

細胞増殖および細胞接着の制御によるがん遺伝子治療法の開発

主任研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 細胞生物学的な現象をつかさどる分子の遺伝子を用いて、新しいがんの遺伝子治療法を開発するために、さまざまな研究が行われた。その結果、bcl-2アンチセンスによる白血病細胞の autophagy、IGF-I 受容体遺伝子変異体による大腸癌細胞の増殖抑制、複数のアポトーシス実行分子による相乗的な遺伝子治療の可能性、慢性骨髄性白血病特異的遺伝子異常に根ざした樹状細胞免疫治療の臨床的な有効性と安全性、リボソーム化変異アデノウイルス裸DNA全身投与遺伝子治療の可能性、タモキシフェンによる人工的な造血細胞の増殖制御、条件複製型単純ヘルペスウイルスによる膀胱癌の全身療法の可能性、モノクローナル抗体を応用したイムノジーン療法の可能性、INI 1 遺伝子欠損ヒト腫瘍における欠損遺伝子補充療法の可能性、などが示された。

分担研究者

高久 史麿	自治医科大学学長
濱田 洋文	癌研究会癌化学療法センター 分子生物治療研究部部長
今井 浩三	札幌医科大学医学部 内科学第一講座教授
平井 久丸	東京大学医学部附属病院 無菌治療部助教授
官澤 文彦	国立がんセンター研究所 薬効試験部室長
間野 博行	自治医科大学分子生物学教室 助教授
矢崎 貴仁	慶應義塾大学医学部 生理学教室講師
石坂 幸人	国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部部長
北村 義浩	国立感染症研究所 免疫部室長

A. 研究目的

細胞の増殖やアポトーシスを制御するさまざまな液性因子や細胞同士の接着に関与する接着分子などは、現代の細胞生物学の中心的課題であり、がん細胞においてもこれらの事項はきわめて重要である。本研究においては、このような細胞生物学的な現象をつかさどる分子の遺伝子や遺伝子産物を用いて、新しく有効ながん遺伝子治療法を開発することを目指す。

B. 研究方法

細胞は遺伝子導入に使われうるさまざまなヒトおよびマウスの培養細胞株もしくはヒトの正常血球を用いた。樹状細胞の分離やCTLの誘導は標準的な手法により行った。遺伝子導入は、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスを用いた系や、リボソームを関した系、膜受容体へのモノクローナル抗体を介したイムノジーン法などを用いた。一部の研究においては、ウイルス自体が抗腫瘍活性を有するベクターの系（アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス）を用いた。増殖は生細胞数の算定、アポトーシスは形態評価やDNA断片化などによってそれぞれ同定した。殺細胞効果は動物実験系においても確認した。遺伝子発現調節系はテトラサイクリン反応性プロモーターを用いて構築した。

(倫理面への配慮)

患者樹状細胞を用いた（遺伝子を用いない）治

療行為（免疫細胞療法）が1件あった（平井久丸分担研究者）。患者や家族に対する口頭による十分な説明と文書による説明と同意を取った上で、所属施設（東京大学医学部付属病院）の倫理委員会の厳正な審査を受け了承を得た後に、慎重かつ適正に行われた。また、いずれの動物実験においても、各研究者が所属施設の規定（実験動物取り扱いに関する規定など）を責任を持って遵守してきた。なお、本研究には、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。また、患者の遺伝（子）情報の収集などの個人のプライバシーに関わるような調査、研究もいっさい含まれない。

C. 研究結果

- 1) 誘導発現系を用いて、白血病細胞におけるbcl-2アンチセンス遺伝子の特異的な細胞死誘導作用を明らかにした。
- 2) Dominant negative IGF-I リセプター遺伝子による大腸癌細胞株の増殖抑制とアポトーシス誘導を確認した。
- 3) アポトーシス関連遺伝子の殺細胞効果を検討し、Caspase-8とNFkB superantagonist、Caspase-9とApaf-1の併用相乗効果を見いだした。
- 4) Myelin basic protein プロモーターなどの組織特異的プロモーターの使用によって、腫瘍特異的なアポトーシス誘導が可能であった。
- 5) 2例のCML患者に対して、末梢血単核球由来樹状細胞使用BCR/ABLペプチド免疫療法を行い、問題となる短期的な副作用を認めず、1例においてBCR/ABLペプチドDTHテスト陽性、BCR/ABL陽性白血病細胞の減少が確認された。
- 6) E1欠損アデノウイルス(AxE1AdB)のTPC付加体リボ化DNAのマウス静脈内投与により、AxElAdB遺伝子の腫瘍への分布と腫瘍細胞の増殖抑制を得た。
- 7) 改良型選択的増幅遺伝子を用いることで生体内ホルモンの影響を受けずに人為的に造血幹細胞の増殖制御が可能ながんマウス in vivo において証明された。
- 8) 腫瘍特異的に複製増殖する変異HSV-G207を用いる oncolytic virus therapy の対象を、脳腫瘍の他に腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌に拡大し、臨床に即した動物モデルで治療効果と副作用のないことを確認した。
- 9) レセプター型チロシンキナーゼRET細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体やRET細

胞外ドメインに結合する新規ペプチドを用いて神経芽腫細胞及び造血幹細胞に外来遺伝子を導入し発現させた。

10) INI1(SNF5)発現するレトロウイルス(MLV)ベクターを作製し、INI1-negativeのmalignant rhabdoid tumor 由来細胞株にINI1を発現させたところ growth arrest を起こした。

D. 考察

さまざまな種類のがん細胞において、特定の遺伝子導入や特定の変異型ウイルスが腫瘍細胞のアポトーシスや増殖抑制を誘導することなどが明らかにされ、がんの遺伝子治療法の新しいモデルがいくつか示された。今後は、これらの実験系が臨床応用につながるような具体的な研究の推進が重要であると考えられた。また、得られた結果の中には全く新しい知見もあり、その機序の解析などの基礎検討も併せて進める必要があると考えられる。

E. 結論

本研究により、ウイルス自体の殺細胞効果、特定の遺伝子によるアポトーシス誘導、樹状細胞免疫療法の効果、人工的造血幹細胞増幅、などが明らかにされ、新たな遺伝子治療の可能性が示された。

F. 研究発表

1) Saeki K, Yuo A, Suzuki E, Yazaki Y, Takaku F: Aberrant expression of cAMP response element-binding protein (CREB) induces apoptosis. *Biochem J* 343:249-255, 1999.

2) Shimura M, Tanaka Y, Nakamura S, Minemoto Y, Yamashita K, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y: Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 13:621-637, 1999.

3) Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene* 18:5703-5713, 1999.

4) Shinoura N, Yoshida Y, Tsunoda R, Ohashi M, Zhang W, Asai A, Kirino T, Hamada H: Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of glioma. *Cancer Res* 59:3411-3416, 1999.

5) Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Expression level of Bcl-2 determines anti- or pro-apoptotic function. *Cancer Res* 59:4119-4128, 1999.

6) Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Kusano M, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Hosokawa M, Imai K: Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 59:3313-3316, 1999.

7) Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K: Contribution of matrilysin

(MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45:252-258, 1999.

8) Ishida T, Chada S, Stipanov M, Gabrilovich DI, Carbone DP, Imai K: Dendritic cells transduced with wild-type p53 gene elicit potent anti-tumor immune responses. *Clin Exp Immunol* 117:244-251, 1999.

9) Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H: Immuno-gene therapy against mouse leukemia using B7 molecules. *Cancer Gene Ther*, in press.

10) Ueno H, Kondo E, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Nakamoto T, Sasaki K, Mitani K, Furusaka A, Tanaka T, Tsujimoto Y, Kadowaki T, Hirai H: Association of IRS proteins with Bcl-2 and their effects on its phosphorylation and anti-apoptotic function. *Mol Biol Cell*, in press.

11) Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H: Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T-lymphocytes. *Br J Haematol*, in press.

12) Kanzawa F, Nishio K, Fukuoka K, Sunami T, Saijo N: In vitro interactions of a new derivative of spicamycin, KRN5500, and other anticancer drugs using a three-dimensional model. *Cancer Chemother Pharmacol* 43:353-363, 1999.

13) Kume A, Ito K, Ueda Y, Hasegawa M, Urabe M, Mano H, Ozawa K: A G-CSF receptor-gyrase B fusion gene: a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260:9-12, 1999.

14) Hunter WD, Martuza RL, Feigenbaum F, Todo T, Mineta T, Yazaki T, Toda M, Newsome JT, Platenberg RC, Manz HJ, Rabkin SD: Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol* 73:6319-6326, 1999.

15) Okui N, Sakuma R, Kobayashi N, Yoshikura H, Kitamura T, Chiba J, Kitamura Y: Packageable antiviral therapeutics against human immunodeficiency virus type 1: virion-targeted virus inactivation by incorporation of a single-chain antibody against viral integrase into progeny virions. *Hum Gene Ther*, in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

白血病細胞増殖抑制活性を有する
オリゴデオキシリボヌクレオチド
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、
小泉 誠、藤原康策、金子正勝
出願人：三共株式会社
特開平11-103860
(公開日：平成11年4月20日)

2. 実用新案取得

なし

3. その他

なし

細胞増殖および細胞接着の制御によるがん遺伝子治療法の開発

分担研究者 高久 史磨 自治医科大学学長

研究要旨 ヒト白血病細胞の通常状態での増殖や生存における**bcl-2**遺伝子の役割を明らかにして白血病遺伝子治療に応用するために、**bcl-2**遺伝子もしくはそのアンチセンス遺伝子の誘導発現系を用いて検討した。遺伝子誘導発現系はテトラサイクリン制御のシステム (tet-onの系) を用いた。この系を用いてヒト白血病細胞株HL-60に**bcl-2**遺伝子を過剰発現させると、この細胞の細胞密度依存性アポトーシスが抑制された。一方、**bcl-2**アンチセンス遺伝子を発現させると、**Bcl-2**蛋白は減少して、著明な細胞死が誘導された。この細胞死は、DNAの断片化、ミトコンドリア膜電位の低下、apoptosis-inducing factor (AIF) の核内移行などのアポトーシスに特徴的な所見を伴わず、電子顕微鏡での形態分析の結果、autophagyを伴うネクローシスであることが判明した。**Bcl-2**蛋白の低下が正常の血液細胞に対して影響が少ないことを鑑みれば、**bcl-2**アンチセンスを介したautophagyは、新しい白血病治療への応用が可能な現象と考えられた。

A. 研究目的

bcl-2遺伝子は、造血器悪性腫瘍の発症やその進展において重要な役割を果たしていると考えられ、造血器悪性腫瘍におけるある種の癌遺伝子とも考えられている。したがって、その作用を何らかの手法でブロックすることにより造血器悪性腫瘍の新たな治療を開発するという試みはこれまでもなされてきた。**bcl-2**遺伝子がコードする蛋白**Bcl-2**は、ミトコンドリアに局在して、細胞外からのストレスに抵抗してアポトーシスを抑制するという作用を有すると考えられているが、**Bcl-2**蛋白はミトコンドリア以外の細胞内小器官 (ライソゾームなど) にも存在する。今回、我々は**bcl-2**のミトコンドリア以外での役割と白血病細胞の (ストレスの無い) 定常状態での生存の機序を解析する過程において、**bcl-2**遺伝子のdown-regulationを介した新しい現象とその治療への応用の可能性を見いだしたので報告する。

B. 研究方法

ヒト白血病細胞はHL-60を用い、**bcl-2**遺伝子誘導発現系は、Clonetech社のTet-Onシステムを用いた。遺伝子導入はエレクトロポレーションによった。Tet-Onシステムを導入した親株はネオマイシン耐性を指標に選択し、**bcl-2**遺伝子を導入した子株はハイグロマイシン耐性を指標に選択した。遺伝子発現誘導はドキシサイクリン添加により行った。DNA断片化 (DNAラダー)、イムノブロットリング、免疫染色、形態観察 (光学顕微鏡、電子顕微鏡) などは、すべて通常の手法により行った。ミトコンドリア膜電位変化は、ローダミン123をプローベとしてFACS解析した。カスパーゼの関与は、その特異的な広域カスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究においては、動物実験、患者検体の分析、患者への何らかの物質の投与などは一切行っていない。

C. 研究結果

テトラサイクリン遺伝子発現誘導系のみを導入したHL-60細胞にドキシサイクリンを添加しても、**Bcl-2**蛋白の量に変化はなく、なんらの細胞

生物学的な変化も誘導されなかった。一方、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系とそれに対応する**bcl-2**センス遺伝子を発現したHL-60細胞では、**Bcl-2**蛋白の増加と細胞密度依存性アポトーシスの抑制が観察された。また、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系とそれに対応する**bcl-2**アンチセンス遺伝子を発現したHL-60細胞では、著明な細胞死が誘導された。

bcl-2アンチセンス遺伝子を発現したHL-60細胞での細胞死について、さらに詳細に検討した。光学顕微鏡での観察では、核クロマチンの凝集は必ずしもすべての細胞に認められず、細胞質の空胞変性が著明であった。また、核は核染色色素に染まりにくく、DNAラダーの形成も認められなかった。すなわち、アポトーシスよりもネクローシスを示唆する所見であった。さらに、電子顕微鏡による観察を行い、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の構造が保たれていることと、著明な自己食空胞 (autophagy) が認められた。従って、通常の典型的なネクローシスではなく、近年にわかに注目されている、autophagyを伴うプログラムされたネクローシスと考えられた。

次に、アポトーシスに関与するいくつかの細胞内シグナル伝達機構を検討した。まず、今回の結果が**bcl-2**に関連する細胞死であることから、ミトコンドリアの経路の検討を行ったが、ミトコンドリア膜電位も低下しておらず、AIFの核内移行も認められなかった。また、z-VAD-fmkによりカスパーゼ阻害を行っても細胞死は全く抑制されなかった。

E. 結論

bcl-2アンチセンスの遺伝子誘導発現系により、白血病細胞の自己食を伴うネクローシスを誘導することが出来た。正常細胞におけるこのような現象は報告されておらず、白血病細胞特異的な遺伝子治療として応用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

この研究内容に関してはなし。

G. 知的所有権の取得状況

この研究内容に関してはなし。

「アポトーシス関連遺伝子の発現によるがんの遺伝子治療法の開発」に関する研究
分担研究者： 濱田洋文 札幌医科大学

研究要旨： 当研究では、アポトーシス関連遺伝子の発現による癌の遺伝子治療法の開発を目的とした基礎研究を行っている。11年度は、平成10年度に引き続き、各種アポトーシス関連遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクターによる腫瘍細胞への殺細胞効果の比較、および腫瘍特異的に発現するプロモーターとの組み合わせの検討を行った。その結果、caspase-8によるアポトーシスはNFkB superantagonist (IkBdN) 併用で強化され、caspase-9によるアポトーシスはApaf-1併用で強化されることを見いだした。また、MBPプロモーター (myelin basic protein promoter) などの組織特異的なプロモーターの使用によって、腫瘍特異的なアポトーシス誘導療法とすることが可能であった。

A. 研究目的

本研究では、腫瘍細胞に特異的なアポトーシス誘導による遺伝子治療の開発を目指した基礎研究を行う。具体的には、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用いて、腫瘍特異的な細胞傷害誘導療法の検討を行う。

B. 研究方法

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アポトーシスを誘導できるかどうか、また、アポトーシス耐性が見られるものについてその分子メカニズムを解析する。さらに耐性のメカニズムを克服できるような、腫瘍特異的なアポトーシス誘導療法を開発する。

C. 研究結果

アポトーシス誘導療法： アポトーシス関連遺伝子 FAS-ligand, FAS, FADD, Bax, caspase-8, caspase-9, Apaf-1などを高発現するアデノウイルスベクターを作製した。アポトーシス関連アデノウイルスベクターを用いた生物活性を主にヒトのグリオーマ細胞を用いて検討し、以下のような結果を得た。

1. Caspaseによる遺伝子治療

a) caspase-3の単独の高発現では、アポトーシスは誘導されなかった。b) Adv-caspase-8の単独の高発現で、強いアポトーシス誘導を得た。c) caspase-8によるアポトーシスはNFkB superantagonist (IkBdN) 併用で増強された。d) caspase-9の単独の高発現でアポトーシスが誘導された。この効果は、Apaf-1の発現を併用することでさらに強化された。e) グリオーマに特異的に発現するMBPプロモーター (myelin basic protein promoter) の使用によって、腫瘍特異的なアポトーシス誘導が可能であった。

2. 腫瘍細胞のアポトーシスにおけるBcl-2 familyの役割

a) Bax高発現で細胞がアポトーシスになるかネクローシスになるかは、BaxとBcl-X_Lの発現のバランスにより決まる。b) アポトーシス抑制作用はBcl-X_Lの方がBcl-2より有効である。c) Bcl-X_Lの構造的な高発現によって、各種のアポトーシス誘導刺激に対して耐性となっている腫瘍が見られ、治療前の分子診断と、Bcl-X_Lによる耐性の克服法の開発が必要とされる。

D. 結論と考察

昨年度の研究で、癌のアポトーシス耐性メカニズムを克服し殺細胞効果を得るには、caspase-8が有用であることがわかった。今年度はさらに、caspase-8によるアポトーシスはNFkB superantagonist (IkBdN) 併用で強化されること、また、caspase-9によるアポトーシスはApaf-1併用で強化されることを見いだした。組織特異的なプロモーターでこれらの遺伝子の発現をコントロールすることによって、腫瘍特

異的なアポトーシス誘導療法とすることが可能であろう。今後は、各種組織由来の癌細胞について、さらに詳細なアポトーシス耐性の分子レベルでのメカニズムを解析し、その理解にもとづいた合理的な治療ストラテジーを開発してゆきたい。

E. 発表論文

1. Matsumoto, G., Sunamura, M., Shimamura, H., Kodama, T., Hashimoto, W., Kobai, 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*, 125(3): 257-264, 1999.
2. 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*, 44(3):366-371, 1999.
3. Inaba, M., Sawada, H., Sadata, A., and Hamada, H. 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): 349-354, 1999.
4. 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.*, 162(6):3574-82, 1999.
5. 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. in press. *Cancer Gene Therapy*, 1999.
6. Zhang Weiping, He Long, Yuan Zhenglong, Xie Zhifang, Wang Jianli, Hamada Hirofumi, and Cao Xuetao. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Hum. Gene Ther.* 10 (7): 1151-1161, 1999.
7. Seino K, Ogino T, Ju ST, Hamada H, Yagita H, Okumura K, Fukao K Biological factors that affect CD95 ligand-mediated inflammation. *Transplant Proc.* 31(2B): 893-895, 1999.
8. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Relative level of expression of Bax and Bcl-X_L determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene*, 18(41): 5703-5713, 1999.
9. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Kirino, T., Asai, A., Hashimoto, M., and Hamada, H. Adenovirus-mediated

- overexpression of Fas induces apoptosis of gliomas. *Cancer Gene Ther. in press* 2000.
10. Caplen, NJ, Higginbotham, JN, Schedl, JR, Vahanian, N., Yoshida, Y., Hamada, H., Blaese, RM, and Ramsey J. Adeno-retroviral chimeric viruses as in vivo transducing agents. *Gene Therapy* 6: (3) 454-459, 1999.
 11. Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang W., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of glioma. *Cancer Res.* 59(14):3411-3416, 1999.
 12. Matsuoka, N., Yukawa, H., Ishii, K., Hamada, H., Akimoto, M., Hashimoto, N., Miyatake, S. Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-x1 prevents cell death in primary neuronal culture of rat. *Neuroscience Lett.* 270(3):177-180, 1999.
 13. Fujii Si, Hamada, H., Fujimoto K, Shimomura T, Kawakita M Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 93(12):4328-4335, 1999
 14. Shinoura, N., Yoshida, Y., Nishimura, M., Muramatsu, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Expression level of Bcl-2 determines anti- or pro-apoptotic function. *Cancer Res.* 59(16): 4119-4128, 1999.
 15. Deguchi, J., Namba, T., Hamada, H., Nakaoka, T., Abe, J., Sato, O., Miyata, T., Makuuchi, M., Kurokawa, K., and Takuwa, Y. Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury. *Gene Ther.* 6: 956-965, 1999.
 16. Takada T, Kato K, Yagita H, Hamada, H., Okumura K Effects of immunization with tumor cells double transfected with interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes on artificial metastasis of colon26 cells in BALB/c mice. *Clin Exp Metastasis* 17(2):125-30, 1999.
 17. Hayashi S, Namii Y, Guan-Lin M, Dai-Kaku L, Kobayashi T, Nagasaka T, Yokoyama I, Hamada, H., Takagi H Effect of adenovirus-mediated gene transfer with CTLA4-Ig gene in organ transplantation. *Transplant Proc* 31(5):1944-1945, 1999.
 18. Cao X, Zhang W, Wang J, Zhang M, Huang X, Hamada, H., Chen W Therapy of established tumor with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology* 97(4):616-625, 1999.
 19. Shibagaki, N., Hanada, Yamashita, H., Shimada, S. and Hamada, H. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA1/ICAM1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA1 in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* in press, 1999.
 20. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, H., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of p33^{ING} with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* 59(21):5521-5528, 1999.
 21. Kawamura, K., Tasaki, K., Hamada, H., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumor effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Therapy* in press 1999.
 22. Sunamura, M., Sun, L., Lozonschi, L., Duda, D.G., Kodama, T., Matsumoto, G., Shimamura, H., Kobari, M., Hamada, H., and Matsuno, S. The anti-angiogenesis effect of IL-12 during early growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Pancreas* in press, 1999.
 23. Asai A, Qiu Jh, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura, N., Hamada, H., Kuchino Y, Kirino, T., High-level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274(48):34450-34458, 1999.
 24. Shinoura et al. and Hamada, H. Adenovirus-mediated gene transduction of IκB or IκB plus Bax drastically enhance tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jp. J. Cancer Res.* in press, 1999.
 25. Koyama, F., Sawada, H., Fujii, H., Hirao, T., Ueno, M., Hamada, H., and Nakano, H. The enzyme/prodrug gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene driven by the CAG promoter associated with 5-fluorocytosine administration. *J. Exp. Clin. Cancer Res. (JECRC)* in press, 1999.
 26. Shinoura, Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of p53 and Fas ligand drastically enhances apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* in press, 2000.
 27. Shinoura, Saito, K., Yoshida, Y., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of Bax with caspase-8 controlled by myelin basic protein promoter induces enhanced apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* in press, 2000.
 28. Sakurada, A., Hamada, H., Fukushige, S., Yokoyama, T., Yoshinaga, K., Furukawa, T., Sato, S., Yajima, A., Sato, M., Fujimura, S., and Horii, A. Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int. J. Oncol.* 15(6): 1069-1074, 1999.
 29. Motoi, F., Sunamura, M., Ding, L., Duda, DG., Yoshida, Y., Zhang, W-P., Matsuno, S., and Hamada, H. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Ther.* 11(2), 223-235, 2000 (Jan 20)
 30. Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-x1 protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* in press 2000.
 31. Narita, M., Takanaga, K., Yoshida, Y., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Hamada, H., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.: Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res.* in press 2000.

IGF-I レセプターの dominant negative による遺伝子治療の試み 分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学医学部教授

研究要旨 テトラサイクリン制御発現システムを用いて、IGF-Iレセプターの α -subunitの一部を dominant negative (dn) として、ヒト大腸癌細胞株 HT29 に遺伝子導入した。dn を発現させると、HT29 細胞はソフトアガーでコロニーを形成することができなかつた。また、dn を発現させた HT29 細胞は抗癌剤 CDDP や 5-FU を加えることにより、dn を発現させていない細胞に比べ、アポトーシスを起こす細胞が有意に増加した。このアポトーシスは IRS-1のシグナルをブロックした結果と考えられた。大腸癌等への臨床応用が期待される。

A. 研究目的

IGF-IR (Insulin-like Growth Factor I Receptor)とこのリガンドはヒトの多くの癌(特に大腸癌や肺癌)で過剰発現しており、癌化に重要な役割を担っている。そこで IGF-IR の機能を抑制することで癌治療への応用が可能であるかを検討するため、IGF-IRの dominant negative(dn)を作製した。また、IGF-IR/dn がブロックする細胞内シグナルについても検討を加えた。

B. 研究方法

IGF-IR の α 鎖の一部であるアミノ酸残基486をコードするDNAをテトラサイクリン制御発現システムのベクターに導入し、ヒト大腸癌細胞株 HT29 に遺伝子導入した(HT29/dn)。この細胞はテトラサイクリン存在下では IGF-IR/dn を発現しないが、非存在下では IGF-IR/dn を産生する。この細胞を用いてソフトアガーでのコロニー形成能や抗癌剤を加えたときのアポトーシス誘導能を検討した。さらにシグナル伝達の阻害について IRS-1, Akt-1, MAPK のリン酸化についても検討した。

C. 研究結果

HT29/dn 細胞はテトラサイクリン非存在下ではほとんどコロニーを形成できず、テトラサイクリン存在下に比較し1000分の1以下であった。抗癌剤 CDDP や5-FUを培養液に加えると、IGF-IR/dnを発現させたものでは、発現させないものに比べアポトーシスを起こしている細胞が2-3倍に増加した。IGF-IR/dnを発現させたHT29細胞は

IRS-1やAkt-1のリン酸化が抑制されていたが、MAPKのリン酸化は抑制されなかつた。

D. 考察

ヒト大腸癌細胞株にIGF-IR/dnを発現させることで、ソフトアガーでの非附着性コロニー形成能を阻害し、抗癌剤存在下でのアポトーシスを誘導したことから、大腸癌などの治療応用が期待される。今後IGF-IR/dn をアデノウイルスベクターなどに導入し検討を加えたい。

E. 結論

IGF-IR/dnは非附着性増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導した。この抗腫瘍効果は、IRS-1, Akt-1 のリン酸化を抑制するためと考えられた。

F. 研究発表

- 1) Okuda H, Adachi M, Miyazawa M, Hinoda Y, Imai K: Protein kinase C alpha promotes apoptotic cell death in gastric cancer cells depending upon loss of anchorage. *Oncogene* 18:5604-5609, 1999
- 2) Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K: Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45: 252-258, 1999
- 3) Ishida T, Chada S, Carbone D P, Gabrilovich D I and Imai K: Dendritic cells transduced with wild type p53 gene elicit potent antitumor immune response. *Clin Exp Immunol* 117: 244-251, 1999

分担研究報告書

「細胞増殖および細胞接着の制御によるがんの遺伝子治療法の開発」班
「慢性骨髄性白血病に対する樹状細胞を用いた免疫療法」に関する研究
分担研究者：平井久丸（東京大学医学部無菌治療部・助教授）

研究要旨：がんに対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発を目的とし、慢性骨髄性白血病(CML)患者に対し樹状細胞を用いた治療を行い、その安全性及び抗白血病効果誘導の有無を検討した。患者末梢血より取り出した樹状細胞にbcr/ablペプチドをパルスしリンパ球と混合培養することにより、bcr/ablペプチド特異的な細胞障害性T細胞(CTL)が特定のbcr/abl型、HLA型で樹立された。このことからin vivoにおいてもbcr/ablペプチドをパルスした樹状細胞を投与することにより抗白血病効果が期待される。当院倫理委員会の承認のもとに3人のCML患者に対し樹状細胞療法を行った。現在までに問題となる副作用は確認されておらず、安全な治療であると考えられる。治療に対する免疫反応及び臨床効果が一部認められたが一過性であった。今後、樹状細胞の質的ならびに量的な改善を加え、より強力な抗白血病効果の誘導を試みる予定である。

A. 研究目的

CML細胞はbcr/ablキメラ蛋白を発現するが、その切断点を含むペプチドは腫瘍特異的であり腫瘍拒絶抗原となりうる。健常人末梢血よりbcr/ablペプチド特異的なCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞が誘導できる。我々は昨年度、CML患者末梢血においてもbcr/ablペプチド特異的なCD8陽性T細胞の誘導がbcr/ablの切断点の型(b3a2)及びHLAの型(A*0201, A*2402, etc)において可能であることを報告した。今年度我々は、bcr/ablをパルスした樹状細胞をCML患者に投与し、この治療法の安全性と効果に関しての検討を行うことを目的に研究を行った。

B. 研究方法

bcr/ablの切断点がb3a2型で、HLA型がA*0201またはA*2402の3名のCML患者において樹状細胞療法を行った。患者末梢血よりアフエーシスにて単核球を分離し、更に比重遠心分離を行い、樹状細胞を精製する。これにbcr/ablペプチドまたコントロールとしてKLH蛋白をパルスし、採取から48時間後に患者に静注にて戻した。以上を2週間隔で計4回施行した。副作用は理学所見、検査所見等で評価した。免疫学的評価は、治療前後にペプチドをパルスした樹状細胞でDTH試験、T細胞のクローナリティーをRT-PCR-SSCP法で解析する方法などで行った。また臨床評価としては染色体、FISHなどによる評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、すでに東京大学医学部倫理委員会承認を受けており、実際の臨床試験において十分な説明を行い患者の同意を得た。

C. 研究結果

- 3例のCML患者に樹状細胞療法を行った。アフエーシスによりCML患者においても樹状細胞が得られることがわかったが、その数は健常人に比し少ない可能性が示唆された。
- 3例の患者において樹状細胞療法による重篤な副作用は現在までに認められていない。
- 治療による免疫学的な反応では、治療開始8週

後頃よりKLHあるいはbcr/ablペプチドに対するDTH反応が一部認められたが何れも一過性であった。また、クローナルなT細胞の集積の出現あるいは消失が治療後の一部症例に認められた。

4. 一部症例においてはFISHにおいて一過性にbcr/abl陽性細胞の割合の減少を認めた。しかし、染色体レベルでは明らかな効果は認められなかった。

D. 考察

CML患者末梢血よりアフエーシスにて得られた樹状細胞の数は少なく、今後治療効果を高めるためにはサイトカインにより単球由来樹状細胞を調製し樹状細胞の投与量を増やす必要があると思われる。また、今回の症例においては副作用は認められず、樹状細胞療法は比較的安全であると考えられた。治療効果に関しては免疫学的および臨床的效果は一部認められたと考えられるが、効果は限局的であった。今後は樹状細胞の投与量、投与回数を増やす、IL-2等のサイトカインを組み合わせる、in vitroで増幅したCTLを投与するなどの方法を検討し、治療効果をより増強させたいと考えている。

E. 結論

CML患者に対し樹状細胞療法を行った。副作用は少なく安全であると考えられた。治療効果は限局的であった。今後、治療法を改善していくことにより、臨床的有用性が得られる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H. Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T-lymphocytes. Br. J. Haematol. (In press)

Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. Immunogene therapy against mouse leukemia using B7 molecules. Cancer Gene Therapy (In press).

アデノウイルスの TPC 付加体リポ化 DNA (DNA-TPC) を用いた
アデノウイルスの全身的投与による遺伝子療法の基礎的研究

分担研究者 官澤文彦 国立がんセンター研究所薬効試験部

研究要旨

E1欠損アデノウイルス (AxE1AdB) の TPC付加体リポ化DNAのマウス静脈内投与により、AxE1AdBの遺伝子は腫瘍に分布しヒト大腸がん細胞の増殖抑制を示した。

A. 研究目的

アデノウイルスを用いたがんの全身的遺伝子導入によるがん治療法の開発を目的で研究を行った。昨年度はリポソームの組織選択性を高い高発現アデノウイルスベクター (AdexCA: E1A, B欠損非増殖型) の遺伝子分配の可能性を検討した。

(1) *in vitro* における Adex の感染に比して Adex/DNA のリポフェクションは効率が悪く、Adex/DNA-TPC の導入により発現効率の増加を認めた。(2) *in vivo* におけるリポ化 Adex/DNA-TPC はリポソームの種類により臓器への遺伝子分配・発現が異なることが示された。(3) E1A 陽性 293 細胞に細胞内増殖型 Adex をリポ化 Adex/DNA-TPC で導入した場合に Adex が Virion として再構築され隣接細胞に感染しうることを示した。本年度は一方宿主細胞の遺伝子に拘束された増殖により抗腫瘍効果を示す E1A 陽性、E1B 陰性アデノウイルス由来 DNA の同法による *in vivo* 全身投与を行い同法による抗腫瘍効果を検討した。また静脈内投与によるウイルスの正常および腫瘍組織への到達性、遺伝子導入効率を検討した。

B. 研究方法

(1) *in vitro* における抗腫瘍効果の検討には MTT 法での増殖抑制試験を用いた。(2) *in vivo* における抗腫瘍効果は、SBC-3 (ヒト小細胞肺癌) と WiDr (ヒト大腸癌) 担癌 BALB/c nu/nu マウスに 5×10^8 pfu の AxE1dB (i. v.) および $15 \mu\text{g}$ リポ化 AxE1AdB/DNA-TPC (i. v.) を行い、腫瘍体積 (短径² × 長径/2) の経時的変化をもって評価した。

(3) 担癌マウス各臓器における AxE1AdB の E1A を PCR 法で検出し、*in vivo* における AxE1AdB とリポ化 AxE1AdB/DNA-TPC のウイルス分配を検討した。

C. 研究結果

(1) *in vitro* 増殖抑制試験で AxE1AdB は、m. o. i=1 程度でヒトがん細胞に対し経時的に増殖抑制効果を示した。(2) *in vivo* において AxE1AdB の静脈内投与で抗腫瘍効果は認められなかったものの、リポ化 AxE1AdB/DNA-TPC によって腫瘍増殖の抑制が認められた。その効果は投与後 10 日前後まで持続し、その後再増殖が認められた。また治療開始時の腫瘍径が小さい場合の方が抗腫瘍効果を強く認めた。(3) AxE1AdB を投与したウイルス遺伝子は脾および肝臓に分布している

のに対しリポ化 AxE1AdB/DNA-TPC を投与した場合は脾臓および腫瘍に分布していた。さらに、腫瘍内ウイルス遺伝子は投与後 7 日まで検出した。

D. 考察

反復投与もしくは抗腫瘍効果増強のための遺伝子を組み込むことにより、同法による一層の抗腫瘍効果を得る可能性が示唆される。がん選択的ウイルスによる全身療法の可能性が示唆された。反復投与もしくは抗腫瘍効果増強のための遺伝子を組み込むことにより同法による一層の抗腫瘍効果を得る可能性が考えられた。

E. 結論

リポ化 AxE1AdB/DNA-TPC の投与はウイルスを腫瘍に分配させ、がん選択的増殖能を有するウイルスによる全身療法の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) F Kanzawa, et al: In vitro interactions of a new derivative of spicamycin, KRN5500, and other anticancer drugs using a three-dimensional model. Cancer Chemother Pharmacol 43:353-363, 1999:

3) Fukumoto, H., et al. Activation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine, UCN-01. Invest New Drugs (in press).

2. 学会発表

1) F. Kanzawa, F. Koizumi, T. Nakamura, T. Sunami, N. Saijo, T. Yoshioka, and K. Nishio. In vitro synergistic interactions between the cisplatin analog nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan. (89th Annual Meeting of AACR, p293, 1999)

G. 知的所有権の取得状況

3. 特許取得

なし

4. 実用新案登録

なし

5. その他

なし

「改良型選択的増幅遺伝子を用いた造血幹細胞の増殖制御」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部助教授

研究要旨：悪性腫瘍に対する化学療法の結果生じる重篤な副作用の一つとして骨髄抑制がある。遷延する汎血球減少症は敗血症や出血などをもたらすため、骨髄抑制の程度によって抗癌剤の用量限界が規定されることが多い。しかし造血幹細胞の増殖が人為的に制御可能となれば、旧来にない集中的な化学療法が可能となると予想される。我々は本研究計画において、エストロジェンの誘導体であるタモキシフェンによって活性化される変異顆粒球コロニー刺激因子受容体を用いることにより各種血液細胞株をタモキシフェン依存性に増殖可能なことを確認した。さらにこの変異受容体発現レトロウィルスを用いてマウス骨髄細胞に感染させることでタモキシフェン依存性のコロニー産生が誘導されることを明らかにした。今後はカニクイザルを動物モデルとして検証することで、本システムが霊長類動物の生体内においても機能することを明らかにしていく予定である。

A 研究目的

抗癌剤がもたらす重篤な副作用として骨髄抑制作用があり、そのために抗癌剤の投与量の上限が規定されることが多い。そこでヒトの造血幹細胞の自己複製を人為的に制御することができれば大量の抗癌剤を使用した後に造血を促進することが可能であり、旧来にない集中的な化学療法が行えると予想される。我々はこの目的のために顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体(GR)と変異型エストロジェン受容体(TmER)との融合蛋白(GR-TmER)を作成し、これを「分子スイッチ」として用いて造血幹細胞増殖の制御を目指す。

B 研究方法

(1)細胞外領域の一部を欠失した GR と、タモキシフェン(Tm)に特異的に反応する変異体 ER(TmER)との融合蛋白質(GR-TmER)をコードする cDNA を作成した。本蛋白が Tm 依存性に二量体化し GR のシグナルを活性化することを検証した。
(3)マウス骨髄細胞に GR-TmER 発現レトロウィルスを感染させ、骨髄単核球由来のコロニーが Tm 添加で増加することを確認した。
(倫理面への配慮)現段階ではヒト検体を用いていない。

C 研究成果

(1)GR-TmER を導入したマウス IL-3 依存性細胞株 BA/F3 は IL-3 だけでなく Tm 添加によっても増殖したが、G-CSF あるいはヒトの生理的濃度のエストロジェンに対する反応性は認められなかった。
(2)GR-TmER およびクラゲ緑色蛍光物質(GFP)の両蛋白を発現するレトロウィルスを作成した。マウス骨髄より調整した新鮮単核球に本ウィルスを感染させ、Tm あるいはエストロジェン添加によるコロニー形成能を検討したところ、Tm 添加によってのみ著明な各種コロニー形成が確認された。また得られたコロニーの殆どで緑色

の蛍光が確認された。

D 結論および考察

GR-TmER は Tm 依存性に GR の細胞内シグナルを伝達すること、またその作用は G-CSF、エストロジェン刺激によっては誘導されないことがわかった。本システムが長期に渡る造血の場で如何に働くかをカニクイザルをモデル動物として検証する予定である。

E 研究発表

- 1) Maeda Y et al: Endogenously Generated Nitric Oxide by Nitric-Oxide Synthase Gene Transfer Inhibits Cellular Proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 387-393, 2000.
- 2) Kume A et al: A G-CSF receptor-tyrosine kinase fusion gene: a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 9-12, 1999.
- 3) Venkataraman C et al: Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J. Immunol.* 162: 4053-4061, 1999.
- 4) Ohya K et al: Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11976-11981, 1999.
- 5) Mano H: The Tec family protein-tyrosine kinases: a subset of kinases for a subset of signalings. *Int. J. Hematol.* 69: 6-12, 1999.
- 6) Mori M et al: β_2 -microglobulin identified as an apoptosis inducing factor and its characterization. *Blood* 94: 2744-2753, 1999.

F 知的所有権の取得状況

本法の特許を申請中。また造血幹細胞に外来遺伝子を発現させるために用いるプロモーターとして tec チロシンキナーゼ遺伝子のプロモーター領域の特許を申請し認可されている(出願番号：特願平 8-54294、公開番号：WO97/34007、国際出願番号：PCT/JP97/00741)。

変異ウイルスを基軸とした悪性腫瘍の複合遺伝子治療

分担研究者 矢崎 貴仁 慶應義塾大学医学部 生理学 専任講師

研究要旨 これまで広範囲な宿主を標的として、感染後細胞融解的に複製増殖する単純ヘルペスウイルス(HSV)を遺伝子操作することにより悪性細胞に特異性を持たせ、それをヘルパーウイルスとして抗腫瘍遺伝子を発現する HSV ベクターを構築し、多機能を同時に発揮させる新しい治療法の開発を検討してきた。条件複製型 HSV-G207 をヘルパーウイルスとした浸潤抑制遺伝子 TIMP2、腫瘍免疫誘導サイトカイン IFN- γ 、および IL-12 発現 HSV ベクターの有効性を確認した。本年度はベクターの安全性とより効果的な臨床応用の方法を探る目的で、ベクターの投与方法を複数のモデルにて検討し、最終的には経静脈投与による全身療法が可能である根拠となる結果を得た。

A. 研究目的

癌に対する遺伝子治療では、機能遺伝子をいかに効率良く導入するかが鍵となる。また、単一遺伝子異常でおこる癌は少なく、ある異常遺伝子を正常遺伝子で置換するという発想には限界がある。これらを克服するため、細胞傷害性ウイルスそのものを腫瘍内で特異的に複製させ、それに追従して複数の機能遺伝子を効率良く発現させることで、実用化しやすい単一ベクター上で、効率の高い複合治療システムを得ること、および毒性減弱型のベクターを用いることで進行癌をも対象とする全身投与が可能かどうかを検討目的とする。

B. 研究方法

(1)ヘルパーウイルスに条件複製型 HSV-G207 を用い、TIMP2, IFN γ を発現する defective HSV vector を Vero cell 上で作製する。(2)組換えウイルスの生物学的活性の解析: *in vitro* でウイルス増殖能・細胞傷害活性等の解析を行う。組み換えウイルスが最も高い生物学的活性を示した細胞を選択し、マウス皮下に腫瘍細胞を移植し、腫瘍の浸潤・増殖を経時的に検討する。また、脳腫瘍細胞については頭蓋内移植モデルを作成し、ウイルスの局所注入による腫瘍の治療効果を見るための生存解析を行う。(3)全身投与の解析: 膀胱癌株化細胞を用いて膀胱腫瘍モデルを作成し、G207 を経尿路的に膀胱注し腫瘍抑制効果を膀胱重量、組織所見より解析する。また皮下移植モデルを転移のモデルと想定して尾静脈より G207 を静注し、腫瘍成長抑制効果と副作用を解析する。(倫理面への配慮) 研究の進行に合わせ患者サンプルを使用する際にはインフォームドコンセントを徹底させる。

C. 研究結果

(1)HSV の複製開始配列 ori と、パッケージングシグナルを含む pBR322 起源のプラスミドを用いて、

CMV プロモーター下流に TIMP2、IFN γ を組込んだアンプリコンプラスミドを構築後 HSV-G207 をヘルパーウイルスとして各遺伝子を発現する defective HSV vector を作成した。

(2)*in vitro* 局所投与の解析では、親ウイルス HSV-G207 と各々の defective vector のウイルス産生能に大きな差は認められず、plaque forming 法による細胞傷害活性の解析でも、ヘルパーウイルスを同濃度で感染させる限りは両者に差は認めなかった。これらの結果は新たに作成したベクターにおいてもヘルパーウイルスによる細胞傷害活性が維持されていることを示す。*In vivo* の解析では、G207 のみ、G207+IFN γ 、G207+TIMP2、G207+IFN+TIMP2 の順に効果の増大が認められた。

(3)膀胱癌を用いた *In vivo* 解析: Intravesical therapy, 静注による血管内投与ともに著明な腫瘍抑制効果が認められ、他臓器への副作用は認められなかった。

D. 考察と結論

HSV-G207 をヘルパーウイルスとして機能遺伝子を同時発現する HSV vector を開発し、TIMP2 と IFN γ を付加することで治療効果が増強することが判明した。毒性減弱型 G207 は、膀胱内投与や静脈投与が副作用無く可能であることが示唆された。今後、進行癌を含めて応用範囲を広げられるか詳細な検討をしたいと考えている。

E. 研究発表

1. Hunter WD., Yazaki T., et al. J Virol. 73, 6319-6326, 1999
2. Yazaki T., Kawase T., et al. in "Neurosurgery " European Association of Neurosurgical Societies (EANS)(ed.) Monduzzi Editore, Via Ferrarese, Italy, pp303-309, 1999
3. Fujimori EK., Yazaki T., et al. J Comp Neurol. 275-288, 2000

モノクローナル抗体を用いた細胞特異的遺伝子導入法の確立から
ペプチドを用いた遺伝子導入への展開

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター

研究要旨 非ウイルス性ベクターシステムによる細胞特異的な遺伝子導入法の確立を目指して、モノクローナル抗体及びペプチドを用いた遺伝子導入法の開発を試みている。今年度はパイロット実験として、新規に作成したレセプター型チロシンキナーゼ、RETに対するモノクローナル抗体 (NBL-1)により、神経芽腫細胞に対する選択的な遺伝子導入が可能になることを明らかにした。さらに、リコンビナントRET蛋白質に結合するペプチド (RBP-1;RET Binding Peptide) を同定し、ビオチン化RBP-1により神経芽腫細胞に対する外来遺伝子導入発現が可能になった。今後、このようなベクターシステムによるin vivoでの抗腫瘍効果を明確にした後、新規モノクローナル抗体を用いた細胞特異的遺伝子導入の一般化とペプチドを用いた新しいベクターシステムの構築に向けた試みを行う予定である。

A. 研究目的

モノクローナル抗体を用いた細胞選択的な遺伝子導入の一般化とペプチドを用いたベクターシステムの簡便化を目的とする。本年度は、パイロット実験として、既知膜抗原であるレセプター型チロシンキナーゼRETに対する抗体 (NBL-1) を用いたin vitroでの遺伝子導入を行うとともに、RETに結合するペプチドの同定とこれを用いた遺伝子導入を試みた。

B. 研究方法

RET遺伝子の細胞外ドメインを酵母を用いて発現精製し、これを抗原としてIgA型マウスモノクローナル抗体を得た。ペプシン処理後のF(ab')₂をビオチン化し、アビジン化ポリリジン (PLA) 及びプラスミドからなる複合体を用いて外来遺伝子を導入した。リポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子を使用し、その活性を測定した。RET結合ペプチドは、リコンビナントRET蛋白質を用いてランダムペプチドライブラリ (Invitrogen社製) から検索し、ビオチン化合成ペプチドを用いた遺伝子導入を試みた。

(倫理面への配慮) 本年度の研究では、患者由来検体は用いなかった。

C. 研究成果

① 神経芽腫細胞への遺伝子導入 ; NBL-1を用いることにより、神経芽腫細胞に対する選択的な遺伝子導入が可能になった。ルシフェラーゼ活性で、約1.8倍の発現効率の上昇が誘導された。また、薬剤耐性を指標としたコロニー法により、NBL-1による薬剤耐性細胞の有為な増加が認められた。

② RET結合蛋白質の同定とこれを用いた遺伝子導入 ; 8個のアミノ酸からなるRET結合ペプチドを同定した。N末にビオチンを添加したRBP-1により、ルシフェラーゼ活性で数十倍の活性が誘導された。

D. 考察

モノクローナル抗体や膜抗原に結合するペプチドによる外来遺伝子導入が可能になることが明らかになった。今後in vivoの実験を行い、担癌マウスに対する抗腫瘍効果の有無を検討する一方、現在得られている

抗体で、大腸癌を標的化することが可能なクローンを用いた大腸癌標的遺伝子治療法の開発を行う予定である。

E. 結論

モノクローナル抗体からペプチドを用いた遺伝子導入システムへの展開の可能性が示された。今後、種々ベクター抗体からペプチドベクターへの変換による細胞特異的遺伝子導入法の一般化と簡略化が可能になると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. Mori, M., et al. b2-microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization. *Blood* 94, 2744-2753, (1999)
 2. Shimura, M., et al. Inhibition of Vpr-induced cell cycle abnormality by quercetin; a novel strategy for searching compounds targeting Vpr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 308-316, (1999)
 3. Minemoto, Y., et al. Multiple centrosome formation induced by the expression of Vpr gene of human immunodeficiency virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 379-384, (1999)
 4. Shimura, M., et al. Micronuclei formation with chromosome breaks and gene amplification caused by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus. *Cancer Res.* 59, 2259-2264, (1999)
 5. Shimura, M., et al. Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 13, 621-637, (1999)

2. 学会発表

1. Yano, L., Shimura, M., Takaku, F., Ishizaka, Y. Specific gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody to RET. *The 5th JSGT*, 1999, Tokyo
2. Date, T., Shimura, M., Yano, L., Takaku, F., Ishizaka, Y. Preparation of monoclonal antibodies useful as vectors for cell specific gene transfer. *The 5th JSGT*, 1999, Tokyo

G. 知的所有権の取得状況 ; 申請準備中

分担研究報告書

Ini1(SNF5)に関する研究

分担研究者 北村義浩 国立感染症研究所・室長

研究要旨

ヒト*ini1*遺伝子は、クロマチン・リモデリング因子の一つであるSNF5をコードしている。malignant rhabdoid tumorsの一部でこの*ini1*を欠失していることが知られている。*ini1*-negativeなヒト細胞株に*ini1*を発現せしめたところコロニー形成阻害（増殖抑制）が観察された。*ini1*をtransientに発現せしめた場合、cell cycle arrestは認められなかったが、一方、apoptosisのマーカであるPARPに対する抗体で染色される細胞が出現してきた。よって、*ini1*発現がapoptosisを起こしたことによって増殖抑制を引き起こしたものと推測される。

A.研究目的

ヒト*ini1*遺伝子は、クロマチン・リモデリング因子の一つであるSNF5をコードしている。malignant rhabdoid tumorsの一部でこの*ini1*を欠失していることが知られている。*ini1*の発ガンにおける役割の解明が大いに期待されている。

本研究の目的はヒト*ini1*遺伝子の発ガンにおける役割を明らかにすることと、それを利用してガンに対する遺伝子治療法を開発することである。

B.研究方法

ini1-negativeなヒト細胞株、G401とTM87-16に*ini1*のcDNAを導入してSNF5を発現させて、stable expression cloneを樹立できるか否かを調べる。

またこれら細胞に*ini1* cDNAを導入し、transientにSNF5を発現せしめ、細胞のcell cycle状態をFACSを用いて解析する。同時に、apoptosis markerタンパク質を免疫染色する。

C.研究結果

G401とTM87-16に*ini1*を発現せしめたところコロニー形成が1%程度にまで阻害され、*ini1*の細胞増殖抑制機能が示唆された。コロニー形成阻害はSNF5のrepeat1を欠く*ini1*ΔBBをtransientに発現せしめた場合には認められなかった。*ini1*をtransientに発現せしめた場合、cell cycle arrestは認められなかったが、一方、apoptosisのマーカであるPARPに対する抗体で染色される細胞が出現してきた。

D. 考察

*ini1*陰性細胞株においては、*ini1*発現がapoptosisを起こしたことによって増殖抑制が引き起こされたと推測される。この増殖抑制にはSNF5のrepeat 1の領域が必要であると思われる。

E.結論

*ini1*発現は*ini1*陰性細胞株においてapoptosisを引き起こした。

F.研究発表

なし

