

4. センダイウイルスベクター

飯田 章博¹, 加藤 篤²

センダイウイルスベクターは分裂細胞、非分裂細胞にかかわらず鳥類及び哺乳類の細胞に遺伝子導入が可能な RNA ウイルスベクターである。伝播型第一世代ベクターと非伝播型第二世代ベクターの二つの型がある。どちらのウイルスベクターもすばやく細胞に導入され、その後2～4時間で発現が認められる。ウイルス自身の性質として細胞傷害性が低く、また細胞質で増えるため宿主染色体に影響を与えないという特徴を持つ。第一世代型ベクターは物質生産系としての利用が可能であり、第二世代型は遺伝子治療などの生体内発現系への利用が計画されている。

はじめに

センダイウイルス (SeV) はマウスやラットを自然宿主とする呼吸器病ウイルスであり、パラミクソウイルス科のマウスパラインフルエンザウイルス1型に分類される^{10,14)}。本ウイルスは1950年代に日本で分離され⁴⁾、SeVという通称の他に赤血球凝集能をもつことから Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) と呼ばれており (SeV の日本ウイルス学会での正式名称は、HVJ である)、細胞生物学の分野ではその強い細胞融合活性を生かして膜融合機構の解析あるいは雑種細胞の作製等の研究に広く用いられた経歴をもつ。

SeV の属するパラミクソウイルス科のウイルスは一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、狂犬病ウイルス等の属するラプトウイルス科並びにエボラウイルス等の属するフィロウイルス科とともにモノネガウイルススーパーファミリーを形成する。モノネガウイルスのゲ

ノム RNA はスクレオカプシド (N) 蛋白質と非常に強く結合しており、この結合状態でのみ RNA 合成の鋳型活性を有し、裸のままではまったく活性が無い。全長15,384塩基の SeV ゲノム RNA には6個の遺伝子がコードされ、全体の93%が蛋白質コード領域である。3'端から順に N 蛋白質遺伝子、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白質 (P) 遺伝子、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリックス蛋白質 (M) 遺伝子、そして宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 (F) 遺伝子と結合にかかわる赤血球凝集素／ノイラミニダーゼ (HN) 遺伝子、最後に RNA ポリメラーゼの大サブユニットである巨大 (ラージ) 蛋白質 (L) 遺伝子が並ぶ。それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独の mRNA として転写され、それぞれ一個の蛋白質が翻訳される。ところが、例外的に P 遺伝子からは P 蛋白質以外に、異なる蛋白質読み枠を利用して翻訳される非構造蛋白質 (C) と P mRNA を読み取り途中の RNA ポリメラーゼが特定の場所でスリップし、グアニン塩基を1分子余計に付加することにより P 蛋白質の読み枠が変えられてできる新しい蛋白質 (V) の3つが翻訳される。このような巧みな方法により SeV ゲノム RNA を効率的に利用して8種類の蛋白質が産生される⁸⁾。

SeV ベクターの特徴

現在までに、自律多段増殖可能な伝播型第一世代 SeV ベクターと一段増殖のみの非伝播型第二世代 SeV ベクターが存在する (詳細後述)。いずれのベクターも基本的には、以下の手順でウイルスベクターを生成する。すなわち、

¹(株) デイナベック研究所
(〒305-0856 茨城県つくば市観音台1-25-11)

²国立感染症研究所
(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1)

Sendai virus based vectors
Akihiro Iida¹, Atsushi Kato²

¹DNAVEC Research Inc.

²National Institute of Infectious Diseases

¹1-25-11 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

²4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

モノネガウイルスはゲノム RNA にもその相補鎖 RNA にも裸の状態の RNA には鋳型活性がないことから、ゲノム RNA と共に適切な比率で N 蛋白質と RNA ポリメラーゼ (L と P) を供給し、細胞内で RNA ゲノム-N 蛋白質-RNA ポリメラーゼ複合体 (RNP 複合体) を再構成させることにより自己複製と転写が開始され、最終的にウイルス粒子が生成されるのである^{5,7)}。したがって、これらの蛋白質の供給方法がウイルス回収の要となっている。生成された SeV ベクターの長所は、概ねウイルス本来の特徴に由来する。すなわち、(1) ヒト由来を含む多くのほ乳類培養細胞、鳥類細胞、発育鶏卵で発現可能²⁰⁾。(2) 細胞への進入が早く、短時間のウイルス暴露で十分な発現が可能¹²⁾。(3) 宿主細胞への細胞毒性が少なく、そのため(4) 感染価を100程度にまで設定することが可能で、感染価に応じて発現量を調節できる¹⁹⁾。(5) 侵入後は自らの RNA ポリメラーゼを使って細胞質でのみ増殖することから、宿主細胞の細胞周期の影響を受けにくく発現が安定している¹⁾。更に、(6) 増殖速度が早いいため、接種後2~4時間目から発現が期待でき²⁾、(7) 第一世代型で3日間程度、第二世代型ではさらに長期間発現させ続けることができる。この一方で、(8) ウイルスゲノムが染色体に組み込まれて宿主染色体に物理的な損傷を与えることがないこと。更に、(9) 自然界のウイルス遺伝子の組換えは報告されておらず、交雑による新規ウイルス誕生の心配がないという特徴を持つ。

短所としては、(1) ゲノムの塩基総数が6の倍数でなくてはならない (rule of 6) こと¹⁸⁾、(2) スプライシングを必要とする遺伝子発現はできない。さらに、(3) SeV ゲノム全長が1万5千塩基であるので、長大な DNA の挿入には向かない。現在までのところ、第一、第二世代型ともに4.5kb 程度までは挿入可能であることを確認している。また、(4) 市販の組換えキットがあるわけではなく簡単に入手することが困難であること、(5) 組換え SeV 作製に T7 RNA ポリメラーゼを発現、供給する組換えワクチニアウイルスを使用すること、(6) 再構成時に必要とされる N, P, L 量の至適化に注意を要すること、(7) N 蛋白質とウイルスゲノムが正しく結合して鋳型活性を持つようになることが必須の条件のため、明らかに二次構造をとる様な RNA (たとえばリボザイム) の発現には不向きな場合がある。また、(8) SeV が容易にマウスコロニーに常在化する危険性があるため、使用にあたってはマウスを扱う実験動物従事者の理解が必要である事があげられる。

SeV ベクターの作製

SeV ベクター作製までの歴史的経緯は、既に本誌⁶⁾にあるのでここではキーポイントである効率向上についてだけ述べる。第一に、人工ゲノムとして本来のゲノムと同じマイナス鎖を使うのではなく、その相補鎖のプラス鎖を使うこ

とである。これにより、ウイルスの生活環のマイナス鎖からプラス鎖合成の過程を1段階スキップできること、また N 蛋白質と会合して鋳型活性を持つはずのマイナス鎖 RNA が再構成に必要な N, P, L 蛋白質をコードする mRNA と先に雑種を形成し鋳型活性を持ちにくかったこと、更にマイナス鎖はプラス鎖に比べて完全長の RNA の生成効率がよくなかったこと等が改善できる¹⁶⁾。次に、適切な量比で N, P, L 蛋白質を供給することである。特に P の至適量の幅は狭く、少なくとも多くても生成効率を大きく低下させる⁵⁾。最後に、人工ゲノム、N, P, L を発現させるのに用いる T7 RNA ポリメラーゼを供給する組換えワクチニアウイルスが起こす細胞傷害効果が生成を妨げるので、これを低く抑えることが重要である⁵⁾。

当初、人工ゲノムは生成効率が低下するのを恐れて、本来のウイルスゲノムを忠実に模して作られていた。ところが、制限酵素サイト等を付加できること、更にそのサイトを利用して異種配列を挿入可能であったことから、本来のゲノムサイズがウイルス粒子形成の限界値でない事が明らかになり SeV ベクターの可能性が示された^{2,20)}。しかし、この一方で RNA ウイルスは DNA ウイルスに比べて変異が著しく、仮に異種遺伝子の発現に成功しベクター化されても、ただちに変異が蓄積し使い物にならなくなるとわれてきた。しかしながら、現実には異種遺伝子を発現させた SeV に直ちに変異が蓄積し、発現が停止するという事態は観察されず、実用的に問題になることはない^{2,20)}。

次に、発現方法について述べてみよう。SeV ベクターは、従来のプラスミドベクターやアデノウイルスベクターなどの DNA 型ベクターや RNA をゲノムとして持ちながら、細胞内で DNA に逆転写されるレトロウイルスベクターとは異なり、宿主の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを利用しない。そのため、プロモーター・エンハンサーによる遺伝子発現量の調節はできないが、だからといって、発現調節ができないわけではない。SeV 由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L と P) の SeV ゲノム上での結合場所は N 蛋白質-RNA ゲノムの 3' 端にしかなく、ここに結合した RNA ポリメラーゼが 3' 端から 5' 端に向けて鋳型上を動いていく過程でそれぞれの遺伝子の両端にある独自の転写開始と終結配列を認識し、開始と停止を繰り返しながら mRNA が合成される。この繰り返しの過程で RNA ポリメラーゼのゲノムからの脱落が低いながらも起こり、このため 5' 側に向かうに従って mRNA 合成量が減衰する極性効果がある³⁾。従って最も高く遺伝子を発現させるためには、最も 3' 端にある N 遺伝子の翻訳領域の直前に挿入し、逆に少量の発現にとどめたい場合にはより下流に挿入すればよい。L 遺伝子の翻訳領域の直後に挿入するまでの 7 か所で転写量を制御することが可能である (図 1)¹⁷⁾。以上の様にして SeV 本来にある遺伝子を壊さずに、異種遺伝子を付加したものが、第一世代型ベクターで

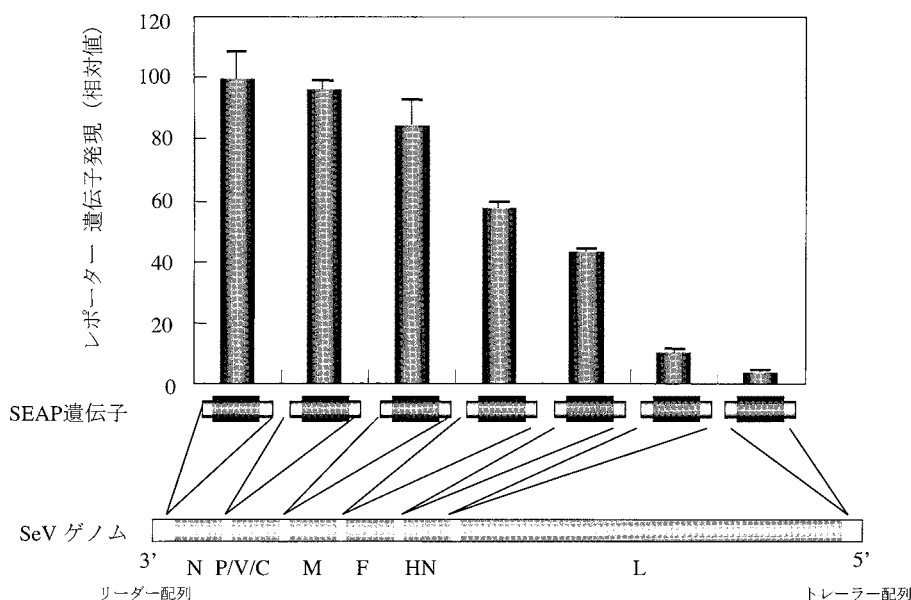


図1 遺伝子発現の極性効果を利用した SeV ベクターの遺伝子発現量の調節
制限酵素 *Not I* 切断部位を各ウイルス遺伝子間の非翻訳領域もしくは N 遺伝子上流, L 遺伝子下流の非翻訳領域に導入した 7 種の組換え SeV を作成することができる。それぞれの制限酵素サイトに、レポーター遺伝子としてヒト分泌性アルカリフォスファターゼ遺伝子 (SEAP) を挿入して、挿入位置と発現効率の関係をj知ることができる。サル腎由来 CV-1 細胞に感染価 (MOI) 2 でそれぞれを導入し、18 時間後の培養上清に分泌された SEAP 活性 (相対値) を比較した。SEAP 活性はゲノムの上流に遺伝子を挿入するほど高い。ゲノムの 3' 端と 5' 端とでは、その発現量に 20 倍以上の差がある。

ある。このベクターは、ウイルス遺伝子の機能により、細胞に感染→増殖→再感染を繰り返す伝播 (多段増殖) が可能であり、そのため培養細胞や発育鶏卵を用いた物質生産システムとしても利用可能である²⁰⁾。

第二世代型 SeV ベクター

SeV ゲノムの転写と複製には、N, P, L 蛋白質が必須である。ところが、M 蛋白質と 2 種類のエンベロープ HN, F 糖蛋白質は、それぞれウイルス粒子の構造の維持と感染細胞への接着及び侵入に関与しており、細胞内転写・複製には必須ではない。この中で、F 蛋白質は非活性型の前駆体 (F₀) として合成され、トリプシン様プロテアーゼにより、F₁ と F₂ に開裂、活性化され、標的細胞の細胞膜と膜融合に関与する。生体内では、トリプターゼクララがその酵素として働き、それを分泌するクララ細胞が肺や気道に存在するために SeV は齧歯類の気道に高い親和性を示す⁹⁾。次に、ゲノムから F 遺伝子を欠損させて多段増殖できないようにした、非伝播型の EGFP 発現 F 欠失 SeV (EGFP-SeVΔF) ベクターを紹介する。

第一世代型と同様に細胞に T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクチニアウイルスを感染させ、EGFP-SeVΔF cDNA および N, P, L をそれぞれ発現する 3 種のプラスミドを導入する。伝播性を持った第一世代型ベクターは、それらの細胞を凍結融解してトリプシンで F 蛋白質を開

裂活性化させた後に発育鶏卵に接種すると、しょう尿液中にウイルスを回収できる。ところが、第二世代の非伝播型ベクターの場合には、トランスフェクトした細胞の凍結融解物をカチオン性リボソームと混合し、F 発現ヘルパー細胞に導入して回収する (図 2)。回収されたウイルス RNA ゲノムを F 遺伝子をプローブとしたノーザンブロット解析を行っても陽性のバンドは検出されない。このことから、SeVΔF ゲノムが、ウイルス再構成中にヘルパー細胞から産生される F 遺伝子由来 mRNA と組換えを起こすことなく、ベクター粒子内に保持されていることがわかる。SeVΔF 粒子を免疫電子顕微鏡で観察すると形態、サイズとも野生型ウイルスとほぼ同じであり、表面にヘルパー細胞から由来する F 蛋白質とウイルスゲノムから由来する HN 蛋白質が認められる。回収された SeVΔF をトリプシン存在下で培養細胞に感染させると、親株 SeV あるいは第一世代型ベクターが次々と隣接細胞に広がっていくのに対して、第二世代型 EGFP-SeVΔF ベクターはまったく広がりを見せず、非伝播型の性質が確認できる¹¹⁾。

第二世代型 SeV ベクターの重症虚血肢の遺伝子治療への応用

非伝播型であるという利点を生かして第二世代型 SeV ベクターは生体への応用が各方面で検討されている。ここではその一つである九州大学遺伝子治療研究コンソーシア

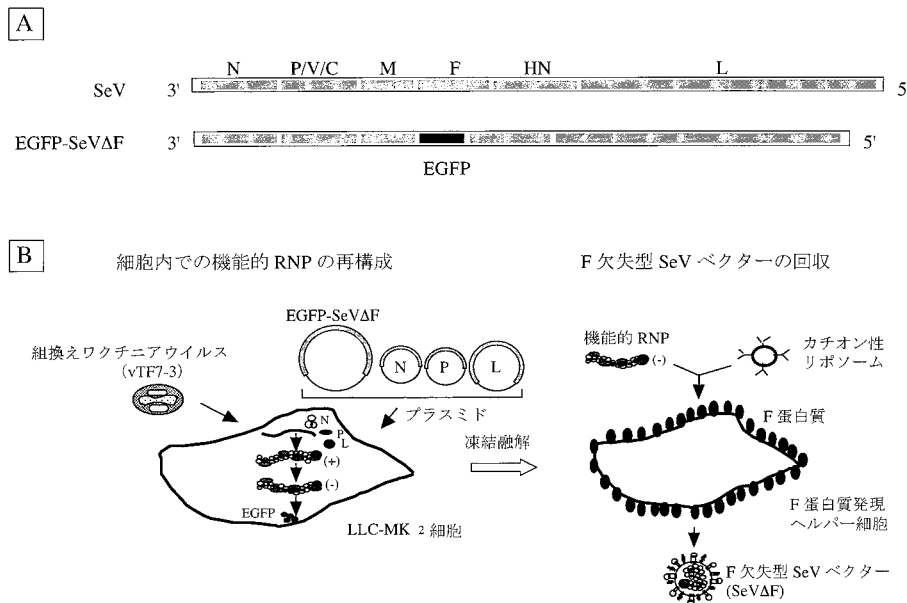


図2 F 欠失型 SeV ベクターの作製法

(A) : SeV (上段) と F 欠失型ベクター (下段) の基本遺伝子構造。ベクターは F 遺伝子を除き、その代わりに外来遺伝子 EGFP を M と HN 間に挿入したものを代表例として示す。(B) : F 欠失型 SeV ベクター (SeVΔF) の 2 段階回収法。T7 RNA ポリメラーゼを発現する組換えワクチニアウイルス (vTF7-3) をサル腎由来細胞株 (LLC-MK2) に感染後、T7 プロモーター支配下に N, P, L 蛋白質を発現するプラスミド、および F 欠失型 SeV のアンチゲノム (+ 鎖) を発現するプラスミドの 4 種類を導入すると、導入細胞の細胞質で RNP が形成され、その後にゲノムの複製・転写が開始される。次に、この細胞を凍結融解して細胞破砕液をつくり、その液に含まれる RNP をカチオン性リポソームと混ぜて F 蛋白質を発現するヘルパー細胞に導入する。F 蛋白質が細胞内でトランスに供給され、SeVΔF ベクターが培養液中に産生される。



図3 重症虚血肢モデルにおける FGF-2 発現 SeV ベクターの救肢効果

重症虚血肢モデルとして虚血手術マウスを用いた。手術後10日目における下肢の肉眼的所見を比べると、治療遺伝子未挿入 SeV ベクター投与のコントロール群及び血管内皮増殖因子遺伝子挿入 VEGF165-SeV ベクター投与群では下肢の脱落を認めたが、FGF2-SeV 投与群では脱落が回避され、明らかな救肢効果が認められた。

ムとの重症虚血肢の遺伝子治療に関する共同研究の一例を示そう。慢性動脈硬化症や糖尿病による下肢の血行障害は激しい疼痛、歩行困難、下肢壊死をもたらし、やがて下肢切断を余儀なくさせ、その予後も多くの場合、必ずしもよくはない。有効な治療方法がないため、血行の再開を目的とした遺伝子治療に期待が集まっている。そこで、FGF2 (fibroblast growth factor 2 : 塩基性線維芽細胞増殖因子) を発現する FGF2-SeV ベクターを用いて、実験的下肢虚血モデルマウスの治療効果を検討した。その結果、発現ベクター投与が下肢脱落を抑制することを見出した(図3)¹³⁾。このモデル試験では、他の遺伝子治療法と比較しても救肢率が大きく上回っていること、SeV ベクターの高発現能を背景に毒性域を十分把握しながら治療が行えること(このような例はこれまでの遺伝子治療ではほとんど不可能であった)、さらには FGF2 が投与局部において、他の血管新生因子を誘導して真に機能的な血管の新生を促すものであることが判明した¹⁵⁾。これらの知見に基づいて、九州大学附属病院では第二世代型の F 欠失型 SeV ベクター (FGF2-SeVΔF) を用いて慢性重症虚血肢(閉塞性動脈硬化症、バージャー病)を対象とした臨床研究を計画し、現在、厚生労働省での審議が行われている。これが実現すれば、日本オリジナルの技術による世界で初めて

の細胞質遺伝子治療となる予定である。

おわりに

SeV は我が国で分離され、世界に先駆けて全シークエンスが決まったパラミクソウイルスである。ウイルス生成系が確立し、今回は新たに有望なウイルスベクターの候補になった。本総説で紹介した業績は、多くの研究者、研究室、研究チームに資産と情熱のバトンが渡されて行き着いた途中到達点での記録である。今後も研究者は走りつづけ、あるいはバトンを渡し、先に進んでいくだろう。目標の一つが遺伝子治療への SeV ベクターの応用であり、本総説はそこに力点を置いた。他に有効な治療法がなく救いを求める人々のためにも真に治療効果が望め、安全性の高い遺伝子導入法の開発、実用化が急務である。SeV 本来の性質に由来するに高い遺伝子導入能と発現能、さらには細胞質で増え核内の宿主染色体 DNA と相互作用しないということは、他の遺伝子導入方法にはない SeV の長所である。治療を待ち望む人々にとって SeV ベクターが福音となってくれる日が来ればいいと願ってやまない。

謝 辞

本総説は、本文中にお名前、業績を載せきれなかった多くの方々によってなされたお仕事の集大成の一部をご紹介させて頂いたものです。慎んでお礼申し上げます。また、このような執筆の機会を与えて下さった東京大学医科学研究所の岩本愛吉教授並びに本誌編集委員の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Armeanu, S., Ungerechts, G., Bernloehr, C., Bossow, S., Gregor, M., Neubert, W. J., Lauer, U.M., Bitzer, M. (2003) Cell cycle independent infection and gene transfer by recombinant Sendai viruses. *J. Virol. Methods*. **108** 229-233.
- 2) Hasan, M. K., Kato A., Shioda, T., Sakai, Y., Yu, D., Nagai, Y. (1997) Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase from 3' proximal first locus. *J. Gen. Virol.* **78** 2813-2820.
- 3) Homann, H. E., Hofschneider, P. H., Neubert, W. J. (1990) Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* **177** 131-40.
- 4) Ishida, N., Homma, M. (1978) Sendai virus. *Adv. Virus Res.* **23** 349-383.
- 5) Kato, A., Sakai Y., Shioda, T., Kondo, T., Nakanishi, M., Nagai, Y. (1996) Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* **1** 569-579.
- 6) 加藤 篤 (1997) センダイウイルス遺伝子操作系の確立と展開 ウイルス **47** 133-144.
- 7) 加藤 篤 (1998) 微生物学実験提要 (東京大学医科学研究所学友会編) pp192-194, 丸善株式会社.
- 8) 加藤 篤 (2003) センダイウイルスアクセサリー C

蛋白質の機能 蛋白質核酸酵素 **48** 1364-1370.

- 9) Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., Kishino, Y., Fukutomi, A., Katunuma, N. (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **267** 13573-13579.
- 10) Lamb, R. A., Kolakofsky, D. (1996) *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication pp1177-1204. In B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 11) Li, H., Zhu, Y., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y., Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., Nagai, Y., and Hasegawa, M. (2000) A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* **74** 6564-6569.
- 12) Masaki, I., Yonemitsu, Y., Komori, K., Ueno, H., Nakashima, Y., Nakagawa, K., Fukumura, M., Kato, A., Hasan, M. K., Nagai, Y., Sugimachi, K., Hasegawa, M., Sueishi, K. (2001) Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* **15** 1294-1296.
- 13) Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tanii, M., Konori, K., Nakagawa, K., Hou, X., Nagai, Y., Hasegawa, M., Sugimachi, K., Sueishi, K. (2002) Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia. Acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res.* **90** 966-973.
- 14) Nagai, Y., Kato, A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. (1999) *Microbiol. Immunol.* **43** 613-624.
- 15) Onimaru, M., Yonemitsu, Y., Tanii, M., Nakagawa, K., Masaki, I., Okano, S., Ishibashi, H., Shirasuna, K., Hasegawa, M., Sueishi, K. (2002) Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression in ischemic limb. *Circ Res.* **91** 723-730.
- 16) Schnell, M. J., Mebatsion, T., Conzelmann, K. K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* **15** 4195-4203.
- 17) Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y., Hasegawa, M. (2002) Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res.* **86** 33-38.
- 18) Vulliamoz, D., Roux, L. (2001) "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J. Virol.* **75** 4506-4518.
- 19) Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D. J., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P. K., Kato, A., Hasan, M. K., Masaki, I., Nagai, Y., Fukumura, M., Hasegawa, M., Geddes, D. M., Alton, E. W. F. W. (2000) Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat. Biotechnol.* **18** 970-973.
- 20) Yu, D., Shioda, T., Kato A., Hasan, M. K., Sakai, Y., Nagai, Y. (1997) Sendai virus-based expression of HIV-1 gp120: reinforcement by the V (-) version. *Genes Cells.* **2** 457-466.