

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890052

研究課題名（和文） shRNA を搭載したアデノ随伴ウイルスによるマウス肺特異的な遺伝子抑制系の確立

研究課題名（英文） Establishment of a mouse lung-specific gene suppression system using adeno-associated virus carrying short hairpin RNA

研究代表者

鹿毛 秀宣（KAGE HIDENORI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80513390

研究成果の概要（和文）：

我々はアデノ随伴ウイルス血清型 2/5 ベクターに short hairpin RNA を搭載し、マウスの肺胞上皮由来の LA-4 細胞にトランスダクションし、Tgf β 1 遺伝子を抑制することに成功した。この結果により遺伝子導入が従来困難であった肺胞上皮細胞へ任意の siRNA を発現させることが可能となることが予想され、呼吸器疾患の解析に寄与すると思われる。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrate that the AAV type 2/5 hybrid vector can carry short hairpin RNA, transduce mouse alveolar epithelium-derived LA-4 cells, and suppress Tgf β 1 expression. This study opens the possibility to suppress an arbitrary gene function in lung alveolar epithelium-derived cells, and help analyze the pathogenesis of pulmonary diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：アデノ随伴ウイルス, short hairpin RNA, RNA 干渉, びまん性肺疾患, Tgf β 1

1. 研究開始当初の背景

(1) siRNA について

siRNA は 21～26 塩基の二本鎖 RNA であり、相同的な配列を持つ mRNA の切断に寄与する。1998 年に哺乳細胞で報告されて以来、遺伝子抑制の標準的な手法となっている。

siRNA を目標とする細胞で発現させるには 3 つの方法が採られている。1 つめは siRNA そのものの投与であり、これは導入効率が低いことが多い上に発現期間が短い。2 つ目は siRNA を化学修飾して封入体を作成する方法であり、これは多数報告されているものの確立された手

法はない。3 つ目はウイルスベクターを用いて short hairpin RNA (shRNA) を発現し、細胞内の切断機構を用いて siRNA を発現させる方法である。これは毒性が懸念されるものの遺伝子導入効率と毒性の知見が最も豊富にある方法である。

- (2) アデノ随伴ウイルスベクターについて
ウイルスベクターはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レトロ/レンチウイルスが主である。このうち、アデノ随伴ウイルスが最も毒性が低く、安全性に優れていることが知られている。また、AAV は血清型により細胞親和性が異なり、肺胞上皮細胞へは AAV5 の親和性が高いことが知られている。AAV5 を用いて肺胞上皮細胞へ遺伝子を導入した報告は数多く存在するが、siRNA を導入した報告はない。

- (3) Tgf β 1 について
TGF β 1 は臓器の線維化に関わる主要な分子であることが知られている (マウスは Tgf β 1 と小文字で表記)。TGF β 1 は肺線維症患者の肺で異常な発現が認められ、動物実験では Tgfb1 を過剰発現すると肺線維症を発症し、Tgf β 1 を抑制すると肺線維症の発症が抑制されることが報告されている。しかし、Tgf β 1 を抑制する際に相同組換えや阻害剤を使用する方法では全身的な作用がおきることが予想され、肺特異的に Tgf β 1 を抑制することが望ましい。

2. 研究の目的

AAV に shRNA を搭載して肺胞上皮細胞で Tgf β 1 を抑制することを通じて肺胞上皮特異的に遺伝子機能を抑制する系を確立する

3. 研究の方法

- (1) siRNA 配列の選択
はじめに我々は siDIRECT のウェブサイトを用いて 4 つの siRNA をデザインした。その後、PNAS 99:5515 に基づく方法を用いて 6 つの siRNA を選択した。
- (2) プラスミドの構築
我々が従来から用いている pGEM に U6 プロモーターを挿入したプラスミドに上記 siRNA を発現する shRNA を組み込んだ。次に U6-shRNA 配列を pAAV-LacZ ベクターに挿入し、pAAV-U6-shRNA-LacZ を作成した。また、AAV5 の Rep タンパクと Cap タンパクをコードする pAAV-R5C5 を National Institute of Health の Chiorini 教授より譲り受け、Cap 5 遺伝

子のみを pAAV-RC の Cap 2 遺伝子と組み替えて pAAV-R2C5 を作成した。

- (3) 培養細胞
肺胞上皮由来の細胞としてはマウス肺腺腫由来の細胞である LA-4 細胞を使用した。その他、マウス線維芽細胞 3T12-3、ヒト肺癌由来の H23, H1975 細胞、およびマウス肺胞マクロファージ由来の MH-S 細胞を使用した。

- (4) プラスミドのトランスフェクション
プラスミドのトランスフェクションには HilyMax または Lipofectamine LTX を使用した。トランスフェクション翌日に継代し、継代翌日に解析を行った。

- (5) AAV2/5 ベクターの構築
pAAV-U6-shRNA-LacZ, pAAV-R2C5, およびアデノウイルスの遺伝子を 3 つコードした pHelper の 3 つのプラスミドを同時にリン酸カルシウム法で AAV293 細胞にトランスフェクションした。3 日後に細胞を超音波破碎し、上清を回収して粗 AAV を得た。粗 AAV を塩化セシウムで超遠心後に透析して精製 AAV を得た。

- (6) AAV2/5 ベクターのトランスダクション
AAV2/5 ベクターを培養細胞に直接添加し、48 時間後に解析を行った。AAV2/5 ベクターの導入効率は X-Gal 染色を用いて解析した。

- (7) ウェスタンブロット
Tgf β 1 には 50mg, β -actin には 10mg のタンパクを使用し、5-20%アクリルアミドゲルで 20mA, 70 分泳動した。PVDF 膜へのトランスファーは 300mA で 3 時間行い、ブロッキングは 5%スキムミルクを用いて 1 時間行った。1 次抗体, 2 次抗体の添加および洗浄後, Tgf β 1 は ECL Plus, β -actin は ECL Detecting Reagent を用いた化学発光法で解析した。

- (8) 定量的 PCR
RNA は AGPC 法で抽出した。AAV2/5 ベクターのコピー数は pAAV-LacZ をコントロールとして標準曲線法で検討した。その他, Tgf β 1, Pdgfr, procollagen Ia \cdot IIIa の mRNA 発現量は β -actin をコントロールとして ddCt 法で解析した。

- (9) 細胞数の検討
細胞数の検討には MTT アッセイの変法を用いた Cell Counting Kit-8 を用いた。

(10) 統計解析

3群の比較には分散分析後にボンフェロニ法で多重比較した。2群の比較にはt検定を行った。

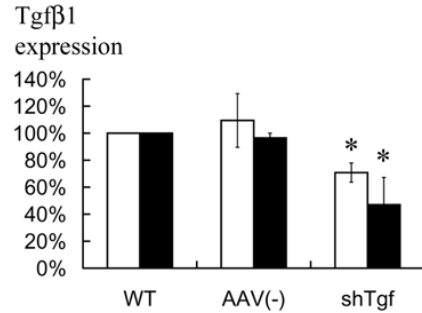
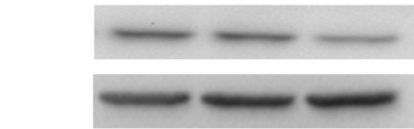
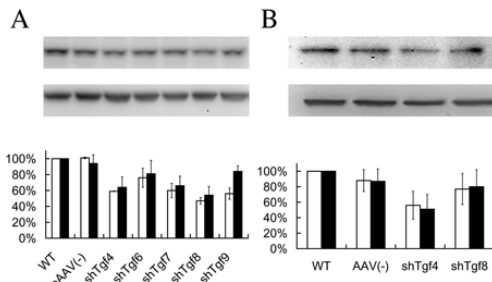
4. 研究成果

(1) AAV2/5-LacZ の LA-4 細胞へのトランスダクション効率は高い

4×10⁹ コピーの AAV2/5 を LA-4 細胞へトランスダクションしたところ、ほぼ 100% の遺伝子導入効率が認められた。3T12-3 細胞で 100% のトランスダクション効率を得るためには 2×10¹¹ コピーの AAV2/5 が必要であった。肺胞上皮細胞由来の肺癌細胞株を調べたところ、H23 細胞は 4×10⁹ コピーでほぼ 100% のトランスダクション効率が得られたが、H1975 細胞は 50% 以下であり、ばらつきが見られた。さらに、肺胞マクロファージ由来の MH-S 細胞も数十%であった。また、トランスフェクション試薬を用いて条件を最適化してもトランスフェクション効率は約 50%であった。以上より、AAV2/5 は LA-4 細胞および一部の肺癌細胞株で高いトランスダクション効率が認められ、線維芽細胞と肺胞マクロファージでは効率が低く、トランスフェクションも効率は低いことが見出された。

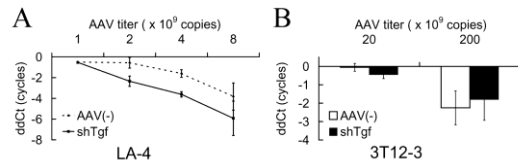
(2) 最適な siRNA 配列の選択

はじめに siDIRECT のウェブサイトから Tgfβ1 に対する siRNA 配列を 4 つ選択し、pGEM ベクターに挿入して Tgfβ1 タンパクの抑制効率を比較した。その結果、「4 番」のみで 50% 以上の抑制効果を認めた。そこで PNAS 99:5515 の方法を用いてさらに 6 配列を追加したところ、「6 番」「7 番」「8 番」「9 番」で 50% 以上の抑制効果を認めた。これらの配列を pAAV に組み替えて比較したところ、「4 番」と「8 番」のみで 50% 以上の抑制効果が認められた。最後に AAV2/5 を作成して比較したところ、「4 番」のみで 50% 程度の抑制効果が認められ、これを AAV2/5-U6-shTgf-LacZ と名づけた。また、上記比較は 3T12-3 細胞を用いて行ったが、LA-4 細胞でも同様の効果が認められることを確認した。



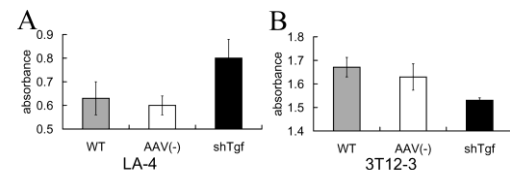
(3) AAV2/5-U6-shTgf-LacZ は LA-4 細胞でのみ Tgfβ1 の mRNA を抑制する。

AAV2/5-U6-shTgf-LacZ を LA-4 細胞および 3T12-3 細胞にトランスダクションしたところ、LA-4 細胞においてのみ Tgfβ1 の mRNA の発現抑制を認めた。このことより、同じベクターと同じ siRNA 配列を用いても細胞種によってタンパク発現を抑制する機構は異なる可能性があることが示唆された。



(4) AAV2/5-U6-shTgf-LacZ により LA-4 細胞の増殖は促進され 3T12-3 細胞は抑制される

Tgfβ1 は上皮細胞の増殖を抑制し線維芽細胞の増殖を促進することが知られている。AAV2/5-U6-shTgf-LacZ の投与により、LA-4 細胞の増殖は促進され 3T12-3 細胞は抑制された。



(5) AAV2/5-U6-shTgf-LacZ により LA-4 細胞においてのみコラーゲン産生が抑制された

Tgfβ1 は線維芽細胞のコラーゲン産生を促進することが知られている。また、肺において発現の高いコラーゲンは I と III である。AAV2/5-U6-shTgf-LacZ により LA-4 細胞においては procollagen I および III の mRNA の発現が低下したが、3T12-3 細胞においては変化が見られなかった。以上より、線維芽細胞によるコラーゲン産生を抑制するには線維芽細胞自体の Tgfβ1 産生を抑制するよりも細

胞外から線維芽細胞に作用する Tgfβ1 を抑制する必要があることが示唆された。

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 0 件)

現在登投稿中

[学会発表] (計 4 件)

1. Kage H, Aki N, Emoto N, Watanabe K, Kutomi T, Kusakabe M, Hamano E, Kitagawa H, Ohishi N, Nagase T, Yatomi Y, Takai D. Knockdown of Tgfβ1 in alveolar epithelium-derived LA-4 cells using replication-defective adeno-associated virus carrying short hairpin RNA. American Thoracic Society International Conference, May 15-20, 2009, San Diego, CA.
2. Kage H, Aki N, Emoto N, Watanabe K, Kutomi T, Kusakabe M, Hamano E, Kitagawa H, Ohishi N, Nagase T, Yatomi Y, Takai D. Knockdown of Tgfβ1 in alveolar epithelium-derived LA-4 cells using replication-defective adeno-associated virus carrying short hairpin RNA. 第 49 回日本呼吸器学会, 6 月 12 日～14 日, 東京.
3. Kage H, Sunohara M, Kawakami M, Kitano K, Emoto N, Watanabe K, Aki N, Kusakabe M, Hamano E, Ohishi N, Nagase T, Takai D. Delivery of short interfering RNA to alveolar epithelium-derived cells using adeno-associated virus type 2/5. AACR-IASLC Joint Conference on Molecular Origins of Lung Cancer, Jan. 11-14, 2010, Coronado, CA.
4. Kage H, Sunohara M, Kawakami M, Emoto N, Watanabe K, Aki N, Hamano E, Ohishi N, Nagase T, Takai D. Delivery of short interfering RNA using adeno-associated virus type 2/5. American Thoracic Society International Conference, May 14-19, 2010, New Orleans, CA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿毛 秀宣 (KAGE HIDENORI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 80513390