

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26242048

研究課題名(和文)革新的組換えアデノウイルスの開発と疾病治療・予防・診断への応用

研究課題名(英文)The development of novel adenovirus vectors and application for treatment, prevention, and diagnosis of diseases

研究代表者

水口 裕之(Mizuguchi, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50311387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が先駆的に開発を進めてきたアデノウイルス(Ad)ベクター改変技術やマイクロRNAによる遺伝子発現制御技術を駆使して、遺伝子治療やワクチン、癌の診断等に利用可能な革新的な組換えAdの開発とその応用を進めた。具体的には、ゲノム編集を目的としたCas9発現Adベクター、Adベクターワクチンを全身投与した場合の粘膜面でのCTL誘導のメカニズム解明、末梢循環腫瘍細胞(CTC)を高感度に検出可能なGFP発現制限増殖型Adの改良を行い、良好な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed several types of novel recombinant adenoviruses (Ad) for the treatment, prevention, and diagnosis of diseases. We developed Cas9-expressing adenovirus vector for genome editing. We analyzed the mechanism how intramuscular vaccination of an adenovirus vector promotes the induction of antigen-specific gut-mucosal CTLs. We also developed a novel detection system of circulating tumor cells using a green fluorescence protein-expressing conditionally replicating adenovirus.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス 遺伝子 癌 免疫学 バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子導入・遺伝子機能制御技術は遺伝子治療の成功の鍵を握る必須な要素であるとともに、新規遺伝子やタンパク質の機能解明、評価系作製、あるいは iPS 細胞が 4 遺伝子の導入により作製されたように細胞の分化・脱分化制御手法として、今や生命科学研究全般の進展や細胞・再生医療、創薬研究になくはない普遍的に重要な基盤技術となっている。こうした目的に広く叶う日本独自の高性能ベクター開発は国益を考えたうえでも最重要研究課題の一つである。

申請者らは、アデノウイルス (Ad) ベクターの長所 (既存のベクター中で最も遺伝子導入効率が高い、高ベクターのベクター調製が可能等) を活かしつつ、様々なベクター改変を行うことで、機能面で優れた改良型 Ad ベクターを開発してきた。本研究では以下の課題について、新規 Ad ベクターの開発や応用を検討した。

### (1) CRISPR/Cas9 システムを搭載した Ad ベクターの開発

CRISPR/Cas9 システムは、標的となるゲノム DNA 配列に相補的な配列を含む guide RNA (gRNA) と、DNA 切断酵素である Cas9 を共発現させることで任意の DNA 配列を切断可能であることから、ゲノム編集ツールとして大きな注目を集めている。現在、CRISPR/Cas9 システムの細胞への導入方法としては、プラスミドベクターを用いてこれらを発現させる方法が主流であるが、導入効率が十分でないこと、導入できる細胞に制限があること、*in vivo*でのゲノム編集が難しいことなど、種々の問題点を有している。一方で、Ad ベクターは、広範な細胞種に極めて高効率に遺伝子導入が可能であることから、遺伝子治療研究ならびに基礎研究で汎用されている。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いた高効率なゲノム編集に向けて CRISPR/Cas9 システム搭載 Ad ベクターの作製を行い、機能評価を行った。

### (2) Ad ベクターの粘膜免疫誘導型ワクチンベクターとしてのメカニズム解明と応用

Ad ベクター投与により惹起される細胞性および液性免疫応答は、Ad ベクターを用いる際の大きな障壁であるが、この免疫反応を巧みに利用すれば、ワクチンベクターとして最適なベクターとなりうる。我々はこれまでに、Ad ベクターを筋肉内へ投与すると、全身だけでなく粘膜面においても搭載抗原特異的な

CD8<sup>+</sup> T 細胞を強く誘導可能であることを明らかにし、全身及び粘膜の双方において強い免疫応答を誘導可能であることを明らかにした。そこで、Ad ベクターワクチンのさらなる最適化を目指し、Ad ベクター投与後の粘膜面での獲得免疫応答誘導メカニズムについて、自然免疫活性化の観点から種々の検討を行った。

### (3) 癌診断のための末梢循環腫瘍細胞 (CTC) 検出用改良型 Ad の開発と臨床応用

CTC は全身転移の危険性を高めることや、CTC が認められた患者の予後が著しく低いことなど臨床症状と密接な関係を示すことから、CTC を予後予測因子やサロゲートマーカーとして利用するために、CTC を簡便かつ高感度に検出可能な手法の開発が期待されている。CTC を検出する手法としては、Cytokeratin-8 などの癌関連抗原を免疫染色する方法 (Cell Search 法) 等が用いられているが、感度や簡便性、正確性、コストの観点から問題が多い。我々は、癌細胞特異的に増殖し、GFP を発現する制限増殖型 Ad (テロメスキャン) を用いて、CTC を簡便に検出する方法を開発した (*J. Clin. Invest.*, 2009)。しかし、従来のテロメスキャンによる CTC の検出には、CTC が Ad 受容体 (CAR) を発現していることが必要であり、浸潤・転移能の高い癌細胞や増殖能の高い細胞では CAR の発現が低下しているため、テロメスキャンではこれらの対象細胞を検出できないという欠点がある。そこで本研究では、あらゆる癌細胞を特異的に精度良く検出可能な改良型テロメスキャンの開発とその臨床応用を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の様々な改良型 Ad ベクターの開発研究や、各種改良型 Ad ベクターの遺伝子導入特性の解析研究を通して明らかとなった基礎的事項を基に、遺伝子治療、ワクチン、癌の診断や広範な基礎研究への応用が可能な革新的 Ad ベクターの開発を行った。さらに、ベクター開発者ならではの視点で、ベクター技術を駆使することで各種疾病の治療に対する新たな戦略を提示し、応用研究を進めた。具体的には、(1) 汎用性と効率に優れた新たなゲノム編集技術として注目されている CRISPR/Cas9 システムを搭載した Ad ベクターの開発、(2) Ad ベクターの粘膜免疫誘導型ワクチンベクターとしてのメカニズム解明と応用、(3) 癌の診断に注目されている CTC を感度良く正確に検出できる新規 Ad

(改良型テロメスキャン)の開発とその臨床応用を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR/Cas9 システムを搭載した Ad ベクターの開発

従来の Ad ベクター作製法では、Cas9 の細胞毒性のために、Cas9 発現 Ad ベクターの作製が困難であった。そこで、Tet-Off システムを利用してパッケージング細胞における Ad ベクター増幅時の Cas9 の発現を抑えることで、Cas9 発現 Ad ベクターの作製を試みた。また、AAVS1 遺伝子座、もしくはマウス血液凝固第 Ⅲ 因子 (mFIX) に対する二種類の gRNA 発現 Ad ベクターと、作製した Cas9 発現 Ad ベクターをヒト、もしくはマウス培養細胞に共作用させ、そのゲノム編集効率を評価した。

#### (2) Ad ベクターの粘膜免疫誘導型ワクチンベクターとしてのメカニズム解明と応用

獲得免疫応答の誘導には自然免疫の活性化が必須であり、我々はこれまでに、自然免疫シグナルの一つである I 型インターフェロン (IFN) シグナルが Ad ベクターワクチン投与後の腸管粘膜 CTL 誘導に重要であることを過去に報告している。そこで、Type I IFN 受容体ノックアウトマウスを用いて、モデル抗原として LacZ を発現する Ad ベクターをマウスの筋肉内に投与した。腸管粘膜 CTL 誘導能を検討するとともに、所属リンパ節における各種免疫細胞の動態を解析するとともに、種々の自然免疫関連サイトカインの遺伝子発現を解析した。

#### (3) 癌診断のための CTC 検出用改良型 Ad の開発と臨床応用

ほぼすべてのヒト細胞で発現している CD46 を介して感染するように、Ad のファイバーを、CD46 を感染受容体とする 35 型 Ad のファイバーに置換した (従来のテロメスキャンは 5 型 Ad 由来)。また血液細胞での GFP の発現を抑制するために、血液細胞で高発現している microRNA である miR-142-3p の標的配列を E1 および GFP 遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入した。この改良型 Ad を CAR 陰性癌細胞およびヒト末梢血単核球 (Human Peripheral Blood Mononuclear Cell; hPBMC) を含む各種血液細胞に感染させ、24 時間後にフローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞数を測定した。また、極少数の癌細胞を一定の割合で hPBMC に添加し、改良型テロメスキャンによって hPBMC 中の癌細胞を検出できるか検討し

た。また、臨床献体 (非小細胞肺がん; 順天堂大学医学部、オンコリスバイオファーマ社との共同研究) を用いた解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CRISPR/Cas9 システムを搭載した Ad ベクターの開発

Tet-Off システムを用いることで、十分な力価の Cas9 発現 Ad ベクターの作製に成功した。作製した Cas9 発現 Ad ベクターと gRNA 発現 Ad ベクターを培養細胞に共作用させたところ、AAVS1 遺伝子座では、標的ゲノム配列の 20~30% が切断されており、またシーケンス解析により、標的ゲノム配列に変異が導入されていることを確認した。さらに、mFIX 遺伝子においてもゲノム編集により顕著にその発現が低下した。以上より、CRISPR/Cas9 システム搭載 Ad ベクターは、高効率なゲノム編集に向けて有用なツールとなりうることが示唆された。

#### (2) Ad ベクターの粘膜免疫誘導型ワクチンベクターとしてのメカニズム解明と応用

Ad ベクターのワクチン効果向上を目指し、Ad ベクター投与後の獲得免疫応答誘導メカニズムについて、自然免疫活性化の観点から種々の検討を行った。その結果、I 型 IFN シグナルが所属リンパ節において 17 型ヘルパー T 細胞 (Th17) 分化誘導サイトカインの発現を亢進させ、また炎症性樹状細胞を誘引および活性化することで、抗原特異的な Th17 を誘導することを示した。また、I 型 IFN シグナルにより腸管粘膜面へと抗原特異的な Th17 が誘導されることを示した。本研究では、筋肉内に投与された Ad ベクターワクチンによって獲得免疫応答が腸管粘膜面へと誘導されるメカニズムの解明を行い、I 型 IFN シグナルにより誘導される Th17 が腸管粘膜 CTL の誘導に重要であることを世界で初めて明らかとした。さらに、今回明らかとしたメカニズムを応用することで、Th17 誘導の増強により腸管粘膜 CTL の誘導を促進可能であるという新規アジュバントコンセプトに繋がる知見を得た。したがって本成果は、より効果的で安全な Ad ベクターワクチンの開発を前進させるだけでなく、従来の注射型ワクチンに対して新たに粘膜免疫誘導能を付与できるようなアジュバントの開発に繋がることも期待される。

#### (3) 癌診断のための CTC 検出用改良型 Ad の開発と臨床応用

本研究で新規に開発した CTC 検出用 Ad(改良型テロメスキャン)は、従来までのテロメスキャンに比べより幅広い癌細胞を検出可能であった。偽陽性の検出(従来までのテロメスキャンは白血球が偽陽性になりやすかった)もほぼ完全に抑制可能であった。即ち、CAR 陰性癌細胞では、従来のテロメスキャンによりほとんど GFP 陽性細胞を検出できなかったが、改変型テロメスキャンではほぼ 100%の細胞が GFP 陽性であった。一方で、血液細胞に改変型テロメスキャンを作用させたところ、GFP 陽性細胞はほとんど検出されなかった。また、改変型テロメスキャンでは、hPBMC 中の癌細胞を従来のテロメスキャンよりも高感度に検出可能であった。さらに、非小細胞肺癌患者から回収した血液細胞を用いた検討では、従来のテロメスキャンでは擬陽性を生じる割合が多かったのに対し、改変型テロメスキャンを用いた場合には擬陽性は低く、効率良く CTC が検出された。一方で、改良型テロメスキャンは若干 GFP 強度が低く、生物学的タイター/物理学的タイターが低い傾向にあった。そこで今後は、GFP カセットの位置等を変更した組換え Ad を作製し、上記問題の克服が可能か否かを検討する。

#### 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 8 件)

- 1) Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Nakatani K., Takayama K., Tachibana M., Mizuguchi H. Inhibition of CRISPR/Cas9-mediated genome engineering by a type I interferon-induced reduction in guide RNA expression, *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 272-277 (2017) doi: 10.1248/bpb.b16-00700
- 2) Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Tachibana M., Fujiwara T., Mizuguchi H. Enhanced oncolytic activities of the telomerase-specific replication-competent adenovirus expressing short-hairpin RNA against Dicer, *Mol. Cancer Ther.*, 16, 251-259 (2017) doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0383
- 3) Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Takayama K., Tachibana M., Mizuguchi H. Type I interferons impede short-hairpin RNA-mediated RNA interference via inhibition of dicer-mediated processing to small interfering RNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 6, 173-182 (2017) doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.007
- 4) Tsuzuki S., Tachibana M., Hemmi M., Yamaguchi T., Shoji M., Sakurai F., Kobiyama K., Kawabata K., Ishii K.J., Akira S., Mizuguchi H. TANK-binding kinase 1-dependent or -independent signaling elicits the cell-type-specific innate immune responses induced by the adenovirus vector. *Int. Immunol.* 28,105-115 (2016) doi: 10.1093/intimm/dxv058
- 5) Wakabayashi K., Tachibana M., Shimizu K., Tachibana M., Sakurai F., Mizuguchi H. Quantitative Analysis of Virus-associated RNAi Expression following Transduction with a Replication-incompetent Adenovirus Vector In Vitro and In Vivo. *J. Mol. Genet. Med.* 9, 169, (2015) doi:10.4172/1747-0862.1000169
- 6) Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Nakatani K., Shimizu K., Tachibana M., Mizuguchi H. NF- $\kappa$ B promotes leaky expression of adenovirus genes in a replication-incompetent adenovirus vector. *Sci. Rep.* 6, 19922 (2016) doi: 10.1038/srep19922
- 7) Hemmi M., Tachibana M., Tsuzuki S., Shoji M., Sakurai F., Kawabata K., Kobiyama K., Ishii K.J., Akira S., Mizuguchi H. The early activation of CD8<sup>+</sup> T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *BioMed Res. Int.*, Article ID 158128 (2014) doi: 10.1155/2014/158128
- 8) Shimizu K., Sakurai F., Tomita K., Nagamoto Y., Nakamura S., Katayama K., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted

sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 1, 14035 (2014) doi:10.1038/mtm.2014.35

〔学会発表〕(計 50 件)

- 1) Wakabayashi K., Machitani M., Tachibana M., Sakurai F., Mizuguchi H. Small RNA derived from Adenovirus Virus-Associated RNA II, mivaRNA II, promotes Ad replication via post-transcriptional gene silencing. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 2016 Annual Congress, 2015年10月18日~21日, フィレンツェ (イタリア)
- 2) Hemmi M., Tachibana M., Fujimoto N., Shoji M., Sakurai F., Kobiyama K., Ishii K.J., Akira S., Mizuguchi H. Type I IFN signaling regulates the antigen-specific mucosal immunity following systemic administration of an adenovirus vector vaccine. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 2016 Annual Congress, 2015年10月18日~21日, フィレンツェ (イタリア)
- 3) Mizuguchi H. Adenovirus vectors, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015年7月24日~26日, Osaka (Japan)
- 4) Machitani M., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. NF- B mediates leaky expression of adenovirus genes in a replication-incompetent adenovirus vector, The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2015年7月24日~26日, Osaka (Japan)
- 5) Hemmi M., Tachibana M., Tsuzuki S., Shoji M., Sakurai F., Kobiyama K., Ishii K.J., Akira S., Mizuguchi H. Type-I IFN signaling induced by systemically administrated adenovirus vector promotes the antigen-specific mucosal immunity. American Society of Gene & Cell Therapy, 17th Annual Meeting 2014, 2014年5月21日~24日, ワシントン DC (USA)
- 6) Machitani M., Sakurai F., Wakabayashi K., Tachibana M., Mizuguchi H. Evaluation of involvement of microRNA

processing factors in adenovirus replication, American Society of Gene & Cell Therapy, 17th Annual Meeting 2014, 2014年5月21日~24日, ワシントン DC (USA)

他 4 4 件

〔図書〕(計 1 件)

町谷充洋、水口裕之；標的化アデノウイルスベクターの開発、遺伝子医学 MOOK 30 今、着実に実り始めた遺伝子治療～最新研究と今後の展望、金田安史編集、63-73 (2016)

〔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

<https://www.seika.site/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水口 裕之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)  
大阪大学大学院・薬学研究科・教授  
研究者番号：50311387

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)  
大阪大学大学院・薬学研究科・准教授  
研究者番号：70370939

立花 雅史 (TACHIBANA MASASHI)

大阪大学大学院・薬学研究科・助教  
研究者番号：80513449

(4)研究協力者

該当なし