

平成 20 年 8 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790135
 研究課題名（和文） 細胞内動態を制御したアデノウイルスベクターの開発
 研究課題名（英文） Development of fiber modified adenovirus vector
 研究代表者
 小泉 直也（KOIZUMI NAOYA）
 昭和薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：80433845

研究成果の概要：

遺伝子治療の更なる発展のためには、既存の遺伝子導入ベクターを詳細に解析し、さらに有用なベクター開発につなげることが必要である。そこで、高い遺伝子導入効率を持つアデノウイルスベクターを解析し、ウイルスタンパク質であるファイバーシャフト部分が効率的遺伝子導入に関与していることを見出した。さらに、シャフト蛋白質は遺伝子を搭載したプラスミドとプラスミド導入試薬による遺伝子発現効率を約10倍上昇することを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

1990 年に開始されたヒトへの遺伝子治療は、一部の先天性免疫不全症等には劇的な治療効果を示しているが、他の疾患に対する遺伝子治療臨床研究は現在までのところ必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクター機能が乏しく、治療効果を引き出すに十分な遺伝子発現量や発現期間を備えていないことにある。遺伝子治療に用いられる遺伝子導入ベクターには、主にウイルスベクターと非ウイルスベクターが使用されており、ウイルスベクターは遺伝子の核輸送がシ

ステム化されているため、非ウイルスベクターに比べ効率的な遺伝子発現が達成できる。しかしながら、ウイルスベクターは免疫反応などの副作用が問題となっており、効率的な遺伝子発現と安全性を兼ね備えたベクターの開発が求められている。これらの背景より、新規遺伝子導入ベクターの開発が世界的に盛んにおこなわれており、特に欧米でのベクター開発はまさに日進月歩の勢いで進歩を見せている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子治療の実用化と一

層の進展に向けて、従来のベクターが抱える問題点を分子レベルで解明し、これら問題点を克服した新規ベクターを開発することである。

アデノウイルスベクターは *in vivo* 投与による高い遺伝子発現能や作製の簡便性などの利点により、現在ヒトへの遺伝子治療に最も多く用いられているベクターの一つである。しかしながら、近年のヒト造血幹細胞等の未分化細胞を用いた検討により、一部の細胞においてアデノウイルスは細胞内に取り込まれているにもかかわらず、ほとんど遺伝子発現が起らないことが明らかとなってきた (Sakurai, *et al.*, Gene Ther., 2005)。これは細胞の種類によりアデノウイルスの細胞内動態や核内での転写効率が著しく変化していることを示しており、効率的な遺伝子発現を達成するためには細胞表面への結合能を上げるだけでなく、細胞内でのウイルス動態の解明および効率的な核への輸送能と転写効率の改善が必要であることを示唆している。よって本研究では、アデノウイルスベクターの効率的な細胞膜の透過、核移行、および転写効率に関するウイルス因子を同定し、これら因子を利用した新規ベクターの開発を目的とする。すなわち、これまで細胞内動態や転写効率の違いにより遺伝子発現が十分に達成できなかった細胞においても、アデノウイルスベクターを改変することで、効率的な遺伝子発現が可能になると考えられる。ウイルス粒子の細胞内動態を明らかとし、ウイルス特有の細胞内移行に関連する因子を同定することは、アデノウイルスの遺伝子導入効率の最適化に応用できるだけでなく、機能蛋白質やペプチド性医薬品等の細胞内デリバリーへも応用できると考えられ、種々の疾患治療の発展に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

アデノウイルスベクターの効率的な遺伝子発現に関する核移行や転写活性に必須のウイルス因子を検索・同定することを目的とする。これまでに、アデノウイルス受容体である CAR、インテグリンおよびヘパラン硫酸との結合性を改変することで、ウイルス粒子の核への移行能が低下することを示唆する結果が得られていることから (Hum. Gene Ther., 2006)、本知見をヒントにウイルス因子の同定を試みる。つまり、3 箇所のアデノウイルスの変異のうち、それぞれ 1 箇所ずつの変異をもったアデノウイルスベクターを作製し、遺伝子発現量を検討することでアデノウイルスベクターに必須のカプシド蛋白質機能を検討する。検討に関しては、アデノウイルスゲノム中にルシフェラーゼ発現カセットが搭載されているため、感染細胞中の

ルシフェラーゼ活性を測定することで遺伝子発現量を測定する。以下詳細について記載する。

(1) 改変型アデノウイルスベクターの作製

5 型アデノウイルスの受容体として知られている CAR、インテグリンとそれぞれ結合できない改変型アデノウイルスベクターは、過去に報告したベクターを使用した (Mizuguchi, *et al.*, Gene Ther., 2002,)、また、もう一つの受容体であるヘパラン硫酸との結合性を欠損させたアデノウイルスベクターは、ファイバーシャフト蛋白質の K K T K モチーフを遺伝工学的に改変し G A G A とすることで欠損させた。さらに、ヘパラン硫酸との結合性がない 35 型アデノウイルスのシャフト蛋白質に置換した 5 型アデノウイルスベクターを作製し、ヘパラン硫酸との結合性を欠損させた。

(2) 各種改変型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討

培養細胞として CAR 陽性細胞である SK-HEP1 細胞および CAR 陰性細胞である SF295 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日 3000VP (vector particles)/cell にて 1.5 時間改変型アデノウイルスベクターを作用させた。さらに 48 時間後にレポーター遺伝子として搭載させたルシフェラーゼ発現量で遺伝子導入効率を求めた。また、*in vivo* 実験では、C57BL/6 マウスの尾静脈より 1×10^{10} VP のベクターを投与し、48 時間後の肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。

(3) 組み換え型シャフト蛋白質の作製

作製したアデノウイルスベクターのゲノム配列を鋳型として、PCR 法によりシャフト遺伝子 (5 型アデノウイルスシャフト、KKTK モチーフを GAGA に変異させた 5 型アデノウイルスシャフト、35 型アデノウイルスシャフト) を増幅した。増幅したシャフト遺伝子を pET16b (ノバジェン) の BamHI と NdeI 制限酵素サイトに挿入し、組み換えシャフト蛋白質作製のプラスミドとした。プラスミドを大腸菌 (BL21) に導入し、得られた大腸菌溶解液から His タグ精製によりシャフト蛋白質を回収した。

(4) シャフト蛋白質を用いたプラスミドトランスフェクション効率の検討

HepG2 細胞を播種し、翌日 CMV プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードした pCMV1、プラスミドトランスフェクション試薬である effecten reagent (キアゲン) および各種シャフト蛋白質を作用させた。2 日後、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を、

ピッカジーン LT2.0 (東洋インキ)にて測定し、遺伝子導入効率の指標とした。

4. 研究成果

(1) 改変型アデノウイルスベクターの作製

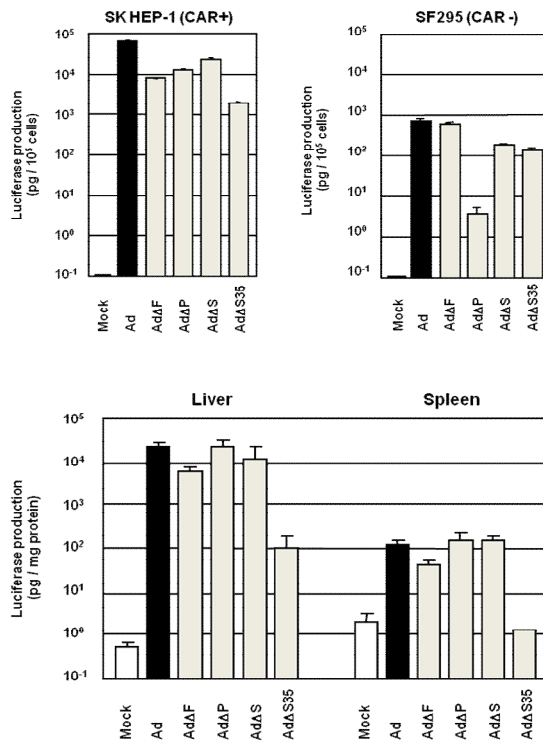
CMV プロモーターによりドライブされるルシフェラーゼ発現カセットを搭載した各種アデノウイルスベクターを作製した。作製した各種ベクターの一覧を示す。

Ad vector	Knob	Penton base	Shaft	Ligand (H1loop)
<i>Conventional Ad</i>				
Ad	intact	intact	5	—
<i>Mutant Ad</i>				
AdΔF	mutation	intact	5	—
AdΔP	intact	mutation	5	—
AdΔS	intact	intact	mutant	—
AdΔS35	intact	intact	type 35	—

*Fiber knob FG loop mutation sequence: -TEG--HAV- (intact sequence: -TEGTAYTHAV-)
 *Penton base mutation sequence: -M1D-TS-RAE- (intact sequence: -M1D-HAIRGDTFAT-RAE-)
 *Fiber shaft mutation sequence: -GAGA- (intact sequence: -KKTK-)
 *Fiber shaft substitution: fiber shaft domain for that derived from Ad type 35

(2) 各種改変型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討

in vitro および in vivo での遺伝子導入実験の結果、5型アデノウイルスのシャフト蛋白質を35型に改変したベクターにおいて、著しい遺伝子導入効率の減少が示された。つまり、シャフト蛋白質がアデノウイルスの効率的遺伝子導入効率に関与していることが明らかとなった。

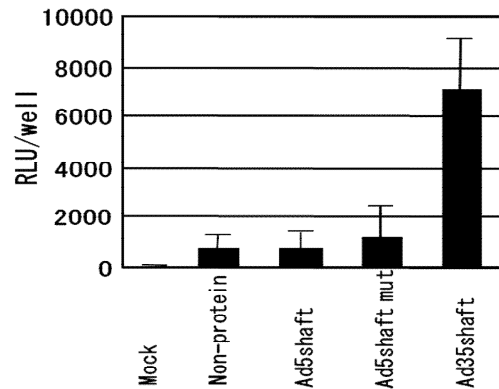


(3) 組み換え型シャフト蛋白質の作製

遺伝子配列はシーケンスにより、組み換え型シャフト蛋白質の精製は SDS-PAGE により作製を確認し、目的のシャフト蛋白質を得ることができた。

(4) シャフト蛋白質を用いたプラスミドトランスフェクション効率の検討

コントロールおよび5型アデノウイルスシャフト (Ad5shaft) に比べ、KKTKモチーフをGAGAに変異させた5型アデノウイルスシャフト (Ad5shaft mut) および35型アデノウイルスシャフト (Ad35shaft) を作用させた場合において遺伝子導入効率の上昇が確認された。特に35型アデノウイルスシャフトを用いた場合においては、コントロールの約10倍の遺伝子発現を示し、アデノウイルスシャフト蛋白質が新規遺伝子導入ベクター作製のツールになる可能性を示した。



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2件)

- (1) Yamaguchi T., Kawabata K., Koizumi N., Sakurai F., Nakashima K., Sakurai H., Sasaki T., Okada N, Yamanishi K., Mizuguchi H: Role of MyD88 and TLR9 in the Innate Immune Response Elicited by Serotype 5 Adenovirus Vectors., *Hum. Gene Ther.*, 18, 753-762 (2007) 査読有
- (2) Kurachi S., Koizumi N., Tashiro K., Sakurai H., Sakurai F., Kawabata K., Nakagawa S., Mizuguchi H: The modification of the pIX or hexon based on fiberless Ad vectors is not effective for the development of targeted Ad vectors, *J. Control. Release.*, 1, 88-95 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Naoya Koizumi, Tomomi Sasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Makiko Fujii, Yoshiteru Watanabe: Infectious mechanism of adenovirus vector in Caco-2 cell for permeability study using a transgene expressed intestinal epithelium model, 8th International Society for the Study of Xenobiotics Meeting, 007年10月9-12日, 仙台
- (2) Naoya Koizumi, Yoshiaki Yamagishi, Hiroyuki Mizuguchi, Makiko Fujii, Yoshiteru Watanabe: DEVELOPMENT OF EFFICIENT GENE TRANSFER SYSTEMS INTO CACO-2 CELL MONOLAYER BY ADENOVIRUS VECTOR, 4th Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences, 2008年2月22-23日, 名古屋
- (3) 山岸喜彰、小泉直也、水口裕之、藤井まき子、渡辺善照 アデノウイルスベクターを用いた Caco-2 単層膜細胞への効率的遺伝子導入方法の開発遺伝子デリバリー研究会 第8回シンポジウム、2008年6月9日、大阪
- (4) 小泉直也、萩原恵理、岩島順子、山岸喜彰、水口裕之、藤井まき子、渡辺善照 アデノウイルスカプシド蛋白質を利用した効率的遺伝子導入法の開発第24回日本DDS学会、2008年6月29-30日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)
昭和薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：80433845