

両者とも sCD4 に比べて反応性が劣るが D1 と D1D2 を認識することが判明した。このことから scFv-213 の認識部位は D1 と示唆された。

次に市販されている CD4 ドメイン 1 のドメイン 2 に隣接する領域のオリゴペプチドである CD4 Fragment 81-92 を用いて ELISA を行った。抗原はモル濃度を同じにした。結果は sCD4 に対する値を 100 % として表示した。

| | Leu-3a | scFv-213 |
|--------------------|--------|----------|
| sCD4 | 100 % | 100 % |
| CD4 Fragment 81-92 | 1.3 % | 95.1 % |

この結果から scFv-213 の認識部位はドメイン 2 に隣接するドメイン 1 の C 端側であることが示唆された。scFv-213 の認識部位が Leu-3a と異なることを再確認するためにコンペティション ELISA を行った。sCD4 に対して scFv-213 か Leu-3a を反応させた後に逆の組み合わせで反応させ、どの程度反応するかを確かめた。結果は単独で反応させたときの個々の sCD4 に対する値を 100 % として表示した。

| | |
|-------------------|-------|
| scFv-213 | 100 % |
| Leu-3a → scFv-213 | 168 % |
| Leu-3a | 100 % |
| scFv → Leu-3a | 51 % |

Leu-3a と scFv-213 の間には CD4 結合に対する相互拮抗阻害は認められなかった。興味深い事に、Leu-3a を先に吸着させると scFv-213 の吸着が促進され、逆だと Leu-3a の吸着が抑制されることが分かった。これらの結果から本 scFv-213 が CD4 の生理機能に関わる部位とは異

なる部位を認識すること、および抗体結合により CD4 D1 ドメインは立体構造が変化する可能性が示唆された。

D. 考察

HTLV-1 感染標的である CD4 陽性 T 細胞への安全な治療分子送達法を構築する上で、健常人に由来する H0538-213 の有用性は高いと期待される。この抗体を改変して治療分子送達に応用するためには scFv の安定性、大量精製系の構築、エピトープの解析は重要なチェックポイントになる。

前年度、scFv 化によって H0538-213 の反応性は維持されている事は明らかとなったが、大量精製においては未だ改善の余地があった。精製効率に影響を与える因子は多数存在するが、抗体分子の発現において一般化できる理論はない。しかし、原因の一つと考えられたのが H 鎖の CDR2 と 3 に各 1 個存在するイレギュラーなシステインである。システインの存在が意図しない分子内・分子間ジスルフィド結合形成により scFv 立体構造の維持、大量発現に負の影響を与える可能性が危惧された。そこで、抗体工学的にシステインからセリンへの置換を行った。反応性についてはによって抗体本来の活性が失われる可能性もあったが、改変 scFv 化 H0538-213 の sCD4 反応性は維持されていた。それだけではなく、物理的な安定性も向上したと推測される。これは抗体の医用応用にアドバンテージになると考えられる。

大量産生効率を改善するためのベクター・精製系についても統一的な理論はなく、試行錯誤的な側面が強い。本研究では従来のベクターから T7 ベクター系への変更を行った。3' His-tag、5' His-tag を試験したが、良好な結果が得られなかった。5' Protein A-tag の導入

と IgG Sepharose を用いたアフィニティで精製良好な結果が得られた。このような抗体改変にかかる経験は今後の応用抗体工学への貴重な基盤情報を提供すると思われる。今後は scFv を細胞膜アンカー型発現が可能になるよう遺伝的改変を加えていくことによって HTLV-1 感染症の治療分子送達にかかるベクター被覆に共したい。

精製した scFv-213 と CD4 抗原を用いてエピトープの同定を行い、CD4 が MHC class II 分子と相互作用するドメイン D1 にエピトープが存在する事が示唆された。一方、D1 の C 末端側にある D2 との境界部分ペプチドは、X 線立体構造的解析により MHC class II 分子と相互作用しないことが明らかとなっている。scFv-213 はこのペプチドと反応性を持つ事が明らかとなり、主たるエピトープと考えられる。MHC class II 分子と相互作用領域を認識するマウスモノクローナル抗体 Leu-3a と競合しないことからエピトープが CD4 の生理機能を障害しない可能性が示唆される。これが CD4 反応性抗体クローン H0538-213 が健常人に存在した原因であると考えられる。scFv-213 との反応が Leu-3a と D1 の結合を促進したことに対する意義については議論の余地がある。現在企図しているベクター被覆においては、scFv-213 と CD4 の反応局所における MHC class II 分子の近接があるとは想定されないが、CD4- MHC class II 分子の相互作用を強める事により安定な TCR-MHC 複合体形成に寄与し、免疫機能の増強を誘導できる可能性がある。マウス CD4 と scFv-213 の反応性があることから、マウスへの投与により抗体が細胞性免疫増強能を持つかを試験することも必要かもしれない。

総じて、当初の予定に従っておもな項目は達

成できたと考える。in vivo での使用を念頭においたときの安全性の面で、H0538-213 が CD4 陽性細胞への治療分子ターゲティングに高い利用価値があることが示唆された。これらの実験結果から、興味深い事に CD4 の D1 ドメインはリガンドとの反応により立体構造が変化しうる可能性が示唆された。これは CD4 の構造機能相関を理解する上で重要な情報を提供するだけでなく、HIV-1 感染症や免疫治療等で CD4 を創薬標的にする場合に有用な知見になると思われる。

E. 結論

HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター被覆に必要な scFv-213 の改変を行い、物理的安定性と反応性の向上を達成した。また、エピトープを明らかにする事により、抗体の安全性に関する基盤を固める事が出来た。

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 無し
2. 学会発表
(国際学会) 無し
(国内学会) 無し

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

分担研究課題：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

研究分担者 武田 哲 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨 HTLV-1 感染症に対して根本的な治療法は存在しない。プロウイルスウイルスを不可逆的に不活化する方法があれば新たな治療法の基盤を提供できると考えられる。そのため HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素 ZFN を開発しその性能評価を行う。この治療分子は標的配列に囲まれた DNA 領域を欠損させることができる（標的 DNA 削除活性）。これを実験的に証明するために LTR 標的配列内の最小標的配列を利用してヒト細胞に一過性発現させた治療分子によって導入される核酸改変の効率評価系を 2 種類構築した。2 組の ZFN を評価したところ、共に 2 つの評価系で標的 DNA 削除活性が検出され、プロウイルスゲノム除去能を有することが示唆された。さらに、細胞代謝を指標としたアッセイ系を用いて、ZFN が HTLV-1 感染細胞に対し増殖阻害効果を持つ事も明らかにした。以上より、ZFN が HTLV-1 感染症に対し有用な治療分子である事が示された。

A. 研究目的

現在日本の HTLV-1 感染者数は増加していると危惧されている。これに対し、治療法としては対症療法が存在するが予防法や根治療法は存在しない。医療経済学的見地からは、治療より発症を防止する方が負担は少ない上、感染者に対する身体的負担も小さいことから総合的にみて優れていると思われる。予防するためにはワクチンによる発症予防や感染予防がある。これに対して、感染したウイルスを体内から取り除く事ができれば上記手法のみでは治療効果が得られない場合に非常に有用であると考えられる。

我々は HTLV-1 の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。これを達成するためには HTLV-1 のプロウイルスを除去す

るか、不可逆的に不活性化する方法が望ましい。特に後者においてはエピジェネティックな遺伝子発現抑制ではなく、プロモーターの機能破壊による不活性がより望ましい。ZFN はこの目的に非常に適していると考えられる。

本研究においては酵母系にて選択された 2 組の治療分子候補 ZFN について、ほ乳類細胞系で治療分子としての機能を評価する。ZFN にはプロウイルスを除去する活性（標的 DNA 削除活性または targeted deletion 活性）が期待される。本年度は、レポーターアッセイ系を利用してヒト細胞で感度よく定量的にプロウイルスを除去する活性の評価を試みた。

ZFN は標的部位に 2 本鎖 DNA 切断（double strand break, DSB）を導入する。近傍に導入された 2 つの DSB が修復系によって再結合され

る際には 2 カ所の DSB で挟まれた部分が除去されて再結合をうける。そこで、治療分子持つ標的 DNA 削除活性に依存してシグナルするレポーター遺伝子を 2 種類作出して活性評価を行った。また、DSB の導入は細胞に DSB-induced apoptosis を惹起することが期待される。従って、ZFN を導入すれば HTLV-1 感染細胞の増殖は特異的に抑制されることが期待される。これら治療分子として期待される 2 つの活性について評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 哺乳類細胞におけるZFNによる標的DNA削除活性の検討

レポーター系A：CMVプロモーターでGFPを発現する哺乳類細胞発現ユニットのGFP ORF+poly A signalをZFN最少認識配列によってはさみ、ルシフェラーゼ遺伝子をその後位置させたレポータープラスミドを構築した。ZFN1とZFN 2の標的配列を持つレポーターとZFN3とZFN4のレポータープラスミドをそれぞれ作製した。これは標的DNA削除活性に依存してルシフェラーゼシグナルを与える。標的DNA削除活性をうけなければGFPを哺乳類細胞で発現する。293T細胞に対し、レポータープラスミドとZFN発現プラスミドを単独または組み合わせで導入し、48時間後にルシフェラーゼ活性測定およびGFP発現を検出した。

レポーター系B：大腸菌における青白セクションを指標にこれを定量化するレポータープラスミドを構築した。これはZFNの最少認識配列を2か所持ち、その間に大腸菌におけるLacZ α の発現ユニットを持つアンピシリン耐性プラスミドである。ZFN1とZFN 2の標的配列を持つレポーターとZFN3とZFN 4のレポータープラスミドをそれぞれ作製した。この

プラスミドは大腸菌DH5 α 株においてx-Gal存在下で青色コロニーを与える。標的配列では含まれた発現ユニットが欠失すると白コロニーを与える。293T細胞にレポータープラスミドとZFNを単独または組み合わせで導入し、3日後に細胞のDNAを回収し、10ナノグラムのDNAを電気穿孔法によりDH5 α に導入した。大腸菌をx-Gal存在下でアンピシリン耐性プレートに植菌し、青白コロニーの数を算定した。対象として細胞に導入しないプラスミドを単独で大腸菌に導入したものをを用いた。白コロニーの一部を増殖させそれらが持つプラスミドを回収した。プラスミドの分子量を電気泳動にて確認し、一部のプラスミドを核酸配列決定に供与した。なお、ZFN発現ベクターはカナマイシン耐性であり本実験系に影響を与えない。

2. ZFNによるHTLV-1感染細胞の増殖抑制試験：ZFNを発現するレトロウイルスベクターを構築した。それぞれネオマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子を発現する。これらのプラスミドベクターを用いてVSV-Gで被覆したMLVを調整してZFNの標的配列を保存しているHTLV-1感染細胞株MT-2、MT-4、M8166、S1T、ED-、TL-OM1及びHTLV-1非感染細胞に感染させた。非感染細胞においてはCEM174、MOLT-4、Jurkat細胞を用いた。順次ZFNを導入し、2種類目のZFNを導入後、bulk cultureで薬剤セクションを行い、選択後7日目に細胞の代謝を指標とする細胞増殖試験をCell Titer GLO (Promega社) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

1. 哺乳類細胞における ZFN による標的 DNA 削除活性の検討: レポーター系 A については、ZFN1+2 deletion のレポーターに対して ZFN1 または ZFN2 単独の発現では GFP の発現が認められ、ルシフェラーゼ活性は検出されなかった。ZFN1 と ZFN2 を同時に発現させると GFP の発現が大きく低下し、有意に高いルシフェラーゼ活性が検出された。これは ZFN3+4 deletion レポーターでも同様であった (図 1 参照)。レポーター系 B においては、ZFN1+2 deletion のレポーターに対し、レポータープラスミド単独でトランスフォームした大腸菌では白コロニー頻度は 0.0%、ZFN1 発現ベクターとレポーターを 293T 細胞に共導入した場合 0.3%、ZFN2 は 0.3%、ZFN1 と 2 を同時に 293T 細胞に遺伝子導入した場合 8.3% の頻度であった。白コロニー頻度は ZFN1+2 で単独の場合に比べて 27.7 倍に増加した。同様に ZFN3+4 のレポーターではレポーター単独で 0.0%、ZFN3 で 0.3%、ZFN4 で 0.4%、ZFN3+4 で 2.2% の頻度であった。白コロニー頻度は ZFN3+4 で単独の場合に比べて 6.3 倍に増加した。大腸菌コロニーの数は ZFN を組み合わせて発現させた場合、単独で発現させた場合の 30-53% に減少した (図 2 参照)。一部の白コロニーからプラスミドを回収し分子量を確認したところ、レポータープラスミドとほぼ同じ分子量を持つプラスミドが多く認められた。これが白コロニーを与えたのは哺乳類細胞内で ZFN の活性とは異なるメカニズムで LacZ 発現ユニットが遺伝子改変をうけたためと思われる。これは ZFN 単独で発現する場合の白コロニー頻度が全ての ZFN でほぼ同じ (0.3-0.4%) であることから支持される。一方 ZFN1+2、3+4 の組み合わせで得られた白コロニーからは

明らかに分子量が小さいコロニーが認められた。この遺伝子配列を解析したところ ZFN 認識配列特異的に遺伝子改変が認められた。

2. ZFN による HTLV-1 感染細胞の増殖抑制試験: レトロウイルスベクターからの ZFN 発現を一過性発現系で確認した上で、レトロウイルスによる ZFN 遺伝子導入を行った。ZFN を単独で恒常的に発現させた細胞を試験した全ての T 細胞株で樹立することができた。これらの ZFN 発現はウエスタンブロッティングで検証した。細胞の増殖は親細胞とほぼ同様であった。さらに ZFN1 と 2、3 と 4 を共発現させ、選択培地で培養した細胞の増殖を定量すると ZFN1+2 または 3+4 の組み合わせで ZFN が導入された細胞で有意に細胞増殖が低下していた (図 3 参照)。この傾向は試験に供した全ての HTLV-1 不死化細胞株と ATL 由来細胞株で観察されたが、HTLV-1 陰性細胞では同様の傾向を認めなかった。細胞増殖阻害能力は HTLV-1 不死化細胞株でより顕著に観察された。同様の結果はクローニングによるアッセイ系でも認められた (田中分担研究者の報告書を参照のこと)。

D. 考察

ZFN がヒト細胞で targeted deletion 活性を有することが明らかとなった。プロウイルスを感染細胞から除去できる方法は過去に例がない。現時点ではレポータープラスミドによる活性の検証段階であるが、HTLV-1 プロウイルスに対しても同様の活性を示し得ることが期待される。

本実験により、ZFN によって標的配列に DSB が導入されたプラスミドのうち多くの分子は修復されない可能性が示唆された。これは DSB-induced apoptosis 系を活性化させるとの作

業仮説とよく合致し、感染細胞に対する増殖抑制効果が認められる事実と極めて整合性が合う。

シグナルノイズ比をもとに評価すると、ZFN1+2 の持つ活性のほうが ZFN3+4 よりも活性が優れていることが予想される。さらに、酵母の実験系では ZFN1+2 がより小さい細胞毒性を持つ事が示唆されている。これらを総合すると、今後の治療分子開発は ZFN1+2 を基盤にするべきと思われる。一方、この活性が LTR の相対的な位置に由来するのか、機能的な位置に関連するのか、細胞のゲノムに類似する配列がある事に起因するのか、サブユニットの位置関係が最適ではないためなのか明らかではない。今後、これらの原因について精査する事により ZFN の治療効果をより引き出す事が出来ると思われる。

ZFN が単独および ZFN ペアで恒常的に発現する細胞株を樹立することができたことは ZFN の持つ細胞毒性が極めて低いことを示唆する。これも ZFN を治療分子として応用する際の大きな advantage になると思われる。

本実験系ではほ乳類細胞にプラスミドを導入してから 2-4 日後に治療分子による標的 DNA 削除活性を定量的にかつ簡便・鋭敏に検出/評価する事が出来る。この実験系は、治療分子の発現効率、作用効率向上のための条件検討、作用 kinetics 解析に非常に大きく貢献できると期待される。

E. 結論

ZFN による標的 DNA 削除活性を迅速に定量する 2 つの実験系を構築し、ZFN に DNA 削除活性を検出した。さらに、ZFN が HTLV-1 感染細胞に対し増殖阻害効果を持つ事も明らか

にした。以上より、ZFN が HTLV-1 感染症に対し有用な治療分子である事が示された。

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. 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. 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. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012 Jul 19;12(1):109-116.

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,

(国内学会)

1. 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
2. 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

3. 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
4. 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
5. 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
6. 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. ZFNによるtargeted deletion活性 (1)

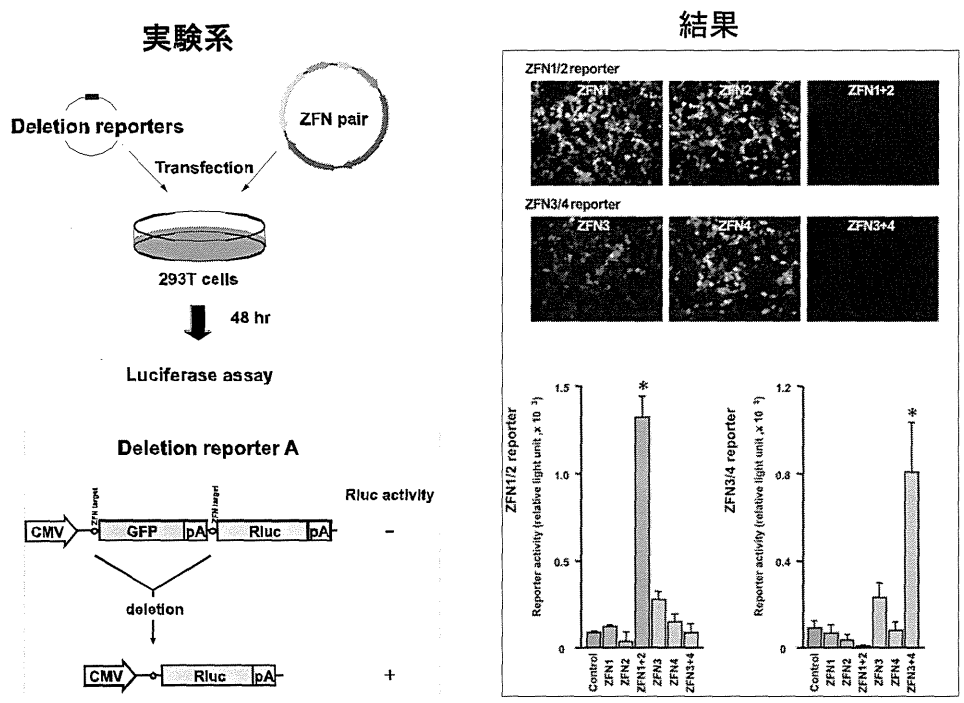


図 2. ZFNによるtargeted deletion活性 (2)

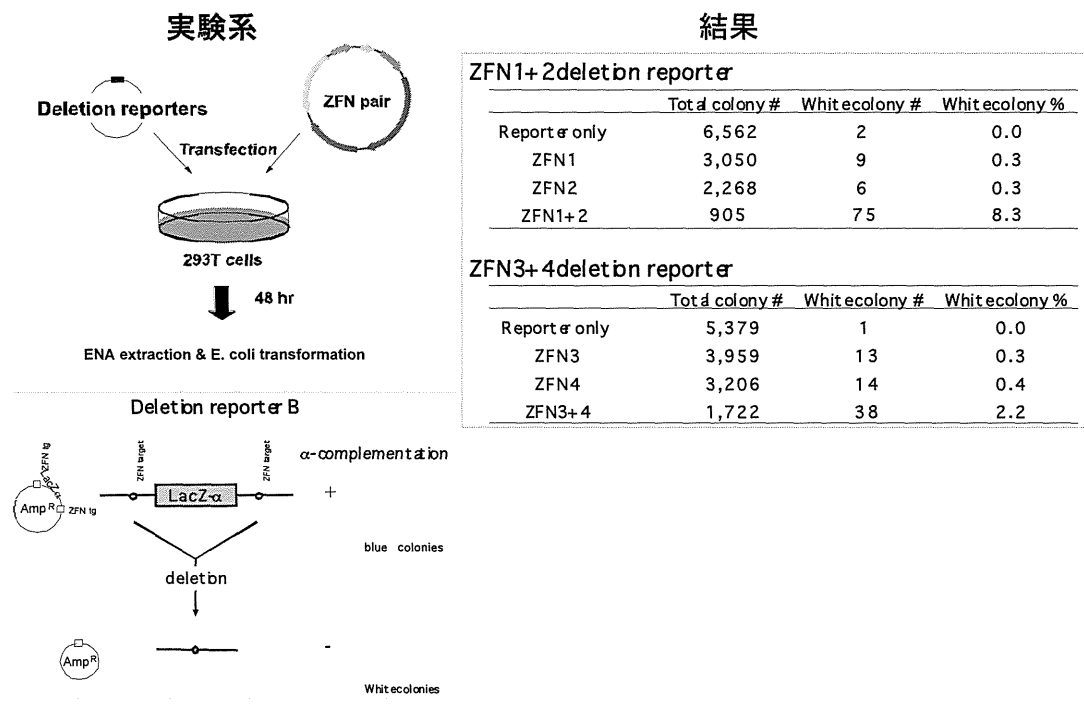
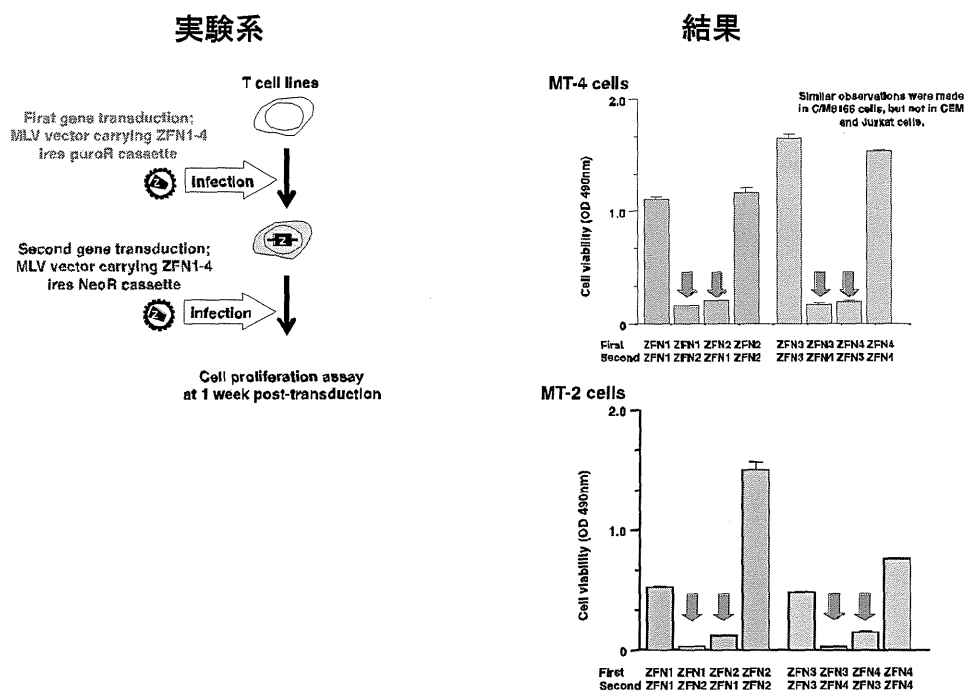


図 3. ZFNによるHTLV-1感染細胞の増殖阻害



分担研究課題：治療分子による HTLV-1 感染細胞増殖阻害機能の評価

研究分担者 田中 淳 大阪大学微生物病研究所・特任講師

研究要旨 ATL や HAM の原因となる HTLV-1 に対する効果的かつ特異的な治療法は存在しない。プロウイルスウイルスを特異的に認識して感染細胞を障害する方法があれば、ウイルス抗原を表出しない潜伏感染細胞を含めた全てのウイルス感染細胞に対し有効で、新たな治療法の基盤を提供できると考えられる。我々は HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素 ZFN を合成した。本年度は、HTLV-1 陽性ヒト T 細胞株に対し、ZFN の治療分子としての性能評価を行った。ZFN は HTLV-1-transformed cell line および ATL-derived cell line の増殖を抑制する活性を有することが明らかとなった。ZFN は非常に特異性の高い治療分子であり、ウイルス抗原を発現していなくても治療効果を発揮するという点でユニークである。小分子化合物による治療薬とは根本的に作用機序が異なる新規性の高い治療分子であると評価できる。

A. 研究目的

ヒトレトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされる成人 T 細胞白血病 (ATL) の日本での年間発症数は約千例と推測されており、また HTLV-1 の感染者数は約 108 万人と推定されいまだ多数存在している。ATL には、予後の悪い急性型、リンパ腫型に加え、慢性型、くすぶり型の 4 病型が知られているが、慢性型およびくすぶり型 ATL の大多数も経過中に急性転化し、その長期予後は不良となる。

ATL の治療には主に多剤併用化学療法が行われるが、ATL 細胞は化学療法にしばしば抵抗性を示し、寛解が得られたとしても再発率は非常に高く、根治療法とはならず満足できるものではない。また近年、ATL に対する根治療法として同種造血幹細胞移植療法が注目

されているが、ATL の病勢がコントロールできない増悪例の場合や、65 歳以上の高齢の場合、同種移植は、拒絶反応や合併症の頻度が高くなるため実施が非常に困難であり、さらに高齢の患者では兄弟間で HLA 一致のドナー候補者を得ることも困難な状況である。

今後は高齢者のキャリアを中心に持続的に ATL の発症が懸念されるが、ATL の効果的な予防・治療法がないことが問題である。これまでに明らかとなった ATL 発症に関わるリスク因子では、特に末梢血リンパ球の高ウイルス量（感染細胞数）の ATL 発症への関与が示唆されている。このことから HTLV-1 感染細胞数を減少させることが ATL 発症を抑えるのに重要であると考えられる。

本研究では ATL 細胞のゲノムに挿入された HTLV-1 遺伝子を得意的に認識し切断できるジ

ンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用い、ZFNがHTLV-1感染transformed cell lineおよびATL-derived cell lineの増殖を抑制するかを検討する。HTLV-1遺伝子を標的としたZFNをHTLV-1感染症特異的な治療分子として用い、ATL患者でのATL細胞の改変による増殖抑制またはATL細胞の破壊によるHTLV-1感染細胞数の減少またはHTLV-1感染細胞の殲滅という形でのATLの発症遅延法、ATL根治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

ヒトHTLV-1感染T細胞におけるZFN発現の影響を評価するため、ZFNの標的配列を保存しているHTLV-1感染transformed cell line C/M8166、ATL-derived cell line S1T細胞にレトロウイルスベクターを利用してZFNを導入した。ZFNは1/2とZFN3/4ペアをそれぞれ検討した。レトロウイルスベクターはネオマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子をもつものを利用し、それぞれ4種類のZFNをクローニングした。ZFNは1/2とZFN3/4ペアはそれぞれ2ステップに分けて順次細胞に導入して薬剤選択をかけた。第一段階でZFN1を導入した細胞には第二段階でZFN1とZFN2を導入した。同様に、第一段階でZFN2を導入した細胞にも第二段階でZFN1とZFN2を導入した。同じZFNを導入した細胞をコントロールとして供した。ZFN3/4も同様に順次細胞に導入した。薬剤選択マーカーによる選択は、それぞれG418 400 ug/mlまたはPuromycin 1 ug/mlにて行った。2種類目のZFN導入後、96ウェルプレートに5~100 cells/wellの密度で細胞を播種し、クローニング効率を測定した。S1T細胞においてはクローニングされた細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRによりLTRを増幅して核酸配列の決定を試みた。こ

のデータ解析に関しては駒野分担研究者の報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

C/M8166細胞ではZFN1/2でもZFN3/4でもペアで導入した細胞のクローニング効率が著しく低下した。低下率はそれぞれ対照と比較して27、20倍であった(図1参照)。これはStudent's t-testによりP値が0.001または0.002と統計学的に有意な低下であった。S1Tで同様の実験条件でクローニング効率を測定すると、ZFN1/2でもZFN3/4でもペアで導入した細胞のクローニング効率がそれぞれ4.4、1.9倍に低下した(図2参照)。ZFN1/2では統計学的に優位な低下であったが($P < 0.001$)、ZFN3/4では有意差を検出する事は出来なかった。同様の結果はクローニング効率ではなく、細胞集団の代謝活性を指標にした細胞増殖アッセイにおいても観察された(武田分担研究者の報告書を参照されたい)。

D. 考察

本実験系ではヒトHTLV-1感染T細胞にLTRを特異的に認識するZFNを導入することにより感染細胞で細胞増殖が阻害される事が明らかとなった。ZFNは1/2とZFN3/4ペアを評価したが、本実験系ではZFN1/2により高い効果を認めた。HTLV-1感染細胞を死滅させる活性は、ZFNがDSB誘導性アポトーシスを誘導する事によるものと考えられる。従って、ZFNは感染者からウイルス感染細胞を除去するためのツールとして有用であると考えられる。同時に、ZFNはATLに対する治療分子としても利用できることも示唆している。

E. 結論

ZFN は HTLV-1-transformed cell line および ATL-derived cell line の増殖を抑制する活性を有することが明らかとなった。ZFN は非常に特異性の高い治療分子であり、ウイルス抗原を発現していなくても治療効果を発揮するという点でユニークである。小分子化合物による治療薬とは根本的に作用機序が異なる新規性の高い治療分子であると評価できる。

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. Jinno-Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Mori T, Sugiura N, Kimata K, Isomura H, Hoshino H. Inhibitory Effect of Chondroitin Sulfate Type E on the Binding Step of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. In press.
3. Tanaka A, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoque A, Mori T, Islam S, Nakatani Y, Shinagawa M, Hoshino H. Entry of human T-cell leukemia virus type 1 is augmented by heparin sulfate proteoglycans bearing short heparin-like structures. *J Virol*. 2012 Mar;86(6):2959-69.
4. Mori T, Shimizu N, Jinno-Oue A, Tanaka A, Shinagawa M, Tokizawa S, Akagi T, Hoshino H. Tax1-expressing feline 8C cells are useful to monitor the life cycle of human T-cell

leukemia virus type I. *J Gen Virol*. 2012 Mar;93(Pt 3):588-93.

2. 学会発表

(国際学会)

特記すべきことなし

(国内学会)

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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 . Inhibition of cell growth by ZFN in HTLV-1-transformed T cell line C/M8166

| Cloning efficiency | | | | | |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | Expt 1 | Expt 2 | Expt 3 | Expt 4 | Mean |
| ZFN1/2 pair | | | | | |
| ZFN1+1 | 1.3 | 1.0 | n.t. | n.t. | 1.15 |
| ZFN1+2 | 0.0 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.14 |
| ZFN2+1 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.04 |
| ZFN2+2 | 3.1 | 4.4 | n.t. | n.t. | 3.75 |
| ZFN3/4 pair | | | | | |
| ZFN3+3 | 5.4 | 3.3 | n.t. | n.t. | 4.38 |
| ZFN3+4 | 0.4 | 0.2 | n.t. | n.t. | 0.31 |
| ZFN4+3 | 0.4 | 0.2 | 0.5 | n.t. | 0.36 |
| ZFN4+4 | 8.8 | 10.0 | n.t. | n.t. | 9.38 |

図 2 . Inhibition of cell growth by ZFN in HTLV-1-positive ATL-derived T cell line S1T

| Cloning efficiency | | | | | |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | Expt 1 | Expt 2 | Expt 3 | Expt 4 | Mean |
| ZFN1/2 pair | | | | | |
| ZFN1+1 | 0.52 | 0.50 | n.t. | n.t. | 0.51 |
| ZFN1+2 | 0.11 | 0.15 | n.t. | n.t. | 0.13 |
| ZFN2+1 | 0.11 | 0.10 | n.t. | n.t. | 0.11 |
| ZFN2+2 | 0.63 | 0.45 | n.t. | n.t. | 0.54 |
| ZFN3/4 pair | | | | | |
| ZFN3+3 | 0.42 | 0.41 | 0.22 | 0.11 | 0.41 |
| ZFN3+4 | 0.33 | 0.38 | 0.10 | 0.07 | 0.35 |
| ZFN4+3 | 0.18 | 0.13 | n.t. | n.t. | 0.15 |
| ZFN4+4 | 0.55 | 0.52 | n.t. | n.t. | 0.54 |

III. 平成24年度 業績一覽

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-----------------------------------|--------|----------|-----------|
| 駒野 淳 | | | | | |
| Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J*. | A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting p19 protein. | <i>Leukemia</i> | | | In press. |
| Kojima Y*, Kawahata T, Mori H, Furubayashi K, Taniguchi Y, Iwasaki A, Taniguchi K, Kimura H, Komano J. | Prevalence and epidemiological traits of HIV-1 infections in populations with high risk behaviors as revealed by genetic analysis of HIV-1. | <i>Epidemiology and Infection</i> | | | In press. |
| 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 glycoprotein are elicited by combined immunization with Sendai virus and replication-competent Vaccinia virus vectors and are boosted by CD40Lm. | <i>PLOS ONE</i> | 7(12) | e51633 | 2012 |
| 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. | <i>Cell Host Microbe</i> | 424(3) | 109-116. | 2012 |
| Urano E, Miyachi K, Ichikawa R, Futahashi Y, Komano J*. | Regulation of Cyclin T1 expression and function by an alternative splice variant that skips exon 7 and contains a premature termination codon. | <i>Gene</i> | 505(1) | 1-8. | 2012 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------------------|--------|------------|-----------|
| Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, <u>Komano J*</u> . | Toll-like receptor (TLR) 3 as a potential sensor of retroviral infection in human cells. | <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> | 12(1) | 519-523. | 2012 |
| Yanagita H, Fudo S, Urano E, Ichikawa R, Ogata M, Yokota M, Murakami T, Wu H, Chiba J, <u>Komano J</u> , Hoshino T*. | Structural modulation study of inhibitory compounds for RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase. | <i>Chem Pharm Bull (Tokyo)</i> | 60(6) | 764-771. | 2012 |
| Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyachi E, Narumi T, Aikawa H, <u>Komano JA</u> , Yamamoto N, Tamamura H*. | Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines. | <i>Bioorg Med Chem.</i> | 20(10) | 3287-3291. | 2012 |
| Miyauchi K, Urano E, Takizawa M, Ichikawa R, <u>Komano J*</u> . | Therapeutic potential of HIV protease-inhibitor CASP3. | <i>Scientific Reports.</i> | 2 | 359 | 2012 |
| <u>岡田 誠治</u> | | | | | |
| Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, <u>Okada S</u> , <u>Komano J*</u> . | A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. | <i>Leukemia</i> | | | In press. |
| Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katao H, and <u>*Okada S</u> . | Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma. | <i>Cancer Lett</i> | | | in press |
| Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, Hattori S, Kimura S, and <u>*Okada S</u> . | Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells. | <i>Bioorg Med Chem Lett</i> | 23(1) | 606-609 | 2013 |

| | | | | | | |
|--|---|--------------------------------|---------------|-----------|--|----------|
| Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Kawano Y, Niino H, Iino T, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, and Okuno Y. | PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. | Blood | | | | In press |
| Tsuruoka N, Arima M, Okada S, Sakamoto A, Hatanoto M, Arguni E, O-Wang J, Jing-Hua Y, Sekiya S, Shozu M, and Tokuhisa T. | ADAR1 induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells. | J Bio Chem | 288(2) | 826-836 | | 2013 |
| Terahara K, Ishiguro M, Ikeno S, Mitsuki Y, Okada S, Kobayashi K, and Tsunetsugu-Yokota, Y. | Evaluation of a Humanized NOD/SCID/JAK3 ^{null} Mouse Model: Expansion of CD4 ⁺ T cells with an Activated Memory Phenotype Affects Infectivity of CCR5-Tropic HIV-1 <i>in vivo</i> . | ProS ONE | 8(1) | e53495, | | 2013 |
| Uthaisar K, Sebwai W, Srikoon P, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, *Okada S, and *Wongkham S. | Cepharanthine suppresses metastatic potential of human cholangiocarcinoma cell lines. | Asian Pac J Cancer Prev | 13 (KKSupp 1) | 149-154 | | 2012 |
| Komizu Y, Yukihara M, Ichihara H, Matsumoto Y, Okada S, and Ueoka R. | Therapeutic effects of hybrid liposomes for mouse model of adult T-cell leukemia/ lymphoma <i>in vivo</i> . | Nano Bulletin | 1(1) | 120105 | | 2012 |
| *Hagiwara S, Yotsumoto M, Odawara T, Ajisawa A, Uehira T, Nagai H, Tanuma J, and Okada S. | Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV -infected patients: an epidemiological study in Japan. | AIDS | 27(2) | 279-283 | | 2013 |
| Michai M, Goto H, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, Wongkham S, and *Okada S. | Soluble CD30: a possible serum tumor marker for primary effusion lymphoma. | Asian Pac J Cancer Prev | 13(10) | 4939-4941 | | 2012 |

| | | | | | |
|--|---|--------------------------------|--------|------------|------|
| Khaenam P, Niibori A, Okada S, Jearanaikoon P, Araki N, and *Limpaiboon T. | Contribution of RIZ1 in proliferation and migration of liver fluke-related cholangiocarcinoma cell line. | <i>Asian Pac J Cancer Prev</i> | 13(8) | 4007-4011 | 2012 |
| Yotsumoto M, Hagiwara S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Nagai H, Fujikawa Y, Masuda S, Kitano K, Arima N, Uno K, Iwai T, Hongo I, Ota Y, Fukutake K, Okada S. | Clinical characteristics of human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma patients in Japan. | <i>Int J Hematol</i> | 96(2) | 247-253 | 2012 |
| Mitsuki Y, Terahara K, Shibusawa K, Yamamoto T, Tsuchiya T, Mizukoshi F, Ishige M, Okada S, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, and *Tsunetsugu-Yokota Y. | HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. | <i>J Virol</i> | 86(13) | 7227-7234 | 2012 |
| Taura M, Suico MA, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M, *Okada S, and *Kai H. | Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. | <i>Mol Cell Biol</i> | 32(8) | 1581-1590 | 2012 |
| Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshida M, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S, *Suzu S. | HIV-1 Proteins Preferentially Activate Anti-Inflammatory M2-Type Macrophages. | <i>J Immunol</i> | 188(8) | 3620 -3627 | 2012 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------------------|--------|-----------|------|
| Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Matsuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, and *Oike Y. | Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. | <i>Cancer Res</i> | 72(7) | 1784-1794 | 2012 |
| Tanimoto S, Sakai S, Kudo E, Okada S, Matsunuma S, Takahashi D, and *Toshima K. | Target-selective photodegradation of HIV-1 protease and inhibition of HIV-1 replication in living cells by designed fullerene-sugar hybrids. | <i>Chemistry- Asian Journal</i> | 7(5) | 911-914 | 2012 |
| Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, and *Okada S. | The antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- κ B pathway. | <i>Cancer Sci</i> | 103(4) | 775-781 | 2012 |
| Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S, and *Sakaguchi N. | Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. | <i>Apoptosis</i> | 17(7) | 679-690 | 2012 |
| Xi Y, Watanabe S, Hino Y, Sakamoto C, Nakatsu Y, Okada S, and *Nakao M. | Hmgal is differentially expressed and mediates transcriptional silencing of the <i>Cd4/Cd8</i> loci in T cell lineages and leukemic cells. | <i>Cancer Sci</i> | 103(3) | 439-447 | 2012 |
| Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanono M, Miwa M, Okada S, Andreef M and *Saya H. | Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. | <i>Oncogene</i> | 31(23) | 2849-2861 | 2012 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------------------|--------|------------|-----------|
| Matsuno T, Kariya R, Yano S, Morino-Koga S, Taura M, Suico MA, Shimauchi Y, Matsumiya S, Okamoto Y, Shuto T, *Kai H, and *Okada S. | Diethylthiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- κ B pathway. | <i>Int J Oncol</i> | 40(4) | 1071 -1078 | 2012 |
| Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoochai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S, and *Suzu S. | HIV-1 Nef Perturbs the Function, Structure, and Cd Signaling of the Golgi through the Src Kinase Hck. | <i>J Cell Physiol</i> | 227(3) | 1090-1097 | 2012 |
| 星野 忠次 | | | | | |
| Yanagita H, Fudo S, Urano E, Ichihikawa R, Ogata M, Yokota M, Murakami T, Wuse H, Chiba J, Komano J, Hoshino T*. | Structural modulation study of inhibitory compounds for RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase. | <i>Chem Pharm. Bull. (Tokyo)</i> | 60(6) | 764-771. | 2012 |
| Yanagita H, Yamamoto N, Fujihara M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T*. | Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds in inhibiting its function | <i>ACS Chem. Biol.</i> | 7(3) | 552-562 | 2012 |
| 武田 哲 | | | | | |
| 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. | <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> | 421(1) | 519-523. | 2012 |
| Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J*. | A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting p12. | <i>Leukemia</i> | | | In press. |