

機関番号：14401
 研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20689004
 研究課題名 (和文) マイクロ RNA による遺伝子発現制御システムを搭載した
 アデノウイルスベクターの開発
 研究課題名 (英文) Development of an adenovirus vector containing microRNA-regulated
 gene expression system
 研究代表者 櫻井 文教
 (SAKURAI FUMINORI)
 大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：70370939

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターに、マイクロ RNA (miRNA) による遺伝子発現制御システムを搭載することにより、miRNA の発現依存的に遺伝子の発現を制御可能な安全性の高い Ad ベクターを開発することに成功した。具体的には、①肝臓もしくは脾臓における導入遺伝子の発現を抑制可能な Ad ベクター、②Ad 遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な Ad ベクター、③正常細胞での増殖を大きく抑制した制限増殖型 Ad を開発した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we developed the adenovirus (Ad) vectors which exhibited enhanced safety profiles by incorporating microRNA (miRNA)-regulated gene expression system. For example, ①an Ad vector which shows reduction in the transgene expression in the liver and spleen by insertion of sequences complementary to liver- and spleen-specific miRNA, respectively, ② an Ad vector which exhibits reduction in the leaky expression of Ad genes by insertion of miRNA complementary sequences into 3'-untranslated region of E2A or E4 genes, ③ a oncolytic Ad which shows reduced replication in normal cells by insertion of sequences complementary to normal cell-specific miRNAs, were developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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：遺伝子治療、マイクロ RNA、発現制御、遺伝子導入ベクター

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルス (Ad) ベクターは、遺伝子導入ベクターとして優れた特性を有しているが、以下のような問題点が報告されている。
 ① 癌などに局所投与した Ad ベクターは、

投与部位より全身循環に漏れ出て、肝臓で遺伝子発現する。特に治療遺伝子として、自殺遺伝子など遺伝子発現細胞に対し高い毒性を示す遺伝子を用いた場合には、高い肝毒性を誘導する。

- ② 導入遺伝子産物が非自己の場合、免疫応答が誘導され、導入遺伝子産物および発現細胞の除去が起こる。
- ③ Ad ゲノムよりわずかにウイルスタンパク質が発現し、これらに対する免疫応答が誘導されることで、遺伝子発現細胞が除去される (図1)。

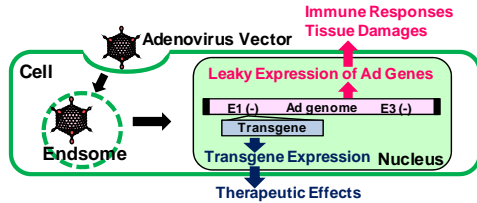


図1. Ad遺伝子の非特異的発現による副作用

- ④ 癌のみで増殖する制限増殖型 Ad では、ウイルスの複製に必須の E1 遺伝子が腫瘍特異的プロモーターでドライブされているが、正常細胞においても E1 遺伝子が低レベルながら発現することにより、ウイルスが増殖する恐れが指摘されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、Ad ベクターに搭載する遺伝子発現カセットの 3'非翻訳領域 (3'-UTR) もしくはウイルス遺伝子の 3'-UTR に、マイクロ RNA (miRNA) の標的配列を挿入することで、細胞特異的に遺伝子発現を制御することにより、高い安全性を有する Ad ベクターを開発することを目的とする。

miRNA は、内在的に発現する約 21 塩基の小分子 RNA で、標的遺伝子の 3'-UTR に存在する部分的相補配列に結合し、遺伝子発現を転写後レベルにおいて抑制する。従って、miRNA の相補配列を遺伝子工学的手法を用いて発現抑制したい遺伝子の 3'-UTR に挿入することにより、その miRNA が発現している細胞において、その遺伝子の発現を抑制することが可能である。以下に、具体的な検討項目を示す。

- ① 肝臓特異的 miRNA (miR-122a) の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入することにより、腫瘍での発現を維持したまま、肝臓における発現を抑制可能な Ad ベクターを開発する。
- ② 脾臓特異的 miRNA (miR-142-3p) の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入することにより、脾臓における遺伝子発現を抑制し、導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制可能な Ad ベクターを開発する。
- ③ Ad ゲノムの E2A および E4 遺伝子の 3'-UTR に、肝臓もしくは脾臓特異的 miRNA の標的配列を挿入することにより、Ad ベクター感染後の Ad 遺伝子の非特異的な発現を抑制する。

- ④ 癌細胞でのみ特異的に増殖し、癌細胞を死滅させる制限増殖型 Ad において、E1 遺伝子発現カセットに癌細胞で特異的に発現が減少している miRNA の標的配列を挿入することにより、正常細胞における制限増殖型 Ad の複製を抑制することを試みる。

3. 研究の方法

- ① 肝臓特異的 miRNA (miR-122a) の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入した Ad ベクターの開発

ホタルルシフェラーゼもしくはヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に、肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列 (完全相補配列) を 4 コピー挿入した。本遺伝子発現カセットを Ad ベクタープラスミドに挿入し、従来と同様の手法により、Ad ベクターを調製した。本 Ad ベクターをマウス皮下腫瘍に局所投与後、腫瘍ならびに肝臓における遺伝子発現を定量するとともに、抗腫瘍効果ならびに肝障害について検討した。

- ② 脾臓特異的 miRNA の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入した Ad ベクターの開発

上記と同様に、ホタルルシフェラーゼ発現カセットの 3' 非翻訳領域に、脾臓特異的 miRNA の標的配列を 4 コピー挿入した Ad ベクターを作製した。さらに、脾臓での遺伝子発現を抑制することを目的に、脾臓特異的 miRNA 標的配列に加えて、肝臓特異的プロモーターを搭載した Ad ベクターも作製した。

- ③ Ad・E2a もしくは E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの開発

Ad ベクター感染後の各 Ad 遺伝子の非特異的な発現を定量的かつ網羅的に解析するため、各種培養細胞に遺伝子導入後、RNA を回収し、Ad 遺伝子に対する定量的 RT-PCR を行った。

Ad・E2a もしくは E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターについては、E2a もしくは E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、miR-122a もしくは miR-142-3p の標的配列を 4 コピー挿入した。また、E1 遺伝子欠損領域には、ホタルルシフェラーゼ発現カセットを挿入した。作製した Ad ベクタープラスミドを 293 細胞に Transfection し、従来手法により Ad ベクターを調製した。本 Ad ベクターを各種培養細胞ならびにマウスに作用させたのち、E2a ならびに E4 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法により検討した。

- ④ E1 遺伝子発現カセットに miRNA の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad の開発
癌特異的プロモーター (Telomerase)

Reverse transcriptase;TERT) によってドライブされる E1 遺伝子発現カセットに、癌で発現低下し正常細胞で高発現する miRNA (miR-143, -145, -199a, let-7a) の標的配列を 4 コピー挿入した。本 E1 遺伝子発現カセットを Ad ベクタープラスミドに挿入し、従来により制限増殖型 Ad を作製した。また、同時に肝臓における制限増殖型 Ad の増殖を抑制するため、miR-122a の標的配列も同時に 4 コピー挿入した制限増殖型 Ad を作製した。作製した制限増殖型 Ad を、各種癌細胞および正常細胞に作用させ、一定時間後 DNA を回収し、Ad ゲノム量を定量的 PCR により検討した。さらに、細胞生存率を Alamar blue assay ならびに Crystal violet 染色により評価した。

4. 研究成果

① 肝臓特異的 miRNA (miR-122a) の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入した Ad ベクターの開発

miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクター (Ad-L-122aT) ならびに Control として miR-122a の標的配列を逆方向にした配列を挿入した Ad ベクターを、各種培養細胞に作用させ、その遺伝子発現効率を検討した。その結果、miR-122a を高発現していた Huh-7 細胞 (ヒト肝癌由来細胞株) ならびにマウス Primary Hepatocytes においては、Control の Ad ベクターと比較し、Ad-L-122aT では 3 ~ 70 倍低い遺伝子発現を示した。そこで次に、各種 Ad ベクターをマウス皮下腫瘍 (B16 細胞) に局所投与した。Control の Ad ベクターでは、腫瘍のみならず、肝臓においても高い遺伝子発現が観察された。これは、腫瘍に投与された Ad ベクターの一部が、腫瘍より漏れ出て全身循環に移行し、肝臓に集積したためと考えられる。一方で、Ad-L-122aT では腫瘍における遺伝子発現は Control の Ad ベクターと同程度であったが、肝臓における遺伝子発現は約 1/100 に抑制されていた。なお、腫瘍ならびに肝臓に集積した Ad ベクターゲノム量を定量的 PCR により検討したところ、Ad-L-122aT および Control の Ad ベクターとの間に有意な差は観察されなかった。つまり、両者の遺伝子発現効率の違いは、ベクターの体内動態の違いではなく、細胞内在化後の転写後レベルにおいて違いが生じているものと考えられる。

そこで次に自殺遺伝子を用いて癌遺伝子治療への応用を検討した。自殺遺伝子発現 Ad ベクターは、その優れた抗腫瘍効果から期待が集まっている。しかしな

がら、腫瘍に局所投与された Ad ベクターの一部が肝臓に集積し、自殺遺伝子が発現することで強い肝障害が誘導される。そこで miR-122a を利用することで、自殺遺伝子による肝障害を抑制することを試みた。自殺遺伝子として、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を用い、その 3'-UTR に miR-122a の完全相補配列を 4 コピー挿入した Ad-tk-122aT を作製した。本 Ad ベクターならびに

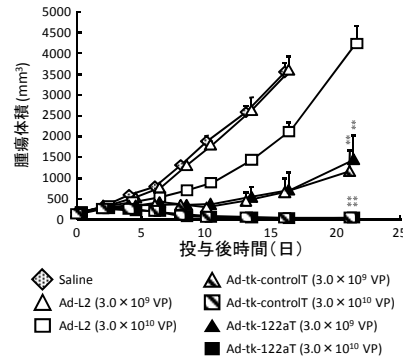


図2. miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクターの癌治療効果
チミジンキナーゼを発現する各種 Ad ベクターを皮下腫瘍に局所投与後、経口的に腫瘍径を測定した。**P<0.005 compared with Ad-L2.

miR-122a の標的配列を挿入していない Ad ベクターを B16 皮下腫瘍に局所投与するとともに、ガンシクロビルを 10 日間連日、腹腔内投与した。その結果、両ベクター投与群ともに有意な癌の退縮が認められた (図 2)。しかし、肝障害を検討したところ、Control の Ad ベクター投与群では著しい肝障害が観察されたのに対し、Ad-tk-122aT 投与群では、ほとんど肝障害は認められなかった。この結果より、miR-122a を利用して肝臓における遺伝子発現を抑制することにより、抗腫瘍効果を維持したまま、肝障害を大きく改善することに成功した (図 3)。

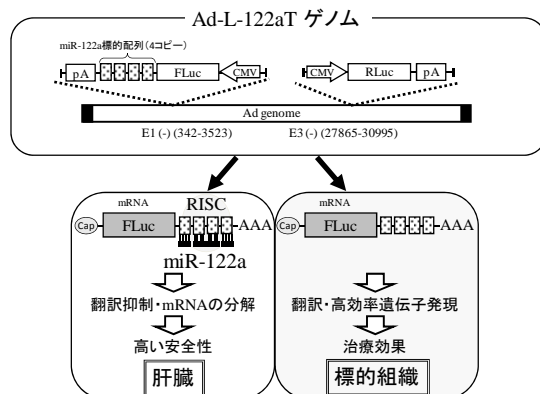


図3. 肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクター

② 脾臓特異的 miRNA の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入した Ad ベクターの開発

脾臓には多くの抗原提示細胞（樹状細胞）が存在することから、脾臓において高発現することにより、遺伝子産物に対する強い免疫反応を誘導する危険性がある。そこで本研究では、脾臓特異的な miRNA である miR-142-3p の標的配列を遺伝子発現カセットに挿入することにより、脾臓における外来遺伝子の発現を抑制することを試みた。miR-142-3p の標的配列を挿入した Ad ベクターを、マウス尾静脈より投与したところ、脾臓の発現を約 1/30 に抑制することに成功した。しかしながら、発現抑制の程度は miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクターの肝臓における遺伝子発現を比較すると低いものであった。そこでさらに脾臓における遺伝子発現を抑制することを目的に、臓器特異的プロモーターを利用することとした。臓器特異的プロモーターとしては、アルブミンプロモーターならびにアンチトリプシンプロモーターを用いた。まず、両プロモーターを搭載した Ad ベクターを作製し、マウス各臓器における遺伝子発現を検討した。その結果、アルブミンプロモーターでは、肝臓以外の臓器での遺伝子発現は大きく抑制されていたが、肝臓での遺伝子発現も従来の CMV（サイトメガロウイルス）プロモーターと比較すると、1/1000 程度に減少した。一方、アンチトリプシンプロモーターの場合には、肝臓での遺伝子発現は CMV プロモーターの約 1/50 であったが、他の臓器における遺伝子発現はほぼバックグラウンドレベルまで抑制していた。現在、腫瘍特異的プロモーターと miR-142-3p の標的配列とを併用した場合の遺伝子発現効率ならびに遺伝子産物に対する免疫応答について検討中である。

③ Ad・E2a もしくは E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターの開発

まずベクター作製に先立ち、従来の Ad ベクター感染後、どのような Ad 遺伝子が、どの程度非特異的に発現するのかを明らかにするため、定量的 RT-PCR により、Ad ベクター感染後の各 Ad 遺伝子の発現について検討した。その結果、E4 遺伝子および pIX 遺伝子が最も高い発現を示した。さらに上記遺伝子よりは低いものの、E2a 遺伝子の発現も認められた。一方で、その他の Ad 遺伝子 (Hexon, Fiber, Penton) については、ほとんど発現が認められなかった。

そこで次に、miRNA を利用して E4 や E2a 遺伝子の発現を抑制することを目的に、E4 もしくは E2a 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、miR-122a もしくは miR-142-3p の標

的配列を 4 コピー挿入した Ad ベクターを作製した。本 Ad ベクターを各種培養細胞ならびにマウスに作用させたのち、E2a・E4 遺伝子を含む各種 Ad 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR により検討した。その結果、miRNA の発現プロファイルに応じて、Ad 遺伝子の非特異的な発現を抑制することに成功した。現在、本研究に関しては、Ad 遺伝子の非特異的な発現を抑制することにより、免疫応答ならびに組織障害を抑制可能か検討している。

④ E1 遺伝子発現カセットに miRNA の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad の開発

制限増殖型 Ad の正常細胞における増殖を抑制することを目的に、E1 遺伝子の 3' -UTR に、癌細胞で特異的に発現低下し、正常細胞で高発現する miRNA (miR-143, -145, -199a, let-7a) の標的配列を 4 コピー挿入した。実験に先立ち、各種培養癌細胞ならびにヒト初代培養細胞における上記 miRNA の発現量を定量したところ、上記 miRNA は正常細胞と比較し、癌細胞において発現低下していることが確認された。そこで次に、各種癌細胞に作製した制限増殖型 Ad を作用させ、その殺細胞効果について検討した。その結果、miR-143, -145, -199a の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad は、標的配列を挿入していない従来の制限増殖型 Ad と同程度の殺細胞効果を示した。一方で、let-7a の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad では、殺細胞効果が大きく減弱していた。これは、let-7a の発現は癌細胞において正常細胞よりも減少しているものの、その発現量自体が高いために、E1 遺伝子の発現が抑制されたためと考えられた。次に、作製した制限増殖型 Ad を各種正常細胞に作用させた。その結果、miRNA の標的配列を挿入した制限増殖型 Ad では、従来の制限増殖型 Ad と比較し、最大 1000 倍も増殖を抑制することに成功した。またこのような正常細胞に、上記 miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させると増殖抑制効果が減弱したことから、上記の増殖抑制効果が miRNA 特異的であることが示された。

次に肝臓における制限増殖型 Ad の複製を抑制することを目的に、癌細胞で特異的に発現低下している miRNA の標的配列に加えて、肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列も挿入した（計 8 コピー）制限増殖型 Ad も作製した。本制限増殖型 Ad では、癌細胞に対し従来の制限増殖型 Ad と同程度の殺細胞効果が観察されるとともに、ヒト正常肝細胞およびその他の正常細胞（繊維芽細胞、ストローマ細胞）両方において、その増殖が大

大きく抑制された。以上の結果より、癌細胞特異的に発現低下している miRNA を利用することにより、制限増殖型 Ad の安全性を大きく向上させることに成功した (図 4)。

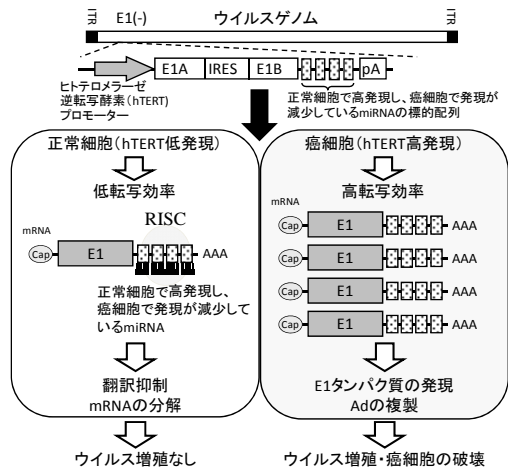


図4. miRNAによる遺伝子発現制御システムを搭載したAdベクター

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 7 件)

1. Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Matsui H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced Safety Profiles of the Telomerase-Specific Replication-Competent Adenovirus by Incorporation of Normal Cell-Specific microRNA-Targeted Sequences. *Clin Cancer Res.* 17: 2807-2818. (2011)
2. Sakurai F, Katayama K, Mizuguchi H. MicroRNA-regulated Transgene Expression Systems for Gene Therapy and Virotherapy. *Frontier in Bioscience*. in press.
3. 水口裕之、櫻井文教、ウイルスベクターと遺伝子治療. *化学療法の領域* 印刷中.
4. Sakurai F, Nishikawa M. Development of cellular and gene therapy products for bioactive protein-based therapy. *Yakugaku Zasshi.* 130:1487-8. (2010)
5. Sakurai F, Mizuguchi H. Development of recombinant adenovirus carrying microRNA-regulated gene expression system. *Yakugaku Zasshi.* 130: 1497-504. (2010)

6. 櫻井文教、川端健二、水口裕之. 遺伝子組換えウイルスの安全性向上に向けた遺伝子改変—microRNA による遺伝子発現制御システムを搭載した組換えウイルスの開発—. *Drug Delivery System.* 24: 572-581. (2009).

7. Suzuki T, Sakurai F, Nakamura S, Kouyama E, Kawabata K, Kondoh M, Yagi K, Mizuguchi H. miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol Ther.* 16:1719-26. (2008)

[学会発表] (計 12 件)

1. Sakurai F, Recombinant adenoviruses carrying microRNA-regulated gene expression system. The 9th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and the International Workshop on Biomaterials 2010. 2010. 6.21. (China)
2. 櫻井文教、水口裕之. マイクロ RNA による遺伝子発現制御システムを搭載した組換えアデノウイルスの開発. 日本薬学会第 130 年会. 2010.3.30. (岡山)
3. Sakurai F, Suzuki T, Nakamura S, Kouyama E, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. MiRNA-regulated expression of herpes simplex virus thymidine kinase prevents hepatotoxicity without disturbing antitumor effect in adenovirus vector-mediated suicide gene therapy. 第 14 回日本遺伝子治療学会学術集会. 2008.6.12-14. (札幌).
4. Sakurai F, Suzuki T, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. MicroRNA-regulated transgene expression system reduces unwanted side effects in adenovirus vector-mediated suicide gene therapy. 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2008.5.28-6.1. (Boston, USA).

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/bunshisei-butugaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70370939

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

水口 裕之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授

川端 健二 (KAWABATA KENJI)
(独) 医薬基盤研究所・幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

形山 和史 (KATAYAMA KAZUFUMI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教

田代 克久 (TASHIRO KATSUHISA)
(独) 医薬基盤研究所・幹細胞制御プロジェクト・プロジェクト研究員

近藤 昌夫 (KONDOH MASUO)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

八木 清仁 (YAGI KIYOHITO)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授

中村紳一郎 (NAKAMURA SHIN-ICHIRO)
滋賀医科大学・動物生命科学センター・准教授

川瀬 篤史 (KAWASE ATSUSHI)
近畿大学・薬学部・講師

岩城 正宏 (IWAKI MASAHIRO)
近畿大学・薬学部・教授

早川 堯夫 (HAYAKAWA TAKAO)
近畿大学・薬学総合研究所長

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

鈴木 孝幸 (SUZUKI TAKAYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生

杉尾 久美子 (SUGIO KUMIKO)
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生

清水 かほり (SHIMIZU KAHORI)
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生

David Mark Gilfedder Bennett
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生

富田 恭子 (TOMITA KYOKO)
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生