

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04003

研究課題名(和文) ゲノム編集による改良型ウイルス感染宿主細胞の構築

研究課題名(英文) Construction of improved virus-susceptible host cells by genome editing

研究代表者

花田 賢太郎 (Hanada, Kentaro)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・主任研究官

研究者番号：30192701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：感染症対策に汎用されるVero細胞には複数の亜株が存在する。ゲノム比較解析から、同細胞亜株は二系統に大別できるが、内在性レトロウイルス挿入位置やI型インターフェロン遺伝子クラスターの本モ接合性欠失位置は亜株間で同一であることを明らかにした。黄熱ウイルス17Dレプリコンが持続複製するVero細胞を作製した他、WHOが主導するポリオ根絶計画に寄与すべく、ポリオウイルス増殖能のないVero細胞も作製した。ヒト肝がん由来 HuH-7細胞系統の亜株でC型肝炎ウイルス産生能が高いHuh7.5.1-8細胞についてウイルス学的な有用性を見出し、HuH-7細胞系統におけるRIG-I変異の実態も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、ウイルス感染症ワクチンを生産する細胞基材の開発・改良のための科学基盤となる。例えば、GFP発現型の黄熱ウイルスレプリコン持続複製Vero細胞は、同ウイルス複製を阻害または増強する薬剤や宿主細胞変異株を簡便に探索するツールとなる。また、本研究で作出したポリオウイルス増殖能のないVero細胞は、WHOが主導するポリオ根絶計画に対処しつつも、広範な種類の新興再興ウイルス感染症の原因ウイルスを分離する際の標準的な宿主細胞となりえる。さらに、Vero細胞やHuH-7細胞のゲノム解析情報はこれら細胞の品質管理に活用できる。

研究成果の概要(英文)：The Vero cell lineage, which is universally used for infectious disease control, has multiple sub-lines. Comparative genomic analysis revealed that the cell sub-lines can be broadly classified into two lineages, but the endogenous retroviral insertion position and homozygous deletion position of the type I interferon gene cluster are identical in all four Vero cell lines examined. We generated a Vero cell line with persistent replication of the yellow fever virus 17D replicon and another Vero cell line without poliovirus growth potential, which may be useful for the WHO-led polio eradication program. We found the virological utility of Huh7.5.1-8 cells, a subline of the HuH-7 cell line derived from human hepatocellular carcinoma with high hepatitis C virus productivity, and also clarified the characteristics of RIG-I mutations in the HuH-7 cell line.

研究分野：生化学

キーワード：宿主細胞 Vero細胞 フラビウイルス ポリオウイルス 内在性レトロウイルス レギュラトリーサイエンス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは感染症対策の大きな柱である。ワクチン製造においては、材料となる病原体(またはその弱毒変異株)だけでなくそれを増殖させる細胞基材も生物であり、これら生物原料の改良には多くの試行錯誤を要する。さらに、生物原料は化学物質のように均一かつ安定に作出できない。そのため、ワクチンの開発およびその品質管理は全ての医薬品の中で今でも最も複雑かつ困難な部類に属している。このような現状を改善していくためには、最新の科学技術を取り入れた斬新な取り組みをさまざまなレベルで行う必要がある。

アフリカミドリザル腎臓から約半世紀前に樹立された Vero 細胞は、多様なウイルスが増殖できる細胞であり、現在でもワクチン生産用細胞基材として最も汎用されている細胞である。我々は、Vero 細胞の全ゲノム配列を世界に先駆けて解読し、I 型インターフェロン (IFN) 遺伝子クラスターが欠失していることなどを明らかにしてきた (Osada et al., DNA Res, 2014)。一方で、C 型肝炎ウイルス (HCV) は一般に細胞培養が困難であるが、genotype 2a の JFH-1 株であればヒト肝癌由来 HuH-7 細胞で増殖することが可能である。応募者らは JFH-1 HCV の増殖が従来の数倍は良い亜株 Huh7.5.1-8 を分離した (Shirasago et al., Jpn J Infect Dis, 2015)。さらに、Huh7.5.1-8 細胞は親細胞に比べて、HCV 以外のいくつかのウイルスに対しても増殖性が良いことも予備的に観察していた。

2. 研究の目的

本課題では、ワクチン生産細胞として多くの実績を有する Vero 細胞および HCV の培養に実績を有するヒト肝癌由来 HuH-7 系統細胞に注目し、これらの細胞を宿主細胞モデルとして、フラビウイルスもしくはその他のウイルスの感染増殖性に関わる宿主遺伝子をゲノムワイドな解析から明らかにしつつ、病原性ウイルスやウイルスワクチン株がより良く増殖する新規細胞亜株をゲノム編集技術によって作出することを目的とした。その成果は、ウイルス感染症ワクチンを生産する細胞基材の開発・改良のための科学基盤となる。さらに、広範な種類のウイルスを従来よりも効率よく増殖できるような細胞は、新興再興ウイルス感染症発生時に一早く原因ウイルスを分離同定する細胞ツールともなる。また、Vero 細胞や Huh7.5.1-8 細胞のゲノム解析情報は、これら細胞の品質管理にも活用できる。

3. 研究の方法

以下の(1)-(3)の計画を同時並行的に実施する。Vero 細胞系列および HuH-7 細胞系列に注目して、(1) それぞれの細胞系列ゲノムに特徴的な情報を引き出し、その細胞系列又は特定の亜株の高ウイルス増殖能の原因解明のヒントとする。(2) 細胞ゲノム情報は、ゲノム編集のための基盤情報として活用するだけでなく、細胞の品質管理手法にも活用する。(3) Vero 細胞のウイルス増殖能をさらに高めることを目的に細胞内免疫経路遮断株をゲノム編集法にて作製する。また、以下のフラビウイルスに関する計画も実施する。(4) フラビウイルス複製を阻害または増強する薬剤や宿主細胞変異株の探索ツールとするため、フラビウイルスの一種である黄熱ウイルスの複製レベルを GFP 発現量により定量化できるようなレプリコンを作製し、本レプリコンを安定発現させた Vero 細胞を得る。(5) フラビウイルスの一種である日本脳炎ウイルス (JEV) 感染に脆弱なヒト肝癌由来 Huh7.5.1-8 細胞に、JEV 感染耐性を付与するような宿主細胞遺伝子の欠損変異をゲノムワイドに探索して見出し、当該遺伝子の野生型 cDNA 過剰生産株を作製する。これらの成果により、フラビウイルス感染増殖が亢進した新規細胞亜株を得られるとともに、フラビウイルスの感染増殖に重要な役割を果たす宿主細胞遺伝子も明らかにできる。なお、感染症対策に有用と思われる新規細胞株を作出した場合、ワシントン条約の対象となる Vero 細胞の系統株においては速やかに世界中に分与できるように公的細胞バンクへ寄託する。

4 . 研究成果

我々がすでにゲノム解読していた Vero 細胞 JCRB0111 株に次いで、ウイルス分離などでも汎用されている ATCC CCL81/JCRB 9013 株、Vero E6/C1008 株を含む複数の亜株のゲノム配列を決定して比較検討した。その結果、(1) Vero 細胞系列は、JCRB0111 株と ATCC CCL81 株を含む系統と Vero 76 や E6 を含む系統の二つに大別できること、(2) 株間でゲノムのコピー数多型があること、(3) 内在性サルレトロウイルス挿入位置や I 型 IFN 遺伝子クラスターのホモ接合性欠失位置はどの株でも同一であることなどが分かった (Sakuma et al., Sci Rep, 2018; Konishi et al., submitted)。I 型 IFN 発現が元来欠損している Vero 細胞において III 型 IFN 受容体を欠く亜株をゲノム編集法で作製したが、期待したようなウイルス増殖性の亢進は見られなかった。一方、世界保健機関が主導するポリオ根絶計画に寄与すべく、ポリオウイルス増殖能のないウイルス分離細胞株としてポリオウイルス受容体欠失 Vero 細胞を作製し、公的細胞バンクへ寄託した (Okemoto-Nakamura et al., Sci Rep, 2021)。

ヒト肝がん由来 HuH-7 細胞系統の亜株で HCV の産生能が高い Huh7.5.1-8 について、フラビウイルス産生能を Vero 細胞と比較解析し、Huh7.5.1-8 細胞のウイルス学的な有用性を見出した (Saito et al., PLOS ONE, 2020)。さらに、当該細胞のゲノム配列決定も行い (Kawamoto et al., Front Genet, 2020)、HuH-7 細胞系統における RNA ウイルスの細胞内先天性免疫システムに關与する RIG-I の変異の実態も明らかにした。一方で、ヒトゲノム CRISPR single-guide RNA ライブラリを用い、Huh7.5.1-8 細胞を親株にして、JEV 感染増殖に必要な宿主細胞遺伝子の探索を実施し、JEV の増殖に關わる宿主遺伝子の候補を複数得た。

黄熱ウイルス YFV17D レプリコンを利用して、当該レプリコンが持続発現している Vero 細胞を作製した (Saito et al., 論文投稿中)。この細胞は同ウイルスの複製能が阻害もしくは亢進するような薬剤や宿主遺伝子変異を探索するためのツールになると期待される。また、ヒトのプリオン蛋白質遺伝子にはさまざまな多型が存在し、異常型プリオンに起因するヒトプリオン病発症に關与する変異も複数知られている。これらプリオン多型変異体を内在性プリオン蛋白質の干渉を受けずに解析できるヒト培養細胞実験系は樹立されていなかった。そこで、感染性プリオン研究に役立つ細胞解析系の構築を目指し、ゲノム編集法を用いて内在性プリオン遺伝子を破壊したヒト神経芽腫由来細胞変異株を樹立した (Okemoto-Nakamura et al., BPB Rep, 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Saito Kyoko, Fukasawa Masayoshi, Shirasago Yoshitaka, Suzuki Ryosuke, Osada Naoki, Yamaji Toshiyuki, Wakita Takaji, Konishi Eiji, Hanada Kentaro	4. 巻 15
2. 論文標題 Comparative characterization of flavivirus production in two cell lines: Human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 and African green monkey kidney-derived Vero	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawamoto Masaki, Yamaji Toshiyuki, Saito Kyoko, Shirasago Yoshitaka, Satomura Kazuhiro, Endo Toshinori, Fukasawa Masayoshi, Hanada Kentaro, Osada Naoki	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 Article 546106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2020.546106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okemoto-Nakamura Yuko, Someya Kenji, Yamaji Toshiyuki, Saito Kyoko, Takeda Makoto, Hanada Kentaro	4. 巻 11
2. 論文標題 Poliovirus-nonsusceptible Vero cell line for the World Health Organization global action plan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Article 6746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86050-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Atsushi, Matsuda Mami, Okabayashi Tamaki, Pitaksajjakul Pannamthip, Ramasoota Pongrama, Saito Kyoko, Fukasawa Masayoshi, Hanada Kentaro, Matsuura Tomokazu, Muramatsu Masamichi, Shioda Tatsuo, Suzuki Ryosuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00339-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00339-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Okenoto-Nakamura , Isei Tanida, Toshiyuki Yamaji , Kentaro Hanada , Ken ' ichi Hagiwara	4. 巻 2
2. 論文標題 1.A PRNP-Disrupted Human Neuroblastoma Cell Line and Its Stable Transformants Expressing Prion Protein Variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Shirasago, Hidesuke Fukazawa, Hideki Aizaki, Tetsuro Suzuki, Takeru Suzuki, Kazuo Sugiyama, Takaji Wakita; Kentaro Hanada, Ryo Abe, Masayoshi Fukasawa	4. 巻 99(10)
2. 論文標題 Thermostable hepatitis C virus JFH1-derived variant isolated by adaptation to Huh7.5.1 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1407-1417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chisato Sakuma, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Fumio Kasai, Kyoko Saito, Masaki Ikeda, Toshiyuki Yamaji, Naoki Osada, and Kentaro Hanada	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel endogenous simian retroviral integrations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Article 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18934-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中村(桶本)優子、 染谷健二、 齊藤恭子、 山地俊之、 竹田誠、 花田賢太郎
2. 発表標題 初心者のための入門講座：感染症研究へのゲノム編集技術の応用 CRISPR/Cas9システムによる新規の細胞株の創出
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第69回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 花田賢太郎
2. 発表標題 パイオロジクスにおけるウイルス安全性確保の新潮流
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 齊藤恭子
2. 発表標題 Vero細胞ゲノムに存在するサル内在性レトロウイルスの性状解析
3. 学会等名 第141回日本薬学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 花田賢太郎
2. 発表標題 寄生細菌クラミジアは宿主細胞のセラミドをいかにして利用するのか
3. 学会等名 日本薬学会生物系薬学部会主催 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム～薬学の基礎と臨床～（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 齊藤恭子, 深澤征義, 白砂圭崇, 鈴木亮介, 山地俊之, 脇田隆字, 小西英二, 花田賢太郎
2. 発表標題 ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Ryosuke Suzuki, Tomohiko Takasaki, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Construction of a yellow fever virus subgenomic replicon system and characterization of cell lines harboring the replicon
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、脇田隆字、小西英二、花田賢太郎
2. 発表標題 ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞におけるフラビウイルス産生の比較解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 池田昌輝, 里村和浩, 関塚剛史, 花田賢太郎, 遠藤俊徳, 長田直樹
2. 発表標題 旧世界ザルゲノムに存在する内在性サルレトロウイルス (SERV) 配列の探索と分子系統解析
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Kawamoto M, Endo T, Fukasawa M, Hanada K, Osada N
2. 発表標題 Search for the factors related to HCV replication in the HuH-7 cell line lineages
3. 学会等名 SMBE2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、脇田隆字、小西英二、花田賢太郎
2. 発表標題 Comparative characterization of human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 cells and African green monkey kidney-derived Vero cells in Japanese encephalitis virus production ヒト肝癌由来Huh7.5.1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero細胞における日本脳炎ウイルス産生の比較解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Chisato Sakuma, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Fumio Kasai, Kyoko Saito, Masaki Ikeda, Toshiyuki Yamaji, Naoki Osada, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Endogenous Simian Retrovirus Variations in Vero Cells: Implications for Quality Control of a Human Vaccine Cell Substrate
3. 学会等名 4th International Symposium for Medicinal Sciences, 2018.3.25-28, Kanazawa (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Vero細胞の物語 ～その樹立からゲノム構造の決定、そして未来へ～ http://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-pneumonia-m/818-biochem/5752-vero.html 動物細胞培養に関する用語など http://www.niid.go.jp/niid/ja/chlamydia-std-m/1880-biochem/3255-2013-02-25-05-58-54.html Vero細胞の物語 ～その樹立からゲノム構造の決定、そして未来へ～ http://www.nih.go.jp/niid/ja/chlamydia-pneumonia-m/818-biochem/5752-vero.html 動物細胞培養に関する用語など http://www.nih.go.jp/niid/ja/chlamydia-std-m/1880-biochem/3255-2013-02-25-05-58-54.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	桶本 優子 (中村優子) (Okemoto-Nakamura Yuko) (30392319)	国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官 (82603)	2019年度から分担者

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齊藤 恭子 (Saito Kyoko) (70235034)	国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	佐久間 智理 (Sakuma Chisato) (80782888)	国立感染症研究所・細胞化学部・研究員 (82603)	2017～2018年度の分担者（異動のため2018年度末で本研究組織を離れた）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山地 俊之 (Yamaji Toshiyuki) (50332309)	国立感染症研究所・細胞化学部・室長 (82603)	
連携研究者	深澤 征義 (Fukasawa Masayoshi) (20291130)	国立感染症研究所・細胞化学部・部長 (82603)	2021年4月1日付けで同研究部室長から部長に昇格

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
タイ	Mahidol University		