

Virol) と、肺胞上皮細胞由来の細胞株、Calu-3 である。MERS-CoV EMC strain (エラスマスメディカルセンターより入手) を細胞に感染させ、細胞変性効果と細胞侵入を解析した。細胞侵入は感染後 5 時間後に作られるウイルス mRNA をリアルタイム PCR 法で検出することにより定量した。また、細胞侵入経路とその阻害効果を調べるために、カテプシン阻害剤 EST と TMPRSS2 阻害剤カモスタットで細胞を処理し、解析をおこなった。

C. 研究結果

MERS-CoV の感染した Vero-TMPRSS2 細胞は、感染後 15 時間程度で非常に大きい細胞融合を呈し(図 1)、感染価は非発現細胞と比較して 100 倍程度高くなっていた(表 1)。さらに、ウイルス粒子上のスパイク蛋白が感染と同時に細胞を融合させる、Fusion From Without (FFWO) が、ウイルス細胞吸着後、僅か 3 時間程度で確認された(図 2)。この FFWO は SARS、229E、NL63 等の他のコロナウイルスでは見られない現象であり、MERS-CoV の非常に強い膜融合活性を示すものである。また、肺胞上皮由来の Calu-3 細胞へもよく感染し、細胞膜融合を引き起こすことが確認できた(図 3)。Calu-3 への感染は、プロテアーゼ阻害剤の EST ではほとんど阻止されず、カモスタットで 1/10 程度に抑える事ができたことから(図 4)、MERS-CoV は肺胞由来細胞では、カテプシン/エンドソーム経路は通らず、もっぱら TMPRSS2 を利用して細胞表面から侵入すると考えられる。カモスタット単独処理により、Calu-3 細胞の細胞変性効果とウイルスの多段階増殖が有意に抑えられたことから(図 3, 5)、TMPRSS2 経路を抑える薬剤は、抗ウイルス薬となる可能性を示すことができた。

D. 考察

MERS-CoV の TMPRSS2 を利用した細胞侵入

と細胞膜融合活性は、SARS や他のコロナウイルス(229E、NL63)と比較して、著しく強い事がわかった。TMPRSS2 は肺胞上皮と腸上皮に発現していることが報告されているため、MERS-CoV の病原性発現に関与する可能性が考えられる。また、カモスタットを用いた TMPRSS2 の阻害により、MERS-CoV の感染を阻止できる可能性を示すことができた。

E. 結論

Vero-TMPRSS2 細胞は MERS-CoV の良い感受性細胞であり、ウイルスの検出と分離に利用できると考えられる。一方、肺胞上皮由来の Calu-3 細胞に感染する時、MERS-CoV は、TMPRSS2/細胞表面経路から侵入することと、セリンプロテアーゼインヒビターであるカモスタットにより感染を阻止されることが解った(図 6)。この結果はカモスタットが MERS-CoV 感染を阻止する抗ウイルス薬となる可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol.* 2013 Dec;87(23):12552-61.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

Table Susceptibility of Vero-TMPRSS2 cells to MERS-CoV and SARS-CoV

Virus	Cell type	Susceptibility (log ₁₀ TCID ₅₀)	Virus production	
			Inoculated virus (log ₁₀ TCID ₅₀)	Propagated virus (log ₁₀ TCID ₅₀)
MERS-CoV	VERO	4.3±0.5	5	5.0±0.7
			4	4.3±0.4
			3	3.5±0.5
			2	2.3±0.4
			1	2.5±0.5
			0	1.3±0.4
			-1	Not detected
	VERO-TMPRSS2	6.3±0.5	5	7.0±1.5
			4	5.5±1.1
			3	5.5±0.5
			2	4.8±0.4
			1	3.8±0.4
			0	2.5±0.5
SARS-CoV	VERO	6.3±0.5	5	5.7±0.3
	VERO-TMPRSS2	7.2±0.5	5	6.1±0.2

表1. TMPRSS2発現細胞でのSARS-CoVとMERS-CoVの感染価比較
 TMPRSS2発現細胞では非発現細胞と比較して、MERS-CoV感受性が
 100倍程度高かった。

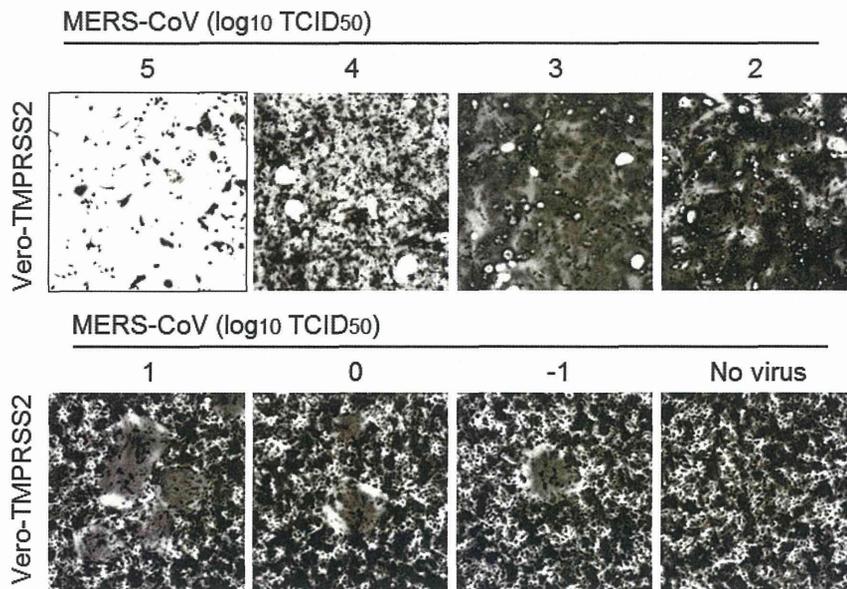


図1. MERS-CoV感染Vero-TMPRSS2細胞

Vero-TMPRSS2細胞はMERS-CoVの感染15時間後に感染価依存的に細胞融合を引き起こす。

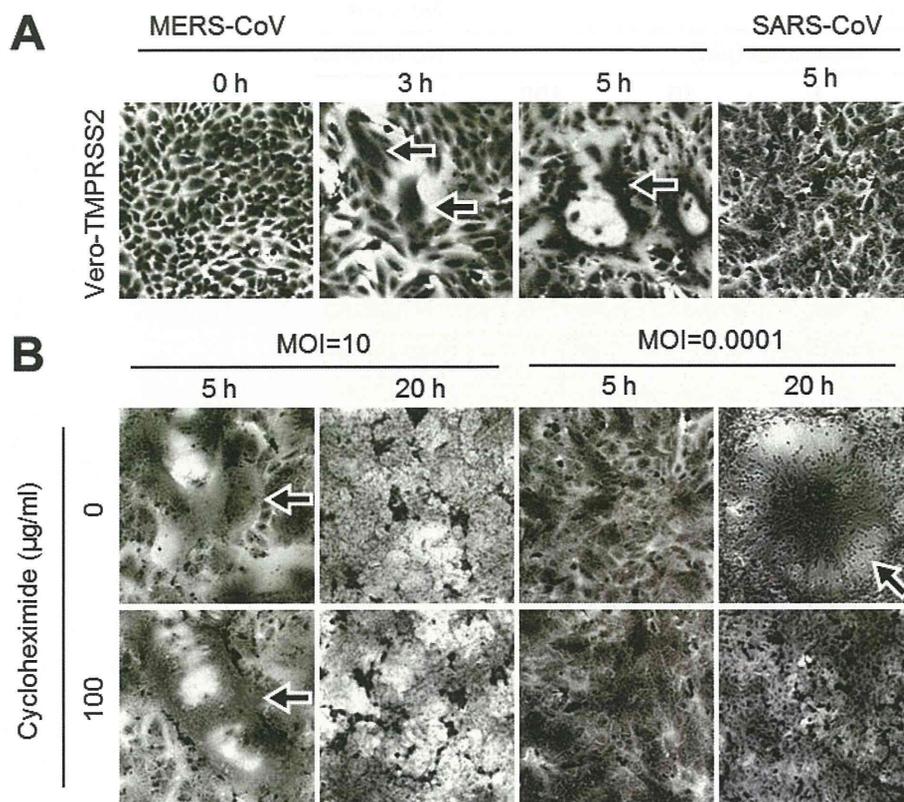


図2. MERS-CoVが引き起こすFusion from without

(A) Vero-TMPRSS2はMERS-CoV感染3時間後に細胞融合を引き起こす。(B)この細胞融合は感染後の蛋白産生を介さず、ウイルス表面のスパイク蛋白によって誘導されるため、蛋白合成阻害剤のcycloheximideによって阻止することができない。

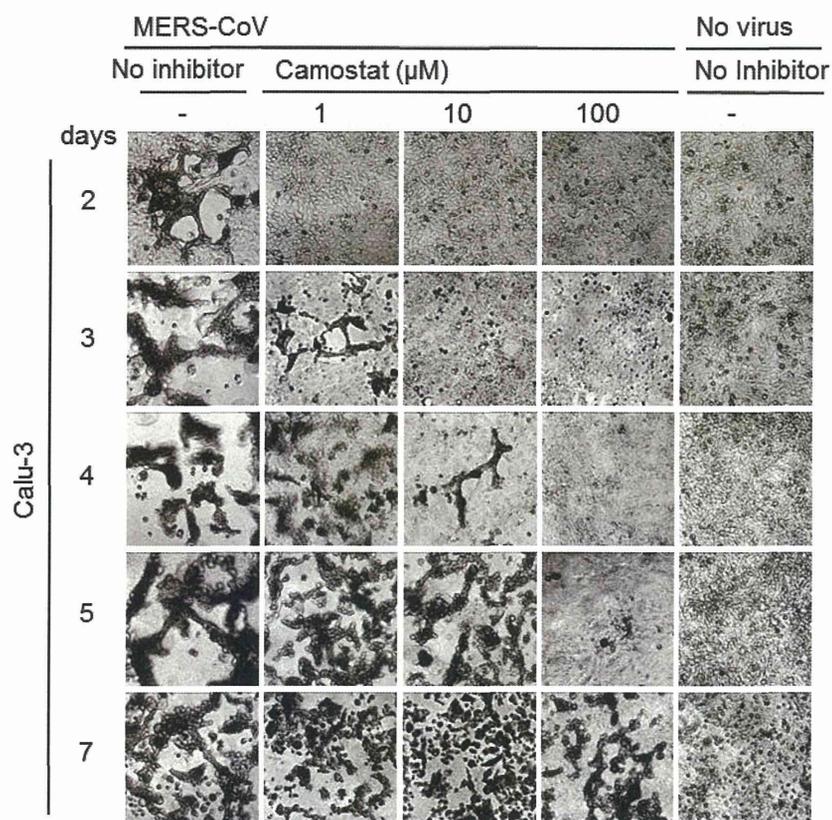


図3. MERS-CoVが肺胞由来Calu-3細胞に引き起こす細胞融合

Calu-3細胞はMERS-CoV感染2日目から細胞融合を引き起こす。TMPRSS2の阻害剤であるカモスタットの濃度依存的に、この細胞融合は抑制され、100 μM カモスタット存在下では、感染後5日まで、細胞変性は見られなかった。

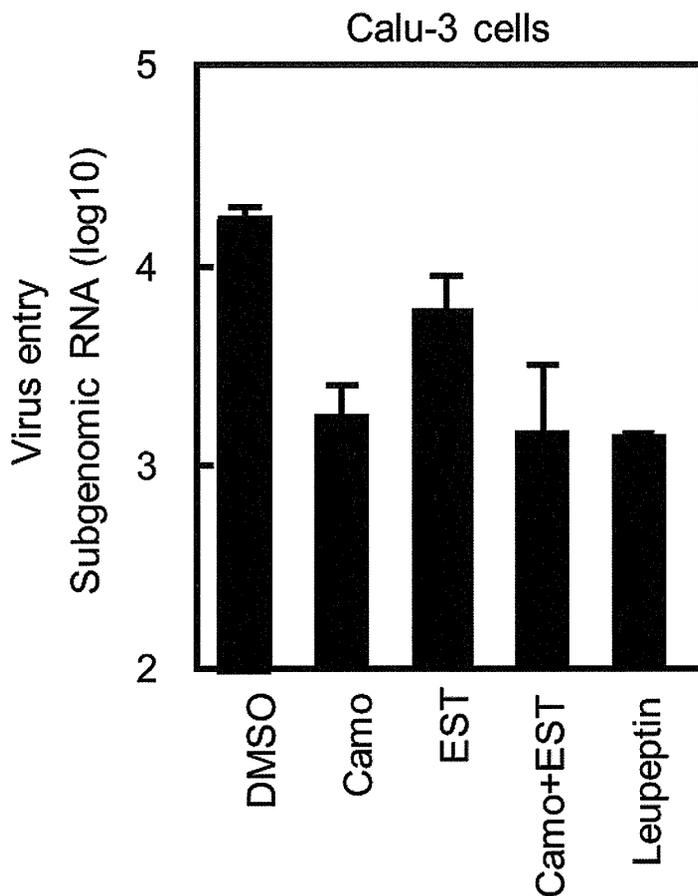


図4. プロテアーゼ阻害剤による肺胞由来Calu-3細胞でのMERS-CoVの感染阻止

Calu-3への細胞侵入は、プロテアーゼ阻害剤のESTではほとんど阻止されず、カモスタットで1/10程度に抑える事ができた。またESTとカモスタットおよび、ロイペプチンによって、カモスタット単独処理の場合以下に感染を抑えることはなかった。このことから、MERS-CoVは肺胞由来細胞では、カテプシン/エンドソーム経路は通らず、もっぱらTMPRSS2を利用して細胞表面から侵入すると考えられる。

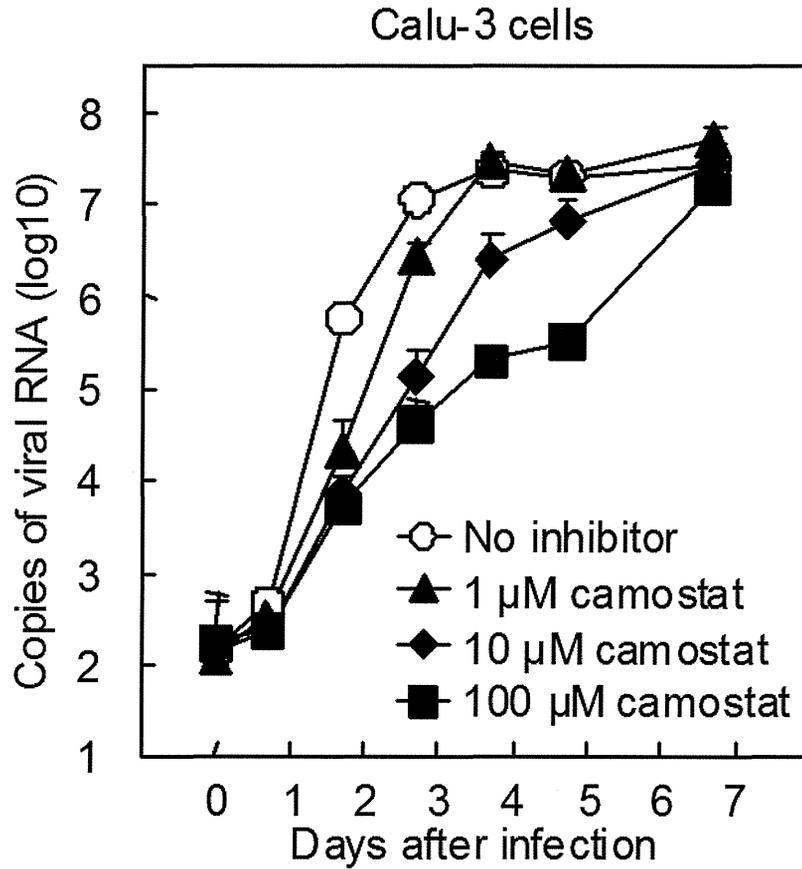


図5. プロテアーゼ阻害剤カモスタット処理によるCalu-3細胞でのMERS-CoVの多段階増殖阻止

MERS-CoV感染後5日まで、カモスタット濃度依存的にウイルスの増殖を抑えることができた。2～5日目では、ウイルス増殖は1/100程度抑えられた。

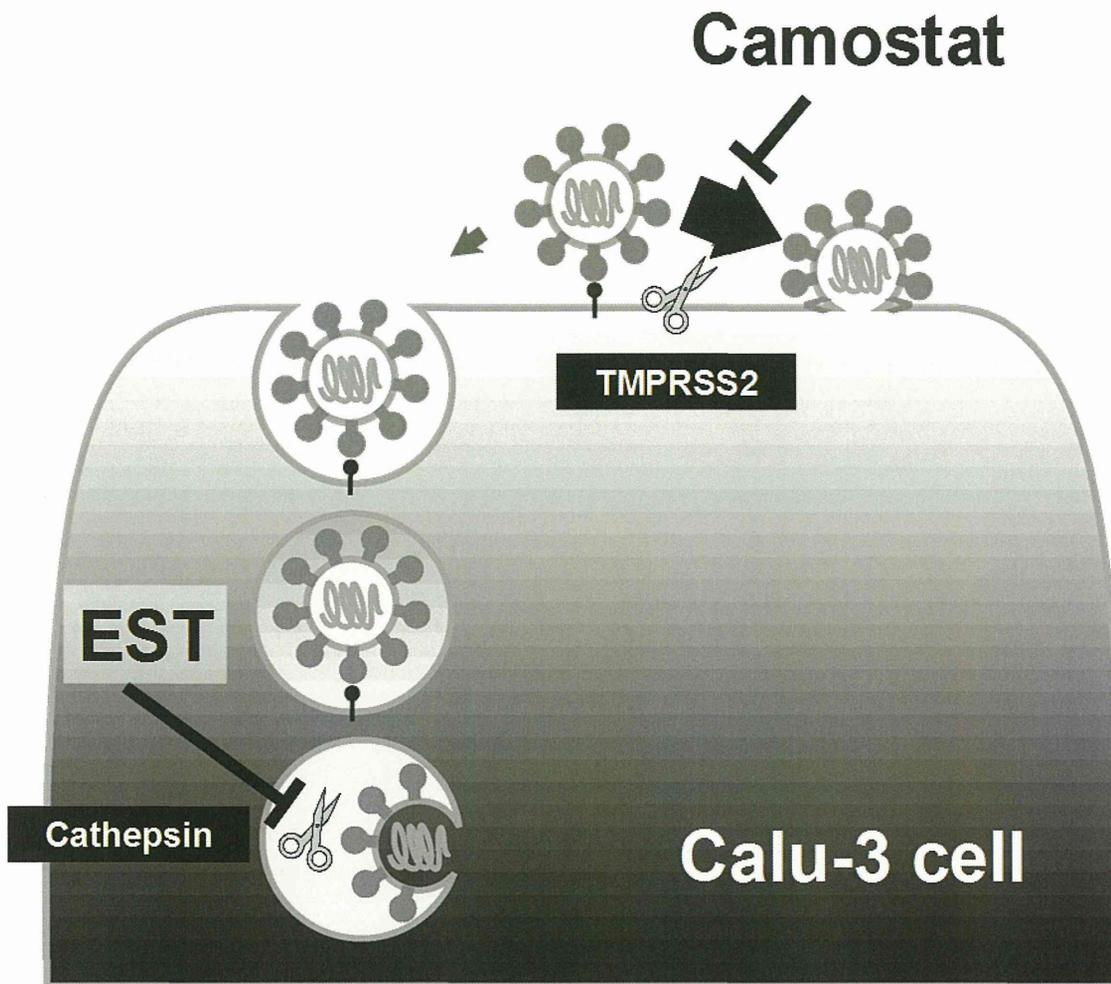


図6. 肺由来Calu-3細胞へのMERS-CoVの感染経路とプロテアーゼ阻害剤による細胞侵入阻止

MERS-CoVは2つの経路(カテプシン/エンドサイトーシスもしくはTMPRSS2/細胞表面)からCalu-3細胞に侵入できるが、ほとんどのウイルスは細胞表面経路から侵入していると考えられる。TMPRSS2の阻害剤であるカモスタットにより、ウイルス感染を効率的に阻止することができる。

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究

— 分担研究報告書 —

分担研究課題：ラブドウイルスベクターを用いた出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発

分担研究者：伊藤 睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官）

研究要旨

致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。そこで、本研究ではラッサウイルスの感染防御ワクチンとして、安全性が高く、且つ細胞性免疫を強く惹起することが知られている非増殖性ラブドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）のモデル系を用いて個体レベルの解析を行うことを目的とする。本研究室で既に確立済みであるP遺伝子欠損非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を用いて、LCMVの主要抗原であるGPCを発現する非増殖性狂犬病ウイルスベクター△P-GPCを作出した。蛍光抗体法により、△P-GPC感染細胞においてGPCの発現を確認した。マウスを用いた致死感染防御試験に置いて△P-GPCにより免疫をおこなった場合、80%の感染防御効果が得られた。今後マウスを用いた解析をさらに進めていきたい。

A. 研究目的

致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。さらにその感染防御には液性免疫ではなく細胞性免疫が非常に重要である事が分かっている。しかし、病原性復帰の問題から弱毒生ワクチンの適用は難しい。そこで、本研究ではラッサウイルスの感染防御ワクチンとして、安全性が高く、且つ細胞性免疫を強く惹起することが知られている非増殖性ラブドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）のモデル系を用いて個体レベルの解析を行うことを目的とする。

これまでに本研究室では増殖に必須であるP蛋白質を欠損した非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を確立している。そこで、今回はこの系を用いてLCMVの主要抗原であるGPCを組込んだ非増殖型狂犬病ウイルスベクターを作出し、そのワクチン効果についてマウスを用いた評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. LCMVのGPCを発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルスの作製：本研究室では、日本の不活化狂犬病ワクチン製造株であるHEP-Flury株をベースとして増殖に必須であるP遺伝子を欠損させたP遺伝子欠損非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を確立済みである。そこで、LCMVの主要抗原遺伝子であるGPCをPCRにより増幅し、P遺伝子欠損ウイルスベクターpHEP-△Pのクローニングサイト（N遺伝子の直下）に挿入したプラスミドp△P-GPCを作製した。このp△P-GPCとともにウイルスの増殖・複製に必要な狂犬病ウイルスのN、P、LおよびG蛋白質を供給する各ヘルパープラスミドを狂犬病ウイルスのP蛋白質を恒常に発現するBHK細胞（BHK-P細胞）にTransIT-LT1（TaKaRa）を用いてトランスフェクトし、常法に従ってLCMVのGPCを発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルス△P-GPCの作出を試みた。ネガティブコントロール

ールとして用いるため、挿入遺伝子を持たない P 遺伝子欠損ウイルス Δ P の作出を行った。トランスフェクション後の培養上清を新しい BHK-P 細胞に数代継代し、培養細胞を 80%アセトンにて固定した後、FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体 Anti Rabies monoclonal globulin (FUJIREBIO) を用いて狂犬病ウイルス抗原の検出を行った。同時に上清を用いて RNA 抽出を行い、GPC 挿入部を増幅する RT-PCR により、遺伝子構造の確認を行った。

- ウエスタンブロッティングによる培養細胞での目的蛋白質発現確認：組換えウイルス Δ P-GPC および Δ P を m.o.i.= 1 で BHK-P 細胞に接種し、3 日間 35°C にて培養した。培養細胞での GPC の発現をウエスタンブロッティングにより確認した。上清を除き PBS (-) で 2 回洗浄した細胞をサンプルバッファーにて溶解し、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングを行った。ポジティブコントロールとして、HEK293 細胞に発現プラスミド（感染症研究所谷口怜先生より分与）を Transfection し、37°C で 48Hr 培養したもの、および Vero 細胞に LCMV を m.o.i.=0.1 にて接種し、37°C で 48Hr 培養したものを同様にサンプルバッファーにて処理して用いた。一次抗体として LCMV の GPC に対する単クローン抗体 KL-25（ジュネーヴ大学 Pinschewer 教授より分与）を二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG を用いて GPC の検出を試みた。検出には SuperSignal West Femto (Thermo Scientific) を使用した。検出バンド Image Reader (FUJIFILM) により数値化し、 β アクチンで補正後発現量の比較を行った。
- 蛍光抗体法による Δ P-GPC 感染培養細胞での目的蛋白質発現確認：組換えウイルス Δ P-GPC および Δ P を m.o.i.=0.1 で BHK-P 細胞に接種し、33°C にて 2 日間培養した。上清を除き 80%アセトンを用いて紫外線照射下で 20 分間固定した。LCMV の GPC を単クローン抗体 KL-25 および

Dylight594 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、狂犬病ウイルスを FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体 Anti Rabies monoclonal globulin (FUJIREBIO) を用いて二重染色を行い、倒立顕微鏡 (OLYMPUS) で観察した。

- 非増殖型組換えウイルスの培養細胞での性状解析：組換えウイルス Δ P-GPC および Δ P を m.o.i.=0.01 で BHK-P 細胞に接種し、35°C にて培養した。経時的に上清を回収し、ウイルス力価を BHK-P 細胞を用いたフォーカスアッセイにより算出した。
- 非増殖型組換えウイルスの高力価ウイルスストックの作製：組換えウイルス Δ P-GPC および Δ P を m.o.i.=0.01 で BHK-P 細胞に接種し、35°C にて 6 日間培養した。培養上清を回収し、新しい培養液を加えさらに 6 日間培養後の上清を回収した。回収した培養上清を 0.45 μ l のボトルトップフィルターでろ過したものに、ポリエチレングリコール (PEG) を加えて 4°C にて 1 晩転倒混和した。4°C にて 2,900 \times g、30 分遠心して沈澱を回収した。その後 60%と 20%のスクロース液を用いて 4°C にて 2,500 \times g、90 分超遠心を行った。ウイルスバンドを回収し、限界ろ過により濃縮・精製を行った。精製ウイルスの力価をフォーカスアッセイにより測定した。
- マウスを用いた防御試験 (図 1)：LCMV モデル系では強毒株である WE 株を用いたマウスでの感染防御試験が可能である。5 週齢の C57BL/6j マウスに 10⁶ ffu/匹の Δ P-GPC を 1 週間間隔で 2 回筋肉内または腹腔内接種し、その 1 週間後に強毒の WE 株を 300 LD₅₀ (10 pfu) 脳内接種した。陰性対照として Δ P を用いた。2 週間の観察を行い、その防御効果を比較した。

C. 研究結果

- フルゲノムプラスミド p Δ P-GPC を用いてリバースジェネティクスを行い、3 回継代後の細胞において狂犬病ウイルス抗原を確認できた。p Δ P

を用いた場合 1 回継代後の細胞においてウイルス抗原が確認できた。3 回継代後の細胞の培養上清を用いて行った RT-PCR の結果予想された分子量の遺伝子断片の増幅が確認された。

2. 作出された組換えウイルス Δ P-GPC 接種細胞において GPC 一過性発現細胞および LCMV 感染細胞 GPC と同一の分子量のバンドが確認された (図 2 左)。陰性対照の Δ P および mock 感染 BHK-P 細胞では GPC 特異的バンドは確認されなかった。発現量の解析の結果、 Δ P-GPC 感染細胞における GPC 発現量は発現プラスミド導入細胞および LCMV 感染細胞に比べそれぞれ約 2.5 および 11 倍低かった (図 2 右)。
3. Δ P-GPC 接種 BHK-P 細胞では、狂犬病ウイルス抗原発現細胞において GPC が検出された (図 3)。陰性対照の Δ P 接種 BHK-P 細胞では、狂犬病ウイルス抗原のみが検出された。
4. BHK-P 細胞での Δ P-GPC の増殖は Δ P のそれと比べ若干低く $10^5 \sim 10^6$ 程度であった (図 4)。
5. 2.3×10^5 ffu/ml のウイルス液 1.7 L を精製・濃縮し、 2.5×10^7 ffu/ml の精製 Δ P-GPC ウイルス液約 3 ml を得た。
6. マウスを用いた防御試験において、筋肉内接種した群では、 Δ P 接種群が全頭死亡したのに対し、 Δ P-GPC 接種群は 5 匹中 4 匹が生残した (図 5 左)。腹腔内接種群においては、 Δ P 接種群では、3 匹中 1 匹のみが生残したのに対して、 Δ P-GPC 接種群は 5 匹中 4 匹が生残した (図 5 右)。どちらにおいても約 80% の防御効果が確認できた。

D. 考察

LCMV の抗原遺伝子 GPC を持つ非増殖性組換えウイルス (Δ P-GPC) の作出に成功した。さらにこの組換えウイルスを BHK-P 細胞に接種したところ、発現量は感染細胞および一過性発現系に比べ低かったものの、目的の分子量の GPC を発現していることをウェスタンブロッティング

により確認できた。蛍光抗体法において Δ P-GPC 感染 BHK-P 細胞では、狂犬病ウイルス抗原陽性細胞に一致して GPC 抗原が検出された。以上のことから作出された Δ P-GPC が目的の抗原遺伝子 GPC を発現していることが確認できた。蛍光抗体法の染色像では、狂犬病ウイルス N 蛋白質の抗原が細胞質に見られたのに対し、GPC は細胞膜表面が強く染まる傾向があった。GPC は宿主のプロテアーゼにより GP1 と GP2 に切断され、ゴルジ装置での成熟を経て膜上に発現される蛋白質であり、この分布は発現した GPC が正常なプロセッシングを受けていることを示唆している。 Δ P-GPC の培養細胞での増殖は Δ P と比較して若干低かった。この理由としては GPC を挿入したことで、それより後ろのウイルス蛋白質の発現が落ちたため、もしくは GPC が細胞膜状に発現することにより、ウイルスの出芽効率に何らかの影響を与えたためと考えられる。精製した Δ P-GPC を用いてマウスを用いた感染防御試験を行ったところ、マウスにおいて一定の防御効果を確認することができた。今後接種ルート、接種量、接種間隔等についてさらに検討をするとともに、免疫後のマウスの中和抗体価や免疫反応についても解析していく予定である。

E. 結論

LCMV の抗原遺伝子 GPC を発現する非増殖性狂犬病ウイルスベクターの作出に成功した。さらにマウスにおいて一定の防御効果を確認できた。今後マウスを用いた解析をさらに進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 42:42-7, 2014
- 2) Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 strain. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (1) :356-9.
- 3) Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, Kakiuchi S, Suzutani T, Nakamichi K, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66 (5) :404-10.

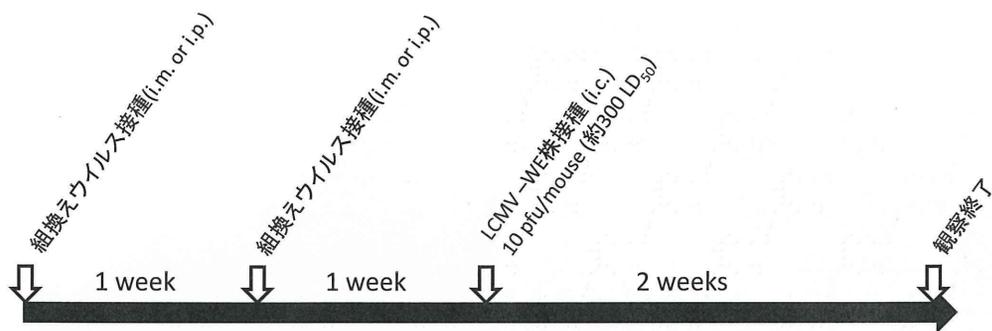
2. 学会発表

- 1) 伊藤(高山) 睦代: 狂犬病ワクチン検定における試験管内不活化試験法の開発, 第23回感染研シンポジウム, 2013年5月
- 2) 垣内五月、王麗欣、伊藤(高山) 睦代、林昌宏、辻正徳、谷口修一、西村秀和、岡明、水口雅、西條政幸: 造血幹細胞移植患者におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス1型についての検討, 第23回抗ウイルス療法研究会総会, 東京, 2013年6月
- 3) 垣内五月、佐藤正明、伊藤(高山) 睦代、林昌宏、蒲ひかり、東裕哉 大澤由記子、木村聡、津川潤、坪井義夫、水口雅、岡明、西條政幸: ヘルペス脳炎を起因した単純ヘルペスウイルス1型のアシクロビル感受性の検討、第45回小児感染症学会総会・学術集会, 札幌, 2013年10月
- 4) 伊藤(高山) 睦代、林昌宏、森本金次郎、垣内五月、山口幸恵、堀谷まどか、西條政幸: ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月

- 5) 山口幸恵、林昌宏、伊藤(高山) 睦代、垣内五月、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、渡邊治雄、西條政幸: 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性を決定する宿主側因子の解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月
- 6) 垣内五月、王麗欣、伊藤(高山) 睦代、林昌宏、西村秀一、辻正徳、谷口秀一、水口雅、岡明、西條政幸: 造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス1型感染症の臨床的意義に関する研究, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

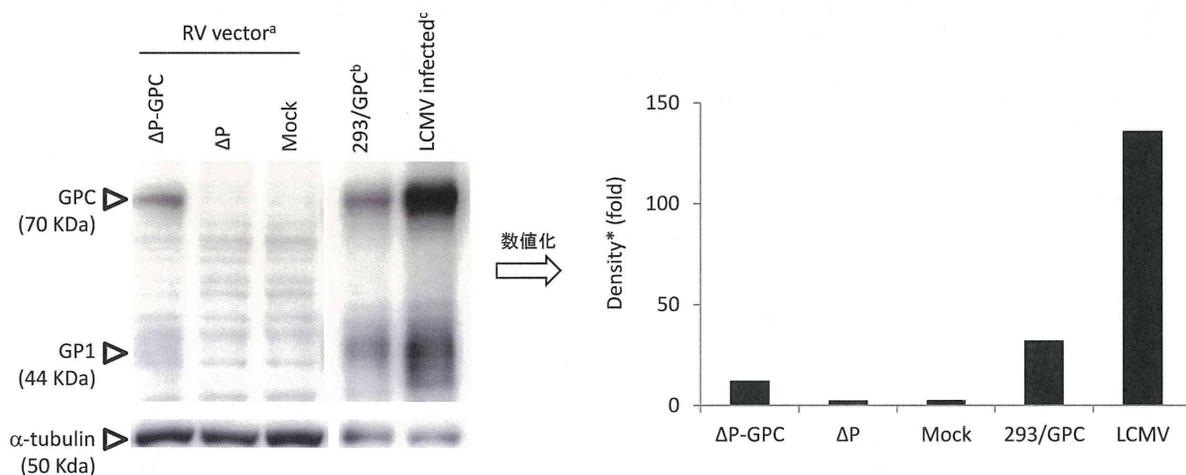
- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし



ウイルス	接種量/mouse	接種ルート	匹数
ΔP-GPC	10 ⁶ ffu	筋肉内	5
ΔP			3
ΔP-GPC	10 ⁶ ffu	腹腔内	5
ΔP			3

マウス: C57BL6j, 5 週齢, ♀

図 1: 組換えウイルスによる感染防御試験における接種スケジュール



a: P蛋白質発現BHK細胞にm.o.i.=1にて各ウイルスまたは希釈液(mock)を接種し35°Cで72Hr培養後、上清を除き細胞をサンプルバッファーにて処理した。
 b: HEK293細胞に発現プラスミド(*pCAGGS-GPC 1μg)をTransfectionし、37°Cで48Hr培養後、上清を除き細胞をサンプルバッファーにて処理した。
 c: Vero細胞にLCMVをm.o.i.=0.1にて接種し、37°Cで48Hr培養後、上清を除き細胞をサンプルバッファーにて処理した。
 *ウイルス第一部第一室の谷口伶先生より分与された。

図 2: 組換えウイルス感染細胞における GPC の発現確認 (ウェスタンブロットティング)

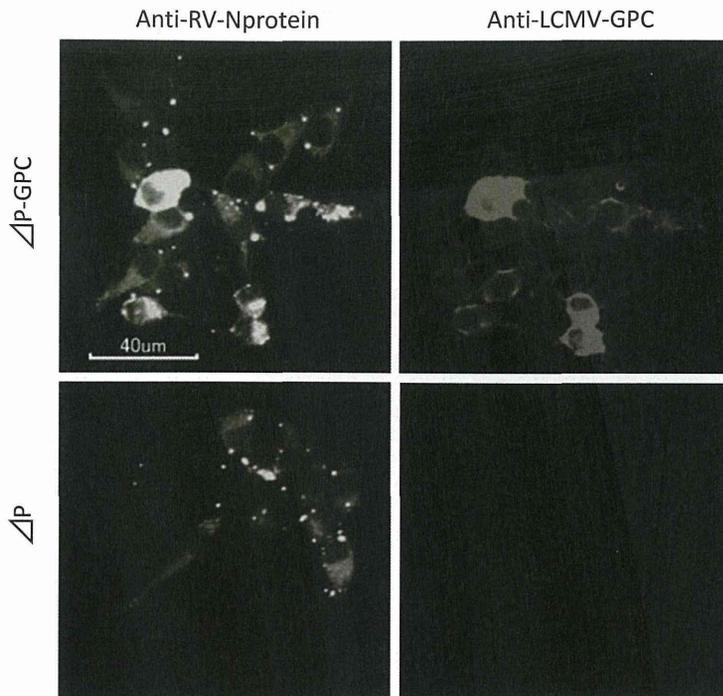


図 3 : 組換えウイルス感染細胞における GPC の発現確認 (蛍光抗体法による二重染色)

Original magnification, × 400

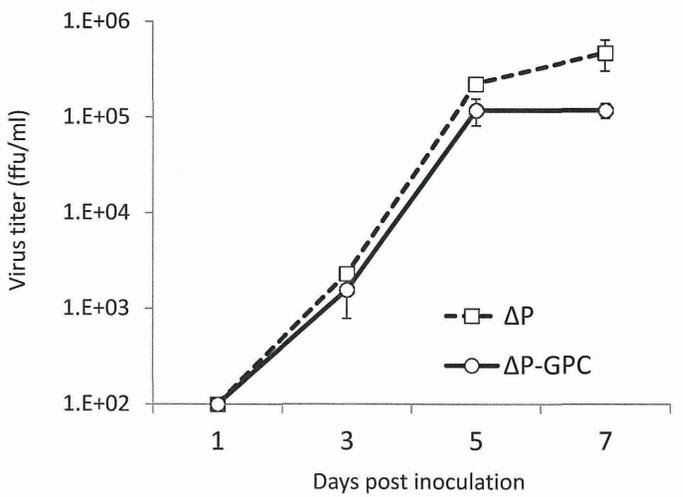


図 4 : P 発現細胞における組換えウイルスの増殖曲線

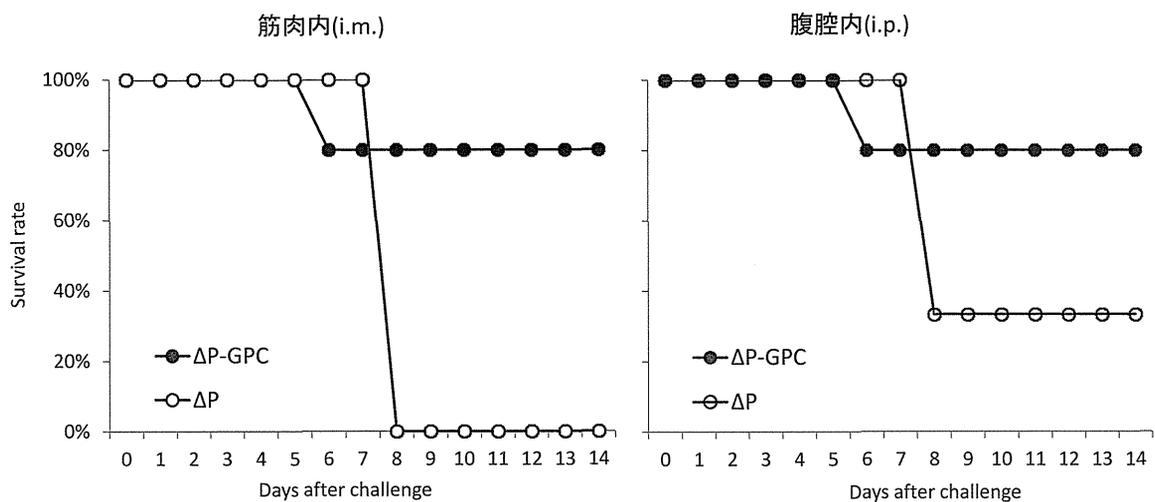


図 5 : 組換えウイルスによる感染防御試験における生残曲線

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究

— 分担研究報告書 —

分担研究課題：コウモリウイルスを効率的に分離するための

「自然免疫系遺伝子群ノックアウトコウモリ細胞」の作出

分担研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 加来義浩

協力研究者 国立感染症研究所 動物管理室 河合康洋

協力研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 野口 章

協力研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 井上 智

研究要旨：コウモリは様々なウイルスの自然宿主として知られており、動物由来感染症のレゼルボアとしての重要性が年々高まっている。本課題では、コウモリ検体から効率よくウイルスを分離するために、自然免疫系遺伝子群をノックアウトしたコウモリ細胞の樹立を目指した。本年度は、ヤエヤマオオコウモリ (*Pteropus Dasymallus yayeyamae*) 腎臓由来 FBKT 細胞に対して、抗ウイルス応答の主要因子である MyD88、MDA5、Interferon alpha receptor 2 遺伝子を標的として、人工ヌクレアーゼ CRISPR/CAS9 システムを用いてノックアウトを行った。薬剤選択後、生存した細胞を限界希釈して播種したうえで、PCR によるスクリーニングを行ったが、これまでに変異導入細胞は確認できていない。今後、さらにスクリーニングを進めるとともに、種々の条件検討を行い、効率よく変異を導入できる系の構築を目指す。

A. 背景と目的

コウモリ類はエボラウイルス、マールブルグウイルス、狂犬病ウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、SARS コロナウイルス等、多くのウイルスの自然宿主である。動物由来感染症のレゼルボアとしてコウモリの重要性は年々高まっていることから、近年、未知／既知ウイルスの探索を目的としたコウモリのサーベイランスが世界各国で行われている。しかし、ウイルス遺伝子や抗体が検出されるコウモリ検体であっても、ウイルスそのものが分離されない事例が多く、病原体の探索は膨大な種類のプライマーを用いた PCR に頼らざるを得ないのが現状である。コウモリ類からのウイルス分離には、現在、アフリカミドリザル由来の Vero 細胞が広く利用されている。Vero 細胞はインターフェロン(Interferon; IFN)産生が欠如しているため、

他の細胞よりも効率的にウイルスが分離できると考えられている。その一方で、(Vero 細胞を含め)コウモリ以外の動物種に由来する cell line からは、検体中の Quasispecies のうち当該細胞に適応したウイルス群が選択的に分離されるため、分離ウイルスはコウモリ集団で実際に循環しているウイルスの性状を反映していない可能性がある。コウモリ由来感染症の疫学を理解し、制御するためには、コウモリ個体／群で最も優勢となっているウイルスを効率的に分離できる系の構築が不可欠である。

そこで本課題では、コウモリ由来細胞から抗ウイルス応答に重要な IFN 産生に関わる自然免疫関連遺伝子をノックアウトすることにより、効率的にコウモリウイルスが分離できる cell line を確立することを目指した。ノックアウトには、簡便かつ高効率に変異が導入できること

が知られている CRISPR/Cas9 システムを利用した。同システムは、原核細菌の獲得免疫系をもとに開発されたものであり、標的配列を認識する 21 塩基の「ガイド RNA (gRNA)」と、人工ヌクレアーゼ「Cas9」から構成される。gRNA/Cas9 複合体を哺乳細胞内に発現させることにより、標的ゲノム配列が切断され、同部位を細胞側因子が修復する際に遺伝子変異が導入される。変異導入効率は、これまで広く利用されていた人工ヌクレアーゼ TALEN と同等と報告されている。gRNA 発現ベクターを変更するだけで簡単に標的配列を変えられるうえ、同時に複数の遺伝子を標的にできることから、次世代のノックアウト法として注目されている。同システムを用い、本年度はヤエヤマオオコウモリ (*PteropusDasymallusyayeyamae*) 腎臓由来 FBKT 細胞に対して、抗ウイルス応答の主要因子である MyD88、MDA5、Interferon alpha receptor 2 遺伝子のノックアウトを試みた。

B. 研究方法

1) コウモリ細胞 MyD88、MDA5、IFNaR2 遺伝子配列の決定

山口大学農学部獣医微生物学教室の前田健教授より供与されたヤエヤマオオコウモリ (*PteropusDasymallusyayeyamae*) 腎臓由来 FBKT 細胞を、本実験に供した。ノックアウト標的遺伝子として、自然免疫に関連する蛋白質群のうち、とくに抗ウイルス応答の主要分子である MyD88、MDA5、Interferon alpha receptor 2 (IFNaR2)を選んだ。

P.D.yayeyamae ゲノム上の MyD88、MDA5、IFNaR2 遺伝子配列は以下のように決定した。まず、これら遺伝子の mRNA 発現を刺激するために、FBKT 細胞を Poly I:C で処理し、0、1、3 時間後の細胞から RNA を抽出した。Oligo-dT プライマーまたはランダムプライマーを用いた逆転写反応により 1st strand cDNA を作成後、

各遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。プライマーはデータベースに公開されているクロオオコウモリ (*PteropusAlecto*) の配列 (GenBank Acc. No.ELK13641 [MyD88], ELK04649.1 [MDA5], ELK04502.1 [IFNaR2]) に基づいて設計された。電気泳動で増幅が確認されたサンプルを用いて、塩基配列を決定した。

2) ノックアウト標的配列の決定

上記で得られた *P.D.yayeyamae* の MyD88、MDA5、IFNaR2 遺伝子配列を、*P. Alecto* および他の哺乳動物の当該配列と比較し、*P.D.yayeyamae* ゲノム上のエクソン/イントロン位置を推測した。第 1 エクソン上の開始コード近傍の領域を対象にして、以下の方法でノックアウト標的配列を探索した。まず、ウェブサイト (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) 上の専用アプリケーション (ZiFiTTargeter Version 4.2) に探索対象領域の塩基配列を入力すると、複数の標的候補配列 (21 塩基) が表示される。標的配列はセンス鎖/アンチセンス鎖のいずれにも設計可能であり、変異はセンス鎖では標的配列の下流、アンチセンス鎖では標的配列の上流に導入される。両鎖を同時に標的にすると、それぞれの標的配列で二本鎖切断が生じるため、両標的配列間で欠損を誘導できる。なるべく大きな欠損 (数 10~100 塩基程度) の誘導を期待して、探索対象配列内に表示された複数の標的候補配列のうち、最も遠距離に存在するセンス鎖/アンチセンス鎖標的配列のセットを、各遺伝子につき 1 つずつ選択した。

3) 遺伝子ノックアウト

ノックアウト用ベクターには、Addgene 社の pX330 U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (CRISPR/Cas9)ベクターを使用した。本ベクターには、U6 プロモーター下流からガイド RNA が、hSp プロモーター下流から CAS9 が発現するように設計されている。まず上記で決定した各標的配列およびその相補配列を含む 21 塩基

のオリゴマーを合成し (表 1)、これらをアニールさせた後、同ベクターの U6 プロモーター下流のクローニングサイトに挿入した。標的配列は各遺伝子に 2 つ (センス鎖、アンチセンス鎖) あるので、ベクターも各遺伝子に 2 種類ずつ作製された。次に、3 つの遺伝子 (MyD88, MDA5, IFN α R2) を独立してノックアウトするため、各遺伝子につき 2 種類のノックアウトベクターを FBKT 細胞に transfection した。CRISPR/Cas9 ベクターには薬剤選択マーカー配列がないため、puromycin 耐性遺伝子発現ベクターも同時に transfection した。具体的には、2 種の CRISPR/Cas9 ベクター (1.0 μ g) と、puromycin 耐性遺伝子発現ベクター (0.1 μ g) を混合したうえで、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて、24-well プレートの FBKT 細胞 (2×10^5 個/well) へ transfection した。Transfection の 48 時間後に 2 μ g/ml の puromycin の添加を開始し、死細胞が出なくなるまでの約 4~6 日間、薬剤選択を継続した。薬剤選択後、生存した細胞の一部を変異導入のスクリーニングに供し (次項)、残りの細胞を凍結保存した。

4) 変異導入細胞のスクリーニング

puromycin 選択後に生存した細胞を限界希釈し、96-well プレート上に 0.2 個/well の濃度で播種し、培養を行った。2~3 週間後に生存が確認できたウェルの細胞からゲノム DNA を抽出し、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、バンドサイズを非ノックアウト細胞由来 PCR 産物と比較することにより、標的配列間で欠損が導入されたクローンを探索した。

C. 研究結果

1) MyD88, MDA5, IFN α R2 遺伝子配列の決定

P.D.yayeyamae 由来 FBKT 細胞を Poly I:C で刺激し、0、1、3 時間後に抽出した RNA に対し

て、MyD88、MDA5、IFN α R2 遺伝子を標的とした RT-PCR を行った。PCR に供する鋳型 cDNA は、RT 反応液を $\times 4$ 、 $\times 16$ 倍希釈して使用した。その結果、Poly I:C 添加によって MyD88 は時間経過に従って発現が低下、MDA5 は時間経過に従って発現が上昇、IFN α R2 は 1 時間後に発現が認められたが、それ以降で低下していた (図 1)。遺伝子発現が確認できたサンプルを用いて、転写産物の塩基配列を決定した (data not shown)。

2) ノックアウト標的配列の決定

上記で得られた塩基配列は、polyI:C 刺激後に得られた mRNA に由来するため、ゲノムのエクソン情報のみを反映している。効果的にノックアウトを行うためには、標的配列をゲノム上の同一エクソン上で、開始コドン近傍に設定する必要があるため、*P.D.yayeyamae* ゲノムのエクソン/イントロン位置を把握する必要がある。しかし公開されている *P.Alecto* のゲノム配列にはエクソン/イントロンの位置に関する情報が付与されていないため、まず同配列を他哺乳動物の MyD88、MDA5、IFN α R2 の mRNA 配列と比較し、*P.Alecto* ゲノム上のエクソン/イントロン位置を推測した。この *P.Alecto* ゲノム情報をもとに、*P.D.yayeyamae* の PCR 産物から得られた塩基配列上のエクソン/イントロン位置を推測したところ、解析された領域はすべて第 1 エクソンに属することが明らかになった。同エクソンについて *P.Alecto* と *P.D.yayeyamae* のゲノム配列を比較し、開始コドン近傍で相同性の高い領域を選択し、センス鎖/アンチセンス鎖の標的配列を、各遺伝子に 1 組ずつ設計した。

3) 遺伝子ノックアウトおよび変異導入細胞のスクリーニング

3 つの遺伝子 (MyD88、MDA5、IFN α R2) について、ノックアウト用 CRISPR/Cas9 ベクター 2 種と、薬剤選択用 Puromycin 耐性遺伝子発現ベクターを FBKT 細胞に co-transfection した。

薬剤選択後、生存細胞について限界希釈を行い、各遺伝子 960 ウェル（合計 2,880 ウェル）に播種したが、2~3 週間のうちにすべての細胞が死滅してしまった。そこで、MyD88 遺伝子についてのみ、ベクター/Lipofectamine を 2 倍量使用したうえで、再度 transfection を行った。初回スクリーニング同様、薬剤選択後 960 ウェルに播種し、2~3 週間培養したところ、53 ウェルにおいて細胞の増殖を確認した。これらの細胞より DNA を抽出し、標的部位を含む領域を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。その結果、53 ウェルのうち 2 ウェル（図 2 の No.6, 7）に由来する産物について、陽性対照と比較してバンドサイズの減少が認められた。そのため、これら 2 つの PCR 産物についてシークエンシングを行ったが、塩基配列の変異を確認することはできなかった（図 3）。

D. 考察

本課題は、人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを用いて、コウモリ由来細胞から自然免疫関連遺伝子をノックアウトすることにより、効率的にコウモリウイルスが分離できる cell line を確立することを目指している。コウモリ類の自然免疫系については他の哺乳類と比較して研究が進んでおらず、その全容は明らかになっていないが、今回はマウス/ヒトで抗ウイルス応答の主要因子のホモログにあたる 3 つの蛋白質（MyD88, MDA5, IFN α 2）をノックアウトの標的として選択した。MyD88 は、細胞表面でウイルスを感知した際のシグナリングに重要な細胞内分子であり、MDA5 は細胞内に侵入したウイルスを感知する分子である。また IFN α 2 は、細胞へ抗ウイルス反応を誘起する Interferon alpha の受容体である。FBKT 細胞における標的部位の配列決定は、*P.D.yayeyamae* のゲノム配列が明らかでないうえ、公開されている *P.Alecto* のゲノム配列にも

エクソン/イントロン位置に関する情報が付与されていないことから困難を極めた。最終的には、まず *P.Alecto* のエクソン/イントロン位置を他の哺乳類ゲノムと比較により推測し、その情報を *P.D.yayeyamae* に適用した。この手法は、今後他のコウモリ類の異なる遺伝子を解析する際にも有効と考えられた。

MyD88、MDA5、IFN α 2 遺伝子の第 1 エクソン内、開始コドン近傍に標的部位を設定し、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトを試みたが、結果的に、今回は遺伝子変異の導入を確認することができなかった。その原因としては以下の 4 点が考えられ、それぞれについて対応策を考察した。

第 1 に、ノックアウト後、解析に供した細胞クローン数が少なかったために、変異導入細胞株が確認できなかった可能性がある。今回は薬剤選択後、生存細胞を限界希釈し、960 ウェルに播種したが、さらに多くのクローンを解析することで変異導入細胞株を得られるかもしれない。今回の限界希釈後の細胞群は凍結保存されているので、これらを用いてさらに解析を続ける予定である。

第 2 に、今回選んだ標的配列が、何らかの理由で変異が入りにくい領域にある可能性がある。今回は各遺伝子に、センス鎖/アンチセンス鎖に 1 組の標的配列を設計したが、CRISPR/Cas9 システムでは gRNA 発現ベクターを変更するだけで簡単に標的配列を変えられることから、先述のウェブサイト上の専用アプリケーションを用いて他の標的部位を検索することも計画している。

第 3 に、CRISPR/Cas9 ベクターに挿入されているプロモーターが FBKT 細胞内で機能していない可能性がある。本ベクターには、ガイド RNA 発現用に U6 プロモーターが、Cas9 発現用に hSp プロモーターが用いられているが、これまで同ベクターがコウモリ細胞のゲノム編集

に使用された例はないことから、これらのプロモーターがコウモリ細胞内で機能することを示す明確な証拠はない。このことから、U6/hsp プロモーターの代わりに新たなプロモーターを試みる価値はあると考える。たとえば、今回のノックアウトに先立ち、FBKT 細胞に GFP 発現 pCAG3.1 ベクターを transfection した際に、GFP 発現を確認できたことから、CAG プロモーターは FBKT 細胞内で正常に機能すると考えられる。今後、U6/hsp プロモーターを順次 CAG プロモーターに置換し、再度ノックアウトを行う予定である。

第 4 に、使用した transfection の方法が適切でなかった可能性がある。今回は、過去に報告されているマウス細胞への導入方法を参考にし、Lipofectamine 2000 を用いて transfection を行った。今回のノックアウト実験に先立ち、予備実験として GFP 発現 pCAG3.1 ベクターと puromycin 耐性遺伝子発現ベクターを、Lipofectamine2000 で FBKT 細胞に co-transfection を行った際は、高頻度に GFP 発現細胞を確認することができた。しかし、CRISPR/Cas9 ベクターに対しては、何らかの理由で Lipofectamine 2000 の transfection 効率が低くなった可能性もある。必要に応じて electroporation 等、他の transfection 方法の検討も行う。

先述のように、コウモリ類の自然免疫系については、一部の分子の配列や機能が解析されているのみで、ノックアウト候補遺伝子の選択や標的部位の決定がきわめて困難な状況にあった。今回、これまでに公開されている *P. Alecto* のゲノム配列情報を、他の哺乳動物のゲノム情報と組み合わせることにより、*P.D.yayeyamae* の標的部位を決定することができた。この手法は、将来的にコウモリ類の自然免疫系の解明に向けて、関連遺伝子群を網羅的に同定していく際にも有効と期待される。

E. 結論

人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを用いて、コウモリ由来細胞から自然免疫関連遺伝子をノックアウトすることにより、効率的にコウモリウイルスが分離できる cell line を確立することを目指した。抗ウイルス応答の主要因子である MyD88、MDA5、IFN α 2 を標的としてノックアウトを行ったが、今回は、遺伝子変異導入細胞を確立することはできなかった。次年度以降、解析クローン数を増やして変異導入細胞を探索するとともに、変異導入効率を高めるために、標的部位、利用するプロモーター、transfection 方法など、種々の要因について検討を加える。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

- 1 論文発表
なし
- 2 口頭発表
なし