

3. 遺伝子導入と発現シリーズ

ウイルスベクターによる遺伝子導入と発現 (4)

三宅 弘一 島田 隆

日本医科大学 化学・分子生物学 (分子遺伝学)

3. Gene Delivery and Expression Series

Viral Vector Mediated Gene Delivery and Expression (4)

Koichi Miyake and Takashi Shimada

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

Abstract

Viral vectors are powerful tools for gene delivery and expression both in vitro and in vivo. Recently, many types of viral vectors have become commercially available and are easily used. It is important to choose appropriate viral vectors according to target cells and organs. In this technical note, we describe the characteristics of viral vectors and how to choose the appropriate viral vector to transduce target cells in vitro.

(日本医科大学医学会雑誌 2012; 8: 150-156)

Key words: retroviral vector, lentiviral vector, adenoviral vector, adeno-associated viral vector

はじめに

ウイルスベクターは細胞への遺伝子導入、蛋白発現の有用なツールであり、物理的、化学的遺伝子導入法と比較して遺伝子導入効率は高く、なおかつ長期間発現させることもできる利点を持つ。Fig. 1はGFP遺伝子を各種導入法にてヒト子宮頸癌細胞であるHeLa細胞に導入したものであるが、ウイルスベクターを用いることにより遺伝子導入効率、発現効率ともに高いのが分かる。またほかの遺伝子導入法では導入困難な血球系細胞や初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入が可能である。さらにウイルスベクターの最大の利点としては、ヒトをはじめとして、サル、ラット、マウスなど多くの動物を対象としてin vivo導入が可能ということである。このことよりウイルスベクターは遺伝

子機能解析のツールとしてだけでなく、病気を治療する遺伝子治療用ツールとしても使用されている。

このようなウイルスベクターは現在では簡単に購入し、使用が可能となってきた。購入可能なウイルスベクターとして、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなど様々なウイルスベクターが存在するが、問題はどのウイルスベクターを使用したらよいのか?ということである。ウイルスベクターはそれぞれのウイルスに由来した特徴を持っており、発現させたい遺伝子、標的細胞、発現期間、発現効率などによりどのウイルスベクターを選択するのが一番よいのが決定されてくる。本稿では上記4種類のウイルスベクターを中心に、それぞれのウイルスベクターの長所、短所を理解し、最近の改良を紹介しながら、どのようなときにどのウイルスベクターを選択すれば

Correspondence to Koichi Miyake, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: kmiyake@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

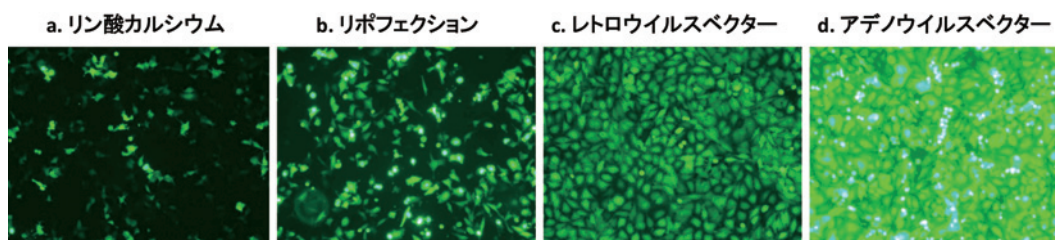


Fig. 1 各種遺伝子導入法の比較

GFP 発現プラスミドをリン酸カルシウム法 (a), リポフェクション法 (b) および GFP 発現レトロウイルスベクター (c), アデノウイルスベクター (d) で HeLa 細胞に遺伝子導入を行い, 3 日後に蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した. ウイルスベクターの使用により遺伝子導入効率, 発現効率ともに上昇させることが可能である.

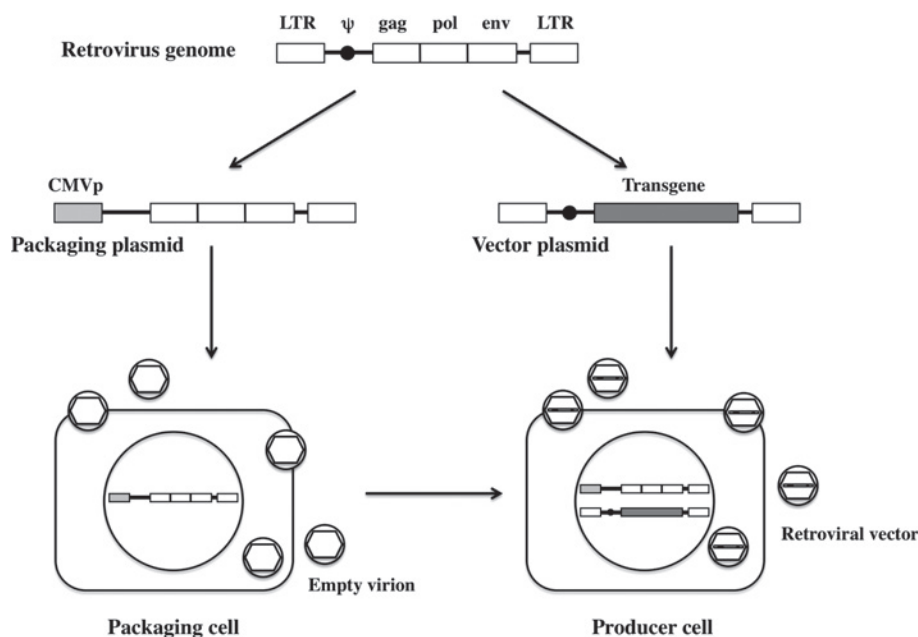


Fig. 2 レトロウイルスベクター作製プラスミドと産生細胞

レトロウイルスベクターはパッケージングプラスミドとベクタープラスミドを同時に細胞にトランスフェクションするか, パッケージング細胞にベクタープラスミドをトランスフェクションすることによって作製される. また, パッケージング細胞にベクタープラスミドも持続的に発現している細胞 (プロデュース細胞) により高力価なレトロウイルスベクターを大量に容易に調製することが可能である. LTR: Long Terminal Repeat, CMVp: サイトメガロウイルスプロモーター

よいのかを考えていきたい.

レトロウイルスベクター

レトロウイルスはエンベロープを持つ一本鎖 RNA ウイルスであり, そのウイルスゲノムは, 両端にプロモーター活性を有する反復配列 (LTR: Long Terminal Repeat) と構造遺伝子 gag (構造タンパク質), pol (プロテアーゼ, 逆転写酵素, インテグラーゼ), env (エンベロープ), RNA ゲノムが粒子内に取り込まれるのに必要なパッケージングシグナル (ψ)

から成る. レトロウイルスベクターの作製は gag, pol, env を発現し, パッケージングシグナルを除いたパッケージングプラスミドと gag, pol, env の代わりに発現させたい遺伝子を挿入したベクタープラスミドを同時に Cos 細胞や 293T 細胞などにトランスフェクションすることによって作製される (Fig. 2). また, 空のレトロウイルスを持続的に産生する, gag, pol, env を発現している細胞 (パッケージング細胞) や, さらに, パッケージング細胞にベクタープラスミドも持続的に発現している細胞 (プロデュース細胞) などの使用により簡便で高力価なレトロウイルス

スペクターを大量に調製することが可能である。

一般的に入手可能なレトロウイルスベクターには齧歯類の CAT1 (cationic amino acid transporter 1) を感染受容体とするエコトロピック (同種指向性) レトロウイルスベクターと, PiT2 (inorganic phosphate transporter 2) を感染受容体とするマウスにもヒトにも感染性があるアンフォトロピック (両種指向性) レトロウイルスベクターが存在する。ヒトの細胞に遺伝子導入するにはアンフォトロピックレトロウイルスベクターを選択するしかないが, マウスなどの齧歯類の細胞を標的とする場合はアンフォトロピックレトロウイルスベクターよりエコトロピックレトロウイルスベクターのほうが断然感染効率が高いのでエコトロピックレトロウイルスベクターの使用を薦める。

レトロウイルスベクターは, 外来遺伝子を安定に染色体 DNA に組み込み, 長期間目的遺伝子を発現させることができるため造血幹細胞などの長期に持続的に発現させたい場合などに有用である。一方, 染色体 DNA の組み込みはランダムに行われるため, 細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制されたり, 癌遺伝子や癌抑制遺伝子の活性化, 不活化により (挿入変異), 細胞が死に至ることや癌化することがありうるため注意を要する。しかしながら, このような細胞の割合は少ないと考えられる。また, レトロウイルスベクターは, レトロウイルスの特徴上分裂細胞しか遺伝子導入ができず, 神経, 筋などの分裂増殖していない細胞への遺伝子導入に向いていないという重大な欠点がある。

レンチウイルスベクター

上述のとおりマウスの白血病ウイルス由来のレトロウイルスベクターはパッケージング細胞により簡単に作製でき, 標的細胞の染色体に安定に組み込まれるという重要な特徴をもつが, 分裂期の細胞にしか遺伝子導入できないという欠点がある。それゆえ, 非分裂細胞である神経細胞をはじめとし, 通常は分裂していない末梢血リンパ球や肝細胞などへのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入は難しい。マウスのレトロウイルスはオンコウイルスに属し, 非分裂細胞へは感染できないのに対して, ヒトのレトロウイルスである human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) はレンチウイルスに属し, 非分裂細胞においても増殖が可能であるといわれている。よってこの HIV をもとにしたウイルスベクターを用いることによりマウスのレトロウイルスベクターでは不可能であった非分裂細胞

への安定な遺伝子導入が可能となる。

HIV ベクターの作製は基本的にはマウスのレトロウイルスベクターと同様にパッケージングプラスミドとベクタープラスミドを 293T 細胞または Cos 細胞に同時にトランスフェクションし作製する。Fig. 3 に HIV ベクターの作製プラスミドを示す。パッケージングプラスミドは, 安全性を高め, 相同組換えによる野生型ウイルス発生の可能性を少なくするために HIV のアクセサリ遺伝子の tat, rev, nef, などを取り除いた gag, pol 発現プラスミド, rev 発現プラスミド, env 発現プラスミドに分割されている。ベクタープラスミドはパッケージングシグナルを含んだ両端の HIV-LTR の間に内部プロモーターと目的とする遺伝子が組み込まれている。さらに 5'LTR の U3 を CMV プロモーターに置換し, 3'LTR のプロモーター, エンハンサー領域を削除することにより, SIN (self inactivating) ベクター¹としている。そしてこれらの基本となるプラスミドベクターには SV40 の複製起点を挿入し 293T 細胞, Cos 細胞内にて効率よく増殖できるようになっている。最近 cPPT (central polypurine tract) がプレインテグレーション複合体の核移行の効率を高めるという報告があり, これをベクタープラスミドに挿入することにより遺伝子導入効率の上昇が認められている²。また, 発現効率を上昇させるために, WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) が組み込まれている³。

HIV のエンベロープを持つ HIV ベクターは HIV と同じ機構により細胞に感染するため, ヒト CD4 陽性細胞に特異的に遺伝子導入可能な組織特異的遺伝子導入ベクターである。また, 非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり, ヒト CD4 陽性リンパ球に高率に遺伝子導入が可能である⁴。しかしながら HIV 自体は病原性があり注意を要する。レトロウイルスベクターのように有用なパッケージング細胞が存在しないため毎回作製にはプラスミドのトランスフェクションが必要である。ヒト CD4 陽性細胞以外への遺伝子導入にはシュードタイプ HIV ベクターが使用されている。シュードタイプとは 1 つの細胞に 2 つのウイルスが感染した場合, 一方のウイルスのエンベロープに囲まれてもう片方のウイルスゲノムが発芽してくる現象をいい, このように 2 種類のウイルスベクターを用いたものをシュードタイプベクターという。HIV のエンベロープは CD4 陽性細胞特異的に遺伝子導入が可能となるが, それ以外の細胞には遺伝子導入ができない。そこで HIV のエンベロープをほかのウイルスのエン

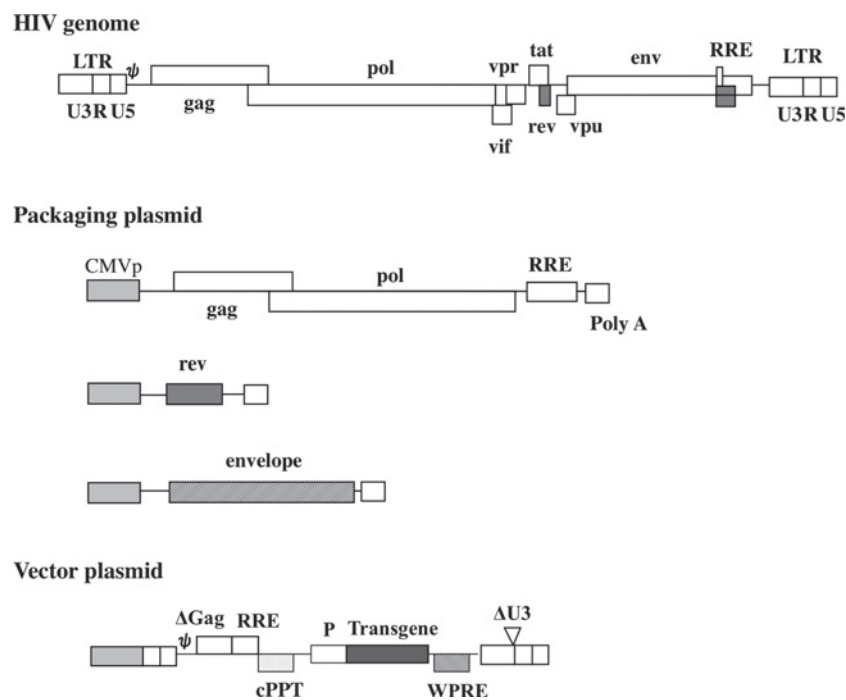


Fig. 3 レンチウイルスベクター作製プラスミド
レトロウイルスベクターは3種類のパッケージングプラスミドとベクタープラスミドを同時に細胞にトランスフェクションすることによって作製される. RRE : Rev Response Element, cPPT : Central Polypurine Tract, WPRE : Woodchuk hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element

ベローブに置き換え、HIV とほかのウイルスとのシュードタイプベクターにより標的細胞を広げ、非分裂細胞へ遺伝子導入を可能とする。現在最も頻繁に使用されているエンベローブはラブドウイルス科の VSV-G (G glycoprotein of vesicular stomatitis virus) である。VSV-G は広範囲な宿主域を持ち、また、レトロウイルスや HIV のエンベローブより物理的に強く、超遠心により容易に濃縮することが可能である。VSV-G と HIV とのシュードタイプベクターは神経細胞、肝細胞、筋肉細胞やマクロファージ、樹状細胞などの非分裂細胞や、通常はほとんど分裂していない造血幹細胞への遺伝子導入が可能である。VSV-G 以外にも murine leukemia virus (MLV) や gibbon ape leukemia virus (GaLV), feline endogenous retrovirus (RD114) の envelop とのシュードタイプ HIV ベクターも使用されており、マウスの細胞や、造血幹細胞の遺伝子導入に有用である。今後、標的細胞により適したシュードタイプ HIV ベクターを使用することが必要となってくると思われる。

アデノウイルスベクター

アデノウイルスは直径約 80 nm の正二十面体構造

をしており、内部に直鎖状約 35~36 kb の二本鎖 DNA をゲノムに持つエンベローブを持たないウイルスである。ウイルス粒子から突出するファイバータンパク質の先端が細胞表面のレセプター (CAR : coxsackie-adenovirus receptor) に結合して吸着・感染する。これまでにヒトをはじめとして、様々な動物を宿主とする多くの血清型が報告されているが、現在一般的に汎用されているアデノウイルスベクターは 5 型アデノウイルスを基本骨格とし、ウイルス増殖に必須な E1A, E1B 領域を目的の遺伝子と置換して作られている (Fig. 4)。このような組換えウイルスベクターを E1A, E1B を持続発現する 293 細胞に導入すると、野生型ウイルスと同様にウイルス粒子を増殖させることができる。

アデノウイルスベクターは高力価で、発現効率が高く、非分裂細胞にも感染可能なため様々な細胞に高率に遺伝子導入が可能であるが、染色体に組み込まれないためにその発現は一過性である。また、細胞毒性や免疫的傷害性が高いという欠点を持つ。近年ウイルス由来の遺伝子をほとんど除き複製およびパッケージングのために必要な DNA 配列のみを含んだガットレスアデノウイルスベクターが開発されている⁵⁾。このベクターは最大 36 kb までの配列を収容することがで

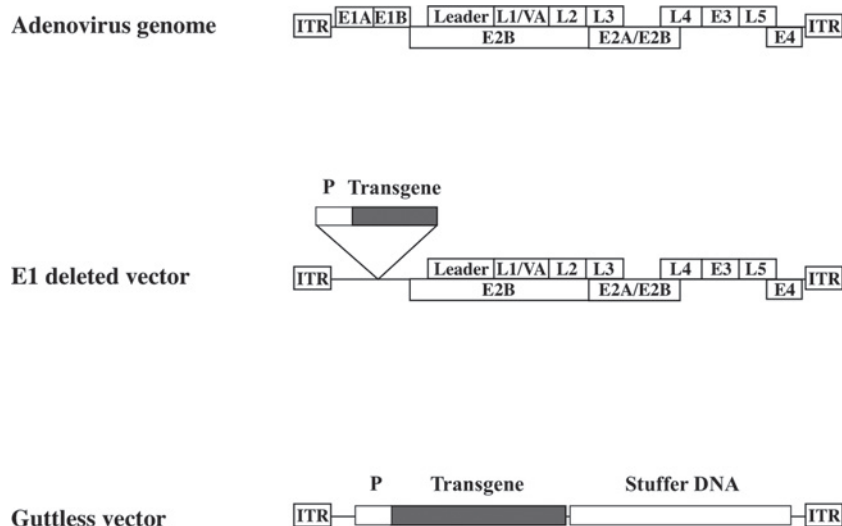


Fig. 4 アデノウイルスベクターの進化

アデノウイルスベクターはウイルス増殖に必要な E1A, E1B 領域を目的の遺伝子と置換して作られている。このような組換えウイルスベクターを E1A, E1B を持続発現する 293 細胞に導入すると、野生型ウイルスと同様にウイルス粒子を増殖させることができる。ガットレスアデノウイルスベクターは最大 36 kb までの配列を収容することができ、ウイルス由来のタンパク質がほとんど産生されないために免疫的傷害性についても抑制する。ITR : Inverted Terminal Repeat

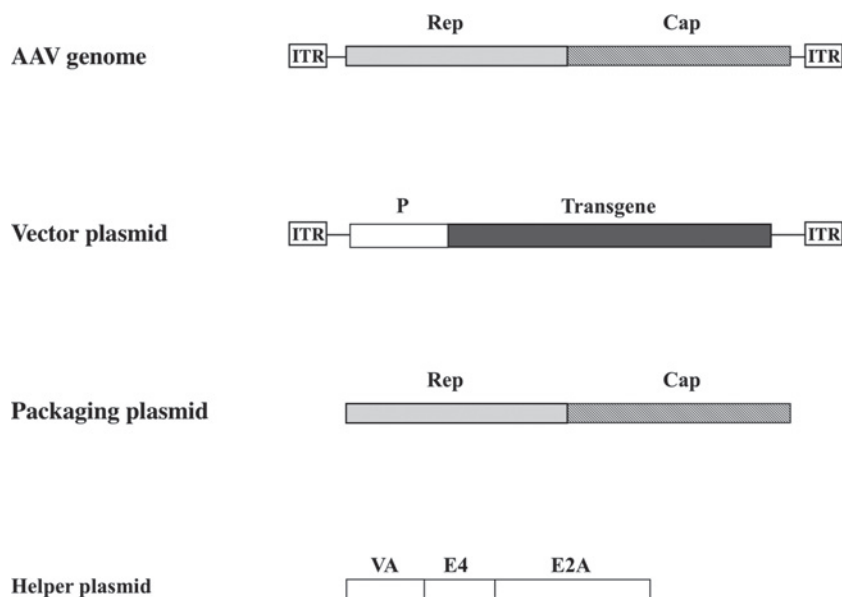


Fig. 5 アデノ随伴ウイルスベクター作製プラスミド

アデノ随伴ウイルスベクターは ITR の間に目的遺伝子と置換したベクタープラスミド, Rep, Cap を発現するパッケージングプラスミド, E2A, E4, VA を発現するヘルパープラスミドをともに 293 細胞 (E1A, E1B を発現) にトランスフェクションして作製する。

き、ウイルス由来のタンパク質がほとんど産生されないために免疫的傷害性についても抑制することができる利点を持つ。ただし高タイトアのベクターを高純度で調整することが困難なため、汎用されるには至って

いない。

従来のアデノウイルスベクターは CAR 陽性細胞へは効率良く遺伝子導入できるが、CAR の発現が低い細胞 (血液系細胞, 間葉系幹細胞, 血管内皮細胞, 滑

Table 1 各種ウイルスベクターの特徴

	レトロウイルス	レンチウイルス	アデノウイルス	アデノ随伴ウイルス
ゲノム	ssRNA	ssRNA	dsDNA	ssDNA
遺伝子挿入サイズ	約 8 kb	約 8 kb	約 8 kb	約 4.7 kb
非分裂細胞への導入	不可	可	可	可
長期発現(染色体への組み込み)	可	可	不可	不可(一部可)
病原性	なし	あり	あり	なし
細胞障害	なし	なし	あり	なし

膜細胞など)への遺伝子導入効率は低いことが課題であった。これを克服するためにファイバータンパク質のHIループやC末端領域にRGD(Arg-Gly-Asp)ペプチドやポリリジンペプチドを挿入し、多くの細胞で発現している α vインテグリンやヘパラン硫酸を認識して効率良く遺伝子導入するアデノウイルスベクターが開発されている⁶。また、ファイバータンパク質を、ヒト由来の細胞ではほとんどの細胞で発現しているCD46を受容体とする35型アデノウイルス由来のものに置換したベクターも開発されている⁷。

アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス(AAV: Adeno-associated virus)はパルボウイルス科に属する約4.7 kbの一本鎖DNAウイルスであり、エンベロープを持たず直径20~30 nmの正二十面体構造のキャプシドを有しており、細胞膜の普遍的成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン(heparan sulfate proteoglycan)を認識して感染するため、宿主域は広い。AAVのゲノム構造は両端のITR(Inverted Terminal Repeat)にRep(複製や転写を司る調節蛋白質)とCap(VP1, VP2, VP3の三つのキャプシドタンパク質)を持つ。AAVの複製にはアデノウイルスのヘルパー機能に依存し、アデノウイルスのE1A, E1B, E2A, E4, VA遺伝子が必要であることが知られている。AAVベクターの作製はITRの間に目的遺伝子と置換したベクタープラスミド, Rep, Capを発現するパッケージングプラスミド, E2A, E4, VAを発現するヘルパープラスミドとともに293細胞(E1A, E1Bを発現)にトランスフェクションして作製する(Fig. 5)。

AAVベクターは、病原性がなく神経などの終末分化した非分裂細胞にも遺伝子導入でき、ウイルス粒子が物理化学的に安定であり、精製・濃縮が可能であるが、導入できるサイズが4.7 kb前後と小さく、ベクターの調整が困難という欠点を持つ。従来AAVベクターは血清型2が使用されていたが、近年様々な血清

型のAAV(1~12型)が使用可能となり⁸、標的細胞に応じて使い分けようになっている。ただしin vivoとin vitroでは導入高率が一致せず、in vitroでは1型, 2型以外は導入効率が低いので注意を要する⁹。また、最近注目されているものとしてself-complementary AAV(scAAV)¹⁰がある。これはAAVの一本鎖DNAのプラス鎖とマイナス鎖が繋がった状態で存在し、標的細胞内で速やかに二本鎖になるため、従来の1本鎖AAVベクターより遺伝子発現が早く高率も良い。しかし、AAVベクタープラスミドに挿入できるサイズが従来法の半分になるため使用可能な目的遺伝子は限られてくる。

おわりに

代用的な4種類のウイルスベクターの特徴をTable 1にまとめた。長期的な安定した発現を目的とするならレトロウイルスベクターかレンチウイルスベクターを、一過性に高発現を望むならアデノウイルスベクターを、というように、その目的や標的細胞の種類、状態(分裂細胞か否か)によって適したウイルスベクターを選択する必要がある。今回はin vitroの培養細胞への遺伝子導入について述べた。次回はマウスなどを標的としたin vivo遺伝子導入時のウイルスベクターの有用性について検討していく。

文献

1. Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ: Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 1999; 261: 120-132.
2. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, et al: The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000; 96: 4103-4110.
3. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999; 73: 2886-2892.
4. Miyake K, Miyake N, Shimada T: Development of

- targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. *J Biotechnol* 2007; 129: 532-538.
5. Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, et al: Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 243-254.
 6. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, et al: An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998; 72: 9706-9713.
 7. Mizuguchi H, Hayakawa T: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002; 285: 69-77.
 8. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM: New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 285-297.
 9. Isotani M, Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T: Direct comparison of four adeno-associated virus serotypes in mediating the production of antiangiogenic proteins in mouse muscle. *Cancer Invest* 2011; 29: 353-359.
 10. McCarty DM: Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008; 16: 1648-1656.

(受付 : 2012 年 2 月 13 日)

(受理 : 2012 年 3 月 12 日)
