

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological  
Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) RNAi型医薬品を標的組織ならびに多能性幹細胞で持続的に発現させる  
ウイルスベクター技術の開発  
(英語) Development of an RNA virus vector system that stably expresses RNAi drug in  
target tissues and pluripotent stem cells
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 教授 朝長啓造  
所属 役職 氏名： (英語) Keizo Tomonaga, Professor, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto  
University
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発担当者は、研究開発分担者である京都大学ウイルス・再生医科学研究所の本田知之ならびに牧野晶子とともに、H28年度は以下の成果を得た。

### ① ボルナウイルスベクターを用いた iPS 細胞の分化誘導

MyoD 発現ボルナウイルスベクターを iPS 細胞に導入することで、iPS 細胞の骨格筋細胞へ分化誘導を行った。その結果、導入 iPS 細胞では、GFP とともに MyoD の発現も認められ、1 週間後には骨格筋のマーカーである MHC (myosine heavy chain) の発現が見られ、細長い形態をとる筋細胞への分化誘導が確認された。

### ② ボルナウイルスベクターの排除法の確立

ボルナウイルスベクターの安全性の向上のため、ファビピラビルを用いてベクター排除法の開発を行った。その結果、200  $\mu$ M 以上のファビピラビルを作用させた培養細胞において作用後 28 日目までに、ボルナウイルスベクターのゲノム RNA が検出限界以下となり、導入細胞からの排除が確認された。

### ③ iPS 細胞におけるボルナウイルスベクターの導入効率比較

ボルナウイルスベクターの iPS 細胞への導入効率を他のウイルスベクターと比較検討を行った。比較に用いたベクターは、レンチウイルス、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス由来のものを用いた。その結果、ボルナウイルスベクターは、他のウイルスベクターと比較して iPS 細胞への長期的な外来遺伝子の導入に優位である可能性が示された。本研究は、アメリカ Mayo Clinic との共同研究で実施された。

In 2016 FY, the research leader, together with Tomoyuki Honda and Akiko Makino of Institute for Life and Frontier Sciences (inFront), Kyoto University, achieved the results below.

### ① Differentiation of iPS cells using bornavirus vector

Differentiation induction of iPS cells into skeletal muscle cells was carried out by introducing the MyoD (myogenic determination) expressing bornavirus vector into iPS cells. As a result, in the vector-introduced iPS cells, expressions of MyoD and MHC (myosin heavy chain), which is a marker of skeletal muscle, were observed after one week, and induction of differentiation into an elongated muscle cell was confirmed.

### ② Establishment of exclusion method of bornavirus vector

In order to improve the safety of bornavirus vector we developed, the method for excluding the vector from induced cells was developed using Favipiravir (T-705). As a result, the genomic RNA of bornavirus vector became undetectable level by 28 day post administration in the bornavirus vector-induced cultured cells with the 200  $\mu$ M or more of Favipiravir, and the exclusion of the bornavirus vector genome from the introduced cells was confirmed.

### ③ Comparison of introduction efficiency of Borna virus vector in iPS cell

The introduction efficiency of bornavirus vector into iPS cells was compared with other virus vectors. The vectors used for comparison were derived from lentivirus, retrovirus, Sendai virus, adenovirus, adeno-associated virus. As a result, bornavirus vector was showed to be more efficient in long-term foreign gene expression in iPS cells than other viral vectors. This study was conducted in collaboration with Mayo Clinic USA.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 8 件)

1. Parrish NF and Tomonaga K. Endogenized viral sequences in mammals. *Curr Opin Microbiol.* 31:176-183. (2016)
2. Komorizono R, Makino A, Horie M, Honda T and Tomonaga K. Sequence determination of a new parrot bornavirus-5 strain in Japan; implication of clade specific sequence diversity in the regions interacting with host factors. *Microbiol Immunol* 60:437-441 (2016)
3. Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Mühldorfer K, Kurth A, Müller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmler M and Tomonaga K. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient RNA virus. *Sci Rep* 6:25873 (2016)
4. Honda T, Yamamoto Y, Daito T, Matsumoto Y, Makino A and Tomonaga K. Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. *Sci Rep* 6:26154 (2016)
5. Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Tomonaga K, Kuhn JH et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol.* 161:2351-2360 (2016)
6. Honda T and Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mobile Genetic Elements* 6:e1165785 (2016)
7. Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T and Tomonaga K. Borna disease virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. *J Biol Chem* 291:25789-25798 (2016)
8. Honda T, Sofuku K, Matsunaga H, Tachibana M, Mohri I, Taniike M, and Tomonaga K. Detection of antibodies to Borna disease virus proteins in an autistic child and her mother. *Jpn J Infect Dis.* 70:225-227 (2017)
9. 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナウイルスとバイオセーフティ. 日本バイオセーフティ学会ニュースレター. 6(1) (2016)
10. 本田知之, 朝長啓造. 内在性 RNA ウイルスエレメントによる多彩な細胞内 RNA 制御. *ウイルス.* 66: 39-46 (2016)
11. 朝長啓造. ヒトゲノム内の RNA ウイルス由来配列の制御機構と機能. *医学のあゆみ* 259(2): 193-194 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(国内)

1. 朝長啓造. ゲノムが語るウイルス共進化. 山口大学最先端微生物研究セミナー. 山口, 2016 年 10 月 7 日 (口頭)
2. 朝長啓造. Bornavirus: a new direction of RNA virus research. 熊本大学医学・生命科学セミナー 熊本, 2016 年 11 月 9 日 (口頭)
3. 牧野晶子, 小森園 亮, Bea Clarise Garcia, 朝長啓造. カワリリスボルナウイルスの特性評価. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)
4. 小松弓子, 竹内 壇, 山本祐介, 桜井英俊, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナウイルスベクターを用いた iPS 細胞から骨格筋への分化誘導法の構築. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)
5. 山本祐介, 藤野 寛, 本田知之, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスマトリックスタンパク質の機能解析.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)

6. 小嶋将平, 本田知之, 朝長啓造. ウイルス感染を抑制する内在性ボルナウイルス由来 RNA エレメントの進化. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)
7. 柳井真瑚, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスの核外輸送シグナルはウイルスの転写活性に関与する. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (ポスター)
8. 小森園 亮, 牧野晶子, 佐々悠起子, 堀江真行, 朝長啓造. 細胞侵入段階は鳥ボルナウイルスにおける主な宿主域規定要因ではない. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)
9. 徳永智哉, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造. T-705 によるボルナ病ウイルスの複製阻害. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (ポスター)
10. Bea Garcia, 小森園 亮. 佐々悠起子, 牧野晶子, 朝長啓造. オウムボルナウイルス 4 の哺乳類細胞への適応. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (ポスター)
11. 平井悠哉, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスと核内アクチンの関連の解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日 (口頭)
12. 藤野 寛, 鈴木朋弥, 田原口智士, 朝長啓造. ジュウサンセンジリス由来内在性ボルナウイルスのボルナ病ウイルス感染阻害機構の解明. 第 39 回分子生物学会 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター)
13. 朝長啓造. 哺乳動物ゲノムに内在化しているボルナウイルス由来因子の機能解析. 第 39 回分子生物学会 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (口頭)
14. 本田知之, 朝長啓造. RNA ウイルス持続感染におけるウイルス特異的核内構造体の構造、形成、その生理意義. 第 39 回分子生物学会 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (口頭)

(国外)

15. Keizo Tomonaga. Transcription profile and prospective function of non-retroviral RNA virus-derived elements in mammalian genomes. International Conference of the Genetics Society of Korea 2016. Jeju Island, Korea 2016 年 11 月 10 日 (口頭)
16. Honda T and Tomonaga K. Analysis of possible crosstalk between Borna disease virus and LINE-1. The 1st Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements. Korea, Pusan, 2016 年 6 月 10 日 (口頭)
17. Kojima S, Honda T and Tomonaga K. A lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome functions as a potent inhibitor of exogenous virus infection. RNA2016. Kyoto 2016 年 6 月 28 日-7 月 2 日 (ポスター)
18. Tomonaga K. Host factors involved in Borna disease virus persistent infection in the nucleus. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. St. Andrews, Scotland, 2016 年 8 月 24-26 日 (口頭)
19. Makino A. Regulation of viral particle production in Borna disease virus-infected cells. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. St. Andrews, Scotland, 2016 年 8 月 24-26 日 (ポスター)
20. Kojima S. A novel lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome is inhibitor against exogenous virus infection. Regulatory & Non-Coding RNAs, CSHLM, Cold Spring Harbor, New York USA, 2016 年 8 月 23-27 日 (口頭)
21. Makino A, Komorizono R, Sakai M and Tomonaga K. Improvement of the production of Borna disease virus vector. ESGCT2016. Florence Italy, 2016 年 10 月 18-21 日 (ポスター)

22. Yanai M, Makino A, and Tomonaga K. ADAR2 is involved in the maintenance of the persistent infection of Borna disease virus. *Viral Immunity: Mechanisms and Consequences, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*. Santa Fe. USA. February 19-23 2017 (ポスター)
23. Komorizono R, Makino A, Sassa Y, Horie M and Tomonaga K. Host range of bornaviruses implies an evolutionary arm race between persistently infected RNA virus and host. *Viral Immunity: Mechanisms and Consequences, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*. Santa Fe. USA. February 19-23 2017 (ポスター)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 朝長啓造. ウイルス化石が語る生命の進化. 第12回 京都大学附置研究所・センター シンポジウム. 京都からの挑戦——地球社会の調和ある共存に向けて. 2017年3月11日. 金沢(国内)

(4) 特許出願

なし