

## 論文の内容の要旨

論文題目           Establishment of pre-packaging cell lines for vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector and virological properties of the pseudotyped vector

VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクター産生細胞株の樹立と  
シュードタイプウイルスベクターのウイルス学的特性

氏名               新井 徹

(序論)            遺伝子をヒト細胞へ安定に効率よく導入することは、基礎医学研究の重要な基盤技術であると共に遺伝子治療においても重要な技術である。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は、細胞染色体中へ遺伝子を導入することができ、その発現量も高いため繁用されてきた。しかしこれまで遺伝子導入用レトロウイルスベクターとして用いられてきたアンフォトロピックウイルスベクターでは、一般にヒト細胞への遺伝子導入率が低く大きな障害となっていた。これらの点を改善するものとして水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質 (VSV-G) をエンベロープの代わりに使用したシュードタイプレトロウイルスベクターが報告されている。このシュードタイプベクターは遠心により濃縮することができ、アンフォトロピックベクターでは遺伝子導入が不十分であったヒトを含め、その他多種の細胞にも高率な遺伝子導入が行えるとされている。しかし持続的にシュードタイプベクターを産生するパッケージング細胞は、VSV-G 自体の細胞障害性のため、樹立が困難とされてきた。そこで本論文では Cre リコンビナーゼによる *loxP* 配列間の部位特異的組み換えを利用して VSV-G の発現を厳密に制御することで、高力価のシュードタイプベクターを産生する細胞株を樹立することを目的とし、同時に産生されるシュードタイプベクターのウイルス学的特性を解析することとした。

(結果・討論) 通常のパッケージング細胞樹立のためには *gag*, *pol*, *env* 及びベクターDNA の発現が必要である。シュードタイプベクターのパッケージング細胞株樹立のためには *env* の代わりに使用する VSV-G の発現によるパッケージング細胞への障害を防ぐために、

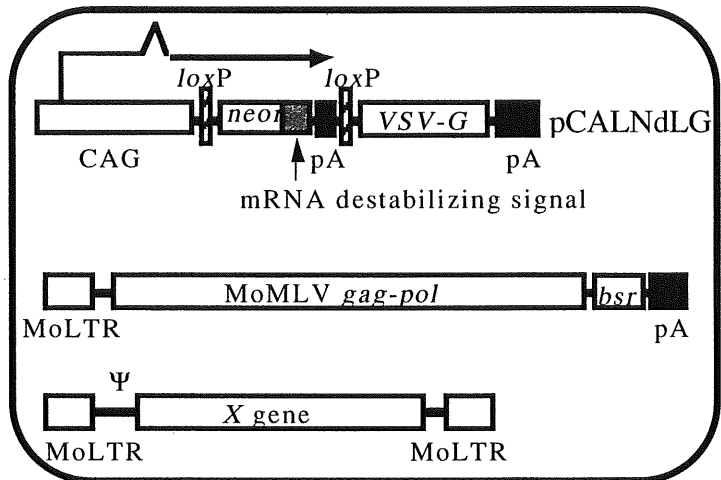
VSV-G の発現制御を厳密に行うことが必要と考えられた。そのため図1の細胞の最上段のプラスミド (pCALNdLG) を作製した。この発現ユニットでは、細胞維持の際には CAG プロモーターによりネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*<sup>r</sup>) が転写されるが、その直後の poly A 付加シグナルにより転写は終結し、VSV-G は発現しない。シュードタイプベクターの調製時にはアデノウイルスベクターにより Cre リコンビナーゼを細胞に導入し、*neo*<sup>r</sup> をはさむ二つの *loxP* 配列間で部位特異的組み換えを起こさせることで *neo*<sup>r</sup> を染色体内から切り出し VSV-G の発現を誘導するように設計されている。

ここで pCALNdLG 中の *neo*<sup>r</sup> の 3'-非翻訳領域に mRNA 不安定化配列を挿入した。このことにより *neo*<sup>r</sup> 転写産物を意図的に減少させると、転写活性が弱い細胞は薬剤耐性とはならず、プロモーター活性が強い細胞のみが選択されることが期待され、Cre recombinase 導入後の VSV-G 産生量が高い細胞が効率よく選択できると考えた。

*gag, pol* を安定に発現するヒト線維芽細胞である FLY 細胞に pCALNdLG をトランスフェクションにより導入し、ネオマイシン誘導体である G418 により合計 255 クローンを選択した。これらのクローンについて免疫染色を行って VSV-G 高発現クローンを 26 個選択した。また mRNA 不安定化配列の効果を調べるためにこの配列を含まないプラスミド pCALNLG も同様に別の FLY 細胞に導入し、その中で最も VSV-G を高発現したクローン (PtG-L1) も加え、以下の実験を行った。

各クローンの一部に対してアンフォトロピックベクターを用いて  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) をコードするマウス白血病ウイルス (MLV) を基盤とするベクターDNA (MFGnslacZ) を導入し、ここへアデノウイルスベクターにより Cre リコンビナーゼを導入後、産生されてく

### Pre-packaging cell line



Cre recombinase

### Packaging cell line

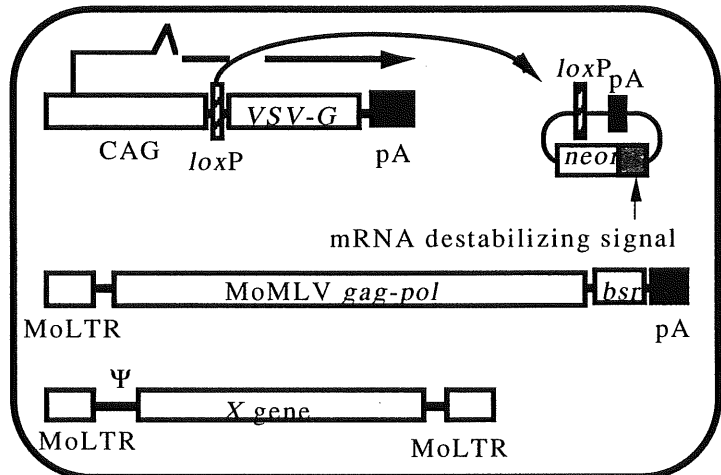


図1 シュードタイプベクター産生細胞の概念図

るシュードタイプベクターの力価を lacZ による発色を指標に測定した。このうち PtG-S2 と名付けられたクローンは Cre リコンビナーゼ導入 3 日後から再現性良く  $10^6$  感染粒子/ml のシュードタイプベクターを産生し、このクローンについてさらに解析を行った。

PtG-S2 細胞の染色体 DNA の構造をサザンブロットで解析したところ Cre リコンビナーゼ導入 4 日後で *neo<sup>r</sup>* が染色体から期待通りに切り出されていることが示された。この時の *Neo<sup>r</sup>*, VSV-G の発現をウエスタンブロットで解析したところ Cre リコンビナーゼ導入 4 日後で発現が *Neo<sup>r</sup>* から VSV-G に完全に切り替わっていることが示された。また mRNA 不安定化配列を含むクローン (PtG-S2) と含まないクローン (PtG-L1) の *Neo<sup>r</sup>* と VSV-G の発現量の比較から、mRNA 不安定化配列はコードするタンパク発現量を 1/20 から 1/30 程度に減少させることが判明し、この配列は VSV-G の強発現を誘導するクローンの選択に極めて有効であることが示された。

MFGnslacZ を含む PtG-S2 細胞に対して Cre リコンビナーゼを導入し産生されるシュードタイプベクターの力価を lacZ 活性を指標に経時的に測定した(図 2)。Cre リコンビナーゼを導入しない場合シュードタイプベクターは全く産生されないのに対して、導入したものはその後 3 から 5 日の間に連日  $10^6$  感染粒子/ml のシュードタイプベクターが再現性良く回収された。この能力は 10 ヶ月間培養した後にも安定に保持されており、そこから産生された  $5 \times 10^6$  感染粒子中には複製能完備型ウイルス及びアデノウイルスベクターの混入はなかった。

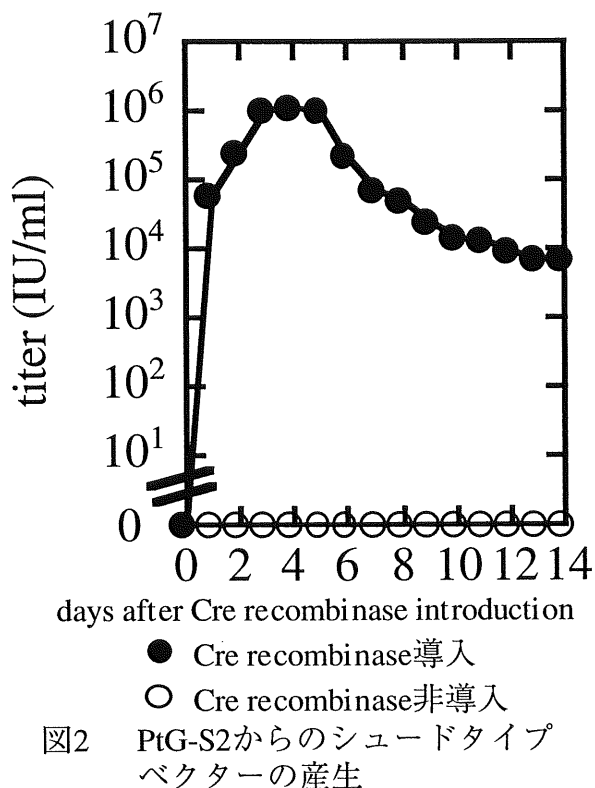


図2 PtG-S2からのシュードタイプベクターの産生

目的とするパッケージング細胞(PtG-S2)が得られたため、そこから産生された VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターの性質をさらに解析した。ラット線維芽細胞 (3Y1) に対して lacZ を導入するシュードタイプベクターとアンフォトロピックベクターを用いて種々の MOI で遺伝子導入を行った後、lacZ を発現する細胞の割合を調べた (図 3)。その結果シュードタイプベクターではポアソン分布により予想される導入効率とほぼ同等の遺伝子導入が可能であり、その結果は超遠心濃縮操作の有無に依らなかった。しかしアンフォトロピックベクターでは低 MOI ではポアソン分布による予想と合致するものの、0.3 以上の MOI では導入効率は頭打ちもしくは減少することが明らかにされた。これらの性質は他の線維芽細胞 (NIH3T3)、ヒト固形癌細胞株 (MIAPaCa-2) でも同様であった。

この原因を調べるためにベクター DNA を含まないアンフォトロピックベクター産生細胞の上清を共存させたところ、低 MOI でもアンフォトロピックベクターによる lacZ 遺伝子導入効率がさらに減少した。そのため上清に含まれる遺伝子導入能力のない粒子および可溶性のアンフォトロピックエンベロープタンパクが、導入細胞上の受容体に対して競合することが、前述の頭打ちの原因であることが示唆された。一方 VSV-G の受容体は細胞表面に大量に存在するフォスファチジルイノシトールなどの陰性脂質であるために、このような競合を受けず用量依存的な遺伝子導入を行うものと考えられる。

(展望) 本研究の成果から産生されたシュードタイプベクターは、一回の遺伝子導入によりヒト単層培養細胞のほぼ全細胞に遺伝子導入を行うことがあり、さらに用量を変えることにより細胞当たりの導入遺伝子のコピー数を制御できることが判明した。これまでに樹立した PtG-S2 細胞を用いて天然の癌抑制遺伝子である *p53*, *patched* や AP-1 活性を阻害するドミナントネガティブ変異体 (*supjunD-1*) などを発現するシュードタイプベクターが作成され、実際に幅広いヒト培養固形癌細胞株の発癌性を抑制することが示されている。複製能完備型ウイルスを一切含まない安全な VSV-G シュードタイプウイルスベクターを高力価で産生させる上で、この系は現在世界最高水準にあり、今後の利用・発展が望まれる。

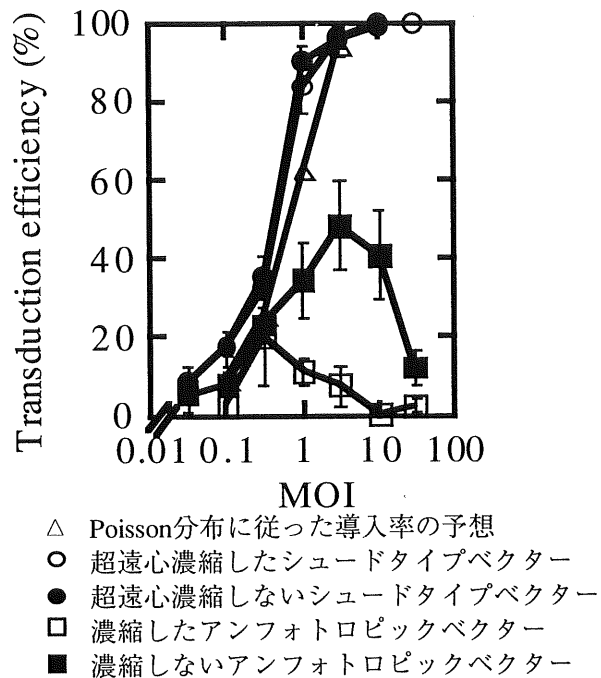


図3 MOIと遺伝子導入された細胞の割合の関係