

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15319

研究課題名(和文)自己削除型レンチウイルスベクターによる遺伝子治療の開発

研究課題名(英文)Development of gene therapy using self-destructive lentivirus vectors

研究代表者

林 日出喜(HAYASHI, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：10218589

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)：ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を利用した自己削除型レンチウイルスベクターによる遺伝子治療法開発のため、構築したベクターのTet-誘導性のベクターの除去を検討した。複雑なベクター構造のため、Tet-誘導性の除去ができなかった。

本課題の実践的な目的は、レンチウイルスベクターによるゲノム上の原因ウイルス遺伝子の除去と、その際使用したベクターの除去である。そのため、レンチウイルスベクターによる標的ウイルス遺伝子の除去後に、宿主細胞のゲノムに組み込まれにくいAAV(アデノ随伴ウイルス)ベクターを使い、ゲノムに組み込まれたレンチウイルスベクターの除去を行う方法へと変更し、一定の除去が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1、HBV、HIV等のウイルスは感染すると、宿主細胞ゲノムにウイルス遺伝子を組み込み、それぞれATL(成人T細胞白血病)、B型肝炎、AIDSの原因となる。近年、ゲノム上のこれらの遺伝子構造が明らかにされたので、ゲノム編集技術を用いこれらのウイルス遺伝子を除去する治療法を検討した。自己削除型のレンチウイルスシステムを構築したが、試薬誘導による削除ができなかった。そのため、まずレンチウイルスベクターで標的ウイルス遺伝子の除去を行い、次にAAV(アデノ随伴ウイルス)ベクターによりこのゲノム上のレンチウイルスベクターを除去する方法へと変更し、一定の除去が可能となったことは大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)： We have constructed self-destructive lentivirus vector system for gene therapy against some virus infections integrating their genes into the host genome. However, the lentivirus vector integrated into the genome was not removed by the Tetracycline treatment.

To achieve a practical goal, we first remove the virus gene from the host genome using a lentivirus vector system, and subsequently removed the lentivirus vector from the host genome using AAV (adeno-associated virus) vector system that is not integrated into the host genome generally. The lentivirus was successfully removed from the host genome with some efficacy, though the system was not self-destructive.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 自己削除型レンチウイルスベクター AAV(アデノ随伴ウイルスベクター)ベクター CRISPR/Cas9 遺伝子治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の発達により、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 システムを使い特異的な遺伝子のノックアウトが比較的容易になった(参考文献1を参照)。AIDS(Acquired immune deficiency syndrome)の治療のため、このシステムを用い、細胞ゲノムに組み込まれた HIV(Human immunodeficiency virus)のLTR(long terminal repeat)を標的とした single-guide RNA(sgRNA)により HIV を除去する方法が報告された(文献2、3)。しかしながら、遺伝子導入効率の高いレンチウイルスベクターを用いた場合、ベクターそのものが、細胞のゲノムに組み込まれたまま残り、副作用が懸念される(文献4、5)。

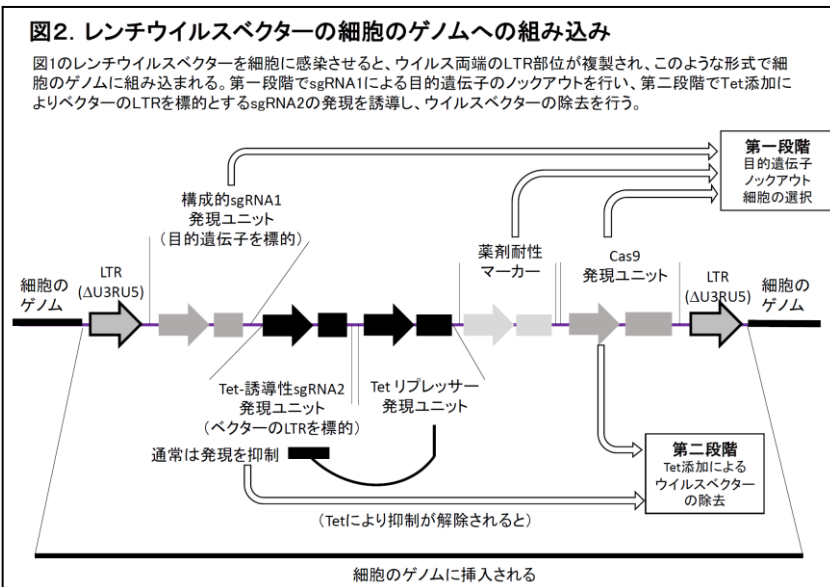
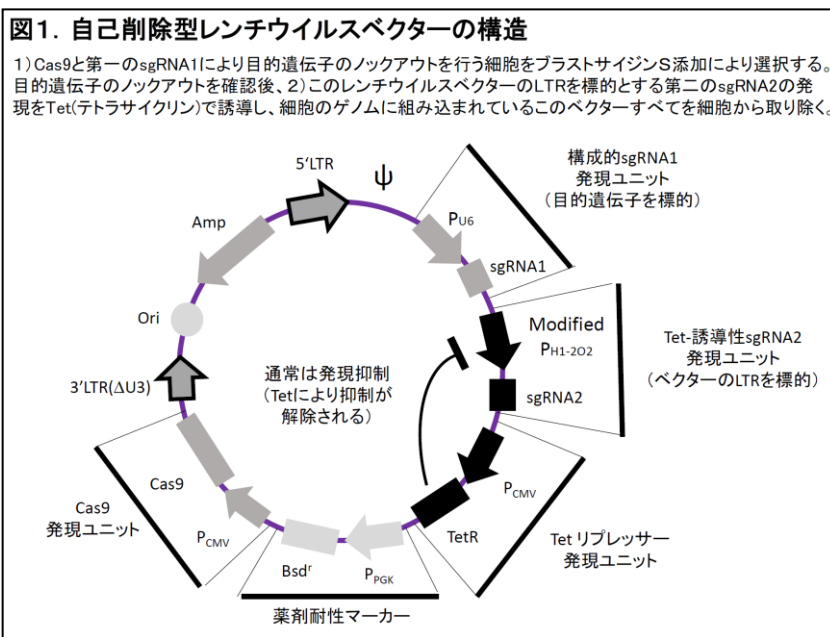
そこで、我々は自己削除型レンチウイルスベクター(図1、図2参照)を開発している。まず Cas9 と目的遺伝子を標的とする第一の single-guide RNA(sgRNA1)により目的遺伝子のノックアウトを行う。次にレンチウイルスベクターのLTRを標的とする第二の sgRNA(sgRNA2)の発現誘導を行い、細胞ゲノムに組み込まれたレンチウイルスベクターを取り除くという二段階の方法である。

参考文献

- 1)Hsu-PD et al, Cell 157:1264-78 (2014).
- 2)Ebina-H et al, Sci Rep 3:2510 (2013).
- 3)Hu-W et al, Proc Natl Acad Sci USA 111:11461-6 (2014).
- 4)Papayannakos-C & Daniel-R, Gene Therapy 20:581-8 (2013).
- 5)Chira-S et al, Oncotarget 6:30675-703 (2015).
- 6)Albertson-DG, Trends Genet 22:447-55 (2006).

2. 研究の目的

ウイルス感染症の中で、HTLV-1(Human T-cell Leukemia Virus-1)、HBV(Hepatitis B virus)、HIVはヒトの細胞に感染すると、細胞ゲノムのランダムな場所にウイルス遺伝子が組み込まれ、それぞれ ATL(Adult T-cell Leukemia)、B型肝炎、AIDS を発症させる原因と



なる。これらの感染症の遺伝子治療法として、細胞ゲノムに組み込まれた、HTLV-1、HBV、HIV ウイルス遺伝子を標的とする自己削除型レンチウイルスを作成し、細胞ゲノムから HBV、HIV の除去、次に Tet によりウイルスベクターの除去をすることが当該研究の目的である。

3. 研究の方法

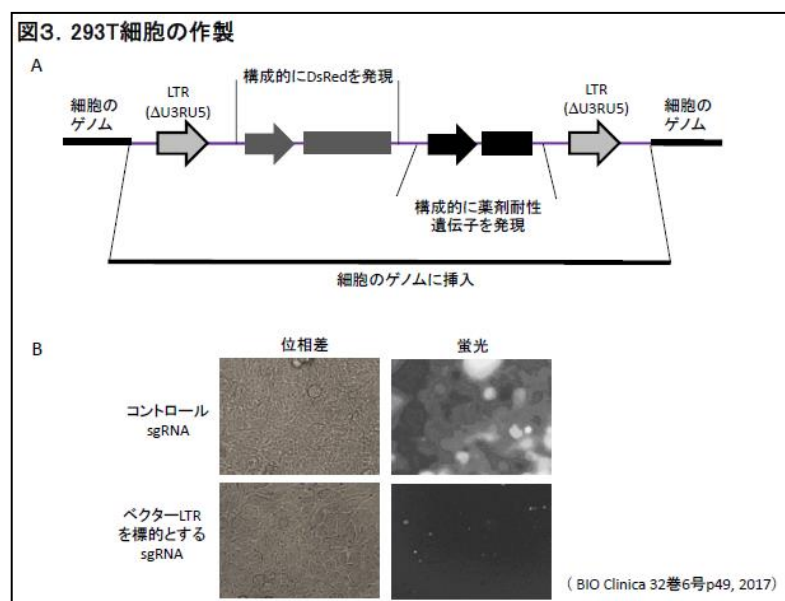
(1) 前項の図 1 に示した自己削除型レンチウイルスベクターの構築を行った。ベクターのサイズは、それぞれ、U6 による構成的 sgRNA1 発現ユニット:0.4kb、改変 H1-202 による Tet-誘導性 sgRNA2 発現ユニット:0.3kb、Tet リプレッサー発現ユニット:1.3kb、薬剤耐性マーカー:0.9kb、Cas9 発現ユニット:4.9kb で、合計 7.8kb と組み換えレンチウイルスに入ることのできる大きさとした。組み換えウイルスのエンベロープは、ヒトの細胞に感染が容易で、高力価のウイルス液が得やすい、VSV (Vesicular Stomatitis Virus)-G を使用した。

(2) この自己削除型レンチウイルスベクター各コンポーネントの機能の確認を行った。標的遺伝子の sgRNA を改変 H1-202 の下流につなぎ Tet-誘導性の GFP の除去を検討した。

(3) 本課題の目的である、レンチウイルスベクターを使った目的ウイルス遺伝子除去の後、使用したレンチウイルスベクターの除去を達成するため、1 つのベクターにすべてのコンポーネントを収めることにこだわらず、宿主細胞のゲノムに組み込まれにくい AAV ベクターも使うことも検討した。

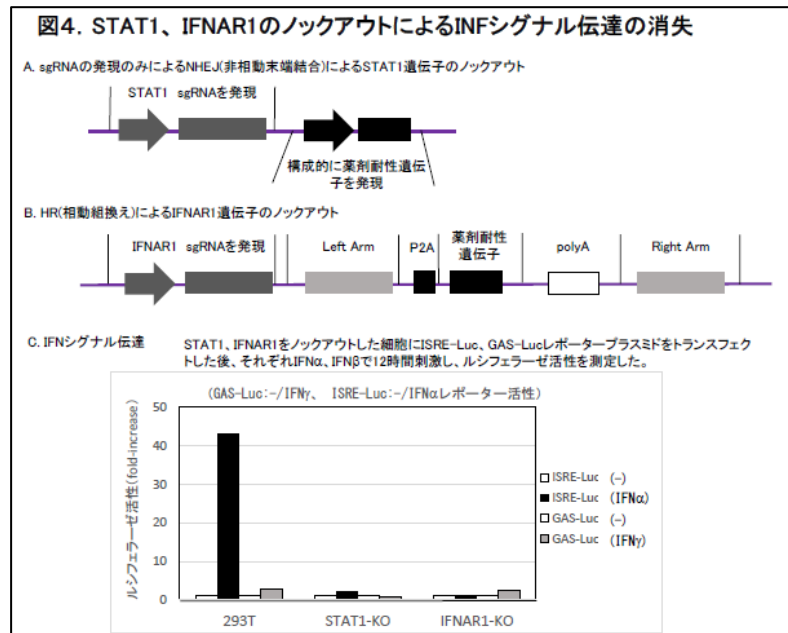
4. 研究成果

(1) 図 1 に示す自己削除型レンチウイルスベクターの構築を行った。まず、この sgRNAs (single-guide RNA) による特異的遺伝子のノックアウトを検討するため、恒常的なノックアウト効果、及び Tet による誘導可能なノックアウトを GFP の蛍光で容易に判定のできる 293T 細胞 (LTR(long terminal repeat)-GFP-LTR、の形で



ランダムにゲノムに組み込み)を作成した(図3、引用文献参照)。これらの細胞に GFP、LTR を標的とする sgRNA を恒常的に発現させ、GFP が除去できることを確認した。次に、ノックアウト効果を sgRNA 発現ユニットを 1~数個タンデムに配列させて検討したところ、異なる箇所を 2 個ターゲットした場合が最も効率よく、ノックアウトできた。さらにノックアウトの方法として、sgRNA による標的遺伝子を切断し、非相同末端結合(NHEJ)する際、切断部位の再接合の仕方によっては標的遺伝子の機能が損なわれないことがあるため(図4A)、ドナーDNA (Left and Right Arms)を供与し相同組み換え(HR)を利用する方法も検討した(図4B)。ドナーDNAによりHRが起こった場合のみ、P2A(Porcine teschovirus, ribosomal skip site)を介して薬剤耐性遺伝子が発現するので、NHEJに比べノックアウトした細胞をより効

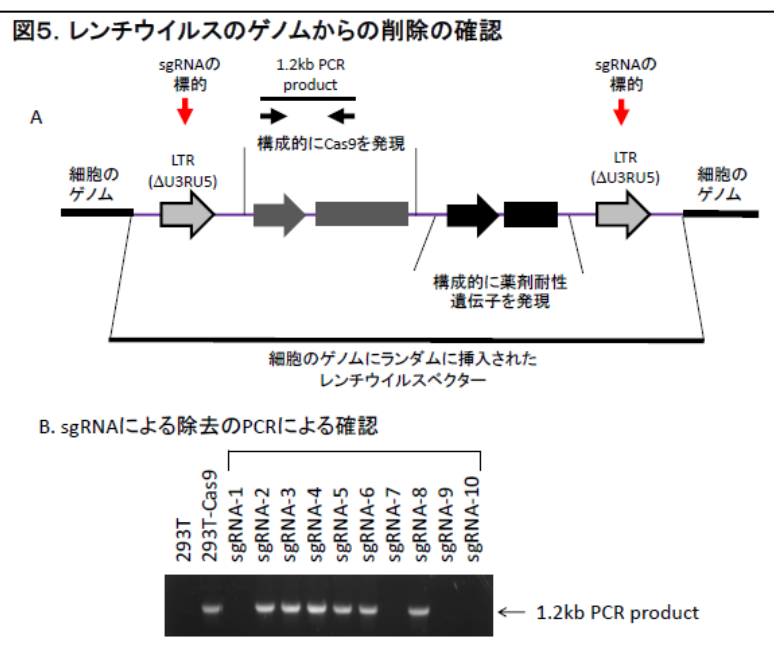
率よく選ぶことができた。実際、STAT1(Signal transducer and activator of transcription 1)、IFNAR1(Interferon alpha/beta receptor 1)等、いくつかの内在性遺伝子のノックアウトができることも確認した。薬剤耐性株の中で、STAT1 遺伝子がKOされた細胞ではインターフェロン(IFN) α 刺激による ISRE(IFN-Stimulated Response Element)-Luc と



IFN γ 刺激による GAS(IFN- γ Activated Site)-Luc レポーター遺伝子両方の活性が、IFNAR1 が KOされた細胞では IFN α 刺激による ISRE-Luc レポーター遺伝子活性のみが消失し、インターフェロン(IFN)シグナル伝達が障害されていることを示している(図4C)。

(2) 標的遺伝子の Tet による誘導性の除去について、sgRNA を改変 H1-202 の下流につなぎ Tet-誘導性の GFP の除去ができるか検討したところ、Tet による誘導性の除去ができなかった。単純なベクター構築の時は TetR による改変 H1-202 プロモーターの発現抑制がかかっていたが、この複雑なベクター構築により、改変 H1-202 プロモーターの発現抑制及び Tet によるこのプロモーターの活性化が充分でなくなった可能性が考えられた。各コンポーネントの機能は確認できたので、誘導性のノックアウトができるよう各コンポーネントのつなぎ方等を再検討したが、良好な結果は得られなかった。

(3) レンチウイルスベクターと AAV ベクターの長所を生かして、レンチウイルスベクターによる目的遺伝子のノックアウトの後に、ゲノムに組込まれたレンチウイルスベクターの除去を行う方法を検討した(図5)。



使い目的遺伝子を効率よくノックアウトできた。その後、このレンチウイルス感染により Cas9 を発現する細胞(292T-Cas9)に、レンチウイルスベクターの LTR をターゲットとした sgRNA を構成的に発現する AAV ベクターを感染させ、薬剤耐性株細胞を独立に 10 個(sgRNA1-10)分離した。それぞれの分離株からゲノム DNA を調整し、Cas9 遺伝子のところを検出する

PCR プローブで PCR をかけ、1.2kb の PCR 産物の有無を調べた。293T 細胞、Cas9 発現細胞 (292T-Cas9) と比較して、sgRNA-1, 7, 9, 10 の 4 株において Cas9 を発現させるレンチウイルスベクターがゲノムから除去されていることがわかる (図 5B)。LTR のいろいろな部位を sgRNA の標的としてみたが、Cas9 を発現させる自己を除去しながらなので、除去の途中で Cas9 の活性が不十分になるためか、レンチウイルスの除去効率はおおむね 20-40% くらいであった。

このように、まずレンチウイルスベクターで標的ウイルス遺伝子の除去を行い、次に AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターによりこのゲノム上のレンチウイルスベクターを除去する方法へと変更することにより、ゲノム上にあるウイルス遺伝子の除去が可能となったので、遺伝子治療へつながるものと考えられた。

〈引用文献〉

林日出喜、クリニカルトピックス：自己削除型レンチウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発、BIO Clinica (北隆館出版)、査読なし、32 巻 6 号、2017、pp. 49-51

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① Kubo Y, Izumida M, Togawa K, Zhang F, Hayashi H. Cytoplasmic R-peptide of murine leukemia virus envelope protein negatively regulates its interaction with the cell surface receptor. *Virology*、査読有、532 巻、2019、pp. 82-87.
doi:10.1016/j.virol.2019.04.005.
- ② Kamiyama H, Izumida M, Umemura Y, Hayashi H, Matsuyama T, Kubo Y. Role of Ezrin Phosphorylation in HIV-1 Replication. *Front Microbiol*、査読有、9 巻、2018、1912.
doi: 10.3389/fmicb.2018.01912.
- ③ Hayashi H, Kubo Y, Izumida M, Takahashi E, Kido H, Sato K, Yamaya M, Nishimura H, Nakayama K, Matsuyama T. Enterokinase Enhances Influenza A Virus Infection by Activating Trypsinogen in Human Cell Lines. *Front Cell Infect Microbiol*、査読有、8 巻、2018、91.
doi:10.3389/fcimb.2018.00091.
- ④ Yasui K, Izumida M, Nakagawa T, Kubo Y, Hayashi H, Ito T, Ikeda H, Matsuyama T. MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*、査読有、501 巻、2018、pp. 833-837.
doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.159.
- ⑤ Kubo Y, Masumoto H, Izumida M, Kakoki K, Hayashi H, Matsuyama T. Rab3a-Bound CD63 Is Degraded and Rab3a-Free CD63 Is Incorporated into HIV-1 Particles. *Front Microbiol*、査読有、8 巻、2017、1653.
doi:10.3389/fmicb.2017.01653.
- ⑥ Kubo Y, Izumida M, Yashima Y, Yoshii-Kamiyama H, Tanaka Y, Yasui K, Hayashi H, Matsuyama T. Gamma-interferon-inducible, lysosome/endosome-localized thioredoxin, GILT, has anti-retroviral activity and its expression is counteracted by HIV-1. *Oncotarget*、査読有、7 巻、2016、pp. 71255-71273.

doi:10.18632/oncotarget.12104.

- ⑦ 林日出喜、クリニカルトピックス：自己削除型レンチウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発、*BIO Clinica*（北隆館出版）、査読なし、32巻6号、2017、pp.49-51
<https://www.molcom.jp/products/detail/114502/>

〔学会発表〕（計3件）

- ① Mai Izumida1、Yoshinao Kubo、Kiyoshi Yasui、Hideki Hayashi、Toshifumi Matsuyama、カテプシンンがエンベロープウイルス感染に与える影響の網羅的解析、第64回日本ウイルス学会学術集会、2016
- ② Sato K、Hayashi H、Shimotai Y、Matsuzaki Y、Yamaya M、Hongo S、Kawakami K、Nishimura H、Analyses of host serine proteases involved in cleavage of HE protein of the influenza C virus、第65回日本ウイルス学会学術集会1、2017
- ③ Mai Izumida1、Yoshinao Kubo、Hideki Hayashi、Atsushi Tanaka、カテプシンBはチクングニヤウイルスのエンベロープ蛋白質を介した感染に必須である、第66回日本ウイルス学会学術集会、2018

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/medura/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：長谷川 寛雄

ローマ字氏名：HASEGAWA, Hiroo

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院(医学系)

職名：准教授

研究者番号：00398166

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中尾 一彦

ローマ字氏名：NAKAO, Kazuhiko

研究協力者氏名：久保 嘉直

ローマ字氏名：KUBO, Yoshinao

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。