

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390144

研究課題名（和文） iPS 細胞を応用したヒトレトロウイルス感染症の発症機構の解明と予防・治療法の確立

研究課題名（英文） Application of iPS cells to the investigation of the pathogenesis of human retroviral infectious diseases and to the establishment of their prevention and therapy

研究代表者

阪井 弘治（SAKAI KOJI）

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究者番号：60260270

研究成果の概要（和文）：ヒトおよびサル iPS 細胞を利用して、ヒトレトロウイルス感染症に対する新規治療法による感染予防と治療薬の開発のための基盤情報を得ることを目的として研究を行った。HIV-1 gp160 外被糖タンパク質遺伝子を導入したヒト iPS 細胞はこれを高発現し、接種マウスでは HIV-1 gp160 抗原に対する細胞性免疫が顕著に誘導され、ヒト iPS 細胞が新たなエイズワクチンのすぐれたベクターとして活用できる可能性が見出された。HIV 増殖を阻害するよう改変した細胞由来因子をヒト iPS 細胞に導入し、恒常的発現に成功した。アカゲザル皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立、これを血液系幹細胞にまで分化誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We carried out this study in order to obtain basic information on the prevention of virus infection by novel therapies and on the development of therapeutic drugs against human retroviral infectious diseases utilizing human and macaque iPS cells. We introduced the HIV-1 gp160 membrane glycoprotein gene into human iPS cells, and obtained high expression of the gene. Remarkable cellular immunity was induced in HIV-1 gp160-iPS cells-inoculated mice. Thus we showed the feasibility of human iPS cells as a vector with superior performance for novel AIDS vaccines. We introduced into human iPS cells modified cellular factors engineered to inhibit the propagation of HIV, and succeeded to establish cell lines constitutively expressing either of the genes. We established iPS cells from rhesus monkey dermal fibroblasts, and succeeded to differentiate them to stem cells of blood lineage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	0	7,600,000
2010年度	3,500,000	360,000	3,860,000
2011年度	3,500,000	360,000	3,860,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	720,000	15,320,000

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：エイズ、HIV、移植・再生医療、ウイルス、感染症

1. 研究開始当初の背景

エイズ(後天性免疫不全症候群)と ATL(成人T細胞白血病)はヒトの2大レトロウイルス感染症である。エイズの病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV)のこれまでの感染者数は全世界で6千万人を越えており、今も感染が着実に広がっている。最近のHAART療法の確立により患者の生命予後は著しく改善したものの、依然根治の見通しは厳しく、治療薬に対する耐性ウイルスの出現も問題となっている。従って、ウイルスの持続感染機構と発症機序を明らかにし、有効な対策を立てることは重要かつ緊急の社会的要請となっている。一方、ATLは本邦を流行国の一つとする、HTLV-1(ヒトT細胞白血病ウイルス)の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性T細胞腫瘍である。今後120万人のキャリアから約10~20万人のATLの発症が推定されるにも関わらず、現時点では有効な治療手段・発症予防法が全く知られていないことから、本疾患の克服は我が国の医療行政上の極めて重要な課題である。

近年、京都大学の山中伸弥らは、遺伝子工学的手法を用いて、分化しきった細胞から多能性幹細胞(iPS細胞)が誘導できることを発表した。iPS細胞は種々の細胞に分化可能であり、同様の特性を有する胚性幹細胞(ES細胞)が持つ倫理的問題を回避でき、拒絶反応の無い自家細胞移植治療が可能なることから、臨床応用面で大きな期待を集めている。また、iPS細胞は研究ツールとしてきわめて魅力的な方法論を提供する。これは“感染トロピズム、つまり標的を厳密に選択する種特異性や組織特異性”を特徴とするウイルスの研究には特に有用と考えられ、この方法を用いることにより、ウイルス学の抱える多くの諸問題が飛躍的に解決するとともに発展し、エイズ、ATL、肝炎など、難治性の多くのウイルス感染症に対する予防治療手段が見出されると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、近年開発されたiPS細胞を利用して、ヒトレトロウイルスの宿主との相互作用、病原性、潜伏・持続感染、宿主抵抗性、感染感受性、抗ウイルス免疫反応(先天性、後天性)などのウイルス学上の大きな諸問題を明らかにし、ワクチン及び新規免疫療法による感染予防と治療薬を開発し、更に臨床応用に備えた実用化のための基盤情報を得ることを狙いとしている。

3. 研究の方法

山中4遺伝子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)法によりヒトiPS細胞を樹立し、CD4陽性Tリンパ球やマクロファージなどの造血系細胞・組織への分化を誘導する。その過程でこれらに指向性を示すヒト特異的レトロウイルス(HTLV-I, HIV-1)を感染させ、その分子機構を解明する。同時に、iPS細胞を一定の分化方向にコミットさせた段階で、免疫不全マウスNOGのリンパ組織、肝臓、子宮、直腸、髄液中などにこれらの細胞を移植し、組織への生着と分化を誘導することで、組織特異的感染モデルマウスを樹立する。さらに、iPS細胞そのもの、またはCD4陽性Tリンパ球に分化後、我々が同定したいくつかのHIV-1抵抗性遺伝子、HEXIM1、Cyclin K/CPR、Brd4、Arp2/3 complex、Naf1等や、よく知られているAPOBEC、TRIM5、Tetherin、さらにはコレセプターCCR5のHIV感染抵抗性変異遺伝子Δ32-CCR5を導入する。この細胞のウイルス抵抗性を確認するとともに、HLAの異なる多数の個人から同様に抵抗性iPS細胞を作製し、HIV-1感染症とエイズに対するテラーメードの細胞治療ライブラリー構築の基本データとする。一方、アカゲザルやカニクイザルからのiPS樹立を試み、同様にSIV感染の実験系を立ち上げる。

4. 研究成果

現在までに様々なエイズワクチンが研究されているが、未だ有効なHIV-1ワクチンの開発には至っていない。そのため、新規ワクチン開発は重要である。近年、iPS細胞を用いたワクチン研究が報告され、iPS細胞の新たな可能性として注目されている。我々はヒトiPS細胞には未知の免疫誘導能があると仮定し、この免疫誘導能がHIV-1ワクチンベクターとして有用かを検討した。モデル抗原としてHIV-1 gp160をアデノウイルスベクターを用いてヒトiPS細胞に導入し、ヒトiPS細胞ワクチンとした。その結果、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入はヒトiPS細胞における高効率な抗原遺伝子発現が可能であり、異常な分化を引き起こさないことが認められた。また、モデル抗原としてHIV-1 gp160を発現するヒトiPS細胞の分化と複製を抑え安全性を高めるために、放射線処理又はホルマリン処理をし、両者の免疫誘導能を確認するため、このワクチンをBALB/cマウスの皮下に投与し抗原特異的な免疫応答をテトラマー法および細胞内サイトカイン染色法及びウエスタンブロット法を用い評価した。その結果、放射線処理したヒトiPS細胞ではホルマリン処理をしたヒトiPS細胞と比較して、顕著にHIVgp160抗原に対する細胞性免疫が誘導された。また、マイクロアレ

イを用いた包括的遺伝子発現解析により、放射線処理したヒト iPS 細胞からは IL-1 や IL-18 などの炎症性サイトカインが分泌されることが示された。本研究により、ヒト iPS 細胞が新たなエイズワクチンのすぐれたベクターとして活用できる可能性が見出された(雑誌論文①)。

HIV の増殖を阻害するよう改変した細胞由来因子(APOBEC3G D128K と Super)をレンチウイルスベクターにてヒト iPS 細胞に導入した後、薬剤選択により、これらの因子を恒常的に発現するヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。

HIV のセカンドレセプターである CCR5 を標的とし、体細胞における CCR5 ノックアウト細胞(HIV 感染抵抗性細胞)の樹立に向けた研究を実施した。HIV インテグラーゼ結合因子である LEDGF のインテグラーゼ結合ドメインと CCR5 標的亜鉛フィンガータンパク質の融合遺伝子を構築し、エレクトロポレーション法を用いて HeLa-CCR5 細胞に導入した。結果としては極くわずか細胞の CCR5 発現低下が見られたものの、導入効率が極めて低く、今後の更なる改良が必要であると考えられる。

iPS 細胞の技術を用いて感染モデル細胞系の構築を試みるため、アカゲザル皮膚線維芽細胞に山中 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立、これを分化誘導し、Rhesus Stem Cell (RSC) を樹立した。本細胞は EBV や RSV などの各種のウイルスに感染し、感染性ウイルスを産生することを明らかにした。今後 SIV 感染を実施する予定である。

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 5 件)

- ①Shinji Yoshizaki, Mayuko Nishi, Asami Kondo, Yoshitsugu Kojima, Naoki Yamamoto, Akihide Ryo, Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, Vol.2, 2011, Article 27: pp.1-8
DOI: 10.3389/fmicb.2011.00027

- ②Wataru Nomura, Akemi Masuda, Kenji Ohba, Arisa Urabe, Nobutoshi Ito, Akihide Ryo, Naoki Yamamoto, Hirokazu Tamamura, Effects of DNA binding of the zinc finger and linkers for domain fusion on the catalytic activity of sequence-specific chimeric recombinases

determined by a facile fluorescent system, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 51, Issue 7, 2012, 1510-1517

DOI: 10.1021/bi201878x

- ③Mika Arakawa, Reiko Okamoto-Nakagawa, Shoichi Toda, Hiroyuki Tsukagoshi, Miho Kobayashi, Akihide Ryo, Katsumi Mizuta, Shunji Hasegawa, Reiji Hirano, Hiroyuki Wakiguchi, Keiko Kudo, Ryota Tanaka, Yukio Morita, Masahiro Noda, Kunihisa Kozawa, Takashi Ichiyama, Komei Shirabe, Hirokazu Kimura, Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan, *Journal of Medical Microbiology*, 査読有, Vol. 61, Pt.3, 2012, 410-419

DOI: 10.1099/jmm.0.035006-0

- ④Kanji Endoh, Mayuko Nishi, Hitoshi Ishiguro, Hiroji Uemura, Yohei Miyagi, Ichiro Aoki, Hisashi Hirano, Yoshinobu Kubota, Akihide Ryo, Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis, *Prostate*, 査読有, Vol.72, Issue 6, 2012, 626-637

DOI: 10.1002/pros.21466

- ⑤Ayako Yoshida1, Naoko Kiyota, Miho Kobayashi, Koichi Nishimura, Rika Tsutsui, Hiroyuki Tsukagoshi, Eiko Hirano, Norio Yamamoto, Akihide Ryo, Mika Saitoh, Seiya Harada, Osamu Inoue, Kunihisa Kozawa, Ryota Tanaka, Masahiro Noda, Nobuhiko Okabe, Masato Tashiro, Katsumi Mizuta, Hirokazu Kimura, Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010, *Journal of Medical Microbiology*, 査読有, Vol.61, Pt.6, 2012, 820-829

DOI: 10.1099/jmm.0.041137-0

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪井 弘治 (SAKAI KOJI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・
主任研究官
研究者番号：60260270
(H21：分担研究者)

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・
センター長
研究者番号：00094053
(H21：研究代表者)

(2)研究分担者

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)
横浜市立大学・医学部・教授
研究者番号：20363814
武田 哲 (TAKEDA SATOSHI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・
研究員
研究者番号：50396959