

次に His-tag 精製カラムを用いた精製の検討を行った。精製プロセスにおける各フラクションが含有する scFv 化 HO538-213 の濃度をヒト CD4 に対する ELISA で測定した。

	OD650
抽出液	0.366
カラムのフロースルー液	0.364
カラムからの溶出液	0.074

大部分の scFv がカラムに吸着せずに流出しているため、効果的な濃縮が得られていないことが示唆された。精製条件の改良と His-tag の設計についての詳細な検討が必要と思われる。

HO538-213 のエピトープ同定と親和性評価およびその改善のため、ヒト CD4 細胞外ドメイン 1 または 1 + 2 の精製を試みた。このため、ドメイン 1 については大腸菌発現ベクター pComb3XmD1.1 を用いて大腸菌でのタンパク質発現精製を行った。ドメイン 1 + 2 については発現ベクター pSecTagBD1D2 を用いて 293F 細胞を用いた一過性発現の系で生産を行った。どちらも His-tag 精製カラムを用いて大腸菌体粗抽出液または細胞培養上清から精製を行った。精製されたタンパク質を 40uM の濃度で ELISA プレートに固相化して CD4 反応性のマウス mAb Leu-3a を陽性対照として ELISA を行った。

	OD650
mD1.1	0.143
D1D2	0.650

mD1.1 の産生量は少ないか質的に良好ではない可能性があることが示唆されたが、D1D2 については十分な抗原量が得られた。良好に作動したシステムを利用する事により問題解決が得られると考え mD1.1 は pSecTagBmD1.1 を用い培養細胞での生産を検討している。

2. 第一段階 II scFv 遺伝子の適正化

抗体遺伝子改変に関してはまず 2 カ所のシステインをセリンに変えたものを作製した。改変前と改変後のクローンについて 2ml の小スケールで培養を行い IPTG 50uM で誘導を行った。その 1.5ml について scFv-213 の抽出を行い scFv-213 に付けた HA タグに対する 2 次抗体を用いて ELISA を行ったところ改変後のクローンは吸光値で 3.5 倍の値を示し、活性の増大が確認された。さらに遠心による濃縮を行ったところ活性の低下が認められなかったことから抗体としての安定性が増したことが確認された。以後の実験では改変遺伝子を用いて行った。

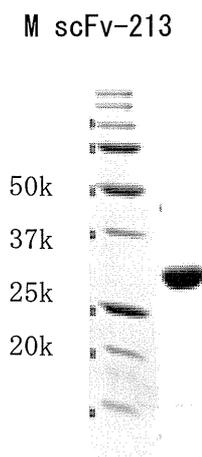
次に抗体遺伝子を T7 ベクター系の pFN6A にクローニングし、シークエンスの確認を取った。これを大腸菌 BL21(DE3) にトランスフォームして 20ml の系での生産を検討した。終夜培養の菌体を培地の 1/100 量加えて 37°C で培養を行い OD600 が 0.3-0.7 に達した時点で IPTG を 0.5mM 加え培養を行い、経時的に大腸菌を 1.5ml ずつ採取した。得られた大腸菌から抗体を抽出し、ELISA で抗体産生量を調べた。

時間	OD450	
	37°C	25°C
0h	0.061	0.053
1h	0.294	0.121
2h	0.164	0.161
3h	0.124	0.224
4h	0.097	0.500
5h	0.101	0.355
6h	0.090	0.337

この結果から 37°Cより 25°Cで培養するほうが収量が増大することが判明した。また培養時間は 4 時間が最適であった。IPTG に関しては 0.1,0.5,1.0mM で検討したところ 0.5mM で収量が最大であった。以後の実験では IPTG 誘導後は 25°Cで 4 時間培養、IPTG 濃度は 0.5mM の条件で行った。

次に大量培養した大腸菌から抽出された scFv-213 抗体の精製の検討を行った。当初 scFv-213 の 3'に His-tag を付加したがアフィニティカラムへの吸着は見られなかった。次に 5'側に His-tag を付加したが同様にアフィニティ精製できなかつた。次に 3'側に ProteinA-tag を付加して産生し、IgG Sepharose で精製の後にプロテアーゼでタグを除去した。SDS-PAGE で検出したのが図 1 である。

図 1. SDS-PAGE 電気泳動像 CBB 染色



タンパク質染色で単一の分子量 30k のバンドとして検出されたことから、精製の確認ができた。これを用いて以下の実験を行った。

CD4 のドメイン 1 (mD1.1)、ドメイン 1 + 2 (D1D2)、ドメイン 1-4 (sCD4) に対する反応性を ELISA を用いて調べた。マウス mAb の Leu-3a を陽性対照として用いた。Leu-3a は

CD4 ドメイン 1 の生理機能を担う MHC class II 分子相互作用部位を認識するマウスモノクローナル抗体である。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。

	Leu3a	scFv-213
sCD4	100 %	100 %
D1D2	78 %	68 %
mD1.1 (D1)	78 %	53 %

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。

3. 第二段階 膜移行型 scFv への改変

scFv-213 をほ乳類細胞の形質膜表面に提示する 2 種類のコンストラクトに関して CHO 細胞にトランスフェクトした。G418 でセレクションをかけて約 10 日後に抗 HA-FITC 抗体で染色し FACS で陽性細胞を解析し、ソーターを利用してシングルセルアイソレーションを行った。解析の結果、PDGF リセプターの膜貫通ドメインを利用したものより、GPI アンカーを利用したコンストラクトの方が細胞あたりの発現量が約 2 倍高いことが分かったので、以後は GPI アンカーを用いて実験を行った。

シングルセルアイソレーションしたいくつかの細胞クローンについて、再度 FACS を行い、安定発現系をセレクションした。得られた細胞について HA-tag を anti-HA monoclonal antibody conjugated with Alexa 594 (Molecular Probe) で染色し、核を Hoechst33258 染色した共焦点レーザー顕微鏡の写真を示す。蛍光シグナルが細胞周囲に位置していることから scFv-213 も細胞の表面に提

示されていると考えられる (図 2 参照)。同様の結果は anti-HA monoclonal antibody conjugated with FITC (Roche)を用いた免疫染色にてても得る事が出来た。

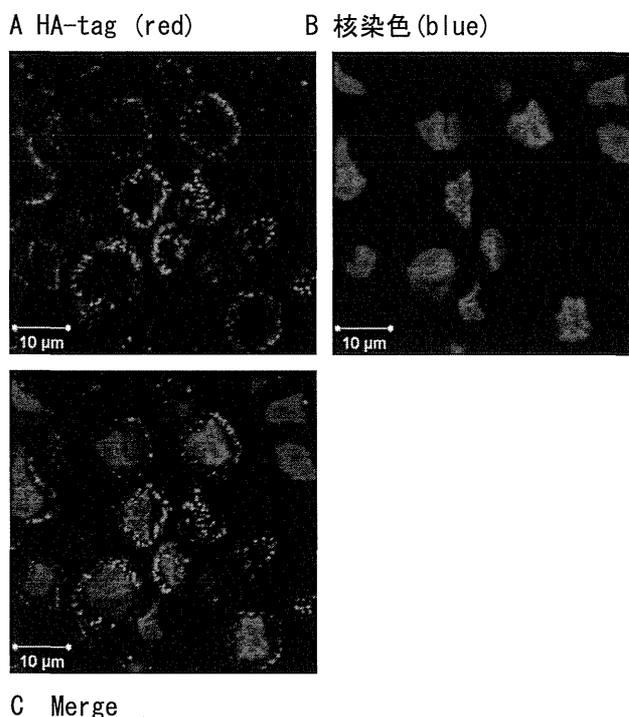


図 2. GPI アンカー型 scFv-213 の CHO 細胞における発現局在

次に CD4-GFP と GFP の産生を行った。当初、分泌型ベクターの pSecTag2 にクローニングして一過性発現系の FreeStyle システム (Life Technology) を採用した。トランスフェクション 1 週間後の培養上清を回収して上清中の GFP を測定したところ、ほとんど産生されていないことが判明した。そこでベクターを分泌型ではない pCDNA3.1 に変え、安定発現系を求めて CHO 細胞にトランスフェクトした。G418 でセレクションして 3 週間後に FACS で GFP 産生細胞を分離し、緑色蛍光シグナル強度の強い細胞をソーターを利用してシングルセルアイソレーションした。GFP 単独の物に比べて CD4-GFP 複合体ではシグナル強度が弱く、ま

た陽性細胞数も半数程度で、CD4-GFP 産生に細胞に負荷がかかると思われた。アイソレーション後に増殖した細胞を用いて GFP の強度と Hoechst33258 染色の強度を測定して、単位細胞あたりの GFP の強度が高い細胞クローンを選抜した。それらを増やして 10 センチシャーレ 2-5 枚分の細胞を用いて得た資料から GFP タグを capture するタンパク質精製を検討した。

蛍光を指標とする蛍光タンパク質の精製

	CD4-GFP*	GFP*
細胞抽出液	8565	18906
カラムに非吸着	7030	13134
溶出	0	24932

*値は緑色蛍光の相対値(relative fluorescence unit)を示す。

GFP の精製は良好に作動したが、CD4-GFP の精製効率は極めて低かった。複数回の試行でも再現性よく低い精製効率が示された。そこで暫定的にカラムに非吸着画分を用いて CHO 細胞の表面に提示している scFv-213 との反応性について検討を行った。対照に GFP 単独を用い、それぞれ細胞に添加して洗浄した後の緑色蛍光を定量した。結果は得られた GFP の蛍光強度を細胞数を表す Hoechst33258 染色の蛍光強度で補正した。

細胞に吸着したと思われる GFP 蛍光強度

細胞の種類	加えたタンパク質		CD4+GFP/GFP
	CD4-GFP	GFP	
CHO+scFv-213	1.167	0.985	1.185
CHO	0.936	0.868	1.078

CD4-GFP を加えた CHO+scFv-213 のみ高い緑色蛍光が観察された。以上の結果より細胞に

提示された scFv-213 と CD4 が抗原抗体反応を行ってい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、健康人に由来する HO538-213 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 化および形質膜発現型への変換、反応性と安定性の維持、抗原と抗体の大量精製系の構築、エピトープの解析は重要なチェックポイントになる。

抗体遺伝子改変においては統一的な理論はなく、試行錯誤的な側面が強い中、scFv 化と GPI アンカー化により、ほ乳類細胞の形質膜発現型誘導体が構築され、その発現と抗原への反応性が検証された。scFv の大量調整効率に影響を与える因子は複数あると思われるが、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ところ、改変 scFv 化 HO538-213 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。一方、大量産生系においては改善の必要性も明らかとなった。scFv および IgG4 型抗体と、CD4 抗原とその誘導体の大量産生系の構築である。今後、抗体の改善を効率的に進めていくために必須となる技術であるため、継続して系の改善を行う必要がある。

ほ乳類細胞の形質膜にヒトモノクローナル抗体の scFv-GPI 型を発現させたのは世界で初めてと思われる。体を利用して治療分子を特定の細胞に送達する技術は各種開発されている。抗体は操作性を考え、多くの場合が scFv に改変されたもので、アデノウイルスベクターの spike に結合させたり、エンベロープタンパク質の機能を阻害しな場所に融合させる等の工夫がなされてきた。本研究では、融合タンパク質ではなく、scFv を単独でエンベロープに取り込ませる方法を用いる点でユニークな試みである。この背景には pseudotyping 技術の進展から、細胞質ドメインを持たない分子がエンベロープウイルスを被覆できる知見が集積した事があげられる。これまで多くの scFv が試験されてきた中で、ヒトモノクローナル抗体に根ざした開発であること、GPI アンカー型改変によりベクター被覆をするアプローチは我々の独自のものである

エピトープの解析も十分な成果をあげた。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 の C 末端側にエピトープが存在する事が示唆された。この部分は、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も明らかとなり、D1 の C 末端側が scFv-213 の主

たる CD4 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 は scFv-213 と CD4 結合を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 HO538-213 が健常人に存在した原因であると考えられる。in vivo での使用を念頭においたときの安全性の面で、HO538-213 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。

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す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。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 複合体形成に寄与するかもしれない。scFv-213 は安全性の観点から in vivo で何ら生理活性を示さない事が望まれるが、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可能かもしれない。

CD4 陽性 T 細胞に対する特異的治療分子送達には、本研究で開発する抗体を基盤とした標的認識分子と細胞の膜融合を惹起する分子が必要である。後者に関しては MLV の Ecotropic Envelop または Influenza virus HA 分子の応用を念頭において開発を進めている。後者にお

いては 1992 年に Vey et al が報告した avian pathogenic influenza A/H7 subtype/fowl plague virus/Rostock/34(FPV) に由来する HA(Vey M et al. Virology 1992)を P. Cannon らの研究グループが改変して得たクローン HA_{tmt}(Y106F, E199Q, G237K)である (Lin AH and PM Cannon. Virus Res 2002)。両者共にヒト細胞が発現する表面抗原に対する認識に極めて乏しいが、低い PH 環境において膜融合を誘導するという優れた活性を持っているうえ、レトロウイルスベクター被覆が可能である事が示されている (Lin AM et al. Hum Gene Ther 2001)。これらの発現システムを導入して本抗体と共被覆した際に得られる高い特異的治療分子送達について今後検討を進めたい。ベクター被覆分子としてはこの他に HTLV-1 のエンベロープを用いる方法や HIV のエンベロープを用いた方法も考えられる。しかし、送達の制御をより確実にするためには抗体の使用がより優れていると思われる。既感染者における抗体の存在を考えると HTLV-1 のエンベロープを用いる方法は季節感染者に対する治療的使用には不利かもしれない。しかし、ベクターの全身投与を反復する治療を念頭に置くと、免疫学的に交差反応が少ない HIV のエンベロープを用いた方法は有利かもしれない。以上の点において、過去の influenza virus 感染既往と FPV の HA に対する抗体の獲得に関する関連性を含めた抗原性についての解析を行い、必要に応じて FPV HA の改良を行うべきかもしれない。

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健常人由来 CD4 反応性抗体 HO538-213 の改変を行い、scFv 化、物理

的安定性と反応性の向上、ほ乳類細胞の形質膜に発現する誘導体の作成にそれぞれ成功した。エピトープを明らかにし、抗体の安全性に関する基盤を固めることが出来た。当初の計画とおり抗体機能の改善を細胞レベルで検証するための基盤技術の構築を達成できた。

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
2. 学会発表
(国際学会)
(国内学会)

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

分担研究課題：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)

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。本研究では HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素 ZFN を開発し、標的 DNA 削除活性と HTLV-1 感染細胞の増殖阻止能力について性能評価を行う。標的 DNA 削除活性を実験的に証明するために効率評価系を 2 種類構築した。評価に供された 2 組の ZFN を試験すると、共にほ乳類細胞において標的 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。さらに詳細な作用機序の解明とより効果的な使用を検討するためにペアとなる ZFN の同調的発現系の構築を試みた。

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。本研究で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、治療分子を持つ標的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。さらに活性の機序を解明し効率を上昇させるための解析系の構築を試みたので併せて報告する。

B. 研究方法

1. レポーターアッセイ用ベクターの構築

レポーター系A：レポータープラスミドpGFPR L ZF1/2pA または pGFPR L ZF3/4pA は二つの最小標的配列によってGFP遺伝子+poly A signalを挟む構造を有する構造を持つプラスミドであり、そのままではほ乳類細胞において緑色蛍光陽性/レニラルシフェラーゼ活性陰性となる。一方、治療分子がGFP遺伝子+poly A signalを除去すると緑色蛍光陰性/レニラルシフェラーゼ活性陽性となる。レポータープラスミドの構築はpEGFP-hRluc (Hamatake et al, Cancer Sci 2009)のCMVプロモーターとGFPの間に位置するAgeIサイトとGFPとhRluc遺伝子の間に位置するBglIIサイトにそれぞれ標的配列をオリゴクロニング法にて導入する。最期にpBK-CMVからTK poly A配列にBsrGIサイトを付加した断片をPCRで増幅してpEGFP-hRluc ZFN1/2または3/4にクロニングする。ベクター名は簡略化してdeletion reporter Aとする。

レポーター系B：レポータープラスミドpcDNA3mt2LacZaは二つの最小標的配列によ

って大腸菌におけるLacZa発現ユニットを挟む構造を有する構造を持つプラスミドであり、そのままでは大腸菌においてX-Gal存在下の寒天プレートでコロニー形成させると青色コロニーとなる。一方、治療分子がLacZaを除去すると白色コロニーとなる。pcDNA3mt2LacZaは以下のように構築する。pcDNA3のXmaIサイトに標的配列をオリゴクロニング法にて導入する。これをpcDNA3mt1とする。大腸菌でLacZaを発現するユニットを挟むNdeIとMfeIサイトでえられるpBK-CMVに由来するDNA断片をpcDNA3mt1のNdeI-EcoRIサイトに導入する。これをpcDNA3mt1LacZaとする。このプラスミドのBglIIサイトとに標的配列をオリゴクロニング法にて導入することにより作出する。完成したベクター名はdeletion reporter Bとする。

2. 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：293T細胞に対し、レポータープラスミドdeletion reporter A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：293T細胞にレポータープラスミドdeletion reporter B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DH5alpha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。

3. 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、ATL由来細胞株S1T、ED-、TL-OmI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で薬剤セレクションを行い、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。

4. 同調的ZFN発現系の構築および発現確認

本実験では厳密な発現制御が可能なTetOnシステム(Clontech社)を採用した。pRetroX-Tight-Purベクターを購入した。IRES配列、ZFN1およびZFN2をそれぞれ制限酵素配列を付加したprimerでPCRを行い、ベクターのNotI/EcoRIサイトにIRES配列をクローニングし、さらにNotIサイトにZFN1、EcoRIサイトにZFN2をクローニングした(pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2)。作製したベクターをpRetroX-Tet-On-Advancedベクターと共に293T細胞にDoxycycline存在下でtransfectionした。ZFN1およびZFN2にはFLAG配列が付加されているため、抗FLAG抗体により検出が可能である。Transfectionの翌日に細胞からタンパク質を回収し抗FLAG抗体を用いてWestern BlotでZFN1およびZFN2の

発現確認を行った。

5. ZFN発現細胞の樹立および発現確認

pRetroX-Tet-On-Advancedベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionし、自立増殖能欠損MLVを回収した。平行してpRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2とVSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionし、自立増殖能欠損MLVを回収した。これら2種類のMLVを、順次HTLV-1プロウイルスをコピーのみ持つATL由来細胞株であるED-およびTL-OmI細胞に感染させた。PuromycinおよびG418にてそれぞれ選択培養を行い、増殖してきた細胞を回収する。細胞を2つに分け、Doxycyclineの有無で培養し、翌日細胞からタンパク質を回収し、Western blotによりZFN1およびZFN2の発現確認を行った。

6. 同調的ZFN発現系の生物活性試験

ZFN1およびZFN2を同調させた発現調節系を導入したED-およびTL-OmI細胞を2つに分け、Doxycycline有無で培養した。培養中、顕微鏡下で観察して細胞の状態を観察した。1週間後、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega社)により生細胞数を定量した。さらにDoxycyclineと同時にDNA repair inhibitorを加えて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

1. レポーターアッセイ用ベクターの構築：クローニングの各ステップで制限酵素による切断パターンまたはsequencingにてベクター構築の正確性を確認し、レポータープラスミド

の構築を完了した。これを用いて以下の実験を実施した。

2. 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 ZFN 2 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。

3. 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）。

4. 同調的 ZFN 発現系の構築および発現確認：IRES 配列、ZFN1、ZFN2 をクローニングした pRetroX-Tight-Pur ベクターについて、挿入したそれぞれの配列はシーケンスを行い、配列に問題ないことを確認した。pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2 ベクターと pRetroX-Tet-On-Advanced ベクターを 293T 細胞に co-transfection し、Doxycycline の有無で培養し、翌日回収したタンパク質を用い、

ZFN1およびZFN2の発現確認を行った(図4参照)。Doxycycline非存在下でも若干の発現が確認されたが、Doxycyclineによる発現増強は確認され、このベクター系の機能が確認された。ZFN1とZFN2の発現比率はZFN1のほうが有意に高かった。

5. ZFN発現細胞の樹立および発現確認：
pRetroX-Tet-On-Advancedベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionして得た自立増殖能欠損MLVをED-およびTL-OmI細胞株に感染させ、G418にて選択培養を行った。増殖してきた細胞株に、pRetroX-Tight-Pur-ZFN1-IRES-ZFN2ベクター、VSV-G発現ベクター、MLV gag/pol発現ベクターを293T細胞にco-transfectionして得た自立増殖能欠損MLVを感染させ、G418とpuromycinにて選択培養を行い、両抗生物質存在下でも増殖可能な細胞株を樹立した。この細胞株をDoxycycline有無で培養を行い、ZFNの発現検出を行ったところ、これらの細胞株ではDoxycycline非存在下では、ZFNの発現は確認されず、Doxycycline存在下でZFN1およびZFN2の発現が同調して誘導されていることが確認された(図5参照)。ZFN1とZFN2の発現比率はZFN1のほうが有意に高かった。

6. 同調的ZFN発現系の生物活性試験：
Doxycycline存在下で、ZFN1およびZFN2の同調した発現が確認できたED-およびTL-OmI細胞株を用い、ZFN発現誘導による生物活性の検出を試みた。細胞を2分し、Doxycycline有無で1週間培養したところ、樹立して比較的早い時期に実施した施行においては顕微鏡下でDoxycycline存在下にて細胞の増殖が一過性に低下することが観察された。Doxycycline添加

後一週間後に生細胞数の定量を行ったところ、Doxycyclineの有無で生細胞数に差は認められなかった。

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。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整合性がある。

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。ZFN1+2は長期効果の点においても優れている事が田中分担研究者によって明らかにされている。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。

Doxycycline により ZFN1 と ZFN2 を同時に発現調節できる細胞株の樹立に成功した。しかし、今回行った増殖抑制試験では、生物活性が検出限界以下となった。今回、ベクター構築時、および細胞樹立時に Doxycycline による ZFN1 および ZFN2 の発現を Western blot にて確認したが、発現量は単独で発現させるベクターよりも少ないことが確認された。さらに、IRES 配列の下流にクローニングした ZFN2 の発現量が IRES 配列の上流にクローニングした ZFN1 の発現量に比べ少ないことも確認された。ペアの ZFN は 1:1 で活性を示す。従って、ZFN ペアの発現量と比率が生物活性の示現に重要な要素であることが示唆された。TetOn 系を利用する際には、IRES を使用せずに ZFN2 の恒常的発現細胞に対し、ZFN1 の発現誘導系を導入するなどの工夫が必要と思われる。また、TetOff 系の適応、他の発現誘導系の検討をあわせ、系統的な実験系の試験が重要と思われた。ZFN が低レベルで発現することにより治療標的が変異を受けている可能性、ZFN の活性が低化した変異体が選択された可能性も否定できない。しかし、HTLV-1 LTR を検査したところ intact であったことから、前者の可能性は否定的である。今後、実験系を構築するために基盤情報を収集することが出来た。

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。生物活性から判断すると、ZFN1/2 がより優れた治療分子候補であると思われる。ペアで小分子によって同調的に発現を制御する実験系の樹立により、治療効果の増幅や作用機序の解明に大きな貢献が期待される。

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**. 2013, 27:1621-1627.
2. Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, Yoshiyama H, Komano J*. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by Epstein-Barr virus type III latency that upregulates CD150/Signaling lymphocytic activation molecule. **Cancer Science**. 2014, Epub ahead of print.
3. 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, USA

(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

7. 駒野 淳, 田中 淳, 武田 哲, 岡田誠治. HTLV-1 プロウイルスを標的とした Zinc Finger Nuclease による ATL 腫瘍原性の抑制. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3-5日. 横浜
8. 武田 哲, 上林大起, 倉田貴子, 吉山裕規, 駒野 淳. Epstein-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10-12日. 神戸

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)

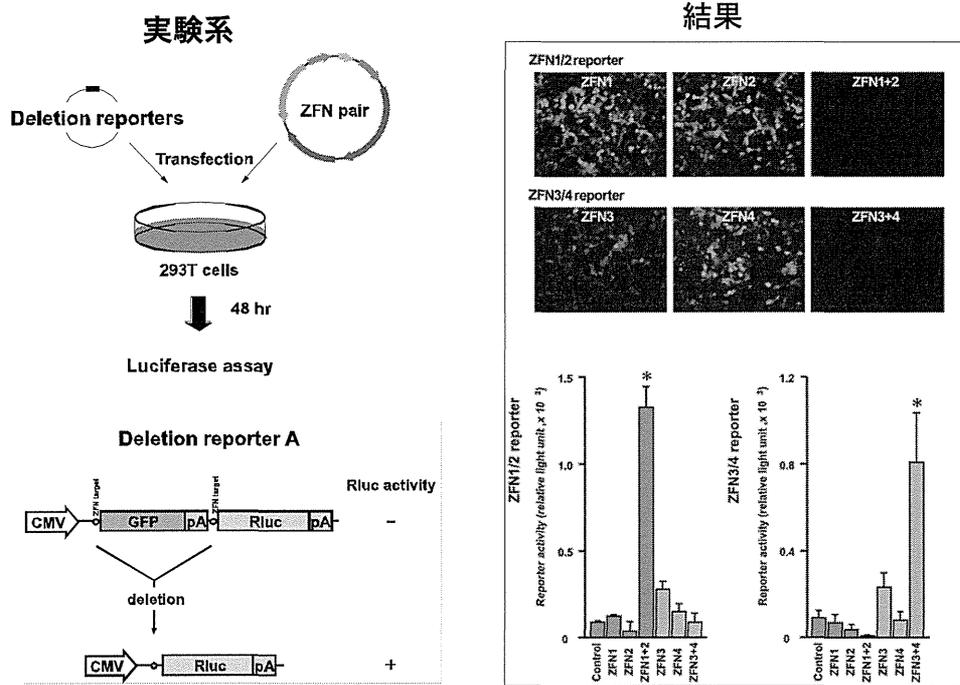


図 2. ZFNによるtargeted deletion活性 (2)

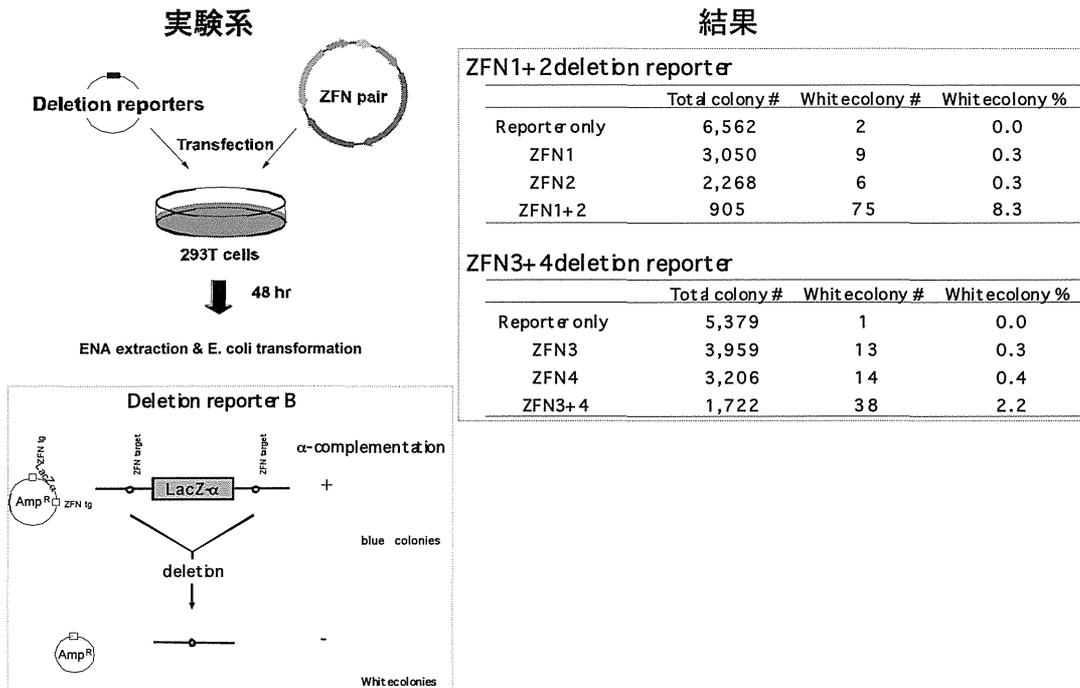


図3. ZFNによるHTLV-1感染細胞の増殖阻害

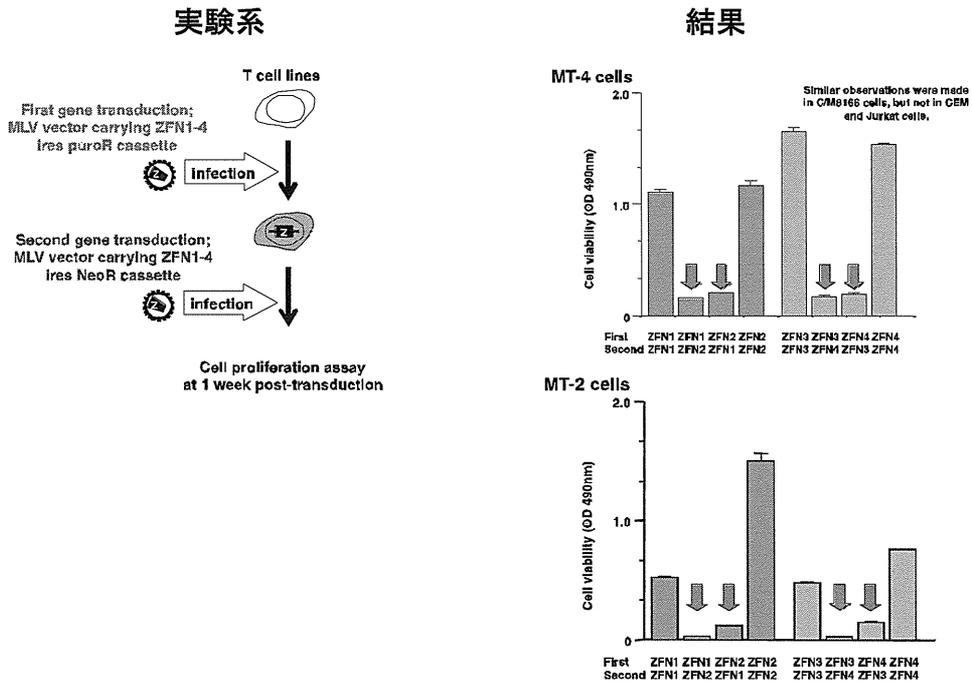


図4. 293T細胞への一過性発現によるpRetroX-Tet-On-Advancedベクター由来ZFN1/2発現確認

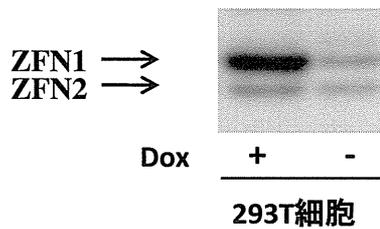
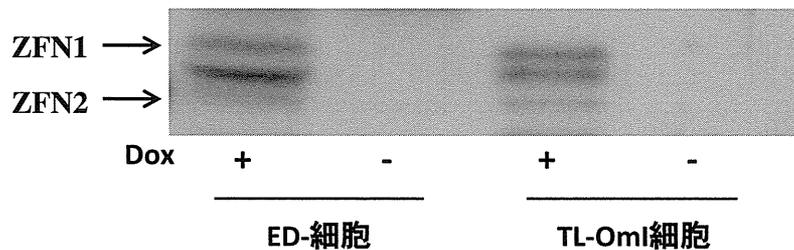


図5. ATL細胞株におけるDoxycycline誘導性ZFN1/2の同調的発現



分担研究課題：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）

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。本研究では 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 感染細胞の増殖を抑制する活性を有することが明らかとなった。また、治療抵抗細胞においても治療効果が維持されることも明らかとなった。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。2重の作用機序を持つ点からも有用性が高いと評価できる。

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。

本研究班では 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し、極めて良好な治療分子活性を認めた(Tanaka A et al, Leukemia 2013)。ZFNを導入したHTLV-1陽性細胞の80-95%は死滅したが、一部の細胞はZFNによる細胞死誘導を回避した。これらには治療分子に対する耐性を有獲得したプロウイルスの存在が示唆された。本年はZFN導入細胞から得られた治療体制細胞から回収された変異LTRについて機能解析を行い、治療分子の採用メカニズムを明らかにすると同時に耐性ウイルスの持つ性質の解明を目指した。

B. 研究方法

1. ZFNの持つ治療効果の評価

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2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2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

エルプレートに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。この核酸配列データの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。

2. 治療効果耐性細胞の解析

2種類のZFNを発現するS1T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を決定した中で、変異を有するLTRに関する機能評価を行った。増幅断片をレポータープラスミドにクローニングしてレポーターアッセイを実施した。使用したプラスミドは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NheI/XhoIサイトにクローニングしたものである。このベクターのNheI/SacIサイトに逆向きにウミシイタケrenillaルシフェラーゼ配列をクローニングした(pRluc-LTR-luc)。これにより、HTLV-1 LTR promoterのforward, reverseそれぞれの向きのpromoter活性を測定することが可能となった。Taxの発現にはpCG-Taxを利用した。レポータープラスミドを単独で、またはpCG-Taxと同時に293T細胞に導入して、48時間後にfireflyとrenillaルシフェラーゼ活性を測定した(Dual-GLO assay kit, Promega)。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

1. ZFNの持つ治療効果の評価

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)。

2. 治療効果耐性細胞の解析

転写の+鎖方向に関してはホタルルシフェラーゼ活性を、-鎖方向をウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定することにより、それぞれの向きの promoter 活性を測定することが可能な pRluc-LTR-luc を基に、樹立された ZFN 導入 S1T 細胞クローンから得られた変異型 HTLV-1 LTR と組み換えを行った。変異型 HTLV-1 LTR を NdeI/XhoI サイトを付加した primer で増幅し、pRluc-LTR-luc ベクターの同サイトと組み換えを行った。ZFN1/2 ペアについては 6 種類、ZFN3/4 ペアについては 6 種類、計 13 種類のベクターを構築した (pRluc-LTR-luc-ZFN(1+2)-f-1, a-1, b-3, pRluc-LTR-luc-ZFN(2+1)-b-1, b-2, b-4, pRluc-LTR-luc-ZFN(3+4)-a-1, c-1, pRluc-LTR-luc-ZFN(4+3)-a-1, a-2, b-1, b-2, c-1)。これらを HTLV-1 tax 発現プラスミドと同時にまたは単独で 293T 細胞に transfect し、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性を pRluc-LTR-luc のそれぞれの活性と比較することで、それぞれの

LTR 変異が promoter 活性にどのように影響を及ぼすか検討した。

HTLV-1 tax による各変異型 HTLV-1 LTR からのルシフェラーゼの活性は ZFN1/2 ペアで誘導された変異の 6 クローン中 5 クローンで +/— 両方向の転写減少が観察された (図 3 参照)。転写が増大するクローンはなかった。一方、ZFN3/4 ペアで誘導された変異では、7 クローン中 2 クローンで + 方向の、5 クローンで - 方向の転写減少が観察された。しかし、7 クローン中 4 クローンで + 方向の、1 クローンで - 方向の転写増加が観察された。中でも 1 つのクローンでは - 方向の転写が 4 倍に増大した。いずれのクローンも Tax による転写増大は野生型 LTR と同様に認められた。Tax 非依存的転写においては明確な活性変動を認めなかった。

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。

我々の用いた ZFN が認識し切断する箇所は HTLV-1 tax が作用するエンハンサー領域や、転写開始のためのプロモーター領域ではないため、ZFN による変異の導入が HTLV-1 LTR からの RNA の転写量に直接関与するとは考え

にくかった。しかしながら今回の我々の結果は転写される RNA の非コード領域に導入された変異が転写産物量の変化を誘導できることを示した。

ZFN1/2 ペアにより認識され切断される領域は HTLV-1 LTR の R 領域にある。HTLV-1 LTR から転写された RNA の R 領域から U5 領域前半にかけては internal ribosome entry site(IRES)を形成する配列を有することや、転写された RNA の安定化に寄与することがこれまで報告されている。ZFN1/2 ペアにより誘導されたこの領域での欠損により、転写された RNA の安定化に寄与する 2 次構造の破壊または IRES 構造の破壊が生じたものと考えられ、このことがルシフェラーゼ産生量の減少を誘導したものと考えられた。

ZFN3/4 ペアにより誘導された変異（欠損）を持つ LTR では+鎖方向からのルシフェラーゼの産生量増加が多く、多くのクローンで観察され、特に最も多い欠損(38bp)のあった LTR クローンからのルシフェラーゼの産生はもとの LTR と比べ 3~4 倍と高かった。ZFN3/4 ペアの認識する非コード領域の 2 次構造は続くコード領域の翻訳を負に制御していると考えられる。

これまでの ZFN 導入による細胞死の誘導において ZFN1/2 ペアの導入が ZFN3/4 ペアの導入よりも効果的であったことより、治療分子としては ZFN1/2 の方が優れていると思われる。また、HTLV-1 感染細胞の生存性において LTR からの転写産物の関与の可能性が考えられる。これらをさらに検証するため今後は転写される RNA 量の比較と、樹立できた各細胞クローンでの HTLV-1 関連蛋白質量の詳細な検討が必要である。

E. 結論

ZFN は HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制する活性を有し、細胞死を免れた細胞でも治療効果が維持されることが明らかとなった。ZFN1/2 がより優れた治療分子候補であること、ZFN による変異導入による HTLV-1 RNA の非コード領域での 2 次構造の変更が HTLV-1 感染細胞での効果的な細胞死を誘発する因子である可能性が示唆された。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。実用化に向けた今後の研究展開が期待される。

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*. 27(8) 1621-7.2013
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*. 2013 Mar;29(3):621-9.
3. Islam S, Shimizu N, Hoque SA, Jinno-Oue A, [Tanaka A](#), Hoshino H. CCR6 functions as a new coreceptor for limited primary human and simian immunodeficiency viruses. *PLoS One*. 2013 Aug 29;8(8):e73116.
4. [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.

5. 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

6. 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

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