

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20177

研究課題名（和文）血液脳関門を突破する新規ナノバイオマシンシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Nano-Biomechanical System for Crossing the Blood-Brain Barrier

研究代表者

前田 史雄（Maeda, Fumio）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：10869069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は細胞毒性が低く、最大150kbpの遺伝子を積載可能な単純ヘルペスウイルス（HSV）ampliconベクターに細胞外小胞（ナノバイオマシン、EV）産生遺伝子を積載し、HSV ampliconベクターを脳血管内皮細胞に感染させることで、治療用分子を積載したナノバイオマシンを脳側の細胞に輸送することを目標とした。

まずEV産生遺伝子を利用して、機能的な分子を輸送できることを明らかにし、特許出願および論文発表を行った。次にHSV ampliconベクターの構築を行った。しかし従来のHSV ampliconベクターの産生法は重大な課題が存在することが判明したため、新規産生法を開発し、特許出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSV ampliconベクターは低毒性であり、最大150kbp積載可能なウイルスベクターである。この積載容量はウイルスベクターの中でも最大級に大きく、様々な応用が考えられるが、生産法に困難であったため利用が限られていた。本研究はこの点を解決したため、今後本技術を利用した疾患治療法の開発が期待される。細胞外小胞に狙った分子を機能性を保ったまま積載する技術は知見が乏しく、本研究のように内在性miRNAを効率的に積載する技術は本研究が初めてである。この技術は細胞外小胞中のmiRNAプロファイルを利用した低侵襲な疾病の診断や細胞間コミュニケーションの制御につながる技術である。

研究成果の概要（英文）：This study aims to deliver nano-biomechanical machines (extracellular vesicles) carrying therapeutic molecules to brain cells by infecting brain endothelial cells with an HSV amplicon vector. Initially, we demonstrated that functional molecules could be transported using genes that produce extracellular vesicles. This success led to a patent application and a paper publication. Next, we constructed the HSV amplicon vector. However, significant issues with the conventional production method became apparent. In response, we developed a new method for producing HSV amplicon vectors and applied for a patent. Achieving our goal requires specifically infecting brain endothelial cells. While we initially planned to use the targeting technology of conventional HSV amplicon vectors, we discovered challenges with this approach as well. Moving forward, we plan to refine the targeting technology for HSV and continue our efforts to transport therapeutic molecules to the brain.

研究分野：ウイルスベクター

キーワード：単純ヘルペスウイルス ウイルスベクター 細胞外小胞 miRNA

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門は血液と脳の選択的な物質輸送を可能としている脳特有の機構である。一方、血液脳関門により中枢神経への物質輸送が制限されることから、アルツハイマーなど中枢性神経薬の開発において血液脳関門の突破は最重要課題となっている。血液脳関門はタイトに結合した脳血管内皮細胞および基底膜(細胞外マトリックス)から構成されている。現状、“トランスフェリン受容体”や“CD98hc”など細胞表面タンパク質を介する、細胞内へのエンドサイトーシスを利用した血液脳関門の透過法などが報告されているが、トランスフェリン受容体は細胞内への移行性が高くないことが報告されている。近年ではウイルスベクターを利用して血液脳関門を通過する輸送技術の研究が行われている。ウイルスベクターを利用した例としては、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを血中投与することで脳内のアストロサイトへ到達することが報告されている。しかし AAV ベクターの細胞標的化が十分ではないため、他組織へオフターゲットな遺伝子発現が生じる。また AAV ベクターの許容可能な外来遺伝子サイズは最大 4.5kbp であり、積載できる遺伝子が限定されることが課題点として挙げられている。

我々が研究対象としている単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)は、遺伝子ベクター (HSV amplicon vector) としての研究が進んでいる。特徴としては、(1) DNA ウイルスであり、ゲノムが挿入されないこと、(2) 特定の細胞表面因子に対し標的化を可能にする技術が存在していること、(3) HSV 粒子の中にウイルスゲノムの代わりに最大 150kbp の外来遺伝子をコンカテマーの形で積載が可能であることが挙げられる。また、研究代表者はこれまでの研究において脳血管内皮細胞に高発現している細胞表面タンパク質 CD98hc の機能が、HSV-1 と細胞の膜融合において重要な役割を果たすことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、HSV amplicon ベクターの最大の特徴である巨大な積載容量を活かし、人工細胞外輸送小胞 (artificial extracellular vesicle, aEV、ナノバイオマシン) を形成する遺伝子および輸送遺伝子を搭載することで、HSV amplicon ベクターを取り込んだ細胞から輸送物質を含んだ aEV (ナノバイオマシン) を分泌させ、周囲の細胞に伝播させる技術を確立する。さらに HSV amplicon ベクターの細胞標的化技術を利用することで、血中投与から脳内の細胞へ任意の物質輸送を可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の技術の核は HSV amplicon ベクターを取り込んだ細胞が破壊されず、輸送物質を内包した aEV (ナノバイオマシン) が周囲の細胞に伝播させる点にある。細胞から aEV (ナノバイオマシン) を放出させる方法については、aEV 産生遺伝子(「エンベロープタンパク質」、「輸送物質を包むケージタンパク質」および「輸送物質」)を発現させ、aEV を形成させる既存の方法を用いる。Votteler らはトランスフェクト法により 3 種類の遺伝子を発現する方法を用いており、特定の細胞から aEV の分泌を可能となる。

本研究ではまず HSV ベクターに搭載する aEV 産生遺伝子により、aEV の産生および特定のタンパク質を aEV に内包して輸送できることを検証した(研究成果 1)。次に、aEV 産生遺伝子を組み込んだ HSV ベクターの構築に取り組んだ。しかし、従来の HSV ベクター産生法には重大な欠点があり、従来の方法では医療応用が困難であることが分かった。そのため HSV amplicon ベクターの新規産生法の開発に取り組んだ(研究成果 2)。

4. 研究成果

研究成果 1 「人工細胞外小胞による物質輸送」

本研究では HSV amplicon ベクターに aEV (ナノバイオマシン) 産生遺伝子は搭載する。Enveloped protein nanocage (EPN) -01 は、aEV の形成を誘導するように設計されたタンパク質である。EPN-01 は 4 つのドメインで構成されている：(i) 膜結合のために human immunodeficiency virus 1 型 (HIV-1) 構造 Gag タンパク質の最初の 6 アミノ酸に対応する N-ミリスチル化シグナル、(ii) 自己集合によって正二十面体ナノケージを形成する I3-01、(iii) Myc タグ、および(iv) endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) タンパク質をリクルートし、HIV タンパク質 Vpr と相互作用する HIV-1 Gag の p6 ドメイン。Votteler らの先行研究では、Vpr 融合タンパク質と EPN-01、膜融合タンパク質である vesicular stomatitis virus (VSV) -G の 3 つを細胞に共発現させると、EPN-01 ナノケージと Vpr 融合タンパク質を含む aEV の出芽が細胞膜から誘導されること、産生された aEV が VSV-G の作用により標的細胞膜と膜融合を生じ、標的細胞内で Vpr 融合タンパク質が機能することが報告されている。

我々はまず任意のタンパク質に Vpr を融合させることで、aEV に内包することができるか検証した。この際、aEV に内包する分子として microRNA(miRNA) 結合タンパク質を選択した。miRNA は約 22bps の non-coding RNA であり、mRNA に標的として遺伝子発現制御を行う。miRNA は miRNA 結合タンパク質とともに EV に内包される。近年の報告では EV に内包された miRNA が細胞間コミュニケーションに利用されており、レセプター細胞の遺伝子発現に変化を与えていることが

示されている。また miRNA の発現プロファイルは低侵襲な診断への応用も期待されている。これは miRNA の発現プロファイルが細胞種や細胞の発生段階によって変化し、さらに中枢神経性疾患、がん、などによっても miRNA が特徴的な発現プロファイルを示すことが知られているためである。EV に内包される miRNA のプロファイルも同様に細胞の状態や種々の疾患によって変化することが知られており、EV は尿や血液といった体液から回収可能であるため、低侵襲な診断への応用が期待されている。我々は miRNA 結合タンパク質の中でも最も多く miRNA と結合することが知られている Argonaute 2(Ago2)に Vpr と融合することで Ago2 を aEV に内包されるか、そして EV 画分から得られる miRNA 量が増加するか検証した。

Ago2 は N 端から順に次の 4 つのドメインから構成されている :N terminal (N) domain, Piwi-Argonaut-Zwille (PAZ) domain, MID domain, P-element induced wimpy testes (PIWI) domain] and two linker domains (L1, L2)。このうち、PAZ が miRNA の 3' 末端と、MID-PIWI が miRNA の 5' 末端と結合する。L2 ドメインは複数タンパク質と microRNA-induced silencing complex (miRISC)を形成する。miRNA の他に mRNA や複数のタンパク質と巨大な複合体を形成し、EPN-01 ナノケージ(約 20nm)には内包されない可能性が想定されたため、我々はまず miRNA と結合し、かつ Vpr を融合することで EPN-01 に内包される Ago2 フラグメントを解析した(図 1)。EPN-01 とともに Vpr を融合した各 Ago2 フラグメントを HEK293 細胞に発現させて、EV 画分を解析した結果、MID-PIWI のみが EV 画分に確認された(図 1 下、EV 画分)。この際、EV 画分における EV または aEV の収量を解析したところ、aEV を産生させると 10 倍近く収量が増加していることが明らかになった。また、MID-PIWI は miRNA である Let7a-5p と結合することが確認された。更に網羅的に aEV に含まれる miRNA の種類と各 miRNA の収量を解析するため次世代シーケンサー(NGS)を用いて small RNA-seq 解析を行った。解析の結果、EV 画分から検出される miRNA の種類および各 miRNA の収量がともに上昇することが明らかになった(図 2)。さらに生来の EV に比べて MID-PIWI を内包した aEV を産生させた場合は親細胞内と EV 画分の miRNA プロファイルの相関が上昇することが明らかになった。この技術は細胞の状態を非破壊的に解析する技術として利用できる他、EV(ナノバイオマシン)による細胞間コミュニケーションを促進する技術となることが期待される。

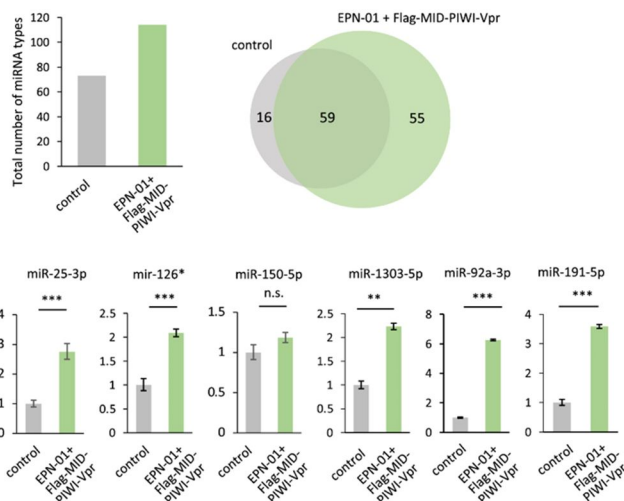
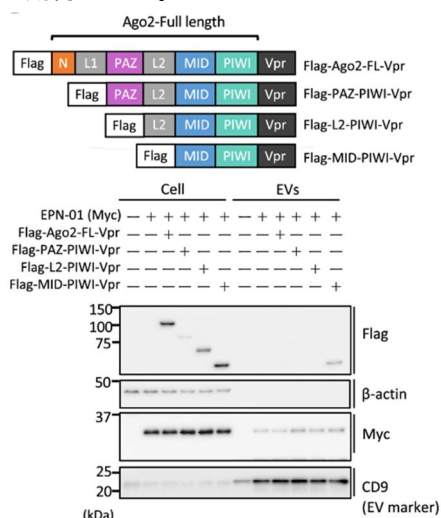


図 1 Ago2 フラグメントの解析 図 2 EV 画分で検出される miRNA の種類(上)と収量(下)

研究成果 2 「HSV amplicon vector の新規産生法の開発」

研究成果 1 より aEV(ナノバイオマシン)に親細胞の情報を反映する分子の搭載が可能であることが確認された。また一部の酵素に関しても Vpr を融合することで aEV(ナノバイオマシン)に載せることができ、標的細胞に添加すると標的細胞内で機能することが確認された(未報告)。我々は次に HSV amplicon ベクターに aEV(ナノバイオマシン)産生遺伝子群を載せることに取り組んだ。しかし、従来の HSV amplicon ベクター産生法は煩雑かつ高コストであることが課題として明確になった。従来法において HSV amplicon ベクターは次の 3 つの遺伝子を細胞に導入することで産生される:(1)増殖に必須なウイルス遺伝子 ICP27 およびウイルス粒子への封入に必要な遺伝子配列(packaging 配列、pac)を欠損した HSV-1 ゲノム、(2)ウイルスゲノムの代わりにウイルス粒子に封入され、発現させたい遺伝子をコードした Amplicon プラスミド、(3)ICP27 発現プラスミド。ベクター産生細胞としては ICP27 を発現する Vero 細胞が用いられている。問題としてはまず HSV-1 ゲノムが約 150kbp と巨大であるため、精製後の長期保存が不可能であり、都度、超遠心分離により HSV-1 ゲノムを精製する必要があった。また、ベクター産生細胞として用いられている組換え Vero 細胞は遺伝子導入効率が著しく悪いため、遺伝子導入には高価な試薬が必要である。以上のことが煩雑さおよび高いコストにつながっており、産業応用のボトルネックになっていたため、我々はこれら課題の解決に取り組んだ。

(出願準備中の特許および出願中の特許に関わるため、以下未記載)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibasaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Arii, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.00306-22	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

1. 著者名 Maeda Fumio, Adachi Shungo, Natsume Tohru	4. 巻 13
2. 論文標題 Non-destructive and efficient method for obtaining miRNA information in cells by artificial extracellular vesicles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-48995-5	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田史雄、足達俊吾、夏目徹
2. 発表標題 HIVレイトドメインを利用した細胞外小胞による非破壊的miRNA取得技術の開発
3. 学会等名 第10回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田史雄、足達俊吾、夏目徹
2. 発表標題 Herpes simplex virus (HSV) amplicon ベクターの簡易な新規産生法の開発
3. 学会等名 第30回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 前田史雄
2. 発表標題 HIVレイトドメインを利用したウイルス様粒子による効率的な非破壊的miRNA取得技術の開発
3. 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 組換え単純ヘルペスウイルスベクターを製造するための細胞、及び組換え単純ヘルペスウイルスベクターの製造方法	発明者 前田史雄、足達俊吾、夏目徹	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-035152	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞から非侵襲的にマイクロRNAを取得する方法	発明者 前田史雄、足達俊吾、夏目徹	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、18/576490	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞から非侵襲的にマイクロRNAを取得する方法	発明者 前田史雄、足達俊吾、夏目徹	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-533488	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関