

15. 遺伝子解析室

室長 神田 忠仁

概要

遺伝子解析室の業務は、遺伝子治療に用いるウイルスベクターの研究とウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索、解析である。種々のウイルスベクターに関する情報の収集、解析とアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの基礎的研究を中心に業務を進めた。また、子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)が表皮基底層細胞に持続感染する分子機構の解明と HPV 感染を予防するワクチンの開発をめざす研究、HIV 逆転写酵素変異体の解析によって多剤耐性の獲得機構を明らかにする研究を継続した。

遺伝子治療は、有効な治療法が殆ど無い先天性遺伝病や癌に対して、革新的な治療法になると期待されている。これまでに欧米及び我が国で行われた臨床試験では、先天性の遺伝子異常による免疫不全症に対して良好な治療効果が見られ、末期癌に対する治療では患者の QOL(quality of life)の改善に貢献することが示されている。治療用遺伝子の細胞内への導入と発現を担うベクターの性能向上が、遺伝子治療の今後の実用化のカギを握るとされ、新たなベクターの開発が進められている。先天性遺伝病に対しては、治療用遺伝子を細胞染色体に組み込み、長期間に渡って安定に発現させる技術が求められ、AAV ベクターを中心とする遺伝子組み込みベクターの改良が進められている。癌の遺伝子治療では、癌細胞の増殖を阻止し、アポトーシスを誘導する遺伝子の一過性の発現を利用する治療戦略が一般的で、遺伝子導入効率の飛躍的向上をめざし、感染力を強化した新たなウイルスベクターが開発されている。一方、米国でのアデノウイルスベクターによる患者の死亡やフランスでのレトロウイルスベクターによる白血病の発症が示すように、いわば人工のウイルスであるベクターのリスク管理の重要性も示されている。このような現状から、我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立つため、内外のウイルスベクターの安全性に関する情報収集に努めた。基礎研究としては、遺伝子組み込み治療への応用が期待される AAV ベクターの研究に注力した。AAV ベクターは安全性が高いとされるが、実はベクターの素材となる AAV の生活環に不明な点が多い。AAV は大部分のヒトに潜伏・持続感染しているため、患者体内でベクターとの組み換え(ベクターレスキュー)が起こる可能性があり、また生殖細胞にベクターが感染すると子孫に影響が生じることも予想される。これらを科学的に解析するにはベクターの体内動態を知ることが必要であり、サルをモデルにしてベクターの体内分布と経時的変動の詳細な解析を進めた。同時に AAV ベクターの改良や新たなベクター作製技術の開発にも取り組んだ。

HPV は子宮頸癌、肛門周囲癌、陰茎癌等の原因となる。小型の DNA ウイルスで、性行為等で生じた上皮組織の微小なキズから侵入し、表皮基底層細胞に潜伏・持続感染する。WHO は、世界の女性の癌の 11%(年間 45 万人)は HPV 感染が原因であるとし、HPV 感染への対策を呼びかけている。HPV には 80 以上の異なる遺伝子型があり、その中で HPV16、18 型に代表される 14 の型(高危険度群)が癌を引き起こすので、高危険度群 HPV の感染を予防できるワクチンの開発をめざしている。HPV の潜伏・持続感染を支える分子機構を明らかにし、持続感染細胞からウイルスを排除する方法を探っている。また、HIV のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性株は、逆転写酵素に変異を持つことがわかったので、変異が逆転写酵素の構造と機能をどのように修飾するのかを詳細に解析し、薬剤耐性の分子機構を知るための研究を継続した。これらの持続感染するウイルスの研究は、ウイルスベクターの研究とも関連するものである。

研究業績

I. 遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

1. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

(1) AAV ベクターの体内動態の解析

カニクイサルでの AAV2 型ベクターの体内動態を解析した。今年度は、導入された遺伝子の発現を調べることに重点を置いた。EGFP-tubulin 融合蛋白質発現ベクターを、4 頭のサルに大腿静脈より接種した。3 ヶ月後に解剖し、各臓器から DNA を抽出した。半定量的 PCR を利用してベクター DNA の有無とおおよその存在量を調べた。脾臓、リンパ節、肝臓、扁桃に多くのベクター DNA が存在し、筋肉、小脳、肺、卵巣などにも検出された。また、組織中の tubulin 蛋白質を抽出、濃縮し、ウエスタンブロット法により EGFP-tubulin 融合タンパク質の発現を調べた。3 ヶ月後でもリンパ節、扁桃、脾臓において導入遺伝子の発現が確認された。(森清一郎、竹内隆正、榎本 裕、佐多徹太郎[感染病理]、山田章雄[獣医科学]、神田忠仁)。

(2) カニクイサルからの新規 AAV ゲノムの単離

カニクイサルの臓器 DNA に、未知の AAV ゲノム DNA を検出したので、クローニングした。AAV9 型及び 10 型と名付け、新たな AAV ベクターの素材となる可能性を探った。ヒトから分離され、現在 AAV ベクターの素材として主に使用されている AAV2 型のキャプシド蛋白質のアミノ酸配列と 9、10 型のアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 84% と 62% だった。9 型、10 型のキャプシドを用いた AAV ベクターを作成し、マウスの尾静脈から接種した。1 週間後に各臓器に存在するベクター DNA を PCR で増幅し、検出した。AAV2 型、9 型のベクターは肝臓に多く、10 型のベクターは肺に多いことがわかり、標的臓器に違いがあることが示唆された。(森清一郎、神田忠仁)

2. 新たな機能分子の開発に関する研究

(1) RNAi を利用した癌の遺伝子治療用カセットの作製

U6 snRNA プロモーターを用いた short hairpin RNA (shRNA) 発現カセットを作製し遺伝子ノックダウンの実験を行えるようにした。癌の遺伝子治療を目的とするため、その発現が細胞の無限増殖に必須であると予想される遺伝子を標的候補とし、また同一標的遺伝子内でも複数の標的配列を選択して、種々の shRNA の発現カセットを作った。薬剤耐性遺伝子を持つ shRNA 発現プラスミドを HeLa 細胞に導入した後、薬剤選択下でのコロニー形成能の低下を指標にして、これらのカセットのノックダウン効果を比較し、癌細胞の増殖抑制効果の機能的評価を行った。(竹内隆正、神田忠仁)。

(2) ヒト DNA 中のインスレーター配列の解析

インスレーターには、隣接するエンハンサーの活性を遮断する機能と、染色体に組み込まれた外来遺伝子の転写が組み込み部位に依存する現象(position effect)を阻止する機能がある。昨年度までに AAVS1 領域の約 300bp の SmaI 断片にはエンハンサー遮断活性が存在することを明らかにしたので、position effect の阻害機能を調べた。ルシフェラーゼ発現ユニットの両端に AAVS1-SmaI 断片ないし DNA 断片を付加したレポーターを 293 細胞に導入し、細胞染色体に組み込ませた。15 週間後、DNA 断片付加の場合はルシフェラーゼ発現は著しく低下したが、AAVS1-SmaI 断片の付加では発現低下がみられなかった。AAVS1-SmaI 断片はインスレーターの特徴とされる 2 つの機能の両方を持つことがわかった。(緒方敏彦、神田忠仁)。

3. 小型 DNA ウイルスベクターの作製技術の開発に関する研究

1) 昆虫細胞 (sf9) を用いた HPV 偽ウイルスの作製

培養細胞で増殖しないウイルスの感染初期過程やウイルス中和抗体の解析には、感染性偽ウイルスが役立つ。HPV の感染性偽ウイルスを sf9 で作る技術を開発した。マーカー遺伝子の発現プラスミドにバキュロウイルス DNA の複製開始点を組み、sf9 に導入した。

さらに HPV キャプシド蛋白質(L1 及び L2)を発現する組み換えバキュロウイルスを感染させ、生じたキャプシドを精製した。キャプシド内にマーカー遺伝子発現プラスミドを組み込んだ感染性偽ウイルスを得ることができた。これまでに開発した試験管内合成法に比べると、プラスミド以外の DNA 断片も組み込まれる傾向があるものの、キャプシド蛋白質あたりの感染価は 10 倍程度上昇した。(石井克幸、神田忠仁)

2)HPV キャプシド形成の分子機構の解析

機能分子を細胞内に運び込む担体として、小型 DNA ウイルスのキャプシドを利用できる。HPV キャプシドは、72 個のキャプソメア(L1 の 5 量体)と 12 分子の L2 から成る。キャプソメア間のジスルフィド結合によって正二十面体構造が作られており、L2 の存在によってキャプシドの安定性が増すが、L2 がどのように存在しているのかは知られていない。昆虫細胞で L2 と野生型 L1、ないし L2 とキャプソメアのみ形成できる変異型 L1 を発現させると、野生型 L1 では直径 55nm のキャプシドが、変異体 L1 では直径 40-50nm の粒子が形成された。即ち、L2 にはジスルフィド結合に非依存的にキャプソメアの会合を仲立ちする機能があることがわかった。(石井克幸、神田忠仁)

II. HPV に関する研究

1.HPV の増殖制御機構の研究

(1) 表皮分化を誘導する転写因子(hSkn-1a)の発現によって変動する遺伝子群の解析

初代ヒト表皮角化細胞で hSkn-1a を発現させると、表皮形成に至る分化が誘導される。HPV の生活環を解析するには、hSkn-1a の発現で生じる細胞生理の連続的な変化をたどることが重要である。培養液にドキシサイクリンを加えると hSkn-1a が発現する HeLa 細胞株を作り、hSkn-1a 発現直後に mRNA 量が大きく変動する遺伝子群を探索した。hSkn-1a 発現後、速やかに mRNA 量が増加したのは Connexin 43(Cx43)と ras homolog gene family, member H(ARHH)で、減少したのは Homo sapiens myxovirus resistance 2 (Mx2)、ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS)であった。新生児表皮角化細胞を分化させ、これらの mRNA 量の変動を調べると、Cx43、ARHH、RalGDS は増加し、Mx2 は減少した。(榎本喜久子、神田忠仁)

(2) HPV 陽性子宮頸癌由来細胞の分化能の検討

薬剤耐性マーカーと表皮分化を誘導する転写因子、hSkn-1a、を発現するプラスミドを種々の癌由来細胞株に導入し、薬剤耐性細胞コロニーを調べた。また、hSkn-1a 発現アデノウイルスベクターを細胞に感染させ、角化細胞の分化マーカー蛋白質の発現とアポトーシスを調べた。角化細胞由来の癌細胞株はすべて hSkn-1a によってコロニーの数とサイズが減少し、一過性に hSkn-1a を発現させたすべての角化細胞由来の癌細胞株で、サイトケラチン 10 の発現誘導と、アポトーシスが検出された。角化細胞由来の癌細胞は hSkn-1a による分化誘導に应答する能力を保持しており、hSkn-1a が分化誘導療法の機能分子となり得ることが示唆された。(榎本 裕、神田忠仁)

(3) HPV16L1 蛋白質の発現抑制機構の解析

HPV16L1 遺伝子を CMV プロモーターに繋いだ発現プラスミドを培養細胞に導入しても、L1 蛋白質は発現しない。この発現抑制機構は、HPV の潜伏・持続感染に重要な役割を担っているらしい。L1 蛋白質のアミノ酸配列を変えずに、核酸の配列を変えると L1 蛋白質の発現が起こったので、この変異体と野生型 L1 遺伝子とのキメラを複数作り、発現抑制を担う領域がどこか調べた。これまでの解析で、全長約 1500bp の L1 遺伝子の 5'端から 200 塩基(nt200)までの領域と nt400 から nt900 までの 2 つの領域があると、L1-mRNA の細胞内での分解が著しく促進されることが示された。分解促進が、角化細胞の分化に伴って消失すると思われる。(尾崎さおり、神田忠仁)

2. HPV ワクチン開発に関する研究

HPV16 型 L2 のアミノ酸 108-120 領域には、複数の HPV 型を中和できるエピトープが存在する。この領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを 10 名のボランティアに、経鼻接種した。プラセボ (3 名)には生理食塩水を用いた。4 及び 12 週後に追加接種した。接種前、6 及び 16 週後に血清を採取した。抗原ペプチドの経鼻接種で大きな副作用は認められなかった。500mg の接種を 3 回受けた 5 名のうち、3 名の血清中に HPV16 及び 52 型 L2 と結合する IgG 抗体が認められ、血清は HPV16 及び 52 型偽ウイルスの感染を阻止した。L2-ペプチドは、ヒトに毒性が無く一部のヒトには抗原性を持つことが示されたので、今後、このペプチドを実用的なワクチン抗原とする方法を開発する。(川名 敬、神田忠仁)

III. HIV に関する研究

1. HIV 逆転写酵素の研究

(1) HIV-1 逆転写酵素の大量発現・精製系の確立

HIV-1 薬剤耐性および易変異性発現の構造機能研究に用いる逆転写酵素の高純度精製標品を効率的に得る系を作った。his-tag 付き逆転写酵素を大腸菌で発現させ、親和性クロマトグラフィ・とゲルろ過で精製した。1 リットルの大腸菌培養液から、純度 90%以上の精製標品を 5 mg 以上得ることができた。同標品は、活性型ダイマ・で、高い比活性を示した。得られた酵素標品は、機能解析の目的には十分な純度を示したが、構造解析には、さらに純度を上げる必要がある。(守宏美、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 逆転写酵素の基質特異性調節機構の研究

HIV-1 薬剤耐性および易変異性発現の分子機構を知るために、HIV-1 逆転写酵素の基質選択性の調節機構を解析した。精製逆転写酵素を用い、細胞質に存在する種々のヌクレオチドおよびアナログが酵素触媒活性に与える影響を反応速度論的に解析した。ATP、GTP、CTP、UTP 存在下で、AZTTP の IC₅₀ は濃度依存的に増加した。ATP の効果が最も顕著であった。ATP 濃度依存的に逆転写酵素の K_m、K_{cat} は、それぞれ約 1/2、1/5 に減少した。AZTTP 感受性株、多剤耐性株で減少幅に有意差は無かった。AZTTP, d4TTP に対する K_i は ATP 濃度依存的に増加した。多剤耐性株の K_i 増加は感受性株より顕著で ATP 非存在下の約 20 倍に達した。ATP は逆転写酵素の基質結合部位とは異なる部位に結合し、基質特異性を変化させるアロステリック効果を持つ可能性が示唆された。(横山勝、佐藤裕徳)

2. HIV-1 の細胞侵入機構の研究

HIV-1 の細胞膜融合・侵入過程のラフト要求性を解析した。受容体非発現細胞である NP2 細胞に CD4-非依存性 HIV-1 Env 発現ベクターを導入し、cyclodextrin 30 分パルス処理した標的細胞 (HeLa 細胞、NP2/CXCR4 陽性細胞) と混合培養し、24 時間後に形成されたシンシチウム数を測定した。LacZ を発現する CD4-非依存性 HIV-1 ベクターを構築し、同様に 標的細胞に感染させ、2 日後に X-Gal 染色により感染価を測定した。HeLa 細胞では、標的細胞のシンシチウム形成は 90 % 阻害された。NP2/CXCR4 細胞の 1 mM cyclodextrin 処理における CD4-非依存性 HIV-1 ベクターの感染価は 50 % 低下した。CD4-非依存性 HIV-1 の感染効率と細胞膜融合効率に標的細胞のラフト構造が重要な役割を果たすことが示唆された。(久保嘉直[長崎大学・熱帯医学研究]、田中勇悦[琉球大学]、山本直樹[エイズ研究センター]、佐藤裕徳)

3. HIVGp120、逆転写酵素活性型ヘテロダイマ・、プロテア・ゼ活性型ホモダイマ・の立体構造研究カナダ CCG 社の統合計算化学システム MOE のホモロジ・モデリングプログラムを用いて、HIV/SIV の野生株、変異株蛋白質の立体構造モデルの作製を進めた。鑄型は報

告された結晶構造及び NMR 構造を用いた。得られたモデルを用いて基質結合のシュミレーション等を行い、結果を報告済みの基質・蛋白質複合体結晶構造と比較することにより、分子モデルの精度を検証した。これまでに、糖鎖が付加した Gp120、逆転写酵素活性型ヘテロダイマ、プロテアゼ活性型ホモダイマについて、精度の高い分子モデルが得られた。今後精度検証を行いつつ、逆転写酵素の基質特異性調節機構の研究、薬剤耐性発現機構研究などに適用する。(横山勝、佐藤裕徳)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y.: Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus (HPV) as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *BBRC*, 296:102-105, 2002.
- 2) Mori, S., Murakami, M., Takeuchi, T., Kozuka, T., and Kanda, T.: Rescue of AAV by antibody-induced Fas-mediated apoptosis from viral DNA integrated in HeLa chromosome. *Virology*, 301: 90-98, 2002.
- 3) Ishii, Y., Tanaka, K., and Kanda, T.: Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein L1: the Cysteines Affecting the Intermolecular Bonding and Structure of L1-Capsids. *Virology*, 308:128-136, 2003.
- 4) Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Takeoka, A., Yaegashi, N., Iwasaka, T., Kanazawa, K., Taketani, Y., and Kanda, T.: IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids: a Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan. *J. Medical Virology*, 69:441-446, 2003.
- 5) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Kimura S, Oka S. Isolation and Molecular Characterization of a Nelfinavir (NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication. *J. Virol.* 77: 318-27, 2003.

2. 和文発表

- 1) 佐藤裕徳: 耐性獲得とウイルスの進化。現代医療社 HIV 感染症・基礎と臨床。第 35 巻、p33-38、2003 年。
- 2) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳: SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割。日本エイズ学会誌。第 5 巻 2 号、p89-91、2003 年。
- 3) 神田忠仁: パピローマウイルスによる発癌とその予防。医学のあゆみ。医歯薬出版社、2002 年。

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Matsuoka S., Sato H., Hachiya A., Tsuchiya K., Takebe Y., Kimura S, and Oka S. :Nelfinavir (NFV) can Potentiate the Infectivity and Replication of HIV-1 Whose Fitness is Otherwise Compromised upon the Acquisition of Gag p17 in Association with Protease Mutations Conferring NFV Resistance. (2002 年 9 月、米国、サンディエゴ市)
- 2) Kawana, K, Yasugi, T, Kawana, Y, Yoshikawa, H, Kanda, T, Taketani, Y : Safety and immunogenicity of a Peptide Containing the Cross-Neutralization Epitope on HPV 16 L2 in Nasal Immunization of Adult Volunteers. 第 20 回 国際パピローマウイルス会議 2002 年 10 月、フランス共和国、パリ市)

2. 国内学会

- 1)Kanda, T: Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of HPV16 L1 Expression in HeLa.

感染と免疫フォーラム（2002年8月、淡路島）

- 2)石井克幸、神田忠仁：ヒトパピローマウイルス 16 型キャプシド主構成蛋白質 L1 の変異解析。第 50 回日本ウイルス学会総会（2002年10月、札幌）
- 3)富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳：SIV Gp120 糖鎖変異が蛋白質の立体構造、細胞内成熟、およびウイルスの増殖活性に及ぼす影響。第 50 回日本ウイルス学会総会（2002年10月、札幌）
- 4)緒方敏彦、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス組み込み領域(AAVS1)のエンハンサー遮断活性。分子生物学会（2002年12月、横浜）
- 5)富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳：SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割。第 15 回日本エイズ学会シンポジウム（2002年11月、名古屋）
- 6)海津雅彦、網康至、泉康之、佐藤裕徳、武部 豊、仲宗根正、染谷健二、北村勝彦、朽久保修、本多三男：エンペロ・プ V3 ル・プ領域の入れ替えが SHIV に与えた *in vitro* および *in vivo* におけるコレセプタ・使用への影響。第 15 回日本エイズ学会総会（2002年11月、名古屋）
- 7)松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、富田康浩、佐藤裕徳、杉浦互：相同組み換えによる患者由来 CRF01AE の再構築とその解析。第 15 回日本エイズ学会総会（2002年11月、名古屋）
- 8)松岡佐織、蜂谷敦子、土屋亮人、佐藤裕徳、岡慎一：NFV 存在下において感染効率の上昇が認められた薬剤耐性株の解析。第 15 回日本エイズ学会総会（2002年11月、名古屋）