

厚生科学研究費補助金 (ヒゲラム・遺伝子治療研究事業)
総括研究報告書

難治がん・進行がんに対する生体内標的遺伝子治療の戦略の研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 現在の遺伝子治療は腫瘍免疫賦活療法と、基本的に局所療法である自殺遺伝子治療に集中しており、有効性が期待できるがんは限られている。本研究では体内に浸潤・播種している固形がんの標的治療の確立を行う。今年度の主な研究成果は下記の通りである。①血管内皮細胞の分子細胞生物学的特徴を利用して、がんの血管新生を標的とした遺伝子治療を開発する目的で、指数増殖期にある分化した血管内皮細胞で発現している新規Kruppel型転写因子を同定し、UKLFと名付けた。UKLFは核移行シグナルをzinc finger領域の前に持ち、転写促進活性を持つ遺伝子であることを示した。②アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスはK-ras遺伝子異常のある膵がん細胞に特異的に増殖抑制効果を示し、かつアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに膵がんの腹膜播種モデルにおけるこのベクターの腹注、同肝転移巣モデルに対する静注により、腫瘍抑制効果を示した。③治療適切除を受けた膵がん患者の内、細胞膜表面の糖蛋白質CD44のvariant form v6とv2の発現が陽性の症例は予後が不良であることを見だし、遺伝子治療等の新しいsurgical adjuvant therapyの適応となることを示唆した。④腫瘍細胞に対するin vivo遺伝子標的を目的として、増殖する腫瘍細胞の表面に高発現しているトランスフェリン受容体のligandであるトランスフェリンに自殺遺伝子HSV-TK DNAを結合させた複合体を効率よく作製する方法を確立した。この複合体を担がんマウスに投与したところ、抗腫瘍効果および延命効果が認められた。⑤部位特異的組換え酵素Creによる遺伝子置換反応を応用した新しいE1欠損型アデノウイルスベクター作製法を確立した。遺伝子導入した293細胞の3回の継代で約70%の目的ウイルスを得た。また、293細胞を用いた限界希釈法で簡便に目的ウイルスを単離できることも示した。⑥腫瘍の特異的な標的化を目指した3系統の遺伝子治療ベクターを開発した。(i) アポトーシス誘導療法としては、p53関連遺伝子 (p53, p73, p33ING1など) を発現する組み換えアデノウイルスを用いて腫瘍に効果的にアポトーシスを誘導できることを示した。(ii) 腫瘍抑制遺伝子p53, Rb/p16の変異を標的化することを目指してE1A・E1B変異型ウイルス (AxdAdB3) を作成した。これはE1B55K単独欠失ウイルス (AxE1AdB) に比べて、腫瘍細胞に対して強い細胞傷害活性が見られた。(iii) 変異アデノウイルスとして、ファイバーのC末端にメラノサイト刺激ホルモン (MSH) の付加を持つAx-F/MSH株の作成に成功し、悪性黒色腫への高効率の遺伝子導入が可能となった。⑦プラスミドベクターを成体親和材料である担体アテロコラーゲンに保持させた形で生体内に導入し、プラスミドベクターの生体内安定性を確保し、かつ徐放化することで生体への遺伝子導入と発現の期間を制御し、生体でのベクターの有効性を高める系の開発を行った。

分担研究者

小菅 智男	国立がんセンター病院	部長
新津洋司郎	札幌医科大学	教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所	助教授
濱田 洋文	(財) 癌研究会癌研究所	部長
落谷 孝広	国立がんセンター研究所	室長

A. 研究の目的

難治がん及び進行期がんの治療成績は早期診断や術後ケアの改善の進歩・普及により少しずつ改善しているが、治療法そのものに関しては従来の外科・化学・免疫・ホルモン・放射線療法の限界が明らかになってきており、新しい原理に基づく治療法の開発が焦眉の課題である。また、社会の急速な高齢化に伴い、優れたがん細胞殺傷・抑制効果と並んで、患者にとってより侵襲の少ない、高いQOLを実現する治療法が必要とされている。このような現代のがん治療の重要課題に対する回答の一つは、がん細胞に高い標的性を持つ治療法を確立することである。

遺伝子治療の戦略にはがん細胞やベクターの特質に基づく様々な標的機構を組み込める可能性があり、その研究の必要性は高い。今までに臨床研究が進められてきたがん遺伝子治療法は免疫賦活療法と自殺遺伝子治療がほとんどを占めるが、いずれも有効性が確立された例は未だない。特に固形がん、特に消化器系固形がんで体内に播種したものを標的とする治療法の研究は今後の重要課題となっている。加えて、播種したがん細胞を狙って生体内で遺伝子導入を行う場合には、必要に応じて遺伝子導入を効率よく停止する安全機構も不可欠である。これらの要求に応え、本研究では複数の方法論を検討し、かつそれらを適宜組み合わせ、難治・進行固形がんに対して標的性、有効性、安全性の3点で優れた治療法を確立することを目的とした基礎研究を行う。

今年度の具体的研究目的は下記の通りである。①がんの血管新生の抑制の標的となりうる血管内皮細胞に発現しているKruppel型転写因子の同定と解析、②膵がんのsurgical adjuvantとしての局所的遺伝子治療の開発、③遺伝子治療などの先進のsurgical adjuvant療法が適応となる膵がんの予後不良群の把握、④新規トランスフェリン (Tf) -DNA複合体によるin vivo標的自殺遺伝子治療の開発、⑤Cre-loxP系を利用した、高効率アデノウイルスベクター作製法の開発、⑥アポトーシス誘導遺伝子治療とがん抑制遺伝子異常、細胞表面受容体を標的にした腫瘍特異的遺伝子治療の開発、⑦生体親和物質包埋プラスミドベクターによる生体内発現制御システムの開発。

B. 研究の方法

上記「A. 研究の目的」で掲げた研究目的順に、研究方法を述べる。①Kruppel型転写因子 (Kruppel-like transcription factor: KLF) は組織特異的な発現を示すものが多く、また造血系など発生や分化と深く関わっている可能性の高い転写因子である。既知のKLFの間で高度に保存されているzinc fingerドメインにdegenerate oligonucleotideプライマーを設定し、RT-PCR法を基にして、ヒト臍帯静脈内皮細胞

(HUVEC) において発現しているKLFを同定した。遺伝子産物の細胞内局在については、cDNAの5'末端にGreen Fluorescence Protein (GFP)ユニットを連結してNIH3T3細胞にトランスフェクションして解析した。転写制御能については、Gal4蛋白質のDNA結合部位との融合蛋白質を発現するプラスミドを作り、Gal4結合部位とCATレポーター遺伝子を結合したプラスミドと共に293T細胞、NIH3T3細胞にトランスフェクションして解析した。

②正常ヒトK-ras遺伝子exon 1、2及びexon 3の一部

からなるcDNA断片374bpを、CAGプロモーターによりアンチセンスまたはセンス方向に発現するアデノウイルスベクターAxCA-AS-Kras、AxCA-S-Krasをそれぞれ構築した。これらのアデノウイルスベクターを各種膵がん細胞株にin vitroで感染させ、増殖への影響を調べた。また、TUNEL法と末端標識によるDNA ladder解析によりアポトーシス誘導能を見た。腹膜播種モデルは膵がんAsPC-1細胞 6×10^5 個をヌードマウス腹腔に移植し、3日後から12時間おきに3回、 1×10^8 pfuのアデノウイルスベクターを腹注した。28日目に開腹して腹腔内腫瘍の程度を計測した。膵がんの肝腫瘍モデルとしては、 2×10^6 個のAsPC-1細胞を20 μ lのリン酸緩衝液に懸濁して、5週令のBalb/cヌードマウスの肝左葉皮膜下に注射した。この系では2週間目には長径5-10mm程度の腫瘍が注射局所に再現性良く生着するので治療効果を肉眼的に評価できる。 1×10^8 pfuを100 μ lのリン酸緩衝液に懸濁し、担がんヌードマウスの尾静脈より膵がんの肝移植後3日目より12時間おきに3回、静注した。

③1990年から1995年までの間に国立がんセンター中央病院で治療的切除を受け、手術時に遠隔転移のないことが確認されている膵がん症例42例について、CD44s、v6、v2をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。5%以上の腫瘍細胞が染色された場合、陽性と判断した。

④抗Tf-Rモノクローナル抗体 (5E7) を作製し、それを固相化したaffi-gel上で単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子とTfとの複合体を作製した。固相化されたTf-R-Tf complexよりdesferalを用いTfを遊離した後、biotin化したTfと再度結合させる。次に、streptavidinを添加し、biotin化DNAを結合させた。最後に、desferalを用いconjugateを抽出後、透析を行なった。K562など各種がん細胞株をSCIDマウスに静注した後、Tf-HSV-TK遺伝子複合体を尾静脈から投与した。治療効果は、ganciclovir投与後の生存日数を検討する群と観察途中で屠殺し転移巣の面積を β gal染色で定量するもの、および臓器重量を測定する群に分け検討した。

⑤新しい組換えアデノウイルス作製法に用いる「遺伝子置換反応」において最も効率が良く、しかも特異性が高い変異型loxPを検索するためにin vitro法を用いて解析を行った。基質は、同一分子上に野生型loxPと変異型loxPを有する直鎖状基質と、環状基質の2分子を用いた。これらの基質とCreを37 $^{\circ}$ C、30minで反応後、制限酵素で切断し電気泳動により生成物を解析した。変異型loxPとしては、以前のCreによる「欠失導入反応」の解析から最も効率の高かったV及びSを用いた。「遺伝子置換反応」を用いたE1

置換型アデノウイルスベクター迅速作製法の開発には、レシピエントウイルスとして、ウイルスの packaging signal を野生型 loxP で挟み、その下流に LacZ 等の発現単位と変異型 loxP を配した組換えアデノウイルスを構築した。また packaging signal と目的遺伝子（ここでは GFP 発現単位を用いた）を野生型と変異型 loxP で挟んだドナープラズミドを作製した。これらを Cre 発現 293 細胞へ導入し、得られたウイルスプールを継代して、各継代時の細胞から総核酸を抽出し制限酵素で置換体ウイルスの生成を調べた。また得られたウイルスを HeLa 細胞へ感染し、GFP の発現を測定した。

⑥ i) p53 類縁遺伝子として発見された p73 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター AxCAhp73 を作製し、悪性神経腫細胞に感染させ、細胞増殖抑制効果の検討、hypodiploidy や Fas、Bax の発現解析を行った。ii) 制限増殖型アデノウイルスを用いた膵がんに対する遺伝子治療の開発を目的として E1B55K を発現しないアデノウイルス (AxE1AdB) を作成し、p53 変異を有する膵がん細胞に対する効果および非増殖型アデノウイルスベクターとの併用効果を検討した。

また一方、アデノウイルスは感染細胞内で E1A を発現し、E1A は pRB と結合して不活性化する。E1A 遺伝子の pRB 結合領域に変異をもつアデノウイルスは、pRB が欠失あるいはリン酸化を受けやすい状態の腫瘍 (p16 の変異など) では、増殖可能であると考えられる。そこで pRB 結合モチーフ (LxCxE) に変異をもつ変異アデノウイルス (AxAdB-3) を作製し、その効果を検討した。膵がん細胞に対し、サイトカインを発現する非増殖型アデノウイルスベクター

(AxCAhIL-2、AxCIhIL-12) を AxE1AdB と共感染させ、IL-2 及び IL-12 の産生量とヒト膵がん移植腫瘍モデルにおける治療効果を検討した。iii) 悪性黒色腫を標的するため、MSH を融合させた変異型ファイバー F/MSH を有するアデノウイルスベクターを作製し、悪性黒色腫への細胞障害能を解析した。

⑦ プラズミドベクターとしては、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子やヒト HST-1 (FGF-4) 遺伝子を組み込んだものを、また担体となる生体親和材料としては既に本研究で成果の上があったアテロコラーゲンを選択した。両者を最適の比率で混合してミニベレットの形状に整形し、筋肉内注射により動物の体内に導入し、遺伝子の発現と生物活性を経時的に観察した。

C. 研究結果

「A. 研究の目的」で掲げた研究目的順に、研究結果を述べる。①ヒト血管内皮細胞初代培養株であ

る HUVEC より新規 KLF として UKLF を同定した。

UKLF 蛋白質は核に局在する蛋白質で、核移行シグナルは zinc finger ドメインの 5' 側にあることがわかった。また、Gal4 DNA 結合ドメインとの融合蛋白質は転写促進因子として機能することを明らかにした。FISH 解析により、UKLF 遺伝子はヒト染色体 2q32.2 に位置することがわかった。

②アンチセンス K-ras RNA 発現アデノウイルスベクター AxCA-AS-Kras の抗腫瘍効果に関して、*in vitro* の検討では、 $\text{moi}=10$ で複数の K-ras 点突然変異を伴う膵がん細胞株に対し増殖抑制効果を示した。対照的に、K-ras 遺伝子の異常がない膵がん細胞株 766T では増殖抑制効果が認められなかった。アンチセンス K-ras cDNA 断片の高発現が少なくとも AsPC-1 細胞にアポトーシスを誘導することも TUNEL 法、DNA ladder formation 解析により明らかになった。*In vivo* の腫瘍抑制効果については、AsPC-1 細胞のヌードマウス腹腔内移植の系で、アンチセンス K-ras ベクターにより有意に腹腔内腫瘍形成が抑制されたが、明らかな副作用・毒性は認められなかった。次に、膵がんの肝腫瘍の系では移植後 2 週間の腫瘍径の評価で、アンチセンス K-ras ベクター静注にて腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、アンチセンスベクター投与群では肝腫大傾向があった。

③全ての膵がん及び正常組織で CD44 分子が発現していたが、v6 及び v2 isoform は膵がんのみで発現していた。これら v6、v2 の発現と TNM 分類や腫瘍径などの臨床病理学的諸因子との間に相関は認めなかったが、Kaplan-Meier 解析によると生存率とは v6、v2 陽性とそれぞれ有意に相関していた。5 年生存率で、v6 陽性・陰性例はそれぞれ 25%・62%、v2 陽性・陰性例はそれぞれ 11%・57% であった。

④Tf-R の affinity column を用いることにより凝集が極めて少ない Tf-DNA 複合体を作製する方法を確立した。*In vivo* 遺伝子導入については、K562 細胞接種ヌードマウスの尾静脈より 20 μg の Tf-GFP 遺伝子複合体を投与し体内分布および発現を解析したところ、投与 5 日目には腫瘍、骨髄、筋肉に GFP-gene の存在が確認され、7 日後にはほぼ腫瘍に局限した。また GFP mRNA ならびに GFP 蛋白質の発現は腫瘍のみに見られた。K562 播種性転移 SCID mouse に Tf-HSV-TK 遺伝子複合体を投与したところ、治療群で延命効果が得られた。臓器重量を卵巣で比較したところ、転移群で、平均 1800mg、治療群で平均 400mg と有意な治療効果を認めた。

⑤まず変異型 loxP の検索を行った。世界で始めて *in vitro* 法による「Cre の遺伝子置換反応」の検出系の確立に成功し、この反応は、一度 loxP を介した挿入反

応が起こり、その後野生型loxP同士あるいは変異型loxP同士でその間の配列を欠失する反応が起きて、最終的に置換体が生成する、という反応のモデルを明らかとした。また変異型loxPに関して以下のことを明らかにした。i)「遺伝子置換反応」の効率においては、Vが最も良く10.2%の置換体を生成した。次いでSが5.3%、以前報告されていた71はこの中では最も効率が悪く3.8%の置換体が生成していた。ii)「遺伝子置換反応」の特異性に関しては、今回検討したVとSでは基質を3倍量加えても、全くリーク由来の生成物は検出されず、特異性が非常に高いことが示された。次にこの変異型loxPのVを用いてCreによる「遺伝子置換反応」を応用したアデノウイルスベクターの迅速作製法の開発を行った。レシピエントウイルスとGFP発現単位を有するドナープラスミドをCre発現293細胞へ共導入し、ウイルスシード（プール）を作製した。このウイルスプールをCre発現293細胞を用いて2回更に継代を加え、この細胞から抽出した総DNAを解析した結果、約7割が目的とするGFP発現ウイルスであった。またこのウイルスをHeLa細胞へ感染したところ、100%の細胞でGFPの発現が確認された。このウイルスプールを293細胞を用いて限界希釈法で感染することにより、目的ウイルスのみを簡便に単離することが可能であった。

⑥ i) AxCAhp73をmoi=300で感染させたU251細胞では、細胞増殖が10%にまで抑制され、hypodiploidyを示す細胞が69%に上昇した。U373細胞では、U251細胞と同等の細胞増殖抑制効果が現れているにもかかわらずhypodiploidyは6%であり、アポトーシス誘導の程度に差が見られた。AxCAhp53-F/K20でp53遺伝子を導入した場合は、U251、U373細胞共に2%まで細胞増殖が抑制され、同程度のhypodiploidyが検出された。A172細胞では、U251、U373細胞に比べて細胞増殖抑制が起こりにくく、p73遺伝子導入によるアポトーシスは検出されなかった。すべての細胞でBax発現量はp73導入により増加した。特にU251細胞においてp73高発現により細胞表面のFasの強い誘導が認められた。A172細胞はp53遺伝子によるアポトーシスの誘導もU251、U373細胞に比べて弱い。A172細胞はbcl-x1を高発現していることから、p53またはp73遺伝子によってアポトーシスが誘導されにくく、ネクローシスによる細胞死の方が優位に起こることが明らかとなった。ii) 腫瘍細胞5株全てでAxE1AdBによる殺細胞効果を認め、ウイルスは50-3000倍に増殖した。SCIDマウスのヒト腫瘍皮下腫瘍モデルにおいても抗腫瘍効果を認めた。ヘルパーウイルスとしてのAxE1AdBは、共感染した非増殖型アデノウイルスベクターも複製させて効果増強が可能である。培

養腫瘍細胞に対し、IL-2、IL-12を発現する非増殖型アデノウイルスベクターをAxE1AdBと共感染させたところ、単独感染に比べてそれぞれ100倍、200倍以上のサイトカイン産生を認めた。さらに、前述のヒト腫瘍皮下腫瘍モデルにおいて、AxE1AdBとAxCAhIL-2の併用による治療では、腫瘍を完全退縮させることができた。E1AのRB結合部位に変異のあるAxdAdB-3は種々の腫瘍細胞で増殖し、AxE1AdBより強い抗腫瘍効果を示した。以上の結果より、AxE1AdBならびにAxdAdB-3は腫瘍に対して有効であり、また他のアデノウイルスベクターとの共感染でその効果を著明に増大させることが示された。iii) 悪性黒色腫に対して特異的に強い細胞傷害活性を有するファイバー変異型アデノウイルスAx-F/MSHの作成に成功した。野生型はヒト悪性黒色腫細胞に感染しても細胞傷害は見られないが、Ax-F/MSH変異型は強い細胞傷害をもたらすことを示した。

⑦ 50 μ gのプラスミドDNAを液状のアテロコラーゲンと混合した後、直径0.6mm、長さ1.0cmに整形した棒状のミニペレットを作った。内包されたプラスミドDNAは、室温または4 $^{\circ}$ Cにおいて数カ月間は安定に存在した。ヒトHST-1遺伝子を発現するプラスミドDNAベクターを内包するミニペレットを動物の筋肉内に留置した所、プラスミドベクターが徐放され、注入された部位の筋肉細胞に導入されるとともに血行性に全身に運ばれ、遠隔臓器での発現が確認された。ミニペレットの形で導入したマウスにおいては40日間にも渡って末梢血中にベクターDNAが検出され、遺伝子発現及び生物活性の指標とした血小板数の上昇期間もミニペレットの方がプラスミド単独注射の場合よりも長期間に渡った。生体内に投与したプラスミドベクター内包ミニペレットを投与後7日以内に外科的に除去することで、遺伝子発現を速やかに停止させることが可能であった。

D. 考察

「A. 研究の目的」で掲げた研究目的順に、研究結果の考察を述べる。①血管新生は血管内皮細胞の増殖に加えて、内皮細胞の遊走、管腔形成、sprouting（発芽・分枝）、細胞外マトリックスの改変などを含む、周辺の細胞・組織との密接な相互作用の上に成立する複雑な過程である。このような複雑かつ多様なプログラムを協調的に稼働させて血管新生が初めて完成するわけで、そこにはマスター遺伝子として一群の転写因子が関与していると考えられる。本研究では血管新生の生物学を解明し、その知見に基づく新しい、血管新生を標的とする特異的遺伝子治療の開発を目的として、血管内皮細胞から組織特異

的分化プログラムに関係することの多いKLF遺伝子のクローニングに成功した。同定された新規遺伝子UKLFは、確かに核蛋白質であり、転写促進活性があることが証明された。転写因子であればアンチセンスRNA、リボザイム、dominant negative分子の利用により、その機能を人為的に操作できる。血管新生を含め、UKLFのin vivoにおける生理的機能を明らかにするため、UKLF遺伝子欠失マウスを創出するため、相同組換えによりUKLF遺伝子を欠失したES細胞をすでに3クローン得ている。

②難治がんの代表である膵がんには他の多くのがんと同様、複数の遺伝子異常が集積している。p53、p16、DPC4などの異常がその例であるが、K-rasがん遺伝子の点突然変異が特徴的に高頻度に、かつがん化の初期から見られることが知られている。従って膵がんのがん形質は、K-ras遺伝子に異常のある細胞においては、この遺伝子異常に厳しく依存している、いわゆる"gene addiction"状態になっていることが予想される。実際、今回のデータでは、AxCA-AS-Krasの顕著な増殖抑制効果はK-ras遺伝子異常のある細胞に特異的であり、この治療戦略の潜在的標的性を示唆した。さらに、本研究により初めて、アンチセンスK-ras RNAが膵がんのアポトーシスを誘導しうることが示され、cytotoxicな治療が可能であることがわかったのは重要な進歩である。一方K-rasはhouse keeping遺伝子として、多くの組織で発現しており、K-ras遺伝子の機能抑制のもたらす副作用についてはさらに慎重な検討が必要である。その点、ヌードマウス腹膜播種モデルにおいて腫瘍形成抑制効果が確認されたにもかかわらず、明らかな毒性が認められなかった点は、この戦略の有用性を期待させる結果であったと言える。また、マウスに対して肝動注を行うことは技術的に不可能であったが、今回行った静注の系で、径血行的に、しかも体循環に投与したアデノウイルスベクターでも有意な肝腫瘍の増殖が抑制されたことは、実際の臨床ではより選択的に高濃度のアデノウイルスベクターを患部に注入できることを考えると、効果の点では極めて有望な治療法といえる。一方、肝腫大傾向が見られたことは、アンチセンスK-ras RNAの正常肝細胞に対する副作用を示している可能性があり、今後の重要な検討課題である。

③遺伝子治療のような新しい、実験的な治療については対象となるがんの病態をよりの確に把握し、risk-benefitを明確にする必要がある。従来の臨床病理学的基準では区別が付かず、かつ同様に治療的切除が可能であった症例でも、今回の解析では明らかな予後の違いがあることがわかった。特にCD44分子は

多くのがんを対象とした解析から転移・浸潤との相関が示されており、アンチセンスK-ras RNA腹注または肝動注による遺伝子治療など、治療切除後の再発予防を主たる効果とするadjuvant療法を必要とする群を把握するためのバイオマーカーとして極めて説得力がある。

④In vivoにおけるTf-DNA複合体を用いた腫瘍標的に必要な条件として、複合体が凝集せずに、効率良くrecycleされることが必要である。本法で作製したTf-DNA複合体は、これらの条件を満たすものであった。また、Tf-Rは腫瘍以外の正常組織での発現も認められることから、これらの組織にも導入される可能性が考えられたが、実際にはTf-Rの発現の多い腫瘍組織に集積し、in vivoでの腫瘍特異的な遺伝子導入を可能にした。実際に、Tf-HSV-TK遺伝子複合体を用いた播種性転移マウスモデルで検討を行ったところ、遺伝子が選択的に播種性腫瘍に取り込まれ、治療効果が確認された。

⑤新たに開発したin vitro法による「遺伝子置換反応」の検出系により、既に報告されていた変異型loxP71は、効率、特異性いずれの面からも、本研究で新たに見いだされたVとSよりも劣っていたことを明らかとした。この検討結果から得られたVを用いることにより、従来よりも約2.5倍の効率でCreによる置換体を生成することが可能となり、新しいアデノウイルスベクター作製法の効率化にとって大きな前進であった。この「遺伝子置換反応」による新しいベクター法の作製では、COS-TPC法で取り扱いが煩雑であると指摘されていたコスミドカセットではなく、目的遺伝子を組み込んだプラズミドを用いる。そのため多くの組換えウイルスを同時に作製し、機能を比較検討することも容易になると考えられる。

⑥i) 悪性神経膠腫細胞においてp73遺伝子を高発現させることによりアポトーシスが誘導された。p73遺伝子はp53遺伝子と同様にBaxおよびFasを誘導することから、p73遺伝子によるアポトーシスの分子機構にはこれらの蛋白質が関与すると考えられる。U251およびU373細胞ではp73遺伝子によるアポトーシスの程度に差が見られたことから、p73遺伝子によって誘導されるアポトーシスに対する感受性の差について調べ、p73遺伝子を発現するアデノウイルスベクターの適応について検討する必要がある。ii) 膵がんに対してはアデノウイルスの感染性は比較的良好で、AxE1AdBウイルスはin vitroで50-3000倍ものウイルス増殖が見られ、SCIDマウス皮下腫瘍治療モデルでは、非常に良い治療成績を得た。ヒトの臨床に適用した場合には、免疫不全のモデルと異なり、比較的速度やかにウイルスの増殖に対抗する免疫反応が誘導

され、治療効果が不十分にしか得られない可能性も考えられる。AxE1AdBのような増殖型のウイルスの場合は、できるだけ強力でしかも場合によってはウイルスの増殖を制御できるような調節のきくタイプのベクターの作成が望まれる。さらに、E1AdBを組織固有のプロモーターの制御下に発現するような組み換えアデノウイルスも作成し、各種がんに対する効果を検討中である。AxE1AdBとサイトカイン遺伝子発現との併用による免疫強化療法も有望である。現在までの研究では、AxE1AdBとIL-2を併用した動物治療実験で膵がんなどの消化器系がん根治的治療効果が得られている。iii) アデノウイルスを用いた *in vivo* 遺伝子治療法では capsid 蛋白質に対する抗体が産生されることにより、2回目以降のベクター投与に対してはウイルスの不活化が速やかに生じる可能性がある。この問題に対して、アデノウイルスのキャプシド・タンパクの変異体を用いて、宿主の免疫を免れる方法が考えられる。アデノウイルスのファイバーや hexon、penton base など capsid 蛋白質を改変できるようになり、本研究で示したような細胞標的性のみならず、現在のアデノウイルスベクターの問題点を克服した新しいベクターの開発が急速に進むようになった。

⑦ プラスミドベクターを、生体親和材料であるアテロコラーゲンに内包させたミニベレットの形で生体内に導入し、プラスミドベクターの安定性を確保し、かつ徐放化することで生体の細胞内への遺伝子導入と発現の期間を制御する方法を開発した。さらにこのミニベレットは外科的に生体内より摘出することが可能であることから、より安全で効果のある遺伝子治療の実現に貢献できると考えられる。今後は、アテロコラーゲンがプラスミドDNAの生体での安定性を保つメカニズムを解明するとともに、ミニベレット内のDNA以外の添加物の種類や濃度を変えることによる生体内放出速度の調節が可能かどうかを検討することで、より確実な発現制御の実現をめざす。

E. 結論

① 新規 Kruppel 型 zinc finger 蛋白質 UKLF 遺伝子 cDNA を血管内皮細胞からクローニングした。UKLF は転写促進活性を持つ核内蛋白質であることを示した。血管新生のみならず、間質の造成・再構築を抑制することで腫瘍増殖や転移の抑制を図るような遺伝子治療法の標的遺伝子となる可能性がある。② アンチセンス K-ras RNA 発現アデノウイルスベクターは、膵がんの K-ras 遺伝子異常を標的する cytotoxic な治療法であり、膵がんの腹膜播種に対する新しい治療法とし

て期待できる。また、このアデノウイルスベクターは血行性に投与した場合でも、肝腫瘍の増殖を有意に抑制することから、膵がんの肝転移巣に対する肝動注による遺伝子治療法をも可能にすると期待される。③ そのような先進的治療もしくはその臨床試験の適応となる膵がん症例を的確に選択する必要があるが、治療切除標本の免疫組織化学的に CD44v6 または CD44v2 などの isoform の発現を認める膵がんが、治療対象候補として考慮されるべきであると考えられた。④ 簡便で高効率の Tf-DNA 複合体作成法を確立し、HSV-TK 自殺遺伝子を用いたヌードマウス移植腫瘍モデルにおいて腫瘍選択的な遺伝子導入と治療効果を証明した。⑤ Cre/loxP 系による「遺伝子置換反応」を応用した新しい E1 欠損型アデノウイルスベクターの作製法を確立し、Cre 発現 293 細胞を用いて 3 回継代を繰り返すことで、目的とする組換えウイルスを約 7 割含むウイルスプールを迅速かつ簡便に作製できることを示した。⑥ p53 関連遺伝子 p73 を発現するアデノウイルスベクターが悪性神経膠腫細胞等にアポトーシスを誘導することとその分子機構の一部を明らかにした。E1A 及び E1B に変異を持つため、p53 及び Rb/p16 系の遺伝子異常を標的するアデノウイルスベクターを構築した。ヌードマウス膵がん移植モデルにおいて優れた腫瘍抑制効果を示した。E1B 変異型アデノウイルスはサイトカインを産生する従来の非増殖型アデノウイルスベクターとの組み合わせにより、*in vivo* 治療モデルにおいて腫瘍の完全退縮が達成された。⑦ 従来のプラスミドベクター単独の投入方法に比べて、アテロコラーゲンが生体でのベクターの長期間の徐放化と発現維持に有効であることを証明した。また、このアテロコラーゲン包埋プラスミドベクター（ミニベレット）は、生体内投与後も物理的な除去が可能であり、遺伝子発現を任意の時期に停止するための新しい方策を示し得た。

F. 研究発表

Ide, H., Saito-Ohara, F., Ohnami, S., Osada, Y., Ikeuchi, T., Yoshida, T., and Terada, M.: Assignment of the BMPR1A and BMPR1B genes to human chromosome 10q22.3 and 4q23->q24 by *in situ* hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, 81:285-286 (1998).

Matsumoto, N., Laub, F., Aldabe, R., Zhang, W., Ramirez, F., Yoshida, T., and Terada, M.: Cloning the cDNA for a new human zinc-finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 73:28229-28237 (1998).

- Nagamachi, Y., Tani, M., Shimizu, K., Yoshida, T., and Yokota, J.: Suicidal gene therapy for pleural metastasis of lung cancer by liposome-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Therapy*, in press.
- Yamamoto, H., Perez-Piteira, J., Yoshida, T., Terada, M., Itoh, F., Imai, K., and Perucho, M.: Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology*, in press.
- Furukawa H, Kosuge T, et al, Mukai K, Iwata T, Kanai Y, Shimada K, Yamamoto J, Ushio K. Helical computed tomography in the diagnosis of portal vein invasion by pancreatic head carcinoma. *Arch Surg* 1998;133:61-65.
- Furukawa H, Kosuge T, Kanai Y, Mukai K, Epidermoid cyst in an intrapancreatic accessory spleen: CT and pathologic findings. *Am J Roentgenol* 1998;171:271-271.
- Furukawa H, Kosuge T, Shimada K, Yamamoto J, Kanai Y, Mukai K, Iwata R, Ushio K, Small polypoid lesions of the gallbladder.-Differential diagnosis and surgical indications by helical computed tomography-. *Arch Surg* 1998;133:735-739.
- Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, Saitoh D, Shimada Y, Kosuge T, Kanai Y, Kakizoe T. Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:1033-1040.
- Yamamoto J, Kosuge T, Shimada K, Yamasaki S, Takayama T, Makuuchi M. Anterior transhepatic approach for isolated resection of the caudate lobe of the liver. *World J Surg* 1999; 23:97-101.
- Kosuge T, Sano K, et al. Should the bile duct be preserved or removed in radical surgery for gallbladder cancer?. *Hepatogastroenterology* 1999(in press)
- Sato T, Yamauchi N, Sasaki H, Takahashi M, Okamoto T, Sakamaki S, Watanabe N, Niitsu Y: An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa receptor gene transfection and mutein TNF administration. *Cancer Res.* 58:1677-1683 (1998)
- Shibagaki, N., Hanada, K., Yamaguchi, S., Yamashita, H., Shimada, S. and Hamada, H. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur. J. Immunol.*, 28(4): 1125-1133, 1998.
- Kanai, F., Kawakami, T., Hamada, H., Sadata, A., Yoshida, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Tateishi, K., Shiratori, Y., and Omata, M. Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentration of 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 58: 1946-1951, 1998.
- Shiratori, Y., Kanai, F., Hikiba, Y., Moriyama, H., Hamada, H., Matsumura, M., Tanaka, T., Lan, K-H., Ohashi, M., Okano, K., Naito, M., and Omata, M. Gene therapy for hepatic micrometastasis of murine colon carcinoma. *J. Hepatology*, 28(5): 886-895, 1998.
- Ohashi, M., Kanai, F., Tanaka, T., Lan, K-H., Shiratori, Y., Komatsu, Y., Kawabe, T., Yoshida, H., Hamada, H., and Omata, M. In vivo adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing pancreatic cancer. *Jp. J. Cancer Res.*, 89: 457-462, 1998.
- Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W., and Hamada, H. Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Therapy*, 5: 1130-1136, 1998.
- Nakazaki, Y., Tani, K., Lin, Z-T., Sumimoto, H., Hibino, H., Tanabe, T., Wu, M-S., Izawa, K., Hase, H., Takahashi, S., Tojo, A., Azuma, M., Hamada, H., Mori, S., and Asano, S.. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their co-operative enhancement of antitumor immunity. *Gene Therapy*, 5 (10): 1355-1362, 1998.
- Shinoura, N., Yoshida, Y., Sadata, A., Hanada, K., Yamamoto, S., Kirino, T., Asai, A., and Hamada, H. Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implication for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 9(14): 1983-1993, 1998.
- Cao, X., Zhang, W., He, L., Xie, Z., Ma, S., Tao, Q., Yu, Y., Hamada, H. and Wang, J. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce antitumor immunity. *J. Immunol.*, 161(11): 6238-6244, 1998.
- Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Shinoura, N. and Hamada, H. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy*, 9(17): 2503-2515, 1998.
- Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Saito, I., and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Human Gene Therapy*, 9(18): 2683-2689, 1998.
- Mano, Y., Ishii, M., Kisara, N., Kobayashi, Y., Ueno, Y., Kobayashi, K., Hamada, H., and Toyota, T. Duct formation by immortalized mouse cholangiocytes: an in vitro model for cholangiopathies. *Lab. Invest.*, 78(11): 1467-1468, 1998.

- Yasuda, H., Nagata, M., Arisawa, K., Yoshida, R., Fujihira, K., Okamoto, N., Moriyama, H., Miki, M., Saito, I., Hamada, H., Yokono, K., Kasuga, M. Local expression of immunoregulatory IL12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.*, 102(10): 1807-1814, 1998.
- Nagasaka, T., Hayashi, S., Tachi, Y., Liu, D., Koike, C., Namii, Y., Katayama, A., Negita, M., Kobayashi, T., Hamada, H., Yokoyama, I., and Takagi, H. Inhibitory effect of alpha(1,2) fucosyltransferase recombinant adenoviral vector on alpha Gal expression. *Transplant Proc.*, 30(7A): 3837-8, 1998.
- Guang-Lin, M., Hayashi, S., Yokoyama, I., Namii, Y., Kobayashi, T., Katayama, A., Nagasaka, T., Hamada, H., Negita, M., Takagi, H. Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4IG gene results in prolonged survival of heart allograft. *Transplant Proc.*, 30(7): 2923-4, 1998.
- Matsumoto, G., Sunamura, M., Shimamura, H., Kodama, T., Hashimoto, W., Kobari, M., Kato, K., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Hamada, H., and Matsuno, S. Adjuvant immunotherapy using genetically engineered interleukin 12 secreting fibroblasts prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery*, in press, 1999.
- Ohashi, M., Kanai, F., Ueno, H., Tanaka, T., Kawakami, T., Koike, Y., Ikenoue, T., Shiratori, Y., Hamada, H., and Omata, M. In vivo adenovirus-mediated p53 gene therapy for gastric carcinoma in vitro and in vivo. *Gut*, in press, 1999.
- Inaba, M., Sawada, H., Sadata, A., and Hamada, H. In vitro circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene. *Jp. J. Cancer Res.*, 90(3): in press, 1999.
- Tanaka, H., Yoshizawa, H., Yamaguchi, Y., Ito, K., Kagamu, H., Suzuki, E., Hamada, H., and Arakawa, M. Successful adoptive immunotherapy of murine nonimmunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. *J. Immunol.*, in press, 1999.
- Ichikawa, T., Tamiya, T., Adachi, Y., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Yoshida, Y., Hamada, H., and Ohmoto, T. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine / cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Therapy*, in press, 1999.
- Zhang, W., He, L., Yuan, Z., Xie, Z., Wang, J., Hamada, H., and Cao, X. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Human Gene Therapy*, 10 (7): in press, 1999.
- Seino, K., Ogino, T., Ju, S.T., Hamada, H., Yagita, H., Okumura, K., and Fukao, K. Biological factors that affect CD95 ligand-mediated inflammation. *Transplant Proc.*, 31(2B): 893-895, 1999.
- Aoki, Y., Aizaki, H., Shimoike, T., Tani, H., Ishii, K., Saito, I., Matsuura, Y. and Miyamura, T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology*, 250: 140-150, 1998.
- Arai, T., Matsumoto, K., Saitoh, K., Ui, M., Ito, T., Murakami, M., Kanegae, Y., Saito, I., Cosset, F. L., Takeuchi, Y. and Iba, H. A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *J Virol*, 72: 1115-1121, 1998.
- Hiasa Y., Horiike, N., Akbar, S. M., Saito, I., Miyamura, T., Matsuura, Y. and Onji, M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 90-95, 1998.
- Kano M., Igarashi, H., Saito, I. and Masuda, M. Cre-loxP-mediated DNA flip-flop in mammalian cells leading to alternate expression of retrovirally transduced genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 248: 806-811, 1998.
- Lee, G. and Saito, I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 216: 55-65, 1998.
- Lu, D., Tamemoto, H., Shibata, H., Saito, I and Takeuchi, T. Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: Insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther*, 5: 888-895, 1998.
- Nakagawa, I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A. and Uede, T. Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Hum Gene Ther*, 9: 1739-1745, 1998.
- Nishimura, I., Uetsuki, T., Dani, S. U., Ohsawa, Y., Saito, I., Okamura, H., Uchiyama, Y. and Yoshikawa, K. Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci*, 18: 2387-2398, 1998.
- Okuyama, T., Fujino, M., Li, X.-K., Funeshima, N., Kosuga, M., Saito, I., Suzuki, S. and Yamada, M. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther*. 5: 1047-1053, 1998.

- Sato, Y., Tanaka, K., Lee, G., Kanegae, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. and Saito, I. Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 244: 455-462, 1998.
- Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai A., Kirino, T., Saito, I. and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Hum Gene Ther*, 9: 2683-2689, 1998.
- Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., Kanegae, Y., Saito, I., Hayashi, Y., Koike, M. and Kohara, M. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem*, 273: 9001-9006, 1998.
- Zhang, H. G., Bilbao, G., Zhou, T., Contreras, J. L., Gomez, N. J., Feng, M., Saito, I., Mountz, J. D. and Curiel, D. T. Application of a Fas ligand encoding a recombinant adenovirus vector for prolongation of transgene expression. *J Virol*, 72: 2483-2490, 1998.
- Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I. and Ozawa, S. Postsynaptic expression of Ca²⁺-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate-type glutamate receptor channels by viral-mediated gene transfer. *Molecular Brain Res*, in press. 1999.
- Takahama Y., Ochiya T., et al., Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding a rat leukemia inhibitory factor: towards generation of pluripotent rat embryonic stem cells. *Oncogene* 16, 3189-3196, 1998
- Konishi H, Ochiya T., et al., Targeting killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cancer cells by reovirus displaying a single chain variable fragment antibody. *Hum Gene Ther* 9, 235-248,1998.
- Masutani M., Ochiya T., et al., Establishment of poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mouse embryonic stem cell lines. *Proc. Japan Acad.* 74, 233-236 (1998).
- Masutani M., Ochiya T., et al., Poly(ADP-ribose) polymerase gene-disruption conferred mice resistant to streptozocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2301-2304 (1999).
- Grako K. A., Ochiya T., et al., PDGF α -receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *J Cell Sci.* in press.
- Ochiya T. and Terada M. Antisense approaches to in vitro organ culture. *ANTISENSE TECHNOLOGY*, edited by M. Ian Pastan. *Methods in Enzymology*, in press.
- Ochiya T. et al. Evaluation of cationic liposome suitable for gene transfer into pregnant animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 平成10年9月28日、変異型loxP配列とその応用、
斎藤 泉、田中啓二、特願平10-331289

2) 平成10年10月12日、リコンビナーゼ発現細胞、
斎藤 泉、鐘ヶ江裕美、特願平10-289785

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

腫瘍血管とがん遺伝子異常を標的する遺伝子治療の研究及び
がんの腹膜播種を標的にした治療法の開発
分担研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 ①臨床的に問題となるがんの増殖及び転移の成立に不可欠である血管新生を標的にした遺伝子治療の開発を行うためには、血管内皮細胞の分子細胞生物学的特徴に関するさらなる基礎的情報が必要かつ有用である。Kruppel型転写因子は組織特異的な発現を示し、発生・分化に深く関わるものが多い。指数増殖期にある分化した血管内皮細胞より新規Kruppel型転写因子を同定し、UKLFと名付けた。UKLFは核移行シグナルをzinc finger領域の前に持ち、転写促進活性を持つ遺伝子であることを示した。発現は正常細胞では内皮細胞の他ケラチノサイト、線維芽細胞などで、がん細胞では神経芽細胞腫NK-OB-1で顕著に高いことがわかり、現在UKLF欠失マウスを作成中である。②膵がんは現在外科の手術以外に有効な治療法のない代表的難治がんである。アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスを構築し、in vitroではmoi=10という低用量で、K-ras遺伝子異常のある膵がん細胞に特異的に増殖抑制効果を示し、かつアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに膵がんの腹膜播種モデルにおいて、アデノウイルスベクター腹注により腫瘍抑制効果を認めた。

A. 研究の目的

本研究の目的は、①血管新生の生物学の解明に基づいた新しい遺伝子治療法の確立と、②がんの遺伝子異常を標的とするin vivo遺伝子治療法の開発である。①については、固型腫瘍がおよそ直径2mmを越えて増殖するためには血管新生が不可欠であるとされている。これは原発巣のみならず、転移巣においてもあてはまる。転移こそが進行がんの特徴であり、難治がんとは早期に高度に転移・浸潤を起こすがんであることを考えると、血管新生を標的とした治療法の開発は、難治がん・進行がんの本態を狙った治療法として重要である。血管新生は、概念上、既存の血管から枝分かれして新たな血管網が作られるangiogenesisと、未だ同定・分離されていない血液・血管共通前駆細胞 (hemangioblast) から分化して血管が作られvasculogenesisとに分けられる。従来、成体では専らangiogenesisによってのみ血管新生がおきると考えられていたが、近年、angioblastが成体にも存在するという報告がなされた。すなわち、血管と血液の発生は互いに深い関係にあり、その発生・分化に関わる遺伝子は、血管新生を標的としたがんの治療を開発する上で重要な研究対象であると考えられる。中でも転写因子は分化・発生・増殖プログラムのマスター遺伝子として機能するものがあ

るはずなので本研究では血管内皮細胞で発現している転写因子、特にKruppel型転写因子を同定し、その構造・機能を明らかにすることを目的とする。

②については、難治がんの代表格である膵がんと、その特徴的な遺伝子異常であるK-ras点突然変異を対象として、アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果について検討する。今までにリポソームを用いて、アンチセンスK-ras RNA発現が膵がんの増殖抑制に有効であることを示してきたが、in vivo遺伝子導入ベクターとして、現時点では最も優れた導入効率を誇るアデノウイルスベクターの系でのこの戦略の有用性を調べる。特に、腫瘍抑制の機構としてアポトーシス誘導能と、標的細胞におけるK-ras点突然変異の有無との相関を調べる。また、in vivoの治療効果としてはヌードマウス移植膵がんの腹膜播種の系で検討する。

B. 研究の方法

①Kruppel型転写因子 (Kruppel-like transcription factor: KLF) は、よく保存された3つのzinc finger domainをもつ転写因子ファミリーを構成し、赤芽球に特異的な発現を示すEKLF (Erythroid KLF) をはじめとして、これまでに7つのKLFが同定されている。これらは組織特異的な発現を示すものが多く、

また造血系など発生や分化と深く関わっている可能性の高い転写因子である。既知のKLFの間で高度に保存されているzinc fingerドメインにdegenerate oligonucleotideプライマーを設定し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) のtotal RNAを鋳型としてRT-PCR法を行った。得られたcDNA断片を元に、さらに5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE)、同じく3' RACEを行い、cDNAの蛋白質翻訳部位の全長の構造を決定した。遺伝子産物の細胞内局在については、cDNAの5'末端にGreen Fluorescence Protein (GFP) ユニットを連結してNIH3T3細胞にトランスフェクションして解析した。転写制御能については、Gal4蛋白質のDNA結合部位との融合蛋白質を発現するプラスミドを作り、Gal4結合部位とCATレポーター遺伝子を結合したプラスミドと共に293T細胞、NIH3T3細胞にトランスフェクションして解析した。

②正常ヒトK-ras遺伝子exon 1、2及びexon 3の一部からなるcDNA断片374bpをアンチセンスまたはセンス方向に発現するアデノウイルスベクターAxCA-AS-Kras、AxCA-S-Krasをそれぞれ構築した。プロモーターは組織非特異的で強力なCAGを選択した。これらのアデノウイルスベクターをK-ras遺伝子に点突然変異のある腫瘍細胞株AsPC-1、MIAPaCa、Panc-1と、K-ras遺伝子に異常の無いHs 766Tにin vitroで感染させ、増殖曲線を得た。AsPC-1細胞に対してはTUNEL法と末端標識によるDNA ladder解析によりアポトーシス活性を見た。腹膜播種モデルはAsPC-1細胞 6×10^6 個をヌードマウス腹腔に移植し、3日後から12時間おきに3回、 1×10^8 pfuのアデノウイルスベクターを腹注した。28日目に開腹して腹腔内腫瘍の程度を計測した。全てのアデノウイルスベクターは293細胞破砕物を塩化セシウム密度勾配超遠心法で精製したものをを用いた。

C. 研究結果

①Degenerate primerを用いたRT-PCR法によりHUVECより新規KLFが同定され、UKLFと名付けた。予測されるUKLF蛋白質は302個のアミノ酸からなり、C末端側に81アミノ酸からなるKLFに典型的な3つのzinc fingerドメインがある。UKLF cDNAの様々な欠損変異体を作り、それぞれGFPと連結してNIH3T3細胞にトランスフェクションしたところ、UKLF蛋白質は核に局在する蛋白質で、核移行シグナルはzinc fingerドメインの5'側にあることがわかった。また、Gal4 DNA結合ドメインとの融合蛋白質は293細胞、NIH3T3細胞においてGal4結合部位の下流に配置したCAT遺伝子の発現を活性化したことが

ら、転写促進因子であることが示唆された。一方、UKLFの発現は血管内皮細胞以外にも胎児肺線維芽細胞、ケラチノサイトなどでも強く、またがん細胞では神経芽細胞腫NK-OB-1で顕著に発現が高かった。FISH解析により、UKLF遺伝子はヒト染色体2q32.2に位置することがわかった。

②アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターAxCA-AS-Krasの抗腫瘍効果に関して、in vitroの検討では、moi=10でAsPC-1、MIAPaCa、Panc-1等の複数のK-ras点突然変異を伴う腫瘍細胞株で増殖抑制効果を示した。AsPC-1細胞に対してmoiの影響を見ると、moi=1でも若干の増殖抑制効果が認められ、moi=25を越えるとウイルスの毒性が出現した。対照的に、K-ras遺伝子の異常がない腫瘍細胞株766Tでは増殖抑制効果が認められず、これはlipofection法を用いて検討した以前の結果と一致した。増殖抑制に伴い、K-ras p21蛋白質の発現も抑制されることがわかった。しかし感染後3日以降になると、p21蛋白質の発現低下は明らかでなかった。また、高い遺伝子導入効率を示すアデノウイルスベクターを用いることにより、アンチセンスK-ras cDNA断片の高発現が少なくともAsPC-1細胞にアポトーシスを誘導することもTUNEL法、DNA ladder formation解析により明らかになった。In vivoの腫瘍抑制効果については、腹腔内リポフェクション法と同じ、AsPC-1細胞のヌードマウス腹腔内移植の系で、未治療群、AxCA-S-Kras投与群、AxCA-AS-Kras投与群を各5匹ずつ解析した。その結果、アンチセンスK-rasベクターにより有意に腹腔内腫瘍形成が抑制されたが、明らかな副作用・毒性は認められなかった。

D. 考察

がんの転移の成立にはその最初の段階として、原発巣における透過性が亢進し、血流の停滞や逆流など、異常な血流動態を示す腫瘍新生血管への腫瘍細胞の侵入がまず起きることを考えると、がんの発生と進展における血管新生の重要性は論を待たない。転移先についても、現在の一般の診断技術では2mm以下の転移巣を検出するのは困難であり、臨床的に我々が見ている転移巣のほとんどは血管新生依存性腫瘍増殖期にあると考えられる。血管新生は血管内皮細胞の増殖に加えて、内皮細胞の遊走、管腔形成、sprouting (発芽・分枝)、細胞外マトリックスの改変などを含む、周辺の細胞・組織との密接な相互作用の上に成立する複雑な過程である。このような複雑かつ多様なプログラムを協調的に稼働させて

血管新生が初めて完成するわけで、そこにはマスター遺伝子として一群の転写因子が関与していると考えられる。本研究では血管新生の生物学を解明し、その知見に基づく新しい、血管新生を標的とする特異的遺伝子治療の開発を目的として、血管内皮細胞から組織特異的分化プログラムに関係することの多いKLF遺伝子のクローニングに成功した。同定された新規遺伝子UKLFは、確かに核蛋白質であり、転写促進活性があることが証明された。転写因子であればアンチセンスRNA、リボザイム、dominant negative分子の利用により、その機能を人為的に操作できる。血管新生を含め、UKLFのin vivoにおける生理的機能を明らかにするため、UKLF遺伝子欠失マウスを創出するため、相同組換えによりUKLF遺伝子を欠失したES細胞をすでに3クローン得ている。

難治がんの代表である膵がんには他の多くのがんと同様、複数の遺伝子異常が集積している。p53、p16、DPC4などの異常がその例であるが、K-rasがん遺伝子の点突然変異が特徴的に高頻度に見られることは良く知られている。K-rasの異常は膵管の過形成や、慢性膵炎でも認められるので、膵発がんのごく初期に存在する増殖異常を引き起こす遺伝子異常であるとされている。K-ras遺伝子異常が特徴的に高頻度に見られる事を考えると、膵がんのがん形質は、K-ras遺伝子に異常のある細胞においては、この遺伝子異常に厳しく依存している、いわゆる"gene addiction"状態が予想される。実際、今回のデータでは、AxCA-AS-Krasの顕著な増殖抑制効果はK-ras遺伝子異常のある細胞に特異的であり、この治療戦略の潜在的標的性を示唆した。さらに、本研究により初めて、アンチセンスK-ras RNAが膵がんのアポトーシスを誘導しうることが示され、cytotoxicな治療が可能であることがわかったのは重要な進歩である。一方K-rasはhouse keeping遺伝子として、多くの組織で発現しており、K-ras遺伝子の機能抑制のみならず副作用についてはさらに慎重な検討が必要である。その点、ヌードマウス腹膜播種モデルにおいて腫瘍形成抑制効果が確認されたにもかかわらず、明らかな毒性が認められなかった点は、この戦略の有用性を期待させる結果であったと言える。

E. 結論

新規Kruppel型zinc finger蛋白質UKLF遺伝子cDNAを血管内皮細胞からクローニングした。UKLFは転写促進活性を持つ核内蛋白質であることを示した。血管新生のみならず、間質の造成・再構築を抑制す

ることで腫瘍増殖や転移の抑制を図るような遺伝子治療法の標的遺伝子となる可能性がある。アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターは、膵がんのK-ras遺伝子異常を標的とするcytotoxicな治療法であり、膵がんの腹膜播種に対する新しい治療法として期待できる。

F. 論文発表

Ide, H., Saito-Ohara, F., Ohnami, S., Osada, Y., Ikeuchi, T., Yoshida, T., and Terada, M.: Assignment of the BMPR1A and BMPR1B genes to human chromosome 10q22.3 and 4q23 ->q24 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, 81:285-286 (1998).

Matsumoto, N., Laub, F., Aldabe, R., Zhang, W., Ramirez, F., Yoshida, T., and Terada, M.: Cloning the cDNA for a new human zinc-finger protein defines a group of closely related Krüppel-like transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 73:28229-28237 (1998).

Nagamachi, Y., Tani, M., Shimizu, K., Yoshida, T., and Yokota, J.: Suicidal gene therapy for pleural metastasis of lung cancer by liposome-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Therapy*, in press.

Yamamoto, H., Perez-Piteira, J., Yoshida, T., Terada, M., Itoh, F., Imai, K., and Perucho, M.: Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology*, in press.

分担研究報告書

膵がんに対する経カテーテル・経内視鏡遺伝子導入法の研究

分担研究者 小菅 智男 国立がんセンター中央病院部長

研究要旨 膵臓周辺には大血管、神経、胆道系などの重要臓器が密集し、局所の浸潤性増殖の対策が重要課題になっている。本研究においては内視鏡やカテーテルを用いた膵がんの局所標的遺伝子治療法確立に必要な基礎的技術の開発と、このような先進的治療法及びその臨床研究の対象となる膵がんの予後不良群の把握を目的とする。今年度の主たる研究成果は、①膵がんの肝転移巣モデルに対するアンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターの腫瘍抑制効果を示した、②治療適切除を受けた膵がん患者の内、細胞膜表面の糖蛋白質CD44のvariant form v6とv2の発現が陽性の症例は予後が不良であることを見だし、遺伝子治療等の新しいsurgical adjuvant therapyが必要であることが示唆された。

A. 研究の目的

膵がんは難治がんの代表であり、発がん初期より効率に遠隔転移を来すため、全身疾患としての対策が必要とされる。一方、膵臓周辺には大血管、神経、胆道系などの重要臓器があり、"locally advanced pancreatic cancer"とも言われるように、主として神経に沿って局所の浸潤性増殖が激しく、手術が非適応となったり、重大な合併症を起こす場合が少なくない。従って、膵がんに対しては、体内に播種した病巣を標的とした治療法の開発と並行して、有効な局所療法が開発が求められている。本研究では経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子導入法に基づく膵がんの局所的遺伝子治療の開発を最終目的とする。そのためには膵がんの画像診断・病理診断等を組み合わせた臨床病態の十分な検討を行い、経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子治療及びその臨床研究の対象となる膵がん症例をしっかりと把握する必要がある。具体的には、今年度の研究目的は①膵がんの肝転移巣に対する経動脈カテーテル遺伝子治療を想定して、膵がんの肝腫瘍モデルを作り、アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターの経血行投与の有効性を評価すること（主任研究者吉田輝彦博士との共同研究）、及び②CD44 variantの発現が従来の治療法のみでは再発率が高く、特に予後不良である膵がん症例を同定するバイオマーカーとなりうる可能性の検討である。

B. 研究の方法

① 2×10^6 個の膵がん細胞株AsPC-1を20 μ lのリン酸緩衝液に懸濁して、5週令のBalb/cヌードマウスの肝左葉皮膜下に注射した。この系では2週間目には長径5-10mm程度の腫瘍が注射局所に再現性良く生着するので治療効果を肉眼的に評価できる。一方、正常ヒトK-ras遺伝子exon 1、2及びexon 3の一部からなるcDNA断片374bpをアンチセンス方向に発現するアデノウイルスベクターAxCA-AS-Krasと、対照のセンス方向ベクターAxCA-S-Krasを構築した。プロモーターは組織非特異的で強力なCAGプロモーターである。塩化セシウム密度勾配超遠心法にて組換えアデノウイルスを精製し、293細胞を標的にして決めた力価にて 1×10^8 pfuを100 μ lのリン酸緩衝液に懸濁し、担がんヌードマウスの尾静脈より膵がんの肝移植後3日目より12時間おきに3回、静注した。②1990年から1995年までの間に国立がんセンター中央病院で治療的切除を受け、手術時に遠隔転移のないことが確認されている膵がん症例42例について、CD44s、v6、v2をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。5%以上の腫瘍細胞が染色された場合、陽性と判断した。

C. 研究結果

①3匹の担がんマウスにAxCA-AS-Krasを、別の3匹にAxCA-S-Krasを静注し、腫瘍移植後2週間目に開腹して肝腫瘍の大きさを計測した。アンチセンスベ

クター投与群の腫瘍径は1x1、3x2、4x1mmであったのに対し、センスベクター投与群の腫瘍径は10x8、10x7、5x5mmで、明らかに腫瘍抑制効果が認められた。また、アンチセンスベクター投与群では肝腫大傾向があった。②全てのがん及び正常組織でCD44分子が発現していたが、v6及びv2 isoformはがんでのみ発現していた。42症例中、21例はv6が、そのうち16例はさらにv2もがん部で発現しており、v2単独発現例はなかった。これらv6、v2の発現とTNM分類や腫瘍径などの臨床病理学的諸因子との間に相関は認めなかったが、Kaplan-Meier解析によると生存率とはv6、v2陽性とそれぞれ有意に相関していた。5年生存率で、v6陽性・陰性例はそれぞれ25%・62%、v2陽性・陰性例はそれぞれ11%・57%であった。

D. 考察

①がんの遺伝子治療のための生体内遺伝子導入法として、lipofection法は毒性が少なく、作製が容易、複数回繰り返し投与できる、という点で優れているが、一般に遺伝子導入効率は劣るとされている。一方、現時点で、生体内遺伝子導入法として最も広く用いられているのはアデノウィルスベクターである。その長所は高い遺伝子導入効率と生体内での安定性であり、短所は毒性及び免疫原性、そして一般には手間のかかるウィルス作製過程である。今回用いたアデノウィルスベクターはexon 1-3に相当する正常K-ras cDNA断片を強力な組織非特異的融合プロモーターCAGの下流にアンチセンス方向に組み込んだもので、その感染により膵がん細胞株のin vitroでの増殖が抑制されること、p21蛋白質の発現が低下すること、またそれぞれのウィルス調整液には複製可能なウィルスの混入はないことは共同研究者が確認している。マウスに対して肝動注を行うことは技術的に不可能であったが、今回行った静注の系で、径血行的に、しかも体循環に投与したアデノウィルスベクターでも有意な肝腫瘍の増殖が抑制されたことは、実際の臨床ではより選択的に高濃度のアデノウィルスベクターを患部に注入できることを考えると、効果の点では極めて有望な治療法といえる。一方、肝腫大傾向が見られたことは、アンチセンスK-ras RNAの正常肝細胞に対する副作用を示している可能性があり、今後の重要な検討課題である。②遺伝子治療のような新しい、実験的な治療を含め、複数の学際的治療手段が選択可能になってきた場合、対象となるがんの病態をよりの確に把握し、risk-benefitを明確にする必要がある。従来の臨床病理学的基準では区別が付かず、かつ同様に治癒的切除が可能であった症例でも、今回の解析では明らかな予後の違いがあることがわかった。特にCD44分

子は多くのがんを対象とした解析から転移・浸潤との相関が示されており、バイオマーカーとして極めて説得力がある。特に組織型やTNM病期分類、腫瘍径などと相関しなかったことから、アンチセンスK-ras RNA腹注または肝動注による遺伝子治療など、治癒切除後の再発予防を主たる効果とするadjuvant療法を必要とする群を把握するための貴重な検査法となりうると考えられる。

E. 結論

膵がんの治療成績を向上させるためには、surgical adjuvantとしての局所遺伝子治療が有用であると期待される。アンチセンスK-ras RNA発現アデノウィルスベクターは血行性に投与した場合でも、肝腫瘍の増殖を有意に抑制することから、膵がんの肝転移巣に対する肝動注による遺伝子治療法を可能にする期待される。一方、そのような先進的治療もしくはその臨床試験の適応となる膵がん症例を的確に選択する必要があるが、治癒切除標本の免疫組織化学的にCD44v6またはCD44v2などのisoformの発現を認める膵がんが、治療対象候補として考慮されるべきであると考えられた。

F. 論文発表

Furukawa H, Kosuge T, et al, Mukai K, Iwata T, Kanai Y, Shimada K, Yamamoto J, Ushio K. Helical computed tomography in the diagnosis of portal vein invasion by pancreatic head carcinoma. Arch Surg 1998;133:61-65.

Furukawa H, Kosuge T, Kanai Y, Mukai K, Epidermoid cyst in an intrapancreatic accessory spleen: CT and pathologic findings. Am J Roentgenol 1998;171:271-271.

Furukawa H, Kosuge T, Shimada K, Yamamoto J, Kanai Y, Mukai K, Iwata R, Ushio K, Small polypoid lesions of the gallbladder.-Differential diagnosis and surgical indications by helical computed tomography-. Arch Surg 1998;133:735-739.

Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, Saitoh D, Shimada Y, Kosuge T, Kanai Y, Kakizoe T. Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. Jpn J Cancer Res 1998; 89:1033-1040.

Yamamoto J, Kosuge T, Shimada K, Yamasaki S, Takayama T, Makuuchi M. Anterior transhepatic approach for isolated resection of the caudate lobe of the liver. World J Surg 1999; 23:97-101.

Kosuge T, Sano K, et al. Should the bile duct be preserved or removed in radical surgery for gallbladder cancer?. Hepatogastroenterology 1999(in press)

トランスフェリン遺伝子複合体を用いた播種性腫瘍に対する遺伝子治療

分担研究者 新津洋司郎 札幌医科大学医学部第四内科 教授

【研究要旨】

腫瘍細胞に対するin vivo遺伝子targetingを目的として、活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現しているトランスフェリン受容体(Tf-R)に着目し、そのligandであるトランスフェリン(Tf)にavidin, biotinを介しDNAを結合させたconjugateを作製した。このconjugateはTf-Rへのbinding motifが良く保たれており、in vivoにおいて高い腫瘍特異性と再現性を有していた。K562播種性転移SCIDマウスにTf-HSV-TK遺伝子複合体を投与したところ、治療群で抗腫瘍効果および延命効果が認められた。

A. 研究目的

現在多くの癌遺伝子治療の試みがなされているが、臨床的に満足すべき成果が得られていない。その第一の理由は腫瘍に対するgene delivery法が確立されていないことにある。トランスフェリン受容体(Tf-R)は活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現している。そのligandであるトランスフェリン(Tf)はTf-Rに結合後internalizeされた後、recycleされることからTf-遺伝子複合体は腫瘍細胞に対するin vivo遺伝子targetingに有用と考えられる。しかし、実際には、諸家の様々な工夫にも関わらず再現性、発現効率などの点で満足すべきin vivo gene delivery法とはなっていなかった。我々はavidin, biotinを架橋剤として用いTfとDNAのstoichiometric ratioをきちんとコントロールするとともにTf-Rのaffinity column上でconjugate formationすることによりTf-Rへのbinding motifが良く保たれた複合体を作製し、再現性と特異性の高いin vivo遺伝子導入法の確立に成功した(American society of gene therapy meeting, Seattle, 1998)。本研究は、この方法を用い、治療が極めて困難である播種性転移腫瘍に対する自殺遺伝子療法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

1) 癌転移マウスの作製

Tf-Rの発現が豊富なK562 cells (human erythroleukemia cell lines)、M7609 cells (human colonic cancer cell line)、TMK-1 cells (human gastric cancer cell line)をそれぞれ抗アジアロGM-1抗体投与と放射線照射で前処置したSCIDマウスの尾静

脈より投与し、3週間後に屠殺し転移巣を確認した。

2) Tf-遺伝子複合体の作製

導入遺伝子として単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK遺伝子)発現vectorであるpCAHSV-TKを用いた。複合体の作製は当教室で作製した抗Tf-Rモノクローナル抗体(5E7)を固相化したaffi-gel上で行なった。はじめに、ヒト胎盤より抽出したTf-Tf-R complexをTf-Rのaffinityを保持するためにそのまま5E7と結合させる。固相化されたTf-R-Tf complexよりdesferalを用いTfを遊離した後、aggregationを避けるため1:1のモル比でbiotin化したTfと再度結合させる。次に、streptavidinを添加し洗浄後、photoactivatable biotinによりbiotin化したbiotin化DNA (DNA1Kbpあたり0.5moleのbiotinを導入)を結合させた。最後に、desferalを用いconjugateを抽出後、透析を行なった。

3) 転移巣形成マウスに対する自殺遺伝子治療

各種癌細胞株の転移を確認後、HSV-TK遺伝子複合体を尾静脈から投与した。

治療効果は、ganciclovir投与後の生存日数を検討する群と観察途中で屠殺し転移巣の面積を β gal染色で定量するもの、および臓器重量を測定する群に分け検討した。さらに治療による副作用を検討するため、血液生化学検査およびWBC, RBC, PLT数ならびに主要臓器の病理学的検討を行った。

C. 研究結果

1) Tf-Rのaffinity columnを用いてTf-DNA複合体を作製することによりaggregationが極めて少ない

active moleculeが得られることが確認された。

2) K562細胞に対して本複合体を用いて green fluorescent protein (GFP)-DNAを導入したところ、その発現は chloroquineを加えなくても約50%と充分高かった。

3) この発現は過剰のTfの添加で抑制されたことから、Tf-Rを介した特異的なものと考えられた。

4) 125Iで標識した複合体を用いた細胞内動態の検討では、nativeTfと同様に速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内に移行した後、recycleすることが確認された。

5) In vivoでの遺伝子 deliveryの検討は、K562細胞接種ヌードマウスの尾静脈より20 μ gのTf-GFP遺伝子複合体を投与し1時間、1日-7日後にマウスを屠殺し体内分布および発現をそれぞれPCR法、RT-PCR法および蛍光顕微鏡で検討した。その結果、投与5日目には腫瘍、骨髄、筋肉にGFP-geneの存在が確認され、7日後にはほぼ腫瘍に局限した。またGFP mRNAならびにGFP蛋白の発現は腫瘍のみにみられた。以上の結果より本複合体を用いて腫瘍特異的な遺伝子導入が可能であると考えられた。

6) K562播種性転移SCID mouseにTf-HSV-TK遺伝子複合体を投与したところ、治療群で延命効果が得られた。臓器重量を卵巣で比較したところ、転移群で、平均1800mg、治療群で平均400mgと有意な治療効果を認めた。

D. 考察および結論

in vivoにおけるTf-DNA複合体を用いた腫瘍 targetingに必要な条件として、複合体が aggregate formをとらず効率良く recycleされることが必要である。本法で作製したTf-DNA複合体は、これらの条件を満たすものであった。また、Tf-Rは腫瘍以外の正常組織での発現も認められることから、これらの組織にも導入される可能性が考えられたが、実際にはTf-Rの発現の多い腫瘍組織に集積し、in vivoでの腫瘍特異的な遺伝子導入を可能にした。実際に、Tf-HSV-TK遺伝子複合体を用いた播種性転移マウスモデルで検討を行ったところ、遺伝子が選択的に播種性腫瘍に取り込まれ、治療効果が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato Y, Neda H, Sasaki K, Yamauchi N, Takahashi M, Fukaura J, Fujii S, Hirayama M, Koshita Y, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y: A novel approach for in vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. submitted

Sato T, Yamauchi N, Sasaki H, Takahashi M, Okamoto T, Sakamaki S, Watanabe N, Niitsu Y: An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa receptor gene transfection and mutein TNF administration. **Cancer Res.** 58:1677-1683 (1998)

Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, Hirayama Y, Kuroda H, Takahashi Y and Niitsu Y: Fibronectin fragment mediated retroviral transfer of glutathione-S-transferase π gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents **Hum Gene Ther.** 8: 1901-1910 (1997)

Sato Y, Koshita Y, Hirayama M, Matsuyama T, Wakimoto H, Hamada H, Niitsu Y: Augmented antitumor effects of killer cells induced by tumor necrosis factor gene-transduced autologous tumor cells from gastrointestinal cancer patients. **Hum Gene Ther.** 7:1895-1905 (1996)

2. 学会発表

Sato Y, Sasaki K, Takahashi M, Yamauchi N, Lu Y, Niitsu Y: A novel approach for in vivo gene delivery to tumor cells via transferrin by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. American society of gene therapy meeting. Seattle, 1998.

新津洋司郎、佐藤康史. Transferrin(Tf)-遺伝子複合体による癌細胞へのin vivo遺伝子導入: 第57回癌学会総会シンポジウム、1998.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

Cre/loxP 系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発

分担研究者 齋藤 泉 東京大学医科学研究所・助教授

研究要旨：部位特異的組換え酵素 Cre による「遺伝子置換反応」を応用した新しい E1 欠損型アデノウイルスベクター作製法を確立した。この方法に用いる、Cre の標的配列すなわち野生型 loxP とは組換えを起こさず変異を加えたもの同士で組換えを起こす変異型 loxP を解析した。その結果変異型 loxP の V が、従来報告されていた変異型 loxP と比較して約 2.5 倍の効率で組換えを起こすだけでなく、精度も高いことが *in vitro* 法で示された。この V を用いて「遺伝子置換反応」によるアデノウイルスベクターの作製を Cre 発現 293 細胞を用いて行った結果、3 回の継代で約 70% の目的ウイルスを得ただけでなく、293 細胞を用いた限界希釈法で簡便に目的ウイルスを単利できることも示した。この方法はアデノウイルスベクターの実用的作製法として広範囲で非常に有用性が高い方法であると考えられる。

A. 研究目的

アデノウイルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして有用性が示唆されているが、申請者らの開発した COS-TPC 法を用いても依然として作製法は煩雑であり、また現行の E1 欠損型ベクター（第 1 世代ベクター）ではウイルスそのものによる免疫原性が指摘されている。そのためウイルスゲノムの殆どの領域を目的遺伝子と置き換えた新しいタイプのベクター（guttated ベクター：第 3 世代ベクター）の作製が行われているが、非常に作製が困難で、未だ世界で数グループで作製されているに過ぎない。そこで本研究では部位特異的組換え酵素 Cre/loxP 系を応用したより簡便で応用範囲の広い新しい組換えアデノウイルス作製法の開発を目的とする。

B. 研究方法

新しい組換えアデノウイルス作製法には、従来発現 ON/OFF 制御系に用いていた Cre による DNA 配列の除去すなわ

ち「欠失導入反応」ではなく、Cre のもう一つの反応である「遺伝子置換反応」を応用する。この方法は Cre の標的配列である野生型 loxP とは組換えを起こさないが、loxP 配列に変異を加えたもの同士では効率よく組換えを起こす変異型 loxP を用いる。

「遺伝子置換反応」において最も効率が良くしかも特異性が高い変異型 loxP を検索するために *in vitro* 法を用いて解析を行った。この解析には Cre 発現組換えアデノウイルスの感染細胞由来の細胞抽出液を用いた。基質は、同一分子上に野生型 loxP と変異型 loxP を有する直鎖状基質と、環状基質の 2 分子を用いた。これらの基質と Cre を 37°C, 30 min で反応後、制限酵素で切断し電気泳動により生成物を解析した。変異型 loxP としては、以前の Cre による「欠失導入反応」の解析から (Lee and Saito, 1999)最も効率の高かった V 及び S、positive control として細胞内での「遺伝子置換反応」で報告されている 71、negative control と

して効率の低い M3 を用いた。

「遺伝子置換反応」を用いた E1 置換型アデノウイルスベクター迅速作製法の開発には、レシピエントウイルスとして、ウイルスのパッケージングシグナル (Ψ) を野生型 loxP で挟み、その下流に LacZ 等の発現単位と変異型 loxP を配した組換えアデノウイルスを構築した。また Ψ と目的遺伝子 (ここでは GFP 発現単位を用いた) を野生型と変異型 loxP で挟んだドナープラスミドを作製した。これらを Cre 発現 293 細胞へ導入し、得られたウイルスプールを継代して、各継代時の細胞から総核酸を抽出し制限酵素で置換体ウイルスの生成を調べた。また得られたウイルスを HeLa 細胞へ感染し、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察するとともに、蛍光プレートリーダーで測定した。

C. 研究結果

まず変異型 loxP の検索を行った。現在まで Cre による「遺伝子置換反応」に関しては、細胞での一変異型 loxP (loxP511 ここでは 71) を用いた報告しかない。そこで、平成 9 年度に確立した *in vitro* 法による Cre のアッセイ系を応用して、「遺伝子置換反応」をより簡便でかつ詳細な検討が可能となる *in vitro* 法で検討することを試みた。「遺伝子置換反応」においては、「欠失導入反応」の約 5 倍の Cre を必要としたが、positive control として用いた 71 で生成物が検出され、negative control の M3 では全く生成物が検出されなかった。この結果から、世界で始めて *in vitro* 法による「Cre の遺伝子置換反応」の検出系の確立に成功した。またその過程で、この反応は、一度 loxP を介した挿入反応が起こり、その後野生型 loxP 同士あるいは変異型 loxP 同士でその間の配列を欠失する反応が起

きて、最終的に置換体が生成する、という反応のモデルを明らかとした。

また変異型 loxP としては、「欠失導入反応」で 71 と同程度の生成物が出現していた V と S で検討を加えた結果、以下のことを明らかにした。i) 「遺伝子置換反応」の効率においては、V が最も良く 10.2% の置換体を生成した。次いで S が 5.3%、報告されていた 71 はこの中では最も効率が悪く 3.8% の置換体が生成していた。ii) 「遺伝子置換反応」の特異性に関しては、既に「欠失導入反応」で指摘されていたが、変異型の 71 は野生型 loxP との組換えにより 4.2% の生成物 (リーク) が確認された。今回検討した V と S では基質を 3 倍量加えても、全くリーク由来の生成物は検出されず、特異性が非常に高いことが示された。

次にこの変異型 loxP の V を用いて Cre による「遺伝子置換反応」を応用したアデノウイルスベクターの迅速作製法の開発を行った。レシピエントウイルスと GFP 発現単位を有するドナープラスミドを Cre 発現 293 細胞へ共導入し、ウイルスシード (プール) を作製した。このウイルスプールを Cre 発現 293 細胞を用いて 2 回更に継代を加え、この細胞から抽出した総 DNA を解析した結果、約 7 割が目的とする GFP 発現ウイルスであった。またこのウイルスを HeLa 細胞へ感染したところ、100% の細胞で GFP の発現が確認されたことから、このレシピエントウイルスの混在したウイルスプールの状態でも、目的遺伝子の予備的な機能確認を *in vitro* だけでなく *in vivo* においても充分に行うことが可能であると考えられた。またこのウイルスプールを 293 細胞を用いて限界希釈法で感染することにより、目的ウイルスのみを簡便に単離することも可能であった。

D. 考察

in vitro 法による「遺伝子置換反応」の検討が可能になったことで、既に報告されていた変異型 loxP71 は、効率、特異性いずれの面からも、昨年度の本研究での検索から新たに見いだされた V と S よりも劣っていたことを明らかとした。この検討結果から得られた V を用いることにより、従来よりも約 2.5 倍の効率で Cre による置換体を生成することが可能となり、新しいアデノウイルスベクター作製法の効率化にとって大きな前進であったと言える。この「遺伝子置換反応」による新しいベクター法の作製では、COS-TPC 法で取り扱いが煩雑であると指摘されていたコスミドカセットではなく、目的遺伝子を組み込んだプラスミドを用いる。そのため多くの組換えウイルスを同時に作製し、機能を比較検討することも容易になると考えられる。

E. 結論

平成 10 年度には、Cre/loxP 系による「遺伝子置換反応」を応用した新しい E1 欠損型アデノウイルスベクターの作製法を確立した。この方法では、Cre 発現 293 細胞を用いて 3 回継代を繰り返すことで、目的とする組換えウイルスを約 7 割含むウイルスプールを迅速かつ簡便に作製することが可能であった。今後はより高度な Cre を発現する 293 細胞の樹立化を目指すとともに、汎用的レシピエントウイルスの開発、guttled ベクターへの応用を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoki, Y., Aizaki, H., Shimoike, T., Tani, H., Ishii, K., Saito, I., Matsuura, Y. and

Miyamura, T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology*, 250: 140-150, 1998.

- 2) Arai, T., Matsumoto, K., Saitoh, K., Ui, M., Ito, T., Murakami, M., Kanegae, Y., Saito, I., Cosset, F. L., Takeuchi, Y. and Iba, H. A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *J Virol*, 72: 1115-1121, 1998.
- 3) Hiasa Y., Horiike, N., Akbar, S. M., Saito, I., Miyamura, T., Matsuura, Y. and Onji, M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 90-95, 1998.
- 4) Kano M., Igarashi, H., Saito, I. and Masuda, M. Cre-loxP-mediated DNA flip-flop in mammalian cells leading to alternate expression of retrovirally transduced genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 248: 806-811, 1998.
- 5) Lee, G. and Saito, I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 216: 55-65, 1998.
- 6) Lu, D., Tamemoto, H., Shibata, H., Saito, I. and Takeuchi, T. Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: Insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther*, 5: 888-895, 1998.
- 7) Nakagawa, I., Murakami, M., Ijima, K.,

- Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A. and Uede, T. Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Hum Gene Ther*, 9: 1739-1745, 1998.
- 8) Nishimura, I., Uetsuki, T., Dani, S. U., Ohsawa, Y., Saito, I., Okamura, H., Uchiyama, Y. and Yoshikawa, K. Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci*, 18: 2387-2398, 1998.
- 9) Okuyama, T., Fujino, M., Li, X.-K., Funeshima, N., Kosuga, M., Saito, I., Suzuki, S. and Yamada, M. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther*. 5: 1047-1053, 1998.
- 10) Sato, Y., Tanaka, K., Lee, G., Kanegae, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. and Saito, I. Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 244: 455-462, 1998.
- 11) Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai A., Kirino, T., Saito, I. and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Hum Gene Ther*, 9: 2683-2689, 1998.
- 12) Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., Kanegae, Y., Saito, I., Hayashi, Y., Koike, M. and Kohara, M. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem*, 273: 9001-9006, 1998.
- 13) Zhang, H. G., Bilbao, G., Zhou, T., Contreras, J. L., Gomez, N. J., Feng, M., Saito, I., Mountz, J. D. and Curiel, D. T. Application of a Fas ligand encoding a recombinant adenovirus vector for prolongation of transgene expression. *J Virol*, 72: 2483-2490, 1998.
- 14) Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I. and Ozawa, S. Postsynaptic expression of Ca²⁺-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate-type glutamate receptor channels by viral-mediated gene transfer. *Molecular Brain Res*, in press. 1999.
- ## 2. 学会発表
- 1) 斎藤 泉、佐藤友美、小高和彦、鐘ヶ江裕美、中井通雄、千葉 丈。組換え酵素を用いた欠失型・置換型ベクター開発の試み 第 57 回日本癌学会総会、横浜 (1998)
- 2) 鐘ヶ江裕美、小高和彦、佐藤友美、千葉 丈、斎藤 泉。置換型組換えアデノウイルス作製法確立の試み 第 46 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (1998)
- 3) 鐘ヶ江裕美、中井通雄、小高和彦、石村正和、佐藤友美、千葉 丈、斎藤 泉。Cre/loxP を応用した新しい組換えアデノウイルス作製法の試み 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜 (1998)
- 4) 小高和彦、鐘ヶ江裕美、千葉 丈、斎藤 泉。部位特異的組換え酵素を用いた遺伝子置換法の解析 第 21