

# 研究報告書(公開)

## 「細胞質持続発現型 RNA ベクター」

研究期間:平成19年10月～平成23年3月

研究者: 西村 健

### 1. 研究のねらい

動物細胞への遺伝子導入技術は、現在のバイオサイエンスの基幹技術である。導入技術により遺伝子発現期間は長短様々であるが、持続的な発現を目的にした際には、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが現在主に用いられている。しかし、これらのベクターは宿主の染色体にベクターゲノムを挿入することによって持続的な発現を実現しているために、宿主の遺伝情報に影響を与えることによるガン化等のリスクが指摘されている。

それに対し RNA ウイルスであるセンダイウイルスは、生活環のすべてが細胞質内であるため、核内の宿主の遺伝情報に全く影響を与えない。また、センダイウイルスの野生株は細胞障害性を有するのに対し、細胞を障害せずに持続感染するセンダイウイルス Cl.151 株という変異株が分離されている。

そこで本研究では、このように非常にユニークな性質を有するセンダイウイルスの持続感染変異株を基に、細胞質内で安定に遺伝情報を維持しながら、持続的な遺伝子発現を可能にする「細胞質持続発現型 RNA ベクター」を開発、実用化することを目指した。さらに、miRNA 等の機能性 RNA の機能と、ベクターの RNA ゲノムを融合させることにより、持続的に遺伝子発現をしながら必要に応じてベクターの除去や遺伝子発現調節が可能な持続発現型ベクターへの改良も試みた。また、持続感染とインターフェロン発現誘導の関係の解析等により、RNA ゲノムが細胞質内で安定に維持されるメカニズムを明らかにし、RNA の生体応用の際に常に問題視されるインターフェロン誘導を回避したベクターの作製を試みた。そして、このような研究を総合して、より医療応用に近い新規 RNA テクノロジーの創出を目指した。

### 2. 研究成果

本研究を開始する前に、既にセンダイウイルス持続感染変異株 Cl.151 の全長ゲノム cDNA のクローニングや、その cDNA に外来遺伝子を挿入した組換えウイルスの作製に成功しており、このような全長型 Cl.151 ベクターは、細胞を障害すること無く、6 ヶ月以上の長期間、持続的に外来遺伝子を発現することが可能であることを明らかにしていた(K. Nishimura, et al. (2007) *J. Biol. Chem.*)。また、Cl.151 株のゲノム上の持続感染関連変異の解析により、ウイルス膜構成タンパク質(M、F、HN 遺伝子)上の変異による感染初期の細胞障害性低下と、ウイルスポリメ

ラーゼタンパク質(L遺伝子)上の変異によるインターフェロン $\beta$ の誘導減少、といった複数の効果が合わさることによって持続感染が成立しているということも明らかにしていた(K. Nishimura, et al. (2007) *J. Biol. Chem.*)。さらに別の解析により、P 遺伝子上の一つの点変異による細胞障害性低下も持続感染に必要であることも明らかにしていた。

以上の結果を受けて、本研究では、(1)センダイウイルスの持続感染機構の解析、(2)細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発、(3)細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用、(4)遺伝子発現調節ベクターへの改良、について研究を進めたので、以下、この順で詳細を説明する。

#### (1)センダイウイルスの持続感染機構の解析

上記の L 遺伝子の変異によるインターフェロンの誘導減少について、より詳細に解析を進めた。

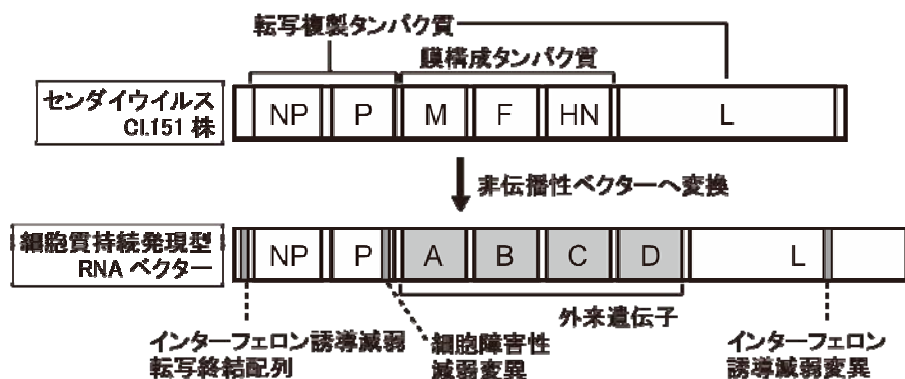
まず、CI.151 株の L 遺伝子上には、親株の Nagoya 株と比較して 4 カ所の点変異が存在していたが、そのうちのたった一つの点変異(1618 番目のロイシンがバリンに変化)のみで、インターフェロン誘導が著しく減少し、それに伴って細胞障害性も減少することを明らかにした。インターフェロン $\beta$ は、ウイルス RNA が宿主の RIG-I タンパク質に認識されることによって誘導されると言われていることから、次に、インターフェロン誘導源であるウイルス RNA 量を定量した。その結果、L タンパク質上の点変異によって、ウイルスゲノム RNA 量に変化は無いが、アンチゲノム方向の RNA の転写量が、特に感染初期(感染後 8 時間以内)において著しく減少していることを明らかにした。また、アンチゲノム RNA の転写量を減少させるための転写終結配列を、野生株のゲノムに人工的に挿入したところ、この組換えウイルスのインターフェロン誘導能は有意に減少していた。

以上の結果から、センダイウイルス RNA のうちアンチゲノム RNA がインターフェロン誘導源となっており、そのような RNA が感染初期において転写されずにインターフェロン誘導が起きないことが、CI.151 株の持続感染の一因となっていることが明らかになった。また、この RNA の転写量を人工的に減少させることにより、細胞障害性を低下させた組換えウイルスの作製が可能であることを明らかにした。

#### (2)細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発

まず始めに、全長型 CI.151 ベクターのゲノムから、ベクターの転写複製に関わらない遺伝子を外来遺伝子に置き換えることによって欠損させて、持続感染能を維持したまま、自律複製できない非伝播性のベクターにすることが可能であるか検討した。その結果、転写複製に関わらないウイルス膜構成タンパク質の 3 遺伝子すべてを外来遺伝子に置換しても、持続感染能を維持したベクターの構築が可能であることを明らかにした。さらに、上記(1)の持続感染機構

解析で有効性が証明された、インターフェロン誘導減弱のための転写終結配列を挿入することにより、より安定して持続感染するベクターへと進化させ、最終的に図 1 に示されるような構造を持つベクター、「細胞質持続発現型 RNA ベクター」の開発に成功した。



＜図1＞細胞質持続発現型 RNA ベクターの構造

次に、細胞質内で持続感染するという本ベクターの特徴を生かすために、持続感染するベクターを人為的に除去する技術の開発を試みた。ポリメラーゼタンパク質をコードする L 遺伝子に対する siRNA でベクター感染細胞を処理したところ、約一週間後にはベクターからの外来遺伝子の発現が検出されなくなり、ベクターゲノムが宿主細胞から除去されたことが明らかになった。以上の結果から、siRNA 処理等でウイルスポリメラーゼの活性を抑制することにより、人為的に持続感染しているベクターを除去できることが明らかになった。

### (3)細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、体細胞に複数の遺伝子を導入することによって誘導されてくる多能性幹細胞であり、再生医療の分野等への応用が期待されている。しかし従来の誘導方法では、4 つの遺伝子を別々に搭載したレトロウイルスベクターを多重感染させる方法が主に用いられており、染色体挿入により残存するベクター由来の誘導遺伝子の再活性化によるガン化等のリスクや、4 遺伝子の発現バランスの違いによる性質のばらつき、等の問題点が指摘されている。それに対し、細胞質持続発現型 RNA ベクターは「染色体挿入無く」「複数の遺伝子を」「持続的に発現し」「人為的除去が可能」であるという特徴を持っていることから、これらの特長を生かした iPS 細胞誘導への応用を試みた。

Oct4、Sox2、Klf4、c-myc の 4 遺伝子を搭載した細胞質持続発現型 RNA ベクターを作製して iPS 細胞を誘導し、その後 siRNA 処理によってベクターの除去を行ったところ、従来の方法よりも約 100 倍効率良く誘導が可能で、最終的にはベクターゲノムが完全に除去された、誘導前の細胞と遺伝情報が全く同一な iPS 細胞を樹立することに成功した。また、4 遺伝子を一定の発現バランスで同時に発現させることから、得られる iPS 細胞のクローン間の性質のばらつき

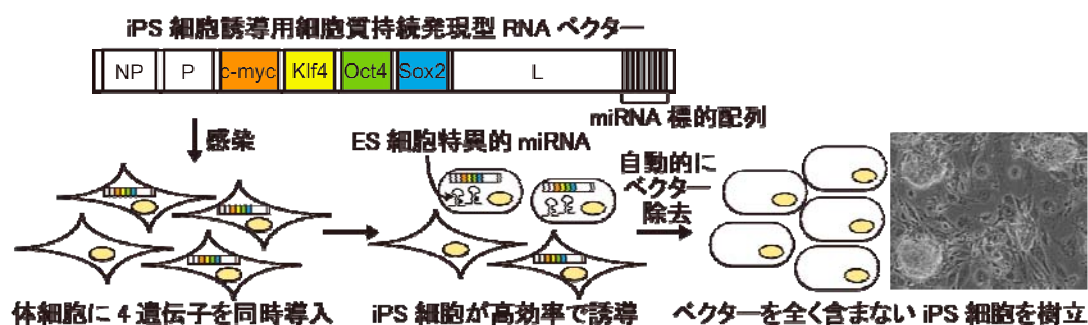
が非常に小さく、均一な性質の iPS 細胞が誘導されていることも明らかになった。さらにベクターへの 4 遺伝子の搭載順を変えることによって発現バランスを変えたところ、より誘導効率を上昇させることができた。以上の結果から、細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いた iPS 細胞誘導方法は、安全性、効率、再現性の面から非常に有用性が高い方法であることを明らかにした。

また、iPS 細胞誘導以外にも細胞質持続発現型 RNA ベクターの応用研究は進行中であり、染色体挿入無く持続感染する性質を利用した遺伝子治療への応用や、タンパク質を高発現する性質を利用したタンパク質製剤の大量産生への応用等も共同研究で行われている。

#### (4) 遺伝子発現調節ベクターへの改良

細胞質持続発現型 RNA ベクターの利便性をより高めるために、ベクターからの遺伝子発現を調節するシステムの構築を試みた。

ES 細胞特異的に発現する miRNA の標的配列を、外来遺伝子の 3' -UTR に挿入したベクターを構築したところ、ES 細胞に感染させた場合のみ、ベクターからの外来遺伝子の発現が減少した。このように組織特異的 miRNA の機能を利用して、ベクターからの遺伝子発現を抑制することが可能であることから、同様に、L 遺伝子の 3' -UTR に ES 細胞特異的 miRNA の標的配列を挿入した iPS 細胞誘導用ベクターを構築し、このベクターを用いて繊維芽細胞からの iPS 細胞誘導を試みた。その結果、iPS 細胞が誘導されると ES 細胞特異的 miRNA が発現してくることにより L タンパク質の発現が減少するため、siRNA 処理をしない場合でも、ベクターゲノムが自動的に除去された iPS 細胞が誘導されてきた。以上のように、自動除去型の iPS 細胞誘導用細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いることにより、一度ベクターを感染させて植え継ぎをするのみで、効率良く、簡便に iPS 細胞を樹立できるという系の構築に成功し(図2)、現在これらを利用して多くの共同研究先において様々な細胞から iPS 細胞が樹立されている。



＜図2＞細胞質持続発現型 RNA ベクターを用いた、安全かつ簡便な iPS 細胞誘導方法

#### 4. 今後の展開

細胞質持続発現型 RNA ベクターの有用性はこれまでの研究によって証明されてきたので、今後はまずベクターの汎用性を高めるために、誰でも簡便に構築できる形に改良する必要があると思われる。具体的には、ファージ DNA にクローニングされているベクター-cDNA をプラスミドにクローニングできるようにして、市販のキット等で簡便に遺伝子操作を行うことが可能になるようにする必要があり、また、外来遺伝子を挿入する際に、使用する制限酵素や塩基数等に制約が多いことから、よりシンプルに外来遺伝子を挿入できるように改変する必要がある。これらの改良によって、ベクターの汎用性を高め、多くの特長を持つ細胞質持続発現型 RNA ベクターを、より幅広い研究者に、様々な分野で応用してもらえようようにしたい。

iPS 細胞誘導方法の開発としては、より誘導効率を上げるために、ベクターに搭載する誘導遺伝子の追加や、搭載順の変換による最適な発現バランスの探索を行う必要があると思われる。このような改良を重ねることにより、iPS 細胞誘導のスタンダードベクターとなることを目指したい。

さらに、細胞質持続発現型 RNA ベクターは効率良く均一な iPS 細胞を誘導できることから、iPS 細胞誘導機構の解析にも有用であると考えられる。特に、発現バランスを変えるのみで誘導効率が大きく異なる現象が観察されているので、このような違いが何に起因しているかを解析することによって、iPS 細胞誘導に関わる因子の同定や、メカニズムの解明を行いたい。

#### 5. 自己評価

本研究の応用研究としての側面である細胞質持続発現型 RNA ベクターの開発と応用に関しては、従来の遺伝子導入方法には無い、多くの特長を兼ね揃えているベクターの開発に成功し、iPS 細胞誘導への応用という道筋をつけることができ、さらに miRNA 標的配列を利用した発現調節系も確立できたので評価できている。また、基礎研究としての側面である持続感染機構の解析についても、詳細な解析はインターフェロン誘導に関する部分のみであり不十分であるが、インターフェロン誘導機構の解析結果をベクター構築にフィードバックさせて、転写終結配列を用いた更なるベクターの安定性の向上を実現できたことは評価できている。

しかし、世界標準の iPS 細胞誘導用ベクターとなるにはまだ知名度が低く、その原因として論文発表が遅れていることがあるのは反省点である。iPS 細胞誘導についてのみならず、本研究で得られた成果を早く論文にまとめて発表することによって知名度を高め、様々な研究者に様々な応用分野で利用してもらえようようにしたい。

#### 6. 研究総括の見解

本研究は、細胞質で増殖する RNA ウイルスであるセンダイウイルスの持続感染変異株を使用したベクターの構築とその利用を目指して行われた。ウイルスゲノムの性質を熟知した上での研究であり、そのため、ウイルス RNA の能力を最大限引き出すことに成功している。応用研究として、均質な性質を持つ iPS 細胞作成に成功し、さらに iPS 細胞誘導終了と同時に、その細胞からベクターを排除する技術の開発にも成功しており、高く評価できる研究結果である。

## 7. 主要な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi, M. Nakanishi: Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: a Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprogramming. *J. Biol. Chem.*, Vol. 286: 4760–4771, 2011.

### (2)特許出願

研究期間累計件数:2 件

1. 発明者:中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之

発明の名称:多能性幹細胞作製用ベクター材料及びこれを用いた多能性幹細胞作製方法

出願人:産業技術総合研究所

出願日:2009/5/18

(非公開希望 1 件)

### (3)その他

<主な学会発表>

1. 西村健、大高真奈美、高安聡子、小林俊寛、小沼泰子、伊藤弓弦、大津真、中内啓光、浅島誠、中西真人:iPS細胞樹立に最適な形に進化させた持続発現型RNAベクターの開発、第 10 回日本再生医療学会総会、2011
2. 大高真奈美、西村健、高安聡子、小沼泰子、中島由郎、伊藤弓弦、玉置也剛、青木仁美、池原譲、國貞隆弘、浅島誠、中西真人:持続発現型RNAベクターを用いた簡便かつ高効率なヒトiPS細胞樹立方法の確立、第 10 回日本再生医療学会総会、2011

3. 西村健、大高真奈美、佐野将之、梅村洋子、中西真人：細胞質持続発現型RNAベクターの開発、第 12 回日本RNA学会年会、2010
4. K. Nishimura, M. Ohtaka, H. Segawa, B. Furuta, R. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, T. Yamaguchi, M. Nakanishi: DEVELOPMENT OF NOVEL CYTOPLASMIC RNA VECTOR CAPABLE OF STABLE GENE EXPRESSION WITHOUT CHROMOSOMAL INTEGRATION、International Society of Stem Cell Research 7<sup>th</sup> Annual Meeting、2009
5. 西村健、中西真人：センダイウイルス感染によるインターフェロン誘導と持続感染機構の解析、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、2008

<著作物>

1. 中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之、酒井菜絵子：細胞質で持続的に遺伝子を発現できる新規ベクターの開発と先端医療への応用、iPS細胞の産業的応用技術、シーエムシー出版、51-60 頁、2009
2. 中西真人、西村健、大高真奈美、佐野将之：安全なiPS細胞作製に向けた新型センダイウイルスベクターの開発、幹細胞の分化誘導と応用、(株)エヌ・ティー・エス、108-118 頁、2009

<受賞>

第 10 回日本再生医療学会総会ベストポスター賞 平成 23 年 3 月 2 日