



Title	マイクロRNAを利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発に関する研究
Author(s)	清水, かほり
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60067
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

【5】

氏 名	し 清 みず か ほ り
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の発現を抑制可能な新規アデノ ウイルスベクターの開発に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 水 口 裕 之 (副査) 教 授 中 川 晋 作 教 授 八 木 清 仁 教 授 辻 川 和 丈

論 文 内 容 の 要 旨

アデノウイルス (Ad) ベクターは、遺伝子導入ベクターとして多くの長所を有しており、遺伝子治療臨床研究において最も汎用されている。従来の非増殖型Adベクターは自己増殖に必須のE1遺伝子を欠損させることで、理論上Ad遺伝子が発現しないよう設計されている。しかし遺伝子導入後、わずかにE1遺伝子非依存的にAdタンパク質が発現することで、これらAdタンパク質に対する細胞性免疫が誘導されるとともに、Adタンパク質そのものによって組織障害が引き起こされることが問題となっている。またそれらにより、Adベクターによる導入遺伝子の発現が減弱することが報告されている。これらの問題に対しこれまでに、Adタンパク質の発現を抑制可能なAdベクターの開発が試みられてきたが、それらAdベクターは大量調製が困難であること、調製に特殊なパッケージング細胞を要することから汎用されるには至っていない。そこで本研究では、マ

イクロRNA (miRNA) を利用することでAd遺伝子の発現を抑制可能で、かつ容易にベクターが大量に調製可能な新規Adベクターの開発を試みた。

これまでに非増殖型Adベクター作用後にAd遺伝子が発現してくることは知られていたが、それらの発現について系統的に検討した報告はなかったため、まず非増殖型Adベクター作用後の各Ad遺伝子の発現プロファイルを定量的RT-PCR法を用いて解析した。ヒト肝癌細胞株SK HEP-1細胞、正常細胞であるヒト胎児肺線維芽細胞WI38細胞に非増殖型Adベクターを作用させ、代表的なAd遺伝子 (hexon、fiber、pIX、E2A、E4遺伝子等) の発現を経時的に検討したところ、E2A、E4、pIX遺伝子の有意な発現が検出され、他のAd遺伝子発現量はほぼ検出限界以下であった。またAdベクター投与後のマウス肝臓におけるAd遺伝子の発現についても解析したところ、E2A、E4、pIX遺伝子の有意な発現が検出された。以上の結果から、非増殖型Adベクターより非特異的に発現するAd遺伝子は、主にE2A、E4、pIX遺伝子であることが明らかとなった。

次に、miRNAの遺伝子発現制御機構を利用して、非増殖型Adベクターより非特異的に発現することが確認されたE2A、E4、pIX遺伝子の発現を抑制することを試みた。miRNAは約22塩基のnon-coding RNAであり、標的とするmRNAの3'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合し、タンパク質への翻訳を抑制することで遺伝子発現を抑制する。そこでE2A、E4またはpIX遺伝子の3'非翻訳領域に、肝臓特異的なmiR-122a、もしくは脾臓特異的なmiR-142-3pの完全相補配列4コピーを挿入したAdベクターを開発した。miRNAの標的配列としては、Adベクターが全身投与後、投与量の90%以上が肝臓に集積するためmiR-122aを、またAdタンパク質に対する免疫応答において脾臓の樹状細胞・マクロファージが関与するためmiR-142-3pを選択した。これらmiRNAはパッケージング細胞である293細胞には発現していないためAdベクター増幅は阻害されず、従来型Adベクターと同程度のタイター量が容易に回収可能であった。そして、これらmiRNAの標的配列を挿入することでAd遺伝子の発現が抑制可能か検討するため、これらAdベクターをマウスに尾静脈内投与後の各Ad遺伝子の発現を検討したところ、miRNAの発現プロファイルに依存して各Ad遺伝子の発現を抑制することに成功した。特にE4遺伝子の3'非翻訳領域にmiR-122aの標的配列を挿入したベクター (Ad-E4-122aT) においては、他のAdベクターによる各種Ad遺伝子発現量と比較して、E4遺伝子のみならず調べた全てのAd遺伝子の発現が劇的に抑制された。

これらAdベクターによる肝障害を検討するため、Adベクター投与後、肝障害の指標である血清中alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST) 値を経時的に測定したところ、Ad-E4-122aTでは血清中のALT・AST値が従来型Adベクターと比較して1/2～1/4に抑制された。さらにマウス肝臓切片を作製し肝障害を評価したところ、従来型Adベクターでは肝細胞の細胞質に強い空胞化が観察されたのに対し、Ad-E4-122aTにおいては空胞化が観察されず、肝障害が大きく抑制された。これらの結果より、Ad-E4-122aTは従来型Adベクターと比較して肝障害性が低く安全性が高いこと、そして肝臓でのE4遺伝子の発現を抑制することがAdベクターによる肝障害の抑制に重要であることが示された。次に、肝障害を抑制することで導入遺伝子の発現プロファイルが改善するか検討するため、レポーター遺伝子としてmurine secreted embryonic alkaline phosphatase (mSEAP) 遺伝子を搭載した従来型Adベクターと、最も肝障害が抑制されていたAd-E4-122aTをマウスに静脈内投与し、血清中mSEAP発現量を測定したところ、従来型AdベクターおよびAd-E4-122aT投与群はともに投与6日後まで高いmSEAP発現を示し、以後徐々に低下していった。しかしAd-E4-122aTは、従来型Adベクターと比較して同程度またはそれ以上のmSEAP発現量を示した。

Ad-E4-122aTが従来型Adベクターよりも肝障害性が低い原因を検討するため、Adタンパク質に対する細胞性免疫応答を検討したところ、Ad-E4-122aTをはじめ全てのAdベクター投与群において脾臓中のヘキソン (Adベクターの主要エピトープ) 特異的な細胞傷害性T細胞の割合が上昇したものの、その値は同程度であった。これらの結果より、Ad-E4-122aTは細胞傷害性T細胞非依存的なメカニズムによる肝障害が抑制されていることが示唆された。そこで、Ad-E4-122aTでは本来に免疫非依存的な経路による肝障害が抑制されているかを検討するため、免疫不全マウス (Rag2/IL2 γ c欠損マウス) にAdベクターを静脈内投与し、血清中ALT・AST値を測定したところ、従来型Adベクターにおいては有意に上昇したことにに対し、Ad-E4-122aTではPBS投与群と同様、全く上昇がみられなかった。これらの結果より、Ad-E4-122aTでは免疫非依存的な経路による肝障害、おそらくAdタンパク質による直接的な肝障害が抑制されていることが示唆された。

以上の結果より、E4遺伝子の3'非翻訳領域にmiR-122aの標的配列を挿入したAdベクターは、従来型Adベクターよりも肝障害性が低く、高い遺伝子発現を示すこと、肝臓でのE4遺伝子の発現を抑制することでAdベクターによる肝障害を軽減可能であることが示された。近年、遺伝子発現を制御するmiRNAや長鎖ノンコーディングRNA等の報告により、種々の新しい遺伝子発現制御機構が明らかとなってきた。このような新たな遺伝子発現制御機構を遺伝子導入ベクターに応用することで、有効性・安全性に優れた次世代型遺伝子導入ベクターの開発が可能になるとともに、それらが遺伝子治療臨床研究をはじめ、生命科学研究に貢献することを期待する。

論文審査の結果の要旨

アデノウイルス（Ad）ベクターは、遺伝子導入ベクターとして多くの長所を有しており、遺伝子治療臨床研究において最も汎用されている。従来の非増殖型Adベクターは自己増殖に必須のE1遺伝子を欠損させることで、理論上Ad遺伝子が発現しないよう設計されている。しかし遺伝子導入後、わずかにE1遺伝子非依存的にAdタンパク質が発現することで、これらAdタンパク質に対する細胞性免疫が誘導されるとともに、Adタンパク質そのものによって組織障害が引き起こされることが問題となっている。またそれらにより、Adベクターによる導入遺伝子の発現が減弱することが報告されている。これらの問題に対しこれまでに、Adタンパク質の発現を抑制可能なAdベクターの開発が試みられてきたが、それらAdベクターは大量調製が困難であること、調製に特殊なパッケージング細胞を要することから汎用されるには至っていない。そこで本研究では、マイクロRNA（miRNA）を利用することでAd遺伝子の発現を抑制可能で、かつ容易にベクターが大量に調製可能な新規Adベクターの開発を試み、以下の結果を得た。

1. 非増殖型 Ad ベクター作用後、非特異的に Ad 遺伝子が発現すること、中でも E2A、E4、pIX 遺伝子が主に発現してくることを明らかにした。
2. Ad ベクターの E2A、E4、または pIX 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、miRNA の標的配列を挿入した Ad ベクターを開発した。それら Ad ベクターでは、miRNA の発現プロファイルに依存して、それぞれの Ad 遺伝子の発現を抑制することに成功した。また、それら Ad ベクターは、通常の調整方法を用いて、従来型 Ad ベクターと同程度のタイター量が容易に回収可能であった。
3. E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクターは、静脈内投与後、従来型 Ad ベクターよりも肝障害性が低く、高い遺伝子発現を示した。
4. 肝臓での E4 遺伝子の発現を抑制することで、Ad ベクターによる肝障害を軽減可能であることを明らかにした。

以上、本研究より、E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a の標的配列を挿入した Ad ベクターは、従来型 Ad ベクターよりも肝障害性が低く、高い遺伝子発現を示すこと、肝臓での E4 遺伝子の発現を抑制することでAdベクターによる肝障害を軽減可能であることが示された。近年、遺伝子発現を制御するmiRNAや長鎖ノンコーディングRNA等の報告により、種々の新しい遺伝子発現制御機構が明らかとなってきた。本研究では、miRNAを利用することで、ウイルス遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な新規Adベクターを開発した。このように新たな遺伝子発現制御機構を遺伝子導入ベクターに応用することで、有効性・安全性に優れた次世代型遺伝子導入ベクターの開発が可能になるとともに、それらが遺伝子治療臨床研究をはじめ、生命科学研究に貢献することを期待するものであり、極めて意義深く、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。