

201225043A

平成24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25年3月

主任研究者 駒野 淳

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部ウイルス課・主任研究官

平成24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25年3月

主任研究者 駒野 淳

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部ウイルス課・主任研究官

研究組織

研究者名	所属	役職
駒野 淳	大阪府立公衆衛生研究所・感染症部ウイルス課	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
田中 淳	大阪大学・微生物病研究所	特任講師

目 次

I. 平成24年度 総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者：駒野 淳（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）・・・・・・・・・・ 1

II. 平成24年度 分担研究報告書

1. 治療分子による部位特異的LTRの物理的破壊に関する解析

駒野 淳（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）・・・・・・・・・・ 9

2. 治療分子による抗ATL効果の*in vivo*における評価

岡田 誠治（熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野）・・・・・・ 17

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）・・・・・・・・ 24

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）・・・・・・・・ 33

5. 治療分子持つ標的DNA削除活性とHTLV-1感染細胞増殖抑制活性の解析

武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター）・・・・・・・・・・ 38

6. 治療分子によるHTLV-1感染細胞増殖阻害機能の評価

田中 淳（大阪大学微生物病研究所・特任講師）・・・・・・・・・・ 45

III 平成24年度 業績一覧

IV 平成24年度 刊行物別刷（抜粋）

1. 平成24年度 総括研究報告書

平成24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 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課 主任研究官
当該年度は3年の研究計画の2年目である

研究要旨 HTLV-1 感染症対策には新たな治療・発症予防法の開発が求められる。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。さらに、ウイルスを感染者から取り除く技術基盤を提供できるかもしれない。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の開発を試みている。これを達成するため、我々は人工酵素 Zinc Finger Nuclease (ZFN)技術を応用する。本技術は既に臨床応用で一定の成果を挙げており、安全性に関するハードルが低く、迅速な実用化が期待できる。本年度は治療分子が HTLV-1 感染細胞の増殖を阻害し、生体内における ATL 細胞の造腫瘍性を低下させることを明らかにし、治療分子の有用性を確証付けた。さらに、治療分子を生体内で安全に HTLV-1 感染標的である CD4 陽性 T 細胞に送達する技術基盤の構築を行った。

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
田中 淳 大阪大学微生物病研究所・特任
講師

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人工酵素である亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(Zinc Finger Nuclease, 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表的部位に double strand break (DSB)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。LTR を標的とすれば一つのプロウイルスに対して2つの治療標的があることになり、治療効果の増大が期待できる。また、2つの LTR 間に位置するプロウイルスを切除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

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

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。シード抗体は健康人由来であるため使用にかかる生理攪乱リスクは低いと思われる。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と期待される。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と同時に腫瘍化した細胞に対しても治療効果を併せ持つ治療分子の開発と送達技術を併せて開発する。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。

本年度は治療分子がHTLV-1感染細胞の増殖を阻害し、生体内におけるATL細胞の造腫瘍性を低下させることを明らかにし、治療分子の有用性を確認付けた。さらに、治療分子を生体内で安全にHTLV-1感染標的であるCD4陽性T細胞に送達する技術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・田中): ZFNを2組作出し、ヒト細胞における遺伝子発現プロファイリングを行った。さらに、LTRプロモーター活性を測定するレポーターアッセイ系、2種類のtargeted deletionレポーターアッセイ系、HTLV-1感染細胞の細胞増殖アッセイ系において、ZFNの治療分子活性を検証した。HTLV-1感染細胞としてはATL由来の細胞株ED, TL-OmI, S1TとHTLV-1-transformed細胞株C8166, MT-2, MT-4を用い、陰性対照としてウイルス陰性のヒトT細胞株Jurkat, MOLT-4, CEMを用いた。

2. 小動物モデルによる治療分子機能評価(岡田): 免疫不全マウスにZFNを導入したATL細胞株EDをxenograftingし、腫瘍細胞の生着と増殖を測定することによりZFNの持つATL治療活性を評価した。

3. 治療分子送達法の開発(竹腰・星野): Invivo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を基盤に開発された LENA、レトロウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターの表面を 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 scFv に改変してその抗原反応特異性とエピトープの同定を行なった。一方、抗原と抗体の結合親和性の改善を支援するための計算プログラム(Orientation)の試行と実証実験系の確立を行った。

(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・田中) : 治療分子 ZFN はヒト細胞において良好に発現し、核移行することが確かめられた。HTLV-1 LTR のプロモーター活性を特異的に阻害し、LTR に物理的損傷と部位特異的に変異を導入する事を明らかにした。さらに治療分子発現により HTLV-1 で不死化したヒト T 細胞と ATL 由来の細胞株の細胞増殖を共に阻害できる事を明らかにした。以上の知見は ZFN が HTLV-1 感染細胞除去と HTLV-1 関連悪性疾患の治療分子として活性を有する事を確認づけるものである。さらに、治療分子 ZFN が認識配列で挟まれた DNA 領域を除去する targeted deletion 活性を持つことが証明された。これは治療分子 ZFN がプロウイルスゲノムを除去する能力、つまりウイルスを体内から取り除く活性を持つ事を示している。

2. 小動物モデルによる治療分子機能評価 (岡田) : マウスモデルにおいて ATL 細胞の造腫瘍性を治療分子 ZFN が抑制することを明らかにした。これは生体内における ZFN の ATL に対する治療効果を直截的に示すものである。

3. 治療分子送達法の開発 (竹腰・星野) : 健康人由来 CD4 反応性モノクローナル抗体 HO538-213 を scFv 化し、さらに特定のアミノ酸を変異させる事により抗体の安定性と反応性の向上を達成した。HO538-213 の認識するエピトープが MHC-CD4 相互作用に影響しない D1 ドメインの C 末端部分に同定された。これは生体への投与における抗体の安全性を強く示唆し、将来の治療分子送達法への応用を支持する知見である。HO538-213 scFv がマウス CD4 と反応性がある事を明らかにした。これは抗体の生体内安全性を試験するうえでマウスが利用できることを示している。独自開発した In silico maturation 法を利用して、CD4 認識抗体の抗原親和性を向上する実験を効果的に推進するための scFv と抗原 D1 ドメインの大量生成系を構築した。In silico maturation 法のパイロット試験を行った。

(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。HTLV-1 のプロウイルスを除去できる活性を持つ治療分子は世界で初めてである。2 種類の ZFN ペアを評価し、LTR 機能阻害、細胞死誘導能、標的 DNA 削除活性においてすべて ZFN1+2 の活性が優れている事が判明した。今後は ZFN1+2 を基盤として実用化に向けた研究開発を進めていきたい。今後の課題としては下記の項があげられる。

- (1) ZFN の持つ治療分子としての活性を向上させるための技術を開発する。
- (2) HTLV-1 プロウイルスを感染細胞から全て除去する方法の基盤技術を確立する。
- (3) ゲノム完全性と遺伝子発現・細胞生理攪乱の角度から治療分子の安全性を評価する。
- (4) 小動物実験系を用いて scFv-213 が生体内で免

疫攪乱を生じるかを評価する。

(5) scFv-213 の CD4 に対する親和性をさらに向上させる。

(6) 免疫グロブリン遺伝子の N 末端シグナルと TNSALP C 末端由来のアミノ酸配列を利用して GPI アンカー型 HO538-213 scFv を作出する。

(7) 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 陽性細胞への選択性向上を検証したうえで LENA 法への技術応用を図る。

(8) CD4 陽性細胞に対する In vivo 治療分子送達の実験的向上を向上させる技術を確立する。

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、iPS 技術、遺伝子治療を組み合わせることにより、将来 ATL に対する特異的な分子療法開発の基盤を提供することもできると期待される。

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、本研究をはじめとする HTLV-1 感染症根治に結びつく研究の推進は厚生労働省研究の一環としてふさわしく、その成果には大きな意義があると考えられる。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も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

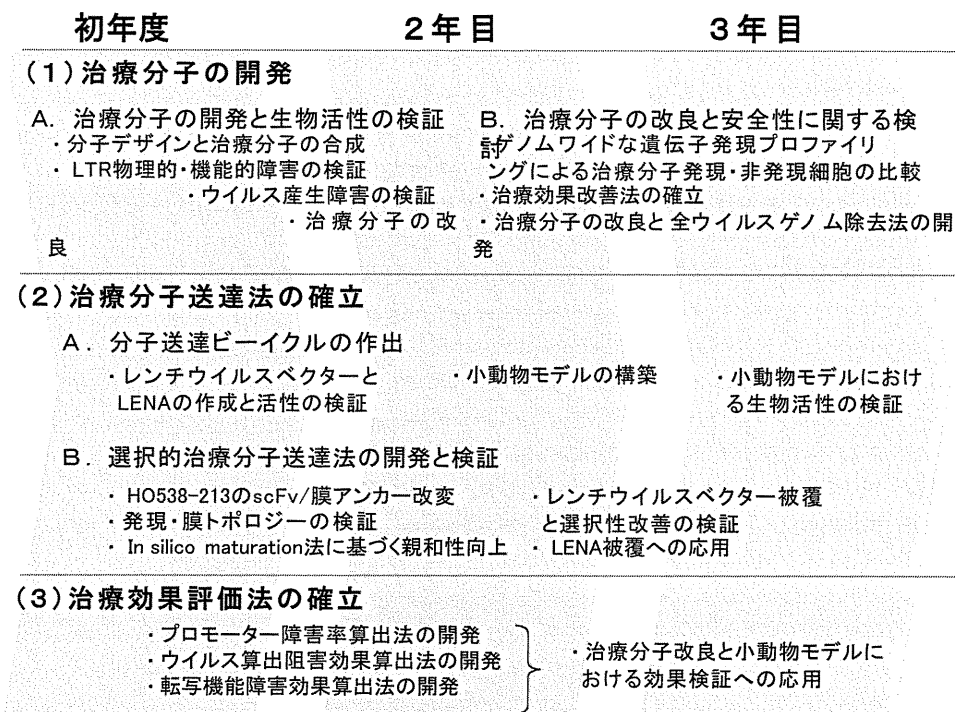
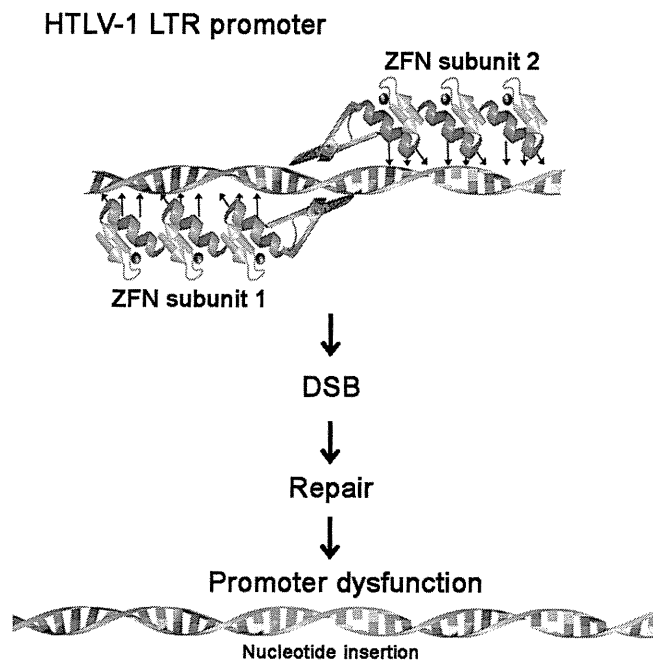


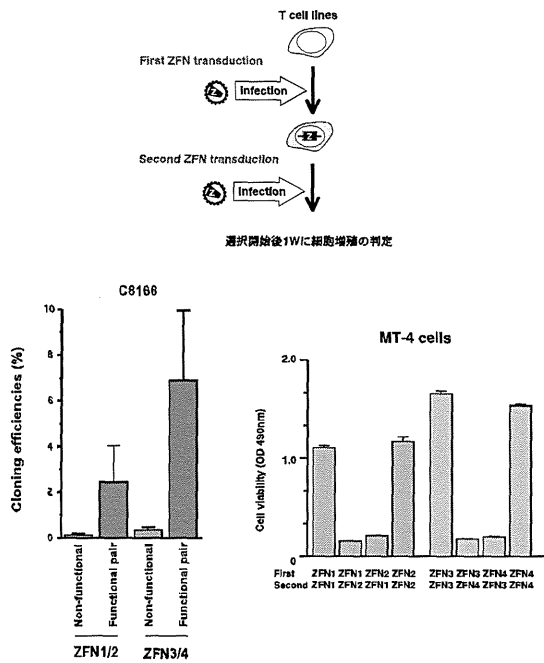
図 2. 治療分子とその作用機序概要



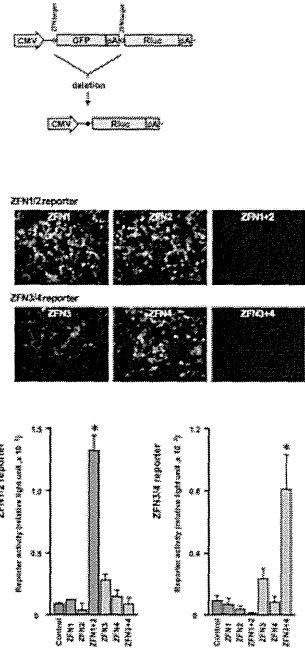
治療分子の作用メカニズム

図3. 本年度の研究成果概要

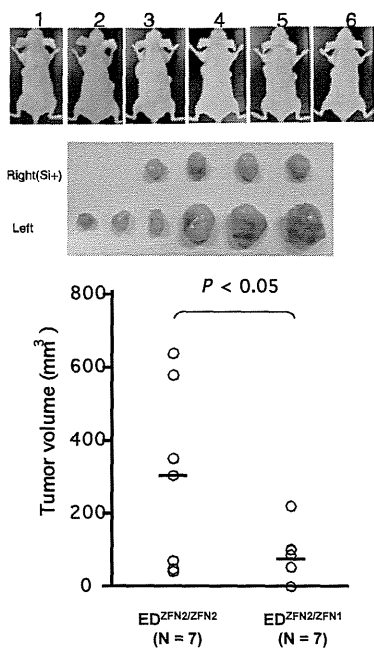
ZFNはHTLV-1感染細胞の増殖を特異的に阻害



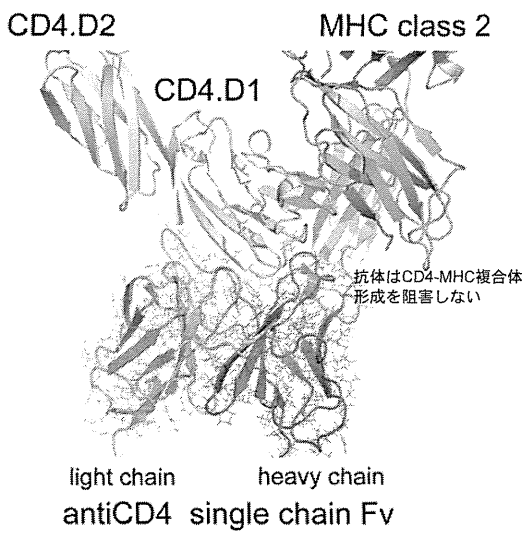
プロウイルス除去活性を検出



ZFNは生体内でATL増腫瘍性を阻害



治療分子デリバリー用抗体の安全性を解析



II. 平成24年度 分担研究報告書

分担研究課題：治療分子による部位特異的 LTR の物理的破壊に関する解析

研究分担者 駒野 淳 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課 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 感染症に対する斬新かつ効果的な新規治療法の開発を試みる。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、一つのプロウイルスに 2 コピー存在する LTR が理想的である。本年度は昨年合成した ZFN が HTLV-1 LTR 機能に与える影響と ATL 細胞で HTLV-1 プロウイルスの LTR に存在する標的部位に遺伝子変異を導入するかを検証した。その結果、ZFN はヒト細胞において HTLV-1 LTR のプロモーター活性を阻害し、標的部位特異的に変異を導入することが確かめられた。本研究により、世界で初めて不可逆的な HTLV-1 プロウイルスゲノム破壊活性が証明された。ZFN は新規 HTLV-1 感染症治療分子として有用と思われる

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。本研究では 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 を導入し、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 を不可逆的に破壊する。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 FokI と融合される。FokI 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

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 Phase 2 臨床試験で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; NCT00842634 and 01044654)。このほか、グルココルチコイドレセプターを標的とした再発性／難治性悪性グリオーマに対しても Phase 1 臨床試験が行われている (NCT01082926)。

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、LTR は一つのプロウイルスに同一のコピーが 2 つ存在する。治療標的数が多いという点も有利である。DNA 損傷修復システムは、一本の DNA の上で DSB が互いに近接した場所に 2 箇所存在すれば、介在する DNA を欠失させて DNA 断端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も期待される。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。

本年度は、昨年度合成した 2 組の ZFN のヒト細胞における局在の検証、HTLV-1 LTR のプロモーター活性に対する障害能の検証、HTLV-1 感染 ATL 細胞において ZFN 治療分子が実際に部位特異的に DSB-repair による変異を導入するかを直截的に証明する事を目的として実

験を行った。

B. 研究方法

1. 細胞内 ZFN 局在の解析：ZFN を発現するプラスミドを導入した 293T 細胞を 80% エタノールにて固定し、抗 FLAG 抗体に FITC がラベルされたものをプロブに用いた (Sigma 社、clone M2 F4049)。核への局在を確かめるためにヘキストにより DNA を染色し、FITC シグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により評価した。

2. LTR のプロモーター活性に与える影響の解析：ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドベクター pGL3 ベーシックに標準的なプロウイルス配列として知られる D13784 における nt1-756 に相当する HTLV-1 LTR をクローニングし、HTLV-1 LTR 転写活性を評価するレポータープラスミドとした。この LTR 領域は U3 と R の全領域及び U5 の 78.7% を含有し、ZFN の認識配列が保存されていることを確認した。

HTLV-1 LTR でホタルルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドに Tax 発現プラスミドを同時に 293T 細胞に導入して、LTR の転写活性を測定する転写系に対し、ZFN を単独または組み合わせで同時に導入し、48 時間後にホタルルシフェラーゼ活性を測定した。対象として CMV プロモーターでレニラルシフェラーゼの発現プラスミドベクターを使用した。

3. 部位特異的変異導入に関する解析：ヒト ATL 由来 T 細胞株 S1T に対し、ZFN1/2 または ZFN3/4 を導入した細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR によって ZFN が標的とする LTR 部分を増幅し、クローニングし、塩基配列を決定した。ZFN subunit の導入順が異なる細胞も調査した。一方、対照として 1 種類の ZFN を繰り返し導入した細胞を用いた。導入方法等は田中分担研究者の報告書を参照されたい。核酸

配列解析はサンガー法に基づく技術をもちいて行った。解析結果はMEGAソフトウェアによりアラインメント表示した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

1. 細胞内 ZFN 局在の解析：ZFN は N 末端に 3xFLAG タグと核移行シグナルを持ち、それに引き続き Zf モチーフと FokI のカタリティックサブユニットをコードしている。予測される分子量は ZFN1 が 48.5kD、ZFN2 が 44.2kD、ZFN3 が 44.2kD、ZFN4 が 47.4kD である。293T 細胞にそれぞれ発現ベクターを遺伝子導入した細胞のライセートにおいて、ウエスタンブロットティングにより抗 FLAG 抗体で予想される分子量にシグナルを検出した。共焦点顕微鏡では核に ZFN シグナルが局在した (図 1 参照)。

2. LTR のプロモーター活性に与える影響の解析：LTR 活性を測定するレポーターアッセイでは ZFN 単独の使用では LTR 活性に影響を与えなかった。しかし、ZFN1 と ZFN 2 の組み合わせまたは ZFN3 と ZFN 4 の組み合わせではプラスミドの量依存的に有意な LTR 活性の減弱が検出された。この活性は CMV プロモーターの転写には観察されなかった (図 1 参照)。

3. 部位特異的変異導入に関する解析：ヒト ATL 由来 T 細胞株 S1T に対し、機能的な組み合わせの ZFN1/2 または ZFN3/4 を導入した細胞から得られた LTR クローンには予想される切断部位に部位特異的な変異が認められた (15/34 クローン、44.1% ; 図 3 参照)。このような変異は機能的ではない ZFN の組み合わせでは観察される事はなかった (0/7 クローン、0.0% ; 図 2 参照)。この違いは統計学的に有意

であった (Peason's exact test, $P < 0.05$)。

変異の種類は欠損が主であり、クローンあたり平均 14.1bp であった。置換変異は 1 塩基のみで、計クローンに認められた。挿入変異は 1 クローンのみで 2bp の insertion が ZFN3+4 のみ認められた。これは ZFN の positioning が三次元的に至適でなければ DSB 導入機能が発揮されないことを示唆しており、ZFN が直接認識する DNA 配列 (図 3 青字) だけでなく、DSB 配列 (図 3 赤字) も ZFN の基質特異性に寄与している事を示している。興味深い事に、変異の種類と規模は ZFN によって異なっていた。ZFN1+2 はクローンあたり平均 10.2bp の欠損であったのに対し、ZFN3+4 は平均 15.0bp であった (図 3 参照)。また、ZFN1+2 発現によって ZFN3+4 の標的部およびその他の解析領域には変異は認められず、変異が特異的な部位に誘導されている事が示された。これは ZFN3+4 発現でも同様であった。

D. 考察

合成された ZFN は哺乳類細胞で良好な発現が確認された。核移行に関して予想通りの挙動を示した。酵母細胞において ZFN1 と ZFN2 または ZFN3 と ZFN4 の組み合わせで標的部特異的に変異導入する ZFN 活性を示すことは前年度に示されていたが、ヒト細胞で 2 種類の ZFN ペア共に同様の活性が検出されたことは大きな意義がある。特に LTR 活性を阻害する活性が検出されたこと、標的部に特異的に変異を導入する活性が認められた事は、当該分子に特異性の高い治療分子活性があることを示している。プロウイルスを不可逆的に損傷することが技術的に可能であることが示された。このような技術は世界的にも報告例がなく、独自性の高い治療法として応用が期

待される。

E. 結論

ZFN はヒト細胞において HTLV-1 LTR 機能を阻害し、ATL 細胞において標的部位特異的に変異を導入することが確証づけられた。新規治療分子として期待される不可逆的なウイルスゲノム破壊活性が世界で初めて証明された。ZFN は今後の新規治療法開発の基盤として有用と考えられる。

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. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J*. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. **Leukemia**. In press.
2. Kojima Y*, Kawahata T, Mori H, Furubayashi K, Taniguchi Y, Iwasa A, Taniguchi K, Kimura H, Komano J. Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in populations with high risk behaviors as revealed by genetic analysis of HBV. **Epidemiology and Infection**. In press.
3. Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, Shioda T, Ohashi T, Komano J, Hanabusa H, Shida H*. Both humoral and cellular immunities to HIV-1 envelope 1 glycoprotein are elicited by combined immunization with Sendai virus and replication-competent Vaccinia virus vectors and are boosted by CD40Lm. **PLOS**

ONE. 2012;7(12): e51633. doi: 10.1371

/journal.pone.0051633.

4. Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, Komano J*. Toll-like receptor (TLR) 3 as a potential sensor of retroviral infection in human cells. **BiochemBiophysResCommun**. 2012 Jul 19;12(1):109-116.
5. Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Futahashi Y, Komano J*. Regulation of Cyclin T1 expression and function by an alternative splice variant that skips exon7andcontains a premature termination codon. **Gene**. 2012 Aug 15;505(1):1-8.
6. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S*. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell Host Microbe**. 2012 Jul 19;12(1):109-116.
7. Yanagita H, Fudo S, Urano E, Ichikawa R, Ogata M, Yokota M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T*. Structural modulation study of inhibitory compounds for RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase. **Chem Pharm. Bull(Tokyo)**. 2012;60(6):764-771.
8. Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi E, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H*. Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines. **Bioorg Med Chem**. 2012 May 15;20(10):3287-3291.
9. Miyauchi K, Urano E, Takizawa M, Ichikawa

- R, Komano J*. Therapeutic potential of HIV protease-activable CASP3. **Scientific Reports**. 2012;2:359.
2. 学会発表
(国際学会)
1. K Miyauchi, E Urano, S Takeda, T Murakami, Y Okada, K Cheng, H Yin, M Kubo, J Komano. Toll-like receptor (TLR) 3 as a potential sensor of retroviral infection in human cells. CSHL meeting on Retroviruses. 2012年5月21-26日. Cold Spring Harbor, NY, (国際学会)
 1. 駒野 淳, 浦野 恵美子, 宮内 浩典, 市川 玲子, 滝沢 真理. 安全な細胞内免疫を可能にする治療分子の開発に関する研究. 第26回近畿エイズ研究会・学術集会. 2012年7月7日. 神戸
 2. 山吉 麻子, 岸本 恭介, 林 里依, 駒野 淳, 小柳義夫, 小堀哲生, 村上 章. Non-coding RNA(7SK)の転写抑制機能を模倣した RNAモチーフの探索. 第58回高分子研究発表会. 2012年7月13日. 神戸
 3. 浦野 恵美子, 木村 雄一, 駒野 淳. P-TEFb複合体機能調節因子群による HTLV-1 転写制御メカニズムの解析. 第5回 HTLV-1 研究会. 2012年8月25-26日. 東京
 4. 駒野 淳, 田中 淳, 武田 哲. Proliferative inhibition of ATL-derived and HTLV-1-transformed human T cells by an artificial restriction endonuclease. 第5回 HTLV-1 研究会. 2012年8月25-26日. 東京
 5. J Komano, A Tanaka, S Takeda, R Ichikawa, E Urano. A novel therapeutic molecule that irreversibly disrupts the HTLV-1 provirus. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日. 札幌
 6. 武田 哲, 駒野 淳. 再生医療による HIV/AIDS 遺伝子細胞治療法の開発に向けた技術基盤の構築. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日. 大阪
 7. 駒野 淳, 田中 淳, 武田 哲. HTLV-1 プロウイルスを物理的に傷害する人工酵素の開発. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日. 大阪
 8. 武田 哲, 田中 淳, 駒野 淳. プロウイルスの物理的障害による HTLV-1 感染細胞増殖の抑制. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日. 大阪
 9. 小島 洋子, 川畑 拓也, 森 治代, 駒野 淳, 谷口 恭, 井戸田 一朗. HBV 感染者における新規 Ae/G リコンビナント HBV の解析. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日. 大阪
 10. 松田 剛, 今留 謙一, 矢島 美彩子, 落合 央, 望月 雅司, 川野 布由子, 山田 千尋, 今井 由美, 濱崎 霞, 浅田 恵理子, 原口 摩耶, 千葉 祐規乃, 清水 則夫, 駒野 淳, 山本 直樹, 藤原 成悦. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日. 大阪
 11. 駒野 淳, 浦野 恵美子. DNA J/HSP40 Co-chaperone family による HIV-1 複製抑制メカニズムの解析. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012年11月24-26日. 横浜
 12. 張 險峰, 祖父江 友芳, 一色 真央, 牧野 俊一, 井上 誠, 加藤 和則, 塩田 達夫, 大橋 貴, 駒野 淳, 花房 秀次, 志田 壽利. 弱毒ワクシニアプライム-センダイウイルスブーストエイズワクチン法の免疫評価および

hCD40Lm アジュバント効果の検討. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日. 横浜

13. 相川 春夫, 松本 大地, 野末 愛美, 浦野 恵美子, Mathieu Metifiot, Maddali Kasthuraiah, 野村 渉, 鳴海 哲夫, 駒野 淳, 村上 努, Pommier Yves, 山本 直樹, 玉村 啓和. ペプチドミメティック型インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日. 横浜

14. 駒野 淳, 武田 哲, 田中 淳. Therapeutic potential of an artificial endonuclease against HTLV-1 infection. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 11-14 日. 福岡

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. Intracellular distribution and inhibitory function on HTLV-1 LTR of ZFN

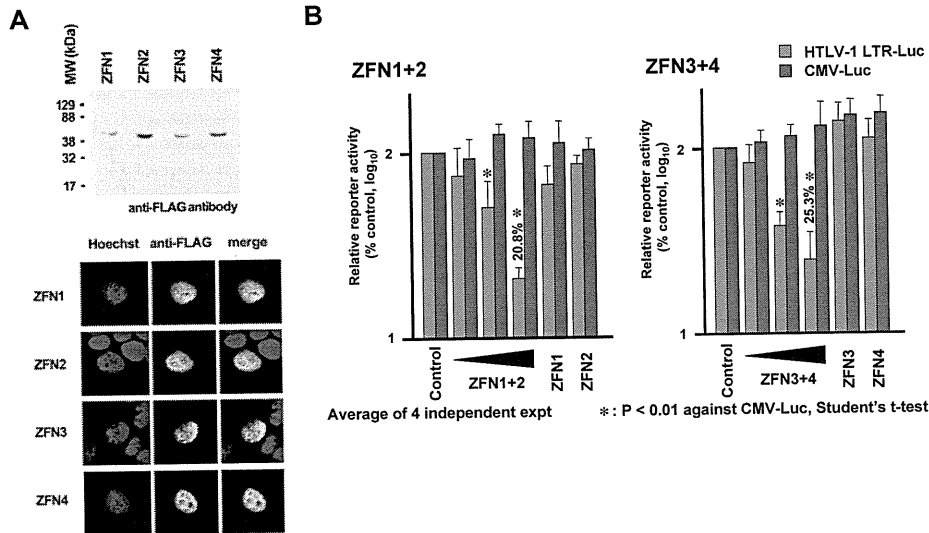
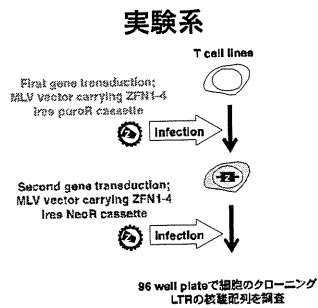


図 2. Detection of site-specific mutations in HTLV-1 LTR generated by ZFNs in an ATL cell line S1T



結果

Modification of S1T proviral LTR by ZFN1+2

	Clone # examined	No mutations	targeted mutations
ZFN1+1	1	1	0
ZFN1+2	9	6	3
ZFN2+1	7	4	3
ZFN2+2	1	1	0

Modification of S1T proviral LTR by ZFN3+4

	Clone # examined	No mutations	targeted mutations
ZFN3+3	3	3	0
ZFN3+4	12	8	4
ZFN4+3	6	1	5
ZFN4+4	2	2	0

Frequency of mutations introduced by heterologous ZFN pair was significantly frequent than the heterologous ZFN pair (0.029 by Pearson's exact test).