

- and Human Mycosis (ISHAM) 2009 2009
年 5 月
- 2) 田辺公一：病原真菌のアゾール系抗真菌薬耐性機構 第 177 回 酵母細胞研究会 2009
年 7 月
- 3) 田辺公一、名木 稔、新見昌一、山越 智、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継：血清による *Candida albicans* の azole 系抗真菌薬感受性の変化の検討 第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会／第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会合同学会学術講演会 2009
年 10 月
- 4) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：真菌 AUS1 トランスポーターの比較解析 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010
年 3 月
- 5) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越 智、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討 第 58 回日本化学療法学会総会 2010 年 6 月
- 6) 名木 稔、田辺公一、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析 第 58 回日本化学療法学会総会 2010 年 6 月
- 7) Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Hironobu Nakayama, Martin Bard, Toshihiro Aoyama, Masakazu Niimi, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Hideaki Ohno and Yoshitsugu Miyazaki. Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 口頭発表
- 8) Minoru Nagi, Koichi Tanabe, Hironobu Nakayama, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Takahiro Oura, Susumu
- Kajiwara, Hideaki Ohno and Yoshitsugu Miyazaki. Substrate specificity and transcriptional regulation of a sterol transporter in *Candida glabrata*. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月

細胞外ステロール取り込みによる抗真菌薬耐性機構の 解明

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 田辺 公一

研究要旨 病原真菌の ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、抗真菌薬に対する薬剤耐性化の主要な原因となっている。申請者は、新規 ABC タンパク質が細胞外からコレステロールを取り込んで、病原真菌をステロール合成阻害剤に耐性化することを見出した。この新規薬剤耐性化メカニズムを解明し、効率が高く耐性化を引き起こさない新規抗真菌薬の開発に応用する。

A. 研究目的

真菌症は、現代社会において Immunocompromised host の増加とともに増加傾向にある感染症の1つであるが、国内で認可されている抗真菌薬は少なく、予防投与に伴う菌の薬剤耐性化が臨床において問題となっている。現在使用されている抗真菌薬の多くは、真菌の細胞膜を構成するエルゴステロール合成経路を標的としているため、真菌のステロール代謝の研究は、耐性化を引き起こしにくく、さらに効果の高い抗真菌薬開発のための重要な研究領域である。

病原真菌 *Candida glabrata* は、好気条件でエルゴステロールを合成する一方で、血清などの生体成分からステロールを大量に取り込む (Antimicrob Agents Chemother 44:2411-8, 2000; Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)。また、*C. glabrata* は血清存在下でステロール合成を阻害する抗真菌薬アゾールに高度耐性化することから (Antimicrob Agents Chemother 45:3037-45, 2001)、真菌のステロール取り込み機構とアゾール耐性には何らかの相関があることが推測された。我々は 2007 年に、ATP-binding cassette タンパク質遺伝子 *CgAUS1* が血清添加で発現が誘導され、コレステロールの取り込みを担うこと、さらに *CgAUS1* 遺伝子を破壊すると血清によるアゾール系抗真菌薬耐性化が起こらなくなることを明らかにした (J Antimicrob Chemother 60:1264-72, 2007)

本研究では、ステロールトランスポーター *CgAUS1p* の病原性において果たす役割を明らかにすることを目的とした。*C. glabrata* マウス感染モデルにおける *CgAUS1* 遺伝子発現低下変異株の病原性の評価を行った。

B. 研究方法

ドキシサイクリンで *CgAUS1* 遺伝子の発現を特異的に抑制できる変異株 (tet-*CgAUS1*) を作製し、マウス感染実験に供した。酢酸コルチゾンとシクロフォスファミドによって免疫抑制した CD-1 マウス (1 群 5 匹) に tet-*CgAUS1* を尾静脈より接種し、通常の飲料水 (*CgAUS1* の発現あり) またはドキシサイクリンを含む飲み水 (*CgAUS1* の発現が抑制される) で飼育した。感染直後、1 週間後、2 週間後のそれぞれのマウスから摘出した腎臓をホモジネートし、寒天培地に塗布した。寒天培地に発育するコロニー数から臓器定着率を算出し、病原性の指標として比較検討した。

(倫理面への配慮)

マウス感染実験に関しては、国立感染症研究所の動物実験委員会の規定に従って行った。環境への拡散も遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律にのっとり、十分に配慮して研究を行っている。

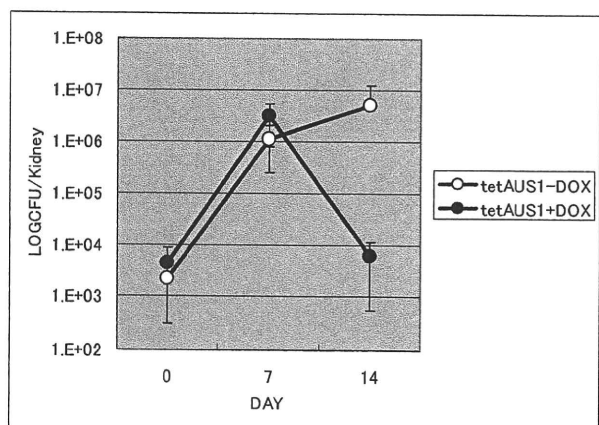
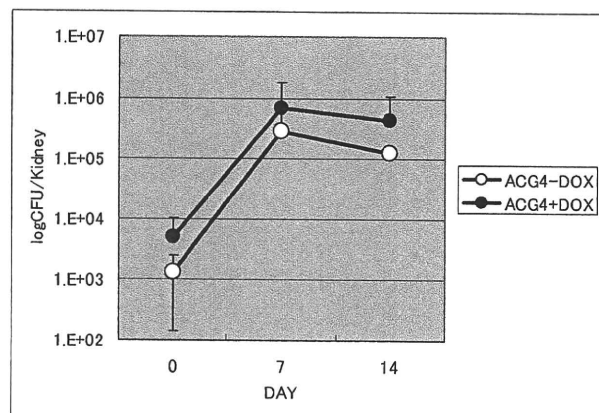
C. 研究結果

tet-*CgAUS1* およびリファレンス株 ACG4 感染

マウスの感染後 6 時間での腎臓定着菌数は $1 \sim 5 \times 10^3$ CFU/kidney となり、各実験群で顕著な差は認められなかった。また 1 週間後の腎臓内菌数に関しては tet-CgAUS1 接種マウスのほうが ACG4 接種マウスよりも最大で約 5 倍高い値を示したが、感染直後からの劇的な菌数の増加という点においては、共通していた。

一方、感染 2 週間後で ACG4 接種マウスではドキシサイクリン投与群と通常飲料水群には約 3 倍の菌数の差異しか認められなかった。一方、tet-CgAUS1 接種マウスにおいてはドキシサイクリン投与群で通常飲料水群の約 1000 倍の菌数の減少が認められた。

野生型 *C. glabrata* を接種したマウス腎臓より切り出した菌塊から全 RNA を抽出し、realtime PCR によって *CgAUS1* の発現量を調べたところ、in vitro で培養した菌と比較して 5 倍以上の発現上昇が認められた（論文作成中のためデータ省略）。



D. 考察

本研究では、*Candida glabrata* のステロールトランスポーター *CgAus1p* の病原性における役割を明らかにすることを目的とした。

マウス感染実験の結果より、*CgAUS1* の発現量が減少すると *C. glabrata* のマウスに対する病原性が減弱することが示唆された。*CgAus1p* は細胞外ステロールの取り込みに必要なタンパク質であることから、*C. glabrata* は感染時に細胞外のステロールを取り込まなければ、宿主体内での増殖すなわち病原性を発揮できないと推測できる。

エルゴステロール合成に必須である *ERG9* 遺伝子の発現を抑制すると in vitro では *C. glabrata* の生育は抑制される。一方、マウス感染実験における腎臓での菌数には *ERG9* の発現抑制は影響を及ぼさないことが、共同研究者らによって明らかにされている (*Antimicrob Agents Chemother* 44:2411-8, 2000)。この結果は、*C. glabrata* が宿主体内で細胞外からステロールを獲得して増殖することを示唆しており、本研究結果の考察を支持するものである。また、in vitro ではほとんど発現しない *CgAUS1* の発現量がマウス腎臓内で増加することも生体内での *CgAus1p* の役割を示唆している。

宿主体内（マウスも人も）は酸素分圧が低く、*C. glabrata* を含む病原真菌は in vitro とは異なり嫌気条件で生育すると考えられる。嫌気条件では脂肪酸とステロールを添加しないと真菌は増殖できない。*CgAUS1* の発現低下は in vivo での増殖に必須な細胞外ステロールの獲得を阻害し、マウス感染実験における病原性低下につながったのかもしれない。

現在、再現実験を試みているが結果が安定しないため、再現性を得るために異なるマウス感染実験が必要であると考えている。

E. 結論

ステロールトランスポーター *CgAUS1* の発現を

抑制すると病原真菌 *C. glabrata* のマウスに対する病原性が減弱した。*CgAUS1* はアゾール系抗真菌薬の効果を減弱させることから、*CgAus1p* は抗真菌薬治療効果に大きな影響を及ぼす分子であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagi M, Nakayama H, Tanabe K*, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells*. 2011 Jan;16(1):80-9. (*Corresponding author)

2) Nakayama H, Ueno K, Uno J, Nagi M, Tanabe K, Aoyama T, Chibana H, Bard M. Growth defects resulting from inhibiting *ERG20* and *RAM2* in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011, 317(1):27-33

2. 学会発表

1) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越 智、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討 第 58 回日本化学療法学会総会 2010 年 6 月

2) 名木 稔、田辺公一、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析 第 58 回日本化学療法学会総会 2010 年 6 月

3) Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Hironobu Nakayama, Martin Bard, Toshihiro Aoyama, Masakazu Niimi, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Hideaki Ohno and Yoshitsugu Miyazaki. Transcription factors *CgUPC2A*

and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 口頭発表

4) Minoru Nagi, Koichi Tanabe, Hironobu Nakayama, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Takahiro Oura, Susumu Kajiwara, Hideaki Ohno and Yoshitsugu Miyazaki. Substrate specificity and transcriptional regulation of a sterol transporter in *Candida glabrata*. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月

ウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることによる安全性の高い遺伝子治療法の革新的技術開発

所 属： 国立国際医療研究センター研究所
難治性疾患研究部
研究代表者： 小山 貴芳
研究期間： 平成20年4月～平成23年3月

研究要旨 本研究では、HIV-1 DNA が宿主染色体の二重鎖切断部位に挿入されるといふ研究代表者の発見を応用し、遺伝子治療に用いられるレンチウイルスベクターをゲノムの特定部位に約50%の効率で挿入させる技術開発に成功した。

A. 研究目的

遺伝子治療では、ウイルスベクターが宿主ゲノムへランダムに挿入することによる、高頻度な発癌が大きな問題となっており (Science, 302, 415 (2003)), そのために研究を中断することが多い。また最近、ヒト iPS 細胞の樹立が報告され (Cell, 131, 1 (2007)), 臨床応用が現実味を帯びてきたように思えるが、外来 DNA 導入に用いられるウイルスベクターの安全性を高めない限り、臨床応用は難しい。ウイルスベクターの安全性を高める研究は従来から進められているが、従来法の改良では不十分であり、新たな方法開発による技術的ブレイクスルーが求められている。

主任研究者らのグループはこれまでに、HIV-1 が感染の際、宿主ゲノムに二重鎖切断 (double-strand break, DSB) を引き起こすという現象を発見し、報告した (Cancer Res., 66, 627 (2006), Oncogene, 26, 477 (2007))。この HIV-1 感染による DSB 誘導の意義と機序を解明する過程で、ウイルス DNA が宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されるということを発見した。同様の現象は B 型肝炎ウイルスやウイルスのコア部位を欠如させたアデノ随伴ウイルスベクターでも報告されていることから (PNAS USA, 101, 11135 (2004), Nat. Genet., 36, 767 (2004)), DSB 部位へのウイルス DNA 挿入は外来 DNA に普遍的な現象である可能性が出てきた。

そこで本研究課題では、(1) レアカッターエンドヌクレアーゼを使ってヒトゲノムの特定部位に DSB を引き起こし、(2) ウイルスベクターを感染させることで、(3) DSB 部位にウイルスベクターを挿入できるのではないかと、という作業仮説を立て研究を行った。

既述した HIV-1、B 型肝炎ウイルスあるいはアデノ随伴ウイルスベクターの研究では 18bp 認識制限酵素 I-SceI による人工的な DSB 誘導の系が用いられるが、本来ヒトゲノム中には I-SceI の認識配列が存在しない。近年、ヒトゲノム中に 200~300 コピー存在する rDNA 内の配列を特異的に切断する 15bp 認識制限酵素 I-PpoI が単離された。そこで本研究課題ではこの I-PpoI を用いてヒトゲノムの rDNA を一部切断し、切断部位への HIV-1 ベースのレンチウイルスベクター挿入を試みた。

B. 研究方法

I-PpoI 発現アデノウイルスベクターの作製
I-PpoI を発現させるアデノウイルスベクターを作製し、様々な細胞株への DSB 誘導に用いた。

レンチウイルスベクターの作成

レンチウイルスベクターは invitrogen 社の pLenti6-V5-DEST に EGFP 遺伝子を導入し (pLenti6-EGFP)、同社 ViraPower Lentiviral Packaging Mix を用いて作製した。また、イ

インテグラーゼ活性欠損ウイルスの作成はインテグラーゼ遺伝子に点変異を導入したプラスミド pLP1-D64V を用いて作成した。

レンチウイルスベクター感染実験

上述のレンチウイルスベクターを HT1080 細胞へ 2h 感染させた。感染の 24h 前には I-PpoI 発現アデノウイルスベクターを用いて rDNA 上の I-PpoI サイト特異的に DSB を誘導した。感染 48h 後に blasticidin を用いてレンチウイルスベクターが感染した細胞を選別した。

PCR 解析

感染 2~3 週間後に blasticidin 耐性を示す細胞をプールの状態で回収し、ゲノム DNA を調製した。I-PpoI サイトにレンチウイルスベクターが挿入されたかを調べるため、rDNA とレンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて PCR を行った。

シークエンス解析

PCR 産物をプラスミドにクローニング後、あるいは直接鋳型としてシークエンス解析を行った。

定量 PCR 解析

I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクターの頻度を定量するため、rDNA とレンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて、定量 PCR 解析を行った。

FISH 解析

クローニングした細胞について、I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入されていることを調べるために、rDNA とレンチウイルスベクターに対するプローブを用いて、2-color FISH 解析を行った。

I-PpoI サイトに挿入された外来遺伝子の発現安定性解析

I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクター上の EGFP 遺伝子の発現安定性を調べるため、2ヶ月間に渡って EGFP の発現を解析した。解析には、I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入されたクローン#1885 を用いた。EGFP の発現は FACS を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞株を用いて行うことから、動物実験、ヒト幹細胞を用いる研究、臨床研究、あるいは個人情報保護法に抵触する研究内容などの倫理面へ配慮すべき内容は含まれない。なお、本研究で行う遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守して行った。

C. 研究結果及び考察

レンチウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させることに成功した

研究方法で述べたようにレンチウイルスベクターを感染させる際に、あらかじめアデノウイルスベクターを用いて I-PpoI サイト特異的に DSB を誘導させた。感染 48h 後に薬剤選択を開始してレンチウイルスベクターが感染した細胞を選別し、感染 2~3 週間後に細胞を回収した。この細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクターの検出を試みた。その結果、I-PpoI サイトを切断したときのみ目的の大きさにバンドが検出された（データは示していない）。さらに、この増幅した DNA をクローニングし、シークエンス解析を行ったところ、I-PpoI サイトにレンチウイルスベクターが挿入されていた。

インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いることにより、I-PpoI サイトへの挿入頻度を約 50% に高めることができる

我々はこれまでに HIV-1 の DSB 部位への挿入はインテグラーゼ活性非依存的であることを明らかにしてきた。そこで、レンチウイルスベクターについても調べたところ、HIV-1 と同様、DSB 部位への挿入はインテグラーゼ活性非依存的であった（データは示していない）。また、インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いることによって、ランダム挿入の頻度が減り、相対的に DSB 部位への挿入割合が増えた（データは示していない）。このインテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを用いて、I-PpoI サイトへの挿入頻度を調べたところ、順向きと逆向きを合わせて約 50% のウイルスベクターが I-PpoI サイトに挿入されていることが明らかとなった。

I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニング

現状では、最適な条件でレンチウイルスベクターを感染させた場合でも、約 50%はランダムに挿入されることから、次に I-PpoI サイトのみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞のクローニングを試みた。レンチウイルスベクターを感染させた細胞を薬剤選択し、コロニーを作ることでクローニングを行った。74 クローン解析したところ、I-PpoI サイトがある rDNA に対して順向きにウイルスベクターが挿入されたクローンは 10 クローン (13.5%)、逆向きが 5 クローン (6.8%)、順向きと逆向き両方入ったクローンは 5 クローン (6.8%) であった (データは示していない)。

これら 20 クローン中 5 クローン (6.8%) は EGFP 陽性であり、サザンブロット解析の結果、3 クローン (4.1%) はレンチウイルスベクターが I-PpoI サイトのみに挿入されていた (データは示していない)。

これら 3 クローンの中でクローン#1885 について 2-color FISH 解析を行い、rDNA とレンチウイルスベクターを染色した。その結果、確かに rDNA にレンチウイルスベクターが挿入されていた。

I-PpoI サイトに挿入されたレンチウイルスベクター上の EGFP 遺伝子は長期に渡って安定的に発現する

クローン#1885 について、薬剤非選択条件下において 2 ヶ月間培養を行ったところ、80%の細胞が EGFP 陽性であった。このことから、I-PpoI サイトに挿入された外来遺伝子はサイレンシングを受けることなく、安定的に発現することが分かった。

I-PpoI サイト以外の場所へのレンチウイルスベクター挿入

人工的に作製されたレアカッターエンドヌクレアーゼである Zinc finger nuclease (ZFN) を用いて、IL2R 遺伝子の第 5 エキソンに DSB を誘導し、同部位にレンチウイルスベクターを挿入させることに成功した。今後はこの ZFN を用いて、細胞に悪影響を与えない安全な場所に DSB を誘導し、同部位にレンチウイルスベクターを挿入させる技術を確認する必要がある。

インテグレース阻害剤を用いることでも、DSB 部位への挿入頻度を高めることが出来る

DSB 部位へのレンチウイルスベクター挿入効率を高めるためには、ウイルス蛋白であるインテグレースの活性をなくす変異の導入が有効であることが分かった。この変異体ウイルスは、インテグレースの酵素活性中心部位である DDE モチーフに変異を導入することで得られるが、HIV-1 治療薬として用いられている Raltegravir にもインテグレース活性をなくす効果があることが知られている。そこで、レンチウイルスベクター感染時に Raltegravir を添加することで、既に作製済みのウイルスベクターをそのまま使用できるのではないかと考え、実験を行った。

その結果、Raltegravir 添加によって、インテグレース活性を持たないレンチウイルスベクターを使用した場合と同様の効果が得られた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義と今後の展望について

本研究で見出した部位特異的外来遺伝子挿入法は「DSB+non-homologous end-joining」を利用しているが、既存の方法である「DSB+homologous recombination」を利用した方法とは異なるメカニズムを応用した方法であり、独創的な技術であると言える。また、本研究の技術は、神経細胞や Hematopoietic stem cell などの、遺伝子治療でのターゲットとなる非分裂細胞へも応用できることは特筆すべき点である。

今後は I-PpoI サイトだけでなく、ZNF などを用いて、ゲノムの任意の場所にレンチウイルスベクターを挿入させ、安全な外来遺伝子挿入の場所を探す必要がある。また、現状で 50%程度の目的部位への挿入効率を 100%に近づける技術開発を行うことで、遺伝子治療への臨床応用へとつながることが期待される。

D. 結論

本研究では、新規メカニズムによって、レンチウイルスベクターをゲノムの部位特異的に約 50%の効率で挿入させる技術開発に成功した。

E. 研究発表

1) 国内

口頭発表 4件
原著論文による発表 0件
それ以外（レビュー等）の発表 0件

その主なもの

論文発表

なし。

学会発表

小山貴芳, 矢代寿子, 奥平准之, 石坂幸人 第31回 日本分子生物学学会年会
レンチウイルスベクターをヒトゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発 ～site specific integration of exogenous DNA; SPIED システムの開発～、

小山貴芳 HIV-1はマクロファージへの感染効率を高めるために宿主DNA二重鎖切断を誘導する。第12回日本レトロウイルス研究会

Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka : HIV-1-induced DNA double-strand breaks enhance the infectivity into resting macrophage. The 10th Kumamoto AIDS Seminar

小山貴芳, 孫賓蓮, 峯本謙, 徳永研三, 佐多徹太郎, 石坂幸人 : HIV-1が誘導する宿主DNA二重鎖切断はマクロファージへの感染効率を上昇させる。第57回日本ウイルス学会学術集会

Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka : Development of a novel system to integrate the lentiviral vector into human genome in a site-specific, designated SPIED (site-specific integration of exogenous DNA) system 第32回日本分子生物学学会年会

Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka, Integration into DNA double-strand break sites of HIV-1 is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor, 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Oct. 2010

Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka : Site-Specific Integration of a Lentiviral Vector in

the Human Genome via DNA Double-Strand Breaks 第33回日本分子生物学学会年会

2) 海外

口頭発表 1件
原著論文による発表 2件
それ以外（レビュー等）の発表 0件

その主なもの

論文発表

Noriyuki Okudaira, Kenta Iijima, Takayoshi Koyama, Yuzuru Minemoto, Shigeyuki Kano, Akio Mimori, Yukihiro Ishizaka. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(43): 18487-92 (2010)

Daiki Taneichi, Kenta Iijima, Akihiro Doi, Takayoshi Koyama, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Mari Shimura, Yukihiro Ishizaka. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Neuroimmune Pharmacol. (2011) In press

学会発表

Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Chikako Nakai-Murakami, Yuzuru Minemoto, Shigeki Hoshino, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka : Facilitated integration of HIV-1 DNA into sites of DNA double-strand breaks; application for improved gene therapy by site-specific integration of exogenous DNA. 4th German-Japanese HIV-Symposium

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

ウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることによる安全性の高い遺伝子治療法の革新的技術開発

所 属： 国立国際医療研究センター研究所
難治性疾患研究部
研究代表者： 小山 貴芳

研究要旨 本研究の目的は、ウイルスベクターをゲノムの標的部位に挿入させることである。本年度は人工ヌクレアーゼである Zinc-finger nuclease を用いた IL-2R 遺伝子へのベクター挿入と、インテグラーゼ阻害剤を用いた導入法の改善に成功した。

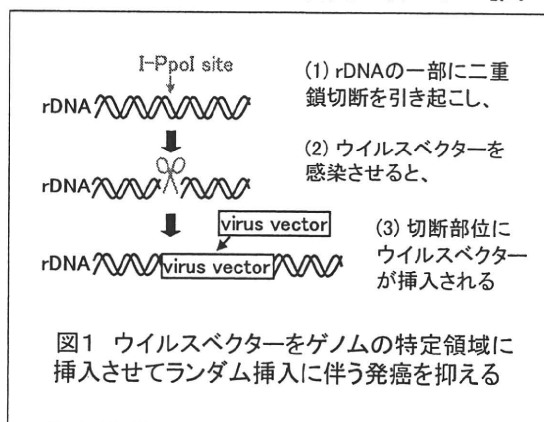
A. 研究目的

本研究課題の目的は、レンチウイルスベクターなどの遺伝子治療や基礎研究でよく用いられるベクターを、ゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発である。

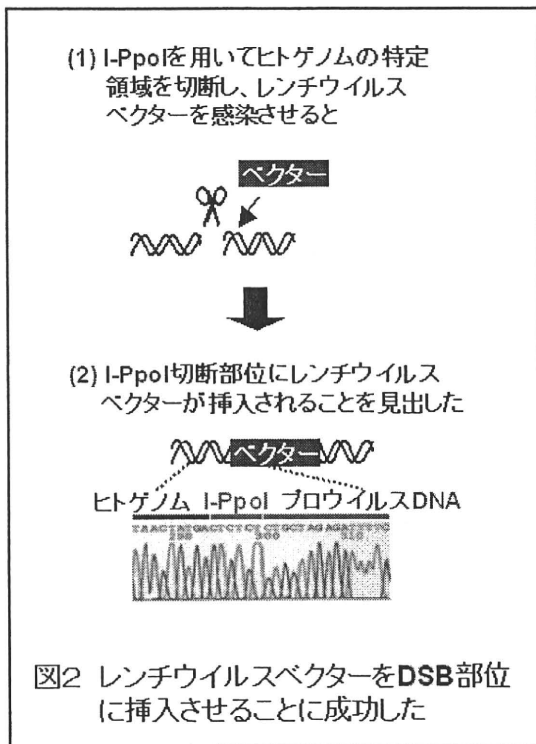
その背景として、遺伝子治療ではウイルスベクターが宿主ゲノムへランダムに挿入することによる、高頻度な発癌が大きな問題となっており(Science, 302, 415 (2003)), そのため研究を中断することが多い。ウイルスベクターの安全性を高める研究は従来から進められているが、従来法の改良では不十分であり、新たな方法開発による技術的ブレイクスルーが求められている。また、基礎研究においても、標的部位へのベクター挿入技術は重要である。即ち、同じ遺伝子を発現させる DNA 断片であっても、挿入されるゲノムの状態（例えばヘテロクロマチンあるいはユークロマチン）によって、その遺伝子の発現量は大きく影響される。従って、ゲノムの特定領域にベクターを挿入させる技術の開発が求められている。

主任研究者らのグループはこれまでに、HIV-1 が感染の際、宿主ゲノムに二重鎖切断 (double-strand break, DSB) を引き起こすという現象を発見し、報告した(Cancer Res., 66, 627 (2006), Oncogene, 26, 477 (2007))。この HIV-1 感染による DSB 誘導の意義と機序を解明する過程で、ウイルス DNA が宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されるということを発見した。そこで本研究課題ではこの現象を応用し、(1) レアカッターエンドヌクレ

アーゼを使ってヒトゲノムの特定部位に DSB を引き起こし、(2) ウイルスベクターを感染させることで、(3) DSB 部位にウイルスベクターを挿入できるのではないかと、という作業仮説を立て研究を行った【図 1】。



近年、ヒトゲノム中に 200~300 コピー存在する rDNA 内の配列を特異的に切断する 15bp 認識制限酵素 I-PpoI が単離された。そこで本研究課題では、昨年度までにこの I-PpoI を用いてヒトゲノムの rDNA を一部切断し、切断部位への HIV-1 ベースのレンチウイルスベクター挿入を試みた。その結果、レンチウイルスベクターを I-PpoI サイト特異的に挿入させることに成功した【図 2】。これまでの研究から、HIV-1 DNA の宿主ゲノムへの挿入はウイルスのタンパクであるインテグラーゼによって触媒されることが分かっている。しかし、DSB 部位へ挿入された HIV-1 DNA の塩基配列を調べたところ、インテグラーゼを介した挿入に特徴的な塩



基配列がみられなかったことが分かった。このことから、DSB 部位への HIV-1 DNA やレンチウイルスベクターの挿入にはインテグラーゼの酵素活性は必要ない可能性が示唆された。そこで、インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを作製し、I-PpoI サイトへの挿入を試みたところ、約 50% のウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させることに成功した。

本年度は Zinc-finger nuclease (ZFN) を用いた IL-2R γ 遺伝子座へのレンチウイルスベクター挿入と、インテグラーゼ阻害剤を用いた作業の簡便化を試みた。

B. 研究方法

EGFP 発現レンチウイルスベクターの作成

本実験には、invitrogen 社のレンチウイルスベクター pLenti6-V5-DEST に EGFP 遺伝子を導入した pLenti6-EGFP を用いた。ウイルスの作製には同社 ViraPower Lentiviral Packaging Mix とインテグラーゼ遺伝子に点変異を導入したプラスミド pLP1-D64V を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションすることによって作成した。

ZFN を用いた IL-2R γ 遺伝子座への DSB 誘導

ZFN は人工的に作製されたメガヌクレアーゼであり、ゲノムの任意の場所を切断する ZFN を作製することが可能である。レン

チウイルスベクターを挿入させる特定部位の候補として、近傍の遺伝子発現に影響を与えず、なおかつ、高発現を継続できる領域（例えばトランスジェニックマウスを作製する際のターゲット部位として用いられる ROSA26 遺伝子座）が好ましい。将来的には、このようなゲノムの安全な領域に DSB を誘導する ZFN を作製して、同領域にレンチウイルスベクターを挿入させることによって安全性の高い遺伝子治療に応用できると考えられる。しかし、ZFN の作製には時間がかかることから、まずは入手可能な IL-2R γ 遺伝子座を認識・切断する ZFN を用いることで ZFN の有用性を調べた。この IL-2R γ -ZFN を発現するプラスミド pVax_5-8_KK と pVax_5-9_EL は米国 Sangamo 社の Michael Holmes 博士から分譲して頂いた。IL-2R γ -ZFN タンパクの発現は、これら 2 種類の発現プラスミドを等量混ぜて HT1080 細胞に transfection することによって行った。

EGFP 発現レンチウイルスベクターの感染

HT1080 細胞に IL-2R γ -ZFN 発現プラスミドを transfection した後に、レンチウイルスベクター (Lenti6-EGFP) を感染させ、その後 blasticidin によって感染細胞を選択した。

IL-2R γ 遺伝子座に挿入されたレンチウイルスベクターの検出

レンチウイルスベクターを感染させてから 2~3 週間後に blasticidin 耐性を示す細胞をプールの状態で回収し、ゲノム DNA を調製した。IL-2R γ 遺伝子座にレンチウイルスベクターが挿入されたかを調べるため、IL-2R γ とレンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて PCR を行った。増幅された PCR 産物は pCR2.1-TOPO ベクターにクローニング後、塩基配列を解読した。

インテグラーゼ阻害剤を用いた DSB 部位へのレンチウイルスベクター挿入効率の改善

昨年度までの研究において、ウイルスタンパクであるインテグラーゼに酵素活性をなくす変異を導入することで、DSB 部位へのレンチウイルスベクター挿入割合を 1% 以下から 50% にまで高めることに成功した。この変異体ウイルスはインテグラーゼの DDE モチーフと呼ばれるアミノ酸に変異を導入することで作製できる。現在、この DDE モチーフをターゲットとした薬剤であ

る Raltegravir が HIV-1 治療薬として使用されており、インテグラーゼ依存的な HIV-1 DNA の挿入を阻害する効果が認められている。そこで、この Raltegravir (あるいは同様の効果が認められている Elvitegravir) を用いることで、インテグラーゼ変異ウイルスを作製する必要がなくなり、すでに作製済みのレンチウイルスベクターすべてに本部位特異的導入法を応用できるのではないかと考えた。

部位特異的 DSB 導入は I-SceI あるいは I-PpoI 発現アデノウイルスを用いて行った。細胞は、I-SceI 認識配列をゲノム上に持つ THP-1 細胞をアデノウイルス感染の 24h 前から PMA 処理によってマクロファージ様に分化させてから使用した。アデノウイルス感染の 24h 後に野生型のインテグラーゼを持つレンチウイルスベクターを感染させ、さらに 48h 後に細胞からゲノム DNA を抽出した。Raltegravir あるいは Elvitegravir は、いずれも終濃度 10 μ M となるように、レンチウイルスベクター感染の 24h 前から 48h 後まで培地に添加した。

抽出したゲノム DNA を用いて、I-SceI サイトあるいは I-PpoI サイトとレンチウイルスベクターを挟むように設計したプライマーを用いて qPCR を行い、DSB 部位への挿入頻度を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞株を用いて行うことから、動物実験、ヒト幹細胞を用いる研究、臨床研究、あるいは個人情報保護法に抵触する研究内容などの倫理面へ配慮すべき内容は含まれない。なお、本研究で行う遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守して行った。

C. 研究結果及び考察

IL-2R γ 遺伝子座へのレンチウイルスベクター挿入

ZFN は任意の塩基配列を切断するために作製された人工メガヌクレアーゼであり、特定の DNA 配列を認識する Zinc-finger ドメインと、DNA を切断するヌクレアーゼドメインから構成されている。1 個の Zinc-finger によって 3 塩基の DNA 配列を認識することができ、Zinc-finger ドメインを 3~4 個つなげることで 9~12 塩基の DNA 配列を認識す

ることができる。さらに ZFN はヘテロダイマーを形成することでヌクレアーゼ活性が生じることから、合計 18~24 塩基の DNA 配列を認識することができ、確率的にヒトゲノム中の 1 箇所のみを認識し、切断する ZFN を作製することが可能である。

本研究では、IL-2R γ 遺伝子座を認識する ZFN を用いて部位特異的に DSB を誘導し、レンチウイルスベクターを感染させたところ、同部位にレンチウイルスベクターを挿入させることに成功した [図 3]。

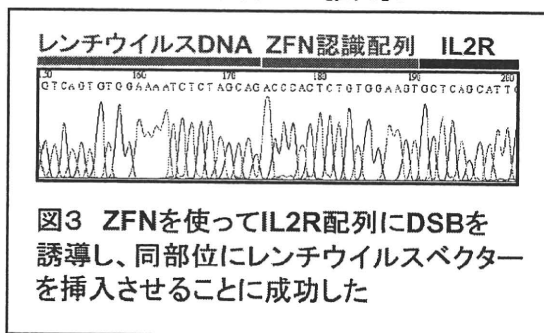


図3 ZFNを使ってIL2R配列にDSBを誘導し、同部位にレンチウイルスベクターを挿入させることに成功した

この結果から、本部位特異的導入法は I-PpoI サイトだけでなく、ゲノム上の任意の場所にレンチウイルスベクターを挿入させることが出来る可能性が示唆された。今後はこの ZFN を用いて、細胞に悪影響を与えない安全な場所に DSB を誘導し、同部位にレンチウイルスベクターを挿入させる技術を確認することで、安全な遺伝子治療への応用が期待される。

インテグラーゼ阻害剤を用いることでも、DSB 部位への挿入頻度を高めることが出来る

昨年度までの研究において、DSB 部位へのレンチウイルスベクター挿入効率を高めるためには、ウイルス蛋白であるインテグラーゼの活性をなくす変異の導入が有効であることが分かった。そこで、この変異導入と同様の効果が認められるインテグラーゼ阻害剤 Raltegravir の添加によって、既に作製済みのウイルスベクターをそのまま使用できるのではないかと考え、実験を行った。

その結果、Raltegravir あるいは Elvitegravir 添加 (終濃度 10 μ M) によって、インテグラーゼ活性を持たないレンチウイルスベクターを使用した場合と同様の効果が得られた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義と今後の展望について

本研究で見出した部位特異的外来遺伝子挿入法は「DSB+non-homologous end-joining」を利用しているが、既存の方法である「DSB+homologous recombination」を利用した方法とは異なるメカニズムを応用した方法であり、独創的な技術であると言える。また、本研究の技術は、神経細胞や Hematopoietic stem cell などの、遺伝子治療でのターゲットとなる非分裂細胞へも応用できることは特筆すべき点である。

今後は I-PpoI サイトだけでなく、ZNF などを用いて、ゲノムの任意の場所にレンチウイルスベクターを挿入させ、安全な外来遺伝子挿入の場所を探す必要がある。また、現状で 50%程度の目的部位への挿入効率を 100%に近づける技術開発を行うことで、遺伝子治療への臨床応用へとつながることが期待される。

D. 結論

本研究では、新規メカニズムによって、レンチウイルスベクターをゲノムの部位特異的に約 50%の効率で挿入させる技術開発に成功した。この部位特異的遺伝子導入法は ZFN と組み合わせて使用することができ、ゲノム上の任意の場所にレンチウイルスベクターを挿入させることが可能である。本方法は遺伝子治療の安全性を高める技術として応用されることが期待される。

E. 研究発表

学会発表

Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka, Integration into DNA double-strand break sites of HIV-1 is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor, 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Oct. 2010

Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka : Site-Specific Integration of a Lentiviral Vector in the Human Genome via DNA Double-Strand Breaks 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 22 年 12 月

論文発表

Noriyuki Okudaira, Kenta Iijima, Takayoshi Koyama, Yuzuru Minemoto, Shigeyuki Kano, Akio Mimori, Yukihiro Ishizaka. Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1)

retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(43): 18487-92 (2010)

Daiki Taneichi, Kenta Iijima, Akihiro Doi, Takayoshi Koyama, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Mari Shimura, Yukihiro Ishizaka. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Neuroimmune Pharmacol. (2011) In press

F. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) なし

Fc γ 受容体を介した Deng 出血熱病態形成機序をターゲットとした治療法の開発

所属 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究者 林 昌宏

研究期間 平成 20 年 4 月～平成 23 年 3 月

Deng 出血熱の病態形成機序解析のため CD32 恒常発現 BHK-21 細胞を用いた Deng ウイルス抗体依存性感染増強 (ADE) モデルを確立し, ADE 阻害物質を検討したところ熱変性凝集 IgG, 抗 CD32A において ADE 阻害効果が観察された。

A. 研究目的

急性熱性疾患である Deng 熱 (DF), 致死性疾患である Deng 出血熱 (DHF) の治療法は今だ確立されておらず, 交通網の発達, 気候の温暖化等により Deng ウイルス (DENV) 感染症の世界的な流行地域の拡大, 本邦への侵入が危惧されている現在, DENV の感染機構および病態解明とその治療法の確立が早急に求められている。世界保健機関 (WHO) により全世界で約 30 億人の人々が DENV の流行地域に居住しており, 年間約 1 億人の DENV 感染者が発生しさらに 2 万 4 千人が DENV により死亡していると推計されている。Deng ウイルス (DENV) は蚊によって媒介されるアルボウイルスであり, 熱帯アジア, 中南米, アフリカ, 豪州, 南太平洋諸島など世界の熱帯・亜熱帯の地域で発生している。日本においては海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。DENV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるエンベロープを有する (+) 一本鎖 RNA ウイルスである。フラビウイルスには黄熱ウイルス, 日本脳炎ウイルス, ウエストナイルウイルス, セントルイス脳炎ウイルスなどが含まれる。

DENV には 1-4 型の 4 つの異なる血清型が存在する。Deng 出血熱は疫学的研究により DENV の再感染時に多く発症することが示され, これは初感染時に誘導された中和能を有しない型交差抗体に起因する抗体依存性感染増強 (ADE) による

と考えられている。我々はこれまでに *in vitro* ADE モデルとして IgG 免疫複合体と結合して細胞内にシグナルを導入しファゴサイトーシスを誘導するレセプター群である Fc γ R の 1 つである Fc γ II A 受容体 (CD32A) を強発現させたサル腎由来細胞 Cos-7 細胞等を確立し, ADE の発生機序において DENV-DENV 型交差抗体複合体と Fc γ 受容体の結合に続く raft との会合及びシグナル伝達が ADE の誘導に重要であることを示した。(モイ他, JGV, 2010) そこで本研究の目的は DHF の治療ターゲットとして CD32A に注目し, DENV 治療法における基盤的研究として CD32A を恒常発現するハムスター由来 BHK-21 細胞を確立し, CD32A 恒常発現 BHK-21 細胞を用いた ADE アッセイ系を確立することにより CD32A を介するウイルスの細胞内侵入機序を阻害する Deng 出血熱の治療法を開発することである。

B. 研究方法

培養細胞: ハムスター由来 BHK-21 細胞 (American Type Culture Collection) は MEM (SIGMA) に 10% の牛胎児血清を加えた培地にて維持した。

フローサイトメトリー: CD32 発現 BHK-21 細胞 (BHK-CD32 細胞) を 4°C x 20 min 処理し PBS (-) で洗浄後, 1 μ g/ml のマウス IgG を用いて細胞表面に発現している CD32 を 15 分間室温にてブロックした。10 μ l の CD32-PE 抗体で 4°C, 45 分間反応した。PBS (-) で 2 回洗浄後 0.4 ml の PBS (-) に再浮遊し,

フローサイトメトリー (Becton Dickinson) にて解析した。コントロールとしてマウス-PE抗体を用意した。DENV感染細胞の染色は抗DENV抗体を用いて行った。

感染増強実験：デング患者血清を10倍階段希釈し、DENV(1型)と混合後37°C1時間反応した。

BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し4日間培養した。DENV感染力価をVero細胞を用いたブランク法にて算出した。

BHK-CD32細胞を用いたDENV中和試験：患者血清を5倍から2560倍まで2倍階段希釈し 2×10^3 PFU/ml DENV(1型と2型)と混合後37°C1時間反応した。BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し1%メチルセルロースを重層し4日間培養した。ホルマリンにて固定しメチルブルーにて染色後ブランクを観察した。

ADE阻害実験：凝集ヒトIgG (Agg-IgG), 抗Fc抗体, 抗CD32A抗体ヤギpAb, 抗ヒトCD32A抗体(AT-10), 抗CD32A抗体(N-10)をBHK-CD32A細胞とそれぞれ4°C1時間反応しPBSにて洗浄後, DENV-DENV型交差抗体複合体をBHK-CD32A細胞に接種し37°C1時間培養した。培養後メチルセルロースを重層しさらに37°Cで5日間培養後固定・染色しウイルス力価を算出した。陰性対照としてDENV単独の力価を測定した。

フラビウイルス共通迅速診断法の開発：フラビウイルス非構造蛋白質NS5領域のフラビウイルス間で相同性の高い塩基配列をターゲットとし, RT-PCRのプライマー設計を行った。プライマーの検討はDENVを初めとした16種類のフラビウイルスを用いて行った。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験を行うにあたり「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき実施した。これに伴い、国立感染症研究所での当該実験申請手続きを行った。国立感染症研究所での実験は、特に研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第1号。)の定めによるほか、「国立感染症研究所組換えDNA実験実施規則に定めるところによるものである。

上記の定めるところにより遺伝子の改変, 使用された技術およびこれらの結果改変された生物に生じた特性に関する情報を明らかにするとともにその移動を制限し実験に供した。また適切に包装, ラベルし保存した。

C. 研究結果

抗体依存性感染増強(ADE)モデルの開発：CD32AをBHK-21細胞に導入し、CD32Aを細胞表面に発現させた。CD32Aの発現の確認はフローサイトメトリーで行った。その結果約80%以上の細胞にCD32Aの発現が認められた。それぞれの細胞は18継代後も安定的にCD32Aを発現した。したがってCD32Aを恒常的に発現するBHK-CD32A細胞が確立されたことが示唆された。次にBHK-CD32A細胞の表面に発現されたCD32Aの機能を検討するためDENVと型交差抗体を有する患者血清を37°C1時間反応し、BHK-CD32A細胞に感染させた。感染5日後にDENVの感染増強を確認した結果、DEN患者血清と反応させたDENVはDEN患者血清と反応させていないDENVに比較して約10倍のADEが観察された。またこの効果は患者血清を希釈することによって消失した。したがってDENVは患者血清中に含まれる抗DENV抗体と複合体を形成し、CD32Aを介してBHK-CD32A細胞に感染していることが示唆された。次に様々なDEN患者血清を用いてADEアッセイを行った結果DENV中和抗体価上昇が認められない急性期患者血清ではADEは観察されなかったが、中和抗体の上昇した回復期血清ではADEが観察された。

CD32AがADEにおいて重要な役割を担うと示唆されたため次にBHK-CD32A細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDEN患者血清のDENVに対する中和抗体価を比較検討した。中和抗体価は抗DENV免疫応答を最も反映する値の1つである。その結果BHK-CD32A細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDEN患者血清のDENVに対する中和抗体価は一致しなかった。様々な患者血清を用いて検討した結果多くの患者血清で、BHK-CD32A細胞を用いた場合と比較して野生株BHK-21細胞を用いた場合、高い中和抗体価が示された。DENVの主なターゲット細胞はCD32A陽性であるため、BHK-CD32A細胞を用いた方がより患者血清のDENVに対する防御能を反映していると考えられた。以上の

ことから ADE 活性を安定的に再現できる ADE モデルが確立された。

ADE 阻害実験：次に確立した ADE モデルを用いて患者血清中の DENV-DENV 型交差抗体複合体と CD32A の相互作用を阻害する物質を検討するため ADE 阻害実験を行った。DENV-DENV 型交差抗体複合体と CD32A の相互作用を阻害すると考えられる凝集ヒト IgG (Agg-IgG), 抗 Fc 抗体, 抗 CD32A 抗体ヤギ pAb, 抗ヒト CD32A 抗体 (AT-10), 抗 CD32A 抗体 (N-10) を用いて DENV の抗体依存性感染増強阻害を検討したところ, 高濃度の凝集 IgG (10 μ g/12 well), 抗 Fc 抗体 (10 μ g/12 well), 抗 CD32A 抗体ヤギ pAb (1 μ g/12 well) において DENV の感染増強阻害が観察された。またこのとき抗ヒト CD32A 抗体 (AT-10), 抗 CD32A 抗体 (N-10) において阻害効果は観察されなかった。以上より ADE モデルを用いた ADE 発生機序をターゲットとする薬剤あるいは抗体の開発の可能性が示唆された。

フラビウイルス特異的迅速診断法の確立：様々な DENV 株を患者血清より検出し, サンプルとして供試するために DENV を含むフラビウイルス迅速診断法を RT-PCR 法にて確立した。フラビウイルスの NS5 領域に存在する共通配列をもとに forward primer を 14 種 reverse primer を 12 種設計し, すべての組み合わせを検討したところ DENV 他, 日本脳炎ウイルス等 16 種のフラビウイルスが検出可能であるプライマーを発見した。さらに本プライマーは DENV の鑑別疾患として重要なアルファウイルス 5 種類に対して非特異的であるため, 急性期患者血清において有用な実験室診断法と成り得ることが示唆された。

D. 考察

我々はこれまでに培養細胞に CD32A を恒常発現させることによって DENV 感染症の ADE モデルの確立に成功した。本モデルにより DENV を型交差性抗体陽性患者血清と反応させたとき BHK-CD32A 細胞において DENV の ADE が観察された。

また本モデルを用いて ADE 活性阻害実験を行った結果 CD32A と DENV-DENV 型交差抗体複合体の相互作用を阻害する物質が ADE 活性を阻害することを示した。このことは DENV-DENV 型交差抗体複合体と CD32A の相互作用を阻害

する物質の ADE 阻害活性の可能性, しいては DENV 感染症の治療法の開発の可能性が示唆された。しかしながらその阻害効果は高濃度の抗体においてのみ観察されたためより低濃度で特異的に ADE を阻害する抗体および物質の探索を今後も継続する必要がある。

また本研究においては様々な DENV 株を患者血清より検出し, サンプルとして供試するために DENV を含むフラビウイルス迅速診断法を確立した。DENV 流行地域では日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルス等の他のフラビウイルスが流行している。また DENV の流行地域においてはトガウイルス科アルファウイルス属に分類されるチクングニヤウイルスによって発症するチクングニヤ熱の流行が報告されている。これらウイルスとは非特異反応を示さないフラビウイルス迅速診断法の開発は本研究のみならず, フラビウイルスに係る公衆衛生の恒常に資する。

E. 結論

本研究により我々は ADE の発生機序に Fc γ R が重要を果たすことを明らかとした。そして ADE の発生メカニズムが Dengue 熱・出血熱の治療法確立のターゲットとなることが示唆された。今後も ADE を阻害する抗体および薬剤の探索を ADE モデルを用いて継続する。患者血清中の DENV-DENV 型交差抗体複合体と CD32A の相互作用機序あるいは Dengue 出血熱に伴う血管透過性亢進機序をターゲットとする薬物は Dengue 出血熱の予防・治療薬としての効果が期待される。現在 DENV 感染に対する特異的治療法はなく, 世界の熱帯・亜熱帯地域において Dengue 熱・Dengue 出血熱の流行は今後も続くことが予想され, 本邦においても海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。Dengue 出血熱や Dengue ショック症候群はひとたび発症するとその致死率は高い重篤な疾患であり, 今だワクチンの開発されていない本感染症の発症メカニズムを明らかとし治療法を開発することは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に大きく貢献する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc γ R-expressing BHK-21 cells than Fc γ R-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 203:1405-1414, 2011.

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Discrepancy in Dengue Virus Neutralizing Antibody Titers between Plaque Reduction Neutralizing Tests with Fc γ Receptor (Fc γ R)-Negative and Fc γ R-Expressing BHK-21 Cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3):402-407, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK cell lines expressing Fc γ RIIA. *Journal of Virology Methods*, 163(2):205-209, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of General Virology*, 91(1): 103-111, 2010.

Lim, C.K., Kurane, I., and Takasaki, T. Re-emergence of chikungunya virus, In Maeda, A. (ed), *Animal Viruses*. Transworld Research Network., Kerala, India, PP. 1-22, 2010.

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5):865-868, 2009.

林 昌宏, 高崎智彦. チクングニア熱と近年の流行状況. *獣医公衆衛生研究*, 13(2):9-13, 2011.

林 昌宏, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行状況. *公衆衛生*, 75(1):39-42, 2011.

2. 学会発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcRIIA. アメリカ熱帯医学衛生学会第58回総会, ワシントンD.C., アメリカ, 2009.

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. 2009年アメリカウエストナイルウイルス学会, サバンナ, アメリカ, 2009.

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Determination of the regions in human FCGRIIA responsible for the antibody dependent enhancement in dengue virus infection. 第2回 Dengue 熱および Dengue 出血熱国際学会, プーケット, タイ, 2008.

Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of Universal Primers for Rapid Detection of Flavivirus. 第2回 Dengue 熱および Dengue 出血熱国際学会, プーケット, タイ, 2008.

Lim, C.K., Takasaki, T., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 第14回国際ウイルス学会, イスタンブール, トルコ, 2008.

モイ メンリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎: Dengue 再感染患者血清中ウイルス力価の検討: 感染性抗体-Dengue ウイルス複合体は Fc γ R 発現細胞においてのみ検出された. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using Fc γ RIIA-expressing BHK cells. 第44回日米医学ウイルス性疾患専門部会, 札幌, 2010.

モイ メイリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎: Fc γ RIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗デングウイルス抗体依存性感染増強(ADE)アッセイの開発. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 小滝 徹, 倉根一郎: 東南アジアにおけるチクングニア熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.

モイ メイリン, 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎. Discrepancy in viremic titers in dengue serum samples between BHK cells and Fc γ R-expressing BHK cells. 第 16 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 東京, 2009.

林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎: フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発. 第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 千歳, 2009.

モイ メンリン, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎. Determination of the regions in Fc γ RIIA which is responsible for antibody dependent enhancement in dengue viral infection. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.

林 昌宏, 西堀武明, 渡辺香奈子, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 倉根一郎, 高崎智彦: チクングニア熱輸入症例患者血清より分離されたチクングニアウイルスの性状解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Determination of the regions in human FCGR2A responsible for the antibody dependent enhancement in dengue virus infection. 第 7 回日中国際ウイルス学会, 東京, 2008.

Lim, C.K., Takasaki, T., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 第 42 回日米医学ウイルス性疾患専門部会, 長崎, 2008.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項無し
2. 実用新案登録
特記事項無し
3. その他
特記事項無し

Fc γ 受容体を介したデング出血熱病態形成機序をターゲットとした治療法の開発

所属 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究者 林 昌宏

デング出血熱の病態形成機序解析のためCD32恒常発現BHK-21細胞を用いたデングウイルス抗体依存性感染増強(ADE)モデルを確立し、ADE阻害物質を検討したところ熱変性凝集IgG、抗CD32AにおいてADE阻害効果が観察された。

A. 研究目的

デングウイルス(DENV)は蚊によって媒介されるアルボウイルスであり、熱帯アジア、中南米、アフリカ、オーストラリア、南太平洋諸島など世界の熱帯・亜熱帯の地域で発生している。本邦においては海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。デングウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるエンベロープを有する(+)-一本鎖RNAウイルスである。

急性熱性疾患であるデング熱、致死性疾患であるデング出血熱(DHF)の治療法は今だ確立されておらず、デングウイルス(DENV)感染症の世界的な流行地域の拡大、日本への侵入が危惧されている現在、DENVの感染機構および病態解明とその治療法の確立が早急に求められている。世界保健機関(WHO)により全世界で約30億人の人々がDENVの流行地域に居住しており、年間約1億人のDENV感染者が発生しさらに2万4千人がDENVにより死亡していると推計されている。

デングウイルスには1-4型の4つの異なる

血清型が存在する。デング出血熱は疫学的研究によりデングウイルスの再感染時に多く発症することが示され、これは初感染時に誘導された中和能を有しない交差抗体に起因する抗体依存性感染増強(ADE)によると考えられている。我々はこれまでに*in vitro*抗体依存性感染増強(ADE)モデルとしてFc γ IIA受容体(CD32)を強発現させたサル腎由来細胞Cos-7細胞等を確立し、ADEの発生機序においてDENV-DENV型交差抗体複合体とFc γ 受容体の結合に続くraftとの会合及びシグナル伝達がADEの誘導に重要であることを示した。(モイ他, JGV, 2010)そこでDHFの治療ターゲットとしてFc γ IIA受容体に注目し、DENV治療法における基盤的研究としてADEを阻害する物質の探索を行うにあたりFc γ IIA受容体を恒常発現するハムスター由来BHK-21細胞を確立した。

本研究の目的は我々の確立したFc γ IIA受容体恒常発現BHK-21細胞を用いたADEアッセイ系を確立しFc γ IIA受容体を介するウイルスの細胞内侵入機序をターゲットとしたデ

ング出血熱の治療法を開発することである。

B. 研究方法

培養細胞：ハムスター由来BHK-21細胞 (American Type Culture Collection) はEMEM(SIGMA)に10%の牛胎児血清を加えた培地にて維持した。

フローサイトメトリー：CD32発現BHK-21細胞(BHK-CD32細胞)を4°Cx20min処理しPBS(-)で洗浄後、1μg/mlのマウスIgGを用いて細胞表面に発現しているCD32を15分間室温にてブロックした。10μlのCD32-PE抗体で4°C、45分間反応した。PBS(-)で2回洗浄後0.4mlのPBS(-)に再浮遊し、フローサイトメトリー (Becton Dickinson) にて解析した。コントロールとしてマウス-PE抗体を用意した。DENV感染細胞の染色は抗DENV抗体を用いて行った。

感染増強実験：デング患者血清を10倍階段希釈し、DENV(1型)と混合後37°C1時間反応した。BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し4日間培養した。DENV感染力価をVero細胞を用いたプラーク法にて算出した。

BHK-CD32細胞を用いたDENV中和試験：患者血清を5倍から2560倍まで2倍階段希釈し2x10³ PFU/ml DENV(1型と2型)と混合後37°C1時間反応した。BHK-CD32細胞および野生型BHK-21細胞にDENV-患者血清複合体を接種し1%メチルセルロースを重層し4日間培養した。ホルマリンにて固定しメチルブルーにて染色後プラークを観察した。

ADE阻害実験：凝集ヒトIgG (Agg-IgG) , 抗Fc抗体, 抗CD32A抗体ヤギpAb, 抗ヒトCD32A抗体(AT-10), 抗CD32A抗体(N-10)をBHK-CD32A細胞とそれぞれ4°C1時間反応しPBSにて洗浄後、DENV-DENV型交差抗体複合体をBHK-CD32A細胞に接種し37°C1時間培養した。培養後メチルセルロースを重層しさらに37°Cで5日間培養後固定・染色しウイルス力価を算出した。陰性対照としてDENV単独の力価を測定した。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験を行うにあたり「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多性の確保に関する法律」に基づき実施した。これに伴い、国立感染症研究所での当該実験申請手続きを行った。国立感染症研究所での実験は、特に研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第1号。)の定めによるほか、「国立感染症研究所組換えDNA実験実施規則」に定めるところによるものである。

上記の定めるところにより遺伝子の改変、使用された技術およびこれらの結果改変された生物に生じた特性に関する情報を明らかにするとともにその移動を制限し実験に供した。また適切に包装、ラベルし保存した。

C. 研究結果

CD32発現BHK-21細胞におけるDENVのADEの検討：抗DENV抗体を有する患者血清とDENVを37°Cで1時間反応し、CD32発現BHK-21細胞および野生型BHK-21細胞に感染した。プラーク法によりDENVの感染価を確認した結果デング患者血清と反応させたDENVはCD32発現BHK-21細胞に対して野生型BHK-21細胞に比較して約10倍のADE効果が観察された。この効果は患者血清を希釈することによって消失した。したがってDENVは患者血清中に含まれる抗DENV抗体と複合体を形成し、CD32を介してBHK-21細胞に感染していることが示唆された。次に様々なDEN患者血清を用いてADEアッセイを行った。その結果DENV中和抗体価上昇が認められない急性期患者血清ではADEは観察されなかったが、中和抗体の上昇した回復期血清ではADEが観察された。

CD32がADEにおいて重要な役割を担うと示唆されたため次にBHK-CD32細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDENV患者血清のDENVに対する中和抗体価を比較検討した。中和抗体価は抗DENV免疫応答を最も反映する値の1つである。

その結果BHK-CD32細胞と野生株BHK-21細胞を用いたDENV患者血清のDENVに対する中和抗体価は一致しなかった。様々な患者血清を用いて検討した結果多くの患者血清で、BHK-CD32細胞を用いた場合と比較して野生株BHK-21細胞を用いた場合、高い中和抗体価が示された。DENVの主なターゲット細胞はCD32陽性であるため、BHK-CD32細胞を用いた方がより患者血清のDENVに対する防御能を反映していると考えられた。

ADE阻害実験：次に確立したADEモデルを用いて患者血清中のDENV-DENV型交差抗体複合体とCD32Aの相互作用を阻害する物質を検討するためADE阻害実験を行った。DENV-DENV型交差抗体複合体とCD32Aの相互作用を阻害すると考えられる凝集ヒトIgG (Agg-IgG), 抗Fc抗体, 抗CD32A抗体ヤギpAb, 抗ヒトCD32A抗体(AT-10), 抗CD32A抗体(N-10)を用いてDENVの抗体依存性感染増強阻害を検討したところ、高濃度の凝集IgG (10 μ g/12 well), 抗Fc抗体 (10 μ g/12 well), 抗CD32A抗体ヤギpAb (1 μ g/12 well) においてDENVの感染増強阻害が観察された(図1)。またこのとき抗ヒトCD32A抗体(AT-10), 抗CD32A抗体(N-10)において阻害効果は観察されなかった。以上よりADEモデルを用いたADE発生機序をターゲットとする薬剤あるいは抗体の開発の可能性が示唆された。

D. 考察

我々はこれまでに培養細胞にCD32Aを恒常発現させることによってDENV感染症のADEモデルの確立に成功した。本モデルによりDENVを型交差性抗体陽性患者血清と反応させたときBHK-CD32A細胞においてDENVのADEが観察された。

また本モデルを用いてADE活性阻害実験を行った結果CD32AとDENV-DENV型交差抗体複合体の相互作用を阻害する物質がADE活性を阻害することを示した。このことはDENV-DENV型交差抗体複合体とCD32Aの相互作用を阻

害する物質のADE阻害活性の可能性、しいてはDENV感染症の治療法の開発の可能性が示唆された。しかしながらその阻害効果は高濃度の抗体においてのみ観察されたためより低濃度で特異的にADEを阻害する抗体および物質の探索を今後も継続する必要がある。

E. 結論

本研究により我々はADEの発生機序にFc γ Rが重要を果たすことを明らかとした。そしてADEの発生メカニズムがデング熱・出血熱の治療法確立のターゲットとなることが示唆された。今後もADEを阻害する抗体および薬剤の探索をADEモデルを用いて継続する。患者血清中のDENV-DENV型交差抗体複合体とCD32Aの相互作用機序あるいはデング出血熱に伴う血管透過性亢進機序をターゲットとする薬物はデング出血熱の予防・治療薬としての効果が期待される。現在DENV感染に対する特異的治療法はなく、世界の熱帯・亜熱帯地域においてデング熱・デング出血熱の流行は今後も続くことが予想され、本邦においても海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。デング出血熱やデングショック症候群はひとたび発症するとその致死率は高い重篤な疾患であり、今だワクチンの開発されていない本感染症の発症メカニズムを明らかとし治療法を開発することは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に大きく貢献する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc γ R-expressing BHK-21 cells than Fc γ R-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 203:1405-1414, 2011.