

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

研究期間：平成16年4月～平成19年3月

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 コロナウイルスの 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。西ナイルウイルスのベクターである蚊の細胞では、JNK シグナル伝達系の活性化は、ウイルス感染を促進し、アポトーシスを抑制することが明らかになり、JNK の阻害剤や siRNA により蚊の幼虫の脱皮が阻害されることを明らかにした。

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：

(1) 江下優樹 (大分大学)

(2) 佐藤朝光 (福岡大学)

(3) 石井孝司、酒井宏治、林昌宏、福士秀悦、

緒方もも子、西條政幸 (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。本研究は、ウイルスの複製に必須の遺伝子をノックダウンできる siRNA を新しい抗ウイルス薬開発へつながる成果を得ることを最終目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. プラスミドベースの siRNA library の作製 :

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用いて、Vero E6 細胞、HeLa 細胞の mRNA から cDNA を作製後、siRNA library を構築した。同様の方法で、SARS コロナウイルスの受容体であるヒト由来のアンギオテンシン変換酵素 II (ACE-2) についても siRNA library を構築した。

### 2. プラスミドベースの siRNA library からの目的 siRNA 遺伝子の回収 :

siRNA library を Vero E6 細胞にトランスフェクション後 48 時間でワクシニアウイルスを感染させ、さらに 48 時間後に生き残った細胞からハート法によりプラスミドを回収した。AmpliTaq Gold を用いて tRNA のプロモーター及びターミネーターを挟むように PCR を行ない、目的のバンドを得た。

### 3. siRNA のトランスフェクション :

合成 GSK-3 $\beta$  を PolyMag と Fugene6 を組み合わせで Vero E6 細胞にトランスフェクションした。

### 4. Western blot 法による解析 :

ウイルスを細胞に感染後、経時的に蛋白質を抽出し、2-ME 添加の条件で 10% もしくは 10-20% のグラジエントゲルを用いて、SDS-PAGE をおこなった。メンブランに転写後、ブロッキングをおこない各種一次抗体を反応させた。約 18 時間後にメンブランを洗浄後、二次抗体を 30 分反応させた。抗原抗体反応の検出は発光法と発色法を用いて行った。

### 5. VSV-S の作製 :

SARS コロナウイルスの S 蛋白質発現 plasmid をトランスフェクションした 293T 細胞に Dr. M. Whitt より分与された VSV $\Delta$ G\*-G ウイルス (VSV ウイルスの膜タンパク質を欠き、代わりに GFP 遺伝子を組み込んである) を感染させ、24 時間後、培養上清 (SARS コロナウイルスの S 蛋白質を被った VSV シュードタイプウイルス) を回収した。作製したシュードタイプウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、蛍光顕微鏡を用いて GFP の発光を指標に感染を評価した。また、蛍光顕微鏡下で細胞を写真撮影後、GFP 発現細胞数を ImageJ software でカウントした。

### 6. ACE-2 発現プラスミドおよび ACE-2 発現細胞株の作製 :

ヒト由来の ACE-2 cDNA を pTarget ベク



ターにクローニングし、HeLa 細胞に導入後 G418 による選択培養を行い、生存細胞から細胞クローニングにより、ACE-2 発現細胞株 HeLa-A3 を作製した。

#### 7. レンチウイルススペースの siRNA library の構築 :

(1) B-Bridge 社の GeneNet siRNA ライブラリー (Human 8.5K siRNA Library) を用いた。この siRNA library は、FIV ベースの遺伝子導入を行なう library で、ヒトの既知の 8,500 遺伝子をターゲットにした siRNA library からなり、遺伝子導入細胞を puromycin で選択できる。また、細胞への導入効率を検討するために、GFP を発現する FIV レンチベクターを用いた。

(2) ジェノファンクション社において、HeLa cDNA, VeroE6 cDNA を材料とした human tRNA<sup>val</sup> promoter による siRNA 発現 library を作製した。lenticral vector においては、human tRNA<sup>val</sup> promoter による siRNA 発現効率が低いことが明らかとなったため、これらの library から short hairpin RNA (shRNA) をコードする inverted repeat (siRNA 発現カセット) を切り出して、human U6 promoter 発現型の plasmid に移すことにより、library を U6 promoter 発現型とし、この library から切り出した siRNA 発現カセットを lenticral vector に移すことにより lenticral vector 搭載型の library を作製した。その後、shRNA をコードする inverted repeat の両端に位置する *SacI* site と *SalI* site を除去することにより、遺伝子抑制能が向上することが明らかになったため、U6 promoter 発現型 library から *SacI* site と *SalI* site を除去し、そこから切り出した siRNA

発現カセットを lenticral vector に移すことにより lenticral vector 搭載型 (*SacI/SalI* 除去型) の library を作製した。また、このレンチベクターベースの siRNA library 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。

#### 7. ウイルス感染や紫外線照射と siRNA 回収 :

ワクチニアウイルス、SARS コロナウイルス、西ナイルウイルス、デングウイルスを siRNA ライブラリー発現細胞に感染後、生き残った細胞から RNA か DNA を抽出し、RT-PCR 法または PCR 法により siRNA を増幅し遺伝子配列を決定した。紫外線照射については、培養液を除去後 2 秒間照射し、再び培養液を添加した。

#### 8. JNK siRNA の作製 :

ヒトスジシマカ由来の細胞 C6/36 から PCR 法で、JNK の遺伝子を増幅した。この PCR 用プライマーには T7 RNA ポリメラーゼの認識配列が付加されているので、PCR 産物精製後に T7 RNA ポリメラーゼによって siRNA を作製した。もしくは、塩基配列から siRNA の標的になると予測される部位を決定して合成した。

#### 9. 蚊の幼虫へのマイクロインジェクション :

JNK の siRNA は 3 齢幼虫へマイクロインジェクションをおこない、成虫になる割合で siRNA の効果を判定した。

#### 10. 蚊の幼虫への siRNA の導入 :

96 穴プレートに 1  $\mu$ g/100  $\mu$ L になるよう

に JNK の siRNA を調整し、1 穴に 1 匹のヒトスジシマカ (*Aedes Albopictus*) の 1 齢幼虫を入れて飼育し、幼虫の生死を観察した。

(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. プラスミドベースの siRNA library の構築:

siRNA 発現ライブラリーの調製は多段階の操作であるため、その調製効率は極めて低いが、本研究において検討した結果、各段階における実験条件を厳密に調整し最適化を行うことにより、効率よく siRNA 発現ライブラリーを調製することに成功した。SARS コロナウイルス・ワクシニアウイルス・西ナイルウイルスに共通の感受性細胞 (VeroE6・HeLa-A3) で発現している遺伝子を網羅的にカバーする siRNA 発現ライブラリーの作製、および SARS コロナウイルスのレセプターである ACE-2 の全配列をカバーする siRNA 発現ライブラリーを効率よく作製することに成功した。

### 2. プラスミドベースの siRNA の基礎的研究:

プラスミドベースの siRNA library の中から効率よく目的の siRNA 発現プラスミドを選択する方法について検討するために、ACE-2 に対する siRNA library を構築し、3 つの方法で siRNA 効果を評価した。この ACE-2 siRNA library は理論上約  $10^5$  種類の ACE-2 遺伝子に対する siRNA を含む。本研究では、ACE-2 siRNA library を有する大腸菌 20 コロニーをひ

とつのグループとして、60 グループ (合計 1,200 遺伝子) からプラスミドを抽出した。

(1) 本研究のために作製した VSV-S シュードタイプウイルス (VSV-S) は自立増殖できないので安全性が高いという特徴を持ち、このウイルスの感染の有無は GFP の発現を指標にして感染後 7 時間で定量的に判定可能という利点を持つ。この VSV-S は ACE-2 を発現している Vero E6 細胞に感染して GFP が発現することを確認した。ACE-2 siRNA library の 60 グループを個別に Vero E6 細胞に導入し、48 時間後に VSV-S 感染を感染させ、その 7 時間後に GFP の発現を阻止できるグループを選出した。その結果、明らかに GFP による蛍光強度が低い 4 つのグループ (No. 1, 4, 29, 50) を得ることができた。

(2) HeLa 細胞に安定に ACE-2 を発現させた細胞 (HeLa-A3) を作製し、上記の 60 グループの ACE-2 siRNA 発現プラスミドを導入した。48 時間後に蛋白質を抽出し、Western blot により ACE-2 の発現量を比較した。その結果、特にグループ No. 1 のプラスミドを導入した細胞の ACE-2 の発現が阻害されていた。また、グループ No. 35 や 41 も阻害できることが確認された。

(3) ACE-2 を発現していない 293T 細胞に、ACE-2 発現プラスミドと ACE-2 siRNA library の各グループを同時に導入し、48 時間後の蛋白質について Western blot により ACE-2 の発現量を比較した。その結果、グループ No. 11, 15, 19, 30, 31, 35, 37, 41, 42, 48, 50 の siRNA 導入細胞で ACE-2 発現量の低下が認められた。

以上、3 通りの実験系で ACE-2 の発現を効果的に阻害できる ACE-2 siRNA プラスミドの検索を行ったが、全ての実験系に共通して効果のあるプラスミドは得られなかった。しか



し、グループ No.1, 35, 41, 50 については、3 つの実験系の内 2 つで阻害効果が認められた。

### 3. ワクチニアウイルスに対するプラスミドベースの siRNA library の効果 :

siRNA を濃縮するための条件設定を中心に実験を行なった。ワクチニアウイルスを Vero E6 細胞に感染させると、ウイルス感染とトランスフェクションによるストレスのために通常よりもやや早い時間で細胞障害が観察された。一方、siRNA をトランスフェクションしていない細胞では生き残る細胞が皆無であったので、siRNA library をトランスフェクションして生き残った細胞があれば、siRNA の効果が得られたと判定することにした。siRNA library を導入した Vero E6 細胞 90 グループにワクチニアウイルスを感染させ、48 時間後に生存細胞があるグループが 6 グループあった。これらから、プレートや細胞表面に沈着している siRNA プラスミドを除去するために洗浄を繰り返し行ない、Hirt 法でこれらの生存細胞からプラスミドを抽出した。しかし、回収されたプラスミドは量が少なかったため、PCR 法で promoter を含む領域を増幅して精製し再びトランスフェクションし、ワクチニアウイルスを感染させた。6 グループのうち 4 グループから回収した DNA からの PCR 産物をトランスフェクションした細胞で、ワクチニアウイルスによる細胞障害活性の低下が認められたが、生存細胞は認められなかった。これら 4 グループからの PCR 産物を pGEM-Teasy プラスミドにクローニングし、10 クロウンを 1 群にして 20 群 (200 クロウン) 毎、Vero E6 細胞にトランスフェクション後ウイルスを感染させたが生存細胞は、いずれのグループ由来プラスミドでも見られなかった。

### 4. SARS コロナウイルスに対するプラスミドベースの siRNA library と合成 siRNA :

SARS コロナウイルスはワクチニアウイルスや西ナイルウイルスよりも、感染後の早い時間 (24 時間) で Vero E6 細胞に強い細胞障害を起こす。もし、siRNA によって標的遺伝子の発現抑制が不完全な場合には、SARS コロナウイルスの複製能力の方が強いために細胞障害を回避できず、siRNA は回収できないと考えられる。そこで、本研究の第一段階として、SARS コロナウイルス感染細胞の細胞障害における責任遺伝子を同定し、siRNA library を評価するためのコントロールとすることを試みた。その結果、SARS コロナウイルス感染 Vero E6 細胞では、caspase3, 6, 7 が活性化し、アポトーシスを起こした。次に、ウイルス感染により活性化してくるシグナル伝達系を詳細に調べてみると、p38, JNK, ERK などの MAPK や、PI3K/Akt, JAK/STAT3 などが活性化されていることが明らかになった。このうち、ERK, PI3K/Akt はアポトーシスを抑制する働きをしていると考えられた。p38 は阻害剤を添加することで SARS コロナウイルスによるアポトーシスを遅延できることから、アポトーシスを誘導する働きがあることがわかった。STAT3 はアポトーシスを抑制する遺伝子を発現することが知られているが、p38 の活性化は STAT3 の不活性化を誘導する結果、アポトーシスを促進していた。

実際に、Vero E6 細胞由来の siRNA library を Vero E6 細胞に導入し、48 時間後に SARS コロナウイルスを感染させると、わずかに生き残る細胞が観察された。しかし、siRNA を導入しない細胞でもウイルス感染による細胞死を免れ、生き残る細胞が極く少数存在する。

このことは、siRNA 効果により生存した細胞と自然に生き残る細胞の区別ができないことを示しているため、siRNA library の評価を困難にすると考えられる。そこで、ウイルス感染後に生存する細胞についての詳細な解析を試みた。この細胞はその後ウイルス粒子を産生しながら分裂を繰り返し、ウイルスによる細胞死は起こさなかった。このような持続感染細胞は、特定の遺伝子配列を有するウイルスによって樹立されるのではなく、約 1,500 個の細胞に 1 個の割合で持続感染細胞になる性質をもつ細胞が出現してくることが明らかになった。さらに、持続感染が成立するためには、少なくとも JNK と Akt の活性化が必要であることがわかった。また、親細胞をクローニングしてウイルスを感染させると、持続感染細胞になりやすい細胞となりにくい細胞があった。

Vero E6 細胞はトランスフェクション効率が極めて低い細胞であり、通常の方法では 1% 以下の導入効率である。そこで、磁気を利用したトランスフェクション試薬 (PolyMag) と Fugene6 を組み合わせることにより、導入効率を上げる検討を行った。蛍光ラベルした合成 siRNA を用いてトランスフェクション効率を解析したところ、100%の細胞にトランスフェクションできる条件を見つけることができた。そこで、SantaCruz 社の GSK-3 $\beta$  に対する siRNA を Vero E6 細胞にトランスフェクションしたところ、GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) は siRNA の効果により減少した。GSK-3 $\beta$  は Akt のシグナル伝達経路の下流に位置し、細胞増殖等に関与していると考えられているが、siRNA 導入細胞とコントロールの細胞を比較しても細胞数に差は認められなかった。また、siRNA を導入した細胞では細

胞増殖に関わる Rb 蛋白質量に変化は無かった。

#### 5. 蚊の JNK 遺伝子に対する siRNA :

JNK の阻害剤を添加した蚊の細胞では、西ナイルウイルスの感染が阻害される。西ナイルウイルスはエンドサイトーシスによって細胞に進入するが、JNK の阻害剤はエンドサイトーシスを阻害していることがわかった。このように、蚊における JNK の活性化は生命維持やウイルス感染防御のために重要であるとされる。しかし、蚊およびその幼虫に遺伝子を導入する方法は未だ確立されていないのが現状である。そこで、本研究では JNK の siRNA を蚊の幼虫に導入する方法を考案することを第一の目的とした。これまでの我々の研究成果から蚊における JNK の働きは多機能に及ぶことが示唆されている。哺乳類の細胞では JNK はアポトーシスに重要な役割を果たしていることが知られているが、アポトーシスを促進するか抑制するかは細胞によって異なる。そこで、JNK のアポトーシスにおける役割をさらに検討する目的で、ヒトスジマカ由来の C6/36 細胞に高温ストレスを与えてアポトーシスを誘導し、JNK 阻害剤を添加してアポトーシスを阻害できるか否かについて検討した。この細胞は 45 度の高温培養では約 25%の細胞がアポトーシスを起こしたが、あらかじめ JNK 阻害剤を添加して JNK を不活性化しておくことにより、約 70%の細胞がアポトーシスを起すことが明らかとなった。このことから、蚊の JNK は C6/36 細胞においては、アポトーシスによる死から回避する役割を果たしていると考えられた。

さらに、ヒトスジマカ (*Aedes Albopictus*) の 1 齢幼虫を JNK 阻害剤存在下で飼育すると、



正常な脱皮が阻害され発育不全により死亡することが明らかとなった。この現象は他の *Aedes* 属(*Aegypti*)でも見られた。このことは、*in vivo* でも C6/36 細胞で見られたように JNK がアポトーシスを抑制していることが示唆される。次に JNK の siRNA が、阻害剤と同様の効果を持つか否かについて検討した結果、ヒトスジシマカの 1 齢幼虫を JNK の siRNA 存在下で飼育すると、正常な脱皮が阻害され発育不全により死亡することが明らかとなった。JNK-siRNA の曝露によるヒトスジシマカの一齢幼虫の死亡率は、 $38.3 \pm 20.4$  %で、対照として用いた Scramble-siRNA の曝露による死亡率は、 $15.0 \pm 10.5$  %であり、有意な差が観察された ( $P < 0.05$ )。さらに、JNK の siRNA を作製し 3 齢幼虫にマイクロインジェクション法により導入した結果、脱皮を阻害して成虫になる割合が激減した。

#### 6. レンチウイルススペースの siRNA library(1):

本システムでは、シュードタイプのレンチウイルス粒子を生成するために必要な FIV 構造タンパク質を発現する pPACK パッケージングプラスミドと、パッケージング、導入、染色体 DNA への配列の挿入に必要な遺伝情報を持った pFIV 発現ベクターをパッケージング細胞株に同時導入する。パッケージング細胞は、発現ベクターを複製し、シュードウイルス粒子の中に取り込むので、これを精製し HeLa-A3 細胞に感染させると、ウイルス発現ベクターがゲノム配列に組み込まれ、挿入した siRNA 配列を発現する。pFIV ベクターは、ゲノム配列に取り込まれることにより 5' LTR プロモーターが不活性化され、ウイルス粒子の複製を防ぐ。pFIV・HIV が導入された細胞では、ウイルスカプシドを生成する遺伝子を

欠失し、ウイルス配列の複製をする機能を持つ 5'LTR が欠落しているために、ウイルスを複製することができない。GFP 発現ウイルスを用いて Vero E6 細胞と HeLa-A3 細胞への感染効率を調べると、Vero E6 細胞では感染効率が極めて低かったのに対し、HeLa-A3 細胞では、ほぼ 100%の細胞がベクターを取り込んでいたことが確認された。そこで、GeneNet siRNA ライブラリー (Human 8.5K siRNA Library) を HeLa-A3 細胞に感染させ、細胞分裂を最小限に抑えて、細胞のストックを作成し、以後、実験毎にこの細胞ストックを使用することにした。

#### 7. レンチウイルススペースの siRNA library(2):

siRNA 発現ライブラリーを改良することにより、活性が高く、SARS コロナウイルス・ワクシニアウイルス・西ナイルウイルスに共通の感受性細胞で発現している遺伝子を網羅的にカバーする siRNA 発現ライブラリーを効率よく作製することに成功した。このライブラリーでは、siRNA library に含まれる siRNA 種が非常に大きいため、より効率的なスクリーニング系が確立しないと目的とする siRNA 情報が得られない。そこで、効率的なスクリーニング法に関して検討した結果、スクリーニング後に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。また、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。

#### 8. ワクチニアウイルスに対するレンチウイルススペースの siRNA ライブラリーの効果：

siRNA library を安定に発現する細胞では、コントロールの細胞と比較して、ワクチニアウイルス感染後の細胞死を免れた細胞群が観察された。7日後に抽出した RNA から RT-PCR により増幅した siRNA の塩基配列を決定したが、27塩基の対になる siRNA 配列に若干の変異がみられた。また、生き残った細胞について更に観察を続けると、最終的には全て死滅し、感染を完全に阻止する siRNA は得られなかった。次に、異なる感染後の日数や異なる dish から生き残った細胞の siRNA 配列を決定して、共通の配列の有無について検討した。その中で、glucocorticoid receptor 遺伝子に対する siRNA は4日目の dish と7日目の dish2 から共通して得られ、ADP-ribosyltransferase-like 2 遺伝子に対する siRNA は dish1 と3から得られ、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。

#### 9. 西ナイルウイルスに対するレンチウイルススペースの siRNA ライブラリーの効果：

レンチウイルススペースの siRNA library を発現する HeLa-A3 細胞に西ナイルウイルスを 0.1 m.o.i. で感染させて細胞を観察したが、ほとんどの細胞が死滅し、siRNA を発現する細胞群で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、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。デングウイルス 2 型は HeLa 細胞に対して細胞障害性が弱いので、感染後 10 日目から細胞死

が観察されるようになる。siRNA ライブラリー発現細胞およびその親細胞にデングウイルス 2 型を 10 m.o.i. で感染させ、細胞を観察した結果、siRNA ライブラリー導入細胞への細胞障害性は高く感染後 7 日目ではほとんどの細胞が死滅したのに対し、コントロールの親細胞は 7 日目では細胞障害性が認められなかった。この現象は予測していた結果と逆で、発現している siRNA とは関係なくレンチウイルスが感染した細胞は、細胞障害性が早く表れている。しかしながら、このように全てのレンチウイルス感染細胞で早い細胞死が誘導されると仮定すると、7 日目では死滅しなかった細胞では siRNA の効果で生き残った可能性を否定できない。そこで、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。

#### 10. SARS コロナウイルスに対するレンチウイルススペースの siRNA ライブラリーの効果：

SARS コロナウイルスを 0.1 と 1 m.o.i. で感染させて細胞を観察したが、ほとんどの細胞が死滅し、siRNA を発現する細胞群で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、SARS コロナウイルスの nucleocapsid (N) 蛋白質に注目して、N を発現するワクチニアウイルスベクターを構築し(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。コントロールとして 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. で感染させた。これまでの研究から、SARS コロ

ナ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 感染細胞ではコントロールと比較して 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 発現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。詳細は明らかにはできなかったが、本実験系では 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 をレンチウイルスベースの siRNA library を発現する HeLa-A3 細胞に 2 m.o.i. で感染させて 48 時間後に生き残った細胞から DNA を抽出し、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。

#### 1.1. 紫外線照射に対する siRNA ライブラリーの効果：

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、一定量の閾値以上の紫外線照射は細胞をアポトーシスへ誘導し、それ以下では染色体の損傷を修復することにより生存できた。そこで、siRNA ライブラリー発現細胞を 4 dishes、コントロールとして siRNA を発現しない HeLa 細胞を 2 dishes 用意して、紫外線照射後 9 日後に細胞を固定しクリスタルバイオレット染色

したところ、コントロールではほとんどの細胞が死滅しているのに対して、siRNA ライブラリー発現細胞ではひとつの dish に平均 100 個の生存細胞のコロニーを形成していた。そこで、紫外線照射から 12 日目の siRNA ライブラリー発現細胞 6 dishes から DNA を抽出して、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。

#### D. 考察

##### 1. プラスミドベースの siRNA ライブラリーの評価：

siRNA library を 10-20 クローン毎にグループに分け、阻害効果のあったグループについて詳細に検討するという方法は、比較的短時間で成果が得られるという利点があった。特定の遺伝子に対する siRNA library を構築して、最も阻害効果のある siRNA プラスミドを得るためには有用であると考えられた。しかし、細胞の全 RNA を網羅的にカバーする siRNA library の場合にはクローン数が極めて多いため、この方法で検討することは不可能である。siRNA library を細胞にトランスフェクションし、ウイルス感染後に生き残った細胞からプラスミドを回収する方法が最良と思われる。実際にワクシニアウイルス感染細胞では、siRNA の導入により生存した細胞が観察されたが、プラスミドの回収量が極端に少なく次のスクリーニングに用いることができないという問題が生じた。本研究では PCR による増幅を試み 2 次スクリーニングを行った結果、細胞障害活性の遅延が認められた。そこで、PCR 産物から再度 library を作製して 3 次スクリーニングを行ったが、良好な結果は得られず改良が必要であった。



SARS コロナウイルスでは、siRNA を導入しなくても少数の細胞が生き残り持続感染細胞になることが明らかとなり、siRNA library の評価を困難にすると考えられたが、細胞をクローン化することで、持続感染細胞になりにくいクローン細胞を選択することに成功したので、今後の実験に用いることにした。また、SARS コロナウイルス感染細胞中で細胞死を促進するシグナル伝達系として p38 MAPK、抑制するシグナルとして ERK や Akt を同定した。これらの遺伝子に対する siRNA は、siRNA library を評価するための良いコントロールになると考えられる。

## 2. レンチウイルスベースの siRNA ライブラリーの評価：

siRNA 発現ライブラリーを改良することにより、活性が高く、SARS ウイルス・ワクシニアウイルス・西ナイルウイルスに共通の感受性細胞で発現している遺伝子を網羅的にカバーする siRNA 発現ライブラリーを効率よく作製することに成功した。レンチウイルスベクターを用いて siRNA 発現細胞を作製する場合、レンチウイルス種と細胞種の TRIM5 $\alpha$  により感染効率が著しく異なる。FIV ベースのベクターで Vero E6 細胞と HeLa 細胞への導入効率を検討した結果、HeLa 細胞には効率良く導入できるが Vero E6 細胞にはほとんど導入できないことが明らかとなった。そこで、SARS ウイルスのレセプター ACE2 発現細胞を用いて siRNA library 発現細胞を作製した。

SARS 感染細胞におけるシグナル伝達系を解析した結果、感染 Vero E6 細胞では、caspase3, 6, 7 が活性化しアポトーシスを起こした。また、p38, JNK, ERK などの MAPK や、PI3K/Akt, JAK/STAT3 などが活性化された。こ

のうち、ERK, PI3K/Akt はアポトーシスを抑制する働きをしていると考えられた。また、感染 Vero E6 細胞の一部が持続感染して生存するが、持続感染成立には少なくとも JNK と Akt の活性化が必要であった。このことから、siRNA によるシグナル伝達系の特定の蛋白発現の抑制により、SARS コロナウイルス感染細胞のアポトーシスを阻害できる可能性がある。そこで、siRNA library 発現細胞から候補遺伝子がスクリーニングされた際に、標的遺伝子の発現抑制を効率的に行なう系を確立するために、モデル実験として Akt 下流の GSK-3 $\beta$  の siRNA による抑制効果を検討した結果、効率的な遺伝子発現抑制系ができた。しかし、SARS コロナウイルス感染により、有意に生存する細胞が得られていない。そこで、主要な蛋白である N 蛋白質発現系により解析を行った結果、N 蛋白質は細胞死を誘導すること、また、Akt や JNK の細胞内シグナル伝達経路を活性化させることが明らかとなった。しかし、これらのシグナル伝達経路の活性化は、SARS コロナウイルス感染細胞での持続感染細胞樹立に関与することから、細胞死を抑制する働きがあると考えられるので、細胞死を誘導するようなシグナル伝達経路が活性化している可能性が高い。そこで、siRNA ライブラリーを発現する細胞において N 蛋白質を発現させ、生き残った細胞で発現している siRNA の配列を調べたところ、Hsp40 の siRNA 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。

ACE2 発現 HeLa 細胞で作製した siRNA library 発現細胞は、SARS コロナウイルス以外にも 西ナイル、ワクチニアウイルスに感受性があるので、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は、細胞障害性の遅延が認められた。すなわち、ワクチニアウイルスによる細胞障害性を抑制できる siRNA が存在すること、細胞障害性発現に関与する宿主因子があることが示唆された。細胞障害が遅延した細胞群から得られた Glucocorticoid receptor 遺伝子や ADP-ribosyltransferase 遺伝子に対する siRNA は、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と考えられる。

一方、HeLa 細胞にレンチウイルスベクターを利用した siRNA を導入するとデングウイルスの細胞障害性が増した。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細胞性 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。このレンチウイルスベクターはピュ

ーロマイシンで選択するシステムなので、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。

デングウイルスや西ナイルウイルス等を媒介する蚊の細胞では、JNK シグナル伝達系の活性化は、西ナイルウイルスの感染を促進し、アポトーシスを抑制していることを明らかにした。また、JNK の阻害剤と siRNA を幼虫に導入すると脱皮が阻害されることがわかり、このシグナルの不活性化は死に繋がることを明らかにした。この研究成果は、新しい殺虫剤としての開発の可能性を示唆する。

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。これに対し紫外線照射では、siRNA ライブラリー発現細胞のうちで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

siRNA は特定の遺伝子発現を阻害できる。プラスミドを用いた siRNA library の研究では実験系に問題点が多く、ウイルスの増殖や細胞死に関与する siRNA を特定することはできなかったが、レンチウイルスベクターに改良後、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。本研究の過程で、SARS ウイルス感染細胞内でのシグナル伝達経路を解明し、西ナイルウイルスのベクターである蚊の JNK の siRNA の効率的導入法により幼虫の脱皮過程を阻害するなどの成果も得た。

#### 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. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of Cell Proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2006. 46: 236-243
3. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. FEBS Lett. 2006. 580: 1417-1424
4. Tajima, S., Nukui, Y., Ito, M., Takasaki, M., Kurane, I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro Virus Research 116:38-44, 2006.

##### 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 FAOBMB Congress, 2006年6月 Kyoto, Japan
3. 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  4. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシェードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  5. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシェードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多
  6. Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
  7. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
  8. Tajima Sigeru, Yoko Nukui, Takasaki Tomohiko, Ichiro Kurane. Identification and characterization of deletion in the variable region located in 3' non-translated region of dengue type 1 virus. 2nd Asian regional dengue research network meeting. (Singapore) 2005 / September 28-30.
  9. 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎. デング1型ウイルス3'非翻訳領域内variable領域の機能解析. 第53回日本ウイルス学会 (横浜) 2005年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



---

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