

201318021A

平成25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26年3月

研究代表者 駒野 淳

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部ウイルス課・主任研究員

平成25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26年3月

研究代表者 駒野 淳

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部ウイルス課・主任研究員

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25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25年度 分担研究報告書

1. 治療分子送達ベクター被覆分子の機能検証

駒野 淳（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）・・・・・・・・・・ 9

2. 成人T細胞白血病のマウスモデルによる治療分子の評価

岡田 誠治（熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野）・・・・・・ 15

3. In silico maturation 法に基づく抗原-抗体の親和性改善について

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）・・・・・・ 23

4. 抗体工学による哺乳類細胞膜局在型の単鎖抗体の作出

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. ZFN によるヒトゲノム毒性評価にかかる実験系の構築

武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター）・・・・・・ 39

6. ZFN 耐性細胞における HTLV-1 プロウイルス機能の減弱

田中 淳（大阪大学微生物病研究所・特任講師）・・・・・・ 45

III 平成25年度 業績一覧

IV 平成25年度 刊行物別刷（抜粋）

1. 平成25年度 総括研究報告書

平成25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 主任研究員

当該年度は3年の研究計画の最終年である

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。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。本年度は治療分子抵抗性を示すプロウイルスの LTR 機能が低化すること、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として、ヒト CD4 反応性抗体 scFv の哺乳類細胞表面発現系を構築した。治療分子とベクター被覆系を統合することにより新たなメカニズムで発症遅延を達成すると同時に、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。

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

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

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人工酵素である亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (Zinc

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。

本年度は治療分子耐性細胞が生じるメカニズムと、耐性細胞がもつ変異 LTR の活性を明らかにした。また、治療分子の安全な送達に利用するための抗体を哺乳類細胞の表面に発現させる系の構築を行った。

B. 研究方法

1. 治療分子の開発 (駒野・武田・田中)：昨年度までにcharacterizeした2組のZFNについて、ATL細胞株S1Tに導入した際に、治療耐性細胞が得られた。この耐性細胞におけるHTLV-1 LTRの配列と機能を解析することにより、耐性のメカニズムとその治療効果にあたる影響に関する研究を行った。また、治療効果の増強と詳細な作用機序を明らかにするためTetOn系を応用したZFNペア同調的発現系の構築を行った。
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実験系を再度実施し、ZFNの持つATL治療活性を評価した。また、ATL細胞株MT-2, MT4にmCherry発現ベクターを遺伝子導入し、フローサイトメトリーを用いてmCherryを強く発現する細胞株を樹立し高度免疫不全マウスであるNOD/Scid/Jak3欠損マウス (NOJマウス) 腹腔内に移植することでin vivo系の構築を試みた。また、NF-kappaB阻害薬であるcepharanthine (CEP) やHybrid liposomes (HLs)を投与する事で治療候補分子を評価する系として有用かについて評価を行った。

3. 治療分子送達法の開発（竹腰・星野・田中・駒野）：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。健常人由来の 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、さらに膜移行シグナルと膜アンカードメインを付加して、哺乳類細胞の形質膜に発現できるよう遺伝的に改変した。この誘導体の抗原反応の特異性を検証すると同時に、抗体の機能を向上させるための発現系について改良を加えた。

（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 ATL 細胞株 SIT において約 10% の頻度で耐性細胞を生じさせる。この細胞クローンから HTLV-1 LTR を回収し、変異 LTR の 5'/3' 方向の転写活性を評価した。多くのクローンは Tax 依存的転写増大能を維持していたが、転写活性は多くの ZFN1/2 誘導変異で減弱した。ZFN3/4 ではこの長期的治療効果が得られる変異が導入される頻度が低かったうえ、転写活性が著しく増大する変異体も同定された。ZFN の活性をより厳密かつ短期間に評価する実験系の構築を試み、ATL 細胞株で TetOn 系を利用した同調的 ZFN ペア発現系の樹立に成功した。

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 が抑制することについて再現性を有する事を明らかにした。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。MT-2 mCherry を高度免疫不全マウスである NOD/Scid/Jak3 欠損マウス (NOJ マウス) 腹腔内に移植したところ、マウス腹腔内の生着が認められた。蛍光イメージングを用いることで腹腔内の腫瘍量を定量的に解析することが可能であった本マウスに NF-kappaB 阻害薬である cepharanthine (CEP) を投与したところ腫瘍量の減少が認められた。また、MT-4 細胞を Balb/c Rag-2Jak3 二重欠損(Balb/c RJ)マウス脾臓に移植したところ脾臓と肝臓への MT-4 細胞の生着が認められた。本マウスに Hybird liposomes (HLs) を投与する事で、MT-4 腫瘍量の減少が確認された。本マウスは ATL に対する新規治療薬候補の有効性と副作用を評価するのに有用な系であると考えられる。

3. 治療分子送達法の開発（竹腰・星野・田中・駒野）：膜貫通ドメインまたは GPI anchor ドメインを付加することにより、昨年度 scFv 化した健常人由来 CD4 反応性モノクローナル抗体 HO538-213 を哺乳類細胞の形質膜に発現させることに成功した。この誘導体は CD4 抗原と反応する活性を維持していることが判明したが、生物学的な活性は検出限界以下であった。独自開発した In silico maturation 法を応用するため、継続して抗原と抗体の大量精製法の構築を試み、安定的に scFv と抗原 D1 ドメインを大量に生成する系を構築した。一方、IgG4 型抗体や CD4 抗原の extracellular domain 全長の発現精製には改善の余地があることが判明した。

（主な研究成果概要図を参照）

D. 考察

世界で初めて我々が樹立した HTLV-1 のプロウイルスを除去できる活性を持つ治療分子について、耐性の側面から有用な情報を蓄積することが出来た。治療の耐性はしばしば問題となる。ZFN に

よる HTLV-1 感染細胞の細胞死誘導においても一部の細胞がこれに耐性を示すことは昨年度までに明らかだったが、耐性細胞に残存ウイルスの病原性または複製能力が現弱しつつあることが明らかとなり、治療効果は細胞死を免れた細胞でも維持されることが示唆された。これは治療効果を2重に持つことを意味し、ZFNによる治療アプローチの優れた特徴として位置づけられる。また、昨年度までいくつかの評価項目で ZFN3/4 よりも優れていると判定されていた ZFN1/2 は、治療効果残存の視点からもより優れていることが示された。今後の治療法開発においては ZFN1/2 に焦点を当てて展開することが望ましい。

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) 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 治療分子送達を選択性を向上させる技術を確立する。
- (9) ZFN 作用機序を模倣した小分子化合物を開発し代替する。

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も否定できない。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

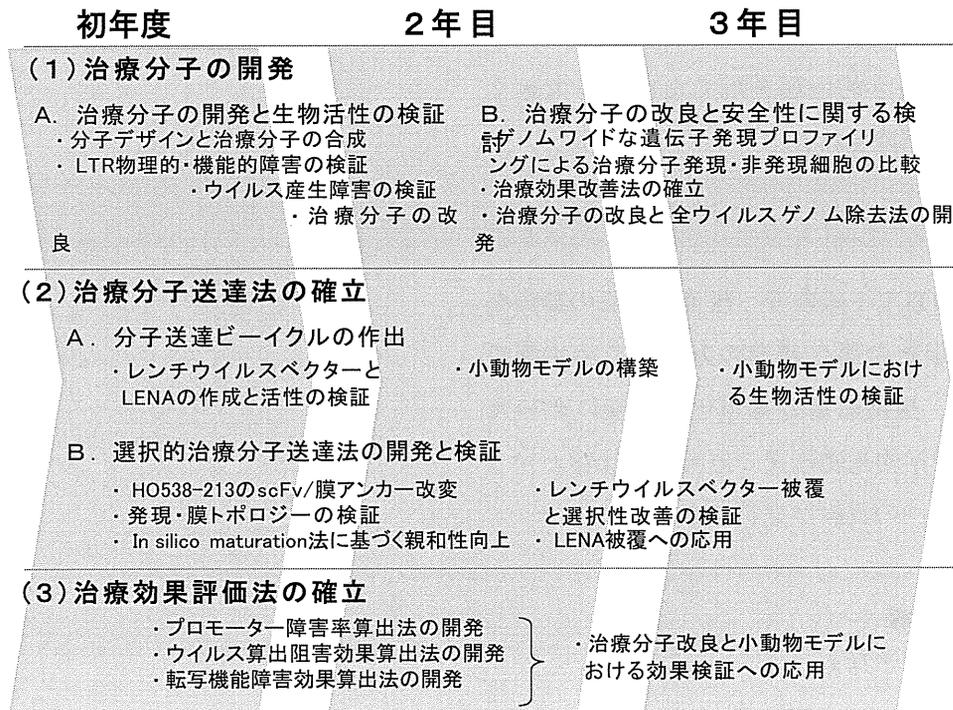


図 2. 治療分子とその作用機序概要

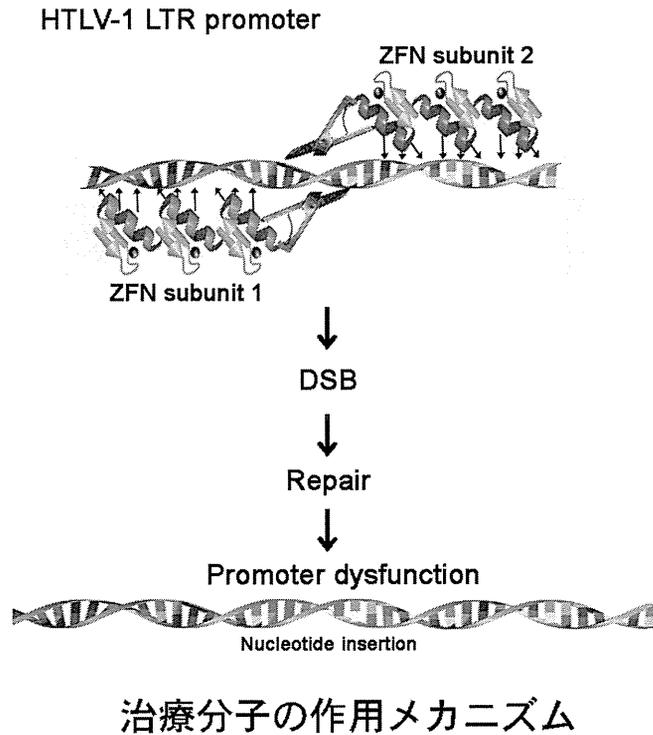
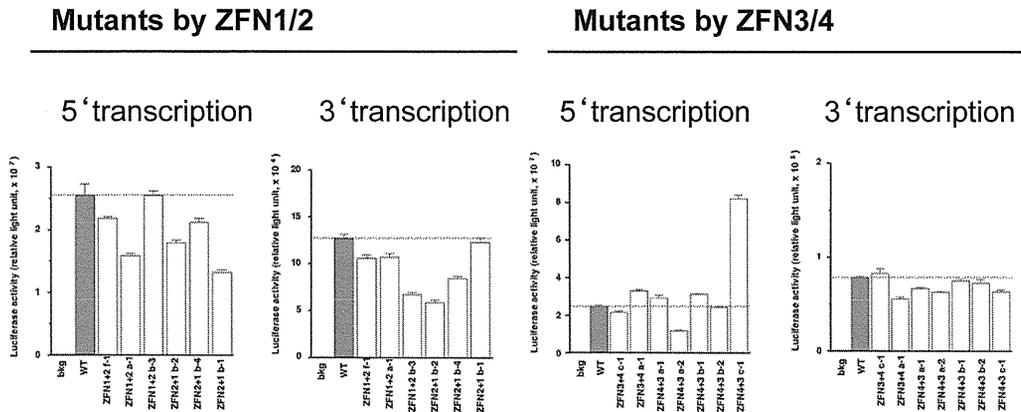


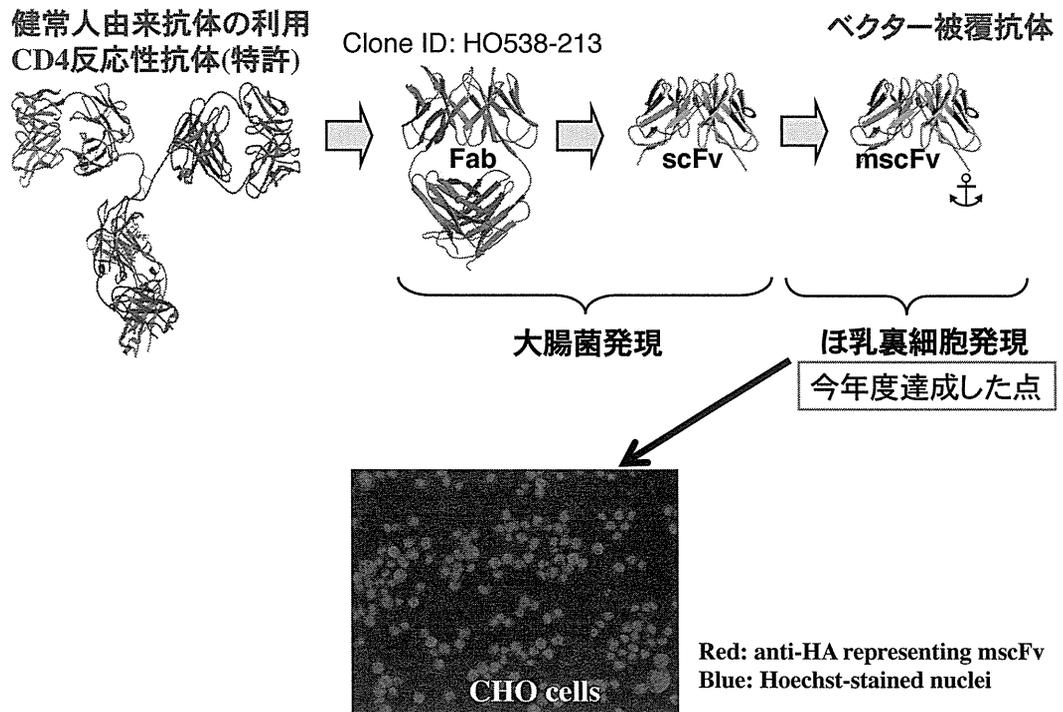
図 3. 本年度の研究成果概要

治療分子は細胞死誘導に耐性の細胞においても治療効果を発揮



The Tax-augmented transcription of the positive strand was reduced by most of the mutations introduced by ZFN1/2 (4/6 clones, Fig. 3D). Similarly, the negative strand transcription was also reduced by ZFN1/2-induced mutations (5/6 clones). On the other hand, increased positive strand transcription was observed in 4/7 LTR mutants recovered from ZFN3/4-transduced cells. By contrast, many of the LTR mutants showed modestly reduced negative strand transcription.

抗体遺伝子改変によりほ乳類細胞の形質膜発現型scFv誘導体を創出



11. 平成25年度 分担研究報告書

分担研究課題：治療分子送達ベクター被覆分子の機能検証

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 主任研究員

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。本年度はこれまで作出した治療分子を HTLV-1 感染細胞に送達するための技術構築において、ヒト細胞でベクター被覆分子の機能評価を行った。CD4 陽性Tリンパ球への治療分子送達に応用するための基盤となる健康なヒトに由来する CD4 反応性抗体クローン HO538-213 を single chain 化し、哺乳類細胞の膜発現型に改変した分子 mscFv はヒト細胞の形質膜に発現した。しかし、細胞間相互作用を指標とする生物学的活性は検出限界以下であった。本研究により、抗体と抗原の親和性を向上させる必要性が明確となった。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症においては、根治療法を可能にする技術が存在しない。非症候性キャリアからウイルスを除去する方法を開発することは、感染者にとって大きな希望を与える。本研究ではこれを達成するために HTLV-1 のプロウイルスを認識してこれを物理的に破壊し、ウイルス感染細胞特異的に DSB-induced apoptosis を誘導する新たな治療分子の構築と、治療分子を効率的に潜伏感染細胞に送達する方法を開発する。

昨年度までに治療分子として HTLV-1 の LTR を特異的に認識して DSB を導入する Zinc finger nuclease を構築し、その治療分子としての活性について詳細な検討を行った。一方、これを HTLV-1 の潜伏感染細胞である CD4 陽性 T 細胞に送達する方法については、ベクターを健康人由来の CD4 反応性抗体で被覆して CD4

陽性 T 細胞に選択的な治療分子送達を可能にするシステムを構築する。ベクターには生体での安全性が臨床応用されているレンチウイルスベクターよりも大幅に進化したタンパク質導入システム LENA を使用する。抗体分子でベクター被覆するために必要な要素は、LENA を作出するための細胞表面に効率よく発現する系に改変することである。この際、ベクター被覆効率を考えると、細胞内ドメインを欠いたほうが好ましい。その理由は、ウイルスベクターの構造タンパク質が細胞膜ドメインが相互作用することが原因で、被覆効率が下がる危険性があるためである。実際、HIV-1 を murine leukemia virus や gibbon ape leukemia virus のエンベロープで被覆しようとする、エンベロープタンパク質の細胞質内ドメインがこれを阻害するため効率的な被覆が達成できないことが報告されている (Freed EO and Martin MA. J Virol. 1995; Christodoulopoulos I and

Cannon PM. J. Virol. 2002)。これに対し、我々は健常人由来 CD4 反応性抗体クローン HO538-213 を一本鎖化 (scFv) し、ER-Golgi 系を經由して哺乳類細胞の細胞表面に発現することに成功した。細胞膜への anchoring を達成するためには、膜貫通ドメインを付与する型と、GPI アンカーを付与する型がある。竹腰分担研究者はこれらの発現系を構築して比較したところ、細胞表面発現効率が高かったのは GPI アンカー型の scFv HO538-213 (mScFv) であった。

本年度は、昨年度合成した治療分子 ZFN を HTLV-1 の宿主の一つである CD4 陽性 T リンパ球に導入するための送達技術の基盤となる mScFv について、細胞間相互作用を測定することにより哺乳類細胞における機能評価を実施した。

B. 研究方法

CHO細胞に恒常的にGPIアンカーを付加したscFv HO538-213 (以下mScFv) を発現させた細胞に対し、ヒト由来CD4陽性T細胞株MT-4、PM-1、Jurkat、ヒト由来CD4陰性B細胞株Rajiを共培養し、CHO細胞と比較して細胞同士の相互作用が増進するかを顕微鏡下で観察した。mScFvの発現はフローサイトメトリーおよび免疫染色により確認し、確認に要したツールはmScFvに付加されたHA epitope tagに対する抗体を利用した。CHO細胞を6 well plateの各ウェルの中心部に播種し、ここに浮遊細胞を 1×10^6 個/wellで添加した。室温～37度で1～24時間培養した後に顕鏡し、プレートを振動させても物理的な細胞接触を維持する細胞の頻度を観察し、mScFvの有無、およびCD4陽性細胞と陰性細胞の相違に焦点を当てて評価した。また、ヒト胎児腎由来細胞株HEK293にmScFvを

発現するpDisplay mScFvをlipofectamine2000 試薬にて一過性に発現導入し、非発現細胞を比較対象として同様の実験を行った。なを、293細胞を利用した実験系において、CD27とCD70の相互作用が検出可能であることを検証済みである。mScFvの構築とCHO細胞への導入に関しては竹腰分担研究者の報告書を参照のこと。(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

mScFv を定常的に発現する CHO 細胞に対し、anti-HA-FITC 抗体にて染色すると、細胞表面における抗体分子の発現が確認された (図 1 参照)。この細胞にヒト CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、mScFv 非発現細胞と比較して、培養時間と温度を系統的に変化させたにもかかわらず、有意に細胞間相互作用が増大する結果は観察されなかった。これはヒト B 細胞を用いた対照実験でも同様であった。CD27-CD70 相互作用においては恒常的発現系での低い発現レベルが検出効率を低下させる減少が観察された。これは一過性発現系により発現レベルを高くする事により改善された。従って、活性の検出に mScFv 発現レベルの影響がある可能性を勘案し、一過性発現系で 293 細胞に mScFv を発現させる実験系で再検討した。293 細胞に一過性に mScFv を発現させた細胞を相互作用標的にしても、同じアッセイ系で有意な T 細胞相互作用は観察できなかった。

D. 考察

抗体工学的に作出された mScFv は哺乳類細胞の細胞表面に良好な発現をみせ、CD4 分子に対する親和性も維持されていることが竹腰分担研究者により確認された。ヒトモノクローナ

ル抗体を scFv 化して哺乳類細胞の表面に発現させたのは世界で初である。

生化学的な検討によると、抗原と抗体親和性が Kd 値で 10^7 程度と生体分子の特異的な相互作用レベルと比較するとやや低かった。これは Fab と scFv で同等の活性であった。Fab においては HIV-1 複製阻害活性という明確な生物活性が認められているにもかかわらず (Hamatake et al. Eur J Immunol 2010)、本実験では生物学的活性が認められなかった。この背景は Fab 抗体では大腸菌に由来するのに対し、mScFv 抗体分子は哺乳類細胞で合成されて、ER-golgi 系を経由すること、innate structural instability に関連があると思われる。しかし、細胞間の相互作用を安定化できなくとも、ウイルスベクター被覆においてはウイルス粒子-細胞間の相互作用を安定化させることが出来る可能性もある。今後はレトロ・レンチウイルスベクター被覆を物理的に検証したうえで、mScFv 被覆ウイルスベクターによる CD4 陽性 T 細胞への反応性向上を評価したい。

プロウイルスを不可逆的に損傷する分子も、ヒトモノクローナル抗体によるベクター被覆も世界的に例のない独自の技術である。これを統合して有用性を示すことにより、独自性の高い治療法として応用が期待される。

E. 結論

哺乳類細胞の細胞間相互作用系にて、細胞膜アンカー型ヒト CD4 反応性モノクローナル抗体 HO538-213 由来 scFv の発現を達成したが、有意な生物学的活性は検出感度限界以下であった。今後、ウイルスベクター被覆による活性の確認と抗体の variable region 改変により親和性を向上させたクローンでの技術検証

を実施する必要がある。

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. Kurata T, Kanbayashi D H, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report. American Journal of Medicine. In press.
2. Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by EBV type III latency that up-regulates CD150/SLAM. Cancer Sci. In press.
3. Kawabuchi-Kurata T, Misaki T, Suehiro Y, Komano J, Kase T, Takahashi K. Longitudinal study on respiratory viral co-infections in 0- to 2-year-old infants with or without clinical manifestations. Jpn J Infect Dis. In press.
4. Urano E, Morikawa Y, Komano J. Novel role of HSP40/DNAJ in the regulation of HIV-1 replication. J Acquir Immune Defic Syndr. 64(2): 154-62. 2013
5. Hiroi S, Morikawa S, Takahashi K, Komano J, Kase T. Molecular epidemiology of human adenoviruses d associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010. Jpn J Infect Dis. 66(5) 436-8. 2013
6. Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products.

ACS Chem Biol. 8(10) 2235-44.2013

7. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(30) 12379-84. 2013
 8. 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. 27(8) 1621-7.2013
 9. 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 behaviours as revealed by genetic analysis of HBV. Epidemiol Infect. 141(11) 2410-7. 2013
2. 学会発表
(国内学会)
1. 駒野 淳. Regulation of P-TEFb complex-dependent transcription by a novel alternative splice variant of Cyclin T1. 第 27 回近畿エイズ研究会学術集会. 2013 年 6 月 1 日. 大阪
 2. 駒野 淳. バイオセーフティに関する最近の話題・大阪府における風しん流行状況について. 大阪府立母子保健総合医療センター研究所. 2013 年 7 月 25 日. 大阪
 3. 駒野 淳、武田 哲、田中 淳、岡田 誠治. Inhibition of ATL tumorigenicity by ZFN targeting HTLV-1 provirus. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日. 横浜
 4. 駒野 淳、倉田貴子、上林大起、西村公志、大平文人、松井陽子、福村和美、松本治子、高橋和郎、廣川秀徹、吉田英樹、塩見正司、信田真里、宮浦徹、東野博彦、内野清子、田中智. 大阪府における風疹流行の現状と疫学解析. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日. 横浜
 5. 加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、永井沙織、西村公志、大平文人、松井陽子、福村和美、松本治子、高橋和郎、駒野 淳、玉井圭. 大阪府における風疹の流行状況と先天性風疹症候群患児への支援体制について. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 2013 年 10 月 26-27 日. 札幌
 6. 左近直美、萬谷雅宣、中田恵子、上林大起、駒野 淳、加瀬哲男. 自然感染における小児のノロウイルス再感染. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 12 日. 神戸
 7. 武田 哲、上林大起、倉田貴子、吉山裕規、駒野 淳. Epetin-Barr virus III 型潜伏感染による Measles virus 感染感受性増強メカニズムの解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 12 日. 神戸
 8. 上林 大起、倉田 貴子、加瀬 哲男、駒野 淳. 風疹ウイルス感染 High-throughput モニタリングシステムの確立と中和抗体価測定への応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 12 日. 神戸
 9. 駒野 淳. 風疹の地域流行がもたらす多面的な影響と検査・研究の最前線. 平成 25 年度厚生労働省地域保健総合推進事業全国疫学情報ネットワーク構築会議. 2013 年 11 月 19 日. 東京
 10. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、駒野 淳、古林敬一、谷口 恭、岩佐 厚、谷口幸一、木村博子. 大阪府内の性感染症関連診療所受診者における HIV・HBV・梅毒の疫学調査と HIV 検査勧奨の効果. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20-22 日. 熊本
 11. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、駒野 淳、松浦基夫、大田加与、大成功一、藤本卓司. 高ウイルス血症と急激な CD4 数の減少を呈する HIV-1 感染初期症例の地域的集積とそのウイルス学的解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月

20-22 日、熊本

12. 上林大起、倉田貴子、高橋和郎、駒野 淳、加瀬哲男. 先天性風疹症候群 (CRS) および関連症例について. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会. 2013 年 12 月 1 日. 津
13. 加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、高橋和郎、駒野 淳. 麻しんにおける家族内 2 次発生について. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会. 2013 年 12 月 1 日. 津
14. 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. Development of novel transcriptional suppressors indpried by non-coding RNA, 7SK. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日. 神戸
15. 中 田 恵 子 、 駒 野 淳 . Beta-glucocerebrosidase/GBA1 confers the resistance to enterovirus 71, a causative agent for Hand-foot-mouth disease. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 4 日. 神戸
16. 斉藤達哉、Lee Hanna、児崎達哉、三澤拓馬、高濱充寛、佐藤荘、竹内理、斉藤愛記、山岡昇司、山本直樹、松浦善治、駒野 淳、審良静夫. RNA ウイルスに対する感染防御応答における Zinc-finger antiviral protein の役割. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 4 日. 神戸
17. 駒野 淳. 風疹流行により顕在化した発疹性疾患サーベイランスの諸問題. 第 27 回公衆衛生情報研究協議会研究会. 2013 年 1 月 24 日. 和光
18. 駒野 淳. 大阪府における風疹の流行状況～Labratory examination 強化と感染性ウイルス可視化の試み. 大阪小児科医会感染症サーベイランスモニター会. 2014 年 3 月 9 日. 大阪

3. その他

特記すべきことなし

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

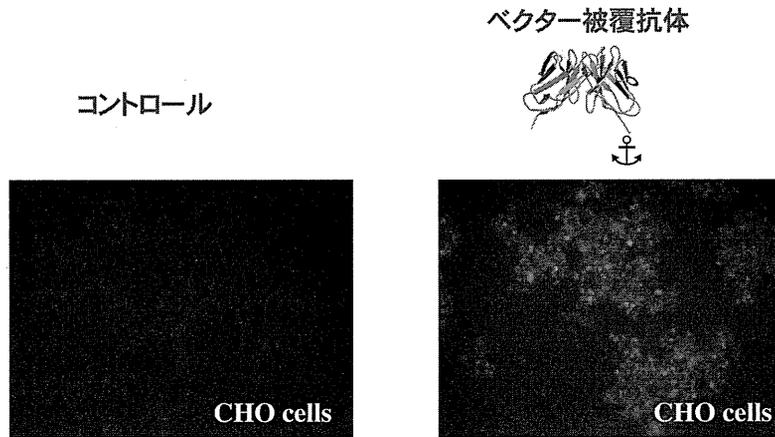
特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

図1. 治療分子デリバリーの基盤技術構築

ヒト抗体をscFv化して細胞膜に発現
局在させる技術開発に成功(世界初)



分担研究課題：成人T細胞白血病のマウスモデルによる治療分子の評価

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、高度免疫不全マウスにATL細胞株を移植することでATLマウスモデルを作成し、新規治療分子として期待されるLTR認識Zinc Finger Nuclease (ZFN)についてATL細胞株EDの腫瘍形成に対する治療効果を*in vivo*で評価した。レトロウイルスベクターでZFN1+2を導入したED細胞は対照となるZFN2+2細胞と比較して有意に腫瘍形成が抑制された。これはZFNがATLの治療分子として有用である事を示唆している。また、本実験系はATLの抗腫瘍作用を評価する実験系としての有用性が期待される。

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の開発が望まれている。

本研究の目的は、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。特に、本研究班で開発した HTLV-1 LTR を特異的に認識する Zinc Finger Nuclease (ZFN)の *in vivo* における有効性について検討した。

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した。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し、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した。本系を用いて、新規治療分子として期待されるLTR認識ZFN、及び様々な治療薬候補の*in vivo*における有効性の検証を行った。

(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、カテゴリー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。