

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890046

研究課題名（和文） インスレーターを用いた p53 発現ウイルスベクターの開発

研究課題名（英文） Development of p53 expressing viral vector using human insulator.

研究代表者

森 蘭代 (MORI MAYUYO)

東京大学・医学部付属病院・登録研究医

研究者番号：30570452

研究成果の概要（和文）：

本研究ではエピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるインスレーターをウイルスベクターに搭載することで、より効果的な遺伝子発現を示すベクターが得られる可能性がある。ヒトを含めた様々な種のインスレーターを搭載した p53 アデノ随伴ウイルスベクターを作成し、より長期間かつ高い遺伝子発現が可能なベクターを開発することを目的とした。

（

研究成果の概要（英文）：

Efficient and continuous expression of a therapeutic transgene is a key factor for improving the efficacy of gene therapy. Some insulators are known to contribute to continuous high-level expression of a therapeutic transgene. In this study, we modified an adeno-associated virus serotype 2 (AAV2) vector expressing p53 from the mouse muscle creatine kinase gene promoter-enhancer (Ckm).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：

キーワード：p53・インスレーター

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、遺伝子疾患や悪性腫瘍を含めさまざまな病気に対する有効な治療法となる可能性があるが、その臨床研究は 21 世紀に入ってから十分な成果をあげているとは言い難い。その理由として、技術的問題、倫理的問題、安全性、有用性など多くの課題がある。アデノ随伴ウイルスベクター

（recombinant adeno-associated virus vector；rAAV）は、作成効率や導入遺伝子の発現率では劣るものの、野生型のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus；AAV)が非病原性ウイルスであることから安全性が高いと考えられている。また物理的・化学的に安定性が高い。さらに、ベクターにはウイルス固有のたんぱく質をコードする遺伝子が含まれないため、遺伝子導入細胞に対する

免疫反応が惹起されにくい。なおかつ神経細胞や筋細胞などの非分裂細胞を含む様々な臓器に遺伝子導入が出来る。非分裂細胞においては、一度の遺伝子導入によって、年単位という長期間の遺伝子発現が可能であることも大きな利点である。したがって遺伝子治療に適したベクターとなる可能性がある。

rAAV のベクター作成効率および遺伝子導入発現率が低いという欠点を補うために、より効率的かつ持続的な遺伝子発現を目指した研究が行われている。我々はその一つの方法として、エピジェネティックな発現調節配列の一つであるインスレーターの利用を考えた。インスレーターは実験的には次のような2つの活性をもった DNA 配列として定義される。1 つはエンハンサー遮断活性と呼ばれ、インスレーターが遺伝子のプロモーターとそのエンハンサーの間に存在するとき、エンハンサーとプロモーターの相互作用を妨げる作用である。エンハンサーとプロモーターの間がない場合には遺伝子発現を抑制することはない点で、サイレンサーとは区別される。もう1つは位置効果と呼ばれ、インスレーターによって挟まれた遺伝子に、周りのゲノム環境の影響が作用するのを遮断する働きである。遺伝子がヘテロクロマチンに隣接して存在しても、インスレーターの存在により、ヘテロクロマチン構造の周囲への拡大による不活性化が起こらない働きである。これら2つのいずれかの活性を持つ配列をインスレーターと定義しており、現在までに酵母、ショウジョウバエ、脊椎動物などさまざまな生物種で見つかっている。このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるインスレーターをウイルスベクターに搭載することで、クロマチン不活性化あるいはサイレンサーなどの周囲の影響から導入遺伝子を守ることにより効果的な遺伝子発現を

示すベクターが得られる可能性がある。ウイルスベクターの臨床応用においては、インスレーターと結合するヒト細胞因子群との親和性を考慮すると、ヒトインスレーターの応用が望ましいと考えられる。しかしヒト由来のインスレーター配列を用いた研究は少ない。本研究ではヒトを含めた様々な種のインスレーターを搭載した rAAV を作成し、より長期間かつ高い遺伝子発現が可能なベクターを開発することを目的としている。

2. 研究の目的

遺伝子治療はさまざまな病気に対する有効な治療法となる可能性があるが、その臨床研究は十分な成果をあげているとは言い難い。その理由として、技術的問題、倫理的問題、安全性、有用性など多くの課題がある。エピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるインスレーターをウイルスベクターに搭載することで、より効果的な遺伝子発現を示すベクターが得られる可能性がある。本研究ではヒトを含めた様々な種のインスレーターを搭載した p53 アデノ随伴ウイルスベクターを作成し、より長期間かつ高い遺伝子発現が可能なベクターを開発することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では効率的な遺伝子発現を示すベクターの開発は遺伝子治療への応用にきわめて重要である。エピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるインスレーターの利用はひとつの効果的な手段となる可能性がある。これまでトリβグロビン遺伝子のインスレーターをレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターに搭載し、インスレータ

ーが導入遺伝子の発現に与える効果についての報告はある。ウイルスベクターの臨床応用においては、インスレーターと結合するヒト細胞因子群との親和性を考慮して、ヒトインスレーターの応用が望ましい。しかし現在までに、ヒトインスレーターである DHS を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、その機能を動物実験で検証した研究はなかった。我々はこれまでの研究で、ヒトを含めた複数の種由来のインスレーターおよび MAR を搭載した新しい rAAV を作成し、C2C12 細胞あるいはマウス四頭筋への形質導入能を調べた。その結果、DHS および cHS4 により、EF による遺伝子発現が、C2C12 細胞において 2 から 3 倍、マウス四頭筋においてそれぞれ 1000 倍および 100 倍に増強した。マウス筋肉におけるベクターゲノムのコピー数は、インスレーターの有無で変化がなかったことから、DHS および cHS4 は EF からの転写を増強したと考えることが出来る。マウス筋肉における EF からの DHS により遺伝子発現増強レベルは、現在までにみつけられたプロモーター/エンハンサーとして最も効率のよい CMV と比べ遜色なかった。DHS および cHS4 は CMV からの遺伝子発現には影響しなかった。これらの結果は、比較的効率のよくないプロモーターの転写レベルを、ほぼ現在考えられる最大レベルまで DHS が増強したことを示唆する。このことから、我々はまずヒトインスレーターを搭載した p53 発現アデノウイルスベクターを作成する。インスレーターとしては DHS を用いることで、効率のよい遺伝子発現が期待できる。

2) 培養細胞を用いた p53 発現効率の確認

続いて作成した発現ベクターを *in vitro* で培養細胞に感染させ、その発現効率を確認する。培養細胞としては C2C12 を用いる予定である。rAAV (1×10^8) を C2C12 細胞に接種し、

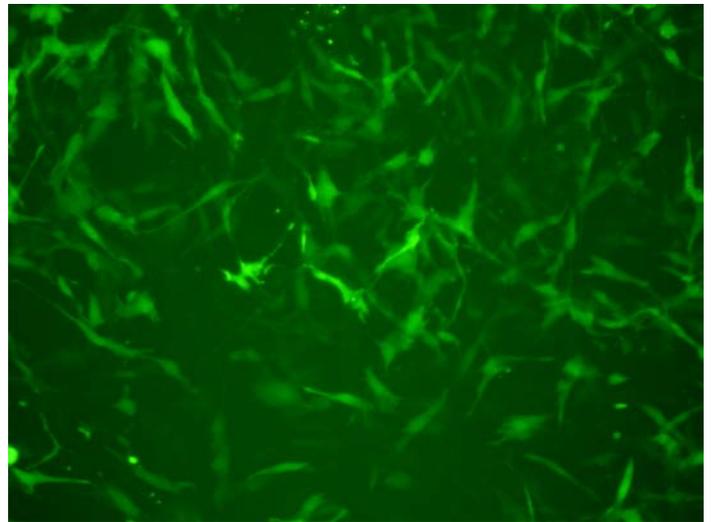
その 72 時間後に細胞を回収し、p53 の遺伝子およびたんぱく発現量を確認する予定である。

4. 研究成果

作成した p53 発現カセットを搭載したアデノ随伴ウイルスベクターのシエマを上記に示す。



この作成したベクターを C2C12 細胞へ投与し、細胞への感染性、また GFP-p53 融合蛋白の発現などを調べた。



C2C12 細胞での GFP-p53 融合蛋白の発現を確認し、ウイルスベクターの動物実験を検討するためにベクターの大量作成を行った。作成した GFP-p53 発現ベクターの精製を行い、必要量のウイルスベクターの準備を行った。今回はウイルスベクターの大量作成で時間を要したため、当初の計画であった Hela 細胞を接種し子宮頸癌モデルマウスに実際の作成したウイルスベクターの投与実験を行うまでに至らなかった。今後の研究継続により動物モデルにおけるインスレーター搭載 p53 発現アデノ随伴ウイルスベクターの効果を実施していくことが望まれる。

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1件)

Murakami I, Takeuchi T, Mori-Uchino M, Mori S, Fujii T, Aoki D, Nakagawa K, Kanda T.

An adeno-associated virus vector efficiently and specifically transduces mouse skeletal muscle. Mol Biotechnol. 査読有、1巻2011、1-10

DOI: 10.1007/s12033-010-9369-z.

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 蘭代 (MORI MAYUYO)

東京大学・医学部附属病院・登録研究医

研究者番号：30570452