

Fig. 35 Summary of toxicity and transfection efficiency of various transfection reagents on human cell panel

Vector conc=5 μ g/ml

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

分担研究者 真弓 忠範 大阪大学薬学研究科 教授

研究要旨

次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究として、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膜融合リポソームを粒子設計していくため、平成10年度は膜融合リポソーム内への遺伝子封入効率の向上や細胞内遺伝子導入効率の増強、封入遺伝子の安定化等を目指した。その結果、膜融合リポソームの粒子径を増大させること、さらには遺伝子をスペルミジンと共に膜融合リポソーム内に封入することにより、遺伝子封入効率の向上や細胞内遺伝子導入効率の増強、封入遺伝子の安定化が可能となり、その遺伝子発現効率を著しく改善し得ることが判明した。また平成9年度に構築した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) 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) を用い、T7発現系の有用性を *in vitro* 評価したところ、リポフェクチンを遺伝子導入ベクターとして適用し、pT7-IRES-LとT7RNAポリメラーゼを細胞質内に導入することで、遺伝子導入後僅か6時間で高い遺伝子発現が認められた。この遺伝子発現は、pT7AUTO-2を加えることによりさらに増強・延長されており、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。平成10年度は新たに、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-リポソームが作製でき、その有用性が示唆された。

A. 研究目的

疾病の複合化や新たな難病の出現に伴い、遺伝子そのものを薬物として捉える遺伝子治療が次世代治療法として考案され、薬物の概念が急速に変化してきている現在、遺伝子をも含めた創薬研究は全く新たな視点が要求されるようになってきた。これまでの薬物送達システム (DDS) 研究に観られる薬物の生体内挙動を厳密に制御する手法の開発はもちろんのこと、今後は組織レベルから細胞レベル、さらにはオルガネラレベルでの薬物送達を可能にし、よりミクロな視点での動態制御に関する研究を推進してゆく必要がある。少なくともこれまでとは違い、遺伝子という「薬物」は吸収されないばかりか、血中で速やかに分解されてしまううえ、細胞内に導入されない限り作用の発現は皆無である。薬学的観点に立てば、遺伝子だけでなく蛋白質、糖、脂質等、どの様な生理活性物質であっても、体内の如何なる細胞内にも送達でき得るという手段は最も重要なテクノロジーであり、この様な物質導入技術の開発は、DDSのみならず生命科学の基礎的研究にとっても必要不可欠となってくる。しかし、細胞は自身の恒常性を維持するために細胞膜というバリアーを有し

ており、細胞内への遺伝子などの高分子物質の移行は厳密に制御されている。そのため、いかにして細胞膜を透過させるかが問題となる。これまでは物理化学的方法により、このバリアーを一時的に破壊して細胞内への物質導入が試みられてきたが、細胞膜の本来の機能に傷害を与えることは、この分野、特に遺伝子治療領域においては致命的であり、この点に充分配慮したDDSを考えなければならない。

遺伝子治療を成功させるための一番の鍵は、遺伝子導入効率が高く、安全性の高いベクターの作製にかかっており、学際的に重要かつ緊急課題として認識されている。現在までに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、ウイルスの感染能力を利用するため、遺伝子導入効率が高い利点を有する反面、サイズの大きいDNAに適應出来ない事、発癌性や細胞毒性に関する懸念が拭いきれない事などの欠点を有し、解決すべき問題点が未だ多く存在する。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。以上の観点から我々は、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ハイブリッド・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、本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無い。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、多くの好都合な特徴を有している。また本リポソームは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、限りなく適用範囲が広い方法である。すなわち膜融合リポソームは、現在、遺伝子導入ベクターとして具備すべき条件として考えられている、1) ヒトに対して非病原性、2) 無細胞毒性、3) 導入遺伝子の形状に関する許容性、4) 高い遺伝子導入効率などの課題を克服している唯一のベクターと考えられる。以上の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、平成9年度はセンダイウイルスの融合機構解明、膜融合リポソームの最適粒子設計法確立、細胞質内直接遺伝子発現システムの開発などを試みた。その結果、リポソーム表面電荷と物質導入効率、安全性、生体内安定性などの相関を追求したところ、*in vivo* 直接遺伝子導入を想定した場合、現状ではアニオン膜融合リポソームが最もこれらバランスに優れていること、カチオン膜融合リポソームに関してはさらに詳細な検討が必要となることなどが判明した。またセンダイウイルスの被膜上に存在する二種のエンベロープ蛋白質のうち、HN蛋白質はリポソームとの融合には関与しておらず、F蛋白質を介

して融合していることが示唆された。一方、細胞質内での遺伝子発現系に関する研究として、T7 promoter 制御 T7 RNA ポリメラーゼ発現 プラスミド (pT7AUTO2)、および reporter gene として T7 promoter 制御 luciferase 発現プラスミド (pT7-IRES-L) の構築に成功した。平成10年度は、膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有用性をより確保していく目的で、昨年度に得られた成果をもとに膜融合リポソームへの遺伝子封入量やその細胞質内遺伝子導入効率の向上、導入遺伝子の安定化方法を確立しようとするものである。さらに昨年度構築に成功した pT7AUTO2、pT7-IRES-L を用い、遺伝子発現に核移行を要しない、細胞質内遺伝子発現システムの開発に試み、従来までの非ウイルスベクター共通の問題であった、導入遺伝子の核移行性の乏しさを回避し得るシステムの開拓を図った。また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) -リポソームを粒子設計した。

B. 研究方法

(1) 培養細胞

T7 RNA polymerase 非産生 サル腎上皮細胞 (LLCMK2 T7 (-)) は 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum ; FCS) を含むイーグル MEM 培地 (ニッスイ) で培養した。T7 RNA polymerase 産生 LLCMK2 細胞 (LLCMK2 T7 (+)) の作製は、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 をリポフェクチンで導入し、G418 耐性で選択した。その後、*in vitro* transcription 法により T7 RNA polymerase 活性を調べ、活性の高い細胞を選択した。なお、この LLCMK2 T7 (+) 細胞は 10% FCS を含むイーグル 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 を含むダルベッコ変法 MEM 培地 (ニッスイ) で培養した。

(2) プラスミド DNA

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

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.2)

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。また、この T7 RNA polymerase は強力な転写活性を有するため、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てしまい毒性を示す。したがって、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。pRSVL は、ラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus; RSV) long terminal repeat の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。

(3) T7 RNA polymerase

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

(4) 遺伝子・リポフェクチン複合体の調製

遺伝子 (最終濃度 1 μ g/ml) とリポフェクチン (最終濃度 5 μ g/ml, LipofectinTM; GIBCO BRL 社) を最終液量の 30 分の 1 になるように混合し、遺伝子・リポフェクチン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イーグル MEM 培地で希釈した。

(5) 遺伝子・酵素・リポフェクチン複合体の調製

遺伝子と T7 RNA polymerase (最終濃度 125U/ml, 宝酒造) 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、この複合体にリポフェクチン (最終濃度 5 μ g/ml) を最終液量の 30 分の 1 になるように加え、遺伝子・酵素・リポフェクチン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イーグル MEM 培地で希釈した。

(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 (+)

(10mM Tris (pH7.6), 150mM NaCl, 2mM CaCl₂) で洗浄し、上述の遺伝子・リポフェクチ

ン複合体または遺伝子・酵素・リポフェクチン複合体を 37°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・リポフェクチン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) を用い経日的にトータル RNA を抽出した。このトータル RNA 2.1 μ g を Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase (TOYOBO) 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プ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 luciferase assay system (ピッカジーン) およびルミノメーター (Lumat LB 9507, Berthold) を用いて測定した。活性は Relative Light Units (RLU) / μ g protein または RLU / well として表した。

(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 時間後細胞を PBS (-) (137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 2.68mM KCl, KH₂PO₄) で洗浄した後、各濃度のマイトマイシン C (和光純薬) を 400 μ l 添加し、37°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 PBS (-) 溶液処理により回収した細胞を SDS により細胞溶解した。そして、その溶解液中の遺伝子量を測定し、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

細胞溶解液をフェノール、クロロホルム処理し、蛋白および脂質を完全に除去した。その後、エタノール沈殿を行うことで細胞溶解液中の遺伝子を回収した。回収した遺伝子量の測定は 3,5-Diaminobenzoic Acid Dihydrochloride (DABA) (ナカライテスク) 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、細胞を 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°C で 30 分間作用させた。作用後、細胞を PBS (-) で洗

浄し、第一節に準じた方法での遺伝子・酵素・リポフェクチン複合体を形成し、細胞に3時間作用させた。3時間作用後、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。

(12) センダイウイルスの調整法>

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°Cで3日間培養後、一晚4°C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。この沈澱物をBSS(-) (5mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.6) に懸濁し、50%-30%のステップシヨ糖密度勾配遠心によりセンダイウイルス層を回収し大量のBSS(-)を用いて再度遠心することによりシヨ糖を完全に除去した。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(-80°C)中に保存した。

(13) プラスミド DNA

pCAL2 (6.4Kb) (Fig.3) は、ニワトリ β -アクチンプロモーターとサイトメガロウイルス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である。BMGCAL2 (Fig.4) は、BMGNeo の Not、Hind site に、pCAL2 のニワトリ β -アクチンプロモーターとサイトメガロウイルス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である。

(14) 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(和光純薬)・ジクロロメタン(和光純薬)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、残った水相にリポフェクチン(最終濃度 5 μ g/ml)を添加した。遺伝子・酵素・リポフェクチン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、第一章第一節に基づき 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。

(15) 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°Cで行った。凍結融解後、リポフェクチン(最終濃度 5 μ g/ml)を添加し、遺伝子・酵素・リポフェクチン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、第一章第一節に基づき 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。

(16) 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。

[1] 逆相蒸発法の変法

卵黄ホスファチジルコリン(PC)(日本油脂)、L- α -ジミリスチルホスファチジン酸(PA)(日本油脂)、およびコレステロール(Chol)(和光純薬)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(46 μ mol/ml)1ml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(和光純薬)に溶解した。この溶液を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。これに上述のプラスミドDNA溶液を添加し、ボルテックスを行い multilamellar vesicle (MLV)を調製した。この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。

[3] 上述の2種類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(25,000rpm, 40分(SW55, Beckman))により未封入のプラスミドDNAを除いた後、リポソームを紫外線照射(8,000J/m²)によりウイルスRNAをあらかじめ断片化しておいたセンダイウイルスと37°C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除去するため、50%(2.5ml)、30%(6ml)、6%(6ml)蔗糖/BSS(-)の上層に載せ24,000rpm、4°Cで2時間(SW28.1, Beckman)遠心した。遠心後、30%と6%蔗糖の界面にある膜融合リポソーム層を回収し、蔗糖を除くため20,000rpm 4°Cで40分間(SW28.1, Beckman)遠心し、沈殿物として膜融合リポソームを得た。この膜融合リポソームをバッファーで懸濁し実験に用いた。

(17) 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 LLCMK2 T7 (-) 細胞を 1×10^5 個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、BSS (+) で懸濁した pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=0.1) を 37°C で 30 分間作用させた。BSS (+) で細胞を 2 度洗浄した後、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。

(18) 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 $350 \mu\text{l}$ 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を行い蛋白および脂質を完全に除去した。その後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。

(19) スペルミジン添加時の遺伝子の分解性
pRSVL $5 \mu\text{g}$ を種々の濃度のスペルミジン (0, 0.67, 2, 6, 18mM) 添加緩衝液 (100mM Tris, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2) $500 \mu\text{l}$ に溶解後、0.15M NaCl で 1 万倍希釈した DNase ($1 \mu\text{l}$) 添加し、 37°C で 3 分間の DNase 処理を行った。処理後、フェノール・クロロホルム処理により DNase を除去し、遺伝子をエタノール沈殿法により沈殿させた。遺伝子の分解性は、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る DNA ラダーの検出により検討した。

(20) 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、第一節の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。

(21) スペルミジン封入膜融合リポソームを用いた細胞への遺伝子導入

12 穴プレートに LLCMK2 細胞を 1×10^5 個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、BSS (+) で懸濁した スペルミジン封入膜融合リポソーム (OD540 = 0.1) を 37°C で 30 分間作用させた。BSS (+) で細胞を 2 度洗浄した後、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。

(22) VSV-リポソームおよび膜融合リポソームの調整

リポソームは egg phosphatidylcholine, L- α -phosphatidyl-serine, cholesterol (モル比 4:1:5) の組成で、凍結融解法により調整した。得られたリポソームをサイジング処理 ($0.2 \mu\text{m}$ ポリカーボネートフィルター) し、最大粒子径を制御した。以上のリポソームを VSV-リポソーム、膜融合リポ

ソームの作製に用いた。VSV は Ingiot らの方法に準じて調整した。VSV とリポソームをクエン酸緩衝液 (140mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 80mM citrate, pH5.5) 下で混合し、水中 30 分間、 37°C 15 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。

(23) VSV-リポソームの細胞内物質導入効率の評価

0.67mg/ml ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) 封入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。 2.5×10^4 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、 $[^{35}\text{S}]$ -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。

C. 研究結果

1) T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系の確立

1970 年代の遺伝子組換え技術の発達に伴い、ヒトの正常遺伝子を取り出し増幅させることが可能となり、これまで現実の治療法として受け入れられていなかった遺伝子治療が、わずかに現実味を帯びてきた。この遺伝子治療を画期的根治療法として確立していくためには、効率よく細胞内に遺伝子を導入できるツールの開発が必須であり、この点に関する研究開発が精力的に行われた。この問題に対して、1980 年初期に Temin, Weinberg, Scolnick の 3 グループによりレトロウイルスベクターが開発されたことにより、その後のアデノウイルスベクターなどが次々と遺伝子導入ベクターの候補として提示された。しかしながら、これらウイルスベクターは、確かに遺伝子導入効率・発現効率に優れていたものの、著論で言及したように安全面での危惧が指摘され続けている。そのため現在ではウイルスベクターの安全性確保に関する研究とともに、非ウイルスベクターの開発も盛んに行われるようになってきた。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。しかしながら、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ためには、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おうとするアプローチが考えられ。この系は、大腸菌で組み換え蛋白質を大量産生させる方法として最も汎用されているものである。また、最近では HIV (Human immunodeficiency virus) が細胞に感染する際のセカンドレセプター発現に関する研究において、本系が HIV の細胞への融合を評価するツールとして用いられているなど、本系はすでに種々の方面で利用されてきている。さて、上述の系で重要な役割を果たしている 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 に相補的な RNA を合成する酵素である。この酵素は従来までノーザンやサザンハイブリダイゼーションのための RNA プロブの作製など *in vitro* での RNA 作製に用いられていた。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。そこで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) 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) 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い、非ウイルスベクターを用いた遺伝子発現効率の増強技術の開発を試みた。

まずはじめに、T7 RNA polymerase 産生細胞として作製された LLCMK2 T7 (+) 細胞に、pT7-IRES-L のみをリポフェクチンにより細胞内に導入し、経時的にその遺伝子発現を検討した (Fig.5)。また、遺伝子発現に核移行を必要とする pRSVL をコントロール遺伝子として用い同様の検討を加えた。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していないため、細胞質にしか存在しないことが知られている。したがって、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 においては、その細胞内導入後、24 時間目以降にようやく遺伝子発現が観察された。一方、pT7-IRES-L を導入した場合、導入後わずか 6 時間目で遺伝子発現が認められた。この事実は、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、時間を費やして核移行した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。これは、pRSVL の場合、核内に到達するまでに時間を要したため、その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、非ウイルスベクターによる遺伝子導入において、効率のよい遺伝子発現系であることを示すものである。さて、通常の動物細胞は当然のことながら細胞内で T7 RNA polymerase を発現していない。したがって、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。そこで次に、LLCMK2 T7 (-) 細胞に pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase をリポフェクチンにより同時に細胞内導入し、経時的な遺伝子発現について検討した (Fig.6)。その結果、Fig.5 と同様に遺伝子導入後 6 時間目において遺伝子発現が認められた。しかしながら、この時の遺伝子発現は非常に低く、ごく短時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であると考えられる。そこで T7 RNA polymerase の遺伝子発現への影響について検討するため、pT7-IRES-L (1 μ g/ml) と種々の濃度の T7 RNA polymerase (0, 30, 60, 125, 500, 1,000 U/ml) 複合体を、リポフェクチンを用い細胞に導入した際の遺伝子発現について検討した (Fig.7)。その結果、T7 RNA polymerase 濃度依存的な遺伝子発現増強が観察された。また当然のことながら、T7 RNA polymerase を導入しなかった細胞においては全く遺伝子発現が認められなかったことより、この遺伝子発現は細胞質内での T7 RNA polymerase に依存したものであることが判明した。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 pT7 AUTO-2 を pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase とともに細胞内に導入し経時的な遺伝子発現について検討した (Fig.8)。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。これは細胞質内に導入した pT7 AUTO-2 から T7 RNA polymerase が持続的に供給されたためであると考えられる。そこで、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、T7 RNA polymerase に対する RT-PCR を行うことで細胞内での T7 RNA polymerase 産生パターンを評価した。その結果、T7 RNA polymerase の mRNA に対する 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（データ示さず）。この結果より、ルシフェラーゼ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.7 のルシフェラーゼの発現パターンを比較すると、T7 RNA polymerase の発現では遺伝子導入後 1 日目ピークであるのに対し、ルシフェラーゼの発現ピークは遺伝子導入後 3 日目であり T7 RNA polymerase とルシフェラーゼの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 0.14 $\mu\text{g/ml}$ と一定にし、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.9)。なお、細胞に作用させる遺伝子量を 1 $\mu\text{g/ml}$ に統一するため、ルシフェラーゼ発現に全く影響しない β -actin プロモーターを有するプラスミド pActLacZ を加えることにより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.10 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。さらに、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、*in vivo* の細胞、特に体細胞に対する遺伝子治療に対し威力を発揮する系であると期待できる。T7 発現系は非ウイルスベクターによる細胞内遺伝子導入における、最大の課題であった遺伝子の核内移行の問題を、全く異なった観点から回避することが可能であるため、効率のよい遺伝子発現が得られるという決定的な利点を有している。遺伝子発現に核内移行が不要であることは、分裂細胞のみならず核膜の消失が起こらない非分裂細胞においても効率のよい遺伝子発現が期待できるということにほかならない。そこで次に、非増殖細胞における遺伝子発現について検討を行うため、マイトマイシン C 処理により細胞の増殖を阻害し、増殖時と非増殖時における T7 発現系の遺伝子発現効率について検討した。T7 発現系の非分裂細胞での有用性を評価するため、BAEC に種々の濃度のマイトマイシン C を細胞に作用させ、2 日後の遺伝子量を指標にマイトマイシン C の細胞増殖阻害濃度を検討した (Fig.11)。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 倍に増加していた。一方、マイトマイシン C 処理群では、濃度依存的に細胞増殖が抑制されており、マイトマイシン C 24 $\mu\text{g/ml}$ 処理においては、マイトマイシン C 処理前と同量の遺伝子量であった。以降の実験では、このマイトマイシン C 24 $\mu\text{g/ml}$ 処理を行うことにより細胞増殖を阻害した。T7 発現系は、導入遺伝子の核内への移行を必要とせず、細胞質内で遺伝子発現を行うため、増殖性、非増殖性細胞を問わず同じ効率で遺伝子発現可能であることが期待される。そこで、この T7 発現系の有用性をより一層評価するために、細胞増殖時と非増殖時における遺伝子発現効率について比較検討を行った (Fig.12)。なお、対照として pRSVL についても同様の検討を加えた。その結果、pRSVL を用いて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てしまった。これは、マイトマイシン C 処理により細胞増殖が阻害された細胞では、核分裂時に生じる核膜の消失が起こらないため、遺伝子発現に核移行を必要とする pRSVL を細胞内に

導入しても、遺伝子の核移行が著しく阻害されてしまったためと考えられた。一方、T7 発現系を導入した場合の遺伝子発現は、マイトマイシンC処理の影響をほとんど受けず、増殖中、非増殖期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。

2) 膜融合リポソームの最適粒子設計

従来まで膜融合リポソーム作製に用いてきたリポソームは、逆相蒸発法により調製していたため有機溶媒にさらしても変性しない物質しか内水相として封入することはできなかった。したがって、現在の調製法では酵素を利用する T7 発現系に膜融合リポソームを適用することは困難であると考えられる。したがって今後、膜融合リポソームの応用範囲を拡大していくためには、T7 RNA polymerase を含むいかなる生理活性物質をも失活させずに膜融合リポソームに封入できるリポソーム調製法を検索しなければならない。そこで次に、リポソーム調製法の異なるリポソームより作製した膜融合リポソームを用い遺伝子発現効率について検討した。まず確認の意味あい、蛋白質を膜融合リポソーム内に封入する際、逆相蒸発法で作製したリポソーム内の蛋白質の活性がどの程度失活するのかを検討するため、T7 RNA polymerase を有機溶媒処理した時の遺伝子発現効率について検討した (Fig.13)。その結果、有機溶媒無処理群では高い遺伝子発現が認められたのに対し、酵素を有機溶媒で処理することにより顕著な遺伝子発現の低下が認められた。このことより、蛋白質、特に不安定な酵素などを膜融合リポソーム内に封入する際のリポソーム調製法として逆相蒸発法は適した方法ではないことが明らかとなった。したがって、逆相蒸発法に代わるリポソームの調製法を検討する必要がある。1965年に英国の Bangham によって報告されたリポソームは、試験管表面にリン脂質の薄膜を作りそこに内水相を加え機械的な力を与えるだけで調製可能であった。このリポソームの調製法は一般的には Bangham 法と呼ばれている。この方法は逆相蒸発法とは異なり有機溶媒を使用しないため蛋白質の失活の心配はほとんどない。しかしながら、Bangham 法で調製したリポソームは、リポソームが多重膜構造であ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、リポソーム内への物質の封入量を増大させるためには、封入容積の大きなリポソームである LUV (Large Unilamellar Vesicle) に変換する必要がある。そこで MLV を

LUV に変換する方法である凍結融解法を用い LUV のリポソームを調製した。なお、一般的に凍結融解の回数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の増大がほぼプラトーに達することが報告されている。そこで今回は、凍結融解を3回繰り返し調製したリポソームを用い種々の検討をした。さて、リポソーム調製の際 T7 RNA polymerase が有機溶媒による失活をまぬがれても、凍結融解により失活してしまっは意味がない。そこで、凍結融解処理における T7 RNA polymerase の酵素活性を、T7 遺伝子発現系を用い検討した (Fig.14)。その結果、T7 RNA polymerase を3回凍結融解しても遺伝子発現の低下は認められず、本酵素は凍結融解処理でも失活しないことが明らかとなった。以上の結果より、酵素などの活性を持つ蛋白質を失活させずに膜融合リポソーム内に効率よく封入するためには、Bangham 法と凍結融解法を組み合わせた方法によるリポソーム調製が有効であることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子導入ベクターとして用いるためには、この方法で作製したリポソームから調製した膜融合リポソームが、従来の逆相蒸発法で作製したリポソームから調製したものと比較して、同程度以上の遺伝子導入効率を有していなければならない。そこで、遺伝子導入ベクターとしての膜融合リポソームの最適化を目的に、調製法および粒子径の異なる膜融合リポソームの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、遺伝子の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。さらに、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 μm 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 法 - 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 法の順であった。また、0.4 μm 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 法 - 凍結融解法で調製した膜融合リポソームで遺伝子封入量がほぼ同等であり、Bangham 法で調製した膜融合リポソームの遺伝子封入量が最低であった。このように、Bangham 法が他の2種類の調製法の膜融合リポソームに比べ遺伝子封入量が低かったのは、膜融合リポソームの膜構造に関係があると考えられる。つまり、Bangham 法で調製した膜融合リポソームの膜構造は、多重膜構造をしており封入容積が小さいため、封入量が低くなったものと考えられる。また、0.8 μm 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 法 - 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全く不明であるが、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りポソームから作製した膜融合リポソームを用いているため、これらの膜融合リポソーム間の粒度分布の違いが、このような封入量の違いに現れているものと考えられた。

次に、これら調製法および粒子径の異なる膜融合リポソームを用い、細胞に遺伝子導入した際の遺伝子発現を比較した (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成る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。したがって、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させ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、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。さて、一般にアデノウイルスなどの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ことが知られている。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 100% の効率で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。そこで次に、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、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 封入膜融合リポソームでは pCAL2 よりも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。以上のことから、膜融合リポソームが遺伝子の大きさに関係なく、単に至適なりポソーム粒子径にするだけで、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するとともに、様々な大きさ

の遺伝子を封入可能であるため遺伝子導入ベクターとして幅広く使用可能であることが明らかとなった。さて、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り、蛋白質・核酸合成を促進することが知られている。さらに、このスベルミジンは遺伝子をコンデンスさせ、安定化させるという興味深い報告もある。したがって、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、遺伝子およびスベルミジン封入膜融合リポソームを調製し、遺伝子発現におよぼすスベルミジンの影響について検討した。まずはじめに、スベルミジンの遺伝子安定化作用を検討するため、遺伝子溶液にスベルミジンを添加した際の DNase 処理に対する遺伝子の安定性について、DNA ラダー法を用い検討した。その結果、スベルミジンの濃度依存的に遺伝子の分解が抑制されることが明らかとなった。これまでに 3 価のポリアミンであるスベルミジンは遺伝子と静電的に結合し、遺伝子のコンフォメーション変化を引き起こし、遺伝子をコンデンスさせることが報告されている。したがって、この遺伝子の DNase 処理に対する安定化は、スベルミジン濃度の上昇に伴う遺伝子のコンデンスによるものと考えられる。以上の結果より、スベルミジンが遺伝子の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。さて、細胞内への遺伝子導入にこの遺伝子-スベルミジン複合体を用いれば、細胞内での遺伝子の安定性が増強し、より高い遺伝子発現が可能になるものと考えられる。そこで、この遺伝子-スベルミジン複合体を膜融合リポソーム内に封入し、その遺伝子発現効率について検討した (Fig.15)。その結果、遺伝子：スベルミジンの混合比が 1:0.625 の複合体を細胞に導入したときに、最大の遺伝子発現を示した。また、さらにスベ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、遺伝子がスベ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。以上のことより、遺伝子-スベルミジンの混合による遺伝子発現には最適混合比が存在することが明らかとなった。また、スベルミジンは T7 RNA polymerase の酵素活性を増強させることが報告されている。現在このスベルミジンを T7 発現系に応用することを考えており、スベルミジンによる T7 発現系の遺伝子発現増強に関する結果が得られつつある (データ示さず)。このようなスベルミジンによる遺伝子発現増強は、遺伝子とスベルミジンを混合するだけでよいと、膜融合リポソーム以外の方法による細胞内

への遺伝子導入にも応用可能な技術であると考えられる。

3) VSV-リボソームの粒子設計

上記方法により作製した VSV-リボソームの細胞内物質導入活性は、DTA を用いて検討した。DTA は、単独では細胞膜を移行できず、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できる強力な毒素である。そこで、DTA 封入 VSV-リボソームの FL 細胞に対する蛋白合成阻害効果を指標に、本リボソームの細胞質内への物質導入活性を評価した。DTA 封入 VSV-リボソームは、リボソーム由来のリン脂質濃度 $0.65 \mu\text{g/ml}$ から濃度依存的に蛋白合成を阻害し、 $6.5 \mu\text{g/ml}$ において約 90% の細胞で蛋白合成を阻害した。本濃度における DTA 封入リボソーム、BSS(-)封入 VSV-リボソームは、全く蛋白合成を阻害しなかった。以上の結果は、VSV-リボソームが、自身の細胞障害性を伴わずにリボソーム内に封入した DTA を intact な状態で細胞質内に導入可能であり、かつその導入効率が、リボソームの 100 倍以上であることを示している。さらに VSV-リボソームは、高濃度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。次年度以降、さらに詳細に検討していく予定である。

D. 考察

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、癌や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。しかしながら近年目覚まし勢いで遺伝子組み換え技術が容易に行えるようになってきたものの、遺伝子治療の技術的基盤となる細胞内への遺伝子導入法・ベクターの開発はまだ不十分であり、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重要・緊急課題となっている。すなわち、遺伝子治療がその本質的価値を十分に発揮し、優れた医療としての地位を確立するためには、倫理面での問題もさることながら多くの課題が山積みの状態である。遺伝子治療用ベクターが具備すべき条件は、導入遺伝子が安定にかつ効率よく発現できること、細胞や宿主ホメオスタシスを傷つけることなく高い遺伝子導入効率を得られること、染色体 DNA に影響を与えないこと、細胞を癌化させないこと、感染性ウイルス粒子を産生しないこと、in vivo 投与可能であることなどが考えられる。米国を中心とした遺伝子治療の臨床実験で、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターなどのウイルスベクター、および合成脂質を用いたカチオニックリボソームなどの非ウイルスベクターが実際に用いられてい

が、上述の条件をすべて備えた、安全性・有効性の確保されたベクターは現在のところ存在しない。

一方、我々が開発しようとしている膜融合リボソームは、もともとヒトへの病原性のないセンダイウイルスに対して、さらに紫外線によりウイルス自身の RNA 遺伝子を断片化することで安全性を確実なものにし、このセンダイウイルスの膜融合能を、すでに臨床での安全性が確認されているリボソームに付与したハイブリットベクターである。この膜融合リボソームは、いかなるリボソーム内封物をも膜融合により、細胞傷害性を示すことなく、直接細胞質中に効率よく導入可能であり、上述の問題を一度に解決している、我が国独自の優れたベクターとなり得る可能性を大いに秘めている。また、膜融合リボソームは遺伝子のみならず、リボソーム内に内封できるものであればタンパク質・核酸・脂質など、いかなる物質でも効率よく細胞質内に直接導入可能であることより、将来的にセンサー機能を有した細胞内シグナル関連蛋白質など、遺伝子治療の有用性・安全性をさらに向上し得る付加価値導入をも可能にする有利な能力を有している。また本研究で供する膜融合リボソームは、均一な高い品質保証を具備させるために、種々精製技術を駆使することでも、安全性・有用性を確保している。以上の背景のもと本研究は、遺伝子治療の実用化とより一層の進展に向け、我が国独自の遺伝子導入ベクターとしての膜融合リボソームの安全性・有用性確保を目的に、膜融合リボソームの最適粒子設計、細胞質内遺伝子発現システムの構築等を試みようとするものである。

T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系は、Moss らにより哺乳類における新しい遺伝子発現系として最近考案されてきた。この T7 発現系は、細胞質内での遺伝子発現を可能にするため、非ウイルスベクターによる遺伝子導入の際に問題となっている遺伝子核移行性の低さを克服する方法として注目された。しかしながら、本系を遺伝子治療に適用する試みはほとんどないのが現状である。そこで本研究では、本系を遺伝子治療に適用するため、本系の最適化を試みた。in vitro において、pT7-IRES-L と T7 RNA polymerase からなる T7 発現系による遺伝子発現を評価したところ、その遺伝子発現は、細胞内に導入されるアクティブな T7 RNA polymerase 量に依存していることが明らかとなった。しかしながら、この発現は短期間の一過性にすぎなかった。Gao らは哺乳類細胞内での T7 RNA polymerase の turnover が約 30 時間であることを報告しており、サル腎上皮細胞の LLCMK2 細胞内においても同程度の turnover であると予想される。したがって、遺伝子発現が上述のような短期間の一過性発現であったのは、最初に導入した T7 RNA polymerase が細胞内でプロテアーゼ等の

分解を受けてしまい、失活してしまったためであると推測される。そこで、T7 RNA polymerase の持続的供給を目的に、T7 RNA polymerase 発現プラスミドである pT7 AUTO-2 を pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase そのものを同時に細胞内に導入したところ T7 発現系の遺伝子発現増強や遺伝子発現期間延長が認められた。さらに、T7 AUTO-2 量を増加させることにより遺伝子発現の増強が認められた。これらの結果より、T7 発現系の遺伝子発現増強には細胞内のアクティブな T7 RNA polymerase の量を如何に高濃度に維持するかが非常に重要なファクターであることが示唆された。したがって、今後さらなる遺伝子発現増強を可能とするため、細胞内 T7 RNA polymerase の産生効率を改善すべく pT7 AUTO-2 に IRES 配列を組み込むことなどを検討している。さて本系を *in vivo* で最大限の効率で利用するためには、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の量的バランスを最適化する必要がある。そこで、遺伝子導入ベクターとしてリポフェクチンを用いた場合の、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の最適混合比に関する検討を行った。その結果、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 がモル比で 1:3 の混合遺伝子を細胞内に導入したとき遺伝子発現効率が最大となることが明らかとなった。したがって、*in vivo* に遺伝子導入を行うなどの投与可能な遺伝子量がおのずと制限される場合には、最適混合比の遺伝子を投与することで T7 発現系の遺伝子発現能力を最大限に発揮させ得ることが示唆された。本年度はリポフェクチンを遺伝子導入ベクターとして用い検討を行ってきたが、リポフェクチンをはじめとする陽電荷リポソームによる細胞内への遺伝子導入は、調製が簡単なためスクリーニング系としては最適であるものの、エンドサイトーシス経路を介して細胞内に遺伝子導入するため、リポソーム内での遺伝子や蛋白質の分解をまぬがれることはできない。一方、膜融合リポソームはリポソーム内に封入可能であればいかなる物質も膜融合により細胞質内に直接導入可能なベクターであり、先の陽電荷リポソームの最大の欠点を克服した唯一の非ウイルスベクターと言える。したがって、膜融合リポソームは T7 発現系を応用していくためには、最適のベクターと考えられる。そこで次に、T7 発現系に膜融合リポソームの応用をも念頭に、膜融合リポソームの粒子設計を行った。

遺伝子導入法の開発は、遺伝子治療分野の足元となる研究領域であるが、いまだ確固たる保証を有するベクターは提示されていない。この問題を解決していくためには、いくつかのブレークスルーになる発見や技術革新が必要であると考えられる。我々の研究室で粒子設計された膜融合リポソームは、リポソーム表面にセンダイウイルスの膜蛋白質を付与

したものであり、センダイウイルスの膜融合能を利用してリポソーム内封物を細胞質内に導入できることが判明している。この膜融合リポソーム法は、ウイルスベクターの細胞内への遺伝子導入効率の高さと非ウイルスベクターの安全性をあわせもったハイブリットベクターであり、次世代の遺伝子導入ベクターとして期待されている。そこで、膜融合リポソームの遺伝子導入効率の向上を目的に膜融合リポソームの粒子設計を試みた。これまでの膜融合リポソームは、逆相蒸発法により作製したりポソームから調製していたため、内水相には有機溶媒処理でも失活しない物質しか封入できなかった。実際に、逆相蒸発法と同じ条件で T7 RNA polymerase を有機溶媒処理すると、顕著な酵素活性の低下が認められた。したがって、活性を有する蛋白質を膜融合リポソーム内に封入するためには、逆相蒸発法以外でリポソーム調製しなければならぬことが示唆された。Bangham らにより報告されたリポソームは、機械的な力を与えるだけの非常に簡単なリポソーム調製法であり、この方法を用いることにより蛋白質を失活させずにリポソーム内に封入可能であると考えられる。しかしながら、この方法で調製した MLV リポソームは、リポソームが多重膜構造であるため封入容積が低い。したがって、凍結融解を行い MLV を 保持容積の大きな LUV に変換した。その結果、遺伝子の封入量は MLV より LUV において高くなった。また、ニワトリ卵白アルブミンを封入したりポソームでも MLV に比べ LUV で高い封入量となった（データ示さず）。このことより、凍結融解法でも効率よく遺伝子や蛋白質を封入可能であることが明らかとなった。凍結融解を行っても T7 RNA polymerase の失活がほとんど見られなかったことより、本酵素を凍結融解法により作製したりポソームに封入し、膜融合リポソームを調製することが最適な方法であることが示唆された。次に、膜融合リポソームの粒子径と遺伝子封入量および遺伝子導入効率の連関について検討を行った。今回の検討では、膜融合リポソームの最大粒子径をそろえるため、 $0.4\ \mu\text{m}$ および $0.8\ \mu\text{m}$ のサイジングフィルターを用いサイジングを行ったりポソームより、膜融合リポソームを調製した。その結果、膜融合リポソームの最大粒子径の増大に伴い遺伝子封入量の増大が認められた。これは、膜融合リポソーム内水相の容積増大によるものであると考えられた。また、Bangham 法で調製した MLV から作製した膜融合リポソームが最も遺伝子封入率が低かった。これは、膜融合リポソームの保持容積を反映した結果であると考えられた。つぎに、この膜融合リポソームを用い細胞に遺伝子導入したときの遺伝子発現について検討したところ、封入量に依存した遺伝子発現が認められた。なお、この

実験では膜融合リボソームの遺伝子導入効率について検討するため、膜融合リボソームのセンダイウイルス由来の蛋白質量をそろえることで、細胞に作用させる粒子数を一定にし遺伝子導入を行った。したがって、ここでの遺伝子発現の大小が、その膜融合リボソームの遺伝子導入効率として評価可能である。その結果、リボソームの遺伝子封入量の増大とともに遺伝子導入効率も向上した。さらに、リボソームの最大粒子径を増大させたことで、遺伝子サイズの大きな遺伝子も効率よく封入可能であり、かつ効率よく細胞内に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。さて、スベルミジンは遺伝子と複合体を形成し遺伝子のコンフォメーション変化させることで遺伝子のヌクレアーゼ抵抗性を増大させることが知られている。しかしながら、この遺伝子の安定化作用を利用した細胞での遺伝子発現増強について検討した報告はほとんどない。そこでスベルミジンによる遺伝子発現増強についての基礎的検討を行った。まずはじめに、スベルミジン添加における遺伝子のヌクレアーゼ抵抗性について検討した。その結果、スベルミジン濃度の上昇に伴い、遺伝子の分解性が低下することが明らかとなった。したがって、遺伝子とスベルミジンの複合体を細胞に導入することで、遺伝子の細胞内での安定性が増大し遺伝子発現増強に結びつくのではないかと考えられる。そこで次に、膜融合リボソームによる細胞への遺伝子導入における、スベルミジンがおよぼす遺伝子発現への影響について検討した。その結果、遺伝子とスベルミジンの混合比が 1 : 0.625 の複合体を膜融合リボソームに封入し細胞に導入したとき最も高い遺伝子発現が認められた。しかしながら、スベルミジン濃度に依存した遺伝子発現増強は認められず、逆にスベルミジン濃度上昇により遺伝子発現の低下が認められた。これは、スベルミジンにより遺伝子のコンフォメーション変化が過度に生じ、遺伝子の転写効率が低下したためであると考えられる。この点に関しては今後の検討課題であると考えている。スベルミジンは、生体内ポリアミンの一種で生体内に普遍的に存在する物質であり、安全性に優れた物質であると考えられる。また、スベルミジンは、混合するだけで遺伝子発現を増強させ得る物質であり、今後の遺伝子発現系に容易に応用可能な方法であることが示唆された。さらに、このスベルミジンは、T7 RNA polymerase の酵素活性を増強させる作用もあることから、T7 発現系にも応用可能であると期待できる。以上に基つき今後はスベルミジンの T7 発現系への応用についても検討を行っていきたいと考えている。

VSV-リボソームは、細胞傷害性を伴わずにリボソーム内に封入した DTA を intact な状態で細胞質内に導入可能であり、かつその導入効率が、リボソ

ームの 100 倍以上であることが判明した。さらに VSV-リボソームは、高濃度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。以上の結果および VSV の感染機構を考慮すると、VSV-リボソームは、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の pH の低下に伴いエンベロープ蛋白質が活性化され、その結果、エンドソーム膜と融合し、リボソームの場合とは異なりライソソーム酵素による分解を受ける前に、封入物質を直接細胞質内に導入していると考えられた。

E. 結論

安全性・有効性が確保された我が国独自の遺伝子導入ベクターとしての膜融合リボソームを開発する目的で、本年度研究により以下の結論を得た。

現在行われている遺伝子治療においては、導入遺伝子の核移行が必須となるが、核膜が一次的に消失する分裂期の細胞においてすら、導入遺伝子の核移行率は 10^{-4} と低いことが知られている。しかも、大部分が非増殖性細胞である *in vivo* においては、この移行率はさらに低下してしまう。本研究は、バクテリオファージの T7RNA ポリメラーゼとそのプロモーターを利用することで、核内ではなく細胞質内で遺伝子発現させることにより、この導入遺伝子の核移行問題を回避すると共に、非増殖性細胞においても効率よく遺伝子発現させ得る細胞質内遺伝子発現系 (T7 発現系) を開発しようとするものである。以上の観点から、平成 9 年度に構築した 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) 及び 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) を用い、平成 10 年度はまず、T7 発現系の有用性を *in vitro* 評価した。その結果、リボフェクチンを遺伝子導入ベクターとして適用し、pT7-IRES-L と T7RNA ポリメラーゼを細胞質内に導入することで、遺伝子導入後僅か 6 時間で高い遺伝子発現が認められた。また、pT7AUTO-2 を加えることにより遺伝子発現の増強および延長が確認できた。さらに、T7 発現系は、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。以上の結果より、本 T7 発現系を利用することで、非増殖性細胞に対しても効率のよい遺伝子治療を行い得るものと期待された。さらに平成 9 年度に引き続き、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膜融合リボソームを粒子設計していくため、平成 10 年度は膜融合リボソーム内への遺伝子封入効率の向上や細胞内遺伝子導入効率の増強、封入遺伝子の安定化等を目指した。膜融合リボソ

ムの粒子径、遺伝子封入効率、遺伝子発現効率などの連関を追求したところ、膜融合リポソームの粒子径を増大させることで遺伝子発現効率が増強出来た。本検討により、従来の膜融合リポソームと比較し遺伝子封入量の上昇とともに、数倍以上もの遺伝子発現効率の増強が可能となった。また大きなサイズの膜融合リポソームを適用することで、15Kb という比較的大きなサイズの遺伝子をも細胞質内に導入出来ることも明らかとなった。一方で、スベルミジン-遺伝子複合体を細胞質内導入することで、遺伝子の細胞内安定性が増大し、著しく遺伝子発現が増強されることが判明した。以上、膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有用性・汎用性が向上できた。また平成10年度は新たに、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-リポソームが作製でき、その有用性が示唆された。

以上、膜融合リポソームの安全性・有用性確保のための基礎的情報の集積・基盤技術の開発に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Fusogenic liposome directs an exogenous antigen into class I major histocompatibility complex antigen-presenting pathway., *Drug Delivery System*, 13 : 27 - 33, 1998.
- 2) Kunisawa J., Nakanishi T., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Fusogenic liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing humoral immune-responses to soluble antigen., *Drug Delivery System*, 13 : 21 - 26, 1998.
- 3) Suzuki R., Nakagawa T., Mizuguchi H., Imazu S., Nakanishi T., Nakagawa S., Nakanishi M., and Mayumi T. : The optimization of cytoplasmic gene expression system with T7 RNA polymerase., *Drug Delivery System*, 13 : 87 - 93, 1998.
- 4) Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Hayakawa T., Uemura H., Yamada O., and Mayumi T. : Development of VSV-liposomes as a novel gene transfer vector., *Drug Delivery System*, 13 : 159 - 164, 1998.
- 5) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Enhancement of liposomal adjuvant actions for tumor vaccines by increasing the degree of surface charge., *Drug Delivery System*, 13 : 151 - 157,

1998.

6) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Cationization of liposome surface charge enhances adjuvant effect of liposomes for tumor vaccine., *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, 58 : 59 - 68, 1998.

7) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., and Mayumi T. : Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes in to the artery that leads to tumors., *Cancer Res.*, 58 : 5725-5730, 1998.

2. 学会発表

- 1) 今津進, 米屋由理, 中西剛, 水口裕之, 堤康央, 早川亮夫, 真弓忠範 : プラスミドベクターが及ぼす DNA ワクチンの免疫誘導能への影響., 日本薬学会第118年会, 京都, 1998年4月.
- 2) 鈴木亮, 中川哲彦, 水口裕之, 堤康央, 久保一義, 中川晋作, 中西真人, 早川亮夫, 真弓忠範 : 遺伝子発現効率増強を目差した膜融合リポソームの改良., 第14回日本DDS学会, 横浜, 1998年7月.
- 3) 中川哲彦, 鈴木亮, 水口裕之, 堤康央, 久保一義, 中川晋作, 中西真人, 早川亮夫, 真弓忠範 : 膜融合リポソームを用いた細胞質内遺伝子発現系の確立., 第14回日本DDS学会, 横浜, 1998年.

图表

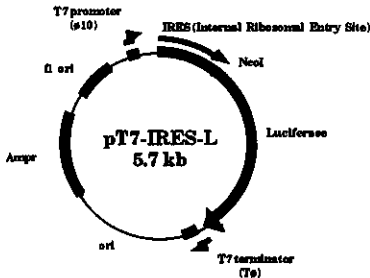


Figure 1 Structure of luciferase expression plasmid pT7-IRES-L

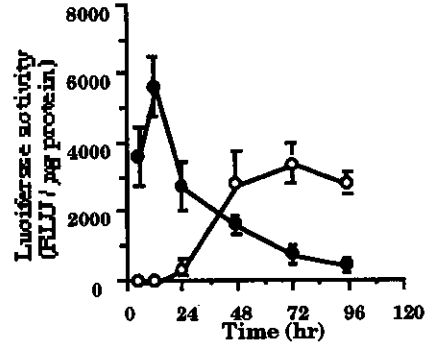


Figure 5 Luciferase activity in LLCMK2 T7(+) cells transfected with lipofectin

LLCMK2 T7(+) cells were incubated with complexes of lipofectin (5 μg/ml) and pT7-IRES-L (●)(1 μg/ml) or pRSVL (○)(1 μg/ml) at 37 °C for 3hr.

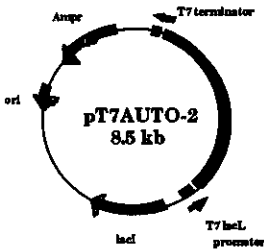


Figure 2 Structure of T7 RNA polymerase expression pT7 AUTO-2

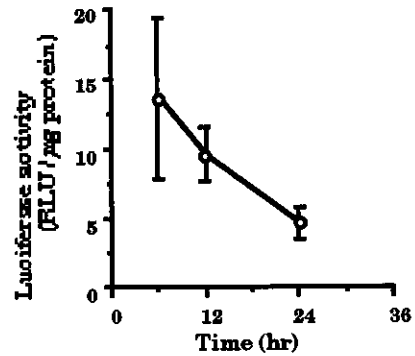


Figure 6 Luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells transfected with pT7-IRES-L and T7 RNA polymerase

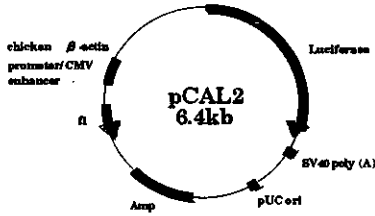


Figure 3 Structure of luciferase expression plasmid pCAL2

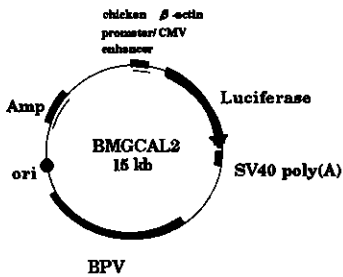


Figure 4 Structure of luciferase expression plasmid BMGCAL2

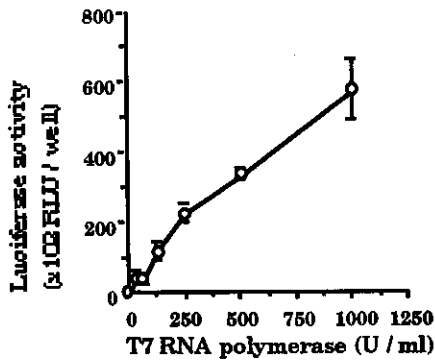


Figure 7 Effect of T7 RNA polymerase on luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells

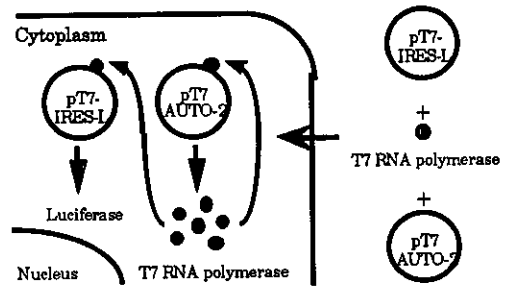


Figure 10 Schematic representation of cytoplasmic T7 system

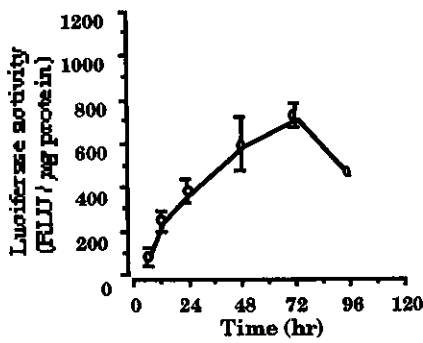


Figure 8 Luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells transfected with pT7-IRES-L and pT7-AUTO-2

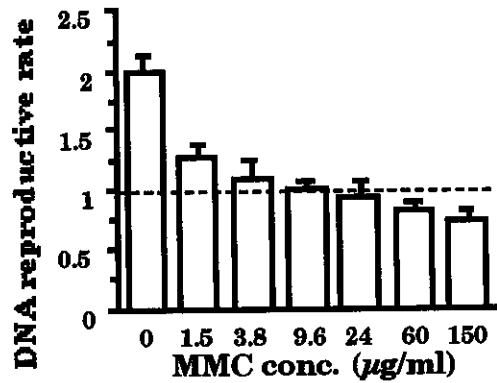


Figure 11 Inhibition of cell proliferation in BAEC cells treated with MMC

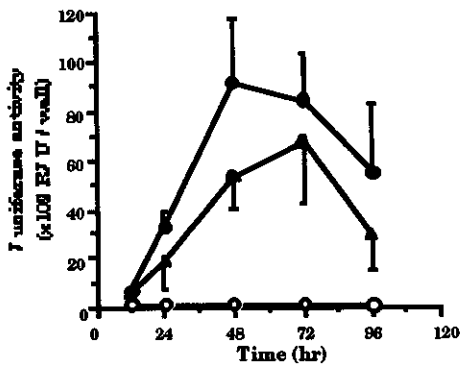


Figure 9 Effect of pT7-AUTO-2 concentration on luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells

LLCMK2 T7(-) cells were incubated with complexes of lipofectin (5 μg/ml), pT7-IRES-L (0.14 μg/ml), pT7-AUTO-2 (0.1 (○), 0.29 (△), 0.86 (●) μg/ml) and T7 RNA polymerase (125 U/ml) at 37°C for 3h. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments.

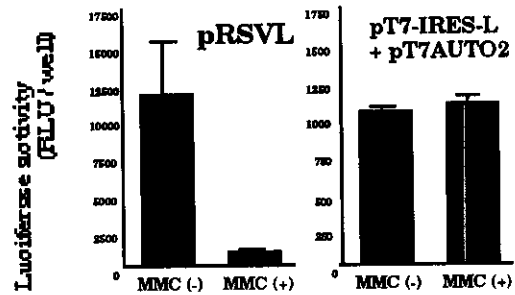


Figure 12 Luciferase activity in BAEC treated with MMC

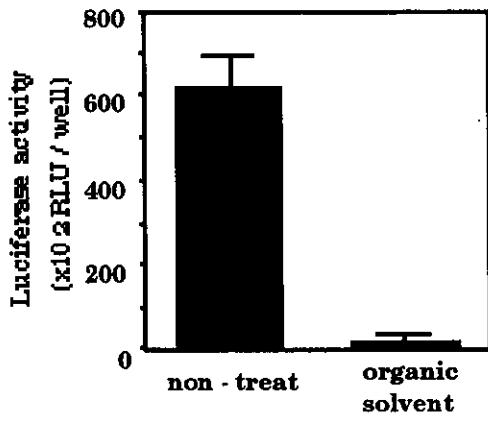


Figure 13 Effect of organic solvent treatment on T7 RNA polymerase activity

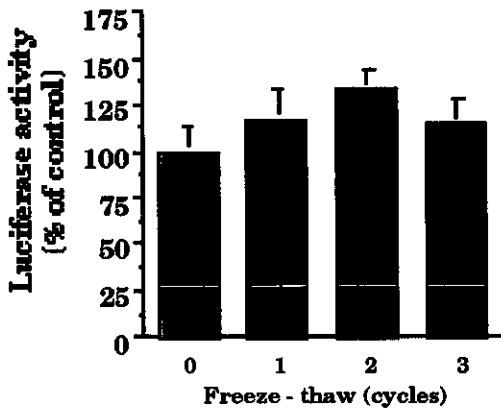


Figure 14 Effect of Freeze and thaw on T7 RNA polymerase activity

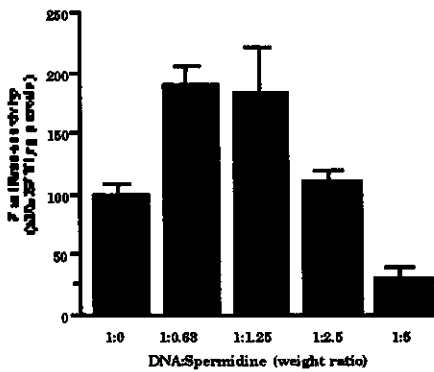


Figure 15 Effect of spermidine on gene expression

Table.1 Effect of fusogenic liposome preparation method on encapsulated concentration

Sizing filter	Encapsulated concentration ($\mu\text{g/ml/OD}$)		
	Reverse-phase evaporation method	Bangham method	Freeze and thaw method
0.4 μm	1.46 \pm 0.29	0.38 \pm 0.28	1.43 \pm 0.18
0.8 μm	4.43 \pm 0.61	1.43 \pm 0.31	6.16 \pm 0.33

Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

Table.2 Effect of fusogenic liposome preparation method on gene expression

Sizing filter	Luciferase activity (RLU / μg protein)		
	Reverse-phase evaporation method	Bangham method	Freeze and thaw method
0.4 μm	4054 \pm 963	270 \pm 57	1776 \pm 422
0.8 μm	4071 \pm 1188	573 \pm 116	3786 \pm 1445

LLCMK2 T7(-) cells were transfected for 30min by the fusogenic liposomes containing pCAL2. After 2days, luciferase activity was measured. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

Table.3 Effect of plasmid size on encapsulated concentration and gene expression

Plasmid DNA	Sizing filter	Encapsulated conc. ($\mu\text{g/ml/OD}$)	Luciferase activity (RLU/ μg protein)
pCAL2 (6.4kb)	0.4 μm	1.43	1776 \pm 422
	0.8 μm	6.16	3786 \pm 1445
BMGCAL2 (15kb)	0.4 μm	0.86	747 \pm 99
	0.8 μm	5.10	1763 \pm 462

LLCMK2 T7(-) cells were transfected for 30min by the fusogenic liposomes containing pCAL2 or BMGCAL2. After 2days, Luciferase activity was measured. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

分担研究報告書

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

分担研究者 中西真人

大阪大学・微生物病研究所

免疫・生体防御部門・神経ウイルス分野・助教授

研究要旨

遺伝子治療の安全性を確保するための新しい遺伝子導入ベクターであるハイブリッドベクターの開発を目指して、核へのDNAターゲティングと核内における遺伝情報の安定性に関する研究を行った。本年度は、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だし、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。また、動物細胞の核内でのDNAの安定性を迅速にかつ正確に測定する系の開発に成功した。さらに、染色体の安定化のメカニズムの1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、前記の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。

A. 研究目的

遺伝子治療は将来、疾患を克服するための画期的な手段となると予想されており、その実用化に向けて世界中で技術開発が進められている。一方、遺伝子治療の安全性の確保という点から遺伝子治療用ベクターの現状を眺めてみると、次にあげたようないくつかの問題点が浮かび上がってくる。

- 1) DNAを中間体として複製するウイルスベクター（レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター）は、現在のところ遺伝子治療の臨床試験において最も多く使われているベクターである。これらのウイルスベクターは動物細胞を使って生産されるが、この際にウイルスゲノムと宿主細胞のゲノムが遺伝子組換えを起こし、人体に感染して複製可能ないわゆるReplication Competent Virusを生じる危険性が指摘されてきた。このようなReplication Competent Virusが生じる現象は、最も安全だと

考えられてきた現行のレトロウイルス・パッケージング細胞でも実際に起きることが最近報告されており (Chong, et al. J. Virol. 72, 2663, 1998)、今後臨床試験例が増えるに従ってその副作用の可能性が問題になると考えられる。

- 2) 非ウイルスベクターは一般にウイルスベクターより安全性が高いと考えられているが、現状では遺伝子導入の効率が悪くかつ一過性の遺伝子発現しか得られないため、治療効果を得るために大量の核酸を繰り返し人体に投与する必要がある。このように遺伝子の大量投与を長期間続けることによる生体や環境への影響についてはほとんどデータが無いが、将来的には安全性を十分に確保できない恐れがある。
- 3) 遺伝性代謝疾患の治療のために必要とされる長期間の遺伝子発現を得るために、現在はレトロウイルス・ヒト免疫不全ウイルス（HIV）・アデノ随伴ウイルス（AAV）などヒトの染色体に挿入されるタイプのベクターが臨床試験に用いられてい

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などの副作用（遺伝子毒性）をもたらす可能性がある。例えば、ヒトの肝臓の全細胞に1コピーの遺伝子を導入して染色体に挿入するような系が実現した場合、遺伝子の平均サイズを10 kbp とすると、ある特定の対立遺伝子の片方が壊された細胞は約50万個も出現することになる。現状では、多くの遺伝子治療の臨床試験の対象が余命の短いガン患者であることや、遺伝子を導入された細胞の数がこの仮定よりはるかに少ないことからこの問題は真剣に議論されていないが、今後臨床試験の規模が大きくなるにつれて副作用が表面化するであろう。

このような問題点を考慮すると、遺伝子導入・発現ベクターの安全性を確保するための技術基盤は以下の諸条件を満たすものでなければならない。

- 1) 動物細胞ゲノムDNAとベクターDNAとの間の遺伝子組換えによって生ずる有害な遺伝情報の混入を回避するため、遺伝情報（DNA）の生産には、非相同組換えの活性の高い動物細胞を使わず、組換え機構が詳細にわかっている大腸菌を使用するベクターを開発する。
- 2) 生体組織細胞への効率のよい遺伝子導入と安定な遺伝子発現を可能にすることで、大量の遺伝子を反復投与することを避けることができるベクターを開発する。
- 3) 外部から導入した遺伝情報を染色体とは独立した形（独立レプリコン）として安定化させることで、染色体上の宿主の遺伝情報への影響を最小限にとどめることができるベクターを開発する。

本研究は、このような遺伝子治療の安全性を確保するための条件を満たした新しいベクターである「ハイブリッドベクター」の開発を目的としている。この目的を達成するため、研究分担者は平成10年度は次の3点に関して研究を進めた。

1. 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。
2. 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。
3. 動物細胞を使って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。

B. 研究方法

- 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はLambda D1180で、Dam15のアンバー変異を持っていて、suppressor tRNAを持たないSup^o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、Clontec社）やホタル・ルシフェラーゼcDNA（Promega社）はサイトメガロウイルス（CMV）の初期遺伝子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。