

201123056A

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

課題番号 課題番号 H23-新興-一般-028

プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1関連  
疾患発症遅延法の開発

総括・分担研究報告書

平成24年3月

主任研究者 駒野 淳

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

課題番号 課題番号 H23-新興-一般-028

プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1関連  
疾患発症遅延法の開発

総括・分担研究報告書

平成24年3月

主任研究者 駒野 淳

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

## 研 究 組 織

研究者名	所属	役職
駒野 淳	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
岡田 誠治	熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野	教授
星野 忠次	千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室	准教授
竹腰 正隆	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学・抗体工学	講師
武田 哲	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官

# 目 次

## I. 平成23年度 総括研究報告書

### 総括研究報告書

主任研究者：駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター）…………… 1

## II. 平成23年度 分担研究報告書

### 1. 治療分子と送達法の開発に関する研究

駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター）…………… 7

### 2. 治療分子の *in vivo* 送達効率の評価に関する研究

岡田 誠治（熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野）…………… 14

### 3. *In silico* maturation 法に基づく scFv の改良

星野 忠次（千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室）…………… 20

### 4. ScFv の遺伝的改変と抗原親和性に関する研究

竹腰 正隆（東海大学医学部基礎医学系分子生命科学・抗体工学）…………… 27

### 5. 治療分子の送達効率と細胞選択性の評価に関する研究

武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター）…………… 31

## III 平成23年度 業績一覧…………… 35

## IV 平成23年度 刊行物別刷（抜粋）…………… 37

# 1. 平成23年度 総括研究報告書

平成23年度 厚生労働科学省研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発」  
課題番号：H23-新興-一般-028  
総括研究報告書

研究者代表者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官  
当該年度は3年の研究計画の初年度である

**研究要旨** HTLV-1 感染症対策には、疫学、新しい治療法・診断法、ワクチンの開発と併行して、感染者における HTLV-1 関連疾患の発症遅延法の開発が必要である。ウイルスゲノムを不可逆的に不活化する方法があれば確実に発症遅延が達成できると期待できる。我々は HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素を潜伏感染細胞に送達してウイルスを不可逆的に不活化する方法を開発する。これは HIV-1 感染症で臨床応用され、治療効果が認められた方法を応用するものである。この意味で、技術的には開発から臨床応用に至る安全性評価に関してハードルが低く迅速な実用化が期待できる。本研究では Zinc Finger Nuclease(ZFN)技術を応用してこの目的を達成しようと試みる。本年度は治療分子候補の選定と並行して治療分子の効果をヒト細胞や *in vivo* で評価する実験系の構築、治療分子を送達するためのベクター被覆に供するヒト CD4 反応性 scFv の構築に成功した。

**研究分担者**

岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター  
予防開発分野・教授  
星野 忠次 千葉大学大学院薬学研究院・准  
教授  
竹腰 正隆 東海大学医学部基礎医学系分子  
生命科学・講師  
武田 哲 国立感染症研究所エイズ研究セン  
ター・研究員

**A. 研究目的**

HTLV-1 感染症には病態進展を防止する方法が存在しない。治療より発症防止の方が感染者の身体的負担は小さいうえ、社会経済的観点からもメリットがある。これを達成するために、我々は治療分子に HTLV-1 LTR を特異的に認識する亜鉛フィンゲールヌクレアーゼ(ZFN)を利用して HTLV-1 のプロウイルスを不可逆的に機能破壊し、

潜伏感染に介入して発症を遅延させる方法の確立を目指す。ZFN は特性が極めて高い核酸配列認識と double strand break を導入する活性を有する。従って、HTLV-1 の LTR を標的とすれば転写機能を不可逆的に奪うことが可能である。また、2つの LTR 間に位置するプロウイルスを制御する事も可能である。LTR 機能の不可逆的破壊やプロウイルスの除去によりウイルスの病原性は失われる事が予想される。この治療分子に加えて、HTLV-1 の主な感染標的と考えられる CD4 陽性 T 細胞に治療分子送達を反復して行う事により十分な治療効果を得る医用技術として完成させたい。送達選択性を高めるため scFv 化膜アンカー型抗 CD4 抗体によるベクター被覆または HTLV-1 Env によるベクター被覆を行う。シード抗体は健常人由来であるため使用にかかる生理攪乱リスクは比較的低い。実用化には感染動態と発症に至るメカニズムをより根底から理解す

る必要がある。従って、他の HTLV-1 研究班と密な情報交換を行い最新の研究成果を参照しながら実用化への戦略を固めたい。HTLV-1 関連疾患の発症には長い潜伏期間を必要とする。好発年齢を考えると、潜伏期間を 3 倍に遅延できれば現実的に発症を防ぐことが可能である。そのため、潜伏感染するプロウイルスゲノムを物理的に傷害して病原性を欠落させる技術を開発する。我々はリンパ腫・ウイルス研究の背景とこれまで蓄積した研究成果を最大限に利用して本法の開発に取り組む。

本研究の特徴は(1) エピジェネティックな転写制御では達成できない不可逆的な治療効果を達成できる。本法と同等の治療分子で HIV-1 感染症にて治療に成功した報告(Holt et al, Nat Biotechnol 2010)は本法の成功と早期実現に期待を持たせる。(2) 治療分子は HTLV-1 LTR に特異的に反応するため、非感染細胞に送達されても重大な副反応を引き起こすとは考えにくい。(3) 厚生科学研究で蓄積してきた研究成果を組み合わせた研究計画で、研究の継続性と高い独自性を有する。具体的には我々が独自開発した安全性の高い蛋白質導入システム LENA またはレンチウイルスベクターを治療分子デリバリーに利用する(Aoki et al, Gene Ther 2010; 2011)。治療分子送達の細胞選択性を向上させるための CD4 反応性抗体クローンは我々が既に樹立し特許化した(Hamatake et al, Euro J Immunol 2010)。これは健康人由来であるため in vivo 投与にかかる副作用の懸念は低い。研究分担者が独自に開発した技術 in silico maturation 法を利用してシード抗体をより高い抗原親和性を持つ抗体に改変する。

本年度は治療分子候補の選定、ヒト細胞における治療分子機能の評価系構築、小動物実験系における治療分子機能の評価系構築、治療分子

送達にかかる技術開発の基盤の構築を行った。

## B. 研究方法

1. 治療分子の開発 (駒野・武田) : HTLV-1 プロウイルスを不可逆的に障害するためヒトにおける遺伝子治療にも実用化されている非常に塩基配列特異性の高いZFNを治療分子として選択し、HTLV-1 プロウイルスLTR塩基配列の中にZFN標的配列をSangamo proprietary algorithmにより選抜し、発現プラスミドの合成を行った。一方、ヒト細胞において治療分子の機能を評価するため、感度・特異性が高い評価系の詳細なデザインを行った。

2. 小動物モデルによる治療分子機能評価系の開発 (岡田) : 免疫不全マウスにおけるHTLV-1トランスフォーム細胞造腫瘍のxenograftingを行い腫瘍細胞の生着と増殖を生体外から測定する系の開発を試みた。

3. 治療分子送達法の開発 (竹腰・星野) : In vivo で感染標的とされる CD4 陽性細胞への治療分子送達を効率よくおこなうためにエンベロープウイルスの表面を CD4 に親和性の高い抗体で被覆する技術を開発する。健康人由来の CD4 反応性抗体 Fab クローン HO538-213 を抗体工学的に改変してエンベロープウイルスベクター被覆が可能な誘導體とする。一方、抗原と抗体の結合親和性算出プログラム(Orientation)の改良を行い、計算速度と評価精度の向上を試みた。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

1. 治療分子の開発 (駒野・武田) : 複数のプロウイルスに共通する配列の中から 9 種類の治療標的を選択し、合成した ZFN により MEL1 アッセイによりヒトで臨床応用されている CCR5 に

対する治療分子よりも生物活性の優れた候補を 2 種類得た。ヒト細胞において治療分子の機能を評価するため、ヒト細胞で一過性に ZFN とその基質を導入して、基質を回収して治療効果を与える核酸改変が導入されたものを大腸菌内で効率よく回収する系をデザインした。さらにプロウイルス除去によってルシフェラーゼシグナルが得られるような基質核酸をデザインした。ウイルスの病理学的理解を深めるため、プロウイルス転写活性を制御する新たな内在性因子としてサイクリン T1 のエクソン 7 欠損スプライスバリエーションの同定を行った。

2. 小動物モデルによる治療分子機能評価系の開発（岡田）：HTLV-1 による腫瘍形成と治療効果を評価するため、マウスモデルにて赤色蛍光を指標とした生体内腫瘍のリアルタイムモニターを実現した。

3. 治療分子送達法の開発（竹腰・星野）：HTLV-1 今年度は HO538-213 の scFv 化に成功し、エピトープ解析に必要な抗原発現生成系を樹立した。CD4 反応性抗体のエピトープ解析に必要な大腸菌及びヒト細胞における抗原 D1D2 ドメイン発現精製系を構築した。また、CD4 認識抗体の改良を支援するための抗原および抗体の大量生成モデルを構築し、モデル分子による *In silico* maturation 法のプログラムの改良を行い、抗体成熟プログラムに特化した汎用的な並列計算ルーチン(MatureUp)を作成した。抗原と抗体の結合親和性算出プログラムに、周辺の水分子の分布を最適化するためのルーチンを組み込むことで、計算による結合親和性の評価精度を向上することができた。これによりスーパーコンピュータで、抗体成熟計算を実行することが可能になり計算速度が向上した。

（主な研究成果概要図を参照）

#### D. 考察

当初の研究計画はおおむね達成できたと考える。今後の課題としては下記の項があげられる。

- (1) 2 組の治療分子最終候補についてヒト細胞における機能試験を行う。
- (2) 治療分子によるプロウイルス機能破壊を核酸レベルで確認づける。
- (3) HTLV-1 感染細胞からのプロウイルス除去効率を評価する。
- (4) HTLV-1 感染細胞におけるプロウイルス LTR 機能破壊効率を評価する。
- (5) ゲノム完全性と遺伝子発現攪乱の観点および細胞生理攪乱の角度から治療分子の安全性の評価を評価する。
- (6) 小動物実験系を用いて治療分子の生物学的作用を確認する。
- (7) scFv 化 HO538-213 のエピトープ解析を行うと同時に生体内に投与した際の免疫攪乱の有無を評価する。
- (8) *In silico* maturation 法を利用して scFv 化 HO538-213 の CD4 に対する親和性の改善を実証する。
- (9) TNSALP C 末端由来のアミノ酸配列を利用して GPI アンカー化細胞膜発現 scFv 化 HO538-213 を作出する。
- (10) レトロまたはレンチウイルスベクターの CD4 反応性 scFv 被覆を行い、CD4 陽性細胞への遺伝子送達選択性の向上を図る。
- (11) *In vivo* におけるヒトの CD4 陽性細胞に対する治療分子送達選択性の向上を評価する。

発症防止は発症後の治療より HTLV-1 感染者の身体的負担は小さい。ATL 治療を念頭に置くと、標準的な化学療法の費用は約 1000 万円以上である。我々の目指す治療法は遺伝子治療に類似するが、標準的な遺伝子治療にかかる価格はその



半額以下とされる。感染者の QOL 維持、医療費軽減の観点から優れたアプローチと思われる。本治療法の原理は HTLV-1 ゲノムの破壊であるため、病態の進行を遅延させるだけでなく、感染者から放出される感染性ウイルスの量も減少させることも期待される。従って、ウイルス伝播を食い止める効果も期待できる。本技術と末梢血幹細胞移植および遺伝子治療を組み合わせることにより、将来 ATL に対するより確実な治療法開発の基盤を提供することもできる。治療分子送達技術や抗体工学は、HTLV-1 感染症領域を超えて、遺伝子治療や抗体医薬の領域にも多大な貢献が期待できる。総じて、本研究によって長期間にわたる医療機関への受診や薬剤の長期投与を感染者に要求せずに発症を食い止める「感染者にやさしい発症予防法」の確立が期待される。HIV-1 感染症ではプロウイルスゲノム駆除法の開発や骨髄移植・遺伝子治療による治療成功が HIV-1 感染者に生きる希望を与えている。不可逆的にウイルスを無力化する技術は根治療法の基盤を提供する極めて重要な技術であり、感染者に希望を与える。予防ワクチンは次世代の感染予防に大きく貢献する事が期待されるが、現在の感染者への救済には結びつかない可能性が高い。さらにワクチンが十分な効果を発揮できない場合には根治療法の提供はなくてはならない医療サービスと思われる。以上を勘案すると、本研究は厚生労働省研究の一環として根治に結びつく研究の推進には大きな意義があると考える。今後も治療概念の証明から実用化するまでの戦略的な支援を期待したい。一方、学術的な観点から見るとプロウイルスの存在、プロウイルスコピー数と細胞の増殖能や悪性化に関する相関については直截的な検証がこれまで技術的に不可能だった。我々の記述はこの重要な

科学的命題を解くために大きく貢献できると期待される。

## E. 結論

本研究は HTLV-1 感染者へ次世代医療の提供を前提とした新たな厚生研究の方向性を示す事ができるほか、根治療法の実用化を念頭においた HTLV-1 病理学的基礎研究の方向性の提示という点で厚生行政への貢献が期待できる。

## F. 健康危機情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

分担報告書参照

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

特記すべきことなし

### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし

### 3. その他

特記すべきことなし

図1. 本研究の研究計画概要

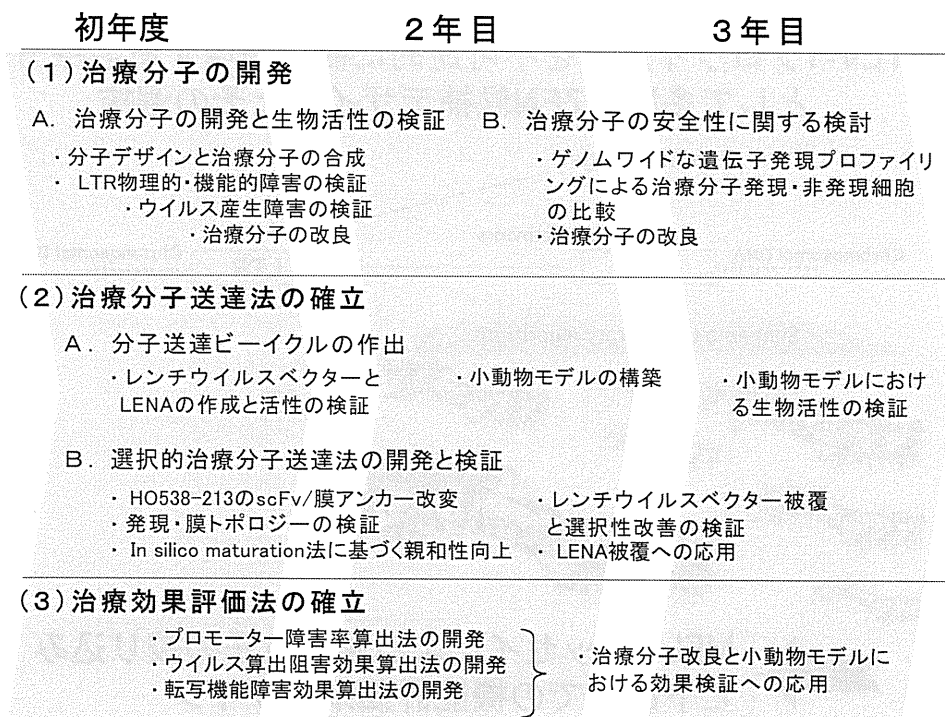
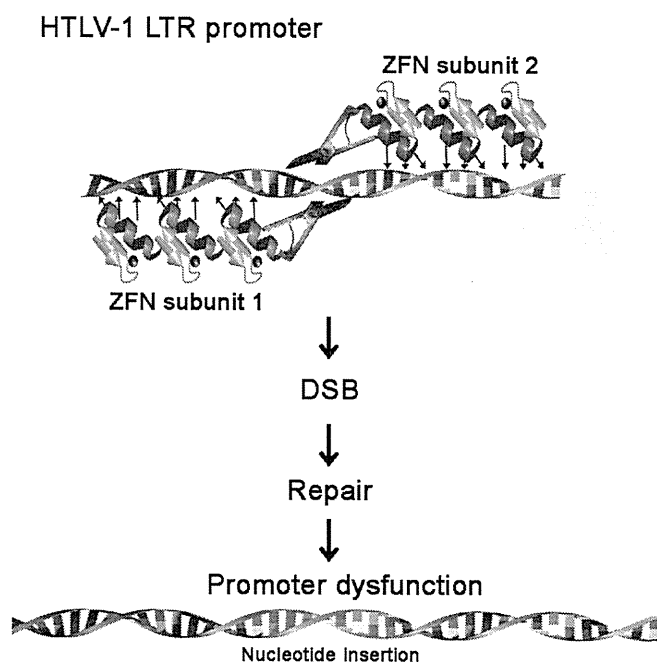


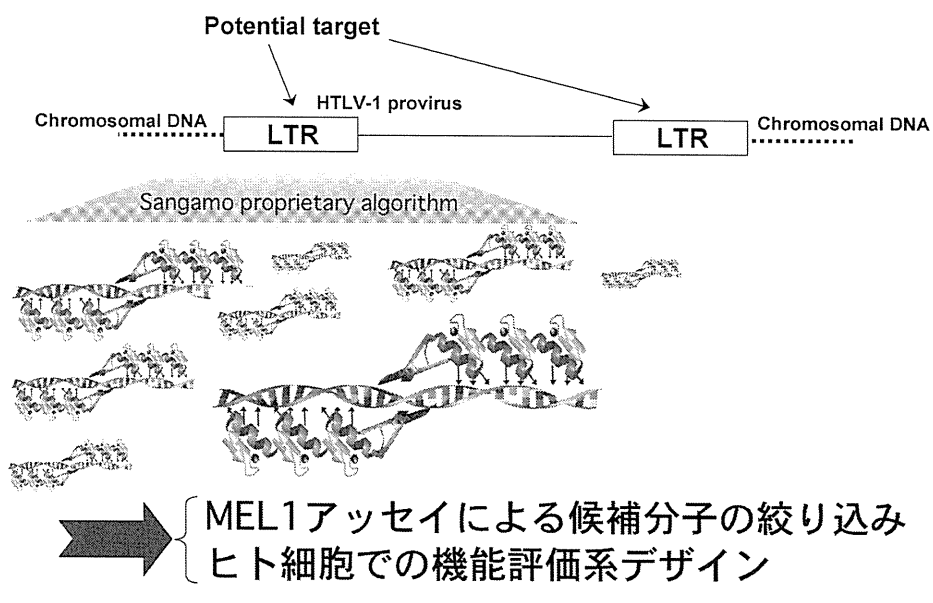
図2. 治療分子とその作用機序概要



治療分子の作用メカニズム

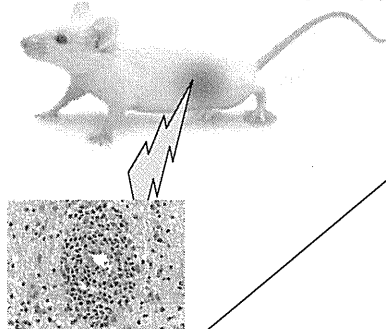
図 3. 本年度の研究成果概要

### HTLV-1プロウイルスを不可逆的に機能破壊する治療分子として多種のZFN候補デザインとその選抜



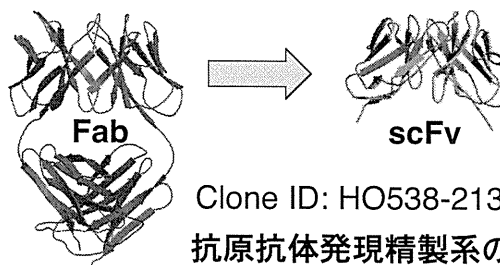
### 治療分子の生体内治療効果評価系の開発

蛍光を利用した生体内HTLV-1  
増腫瘍性モニター系を開発



### 治療分子送達法の開発

抗体工学による健常人由来  
CD4反応性抗体のscFv化に成功



## 11. 平成23年度 分担研究報告書

平成23年度 厚生労働科学省研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発」  
課題番号：H23-新興-一般-028  
分担研究報告書

分担研究課題：治療分子と送達法の開発に関する研究

研究分担者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

**研究要旨** 本研究では Zinc Finger Nuclease (ZFN)を応用してHTLV-1 プロウイルスを破壊する治療分子を開発して HTLV-1 感染症に対する根本的な治療法の開発に対する可能性を示す。DSB は宿主細胞の修復系により再結合されるが、修復後の核酸配列はもとの配列から変化する。この特性を生かして HTLV-1 プロウイルスの機能を不可逆的に破壊するような治療分子を開発する。標的配列にはウイルス遺伝子発現を担う唯一のウイルスプロモーターである LTR が理想的である。また、修復系の反応の最終反応は2本鎖 DNA 平滑末端の結合反応である。2本鎖 DNA の近傍に2カ所の DSB を導入すれば導入箇所間に存在する核酸断片は除去されて結合反応が起こる。HTLV-1 プロウイルスには2カ所に LTR が存在する。これを標的にすれば感染細胞からプロウイルスを除去することが可能になると期待される。本年度は Sangamo proprietary algorithm により LTR を標的とする ZFN のデザインと酵母における候補分子の酵素反応の検証を行い、高い活性を持つ2種類の治療分子工法の合成に成功した。

#### A. 研究目的

ZFN は標的核酸配列に結合して DNA に DSB を導入する。HTLV-1 LTR を特異的に認識する ZFN をデザインして、HTLV-1 provirus に特異的に結合して DSB を導入する。DSB が宿主の DSB Repair system により修復される過程で引き起こされる変異を利用して HTLV-1 provirus 機能を破壊する。ZFN は2つの分子 (subunit A/B) から構成される。2つの ZFN はそれぞれ特定の DNA 配列に結合するようにデザインされ、その認識配列長は 12-18 ヌクレオチドである。2つの ZFN はそれぞれ Fok I と融合される。Fok I の Nuclease 活性は2つの Fok I が互いに近接しなければ発揮できない。約 30 ヌクレオチドからなる標的部位に ZFN を2分子

結合させて、2分子の ZFN 部位が結合する DNA 配列を近接させることにより、同部位に Fok I によって DSB を導入することができる。Fok I の切断は3'末端突出である。宿主の DSB Repair system は DSB 部位を認識してこれを結合させ修復させる機能をもつ。宿主の DSB 修復系が機能するときには fill-in 反応を経由して DNA 末端を再結合する必要がある。従って修復反応後の DNA 配列はもとの配列とは異なる。これが ZFN システムによって特定の DNA 配列を損傷する事ができるメカニズムである (Handel E.M. and Cathomen T., Curr Gene Ther 2011)。ヒトゲノムの大きさと DNA の構成要素が4つの塩基の組み合わせであることを考慮すると、約 30 ヌクレオチドの長さは非常に

高い特異性と考えられる。この特異性が ZFN のゲノム毒性が低い原因であり、ヒトにおける遺伝子治療へ臨床治験応用が認可された背景である。実際、この手法を利用した CCR5 遺伝子破壊が HIV-1 感染症に対するヒト遺伝子治療に応用され治療効果が得られている (Holt N. et al., Nat Biotechnol 2010; Cannon P. and June C., Curr Opin HIV AIDS 2011)。

宿主の DSB Repair system は DSB 部位を認識してこれを結合させ修復させる機能をもつが、その標的配列はウイルスの遺伝子発現が依存する唯一のウイルスプロモーターである long terminal repeat (LTR) が望ましいと考えられる。これが機能障害されれば、ウイルス遺伝子は発現せず、病原性は失われると期待される。さらに、DSB が近接した場所に 2 箇所存在すれば、その間に存在する DNA を欠失させて DNA 断片同士を再結合する活性がある。もし HTLV-1 プロウイルスの LTR を標的にすれば、LTR の機能を破壊できる可能性と、provirus を宿主ゲノムから除去できる可能性がある。この意味で標的配列を LTR にすることは理にかなっている。本研究では HTLV-1 感染症の根治を可能にする宿主ゲノムからの provirus 除去というコンセプトの検証を念頭に置いた研究を推進する。

## B. 研究方法

標的配列の絞り込みは Sangamo proprietary algorithm により行う。対象とするプロウイルスの核酸配列は、少なくとも 1983 年に Seiki, M が発表した J02029 と 1988 年に Malik, KT が報告した D13784 の LTR を認識するようにデザインを試みた。分子合成は Sigma 社にて行う。候補となる ZFN は 9 種類を調査し、その中で最も高い活性を持つものを選択する。対象として

HIV クレイド B の LTR を認識する 7 種類の ZFN を評価して同様の実験を進める。生物学的な機能の評価には酵母発現系を応用した MEL1 アッセイを利用する。これは ZFN 表的部位を導入した酵母プラスミドを利用し、ZFN が機能しなければレポーター遺伝子としての MEL1 活性が再構築できないようにしたアッセイ系である (Doyon Y. et al., Nat Biotech 2008)。MEL1 は分泌型  $\alpha$  ガラクトシアーゼの遺伝子であり、しばしばレポーターアッセイに利用される。本実験系では MEL 遺伝子を機能しないように 5' 及び 3' 領域に分割して、その中に ZFN の標的配列を位置させた遺伝子を持つレポーター酵母株を作成する。これに 2 種類の ZFN 発現プラスミドを導入し、GAL1 プロモーターを活性化することにより一過性に ZFN を酵母中で発現させる。これらが協調して標的配列を認識し、DSB を導入すると一定の頻度で修復された遺伝子により MEL1 活性が復帰する。この頻度を酵素活性により評価する。もし、極めて強い細胞毒性が ZFN にある場合は、MEL1 活性陽性の細胞が得られる頻度は減少する。したがってこの実験系では酵素活性と細胞毒性を同時に評価することができる。この評価系で選抜される候補分子は少なくとも臨床応用に供されたヒト CCR5 遺伝子を破壊する ZFN の機能効率と比較して同程度かより高いものである (Holt N. et al., Nat Biotechnol 2010)。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

電算機解析の結果得られたヒトゲノムに標的配列が存在せず、HTLV-1 プロウイルスの LTR を特異的に認識することが期待される候補配列として 20 種類を得た (表 1)。この中

から複数のウイルス株で保存されている配列 9 種類に焦点を絞って酵母における酵素活性試験を行った。対照として HIV-1 クレイド B を認識する 11 種類の候補配列から複数の分子クローンに共通した配列を中心に 7 種類を選抜して酵母における酵素活性試験を行った (表 2)。MEL1 アッセイでは上記候補塩基配列の中で HTLV-1 の LTR を標的とする 2 ペアの ZFN が高いシグナルを与えた (図 1)。このシグナルはヒトで臨床応用されている CCR5 に対する ZFN より 2 倍以上の活性を持つ。一つの候補は galactose による PGAL1 活性化によって MEL1 活性を与えたが、もう一方はプロモーター活性の誘導を与えない状態で非常に低い発現レベルでも十分に高い MEL1 活性を与えたことから、ZFN1/2 の組み合わせが持つ生物活性がより強い事が示唆された。この標的配列は表 1 における #16 と #20 である。HIV-1 の LTR を標的とする群では有意な活性を与える候補は得られなかった。

#### D. 考察

候補配列選定において、exclusion criterion の自動化は容易であるが、conservation sequence について自動的に絞り込みを欠けるというプログラム設定がされていないため、候補配列の選定については候補配列を個別に手作業で保存領域かどうかの検証をする必要があったため、候補配列の最終的な導出までには時間を要した。さらに、候補配列選定の後、合成された ZFN 遺伝子からの酵素タンパク質の発現および酵素活性の強さと特異性に関してはバイオアッセイによる検証が不可欠であるため、場合によっては ZFN 自体の再合成や標的配列の再スクリーニングを必要とする。この意味では ZFN 技術自体にはさ

らに経験の積み重ねによる改良が必要であると思われる。対照として使用している CCR5 に対する酵素活性よりも優良な候補分子を得る事は将来の臨床応用という観点からは非常に望ましいと考える。酵母における MEL1 アッセイはほ乳類細胞における発現およびゲノム毒性を完全に反映するものではないため、今後はヒト細胞系における候補分子の活性検証と安全性評価を進める必要がある。

#### E. 結論

Sangamo proprietary algorithm により LTR を標的とする ZFN のデザインと酵母における候補分子の酵素反応の検証を行い、今後ヒト細胞系で評価するための治療候補分子を得た。

#### F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Kusagawa S, Kitamura K, Naganawa S, Murakami T, Honda M, Yamamoto N, Komano J\*. Regulation of the susceptibility of HIV-1 to a neutralizing antibody KD-247 by non-epitope mutations distant from its epitope. AIDS. In press.
2. Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. ChemMedChem. In press.
3. Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J\*. The hematopoietic

cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. AIDS Res Hum Retroviruses. In press.

4. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa-Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S\*. CD4-positive T cells have a critical role in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. PLOS Pathog. In press.

5. Urano E, Kuramochi N, Tomoda H, Takebe Y, Miyauchi K, Komano J\*, Morikawa Y\*. A Novel Postentry Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Sep;55(9):4251-60.

6. Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J\*. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. Gene Therapy. 2011 Sep;18(9):936-41.

7. Miyauchi K, Urano E, Yoshiyama H, Komano J\*. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. Cancer Sci. 2011 Jun;102(6):1236-41.

8. Yanagita H, Urano E, Matsumoto K, Ichikawa R, Takaesu Y, Ogata M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. Bioorg Med Chem. 2011; 19, 816-25.

9. 駒野 淳. 止まらないエイズウイルス流行の拡大。中央論評、In press

## 2. 学会発表 (国際学会)

1. Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Mari Takizawa, Jun Komano. HIV-1 protease-activable CASP3 as a therapeutic gene against HIV-1 infection. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sep 13, 2011, Sapporo

2. Tadashi Watanabe, Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Makiko Hamatake, Kei Sato, Hiroataka Ebina, Yoshio koranagi, Jun Komano. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sep 13, 2011, Sapporo

3. Ken-ichi Imadome, misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakazawa, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, Tomohiro Morio, Shouichi Ohga, Mamoru Ito, Jun Komano, Shigeyoshi Fujiwara. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV-HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sep 13, 2011, Sapporo

4. Hiroshi Yanagita, Tyuji Hoshino, Masakazu Ogata, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Tsutomu Murakami, Jun Komano. Development of the compounds inhibiting RNase H enzymatic activity of HIV-1 reverse transcriptase. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sep 13, 2011, Sapporo

5. Kosuke Miyauchi, Emiko Urano, Jun Komano. Induction of innate anti-viral response by



XMRV infection. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sep 13, 2011, Sapporo

6. Jun Komano. Inhibition of leukemic cell growth and HIV-1 propagation by HIV-1 protease-activable CASP3. CSHL meeting on Retroviruses, May 23-28, 2011, CSHL meeting on Retroviruses, NY

(国内学会)

1. Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Mari Takizawa, Reiko Ichikawa, Jun Komano. Therapeutic potential of CASP3 engineered to be activated by HIV-1 protease. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

2. 齊藤達哉、駒野淳、斎藤愛記、山岡昇司、山本直樹。好中球は Neutrophil extracellular traps により Human immunodeficiency virus-1 を排除する。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

3. Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Emiko Urano, Yoshiaki Okada, Cheng Kui, Yin Hang. Activation of TLR3-mediated innate immune response by retroviral infection in human cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

4. 齊藤達哉、駒野淳、斎藤愛記、山岡昇司、山本直樹、審良静男。Zinc finger antiviral protein はガンマレトロウイルスに対する感染防御応答を制御する。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

5. 柳田浩志、横田瑞穂、尾瀨将一、浦野恵美子、市川玲子、村上努、駒野淳、星野忠次。HIV-1 逆転写酵素 RNase H 活性阻害剤の開発。第 25 回日本エイズ学会学術集会・

総会、2011 年 12 月 2 日、東京

6. 浦野恵美子、宮内浩典、滝澤万里、市川玲子、駒野淳。HIV プロテアーゼ活性型 CAPS3 による HIV 複製抑制。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 11 月 30 日、東京

7. 尾崎太郎、浦野恵美子、鳴海哲夫、野村渉、Maddali Kasthuraiah、Pommier Yves、山本直樹、駒野淳、玉村啓和。Vpr 由来インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 11 月 30 日、東京

8. 招待講演 Jun Komano. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a

potential diagnostic tool for B cell lymphoma. シンポジウム「ガン・免疫・代謝研究を加速する Multiplex Assay とその応用」、2011 年 6 月 7 日、東京

9. Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Aki Ohya, Kosuke Miyauchi, Tetsuo Narumi, Jun Komano, Naoki Yamamoto, Hirokazu Tamamura. Synthesis of Trimeric Peptide Based on Gp41-C34 and its Anti-HIV effects(HIV 外被タンパク質 gp41-C34 3 量体の合成とその抗 HIV 作用). 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会、2011 年 5 月 23-25 日、東京

#### H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
特記すべきことなし
2. 実用新案登録  
特記すべきことなし
3. その他  
特記すべきことなし

表1. ZFNの標的とする HTLV-1 LTR 候補配列一覧<sup>a</sup>

---

1	CTCCCCCGGAGGACAGnnCAGCACCAGCTCAGGCT
2	CCGGAGGACAGCTCAGCnnCAGCTCAGGCTAGGCC
3	CATGTTTGTCAAGCCGTnCTCAGGCGTTGACGACA
4	ACCCCTCACCTCAAAAAnnTTTTTCATGGCACGCATACGGCT
5	CTCTCCTTACGCGCCCGCCnnCTTACCTGAGGCCGCCA
6	CGCGCCCGCCGCTTACCTGnGGCCGCCATCCACGCCG
7	GCCGCTTACCTGAGGCCGCCAnCCACGCCGTTGAGTCGCGTT
8	CCTTACCTGAGGCCGCCATCnnCGCCGTTGAGTCGCGTT
9	GGCCGCCATCCACGCCGTTnngTCGCGTTCTGCCGCCTCCCG
10	CATCCACGCCGTTGAGTCGnTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTG
11	CGGTTGAGTCGCGTTCTGnnGCCTCCCGCCTGTGGTG
12	TTCTGCCGCCTCCCGCCnGTGGTGCTCCTGAACTACG
13	TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTnCCTCCTGAACTACGTCC
14	CTCCTGAACTACGTCCGCCGnCTAGGTAAGTTTAGAGCT
15	AACTACGTCCGCCGTCTAGGnAAGTTTAGAGCTCAGGTCGAG
16	GCCTACCTAGACTCAGCCGGCTnTCCACGCTTTGCCTGAC
17	CTTTGTTTCGTTTTCTGnnCTGCGCCGTTACAGATCGAA
18	CTTTGTTTCGTTTTCTGTTcngCGCCGTTACAGATCGAAAG
19	TCCACCCCTTTCCCTTTnnTTCACGACTGACTGCCGGCT
20	TCCACCCCTTTCCCTTTCATnnACGACTGACTGCCGGCT

---

<sup>a</sup>Capital letters: ZFN recognition sequence, Lower case: DSB introduction site

表2. ZFN の標的とする HIV-1 LTR 候補配列一覧

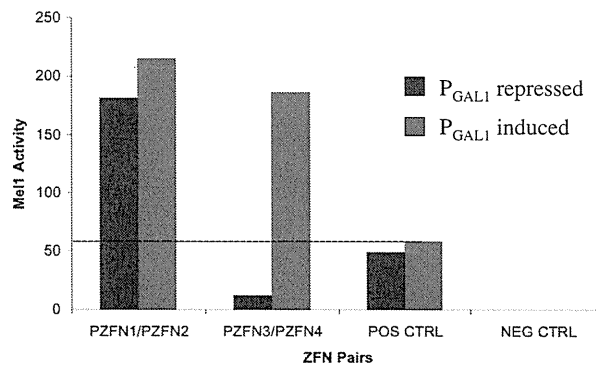
---

1	CTACTTCCTGATTAGCnGAACTACACACCAGGGCCAG
2	TCCACTGACCTTTGGATnGTGCTACAAGCTAGTACCAG
3	AGCTAGTACCAGTTGAGnCAGAGAAGTTAGAAGAAGCC
4	AACACCAGCTTGTTACAnnCTGTGAGCCTGCATGGA
5	CAGCTTGTTACACCCTGTGAnCCTGCATGGAATGGATG
6	TACACCCTGTGAGCCTGnATGGAATGGATGACCCGGAG
7	CTGTGAGCCTGCATGGAnTGGATGACCCGGAGAGAGAA
8	CCTGTGAGCCTGCATGGAATnnATGACCCGGAGAGAGAA
9	CGCTGGGGACTTTCAGnGAGGCGTGGCCTGGGCGGGA
10	ATCCTGCATATAAGCAGCTGnnTTTTGCCTGTACTGGGT
11	CCAGATCTGAGCCTGGGAGCnCTCTGGCTAACTAGGGA

---

<sup>a</sup>Capital letters: ZFN recognition sequence, Lower case: DSB introduction site

図1. ZFNペア2種類がMEL1 assayにて治療分子候補として選抜



発現誘導前は微弱な ZFN 発現によって MEL1 活性が再構築される。  
陽性コントロールとして CCR5 に対する ZFN を用いている。

分担研究課題：治療分子の *in vivo* 送達効率の評価に関する研究

研究分担者 岡田 誠治 熊本大学・エイズ学研究センター 教授

**研究要旨** 成人T細胞性白血病(ATL)は、腫瘍ウイルスである HTLV-1 感染を原因とする極めて予後不良の悪性腫瘍である。現時点では根本的治療法がないため、新たな治療法の開発が望まれている。本研究では、HTLV-1 による腫瘍形成と治療分子による治療効果を *in vivo* で評価する系の樹立を目的に、蛍光色素等を遺伝子導入した ATL 細胞株を高度免疫不全マウスに移植することにより、ATL のマウスモデルを樹立し、蛍光イメージング装置等により腫瘍量を経時的・定量的に解析する事で治療効果を評価する系の開発を試みている。本年度は、赤色蛍光を遺伝子導入した成人T細胞性白血病株(MT-2, MT-4)を高度免疫不全マウスに移植し、蛍光イメージング装置により腫瘍量を定量的に解析する事に成功した。本モデル系は、ATL に対する新規治療分子の効果や副作用を *in vivo* で評価するのに適した系である。

#### A. 研究目的

成人 T 細胞性白血病 (Adult T cell leukemia/lymphoma: ATL)は、腫瘍ウイルスである Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1)感染を原因とする極めて予後不良の悪性腫瘍である。現時点では根本的治療法がないため、感染予防・発症予防と新たな治療法が開発が望まれている。

本研究の目的は、成人T細胞性白血病(Adult T cell leukemia: ATL)のマウスモデルを作成し、治療分子の治療効果を経時的・定量的に解析する系を樹立し、ATL の病態解析と新規治療法の開発に供することである。

#### B. 研究方法

治療効果の *in vivo* 解析に適した様々な高度免疫不全マウスを樹立する。これらのマウスに

蛍光色素等を遺伝子導入したATL細胞株を移植して、ATLモデルマウスを作成する。ATLモデルマウスを用いてATLの病態解析及び治療薬の経時的・定量的な評価系を樹立する。

(倫理面への配慮)

免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行っている。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリ B（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。