

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05986

研究課題名(和文) ノロウイルスの増殖におけるレトロウイルスの関与を解明する研究

研究課題名(英文) Investigation of the role of retrovirus on the persistent infection of norovirus in cell culture

研究代表者

花木 賢一 (Hanaki, Ken-Ichi)

国立感染症研究所・安全実験管理部・部長

研究者番号：40376421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではノロウイルスはレトロウイルスと細胞内に共存することにより効率よい増殖と長期持続感染を実現できるのではないかと仮説を立て、RAW264.7細胞の内在性レトロウイルス(MuLV)の増殖をゲノム編集技術により阻害することで、マウスノロウイルス(MNV)の増殖性と持続感染性が阻害または低下するか。一方、MNVが増殖しないJ774.1細胞とP388細胞、増殖性が悪いWEHI-231細胞にMuLVを感染させると、MNVの増殖性と持続感染性が向上するかを検討した。しかし、前者はゲノム編集を行った細胞が増殖しない、後者は3つの株化細胞にMuLVを感染させることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトノロウイルス(HuNoV)の効率よい培養系の樹立とAIDS患者や免疫抑制状態のヒトでHuNoVが持続感染する機序の解明に資する知見が得られると考え、MNVとMuLVが持続感染している培養細胞を用いた検討を行った。具体的な方法として、ゲノム編集技術を用いてMNV持続感染細胞から内在性MuLVを不活化することでMNV持続感染が破綻するか、内在性MuLVを不活化したRAW264.7細胞ではMNVの増殖と持続感染効率が低下することかを検証することであった。しかし、ゲノム編集を行ったRAW264.7細胞は増殖しなかったことから実証実験を行うことができず、解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that norovirus could achieve efficient replication and long-term persistent infection by coexisting with retrovirus in cells. Then, we investigated whether the proliferation and persistent infectivity of mouse norovirus (MNV) were inhibited or decreased by inhibiting the proliferation of endogenous retrovirus (MuLV) in RAW264.7 cells by genome editing technology. We also investigated whether infecting J774.1 cells and P388 cells, which MNV cannot replicate in them, and WEHI-231 cells, which have poor replication potential, with MuLV would improve the replication ability and persistent infectivity of MNV. However, in the former, the cells whose genome was edited did not proliferate, and in the latter, MuLV could not replicate in the respective cell lines. Therefore, the hypothesis could not be proved.

研究分野：実験動物感染症

キーワード：ノロウイルス レトロウイルス 持続感染

1. 研究開始当初の背景

(1) 1968年に米国オハイオ州ノーウォークで集団発生した非細菌性急性胃腸炎はヒトノロウイルス (HuNoV) を原因とする急性胃腸炎の初例として知られるが、HuNoV 細胞培養法の確立が困難なために研究が進まなかった。そのような状況で、斃死した *RAG2/STAT1* 遺伝子欠損マウスからマウスノロウイルス (MNV) が初めて分離され、培養可能なノロウイルス属ウイルスとして注目を集めた (⑨)。MNV は今日までに世界中のマウスコロニーから多数分離され、最初の分離株 MNV-1 を例外として、免疫正常マウスに一ヶ月以上持続感染することが明らかにされている (⑦, ⑩)。そこで、研究代表者は MNV が *in vivo* で持続感染する事象を *in vitro* で検証することを目的として、MNV の培養で汎用される RAW264.7 細胞を用いて持続感染細胞の樹立を試みた。そして、MNV-1 と MNV-S7 の持続感染細胞を樹立し、前者は後者に比べて培養上清中ウイルスゲノム量が平均して約 100 倍少ないこと、後者は 150 継代、3 年を超えて維持できることを明らかにした。また、MNV-S7 持続感染細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると、MNV の集簇と同時にレトロウイルス (RV) 様ウイルス粒子を認めた。RAW264.7 細胞は Abelson murine leukemia virus (MuLV) を感染させた BALB/c マウスの腫瘍から作出されたマウスマクロファージ様株化細胞であるが、MuLV は産生しないとされていた (⑬)。しかし、2008 年に RAW264.7 細胞が感染性 MuLV を産生していることが報告された (⑥)。RAW264.7 細胞に代わる MNV 感受性細胞としては BV-2 細胞が報告されている (④)。BV-2 細胞はマウスマイクログリア初代培養細胞を *v-raf/v-myc* がん遺伝子を保有する RV を感染させて作出された不死化細胞である (②)。興味深いことに、BV-2 細胞もまた RV を産生していることが Cell Line Data Base (⑫) に記載されている。そこで、MNV の増殖に RV が関与している可能性を考え、RV を産生しないマウスマクロファージ様 J774.1 細胞とマウスリンパ球様 P388 細胞に MNV-S7 を接種し、MNV の増殖について定量 RT-PCR 法 (⑤) により解析した。その結果、これら 2 種の細胞では予想通りに MNV の増殖を認めなかった。

(2) HuNoV の培養は 2014 年にバーキットリンパ腫 B 細胞由来 BJAB 細胞を用いて成功したことが報告された (⑧)。しかし、BJAB 細胞では HuNoV 感染後 5 日目のウイルスゲノム量が感染直後の 25 倍と極めて低レベルである。Jones et al. (⑧) はまた HuNoV 培養法に関する論文の中で、MNV-3 を接種して生存したマウスリンパ腫由来 WEHI-231 細胞が MNV を産生する状態を 20 日間維持できたことを報告している。持続感染細胞としては短命であるが、興味深いことに WEHI-231 細胞は RV を産生しない。

2. 研究の目的

(1) RAW264.7 細胞は、MNV に関する最初の論文で MNV が培養可能な細胞として紹介されて以来、今日まで MNV に関するほとんどの研究で使用されている (⑨)。これに対し、Hartley et al. (⑥) は RAW264.7 細胞が MuLV を産生していることを報告し、MuLV が RAW264.7 細胞を用いて培養される他のウイルスに影響を及ぼす可能性を言及した。しかし、RAW264.7 細胞を用いたこれまでの MNV 研究では、MuLV の存在を全く考慮されていない。In vivo では MNV と MuLV の関係について検討されているが、MuLV のマウス感染実験における MNV 重感染による影響に関するものである (①)。また、HIV 患者 (⑮) や慢性白血病患者 (⑬)、免疫抑制薬使用患者 (⑭) における HuNoV 慢性感染は、患者が免疫不全状態にあるためと説明されているが、HuNoV の持続感染に RV が関与するという着眼での検討は行われていない。

(2) 本研究では、ノロウイルスは RV と共存することにより効率よい増殖と長期持続感染を実現できるのではないかと仮説を立て、その仮説を証明することを研究の目的とする。具体的には、RAW264.7 細胞の MuLV の増殖を阻害することで、MNV の増殖性と持続感染性が低下するか。反対に、MNV が増殖しない J774.1 細胞と P388 細胞、及び増殖性が悪い WEHI-231 細胞に MuLV を感染させると、MNV の増殖性と持続感染性が向上するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MNV 持続感染細胞の継代維持： MNV 持続感染 RAW264.7 細胞は 10%FBS 加 DMEM に懸濁し、φ 10cm 培養シャーレに播種して 37℃、5%CO₂ 下で培養を行った。細胞の集密度を観察して 90%程度となる 4~6 日毎にセルスクレイパーで細胞を掻き取り、10%FBS 加 DMEM に再懸濁して 1/4 量をさらに 10%FBS 加 DMEM で希釈して新たな培養シャーレへ播種した。

(2) 顕微鏡解析： 蛍光顕微鏡 (FM) 解析を行うために、MNV 持続感染細胞は 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、0.5% Triton X100 で透過処理を行った。細胞は抗 MNV マウス血清、続いて AlexaFluor594 標識抗マウス IgG+IgM 抗体を反応させ、次に予め AlexaFluor488

標識抗マウス Zenon®フラグメントと反応させた dsRNA を認識する J2 マウスモノクローナル抗体 (Jena Bioscience) を反応させた。最後に細胞核を DAPI で染色し、FM で各蛍光画像を取得し、顕微鏡付属の画像処理ソフトにより重ね合わせ画像を取得した。

(3) MuLV を不活化するための CRISPR-Cas9 システムの設計： RAW264.7 細胞由来 MuLV の *gag* 遺伝子および *pol* 遺伝子の塩基配列を基に、ガイド RNA (gRNA) のデザイン web ツール「CHOP CHOP」と「CRISPRdirect」を用いて *gag* および *pol* 遺伝子を標的とした gRNA の配列 (GAG1, GAG2, POL1, POL2) を設計した。当該配列を Guide-it CRISPR/Cas9 Systems (Clontech Laboratories) を用いて pGuide-it-ZsGreen1 Vector にクローニングした。RAW264.7 細胞には 4 種のトランスフェクション試薬 [TransIT-X2® Dynamic Delivery System (Mirus); TransIT-Jurkat Transfection Reagent (Mirus); Lipofectamine™3000 Transfection Reagent (Invitrogen); GenePORTER® 3000 Transfection Reagent (Genlantis)] を用いてトランスフェクションを行った。48 時間後に細胞を回収し、限界希釈法にて 96well プレートに 1 細胞/well で播種、その後、蛍光顕微鏡下で観察して蛍光タンパク質発現細胞の増殖確認を行った。また、ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む VectorBuilder 社の Mammalian CRISPR Vector (Single gRNA) へ GAG1 または POL1 の配列を組み込んだベクターを作成し、同様にトランスフェクションを行った。

(4) MNV 非増殖性及び低増殖性細胞における MuLV 感染細胞の樹立： MNV 非増殖性のマウス・マクロファージ細胞株 J774.1 細胞とマウスリンパ球系腫瘍由来細胞株 P388 細胞は理研 BRC、MNV 低増殖性のマウスリンパ腫由来 WEHI-231 細胞は株式会社ケー・エー・シーより入手し、J774.1 細胞と P388 細胞は 10% FBS 加 RPMI1640、WEHI-231 細胞は 0.05mM 2-Me 及び 10% FBS 加 DMEM で 37°C、5%CO₂ 下で培養を行った。それらの細胞に感染させる MuLV は、RAW264.7 細胞を無血清 DMEM で培養した上清よりポリエチレングリコール (MW 6000) による遠心濃縮を行って調製した。それぞれの細胞には無血清培地で MuLV を接種して 1 日培養し、その後、10% FBS 加培地で培養を続けた。それぞれの細胞が MuLV に感染しているか確認するため、培養上清からのウイルス RNA の調製は High Pure RNA Isolation Kit (Roche)、細胞からのウイルス RNA の調製は ISOSPIN Cell & Tissue RNA (ニッポンジーン) のプロトコールに従って行った。そして、それら RNA を鋳型とする定量 RT-PCR (③) は TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) MNV 持続感染細胞株の内、MNV 高産生株である MNV-S7 持続感染細胞について継代を継続した。その間、細胞内 MNV 抗原は間接蛍光抗体法 (IFA) 解析により徐々に量の低下が見られ、170 継代を過ぎて蛍光観察できないレベルにまで低下した。定量 RT-PCR 解析によりウイルス複製は確認できたが、ウイルス RNA 量は IFA 解析で細胞内 MNV 抗原が明瞭に認められた時点の 1/100 程度であった。そこで、MNV 高産生持続感染細胞を復帰させるため、90 継代時に凍結保存した細胞を起こして継代を再開した。凍結保存から起こして 110 継代時の MNV-S7 持続感染細胞において、ウイルス複製に関わる細胞の割合を明らかにするため、抗 MNV 血清とウイルス複製時に認められる dsRNA を認識するマウスモノクローナル抗体を用いて二重染色を行った (図 1)。

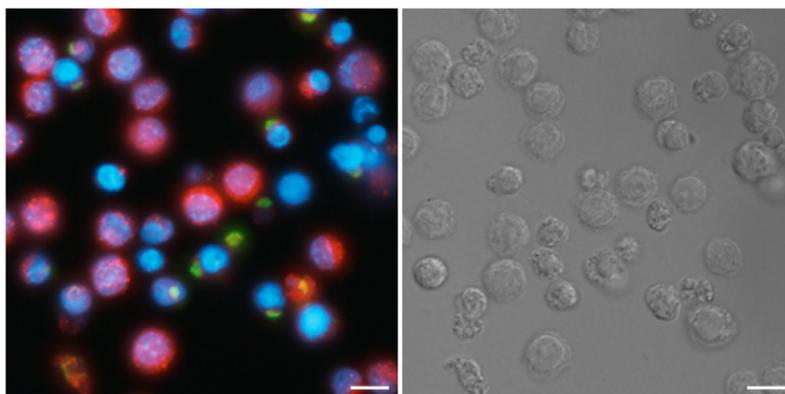


図 1 MNV 持続感染細胞におけるウイルス抗原と dsRNA の分布

その結果、ウイルス抗原 (赤色) はほぼすべての細胞で認めたが、dsRNA (緑色) は約 20% の細胞、特に死細胞で観察された。

図 1 の説明：左図は FM 像でウイルス抗原が赤色 (AlexaFluor® 594)、dsRNA が緑色 (AlexaFluor® 488)、核が青色 (DAPI) で示される。右図は同一視野の微分干渉画像である。(scale bar, 20 μm)

そこで、持続感染は以下のメカニズムにより維持されると推察された (図 2)。ウイルスを取り込んだ細胞の内、約 20%においてウイルスが複製する。細胞はウイルス複製に伴ってアポトーシスにより壊れ、新たなウイルス粒子が培地へ放出される。培地中のウイルスを取り込んだ細胞のほとんどは、ウイルスが複製すること無く細胞分裂あるいは壊死する。

図 2 の説明：①持続感染細胞、②壊死細胞からのウイルス粒子放出、③ウイルス複製開始 [dsRNA]、④アポトーシス [核濃縮]、⑤アポトーシス細胞からのウイルス粒子放出 [核崩壊]。

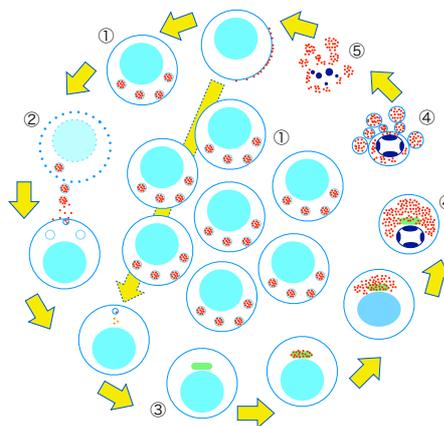


図 2 MNV 持続感染細胞維持メカニズム

(2) RAW264.7 細胞由来 MuLV の *gag* 遺伝子及び GAG2, POL1, POL2) を設計し、Guide-it CRISPR/Cas9 Systems を用いて当該配列を pGuide-it-ZsGreen1 Vector にクローニングした。このベクターを用いて 4 種のプラスミドを作成し、4 種のトランスフェクション試薬を用いて RAW264.7 細胞 (4×10^5 /well : 24well プレートまたは 8×10^5 /well : 12well プレート) へトランスフェクションを行った。48 時間後に細胞を回収し、限界希釈法にて 96well プレートに 1 細胞/well を播種した (図 3)。その後、FM で観察を経日的に行ったが、蛍光タンパク発現細胞の増殖は認められなかった。

次に、RAW264.7 細胞はトランスフェクション効率の低い場合、トランスフェクション後の別のプレートへの播種によるダメージや細胞のロスを軽減するため、G-418 によるネオマイシン耐性遺伝子発現細胞の選択を試みた。そのために、ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む Mammalian CRISPR Vector

(Single gRNA) へ GAG1 または POL1 の配列を組み込んだベクターを作成し、同様にトランスフェクションを行った (図 4A)。

48 時間後に G-418 (0.8mg/mL) を含む培地に置換して 3 週間培養を継続したが、細胞の増殖は認められず、全細胞が死滅した。そこで、オフターゲット活性の減少を目的とし、gRNA の配列を再検討した上で、Mammalian CRISPR Vector (Dual gRNA) に新たな gRNA の配列 (gRNA#2 および gRNA#5) を組み込んだベクターを作成し、同様にトランスフェクションを行った (図 4B)。48 時間後に G-418 (0.8mg/mL) を含む培地に置換して 3 週間培養を継続したが、上記と同様に全細胞が死滅した。

Guide-it CRISPR/Cas9 Systems (Clontech Laboratories) を使用

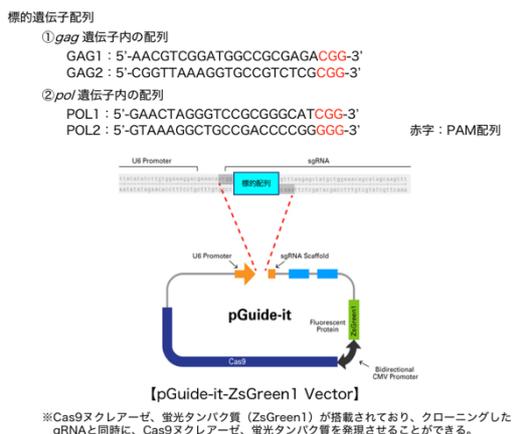


図 3 Guide-it CRISPR/Cas9 Systems

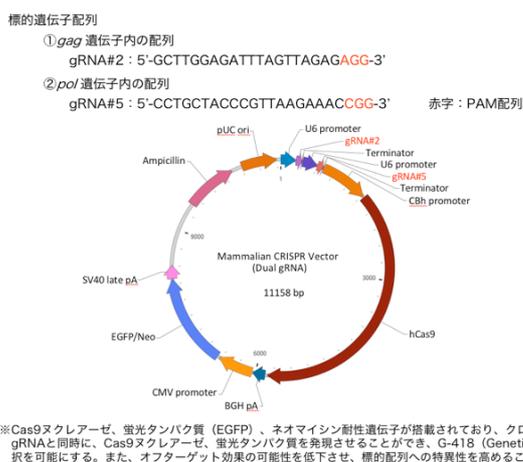
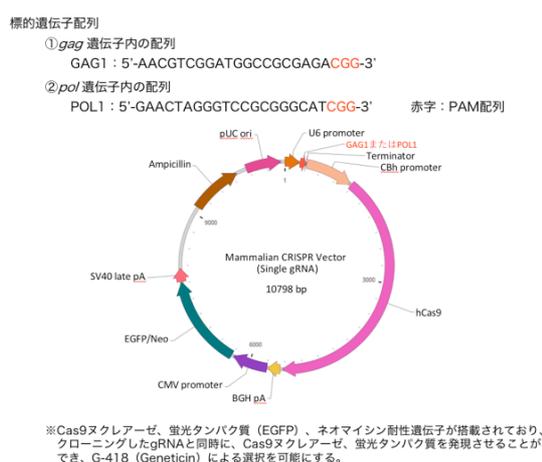


図 4 A. Mammal. CRISPR Vector Single gRNA



B. Mammal. CRISPR Vector Dual gRNA

(3) J774.1 細胞、P388 細胞、WEHI-231 細胞それぞれに MuLV を接種して 0, 3, 5, 7 日目に培養上清と細胞を回収し、それぞれより RNA を抽出して *abl* 遺伝子を標的とする定量 RT-PCR を行った。しかし、何れの細胞も 0 日目の Ct 値が最大であり、MuLV の増殖は確認できなかった。

(4) 本研究はノロウイルスとレトロウイルスとが共存することにより、ノロウイルスの効率よ

い増殖と長期持続感染を実現できるのではないかと仮説に基づき、RAW264.7 細胞の内在性 MuLV ゲノムを CRISPR-Cas9 システムで不活化するアプローチと MNV が増殖しないまたは増殖効率の悪いマウスリンパ球系株化細胞 (J774.1, P388, WEHI-231) に MuLV を感染させることで MNV への感受性を獲得させるアプローチを試みた。しかし、何れも研究期間中に結論を得るに至らなかった。MuLV を不活化した RAW264.7 細胞の樹立については、プラスミドベクター単体のトランスフェクションでは細胞株の樹立ができなかったため、ドナーベクターとプラスミドのベクターコトランスフェクション、Cas9 タンパク質と gRNA を導入する方法、ウイルスベクターの使用等、他の導入方法の検討を試みる予定である。

<引用文献>

- ① Ammann CG, Messer RJ, Varvel K, Debuysscher BL, Lacasse RA, Pinto AK, Hasenkrug KJ. Effects of acute and chronic murine norovirus infections on immune responses and recovery from Friend retrovirus infection. *J Virol.* 2009. 83(24):13037-41.
- ② Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol.* 1990. 27(2-3):229-37.
- ③ Bock S, Mullins CS, Klar E, Pérot P, Maletzki C, Linnebacher M. Murine Endogenous Retroviruses Are Detectable in Patient-Derived Xenografts but Not in Patient-Individual Cell Lines of Human Colorectal Cancer. *Front Microbiol.* 2018. 9:789.
- ④ Cox C, Cao S, Lu Y. Enhanced detection and study of murine norovirus-1 using a more efficient microglial cell line. *Virol J.* 2009. 6:196.
- ⑤ Hanaki K, Ike F, Kajita A, Yasuno W, Yanagiba M, Goto M, Sakai K, Ami Y, Kyuwa S. A broadly reactive one-step SYBR Green I real-time RT-PCR assay for rapid detection of murine norovirus. *PLoS One.* 2014. 9(5):e98108.
- ⑥ Hartley JW, Evans LH, Green KY, Naghashfar Z, Macias AR, Zerfas PM, Ward JM. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology.* 2008. 5:1.
- ⑦ Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp Med.* 2006. 56(4):247-51.
- ⑧ Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinjé J, Tibbetts SA, Wallet SM, Karst SM. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science.* 2014. 346(6210):755-9.
- ⑨ Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW 4th. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science.* 2003. 299(5612):1575-8
- ⑩ Nice TJ, Strong DW, McCune BT, Pohl CS, Virgin HW. A single-amino-acid change in murine norovirus NS1/2 is sufficient for colonic tropism and persistence. *J Virol.* 2013. 87(1):327-34.
- ⑪ Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Cell. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 1978. 15(1):261-7.
- ⑫ Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2009. 37:D925-32.
- ⑬ Ronchetti AM, Henry B, Ambert-Balay K, Pothier P, Decroocq J, Leblond V, Roos-Weil D. Norovirus-related chronic diarrhea in a patient treated with alemtuzumab for chronic lymphocytic leukemia. *BMC Infect Dis.* 2014. 14:239.
- ⑭ Schorn R, Höhne M, Meerbach A, Bossart W, Wüthrich RP, Schreier E, Müller NJ, Fehr T. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis.* 2010. 51(3):307-14.
- ⑮ Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, Blanchard TJ. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: a novel cause. *J Clin Virol.* 2010. 49(3):219-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花木賢一、石山絵里、花坂智人、滝本一広、田原口元子、森一泰、石田欣二
2. 発表標題 マウスノロウイルス持続感染細胞のイメージング解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	滝本 一広 (Takimoto Kazuhiro) (70280766)	国立感染症研究所・安全実験管理部・室長 (82603)	
研究分担者	田原口 元子 (Taharaguchi Motoko) (20392326)	国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	森 一泰 (Mori Kazuyasu) (20270655)	国立感染症研究所・エイズ研究センター・客員研究員 (82603)	

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
---------	---------