HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カイコバキュロウイルスを用いた遺伝子導入技術の開発と創薬基盤研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	今井, 徳俊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12734号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65298
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsutoshi_Imai_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　今　井　徳　俊

	主　査	教　授	前　仲　勝　実
審査担当者	副　査	教　授	菅　原　　満
	副　査	准教授	武　隈　　洋
	副　査	准教授	尾　瀬　農　之

学 位 論 文 題 名

カイコバキュロウイルスを用いた遺伝子導入技術の開発と創薬基盤研究

創薬の現場では、バイオハザード管理の徹底、ニーズに応える迅速なスクリーニング、薬価引下げに対応する経済的な実験法の選択が求められる。従って、各種解析に必要な組換え標的蛋白質の調製法や遺伝子導入法は「安全、迅速、安価」であることが望ましい。カイコガ科バキュロウイルス（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV）は、哺乳類細胞内では複製されないため、感染細胞での残存リスクは低く、実験操作上も安全であるため上述の要求に応えることができる可能性がある。また、一般に広く用いられている同属のキンウワバ科バキュロウイルス（*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV）の増幅には昆虫細胞が使われるが、血清を含む培地や安全キャビネットの利用が必須である。それに対し、BmNPV はカイコ体内で増幅させることができ、また特別な飼育設備を必要としないという利点がある。申請者の研究室では、BmNPV ゲノム（バクミド）に任意の標的遺伝子を導入した組換えバクミドをカイコへ投与することで、標的蛋白質を大量発現させる BmNPV-カイコ発現系を確立している。しかし、本発現系の創薬研究への応用や BmNPV をウイルスベクターとして利用することを目指した基盤研究はほとんど進んでいない。

本論文では、BmNPV-カイコ発現系を活用した創薬標的蛋白質の相互作用解析と新たな遺伝子導入法の確立を目的としている。

申請者は、創薬ターゲットのモデルとして麻疹ウイルスに着目した。麻疹ウイルスは世界中で多数の死者を出す危険なウイルスであるが、有効な薬が存在しないため、治療薬の開発が求められている。麻疹ウイルスの感染は、ウイルス表面蛋白質ヘマグルチニン H (MV-H)とヒト免疫細胞受容体（SLAM）の結合が引き金となっているため、この結合を阻害する物質は治療薬候補となりうる。著者の研究室では既に、哺乳類細胞発現系にて調製した MV-H と SLAM による相互作用解析法を確立している。申請者はこれを対照とし BmNPV-カイコ発現系により調製した組換え蛋白質と表面プラズモン共鳴を用いた相互作用実験を実施した。その結果、カイコで発現させた蛋白質を用いた場合、哺乳類細胞にて発現させた蛋白質の場合と比べ、解離定数 K_D にして 10 倍以上低い強い結合であった。更に、MV-H–SLAM 複合体構造と *N* 型糖鎖切断酵素による消化実験から、カイコで発現させた SLAM には比較的均質で低分子量の糖鎖が結合するが、哺乳類細胞で発現させた場合は分子量の不均一な糖鎖が結合することを明らかにし、この糖鎖構造の違いが MV-H との結

合に影響することを示唆した。以上より、カイコ発現系を利用すると安価に組換え蛋白質を調製できるだけでなく、糖鎖修飾の差異から相互作用活性が向上し、実験に用いる蛋白質量を減らすことができるためMV-HとSLAMの結合阻害剤探索を安価に実施できる可能性を示した。

次に、申請者は近年開発されたAcMNPVを用いたバキュロウイルス－哺乳類細胞発現系（BacMam）に着目した。ウイルス力価増幅のために時間や費用がかかるといったAcMNPVの欠点を、BmNPV-カイコの系の適用により克服した新たな哺乳類細胞への遺伝子導入法（BmBacMam）の確立を目指した。著者は、カイコバキュロウイルスゲノムに哺乳類細胞発現プロモーターとその下流にEGFP遺伝子を組込んだ組換えBmNPVを感染させた哺乳類細胞中のEGFPの発現を指標に遺伝子導入方法の構築を進めた。ウイルス曝露時における種々の条件を広範に検討し、EGFP陽性細胞率、発現強度を大幅に改善することに成功した。以上の結果は、BmBacMamが機能することを初めて実証した成果である。

最後に、BmBacMamを応用したiPS細胞の作製を目指した。iPS細胞は、再生医療、疾患モデル構築、薬剤探索などへの応用が期待されているが、現在iPS細胞作製に汎用されているレトロウイルスは、ランダムに宿主ゲノムに遺伝子を挿入する可能性があるため、宿主のがん化の懸念がある。一方でバキュロウイルスの感染は宿主ゲノムへの遺伝子挿入を伴わないためこの問題を解決しうる。申請者はiPS細胞作製に必須な転写因子をコードする組換えBmNPVを調製し、マウス繊維芽細胞やヒト正常細胞へ投与することでiPS細胞の樹立を試みた。その結果、ウイルス投与5日後から徐々に細胞の生存率が低下しiPS細胞の樹立には至らなかった。更なる条件検討が必要であるが、iPS細胞化に最も重要とされるOct4, Sox2の発現を確認できたため、マウス線維芽細胞やヒト正常細胞に対してもBmBacMamを確立した条件で転写因子を導入できることが分かった。

以上のように、申請者は博士（生命科学）を受けるに十分な知識と能力を有しているものと認めた。