

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659236

研究課題名（和文）次世代標的化ベクターの開発

研究課題名（英文）Development of a novel virus targeting vector

研究代表者

竹田 誠 (TAKEDA MAKOTO)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

研究者番号：40311401

研究成果の概要（和文）：本研究では、多数の外來性遺伝子を搭載でき、また、標的とする表面抗原に対する抗体とを混ぜ併せることで、目的とする細胞種へ感染（標的化）できるウイルスベクターを開発することを目的としている。（1）Fc受容体を発現する細胞を用いて、麻疹ウイルスの抗体依存的感染の可能性を解析し、麻疹ウイルスが抗体とFc受容体を介して細胞へ感染できることを明らかにした。（2）多遺伝子搭載非増殖型ウイルスベクターの作成と、そのベクターを用いてiPS細胞の作製を試みた。F遺伝子欠損（非増殖型）麻疹ウイルスベクターの作成に成功した。iPS細胞作成を試みているが、今のところ初期化遺伝子の一部の発現は確認できるが、iPS細胞の作成までには至っていない。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to generate a novel viral vector, which has the ability to accommodate multiple foreign genes and target specific cell types. The targeting will be achieved by mixing the vector with antibodies against specific surface antigens on cells to be targeted. (1) Using cells expressing Fc receptor, the antibody-dependent infection ability of measles virus vector was demonstrated. (2) A replication-incompetent virus vector accommodating multiple foreign genes was successfully generated. Using the vector, we have tried to produce iPS cells. However, so far, no iPS was produced, although expression of several reprogramming (early) genes was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	0	2,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：細胞、ウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療、癌治療、遺伝子治療などの最先端医療の分野においてレトロウイルス、アデノウイルス、パラミクソウイルスなど様々なウイ

ルスを用いたウイルスベクターが開発され、利用されている。パラミクソウイルスベクターを用いた場合は、恒久的な発現は期待できないが、細胞質のみで増殖するRNAウイルスである

という特性から、ゲノムを傷つける危険性は皆無であり、安全性の点からは、最良のベクターといえる。実際に、わが国でもセンダイウイルスベクターを使った遺伝子治療研究が進められ、成果をあげている。さらに、米国では、麻疹ウイルスやニューカッスル病ウイルスなどのパラミクソウイルスベクターを用いた癌治療研究が進んでおり、臨床応用研究も盛んに行われている。再生医療への応用も始まっている。

ウイルスベクターを目的の細胞だけに感染させる「標的化」技術は、再生医療、癌治療、遺伝子治療のいずれの分野においても、非常に望まれてはいるが、未だ理想的な系は開発されていない。2004年にRussellらの米国の研究チームが、麻疹ウイルスを用いて「標的化」の技術開発にはじめて成功し(Nakamura et al. 2004 Nat Biotechnol)、それが米国における癌治療ウイルスベクター研究の基盤になっている。しかしながら、彼らのベクターの難点は、表面抗原の種類毎に一からウイルスベクターを作成する必要があり、しかも高度かつ特殊な技術をもった特定の施設でしか作成できないことにある。

申請者は、2000年に麻疹ウイルス（野生株）の遺伝子操作手法を開発し、これまでに様々な効率的操作法を公表してきた(Takeda et al. 2000 J Virol; 2005 Virus Res)。2006年には、多数の外来性遺伝子を搭載するための新技術を開発し、特許を取得している（特願2007-524729）(Takeda et al. 2006 J Virol)。最近、麻疹ウイルスの受容体結合タンパク（Hタンパク）の構造を明らかにし(Hashiguchi et al. 2008 PNAS)、その知見をもとにして、麻疹ウイルスが免疫細胞と上皮細胞への感染力をもつ双指向性ウイルスであることを見出した(Takeda et al. 2008 J Clin Invest)。最近、麻疹ウイルス感染にお

ける抗体依存性増強効果の存在を発見し（未発表データ）、それらの成果から本申請の「次世代標的化ウイルスベクター」の着想を得た。

## 2. 研究の目的

再生医療、癌治療、遺伝子治療などの最先端の分野においてウイルスベクターが利用されている。ウイルスベクターを目的の細胞だけに感染させることができれば、その有用性は飛躍的に向上する。ある種の表面抗原をもつ細胞種に特異的に感染するウイルスベクターが、一部で開発されてはいるが、表面抗原の種類毎に一からウイルスベクターを作成する必要があり、汎用性に低く、時間も非常にかかり、しかも高度かつ特殊な技術をもった特定の施設でしか作成できない。本研究では、標的とする表面抗原に対する抗体とを混ぜ併せるだけで、自由自在に目的とする細胞種へ感染（標的化）できるウイルスベクターを開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) Fc受容体を発現する細胞を用いて、麻疹ウイルスの抗体依存的な感染をもつとも効率よく誘導できるHタンパクに対するモノクローナル抗体を選別する。

Fc受容体を恒常的に発現するBHK細胞に各種モノクローナル抗体存在下で麻疹ウイルスを感染させる（実験を、効率的そして定量的に実施するためにレポータータンパクGFPあるいはルシフェラーゼを発現する組換え麻疹ウイルスを利用する）。抗体が認識するHタンパクの領域の違いによって、感染を誘導する能力に違いが出ると予想している。

(2) 各モノクローナル抗体が認識するHタンパクの領域を特定する。

各々の抗体がHタンパク上のどの領域（エピトープ）を認識するのかを明らかにするため

に、その抗体存在下で、麻疹ウイルスを培養し、継代を繰り返すことによって抗体存在下でも効率よく増殖するように変異した株（エスケープ変異株）を作り出す。エスケープ変異株を数株作った後、ゲノムの塩基配列の解析を行うことによって H タンパクに起こったアミノ酸変異を特定する。数株以上のエスケープ変異株のデータを集積し、選別された抗体が認識する H タンパクの立体構造上の領域を正確に明らかにする（H タンパクの X 線立体構造解析のデータを利用する）。

（3）H タンパク上の特定の領域部分に Fc 受容体またはプロテイン A を融合させた麻疹ウイルスベクターを作成する。

麻疹ウイルスの H タンパクの X 線立体構造解析のデータから、（2）の実験で特定した領域上あるいはその近傍で外側へ露出しているループ構造を見つけ出す。そのループ構造部分に Fc 受容体の Fc 結合領域、もしくはプロテイン A を融合させるように H 遺伝子を改変した麻疹ウイルスベクターを構築する。

（4）作成されたベクターの抗体依存的標的化性能を解析する。

様々な表面抗原に対する特異抗体と Fc 受容体（またはプロテイン A）を融合させた H タンパクをもった麻疹ウイルスベクターとを混合し、抗体を十分に麻疹ウイルスベクター粒子に結合させた後、用いた特異抗体の標的となる分子を発現している細胞に感染させ、抗体依存的な感染能力を解析する（実験を、効率的そして定量的に実施するためにレポータータンパク GFP あるいはルシフェラーゼを発現する組換え麻疹ウイルスを利用する）。

（5）ウイルスベクターの自己多段階増殖能力を消失させる。

ウイルスベクターが、子孫ウイルス粒子を生み出し、次から次へと多段階増殖する場合には、ウイルスベクターの安全性を保証すること

はできない。そこで、膜融合タンパク（F タンパク）をコードする遺伝子（F 遺伝子）を欠いたウイルスベクターを作成する。ベクター作成の段階では、F タンパクは、細胞側に発現ベクターを用いて発現させることによって供給する。

（6）多遺伝子搭載非増殖型ウイルスベクターの作成と iPS 細胞の作製。

ウイルスゲノムを二本に分節化することにより、6種の外来性遺伝子（EGFP、Oct3、Glis1、Pin1、Klf4、Sox）を同時に搭載したウイルスベクターの作成を行う。

（7）iPS 細胞の作成

上記（6）のベクターを用いて、iPS 細胞の作成を試みる。

#### 4. 研究成果

（1）Fc 受容体を発現する細胞を用いて、麻疹ウイルスの抗体依存的な感染をもっとも効率よく誘導できる H タンパクに対するモノクローナル抗体を選別する。

約 15 種類のモノクローナル抗体を試して、麻疹ウイルスが抗体依存的に Fc 受容体を用いて感染することが可能であること、ならびに用いる抗体によってその効果に違いがあることを証明した。また、モノクローナル抗体のみならず患者血清でも類似の効果が得られることを示した。

（2）各モノクローナル抗体が認識する H タンパクの領域を特定する。

麻疹ウイルス H タンパク質上の抗原エпитープ 6 箇所の詳細な位置を明らかにし、また、各々のモノクローナル抗体が認識するエピトープを明らかにした。

（3）H タンパク上の特定の領域部分に Fc 受容体またはプロテイン A を融合させた麻疹ウイルスベクターを作成する。

ウイルスの作成に成功した。

(4) 作成されたベクターの抗体依存的標的化性能を解析する。

ウイルスの作成には成功したが、抗体依存的な感染能力を示すことはできなかった。

(5) ウイルスベクターの自己多段階増殖能力を消失させる。

膜融合タンパク (F タンパク) をコードする遺伝子 (F 遺伝子) を欠いたウイルスベクターの作出に成功した。

(6) 多遺伝子搭載非増殖型ウイルスベクターの作成とiPS細胞の作製。

6種の外来性遺伝子 (EGFP, Oct3, Glis1, Pin1, Klf4, Sox) を同時に搭載したウイルスベクターの作成に成功した。

(7) iPS細胞の作成

上記 (6) のベクターを用いて、iPS細胞の作成を試みたが、今のところ初期化遺伝子の一部の発現は確認できるが、iPS細胞の作成までには至っていない。

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. Tahara M, Ito Y, Brindley M, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota P, Plemper R, Maenaka K, Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J. Virol.* 87:666-75.
2. Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. (2013) The Receptor-binding Site of the Measles Virus Hemagglutinin Protein Itself Constitutes a Conserved Neutralizing Epitope. *J Virol.* 87:3583-6.

[学会発表] (計 7 件)

1. Tahara M, Komase K, Ma XM, He JL, Yanagi Y, Maenaka K, Rota PA, and Takeda M. (2011 July 15. Mayo Clinic, Rochester, MN) Antigenic determinants of Measles Virus Hemagglutinin associated with single serotype. 2011 Measles Virus Mini-Symposium.
2. Tahara M, Komase K, Yanagi Y, Maenaka K, Rota PA, Takeda M. (2011 July 16-20. Minneapolis, Minnesota) Conserved and variable antigenic sites on the measles virus hemagglutinin protein. 30th Annual Meeting of American Society for Virology.
3. Tahara M, Komase K, Ma XM, He JL, Yanagi Y, Maenaka K, Rota PA, Takeda M. (2011 September 11-16. Sapporo, Japan) Identification of conserved neutralizing epitopes of the measles virus hemagglutinin protein located in proximity and distal to the receptor-binding site. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress.
4. Tahara M, Ma XM, He JL, Ito Y, Fukuhara H, Brindley MA, Sakai K, Yanagi Y, Komase K, Plemper RK, Rota PA, Maenaka K, Takeda M. (2011 December 2. University of Georgia, Atlanta, GA, USA) Measles virus escapes from neutralization at the cost of SLAM-binding activity. Atlanta Area 5th Paramyxer.
5. Tahara M, Miura Y, Kurita R, Ryo A, Tani K, Takeda M. (2012 June 13-16. Yokohama, Japan) Generation of a novel non-transmissible and cytosol-replicating RNA virus vector that encodes five iPS cell-inducing genes and a reporter gene. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 11th Annual Meeting.
6. Tahara M, Miura Y, Kurita R, Ryo A, Tani K, Takeda M. (2012 July 21-25. Madison, WI, USA) A novel non-transmissible measles virus vector with five iPS cell-inducing genes and a reporter gene. 31st Annual Meeting for American Society for Virology.
7. Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Ohno S, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. (2012 September 11-14. Awaji Island, Hyogo, Japan) A structural and biochemical basis for the single serotype nature of measles virus. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 誠 (TAKEDA MAKOTO)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

研究者番号：40311401

