

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19264

研究課題名(和文)ゲノム編集システムを応用した動物RNAウイルス不活化戦略

研究課題名(英文)A novel strategy on inactivation of animal RNA viruses by RNA editing system

研究代表者

堀本 泰介(Horimoto, Taisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00222282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA編集テクノロジーであるCRISPR/LwaCas13aシステムを鳥インフルエンザの制御へ、応用することを目的とした。LwaCas13a発現ベクターとインフルエンザウイルスの特異配列を認識できるrgRNAを発現するプラスミドを同時に培養細胞に導入し、ウイルスの増殖が抑制できるかを評価したところ、一部のコンストラクトで効果が見られたが有意ではなかった。一方、CasあるいはrgRNA発現するインフルエンザベクターの構築を試みたところ、レスキューしたウイルスには導入配列の欠落が認められた。今後、何らかの改変が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HA亜型に関係なく鳥インフルエンザウイルスの感染に対して画期的な制御法のブレイクスルーになる可能性から本萌芽研究を計画し実施したが、期待した成果は得られなかった。しかし、本方法論は、ヒトインフルエンザや動物インフルエンザ、あるいは別のRNAウイルス感染症の治療効果が期待できる汎用性の高い方法になる潜在性があり、より一層の研究の継続が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The purpose was to apply the CRISPR / LwaCas13a system, which is an RNA editing technology, to the control of avian influenza. When the LwaCas13a expression vector and the plasmid expressing rgRNA capable of recognizing the specific sequence of influenza virus were simultaneously introduced into cultured cells and evaluated whether the virus growth could be suppressed, the effect was observed in some constructs, but it was not significant. On the other hand, when an attempt was made to construct an influenza vector expressing Cas or rgRNA, the rescued virus was found to lack the introduced sequence. It was thought that some kind of modification would be necessary in the future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザは、毎年のように日本に侵入し、家禽産業に甚大な経済被害を及ぼしている。海外では H5 亜型の高病原性ウイルス等がヒトにも散発的に感染し、多くの死亡者を出している。鳥インフルエンザウイルスは、抗原変異が頻発するため効果的なワクチンの開発は難しい。比較的簡単に用意できる不活化ワクチンは、動物からのウイルス排出を抑えなためかえって感染を広げてしまうという科学的判断から使用できないため、わが国を含め多くの国々では、鳥インフルエンザ対策として摘発・淘汰という方法に頼らざるおえない。また、耐性ウイルス出現やコスト面から抗ウイルス薬はヒト以外には適応されない。このままでは鳥インフルエンザは永久に制御できず、人類は常に鳥インフルエンザの侵入とそれによる莫大な経済損失、さらにパンデミックに結びつくような新型ウイルスの出現危機の中に置かれる。したがって、インフルエンザを根本的に制御できる新しい感染制御戦略が渴望されている。

最近、DNA のみならず RNA を切断・不活化できるゲノム編集システムが報告され、このシステムのインフルエンザウイルスゲノム RNA 不活化戦略への応用を構想した。この方法は、鳥インフルエンザに対して世界で前例のない画期的な制御法を提供し、場合によっては、いまだ出口の見えない高病原性鳥インフルエンザの世界的流行を終結させるブレイクスルーになる可能性がある。また、HA 亜型に関係なく今後予測のできない鳥インフルエンザの発生に対しても迅速に対応できる防御戦略になりうる。さらに、鳥インフルエンザだけでなく、ヒトインフルエンザの治療、あるいはブタやウマ、イヌ、ネコなど全ての動物インフルエンザに対して抑制効果が期待できる汎用性の高い方法になる潜在性もある。

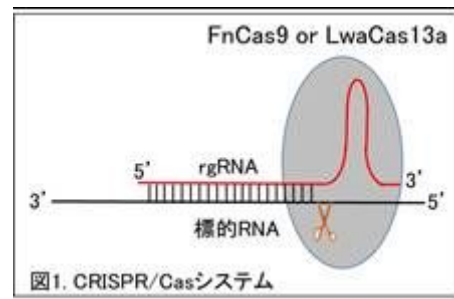
2. 研究の目的

本研究では、新奇の革新的 RNA 編集テクノロジーである CRISPR/FnCas9 および CRISPR/LwaCas13a システムを、動物の RNA ウイルス感染症の制御へ応用することを目的とする。これまでその制御が困難とされる RNA ウイルス感染症、特に鳥インフルエンザの制御を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ウイルスベクターと CRISPR/Cas システムを融合させる独自の方法を開発する。まず、CRISPR/Cas システムに必須な rgRNA と FnCas9 および LwaCas13a をそれぞれ発現する非増殖型のインフルエンザウイルスベクターを構築する。標的とする配列はインフルエンザウイルスゲノムに保存されている配列から選択する。このベクターは、申請者が得意とするリバースジェネティクス法により作製できること、発育鶏卵により高力価のベクターウイルスが用意できること、インフルエンザ抗体保有動物においてはベクターの HA 亜型の選択によりベクターウイルスの感染性を操作できること、CRISPR/Cas は PAM 配列非依存的に RNA を切断するので、HA 亜型に関係なく全てのインフルエンザウイルスをユニバーサルに制御できることなど様々な利点が想定される。次に、これらのベクターウイルスと感染性の鳥インフルエンザウイルスを培養細胞に重感染させ、後者の感染性が不活化されるかを調べる。両者の感染トロピズムが一致することから、他のベクターシステムを用いるより極めて効果的にウイルス増殖を抑

制することが期待される。培養細胞で効果があった場合は、マウスやニワトリを用いた実験動物での感染実験により、同様なウイルス増殖抑制効果があるか検証する。これらの結果から、CRISPR/FnCas9 および CRISPR/LwaCas13a システムが、鳥インフルエンザウイルスの RNA を標的とし、切断・不活化できるかが評価できる。



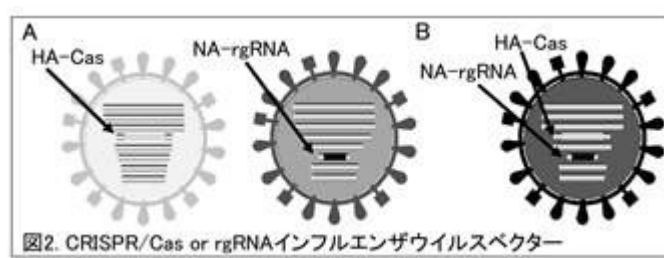
4. 研究成果

(1) プラスミドバンク（米国Addgene社）よりLwaCas13a遺伝子を含むプラスミドを入手し、トランスフォームした細菌を増殖させ、プラスミドを精製した。そこからLwaCas13a遺伝子を切り出し、CRISPRシステムに適用可能な発現ベクターにサブクローニングした。

(2) 一方、インフルエンザウイルスの特異配列を認識できるRNA-targeting guide RNA (rgRNA) を発現するコンストラクトをゲノム共通配列を中心にデザインし、プラスミドの構築を試みた。特に、A型インフルエンザウイルス株間で保存されているポリメラーゼ遺伝子配列（PB2, PB1, PA）を標的にした。

(3) 構築したLwaCas13a発現ベクターとインフルエンザウイルスの特異配列を認識できるrgRNAを発現するプラスミドを同時に培養細胞に導入し、インフルエンザウイルスの増殖が抑制できるかを評価した。現在までいくつかのコンストラクトを試したが、細胞でのインフルエンザウイルスの増殖抑制効果は見られていない。一部、ウイルス増殖を抑制するコンストラクトを選択したが、その抑制効果は弱く有意ではなかった。

(4) インフルエンザウイルスの培養細胞での有意な抑制を確認してからベクター構築を予定していたが、一部見られた抑制効果に期待し、Casを発現する、あるいはrgRNAを発現するインフルエンザベクターの構築（図2A）をリバースジェネティクス法を用いて試みた。いずれも感染性ウイルスがレスキューされたものの、複数回の試みに関わらず導入した配列の欠落が認められた。



(5) 細胞核内で増殖するインフルエンザウイルスRNAに対する切断効果は現在の方法では不十分であると推測され、その効果が高まるような何らかの改変が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suda Y, Murakami S, Horimoto T.	4. 巻 164(1)
2. 論文標題 Bovine viral diarrhea virus non-structural protein NS4B induces autophagosomes in bovine kidney cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch. Virol.	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-018-4045-x.	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 Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M.	4. 巻 71
2. 論文標題 The development of a novel diagnostic assay that utilizes a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 205-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2017.354.	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 Matsugo H, Kobayashi-Kitamura T, Kamiki H, Ishida H, Takenaka-Uema A, Murakami S, Horimoto T	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of a simple and efficient reverse genetics system for canine adenoviruses using bacterial artificial chromosomes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12070767	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0件

〔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	村上 晋 (Murakami Shin) (10636757)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

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