

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15572

研究課題名（和文）慢性疼痛の遺伝子治療を目指した知覚神経指向性ウイルスベクターの開発

研究課題名（英文）Development of a viral vector for gene therapy of chronic pain

研究代表者

山田 健太郎（YAMADA, Kentaro）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：70458280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、知覚神経指向性を示す狂犬病ウイルス1088株のG蛋白質を纏ったレンチウイルスベクターを作製し、慢性疼痛の遺伝子治療に利用可能な知覚神経指向性ベクターとしての適合性について検証を行った。1088株のG蛋白質を纏ったレンチウイルスの回収に成功し、さらにそのG蛋白質へのN型糖鎖の追加はレンチウイルス粒子の産生を亢進することが確認されたが、その産生量は水疱性口炎ウイルス由来G蛋白質による場合と比べると依然低く、今後、ウイルスベクターとして動物実験等により評価を行うためにはウイルス産生量を高めるための改善がさらに必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this work, we assessed a lentiviral vector pseudotyped with the G protein of the rabies virus strain 1088, which prefers to infect sensory neurons, as a vector for gene therapy for chronic pain. We succeeded in production of infectious lentiviral particles with the G protein and found that an N-glycan addition on the G protein slightly enhanced the virus production. However, the virus production by the modified 1088 G protein was still significantly lower than that by the G protein of vesicular stomatitis virus. In order to assess using animal experiments, we consider that some improvements are needed to increase the production of the pseudotyped virus.

研究分野：ウイルス学、獣医学

キーワード：慢性疼痛 遺伝子治療 狂犬病ウイルス G蛋白質 知覚神経指向性 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、その名に示すように慢性的な耐え難い痛みであり、患者の QOL を著しく低下させ、社会経済的損失をもたらす。特に、薬物療法や神経ブロック療法等の既存の治療法では効果が薄いケースを難治性慢性疼痛と呼び、有効な治療法の確立が望まれている。これについて、低侵襲性および治療効果の長期持続性の観点から、ウイルスベクターによる遺伝子治療が注目され、その確立が試みられている(Huang et al, Pain Res Treat, 2011 等)。その遺伝子治療法の戦略としては、発痛を抑制する内因性オピオイド等の過剰発現、もしくは内因性発痛物質およびその受容体の発現抑制が挙げられる。一方、その遺伝子治療用のウイルスベクターについては、単純ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルスおよびレンチウイルス(HIV)等をベースに開発が試みられているが、安全性、免疫原性、細胞指向性や簡便性等の点においてそれぞれに欠点がある。ただし、レンチウイルスベクターについては近年、非常に安全性の高い増殖力欠損型ベクターが開発されており、非分裂細胞(神経細胞等)への遺伝子導入や導入遺伝子の長期安定発現等の利点と併せて非常に扱いやすくなっている。このベクターの神経系細胞への導入は、神経細胞指向性の高いウイルスエンベロープ蛋白質を纏わせることで果たすことが可能で、実際に神経指向性である狂犬病ウイルスのエンベロープ蛋白質(G蛋白質)が使用されている。しかし、これまで使用されている G 蛋白質は実験室株由来で運動神経指向性を示すものであり(Mazarakis et al, Human Mol Genet, 2001 等)知覚神経指向性を示す G 蛋白質についての報告はなかった。

最近、申請者らは当研究室が保有する狂犬病ウイルス街上市 1088 株(北米・ウッドチャック由来野外株)がマウスにおいて実験室株とは異なり、運動神経ではなく知覚神経に選択的に感染することを発見した(Kimitsuki et al, J Vet Med Sci, 2017)。このことから、1088 株 G 蛋白質を利用すれば、難治性慢性疼痛等の知覚神経関連疾患の遺伝子治療に資する知覚神経指向性レンチウイルスベクターを作製できるのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

そこで研究背景を踏まえ、本研究では街上市毒株 G 蛋白質を纏ったレンチウイルスベクターを作製し、慢性疼痛の遺伝子治療に利用

可能な知覚神経指向性ベクターとしての適合性について検証を行った。特に 1088 株 G 蛋白質については、N 型糖鎖の追加がレンチウイルス粒子の産生の亢進をもたらすか検討を行った。さらに難治性慢性疼痛に対する遺伝子治療に資するようウイルスベクターの改良についての試みも行った。

3. 研究の方法

(1) 狂犬病ウイルス 1088 株 G 蛋白質を纏ったレンチウイルスベクターの作製

Cell BioLabs 社のレンチウイルス発現システム(ViraSafe Universal Lentiviral Expression System)は安全性の高い増殖力欠損型の SIN 型レンチウイルスベクターが作製可能で、さらに任意のプロモーターも導入可能で、パッケージングプラスミドも別々に調製して導入するため、汎指向性を示す水疱性口炎ウイルス(VSV)G 蛋白質の代わりに任意の、すなわち、狂犬病ウイルス G 蛋白質の供給が可能となることから、本キットを採用して実験を進めた。本キットのベクターを基にして、強力な CAG プロモーターにより緑色蛍光蛋白質(EGFP)を発現するレンチウイルスベクターを構築し、293LTV 細胞にパッケージングプラスミドを共導入して、ウイルスの回収を行った。G 蛋白質の供給には VSV-G 蛋白質、野生型 1088 株 G 蛋白質(WT)に加え、第 194 位に N 型糖鎖が追加された 1088 株 G 蛋白質(R196S)を使用した。コントロールベクターとして、LacZ を発現するウイルスベクターについても同様に調製を行った。調製したウイルス粒子の感染価については、感染細胞の GFP 発現観察もしくはβガラクトシダーゼアッセイにより行った。さらに、SIGMA 社のパッケージングプラスミドについても検証を行った。

(2) ルシフェラーゼをレポーターとするレンチウイルスベクターの作製とウイルス産生における G 蛋白質細胞質領域の関与についての検証

トゲオキヒオドシエビ由来の小分子ルシフェラーゼである NanoLuc を発現するウイルスベクターを構築し、G 蛋白質細胞質領域がウイルス粒子産生効率に与える影響について検証した。すなわち、1088 株 G 蛋白質(WT)もしくは R196S)の細胞質領域を VSV-G 蛋白質もしくは狂犬病ウイルス実験室株 CVS 株 G 蛋白質由来に置換したものをそれぞれ構築し、NanoLuc 発現ウイルスベクターを用いて、それらのウイルス粒子産生性

についてルシフェラーゼアッセイにより比較検証を行った。

(3) 疼痛刺激依存的にレポーター遺伝子を発現するレンチウイルスベクターの作製と検証

疼痛関連遺伝子発現依存的に疼痛抑制分子（内因性オピオイド）を知覚神経細胞特異的に発現させることができれば副作用の少ない慢性疼痛の制御が可能になると考えられる。これに関して、第5腰髄神経後根神経節結紮ラット（慢性疼痛モデル）において、後根神経節で疼痛刺激特異的にBDNF（脳由来神経栄養因子）エキソン1スプライスバリエーションの発現が上昇すること、さらにその発現に重要なプロモーター領域について報告されている（Kobayashi et al, Brain Res, 2008; Obata et al, BBRC, 2011）。そこで、レポーター遺伝子（NanoLuc）の上流にマウスBDNFエキソン1スプライスバリエーション用プロモーターを配置した発現ユニットを持つレンチウイルスベクタープラスミドを構築し、培養神経系細胞（マウス神経芽腫由来NA細胞）に導入して、NGF（神経栄養因子）依存的にレポーター遺伝子の発現が誘導されるか、ルシフェラーゼアッセイにより確認を行った。

4. 研究成果

(1) 狂犬病ウイルス1088株G蛋白質を纏ったレンチウイルスベクターの作製

CAGプロモーター依存的にEGFPを発現するレンチウイルスベクタープラスミドを構築し、これを培養細胞に直接導入したところ、明瞭なEGFPの発現が確認された。

そこでまず、VSV-G蛋白質を用いてウイルス粒子の調製を行い、NA細胞に接種してEGFPの発現確認を行ったが、その発現を確認することはできなかった。LacZを発現するコントロールベクターを用いても、同様の結果しか得られなかった。

SIGMA社のパッケージングプラスミドは、Cell Biolabs社のパッケージングプラスミドと比べて導入するプラスミドの数が一種類少なく、ウイルス産生効率も高いという報告（Albrecht et al, Mol Biotechnol, 2015）もあったことから、SIGMA社のパッケージングプラスミドについて検討を行ったところ、LacZコントロールベクターについて感染性ウイルスの産生が確認できた。しかし、EGFPウイルスについてはEGFPの発現を指標にした感染性ウイルスの確認はできなかった。これは、βガラクトシダーゼアッセイのような酵

素反応を基にした着色による検出系では、細胞1つあたりにウイルスゲノムが1コピーしか導入されない場合（LacZの発現が低い場合）でも、反応時間を長くすればいずれ検出可能となるが、蛍光顕微鏡による目視での観察ではEGFPの場合は細胞内で十分に発現しないと検出できないため、EGFP発現レンチウイルスについては感染性粒子の産生が確認できなかったと考えられた。LacZウイルスによるβガラクトシダーゼアッセイにおいても、着色した細胞を顕微鏡下で1つずつ計測していくことは非常に煩雑であったため、ルシフェラーゼを利用した系を確立する必要があると考えられた。

また、LacZベクターおよびSIGMA社パッケージングプラスミド（pMISSION GAG POL）を用いて、VSV-G蛋白質、1088株G蛋白質（WTもしくはR196S）の供給によるウイルス粒子産生効率の比較試験を行ったところ、1088株G蛋白質を供給した場合は何れもVSV-G蛋白質を供給した場合に比べて1000分の1程度しかなかった。これに関して、G蛋白質細胞質領域はウイルス産生効率に影響を与えることが報告されており（Mebatsion et al, Cell 1996）VSV株G蛋白質と狂犬病ウイルスG蛋白質の細胞質領域の長さは異なることから（それぞれ28残基と43残基）この違いがウイルス産生効率の違いに関与しているのではないかと考えた。

(2) NanoLuc発現レンチウイルスベクターの作製とウイルス産生におけるG蛋白質細胞質領域の関与についての検証

NanoLuc発現レンチウイルスベクタープラスミドを構築し、さらにVSV-G蛋白質由来もしくはCVS株G蛋白質由来細胞質領域に置換された1088株G蛋白質発現プラスミドをWTおよびR196Sの何れについても構築し、これらを用いてウイルス産生試験を行った。その結果、この系においては、WTによるウイルス産生効率はVSV-Gのそれに比べ5.5%であったが、R196SではWTに比べ約2.6倍高かった（VSV-Gの14.2%）。一方、VSV-G蛋白質細胞質領域を有するWTのウイルス産生効率は置換していない場合に比べて約2倍改善したが（VSV-Gの11.0%）R196Sの場合では低下した（VSV-Gの5.5%）。しかし、CVS株G蛋白質由来細胞質領域への置換による1088株G蛋白質によるウイルス産生効率の変化は何れについても認められなかった。

(3) 疼痛刺激依存的にレポーター遺伝子を発現するレンチウイルスベクターの作製と検証

マウス BDNF 遺伝子のエキソン 1 の上流部分 (434 塩基) とその下流に NanoLuc 遺伝子が挿入されたレンチウイルスベクターを NA 細胞に導入して評価を行った。しかし、疼痛発現にも関与するマウス神経栄養因子 (NGF) に依存的なルシフェラーゼの発現を認めることはできなかった。これについて、NA 細胞は NGF 受容体を発現していない、NGF 受容体より下流のシグナル伝達系が働いていない、もしくは NGF シグナル伝達により活性化される転写因子は BDNF 遺伝子エキソン 1 上流部に結合しないなどの理由が考えられた。

今回、知覚神経指向性を示す狂犬病ウイルス 1088 株の G 蛋白質を纏ったレンチウイルスベクターの回収に成功し、さらにその G 蛋白質への N 型糖鎖の追加はレンチウイルス粒子の産生亢進することが確認されたが、VSV 由来 G 蛋白質に匹敵するほどではなく、今後、ウイルスベクターとして動物実験等により評価を行うためにはさらに改善・工夫が必要であると認識した。

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 1 件)

Kimitsuki K, Yamada K, Shiwa N, Inoue S, Nishizono A, Park CH. Pathological lesions in the central nervous system and peripheral tissues of ddY mice with street rabies virus (1088 strain). J Vet Med Sci. 2017, in press.

査読有り

DOI:10.1292/jvms.17-0028.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健太郎 (YAMADA, Kentaro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号: 70458280

(2) 研究分担者

朴 天鎬 (PARK, Chun-Ho)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 50383550

野口 賀津子 (NOGUCHI, Kazuko)

南九州大学・健康栄養科学部・助手

研究者番号: 00760943