

回日本分子生物学会 年会、横浜  
(1998)

- 5) Kanegae, Y., Nakai, M., Yamamoto, H.,  
Komiya, K., Sato, Y. and Saito, I. An  
approach for generation of E2A/L4-  
deleted adenovirus vector applying  
Cre/loxP system. The American Society  
of Gene Therapy 1st Annual Meeting,  
Seattle (1998)

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

## 「腫瘍細胞の特異的標的化を目指したベクターの開発」に関する研究

分担研究者：濱田洋文 (財) 癌研・癌化学療法センター・分子生物治療研究部

研究要旨：本研究では、腫瘍の特異的な標的化を目指した遺伝子治療のベクターの開発を行っている。(1) 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作成し、腫瘍細胞に高発現させることにより、効果的にアポトーシスを誘導できることを示した。(2) 腫瘍抑制遺伝子(p53、Rb/p16など)の変異を標的化することを目指してE1A変異型ウイルス(AxAdB3)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。(3) 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。

### A. 研究目的

本研究では、各種組織由来の難治性の癌に対する効果的な治療法の開発を目的として、レトロウイルス、アデノウイルスなどの組み換えウイルスベクターを用いて、腫瘍の特異的な標的化を目指した遺伝子治療の基礎研究を行う。

具体的には、以下のプロジェクトを進める。

(a) アポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、腫瘍抑制遺伝子などを高発現するアデノウイルスベクターを作成する。これを用いて、各種組織由来の腫瘍に特徴的なアポトーシス耐性の分子メカニズムを解析する。さらにその結果に基づいて、腫瘍特異的なアポトーシス誘導療法を開発する。

(b) 腫瘍抑制遺伝子p53などの変異を利用して、腫瘍細胞に特異的な遺伝子治療法を開発する。

(c) 細胞側の受容体分子との吸着を担うファイバー・タンパクに変異を導入することによって、癌細胞の特異的標的化が可能な変異アデノウイルスベクターを開発する。これと、上記の(a)(b)の方法とを組み合わせることで腫瘍特異性と治療効果を高める。

### B. 研究の方法と結果

(1) アポトーシス誘導療法：  
組み換えアデノウイルスベクターを用いたp73遺伝子導入によるアポトーシスの誘導：癌遺伝子p53のホモログとして発見されたp73遺伝子をアデノウイルスベクターにより悪性神経膠腫細胞へ導入して生物学的効果を調べると共に、遺伝子治療への応用を検討した。ヒトp73遺伝子のcDNAを組み込んだアデノウイルスAxCAhp73を作製し、Western blottingにより73 kDaのタンパク発現を確認した。悪性神経膠腫細胞U251、U373およびA172にアデノウイルスを感染させ、細胞数測定による細胞増殖抑制効果の検討、FACSscanによるhypodiploidyの検出を行った。また、細胞表面のFas発現は、FITCラベルした抗Fas抗体と細胞を反応させ、FACSscanにより検出した。Baxの誘導は、21 kDaのBaxタンパク発現をWestern blottingにより検出した。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。

p53遺伝子によるアポトーシスに関与しているBaxおよびFasの発現が、p73遺伝子の高発現ではどのように変化しているかを検討した。その結果、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。U373およびA172細胞ではp53、p73遺伝子の順でFas発現量が増加したが、その変化はU251細胞よりも弱かった。AxCAhp73 MOI 300の感染でアポトーシス誘導が最も強く起こったU251細胞では、FasおよびBaxの誘導が認められた。U373細胞ではp73遺伝子導入によってU251細胞と同等の細胞死が起こるにもかかわらず、U251細胞のような顕著なhypodiploidyの増加、およびFasの誘導が認められなかった。このことから、p73遺伝子によるアポトーシスにはBax以外の分子、例えばFasなどが関与している可能性が考えられる。A172細胞ではp73遺伝子導入により55%まで細胞増殖が抑制されたが、hypodiploidyの増加は認められなかった。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。

### (2) 腫瘍抑制遺伝子p53などの変異の利用：

制限増殖型アデノウイルスを用いた腫瘍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変異を有する腫瘍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。その結果細胞はS期に入りウイルスの増殖が起こる。E1A遺伝子のpRB結合領域に変異をもつアデノウイルスは、正常細胞では上述の変化を起こせない



が、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。そこで本研究ではpRB結合モチーフ (LxCxE) に変異をもつ変異アデノウイルス (AxdAdB-3) を作製し、その効果を検討した。膵癌細胞5株全てでAxElAdBによる殺細胞効果を認め、ウイルスは50~3000倍に増殖した。スキッドマウスのヒト膵癌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AxElAdB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。培養膵癌細胞に対し、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, AxClhIL-12) をAxElAdBと共感染させた。AxCAhIL-2とAxElAdBの共感染では、AxCAhIL-2単独に比べ100倍以上のIL-2の産生を認め (CTLL-2アッセイ)、AxClhIL-12との共感染においてもAxClhIL-12単独の200倍のIL-12産生を認めた (ELISA法)。さらに、前述のヒト膵癌皮下腫瘍モデルにおいて、AxElAdB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。AxdAdB-3は種々の膵癌細胞で増殖し、AxElAdBより強い抗腫瘍効果を示した。

以上の結果より、AxElAdBならびにAxdAdB-3は膵癌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。今後さらに正常組織に与える影響を検討していく。

### (3) キャプシド変異アデノウイルスの作成:

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F/MSHの作成に成功した。野性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、F/MSH変異型は強い細胞傷害をもたらす。今後、メラノーマの治療への実用化を目指して準備を進めたい。

## C. 考察

### (1) アポトーシス誘導療法:

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メカニズムにはこれらのタンパクが関与すると考えられる。今後、他のp53関連遺伝子とp73遺伝子の関係を調べ、さらにp73遺伝子の生物学的性質を検討する予定である。また、U251およびU373細胞は共にp53遺伝子変異 (273 Arg → His) を有するが、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、細胞の違い (アポトーシス関連遺伝子の発現量の差やp53遺伝子、p73遺伝子異常の有無) と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、さらにp73遺伝子を発現するアデノウイルスベクターの癌遺伝子治療への応用を検討してゆきたい。

現在までの私たちの研究では、正常細胞にアポトーシスを誘導せず、腫瘍細胞にのみアポトーシスを引き起こすような有効な遺伝子ないし遺伝子の組み合わせは見つかっていない。むしろFas ligandの刺激などに対しては容易に耐性を獲得することが明らかとなってきた。

今後、腫瘍細胞のアポトーシスの分子メカニズムを詳細に検討し、耐性をどのように克服してゆくか、耐性の獲得されにくいのはどのような方法かなどの点を明らかにし、最終的には腫瘍特異的な遺伝子変化に基づいた細胞死誘導を得る手段を見つけてゆきたい。

### (2) 腫瘍抑制遺伝子p53などの変異の利用:

いかにして正常細胞への毒性をあげないで、p53欠失腫瘍細胞に対する毒性だけを高めることができるだろうか? 膵癌に対してはアデノウイルスの感染性は比較的良好で、AxElAdBウイルスはin vitroで50~3000倍も増殖がみられた。ところが食道癌の細胞株では、アデノウイルスの感染性も低く、AxElAdBウイルスの増殖も非常に少ない。結果として食道癌に対しては、たとえp53欠失株であってもAxElAdBウイルスの治療効果はほとんど得られていない。

私たちは、E1B55Kの欠失に加えてさらにE1AのRb結合モチーフLxCxEをSxGxEに改変した制限増殖型変異アデノウイルス (AxdAdB-3) を作成し、p16/Rb欠失腫瘍の特異的標的化を試みている。AxdAdB-3は、単なるE1B55K欠失型 (AxElAdB) よりも、消化器系の癌細胞に対してはるかに強い細胞傷害能を示した。AxdAdB-3が、どのような遺伝子異常と関連して増殖し細胞傷害活性を示すかについては今後の詳細な解析を必要とするが、ともかく現在までのところで、E1Aの変異型を作成して調べてゆくことで予想外の面白い制限増殖型アデノウイルスが得られることがわかった。今後、力を注いでゆきたい有望なプロジェクトである。

E1B55K欠失ウイルス (AxElAdB) を用いた膵癌のスキッド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、スキッドマウスのような免疫不全のモデルと異なり、比較的速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。AxElAdB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であろう。現在私たちは、このE1B55Kを欠失したアデノウイルス (AxElAdB) を用いて、p53欠失細胞での増殖とアポトーシスの誘導がどこまで各種の癌細胞に当てはまる一般的な現象であるのか、また、p53欠失細胞にどこまで特異的な増殖であるのか、正常組織に対する副作用の有無とその性質、などについて解析を行っている。さらに、E1AdBを組織固有のプロモーター (AFP, CEA, PSAなどのプロモーター) 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、現在、肝癌、膵癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌などのモデルを用いて治療効果を検討している。また、パピローマウイルスなどが関与した婦人科領域の腫瘍などでは、p53のゲノムの異常がなくてもAxElAdBが有効である可能性を示すデータもあり、有望である。

E1B55Kタンパク欠損変異 (E1AdB) 型アデノウイ



ルス (AxE1AdB) に関してはすでに欧米で臨床研究がさかんに行われている。さらに、組織特異的プロモーターでE1AdBをドライブして、ウイルスの増殖に関して腫瘍特異性を高める方法も有望である。ただし、現在手に入るものは発現強度が弱い上に特異性も不十分で、臨床研究に使ってみたいと思われるほどの効果は期待できない。今後の改良に待つところが大きい。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。現在までの私たちの研究では、AxE1AdBとIL-2を併用した動物治療実験で膵癌などの消化器系癌に根治的治療効果が得られている。

### (3) キャプシド変異アデノウイルスの作成

アデノウイルスを用いた遺伝子治療法で当然予想される問題点としては、複数回投与が可能かどうかが挙げられよう。アデノウイルスのキャプシド・タンパクに対する抗体が産生されることにより、2回目以降のアデノウイルス投与に対してはウイルスの不活化がすみやかに生じる可能性がある。現在、ベクターとしてよく用いられているヒト・アデノウイルス5型に対しては、ほとんどの成人が既に感染しており、複数回の投与は困難である可能性も高い。もしこのようなウイルスの不活化が問題になるようであれば、その対処法を構じなければならぬだろう。最も単純かつ本質的な方法として、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ことが考えられる。実際、宿主の細胞への感染を担うファイバーやヘキソン・タンパクに局所的に適切な変異をいれることにより、感染能は保ったまま、抗体による中和をしばらく免れるようにすることは可能と思われる。もちろん宿主の免疫はすぐに対応してくることであろうが、さらにセカンド・ライン、サード・ラインの変異ウイルスに順番に替えてゆくことで、宿主の免疫を逃れることもできるのではないかと。つまり、インフルエンザウイルスなどが自然界で用いている戦略を私たちのベクター・ウイルスの場合にも用いることができるのではないかと考えられる。

上に述べたように、アデノウイルスのキャプシドタンパク (特にヘキソン) の型を替えることによって宿主の免疫から逃れることは可能であろう。しかし、何種ものウイルスを用意して臨床研究に用いるのは、安全性のチェックなどの問題も含めてプラクティカルにはなかなか大変であろう。述べて、これからの重要なプロジェクトとして、抗体によって中和されないようなアデノウイルス治療システムを開発してゆきたいところである。方法としては、宿主の免疫寛容をキャプシドタンパクに特異的に誘導することも可能であろう。また、変異型キャプシドを工夫することによってたとえキャプシドの表面に抗体が付着しても、キャプシドタンパクの機能が温存されるような方法も可能であろう。すなわち、中和抗体ができないような変異キャプシドの作成である。トリパノソーマやマラリアなどの原虫は上に述べたようなストラテジーも含めていくつかの方法を組み合わせ、宿主の免疫からじょうずに自らを守っている。自然界にすでに存在する宿

主と寄生体の相互関係のメカニズムから、多くの有益なヒントが得られることと思う。

### D. 結論

たとえば転移を伴う悪性黒色腫 (メラノーマ) などを、アデノウイルスベクターを用いて根治をめざす場合を想定してみよう。全身に散らばっている癌をすべて殺すのは、非常にむずかしい。ウイルスを局所に注射するような原始的な方法では役立たない。静脈内に注射して全身に散っている癌細胞にゆきわたらせる必要がある。従って正常の肝や肺などの重要な臓器には感染することなく腫瘍細胞だけに感染するようなベクターの開発が必須である。10年前ほとんど不可能と思われたこれらの条件も、ひとつずつ次第にクリアしてゆくことが可能ではないかと考え、基礎研究を進めている。

アデノウイルスの感染は、細胞表面のCARという受容体を介することが解明された。そこで、アデノウイルスのファイバーのCAR結合部位に変異をいれること (Fx) で、ほとんどの正常細胞に感染しないアデノウイルスAdv-Fxが作成できる。このような変異ウイルスは通常の293細胞ではつくることができない。しかし同じFxファイバーでも癌に対する指向性をもったペプチドリガンド (たとえばMSHなど) を付けた変異型 (Fx/MSH) を用いれば、MSHレセプターを人工的に高発現させた293細胞 (293/MSHR) ではウイルスを多量につくることが可能である。このような変異型ウイルスは、本来MSH受容体を持たない肝や肺などの正常細胞にはトラップされることなく全身投与することが可能であろう。すなわち指向性を飛躍的に高めた遺伝子治療用のベクターとなることが期待される。

もちろん、単に癌細胞に感染しやすくなったというだけでは癌細胞を殺すには不十分であり、本報告でも述べたような、癌に特異的な遺伝子変化 (p53やRb/p16など) を見分けて増殖したり殺細胞効果を発現したりする方法とじょうずに組み合わせることが大切である。

テクニカルに非常にむずかしかったキャプシド変異型アデノウイルスの作成も、本研究の成果により比較的容易に達成できるようになった。今後は複数回の全身投与が可能な、治療効果の高いベクターの開発をめざしたい。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Cao, X., Zhang, W., He, L., Xie, Z., Ma, S., Tao, Q., Yu, Y., Hamada, H. and Wang, J. Lymphotoxin 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.
9. 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.
10. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Saito, I., and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for proapoptotic genes. *Human Gene Therapy*, 9(18): 2683-2689, 1998.
11. Mano, Y., Ishii, M., Kisara, N., Kobayashi, Y., Ueno, Y., Kobayashi, K., Hamada, H., and Toyota, T. Differentiated phenotypes of cultured mouse cholangiocytes transformed by a temperature-sensitive mutant T antigen of Simian virus 40. *Lab. Invest.*, 78(11): 1467-1468, 1998.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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 lymphotoxin. *Human Gene Therapy*, 10 (7): in press, 1999.
21. 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.



分担研究報告書

アテロコラーゲンによる成体への新規遺伝子導入法の開発に関する研究

分担研究者 落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室長

研究要旨 本研究の全体的目的は*in vivo*遺伝子導入技術に基づく難治がん及び進行がんに対する新たな遺伝子治療の開発を目指す基礎研究を行うことにある。特に今年度の本分担研究では、プラスミドベクターを生体親和性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システム開発を検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は難治がん及び進行期がんを対象とし、*in vivo*で直接治療遺伝子を標的細胞に導入する方法に基づく遺伝子治療の確立を目標とした基盤的研究を行うことにある。現在がんの遺伝子治療の戦略としては免疫遺伝子治療、自殺遺伝子治療、がんの遺伝子異常に拮抗する治療法などが主なものである。このなかでがんの遺伝子異常の機能的または構造的修復を狙う戦略の研究は近年急速に進むがんの遺伝子異常の解析とゲノムプロジェクトにより、がんの治療法として大きな期待を集めている。この場合の遺伝子導入ベクターとしては、汎用されているウイルスベクター以外に、裸の、もしくはカチオン性リポソーム等で修飾されたプラスミドベクターが有力視されている。しかし、プラスミドベクターの場合、その効力はもちろんのこと、投与方法など、実際の臨床で用いる場合の多くの問題はクリアーされていない。本研究の目的は、プラスミドベクターを生体親和材料であるキャリアに保持させた形で生体内に導入し、ベクターの安定性を高め、かつ徐放することで、生体への遺伝子導入と発現の期間を制御し、安全で効果の高い遺伝子

導入法を開発することにある。

B. 研究方法

プラスミドベクターとしては、 $\beta$ -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、またキャリア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ペ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

(1) まず、プラスミドベクターを液状のアテロコラーゲンと混合した後、直径0.6 mm、長さ1.0 cmに整形し、この棒状のミニペレット内に、50 $\mu$ gのプラスミドDNAが内包されるようにした。内包された環状二本鎖プラスミドDNAは、室温または4 $^{\circ}$ Cにおいてニックなどが入る構造変化は認められず、数カ月間は安定に存在した。  
(2) このヒト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。この筋肉内に包埋された状態のミニペレットは成



分解を受けるとともにプラスミドベクターを放出し、注入された部位の筋肉細胞に導入されたり、または血流に乗り全身に運ばれ、遠隔部位の組織で導入、発現が確認された。プラスミドDNAを単独で筋肉内注射した場合、プラスミドDNAが末梢血中にPCR法で確認できる期間はおよそ2週間以内であるのに対し、ミニペレットの形で導入したマウスにおいては40日間にも渡って観察された。(3)さらに遺伝子の発現を末梢血中に産生されたHST-1蛋白質によってモニターしたところ、プラスミドベクター単独で注入した場合に比べ、ミニペレットによる導入は長期間に渡る遺伝子発現を実現した。また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長期間に渡った。(4)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日以内に外科的手術により除去することで、遺伝子発現を比較的速やかに中止することが可能であった。

#### D. 考察

近年、様々な遺伝子治療に有効性が期待されるプラスミドベクターの遺伝子導入方法では、遺伝子導入は生体の持つ酵素などにより投与直後に終了するため効果の持続には限界があり、目的の遺伝子発現を長期に渡って必要とする治療には適さない。この欠点を補うためのベクターの頻回投与は患者にとって負担となるばかりか、重篤な副作用を誘発する結果となる。また疾患の種類や症状によっては、直ちにそのベクターによる治療をストップするシステムが必要である。本研究では、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ペ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

方法が開発され、さらにこのミニペ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可能性が生まれた。今後の課題としては、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、ミニペレット内の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

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(ミニペレット)は、生体内投与後も物理的な除去が可能であり、昨年度に既に報告したアデノウイルスベクターの場合と同様、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. 論文発表

1. 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
2. Konishi H, Ochiya T., et al., Targeting killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cancer cells by retrovirus displaying a single chain variable fragment antibody. *Hum Gene Ther* 9, 235-248, 1998.
3. Masutani M., Ochiya T., et al., Establishment of poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mouse embryonic

tem cell lines. Proc. Japan Acad.  
74, 233-236 (1998).

4. 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).

5. Grako K. A., Ochiya T., et al.,  
PDGF  $\alpha$ -receptor is unresponsive  
to PDGF-AA in aortic smooth  
muscle cells from the NG2  
knockout mouse. J Cell Sci.  
in press.

6. Ochiya T. and Terada M.  
Antisense approaches to *in vitro*  
organ culture.

ANTISENSE TECHNOLOGY,  
edited by M. Ian Pastan.  
Methods in Enzymology, in press.

7. 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

「安定な遺伝子製剤」

平成10年5月22日国内特許出願、  
平成11年3月現在、国際特許出願中