

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07926

研究課題名(和文) 組織標的性を持つ遺伝子導入ベクターとしての次世代バキュロウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of next generation of baculovirus vectors with tissue specific gene transduction

研究代表者

田村 隆彦 (Tamura, Takahiko)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00434035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では出芽型組換えバキュロウイルスベクター(BV)に注目した。BVの大きなメリットとして、BV粒子のエンベロープに目的の膜タンパク質を発現させることが容易に可能であり、標的化遺伝子導入ベクターとしての応用が期待される。標的化分子の検索には、マラリア原虫には標的化に適した分子が多く存在することに着目した。肝細胞に高い親和性をもつCSPやTRAPを発現させたBVがヒト肝癌細胞(HepG2など)やヒト初代肝細胞PXB細胞において高い遺伝子導入効率を示すことを明らかにした。また補体制御因子の融合体を発現させることで、高い補体抵抗性をもつBVの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, budded recombinant baculovirus vectors (BVs) have been developed because BVs have many advantages for tissue targeting gene delivery vectors. It is easily possible to display exogenous proteins on the surface of BV virion. CSP and TRAP, malaria sporozoite surface proteins have highly selective affinity to hepatocytes. BVs expressing CSP or TRAP molecule on the virion surface have been constructed and they were shown to greatly increase transduction efficacy to human hepatoma cell line (HepG2 et al.) and human primary hepatocytes (PXB cells). Furthermore, to overcome the vulnerability to serum complement system, fusion molecules of complement regulatory proteins were displayed to BV virion surfaces. These BVs were shown to greatly increase resistance against complement attack.

研究分野：バキュロウイルス、免疫学、寄生虫学

キーワード：バキュロウイルス マラリア原虫

## 1. 研究開始当初の背景

がん、生活習慣病などにおける疾患関連遺伝子や、抗がん剤、高脂血症治療薬などの薬効やその個人差に影響する薬物動態関連遺伝子の同定が進んでいる。それらの遺伝子は肝臓、腎臓など様々な組織で特異的に発現して機能しており、遺伝子の *in vivo* 機能解析などの局面で、効率的で簡便な組織標的性のある遺伝子導入方法が可及的に求められている。*in vivo* での遺伝子導入方法としてはウイルスベクターが最もよく使用されているが、現状で汎用されているウイルスベクターには作製の困難さや導入効率、標的性の問題があり理想的なものが存在しない。

本研究計画では出芽型組換えバキュロウイルスベクター(BV)に注目した。BV は約130Kbの環状DNAをゲノムとしてもつ。昆虫細胞を用いたタンパク質発現系として広く普及しているが、近年BVは分裂、非分裂を問わず哺乳類細胞に transduction して効率的に外来遺伝子の発現が可能であることが明らかになり、新しい遺伝子導入ベクターとして大きく注目されつつある。BV は哺乳類細胞では増殖しないため人体に与える病原性はほとんどないと想定されている。BV のウイルス作製や増幅、精製は簡便であり他のウイルスベクターでみられる煩雑さはほとんどないため、プラスミドのような感覚で取り扱えるのが大きなメリットである。BV のもうひとつの大きなメリットとして、出芽ウイルス粒子のエンベロープに目的の膜タンパク質を発現させることが容易に可能である。ゲノムDNAを含むウイルスカプシドは昆虫細胞膜由来のエンベロープで覆われていてエンベロープには昆虫細胞への感染と哺乳類細胞への transduction に必要なBVのgp64タンパク質が存在する。大腸菌を用いた発現と異なりBVでの膜タンパク質発現は立体構造を正しく保っていることが知られており、GPCRなどの複雑な膜タンパク質

の機能解析にも用いられている。従ってエンベロープに標的化膜タンパク質を発現させることでBVの遺伝子導入に標的性を持たせることが可能と考えられる。また、BVは40nm×200nm程度の大きさで、ナノ粒子としての性質をもつ。

## 2. 研究の目的

多くの疾患関連遺伝子や薬効に影響を及ぼす遺伝子の同定が進み、それらの遺伝子機能解析を *in vivo* で行うための遺伝子導入法が求められている。本研究計画は補体抵抗性をもち、かつ、肝臓、胎盤、肺、脳、腎臓などの組織、あるいは腫瘍などの疾患部位への標的性をもった *in vivo* で遺伝子導入使用可能な次世代バキュロウイルスベクターの作製を目的とする。組織標的化バキュロウイルスベクターを用いた研究により、病態や薬物動態などに関わる遺伝子の標的組織における機能解析が促進され、より効果的な創薬研究の推進に大きく貢献できると考えられる。

## 3. 研究の方法

マラリア原虫遺伝子やランダムペプチドを標的化分子の材料にして肝臓、胎盤、肺、脳、腎臓、腫瘍組織などに標的性をもつバキュロウイルスベクターを作製する。肝臓についてはCSPやTRAP、胎盤についてはPfEMP1var2CSAをウイルス表面に発現させる。肺、脳などについてはマラリア原虫cDNAライブラリーから、腎臓、腫瘍部位などについてはランダムペプチドライブラリーから、組織標的性のあるバキュロウイルスベクターのスクリーニングを行い、レポーター遺伝子発現を指標に transduction 効率の上昇するウイルスクローンを選択する。肝臓標的性バキュロウイルスベクターを用いて肝臓におけるトランスポーターや代謝関連遺伝子の機能を解析する。

#### 4. 研究成果

肝臓標的性を持たせる分子としてマラリア原虫スポロゾイトの表面タンパク質であるCSPならびにTRAPに注目した。CSPやTRAPは肝細胞と結合する能力があり、マラリアスポロゾイトの肝臓への感染に大きく寄与する。CSPあるいはTRAPをBV表面に発現させたBVを作製し(CSP-BV, TRAP-BV)、精製したBVにおける発現をウエスタンブロットングや電子顕微鏡において確認した。HepG2細胞、Huh7細胞(ヒト肝癌細胞株)において遺伝子導入効率が数十倍上昇することを明らかにした。さらに、ヒト初代肝細胞であるPXB細胞においても顕著な遺伝子導入の上昇が確認できた。またマウスにCSP-BVを注入すると肝臓での遺伝子導入効率が飛躍的に上昇することを明らかにした。CSP-BVはコントロールBVと比べてHepG2細胞への結合はわずかに上昇したが、むしろ核内への取り込みが大きく上昇することが明らかになった(雑誌論文1、3)。

CSPやTRAPに見るようにマラリア原虫には標的に適した分子が多く存在することに着目した。例えば、マラリア原虫に感染した赤血球は脳や肺、胎盤、脂肪組織などの創薬研究に重要な組織に付着、集積することが知られている。胎盤ではマラリア感染赤血球がsyncytiotrophoblastに接着するが、マラリア原虫のPfEMP1var2CSA分子が重要であることが既に明らかになっており、BVのsyncytiotrophoblastへの標的に用いることで、胎盤でのトランスポーターの機能解析などへの応用が可能である。var2CSA遺伝子を発現するBV(var2CSA-BV)を作製し、精製したBVにおける発現をウエスタンブロットングで確認した。さらに、ヒト絨毛癌細胞Bello細胞でのtransduction試験を行い、コントロールBVと比較して、var2CSA-BVの遺伝子導入効率の有意な上昇を確認した。胎盤標的性を目指したvar2CSA-BVのさらなる評価を行った。胎盤特異性を確認するため、ヒト肝癌由来細

胞であるHepG2細胞においてvar2CSA-BVのtransduction試験を行ったところ、CSP-BVと同程度である10倍以上の大きな遺伝子導入効率の上昇が見られ、胎盤特異性は確認できなかった。BVによる哺乳類細胞へのtransductionにはBV表面タンパク質のgp64が重要であることがすでに明らかになっているが、anti-gp64抗体を添加し、BVのgp64の働きを阻害したところ、CSP-BVのHepG2細胞へのtransductionはほぼ抑制したが、var2CSA-BVではほとんど抑制されなかった。Var2CSA-BVの遺伝子導入メカニズムの解明にはさらなる検討が必要であることが明らかになった。

補体成分によるバキュロウイルスの不活性化について検討を行った。ヒト補体成分との反応時間を検討したところ、5分でも十分な失活が認められ、不活性化は非常に短時間の血清曝露でも起こることが明らかになった。また補体の古典経路と第二経路のどちらが重要か検討したところ、第二経路が主な不活性化経路であることが判明した。このことはほとんどのヒトの血清ではバキュロウイルスに対する抗体を保持していないにも関わらず補体反応によりウイルスが失活することとよく符合すると考えられる。ウイルス上に形成される膜侵襲複合体をELISAで検出し、補体反応後に有意に上昇することを確認した。BVを補体攻撃から保護する目的で、補体制御因子としてDAF分子を、ついでCD46-DAF-CD59 fusion分子を検討した。これらの因子は古典経路も第二経路にも有効と考えられるものである。補体制御因子を発現するプラスミドを作製し、Sf9細胞にtransfectionを行い、安定発現細胞を得た。細胞表面における目的タンパク質の発現をフローサイトメトリー解析で確認した。これら補体制御因子発現Sf9細胞にウイルスを感染させ、得られた精製ウイルスをさらなる実験に使用した。ウエスタンブロットングアッセイでウイルスにおける補体制御因子の発現を確認した。DAF、あるいはfusionを発

現するバキュロウイルスは発現していないコントロールウイルスと比較して膜侵襲複合体の形成が有意に抑制されていることを確認した。また、DAF型ウイルスをマラリアワクチンに応用した(雑誌論文2)。

さらに、肝臓標的性向上のために作製したマラリア原虫スポロゾイト表面タンパク質であるCSPあるいはTRAP発現バキュロウイルスの増幅の時に、補体制御因子を発現するSf9細胞を用いることで補体制御因子とCSP/TRAPの両方を発現するバキュロウイルスの作製し、精製ウイルスピリオンにおける補体制御因子とCSP/TRAPの両分子の発現を確認した。このウイルスを用いて、ヒト肝癌細胞株HepG2細胞におけるtransduction実験を行った。その結果、CD46-DAF-CD59融合分子を発現したCSP/TRAPバキュロウイルスはHepG2細胞において遺伝子導入効率の顕著な上昇を示し、CSP/TRAPの肝細胞における効果は有意に認められた。またヒト補体活性存在下においても50%以上の活性を保持しており、コントロールウイルスと比較して有意な補体抵抗性の向上を示した。一方でDAF発現型はCSP/TRAPと組み合わせた場合でも補体抵抗性の向上は確認できたが遺伝子導入効率の大きな低下が見られた。したがって、補体制御因子としては既に報告があるDAF型よりも本研究で作製したCD46-DAF-CD59型の方が優れていると考えられる(論文投稿準備中)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{雑誌論文}(計 3件)

1, Mitsuhiro Iyori, Daisuke S. Yamamoto, Miako Sakaguchi, Masanori Mizutani, Sota

Ogata, Hidesato Nishiura, Takahiko

Tamura, Hiroyuki Matsuoka and Shigeto

Yoshida.

DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine

enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. Malaria Journal, (2017). doi: 10.1186/s12936-017-2039-x. 査読あり

#### 2. 田村隆彦

組織標的性を持つバキュロウイルスの開発  
月刊「細胞」, 49(4), 44(200)-46(202), (2017)  
査読なし

3, Takahiko Tamura, Chiaki Kawabata, Shunsuke Matsushita, Miako Sakaguchi and Shigeto Yoshida.

Malaria sporozoite protein expression enhances baculovirus-mediated gene transfer to hepatocytes. Journal of Gene Medicine, 18,75-85, (2016). ; corresponding author. doi: 10.1002/jgm.2879.

査読あり

{学会発表}(計 2件)

1. 田村隆彦、川端千明、川井悠輔、坂口美  
亜子、吉田栄人

補体抵抗性を持った肝細胞標的性バキュロウイルスベクターの開発、日本分子生物学学会、2016年11月、ポスター、横浜

2. 田村隆彦、川井悠輔、川端千明、松下俊介、坂口美亜子、吉田栄人

組織標的性を持つ遺伝子導入ベクターとしての次世代バキュロウイルスの開発、日本分子生物学学会、2015年12月、口演、神戸

{図書}(計 0件)

{産業財産権}

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田村 隆彦 (TAMURA, Takahiko)  
金沢大学・薬学系・助教  
研究者番号：00434035

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

坂口 美亜子 (SAKAGUCHI, Miako)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：50400651

##### (4) 研究協力者

( )