

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	低分子 RNA 治療を実現するための新規 RNA ウイルスベクタープラットフォームの創製
研究機関・部局・職名	京都大学・ウイルス研究所・教授
氏名	朝長 啓造

【研究目的】

低分子 RNA は、mRNA の発現もしくは翻訳を特異的に抑制することができる 30 塩基以下の短い RNA 分子である。近年、ガンや神経疾患など様々な疾患の関連遺伝子の発現を制御する新しい治療法として、低分子 RNA を利用した創薬開発に期待が持たれている。しかしながら、非常に壊れやすい RNA 分子を体の中に安定に運び、疾患局所で持続的に作用させる方法が確立されておらず、低分子 RNA 治療は実現していない。これまでに、低分子 RNA を生体内で作用させる方法として、ウイルスベクターやナノ粒子が検討されてきた。なかでも、複製能力を持つウイルスベクターは、導入効率において極めて優れているが、免疫応答やガンの誘導などの副作用の面で問題が指摘されている。また、低分子 RNA を末梢より脳内に効率よく輸送できるウイルスベクターは開発されておらず、組織特異性の面でも課題は残されている。

ボルナウイルスは、神経細胞に親和性を示す RNA ウイルスである。数多く存在する RNA ウイルスの中で、細胞を破壊せずに核内で持続感染できるのはボルナウイルスのみである。この性状は、ボルナウイルスがこれまでにない長所を持つウイルスベクターとなることを示している。さらに、低分子 RNA の成熟には核内因子が必要であることから、核内で複製するボルナウイルスは低分子 RNA を発現できる世界で唯一の RNA ウイルスベクターになると考えられる。そこで本研究は、ボルナウイルスならびにボルナウイルスベクターに関する独自の成果をもとに、持続的かつ効率的に低分子 RNA の発現を可能にする新規 RNA ウイルスベクターの開発を行うことを目的とした。また、ボルナウイルスの複製と病原性の解明を通して、ボルナウイルスベクターの安全基盤を確立するのが本研究の目的である。

【具体的な達成目標】**1. 低分子 RNA 発現に適したボルナウイルスベクターと効率的なウイルス産生システムの開発**

低分子 RNA の発現に特化した効率の良いボルナウイルスベクターを開発する。また、ウイルスの複製能力を向上させる。具体的には、欠損型ウイルスベクターや転写酵素に変異を導入したウイルスベクターを作製する。また、細胞傷害性に関与すると思われるウイルス遺伝子への変異導入を行い、組換えウイルスの発現効率を上昇させる。さらに、組換えウイルスを効率よく産生する細胞を選択し、ウイルスベクターの

導入に適したクローン細胞株を樹立する。

2. シュードタイプボルナウイルスベクターの確立

ボルナウイルスは中枢神経系に強い感染性を示す一方で、他臓器への感染効率は低い。そこで、細胞特異性を決定しているエンベロープタンパク質を他のウイルスのそれと入れ換えることで、様々な細胞や臓器に適用が可能なボルナウイルスベクターを作製する。

3. ボルナウイルスの複製と病原性ならびに低分子 RNA の発現動態の解明

ボルナウイルスの複製と病原性について詳細な解明を行う。具体的には、宿主ゲノムに及ぼすボルナウイルスの変異原性の機序と病態への関与の解明である。ボルナウイルスと宿主染色体との相互作用の解明も病原性の把握ために必須である。実験動物を用いた病原性発現の分子機構も明らかにする。さらに、ウイルス感染による細胞由来低分子 RNA の発現を解析することで、ウイルスベクターの複製と低分子 RNA 発現への影響を明らかにすることができる。

4. 難治疾患に対する特異的低分子 RNA を発現するボルナウイルスベクターの創製

難治性の神経疾患に対して特異的に作用する低分子 RNA 配列を確立する。決定した低分子 RNA 配列を有するボルナウイルスベクターを作製して、ターゲット分子の制御に効果を示す組換えボルナウイルスを開発する。各種疾患モデル動物での有効性を検討する。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

低分子 RNA 発現に適したボルナウイルスベクター、様々な細胞や臓器に感染し得るシュードタイプボルナウイルスベクターおよびアミロイドシス前駆体タンパク質に対する shRNA を発現するボルナウイルスベクターの作製に成功している。加えて、ボルナウイルスの持続感染機構を明らかにし、その成果は国際的に高く評価されている学術誌に複数の論文として掲載されている。したがって、研究の進展、目的達成状況はおおむね順調と判断できる。

アルツハイマー病疾患モデル動物への当該疾患への特異的低分子 RNA を発現するボルナウイルスベクターの創製ならびに動物実験が残された研究課題となっている。今後、開発した新規のボルナウイルスベクターについての安全性の検討、特に実験動物を用いての効果の実証実験を推し進めることが重要である。また、開発したベクターを国内外の研究者との共同研究や供与を通して、新手法の普及とその有用性をより

幅広い分野で検証することが望まれる。成果の実用化という面では、開発したボルナウイルスベクターの企業等との積極的な共同研究の展開が望まれる。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

研究は予定どおり進捗しており、4つの具体的な目標について3つは順調に進捗していると判断される。しかし、難治病に対するモデル動物を用いた新規ベクターによる治療の有効性実証実験については目標に到達していない。全般的にみれば、順調に予定の研究が進行したといえる。具体的には、ボルナウイルスベクターのゲノム改変に成功しており、病原性を軽減させるための欠損ウイルスの樹立にも成功している。ウイルスを効率良く産生する細胞株の樹立が今後の課題として残された。種々の細胞や臓器に感染できるボルナウイルスベクターについては、VSVのエンベロープタンパク質を持つシュードタイプボルナウイルスが確立されており、所定の目的は達成されたと評価される。ボルナウイルスの病原性解明については、宿主因子であるHMGB1が本ウイルスの効率的な複製に重要であることが報告されており、優れた研究成果があげられている。加えて、宿主因子IFI16がボルナウイルスRNPと相互作用して本ウイルス複製を負に制御していることも明らかにされている。アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドベータ前駆体タンパク質に対するshRNAを組み込んだボルナウイルスベクターの作製には成功しているが、モデル動物を用いた感染実験には成功しなかった。

低分子RNAを発現する組み換えボルナウイルスベクターは樹立されているので、実験動物を用いた感染実験を行える段階に達している。しかし、その効果判定のため、基礎実験の実施とボルナウイルスベクターの改良が予定され、既に海外の研究者(ドイツ、アメリカ)との共同研究が開始されたことは評価できる。一つの計画は、脳で発現しているReelinに対するshRNAを共同開発であり、神経幹細胞への遺伝子導入計画は十分期待できるものとする。

③ 研究の成果

・ これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・ 当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

ボルナウイルスのPタンパク質とLタンパク質に点変異を導入させ、複製効率が高く低分子RNA発現に適したボルナウイルスベクターを作製したことは大きな成果といえる。加えてVSVのエンベロープタンパク質をもち、様々な細胞や臓器に適用でき

るシュードタイプボルナウイルスの作製に成功したことも、感染実験などに有効に利用でき、大きな成果といえる。

ボルナウイルスの複製複合体である RNP が宿主細胞のクロマチンに結合して安定的に核内に留まることを明らかにするとともに、宿主因子 HMGB1 が核内での効率的な複製に重要であることを世界で初めて明らかにしたことは、極めて大きな学術的成果であった。さらに、宿主因子 IFI16 が本ウイルス RNP を核内で感知して、抗ウイルス応答を誘導することを明らかにしたことも感染病態の解明に役立つ研究結果といえる。

ボルナウイルスベクターの生物学的・医学的安全性についてはさらに検証が必要ではあるが、導入細胞で長期に発現する RNA ウイルスベクターは理論的にも他の手法よりはるかに発がん性等において優位であると考えられる。したがって、先進性および有意性がある。ただし、動物による安全性試験による確認は今後の課題として残っている。本研究で作製されたボルナウイルスベクターは持続的な低分子 RNA の発現を可能とするものであり、本研究の対象となっているアルツハイマー病のみならず種々の神経系疾患の病態解明に活用されることが期待され、本研究に関連する領域のブレークスルーとなるであろう。

加えて、ボルナウイルスの複製複合体である RNP が宿主細胞のクロマチンに結合して安定に核内に留まること、宿主因子 HMGB1 が核内での効率的なウイルス複製に重要であることを明らかにし、ボルナウイルスのユニークな持続感染メカニズムを解明したことも、ウイルス学研究の大きなブレークスルーになるものとみなされる。

ヒトゲノム内在化ボルナウイルス (EBLN) が細胞内でミトコンドリアに局在することや宿主のアポトーシス制御因子 HAX-1 と相互作用をすることなどが本研究課題より明らかにされた。本研究成果は宿主細胞が感染ボルナウイルス遺伝子を自らのゲノムに取り込み、機能性遺伝子として利用している可能性を示すものであり、ウイルス学領域における新たな知見といえる。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

生体内で低分子 RNA を効率的にかつ持続的に発現する RNA ウイルスベクターが確立された。本手技はボルナウイルスのみならず他のウイルスにも適応可能であり、関連分野の研究の進展に寄与するものである。本研究結果は他の難治性神経疾患を対象とした研究にも利用可能である。ボルナウイルスの複製機構の解明は本ウイルスの病原性、感染性について未だ十分理解されていない諸問題の解決につながることを期待される。

低分子 RNA を発現するボルナウイルスベクターの確立により、難治疾患に対する低分子 RNA 治療への可能性が高まったものと期待される。本研究の結果は、これまでの原因不明の難治性疾患の治療に活用され、社会的および経済的課題の解決の一助とな

るものと考えられる。安定的な RNA ウイルスベクターの確立は、shRNA による治療を研究している多くの研究者が利用可能であり、関連する研究の進展に寄与すると思われる。

ボルナウイルスベクターが神経系細胞への持続感染が成立することを考えると、様々な中枢神経系の病態解析、治療法の解析に利用される可能性が高く、中枢神経疾患の研究分野に貢献することが期待される。

今回開発されたベクターの安全性が確認され、大量生産技術が確立した場合には多くの慢性疾患の治療への応用が考えられ貢献が期待される。しかしながら、真の実用化にはまだ越えなければならないハードルが多々存在するのも事実である。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究実施体制については研究代表者、特定研究員、博士研究員、研究支援員により的確な課題研究が分担され実施されており、研究遂行上のマネジメントは適切なものとみなされる。ただ実用化のための企業との共同研究がないのが残念である。各年度において多額の未執行額が発生していたが、購入機器の利用状況を含めて、助成金は概ね有効に利用されたと考えられる。ボルナウイルスの安全性、対象疾患の絞り込み、実用化のための産学連携などの指摘事項についても、適切な対応がなされている。

研究課題の成果は国際的に高い評価を受けているトップジャーナル (Cell Host Microbe, J Virol, PLoS One) に 4 編の学術論文として掲載されており、研究成果の発信は適切に行われている。加えて他の研究者との合同による学術論文 (全体で 11 編) も複数発表されている。国内会議のみならず国際会議にも積極的に参加し、18 件にわたり発表している (招待講演も含む)。これらの実績より、研究成果の発信は適切に行われていると判定される。

最先端・次世代研究の成果とその展望について複数の高校へ出張講義を実施した。この取り組みは評価できる。また、ボルナウイルス研究会を主宰し、本領域での研究を推進している。これらの実績により、研究代表者は、国民との科学・技術対話を効果的に実施していると言える。