

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05165

研究課題名(和文) ウイルスベクターで導入した外来遺伝子の発現を飛躍的に増大させる技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of technology to dramatically increase the expression of foreign genes introduced by viral vector

研究代表者

荒尾 雄二郎 (Arao, Yujiro)

岡山大学・保健学域・教授

研究者番号：40151146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：比較的高いとされるアデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターによる外来遺伝子発現を、形質導入細胞を糖などの害の少ない化合物の存在下で培養することで、さらに、それぞれ約12倍と40倍に増大させることを可能にした。増大効果を発揮する化合物の種類と濃度は細胞ごとに異なっており、各細胞に最適な化合物を選定する必要があった。また、糖の外来遺伝子発現増大効果を、ポリカチオンによるウイルス表面負電荷の中和、及びERK1/2阻害剤によるADV受容体誘導と組み合わせることで、THP-1細胞でのADVベクターによる外来遺伝子発現を500倍以上に増強できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ウイルスベクターによる外来遺伝子発現を大幅に増やすことを可能にした。この技術は、学術的には、生物学・基礎医学研究、並びに遺伝子治療の発展に寄与すると考えられる。また、10倍発現量が増えると生産コストは10分の1に、100倍発現量が増えると生産コストは100分の1に近づくことから、社会的には、有用蛋白質の生産における生産コストを下げ、適正価格による利用を実現するために貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In general, the viral vector-mediated gene expression is evaluated to be relatively high. We made it possible to increase the adenoviral vector-mediated gene expression by approximately 12-fold by culturing the transduced cells in the presence of less harmful compounds such as sugars. We also realized to increase the adeno-associated virus vector-mediated gene expression by about 40-fold by the same method. The types and concentrations of compounds that exerted the maximal increasing effect differed from cell to cell. Therefore, it was necessary to select the optimum compound for each cell. Furthermore, we show that adenovirus vector-mediated transgene expression in THP-1 cells was increased more than 500-fold by combining the enhancing effect of sugar on transgene expression with the neutralization of negative charges on the virus surface by polycations and the induction of CAR, ADV receptor, by an ERK1/2 inhibitor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：外来遺伝子発現 ウイルスベクター 緑色蛍光蛋白質 糖 オスモライト ERK1/2阻害剤 ポリカチオン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞における外来遺伝子発現は、生物学・基礎医学研究、遺伝子治療、並びに有用蛋白質の生産に不可欠な基盤的技術である。外来遺伝子発現の向上は、生物学・基礎医学研究における研究範囲の拡大や研究結果の明確化をもたらす。また、遺伝子治療における治療効果の顕著な改善と高額な費用の軽減を実現する。さらに、有用蛋白質の生産では、生産コストを下げ適正価格による有用蛋白質の利用を可能にする。

外来遺伝子発現を向上させる方法には、遺伝子導入技術や転写調節領域の改良とともに、細胞状態の適正化がある。細胞状態の適正化とは、外来遺伝子導入細胞を化合物で処理することにより、その細胞を外来遺伝子発現に適した状態にすることである。

クロロキン、5-ブロモデオキシウリジン、シスプラチン、及びパクリタキセルは、「非ウイルスベクターで導入した外来遺伝子の発現」を増大させると報告された。また、Toll 用受容体結合物質、炎症性サイトカイン、トポイソメラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、5-フルオロウラシル、ヒドロキシウレア、バーシカン、及び高分子量ヒアルロン酸は、「ウイルスベクターで導入した外来遺伝子の発現」を増大させる報告された。しかし、これらの化合物は、毒性、経済性、並びに外来遺伝子発現増大効果の低さから、現時点では一般的な使用が困難である。

他方、我々は、「非ウイルスベクターで導入した外来遺伝子の発現」を D-glucose などの糖が増大させることを見出した (Kimura M, Namba H, Okubo M, Ezumi M, Susumu N, Yamada M, and Arao Y. Enhancive effects of D-glucose and its analogs on expression of D-glucose-unrelated transgenes in mammalian cells. *J Biosci Bioeng.* (2011) 112(2):194-201.、難波ひかる、荒尾雄二郎. タンパク質産生用培地を用いたプロモーターの活性化方法およびタンパク質の産生方法. 登録番号：特許 5748808. (2015) 特許権者：国立大学法人岡山大学)。D-glucose に代表される糖は、その大部分が安全性が高く、安価に、かつ容易に入手することが可能であり、使い勝手が良いと期待される。これまでに、トレハロース、ショ糖、マンニトール、キトサンなどの糖で遺伝子導入効率が上昇するとの報告があった。しかし、糖が細胞を外来遺伝子発現に適した状態にするとの報告は他に類を見ない。さらに、準備試験を行ったところ、「アデノウイルス (ADV) ベクターで導入した外来遺伝子の高い発現」に D-glucose の増大効果が相乗的に働く可能性が示唆された。すなわち、D-glucose で刺激しない場合の外来遺伝子発現が高いほど、D-glucose で刺激した場合の発現が相乗的に増大した。これらの経緯を踏まえて、非ウイルスベクターよりも遺伝子導入効率の高いウイルスベクターを用いた形質導入における外来遺伝子発現を飛躍的に高める方法を開発するために本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

我々は、以前に、安全性の高い糖が、非ウイルスベクターによる外来遺伝子発現を増大することを報告した。さらに、準備実験で、糖の増大効果が、ADV ベクターによる高い外来遺伝子発現にも相乗的に働く可能性があることを見出した。これらの結果を受けて、本研究では、ウイルスベクターと糖を用いて非常に高い外来遺伝子発現を実現できることを実証するとともに、これを有効利用する方法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞

遺伝子導入するヒト培養細胞としては、A431、A549、FL、HepG2、H28、H2052、H2452、MCF-7、MES-SA、NCTC2544、PC-3、THP-1、及び 211H を用いた。431、A549、FL、HepG2、H2452、MCF-7、MES-SA、NCTC2544、PC-3、211H 細胞の増殖には、10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した高グルコース含有ダルベッコ改良最小必須栄養培地 {10F/DMEM (HG)} を用いた。H2052、及び THP-1 細胞は、10% FBS を添加した RPMI1640 培地 (10F/RPMI) で増殖させた。H28 細胞は 10F/DMEM (HG) または 10F/RPMI で増殖させた。THP-1 以外の細胞を薬剤処理する際、及び遺伝子導入後に培養する際には、FBS 濃度を 5% にした。THP-1 細胞を薬剤処理する際、及び遺伝子導入後に培養する際の FBS 濃度は 10% であった。

### (2)遺伝子導入

レポーター遺伝子の導入には、ADV ベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、レンチウイルス (LV) ベクター、非組換え ADV・ポリエチレンイミン (PEI)・プラスミド複合体を用いた。ADV ベクターとしては、Ad-GFP (SignaGen Laboratories, Frederick, MD) を用いた。Ad-GFP には、ヒトサイトメガロウイルス前初期 (CMVIE) プロモーターと SV40 poly(A) シグナルで制御された EGFP 遺伝子が搭載されている。AAV ベクターとしては、pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH から作成された AAV2 (Addgene, Watertown, MA) を使用した。このウイルスベクターには、CMVIE プロモーターと pGH poly(A) シグナルで制御された EGFP 遺伝子が搭載されている。LV ベクターとしては、rLV.EF1.ZsGreen1-9 (Vectalys) を使用し

た。このウイルスベクターには、EF-1 $\alpha$  プロモーターと IRES で制御された ZsGreen1 遺伝子が搭載されている。非組換え ADV5 型・ポリエチレンジアミン (PEI)・プラスミド複合体は、CMVIE プロモーターと SV40 poly(A) シグナルで制御された EGFP 遺伝子を有するプラスミド pEGFP-CMV を使用し、既報 (Cotten M. et al. Transfection Complexes Generated with Adenovirus and Polyethylenimine-Codensed DNA in Adenovirus Methods and Protocols, edited by William S. M. Wold, p295-307) に従って複合体を準備した。1 日前に  $40 \times 10^4$  cells/mL で播種した各種培養細胞に、 $167 \text{ CCID}_{50}/\text{cell}$  の ADV ベクター、 $5000 \text{ genome copies}/\text{cell}$  の AAV ベクター、 $8 \text{ transducing units}/\text{cell}$  の LV ベクター、または  $10^6 \text{ ng}/\text{cell}$  の pEGFP-CMV を含む複合体を接種し、2 時間の吸着の後、ウイルス液を維持培地に交換して導入細胞を外来遺伝子発現解析まで 3 日間培養した。

(3) レポーター遺伝子導入前の細胞の薬剤処理

① ERK1/2 阻害剤 (SCH772984) 処理

ADV ベクターでレポーター遺伝子を導入する前に、 $40 \times 10^4$  cells/mL の THP-1 細胞を 0、0.15、0.5、1.5、5、15、または  $50 \mu\text{M}$  の SCH772984 を含む 10F/RPMI で 40 時間前培養した。前培養後、 $100 \times 10^4$  cells/mL の細胞濃度で ADV を 2 時間吸着させた後、ウイルス液を除いて、10F/RPMI で  $40 \times 10^4$  cells/mL の濃度に浮遊し、外来遺伝子発現解析まで 3 日間培養した。

② 2-アミノプリン (2AP) 処理

1 日前に  $16 \times 10^4$  cells/mL で播種した A431、H2052、MCF-7、及び NCTC2544 細胞を、0、0.1、0.3、1、3、10、または  $30 \text{ mM}$  の 2AP を含む 5F/DMEM(HG) で 2 日間培養した後、ADV ベクターを用いたレポーター遺伝子導入に供した。形質導入後は 5F/DMEM(HG) 中で 2 日間培養して外来遺伝子発現解析を行った。

(4) レポーター遺伝子導入細胞の薬剤処理

1 日前に  $40 \times 10^4$  cells/mL で播種した定着性細胞にレポーター遺伝子導入した後、0、1、2、3、4、5、または 6% の化合物を含む 5F/DMEM(HG) または 5F/RPMI で 3 日間培養して外来遺伝子発現を解析した。

(5) 蛍光強度測定

定着細胞では、レポーター遺伝子を導入して 2 または 3 日間培養した後、細胞上から培養液を取り除き、細胞を 96 well plate の 1 well あたり  $200 \mu\text{L}$  の  $1 \times$  Lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH7.8)、2 mM EDTA、10% Glycerol、0.1% TritonX-100) で溶解した。その溶解液の蛍光を蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL、大日本製薬株式会社) で計測した。蛍光測定の励起波長は 485 nm、測定波長は 538 nm であった。

浮遊細胞 THP-1 では、 $40 \times 10^4$  cells/mL の濃度で各種化合物存在下で 3 日間培養した後、培養液の半分を別容器に分注し、細胞を含む半量の培養液と細胞を含まない半量の培養液のそれぞれに等量の  $2 \times$  Lysis buffer を加えて溶解した。溶解後、蛍光マイクロプレートリーダーで EGFP の発する蛍光を上記同様に測定した。そして、細胞を含む培養液の蛍光強度から細胞を含まない培養液の蛍光強度を引くことで細胞由来の蛍光強度を算出した。

(6) EGFP 量測定

1 日前に  $40 \times 10^4$  cells/mL で播種した HepG2、NCTC2544、及び H28 細胞に、HepG2 と NCTC2544 細胞には ADV ベクターで、H28 細胞には AAV ベクターで、レポーター遺伝子を導入した。形質導入後、HepG2 細胞は 5% D-glucose を含む、NCTC2544 細胞は 6% Lactulose を含む、H28 細胞は 4% Taurine を含む 5F/DMEM(HG) で 3 日間培養し、GFP ELISA Kit (abcam、Cambridge、UK) を用いて、その取扱説明書に従って、EGFP 量を計測した。

(7) 高浸透圧による細胞死を抑制する薬剤の探索

文献上の情報から、高浸透圧による細胞死を抑制すると期待された 18 種類の薬剤、アセタゾラムド、ウアバイン、カリポリド、セラミド C-6、チロフォスチン 23、トリコスタチン A、ピフィスリン $\alpha$  臭化水素、プエラリン、C16、Go 6976、L-カルニチン、MHY1485、N-アセチル-L-システイン、PI-103、SB203580、U73122、Y-39983 塩化水素、及び 2-アミノプリンについて、3% D-glucose または 3% mannitol 存在下で培養した THP-1 細胞の細胞死を抑制できるか否かを検討した。 $40 \times 10^4$  cells/mL の THP-1 細胞を各種濃度の上記薬剤で 2 日間培養してから、3% の D-glucose または mannitol 存在下で 3 日間培養して細胞死を評価した。細胞死の評価は AlamarBlue 色素を用いて、その取扱説明書の指示に従って実施した。

(8) ADV ベクターの形質導入を補助する既存試薬の検証

THP-1 細胞に、細胞表面に CAR を付与する試薬 (CAR Receptor Booster、Clontech、Mountain View、CA) や CAR 以外の細胞表面レセプターに ADV を結合させる試薬 (AdenoBlast、OZ biosciences、Marseille、France) を用いて、それらの取扱説明書に従って、ADV ベクターの遺伝子導入を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) ADV ベクターで形質導入した場合の各種化合物の外來遺伝子発現増大効果

哺乳類細胞が外来遺伝子を発現し易い状態になる化合物を探索することを目的とする。まず、10 種類のヒト培養細胞に ADV ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入し、それらの導入細

胞を各種化合物の存在下で培養することで細胞が放つ蛍光が増大するか否かを検討した。その結果、多くのヒト培養細胞で蛍光強度増大が観察され、糖やオスモライトによる外来遺伝子発現増大効果が検証された。HepG2 細胞では 6% D-glucose で 11.8 倍の、NCTC2544 細胞では 6% Lactulose で 11.8 倍の蛍光増大が認められた。また、H28 細胞では 6% D-mannose で 5.3 倍の、FL 細胞では 1% D-ribose で 5.3 倍の蛍光増大が検出された。A549、及び PC-3 細胞では 3 倍程度の蛍光増大が誘導された。他方、MES-SA、211H、H2452、及び A431 細胞では蛍光は増大されなかった。

ADV ベクターを用いて HepG2 細胞と NCTC2544 細胞に EGFP 遺伝子を導入した後、それぞれ、5% D-glucose と 6% Lactulose 存在下で培養し、細胞内の EGFP 量を ELISA で測定した。5% D-glucose 処理、及び 6% Lactulose 処理により EGFP 量はそれぞれ、24.4 倍と 9.0 倍に増大した。糖による EGFP 遺伝子の発現増大を蛋白質として確認できた。

(2) AAV ベクターで形質導入した場合の各種化合物の外来遺伝子発現増大効果

AAV ベクターを用いて EGFP 遺伝子を 9 種類のヒト培養細胞に導入し、それらの導入細胞を外来遺伝子発現に対して高い増大効果が期待される化合物の存在下で培養して蛍光強度を測定した。外来遺伝子発現に対して高い増大効果が期待される化合物としては、ADV ベクターで形質導入した上記の実験で相対的に蛍光強度増大効果の高かった化合物を用いた。ADV ベクターを用いた場合と比べて明らかに高い蛍光強度増加倍率を示す糖が多く見出された。HepG2 では 6% D-glucose で 45.2 倍、H28 細胞では 5% Taurine で 41.5 倍の増大が誘導された。AAV ベクターを用いた場合でも ADV ベクター使用時と同様に、化合物の外来遺伝子発現増大効果が発揮されにくい細胞が散見された。これらの細胞の外来遺伝子発現非許容性を減弱させる方法の必要性が認識された。

AAV ベクターを用いて H28 細胞に EGFP 遺伝子を導入し、その導入細胞を 4% Taurine 含有維持培地で培養して細胞内の EGFP 量を ELISA で定量した。4% Taurine で処理することにより細胞内の EGFP 量は 30.8 倍増大した。これらの結果は、4% Taurine による H28 細胞での蛍光強度増大が主に EGFP 産生量増加によるものであること示すと考えられた。

(3) LV ベクターで形質導入した場合の各種化合物の外来遺伝子発現増大効果

上記の AAV ベクターを用いた検討と同じ探索を LV ベクターを用いて実施した。LV ベクターを用いて準備した導入細胞でも蛍光強度の増大が認められたがその増大は顕著ではなかった。一つには、今回、LV ベクターの MOI が低かったことにより化合物非添加の場合の外来遺伝子発現が低すぎたために、化合物の増大効果も十分に発揮されなかったものと推測する。しかし、その条件下でも ADV や AAV ベクターでは増大効果を発揮しにくかった A431、A549、及び PC-3 細胞において約 3 倍の増大効果が検出され、LV ベクターを用いた形質導入においても糖などの化合物が外来遺伝子発現を有効に増大させる可能性を示された。

(4) 非組換え ADV5 を利用して遺伝子導入した場合の各種化合物の外来遺伝子発現増大効果

上記の探索に用いた ADV、AAV、及び LV ベクターは組換えウイルスであり、カルタヘナ条約により使用上の制限が設けられている。使用上の制限の少なく、かつウイルスの高い細胞内侵入能力を利用して外来遺伝子を導入する「不活化 ADV・ポリエチレンイミン・プラスミド複合法」で EGFP 遺伝子を導入し、導入細胞に対する各種化合物の効果を検証した。その結果、A549 細胞において 2% D-mannose が 13.9 倍の顕著な増大効果を発揮することが立証された。ウイルスベクターを用いた場合と同様に、細胞の種類によって効果の高い化合物の種類が異なることが判明した。

(5) 2AP 前処理による細胞の外来遺伝子発現許容性の増大

ウイルスベクターによって形質導入した細胞に対する各種化合物の外来遺伝子発現増大効果を有効に発揮させるためには、細胞が外来遺伝子発現に対して許容性であることが必要である。そのため、許容性の低い細胞をより許容性の高い細胞に変える方法が必要である。そこで、まず、外来遺伝子発現許容性が低い細胞を選抜し、それらの細胞を形質導入前に薬剤処理して一時的に外来遺伝子発現許容性を増大させることができるかどうかを検討した。薬剤としては、2AP を試した。許容性の低い細胞はウイルス DNA などの外来遺伝子発現を抑制する細胞内防御機構が働いており、それらの機構のハブになっているのが蛋白質リシン酸化酵素 R (PKR) でないかと推測される。2AP は PKR 阻害剤として作用すると期待される。

① 外来遺伝子発現許容性の低い細胞の特定

まず、外来遺伝子発現許容性の低い細胞を選抜した。H28、A431、H2052、MCF-7、及び NCTC2544 細胞に ADV ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入し、化合物で刺激することなく、蛍光強度を測定した。H28 細胞は、外来遺伝子発現許容性が高い細胞であり、比較基準として使用した。A431、H2052、MCF-7、及び NCTC2544 の各細胞の蛍光は H28 細胞と比較して 13 分の 1 以下であり、外来遺伝子発現に対する許容性が低いことが明らかになった。

② 2AP 前処理による対象細胞の外来遺伝子発現許容性の増大

A431、H2052、MCF-7、及び NCTC2544 細胞を 10 mM の 2AP で前処理してから ADV ベクターで EGFP 遺伝子を導入して蛍光を測定したところ、前処理により、それぞれ、8.5 倍、3 倍、2.1 倍、及び 2.2 倍に増大した。2AP による前処理が外来遺伝子発現許容性を増加させることが明らかになった。

(6) ポリカチオンを用いた「ADV ベクターによる THP-1 細胞への形質導入」の向上

THP-1 細胞は、通常、ADV レセプターである CAR を発現しない。従って、ADV ベクターで形質導入することが非常に困難であり、糖などの化合物による外来遺伝子発現増大効果も期待できない。ウイルスベクター粒子の表面も細胞表面も負に荷電している。両方が同じ荷電状態であることから斥力が働きウイルスベクターを用いた遺伝子導入の効率を低下させる。これらの負の荷電をポリカチオンを用いて中和することで遺伝子導入効率を高められることが報告されている。そこで、各種ポリカチオンで ADV ベクター、及び THP-1 細胞表面の負の荷電を中和し、ADV ベクターを用いた THP-1 細胞へ EGFP 遺伝子導入を増大させることを試みた。その結果、DEAE dextran が ADV ベクター処理 (750 µg/mL)、THP-1 細胞処理 (300 µg/mL) の双方で良好に形質導入効率を上昇させた。そして、ADV ベクター処理と THP-1 細胞処理を同じロットの細胞で直接的に比較すると、ADV ベクター処理の方がより効果的であった。

- (7) 「ADV ベクターによる THP-1 細胞への EGFP 遺伝子導入」に対する「細胞の ERK1/2 阻害剤前処理」の増大効果

THP-1 細胞を SCH772984 を用いて前処理した後、ADV ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入したところ、SCH772984 処理なしでは検出限界以下であった THP-1 細胞の蛍光が、50 µM の SCH772984 前処理によって 0.040 AU まで増大した。従って、CAR を細胞表面に発現しない細胞を ERK1/2 阻害剤で処理することによって、その細胞の ADV 感受性を大きく改善することができると考えられた。

- (8) DEAE dextran 処理 ADV ベクターで、ERK1/2 阻害剤 (SCH772984) 前処理済み THP-1 細胞に、レポーター遺伝子を導入した場合の外来遺伝子発現に対する Pullulan の増大効果

50 µM の SCH772984 を用いて前処理した THP-1 細胞に、750 µg/mL の DEAE dextran 塩化水素で処理した ADV ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入した。その EGFP 遺伝子導入 THP-1 細胞を 1% の Pullulan 存在下で培養すると、Pullulan を非存在下と比べてその蛍光は 2.5 倍に増大した。Pullulan は多糖であり、単糖、二糖、三糖などに比べて細胞に害のある浸透圧への影響が少ないと考えられ、これが、今回、Pullulan のみで外来遺伝子発現増大効果が認められた理由であると思われる。この結果は、THP-1 細胞のような浮遊系の細胞であっても、糖の外来遺伝子発現増大効果を発揮させることは可能であることを示唆する。

- (9) 高浸透圧による細胞死を抑制する方法の探索

18 種類の候補薬剤について、3% の D-glucose または mannitol 存在下で誘導される THP-1 細胞の死を抑制できるか否かを検討した。しかし、細胞死を抑制できる薬剤を見出すことはできなかった。

- (10) ADV ベクターによる形質導入を増加すると期待された既存試薬の検討

ADV ベクターによる THP-1 細胞への EGFP 遺伝子導入において、市販の補助試薬である CAR Receptor Booster (Clontech, Mountain View, CA) 及び AdenoBlast (OZ biosciences, Marseille, France) の効果を調べたが、顕著な EGFP 発現増大は認められなかった。

- (11) 結果のまとめ

#### ①糖やオスモライトによる外来遺伝子発現増大効果の特徴

3 種類のウイルスベクターと 10 種類のヒト培養細胞を用いて検討した結果は次のことを示唆する。まず、全てのヒト培養細胞で顕著な外来遺伝子発現増大効果を発揮する化合物は見出せなかった。すなわち、対象となる細胞や形質導入に用いるウイルスベクターの種類が異なれば、十分な増大効果を誘導する化合物の種類が異なった。故に、現状では、対象細胞と使用ウイルスベクターの組合せに合わせて、予め、最適な化合物とその濃度を見つけておく必要がある。今後、糖などの化合物が細胞の状態を適正化して外来遺伝子発現を増大させる機構の全容が解明されれば、ユニバーサルに働く化合物を準備することができるのではないかと期待される。

#### ②糖やオスモライトの外来遺伝子発現増大効果を阻む要因の解除

主な ADV ベクターの受容体である CAR を細胞表面に出していない THP-1 細胞では、ADV ベクターによる外来遺伝子発現のベースラインが低すぎるために、糖やオスモライトの外来遺伝子発現増大効果を十分に発揮できないと言う障害があった。しかし、ADV 粒子のポリカチオン処理と対象細胞の ERK1/2 阻害剤処理でベースラインを十分に上昇させることに成功し、糖の外来遺伝子発現増大効果を有効に引き出すことができた。

A431、H2052、MCF-7、及び NCTC2544 細胞も ADV ベクターによる外来遺伝子発現のベースラインが非常に低いことが確認された。これらの細胞は外来遺伝子発現許容性がとても低いと推測された。そこで、これらの細胞を PKR 阻害剤である 2-アミノプリン存在下で 2 日間培養したところ、導入したレポーター遺伝子からの蛍光蛋白質の蛍光強度が増大した。このような PKR 阻害により細胞の許容性を高めて、外来遺伝子発現のベースラインを上昇させることにより、糖やオスモライトの外来遺伝子発現増大効果を十分に引き出すことができるものと期待される。

THP-1 細胞で認められた高浸透圧による細胞死は、比較的高濃度の糖やオスモライトで導入細胞を培養する本研究の方法には障害となる。細胞死の抑制を期待できる 18 種類の薬剤について検討したが、高浸透圧による THP-1 細胞死を抑制できる薬剤を見出すことはできなかった。更なる解決策の探索が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒尾 雄二郎、山本 結加
2. 発表標題 CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) を発現しないTHP-1細胞において、アデノウイルス (ADV) を利用して外来遺伝子を発現させる技術の開発
3. 学会等名 第35回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------