



Title	Functional modification of Sendai virus by siRNA
Author(s)	佐賀, 公太郎
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49970
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	佐 賀 公 太 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病態制御医学専攻
学 位 論 文 名	Functional modification of Sendai virus by siRNA (siRNA を利用したセンダイウイルスの機能変改)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金田 安史 (副査) 教 授 塩田 達雄 教 授 金倉 讓

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

センダイウイルス外被膜 (HVJ-E) は細胞や組織への分子導入ベクター、及び抗腫瘍ベクターとして利用可能である。しかし、ウイルス膜タンパクである Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) は赤血球凝集を引き起こす為、HVJ-E の安全な生体内投与には HN の制御が必要である。本研究では HN 特異的な siRNA (HN-siRNA) を利用する事で HN 含量の著しく低下した HN-depleted HVJ を作製し、更にリコンビナント HN を HN-depleted HVJ-E に取り込ませる事によって新たな機能を有する改変 HVJ-E の作製を試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

1. HN-siRNA を利用した HN-depleted HVJ の產生

HN をノックダウンする為に HN mRNA を認識する siRNA を 5 種類 (HN-223, -342, -889, -1142, -1427) 作製した。これらの siRNA を導入したサル腎細胞 (LLC-MK2) に HVJ を感染させ、感染 24 時間後の HN mRNA をノーザンプロット法によって検出した結果、HN-899 (HN-siRNA) が最も HN ノックダウン効果を有する事が確認された。HVJ を感染させた HN-siRNA 導入 LLC-MK2 から出芽していく HVJ は HN 含量が著しく低下しており、HN-depleted HVJ の產生が可能となった。HN-depleted HVJ の赤血球凝集活性は野生型 HVJ と比較して著しく低下していたが、その細胞感染効率も共に低下していた。しかし、遠心により HN-depleted HVJ を細胞に人工的に接着させると感染効率は回復し、更に HN-depleted HVJ-E による FITC-オリゴ DNA 細胞内導入も可能であった事から、HN の減少によって HN-depleted HVJ の細胞への接着能は低下したが膜融合能は保持している事が明らかとなった。

2、一本鎖インターロイキン12結合型 HN-depleted HVJ の作製と機能解析

約500アミノ酸から成るHN細胞外ドメインをC末端側から100アミノ酸ずつ削った6種類のリコンビナントHN発現ベクター(Full length HN, ecto-400aa-HN, ecto-300aa-HN, ecto-200aa-HN, ecto-100aa-HN, ecto-0aa-HN)を作製した。各発現ベクターの細胞内導入におけるタンパク発現をウェスタンプロット法により確認すると、ecto-0aa-HN以外のリコンビナントHN発現が確認されたが、その細胞内局在を免疫染色法で確認するとFull length HN及びecto-100aa-HNのみが細胞膜表面に局在している事が明らかとなった。更に、これらのリコンビナントHN発現細胞にHVJを感染させると、ecto-100aa-HNのみが感染細胞由来HVJに取り込まれている事が確認された。

ecto-100aa-HNの先端にマウスIgG定常領域(Fc)を融合させたリコンビナントHN(Fc-HN)発現ベクターを作製し、その安定発現組換え体LLC-MK2を作製した。その細胞にHN-siRNA導入、及びHVJ感染を行う事で、Fc-HNを有したHN-depleted HVJ(Fc-HVJ)の產生に成功した。また、インターロイキン12(IL12)構成因子であるp40サブユニットとp35サブユニットをリンカー((Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄)で連結させた一本鎖IL12(scIL12)を作製し、そのN末端側にFc特異的結合能を有するプロテインAのZZドメインを融合させたZZ-scIL12を作製した。

ショ糖密度勾配遠心法を利用した共沈実験により、Fc-HVJとZZ-scIL12はFc-ZZ相互作用により結合可能であり、マウス血清中においても安定に結合している事が確認された。以上的方法で得られたZZ-scIL12結合型Fc-HVJ-Eをマウス樹状細胞(DC)やマウス脾細胞に反応させると、野生型HVJ-Eでの反応では見られなかったIFN- γ の分泌が確認された。更に、F10メラノーマ移植マウスにZZ-scIL12結合型Fc-HVJ-Eを腫瘍内投与すると野生型HVJ-E投与と比較して腫瘍は有意に萎縮し、ELISPOT assayやCr⁵¹releasing assayによってF10メラノーマに対する細胞障害性T細胞活性も増加している事が確認された。

〔 総 括 〕

HN-siRNAの利用により、赤血球凝集活性は低下したが膜融合能は保持しているHN-depleted HVJの產生に成功した。またFc-HVJ-EにZZ-scIL12を結合させる事で、HVJ-E抗腫瘍効果の増強に成功した。Fc-ZZ結合を利用したHVJ-Eへの機能分子結合は他の機能分子でも応用が可能であり、例えば組織特異的一本鎖抗体のHVJ-E結合による組織標的HVJ-E開発など、今後の応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、センダイウイルス外被膜を利用したDDSであるHVJ envelope vector(HVJ-E)の生体内投与において、より安全で疾患治療に対する有効性の高いベクター開発を目的とし、ウイルスゲノム操作のないHVJ機能改変を試みた。その結果、siRNAを利用する事によりHN含量、及び赤血球凝集活性が著しく低下したHVJ-Eの作製に成功した。更に、遺伝子工学的にマウスIgG定常領域融合型HN(Fc-HN)を作製し、Fc-HN安定発現細胞株を作製した。Fc-HN安定発現細胞株にsiRNA導入・HVJ感染を行う事により、Fc-HN含有HN欠損型HVJ-E(Fc-HVJ-E)の作製に成功し、更にFc-HVJ-EにZZドメイン融合型一本鎖IL-12(ZZscIL12)を結合させる事によりZZscIL12をFc-HVJ-E表面

に提示する事に成功した。ZZscIL12結合型Fc-HVJ-Eは樹状細胞や脾細胞からのIFN- γ 分泌を誘導し、HVJ-Eの持つ抗腫瘍効果を増大させる事が明らかとなった。本研究により開発されたHVJ-Eシステムは、様々な機能分子をFc-HVJ-E表面に結合させる事が可能である。機能分子として抗癌原抗体を利用する事により、転移癌標的化HVJ-Eの作製が可能となり、転移癌に対する新たな治療法としての応用も期待される。以上より、本研究は将来的な新規癌治療の開発に寄与するものであり、学位の授与に値すると考えられる。