

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22530

研究課題名（和文）中枢神経系疾患の遺伝子治療を加速させる自己編集型RNAウイルスベクターの開発

研究課題名（英文）Development of a self-editing RNA viral vector to accelerate gene therapy for neurological diseases

研究代表者

朝長 啓造（Tomonaga, Keizo）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：10301920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、中枢神経系に高い指向性を持つボルナ病ウイルス（BoDV）ベクターを非侵襲的に脳内へと導入し、その後、BoDVベクターが自らの伝播能力あるいは複製能力を欠損させる自己編集型RNAウイルスベクターの構築を行うことを目的としている。研究期間内に、開発済みのBoDVベクターを基盤として、RNA編集酵素であるADAR2とCas13を利用した自己編集型ベクターの基礎実験を行うとともに、Casを発現するBoDVベクターの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BoDVベクターは、遺伝子治療に使われているレンチウイルスやアデノ随伴ウイルスに由来する既存のウイルスベクターに比べ、細胞傷害性が低く、ゲノム毒性を示すこともなく、分裂細胞にも外来遺伝子を持続的に発現することができる。また、鼻腔より非侵襲的に脳への送達が可能なことである。生体内で自らのゲノムや遺伝子発現を編集する新しい自己編集型BoDVベクターの作製により、中枢神経系に導入したBoDVベクターの安全性と利便性がさらに高めることが可能となり、遺伝子細胞治療への応用が加速されることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to construct a self-editing RNA viral vector using Borna disease virus (BoDV), which can be noninvasively transduced into the brain, and subsequently lose its propagation and replication abilities. During the research period, we conducted basic experiments of self-editing vectors using the RNA editing enzymes, ADAR2 and Cas13, based on the prototype BoDV vector, and succeeded in constructing a BoDV vector expressing Cas.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ボルナウイルス ウイルスベクター ADAR Cas13

1. 研究開始当初の背景

世界中で多くのウイルスベクター開発が進んでいるが、中枢神経系疾患の遺伝子治療に安全かつ長期間適用できるウイルスベクターはいまだ開発されていない。その理由は、ベクター粒子を非侵襲的に脳内に到達し、有用遺伝子を安全かつ持続的に発現させる技術開発が困難なためである。中枢神経系疾患への利用として研究開発が最も進んでいるウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス9型(AAV)である。AAVには多くの血清型が存在しており、異なる血清型の遺伝子を組換えて改変することで、極めて効率の良い遺伝子導入ベクターの作製が可能になっている。AAV9は、血管内投与により、脳血液関門や血液脳脊髄液関門を突破できる性状を持つことから、中枢神経系疾患の遺伝子治療に有望なベクターである。実際に、改良型AAV9の静脈中への単回投与により、脊髄性筋萎縮症の幼児の症状が劇的に緩和されたことが米国より報告されている。しかしながら、静脈注射では成人や神経細胞への到達が難しいこと、グリア細胞など分裂する細胞では持続的導入が困難であること、また、静脈接種で中枢神経系に送達のためには大量のベクター粒子の投与が必要であり、それは肝障害を引き起こす可能性が高いことが示されている。

私たちは、中枢神経系疾患の遺伝子治療に向けた新規ウイルスベクター開発を行ってきた。そこで利用しているのが、ユニークな特性を持つボルナ病ウイルス(BoDV)である。BoDVは、一本鎖マイナス鎖RNAのゲノムを持つRNAウイルスである。中枢神経系に強い指向性を示し、非細胞傷害性に持続感染することを特徴としている。ヒトへの感染は極めて限局的であり、病原性も低いことが証明されている。私たちはこれまでに、BoDVを用いたウイルスベクターの開発に世界に先駆け成功した(図1A)。BoDVベクターの優位性のある特徴は、細胞傷害性が低く、

ゲノム毒性を示すこともなく、外来遺伝子を持続的に発現すること(図1B)。グリア細胞や神経幹細胞を含む神経系細胞に効率的に導入可能であること、低分子RNAであるmiRNAを発現できること(図1C)。様々な幹細胞に持続的に遺伝子導入ができること(図1D)。そして、鼻腔より非侵襲的に脳への送達が可能なことである(図1E)。

一方で、BoDVベクターの生体への適用を考慮するにあたり、非伝播型BoDVベクターを開発するなどの改良を行ってきたが、安全性と利便性をさらに高め実用化を行うためには、生体内で自らのゲノムや遺伝子発現を編集できる自己編集型ベクターの作製が必要と考えられた。

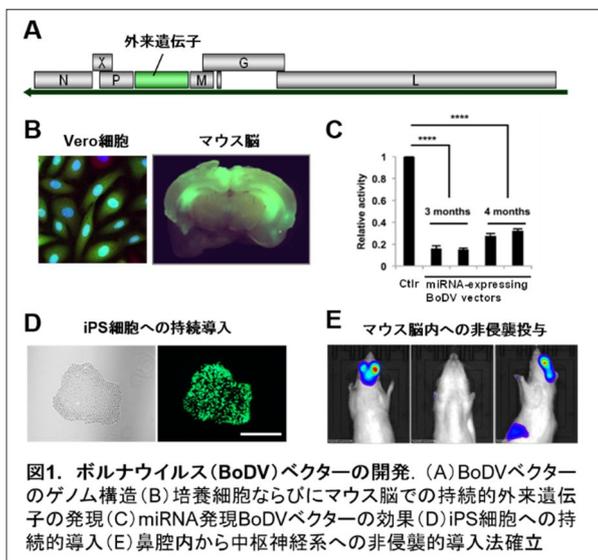


図1. ボルナウイルス(BoDV)ベクターの開発。(A) BoDVベクターのゲノム構造(B)培養細胞ならびにマウス脳での持続的外来遺伝子の発現(C)miRNA発現BoDVベクターの効果(D)iPS細胞への持続的導入(E)鼻腔内から中枢神経系への非侵襲的導入法確立

2. 研究の目的

そこで本研究では、BoDVベクターを非侵襲的に脳内へと導入後、BoDVベクターが自らの伝播能力あるいは複製能力を欠損させる自己編集型RNAウイルスベクターの構築を行うことを目的とした。本研究の達成により、これまでにはない極めて安全性の高い中枢神経系疾患の遺伝子治療用ベクターの作製が可能となる。本研究の目標は、BoDVベクターの実用化を加速するのみならず、他のウイルスベクターの自己編集も可能にし、ウイルスベクターの利用範囲を格段に広げることである。

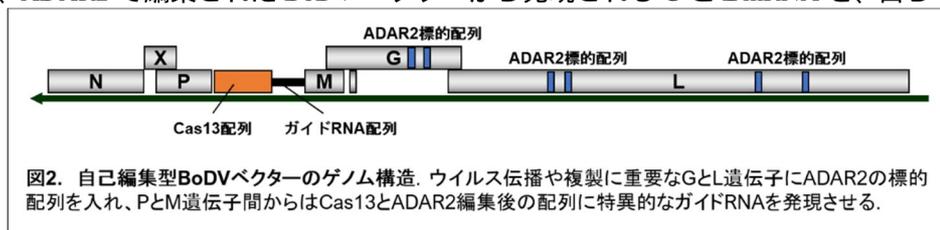
3. 研究の方法

本研究では、既に関済済みのBoDVベクターを基盤に、RNA編集酵素であるADAR2とCas13による2段階の自己編集を導入することで、脳内で伝播もしくは複製能力を欠損するウイルスベクターを開発する(図2)。

第一段階は、ADAR2編集型BoDVベクターの作製である。RNA編集酵素であるADARは、2本鎖中のアデニンをイノシンに変換させるA-to-G編集能力を有している。BoDVゲノムも感染細胞内でADARによるA-to-G編集を受けている。脳内には3つのADARのサブタイプのうちADAR2が多く発現しており、AMPA受容体サブユニットGluA2 mRNAのグルタミン/アルギニン部位を100%編集することが知られている。そこで、BoDVベクターゲノムのエンベロープ(G)もしくはは

L 遺伝子領域内に、感染細胞内で A-to-G 編集により非同義置換を高率に誘導する変異を、GluA2 mRNA を参考に導入する。BoDV ベクターは ADAR ノックアウト細胞で作製する。作製した ADAR2 編集型 BoDV ベクターをマウス脳に導入し、脳内での A-to-G 編集を確認し、効率のよい ADAR2 編集型 BoDV ベクターを選別する。

第 2 段階は、Cas13-sgRNA 発現 ADAR2 編集型 BoDV ベクターの作製である。で作製した ADAR2 編集型 BoDV ベクターに、RNA 切断能力を持つ Cas13 遺伝子と ADAR2 編集後のベクターゲノムから発現される G/L mRNA に特異的に結合するガイド RNA (sgRNA) の発現ユニットを挿入する。これにより、ADAR2 で編集された BoDV ベクターから発現される G と L mRNA を、自らが発現する Cas13-sgRNA により、自らが切断する自己編集型 BoDV ベクターを開発する。



4 . 研究成果

2 年間の研究期間において、まず ADAR2 の BoDV のゲノムへの編集活性について培養細胞を用いた解析を行った。その結果、ADAR2 は感染細胞において BoDV ゲノム RNA と結合し、ゲノムに A-to-G 変異を効率的に誘導していることを明らかにした。また、BoDV ゲノムでの A-to-G 変異部位は X 遺伝子領域に多いことを突き止めた (Yanai M., J. Virol. 2020)。現在、さらに詳細な BoDV ゲノムにおける A-to-G 変異部位の配列解析を継続して行っている。一方、配列解析から得られたデータをもとに、ADAR2 により編集を受けやすい配列を同定しベクターの G 遺伝子部位に導入した編集型ベクターのプロトタイプを作製した。1 年目ではこのプロトタイプベクターの ADAR2 による編集効率の解析を行った。しかしながら、導入した予測配列においても効率的な編集が効率よく確認されず、さらなる改良が必要と考えた。

次に、第二段階のベクター構築のための Cas13-ガイド RNA を発現させるカセット作製した。そして、カセット配列を BoDV ベクターの P 遺伝子と M 遺伝子の間に挿入を行うことで、Cas 発現 BoDV ベクターの構築を行った。現在、継続してカセットを挿入したベクターより組換えウイルスの作製を進めている。さらに今後は、ADAR2 による編集効率の向上を進めることで、脳内で自己切断するベクターの開発を完了させる予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakai Madoka, Fujita Yoko, Komorizono Ryo, Kanda Takehiro, Komatsu Yumiko, Noda Takeshi, Tomonaga Keizo, Makino Akiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Optimal Expression of the Envelope Glycoprotein of Orthobornaviruses Determines the Production of Mature Virus Particles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02221-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02221-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Yumiko, Tanaka Chiaki, Komorizono Ryo, Tomonaga Keizo	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo biodistribution analysis of transmission competent and defective RNA virus-based episomal vector	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62630-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Yumiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 44
2. 論文標題 Reverse genetics approaches of Borna disease virus: applications in development of viral vectors and preventive vaccines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Virology	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.coviro.2020.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Yumiko, Kakuya Yoji, Tomonaga Keizo	4. 巻 64
2. 論文標題 Production of high titer transmission defective RNA virus based episomal vector using tangential flow filtration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 602 ~ 609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Y, Takeuchi D, Tokunaga T, Sakurai H, Makino A, Honda T, Ikeda Y, Tomonaga K.	4. 巻 14
2. 論文標題 RNA Virus-Based Episomal Vector with a Fail-Safe Switch Facilitating Efficient Genetic Modification and Differentiation of iPSCs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2019.05.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Tomonaga K, Makino A.	4. 巻 94
2. 論文標題 ADAR2 Is Involved in Self and Nonself Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01513-19.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01513-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Cleavage of viral membrane glycoprotein enhances transduction efficiency of RNA virus-based episomal vector.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松弓子, 朝長啓造
2. 発表標題 RNA virus-based episomal vector system and its applications in gene and cell therapy.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Komatsu, C Tanaka, and K Tomonaga.
2. 発表標題 In vivo evaluation of replication competent and defective RNA-virus based Episomal vector system.
3. 学会等名 ESGCT 27th annual congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mako Yanai, Shohei Kojima, Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 BoDV utilizes ADAR2 for evasion of innate immune response.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

朝長研究室HP https://t.rnavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/ 京都大学ウイルス・再生医科学研究所HP https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/
--

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