

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 (5)

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 (5)

Koichi Miyake and Takashi Shimada

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

Abstract

Most of the candidate tissues for *in vivo* gene transfer are made of quiescent cells, such as from the brain, liver, and muscle. Thus, the optimal vector should infect non-dividing cells. Recently, many type of adeno-associated virus (AAV) vectors have been developed and used in *in vivo* gene transfer. This technical note focuses on the *in vivo* gene transfer using AAV vectors. We discuss about how to choose the appropriate viral vector to transduce target organs *in vivo*.

(日本医科大学医学会雑誌 2012; 8: 216-221)

Key words: *in vivo* gene transfer, lentiviral vector, adenoviral vector, adeno-associated viral vector

はじめに

マウスなどの動物への遺伝子導入 (*in vivo* 導入) においてウイルスベクターは有用なツールであり, 目的の遺伝子を過剰発現させたり RNAi (RNA interference) などにより発現を抑えて遺伝子機能解析を *in vivo* で行うことが可能である. *in vivo* での標的臓器の多く (神経細胞, 肝細胞, 筋肉細胞) は非分裂細胞であるためにレトロウイルスベクターはほとんど使用されず, 非分裂細胞への遺伝子導入が可能で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 (AAV: adeno-associated virus) ベクターが使用されている. *in vivo* 遺伝子導入におい

てこの3種類のうちどのウイルスベクターを使用するか? については基本的には *in vitro* 導入時と同様にそれぞれのウイルスの特徴を加味して選択するが, アデノウイルスベクターは高発現ではあるが細胞毒性, 肝毒性などがあること, レンチウイルスベクターは安全性の問題, また, これらのウイルスベクターの使用には組換えウイルスの拡散防止措置が必要であり, 使用に当たり文部科学省より定められたこと項を満たした施設 (P2A: http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/data/anzen/kakusan_list.pdf) が必要であることを考えると AAV ベクターが安全性, 毒性の面においても, また, 一般的な動物の飼育室である P1A での使用が可能であることなどからお勧めである. 本稿では AAV ベクターによる *in vivo* 遺伝子導入を中

Correspondence to Koichi Miyake, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: kmiyake@nms.ac.jp

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

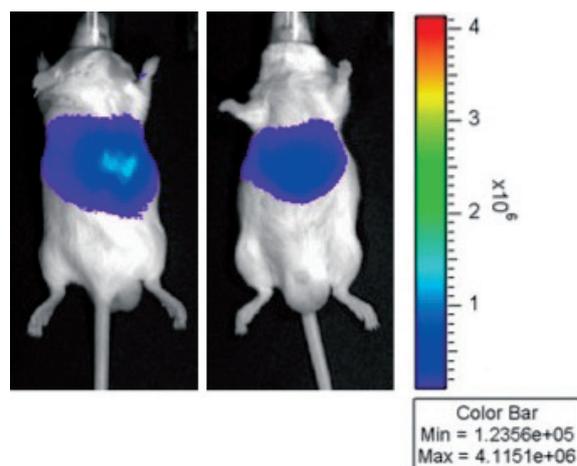


Fig. 1 レンチウイルスベクターによる遺伝子導入ルシフェラーゼ発現レンチウイルスベクターをマウスに尾静脈より静注し、1カ月後にIVISにて分布を測定した。レンチウイルスベクターのほとんどが肝臓に集積しているのが分かる。

心に、目的の臓器に遺伝子導入を試みる時、どのタイプのAAVベクターをどのような方法で導入するのが良いのかを考えていきたい。

レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは非分裂細胞への遺伝子導入が可能であり、染色体にも組み込まれるため、神経細胞、肝細胞、筋肉細胞などに直接投与することにより長期にわたり発現を持続させることが可能である¹²。Fig. 1にルシフェラーゼ発現レンチウイルスベクターをマウスの尾静脈より投与した時のベクターの分布をIVIS (in vivo imaging system)にて解析した結果を示す。ベクターのほとんどは肝臓に分布していることから、肝臓を標的とする場合レンチウイルスベクターの肝臓への直接投与でなくても全身投与により遺伝子導入が可能である。

アデノウイルスベクター

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古くから脳神経系を中心にin vivo遺伝子導入ツールとして使用されている。しかしながら細胞毒性、免疫原性が高く導入細胞に影響がなく、必要十分な発現を得られるアデノウイルスベクターの量を検討することが重要である。またウイルスゲノムは染色体に組み込まれないため、分裂細胞ではその発現は一過性であるので注意を要す

る。発現させたい目的の遺伝子の大きさが大きくレンチウイルスベクターやAAVベクターでは組み込めない場合、ガットレスアデノウイルスベクター³を用いれば最大36 kbまでの配列を収容することができるので、その場合は一考されたい。

アデノ随伴ウイルスベクター

血清型と組織特異性

AAVベクターは、病原性がなく神経細胞、筋肉細胞、肝細胞などの非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であり、P1Aにて使用可能なためin vivo遺伝子導入法としてお勧めのウイルスベクターである。ただし、導入できる遺伝子のサイズが4.7 kb前後と小さいので注意を要する。従来AAVベクターは血清型2 (AAV2)が使用されていたが、近年様々な血清型のAAVが使用可能となり⁴、標的細胞に応じて使い分けようになってきている。Fig. 2に主な血清型のルシフェラーゼ発現AAVベクターをマウスの尾静脈より投与した時のベクターの分布をIVISにて解析した結果を示す。AAV4型を除きほとんどの血清型は肝臓、筋肉を中心に導入される。AAV4型は肺を中心に遺伝子導入される。発現高率によって低発現型(AAV2, 4)、中発現型(AAV1, 5, 10)、高発現型(AAV7, 8, 9)に分けられる。遺伝子導入したい目的とする臓器、必要な発現量によってAAVの血清型を選択する。

神経細胞への遺伝子導入

AAVベクターの静脈投与では血液脳関門 (BBB: blood brain barrier) が存在するために中枢神経系への遺伝子導入は困難であり、脳実質への直接投与が試みられている。Fig. 3にマウスの線条体へ各血清型AAVベクターを直接投与した後のIVISの結果を示す。中枢神経系へはAAV9, 10が高率に遺伝子導入が可能である。別の方法としてBBBが幼弱な時期(新生児期)にAAVを静脈投与することにより中枢神経系への遺伝子導入が可能となる。この場合もAAV9が全身に高率に遺伝子導入が可能であり (Fig. 4a)、中枢神経系へも遺伝子導入されているのが観察できる (Fig. 4b)。GFP発現AAVベクターでは脳全体にわたり遺伝子導入されていることが分かる (Fig. 4c)⁵。このようにAAVベクターを新生児期に投与することにより中枢神経系を含む全組織に遺伝子導入が可能であり、目的の遺伝子を強発現させたり、RNAiにより発現を抑えて遺伝子機能解析をin vivoで行うことが可能である。

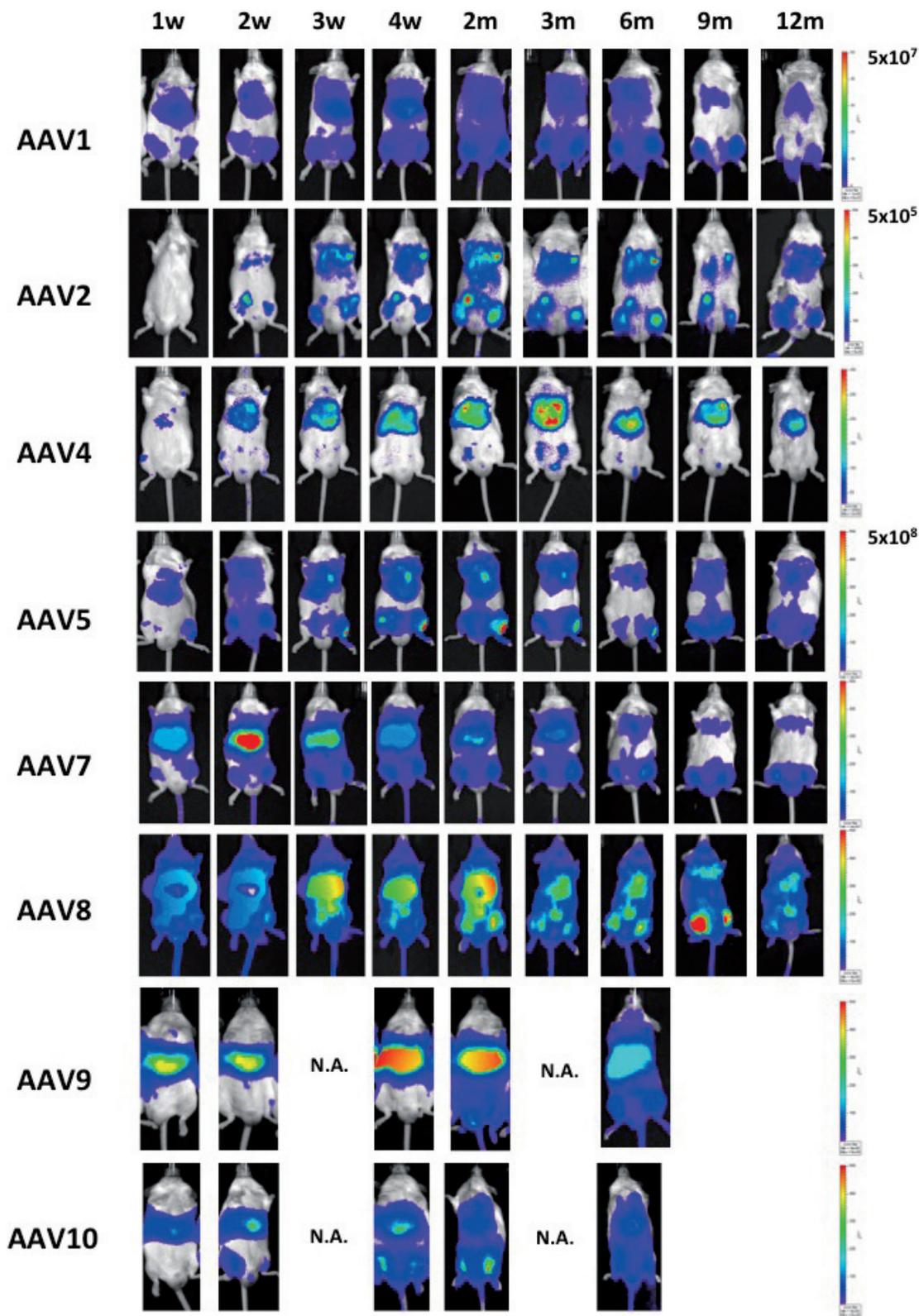


Fig. 2 各血清型の AAV ベクターによる遺伝子導入
 主な血清型のルシフェラーゼ発現 AAV ベクターをマウスに尾静脈より静注し、経過を追って遺伝子発現を IVIS にて測定した。N. A. : not available

self-complementary AAV (scAAV)

従来の1本鎖 AAV ベクター (ssAAV : single strand AAV) と比較して遺伝子発現が早く効率も良

い AAV ベクターとして注目を浴びているのが scAAV⁶ である。Fig. 5 に同じ力価の GFP 発現 ssAAV と scAAV をマウスの尾静脈より静注した時

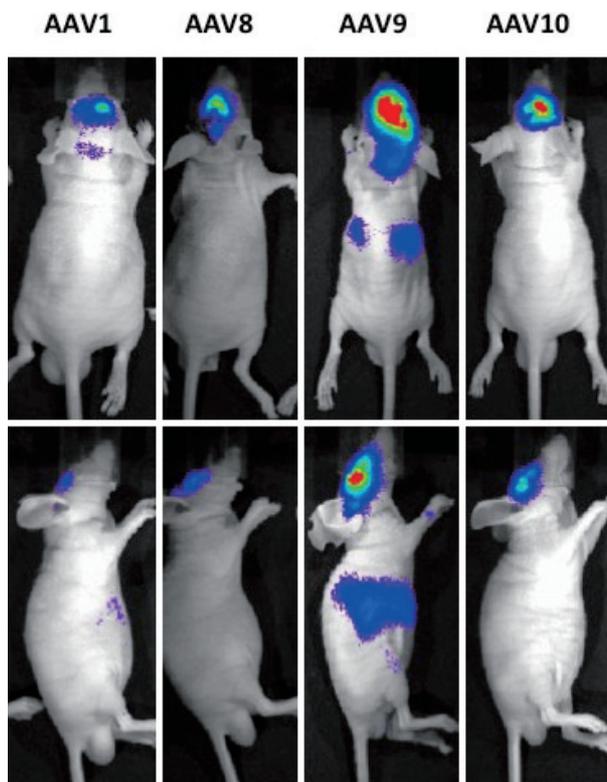


Fig. 3 AAV ベクターによる中枢神経への遺伝子導入
 ルシフェラーゼ発現 AAV ベクターを線条体に注入し、2 週間後に遺伝子発現を IVIS にて測定した。

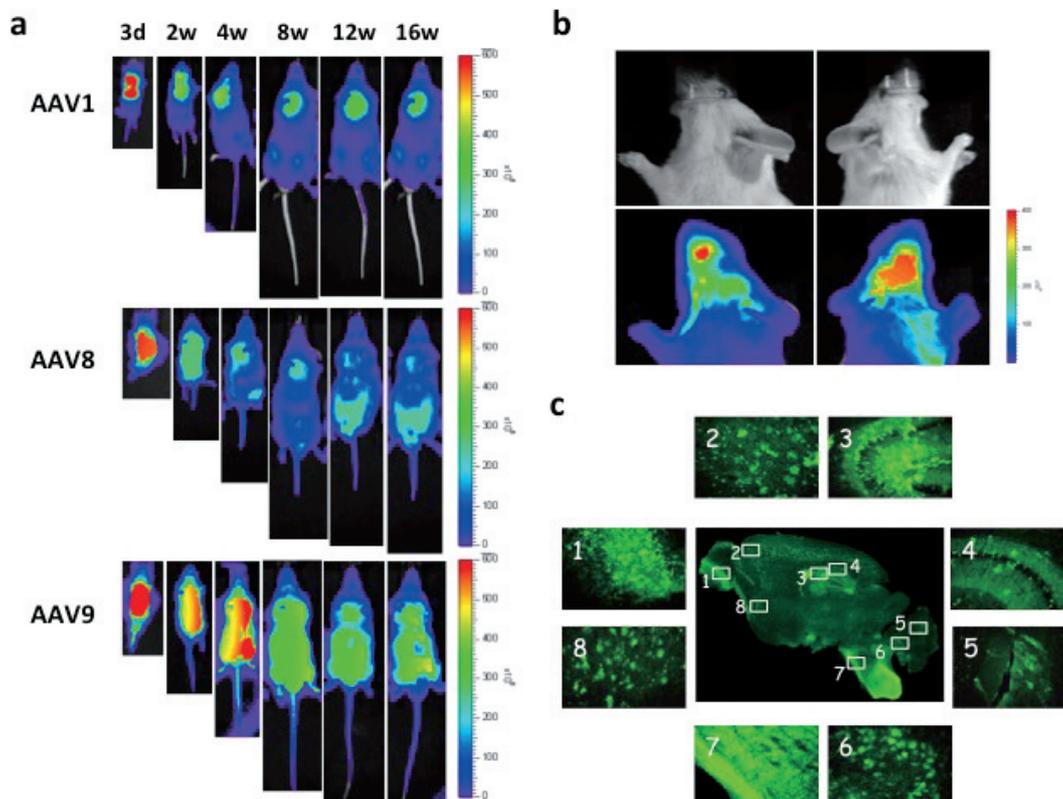


Fig. 4 新生マウスへの AAV ベクターによる遺伝子導入
 a. ルシフェラーゼ発現 AAV ベクターを Day0 のマウスに尾静脈より静注し、経過を追って遺伝子発現を IVIS にて測定した。 b. AAV ベクター静注 1 カ月後の頭部の IVIS 測定。 c. GFP 発現 AAV ベクターを Day0 のマウスに尾静脈より静注し、1 年後に中枢神経の GFP 発現を解析した。 1：嗅球, 2, 8：皮質, 3, 4：海馬, 5, 6：小脳, 7：脳幹

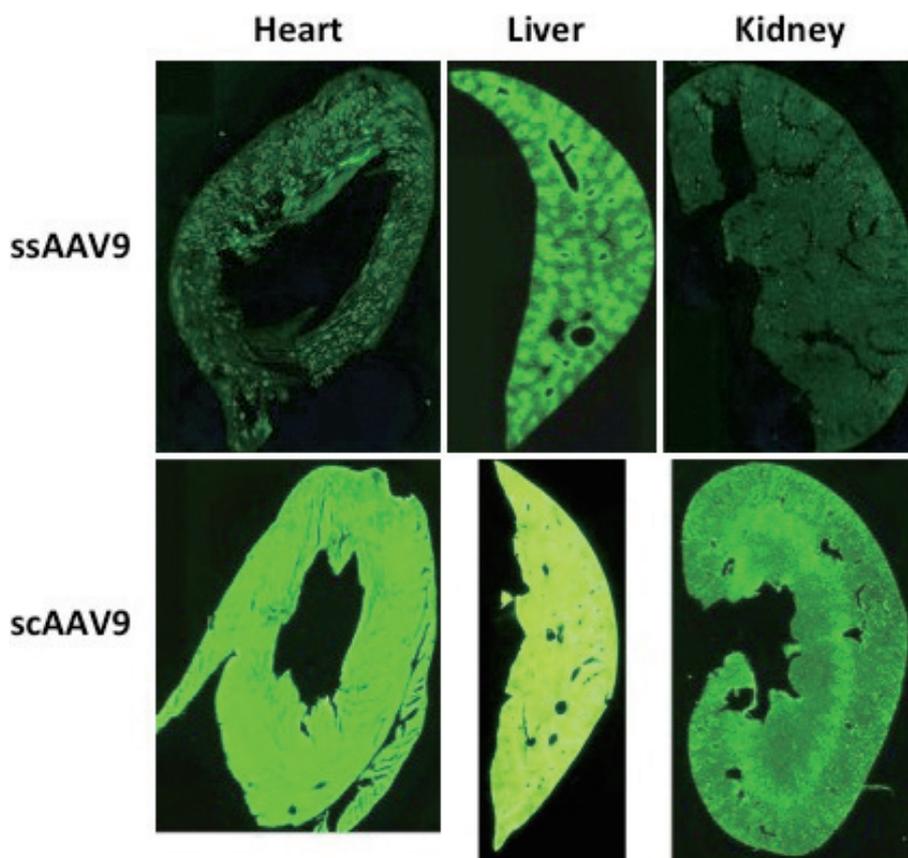


Fig. 5 ssAAV と scAAV の比較

GFP 発現 ssAAV9 および scAAV9 ベクターをマウスに尾静脈より静注し、2 週間後に GFP 発現を解析した。心臓、肝臓、腎臓すべてにおいて scAAV のほうが高発現が認められる。

Table 1 AAV ベクターの血清型と標的臓器

血清型	発現高率	標的臓器
AAV1	中	筋肉, 肝臓, 神経
AAV2	低	神経, 肝臓
AAV3	低	肝臓 (癌細胞)
AAV4	低	肺, 脳室上衣細胞
AAV5	中	筋肉, 肝臓, 神経, 網膜
AAV6	中	筋肉, 肝臓, 脊髄
AAV7	高	筋肉, 肝臓
AAV8	高	筋肉, 肝臓, 網膜
AAV9	高	神経, 筋肉, 肝臓, 心臓
AAV10	中	神経, 筋肉, 肝臓

の各臓器での GFP 発現を示す。ssAAV と比較して scAAV ではどの臓器でも発現高率が高いのが分かる。目的とする遺伝子を高発現させたい時に有用ではあるが、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 (2.3 kb 前後) 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

AAV ベクターの主な血清型と標的臓器を **Table 1** にまとめた。投与動物, 投与方法, 投与時の週齢によっても異なるが, 中枢神経には AAV9⁷, 脊髄には AAV6⁸, 筋肉, 網膜には AAV8^{9,10}, 肺には AAV4, 心臓には AAV9¹¹ の使用を薦める。前回と今回で in vitro と in vivo に分けて各種ウイルスベクターによる遺伝子導入と発現について紹介した。これらのウイルスベクターはすべて当教室にて供給可能であるので, 皆様の実験の目的に応じた最適なウイルスベクターを使用して頂ければ幸いである。

文 献

1. Naldini L: In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thromb Haemost* 1999; 82: 552-554.
2. Wong LF, Goodhead L, Prat C, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND: Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 1-9.

3. 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.
4. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM: New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 285-297.
5. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Res* 2011; 1389: 19-26.
6. McCarty DM: Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008; 16: 1648-1656.
7. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP: AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther* 2008; 16: 89-96.
8. Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, et al: Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum Gene Ther* 2011; 22: 1129-1135.
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. Igarashi T, Miyake K, Masuda I, Takahashi H, Shimada T: Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 631-637.
11. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al: Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* 2006; 99: 3-9.

(受付 : 2012 年 5 月 14 日)

(受理 : 2012 年 6 月 13 日)
