

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590377

研究課題名(和文) ヘルパー依存型アデノウイルスベクター発現効率向上と細胞特異性付加に向けた改良

研究課題名(英文) Improvement of helper-dependent adenovirus vector not only increasing gene expression but also cell/tissue specificity

研究代表者

鐘ヶ江 裕美 (Kanegae, Yumi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80251453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター(HD-AdV)は、発現効率がE1置換型ベクターよりも劣っていた。本研究では、有用性の高いstufferの同定と目的遺伝子発現効率を上昇するウイルスDNA領域の同定に成功した。この領域は特定の蛋白質をコードせず、エンハンサー活性も持たないことを明らかにした。

また、ゲノムから切り出した細胞特異的プロモーターを組み合わせた「細胞特異的発現HD-AdV」として、THプロモーターからCreを発現するスイッチユニットとCre依存的にGFPを発現する「標的ユニット」を併せ持つベクターの構築に成功し、ドーパミン神経細胞特異的にGFPが発現することを確認した。

研究成果の概要(英文)：The helper-dependent adenovirus vector (HD-AdV) is attractive tool for gene therapy, specially, genetic disease, because of its low-inflammation. However, it was reported that the purpose gene expression efficiency is lower than E1-substituted AdV. In this study, we determined the useful stuffer region and demonstrated an only 0.3kb DNA region near the rightend of the virus genome played an important role for efficient gene expression. And we showed that this region did not code any protein and enhancer.

We also developed a construction method of "cell/tissue-specific HD-AdV", which contains a switch unit carrying Cre gene expressed by cell/tissue-specific promoter and a target unit bearing purpose gene expression unit regulated by Cre. We chose the TH promoter for the cell/tissue-specific promoter and GFP for purpose gene. Finally, we succeeded in the construction and detected the dopamine neuron specific expression by this vector.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子治療 アデノウイルスベクター 細胞特異性

1. 研究開始当初の背景

ヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター (HD-AdV) は、ベクターに対する免疫原性の少ない長期発現型ベクターとして、遺伝病に対する遺伝子治療などへの有用性が期待されているが、未だいくつかの問題を抱えていた。1 つには、AdV と比べ発現効率が低い点である (Parks, R.J. *et al.*, *J. Virol.*, 73, 1999)。この問題を解決するため、ベクターゲノムサイズを調整するスタッファー領域の解析が行われており、ヒポキサンチン・グアニン phosphoribosyl transferase (HPRT) 遺伝子のイントロンが用いられているが、依然として十分な解決にはなっていない。また Park らは、ベクターゲノムの一部を残存することで発現量は 6 倍上昇したが、おそらくそのゲノムから発現するベクター由来のタンパク質により *in vivo* での発現持続期間が短縮してしまい、発現量を上昇しながら目的遺伝子のみを発現するベクターの開発は困難であることを報告していた。

本研究では HD-AdV の発現効率を上昇するために、スタッファー領域の更なる同定を行うこととした。またもう 1 つのアプローチとして、ベクターゲノム領域を残存したことによる発現上昇に着目し、その領域を特定し、ベクター由来のタンパク質の発現を抑制することにより発現上昇と発現持続を試みることとした。これらの改良により HD-AdV の発現効率を上昇し、細胞特異的プロモーターをゲノムから大きくクローニングすることにより、生体内での実際に起きている制御機構により忠実な目的遺伝子の発現及び制御機構の解析等への応用も可能な「細胞特異的 HD-AdV」作製が可能になると考えた。

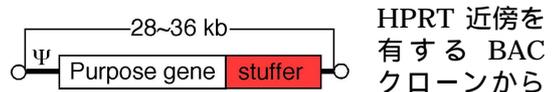
2. 研究の目的

HD-AdV は、ベクターに対する免疫原性の少ない長期発現型ベクターとして、遺伝病に対する遺伝子治療などへの有用性が期待されているものの、発現効率が E1 置換型ベクターよりも劣っていることも報告されており、この問題を解決することは HD-AdV の遺伝子治療における応用範囲を格段に上昇するだけでなく、例えばゲノムから大きく切り出した細胞特異的プロモーター領域の応用も可能になり、生体内で起こっていることをより忠実に再現することも可能になると考えられることから発生研究などにも有用性が高い。本研究は HD-AdV のサイズを調整するために挿入するスタッファーを最適化すること、HD-AdV 化において欠失したベクターゲノム上に存在することが示唆されている目的遺伝子の発現効率に寄与している領域を同定し最適化することにより発現効率を格段に上昇する有用性の高い HD-AdV システムを構築するとともに、HD-AdV とゲノム領域から切り出した細胞特異的プロモーターを組み合わせた細胞特

異的発現ベクターの作製と評価を行う。

3. 研究の方法

(1) スタッファー領域の検索



HPRT 近傍を有する BAC クローンから 5' -non coding 及び 3' -non coding の 11~15kb の DNA を HD-AdV 生成確認マーカーとして GFP の発現単位を挿入した HD-AdV 作製用コスミドカセットに挿入した。同時に既に報告されている HPRT のイントロン領域と従来用いられていた Lambda ファージのフラグメントを挿入した HD-AdV 作製用コスミドも構築した。ヘルパーウイルスとしてはウイルスのパッケージングシグナルを FLP の標的配列である FRT で挟んだもの(既に作製済み)を用いた。

作製した HD-AdV 作製用コスミドとヘルパーウイルスをヒト型・温度安定型 FLP (hFLPe) 発現 293 細胞に同時に導入し、得られたベクターシードを 3 回 hFLPe 発現 293 細胞でヘルパーウイルスを加えながら継代した。HD-AdV 生成マーカーとして挿入した GFP の発現強度を用いたスタッファー間で比較検討し、最も GFP 発現強度の高いスタッファーを同定した。

(2) 目的遺伝子発現上昇に寄与するウイルスゲノム領域の同定

既報ではベクターゲノムの右側 6kb に発現上昇に寄与するゲノム領域があると報告されていた。その領域にはアデノウイルスが細胞表面に吸着するためのファイバーのコード領域である L5 やウイルスの初期タンパク質の 1 つでありウイルス感染後の細胞周期の進行やアポトーシスへの拮抗、大量のウイルスタンパク質の生成促進など多岐にわたり関与することが知られている E4 タンパク質発現領域がある。そこで、どの領域が目的遺伝子発現上昇に寄与するかを検討するため、既報の 6kb、L5 領域のみ、E4 領域のみを発現する DNA を挿入した GFP 発現プラスミドを作製した。また、これらの領域を更に短絡したプラスミドも構築した。これらのプラスミドを細胞に導入し、GFP 遺伝子の発現強度を解析した。

(3) HD-AdV による細胞特異的発現制御ベクターシステムの構築

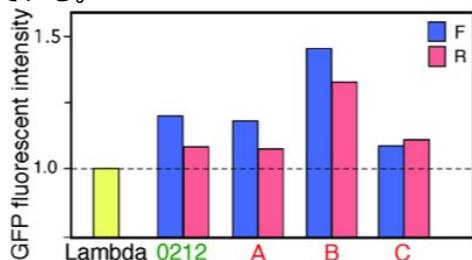
当初の計画では 2kb と 5kb の γ -フェトプロテインプロモーターを応用する予定であったが、より大きな 10kb の Tyrosine hydroxylase (TH) プロモーターを入手したため、TH プロモーターから Cre を発現するスイッチユニットと Cre 依存的に目的遺伝子 (ここではマーカー遺伝子、GFP) を発現する標的ユニットを持ち、本研究で同定した最適なスタッファー領域を加えて約 30kb に設計した HD-AdV を作製した。得られた「細

胞特異的」をドーパミン神経細胞に導入し GFP の発現を確認した。

4. 研究成果

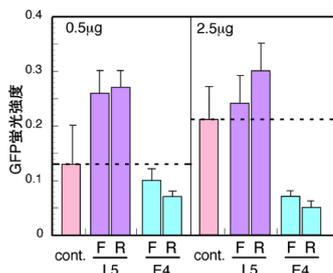
(1) スタッファー領域の検索

本研究では、HD-AdV の発現効率を上昇するためのスタッファー領域の検討を行った。その結果、従来応用されていた Lambda ファージ由来の stuffer や HPRT 由来の stuffer (0212) よりも 3 倍 GFP 遺伝子の発現を上昇する新規 stuffer 領域(B)を同定することに成功した。現在論文作成中であるが、現在の HD-AdV ではこの領域から任意の大きさの stuffer を調製し、HD-AdV のサイズを最適化している。



(2) 目的遺伝子発現上昇に寄与するウイルスゲノム領域の同定

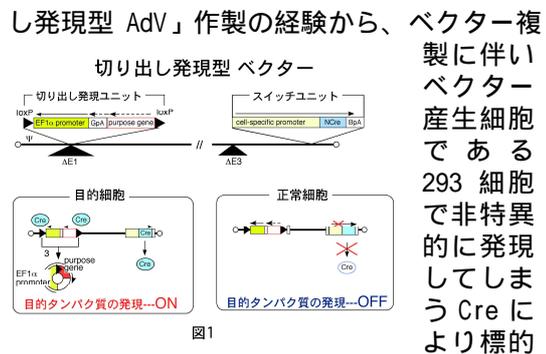
Parks らが報告したウイルスゲノム右側 6kb を分割し、L5 領域のみ、E4 領域のみでの解析を行った。その結果、L5 領域側に発現を上昇する領域が見いだされた。興味深いことに E4 領域の右側を挿入した場合には目的遺伝子として用いた GFP の発現が低下していた。発現上昇が認められた L5 領域を更に細かく分割した結果、最終的に約 300bp の領域を挿入した場合に GFP の発現が約 2 倍上昇していた。この領域からは蛋白質の発現は認められなかった。またエンハンサートラップを行ったが明確なエンハンサー活性は認められなかった。そこで、HD-AdV にこの領域を挿入したところ、僅かではあったが HD-AdV における目的遺伝子の発現効率が上昇している可能性が示唆された。現在機能について解析を行っており、有用性が確認された場合には特許申請を行う予定である。



(3) HD-AdV による細胞特異的発現制御ベクターシステムの構築

ゲノムから切り出してきた細胞特異的プロモーターから Cre を発現するスイッチユニットと Cre 依存的に目的遺伝子を発現する標的ユニットを併せ持つ「細胞特異的 HD-AdV」の作製を試みた。

E1 置換型ベクターでの「細胞特異的切り出



し発現型 AdV」作製の経験から、ベクター複製に伴いベクター産生細胞である 293 細胞で非特異的に発現してしまう Cre により標的ユニットが切り出されたベクターが主流になる可能性を考えていたが、HD-AdV の複製効率は E1 置換型と比べて低いため、標的ユニットが切り出された HD-AdV の量は比較的少ないことが明らかになった。そこで、ヘルパーウイルスの感染量を最適化したところ、目的とする「細胞特異的 HD-AdV」のみを増殖することに成功した。

この「細胞特異的 HD-AdV」に使用するプロモーターとして、当初は -フェトプロテインプロモーターを想定していたが、最大でも E1 置換型で作製可能な大きさである 5kb であった。そこで、HD-AdV の特性を活かすため、10kb の TH プロモーターを入手しベクター作製を行った。作製した HD-AdV はドーパミン神経細胞で特異的な発現が確認され、有用性が実証された。

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 10 件)

- Chiyo T, Sekiguchi S, Hayashi M, Tobita Y, Kanegae Y, Saito I, Kohara M. Conditional gene expression in hepatitis C virus transgenic mice without induction if severe liver injury using a non-inflammatory Cre-expressing adenovirus. *Virus Res* 2011;160:89-97.
- Takata Y, Kondo S, Goda N, Kanegae Y, Saito I. Comparison of efficiency between FLPe and Cre for recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) *in vitro* and in adenovirus vector production. *Genes Cells* 2011;16:765-777.
- Kanegae Y, Terashima M, Kondo S, Fukuda H, Maekawa A, Pei Z, Saito I. High-level expression by tissue/cancer-specific promoter with strict specificity using a single adenoviral vector. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e7.
- Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.* 2011;489-497.

Ishijima N, Suzuki M, Acida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Boren T, Haas R, Sasakawa Cand Mimuro H. BavA-mediated adherence is a potentiator of the Helicobacter pylori type IV secretion system activity. J. Biol. Chem. 2011;25256-25264.

Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. Scientific Reports 2013;3:1136.

Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology 2012;432:29-38.

Kanegae Y, Ishimura M, Kondo S, Saito I. Influence of loxP insertion upstream of the cis-acting packaging domain on adenovirus packaging efficiency. Microbiol Immunol. 2012;447-455.

Pei, Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration. BBRC 2012;417:945-950.

Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. Scientific Rep., 2013, 3, 3575.

〔学会発表〕(計 15 件)

前川文、裴崢、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. 高力価 VA RNAs 欠失アデノウイルスベクター新規作製法の開発。第 60 回日本ウイルス学会学術総会, 大阪, 2012.

裴崢、史国利、近藤小貴、伊藤昌彦、鐘ヶ江裕美、鈴木哲朗、齋藤泉. VA RNA 欠失型アデノウイルスベクターを用いた C 型肝炎治療法の開発。第 60 回日本ウイルス学会学術総会, 大阪, 2012.

鈴木まりこ、前川文、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. 第一世代アデノウイルスベクターにおける異なる目的遺伝子挿入部位による発現効率の比較検討。第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 2012.

前川文、裴崢、鈴木まりこ、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. 高力価 VA RNAs 欠失アデノウイルスベクター新規作製法の開発。第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 2012.

裴崢、史国利、近藤小貴、伊藤昌彦、鈴木哲朗、齋藤泉、鐘ヶ江裕美. アデノウイルスベクターから発現する VA RNA が shRNA に影響を与えるか。第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 2012.

近藤小貴、前川文、裴崢、鈴木まりこ、齋藤泉、鐘ヶ江裕美. 宿主 RNAi 経路に影響を与える virus-associated RNA を欠失したアデノウイルスベクターの高効率作製法。第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 2013

Pei Z, Maekawa A, Suzuki M, Kanegae Y, Kondo S, Saito I. Therapeutic strategy of HBV using VA-deleted adenovirus vectors dually expressing shRNA and interferon. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Fudan University, Shanghai, 2013.

Kanegae Y, Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Kondo S, Saito I. Dual-safe adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes enhanced shRNA activity. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress, Madrid, 2013.

Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Kanegae Y, Saito I. First-generation adenovirus vector expresses viral-associated (VA) RNAs that disturb cellular gene expressions. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress, Madrid, 2013.

Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Kondo S, Saito I, Kanegae Y. Very efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery: safer alternative to current vector. The European Society of Gene and Cell Therapy 2013 Annual Meeting, Palacio Municipal de Congresos, Madrid, 2013.

近藤小貴、前川文、鈴木まりこ、鐘ヶ江裕美. アデノウイルスベクターから常に発現している virus-associated (VA) RNA は標的細胞内の遺伝子発現に影響を与える。第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013

鈴木まりこ、前川文、近藤小貴、鐘ヶ江裕美. アデノウイルスベクターの目的遺伝子挿入領域と向きはベクター作製や発現効率に影響を与えるか: Dual 発現 vector 作製に向けた検討。第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013

近藤小貴、前川文、裴崢、鈴木まりこ、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. アデノウイルスベクターの問題点: ベクターがコードする Virus-associated (VA) RNA は宿主遺伝子発現に影響を与える。第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013

前川文、裴崢、鈴木まりこ、吉岡貴史、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、齋藤泉. 細胞特

異的長期発現持続型 mini-adenovirus vector (mini-AdV)の開発、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013
鈴木まりこ、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉. E3領域への目的遺伝子の挿入はアデノウイルスベクターの作製効率に影響を与えるか：ベクター/目的遺伝子キメラ mRNA の生成、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013

〔図書〕(計2件)

近藤小貴、前川文、斎藤泉、鐘ヶ江裕美. 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、裴崢、斎藤泉、鐘ヶ江裕美. 羊土社、実はもっと簡単に使いやすいアデノウイルスベクター、実験医学、第32巻、103-108、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：

VA 遺伝子破壊アデノウイルスベクターおよびそれを調製するための前駆体ベクター

発明者：鐘ヶ江 裕美、斎藤 泉

権利者：同上

種類：特許、

番号：特願 2012-213069

出願年月日：2012年09月26日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

鐘ヶ江 裕美 (KANEGAE, Yumi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80251453

(2)連携研究者

斎藤 泉 (SAITO, Izumu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70158913