

バキュロウイルスベクター —哺乳動物細胞への遺伝子導入—

松浦 善治

昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、約 130 kbp の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとして持ち、感染すると全細胞タンパク質の 30 ～ 40% が多角体タンパク質に置換されるほどの強力なプロモーターを有している。この性質を利用して、本ウイルスは昆虫細胞を用いた目的タンパク質の高度産生法として普及している。¹⁻²⁾ ところが近年、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく効率よく外来遺伝子を導入できることが判明し、新しい遺伝子導入ベクターとしても脚光を浴びることとなった。³⁾ 本稿では、バキュロウイルスによる哺乳動物細胞への遺伝子導入と宿主応答について紹介したい。

組換えウイルスの作製と遺伝子導入

哺乳動物細胞で遺伝子を発現できるバキュロウイルスは、組換えに用いるトランスファーベクターが異なる点と、ウイルスが哺乳動物細胞内で複製しないため、感染時に比較的高力価のウイルスを接種する必要がある点を除けば、従来の昆虫細胞に感染させるバキュロウイルスと基本的には同じである。組換えウイルスの作製方法としては、従来の致死欠損ウイルス DNA とトランスファーベクターを用いた相同組換え法の他に、全バキュロウイルスゲノムを組み込んだファージミド (バクミド) にトランスポゾンを利用して、大腸菌体内で効率よく外来遺伝子を挿入できる方法が開発されている。このシステムでは組換えウイルス遺伝子を持ったバクミドを菌体から抽出し、昆虫細胞にトランスフェクトするだけで容易に組換えウイルスを回収できる。

バキュロウイルスを哺乳動物細胞に接種すると、細胞内に取り込まれることは以前より報告されていたが、多角体プロモーターは哺乳動物細胞内で機能しないこともあり外来遺伝子の発現は確認されていなかった。ところが、数年前に哺乳動物細胞で機能するプロモーターを組み込んだバキュロウイルスが、肝細胞特異的に外来遺伝子を効率よく発現できるという報告がなされた。³⁾ その後、多くのグループからさまざまな哺乳動物細胞株へも遺伝子導入が可能であることが示され、現在では培養株化細胞だけでなく、各種初代培養細胞などへの遺伝子導

入も可能であることが明らかにされている。バキュロウイルスは肝細胞などの細胞株にはきわめて効率よく遺伝子を導入できるが、すべての哺乳動物細胞株に遺伝子を導入できるわけではない。細胞への遺伝子導入効率を上げるためのいくつかの手法が報告されている。水痘性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質 (VSVG)、マウス肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質 (MHVS)、あるいは、バキュロウイルスの gp64 タンパク質を多角体プロモーターの下流に挿入し、さらに、リポーター遺伝子をニワトリのアクチンプロモーターの下流に組み込みこんだ組換えウイルスは、コントロールウイルスに比べて、500 倍も高い遺伝子導入効率を示した (図 1)。⁴⁾

In vivo での遺伝子導入

バキュロウイルスの *in vivo* における遺伝子導入は、血液中の補体成分によってウイルスが不活化されるため、それをなんとか克服する必要がある。これまでに補体の活性化を阻害する蛇毒因子や可溶性補体レセプター因子を用いてウイルスの不活化を抑制したり、⁵⁾ 補体制御因子である DAF と融合させた組換え gp64 タンパク質を持ったバキュロウイルスの作製⁶⁾ などが試みられているが、動物個体への遺伝子導入は満足の行くものではな

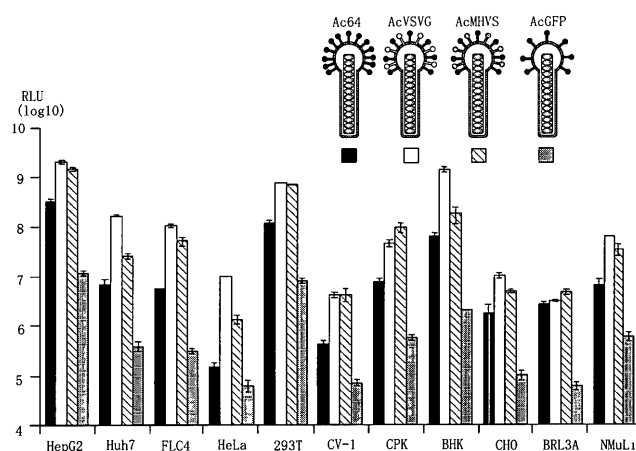


図 1 哺乳動物細胞における遺伝子導入効率。作製した組換えウイルスを各種細胞に細胞あたり 50 感染価 (moi 50) で接種し、24 時間後に感染細胞を回収し、ルシフェラーゼの活性を測定した。いずれの細胞においても、組換えウイルスが高い遺伝子導入活性を示した。

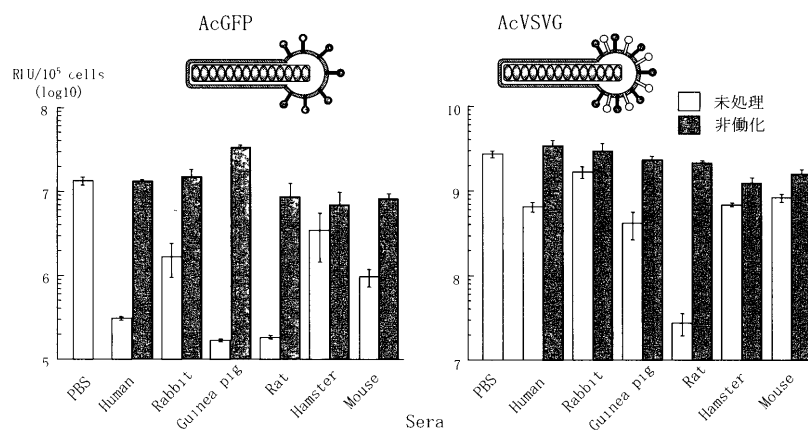


図2 バキュロウイルス感染における血清の影響 各種動物血清成分（ヒト，ウサギ，モルモット，ラット，ハムスター，マウス）を非働化したもの（■）と未処理のもの（□）をそれぞれバキュロウイルスと反応させた後，HepG2細胞へ接種し，遺伝子導入への影響を調べた。

かった。さまざまな動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を調べてみたところ，マウス以外の非働化していない動物血清はバキュロウイルスを不活化させたが，VSVGを被った組換えバキュロウイルスでは対照ウイルスに比べて血清成分に対して抵抗性を示した（図2）。

また，補体経路の活性化を抑制できる薬剤であるFUT-175 (6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate, フサン) は，濃度依存的に血清成分によるバキュロウイルスの不活化を阻害した。今後は，組換えバキュロウイルスとFUT-175のような薬剤との併用による方法により，動物個体への遺伝子導入も可能になるものと思われる。我々も組換えウイルスを用いてマウスの脳組織，および精巢のセルトリ細胞（図3）での遺伝子発現を認めている。⁷⁾

ターゲティング可能なベクターの開発

上述のように他のウイルスタンパク質を組み込むことによって広範な細胞に高率よく遺伝子導入できるベクターの開発とともに，ウイルス粒子表面に任意のタンパク質のみを提示させることによって，狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発も重要である。

gp64 タンパク質は動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して侵入するため，このままでは遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで，バキュロウイルスのgp64 遺伝子を欠損させ，ウイルス粒子表面に任意のタンパク質を自在に提示させることによって，狙った細胞だけに目的遺伝子を導入可能なターゲティングベクターの作製系を構築した。gp64の代わりにVSVGを被ったウイルスによる遺伝子導入は，抗

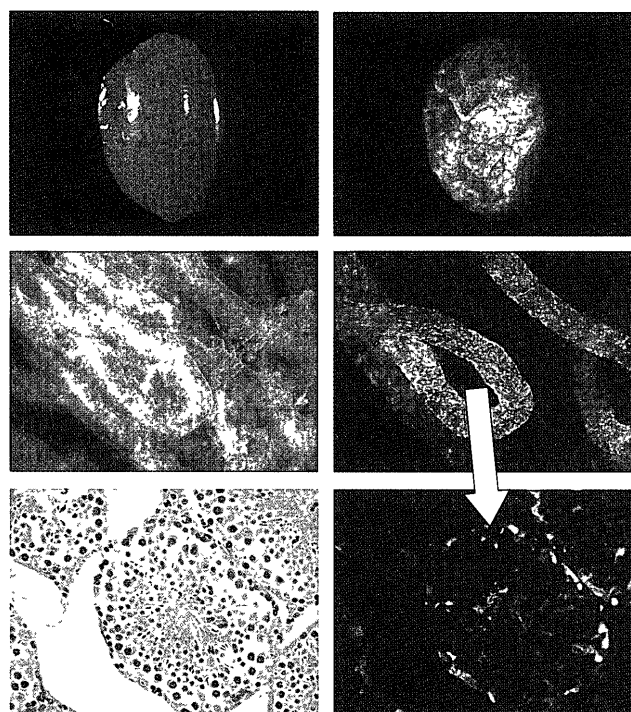


図3 *In vivo*におけるバキュロウイルス遺伝子導入。マウス精巣への導入 AcVSVG-CAGFPを 2×10^8 PFUで精巣管に沿って精巣に直接接種し，2日後に実体蛍光顕微鏡下でGFPの発現を確認した。精巣全体像（上），精巣管（中），精巣管の断面図（下）を示す。左は光学顕微鏡像，右は蛍光顕微鏡像。下左図はヘマトキシリン染色像。

gp64抗体では阻止できず，抗VSVG抗体で中和されたことから，設計どおりに粒子表面に発現させたVSVGを介して遺伝子が導入されていることが確認された。また，ウイルスのエンベロープタンパク質だけでなく，逆にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒

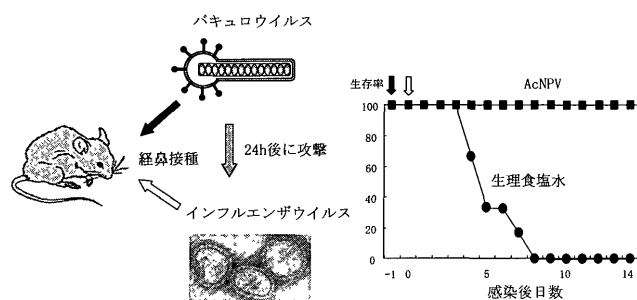


図4. バキュロウイルスによる自然免疫誘導. バキュロウイルス (10^8 PFU) をマウスに鼻腔内接種し, 24 時間後に致死量のインフルエンザウイルス (A/PR8) で攻撃した. バキュロウイルス接種群 (■) とコントロールとして等量の生理食塩水 (●) を鼻腔内接種したマウスの感染後, 14 日目までの生存率.

子表面に提示すれば, ウイルスに感染してエンベロープタンパク質を発現している細胞や癌細胞だけにチミジンキナーゼなどの自殺遺伝子を導入し, プロドラッグとの併用によって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる.

バキュロウイルスによる宿主応答

初代ラット培養細胞にバキュロウイルスを接種すると $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ の誘導が惹起されることが報告されており,⁸⁾ さらに, バキュロウイルスの感染細胞のエンベロープタンパク質画分をマウスの腹腔内に投与することによりインターフェロンの誘導が見られ, 脳筋炎ウイルスの致死感染からマウスが防御されることが報告されている.⁹⁾ 我々はバキュロウイルスを 24 時間前に鼻腔内投与したマウスが A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることを明らかにした (図4).¹⁰⁾

これまで多くのウイルスエンベロープタンパク質が自然免疫を誘導できることが報告されており, これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロープタンパク質が自然免疫を誘導することを支持するものであった. しかしながら, 我々はバキュロウイルスによる自然免疫の誘導がエンベロープタンパク質によるものではなく, 細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが toll-like receptor 9 (TLR9) を介してシグナルを核に伝達していることを明らかにした. 免疫担当細胞においてはエンベロープタンパク質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは, 主に分解経路に輸送され, 分解されたゲ

ノム DNA が, 細胞内に局在する TLR9 にシグナルを伝達しているものと思われる. この成績は, バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく, 接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである. このように免疫担当細胞に対しては, 細胞に侵入したバキュロウイルスゲノムが TLR9 を介して免疫遺伝子の発現を誘導するが, 遺伝子の発現は確認できない. 一方, 一般の細胞ではウイルスゲノムは核に移行し, 効率よく外来遺伝子が転写翻訳されるものと思われる.

バキュロウイルスが哺乳動物細胞に遺伝子を導入できることが明らかとなり, これまでに多くのグループによって効果的な利用法が検討されてきた. 特に, 肝細胞に効率よく遺伝子を導入できることを利用して, B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス¹¹⁾ の基礎研究への応用にも用いられている. 昆虫細胞で各種ウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を大量に産生することも可能であることから, 粘膜免疫の誘導を目的とした VLP ベクターや, バキュロウイルスの粒子表面に効率よく外来タンパク質を提示させるウイルスディスプレイシステム¹²⁾ の開発も期待される領域である. また, 昆虫細胞に哺乳動物細胞の糖鎖転移酵素遺伝子を導入したヒト化昆虫細胞の樹立も報告されており, ヒト型糖鎖を保持した組換えタンパク質の産生も期待される.¹³⁾ さまざまな可能性を秘めたバキュロウイルスベクターの今後の進展に期待したい.

文 献

- 1) 松浦善治: 蛋白核酸酵素, **37**, 211 (1992).
- 2) 松浦善治: 遺伝子導入と発現・解析法 (横田 崇, 新井賢一編) 羊土社, 東京 (1994).
- 3) Hofmann, C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10099 (1995).
- 4) Tani, H. et al.: *Virology*, **279**, 343 (2001).
- 5) Hofmann, C. and Strauss, M.: *Gene Ther.*, **5**, 531 (1998).
- 6) Hüser, A. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 451 (2001).
- 7) Tani, H. et al.: *J. Virol.*, **77**, 9799 (2003).
- 8) Beck, N. B. et al.: *Gene Ther.*, **7**, 1274 (2000).
- 9) Gronowski, A. M. et al.: *J. Virol.*, **73**, 9944 (1999).
- 10) Abe, T. et al.: *J. Immunol.*, **171**, 1133 (2003).
- 11) Shimoike, T. et al.: *J. Virol.*, **73**, 9718 (1999).
- 12) Grabherr, R. et al.: *Trends in Biotechnology*, **19**, 231 (2001).
- 13) Jarvis, D. L.: *Virology*, **310**, 1 (2003).