

平成10年度厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

研究報告書

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究
(H10-ゲノム-033)

主任研究者	早川 堯夫	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	真弓 忠範	大阪大学薬学部
	中西 真人	大阪大学微生物病研究所
	鈴木 宏治	三重大学医学部

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

主任研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

研究要旨

本研究では遺伝子治療の実用化と一層の進展に向け、より安全性の高い次世代遺伝子治療薬の開発に資する技術基盤の確立及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的に、次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究、ミニ人工染色体（独立レプリコン）の開発に向けた基礎研究、導入遺伝子の核移行に関する研究、細胞質内での遺伝子発現系に関する研究、の各課題について並行して検討を進め、これらを総合することにより、遺伝子治療の安全性を確保する次世代ハイブリッド型遺伝子治療用ベクターの開発を目指すとともに、関連する安全性等評価技術の開発を目指している。本年度は各課題について以下の結果を得た。

1. 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究：より有効性、安全性が確保された遺伝子導入ベクターとしての膜融合リポソームの粒子設計を検討した。膜融合リポソームの作製法の変更、粒子径の増大による遺伝子封入効率の向上や細胞内への遺伝子導入効率の増強、スベルミジンによる封入遺伝子の安定化により、遺伝子発現効率を著しく改善し得ることが判明した。また、新たに VSV（Vesicular Stomatitis Virus）を利用した安全性の高い新規ベクターの開発を試み、VSV の特性をリポソームに付与した VSV-リポソームの有用性を示唆した。

2. ミニ人工染色体（独立レプリコン）の開発に向けた基礎研究：核内における遺伝情報の安定性に関する研究を行い、動物細胞核内での DNA の安定性を迅速かつ正確に測定する系の開発に成功した。また、染色体安定化のメカニズムの一つとして、テロメア配列(TTAGGG)_nとテロメア結合タンパク質 hTRF1 の相互作用を発見し、安定性測定系と合わせて動物細胞で安定に存在できる独立レプリコン（人工染色体）の研究に見通しをつけた。また、自立複製能を持ち核内に長期間安定に維持される新規エピソームベクターの開発を目指して、プラスミドの複製、安定性に寄与するヒト染色体断片の候補を取得した。

3. 導入遺伝子の核移行に関する研究：核移行活性を持つラムダファージ（NLS ファージ）が、その中に封入した遺伝子の発現を強く促進することを見いだした。さらに NLS ファージの頭部に任意のプラスミドを封入できるパッケージング大腸菌の開発に成功した。

4. 細胞質内での遺伝子発現系に関する研究：T7 プロモーター制御遺伝子発現プラスミドと T7 RNA ポリメラーゼを用いた細胞質内遺伝子発現系の有用性を *in vitro* で評価したところ、遺伝子導入後、短時間で遺伝子発現が認められること、T7 プロモーター制御 T7RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを加えることによりさらに遺伝子発現が増強・延長され、細胞の増殖性にかかわらず同等の効率で遺伝子発現可能であることが判明した。

5. 遺伝子治療の応用研究：術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究を開始した。抗血栓性因子であるヒトトロンボモジュリンの遺伝子を膜融合リポソームを用いて *in vivo*, *in vitro* で肝臓洞内皮細胞へ導入し、遺伝子発現を確認した。

6. 非ウイルスベクター類の安全性評価：非ウイルスベクター類による遺伝子発現効率と毒性発現の関係を *in vitro* で細胞パネルを用いて検討し、安全性・有効性に関与するパラメーターを明らかにした。

分担研究者

真弓 忠範 大阪大学薬学部 教授
中西 真人 大阪大学微生物病研究所 助教授
鈴木 宏治 三重大学医学部 教授

協力研究者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 室長
水口 裕之 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

A. 研究目的

遺伝子治療は、これまで効果的な治療法がなかった先天性疾患や、癌、エイズなどの致命的疾患に対する画期的な治療手段として期待されている。しかし、その技術的基盤となる細胞内への遺伝子導入法・ベクターの開発は未だ不十分であり、安全性・有効性が確保されたベクターをいかに開発していくかが学際的に重要かつ緊急の課題となっている。遺伝子治療薬の安全性確保をはじめ治療の成否には、1)ヒトに対する非病原性、2)低細胞毒性、3)非抗原性、4)導入遺伝子の数や大きさに関する選択許容性、5)標的細胞特異性、6)遺伝子導入効率、7)安定性、8)導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節などの諸要件の達成度が鍵になると再認識されている。米国を中心にレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターをはじめとするウイルスベクター法や、合成脂質を用いたカチオニックリポソーム法などが開発され、基礎から応用に至る莫大なデータが蓄積されてきている。しかしウイルスベクター法は、遺伝子導入効率が高い反面、サイズの大きいDNAに適用できないこと、増殖性ウイルス出現や発癌性、細胞毒性に関する懸念があること、レトロウイルスベクターでは非分裂細胞への導入不能、宿主染色体への遺伝子挿入変異の可能性があること等の問題点を有している。一方、カチオニックリポソーム法は導入する遺伝子の形状やサイズに制限がなく、上述のような危険性がない反面、ウイルスベクター法に比べ遺伝子導入効率は著しく低い。これら既存のベクターの改良も種々検討されているが、それにも限界が見えはじめているのが現状であり、新しい発想に基づいたベクターの開発が緊急かつ重要な課題となっている。

本研究では遺伝子治療の実用化と一層の進展に向け、より安全性の高い次世代遺伝子治療薬の開発に資する技術基盤の確立及び各種安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とし、1)安全性の確認と大量生産が容易な素材を用い、従来のウイルスベクターや非ウイルスベクター双方の長所を併せ持つように設計した、高機能で安全性の高い独自の遺伝子導入系の構築とその細胞選択性、安定性等の確保、遺伝子導入の至適化、2)導入遺伝子の宿主染色体への挿入による染色体遺伝情報発現への悪影響を回避する手段として、導入遺伝子が細胞核内の宿主染色体外で安定に存在しながら情報発現できるようなミニ人工染色体の開発、3)遺伝子を効率よく核内に送達するための技術開発、4)細胞質内で遺伝子発現が可能な系の構築と細胞質内への

導入法の開発、などの各課題を並行して進め、さらに5)これらを総合してハイブリッド型の遺伝子治療用ベクターを構築し、有用性、安全性を検討する。また6)非ウイルスベクター類の安全性評価システムの確立に関する基盤研究として、安全性確保に必要な細胞や動物レベルでの安全性評価技術の開発と、評価法の標準化及び安全性評価指標の設定に関する研究を行うものである。

本年度は、1. 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究として、膜融合リポソームへの遺伝子封入量や細胞への遺伝子導入効率の向上、導入遺伝子の安定化方法の検討を行うとともに、新たなハイブリッド・ベクター候補として Vesicular Stomatitis Virus (VSV) -リポソームの検討を行った。また、2. 独立レプリコンの開発を目指した基礎研究として遺伝情報が細胞核内で独立レプリコンとして安定に存在するために必要なDNA構造の研究、及び動物細胞を使って独立レプリコンとして存在する遺伝情報の安定性を測定するための新しいシステムの開発、3. 分裂していない細胞への遺伝子導入の効率を上昇させることを目指したDNAの核への能動的ターゲティング、4. 遺伝子発現に核移行を要しない細胞質内直接遺伝子発現システムの開発としてT7遺伝子発現系の *in vitro* での検討など、ハイブリッドベクターの特性を生かした遺伝子発現系の構築を目指した検討を行った。さらに、5. 遺伝子治療の応用研究として術後肝障害阻止のための抗血栓性遺伝子導入に関する研究、6. 非ウイルスベクター類の安全性評価のための基礎研究も開始した。

B. 研究方法

B.1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

1) センダイウイルスの調製法

ふ化後10日目のニワトリの有精卵にセンダイウイルス感染漿尿液を接種し、35.5℃で3日間培養後、一晚4℃に静置し漿尿液を回収した。1,000g、15分間遠心した漿尿液の上清を、さらに26,700g、40分間遠心しセンダイウイルスの沈澱物を得た。この沈澱をBSS(-) (5mM NaCl、10mM Tris-HCl pH7.6) に懸濁し、50%-30%のステップショ糖密度勾配遠心により回収、精製した。精製したセンダイウイルスはBSS(-)に懸濁し、使用直前まで液体窒素中に保存した。

2) 遺伝子封入膜融合リポソームの調製

膜融合リポソームは逆相蒸発法の変法および凍結融解法の変法で調製したリポソームを用いて作

製した。

[1] 逆相蒸発法の変法

卵黄ホスファチジルコリン(PC)、L- α -ジミリス
トイルホスファチジン酸(PA)、およびコレステロ
ール(Chol)を4:1:5(モル比)になるようにジ
エチルエーテル・ジクロロメタン混液(53:47
(V/V))に溶解した。この脂質溶液1 mlに10mM
Tris(pH7.6)/150mM NaCl/10mM EDTAに溶解し
たプラスミドDNA(10mg/ml)0.3mlを加えてよく
混合した後、ロータリーエバポレーターを用い一枚
膜リポソームを作製した。

[2] 凍結融解法の変法

PC:PA:Chol=4:1:5(モル比)になるよう
クロロホルムに溶解した。ロータリーエバポレー
ターを用い溶媒除去し、遠沈管内壁にlipid filmを
作製した。これにプラスミドDNA溶液を添加し、ボ
ルテックスを行い multilamellar vesicle (MLV)を調
製した。MLVは凍結融解を3回繰り返すことによ
り一枚膜リポソームに変換した。

[1]、[2]の方法で調製した一枚膜リポソームの
最大粒子径をそろえるため、0.4 μ mおよび0.8 μ m
のポリカーボネート膜を通した。超遠心(25,000
rpm, 40分, SW28.1, Beckman)により未封入のプ
ラスミドDNAを除いた後、紫外線照射(8,000J/m²)
によりウイルスRNAを断片化・不活化したセンダ
イウイルスと37℃で2時間反応させ両者を融合さ
せた。反応後、未反応のリポソームとセンダイウ
イルスをショ糖密度勾配遠心法により除去し、膜融
合リポソームを精製した。

3) プラスミドDNA

プラスミドDNAとしてはpT7-IRES-L、pCAL2、
BMGCAL2、pRSVLを用いた。pT7-IRES-LはB.4
項に詳述する。pCAL2(6.4Kb)(Fig.1)は、ニワ
トリB-アクチンプロモーターとサイトメガロウイ
ルス(CMV)エンハンサーおよびSV40 early gene
poly(A) signalを含むルシフェラーゼ発現プ
ラスミド、BMGCAL2(Fig.2)は、BMGNeoのNot I、
Hind III siteにpCAL2のニワトリB-アクチンプロ
モーターとCMVエンハンサーおよびSV40 early gene
poly A signalを組み込んだルシフェラーゼ発現プ
ラスミド、pRSVLはラウス肉腫ウイルス(RSV)プロ
モーターを有するルシフェラーゼ発現プラスミド
である。

4) T7 RNA polymerase の有機溶媒処理後の遺伝子 発現効率の測定

T7 RNA polymerase(最終濃度1,000U/ml)と
pT7-IRES-L(最終濃度1 μ g/ml)を最終液量の30分

の1になるように混合し、複合体形成のため10分
間室温に放置した。複合体形成後、有機溶媒(ジ
エチルエーテル・ジクロロメタン混液(53:47
(V/V))を150 μ l添加し、ピペッティングおよび
ボルテックスを行った。エバポレーターを用い懸濁
液中の有機溶媒を完全に除去し、残った水相に
Lipofectin(最終濃度5 μ g/ml, GIBCO-BRL)を添加
し遺伝子・酵素・Lipofectin複合体を形成するため室
温に10分放置した。この複合体を血清無添加
MEM培地で適当に希釈し、LLCMK2 T7(-)細胞に
遺伝子導入した。遺伝子発現は、遺伝子発現が最大
となる遺伝子導入6時間後にルシフェラーゼ活性を
測定した。

5) T7 RNA polymerase の凍結融解後の遺伝子発現 効率の測定

T7 RNA polymerase(最終濃度125U/ml)、
pT7-IRES-L(最終濃度0.14 μ g/ml)およびpT7
AUTO-2(最終濃度0.86 μ g/ml)を最終液量の30
分の1になるように混合し複合体形成のため10分
間室温に放置した。凍結融解は、液体窒素および
37℃で行った。凍結融解後、Lipofectin(最終濃度5
 μ g/ml)を添加し、遺伝子・酵素・Lipofectin複合体
を形成するため室温に10分放置した。この複合体
を血清無添加MEM培地で適当に希釈し、
LLCMK2 T7(-)細胞に遺伝子導入した。酵素活性は
遺伝子導入48時間後にルシフェラーゼ活性を測定
することにより評価した。

6) 膜融合リポソームを用いた培養細胞への遺伝子 導入

12穴プレートにサル腎上皮細胞LLCMK2 T7(-)
細胞を1 $\times 10^5$ 個播種し、24時間後に細胞を
BSS(+)(10mM Tris pH7.6, 150 mM NaCl, 2mM CaCl₂)
で洗浄した後、BSS(+)(懸濁したpCAL2封入膜融
合リポソーム(OD540=0.1)を37℃で30分間作
用させた。BSS(+)(細胞を2度洗浄後、通常の培
地で培養し48時間後にルシフェラーゼ活性を測定
した。

7) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (ピ
ッカジーン)を用いルミノメーター(Lumat LB 9507,
Berthold)で測定した。活性は Relative Light Units
(RLU)/ μ g protein または RLU/well として表した。

8) 膜融合リポソーム内の封入遺伝子量の測定

膜融合リポソーム(OD540=0.5)350 μ lに10%
SDS溶液を加えリポソームを可溶化し、フェノール
クロロホルム処理、エタノール沈殿を行うことで膜
融合リポソーム内に封入された遺伝子を回収した。

回収した遺伝子量の測定は 3,5-Diaminobenzoic Acid Dihydrochloride (DABA) を用いて定量した。

9) スペルミジン添加時の遺伝子の分解性

pRSVL 5 μ g を種々の濃度のスペルミジンを添加した緩衝液 (100mM Tris, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) 500 μ l に溶解後、37°Cで3分間の DNase I 処理を行った。フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により遺伝子を回収し、2%アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色による DNA ラダーの検出により分解を検討した。

10) スペルミジン封入膜融合リポソームの調製

pCAL2 10mg/ml (0.3ml)にスペルミジンを最終濃度 6.25、12.5、25、50mg/mlとなるように添加し遺伝子-スペルミジン複合体を形成した。この複合体を内水相として凍結融解法の変法によりリポソームを調製し、センダイウイルスと反応させ膜融合リポソームを調製した。

11) VSV-リポソームおよび膜融合リポソームの調製

リポソームは PC:ホスファチジルセリン:Chol=4:1:5 (モル比)の組成で凍結融解法により調製した。得られたリポソームをサイジング処理 (0.2 μ m ポリカーボネートフィルター) し、最大粒子径を制御した。VSV は Ingiot らの方法に準じて調製した。VSV とリポソームをクエン酸緩衝液 (140mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mM EGTA, 80mM citrate, pH5.5) 下で混合し、水中30分間、37°C15分間反応させ、両者を融合させた。ステップシヨ糖密度勾配遠心により精製し、VSV-リポソームを得た。

12) VSV-リポソームの細胞内物質導入効率の評価

ジフテリア毒素フラグメント A(DTA)0.67mg/ml を封入したリポソームを作製し、このリポソームと VSV と融合させることで、VSV-リポソームを得た。2.5x10⁴個のヒト羊膜由来 FL 細胞に、様々な濃度の DTA 封入 VSV-リポソームを 37°C、3時間作用させた後、³⁵S-メチオニンをパルスし、蛋白合成を指標に細胞内物質導入効率を評価した。なお、リポソームのリン脂質濃度は、リン脂質測定キット (リン脂質 B テストワコー) を用いて測定した。

B. 2 独立レプリコンの開発に向けた基礎研究

1) テロメアシーディングによるテロメア配列の活性の検定

500 bp の人工テロメア配列と Hygromycin B 耐性遺伝子を含むプラスミド pMYAC1 を制限酵素 NotI で切断し末端にテロメア配列を持つ直鎖状とした後、その 1 μ g を種々の細胞にエレクトロポレーシ

オン法で導入した。ただちに 100 mm デイッシュ 100 枚 (浮遊細胞の場合は 96 well デイッシュ 100 枚) に細胞をまき直し、48時間後から Hygromycin B を含む培地に交換し遺伝子が取り込まれた細胞を選択した。10日目に各デイッシュに出現した Hygromycin B 耐性コロニーを単離し、増殖後 DNA を抽出して制限酵素 Hind III で消化後、pUC19 をプローブとしてサザンブロット解析により pMYAC1 導入部位の解析を行った。サザンブロットで染色体末端であることを示すスミアなシグナルが得られたサンプルに関しては、さらにエキソヌクレアーゼ Bal31 感受性試験によって染色体上での位置を確認した (染色体の末端にある場合には、シグナルは Bal31 感受性となる)。テロメアシーディングの活性は、pMYAC1 が挿入された部位で染色体が切断されて新しいテロメアができたクローンの数を全クローンの数で割った割合で求めた。

2) ポジティブ・ネガティブセクション法に用いるベクターの構築

CITE 配列の下流に置いたフレオマイシン耐性遺伝子 cDNA は、pIRESbleo (Clontech) から PstI / XbaI 断片として単離し、CITE 配列の上流に終止コドンがくるように配置したオリゴ DNA とともにプラスミド pGEM3Zf に挿入した (pYI6)。次に、pYI6 を鋳型として CITE 配列とフレオマイシン cDNA の接続が翻訳に関して最適化するように *in vitro* mutagenesis で塩基配列の改変を行った (pYI11)。pYI11 から EcoRV / BamHI 断片として単離した CITE 配列=フレオマイシン cDNA を、プラスミド pHG1 の CMV プロモーターと SV40・後期転写終結シグナルの間 (SmaI / BamHI) に挿入した (pYI13)。さらに pYI13 の CITE 配列の上流 (NcoI / XhoI) に、pGZ1 から NcoI / XhoI 断片として単離した Rat P450 2B1 cDNA を挿入して pYI15 を完成した。また、プラスミド p220.2 から NsiI / SalI 断片として単離した EB OriP を、pYI15 のプロモーターの上流に挿入して pYI16 を得た。

3) ポジティブ・ネガティブセクション法による染色体外 DNA の安定性の測定

基本的な予備実験には、pYI13 と pYI15 をそれぞれ陽荷電リポソーム (DOTAP, Boehringer) を使って HeLa 細胞に導入し、Zeocin (400 μ g/ml) で選択して得られたコロニー (YI13 と YI15) を用いた。この2つの細胞を、YI13 の数を100個に固定して YI15 の数を0から10⁶個混合したもの (Table 5)、あるいは YI15 の数を10⁴に固定して YI13 の数を0から1,000個混合したもの (Fig. 10) を、0.5 mM

の Cyclophosphamide を含む培地で培養し、1 週間後に生存するコロニー数から至適条件を推定した。

EB OriP を含むプラスミド pYI16 の HeLa-EBNA1 細胞における安定性は以下のようにして測定した。まず、pYI16 を HeLa-EBNA1 細胞に導入し、Zeocin (400 µg/ml) を含む培地で 5 日間培養して、この DNA を含む細胞のプールを選択した。次に、この細胞を薬剤を含まない培地で 24 時間、48 時間あるいは 72 時間培養し、その直後に 0.5 mM の Cyclophosphamide を含む培地に 1,000 個ずつまき直した。安定性は、一週間後に出現したコロニー数から計算した。

4) EBV プラスミドの調製

EBNA1 と EB OriP を有する EBV ベクター-p220 (Dr. Sugden より供与) から OriP の中の複製開始領域である DYAD 領域を制限酵素 EcoRV/HpaI により除去し、核マトリックス保持能は維持しているが複製能を失ったプラスミド pDY- を作成した。ヒトゲノム DNA (ヒト全血由来、Promega) を Hind III により部分消化した断片を pDY- の Hind III site に挿入することによりライブラリープラスミド pDYLIB を調製した (Fig.11)。

5) 自立複製プラスミドのクローニング

100mm ディッシュに 293 細胞を 1×10^6 個播種して一晩培養後、P220, pDY-, pDYLIB の各プラスミド 4 µg/dish を Lipofectamine plus (GIBCO-BRL) を用いて導入した。一晩培養後、トリプシン処理により 100mm プレート 3 枚に撻きなおし、2 日目より Hygromycin B 200 µg/ml で選択培養を行った。1 枚はコロニー計測に使用し、1 枚はそのまま薬剤選択下、継代培養を続けた。pDYLIB を導入したものは得られた各コロニーを薬剤選択下、拡大培養し、染色体外 DNA を Hirt 抽出後、大腸菌による複製プラスミドのレスキューによりクローニングを行った。

5) 染色体外 DNA の Hirt 抽出

100mm ディッシュ 1 枚の細胞を PBS で洗浄後、800µl の 0.6% SDS/10 mM EDTA を加えて室温で 20 分間放置して細胞を溶解した。200µl の 5M NaCl を添加し、4℃で 5 時間以上放置後、15000rpm, 10 分遠心した上清より染色体外プラスミドをフェノール/クロロホルムにより抽出し、エタノール沈殿後、30µl の TE に溶解した。

6) サザンブロットによる複製プラスミドの検出

Hirt 抽出した染色体外 DNA 10 µl を制限酵素 Hind III および MboI により一晩完全消化した後、0.6% アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンフィルターに転写後、標識プローブでサザンブロットを行った。

プローブは pDY- を Hind III/DpnI 消化して得られる 2.8kb の EBNA1 断片を用い、プローブの標識・検出は ECF ランダムプライムラベリング・検出システム (Amersham) を用いた。得られた蛍光シグナルは FluoroImager (Molecular Dynamics) により検出した。

7) 大腸菌による複製プラスミドのレスキュー

Hirt 抽出した染色体外 DNA 10 µl を制限酵素 DpnI で一晩完全消化することにより大腸菌由来の非複製プラスミドを切断した後、大腸菌 DH10B にエレクトロポレーションにより導入した。得られたアンピシリン耐性コロニーから細胞中で複製されたプラスミドをレスキューした。

8) コロニー形成アッセイ

プラスミドを細胞に Lipofectamine plus を用いて導入し、2 日目に細胞を 1/5~1/10 に撻きなおした後、200µg/ml の Hygromycin B により薬剤選択を行った。10-14 日後に培養液を除去し、クリスタルバイオレット染色液 (0.05% クリスタルバイオレット/10%ホルムアルデヒド) により耐性コロニーを染色してコロニー数の計測を行った。

B. 3 導入遺伝子の核移行に関する研究

1) 核移行シグナルを付与したラムダファージへのマーカー遺伝子の組み込み

ベースとしたラムダファージ Lambda D1180 は Dam15 のアンバー変異を持ち suppresser tRNA を持たない SupO の大腸菌では Dタンパク質を作らない。またこのファージの右腕は Lambda gt11 と同一であり、野生型ラムダファージの SacI-EcoRI を削除し、EcoRI site を一つだけ持つように改変してある。Green Fluorescent Protein (GFP, Clontech 社) やホタル・ルシフェラーゼ cDNA (Promega 社) は CMV プロモーターの下流に接続した EcoRI-EcoRI 断片として構築し、Lambda D1180 の EcoRI site に挿入した。できたラムダファージの DNA は大腸菌 TOP10 に溶原化してファージ粒子の調製に用いた。

2) 核移行シグナルを付与したラムダファージの調製

SV40・T 抗原由来の核移行シグナルを人工的にラムダファージの頭部に発現させる実験は Sternberg らが報告したペプチド抗原をファージ表面に発現したライブラリーの作成法 (Sternberg and Hosess, PNAS 92, 1609, 1995) に基づいた。ラムダファージ D 遺伝子を含む DNA 断片は、ファージ DNA を鋳型にして PCR 法によって増幅後、発現ベクター pTrcHisA (Invitrogen) に組み込んだ。核移行シグナルに対応する遺伝子は合成オリゴヌクレオチドを

使って作成し、Dタンパク質のN末端側に遺伝子レベルで融合させた。Dタンパク質を発現させるためのプラスミド pS1 を、GFP 遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子を含みかつD遺伝子にアンバー変異があるラムダファージ D1180 を溶原化した大腸菌に導入後、42℃、15分の熱処理でファージの増殖を誘導し、さらに38℃で40分培養後に集菌した沈澱からクロホルム処理で組換えファージ粒子を抽出した。

3) 核移行シグナルを付与したラムダファージの核移行活性の測定

ファージ粒子は塩化セシウム密度勾配遠心法で精製後、透析によって塩化セシウムを除去し限外濾過法で濃縮した。この後、HEL細胞にTexas-Red 標識BSA(細胞質局在のコントロール)と共にマイクロインジェクションし、37℃、60分培養後にホルマリン固定をしてファージ粒子の細胞内での位置を検討した。ファージ粒子の検出は、ファージ粒子頭部の主要タンパク質のひとつであるEタンパク質に対する特異抗体(抗GST-Eタンパク質・ウサギ血清)を一次抗体とし、FITC 標識抗ウサギIgGを二次抗体として共焦点蛍光顕微鏡を使った間接蛍光抗体法で検討した。

4) プラスミドDNAを核移行シグナルに封入するためのパッケージング大腸菌の作製

ラムダファージのD、E、H遺伝子を含むDNA断片はAscI-AscI断片として切り出し、プラスミドに挿入した。これをもとに、D遺伝子にはNLS-D遺伝子に、E遺伝子にはEdefK562(6985C-T, Thr284-Ile)変異を、H遺伝子にはHde112(del 11,079-12,743, del Thr180-Ala734)の欠失を導入した。このAscI-AscI断片をLambda clts857, Sam7のゲノムDNAのcos-AscI断片、AscI-cos断片と結合し、ラムダ・パッケージング・キットを用いて大腸菌STBL2に導入した。このDNAを溶原化した大腸菌は、野生型ファージに対する耐性とPCRによる導入DNA断片の検出によってスクリーニングした。この大腸菌からのファージ粒子の作製は、2)と同様に行った。

B. 4 細胞質内での遺伝子発現系に関する研究

1) 培養細胞

T7 RNA polymerase 非産生 LLCMK2 T7(-)は10%牛胎児血清(FCS)含有MEM培地で培養した。T7 RNA polymerase 産生 LLCMK2 細胞 LLCMK2 T7(+)は、LLCMK2 T7(-)細胞にT7 RNA polymerase 産生プラスミド pCA-T7 およびネオマイシン耐性プラスミド pSV2-neo をLipofectinで導入し、G418耐性で選択した。その後、*in vitro* transcription 法に

よりT7 RNA polymerase 活性の高い細胞を選択した。なお、このLLCMK2 T7(+)細胞は10%FCSを含むMEM培地で培養した。ウシ大動脈血管由来内皮細胞(BAEC)は、10%FCSを含むDMEM培地で培養した。

2) プラスミドDNA

[1] pT7-IRES-L (Fig. 19)

T7プロモーターとターミネーターの間にピコナウイルス5'非翻訳領域のIRES(Internal Ribosomal Entry Site)配列およびレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を連結させたプラスミドであるpT7-IRES-Lを調製した。一般に真核生物における効率のよい翻訳には、核内でのmRNAに付与される5'cap構造が不可欠であるが、T7プロモーターにより転写されたmRNAはcap構造が付与されないため効率的な翻訳が期待できない。IRES配列はmRNAの5'cap構造非依存的に効率のよい翻訳を可能にすることが知られているため、翻訳のエンハンサーとしてIRES配列を組み込んだ。

[2] pT7 AUTO-2 (Fig. 20)

T7プロモーターとターミネーターの間にT7 RNA polymerase 遺伝子を連結したプラスミドであるpT7 AUTO-2は、Brookhaven National LaboratoryのWilliam Studier博士より御供与いただいた。本プラスミドDNAは、T7プロモーター制御下において細胞質内でアクティブなT7 RNA polymeraseを産生することが可能である。T7 RNA polymeraseは強力な転写活性を有し、プラスミドを大腸菌内で増殖する際、宿主のRNA polymeraseによる転写を抑制し毒性を示すため、プラスミド増殖の際には、宿主内でのpT7 AUTO-2からのT7 RNA polymeraseの産生を抑制する必要がある。そこで、pT7 AUTO-2にlacリプレッサーをつなぐことによるT7プロモーターのinitiation阻害とT7 lysozyme産生プラスミドであるpLysSを加えることによるT7 RNA polymeraseの不活化を行い、宿主内でのT7 RNA polymerase産生を抑制した。

3) T7 RNA polymerase

T7 RNA polymeraseは、宝酒造(50U/μl)またはフナコシ(200U/μl)のものを実験に供した。

4) 遺伝子・Lipofectin複合体の調製

遺伝子(最終濃度1μg/ml)とLipofectin(最終濃度5μg/ml)を最終液量の30分の1になるように混合し、遺伝子・Lipofectin複合体を形成するため室温に10分間放置した。最後に適当な濃度になるよう血清無添加MEM培地で希釈した。

5) 遺伝子・酵素・Lipofectin複合体の調製

遺伝子と T7 RNA polymerase (最終濃度 125U/ml) を混合し、遺伝子・酵素複合体を形成するため室温に 10 分間放置した。さらに、この複合体と Lipofectin (最終濃度 5 μ g/ml) を 4) 項と同様に混合、調製した。

6) 培養細胞への遺伝子導入

2 \times 10⁴ 個の LLCMK2 T7(-) または T7(+) 細胞を 12 穴プレートに播種した。細胞が十分に蛋白合成を行っている状態で遺伝子導入するため 48 時間インキュベーション後、細胞を BSS(+) で洗浄し、上述の遺伝子・Lipofectin 複合体または遺伝子・酵素・Lipofectin 複合体を 37 $^{\circ}$ C で 3 時間作用させた。BSS(+) で 2 度洗浄を行い、通常の培地で培養した。

7) pT7 AUTO-2 から産生される T7 RNA polymerase 発現パターンの測定 (RT-PCR)

LLCMK2 T7(-) 細胞を 35-mm dish あたり 1 \times 10⁵ 個播種し 48 時間培養後、遺伝子・酵素・Lipofectin 複合体を上述の方法で細胞に作用させ ISOGEN (ニッポンジーン) を用い経日的に total RNA を抽出した。この total RNA 2.1 μ g を Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase を用い逆転写反応を行った。逆転写反応により合成された cDNA について T7 RNA polymerase をコードする部分に対するプライマーを用い PCR を行った。なお、 β -actin を内部標準物質とするためヒト β -actin プライマー (STRATAGENE) を PCR 反応液中に添加した。PCR 産物の検出は 2% アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色により行った。

8) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は B.1.5) 項と同様に測定した。

9) マイトマイシン C 処理による細胞増殖阻害濃度の測定

BAEC を 12 穴プレートに 4 \times 10⁴ 個播種し、24 時間培養後、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で洗浄し、各濃度のマイトマイシン C を 400 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分作用させた。作用後、細胞を PBS(-) で洗浄し、通常の培地で 2 日間培養した。培養後、0.25% トリプシン処理により回収した細胞を SDS により溶解し、溶解液中の遺伝子量を指標にマイトマイシン C 処理による細胞増殖阻害濃度を算出した。

10) 細胞溶解液中の遺伝子量の測定

細胞溶解液中の遺伝子をフェノール、クロロホルム処理、エタノール沈殿により回収した。回収した遺伝子量の測定は DABA を用いて定量した。

11) マイトマイシン C 処理後細胞への遺伝子導入
BAEC を 12 穴プレートに 2 \times 10⁴ 個播種し、24 時間培養し PBS(-) で洗浄した。24 μ g/ml のマイト

マイシン C 溶液を 400 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間作用させた。作用後、細胞を PBS(-) で洗浄し、遺伝子・酵素・Lipofectin 複合体を細胞に 3 時間作用させた。作用後、細胞を培地で洗浄し通常の培地で 2 日間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 5 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

1) ヒトトロポモジュリン(TM)、ラット TM およびヒト組織因子系凝固阻害因子(TFPI)の cDNA クローニング

ヒト TMcDNA は、 λ gt11 ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) cDNA ライブラリーからモノクローナル抗 TM 抗体を用いてクローニングした。ラット TMcDNA は、ヒト TM cDNA の塩基配列を指標にして作成した一対のプライマーを用いて、ラットの血管内皮細胞由来 mRNA を鋳型とした RT-PCR 法によって増幅し、クローニングした。一方、ヒト TFPI cDNA は、既報のヒト TFPI cDNA 塩基配列を指標にして作成した一対のプライマーを用いて、血管内皮細胞由来 mRNA を鋳型とした RT-PCR 法によって増幅し、クローニングした。

2) ヒト TM、ラット TM およびヒト TFPI の発現ベクターの構築

ヒト TM 発現ベクター (pRC/CMV-hTMcDNA) は、ヒト TMcDNA を CMV プロモーターおよびウシ成長ホルモンターミネーターを有する哺乳動物発現ベクターの pRC/CMV の Hind III 切断部位に挿入して作製した (Fig. 30)。今年度は、この発現ベクターを用いた研究を実施した。ラット TM 発現ベクター (pRC/CMV-rTM cDNA) はラット TM cDNA を pRC/CMV の XbaI 切断部位に、ヒト TFPI 発現ベクター (pRC/CMV-hTFPI cDNA) はヒト TFPI cDNA を pRC/CMV の BglII 切断部位にそれぞれ挿入して作製した。これらの発現ベクターは次年度の実験で用いるため、凍結保存した。

3) ヒト TM cDNA 発現ベクター封入膜融合リボソームの調製

ヒト TM 発現ベクター (pRC/CMV-hTMcDNA) を封入した膜融合リボソームは逆相蒸発法の変法で調製した。

4) ラット肝類洞内皮細胞の単離

ラットの肝類洞内皮細胞は、コラゲナーゼ環流後にエルトリエーションロータを用いて谷川らの方法に従って単離した。得られた類洞内皮細胞分画を数回、20% FCS を含む William's E 培地で洗浄後、コラゲン・コートプレートに巻き培養した。得られた

細胞はその 95%以上が形態学的に肝類洞内皮細胞であった。

5) ヒト TM の活性および抗原濃度の測定

ラット肝類洞内皮細胞で発現したヒト TM は、単離した類洞内皮細胞を 0.5% Triton X-100 を含む TBS 溶液 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) で 1 時間処理して抽出し、TM 活性をトロンビンによるプロテイン C の活性化に対する活性化促進活性として求めた。活性化プロテイン C (APC) 活性は合成基質 (Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA) の分解活性として測定した。細胞抽出液中のヒト TM 抗原濃度は、エピトープの異なる 2 種類のモノクローナル抗ヒト TM 抗体を用いて作製したサンドウィッチ ELISA 法で測定した。

6) ヒト TM mRNA の測定

ラット肝類洞内皮細胞中の total RNA を acidic phenol guanidine thiocyanate (AGPC) 法で抽出し、260 nm の吸光度を指標として定量した。この total RNA の一定量を鋳型として RT-PCR を行い、さらに増幅された TM mRNA 由来のバンドの強度を定量するため、アガロースゲル電気泳動後、ナイロン膜に転写し、³²P 標識ヒト TM cDNA をプローブとしたサザンブロット解析を行い、バンド強度を BAS-2000 イメージアナライザーを用いて解析して数値化した。

7) ヒト TM cDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームのラット門脈への導入 (in vivo 実験)

ラットをペントバルビタール麻酔後開腹し、pRC/CMV-hTM cDNA 封入膜融合リポソーム溶液 (50 ml) をラット門脈に投与後、閉腹した。その 6 日後および 10 日後に、処理ラットの肝類洞内皮細胞をコラゲナーゼ環流後にエルトリエーションロータを用いて分離した。得られた類洞内皮細胞をコラゲン・コートプレートに巻き、20%FCS 含有 William's E 培地で 37℃で 24 時間培養した。その後、類洞内皮細胞をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で数回洗浄し、界面活性化剤で可溶化後、ヒト TM の活性、抗原量、mRNA 量を測定した。

8) ヒト TM cDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームの単離ラット肝類洞内皮細胞への導入 (in vitro 実験)

ラットの肝類洞内皮細胞をコラゲナーゼ環流後にエルトリエーションロータを用いて分離した後、一定量の細胞をコラゲン・コートプレートに巻き、37℃で 2 時間、20%FCS 含有 William's E 培地で培養後、pRC/CMV-hTM cDNA 封入膜融合リポソームを 37℃で 48 時間処理した。その後、類洞内皮細胞

を PBS で数回洗浄し、界面活性化剤で可溶化後、ヒト TM の活性、抗原量、mRNA 量を測定した。

B. 6 非ウイルスベクター類の安全性評価に関する研究

1) 細胞パネル

正常ヒト初代細胞として、臍帯血管静脈内皮細胞 (HUVEC)、臍帯血管静脈平滑筋細胞 (HUVSMC)、皮膚線維芽細胞 (HSFB) を Technoclone 社より、ヒト肝細胞を米国 IAM 社より入手した。また、ヒト培養細胞株である HeLa (子宮頸癌)、293 (胎児腎臓細胞)、A172 (グリア芽細胞種)、CCD-14Br (気管支線維芽細胞 2 倍体)、COLO320DM (結腸腺癌)、HuH7 (肝癌)、SBC-1 (小細胞肺癌)、NB1 (神経芽腫)、KATO III (胃癌)、K562 (赤芽球系白血病細胞)、HL60 (前骨髄性白血病細胞)、U937 (単球系白血病細胞)、IM9 (B 細胞系白血病細胞) を JCRB 細胞バンクより、Jurkat (T 細胞リンパ腫) を 理研細胞バンクより入手した。HeLa, CCD-14Br は 10% FCS と非必須アミノ酸含有 MEM 培地で、A172, HuH7 は 10% FCS 含有 DMEM 培地で、293 細胞は 10% FCS 含有 MEM 培地で、NB-1, KATO III は 10% FCS 含有 45% MEM, 45% RPMI1640 培地で、K562, HL60, U937, IM9, Jurkat は 10% FCS 含有 RPMI1640 培地で、HUVEC, HUVSMC, HSFB は 20% FCS, 5U/ml ヘパリン、15μg/ml 内皮細胞増殖因子 (ECGF) を含む 199 培地でそれぞれ使用まで継代培養した。ヒト肝細胞は改変 William's E 培地にヒドロコルチゾン、EGF、トランスフェリン、インスリン、アスコルビン酸、BSA を添加した培地を用いて実験の前日に凍結細胞を融解、播種して使用した。

2) 導入遺伝子

CMV プロモーターを有する β-ガラクトシダーゼ発現プラスミド pCMVβ (Chlontech 社) を レポーター遺伝子として用いた。96 ウェルあたり 0.1μg を遺伝子導入した。

3) ベクター

市販の遺伝子導入試薬である Lipofectin (GIBCO-BRL)、Lipofectamine plus (GIBCO-BRL)、Superfect (Qiagen)、Effectene (Qiagen)、DIMRIE-C (GIBCO-BRL)、DOTAP (Boehringer mannheim) を非ウイルスベクターのモデルとして用いた。各ベクターの組成は以下の通りである。Lipofectin: 陽電荷脂質 DOTMA/共役脂質 DOPE=1/1; Lipofectamine Plus: 陽電荷脂質 DOSPA/共役脂質 DOPE=1/1 +DNA 凝集試薬; Superfect: 活性デンドリマー; Effectene: 非リポソーム脂質と DNA 凝集試薬; DIMRIE-C: 陽電荷脂質

DIMRIE/コレステロール=1/1；DOTAP：陽電荷脂質 DOTAP。

4) ベクター・DNA 複合体の調製

96 穴プレートのウェルあたり一定量の DNA (pCMVB 0.1 μ g/well) を使用し、ベクター (脂質類) を 4 濃度 (0.25, 0.5, 1, 2 μ g/well、終濃度 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml) の割合で各試薬の説明書の指示に従って混合し、至適の時間放置することによりベクター・DNA 複合体を形成した。複合体形成後、無血清 Opti-MEMI 培地を添加して 50 μ l/well に調整した。

4) 遺伝子導入プロトコール

接着細胞の場合は前日に 96 穴プレートのウェルあたり 5×10^3 細胞を播種し遺伝子導入直前に無血清培地 Opti-MEMI 50 μ l/well で一回洗浄後、無血清の Opti-MEMI または 20%FCS 含有 Opti-MEMI 50 μ l/well を加えた。浮遊細胞の場合は当日にウェルあたり 2.5×10^4 細胞を無血清の Opti-MEMI または 20%FCS 含有 Opti-MEMI 50 μ l に浮遊し、播種した。細胞にベクター・DNA 複合体 50 μ l を添加して 1 時間、37 $^{\circ}$ C で作用させた後、培地を除去し、各細胞の通常の培養に用いる培地 100 μ l に交換してさらに 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。

5) 毒性評価

細胞膜傷害性は細胞をベクター・DNA 複合体と 1 時間反応させた後、培養上清 30 μ l を別のプレートに回収し、LDH 細胞毒性テストワコー (和光純薬) を用いて遊離 LDH 活性を指標に測定した。また、細胞生存率は細胞をベクター・DNA 複合体と 1 時間反応させた後、培地を交換しさらに 24 時間培養後、TetraColor ONE cell proliferation assay system (生化学工業) により測定した。

6) 遺伝子発現効率

遺伝子発現効率は細胞をベクター・DNA 複合体と 1 時間反応させた後、培地を交換しさらに 24 時間培養後、 β -ガラクトシダーゼ活性を Galacto-Star レポータージーンアッセイシステム (Tropix 社) を用いてケミルミネッセンス法により測定した。発光の測定には Wallac ARVO マルチラベルカウンターを用い、ウェルあたりの相対発光強度 (RLU/well) として測定した。また、遺伝子発現率 (遺伝子発現細胞数) を β -ガラクトシダーゼの染色により算出した。

C. 研究結果

C. 1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

我々は、ウイルスベクターの持つ高い遺伝子導入効率と、非ウイルスベクターの持つ安全性や、あらゆる遺伝子を導入出来得るなどの性質を合わせ持

った遺伝子導入ベクターである膜融合リポソームを提示してきた。この我が国独自の遺伝子導入ベクターである膜融合リポソームは、センダイウイルスの膜融合能をリポソームに付与したものであり、細胞膜との融合によりリポソーム内に封入した遺伝子などの物質を直接効率よく細胞質内に導入出来る。この膜融合リポソーム法では、センダイウイルスの膜融合能を利用しているが、センダイウイルスは元々ヒトに対して病原性を示さないうえ、事前に紫外線照射によりウイルス RNA を完全に断片化しておくため、感染の心配が無く、他のウイルスベクターの様な危険性はない。さらに、ウイルスベクターとは異なり、リポソーム内に封入することが出来れば導入する遺伝子の形状 (塩基配列) および大きさに制限がなく、生理活性蛋白質や糖脂質などの様々な高分子物質をも自由に効率よく、インタクトな状態で細胞内導入することが出来るなど、多くの特徴を有している。また膜融合リポソームはセンダイウイルスとほぼ同等の膜融合活性を持っており、ほとんど全ての動物細胞に対して物質導入が可能であることから、適用範囲が広いベクターである。本研究ではこのように優れた遺伝子導入ベクターとなり得る膜融合リポソームの安全性・有効性をさらに確保していくこと、さらには膜融合リポソームの特性を生かした遺伝子発現システムの構築などを目的に、膜融合リポソームの最適粒子設計を検討しており、今年度はリポソーム調製法の変更による遺伝子封入量や遺伝子導入効率の増強、導入遺伝子の安定化などを検討した。また、膜融合リポソームに代わる新たな安全性の高いハイブリッドベクターの開発を目指して Vesicular Stomatitis Virus (VSV) の性質を利用した VSV-liposome を作製し有用性を検討した。

C.1.1 膜融合リポソームの最適粒子設計

従来の膜融合リポソームは逆相蒸発法により調製したりポソームを用いるため、有機溶媒で失活する物質を封入することはできない。C.4 項に述べる T7 細胞質内遺伝子発現系では T7 RNA polymerase を DNA とともに細胞に導入する必要があるが、本酵素は有機溶媒により失活してしまう (Fig. 3)。そこでこのような場合にも膜融合リポソームを適用できるようにするために、生理活性物質を失活させずに封入できるリポソーム調製法を検討した。Bangham 法と呼ばれるリポソーム調製法は、試験管表面に作製したリン脂質の薄膜に内水相を加え機械的な力を与えるだけでリポソームを調製可能な

方法で、蛋白質の失活の心配はほとんどないが、リポソームが多重膜構造 (MLV) となるため封入容積が小さくリポソーム内に効率よく物質を内封させることは困難である。したがって MLV をより封入容積の大きなリポソームに変換する方策を考える必要がある。凍結融解法は MLV を凍結融解することにより封入容積の大きなリポソーム LUV (Large Unilamellar Vesicle) に変換する方法である。一般的に凍結融解の回数増加にともないリポソームの保持効率が増加するが、3 回以上の凍結融解では保持効率がほぼプラトーに達することが報告されているため、3 回の凍結融解により LUV を調製することにした。凍結融解処理を繰り返すと生理活性物質が失活する可能性があるが、T7 RNA polymerase については 3 回凍結融解しても遺伝子発現の低下は認められないことを確認した (Fig. 4)。

これらのリポソーム調製法および粒子径の異なるリポソームを用いて膜融合リポソームを作製し、遺伝子封入量と遺伝子発現の相関について検討した (Table 1)。その結果、遺伝子封入量はリポソーム調製法にかかわらず、膜融合リポソームの粒子径の増大に伴い増加することが明らかとなった。これは、膜融合リポソーム粒子径の増大に伴い、内水相の容積が増加したためであると考えられる。同じサイズの膜融合リポソーム間で遺伝子封入量を比較すると、0.8 μ m でサイジングしたリポソームから作製した膜融合リポソームの場合、Bangham-凍結融解法で調製した膜融合リポソームにおいて遺伝子封入量が最大であり、次いで逆相蒸発法、Bangham 法単独の順であった。また、0.4 μ m でサイジングしたリポソームから作製した膜融合リポソームの場合、逆相蒸発法と Bangham-凍結融解法で調製した膜融合リポソームにおける遺伝子封入量がほぼ同等であるのに対し、Bangham 法単独で調製した膜融合リポソームの遺伝子封入量は最低であった。Bangham 法が他の調製法に比べ遺伝子封入量が低いのは、多重膜構造をとり封入容積が小さいためと考えられる。また、0.8 μ m サイジングのリポソームから作製した膜融合リポソームにおいて、逆相蒸発法より Bangham-凍結融解法で調製した膜融合リポソームの封入量が大きく異なった理由は不明であるが、今回の検討ではサイジングフィルターにより最大粒子径のみを揃えたリポソームから膜融合リポソームを作製したため、これらの膜融合リポソームの粒度分布の違いが封入量の違いとして現れているものと考えられた。

次に、調製法および粒子径の異なるリポソームよ

り作製した膜融合リポソームの遺伝子発現効率を比較した (Table 2)。その結果、膜融合リポソーム粒子径の増大に伴い高い遺伝子発現が認められた。また、同じサイジングフィルターを用い粒子径を制御した膜融合リポソームでは、遺伝子封入量に依存した遺伝子発現が認められた。さらに、膜融合リポソームの粒子数を揃えて遺伝子導入したところ、Bangham-凍結融解法で作製し、0.8 μ m フィルターでサイジングしたリポソームから作製した膜融合リポソームが、最も高い遺伝子封入率および遺伝子発現を示した。このことより、Bangham-凍結融解法でも遺伝子導入効率に優れた膜融合リポソームを調製可能であることが明らかとなった。Bangham-凍結融解法によりリポソームを調製することで、酵素などの活性を有する蛋白質でも失活することなく膜融合リポソーム内に封入可能となり、効率よく細胞内に酵素などを導入可能になると期待される。以降の実験では Bangham-凍結融解法によりリポソーム調製した膜融合リポソームを用い検討した。

一般にウイルスベクターを遺伝子導入ベクターとして用いる場合、導入する遺伝子の大きさに制限があり、大きな遺伝子を細胞に導入することは困難である。一方、膜融合リポソームはリポソーム調製時に封入可能な物質であればいかなる物質も細胞質内に導入可能である。したがって、膜融合リポソームの粒子径を増大させることで、サイズの大きなプラスミドでも自由に効率よく封入可能となる結果、ウイルスベクター以上に適用範囲の広いベクターになり得るものと期待される。そこで、pCAL2 より 2 倍以上サイズの大きいルシフェラーゼ発現プラスミドである BMGCAL2 を用いて、粒子径の異なる膜融合リポソームにおける遺伝子封入量および遺伝子発現について検討した (Table 3)。その結果、BMGCAL2 では pCAL2 よりも膜融合リポソームへの封入量および遺伝子発現量が低下したものの、膜融合リポソームの粒子径の増大により封入量および遺伝子発現の上昇が認められた。膜融合リポソームは至適なりポソーム粒子径にすることにより、細胞内に 15Kb という比較的大きなサイズの遺伝子をも導入することが可能であることが判明した。

スベルミジンは生体内に普遍的に存在する低分子塩基性生理活性アミンであるが、遺伝子を凝縮させ安定化させるという興味深い報告がある。スベルミジンを遺伝子と同時に膜融合リポソーム内に封入し、スベルミジンにより安定化された遺伝子を細

胞質内に直接導入することが可能であれば、細胞内で遺伝子の分解が抑制され遺伝子発現の増強につながることを期待される。そこで、遺伝子発現におよぼすスペルミジンの影響について検討した。まず、スペルミジンの遺伝子安定化作用を検討するため、DNA 溶液にスペルミジンを添加し、DNA 分解酵素 DNase I 感受性を検討したところ、スペルミジンの濃度に依存して DNA の分解が抑制されることが明らかとなった。3 価のポリアミンであるスペルミジンは DNA と静電的に結合し、コンフォメーション変化を引き起こし、DNA をコンデンスさせることが報告されている。この結果よりスペルミジンが遺伝子をコンデンスさせることにより安定性を上昇させ得る物質として有用であることが示唆された。次にこの遺伝子-スペルミジン複合体を膜融合リポソーム内に封入し、遺伝子発現効率に及ぼすスペルミジンの影響を検討した (Fig. 5)。その結果、遺伝子:スペルミジンの混合比が 1:0.625 のときに、最大の遺伝子発現増強が認められた。しかし、さらにスペルミジン濃度を増加させても遺伝子発現は増強せず、逆に高濃度では遺伝子発現の低下が認められた。これは、遺伝子がスペルミジンにより必要以上にコンデンスされ、細胞内での遺伝子の転写効率が低下したためであると考えられる。以上の結果より、スペルミジン添加による遺伝子発現増強には最適混合比が存在することが明らかとなった。

C.1.2 VSV-リポソームの開発に関する検討

膜融合リポソームにかわる新たなハイブリッド・ベクター候補として Vesicular Stomatitis Virus (VSV) とリポソームを融合させた VSV-リポソームについて検討を行った。VSV-リポソームによる細胞内への物質導入活性は DTA を用いて検討した。DTA は、単独では細胞膜を通過できず、全く毒性を示さないが、細胞質内に intact な状態で数分子でも導入されれば、蛋白合成を阻害し細胞死を誘導する強力な毒素である。そこで、DTA 封入 VSV-リポソームの FL 細胞に対する蛋白合成阻害効果を指標に、細胞質内への物質導入活性を評価した。その結果、DTA 封入 VSV-リポソームは、リポソーム由来のリン脂質濃度 0.65 μ g/ml から濃度依存的に蛋白合成を阻害し、6.5 μ g/ml において約 90% の細胞で蛋白合成を阻害した。一方、同濃度の DTA 封入リポソーム、BSS(-)封入 VSV-リポソームは、全く蛋白合成を阻害しなかった。このことは、VSV-リポソーム単独では細胞障害性を発現しないが、リポソーム内に封入された DTA を intact な状態で細胞質

内に導入可能であること、導入効率はリポソームのみの場合の 100 倍以上であることを示している。さらに VSV-リポソームは、単独では高濃度で細胞に作用させても全く毒性を示さなかったことから、物質導入キャリアーとしての安全性に優れていることが判明した。VSV-リポソームについては次年度以降、さらに詳細に検討していく予定である。

C. 2 ミニ人工染色体 (独立レプリコン) の開発に向けた基礎研究

C.2.1 遺伝情報が細胞核内で独立レプリコンとして安定に存在するために必要な因子の研究

これまで遺伝子治療用のベクターとして臨床試験に使われたウイルスベクターのうち、遺伝情報を核内で安定に保つことができるレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノ随伴ウイルスベクターはすべて、ヒトの染色体に外来の遺伝情報を挿入することでその目的を達している。しかしこれらのベクターによる染色体への遺伝情報のランダムな挿入は、発癌遺伝子の異常な活性化やガン抑制遺伝子の不活性化、その他挿入部位はもとよりそれ以外の遺伝子発現に影響するなどの有害作用 (遺伝子毒性) をもたらす可能性がある。したがって染色体に挿入されなくても安定に存在できる遺伝情報の構築は、安全な遺伝子治療用ベクターの開発を目指す上で必須である。小型化したミニ染色体の開発はこのような必要条件を直接的に満たすものであり、酵母で開発された人工染色体を範として、ヒト細胞でも酵母と同様のアプローチで作られた人工染色体も報告され、新しい遺伝子治療への第一歩とされている。しかし、現在、開発された人工染色体のサイズは極めて巨大である。一方、安定な遺伝情報の発現を必要としているのは主として代謝性疾患であり、その遺伝子治療の主なターゲットは肝臓・脳などほとんど分裂していない細胞から構成されている組織・器官であるため、現状の人工染色体のような巨大な DNA が核膜というバリアーを通過することはほとんど不可能で実用的ではないと考えられる。C.3 項に述べるラムダファージは DNA が非常に高度に凝縮された構造を取っているが、それでも 50 kbp の DNA を包み込むと核膜孔を通過するぎりぎりのサイズであるという事実から、我々は遺伝子治療に使用できる独立レプリコンのサイズの上限を 50 kbp と考えている。一般に人工染色体に必要な機能としては DNA の複製と分配が挙げられるが、代謝疾患の遺伝子治療の対象となる組織の細胞はほとんど分裂していないことから DNA を核内で安

定に保持する機能もそれに劣らず重要であると考えられる。実際、染色体はヒトの生涯にわたって安定で細胞から失われることはないが、アデノウイルスのゲノム DNA や大腸菌で作られたプラスミド DNA は分裂していない細胞の核に送り込まれても不安定で短期間で消失する。この現象は染色体に存在する安定化に必要な構造がこれらのベクターの DNA には欠けていることを示している。そこで、本研究では DNA が細胞核の中で安定に存在するために必要な DNA の一次構造に研究の焦点をあてた。

染色体の構造の中で安定性に関与する構造として最近注目を集めているのが染色体末端にあるテロメアと呼ばれる部分である。ヒトを含む脊椎動物細胞のテロメアには、TTAGGG という 6 塩基対からなる繰り返し構造 (テロメア配列) が存在しており、テロメア配列がテロメア合成酵素 (テロメラーゼ) の基質となって染色体末端での複製が保証されていると考えられている。テロメア配列が染色体の安定性に深く関与していることは、正常体細胞を培養しているとテロメア配列の長さが短くなり、ある閾値を下回った点で染色体が不安定になり、細胞が死に至ることから明らかになった。この事実から、テロメアは、染色体が独立した遺伝情報としての安定性を維持するために必須な要素であると考えられ、本研究で目標としている「NLS フェージに組み込めるような最大 50 kbp までの人工独立レプリコンの開発」にあたって最も重要な要素の一つと認識している。テロメアの機能に関しては、テロメラーゼを中心に染色体末端の DNA 複製に関する研究は進んでいるが、染色体末端の安定化機構、テロメアとしての機能を持つために最小限必要な要素についてはまだ十分には解明されていない。このため我々は、昨年度、外部から導入したテロメア配列 (TTAGGG)_n が細胞内の染色体を切断するテロメア・シーディングという現象を用いて、テロメアとして機能するために必要な因子について解析を進め、少なくとも 500 bp 以上の長さの (TTAGGG)_n の存在がヒト細胞内でテロメアが機能するために必要であることを明らかにした (Fig. 6)。この発見の重要な点は、テロメア配列が、テロメラーゼの基質としての機能とは明らかに異なる生物学的機能を持っているという点にある。その根拠は、1) テロメラーゼは (TTAGGG)_n に類似した塩基配列を持つ DNA も基質として認識するが、(TTAGGG)_n 以外の DNA は染色体の末端として機能しない、2) テロメラーゼは 20 から 30 bp の短い DNA を基質として TTAGGG を合成できるが、染色体の末端には

500 bp 以上 (細胞によっては 2,000 bp 以上) の長さの (TTAGGG)_n がないと安定化現象が観察されない (Fig. 6)、3) (TTAGGG)_n が染色体の末端として機能するかどうかは細胞内のテロメラーゼの活性とまったく相関がない、という 3 点である。

そこで本年度は、(TTAGGG)_n と相互作用して染色体末端を安定化している細胞側の因子に重点をあてて解析を進めた。これまでに、(TTAGGG)_n という配列の DNA に結合するヒト細胞内のタンパク質として、hTRF1 と hTRF2 が同定されている。このうち、hTRF1 は、強制発現させた場合に染色体末端の (TTAGGG)_n の長さが短くなることが報告されており、テロメアの長さを制御している因子と考えられている。また、hTRF2 は、その変異体を強発現させると染色体同士の融合が起こって不安定になることが報告されている。昨年度のテロメアシーディングの結果から、染色体末端の安定性と末端の (TTAGGG)_n の長さが逆相関することがわかったので、染色体安定化因子としての hTRF1 に焦点をおいて研究を進めた。

まず、(TTAGGG)_n に対する認識が弱いために十分にテロメアを安定化できないと考えられる HeLa-LT 細胞に、Flag-Tag を N 末端につけた hTRF1 遺伝子の発現ベクターを導入し、抗 Flag 抗体を使ったタンパク質プロットティングと間接蛍光抗体法を用いて hTRF1 を大過剰に発現している細胞株を 3 つ単離した (Fig. 7)。さらにこれらの細胞に 500 bp の (TTAGGG)_n を持つ pMYAC1 を直鎖状にして導入し、テロメアシーディングの起こる頻度を計測した。その結果、テロメア配列結合因子である hTRF1 を過剰に発現させると、テロメアシーディングを起こしにくい HeLa-LT 細胞でも 500 bp の (TTAGGG)_n をテロメアとして認識し、染色体末端として安定に存在させ得ることを見出した (Table 4)。すなわち、染色体の末端を安定にするために必要な因子は、テロメア配列 (TTAGGG)_n とこれに結合する hTRF1 の複合体であることが明らかになった。hTRF1 の DNA 結合能には厳密な配列特異性があり (TTAGGG)_n 以外の配列を持つ DNA とは結合しないことも、テロメア・シーディングにおいて得られている結果と一致しており、この複合体が染色体安定化に関与する因子であることを強く示唆している。

さらに重要なことは、hTRF1 が DNA と複合体を作る場合、その相手となるテロメア配列は必ずしも直鎖 DNA の末端にある必要はないという点である。すなわち hTRF1 の染色体安定化因子としての機能

は、テロメア配列が環状 DNA に組み込まれていても発揮される可能性がある。我々はこれまでに、核に導入されたファージ内部の DNA は適当な複製起点さえあれば、cos 領域で結合されて再び環状となっていることを見い出しており、今回、500 bp 以上の(TTAGGG)_n が染色体安定化因子として同定されたことは、今後、環状 DNA による独立レプリコンを開発する上で非常に重要な意味を持っている。この点については、次の C.2.2 項で詳述する動物細胞内で遺伝情報の安定性を測定するための系と組み合わせての解析を始めている。

C.2.2 動物細胞での遺伝情報の安定性を測定するための新しいシステムの開発

C.2.1 項で述べたように、遺伝情報の安定化にはテロメア配列が関与していることが明らかになった。酵母では実際に、環状の不安定なプラスミド DNA がテロメア配列の挿入によって非常に安定になることが報告されている。しかし、(1)遺伝情報の安定性は1細胞分裂あたりの遺伝情報の消失の割合で表すが、世代時間が24時間以上と酵母の12倍から20倍の時間が必要な動物細胞では安定性を定量するのに非常に時間がかかること、(2)酵母では Ura3 遺伝子をマーカーとして遺伝子の消失を定量化するネガティブ選択のシステムが確立しているが動物細胞にはないこと、の2つの理由から動物細胞の遺伝情報の安定性を調べることは酵母に比べると容易ではない。分裂速度の問題は動物細胞を使う限り避けられない問題であるが、Ura3 遺伝子に相当するネガティブ/ポジティブ選択の系が動物細胞でできれば、検出感度を大きく上げることで解決可能である。動物細胞ではネガティブ選択の機能に相当する遺伝子として自殺遺伝子が知られている。例えば Herpes simplex virus の Thymidine kinase (TK) 遺伝子を発現している細胞は ganciclovir という薬剤に感受性となる。またポジティブ選択遺伝子としては種々の薬剤耐性の遺伝子が知られている。そこで我々は、2つの異なる選択マーカー・タンパク質を一つの遺伝子単位から作り出す工夫をすることでこの問題を解決することを考えた。我々の考案した選択用の遺伝子は、1つの強いプロモーターの下流にネガティブ選択酵素 cDNA とポジティブ選択酵素 cDNA を直列につなぎ、その下流に転写終点を配置した構造をとる (Fig. 8)。動物細胞では、リボゾームは mRNA 5' 末端のキャップ構造を認識して結合した後 3' 側に移動して最初の cDNA だけをタンパク質に翻訳するため、下流の cDNA は一般には

ほとんど翻訳されない。そのため、2つの cDNA の間に 424 bp の Encephalomyocarditis virus 由来の CITE 配列 (cap independent translation enhancer) を挿入し、mRNA の途中にもリボゾームが結合して下流の cDNA を翻訳するような工夫を施した。そして、自殺遺伝子 (ネガティブ選択遺伝子) の cDNA を上流に、薬剤耐性遺伝子 (ポジティブ選択遺伝子) の cDNA を下流において、ポジティブ選択遺伝子が発現している細胞では、すべて同時に自殺遺伝子が発現していることを確実にしている。このアッセイ系を使えば、選択用遺伝子を失った細胞だけがネガティブ選択培地で増殖してくるので、1細胞分裂につき1%以下の微妙な安定性の相違も1週間後に生存してくる細胞のコロニー数を数えることで簡単に測定できる。

昨年度は、このシステムに使用する組換え DNA の準備を開始したが、本年度は DNA の作製を終了し、その生物活性を測定した。まずこのシステムに使用するために、ネガティブ選択遺伝子3種類とポジティブ選択遺伝子3種類を候補に選び、それぞれを組み合わせて活性を検討した。ポジティブ選択マーカーとしては、Hygromycin B 耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、フレオマイシン耐性遺伝子を選び、それぞれを CITE 配列による発現がもっとも高くなるように in vitro mutagenesis で改変した後、CMV 初期遺伝子プロモーターの下流に接続して HeLa 細胞に導入し、期待される薬剤耐性の活性が得られるかどうかを検討した。その結果、Hygromycin B 耐性遺伝子とフレオマイシン耐性遺伝子では薬剤耐性活性が見られたが、ピューロマイシン耐性遺伝子では耐性コロニーが得られなかった。ピューロマイシン耐性遺伝子はかなり強く発現しないと耐性の形質を示さない可能性があるが、mutagenesis にあたって不必要な部位に変異が入った可能性も否定できない。いずれにしろ、今後の検討にあたっては2つの耐性遺伝子のうち細胞毒性が Hygromycin B より強い Zeocin に対する耐性を獲得できるフレオマイシン耐性遺伝子を使用することにした。

次に、CITE-フレオマイシン耐性遺伝子の上流にネガティブ選択遺伝子をつないで HeLa 細胞に導入して活性を検討した。ネガティブ選択遺伝子としては、Herpes simplex virus の TK 遺伝子 (Ganciclovir 感受性をもたらす)、大腸菌の Cytosine deaminase 遺伝子 (5-Fluorocytosine 感受性をもたらす) およびラットの Cytochrome P450 2B1 遺伝子 (Cyclophosphamide 感受性をもたらす) について検

討した。その結果、TK 遺伝子と Cytosine deaminase 遺伝子の両者は CITE-フレオマイシン耐性遺伝子の 上流に接続すると Zeocin 耐性の細胞を得ることができなかったのに対し、Cytochrome P450 2B1 遺伝子では目的のクローンを得ることができた。TK 遺伝子と Cytosine deaminase 遺伝子は核酸合成経路に働く酵素であるが、もともと動物細胞では発現していない遺伝子であるため、強発現させた場合には基質に依存しない非特異的な毒性を示したものと思われる。これに対し、ラットの Cytochrome P450 2B1 遺伝子はもともと肝臓で強く発現している遺伝子であるため、動物細胞に対する非特異的な毒性はないものと思われる。以上の検討から、遺伝情報の安定性を測定するシステムには、CMV 初期遺伝子プロモーター=ラット Cytochrome P450 2B1 遺伝子=CITE =フレオマイシン耐性遺伝子=SV40 後期転写終結/poly(A)付加シグナルという構成の遺伝子を持つ DNA (pYI-15) を使用することを決定した。

次に、pYI-15 と、pYI-15 から Cytochrome P450 2B1 遺伝子を除去して CMV 初期遺伝子プロモーター=CITE =フレオマイシン耐性遺伝子=SV40 後期転写終結/poly(A)付加シグナルという構成にした pYI-13 を使って詳細な条件検討を行った。まずこの両者をそれぞれ HeLa 細胞に導入して、400 µg/ml の Zeocin を含む培地で選択し、耐性のコロニー (YI-15 および YI-13) を得た。この 2 つの細胞株を種々の濃度の Cyclophosphamide 存在下で培養して感受性を調べたところ、YI-13 細胞は 2 mM の Cyclophosphamide 存在下でも正常に増殖するのに対し、チトクロム P450・2B1 遺伝子を発現している YI-15 細胞は 0.5 mM 以上の Cyclophosphamide 存在下で完全に死滅し、予想通りの薬剤感受性を示すことを明らかにした (Fig. 9)。また、YI-13 細胞と YI-15 細胞を混合培養してポジティブ・ネガティブ選択の条件を検討し、100 mm ディッシュあたりの総細胞数を 10^4 個以下、出現するコロニーの数を 100 個以下とすることで、正確に選択されたコロニーの数を検出できることを確認した (Table 5, Fig. 10)。

このシステムを用いて、ヒト細胞での染色体外複製系として知られる Epstein-Barr ウイルス (EBV) 複製系を含むプラスミド DNA の安定性を測定した。EBV 複製系は cis に働く複製起点として OriP が、trans に働く因子として EBV の EBNA1 タンパク質が同定されており、ヒト・サルの細胞中で染色体外 DNA として複製することが知られている。またその細胞内での安定性も調べられており、細胞分裂あ

たり 2.8 % から 5.7 % の割合で失われていくことが知られている。そこで今回作製したポジティブ・ネガティブ選択遺伝子を含む pYI-15 に OriP を挿入し、EBNA1 発現細胞に導入して染色体外 DNA としての安定性を測り、得られた値をこれまでの報告と比較することで、我々が作り上げた DNA の安定性を測るシステムの検定を行うことにした。まず、pYI-15 に OriP を挿入した pYI-16 を作製した。この DNA を EBNA1 発現細胞である HeLa-EBNA1 細胞に導入し、5 日間 Zeocin 存在下で培養して出現した複数の耐性細胞のコロニーを集めてプール細胞を得た。この細胞の中では導入した pYI-16 は染色体外のエピゾームとして存在している。次にこの細胞を薬剤非存在下で 24 時間、48 時間および 72 時間培養し、各培養時間終了後に 1,000 個の細胞を 0.5 mM の Cyclophosphamide を含む培地で 100 mm ディッシュにまき直して、1 週間後に出現した耐性細胞のコロニーの数から、細胞分裂あたりに出現する pYI-16 を失った細胞の割合を計算した (HeLa 細胞は 24 時間に 1 回分裂する)。その結果、1 回の細胞分裂あたり 4.1 %, 3.1 %, 3.3 % という割合で pYI-16 が脱落していくことがわかり、これまでの報告と完全に一致することが確認できた (Table 6)。

以上示したように、これまで間接的な方法しか存在しなかった動物細胞での遺伝情報の安定性の測定を、非常に定量的にかつ 20 日以内という短時間に達成できる方法を確立した。この方法に基づいて、C.2.1 項で述べたテロメア配列や核マトリックス結合領域を候補として、環状 DNA を動物細胞の核の中で安定にできる因子の検索を開始している。

C.2.3 自立複製エピソーマルベクター開発のための基礎研究

環状 DNA として宿主染色体に組み込まれることなく染色体外に安定に保持され、さらに宿主 DNA とともに複製されることにより持続的な遺伝子発現が可能な自律複製エピソーマルベクターは遺伝子治療に用いる独立レプリコンとして有望なものと考えられる。ヒト細胞での染色体外複製系として知られる EBV 複製系は複製されたプラスミドが細胞の分裂時にランダムに分配されるため、プラスミドの安定性はあまり高くない。また、EBV はヒトやサルの細胞中では複製されるが、齧歯類の細胞では複製しないことが知られており、EBV ベクターの *in vivo* 遺伝子導入ベクターとしての有用性を検討することは困難である。そこで複製系を EB OriP ではなくヒト染色体由来の複製起点を用いることによ

り、複製能・安定性に優れ、齧歯類の細胞中でも複製されるベクターを作成することが可能であるという報告に基づいて、ヒト染色体中の複製起点のクローニングを試みた。

293細胞にP220, pDY-, pDYLIBの各プラスミド(Fig.11)を導入し、2日目より薬剤選択を行ったところ、ヒトの染色体断片を挿入したpDYLIBの導入によりP220, pDY-に比べて顕著に多数の薬剤耐性コロニーが形成されることが確認された(Table 7)。また、プラスミド導入細胞について薬剤選択を続け、経時的に染色体外DNAを抽出してサザンプロットにより導入プラスミドの細胞内での複製を検討した。プラスミドが細胞内で複製され、DNAのメチル化が失われると制限酵素MboIに感受性となり、8.8KbのpDY-断片から2.8Kbのシグナルが出現するようになる。pDY-では9日目、p220では16日目以降はこの複製シグナルが消失したが、pDYLIBでは30日以上にわたり複製シグナルが検出された(Fig. 12)。この結果から、pDYLIBに挿入されたヒト染色体断片にはプラスミドの細胞内複製、安定性に関与する活性があることが確認された。

そこで薬剤耐性選択により得られた各コロニーを拡大し、約2ヶ月間薬剤選択を続けた後、細胞内で複製されたプラスミドを大腸菌でレスキューした。レスキューされたプラスミド約200個について分析したところ、ほとんどのプラスミドはHind III挿入断片が2-7本と複数の挿入断片を有し、平均挿入断片長は18Kdとかなり大きいことが判明した。そこで、Hind III挿入断片数が2本以内の24個のレスキュープラスミドを選択し、細胞に再度導入することにより自立複製配列を持つプラスミドのスクリーニングを行った。その結果、293細胞ではpDYLIB-Re23, 130の2種類のプラスミドからのみ再現性よく薬剤耐性コロニーが得られた。またHeLa細胞でもpDYLIB-Re23, 130の導入によりP220, pDY-と比較して顕著に多数の薬剤耐性コロニーが得られた(Table 8)。また、これらのプラスミドを導入した293細胞から得た染色体外DNAをサザンプロットすると複製シグナルが得られること、さらに複製プラスミドのレスキューも確認されたことから、これらのプラスミドはエピソームベクターとして存在することが推測された。以上の結果よりこれら2種類のプラスミドのHind III挿入断片を自立複製配列を含む染色体断片の候補とした。

pDYLIB-Re23は7Kと9K、pDYLIB-Re130は14Kと3KのHind III挿入断片を有する(Fig. 13)。そこで

各断片を単独でpDY-ベクターに組み込んだプラスミド、pDYLIB-3K, -7K, -9K, -14K(それぞれ元のベクターの挿入方向に対して逆方向、正方向で挿入されたものを(-), (+)とした)を作成し、各断片の自立複製能を検討した。その結果、7K, 14Kの断片を挿入したプラスミド導入細胞からは薬剤耐性コロニーが高頻度に得られた(Fig. 14)。一方、サザンプロットにより細胞内プラスミド複製を検討したところ、9K, 14Kの各断片を挿入したプラスミドで強い複製シグナルが検出されたが、7K断片の複製シグナルは微弱であった。(Fig.15)。以上の結果より、7K, 14Kの各断片はプラスミド保持能が強いこと、また9K, 14Kの各断片は強い複製能を有する可能性が示唆された。今後、これらの断片をより詳細に解析し、自立複製ベクターの開発を検討する予定である。

C. 3 導入遺伝子の核移行に関する研究

非ウイルスベクターは一般にウイルスベクターに比べて遺伝子発現効率が悪いが、その理由の一つに細胞膜と核膜という2つのバリアーをくぐり抜けてDNAを核にターゲティングする効率がウイルスベクターに比較してはるかに悪いという点が指摘されている。膜融合リポソームはセンダイウイルス膜タンパク質の機能を使って自ら細胞膜と融合することにより最初のバリアーをクリアしている点で、非ウイルスベクターの中ではユニークな存在であるが、細胞質に導入された遺伝情報を核へ積極的に輸送するわけではない。より高い遺伝子導入活性を求めためにはさらに核膜という第2のバリアーを越える工夫をしなければならない。培養細胞を使った研究から、細胞質に導入されたプラスミドなどのDNAが核に移行する確率は約0.1%から0.01%と推定され、なんらかの工夫をしないとこのバリアーを越えることはできない。DNAの核への移行に関してはかつて、DNA自体にその活性があるという研究や、核タンパク質HMG1にDNAを核に移行させる活性があるという研究が発表されてきたが、現在ではタンパク質が核に移行する機構の研究や核膜・核膜孔の構造に関する研究が大きく進んだためこれらの研究結果はほぼ否定されている。そのため、DNAの核への能動的ターゲティングは、安全性の高い遺伝子治療用ベクターの開発を手がけている研究者にとって非常に重要なテーマの一つとなっている。

これまでに蓄積されたタンパク質の核移行の研究から得られた結果から、DNAを核の中に能動的

に輸送させるための必須条件としては次の諸点が挙げられる。

(1)DNA の一次構造自体には核に移行するためのシグナルがないので、タンパク質由来のペプチド性核移行シグナルをDNA に付加する。ウイルスの場合、裸のDNA が単独で核に移行するとは考えられておらず、それぞれのウイルスの構造タンパク質の働きで核に送り込まれていると予想されている。

(2)DNA を60 nm 以下のサイズに凝縮する。細胞質から核に輸送される物質が通過する唯一の通り道と考えられている核膜孔の外径は約80 nmから100 nm であり、遺伝子導入に使用される最も凝縮したDNA である閉環状プラスミドの直径(約200 nm)よりはるかに小さいので、DNA をさらに強く凝縮しなければ核膜孔を通過することは物理的に不可能である。

以上の2つの条件を満たすために、我々は既に遺伝子組換え実験に使われ安全性が確立している大腸菌を使って増殖可能な細菌ウイルスのうち、遺伝子クローニング等に広く使われているラムダファージをベクター作成の素材として選んだ。ラムダファージはサイズが比較的小さく(頭部の直径が54 nm)、形態を決定する遺伝学上の情報の蓄積があってサイズや形状をコントロールすることが可能である。また外来の遺伝情報を最大50 kbp まで頭部に封入することが可能である。これまで化学物質を使ってプラスミドDNA を生理的条件下で100 nm 以下に凝縮できたという報告はなく、現在のところファージ粒子の採用は核へのターゲティングに求められる凝縮条件を生理的条件下で満たす唯一の方法である。さらにファージ頭部の主要抗原の一つであるDタンパク質を使って、外来のペプチド抗原をファージ表面に発現させることが可能であるという利点を有する。

昨年度までに、我々は強力な核移行シグナル(NLS)を頭部表面に発現させたラムダファージ(NLSファージ)の作成に成功し、ファージ粒子に封入されたDNA を核の内部にターゲットすることに成功した。これは、核移行シグナルを使ってDNA のような巨大分子を核の内部に能動的に輸送させた世界で初めての成果である。この結果に基づいて、本年度は核へのファージ粒子の移行をさらに詳しく解析すると共に、NLSファージのゲノムに動物細胞での遺伝子発現を観察するためのマーカー遺伝子を組み込んで、DNA が核に移行することにより実際に遺伝子発現が増強されるかどうかを観察した。ファージ粒子の核への移行は、ファージ頭部を

構成するもう一つのタンパク質であるEタンパク質に対する抗体をプローブとして検討した。Eタンパク質はNLSを持たず核に移行する活性を持たないので、このタンパク質が核の内部にあることがわかればファージ粒子が核の中に入った証拠となる。その結果、ファージ粒子の核への移行は、(1)低温(4℃)、(2)ATPの枯渇、(3)核膜孔に結合する小麦胚芽レクチン(WGA)の存在によって阻害されることが明らかになった(Fig.16)。この結果は、NLSを組み込んだファージが、核膜孔を通してエネルギー依存性に能動的に核の中に運ばれていることを示している。

次にNLSファージのゲノムに動物細胞で発現するマーカー遺伝子を挿入して、その発現が核移行によって促進されるかどうかを検討した。マーカーとしては、発現した場所で蛍光を発するGreen Fluorescent Protein(GFP)と、低いバックグラウンドで定量的な測定が可能なホタル・ルシフェラーゼを用いた。まず、GFPやルシフェラーゼのcDNAを強力なCMV初期プロモーターの下流に接続して発現ユニットを作り、これをファージゲノムDNAに挿入した後、大腸菌のゲノムに溶原化した。このファージゲノムのD遺伝子にはアンバー変異があり、suppressor tRNAを持たない大腸菌ではDタンパク質を作ることができないが、NLS-Dタンパク質を同時に大腸菌で発現させることにより機能を相補してNLSファージを作ることができる。次に、精製したGFP遺伝子組み込みファージとそこから抽出したDNAをそれぞれ3,000コピーずつマイクロインジェクターを使ってHEL(Human embryonic lung fibroblast)細胞の細胞質に導入し、経時的に蛍光顕微鏡下でGFPの発現を測定した。その結果、NLSファージを導入した細胞では時間と共にGFPを発現している細胞の数が上昇し、48時間後では80%近い細胞がGFPを発しているのに対し、DNAを導入した細胞では48時間後でもGFPを発現している細胞は見いだせなかった(Fig.17)。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子組み込みファージを陽荷電リポソーム(Lipofectin)を使って細胞に導入し、同コピーのDNAを導入した細胞と発現の強さを比較した。その結果、NLSを持つファージと持たないファージでは約30倍の遺伝子発現の差が見られ、NLSファージとDNAでは約4倍の遺伝子発現の増強が見られた(Fig.17)。マイクロインジェクションによる結果と比べるとNLSファージとDNAの間の遺伝子発現の差は少ないが、これは陽荷電リポソームがDNAとの間では至適条件で複合体を作っているの

に対しファージ粒子との間では必ずしも至適な複合体を作っていないことに起因すると思われる。従ってよりマイクロインジェクションに近いデリバリーシステムである膜融合リボソームと組み合わせることが重要と考え、現在、ファージ粒子を膜融合リボソームに封入して細胞に導入する条件を検討している。

以上の研究から、核移行シグナルを使って DNA の細胞内デリバリーシステムの構築を目指す NLS ファージの開発に目途をつけることができた。このシステムは大腸菌で生産するため大量調製が可能であり、各種のデリバリーシステムと組み合わせ、新規ベクターを開発するための素材としての有用性が高い。しかし、NLS ファージは suppresser tRNA を持つ大腸菌に感染して殺すという生物活性を持っている。大腸菌は人体にも存在する常在菌であり安全性の点からはこのような性質は好ましくない。そのため、このシステムをより安全性に優れた効率の高いベクターとするために、ファージ粒子の持つ大腸菌への感染性を欠失させると共に、ファージ粒子の中からファージゲノム DNA を除去し、かわりに任意のプラスミドを封入することができるパッケージング大腸菌を作製して、二重に安全性確保することを検討した。

ファージ粒子にファージゲノムが封入されないようにするためには、頭部のサイズが小さくなるような E タンパク質の変異をゲノム DNA に挿入することが有効である。この場合、全長の長さを持つファージゲノムは大きすぎて頭部に入らないので、大きさが 20 kbp 程度で cos 配列を持つプラスミドが選択的にファージ粒子内部に封入される。また感染性を失わせるためには尾部の遺伝子に変異を入れることが有効である。ただし尾部をまったく作ることができない変異を入れると頭部の底に小さな穴が残り、内部の DNA がヌクレアーゼ感受性になるので、尾部は残るが感染性が欠如した変異が望ましい。そこで、小さな頭部を作るために、頭部の主要抗原を作る E 遺伝子に EdefK 562 変異を、感染性を持たない尾部を作るために、尾部の長さを決める H 遺伝子に Hdel112 変異を導入し、さらに野生型 D タンパク質ができないように D 遺伝子を NLS-D 遺伝子と置き換えることにした。これらの変異を持つ DNA を *in vitro* mutagenesis によって作成し、それらを互いに結合したあと大腸菌ゲノムに導入して溶原菌を作製した。できた溶原菌に期待したファージゲノムが存在することは、PCR 法による導入断片の検出によって最終確認した。この大腸菌に、サ

イズが 13 kbp から 18 kbp で、ファージ粒子へのパッケージングに必要な cos 配列を 1 コピー持ったプラスミドを導入し、温度による誘導をかけてファージ粒子を調製した。できたファージは D タンパク質のかわりに NLS-D タンパク質を持ち、電子顕微鏡で観察すると予想どおり小さい頭部と短い尾部を持っていた (Fig. 18)。最終精製標本 (NLS ミニファージ) を大腸菌と混合して検定したところ、内部のプラスミド DNA の性質 (アンピシリン耐性) を大腸菌に導入できる粒子も、感染性のあるファージ粒子も検出できなかったことから、生体内の常在菌への安全性が確保されたことが確認できた。ファージの頭部を小さくすると共に尾部を短くしたことで、NLS ミニファージはその原型となった NLS ファージよりも核への通過効率が向上している可能性があり、現在、精製したファージを使って遺伝子発現活性の検定を行っている。

C. 4 細胞質内での遺伝子発現系に関する研究

従来の遺伝子治療に用いられている遺伝子の多くは、哺乳類のプロモーターを有しているため遺伝子発現の第一段階である転写は、その遺伝子が核内に到達してはじめて行われる。ウイルスベクターによる細胞内への遺伝子導入では、ウイルスの感染経路を利用できるため遺伝子を効率よく核内にまで送達することができるが、非ウイルスベクターの場合、細胞質内に遺伝子を導入できたとしても、その遺伝子を核内に効率よく移行させる機能は有していないため、これまでの核内遺伝子発現系では十分な遺伝子発現が望めない。この問題を解決する一つの方法として、T7 ファージのプロモーターと RNA polymerase を利用し、細胞質中で遺伝子発現を行うというアプローチが考えられる。T7 RNA polymerase は、T7 ファージの DNA にコードされる分子量 98,000 の蛋白質で、T7 プロモーター配列を含む DNA を鋳型にプロモーター下流の一本鎖 DNA に相捕的な RNA を合成する酵素である。最近、この酵素と T7 プロモーター配列を含む DNA を細胞内に導入したとき、哺乳類細胞の細胞質内でも遺伝子発現し得ることが報告された。また、本系は遺伝子発現に核移行を必要としないため、非増殖細胞においても効率よく遺伝子発現可能な系として期待される。

まず昨年度作製した pT7-IRES-L (T7 プロモーター制御下でのルシフェラーゼ発現プラスミド, Fig. 19) および pT7AUTO-2 (T7 プロモーター制御下での T7RNA ポリメラーゼ発現プラスミド, Fig.

20) を用い、T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系の確立を行った。T7 RNA polymerase 産生細胞として作製した LLCMK2 T7(+) 細胞及び T7 RNA polymerase 非産生細胞である LLCMK2 T7(-)細胞に pT7-IRES-L のみを Lipofectin により細胞内に導入し、経日的にその遺伝子発現を検討した (Fig. 21)。その結果、pT7-IRES-L を遺伝子導入した LLCMK2 T7(-)細胞では全く遺伝子発現が認められず、LLCMK2 T7(+)細胞においてのみ高い遺伝子発現が認められた。T7 RNA polymerase は核移行シグナルを有さず細胞質にしか存在しないため、pT7-IRES-L の遺伝子発現は細胞質内で行われてたものと考えられた。また、遺伝子発現に核移行を必要とする pRSVL では遺伝子導入後 24 時間以降にようやく遺伝子発現が観察されたが、pT7-IRES-L では導入後わずか 6 時間で遺伝子発現が認められた。この結果は、T7 プロモーターを有する pT7-IRES-L が細胞質内に導入後すぐに細胞質中に存在する T7 RNA polymerase により転写されたことを示唆しており、核移行後にはじめて遺伝子発現が可能となる pRSVL よりも、迅速性の点で T7 発現系が優れていることを示している。さらに、pRSVL と pT7-IRES-L を細胞に導入した際の最大遺伝子発現量を比較したところ、pT7-IRES-L は pRSVL に比べ高い遺伝子発現が認められた。pRSVL の場合、核内に到達するまでに多くが細胞質内に存在するヌクレアーゼにより分解されてしまい、最終的にはごく微量の pRSVL しか核内に移行できなかったためと考えられる。以上の結果は、T7 細胞質遺伝子発現系が効率のよい遺伝子発現系であることを示すものである。

通常の動物細胞は細胞内で T7 RNA polymerase を発現していないため、T7 発現系のヒトへの臨床応用を想定すると T7 プロモーターを有する遺伝子とともに T7 RNA polymerase を同時に導入することが必要となる。そこで、pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase を Lipofectin により LLCMK2 T7(-)細胞に同時に導入し、経時的な遺伝子発現を検討した (Fig. 22)。その結果、T7 発現細胞の場合 (Fig. 21) と同様に遺伝子導入後 6 時間で遺伝子発現が認められたが、遺伝子発現は非常に低く、ごく短期間で発現が消失した。一般に細胞質内にはプロテアーゼが大量に存在することから、細胞質内導入した T7 RNA polymerase が速やかに分解されてしまったためと考えられる。T7 RNA polymerase の遺伝子発現への影響を検討するため、pT7-IRES-L (1 μ g/ml) と種々の濃度の T7 RNA polymerase 複合体を細胞に導入した

(Fig. 23)。その結果、T7 RNA polymerase の濃度に依存して遺伝子発現増強が観察され、T7 RNA polymerase を導入しないと全く遺伝子発現が認められなかった。したがって、T7 発現系による遺伝子発現を増強するためには、細胞質内のアクティブな T7 RNA polymerase 量を高く維持することが不可欠であると考えられる。そこで次に、細胞質内におけるアクティブな T7 RNA polymerase を高濃度で維持するため、T7 RNA polymerase 存在下で T7 RNA polymerase を産生するプラスミド pT7 AUTO-2 を pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase とともに細胞内に導入した (Fig. 24)。その結果、pT7 AUTO-2 を共導入することにより顕著な遺伝子発現増強が認められたうえ、さらに遺伝子発現期間が長期化できることが判明した。この遺伝子発現の増強および長期化が細胞内の T7 RNA polymerase の持続的供給によるものであることを確認するため RT-PCR を行った。その結果、T7 RNA polymerase の mRNA に対応する PCR 産物のバンドが経日的に薄くなり、T7 RNA polymerase の発現が経日的に低下していくことが明らかとなった。なお、逆転写反応を行っていない群においては全くバンドが認められなかったことより、RT-PCR 産物がプラスミドのコンタミによるバンドではないことを確認している。また、今回の PCR のサイクル数では定量性に支障を生じないことも確認済みである。この結果より、遺伝子発現の増強や長期化には、細胞内に導入された pT7 AUTO-2 から産生された T7 RNA polymerase が関与していることが示唆された。しかし、細胞内における T7 RNA polymerase と Fig. 23 のルシフェラーゼ発現パターンを比較すると、T7 RNA polymerase は遺伝子導入後 1 日目がピークであるのに対し、ルシフェラーゼ発現ピークは遺伝子導入後 3 日目で、発現パターンが異なることが明らかとなった。通常、哺乳類細胞質内での T7 RNA polymerase の turnover は約 30 時間と言われている。したがって、pT7 AUTO-2 から供給された T7 RNA polymerase がアクティブなまま細胞内に蓄積した結果、ルシフェラーゼ遺伝子発現のピークが 3 日目になったものと考えられる。さらに、pT7 AUTO-2 の遺伝子発現への影響について検討するため、細胞に作用させる pT7-IRES-L 濃度を一定にし、pT7 AUTO-2 の濃度を変化させたときの遺伝子発現について検討した (Fig. 25)。なお、細胞に作用させる遺伝子量を統一するため、ルシフェラーゼ発現に影響しない *B*-actin プロモーターを有するプラスミド pActLacZ を加えて遺伝子濃度の補正を行った。その結果、pT7

AUTO-2 の濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の時には非常に弱い遺伝子発現しか認められなかったのに対し、pT7 AUTO-2 の濃度上昇に伴い遺伝子発現の増強が認められた。したがって、T7 発現系による遺伝子発現を最適化していくためには細胞内におけるアクティブな T7 RNA polymerase の産生量を高く維持することが必要であることが明らかとなった。以上の結果より、Fig. 26 に示したような細胞質内 T7 発現系が確立された。すなわち、pT7-IRES-L、pT7 AUTO-2 と T7 RNA polymerase を細胞内に共導入すると、はじめに導入された T7 RNA polymerase によりルシフェラーゼと T7 RNA polymerase が産生され、新たに細胞内で産生されたアクティブな T7 RNA polymerase がさらにルシフェラーゼと T7 RNA polymerase を産生するという持続的な発現が起こることが示された。したがって、この T7 発現系を利用することにより非ウイルスベクターにおける最大の欠点であった遺伝子発現効率を改善することが可能になるものと期待される。

T7 発現系では遺伝子発現が細胞質内で行われるため、核膜の消失が認められない非増殖性細胞においても効率よく遺伝子発現させ得るものと考えられる。そこで次に、非分裂細胞における T7 発現系の有用性について検討することにした。まずマイトマイシンC処理による細胞の増殖阻害を検討するため、BAEC に種々の濃度のマイトマイシンCを作用させ、2日後の遺伝子量を指標に細胞増殖阻害濃度を検討した (Fig. 27)。マイトマイシンC無処理群では、2日後のBAECの遺伝子量が約2倍に増加したが、マイトマイシンCで処理すると濃度依存的に細胞増殖が抑制されており、24 $\mu\text{g/ml}$ でマイトマイシンC処理前と同量の遺伝子量であった。そこでマイトマイシンC 24 $\mu\text{g/ml}$ 処理による細胞増殖阻害時の遺伝子発現効率を細胞増殖時と比較した (Fig. 28)。対照としてpRSVLを遺伝子導入した場合は、マイトマイシンC処理によって遺伝子発現効率が著明に低下した。一方、T7 発現系を導入した場合、遺伝子発現はマイトマイシンC処理の影響をほとんど受けず、増殖時、非増殖時の細胞ともほぼ同等の遺伝子発現が認められた。このことより、細胞質内で遺伝子発現を行う T7 発現系は、非増殖性の細胞であっても効率よく遺伝子発現が可能となり得ることが明らかとなった。したがって、T7 発現系は非増殖性細胞が大多数を占める *in vivo* における組織や細胞での遺伝子発現に適した系になり得ることが示唆された。

C. 5 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

肝臓、肝炎、肝硬変等では異常患部の切除が不可欠であるが、術後の肝再生や生体機能全般の回復、生存性など予後の善し悪しは肝障害の発生の有無に関わっている。術後肝障害の発生は肝類洞内皮の障害、特に類洞内皮の抗血栓性機能や抗炎症性機能の低下に基づく血液凝固の亢進による微小血栓の形成が、残肝組織の壊死やアポトーシスを誘導する最大の原因になることが示唆されており、類洞内皮の機能保全、特に抗血栓性機能の維持補填が遺伝子治療によって可能になれば、術後肝障害の発生は大きい軽減できるものと期待される。

血管内皮細胞膜にはトロンボモジュリン (TM) やヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの抗血栓性因子が存在し、また、内皮細胞は組織因子系凝固阻害因子 (TFPI) などを産生し、内皮細胞上の抗血栓性機能を維持している。しかし、感染等によるリポポリサッカライド (LPS) の侵入は単球や内皮細胞を刺激し、炎症性サイトカインの産生、凝固開始因子である組織因子の産生、細胞接着因子である VCAM-1 や ICAM-1 の産生を促すとともに、内皮細胞での抗血栓性因子の TM や TFPI などの産生低下を来し、血管内皮上は炎症と血液凝固亢進の場へと変化する。LPS 刺激による血管内皮細胞の障害は、肝類洞内皮細胞においてもほぼ同様に生じると考えられ、我々はこれまでに、肝切除イヌモデルならびにラットモデルを用いた研究において、術後の肝機能障害は類洞内皮細胞の TM の発現低下が一因になること、また、術後の肝障害がプロスタサイクリン (PGI₂) の前投与で軽減されることを示してきた。

本研究では、こうした実績に基づき、術後肝障害の発生の阻止を目指して、抗血栓性因子や抗炎症性因子の遺伝子を肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価検討することを目的とする。具体的にはラットを用いて肝切除、肝硬変および敗血症モデルを作製し、それらの病態における肝類洞内皮細胞の抗血栓性の低下を改善する目的で、ヒトやラットの TM、TFPI などの cDNA を組み込んだ発現ベクターを膜融合リポソームを用いて *in vitro* ならびに *in vivo* で導入し、類洞内皮細胞内への遺伝子導入効率、遺伝子発現量、遺伝子由来蛋白質の生物活性、抗原量および mRNA の発現量を指標として、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価しようとするものである。今年度はヒト TM 遺伝子導入の基礎的検討を行った。