

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670176

研究課題名(和文)新しい概念に基づく遺伝子操作マウス創出基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of genetically engineered mouse creation foundation based on a new concept

研究代表者

米満 吉和 (YONEMITSU, YOSHIKAZU)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40315065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、センダイウイルスの組換え系(rSeV)の研究を進め、この世界初のベクターによる臨床研究を実施してきた。また、最近の基盤技術研究の結果、少なくともいくつかの分化誘導系では、rSeVの感染そのものは細胞分化へ影響しないことが明らかとなった。更に、rSeV感染ES細胞より、臓器発生に異常な表現系を示すことなく、個体が発生することが明らかとなった。しかしながら、生後数時間で全個体が死亡した。結果、RNAヘリカーゼのノックダウンでは長期生存を認められず、RNAヘリカーゼ以外の何らかの要因が長期生存に関連していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells (ES cells) are derived from the inner cell mass of blastocysts (early embryos). These cells are pluripotent, which means that they can develop into almost any type of tissue. ES cells are used for more precise modifications of the mouse genome. We have previously developed Sendai virus (SeV) vectors that replicate in the form of negative-sense single-stranded RNA in the cytoplasm of infected cells and do not go through a DNA phase. Here we report that the SeV-mediated gene transfer into murine ES cells was very efficient and stable. This technique makes it possible to insert as well as remove or modify DNA sequences. Knock-out, knock-in and conditional mutant mice can be produced with this method.

研究分野：遺伝子治療学・血管病態学

キーワード：遺伝子操作マウス センダイウイルスベクター RNAヘリカーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、センダイウイルスの組換え系(rSeV)の研究を進め、この世界初のベクターによる臨床研究を実施してきた。また、最近の基盤技術研究の結果、少なくともいくつかの分化誘導系では、rSeVの感染そのものは細胞分化へ影響しないことが明らかとなった。更に、rSeV感染ES細胞より、臓器発生に異常な表現系を示すことなく、個体が発生することが明らかとなった。これは即ち、細胞質で遺伝子を発現するrSeVに種々の外来遺伝子を搭載することにより、簡便かつ高効率に野生型と全く同じ染色体遺伝子構造を持つトランスジェニックマウス(以下、rSeV-TGマウス)やノックダウンマウスを作成できることを意味する。

### 2. 研究の目的

本研究では、rSeV-TGマウス作成法を体系化・プロトコール化することにより、全く新しい概念の遺伝子操作マウスの創出技術を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ベクターの作成方法

センダイウイルス転写ユニットを作製するために、T7プロモーター、プラス鎖RNAが転写されるように設計されたセンダイウイルスcDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持するDNAを、pUC18プラスミドに挿入し、センダイウイルスゲノムプラス鎖のcDNAを含むプラスミドpSeV(+)を構築した。pSeV(+)をベースに外来目的遺伝子の発現が出来るように、pSeV(+)のSeVリーダー配列とNP構造遺伝子の間にNotI制限酵素認識部位を含む18塩基のクロニングサイトを挿入したSeVゲノムcDNAプラスミドpSeV18+b(+)を作製。さらに、センダイウイルス(SeV)全長ゲノムcDNA、PCR法を用いてpSeV18+b(+)より各遺伝子

(M,F,HN)を除いて連結し、各欠失型SeVゲノムcDNAを構築(dFではFのみ欠損、3欠損では全て)。さらに、pSeV/dF(pSeV/dFdMdHN)ベクターの遺伝子欠失部位に供与核酸(GFP遺伝子)を挿入し、ベクターテンプレートpSeV/dF-GFP、pSeV/dMdFdHNを作製。

pSeV/dF-GFPからrSeV/dF-GFPを作成するために、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクチニアウイルス(vTF7-3)をサル腎臓由来LLC-MK2細胞に感染後、pSeV/dF-GFPとT7プロモータ支配下でNP, P, L,及びF(3欠損ではさらにM, HN)タンパク質を発現するプラスミドを同時にLLC-MK2細胞にトランスフェクションすることにより

rSeV/dF-GFP(or dMdFdHN-GFP)ベクターシードを作製し、欠失しているF(or F,M,HN)遺伝子産物はウイルス感染に必須であるため、SeV-Fタンパク質を継続的に発現しベクターにトランスに供給するパッケージング細胞(LLC-MK2/F/Ad or LLC-MK2/M/F/HN/Ad)を作出して最終産物rSeV/dF-GFPor rSeV/dMdFdHN-GFPを作成する。

#### ②rSeV(RIG-IC)/tsdF-GFPの作成

rSeV/dFに細胞傷害性を減弱させる変異を導入して作製したrSeV/tsdF-GFPにRIG-IのドミナントネガティブであるRIG-IC遺伝子を導入し、pSeV(RIG-IC)/TsdF-GFPを作製した。ついで、前記のようにトランスフェクションにより、ベクターシードを作製し、LLC-MK2/F/Adを用いて拡大培養を行いベクターの作製を行った。

#### (2) RNAヘリカーゼのノックダウン

①RIG-IのドミナントネガティブであるRIG-ICを発現するベクターを作成(以後、rSeV(RIG-IC)/TsdF-GFP)

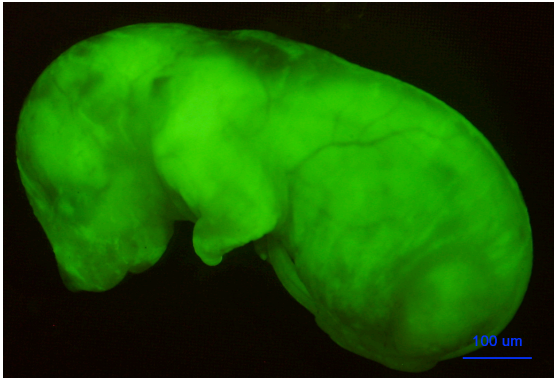
②ES細胞にrSeV(RIG-IC)/TsdF-GFPをMOI=50で1時間感染させ、その後T25フラスコ内で培養。GFP陽性ES細胞をピックアップし、Blastocyst injection実施し、仮母マウス子宮内に胚盤胞を移入。

### 4. 研究成果

(1) 使用するベクターシステムの最適化  
特に、rSeV/dMdFdHN(ウイルス膜を構成する膜蛋白遺伝子全てを欠損する)については、ベクター作成から回収においてタイターが低い場合、製造法の仔細を検討した結果、生産開始時に使用するシードベクターの量を調整し、培養温度及び培養時間を延長することによりタイターの高いベクター作成が可能となった。

#### (2) RNAヘリカーゼのノックダウン

ES細胞にrSeV(RIG-IC)/TsdF-GFPを感染させ、GFP陽性ES細胞から個体発生したGFP陽性マウスの作成に成功した。体表全体、血液、臓器を含む全てで異常のない個体発生が認められた(図)。しかしながら、生後数時間で全個体が死亡した。結果、RNAヘリカーゼのノックダウンでは長期生存を認められず、RNAヘリカーゼ以外の何らかの要因が長期生存に関連していると考えられた。



図：GFP 陽性 ES 細胞から個体発生した GFP 陽性マウス

## 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 11 件)

①Yonemitsu Y, et.al,

DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: Phase I/IIa, open-label, dose escalation clinical trial. *Molecular Therapy* 21: 707-714, 2013. (査読有)

②Saito S, Harada Y, ..., Yonemitsu Y.

*Ex vivo* generation of highly purified and activated NK cells from human peripheral blood. *Human Gene Therapy Method* 24: 241-252, 2013 (査読有)

③Kobayashi M, ..., Yonemitsu Y.

Prognostic factors related to add-on dendritic cell vaccines on patients with inoperable pancreatic cancer receiving chemotherapy: a multicenter analysis. (査読有)

④Kyuragi R, ..., Yonemitsu Y.

BubR1 insufficiency impairs vascular smooth muscle cell proliferation and inhibits neointimal hyperplasia in mice. *Arterioscler Theromb Vasc Biol* 35:341-347, 2015. (査読有)

⑤Kasagi Y, Harada Y, ..., Yonemitsu Y.

Peritoneal dissemination requires an Sp1-dependent CXCR4/CXCL12 signaling axis and extracellular matrix-directed spheroid formation. *Cancer Research* 76:347-57, 2016. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

①米満吉和

教育講演 3 :

「ブランクバイオロジーから動脈硬化診療へつなぐトランスレーショナルリサーチ」  
第 13 回 動脈硬化学会教育フォーラム 2013. 2.3. (京都)

②米満吉和

教育講演 2 :

「ナノ・サージェリー：外科視点からのトランスレーショナルリサーチ」  
第 113 回日本外科学会定期学術総会 2013. 4.11-13. (福岡)

③米満吉和

イブニングセミナー :

「FGF-2 の生理活性を利用した RNA バイオ医薬品の開発：基礎と臨床」  
第 5 回日本創傷治癒学会総会 2013. 7.11. (京都)

④米満吉和

シンポジウム 7 「血管再生研究の最前線」  
「血管再生治療は PAD の clinical endpoint を達成できるか？」  
第 21 回日本血管生物医学会 2013. 9.26-28. (大阪)

⑤米満吉和

パネルディスカッション「血管新生～基礎から臨床応用まで」  
講演「血管再生は PAD のエンドポイントを達成できるか？」  
第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2014. 9.5. (神戸)

⑥米満吉和

シンポジウム  
講演「虚血肢治療用遺伝子治療製剤 DVC1-0101 の開発」  
第 88 回日本薬理学会年会 2015. 3.18-20. (名古屋)

⑦米満吉和

パネルディスカッション「創薬・医療機器創成と産学連携」  
講演「遺伝子・細胞治療領域における産学連携」  
第 29 回日本医学会総会 2015 2015. 4.11-13. (京都)

⑧米満吉和

シンポジウム 4 「iPS 細胞とベクターテクノロジー」  
講演「Overview: recent advances on the vector technology of iPS cell research」  
第 21 回日本遺伝子治療学会総会 2015. 7.24-26. (大阪)

[図書] (計 6 件)

①田中理子、米満吉和  
書籍『遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発』  
第4節 血管新生遺伝子治療  
技術情報協会編 pp310-314, 2014

②松本拓也、米満吉和  
書籍『遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発』  
第3節 遺伝子治療薬の臨床試験デザインの考え方  
技術情報協会編 pp422-424, 2014.

③Tanaka M, Taketomi K, Yonemitsu Y.  
Therapeutic angiogenesis: recent and future prospects of gene therapy in peripheral artery disease.  
*Current Gene Therapy* 14:300-308, 2014.

④赤司浩一、米満吉和  
Round Table Meeting 「血管新生阻害研究の進歩」がん分子標的治療 11:147-154, 2013.

⑤田中理子、米満吉和  
循環器内科「bFGFによる遺伝子治療の臨床」科学評論社 76:460-465, 2014.

⑥米満 吉和  
医療イノベーション創出ネットワークの現状と展望  
「高性能国産新規 RNA ウイルスベクターによる虚血肢治療製剤の開発」  
臨床評価刊行会 臨床評価 43 (sup.XXXV):241-244, 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://lits-tr.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
米満 吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu)  
九州大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：40315065

(2) 研究分担者  
原田 結 (HRADA, Yui)  
九州大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：00608507

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：