

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 大腸菌内でのゲノム進化を利用したヘルペスウイルスベクターの新規変異体作製
(英語) Development of mutant herpes simplex virus vector using genome evolution
in *Escherichia coli*

研究開発実施期間：2018年10月15日～2021年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 塩澤 裕介
(英語) Yusuke Shiozawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 学校法人日本医科大学・研究部共同研究施設分子解析研究室・助教

(英語) Nippon Medical School・Collaborative Research Institute, Laboratory of Molecular Analysis・
Assistant Professor

II 研究開発の概要

単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターは、ゲノムが約 150 kb と大きいと複製かつ巨大な遺伝子を搭載でき、宿主ゲノムへの組み込みが起こらないという利点がある。一方、HSV ベクターには細胞毒性の問題があり、無毒化を目指した HSV ゲノム改変が国内外で試みられてきた。その中で我々は、HSV ゲノムから毒性遺伝子発現を欠失させ、その毒性を著しく低減することに成功した。我々はこの無毒化 HSV ベクターを基に遺伝子治療用ベクターを開発してきたが、課題も浮上してきた。それは、1) 毒性遺伝子を除去した代償としてベクターゲノムからの転写活性が低下すること、2) 局所投与以外による標的へのベクター送達が難しいこと、3) 遺伝子導入領域が狭い範囲に留まること、である。細胞毒性のときは異なり、これらの問題を解決するために必要な遺伝子改変は自明ではない。こういった場合、網羅的な変異導入により変異体を作製するアプローチが有用である。しかし、サイズの大きい HSV ゲノムは多くの遺伝子を有しており、遺伝子改変が煩雑であることもあって網羅的な変異導入は行われてこなかった。そこで本研究では、標的移行性と治療遺伝子発現の持続性に優れた遺伝子治療用ベクターを作製するため、ランダムな点変異を HSV ゲノム全体に導入することにより HSV ベクターの新規変異体作製を行うこととした。変異導入にあたっては、DNA 校正・修復活性を低下させた大腸菌 (高変異性大腸菌) を用いることとした。作製したベクターの性能を *in vitro*・*in vivo* で評価し、有用な変異体の同定を試みた。

まず、HSV ベクターゲノムを高変異性大腸菌内に保持させるため、これを bacterial artificial chromosome (BAC) 化した。その後、HSV ゲノムから細胞毒性のある遺伝子を除いた。こうした毒性遺伝子として、*ICP27*、*ICP4*、*ICP0*、*ICP22* が知られている (図 1)。*ICP4* と *ICP0* は反復配列に位置しているため、HSV ゲノム中に 2 コピーずつ存在する。我々が過去に行った遺伝子改変では、まず junction 領域全体を削除し、残った 1 コピーの *ICP4* と *ICP0* を欠失させていた (図 2)。このアプローチは、junction 領域がなくなった分だけベクターに搭載できる遺伝子のサイズが大きくなることや、相同配列がなくなるためベクターゲ

ノム内での組換えが起きにくくなる、といった利点がある。しかし、junction 領域には多くの non-coding RNA が含まれており、HSV ゲノムからの転写活性を維持する作用などが知られている。そのため、junction 領域全体を欠失させることで、治療遺伝子の発現低下が懸念された。そこで本研究では、junction 領域全体ではなく ICP4 と ICP0 のみを欠失させることで、ベクターゲノムの改変を最低限に止めるようにした。これらの改変を、1) Red/ET recombination system による大腸菌内での組換えと、2) HSV ベクター感染細胞内での相同組換え、の 2 つの方法により順次行った。

図1 HSV ゲノムの構造

HSV ゲノムの各領域と、細胞毒性と関連する遺伝子の位置を示す。矢印は転写の方向を表している。

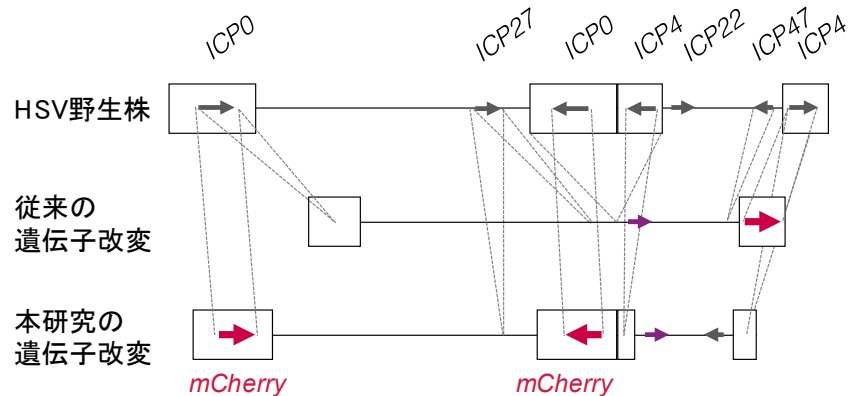


図2 HSV ゲノムにおける毒性遺伝子の欠失改変

HSV ゲノム中の細胞毒性の原因となる遺伝子を不活化する方法について、従来のものと本研究で採用したものを示す。

このようにして BAC 化と無毒化を行った HSV ベクターゲノムにより、高変異性大腸菌を形質転換した。本菌はアラビノースの添加により DNA 複製時の変異率が上昇するようになっているため、まずアラビノース濃度が変異率に与える影響を調べた。1 μ M から 1 M までの 7 段階の濃度を検討した。まず、アラビノース濃度を 1 M とした菌液では大腸菌がほとんど増殖しなかった。これは、アラビノース濃度が高いことにより大腸菌ゲノムにも多くの変異が蓄積し、菌が増殖できなくなるためであると考えられた。100 mM の菌液では大腸菌の増殖速度は低下していたものの、最終的な HSV-BAC の収量は保たれていた。そこで、100 mM 以下のアラビノース濃度で培養した菌液から HSV-BAC を抽出し、シーケンス解析を行った。その結果、アラビノース濃度が高くなるほど変異の頻度が高くなる傾向が認められた。変異の頻度は一塩基置換が 0.03%、欠失が 0.004%、挿入が 0.001% までであった。一般に、分子進化を目的とするときの変異導入の頻度としては、1 つのタンパク質あたり 1~4 アミノ酸、塩基に換算すると一遺伝子あたり 2~7 塩基程度という条件がよく用いられる。HSV ゲノムのうち、ベクターゲノムの複製やベクター粒子形成に必須ではなく、遺伝子改変を加えることができる領域は約 60 kb であり、これは全体の約 40% にあたる。このことから、HSV ゲノムあたり 5~20 個の変異、すなわち変異頻度が 0.003-0.012% であるような条件で変異導入を行うのがよいと考えられた。そこで 100 μ M、1 mM、10 mM の 3 種類のアラビノース濃度を用いることとした。これらのアラビノース濃度で大腸菌を大量培養し、HSV-BAC を抽出・精製した。得られた HSV-BAC を large-scale で培養したベクター産生細胞にトランスフェクションし、変異 HSV ベクターライブラリを得た。

神経系と肝臓を標的とした新規 HSV ベクターを開発するため、in vitro での検討として、神経芽腫由来の細胞株 IMR32 と肝細胞がん細胞株の HepG2 に HSV ベクターを感染させた (図 3)。IMR32 に対してはレチノイン酸処理を行い、ニューロンへの分化を促した後に HSV ベクターを感染させた (図 3B)。感染後の細胞から

経時的に RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を行った。その結果、IMR32 と HepG2 の双方において、感染後 24 時間まで転写活性が高い領域を同定した (図 4)。しかし、この領域の転写活性は感染後 3 日目以降に急激に低下していった。一方、同じく HSV ベクターゲノム内のある領域の転写活性は、感染直後は低いが持続的に保たれる傾向があり、特に IMR32 で高く保たれていた (図 4)。

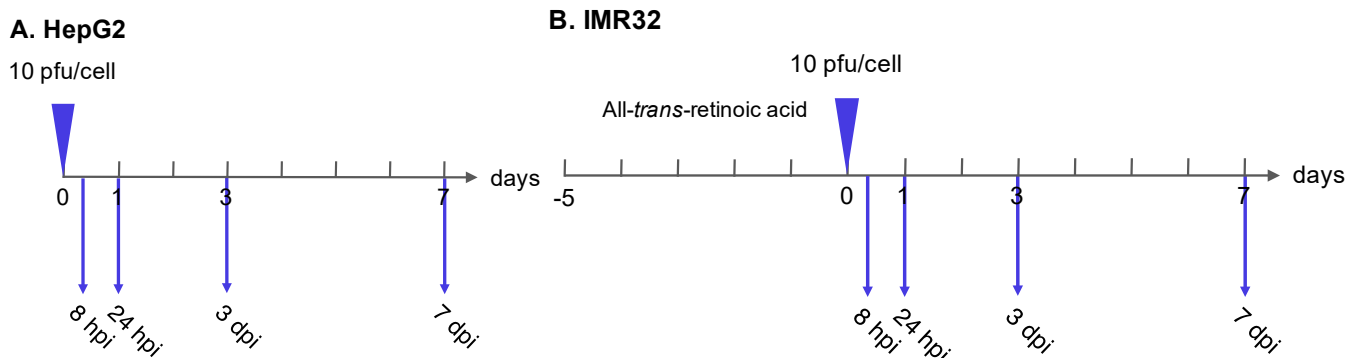


図 3 HSV ベクターによる培養細胞株への遺伝子導入

HSV ベクターを培養細胞株 (A. HepG2、B. IMR32) に MOI 10 pfu/cell で感染させ、その 8 時間後・24 時間後・3 日後・7 日後に RNA を採取した。IMR32 ではベクター感染の 5 日前からレチノイン酸による分化誘導を行った。hpi: hours post infection、dpi: days post infection。

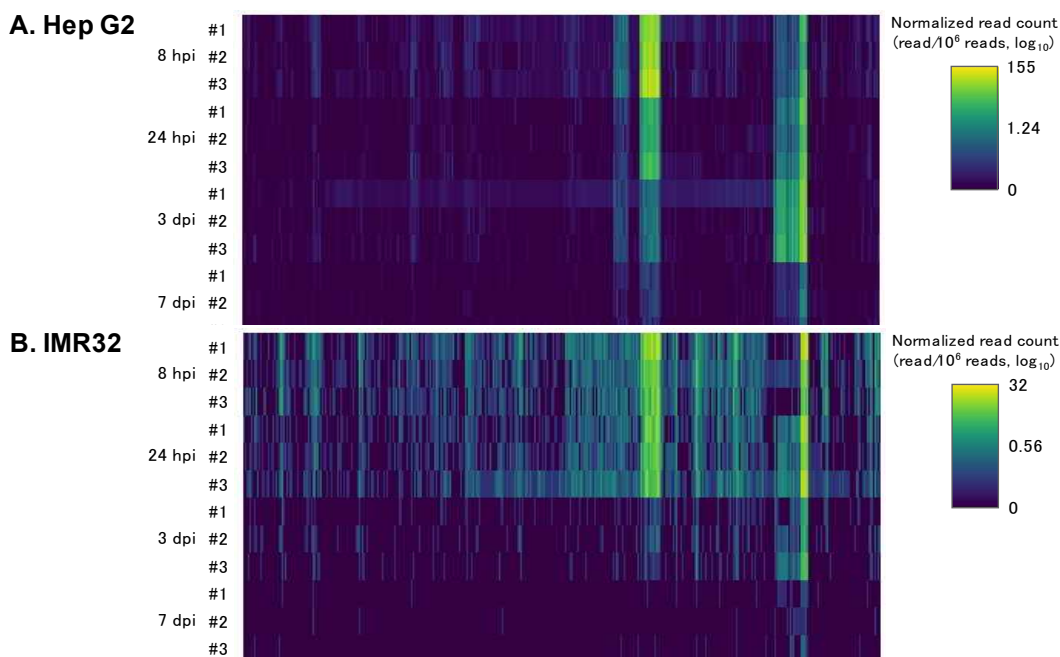


図 4 培養細胞株での HSV ベクターの遺伝子発現プロファイル

培養細胞株 (A. HepG2、B. IMR32) における HSV ベクター由来の遺伝子発現量をヒートマップで示した。横軸は HSV ゲノム上の位置を表し、サンプルは経時的に縦に並べている。

以上の結果から、治療遺伝子組み込み部位として、一過性発現と持続的な発現それぞれに適した領域が同定された。そこで、これらの領域に Gateway®カセットを有する HSV ベクターを作製した。Gateway®カセットを用いることで挿入遺伝子の交換が容易になり、HSV ゲノム改変の煩雑さを避けることができるためである。持続的な発現に適した領域は HSV ゲノムの反復配列中にあり、本研究では junction 領域を欠失させていないため、Gateway®カセットを 2 コピー挿入することができた。これにより、従来の HSV ベクタ

一と比べて2倍の遺伝子発現量が期待できる。さらに、junction領域にコードされる non-coding RNA も残っている。これらの non-coding RNA は HSV ゲノムからの転写活性を維持する作用などが知られているため、これが欠失していないことも治療遺伝子の発現に有利に働くことが期待される。Gateway®カセットを2コピー持つことで治療遺伝子を挿入する際の操作が煩雑になることが懸念されたが、1回の組換え反応で一度に2コピーの遺伝子を挿入できるプロトコルを確立することができたため、この問題も解決された。このように、本研究で作製した HSV ベクターは、従来のもの比べて多くの利点を有している。現在、これらのベクターと従来のベクターの比較を進めているところである。持続発現用のベクターは従来のベクターよりも生物学的力価が高い傾向にあり、遺伝子導入効率についても期待できる結果となっている。

Herpes simplex virus (HSV) vector has a large genome and a high capacity for transgene cassettes. One of the barriers to clinical application of HSV vectors is their cytotoxicity. We have eliminated vector toxicity by silencing all the toxic genes in HSV genome. The remaining obstacles are silencing of transgenes and vector delivery to target organs. The aim of this study is to develop novel mutant HSV vector with durable transgene expression and improved transduction efficiency in nervous system or liver. We do not have a prior knowledge about required modifications of HSV genome to overcome these problems. This leads us to hypothesize that random mutagenesis of HSV genome is a promising approach to prolong duration of transgene expression and to enhance vector delivery. We use an *in vivo* mutagenesis system in which HSV genome is replicated in a mutator strain of *E. coli*. The mutant vectors are individually tested for its tropism and duration of transgene expression.

We first inserted a bacterial artificial chromosome (BAC) cassette into HSV vector genome, followed by removal of cytotoxic genes: *ICP27*, *ICP4*, *ICP0*, and *ICP22*. HSV genome has two copies of *ICP4* and *ICP0*. Unlike the conventional approach, we deleted two copies of these genes one by one to leave the adjacent sequences intact. The flanking regions of *ICP4* and *ICP0* contain many non-coding RNAs that have a role in maintaining transcriptional activity of HSV genome. Our HSV vector retains expression of these non-coding RNAs, which potentially has a positive effect on transgene expression.

We transformed *E. coli* with a plasmid that express genes known to decrease DNA replication fidelity. This highly mutagenic *E. coli* was then transformed with the HSV vector genome. The mutation rate during replication of this *E. coli* increases upon addition of arabinose to the medium. We thus evaluated the effect of arabinose concentration on the mutation rate. The concentration of arabinose was increased from 1 μ M to 1 M. Bacterial growth was inhibited in the medium with 1 M arabinose. This level of arabinose was thought to induce accumulation of deleterious mutations in *E. coli* genome. HSV vector genome was extracted from the bacteria grown in the medium with 1 μ M to 100 mM of arabinose. Sequencing analysis revealed that mutation rate was associated with arabinose concentration. We decided to use three levels of arabinose concentration in the following experiments: 100 μ M, 1 mM, and 10 mM. Large-scale culture was performed at these concentrations. The obtained HSV-BAC was then transfected into a vector-producing cell line to produce mutant HSV vector libraries.

We transduced *in vitro* a neuroblastoma-derived cell line IMR32 and a hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by the HSV vector. IMR32 was treated with retinoic acid to promote differentiation into neurons and then infected with the vector. RNA was extracted from the infected cells over time, and gene expression analysis was performed. A specific vector genomic region was identified to show high transcriptional activity immediately after transduction in both IMR32 and HepG2. Gene expression from this region sharply decreased after 3 days post-infection. On the other hand, another region in the HSV vector genome showed low but persistent transcriptional activity, which was particularly prominent in IMR32.

These results indicated vector genomic regions suitable for transient and persistent transgene expression. We inserted a Gateway cassette into these regions for the ease of the exchange of transgenes. Since we retained the junction region of the HSV vector genome, we were able to insert two copies of a Gateway cassette. We established a protocol that simultaneously exchanged two cassettes into a transgene. We are currently comparing our HSV vectors with conventional ones. Vectors for sustained expression tend to have higher biological titers than conventional ones, which suggests higher transduction efficiency.