

遺伝子治療用DNA製剤の開発と 癌治療への応用

(H10-ゲノム-034)

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)
研究成果報告書

平成11年3月

主任研究者 吉 田 純
(名古屋大学医学部教授)

は し が き

本冊子は、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）「遺伝子治療用DNA製剤の開発と癌治療への応用」の報告書としてまとめたものである。

研 究 組 織

主任研究者： 吉田 純（名古屋大学医学部教授）

分担研究者： 萩原正敏（東京医科歯科大学教授）

分担研究者： 高橋利忠（愛知がんセンター研究所副所長）

分担研究者： 妹尾久雄（名古屋大学環境医学研究所教授）

分担研究者： 小林 猛（名古屋大学大学院工学研究科教授）

分担研究者： 寺川 進（浜松医科大学光量子医学研究センター教授）

分担研究者： 舛本 寛（名古屋大学大学院理学研究科講師）

研 究 経 費

平成10年度 30,000 千円

計 30,000 千円

総括研究報告書

遺伝子治療用DNA製剤の開発と癌治療への応用

主任研究者 吉田 純 名古屋大学医学部脳神経外科・教授

研究要旨

本研究は①安全で効率の良いDNA製剤の開発と②その臨床応用の2つを課題とし、癌治療の分野で遺伝子治療を実現させることを目的とした。

課題1：安全で効率の良いDNA製剤の開発

1：生物学的DNA製剤

①DNA製剤の安定性：DNA製剤のひとつであるリボソーム製剤の品質を臨床研究で使用できるレベルにまで向上させるため、(1)製剤の品質基準、(2)製剤の調製工程、(3)製剤調製室の設置について検討した。また製剤の調製工程を記した手順書を作成し、製剤の調製に必要な遺伝子治療製剤調製室を設計・建設した。この施設により調製された遺伝子治療用DNA製剤（プラスミド包埋リボソーム製剤）は臨床研究に十分耐えうる品質をもつことが証明された。また遺伝子の安定性について人工染色体の研究を通して評価した。その結果、効率の良い人工染色体の形成には50kb以上の連続した α 21-I配列が必要であることが判明した。さらにEBウイルスの複製開始点を挿入することで外来遺伝子を人工染色体上に簡便に導入できる可能性が示唆された。②DNA製剤の汎用性：DNA製剤に組織特異性を持たせる目的で作製されたリコンビナントsFv抗体の特異性を免疫染色及び組織内分布を観察することで確認した。③発現効率の向上と発現調節：リボソームとウイルスベクターとのコンビネーションにより遺伝子発現効率を増強させることが可能になった。また遺伝子発現調節機構としてHSP 70Bのpromoterでドライブされるプラスミドと磁性微粒子であるマグネタイトとのコンビネーションが有用であることが示された。④抗腫瘍メカニズムの解明：インターフェロン遺伝子をヒトグリオーマ細胞に導入することでアポトーシスが誘導されることが判明した。またこのアポトーシスに続いて二次性のネクローシスが生じることもわかった。同時にNF- κ BやCaspase 3及び8の上昇およびheat shock protein (HSP)の上昇を認めた。最近HSPが宿主の免疫を賦活するための重要なタンパクであることが報告されていることから、この事実は抗腫瘍メカニズムを解明する上で重要な手がかりになるものと思われた。

2：DNA製剤の細胞療法への応用

①Dendritic cells (DC細胞)の培養法を確立した。DC細胞への遺伝子導入にはAAVベクターがよいことがわかった。

課題2：臨床応用

悪性脳腫瘍、メラノーマ、肺癌等を対象に新たに開発されたリボソーム製剤を臨床研究可能なまでに品質を高めた。これにより臨床研究の実現に一歩近づいたと考えられた。

主任研究者：

吉田 純 名古屋大学医学部教授

分担研究者：

萩原正敏 東京医科歯科大学教授

高橋利忠 愛知がんセンター研究所副所長

妹尾久雄 名古屋大学環境医学研究所教授

小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科教授

寺川 進 浜松医科大学光量子医学研究センター教授

舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科講師

A. 研究目的

本研究事業は課題1：安全で効率の良いDNA製剤の開発と課題2：その臨床応用の2つをテーマとし、癌治療の分野で遺伝子治療を実現させることを目的とする。

課題1：安全で効率の良いDNA製剤の開発

1：生物学的DNA製剤

①DNA製剤の安定性：本研究事業で開発されてきたDNA製剤のひとつであるリポソーム製剤の品質を臨床研究で使用できるレベルにまで向上させるため、(1)製剤の品質基準、(2)製剤の調製工程、(3)製剤調製室の設置について検討する。さらにこれらの結果に基づいて調製された製剤について、その品質の検証を行う。また人工染色体の安定性に関連する因子を $\alpha 21$ -I配列の長さを目安に評価する。一方で人工染色体への外来遺伝子の導入におけるEBウイルス複製開始点の役割を検討する。

②DNA製剤の汎用性：癌治療全般に応用するため、各種癌細胞に発現している癌特異的抗原に対するリコンビナントsFv抗体を作製しリポソームと結合させる方法を確立する。これに先立ち、まずは作製されたリコンビナントsFv抗体の特異性及び組織内分布について検討する。

③遺伝子発現効率の向上：昨年来進められているハイブリッドベクターの開発研究のうち、アデノウイルスベクターあるいはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとリポソームをコンビネーションさせた新規ベクターについてその発現効率と組織内分布を調べる。一方で発現調節機構(TetRシステム、温熱発現調節システム等)をもったAAVベクターを構築し、その有用性も合わせて検討する。

④抗腫瘍メカニズムの解明：治療遺伝子、特にインターフェロン遺伝子を包埋したリポソーム製剤が導く抗腫瘍効果のメカニズムをビデオ強化型顕微鏡やFACS等を用いて検討する。

2：DNA製剤の細胞療法への応用

①本年度より新たにDNA製剤の細胞療法への応用をはかるため、強力な抗原提示細胞であるDendritic cells (DC細胞)の培養を開始し、この細胞に対する効率の良い遺伝子導入法を検討する。

課題2：臨床応用

悪性脳腫瘍、メラノーマ、肺癌等を対象にした遺

伝子治療の実現に努める。臨床研究の準備として名古屋大学医学部附属病院内に遺伝子治療製剤調製室を設置し、臨床研究用DNA製剤の調製をはじめめる。

B. 研究方法

課題1：安全で効率の良いDNA製剤の開発

1：生物学的DNA製剤

①DNA製剤の安定性：本研究事業で開発されてきたリポソーム製剤の品質を向上させるため、製剤の品質基準及び製剤の調製工程の手順書を作成し、これに基づいた製剤の調製法を検討した(吉田)。また人工染色体の安定性について $\alpha 21$ -I配列の長さを目安に評価した。一方で人工染色体への外来遺伝子の導入におけるEBウイルス複製開始点の役割を検討した(舛本)。

②DNA製剤の汎用性：作製されたリコンビナントsFv抗体の特異性及び組織内分布について検討した。特異性については癌特異抗原を発現している臨床検体を用いて免疫染色を行った。一方組織内分布については抗体をアイソトープ標識してマウス尾静脈より注入し、検討した。(吉田、高橋)。

③発現効率の向上と発現調節：昨年度の本研究で開発されてきたハイブリッドベクターのうち、アデノウイルスベクターとリポソームのコンビネーションについて発現効率と組織内分布を β -galactosidase遺伝子の発現をもとにin vitro及びin vivoで評価した。一方で発現調節機構(TetRシステム、温熱発現調節システム等)をもったAAVベクターを構築し、その有用性も同時に検討した(吉田、小林)。

④抗腫瘍メカニズムの解明：インターフェロン遺伝子をヒトグリオーマ細胞に導入した後の形態学的変化をビデオ強化型顕微鏡を用いてビデオに納め、詳細に検討した。FACSではアポトーシスの指標であるAnnexin VとPropidium Iodide (PI)の二重染色で細胞の性状を評価した。さらにNF- κ B及びCaspase 3と8の活性の経時的変化を検討した(吉田、寺川、妹尾)。

2：DNA製剤の細胞療法への応用

①本年度より新たにDNA製剤の細胞療法への応用をはかるため、強力な抗原提示細胞であるDendritic cells (DC細胞)の培養を開始し、得られた細胞の性状を解析した。またこの細胞に対する遺伝子導入法としてリン酸カルシウム法やリポソーム法、さらに各種ウイルスベクターを用いた方法を検

討した。

課題2：臨床応用

悪性脳腫瘍、メラノーマ、肺癌等を対象にした遺伝子治療の実現に向けた準備をはじめ。まずは「正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究」の早期実現のために、名古屋大学医学部附属病院内に遺伝子治療製剤調製室を設置し、臨床研究用DNA製剤の調製をはじめ。

C. 研究結果と考察

1：生物学的DNA製剤

①臨床研究用DNA製剤の調製：(1)製剤の品質基準は米国で行われている臨床研究を参考に、(a)吸光スペクトル (A260/A280) は1.75-2.0、(b) DNA濃度は90%以上、(c) 大腸菌由来のDNAはサザンプロット法により定量し、2%以下、(d) タンパク質はピシンコニン酸法により定量し、1%以下といった基準を昨年度作成したが、本年度はこれらの基準を常にクリアできるようプラスミド調製手順書を作成した。(2)製剤の調製工程の確立：製剤調製工程を詳細に記した手順書を作成した。(3)製剤調製室の設置：名古屋大学医学部附属病院内に遺伝子治療製剤調製室を設計・建設し、作成された手順書に基づいて実際に調製を行った。調製されたりポソーム製剤の品質については科研製薬株式会社分析を依頼し、その品質の評価を行った。評価項目としては性状、pH、浸透圧比、純度試験、発熱物質試験、無菌試験、生物活性、規格定量の試験項目を設けた。その結果調製された遺伝子治療用リポソーム製剤は臨床研究に十分耐えうるものと考えられた。また遺伝子の安定性について人工染色体の研究を通して評価した。その結果、効率のよい人工染色体の形成には50kb以上の連続したα21-I配列が必要であることが判明した。またEBウイルスの複製開始点を挿入することで外来遺伝子を人工染色体上に簡便に導入できる可能性が示唆された。

②DNA製剤の汎用性：DNA製剤に組織特異性を柔軟に持たせる方法としてリコンビナントsFv抗体（今回は脳腫瘍に高発現の認められるCD44と肺癌や乳癌に高発現の認められるdeletion-mutant EGFRに対するリコンビナントsFv抗体を使用）をリポソームに結合させる方法の確立を目指した。それに先立ち行われた抗体の特異性に関する免疫染色で、予

想通りの特異性が確認された。一方アイソトープを用いた組織内分布においても腫瘍特異性が確認された。またアシアロ蛋白をリポソームに取り込ませることで、ヒト肝癌細胞HepG2への遺伝子導入効率を、β-galactosidase活性として2-5倍増強させることにも成功した。このことはこのDNA製剤が肝細胞癌に応用できる可能性を示唆するものと考えられた。

③発現効率の向上と発現調節：ウイルスベクターとのコンビネーションではアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをリポソームに包埋することで、遺伝子発現効率を2.4倍増強することができた。これにより特異性のないAAVベクターに細胞特異性をもたせることが可能となった。また遺伝子発現調節可能なベクターの開発も試みた。具体的にはBluescriptをベースにHSP 70Bのpromoterでドライブされるインターフェロン-β発現プラスミドpBS-hsp-IFN-βを作製した。このプラスミドを磁性微粒子マグネタイトと同時にリポソームに包埋し、細胞内に導入後細胞をペレット状にして外から3850eの磁場を8時間あて再びシャーレにまき直した。40時間後インターフェロン-βの産生量をEIAにて測定し、10~20 IU/ml程度のインターフェロン-βの発現を確認した。以上の事実はリポソーム製剤の中に包埋するプラスミドを発現制御可能なものに置き換えることでより安全なDNA製剤が調製できることを示すものと考えられた。

④抗腫瘍メカニズムの解明：インターフェロン遺伝子をヒトグリオーマ細胞に導入することでアポトーシスが誘導されることが判明した。またこのアポトーシスの課程はNuclear and cytoplasmic condensation、Membrane blebbing、Cell shrinkage、Formation of apoptotic bodies and ballooningの各ステージに分類できることがわかった。さらにこのアポトーシスに続いて二次性のネクローシスが生じることもわかった。同時にNF-κBやCaspase 3及び8の上昇を認めた。またこのとき腫瘍組織内ではheat shock protein (HSP)の上昇が観察された。最近HSPが宿主の免疫を賦活するための重要なタンパクであることが報告されていることから、この事実は抗腫瘍メカニズムを解明する上で重要な手がかりになるものと思われた。

2：DNA製剤の細胞療法への応用

①本年度より新たにDNA製剤の細胞療法への応用を検討した。まずはマウス骨髄よりDendritic cells

(DC細胞) を分離する方法を確立した。得られた細胞の性状をFACSにて解析したところ、CD11c及びCD86陽性のDC細胞が90%以上のpopulationをもつことが確認された。またDC細胞への遺伝子導入にはAAVベクターが有用であることが確認された。このことはDC細胞を修飾した新しい免疫遺伝子治療の開発に大いに役立つものと考えられた。

D. 結論

以上のことから本研究事業で開発された遺伝子治療用DNA製剤(プラスミド包埋リポソーム製剤)は臨床研究に十分耐えうるものと考えられた。またリコンビナントsFv抗体や発現調節機構を組み込んだプラスミドあるいは人工染色体を利用することで汎用性が高まることが証明された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuno M, Yoshida J, Peter Colosi, and Gary J Kurtzman. Adeno-associated Virus Vectors Containing the Herpes Simplex Virus-thymidine Kinase Gene Cause Complete Regression of Intracerebrally Implanted Human Gliomas in Mice. *Jpn J Cancer Res* 89: 76-80, 1998
- 2) Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus vector by entrapment in multilamellar liposomes. *Jpn J Cancer Res* 89: 352-354, 1998
- 3) Bucur N, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshida J. Growth inhibition of experimental glioma by human interferon- β superinduced by cationic liposomes entrapping polyinosinic:polycytidilic acid. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38: 469-474, 1998
- 4) Ohta S, Yoshida J, Yamamoto S, Uemura K, Wakabayashi T, Mizuno M, Sakurai T, Terakawa S. Video-enhanced microscopic visualization of apoptotic cell death caused by anti-Fas antibody in living human glioma cells. *Brain Tumor Pathol* 15: 19-21, 1998
- 5) Mizuno M, Yoshida J. Effect of human interferon- β gene transfer upon human glioma transplanted into nude mouse brain involves induced

natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 47: 227-232, 1998

- 6) Wakabayashi T, Mizuno M, Yoshida J. Gene Therapy of central nervous system Tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38: 763-771, 1998

2. 学会発表

- 1) Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus vector by entrapment in multilamellar liposome 第4回日本遺伝子治療学会 平成10年6月4~5日 東京
- 2) 吉田 純 脳腫瘍の遺伝子治療 第57回日本癌学会総会 平成10年9月30日~10月2日 横浜
- 3) 夏目敦至、水野正明、立家康至、吉田 純 マウス脳内グリオーマモデルにおけるマウス β 型インターフェロン遺伝子による抗腫瘍効果と宿主腫瘍免疫の検討 第57回日本癌学会総会 平成10年9月30日~10月2日 横浜
- 4) 水野正明、中原紀元、吉田 純 アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳腫瘍に対する遺伝子治療の開発 第6回脳腫瘍遺伝子治療懇話会 平成10年9月19~20日 京都
- 5) 中原紀元、水野正明、夏目敦至、立家康至、吉田 純、寺川 進 アデノ随伴ウイルスベクターによるInterferon- β 遺伝子導入glioma cellの形態学的変化: ビデオ強化型微分干渉顕微鏡による解析 第6回脳腫瘍遺伝子治療懇話会 平成10年9月19~20日 京都
- 6) 夏目敦至、水野正明、立家康至、吉田 純 カチオニックリポソーム包埋 β 型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマの遺伝子治療の開発に関する研究: C57BL/6マウスを用いた検討 第2回基盤的癌免疫研究会 平成10年7月14~15日 名古屋
- 7) 中原紀元、水野正明、夏目敦至、立家康至、吉田 純、寺川 進

- Glioma細胞におけるFas誘導apoptosis：ビデオ強化型微分干涉顕微鏡による初期変化の観察
第57回日本脳神経外科学会総会 平成10年10月14～16日 札幌
- 8) 夏目敦至、水野正明、立家康至、吉田 純
カチオニックリポソーム包埋β型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマの遺伝子治療に関する研究：C57BL/6マウスを用いた検討
第57回日本脳神経外科学会総会 平成10年10月14～16日 札幌
- 9) 立家康至、水野正明、夏目敦至、吉田 純
アデノウイルスベクター・カチオニックリポソーム複合体によるヒトグリオーマ細胞への遺伝子導入
第57回日本脳神経外科学会総会 平成10年10月14～16日 札幌
- 10) 岡本健太、水野正明、中原紀元、夏目敦至、立家康至、吉田 純
Cationic liposomeのよるTNF-α遺伝子導入時におけるglioma細胞の形態変化
第57回日本脳神経外科学会総会 平成10年10月14～16日 札幌
- 11) 水野正明、中原紀元、夏目敦至、立家康至、吉田 純
遺伝子発現制御可能なアデノ 随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の開発と抗腫瘍メカニズムの解明
第57回日本癌学会総会、平成10年9月30日～10月2日 横浜
- 12) 中原紀元、水野正明、夏目敦至、立家康至、吉田 純
Interferon-β 遺伝子導入glioma cellの形態学的変化：ビデオ強化型微分干涉顕微鏡による解析
第57回日本癌学会総会、平成10年9月30日～10月2日 横浜
- 13) 夏目敦至、水野正明、立家康至、吉田 純
マウス脳内グリオーマモデルにおけるマウスβ型インターフェロン遺伝子による抗腫瘍効果と宿主腫瘍免疫の検討
第57回日本癌学会総会、平成10年9月30日～10月2日 横浜
- 14) 吉田 純
癌の遺伝子治療の現状と展望
第36回日本癌治療学会総会 平成10年10月9日 久留米
- 15) Masaaki MIZUNO, Atsushi NATSUME, Yasushi RYUKE, Jun YOSHIDA
Cytocidal effect of liposomes containing mouse interferon-beta gene on mouse glioma transplanted into mouse brain.
AANS, 1998 Seattle, WA, USA
- 16) Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, and Gary J Kurtzman
Gene therapy of brain tumors by means of AAV vectors containing herpes simplex virus-thymidine kinase (HS-tk) gene.
ASGT 1998 Seattle, WA, USA
- 17) Jun YOSHIDA, Masaaki MIZUNO, Atsushi NATSUME, Yasushi RYUKE.
Gene therapy of malignant glioma by means of cationic liposomes containing human interferon-β gene
ASGT 1998 Seattle, WA, USA
- 18) Yasushi RYUKE, Masaaki MIZUNO, Atsushi NATSUME, Jun YOSHIDA
Efficient gene transfer to glioma cells by mean of cationic liposomes entrapped with adenovirus or adeno-associated virus vectors.
ASGT 1998 Seattle, WA, USA
- 19) Atsushi NATSUME, Masaaki MIZUNO, Yasushi RYUKE, Jun YOSHIDA.
Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-β gene transfer against intracerebral glioma in mouse.
ASGT 1998 Seattle, WA, USA

分担研究報告書

遺伝子の発現調節機構の解明に関する研究

分担研究者 萩原正敏 東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授

研究要旨

遺伝子発現過程、特に転写がリン酸化反応によって制御されていると述べても、それに疑義をはさむ読者はいないであろう。我々自身も転写因子CREBをモデルとして、転写のリン酸化制御機構を解明してきたが、遺伝子発現は転写段階でのみ制御されているわけではなく、mRNAプロセッシング以降にもリン酸化制御ポイントが存在する可能性が高い。

A. 研究目的

1993年、Chriviaらがマウス脳cDNAライブラリーよりCBP (CREB binding protein)と名付けられた核蛋白をクローニングし、筆者がCBPはCREBのSer-133のリン酸化されたKID領域に選択的に結合すること明らかにした¹⁾。CBPはその後、中島さんの稿でも詳述されているように、種々の核蛋白と結合することが証明されているが、筆者が転写調節因子CREBの活性化機構の研究から得た根本的アイデアは、遺伝子発現に関わる核内蛋白の離合集散の調節にリン酸化、それもSerのリン酸化が使われているのではないかというものであった。本研究では、成熟mRNA産成を司るmRNA factoryの随所に顔を出すリン酸化調節機構の解明を目指した。

B. 研究方法

その多くがリン酸化蛋白であることが証明されつつある、スプライシング因子のリン酸化酵素について詳述する。同じ一次転写産物から選択的スプライシングによって、多様な最終産物が生み出されることから、選択的スプライシングの特異的制御も、転写に劣らず重要な意義を有するものと思われる。スプライシング因子として、RNPとよばれるRNA結合蛋白以外にも、直接RNAに結合しないがスプライシングパターンに影響を与える一群の核蛋白が見出されている。こうしたスプライシング因子は蛋白

間結合により、RNPなどと複合体を作っていると予想される。SRタンパク質は、選択的スプライシングにおいても不可欠なスプライシング因子である。このタンパク質は、セリン、アルギニンに富むRSドメインを持ち、この部位を介した蛋白間相互作用がスプライソソームの形成に重要であると考えられている。これらSRタンパク質の多くが細胞内でリン酸化を受けていることが示されており、特にSRタンパク質のひとつであるSF2/ASFは、ペプチドマッピングによる解析から、RSドメイン内の複数の部位でリン酸化されていることが確認されている。またSF2/ASFのU1snRNPへの選択的結合能は、リン酸化によって高まることが知られている。そこで、我々はSF2/ASFのRSドメインに直接結合しているリン酸化酵素が存在するのではないかと考え、以下に示したようなアッセイ方法を考案した。

Pull-down kinase assay法の概略

- (1)PBS中でタンパク質をインキュベートし、(例えばHeLa核抽出液とGST-SF2)タンパク質同志を結合させる。
- (2)溶液中にグルタチオンビーズを加え、GST融合タンパク質をおとす。この時、このタンパク質に結合している他のタンパク質が共におちる。
- (3)グルタチオンビーズを数回洗い、結合しなかったタンパク質を除く。

(4) [γ -³²P] ATP 存在下でリン酸化反応後、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより、リン酸化活性を検出する。

この "Pull Down Kinase Assay" により、HeLa 細胞抽出液中に SF2/ASF に結合する蛋白リン酸化酵素活性が存在することが判明したので、このリン酸化酵素を HeLa 細胞より GST-SF2 アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

C. 研究結果

GST-SF2 アフィニティークラムより高塩で溶出された SF2 リン酸化活性の位置に一致して、95kDa 蛋白が銀染色で main band して認められた。ウエスタンプロットにより、この 95kDa 蛋白が何者であるのか検討したところ、SRPK1 に対するモノクローナル抗体がこの 95kDa 蛋白に交叉することを見出した。SRPK1 は SF2 や SC35 などの SR ドメインをリン酸化する酵素として、1994 年に Gui らが HeLa 細胞より SR 蛋白リン酸化酵素を精製し、cDNA クローニングしたリン酸化酵素である。最近我々は、この SRPK1 と分裂酵母の細胞周期制御遺伝子 Dsk1 の高い相同性に着目して、マウス脳 mRNA より新規の SR 蛋白リン酸化酵素をクローニングし、SRPK2 と名付けている。大腸菌で発現させた SRPK1 と SRPK2 を用いて、GST-SF2 Pull-Down Kinase Assay を行うと、両酵素とも SF2/ASF に結合してリン酸化活性を示した。実際に細胞内でも SF2/ASF と SRPK が複合体を形成していることを、共沈実験で確かめている。この SF2/SRPK 複合体の形成には RS ドメインが必須で、RS ドメインのリン酸化状態により両者間の親和性が異なる。さらに面白いことには、CREB/CBP 複合体形成とは逆に、リン酸化されていない SF2/ASF と SRPK は複合体を形成するが、リン酸化された SF2/ASF と SRPK はもはや結合しなかった。これだけなら、単に、酵素と基質が結合したて、酵素反応が終わると解離するだけだとも理解できる。SRPK など SR 蛋白をリン酸化する酵素を過剰発現させた細胞内で、核内 speckle 様構造が崩壊し SF2/ASF は核外に移行する現象が観察されていた。ところが、ATP 結合部位を点突然変異により改変してリン酸化活性を喪失させた SRPK2K108R を HeLa 細胞内で発現させたところ、驚いたことに、核内で speckled pattern を示したいた SF2/ASF は核外に移行した。こ

の現象から、SF2/ASF の核外移行は、本稿で述べてきた SF2/ASF と SRPK の複合体形成によるためではないかと考え、SRPK1 の SF2 結合部位欠損ミュータント SRPK1553-580 を作製し、同様に HeLa 細胞内で発現させると、SF2/ASF は核内にとどまり speckled pattern を示した。

D. 考察

以上のことから、SR 蛋白の shuttling 機構の存在が予想される。すなわち、SRPK は細胞質に SR 蛋白をアンカーしており、SRPK が活性化されて SR 蛋白の RS ドメインがリン酸化を受けると、SR 蛋白が SRPK から解離して、核内に移行するものと思われる。実際、SRPK は M 期以外は不活性化状態にあると報告されている。その活性調節機構は不明だが、大腸菌より調製した recombinant SRPK は高い SR 蛋白リン酸化活性を示すことより、M 期にだけ解離するような不活化因子の存在が予想される。

では、SRPK による SR 蛋白 shuttling 制御はどのような生理的意義を有するのか？この問いに対する確たる答えはまだ持ち合わせていないが、我々の実験結果と Dsk が分裂期にのみ核内移行することから、SRPK ファミリーは細胞周期依存的な スプライソゾームの離合集散を制御しているのではないかと筆者らは考えている。細胞周期依存的に核内の SR 蛋白 (SRPK が SF2 以外のどの種の SR 蛋白と結合するかは現在検討中) の局在を変化させることが、ある種の遺伝子の成熟 mRNA を作る上で必要なのであろう。実際、dsRNA のインジェクションにより線虫で SRPK の発現を抑制すると、形態形成期で初期発生が止まる。また、その時期を生き延びた個体では、生殖巣欠損の表現形 (gonadless) を示す (未発表データ)。

E. 結論

転写制御だけでなく、mRNA プロセッシングにもリン酸化が重要な役割を果たしていることが示唆された。この制御ポイントを上手く利用することにより新しい遺伝子治療への応用が可能となるかもしれない。

分担研究報告書

一本鎖抗体ペプチドの調製

分担研究者 高橋利忠 愛知県がんセンター研究所・副所長

研究要旨

ヒトグリオブラストーマの一部の症例ではEGFR(Epidermal growth factor receptor)遺伝子の一部欠損が認められる。この変異遺伝子により産生される遺伝子産物を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを既に樹立しており、抗体遺伝子を単離し、組み換え型単鎖抗体の作製を試みた。大腸菌で産生された抗体の反応性を検索し、変異EGFRペプチド及び変異EGFR遺伝子を導入した細胞に特異的に反応することを確認した。

A. 研究目的

ヒトグリオブラストーマではEGFR遺伝子の発現上昇が認められるが、さらにその内の17%においてはEGFRの細胞外ドメインをコードする遺伝子の一部欠失が見い出されている。この欠失のため、再構成部位に一つの新しいアミノ酸、グリシンの発現が認められる。この変異EGFRは腫瘍細胞に特異的に発現しているため、腫瘍特異的な抗原性を持つ可能性があり、抗体を用いた腫瘍の画像診断やミサイル療法の標的として最適と考えられる。これまでの研究によりこの変異EGFR遺伝子産物と特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功し、また変異EGFRを発現するヌードマウス移植腫瘍を標的とした腫瘍集積性の検討でも良好な成績を示すことを確認している。生体内では全抗体分子に比し、F(ab)₂、あるいはFab等小さな分子の方がより集積性が良いことが知られており、臨床応用にあたってはこれら小さな抗体分子の作製が望まれている。また組み換え型抗体が作製できれば、抗体のヒト型化やトキシンとの融合蛋白としての抗体の作製など様々な修飾も容易となる。

そこで本研究は、この抗体の遺伝子の単離を行い、単鎖抗体(scFv)を作製し、次いで、これら抗体の臨床応用をめざした基礎的研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

抗体の遺伝子を単離するため、先ず精製したモノクローナル抗体を気相法によりN末から部分的にアミノ酸配列の決定を行った。得られたアミノ酸配列を基にKabatのデータベースを用いて配列の共通部分と異なる部分の検索を行った。この検索結果より抗体遺伝子単離のために本抗体に特異的な配列が3'端となるようにPCR用primerを設計し、ハイブリドーマから得られたRNAを用いてRT-PCRを行い、抗体遺伝子のクローニングを試みた。得られた抗体遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込み、大腸菌での抗体産生と精製を行った。産生された抗体の反応性は、本抗体作製時に免疫原として用いた変異EGFR合成ペプチドを標的抗原としたELISA法と、変異EGFR発現細胞を標的細胞とした免疫染色により検討した。

C. 研究結果

変異EGFRと特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマ細胞より得られたRNAを用い、RT-PCR法により、H鎖、L鎖のそれぞれの超変領域を含む抗原結合部をコードする遺伝子を単離した。抗体分子は(His)₆・L鎖・リンカー(15アミノ酸)・H鎖の順に配置し、発現させた。産生された蛋白をSDS-PAGE、並びにHisTagを標的としたWestern

blotting法により解析し、予想される分子量約29kDaに一致した抗体のbandを確認した。

大腸菌からはinclusion bodyとして抗体蛋白を得、refold後、本抗体に付加したHis Tagを利用して抗体を精製した。得られた抗体の活性をELISA法で検討し、scFvは蛋白濃度あたり親抗体分子の1/5の抗体価を持っていることを明らかにした。次いで本抗体のnativeな抗原に対する反応性を変異EGFR遺伝子導入細胞及びwild typeのEGFRを発現するヒト由来扁平上皮癌株を対象としてMHA法により検査したところ、親抗体と同様に変異EGFR遺伝子導入細胞にのみ陽性反応を得、変異遺伝子産物に対する反応性を確認した。さらに本抗体による免疫染色も施行し、本遺伝子異常を示すヒトグリオブラストーマ1症例の腫瘍組織に陽性染色を認めた。

D. 考察

ヒトグリオブラストーマに発現が認められる変異EGFR遺伝子産物に特異的に反応するモノクローナル抗体由来のscFvの作製に成功した。可溶化抗体の免疫染色からその特異性も保たれていることが確認され、正しい抗体遺伝子が単離されていることが示された。昨年度での研究では、活性を持つ抗体が極めて少量しか得られなかったが、本年度は可溶化とrefoldingの方法を改良することに成功し、大量の可溶化蛋白抗体を得ることが可能となった。今後は、本抗体を基礎とした応用研究を開始する計画であり、まず、遺伝子治療に有用なイムノリポソームの作製に利用可能か検討したい。

E. 結論

変異EGFR遺伝子産物に特異的に反応するモノクローナル抗体産生性ハイブリドーマより抗体遺伝子の単離に成功し、さらにscFvの作製に成功した。抗体の反応特異性も保たれており、遺伝子治療への臨床応用が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsudomi, T., Suzuki, S., Yatabe, Y., Nishio, M., Gotoh, K., Hatooka, S., Shinoda, M., Suyama, M., Ogawa, M., Takahashi, T., Ariyoshi, Y., Takahashi, T.: Clinical implication of p53 antibodies in sera of patients with non-small cell

lung cancer. J. Natl. Cancer Inst., 90: 1563-1568, 1998.

分担研究報告書

悪性脳腫瘍に対するサイトカイン遺伝子療法

分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所・教授

研究要旨

Tumor necrosis factor α (TNF α)は悪性脳腫瘍に対し、増殖抑制効果を示し、脳腫瘍のサイトカイン療法として用いられている。しかしながら、脳腫瘍細胞によってTNF α に対する感受性に差異を認め、治療の障害となっている。我々は既に、脳腫瘍細胞のサイトカインに対する感受性の差異とTNF α による転写因子NF-kBの誘導およびそのNF-kBによる転写活性化能の差異を検討し、抵抗性株では活性型のNF-kBが誘導されていることを示した。本研究では、この活性化されたNF-kBを抑制することにより、TNF α の抗腫瘍効果を増強させ得るか否かについて検討した。まず、NF-kBの転写活性化能を抑制するドミナントネガティブNF-kBを発現するcDNA (p65 DN)を構築し、その発現量を昆虫ホルモンであるエクダイソンの濃度依存性に調節することができる発現ベクターに挿入し、TNF α 抵抗性株であるU251-MGに導入し、stable transformantを選択した。得られた1つのクローンにおいて、エクダイソン濃度依存性にドミナントネガティブNF-kBの発現誘導が認められ、TNF α により活性化されたNF-kBの機能を阻害した。TNF α の抗腫瘍効果をWSTアッセイ法により検討すると、エクダイソン投与によりp65 DNを誘導しNF-kBを阻害した場合にTNF α の細胞増殖抑制効果が増強された。以上より、TNF α の抗腫瘍効果には活性化されたNF-kBが関与し、それを抑制することにより抗腫瘍効果を改善できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

サイトカインであるTNF α を用いて悪性脳腫瘍の治療が行われているが、腫瘍細胞によってそれらに対する反応性が異なることが知られている。TNF α の作用経路のひとつとして、近年、細胞内の活性酸素種の増加を経て最終的には転写因子であるNF-kBの活性増加を引き起こす系が注目を浴びている。我々は、これまでにTNF α に対する感受性の差異とNF-kBの活性化の関連を検討した結果、TNF α 抵抗性株では活性型のNF-kBが誘導されることを見出した。

本研究では、TNF α の抗腫瘍効果に対する抵抗性をNF-kBの活性化を抑制することにより改善できるか否かについて、TNF α 抵抗性株に昆虫ホルモンで

あるエクダイソンの濃度依存性によりNF-kBの活性化を抑制できるプラスミドを導入し、stable transformantを作成して、TNF α による抗腫瘍効果がNF-kBの抑制によりどのように変化するかを検討した。

B. 研究方法

活性型NF-kBであるp65のカルボキシル端には転写活性化部位が存在する。従って、その部位を欠失させることにより、活性化されたNF-kBの機能を抑制するドミナントネガティブNF-kB (p65 DN)を発現するcDNAを構築した。p65 DNのNF-kBに対する抑制効果を確認した後、そのcDNAをecdysone inducible mammalian expression system (Invitrogen)のベクター

(pIND)に挿入した。このプラスミドとpVg RXRプラスミドをTNF α 抵抗性株U251-MGへ遺伝子導入し、この2つのプラスミドをゲノムに保持する細胞をZeocinとG418により選択し、stable transformantを得た。

得られたstable cell lineにエクダイソンを投与して24時間後に核抽出液を作成し、NF-kB結合オリゴを用いたゲルシフト法によりp65 DNの誘導の有無を検討した。さらに、TNF α の添加により誘導されるNF-kBの転写活性化能がp65 DNによりどのように変化するかについて、ゲルシフト法ならびにNF-kB応答性ルシフェラーゼ遺伝子を用いたトランスフェクション法により解析した。

エクダイソン添加によりp65 DNを発現誘導した場合のTNF α の抗腫瘍効果の変化をWSTアッセイ法により検討した。

C. 研究結果

TNF α 抵抗性株U251-MGにドミナントネガティブNF-kB (p65 DN)誘導可能なstable transformantを選択したところ、4つのpositive cloneを得た。エクダイソンを投与してそれらクローンにおけるp65 DNの発現誘導を検討すると、1つのクローンにおいてエクダイソンの濃度依存性にp65 DNの誘導が認められた。その他の3つのクローンでは恒常的にp65 DNが発現していたり、またエクダイソンによるp65 DNの誘導が認められないものであった。

エクダイソンによりp65 DNの発現が誘導できるクローンを用いて、p65 DNの発現誘導がNF-kBの活性化を抑制するかについて検討した。その結果、ゲルシフト法ではTNF α 添加により活性化されるp50-p65 heterodimer NF-kBの結合が、エクダイソンにより誘導されるp65 DNにより減少した。

NF-kB応答性ルシフェラーゼ遺伝子を用いたトランスフェクション法では、TNF α 添加により増加するルシフェラーゼ活性が、エクダイソンによるp65 DNの発現誘導により減弱した。

p65 DN発現誘導株は親株U251-MGと同様にTNF α に耐性を示した。一方、エクダイソン添加によりp65 DNの発現を誘導した場合には、TNF α の細胞増殖抑制効果が認められ、そお抑制はエクダイソンの濃度依存性に増強した。

D. 考察

TNF α を用いた脳腫瘍治療におけるひとつの問題点として、脳腫瘍細胞間のTNF α に対する感受性の差異が挙げられる。今回、TNF α の抗腫瘍効果に対する抵抗性がTNF α により誘導される転写因子NF-kBによる可能性について検討し、NF-kBの活性化を阻害することによりTNF α の抗腫瘍効果が増強することを見出した。TNF α の抗腫瘍効果に関わる経路とNF-kB発現を誘導する経路が異なり、NF-kB発現誘導が抗腫瘍効果に対する抵抗性に関わっていることが脳腫瘍において明らかにされた。

このことより、脳腫瘍治療に際してNF-kBの活性化を抑制する薬剤を用いることは、TNF α による抗腫瘍効果を増強する有効な補助的療法となり得ることが示唆された。今後、NF-kBの活性化が如何なる機序によりTNF α に対する抵抗性に関与しているかを解明することにより、抗腫瘍効果抵抗性改善の観点からの新たな脳腫瘍治療の可能性を追求したい。

E. 結論

脳腫瘍細胞株におけるTNF α 抵抗性が転写因子NF-kBの活性化を阻害することにより改善することを示し、TNF α 治療における抗腫瘍効果増強の補助的療法となり得ることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Activation of transcriptionally active nuclear factor-kappa B by tumor necrosis factor- α and its inhibition by antioxidants in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinology* 139(4): 1715-1722, 1998.
- 2) TNF- α increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kB in osteoblast like ROS17/2.8 cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 13(8): 1290-1299, 1998.
- 3) Inhibition of vitamin D3-dependent induction of osteocalcin and osteopontin gene expression by TNF α in osteoblastic cells. *Environmental Medicine* 42(1): 8-10, 1998.
- 4) Establishment of a stable human glioma cell line expressing an inducible dominant negative form of NF-kB by *Dorosiphila* steroid hormone (ecdysone). *Environmental Medicine* 42(2): 111-114, 1998.
- 5) Activation of NF-kB TNF- α in human chondrosarcoma HCS-2/8 cells. *Environmental*

2. 学会発表

- 1) TNF α の抗腫瘍効果と転写因子NF-kBの発現との関連. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998. 6. (福岡)
- 2) 活性型NF-kBの抑制によるTNF α の抗腫瘍効果: 神経膠腫細胞を用いた検討. 第57回日本癌学会総会, 1998, 9. (横浜).
- 3) ヒトグリオーマ細胞株におけるTNF α の抗腫瘍効果と転写因子NF-kBの発現との関連. 第57回日本脳神経外科学会総会, 1998. 10. (札幌)
- 4) Activation of transcriptionally active NF-kB by TNF- α and its inhibition by antioxidants in rat thyroid FRTL-5 cells. 5th International Symposium on Molecular Thyroidology, 1998. 3. (名古屋)
- 5) 甲状腺細胞におけるTNF α によるNF-kB活性化に対する抗酸化剤の影響. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998. 6. (福岡)
- 6) Low T3症候群の発症機序の解明: 活性型NF-kBによる甲状腺ホルモン受容体(TR)機能の抑制. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998. 6. (福岡)
- 7) 骨芽細胞における転写因子NF-kBの活性化によるビタミンD3作用の抑制. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998. 6. (福岡)
- 8) ラット骨芽 細胞様細胞株(ROS17/2.8)における転写因子NF-kBを介したTNF α によるIL-6およびICAM-1遺伝子発現の活性化. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998. 6. (福岡)

分担研究報告書

電磁波で誘導可能なサイトカイン遺伝子治療法の開発 分担研究者 小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科・教授

研究要旨

温熱に感受性を持ち、遺伝子発現を誘導するプロモーターを組み込んだ遺伝子治療用プラスミドを作製し、電磁波による誘導効果について検討した。電磁波に感応して磁性微粒子が発生した熱により組み込んだ遺伝子の発現は最大18倍向上した。

A. 研究目的

本研究では新しい遺伝子治療法である温熱遺伝子治療法の遺伝子導入用担体として、電磁波で発熱する磁性微粒子を包埋したリポソームの作成を行っている。本年度はその遺伝子発現のコントロールに関する検討を行った。具体的には、化学薬剤や活性酸素により誘導されるプロモーターであるGADD153の下流にルシフェラーゼ遺伝子に組み込んだプラスミドを用い、温熱処理による遺伝子の発現誘導を試みた。そして処理温度と時間を変え、目的遺伝子の発現に最適な条件を検討した。

B. 研究方法

ルシフェラーゼ遺伝子をコードしたピッカジーンプラスミド（東洋インキ）の上流にGADD153プロモーターを挿入し、プラスミドpGADLucを作成し、実験に用いた。宿主細胞としてマウス繊維芽細胞株NIH-3T3細胞を用いた。遺伝子導入はカチオニックリポソーム法を用いた。これはフォスファチジルコリンジラウレート（DLPC）・フォスファチジルエタノールアミンジオレイル（DOPE）・N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタミン酸（TMAG）の3種の脂質を2：2：1に混合して作ったりポソームにプラスミドを添加してプラスミド-カチオニックリポソーム複合体を調製して、細胞培養液に添加することにより行った。使用細胞株としてはヒトグリオーマ細胞株U251-SP及びU87-MG株を用いた。

実験は次のように行った。まず癌細胞を100 mmシャーレ上で24時間増殖させ、ついでそれぞれシャーレにプラスミド-カチオニックリポソーム複合体（0.2 mg/ml）を加え、遺伝子導入を行った。遺伝子導入開始60時間後、細胞を培養したシャーレをパラフィルムで密封した後、温浴に浸して温熱処理を行った。温熱処理は39、41、43及び45℃で処理時間を変えて行った。温熱処理後、経時的に細胞をサンプリングし、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定は市販のルシフェラーゼ測定キットを用いた。また、生細胞数はトリパンブルー色素排除法により行った。

C. 研究結果

39℃での加温では6時間の温熱処理を施したにもかかわらず、最大でもコントロールの4倍程度にしか遺伝子発現は誘導されなかった。さらに温度を高め、41℃で加温した場合、4時間の処理で24～26時間後に最大10倍、43℃加温では1時間の処理で最大18倍と非常に高いルシフェラーゼ活性のピークが観察された。なお、43℃で1時間の処理によって生細胞の35%程度は死滅した。しかしながら、45℃加温では温熱処理24時間目までにはほとんど遺伝子誘導のピークは観察されなかった。45℃加温ではほとんどの細胞は死滅したため、組み込んだ遺伝子の発現が認められなかったのも当然のことと考えられる。以上の結果より、GADD153プロモーターの誘導には細胞が死滅してしまうよりも若干低い温度である

43℃、1時間程度の温熱処理が有効であることがわかった。

D. 考察

GADD153 プロモーターは本来活性酸素などDNAにダメージを与える条件下に置いて誘導されるプロモーターであるが、本研究において温熱処理を行ったところ、最大18倍という高い発現誘導が認められた。本研究ではGADD153 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組込んだ場合について検討したが、インターフェロン遺伝子または腫瘍壊死因子遺伝子を組込んで実験する必要があるだろう。電磁波で発熱する磁性微粒子を包埋したリポソームによる温熱療法だけではガン組織を死滅できない場合には、他の治療法との併用も考慮したらよいと考えられる。遺伝子治療との併用の場合、その発現をコントロールできる方が安全性の面で有効であろう。この点で、正常細胞に毒性を及ぼさない電磁波によるコントロールは有用であろう。また、本実験で示されたように、細胞が温熱で死滅するよりも少し低い温度処理によって37℃の場合と比較して20倍近くも発現が促進される温熱遺伝子療法は効果的であろうと考えられる。

E. 結論

GADD153 プロモーターを組み込んだプラスミドの温熱による遺伝子発現誘導について検討した。41℃で加温した場合、4時間の処理で24~26時間後に最大10倍、43℃加温では1時間の処理で最大18倍と非常に高い遺伝子発現誘導が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. A. Bouhon, A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayshi : Hyperthermic induction of gene expression using stress inducible promotor, Proceeding of JAACT'98, (1998), in press

2. 学会発表

- 1) I. A. Bouhon, A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayshi : Hyperthermic induction of gene expression using stress inducible promotor, JAACT98 at Nagoya Program & Abstracts (1998)

分担研究報告書

ビデオ強化型微分干渉顕微鏡を用いた解析

分担研究者 寺川 進 浜松医科大学・光量子医学研究センター・教授

研究要旨

細胞外からカチオン化リポソームに封入したDNAが細胞内に取り込まれ核に達する様子を光学顕微鏡的に追跡した。その結果、核のDNAの観察には共焦点顕微鏡が、またリポソーム中のDNAの観察と細胞膜におけるリポソームの融合反応の観察には、エバネッセンス顕微鏡法がそれぞれ適していることがわかった。

A. 研究目的

細胞外からカチオン化リポソームに封入したDNAが細胞内に取り込まれ核に達する様子を光学顕微鏡的に追跡することを目的に、細胞内のDNAを蛍光顕微鏡的に観察する手法を模索した。

B. 研究方法及び結果

DNAと結合性のあるといわれる Hoechst 33374、YOYO、CYTO、trypan blue、acridine orangeなどを、大脳皮質の神経細胞とグリア細胞の単離培養した標本に、生きた状態で投与し、細胞核の染色性を比較した。Trypan blueは細胞膜の壊れたときのみ核内に取り込まれた。Acridine orangeは細胞内酸性顆粒により強く取り込まれ、核には入らなかった。HoechstとYOYOの核染色は比較的高かったが最もよい結果を出したのはCYTOであった。

細胞内の分子レベルの蛍光を検出する方法として、最も明るい落射照明蛍光顕微鏡法、細胞を切断したようなイメージをリアルタイムで構成できるニポードディスク走査型共焦点蛍光顕微鏡法、我々自身が開発し細胞膜直下を抜群のコントラストで観察できるエバネッセンス光照明蛍光顕微鏡法について、各色素の見え方を比較検討した。その結果、核のDNAの観察には共焦点顕微鏡が適しており、DNAアセンブリーの4次構造が核内で不均一なものとなっていることがわかった。また、リポソーム中のDNAの観察と細胞膜におけるリポソームの融合反応の観

察には、エバネッセンス顕微鏡法が適していることがわかった。

C. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Terakawa, T. Sakurai, K. Kumakura Exocytosis of adrenal chromaffin cells observed with a video-enhanced differential interference contrast microscope and a fluorescence microscope. *Adrenal Chromaffin Cell: archetype and exemplar of cellular signalling control.* (ed. By T. Kanno) Hokkaido-University Press, pp. 375-382. 1998
- 2) H. Mitsuoka, T. Sakurai, S. Terakawa, S. Nakamura, H. Kaneko, N. Unno, S. Baba. Intravital confocal microscopy of the pulmonary edema resulting from intestinal ischemia reperfusion in the rat. *Critical Care Medicine* 26, in press.
- 3) 寺川 進 ビデオ強化顕微鏡一分解能の限界を超えて バイオイメージング ニューバイオフィジクスシリーズ 共立出版 pp. 49-60. (1998)

2. 学会発表

- 1) Mitsuoka, T. Sakurai, S. Terakawa, S. Nakamura, H Kaneko, N. and Unno, S. Baba, Intravital confocal microscopy of the pulmonary edema resulting from intestinal ischemia reperfusion in the rat. 27th Education and scientific symposium, Society

- of Critical Care Medicine, Critical Care Medicine
26, A76. 1998.2.4-8. (San Antonio)
- 2) 寺川 進 トランスミッター放出の光学イメージング 生体物理シンポジウム 日本物理学会 第53回年会1998.3.30 (習志野)
 - 3) 櫻井孝司、菊田敏輝、寺川進、熊倉鴻之助 クロマフィン細胞におけるマルチモードエキソサイトーシス 第75回日本生理学会 1998.3.26-28 (金沢)
 - 4) 坪井貴司、櫻井孝司、菊田敏輝、寺川進 エバネッセント光によるクロマフィン細胞の開口放出反応可視化の試み 第75回日本生理学会 1998.3.26-28 (金沢)
 - 5) 寺川 進、M. B. Feller, L.M.Mannuzzu, E.Y. Isacoff. エバネッセンス顕微鏡法による単一Kチャネル・ゲーティングの可視化. 第21回日本神経科学・第41回神経化学学会合同大会 1998.9.21-23 (東京)
 - 6) 坪井貴司、菊田敏輝、櫻井孝司、寺川 進 エバネッセンス顕微鏡による開口放出反応の可視化 第21回日本神経科学・第41回神経化学学会合同大会 1998. 9.21-23 (東京)
 - 7) 山本清二、寺川 進、櫻井孝司、松村伸治 スーパーオキシドに無関係なグルタミン酸神経毒性の早期過程。第21回日本神経科学・第41回神経化学学会合同大会 1998. 9.21-23 (東京)
 - 8) 寺川 進 高開口数対物レンズの共焦点顕微鏡とエバネッセンス顕微鏡への応用 分子神経科学方法論のCutting edge シンポジウム 第21回日本神経科学・第41回神経化学学会合同大会 1998.9.21-23 (東京)
 - 9) 吉田孝人、櫻井孝司、河野栄治、寺川 進 共焦点レーザー顕微鏡によるPDT細胞死のin vitro解析 PDT cell death in vitro observed with a color CCD camera under a confocal laser video-microscope. The 4th international porphyrin-heme symposium. 1998.10.2-3. (Yonago)
 - 10) Terakawa Direct observation of exocytosis of chromaffin granules by using an objective lens of high numerical aperture and evanescence microscopy. International Symposium on Biomedical Photonics 1998.10.2-4 (Heidelberg)
 - 11) 寺川 進 光学顕微鏡の新技術：動的反応への応

用 教育講演 第62回日本皮膚科学会東部支部
総会・学術大会 1998.11.1 (浜松)

分担研究報告書

遺伝子治療をめざしたヒト人工染色体の開発に関する研究
分担研究者 舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科・講師

研究要旨

分担研究者はヒトセントロメア由来DNA配列と酵母人工染色体(YAC)技術を用い、ヒト培養細胞中で染色体外に安定保持される人工染色体(MAC)を開発した。本研究課題ではMACを用い染色体安定保持に必要な配列の解明を行うとともに、MAC内に任意の遺伝子を組み込み加工しヒト細胞へ導入し細胞を安定に形質転換する技術の開発を進めた。

A. 研究目的

本研究課題では、MACを各種ヒト細胞やマウス受精卵などに導入し染色体安定維持の機構解明をめざすと共に、MACを用いた染色体工学を進展させ遺伝子治療へ応用する技術の開発を行うことを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1. 染色体安定維持に必要な機能配列の限定:ヒト人工染色体を効率よく形成するYACの挿入配列であるヒト染色体セントロメアに由来するDNA配列(アルフォイドDNA)の欠失シリーズを作成し、ヒト培養細胞へ導入し、人工染色体形成に必要な配列の限定を進めた。

2. MACを用いた染色体工学: MAC前駆体YACへ任意の遺伝子を導入する技術の開発を進めるため、酵母細胞内での相同組換えを利用して、EBウイルス複製開始点を前駆体YACへ挿入する研究を行った。

C. 研究結果

1. YACにクローン化したヒト染色体セントロメアに由来するアルフォイドDNA($\alpha 21-I$)の欠失シリーズ(80、50、30、10kb)をそれぞれヒト培養細胞に導入したところ、50kb以上の $\alpha 21-I$ 配列を含むクローンでは効率よく人工染色体を形成し、30kbのクローンでは効率の低下が観察され、10kbのクローンでは

人工染色体が殆ど形成されなかった。

2. YAC前駆体YACへ酵母細胞内での相同組換えを利用して、EBウイルス複製開始点(oriP)を挿入することに成功した。

D. 考察と結論

ヒト染色体セントロメアに由来する $\alpha 21-I$ アルフォイドDNAはヒト細胞へ導入すると人工染色体を形成するが、効率のよい人工染色体形成には50kb以上の連続した $\alpha 21-I$ 配列が必要であることが判明した。 $\alpha 21-I$ アルフォイドYACへEBウイルス複製開始点(oriP)を挿入することに成功したことから、人工染色体上へ外来遺伝子を同様の方法で簡便に導入できる可能性が開けた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Masumoto, M. Ikeno, M. Nakano, T. Okazaki, B. Grimes, H. Cooke and N. Suzuki: Assay of centromere function using a human artificial chromosome. *Chromosoma*, 107,406-416 (1998)
- 2) M. Ikeno, B. Grimes, T. Okazaki, M. Nakano, K.Saitoh, H. Hoshino, N. McGill, H. Cooke and H. Masumoto: Construction of YAC based Mammalian Artificial Chromosomes. *Nature Biotech.*,16, 431-349 (1998)