

厚生科学研究費補助金 ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

平成11年度研究報告書

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

(H10-ゲノム-033)

主任研究者：早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究者：真弓 忠範 大阪大学薬学部

中西 真人 大阪大学微生物病研究所

鈴木 宏治 三重大学医学部

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

本研究は遺伝子治療の実用化と一層の進展に向け、わが国独自の独創的で、より安全性の高い次世代遺伝子治療薬の開発に資する技術基盤の確立及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的に、次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究、ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究、導入遺伝子の核移行に関する研究、細胞質内での遺伝子発現系に関する研究、の各課題について並行して検討を進め、適宜これらの成果を組み合わせるにより、遺伝子治療の安全性を確保する次世代ハイブリッド型遺伝子治療用ベクターの開発を目指す。また、現存する遺伝子治療用ベクターの中では遺伝子導入効率が最も優れたベクターであるアデノウイルスベクターの問題点を克服する技術開発を行うものである。本年度は各課題について以下の結果を得た。

1. 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究：1) 膜融合リポソームの実用化に向けて製剤としての安全性に関わる問題を検討し、病原性ウイルスの混入を抑えながら活性と安全性を保つ条件を決定した。2) 膜融合リポソームは短時間での遺伝子導入、高い遺伝子発現効率、低い細胞傷害性、血清存在下でも遺伝子導入が可能という特徴を有することを明らかにした。3) VSV (Vesicular Stomatitis Virus) -リポソームはヒト赤血球を溶血せず、血漿中でも安定で、遺伝子導入ベクターとしての有用性を示唆した。
2. 膜融合リポソームを用いた遺伝子治療応用研究：1) ヒト Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 遺伝子封入膜融合リポソームを担癌マウスの腫瘍支配動脈内に投与することにより、投与部位の血管及び腫瘍部位での TNF- α の発現と共に顕著な抗腫瘍効果が得られ、固形癌に対する in vivo 遺伝子治療の新たな方法論を提示した。2) Degenerin (変異 Na イオンチャンネル) 遺伝子を Carcinoembryonic antigen プロモーターにより癌細胞特異的に発現させるよう設計し、膜融合リポソームを用いてヒト胃癌腹膜播種モデルマウスに投与することにより、効果的な治療に成功した。3) 術後肝障害阻止を目指し、膜融合リポソームを用いて抗血栓性因子トロンボモジュリン遺伝子をラット肝類洞内皮細胞に導入し、遺伝子発現と膜融合リポソームの in vivo での安全性を確認した。
3. 導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤に関する研究：細胞膜、核膜通過活性を持つ Tat ペプチドを表面に発現し、内部に目的遺伝子を封入した Tat-ファージの開発に成功した。
4. ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究：1) 人工染色体構築に必要な、染色体の安定性を決定する因子の解析を進め、染色体末端のテロメア配列に結合するタンパク質 TRF1 にその活性があることを見いだした。2) ヒト型エピソーマルベクターの開発を目指し、EB ウイルスベクターの複製開始領域をヒト染色体複製領域に置換したベクターを構築し、種々の細胞で持続的な遺伝子発現を確認した。
5. 細胞質内での遺伝子発現系の確立に関する研究：1) T7 RNA polymerase を利用した T7 細胞質内遺伝子発現系は in vivo でも効率の良い遺伝子発現を示すことを明らかにした。2) センダイウイルスの NP 蛋白質に RNA 依存的 mRNA 合成活性と鋳型 RNA 複製活性があることを見だし、NP 遺伝子自体を鋳型に含む RNA レプリコンによる細胞質での持続的遺伝子発現系開発の技術基盤が確立された。
6. 次世代アデノウイルスベクター開発基盤研究：1) 任意の外来ペプチドを表現し感染細胞特異性を制御できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムの開発のための基盤となるプラスミドを作製した。2) 全てのウイルス遺伝子を欠損させた gutless アデノウイルスベクターの作製に関する技術基盤を確立した。

分担研究者

真弓 忠範 大阪大学薬学部 教授
中西 真人 大阪大学微生物病研究所 助教授
鈴木 宏治 三重大学医学部 教授

協力研究者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 室長
水口 裕之 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

A. 研究目的

遺伝子治療は、これまで効果的な治療法がなかった先天性疾患や、癌、エイズなどの致命的疾患に対する画期的な治療手段として期待されている。しかし、その技術的基盤となる細胞内への遺伝子導入法・ベクターの開発は未だ不十分であり、安全性・有効性が確保されたベクターをいかに開発していくかが学際的に重要かつ緊急の課題となっている。遺伝子治療薬の安全性確保をはじめ治療の成否には、1) ヒトに対する非病原性、2) 低細胞毒性、3) 非抗原性、4) 導入遺伝子の数や大きさに関する選択

許容性、5)標的細胞特異性、6)遺伝子導入効率、7)安定性、8)導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節、などの諸要件の達成度が鍵になると再認識されている。米国を中心にレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターをはじめとするウイルスベクター法や、合成脂質を用いたカチオニックリポソーム法などが開発され、基礎から応用に至る莫大なデータが蓄積されてきている。しかしウイルスベクター法は、遺伝子導入効率が高い反面、現状ではサイズの大きいDNAに適用できないこと、増殖性ウイルス出現や発癌性、細胞毒性に関する懸念があること、レトロウイルスベクターでは非分裂細胞への導入不能、宿主染色体への遺伝子挿入変異の可能性があること等の問題点を有している。一方、カチオニックリポソーム法は導入する遺伝子の形状やサイズに制限がなく、上述のような危険性がない反面、ウイルスベクター法に比べ遺伝子導入効率は著しく低い。これら既存のベクターの改良も種々検討されているが、それにも限界が見えはじめているのが現状であり、新しい発想に基づいたベクターの開発が緊急かつ重要な課題となっている。

本研究は遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けて、わが国独自の独創的で、より安全性の高い次世代遺伝子治療薬の開発に資する技術基盤の確立及び安全性評価技術の開発に関する研究を先導的に行い、もって将来のわが国における遺伝子治療の実用化、治療対象の拡大を促進し、保健医療の向上に貢献することを目的とする。そのため、1)安全性の確認と大量生産が容易な素材を用い、従来のウイルスベクターや非ウイルスベクター双方の長所を併せ持つように設計した、高機能で安全性の高い独自の遺伝子導入系の構築とその細胞選択性、安定性等の確保、遺伝子導入の至適化、2)遺伝子を効率よく核内に送達するための技術開発、3)導入遺伝子の宿主染色体への挿入による染色体遺伝情報発現への悪影響を回避する手段として、導入遺伝子が細胞核内の宿主染色体外で安定に存在しながら情報発現できるようなミニ人工染色体の開発、4)細胞質内で遺伝子発現が可能な系の構築と細胞質内への導入法の開発、などの各課題を並行して進め、適宜これらの成果を組み合わせることにより次世代ハイブリッド型遺伝子治療用ベクターの開発を目指す。また5)現存する遺伝子治療用ベクターの中では遺伝子導入効率が最も優れたベクターであるアデノウイルスベクターの問題点を克服する技術開発を行うものである。

本年度は、1.次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究として、膜融合リポソームの安全性を確保する調製法の開発と特性評価を行うとともに、新たなハイブリッド・ベクター候補として Vesicular Stomatitis Virus (VSV) -リポソームの検討を行った。また、2.膜融合リポソームを用いた遺伝子治療応用研究も進めた。一方、3.導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤としてラムダファージを用いた新しい遺伝子導入系の開発

に関する研究、4.ミニ人工染色体の開発を目指した基礎研究として遺伝情報が細胞核内で安定に存在するために必要なDNA構造や安定化に寄与するタンパク質に関する研究、5.遺伝子発現に核移行を要しない細胞質内での直接遺伝子発現系としてT7細胞質内遺伝子発現系のin vivoでの検討及びRNAレプリコンの開発に関する研究など、ハイブリッドベクターの特性を生かした遺伝子発現系の構築を目指した検討を行った。さらに、6.現存する遺伝子治療用ベクターの中では遺伝子導入効率が最も優れたベクターであるアデノウイルスベクターの問題点を克服する技術開発を行った。

B. 研究方法

B.1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

B.1.1 膜融合リポソームの安全性を確保するための最適化条件の検討

センダイウイルスZ株とZ(V欠損)株(国立感染症研究所・加藤篤博士より分与)は、10日目孵化鶏卵を用いて増殖させた。センダイウイルスの精製は、5,000 rpm, 5 min で上清を回収、12,000 rpm, 50 min で沈殿後、30%/50% 蔗糖ステップ遠心(20,000 rpm, 60 min)を2回繰り返して30%と50%の境界から回収した。ウイルスは0.03%のbeta-propiolactoneで37°C, 2 h 処理後、4°Cで一晩放置して不活化し、最後にSephacryl S1000 superfine(22 x 90 mm)によるゲル濾過法で精製して最終標本とした。

一枚膜リポソームは Extruder 法を改良し、Anodisc(13mm, 0.2µm)を用いて作成した。BSS(5mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.6)/12%/20%のステップ蔗糖密度勾配遠心(20,000 rpm, 30 min)でBSS/12% sucroseの界面からリポソームを回収し、最後にSephacryl S1000 superfine(22 x 90mm)によるゲル濾過法で精製して最終標本とした。膜融合リポソームは精製センダイウイルスと精製リポソームを37°Cで反応させて作製し、12%/30%/50%のステップ蔗糖密度勾配遠心(20,000rpm, 60min)で12%/30% sucroseの界面から回収した。走査型電子顕微鏡用のサンプルは2.5%グルタルアルデヒドで室温1時間固定した。

B.1.2 膜融合リポソームの特性評価

(1) プラスミドDNAを封入した膜融合リポソームの調製

遺伝子導入の検討はニワトリβ-アクチンプロモーターとサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー及びSV40 early gene poly(A) signalを有するルシフェラーゼ発現プラスミドpCAL2(6.4 Kb)を用いた。pCAL2(10 mg/ml)を10 mM Tris(pH 7.6)/150 mM NaCl/10 mM EDTAに懸濁し、一枚膜リポソームを作製した。リポソームのサイズは、0.4 µmのポリカーボネートフィルター(Nucleopore)を通すことにより調節した。このリポソームを、あらかじめ紫外線照射によりウイルスRNAを断片化した

センダイウイルスを用いて膜融合リポソームを調製した。膜融合リポソームに封入されている DNA 量は、DNA をフェノール、フェノール/クロロホルムで抽出後、3,5-ジアミノ安息香酸を用いた蛍光法により測定した。膜融合リポソームは、OD540=1.0 あたり 2.0 $\mu\text{g/ml}$ の DNA を封入していた。

(2)pCAL2 封入膜融合リポソームを作用させた細胞の遺伝子発現

35-mm ディッシュに L 細胞を 1×10^5 個播種し、24 時間後に細胞を BSS(+) で洗浄後、pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1) を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、90 分間作用させた。MEM で細胞を洗浄後、通常の培地で培養し、経時的にルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 遺伝子発現に及ぼす 膜融合リポソームと細胞との接触時間の影響

35-mm ディッシュに細胞を 1×10^5 個播種し、24 時間後に細胞を洗浄後、pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=0.25) を 37 $^{\circ}\text{C}$ で一定時間作用させた。高濃度のベクターを細胞に作用させた実験においては、膜融合リポソーム (OD540=3.0、1.0、0.3、0.1) を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 90 分間作用させた。MEM で 2 回洗浄後、通常の培地で培養し、48 時間後にルシフェラーゼ活性または細胞傷害性を測定した。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は、luciferase assay system (ピッカジーン) およびルミノメーター (Lumat LB9501、Berthold) を用いて測定した。活性は relative light units (RLU) / μg protein、あるいは RLU/35-mm ディッシュとして表した。

(5) 細胞傷害性の測定

細胞傷害性は Bio-Rad protein assay kit により細胞の蛋白量を測定して評価した。本測定法は生細胞数を MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetra-zolium bromide) 法により測定したものと相関した。

(6) カチオニックリポソーム・DNA 複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入

カチオニックリポソームとしてリポフェクチン (GIBCO) を用いた。pCAL2 (3.0 μg) とリポフェクチン (15.0 μg) をそれぞれ 100 μl の無血清 MEM に懸濁し、両者を混合して室温で 15 分間反応させた後、無血清 MEM で目的濃度に希釈した。これを、膜融合リポソームと同様のプロトコールで細胞に作用させた。カチオニックリポソームと DNA の比率は遺伝子発現効率が最適である 5:1 (w) を用いた。

(7) 血清存在下での遺伝子導入

35-mm ディッシュに L 細胞を 1×10^5 個播種し、24 時間後に種々の濃度の FCS を含む MEM を 0.5 ml (最終 FCS 濃度 5, 10, 20, 40 %)、無血清 MEM に懸濁した pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=0.5; DNA 1.0 $\mu\text{g/ml}$)、あるいはカチオニックリポソーム・DNA 複合体(カチオニックリポソーム 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、DNA 1.0 $\mu\text{g/ml}$) 0.5 ml を細胞に加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間作用させた。MEM で細胞を洗浄後、通常の培養液で培養し、48 時間後にルシフェラーゼ活

性を測定した。

(8) S-180 腹水癌細胞への in vivo 直接遺伝子導入
S-180 細胞 (1×10^6 個) を ddY 雄性マウス (5 週令) に腹腔内投与し、5 日後に pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=1.0; DNA 1.5 $\mu\text{g/ml}$)、およびカチオニックリポソーム・DNA 複合体 (DNA 1.5 or 40 $\mu\text{g/ml}$) 1 ml を腹腔内投与した。48 時間後に S-180 細胞を腹腔内より回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B.1.3 VSV-リポソームの開発

(1) VSV-リポソームおよび膜融合リポソームの調製

負電荷リポソーム (最大粒子径 0.2 μm) を VSV-リポソーム、膜融合リポソームの作製に用いた。VSV は Ingiot らの方法に準じて調製した。VSV とリポソームをクエン酸緩衝液 (140mM NaCl、2mM MgCl₂、1mM EGTA、80mM citrate、pH5.5) 下で混合し、水中 30 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間反応させ、両者を融合させた。ステップショ糖密度勾配遠心により精製し、VSV-リポソームを得た。

(2) VSV-リポソームの細胞内物質導入効率の評価

ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) 0.67mg/ml を封入したリポソームを作製し、このリポソームと VSV を融合させることで、VSV-リポソームを得た。ヒト羊膜由来 FL 細胞に、様々な濃度の DTA 封入 VSV-リポソームを 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間作用させた後、^[35S]-メチオニンをパルスし、蛋白合成を指標に細胞内物質導入効率を評価した。リポソームのリン脂質濃度は、リン脂質測定キット (リン脂質 B テストワコー) を用いて測定した。

(3) 血中安定性の評価

赤血球溶血活性は Hsu らの方法に準じて行った。すなわち、1% ヒト赤血球にリポソーム、VSV-リポソームおよび膜融合リポソームを 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間静置し、さらに 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応後、上清のヘモグロビン量を測定した。あらかじめ N-ローダミン-PE でリポソーム膜を蛍光ラベルし、ローダミンの蛍光強度を一定にすることで各リポソームの粒子数を揃えた。血漿中での安定性は、カルボキシフルオレセイン (CF) を封入したリポソームを用いて検討した。すなわち、37 $^{\circ}\text{C}$ に保温したラット新鮮血漿に粒子数をそろえた各リポソームを添加し、経時的に血漿中の CF の蛍光強度を測定した。100% 崩壊率は、Triton X-100 で各リポソームを完全崩壊させたときの CF の蛍光強度とした。

(4) VSV-リポソームによる培養細胞への遺伝子導入

サル腎上皮 LLC-MK2 細胞 (5.0×10^4 個) に、pCAL2 封入膜融合リポソーム (23.5 $\mu\text{g/ml}$ /OD540、OD540=0.1) 及び同粒子数の VSV-リポソームを 500 μl 加えて培養した。経時的に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 2 膜融合リポソームを用いた遺伝子治療応用研究

B.2.1 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) による

癌遺伝子治療

(1) TNF- α 発現プラスミド pCATNF2 の構築

pGEM-5Zf (+) (プロメガ) にニワトリ β -アクチンプロモーターと CMV エンハンサー、SV40 early gene poly (A) signal を挿入したプラスミド pBV1 の HindIII 部位にヒト TNF- α cDNA を挿入して pCATNF1 を得た。さらに TNF- α の coding frame を、 β -アクチンスタートコドンのすぐ下流に接続させるため、オリゴヌクレオチドをプライマーとして kunkel らの方法に従い、site-directed mutagenesis を行って pCATNF2 を得た。pCATNF2 により活性のあるヒト TNF- α が産生されることは L929 細胞を用いた Bioassay により確認した。pCATNF2 は L 細胞において pCATNF1 の約 5 倍の TNF- α の発現を示した。実験には pCATNF2 を用いた。

(2) 培養ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) における TNF- α 発現

35-mm ディッシュに BAEC (1×10^5 個) を播種し、24 時間後に pCATNF2 封入膜融合リポソーム (OD540=0.25; DNA 0.5 μ g/ml) を 37 $^{\circ}$ C で 90 分間作用させた。DMEM で細胞を洗浄後、通常の培養液で培養し、培養液中に分泌された TNF- α 産生量を ELISA 法で測定した。本法における検出限界は、0.112 pg/ml であった。

(3) マウス大腿動脈血管内皮細胞への in vivo 直接遺伝子導入による TNF- α 発現

ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に S-180 細胞 (1×10^6 個) を移植し、footpad の厚さが 5 mm 以上に達した 7 日後に、pCATNF2 封入膜融合リポソーム 30 μ l (OD540=6.0, DNA 0.36 μ g) を左脚大腿動脈内に直接投与した。10 分間血流を遮断後、血流を再開させた。48 時間後、血管 1 cm と footpad の腫瘍を回収し、BSS(-) で懸濁・細切後、凍結融解を 3 回繰り返した。遠心にて細胞を沈殿させ、上清中の TNF- α の量を ELISA 法で測定した。

(4) FITC-デキストラン封入膜融合リポソームの大腿動脈内への投与

ddY 雄性マウス (5 週令) の大腿動脈に FITC-デキストランを封入した膜融合リポソーム (OD540=6.0) 30 μ l を直接投与した。10 分間血流を遮断後、BSS (-) 投与により血管内を洗浄し、大腿動脈および大腿静脈部分を回収して包埋剤 (TISSUE-TEK; Miles) に包埋した。液体窒素で組織を凍結後、クリオスタットで凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により血管への FITC-デキストランの局在を観察した。

(5) PCR による pCATNF2 の体内分布の検討

ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に S-180 細胞 (1×10^6 個) を移植し、(3) と同様に pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与した。48 時間後、左脚大腿動脈 (1 cm)、腫瘍、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、20 mM トリス (pH 8.3) / 0.5 % Tween 20 / 1.5 mM $MgCl_2$ / 25 mM KCl / 1 mM EDTA で 10 % ホモジネイトを作製し、プロテイナーゼ K (0.1 mg/ml) で 56 $^{\circ}$ C、2 時間処理後、12,000 rpm、5 分間遠心した。上清より抽出した DNA

100 ng を PCR 用サンプルとした。

(6) TNF- α 遺伝子導入による S-180 固形癌に対する抗腫瘍効果

pCATNF2 封入膜融合リポソームを ddY マウスの大腿動脈に投与した。コントロールとして、生理食塩水、および pCAL2 封入膜融合リポソームを投与した。また、pCATNF2 封入膜融合リポソームを、S-180 細胞を移植した脚と反対の右脚の大腿動脈に投与した場合についても検討した。腫瘍の増殖を観察するため、3, 4 日毎に footpad の厚さを測定し、治療開始前の厚さとの比を求めた。有意差の評価は Student t-test により行った。

(7) 腫瘍増殖抑制に及ぼす抗ヒト TNF- α 抗体の効果

マウス抗ヒト TNF- α 中和抗体 0.1 mg を、TNF- α 遺伝子封入膜融合リポソームの投与日及びその 3 日後に腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制に及ぼす効果を観察した。コントロールとして抗ヒトインターロイキン-6 (IL-6) 中和抗体 0.1 mg を腹腔内投与した。

(8) 腫瘍増殖抑制に及ぼす T 細胞の影響

ラット抗マウス CD4 抗体 0.5 mg 及びラット抗マウス CD8 抗体 0.5 mg を、TNF- α 遺伝子封入膜融合リポソーム投与 24 時間前に尾静脈投与し、腫瘍増殖抑制に及ぼす効果を観察した。抗体投与 24 時間後から少なくとも 10 日間は、マウスの CD4 および CD8 陽性 T 細胞が消失していることをフローサイトメーターにより確認した。

B.2.2 CEA (carcinoembryonic antigen) プロモーター/Degenerin (変異 Na イオンチャンネル) 遺伝子による癌遺伝子治療

Degenerin cDNA はラット脳組織 cDNA より既報の塩基配列情報をもとに単離した。この cDNA を発現ベクター pCDNA3 (invitrogen) に組み込んだ後、430 番目のグリシンがフェニルアラニンに変化するよう in vitro mutagenesis を行い、CMVpCDNA3MDEG-G430F を作成した。さらにこの遺伝子の発現に癌特異性を持たせるために、このプラスミドの CMV promoter を除去し、CEA promoter と置き換えて CEApCDNA3MDEG-G430F を作成した。この遺伝子の発現は HepG2 細胞を使って培養系で確認した。

ヒト胃癌患者の腹膜播種よりマウス腹腔継代により樹立した MKN45 細胞 10^6 個をヌードマウス腹腔に接種し、3 日目に血中の CEA を測定して有意な上昇を認められたマウスを 15 匹ずつ 3 群に分けた。10 日目から毎週一回の頻度で計 4 回、一回当たり 0.5 μ g の CEApCDNA3MDEG-G430F を含む膜融合リポソームを腹腔内投与し、生存率を解析した。

B.2.3 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

(1) ヒト及びラットトロンボモジュリン (TM) cDNA のクローニングおよび発現ベクターの構築

ヒト (h) TMcDNA は、 λ gt 11 ヒト臍帯血管内皮細胞 cDNA ライブラリーからポリクローナル抗 TM 抗体

を用いてクローニングした。ラット(r)TM cDNAは、ヒトTM cDNAの塩基配列を指標に作成した一対のプライマーを用いて、ラットの血管内皮細胞由来mRNAを鋳型としたRT-PCR法により増幅してクローニングした。hTM発現ベクター(pRC/CMV-hTM cDNA)は、hTMcDNAをCMVプロモーターおよびウシ成長ホルモンターミネーターを有する哺乳動物細胞発現ベクターpRC/CMVのHind III切断部位に挿入して作製した。rTM発現ベクター(pRC/CMV-rTM cDNA)は、rTM cDNAをpRC/CMVのXba I切断部位に挿入して作製した。

(2) 膜融合リボソームの調製およびラットへの投与

膜融合リボソームは、コレステロール、リン脂質および不活化センダイウィルスを用いて調製した。hTM発現ベクターを含む膜融合リボソームは、ラットをペントバルビタール麻酔下に開腹し、門脈から注入した(4 μ g DNA/80 μ l/匹)。

(3) ラット血漿、肝細胞、肝類洞内皮細胞の単離

ラットクエン酸血漿は、膜融合リボソーム投与後、経時的にラット門脈から採血し(クエン酸加血液)、遠心分離により血球成分を分離して調製した。ラットの肝細胞および肝類洞内皮細胞は、コラゲナーゼ環流法およびその後のエルトリエーションロータ分離法を用いてそれぞれ単離した。得られた肝細胞はウィリアムズ E 培地で、また肝類洞内皮細胞は20%ウシ胎児血清を含むウィリアムズ E 培地で数回洗浄後、コラーゲンコートプレートを用いて培養した。

(4) 血漿 GOT、GPT および LDH 活性の測定

血漿 GOT、GPT および LDH 活性はコダックエクタクーム 250 を用いて測定した。

(5) hTM 抗原、TM 活性および TM mRNA の測定

ラット肝細胞あるいは類洞内皮細胞で発現したhTM蛋白量は、単離した細胞を0.5%Triton X-100を含むTBS溶液(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5)で1時間処理し、細胞抽出液を調製後、エピトープの異なる2種類のモノクローナル抗hTM抗体を用いたサンドウィッチELISA法で測定した。細胞表面上のTM活性は、培養細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で数回洗浄後、トロンビンおよびプロテインCを添加し、生成した活性化プロテインCの合成基質(Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA)分解活性を測定した。hTM mRNA量は肝類洞内皮細胞中の全RNAを抽出後、hTM cDNAに特異的な1対のプライマーを用いたRT-PCR法で増幅し、アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により検出した。

(6) ラット Protein S (rPS) cDNA のクローニングおよび発現ベクターの構築

rPS cDNAは、 λ gt 11 ラット肝臓 cDNA ライブラリーからhPScDNAをプローブにクローニングした。rPS発現ベクター(pRC/CMV-rPS cDNA)はrPScDNAをpRC/CMVのCla IおよびXba I切断部位に挿入して作製した。

(7) ラット敗血症モデルにおける肝類洞内皮細胞 PS の発現に関する検討

敗血症モデルラットは、ラット腹腔にリポポリリッ サッカライド(LPS, 3 mg/kg)を投与して作製した。ラット類洞内皮細胞でのPSの発現量は、単離した細胞を24時間培養後、培養上清中のPS抗原値としてELISA法により測定した。PS mRNA量は肝類洞内皮細胞中の全RNAを抽出後、ラットPScDNAに特異的な1対のプライマーを用いたRT-PCR法で増幅し、アガロースゲル電気泳動後、rPS cDNAをプローブとしたSouthern blot解析(RT-PCR-Southern blot解析)により定量した。また、培養肝類洞内皮細胞のPS発現に及ぼすLPSの影響は、単離類洞内皮細胞を種々の濃度のLPSで24時間処理した後、培養上清中のrPS抗原をELISA法で、rPS mRNA量をRT-PCR-Southern blot解析で定量した。

B. 3 導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤に関する研究

B.3.1 Tat ペプチドを付与したラムダファージの調製

ベースとしたラムダファージはLambda D1180で、Dam15のアンバー変異を持ち suppresser tRNAを持たないSup0の大腸菌ではDタンパク質を作らない。またこのファージの右腕は λ gt11と同一であり、野生型ラムダファージのSacI-EcoRIを削除し、EcoRI siteを一つだけ持つように改変してある。Green Fluorescent Protein (GFP)及びホタル・ルシフェラーゼ cDNAはCMVの初期遺伝子プロモーターの下流に接続したEcoRI-EcoRI断片として構築し、Lambda D1180のEcoRI siteに挿入した。作製したラムダファージのDNAは大腸菌TOP10に溶原化してファージ粒子の調製に用いた。

Tat ペプチドを人工的にラムダファージの頭部に発現させる実験はSternbergらが報告したペプチド抗原をファージ表面に発現したライブラリーの作成法(Sternberg and Hosess, PNAS 92, 1609, 1995)に基づいた。ラムダファージD遺伝子を含むDNA断片は、ファージDNAを鋳型にしてPCR法によって増幅後、発現ベクターpTrcHisA (Invitrogen)に挿入した。Tat ペプチドに対応する遺伝子は合成オリゴヌクレオチドを使って作製し、Dタンパク質のN末端側に遺伝子レベルで融合させた。Dタンパク質を発現させるためのプラスミドpS1を、GFP遺伝子ヤルシフェラーゼ遺伝子を含み、D遺伝子にアンバー変異があるラムダファージD1180を溶原化した大腸菌に導入後、42 $^{\circ}$ C, 15 minの熱処理でファージの増殖を誘導し、さらに38 $^{\circ}$ C, 40 min培養後に集菌した沈澱からクロロホルム処理で組換えファージ粒子を抽出した。

B. 4 ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究

B.4.1 遺伝情報が細胞核内に安定に存在するために必要なDNAの構造

500 bpの人工テロメア配列とハイグロマイシンB耐性遺伝子を含むプラスミドpMYAC1を制限酵素NotIで切断すると、末端にテロメア配列を持つ直

鎖状になる。この DNA 1 μ g を種々の細胞にエレクトロポレーション法で導入した。ただちに 100mm ディッシュ 100 枚 (浮遊細胞の場合は 96 well ディッシュ 100 枚) に細胞をまき直し、48 時間後からハイグロマイシン B により遺伝子が入り込まれた細胞を選択した。10 日目にそれぞれのディッシュに出現したハイグロマイシン B 耐性コロニーを単離し、増殖後 DNA を抽出して解析した。

得られたハイグロマイシン B 耐性のコロニーより DNA を抽出し、制限酵素 HindIII で消化した。それぞれ 10 μ g の DNA を 1% アガロースゲルで分画後、ナイロンメンブレンに転写し、pUC19 をプローブとしてサザンブロット解析により pMYAC1 導入部位の解析を行った。サザンブロットで染色体末端であることを示すスミアなシグナルが得られたサンプルに関しては、さらにエキソヌクレアーゼ Bal31 感受性試験によって染色体上での位置を確認した (染色体の末端にある場合には、シグナルは Bal31 感受性となる)。テロメアシーディングの活性は、pMYAC1 が挿入された部位で染色体が切断されて新しいテロメアができたクローンの数を全クローンの数で割った割合で求めた。

テロメラーゼ活性は、各細胞の核抽出液を使い、Tatematsu らの方法 (Tatematsu, et al. Oncogene, 13, 2265, 1996) で測定した。この方法は、PCR によるテロメラーゼ活性測定の原法に比較して直線性が改良され、テロメラーゼ活性を定量的に測定できた。

染色体末端のテロメア配列の長さは、HinfI/RsaI で切断したゲノム DNA を 32 P で標識した (TTAGGG)_n プローブを使った DNA ブロッキングによって解析し、HeLa-LT 細胞のテロメア配列の長さ (22.5 kbp) を標準にしてシグナルの強さによって測定した。

テロメア配列結合タンパク質 TRF1, TRF2 の定量はタンパク質ブロッキングによって行った。抗 TRF1 ウサギ抗体は大腸菌で作った TRF1 acidic domain を含む組換えタンパク質をウサギに免疫して作成した。抗 TRF2 ウサギ抗体は Dr. Titia de Lange より分与された。

B.4.2 エピソーマルベクターの開発

EBNA1 と OriP を有する遺伝子発現ベクター pREP4 (Invitrogen) に pGL3 control (Promega) 由来の Luciferase 遺伝子および polyA を組み込んだプラスミド pREP4-L1 をもとに、EBNA1- OriP 領域を p205 (p220 の EBNA1 の一部を除去したもので、よりプラスミド維持活性が強い) の EBNA1-OriP 領域と置換したプラスミド p205-L1, OriP の DYAD 領域を除去して自律複製しないプラスミド p205-L2 を作製した。この p205-L2 に、昨年度取得したヒト染色体 HindIII 断片を挿入した。EBNA-1, OriP を全く持たないプラスミド pHRSVL をコントロールとして使用してプラスミドの遺伝子発現の持続性を以下のように検討した。すなわち、12 well または 24 well plate にそれぞれ 1×10^5 個 または 5×10^4 個の細胞を

播種し、翌日各ベクターを LipofectAMINE Plus を用いて遺伝子導入した。導入後 1 日目に細胞を 1/10 ずつ well または dish にまき直し、2 日目より経日的にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は発光試薬としてピッカジーンを使用し、測定には Wallac multilabel counter を用いた。

B.5 細胞質内での遺伝子発現系の確立に関する研究

B.5.1 T7 細胞質内遺伝子発現系

(1) T7 発現系における pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の最適混合比の検索

T7 プロモーター制御ルシフェラーゼ発現プラスミド (pT7-IRES-L) および T7 プロモーター制御 T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド (pT7 AUTO-2) を種々のモル比で混合し、DNA・酵素・リポフェクシン複合体を調製した。この複合体を LLCMK2 T7(-) 細胞に遺伝子導入し、経日的に遺伝子発現を測定した。

(2) マウス脳内への遺伝子導入

マウス脳内への遺伝子導入は Schwartz らの方法に基づいて行った。調製した DNA・酵素・リポフェクシン複合体 (pT7-IRES-L; 7ng, pT7 AUTO-2; 43ng, T7 RNA polymerase 2.5U; リポフェクシン 250ng) を 30G の注射針を用い BALB/c マウス (2-3 日齢) 脳内に注入した。対照として pRSVL (7ng) をリポフェクシン (35ng) とともに脳内に導入した。遺伝子発現は遺伝子導入後、経日的にマウス全脳を摘出し、細胞溶解ホモジネート上清のルシフェラーゼ活性により評価した。

B.5.2 RNA レプリコンの開発

T7 RNA polymerase を安定に発現している LLCMK2 細胞 LLC-T7#10 は CMV enhancer / beta actin promoter の下流に T7 RNA polymerase cDNA を接続してリン酸カルシウム法で導入して作成した。(-)鎖 RNA mini genome を作るための鑄型 pHVLuciB は、センダイウイルスのゲノムの 3' 端と 5' 端を接続したホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 cDNA を T7 RNA polymerase promoter 下に negative 方向に接続して作成した。この鑄型からは T7 RNA polymerase によって (-)鎖 RNA が転写される。また NP タンパク質を作る発現ベクター pGEM-NP は、NP cDNA を T7 RNA polymerase promoter 下に positive 方向に接続して作成した。このベクターからは NP タンパク質を作るための mRNA が転写され、それをもとに NP タンパク質が翻訳される。RNA polymerase の活性測定は、pHVLuciB と pGEM-NP を同時に LLC-T7#10 細胞に導入することによって行った。これらのプラスミドをそれぞれ単独で導入した場合はルシフェラーゼを作るための mRNA 合成は起こらず、ルシフェラーゼ活性は検出されないが、両者を同時に導入することにより mRNA が合成されルシフェラーゼが検出される。

B.6 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤

研究

(1) ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの基盤となるプラスミドの作製

ファイバー蛋白質の HI loop をコードした遺伝子配列部分に、ユニークな制限酵素部位 Csp45I と ClaI 部位を挿入したアデノウイルスベクタープラスミド pAdHM15 を作製した。

(2) 全てのウイルス遺伝子を欠損した gutless アデノウイルスベクターシステムの開発

アデノウイルス E4 領域と 3' ITR の間に loxP の配列を有したベクタープラスミドの pAdHM4-lox と、シャトルプラスミドに loxP の配列を有したプラスミド pHM3-lox を作製した。モデルとして、シャトルプラスミドに human $\alpha 1$ anti-trypsin (hAAT) の遺伝子を挿入し、我々が開発した in vitro ligation 法でベクタープラスミドの E1 欠損領域に loxP および hAAT の遺伝子を挿入した。これにより、全てのウイルス遺伝子が loxP の配列に囲まれたベクターシステムが構築された。このプラスミドを 293 細胞に導入することでアデノウイルスベクターを作製し、このベクターを cre を発現した 293 細胞に導入して gutless アデノウイルスベクターを調製した。gutless アデノウイルスベクターは、塩化セシウムの密度勾配遠心法を用いることで、従来型のベクターと同様に分離・精製した。

(倫理面への配慮)

動物実験については各所属施設の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。またヒト初代細胞、培養細胞は研究用の市販品、頒布品を用いており、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

C. 1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

C.1.1 高度な安全性を確保した膜融合リボソーム調製法の開発

膜融合リボソームは、センダイウイルスの膜融合能を利用して細胞に効率よく遺伝情報を導入することができる優れたベクター系であり、本研究において開発を進めてきた核への DNA のターゲティングベクターや人工染色体、細胞質内遺伝子発現系と組み合わせ高機能を発揮するハイブリッドベクターの基盤となる重要な技術である。膜融合リボソームは遺伝情報をあらかじめ物理的・化学的に不活化してあるセンダイウイルス粒子を使って作成するため、組換えウイルスとは区別して非ウイルスベクターとして分類されている。一般的に、合成脂質や合成ポリマーなど非生理的な成分を使用しているベクターの安全性は急性の毒性・細胞障害性を指標に検討されている。膜融合リボソームには急性の毒性や細胞傷害性は観察されないものの、その成分にウイルス粒子に由来する核酸・タンパク質・脂質が含まれているため、他のベクターとは異なる視点から安全性を点検しておくことが重要となる。この項

では、動物を使った前臨床試験・実際の患者に対する臨床試験を前提とした膜融合リボソーム自体の安全性に関わる問題点を整理し解決を試みた。

まず、製剤成分に感染性ウイルス粒子を含む可能性とその危険性について、1) ウイルスそのものの病原性と、2) ウイルス活性の不活化の 2 点に焦点をあてて検討した。センダイウイルスの病原性については、エンベローブ糖タンパク質の F タンパク質開裂部位のタンパク質分解酵素に対する感受性や P タンパク質にオーバーラップしてコードされている V タンパク質の存在が、高い病原性の維持に必要であることが報告されている。我々がこれまでに用いてきたセンダイウイルス・Z 株はもともと F タンパク質のタンパク質分解酵素に対する感受性が低い弱毒株である。最近作製された Z (V 欠損) 株はさらに病原性が低く、野生株 (流行を引き起こす強毒株) に比較して病原性が 100 万分の 1 以下に低下している超弱毒株であるが、孵化鶏卵での増殖性は変化していない。そこで膜融合リボソームの素材としての Z (V 欠損) 株の有用性を検討した結果、Z 株とまったく同様に使用できることが明らかになった (data not shown)。センダイウイルスはヒトへの病原性は無いと考えられるが、この変異型ウイルスの採用により、さらにその可能性を最小限に留めることが可能となった。

次に、センダイウイルスの不活化条件を検討した。センダイウイルス遺伝子は修復機構を持たない 1 本鎖 RNA であるため紫外線・化学修飾剤等によって容易に不活化され、ウイルスは膜融合の機能を損なわずに感染能を失う。従来は簡便性から紫外線による不活化法を採用してきたが、今回、化学修飾剤である beta-propiolactone による不活化との比較を行った。その結果、不活化後のウイルスの融合活性は beta-propiolactone で不活化した方が高く、最終的な膜融合リボソームの比活性も高いことが明らかになった (Table 1)。これは紫外線照射がある程度はタンパク質にも影響を与えるのに対し、薬剤は核酸特異的であることによると思われる。さらに紫外線の場合、濃縮したウイルスに対する均一な照射が難しく感染能を持った粒子が残存する可能性を否定するのが容易でないのに対し、beta-propiolactone では均一な不活化が可能であることも長所である。また beta-propiolactone は水溶液中で不安定であり、氷温、24 時間の処理で分解され、さらにウイルスの精製処理を行うことにより残存する薬剤は完全に除去できる。さらに beta-propiolactone は不活化ワクチンの製造に使用することが国内で認可されており、安全性を確保する上でも最適であると考えられる。

さらに、センダイウイルスの物理的精製法に関しても検討を加えた。センダイウイルスはこれまで 30% と 50% の蔗糖溶液からなる密度勾配遠心法を用いて精製してきたが、非常に鋭敏なマーカーである孵化鶏卵中の RNA 分解酵素の残存量を指標に精製度を検討した。その結果、蔗糖密度勾配遠心法を 2 回

繰り返すことにより RNA 分解酵素を 100%除去できることを確認し、ウイルス粒子外部に存在する孵化鶏卵由来のタンパク質に関してはこの方法で除去できるという結論に達した。センダイウイルスはこの後、beta-propiolactone を用いて不活化するが、この薬剤の完全な除去と粒子径の均一化のために Sephacryl S1000 によるゲル濾過法を用いてさらに精製を行った。こうして得られた最終産物は直径 232nm の非常に均一な粒子であることを光散乱法によって確認した。この最終サンプルにはバッファー成分以外のウイルス粒子外の不純物は含まれていない。以上、膜融合リポソムの素材であるセンダイウイルスに関しては理論上考えられる最大限の安全性の確保が可能であることを確認した。

次に、もう一つの素材である遺伝子封入リポソムについても安全性に関する検討を加えた。一枚膜からなる融合リポソムは旧来の多重膜の膜融合リポソムに比べてはるかに高い遺伝子導入活性と安定性を持っている。しかし従来は、DNA を高濃度で封入した一枚膜リポソムを有機溶媒を使わずに効率よく作ることが難しく、安全性の点からは工業生産に適しているとは言い難かった。そこで製剤化に適した一枚膜リポソムの製造法に関する基礎的検討を行った。

Extruder 法は、均一な孔径を持った膜に粒子径の大きな多重膜リポソムを高圧下で通して粒子径を揃えたとともにリポソムを一枚膜にする方法で、これまでにポリカーボネート膜を使った方法が発表され、製剤化に適した方法として実用化されている。しかし原法のままでは DNA などの高分子を高濃度に含む、粘度の高い試料を封入することは非常に困難であった。本研究では、DNA の精製法の改良と金属製の Anodisc 膜の使用により、高分子を封入したリポソムを効率よく作成する方法を確立した。リポソム内部に封入する DNA は Alkaline Lysis 法の変法とゲル濾過法を組み合わせることで精製し、エタノール沈殿を行わず限外濾過法で濃縮した。この方法はすでに DNA ワクチンの製造法として発表されているものを改良したものであり、エンドトキシンなどの有害な混入物をほぼ完全に除去することが可能である。またこの方法では DNA はフィルターに詰まるような沈殿を形成しないのでリポソムへの封入が容易になる。一方、Anodisc 膜は乾熱滅菌にも対応しており、また均一な孔が多数存在するハニカム構造をとりフィルターにかける圧力が低くてすむため、この膜を使用した Extruder 法の変法は、分解酵素に感受性が高く機械的剪断力にも弱い DNA をリポソムに封入するための方法として極めて優れている。さらに本研究では、リポソムを作るための素材に製剤用の高純度のものを使用することで酸化物などの不純物による問題点を回避している。このようにして作成したリポソムは蔗糖密度勾配遠心法と Sephacryl S1000 によるゲル濾過法を組み合わせることで精製し、粒子径は 215nm で非常に均一であることを光散乱法によって確認した。ま

た膜融合リポソムの作成と精製はすべて無菌条件下で行うことが可能である。

以上のように安全性に配慮して作製した不活化センダイウイルスとリポソムを素材として膜融合リポソムを作製した結果、最終産物は直径 253nm の単分散を示し、均一な集団であることを確認した。また精製したサンプルの構造を走査型電子顕微鏡で観察し、最終的に得られた膜融合リポソムがウイルス様の構造を外側に持つ均一な粒子であることを確認した (Fig. 1)。

C.1.2 膜融合リポソムの特性評価

最適粒子設計を行った膜融合リポソムの遺伝子導入ベクターとしての性質を検討した。まず、ルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を封入した膜融合リポソムを L 細胞に作用させ、経日的な遺伝子発現パターンを検討したところ、ルシフェラーゼ活性は遺伝子導入 2 日後に最大を示し、4 日後まで高い活性を維持した後、6 日後には最大活性の約 3 分の 1 に減少した (Fig. 2)。このような一過性の遺伝子発現は、プラスミド DNA が染色体に組み込まれず、次第に分解・脱落したためと考えられる。また、遺伝子発現効率に及ぼす膜融合リポソムと細胞との接触時間の影響についても検討した (Fig. 3)。その結果、膜融合リポソムはわずか 1 分間の接触で 90 分間処理時の 35 % ものルシフェラーゼ活性を示し、短時間処理においても高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。センダイウイルスによる膜融合は数分で起こること、また膜融合リポソムはエンベロープ蛋白質の働きで細胞に積極的に結合できることから、膜融合リポソムがセンダイウイルスの強力な膜融合能をそのまま保持していると考えられた。

次に膜融合リポソムとカチオニックリポソムについて遺伝子発現効率を比較した (Fig. 4)。In vivo で細胞に直接遺伝子 (ベクター) を導入する場合には、ベクターが長時間 intact なまま細胞に作用するとは考えにくいことから、細胞との作用時間は 30 分間までとした。DNA 濃度は、カチオニックリポソムが細胞傷害性をほとんど示さない 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に統一した。この条件下では、膜融合リポソムは全く細胞傷害性を示さなかった。その結果、膜融合リポソムでは、L および HeLa 細胞とも 1 分から 10 分間の作用で高いルシフェラーゼ活性が得られたのに対し、カチオニックリポソムでは同レベルの活性を得るためには 30 分間作用させる必要があった。10 分間までで比較すると膜融合リポソムはカチオニックリポソムに比べ、4 倍から 100 倍以上の活性を示し、膜融合リポソムは非常に短時間で細胞に遺伝子導入できることが明らかとなった。これは膜融合リポソムが、センダイウイルスのエンベロープ蛋白質の働きで積極的に細胞に結合し、融合によって遺伝子を直接細胞質内に導入するのに対し、カチオニックリポソムは受動的に細胞に結合し、主にエンドサイトーシスで細胞内に

取り込まれるために短時間では十分に遺伝子導入できないためと考えられた。

また、遺伝子発現と細胞毒性に及ぼす両ベクターの濃度の影響についても検討した(Fig.5)。様々な濃度のベクターを L 細胞に作用させたところ、両ベクターとも濃度依存的な遺伝子発現を示したが、膜融合リポソームは DNA 濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度においても高いルシフェラーゼ活性を示したのに対し、カチオニックリポソームは同じ濃度ではその 1/4 以下の活性しか示さなかった。さらに低濃度の DNA 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においては、カチオニックリポソームと比較して膜融合リポソームは約 30 倍の活性を示した。カチオニックリポソームが膜融合リポソームと同等の活性を示すためには、DNA 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高濃度が必要であり、かつその条件下では細胞傷害性は避けられなかった。一方、膜融合リポソームは、高濃度 (OD540=3.0; DNA 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) においても全く細胞傷害性を示さなかった。これらの結果から、センダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームは、カチオニックリポソームに比べ、安全で効率よく外来遺伝子を導入・発現可能であることが明らかとなった。

In vivo への直接の遺伝子導入を考えた場合、生体内には遺伝子導入を妨げる様々な蛋白質等の因子が存在することが考えられる。そこで、両ベクターの遺伝子発現に及ぼす血清の影響について検討した(Fig.6)。膜融合リポソームは血清存在下でも遺伝子導入可能で、40%血清存在下においても血清非存在下の 70%もの遺伝子発現を示した。一方、カチオニックリポソーム・DNA 複合体による遺伝子導入は血清により強く阻害され、わずか 5%の血清が存在するだけで活性が 99%以上消失した。これは、カチオニックリポソーム・DNA 複合体では、DNA がリポソーム膜に封入されずに単に複合体を形成しているだけなので、DNA がヌクレアーゼにより分解をうけるのを避けられないこと、あるいはカチオニックリポソームの作用が血清蛋白質により阻害を受けたためと考えられる。膜融合リポソームでは、DNA はリポソーム膜に封入されているためにヌクレアーゼによる分解を回避できること、膜融合活性が血清蛋白質の影響をほとんど受けないうために血清存在下でも遺伝子導入できたものと考えられた。これらの結果から、膜融合リポソームは短時間で、低い濃度でも遺伝子導入でき、かつ血清の影響をほとんど受けないことが明らかとなり、特に in vivo での組織細胞への直接の遺伝子導入において優れたベクターとなりうる可能性が考えられた。

そこで、膜融合リポソームを用いた in vivo 遺伝子導入について検討した。pCAL2(1.5 μg)を封入した膜融合リポソームを S-180 腹水担癌マウスに腹腔内投与したところ、S-180 細胞に高いルシフェラーゼ活性が認められた(Table 2)。一方、カチオニックリポソームによる投与では DNA 1.5 μg ではほとんどルシフェラーゼ活性を示さず、DNA 40 μg の投与においても膜融合リポソーム(DNA 1.5 μg)の

約 1/85 の活性しか示さなかった。この時、いずれのマウスにも体重減少等の副作用は見られなかった。また、腹腔内の細胞数も BSS(-)投与マウスと変化はなかった。以上の結果より、膜融合リポソームは in vivo の細胞に対しても直接遺伝子を導入できること、その活性は投与量をも考慮に入れると、カチオニックリポソームと比較し、1,000 倍以上効率がよいことが判明した。

C.1.3 VSV リポソームの開発

膜融合リポソームにかわる新たなハイブリッドベクター候補として、VSV (Vesicular Stomatitis Virus) を利用した安全性の高いベクターの開発を試み、昨年度、VSV の特性をリポソームに付与した VSV-リポソームの作製に成功した。本年度は VSV-リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有用性を検討した。

VSV-リポソームの細胞内物質導入活性は、ジフテリア毒素フラグメント A(DTA)を用いて検討した。DTA は単独では細胞膜を移行できず、全く毒性を示さないが、細胞質内に intact な状態で数分子でも導入されれば、蛋白合成を阻害し細胞死を誘導できる強力な毒素である。そこで、DTA 封入 VSV-リポソームの FL 細胞に対する蛋白合成阻害効果を指標に、本リポソームの細胞質内への物質導入活性を検討したところ、DTA 封入 VSV-リポソームは、リポソーム由来のリン脂質濃度 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から濃度依存的に蛋白合成を阻害し、6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において約 90%の細胞で蛋白合成を阻害した(Fig.7)。DTA 封入リポソーム及び空の VSV-リポソームは全く蛋白合成を阻害しなかった。このことは、VSV-リポソームが、自身の細胞障害性を伴わずにリポソーム内に封入した DTA を intact な状態で細胞質内に導入可能であることを示している。さらに、VSV-リポソームは高濃度細胞に作用させても全く毒性を示さなかったことから、物質導入キャリアーとしての安全性に優れていることが判明した。以上の結果および VSV の感染機構を考慮すると、VSV-リポソームは、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の pH の低下に伴いエンベロープ蛋白質が活性化され、その結果、エンドソーム膜と融合し、リポソームの場合とは異なりライソソーム酵素による分解を受ける前に、封入物質を直接細胞質内に導入していると考えられた。次に VSV-リポソームの赤血球溶血活性について検討した(Table 3)。膜融合リポソームは pH5.5 から pH7.0 の間で 50~70%の溶血活性を示したが、VSV-リポソームはリポソームと同様ほとんど溶血を引き起こさず、膜融合リポソームの 1/300 であった。これは、赤血球を溶血しないという VSV の特性を VSV-リポソームがそのまま保持しているためと考えられる。以上の結果より VSV-リポソームが全身投与可能な細胞質内への物質導入キャリアーとなり得ることが示唆された。VSV-リポソームの in vivo 直接投与を考えた場合、種々

の血漿蛋白質や補体などにより遺伝子発現効率が阻害される可能性が考えられる。そこで VSV-リボソームの血漿安定性をリボソームの封入物質の維持という観点からラット新鮮血漿を用いて検討した (Fig. 8)。リボソームの場合は封入したカルボキシフルオレセイン (CF) はほとんど漏出しなかったのに対し、膜融合リボソームではわずか 1 分で約 50%、1 時間で 75% の CF を漏出し、その半減期は 1 分以内と血漿安定性が乏しいことが明らかになった。VSV-リボソームでは漏出半減期は約 10 分であり、血漿中における安定性に優れているものと考えられた。膜融合リボソームの血漿不安定性の要因としては補体因子を想定しているが、これについては現在検討中である。以上、溶血活性や安定性を考慮した場合、in vivo で直接静脈内投与を行う時には、VSV-リボソームは効率のよい遺伝子導入ベクターになり得る可能性が考えられた。そこで次に VSV-リボソームの遺伝子導入ベクターとしての有効性をリボソームと比較検討した (Table 4)。LLC-MK2 細胞にルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を封入したリボソームでは遺伝子発現は認められなかったが、pCAL2 封入 VSV-リボソームではルシフェラーゼ活性は経日的に上昇し、3 日後に最大活性を示し、4 日後には最大活性の 60% に減少した。一方、膜融合リボソームではルシフェラーゼ活性は遺伝子導入 1 日後から高く、2 日後に最大活性を示し、4 日後には最大活性の約 1/3 に減少した。以上の結果より、VSV-リボソームはリボソームと比較すると効率の良い遺伝子導入ベクターであることが示された。しかし膜融合リボソームと比較すると最大遺伝子発現量は約 1/70 にすぎなかった。VSV-リボソームによる遺伝子発現が低い原因のひとつとして、以下のことが考えられる。VSV は、エンドサイトーシス経路により感染するウイルスであり、VSV-リボソームも同様の経路をとると考えられる。一般にエンドサイトーシスは、粒子径 150~200nm で最も効率よく行われることが知られている。今回使用した pCAL2 は 6.4Kb で超らせん構造をとる時の長径は約 200nm になると考えられるため、200nm 以上のサイズの VSV-リボソームを作製せざるを得なかった。その結果、細胞に対してエンドサイトーシスされにくい粒子径になっていたものと予想される。今後、VSV-リボソームの粒子径を詳細に検討し、効率よくエンドサイトーシスされる粒子径を有する VSV-リボソームを設計するとともに、封入遺伝子のサイズをコンパクトにする方法の開発などにより、細胞内への物質導入活性を向上させることも可能と考えられる。

C. 2 膜融合リボソームを用いた遺伝子治療応用研究

C.2.1 TNF- α による癌遺伝子治療

サイトカイン遺伝子を癌細胞に導入し、宿主の抗腫瘍免疫反応の増強を期待する遺伝子治療は、悪性腫瘍に対する新しい治療法として期待されている。

本法は、全ての癌細胞に遺伝子導入できなくても抗腫瘍免疫反応を得ることができると考えられることから、腫瘍組織内に直接遺伝子を導入する in vivo アプローチにおいても効果が期待できる。しかし、種々のサイトカイン遺伝子を in vitro で癌細胞に導入し、その細胞を in vivo に移植する ex vivo アプローチによる実験においては、多くの癌細胞において抗腫瘍免疫反応の誘導がみられるのに対し、すでに in vivo に存在している癌細胞に、直接遺伝子を導入することによって治療効果が得られたという報告は非常に少ない。これは、たとえサイトカイン産生ベクターを腫瘍内に投与し、抗腫瘍免疫反応が一部誘導できたとしても、腫瘍がある程度の大きさを越えれば、腫瘍増殖の抑制を得ることが困難であることを示している。そのため、現在では複数のサイトカイン遺伝子を組み合わせる免疫系のさらなる活性化を促したり、サイトカイン遺伝子と自殺遺伝子を組み合わせる方法などが報告されているが、その数も少ないのが現状であり、全く新しい方向からのアプローチが必要と考えられる。癌に対する遺伝子治療は、労力、費用、簡便さなど全ての点から、in vivo 直接遺伝子導入による方法が望ましいことは自明の理であるが、in vivo 遺伝子治療において抗腫瘍効果が期待できるベクターやシステムの開発が非常に困難なため、重要研究課題となっている。

腫瘍壊死因子 (TNF- α) は癌に対する遺伝子治療において最も広く研究されているサイトカイン遺伝子の一つであり、癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に in vitro で遺伝子導入し、その細胞を in vivo に移植することによって、抗腫瘍免疫反応を誘導できることが報告されている。さらに、TNF- α は腫瘍血管透過性の向上、腫瘍血管内皮細胞の傷害を引き起こすことや、腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞の ICAM-1、ELAM-1 等の接着分子の発現を誘導することが知られている。また、免疫系の細胞が癌組織に浸潤するためには、まず腫瘍血管内皮細胞に作用する必要がある。これらのことを考慮すると、TNF- α を腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞に産生させることによって腫瘍組織の TNF- α 濃度を選択的に高め、腫瘍のみならず腫瘍血管内皮細胞にも TNF- α が作用しうるシステムを構築することにより免疫系の効率的な活性化が得られる可能性がある。そこで、固形癌に対する in vivo 遺伝子治療の新しい戦略として、膜融合リボソームを用いて腫瘍支配動脈内にヒト TNF- α の遺伝子を直接導入することによって腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞にヒト TNF- α を産生させ、腫瘍増殖の抑制がみられるかどうかを検討した。

まず、ヒト TNF- α 発現プラスミド pCATNF2 を封入した膜融合リボソームを BAEC に作用させたところ、培養上清中には分泌された TNF- α が認められ、その累積産生量は細胞 10^6 個あたり 1 週間で 381 pg に達した (Fig. 9)。TNF- α の 24 時間あたりの最高発現量は、遺伝子導入 24 時間後から 48 時間後までの

間の $116 \text{ pg}/10^6$ 細胞であった。次に、マウス血管内皮細胞への *in vivo* 遺伝子導入を検討するため、footpad に S-180 細胞を移植し、footpad の厚さが 5 mm 以上に達した 7 日後に pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内に投与した。*in vitro* で最高の TNF- α の産生を示した 48 時間後に、膜融合リポソームを投与した血管及びその下流に移植された S-180 細胞での TNF- α の発現を調べた (Table 2)。その結果、血管では 370.3 pg もの TNF- α の産生が認められ、膜融合リポソームによりマウスの大腿動脈血管内皮細胞への直接の遺伝子導入が可能であった。これは短時間の細胞との接触によっても十分な遺伝子導入が可能という膜融合リポソームの性質を反映したものと考えられた。また、TNF- α の発現は腫瘍部位においても認められ (68.9 pg)、腫瘍支配動脈である大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、一部腫瘍部位まで到達し、遺伝子を導入したものと考えられた。腫瘍部位の血管は正常組織の血管に比べ高い透過性を示すことが知られているが、リポソームが透過できるほどではないため、腫瘍部位における遺伝子発現は主に腫瘍血管内皮細胞によって産生されたものと考えられた。なお、マウスの血中にはヒト TNF- α は認められなかった。膜融合リポソーム投与による封入物質の局在を FITC-デキストラン (平均分子量 $71,200$) を用いて検討した。FITC-デキストラン封入膜融合リポソームを大腿動脈に投与し、動脈および静脈部分の凍結切片を作製したところ、動脈血管内皮細胞に FITC-デキストランの蛍光が認められ、膜融合リポソームは確かに封入物質を血管内皮細胞内に導入しているものと考えられた。一方、静脈血管内皮細胞には全く蛍光が認められず、大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、主に投与部位の血管内皮細胞に融合し、物質導入できるものと考えられた (Data not shown)。また pCATNF2 の臓器分布を PCR により検討したところ、大腿動脈部分においては pCATNF2 の存在を示す 585 bp のバンドが認められ、一部その下流の footpad に移植された腫瘍部位にも認められた (Data not shown)。これは、Table 5 において検討した血管と腫瘍部位の TNF- α の発現を反映したものであった。一方、血管と腫瘍部位以外の正常組織においては、本条件下では全くバンドは認められず、大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、血管とその下流の組織である腫瘍組織に特異的に遺伝子を導入したものと考えられた。これは、膜融合リポソームが血中で比較的速やかに分解されるために、投与近傍の組織の細胞とは融合できるものの、他の組織の細胞とは融合しなかったためと考えられた。また、大腿動脈血管内皮細胞における pCATNF2 の存在は、少なくとも投与 16 日後においても確認できた。

次に、footpad に移植した S-180 細胞の増殖に対して、pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内へ直接投与したときの影響について検討した (Fig. 10)。pCATNF2 封入膜融合リポ

ソーム投与群では、有意な腫瘍増殖の抑制が観察され、11 匹中 4 匹は完全に腫瘍が消失した。TNF- α はいくつかの腫瘍において出血壊死を誘導し、腫瘍を退縮させることが知られているが、本実験では出血壊死は全く認められなかった。従って、本実験における腫瘍の退縮は、TNF- α による腫瘍血管内皮細胞への傷害作用のためではないことが示唆された。また、TNF- α は培養 S-180 細胞への傷害作用を示さなかったことから、TNF- α の直接の抗腫瘍活性により退縮したわけではないことが明らかとなった。また、完全治癒を示したマウスに対して、S-180 細胞を移植していた脚と反対の脚の footpad に S-180 細胞を再移植しても生着せず、S-180 細胞に対する抗腫瘍免疫が誘導されている可能性が示唆された。一方、コントロールとして pCAL2 を封入した膜融合リポソームを投与したマウスでは、全く腫瘍増殖の抑制はみられなかった。このことから、pCATNF2 封入膜融合リポソームの投与によって得られた腫瘍増殖の抑制は、膜融合リポソーム自身の作用ではなく、遺伝子導入により発現された TNF- α によるものである可能性が考えられた。また、S-180 細胞を移植した脚と反対の脚の大腿動脈に pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与したところ、このような条件下では腫瘍増殖の抑制は観察されず、抗腫瘍効果発現には TNF- α が腫瘍支配動脈および腫瘍組織の細胞に産生される必要があることが明らかとなった。さらに抗ヒト TNF- α 中和抗体を投与することにより、腫瘍増殖の抑制が消失するかどうかを検討した (Fig. 11)。その結果、コントロールとして抗ヒト IL-6 中和抗体を投与しても、全く pCATNF2 封入膜融合リポソームの抗腫瘍効果に影響がなかったのに対し、抗ヒト TNF- α 中和抗体の投与では、腫瘍増殖抑制効果が完全に消失した。以上の結果から、pCATNF2 封入膜融合リポソームを、腫瘍支配動脈内へ直接投与することによって得られた抗腫瘍効果は、pCATNF2 が腫瘍支配動脈である大腿動脈や腫瘍組織の血管内皮細胞などに導入され、産生されたヒト TNF- α によりもたらされたものであることが明らかとなった。さらに、本系における腫瘍退縮のメカニズム解明を目的として、宿主の T 細胞系の関与について調べた。マウスに抗マウス CD4 抗体、あるいは抗マウス CD8 抗体を投与し、それぞれ CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスを用いて、TNF- α 遺伝子導入による抗腫瘍効果について検討した (Fig. 12)。その結果、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスでは、完全に TNF- α 遺伝子導入の効果が観察されなくなった。これらの結果より、遺伝子導入により産生された TNF- α による S-180 腫瘍増殖の抑制には、宿主の CD4 および CD8 陽性 T 細胞の働きが重要な役割をしているものと考えられた。本実験における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明については今後の重要な研究課題であるが、血管を介して TNF- α 遺伝子を導入し、腫瘍細胞だけではなく腫瘍血管内皮細胞にも TNF- α が作用し得る本システムは、TNF- α 遺伝子を用いた癌の遺

伝子治療において全く新しい戦略を提示したものと考えられる。

C.2.2 CEA プロモーター/Degenerin (変異 Na イオンチャンネル) 遺伝子による癌遺伝子治療

膜融合リポソームは、個々の細胞に導入できる DNA の量が少ないため外来遺伝子の導入によって誘導できる遺伝子発現は強いとは言えないものの、細胞特異性は一般に低く、血球系の一部細胞を除く多くの癌細胞に効率よく遺伝子を導入できるので *in situ* で一度に多くの細胞に遺伝子を導入できるという特徴を持っている。そのため、毒性のある遺伝子を癌細胞特異的に発現させることで局所に限定して存在する固形癌や、腹腔内に限局して散在している腹膜播種性癌の遺伝子治療が理論上可能となる。本研究では、致死性の Degenerin 遺伝子を癌特異的な CEA プロモーターを使って癌細胞特異的に発現させることで癌細胞の死滅を狙った実験を行った。

ヒト胃癌腹膜播種モデルマウスに、癌接種後 10 日目から毎週一回の頻度で計 4 回、一回当たり 0.5 μg のハイブリッド遺伝子を含む膜融合リポソームを腹腔内投与した。その結果、対照群 (ベクター-DNA 投与群、および空のリポソーム投与群) のマウスは 35 日で全滅したのに対し、実験群では 95%が生存し、投与されたハイブリッド遺伝子が、*in vivo* で癌細胞特異的に発現してこれを死滅させたことが確認され、効果的な治療に成功した (Fig. 13)。

C.2.3 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

肝癌、肝炎、肝硬変等では異常患部の切除が不可欠であるが、手術の予後 (肝再生や生体機能全般の回復、生存性など) は肝障害の発生の有無に関わる。術中・術後の感染による肝障害は頻度も高く、死に至ることも希ではない。したがって、いかに術中、術後の感染を軽減し、肝障害の発生を防ぐかが重要な臨床的課題となっている。術後肝障害の発生は肝類洞内皮の障害、特に類洞内皮の抗血栓性機能や抗炎症性機能の低下に基づく血液凝固の亢進による微小血栓の形成が、残肝組織の壊死やアポトーシスを誘導する最大の原因になることが示唆されている。したがって、類洞内皮の機能保全、特に抗血栓性機能の維持補填が遺伝子治療をはじめとする人工的手法によって可能になれば、術後肝障害の発生は大いに軽減できると期待される。

血管内皮細胞膜にはトロンボモジュリン (TM) やヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) などの抗血栓性因子が存在し、また、内皮細胞は組織因子系凝固阻害因子 (TFPI) やプロテイン S (PS) などを産生し、内皮細胞上の抗血栓性機能を維持している。しかし、感染等によるリポポリサッカライド (LPS) の侵入は単球や内皮細胞を刺激し、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生、凝固開始因子の組織因子 (TF) の産生、細胞接着因子の VCAM-1 や ICAM-1 の

産生を促すとともに、内皮細胞での抗血栓性因子の TM や HSPG、TFPI などの産生低下を来し、血管内皮細胞上は炎症と血液凝固亢進の場へと変化する。LPS 刺激による血管内皮細胞の障害は、肝類洞内皮細胞においてもほぼ同様に生じると考えられ、我々はこれまでに、肝切除ラットモデルを用いた研究において、術後の肝機能障害は類洞内皮細胞の TM の発現低下が一因になること、また、術後の肝障害がプロスタサイクリン (PGI₂) の前投与で軽減されることを示してきた。

本研究ではこれまでの研究成果に基づき、術後肝障害の発生の阻止を目的として、抗血栓性因子や抗炎症性因子の遺伝子を肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価検討することとした。すなわち、ラットを用いて、肝切除、肝硬変および敗血症モデルを作製し、これらの病態時における肝類洞内皮細胞の抗血栓性の低下を改善する目的で、ヒトやラットの TM、TFPI などの cDNA を組み込んだ発現ベクターを膜融合リポソームを用いて、*in vitro*、*in vivo* で類洞内皮細胞に導入し、遺伝子導入効率の検討、*in vivo* での肝障害マーカーを指標とした安全性の検討、導入遺伝子由来蛋白質の生物活性、抗原量、mRNA の発現量を指標とした導入遺伝子の導入効率の評価、さらに肝類洞内皮抗血栓性の低下機序に関する検討を行った。

まず、hTM cDNA の *in vitro* での導入効果を検討するため、単離ラット肝類洞内皮細胞を pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソーム (1 μg DNA/2ml 培養液) で処理した後、培養類洞内皮細胞の hTM の発現量を測定した。その結果、未処理の肝類洞内皮細胞に比較して TM の抗原値と活性値が有意に増加していた ($p < 0.05$) (Fig. 14)。また、hTM mRNA 量も hTM cDNA 含有膜融合リポソーム処理細胞では、未処理細胞に比較して明らかに増加していた。

次に、hTM cDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームの *in vivo* での安全性および遺伝子導入効果を検討するため、正常ラットの門脈から pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソーム溶液 (4 μg DNA/80 μl) を注入し、10 日目まで血漿を採取し、GOT、GPT および LDH 活性を測定した。その結果、LPS 投与ラットではこれらの値が著しく増加したのに対して、膜融合リポソーム投与ラットでは血漿 GOT、GPT および LDH 値はほとんど変化せず、膜融合リポソーム投与による直接的な肝障害は生じないことが判明した (Fig. 15)。また、門脈内投与後、ラット肝細胞および肝類洞内皮細胞を単離し、これらの細胞における hTM の発現量を測定した。その結果、hTM 遺伝子は肝細胞では発現されなかったが、肝類洞内皮細胞では投与後 5 日目に hTM 抗原値および TM 活性値は共に有意に増加し ($p < 0.01$)、その後徐々に低下した (Fig. 16)。RT-PCR 法で測定した hTM mRNA 量の発現動態も同様であった。以上の結果から、膜融合リポソームの投与による肝障害は殆どなく、治療上安全であること、膜融合リポソーム含有 hTM cDNA 発現ベクターは投与後約 5 日目に最大発現量を呈する

こと、門脈から投与した hTM 遺伝子発現ベクターは、肝細胞ではなく類洞内皮細胞で特異的に発現されることが示唆された。

次に、肝類洞内皮抗血栓性の低下機序に関する検討として、敗血症時のラット肝類洞内皮細胞での抗血栓性因子 PS の発現について検討した。LPS (3 mg/kg) 投与ラットの肝臓から肝細胞および類洞内皮細胞を単離し、24 時間培養後の類洞内皮細胞および肝細胞の培養上清中の PS 抗原値およびそれぞれの細胞中の PS mRNA 発現量を測定した結果、類洞内皮細胞培養上清中の PS 抗原値および PS mRNA 値は、正常ラットから単離した類洞内皮細胞のそれぞれの値の 60% および 50% に低下していた (Fig. 17)。単離肝細胞での PS 抗原値および PS mRNA 値は、正常ラット肝細胞と比較して有意な低下を認めなかった。さらに、正常ラットから単離した類洞内皮細胞を LPS で 24 時間処理後、培養上清中の PS 抗原値および PS mRNA 量を測定した結果、PS 抗原値は LPS の濃度依存的に低下し、100 μ g/ml の LPS 処理により 50% に低下した。また、類洞内皮細胞の PS mRNA レベルも LPS 処理により低下し、100 μ g/ml の LPS 処理では約 50% に低下していた。しかし、LPS で処理した分離肝細胞中の PS mRNA には有意な変化は認められなかった。

C. 3 導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤に関する研究

昨年度実施したラムダファージを用いた核への遺伝子ターゲティングシステムの研究から、頭部にさまざまな機能を持ったペプチドを発現するファージ粒子の作成が可能になった。そこで本年度は、ヒト免疫不全ウイルスの Tat タンパク質由来の Tat peptide に注目し、これを頭部に発現するファージを構築して粒子内部に封入した遺伝子の導入活性を観察した。

Tat ペプチドを N 末端に含むキメラ・タンパク質は細胞膜を通過して細胞内に自律的に移行することが知られており、またさらに核にまで移行するという報告もある。そこで、ファージ頭部を構成する主要タンパク質である D タンパク質の N 末端側にこのペプチドを組み込んだ変異ファージを作成し、ファージ粒子を精製してウエスタンブロッティングによりキメラ・タンパク質が確かに頭部に組み込まれていることを確認した (Fig. 18)。次に、このファージを培養液中に添加し、COS 細胞への遺伝子導入活性を、ファージ粒子内部に封入したルシフェラーゼ遺伝子を指標に測定した。その結果、市販のカチオニックリポソーム・DNA 複合体と同等以上の遺伝子導入活性を持っていることが確認できた (Fig. 19)。野生型ファージや核移行シグナルを発現しているファージでは遺伝子導入は観察されないことから、この活性は Tat ファージに特有の性質である。他の非ウイルスベクターとの比較で注目すべき点は、動物細胞にほとんど傷害をもたらさないことで、カチオニックリポソームの毒性が強いことと

対照的である (Fig. 20)。さらに遺伝子導入の時間経過を測定すると、細胞との接触時間が重要で、最大 6 時間までの範囲で遺伝子導入効率は時間に比例して上昇した (Fig. 21)。一方、他の非ウイルスベクターで観察される血清による阻害は起こらず、血清の添加はむしろ遺伝子発現を上昇させる傾向が見られた。

以上の結果は、Tat peptide がタンパク質だけではなく DNA のような巨大な分子をも細胞内に導入できる活性を持っていること、この活性はカチオニックリポソームなどに比べてはるかに細胞毒性が低く遺伝子治療用ベクターとして有効であることを示している。この活性は短い Tat ペプチドに依存しているため、今後、このペプチドを高分子ポリマーに組み込んだ新しいベクター系を開発できる可能性を強く示唆しており、細胞傷害性の低い安全な遺伝子導入系の候補になることが期待される。

C. 4 ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究

C.4.1 遺伝情報が細胞核内で安定に存在するために必要な DNA 構造の研究

遺伝性代謝疾患のように長期間の遺伝子発現が要求される場合、現在の遺伝子治療では染色体への遺伝子の組み込みが第一選択となっている。しかし染色体に外来遺伝子を導入するためには細胞分裂 (DNA 複製) が必須であることが明らかになっており、神経・肝実質細胞を強制的に分裂させて遺伝子を組み込もうとするアプローチは事実上不可能である。さらに染色体に外来遺伝子を組み込むことは、ガン抑制遺伝子の不活化・ガン遺伝子の異常な活性化など未知の危険性を伴い、遺伝子治療に求められる安全性を確保することは難しい。我々は、導入した遺伝子の安定性と安全性の問題を同時に解決するために、核内で染色体とは独立に安定に存在できる人工染色体を開発し、これを遺伝子デリバリーシステムと組み合わせて新たなベクターを開発することを目指している。そこで本研究では、染色体の構造の中でも特に安定性と関係が深いと考えられるテロメアに焦点をあて、その機能の解析を行った。

染色体の末端に存在するテロメアが染色体の安定性に深く関わっていることは、放射線などでテロメアを失った染色体が極度に不安定になることや、有限寿命を持つ体細胞ではテロメア配列と呼ばれる (TTAGGG) $_n$ という染色体の最末端の繰り返し配列が短くなることに伴って染色体が不安定になり細胞死が誘導されることから予想されてきた。しかしテロメア配列以外にどのような因子が染色体の安定性を決定しているのかということについてはほとんど何も判っていない。本研究ではテロメアが染色体の安定性に果たす機能について研究を進めてきたが、前年度までの研究から、外部から導入したテロメア配列を含む DNA 断片 (テロメア・シード) が染色体に導入されて新しいテロメアを作る現象 (テロメア・シーディング) が、外部から導入するテロメア配列の長さに比例し (Fig. 22)、個々の細胞

内にあるテロメア配列の総延長に逆比例して起きることを突き止めた(Table 6)。この結果から、外部から導入したテロメア配列と内在性のテロメア配列が、この配列に結合する同一の因子を競合していることが推定された。

本年度は、テロメア配列結合因子として既に同定されていた TRF1 がテロメアの安定化を通じて染色体を安定化していることを突き止めた。まず8種類のヒト細胞に関して TRF1 の量をウエスタンブロットティングにより定量し、テロメア・シーディングの活性と単位テロメア配列あたりの TRF1 の量の間には正の相関があることを見いだした(Table 7)。全く同じ配列に結合することが知られている TRF2 に関してはそのような相関は見られなかった。さらに、この結果を裏付けるためにテロメア・シーディングが起きにくい(すなわち新しいテロメアができにくい) HeLa-LT 細胞に TRF1 遺伝子を導入して安定に発現する細胞を樹立した(Fig. 23)。これらの細胞ではすべてテロメア・シーディングの活性が上昇していることを見だし(Table 7)、外部から導入したテロメア配列が新たな染色体末端となるために必須で、その律速段階となっている因子が TRF1 であることを最終的に確認した。

この結果は、外部から導入したテロメア配列から新たにテロメアを作るという人工的な系から得られたものであるが、染色体は複製のたびごとに新しい TRF1 を常に末端に補給しなければならないので、細胞内の染色体の維持もテロメアシーディングとまったく同様の機構で調節されているはずである。そこでさまざまなヒト体細胞における TRF1 の量を定量したところ、明らかに不死化細胞よりも発現が少ないことを見いだされた(Fig. 24)。特に分裂寿命がほとんどないヒト末梢血単核細胞ではほとんど TRF1 は検出されなかった。このことから我々はテロメア(ひいては染色体)の安定性が TRF1 によって決まっているという仮説を提唱している。本研究で示したように、寿命が有限である体細胞では TRF1 が少なく染色体の安定性の律速となっており、逆に不死化細胞では TRF1 が多く律速がはずれて染色体の不安定化による細胞死から免れている可能性が考えられる。また、寿命が有限である体細胞ではテロメア配列が短くなるに従い染色体が不安定になり細胞死が誘導されることが知られているが、なぜテロメア配列がある程度短くなったところで染色体が不安定になるのかはまったく判っていなかった。我々の仮説はこの現象も矛盾無く説明できる。

以上の結果から、本研究の目的であった人工染色体の安定性を決める因子は TRF1 であると結論した。TRF1 は細胞の中にもともと存在する分子であり、生殖細胞や胚性幹細胞・胸腺など正常組織で高発現していることが知られているので、これ自体がガン化を引き起こしたり異常な免疫反応を誘導したりすることは考えにくく、外部から導入した DNA を安定化するためにはヘルペスのような病原性を有するウイルスに頼るよりはるかに高い安全性を確保で

きる。TRF1 は環状のプラスミド DNA にも結合することが示されているので、細胞核内でも同様に環状の DNA を安定化できると考えられ、この現象の遺伝子治療用ベクターとしての実用化を目指して現在その確認を行っている。

TRF1 が染色体末端を安定化する機構についてはまだ不明である。近年、動物細胞のテロメアは末端がループ状になっており、染色体末端が DNA の切断面として認識されないのはこの構造を取っているためであるという説が有力となっている。またこの構造で DNA が三叉路構造を取っているところに TRF2 が結合し、TRF1 はこのループの部分に結合していることが示唆されている。そのため、TRF1 はこのループ状構造を作るために必要である可能性がある。一方、TRF1 は核膜の裏側に存在する核マトリックスに結合していることが知られており、DNA を核膜に結合することで安定化を実現している可能性もある。今後は TRF1 の分子機能について解析を進め、遺伝子治療用ベクターの素材としての TRF1 の有用性を探っていく予定である。

C.4.2 エピソーマルベクターの開発

遺伝子治療に用いる独立レプリコンとしては、人工染色体の他に、環状 DNA として宿主染色体に組み込まれることなく染色体外に安定に保持され、さらに宿主 DNA とともに複製されることにより持続的な遺伝子発現が可能な自律複製エピソーマルベクターも有望なものであると考えられる。ヒト細胞での染色体外複製系としては Epstein Barr virus の EBNA1 蛋白質と複製起点 OriP よりなる EBV 複製系が知られているが、EBV 複製系では複製されたプラスミドが細胞の分裂時にランダムに分配されるため、プラスミドの安定性はあまり高くない。また、EBV はヒトやサルや霊長類の細胞中では複製されるが、齧歯類の細胞では複製しないことが知られており、EBV ベクターの *in vivo* 遺伝子導入ベクターとしての有用性を検討することは困難である。本研究では、複製系を EB OriP からヒト染色体由来の複製起点に置換することにより、複製能・安定性に優れ、齧歯類の細胞中でも複製されるベクターを作成することが可能であるという報告に基づいて、ヒト染色体の複製起点あるいは DNA の安定性を増す要素を搭載したエピソーマルベクターの構築を目指している。昨年度はヒトゲノム DNA の HindIII 断片から DNA の複製、安定性に寄与する DNA 配列のクローニングを試み、その候補として 3K, 7K, 9K, 14K の DNA 断片を取得した。

今年度はこれらの DNA 断片を組み込むことにより遺伝子発現の持続性が達成されるかどうかを検討した。まず、EBNA-1, OriP を有するルシフェラーゼ発現 EBV プラスミド p205-L1 及び p205-L1 から EBV の複製起点を除去し、自律複製されないプラスミド p205-L2 を作製し、さらに p205-L2 に各 HindIII 断片を組み込んだプラスミドを作製した(Fig. 25)。これらのプラスミドを 293 細胞に導入し

て遺伝子発現の経時変化を検討した(Fig. 26)。その結果、p205-L2に7K, 9K, 14KのDNA断片を挿入したプラスミドでは遺伝子導入後12日目まで細胞の増殖に伴って遺伝子発現が増加し、その後低下した。一方、p205-L1, L2及びp205-L2に3Kの断片を挿入したプラスミドでは遺伝子発現はある程度維持されるものの増加は認められなかった。またEBNA1, OriPを持たないプラスミドpHRSVLでは遺伝子発現は経日的に顕著に低下した。この結果より、7K, 9K, 14KのDNA断片にはプラスミドの複製活性があり、そのために活性が増加したことが示唆された。さらにこれらのプラスミドによる遺伝子発現の経時変化をHeLa細胞、ECV304細胞(ヒト血管内皮細胞由来)、及びNIH/3T3細胞でも検討した(Fig. 27)。その結果、p205-L2及びp205-L2に9K断片を挿入したものは遺伝子発現は8日目まで徐々に低下するか殆ど変わらないのに対し、7K, 14Kを挿入したものは少なくとも6日目までは遺伝子発現の増加が認められ、長期間高い遺伝子発現が得られることが判明した。以上の結果より、少なくとも7K, 14KのヒトDNA断片はプラスミドの複製、安定性に寄与する活性を有しており、これらをプラスミドに組み込むことにより、種々の細胞でプラスミドが複製され、高い遺伝子発現が維持されることが示された。

C. 5 細胞質内での遺伝子発現系の確立に関する研究

C.5.1 T7細胞質内遺伝子発現系

昨年度までの研究において、pT7-IRES-L(T7プロモーター制御下でのルシフェラーゼ発現プラスミド)およびpT7-AUTO-2(T7プロモーター制御下でのT7RNAポリメラーゼ発現プラスミド)を用い、遺伝子発現に核移行を要しない、細胞質内遺伝子発現系の確立を図った。その結果、T7発現系が*in vitro*非増殖性細胞に対する遺伝子発現系として有用性であること示された。そこで本年度は、T7発現系の*in vivo*における遺伝子発現の特性および有用性を評価した。

まず、本系での遺伝子発現に必須の2つの遺伝子、すなわちレポーター遺伝子としてのpT7-IRES-LとT7 RNA polymeraseを供給するpT7-AUTO-2の量的バランスを最適化するため、様々な混合比で細胞に遺伝子導入後、経日的に遺伝子発現量を測定した(Fig. 28)。その結果、pT7-IRES-L:pT7-AUTO-2=1:3(モル比)で導入した場合、最も高い遺伝子発現が観察された。そこで、この混合比のT7発現系または遺伝子発現に核移行を必要とするプラスミドpRSVLをマウス脳内にリポフェクチンを用いて遺伝子導入し、経日的な遺伝子発現を検討した(Fig. 29)。その結果、T7発現系を導入した場合は、遺伝子導入後2日目をピークに効率のよい遺伝子発現が認められたが、pRSVLを導入した場合は、ほとんど遺伝子発現が認められなかった。pRSVLでは、遺伝子の核内への移行が核膜により阻害されたた

め、遺伝子発現がほとんど認められなかったものと考えられる。一方、T7発現系は核移行を全く必要とせず細胞質内で遺伝子発現を行うため、効率よい遺伝子発現が認められたものと考えられる。このようにT7発現系は*in vivo*での遺伝子発現においても効率のよい遺伝子発現が可能であり、今後の非ウイルスベクターを用いた体細胞をターゲットとした遺伝子治療に応用可能な系として期待される。

C.5.2 細胞質内で安定に遺伝子発現を行うRNAレプリコンの研究

細胞質で遺伝情報を発現するシステムとしてはこれまでにT7 RNA polymeraseによるものとワクチニアウイルス(種痘ウイルス)ベクターによるものが知られており、神経など分裂していない組織でも比較的強い遺伝子発現が可能であることが示されている。T7 RNA polymeraseはDNAを鋳型としてRNAを合成するがDNAを合成する活性をもたないため、遺伝子発現は鋳型DNAの安定性に依存して一過性である。またワクチニアウイルスは強い遺伝子発現活性を持つため実験室レベルではよく使われているが、現在では種痘が廃止されたためにこのウイルスに対する免疫を持たない人が多く、病原性から考えて安全な選択肢とは言えない。またワクチニアウイルスベクターも遺伝子発現は一過性であり、さらに強い細胞毒性を持つので遺伝性代謝疾患の治療には使用できない。そこで我々は細胞質で安定に遺伝子発現を行うことができる系のモデルを自然界に求め、一本鎖RNAウイルスであるパラミキソウイルスの遺伝子発現系に注目した。このウイルスの仲間では麻疹ウイルス・流行性耳下腺炎(おたふく風邪)ウイルス・ニューカッスル病ウイルスなどが知られているが、いずれも細胞質で遺伝情報を発現すること、ある条件下で細胞質で安定に遺伝子発現を続けながら宿主細胞と共存する持続感染という感染様式を取ることが共通した性質である。我々はこの中で、ヒトに対する病原性を持たないセンダイウイルスに着目し、その遺伝子発現系の解析を行った。

すでに我々は、センダイウイルスの持続感染がウイルス・タンパク質の一つMタンパク質の変異によって引き起こされていること、このタンパク質が遺伝子発現には関与していないことを明らかにしているが、このウイルスの遺伝子発現機構の主要部分はまだほとんど明らかになっていなかった。センダイウイルスでは複製・転写は共にネガティブ鎖RNAを鋳型とするRNA合成活性に依存しており、またこの活性はLタンパク質に存在すると考えられてきたが、RNA合成活性は宿主細胞のタンパク質(チューブリンなど)に完全に依存しており*in vitro*系の構築が難しく、詳細な解析はなされていない。この問題を解決するため、我々は鋳型となるRNAと個々のウイルスタンパク質を、T7 RNA polymeraseを安定に発現する細胞の中で直接作って機能を解析する系を作成し、ヌクレオキャプシド(ウイルスゲノ

ムRNAとウイルスタンパク質からできている複合体で、遺伝子の本体)を構成するタンパク質についてRNA合成活性を測定した。その結果、主要タンパク質であるNPタンパク質にRNA polymerase活性の本体が存在することを見いだした(Table 8)。またNP発現ベクターと構造は非常に似ているがNPタンパク質を作ることができないDNAを導入してもRNA polymeraseの活性が検出できないことから、この活性がNPタンパク質自体に存在することが確かめられた(Fig. 30)。また鋳型RNAの3'側の構造が重要であり、この部分にNPタンパク質と結合してRNA合成を開始するプロモーター領域があることがわかった(Fig. 31)。さらにNPタンパク質が合成したプラス鎖RNAの構造をS1 Nuclease Assayで検討したところ、ゲノムRNA3'側にあるmRNAの転写開始領域R1とゲノムRNA3'末端の両方からRNA合成が始まっていることがわかり、NPタンパク質がmRNAの転写とゲノムRNAの複製の両方を担っていることも示唆された(Fig. 32)。以上の結果は、NPタンパク質を駆動力として、細胞質で自ら複製しながらmRNAを合成できる新たな遺伝子発現系の構築が可能であることを示している。本年度はさらにNP遺伝子を含んだベクター作成のための鋳型DNAの作成を完了しており(Fig. 33)、これらの研究成果に基づいた遺伝子発現系の開発が近い将来に実現することが期待される。

C. 6 次世代アデノウイルスベクター開発基盤研究

アデノウイルスベクターは、現存する遺伝子治療用ベクターの中では、最も遺伝子導入効率の優れたベクターであり、非分裂細胞や *in vivo* の組織細胞への直接の遺伝子導入も可能なことから画期的なベクターとして注目されてきた。しかしながら、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合、多くの細胞・組織に非特異的に移行すること、逆に、アデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)) の発現がない細胞には感染できないことがなどという問題点が指摘されている。また、ベクター感染細胞内でわずかに産生されるウイルス蛋白質に対する免疫反応の問題が提起され、低抗原性ベクターの開発が望まれている。そこで、ウイルス表面のファイバー蛋白質に外来ペプチドを発現させることによりベクターの標的細胞選択性を制御し、より広範な目的に使用できる可能性を付与したファイバーミュータントアデノウイルスベクター、さらには全てのウイルス遺伝子を欠損させることで免疫反応の問題を解決した *gutless* アデノウイルスベクターの開発を目指した基礎研究を行った。

1) ファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムの開発のための基盤研究

ファイバー蛋白質のHI loopをコードした遺伝子配列部分に、ユニークな制限酵素部位を挿入したア

デノウイルスベクタープラスミドを作製した(Fig. 34)。これにより、任意の挿入したい外来ペプチドに相当するオリゴDNAを、1 stepの *in vitro* ligationでアデノウイルスDNAに導入することが可能となると考えられる。

2) 全てのウイルス遺伝子を欠損した *gutless* アデノウイルスベクターシステムの開発基盤研究

P1 ファージの組み換え酵素である Cre recombinase とそのターゲット配列である loxP を利用し、全てのウイルス遺伝子を欠損させたアデノウイルスベクター (*gutless* アデノウイルスベクター) の開発に成功した。即ち、全てのウイルス遺伝子を loxP の配列で挟んだベクターを作製し、これを cre を発現した 293 細胞 (ウイルス産生細胞) に作用させることにより *gutless* アデノウイルスベクターを取得した。このシステムにより副作用の原因となっていたウイルス遺伝子を除去し、目的外来遺伝子だけを含んだベクターの産生の可能性が開けた。

D. 考察

D. 1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

D.1.1 高度な安全性を確保した膜融合リボソーム調製法の開発

膜融合リボソームがユニークな活性を持つ遺伝子導入系であることは広く知られるようになり、動物実験の段階ではガンの遺伝子治療を中心にさまざまな成果が報告されている。しかし、実際に臨床応用を目指すためには、生産工程や素材の問題を含めた安全性に関しての詳細な検討が必要である。本年度は、膜融合リボソームの製造に関して現状で研究室レベルで考え得る点をすべて検討し、今後の動物を使った安全性試験に必要な情報を得ることができた。素材である不活化センダイウイルスへの病原性ウイルス粒子の混入については、センダイウイルス Z(V 欠損)株の持つ病原性がマウス投与時 50% 致死率で 10^8 と報告されていること、また beta-propiolactone による不活化で感染性が 10^8 低下すると考えると、両者で 10^{-16} となり、病原性粒子の存在は事実上無視できる値となる。センダイウイルスは組換えを起こさないため病原性を持つウイルスに復帰変異をすることは無く、安全性の確保は容易である。ちなみに、遺伝子治療の臨床試験で現在使用されているアデノウイルスベクター最終製品への野生型アデノウイルスの混入率は 10^{-9} 程度であり、不活化センダイウイルスはこの基準を容易に満たしている。一方、膜融合リボソームのもう一つの素材である DNA 封入リボソームに関しては、リボソームも DNA もそれぞれ単独ではすでに製剤としての検討がなされており、素材の工業生産については大きな問題点はないが、今回の研究でさらに両者を複合した最終産物の実用化に向けた情報を得ることもできた。

D.1.2 膜融合リボソームの特性評価

膜融合リボソームの遺伝子導入ベクターとしての性質について、非ウイルスベクターとして広く用いられているカチオニックリボソームのリポフェクチンと比較しながら検討した。膜融合リボソームは細胞との短時間の接触で遺伝子導入可能であるのに対し、カチオニックリボソームでは十分な遺伝子発現を得るためには30分間以上の作用が必要であり、膜融合リボソームと同程度の遺伝子発現を得るためには細胞傷害性を伴うことが避けられなかったのに対し、膜融合リボソームは高濃度においても全く細胞傷害性を示さなかった。さらに、膜融合リボソームは血清存在下においても遺伝子導入が可能であり、これらの性質を反映して *in vivo* でも膜融合リボソームはカチオニックリボソームと比較して1,000倍以上効率よく *in vivo* の細胞に遺伝子導入できることが判明した。今回実験に用いた遺伝子は、細胞内で複製不能なプラスミドであるため一過性の遺伝子発現しか示さなかった。膜融合リボソームは遺伝子を効率的に細胞内に運ぶためのベクターの役割を提供しているのであり、一過性の遺伝子発現しか示さなかった原因は、膜融合リボソームの問題ではなく、導入された遺伝子そのものの問題である。これはウイルスベクターとは大きく性質を異にする点である。すなわち、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターの現行のもの（第1世代）では、遺伝子の形状やその発現様式はベクター自身の性質に依存したものであり、導入される遺伝子の自由度は非常に低い。一方、膜融合リボソームなど非ウイルスベクターの場合には、導入される遺伝子の自由度は大きく、動物細胞核内で染色体外DNAとして複製可能なプラスミドを用いることにより永続的な遺伝子発現を得ることも可能と考えられる。本研究で明らかとなったように、非ウイルスベクターでもカチオニックリボソームなどの物理・化学的複合体を利用する非生物学的な方法では、遺伝子の発現と毒性とのバランスを打破し、細胞傷害性を示すことなく効率的な遺伝子発現を得ることは容易ではない。膜融合リボソームの場合は、ウイルスの感染能を生物学的に利用して安全に、効率よく遺伝子を細胞内に導入でき、さらに *in vivo* の細胞への遺伝子導入も可能である。このように膜融合リボソームは、ウイルスと非ウイルスの中間の性質を有したハイブリッドなベクターであり、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの長所を合わせ持ったベクターであるといえる。

D.1.3 VSV リボソームの開発

VSVは、レトロウイルスベクターよりも高い感染能を有し宿主域も広い。従ってVSV-リボソームは、ウイルスベクターの高い遺伝子発現効率と非ウイルスベクターの安全性などを合わせ持つ血管内直接投与遺伝子導入ベクターとなり得るものと考えられる。

D. 2 膜融合リボソームを用いた遺伝子治療応用研究

D.2.1 TNF- α による癌遺伝子治療

TNF- α は当初、正常細胞を傷害することなく、癌細胞を選択的に傷害する物質として発見され、その強力な抗腫瘍活性から夢の抗癌剤として注目を集めたサイトカインである。しかし、全身投与におけるTNF- α の奏効率は5%前後と期待を大きく裏切る結果に終わっている。これは、副作用のために投与量が抗腫瘍効果を期待できる量をはるかに下回っているためと考えられている。一方、TNF- α の腫瘍内投与や動注療法などの局所療法では高い奏効率が得られることが明らかとなり、治療効果発現にはTNF- α の腫瘍局所における濃度をいかに高めるかが重要な問題となっている。TNF- α 遺伝子を用いて癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球にTNF- α を発現させる癌の遺伝子治療は、腫瘍局所におけるTNF- α 濃度を選択的に高め、正常細胞への副作用を抑えることが期待できることから、癌に対する新しい治療法として期待される。現在までに報告されているTNF-遺伝子を用いた癌の遺伝子治療に関する動物実験や臨床実験は、遺伝子を *in vitro* で導入し、その細胞を *in vivo* に移植する *ex vivo* の系で行われている。将来的にはより簡便な、*in vivo* の組織細胞に直接TNF- α をはじめとするサイトカイン等の遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療が主流になることが期待されている。ところが、*in vivo* にすでに生着している癌に対して、直接遺伝子を導入し、治療効果を得たという報告は非常に少ない。我々の検討においても、*ddY* マウスの腹部皮内に移植されたS-180固形癌に、pCATNF2封入膜融合リボソームを腫瘍内投与しても、全く抗腫瘍効果は得られなかった。従って、固形癌に対する *in vivo* 遺伝子治療においては、全く新しい方向からのアプローチが必要と考えられた。そこで、TNF- α の腫瘍血管内皮細胞への作用を第一のターゲットとしたアプローチ、すなわちTNF- α を腫瘍上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞に産生させることによって、TNF- α を持続的に腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞に作用させ、より効率よく免疫系の細胞を活性化させる結果、すでに生着している癌に対しても抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。

マウスの腫瘍支配動脈である大腿動脈内に膜融合リボソームを用いてpCATNF2を導入すると、投与部位の大腿動脈およびそのすぐ下流の組織である腫瘍組織にはpCATNF2の存在が認められ、さらにヒトTNF- α の発現もみられた。また、pCATNF2封入膜融合リボソームの投与により顕著な腫瘍増殖の抑制が認められ、11匹中4匹は腫瘍の完全治癒を示した。pCAL2封入膜融合リボソームを投与したマウスにおいては、腫瘍増殖の抑制が全く認められないこと、pCATNF2封入膜融合リボソームの効果が抗ヒトTNF- α 中和抗体の投与によって完全に消失したことから、導入されたヒトTNF- α 遺伝子により発現したヒトTNF- α によって抗腫瘍効果が得られ

たものと考えられた。TNF- α 遺伝子を S-180 細胞を移植した脚と反応の脚の大腿動脈に投与しても効果がみられないことから、腫瘍上流および腫瘍組織より TNF- α が持続的に分泌されることが、腫瘍増殖の抑制には必要である。さらに、抗 CD4、CD8 抗体の投与によって、それぞれ CD4、CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスにおいては抗腫瘍効果が完全に消失したことから、宿主の T 細胞の働きが腫瘍増殖の抑制には重要な役割を果たしていることが示唆された。また腫瘍が完全に消失したマウスに S-180 細胞を再投与しても腫瘍の生着はみられず、腫瘍免疫反応が誘導されている可能性が考えられた。本系における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明については今後の重要な研究課題であるが、腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生された TNF- α によって、腫瘍血管内皮細胞上のリンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤を促す接着分子等の発現が上昇し、免疫担当細胞の腫瘍組織への浸潤を効率よく誘導している可能性が考えられる。さらに、TNF- α は様々な免疫調節作用を有し、マクロファージ、NK (natural killer) 細胞、好中球の活性化、T 細胞の増殖促進、リンパ球のインターロイキン 2 レセプター発現や癌細胞の MHC class I 発現増強、他のサイトカインの誘導、LAK (lymphokine-activated killer cells)、CTL (cytotoxic T lymphocyte) などの抗腫瘍エフェクター細胞の誘導を増強することが知られていることから、TNF- α は腫瘍組織に効率よくリクルートした免疫担当細胞の抗腫瘍活性を増強していることも考えられる。これらの結果は、TNF- α を腫瘍上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生させることによって、TNF- α の腫瘍集積性を高め、さらに腫瘍細胞のみならず腫瘍血管内皮細胞をもターゲットとすることにより、優れた抗腫瘍効果が得られたことを示している。固形癌の局所にサイトカイン遺伝子を直接投与し、抗腫瘍効果が観察されたという報告はほとんどないのが現状であり、血管を介して腫瘍組織にサイトカイン遺伝子を導入する本システムは、固形癌の遺伝子治療に対して全く新しい戦略を提示したものであり、その意義は非常に大きいと考えられる。

D.2.2 CEA プロモーター/Degenerin (変異 Na イオンチャンネル) 遺伝子による癌遺伝子治療

膜融合リポソームの遺伝子治療応用例の一つとして、腹腔内に広がった癌の遺伝子治療という難しいモデルを手がけた。CEA promoter で転写される Degenerin 遺伝子により癌細胞を特異的に殺すことができるという発想は、従来の抗体・毒素キメラ分子を使ったミサイル療法をさらにエレガントにしたものであるが、ここで注目すべき点は、毒性を持つ遺伝子をウイルスベクターに組み込むことは原理的に不可能なので、CEA promoter で転写される Degenerin 遺伝子を組み込んだウイルスベクターを作ることも非常に難しいということである。一方、

この遺伝子は大腸菌には何の毒性も持たないのでプラスミドとして大量に調製することは容易だが、調製した DNA を既存の他の非ウイルスベクターと組み合わせても、遺伝子導入の効率が低く腹腔内に散らばったすべての癌細胞にこの遺伝子を導入して殺すという目的を達成することができない。つまり、今回の研究は、非常に多くの細胞に生体内で同時に任意の遺伝子を導入することができるという膜融合リポソームの性質を完全に活かし、その有用性を証明した成果であるということができる。

D.2.3 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

我々はこれまで、感染症患者の臨床検体および LPS 感染敗血症モデル動物を用いた研究を行い、肝の術後感染による肝機能障害は、主に腸管から門脈内に移入した感染細菌由来の LPS による肝類洞内皮の抗血栓性機能の障害、特に TM の発現低下によることを示唆してきた。この研究成果に基づき、本研究では肝癌、肝炎、肝硬変等で異常患部の切除手術後に発生する肝障害の阻止を目指して、抗血栓性因子の遺伝子をラットの肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価することを目的として実施した。

まず、hTMcDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームの *in vitro* でのラットの単離肝類洞内皮細胞への導入実験においては、hTM 遺伝子の導入は認められるものの、TM 活性の増加は basal level の 2 倍程度であった。このことより導入遺伝子の発現には導入後一定の時間を必要とする可能性が示唆された。次に、ラット門脈へ hTMcDNA 含有膜融合リポソームを投与し、経時的にラット類洞内皮細胞における hTM の発現を検討した。投与されたリポソームが門脈内で血球と瞬時に融合したり、血液中の蛋白質により破壊されるのを避けるため、遺伝子封入リポソームを投与する直前に、門脈血流を一時的に遮断し、門脈内を生理食塩水で洗浄して血液や蛋白質類を除去した後にリポソーム溶液を投与することにした。その結果、hTM 発現量は投与後 5 日目に発現ピークが認められた。このことは hTM 遺伝子の発現には、遺伝子導入後約 5 日間の時間経過が必要であることを示し、*in vitro* 実験で 24 時間では顕著な hTM 活性の発現の増加が認められなかった点と一致した。

また、感染症時の肝類洞内皮の抗血栓性の低下機序に関して、内皮細胞の産生する抗血栓性因子の一つである PS の発現動態の検討を行った。その結果、感染症モデルラットでは肝細胞での発現低下はみられなかったものの、類洞内皮細胞での PS の発現量が著しく低下することが明らかになった。この PS の産生低下は感染症時の類洞内皮の抗血栓性の低下による微小血栓形成に直接的に影響を及ぼすものと考えられた。

今後は引き続き、既に準備を完了している hTFPI 遺伝子発現ベクター、rTM 遺伝子発現ベクタ

一、rPS 遺伝子発現ベクターを用いた実験を行うとともに、LPS 投与敗血症モデルラットや肝部分切除ラット等に対する抗血栓性因子遺伝子の導入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。また、標的組織や標的細胞内での遺伝子導入効率と遺伝子発現効率をさらに高めるため、現時点で最強のベクターといわれるアデノウイルスベクターを用いた hTM、rTM、hTFPI および rPS 遺伝子の導入を検討すると共に、LPS 投与敗血症モデルラットや肝部分切除ラット等に対する抗血栓性因子遺伝子の導入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。現在、その研究の実施に必要な諸手続きを進めている。

D. 3 導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤に関する研究

非ウイルスベクターの開発にあたっては、デリバリーシステムを最終的には完全に合成化合物に置き換えることが可能かどうかということに常に意識しているが、本年度開発した Tat-Phage は、新しいポリマーミセル型遺伝子導入ベクターのモデルとなる可能性を秘めている。ファージを使った遺伝子導入系の特徴は、ポリマーミセルと類似した形態を持ち、かつ決まった数(今回の場合は 440 コピー)のペプチド性シグナルを表面に持つ構造を容易に作る点であり、ペプチドを合成してミセルを作るのに比べるとさまざまなシグナルを持つ粒子を容易に得ることができる。Tat-peptide は今後、遺伝子導入用合成ベクターの素材として検討を進める予定である。

D. 4 ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究

人工染色体の開発は、遺伝子治療のみならず今後のバイオテクノロジーに大きな役割を果たすであろう重要なテーマであるが、研究を進めるためには染色体安定化機構の解明が最優先の課題であった。染色体末端のテロメアが染色体本体の安定性に重要な役割を果たしていることはすでに 60 年近く前に判っていたが、具体的にテロメアがどのような構造を持ち、どんな機能を持っているのかが明らかになり始めたのはこの 10 年くらいのことである。本研究では、染色体末端にあるテロメア配列 (TTAGGG)_n に結合する TRF1 というタンパク質が染色体の安定性を決めている因子の本体であることを明らかにし、テロメア配列を組み込んだ DNA を TRF1 を介して核内で安定化させることが人工染色体の開発に必須であるという結論を得た。さらに本研究から、染色体の安定性がそのまま細胞の老化と不死化に直結する問題であることも同時に判明し、外来遺伝子を使って TRF1 を過剰に発現させることにより、単に導入遺伝子の安定化を実現することができるだけでなく、遺伝子導入した細胞の寿命を選択的に延ばすことにより遺伝子治療の効果を増強できる可能性があり、今後の展開に大いに期待が持てると考えている。

一方、エピソーマルベクターの開発では、ヒト染色体の複製起点を含むと思われる 7K 及び 14K のヒト DNA 配列をクローニングし、この配列を EBV 由来の遺伝子発現ベクターに、EBV の複製配列に換えてこれらのヒト DNA 断片を載せたベクターを構築し、遺伝子発現を検討したところ、プラスミドの複製を反映して、ある程度持続的な遺伝子発現が得られることが示された。今後はこれらの DNA 配列の解析を行い、複製起点の構造を明らかにするとともに、複製配列のサイズの低減をはかり、ヒト型エピソーマルベクターとしてより実用的なものとする予定である。今回の検討では、一定日数以上経つと遺伝子発現が急激に低下し、永続的な遺伝子発現は得られなかったが、より持続的な遺伝子発現を達成するため、遺伝子を核に安定化させる因子をさらにプラスミドに載せることなども考えている。

D. 5 細胞質内での遺伝子発現系の確立に関する研究

D.5.1 T7 遺伝子発現系

T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系は、Moss らにより哺乳類における新しい遺伝子発現系として最近考案された。この T7 発現系は、細胞質内での遺伝子発現を可能にするため、非ウイルスベクターによる遺伝子導入の際に問題となる遺伝子核移行性の低さを克服する方法として注目されたが、本系を遺伝子治療に適用する試みはほとんどないのが現状である。そこで本研究では T7 発現系を遺伝子治療に適用するための最適化を行い *in vivo* における効率のよい遺伝子発現系の確立を行った。今年度は *in vivo* での有用性を評価した。まず pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の量的バランスとして、モル比 1:3 で混合した遺伝子を細胞内に導入したとき遺伝子発現効率が最大となることが明らかとなった。したがって、*in vivo* に遺伝子導入を行うなど、投与可能な遺伝子量がおのずと制限される場合には、最適混合比の遺伝子を投与することで T7 発現系の遺伝子発現能力を最大限に発揮させることが示唆された。次に、この最適混合比の遺伝子をマウス脳内に投与し、その遺伝子発現について検討した結果、レポーター遺伝子として一般的に用いられている pRSVL を投与した場合はほとんど遺伝子発現が認められなかったのに対し、T7 発現系を投与した場合は効率のよい遺伝子発現が認められた。この結果は、T7 発現系が *in vivo* の非増殖性細胞における効率のよい遺伝子発現系に成り得ることを示すと同時に、非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入の最大の欠点であった核移行の問題を、全く違った視点から解決し得ることを強く示唆するものであり、今後のより詳細な検討が興味のもたれるところである。

D.5.2 RNA レプリコンの開発

RNA を鋳型に RNA を自律複製しつつ遺伝情報を発現することを目指した RNA レプリコンの開発はまだ