

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830070

研究課題名(和文) ウイルスDNAを標的としたEBV疾患モデルマウスでの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy using gene editing in model mice of EBV infectious diseases

研究代表者

松田 剛 (Matsuda, Go)

独立行政法人国立成育医療研究センター・母児感染研究部・研究員

研究者番号：60392130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)は様々な腫瘍性疾患に関与する。全てのEBV関連疾患で発現しているウイルスタンパク質EBNA1はウイルスゲノムを保持し、潜伏感染に必須である。本研究の目的はEBNA1を標的とした人工ヌクレアーゼを利用し、感染細胞からウイルスゲノムを排除する新規治療法の開発である。

今回、CRISPR/Cas9システムを用いて、HeLa細胞内で効果的にEBNA1配列を切断することができた。しかしながら、EBV感染細胞では十分な効果を得ることはできなかった。さらに治療効果を評価するためのEBV疾患モデルマウスが作製出来た。EBV感染細胞での効果が上がり次第、試す予定である。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is associated with various neoplastic diseases. EBNA1 can be a target of anti-viral therapy because EBNA1 is expressed in all EBV associated diseases and is an essential factor for maintaining viral genome and persistence in infected cells. The aim of this study is to remove EBV genome from infected cells by targeting EBNA1 regions in EBV genome using artificial nuclease techniques.

In this research, we showed that CRISPR/Cas9 system could cleave EBNA1 regions effectively in HeLa cells. But the efficiency of viral gene editing in EBV infected cells was not enough. Furthermore we succeeded the preparation of model mice of EBV infectious diseases. We will try new therapy using gene editing in the model mice as soon as the efficiency is increased.

研究分野：実験動物学

キーワード：感染症 ウイルス 癌 人工ヌクレアーゼ 遺伝子治療 応用動物

1. 研究開始当初の背景

(1) EBウイルス(EBV)は成人の90%が既感染で、生涯に渡って潜伏感染している。しかしながら、バーキットリンパ腫、慢性活動性EBV感染症、移植後リンパ増殖性疾患など様々な腫瘍性疾患の原因にもなる。全ての疾患に共通して発現しているのはEBNA1であり、潜伏感染に必須なウイルスゲノムを保持している。EBNA1は細胞傷害性T細胞による免疫を回避でき、EBNA1を標的とした細胞免疫療法には限界がある。

(2) 近年、Zinc finger nuclease (ZFN)やTranscription Activator-Like Effectors Nuclease (TALEN)といった配列特異的DNA切断ツールが遺伝子治療技術への応用として注目されてきた。EBVはウイルスゲノムをDNAの状態に核に留めているため、EBNA1の切断による感染細胞からウイルスゲノムの排除による新規治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

(1) EBV感染細胞株にレンチウイルスベクターを利用し、EBV特異的ヌクレアーゼでEBNA1遺伝子欠損によるゲノム排除を目指す。

(2) EBVリンパ増殖性疾患モデルマウスを用いて、ウイルスゲノム排除による腫瘍抑制効果の検証をする。

3. 研究の方法

(1) EBNA1を切断するのに効果的な人工ヌクレアーゼを選択する。EBNA1特異的COMPACT TALEN、CRISPR/CAS9システムを作製し、EBV感染細胞株でEBNA1切断によって生じた変異を特異的に切断するヌクレアーゼ検出法(SURVAYOR NUCLEASE ASSAY)および遺伝子配列をにより確認する。

(2) EBNA1切断標的部位を蛍光タンパク質の間にはさみ、切断後に蛍光を発する発現ベクターを作製する。これを用いて、哺乳類動物細胞にEBNA1特異的COMPACT TALEN、CRISPR/CAS9システムと同時に遺伝子導入し、切断効果を確認する。

(3) EBV感染細胞にCRISPR/CAS9システムを遺伝子導入し、導入された細胞だけを選択し、EBNA1切断をSURVAYOR NUCLEASE ASSAYにより確認する。

(4) 人工ヌクレアーゼの効果をEBV疾患

モデルマウス内で確認する。

4. 研究成果

(1) 人工ヌクレアーゼ分野の研究が急速に進み、申請時にはZFNとTALENしかを利用できなかったが、研究開始後にCRISPR/CAS9システムおよびCOMPACT TALENを利用できるようになった。ZFNとTALENはタンパク質2分子でDNAを切断するが、COMPACT TALENは1分子、CRISPR/CAS9システムはRNAとタンパク質1分子で切断するため、これらの切断効果を確認することにした。

EBNA1特異的切断ができるCOMPACT TALENを2種類、CRISPR/CAS9システムを2種類作製した。これらは何種類かのEBV感染細胞に遺伝子導入し、単独あるいは2種類同時導入による切断効果をSURVAYOR NUCLEASE ASSAYおよび遺伝子配列を確認した。

SURVAYOR NUCLEASE ASSAYでは2種類同時導入による欠損を確認することを考え、EBNA1全長をPCRによりクローニングすることにした。しかしながら、EBNA1全長はGly、Alaに富む領域があるため、この領域が全長EBNA1のクローニングを難しくさせた。そこで何種類かのEBV感染細胞株でEBNA1をPCRにより増幅させた結果Raji細胞を使うのが効果的であることがわかった。これはEBNA1の配列を読んだ結果、Gly、Alaに富む領域が全長EBNA1に比べて短かったためPCRが増幅されやすかったと考えられる。

Raji細胞にEBNA1特異的COMPACT TALEN、CRISPR/CAS9システムを一過的に遺伝子導入し、SURVAYOR NUCLEASE ASSAYで切断効率を確認した。二つのうちCRISPR/CAS9システムで切断が確認されたものが一部にみられた。実際の切断部位の遺伝子配列を確認したが、変異はほとんどみつからなかった為、その効率は悪かったと考えられる。

(2) そこで、EBNA1切断標的部位を蛍光タンパク質の間にはさみ、切断後に相同性組み換えにより蛍光を発する発現ベクターを作製した。この発現ベクターは一度切断されれば蛍光を発したままなので、蛍光の強弱で切断効率を確認できると考えられた。

この発現ベクターと同時にEBNA1特異的COMPACT TALENを2種類、CRISPR/CAS9システムをEBNA1特異的配列4種類および非特異的配列1種類をそれぞれHeLa細胞に遺伝子導入し48時間後の蛍光を観察した。2種類のCOMPACT TALENで蛍光を確認

できた。また、CRISPR/CAS9システムでは非特異的配列では蛍光は確認されなかったが、EBNA1特異的な4種類の配列では蛍光を確認した。COMPACT TALENとCRISPR/CAS9システムを比較した結果、CRISPR/CAS9システムに最も切断効果が高いものが存在した(図1)。

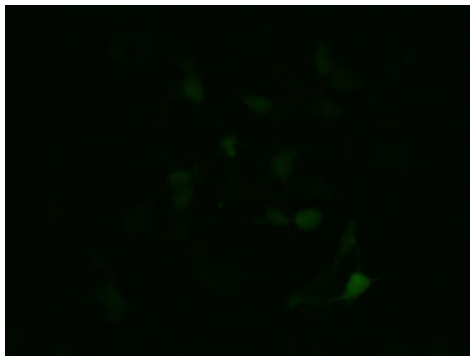


図1 HeLa細胞でのEBNA1標的配列の切断効果

(3) この結果、CRISPR/CAS9システムで切断効率の良かったEBNA1特異的な2種類と非特異的な1種類をB細胞であるRaji細胞に遺伝子導入し、36時間後、導入効率をフローサイトメーターにより同時発現するCD4およびB細胞のマーカーであるCD19のダブルポジティブ領域により確認したところ、約15~30%の割合で遺伝子導入された(図2)。

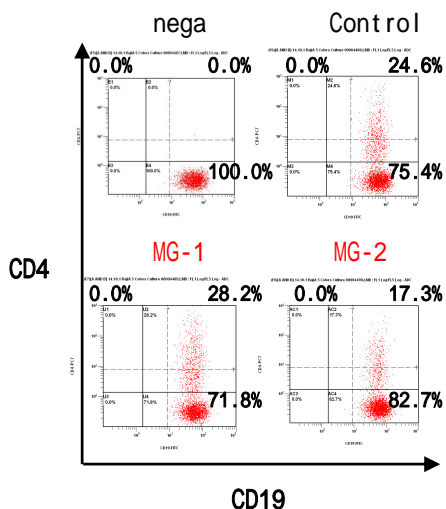


図2 EBV感染細胞への遺伝子導入効率

導入された細胞だけをCD4を選択マーカーとして磁性ビーズにより分画分離した。これらの細胞からDNAを抽出し、EBNA1切断をSURVAYOR NUCLEASE ASSAYにより確認した。しかしながら、一過的な遺伝子導入では効果的な切断

は確認できなかった(図3)。

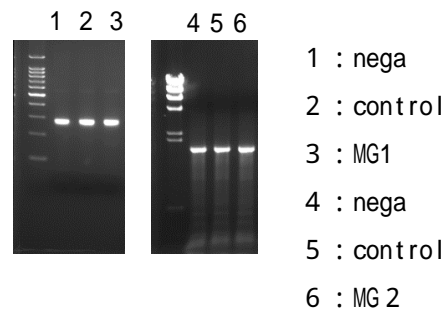


図3 EBV感染細胞での変異による切断効果

(4) 当初、人工ヌクレアーゼによるEBNA1の切断による感染細胞からウイルスゲノムの排除をEBV疾患モデルマウスで行う予定であったが、効果的な切断が確認できなかった為、マウスでの実験を行えなかった。しかしながら、何種類かのEBV感染細胞をNOGマウスに移植することで、EBVリンパ増殖性疾患モデルマウスの作製に成功した。その結果、移植した細胞株によって脾臓、肝臓、腎臓などに形態異常や腫瘍が確認された(図4)。これらの疾患モデルマウスは、EBNA1遺伝子の効果的な切断後すぐに治療効果の確認に利用可能であると考えられる。



EBV感染細胞移植マウスの脾臓



コントロールマウスの脾臓

図4 EBV疾患モデルマウスの臓器

研究期間内でEBNA1の効果的な切断配列を得ることができた。EBVのゲノム切断によって、これまで創薬の対象とみられなかったウイルスゲノムを標的とする新規治療法の開発へ一歩近づいたと考えられる。今後は更なる改良を加えて、より効果的にEBVのゲノムを切断することによるウイルスゲノムの感染細胞からの排除を目指したい。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

松田 剛、EB ウイルスゲノムを標的としたゲノム編集技術による効果、第4回ゲノム編集研究会、2014年10月6日、広島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

松田 剛 (MATSUDA, Go)

国立成育医療研究センター・母児感染研究部・研究員

研究者番号：60392130

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし