

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19909

研究課題名（和文）エピソーマルRNAウイルスベクターによるエピゲノム摂動を探索

研究課題名（英文）Exploring epigenomic perturbation by an episomal RNA virus vector

研究代表者

朝長 啓造（TOMONAGA, Keizo）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：10301920

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、ボルナ病ウイルスを基盤に開発したRNA型エピソーマルウイルスベクター-REVecによるエピゲノム摂動を明らかにすることを目的に実施された。ウイルス由来エピソーマルRNAによるエピジェネティクス制御を探究するために、以下の2項目を実施した。1）REVec導入による幹細胞のエピゲノム摂動の解明。2）REVec エピゲノム摂動の幹細胞分化への影響の検証。1）では、REVecを導入した間葉系幹細胞を作製し、分化誘導と導入幹細胞の生化学的性状を解析した。2）では、REVec導入間葉系幹細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析し、未分化マーカーの発現やがん化に関する試験を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来遺伝子を発現するウイルスベクターを生体に導入するためには、その毒性を可能な限り排除しなくてはならない。しかしながら、これまでウイルスベクターによる細胞のエピジェネティックな変化（エピゲノム摂動）を「毒性」として捉え詳細に検証した研究はない。本研究では、遺伝子再生治療や再生医療に応用されている幹細胞をターゲットとして、ベクター導入におけるエピゲノム変化の探索を実施した。本研究の成果により、RNAウイルスベクター導入による幹細胞の分化と生化学的性状が明らかとなり、エピゲノム変化との関連性が示唆された。今後の継続した解析によりウイルスベクター導入による影響の検証が可能となった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate epigenomic perturbation by REVec, an episomal RNA-based viral vector developed from the Borna disease virus. To explore the regulation of epigenetics by virus-derived episomal RNA, the following two points were performed: 1) elucidate the epigenomic perturbation of stem cells by REVec transduction; 2) examine the effect of REVec epigenomic perturbation on stem cell differentiation; in 1), REVec-transduced mesenchymal stem cells were generated and in 2), we analyzed gene expression changes in REVec-transfected mesenchymal stem cells by microarray and tested for expression of undifferentiated markers and oncogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルスベクター 幹細胞 遺伝子治療 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は未来医療の大きな柱である。なかでも、幹細胞を用いた遺伝子細胞治療は、中枢神経系疾患、代謝異常症、固形癌など、根治的治療が難しい疾患に効率的な遺伝子治療を提供できると期待されている。現在、遺伝子治療に用いられているウイルスベクターは、主にレンチウイルス（LeV）とアデノ随伴ウイルス（AAV）由来のベクターである。これらのウイルスベクターは、現在、種々の疾患への適用が検討され、非臨床研究においてその有効性も実証されている。しかしながら、高度の安全性と持続性が求められる幹細胞での遺伝子発現にこれらウイルスベクターは必ずしも適しているとはいえない[1]。その理由として、LeV ベクターは、予期せぬゲノム傷害性があり、幹細胞の癌化が危惧されている。また、遺伝子サイレンシングが起こりやすく、遺伝子発現の消失も問題である。一方で、AAV ベクターは分化増殖する細胞では希釈されるため発現が低下する。また、抗体や細胞傷害性 T 細胞により不活化され、生体では徐々に発現効果が落ちるといった難点がある。すなわち、現状において幹細胞に安全かつ安定して遺伝子導入できるスタンダードベクターは存在していないと言える。

研究代表者が開発を進めている REVec（RNA virus-based episomal vector）は、マイナス鎖一本鎖の RNA をゲノムに持つボルナ病ウイルスを利用した新規の RNA ウイルスベクターである。ボルナ病ウイルスのゲノム RNA は、感染細胞の核内でエピソーマル RNA を形成し、細胞周期を通して染色体上に局在する。この性状により、ボルナ病ウイルスは核内で安定した持続感染を維持することができる[2,3]。このボルナ病ウイルスの性状を利用した REVec は、エピソーマル RNA として核内で遺伝子発現を行う。そのためゲノム傷害性がなく、遺伝子サイレンシングも受けない。また、分裂染色体とともに娘細胞の核へと安定に運ばれるため、分化増殖細胞でも持続的な遺伝子発現が可能である[4]。これまでの研究から、REVec は間葉系幹細胞や造血幹細胞などの体性幹細胞に加え、多能性幹細胞である iPS 細胞への安定した遺伝子導入が可能であり、iPS 細胞への導入効率と持続性は既存のウイルスベクターを凌駕していることを報告している[5,6]。また、改良を進めることで REVec が幹細胞を用いた遺伝子細胞治療における最適なウイルスベクターとなることを示してきた[7-13]。一方で、幹細胞導入における REVec の安全性については解決すべき課題がまだまだ多く残っている。

## 2. 研究の目的

これまでの研究開発において、研究代表者はボルナ病ウイルス由来の新規ウイルスベクター REVec が、既存の他のウイルスベクターと比べて幹細胞への遺伝子導入に最適な性状を持つ革新的ウイルスベクターであることを示してきた。一方で、REVec の幹細胞への毒性については、不明な点が多く残されている。特に、REVec 由来のエピソーマル RNA が細胞にどのような影響を与えているのかが重要な課題となっている。そこで本研究では、REVec の幹細胞への持続導入による遺伝子変動を含むエピゲノム摂動を明らかにすることを目的にした。本研究は、幹細胞遺伝子治療ベクターとしての REVec の安全性と有効性を検証するとともに、エピソーマル RNA によるエピジェネティクス制御というウイルスの新しいエピゲノム制御機構の解明が目標である。

## 3. 研究の方法

本研究では、幹細胞への REVec の持続導入によるエピゲノム解析を実施するために、まずは REVec を間葉系幹細胞に導入する技術的確立を行うとともに、REVec 導入間葉系幹細胞の安全性評価について、エピジェネティクスを中心に解析を進めた。本研究で設定した 2 つの達成目標「REVec 導入による幹細胞のエピゲノム摂動の解明」と「REVec エピゲノム摂動の幹細胞分化への影響の検証」において検討した主な方法について記載する。

(1) REVec 導入幹細胞の作製: 間葉系幹細胞は由来組織によって細胞の性状が大きく異なるため、骨髄・皮下脂肪・臍帯血由来間葉系幹細胞における REVec の導入効率と遺伝子発現の持続性を

ルシフェラーゼにより評価した。

(2) REVec 導入幹細胞のトランスクリプトームならびにエピゲノムの解析：REVec 導入間葉系幹細胞の RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析を実施し、REVec 導入前後での変動を解析した。

(3) REVec 導入ヒト由来間葉系幹細胞のがん化リスク解析：REVec 導入間葉系幹細胞における染色体異常の核型、ベクターゲノムのインテグレーションを PCR 法にて検出した。

(4) REVec 導入間葉系幹細胞のラット脳内への移植：骨髄由来間葉系幹細胞にルシフェラーゼ搭載 REVec を導入し、 $10^5$  cell/kg で免疫抑制剤を処置後の野生型ラットに脳実質内投与により移植した。

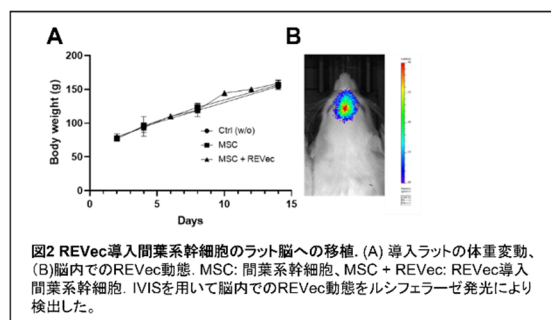
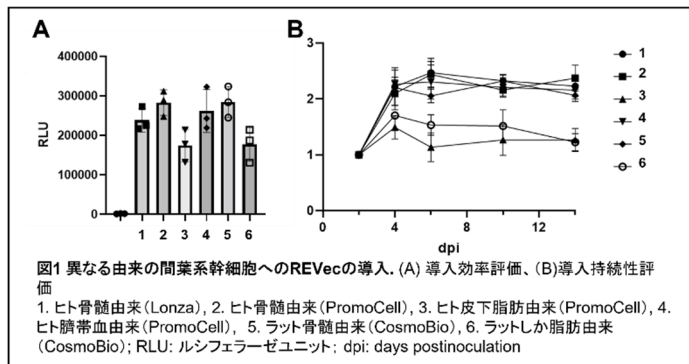
#### 4. 研究成果

2 年間の研究期間において、まずは解析の材料となる REVec 導入間葉系幹細胞の樹立を行った。様々な由来にヒト間葉系幹細胞に REVec の導入を試みた結果、皮下、骨髄および臍帯血由来間葉系幹細胞のいずれもおいても REVec の導入効率が高いことが示された (図 1A)。またの間葉系幹細胞においても少なくとも 2 週間は目的遺伝子の発現を維持できることが明らかとなった (図 1B)。REVec 導入間葉系幹細胞を用いて、その分化誘導能を解析したところ、REVec 導入間葉系幹細胞は非導入細胞と同等の分化能を示した[5]。そこで、REVec 導入間葉系幹細胞を以後の解析に供した。マイクロアレイならびに RNA-seq 解析により GFP 発現 REVec を導入した間葉系幹細胞の遺伝子発現の解析を行うとともに、ChIP-seq およびによるエピゲノム解析を実施した。現在までに解析は終了しているものの、詳細なデータ分析が不十分である。今後引き続きデータ分析を進め、REVec 導入において変動がみられる遺伝子発現を解析する。また、エピゲノム解析のための ATAC-seq 解析も準備中である。

一方で、REVec 導入間葉系幹細胞のがん化に関する性状を調べるために、染色体異常の核型とベクター

ゲノムのインテグレーションを PCR 法にて検出した。その結果、REVec 導入間葉系幹細胞において染色体異常の核型は認められず、またゲノムにおける REVec 配列の挿入も確認することはできなかったことから、REVec 導入による細胞のがん化リスクは低いと評価された。

さらに本研究では、in vivo における REVec 導入間葉系幹細胞の安全性を確認するために、ラット脳内への REVec 導入間葉系幹細胞の移植を試みた。間葉系幹細胞にルシフェラーゼ搭載 REVec を導入し、免疫抑制剤を処置後のラットに移植した結果、少なくとも 2 週間は遺伝子発現を検出した (図 2AB)。間葉系幹細胞移植後の個体の体重変動は、コントロールと比較し有意な差は認められなかった。今後はこのラットを用いて in vivo における、REVec 導入間葉系幹細胞の毒性評価を進める予定である



<引用文献> 1. Kotterman MA et al., Annu Rev Biomed Eng (2015), 2. Matsumoto et al., Cell Host Microbe (2012), 3. Hirai Y et al., J Biol Chem (2016), 4. Daito T et al., J Virol (2011), 5. Ikeda Y et al., Gene Ther (2016), 6. Komatsu et al., Mol Ther Methods Clin Dev (2019), 7. Honda T et al., Sci Rep (2016), 8. Tokunaga et al., Antiviral Res (2017), 9. Fujino K et al., Microbial Immunol (2017), 10. Sakai M et al., Microbial Immunol (2018), 11. Yamamoto et al., Front Microbiol (2019), 12. Komatsu Y., Microbial Immunol (2020), 13. Komatsu Y., Sci Rep (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Garcia Bea Clarise B., Horie Masayuki, Kojima Shohei, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 65
2. 論文標題 BUD23-TRMT112 interacts with the L protein of Borna disease virus and mediates the chromosomal tethering of viral ribonucleoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 492 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12934	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 Yanai Mako, Sakai Madoka, Komorizono Ryo, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 66
2. 論文標題 Stability of Borna disease virus based episomal vector under physical and chemical stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12946	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 Kanda Takehiro, Sakai Madoka, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 103
2. 論文標題 Exogenous expression of both matrix protein and glycoprotein facilitates infectious viral particle production of Borna disease virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001767	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 Kanda Takehiro, Tomonaga Keizo	4. 巻 14
2. 論文標題 Reverse Genetics and Artificial Replication Systems of Borna Disease Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2236 ~ 2236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14102236	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keizo Tomonaga
2. 発表標題 A novel intranuclear RNA vector system targeting stem cells and the central nervous system.
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanda T, Sakai M, Makino A, Tomonaga K.
2. 発表標題 Additional expression of matrix protein and glycoprotein facilitates infectious virus production of Borna disease virus 1.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Garcia BCB, Horie M, Kojima S, Tomonaga K.
2. 発表標題 BUD23-TRMT112 mediates the chromosomal tethering of Borna disease virus 1 and catalyzes the m7G methylation of the viral RNA.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Pauline Santos, Dirk Hoper, Martin Beer, Dennis Rubbenstroth, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Establishment of a reverse genetics system for Borna disease virus 2.
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 Unsteady elongation at 3' terminal of genomic RNA determines replication efficiency of Borna disease.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学医生物学研究所 <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/</a> 京都大学医生物学研究所朝長研究室 <a href="https://t.rnavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/">https://t.rnavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/</a>
---

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
---------	---------