

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16180

研究課題名（和文）新規HIVプロウイルス編集システムとゲノム編集促進薬によるHIV排除法の開発

研究課題名（英文）Development of a HIV-1 genome editing system and genome inducing agent for HIV-1 treatment

研究代表者

中村 朋文（Nakamura, Tomofumi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・研究員

研究者番号：00772526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：『HIV治癒』に向けて、問題となっている感染細胞内に残存するHIVプロウイルスを切断することを目的に改変型CRISPR-Cas9を作成した。そのデリバリーシステムとして改変型アデノ随伴ウイルス（rAAV）やエクソソーム様小包（Gesicle）を用いて、新規のHIV-1ゲノム排除システムを構築し、試験管内でHIV-1のゲノム排除率を検討した。しかしながら、HIV-1の感染能力は非常に強く、新規システムのみではHIV-1の増殖は全く抑制できず、薬剤と併用した状態でのHIV-1プロウイルスの完全排除も困難であった。ツールとし更なる改良が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染症は、combination antiviral therapy (cART) が唯一の治療法であるが、服薬を中止すると体内のHIVリザーバーからHIVが再増殖するため、生涯にわたりcARTを継続しなければならない。ゆえに『HIV治癒』に向けて斬新で画期的な新規治療法の開発が必要不可欠な状況である。問題となるHIVリザーバーの一因として、HIVのプロウイルス状態（感染細胞に増殖可能なHIV-1 DNAが残存）が指摘されているが、このHIVプロウイルスの排除法を開発することが『HIV治癒』に向けて必須のステップになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：HIV-1 DNA elimination from the human body was required for HIV-1 cure as a next generation therapy. We created a novel modified CRISPR-Cas9 to cut the HIV proviral remaining in the infected cells and utilized adeno-associated virus (rAAV) or exosomes like parcels (Gesicle) as delivery systems, producing a new HIV-1 genome editing system in vitro. However, HIV-1 infectivity ability and replication fitness was so powerful that the only new systems did not inhibit the HIV-1 proliferation. Even though the addition of some HIV-1 drugs after HIV-1 infection, it was hard to eliminate HIV-1 provirus from the infected cells. Further improvement of these tools was required for HIV-1 provirus elimination from HIV-1 infected cells.

研究分野：HIV-1 感染症

キーワード：HIV-1感染症 新規HIV-1治療法 HIV-1ゲノム編集 CRISPR-Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症は、cART により末梢血液内の HIV-RNA 量が検出限界以下になるまでコントロール可能になっている。しかし、cART を中止すると HIV は再度増殖してしまう。期待されていたワクチンによる治療も容易にエスケープするため未だ実用化されていない。このような状況が継続する限り、HIV 感染者は cART のみの治療で、終生高額な薬剤の服薬を求められ、国は莫大な医療費を消費し続けなければならない。したがって、cART を中断しても HIV の再増殖が起こらないような『HIV 治癒』(体内 HIV が AIDS を発症しない状態に低く抑えられる治癒『Functional cure』や、最終的には HIV-1 の体内からの完全な排除『Eradication cure』)を目指した治療法の開発が HIV 感染者および医療経済的観点からも急務であることは言うまでもない。cART 中止後の HIV の再増殖の主たる原因として、HIV リザーバーの存在が考えられている。HIV は活性化 CD4 陽性 T 細胞に感染し増殖するため、感染したそれらの細胞の一部が静止状態(静止期 CD4 陽性 T 細胞)となりプロウイルスゲノムを保持するようになった場合、HIV リザーバー状態となると考えられている。したがって、HIV 感染者体内の HIV リザーバーを少しでも減らすような画期的な新規治療法の開発は、次世代の研究者に課せられた使命であると考えている。

2. 研究の目的

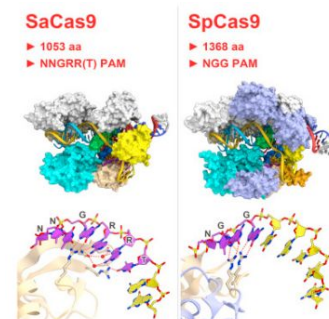
2013 年に登場した clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins 9 (CRISPR-Cas9) は、遺伝性疾患、ウイルス潜伏感染、がん疾患等で医学的な応用が検討され、対象遺伝子を編集することで治療効果を発揮する遺伝子治療のツールとして大いに期待されている。一方で、このシステムの限界や欠点も徐々に蓄積・報告されてきている。すでに分化した組織を構成する細胞全体のゲノム編集効率は低く(細胞やデリバリーシステムに左右される)、少なからず Off-target 効果(非特異的ゲノム編集)が認められることで予期せぬ機能不全や発現の問題も考慮せねばならない。従来のヒトの生体内遺伝子治療の過去の臨床試験は期待されるほどの効果はなく、安全で副作用の少ない効率的なデリバリーシステムの確立もなされていない。したがって、ヒトを対象としたゲノム編集(遺伝子治療)を現実にするためには、このような欠点を少しずつ克服することが必要不可欠である。申請者は、将来のゲノム編集治療の実現化を見据え、2つのユニークなデリバリーシステムに着目した。ヒト血友病遺伝子治療に用いられた adeno associated virus (AAV)(Nathwani AC et al. N Engl J Med. 2011 365(25):2357-65)と細胞間のシグナル伝達に利用されているエクソソームを模したエクソソーム様小包(Guide-it CRISPR/Cas9 Gesicle Production System)である。申請者は、HIV 標的 DNA と新規の CRISPR-Cas9 を発現するような recombinant-AAVCas9 やそれらを含む改変型 Gesicle-Cas9 を作成し、2つのデリバリーシステムの有効性を in vitro で検証・解析することを第一の目的とした。また、申請者はすでに HIV の逆転写酵素阻害剤(NRTI)として臨床応用されている Azidothymidine (AZT) が CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を促進する薬剤として報告された(Yu C, et al. Cell Stem Cell 2015 (16) 142-147)ことに着目し、申請者の研究室で保有する大量の NRTI のライブラリーと新規に購入した類縁化合物から CRISPR-Cas9 のゲノム編集を促進する新規薬剤の選定・同定を行った。作製した改変型デリバリーシステムを用いた in vitro での HIV プロウイルス排除率と、新規同定されたゲノム編集促進剤を組み合わせた HIV プロウイルス排除率の向上についても比較・解析することにした。

3. 研究の方法

『Engineered-SaCas9 を搭載した改変型デリバリーシステムの構築』

(1) eSaCas9 を搭載した capsid 改変 AAV (rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA) の作成

本研究で使用するサイズの小さい黄色ブドウ球菌由来の SaCas9 は、編集効率を上昇させ、off-target 効果を抑えるために nt-groove 領域にアミノ変異を有する eSaCas9 である(Slaymaker IM, et al. Science. 2016 351(6268):84-8) (右図)。AAV は血清型によって細胞・組織指向性が変化するウイルスで、AAV capsid タンパク質の配列に依存している。標的配列である HIV-sgRNA は、HIV の発現に重要な LTR 部位や integrase の塩基配列で比較的変異がなく保存されている領域を複数設定している。したがって、今回使用する rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA はオリジナル性が高く、様々な改善が施された AAV デリバリーシステムである。



(2) eSaCas9 を搭載した Gesicle-eSaCas9/HIVsgRNA の作成

市販されている Guide-it CRISPR/Cas9 Gesicle Production System を購入し、plasmid 内にコードされている SpCas9 を eSaCas9 に変更し、同上の HIVsgRNA 配列を導入した plasmid を作成した。作成した plasmid を Gesicle producer 293Tcell にトランスフェクションすることによって、細胞に導入可能な eSaCas9/HIVsgRNA を含むエクソソーム様小包(Gesicle)を作成した。このシステムは eSaCas9/HIVsgRNA を含む改変型エクソソームデリバリーシステムである。

これらの方法についての簡略図を図 1 に示す。

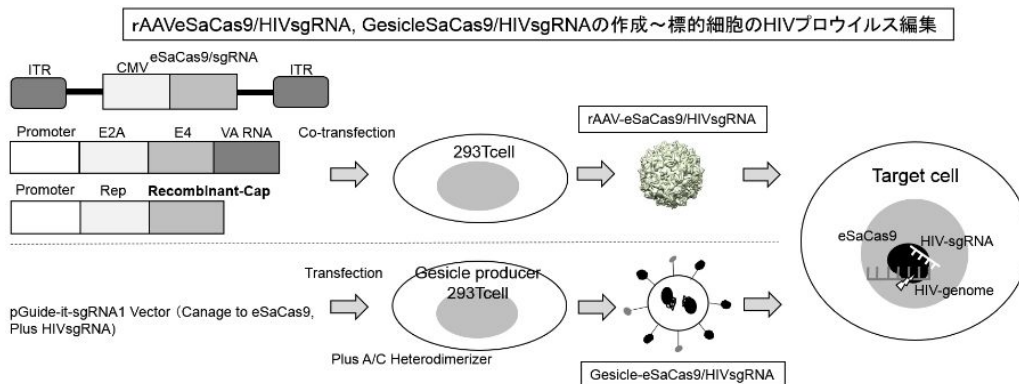


図 1：新規デリバリーシステムの作成および標的細胞図

4. 研究成果

(1) eSaCas9 を搭載した capsid 改変 AAV (rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA) の機能評価 eSaCas9 の遺伝子編集効率

遺伝子編集効率の上昇および off-target 効果を抑制するために nt-groove 領域にアミノ変異を有する eSaCas9 を使用した。px330 Plasmid 内に挿入した sgRNA 配列は、一般的に用いられる HIV-LTR に対する標的配列を設定した。その遺伝子編集効率を調べるために HIV-LTR 依存的な Luciferase assay システムに px330-SpCas9、px330-SaCas9、px330-eSaCas9 を transfection し、その後 HIV-1 を感染させることによって、それぞれの遺伝子編集効率を Luciferase の輝度を計測することによって比較した(図 2)。SaCas9 および eSaCas9 の編集効率が、SpCas9 の遺伝子編集効率よりも優れている結果であった。eSaCas9 は SaCas9 に比べて 3%程度 Luc の発現を抑制したが、2 群間に統計学的に有意な編集効率の差は認めなかった。これは、それぞれの遺伝子編集機能の差よりも SpCas9 に比べて SaCas9 の分子量が比較的小さく細胞内の発現効率の差による影響およびアッセイシステムの感度による影響が考えられた。

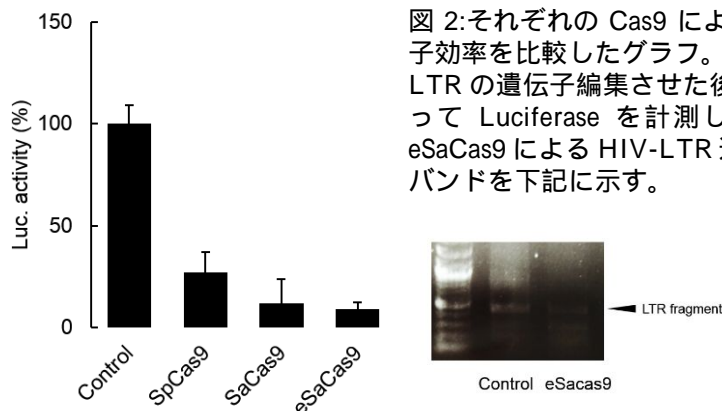


図 2:それぞれの Cas9 による HIV-LTR を標的とした遺伝子効率を比較したグラフ。px330 を transfection し、HIV-LTR の遺伝子編集させた後、HIV-1 を感染させることによって Luciferase を計測し、コントロールと比較した。eSaCas9 による HIV-LTR 遺伝子編集部位を含む PCR 増幅バンドを下記に示す。

AAV システムの細胞感染能と eSaCas9 の遺伝子編集効率

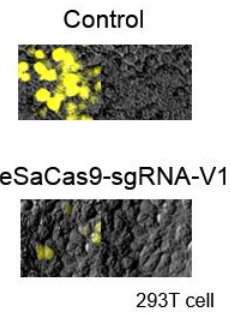
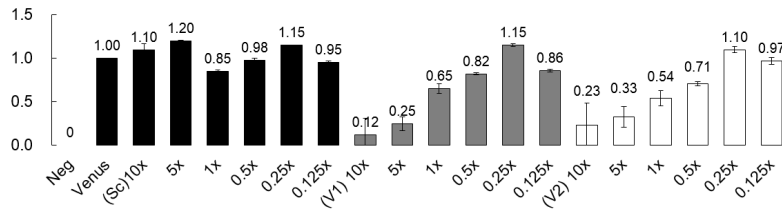
次に AAV に搭載した eSaCas9 の細胞への感染性をみるために以前 AAV-2 capsid 由来の MT-4 に adaptation させた capsid を搭載した rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA を作成した。(AAV の作成は、AAVpro Helper Free System ; TAKARA、AAVpro 293T cell、および pX601-AAVpCMV:NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6:BsaI-sgRNA を利用した)。続いて piggy bac 法で作製された恒常的に蛍光 Venus を発現する 293T 細胞の Venus の遺伝子編集効率に関して蛍光を測定することによって評価した。plasmid 内に挿入した sgRNA 配列は、Scramble (SC) 配列及び Venus に対する標的配列を 2 か所 (V1, V2) 設定した。標的配列は CRISPA Direct を用いてゲノム DNA とできる限り相同性がないように設定した。(図 2 上) 本研究で構築された rAAV-eSaCas9/Venus-sgRNA 投与量と Venus の相対蛍光輝度 (遺伝子切断効率) の結果を図 2 下に示す。設定した Venus に対する標的配列 (V1, V2) および rAAV-eSaCas9/Venus-sgRNA による Venus のゲノム編集効果の結果、Venus の相対蛍光輝度の低下、すなわち Venus の発現が抑制されていることが示唆された(グラフおよび顕微鏡による蛍光撮影)。

図 3：上表は標的 sgRNA 配列とヒトゲノムとの相同性を比較した表、下グラフは sgRNA Scramble (SC) 配列及び Venus に対する標的配列 (V1, V2) を使用した際の Venus の相対蛍光輝度を示す。

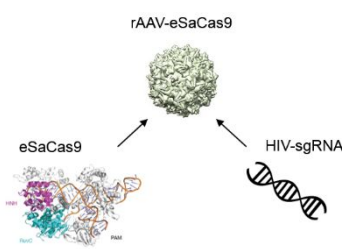
AAV のタイター測定は ITR をターゲットとし real-time PCR 法を用いた。投与量は、測定タイター基準値を 1 と設定した際の調整濃度である。

Target sequence (20mer)

	Start-end	+	-	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	20mer+PAM	12mer+PAM	8mer+PAM
Sc	9 - 31	+	-	ATATATATGACTACTACTAGG	20.00 %	55.45 °C	-	0	8	2320
V1	4 - 26	-	-	CCCTCGTGACCACCTGGGCTAC	65.00 %	80.44 °C	-	0	6	989
V2	63 - 85	-	-	CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGG	65.00 %	77.53 °C	-	0	1	1034



rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA による HIV-1 感染細胞 (MT4 細胞) の遺伝子編集効率



様々な種類の AAV Capsid および標的 HIV-1 DNA を設定した rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA を作成した(左図)。ここでは前述の capsid および HIV-LTR を標的とした sgRNA を搭載した rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の測定結果のみを示す。MT-4 細胞に HIV-1_{NL4-3} を感染させた後、rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA を様々な濃度で HIV-1 が感染した MT-4 細胞に感染させた。HIV-LTR 遺伝子編集による影響をその後の複製した HIV-1 の P24 を計測することによって評価した (図 4)。

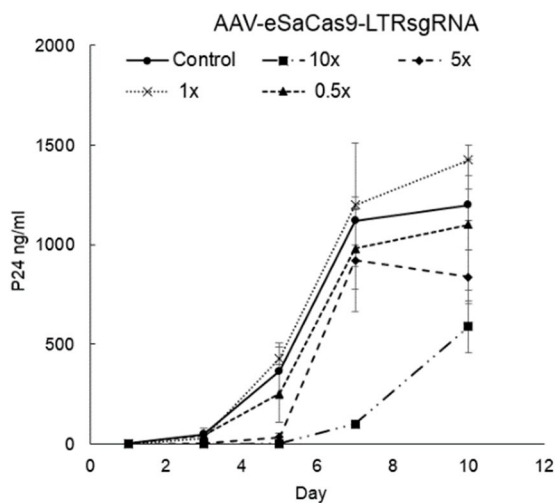


図 4 : HIV-1_{NL4-3} を 37 °C、3 hr 感染させた後、様々な濃度の rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA を添加した。感染後 Day3、5、7、10 の培養 MT-4 細胞の上清中の P24 濃度を計測した。縦軸は P24 (ng/ml)、横軸は Day を表している。

rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の濃度依存的に HIV-1 の複製能力を阻害している。しかし、その阻害程度は一時的かつ脆弱なものであり、rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA によって HIV-1 の複製を完全に阻害できていない。すなわち、HIV-1 の増殖能力に高濃度投与された rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA 単独では抑制できていない。

上記 rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の感染力および SaCas9 の発現や HIV-LTR 遺伝子編集に時間を要すること、HIV-1 の増殖能が非常に早

いことが考えられた。

次に一時的に抗 HIV-1 薬である raltegravir (RAL) を投与し、HIV-1 の複製能を制御した状態で、rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の HIV-LTR 遺伝子編集作用を確認した (図 5)。

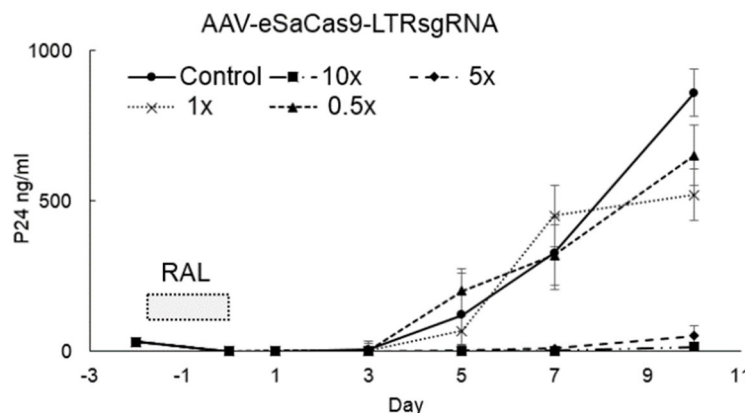


図 5 : HIV-1_{NL4-3} を 37 °C、O/N で感染させた後、RAL を加えて一時的に HIV-1 の増殖を阻害した状態にして、様々な濃度の rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA を添加した (48 時間)。MT-4 細胞を洗浄した後、Day3、5、7、10 の培養 MT-4 細胞の上清中の HIV-1 P24 濃度を計測した。縦軸は P24 (ng/ml)、横軸は Day を表している。

以上の結果から HIV-1 感染細胞内の rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA による HIV-LTR の遺伝子編

集は可能である。しかし、様々な工夫を加えたシステムであるにもかかわらず、現時点では HIV-1 感染細胞内のすべての HIV-1 DNA の遺伝子編集が可能であるシステムではない。また、不完全なデータで報告できないが、off-target 効果も完全にコントロールできていない状況が示唆されている。図 5 に示されるように抗 HIV-1 薬との併用によって、遺伝子編集効果が強調されている。しかし、10X ですら Day10 においてわずかに P24 の上昇を認めており、次第に HIV-1 が増殖してくることが予想される。さらにこのシステムを改善して、標的遺伝子編集効果の効率を上昇させる必要があり、マウス等を用いた in vivo での評価も必要である。

薬剤存在下における rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の HIV-1 感染細胞 (MT4 細胞) の遺伝子編集効率

次に、NHEJ 促進薬として報告された逆転写酵素阻害剤である AZT、NHEJ 阻害剤として報告された SCR7 存在下でこのシステムを評価した。薬物の化学構造およびそれぞれ薬剤存在下での遺伝子編集効果を図 6 に示す。

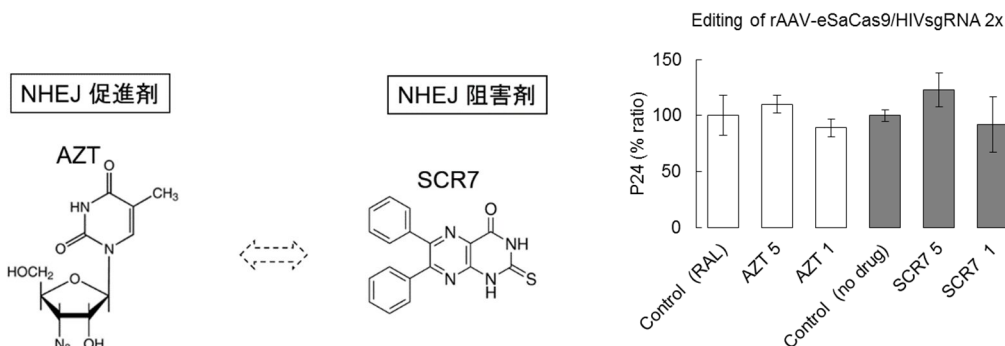
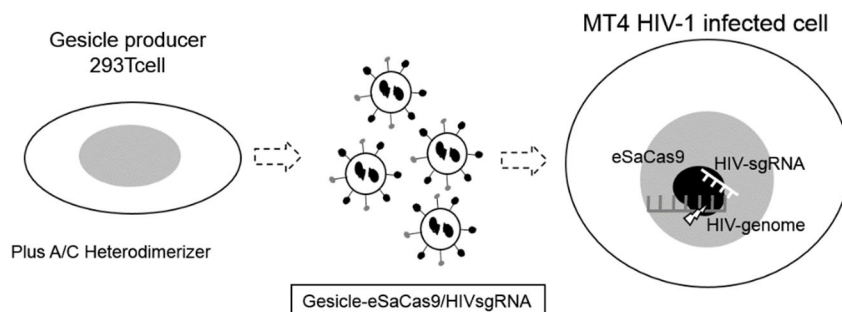


図 6 : 化学構造(左)、薬剤存在下における rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA の HIV-LTR の遺伝子編集効率を Day7 での P24 を測定し、それぞれのコントロールと比較・評価した。

NHEJ 促進薬として報告された逆転写酵素阻害剤である AZT 存在下 (5 および 1 μM) での rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA による HIV-LTR の編集効果はコントロールである RAL 存在下と比べて有意な差は認められなかった。NHEJ 阻害剤として報告された SCR7 の 5 μM 存在下で 123% の P24 の増加を認めた。NHEJ 阻害効果による影響が示唆されるが、統計学的な有意差は認めなかった。NHEJ 促進剤および阻害剤として報告されている薬剤は、その効果はそれほど強くないことが示唆された。さらに rAAV-eSaCas9/HIVsgRNA および薬剤投与濃度を上昇させたが、細胞毒性と思われる影響を認めた。薬剤による NHEJ のコントロールは困難と考えられた。現在も、AZT と構造が類似している当科所有のライブラリーの NHEJ の促進効果を評価している。

(2) eSaCas9 を搭載した Guide-it eSaCas9/HIV-sgRNA Gesicle の機能評価

改変型 eSaCas9 の配列および HIV-LTRsgRNA を TAKARA から購入した Gesicle plasmid に挿入し、Gesicle producer 293Tcell にトランスフェクションすることによって、細胞に導入可能な eSaCas9/HIV-sgRNA を含有する Gesicle を作成した。しかしながら、作成した Gesicle を定量化する方法が困難であった。(CherryPicker 蛍光タンパク質での確認は可能である。)作成した Gesicle の HIV-LTR の遺伝子編集効果を確認することはできたが、その定量的な影響についてはバラつきが多く、改善の余地が残る結果となった。作製した上清に含まれる Gesicle-eSaCas9/HIV-sgRNA はかなり濃縮が必要であった(濃縮後の濃度が計測できないので投与量が安定しない)。このシステムを利用して遺伝子編集は可能であったが、今後はこのシステムを vivo で投与した場合にどのような編集効果が認められるか確認が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakamura Tomofumi, Nakamura Teruya, Amano Masayuki, Miyakawa Toshikazu, Yamagata Yuriko, Matsuoka Masao, Nakata Hiroto	4. 巻 94
2. 論文標題 A Conformational Escape Reaction of HIV-1 against an Allosteric Integrase Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00486-20	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村朋文, 天野将之, 宮川寿一, 松岡雅雄, 満屋裕明, 中田浩智
2. 発表標題 薬剤耐性変異解析から得られたHIV-1成熟過程におけるHIV-1インテグラーゼ多量体形成とHIV-1RNA相互作用の重要性
3. 学会等名 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村朋文, 天野将之, Travis Chia, 松岡雅雄, 満屋裕明, 中田浩智
2. 発表標題 薬剤耐性HIV-1インテグラーゼはHIV-1 RNAの結合を強化し、ヌクレオカプシドとHIV-1粒子形成に関係している
3. 学会等名 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村朋文, 天野将之, Travis Chia, 松岡雅雄, 中田浩智
2. 発表標題 感染効率を上昇させるHIV-1ヌクレオカプシド内に認められた薬剤耐性変異
3. 学会等名 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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