

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、 〈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	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22718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改変)
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 譲

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 の産生

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 をノーザンブ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 から出芽してくる HVJ は HN 含量が著しく低下しており、HN-depleted HVJ の産生が可能となった。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ブ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) を融合させたりコンビナント 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) の産生に成功した。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的に結合している事が確認された。以上の方法で得られた 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 Cr⁵¹ releasing 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 の産生に成功した。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。機能分子として抗腫瘍抗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。