

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15331

研究課題名(和文)ゲノム改変に基づくウイルス感染のシングルセル・リアルタイム観測技術の創出

研究課題名(英文)Creation of single cell and real-time observation technology of virus infection based on genome modification

研究代表者

渡邊 映理(WATANABE, Eri)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20433253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染実験では、目的とするウイルスのトロピズムの合致したヒト由来の細胞が実験材料として供給できない場合があり、自然宿主ではない培養細胞株を用いるか、類縁のウイルス種を用いたモデル系で感染実験を行うことが多い。一方、ウイルス感染を検出する方法としては、レトロスペクティブな証明法が主流であり、生きた個々の細胞でリアルタイムに観察することは難しく、また感染したウイルスを迅速、高感度、精確に検出することも容易ではない。本研究では、染色体改変技術を用いて、自然宿主に近い細胞におけるウイルス感染をリアルタイムに観測できる細胞(ウイルスセンサー細胞)の樹立を目的とした。

研究成果の概要(英文)：In virus infection experiments, cells derived from humans matching the target virus tropism can sometimes not be supplied as experimental material. In that case, infection experiments are often carried out using a cultured cell line that is not a natural host, or a model system using related virus species. On the other hand, as a method of detecting virus infection, a retrospective proof method is mainstream. However, it is difficult to observe in live individual cells in real time, and it is not easy to detect infected virus quickly, highly sensitively and precisely. In this study, we aimed to establish cells (virus sensor cells) that can observe viral infection in real time in cells close to the natural host using chromosome modification technology.

研究分野：免疫学

キーワード：臨床微生物学 ウイルス感染

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス感染実験では、目的とするウイルスのトロピズムの合致したヒト由来の細胞が実験材料として供給できない場合があり、自然宿主ではない培養細胞株を用いるか、あるいは感染可能な培養細胞株がない場合には、類縁のウイルス種を用いたモデル系で、感染実験を行うことも多い。

一方、ウイルス感染を検出する方法としては、従来は培養した後に、細胞の死を観察したり、あるいは細胞を壊してウイルス核酸を定量したりするという、レトロスペクティブな証明法が主流であり、生きた細胞で継続的にリアルタイムに観察することは難しく、また感染したウイルスを迅速、高感度、精確に検出することも容易ではない。

(2) そこで、標的遺伝子に特異的な改変が加わるようにゲノム配列を操作したヒト由来細胞株を樹立し、自然宿主に近い細胞におけるウイルス感染をリアルタイムに観測できる細胞（ウイルスセンサー細胞）を樹立すれば、増幅したウイルスを迅速かつ高感度に検出できる技術を創出できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 染色体改変技術（CRISPR-Cas9）により、ウイルスセンサー細胞を樹立しようとの着想に基づき、本研究ではヒト由来細胞にそのようなゲノム改変を加えた感染検出用の細胞の樹立を目的として研究を行った。様々なヒト由来の細胞株に対して CRISPR/Cas9 を用いた改変を加え、シングルクローンから細胞株を樹立する試みを行った。

(2) CRISPR-Cas9 によりウイルス感染検出に特化した人為的改変細胞をセンサー細胞として創出する点は、極めてユニークであると考えられる。また、ウイルス感染を高感度にリアルタイム観測することに応用するという点も、本研究の斬新な着眼点である。本研究のような試みはこれまで行われたことはなく、極めて独創的でチャレンジングな研究である。

(3) 本研究の成果は、ヒト細胞、とくに自然宿主に近い細胞におけるウイルス感染の分子メカニズムの解明につながると期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、目的とする遺伝子を、染色体改変技術 CRISPR/Cas9 を用いて操作し、遺伝子改変細胞を樹立した。

(2) 遺伝子の改変には、本研究室にてガイド RNA 配列、Cas9 遺伝子、薬剤耐性遺伝子、GFP 遺伝子を含む種々の構築のベクターを作出した。得られたベクターを細胞に導入した。

(3) その後、様々なヒト由来細胞を増殖し、対数増殖期に、作成したベクターをトランスフェクトした。

(4) GFP 発現が認められたクローンを選択して増殖させた。このようにして得た多くのクローンに対して mRNA レベルとタンパクレベルで目的とする遺伝子改変がなされているかどうかを確認して、目的のシングルクローンをいくつか選出した。

(5) 次の段階として、前段階で作成したシングルクローンセルに種々のウイルスを感染させた。

(6) 上記の細胞から RNA を抽出し、ウイルス RNA を経時的に計測した。また培養上清を採取し、ウイルスのタイターを経時的に計測した。

(7) 本研究の遺伝子組換え実験はすべて認可を得て行った。

## 4. 研究成果

(1) 目的とする遺伝子改変を有するクローンを得た(図 1)。

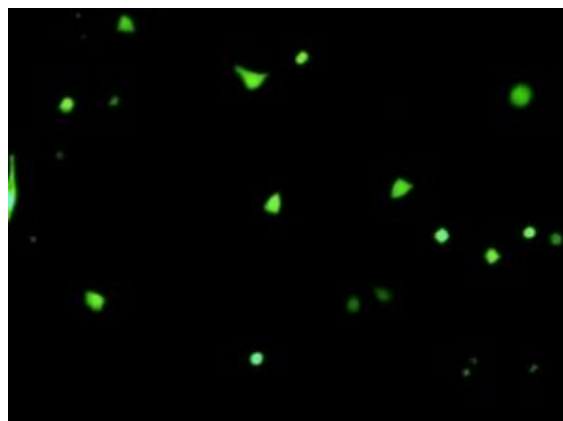
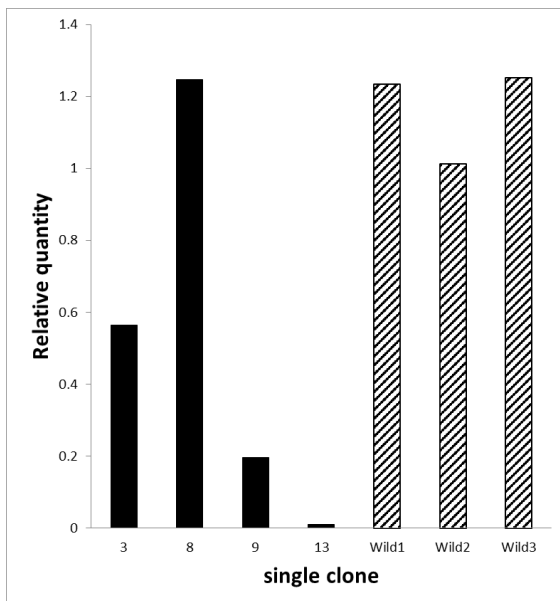


図 1  
トランスフェクションを行ったヒト由来細胞の蛍光顕微鏡像。遺伝子導入後の細胞を蛍光顕微鏡 BZ-II Analyzer (Keyence) を用いて観察した。



**図2**  
**標的遺伝子の mRNA 発現のリアルタイム RT-PCR 結果。**クローン 3, 8, 9, 13 は CRISPR/Cas9 を導入し、薬剤選択で得た代表的なクローンであり、Wild 1, 2, 3 は、ワイルドタイプのクローンである。RNA は ISOGEN II (Nippon Gene) で回収後、ReverTra Ace qPCR RTMaster Mix (Toyobo) を用いて逆転写した。Real-time RT-PCR は、Real-Time PCR Master Mix (Toyobo) を用い、7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で行った。β-アクチン遺伝子の mRNA レベルに対する相対レベルで表した。

(2) 図2に、代表的なクローンにおける標的遺伝子の mRNA 発現レベルを示す。リアルタイム RT-PCR の結果、標的遺伝子の発現がほぼ完全に消失したクローンが得られたこと、また部分的に発現が低下したクローンも得られたことがわかる。

(3) これらの細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングによって標的遺伝子のタンパク発現レベルを解析したところ、標的タンパク発現がほぼ消失していることを確認した。

(4) さらに現在、本研究室にてより導入効率の高い方法やベクターを検討するとともに、これらのシングルクローンのフェノタイプをより安定化する改良を加えているところである。

(5) 上記のクローンをセンサー細胞の候補として、種々のウイルスを感染させる実験を行った。標的遺伝子が操作されたクローンにおいて、野生株への感染と比較して、ウイル

スのタイターとウイルス RNA の定量等を行った。

(7) 自然宿主におけるウイルス感染をリアルタイムに観測し、増幅したウイルスを迅速かつ高感度に検出できる技術が確立できれば、自然宿主に近いヒト細胞におけるウイルス感染の分子メカニズムの解明につながると期待できる。

(8) 本研究の手法を用いれば、例えば従来は感染が極めて困難であったヒト細胞においても感染実験ができるので、代替細胞を使用するのではなく、トロピズムに従ったヒト細胞をモデルにして、感染実験を行うことができる。自然宿主である細胞種への感染実験を行うことによって、本研究はウイルス感染の分子病態と抗ウイルス自然免疫応答の理解に新しい地平を開くものと期待できる。

(9) 一方で、このセンサー細胞に様々なウイルスを感染させ、培養することによって、ウイルスを産生する細胞として直接利用できるようになると思われる。

(10) 自然な感染に近い細胞から産生されるウイルスであり、かつ大きなスケールでの培養もできるので、臨床検体等とは異なり均一なウイルス株を安定的かつ大量に供給できることが予想できる。

したがって、ワクチン開発や治療薬の開発にも直接応用できる可能性が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 映理 (WATANABE, Eri)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20433253

(2)研究分担者

(3)連携研究者

松田 修 (MAZDA, Osam)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号： 00271164

(4)研究協力者 なし