

[Mini Review]

ウイルスベクターによる唾液腺への遺伝子導入と遺伝子治療への応用

森田 貴雄

北海道医療大学歯学部 口腔生物学系 薬理学分野

Viral vector-mediated gene transfer to salivary glands in vivo and trial for clinical applications

Takao MORITA

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

はじめに

動物の生体内に遺伝子を導入し発現させる、または遺伝子機能を抑制して機能解析する方法は1990年代から試みられている。代表的なものはノックアウト動物やトランスジェニック動物の作製であるが、これらの方法は莫大な労力、時間およびコストがかかる。これに対し、遺伝子を限られた組織に導入する方法は、労力が比較的少なく、低コストですむ利点がある。この方法に使われるベクターは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。

ウイルスベクターは導入効率が高いが、炎症などの組織ダメージがあり、がん化など安全性に問題がある (Baum et al., 2002)。プラスミドなどの非ウイルスベクターによる遺伝子導入では炎症などの組織侵害性が少なく、安全性が高い反面、導入・発現効率が非常に悪い (Baum et al., 2002)。

本稿では、ウイルスベクターのうち、主にアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた唾液腺への遺伝子導入法とその応用例を紹介する。アデノウイルスは導入効率は高いが、発現が一過性であり、炎症などの組織ダメージがあるのに対して、AAVの発現効率はよくないが、炎症が軽微で、発現が長期にわたる利点がある (表1)。

唾液腺は、口腔の開口部から直接導管を通して非侵襲的に遺伝子を導入することができ、体表に比較的近くに位置するため、外来遺伝子をin vivoで発現させ、その機能を外から解析するのに適している。また生命機能に直接関わらないため、遺伝子導入による組織ダメージ、あるいはがん化の恐れがある場合には摘出することで生命を危険にさらさなくてすむ。さらに、血管を通して体内循環に遺伝子発現産物を供給することもできる。このようなことから、唾液腺を遺伝子治療のための治療分子産生センターとして利用しようとする研究も行われている。

表1 ウイルスベクターの特徴

種類	挿入可能サイズ	長所	短所	適用動物, 発現部位
アデノウイルス (Adenovirus)	7-8 kb	・発現効率が高い ・非分裂細胞に導入可能	・細胞毒性 ・組織障害	マウス, ラット, サル 腺房・導管細胞
Ad 5				
アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus)	4.5 kb	・非病原性 ・長期発現が可能 ・非分裂細胞に導入可能	・発現が遅い ・発現効率が悪い	マウス ラット AAV2, 5 AAV5, 9 導管細胞 導管細胞
AAV2, AAV5, AAV9				
レンチウイルス (Lentivirus)	8-10 kb	・長期発現が可能 ・非分裂細胞に導入可能	・発現効率が悪い	マウス 腺房・導管細胞

アデノウイルスベクター

アデノウイルスは約36 kbの二本鎖DNAをゲノムとして持つウイルスであり、宿主染色体に組み込まれず、一過性の発現をする。導入効率が高く、培養細胞はもちろん、動物個体への導入にもよく用いられている。最も用いられているタイプは5型アデノウイルス (Ad 5) である。

約20年前に、NIDCRのBaumのグループにより、アデノウイルスを唾液腺開口部から逆行性に注入して、生きた動物の唾液腺組織に外来遺伝子を発現させる手法が確立された (Mastrangeli et al., 1994)。彼らは、 10^{10} pfu程度のアデノウイルスを顎下腺や耳下腺に導入し、 β -galactosidaseや α 1-antitrypsinを発現させた。これらは腺房細胞、導管細胞の両方に一過性に発現したが、導入により唾液分泌量が著しく減少した (Mastrangeli et al., 1994)。また導入された組織では深刻な炎症反応が観察された (Adesanya et al., 1996)。特に腺房細胞での影響は大きく、腺房細胞の破壊により唾液分泌量が低下したが、ステロイドであるデキサメタゾンの前投与により、炎症反応や唾液分泌量の低下が回復した (Adesanya et al., 1996)。

またBaumらは、放射線治療により生ずる唾液腺障害を治療する目的で、放射線による唾液腺障害モデル動物の唾液腺に、アデノウイルスを用いて水チャネルであるaquaporin-1 (AQP 1) を発現させた (Delporte et al., 1997; Shan et al., 2004)。AQP 1の発現により、放射線照射により低下した唾液分泌量が大きく回復し、この方法が唾液腺障害の遺伝子治療法として有効であることが示唆された。アメリカでは、ヒトへの臨床応用に向けて phase I臨床試験が行われている (Baum et al., 2012)。

またシェーグレン症候群や他の遺伝子疾患への遺伝子治療にアデノウイルスを使う試みもある。IL-17受容体抗体, growth hormone, erythropoietin, immunoglobulin G Fc fragment, parathyroid hormoneなど様々な分子を唾液腺に発現させ、血流を通じてこれらを体内に供給するという治療法である (Samuni et al., 2008; Samuni et al., 2008; Voutetakis et al., 2008; Nguyen et al., 2011)。しかし、血中と唾液中のどちらに分泌されるかは発現分子によって異なり (Samuni et al., 2008; Voutetakis et al., 2008; Racz et al., 2009)、同じベクターを導入しても、ラットとマウス、耳下腺と顎下腺では放出される向きが異なることも報告されている (Adriaansen et al., 2008, Adriaansen et al., 2011)。このように、目的の分子を血中に分泌させるのは簡単ではなく、細胞内輸送メカニズム

など基礎研究を含めたさらなる研究が必要である。

最近我々は、アデノウイルスをラット顎下腺開口部から逆行性に注入することにより、炎症反応をほとんど起こすことなしに、蛍光標識分子 (Stim1-mKO1) を腺房細胞に発現させることに成功した (図1, Morita et al., 2011)。今までとの違いは、より低用量のウイルス (10^8 pfu程度) を導入したことである。Stim1-mKO1を発現した腺房細胞では、容量性 Ca^{2+} 流入が有意に増加しており、この結果は発現させたStim1-mKO1が機能的であることを示している。さらに予期せぬ事に、ムスカリン受容体アゴニスト刺激による Ca^{2+} 放出反応も増加していた (Morita et al., 2013)。ストア内の Ca^{2+} 量に差はなかったことから、ストアの増大ではなく、別の要因で受容体の感受性が高まっていると考えられる。

アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、非病原性のウイルスに由来し、遺伝子発現が長期間持続することから、安全性が高く、遺伝子治療に使えると期待されている。また種々の細胞に感染するが、血清型により組織特異性が見られるという特徴を持つ (小澤, 2007)。しかし導入できるサイズが4.5 kbと小さく、ウイルスゲノムが1本鎖DNAであるため、遺伝子発現の効率が悪

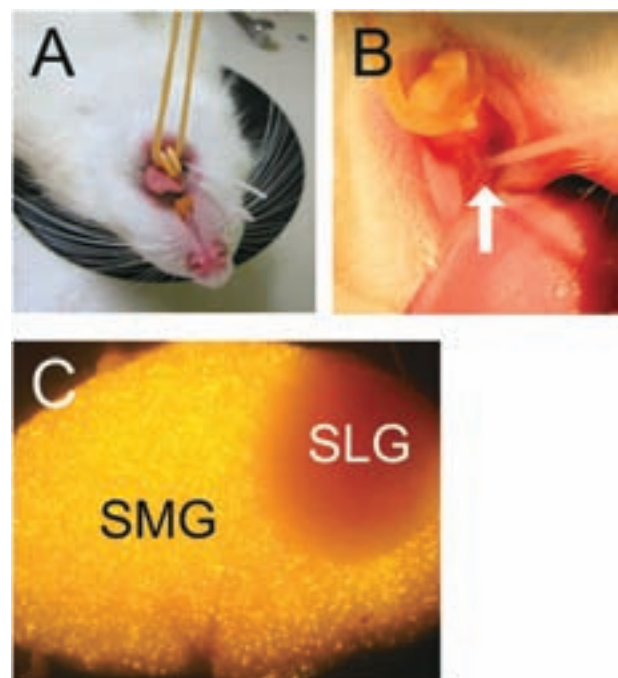


図1 アデノウイルスの逆行性注入による唾液腺への遺伝子導入

A: 麻酔下のラット顎下腺開口部へのチューブの挿入

B: その拡大図, 矢印は顎下腺開口部を示す

C: アデノウイルス導入により顎下腺全体に発現したStim1-mKO1の蛍光像

SMG: 顎下腺, SLG: 舌下腺

く、発現が遅い（最大発現に1-2週間以上）。最近この弱点を克服しようと、scAAV（self-complementary AAV）ベクターが考えられた（小澤，2007）。細胞内ですぐに2本鎖になるので、遺伝子発現が速いが、ベクターに挿入できるサイズが半分（約2.5 kb）になり、応用できる遺伝子は限られる。

唾液腺への遺伝子導入にはAAV 2 と AAV 5 がよく用いられている（表1）。動物の唾液腺にAAVを用いて最初に遺伝子導入したのはBaumのグループである。AAV 2を用いてAQP 1を正常マウスの唾液腺に発現させたところ、アデノウイルスとは異なり、AQP 1は主に導管細胞に発現し（Braddon et al., 1998）、腺自体の炎症反応および唾液分泌の低下は起きなかった（Kok et al., 2005）。しかし残念ながら、ラット唾液腺ではAAV 2の導入によるAQP 1の発現が見られなかった（Braddon et al., 1998）。次にAAV 5を用いたところ、マウス唾液腺ではAAV 2より7倍もの導入効率が得られ、ラットの唾液腺導管にも発現が見られた（Katano et al., 2006）。このようにAAVにより唾液腺導管への遺伝子の特異的な発現が期待できることから、導管細胞の機能解析に利用できると思われる。

またアデノウイルスと同様に、AAVによる唾液腺への遺伝子導入を唾液腺障害の治療に使う研究も行われている。Yinらはシェーグレン症候群モデルのNOD-Aec 1/Ace 2マウスの唾液腺に、自己免疫疾患であるリウマチの治療に使われているcytotoxic T-lymphocyte antigen 4（CTLA 4 IgG）をAAV 2を用いて発現させた。その結果、リンパ球浸潤や炎症性サイトカインなどの炎症反応が抑制されると共に唾液分泌が回復し、その効果は10ヶ月以上続いた（Yin et al., 2012）。またAAV 9を用いて、ラットの唾液腺にDNA修復に関わる遺伝子Tousled-like kinase 1B（TLK1B）をあらかじめ発現させておくと、放射線照射による唾液腺障害（炎症や唾液分泌低下）が改善された（Srinivasan et al., 2013）。これ以外にも、糖尿病モデル動物の唾液腺に糖尿病治療薬（Exendin-4, Ex-4）を長期的に発現させ、体内循環を介して糖尿病の治療に応用しようとする試みもある（Di Pasquale et al., 2012； Wang et al., 2014）。Ex-4の持続的発現により、体重減少や血糖値の減少など、糖尿病症状の改善が見られた。

AAVはアデノウイルスに比べて長期間の遺伝子発現が可能であり、炎症反応などが少ないことから、将来的なヒトに対する遺伝子治療への応用が期待されている。この観点から、サルなどの霊長類の唾液腺へのAAV2やAAV5の適用が試みられている。しかしマウスでの結果

と異なり、サルではAAV5の発現は一過性であり、AAV 2より発現効率が悪かった（Voutetakis et al., 2010）。このようにマウス、ラット、さらにサルといった動物種の違い、そしてAAV2やAAV5など血清型の違いにより導入効率や発現分布が異なることから、AAVを用いた動物実験の結果をヒトに応用するにはまだまだ課題が多く残されている。

AAVは長期間の遺伝子発現が可能であるため、in vivoでの適用だけでなく、ex vivoでの唾液腺の発生・分化過程の研究にも使われている。Hsuらはマウスの胚から取り出した顎下腺組織にscAAV 2を使ってfibroblast growth factor 7を上皮組織に発現させて培養し、顎下腺の分枝形態が増加したことを報告している（Hsu et al., 2012）。最近我々も、唾液腺由来培養細胞にAAVを導入することにより、Ca²⁺センサーの恒常発現細胞を簡便に作製することに成功した。この手法を他のセンサーやシグナル分子等に応用することで、分子間相互作用などの機能解析がよりしやすくなると期待される。

その他のウイルスベクター

その他レンチウイルスベクターが動物の唾液腺への遺伝子導入に使われている（表1）。レンチウイルスベクターによる導入では、遺伝子発現は腺房細胞と導管細胞に共に見られ、比較的長期間発現しているが、発現効率が悪い（Shai et al., 2002； Shai et al., 2005）。

おわりに

本稿では触れなかったが、非ウイルスベクター（プラスミドやセンダイウイルスの殻であるHVJエンベロープベクター）や超音波を用いた唾液腺組織への遺伝子あるいはsiRNAの導入・発現による機能解析も行われている（Ishibashi et al., 2006； Ishibashi et al., 2008； Sakai et al., 2009； Sramkova et al., 2009）。Sramkovaらはプラスミドと、タンパク質をコードしないアデノウイルスを混ぜて唾液腺に導入した。この実験では発現細胞が1-2%と効率は極めて悪いが、蛍光イメージングでは発現している細胞があれば解析が可能であり、効率はそれほど問題ではないとしている（Sramkova et al., 2009）。

最近我々は、アデノウイルスベクターを用いて高感度Ca²⁺バイオセンサー（YC-Nano50）を顎下腺に発現させ、アゴニスト刺激によるCa²⁺応答のin vivoイメージングに成功した。このCa²⁺応答と唾液分泌を同時に解析したところ、唾液分泌は比較的弱いCa²⁺応答で起こることがわかった。しかし、アゴニスト刺激と神経刺激でCa²⁺応答や唾液分泌に違いがあるかなどの詳細な解析はこれ

からである。

羅列的になってしまったが、ウイルスベクター導入による唾液腺研究のこれまでの流れを少しでもわかっていただけなら幸いである。本稿で紹介した研究はこの分野の全体の一部であり、我々が行っているような研究を含めて基礎・臨床を問わずいろいろな応用の可能性が考えられる。このような研究に興味を持たれた方が、この分野の研究を進展させてくれることを期待して結びとする。

謝 辞

本学会誌にミニレビューを書く機会を与えてくださいました編集委員長の田隈泰信教授に心から感謝申し上げます。また、当研究室の東城庸介教授、谷村明彦教授、根津顕弘講師に感謝いたします。

参 考 文 献

- Adesanya MR, Redman RS, Baum BJ, O'Connell BC. Immediate inflammatory responses to adenovirus-mediated gene transfer in rat salivary glands. *Hum Gene Ther* 7 : 1085-1093, 1996.
- Adriaansen J, Zheng C, Perez P, Baum BJ. Production and sorting of transgenic, modified human parathyroid hormone in vivo in rat salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 391 : 768-772, 2010.
- Adriaansen J, Perez P, Goldsmith CM, Zheng C, Baum BJ. Differential sorting of human parathyroid hormone after transduction of mouse and rat salivary glands. *Hum Gene Ther* 19 : 1021-1028, 2008.
- Adriaansen J, Perez P, Zheng C, Collins MT, Baum BJ. Human parathyroid hormone is secreted primarily into the bloodstream after rat parotid gland gene transfer. *Hum Gene Ther* 22 : 84-92, 2011.
- Baum BJ, Alevizos I, Zheng C, Cotrim AP, Liu A, McCullagh L, Goldsmith CM, Burbelo PD, Citrin DF, Mitchell JB, Nottingham LK, Rudy SF, Van Waes C, Whatley MA, Brahim JS, Chiorini JA, Danielides S, Turner RJ, Patronas NJ, Chen CC, Nikolov NP, Illei GG. Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 : 19403-19407, 2012.
- Baum BJ, Wellner RB, Zheng C. Gene transfer to salivary glands. *Int Rev Cytol* 213 : 93-146, 2002.
- Braddon VR, Chiorini JA, Wang S, Kotin RM, Baum BJ. Adenoassociated virus-mediated transfer of a functional water channel into salivary epithelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 9 : 2777-2785, 1998.
- Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, Baum BJ. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 3268-3273, 1997.
- Di Pasquale G, Dicembrini I, Raimondi L, Pagano C, Egan JM, Cozzi A, Cinci L, Loreto A, Manni ME, Berretti S, Morelli A, Zheng C, Michael DG, Maggi M, Vettor R, Chiorini JA, Mannucci E, Rotella CM. Sustained exendin-4 secretion through gene therapy targeting salivary glands in two different rodent models of obesity/type 2 diabetes. *PLoS One* 7 : e40074, 2012.
- Hsu JC, Di Pasquale G, Harunaga JS, Onodera T, Hoffman MP, Chiorini JA, Yamada KM. Viral gene transfer to developing mouse salivary glands. *J Dent Res* 91 : 197-202, 2012.
- Ishibashi K, Okamura K, Yamazaki J. Involvement of apical P2Y2 receptor-regulated CFTR activity in muscarinic stimulation of Cl⁻ reabsorption in rat submandibular gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 : R1729-R1736, 2008.
- Ishibashi K, Yamazaki J, Okamura K, Teng Y, Kitamura K, Abe K. Role of CLCA and CFTR in electrolyte reabsorption from rat saliva. *J Dent Res* 85 : 1101-1105, 2006.
- Katano H, Kok MR, Cotrim AP, Yamano S, Schmidt M, Afione S, Baum BJ, Chiorini JA. Enhanced transduction of mouse salivary glands with AAV5-based vectors. *Gene Ther* 13 : 594-601, 2006.
- Kok MR, Voutetakis A, Yamano S, Wang J, Cotrim A, Katano H, Bossis I, Chiorini JA, Tran SD, Tak PP, Baum BJ. Immune responses following salivary gland administration of recombinant adeno-associated virus serotype 2 vectors. *J Gene Med* 7 : 432-441, 2005.
- Mastrangeli A, O'Connell B, Aladib W, Fox P, Baum BJ, Crystal RG. Direct in vivo adenovirus-mediated gene transfer to salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299 : G1146-G1155, 1994.
- Morita T, Nezu A, Tojyo Y, Tanimura A. Increase in muscarinic stimulation-induced Ca²⁺ response by adenovirus-mediated Stim1-mKO1 gene transfer to rat submandibular acinar cells in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 439 : 433-437, 2013.
- Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A,

- Takuma T, Tojyo Y. Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. *Arch Oral Biol* 56 : 1356-1365, 2011.
- Nguyen CQ, Yin H, Lee BH, Chiorini JA, Peck AB. IL17 : potential therapeutic target in Sjögren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. *Lab Inv* 91 : 54-62, 2011.
- 小澤敬也 AAVを利用した遺伝子治療ウイルス 第57巻 47-56, 2007.
- Racz GZ, Perez-Riveros P, Adriaansen J, Zheng C, Baum BJ. In vivo secretion of the mouse immunoglobulin G Fc fragment from rat submandibular glands. *J Gene Med* 11 : 580-587, 2009.
- Sakai T, Kawaguchi M, Kosuge Y. siRNA-mediated gene silencing in the salivary gland using in vivo microbubble-enhanced sonoporation. *Oral Dis* 15 : 505-511, 2009.
- Samuni Y, Cawley NX, Zheng C, Cotrim AP, Loh YP, Baum BJ. Sorting behavior of a transgenic erythropoietin-growth hormone fusion protein in murine salivary glands. *Hum Gene Ther* 19 : 279-286, 2008.
- Samuni Y, Zheng C, Cawley NX, Cotrim AP, Loh YP, Baum BJ. Sorting of growth hormone-erythropoietin fusion proteins in rat salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 373 : 136-139, 2008.
- Shai E, Falk H, Honigman A, Panet A, Palmon A. Gene transfer mediated by different viral vectors following direct cannulation of mouse submandibular salivary glands. *Eur J Oral Sci* 110 : 254-260, 2002.
- Shai E, Palmon A, Panet A, Marmary Y, Sherman Y, Curran MA, Galun E, Condiotti R. Prolonged transgene expression in murine salivary glands following non-primate lentiviral vector transduction. *Mol Ther* 12 : 137-143, 2005.
- Shan Z, Li J, Zheng C, Liu X, Fan Z, Zhang C, Goldsmoth CM, Wellner RB, Baum BJ, Wang S. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated miniature pig parotid glands. *Mol Ther* 11 : 444-451, 2005.
- Sramkova M, Masedunskas A, Parente L, Molinolo A, Weigert R. Expression of plasmid DNA in the salivary gland epithelium : novel approaches to study dynamic cellular processes in live animals. *Am J Physiol Cell Physiol* 297 : 1347-1357, 2009.
- Srinivasan P, Shanmugam T, Dayton RD, Palaniyandi S, Abreo F, Caldito G, Klein RL, Sunavala-Dossabhoy G. Recombinant AAV9-TLK1B administration ameliorates fractionated radiation-induced xerostomia. *Hum Gene Ther* 24 : 604-612, 2013.
- Voutetakis A, Zheng C, Metzger M, Cotrim AP, Donahue RE, Dunbar CE, Baum BJ. Sorting of transgenic secretory proteins in Rhesus macaque parotid glands after adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 19 : 1401-1405, 2008.
- Wang J, Voutetakis A, Mineshiba F, Illei GG, Dang H, Yeh CK, Baum BJ. Effect of serotype 5 adenoviral and serotype 2 adeno-associated viral vector-mediated gene transfer to salivary glands on the composition of saliva. *Hum Gene Ther* 17 : 455-463, 2006.
- Wang J, Wang F, Xu J, Ding S, Guo Y. Double-strand adeno-associated virus-mediated exendin-4 expression in salivary glands is efficient in a diabetic rat model. *Diabetes Res Clin Pr* 103 : 466-473, 2014.
- Yin H, Nguyen CQ, Samuni Y, Uede T, Peck AB, Chiorini JA. Local delivery of AAV2-CTLA4IgG decreases sialadenitis and improves gland function in the C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 14 : R40, 2012.



森田 貴雄

平成2年3月 新潟大学理学部生物学科 卒業
 平成4年3月 新潟大学大学院理学研究科修士課程 修了
 平成9年3月 東京大学大学院医学系研究科第二基礎医学専攻 修了
 平成9年4月 CREST研究員
 平成10年12月 新潟大学脳研究所 研究機関研究員
 平成12年4月 北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座 助手
 平成19年4月 北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野 助教
 平成20年4月～現在 北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野 講師