

光制御性ウイルスベクター ウイルスベクターの遺伝子発現や増殖を自由自在に操れる世界初の技術

1. 発表者：

竹田 誠（国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長）
田原 舞乃（国立感染症研究所 ウイルス第三部 主任研究官）
佐藤 守俊（東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻広域システム科学系 教授）
谷 憲三朗（東京大学医科学研究所 ALA 先端医療学社会連携研究部門 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆青色光を使って、意のままにコントロールできるウイルスベクターを開発した。
- ◆ウイルスベクターの遺伝子発現と増殖を思いのままにスイッチオン・スイッチオフできる世界初の技術である。
- ◆ウイルスベクターは、再生医療分野、遺伝子治療分野、癌治療分野において不可欠なツールであり、それらの分野における革新的ツールとなることが期待できる。

3. 発表概要：

再生医療、癌治療、そして遺伝子治療などの分野において近年医療は目覚ましい進歩を遂げています。これら全ての分野においてウイルスベクターは、不可欠な役割を果たしています。ウイルスベクターの性能の一つとして期待されつつも困難とされてきた技術の一つが、ウイルスベクターの遺伝子発現や増殖を意のままに操ることでした。この技術があれば、不要になったウイルスベクターは簡単に取り除くことができますし、また必要な場所、必要な時にだけ増殖させることができ、利便性や安全性が飛躍的に向上します。

今回、田原舞乃主任研究官、竹田誠部長（国立感染症研究所）、佐藤守俊教授（東京大学大学院総合文化研究科）、谷憲三朗教授（東京大学医科学研究所）らの共同研究グループは、マグネット（注1）という光スイッチタンパク質を使って、遺伝子発現や増殖を思いのままにスイッチオン・スイッチオフできる世界初のウイルスベクター（注2）の開発に成功しました。

同グループは、モノネガウイルス（注3）の仲間、麻疹ウイルスと狂犬病ウイルスをモデルに用いて実験を行いました。マグネットをウイルスのポリメラーゼ（注4）に組み込んで、青色光で照射された時にだけポリメラーゼが働いて、ウイルスが遺伝子を発現し、増殖することを確認しました。また動物を用いた実験で、本ベクターを接種して青色光の照射を受けた癌が、著しく縮小することを確認しました。今後、再生医療、遺伝子治療、癌治療などの分野を一層発展されることが期待できます。

4. 発表内容：

研究の背景

人工多能性幹（iPS）細胞（注5）に代表される再生医療分野、CAR-T細胞療法（注6）に代表される癌治療分野、そして難病に対する遺伝子治療（注7）など近年医療は目覚ましい進歩を遂げています。ウイルスは、特定の細胞に感染し、効率良く遺伝子を発現することができ、また、人工的な遺伝子操作が比較的容易であることから、目的の遺伝子を特定の細胞へ送り込

むための遺伝子導入ツールとして使われてきました。また、ある種の癌細胞に対して強い腫瘍溶解性（注8）を示すことが分かっており、その効果と安全性を高めたウイルスベクターを用いた新しい癌治療法の開発が進められています。一般的に、増殖性の強いウイルスベクターほど、癌治療に対する効果は期待できますが、同時に副作用の危険性が高まります。また、再生医療や遺伝子治療においては、ウイルスベクターによる遺伝子発現の当初の目的が達成された段階で、不要になったウイルスベクターを取り除くことが必要です。しかしながら、ウイルスベクターの意図的な取り除き法については、さまざまな努力がなされてきましたが、確実かつ安全で、効果的な方法は開発されていませんでした。

研究内容

今回、田原舞乃主任研究官、竹田誠部長（国立感染症研究所）、佐藤守俊教授（東京大学大学院総合文化研究科）、谷憲三朗教授（東京大学医科学研究所）らの共同研究グループは、ウイルスベクターの遺伝子発現や増殖を、まるで電気をスイッチオン・スイッチオフするように操る世界初の画期的な技術の開発に成功しました。

同グループは、再生医療、腫瘍溶解性治療でよく利用されているモノネガウイルスに着目して研究を行いました。モノネガウイルスの代表として麻疹ウイルスと狂犬病ウイルスを用いました。モノネガウイルスは、Lタンパクという名前のウイルスポリメラーゼを持っています。Lタンパクは、大きく分けて5つの機能ドメイン（注9）を持っており、それらが適切な配置を取ることによってはじめて、ポリメラーゼの活性が発揮されて、ウイルスゲノムの転写や複製が起こると考えられています。彼ら研究チームは、それら機能ドメインを繋ぎ合わせるループ構造領域（注10）の一つに、マグネットという光スイッチタンパク質を導入しました。

本研究では、ウイルスの遺伝子発現を視覚的に観察するために、緑色蛍光タンパク質（Green fluorescent protein: GFP）を発現するウイルスベクターが使用されました。Lタンパク内部にマグネットを持ったウイルスは、青色光の照射を受けている時にだけ、遺伝子発現が起こり、増殖することができました。ウイルスの遺伝子発現と増殖は、GFPの蛍光で確認できます（図1）。本ウイルスベクターの光依存的な遺伝子発現と増殖をさらに実証するために同グループは、ウイルスベクターを感染させた細胞の培養皿の底をアルファベット型のスリットを入れた黒ビニールテープで覆い、下から青色光を照射してウイルスベクター感染細胞を培養しました。その結果、数日後には、青色光の照射を受けている部分でだけウイルスベクター遺伝子の発現が起こり、アルファベットがGFP蛍光の文字として浮かびあがりました（図2）。さらに同グループは、皮下にヒトの癌細胞を移植し、腫瘍を形成させた担癌マウス（注11）を用いて、本ウイルスベクターの腫瘍に対する効果を解析しました。その結果、本ウイルスベクターを接種して、青色光の照射を受けたマウスでのみ、急激な腫瘍の縮小が確認されました（図3）。

ウイルスベクターの遺伝子発現や増殖を意図的に操作できれば、その利便性や安全性は飛躍的に向上します。その用途は、少なくとも再生医療分野、癌治療分野、遺伝子治療分野など、さまざまな先端医療分野に広がることを期待できます。また、分子生物学、細胞生物学の研究用ツールとしての応用性は、非常に大きいと考えられます。また、新たなワクチン開発の応用にも期待される場所です。モノネガウイルスの仲間には、ヒトで増殖する病原体も多く含まれていますが、全く病気を起こさないもの、動物で増殖するもの、植物で増殖するものも含まれ

ています。今後、畜産や農業分野においても、光制御性ウイルスベクター技術が活用されることも期待されると思います。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*」

論文タイトル：Photocontrollable mononegaviruses

著者：Maino Tahara, Yuto Takishima, Shohei Miyamoto, Yuichiro Nakatsu,
Kenji Someya, Moritoshi Sato, Kenzaburo Tani, Makoto Takeda*

DOI 番号：10.1073/pnas.1906531116

アブストラクト URL：<https://www.pnas.org/content/early/2019/05/21/1906531116>

6. 問い合わせ先：

国立感染症研究所 ウイルス第三部

部長 竹田 誠（たけだ まこと）

東京大学大学院総合文化研究科

教授 佐藤 守俊（さとう もりとし）

東京大学医科学研究所 ALA 先端医療学社会連携研究部門

教授 谷 憲三朗（たに けんざぶろう）

7. 用語解説：

（注1）マグネット（Magnet）

アカパンカビ（*Neurospora crassa*）の青色光受容体ヴィヴィッド（Vivid）の人工的変異体。正電荷を持つポジティブマグネットと負電荷を持つネガティブマグネットからなる。青色光照射に反応して、ポジティブマグネットとネガティブマグネットが結合する（スイッチオン状態）。光を遮断するとお互いに離れて元に戻る（スイッチオフ状態）。

（注2）ウイルスベクター

外来の目的遺伝子を目的の細胞へ運ぶために改変されたウイルス。

（注3）モノネガウイルス

分節化されていない一本鎖のマイナス鎖 RNA をゲノムに持ったウイルスの総称。モノネガウイルス目のウイルスのことを指す。ヒトのみならず動植物のウイルスなど、さまざまなウイルスが含まれているが、遺伝子の構造や遺伝子の発現の仕組みは類似している。麻疹ウイルス、狂犬病ウイルス、センダイウイルス、水疱口内炎ウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどが含まれる。

(注 4) ポリメラーゼ

核酸を鋳型として、相補的な塩基配列の核酸を合成する酵素の総称。モノネガウイルスの場合、RNA を鋳型にして相補的な RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを持っている。

(注 5) 人工多能性幹 (iPS) 細胞

4 種類の特定の転写因子を導入することで体細胞を初期化して樹立されるさまざまな細胞への分化能をと自己複製能を持つ人工多能性幹細胞。4 種類の転写因子の体細胞への導入には、ウイルスベクターが利用されることが多い。

(注 6) CAR-T 細胞療法

難治性の癌に対する治療法として開発された。患者の免疫細胞 (T 細胞) を取り出して、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように改変して増やした後に患者に投与する。CAR を介して T 細胞が癌細胞を狙い撃ちする効果が期待できる。T 細胞の改変にはウイルスベクターが利用されることが多い。

(注 7) 遺伝子治療

欠陥のある遺伝子を修復または補完することによって遺伝子の異常による病気を治療する方法。遺伝子の修復や補完には、ウイルスベクターが利用されることが多い。

(注 8) 腫瘍溶解性

ウイルスが癌細胞に感染して死滅させる効果の一つ。癌細胞を感染によって直接死滅される効果もあるが、癌細胞に対する免疫を賦活化させることで腫瘍を縮小または消滅される効果が期待できる。

(注 9) 機能ドメイン

タンパク質の配列または構造の一部。タンパク質の他の部分とは立体構造上、独自に折りたたまれたコンパクトな構造となっていることが多い。単に構造的に独立しているだけでなく、その部分が特定の機能を持つ場合にいう。

(注 10) ループ構造

タンパク質の三次元構造のうち、折りたたまれた構造とらず、ゆったりとした折れ曲り構造をいう。

(注 11) 担癌マウス

ヒトの癌細胞を移植したマウス。薬など癌への治療効果を調べる抗腫瘍性試験などに用いる。

8. 添付資料 :

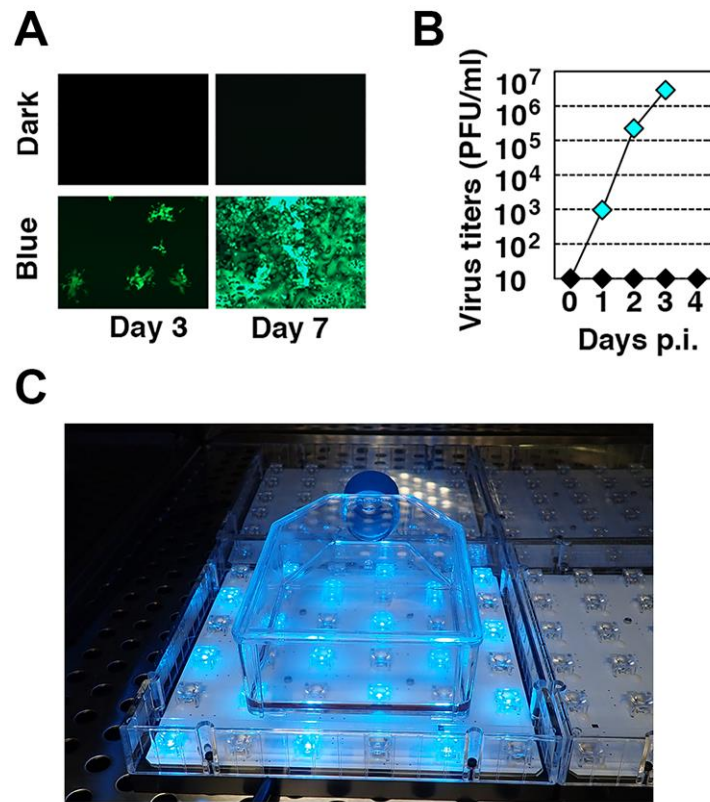


図1 光スイッチタンパク質マグネットを組み込んだ麻疹ウイルス (rMVEGFP-LDMH) の増殖像。

(A) rMVEGFP-LDMH を Vero/hSLAM 細胞へ MOI=0.01 で感染させて継時的に細胞を蛍光顕微鏡で観察した。Dark : 細胞を暗所で培養した。Blue : 細胞を青色光(470±20 nm)で照射しながら培養した。(B) rMVEGFP-LDMH を Vero/hSLAM 細胞へ MOI=0.01 で感染させて継時的に感染性ウイルス粒子数を測定した。Black : 細胞を暗所で培養した。Cyan : 細胞を青色光(470±20 nm)で照射しながら培養した。(C) 青色光を照射している状態の細胞。

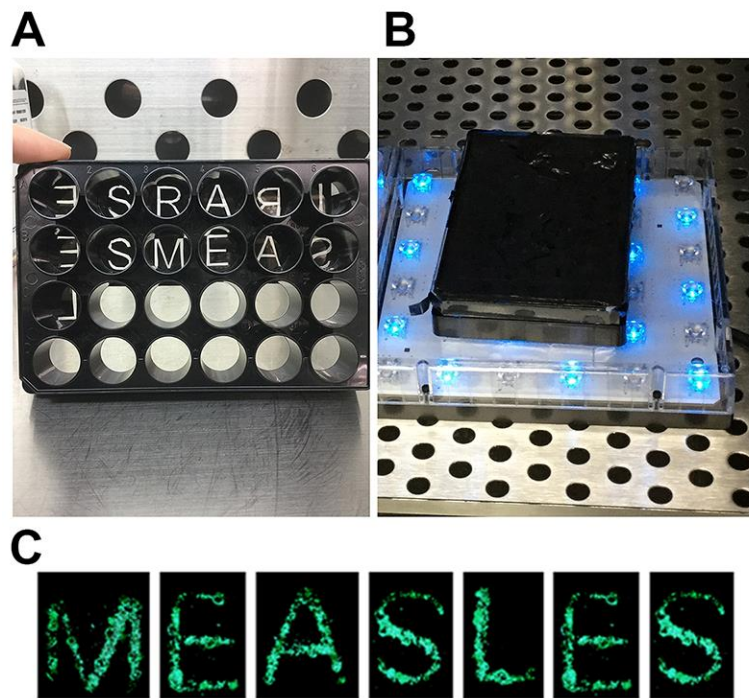


図 2 光制御性麻疹ウイルス (rMV^{EGFP}-LDMH) を用いた文字の描出。

(A, B) rMV^{EGFP}-LDMH を 24 穴プレート上に培養した Vero/hSLAM 細胞へ MOI=0.01 で感染させて 5 日間培養した。プレートは黒のビニールテープで遮光した。底面は、アルファベット文字のスリットを設けて、底面から青色光を照射して培養した。(C) 5 日後に黒のビニールテープを全て剥がして、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。MEASLES (麻疹)。

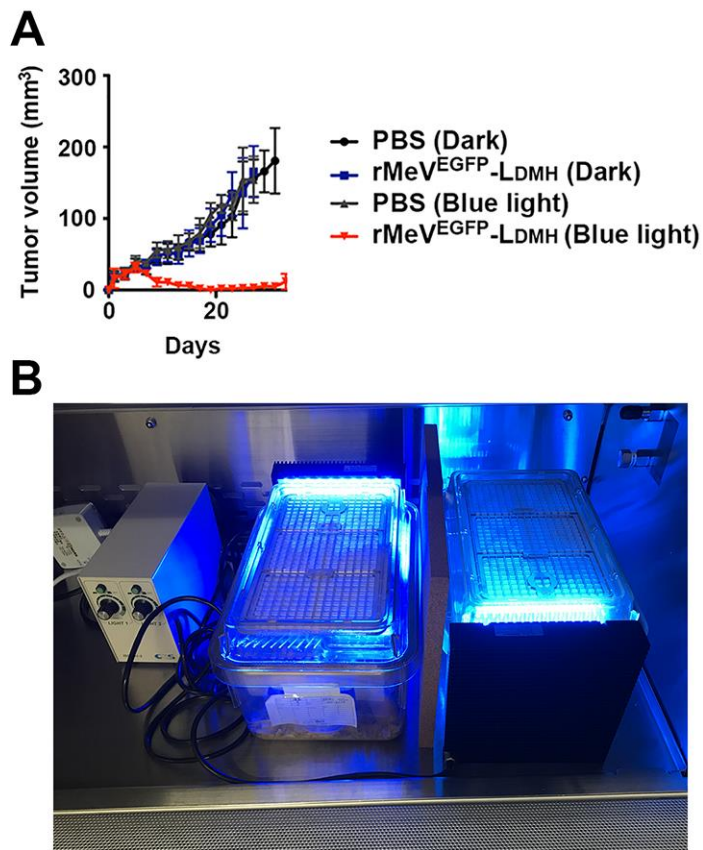


図 3 光制御性麻疹ウイルス (rMV^{EGFP}-LDMH) による腫瘍溶解効果。

(A) 5~6 週令の Balb-c nu/nu マウスの皮下にヒトの乳癌細胞 MDM-MB-468 細胞を接種して、担癌マウスを作成した。腫瘍が径 2mm になった時点で、rMV^{EGFP}-LDMH を腫瘍内に接種した。ウイルスベクター非接種群には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を接種した。光照射群のマウス (Blue light) では、一日 12 時間、青色光を照射した。非照射群 (Dark) は、1 日中暗所で飼育した。(B)青色光照射下でのマウスの飼育。