

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689010

研究課題名(和文)RNA結合タンパク質・アンチセンス転写物を利用した高効率遺伝子発現ベクターの開発

研究課題名(英文)Development of an efficient gene expression vector utilizing RNA-binding proteins and antisense transcripts

研究代表者

櫻井 文教(SAKURAI, FUMINORI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70370939

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文): 遺伝子治療の実用化に向けては、標的組織特異的に高効率に遺伝子発現可能な遺伝子導入ベクターの開発が必要不可欠である。そこで本研究では、特にmRNAの安定性・分解を制御することにより遺伝子発現効率(治療効果)の改善を試みた。HuRやAU-rich配列を利用した検討については期待されたほどの遺伝子発現効率の向上は観察されなかった。一方、Adベクターゲノムに非コードRNA標的配列を組み込み、Ad遺伝子の発現を抑制したところ、搭載遺伝子の発現を劇的に改善することに成功した。また本Adベクターは成体マウスのみならず新生仔マウスにおいても有用であった。

研究成果の概要(英文): A novel gene expression vector which efficiently mediates transgene expression in a targeted organ-specific manner is required for achievement of safe and effective gene therapy. In this study, we tried to improve transgene expression profiles and therapeutic effects by regulating stability of mRNA. Dramatic improvement of transgene expression profiles was not found by utilizing HuR or AU-rich sequences. On the other hand, adenovirus (Ad) vector-mediated transgene expression profile was significantly improved by suppression of leaky expression of Ad genes utilizing non-coding RNA. This novel Ad vector also mediated efficient transduction in neonatal mice.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：gene therapy non-coding RNA microRNA adenovirus vector gene expression

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療の実用化に向けては、標的組織特異的に高効率な遺伝子発現を示す遺伝子発現ベクターの創製が必要不可欠である。これまで高効率な遺伝子発現を示すベクターの開発に向けては、主に遺伝子を搭載するベクターを改変し、遺伝子送達効率を向上させる、遺伝子発現カセットを改良し、転写・翻訳効率を向上させるアプローチが行われてきた。このうち、<sup>①</sup>については、主にプロモーターの開発研究によるものであった。しかし、高い転写活性を示すプロモーターでは、標的組織のみならず、標的以外の組織でも高発現してしまう。また、強力なプロモーターを用いても遺伝子発現量が十分でないケースもあることから、プロモーター以外の領域を改変する新たなアプローチにより遺伝子発現を増強させるとともに、将来的には強力なプロモーターと組み合わせることが望ましい。しかし、プロモーター以外の領域を改変して、遺伝子発現増強を試みる研究は少ない。特にベクターに搭載する治療遺伝子については、タンパク質をコードする領域 (Open reading frame) のみが用いられており、非翻訳領域の最適化により遺伝子発現を増強させる試みは全く検討されていない。近年、mRNA の非翻訳領域が mRNA の安定性や翻訳効率、細胞質輸送などに大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、mRNA の非翻訳領域を改変することで、遺伝子発現効率の制御を試みた。具体的には以下の検討を試みた。

mRNA の AU-rich 領域に HuR が結合することで、mRNA の安定性が向上することが報告された。そこで導入遺伝子の 3' 非翻訳領域に AU-rich 配列を挿入することにより mRNA の安定性が向上し、遺伝子発現量が上昇するか検討する。

近年、遺伝子の Antisense Transcript が標的 mRNA の相補配列部位に相補的に結合することで mRNA の安定性が向上する例が報告されている。そこで、p53 mRNA の Antisense Transcript である Wrap53 の標的配列 (相補配列) を標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入することで、Wrap53 発現細胞における遺伝子発現が上昇するか検討する。

miRNA 標的配列近傍に AU-rich 配列が存在すると、RNA-induced silencing complex (RISC) と HuR が協調的に働くことでより高い遺伝子発現抑制効果が得られることが報告された。そこで、遺伝子導入ベクターにおいても、miRNA 標的配列近傍に AU-rich 配列を挿入することでより高い遺伝子発現効率を得られるか検討する。

## 3. 研究の方法

RNA 結合タンパク質 HuR を利用した遺伝子発現効率の向上に関する検討

CMV プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミド (pCMVL1) において、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に、AU-rich 配列 (5' -ATTTATTTATTTATTTATTTA-3') もしくは既に HuR 結合配列として報告のある配列を遺伝子工学的に挿入した (pCMVL1-AU)。作製したプラスミドを HeLa 細胞などの培養細胞に導入し、遺伝子発現効率を比較検討した。また HuR 発現プラスミドを作製し、上記プラスミドと Co-transfection することで遺伝子発現行為率の向上が観察されるか検討した。さらには HuR を免疫沈降により回収し、AU-rich 配列を有するホタルルシフェラーゼ mRNA が HuR に結合しているか検討した。

Antisense Transcript を利用した遺伝子発現効率の向上に関する検討

上記と同様に pCMVL1 において、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に、Wrap53 の相補配列 (p53 mRNA の 3' 非翻訳領域の一部) を挿入した。作製したプラスミドを種々の培養細胞に Transfection し、一定期間培養後、遺伝子発現効率を検討した。

pCMVL1 のルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a (肝臓特異的な miRNA) の標的配列を組み込んだプラスミド (pCMVL1-122aT) において、miR-122a の標的配列に加えて AU-rich 配列を挿入した (pCMVL1-122aTAU)。作製したプラスミドを miR-122a を発現する細胞株である Huh7 細胞に導入した。一定期間培養後、遺伝子発現効率を検討した。またマウスに Hydrodynamics 法によりプラスミドを静脈内投与し、一定期間後の肝臓における遺伝子発現量を測定した。

上記 ③の研究に関連して、HuR が Ad による細胞毒性に関与することが報告されたことから、非増殖型 Ad ベクターにおける Ad 遺伝子の発現の抑制と細胞毒性について検討した。アデノウイルス (Ad) ベクターの各種 Ad 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA など非コード RNA の標的配列を挿入した Ad ベクターを遺伝子工学的に作製した。作製した Ad ベクターを各種培養細胞およびマウスに作用させ、Ad 遺伝子の E1 遺伝子非依存的な発現レベルおよび細胞・組織障害レベルを検討した。また導入遺伝子の発現量を測定した。さらには成体マウスのみならず、新生仔マウスを用いて検討した。

## 4. 研究成果

各種培養細胞に pCMVL1 および pCMVL1-AU を Transfection し、遺伝子発現効率を検討したところ、pCMVL1-AU において

pCMV1 よりも若干高い遺伝子発現効率を示した(最大2倍)。しかしながら、その遺伝子発現効率は期待されたほどではなかったことから、次に HuR を過剰発現させることで遺伝子発現効率の向上を試みた。まずは免疫沈降法により HuR が AU-rich 配列を有する mRNA に結合しているかどうか検討したところ、結合していることが確認された。そこで実際に遺伝子発現効率を検討したが、劇的な遺伝子発現効率の向上は観察されなかった(最大で約3倍)。原因としては、HuR は核と細胞質を行き来していることが報告されており、十分量の HuR が細胞質に存在しなかったこと、AU-rich 配列は mRNA の安定性を低下させるケースも報告されていることが考察された。そこで核への移行を抑制した変異型 HuR 発現プラスミドを作製し、pCMV1-AU と Co-transfection したところ、野生型 HuR を過剰発現させた場合と比較し、有意に高い遺伝子発現効率を得ることに成功した。

Wrap53 の相補配列を有するプラスミドを Transfection し、その遺伝子発現効率を検討したところ、予想に反し遺伝子発現効率が 1/100 以上大きく減少した。また Wrap53 はストレスによってその発現量が上昇することが報告されていることから、ストレス存在下において Wrap53 の発現量が上昇し、遺伝子発現効率が向上することを期待し検討を行ったが、遺伝子発現効率の向上は観察されなかった。これは Wrap53 の相補配列は約 200 塩基と長いために、その他の要因によって mRNA の不安定化が起こったものと推察された。

pCMV1-122aT と pCMV1-122aTAU を Huh7 細胞に Transfection し、遺伝子発現効率を検討したところ、pCMV1-122aT では pCMV1 と比較し 80% 以上の遺伝子発現効率の低下が観察された。また pCMV1-122aTAU では、pCMV1-122aT と比較し更なる遺伝子発現効率の低下が観察されたものの、その低下レベルは 5% 以下であった。そこで AU-rich 配列を挿入した効果が十分に得られない理由として、miR-122a の発現量が十分でないと考え、マウス肝臓における遺伝子発現効率を検討することとした。Hydrodynamics 法にてマウスに投与し検討したが、両プラスミド間で遺伝子発現効率に大きな差は観察されなかった。また HuR を免疫沈降により回収し、結合した mRNA を解析したところ、AU-rich 配列を挿入しても HuR への結合が上昇していないことが示された。この原因としては、今回 miR-122a 標的配列と AU-rich 配列は一部重なるように設計したが、miR-122a 標的配列は RISC が結合することから立体障害により HuR が結合できない可能性が示唆された。

上記①～③の検討をしているなかで、Ad

の E4 遺伝子産物が HuR とともに AU-rich 配列を持つ遺伝子の発現を制御し、細胞の癌化などの関与することが報告された。Ad の E4 遺伝子は非増殖型 Ad ベクター作用後においてもわずかながら発現することが報告されている。そこで、E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miRNA の標的配列を有した Ad ベクターを用いて、その細胞毒性発症メカニズムについて検討した。その結果、E4 遺伝子の発現は免疫依存的・非依存的両方の経路による組織障害を促進することが明らかとなった。また E4 遺伝子の発現を抑制することで、Ad ベクターに搭載した遺伝子の発現が劇的に向上することが明らかとなった。一方で新生仔マウスに Ad ベクターを投与した場合には、E4 遺伝子が発現しても組織障害を示さなかった。すなわち、成体と新生児では E4 遺伝子産物に対する生体応答が異なることが示唆された。また上記結果より miRNA の標的配列を挿入することで、Ad 遺伝子の発現を制御可能であることが明らかになったことから、ウイルスの自己増殖に必須の E1 遺伝子ならびに E3 欠損領域に挿入した GFP 遺伝子の 3' 非翻訳領域に血液細胞特異的な miRNA である miR-142-3p の標的配列を挿入することで、血液細胞における Ad ゲノムの複製および GFP の発現を抑制することに成功した。これによって Ad を用いた血液循環癌細胞 (Circulating tumor cells; CTC) の検出系において偽陽性の出現を劇的に抑制することに成功した。

## 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7件)

1. Iizuka S, Sakurai F, Shimizu K, Ohashi K, Nakamura SI, Tachibana M, Mizuguchi H. Evaluation of transduction properties of an adenovirus vector in neonatal mice. *Biomed Res Int.*, in press.
2. Kuno S, Sakurai F, Shimizu K, Matsumura N, Kim S, Watanabe H, Tashiro K, Tachibana M, Yokoi T, Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29:296-304. (2014)
3. Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura S, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Suppression of

leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1:14035. (2014) doi: 10.1038/mtm.2014.35.

4. Sakurai F, Fujiwata T, Mizuguchi H. Development of a detection system for circulating tumor cells in peripheral blood using a next generation conditionally-replicating adenovirus. *Yakugaku Zasshi.* 133:291-6. (2013)
5. Shimizu K, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Development of a novel adenovirus vector exhibiting microRNA-mediated suppression of the leaky expression of adenovirus genes. *Yakugaku Zasshi.* 132:1407-12. (2012)
6. Bennett D, Sakurai F, Shimizu K, Matsui H, Tomita K, Suzuki T, Katayama K, Kawabata K, Mizuguchi H. Further reduction in adenovirus vector-mediated liver transduction without largely affecting transgene expression in target organ by exploiting microRNA-mediated regulation and the Cre-loxP recombination system. *Mol Pharm.* 9:3452-63. (2012) doi: 10.1021/mp300248u.
7. Shimizu K, Sakurai F, Machitani M, Katayama K, Mizuguchi H. Quantitative analysis of the leaky expression of adenovirus genes in cells transduced with a replication-incompetent adenovirus vector. *Mol. Pharm.* 8:1430-5. (2011) doi: 10.1021/mp200121z.

[学会発表](計22件)

1. 櫻井文教、藤原俊義、水口裕之. 次世代型制限増殖アデノウイルスを利用した血中循環癌細胞検出法の開発.(招待講演)日本薬学会第132年会 2012年3月31日(北海道)
2. 櫻井文教. microRNAによる遺伝子発現制御システムを搭載した遺伝子組換えアデノウイルスの開発.(招待講演)生体機能関連化学部会若手の会 2012年7月27-28日(福岡)
3. 櫻井文教. 非コードRNAによる遺伝子発現

制御機構を利用した遺伝子組換えアデノウイルスの開発.(招待講演)関西実験動物研究会第124回研究会 2014年12月5日(京都)

4. 櫻井文教、水口裕之. Post-transcriptional gene silencing機構を利用した高機能型遺伝子組換えアデノウイルスの開発.(招待講演)日本薬学会第135年会 2015年3月25-28日(神戸)

[図書](計3件)

1. 櫻井文教、水口裕之. メディカルドゥ. microRNA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(遺伝子医薬MOOK;臨床・創薬利用が見えてきたmicroRNA)2012、182.
2. 水口裕之、櫻井文教. 医薬ジャーナル社. ウイルスベクターと遺伝子治療(新編ウイルスの今日的意味)2012、101.
3. 櫻井文教、水口裕之. シーエムシー出版. microRNAによる遺伝子発現制御システムを搭載した遺伝子発現ベクター(ドラッグデリバリーシステムの新展開II)2011、47.

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

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

立花 雅史 (TACHIBANA MASASHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

中村紳一朗 (NAKAMURA SHIN-ICHIRO)

滋賀医科大学・動物生命科学センター・准教授

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

清水 かほり (SHIMIZU KAHORI)

大阪大谷大学・薬学部・助教

岡本 小百合 (OKAMOTO SAYURI)

大阪大学・大学院薬学研究科・非常勤職員

細山田 衣里 (HOSOYAMADA ERI)  
大阪大学・大学院薬学研究科・非常勤職員

町谷 充洋 (MACHITANI MITSUHIRO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生

林 晃平 (HAYASHI KOHEI)  
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

飯塚 俊輔 (IIZUKA SYUNSUKE)  
大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生