

2015年度リレー・フォー・ライフ・ジャパン

「プロジェクト未来」研究助成金

2016年 報告書

課題名 成人T細胞白血病ウイルスを体内から除去する方法の開発

研究代表 名古屋医療センター 統括診療部 臨床検査科 駒野 淳 科長

研究の概要

原因が分かっているにも関わらず、発症を阻止する方法がない白血病がある。発症を食い止める方法が開発できないか — これが本研究のテーマである。

成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) はヒトに感染すると生涯潜伏感染を持続し白血病 (ATL) や神経疾患 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。ATL や HAM に対する特異的な治療法はなく、HTLV-1 に対するワクチンも実用化されていない。

我々は先行研究でこの課題に取組み、細胞からウイルスのプロウイルスゲノムを除去できる 治療分子の開発に世界で初めて成功した (Leukemia 2013)。この治療分子は既に他の疾患で臨床応用されている Zinc Finger Nuclease 技術を基盤とする。我々の開発した治療分子モデルは、HTLV-1 プロウイルスを特異的に認識し切断することで、ウイルス感染細胞に細胞死を誘導することが出来る。この科学的知見をもとにすれば、HTLV-1 キャリアからウイルスを段階的に除去し、ATL や HAM への病態進展を未然に防止する HTLV-1 感染症治療法が開発できるかもしれない。本研究は先行研究で明確化になった 実用化に向けた諸課題のうち、プロウイルスを除去した細胞の生理学的特徴を明らかにするというサブテーマに焦点をあてた。

方法

HTLV-1 陽性 ATL 由来培養細胞の TL-Om1 および ED 細胞に対しウイルスベクターにて ZFN1 と ZFN2 を導入し、ベクターの持つ薬剤耐性マーカーを用いて細胞を薬剤選択し、その中からウイルスゲノムが脱落した細胞クローンを同定する。これらの細胞株は HTLV-1 プロウイルスゲノムが細胞あたり1コピーしか存在しないため実験目的に適している。ZFN による HTLV-1 陽性細胞への特異的の細胞障害作用をみるために並行してウイルス陰性細胞の Jurkat を用いた。構築された発現ユニットの持つプロウイルス切除機能は一過性の細胞への遺伝子導入系でタンパク質発現とレポーターアッセイにて評価した。細胞クローンの同定は HTLV-1 ゲノムを特異的に増幅する PCR を利用し、ZFN の作用機序を鑑みて、*gag* 遺伝子の

増幅がみられず変異が導入された LTR 遺伝子のみ増幅されることを指標とした。細胞の特性は低血清または軟寒天中での増殖効率、免疫不全マウスにおける造腫瘍能力にて評価する。

結果

先行研究の結果より、HTLV-1 ゲノム脱落クローンの作出には ZFN ペアを一度に細胞に送達しなければならない。そのため、レンチウイルスベクターにより ZFN ペアを同時に細胞へ導入する ZFN2-IRES-ZFN1 系と、2つのレトロウイルスベクターにより各 ZFN を別々に同時に導入する系をそれぞれ試験した。ZFN2-IRES-ZFN1 系では ZFN1 の発現効率が低い事が確認されたが、基本的な発現ユニットが期待するプロウイルス切除機能を有する事を一過性の細胞への遺伝子導入系でタンパク質発現とレポーターアッセイにて確認した。

レンチウイルスベクターにて HTLV-1 陽性 ATL 由来培養細胞の TL-0m1 および ED 細胞それぞれ約 10^7 個に対し ZFN1 と ZFN2 を導入し、ベクターの持つ薬剤耐性マーカを利用して puromycin $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いて 96 ウェルプレートで細胞を薬剤選択した。TL-0m1 細胞からはクローンが得られなかったが、ED 細胞からは 20 クローンが樹立された。PCR によるスクリーニングをかけると全てのクローンで HTLV-1 ゲノムがインタクトで残存する事が判明した。ZFN1 と ZFN2 の発現比率が良好ではない影響が懸念されたため、レトロウイルスベクター系を試験した。

TL-0m1 および ED 細胞それぞれ約 10^7 個に対しレトロウイルスベクターにて ZFN1 と ZFN2 を個別に導入し、ベクターの持つ薬剤耐性マーカを利用して Blasticidin と puromycin をそれぞれ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ と $1\mu\text{g}/\text{ml}$ にて細胞を薬剤選択した。現在実験中であり、結果がまたれる。

考察

プロウイルスを除去した細胞の樹立に関しては未だ結果が出ていないが、実験系に関しては大きな進展があった。IRES を使ったレンチウイルスベクターの系では、非常に高い効率で2種類の ZFN を細胞に導入できることが分かった。これは HTLV-1 陽性細胞を効率よくかつ同調して殺傷させることができる。ゲノム編集によりプロウイルス除去細胞が得られなかったが、これを利用すればこれまで困難だった ZFN による HTLV-1 陽性細胞の特異的な細胞死誘導の分子メカニズムを解析できる。二本鎖 DNA が切断された場合 (double strand break, DSB) その修復が起こるが、これが十分に機能しない場合には DSB-induced apoptosis が惹起される。ZFN によって HTLV-1 陽性細胞がこのメカ

ニズムで殺傷されているのかは直接的な実証がない。本課題と並行して、新たな課題を並行して検証して行きたい。

体内から HTLV-1 を駆除するためには、2つの戦略が考えられる。一つはウイルスが感染した細胞を何らかの目印をつかって認識して、これを攻撃する方法。もう一つは全身の細胞に薬剤を送りこみ、ウイルスが感染した細胞でのみ攻撃能力を発揮させるようにする方法である。現在の科学技術では両方とも達成が困難である。しかし、我々が開発した ZFN をもとにした方法は、後者の方向性からウイルス駆除を可能にする方法を開発する礎になると考える。ただし、実用化への課題は山積しており、これらを解決する為には相当な努力と工夫を必要にする。我々が今回焦点を当てた課題も容易に答えが得られるものではない。しかし、この困難から新たなアイデアを得て、解決にむけて進んで行きたい。

再生医療分野では脱分化を制御するために、細胞に転写因子を導入する必要がある。近年、転写因子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。これを本研究に当てはめると、我々の開発した ZFN を小分子化合物へ「進化」させることが実用化への鍵となる課題であることが浮き彫りになる。そうすれば複雑な治療介入を必要とせず、「飲む HTLV-1 駆除薬」が作出できるかもしれない。

本研究の治療法はウイルスに起因する悪性腫瘍である B 細胞リンパ腫、肝細胞がん、子宮頸癌の治療・予防法の開発にも適応できる。治療分子送達技術や抗体工学は遺伝子治療や抗体医薬の領域にも技術応用可能である。総じて、HTLV-1 の領域を超えて、多大な波及効果が期待できる。根治を求める患者を救済したいという思いを強くもって、引き続き関連する諸課題に向き合って行きたい。