

2013/802/B

平成 23-25 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

総合研究報告書

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 23-25 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

総合研究報告書

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23-25年度 総合研究報告書

### 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23-25年度 分担研究報告書

### 1. HTLV-1 感染症に対する革新的治療技術の開発

駒野 淳（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）・・・・・・・・・・ 11

### 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）・・・・・・・・ 27

### 3. 抗体工学を応用した HTLV-1 感染標的に対する安全な治療分子送達法の開発 (I)

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）・・・・・・・・ 41

### 4. 抗体工学を応用した HTLV-1 感染標的に対する安全な治療分子送達法の開発 (II)

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）・・・・・・・・ 53

### 5. HTLV-1 プロウイルスゲノムを標的とした新規治療分子の開発 (I)

武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター）・・・・・・・・・・ 63

### 6. HTLV-1 プロウイルスゲノムを標的とした新規治療分子の開発 (II)

田中 淳（大阪大学微生物病研究所・特任講師）・・・・・・・・・・ 73

## III 平成23-25年度 業績一覧

## IV 平成23-25年度 刊行物別刷（抜粋）

# 1. 平成23-25年度 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

**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、人工酵素 Zinc Finger Nuclease (ZFN) 技術を応用した治療分子の合成に成功した。治療分子は 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小動物モデルにて実証し、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。2つの技術を統合すると日本で数十万と推定される無症候キャリアの救済に役立つ新たな治療技術が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

必要があるが、一度感染したウイルスを宿主から排除する技術は確立されていない。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 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

#### A. 研究目的

HTLV-1 はヒトに感染すると生涯潜伏感染を持続し ATL や HAM の原因となる。病期進行を阻止するためには生体から HTLV-1 を除去する

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治療法を確立すること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。無症候キャリア対策で重要な点は、潜伏感染細胞のウイルス遺伝子発現が乏しいことにある。従って、遺伝子発現に影響されないプロウイルスゲノムを治療標的にし、HTLV-1 が潜伏する T リンパ球の細胞表面マーカーCD4 を治療分子送達に利用する。プロウイルスゲノムを標的とする治療は過去に実用化された例がない。

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。

本研究の特徴は本研究の特色は (1) 治療分子、LENA 法、ベクター被覆抗体、抗体性能の改善法はすべて独自に開発された日本発の技術であること、(2) 臨床応用を念頭において、開発当初から安全性の高い技術を採用していること、(3) 無症候キャリアの救済に主眼をおいた研究であること、(4) ATL に対する治療法としても使用できること、(5) 物理的にプロウイルスゲノムを破壊するという治療アプローチが

過去に例を見ないことである。特に、最後の点において、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。

1 番目の点に関しては、我々が治療分子送達に利用を企図している蛋白質導入システム LENA は独自技術であり、レンチウイルス系には特許を有している。また、治療分子送達に応用するヒト由来 CD4 反応性抗体クローンは我々が樹立し特許化した(Hamatake et al, Euro J Immunol 2010)。電算機を利用した抗体機能の効率的な改善にかかる技術も我々が独自に開発した特許技術 *in silico* maturation 法を利用する。これらは過去の厚生科学研究で蓄積してきた研究成果を組み合わせたもので、研究の独自性と継続性は特筆すべき点である。

2 番目の点に関しては、治療分子の基盤となる ZFN 技術は HIV-1 感染症にて臨床治験に成功した報告(Holt et al, Nat Biotechnol 2010)がある。蛋白質導入システム LENA は宿主ゲノムを損傷しないため既存のレトロ・レンチウイルスベクターよりも安全性が高い (Aoki et al, Gene Ther 2010; 2011: Miyauchi et al, Sci Report 2012)。治療分子送達の細胞選択性を向上させる抗体は健常人由来であるため *in vivo* 投与にかかる副作用の懸念は低いことなどがポイントである。

2 番目の点に関しては、日本で数十万と推定される無症候キャリアの救済に主眼をおいた治療研究は乏しいため、本研究の必要性は高い。ATL 治療には抗 CCR4 抗体、免疫療法などが試験されている。これらは長年の基礎研究の成果である。しかし、HTLV-1 感染症がこれで解決するわけではなく、次世代の治療を支える基盤研究を戦略的に推進することも重要である。

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（図 1、2）。

3 年の研究期間で治療分子をデザイン・合成し、これが HTLV-1 感染細胞特異的に作用して増殖を阻害し、生体内における ATL 細胞の造腫瘍性を低下させる活性を検証して治療分子の有用性を確認付けたい。また、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を構築したい。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。治療分子の標的と送達特異性とそれぞれの安全性が実用化レベルに到達できるかについて十分な科学的知見を収集したい（図 1、2）。

研究班活動においては、班員を 2 つにグループ分けして、治療分子と治療分子送達法の開発を分担協力して進める。それぞれの科学的知見については独立した 2 つの研究グループが検証することで、再現性を検証する。また技術的ノウハウをとプロダクトを共有することで研究を効率的に推進する。

## B. 研究方法

1. 治療分子の開発（駒野・武田・田中・岡田）：Sangamo アルゴリズムにて HTLV-1 LTR を認識しヒトゲノムを認識しない ZFN をデザインし合成する。ZFN 機能を評価するため、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て ZFN の治療分子活性を検証した。ZFN に対する治療細胞を利用

して作用機序の解析、治療耐性獲得のメカニズム、作用効果の維持に関する解析を行った。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。さらに免疫不全マウスに 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。

2. 治療分子送達法の開発（竹腰・星野・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、さらに膜結合型誘導体に改変してその抗原反応特異性を確認する。また安全性確保の観点からエピトープの同定を行なった。一方、抗原と抗体結合の改善を検証するためのタンパク質精製系の構築と、これを支援するための電算機プログラム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・岡田）：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。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。

一方、治療耐性細胞の解析により、これらの細胞が有する変異型 LTR は ZFN1+2 によって機能が低化していることが示された。これはウイルスの複製能力や病原性を低減させる効果が期待される。従って、一見「治療耐性」にみえる細胞においても治療効果が維持されており、ZFN の治療効果は 2 重であることが明らかとなった (図 3)。

2. 治療分子送達法の開発 (竹腰・星野・駒野) : 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哺乳類細胞の形質膜に発現させることに成功した。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大腸菌および哺乳類細胞における抗原と抗体の大量生成系を各種構築し産生効率と改善点の抽出を行った (図 3)。

(主な研究成果概要図を参照)

#### D. 考察

我々は本研究でウイルス感染細胞を除去することが可能な革新的な治療分子候補を開発した (Leukemia 2013)。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、治療分子活性として 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 (図 4)。

今後の研究の方向性としては下記の項があげられる。まず、実用化において効果と安全性の数値目標を策定することは治療技術の具体像を提示する上で開発において極めて重要である。治療効果については、1 クールの治療で 50% の viral load 減を達成目標にする。治療分子の送達においては、その効率を 1 回の LENA 投与で 10% 以上の CD4 陽性 T 細胞を target すること。安全性の面からは、治療分子は既に実用化された ZFN より低いオフターゲット効果を実用化レベルの指標とする。治療分子送達に利用する健康人由来 CD4 反応性抗体の安全性は、小動物モデルで生理学的攪乱が検出限界以下と定義する。先行研究で確立した動物モデルを最大限に活用して、ATL に対する治療効果の検討も行い、実用化への状況を整備したい。

これらを達成するため、治療分子の開発においては、次世代核酸配列解析装置を用いた標的特異性の厳密な評価、治療効果の向上、治療分子の小分子化を、治療分子送達においてはベクター被覆分子の性能向上、生理機能への影響と

デリバリー効率・特異性の詳細な検討に焦点を当てる。主に小動物実験モデルで治療技術の一層の向上と安全性の検証を行い、支援をいただければ積極的に実用化にむけた科学的知見を集積したい。

特に 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においては HIV 感染症を手本とする。HIV/AIDS 研究では根治にむけた研究が進められている。そのうちの一つに ZFN を利用した Cell Gene Therapy がある (Holt et al. Nat Biotechnol 2011 : NCT01252641/NCT01044654)。さらに、治療効果を高めるために化学療法 (cyclophosphamide) との併用が試験されている (SB-728-1101, Phase 1/2 Study)。ZFN による HTLV-1 感染症治療も化学療法との併用でより高い治療効果が得られる可能性がある。DSB repair inhibitor との併用について今後更なる検討を進める。

最終的なゴールを達成するために多面的に問題解決手法の開発を担保する必要がある現法はナノ粒子による治療分子送達である。高い安全性と効果を達成できる可能性を持つ反面、技術開発には困難も予想される。再生医療分野に目を向けると、iPS 細胞創出のため転写因子の導入が必要であるが、これを代替する小分子化合物が探索され、一定の成果を得ている。作用メカニズムを明らかにして、治療分子の分子量を小さくする努力は他の分野では一般的である。ZFN においても、作用メカニズムを模倣した小分子治療薬を作出してこれを代替することにより「飲んで効く薬」が出来るかもしれない。

新しい治療技術の臨床応用に際しては、被験者へのメリットと安全性のバランスが重要である。本研究で目指す技術は asymptomatic HTLV-1 carrier を対照にする。健常人への治験

には倫理的なバリアが高い。従って、実用化に際しては治療抵抗性の ATL 患者への投与を行い、抗腫瘍効果とウイルス量低化を検証するステップが想定される。これは他の治療法やワクチン開発においても同様の戦略が取られており、不可避と考えられる。健常人への治験よりも効果の発現において不利となる可能性も否定できない。これをクリアするために本研究では体内からのウイルス排除と並行してマウス ATL モデルで治療効果を得るためのプロトコル最適化を精力的に進めておく必要がある。

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。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。

本研究は技術開発という色彩が強い。研究結果は HTLV-1 の治療という狭い領域への貢献だけにとどまらない。本研究の治療法は EBV による B 細胞リンパ腫、HPV によるパピローマ、HBV による肝細胞がん、KSHV によるカポジ肉腫などへも応用可能である。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。従って、本研究には健康科学の推進に大きな波及効果も期待できる。

以上を勘案すると、臨床応用まで数年を要する研究だが、HTLV-1 感染症の発症遅延を達成できる具体策を提供し、感染者に希望を与える点から、本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。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

本研究により世界で始めて HTLV-1 感染細胞からプロウイルスゲノムを除去したりヒトモノクローナル抗体を単鎖化して哺乳類細胞の形質膜に発現する技術開発に成功した。非症候キャリアを発症前に治療する方法の開発にむけた基盤技

術を提示することが出来た。次世代の HTLV-1 医療提供を前提とした新たな厚生研究の方向性を示すことに大きく貢献した。

## 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

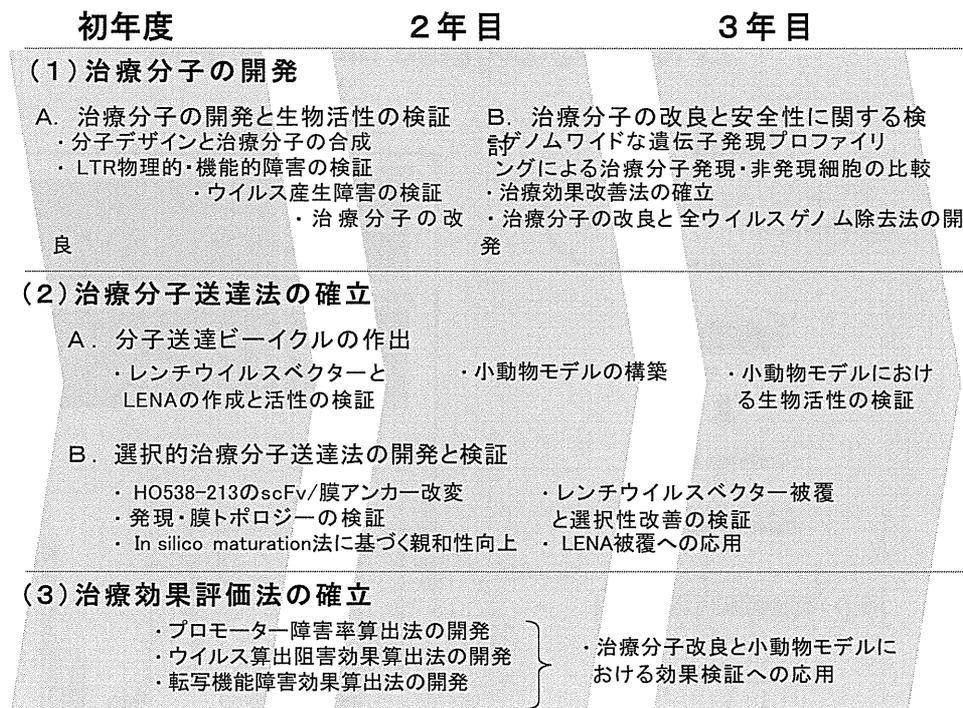
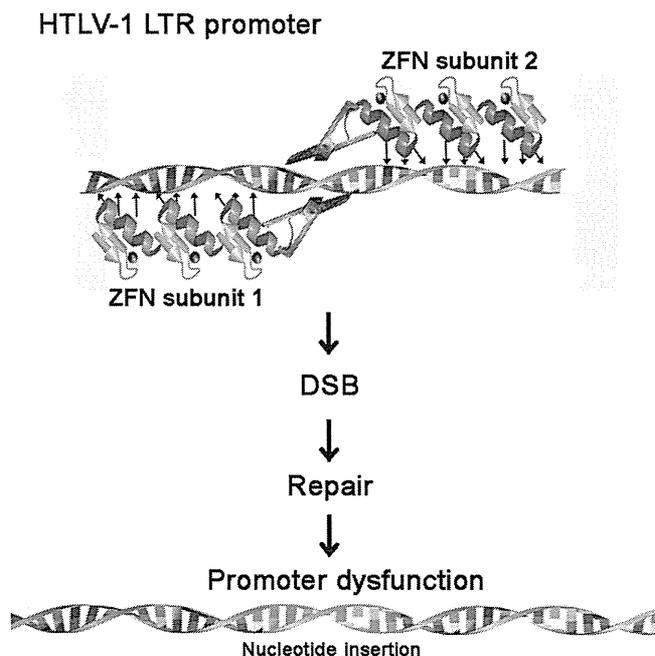


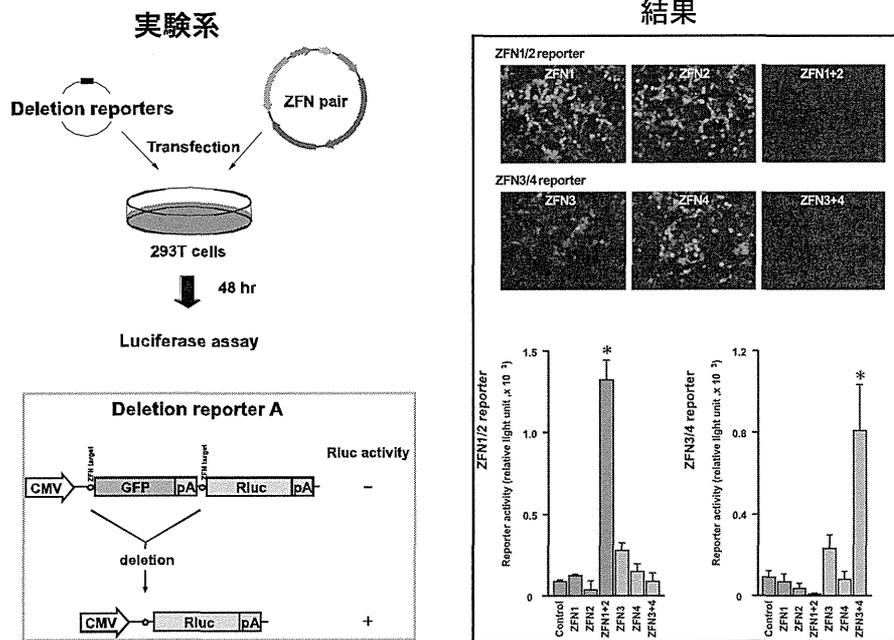
図 2. 治療分子とその作用機序概要



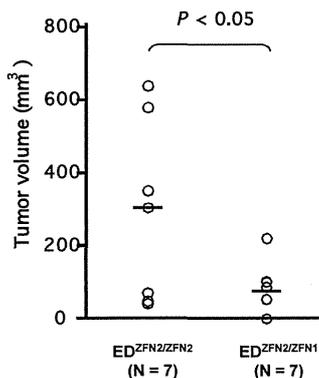
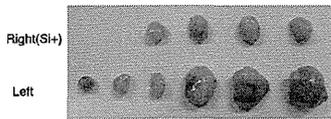
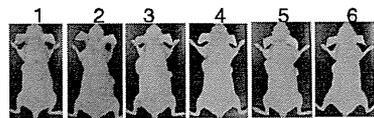
治療分子の作用メカニズム

図 3. 研究成果概要

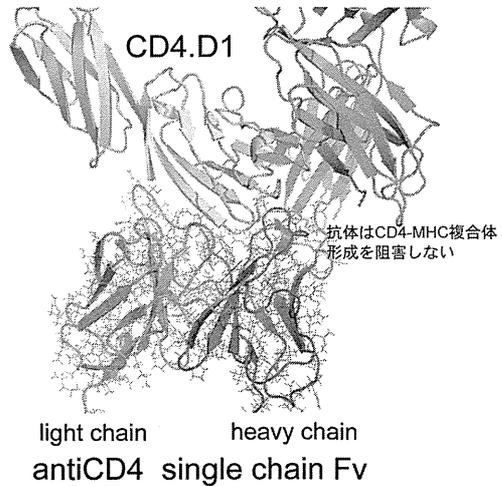
### ZFNによるtargeted deletion活性



### 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



### CD4.D2 MHC class 2



# 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

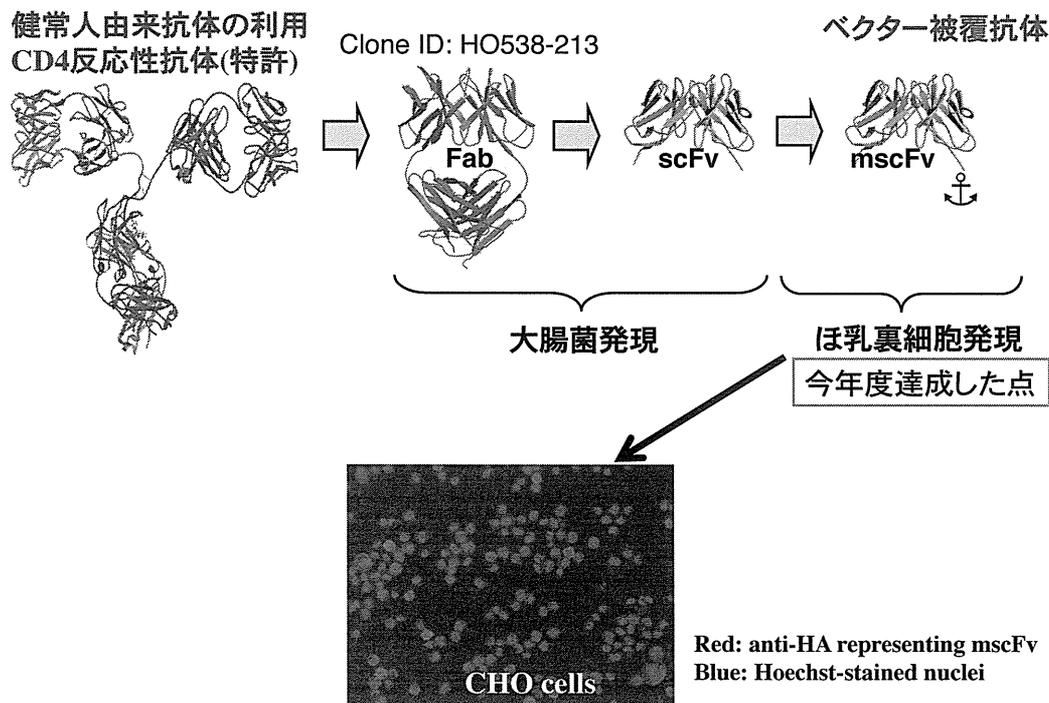
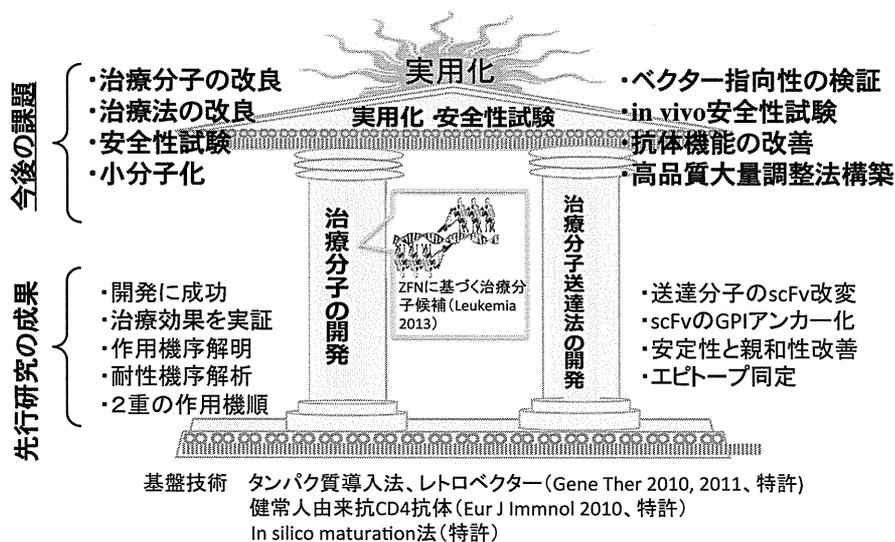


図 4. 研究の進捗状況と今後の方向性



## 11. 平成23-25年度 分担研究報告書

分担研究課題：HTLV-1 感染症に対する革新的治療技術の開発

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。3 年の研究機関で ZFN を合成してその治療分子としての基本性能を明らかにするため、ヒト細胞において HTLV-1 LTR のプロモーター活性阻害活性、標的部特異性の検討を行った。また、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、細胞膜アンカー型 scFv の機能をヒト細胞で評価した。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、ZFN が新規 HTLV-1 感染症治療分子として有用であることを実証されたと同時に、治療分子の効率的な CD4 陽性 T 細胞への送達には抗原-抗体親和性を向上させる必要性が明らかとなった。

#### 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。

治療分子として、我々は Zinc Finger Nuclease (ZFN) を利用する。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 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

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 臨床治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、グルコシ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 臨床治験が行われている (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。

一方、治療分子を 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、ベクターを健常人由来の 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。抗体分子でベクター被覆するために必要な要素は、抗体を細胞表面に発現することである。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。

3年の研究期間において、1年目に ZFN の合成を、2年目に 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。3年目は治療分子 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

1. ZFNの合成：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らが発表したJ02029と1988年にMalik, KTらが報告した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クレード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出する。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)。

2. 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ーブに用いた(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。

3. 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-1LTRをクローニングし、HTLV-1LTR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。

4. 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。

5. 細胞膜アンカー型scFvの機能評価：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 $1 \times 10^6$ 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。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

1. ZFN の合成：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。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。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。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。

2. 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 2)。

3. 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 2)。

4. 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)。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 3)。この違いは統計学的に有意であった (Pearson'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 でのみ認められた。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 4 青字) だけでなく、DSB 配列 (図 4 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 4)。また、ZFN1+2 発現によって ZFN3+4 の標的部位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。

5. 細胞膜アンカー型 scFv の機能評価: 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 5)。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

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