

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ポリオーマウイルスを用いたドラックデリバリーシステムの構築 —ポリオーマウイルス関連疾患の治療を目指して—
キーワード	① ポリオーマウイルス、② ドラックデリバリーシステム、③ マイクロ RNA

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	イチカワ ヒロナ 市川 裕菜
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	武蔵野大学 薬学部 機能形態学研究室 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	武蔵野大学 薬学部 機能形態学研究室 助教
プロフィール	2014年3月に武蔵野大学薬学部(6年制)を修了し、薬剤師免許を取得。 2018年3月に東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科ウイルス制御学分野で博士(医学)を取得した。博士課程では主にウイルス学や腫瘍学の研究を行い、ティーチングアシスタントとして参加した医学部の微生物学実習では、インフルエンザウイルスや結核菌を含めて幅広いウイルスや細菌類の取り扱いや検査法を習得した。 2018年4月より現在は、武蔵野大学薬学部で助教として薬学生の教育と並行してウイルス感染症の研究に取り組んでいる。

1. 研究の概要

ウイルス様粒子(VLPs: Virus-like particles)は、ウイルスのカプシドタンパク質で構成されたナノ粒子で、カプシドの内側にウイルス DNA やウイルス RNA を含まない輸送担体である。現在臨床現場では、ヒトパピローマウイルスワクチン等にこの VLPs の技術が応用されている。ワクチン応用以外にも、VLPs を遺伝子導入システムとして利用する遺伝子治療への応用が研究されている。

遺伝子治療は、既にアデノ随伴ウイルス(AAV)やレトロウイルス、レンチウイルスなどが臨床応用されている。しかしながら AAV は、導入する遺伝子の大きさに限りがある。また、レトロウイルスやレンチウイルスには、宿主染色体への挿入変異による癌化などが懸念される(Bulcha JT et al., Signal Transduct Target Ther., 2021)。上記の理由により、より汎用性が高く、安全なウイルス媒体が求められている。本研究において申請者は、ポリオーマウイルスの VLPs を遺伝子導入媒体として注目している。

ポリオーマウイルス科のウイルスは、エンベロープを持たない環状二本鎖 DNA ウイルスである。特にポリオーマウイルス科に属する Simian Virus 40 (SV40) は、これまでも遺伝子導入システムとして研究されている。主に、試験管内(in vitro)でのポリオーマウイルス VLPs の作製が行われてきたが、標的細胞への感染効率や遺伝子発現効率に問題がある(Tsukamoto H et al., Genes Cells., 2007)。ポリオーマウイルスのカプシドタンパク質は、VP1、VP2 および VP3 が知られているが、これまでの系ではウイルス粒子の主たる構成因子である VP1 のみを用いていたことが、感染効率低下の原因と考えられる。

本研究では、3つすべてのカプシドタンパク質を安定的に発現するパッケージング細胞を

作製し、その細胞を用いて培養細胞系でのポリオーマウイルス VLPs の作製方法を構築し、VLPs 感染効率の改善を試みた。

2. 研究の動機、目的

ヒトに感染するポリオーマウイルスは 14 種同定されており、そのうち 8 種はヒトに多様な疾患を引き起こす (Ambalathingal RG et al., Clin Microbiol Rev., 2017, Moens U et al., Infect Genet Evol., 2017)。特に JC ポリオーマウイルスや BK ポリオーマウイルスは、成人の 80% に潜伏感染しており、健常時には病原性を示さないが、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症や免疫抑制剤服用中などの免疫機能低下時には進行性多巣性白質脳症や BK ウイルス腎症などのポリオーマウイルス関連疾患を引き起こす。しかしながら、これらのポリオーマウイルス関連疾患に対する治療法は確立していない。

申請者はこれまで、ポリオーマウイルスの一種である SV40 の生活環やウイルスタンパク質およびウイルスのマイクロ RNA (miRNA) の機能解析を行ってきた。その過程で、ポリオーマウイルスの miRNA がウイルス複製に必須なウイルスタンパク質である Large T 抗原を標的とし、その発現を低下させることにより、最終的にウイルス複製を低下させることを明らかにした (Tokorodani M*, Ichikawa H* (*equally contributed) et al., Biol Pharm Bull., 2020)。

そこで本研究では、ポリオーマウイルス関連疾患の新規治療法として、同じ感染経路および感染指向性であるポリオーマウイルスの VLPs を用いた miRNA 遺伝子治療法の確立を目指してこの VLPs 作製と感染効率の改善を図った。

3. 研究の結果

初めに、ポリオーマウイルスの複製に必須な T 抗原の発現抑制効果を検証するために、T 抗原を標的とするマイクロ RNA (miR-S1) をポリオーマウイルス VLPs に内包した VLPs-miR-S1 を作製した。野生型ポリオーマウイルスを一次感染させた CV-1 細胞 (ミドリザル腎臓細胞) に VLPs-miR-S1 を添加して 48 時間後の T 抗原の発現をウエスタンブロット法で解析したところ、VLPs-miR-S1 処理群で T 抗原 (Large T 抗原および small t 抗原) の発現抑制傾向が認められた (図 1 左)。次に、T 抗原がゲノム DNA に組み込まれている COS-7 細胞 (ミドリザル腎臓細胞) に VLPs-miR-S1 を添加 48 時間後の T 抗原の発現をウエスタンブロット法で解析したところ、同様に VLPs-miR-S1 処理群で Large T 抗原および small t 抗原の発現が抑制された (図 2 左)。この時の miR-S1 の発現は、VLPs-miR-S1 未処理時と比べて著しく高い発現を示している (図 1, 2 右)。以上の結果より、今回開発した VLPs-miR-S1 は T 抗原を標的としてその発現を抑制し、治療担体として機能していることがわかった。

次に、ポリオーマウイルス VLPs の作製効率化を図るため、レトロウイルスベク

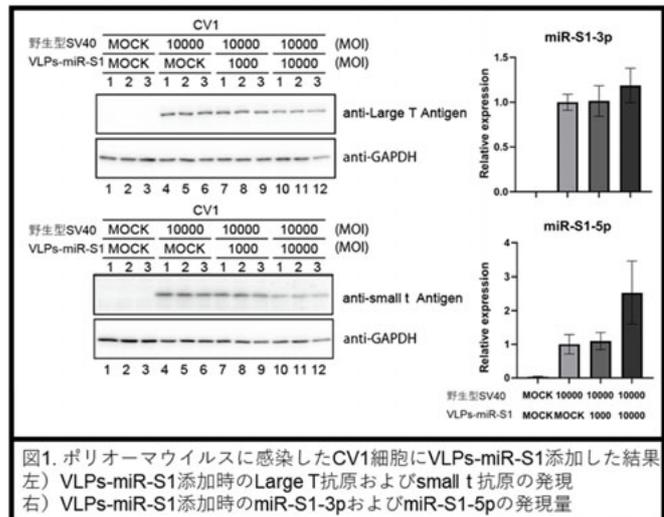


図1. ポリオーマウイルスに感染したCV1細胞にVLPs-miR-S1添加した結果
左) VLPs-miR-S1添加時のLarge T抗原およびsmall t抗原の発現
右) VLPs-miR-S1添加時のmiR-S1-3pおよびmiR-S1-5pの発現量

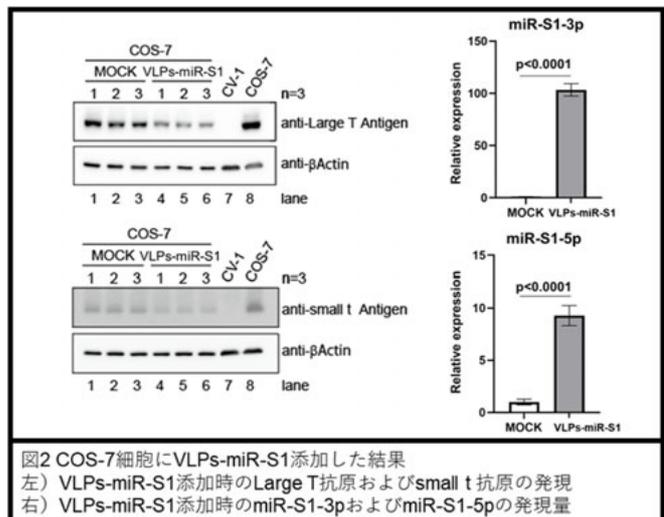


図2 COS-7細胞にVLPs-miR-S1添加した結果
左) VLPs-miR-S1添加時のLarge T抗原およびsmall t抗原の発現
右) VLPs-miR-S1添加時のmiR-S1-3pおよびmiR-S1-5pの発現量

ターの遺伝子導入技術を利用した、ウイルスカプシドタンパク質を安定発現するパッケージ細胞の作出を試みた。ここで細胞にクローニングする領域を選択するのに難渋したが、最終的にはポリオーマウイルス由来のプロモーターを含めてその下流にあるウイルスカプシドタンパク質 (VP1、VP2、VP3) 及びウイルス放出に必須な Agno protein を含む遺伝子クラスターをレトロウイルスベクターにクローニングした。このベクターを 293 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞) にトランスフェクションし、クローニングした各遺伝子の発現をウエスタンブロット法で確認しところ、目的通り、VP1、VP2 および VP3 の発現が認められた。今後は、得られたウイルスベクターを利用して SV40 産生時に利用する CV-1 細胞に遺伝子の安定発現を試みる予定である。

4. 研究者としてのこれからの展望

現代では、新型コロナウイルス感染症の世界的流行に代表されるように様々な新興・再興感染症の拡大が社会的な問題となっている。ヒトの生活環境には、多種多様な微生物が存在し、進化および変化し続けており、常に未知の疾患を引き起こす危険を孕んでいる。こうした微生物を適切に取り扱える施設や人材を整備することは研究活動が社会に貢献する大きな役割の一つである。

ウイルス研究を通して病原微生物の取り扱いを学ぶとともにその対策法を見出し、社会に還元していきたい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本奨励金により、ポリオーマウイルス感染に対する遺伝子治療法確立の足掛かりが得られました。今後さらなる研究によりポリオーマウイルス感染のみならず、他疾患の遺伝子治療への応用につながるものと考えております。今後も本助成によって得られた研究知見をもとに、研究活動および学生育成に邁進してまいります。

最後になりましたが、本研究をご理解いただき、その遂行をご支援いただきました支援者の皆様並びに日本私立学術振興・共済事業団に心より御礼申し上げます。