

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22505

研究課題名（和文）改変ヘルペスウイルスLAT発現系による恒久的治療遺伝子供給システムの構築

研究課題名（英文）Generation of a persistent therapeutic transgene expression system by engineered latency associated transcript expression cassette of herpes simplex virus

研究代表者

宮川 世志幸（Yoshitaka, Miyagawa）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90415604

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）：本研究では、申請者らが開発した無毒化HSVベクターシステムを改良し、恒久的に治療遺伝子発現が継続できる新規治療用担体の開発を行った。新規発現系構築のために、HSVゲノム領域LATへ持続的に人工転写活性因子がリクルートされるように改変Cas9発現系を構築した。本発現系においては、LAT領域に標的化された改変Cas9-sgRNA複合体により、同領域を特異的に転写活性化できることが判明した。さらにsgRNAを複数組み合わせることにより、同領域の転写活性を大幅に増加できることを見出した。以上、作製した発現系は、無毒化HSVベクターから長期的かつ安定な治療遺伝子発現に極めて有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、sgRNAの発現にはPol IIIプロモーターが用いられ、転写調節因子dCas9とは別々に発現される。この場合、これらの発現系はそれぞれ転写機構が異なるため、人工的に転写調節を同時に行うことは困難である。一方、今回提案する発現系では、miRNA発現系を巧みに利用してPol IIIプロモーターによりsgRNAを効率的に発現できる。以上により、本発現系を構成する全ての因子を一括して発現制御することを可能とし、自己プロモーターの恒常的な転写活性化を実現できる。本発現系を用いた遺伝子治療が完成すれば、恒久的な治療効果が期待され、ベクター使用量及びベクター由来免疫応答を最小限に抑えることができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated a persistent therapeutic gene expression system by modifying the latency associated transcript (LAT) locus in a non-toxic herpes virus (HSV) vector that we have recently developed. In this novel expression system, a complex of artificial transcriptional activator dCas9 and single guide RNA (sgRNA) to target the LAT locus were continuously recruited to the LAT locus of non-toxic HSV, which allowed the region to be kept in a transcriptionally active state persistent. Moreover, we found that the transcription in the LAT locus can be further activated by using multiple sgRNAs. Our study showed that the engineered expression system generated in this study can be useful for persistent and stable therapeutic transgene expression from non-toxic HSV vectors.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：ヘルペスウイルス CRISPRa インシュレーター

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルス (HSV) は、その高い遺伝子搭載能力と神経親和性から、遺伝子治療用ベクターへの応用が期待され、これまで研究開発が行われてきた。ベクター開発にあたり課題点であった HSV が持つ強力な細胞毒性は、申請者らが開発した無毒化技術により大きく改善された (Miyagawa *et al*, PNAS 2015)。一方、今後の課題点として顕在化してきたのが、治療遺伝子発現の一過性である。無毒化された HSV ベクターを用いたラット海馬に対する遺伝子導入例では投与後最高 6 ヶ月まで観察されたが、その発現量は経時的に減少した (Miyagawa *et al*, Mol Ther. Methods Clin Dev. 2017)。今後、本ベクターシステムの臨床応用の実現を目指すには、長期かつ安定的に治療遺伝子の供給が期待できる新規遺伝子発現系が必要となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変により無毒化した HSV ベクターを基盤とし、半永久的に治療遺伝子が供給できる新規遺伝子治療用ベクターの開発を目的とする。本新規発現系では、ゲノム編集技術により HSV の特定のゲノム領域 Latency associated transcript (LAT) へ継続的な人工転写活性因子のリクルートが可能となる。この場合、LAT 領域は恒久的に転写活性化状態となり、課題となっている治療遺伝子発現不活化による遺伝子治療効果の低下が克服される。本技術開発が成就すれば、治療効果が安定かつ長期的に維持され、高性能な遺伝子治療用担体が提供できる。

## 3. 研究の方法

### (1) LAT 領域標的 CRISPRa 発現系の構築

本発現系のプロモーターには、申請者らが構築した HSV LAT element と哺乳細胞で強い転写活性を持つ CAG プロモーターを連結した LAT-CAG 融合プロモーターを用いる。CRISPRa により LAT-CAG 融合プロモーターを標的化するために、同領域に対する sgRNA をデザインする。デザインした sgRNA による遺伝子発現誘導を確かめるため、LAT-CAG 発現ベクターに sgRNA 及び改変 Cas9 を組み込む。また治療遺伝子のモデルとしてレポーター遺伝子である GFP を同様に組み込む。作製したベクターを培養細胞に導入して、その発現誘導を定量 PCR・顕微鏡観察にて解析する。

### (2) LAT 領域標的 CRISPRa 発現系搭載した無毒化 HSV ベクターの構築

新規発現系の遺伝子発現安定化を図るために、無毒化 HSV ベクターにおける HSV 特異的インシュレーター (Miyagawa *et al*, PNAS 2015) が位置する LAT 領域に(1)で作製した発現系を挿入する。挿入遺伝子発現を確認するため、作製した改良無毒化 HSV ベクターを培養細胞に感染させ、その遺伝子発現を定量 PCR・ELISA 法・顕微鏡観察にて検証する。

### (3) 改良無毒化 HSV ベクターの安全性・機能性評価

(2)で作製した改良無毒化 HSV ベクターの *in vivo*での機能評価を行うために、動物モデルを用いた発現解析を行う。作製したベクターをマウス静脈・腹腔内・中枢神経系・末梢神経系に投与し、その遺伝子発現を免疫染色法・定量 PCR 等にて解析する。また同ベクターの安全性について評価するために、組織学的解析を行い、細胞変性や免疫応答について検証する。

#### 4. 研究成果

本研究ではゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 の改変型であり、任意の遺伝子の発現誘導する手法である CRISPRa を用いる。そこで、CRISPRa に必要なヌクレアーゼ活性を不活化した Cas9 (dCas9) に転写活性因子を融合させた改変 Cas9 発現系を構築した。また同時に標的である CAG プロモーター及び LAT 領域を標的とする sgRNA (CAG 標的 sgRNA: C1-3, LAT 標的 sgRNA: L1-6, 図 1) をデザインし、sgRNA 発現系を組み入れた。いずれの sgRNA が LAT-CAG 標的化に適しているか解析するために、LAT-CAG プロモーター下流にレポーター遺伝子である AcGFP を組み込んだレポータープラスミドを作製した。以上のプラスミドをヒト培養細胞に対して遺伝子導入して、そのプロモーター活性を比較した (図 1, 2)。その結果、いずれの sgRNA についてもレポーター遺伝子の AcGFP 発現上昇が見られる一方、その転写活性化の度合いは sgRNA により異なることが判明した。以上の試験により、デザインした sgRNA は dCas9 を特異的に LAT 領域にリクルートし、同領域の転写活性を有意に向上させる機能があることが判明した。次に、LAT 領域及び CAG プロモーターを標的とする sgRNA を複数組み合わせ併用することで、転写活性化効率を増強することができるか検討を行った (図 3)。その結果、sgRNA 単独使用より複数の sgRNA 併用の方が有意に LAT-CAG 転写活性を向上できることが明らかとなった。各 sgRNA の組み合わせに対する発現量増加を解析した結果、転写活性をより効率的に上昇させる sgRNA の組み合わせを複数特定した。これら作製した発現カセットを無毒化 HSV ベクターシステムに組み込むために、LAT 領域に Gateway システム組換え配列を挿入した HSV-GW ベクターを調整した。HSV-GW ベクターを用いて、選定した LAT-CAG 標的 sgRNA 発現系及び dCas9 発現系を搭載した組換え HSV を作製した。同ベクターは無毒化 HSV ベクター専用のウイルス産生細胞に導入し、組換え HSV ベクターストックを調整した。本 CRISPR システムにより LAT 領域及び CAG プロモーター

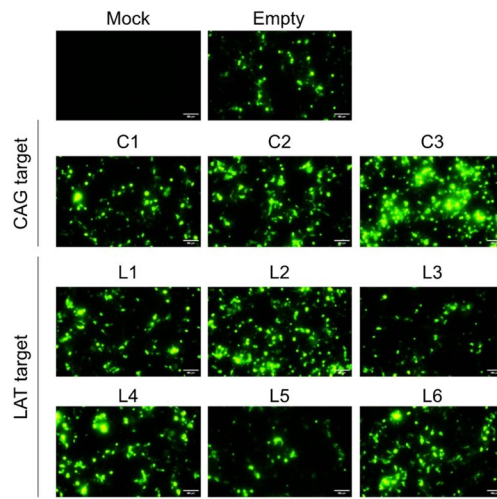


図1. CAG/LAT標的sgRNAによるLAT-CAGプロモーター活性化

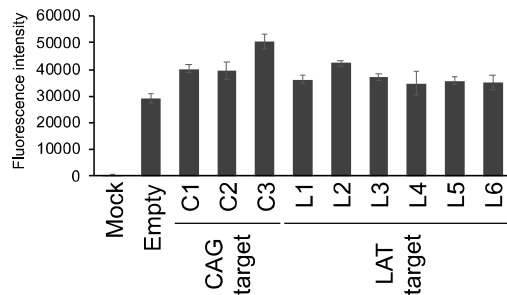


図2. 各CAG/LAT標的sgRNAによるLAT-CAGプロモーター活性の比較

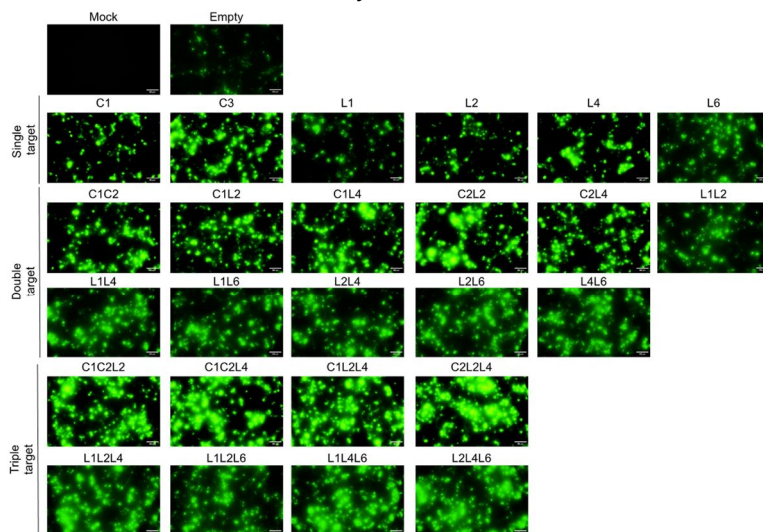


図3. CAG/LAT標的sgRNA併用によるLAT-CAGプロモーター活性化

を標的化可能か調べるために、LAT 領域及び CAG プロモーターにレポーター遺伝子 GFP を連結した無毒化 HSV を調整し、ヒト線維芽細胞に対する共感染実験を実施した。現在、無毒化 HSV ベクターからの遺伝子発現を最大限に向上させる sgRNA の組み合わせ及び最適なベクター量について複数の実験系を用いて条件検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hall Bonnie L., Leronna Daniela, Miyagawa Yoshitaka, Goins William F., Glorioso Joseph C., Cohen Justus B.	4. 巻 21
2. 論文標題 Generation of an Oncolytic Herpes Simplex Viral Vector Completely Retargeted to the GDNF Receptor GFR 1 for Specific Infection of Breast Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8815 ~ 8815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228815	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 Kuroda Seiji, Miyagawa Yoshitaka, Sato Yuriko, Yamamoto Motoko, Adachi Kumi, Kinoh Hiromi, Goins William F., Cohen Justus B., Glorioso Joseph C., Taniai Nobuhiko, Yoshida Hiroshi, Okada Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Protocol Optimization for the Production of the Non-Cytotoxic J NI5 HSV Vector Deficient in Expression of Immediately Early Genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 612 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.03.014	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshitaka Miyagawa, Gianluca Verlengia, Yukage Kobari, Fang Han, Ryotaro Hashizume, Michele Simonato, Akihiro Umezawa, Justus B. Cohen, and Joseph C. Glorioso.
2. 発表標題 A non-cytotoxic herpes simplex virus vector provides standalone inducible co-expression of four cellular reprogramming factors.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021).
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 誠司, 宮川 世志幸, 助川 誠, 酒井 真志人.
2. 発表標題 遺伝子治療目的の高品質無毒化ヘルペスウイルス(HSV)ベクター精製方法および保管条件の検討.
3. 学会等名 第 89 回 日本医科大学医学会総会.
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yoshitaka Miyagawa, Motoyo Maruyama, Atsushi Sakai, Yuriko Sato, Seiji Kuroda, Hiromi Kinoh, Motoko Yamamoto, Ryotaro Hashizume, Hidenori Suzuki, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Takashi Okada.
2 . 発表標題 Efficacy and safety of non-cytotoxic herpes simplex virus-based vectors in vivo.
3 . 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2020)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Seiji Kuroda, Yoshitaka Miyagawa, Makoto Sukegawa, Taro Tomono, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, William F. Goins, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, and Takashi Okada.
2 . 発表標題 Evaluation of Purification and Storage Conditions for Highly Defective, Non-Cytotoxic Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Therapy.
3 . 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2020)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Seiji Kuroda, Yoshitaka Miyagawa, Gianluca Verlengia, Makoto Sukegawa, Kumi Adachi, Motoko Yamamoto, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Hideyuki Suzuki, Hiroshi Yoshida and Takashi Okada.
2 . 発表標題 Improved purification method for herpes simplex virus-based vectors.
3 . 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2020)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yoshitaka Miyagawa, Motoyo Maruyama, Seiji Kuroda, Atsushi Sakai, Yuriko Sato, Ryotaro Hashizume, Hiromi Kinoh, Motoko Yamamoto, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Takashi Okada.
2 . 発表標題 Optimization of vector design of non-toxic herpes simplex virus-based vector for efficient in vivo transduction
3 . 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2020)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Miyagawa, Motoyo Maruyama, Seiji Kuroda, Atsushi Sakai, Yuriko Sato, Hiromi Kinoh, Motoko Yamamoto, Justus B. Cohen, Joseph C. Glorioso, Takashi Okada.
2. 発表標題 In vivo imaging of transgene expression from a non-toxic herpes simplex virus vector
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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