KO マウスを用いた研究等に拠ると、STAT1 がなくても細胞は I 型 IFN に応答して抗ウイルス状態になるという。そこで、本研究では、ヒト肝細胞癌由来培養細胞株 Huh7.5 の両 IFN に対する応答の STAT1 依存性を検討することにした。この目的のため、CRISPR/Cas9 システムを用いて STAT1 遺伝子等の KO 細胞株を樹立し、これら KO 細胞の IFN 応答能を調べた。

### 研究の内容および成果

#### 結果 1. IFN- $\alpha$ の抗ウイルス作用の STAT1 依存性

C 型肝炎ウイルス (HCV) キメラ株 (遺伝子型 2a) に感染した Huh7.5 細胞を IFN- $\alpha$  で処理すると、感染細胞内のウイルス核酸・蛋白質発現レベルは徐々に減少していく。この抗 HCV 効果は、ヒトゲノムを編集できないと思われるガイド RNA を導入した基準細胞 (NT 細胞) でも再現された。これに対し、STAT2-KO 細胞及び IRF9-KO 細胞では IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果が消失していた。一方、STAT1-KO 細胞では、親細胞や基準細胞に比べて若干弱いものの、IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果が認められた (図 1)。また、HCV Con1 株 (遺伝子型 1b) のサブゲノムレプリコンを保有する Huh7.5 細胞の STAT1 遺伝子を KO した場合も、IFN- $\alpha$  の抗 HCV 効果が確認された。

以上の結果は、IFN- $\alpha$  が抗 HCV 効果を発揮する

に当たり、ISGF3 構成蛋白質三種のうち STAT1 は必ずしも必要でないことを示す。

#### 結果 2. IFN- $\lambda$ の抗ウイルス作用の STAT1 依存性

STAT1-KO 細胞 (図 1) と STAT2-KO 細胞、どちらも IFN- $\lambda$  の抗 HCV 効果は消失していた。

結果 1 と 2 より、IFN- $\alpha$  と IFN- $\lambda$  の抗 HCV 作用は STAT1 依存性において大きく異なることが分かった。

#### 結果 3. ISG 転写誘導の動態

STAT1-KO 細胞では IFN- $\lambda$  処理しても ISG である PKR と MX1 遺伝子の転写は誘導されなかった。一方、IFN- $\alpha$  処理では転写誘導が認められた。ただし、IFN- $\alpha$  処理 8 時間後で見ると、基準細胞と比べ、

KO 細胞では転写レベルが低く、転写誘導に遅れが生じていた。この遅れは前述した抗 HCV 効果の若干の減弱と関係しているかも知れない。

#### 結果 4. IFN 処理細胞のマイクロアレイ発現解析

結果 3 の通り、STAT1-KO 細胞の IFN- $\alpha$  処理で起こる PKR と MX1 遺伝子の転写誘導は基準細胞の場合と比べ遅延していたが、IFN 処理 24 時間後では両遺伝子の転写レベルが基準細胞でのレベルとほぼ同等になった。そこで、この時点でマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。

結果として、基準細胞の IFN- $\alpha$  処理、 $\lambda$  処理、及び、STAT1-KO 細胞の IFN- $\alpha$  処理により 3 倍以上転写誘導された遺伝子が、それぞれ、42、66、90 遺伝子あったのに対し、STAT1-KO 細胞の IFN- $\lambda$  処理で誘導されていたのはわずか 1 遺伝子であった（遺伝子プローブセットのうち Gene Symbol が付与されていた 31, 128 セットに限って集計）。基準細胞の IFN- $\alpha$  処理で顕著に転写誘導された上記 42 遺伝子のうち 38 遺伝子（90%）は KO 細胞の IFN- $\alpha$  処理でも 3 倍以上転写誘導されていた。

以上より、STAT1 の有無に関わらず Huh7.5 細胞が IFN- $\alpha$  に応答できるのは明らかである。

#### 結果 5. STAT2 チロシンリン酸化の STAT1 依存性

IFN 応答は STAT 蛋白質のチロシンリン酸化を経て進行する。STAT1-KO 細胞では IFN- $\lambda$  処理しても STAT2 のチロシンリン酸化は認められなかった。これに対し、IFN- $\alpha$  処理では、基準細胞に比べ減弱していたものの、STAT2 のチロシンリン酸化が長時間に渡って観察された。

このことから、Huh7.5 細胞の IFN- $\alpha$  応答と IFN- $\lambda$  応答が STAT1 依存性において異なっていた理由は、おそらく、STAT2 チロシンリン酸化の STAT1 依存性の違いに基づくものと思われる。

#### 考察

STAT1 を含まない転写活性化因子として STAT2 と IRF9 を含む複合体を想定すると、今回得られた実験結果を合理的に解釈できるように思われる（図 2）。

本研究では、I 型、III 型 IFN の両方に応答可能なヒト由来細胞株を用い、両 IFN のシグナル伝達が STAT1 依存性において異なることを明らかにし

た。この違いは、それぞれの型の IFN が生体防御において果たす役割の違いと何らかの形で関連している可能性がある。例えば、ウイルスの中には STAT1 を標的分子として IFN 応答を阻害するものがあるが、今回観察された STAT1 非依存性シグナル伝達経路は、このようなウイルスに対抗するべく I 型 IFN のシグナル伝達機構においてのみ発達した、予備的経路なのかもしれない。

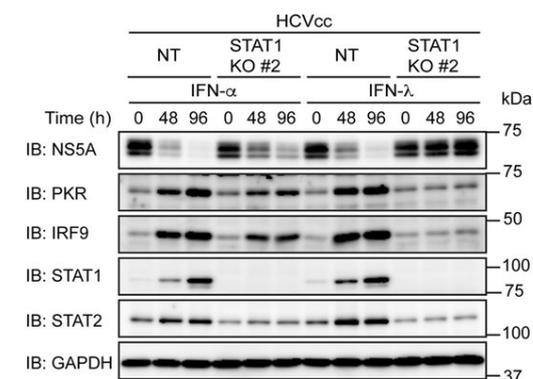


図 1. HCV 感染 STAT1-KO 細胞の IFN- $\alpha$  または IFN- $\lambda$  処理による ISG 発現産物（PKR 蛋白質など）の蓄積とウイルス蛋白質 NS5A の減少<sup>1)</sup>

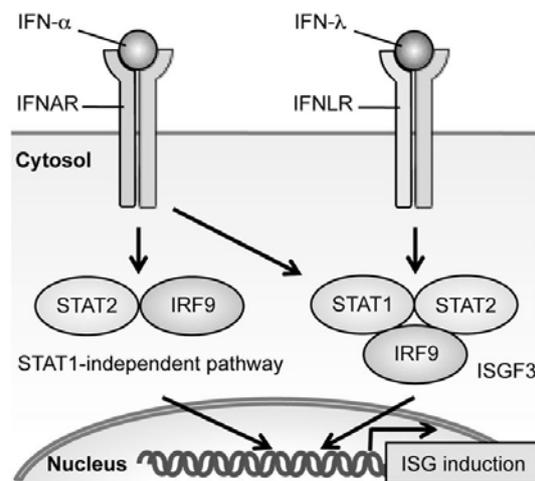


図 2. IFN- $\alpha$  と IFN- $\lambda$  のシグナル伝達の STAT1 依存性における違い<sup>1)</sup>

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

#### 「主な発表論文等」

1) Yamauchi S, Takeuchi K, Chihara K, Honjoh C, Kato Y, Yoshiki H, Hotta H & Sada K. STAT1 is essential for the inhibition of hepatitis C virus replication by interferon- $\lambda$  but not by interferon- $\alpha$ . *Scientific Reports*, 6, 38336 (2016).

#### 「特記事項」

本助成による成果は、山内翔太特命助教（H28 年 7 月退職。現在、米国に留学中）を筆頭著者とする左記論文に加えられ、公表された。

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費補助金・基盤研究（C）・H29-31 年度「ヒト I 型、III 型インターフェロンシグナル伝達機構の比較解析」代表・申請中。