

論文の内容の要旨

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

前川 文

序論

第1世代アデノウイルスベクター (FG AdV) は、アデノウイルス複製に必須であるE1領域を目的遺伝子と置換したベクターであり、E1Aタンパク質を恒常的に発現している293細胞では増殖するが、その他の細胞ではE1プロモーター以外の全てのウイルスプロモーターの発現に必須なE1Aタンパク質が存在しないため教科書的にはウイルス由来のタンパク質発現はなく、また細胞染色体への積極的な組み込み機構を持たない、一過性の高発現ベクターである。

しかし、今まであまり問題視されていなかったが、FG AdVでは目的遺伝子のタンパク質以外に唯一polIIIにより転写される2種類のウイルス関連RNA (Virus-associated RNA; VA IおよびVA II) が転写されており、AdVを用いた実験結果に影響を与えてしまう可能性がある。VA RNAは160 ntからなるnon-coding RNAで、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VAIが結合し、PKRの活性化を阻害することにより、ウイルス増殖に適した環境を整えることである。またmicroRNA (miRNA) やshort-hairpin RNA (shRNA) と同様の経路でプロセスされ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近年報告された。さらにVA RNAがウイルス由来のmiRNA (mivaRNA) の前駆体となり、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ることが報告され、AdVを用いた研究にもVA RNAによる細胞遺伝子発現への影響が危惧されていた。そこで、真の意味で目的タンパクのみを発現する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はウイルス増殖に必須ではないとはいえ、VA RNAを欠失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ため、VA欠失ウイルス作製法に則ったVA欠失AdVの作製が試みられてきた。Machitaniらにより、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。我々も、VA RNA発現293細胞や、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ことを応用して、Rasの発現によりPKRが常に不活化されている293T細胞を用いてVA欠失AdVの作製に成功したが、高力価のVA欠失AdVの作製はやはり困難であった。

VA欠失AdV作製が困難であった原因として、ウイルスでは一定の感染量で細胞に感染し数回の複製で十分量のウイルスが生成するのに対し、ベクターではトランスフェクションされたゲノムDNAから供給されるわずかなウイルスタンパク質により生成した少ないコピー数のベクターから多段階の複製が必要である違いが考えられた。VA RNAがウイルス増殖に必須では無いことを考え合わせると、おそらくVA RNA欠失ウイルスではゲノム複製中に十分に発現している他のウイルスタンパク質がVA RNAの機能を補完し、その結果宿主側のウイルス増殖抵抗機構を抑制してウイルス増殖が可能であったが、ベクターでは補完するウイルスタンパク質の発現が充分ではない少ないコピー数の期間があるため、ベクターとして生成しなかった可能性が考えられた。

そこで本研究では、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し、通常293細胞でVA保持AdV (pre-vector) として高力価AdVを回収後、FLP高発現293細胞でVA RNAのみを欠失するというVA欠失AdVを高効率に作製する新規作製法を開発した。

材料と方法

VAを保持しているpre-vectorの作製には293細胞を用いて、通常AdV作製法に則り行った。ベクター力価測定にはHeLa細胞を用いた。Southern blot法によるDNA構造解析およびnorthern blot法によるVA RNAの定量解析には293細胞及びHuH-7細胞を用いて定法通りに行った。TaqMan PCR (qPCR) の解析には、Applied Biosystems社のABI PRISM 7000 Sequence Detection Systemを用いてHuH-7細胞、HeLa細胞で解析した。GFP蛍光強度の測定にはFluoroscanner Ascent FL (Lab systems, Thermo Scientific) を用いてHuH-7細胞で解析した。

結果と考察

VA発現293細胞株で高力価のVA欠失AdV作製が困難である原因として、発現細胞から供

給されるVA RNA量が不十分であった可能性を検討するために、まず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・プローブの同定を行い、qPCRを用いたVA RNAの正確な定量法の確立に成功した。その結果、VA発現293細胞のVA RNA発現量は293細胞で複製したAdVのVA Iが1/550、VA IIが1/720に留まっていた。従って、ベクターの効率的な増殖にはより大量のVA RNA発現が必要である可能性が示された。しかしVA RNAの細胞毒性の影響によりVA RNAを高度に発現する293細胞株の樹立化は困難であった。

そこで、まず組換え酵素により欠失可能なVA RNA遺伝子を有するpre-vector (VA欠失AdV前駆体ベクター) を作製し、十分に増殖させた後にVA RNA遺伝子を除去すれば、高力価のVA欠失AdVの作製が可能であろうと考えた。pre-vectorからVA RNAを欠失する方法として、部位特異的組換え酵素であるFLPを応用した。FLPの組換え効率はCreと比べ劣ることが知られていたが、Kondoらの開発したヒト型・温度安定型FLP (hFLPe) を高度に発現する293細胞 (hFLPe発現293細胞) では、1万コピーまで複製するアデノウイルスゲノム上のFRT間を95%以上の効率で、環状分子として欠失させることが可能であった。そこで、FRTでVA RNAコード領域を挟んだVA RNA発現単位 (FVF) を作製し、2種類のpre-vectorを作製した。

VA RNAコード領域近傍にはウイルス増殖に必須である末端タンパク質と52/55Kタンパク質のコード領域が存在するため、本来のVA RNA遺伝子の中にあるpolIIIプロモーターの活性に必須であるB-box内在性プロモーターを不活化し、E4領域右側にFVF断片を挿入した「E4挿入型VA欠失AdV」を作製することができた。しかし、E4挿入型はB-boxのみが異なる約460塩基のVA RNA領域が同一ベクターゲノム上に存在するため、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、VA領域のほぼ全長を欠失し、FVF断片と置換したVA置換型も加えて作製した。複数のE4挿入型、VA置換型ベクターを作製したが、ともにpre-vectorを高力価で作製することが可能であったため、現在は主にVA置換型ベクターとしてpre-vectorを作製している。

次に、hFLPe発現293細胞へpre-vectorを感染した場合には、FLPにより切り出された環状分子と残存したpre-vectorゲノムの両方からVA RNAが供給されるためベクターは増殖が可能であり、これを1st stockとした。1st stockを通常の5倍の感染量でhFLPe発現293細胞に導入して作製した2nd stockをVA欠失AdVとして実験に供した。まず、VA置換型として作製した2nd stockを用いて、pre-vector残存量を検討した。2nd stockをベクターが増殖しないHuH-7細胞に導入し、ベクターゲノムのDNA構造をSouthern blotで、VA RNA発現の残存の有無をnorthern blotで、更にVA RNAの定量をqPCRにより行った。その結果、2nd stockでは、pre-vectorのVAコード領域由来の2.7 kbのバンドは、VAコード領域が欠失した場合に検出される2.2 kbのバンドに完全にシフトしていた。また、northern blotでも2nd stockからのVA RNAは全く検出されなかった。qPCRによりVA I及びVA IIを定量した結果、この2nd stock中の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、残存したVA RNA発現量は非常に少ないことが明らかになった。

更に高感度にVA RNAの検出を行うために、FG AdVの複製が可能である293細胞を用いてウイルス複製条件下でのバイオアッセイを行った。前述したHuH-7細胞での検証とは異なり、293細胞では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。Southern blot及びnorthern blotを用いた解析から、2nd stockでわずかにVA RNAが検出されたが、非常に微量であった。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、残存したpre-vectorからのVA RNAはほぼ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として応用しても問題がないと考えられた。

VA欠失AdVのベクター力価は、pre-vectorと比べ約1/10 (8-14%)に留まっていたが、これまでに報告されていたVA欠失AdVの100倍の力価を示しており、通常の実験に十分に応用可能な力価であると考えられた。特に通常のAdVでも作製が困難であるCreを発現するVA欠失AdVも高力価で作製が可能であったことから、本法は有用性の高い方法であると考えられる。また、VA RNAを持つプラスミドにより目的遺伝子の発現効率が上昇するという報告があり、既にキット化されていたため、VA欠失AdVでは目的遺伝子発現効率が低下する可能性が示唆されていた。しかし、GFP発現ベクターを用いてpre-vectorとVA欠失AdVのGFP蛍光強度を比較した結果、VA RNAの有無に関わらず同程度のGFP発現量を示したことから、ベクターゲノム上のVA RNAは目的遺伝子の発現には影響していないことが示唆された。

本研究で作製法が確立されたVA欠失AdVを用いて、通常細胞では複製しない僅かのベクターゲノムから発現したVA RNAが細胞遺伝子発現に影響を与えていたかについての検討が行われた。その結果、VA欠失AdVからの少量のVA RNAによって発現が低下した複数の細胞遺伝子が実際に同定され、VA欠失AdVの有用性が示されたとともに、アデノウイルス感染初期のVA RNAの機能解析にも貢献した。また、HCVに対するshRNAを用いた解析では、VA欠失AdVは従来のVA RNA保持AdVと比べHCVの複製を有意に抑制していたことから、VA RNAがshRNAの成熟過程で拮抗していたことが初めて明らかになり、shRNA発現ベクターとしては従来のベクターではなくVA欠失AdVの有用性が高いことを示している。

以上の結果から、AdVにおいては、pre-vectorとしてベクター作製を行い、VA RNAの関与が疑われる場合にはVA欠失AdVを作製する方法が今後は一般化すると考える。現在、ゲノム編集に应用されているCRISPR/Cas9システムにVA欠失AdVを応用することにより、guide RNAの転写効率を高めることで、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。