

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18385

研究課題名(和文) iPS細胞への長期的遺伝子発現を可能とするエピソーマルベクターの迅速作製法の確立

研究課題名(英文) Investigating strategies to increase efficiency of BoDV vector production

研究代表者

小松 弓子 (Komatu, Yumiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：20778162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナウイルスベクター(BoDVベクター)は、細胞核で持続感染するRNAウイルスを利用したエピソーマルウイルスベクターである。BoDVベクターはiPS細胞への遺伝子導入が可能であるため、今後これらの細胞を利用した細胞療法への応用が期待されているが、ベクターの作製効率の改善とベクター力価の向上が必要とされている。本研究では、これらの問題点を解決するため、ベクターの作製効率を上げるための細胞の検討と、タンジェンシャルフローろ過システムを用いた濃縮による力価向上を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在遺伝子導入に利用されるウイルスベクターは、標的細胞により遺伝子の発現が安定しない場合や、ゲノムへの挿入変異が懸念されている。この現状を打破するために新しいウイルスベクターの開発が待たれている。BoDVベクターは、染色体を汚染せずに長期間にわたり安定した遺伝子の発現を可能とするこれまでにないウイルスベクターである。本研究により特定された細胞株と濃縮技術は、今後BoDVベクターの迅速な配給を可能にするための技術開発において有用な知見となる。

研究成果の概要(英文)：BoDV vector is an episomal vector system developed based on Borna disease virus (BoDV), an RNA virus that causes persistent intranuclear infection in variety of cell types in vitro. Although BoDV vector is a promising gene delivery vehicle for long-term transduction of induced pluripotent stem cells (iPSCs), the conventional system suffers from low efficiency of vector production and low vector titer. Here, we addressed these issues by screening various cell types to identify cell lines that can be exploited to increase efficiency of vector production. In addition, we evaluated tangential flow filtration system as a strategy to increase vector titer.

研究分野：癌研究、ウイルス学

キーワード：ウイルスベクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、これまでに細胞核でエピソームに持続感染する特徴を持つボルナウイルス(BoDV)を利用したウイルスベクター、ボルナウイルスベクター(BoDV ベクター)を開発した(Daito et al., 2011)。BoDV は細胞周期を通じて複製複合体であるリボ核酸複合体(RNP)を宿主染色体に結合させ複製するため、細胞核内で持続感染する。しかし、増殖の過程で DNA を生産せず、複製のために宿主染色体に入り込む必要がないため、宿主ゲノムに組み込まれる可能性は極めて低い(Horie et al., 2013)。したがって、宿主染色体の汚染による突然変異や細胞の癌化が起こる可能性も極めて低い。また、ウイルスの多くは増殖の過程で宿主細胞を殺してしまうが、BoDV は細胞障害性を示さずに持続感染する特徴を持つ(Hans et al., 2004)。したがって、BoDV ベクターを用いれば、ゲノム汚染の可能性が極めて低い長期の遺伝子発現が可能になる。

我々はこれまでに、BoDV ベクターを遺伝子治療や再生医療に向け利用するため、様々な細胞への遺伝子導入を試みてきた。その中でも、とりわけ iPS 細胞に効率良く遺伝子導入が可能であることを報告した(Ikeda et al., 2016)。今後 BoDV ベクターを iPS 細胞への遺伝子導入技術としての応用に向けた開発を進めていくためには、迅速なウイルスベクターの供給が求められる。しかし、そのために解決しなければならない課題がこれまでに 2 つ挙げられた。(1)ベクター作製効率の問題点と(2)ベクター力価の低さである。

### 2. 研究の目的

(1) 現在の BoDV ベクターの作製法は煩雑な上、およそ 2 ヶ月もの時間がかかる。作製効率を改善するために様々な細胞株をスクリーニングし、BoDV ベクターの作製効率を向上させる細胞株の特定を目指した。

(2) ベクター力価においては、これまでの予備実験においてタンジェンシャルフローろ過システムが伝播型 BoDV ベクターの濃縮に有用であることが示唆されている。ベクターの安全性を考えた上で、今後は主に非伝播型ベクターの利用が想定される。そこで本研究では、TFF システムを用いて iPS 細胞への遺伝子導入に有用な高力価非伝播型 BoDV ベクター調整方法の確率を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 現在 BoDV ベクターの作製には Vero 細胞を使用しているが、よりベクターの産生効率が高い細胞を利用すれば、作製効率を改善することが可能である。BoDV ベクターを高効率に産生する細胞を同定するため、伝播型と非伝播型ベクターを用いてベクターに対する感受性を細胞間で比較した。

(2) 非伝播型ベクターの力価を向上させるため、持続感染細胞からセルフフリーの非伝播型ベクターを調整した。持続感染細胞を超音波処理により破碎し、遠心した後、上清を回収した。次に 0.45  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターを用いて細胞破片を除去した産物を AKTA flux S システムを用いて 5 倍濃縮し、PBS で透析した。濃縮前と濃縮後のベクターの力価を、Vero 細胞を用いて focus forming assay により測定した。

### 4. 研究成果

(1) ベクターの作製効率を改善させるためには、BoDV ベクターに対して高い感受性を持つ細胞を利用する必要がある。従来の作製方法で使用される Vero 細胞よりも高い感受性を持つ細胞株を同定するため、GFP マーカーを持つ伝播型と非伝播型ベクターを Vero、OL、T98G、U118、U87、SHSY-5Y、SJ-N-SD、SMS-KAN、TGW、GOTO 細胞に感染させ、3 日後に感染効率を Tali image cytometer を用いて測定した。その結果、U87、SHSY-5Y、SJ-N-SD、TGW 細胞において伝播型と非伝播型ベクター共に Vero 細胞よりも高い感染効率を確認された(図 1)。その中でも、ヒト神経芽細胞腫由来である SHSY-5Y と SJ-N-SD 細胞においては GFP 陽性細胞が 90% 以上と、BoDV ベクターに対して高い感受性を持つことが示された。今後これらの細胞株をリバースジェネティクス法により組み替えウイルスを作製する際

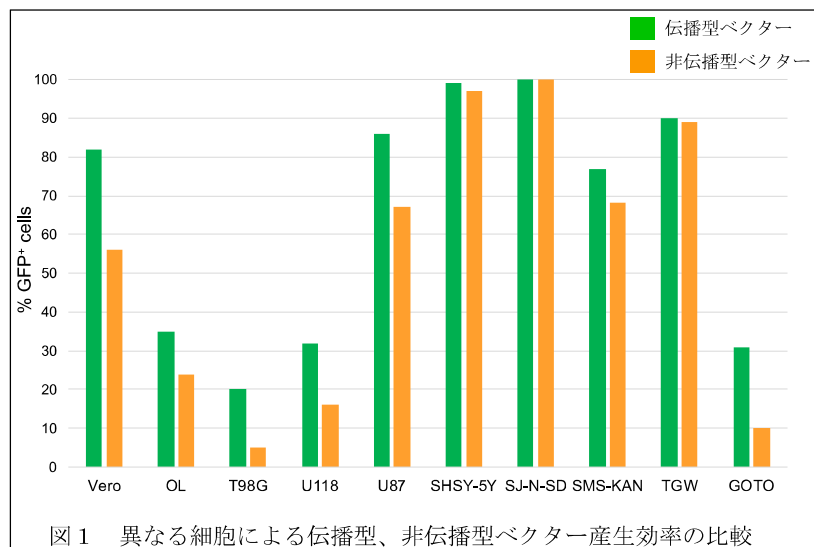


図 1 異なる細胞による伝播型、非伝播型ベクター産生効率の比較

に利用することで BoDV ベクターの作製効率の改善につながるか検討を進める。

(2) 高力価の BoDV ベクターを作製するため、持続感染細胞からベクター溶液を調整し、タンジェンシャルフロー濾過法を用いて濃縮と透析を行った。AKTA flux S システムを用いてベクターを 5 倍濃縮し、その後 PBS バッファーにて透析した。その結果、濃縮前の力価が  $5 \times 10^5$  FFU/ml であったのに対し、濃縮・透析後では力価は  $> 10^6$  FFU/ml まで向上し、タンジェンシャルフロー濾過法が非伝播型 BoDV ベクターの力価向上に有用であることが示された (図 2)。

本実験は、タンジェンシャルフロー濾過法の BoDV ベクター力価向上への有用性を検討することを目的としたため、5 倍濃縮したベクターを定量したが、濃縮率をさらに上げることで、より力価の高い非伝播型ベクターの調整も可能であると考えられる。

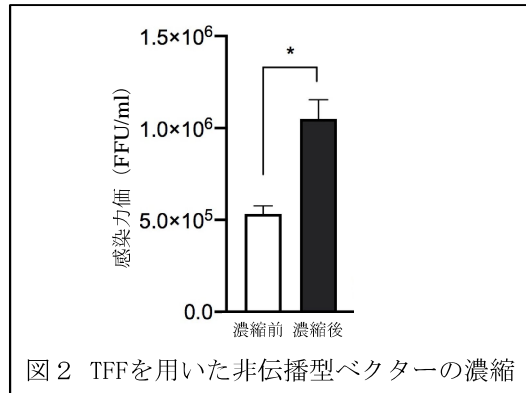


図 2 TFFを用いた非伝播型ベクターの濃縮

#### <引用文献>

1. Daito T, Fujino K, Honda T, Matsumoto Y, Watanabe Y, Tomonaga K. A Novel Borna Disease Virus Vector System That Stably Expresses Foreign Proteins from an Intercistronic Noncoding Region. *J Virol*. 2011;85(23):12170-8.
2. Horie M, Kobayashi Y, Suzuki Y, Tomonaga K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1626):20120499.
3. Hans A, Bajramovic JJ, Syan S, Perret E, Dunia I, Brahic M, Gonzalez-Dunia D. Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. *FASEB J*. 2004;18:863-5.
4. Ikeda Y, Makino A, Matchett WE, Holditch SJ, Lu B, Dietz AB, Tomonaga K. A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification. *Gene Ther*. 2016;23(3):256-62.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komatsu, Yumiko Takeuchi, Dan Tokunaga, Tomoya Sakurai, Hidetoshi Makino, Akiko Honda, Tomoyuki Ikeda, Yasuhiro Tomonaga, Keizo	4. 巻 14
2. 論文標題 RNA Virus-Based Episomal Vector with a Fail-Safe Switch Facilitating Efficient Genetic Modification and Differentiation of iPSCs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev.	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2019.05.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松弓子
2. 発表標題 ボルナウイルスベクターを利用した遺伝子治療法の検討
3. 学会等名 第7回K-CONNEX研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 RNA virus-based episomal vector system and its applications in gene and cell therapy
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----