

論文内容の要旨

論文題目

アデノ随伴ウイルス血清型2及び5のハイブリッドウイルスベクターを用いたマウス胚由来線維芽細胞への Tgfβ1 に対する short hairpin RNA の導入及び発現抑制

指導教員 長瀬 隆英 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

鹿毛秀宣

背景

近年、RNA 干渉を用いた研究手法が開発され、大きく発展してきた。RNA 干渉とは 20-30 塩基程度の短い RNA が遺伝子の mRNA と相補的に結合をすることによりその遺伝子を抑制する機能のことを呼ぶ。RNA 干渉に関わる短い RNA には siRNA, miRNA, piRNA/rasiRNA などがある。生理的な siRNA はウイルスやレトロトランスポゾン由来の RNA から合成され、細胞の防御機能に関わる。miRNA はゲノムの非翻訳領域より転写され、修飾を受けて産生され、自己の遺伝子の発現抑制に関わる。piRNA/rasiRNA の合成経路および機能はいまだ解明されていないが、生殖細胞の分化に関わると考えられている。これらの生理的な RNA 干渉の経路を利用した siRNA や short hairpin RNA (shRNA) により *in vitro* では簡単に遺伝子を抑制できるようになった。しかし、*in vivo* ではいまだ siRNA の導入に問題点が多く、これを克服するため、様々な工夫がなされてきた。その手法は大きくウイルスベクターと化学修飾に大別される。siRNA にリガンドやリポソームなどを付加した化学修飾は多くの手法が報告さ

れているが、遺伝子の導入効率と毒性を両立させることが困難である。

これに対し、ウイルスベクターは遺伝子の導入効率も毒性も既に確立しており、魅力的な手段である。現在利用されているウイルスベクターのうち、アデノウイルスは毒性が高い上に遺伝子の発現期間が短く、レトロウイルスは非分裂細胞への遺伝子導入が不可能であり、いずれも利用頻度が減少している。レンチウイルスは非分裂細胞への遺伝子導入が可能で遺伝子の発現期間も長く、手技も簡便なため *in vitro* では頻用されるようになってきている。しかし、導入する遺伝子は染色体に組み込まれるため、*in vivo* では発癌性を含め、挿入部位での遺伝子の欠損が問題となる。その点、アデノ随伴ウイルス (AAV) は手技が煩雑であるが、毒性が極めて低く、安全性も高いため、*in vivo* では第一選択と考える。一方、これまで AAV を含め、ウイルスベクターに shRNA を搭載して呼吸器系の遺伝子を抑制した報告はない。

我々は AAV を用いた siRNA 実験の標的遺伝子として TGF β 1 を選択した。TGF β 1 は細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、細胞外基質の産生などの機能を持ち、線維化や悪性腫瘍に関わる重要な分子として知られる。従来、遺伝子を抑制する手法として用いられてきたノックアウトマウスは TGF β 1 では周産期致死であり、抗体、小分子阻害剤、アンチセンスなどはいずれも効果、特異性、安全性などに問題がある。

今回、我々は肺線維症や悪性腫瘍において重要な TGF β 1 をマウスの肺において抑制することを念頭に置き、マウス Tgf β 1 に対する shRNA を AAV に搭載してマウス線維芽細胞において Tgf β 1 の発現抑制に成功した。

結果

まず、我々は Tgf β 1 を抑制する最適な siRNA 配列を検討した。はじめに公開されているウェブサイトを利用して 4 配列を比較し、十分な効果を認めたのは 1 つだけであった。そのため、文献に基づくアルゴリズムを用いてさらに 6 配列追加し、最適な配列をさらに一つ、選択した。AAV を産生する際に用いるプラスミドにこの shRNA の配列を組み込み、マウス胚由来線維芽細胞 3T12-3 への transfection により Tgf β 1 タン

パクが約 50%抑制されることを Western blot で確認した. 次に, プラスミドより shRNA を発現させる際に, RNA polymerase III (PolIII) プロモーターと通常の stem-loop 型の shRNA を用いるよりも, PolIII プロモーター下に primary miRNA 由来の配列と目的の shRNA を組み込んだ方が高い効果が得られる, とする報告に基づき, 我々も同様の手法を試みた. その結果, PolIII プロモーターと primary miRNA に基づく配列はプラスミドの transfection ではノックダウン効果を認めず, 核内に確実に導入する必要があることが判明した. また, AAV を用いても PolIII プロモーターと stem-loop 型の shRNA のノックダウン効果が高かった.

最適な siRNA 配列が決定したため, 次に AAV の作成に移った. AAV の組織親和性は Cap タンパクに規定される血清型に依存し, 気道上皮細胞への親和性は AAV5 由来の Cap が最も高いことが知られている. そのため, 我々は市販されている AAV2 の配列に Cap タンパクのみ AAV5 由来のものに置き換えた AAV2/5 ハイブリッドウイルスベクターを作成した. すなわち, AAV2 由来の inverted terminal repeat (ITR) 配列の間に PolIII プロモーターと shRNA を含むプラスミド, AAV2 由来の Rep タンパクと AAV5 由来の Cap タンパクをコードするプラスミド, および増殖に必要なアデノウイルスの遺伝子をコードするプラスミドをリン酸カルシウム法で 293 細胞に triple transfection し, 細胞を破碎してウイルスを得た (図 1).

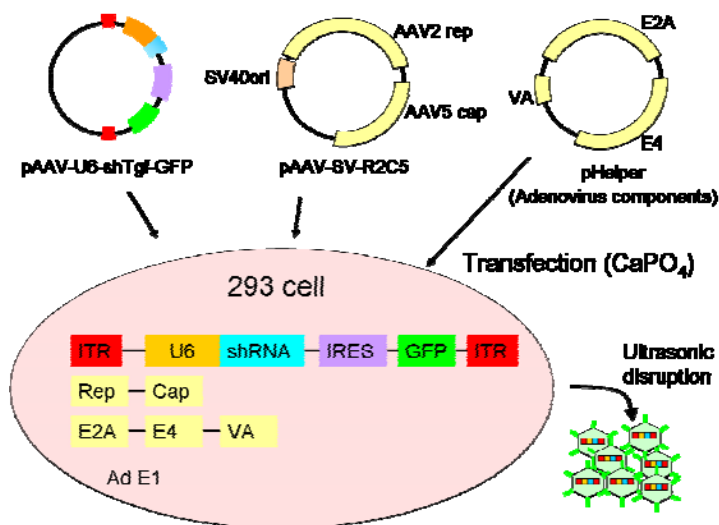


図 1. AAV の作成方法のシエーマ

精製後，real time PCR で力価を測定し，十分な力価のウイルスを得ていることを確認した．この際，細胞破碎や精製の条件検討を行い，細胞破碎は凍結融解と超音波破碎で大きな違いがなく，精製は市販されているカラム型のキットよりも塩化セシウムを用いた超遠心と透析の方が優れていた．

最後に，Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 を 3T12-3 に transduction したところ，Tgfβ1 タンパクが約 40%に抑制された（図 2）．

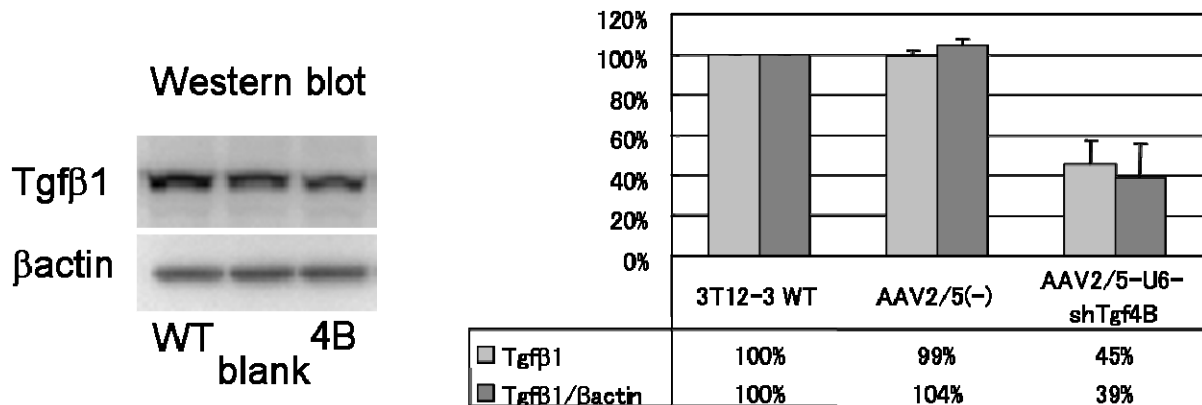


図 2. Tgfβ1 に対する shRNA を搭載した AAV2/5 を 3T12-3 細胞に transduction した際の Tgfβ1 タンパクの抑制効果． WT : 3T12-3 のみ， blank : AAV2/5-shRNA(-)， 4B : AAV2/5-shTgf4B

Real time PCR で mRNA の発現を確認したところ， mRNA の発現レベルの低下は認められず，我々の系では siRNA の配列が mRNA と完全に相補的であったにも関わらず， mRNA が切断されているのではなく，翻訳が抑制されていることが判明した．

結論

以上より，我々はマウス Tgfβ1 に対する shRNA を AAV2/5 に搭載し，3T12-3 細胞において Tgfβ1 タンパクを抑制することに成功した． AAV を利用して線維芽細胞に遺伝子を導入したことから， shRNA を AAV2/5 に搭載して遺伝子を抑制したのはこれが初めてである．我々の系では今後，マウスの気道において任意の遺伝子をノックダウンすることが可能であると考えられる．