

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

遺伝子治療のための標的遺伝子導入技術の開発に関する研究

主任研究者 島田 隆 日本医科大学第二生化学教室教授

研究要旨

本研究は次世代の重要な遺伝子治療技術と考えられている、細胞ターゲティング技術の開発を目指している。エイズ遺伝子治療のためのリンパ球特異的遺伝子導入法として高力価の HIV ベクターを調製し、ヒトの初代培養リンパ球に高率に遺伝子導入できることを示した。更に、NOD-SCID マウスを使った実験で、HIV ベクターによる *in vivo* でのリンパ球特異的遺伝子導入が可能であることを示した。レトロウイルスの受容体 (EcoRec) 遺伝子を組織特異的プロモーターで発現させるベクターと、マーカー遺伝子を持つレトロウイルスベクターを組み合わせた二段階法を開発し、HIV 感染細胞、肝癌細胞、筋芽細胞に特異的な遺伝子導入を行った。更に、塩基性ミエリン蛋白質 (MBP) のプロモーターと CD4 遺伝子を持つアデノウイルスベクターと、HIV ベクターをマウス脳内に注射することで、オリゴデンドログリア細胞を特異的に遺伝子導入できることを示した。アデノウイルスベクターと HIV ベクターを組み合わせた遺伝子導入法により、非分裂細胞の細胞特異的遺伝子導入が可能になった。

A. 研究目的

現在、臨床試験で使われているウイルスベクターは、細胞に対する特異性がなく、標的細胞以外の細胞にも遺伝子が導入されてしまう。従って *in vivo* でベクターを投与した場合、生殖細胞にも遺伝子が導入されてしまう可能性がある。又、自殺遺伝子などの毒性遺伝子を使ったガンやエイズの遺伝子治療では、正常細胞への遺伝子導入は重篤な副作用の原因となる。これらは遺伝子治療の重要な安全性の問題と考えられている。更に、他の細胞への感染でベクターが消費されてしまうことは、標的細胞への導入効率を下げる大きな原因の一つとなっている。これらの問題点を解決するため、

特定の組織にだけ遺伝子を導入し発現する標的遺伝子導入法の開発を行う。

B. 研究方法

1) HIV ベクターによる *in vivo* リンパ球特異的遺伝子導入

NOD-SCID マウスを抗 NK 抗体にて処理後、ヒト末梢血単核球を腹腔内に移植し hu-PBL NOD-SCID マウスを作製した。GFP 遺伝子を組み込んだ高力価 HIV ベクターを調製し、腹腔内に投与し、10日後に、マウスの末梢血、腹水、肝臓、脾臓より単核球を分離し、CD4 と GFP の発現を FACS で解析した。

2) 二段階法によるオリゴデンドロサイト

特異的遺伝子導入

オリゴデンドロサイトに特異的に発現しているミエリン塩基性蛋白 (MBP) のプロモーターと CD4 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AdMBPCD4) を作製した。HIV の co-receptor である CXCR4 を供給するためのアデノウイルスベクター (AdCACXCR4) も作製した。標的細胞としては、*in vitro* の実験ではラットの神経初代培養細胞を、*in vivo* の実験では定位脳固定法を用いてベクターをラット脳に直接注入した。オリゴデンドロサイトの同定は Carbonic anhydrase II (CAII) に対する抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡により解析した。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした実験は行っていない。動物実験については日本医科大学実験動物倫理委員会の許可を得た。

C. 研究結果

1) HIV ベクターによる *in vivo* リンパ球特異的遺伝子導入

ベクターを投与したマウスの各臓器に組織学的な変化は見られなかった。野生型 HIV の出現も認められなかった。末梢血、腹水、肝臓、脾臓のすべての単核球において CD4 陽性細胞のみに 1-2% の効率で GFP 遺伝子の発現が確認できた。細胞から抽出した DNA の PCR 解析においても 0.1-1% の細胞へのベクターの組み込みが認められた。

2) 二段階法によるオリゴデンドロサイト特異的遺伝子導入

我々の開発した、二段階遺伝子導入法を

使って非分裂細胞に対する細胞特異的遺伝子導入を試みた。ラットの初代培養細胞に AdMBPCD4 と AdCACXCR4 を感染させると、CAII 陽性細胞で特異的に CD4 が発現していることが認められた。その後、GFP をもつ HIV ベクターを感染させると、CAII 陽性オリゴデンドロサイトでのみ GFP が発現していることが確認できた。

In vivo でのオリゴデンドロサイト特異的遺伝子導入を検討する目的で、ラットを麻酔後、定位脳固定法を用いて AdMBPCD4 と AdCACXCR4 の脳内への注入を行った。その後、HIV ベクターを同じ場所に注入し、GFP の発現を調べた。レーザー顕微鏡により抗 CAII 抗体の蛍光と、GFP の蛍光を比較すると、GFP 遺伝子はオリゴデンドロサイトでのみ発現していることが確認された。

D. 考察

特定の細胞だけを治療するための遺伝子導入法の開発は遺伝子治療を実用化するための最も重要な基盤技術と考えられており、これまでも多くの研究が行われている。最も単純な方法は組織特異的プロモーターを使って、遺伝子の発現レベルで特異性を出そうとする方法である。組織特異的プロモーターを内部プロモーターとして持つレトロウイルスベクターを使った方法が報告されている。しかし、この方法では発現しない遺伝子が、標的細胞以外の細胞にも組み込まれてしまうことになる。

レトロウイルスはエンベロープが細胞側レセプターと結合し、引き続いて起こるエンベロープと細胞膜との融合により細胞内に入ります。従って、レトロウイルスの宿主域は一義的にはエンベロープと細胞膜と

の相互作用により決定されていると考えられている。それ故、エンベロープを改変して特定の細胞だけ結合できるようなベクターを作る試みが行われてきたがほとんど成功していなかった。最近になってエリスロポエチンを組み込んだキメラエンベロープを持つベクターによる赤芽球系細胞に対する遺伝子導入と、LDL レセプターに対する単鎖抗体を組み込んだキメラエンベロープを持つベクターによる肝細胞への遺伝子導入が相次いで報告された。

我々はこれまで HIV を改変した HIV ベクターを開発し、このベクターが CD4+細胞に特異的に遺伝子導入できる事を明らかにしてきた。HIV ベクターはリンパ球を標的とするエイズの遺伝子治療のための理想的なベクターと考えられる。しかし HIV ベクターは生産方法が煩雑で、高力価のベクターを大量に調製することが難しかった。我々は硫酸セルロースカラムや限外ろ過カラムを使い効率よくベクターを濃縮する方法を開発した。この方法で調製された HIV ベクターがほぼ 100%のヒト初代培養リンパ球に遺伝子導入が可能であることを示した。更に、本実験においては NOD-SCID マウスを用いた実験で、*in vivo* でもリンパ球特異的遺伝子導入が可能であることを明らかにした。従って、理論的には患者の体内でリンパ球を特異的に治療することが可能であり、HIV ベクターはリンパ球を標的とする各種疾患の遺伝子治療にとって大変有用なベクターであると考えられた。

オリゴデンドロサイトは神経系の変性を伴う先天性代謝異常症である異染性ロイコジストロフィーや Krabbe 病の重要な標的細胞である。神経系疾患の遺伝子治療法と

して、ウイルスベクターの直接脳内注入が考えられているが、神経細胞（ニューロン）や神経ネットワークを遺伝子レベルで改変することは、精神活動に影響を与える可能性があり、倫理的に大きな問題であると考えられている。グリア細胞を標的とする遺伝子治療では神経細胞に遺伝子を組み込まない遺伝子導入法の開発が不可欠である。

本研究では、我々が開発した二段階遺伝子導入法を応用してオリゴデンドロサイトに特異的に遺伝子を導入する方法を検討した。MBP プロモーターはオリゴデンドロサイトで特異的に活性化されることが知られている。又、アデノウイルスと HIV は非分裂細胞にも効率よく感染することが知られている。これらの特徴を利用して、アデノウイルスベクターを使ってオリゴデンドロサイトに特異的に CD4 を発現させられることを示した。CD4 陽性となった細胞は HIV に感受性となり HIV ベクターによる特異的遺伝子組み込みが可能になった。ラットの実験系では HIV 感染のために必要な co-receptor である CXCR4 が発現していないため、CXCR4 発現ベクターも同時に感染させたが、ヒトへの応用の場合には CD4 発現だけで十分であると考えられる。

ほとんどのヒト組織細胞は通常細胞分裂していない。したがって *in vivo* で遺伝子治療を行う場合は非分裂細胞を対象とすることになる。アデノウイルスベクターと HIV ベクターは非分裂細胞に遺伝子導入できることで注目されているが、この両者を組み合わせることで非分裂細胞への細胞特異的遺伝子導入が可能であることが示された。組織特異的プロモーターを選択することで多くの種類の細胞に対する *in vivo* 遺

伝子導入が可能になると考えられる。

E. 結論

高力価の HIV ベクターにより *in vitro* 及び *in vivo* でのリンパ球特異的遺伝子導入が可能であることが示された。アデノウイルスベクターと HIV ベクターを組み合わせた二段階遺伝子導入法により非分裂細胞への細胞特異的遺伝子導入が可能であることが *in vitro* 及び *in vivo* の実験で明らかにされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hisayasu, S., Miyauchi, M., Akiyama, K., Gotoh, T., Satoh, S., and Shimada, T. (1999) *In vivo* targeted gene transfer into liver cells mediated by a novel galactosyl-D-lysine/D-seline copolymer. *Gene Ther.* 6:689-693
- 2) Matsukura, N., Hoshino, A., Igarashi, T., Hasegawa, H., Onda, M., Tanaka, S., Iijima, O., Akiyama, K., Goto, T., Takubo, K., Suzuki, S., Shimada, T. (1999) *In situ* gene transfer and suicide gene therapy of gastric cancer in dogs induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Jpn. J. Cancer Res.* 90:1039-1049
- 3) Kitamura, Y., Ishikawa, T., Okuni, N., Kobayashi, N., Kanda, T., Shimada, T., Miyake, K., and Yoshiike, K. (1999) Intracellular expression of a single-chain antibody against integrase of human immunodeficiency virus type 1 inhibited the viral replication at both early and late steps of the viral life cycle. *J. AIDS Hum.*

Retrovirol. 20:105-114

- 4) Koseki, S., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., Shioda, T., Nagai, Y., Shimada, T., Ohkawa, J., and Taira, K. (1999) Factors governing the activity *in vivo* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J. Virol.* 73:1868-1877
- 5) Asano-Tsutsuda, A., Migita, M., Takashashi, K., and Shimada, T. (1999) Transduction of fibroblasts and CD34+progenitors using a selectable retroviral vector containing cDNAs encoding arylsulfatase A and CD24. *J. Hum. Genet.* 45:18-23
- 6) Ichikawa, M., Nakane, H., Marra, G., Corti, C., Jiricny, J., Fitch, M., Ford, J. M., Ikejima, M., Shimada, T., Yoshino, M., Takeuchi, S., Nakatsu, Y. and Tanaka, K. (2000) Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. *Mutation Res.* in press
- 7) 島田隆：ガン細胞を特異的に殺傷する遺伝子治療法の開発. *Academia 学術新報* 30-35 (1999)
- 8) 島田隆：導入技術・標的特異性—細胞特異的遺伝子導入法「遺伝子治療開発研究ハンドブック」日本遺伝子治療学会編 p302-309 (1999) エヌティーエス
- 9) 平井幸彦、玉寄賢治、島田隆：導入技術・AAV ベクター「遺伝子治療開発研究ハンドブック」日本遺伝子治療学会編 p377-384 (1999) エヌティーエス

- 10) 三宅弘一、島田隆：導入技術・ HIV ベクター「遺伝子治療開発研究ハンドブック」日本遺伝子治療学会編 p404-410 (1999) エヌティーエス
- 11) 島田隆：ガイドライン・厚生省/文部省「遺伝子治療開発研究ハンドブック」日本遺伝子治療学会編 p757-806 (1999) エヌティーエス
- 12) 島田隆：HIV ベクター「セルセラピー」関口定美編集 p100-109 (1999) エフ・コピント富士書院
- 13) 渡辺淳、右田真、渡辺裕子、島田隆：遺伝子診療のめざすもの。日本医科大学雑誌 66：340-342 (1999)
- 14) 島田隆：遺伝子治療。岩波講座現代医学の基礎「細胞増殖とがん」黒木登志夫、渋谷正史編 p232-248 (1999) 岩波書店
- 15) 三宅弘一、鈴木紀子、島田隆：AIDS の遺伝子治療（特集：遺伝子治療の進歩）血液、腫瘍科 39：477-483 (1999)
- 16) 平井幸彦、玉寄兼治、島田隆：1.8 "AAV ベクター"、第2節 各論、第3章導入技術、編集代表：大野典也、衛藤義勝、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、p377-384、エヌ・ティ・エス、東京、1999.
- 17) 島田隆：遺伝子治療の現状と展望。よくわかる遺伝子工学（村松正實編）p145-160 (2000) 羊土社
- 18) 中島英逸、島田隆：遺伝子の組換えと修復。臨床遺伝子医学ガイダンス（小澤敬也編）p26～33 (2000) 南山堂
- 19) 島田隆：新しい遺伝子導入/遺伝子治療技術の開発。（特集-遺伝子医療の発展）最新医学 55：51-58 (2000)
2. 学会発表
- 1) Shimada, T.: A novel strategy of cell targeting by two step gene transfer. Second US-JAPAN Gene Therapy Conference. Bethesda. 1999. 2.
- 2) Shimada, T.: Tissue specific gene delivery by retroviral vectors. 1999 Tandem Bone Marrow Transplantation Meetings. Keystone. 1999. 3.
- 3) Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., and Shimada, T.: Targeted gene transfer into HIV infected cells by the combination of HIV and MLV vectors. The 2nd annual meeting of American Society of Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6.
- 4) Mochizuki, H., Migita, M., Tsuganesawa, T., Takahashi, K., Sakuragawa, N., Shimada, T., and Mizuno, Y.: Cell therapy for Parkinson's disease using genetically modified amniotic epithelial cells. The 2nd annual meeting of American Society of Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6.
- 5) Migita, M., Nakano, K., Tsuganesawa, T., Takahashi, K., and Shimada, T.: Bone marrow cells as a target for ex vivo gene therapy of neurological disorders. The 2nd annual meeting of American Society of Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6.
- 6) Suzuki, N., Miyake, K., Iijima, O., Akiyama, K., Gotoh, T., Uchida, K., Yokoyama, K., and Shimada, T.: Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 infection by a recombinant HIV vector expressing antisense-CXCR4. The 2nd annual meeting of American Society of

- Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6.
- 7) Satoh, W., Hirai, Y., Tamayose, K., and Shimada, T.: Site specific integration of the AAV vector sequence can be achieved by regulated expression of Rep proteins using Cre/loxP system. The 2nd annual meeting of American Society of Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6.
 - 8) Miyake, K., Suzuki, N., Tsuganesawa, T., Iijima, O., Gotoh, T., Shimada, T.: Targeted gene transfer into oligodendrocytes by two step gene transfer using adenoviral and HIV vectors. The 2nd annual meeting of American Society of Gene Therapy. Washington.D.C. 1999. 6..
 - 9) Miyake, K., Suzuki, N., Koyanagi, Y., and Shimada, T.: In vivo targeted gene transfer into CD4 positive T-cells in high titer recombinant HIV vectors. The 41st annual meeting of the American Society of Hematology. New Orleans. 1999. 12.
 - 10) Suzuki, N., Miyake, K., Hirai, Y., and Shimada, T.: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into human primary lymphocytes. Eighth International Conference on Gene Therapy of Cancer. San Diego. 1999. 12.
 - 11) Miyake, K., Suzuki, N., Koyanagi, Y., and Shimada, T.: In vivo targeted gene transfer into CD4 positive T-cells in high titer recombinant HIV vectors. Eighth International Conference on Gene Therapy of Cancer. San Diego. 1999. 12.
 - 12) Nakajima, E., Sakai, N., Yamamoto, M., Miyake, K., and Shimada, T.: Genomic instability of retrovirus vectors. Keystone Symposia Gene Therapy: The Next Millennium. Keystone. 2000. 1.
 - 13) Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., and Shimada, T.: A novel strategy of targeted gene transfer into HIV infected cells. Keystone Symposia Gene Therapy: The Next Millennium. Keystone. 2000. 1.
 - 14) 三宅弘一、鈴木紀子、山下孝之、島田隆：HIV ベクターによる CXCR4 を標的とした AIDS の遺伝子治療。第 61 回日本血液学会総会（東京）1999.4
 - 15) 山田 薫、二木真琴、三宅弘一、鈴木紀子、山下孝之、島田隆、中畑龍俊：bicistronic retrovirus vector を用いた A 群 Fanconi 貧血の迅速診断。第 61 回日本血液学会総会（東京）1999.4
 - 16) Miyake, K., Suzuki, N., Iijima, O., Akiyama, K., Gotoh, T., Uchida, K., Yokoyama, K., Shimada, T. : Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 infection by a recombinant hiv vector expressing antisense-CXCR4. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 1999. 6
 - 17) Miyake, K., Suzuki, N., Tsuganesawa, T., Iijima, O., Goto, T., Shimada T. : Targeted gene transfer into oligodendrocytes by two step gene transfer using adenoviral and HIV vectors. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 1999.6
 - 18) Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., Shimada, T. : Targeted gene transfer into HIV infected cells by the combination of HIV and MLV vectors. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene

- Therapy (Tokyo) 1999.6
- 19) Nakano, K., Migita, M., Tsuganezawa, T., Takahashi, K., and Shimada, T.: Bone marrow cells differentiate into both hematopoietic and neuronal cells. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 1999.6
 - 20) Migita M., Takahashi K., Tsuganesawa T., Hirai Y. and Shimada T.: rAAV vector containing cDNA of arylsulfatase A enables transduction of glia in CNS and enzymatic correction of cells from patients with metachromatic leukodystrophy. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 1999.6
 - 21) 池島三与子、中島英逸、渡辺淳、折茂英生、島田隆：ミスマッチ修復異常と発癌、第3回がん分子標的治療研究会総会（福岡）1999.6
 - 22) 池島三与子、中島英逸、渡辺淳、島田隆：抗体を用いた hMSH3 蛋白質の機能解析、第58回癌学会総会（広島）1999.10
 - 23) 市川稔、中津可道、池島三与子、島田隆、田中亀代次：A 群色素性乾皮症モデルマウスにおける紫外線誘発皮膚癌由来細胞株の紫外線抵抗性獲得機構の解析、第58回癌学会総会（広島）1999.10
 - 24) 中野起久恵、右田真、津金澤俊和、高橋久美、島田隆：神経系細胞を標的とした遺伝子治療に向けて－骨髄細胞からの神経系細胞への分化能の検討－日本人類遺伝学会第44回大会（仙台）1999.11
 - 25) 中島英逸、堺 則康、山本基子、三宅弘一、島田 隆：レトロウイルスベクターのゲノム安定性に関する研究、第22回日本分子生物学会年会（福岡）1999.12
 - 26) 久安早苗、平井幸彦、島田 隆：組換えセンダイウイルスにより哺乳動物細胞に発現させた AAV-Rep78 蛋白質の精製と特性 第22回日本分子生物学会年会。（福岡）1999.12
 - 27) 平井幸彦、佐藤越、島田隆：Rep 蛋白質の直接導入による AAV ベクタープラスミドの部位特異的導入第22回日本分子生物学会年会。（福岡）1999.12