

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15145

研究課題名(和文)光制御麻疹ウイルスベクターの開発

研究課題名(英文)DEVELOPMENT OF OPTICAL CONTROLLABLE NOVEL MEASLES VIRUS VECTOR

研究代表者

田原 舞乃(TAHARA, MAINO)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：10572109

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)：麻疹ウイルスは、癌治療、再生医療などの最先端医療研究において不可欠になっている。麻疹ウイルスベクターの利点は、細胞のゲノムに障害を与えることなく効率的に外来遺伝子を発現できる点、特定の細胞に感染させる標的化が出来る点などである。申請者らは従来のもより効率よくiPS細胞を樹立出来る麻疹ウイルスベクターを開発した。

ウイルスのベクターとしての有用性は充分に実証されているが、必要なタイミングでウイルスが増殖し、それ以外では増殖を停止させるような増殖制御可能なウイルスベクターはどのウイルス種でも成功していない。申請者は光に応答して増殖する麻疹ウイルスの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Measles virus (MeV) vector can transfer multiple genes into human cells efficiently without affecting the host genome. We recently have developed novel MeV gene transfer vector which is non-transmissible, can transfer multiple genes simultaneously. We could successfully generate induced pluripotent stem cells from human fibroblasts or peripheral blood T cells using this vector.

Although MeV as gene transfer vector is clearly beneficial, no method has been developed to control viral growth. We set out to design a method of controlling viral growth. Now, we developed optically controllable MeV. We believe our new optically controllable MeV vector has the potential to revolutionize gene transfer technologies.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス ウイルスベクター 遺伝子治療 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

麻疹ウイルスは、癌治療、再生医療などの最先端医療研究において不可欠になっている。麻疹ウイルスベクターの利点は、細胞のゲノムに障害を与えることなく効率的に外来遺伝子を発現できる点、特定の細胞に感染させる標的化が出来る点などである。麻疹ウイルスはその病原性について多くの知見が存在し、中和抗体、感染阻害ペプチド、効果的なワクチンが存在するなど、臨床応用に向けての基盤を有するウイルスである。そのため「腫瘍溶解性ウイルス」として既に臨床研究が行われている。しかしその遺伝子発現の特性により、遺伝子導入用ベクターとして多数の外来性遺伝子を発現することが困難であった。申請者らは、麻疹ウイルスゲノムを分節化するという画期的な発想により多数遺伝子の同時発現に世界で初めて成功し、この多遺伝子発現技術を用いてヒト血球細胞から直接、『基底状態様』人口多能性幹 (iPS) 細胞を作成することに成功した (特許出願済 PCT/JP2015/081145)。ヒト『基底状態様』iPS 細胞とは、従来のヒト iPS 細胞よりも、一段階初期化の進んだヒト iPS 細胞である。未分化かつ均一な状態での培養維持が容易であり、iPS 細胞の汎用性を飛躍的に高めることが期待されている。このベクターは、申請者のこれまでの麻疹ウイルスの研究知見に従い、複数のウイルスタンパク質を遺伝子改変することで、非伝播型で細胞障害性を低く抑え、全てのヒト有核細胞への遺伝子導入を可能にした、従来の他のウイルスベクターの性能を凌駕する画期的なウイルスベクターである。

ウイルスのベクターとしての有用性は充分に実証されているが、必要なタイミングでウイルスが増殖し、それ以外では増殖を停止さ

せるような増殖制御可能なウイルスベクターはどのウイルス種でも成功していなかった。例えばゲノムへの組み込みを目的としたレトロウイルスを用いた場合には、ゲノムへの組み込みが完了した後もウイルスが残存し、副作用を引き起こすことがあった。また、一過的な遺伝子発現を目的としてアデノウイルスやアデノ随伴ウイルスを用いた場合であっても、体内の様々な組織においてウイルスが残存すること、また既にヒトに感染して潜伏しているウイルスとの間で、ベクターレスキューが生じる危険性も指摘されている。

必要なタイミング・場所だけでベクターが増殖し、それ以外では増殖を停止させ、効率よく細胞から排除できるような性質をウイルスに付与することができれば、従来のベクター性能をはるかに凌駕し、再生医療研究、遺伝子治療研究を革新的に進める究極のツールになる。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞作製等の再生医療研究、遺伝子治療研究分野では、増殖を正確に制御できるウイルスベクターの開発が強く望まれているが、そのようなベクターは、未だ開発されていない。ウイルスベクターが役割を終えた後、細胞から除去する技術については、siRNA などを導入する方法がとられている。しかし、siRNA の導入によって細胞に障害を与える可能性も指摘されている。よってそのまま細胞が増殖し、ウイルスベクターが希釈されるまで待つ、といった消極的な方法が一般的である。また、熱感受性ウイルスベクターも報告されているが、排除効率が悪く、細胞への障害の可能性も否定できない。本研究では光照射によって

増殖をコントロールできる麻疹ウイルスベクターの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

これまで生命科学分野に利用されてきた光応答性タンパク質は、光を受容する部分が特殊な化学基であったため、ウイルスタンパク質に融合させる事は考えにくかった。また、ウイルスタンパク質と融合させた場合にその構造を変化させる程の構造変化を起こすものは報告されていなかった。2012年に、Dronpa というタンパク質がタンパク質自体で光応答性を示し、さらに変異を入れる事でダイナミックな構造変化を起こす事が報告された(Xin X. Zhou et al. 2012 Science)。この論文中で筆者らは、Dronpa とプロテアーゼを融合させて、プロテアーゼの活性を光で制御する方法を開発しており、本研究のアイデアの基礎となっている。本研究では、麻疹ウイルスの複数の機能ドメインを含むウイルスタンパク質の外来遺伝子導入可能部位に Dronpa を様々な方法で挿入した。

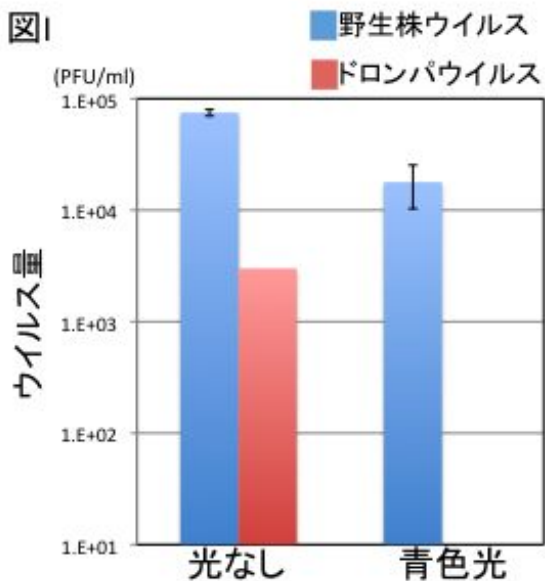
### 4. 研究成果

Dronpa はサンゴ由来の新規の蛍光タンパク質であり、変異を加えることで、青色光が当たった場合に構造変化する事が報告されている。

まずウイルスタンパク質を外来遺伝子導入可能部位で2つに分離し、各末端にDronpaを付加した。このとき2つに分離したウイルスタンパク質には自動的に相互作用する力はない。ところが、GCN4など二量体を形成するタンパク質をそれぞれに付加してやると、GCN4が会合するのにあわせてウイルスタンパク質として機能する

ようになることが報告されている。この知見を基にGCN4の代わりにDronpa遺伝子を相互作用ドメインとして機能させた。この場合、ウイルスゲノムを2分節にする事になるが、麻疹ウイルスゲノムの分節化には申請者らが既に成功しており、麻疹ウイルスにとって問題ない事は既に証明している。これは麻疹ウイルスが本来の性質として粒子中にゲノムを複数本持つためであると考えられている。最近申請者が開発した従来のベクターより効率の良いiPS細胞作製麻疹ウイルスベクターも2分節化の技術を用いている。この方法のDronpaのウイルスを作製したが、ウイルスが回収できなかった。Dronpa同士の結合力がGCN4に比べて低すぎる為だと考えられた。

そこで、ウイルスタンパク質を2つに分離せずに、外来遺伝子導入可能部位にDronpaを挿入したウイルス(ドロンパウイルスとする)を作製した。このウイルスの回収には成功した。ドロンパウイルスは野生株のウイルスに比べて少々増殖スピードが遅いものの、効率よく細胞で増殖した。細胞に青色光を当てた場合ウイルス増殖が止まった(図1)。つまり増殖をコントロールできる麻疹ウイルスの作製に成功した。ただし、ウイルス増殖を止めるのに必要な光量が強すぎ、細胞にも負担がかかっており、実用化には向いていないと思われた。今後はDronpaより弱い光で増殖をコントロールできるウイルスを作製することを目標にする。ドロンパウイルスの作製に成功したことから、ウイルスタンパク質の改変方法はこの方法で進め、Dronpaなどの光応答タンパク質の改変を検討する。



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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 1件)

名称：ウイルスベクター、細胞およびコンストラクト

発明者：谷憲三郎、竹田誠、平本貴史、田原舞乃

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2015/081145

出願年月日：2015年11月5日

国内外の別：国際特許

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 舞乃 (TAHARA, Maino )

国立感染症研究所ウイルス第3部主任研究官

研究者番号：10572109

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし