

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号： 12601

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2010～2011

課題番号： 22790425

研究課題名（和文） エボラウイルス感染に関わる宿主因子の網羅的同定

研究課題名（英文） Comprehensive identification of host factors involving in ebolavirus replication

研究代表者

小澤 真 (OZAWA MAKOTO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号： 50568722

研究成果の概要（和文）： エボラウイルスの増殖に関わる宿主因子を網羅的に同定することを目的として、遺伝子組み換え技術により作出した無毒化エボラウイルスを用い、宿主因子探索系の構築を試みた。しかし、宿主因子の探索・同定に最適と考えられたヒト由来 KBM7 細胞株は、エボラウイルスに感受性を示さず、ウイルス感染に必要な未同定の宿主因子が発現していないことが示唆された。一方、ハムスター由来 CHO 細胞は無毒化エボラウイルスに感受性を示したことから、今後は CHO 細胞を基盤として研究を遂行することが期待できる。

研究成果の概要（英文）： For comprehensive identification of host factors involving in replication of ebolavirus, we sought to establish a screening system for such fact factors by using genetically-engineered biologically contained ebolavirus. A human-derived cell line KBM-7, which had been thought to be the most suitable for host factor screening/identification was turned out to be resistant to ebolavirus infection, suggesting that this cell line dose not express an unknown host factor(s) required for ebolavirus infection. By contrast, a hamster-derived cell line CHO was susceptible to ebolavirus, indicating that this screening project can be carried out based on CHO cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： ウイルス学

科研費の分科・細目： 基礎医学・ウイルス学

キーワード： ウイルス・細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こすエボラウイルスは、アフリカ諸国で散発的な流行を繰り返しており、さらに、その

高い致死率と凄惨な病状から、生物兵器としての使用も危惧されている。しかし、ウイルスの取り扱いが Biosafety Level 4 (BSL4) 実験施設に制限されていることが基礎研究

を行う上での障害となっており、効果的な予防・治療法は未だ確立されていない。

ウイルス増殖に関わる宿主因子は、これを標的とした抗ウイルス薬の研究開発への発展が期待できることから、探索・同定へ向けた研究が世界中で盛んに行われている。研究環境が限られているエボラウイルスも例外ではなく、細胞侵入に関わる **Cathepsin** や、細胞から出芽する際に重要な働きをする **Tsg101** などが同定されてきたが、これらの宿主因子は、ウイルス増殖のみならず正常な細胞増殖にも必須なため、抗ウイルス薬の標的にはなり難い。

2008 年、**Halfmann** らは、遺伝子組み換え技術を駆使して、特殊な細胞でのみ増殖可能な無毒化エボラウイルスを作出した。これにより、エボラウイルス増殖過程の詳細な解析が、**BSL4** よりも制約の少ない **BSL3** 施設で可能となった。

染色体数が約半数（低 2 倍性）の細胞株は、レトロウイルスベクターや変異原性薬剤を用いたランダムな遺伝子変異導入（**Mutagenesis**）により、細胞の遺伝子機能解析に応用されてきた。この手法では、細胞増殖には大きな影響を与えず、抗ウイルス薬の標的に相応しい細胞の遺伝子（＝宿主因子）を同定することができる。また、より効率の良い **Mutagenesis** 実験ツールとして、レンチベクターの開発・応用が進んでいた。

2. 研究の目的

エボラウイルス感染に対する効果的な予防・治療法の確立を目指して、エボラウイルス増殖過程に重要な役割を果たし、かつ抗ウイルス薬の標的となり得る宿主因子を網羅的に探索・同定することを目的とする。

3. 研究の方法

低 2 倍性細胞株であるヒト白血球由来 **KBM7** 細胞に **VP30** を強制発現させた細胞株を樹立した。さらにこの **VP30** 蛋白質強制発現細胞をもとに、エボラウイルス侵入増強宿主因子として知られる **Axl** も同時に強制発現する細胞株を樹立した。

一方、遺伝子組み換え技術を用いて、**BSL3** 施設で取り扱うことのできる **VP30** 欠損組み換えエボラウイルスを作出した。この組み換えウイルスを上記の細胞株に感染させ、ウイルス増殖の有無を調べた。

また、ハムスター卵巣由来の低 2 倍性細胞である **CHO** 細胞にも **VP30** 蛋白質を強制発現させ、**VP30** 欠損組み換えエボラウイルスに対する感受性を調べた。

4. 研究成果

KBM7 細胞をもとにしたいずれの細胞株においても、**VP30** 欠損組み換えエボラウイルスの増殖は確認できなかった。一方、**VP30** 蛋白質強制発現 **CHO** 細胞は、**VP30** 欠損組み換えエボラウイルスに対して感受性を示した。これらの結果から、**CHO** 細胞を基盤とすることで、本研究を遂行可能であることが示された。また **KBM7** 細胞には、エボラウイルスの感染・増殖をサポートする未同定の宿主因子が発現していないことが示唆された。

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 9 件）

1. Victor ST, Watanabe S, Katsura H, Ozawa M, Kawaoka Y. 2012. A Replication-Incompetent PB2-Knockout Influenza A Virus Vaccine Vector. **J Virol** 86: 4123-4128. 【査読有】

- DOI:10.1128/JVI.06232-11
2. Das SC, Watanabe S, Hatta M, Noda T, Neumann G, Ozawa M, Kawaoka Y. 2012. The highly conserved arginine residues at positions 76 through 78 of influenza A virus matrix protein M1 play an important role in viral replication by affecting the intracellular localization of M1. **J Virol** 86: 1522-1530. 【査読有】 DOI:10.1128/JVI.06230-11
 3. Ozawa M, Kawaoka Y. 2011. Taming influenza viruses. **Virus Res** 162: 8-11. 【査読無】 DOI:10.1016/j.virusres.2011.09.035
 4. Watanabe T, Shinya K, Watanabe S, Imai M, Hatta M, Li C, Wolter BF, Neumann G, Hanson A, Ozawa M, Yamada S, Imai H, Sakabe S, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Ito M, Fukuyama S, Kawakami E, Gorai T, Simmons HA, Schenkman D, Brunner K, Capuano SV, 3rd, Weinfurter JT, Nishio W, Maniwa Y, Igarashi T, Makino A, Travanty EA, Wang J, Kilander A, Dudman SG, Suresh M, Mason RJ, Hungnes O, Friedrich TC, Kawaoka Y. 2011. Avian-type receptor-binding ability can increase influenza virus pathogenicity in macaques. **J Virol** 85: 13195-13203. 【査読有】 DOI:10.1128/JVI.00859-11
 5. Ozawa M, Victor ST, Taft AS, Yamada S, Li C, Hatta M, Das SC, Takashita E, Kakugawa S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. 2011. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. **J Gen Virol** 92: 2879-2888. 【査読有】 DOI:10.1099/vir.0.037648-0
 6. Sakabe S, Ozawa M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. 2011. Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice. **Virus Res** 158: 124-129. 【査読有】 DOI:10.1016/j.virusres.2011.03.022
 7. Shinya K, Makino A, Hatta M, Watanabe S, Kim JH, Hatta Y, Gao P, Ozawa M, Le QM, Kawaoka Y. 2011. Subclinical Brain Injury Caused by H5N1 Influenza Virus Infection. **J Virol** 85: 5202-5207. 【査読有】 DOI:10.1128/JVI.00239-11
 8. Kiso M, Ozawa M, Le MT, Imai H, Takahashi K, Kakugawa S, Noda T, Horimoto T, Kawaoka Y. 2011. Effect of an asparagine-to-serine mutation at position 294 in neuraminidase on the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus. **J Virol** 85: 4667-4672. 【査読有】 DOI:10.1128/JVI.00047-11
 9. Ozawa M, Basnet S, Burley LM, Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. 2011. Impact of Amino Acid Mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the Replication and Pathogenicity of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Viruses. **J Virol** 85: 4596-4601. 【査読有】 DOI:10.1128/JVI.00029-11
- [学会発表] (計 3 件)
1. Ozawa M et al. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (September 2011)
 2. Ozawa M et al. Identification of an influenza A viral RNA transcription/replication inhibitor by using viral ribonucleoprotein complex-expressing cells. Keystone

Symposia, Pathogenesis of Influenza:
Virus-Host Interactions, Hong Kong
SAR, China (May 2011)

3. Ozawa M et al. Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. 5th Annual CEIRS (Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance) Meeting, Atlanta, USA (April 2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Novel influenza virus vaccines

発明者 : Kawaoka Y, Neumann G, Ozawa M

権利者 : University of Wisconsin-Madison

種類 : 特許

番号 : P110003US01

出願年月日 : 2011 年 8 月 26 日

国内外の別 : 海外 (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 真 (OZAWA MAKOTO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号 : 50568722

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :