

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法によって増幅したあと発現ベクター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°C 15分の熱処理でファージの増殖を誘導し、さらに38°Cで40分培養後に集菌した沈澱からクロ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°C 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Ascl-Ascl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遺伝子はNLS-D遺伝子に、E遺伝子にはEdofK562(6985C-T, Thr284-Ile)変異を、H遺伝子にはHdel12(del 11,079-12,743, del Thr180-Ala734)の欠失を導入した。このAscl-Ascl断片をLambda clts857, Sam7のゲノムDNAのcos-Ascl断片、Ascl-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。

5) 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ハイグロマイシン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あと、その1マイクログラムを種々の細胞にエレクトロポレーション法で導入した。ただちに100 mm ディッシュ100枚(浮遊細胞の場合は96 well ディッシュ100枚)に細胞をまき直し、48時間後からハイグロマイシンBを含む培地に置き換えて遺伝子を取り込まれた細胞を選択した。10日目にそれぞれのディッシュに出現したハイグロマイシンB耐性コロニーを単離し、増殖後DNAを抽出して制限酵素HindIII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メ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。

6) ポジティブ・ネガティブセレ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 のサイトメガロウイルス・初期遺伝子プロモーターと 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。

7) ポジティブ・ネガティブセレ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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 (表 2)、あるいは YI15 の数を 10⁴ に固定して YI13 の数を 0 から 1000 個混合したもの (図 9) を、0.5 mM の Cyclophosphamide を含む培地で培養し、1 週間後に生存してきたコロニーの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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培地で 5 日間 (途中、一度まき直しを含む) 培養して、この DNA を含む細胞のプールを選択した。次に、この細胞を薬剤を何も含まない培地で 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の数から計算した。

8) その他

プラスミド作成を含む組換え DNA 実験の方法は成書 ("Molecular cloning, 2nd ed." (eds. Sambrook, J. et al.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。*In vitro* mutagenesis は Kunkel らの方法によった (Kunkel T.A., et al., *Methods in Enzymology*, 154, 367, 1987)。

C. 研究結果

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

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。我々が開発してきた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って最初のバリアーをクリアーしている点で、非ウイルスベクターの中ではユニークな存在であるといえる。しかしそれでもなお、細胞質に導入された遺伝情報は核へ積極的に輸送されるわけではなく、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%と推定されており(Yamaizumi, et al. *Molecular and Cellular Biology*, 3, 511, 1983)、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HMG 1にDNAを核に移行させる活性があるという研究(Kaneda, et al. *Science*, 243, 375, 1989)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。実際、ウイルスの場合は裸のDNAが単独で核に移行するとは一般的に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もっとも凝縮した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。ちなみに、金コロイド粒子に核移行シグナルを結合させた実験では、核に移行できる最大の粒子の直径は26 nmであると報告されている(Dworetzky, et al. *J. Cell Biol.*, 107, 1279, 1988)。

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て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。その理由を以下に掲げる。

- 1) サイズが比較的小さく(頭部の直径が54 nm)、さらに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。
- 2) 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。
- 3) 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(Sternberg and Hosess, *PNAS* 92, 1609, 1995)。

昨年度までに、我々は、遺伝子組換えの技術を用いて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（Akuta, et al. in preparation）。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度）、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（図1）。

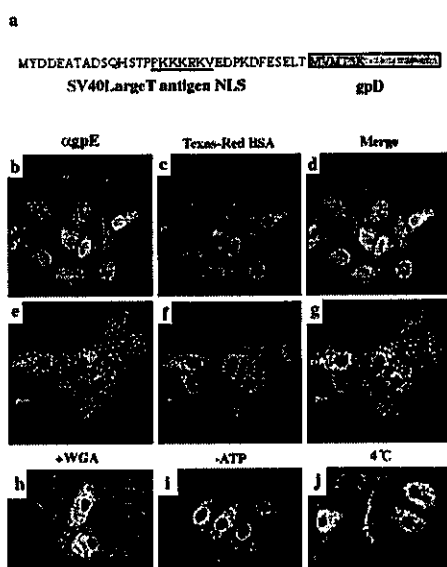


図1 NLSファージの核移行

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。

本年度はさらに、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・ルシフェラーゼを使った。GFPを使うと、細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより直接に発現を検出できるので、マイクロインジェクションにより微量注射した細胞中でこの遺伝子を発現しているものの割合を直接測定できる。またルシフェラーゼを使えばその酵素活性を指標に遺伝子発現をより定量的に測定することが可能である。

まず、GFPやルシフェラーゼのcDNAを強力なプロモーターであるサイトメガロウイルスの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。ファージの調製は昨年度報告した方法に従って行った。

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の下で観察して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G

F P を発現している細胞は見いだせなかった (図 2)。

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 (図 2)。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縮まっているが、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。つまり、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ポソームと組み合わせることが重要であり、現在、ファージ粒子を膜融合リポソームに封入して細胞に導入する条件を検討している。

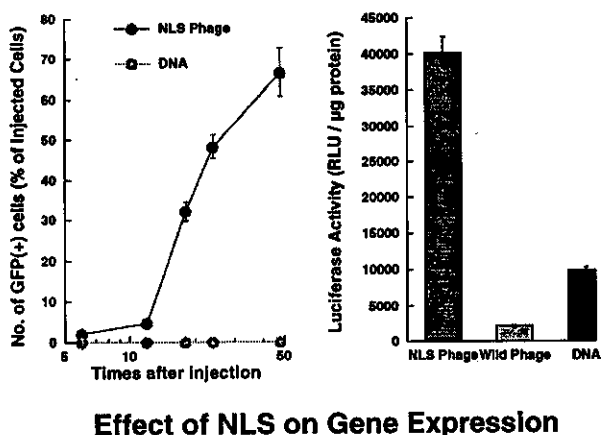


図 2 核移行による遺伝子発現の増強

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

と組み合わせて、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、本研究で開発に成功した NLS ファージは、suppressor 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なので、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、本年度は、このシステムをさらに改良して安全性に優れ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 を除去して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の作製を行って、二重に安全性確保を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、全長の長さを持ったファージゲノムは大きすぎて頭部に入ることができないので、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。

以上のような条件を考えて、小さな頭部を作るためには頭部の主要抗原を作る E 遺伝子に EdefK 562 変異 (Katsura, I., J. Mol. Biol., 171, 297-317 (1983)) を、感染性を持たない尾部を作るためには尾部の長さを決める H 遺伝子に Hdel 112 変異 (Katsura, I., Nature, 327, 73-75 (1987)) 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コピーを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(図3)。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。

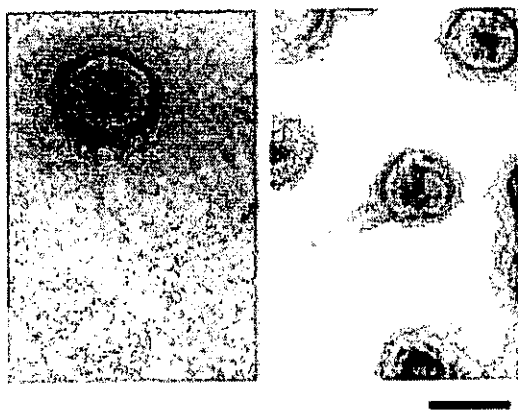


図3 野生型ファージ(左)とEdefK562, NLS-D, Hdel112変異ファージ(右)
Bar は50 nm

我々が本研究で作製に成功したさまざまなNLSファージは、ただ単に安全なベクターの素材となるだけではなく、非ウイルスベクターに共通した課題である核へのDNAの能動的輸送という問題を克服するために必要な、粒子サイズや必要なシグナルについて重要な情報を提供することが期待される。つまり、本研究の成果は、将来、細胞内ターゲティングの機能を合成ポリマーとDNAとの複合体に持たせるために必要な情報を提供してくれるという点で、安全性の高い完全合成ベクターの実現に向けた重要な一歩であると考えている。

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ベクター(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を使ったベクター)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。これは現在のところ核の中で安定に存在できる遺伝情報が染色体しかない以上いたしかたのないところである。しかし先にも述べたように、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。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ダイレクト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(Heller, et al. PNAS, 93, 7125, 1996; Harrington, et al. Nature Genetics, 15, 345,

1997)、新しい遺伝子治療への第一歩としてもはやされている。

しかし、1項で述べたDNAの核へのターゲティングという問題を考えると、これがそう単純な問題ではないことが理解される。すなわち、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・器官であるが、この場合、現状の人工染色体のような巨大なDNAを核膜というバリアーを通過させることはほとんど不可能である。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人工独立レプリコンのサイズの上限を50 kbpと考えている。

ところで50 kbpの人工独立レプリコンに要求される機能にはなにがあるのだろうか。一般に人工染色体に必要な機能というとDNAの複製と分配が挙げられるが、前述したように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を考えると、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あり短時間で消失してしまう。この現象はこれらのベクターのDNAには染色体には存在する安定化に必要な構造が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ラーゼというDNA合成酵素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時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(Hastie, et al. Nature, 346, 866, 1990)。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要な要素であると考えられ、本研究で目標としている「NLSファ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であると認識している。

テロメアの機能に関しては、テロメア合成酵素(テロメラーゼ)を中心として染色体末端のDNA複製に関する研究は進んでいるが、染色体の末端はどのようにして安定化されているのか、またテロメアとしての機能を持つために最小限必要な要素は何かという点についてはまだ十分に理解されているとは言い難い。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た。その結果、少なくとも500 bp以上の長さの(TTAGGG) n が存在することが、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

(図4) (Okabe and Nakanishi, in preparation)。

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った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（図4）、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。

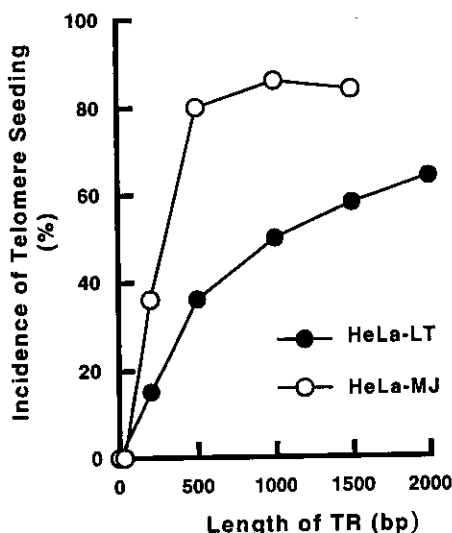


図4 テロメア配列(TTAGGG)*n*の長さが染色体末端の安定性に与える影響

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は何かという点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 (Steensel and de Lange, Nature, 385, 740, 1997) と hTRF2 (Steensel et al., Cell, 92, 401-413, 1998) 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(Steensel and de Lange, Nature, 385, 740, 1997)、テロメアの長さ

を制御している因子ではないかと考えられている。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(Steensel et al., Cell, 92, 401-413, 1998)。昨年度行った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*の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ブロッ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(図5)。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。

Establishment of Flag-hTRF1 overexpressed cell lines

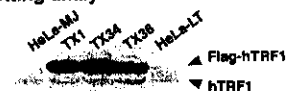
A. Immunofluorescent microscopy analysis



Flag-hTRF1 expressed cell line (TX34) negative control (HeLa-LT)

HeLa-LT cells were transfected with a Flag-TRF1 expression vector, and three clonal cell lines (TX1, TX34 and TX36) were established. Uniform expression of Flag-hTRF1 in established cell lines was confirmed by immunofluorescent microscopy using anti-Flag monoclonal antibody.

B. Protein blotting analysis



Whole-cell extracts from cell lines were analyzed using anti-TRF1 antibody.

図5 HeLa-LT細胞でのFlag-hTRF1の強制発現

その結果、テロメア配列結合因子であるhTRF1を過剰に発現させれば、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(表1)

(Okabe and Nakanishi, in preparation)。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。

Effects of exogenous Flag-hTRF1 on telomere seeding

Cell line	Telomere seeding, % (Tel./Exam.)
HeLa-MJ	79 (41/52)
HeLa-LT	36 (9/25)
Flag-hTRF1 overexpressed cells derived from HeLa-LT cells	
TX1	81 (21/26)
TX34	83 (35/42)
TX36	73 (19/26)

Each cell line was transfected with pMYAC1 and incidence of telomere seeding was determined by DNA blotting.

表1 テロメアの安定性に及ぼすhTRF1の影響

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。言い換えると、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出し、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3.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での解析を始めている。

3. 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

2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。また酵母では実際に、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(Longtine, et al. Molecular and Cellular Biology, 12, 1997, 1992)。このように、動物細胞でも核内で安定にDNAを保持するために必要な因子が明らかになりつつあるが、残念ながら動物細胞の遺伝情報の安定性を調べるのは酵母に比べると容易ではない。これには2つの理由がある。

- 1) 遺伝情報の安定性は1細胞分裂あたりどのくらいの割合でその遺伝情報が失われるかという単位で表すが、動物細胞のように世代時間が24時間以上あると安定性を定量するために非常に時間がかかる。例えば、24時間に1回分裂する増殖の早い動物細胞を使って1細胞分裂あたり5%の遺伝情報の消失を観察する場合（これはかなり不安定な部類に入る）、30%の細胞から遺伝情報が失われるという有意な差のつく状態になるには7日の培養ですむ。しかし1細胞分裂あたり2%の消失では18日、1%の消失では35日、0.5%の消失ではなんと71日培養しなければ結果がでない。

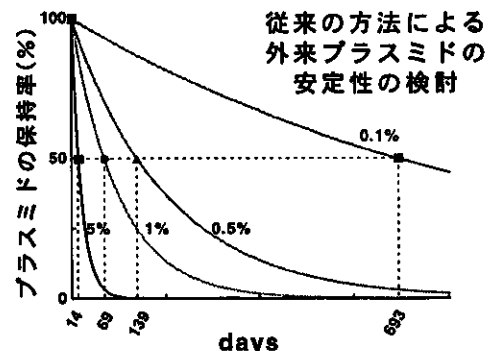


図6 遺伝情報の安定性

酵母細胞の分裂速度は動物細胞の12倍から20倍であるが、細胞の分裂速度が大きければ同じ時間でたくさんの細胞分裂が行われるため、遺伝情報の消失速度も速くなる。

- 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。5-fluoroorotic acid (5-FOA) は Ura3 遺伝子の働きで細胞毒性の高い5-fluorouracil に変化するため、Ura3 陽性酵母細胞は5-FOAの入った培地では生育できないが、Ura3 陰性となった細胞は5-FOA耐性となってコロニーを作る。そのため、最初にuracil欠損の培地で培養してすべての酵母細胞をUra3 陽性にしておいてから一定時間非選択培地で培養し、その後5-FOA培地に移すと、非選択培地で培養している間にUra3 遺伝子を失った細胞の割合を、5-FOA培地で生育するコロニーの数として定量する事ができる。

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。動物細胞では酵母のUra3の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(Suicide gene)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。特に、先に述べたTK遺伝子はThymidine kinase 欠損細胞においてはHAT選択培地を使うことによりポジティブ選択遺伝子としても機能するが、これは対象となる細胞がTk遺伝子欠損細胞であることが前提なので、あまり一般的な方法とは言えない。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(図7)。

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、その下流に転写終結点を配置した構造を持っている(図7)。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ので、下流のcDNAは一般に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) (Parks, et al. J. Virol., 60, 376, 1986)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。

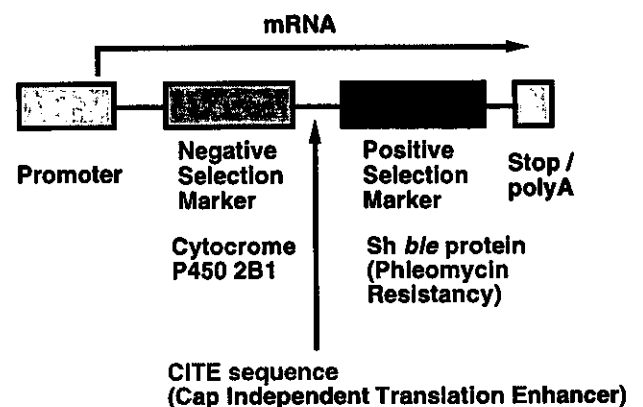


図7 完成したネガティブ・ポジティブ選択用ベクター

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、ハイグロマイシン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、サイトメガロウイルス (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、ハイグロマイシン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い発現を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ハイグロマイシン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Thymidine kinase (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、Thymidine kinase 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ゼオシン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。Thymidine kinase 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った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 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 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。

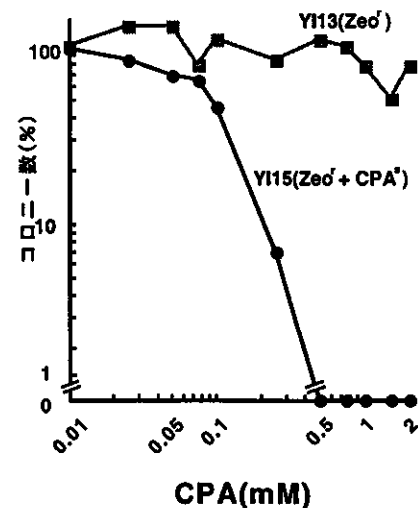


図8 YI-13, YI-15 に対する Cyclophosphamideの毒性

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 p 4 5 0 ・ 2 B 1 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(図8)。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 104 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(表2、図9)(Ikawa and Nakanishi, in preparation)。

YI15 : YI13	コロニー数	YI15 : YI13	コロニー数
10 ⁶ : 100	0	10 ⁶ : 0	0
10 ⁵ : 100	0	10 ⁵ : 0	0
10 ⁴ : 100	74	10 ⁴ : 0	2
10 ³ : 100	64	10 ³ : 0	1
0 : 100	79		

表2 YI-13, YI-15による条件検討(1)

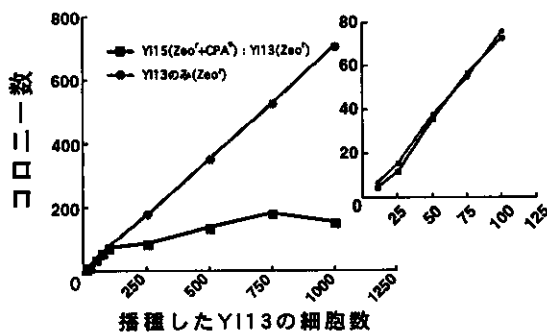


図9 YI-13, YI-15による条件検討(2)

最後に、本年度開発したシステムを用いて、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(Yates, et al., Nature, 313, 812-815, 1985)。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(Yates, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 3806-3810, 1984)。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。

そこでまず、pYI-15にOriPを挿入したpYI-16を作製した。このDNAをEBNA1を発現しているHeLa-EBNA1細胞に導入し、5日間ゼオシン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を含む培地を入れた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。

	CPA耐性の コロニー数		最初に 播いた 細胞数	プラスミドの 脱落率	1回の分裂 あたりの 脱落率
	実測値	推定値			
24h	29	41	10^3	4.1%	4.1%
48h	43	61	10^3	6.1%	3.1%
72h	92	131	10^3	13.1%	3.3%

図10 ネガティブ・ポジティブ選択法を用いたEBV複製系の安定性の検討

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、現在、前章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。

D. 考察

本年度の研究では、非ウイルスベクターの安全性とウイルスベクターの効率を兼ね備えたハイブリッド・ベクターの実用化に向けて、3つの研究テーマにおいて着実な進展を見ることができた。

DNAの核内へのターゲッティングという、DNAのDDS(Drug Delivery System)の分野でもっともホットなテーマでは、昨年度のファージ粒子の作製に続いて、ファージ内部のDNAが核内に能動的に移行していることを証明し、またこの能動輸送が実際に遺伝子発現を大きく上昇させることを証明できた。さらに、このシステムから大腸菌への感染性を除き、ファージDNAではなく、短いcos配列(ファージ粒子へのパッケージングシグナル)を持つ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作成にも成功した。これらは、動物ウイルスに頼らずに遺伝子の核へのターゲットに成功した世界初のデリバリーシステムである。

このNLSファージシステムは、不十分な精製時に混入する恐れがあるエンドトキシンを除いて、動物や細菌に有害な成分をまったく含んでいないので、ウイルスベクターに比較して極めて安全性が高く、また安価に大量生産することが可能であるという特色を持つ。さらに内部に封入するDNAに工夫をすることによって、短いcos配列以外のバクテリア由来のDNAを粒子の内部から完全に除き、発現させたい遺伝子やヒト染色体の安定化に関わる領域(テロメアなど)だけにしてしまうことも可能であるなど、遺伝子治療用ベクターの素材としては理想に近い物となっている。また、NLSファージの今後の研究から得られる情報(DNAの核の中へのターゲッティングに必要な核移行シグナルの性質や、核の中へ移行できる粒子のサイズなど)は、現在、高分子化学の分野で研究が盛んに進められている「生物機能を持ったインテリジェント・ポリマー」の開発に非常に役立つと期待されている。これらの研究によって、将来はDNA以外はすべて合成品でまかなえる遺伝子導入系ができるだろう。

遺伝情報の安定性を高めて、染色体に挿入しなくても核内で安定に存在できる独立レプリコン(人工染色体)の開発は、安全な非ウイルスベクターの研究開発においても一つの大きなトピックである。遺伝子治療において、独立レプリコンの開発が重要であるのには以下のような理由がある。

- 1) 染色体への外来遺伝子の挿入によって宿主の遺伝子が異常な活性化や不活化などの影響を受け、その結果、ガン化を引き起こす可能性を否定できない。この問題は、現在のように挿入型ベクター(レトロウイルス、HIV、AVV)の効率が低い状況では顕在化しないが、将来、これらのベクターの改良によって大規模に遺伝子導入が行われるようになる。

ると必ず重篤な副作用をもたらすことが予想される。これを解決できるのが独立レプリコンの開発である。

- 2) DNA合成をしていない(言い換えると分裂していない)細胞の染色体に外来のDNAが挿入される確率は低く、この段階が遺伝子導入・発現の律速段階の一つになっている。遺伝性代謝疾患の対象となる肝臓・神経系などはすべて分裂しておらず、染色体に導入するためには大量のベクターを投与する必要があり、予期しない副作用をもたらす可能性がある。独立レプリコンであれば、核の中にさえ導入されれば自らを安定に保つ能力を持っているので律速段階が一つ解消でき、遺伝子導入効率は非常に高くなることが期待される。

これらの問題点はこれまでも指摘されてきたが、動物細胞の場合、遺伝子の安定性を評価する適当な系が存在しなかったことが研究を妨げてきた。独立レプリコンの開発はまだ研究を進めている研究室がほとんどないため、実際にどこまで遺伝子の安定性が要求されるかという具体的な数値目標が発表されているわけではないが、我々は半減期としてT細胞の体内での寿命に相当する2年間を目標としている。半減期2年という目標を達成するためには、細胞から失われていくDNAを24時間あたり0.1%以下としないといけない。しかしこのような高い安定性を正確に測定する系はこれまで皆無であった。我々が本年度の研究で開発したDNAの安定性を正確にかつ迅速に測定するシステムは、24時間あたり0.1%の脱落率の測定を20日間で正確に実施することを可能とした。この成功により、独立レプリコンの開発は初めて現実に研究の対象になったといえる。

今後は、この系を使って実際に独立レプリコンを安定化できるDNA構造や細胞側の因子を探索していく予定であるが、これまでの研究から、我々が見いだしたテロメア配列や、早川らが探索して

いるヒト染色体の複製起点などが候補にあがっている。なかでもテロメア配列はテロメア結合因子hTRF1との相互作用によって安定化に寄与していると考えられるが、この両者とも正常な組織細胞でも染色体を安定に保つ役割を持っているのではないかと予想されるため、EBVなどガン化との関連性が疑われるウイルスの複製系と比べて副作用を引き起こす危険性ははるかに低いと考えられる。

このように、常に安全性を視点に入れて研究を進めつつ、来年度は実際に動物の組織に効率よくまた安全に遺伝子導入・発現を行うことができるシステムの構築を追求していきたい。

E. 結論

本年度の研究では以下の成果を得た。

- 1) 表面に核移行シグナルを持つNLSファージを使って、ファージ粒子内部のDNAを核に能動輸送し、そこに組み込んであるマーカー遺伝子の発現を著しく増強することに成功した。またファージゲノムDNAを排除して任意のプラスミドDNAを頭部の小さいNLSファージ頭部に組み込むことができるパッケージング大腸菌の作製に成功した。
- 2) 染色体の安定化機構の一つとしてテロメア配列(TTAGGG)_nを同定し、このDNA構造がテロメア結合タンパク質の一つであるhTRF1との相互作用によって染色体の安定化に関与していることを明らかにした。
- 3) 動物細胞で染色体外に存在するDNAの安定性を、正確にかつ迅速に測定する系の開発に成功し、24時間(分裂1回)あたり0.1%の不安定性(半減期2年間)を正しく測定できることを明らかにした。
- 4) 以上の研究を通して、DNAを核に能動的に輸送し、核内ではそのDNAを染色体外の独立した人工染色体(独立レプリコン)として存在させるための基盤がほぼできあがった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mahito Nakanishi, Hiroyuki Mizuguchi, Ken-ichi Ashihara, Takao Senda, Jun Okabe, Emi Nagoshi, Akinori Masago, Akiko Eguchi, Teruo Akuta, Yosuke Suzuki, Hachiro Inokuchi, Akiko Watabe, Shigeharu Ueda, Takao Hayakawa and Tadanori Mayumi (1998). *Journal of Controlled Release*, 54, 61-68. Gene transfer vectors based on Sendai virus.
- 2) Hiroyuki Mizuguchi, Tetsuhiko Nakagawa, Satoru Toyosawa, Mahito Nakanishi, Susumu Imazu, Tsuyoshi Nakanishi, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Naokuni Ijuhin, Tadanori Mayumi (1998). *Cancer Research*, 58, 5725-5730. Tumor Necrosis Factor- α -mediated Tumor Regression by the Direct Delivery of the Genes into the Artery Controlling Tumors In Vivo.
- 3) Akiko Watabe, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi, Eriko Uchida, Akiko Eguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi, Mahito Nakanishi and Takao Hayakawa (1999). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1416, 339-348. Target Cell Specificity of Fusogenic Liposomes-Membrane Fusion-Mediated Macromolecule Delivery into Human Blood Mononuclear Cells.
- 4) Mahito Nakanishi, Hiroyuki Mizuguchi, Ken-ichi Ashihara, Takao Senda, Akiko Eguchi, Akiko Watabe, Tsuyoshi Nakanishi, Masuo Kondo, Tetsuhiko Nakagawa, Akinori Masago, Jun Okabe, Shigeharu Ueda, Tadanori Mayumi and Takao Hayakawa (1999). *Molecular Membrane Biology*, in press. Gene Delivery Systems Using the Sendai Virus.
- 5) Keisuke Miyake, Shoji Kimura, Mahito Nakanishi, Akihiko Hisada, Mamoru Hasegawa, Seigo Nagao and Youichi Abe (1999). *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, in press. Transforming growth factor- β 1 stimulates contraction of human glioblastoma cell-mediated collagen lattice through enhanced α 2 integrin expression.
- 6) Hiroyuki Mizuguchi, Tsuyoshi Nakanishi, Masuo Kondoh, Tetsuhiko Nakagawa, Mahito Nakanishi, Takahiro Matsuyama, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, and Tadanori Mayumi (1999). *Virus Research*, in press. Fusion of Sendai virus with liposome depends on only F protein, but not HN protein.
- 7) 中西真人・水口裕之 (1998). 日本薬理学会雑誌(*Folia Pharmacology of Japan*), 112, 299-305. 膜融合リポソームによる細胞内への物質導入.
- 8) 中西真人 (1998). 日本臨床, 56, 713-717. 膜融合リポソームによる細胞内遺伝子導入法.
- 9) 岡部潤・中西真人 (1998). 炎症と免疫, 6, 591-597. テロメア・テロメラーゼ.
- 10) 岡部潤・中西真人 (1998). 組織培養工学, 24, 563-566. テロメア・シーディング.
- 11) 鈴木亮・中川哲彦・水口裕之・今津進・中西剛・中川晋作・中西真人・早川堯夫・真弓忠範 (1998). *DD S*, 13, 87-93. T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系の最適化.

2. 学会発表

- 1) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Eguchi, A., Watabe, A., Hayakawa, T. and Mayumi, T. Gene Delivery System Using Sendai Virus. *Internal Symposium Membrane Fusion: Mechanisms and applications to Cell biology, Drug Delivery and Gene Therapy*, Salamanca, Spain, 1998.
- 2) Nakanishi, M., Akuta, T., Eguchi, A., Okuyama, H., Suzuki, Y., Takeda, K., Hasegawa, M. and Inokuchi, H. Enhancement of Gene Expression by Nuclear Targeting of DNA: Recombinant NLS-Lambda Phage System. *Keystone Symposia, Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy*, Salt Lake City, USA, 1999.
- 3) Okabe, J. and Nakanishi, M. Molecular and Cellular Factors Required for Human Telomere Formation. *Cold Spring Harbor Meeting, Telomere and Telomerase*. Cold Spring Harbor, USA, 1999.
- 4) 中西真人、組織・細胞へのアクセス：各種細胞の表面特性とターゲティング。第14回日本DDS学会総会、横浜、1998.
- 5) 岡部潤・中西真人、染色体を安定化するテロメアの機能に必須な要素の解析。第21回日本分子生物学会総会、横浜、1998.
- 6) 中西真人、遺伝性難病の遺伝子治療のための新規ベクター系の開発。第10回内藤コンファレンス、逗子、1998.
- 7) 中西真人、Nuclear Targeting of DNA Using Lambda Phage Particle. 日本薬学会第119年会、徳島、1999.

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究 —術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究—

分担研究者 鈴木 宏治 三重大学医学部医学科 教授

研究要旨

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究の応用研究として、肝癌、肝炎、肝硬変等で異常患部の切除手術後に発生する肝障害の阻止を目指して、抗血栓性因子の遺伝子をラットの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の評価検討を目的とした研究を実施した。まず、ヒトトロンボモジュリン(TM) cDNA発現ベクター (pRC/CMV-hTM cDNA) 封入膜融合リポソームの遺伝子導入効果をin vivo実験で検討するため、ラットの門脈からpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム溶液を注入した。その後、肝類洞内皮細胞を単離し、この細胞におけるヒトTMの発現量(活性、抗原、mRNA)を測定し、遺伝子の導入を確認した。また、pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームのラット肝類洞内皮細胞への導入効率をin vitro実験で評価するため、単離した肝類洞内皮細胞を遺伝子含有膜融合リポソームで処理し、処理細胞でのヒトTMの発現量(活性、抗原、mRNA)を測定し、遺伝子の導入を確認した。

A. 研究目的

肝癌、肝炎、肝硬変等では異常患部の切除が不可欠であるが、術後の予後(肝再生や生体機能全般の回復、生存性など)の善し悪しは肝障害の発生の有無に関わっている。特に、術中・術後の感染による肝障害は頻度も高く、死に至ることも希ではない。したがって、如何に術中の感染を軽減し、また、如何に術後の肝障害の発生を防ぐかが重要な臨床的課題となっている。これまでの術後肝障害に関する基礎的研究で、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いる。したがって、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をはじめとする人工的手法によって可能になれば、術後肝障害の発生は大いに軽減できるものと期待される。

一方、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(HSPG)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、TNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインの産生、凝固開始因子の組織因子(TF)の産生、細胞接着因子の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HSPG、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。

この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現象と考えられ、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。

こうしたこれまでの実績に基づき、本研究では、遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究の応用研究として、術後肝障害の発生を阻止して、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。すなわち、ラットを実験動物に用いて、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内に封入し、この遺伝子

封入膜融合リポソームを用いて、in vitro ならびに in vivo での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。

B. 研究方法

(1) ヒト TM、ラット TM および ヒト TFPI の cDNA クローニング

ヒト TMcDNA は、 λ gt 11 ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVECs) 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 TM cDNA を増幅し、クローニングした。得られた cDNA より推定されたアミノ酸配列から、ラット TM もヒト TM と同様に N 末端レクチン様ドメイン、6 個の EGF 様ドメイン、O 型糖鎖結合ドメイン、細胞膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインという 5 個のドメインから構成されていた。また、ラット TM はヒト、ウシ、マウス TM とそれぞれ、65.3%、62.0%、84.2% の相同性を有していた (図 1)。TM 分子内のシステイン残基の位置は完全に保存されていたが、推定される O 型糖鎖結合部位はヒト TM では 3 カ所存在するのに対して、ラット TM では 2 カ所であった。また、ラット白血球ゲノム DNA ライブラリーからも同一の cDNA が得られたことから、ラット TM もヒト TM と同様に遺伝子内にイントロンが存在しないことが示唆された。

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 サイトメガロウィルス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 (図 2)。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 を哺乳動物発現ベクターの pRC/CMV の Xba I 切断部位に挿入して作製した。こ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。

ヒト TFPI 発現ベクター (pRC/CMV-hTFPI cDNA) は、ヒト TFPI cDNA を哺乳動物発現ベクターの pRC/CMV の Bgl II 切断部位に挿入して作製した。この発現ベクターも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ポソームの調製

膜融合リポソームは、コレステロール、リン脂質および不活化センダイウィルスを用いて Nakanishi らの方法に従い調製した。すなわち、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸およびコレステロールを重量比で 5 : 1 : 3.1 の割合で混合し、クロロホルム : メタノール (9 : 1) に溶解後、有機溶媒を減圧除去したものを 36 mg を 2 ml のジクロロメタン : ジエチルエーテル = 47 : 53 の組成の有機溶媒で再溶解した。その後、10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA (BSS) に溶解したヒト TM 発現ベクター (pRC/CMV-hTMcDNA) を混合し、ロータリーエバポレータを用いて有機溶媒を除去することにより転相させ、再度 BSS で懸濁した後、生成したリポソームをショ糖密度勾配遠心法を用いて分画・回収した。得られたリポソーム画分に紫外線照射により不活化したセンダイウィルスを混合し、37°C で 2 時間反応させた後、ショ糖密度勾配遠心法を用いて分画し、膜融合リポソームを作製した。

(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。すなわち、ラットをペントバルビタール麻酔後、開腹し、門脈からカルシウムやマグネシウムを含まないハンクス溶液で環流して脱血し、0.05% コラゲナーゼおよび 0.005% トリプシンインヒビターを含むハンクス溶液で 37°C で 20 分間環流した。次に、肝組織を摘出し、クリーンベンチ内で細切後、肝実質細胞と非肝実質細胞を数回の低速遠心分離により分離し、最後に エルトリエーションロータを用いて類洞内皮細胞を分画した。得られた類洞内皮細胞分画を数回、20% ウシ胎児血清を含むウィリアムズ 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。こうして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た。細胞抽出液中のTM活性は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、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全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。この全RNAの一定量を鋳型とし、オリゴdTおよびreverse transcriptaseを用いて逆転写後、作製されたcDNAを鋳型としてヒトTM cDNAに特異的な一対のプライマーを用いてPCR法で増幅し、ethidium bromide存在下のアガロースゲル電気泳動後、写真撮影を行った。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Southern blot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)

ラットをベ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 μl)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%ウシ胎児血清を含むウィリアムズE培地で37°C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°Cで2時間、20%ウシ胎児血清を含むウィリアムズE

培地で培養後、pRC/CMV-hTM cDNA封入膜融合リポソームを37°C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、界面活性剤で可溶化後、ヒトTMの活性、抗原量、mRNA量を測定した。

C. 研究結果

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

ヒトTM cDNA発現ベクター封入膜融合リポソームのin vivo実験での遺伝子導入効果を検討するため、正常ラットの門脈からpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム溶液(50 μl)を注入し、6日後および10日後に肝類洞内皮細胞を単離し、この細胞におけるヒトTMの発現量(活性、抗原、mRNA)を測定した。

その結果、pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームの門脈内投与後、6日目の肝類洞内皮細胞にはTM活性およびTM抗原量の有意な増加が認められた($p < 0.05$)。しかし、投与10日後の肝類洞内皮細胞では、TM活性とTM抗原量の有意な発現はみられなかった(図3)。また、RT-PCR法を用いて測定したヒトTM mRNAも投与6日後の肝類洞内皮細胞では明らかな発現が認められたが、10日後の肝類洞内皮細胞では全く認められなかった(図3)。

現在、pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームを門脈から投与後、2、4、6、10日後のラットの肝類洞内皮細胞および肝実質細胞におけるヒトTMの発現を、モノクローナル抗ヒトTM抗体を用いた免疫染色法およびヒトTMをコードするRNAプローブを用いたin situ hybridization法で解析中である。

(2) 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)

pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームのin vitroでのラット肝類洞内皮細胞への導入効率を評価するため、単離した肝類洞内皮細胞をpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームで48時間処理し、その後、細胞に発現したヒトTMの活性、抗原およびmRNAを定量した。その結果、pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームで処理した肝類洞内皮細胞では、未処理のそれに比較してTMの活性と抗原量が有意に($p < 0.05$)増加していた(図4)。また、RT-PCR法を用いて測定したヒトTM mRNA量もpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム処理した肝類洞内皮細胞では増加していたが、未処理の類洞内皮細胞では発現量に変動は認め

られなかった(図4)。

D. 考察

本研究では、遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究の応用研究として、肝癌、肝炎、肝硬変等で異常患部の切除手術後に発生する肝障害の阻止を目指して、抗血栓性因子遺伝子をラットの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して実施した。この分担研究は開始されてから日が浅く、組織細胞へ導入する遺伝子の単離や遺伝子導入方法の検討等、研究は基礎的段階であるため、現段階で得られた研究成果は必ずしも充分ではない。しかし、これまでも今後の研究の発展に繋がる幾つかの成績が得られた。

まず、ヒトTMcDNA発現ベクター封入膜融合リボソームのラットの肝類洞内皮細胞への導入実験においては、そのTM遺伝子の最大発現時期と発現量から推測して、以下の点が今後の検討課題になると考えられた。ラット門脈への投与方法については、今回持ちいた方法では門脈内に投与されたリボソームがそこに存在する多くの血球と瞬時に融合して捕捉され、目的組織の類洞内皮細胞に充分量届かない可能性がある。また、真弓忠範 班員が指摘されたように、投与されたリボソームが血液中の蛋白質によっても破壊される可能性もある。したがって、リボソーム投与方法に関する今後の研究では、遺伝子封入リボソームを投与する直前に、門脈血流を一時遮断した後に門脈内を数 ml の生理食塩水等で洗浄して血液や蛋白質類を洗浄し、その後にリボソーム溶液を投与する必要があると考えられた。次にリボソーム投与後の類洞内皮組織での導入遺伝子の最大発現に要する時間の選定については、遺伝子の発現が予想よりも早く見られたことから、今後は投与後、1、2、4、6、8日後の肝類洞内皮細胞での発現遺伝子量、蛋白量、活性等を調査し、最大発現時間を選定する必要性が考えられた。

一方、ヒトTMcDNA発現ベクター封入膜融合リボソームの培養肝類洞内皮細胞への導入実験においては、遺伝子の導入効率と発現効率の問題を除けば取り合えず大きな解決すべき問題は無いものと考えられた。

今後は引き続いて、既に準備を完了しているヒトTFPI遺伝子発現ベクターやラットTM遺伝子発現ベクターを封入した膜融合リボソームを用いた実験を実施するとともに、LPS投与敗血症モデルラットや肝

部分切除ラット等に対する抗血栓性因子遺伝子の導入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。また、標的組織や標的細胞内での遺伝子導入効率と遺伝子発現効率をさらに高めるため、現段階では最適なベクターといわれるアデノウィルスベクターを用いた検討に移る必要性が考えられた。そのためには、研究の実施に関わる動物飼育施設等の諸問題を解決する必要性があろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Usui M, Hanamura N, Kuroda H, Higashiguchi T, Hayashi T, Suzuki K and Kawarada Y: Effect of prostaglandin I₂ analog on expression of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells and in endothelial cells of the canine liver and spleen after extensive hepatectomy. (in submitted)
- (2) Yuasa H, Tanaka H, Hayashi T, Wakita T, Nakamura H, Nishioka J and Suzuki K: Bovine protein C inhibitor, which has a different reactive site amino acid residue from other species, transiently inhibits plasmin. (in submitted)
- (3) Hayashi T, Nakamura H, Okada A, Wakita T, Yuasa H, Nogami M, Okumura K and Suzuki K: Organization of human endothelial protein C receptor gene and its chromosome location. (in submitted)

2. 学会発表

- (1) 湯浅浩行、白井正信、三枝章太郎、久米正根、川原田嘉文、林 辰弥、鈴木宏治：
LPS投与時の肝および類洞内皮細胞の抗血栓性低下機序の解析。
日本外科学会（平成11年3月発表予定）
- (2) 湯浅浩行、林 辰弥、鈴木宏治、山際健太郎、田岡大樹、伊佐地秀司、横井 一、川原田 嘉文：
重症感染症時における肝類洞内皮細胞でのプロテインS (PS) 産生の変動。
日本Shock学会（平成11年5月発表予定）

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