

導入遺伝子の発現制御を可能にする新規ボルナ病
ウイルスベクターREVec -L2b9 の開発

山本 祐介

目次

要旨	3
略語表	5
第一章 序論	6
1-1. ウイルスベクターの現状	6
1-2. ボルナ病ウイルス (BoDV)	6
1-3. ボルナ病ウイルスベクターの現状	9
1-4. ウイルスベクターの発現制御機構	10
1-5. リボスイッチ	11
1-6. 研究目的	12
第二章 実験材料と方法	14
2-1. 細胞	14
2-2. プラスミド	14
2-3. リバースジェネティクス法による REVec の作成	15
2-4. REVec の回収	15
2-5. ウイルス増殖動態の評価	16
2-6. 免疫蛍光染色法	16
2-7. ウェスタンブロットティング法	17
2-8. ルシフェラーゼアッセイ	17
2-9. リアルタイム PCR 法	18
2-10. 統計処理	18
第三章 結果	20
3-1. REVec-GLuc-L2b9 はウイルスベクターとしての機能を保持している	20
3-2. REVec-GLuc-L2b9s からの遺伝子発現は制御が可能である	23
3-3. REVec-GLuc-L2b9s の GLuc 発現制御は可逆的である	25
3-4. REVec-L2b9 システムは感染細胞の表現型制御が可能である	27

3-5. まとめ	31
第四章 考察.....	32
引用文献	36
謝辞	40

要旨

ウイルスベクターは効率的なジーンデリバリーシステムだが、多くのウイルスベクターは実用化する上で問題を抱えている。例えば、長期間の安定した遺伝子発現が不可能であることや宿主へのウイルス由来配列の挿入による変異原性、そして細胞傷害性などが挙げられる。また、ウイルスベクターの遺伝子発現をより効率的にし、かつ安全性を高めるには、外来遺伝子の発現制御機構を組み込む必要がある。

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus : BoDV) は一本鎖のマイナス RNA をゲノムに持つ RNA ウイルスであり、細胞傷害性が極めて低い。また、宿主の細胞核内で長期間持続感染する、そして宿主域が非常に広いといったウイルスベクターに適した性質を持つ。BoDV をもとにしたウイルスベクターとして RNA virus-based episomal vector (REVec) が開発されている。REVec は導入遺伝子の発現を長期間持続できる優れたウイルスベクターで、より安全性を高める研究が進んでいる。しかしながら、REVec を実用化する上において遺伝子発現制御機構を持たないことが大きな障害となっている。

RNA ウイルスベクターである REVec に適した遺伝子発現制御機構として、テオフィリン依存的な自己開裂型リボスイッチ、L2bulge9 (L2b9) を見出した。本研究では、REVec に L2b9 による遺伝子発現制御機構を組み込んだ新しい RNA ウイルスベクター、REVec-L2b9 の開発に成功した。レポーター遺伝子である GLuc (*Gaussia Luciferase*) の 3 末端非翻訳領域に L2b9 を導入した REVec-GLuc-L2b9 から発現するルシフェラーゼ活性はテオフィリン非存在下で抑制され、テオフィリン存在下で亢進した。また、L2b9 による発現制御は GLuc mRNA へのみ起こり、mRNA と同じプラス鎖 RNA である REVec のアンチゲノム RNA の発現量には影響を及ぼさなかった。さらに、REVec-GLuc-L2b9 の発現制御は一度テオフィリン処理を行うともとに戻らない不可逆性のものではなく、テオフィリンを除去することで再び発現抑制が戻る可逆性の制御であることも明らかにした。

次に、REVec-L2b9 に small GTPase の一種である Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1) の恒常活性型変異体、RacQ61L を導入し、細胞膜に形成されるひだ状構造 (ruffling) の

発現制御を試みた。REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞にテオフィリン処理を行うと、ruffling を形成する細胞数が増加することが判明した。また、REVec-RacQ61L-L2b9x2 においても、L2b9 による発現制御は RacQ61L mRNA にのみ起こり、REVec のアンチゲノム RNA 量には影響を及ぼさなかった。さらに、テオフィリン処理を行った REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞からテオフィリンを除去すると、約 1 日で ruffling を形成した細胞数がコントロールと同等のレベルまで減少した。

以上の結果から、本研究により樹立した新しい RNA ウイルスベクターシステム、REVec-L2b9 は導入遺伝子の発現制御に極めて有効であると考えられた。REVec-L2b9 は安全かつ効率的な RNA ウイルスベクターとして、今後、中枢神経系疾患の遺伝子治療や、*ex vivo* での細胞治療などへの応用が見込まれる。

略語表

AAV : Adeno-associated Virus

BoDV : Borna disease virus

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

FCS : fetal calf serum

GLuc : *Gaussia* Luciferase

GOI : Gene of interest

L2b9 : L2bulge9

REVec : RNA virus-based Episomal Vector

Rac1 : Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1

UTR : Untranslated region

第一章 序論

1-1. ウイルスベクターの現状

遺伝子を導入することで病態の改善を目的とする遺伝子治療や細胞に遺伝子導入などの改変を行い移植する細胞治療の実現には、効率的で安全なジーンデリバリーシステムが必要である。遺伝子導入には大きく分けて、化学的手法、物理的手法、生物学的手法の3種類が存在する。化学的手法としてリポフェクション法等が、物理的手法としてマイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等が、そして生物学的手法として様々なウイルス由来のシステム、ウイルスベクターが利用されている。ウイルスベクターは3種の遺伝子導入の手法では最も遺伝子導入効率が高く、代表的なものにアデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられる¹⁻³。これらウイルスベクターは基礎研究のみならず臨床研究においても利用されており、様々な遺伝子の導入に成功した報告がなされている。一方、これらのウイルスベクターには細胞傷害を惹起する、遺伝子発現が一時的で持続的なものではない、宿主のゲノムにウイルスベクター由来の配列が組み込まれ挿入変異を起こす可能性がある、といった欠点も存在している(図 1-1)。さらに、導入した遺伝子を常に過剰発現させている場合、有害な副作用を引き起こす可能性がある。そのためウイルスベクターには導入遺伝子の発現を適切なタイミング、適切な発現量にコントロールできる機構を備えている必要がある。

1-2. ボルナ病ウイルス (BoDV)

BoDVは、エンベロープに覆われた非分節型のマイナス鎖、約8.9kbのRNAをゲノムに持つモノネガウイルス目 (*Mononegavirales*) ボルナウイルス科 (*Bornaviridae*) オルソボルナウイルス属 (*Orthobornavirus*) に属するRNAウイルスである(図 1-2)。BoDVの主な自然宿主はウマやヒツジで、急性感染したウマでは進行性の髄膜脳脊髄炎や抑うつ等の神経症状を惹起し、多くが死亡する。他にもネコやウシにおいても神経疾患を引き起こすことが知られて

いるが、ヒトにおいては BoDV の感染と神経疾患に相関は確認されていない。BoDV のゲノムは 6 つのタンパク質をコードしており、N タンパク質 (nucleoprotein)、P タンパク質 (phosphoprotein)、M タンパク質 (matrix protein)、G タンパク質 (glycoprotein)、L タンパク質 (large protein) は構造タンパク質、X タンパク質は非構造タンパク質である。これらの構造タンパク質の中で、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質は BoDV の複製および転写に必須のタンパク質である。BoDV のリボヌクレオタンパク質 (RNP) 複合体は、N タンパク質および RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 複合体を含有している。RdRp 複合体は P タンパク質および L タンパク質から構成され、BoDV ゲノム RNA の複製および転写に関与している。非構造タンパク質である X タンパク質は、RdRp 複合体に対して強力な阻害活性を有している。M タンパク質はウイルス粒子の構築および宿主細胞からの出芽 (budding) に重要な役割を果たしている。また、BoDV 粒子表面に存在する G タンパク質は、標的細胞への侵入に関与している。

BoDV はいくつかの興味深いウイルス学的特徴を備えている (図 1-1)。BoDV は他の動物由来モノネガウイルスと異なり宿主細胞の核内で増殖・複製を行い、宿主細胞に与える細胞傷害は微弱である⁴。また、BoDV の RNP は宿主染色体と相互作用することで、核内での長期間の持続感染を可能にしている⁵。宿主ゲノムへ BoDV に由来する配列の組込みが発生することも報告されているが⁶、レトロウイルスや DNA ウイルスに比べその確率は極めて低い⁷。さらに、BoDV は中枢神経指向性を持ち、様々な生物種に感染することが可能である。以上の特徴から、BoDV は長期間の安定かつ効率的な遺伝子導入を可能にする安全なジーンデリバリーシステムとなりうる可能性を秘めている。

	レンチウイルス	アデノウイルス	AAV	BoDV
ゲノム	ssRNA	dsDNA	ssDNA	ssRNA
導入遺伝子 サイズ	約 8 kb	約 8 kb	約 4.7 kb	約 3 kb
長期持続発現	可	不可	可 (分裂細胞では 一過性)	可
染色体への 挿入	100 %	1 %	1 %	< 0.1 %
細胞傷害性	なし	あり	なし	なし

図 1-1. 各種ウイルスベクターの特徴と欠点

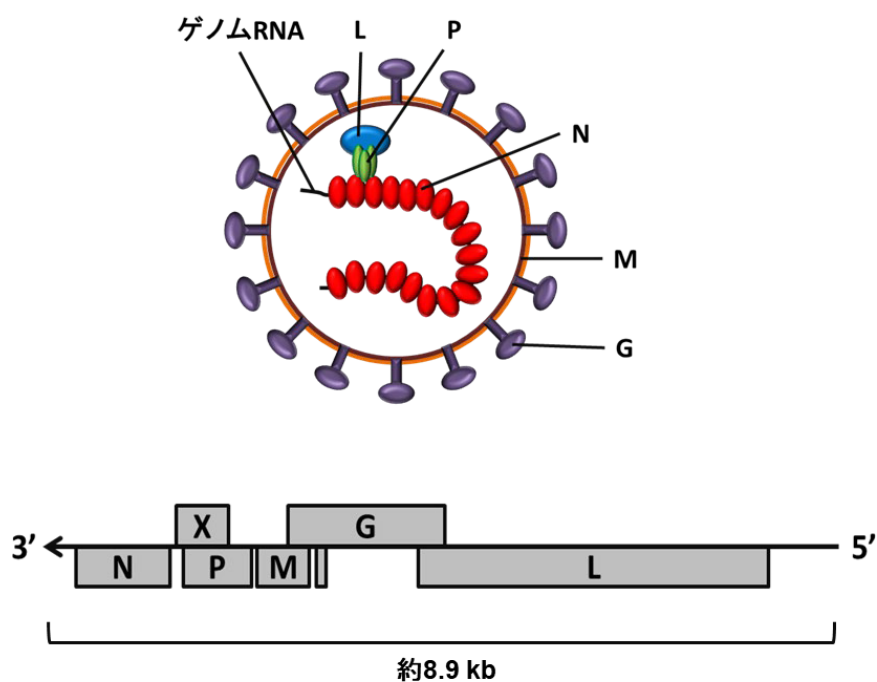


図 1-2. BoDV 粒子および BoDV ゲノム構造の模式図

BoDV はエンベロープを持つ球形の粒子であり、粒子内には N タンパク質に覆われたゲノム RNA が存在する。BoDV のゲノムは約 8.9 kb のマイナス鎖 RNA であり N、X、P、M、G、L の 6 つのタンパク質をコードしている。

1-3. ボルナ病ウイルスベクターの現状

私が所属している研究室では、BoDV をもとにしたウイルスベクターである REVec を開発し報告した⁸。REVec は、BoDV のゲノム中の P タンパク質コード領域と M タンパク質コード領域の間に、任意の遺伝子を発現できるカセットを組み込んでいる (図 1-3)。REVec に GFP 遺伝子を挿入した組換えウイルスベクター、REVec-GFP は培養細胞およびマウスの脳組織中で長期間の GFP 発現を可能にした。さらに、REVec はマイクロ RNA (miRNA) の発現によるターゲット遺伝子のサイレンシングや、分化能を妨げることなくヒト多能性幹細胞 (iPSCs) やヒト由来間葉系幹細胞への持続的遺伝子導入に成功したという報告がなされている⁹⁻¹¹。

REVec の改良型として、REVec ゲノムから M 遺伝子と G 遺伝子を欠落させた REVec Δ MG が存在する(図 1-3)¹²。BoDV の M タンパク質および G タンパク質はウイルス粒子の形成やウイルスの伝播に関与しており、また細胞傷害を引き起こす可能性も報告されている。つまり、伝播型 (transmission-competent) である REVec よりも非伝播型(transmission-defective) である REVec Δ MG はより安全性の高いウイルスベクターであると考えられる。

REVec は様々な用途に利用できる、安全性の高い RNA ウイルスベクターである一方、欠点も存在する。その中で REVec 実用化に向けて最も大きな障害であると思われるのは、導入遺伝子発現の制御がまだ実現できていないことである。

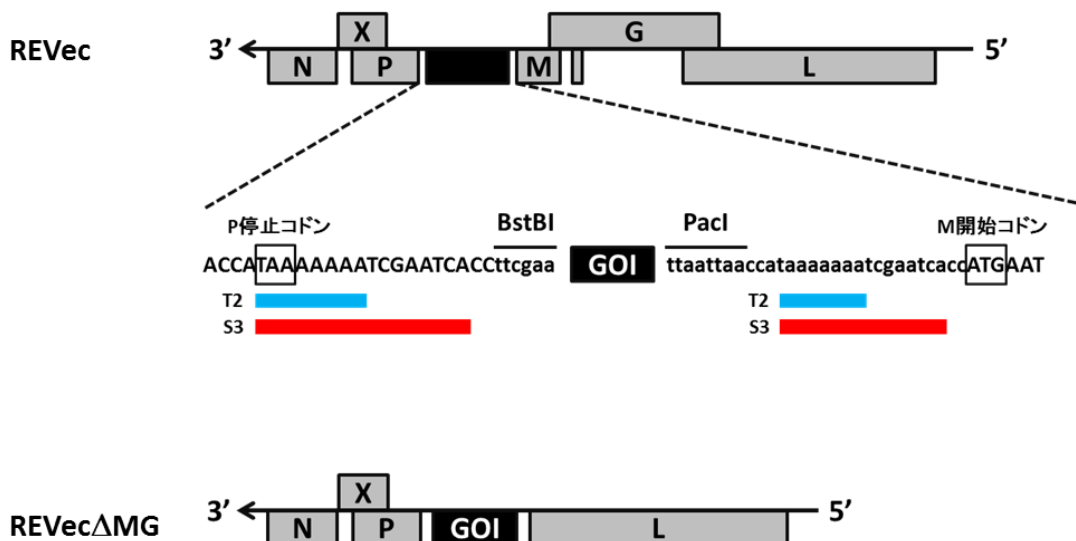
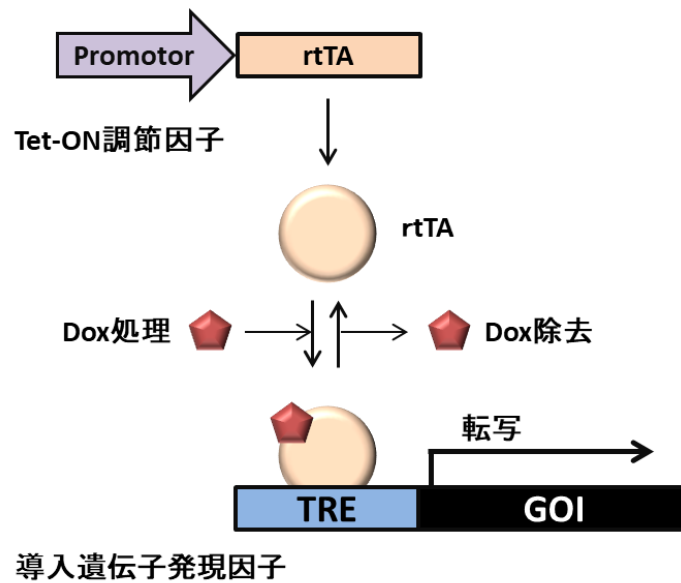


図 1-3. REVec および REVecΔMG のゲノム構造概略図

REVec は P 遺伝子 - M 遺伝子間に導入遺伝子発現カセットが存在する。この発現カセットは遺伝子発現のために転写開始シグナル (S3)、転写終結シグナル (T2) および制限酵素サイト (BstBI、PacI) を有する。REVecΔMG は REVec から M 遺伝子および G 遺伝子を除去することで、ウイルスベクターの伝播を防いでいる。

1-4. ウイルスベクターの発現制御機構

現在、遺伝子発現制御機構として最も広く利用されているのはテトラサイクリン (Tet) 発現誘導システムである (図 1-4)。Tet システムは Tet リプレッサータンパク質と Tet オペレーターDNA 配列を基にした転写制御システムで、テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリンに対して濃度依存的に下流遺伝子の転写を制御する。Tet システムはウイルスベクターの発現制御機構としても利用されており、AAV ベクター¹³、アデノウイルスベクター¹⁴、レンチウイルスベクター¹⁵⁻¹⁷、レトロウイルスベクター¹⁸ で遺伝子発現制御の成功が報告されている。Tet システムは有用な発現制御機構であるが、REVec のようにレトロウイルスでない RNA ウイルスは、ゲノム複製のステージで DNA を介さないため、DNA の形態で機能する Tet システムは RNA ウイルスベクターには不適な発現制御機構である。つまり、REVec に適した発現制御機構は RNA の形態で機能するものでなくてはならない。



導入遺伝子発現因子

図 1-4. Tet-ON システムの模式図

Tet-ON システムは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) とテトラサイクリン応答因子 (TRE) からなる転写制御システムである。テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) を添加すると、rtTA が TRE と結合して下流の遺伝子発現を誘導する。

1-5. リボスイッチ

RNA の形態で作用する遺伝子発現制御機構としてリボスイッチが考えられる。リボスイッチとは RNA がとる構造で、リガンドと結合し転写、翻訳、スプライシング、または mRNA の安定性を制御することで遺伝子発現の制御を行う¹⁹。自然界では主に細菌類や糸状菌²⁰、緑藻²¹、高等植物^{22,23} でチアミンピロリン酸 (Thiamine pyrophosphate) リボスイッチを利用した発現制御が行われている。近年、人工的に合成されたリボスイッチの研究も進んでおり、例えば酵母でテトラサイクリン依存型人工リボスイッチを用いた発現制御に成功している

^{24,25}。

1-6. 研究目的

本研究では、REVec を用いて導入遺伝子発現の制御を可能にすることを目的に、リボスイッチである L2bulge9 (L2b9) の検討を行った。L2b9 は、テオフィリン依存型アプタマーと自己開裂型リボザイムから構成される人工合成の ON リボスイッチである²⁶ (図 1-5)。テオフィリン非存在下では自己開裂型リボザイムが活性化しており、自己開裂することで mRNA のポリ A 鎖が除去され、mRNA の分解を惹起し遺伝子の発現を OFF 状態に誘導する。一方、テオフィリン存在下ではアプタマー部位にテオフィリンが結合することでリボザイムのコンフォメーションが変化し、リボザイムが不活性化する。その結果 mRNA は安定化し、遺伝子の発現が ON 状態に誘導される。L2b9 は既に哺乳類細胞で機能することが確認されていたため、遺伝子発現制御が可能な REVec を作成する上で最適なリボスイッチであると考えられた。そこで REVec と L2b9 を用いて、導入遺伝子の発現制御機構を備えた、新たな REVec システムの作成を試みることにした。

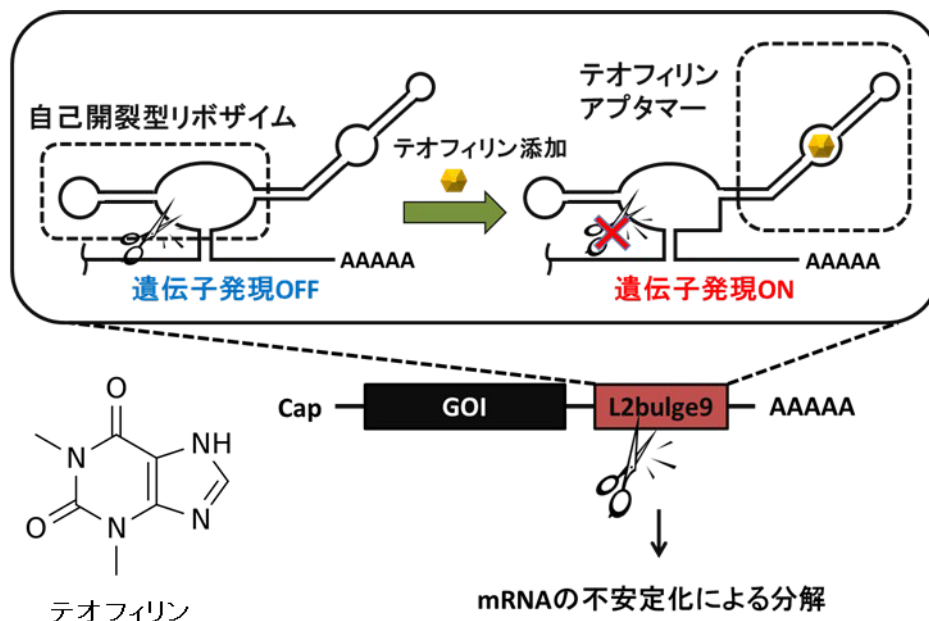


図 1-5. L2b9 による遺伝子発現制御機構の概略図

L2b9 は自己開裂型リボザイムとテオフィリンアプタマーからなる ON リボスイッチである。リガンドとなるテオフィリンはカフェインの構造類縁体で、医薬品として気管支喘息や慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの呼吸器系疾患の治療に用いられている。テオフィリン非存在下ではリボザイムが自己開裂し、mRNA の分解を誘導する。一方テオフィリンを添加するとリボザイムのコンフォメーションが変化し、自己開裂活性が抑制され、遺伝子発現が誘導される。

第二章 実験材料と方法

2-1. 細胞

ピューロマイシン耐性の Vero 細胞 (Vero/puro) は 2% FCS を含む DMEM 培地 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で培養した。293T 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地で培養した。全ての細胞は 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

2-2. プラスミド

遺伝子発現カセットを導入した BoDV ゲノムをコードするプラスミド、pBoDV は以前の論文で使用されたものを用いた⁸。自己開裂型リボスイッチ、L2bulge9 (L2b9) はプライマーを用いて PCR で新規合成した。分泌型ルシフェラーゼである GLuc 遺伝子は PCR を用いて L2b9 と融合させ、GLuc-L2b9x1、GLuc-L2b9x2 および GLuc-L2b9x3 を作製した。pBoDV-GLuc-L2b9x1、pBoDV-GLuc-L2b9x2 および pBoDV-GLuc-L2b9x3 は pBoDV の BstBI、PacI 制限酵素サイトにそれぞれ GLuc-L2b9 配列を導入することで作製した。Rac1 遺伝子は 293T 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で作成した cDNA からクローニングを行った。PCR を用いて Rac1 配列の 181 番目から 183 番目であるコドン CAA を CTG に置き換え、Rac1 の恒常活性変異体 RacQ61L を作製した。pBoDV-RacQ61L-L2b9x2 は pBoDV-GLuc-L2b9x2 の BstBI、SbfI 制限酵素サイトに RacQ61L 配列を導入することで作製した。使用したプライマーは表 1 に示した。

2-3. リバーシジェネティクス法による REVec の作製

6-well プレートに播種した 293T 細胞に pBoDV プラスミドおよび BoDV の N、P、L 遺伝子をそれぞれコードしたヘルパープラスミドを Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 3 日後に 293T 細胞の半量を 10 cm ディッシュに播種した。1 日後、Vero/puro 細胞を 293T 細胞に重層し共培養を行った。この共培養の過程で、293T 細胞で生産された REVec を Vero/puro 細胞へと伝播させる。共培養細胞は 3 日毎に継代とピューロマイシンの添加を行い、徐々に REVec 感染 293T 細胞を排除した。数週間の継代後、感染率 100%の REVec 感染 Vero/puro 細胞を得た。この手法で REVec-GFP、REVec-GLuc、REVec-GLuc-L2b9×1、REVec-GLuc-L2b9×2、REVec-GLuc-L2b9×3、REVec-RacQ61L、REVec-RacQ61L-L2b9×2 を新規に作製することに成功した。REVec 形成の可否は免疫蛍光染色法により評価した。

2-4. REVec の回収

REVec 感染 Vero/puro 細胞を 50 mL チューブに回収し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄した。洗浄後、2% FCS を含む DMEM を添加し超音波処理で細胞を破砕し、遠心分離により細胞由来のデブリを除去した。遠心分離後の上清をスクリーキャップチューブに分注し、ウイルスストックとした。ウイルスストックは-80 °C で保存した。

2-5. ウイルス増殖動態の評価

24-well プレートに播種した Vero/puro 細胞に REVec を 37°C、感染効率 (MOI) 0.01 で感染させ、1 時間後に細胞を PBS で洗浄した。REVec 感染 Vero 細胞は 3 日毎に継代を行い、継代の際に感染細胞 2×10^4 細胞/well を 8-well チャンバースライドに播種した。チャンバースライドへの播種 24 時間後に細胞を免疫蛍光染色法を用いて観察し、細胞の感染率を測定した。

2-6. 免疫蛍光染色法

8-well チャンバースライドに播種した REVec 感染 Vero/puro 細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 20 – 30 分固定後、0.25% Triton X-100/PBS で 10 分間透過処理を行った。透過処理後、Rabbit 抗 BoDV P 抗体で 1 時間、Alexa Fluor 555-conjugated Goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) 及び DAPI で 1 時間反応させた。図 3-4-2 A の REVec-GLuc-L2b9×2、REVec-RacQ61L-L2b9×2、REVec-RacQ61L 感染 Vero/puro 細胞は透過処理後、Rabbit 抗 BoDV P 抗体で 1 時間、Acti-stain 488 phalloidin (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, United States)、DAPI 及び Alexa Fluor 555-conjugated Goat anti-rabbit IgG で 1 時間反応させた。染色した細胞の画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, Shinagawa, Japan) で取得した。また、図 3-4-2 A はシングルセルのみを探索して画像を取得した。

2-7. ウェスタンブロッティング法

REVec 感染 Vero 細胞を SDS サンプルバッファーに溶解させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) に供した。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写し 1 時間のブロッキング後、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 を含む トリス緩衝生理食塩水 (TBS) でメンブレンを洗浄後、horseradish peroxide-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, Waltham, MA, United States) を室温で 1 時間反応させた。抗体の検出には ECL Prime Western Blotting System (GE Healthcare Bioscience, Piscataway, NJ, United States) 及び LAS-4000 Mini Lumino Image analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いた。一次抗体は下記を使用した。

Anti-BoDV N antibody (HN132)

Mouse anti-GFP antibody (JL-8) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)

Mouse anti-tubulin antibody (B-5-1-2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States)

2-8. ルシフェラーゼアッセイ

テオフィリン (Wako, Osaka, Japan) は 2% FCS を含む DMEM に溶解させた。REVec 感染 Vero 細胞を 48-well プレートにそれぞれ 4×10^4 細胞/well ずつ播種し、3 時間後に培地をテオフィリンを添加した DMEM に入れ替えた。培地交換 24 時間後に培地上清を回収し、Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Bad WildBad, Germany) 及び Biolum *Gaussia* Luciferase Assay Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, United States) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同時に well 毎の細胞数を測定し、ルシフェラーゼ活性を細胞数で補正した。

2-9. リアルタイム PCR 法

REVec 感染 Vero 細胞の全 RNA を TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, United States) を用いて抽出し、Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) で全 RNA から cDNA を逆転写した。REVec のゲノム RNA 及びアンチゲノム RNA の量は、蛍光ラベルプローブと Rotor Gene Q 2plex HRM system (QIAGEN, Hilden, Germany)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて定量した。GLuc mRNA の発現量は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて定量した。用いたプライマーは表 1 に示した。

2-10. 統計処理

統計処理が必要な実験結果は two-tailed Student's t-test、図 3-2-1 A と図 3-2-2 に関しては One-way ANOVA および Tukey's test を用いて統計処理を行った。アスタリスクは有意差 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$; n.s., not significant を示した。

表 1. 本研究に用いたオリゴヌクレオチド配列

L2b9 合成用プライマー

	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
L2b9 _F	AAACAAACAAAGCTGTCACCGGATGTGC TTTCCGGTCTGATGAGTCCGTT	AAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATTGG ACAACGGACTCATCAGACCGGA
L2b9 _R	TCGTCTTGATGCCCTTGGCAGTGGATGG GGACGGAGGACGAAACAGCAAA	TTAATTAATAAAAAAAAAAATTTTATTTTTCT TTTTGCTGTTTCGTCTCCGTT

REVec P-M 間増幅用プライマー

	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
P/M	GACCTCCTCTACGCATCAAC	CATCCAGGGACGATTACCTT

RT-PCR 用プライマー

	Sequence 5' to 3'
REVec-genome-RT	GTTGCGTTAACAACAAACCAATCAT
REVec-antigenome-RT	TGCGCTACAACAAAGCAACAACC

リアルタイム PCR 用プライマー

	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
<i>REVec</i>	ATGCATTGACCCAACCGGTA	ATCATTCGATAGCTGCTCCCTTC
<i>GLuc</i>	ACCTACGAAGGCGACAAAGA	TTGTGCAGTCCACACACAGA
<i>β-Actin</i>	GCGCGGCTACAGCTTACCAC	GGGCGCCAGGGCAGTAATCTC
<i>Rac-L2b9</i>	CTTTGTTTGTGTTGTCGAGAAA	TTGTTTGTTCCTGCAGGTTA

リアルタイム PCR 用プローブ

	Sequence 5' to 3'
REVec-probe	FAM-AGAACCCCTCCATGATCTCAGACCCAGA-TAMRA

第三章 結果

3-1. REVec-GLuc-L2b9 はウイルスベクターとしての機能を保持している

導入遺伝子発現を制御可能な REVec を作製するため、既存の REVec プラスミド pBoDV の P-M 間に GLuc-L2b9s 配列を導入した。GLuc-L2b9s 配列は GLuc 遺伝子の 3' UTR に L2b9 配列を 1 つから 3 つ融合させたものである。これにより REVec プラスミド、pBoDV-GLuc、pBoDV-GLuc-L2b9x1、pBoDV-GLuc-L2b9x2、pBoDV-GLuc-L2b9x3 を得た。これらプラスミドの BoDV ゲノム構造は図 3-1-1 A に示した。

得られた REVec プラスミドを用いて、リバーシジェネティクス法により新規の REVec を作成した (図 3-1-1 B)。作成した REVec は、ウエスタンブロッティング法によりウイルス由来のタンパク質の形成を確認した (図 3-1-2 A)。また、REVec 感染 Vero 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応によりそれぞれの REVec の cDNA を作成した。これらの cDNA を鋳型に、REVec の P-M 間の配列を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動で導入した GLuc-L2b9x1、GLuc-L2b9x2、GLuc-L2b9x3 の配列が保持されていることを確認した (図 3-1-2 B)。また REVec-GLuc-L2b9s の増殖動態を評価するため、Vero 細胞に REVec-GLuc-L2b9s を MOI = 0.01 で感染させ 3 日毎に感染率を測定した (図 3-1-2 C)。REVec-GLuc-L2b9s の増殖動態は、REVec-GFP や REVec-GLuc といった L2b9 を有しない REVec のものとほぼ同じ傾向を示した。

以上の結果より、REVec への L2b9 の導入はウイルスの複製に影響を及ぼさず、P-M 間の導入遺伝子も保持されていることが確認された。

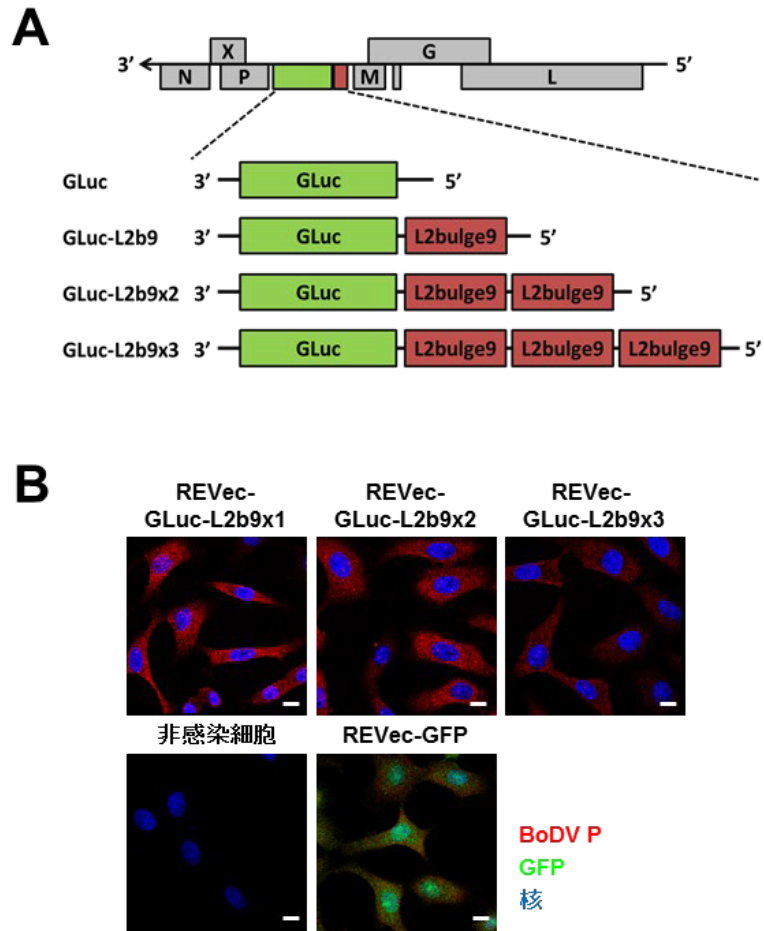


図 3-1-1. REVec-GLuc-L2b9 の作成 1

(A) REVec-GLuc、REVec-GLuc-L2b9x1、REVec-GLuc-L2b9x2 および REVec-GLuc-L2b9x3 のゲノム構造概略図。(B) 免疫蛍光染色法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で REVec-GLuc-L2b9 感染 Vero 細胞を観察した。白線は 10 μm を示す。

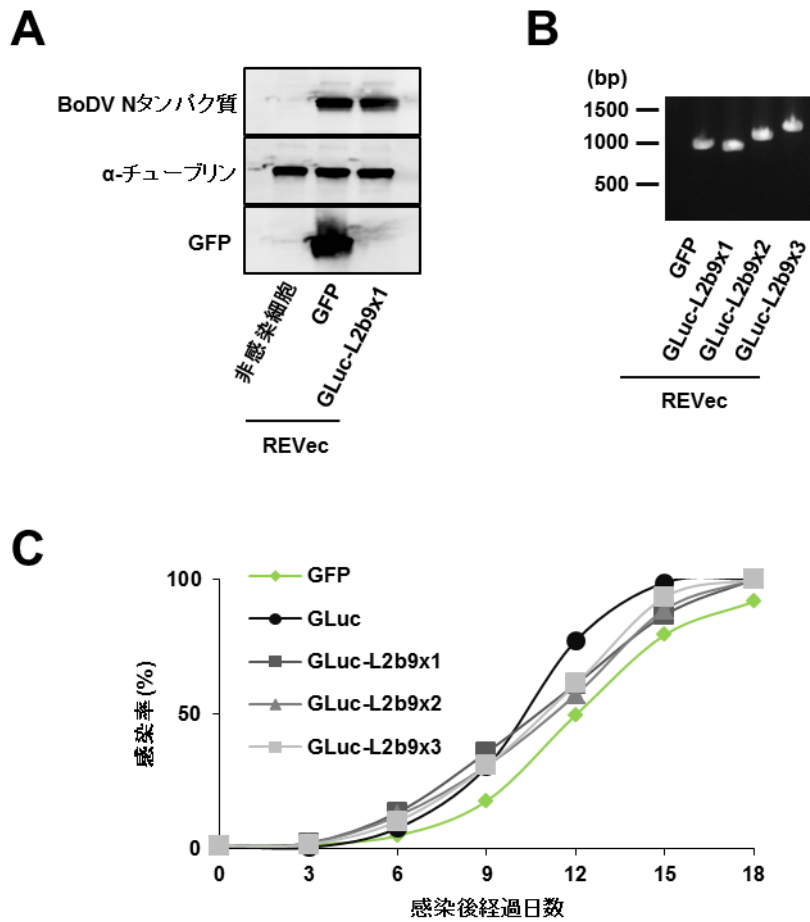


図 3-1-2. REVec-GLuc-L2b9 の作成 2

(A) REVec-L2b9 感染 Vero 細胞中の BoDV N タンパク質発現をウエスタンブロッティング法で評価した。(B) REVec-L2b9 ゲノム中の外来遺伝子発現カセット配列を確認した。REVec-L2b9 感染 Vero 細胞から全 RNA を抽出し、逆転写反応で REVec ゲノムの cDNA を作成した。(C) REVec-GFP、REVec-GLuc 及び REVec-GLuc-L2b9s の増殖動態を観察した。Vero 細胞に REVec をそれぞれ MOI = 0.01 で感染させ、3 日毎に免疫蛍光染色法で感染率を測定した。

3-2. REVec-GLuc-L2b9s からの遺伝子発現は制御が可能である

次に、REVec-GLuc-L2b9s 感染 Vero 細胞に L2b9 のリガンドであるテオフィリンを加えることで、GLuc の発現を制御することが可能であるか評価するためにルシフェラーゼアッセイを行った。テオフィリン処理条件下では、いずれの REVec-GLuc-L2b9 感染細胞においても、テオフィリン濃度依存的にルシフェラーゼ活性の向上が見られた (図 3-2-1 A)。また、テオフィリン未処理条件下の REVec-GLuc-L2b9x1 と REVec-GLuc-L2b9x3 のルシフェラーゼ活性を比較すると、REVec-GLuc-L2b9x3 の方がよりルシフェラーゼ活性が低下していることが確認された (図 3-2-1 B)。この結果は REVec に導入する L2b9 の数を増やすことで、より OFF 状態における遺伝子発現を抑えられる可能性を示唆する。一方、10 mM テオフィリン処理を行った REVec-GLuc-L2b9x1 と REVec-GLuc-L2b9x3 のルシフェラーゼ活性を比較すると、有意差は認められなかった (図 3-2-1 C)。仮説では GLuc-L2b9 の mRNA にテオフィリンが結合することで mRNA の安定化し、ルシフェラーゼ活性が向上しているはずである。そこでリアルタイム PCR 法を用いて、テオフィリン処理または未処理の REVec-GLuc-L2b9 感染 Vero 細胞中の GLuc mRNA 量を測定した (図 3-2-2 A)。その結果、REVec ゲノム RNA あたりの GLuc mRNA 量がテオフィリン濃度依存的に増加していることが確認された。

一方、mRNA 中で L2b9 が機能しているならば、同じプラス鎖 RNA である REVec アンチゲノム RNA 中においても L2b9 が機能している可能性が考えられる。そこでリアルタイム PCR 法を用いて、テオフィリン処理または未処理の REVec-GLuc-L2b9s 感染 Vero 細胞中の REVec アンチゲノム RNA 量およびゲノム RNA 量を測定した (図 3-2-2 B)。その結果、REVec ゲノム RNA あたりの REVec アンチゲノム RNA 量はテオフィリン処理による L2b9 の発現制御の影響を受けていないことが確認された。

以上の結果より、仮説通り REVec-GLuc-L2b9s 由来の GLuc mRNA がテオフィリン処理により安定化されることで、GLuc 発現を誘導できることが示唆された。

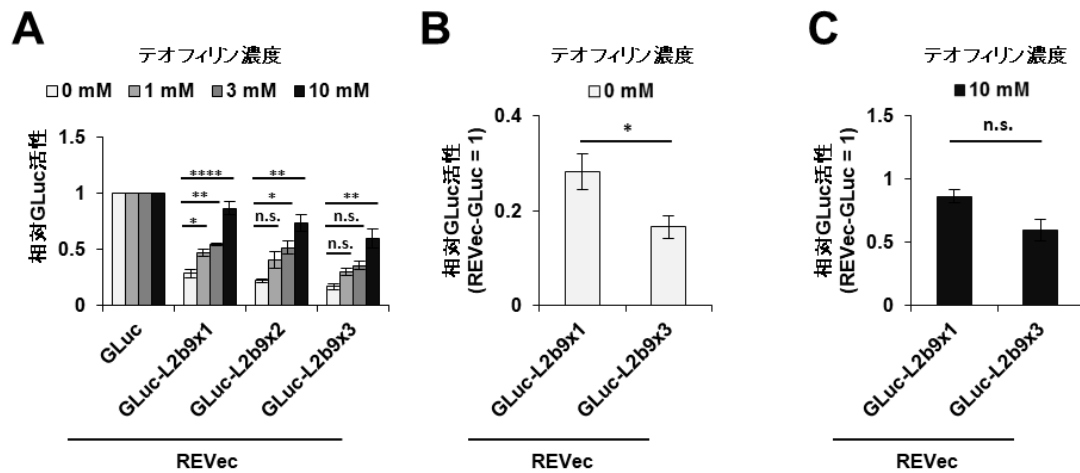


図 3-2-1. REVec-GLuc-L2b9 はテオフィリン濃度依存的にルシフェラーゼ活性を制御した。

(A) REVec-GLuc-L2b9 感染 Vero 細胞を 0、1、3 または 10 mM のテオフィリンで 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は細胞数で補正した後、それぞれのテオフィリン濃度の REVec-GLuc を 1 とした相対値を算出した。(B) テオフィリン未処理の REVec-GLuc-L2b9x1 および REVec-GLuc-L2b9x3 感染 Vero 細胞の相対ルシフェラーゼ活性を比較した。(C) 10 mM テオフィリン処理した REVec-GLuc-L2b9x1 および REVec-GLuc-L2b9x3 感染 Vero 細胞の相対ルシフェラーゼ活性を比較した。(B)および(C)の相対ルシフェラーゼ活性は同濃度で処理した REVec-GLuc 感染 Vero 細胞のルシフェラーゼ活性を 1 としたものである。

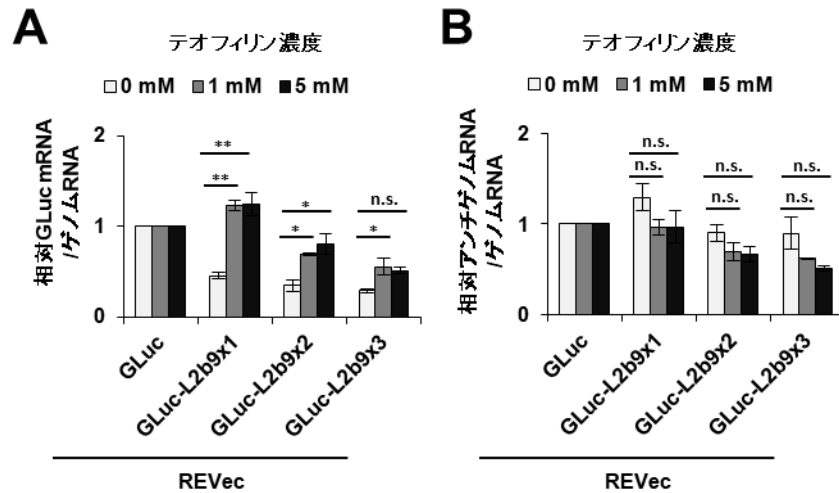


図 3-2-2. L2b9 はテオフィリン処理により GLuc mRNA の安定性を制御した

(A,B) REVec-GLuc-L2b9 感染 Vero 細胞を 0、1 または 5 mM テオフィリン処理し、リアルタイム PCR 法で RNA 発現を定量した。いずれの RNA 発現量も REVec ゲノム RNA 発現量で補正した。(A) GLuc mRNA 発現量。(B) REVec アンチゲノム RNA 発現量。

3-3. REVec-GLuc-L2b9s の GLuc 発現制御は可逆的である

前節の結果より、REVec-GLuc-L2b9s は感染細胞中でテオフィリン投与により GLuc 発現を誘導できることが判明した。この発現誘導が可逆的であるなら、REVec-L2b9 システムのさらなる有用性を示すことができる。そこで、REVec-GLuc-L2b9 の発現誘導が可逆的であるか否かを検証するためにルシフェラーゼアッセイを行った (図 3-3 A,B)。このルシフェラーゼアッセイは、REVec-GLuc-L2b9x2 感染 Vero 細胞を 24 well プレートに播種した日を 0 日とし、24 時間テオフィリン添加培地で培養後、培地上清をサンプルとして回収した。同時に培地をテオフィリン未添加培地に変更し、さらに 24 時間後培地上清をサンプルとして回収し、サンプルのルシフェラーゼアッセイを行った。テオフィリン処理サンプルを Day 1 サンプル、テオフィリン未処理サンプルを Day 2 サンプルとした。Day 1 サンプルはテオフィリン処理によりルシフェラーゼ活性の向上が見られた一方、Day 2 サンプルはルシフェラーゼ活性がテオフィリン未処理サンプルと同程度まで回復していることが確認された。

この結果より、テオフィリン処理による REVec-L2b9 の導入遺伝子発現制御は可逆的であることが示唆された。

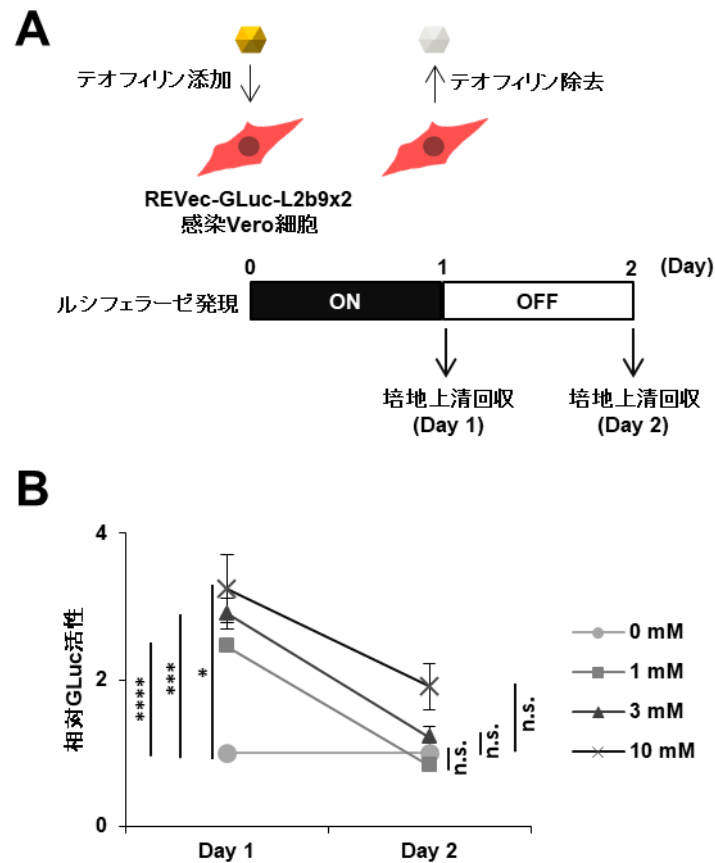


図 3-3. REVec-GLuc-L2b9 は GLuc 発現を可逆的に制御した

(A) REVec-GLuc-L2b9x2 感染 Vero 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイのタイムコースを示した。テオフィリン処理 24 時間後に培地上清を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した (Day 1 サンプル)。また同時にテオフィリンを含まない培地に交換し、24 時間後ルシフェラーゼ活性を測定した (Day 2 サンプル)。(B) Day 1 サンプルと Day 2 サンプルの相対ルシフェラーゼ活性を評価した。ルシフェラーゼ活性は細胞数で割った後、テオフィリン未処理のものを 1 とした相対値を算出した。

3-4. REVec-L2b9 システムは感染細胞の表現型制御が可能である

ここまでの結果から、REVec-L2b9 システムはテオフィリン処理により導入遺伝子発現の制御が可能であり、またその制御は可逆的であることが判明した。しかし、ここまでの実験結果はレポーター遺伝子によるものであり、REVec-L2b9 が生物学的プロセスの制御にまで応用可能であるか否かは不明であった。そこで REVec-L2b9 システムに Rac1 遺伝子を導入し、細胞の表現型制御を試みた。Rac1 は small GTPase の一種で様々な生物学的プロセスに関与しているが、この実験ではその内の細胞膜のひだ状構造 (ruffling) を形成する機能に着目した²⁷。Rac1 の恒常活性型である RacQ61L^{28,29} を pBoDV-L2b9x2 および pBoDV プラスミドに導入し、さらにリバーシジェネティクス法を用いて REVec-RacQ61L-L2b9x2、REVec-RacQ61L を作成した (図 3-4-1 A,B)。

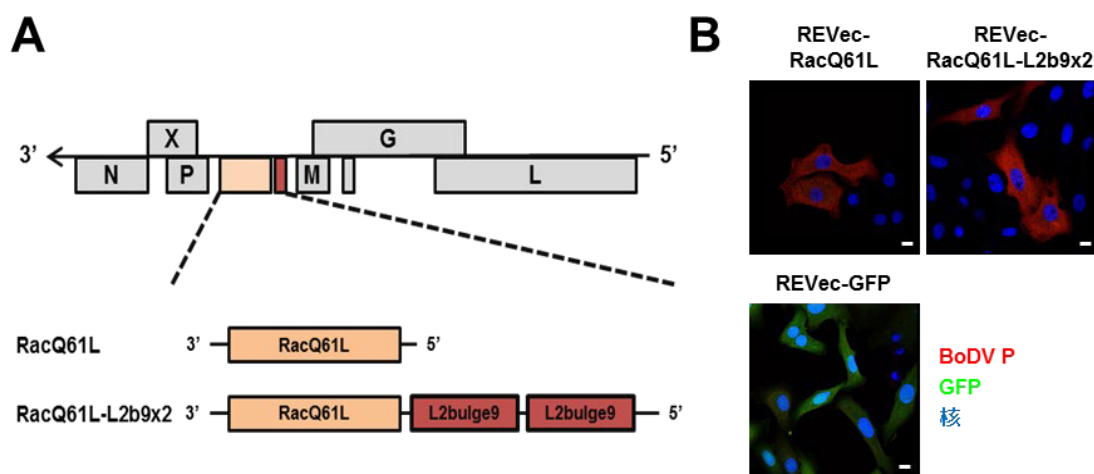


図 3-4-1. REVec-RacQ61L および REVec-RacQ61L-L2b9x2 の作成

(A) REVec-RacQ61L および REVec-RacQ61L-L2b9x2 のゲノム構造概略図。(B) 免疫蛍光染色法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で REVec-RacQ61L および REVec-RacQ61L 感染 Vero 細胞を観察した。白線は 10 μm を示す。

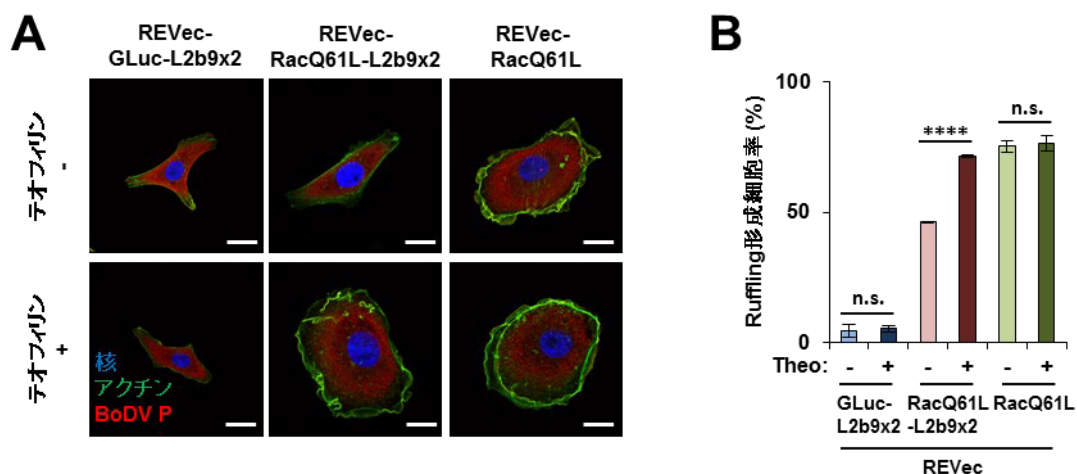


図 3-4-2. REVec-RacQ61L-L2b9x2 は細胞の表現型を制御した

(A) REVec-GLuc-L2b9x2、REVec-RacQ61L-L2b9x2 および REVec-RacQ61L 感染 Vero 細胞を 0 または 3 mM のテオフィリンで 24 時間処理した後、免疫蛍光染色法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。白線は 10 μ m を示す。(B) 全シングルセル中の ruffling を形成した細胞のパーセンテージを示した。REVec-GLuc-L2b9x2、REVec-RacQ61L-L2b9x2 および REVec-RacQ61L 感染 Vero 細胞を 3 mM のテオフィリンで 24 時間処理した後、免疫蛍光染色法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で細胞数を計測した。(-)はテオフィリン未処理、(+)は 3 mM テオフィリン処理を示す。

REVec-RacQ61L-L2b9x2、REVec-RacQ61L および REVec-GLuc-L2b9x2 感染 Vero 細胞にテオフィリン処理を行い、免疫蛍光染色法により細胞膜の形状を観察した (図 3-4-2 A,B)。テオフィリン未処理条件下では、REVec-RacQ61L 感染細胞に多数の ruffling を形成した細胞が観察された。REVec-RacQ61-L2b9x2 感染細胞では、ruffling を形成した細胞は REVec-RacQ61L 感染細胞よりも少なく、REVec-GLuc-L2b9x2 感染細胞ではほぼ ruffling を形成した細胞が確認できなかった。一方、テオフィリン条件下においては、REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞で ruffling を形成した細胞数が増加した。REVec-RacQ61L および REVec-GLuc-L2b9x2 感染細胞では、テオフィリン処理と未処理細胞間で ruffling を形成した細胞数に有意な差は認められなかった。この結果から REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞において、テオフィリンにより RacQ61L 発現が誘導され、細胞膜の ruffling 形成を促進したことが示唆された。

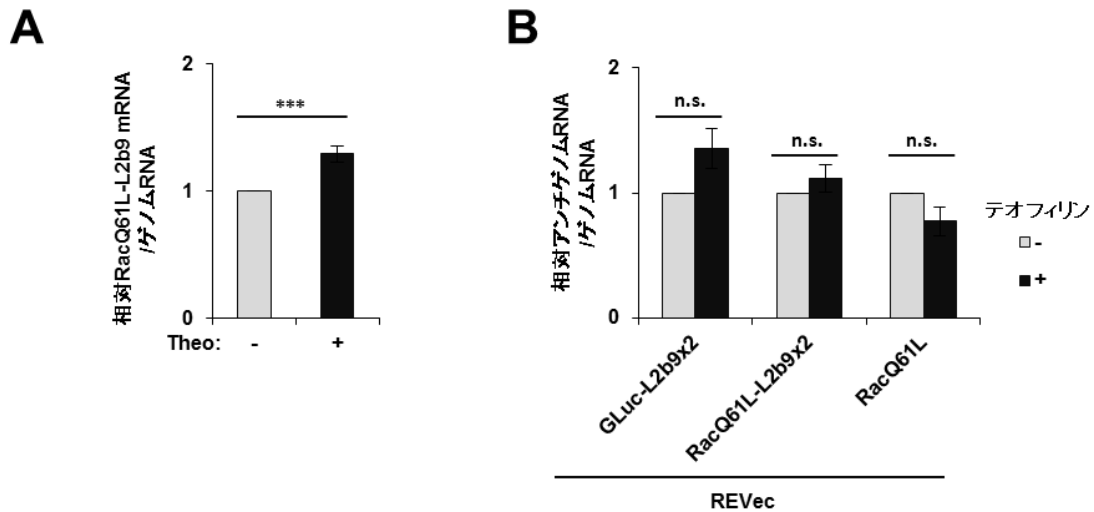


図 3-4-3. REVec-RacQ61L-L2b9x2 は RacQ61L mRNA の安定性を制御した

(A) REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染 Vero 細胞を 0 または 3 mM テオフィリンで処理し、リアルタイム PCR 法で RacQ61L-L2b9 mRNA 相対発現量を定量した。RacQ61L-L2b9 mRNA 量は REVec ゲノム RNA 量で補正し、テオフィリン未処理を 1 とした相対値を算出した。(B) REVec-GLuc-L2b9x2、REVec-RacQ61L-L2b9x2 および REVec-RacQ61L 感染 Vero 細胞を 0 または 3 mM テオフィリンで処理し、リアルタイム PCR 法で REVec アンチゲノム RNA 相対発現量を定量した。REVec アンチゲノム RNA 量は REVec ゲノム RNA 量で補正し、テオフィリン未処理を 1 とした相対値を算出した。(-)はテオフィリン未処理、(+)は 3 mM テオフィリン処理を示す。

リアルタイム PCR 法を用いて REVec-RacQ61L-L2b9x2 の mRNA 量を測定したところ、テオフィリン処理により REVec-RacQ61L-L2b9 mRNA 量が有意に増加した (図 3-4-3 A)。一方、REVec アンチゲノム RNA 量を測定したところ、テオフィリン処理に伴う L2b9 発現制御はアンチゲノム RNA 量に影響を及ぼさないことが確認された (図 3-4-3 B)。この結果から REVec-GLuc-L2b9 と同様に、L2b9 は RacQ61L mRNA のみに影響を及ぼしていることが確認された。

最後に REVec-RacQ61L-L2b9x2 の表現型制御は可逆的であるか否かを確認するため、前節と同様のテオフィリン処理中断実験を行った (図 3-4-4 A)。REVec-RacQ61L-L2b9x2、REVec-RacQ61L および REVec-GLuc-L2b9x2 感染 Vero 細胞を 8 well チャンバープレートに播種した日を 0 日とし、24 時間テオフィリン添加培地で培養後、免疫蛍光染色法で ruffling

形成細胞数を測定した。同時に培地をテオフィリン未添加培地に変更し、さらに 24 時間後に免疫蛍光染色法で ruffling 形成細胞数を測定した (図 3-4-4 B)。テオフィリン処理感染細胞を Day 1、テオフィリン未処理細胞を Day 2 とした。REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞において、テオフィリン処理による ruffling 形成細胞数は 1 日でテオフィリン未処理 REVec-RacQ61L-L2b9x2 感染細胞の水準にまで減少した。一方、REVec-RacQ61L および REVec-GLuc-L2b9x2 感染細胞においてはテオフィリン処理、未処理細胞間で有意な差が確認できなかった。以上の結果から、REVec-L2b9 システムは生物学的プロセスの制御に応用できることを実証した。

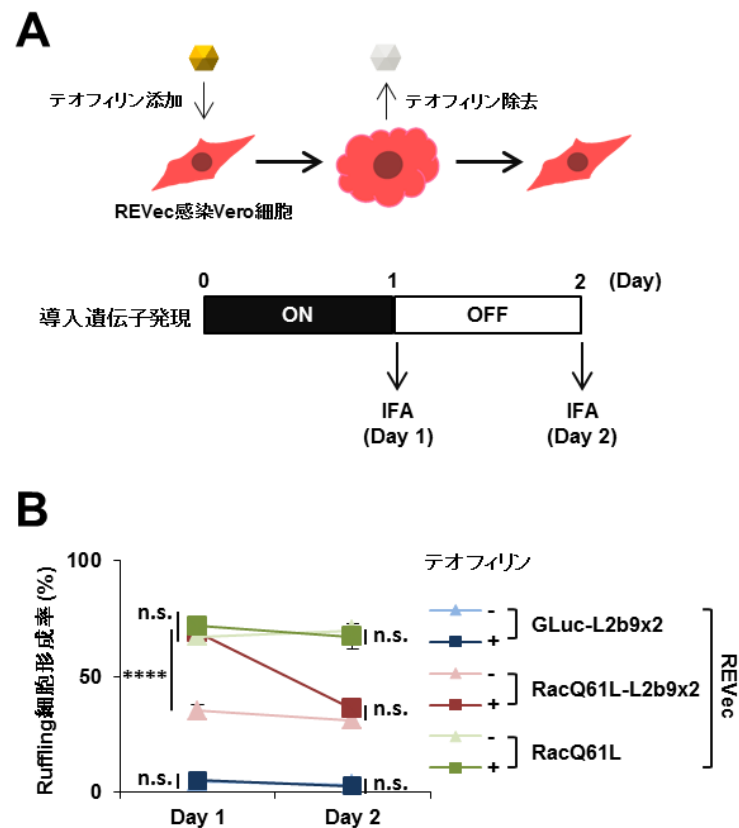


図 3-4-4. REVec-RacQ61L-L2b9x2 は可逆的に細胞の表現型を制御した

(A) REVec-GLuc-L2b9x2、REVec-RacQ61L-L2b9x2 および REVec-RacQ61L 感染 Vero 細胞を用いたアッセイのタイムコースを示した。テオフィリン処理 24 時間後に免疫蛍光染色法を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で全シングルセル中の ruffling を形成した細胞のパーセンテージを計測した (Day 1)。また同時にテオフィリンを含まない培地に交換し、24 時間後再度細胞を染色して ruffling を形成した細胞のパーセンテージを計測した (Day 2)。

3-5. まとめ

新規の RNA ウイルスベクターである REVec-L2b9 の開発に成功した。REVec-L2b9 はテオフィリン処理により自在に導入遺伝子発現のオン・オフを制御でき、またその制御は可逆的であった。また、REVec-L2b9 システムは RacQ61L を導入して、細胞形態の可逆的な制御にも応用可能であることを示した。

第四章 考察

現在、基礎研究や臨床研究の場においては AAV、アデノウイルスなどの DNA ウイルスベクターやレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターが主に利用されている。いずれも有用な遺伝学的ツールであるが、少なからず欠点を抱えている。例えばアデノウイルスベクターは細胞傷害や免疫応答を惹起する^{30,31}。宿主ゲノムへの組み込みが起こるレンチウイルスベクターは挿入変異や腫瘍形成を起こす可能性がある³²。また AAV ベクターは分裂細胞では徐々にゲノム量が減少していくため、長期間の遺伝子発現が不可能であることが判明している³³。一方、水疱性口炎ウイルス (VSV) やセンダイウイルスといった RNA ウイルスベクターはゲノムが DNA の形態をとらないため、宿主ゲノムにウイルスゲノムが組み込まれる危険性は大幅に低いものと考えられる。そのため、RNA ウイルスは既存のウイルスベクターより安全なウイルスベクターに適していると思われる。しかし RNA ウイルスはゲノムが RNA であることから脆弱であり、長期間の導入遺伝子発現には不向きである。

REVec は多くの RNA ウイルスベクターとは異なり、宿主の染色体にウイルスゲノムが付随することで核内での長期持続感染を可能としている⁵。そのため、REVec は安全かつ導入遺伝子の長期発現に適した RNA ウイルスベクターであると考えられる。また、導入遺伝子の持続発現により副作用が起きた場合、導入細胞から REVec を除去できる何らかの安全装置が必要だと考えられるが、その候補として T-705 という化学物質が報告されている³⁴。しかし、T-705 を用いて REVec を除去してしまった場合、再び遺伝子を導入し発現させるためには再び REVec を感染させる必要がある。そのため REVec をより利便性の高い RNA ウイルスベクターにするためには、導入遺伝子を制御できる何らかの機構を組み込むのが理想的であると思われる。また、再発性の病状を引き起こす慢性疾患を緩和するためには、任意のタイミングで治療遺伝子の発現を誘導できる機構をウイルスベクターに組み込むことが重要である³⁵。発現制御機構を組み込むことで、導入遺伝子の持続的な過剰発現により引き起こされる副作用を低減する効果も見込める。そのため、REVec をより安全で利便性の高い RNA

ウイルスベクターとするには、可逆的かつ任意のタイミングで遺伝子発現を誘導可能な制御機構が必要であると思われる。

RNA ウイルスのゲノム RNA やアンチゲノム RNA に自己開裂型リボスイッチを導入することは、ウイルスの増殖機構に有害であるように思われる。しかし、予想に反していくつかの細胞質増殖性 RNA ウイルスでリボスイッチの導入に成功した報告がなされている³⁶⁻³⁸。その中で、プラス鎖 RNA ウイルスであるアルファウイルスベクターはテオフィリン依存的な自己開裂型リボスイッチの導入に成功している。このアルファウイルスベクターでは、ウイルスベクターの作成やウイルスゲノムの安定化のためにテオフィリンを添加する必要がある³⁷。これはテオフィリンを添加しない場合、リボスイッチの作用でウイルスゲノムが不安定化し、ウイルスの複製に悪影響を及ぼすためであると考えられる。しかし、本研究ではテオフィリンを添加しなくともリバーシジェネティクス法により REVec-L2b9 の回収に成功した。さらに REVec-L2b9 は導入遺伝子発現をテオフィリンによって制御可能であり、しかもその制御は可逆的であることが証明された。一方で、REVec-L2b9 のアンチゲノム RNA 量はテオフィリンに関係なく一定であった。これはプラス鎖ウイルスであるアルファウイルスベクターと異なり、REVec では新規に合成されたアンチゲノム RNA が N タンパク質により RNP へとパッケージングされ³⁹、結果としてアンチゲノム RNA 中のリボスイッチが自己開裂することを阻害しているためではないかと推測される。

REVec-L2b9 はリボスイッチを導入した既存の細胞質増殖性 RNA ウイルスベクターより優れた点がいくつか存在する。リボスイッチ導入に成功した RNA ウイルスベクターで、リボスイッチによる導入遺伝子発現制御が可能で、かつウイルスの増殖能に影響がないものは REVec-L2b9 および VSV ベクターのみである。REVec-L2b9 と VSV ベクターを比較すると、REVec-L2b9 はテオフィリン処理を行ってから 24 時間で導入遺伝子の発現が可能であるのに対して、VSV は 48 時間を要する³⁸。また、REVec-L2b9 は長期間の持続した導入遺伝子の発現が可能であることも利点の一つである。一般的に VSV 由来のウイルスベクターの遺伝子発現は一時的であるが、REVec は少なくとも 8 か月間導入遺伝子の発現が可能であると

報告されている⁸。加えて、REVec-L2b9 は生物学的プロセスの制御が可能であることを明らかにしたが、VSV ベクターではそのような報告はされていない³⁸。

本研究では REVec-L2b9 の OFF 状態と ON 状態間で、導入遺伝子発現量に十分に大きな差が見られなかった。この問題はリボスイッチが OFF の状態で遺伝子発現を十分にサイレンシングできていないことに由来すると考えられる。REVec-GLuc-L2b9x1 と REVec-GLuc-L2b9x3 を比較してみると、OFF 状態での導入遺伝子発現量は L2b9 の増加に伴い減少している。一方で ON 状態での発現量は REVec-GLuc-L2b9x1 と REVec-GLuc-L2b9x3 間で有意な差を確認できなかった。以上のことから、REVec に導入するリボスイッチの数を増やすことで OFF 状態の導入遺伝子発現量をより減少させられる可能性が考えられる。また本研究では、REVec-L2b9 感染細胞で導入遺伝子の発現を誘導するために高濃度のテオフィリンを添加している。テオフィリンの濃度が上昇するにつれて大きな細胞傷害性を発揮することが確認されたため、より低濃度で機能し細胞傷害性の低いアプタマー、リガンドの組み合わせを探索する必要があると思われる。加えて、より OFF 状態の遺伝子発現を抑えられるようにリボザイムを探索し、リボスイッチを最適化することで、REVec-L2b9 システムの遺伝子発現制御機構をより効率的に改善する必要があると考えられる。

本研究では、リボスイッチによる導入遺伝子発現機構を備えた初の核内増殖性 RNA ウイルスベクター、REVec-L2b9 の開発に成功した。REVec-L2b9 は安全かつ有用なジーンデリバリーシステムではあるが、まだ改善すべき点も残っている。例えば、リバーシジェネティクス法による REVec の作成には 1 ヶ月以上の時間を要し、組換えウイルス収量もそれほど多くない。また、本研究では他細胞伝播性の REVec を用いてベクターを作成したが、将来的にはより安全な非伝播性である REVec Δ MG でベクターを作成すべきであると思われる。これら問題点の改善がなされ、REVec-L2b9 のさらなる発展と遺伝子治療への応用が期待される。

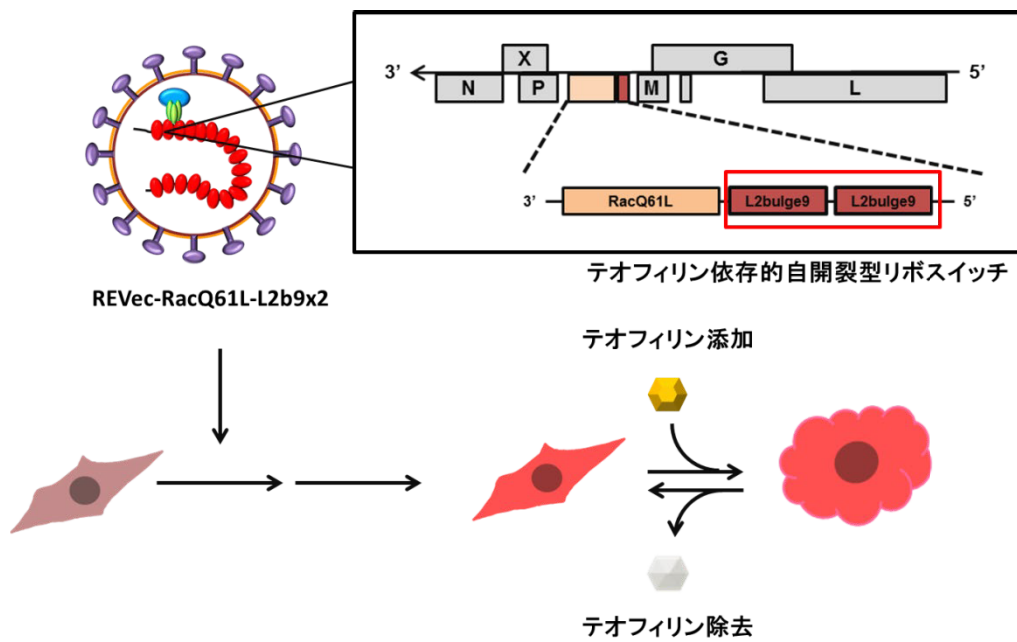


図 4. 本研究のまとめ

新規の RNA ウイルスベクター REVec-L2b9 を開発した。REVec-L2b9 はルシフェラーゼ遺伝子および RacQ61L 遺伝子いずれの導入においても可逆的な遺伝子発現制御に成功し、REVec-RacQ61L-L2b9x2 は細胞形態の制御も可能にした。

引用文献

1. Crystal, R. G. Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* **25**, 3–11 (2014).
2. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* (2017). doi:10.1007/s40259-017-0234-5
3. Escors, D. & Breckpot, K. Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (2010). doi:10.1007/s00005-010-0063-4
4. Ludwig, H. & Bode, L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* **19**, 259–88 (2000).
5. Matsumoto, Y. *et al.* Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* (2012). doi:10.1016/j.chom.2012.04.009
6. Horie, M. *et al.* Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* **463**, 84–7 (2010).
7. Horie, M., Kobayashi, Y., Suzuki, Y. & Tomonaga, K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120499 (2013).
8. Daito, T. *et al.* A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. *J. Virol.* **85**, 12170–8 (2011).
9. Honda, T. *et al.* Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep26154
10. Ikeda, Y. *et al.* A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification. *Gene Ther.* (2016). doi:10.1038/gt.2015.108
11. Komatsu, Y. *et al.* RNA Virus-Based Episomal Vector with a Fail-Safe Switch Facilitating

- Efficient Genetic Modification and Differentiation of iPSCs. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* (2019). doi:10.1016/j.omtm.2019.05.010
12. Fujino, K. *et al.* Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein genes. *Microbiol. Immunol.* (2017). doi:10.1111/1348-0421.12505
 13. McGee Sanftner, L. H. *et al.* Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol. Ther.* (2001). doi:10.1006/mthe.2001.0308
 14. Salucci, V. *et al.* Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2s-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther.* (2002). doi:10.1038/sj.gt.3301813
 15. Kafri, T., van Praag, H., Gage, F. H. & Verma, I. M. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol. Ther.* **1**, 516–21 (2000).
 16. Johansen, J. *et al.* Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene Ther.* (2002). doi:10.1038/sj.gt.3301778
 17. Régulier, E., Pereira de Almeida, L., Sommer, B., Aebischer, P. & Déglon, N. Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1981–90 (2002).
 18. Iida, A., Chen, S. T., Friedmann, T. & Yee, J. K. Inducible gene expression by retrovirus-mediated transfer of a modified tetracycline-regulated system. *J. Virol.* **70**, 6054–9 (1996).
 19. Serganov, A. & Nudler, E. A decade of riboswitches. *Cell* (2013). doi:10.1016/j.cell.2012.12.024
 20. Cheah, M. T., Wachter, A., Sudarsan, N. & Breaker, R. R. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**, 497–500 (2007).
 21. Croft, M. T., Moulin, M., Webb, M. E. & Smith, A. G. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0705786105

22. Bocobza, S. *et al.* Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom. *Genes Dev.* (2007). doi:10.1101/gad.443907
23. Wachter, A. *et al.* Riboswitch Control of Gene Expression in Plants by Splicing and Alternative 3' End Processing of mRNAs. *Plant Cell* (2007). doi:10.1105/tpc.107.053645
24. Berens, C., Thain, A. & Schroeder, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2549–56 (2001).
25. Suess, B. *et al.* Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1853–8 (2003).
26. Win, M. N. & Smolke, C. D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0703961104
27. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514 (1998).
28. Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. & Greenberg, S. ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8158–68 (1999).
29. Davis, M. J. *et al.* RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 912–7 (2013).
30. Franklin, R. m, Quick, M. m & Haase, G. Adenoviral vectors for in vivo gene delivery to oligodendrocytes: transgene expression and cytopathic consequences. *Gene Ther.* **6**, 1360–7 (1999).
31. Muruve, D. A. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1157–66 (2004).
32. Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B. & Baum, C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **24**, 132–42 (2013).
33. Colella, P., Ronzitti, G. & Mingozzi, F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* (2018). doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007

34. Tokunaga, T., Yamamoto, Y., Sakai, M., Tomonaga, K. & Honda, T. Antiviral activity of favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. *Antiviral Res.* **143**, 237–245 (2017).
35. Goverdhana, S. *et al.* Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: Progress and future challenges. *Molecular Therapy* **12**, 189–211 (2005).
36. Ketzer, P. *et al.* Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E554-62 (2014).
37. Bell, C. L. *et al.* Control of alphavirus-based gene expression using engineered riboswitches. *Virology* **483**, 302–11 (2015).
38. Takahashi, K. & Yokobayashi, Y. Reversible Gene Regulation in Mammalian Cells Using Riboswitch-Engineered Vesicular Stomatitis Virus Vector. *ACS Synth. Biol.* **8**, 1976–1982 (2019).
39. Honda, T. & Tomonaga, K. Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* **5**, 1978–90 (2013).

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、絶え間ない御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学 朝長啓造先生、大阪大学 本田知之先生に心より感謝申し上げます。

また、京都大学 朝長啓造先生には主指導教員としても多くの御指導、御助言を頂きました。

最後に、諸事に渡り御指導、御協力を頂きました本研究室スタッフならびに大学院生の諸兄諸姉に深く感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yusuke Yamamoto, Keizo Tomonaga, Tomoyuki Honda.

Development of an RNA Virus-Based Episomal Vector Capable of Switching Transgene Expression

Front Microbiol, Nov 6;10:2485, 2019