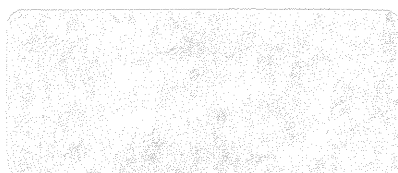


199800135A

細胞増殖および細胞接着の制御による  
がん遺伝子治療法の開発

主任研究者  
高久史磨



## 細胞増殖および細胞接着の制御によるがん遺伝子治療法の開発

主任研究者 高久 史磨 自治医科大学学長

**研究要旨** 細胞生物学的な現象をつかさどる分子の遺伝子を用いて、新しいがんの遺伝子治療法を開発するために、さまざまな研究が行われた。その結果、Caspase 8 遺伝子導入による細胞死誘導効果、腫瘍特異的増殖型アデノウイルスによる *in vitro*、*in vivo* の両方における殺腫瘍細胞効果、殺細胞的な変異単純ヘルペスウイルスの感染とサイトカイン遺伝子の導入による相乗的な殺腫瘍細胞効果、野生型 p53 遺伝子導入樹状細胞を介した CTL による免疫遺伝子治療の有効性、白血病細胞特異的なペプチドをパルスした樹状細胞による CTL 誘導とその白血病治療における有効性、アデノウイルス由来 DNA リボソーム全身投与による腫瘍特異的な遺伝子導入法、肝細胞癌特異的な遺伝子発現法と 5FC-CD システムを用いた肝細胞癌治療法、ベクター機能を有する新たなモノクローナル抗体の有効性、転写因子 CREB の過剰発現によるアポトーシスの誘導、などが明らかになった。

### 分担研究者

濱田 洋文 癌研究会癌化学療法センター  
分子生物治療研究部部長  
今井 浩三 札幌医科大学医学部  
内科学第一講座教授  
平井 久丸 東京大学医学部附属病院  
無菌治療部助教授  
官澤 文彦 国立がんセンター研究所  
薬効試験部室長  
間野 博行 自治医科大学分子生物学教室  
助教授  
矢崎 貴仁 慶應義塾大学医学部  
生理学教室講師  
石坂 幸人 国立国際医療センター研究所  
難治性疾患研究部部長  
佐藤 裕子 国立国際医療センター研究所  
難治性疾患研究部室長  
湯尾 明 国立国際医療センター研究所  
血液疾患研究部部長

化などによってそれぞれ同定した。殺細胞効果は動物実験系においても確認した。遺伝子発現調節系はテトラサイクリン反応性プロモーターを用いて構築した。

### C. 研究結果

- 1) アデノウイルスベクターを用いてアポトーシス関連遺伝子 (Fas、Caspase、Bax、など) をグリオーマ細胞に導入し、アポトーシスを誘導できた。また、E1B欠損アデノウイルスのファイバーにK20の変異を導入しグリオーマに導入効率を高めたウイルスベクターは、*in vivo* も含めて治療に有用であった。
- 2) 野生型p53-アデノウイルスベクターを樹状細胞に感染させ、マウスを免疫することにより、変異p53を発現した腫瘍細胞を退縮させるCTLを得ることに成功した。
- 3) 慢性骨髄性患者末梢血より樹状細胞を取り出し、bcr/abl融合ペプチドをパルスして同患者のリンパ球と混合培養することによりペプチド特異的CTLを樹立した。
- 4) リボソーム化アデノウイルス由来 DNA-Terminal protein complex の静脈内投与によりマウス皮下腫瘍に遺伝子の導入が可能であった。
- 5) アルファフェトプロテイン(AFP)遺伝子のプロモーター下流にシトシンデアミナーゼ(CD)cDNAを挿入した発現ユニットを作成し、5-fluorocytosine (5FC)併用遺伝子治療法を試みたところ、*in vitro* においても *in vivo* においても肝細胞癌特異的に細胞死を誘導した。
- 6) 腫瘍特異的に細胞毒性を示すヘルパーウイルス (HSV-G207) を用いて、浸潤抑制因子 TIMP2、腫瘍ワクチン誘導因子IFN- $\gamma$ をおのおの発現するdefective HSV vectorを構築し、*in vitro* と *in vivo* でその抗腫瘍効果を確認した。両vectorともにHSV-G207単独よりも強力な抗腫瘍効果を示し、*in vivo* ではTIMP2発現vectorが最も強い効果を発揮した。
- 7) 細胞特異的遺伝子導入を目指して、レセプター型チロシンキナーゼ (RET)、神経芽腫細胞、胆道がん、大腸がんの未知膜抗原、等に対するモノクローナル抗体を作成した。これらのうちRETに対する抗体を用いて、神経芽腫細胞、造血幹細胞で

### A. 研究目的

細胞の増殖やアポトーシスを制御するさまざまな液性因子や細胞同士の接着に関与する接着分子などは、現代の細胞生物学の中心的課題であり、がん細胞においてもこれらの事項はきわめて重要である。本研究においては、このような細胞生物学的な現象をつかさどる分子の遺伝子や遺伝子産物を用いて、新しく有効ながん遺伝子治療法を開発することを目指す。

### B. 研究方法

細胞は遺伝子導入に使われうるさまざまなヒトおよびマウスの培養細胞株もしくはヒトの正常血球を用いた。樹状細胞の分離やCTLの誘導は標準的な手法により行った。遺伝子導入は、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスを用いた系や、リボソームを関した系、膜受容体へのモノクローナル抗体を介したイムノジン法などを用いた。一部の研究においては、ウイルス自体が抗腫瘍活性を有するベクターの系 (アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス) を用いた。増殖は生細胞数の算定、アポトーシスは形態評価やDNA断片

の遺伝子導入、発現を確認した。

8) ヒト白血病におけるt(1;12)転座の転座切断点を明らかにし、転座の結果生じる融合遺伝子TEL/ARG融合mRNAの解析を行った。

9) 転写因子として知られているCREB蛋白(及びそのC末端ペプチド断片)に、腫瘍細胞を殺傷する(アポトーシスを介して)作用があることが明らかになった。

#### D. 考察

さまざまな種類のがん細胞において、特定の遺伝子導入や特定の変異型ウイルスが腫瘍細胞のアポトーシスや増殖抑制を誘導することなどが明らかにされ、がんの遺伝子治療法の新しいモデルがいくつか示された。今後は、これらの実験系が臨床応用につながるような具体的な研究の推進が重要であると考えられた。また、得られた結果の中には全く新しい知見もあり、その機序の解析などの基礎検討も併せて進める必要があると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、ウイルス自体の殺細胞効果と特定の遺伝子によるアポトーシス誘導が明らかにされ、新たな遺伝子治療の可能性が示された。

#### F. 研究発表

1) Nishizawa Y, Saeki K, Hirai H, Yazaki Y, Takaku F, Yuo A. Potent inhibition of cell density-dependent apoptosis and enhancement of survival by dimethyl sulfoxide in human myeloblastic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 174:135-143,1998.

2) Shimura M, Tanaka Y, Nakamura S, Minemoto Y, Yamashita K, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y: Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 13:621-637,1999.

3) Saeki K, Yuo A, Takaku F: Cell cycle regulated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB): identification of novel phosphorylation sites. *Biochem J* 338:49-54,1999.

4) Yoshida Y, Sadata A, Zhang W, Shinoura N, Hamada H: Generation of a fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9:2503-2515,1998.

5) Shinoura N, Ohashi M, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Saito I, Hamada H: Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic

genes. *Human Gene Therapy* 9:2683-2689,1998.

6) Shinoda M, Kudo T, Imai K, Hinoda Y, et al.: Effective adoptive immunotherapy by T-LAK cells retargeted with bacterial superantigen-conjugated antibody to MUC1 in xenografted SCID mice. *Cancer Res* 58:2838-2843,1998.

7) Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Imai K, et al: Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene* 16:1443-1453, 1998.

8) Honda H, Oda H, Suzuki T, Takahashi T, Witte ON, Ozawa K, Ishikawa T, Yazaki Y, Hirai H: Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. *Blood* 91:2067-2075,1998.

9) Takahashi T, Yamada K, Tanaka T, Kumano K, Kurokawa M, Takahashi T, Hirano N, Honda H, Chiba S, Tsuji K, Yazaki Y, Nakahata T, Hirai H: A potential molecular approach to ex vivo hematopoietic expansion with recombinant EGFR-expressing adenovirus vector. *Blood* 91:4509-4515,1998.

10) Yazaki T, Hoshi M, Terao S, Uyemura K, Kawase T, Rabkin SD, Martuza RL: Combined gene therapy for malignant tumors using HSV vector system. *Gene Therapy (CSH Lab)* 217, 1998.

11) Hunter WD, Yazaki T, Mineta T, Rabkin SD, Martuza RL: Intracerebral inoculation of replication-competent herpes simplex virus mutant G207 in non-human primates. *J Virol* in press, 1999.

12) Yazaki T, Hoshi M, Terao S, Kawase T, Uyemura K: Combined gene therapy for gliomas by both replication-competent and replication-defective virus vectors. *Mol Chem NeuroPath* in press, 1999.

13) Kondo S, Ishizaka Y, Okada T, Kondo Y, Hitomi M, Tanaka Y, Haqqi T, Barnett GH, Barna BP: FADD gene therapy for malignant gliomas in vitro and in vivo. *Human Gene Therapy* 9:1599-1608,1998.

14) Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, Ishizaka Y, Hitomi M, Haqqi T, Liu J, Barnett GH, Alnemri ES, Barna BP: Retroviral transfer of CPP32 gene into malignant gliomas in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58:962-967, 1998.

「細胞増殖および細胞接着の制御によるがんの遺伝子治療の開発」班  
「アポトーシス関連遺伝子の発現によるがんの遺伝子治療法の開発」に関する研究  
分担研究者：濱田洋文 (財) 癌研・癌化学療法センター・分子生物治療研究部

研究要旨：当研究では、アポトーシス関連遺伝子の発現による癌の遺伝子治療法の開発を目的とした基礎研究を行っている。平成10年度は、各種アポトーシス関連遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクターによる腫瘍細胞への殺細胞効果の比較および腫瘍特異的に発現するプロモーターとの組み合わせの検討、さらに増殖型アデノウイルスベクターを組織特異的に発現するように改変し、治療効果を検討した。その結果、caspase-8の遺伝子導入は腫瘍の抗アポトーシス遺伝子の発現にかかわらずアポトーシスの誘導が可能であり、組織特異的発現プロモーターを使用しても殺細胞効果があった事、腫瘍特異的増殖型アデノウイルスベクターはin vitro、in vivo共に抗腫瘍効果が高い事がわかった。

#### A. 研究目的

当研究では、腫瘍細胞がもともとアポトーシス関連遺伝子の異常がありアポトーシスを起こしにくい事を利用して、腫瘍特異的な細胞障害を得るような治療法の開発を目的とした基礎研究を行っている。本年度は、1) 様々なアポトーシス関連遺伝子の導入が、腫瘍に細胞死を誘導するか、特に腫瘍特異的なプロモーターとの併用はどうか、2) 腫瘍特異的に増殖するアデノウイルスベクターの抗腫瘍効果はどうか、に関して検討を行った。

#### B. 研究方法

- 1) a) caspase-8、caspase-3、Bax等のアポトーシスを誘導する遺伝子と、Bcl-2、Bcl-XL等の癌をアポトーシスより守る遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作成した。
- b) ウイルスベクターによる遺伝子導入後のアポトーシスに関して、悪性神経膠腫に特異的に発現するmyelin basic protein promoterの併用も含めて検討した。
- 2) fiber knobにリジン20個をつけ、さらにE1B55Kを発現しないように改変した腫瘍特異的増殖型アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果をin vitro、in vivoで検討した。

#### C. 研究結果

- 1) a) caspase-8及びBaxは癌(特にグリオーマ)に効果的にアポトーシスを誘導したが、caspase-3は効果的ではなかった。
- b) 悪性神経膠腫に特異的に発現するmyelin basic protein promoterの併用にも、caspase-8は効果的にアポトーシスを誘導した。
- c) caspase-8によるアポトーシスはBcl-2、Bcl-XLでは抑えられず、癌の治療に有用である事がわかった。
- 2) 腫瘍特異的増殖型アデノウイルスベクターはグリオーマ特異的に増殖し、in vitro、in vivoにおいても、従来の増殖型アデノウイルスベクターに比べて、殺細胞効果が高い事がわかった。

#### D. 結論と考察

本年度の研究によって、様々なアポトーシス関連遺伝子をアデノウイルスで導入する場合に、癌のアポトーシスを起こしにくいメカニズムに打ち勝ち殺細胞効果を誘導するにはcaspase-8が有用である事がわかった。これらのアポトーシス関連遺伝子を利用した治療は、癌への特異

的な、効率の高い導入方法と組み合わせ、今後の治療に応用可能であると思われる。また癌がアポトーシスを起こしにくいという事は、ウイルスが増殖しやすいという事であり、腫瘍特異的増殖型アデノウイルスベクターの導入が(ウイルスによる)発癌のメカニズムの1つと密接に結びついた、根治的な治療となる可能性がある。今後このウイルスベクターの臨床応用を検討していく予定である。

#### E. 発表論文

1. Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Shinoura, N. and Hamada, H. Generation of a fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9(17) 2503-2515, 1998.
2. Shinoura, N., Yoshida, Y., Sadata, A., Hanada, K., Yamamoto, S., Kirino, T., Asai, A., and Hamada, H. Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implication for gene therapy. *Human Gene Therapy* 9(14): 1983-1993, 1998.
3. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Saito, I., and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Human Gene Therapy* 9(18) 2683-2689, 1998.
4. Shibagaki, N., Hanada, K., Yamaguchi, S., Yamashita, H., Shimada, S. and Hamada, H. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 28(4): 1125-1133, 1998.
5. Kanai, F., Kawakami, T., Hamada, H., Sadata, A., Yoshida, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Tateishi, K., Shiratori, Y., and Omata, M. Adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentration of 5-fluorouracil. *Cancer Res.* 58: 1946-1951, 1998.
6. Shiratori, Y., Kanai, F., Hikiba, Y., Moriyama, H., Hamada, H., Matsumura, M., Tanaka, T., Lan, K-H., Ohashi, M., Okano, K., Naito, M., and Omata, M. Gene therapy for hepatic micrometastasis of murine colon carcinoma. *J. Hepatology* 28 (5): 886-895, 1998.
7. Ohashi, M., Kanai, F., Tanaka, T., Lan, K-H., Shiratori, Y., Komatsu, Y., Kawabe, T., Yoshida, H., Hamada, H., and Omata, M. In vivo adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing pancreatic cancer. *Jp. J. Cancer Res.* 89: 457-462, 1998.
8. Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W., and Hamada, H. Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Therapy* 5: 1130-1136, 1998.

樹状細胞と野生型 p53 - アデノウイルスベクターを用いた遺伝子免疫療法  
分担研究者 今井 浩三 札幌医大医学部教授

**研究要旨** ヒト野生型 p53-アデノウイルスベクター (Wt-Ad-p53) を感染させたマウスの樹状細胞で免疫したマウスでは、85% がヒトの変異p53 を遺伝子導入したマウスの NIH3T3 (D459) 細胞を拒絶した。また、マウスの p53 の変異のあるマウスの腫瘍細胞、Meth A も拒絶した。拒絶したマウスでは、異なる2種のヒト変異 p53 蛋白発現細胞に対する CTL が認められた。これらの結果より、Wt-Ad-p53 を用いることで、p53 の変異部位の異なる様々の腫瘍に対して CTL を誘導できる可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

変異 p53 蛋白は、正常機能を持たず、癌細胞の細胞質内に蓄積される。この突然変異を含むエピトープは腫瘍だけが発現し、腫瘍抗原として理想的なものと考えられる。しかし、これらのエピトープが MHC-class I と結合できなければ CTL を誘導することはできない。最近、正常組織に微量に発現している抗原でも、正常細胞に比して癌細胞に大量に発現していれば、癌抗原となりうる事が報告されている。過剰発現している変異 p53 蛋白のうち、変異を含まない正常部分のエピトープが MHC-class I と結合できれば、正常な p53 ペプチドでワクチンが可能になる。また正常 p53 蛋白の全長を使用することにより、患者の HLA class I の種類によらずワクチン療法を行える可能性がある。そこで Wt-AD-p53 を用い、変異 p53 蛋白をもつ腫瘍への CTL の誘導を試みた。

**B. 研究方法**

1) ヒト Wt-Ad-p53 を感染させたマウスの DC をマウスの腹腔内に投与して免疫し、D459 を拒絶するか検討した。  
2) 免疫したマウスの脾細胞を用い、ヒト変異 p53 蛋白発現細胞に対する CTL を誘導できるか検討した。

**C. 研究結果**

1) ヒト Wt-Ad-p53 を感染させたマウスの DC で免疫されたマウスでは 85% (17/20) が D459 を拒絶した。マウスの腫瘍細胞でマウスの p53 の変異を持つ MethA に対して拒絶が認められた。拒

絶したマウスでは、ヒト変異 p53 蛋白発現細胞に対する CTL が認められた。

2) BALB/c マウスに D459 細胞を投与し腫瘍を確立した後、DC に Wt-Ad-p53 を感染させ投与したところ、有為に腫瘍の増殖が抑制された。

**D. 考察**

Wt-Ad-p53 を DC に感染させて免疫治療する報告はこれまでは見られない。この方法を用いることで p53 の変異の場所にかかわらず、また癌患者の HLA のタイプに関係なく、多くの患者に使用できることが期待される。

**E. 結論**

Wt-Ad-p53 を免疫原として使用することで、変異 p53 蛋白を発現している細胞を拒絶し、CTL が誘導された。CTL は異なる変異 p53 蛋白を発現している細胞に対しても認められた。

**F. 研究発表**

1) Ishida T, Chada S, Carbone D P, Gabilovich D I and Imai K : Dendritic cells transduced with wild type p53 gene elicit potent antitumor immune response. Cancer Res. in press.  
2) Shinoda M, Kudo T, Imai K et al. : Effective adoptive immuno-therapy by T-LAK cells retargeted with bacterial superantigen-conjugated antibody to MUC1 in xenografted SCID mice. Cancer Res 58:2838-2843, 1998.

## 分担研究報告書

「細胞増殖および細胞接着の制御によるがんの遺伝子治療法の開発」班  
「慢性骨髄性白血病に対する樹状細胞を用いた免疫療法」に関する研究  
分担研究者：平井久丸（東京大学医学部無菌治療部・助教授）

研究要旨：がんに対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発を目的とし、慢性骨髄性白血病(CML)を標的として樹状細胞を用いた抗白血病効果の誘導を検討した。患者末梢血より取り出した樹状細胞にbcr/ablペプチドをパルスしリンパ球と混合培養することにより、bcr/ablペプチド特異的なCD4陽性T細胞およびCD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)を樹立した。複数の患者においてこのbcr/ablペプチド特異的T細胞の樹立を試みた結果、白血病細胞の切断点の型とHLAの型に大きく依存することが予想された。現在、この結果を用いてCML患者に対する樹状細胞療法の臨床応用を準備している。今後、樹状細胞に腫瘍抗原や抗腫瘍反応を誘導する分子の遺伝子導入を行い、*in vitro*で抗白血病作用をもつ自己T細胞をより効率よく増幅させ、患者体内に戻す養子免疫療法あるいはそれら遺伝子を導入した樹状細胞に戻す遺伝子治療を検討する予定である。

### A. 研究目的

慢性骨髄性白血病細胞は、そのほとんどがbcr/ablキメラ遺伝子をもち、その発現する蛋白は白血病細胞の増殖に必須である。しかも切断点を含むペプチドは腫瘍特異的であり腫瘍抗原となりうる。実際、健康人末梢血よりbcr/ablペプチド特異的なCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞が誘導できることが示されている。今年度我々は、CML患者末梢血においてもbcr/ablペプチド特異的T細胞の誘導が可能か否かと、またその誘導がbcr/ablの切断点の型及びHLAの型に依存するかについて調べ、CMLに対する樹状細胞を用いた免疫療法の臨床応用へ向けての基礎的検討を行った。

### B. 研究方法

約20名のCML患者のbcr/ablの切断点の型、及びHLA型を調べた。患者末梢血より抗CD14抗体ビーズを用いて単球を回収し、メデイウムにIL-4とGM-CSFを加えて樹状細胞化させた。17merのbcr/ablペプチドを加え、同じ患者のリンパ球と混合培養を行った。ペプチドをパルスした樹状細胞による刺激は7-10日間隔で繰り返した。2回目の刺激後、抗CD4/CD8抗体ビーズを用いてCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞に分離した。5回以上刺激した後、樹立したT細胞のペプチドに対する反応性を樹状細胞を用いた系により<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みや<sup>51</sup>Cr遊離試験による評価を行った。

### C. 研究結果

1. 患者末梢血より取り出した単球をIL-4とGM-CSFで培養し形態変化及び細胞表面マーカーで樹状細胞化していることを確認した。
2. b3a2型bcr/ablペプチドに特異的に反応するCD8陽性T細胞を樹立した。HLA型ではA\*0201及びA\*2402を持つ患者で樹立できた。b2a2型bcr/ablペプチドに特異的に反応するCD8陽性T細胞は樹立できなかった。
3. bcr/ablペプチド特異的CD8陽性T細胞を樹立された患者において、CD4陽性T細胞について調べたところ、bcr/ablペプチドに反応するCD4陽性T細胞が

誘導されている場合とそうでない場合がみられ、これはHLA classIIで規定される可能性が推測された。

### D. 考察

CML患者末梢血よりbcr/abl特異的CD4陽性及びCD8陽性T細胞の誘導が可能であることがわかった。この誘導はbcr/ablの切断点の型、及びHLAの型に大きく依存していることが示唆された。今後、患者に臨床応用していく上でこれらを基に適応症例を決めることが可能であると思われる。また、今後はbcr/abl特異的T細胞をより効率よく誘導するために樹状細胞に腫瘍抗原、あるいは免疫反応を増強させる分子の遺伝子を導入し、遺伝子治療として発展させて行く予定である。

### E. 結論

CML患者の末梢血より樹状細胞を用いてbcr/abl特異的T細胞を樹立した。この結果から、樹状細胞を用いた免疫療法をCMLに対して臨床応用することが可能であると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hirano N et al. Protective And Therapeutic Immunity against Leukemia Induced by Irradiated B7-1 (CD80)-Transduced Leukemic Cells. Human Gene Therapy 8:1375-1384, 1997.
- 2) Takahashi T et al. A Potential Molecular Approach to Ex Vivo Hematopoietic Expansion With Recombinant Epidermal Growth Factor Receptor-Expressing Adenovirus Vector. Blood. 91:4509-4515,1998.
- 3) Honda H, et al. Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human P h1-positive leukemias. Blood 91:2067-2075, 1998.

#### 2. 学会発表

- 1) Takahashi T et al. 「慢性骨髄性白血病に対する樹状細胞を用いた免疫療法」(日本臨床血液学会シンポジウム, 1998)

厚生科学研究費補助金(がん克服戦略研究事業)  
分担研究報告書

アデノウイルス全身投与による遺伝子治療と抗がん剤併用に関する基礎的検討

分担研究者 官澤 文彦 国立がんセンター研究所 薬効試験部室長

研究要旨

アデノウイルス由来 DNA-TPC(terminal protein complex)のリポソームを静脈内投与することによりヒト肺癌細胞株皮下移植担癌マウスの腫瘍組織に遺伝子導入が可能であった。アデノウイルス全身投与による遺伝子治療の可能性が示唆された。

分担研究者 官澤 文彦  
国立がんセンター研究所  
室長

A. 研究目的

肺がん等の固形がんの治療戦略は集学的治療である。高い感染効率を有するアデノウイルスの全身投与を利用した、遺伝子治療と抗がん剤との併用の基礎的検討を行っている。特にアデノウイルス裸DNAの静脈内投与による全身投与法を開発することを本年度の目標とした。

B. 研究方法

E1A 欠損、CAG プロモーター、LacZ 遺伝子を有するアデノウイルスから TPC(terminal protein complex)を含む DNA(AdexCALacZLDNA-TPC)を抽出し各種リポソーム剤を用いリポソーム化した。非増殖型モデルとしてヒト小細胞肺癌 SBC-3 細胞を皮下移植したヌードマウスの尾静脈より静脈内投与し、腫瘍組織を含む、全身組織における LacZ 遺伝子産物  $\beta$ -Gal の発現により、同投与法による遺伝子導入効率を検討した。

C. 研究結果

各種リポソームを用い作成した AdexLacZDNA-TPC/Lipo をヒト肺癌細胞株皮下移植担癌ヌードマウスへ静脈内投与し腫瘍組織を含めた各臓器での  $\beta$ -Gal の発現を検討した。その結果、Liposome

の組成に導入された遺伝子の発現部位には差が生じることが確認された。TransFast<sup>®</sup>を用いた場合の腫瘍組織において  $\beta$ -Gal の高発現を認め、全身投与の可能性が示唆された。

D. 考察

p53 機能異常細胞内増殖型 type 5 adenovirus vector(AxE1AdB)での細胞障害性を MTT 法により検討しており、今後 AxE1AdB DNA-TPC/Lipo の in vitro 抗腫瘍活性及び in vivo における静脈内投与による治療効果の検討を行いたい。

E. 結論

リポソーム化アデノウイルス由来 DNA-Terminal protein complex の静脈内投与によりマウス皮下腫瘍に遺伝子導入可能と示した。アデノウイルス裸DNA全身投与による遺伝子治療の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表  
Sunami, F *et al.* Cancer Chemother Pharmacol (in press)  
Kanzawa, F *et al.* Cancer Chemother Pharmacol (in press)
2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

「研究要旨」肝細胞癌(HCC)は慢性肝炎、肝硬変などに引き続いて発症する予後不良の疾患であり、早期診断が困難なことから根治可能な例は極めて少ない。我々はHCCに対する遺伝子治療法を開発しヒトへの臨床応用を目指して以下の検討を行った。まずHCC細胞特異的に $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 蛋白が産生されることに着目し、AFP遺伝子プロモーターによって自殺遺伝子発現が調節される様な遺伝子治療法の開発を試みた。具体的にはAFP遺伝子プロモーターの下流にcytosine deaminase (CD) 遺伝子cDNAを結合し、この発現ユニットを組み込んだ組換えレトロウイルスを作成した。本ウイルス感染HCC細胞株は5-fluorocytosine (5-FC) 添加によって速やかに細胞死へと向かった。またこの細胞を接種したヌードマウスに5-FCを経腹腔投与することにより、腫瘍の増殖がほぼ完全にブロックされた。以上より我々が開発した組換えレトロウイルスはin vivoでHCCに対する抗腫瘍効果を持つことが確認された。

#### A. 研究目的

悪性腫瘍に対する遺伝子治療法としてこれまで、(1)免疫強化療法、(2)自殺遺伝子発現、(3)癌遺伝子発現の抑制あるいは癌抑制遺伝子機能の回復、など様々な方法が検討されてきた。いずれの場合もモデルマウスにおいて治療効果が挙げられたものはあるが、高等哺乳動物で効果が確認されたものは殆どない。上記の遺伝子治療法の多くにおいて腫瘍細胞特異的に目的遺伝子を発現するシステムが重要になってくるが、我々は肝細胞癌(HCC)特異的に $\alpha$ -fetoprotein(AFP)が発現することに着目し、AFP遺伝子プロモーターを利用することでHCC細胞のみに自殺遺伝子を発現させる遺伝子治療法の開発を目指した。また正常肝細胞が分裂しないのに比しHCC細胞が増殖することに注目し、遺伝子導入ベクターとしてレトロウイルスを利用した。

#### B. 研究方法

- 1 AFP遺伝子プロモーターの特異性を検定する目的でAFP遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼcDNAを結合した発現ユニットを作成し、これらを組み込んだレトロウイルスを作成する。本ウイルスをAFP産生HCC細胞株を含む様々な細胞株に感染させ、ルシフェラーゼ活性を検討する。
- 2 用いる自殺遺伝子としてcytosine deaminase (CD)を用いる。CDはprodrugである5-fluorocytosine (5-FC)を極めて細胞毒性の強い5-fluorouracil (5-FU)に変換し、細胞死を誘導することが知られる。このCD cDNAをAFPプロモーターの下流に結合させ、これらを組み込んだ治療用ウイルスを作成し、1と同様に細胞株に導入する。これら細胞の培養上清中に5-FCを添加し、AFP産生細胞特異的に細胞死が誘導されることを確認する。
- 3 本実験計画のin vivoにおける有効性を確認する目的で治療用レトロウイルス感染HCCをヌードマウスの皮下に接種し、5-FCあるいはその溶媒であるPBSを経腹腔投与する。5-FC投与群のみで接種した腫瘍の増殖がブロックされるか否か検討する。

#### C. 研究結果

- 1 AFPプロモーター-ルシフェラーゼ組み込みレトロウイルスを感染させたHCC細胞(HepG2およびHep3B)のルシフェラーゼ活性は、同ウイルス感染マウス線維

芽細胞株(3T3)及びヒト子宮頸癌細胞株(HeLa)の数百倍以上であり、我々が用いたAFPプロモーターの選択性が極めて高いことが確認された。

- 2 CDの発現がSV40プロモーターによって調節されるレトロウイルスを感染させた場合には、細胞の種類に関わらず5-FC添加で細胞死が誘導されたが、治療用ウイルスの場合はHCC特異的に細胞死が誘導された。

- 3 治療用ウイルス感染Hep3B細胞をヌードマウスに接種し5-FCあるいはPBSを腹腔投与した結果、PBS投与群には皮下腫瘍の増殖が確認されたが、5-FC投与群では腫瘍の発育がほぼ完全にブロックされた。

#### D. 考察

以上よりAFPプロモーター/CD遺伝子cDNA発現ユニットを組み込んだレトロウイルスを感染させることによってAFP産生細胞においてのみCD遺伝子が発現され、その結果5-FC投与によって細胞死を誘導することが可能であること、また同じ濃度の5-FCはAFP非産生細胞においては影響を与えないことが示された。

#### E. 結論

我々の最終的な臨床応用の目標は、HCC診断目的に行われる肝動脈造影の際に、開発したウイルスを経動脈投与し治療することである。今後はより臨床に近い実験モデルとしてHCCを自然発生するWoodchuckラットを用い、de novoのHCCに対する我々のウイルスの治療効果を判定する。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

Kokubun M et al: Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Therapy* 5: 923-929, 1998.

Ito K et al: Development of a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic cells. *Blood* 90: 3884-3892, 1997.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1 特許取得

マウスtec遺伝子プロモーター：出願番号 特願平8-54294、公開番号 WO97/34007、国際出願日 97.3.12



## 変異ウイルスを基軸とした悪性腫瘍の複合的遺伝子治療

分担研究者 矢崎 貴仁 慶應義塾大学医学部 生理学 専任講師

**研究要旨** 広範囲な宿主を標的として、感染後細胞融解的に複製増殖する単純ヘルペスウイルス(HSV)を、遺伝子操作することにより悪性細胞に特異性を持たせ、さらにそれをヘルパーウイルスとして抗腫瘍遺伝子を発現する HSV ベクターを構築し、一つのシステムで多機能を同時に発揮させる新しい治療法の開発を検討した。腫瘍特異的複製可能 HSV-G207 をヘルパーウイルスとして浸潤抑制遺伝子 TIMP2、腫瘍免疫誘導サイトカイン IFN- $\gamma$ 、および IL-12 を発現する非複製型 HSV ベクターを構築した。各々のベクターを、脳腫瘍、大腸癌細胞等に感染させ、*in vitro* と *in vivo* 双方における細胞傷害効果を検討した結果、いずれも HSV-G207 単独の場合よりも高い治療効果を示した。悪性腫瘍に対する効率的な遺伝子治療を行うには、細胞傷害性増殖型 HSV と、機能遺伝子を単一ベクターで発現させる方法が有効である可能性が示された。

### A. 研究目的

癌に対する遺伝子治療では、機能遺伝子をいかに効率良く導入するかが鍵となる。また、単一遺伝子異常でおこる癌は少なく、ある異常遺伝子を正常遺伝子で置換するという発想には限界がある。これらを克服するため、細胞傷害性ウイルスそのものを腫瘍内で特異的に複製させ、それに追従して複数の機能遺伝子を効率良く発現させることで、実用化しやすい単一ベクター上で、効率の高い複合治療システムを得ることを目的とする。

### B. 研究方法

(1)アンプリコンプラスミドと defective HSV vector の作製：TIMP2, INF $\gamma$ および IL12 を CMV プロモーター下流に組み込んだアンプリコンプラスミドを構築する。ヘルパーウイルスに HSV-G207 を用い、TIMP2, INF $\gamma$ および IL12 を発現する defective HSV vector を Vero cell 上で作製する。目的の組み換えウイルスが出来たかどうかについては、サザンブロット法を用いて確認する。

(2)組換えウイルスの生物学的活性の解析：*in vitro* でウイルス増殖能・細胞傷害活性等の解析を行う。また、組込んだ各遺伝子産物の発現については、免疫細胞化学、ウエスタンブロット法を用いて確認する。TIMP2 発現ウイルスについては double chamber を用いて感染腫瘍細胞の浸潤能解析を行う。組み換えウイルスが最も高い生物学的活性を示した細胞を選択し、マウス皮下に腫瘍細胞を移植し、腫瘍の浸潤・増殖を経時的に検討する。また、脳腫瘍細胞については頭蓋内移植モデルを作成し、ウイルスの局所注入による腫瘍の治療効果を見るための生存解析を行う。

### C. 研究結果

(1)HSV の複製開始配列 ori と、パッケージングシ

グナルを含む pBR322 起源のプラスミドを用いて、CMV プロモーター下流に TIMP2, INF $\gamma$  および IL12 を組込んだアンプリコンプラスミドを構築した。さらに HSV-G207 をヘルパーウイルスとして各遺伝子を発現する defective HSV vector を作成した。

(2)*in vitro* の解析では、親ウイルス HSV-G207 と各々の defective vector のウイルス産生能に大きな差は認められず、plaque forming 法による細胞傷害活性の解析でも、ヘルパーウイルスを同濃度で感染させる限りは両者に差は認めなかった。これらの結果は新たに作成したベクターにおいてもヘルパーウイルスによる細胞傷害活性が維持されていることを示す。TIMP2 発現ウイルスを用いた浸潤解析では、TIMP2 の浸潤抑制効果が認められ、TIMP2 発現ウイルス感染腫瘍細胞が効率良く死滅した。*In vivo* の解析では、皮下移植腫瘍の成長抑制、脳腫瘍モデル動物の生存延長ともに TIMP2 発現ウイルス感染群で著明な効果が認められた。

### D. 考察と結論

HSV-G207 をヘルパーウイルスとして、機能遺伝子を同時に発現する defective HSV vector の作成法を開発した。TIMP2 発現ウイルスは、腫瘍の浸潤を抑制することで、HSV-G207 の細胞傷害効果を効率良く向上させることが可能であった。

### E. 研究発表

- 1) Yazaki T et al: in "Neural Development" Springer-Verlag Tokyo, pp509-514, 1998
- 2) 矢崎貴仁 他: 複製型ウイルスを応用した脳腫瘍の遺伝子治療. Neuro-Oncology8, 2-6 1998
- 3) Toda M et al: J Immunol 160, 4457-4464, 1998
- 4) Yazaki T et al: Combined gene therapy for malignant brain tumors using HSV vector system. Gene Therapy (CSH Lab.), 217, 1998

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所、難治性疾患研究部長

**研究要旨** 抗体を用いた細胞特異的遺伝子導入を一般化するため、ベクター機能を有することが期待される4種類のモノクローナル抗体を作成した。既知の膜抗原としてRET、未知膜抗原として3種の癌細胞の膜画分を抗原として用いた。RETはレセプター型チロシンキナーゼをコードする遺伝子で、神経芽腫細胞やCD34陽性細胞での発現が報告されている。今回、リコンビナント蛋白質として発現したRET細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体は、細胞培養液中に添加すると胞体内に取り込まれ、さらにビオチン・アビジンを介したDNAとの複合体を用いることにより、外来遺伝子を細胞に発現させることが可能となった。このようなベクター機能が期待されるモノクローナル抗体を種々の癌細胞に対して作成することにより、抗体による細胞特異的遺伝子導入システム化が可能になると考えられた。今後、今回作成したモノクローナル抗体を用いた遺伝子導入を行う予定である。

#### A. 研究目的

モノクローナル抗体やリガンドを用いることにより、細胞特異的な遺伝子導入が可能になりつつある。しかし、現在用いられているモノクローナル抗体は、そのほとんどが、既知膜抗原に対するものであり、細胞特異的遺伝子導入を一般化するためには、未知膜抗原を認識し、かつ、ベクターとして機能するモノクローナル抗体（以下ベクター抗体）を用意することが必須と考えられる。我々は、モノクローナル抗体を用いた細胞特異的遺伝子導入をシステム化するため、まず、既知膜抗原であるRETに対する抗体を作成し、次いで、未知膜抗原を認識するベクター抗体の作成を試みた。

#### B. 研究方法

酵母の蛋白質発現システムを用いて発現したRET細胞外ドメインを、マウスに免疫し、モノクローナル抗体（以下NBL-1）を作成した。NBL-1のFab断片をビオチン化し、アビジン化ポリリジン及びDNAの3量体を作成した。リポーター遺伝子として、Green Fluorescent Protein（以下GFP）とピュロマイシン抵抗性遺伝子を用いた。標的細胞として、神経芽腫細胞及び、臍帯血由来単核球細胞とCD34陽性細胞を用いた。一方、神経芽腫細胞、胆道癌及び大腸癌細胞の各膜画分を免疫し、ハイブリドーマを得た。ELISAによるスクリーニングの際、免疫した細胞に加えて、他臓器に由来する細胞株を組み合わせることで、特異的に結合する抗体を選別した。さらに、これらの抗体の中から、細胞培養液中に添加することにより、細胞の中に取り込まれるクローンを選別した。

#### C. 研究結果

1. NBL-1を用いた遺伝子導入とCD34陽性細胞におけるRETの発現

NBL-1により神経芽腫細胞の約5%に抗体依存的な外来遺伝子の発現を認めた。一方、CD34陽性細胞の約30-40%にRETの発現を認めた。CD34陽性細胞の液体培養系に抗体を添加すると、胞体内に取り込まれた。さらに、臍帯血由来単核球細胞について、ピュロマイシン抵抗性遺伝子をレポーター遺伝子として導入操作を行うことにより、抗体依存性に薬剤抵抗性を示すコロニーの出現が認められた。

#### 2. ベクター抗体の作成

神経芽腫細胞、胆道癌及び大腸癌細胞に対するモノクローナル抗体（それぞれ、NBL-M, CBD, LIC）が得られた。特に、胆道癌細胞及び大腸癌細胞に対する抗体

は、肝臓癌に対して反応性を示さないことから、将来的な臨床応用の可能性が期待される。

#### D. 考察

今後

1. 導入効率の改善
2. 骨髄細胞への遺伝子導入の再現性の確認
3. NBL-M, CBD, LICを用いた特異的遺伝子導入を試みる予定である。抗体を用いた遺伝子導入の最大の難点として、取り込まれたDNA複合体がendosomeにとどまり、ライソゾームにより分解される点が挙げられる。現在、DNA複合体が細胞質へ効率良く移行するのを誘導する因子の導入を模索中である。

#### E. 結論

1. レセプター型チロシンキナーゼRETに対する抗体を用いることにより、神経芽腫細胞に遺伝子導入が可能になった。
2. この抗体を用いての、造血幹細胞に対する遺伝子導入の可能性が示唆された。
3. 種々の腫瘍細胞に対するベクター抗体の候補が作成され、モノクローナル抗体を用いた細胞特異的遺伝子導入法の一般化が可能になると考えられた。

#### F. 研究発表

1. Shimura, M., Tanaka, Y., Nakamura, S., Minemoto, Y., Yamashita, K., Hatake, K., Takaku, F., and Ishizaka, Y. FASEB J., in press.
2. Shimura, M., Okuma, E., Yuo, A., Sasaki, T., Mukai, C., Takaku, F. and Ishizaka, Y. Cancer Lett., 132, 7-16, (1998)
3. Kondo, S., Ishizaka, Y., Okada, T., Kondo, Y., Hitomi, M., Tanaka, Y., Haqqi, T., Barnett, G.H. and Barna, B.P. Human Gene Therapy 9, 1599-1608, (1998)
4. Terui, Y., Ikeda, M., Tomizuka, H., Kasahara, T., Ohtsuki, T., Uwai, M., Mori, M., Itoh, T., Tanaka, M., Yamada, M., Shimamura, S., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Ozawa, K., Miura, Y. and Hatake, K. Blood 92, 2672-2680, (1998)
5. Kondo, S., Tanaka, Y., Kondo, Y., Hitomi, M., Barnett, G.H., Ishizaka, Y., Kiu, J., Haqqi, T., Nishiyama, A., Villeponteau, B., Cowell, J.K. and Barna, B.P. FASEB J. 12, 801-811, (1998)
6. Kondo, S., Tanaka, Y., Kondo, Y., Ishikaka, Y., Hitomi, M., Haqqi, T., Liu, J., Barnett, G.H., Alnemri, E.S. and Barna, B.P. Cancer Res. 58, 962-967, (1998)

## t(1;12)転座における転座切断点と TEL/ARG 融合遺伝子の解析

### ——細胞分化誘導にむけた遺伝子治療の可能性——

分担研究者： 佐藤 裕子 (国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究室)

**【研究要旨】** t(1;12)(q25;p13)転座を持つ AML(M3)由来の細胞株 HT93A より単離した TEL/ARG 融合遺伝子の切断点と遺伝子産物の解析を行った。転座切断点は TEL 第5イントロン内 (nt 1033、第337番目アミノ酸)、ARG 第一イントロン内 (1A エクソンと1B エクソンの間) で nt 361 (第53番目アミノ酸) または nt 422 (第74番目アミノ酸)であった。TEL mRNA には TEL1A form (全 HLH ドメインあり) と TEL1B form (HLH ドメインの5'が欠ける) あり、本例では両方の発現が認められるが、発現量は TEL1A form が多かった。融合 mRNA としては TEL/ARG のみであり、ARG/TEL は見られなかった。ARG/TEL 遺伝子については、HT93A では ATRA 及び GM-CSF, IL3, IL5 を添加した培養系で好中球と好酸球に分化すること、T-ALL 症例より得られた t(1;10;12)転座を持つ細胞株では GM-CSF や IL3 添加により myeloid differentiation を起こすことが知られている。ARG は ABL と高いホモロジーを有するが BCR との affinity が弱いなど、ABL とは異なった性質を持っている。上記の結果より、TEL/ARG 融合遺伝子は細胞分化の switch 機構に関与している可能性も考えられるため、今後は TEL/ARG 融合遺伝子および ARG 遺伝子の機能を解析し、細胞分化誘導に向けた遺伝子治療の可能性を探って行きたい。

#### A. 研究目的

t(1;12)(q25;p13)転座より単離された TEL/ARG 融合遺伝子は細胞分化の switch 機構に関与している可能性が考えられるため、TEL/ARG 融合遺伝子および ARG 遺伝子の機能を解析し、細胞分化誘導に向けた遺伝子治療の可能性を探る。

#### B. 研究方法および結果

本年度は 3' RACE, RT-PCR, ノーザン解析を用いて TEL 遺伝子および ARG 遺伝子の切断点と TEL/ARG 融合遺伝子産物の詳しい解析を行った。その結果、TEL 切断点は第5イントロン内で、第337番アミノ酸位置(nt 1033)、ARG 切断点は第一イントロン内 (1A エクソンと1B エクソンの間) で第53番目アミノ酸位置(nt. 361) または第74番目アミノ酸位置(nt 422)であった。TEL mRNA には TEL1A form (全 HLH ドメインあり) と TEL1B form (HLH ドメインの5'が欠ける) があり、本例では両方の発現が認められるが、発現量は TEL1A form が多かった。ノーザン解析でみられた 10kb 以上の TEL/ARG mRNA も TEL1A form であった。融合 mRNA としては TEL/ARG のみであり、ARG/TEL は見られなかった。また、正常 TEL allele の欠損も見られなかった。

#### C. 結論と考察

TEL/ARG mRNA は、TEL 遺伝子のエクソン5までと ARG 遺伝子の1B エクソン以降がつながったもので、

TEL 遺伝子の HLH ドメインと ARG 遺伝子の SH2~3 ドメイン及び tyrosin kinase ドメインを持っている。この転座切断点は t(12;21)転座や t(9;12)転座と同様である。今後は TEL1A/ARG full construct を作成し、transforming activity、tyrosin kinase activity の検討や種々の細胞株に導入して分化誘導能の検討を行なう予定である。

#### D. 研究発表

- 1) Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Suzuki K, Morishita K, Sato Y, Kudo S, Tanaka K, Nagamura F, Asano S, Kamada N: Fusion of the ETV6 to neutrophin-3 receptor TrkC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). Blood, in press
- 2) Sato Y, Kobayashi H, Suto Y, Davis EM, Super HG, Espinosa III R, Le Beau MM, Bohlander SK, Rowley JD: Genetic instability in the Band 12p13: Multiple chromosomal breaks occur resulting in formation of complicated chromosomal rearrangements and a subclone which has the different breakpoints but the same karyotype as the main clone, submitted
- 3) Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new ETV6(TEL) partner gene, ARG (ABL related gene or ABL2) identified in a AML-M3 cell line with the t(1;12)(q25;p13) translocation, submitted

## cAMP応答エレメント結合蛋白 (CREB) によるアポトーシスの誘導

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部長

**研究要旨** 我々は、cAMP応答エレメント結合蛋白 (CREB) が細胞周期依存性にリン酸化を受けること、CREBのアンチセンスが細胞増殖を著明に抑制する事を示してきた。今回は、CREB遺伝子の過剰発現が複数の種類の細胞にアポトーシスを誘導すること、このようなアポトーシス誘導活性とCREB蛋白本来の転写因子活性は異なる機序を介していること、アポトーシスの誘導にはCREB蛋白C末端側の63個のアミノ酸のみで十分であることを明らかにした。以上の結果は、アポトーシスを介したCREB遺伝子による癌の遺伝子治療の可能性を示唆するものである。

### A. 研究目的

ガン細胞を死滅させるための遺伝子治療においては、ガン細胞そのものにアポトーシスを惹起させる遺伝子を導入するという手法がとられてきた。これらの中にはFasやその細胞内刺激伝達に関わるCaspaseの遺伝子が含まれる。しかしながら、これらの遺伝子によるアポトーシスは細胞の種類によって、その結果が大きく異なりすべてにガン細胞での共通性に乏しいという欠点がある。

今回我々は、細胞周期に関与するが明らかにされつつある転写因子CREBのアポトーシス誘導作用について検討した。

### B. 研究方法

遺伝子導入は、スタンダードのカルシウムリン酸法を用いた。

細胞は、ヒト羊膜FL細胞、COS細胞、L929細胞を用いた。

抗CREB抗体は、CREB蛋白のC末端部分のペプチドを免疫原として用いて作成し、CREB蛋白の免疫染色とイムノブロットは規定の方法により行った。

アポトーシスの同定は、DNAラダーの検出と細胞核の形態により行った。

### C. 研究結果

CREB遺伝子の導入によって、今回用いたすべての細胞株においてアポトーシスが誘導され、遊離細胞が増加した。免疫染色の結果、CREB蛋白を過剰発現している細胞のみがアポトーシスを起こしていることを確認した。

正常細胞において見られる内在性のCREB蛋白の細胞周期特異的リン酸化は、CREBを過剰発現している細胞でのCREB蛋白においては観察されなかった。

CREB遺伝子変異体を用いた実験から、CREBの有する転写因子活性と今回観察したアポトーシス誘導活性が異なる分

子機序を介している事が示された。

様々のN末端欠失体を用いた実験から、CREB蛋白のC末端側63個のアミノ酸があればアポトーシスを誘導できることが明らかになった。

### D. 考察

今回の研究結果より、CREBという転写因子蛋白の過剰発現が、その転写因子作用とはおそらく異なる作用機序によって、多くの細胞をアポトーシスに陥れることが明らかになった。

この結果は、我々が以前に示したCREBの細胞周期進行や細胞分裂における何らかの役割と合致する所見である。

このようなCREB遺伝子の新しい作用はC末端側の短い遺伝子でも再現でき、細胞死を介した癌の遺伝子治療に使いやすいものと考えられた。

### E. 結論

CREB蛋白およびそのC末端のペプチドの過剰発現は、幅広い種類の細胞にアポトーシスを誘導し、細胞の生死の人工的な制御に応用できることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Saeki K et al: Cell cycle regulated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB): identification of novel phosphorylation sites. Biochem J in press.

#### 2. 学会発表

佐伯久美子他：アンチセンスCREBによる血液細胞の増殖抑制。第60回日本血液学会総会、1998年4月、大阪。

### G. 知的所有権の取得状況 現時点では無し。

