

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14993

研究課題名(和文) ゲノミクスを基盤としたウイルス増殖性改良型Vero細胞の開発

研究課題名(英文) Genomics-based improvement of Vero cells for virus growth

研究代表者

花田 賢太郎 (Hanada, Kentaro)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

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)：多様なウイルスが感染可能なアフリカミドリザル腎臓由来Vero細胞の全ゲノム配列を我々は最近決定した。本研究では、ウイルス増殖性の亢進したVero細胞株をゲノム編集技術により作製する実験条件を以下のように整備した。【1】日本脳炎ウイルス感受性を高く維持したままVero細胞をクローン分離できる条件を設定した。【2】志賀毒素に対する耐性を指標としたゲノムワイド探索実験を実施し、ヒトCRISPR single-guide RNAライブラリがVero細胞にも適用出来ることをバリデートした。【3】ウイルス増殖性改良型Vero細胞を遺伝子改変で作製する際に適した親Vero細胞株を選定した。

研究成果の概要(英文)：We recently examined the whole genome sequence of African green monkey kidney-derived Vero cells susceptible to various virus types. We herein prepared basic experimental conditions to produce new Vero cell variants that support better virus proliferation using genome editing technology. The following results were obtained. (1) Experimental conditions to isolate a Vero cell clone sustaining high susceptibility to Japanese encephalitis virus (JEV) were established. (2) The genome-wide screening of genes, the disruption of which confers Vero cells with resistance to Shiga-like toxin, was conducted. This screening hit many genes involved in the biosynthesis of the toxin receptor glycosphingolipid Gb3, which confirmed that the human CRISPR single-guide RNA library is applicable to Vero cells. (3) Among four Vero sublines, a parental Vero cell subline suitable for a somatic genetic approach was selected based on the stability of its karyotype and the sustainability of JEV susceptibility.

研究分野：感染細胞科学

キーワード：細胞基材 ペロ細胞 宿主細胞 ゲノム編集 ウイルス ワクチン 感染症

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。

本研究課題の代表者は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた遺伝生化学的な研究に長らく取り組んできた(Hanada et al 1990 *JBC*; 265, 22137; Hanada et al 1998 *JBC*; 273, 33787; Hanada et al 2003, *Nature*, 426, 803)。CHO細胞は体細胞遺伝学には重要な材料であるが、ヒト感染症を対象にする研究には病原体感受性の面で限界があった。しかし、直近の数年間でゲノム編集技術が急速に発展し、霊長類由来の培養細胞でも体細胞遺伝学手法が適用できるようになってきた。そこで、アフリカミドリザル腎臓由来Vero細胞は病原体感染細胞として最も実績のあることに注目し、今まで未解読であったVero細胞のゲノム構造の詳細を決定し、それを基盤資源として利用しながら研究を展開したいと考え、Vero細胞の全ゲノム配列を含む genome landscape を世界に先駆けて明らかにした(Osada et al 2014 *DNA Res*, 21, 673-683)。

2. 研究の目的

フラビウイルス科ウイルスには、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、デングウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルスなど重

篤なヒト感染症の原因ウイルスが数多く属し、その多くはVero細胞での増殖が可能である。そこで、我々が準備したVero細胞ゲノム情報を基盤にして、フラビウイルスもしくはその他のウイルスの増殖性が亢進した新規細胞亜株を作製するための実験基盤条件を整備し、そのような亜株を取得することを目的とする。

3. 研究の方法

Vero細胞クローン化条件の設定

4つのVero細胞亜株(JCRB0111, ATCC CCL81と同等のJCRB9013, Vero 76, Vero C1008)の中で日本脳炎ウイルス(Nakayama株)感受性が比較的高かったJCRB9013とVero 76に対して、当該感受性を維持しながら細胞をクローン化できる培養条件を検討した。

Vero細胞に対するヒトゲノムsgRNAライブラリ適用性の解析

当研究グループが解読したVero細胞のゲノム配列情報から、ヒトとVero細胞のゲノム配列同一性は90%以上であることが明らかとなり、CRISPR法を用いたヒトゲノム編集用に開発されたsingle-guide (sg) RNAライブラリがVero細胞にも一定レベル適用可能であろうと期待された。そこで、志賀毒素に感受性を持つHeLa細胞とVero細胞(CT1008株)に対して既存のヒトCRISPRsgRNAライブラリを導入し、志賀毒素耐性を与える際に濃縮されるsgRNAを次世代シーケンサ解析によって網羅的に比較した。

遺伝子改変に適した親細胞株の設定

Vero細胞亜株4種の間で日本脳炎ウイルス(Nakayama株)に対する感受性および当該感受性を維持した細胞のクローン化効率を比較した。また、医薬基盤・健康・栄養研究所の小原博士・笠井博士および北海道大学の長田博士の協力によりこれら

Vero 細胞亜株間の核型比較を行った。
また、医薬基盤・健康・栄養研究所の小原博士・笠井博士および北海道大学の長田博士の協力によりこれら Vero 細胞亜株間の核型比較を行った。

4 . 研究成果

Vero 細胞クローン化条件の設定

体細胞遺伝学的アプローチには、モノクローナルな細胞分離法が不可欠であるが Vero 細胞にはクローン化の確立した方法がなかった。日本脳炎ウイルス感受性を高く維持したまま Vero 細胞をクローン分離できる条件を試行錯誤の末に設定できた。

Vero 細胞に対するヒトゲノム sgRNA ライブラリ適用性の解析

ヒト CRISPR sgRNA ライブラリがサル由来の Vero 細胞に適用出来るか検証するため、志賀毒素に対する耐性を指標としたゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、受容体 Gb3 の生合成に必須な遺伝子等予想される遺伝子が網羅的に同定出来たことから、ゲノムワイドスクリーニングに Vero 細胞を用いる目途が付いた。

遺伝子改変に適した親細胞株の設定

日本脳炎ウイルスに対する感受性の維持や核型の安定性などを比較検討し、ウイルス増殖性改良型 Vero 細胞を遺伝子改変で作製する際に適した親株となる Vero 細胞株を選定した。

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 1 件)

英文論文(査読有)

Hokyung Oh, Jinho Shin, Manabu Ato, Xiao Ma, David Williams, Kiwon Han, Yang Jin Kim, Hyung Goo Kang, Kikyung Jung, Kentaro Hanada, Masaki Ochiai, Pham Van

Hug, Sangmi Park, and Chiyong Ahn: Meeting report: The first meeting of the national control laboratories for vaccines and biologicals in the Western pacific in 2016, *Osong Public Health Res. Perspect.*, 8, 91-103, 2017. Doi: org/10.24171/j.phrp.2017.8.1.13

[学会発表](計 3 件)

国際学会

1) Kentaro Hanada: Vero cells: Determination of the genome landscape and its application to QC, Workshop of Western Pacific National Control Laboratories for Vaccines and Blood Products, 2016.9.1-2, Seoul, Korea (招待講演).

国内学会

- 2) 花田賢太郎: Vero 細胞基材の品質管理に資する基盤研究、バイオロジクスフォーラム第 13 回学術集会、2016.2.29、東京 .
- 3) 花田賢太郎: カルタヘナ法と関わる組換え生物生ワクチン ワクチン分科会趣旨説明、バイオロジクスフォーラム第 14 回学術集会、2017.1.12、東京 .

[その他]

ホームページ等(ページ名と URL)

(1) 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>

(2) 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>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花田 賢太郎 (HANADA, Kentaro)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

(2)研究分担者

齊藤 恭子 (SAITO, Kyoko)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究
官

研究者番号：70235034

(3)連携研究者

山地 俊之 (YAMAJI, Toshiyuki)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：50332309

深澤 征義 (FUKASAWA, Masayoshi)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：20291130

佐久間 智理 (SAKUMA, Chisato)

国立感染症研究所・細胞化学部・研究員

研究者番号：80782888