

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用

所属：国立感染症研究所ウイルス第1部
研究者：森川 茂

研究要旨：新興・再興感染症の原因ウイルスの増殖やウイルス感染により誘導される細胞死に関与する細胞側の遺伝子を同定することを目的として、細胞の mRNA に対する siRNA をレンチウイルスベクターで発現する細胞ライブラリーを構築した。ワクチニアウイルスの感染や紫外線照射では細胞死が遅延あるいは回避された細胞から、その効果に関連する可能性のある siRNA 配列が得られた。一方、デングウイルスを感染させると、siRNA 発現細胞では細胞死が増強された。また、SARS ウイルスの N 蛋白質を発現すると細胞死が誘導されるが、細胞死が遅延した細胞では分子シャペロンの機能を有する Hsp40 等の siRNA 等が同定された。また、より多くの遺伝子をカバーする siRNA ライブラリーから候補 siRNA 発現カセットを回収して再度細胞へ transduction する系を確立した。

分担研究者：

- (1) (株) ジェノファンクション・研究部長
鈴木要介
- (2) 国立感染症研究所ウイルス第1部室長
高崎智彦
- (3) 国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官
水谷哲也
- (4) 国立感染症研究所ウイルス第1部長
倉根一郎

研究協力者：

石井孝司、酒井宏治、林昌宏（国立感染症研究所）

A. 研究目的

近年、SARS、西ナイル熱、サル痘などの新興・再興感染症が頻発している。その対

策としては、迅速な診断法の確立とともにウイルスの増殖機構や病原性発現機構を理解することが重要である。一方、siRNA の技術により遺伝子の発現・翻訳を効率良く阻害することが可能になった。さらに、siRNA 発現ライブラリーの作製技術により、標的とするウイルス遺伝子や細胞で発現する個々の遺伝子を網羅的に阻害する実験系が確立された。ウイルスは増殖の場として細胞を必要とし、細胞の蛋白質や代謝系を利用して複製する。細胞の遺伝子に対する siRNA 発現ライブラリーを細胞に導入すると、個々の遺伝子がノックダウンした細胞の集合体を得られる。この細胞群にウイルスを感染させると、ウイルスの増殖に必須の蛋白質がノックダウンされた細胞はウイルスによる細胞障害から免れて生き残るこ

とが期待される。昨年度は、レンチウイルスベースの siRNA ライブラリー発現細胞を作製し、SARS ウイルス・西ナイルウイルス・ワクチニアウイルスを感染させたが、SARS ウイルスと西ナイルウイルスでは対象細胞と比較して有為に生存する細胞が得られなかった。ワクチニアウイルスでは生存する細胞から siRNA の配列が得られたが、ウイルスの複製に関与することが示唆されるような遺伝子は見つからなかった。そこで、本年度は、複数のポイントでサンプリングすることによって共通の siRNA 配列を得ること（ワクチニアウイルス）、西ナイルウイルスに近縁で病原性の弱いウイルスを用いること（デングウイルス）、ウイルスの蛋白質発現により評価する系を確立すること（SARS ウイルス）、またウイルス以外の細胞死刺激を加えること（紫外線照射）で、これらの問題点を解決し、ウイルスによる細胞死に関与する細胞遺伝子群を同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. siRNA 発現細胞ライブラリー：

ワクチニアウイルスと西ナイルウイルスは HeLa 細胞に感染して細胞障害を起こすが、SARS ウイルスは HeLa 細胞に感染できない。そこで、HeLa 細胞に SARS ウイルスのレセプター ACE2 を安定に発現する細胞（HeLa-A3）を作製し、レンチウイルス siRNA library を感染して薬剤耐性細胞を得て siRNA 発現細胞ライブラリーを作製した。

2. 細胞へのウイルス感染あるいは紫外線照射：

上記細胞にワクチニアウイルス、デングウイルス、SARS ウイルスの N 蛋白発現増

殖欠損型組換えワクチニアウイルスを感染させて細胞障害性を観察した。また、紫外線照射によりアポトーシスを誘導した。ウイルス感染後、あるいは紫外線照射後に細胞死が遅延あるいは細胞死を回避した細胞群から RNA を抽出し、RT-PCR により siRNA を増幅して塩基配列を決定した。

3. ジェノファンクション社製 siRNA library の効率的スクリーニング法の検討：

ジェノファンクション社が確立した 2 本鎖 DNA を原料とした siRNA 発現ベクターライブラリーの作製方法を応用して、レンチベクターベースの siRNA library を構築した。これを用いた効率良い標的遺伝子スクリーニング法に関して検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒト検体を用いず、また実験動物も使用していない。遺伝子組換え実験は、文部科学省の遺伝子組換え実験の承認を得て行っている。

C. 研究成果

1) siRNA 発現細胞ライブラリー作製に用いたシステムでは、感染後に siRNA を発現するが 5' LTR プロモーターは不活性化される。このため、細胞遺伝子の LTR による発現活性化はなく、発現 siRNA による標的細胞遺伝子の発現抑制のみが期待される。本細胞ライブラリーにウイルス感染、ウイルス蛋白発現、あるいは紫外線照射を行なった結果、以下の結果を得た。

1. siRNA 発現細胞ライブラリーへのワクチニアウイルス感染：

ワクチニアウイルス感染後の日数や感染細胞群の異なる条件で、感染後に生き残った細

胞群から抽出した RNA から siRNA 配列を決定して、共通の配列の有無について検討した。その結果、glucocorticoid receptor 遺伝子に対する siRNA が感染 4 日目と 7 日目の生存細胞群から共通して得られ、ADP-ribosyltransferase-like 2 遺伝子に対する siRNA が、感染 7 日目の複数の感染実験から得られた。これらの遺伝子がワクチニアウイルスの複製やウイルスによる細胞死に関与している可能性が示唆された。

2. siRNA 発現細胞ライブラリーへのデングウイルス感染：

昨年度は、siRNA 発現細胞ライブラリーに西ナイルウイルスを感染した結果ほとんどの細胞が死滅し、siRNA 発現細胞群で対象細胞群と比較して有意に生き残った細胞が出現することはなかった。そこで、本年度は西ナイルウイルスに近縁で細胞毒性の弱いウイルスを探索した。その結果、デングウイルス 2 型は HeLa 細胞に対する細胞障害性が弱く、感染後 10 日目から細胞死が観察されるようになることがわかった。そこで、siRNA 発現細胞ライブラリーおよび対象細胞にデングウイルス 2 型を 10 multiplicity of infection (m.o.i.) で感染させた結果、デングウイルス 2 型の siRNA 発現細胞ライブラリーに対する細胞障害性は高く、感染後 7 日目で大部分の細胞が死滅した。対象細胞では感染 7 日目では細胞変性効果は認められなかった。この現象は予測した結果と逆で、発現している siRNA の種類とは関係なくレンチウイルスベクターが感染した細胞に、細胞障害性が早く現れている。この感染後 7 日目で生き残っている細胞から RNA を抽出して、発現している siRNA の配列を決定したが、細胞死やウイルスの増殖に関与し

ていると考えられる遺伝子の情報は得られなかった。

3. siRNA 発現細胞ライブラリーへの SARS ウイルス nucleocapsid(N)蛋白質発現：

SARS ウイルスの N 蛋白質に注目して、N を発現する非増殖型組換えワクチニアウイルスを構築し(DIs-N)、Vero E6 細胞に 5 m.o.i で感染させて 18 時間後に蛋白質を抽出し、Western blot 法によりリン酸化されるシグナル伝達関連蛋白質を検出した。対象として GFP を発現するワクチニアウイルスベクター (DIs-GFP) を 5 m.o.i で感染させて比較した。これまでの研究から、SARS ウイルス感染細胞では p38 MAPK がリン酸化されることにより細胞死が誘導され、Akt のリン酸化は生存シグナルであることが明らかになっている。DIs-N 感染細胞では対象と比較して p38 MAPK のリン酸化には変化が認められなかったが、Akt は有為にリン酸化フォームが増加していた。この結果は、細胞内で N 蛋白質が Akt をリン酸化させることにより細胞死から免れるように働いていると考えられるが、DIs-N 感染細胞では細胞死が強く誘導されるので、Akt 以外のシグナル伝達経路の活性化が細胞死を誘導していることが示唆される。すなわち、N 蛋白質は細胞死の誘導と抑制の両方に関与している可能性がある。そこで、DIs-N を siRNA 発現 HeLa-A3 細胞ライブラリーに 2 m.o.i で感染させて 48 時間後に生き残った細胞群の siRNA の塩基配列を検討したところ、Hsp40 に対する siRNA の配列が得られた。

4. siRNA 発現細胞ライブラリーへの紫外線照射：

細胞へ紫外線を照射すると染色体 DNA の損傷が起こる。初期段階では修復機構が働いているが、修復に関与する酵素の減弱にともないカスパーゼが関与するアポトーシスにより細胞死が進行していく。本研究では、紫外線照射によるアポトーシス誘導条件を検討し、その条件で siRNA 発現細胞ライブラリーを 4 dishes、対象として siRNA を発現しない HeLa 細胞を 2 dishes に紫外線照射した。照射後 9 日後に細胞を固定しクリスタルバイオレット染色して、生存細胞コロニーの形成を比較したところ、対象ではほとんどの細胞が死滅したのに対して、siRNA 発現細胞ライブラリーでは平均 100 コロニー/dish の生存細胞コロニーが認められた。そこで、紫外線照射から 12 日目の siRNA 発現細胞ライブラリー 6 dishes から生存細胞群の siRNA の塩基配列を決定した。その中で ERK3 やグランザイムに対する siRNA 配列が得られた。

2) ジェノファンクション社製 siRNA library の効率的スクリーニング法:

1. lentiviral vector の調製:

lentiviral vector の調製に用いる siRNA 発現ライブラリーは host を Stbl4 とした glycerol stock となっており、菌の増殖速度差等に起因するライブラリーの不均一化を起こさないためには、寒天培地あるいは軟寒天培地での増幅が最適であることが明らかとなった。

2. transduction した細胞からの library の回収方法:

lentiviral vector を transduction した細胞を用いてスクリーニングを実施した後、標的遺伝子を明らかにするために、細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として promoter-

hairpin-terminator カセットを PCR にて増幅しそれを再び plasmid に戻すという方法で library の回収を行う系を確立した。

3. 回収された plasmid の sequencing:

本 siRNA library にある強固な hairpin 構造が、細胞から回収した siRNA を含む PCR 産物の sequencing 反応の障害になる。そこで、強固な hairpin 構造を有する siRNA の stem 部分を制限酵素で切断した後 sequencing 反応を行うことにより sequencing が可能となった。

D. 考察

siRNA library 発現細胞は、SARS, 西ナイル、ワクチニアウイルス全てに感受性があるが、これらのウイルスを感染させた結果、ワクチニアウイルスでのみ、細胞障害の遅延が認められた。ワクチニアウイルスによる細胞障害を抑制できる siRNA が存在すること、すなわち細胞障害の発現に関与する宿主因子があることが示唆された。glucocorticoid receptor 遺伝子や ADP-ribosyltransferase 遺伝子に対する siRNA は、本研究により得られたワクチニアウイルスの増殖もしくはウイルスによる細胞死を抑制できる候補である。

SARS ウイルスの N 蛋白質(SARS-N)を発現すると細胞死が誘導されるが、一方で細胞死を抑制する働きがあると考えられる Akt や JNK の細胞内シグナル伝達経路が活性化されることが明らかとなった。このことは、SARS-N 発現細胞では、細胞死を誘導する別なシグナル伝達経路が活性化していると考えられる。siRNA 発現細胞ライブラリーにワクチニアウイルスベクターで SARS-N を発現させ、生存細胞群で発現している siRNA の配列を調べたところ、Hsp40 の遺伝子配列が得ら

れた。Hsp40 は分子シャペロンであり、Hsp70 と共に未成熟蛋白質の折り畳みを促進することが知られている。Hsp40 の siRNA が発現している細胞では、Hsp40 量が低下した結果、正常な SARS-N 発現が抑制されて細胞障害性が低下した可能性がある。しかし、Hsp40 のウイルス増殖への関与は、より複雑な場合がある。例えば、HIV では Nef と相互作用して核内へ移行しプロウイルス遺伝子の発現を促進するが、HBV では Hsp40 は core 蛋白と相互作用してウイルス複製を抑制する。このため、SARS ウイルス増殖における Hsp40 の役割に関しては、今後、ウイルス蛋白との直接的な結合能や RNA 複製への影響など詳細に検討する必要がある。

一方、siRNA 発現細胞ライブラリーでは、デングウイルス感染による細胞障害性が増すことが明らかとなった。その理由のひとつとして考えられることは、siRNA ライブラリー導入細胞はすでにレンチウイルスの感染を受けており、全ての細胞に何らかの細胞内環境の変化が生じている可能性がある。レンチウイルスは細胞の染色体 DNA にランダムにインテグレートされるので、レンチウイルスの挿入により特定の細胞 mRNA の発現に変化が生じたとは考えにくい。また、挿入 DNA からはウイルス性蛋白質が発現されるシステムではない。用いた実験系では siRNA 発現細胞をピューロマイシンで選択するため、ピューロマイシン耐性遺伝子がデングウイルスの細胞障害性を増強させている可能性がある。

このように、siRNA 発現細胞ライブラリーにウイルスを感染させる実験系では、ワクチニアウイルスでのみ細胞死の遅延が認められたが、これらの細胞でもウイルス増殖は阻害されずに最終的には細胞が死滅した。このこ

とは、siRNA により単一の遺伝子発現を抑制するだけではウイルス増殖を完全に抑制することは難しいため、あるいはそのような細胞遺伝子は細胞の生存に必須であり siRNA でノックアウトした細胞が得られないためと考えられる。

一方、siRNA 発現細胞ライブラリーへの致死的な紫外線照射では、細胞死を耐過する細胞群が得られた。ウイルス感染による細胞死には多くのウイルス蛋白質が関与するので細胞死に至る機構は複雑であるのに対し、紫外線照射による細胞死は一過性の DNA 損傷から始まり、修復酵素や p53 などが関与するなど、そのメカニズムはウイルス感染に比べると明らかにされていることが多い。紫外線照射後に生存した細胞から得られた siRNA の配列は多岐にわたり、全ての siRNA により発現抑制された蛋白がアポトーシスに関与しているとは考え難いが、このような系では、細胞死に関与する細胞遺伝子を特定するのが比較的容易であることが明らかとなった。

これらの実験系では、候補 siRNA の配列情報までは得られるが、候補 siRNA 発現カセットを回収して再度細胞へトランスダクションする系がなかった。そこで、siRNA 発現カセットを PCR で回収して再び plasmid に戻す系を確立した。この回収系を用いることで、より多くの遺伝子をカバーする siRNA 発現細胞ライブラリーをジェノファンクションライブラリーにより作製して、同様の実験を行うことにより、特定のウイルスに対して増殖抑制につながる siRNA を得ることが可能になると思われる。

E. 結論

レンチウイルスベクターを用いて作製し

た siRNA 発現細胞ライブラリーでは、ワクチニアウイルスによる細胞変性効果を遅延できることが明らかとなり、その効果のある siRNA の候補を得ることができた。また、SARS ウイルスの N 蛋白質や紫外線照射による実験でも、これら刺激に対して効果のある siRNA の配列の候補を得た。しかし、デングウイルスを用いたときには、逆に siRNA ライブラリー発現細胞への細胞障害性が増強した。

FAOBMB Congress, 2006年6月 Kyoto, Japan

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Saijo M, Kanaji Y, Shirota K, Kurane I, Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. 347:261-265.

2. 学会発表

1. 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本綾、倉根一郎、森川茂. SARS-CoVと *Mycoplasma fermentans* の共感染が細胞に及ぼす影響. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
2. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Endo D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Molecular mechanism of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社