

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14927

研究課題名（和文）網羅的変異導入と遺伝子発現解析による治療用ヘルペスウイルスベクターの開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic herpes simple virus vector through comprehensive mutagenesis and gene expression profiling

研究代表者

塩澤 裕介（Shiozawa, Yusuke）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60801511

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）：単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターを感染させた培養細胞株のトランスクリプトーム解析の結果、感染後24時間まではUL39遺伝子領域で転写活性が高いこと、およびLAT領域と呼ばれるゲノム領域で転写活性が持続的に保たれることが明らかになった。これを受け、LAT領域またはUL39領域にGatewayカセットを有するHSVベクターを作製した。LAT領域はHSVゲノムの反復配列中にあるため、Gatewayカセットを2コピー挿入できた。また、1回の組換え反応で一度に2コピーの遺伝子を挿入する方法を確立した。持続発現用のベクターは従来のものよりも生物学的力価が高い傾向にあり、遺伝子導入効率も高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の治療では根治困難な疾病を克服するための新規治療法としてウイルスの医療実装が研究されている。遺伝子治療はその代表例であり、治療遺伝子を標的細胞に送達するためのベクターとしてウイルスが広く用いられている。単純ヘルペスウイルスベクターは大きな遺伝子も搭載可能であるという利点を有しているが、毒性が高いという問題がある。そのため、ウイルスの毒性を低減させる処理が必要になるが、これにより治療遺伝子の発現量が低下してしまう。本研究は、治療標的とする細胞で遺伝子の発現が保たれ、治療遺伝子を持続的に発現できるベクターゲノムの領域を解明した。

研究成果の概要（英文）：Non-toxic herpes simplex virus (HSV) vectors were infected with cell lines, followed by extraction of RNA. RNA sequencing revealed that transcriptional activity is high in the UL39 region up to 24 hours after infection and is sustained in a genomic region called the LAT locus. Based on these findings, we inserted Gateway cassettes into the LAT or UL39 regions of the HSV vector. Since the LAT locus is located in the repetitive sequence of the HSV genome, two copies of the Gateway cassette were able to be inserted. We also established a method to simultaneously insert two copies of the transgene at a time in a single recombination reaction. Vectors for sustained expression tended to have higher biological titer and gene transfer efficiency than conventional ones.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

従来の治療では根治困難な疾病を克服するための新規治療法としてウイルスの医療実装が研究されている。遺伝子治療はその代表例であり、治療遺伝子を標的細胞に送達するためのベクターとしてウイルスを用いる。HSV ベクターは、表1に示す通り遺伝子治療に適した多くの利点を有している。本ベクターを遺伝子治療に応用する上では、細胞毒性の低減と高い治療効果の両立が求められる。野生型の HSV は細胞毒性が高く、標的とする細胞・組織の傷害を防ぐためには HSV ゲノムから毒性遺伝子を除く必要がある (図1)。こうした遺伝子改変はベクターの安全性を高める一方、大半のベクターゲノム領域からの転写活性を低下させ、治療遺伝子発現のサイレンシングを招く。そのため、細胞毒性と治療遺伝子の発現抑制の双方を最小限にする遺伝子改変法が必要になる。さらに、治療遺伝子を挿入する領域も重要である。HSV ゲノムの転写活性はゲノム領域ごと、感染細胞種ごとに厳密に制御されている。治療標的とする細胞で転写活性が保たれ、治療遺伝子を持続的に発現できる HSV ゲノム領域の解明が求められる。

表1 HSVベクターを医療応用する上での利点

1. 幅広い種類の細胞に感染可能である
2. ゲノムが大きく(約150 kb)、複数かつ巨大な遺伝子を搭載できる
3. 宿主ゲノムへの組み込みが起こらない
4. 潜伏感染というライフサイクルを持ち長期的な遺伝子発現が見込める
5. 自然宿主のヒト以外では拡がらないため、環境への影響がない
6. 感染経路が接触感染のみで体外ですぐに不活化される

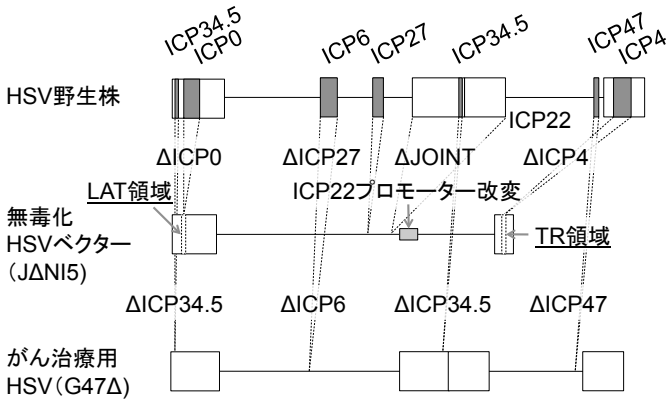


図1 HSVベクターに加えられる遺伝子改変の例

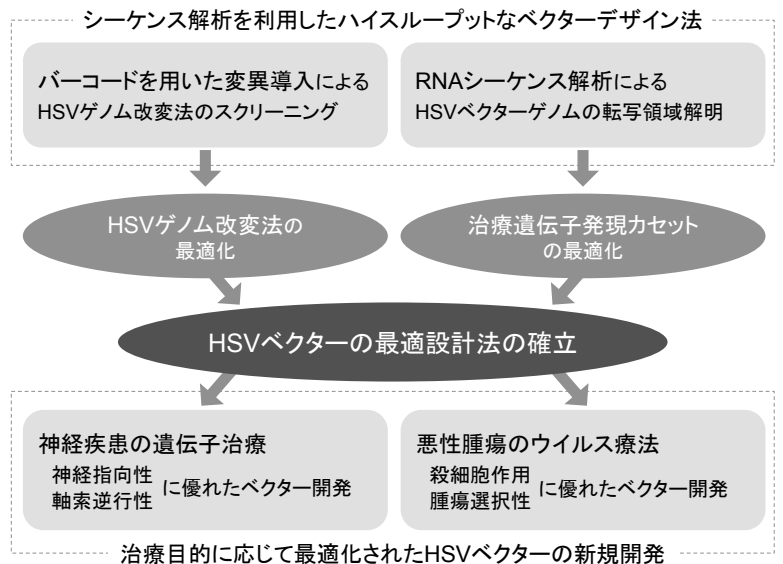


図2 研究計画のアウトライン

2. 研究の目的

本研究の目的は、治療目的に応じて最適な遺伝子改変を加えた新規 HSV ベクターを開発することである。具体的には、以下の二点を達成することを目指す (図2)。

(1) HSV ベクター設計のハイスループットスクリーニング法の開発

HSV ベクターの最適設計を実現するため、遺伝子改変と治療遺伝子挿入部位の二点についての高効率スクリーニング法を開発する。前者については、遺伝子改変時に固有のバーコードを組み込み、変異との間に一対一の対応をつける。こうして作製したウイルスライブラリを標的細胞に感染させ、バーコードを定量する。後者については、HSV ベクター感染細胞の RNA シーケンス解析により HSV ゲノム領域からの転写活性を網羅的に解析する。

(2) 治療目的に応じた HSV ベクターの開発

上記スクリーニング法を用い、神経疾患の遺伝子治療用ベクターを作製する。野生型 HSV は高い神経指向性を持ち、また、末梢神経細胞に感染して軸索を逆行し、神経節細胞に潜伏感染する。軸索を逆行する能力を保っている HSV ベクターは、末梢からの投与によっても高い治療効果を発揮することが期待される。本研究では、無毒化に伴う遺伝子改変後も標的神経領域への高い指向性が維持される、あるいは向上する変異を同定する。また、腫瘍溶解性ウイルスとして、がん細胞感染時のみ高い自己複製能と殺細胞作用を持つウイルス株を作製する。

### 3. 研究の方法

#### (1) HSV ベクターの無毒化

HSV ベクターの毒性を低減するための遺伝子改変を行った。HSV ゲノム中の毒性遺伝子として、*ICP27*、*ICP4*、*ICP0*、*ICP22* が知られている (図 1)。このうち、*ICP27* は遺伝子全体を欠失させ、*ICP22* はプロモーターを改変することで、ベクター産生時には発現が保たれるが、ベクターにより遺伝子を導入した細胞では遺伝子発現がなくなるようにした。*ICP4* と *ICP0* は反復配列に位置しているため、HSV ゲノム中に 2 コピーずつ存在する (図 1)。我々が過去に行った遺伝子改変では、まず *junction* 領域全体を削除し、残った 1 コピーの *ICP4* と *ICP0* を欠失させていた (図 3)。このアプローチは、*junction* 領域がなくなった分だけベクターに搭載できる遺伝子のサイズが大きくなることや、相同配列がなくなるためベクターゲノム内での組換えが起きにくくなる、といった利点がある。しかし、*junction* 領域には多くの non-coding RNA が含まれており、HSV ゲノムからの転写活性を維持する作用などが知られている。そのため、*junction* 領域全体を欠失させることで、治療遺伝子の発現低下が懸念された。そこで本研究では、*junction* 領域全体ではなく *ICP4* と *ICP0* のみを欠失させることで、ベクターゲノムの改変を最低限に止めるようにした。*ICP47* は細胞によるウイルス抗原の提示を阻害する作用があり、ベクターに対する免疫応答を減弱する可能性があるため、本研究では残すこととした (図 3)。これらの改変を、1) Red/ET recombination system による大腸菌内での組換えと、2) HSV ベクター感染細胞内での相同組換え、により順次行った。

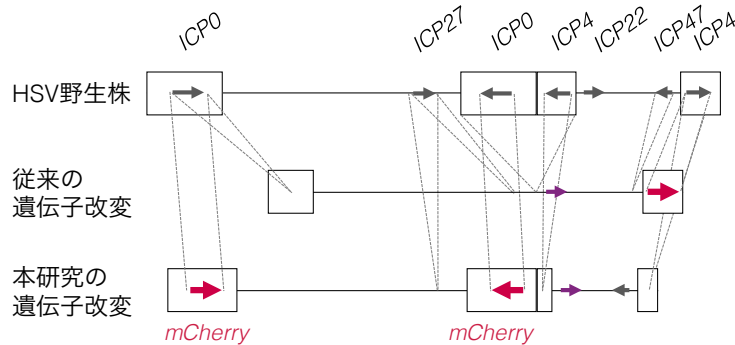


図 3 HSV ゲノムにおける毒性遺伝子の欠失改変

#### (2) HSV ベクター感染細胞のトランスクリプトーム解析

次に、神経系と肝臓を標的とした新規 HSV ベクターを開発するため、*in vitro* での検討として、神経芽腫由来の細胞株 IMR32 と肝細胞がん細胞株の HepG2 に HSV ベクターを感染させた (図 4)。IMR32 に対してはレチノイン酸処理を行い、ニューロンへの分化を促した後に HSV ベクターを感染させた (図 4 B)。感染後の細胞から経時的に RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を行った。

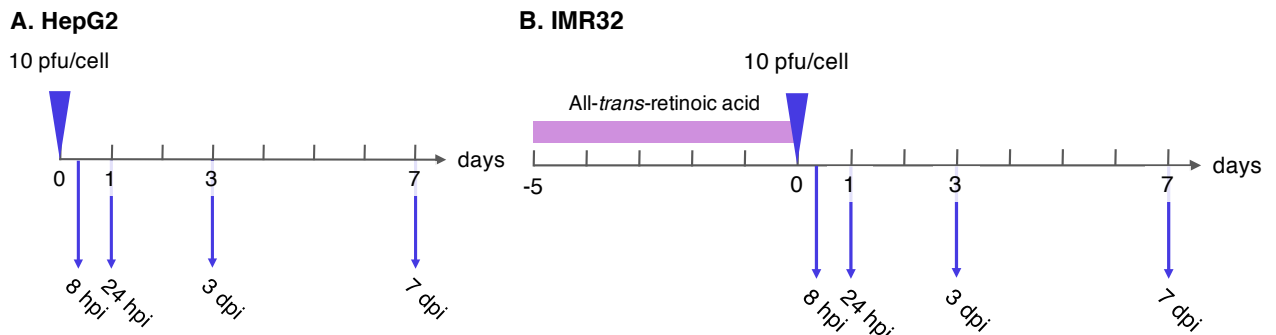


図 4 HSV ベクターによる培養細胞株への遺伝子導入

HSV ベクターを培養細胞株 (A. HepG2、B. IMR32) に MOI 10 pfu/cell で感染させ、その 8 時間後・24 時間後・3 日後・7 日後に RNA を採取した。IMR32 ではベクター感染の 5 日前からレチノイン酸による分化誘導を行った。hpi: hours post infection、dpi: days post infection

### (3) 転写活性が高い領域に Gateway カセットを有する HSV ベクターの作製

上記の解析により、一過性発現には *UL39* 遺伝子領域が、持続発現には *LAT* 領域がそれぞれ適していると考えられた。そこで、これらの領域に治療遺伝子挿入部位として Gateway® カセットを組み込むこととした。Gateway® カセットを用いることで挿入遺伝子の交換が容易になり、HSV ゲノム改変の煩雑さを避けることができる。

まず、無毒化した HSV ベクターから *mCherry* 遺伝子を除去した。次に、Red/ET recombination system による組換え反応により、*UL39* 遺伝子領域または *LAT* 領域に Gateway® カセットを挿入した。*LAT* 領域は *TRL*・*IRL* に 1 コピーずつ、計 2 コピーあるため、2 コピー目の *LAT* 領域には別の Gateway® カセットを挿入する必要がある。そこで、positive selection marker としてカナマイシン耐性遺伝子を、negative selection marker として *sacB* 遺伝子を持つ Gateway® カセットを作製し、2 コピー目の *LAT* 領域に挿入した。

最後に、これらの Gateway® カセットに DNA 断片を組み込めることを確認した。マーカー遺伝子として *AcGFP* 遺伝子を挿入することとし、CAG プロモーター支配下に *AcGFP* 遺伝子をコードするプラスミドを作製した。次に、このプラスミドのプロモーターの上流とポリ A シグナルの下流にそれぞれ DNA 組換え配列をサブクローニングした。これをテンプレートとし、LR クロナーゼによるベクターとの組換え反応を行った。

## 4. 研究成果

### (1) HSV ベクターの無毒化

Red/ET recombination system による大腸菌内での組換えと、HSV ベクター感染細胞内での相同組換えにより、*ICP27*、*ICP4*、*ICP0* の欠失改変を行った。また、*ICP22* はプロモーターをチミジンキナーゼプロモーターに置換した。

### (2) HSV ベクター感染細胞のトランスクリプトーム解析

HSV ベクターを感染させた培養細胞株のトランスクリプトーム解析の結果、IMR32 と HepG2 の双方において、感染後 24 時間までは HSV ベクターゲノム内の *UL39* 遺伝子領域の転写活性が高いことが分かった (図 5・6)。しかし、この領域の転写活性は感染後 3 日目以降に急激に低下していった。一方、同じく HSV ベクターゲノム内の *LAT* 領域の転写活性は、感染直後は *UL39* 遺伝子領域より低い、持続的に保たれる傾向があり、特に IMR32 で高く保たれていた (図 6)。

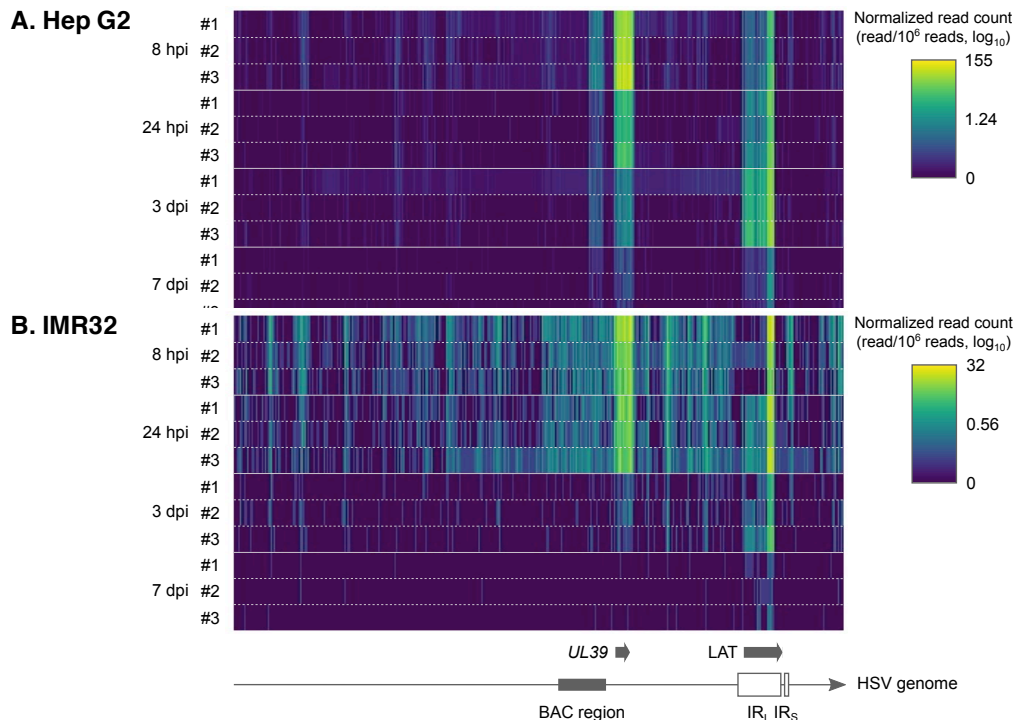


図 5 培養細胞株での HSV ベクターの遺伝子発現プロファイル

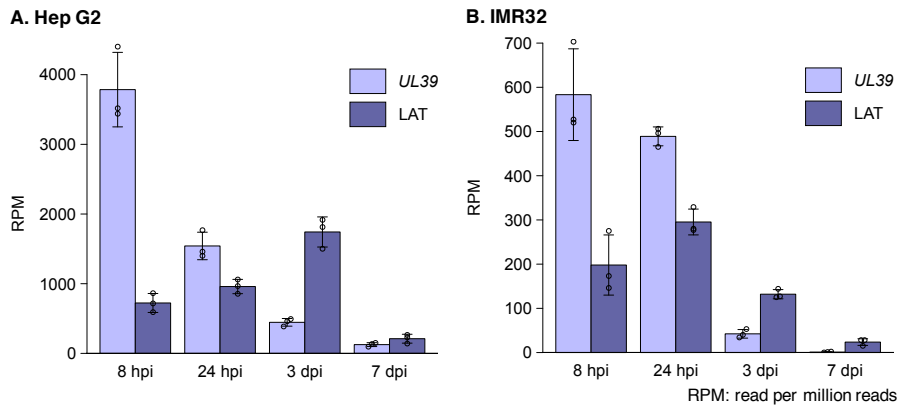


図6 *UL39* 遺伝子領域と *LAT* 領域由来の遺伝子発現の経時的変化  
培養細胞株 (A. HepG2、B. IMR32) における *UL39* 遺伝子領域と *LAT* 領域由来の遺伝子発現量の経時的変化を示す。エラーバーは標準偏差を表す。

### (3) 転写活性が高い領域に Gateway カセットを有する HSV ベクターの作製

まず、*mCherry* 遺伝子の除去と Gateway®カセットの挿入を行った。これにより、*UL39* 遺伝子領域または *LAT* 領域に Gateway®カセットを有する HSV ベクターを作製することができた。ここでは簡単のため、前者を *UL39* ベクター、後者を *LAT* ベクターと呼ぶ。

次に、これらの Gateway®カセットに DNA 断片を組み込めることを確認した。その結果、いずれのベクターにおいても問題なく *AcGFP* 遺伝子を挿入できることを確認した。*LAT* ベクターは Gateway®カセットを 2 コピー有しているが、一回の組換え反応により 2 つのカセットに同時に *AcGFP* 遺伝子を挿入することに成功した。

従来の HSV ベクターと本研究で作製した HSV ベクターの比較を図 7 に示す。本研究では *junction* 領域を欠失させていないため、作製したベクターは 2 コピーの *LAT* 領域を持つ。そのため、*LAT* ベクターでは治療遺伝子挿入用の Gateway®カセットを 2 コピー置くことができた。これにより、従来の HSV ベクターと比べて 2 倍の遺伝子発現量が期待できる。さらに、*junction* 領域にコードされる non-coding RNA も残っている。これらの non-coding RNA は HSV ゲノムからの転写活性を維持する作用などが知られているため、これが欠失していないことも治療遺伝子の発現に有利に働くことが期待される。1 回の組換え反応で一度に 2 コピーの遺伝子を挿入できるため、ベクター中の治療遺伝子を交換する際の煩雑さもない。このように、本研究で作製した HSV ベクターは、従来のものと比べて多くの利点を有する可能性がある。今後はこれらのベクターの性能評価を進め、論文作成へと進む予定である。

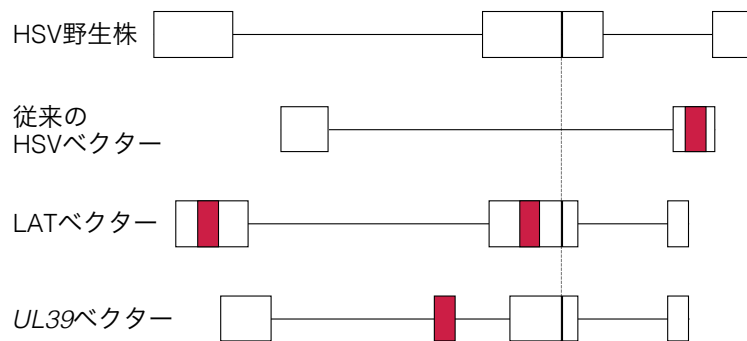


図7 従来の HSV ベクターと本研究で作製した HSV ベクターの比較  
HSV のゲノム構造を、野生株と従来の HSV ベクター、および本研究で作製した *LAT* ベクターと *UL39* ベクターについて示した。白い四角は反復配列領域、赤い四角は治療遺伝子挿入部位を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------