

## 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによる ES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所  
基盤研究第三プロジェクトチーム  
研究者 川端 健二

ES細胞は再生医療のための有力な細胞ソースとして注目されている。ES細胞の分化を自在に制御するには効率の良い遺伝子導入法の開発が必須である。そこで本研究では、アデノウイルスベクターを用いたES細胞への高効率遺伝子導入法の開発を行った。

### A. 研究目的

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は 無限増殖能と分化多能性を有する細胞であり、1981年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、ES細胞は遺伝子欠損マウス作成のための発生工学的材料として重用されてきたが、1998年にはヒト胚からもES細胞が樹立され、再生医療への応用が考えられるようになった。ES細胞を目的の細胞に分化させるには、通常時は未分化のまま維持し、適宜何らかの刺激を与えて分化させることが必要である。マウスES細胞は分化を抑制するサイトカインLIF (leukemia inhibitory factor) を加えることにより未分化状態を維持できることが知られているが、その作用機構については不明な点が多い。さらに、未分化ES細胞から目的の細胞に分化させる技術についても試行錯誤の状態が続いている。これは、ES細胞への遺伝子導入技術が確立されていないため、ES細胞への外来遺伝子導入による機能解析研究が行えないことに起因する。

本研究では、多くの細胞で効率の良い遺伝子導入が可能であることが知られているアデノウイルスベクターを用いて、ES細胞への効率良い外来遺伝子導入実験系を開発し、それを用いて再生医療へ向けたES細胞の分化誘導系を確立することを目的とする。

### B. 研究方法

#### (1) マウス ES 細胞の培養

通常、E14マウスES細胞(mES細胞)はLIF含有培地にてフィーダー細胞上で培養し、3-5日ごとに継代した。フィーダー細胞にはマイトマイシンCで不活化したマウス胚繊維芽細胞を用いた。フィーダー非存在下で培養する際には、フィーダー上のmES細胞をトリプシンで剥離した後、37°C、40分インキュベートすることにより得たmES細胞の単細胞浮遊液をゼラチンコートした培養皿上に播種した。

#### (2) ベクタープラスミドの作製

アデノウイルスベクターの作製はin vitroライゲーション法により行った。シャトルプラスミドpHMCMV5およびそのプロモーターをCAプロモーター、EF-1 $\alpha$ プロモーターで置換したプラスミドpHMCA5、pHMEF5を用意した。それぞれのマルチクローニング部位に $\beta$ -ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を挿入し、LacZ発現シャトルプラスミドpHMVMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZを作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを制限酵素I-Ceu IとPI-Sce Iで消化し、同酵素で消化したベクタープラスミドpAdHM4とライゲーションを行うことによりLacZ発現ベクタープラス

ミド pAdHM4-CMVlacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。さらに、ファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM4 だけでなく、他のベクタープラスミド pAdHM15、pAdHM41-K7(C)、pAdHM34 とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1、pAdHM34-EFLacZ1 を作製した。

### (3) アデノウイルスベクターの作製

(2) で作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現アデノウイルスベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ を得た。

各アデノウイルスベクターは 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製した。アデノウイルスベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol から成る溶液で透析した。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価はクロンテック社の Adeno-X Rapid Titer Kit を用いて測定した。

### (4) LacZ アッセイ

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10<sup>5</sup> cells/well 播種し、翌日各アデノウイルスベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、X-gal 染色液 (1.3 mM MgCl<sub>2</sub>、15 mM NaCl、44 mM hepes、3 mM potassium ferricyanide、3 mM potassium ferrocyanide、0.05% X-gal) にて染色を行った。

### (5) RT-PCR

フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR を

行った。PCR におけるプライマーの配列は以下の通りである。

G3PDH(F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH(R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

CAR(F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'

CAR(R): 5' -TTAACAAGAACGGTCAGCAG-3'

Oct-3/4(F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'

Oct-3/4(R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'

### (6) ウェスタンブロッティング

マウス CAR に対するポリクローナル抗体は CAR の部分配列 KTQYNQVPSDFERAPQC に対応するペプチドをウサギに免疫することにより作製した (業者に委託)。フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞からタンパク質を抽出し、マウス CAR 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

### (倫理面への配慮)

今年度は動物実験を行わなかった。また、ヒト由来の生体試料等を用いた実験も行わなかった。

## C. 研究結果

LacZ を発現するプロモーターの異なる 4 種の 5 型 (従来型) アデノウイルスベクター Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を作製し、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞にこれらのベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。その結果、Ad-RSV-LacZ および Ad-CMV-LacZ を用いたときはほとんど発現が認められなかったのに対し、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いたときは高レベルの発現が認められた (Fig. 1A-1D)。また、Ad-CA-LacZ を用いたときはフィーダー細胞と mES 細胞両者に遺伝子導入されたのに対し、Ad-EF-LacZ を用いたときはフィーダー細胞にはほとんど発現が見られず、mES 細胞特異的に遺伝子発現が認められた (Fig. 1C およ

び 1D)。次に、フィーダー細胞非存在下の mES 細胞への遺伝子導入を調べた結果、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いた場合のみ、高い LacZ の発現が得られた (Fig. 1E-1H)。以上より、CA プロモーターあるいは EF-1 $\alpha$  プロモーターを用いることにより、mES 細胞に効率よく遺伝子発現させることができ、特に EF-1 $\alpha$  プロモーターは ES 細胞特異的に発現させることができることが明らかとなった。

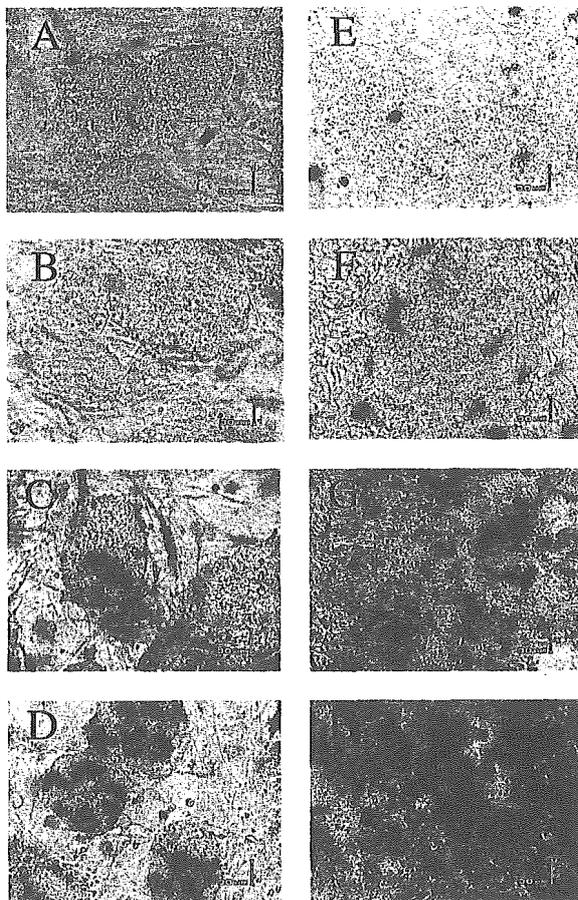
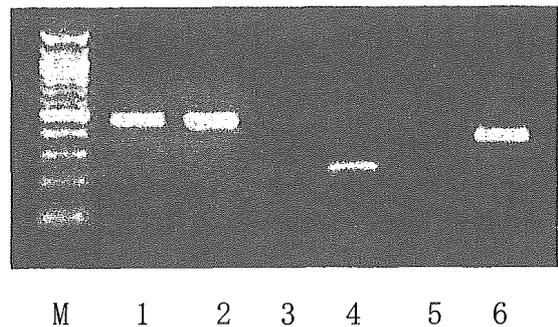


Fig. 1 X-gal staining of Ad vector-transduced mES cells. mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-RSV-LacZ (A, E), Ad-CMV-LacZ (B, F), Ad-CA-LacZ (C, G), or Ad-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

(A)



(B)

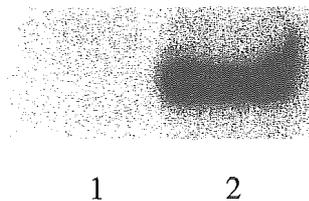


Fig. 2 CAR expression in mES cells. (A) Total RNA from feeder cells (lanes 1, 3, 5) or mES cells on feeder cells (lanes 2, 4, 6) was purified and reverse-transcribed into cDNA, and then cDNA was amplified by PCR for analyzing the expression of G3PDH (lanes 1, 2), CAR (lanes 3, 4), and Oct-3/4 (lanes 5, 6). M represents molecular marker. (B) Cell lysate (20  $\mu$ g/lane) from feeder cells (lane 1) or mES cells on feeder cells (lane 2) were loaded onto a 12.5% SDS-polyacrylamide gel, electrophoresed, and subsequently transferred to the membrane. The immunoblot was probed with a polyclonal antibody for mouse CAR.

アデノウイルスは細胞表面上の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を介して細胞に感染することが知られている。CA プロモーターあるいは EF-1 $\alpha$  プロモーターを有するアデノウイルスベクターが mES 細胞において高い遺伝子発現を示したので、mES 細胞における CAR の発現を RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより調べた (Fig. 2A および 2B)。その結果、フィーダー細胞では CAR の発現は認められなかったが、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞では CAR が高発現していることが明らかとなった。また、mES 細胞は未分化 ES 細胞のマーカーである Oct-3/4 も高発現していた (Fig. 2A)。

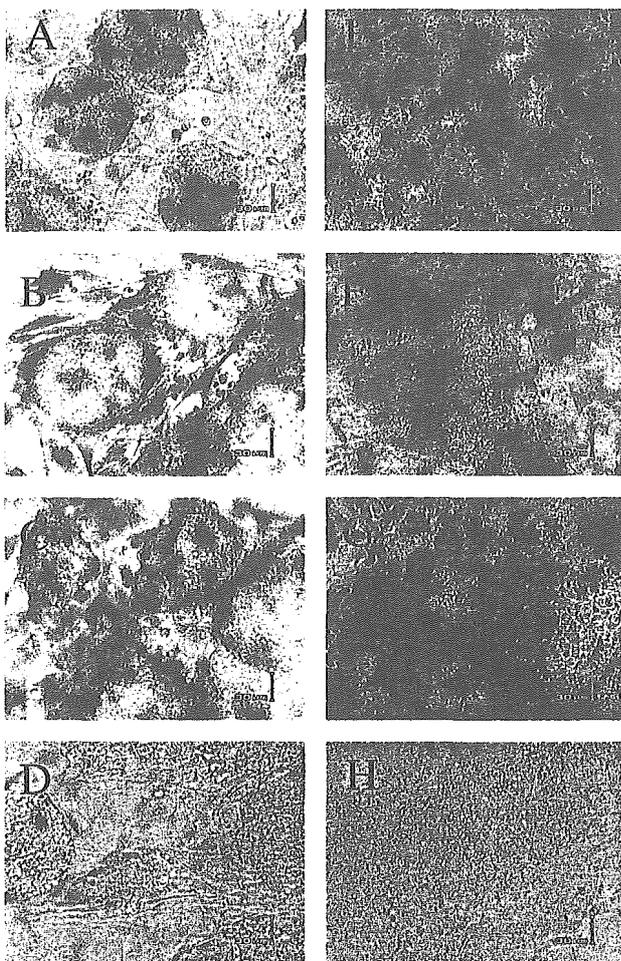


Fig. 3 X-gal staining of mES cells transduced with fiber-modified Ad vectors. mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-EF-LacZ (A, E; the figures correspond to those in Fig. 1), AdRGD-EF-LacZ (B, F), AdK7-EF-LacZ (C, G), or AdF35-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

次に、ES 細胞でのさらなる遺伝子発現の上昇を調べるために 3 種のファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製した。すなわち、AdRGD-EF-LacZ はウイルスのファイバーノブの HI ループ部位にインテグリンと高親和性を有する RGD 配列のペプチドを挿入したベクターであり、AdK7-EF-LacZ はファイバーノブの C 末端に 7 つのリジン残基を挿入したベクターであり、AdF35-EF-LacZ は 5 型アデノウイルスのファイバーノブとシャフトを 35 型アデノウイルスのものに置換したベクターであり、それぞれの受容体は  $\alpha_v$  インテグリン、ヘパラン硫酸、

CD46 である。従来型を含めたこれら 4 種のベクターのうち、Ad-EF-LacZ が最も高効率かつ特異的に mES 細胞に LacZ を発現させることができた (Fig. 3A および 3E)。AdRGD-EF-LacZ および AdK7-EF-LacZ は mES 細胞よりもむしろフィーダー細胞に遺伝子導入され、AdF35-EF-LacZ を用いたときは両細胞にわずかに発現が認められたのみであった (Fig. 3B-3H)。

#### D. 考察

本研究ではアデノウイルスベクターによる mES 細胞への高効率遺伝子導入法の開発を試み、それに成功することができた。種々のプロモーターを検討した結果、mES 細胞には EF-1 $\alpha$  プロモーターが最も高効率かつ特異的に遺伝子発現させることができたことが明らかとなった。また、従来型アデノウイルスベクターと種々のファイバー改変型アデノウイルスベクターとを比較した結果、従来型ベクターが最も特異的に mES 細胞に遺伝子導入可能であった。これは、mES 細胞は CAR を発現しているが、フィーダー細胞は CAR を発現していないことに起因することも明らかとなった。一方、mES 細胞だけでなく、フィーダー細胞にも遺伝子導入したいときは AdRGD-EF-LacZ や AdK7-EF-LacZ などのベクターが有効であることも示された。

ES 細胞に最も適当なアデノウイルスベクターを系統的に検討することにより、高効率かつ特異的なベクターを決定することができた。今後、このベクターを用いて、ES 細胞に機能遺伝子を導入し、ES 細胞分化を自由に制御できるかどうか検討していく予定である。

#### E. 結論

- (1) ES 細胞はアデノウイルス受容体 CAR を発現している。
- (2) EF-1 $\alpha$  プロモーターを有する 5 型アデノウイルスベクターが ES 細胞には最適である。

(3) ES 細胞だけでなく、フィーダー細胞にも同時に遺伝子導入したいときは、AdRGD や AdK7 などのファイバー改変型ベクターが有効である。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫. Development of an adenoviral vector system for embryonic stem (ES) cells. 第10回日本遺伝子治療学会総会, 東京, 2004年7月

川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫. ES 細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし