

27C-pm09

Occludin のノックアウト肝細胞の樹立と本細胞を用いた HCV 感染の解析

○白砂 圭崇^{1,2}, 谷田 以誠¹, 清水 芳実^{1,3}, 鈴木 哲朗⁴, 脇田 隆宇⁵, 花田 賢太郎¹, 近藤 昌夫³, 安部 良², 深澤 征義¹ (1国立感染研・細胞化学部, 2東京理大院・生命科学研究所, 3阪大院薬, 4浜松医大・医, 5国立感染研・ウイルス第二部)

【背景・目的】C 型肝炎ウイルス (HCV) の宿主細胞への侵入に重要な宿主因子として Occludin (OCLN) が知られている。肝細胞における OCLN を介する HCV 感染機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いてヒト肝由来 Huh7.5.1 細胞から OCLN ノックアウト細胞を樹立し、本細胞を用いて HCV 感染機構について解析を行った。

【方法・結果・考察】CRISPR/Cas9 システムを用いて、Huh7.5.1-8 細胞のゲノム DNA の OCLN 翻訳領域 2 箇所を標的に変異を導入した。クローニングした複数の細胞で OCLN の発現が欠損していることをイムノプロット解析で確認した。これらの株の 1 つを crOCLN 細胞と命名した。crOCLN 細胞の OCLN ゲノムの塩基配列には標的配列間 (158 塩基) の欠損が見られた。この crOCLN 細胞を用いて HCV 感染の解析を行った。HCV-JFH1 株を用いて侵入過程を評価した結果、crOCLN 細胞への侵入が見られず、OCLN の発現を戻した crOCLN 細胞には感染が確認できたことから、ヒト肝細胞において HCV 感染に OCLN の発現が必須であることが確認された。HCV の侵入には OCLN の第 2 細胞外ドメインが重要とされている。そこで、ヒト由来 OCLN のアミノ酸残基をマウス由来のものに置換した変異体を crOCLN 細胞に発現させて HCV に対する感染を評価したところ、少なくとも 223 番目の Ala 残基が HCV 感染に必須であることが判明した。また、細胞-細胞間感染に OCLN が必須であることも明らかとなった。crOCLN 細胞は未だ不明な点の多い HCV 侵入過程の理解に有用なツールとして期待される。