

Title	Development of tissue-targeting HVJ envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin
Author(s)	河地, 正子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48884
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	かわ ち まさ こ 河 地 正 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 6 1 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 10 月 18 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Development of tissue-targeting HVJ envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin (マウス皮膚への高効率治療用遺伝子導入の為の組織ターゲティング HVJ エンベロープベクター開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 田 安 史 (副査) 教 授 松 浦 善 治 教 授 目 加 田 英 輔

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

センダイウイルス (hemagglutinating virus of Japan ; HVJ) はマウスやラットを自然宿主とするパラミキソウイルスで、ウイルス表面の HN 蛋白で細胞表面のシアル酸を認識し、F 蛋白質の膜融合活性により細胞内へウイルスゲノムを導入する。我々は、HVJ のウイルスゲノムを不活化し、その外被 (envelope) のみを利用して遺伝子や蛋白質などを封入し、さまざまな細胞や組織へ導入することが可能な HVJ envelope (HVJ-E) ベクターを開発した。HVJ-E ではウイルスのゲノム RNA は完全に不活化されており動物への感染性・増殖性は失われているため安全性が高く、非ウイルス性の遺伝子導入ベクターとして有用である。しかし、生体内のほとんどの細胞膜上にシアル酸が発現していることから、HVJ-E は細胞・組織特異性が低い。遺伝子治療を行う上で、導入遺伝子を効率的に機能させるには、遺伝子を目的とする細胞に効率よく導入することが必要となる。そこで、特定の組織に親和性の高い Tissue-Targeting HVJ-E ベクターを開発し、より高効率な治療分子の導入を試みた。

[方法ならびに成績]

遺伝子工学的手法により HVJ の F 蛋白遺伝子にターゲット細胞に親和性の高いリガンド分子の遺伝子を組み込み LLCMK2 細胞上で発現させ、この細胞に HVJ を感染・出芽させた際にリガンド分子をエンベロープ膜上に取り込んだウイルスを chimera HVJ として得る方法論を検討した。HVJ の F 蛋白は N 末から F2 領域と F1 領域に分けられ、F2 の先端には signal peptide、F1 の先端に fusion peptide と末端に transmembrane 領域がある。まず、F 蛋白分子における機能的リガンド分子挿入部位を検討するために、長さの異なる 4 種類の chimeraF 蛋白発現ベクターを作成した。この 4 種類の chimeraF 蛋白を LLCMK2 細胞上で発現させ、その局在を免疫染色法にて検討した結果、signal peptide と transmembrane 領域でリガンド分子を挟んだ最も短い chimeraF 蛋白のみが細胞膜上に発現していることが明らかとなった。次に、最短 chimeraF 蛋白を LLCMK2 細胞上に発現させ、この細胞に HVJ を感染・出芽させてウイルスを回収し、ウエスタンブロット法および免疫電子顕微鏡法による解析により、ウイルスのエンベロープ膜上に chimeraF 蛋白が組み込まれていることが確認され、この方法によるターゲティング HVJ の作成が可能である

ことが明らかとなった。

そこで、この方法論を用いて HVJ の F 蛋白表皮基底細胞に親和性の高いリガンド分子として表皮の基底細胞特異的カドヘリンであるデスモグレイン 3 (Dsg3) に対する一本鎖抗体を組み込み (Dsg3-scFv-F)、前述した方法論を用いて Dsg3-scFv-F を膜上に取り込んだウイルスを chimera HVJ として回収した。chimera HVJ を用いた電顕的解析の結果から、HVJ のエンベローブ膜上に Dsg3-scFv-F を有することが確認された。さらに、Dsg3 ELISA により wild type HVJ に比較して、chimera HVJ は Dsg3 に極めて高親和性を有することが示された。得られた chimera HVJ の種々の細胞への感染効率を検討したところ、Dsg3 を発現していない細胞に比べ、発現している細胞への感染効率は wild type HVJ よりも chimera HVJ の方が有意に高かった。さらに、VII 型コラーゲン欠損により表皮接着能が著しく低下した表皮水疱症モデルマウスを用いて、chimera HVJ の表皮基底細胞への *in vivo* における感染効率を検討したところ、同様に wild type HVJ よりも chimera HVJ のほうが有意に高かった。この表皮水疱症モデルマウスの水疱内に type VII collagen の発現ベクターを封入した HVJ-E ベクターを導入すると、キメラ HVJ-E ベクターにおいて有意に高い type VII collagen の発現が基底膜上に確認できた。

[総 括]

HVJ の F 蛋白を利用し mDsg3-scFv を組み込んだキメラ F タンパクを HVJ-E ベクター上に挿入させることで表皮基底細胞への親和性が向上し、さらには表皮基底細胞での type VII collagen の発現効率を有意に向上させることに成功した。本研究によるキメラ HVJ-E ベクターの開発の試みは様々な scFv でも適応できる技術であり、今後、特異性の高い標的導入法として難病治療に大きく貢献できることが期待される。

論文審査の結果の要旨

遺伝子治療を行う上で、導入遺伝子を効率的に機能させるには、遺伝子を効率よく細胞内に導入できるベクターが必要となる。これまでに、センダイウイルス (HVJ) のゲノム RNA を UV で不活性化し、エンベローブのみで構成された、安全かつ高効率に遺伝子を導入することが可能な非ウイルスベクター; HVJ-E ベクターがすでに開発されているが、組織特異性を持たず予期せぬ副作用の発現へとつながる可能性がある。そこで申請者は、特定の組織に親和性の高い Tissue-Targeting HVJ-E ベクターの開発を行い、より高効率な治療分子の導入を試みた。

まず、特定の組織に親和性の高いリガンド分子を HVJ の F タンパク遺伝子に挿入し、LLCMK2 細胞で発現させた。次にこのキメラ F タンパク発現細胞に HVJ を感染させ、出芽する際にキメラ F タンパクを取り込んだ HVJ をキメラ HVJ として回収し、ターゲティング HVJ-E ベクターとして用いるという方法論で研究を行った。

本研究にて、HVJ の F タンパクを利用し、デスモグレイン 3 に対する一本鎖抗体を取り込ませたキメラ HVJ の作成に成功した。このキメラ HVJ はデスモグレイン 3 に対し高い結合活性を示し、また *in vitro*、*in vivo* の系においてデスモグレイン 3 発現細胞および表皮基底細胞に対し高い感染効率を示した。また、キメラ HVJ を UV で不活性化したターゲティング HVJ-E ベクターに VII 型コラーゲン発現ベクターを封入し、VII 型コラーゲンノックアウトマウスの水疱内に導入すると、ワイルドタイプ HVJ に比べ基底細胞上により高効率に VII 型コラーゲンを発現させることに成功した。

この研究成果は、VII 型コラーゲンが欠損することにより水疱が形成される表皮水疱症の病態を改善する可能性を示唆するものであり、本研究は博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。