

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670485

研究課題名(和文)染色体手術によるウイルス・エリミネーション法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a procedure to eliminate viral sequences by means of the chromosome editing

研究代表者

岸田 綱郎 (Kishida, Tsunao)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00370205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HIV感染の治療には、プロテアーゼ阻害薬や逆転写酵素阻害薬など、ウイルスの特定のたんぱくを阻害する薬剤が功を奏しているが、感染細胞の染色体に組み込まれたHIVゲノムを特異的に切断、除去することは、これまで可能ではなかった。最近になって、染色体上の任意の配列を特異的に改変する技術が、哺乳動物細胞においても可能となった。そこで本研究では、この染色体改変技術を用いて、HIVゲノムを切断、除去する手法を開発することを目的として行った。その結果、ヒト細胞に感染させたレンチウイルスのゲノム配列を切断しトランケートすることに成功した。本研究の成果は、HIV感染症に対する根治療法をもたらす可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For the treatment of HIV infection, some medicines that suppress particular viral proteins are commonly used and have improved clinical outcomes. However, dissection and elimination of viral genome that has been integrated into host cell chromosomes have not been possible. Recently, genome editing technologies that specifically edit genomic sequences have been applied to mammalian cells. Thus, our study aimed at establishing a procedure to dissect and eliminate the provirus sequence in HIV-infected human cells. As results, we succeeded in introducing truncation in lentivirus vector sequence in the chromosome of the infected human cells. The present study may potentially lead to a novel therapeutic procedure to cure the HIV infection.

研究分野：感染症内科学

キーワード：感染症治療学

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

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の HIV 陽性者数は 3,530 万人、新規 HIV 感染者数は年間 230 万人、エイズによる死亡者数は年間 160 万人であり、WHO は現在もっとも喫緊の対策が必要な感染症であると勧告している。わが国では 2011 年に報告された新規 HIV 感染者は 1,056 名（男性 994 名、女性 62 名）をかぞえ、先進国で唯一、新規感染者が増加傾向にある。特に若年層での増加が大きな問題となっている。現在、HIV 感染症に対しては抗 HIV 多剤併用療法を行うことで、ウイルスの複製を抑制し AIDS の発症を遅らせることが可能になっている。しかしながら、現在の抗 HIV はウイルスの増幅を遅らせることはできても、染色体上のプロウイルスを排除することはできない。ウイルスゲノムを直接切断ないしは変異させることによって、HIV 感染症を完治する方法は存在しない。

TALEN(Transcription Activator-like effector Nuclease) は、Xanthomonas の TALEs タンパクに由来する DNA 結合ドメインと、ヌクレアーゼドメインを融合した人工酵素である。DNA 結合ドメインを自由にデザインすることで、任意の標的配列を特異的に切断することができる。

さらに最近になって、CRISPR Cas9 が哺乳動物細胞にも用いられるようになったが、CRISPR Cas9 を用いれば TALEN よりも効率が高く、簡便迅速にゲノム編集を行える可能性がある。

我々は、これらのゲノム改変技術を用いれば、HIV 感染細胞の染色体にインテグレートしているウイルスを切断・除去できるのではないかと考えた（図 1）。すなわち、HIV の増幅に必須の遺伝子（たとえば p17）に特異的な TALEN または CRISPR Cas9 を作成し、HIV 感染細胞内に導入することで、染色体上の HIV ゲノムを特異的に切断し、欠失させるという手法である。p17 に欠失が入ることで、この細胞の染色体上の HIV ゲノムは、子孫ウイルスを増やすことができない。

TALEN や CRISPR Cas9 を用いたゲノム改変研究の報告は増加の一途をたどっている。しかしながら、哺乳動物細胞を対象としたものは、ES 細胞や iPS 細胞を用いた報告がほとん

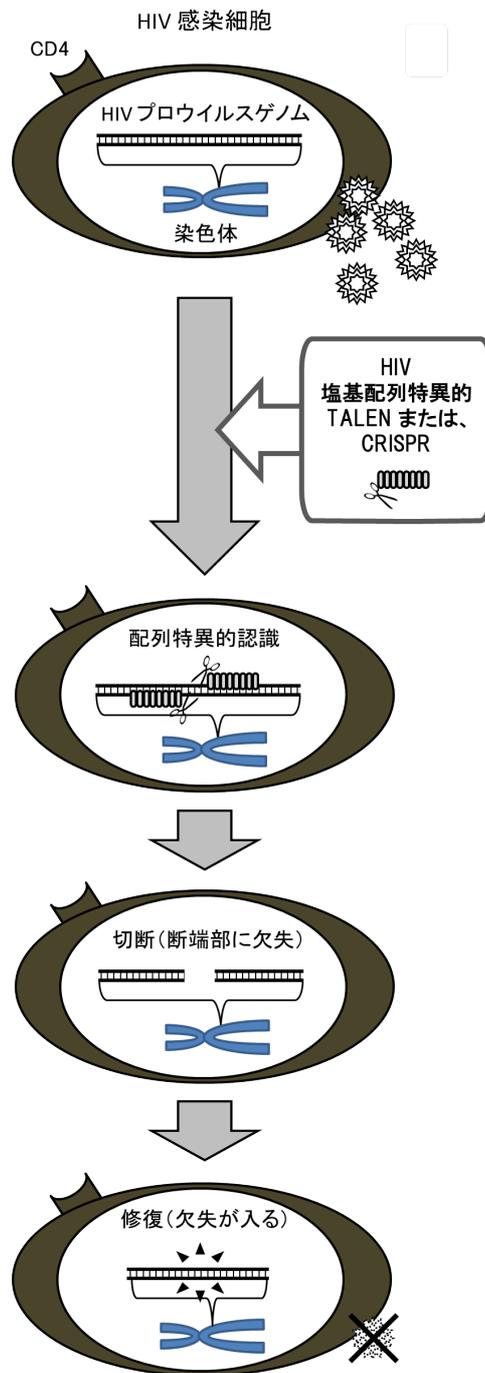


図 1 染色体にインテグレートされた HIV プロウイルスのゲノム編集による切断・除去。

どであり、体細胞を用いた報告は極めて少ない。したがって、本研究で開発する、感染細胞内で HIV ゲノムを切断・除去する TALEN は、極めて斬新なツールであるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム改変技術をもちいることによって、HIVを切断・除去する新たなAIDS治療法の開発を目指した。そのために、HIVのGag p17をターゲットとするTALEN組換え蛋白をデザイン、作成し、HIV感染細胞に直接導入して、染色体にインテグレートされたHIVゲノムを切断・破壊する技術の確立を目的とした。本研究はテクニカルにも、また将来的な臨床応用という視点からも、斬新かつ先見性に富んでおり、非常に大きなチャレンジ性を有している。

3. 研究の方法

HIV増殖に必須のマトリックス蛋白質でGag p17を標的とするTALENベクターを多数、設計・作成し、SSAアッセイを用いた評価を行った。これにより、HIVのGag p17遺伝子配列を効果的に切断することができるTALEN配列を確定した(pcDNA-TAL-NC2 HIVp17 R+L)。HIV-1増殖力等を欠損したレンチウイルスベクターをTリンフォーマ細胞株に感染させることによってGag p17配列が染色体上にインテグレートされた細胞株を樹立した。これらに、pcDNA-TAL-NC2 HIVp17 No.18 R+Lを導入し、その3日後にゲノムDNAを回収した。p17配列をPCRで増幅後、PCR産物をT vector MD20にクローニングし、シーケンシングを行って、HIVp17遺伝子領域の塩基配列が除去されているか否かを検討した。

4. 研究成果

切断効率(%)

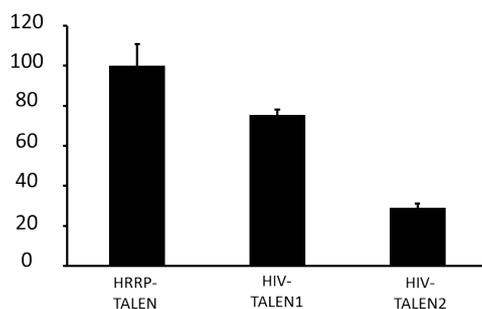


図2 SSA assayによるDNA切断効率の評価。ポジティブ・コントロールとしてHRRP特異的なTALENの効率と比較した。HIV-TALEN1では約75%の切断効率を得られた。

HIVのGag p17配列を切断するTALEN配列をデザインし、SSAアッセイに供した結果、実際に高い効率で切断するTALENを見出すことができた(図2)。

これを用いて、レンチウイルスベクター感染Tリンフォーマ細胞株に導入したところ、一部の細胞において染色体上にインテグレートされたp17遺伝子配列に欠損が見られることが示された(図3)。その効率は細胞のクローンによって大きくことなり、10%~90%であった。1回の導入によって誘導された欠失なので、反復して導入することで、効率はさらに向上できる可能性がある。あるいは、細胞のクローンによってTALENが染色体を改変できる効率が異なる可能性も考えられる。今後はCRISPRによる改変との比較が重要になるであろう。

エイズ治療に用いられているHIV治療薬は、近年大きく進歩したが、プロテアーゼ阻害薬や逆転写酵素阻害薬など、ウイルスの増幅に必須のたんぱくを阻害することによって、ライフサイクルの特定のステップを抑制する薬剤が中心である。多剤を複合投与することで、AIDS発症を大きく遅延することが可能となった。しかし、根本的な治療を行える薬剤は存在しない。

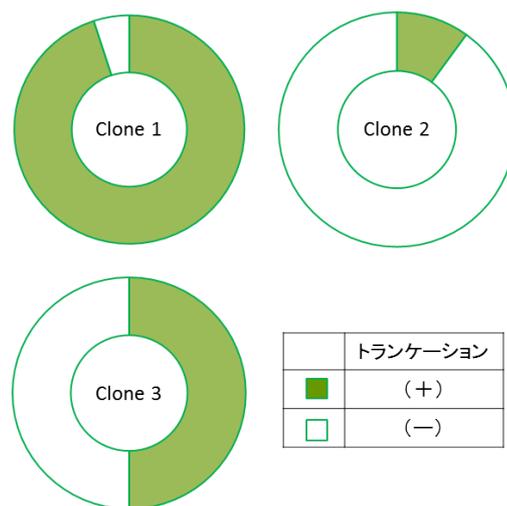


図3 HIVゲノムトランケーションの効率。HIV感染リンフォーマ細胞株、3クローンに図2のTALENを導入後、各20クローンのPCR増幅配列をシーケンシングした。トランケート有の配列では、9塩基~37塩基の欠失がp17コーディング領域に認められた。

現状の HIV 治療は、持続的な薬剤の投与が必要である。延命が可能になったので、その医療費は極めて大きい。日本において、HIV 治療に必要な医療費は、余命が 40 年程度であれば約 1 億円(毎月 20 万円×12 カ月×40 年=9,600 万円)が必要であるといわれ、行政にとっても個人にとっても非常に大きな負担であるといえる。本研究の成果は、国および個人の医療費の負担を大きく解決する手段を提供できると可能性がある。また、世界規模でみると、AIDS の治療が可能なのは先進国のみであり、発展途上国では、そのような高額治療は受けられず、国民の平均寿命が低下してしまった国もある。本研究の成果は、この大問題の解決に貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, Umezawa A, Gojo S. *Nanomedicine*. 2014 Aug;10(6):1165-74. 査読有 doi: 10.1016/j.nano.2014.03.018
- (2) HIF-1 α -induced HSP70 regulates anabolic responses in articular chondrocytes under hypoxic conditions. Tsuchida S, Arai Y, Takahashi KA, Kishida T, Terauchi R, Honjo K, Nakagawa S, Inoue H, Ikoma K, Ueshima K, Matsuki T, Mazda O, Kubo T. *J Orthop Res*. 2014 Aug;32(8):975-80. 査読有 doi: 10.1002/jor.22623
- (3) Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. Fujioka K, Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Fujii W, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Kohno M, Oda R, Yamamoto T, Fujiwara H, Kawahito Y, Mazda O. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 16;456(3):785-91. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.040
- (4) Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, Kubo T, Yamamoto T, Kanamura N & Mazda O. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 May 12;112(19):6152-7. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1420713112

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Direct reprogramming of functional human osteoblasts for periodontal tissue regeneration. Yamamoto K, Yamamoto T, Kishida T, Mazda O, Kanamura N. International Association for Dental Research. 2015 年 3 月 12 日, Boston, MS, USA
- (2) Directly reprogrammed osteoblasts engineered to produce interleukin-10 significantly suppress osteoclastogenesis. Fujioka K, T. Kishida, Y. Kukida, H. Nagahara, W. Fujii, K. Murakami, T. Seno, A. Yamamoto, M. Kohno, Osam Mazda, Y. Kawahito. EULAR 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 綱郎 (KISHIDA TSUNAO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 00370205

(2) 連携研究者

中屋 隆明 (NAKAYA TAKAAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80271633

(3) 研究協力者

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)
京都府立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80300820
渡邊 映理 (WATANABE ERI)
京都府立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20433253
新屋 政春 (SHIN-YA MASAHARU)

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト研究
員

研究者番号:10405277

江島 晃佳 (EJIMA AKIKA)

京都府立医科大学・医学部・研究員