

令和元年6月13日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08249

研究課題名(和文)新規無毒化HSVベクターを用いた神経細胞選択的治療遺伝子デリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of non-toxic herpes simplex virus vectors for neural-specific gene delivery

研究代表者

宮川 世志幸 (Yoshitaka, Miyagawa)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90415604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが開発した無毒化ヘルペスウイルス(HSV)ベクターシステムを応用して、神経特異的に治療遺伝子を送達できる新規遺伝子治療用担体の創出を目指している。同技術開発のために、本研究ではHSVゲノム上の神経特異的に転写活性化するTR領域に注目し、その遺伝子発現機構を解析した。その結果、TR領域に存在するインシュレーターが本領域からの遺伝子発現に重要な役割を果たしていること、また本制御配列の遺伝子改変により同領域からの遺伝子発現を有意に向上できることを見出した。本成果は、無毒化HSVベクターによる高度に制御された神経特異的遺伝子送達システムの創出の一助となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のウイルス製剤開発において最重要課題のひとつは標的組織特異的治療遺伝子の送達である。多くのウイルスベクターでは非特異的な遺伝子導入の抑制が不完全であり、未だ高精度な標的化遺伝子導入システムは存在しない。一方、我々は既にHSV糖タンパク質gD改変(細胞侵入を制御)及びmiRNA認識配列(翻訳を制御)の利用による非特異的遺伝子導入抑制技術を確立している。これに本研究で着目するTR制御配列による標的細胞特異的転写制御技術(転写を制御)を融合すれば、極めて高精度な細胞標的化が可能となる。従って本研究成果は神経疾患に対するウイルス製剤を開発する上で理想的なプラットフォームを提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to generate an innovative non-toxic herpes simplex virus (HSV)-based vector capable of neuro-specific delivery of therapeutic genes. Here, we demonstrated that chromatin insulator-like elements in the terminal repeat (TR) locus of non-toxic HSV viral genome play a crucial role in the transcription from the TR locus in neural cells. In addition, the modification of the chromatin insulator-like elements significantly improves the transgene expression from the TR locus. Our results would provide the sophisticated neural-specific gene transduction system with non-toxic HSV vector.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヘルペスウイルス 遺伝子治療 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルス (HSV) は神経細胞に潜伏感染するユニークな生活環と巨大かつ複数の治療遺伝子が搭載可能な極めて大きいウイルスゲノムにより古くから遺伝子治療ベクターとしての臨床応用が期待され、これまでに数々の研究が進められてきた。しかし従来型の HSV ベクターは元来 HSV が持っている強い細胞障害性とウイルス遺伝子改変に伴う外来遺伝子の発現量低下等が大きな障壁となり、その遺伝子治療ベクターとしての応用は限定的なものであった。近年、申請者はこれら諸問題を解決する無毒化 HSV ベクターシステムを開発した (Miyagawa *et al*, PNAS 2015)。申請者らの開発により、多くの細胞種に対して細胞障害性を示すことなく高効率で感染し、治療遺伝子を長期かつ安定して供給することが可能となり、HSV ベクターシステムの安全性や遺伝子導入効率は飛躍的に改善された。しかし同技術を実際に臨床用のウイルス製剤化に展開するためには、まだ解決しなければならない事項も多く残されている。その一つが非特異的な遺伝子導入である。HSV は様々な細胞種に効率的に感染可能であるため、標的以外の細胞に広範囲に分散感染することが予想される。この場合、目的細胞にはごく一部の治療ベクターしか到達しないため、目的の患部で十分量の治療遺伝子の発現を供給するには大量のベクターあるいは複数回の投与が必要となる。このような過剰投与による非特異的な遺伝子導入は望ましくない細胞の形質転換や予測不可能な副作用を引き起こす可能性がある。よって安全性向上のためには目的細胞にのみ遺伝子を導入する、いわゆる選択的遺伝子導入技術の開発が急務である。本研究では無毒化 HSV ベクターシステムを用いて神経細胞選択的に治療遺伝子を供給するシステムの基盤研究を行い、難治神経疾患に対する新たな治療戦略を構築することを最終目的とする。

2. 研究の目的

本研究では申請者が近年開発した無毒化 HSV ベクターを利用して神経細胞選択的に治療遺伝子を運ぶ次世代型ウイルス製剤の基盤技術開発を目指す。申請者は既に無毒化 HSV ベクターにおける神経特異的な治療遺伝子発現に有用な HSV ゲノム領域として Terminal repeat (TR) 領域を同定している。本研究で同 TR 領域に着目し、遺伝子発現調節機構を詳細に明らかにする。本解析で明らかになった TR 領域による神経特異的転写制御に、申請者らが以前開発した細胞選択的 HSV 感染技術と miRNA を利用した非特異的遺伝子発現抑制を融合させ、3 つの側面より遺伝子発現を厳密に制御した治療遺伝子選択的デリバリーシステムを確立する。

3. 研究の方法

(1) TR 領域による神経特異的転写活性化メカニズムの解明

申請者は HSV ゲノム上の神経特異的転写活性領域として TR 領域を同定している (Miyagawa *et al*, PNAS 2015, Miyagawa *et al*, ASGCT 2015)。TR 領域のどの部位が神経特異的転写活性に重要かを解明するために、TR 領域をプラスミドベクターにクローニングを行い、初代培養の神経細胞・非神経細胞内での転写活性をレポーターアッセイを用いて測定する。TR 領域に位置するインシュレーターCTRS/CTUS については特に注目し、その神経細胞特異的な転写制御への関与を調べる。

(2) TR 領域転写制御配列を搭載した無毒化 HSV ベクターの構築

TR 領域の遺伝子発現調節機構を明らかにするため、TR 領域 CTRS/CTUS を欠損した HSV ベクターを開発する。同改変 HSV ベクターの TR 領域にレポーター遺伝子を挿入し、その転写活性を初代培養の神経細胞・非神経細胞内で定量する。また同時に *in vivo* における本領域の転写活性を調べるために、同改変 HSV ベクターをマウス・ラット中枢/末梢神経組織各部位に導入後、レポーター遺伝子発現パターンを蛍光顕微鏡及び免疫組織学的手法により解析する。

4. 研究成果

TR 領域に含まれるインシュレーターCTRS/CTUS による遺伝子発現調節機構を調査することを目的として、同 TR 領域をプラスミドベクターにクローニングを行った。次に同領域に含まれる CTRS 1/2 と CTRS3 の間にレポーター遺伝子として AcGFP 発現カセットを挿入した。これらレポータープラスミドの発現解析を行うために、ラット神経細胞初代培養系に対してリポフェクション法、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入実験を実施した。しかし遺伝子導入効率、細胞生存率の問題により *in vitro* による検討は難航したため、インシュレーターの機能解析は HSV ベクターゲノム上にて直接解析を行うこととし、インシュレーター改変 HSV ベクターの作製へと進んだ。本解析を行うにあたり、まず無毒化 HSV ベクターの TR 領域に存在する CTRS1/2/3 を改変した組換え HSV を複数作製した。作製した改変 HSV ベクターの TR 領域に対してそれぞれレポーター遺伝子 AcGFP を挿入した。以上、作製した組換え HSV ベクターをラット後根神経節 (DRG)、海馬由来神経細胞初代培養系に感染させ、同領域の転写活性をレポーター遺伝子発現により解析した。その結果、CTRS1/2/3 改変はいずれの場合も TR 領域の転写活性を大きく変化させることが明らかとなった。次にインシュレーターによる遺伝子発現制御に Immediate-early (IE) 遺伝子 ICP0 がどのように影響するか解析するために、CTRS1/2/3 改変に加えて ICP0 を欠損した組換え HSV を作製した。以上の改変ベクターからの遺伝子発現を同様に神経細胞初代培養系にて評価したところ、ICP0 を欠損した状

態においても、CTRS1/2/3 改変は同領域の転写活性に強い影響を与えることが判明した。また他の IE 遺伝子である ICP4/27 遺伝子の存在下では同領域からの遺伝子発現がどのように変化するか調べたところ、上記同様の遺伝子発現の傾向が認められた。以上の成果により、TR 領域からの遺伝子発現調節には同領域に位置するインシュレーターが深く関与しており、その遺伝子改変は TR 領域からの遺伝子発現様式を大きく変化させる可能性が示唆された。

次に *in vivo* における TR 領域の遺伝子発現機構を解析するために、マウス座骨神経に対して、上記で作製した改変 HSV ベクターを投与し、1 週間後、投与部位組織及び DRG を単離した。現在その発現解析・病理解析を免疫組織学的手法にて進めている。以上、本研究期間を通じて、神経特異的に転写活性化する TR 領域の遺伝子発現制御機構を解析し、その遺伝子発現調節にインシュレーターが極めて重要な役割を果たしていること、また同配列の遺伝子改変が TR 領域からの遺伝子発現向上に有用な変異であることを見出した。今後は本研究で得られた成果を元により洗練された神経特異的治療遺伝子送達システムの創出に力を注ぎたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Han F, Miyagawa Y, Verlengia G, Ingusci S, Soukupova M, Simonato M, Glorioso JC, and Cohen JB. Cellular Anti-Silencing Elements Support Transgene Expression from Herpes Simplex Virus Vectors in the Absence of Immediate-Early Gene Expression. *J Virol*. 2018 Jun 27. pii: JVI.00536-18. doi: 10.1128/JVI.00536-18. Print 2018 Sep 1.

Uchida H, Hamada H, Nakano K, Kwon H, Tahara H, Cohen JB, Glorioso JC. Oncolytic Herpes Simplex Virus Vectors Fully Retargeted to Tumor- Associated Antigens. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):162-170. doi: 10.2174/1568009617666170206105855.

Miyagawa Y, Verlengia G, Reinhart B, Han F, Uchida H, Zucchini S, Goins WF, Simonato M, Cohen JB, Glorioso JC. Deletion of the Virion Host Shut-off Gene Enhances Neuronal-Selective Transgene Expression from an HSV Vector Lacking Functional IE Genes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 Jun 16;6:79-90. doi: 10.1016/j.omtm.2017.06.001. eCollection 2017 Sep 15.

Okubo Y, Uchida H, Wakata A, Suzuki T, Shibata T, Ikeda H, Yamaguchi M, Cohen JB, Glorioso JC, Tagaya M, Hamada H, Tahara H. Syncytial Mutations Do Not Impair the Specificity of Entry and Spread of a Glycoprotein D Receptor-Retargeted Herpes Simplex Virus. *J Virol*. 2016 Nov 28;90(24):11096-11105. Print 2016 Dec 15.

Shibata T, Uchida H, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Ther*. 2016 Jun;23(6):479-88. doi: 10.1038/gt.2016.17. Epub 2016 Feb 23.

[学会発表] (計 8 件)

Yoshitaka Miyagawa, Motoyo Maruyama, Seiji Kuroda, Atsushi Sakai, Yuriko Sato, Hiromi

Kinoh, Motoko Yamamoto, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Takashi Okada. *In vivo* distribution of transgene expression from an HSV vector functionally deleted for all immediate-early genes. The 41th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Nov 28-30, 2018. Yokohama. Japan.

宮川 世志幸、黒田 誠司、丸山 基世、喜納 裕美、山本 基子、Gianluca Verlengia、Michele Simonato、Justus Cohen、Joseph Glorioso、岡田 尚巳。難治性神経・筋疾患の遺伝子治療に向けた新規無毒化ヘルペスウイルスベクターの開発。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), Kobe, Japan, December 6-9, 2017.

新規ウイルス産生細胞を用いた無毒化ヘルペスウイルスベクターの生産系の確立。黒田 誠司、宮川 世志幸、足立 久美、山本 基子、Cohen Justus B.、Glorioso Joseph C.、鈴木 英之、内田 英二、岡田 尚巳。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), Kobe, Japan, December 6-9, 2017.

クロマトグラフィー技術を用いた 8 型アデノ随伴ウイルスベクター (rAAV8) の精製。伴野 太郎、増田 千明、宮川 世志幸、岡田 浩典、平井 幸彦、石井 亜紀子、玉岡 晃、岡田 尚巳。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), Kobe, Japan, December 6-9, 2017.

イオン交換カラムクロマトグラフィー技術による組換え 5 型アデノ随伴ウイルス精製法の開発。増田 千明、伴野 太郎、宮川 世志幸、岡田 浩典、平井 幸彦、岡田 尚巳。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), Kobe, Japan, December 6-9, 2017.

Reinhart B, Marzulli M, Leronni D, Miyagawa Y, Cohen JB, Glorioso JC. HSV Vector Development for Targeted Gene Delivery. 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Washington, DC, May 4-7, 2016.

Miyagawa Y, Verlengia G, Simonato M, Cohen JB, Glorioso JC. Generation of a non-cytotoxic herpes simplex based vector for neural transduction. The 13th international congress of human genetics, Kyoto, Japan, April 3-7, 2016.

宮川 世志幸、喜納 裕美、岡田 尚巳、ウイルスベクターによる遺伝子治療の可能性、臨床プロテオーム研究会、東京、2016 年 5 月 2 1 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内田 宏明

ローマ字氏名：Hiroaki Uchida

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁) : 20401250

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Joseph C. Glorioso III

ローマ字氏名：Joseph C. Glorioso III

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。