

博士論文

論文題目 高力価VA RNA欠失アデノウイルスベクターの
新規作製法の開発と応用

氏 名 前川 文

要旨

アデノウイルスベクター (AdV) ではウイルスタンパク質は発現しないが、**polIII**により転写される **VA RNA** が常に発現している。本研究では、本来の **VA RNA** 遺伝子を破壊し、**FLP** で除去可能な **VA RNA** 遺伝子に置換した **pre-vector** を通常の方法で作製し、**FLP** 高発現 293 細胞に導入する **VA** 欠失 AdV 作製法を確立した。調製されたベクターの **pre-vector** の混入は 3%以下であり、しかも十分に応用可能な高力価を保持し、目的遺伝子発現効率も AdV と遜色がなかったことから、今後 AdV は **pre-vector** として作製を行い、目的に応じて **VA** 欠失 AdV を調製することが一般化するのではないかと考えられる。

目次

1. 序論	1
2. 材料及び方法	9
2.1 細胞培養.....	9
2.2 pre-vector作製用コスミドの構築.....	9
2.3 VA欠失AdV作製用pre-vectorの作製.....	11
2.4 力価測定法.....	12
2.5 Southern blot.....	13
2.6 Northern blot.....	14
2.7 逆転写反応.....	15
2.8 TaqMan PCR (qPCR).....	16
2.9 GFP蛍光強度測定.....	17
3. 結果	18
3.1 VA RNA発現細胞株からのVA RNAの定量.....	18
3.2 VA欠失AdV新規作製法の概略.....	18

3.3	VA RNAの配列と欠失領域.....	20
3.4	作製したpre-vectorとVA RNA欠失後の構造.....	22
3.5	hFLPe発現293細胞によるVA RNA欠失効率の検証.....	23
3.6	ウイルス増殖条件によるVA RNA欠失効率の高感度な検証.....	25
3.7.	VA欠失AdVの力価測定.....	26
3.8.	VA欠失AdVからの目的遺伝子発現量の定量.....	27
4.	考察.....	29
5.	参考文献.....	38
6.	謝辞.....	51
7.	図表.....	52

1. 序論

アデノウイルス（Ad）は約36kbの直鎖状二本鎖DNAをゲノムとして持つ非エンベロープタイプのウイルスである。カプシド表面に細胞への吸着に必要なファイバー、侵入に必要なペントンベースを配した正二十面体構造を持つ（図1A）。大きくAからFまでの6種類のサブタイプに分かれ、血清型は55型まで報告されており（図1B）、小児の風邪や結膜炎の原因ウイルスとして知られている。

12型Adのハムスターにおける発癌性が報告され分子生物学的な解析が盛んに行われてきたが、ヒトの癌との直接的な因果関係が証明されなかったこともあり、癌ウイルスというよりも転写因子の同定などの研究に応用されていた。1990年代には、Adをベクターとして応用する試みが始まったが¹、作製法が煩雑であり汎用されるには至っていなかった。Graham、Saitoらによるベクター作製法の改良やキット化が進んだこともあり、現在では遺伝子治療のみならず多くの基礎研究にも応用されている^{2,3}。

汎用されているアデノウイルスベクター（AdV）は第一世代AdV（FG AdV）あるいは非増殖型AdVとも呼ばれている。FG AdVには、小児の風邪の原因ウイルスのひとつであるアデノウイルス5型が主として利用される。FG AdVは、ウイルスの全ての初期遺伝子プロモーターをトランスに活性化するE1Aタンパク

質をコードしているE1領域を欠失している。そのため、E1領域が細胞染色体に挿入されているヒト胎児腎臓細胞由来の293細胞でのみ、恒常的に発現しているE1Aタンパク質により、AdVゲノム上のポリメラーゼを含む全ての初期タンパク質のプロモーターが活性化され、ウイルスゲノム末端に共有結合している末端タンパク質をプライマーとしてゲノムの複製が可能である⁴ (図1C)。しかし、それ以外の細胞では教科書的にはウイルス由来のタンパク質は発現せず、E1欠失領域に挿入した目的遺伝子のみを発現するとされている⁵ (図2左)。

またE3領域には、MHCクラス I 分子複合体の細胞表面への提示を減少させる機能などをもつ宿主免疫抑制遺伝子がコードされており、培養細胞でのウイルス増殖には関与していないことが知られている。そのため挿入可能な目的遺伝子のサイズを最大にするため、E3領域も欠失することで最終的に7.5kbの目的遺伝子の挿入が可能である^{2,6,7}。

FG AdVは、レトロウイルスベクターなどとは異なり、染色体への積極的な挿入機構を持たないため、一過性の発現ベクターであり、プラスミドのトランスフェクション効率を100%にしたベクターとも言える。また、塩化セシウム平衡密度勾配遠心により簡便に*in vivo*への直接投与が可能で 10^{10} plaque-forming units (PFU) オーダーのベクター調製が可能である。FG AdVの最大の利点は、神経

細胞を含む多くの細胞種に高い遺伝子導入効率を示すことであり、例えば、接着系細胞である肝細胞癌由来のHepG2、サルの腎臓由来のVero及びマウスのNIH-3T3細胞等へは非常に高い遺伝子導入効率を示す。一方血球系細胞であるJurkatやEB形質転換B細胞、マウスB細胞由来のBa/F3細胞では、細胞により異なる遺伝子導入効率を示すが総じて低い導入効率を示す（図2右）。最も高い遺伝子導入効率を示すのは肝臓由来の細胞であり、例えばマウスの尾静脈からAdVを静脈注射すると約90%が肝臓へ導入されることが知られている。

しかし、*in vivo*投与では特に肝臓において強い炎症反応が認められ、ベクターそのものに依存した免疫原性が認められた。教科書的にはFG AdVではウイルスタンパク質は発現しないはずであるが、免疫原性の原因となるウイルス由来タンパク質の探索が行われ、複数のウイルスタンパク質の可能性が示唆されてきたが、特定には至っていなかった。Nakaiらは、目的遺伝子発現単位挿入領域の直下のベクターゲノムにコードされているpIXタンパク質が、目的遺伝子発現に用いた外来の強力なウイルスプロモーター（CAGまたはCMV）のエンハンサー依存的に発現したためにこの免疫原性による炎症反応が誘起されていたことを見いだした（図3上）。またこのpIXタンパク質の発現や炎症反応は、目的遺伝子発現単位を全く持たないコントロールベクター（Ax1w1）やエンハンサー効果

を生じない細胞由来のEF1 α プロモーターを目的遺伝子発現用プロモーターとして利用したFG AdVでは誘起されず、EF1 α プロモーターからヒト成長ホルモンを発現するFG AdVではマウスにおいて6ヶ月間発現が持続したことも報告した。この結果から齋藤らはEF1 α プロモーターを用いるFG AdVを「低炎症型FG AdV」として命名し⁸、FG AdVの遺伝子治療への応用が可能なFG AdVを目指して改良を進めてきた。

「低炎症型FG AdV」ではウイルス由来タンパク質の発現がほぼなくなったことから、FG AdVの有用性は格段に上昇した。しかし、今まであまり問題視されていなかったが、FG AdVにはRNA polymerase IIIにより転写される2種類のウイルス関連RNA (Virus-associated RNA ; VA RNA) コード領域が残存している。E1領域を欠失した「低炎症型FG AdV」ではRNA polymerase IIにより転写されるウイルス由来のタンパク質はないが、VA RNAはpolIIIプロモーターから転写されるため、目的遺伝子以外に唯一発現してしまっているウイルス由来の転写産物であると言える (図3下)。

VA RNAにはVA I 及びVA II の2種類が存在し、アデノウイルス5型の約30 map unit (10576-11034 nt) にコードされているそれぞれ約160 ntのsmall RNAである (図4上)。VA I は全ての血清型、VA II においても約80%の血清型に存在してお

り、配列的には多様性が見られるが、その二次構造は血清型間で高く保存されている。A box, B boxとよばれる内在性プロモーターにより転写されており、野生型のアデノウイルスでは、VA RNAの発現は感染の極めて初期から始まる。感染後期、すなわちDNAゲノム複製以降、細胞あたり約1万コピーまで増幅するアデノウイルスゲノムに伴い、VA RNAも大量に発現する。VA RNAはpre-microRNA (pre-miRNA) やshort-hairpin RNA (shRNA) とよく似たstem-loop構造をとるため、同様のプロセス、すなわちExportin 5により細胞質へ輸送され、Dicerにも結合する。その結果、Exportin 5やDicerを飽和させることにより宿主細胞内のpre-miRNAやshRNAなどのRNAi機構を攪乱させることが報告されている⁹⁻¹²。最も有名な機能は、インターフェロン (IFN) で活性化されるProtein kinase R (PKR) にVA I が直接結合してPKRの活性化を阻害した結果、PKRによる翻訳開始因子eIF-2のリン酸化が阻害され、翻訳阻害を阻止することである^{13,14}。その結果、細胞のウイルス防御機構を抑制し、ウイルス増殖に適した環境を整えることに寄与していると考えられている¹⁵。しかし、VA RNAはE1Aタンパク質と同様に極めて初期から発現しており、そのウイルス学的な役割は不明であった。

AdVではアデノウイルスゲノム複製状況下と比べれば発現しているVA RNAの量は少なく、VA RNA発現の残存がベクターとして大きな問題ではないと認識

されていたが、2010年、Aparicioらにより、VA RNAが細胞内でshRNAやmiRNAと同じ経路でプロセスされた結果、miRNA（mivaRNA I と mivaRNA II）となり、宿主細胞側の複数の遺伝子発現を変動させていることが報告された¹⁶（図4表）。またFG AdVでは任意のプロモーターの応用が可能であるため、U6あるいはH1などのpol IIIプロモーターを用いてshRNAを導入するツールとしての有用性が高く、既に多くの論文が報告されてきた¹⁷⁻²¹。しかしVA RNAはshRNAと同様の経路でプロセスされるため、shRNAの成熟化に競合拮抗することが報告されており、AdVはshRNA発現ベクターとして十分な活性を示していない可能性も示唆された^{12,22}（図5）。

これらの発見により、VA RNA発現が残存したままでFG AdVを応用することは、常にVA RNAによる影響を視野にいれる必要が生じるため、VA RNAを欠失したAdV（VA欠失AdV）の必要性が高まっていた。VA RNAはウイルス増殖に厳密な意味では必須ではない。しかし、VA RNAを完全欠失しE1を保持したアデノウイルスの増殖は1/60以下に低下することが報告されていた¹⁵。我々は、VA RNAコード領域を完全欠失したVA欠失AdVの作製を293細胞で試みたが、得ることはできなかった。その原因のひとつとして、VA RNAコード領域の近傍の遺伝子配列およびその発現がcisにFG AdVの増殖に影響を与えていた可能性が考えられ

た。そこで、VA RNAのプロモーターとして機能しているVA RNAコード領域内の一部を欠失したVA欠失AdVの作製を試みたが、やはり困難であった。すなわち、発現したVA RNAそのものが増殖に直接の影響を与えていたことが示唆された。

そこで、VA RNAがIFNにより誘導されるPKRの活性化を阻害することでウイルス増殖環境の整備に寄与しているという報告を応用して、Rasの恒常的な発現によりPKRが常に不活化されている293T細胞を用いてVA欠失AdVの作製を試みた（図6A）。FG AdVの作製には2週間以上細胞を維持することが必要であるが293T細胞は293細胞とは異なり細胞を維持することが難しく、図6A写真左に示したように、細胞死とウイルス生成による細胞変性（cytopathic effect : CPE）との識別は困難であった。そこでdsRedをVA欠失AdV生成確認用マーカーとして挿入し、生成したAdVを可視化することによりVA欠失AdVの作製に成功したが、常にVA欠失AdV生成確認用マーカーが必要であり、ベクター力価も通常の1/100程度に留まっていた。VA RNAをテトラサイクリン誘導型で発現する293細胞を用いたVA欠失AdV作製法も2011年に報告されたが、この報告ではVA欠失AdVの力価は通常ベクターの1/1000以下と極めて低かった²³（図6B）。

そこで本研究では、全く異なる発想でVA欠失AdVを作製する新規作製法を開

発した。その方法は、部位特異的組換え酵素FLPの標的配列であるFRTをVA RNAコード領域の両側に挿入（以下、FVF断片）し、通常の293細胞でVA欠失AdVの前駆体であるVA保持AdV（pre-vector）として作製する。この段階ではFG AdVと同様にウイルスゲノム複製時にVA RNAが十分に供給されるため、十分に高力価のpre-vectorを調製することが可能であった。これまでの293T細胞を用いたVA欠失AdVの作製における知見から、高い感染量で293細胞へVA欠失AdVを導入すると、効率は劣るもののベクター増殖は低レベルで可能であった。そこで、この高力価pre-vectorを大量にhFLPe高発現293細胞に感染することで、hFLPeによりFRTで挟まれたVA RNAコード領域（FVF断片）が環状に切り出され、VA RNAのみを欠失することができ、かつ高力価を維持することが可能ではないかと考えた。

本論文では、FG AdVでウイルス遺伝子産物の発現が唯一残存していたVA RNA遺伝子を欠失したVA欠失AdVを高力価で簡便に作製する新規作製法を確立し、複数の目的遺伝子を発現するVA欠失AdVの作製に成功したので報告する。

2. 材料及び方法

2.1. 細胞培養

VAを保持しているpre-vectorの作製にはアデノウイルスのE1A、E1Bタンパク質を恒常的に発現するヒト胎児腎臓細胞由来293細胞（ATCC）を用いた²⁴。Southern blotの解析には293細胞及びヒト肝細胞癌由来HuH-7細胞を用いた。TaqMan PCR（qPCR）の解析では、HuH-7細胞、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞を用いた。これらの細胞は10%牛胎児血清（Gibco-BRL）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM（Gibco-BRL））（10%FCS-DMEM）を用いて、37°C、5%二酸化炭素の条件下で培養した。また、AdV導入及び導入後の維持には5% FCS-DMEMを用いた。

VA欠失AdVの作製には、ヒト型・温度安定型FLP（hFLPe）²⁵を高度に発現する293細胞由来の細胞株hde12細胞を用いて作製した。hde12細胞の培養には0.75mg/mL G418（Invitrogen）添加10% FCS-DMEMを用いた。

2.2. pre-vector作製用コスミドの構築

pVA41daはアデノウイルス5型の10576-11034 ntにコードされているVA I とVA II 遺伝子領域をもつプラスミドである。pVA41daをVA I, VA II領域両端のHindIII

-*Xba*Iで切断し、平滑末端後、pUFwF²⁶の*Swa*Iサイトに挿入し、VA I、VA II領域の両端がFRTで挟まれた断片（FVF）を有するpUFVA41daFを作製し以下の実験に供した。

2種類のpre-vector作製用コスミドカセットは、E1領域とE3領域を除くAdVゲノム全長をもつコスミドカセットpAxcwit2から構築した²⁷。E4領域にFVFを挿入したコスミドカセットであるpAxdV-4FVFW（E4挿入型）は、pAxcwit2に存在する本来のVA I 及びVA II 発現用polIIIプロモーターを部分欠失することによりVA RNAが発現しない様に作製されたコスミドであり、E1領域に目的遺伝子発現単位のクローニングサイト*Swa*Iをもち、E4領域の右端側（35770 nt）にある*Sna*BIサイト²⁸にFVF断片を有する。この*Swa*IクローニングサイトにEF1 α プロモーターからGFPを発現する発現単位を左向きに挿入し、GFP-E4挿入型のpre-vector作製用コスミドpAxdV-4FVF-GFPを作製した。Cre-E4挿入型のpre-vector作製用コスミドpAxdV-4FVF-NCreは、GFP遺伝子の代わりに核移行シグナル付加Cre²⁹を挿入したことを除き、pAxdV-4FVF-GFPと同様の構造を持つ。

もう一方のpre-vector作製用コスミドカセットであるpAxdV-FVF-4c（VA置換型）はpAxcwit2のVA RNA領域ほぼ全長（10635-11012 nt）を欠失し、FVF断片と置換して作製した。このコスミドカセットのE1領域にある*Swa*Iクローニングサ

イトにGFP発現単位を挿入することにより、GFP-VA置換型のpre-vector作製用コスミドpAxdV-FVF-GFPを作製した。またSR α プロモーター³⁰からCherry遺伝子を発現する発現単位をpAxdV-FVF-4cのE4領域右端側にある*Cl*Iサイトに挿入し、E4Cherry-VA置換型のpre-vector作製用コスミド pAxdV-FVF-4SRCheを作製した。

2.3. VA欠失AdV作製用pre-vectorの作製

pre-vectorの作製は、完全長ウイルスゲノム導入法²⁷を用いて通常のAdV作製法に則り行った。pre-vector作製用コスミドのアデノウイルスゲノム両末端には、アデノウイルスゲノム及び発現単位を切断しない制限酵素*Pac*Iサイトが挿入されているため、*Pac*Iで切断することにより完全長ウイルスゲノムの両末端を露出後、293細胞にTransfast (Promega) を用いて導入した。翌日96穴プレートにまき直して培養を続け、細胞変性が確認されたウェルから培地ごと細胞を回収し、密閉型ソニケーター (BioruptorII, コスモバイオ) を用いて氷水中で、30秒間、4回の超音波処理後、6,000rpm、5分間、4°Cで遠心し、上清を1st seedとした。得られたpre-vectorの1st seedを24穴プレートに感染して2nd seedを得た。2nd seedのpre-vectorを293細胞に感染し3rd seedを調製後、更に3rd seedを293細胞に感染して4th seedを調製し、実験に供した。

2.4. 力価測定法（図7）

全てのAdVの力価はTaqMan PCRによる定量PCR（qPCR）を応用したアデノウイルスベクター迅速定量法を用いて測定した³¹。汎用されているAdV力価測定法は、AdV作製細胞である293細胞を用いたAdVによる細胞変性あるいはウイルスタンパク質の定量により算出される。しかし本研究ではウイルス増殖に影響を与えるVA RNAが存在するAdVと欠失したAdVを比較するため、通常力価測定法では正確な力価測定は不可能である。一方、この迅速定量法はAdVが複製しない細胞を用いて細胞内に導入されたベクターDNAコピー数をqPCRで算出する。その際、力価測定時の細胞状態による影響を最小限に留めるため、AdV力価既知のコントロールベクターのCt値と希釈倍率との直線性を基に、目的ベクターのCt値から相対的にAdV力価を算出する（rVT；相対的ベクター力価）。そのため本研究で危惧されるウイルス増殖に影響を与えるVA RNAの有無によるベクター力価への影響を最小限に留めることが可能である。

pre-vector及びVA欠失AdVとともにコントロールベクターとして既に力価が既知であるAxCAGFPを6穴プレートのHeLa細胞に導入し、2日後に細胞表面をPBS（－）で2回洗浄した。TNE buffer 400uL、Proteinase K溶液（20mg/mL）4μL、10%SDS 4μLを加えて回収後50℃で2時間反応した。フェノール／クロロホルム

処理を2回、クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈殿を行い、RNaseA処理により細胞総DNAを抽出した³²。抽出した細胞総DNAをアデノウイルスゲノム上のpIX領域に対応するプライマー・プローブ (Table 1 : AdV) ^{28,31}を用いてABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Bioystems) でqPCRを行った (図7A)。AxCAGFPのCt値と目的ベクターのCt値の差から、相対的な目的ベクターの力価を算出した (図7B, C)。

2.5. Southern blot

pre-vector及びそのVA欠失AdVを6cm dish のHuH-7細胞に導入し3日後、あるいは293細胞に導入し18時間後にPBS (-) で2回洗浄後、導入細胞を回収した。得られた導入細胞にTNE buffer 700 μ L、Proteinase K溶液 (20mg/mL) 14 μ L、10% SDS 7 μ Lを加え、50 $^{\circ}$ Cで2時間反応した。その後、フェノール処理を2回、クロロホルム処理を2回行った後エタノール沈殿を行い、RNaseA処理後細胞総DNAを抽出した。抽出した細胞総DNAを*KpnI*あるいは*EcoRV*で切断後、1% TAEアガロースゲルを用いて、30Vで16時間あるいは80Vで3時間電気泳動した。泳動したDNA断片を一定の長さに切断しトランスファーの効率を均一にするために、電気泳動したゲルを0.1-N HCl、350mLを用いて20分振とうし、酸処理を行った

(Saito, MCB, 1989)。その後アルカリ処理、中和処理を経て、capillary transfer法を用いてナイロンメンブレン (Hybond-N; Amersham GE) 上にトランスファーした。その後常法により $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ のUV照射 (Spectronics) を行い、DNAをメンブレン上にクロスリンクした。68°Cにて6時間以上prehybridizationを行った後プローブを加え68°Cで一晩hybridizationを行った。

プローブにはアデノウイルスゲノムをEcoRVで完全切断して得られる1.2 kbの断片 (9202-10440 nt) 及びBgl I で完全切断して得られる1.7 kbの断片 (30823-32495 nt) を、またPst I とBspE I で完全切断して得られる1.2 kbの断片 (33884-35055 nt) を、DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics) を用いてジゴキシンゲンで標識したものをを用いた。

フィルターを室温の2×SSC-SDSで3回 (5分/回) 洗浄した後、68°Cの0.1×SSC-SDSで2回 (20分/回) 洗浄した。その後室温で30分ブロッキングしwash bufferで4回 (10分/回) 洗浄後、20μLの発光基質CDP-Star (Roche Diagnostics) を加え、LAS-4000 (Fuji Film) を用いて特異的なバンドを検出した。

2.6. Northern blot

pre-vector及びそのVA欠失AdVを10cm dish のHuH-7細胞に導入し3日後、ある

いは293細胞に導入し18時間後にPBS (-) で2回洗浄後回収した。得られた導入細胞からNucleoSpin[®] miRNA (MACHEREY-NAGEL) を用いて定法通りに総RNAを抽出した。抽出した総RNAを2% TAEアガロースゲルを用いて、120V、2時間で電気泳動した。電気泳動したゲルをアルカリ処理、中和処理を経て、capillary transfer法を用いてナイロンメンブレン (Hybond-N⁺; Amersham GE) 上にトランスファーした。その後、Southern blotと同じ方法により特異的なバンドを検出した。

VA I の検出にはアデノウイルスゲノムの10583-10818 ntまでの断片を、VA II の検出には10583-11049 ntまでの断片をプローブとして用いた。

2.7. 逆転写反応

細胞から総RNA抽出した所定量のRNA 700ngに対してTaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) キットを用いて、25 mM MgCl₂、10 mM dNTP mixture、10×RT buffer、50μM random hexamer、20 U/μL RNase inhibitor、50 U/μL MultiScribe Reverse Transcriptaseを加え、全量100μLの反応系で25°C 10分間、48°C 30分間、95°C 5分間、Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行った。

2.8. TaqMan PCR (qPCR)

VA RNA量及び目的遺伝子のmRNA量の定量は、逆転写反応後のDNAを用いて行った。DNAに250 nMのTaqManプローブ、900 nM 5' プライマー、900 nM 3' プライマー、1×内在性コントロール、1×TaqMan^R Universal PCR Master Mixを加え、純水で全量50 µL/wellとした。これを各サンプル180µL調製し、96-well Optical Reaction Plateの3 wellに50µL/wellずつ分注し、Optical Adhesive Cover Starter Kitでしっかりとカバー後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて50°C 2分間、95°C 10分間行い、95°C 15秒間、60°C 1分間で40サイクルの反応を行った。VA I 及びVA II の定量及びGFPの定量に用いたプライマーはTable 1に示した。細胞のRNA量は18S-rRNAのプライマー (Applied Biosystems) を用いて算出し、補正を行った。

細胞に導入されたベクターコピー数の算出には、NucleoSpin^R miRNA及びNucleoSpin^R RNA/DNA Buffer set (MACHEREY-NAGEL) を用いて抽出した細胞総DNAを用いた。細胞のDNA量はβアクチン遺伝子のプライマー・プローブ (Table 1) を用いて算出し²⁸、補正を行った。導入されたウイルスゲノムコピー数の定量には、アデノウイルスゲノム上のpIX領域に対応するプライマー・プローブ (Table 1) を用いた^{28,31}。

2.9. GFP蛍光強度測定

6穴プレートのHuH-7細胞に対しGFP発現pre-vector及びそのVA欠失AdVを感染し3日後、その培地をHanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen) と置換し、Fluoroscanner Ascent FL (Lab systems, Thermo Scientific) を用いて、GFP蛍光強度を測定した。

3. 結果

3.1. VA RNA発現細胞株からのVA RNAの定量

VA欠失AdVの作製は世界的に非常に困難で、既に報告されているVA発現細胞株を用いた作製法でも通常ベクターの1/1000以下と極めて低い力価しか得られていなかった²³。そこで、VA RNAを保持しているFG AdVが293細胞で増殖しているときのVA RNA発現量と、VA発現293細胞でのVA RNAの発現量を定量した。これまでVA RNAの定量はnorthern blotが主流であったが、qPCRによる正確な定量を行うために、まずVA I 及びVA II を独立して定量可能なqPCR用プライマー・プローブの検索を試みた。

VA I とVA II の二次構造には相同性があり、それぞれ約160 ntほどしかないsmall RNAであるため、この領域を認識するプライマー設計は困難であることが予想された。そこで、まずVA I あるいはVA II 遺伝子をもつプラスミドを段階希釈し、設計した複数のプライマー・プローブ (図8A) を用いてqPCRによる定量を試みた。その結果、Table 1に示したVA I プライマー・プローブのprVA I -3及びVA II プライマー・プローブのprVA II -2は、2種類のVA RNAを各々特異的に認識し、高感度で定量可能なプライマー・プローブであった (図8B)。

次に、VA保持GFP発現FG AdVを用いて同一ベクター上から発現するVA I 、

VA II 及びGFPのmRNAの定量をqPCRにより行った。FG AdVを段階希釈後HeLa細胞に感染し、3日目に総RNAを抽出し、逆転写後各々のプライマー・プローブを用いてqPCRを行った結果、ベクターの感染量とVA I 及びVA II のThreshold cycle値 (Ct値) に直線性の相関があることが確認されたため、本研究で同定されたプライマー・プローブによるVA I、VA II の定量が可能であると結論した (図8C)。

このプライマー・プローブを用いて、VA欠失AdV作製のために樹立化したVA発現293細胞株³³のVA RNA発現量を定量した。またFG AdVを293細胞に導入し3日目のVA RNA発現量を定量した。その結果、VA発現293細胞におけるVA I 及びVA II の発現量は、FG AdVのそれぞれ1/550および1/720であり (図8D)、VA発現293細胞からのVA RNA供給量の不足によりベクターが十分に増殖できなかった可能性が示唆された。

3.2. VA欠失AdV新規作製法の概略

本研究では、通常のFG AdVとしてまず十分なベクター量を確保した後、293細胞で複製中のAdVゲノムからVA RNA領域を欠失してVA欠失AdVを作製する方法の確立を試みた。そのためには、高効率にVA RNAを欠失するシステムが必

要であるため、部位特異的組換え酵素FLPの温度安定型であるFLPeのcodon usageをヒト型化した、ヒト型・温度安定型FLP (hFLPe)³⁴を応用することにした。

hFLPe高発現293細胞は、約1万コピーまで増幅するアデノウイルスゲノム上に挿入したFLP標的配列であるFRT間を95%以上環状に切り出すことが可能であることが報告されていた²⁵。

図9には本法の概略を示した。VA RNAコード領域の両側にFRT (以下、FVF断片)を挿入し、通常の293細胞でVA保持AdV (pre-vector)として作製する。この高力価pre-vectorを大量にhFLPe高発現293細胞に感染することで、hFLPeによりFVF断片が環状に切り出された結果、VA RNAのみを欠失し、かつ高力価を維持することが可能ではないかと考えた。

3.3. VA RNAの配列と欠失領域

VA RNAについては、VA RNAが内在性pol IIIプロモーターから転写されること、特にB-box配列がプロモーター活性に必須であること、及びVA RNAコード領域の上流配列が転写効率に関与していることが報告されていた^{35,36}。この上流配列に関しては、VA RNAコード領域の41塩基上流までの配列を有するプラスミドを用いた解析から、VA RNA転写効率は十分に保持されていたことを確認した (data

not shown)。

一方で、VA RNAのコード領域近傍にはベクターの増殖に必須である末端タンパク質 (pTP) と52/55Kタンパク質のコード領域があり、特に裏鎖にコードされているterminal protein precursor (pTP) のイントロンにVA RNAのコード領域が存在する。そのため、VA RNAコード領域を広く欠失した場合にはpre-vectorの作製が困難になる可能性が考えられた。そこで、まずVA RNAコード領域のpol IIIプロモーターの発現に必須なB-box配列の十数塩基だけを欠失し、E4領域右側にFVF断片を挿入したE4挿入型pre-vectorの作製を行った (図11A上段参照)。

図10AにはFVF断片の中の機能的VA I、VA II 遺伝子の全塩基配列を示した。pTPの異所的なスプライシングの影響を避けるため、VA I の5'末端上流に存在するpTPのsplicing acceptor siteのAG配列をCCに置換することで破壊した。図10AにはVA I とVA II のプライマー・プローブの位置も同時に示した。図10Bには、pol IIIプロモーターを不活化するための欠失領域を示した。本来のVA RNAコード領域のB-boxを含むVA I では15塩基、VA II では17塩基を欠失し、代わりに、E4領域右側にFVF断片を挿入したpAxdV-4FVF-w (E4挿入型) コスミドカセットを作製した。

このE4挿入型AdVの構造ではB-boxのみが異なる約460塩基のVA RNAコード

領域が同一ベクターゲノム上の本来のVA RNA領域とE4領域右側に存在している。そのため、293細胞でのpre-vector作製中に相同組換えが起きpre-vector作製が困難になる可能性が残っていた。そこで、図10Cに矢印で示した、本来のVA遺伝子のほぼ全長を欠失させ、FVF断片と置換したベクター（図11A下段）を作製するため、pAxdV-FVF-w（VA挿入型）コスミドカセットを構築した。

3.4 作製したpre-vectorとVA RNA欠失後の構造

AdVではE1置換部位およびE4挿入部位の二つのクローニングサイトが利用できる。E4挿入型は、E4領域右側のクローニングサイトにFVF断片が挿入されているため、E1クローニングサイトのみに目的遺伝子発現単位の挿入が可能であり、E1にEF1 α プロモーターからGFPを発現する発現単位（AxdV-4FVF-GFP）あるいは、核局在シグナル付きCreを発現する発現単位（AxdV-4FVF-NCre）を挿入しpre-vectorを通常のFG AdV作製法で作製した（図11A上段）。VA置換型は、E1に加えてE4クローニングサイトにも目的遺伝子発現単位の挿入が可能であるため、E1にEF1 α プロモーターからGFPを発現するAxdV-FVF-GFPあるいはE4にSR α プロモーターからCherryを発現するAxdV-FVF-4SRCheを作製した（図11A下段）。E4にFVF断片を挿入した場合にも、VA RNAコード領域をFVFに置換した

場合にも高力価のpre-vectorの作製が可能であった。

図11B右側に、hFLPe発現293細胞に感染して得られると想定されるVA欠失AdVの構造を示した。E4挿入型由来のVA欠失AdVでは、本来のVA RNAコード領域ではVA I とVA II のB-boxが欠失しているためVA RNAの発現はなく、E4領域にFRTのみが残存するのではないかと考えた。一方、VA置換型ではFLPにより欠失したVA RNAコード領域にFRTのみが残存すると考えられる。

実際に行ったVA欠失AdVの作製法をGFP発現ベクターを例として以下に示した³⁷。pre-vectorの2nd seedをhFLPe高発現293細胞あたり10コピーで導入し、得られたVA RNAを欠失したAdVを1st stockとする。hFLPeにより切り出された環状分子(図11B中央)、及び切り出される前のpre-vectorから発現するVA RNAが残存するため、1st stockの増殖が可能であると考えられる。次に、通常用いる5倍量の1st stockをhFLPe高発現293細胞に感染して2nd stockを得た。1st stockを大量に感染することにより2nd stockの増殖が可能であり、良好な細胞変性が確認された。得られた2nd stockをVA欠失AdVとして応用することが可能であるかの検討を行った(図11B右上、右下)。

3.5. hFLPe発現293細胞によるVA RNA欠失効率の検証

上記作製法により得た2nd stockには、hFLPeによりFVF断片が切り出されなかった少量のpre-vectorが混入している可能性があった。そこで、pre-vectorあるいは2nd stockをHuH-7細胞に感染し、3日後に総DNA/RNAを抽出した（図12A）。ここにはVA置換型由来のAxdV-F-GFPの結果を示した。

まずベクターゲノム構造を確認するために、総DNAを*KpnI*で切断後、Southern blotにより2nd stockのDNA構造を確認した結果を図12Bに示す。5.9kbのバンド（Constant）により、導入したベクターコピー数はほぼ同程度であったことが確認された。その条件下で、FVF断片を含むpre-vector由来の2.7kbのバンドは、VA欠失AdVでは全く検出されず、FVF断片が切り出された場合にのみ出現する2.2kbのバンドに完全にシフトしていた。この結果から、hFLPe高発現293細胞は、複製しているpre-vectorゲノムのVA RNAを効率的に欠失していたことが確認された。E4挿入型由来のAxdV-4F-GFPにおいても同様の結果が認められた（data not shown）。

次に、VA RNAの発現を確認するために抽出した総RNAを用いてnorthern blotを行った（図12C）。pre-vector（VA+）では多量のVA I及びVA IIが発現していたが、2nd stock（VA-）ではVA I及びVA IIともに検出されなかった。E4挿入型由来のAxdV-4F-GFPにおいても同様の結果を得た（data not shown）。また、CAG

プロモーターからGFPを発現する通常のFG AdVであるAxCAGFPとpre-vectorでは同程度のVA RNA量が発現していた (data not shown)。

更に詳細にVA RNA発現量を定量するためにqPCRを行った。pre-vectorあるいは2nd stockを導入したHuH-7細胞から総RNAを抽出し、逆転写反応後、qPCRによりVA I 及びVA IIを独立して定量した (Table 2)。その結果、2nd stock調製後のVA RNA残存量は、E4挿入型ではVA Iは1%未満、VA IIでは検出限界以下、VA置換型でもVA Iは2.9%、VA IIは1.4%と高効率でVA RNA発現量が減少したことが明らかになった。pre-vectorのVA発現量はFG AdVであるAxCAGFPと同程度であり、これらの結果は前述したnorthern blot (図12C) の結果と相関していた。

3.6. ウイルス増殖条件によるVA RNA欠失効率の高感度な検証

pre-vectorであるAxdV-4FVF-GFPの混入は、qPCRを用いてもほとんど検出されなかった。そこで、ウイルス複製条件下での高感度なバイオアッセイをさらに行った。

FG AdVの複製が可能である293細胞にE4挿入型のpre-vectorあるいは2nd stockを感染し、抽出した総DNA及び総RNAを用いてSouthern blotおよびnorthern blotを行った (図13A)。前述したHuH-7細胞での検証 (図12A) とは異なり、293細

胞ではVA RNAが発現しているpre-vectorのみが効率的に複製するため、pre-vectorの混入が微量でも残存したpre-vector由来のVA RNAを検出することが可能である。複製したベクターゲノムDNA中のVA RNAコード領域をSouthern blotを用いて解析したが、2nd stockに残存していた場合に出現する2.8kbのバンドはほとんど検出されなかった（図13B ; VA-）。northern blotを用いた解析では、2nd stockでもほんのわずかにVA RNAが検出されたが、非常に微量であった（図13C ; VA-）。

293細胞を用いたこの検証は定量的ではないが、これらの結果は、293細胞以外の、複製しない目的の細胞においては、混入したpre-vectorからはほぼVA RNAが発現しないと推定するに充分であることを示していたことから、この2nd stockをVA欠失AdVとして応用することとした。

3.7. VA欠失AdVの力価測定

本研究で作製した4種類のpre-vector、VA欠失AdV及びコントロールベクターとして用いたAxEGFPのベクター力価を「材料と方法」に示した迅速ベクター力価測定法により算出した（Table 3）。本法では、目的細胞に導入されたベクターコピー数を基にベクター力価を算出しているため、ウイルスとしての増殖能力が劣るVA欠失AdVにおいても正確なベクター力価算出が可能であった。

その結果、目的遺伝子として用いたGFP、Cre及びCherryの違いに関わらず全てのVA欠失AdVの力価はそれぞれのpre-vectorの約1/10（8-14%）程度に低下していたが、VA発現293細胞を用いた従来のVA欠失AdV作製法で得られたベクター力価²³の約100倍に相当する高力価であり、十分に応用可能な力価であった。また特にAdVとして作製が困難であることが知られているCreを発現するAxdV-4F-NCreを高力価に作製可能であったことから、本法は極めて高効率な作製法であると考えられた。

3.8. VA欠失AdVからの目的遺伝子発現量の定量

VA RNAが外来の目的遺伝子発現を上昇するという報告があり、VA RNAを挿入したプラスミドがプロメガ社より販売されていた³⁸。そこでVA RNA発現の有無がAdVにおいても目的遺伝子発現量に影響を与えるかどうかについてGFP発現ベクターを用いて検討を行った。pre-vectorまたはVA欠失AdVをHeLa細胞に導入し、3日後のGFP蛍光強度をAscentで、GFP mRNA量をqPCRで測定した（Table 4）。その結果、VA領域欠失方法の異なる両ベクターともVA欠失AdVのGFP発現量はそれぞれのpre-vectorと同程度であった。この結果から、目的遺伝子の高度発現が可能であるAdVにおいてはVA RNAによる遺伝子発現効率上昇効果は殆

ど認められず、VA欠失AdVの有用性には影響を与えないことが明らかになった。

4. 考察

本研究では、FG AdVで唯一残存していたウイルス由来RNAであるVA RNAを欠失したAdVを高力価で簡便に作製する新規VA欠失AdV作製法を確立した。目的遺伝子導入ツール、または機能解析などで応用されるベクターとしての有用性を考える上で、ウイルスベクターからのウイルス由来発現産物が無いことは重要な事であり、本研究により作製が可能となったVA欠失AdVの意義は高いと考える。

VA RNAはウイルス増殖に必須では無いこと、VA欠失アデノウイルスは、Rasの恒常的発現によりPKRが常に不活性化されている293T細胞を用いるだけで十分に作製が可能であるだけでなく、Ras発現細胞でのみVA欠失アデノウイルスが増殖する性質を応用した癌に対する遺伝子治療用ベクターとしての報告もあったため³⁹、VA欠失AdVの作製は容易であると考えていた。しかし、293T細胞やVA発現293細胞を用いたVA欠失AdVの作製は非常に困難であり、高力価のベクター調製は不可能であった。そこで、我々はVA RNAの発現量が高い293細胞の樹立化を試みたが、おそらくVA RNAの細胞毒性により、より高度に発現するVA発現293細胞の樹立には至らなかった。また、MachitaniらはVA RNAの細胞毒性を考慮して、テトラサイクリン誘導型VA RNA発現293細胞を作製して検討を報

告した。VA RNA発現量は我々の作製したVA RNAを直接発現する293細胞よりも高いと考えられるが、それでも高力価のVA欠失AdV作製が不可能であった。以上のことを考え合わせると、ウイルスタンパク質を欠失したウイルスをレスキューするために通常用いる細胞株からのVA RNAを補充する方法では、複製後期のVA RNA量には不十分で、高力価のベクター作製は困難である可能性が強く示唆された。

VA欠失ウイルスが作製可能でVA欠失AdV作製が非常に困難である原因として、VA欠失ウイルスでは細胞当たりのウイルス感染量として数十のウイルスが感染するため、一旦複製が始まれば細胞内で1万コピーまで増殖しVA RNAが発現しなくても、細胞のウイルス増殖抵抗機構に対抗するE4タンパク質などが高度に発現し同じ様な働きをしてウイルス増殖が可能であったと考えられた。一方、ベクターはトランスフェクションされたゲノムDNAから僅かに生成するウイルスタンパク質を用いていくつかの細胞で生成したベクターから徐々に複製が始まるため、ベクターコピー数が少ない期間に宿主側のウイルス増殖抵抗機構によりベクター増殖が困難になった可能性があるのではないかと考えた。そこでVA RNAを有した十分に高力価のpre-vectorを293細胞で調製した後、大量にこの高力価pre-vectorをhFLPe高発現293細胞に感染してVA欠失AdVを作製する

方法を考案した。

本研究結果から、pre-vectorをVA RNAの発現が無いhFLPe高発現293細胞に導入するだけで、VA欠失AdVを高力価で回収することが可能になったことから、やはりベクター生成初期の少ないコピー数の際に宿主側のウイルス増殖抵抗因子により生成したベクターの増殖が困難であった可能性が強く示唆された。pre-vectorを用いた特定ウイルス遺伝子欠失法は、アデノウイルスに限らず他の欠失ウイルスへの応用も可能ではないかと考えている。

また、本研究では、pre-vectorでのVA RNAの供給方法としてE4挿入型とVA置換型を用いた。既に数十種類のE4挿入型VA欠失AdVを作製したが、pre-vectorの力価が低下する現象は認められず、懸念されていた相同組換えの影響は殆どないと考える。しかし、VA置換型では、E4挿入型でVA RNA発現単位を挿入していたE4のクローニングサイトに目的遺伝子を挿入したデュアルベクター作製も可能であり利便性が高い。VA置換型でもE4挿入型と同程度の力価が得られたことから、現在では主にVA置換型を用いている。その結果、本法で作製したpre-vectorは通常のFG AdVとVA RNAコード領域のFRT配列を除いてほぼ同様の構造を有している。そのため現在、私の所属する研究室では全てのAdVをpre-vectorとして作製し実験に用いており、VA RNAによる影響が考慮される場合

には、pre-vectorをhFLPe発現293細胞に感染してVA欠失AdVを作製し解析を行っている。今後はAdVをこのpre-vectorで作製する方法が一般化するのではないかと考える。

この作製法に極めて重要なのは、1万コピーまで複製するAdVゲノム上からVA RNAコード領域を効率的に切り除くことを可能にしたhFLPe高発現293細胞であった。一般的に部位特異的組換え酵素には組換え効率の高いCreが用いられ、ウイルス由来のDNA領域をほぼ目的遺伝子と置換したヘルパー依存型AdVの作製にもCre発現293細胞が用いられている。この細胞株は複製しているヘルパーウイルスからウイルスパッケージング領域を切り除き、ヘルパー依存型AdVを濃縮するために用いられるが、Creによる切り出し効率は細胞株では70-80%に留まることが報告されていた^{40,41}。その原因として293細胞において高発現したCreの毒性による可能性が示唆されていた⁴²⁻⁴⁵。そのため混入したヘルパーウイルスを塩化セシウムステップ平衡遠心により取り除くなど、煩雑な操作が必要であった。

一方でCreに比べると一般的に組換え効率が低いとされているFLPはこれまで毒性は報告されていない。Kondoらの開発したFLPの温度安定型であるFLPeのcodon usageをヒト型化した、ヒト型・温度安定型FLP (hFLPe)³⁴は、通常のFLPの組換え効率を3倍上昇し有用性を高めていた。Takataらは、hFLPe発現293細胞

では、約1万コピーまで増幅するアデノウイルスゲノム上に挿入したFRT間を95%以上の効率で環状に切り出すことが可能であったことを明らかにした。これはhFLPeの組換え効率がCreと比べて劣るものの細胞への毒性が少なく、そのためhFLPeを高度に発現する293細胞株が樹立出来た可能性を示唆していた²⁵。このhFLPe発現293細胞は新規VA欠失AdV作製法だけでなくヘルパー依存型AdVの作製にも有用性が高く、我々はこの細胞株を用いてこれまで十数個のヘルパー依存型AdVを作製している。

本研究で得られた副産物として、VARNAコード領域がクローニングサイトとして応用可能である可能性が示唆された。AdVではほとんどのウイルスゲノム領域を残存しており、293細胞ではそこから発現するウイルスタンパク質を用いて増殖するため（図1C）、外来DNAの挿入が可能な部位は実は少なく、一般的にAdVへの目的遺伝子の挿入部位はE1領域置換型、E3領域置換型⁴⁶及びSaitoらが発見したE4領域挿入型（E4遺伝子コード領域右側）¹のみが今のところ報告されている。たとえ部位特異的組換え酵素の標的配列のような短い配列でもAdVゲノムに外来DNA配列が挿入されると、ウイルスタンパク質発現への影響が考えられ、AdVが複製できないまたは低力価となる場合が多い。VARNA本来の領域の両側にFRTをもつVA置換型pre-vectorが、FG AdVと同程度の力価を示したことが

ら、上記3領域に加え、VAコード領域を新たな外来DNA挿入領域として応用可能であることが示唆された。

本研究によりVA欠失AdVの作製が可能となり、KondoらはVA RNAの機能解析にVA欠失AdVを応用した⁴⁷。2010年にAparicioらにより、ウイルス複製後期に大量に発現したVA RNAがウイルス由来のmiRNA (mivaRNA)としてプロセスされ、RNA代謝に関わるTIA-1を含む多くの宿主細胞の遺伝子発現を低下させていたことから、VA RNAがRNA干渉機構を介して宿主側のウイルス増殖抵抗機構に対抗するために機能している可能性が提唱されていた¹⁶。

一方で、VA RNAの転写はpol IIIプロモーターにより起きるため、ウイルス増殖の極めて初期から転写されるRNAであるが、ウイルス感染初期におけるVA RNAの機能は解明されていなかった。つまり、目的細胞では複製しないためウイルス感染初期と同程度の少量のVA RNAしか転写されないFG AdVのVA RNA量でも細胞遺伝子の発現へ影響があるかどうかについては検討されていなかった。そのため、VA欠失AdVを用いなくても細胞へのVA RNAによる影響は少ない可能性も考えられていた。

そこで、Kondoらは本研究で作製が可能となったVA欠失AdVとVA RNAが発現するFG AdVをベクター増殖のない細胞に導入し、細胞遺伝子の発現変動をマイ

クロアレイ解析により検討した⁴⁷。その結果、Aparicioらの報告したTIA-1は、FG AdVを通常の量で細胞に導入した場合には発現量の低下が認められず、ベクターレベルのVA RNA転写量では影響を受けない遺伝子であった。一方、HDGF (hepatoma-derived growth factor) を含む複数の遺伝子の発現がAdVから発現する少量のVA RNAでも影響を受けていたことが新たに明らかとなり、特にHDGF遺伝子がウイルス感染初期におけるVA RNAの標的遺伝子となり、発現が抑制されることで、ウイルス増殖環境の整備に寄与していた可能性が示唆された。

すなわちFG AdVレベルの少量のVA RNAでも細胞の遺伝子発現が影響を受けることが明らかになったことから、目的遺伝子の機能解析等を行う場合に通常のFG AdVではVA RNAによる影響を考慮しなくてはならないため、VA欠失AdVは有用性が高いのではないかと考えている。

更に、VA欠失AdVの有用性はshort-hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターとしても実証された³³。PeiらはFG AdVから発現するVA RNAがshRNAの成熟化に競合拮抗し、shRNA活性を阻害するかについて、C型肝炎ウイルス (HCV) に対するshRNAを用いて検討を行った。HCVに対する2種類のshRNA (sh277, sh331) を発現するVA欠失AdVとそのpre-vectorを、HCV感染細胞系であるJFH-1感染細胞⁴⁸に導入し、qPCRを用いてHCV複製抑制効率を算出した。その結果、sh277あるい

はsh331を発現するVA欠失AdVを導入した場合のHCV RNAコピー数は、FG AdVよりも有意に低下していた。また、細胞中のHCVタンパクであるNS5Aをwestern blotにより検出した結果、sh277とsh331発現VA欠失AdV及びIFN発現AdVを導入した細胞ではNS5Aの発現が低下していた。以上の結果から、FG AdVからのVA RNAの発現はshRNAの成熟化を阻害し、その結果HCV複製抑制効果を減弱させていたことが明らかとなった。

small RNAを応用した遺伝子機能解析は、シグナル伝達、細胞分化、iPS研究等、さまざまな研究分野で広範囲に用いられており、shRNAやmiRNA発現FG AdVを用いた論文が既に多く報告されているが、Peiらの検討からVA欠失AdVを応用することにより更にshRNA活性が上昇する可能性が示され、これらの分野でのVA欠失AdVの有用性が示された。

現在私は、近年ゲノム編集に応用されているCRISPR/Cas9システムへのVA欠失AdVの応用を試みている。CRISPR/Cas9システムは、標的遺伝子と相補的な約20 merの配列を持つguide RNAと、DNAを切断するCas9タンパク質を細胞へ導入することで、標的部位を特異的に切断することが可能なシステムであり、従来用いられていたzinc-finger nuclease (ZFN) やtranscription activator-like effector nuclease (TALEN) と比較して、guide RNAを設計するだけで任意のゲノム切断

が可能なことから、遺伝子機能解析などへ応用されている⁴⁹⁻⁵²。CRISPR/Cas9システムへのAdVの応用は未だ報告数が少ないが⁵³、我々は高度にCas9を発現するAdV作製に成功した。CRISPR/Cas9システムでは、guide RNAの設計と転写量が重要であるが、guide RNAの発現にはpolIIIプロモーターであるU6やH1プロモーターが応用されることが多い。そこで、AdVを用いてguide RNAを発現する場合には、shRNAと同様、VA RNAと競合してしまう可能性を考えた（図14）。現在CRISPR/Cas9システムにVA欠失AdVを応用することにより、さらに効率的にゲノム編集が可能ではないかと考え、詳細な検討を行っている。

本研究で高効率かつ高力価で作製が可能になったVA欠失AdVは、目的遺伝子機能解析やshRNA及びCRISPR/Cas9システムの効率化において有用性の高いベクターであり、今後更に応用されていくと考えている。

5. 参考文献

- 1 Saito, I., Oya, Y., Yamamoto, K., Yuasa, T. & Shimojo, H. Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase hepatitis B virus DNA near the right end of its genome. *J Virol* 54, 711-719 (1985).
- 2 Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. & Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1320-1324 (1996).
- 3 Anton, M. & Graham, F. L. Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol* 69, 4600-4606 (1995).
- 4 Ginsberg, H. S. *The Adenovirus*. New York : Plenum Press (1984).
- 5 斎藤 泉. アデノウイルス・ベクター. 第 41 回日本ウイルス学会学術

総会, 北海道 (1993)

- 6 Zabner, J., Couture, L. A., Gregory, R. J., Graham, S. M., Smith, A. E. & Welsh, M. J. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75, 207-216 (1993).

- 7 Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C. S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A., Eissa, N. T. & Danel, C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 8, 42-51 (1994).

- 8 Nakai, M., Komiya, K., Murata, M., Kimura, T., Kanaoka, M., Kanegae, Y. & Saito, I. Expression of pIX gene induced by transgene promoter: possible cause of host immune response in first-generation adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 18, 925-936, (2007).

- 9 Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I. & Fortes, P. Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol* 80, 1376-1384(2006).
- 10 Xu, N., Segerman, B., Zhou, X. & Akusjarvi, G. Adenovirus virus-associated RNAII-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes. *J Virol* 81, 10540-10549, (2007).
- 11 Wahid, A. M., Coventry, V. K. & Conn, G. L. Systematic deletion of the adenovirus-associated RNAI terminal stem reveals a surprisingly active RNA inhibitor of double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283, 17485-17493(2008).
- 12 Lu, S. & Cullen, B. R. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* 78, 12868-12876 (2004).

- 13 Kitajewski, J., Schneider, R. J., Safer, B., Munemitsu, S. M., Samuel, C. E., Thimmappaya, B. & Shenk, T. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* 45, 195-200 (1986).
- 14 O'Malley, R. P., Mariano, T. M., Siekierka, J. & Mathews, M. B. A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI. *Cell* 44, 391-400 (1986).
- 15 Bhat, R. A., Domer, P. H. & Thimmappaya, B. Structural requirements of adenovirus VAI RNA for its translation enhancement function. *Mol Cell Biol* 5, 187-196 (1985).
- 16 Aparicio, O., Carnero, E., Abad, X., Razquin, N., Guruceaga, E., Segura, V. & Fortes, P. Adenovirus VA RNA-derived miRNAs target cellular genes involved in cell growth, gene expression and DNA repair. *Nucleic Acids Res* 38, 750-763, (2010).

- 17 Amarzguioui, M., Rossi, J. J. & Kim, D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* 579, 5974-5981 (2005).
- 18 Scherr, M. & Eder, M. Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle* 6, 444-449 (2007).
- 19 Mowa, M. B., Crowther, C. & Arbuthnot, P. Therapeutic potential of adenoviral vectors for delivery of expressed RNAi activators. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 1373-1385 (2010).
- 20 Liu, Y. P. & Berkhout, B. miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions. *Biochim Biophys Acta* 1809, 732-745 (2011).
- 21 Carnero, E., Sutherland, J. D. & Fortes, P. Adenovirus and miRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1809, 660-667 (2011).
- 22 近藤 小貴, 前川 文, 斎藤 泉, 鐘ヶ江 裕美. アデノウイルスベクタ

一の最近の進展：VA 欠失ベクターを中心に. ウイルス 第 63 卷 第 2 号, pp155-164, 2013

- 21 Machitani, M., Katayama, K., Sakurai, F., Matsui, H., Yamaguchi, T., Suzuki, T., Miyoshi, H., Kawabata, K. & Mizuguchi, H. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release* 154, (2011).
- 22 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74 (1977).
- 23 Takata, Y., Kondo, S., Goda, N., Kanegae, Y. & Saito, I. Comparison of efficiency between FLPe and Cre for recombinase-mediated cassette exchange in vitro and in adenovirus vector production. *Genes Cells* 16, 765-777 (2011).
- 24 Nakano, M., Odaka, K., Ishimura, M., Kondo, S., Tachikawa, N., Chiba, J.,

- Kanegae, Y. & Saito, I. Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP recombinase-expressing recombinant adenovirus. *Nucleic Acids Res* 29, E40 (2001).
- 25 Fukuda, H., Terashima, M., Koshikawa, M., Kanegae, Y. & Saito, I. Possible mechanism of adenovirus generation from a cloned viral genome tagged with nucleotides at its ends. *Microbiol Immunol* 50, 643-654 (2006).
- 26 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* 39, e7 (2011).
- 27 Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. & Saito, I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 23, 3816-3821 (1995).

- 28 Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. & Arai, N. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 8, 466-472 (1988).
- 29 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. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 945-950 (2012).
- 30 Nakano, M., Odaka, K., Takahashi, Y., Ishimura, M., Saito, I. & Kanegae, Y. Production of viral vectors using recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Res* 33, e76 (2005).
- 31 Pei, Z., Shi, G., Kondo, S., Ito, M., Maekawa, A., Suzuki, M., Saito, I., Suzuki, T. & Kanegae, Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression

- enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Sci Rep* 3, 3575 (2013).
- 32 Kondo, S., Takata, Y., Nakano, M., Saito, I. & Kanegae, Y. Activities of various FLP recombinases expressed by adenovirus vectors in mammalian cells. *J Mol Biol* 390, 221-230 (2009).
- 33 Furtado, M. R., Subramanian, S., Bhat, R. A., Fowlkes, D. M., Safer, B. & Thimmappaya, B. Functional dissection of adenovirus VAI RNA. *J Virol* 63, 3423-3434 (1989).
- 34 Cascallo, M., Gros, A., Bayo, N., Serrano, T., Capella, G. & Alemany, R. Deletion of VAI and VAII RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther* 17, 929-940 (2006).
- 35 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. *Sci Rep* 3, 1136 (2013).
- 36 Groskreutz, D. and Schenborn, E. Increased gene expression in mammalian cell lines using pAdVantage™ DNA as a co-transfectant. *Promega Notes* 48, 8-12 (1994).
- 37 Cascallo, M., Capella, G., Mazo, A. & Alemany, R. Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res* 63, 5544-5550 (2003).
- 38 Ng, P., Eveleigh, C., Cummings, D. & Graham, F. L. Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the Cre/loxP helper-dependent adenoviral vector system. *J Virol* 76, 4181-4189 (2002).
- 39 Ng, P., Parks, R. J. & Graham, F. L. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Mol Med* 69, 371-388 (2002).

- 40 Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers, J. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-9214 (2001).
- 41 Pfeifer, A., Brandon, E. P., Kootstra, N., Gage, F. H. & Verma, I. M. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11450-11455 (2001).
- 42 Silver, D. P. & Livingston, D. M. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* 8, 233-243 (2001).
- 43 Baba, Y., Nakano, M., Yamada, Y., Saito, I. & Kanegae, Y. Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 49, 559-570 (2005).

- 44 Berkner, K. L. & Sharp, P. A. Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* 11, 6003-6020 (1983).
- 45 Kondo, S., Yoshida, K., Suzuki, M., Saito, I. & Kanegae, Y. Adenovirus-Encoding Virus-Associated RNAs Suppress HDGF Gene Expression to Support Efficient Viral Replication. *PLoS One* 9, e108627 (2014).
- 46 Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T. J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11, 791-796 (2005).
- 47 Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31, 230-232 (2013).
- 48 Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J.

- E. & Church, G. M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826 (2013).
- 49 Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. & Doudna, J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2, e00471 (2013).
- 50 Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823 (2013).
- 51 Maggio, I., Holkers, M., Liu, J., Janssen, J. M., Chen, X. & Goncalves, M. A. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep* 4, 5105 (2014).

6. 謝辞

本研究は東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設で行われました。本研究の遂行及び論文の執筆にあたり、終始多大な御指導・ご鞭撻を賜りました、東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設 施設長 斎藤 泉教授、鐘ヶ江 裕美助教、近藤 小貴助教に深く感謝致します。

また、在籍した東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設で、貴重な助言を頂きました裴 崢さん、鈴木 まりこさん、吉岡 貴史さん、田畑 裕貴さん、佐藤 久美子さん、研究を陰ながら支えて下さった秘書の椎野 孝子さんに深く感謝致します。

7. 図表

Table 1 qPCRで用いたプライマー・プローブの配列

図1 アデノウイルス (Ad)

(A) ウイルス粒子と構造

(B) アデノウイルスの分類と増殖力

(C) アデノウイルス 5 型のコード領域

図2 第一世代アデノウイルスベクター (FG-AdV)

図3 FG-AdVの問題点

図4 VARNA

図5 VARNAはshRNAと同じ経路でプロセスされる

図6 従来のVA欠失AdV作製法

(A) 293T細胞 (Ras (+))

(B) VA発現細胞株

図7 qPCRによるAdV力価測定法

(A) 測定手順。

(B) コントロールベクターの力価測定。

(C) 目的ベクターの力価測定。

図8 VA発現細胞株からのVA RNAの定量

(A) プライマー・プローブの作製。

(B) プラスミドを用いた検量線

(C) VA保持GFP発現FG-AdVの希釈液を用いた検量線

(D) qPCRによるVA RNA量の定量。

図9 FLP発現293細胞を用いたVA欠失AdV新規作製法

図10 VA I、VA II領域

- (A) FRTで挟んだVA I、VA II 遺伝子の全塩基配列。
- (B) 内在性polIIIプロモーターを不活化するためのB-box欠失領域。
- (C) VA置換型におけるVA I – VA II 欠失領域。

図11 作製したpre-vectorとVA欠失AdV

- (A) 作製したpre-vectorの構造。
- (B) prevectorの構造及びVA欠失ベクターの構造。

図12 VA欠失AdVのVA RNA欠失を確認

- (A) 実験方法 (HuH-7細胞)。
- (B) Southern blotによるベクターゲノム構造の確認。
- (C) Northern blotによるVA RNAの検出。

Table 2 qPCRによるVA RNAの定量

図13 pre-vectorの混入がないことを確認

- (A) 実験方法 (293細胞)。

(B) Southern blotによるベクターゲノム構造の確認。

(C) Northern blotによるVA RNAの検出。

Table 3 新規VA欠失AdVの力価

Table 4 VA欠失AdVによる目的遺伝子（GFP）発現への影響

図14 CRISPR/Cas9システムにおけるVA欠失AdVの有用性

Table 1 qPCRで用いたプライマー・プローブの配列

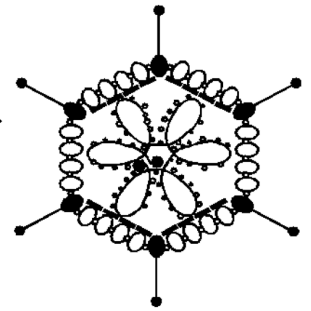
		Primer / Probe配列
AdV	F :	TGTGATGGGCTCCAGCATT
	P :	ATGGTCGCCCCGTCCTGCC
	R :	TCGTAGGTCAAGGTAGTAGAGTTTGC
GFP	F :	CTACAACAGCCACAACGTCTATATCA
	P :	CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
	R :	ATGTTGTTGCGGATCTTGAAG
β -Act	F :	CTCGCAGCTCACCATGGAT
	P :	ATGATATCGCCGCGCTCGTCGT
	R :	GCTGTCACTTGGTCGT
VA I	F :	CACTCTTCCGTGGTC
	P :	GTGGATAAATTCGCAAGGGTAT
	R :	GGGCTCGAACCCCGGTCGTCCGCCAT
VA II	F :	TCGCTCCCTGTAGCCGGA
	P :	TATTTTCCAAGGGTTGAGTCGCGGGA
	R :	TCCGAGACTCGAACCGGG

F : forward primer, P : probe, R : reverse primer,

β -Act : β -actin gene

A)

- ・約36kbの直鎖状二本鎖DNAを有する非エンベロープ型DNAウイルス
- ・カプソメア、ヘキソン、ペントンより構成される正二十面体構造



B)

Subgroup	血清型	形質転換能	増殖力
A IV	12, 18, 31	High	Low
B I	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Moderate	Moderate
C III	1, 2, 5, 6	Low or none	High
D II	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 53, 54	Low or none	Moderate or low
E III	4	Low or none	Moderate
F III	40, 41	Unknown	Low

C)

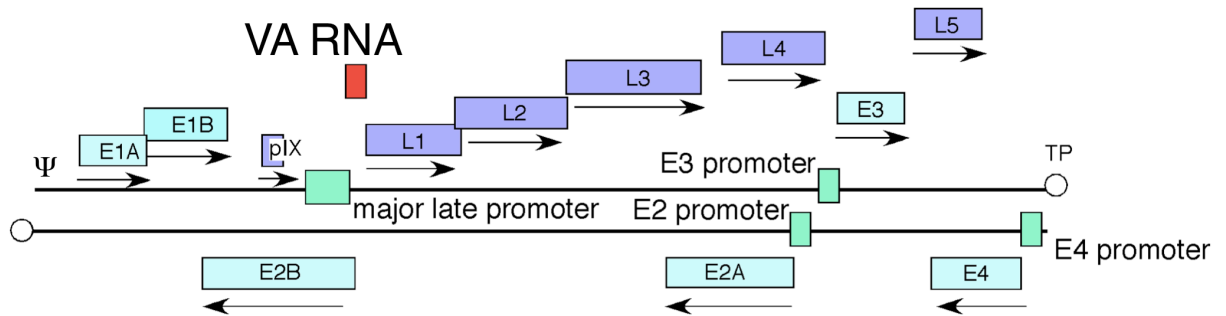


図1 アデノウイルス (Ad)

- (A) ウイルス粒子と構造。
- (B) アデノウイルスの分類と増殖力。
- (C) アデノウイルス5型のコード領域。プロモーター領域を緑、初期遺伝子を水色、後期遺伝子を紫、viral-associated RNA (VA RNA) を赤で示した。TP, terminal protein; Ψ, packaging signal。

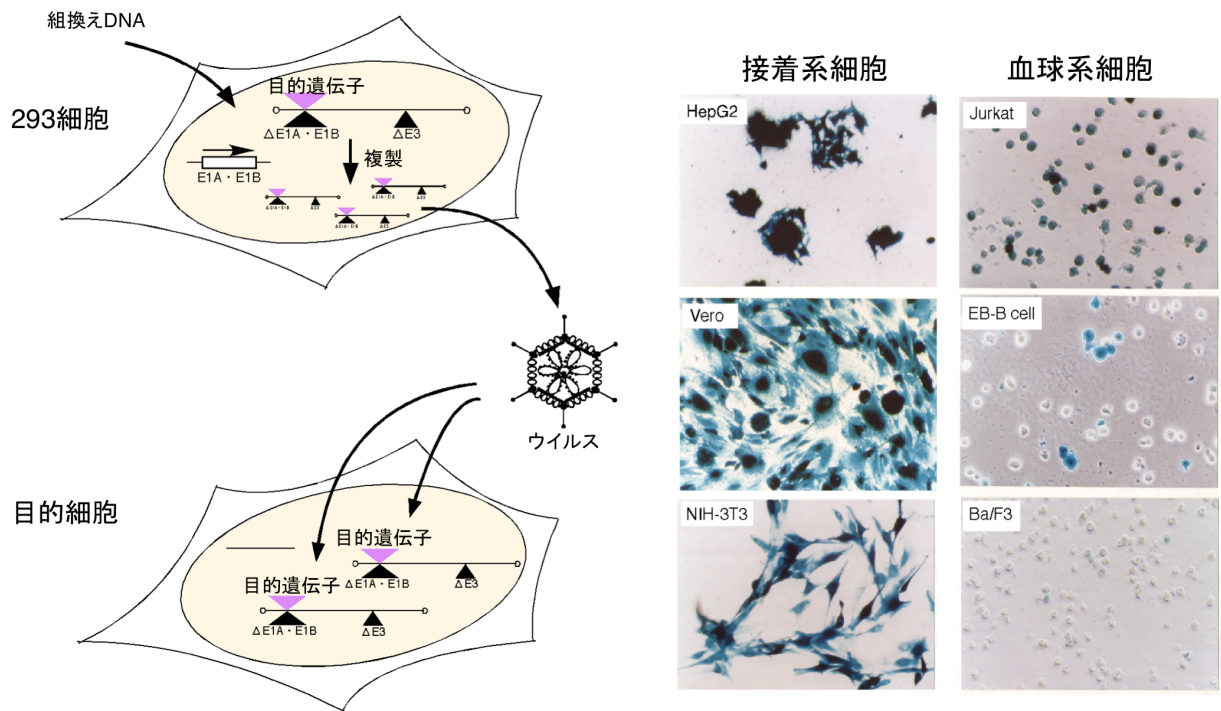


図2 第一世代アデノウイルスベクター (FG-AdV)

(Kanegae *et al.*, 第41回日本ウイルス学会学術総会⁵, 1993を改変)

ウイルスの全ての初期遺伝子プロモーターをトランスに活性化するE1Aを含むE1領域を欠失したFG-AdVは、E1を恒常的に発現する293細胞でのみ複製が可能であり(左上)、目的細胞においては教科書的にはウイルス由来のタンパク質は発現せず、E1欠失領域に挿入した目的遺伝子のみを発現するとされる(左下)。FG-AdVは接着系細胞、特に肝細胞癌由来の細胞へは非常に高い遺伝子導入効率を示すが、一方血球系細胞には総じて低い導入効率を示す(右図：LacZ発現AdVを各細胞に導入し、 β -galで染色)

FG AdV

低炎症型プロモーターの利用

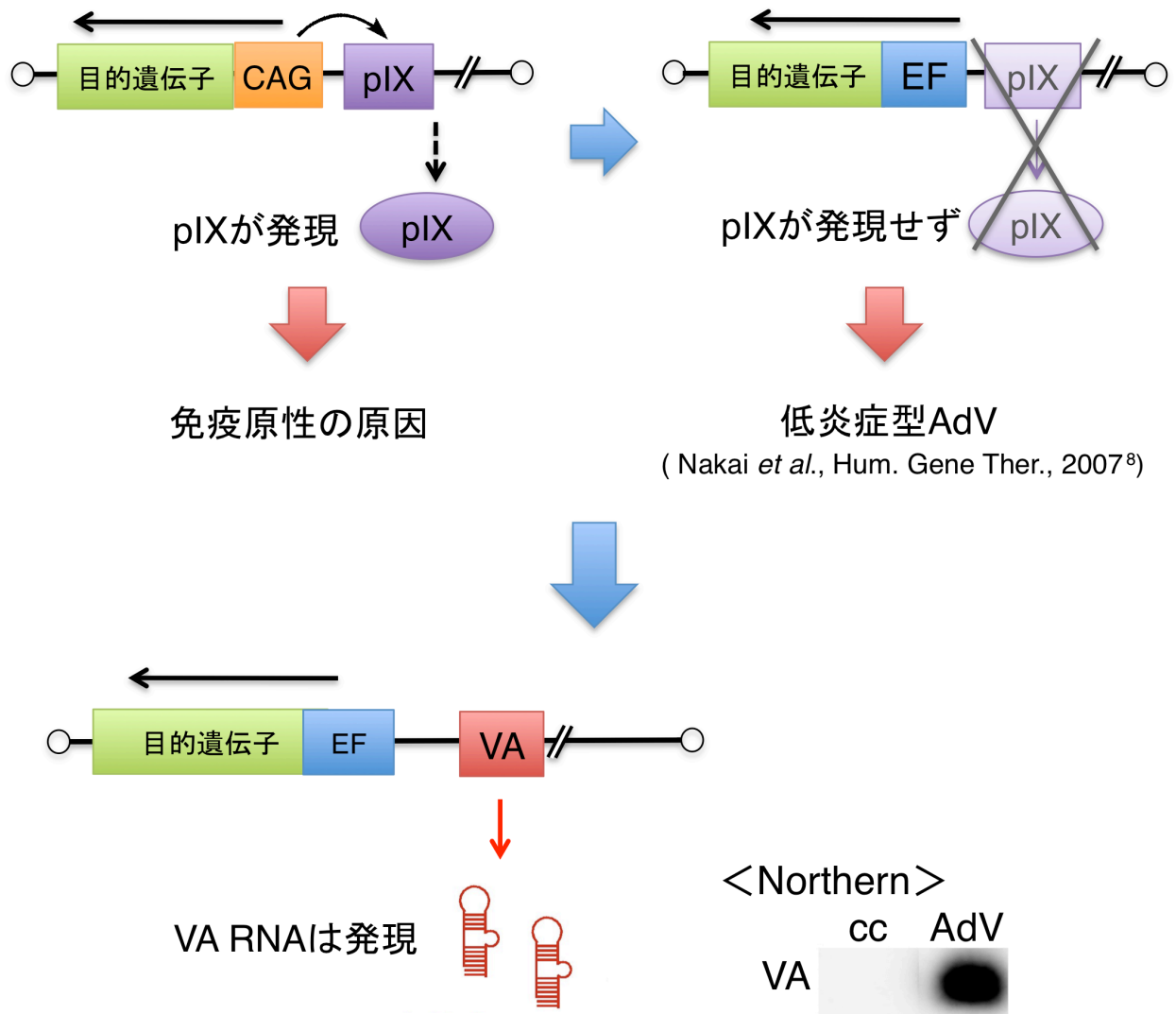


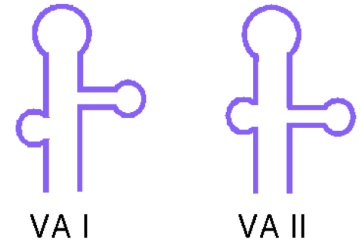
図3 FG AdVの問題点

一般的に使われているAdVではpIX、およびVA RNAが常に発現している。NakaiらはAdVの炎症の主原因のひとつであるウイルスタンパク質、pIXを同定し、EF1 α プロモーターを用いることでマウスでの炎症がほぼ抑制されたことから、「低炎症型AdV」として報告した(上段)。

FG-AdVからは目的遺伝子以外に唯一、p₀IIIプロモーターにより転写される2種類のウイルス関連RNA (VA RNA) が発現している(下段)。

VA RNA (virus-associated RNA)

- RNA polymerase IIIにより転写される2種類のnon-coding RNA
- VAI, VAIIの2種類が存在し、いずれも約160塩基
- protein kinase R (PKR)の活性化を抑制
- 宿主RNAi経路を競合阻害
例) shRNA, miRNA
- miRNAにプロセスされる



VA RNAにより発現が変動する宿主細胞側遺伝子

Gene	Category
ARHGEF7, PPP1R3C etc.	Cell signaling
TGFBR3, LY6K, CCND1 etc.	Cell growth
RBPSUH, ETS1, CDK8 etc.	Transcription
TIA-1, DAZAP2, MDN1 etc.	RNA metabolism

(Aparicio *et al.*, Nucleic Acids Res., 2010¹⁶)

図4 VA RNA

VA RNAはウイルス増殖に適した環境を整備する多機能RNAである。ウイルス由来のmiRNAとなり得ることが報告され、細胞増殖やDNA複製に関わる細胞内の複数の遺伝子発現を抑制していたことが明らかとなった。

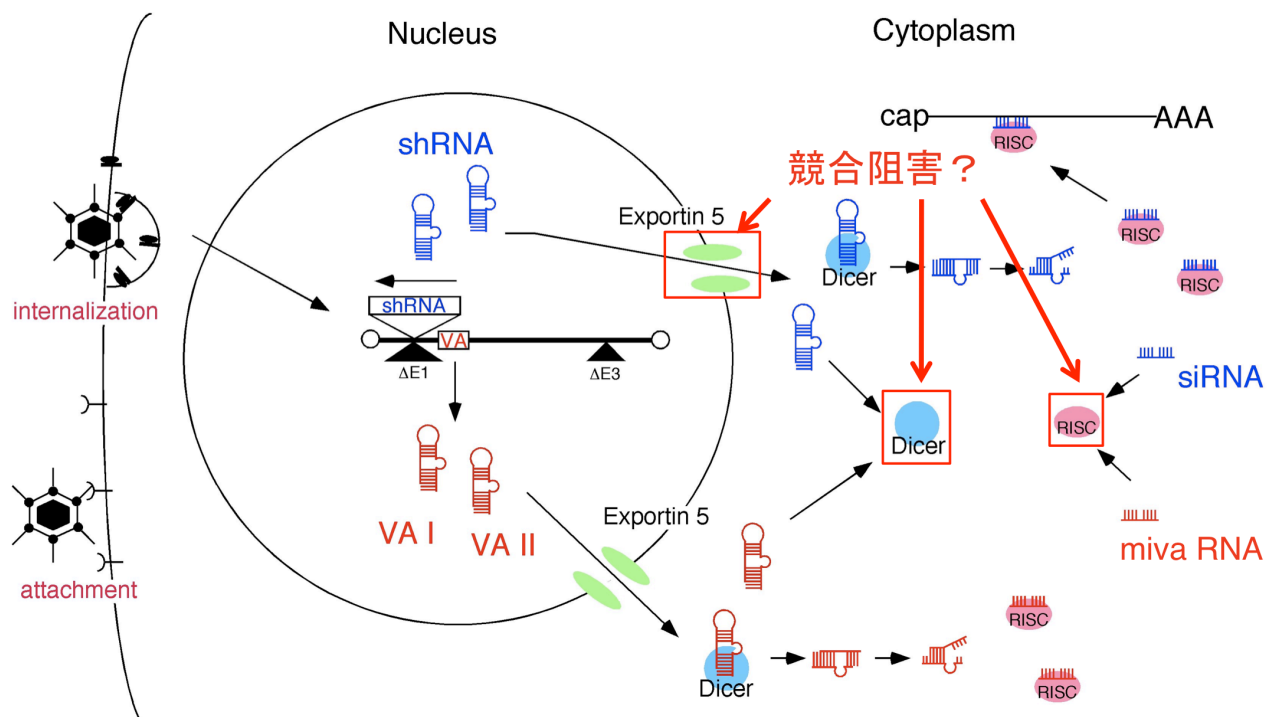
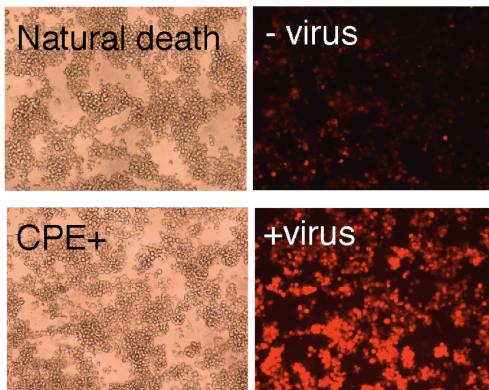
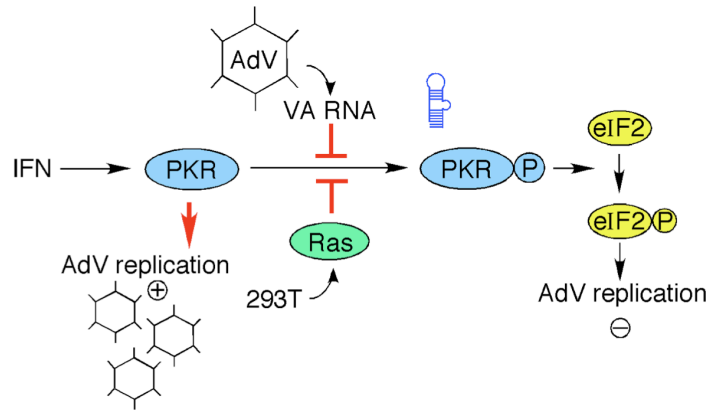


図5 VA RNAはshRNAと同じ経路でプロセスされる

(Kondo *et al.*, ウイルス, 2013²²を改変)

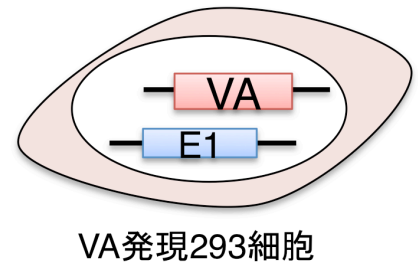
細胞内ではmiRNAやshort-hairpin RNA (shRNA)と同様の経路でプロセスされるため、Exportin 5やDicerを飽和させることにより、宿主細胞内のRNAi機構を攪乱させること、shRNAの成熟化に競合拮抗することが報告されている。

A) 293T細胞 (Ras (+))

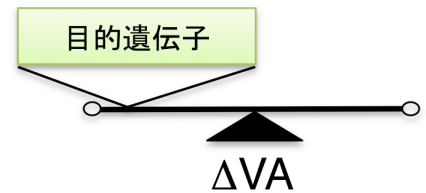


ウイルス生成による細胞変性の区別が
つかず、生成確認マーカーが必要

B) VA発現細胞株



VA欠失 AdV

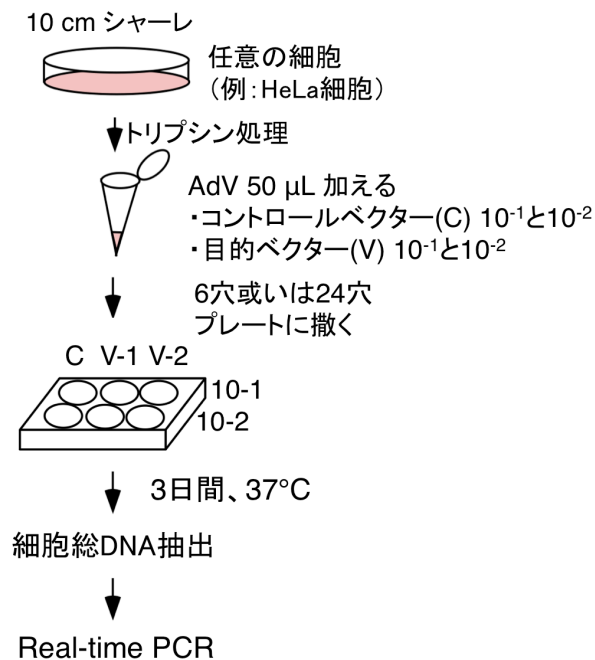


ベクター作製不可
または
非常に低力価

図6 従来のVA欠失AdV作製法

- (A) 293T細胞 (Ras(+))。VA RNAがIFNにより誘導されるPKRの活性化を阻害することでウイルス増殖環境の整備に寄与している原理を応用して、Rasの発現によりPKRが常に不活化されている293T細胞を用いたVA欠失AdV作製法が考えられたが、細胞死とウイルス生成による細胞変性の識別は困難であり、常にVA欠失AdV生成確認用マーカーが必要となる。ベクター力価も通常の1/100程度に留まっていた。
- (B) VA発現細胞株。VA RNA発現293細胞を用いたVA欠失AdV作製法が報告されたが、VA欠失AdVの力価は通常ベクターの1/1000以下と極めて低く汎用されるには至っていなかった。

A) 測定手順



B) コントロールベクター : AxCAGFP

2.4×10^8 コピー/mL

2.5×10^8 TCID₅₀/mL

↓
目的ベクター算出に用いる

C) 目的ベクター力価測定 (relative vector titer; rVT/mL)

コントロールベクターのCt値

10^{-2} 希釈: 22.6

$22.6 = 2.5 \times 10^6$ TCID₅₀

目的ベクターのCt値

10^{-2} 希釈: 19.4

計算

$rVT/mL = 2^{(\text{コントロールベクターのCt値} - \text{目的ベクターのCt値})}$

× 希釈倍率

× コントロールベクターのTCID₅₀

$= 2^{(22.6 - 19.4)} \times 1/10^{-2} \times 2.5 \times 10^6$

$= 2.3 \times 10^9$ rVT/mL

図7 qPCRによるAdV力価測定法

(Pei *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012²⁹)

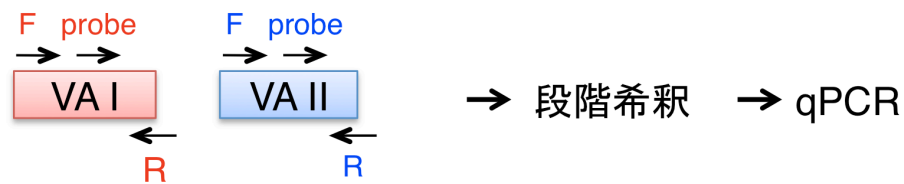
(A) 測定手順。AdV増殖可能な293細胞の細胞変性を応用したTCID₅₀法などで既にベクター力価が既知のコントロールベクターAxCAGFPを基準に目的ベクターの力価を相対的に算出するための実験方法を示した(相対的ベクター力価; rVT/mL)。

(B) コントロールベクターの力価測定。AxCAGFPのコピー数は 2.4×10^8 コピー/mLであり、TCID₅₀法で測定した 2.5×10^8 TCID₅₀/mLとほぼ変わらないため、これを目的ベクターの算出に用いた。

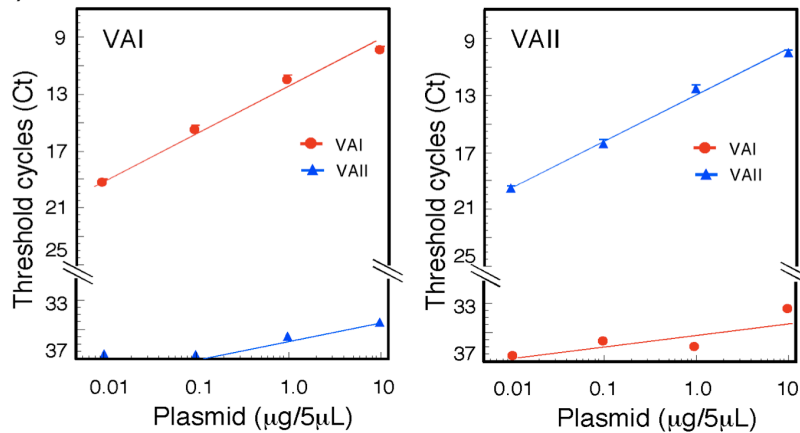
(C) 目的ベクターの力価測定。

VA欠失AdVは293細胞ではほとんど増殖しないため、標的細胞へ導入されたウイルスゲノムコピー数を基にした本方法でしか力価測定が行えない。

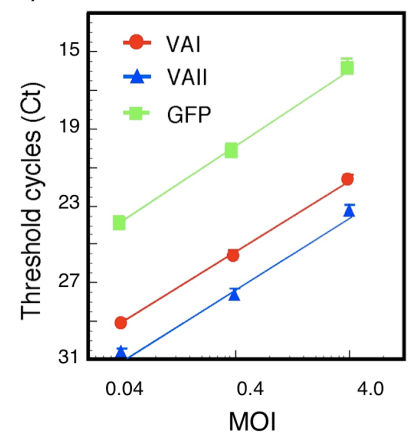
A) VAI及びVAIIを独立して定量可能なqPCR用プライマー・プローブの作製



B)



C)



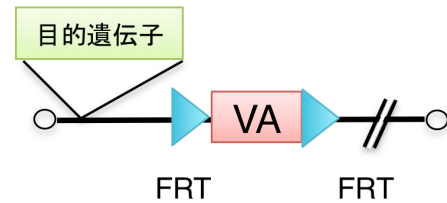
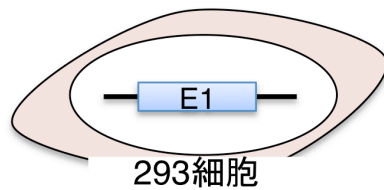
D) qPCRによるVA RNA量の定量

	VAI	VAII
FG-AdV	1	1
VA発現293細胞	1/550	1/720

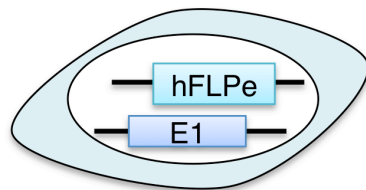
図8 VA発現細胞株からのVA RNAの定量

- (A) プライマー・プローブの作製。VA IあるいはVA II遺伝子をもつプラスミドを段階希釈し、設計した複数のプライマー・プローブを用いてqPCRによる定量を試みた。プライマー・プローブの塩基配列はTable 1及び図10Aに示す。
- (B) プラスミドを用いた検量線。
- (C) VA保持GFP発現FG-AdVの希釈液を用いた検量線。
- (D) qPCRによるVA RNA量の定量。VA欠失AdVが作製困難な原因として、ウイルス複製後期には大量のVA RNAが必要であり、細胞株から供給されるVA RNA量が不十分であったことが考えられる。

1st step : Pre-vector (VA保持AdV)



2nd step : VA欠失AdV



hFLPe発現293細胞

(Takata et al., Genes Cells., 2011²³)

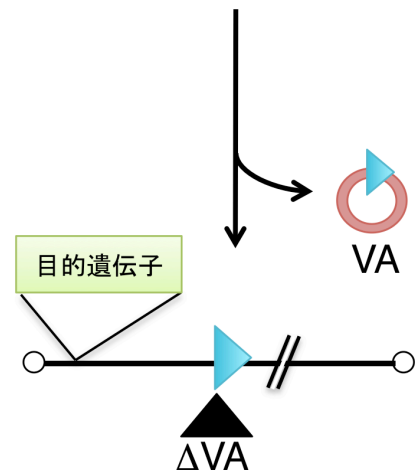


図9 FLP発現293細胞を用いたVA欠失AdV新規作製法

部位特異的組換え酵素FLPの標的配列であるFRTをVA RNAコード領域の両側に挿入し、通常の293細胞でVA保持AdV (pre-vector) として作製する。この高力価pre-vectorを大量にhFLPe高発現293細胞に感染することで、hFLPeによりFRTで挟まれたVA RNAコード領域が環状に切り出され、VA RNAのみを欠失する。

A)

```

-----GCGCAA TCGTTGACGCTCTAGACCGTGCAAAGGAGAG
←pTP          -41↑ 5' end |GA---(intron)-----

      →VAI
CCTGTAAGC GGGCACTCTCCGTGGTCTGGTGGATAAAATTCGAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTTCGAGCCCCG
prVAI-3 |— F-primer →| |— probe →| |← R-primer —|

TATCCGGCCGTCGCGCGTGATCCATGCGGTTACCGCCCGGTGTCGAACCCAGGTGTGCGACGTCAGACAACGGGGGAGT

GCTCCTT TTGGCTTCCTTCCAGGCGCGGGCTGCTGCGCTAGCTTTTTTGCCACTGGCCGCGCGCAGCGTAAGCGGTT

      →VAII
AGGCTGGAAAGCGAAAGCATTAAGT GGCTCGCTCCCTGTAGCCGGAGGGTTATTTTCCAAGGGTTGAGTCGCGGGACCCC
prVAII-2 |— F-primer →| |— probe →| |← R-primer —|

CGGTTTCGAGTCTCGGACCGCGGACTGCGGCGAACGGGGTTTGCCTCCCCGTATGCAAGACCCCGCTTGCAAATTC
R-primer —|

3' end ↓
TCGGAAACAGGGACGAGCCCTT TTTTGCTTTT CCCAG|ATG CAT CCG -----
----- (intron) ---AG| 52/55k→

```

B)

```

      →VAI                                     |← del 15nt →|
---AAGC GGGCACTCTCCGTGGTCTGGTGGATAAAATTCGAAGGGTATCATGGCGGACgaccggggttcgagccCCG--
                                           |← B-box →|

      →VAII                                     |← del 17nt →|
---AAGT GGCTCGCTCCCTGTAGCCGGAGGGTTATTTTCCAAGGGTTGAGTCGCGGGACccccgggttcgagtctcgGAC--
                                           |← B-box →|

```

C)

```

-----GCGCAATCGTTGACGCTCTAGACCGTGCAAAGGAGAGCCTGTAAGC GGGCACTCTCCGTGgtctg.....
←pTP                                     EarI +15↓

..... del 381nt .....ccct CCGGAAACAGGGACGAGCCCTT TTTTGCTTTTCCCAG|ATG CAT CCG -----
BspEI                                     ----- (intron) ---AG| 52/55k→
↑+127

```

図10 VAI、VAII領域

- (A) FRTで挟んだVAI、VAII遺伝子の全塩基配列。VAI及びVAIIコード領域を枠で示した。VAIとVAIIのプライマー・プローブの位置も同時に示した。pTP, terminal protein precursor; 52/55k, 52k及び55kタンパク質。
- (B) 内在性polIIIプロモーターを不活化するためのB-box欠失領域を小文字で示した。
- (C) VA置換型におけるVA I-VA II欠失領域。VAIの5'端 +15塩基からVAIIの+127塩基の381塩基を、FVF断片と置換した。

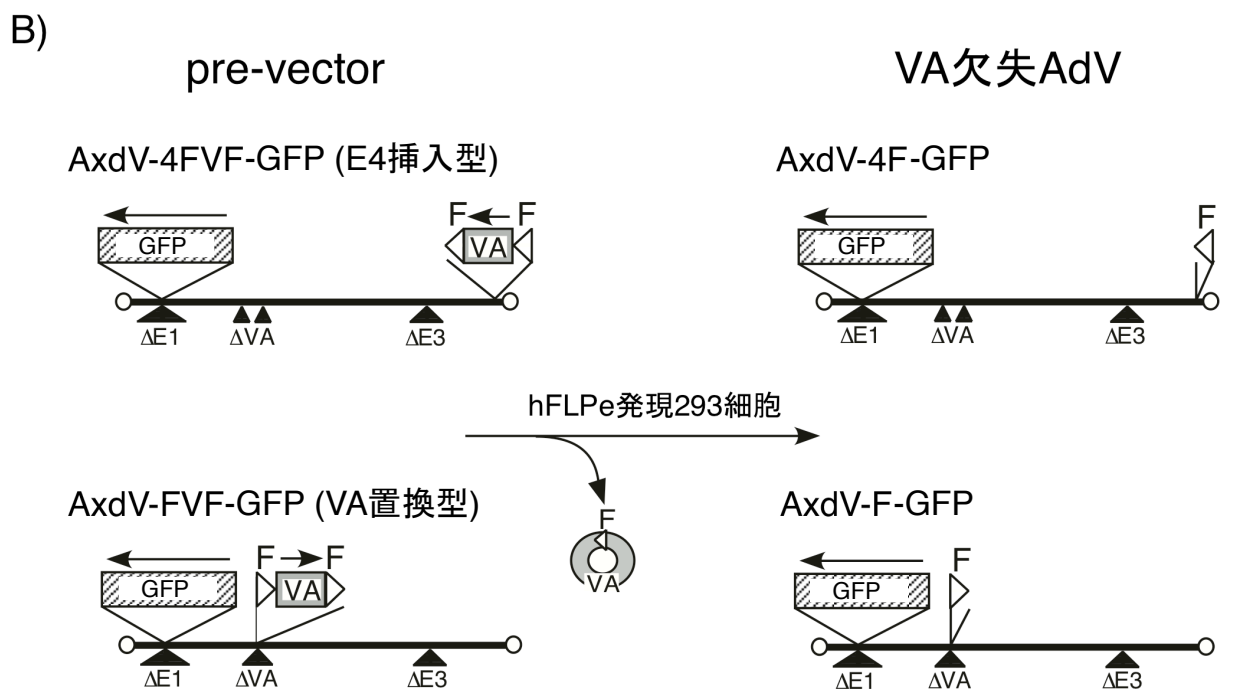
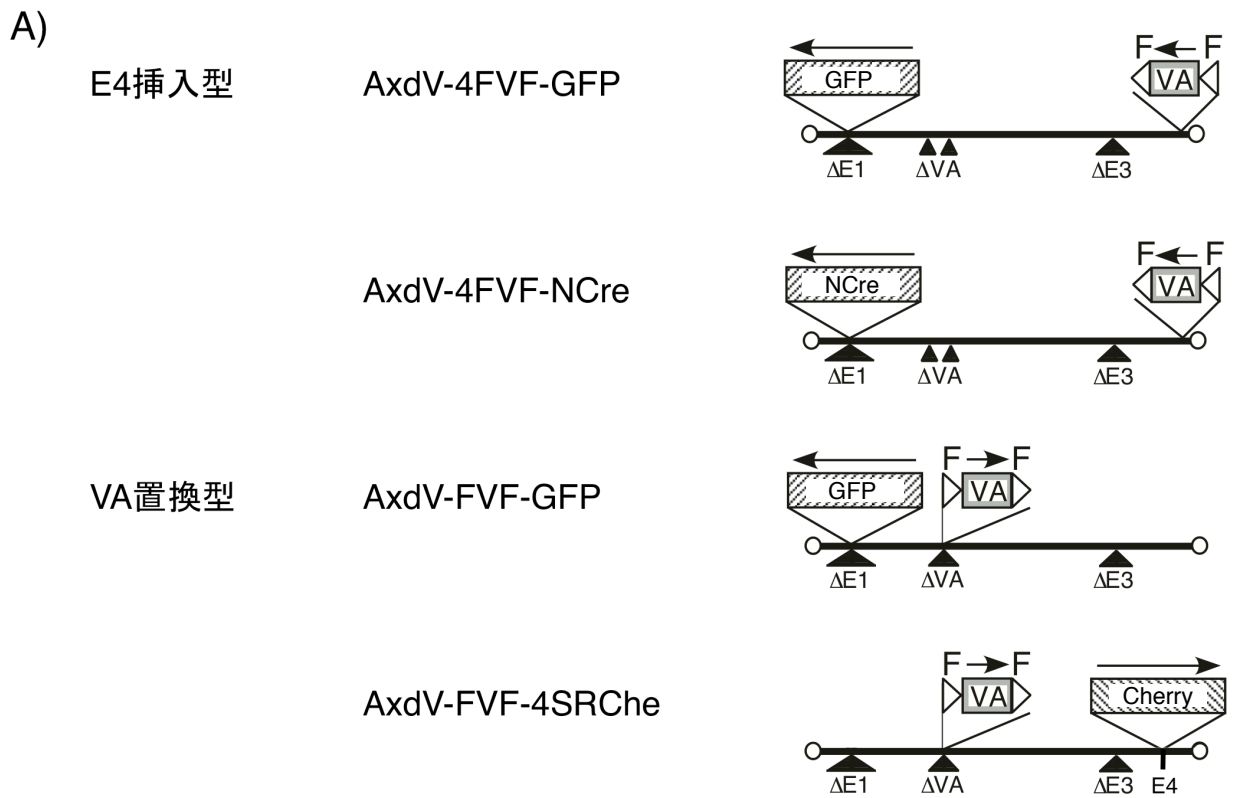
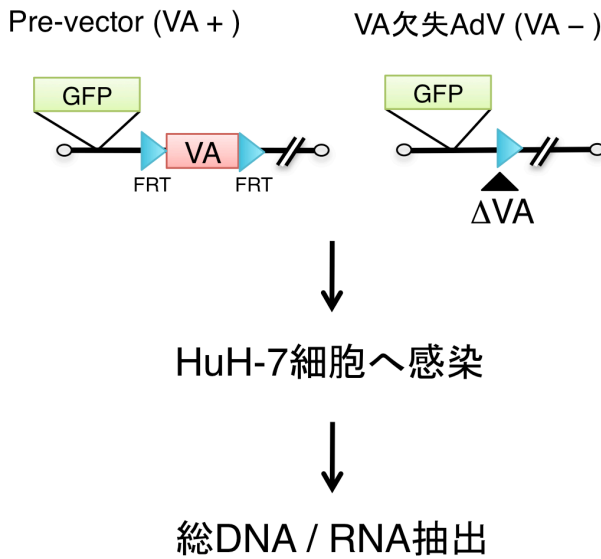


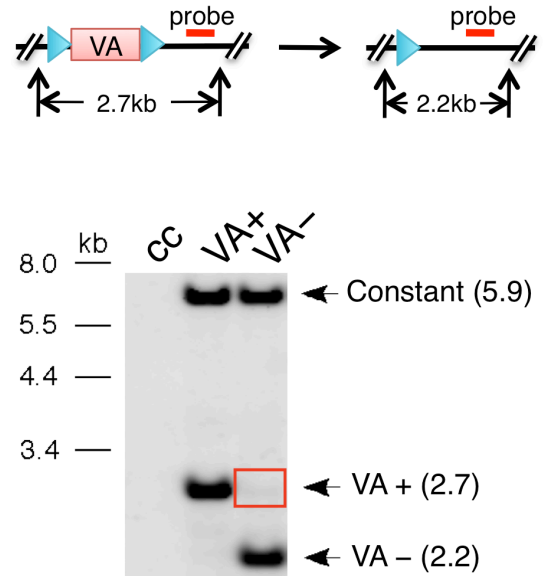
図11 作製したpre-vectorとVA欠失AdV

- (A) 作製したpre-vectorの構造。E4挿入型を上段に、VA置換型を下段に示した。矢印は転写方向を、斜線部は目的遺伝子発現単位を示している。F, FRT。
- (B) 代表的なpre-vectorの構造を左に、VA欠失後のベクター構造を右に示した。

A) 方法



B) DNA構造 (Southern blot)



C) Northern blotによるVA RNAの検出

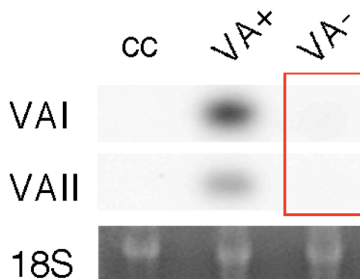


図12 VA欠失AdVのVA RNA欠失を確認

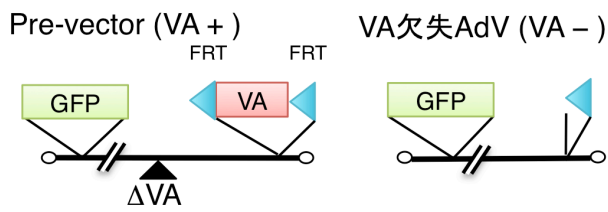
- (A) 実験方法。pre-vectorあるいはFLP発現細胞株で調製した2nd stockをHuH-7細胞に感染し、3日後に総DNA / RNAを抽出した。
- (B) Southern blotによるベクターゲノム構造の確認。Southern blotに用いたプローブを赤で、制限酵素による切断箇所を矢印で示した。5.9kbのバンド (Constant)は、導入したベクターコピー数はほぼ同程度であったことを示す。その条件下で、FVF断片を含むpre-vector由来の2.7kbのバンドは、2nd stockでは全く検出されず、FVF断片が切り出された場合にのみ出現する2.2kbのバンドに完全にシフトしていた。cc, uninfected control cells。
- (C) Northern blotによるVA RNAの検出。2nd stockではVAI、VAIIともに検出されなかった。18S, 18 S ribosomal RNA。

Table 2 qPCRによるVA RNAの定量

AdVs	Type	VAI		VAII	
		Copies ($\times 10^8$)	Ratio (%)	Copies ($\times 10^8$)	Ratio (%)
E4挿入型	pre-vector	4.47 \pm 0.81	100	1.36 \pm 0.15	100
	VA-deleted	0.02 \pm 0.00	<1	ND	<1
VA置換型	pre-vector	1.81 \pm 0.06	100	1.83 \pm 0.32	100
	VA-deleted	0.05 \pm 0.00	2.9	0.03 \pm 0.00	1.4
FG-AdV	AxCAGFP	5.97 \pm 0.83		4.17 \pm 0.16	

FG-AdVを100%としたとき、VA RNA残存量は、E4挿入型ではVA IIは1%未満、VA IIでは検出限界以下、VA置換型でもVA IIは2.9%、VA IIIは1.4%と残存したVA RNA発現量は非常に少ないことが確認された。

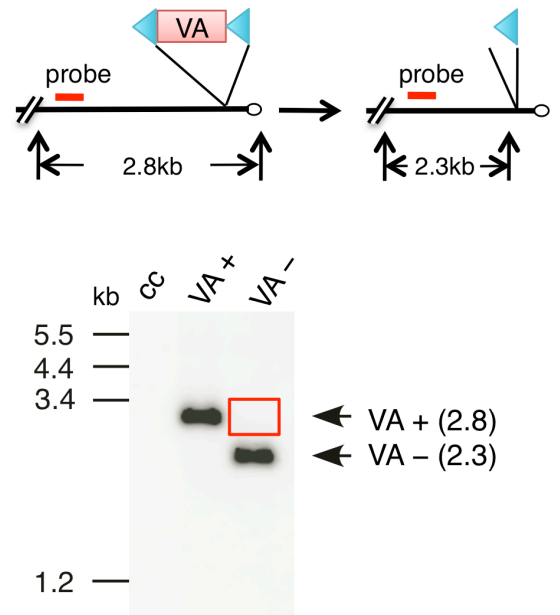
A) 方法



293細胞へ感染

総DNA / RNA抽出

B) DNA構造 (Southern blot)



C) Northern blotによるVA RNAの検出

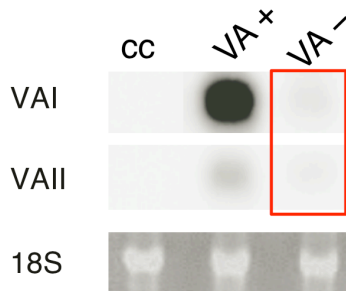


図13 pre-vectorの混入がないことを確認

- (A) 実験方法。pre-vectorあるいは2nd stockを293細胞に感染し、3日後に総DNA/RNAを抽出した。
- (B) Southern blotによるベクターゲノム構造の確認。FVF断片を含むpre-vector由来の2.8kbのバンドは、2nd stockでは全く検出されず、FVF断片が切り出された場合にのみ出現する2.3kbのバンドに完全にシフトしていた。
- (C) Northern blotによるVA RNAの検出。2nd stockではほんのわずかにVA RNAが検出されたが、非常に微量であった。

Table 3 新規VA欠失AdVの力価

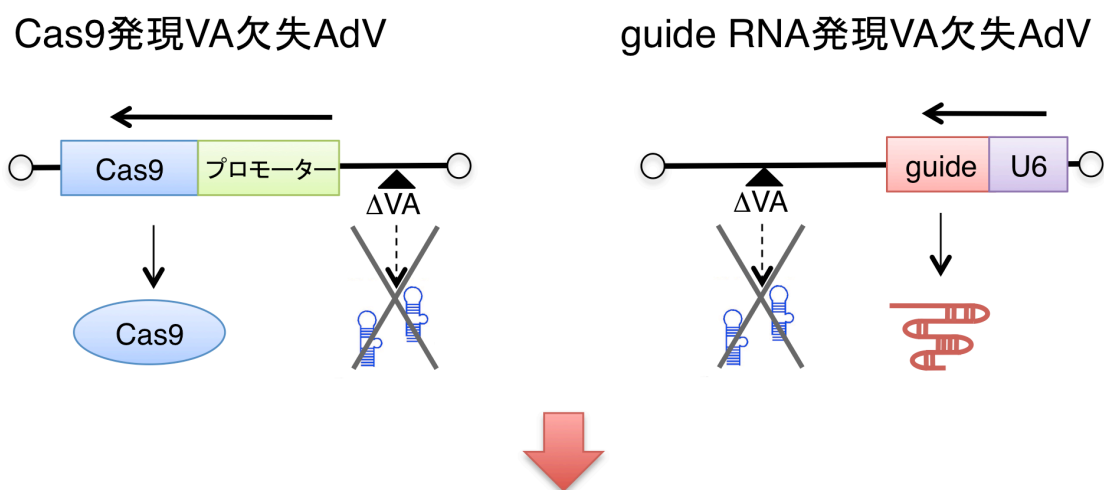
AdVs	Gene	Type	Transduction titer copies/ mL ($\times 10^7$)	Ratio (%)
E4挿入型	GFP	pre-vector	37	100
		VA-deleted	5	14
	NCre	pre-vector	47	100
		VA-deleted	4	8
VA置換型	GFP	pre-vector	60	100
		VA-deleted	7	12
	Cherry	pre-vector	20	100
		VA-deleted	2	12
FG-AdV	GFP	—	83	—

目的遺伝子として用いたGFP、Cre及びCherryの違いに関わらず全てのVA欠失AdVの力価はそれぞれのpre-vectorの約1/10 (8-14%) 程度の低下に留まった。

Table 4 VA欠失による目的遺伝子(GFP)発現への影響

AdVs	Type	Ratio	
		蛍光強度	mRNA発現量
E4挿入型	pre-vector	1	1
	VA-deleted	0.97 ± 0.15	0.81 ± 0.16
VA置換型	pre-vector	1	1
	VA-deleted	1.14 ± 0.31	1.18 ± 0.20

pre-vectorまたはVA欠失AdVをHeLa細胞に導入し、3日後のGFP蛍光強度をAscentで、GFP mRNA量をqPCRで測定した結果、VA RNA発現の有無が目的遺伝子発現量に影響を与えないことが確認された。



VA欠失AdVを用いることでguide RNAとVA RNAが競合拮抗する可能性を回避

図14 CRISPR/Cas9システムにおけるVA欠失AdVの有用性

CRISPR/Cas9システムは、標的遺伝子と相補的な約20 merの配列を持つguide RNAと、DNAを切断するCas9タンパク質を細胞へ導入することで、標的部位を特異的に切断することが可能なシステムである。AdVを用いてguide RNAを発現する場合には、shRNAと同様、VA RNAと競合してしまう可能性を考えた。現在CRISPR/Cas9システムにVA欠失AdVを応用することにより、さらに効率的にゲノム編集が可能ではないかと考え、詳細な検討を行っている。