

## 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25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659092

研究課題名（和文）ウイルスハンティングに有用なインターフェロン伝達因子阻害細胞株の樹立

研究課題名（英文）Establishment of an interferon transfer factor prevention cell strain useful on virus hunting

研究代表者

松山 俊文 (MATSUYAMA TOSHIFUMI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30165922

研究成果の概要（和文）：IFN シグナル伝達系が阻害された細胞株を樹立することでウイルスの感染、増殖、生存が容易である環境を作り、特に分離が困難な新興・再興感染ウイルスハンティングへの道を開くことを目的とした。IFN シグナル伝達系を阻害するためにその経路に重要な種々の伝達因子の dominant negative 変異体や特異的な shRNA を作成し 293 T 細胞を用いてその効果を確認したが最終的に目指しているのは iPS 細胞を用いた系である。iPS 細胞を使用することで、一旦 IFN シグナル伝達系が阻害された安定株が得られればいろいろな組織に分化させることにより組織指向性の高いウイルスの分離に威力を発揮するからである。現在、IFN シグナル伝達経路の欠失した安定株を得る努力を続けているので近い将来、臨床の現場にウイルスハンティングに有用な細胞株を提供できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The goal of our project is to establish interferon (IFN) signaling-deficient cell lines that are highly susceptible to viral infection, proliferation and survival. In particular, we target those viruses which are proven difficult to isolate by established protocols. We transformed 293T cells with plasmids that have negative effects on various IFN-signal transduction molecules, and subsequently confirmed by monitoring IFN-stimulated genes. Our final goal is to establish iPS cells deficient in IFN signaling. As iPS cells are pluripotent, we hypothesized that once established, we can manipulate these iPS cells to differentiate into different tissue types. This will become a very powerful tool for the isolation of tissue-specific viruses. Currently, we focus our effort in generating iPS cells deficient in IFN signaling. We expect these cells will become available soon and hope to translate it for clinical use in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	480,000	3,080,000

研究分野：医歯薬学

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、インターフェロン、IRF、iPS細胞、ワクチン

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで抗ウイルス作用を持つとされる腫瘍壊死因子 (TNF) やインターフェロン (IFN) の研究を行ってきた。特にインターフェロン制御因子 (Interferon Regulatory Factor, IRF) に関しては東京大学の谷口維紹博士らのグループからの協力を得て IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5 について遺伝子欠損マウスを中心とした解析を行ってきた。IRF は IFN 受容体からの刺激で誘導されるとともに Toll-like receptor (TLR) からのシグナル伝達の標的であることから自然免疫系において鍵となる因子である。近年、種々のウイルスがウイルス自身で dominant negative IRF をコードして、あるいは間接的に IRF を阻害して宿主の自然免疫系のシグナル伝達経路を遮断することでウイルスの生存、増殖を図っていることがわかってきた (Viral interferon regulatory factors, Lee HR et al, J Interferon Cytokine Res, 2009, 29, 621)。またウイルスによっては IRF 以外の IFN シグナル伝達因子である PKR, RNaseL, OAS を阻害するものがある。一方、遺伝的に IFN シグナル伝達因子に機能喪失変異があればウイルスへの感受性が増すと考えられる。実際、SNPs の解析から前立腺癌患者では RNaseL 遺伝子の機能喪失変異型 R462Q variant との関連があることが見付き、そのような患者ではマウス由来のレトロウイルスが高率に感染していることが明らかにされた (Urisman A et al., PLoS Pathog, 2006, 2, e25)。

以上のことは、IFN シグナル伝達系が阻害された細胞ではウイルスの感染、増殖、生存が容易であることを示唆している。すなわち IFN シグナル伝達系を阻害した細胞を作成すれば、今まで困難を極めてきたウイルス分離が容易になると考えられる。

## 2. 研究の目的

通常は宿主細胞が感染したウイルスを排除するために活性化させる IFN のシグナル伝達経路に関わる分子 (IRF1, IRF3, IRF7, IRF9, PKR, RNaseL 等) の DN: ドミナントネガティブ変異体、あるいはそれらの遺伝子の特異的にノックダウンする shRNA を用いて、IFN シグナル伝達経路を意図的に阻害し、ウイルスが増殖しやすい安定細胞株を作成することが目的である。その際、iPS 細胞を使用すれば、安定株を樹立した後に、いろいろな細胞に分化させることにより、細胞指向性の高いウイルスの分離に威力を発揮するものと期待される。それらは、新興ウイルスの分離や、これまでウイルス感染が疑われながら、ウイ

ルスが分離できなかった症例等からのウイルス分離 (ウイルスハンティング)、ウイルスそのものの研究、ワクチン製造にも活用できると考えられる。

## 3. 研究の方法

1) ウイルス感染時に宿主細胞において誘導される IFN のシグナル伝達経路に関わる分子 (IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9, PKR, RNaseL 等) の DN: ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの遺伝子の特異的にノックダウンする shRNA を発現するプラスミド・コンストラクトを作成する。

2) これら DN 変異体を iPS 細胞で安定に発現させるため各種プロモーターの比較解析を行い、最終的にハウスキーピング遺伝子の一つである EF1 $\alpha$  プロモーターを選択した。その下流に上記の目的遺伝子及び、IRES-GFP をつなぎ、目的遺伝子の発現を GFP の蛍光で簡便にモニターできるようにした (EF1 $\alpha$ -各 DN 変異体-IRES-GFP)。さらに PGK のプロモーターの下流 Puro<sup>r</sup> (ピュロマイシン耐性遺伝子) をつなぎ、安定株の薬剤選択ができるようにした (PGK-Puro<sup>r</sup>)。プラスミドを用いた一過性発現実験でこれらのプロモーターが iPS 細胞内で機能することを確認することにした。また、shRNA 発現は U6 プロモーターが iPS 細胞内で機能することが知られているので、U6 プロモーターを使うこととした。

3) 安定株作成のためのウイルスベクター構築を行う。これらのプロモーターがウイルスベクター内在性のプロモーターと競合することなく使われるように、また安全性を考慮してレトロウイルスベクターの内在性のプロモーターを不活化するコンストラクト (クローンテック社の pQC) を基にしてプラスミドを構築した。

4) ウイルスベクター・コンストラクトをパッケージング細胞にトランスフェクトして、ヒト培養細胞に感染性のあるレトロウイルス液を調製後、iPS 細胞に感染させ、安定株を得るようにした。

ウイルスベクターによる iPS 安定細胞株の樹立がうまくいかなかった場合の対策として

5) まず一般によく使用されている培養細胞 (HeLa 細胞、293T 細胞等) で一過性の発現ではなく、安定株を効率よく樹立できる DN 変異体発現プラスミド、あるいは shRNA 発現プラスミドのコンストラクトを作成する。その後、iPS 細胞にこれらのプラスミドを導入することにより安定株を樹立することにした。

6) これまで使いらぬウイルス分離によく使用されてきた Vero 細胞 (IFR3 欠損) に、これら IFN のシグナル伝達経路に関わる分子の DN 変異体、あるいは shRNA 発現プラスミドを導入し、さらにウイルスが増殖しやすい super-sensitive Vero 細胞を得ることにした。

#### 4. 研究成果

1) IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9, PKR, RNaseL 等の DN 変異体を作成し、293T 細胞に一過性に発現させ、内在性の各分子の機能を抑制することを確認した。また、shRNA の特異的なノックダウン効果も 293T 細胞への一過性発現実験で確認した。

2) EF1 $\alpha$  プロモーターを使って作成したこれらの DN 変異体プラスミドを一過性に iPS 細胞に導入し、iPS 細胞内で機能することを確認した。

3) クローンテック社の pQC を基にしてプラスミドを構築安定株作成のためのウィルスベクター構築を行った。

4) ウィルスベクター・コンストラクトをパッケージング細胞にトランスフェクトして、ヒト培養細胞に感染性のあるレトロウイルス液を調製後、iPS 細胞に感染させたが、安定株を得ることができなかった。

その対策として、

5) 一般の培養細胞 (HeLa 細胞、293T 細胞等) で効率よく安定株を樹立できる DN 変異体発現プラスミドのコンストラクトを決めた。DN 変異体の発現に関しては、全体のユニットをレトロウイルス由来の LTR で挟み、さらに EF1- $\alpha$  プロモーター-各 DN 変異体-IRES-GFP/PGK-Puro<sup>r</sup> とつないだコンストラクトが、より効率よく安定株を作成することができた。この場合は IRES-EGFP の発現が DN 変異体の発現の程度をよく反映し、細胞を選び出すのに好都合だった。また、shRNA の発現に関しては、U6 プロモーター-shRNA/PGK-Puro<sup>r</sup> のみを発現させるシンプルな構造が最も効率良く、安定株を得ることができた。現在、これらの発現プラスミドの iPS 細胞への導入を行っている。

6) Vero 細胞 (IFR3 欠損) に、これら IFN のシグナル伝達経路に関わる分子の DN 変異体、あるいは shRNA 発現プラスミドを導入し、薬剤耐性コロニーを分離した。現在、それぞれの内在性の分子に対する DN 変異体と shRNA の効果を確認中である。

#### 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 11 件)

① Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer.

Tokunaga T, Naruke Y, Shigematsu S, Kohno T, Yasui K, Ma Y, Chua KJ, Katayama I, Nakamura T, Hishikawa Y, Koji T, Yatabe Y, Nagayasu T, Fujita T, Matsuyama T, Hayashi H

Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 2010 Jun 25;397(2):202-7. Epub 2010 May 23.

② The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection.

Satoh T, Takeuchi O, Vandenberg A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S.

Nat Immunol. (査読有) 2010 Oct;11(10):936-44. Epub 2010 Aug 22.

③ CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B.

Yoshii H, Kamiyama H, Goto K, Oishi K, Katunuma N, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y.

PLoS One. (査読有) 2011 Apr 25;6(4):e19352.

④ Shared and distinct functions of the transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development.

Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama

A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M, Ichino M, Nakazawa M. Matsuyama T, Kamijo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T. PLoS One. (査読有) 2011;6(10):e25812

⑤ Infection of XC cells by MLVs and Ebola virus is endosome-dependent but acidification-independent

Kamiyama H, Kakoki K, Yoshii H, Iwao M, Igawa T, Sakai H, Hayashi H, Matsuyama T, Yamamoto N, Kubo Y. PLoS One. (査読有) 2011;6(10):e26180

⑥ TNFR1-mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion.

Hisanaga T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Murata T, Matsuyama T, Nishina H, Sakaida I. Cell Tissue Res. (査読有) 2011 Oct;346(1):79-88

⑦ Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IRF-2 in trypsinogen5 gene transcription.

Hayashi H, Kohno T, Yasui K, Murota H, Kimura T, Duncan GS, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Ma Y, Chua KJ, Suematsu T, Shimokawa I, Akira S, Kubo Y, Mak TW, Matsuyama T.

Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 2011 Nov 15;108(46):18766-71

(Cited by Faculty of 1000 as in the top 2% of Biology and Medicine)

⑧ Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation

with c-Rel.

Shindo H, Yasui K, Yamamoto K, Honma K, Yui K, Kohno T, Ma Y, Chua KJ, Kubo Y, Aihara H, Ito T, Nagayasu T, Matsuyama T, Hayashi H.

Cytokine. (査読有) 2011 Dec;56(3):564-72. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.014. Epub 2011 Sep 3.

⑨ Interferon regulatory factor-2 regulates hematopoietic stem cell in mouse bone marrow

Masumi A, Miyatake S, Kohno T, and Matsuyama T

Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, InTech book (査読有) 2012 chapter 5: 91-112 ISBN 978-953-307-930-1

⑩ Serum Starvation Activates NF- $\kappa$ B Through G Protein  $\beta$ 2 Subunit-Mediated Signal

Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H

DNA Cell Biol. (査読有) 2012 Nov;31(11):1636-44.

⑪ CXCR4-Tropic, But Not CCR5-Tropic, Human Immunodeficiency Virus Infection Is Inhibited by the Lipid Raft-Associated Factors, Acyclic Retinoid Analogs, and Cholera Toxin B Subunit

Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y

AIDS Res Hum Retroviruses. (査読有) 2013 Feb;29(2):279-88

〔学会発表〕(計 9件)

①久保 嘉直

XMRV infection confers androgen-dependent cell growth of a prostate cancer cell line, LNCaP, to androgen-independent  
23rd workshop on retroviral pathogenesis 2011年11月(フランス、モンペリエ)

②久保 嘉直

エンドソームに局在する宿主自然免疫因子による HIV-1 増殖抑制  
第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月(東京)

③林 日出喜

Identification of poly(I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice  
第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月(横浜)

④重松 小百合

L'influence des cellules-hôte pour la survie des virus de la grippe A dans l'eau - (A 型インフルエンザウイルスの水環境中の生存に宿主細胞が及ぼす影響について)  
科学シンポジウム(JFR) 2011 年 12 月(東京)

⑤重松 小百合

Role of SAM domain of SAMHD1 in its function as an innate immune factor against HIV-1 infection  
Frontiers of Immunology in Health and Diseases 2012 年 9 月(Cold Spring Harbor Asia, 中国)

⑥林 日出喜

Screening of bioactive products to induce TRAIL-dependent cell death in ATL cells -ATL 細胞株の細胞死を TRAIL-依存性に促進させる生物活性物質のスクリーニング  
第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月(札幌)

⑦重松 小百合

SAMHD1 の HIV-1 感染抑制活性における SAM ドメインの機能  
第 60 回ウイルス学会学術総会 2012 年 11 月(大阪)

⑧久保 嘉直

SAMHD1 の HIV-1 感染抑制活性における SAM ドメインの機能  
第 26 回日本エイズ学会学術集会 2012 年 11 月(横浜)

⑨安井 潔

Serum Starvation Activates NF-kappaB Through G Protein beta2 Subunit-Mediated Signal  
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月(福岡)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: ウイルス感染症の予防又は治療剤  
発明者: 久保嘉直、神山陽香、鹿子木桂、松山俊文、林日出喜  
権利者: 国立大学法人長崎大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2012/078053  
出願年月日: 平成 24 年 10 月 30 日  
国内外の別: 国際出願

○取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 俊文 (MATSUYAMA TOSHIFUMI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 30165922

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

林 日出喜 (HAYASHI HIDEKI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 10218589