

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19069

研究課題名(和文) 幹細胞遺伝子治療を実現する非伝播型エピソーマルRNAウイルスベクターの創製

研究課題名(英文) Generation of episomal RNA viral vector for stem cell gene therapy

研究代表者

牧野 晶子 (Makino, Akiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：30571145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナウイルス(BoDV)は幹細胞へ持続感染するRNAウイルスである。本研究ではBoDVを用いて幹細胞治療を実現する長期遺伝子導入系の構築を目指した。X-SCIDの原因遺伝子であるIL2RG発現BoDVベクターを作製して造血幹細胞へ接種した。同ベクターは目的の遺伝子を発現したが導入効率は低かった。G蛋白質をCnBV-1に置換したベクターは効率が15倍上昇した。同ベクターはiPS細胞を含む幹細胞への導入効率も上昇させた。X/P遺伝子をVSBVの配列に置換したBoDVベクターも効率を上昇させた。本研究で作製した改良型BoDVベクターは幹細胞遺伝子治療の新しいプラットフォームになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Borna disease virus (BoDV) is an RNA virus persistently infecting stem cells. In this study, we aimed to construct a long-term stable gene transfer system that realizes stem cell therapy using the virus. The BoDV vector expressing IL2RG, which is the causative gene of X-SCID, was prepared and inoculated into hematopoietic stem cells. This vector stably expressed the target gene, however, the transduction efficiency was low. The vector in which the G protein was replaced with CnBV-1 increased the efficiency by 15-fold as compared with BoDV. The improved vector significantly increased the efficiency of transduction into stem cells including iPS cells. BoDV vector with X/P gene of VSBV also increased the transduction efficiency. The improved BoDV vector prepared in this study could be a new platform for stem cell gene therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルスベクター 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ボルナウイルス (BoDV) は、細胞非傷害性に核内で持続感染する動物由来 RNA ウイルスである。BoDV は自らの複製複合体を、細胞周期を通じて染色体に繋ぎとめることで核内に長期的な感染を維持するという、RNA ウイルスとしては極めて特徴的な感染様式を持っている (Matsumoto et al., Cell Host Microbe, 2012)。BoDV は動物に広く感染することがわかっているが、ヒトに対しては病原性を示さないと考えられ、ウイルスベクターとしての応用が期待されている。これまでに我々の研究室では、外来遺伝子または低分子 RNA を持続的に発現する BoDV ベクターの確立に成功している (Daito et al., J. Virol. 2011)。本ベクターは、マウス脳内で外来遺伝子として導入した GFP を少なくとも接種後 8 ヶ月間維持することが示されている。また次項で示すように、BoDV ベクターの幹細胞への感染、さらに伝播に必須の遺伝子を欠損する非伝播型 BoDV ベクターを、iPS 細胞に長期間持続感染させることに成功している。非伝播型ベクターは目的の細胞でのみ遺伝子を発現し、感染細胞を体内へ移植してもウイルスの感染が広がることはない。このように BoDV は従来の問題を解決する新規エピソーム型 RNA ウイルスベクターとして最適であり、新規性があると考えられる。

2. 研究の目的

さまざまな細胞へ分化しうる幹細胞への効率的な遺伝子導入技術の開発は、遺伝子・再生治療を飛躍的に進歩させうる。しかし従来の導入技術には、ゲノムへの変異挿入や遺伝子発現の効率の悪さといった問題が存在する。ボルナウイルスは、iPS 細胞を含むさまざまな幹細胞への持続感染が確認されている非細胞傷害性の RNA ウイルスである。本研究では、核内でエピソームな状態のまま安定的に遺伝子を発現するボルナウイルスの特徴を活かし、難治性遺伝子疾患の幹細胞治療を実現する全く新しい長期安定型遺伝子発現デリバリーシステムを構築する。これまでにない非伝播型エピソーム RNA ウイルスベクターの幹細胞への適応および遺伝子治療の実現性の評価が本研究の目標である。

3. 研究の方法

X 染色体上のサイトカインレセプター共通 γ 鎖 (IL2RG) の変異により、T 細胞と NK 細胞がほとんど産生されず B 細胞が機能不全を起こす難治性遺伝子疾患である、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) への遺伝子治療の有効性を評価するため、原因遺伝子である IL2RG (ヒトまたはラット) を発現する伝播型および非伝播型のボルナウイルスベクターを作製した。ラットの骨髄から CD34 をマーカーとしたセルソーティングにより、造血幹細胞を単離した。IL2RG を発現するウイルスベクターを単離したラットの造血幹細胞へ接種し、感染効率を IFA により評価した。

次に非伝播型 BoDV ベクターが持続感染する 293T 細胞へ、BoDV と近縁の鳥ボルナウイルスの 7 遺伝子型の G タンパク質を発現するプラスミドを導入した。細胞からウイルスを回収して、哺乳類と鳥類の培養細胞およびヒト iPS 細胞を含む幹細胞へ接種した。さらに BoDV と同じ哺乳類ボルナウイルスに分類されるカワリリスボルナウイルス (VSBV) と BoDV の転写複製をおこなう複製複合体を形成する L, P, N による転写複製活性をミニゲノムアッセイにより評価した。BoDV の X/P 遺伝子または N 遺伝子を VSBV と置換したウイルスを作製して、性状解析をおこなった。

4. 研究成果

IL2RG 発現 BoDV ベクターは目的の遺伝子を安定的に発現したが、標的細胞である造血幹細胞への導入効率が低かった。そこで非伝播型 BoDV ベクターの表面に発現する G 蛋白質を、BoDV と近縁の鳥ボルナウイルスの 7 遺伝子型に各々置換したベクターを作製して外来遺伝子の導入効率を評価した。その結果、カナリアボルナウイルス 1 型の G を用いたベクターは BoDV と比較して効率が 15 倍上昇した。同改良型ベクターは、ラット初代培養細胞およびヒト iPS 細胞に対しても、従来型と比較して導入効率を有意に上昇させた。また BoDV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの補因子である P 遺伝子を近縁のカワリリスボルナウイルスの配列に置換した BoDV ベクターは、導入効率およびウイルス回収効率を有意に上昇させた。これらのことから、本研究で作製した改良型 BoDV ベクターは、幹細胞遺伝子治療の新しいプラットフォームになりうると考えられた。

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 2 件)

1. Sakai M, Ueda S, Daito T, Asada-Utsugi M, Komatsu Y, Kinoshita A, Maki T, Kuzuya A, Takahashi R, Makino A*, Tomonaga, K. (*corresponding author) Degradation of amyloid β peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector. Microbiol Immunol. DOI:10.1111/1348-0421.12602. 2018.
2. Yanai M, Sakai M, Makino A*, Tomonaga K. (*corresponding author) Dual function of the nuclear export signal of the Borna disease virus nucleoprotein in nuclear export activity and binding to viral phosphoprotein. Virol J. 14:126. 2017.

〔学会発表〕(計 34 件)

1. 牧野晶子: カワリリスボルナウイルスの遺伝子機能解析 第 9 回ボルナウイルス研究会 鹿児島 2016 年 1 月 29 日
2. Mako Yanai, Katashi Degushi, Kunio Takeyasu, Akiko Makino, Tomoyuki Honda and Keizo Tomonaga: Identification of

- BDV N protein regions important for viral replication The 14th International Student Seminar 京都 2016年3月10-11日
3. Ryo Komorizono, Akiko Makino, Masayuki Horie, Bea Garcia and Keizo Tomonaga: Probing the Viral Evolution; Phylogenetic and Infection analyses of Emerging Bornaviruses The 14th International Student Seminar 京都 2016年3月10-11日
 4. Bea Clarise Garcia, Ryo Komorizono, Akiko Makino, Tomoyuki Honda and Keizo Tomonaga : Isolation of mammalian-adapted parrot bornavirus-2 and -4 The 14th International Student Seminar 京都 2016年3月10-11日
 5. Garcia, B.C.B., Komorizono, R., Sassa, Y., Makino, A., & Tomonaga K : Adaptation of parrot bornavirus-4 to a mammalian cell line. the 15th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT. Taipei City, Taiwan. 2016, Jun 18.
 6. Akiko Makino: Regulation of Viral particle production in Borna disease virus-infected cells Within host persistent RNA virus infection UK 2016.8.24-26
 7. Mako Yanai, Akiko Makino, Keizo Tomonaga: An impaired nuclear export signal of Borna disease virus nucleoprotein enhances viral transcription activity The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity Hyogo 2016.9.6-9
 8. Ryo Komorizono, Madoka Sakai, Yukiko Sassa, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga : Host range restriction and zoonotic potential of emerging avian bornaviruses The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity Hyogo 2016.9.6-9
 9. Bea Garcia, Ryo Komorizono, Yukiko Sassa, Akiko Makino, Keizo Tomonaga: A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity Hyogo 2016.9.6-9
 10. Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Mako Yanai, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga: Comparison of the envelope glycoprotein between mammalian and avian bornaviruses The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity Hyogo 2016.9.6-9
 11. Akiko Makino, Ryo Komorizono, Madoka Sakai, Keizo Tomonaga : Improvement of the production of Borna disease virus vector ESGCT2016 Italy 2016.10.18-21
 12. 牧野晶子, 小森園亮, Bea Clarise Garcia, 朝長啓造 : カワリリスボルナウイルスの特性評価 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 13. 小松弓子, 竹内壇, 山本祐介, 桜井英俊, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造 : ボルナウイルスベクターを用いた iPSC 細胞から骨格筋への分化誘導法の構築 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 14. 柳井真瑚, 牧野晶子, 朝長啓造 : ボルナ病ウイルスの核外輸送シグナルはウイルスの転写活性に関与する 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 15. 小森園亮, 牧野晶子, 佐々悠起子, 堀江真行, 朝長啓造 : 細胞侵入段階は鳥ボルナウイルスにおける主な宿主域規定要因ではない 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 16. 徳永智哉, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造 : T-705 によるボルナ病ウイルスの複製阻害 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 17. Bea Garcia, 小森園亮, 佐々悠起子, 牧野晶子, 朝長啓造 : オウムボルナウイルス4の哺乳類細胞への適応 日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 18. 平井悠哉, 牧野晶子, 朝長啓造 : ボルナ病ウイルスと核内アクチンの関連の解析 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2016年10月23-25日
 19. Development of Borna Disease Virus Vector for Differentiation of Human iPSCs into Skeletal Muscle Cells 口頭 Yumiko Komatsu, Dan Takeuchi, Yusuke Yamamoto, Hidetoshi Sakurai, Tomoyuki Honda, Akiko Makino, Yasuhiro Ikeda, Keizo Tomonaga, 20th Annual Meeting of the ASGCT, 2017/5/5-11 国外
 20. A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line, Bea Clarise B. Garcia, Yukiko Sassa, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. ポスター 36th Annual Meeting of the American Society for Virology 2017/6/24-28, 国外
 21. ボルナウイルスの宿主域を決定する分子機構とその進化的特徴 ポスター 小森園亮 佐々悠起子 堀江真行 牧野晶子 朝長啓造 環境微生物系学会合同大会 2017/8/29 国内
 22. 新興ボルナウイルスのG蛋白質を介した感染性の比較 口頭 酒井まどか, 小森園亮, 柳井真瑚, 堀江真行, 牧野晶子, 朝長啓造 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017/9/13 国内
 23. RNA 編集酵素 ADAR はボルナ病ウイルスに関与する 口頭 柳井真瑚, 牧野晶子, 朝長啓造 第 1 回獣医 RNA ウィルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス

- 研究会合同大会 2017/9/15 国内
24. ボルナウイルスの宿主域決定メカニズムの解析 口頭 小森園 亮, 佐々 悠木子, 堀江 真行, 牧野 晶子, 朝長 啓造 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会 2017/9/15 国内
25. 高純度・高力価ボルナウイルスベクター精製法の開発 ポスター 角家洋次, 酒井まどか, 小嶋将平, 牧野晶子, 小松弓子, 朝長啓造 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会 第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会 2017/9/15 国内
26. Borna disease virus utilizes host mRNA binding proteins, IGF2BPs, for translational regulation 口頭 Akiko Makino, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会 2017/10/24-26 国内
27. Analysis of possible influences of nuclear actin in forming the viral factories of Borna disease virus and its crosstalk with Cajal bodies. 口頭 Yuya Hirai, Akiko Makino, Hideyuki Okamura, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017/10/24-26 国内
28. Characterization of BoDV vector for gene delivery to iPSCs ポスター Yumiko Komatsu, Yasuhiro Ikeda, Akiko Makino, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017/10/24-26 国内
29. ADAR2 plays a key role in the maintenance of the persistent infection of Borna disease virus ポスター Mako Yanai, Akiko Makino, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017/10/24-26 国内
30. Genomic analysis of bornaviruses implies the clade 2 avian bornaviruses possess mammalian-adapted gene composition. ポスター Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会 2017/10/24-26 国内
31. Comparison of transduction efficiency of pseudotyped BoDV vectors with different envelope G proteins from the genus Bornavirus 口頭 Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Sumio Minamiyama, Makoto Urushitani, Akiko Makino, Keizo Tomonaga 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017/10/24-26 国内
32. 高純度・高力価ボルナウイルスベクター精製法の開発 ポスター 角家洋次, 酒井まどか, 小嶋将平, 牧野晶子, 小松弓子, 朝長啓造 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017/10/24-26 国内
33. RNA 編集酵素 ADAR2 はボルナ病ウイルス感染に關与する 柳井真瑚, 牧野晶子, 朝長啓造 口頭 7th Negative RNA virus meeting-Japan 2018/1/15-17 国内

34. 核移行はボルナウイルスの適応進化の原動力である 小森園 亮, 佐々 悠木子, 堀江 真行, 牧野 晶子, 朝長 啓造 口頭 7th Negative RNA virus meeting-Japan 2018/1/15-17 国内

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: ボルナウイルスベクターおよびその利用
 発明者: 朝長啓造・牧野晶子・国立大学法人京都大学
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2017-04924
 出願年月日: 2017/3/14
 国内外の別: 国内

○取得状況(計 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
 牧野 晶子 (Makino, Akiko)
 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 助教
 研究者番号: 30571145

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()