

## HCV粒子ワクチン製造用細胞株の探索 - 正常ヒト肝細胞からの不死化細胞株樹立の試み -

研究分担者 中村 紀子 東レ株式会社医薬研究所 主任研究員

研究要旨：JFH-1株を用いたウイルス培養法で効率にウイルスを生産できる細胞株はHuh7細胞のみであり、Huh7細胞は肝細胞がん由来であることからワクチン用のウイルス生産細胞株としては適当ではない。近年、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス5型のE1遺伝子で形質転換した不死化細胞Per.C6がインフルエンザワクチンの製造に使用されだしたことから、正常肝細胞にE1遺伝子を導入し、不死化細胞株を作製できれば、HCV粒子ワクチン製造用細胞株の候補となる。本研究ではこの可能性について検討した。

### A. 研究目的

HCVのワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌され、さらにJFH-1の非構造遺伝子と他のHCV株の構造遺伝子からなるキメラウイルスも作製できることが分かった。我々は、これまでに本ウイルス産生系で、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアクセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることも実証してきた。しかし、このJFH-1株を用いたウイルス培養法で効率にウイルスを生産できる細胞株はHuh7細胞のみであり、Huh7細胞は肝細胞がん由来であることからワクチン用のウイルス生産細胞株としては不適當である。従って、細胞培養法ワクチンの製造可能な高力価のウイルスを得ることのできる細胞株の探索が必要である。

近年、タンパク医薬の製造およびワクチン製造用の細胞株として注目されているのがPer.C6細胞である。Per.C6細胞は、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス5型のE1遺伝子で形質転換した不死化細胞であ

り、インフルエンザワクチンの製造に使用されだしている。さらに、OCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYC遺伝子を導入して作製したiPS細胞から分化誘導した細胞が再生医療に使用されようしていることから、遺伝子導入細胞をワクチン製造株として使用することは可能であることが示唆される。この可能性をサポートする知見として、HPVのE6/E7遺伝子とhTERT遺伝子を導入して作製した不死化ヒト肝細胞株でHuh7細胞より約1/5の効率であるがHCV粒子が生産されることが示されていることから、HCVワクチン製造株として正常肝細胞に遺伝子導入して不死化した細胞を検討することは重要な課題として挙げるができる。

そこで本研究では、正常肝細胞にアデノウイルスのE1遺伝子を導入し、不死化細胞株を作製することを試みたので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. E1 遺伝子発現ベクター

##### (1) E1 遺伝子のクローニング

293細胞のゲノムDNAを鋳型に2つのプライマー、GGCTAGCAGAATTCCCACCatgagacatattatctgccacggag およびGAGCGGCCGCAACGCGTcctcaatctgtatcttcatcgctagを用いてPCRを行い約3.0kbのE1遺伝子を増幅した。増幅遺伝子をpCR2.1-TOPOにクローン化し、シーケンスにて

配列を確認した。

## (2) E1 遺伝子発現ベクターの作製

E1 遺伝子を NheI と NotI で切り出し、発現ベクター、pLV-SIN-EF1 $\alpha$ -Puro の XbaI と NotI 間に挿入した。

## 2. IRF7 ドミナントネガティブ変異体(IRF7DN)発現ベクター

### (1) IRF7DN 発現ベクターの作製

IRF7 アイソフォーム A の 227 番目のアミノ酸残基から 503 番目のアミノ酸残基までのポリペプチドをコードする核酸を人工合成し、CMV プロモーター、アデノウイルス pIX プロモーターおよび肝臓特異的転写因子配列 + SNEP プロモーターの制御下に発現する IRES-GFP ベクターに挿入した。

### (2) プロモーターの選択

上記 3 種類のプロモーターからなる IRF7DN 発現ベクターを 293 細胞および Huh7 細胞に Lipofectamine® 2000 を用いて導入し、GFP の発現の頻度を指標にベクターの発現効率を評価した。

### (3) IRF7DN 遺伝子の E1 遺伝子発現ベクターへの組み込み

E1 遺伝子発現ベクター-pLV-SIN-EF1 $\alpha$ -E1-Puro の MluI、NotI 間に肝臓特異的転写因子配列-SNEP プロモーター-IRF7DN からなる DNA 断片を挿入した(pLV-SIN-EF1 $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro)。

## 3. レンチウイルスベクターの作製

### (1) ウイルスベクターの作製

発現ベクター-pLV-SIN-EF1 $\alpha$ -E1-Puro、pLV-SIN-EF1 $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro または pLV-Green(GFP 発現ベクター)を pCMV-VSV-G、pRSV-REV および pCgV とともに 293FT 細胞に Lipofectamine® 2000 を用いて導入した。48 時間培養後の上清を Lenti-X Concentrator にて濃縮し、ウイルスストックとした。これらのウイルスをそれぞれ pLV-SIN-AdE1、pLV-SIN-AdE1-IRF7DN、pLV-Green とした。

### (2) 力価検定

ウイルスの力価は HT1080 細胞を用いて行った。6 well プレートに  $2 \times 10^5$  の HT1080 細胞を播種し、培養した。翌日、希釈したウイルス液を 1mL 加え、Polybrene を最終濃度が  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加

し、一夜培養した。完全培地 2mL に置き換え、引き続き培養し、翌日に  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の Puromycin を含む培地に置き換え、コロニーが形成されるまで培養し、コロニーの数を測定した。

## 4. 正常ヒト肝細胞の培養と遺伝子の導入

### (1) 正常ヒト肝細胞の培養

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps™ を使用し、肝細胞基本培地 (CC-3199) に 肝細胞添加因子セット (CC-4182) を添加した培地 (HCM) を使用し、Type I コラーゲンコートプレート (6 well) に  $8 \times 10^4$  個/well で培養した。翌日、5%FCS、1000 単位/mL の肝細胞増殖因子 (HGF) を含む HCM(HCM-5%FCS-HGF) に培地交換し、培養を続けた。

### (2) 正常ヒト肝細胞への遺伝子の導入

レンチウイルスに ViraDuctin Lentivirus Transduction Kit (cellbiolabs 社) の試薬 A、B を加え、複合体を形成させた。この複合体を正常ヒト肝細胞に加え、一夜培養し、培養液を除去し、試薬 c を加え、1 分間処理後、HCM にて洗浄し、2mL の HCM-5%FCS-HGF を加え、培養を続けた。翌日、1mg/mL の Puromycin を含む HCM-5%FCS-HGF で薬剤選択を行った。

### (倫理面の配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 肝細胞における IRF7DN の発現量の比較

肝細胞株 Huh7 において、IRF7DN の発現効率の高いプロモーターについて評価した。その結果 293 細胞においては、CMV プロモーターが一番強く、アデノウイルス pIX および肝臓特異的転写因子配列 + SNEP プロモーターは同程度であった。一方、Huh7 細胞においては、肝臓特異的転写因子

配列 + SNEP プロモーターが最も発現が高い結果となった。以上から、レンチウイルスベクターにおいて IRF7DN を発現させるプロモーターとして、肝臓特異的転写因子配列 + SNEP プロモーターを選定することにした。

## 2. E1 遺伝子発現ベクターの構造

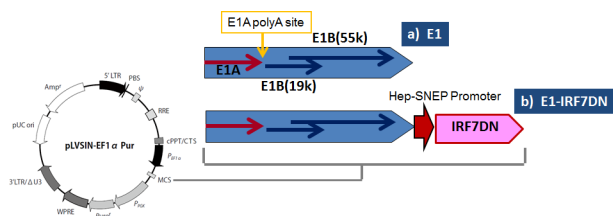


図-1 ベクターの構造

図-1 に作製したベクターの構造を示した。挿入した E1 遺伝子から EF-1 $\alpha$  プロモーターの制御下に E1A、E1B(19K)、E1B (55k) のタンパク質が発現する。pLVGreen-EF1 $\alpha$ -E1-IRF7DN-Puro は、E1 遺伝子に加えて、肝臓特異的転写因子配列 + SNEP プロモーターの制御下に IRF7DN を発現する。

## 3. ウイルスベクターの力価の評価

pLVGreen-AdE1、pLVGreen-AdE1-IRF7DN 力価を HT1081 細胞の puromycin 耐性コロニーの出現率で評価した。10 倍濃縮したにもかかわらず、力価はそれぞれ、 $2 \times 10^4$  transducing units (TU)/mL、 $1 \times 10^4$  TU/mL であった。ウイルス力価は低いのは E1 遺伝子中に E1A 遺伝子の polyA 付加部位が存在するため、E1B 遺伝子を含む全長 RNA が生成されにくいものと考えられた。

## 4. 正常ヒト肝細胞への E1 遺伝子の導入

正常ヒト肝細胞は Lonza 社の hNHeps™ を使用した。添付書では、本細胞の増殖率は高くないという記載であった。

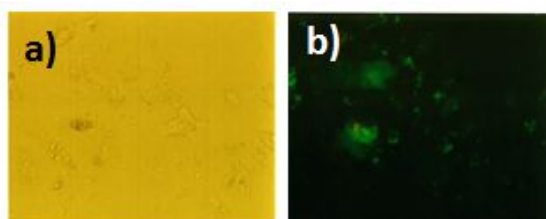


図-2 pLVGreen 感染 hNHeps™

そこで、できるだけ増殖を向上させる目的で HGF を添加して培養した。その後、レンチウイルスを感染させた。コントロールに用いた GFP 発現レンチウイルスを感染させたときの細胞の写真を図-2 に示した。約 50% の細胞に感染することが示された。

一方、pLVGreen-AdE1、pLVGreen-AdE1-IRF7DN を感染させた hNHeps™ を puromycin を含有する HCM-5%FCS-HGF で培養を続けたが、増殖する細胞は出現しなかった。

## D. 考察

Aly らは、初代肝細胞に HPV の E6/E7 およびテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子を導入すると不死化細胞が樹立されることを示し、さらに IRF7DN 発現ベクターを導入したクローンは、Huh7.5 細胞の約 1/5 の効率ではあるが、JFH1 の増殖を支持することを示していること、ヒト胚網膜芽細胞をアデノウイルス 5 型の E1 遺伝子で形質転換した不死化細胞 Per.C6 がインフルエンザワクチンの製造に使用されだしたことを手がかりとして、我々は正常ヒト肝細胞にアデノウイルスの E1 遺伝子を導入し、不死化を試みた。正常ヒト肝細胞に Lonza 社の hNHeps™ を使用した。レンチウイルスベクターによる hNHeps™ への遺伝子導入の効率は GFP を指標とすると、約 50% であったが、E1 遺伝子の導入で不死化し増殖する細胞は出現しなかった。Aly らは、初代肝細胞に HPV の E6/E7 を単独で発現させても不死化細胞は得られず、hTERT を同時に発現させたときに不死化細胞が得られることを報告しているので、アデノウイルス E1 遺伝子での不死化においても hTERT が必要かもしれない。今後、E1 遺伝子と hTERT の遺伝子の導入を検討する。

我々が使用した正常ヒト肝細胞、hNHeps™ は凍結細胞であり、機能評価用に開発されたものである。一方、正常ヒト肝細胞への遺伝子導入による不死化に使用した肝細胞は、凍結保存されておら

ず、細胞分離後、直ちに使用している。凍結保存細胞は増殖性に問題がある可能性があるため、今後、ヒト肝臓キメラマウスより単利した肝細胞の使用を検討する。

また、HCVの増殖はIRF3、IRF7、miR122によって制御されていることも報告されている。今後不死化した肝細胞については、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムによるIFN関連遺伝子の破壊等を行い、HCVウイルス高産生細胞株の樹立を目指す。

#### E. 結論

E1 遺伝子だけでは肝細胞は不死化できず、Aly HH et. al(J Hepatol. 46:26-36,2007)の報告のようにhTERTの発現が必要である可能性がある。今後、E1+hTERTの組合せで不死化を試みる

不死化肝細胞樹立研究における肝細胞のソースが調製直後の細胞であるのに対し、本研究ではLonzaのhNHeps™は凍結細胞であり、これが原因で不死化ができない可能性がある。そこで、肝細胞のソースとして、ヒト肝細胞キメラマウス(PBX®マウス、フェニックスバイオ)より調製した肝細胞を使用を試みる。

不死化細胞株を樹立した後でインターフェロンシグナル関連遺伝子をCRISPR/Casシステムを用いて破壊することも視野に入れる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1) Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., Ishii K., Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both *in vitro* and *in vivo*. Gastroenterology, 145: 447-455 (2013)

##### 2.学会発表

1) Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.

2) 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCVワクチンの有効性の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸.

3) 横川寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字. アカゲザルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの抗体誘導能と安全性の検討. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸.

#### H.知的所有権の出願・取得状況

##### 1.特許取得

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし