

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07768

研究課題名(和文) 光制御ウイルスベクターの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of optically controllable viral vectors.

研究代表者

田原 舞乃 (Tahara, Maino)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：10572109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：モノネガウイルスは、遺伝子治療や再生医療における腫瘍溶解性ベクターや遺伝子導入ベクターとして有望なツールである。青色光照射により可逆的にヘテロ二量化するMagnetタンパク質を用いて、光制御可能なモノネガウイルス(麻疹ウイルスと狂犬病ウイルス)を作製した。Magnetタンパク質をウイルスポリメラーゼのフレキシブルドメインに挿入し、青色光照射によりウイルスポリメラーゼが活性化されたときのみ、強いウイルス複製と腫瘍溶解性を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスをベクターとして利用する場合に期待されつつも困難とされてきた技術の一つが、遺伝子発現や増殖を意のままに操ることである。この技術があれば、不要になったウイルスベクターを簡単に取り除くことができる。また必要な場所、必要な時にだけ遺伝子発現させることができ、利便性や安全性が飛躍的に向上する。今回開発したウイルスベクターによって以上のことが実現され、再生医療研究、遺伝子治療研究、癌治療研究を革新的に進めるツールになりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Mononegaviruses are promising tools as oncolytic vectors and transgene delivery vectors for gene therapy and regenerative medicine. By using the Magnet proteins, which reversibly heterodimerize upon blue light illumination, photocontrollable mononegaviruses (measles and rabies viruses) were generated. The Magnet proteins were inserted into the flexible domain of viral polymerase. Photocontrollable viruses showed efficient replication and oncolytic activities only when the viral polymerases were activated by blue light illumination.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス 狂犬病ウイルス 光遺伝学 ウイルスベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹 (iPS) 細胞に代表される再生医療分野、CAR-T 細胞療法に代表される癌治療分野、そして難病に対する遺伝子治療など近年医療は目覚ましい進歩を遂げている。ウイルスは、特定の細胞に感染し、効率良く遺伝子を発現することができ、また、人工的な遺伝子操作が比較的容易であることから、目的の遺伝子を特定の細胞へ送り込むための遺伝子導入ツールとして使われてきた。また、ある種の癌細胞に対して強い腫瘍溶解性を示すことが分かっており、その効果と安全性を高めたウイルスベクターを用いた新しい癌治療法の開発が進められている。一般的に、増殖性の強いウイルスベクターほど、癌治療に対する効果は期待できるが、同時に副作用の危険性が高まる。また、再生医療や遺伝子治療においては、ウイルスベクターによる遺伝子発現の当初の目的が達成された段階で、不要になったウイルスベクターを取り除くことが必要である。しかしながら、ウイルスベクターの意図的な取り除き法については様々な努力がなされてきたが、確実かつ安全で、効果的な方法は開発されていなかった。

2. 研究の目的

ウイルスベクターの遺伝子発現や増殖を、まるで電気をスイッチオン・スイッチオフするかのよう操る技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

再生医療、腫瘍溶解性治療でよく利用されているモノネガウイルスに着目して研究を行った。モノネガウイルスの代表として麻疹ウイルスと狂犬病ウイルスを用いた。モノネガウイルスは、L タンパクという名前のウイルスポリメラーゼを持っている。L タンパクは、大きく分けて 5 つの機能ドメインを持っており、それらが適切な配置を取ることで初めて、ポリメラーゼの活性が発揮されて、ウイルスゲノムの転写や複製が起こると考えられている。それら機能ドメインを繋ぎ合わせるループ構造領域の一つに、マグネットという光スイッチタンパク質を導入した。マグネットとはアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の青色光受容体ヴィヴィッド (Vivid) の人工的変異体である。正電荷を持つポジティブマグネットと負電荷を持つネガティブマグネットからなる。青色光照射に反応して、ポジティブマグネットとネガティブマグネットが結合する。光を遮断するとお互いに離れて元に戻る。

4. 研究成果

ウイルスの遺伝子発現を視覚的に観察するために、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) を発現するウイルスベクターを作製した。L タンパク内部にマグネットを持ったウイルスは、青色光の照射を受けている時にだけ、遺伝子発現が起こり、増殖することができた。ウイルスの遺伝子発現と増殖は、GFP の蛍光で確認できた。同様の方法で光制御性の麻疹ウイルスと狂犬病ウイルスの両ウイルスを作製することに成功した。麻疹ウイルスと狂犬病ウイルスは、同じモノネガウイルスに属するウイルスであるが、それぞれ異なる科に属する。そのため両ウイルスでの成功によっ

て、この技術が、すでに研究や臨床に応用されているセンダイウイルスベクターを含んだ多種のモノネガウイルスベクター全般へ応用可能なことが立証された。

本ウイルスベクターの光依存的な遺伝子発現と増殖をさらに実証するために、ウイルスベクターを感染させた細胞の培養皿の底をアルファベット型のスリットを入れた黒ビニールテープで覆い、下から青色光を照射してウイルスベクター感染細胞を培養した。その結果、数日後には、青色光の照射を受けている部分でだけウイルスベクター遺伝子の発現が起こり、アルファベットが GFP 蛍光の文字として浮かびあがった。さらに皮下にヒトの癌細胞を移植し、腫瘍を形成させた担癌マウスを用いて、本ウイルスベクターの腫瘍に対する効果を解析した。その結果、本ウイルスベクターを接種して、青色光の照射を受けたマウスでのみ、急激な腫瘍の縮小が確認された。

光制御ベクターは、光照射によって、時間的、空間的に増殖が制御できた。光照射には青色 LED を用いるが、様々なデバイスが開発されており、生体内での利用も可能である。また、比較的表層部分であれば、外部からの照射でも十分にベクターを制御することが可能である。

この技術はウイルスベクターの利便性や安全性を飛躍的に向上させる技術であり、今後、再生医療、癌治療、そして遺伝子治療などの研究を革新的に進める重要なツールになると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 1.Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M.	4. 巻 117
2. 論文標題 Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 7001-7003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2002589117.	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 -

1. 著者名 Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Nakatsu Y, Someya K, Sato M, Tani K, Takeda M	4. 巻 116
2. 論文標題 Photocontrollable mononegaviruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 11587-11589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1906531116.	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 -

1. 著者名 Hiramoto T*, Tahara M*, Liao J, Soda Y, Miura Y, Kurita R, Hamana H, Inoue K, Kohara H, Miyamoto S, Hijikata Y, Okano S, Yamaguchi Y, Oda Y, Ichiyangi K, Toh H, Sasaki H, Kishi H, Ryo A, Muraguchi A, Takeda M, Tani K	4. 巻 28
2. 論文標題 Non-transmissible MV vector with segmented RNA genome establishes different types of iPSCs from hematopoietic cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther.	6. 最初と最後の頁 129-141.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Tadokoro T, Jahan ML, Ito Y, Tahara M, Chen S, Imai A, Sugimura N, Yoshida K, Saito M, Ose T, Hashiguchi T, Takeda M, Fukuhara H, Maenaka K.	4. 巻 287
2. 論文標題 Biophysical characterization and single-chain Fv construction of a neutralizing antibody to measles virus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 145-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14991.	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 -

1. 著者名 Saikusa M, Nao N, Kawakami C, Usuku S, Tanaka N, Tahara M, Takeda M, Okubo I.	4. 巻 72
2. 論文標題 Predominant detection of the subgroup A2b human metapneumovirus strain with 111-nucleotide duplication in Yokohama City, Japan in 2018.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 350-352.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2019.124.	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 -

1. 著者名 Nao N, Sato K, Yamagishi Y, Tahara M, Nakatsu Y, Seki F, Katoh H, Ohnuma A, Shirogane Y, Hayashi M, Suzuki T, Kikuta H, Nishimura H, Takeda M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Consensus and variations in cell line specificity among human metapneumovirus strains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0215822.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tahara M, Sato M, Takayama-Ito M, Saijo M, Tani K, Takeda M.
2. 発表標題 Optically controllable rabies virus
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tahara M, Sato M, Nakatsu Y, Tani K, Takeda M
2. 発表標題 A new optically controllable measles virus vector
3. 学会等名 Negative Strand Virus Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tahara M, Sato M, Tani K, Takeda M
2. 発表標題 Photocontrollable mononegavirus vector
3. 学会等名 Sapporo Summer Symposium for One Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K.
2. 発表標題 F-deletion non-integrating measles virus vector: A promising tool for T-cell engineering and naive iPSCs generation.
3. 学会等名 61st American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 20. 田所高志、Mst Lubna Jahan、伊藤由梨、田原舞乃、橋口隆生、竹田誠、福原秀雄、前仲勝実
2. 発表標題 麻疹中和抗体のフラグメント化と物理化学的特性の解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 田原舞乃, 竹田誠	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 感染・炎症・免疫	

1. 著者名 田原舞乃, 竹田誠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 4
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 田原舞乃, 竹田誠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光制御性のウイルスタンパク質、その遺伝子、及びその遺伝子を含むウイルスベクター	発明者 谷 憲三郎, 平本 貴史, 竹田 誠, 田原舞乃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/026211	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------