

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業

2. 研究開発課題名：RNAi 型医薬品を標的組織ならびに多能性幹細胞で持続的に発現させるウイルスベクター技術の開発

3. 研究開発代表者：朝長啓造

4. 研究開発の成果：

平成 27 年度は、研究開発代表者である朝長以下、研究分担者ならびに博士研究員の計 4 名で研究開発を行った。本事業の 4 つの研究開発項目 (1) RNAi 型医薬品を発現するボルナウイルスベクターの確立、(2) ボルナウイルスベクターの産生と安全性向上のための技術革新、(3) 多能性幹細胞へのボルナウイルスベクターの導入と応用、(4) 実験動物を用いたボルナウイルスベクターの検討において、6 つのマイルストーンに向けた開発を行った。以下に、その概要を記載する。

### M4(B)： 外来遺伝子発現 ON/OFF ボルナウイルスベクターの開発

これまでの研究開発において、ボルナウイルスベクターの P と M 遺伝子の間 (P/M 間) に外来遺伝子を組み込んだ外来遺伝子発現技術を確立している。平成 27 年度は、P/M 間から発現する外来遺伝子の翻訳を薬剤依存的に制御するシステムの確立を行った。自己開裂型リボザイムである L2 バルジ (L2b9) を標的 mRNA の非翻訳領域に挿入すると、テオフィリン非存在下では標的 mRNA は自己開裂を起こし翻訳されない (図 1a)。そこで、分泌型のガウシアルシフェラーゼ遺伝子の 3' 末端非翻訳領域に L2b9 配列を挿入したボルナウイルスベクターを作製した (図 1b)。解析の結果、このボルナウイルスベクターが導入された細胞では、テオフィリンを加えることによりシフェラーゼの活性が有意に上昇し (図 1c,d)、外来遺伝子の翻訳を制御できるシステムが確立に成功した。

### M6(B)： その他幹細胞へのボルナウイルスベクターの適用

平成 27 年度は、ボルナウイルスベクターの適用範囲を広げるために、iPS 細胞以外の幹細胞へのボルナウイルスベクターの導入を試みた。ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞に GFP 発現ボルナウイルスベクターを持続感染させたところ、ベクター導入によっても間葉系幹細胞の基本性状は変化しないことが示された。さらに、ベクター導入間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化誘導にも成功した (図 2b)。次に、ヒト造血幹細胞への導入を試みた。CD34 陽性のヒト由来造血幹細胞を、GFP 発現ボルナウイルスベクター感染 Vero 細胞と共培養したところ約 2.2% が GFP 陽性を示し、ベクター導入が確認された (図 2c)。

### M7(A)： ボルナウイルスベクターを用いた iPS 細胞の分化誘導

ボルナウイルスベクター導入 iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導を試みた。ヒト横紋筋肉腫由来株化細胞である TE671 から骨格筋細胞の分化誘導因子である MyoD1 遺伝子をクローニングし、ボルナウイルスベクターに組み込んだ。また、マーカー遺伝子を挿入したボルナウイルスベクターを構築し、リバーシジェネティック法により MyoD1 とマーカー遺伝子を発現する組換えボルナウイルスを回収した。

### M8(C) : ボルナウイルスベクター高産生細胞の樹立

ボルナウイルスの感染細胞からのウイルス粒子放出を促進する宿主因子として IGF2 を同定している。平成 27 年度は、IGF2 をノックダウンした 293T 細胞ならびに Vero 細胞株を樹立した。これらの細胞を用いてリバースジェネティクスを行った結果、7 日目の組換えウイルスの感染細胞数は、野生型細胞と比べて約 7 倍に上昇した。これらの結果は、IGF2 のノックダウンの効果が確認された。

### M9(B) : ボルナウイルスベクターの臓器特異性の確認

生体内でボルナウイルスベクターの感染動態を可視化できるシステムの確立を試みた。可視化マーカー遺伝子としてルシフェラーゼもしくは Cre リコンビネースを持つボルナウイルスベクターの作製し、組換えウイルスの回収を行った。現在、動物個体内でのボルナウイルスベクターの動態解析のための予備実験を行なっている。

### M12(B) : 他のウイルスベクターとの比較検討

ボルナウイルスベクター技術の優位性を確立するためには、既存のレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ならびにアデノ随伴ウイルスベクターなどと比較検討する必要がある。平成 27 年度は GFP を発現するこれら様々なタイプのウイルスベクターを作製するとともに、ウイルスベクターの使用許可（大臣確認）の申請を進めた。

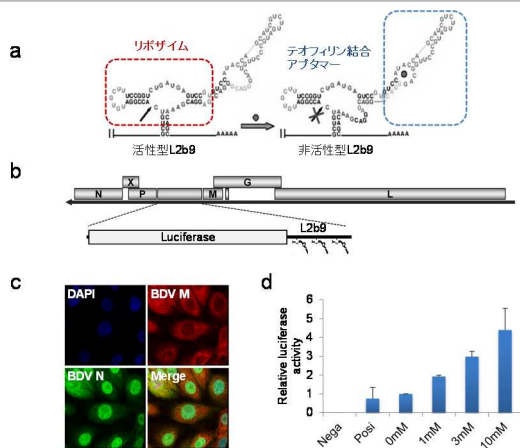


図1. 外来遺伝子発現ON/OFFボルナウイルスベクターの開発。(a) 自己開裂型リボザイムL2b9の構造。アプタマー部位へのテオフィリン結合により構造変換を起こして非活性型となる。(b) L2b9を組み込んだボルナウイルスベクターの構造。(c) L2b9リボザイムを持つ組換えボルナウイルスの回収。(d) Luciferase-L2b9を発現する組換えボルナウイルス感染細胞ではテオフィリンの添加により、ルシフェラーゼ活性が上昇した。

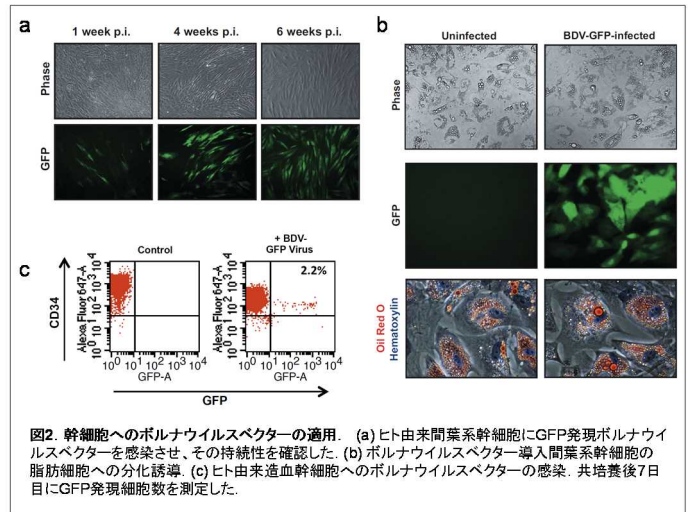


図2. 幹細胞へのボルナウイルスベクターの適用。(a) ヒト由来間葉系幹細胞にGFP発現ボルナウイルスベクターを感染させ、その持続性を確認した。(b) ボルナウイルスベクター導入間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化誘導。(c) ヒト由来造血幹細胞へのボルナウイルスベクターの感染。共培養後7日目にGFP発現細胞数を測定した。