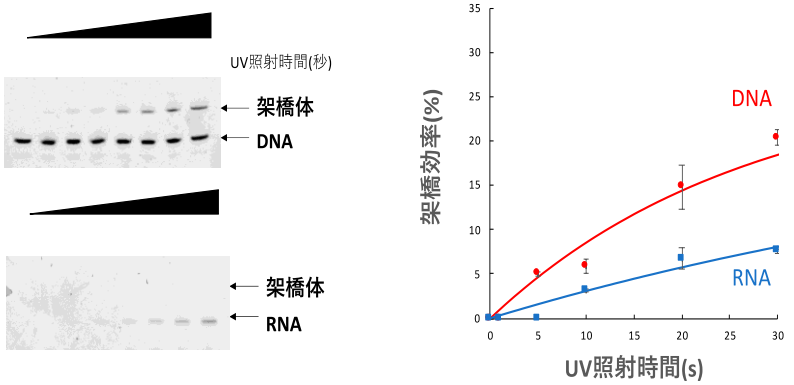
| 102　プロウイルスゲノムを標的とした光ゲノム編集技術開発 | 山吉　麻子 |
|---|---|

**【目的】**ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（HTLV-1）は、成人 T 細胞白血病や HTLV-1 関連脊髄症などの難病を引き起こすレトロウイルスである。HTLV-1 に感染すると、ウイルス由来の遺伝子（プロウイルスゲノム）が宿主 DNA に組み込まれるため、HTLV-1 が半永久的に産出される。現在、HTLV-1 感染性疾患に対する治療法として、複数種の抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が適用されているが、その効果は一過性であり、根治には至らない。そこで我々は、2 重鎖 DNA に対して配列特異的に結合する 3 重鎖形成核酸が、DNA の複製過程を阻害することで二重鎖切断（double-strand break：DSB）を誘導する現象に着目した。本研究では、この現象に着目し、光応答性分子であるソラレンを導入した 3 重鎖形成核酸（Light-Scissors）を設計・合成し、ゲノム DNA に対する光架橋効率ならびに DSB 誘導能を検証・最適化することで、光をトリガーとした新規ゲノム編集技術を開発し、プロウイルス遺伝子のノックアウト（無効化）と HTLV-1 感染性疾患の根治を目指す。具体的には、Light-Scissors を用いた『人為的ゲノム DNA 損傷』の作製、それに続く DSB の誘導、DSB 修復機構によるゲノム編集の誘導を目指す。本法より、外来タンパク質酵素を用いず、DNA 切断配列に制限の無いゲノム編集技術の実現が可能となる。さらには、その時空間的制御技術を *in vivo* で可能にする光照射技術を開発することに挑戦する。

**【方法】**ソラレンは DNA 中のピリミジン塩基と架橋する性質を持つ。このため、まず、DNA 中のチミン塩基に対する架橋選択性を向上させるため、ソラレンをアデノシン糖環 2'位に導入するリンカーの化学構造に着目し、従来型の柔軟なエトキシメチレンリンカーに代わり、比較的剛直なアミドメチレンリンカーを採用した新しいヌクレオシドの開発を行った。次に、HTLV-1 プロウイルス遺伝子の無効化効率の迅速アッセイ系の構築ならびに Light-Scissors の機能評価を行った。実験系として、HTLV-1 のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼならびにオワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを構築し、293FT（ヒト胎児腎臓細胞）にトランスフェクション後、トランスフォーマントを樹立した。

**【結果】**まず、合成した Light-Scissors と標的 DNA あるいは RNA とを混合し、それぞれの架橋効率を評価した。その結果、Light-Scissors は一塩基の違いをも認識して標的 DNA 特異的に架橋する性質を持つことが見出された。次に、上述の迅速アッセイ系で Light-Scissors のゲノム編集効率を評価した。我々が樹立した細胞系では、HTLV-1 プロモーター遺伝子に DSB が起こり、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 1 部が欠損して、ゲノム DNA 配列が組変わると、オワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子が発現するシステムとして機能する（細胞樹立後、CRISPR/Cas9 システムを用いてコントロール実験を行うことで想定した系が動くことを確認している）。この系を用いて合成した Light-Scissors のゲノム編集効率を評価したところ、光照射を行った系にのみ、ホタルルシフェラーゼ活性が減少し、オワンクラゲルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された。以上の結果より、Light-Scissors がゲノム DNA 中の HTLV-1 プロモーター遺伝子に結合した後、細胞内の遺伝子修復機構が働くことによって DSB が起こり、ゲノム編集が誘起されることが示された。

開発した Light-Scissors と標的 DNA／RNA の架橋効率の評価



# 102. プロウイルスゲノムを標的とした光ゲノム編集技術開発

山吉　麻子

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）

Key words：核酸医薬，ゲノム編集，光操作，光架橋性核酸，ソラレン

## 緒　言

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（HTLV-1）は、成人 T 細胞白血病や HTLV-1 関連脊髄症などの難病を引き起こすレトロウイルスである［1］。HTLV-1 に感染すると、ウイルス由来の遺伝子（プロウイルスゲノム）が宿主 DNA に組み込まれるため、HTLV-1 が半永久的に産出される。現在、HTLV-1 感染性疾患に対する治療法として、複数種の抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が適用されているが、その効果は一過性であり、根治には至らない［2］。

この状況に対し、近年、生命の設計図である遺伝子配列を人為的に操作できる「ゲノム編集技術」を用いたウイルス遺伝子の不活性化法が注目を集めている［3，4］。CRISPR/Cas9 システムや ZFN など、「外来の DNA 切断酵素」を用いた技術が主流であり、作用機序は以下の様になる：(A) DNA 切断酵素を用いてゲノム DNA に二重鎖切断（double-strand break；DSB）を誘導、（B）非相同末端結合によって修復される場合に遺伝子の一部欠損が誘起されウイルス遺伝子が不活性化される［4］。

しかしながら上述のいずれのゲノム編集技術においても、現状として下記の課題が存在する。

1. 真核生物の持たない DNA 切断酵素（Cas9、TALEN 等）を細胞内に導入する必要がある
2. 編集出来るゲノム配列に制限がある：CRISPR/Cas9 の場合、PAM 配列（NGG）から数塩基上流部位でのみ DSB が可能
3. 外部制御が困難
4. 特に CIRPSR/Cas9 の場合、米国特許に主要技術を押さえられており、実用化が困難

そこで我々は、2 重鎖 DNA に対して配列特異的に結合する 3 重鎖形成核酸が、DNA の複製過程を阻害することで DSB を誘導する現象に着目した［5］。本研究では、この現象に着目し、光応答性分子であるソラレンを導入した 3 重鎖形成核酸（Light-Scissors）（図 1）を設計・合成し、ゲノム DNA に対する光架橋効率ならびに DSB 誘導能を検証・最適化することで、光をトリガーとした新規ゲノム編集技術を開発し、プロウイルス遺伝子のノックアウト（無効化）と HTLV-1 感染性疾患の根治を目指す。

具体的には、Light-Scissor を用いた『人為的ゲノム DNA 損傷』の作製（図 1a①）、それに続く DSB の誘導（図 1a②）、DSB 修復機構によるゲノム編集の誘導（図 1a③）を目指す。本法より、外来タンパク質酵素を用いず、DNA 切断配列に制限の無いゲノム編集技術の実現が可能となる。さらには、その時空間的制御技術 *in vivo* で可能にする光照射技術を開発することに挑戦する。

## 方法および結果

### 1. Light-Scissors の分子構造の最適化

我々は既に様々な化学構造を持つ Light-Scissors の開発に成功しているが［6，7］、現行の Light-Scissor は核酸の 5'末端に比較的長いリンカーを介してソラレンを導入しているため、標的塩基の前後塩基と架橋する可能性を持つ。このため、ソラレンの導入位置の検討、リンカー長および化学構造の検討を行った。

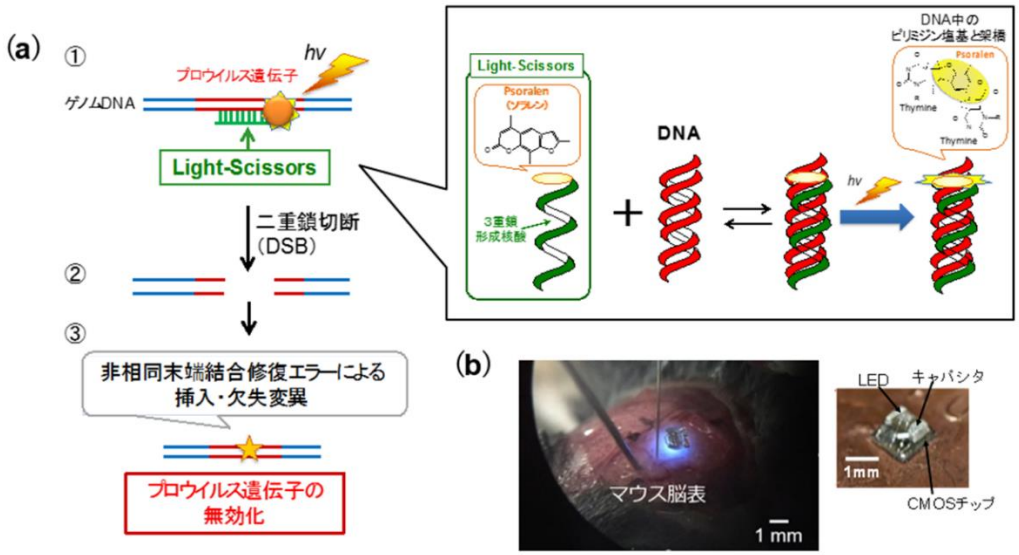



図 1. 光を用いた新しいゲノム編集技術と開発した光応答性核酸

a) 本法の研究概略図。① ゲノム DNA に Light-Scissor を結合させ光照射により架橋、②DSB の誘導、③非相同末端結合による修復エラーにより『標的遺伝子の一部欠損（あるいは点変異挿入）』を誘起し、光を用いたプロウイルス遺伝子の無効化を目指す。

b) *in vivo* 展開を可能とする光照射装置（マウス脳モデルを本法用に改変）。

ソラレンは DNA 中のピリミジン塩基（チミン、シトシン）と架橋する性質を持つ。このため、まず、DNA 中のチミン塩基に対する架橋選択性を向上させるため、ソラレンをアデノシン糖環 2'位に導入するリンカーの化学構造に着目し、従来型の柔軟なエトキシメチレンリンカーに代わり、比較的剛直なアミドメチレンリンカーを採用した。DNA／DNA 二重鎖と比較して RNA／DNA 二重鎖は核酸塩基間の間隔が狭いため、Ps-amd-Oligo が RNA に結合した際、ソラレンが塩基間にインターカレートしにくくなり、二重鎖の外にフリップアウトされると期待される。$N^6$-ベンゾイルアデノシンを出発原料として Aps のアミダイトユニットを計 5 ステップで合成し（総収率 13%）、得られた化合物を固相ホスホロアミダイト法によりオリゴ核酸に導入することで Ps-amd-Oligo を得た。Ps-amd-Oligo と標的 DNA あるいは RNA とを混合し（終濃度 2 μM in 0.01 M リン酸緩衝液（pH7.0）／0.1 M NaCl 水溶液）、アニーリング（95℃／3 min、−1℃／min）UV 照射（365 nm）を行った。サンプル溶液を熱変性後（95℃、1.5 min）、変性 PAGE により分析し（20% polyacrylamide／7 M urea／25% formamide／TBE、200 V、120 min）、それぞれの架橋効率を評価した。その結果、Ps-amd-Oligo は一塩基の違いをも認識して標的 DNA 特異的に架橋する性質を持つことが見出された（図 2）[8]。

次に、DNA 中のシトシン塩基に対する架橋選択性を向上させるため、グアノシン糖部 2'位にソラレンを導入したヌクレオシド（Gps）を含む新規光架橋性核酸（Gps-Oligo）の開発を行った。DNA に対する架橋選択性を付与するため、ソラレンをグアノシンに導入するリンカーとして、従来型の柔軟なエトキシメチレンリンカーに代わり、剛直なアミドメチレンリンカーを採用した。$N^2$-イソブチリルグアノシンを出発原料として GPs のアミダイトユニットを計 6 ステップ、総収率 8%で合成した。得られた化合物を固相ホスホロアミダイト法によりオリゴ核酸に導入し、GPs-Oligo を得た。シトシン（C）およびメチルシトシン（mC）を含む相補鎖 DNA ならびに RNA に対する GPs-Oligo の架橋効率を評価したところ、mC を含む DNA 選択的に架橋することが確認された。また、mC の脱メチル化過程で生じるヒドロキシメチルシトシン（hmC）、ホルミルシトシン（fC）、カルボキシシトシン（caC）を含む相補鎖 DNA との架橋効率を評価したところ、fC に対しても架橋することが見出された。fC に対して架橋能を示す光応答性分子に関する報告例は未だ無く、極めて興味深い結果といえる（速報作成中）。

**2. HTLV-1 プロウイルス遺伝子の無効化効率の迅速アッセイ系の構築ならびに Light-Scissors の機能評価**

実験系として、HTLV-1 のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼならびにオワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを構築し、293FT（ヒト胎児腎臓細胞）にトランスフェクション後、トランスフォーマントを樹立した。この細胞系では、HTLV-1 プロモーター遺伝子に DSB が起こり、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の一部が欠損して、ゲノム DNA 配列が組変わると、オワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子が発現するシステムとして機能する（細胞樹立後、CRISPR/Cas9 システムを用いてコントロール実験を行うことで想定した系が動くことを確認している）。この系を用いて前項目 1 で合成した Light-Scissors のゲノム編集効率を評価した。上記項目 1 で合成した Light-Scissors を細胞内に導入したところ、光照射を行った系にのみ、ホタルルシフェラーゼ活性が減少し、オワンクラゲルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された。以上の結果より、Light-Scissors がゲノム DNA 中の HTLV-1 プロモーター遺伝子に結合した後、細胞内の遺伝子修復機構が働くことによって DSB が起こり、ゲノム編集が誘起されたと考えられる。

**3. *in vivo* 展開を可能とする光照射デバイスの開発**

Light-Scissors 処理後、UV 光照射（320 nm～380 nm）が必要であるが、Light-Scissors と標的遺伝子との架橋反応は UV 光照射時にしか起こらないため、継続的に光照射を行う必要がある。HTLV-1 は T 細胞に感染するため、主要なリンパ系組織に設置可能な LED 形状の UV 光照射デバイスを開発し、体内に埋入して *in vivo* 展開について検証した。現在のところ、*in vivo* に埋入しても臓器癒着が起こらず、患部に紫外線照射することが可能な UV 光照射デバイスの開発に成功していることが確認されている。実験手技の問題で *in vivo* に埋入後に長い期間（数週間）、マウスを安定的に飼育できないという技術的課題が残されているが、今後の *in vivo* 展開が期待される。

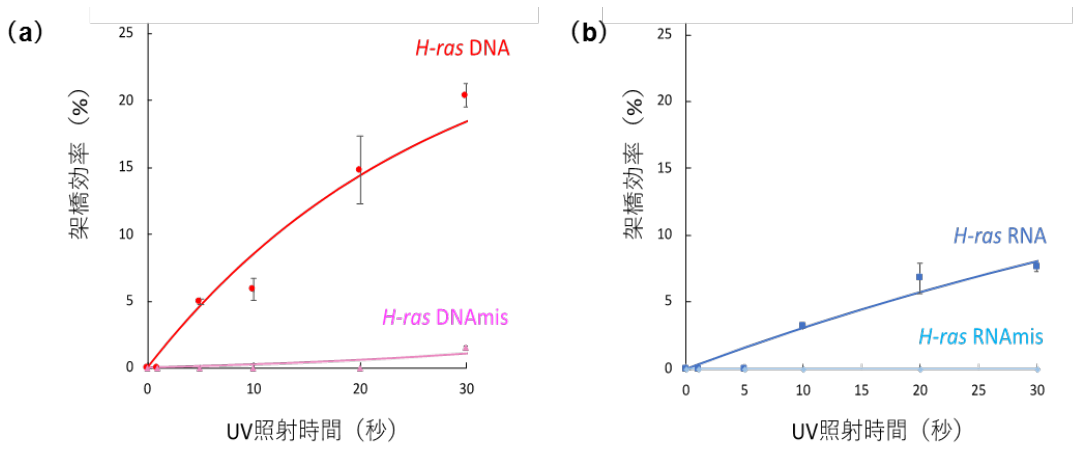



図 2. Ps-amd-Oligo と標的 DNA／RNA の架橋効率の評価

a）対象が DNA の場合（H-r*as* DNA：Ps-amd-Oligo と完全相補配列を持つ DNA、H-r*as* DNAmis：Ps-amd-Oligo と一塩基ミスマッチ配列を有する DNA）。

b）対象が RNA の場合（H-r*as* RNA：Ps-amd-Oligo と完全相補配列を持つ RNA、H-r*as* RNAmis：Ps-amd-Oligo と一塩基ミスマッチ配列を有する RNA）。

## 考　察

現在、*in vivo* において、Light-Scissors による HTLV-1 プロウイルス遺伝子の無効化効率の評価を行うための実験系構築にも着手しており、細胞レベルでの遺伝子解析が追跡出来る様に、「HTLV-1 プロウイルス遺伝子のプロモーター領域配列を両端に有するルシフェラーゼ遺伝子をコードする様に組換えたレトロウイルス」を作製し、これをプロウイルスとして組み込んだマウス T リンパ腫細胞株 EL-4 のマウス個体内での遺伝子発現解析を試みようとしているところである。

HTLV-1 感染症は日本の風土病とも言われている。感染者の増加を受け、未だ存在しない発症防止法の開発に対する社会的な要請は高い。本研究は HTLV-1 感染症の根治に繋がる技術の開発であり、無症候キャリアに希望を与え、社会的な要請に応えるものと位置づけられる。従来のゲノム編集技術では細胞に DNA 切断酵素を導入する必要があるが、これを代替する人工核酸（Light-Scissors）の開発および製剤化が進むことにより、ゲノム編集の作用メカニズムを模倣した「飲む HTLV-1 駆除薬」が作出できる可能性も秘めている。本研究の治療法はウイルスに起因する悪性腫瘍の治療にも応用可能である。さらに治療分子送達技術などと組み合わせることにより、HTLV-1 感染症領域を超えて様々な遺伝子治療領域に多大な波及効果が期待される。本研究課題は遺伝子を外から導入する手法とは一線を画すものであって、全く新たなゲノム編集原理を提案するものであるといえる。今後、光操作によって時空間的制御も可能とする本法の実用化研究に邁進していきたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪薬科大学生物予防薬学領域感染制御学研究室の駒野淳教授、ならびに、東京工業大学科学技術創成研究院・未来産業技術研究の徳田崇教授である。

## 文　献


1) Watanabe T. HTLV-1-associated diseases. Int J Hematol 1997 Oct;66(3):257-78. PMID: 9401272 DOI: 10.1016/s0925-5710(97)00077-7.
2) Faris M. Potential for molecular targeted therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. Int Rev Immunol. Jan-Apr 2008;27(1-2):71-8. PMID: 18300056 DOI: 10.1080/08830180701777475.
3) Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014 Nov 28;346(6213):1258096. PMID: 25430774 DOI: 10.1126/science.1258096.
4) 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 Aug;27(8):1621-7. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23411465 DOI: 10.1038/leu.2013.46
5) McNeer N.A,. Anandalingam K., Fields R.J., Caputo C., Kopic S., Gupta A., Quijano E., Polikoff L., Kong Y., Bahal R., Geibel J.P., Glazer P.M., Saltzman W.M., Egan M.E. Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del CFTR in airway epithelium. Nat Commun. 2015 Apr 27;6:6952. PMID: 25914116 DOI: 10.1038/ncomms7952.
6) Yamayoshi A., Kato K., Suga S., Ichinoe A., Arima T., Matsuda T., Kato H., Murakami A., Wake N. Specific apoptosis induction in human papillomavirus-positive cervical carcinoma cells by photodynamic antisense regulation. Oligonucleotides. Spring 2007;17(1):66-79. PMID: 17461764 DOI: 10.1089/oli.2006.0047.
7) Yamayoshi A., Matsuyama Y.., Kushida M, Kobori A., Murakami A. Novel photodynamic effect of a psoralen-conjugated oligonucleotide for the discrimination of the methylation of cytosine in DNA. Photochem Photobiol. May-Jun 2014;90(3):716-22. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24372306 DOI: 10.1111/php.12232.
8) Yamayoshi A., Higuchi M., Sakai Y., Kobori A., Yamamoto T., Shibata T., Murakami A. Selective cross-linking behavior of oligodeoxyribonucleotides containing 2'- O-[ N-(4,5',8-trimethylpsoralen-4'-ylmethylcarbamoyl)]adenosine to mutant H-ras DNA. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2020;39(1-3):119-130. 2019.1677912. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31645189 DOI: 10.1080/15257770.