

## 分子 ZIP コード標識による超ウイルスベクターを用いた ピンポイント遺伝子輸送

寺島 智也<sup>1)</sup>, 小島 秀人<sup>2)</sup>, 大井 二郎<sup>1)</sup>, 川合 寛道<sup>1)</sup>, 前川 聡<sup>1)</sup>

1) 滋賀医科大学 内科学講座 (糖尿病・腎臓・神経内科)

2) 滋賀医科大学 分子遺伝医学講座

## Super viral vector for pinpoint gene transfer by molecular ZIP-code

Tomoya TERASHIMA<sup>1)</sup> Hideto KOJIMA<sup>2)</sup>, Jiro OI<sup>1)</sup>, Hiromichi KAWAI<sup>1)</sup> and Hiroshi MAEGAWA<sup>1)</sup>

1) Department of Medicine, Shiga University of Medical Science

2) Department of Molecular Genetics in Medicine, Shiga University of Medical Science

### Abstract

"Molecular ZIP-code" is very small size of peptide, which be able to target to specific tissues or cells, recently considered as one of the remarkable material for molecular imaging or therapy. In this study, we engineered the new therapeutic strategy to realize pinpoint gene transfer with "Molecular ZIP-code" inserted into helper-dependent adenovirus vectors (HDAd). We identified three different types of dorsal root ganglion (DRG) "Molecular ZIP-code" which could specifically bind to DRG neurons. Each ZIP-code were separately inserted into the fiber of helper virus detargeted for its native tropism (coxsackie and adenovirus receptor and heparan sulfate proteoglycan binding site). We generated the DRG-targeting HDAd with the use of DRG-targeting helper virus, injected the HDAd into intrathecal lesion of mice and evaluated the transduction efficiency. Most effective HDAd produced a 100-fold higher transduction of DRG neurons than non-targeting vector and three different kinds of DRG-targeting HDAd showed the different transduction patterns in the cell size distribution of DRG neurons. We succeeded to develop a new strategy to produce HDAd that specifically target DRG neurons. The development of the strategy in this communication using the much more versatile and far less toxic HDAd should facilitate its possible application in clinical trials for DRG neuropathies in the near future.

**Keyword** Molecular ZIP-code, helper-dependent adenovirus vectors (HDAd), gene transfer, dorsal root ganglion (DRG)

### 1. はじめに

近年、全身臓器または組織は非常に短鎖なペプチドで標識されることが報告され、それらペプチドが生体内で臓器の場所を示すことから、体内の郵便番号のように捉え、「Molecular ZIP-code (分子 ZIP コード)」と称され、分子診断や分子治療への応用性が期待されている[1]。

そこで、我々はこの「分子 ZIP コード」を用いて組織特異的遺伝子治療ベクターの開発に着手することにした。使用するベクターとしては、以前より安全性が

高いことで注目されている「ヘルパー依存型アデノウイルスベクター」[2]である。また、標的組織としては、以前より我々が精通している後根神経節 (DRG) [3,4]を用いた。

具体的には、①DRG 標的分子 ZIP コードの同定、②ZIP コードのアデノウイルス (ヘルパーウイルス) への挿入、③DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成および効果判定、の順に検討を行った。

### 2. DRG 標的分子 ZIP コードの同定

Received November 30, 2012

Correspondence: 滋賀医科大学内科学講座 (糖尿病・腎臓・神経内科) 寺島 智也

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 tom@belle.shiga-med.ac.jp

組織標的ペプチドを検索するために、ファージライブラリーキット (New England BioLab) を用いた *in vitro* ファージディスプレイ (図 1) [1] を行った。このキットは、ファージの親和性を決定していると言われる先端部に 7 つのアミノ酸をランダムに発現するように調整されている。このファージ  $10^{12}$  pfu を神経細胞以外の細胞に吸収させ、結合しなかったファージを DRG ニューロンと反応、結合したファージを回収、増幅を行った。この過程を 5 回繰り返し、DRG に対して親和性、特異性の高いファージを決定し、そのアミノ酸配列の同定を行った。

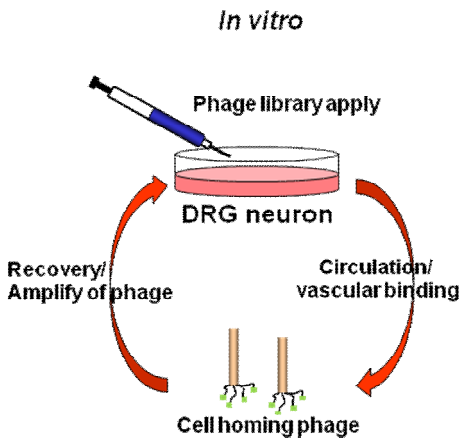


図 1. ファージディスプレイ法を用いた DRG 標的分子 ZIP コードの同定

その結果、DRG1:C-SPGARAF-C, DRG2:C-DGPWRK M-C, DRG3:C-FGQKASS-C, の三種類の DRG 標的分子 ZIP コードを同定した[5]。

### 3. ZIP コードのアデノウイルス (ヘルパーウイルス) への挿入

同定した DRG 標的分子 ZIP コードをアデノウイルスに挿入するが、一般的にアデノウイルスが感染する際に結合する部位が分子 ZIP コードの効果を低下させてしまうと考え、共通結合部位を改変したものを採用することとした。アデノウイルスには、ファイバーと呼ばれる構造があり、その先端に近いノブ部分 (fiber knob) にコクサッキーアデノウイルスレセプター (CAR) 結合部位を、シャフトの部位 (fiber shaft) にへ

パラン硫酸塩 (heparan sulfate) 結合部位を有している。それらの結合能力を欠失させたファイバー遺伝子をプラットフォームとして用いることとした (図 2) [6]。

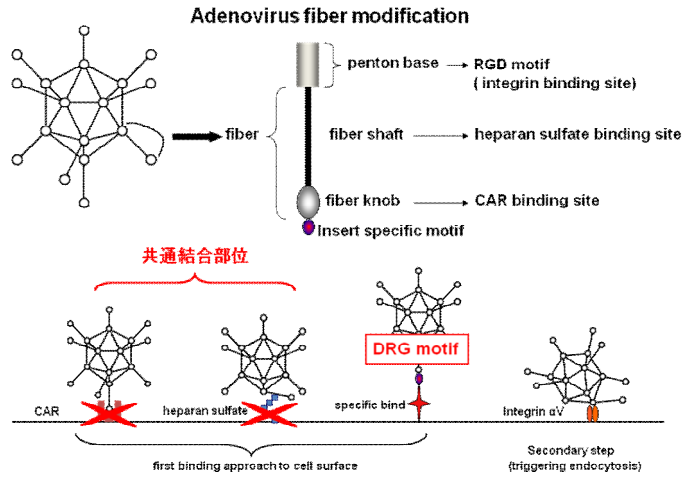


図 2. アデノウイルスへの DRG 標的分子 ZIP コードの挿入

またファイバーの基部であるペンテンベース (penton base) に存在する RGD モチーフ (インテグリン結合部位) については、ウイルスパーティクルが細胞内に取り込まれるために必須であり、温存とした(図 2) [7]。目的の DRG 標的分子 ZIP コードは、ファイバーノブの先端部分に制限酵素サイトを作成後に遺伝子配列の改変を行うことにより挿入した。

次に、DRG 標的分子 ZIP コードを挿入したアデノウイルスベクターのターゲティング効果を確認するために、改変したアデノウイルスベクターをマウス髄腔内への注射を行った。その結果、投与 2 日後の DRG 組織で、改変ウイルスベクターが見事にターゲティングし、輸送遺伝子 (この場合 lacZ のレポーター遺伝子) から合成された蛋白が発現していることが分かる (図 3)。実体顕微鏡下にて、神経線維部分での発現はほとんど認められず、神経節のみで発現を認め、さらには神経細胞の形態が丸く観察される (詳細は、切片で確認済み)。発現程度は、DRG1>DRG2>DRG3 の順に高発現を認めた[8]。

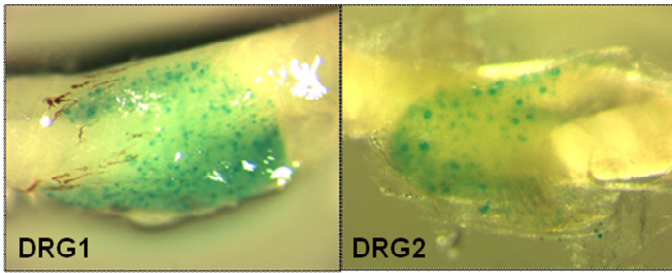


図 3. DRG 標的アデノウイルスの発現効果  
(青色: X-gal 染色、実体顕微鏡下にて)

#### 4. DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成および効果

DRG 標的化アデノウイルスベクターが組織特異的遺伝子輸送に効果的であることより、安全性の高いヘルパー依存型アデノウイルスベクターへの応用が可能であると考え、DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成を行った。作成したベクターをアデノウイルスの際と同様に、髄腔内に投与し、ターゲティングの効果を判定した。図 4 に示されるように、DRG1-3 の DRG 標的分子 ZIP コードにて標的化したヘルパー依存型ウイルスベクターは、野生型(WF)に比較し、GFP 蛋白の強い発現を認め、その程度は、特に DRG1, DRG2 にて強い傾向にあった[8]。

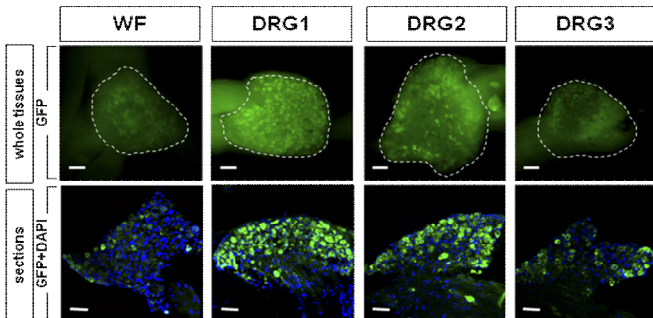


図 4. DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターによるターゲティング(上段:実体顕微鏡(DRG 組織)、下段:蛍光顕微鏡(DRG 切片))

#### 5. 超ウイルスベクター(組織特異的標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクター)の有用性

今回、我々は、分子 ZIP コードを利用して、組織特異的標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成に成功した。このウイルスベクターシステムは、効

率よく目的の臓器(組織)のみに遺伝子を輸送できるため、最小限のベクター量にて高蛋白発現(遺伝子治療効果)が期待できる。更に、他の臓器(組織)への副作用を最小限に抑えられるだけでなく、目的臓器(組織)に対しても、ウイルス毒性などの影響を最小限にとどめることを可能とする”超ウイルスベクター”である。今回の検討では、DRG を標的としたが、全身の各臓器(組織)の分子 ZIP コードが明らかになれば、目的の遺伝子を目的の部位のみに運ぶ理想的な遺伝子輸送システムの構築も可能とするものと考えられる。

#### 文献

- [1] Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med*, 7(11):1249-53, 2001
- [2] Oka K, Chan L. Construction and characterization of helper-dependent adenoviral vectors for sustained in vivo gene therapy. *Methods Mol Med*, 108:329-50, 2005
- [3] Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve. *J Neurochem*, 77(4):986-93, 2001
- [4] Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Oi J, Hara M, Kashiwagi A, Kimura H, Yasuda H, Chan L. The fusion of bone-marrow-derived proinsulin-expressing cells with nerve cells underlies diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12525-30, 2005
- [5] Oi J, Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Maeda K, Arai R, Chan L, Yasuda H, Kashiwagi A, Kimura H. Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice. *Neurosci Lett*, 434(3):266-72, 2008
- [6] Kritz AB, Nicol CG, Dishart KL, Nelson R, Holbeck S, Von Seggern DJ, Work LM, McVey JH, Nicklin SA, Baker AH. Adenovirus 5 fibers mutated at the putative HSPG-binding site show restricted retargeting with targeting peptides in the HI loop. *Mol Ther*, 15(4):741-9, 2007
- [7] Koizumi, N, Mizuguchi, H, Sakurai, F, Yamaguchi, T, Watanabe, Y and Hayakawa, T. Reduction of natural tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and  $\alpha$  v integrin-binding ablation. *J Virol*, 77:13062-72, 2003
- [8] Terashima T, Oka K, Kritz AB, Kojima H, Baker AH, Chan L. DRG-targeted helper-dependent adenoviruses mediate selective gene delivery for therapeutic rescue of sensory neuropathies in mice. *J Clin Invest*, 119(7):2100-112, 2009