

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701021

研究課題名(和文) microRNAを高効率に発現するVA欠失型アデノウイルスベクターの開発

研究課題名(英文) Development of adenovirus vector lacking VA RNA genes for efficient microRNA expression

研究代表者

近藤 小貴 (Kondo, Saki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80451871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアデノウイルスベクター(AdVs)を用いた高効率small RNA発現系の開発を行った。AdVsはvirus-associated RNA (VA)というRNAを発現しているためsmall RNA効果を減弱する可能性があるがVA欠失AdVsの作製は困難であった。我々は高効率VA欠失AdV作製に成功しsmall RNAを発現した結果、VA欠失することで効果が増大した。

本研究により従来のAdVsから微量に発現しているVAはsmall RNAの効果を減弱することが初めて示され、より効率的なsmall RNA発現系として本系は有用性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-coding small RNAs are involved in tumorigenesis. Although the transfection system is used to examine the role of small RNAs, it is not applicable for in vivo studies. Adenovirus vector (AdV) is used to deliver small RNAs including short-hairpin RNA (shRNA) and microRNA (miRNA). However, this vector expresses virus-associated RNAs (VA RNAs). Since VA RNAs are processed using the same pathway as shRNAs, a question arises as to whether VA RNAs influence the RNAi strategy when this vector is used. It has not been tested because VA-deleted AdVs have been difficult to develop.

We established a method for VA-deleted AdV production. We compared the activities of shRNAs against hepatitis C Virus (HCV) expressed from VA-deleted AdVs with conventional AdVs. The VA-deleted AdVs inhibited HCV production much more efficiently. Therefore, VA-deleted AdVs were more effective than the current AdVs for shRNA downregulation, probably because of no competition between VA RNAs and the shRNAs.

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：microRNA ウイルスベクター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) microRNA (miRNA)はタンパク質をコードしない non-coding small RNA であり、動物細胞における全タンパク質のおよそ30%の発現制御に関わっている。疾患特異的に発現が変動する miRNA も多数報告されており、近年がん疾患のマーカーや治療のターゲットとしても注目されている。miRNA の機能解析は合成 RNA を直接細胞へ導入する方法が簡便であるが、我々はより低コストで定量的な方法としてアデノウイルスベクター(AdV)を用いた miRNA 導入法に着目した。

(2) AdV は多種多様な細胞へ効率的に遺伝子を導入することが可能であるが、ウイルス RNA として virus-associated RNA (VA RNA)が常に発現している。VA RNA は細胞内 miRNA 生成過程に必須な RNAi 機構を介してウイルス由来 miRNA としてプロセスされるため、VA RNA を発現する AdV を用いて目的 miRNA を導入すると miRNA の生成を競合拮抗する可能性が考えられた。しかし VA RNA 領域を欠失した AdV の作製は今まで困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、低コストで定量的な方法として AdV による遺伝子導入法を確立することを目的として、今まで作製が困難であった VA RNA 欠失 AdV の効率的な作製法を開発し、miRNA など small RNA 導入ツールとしての VA 欠失 AdV の評価を行う。従来の AdV と比較検討を行うことで VA RNA の miRNA 生成に対する競合拮抗の有無を確認し、高効率 miRNA 導入法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) VA 欠失 AdV 作製のため、VA RNA 発現 293 細胞株を複数樹立し、その中で最も VA RNA 発現量の多い細胞株の同定を行った。AdV 作製のために VA RNA 領域を欠失したコスミドカセットの構築を行った。一方で部位特異的組換え酵素 FLP を応用した作製法の開発に向け、組換え酵素の標的配列 FRT で VA RNA 領域を挟んだ AdV ゲノムを持つコスミドカセットの作製を行った。これら 2 種類の細胞株を用いてそれぞれ VA 欠失 AdV の作製を行った。

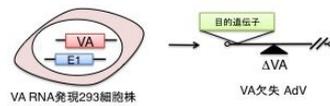
(2) miRNA と同様に細胞内 RNAi 機構を介してプロセスされる short-hairpin RNA (shRNA) 発現単位を複数構築し、(1)で作製したコスミドカセットにクローニングした。これらのコスミド DNA を用いて(1)で得られた VA 欠失 AdV 作製法により shRNA 発現 VA 欠失 AdV 及び従来の VA 保持型 AdV を作製した。shRNA 活性の比較には C 型肝炎ウイルス (HCV) のレプリコン細胞株を用い、定量的 PCR (qPCR)により細胞内 HCV ゲノムを測定し評価を行った。

4. 研究成果

(1) VA 欠失 AdV 作製に必要な細胞株の検出を行うために 2 種類の VA RNA (VAI、VAII) に特異的な qPCR 用 primer/probe の作成を行った。VA RNA は約 160 塩基の非常に短い RNA であるが、それぞれの VA RNA に対して特異性、感度共に高い primer/probe の作成に成功した。これらを用いて VA RNA 発現 293 細胞株の解析を行った。その過程で VA RNA の高発現細胞株の樹立が困難であることを見いだしたが、得られた細胞株のうち VA RNA 発現量の高い細胞株を用いることで VA 欠失 AdV 作製に成功した。また、作製した複数の VA 欠失 AdV を用いて発現解析を行った結果、VA 欠失 AdV の目的遺伝子発現量は従来の AdV と同等であることを確認していることから、VA RNA を欠失しても AdV として十分に機能すると考えられた。

(2) 一方で、VA RNA 発現 293 細胞株を用いた方法では AdV に挿入した目的遺伝子の種類によっては VA 欠失 AdV の作製が困難であった。その理由としては細胞株から発現する VA RNA 量が AdV から発現する量よりも少なかったためではないかと考えた (Fig.1)。

1) VA RNA発現293細胞株を用いたVA欠失AdV作製法



2) 定量的PCRを用いたVAI、VAII量の比較

	VAI	VAII
VA保持型AdV	1	1
VA RNA発現 293細胞株	1/550	1/720 → 十分でない?

Figure 1. VA RNA発現293細胞株を用いた検討

そこで AdV 生成時に VA RNA が AdV ゲノム上から供給されるように通常の方法で AdV 作製後、ベクターゲノムから VA RNA 領域を欠失することで VA 欠失 AdV の作製を試みた (Fig. 2)。

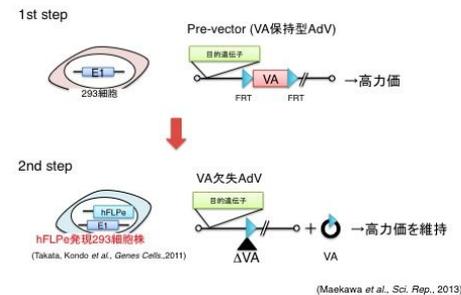


Figure 2. 部位特異的組換え酵素を用いたVA欠失AdV作製法

まず pre-vector として、ベクターゲノム上の VA RNA 領域を部位特異的組換え酵素 FLP の標的配列 FRT で挟んだ AdV を常法にて作製し、得られた pre-vector を FLP 発現 293 細胞

胞へ感染、増幅することで FLP による FRT 間の組換えの結果、VA RNA 領域が切り出され、VA 欠失 AdV が効率的かつ高力価で作製が可能であった。我々はヒト型、温度安定型 FLP (hFLPe) (Kondo *et al.*, *JMB*, 2009) を高発現する 293 細胞株の樹立に成功しているため (Takata *et al.*, *Gen. Cel.*, 2011)、細胞あたり 100,000 コピーまで増幅する AdV ゲノムから効率的に VA RNA を欠失することが可能であった。

(3) そこで VA 欠失 AdV を用いて shRNA を発現し、shRNA の活性を従来の AdV から発現する shRNA と比較することで、VA RNA による細胞内 RNAi 機構の競合拮抗 (Fig.3) について検討を行った。

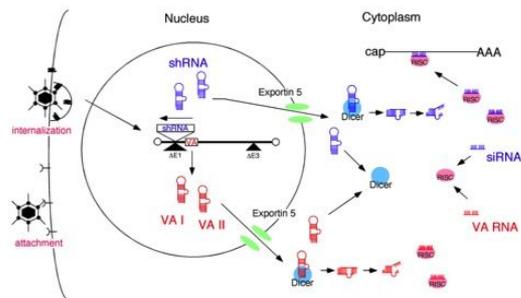


Figure 3. VA RNAはshRNAの成熟化を阻害する？

C 型肝炎ウイルス (HCV) は RNA ウイルスであり、HCV ゲノムを標的とした shRNA は HCV 治療に応用が期待されている。そこで我々は HCV RNA ゲノムに対する shRNA を複数設計した。このうち効果が認められた shRNA (sh277) と既に効果が報告されている shRNA (sh331) を発現する AdV を VA 欠失型、従来型でそれぞれ作製した。各々の AdV を HCV レプリコン細胞へ感染し、shRNA による HCV ゲノム複製の抑制効果を HCV ゲノムに対する qPCR により測定した。その結果、検討を行った 2 種類の shRNA どちらにおいても従来型 AdV (FG) を用いた場合に比べ VA 欠失型 (VA) を用いた方が優位に shRNA の効果が高く、VA 欠失 AdV は従来の AdV の 1/5 量で同じ shRNA 効果が得られることを確認した (Fig.4) (Pei *et al.*, *Sci. Rep.*, 2013)。

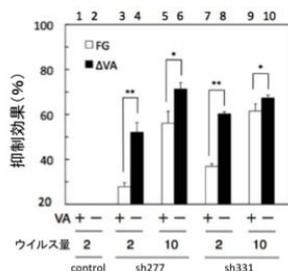


Figure 4. AdVから発現したshRNAによるHCVゲノム複製の抑制効果

これは大量の AdV が必要な動物実験において非常に有用性が高いだけでなく、全ての実験において AdV 感染による影響を最小限にするためにも意義があると考えられる。

VA RNA はその二次構造が shRNA や pre-miRNA (miRNA の前駆体) と極めて類似しており、shRNA や miRNA の成熟化と同様の機構を介して miRNA として機能することが知られているが、今回我々は初めて AdV から発現している VA RNA が shRNA 機能を阻害することを明らかにした。本研究により VA 欠失 AdV が shRNA や miRNA 発現ベクターとして有用性が高いことが示されただけでなく、従来の VA 保持型 AdV により細胞内 miRNA 機構も攪乱される可能性が強く示唆されたことから、VA 欠失 AdV は安全性の面から有用性が高いベクターであると考えられた。

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)

Aya maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Hiromitsu Fukuda, Yohei Ono, Saki Kondo, Izumu Saito and Yumi Kanegae. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Reports*, 査読有, 3 巻, 2013
doi: 10.1038/srep01136

Zheng Pei, Guoli Shi, Saki Kondo, Masahiko Ito, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Izumu Saito, Tetsuro Suzuki and Yumi Kanegae. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNAs expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication, *Scientific Reports*, 査読有, 3 巻, 2013
doi: 10.1038/srep03575

[学会発表](計8件)

近藤小貴、齋藤泉、Nic Jones. 第18回日本遺伝子治療学会, 2012

近藤小貴、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. 第17回日本癌学会, 2012

Saki Kondo, Yumi Kanegae, Nic Jones, Izumu Saito. The 20th European Society of Gene and Cell Therapy meeting, 2012

近藤小貴、前川文、裴崢、鈴木まりこ、齋藤泉、鐘ヶ江裕美. 第19回日本遺伝子治療学会, 2013

近藤小貴、齋藤泉、鐘ヶ江裕美. 第72回日本癌学会, 2013

Saki Kondo, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae and Izumu Saito. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013

近藤小貴、前川文、裴崢、鈴木まりこ、
鐘ヶ江裕美、齋藤泉．第61回日本ウイ
ルス学会，2013

近藤小貴、前川文、裴崢、鈴木まりこ、
鐘ヶ江裕美、齋藤泉．第36回日本分子
生物学会，2013

〔図書〕(計2件)

近藤小貴、他、日本ウイルス学会、アデ
ノウイルスベクターの最近の進展:VA欠
失ベクターを中心に、第63巻、155-164、
2013

近藤小貴、他、羊土社、実はもっと簡単
で使いやすいアデノウイルスベクター、
第32巻、103-108、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 小貴 (Saki Kondo)
東京大学医科学研究所、遺伝子解析施設、
助教

研究者番号：80451871