

遺伝子治療用DNA製剤の開発と 癌治療への応用

(H10-ゲノム-034)

平成11年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
研究成果報告書

平成12年3月

主任研究者 吉田 純
(名古屋大学医学部教授)

は し が き

本冊子は、平成11年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）「遺伝子治療用DNA製剤の開発と癌治療への応用」の報告書としてまとめたものである。

研 究 組 織

主任研究者： 吉田 純（名古屋大学医学部教授）

分担研究者： 萩原正敏（東京医科歯科大学教授）

分担研究者： 高橋利忠（愛知がんセンター研究所副所長）

分担研究者： 妹尾久雄（名古屋大学環境医学研究所教授）

分担研究者： 小林 猛（名古屋大学大学院工学研究科教授）

分担研究者： 寺川 進（浜松医科大学光量子医学研究センター教授）

分担研究者： 舛本 寛（名古屋大学大学院理学研究科講師）

研 究 経 費

平成11年度 30,000 千円

計 30,000 千円

総括研究報告書

遺伝子治療用DNA製剤の開発と癌治療への応用 主任研究者 吉田 純 名古屋大学医学部脳神経外科・教授

研究要旨

本研究事業は以下に示す3つの課題を中心に研究を進め、癌治療の分野で遺伝子治療の実現を目指すことを目的とした。

課題1：安全で効率の良いベクター（DNA製剤）の開発とその導入・発現機構の解明

①人工染色体(MAC)を用いた遺伝子治療：ヒト培養細胞でMACの安定保持に必要な配列の解明し、MAC内に任意の遺伝子を組み込みヒト細胞を形質転換する技術を開発した。

②発現調節可能なベクターの開発：遺伝子発現調節能を有するGADDプロモータと温熱療法との併用療法の有効性を検討し、遺伝子発現調節が可能であること、さらに抗腫瘍効果の検討では相加または相乗効果を認めた。

③遺伝子発現機構の解明：(1)蛋白メチル化反応はインターフェロンの細胞内伝達経路で重要な意義をもつことが確認された。(2)インターフェロン遺伝子が誘導するアポトーシスではcaspaseの活性化までの時間が遅いこと、また活性化の程度もきわめて低いことがわかった。このことからインターフェロン遺伝子が誘導するアポトーシスではcaspaseの活性化以外の経路の存在が示唆された。(3)NF- κ Bの研究は昨年樹立したドミナントネガティブNF- κ Bを発現する細胞株を用いてサイトカイン抵抗性のメカニズムを検討した。その結果、NF- κ Bのsubunitの結合パターンの違いによりサイトカインに対する抵抗性が変化することを見い出した。

④リポソーム製剤の保存：凍結乾燥化により長期保存が可能となったりリポソーム製剤の薬効薬理はこれまでの液剤のリポソーム製剤と全く同等であることがわかった。

課題2：ベクターを標的組織あるいは標的細胞に選択的かつ効率よく輸送するシステム（DDS）の開発

癌特異的単鎖抗体の作成：作成された変異EGFRに対するscFvの反応性や安定性は元の抗体とほぼ同様であることが観察された。

課題3：これらの研究に基づいた遺伝子治療の臨床研究の実現を目指す

遺伝子治療製剤調製室で調製された製剤を用いた臨床研究実施計画が平成12年1月厚生省及び文部省で承認され、平成12年4月3日実施した。

主任研究者：

吉田 純 名古屋大学医学部教授

分担研究者：

萩原正敏 東京医科歯科大学教授

高橋利忠 愛知がんセンター研究所副所長

妹尾久雄 名古屋大学環境医学研究所教授

小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科教授

寺川 進 浜松医科大学光子医学研究センター教授

舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科講師

A. 研究目的

本研究事業は以下に示す3つの課題を中心に研究を進め、癌治療の分野で遺伝子治療の実現を目指すことを目的とした。

課題1：安全で効率の良いベクター（DNA製剤）の開発と、その導入・発現機構の解明

①人工染色体(MAC)を用いた遺伝子治療：ヒト培養細胞でMACの安定保持に必要な配列の解明を行った後、MAC内に任意の遺伝子を組み込みヒト細胞を形質転換する技術を開発する。

②発現調節可能なベクターの開発：gaddプロモ

ータと温熱療法との相加または相乗効果の有無を検討する。

③遺伝子発現機構の解明：(1)インターフェロンの細胞内伝達経路で重要な意義をもつと考えられている蛋白メチル化反応について検討を加える。(2)インターフェロン遺伝子がアポトーシスを誘導するメカニズムについて詳細に検討する。(3)NF- κ Bの研究は昨年樹立したドミナントネガティブNF- κ Bを発現する細胞株を用いてサイトカイン抵抗性のメカニズムを検討する。

④リボソーム製剤の保存：昨年度はリボソーム製剤の乾燥保存方法を確立した。本年度はこの凍結乾燥製剤の薬効薬理を検討する。

課題2：ベクターを標的組織あるいは標的細胞に選択的かつ効率よく輸送するシステム(DDS)の開発

癌特異的単鎖抗体の作成：昨年作成した変異EGFRに対するscFvの反応性や安定性を、元の抗体と比較する。更にこの抗体のイムノリボソームへの応用についても検討する。

課題3：これらの研究に基づいた遺伝子治療の臨床研究の実現を目指す

本年度は遺伝子治療製剤調製室で調製された製剤を用いた臨床研究のスタートをめざす。

B. 研究方法

課題1：安全で効率の良いベクター(DNA製剤)の開発と、その導入・発現機構の解明

①人工染色体を用いた遺伝子治療の開発(舛本・吉田)：(1)ヒト培養細胞中で人工染色体を効率よく形成する α 21-IアルフォイドDNA、ヒトテロメア配列、選択マーカーを組みこんだ酵母人工染色体(YAC)へ、さらにウイルス由来複製開始点を組み込みヒト培養細胞へ導入し、人工染色体がより効率よく形成され、安定に維持されるかどうか調べた。(2)MACをベクターとして利用するためMAC前駆体YACへ酵母や細胞内での組換えを利用してマーカーとなる遺伝子を導入し、薬剤選択のない条件でも導入遺伝子からの発現が起こるかどうか解析した。

②発現調節可能なベクターの開発(吉田・妹尾・小林)：GADDプロモータと温熱療法との相乗効果について検討した。

③遺伝子発現機構の解明：(1)インターフェロンの細胞内伝達経路で重要な意義をもつと考えられている蛋白メチル化反応について検討を加えた。(2)イン

ターフェロン遺伝子がアポトーシスを誘導するメカニズムについてcaspase活性を測定し、典型的なアポトーシスと考えられているTNF- α で誘導されるマウスL細胞でのアポトーシスと比較した。(3)NF- κ Bの研究は昨年樹立したドミナントネガティブNF- κ Bを発現する細胞株を用いてサイトカイン抵抗性のメカニズムを検討した。

④リボソーム製剤の保存：昨年度調製された凍結乾燥製剤の薬効・薬理を培養細胞及び担癌マウス(メラノーマモデル)を用いて検討した。

課題2：ベクターを標的組織あるいは標的細胞に選択的かつ効率よく輸送するシステム(DDS)の開発

癌特異的単鎖抗体の作成と応用(高橋・吉田)：inclusion bodyよりrefoldして得られたscFvについて元のモノクローナル抗体と反応特異性、アフィニティー等を比較検討した。

課題3：これらの研究に基づいた遺伝子治療の臨床研究の実現を目指す

悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療臨床研究を開始する。(吉田)

C. 研究結果と考察

課題1：安全で効率の良いベクター(DNA製剤)の開発と、その導入・発現機構の解明

①人工染色体を用いた遺伝子治療の開発(舛本・吉田)：(1)YACにクローン化したヒト染色体セントロメアに由来するアルフォイドDNA(α 21-I)の欠失シリーズ(80、50、30、10kb)をそれぞれヒト培養細胞に導入したところ、50kb以上の α 21-I配列を含むクローンでは効率よく人工染色体を形成し、30kbのクローンでは効率の低下が観察され、10kbのクローンで人工染色体が殆ど形成されなかった。効率のよい人工染色体形成には50kb以上の連続した α 21-I配列が必要であることが判明した。

(2)MAC前駆体YACへ酵母細胞内での相同組換えを利用して、レポーター遺伝子やウイルス複製開始点(oriP)を挿入することに成功し、人工染色体上へ外来遺伝子を簡単に挿入できる可能性が開けた。

②発現調節可能なベクターの開発(吉田・妹尾・小林)：gadd153プロモーターが温熱により誘導されるか実験を行った。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を使った実験において、温熱処理が遺伝子発現を数十倍に高めることを見出した。そこで、同プロモーター下流にTNF- α 遺伝子を組み込み、ヒト

グリオーマ細胞株 U251-SPにカチオニックリポソーム法で遺伝子導入して誘導実験を行った。その結果、温熱を加えない場合、同遺伝子はまったく殺細胞効果を示さなかったのに対し、43℃1時間の加温処理、あるいは45℃1時間の加温処理を行った場合、TNF- α の発現誘導が認められ、その発現量は温熱を加えない場合より有意に高くなった。

③遺伝子発現機構の解明(萩原・吉田)：

(1)two-hybrid法の結果、HMT1破壊株において特異的にNPL3とのinteractionが変化する蛋白をコードする遺伝子が数種類スクリーニングされた。我々はこの中でHMT1破壊株特異的に生育が遅延するものに注目し、その遺伝子をクローニングしAIR1と名付け全塩基配列を決定した。その結果この蛋白はring fingerドメインと呼ばれる蛋白質間相互作用に必要な領域を持っていることが明らかとなった。Data base検索によりyeastにはAIR1と相同性の高い遺伝子がもう一つ存在することが判明し、あわせてクローニングしAIR2と名付けた。AIR1、2それぞれの単独破壊株では生育に変化が見られなかったが、二重破壊株では生育が遅延した。これはAIR1、2がお互いの機能を相補しているためと考えられる。二重破壊株において生育が遅延が見られたことから、AIR1、2が細胞の増殖に関与する可能性があることが示唆された。(2)インターフェロン遺伝子で誘導されるヒトグリオーマ細胞のアポトーシスではTNF- α で誘導されるマウスL細胞のアポトーシスと比較し、アポトーシスの誘導される時間が極めて遅いこと、caspaseの多くが活性化されない点で違いが見られた。またannexin VとPIとの二重染色では細胞死の後半でアポトーシスともネクローシスとも判断しがたい、中間型が存在することがわかった。(3)サイトカインのうちTNF- α の抵抗性についてヒトグリオーマ細胞株を用いて検討した。WST法では、SK-MG-1以外のグリオーマ細胞株は全てTNF- α 抵抗性であることが示された。TNF- α 抵抗性株ではTNF- α 添加により活性化型NF- κ Bであるp50-p65ヘテロダイマーが誘導されるのに対し、感受性株ではp50ホモダイマーがTNF- α の有無に関わらず認められた。この結果と呼応して、TNF- α によるレポーター遺伝子の発現は、抵抗性株にのみ認められ、SK-MG-1では認められなかった。またヒトグリオーマ細胞株U251MGにドミナントネガティブp65遺伝子を導入したU-251MG-pINDは、その親株であるU-251MGと同様TNF- α に抵抗性を示したが、エクダイソンを添加しp65の発現を誘導すると、TNF- α に感受性

を示すようになった。TNF- α により活性化されるNF- κ Bをp65DNより抑制した際の細胞増殖の抑制は、アポトーシスの誘導ではなく、細胞周期をG0/G1で停止させることによることも明らかにされた。

④リポソーム製剤の保存：凍結乾燥製剤の調製に成功した。またこの凍結乾燥製剤は従来用いていた液剤との同等性がメラノーマ細胞を移植した担癌マウスのモデルで確認された。この技術はリポソーム製剤の汎用性を高める重要な技術と考えられた。

課題2：ベクターを標的組織あるいは標的細胞に選択的かつ効率よく輸送するシステム(DDS)の開発

癌特異的単鎖抗体の作成と応用(高橋・吉田)：昨年までの研究で、変異EGFRに特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマ細胞より得られたRNAを用い、RT-PCR法により、H鎖、L鎖それぞれの超過変領域を含む抗原結合部をコードする遺伝子の単離を行った。抗体分子は(His)6Tag・L鎖・リンカー(15アミノ酸)・H鎖の順に配置し、発現させた。産生された蛋白をSDS-PAGE、並びに(His)6Tagを標的としたWestern blotting法により抗体分子の確認を行い、その結果アミノ酸配列より予想される分子量約29kDaに一致した抗体のbandを確認した。

また、単鎖抗体は可溶性蛋白としては認められず、不溶性のinclusion bodyとして産生されていた。そこでinclusion bodyから可溶性の抗体の精製を試みてきたが、超音波処理では可溶化される抗体は僅かであり、また尿素による可溶化抗体の透析中の不溶化が起きるため十分な活性の検討が出来なかった。本年度はその点を改良し、尿素処理後に単鎖抗体の(His)6Tagを利用して精製を行い、更にrapid dilution法によるrefoldingを行うことにより、検査に使用できる抗体の精製が可能となった。得られた抗体により、ELISA法、MHA法、免疫染色により単鎖抗体の反応性を元抗体と比較したところ、ほぼ同様の反応特異性が観察された。

課題3：これらの研究に基づいた遺伝子治療の臨床研究の実現を目指す(吉田)

悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療臨床研究を開始するため、昨年4月に臨床研究プロトコルを文部省及び厚生省に申請し、平成12年1月に両省庁から実施計画の承認を得た。これを受けて遺伝子治療臨床研究の本格実施に向け、学内施設及び体制作りを

開始し、平成12年4月3日実施した。

D. 結論

以上のことから本研究事業で開発された遺伝子治療用DNA製剤（プラスミド包埋リポソーム製剤）は臨床研究に十分耐えうるものと考えられた。また凍結乾燥製剤はリポソーム製剤の汎用性を高める技術と考えられた。またリコンビナントsFv抗体や発現調節機構を組み込んだプラスミドあるいは人工染色体を利用することで汎用性が高まることが証明された。平成12年4月3日、悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療臨床研究をスタートした。

E. 研究発表

論文発表

1. Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y and Yoshida J. Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon- β gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Therapy* 6:1626-1633, 1999
2. Bouhon IA, Shinkai M, Honda H, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Synergism between mild hyperthermia and interferon- β gene expression. *Cancer Letters* 139:153-158, 1999
3. Otsuka G, Nagaya T, Saito K, Mizuno M, Yoshida J, and Seo H. Inhibition of NF- κ B activation confers sensitivity to TNF α by impairment of cell-cycle progression in human glioma cells. *Cancer Res.* 59:4446-4452, 1999
4. Taniguchi K, Wakabayashi T, Yoshida T, Mizuno M, Yoshikawa K, Kikuchi A, Nakashima N, Yoshida J. Immunohistochemical staining of DNA topoisomerase II α in human gliomas. *J Neurosurg* 91:477-482, 1999
5. Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, and Yoshida J. Transduction Efficiency of Adenoviral Vectors Into Human Glioma Cells Increased By Association With Cationic Liposomes. *Neurol Med Chir*, in press
6. Kasuya K, Mizuno M, Nishiyama K, Yoshida J. Combined therapy of adeno-associated virus vector and mutant herpes simplex virus vector (Icp6d) for gastric cancer. *J*

Surgical Oncology, in press

7. Hao Yu-Jun, 夏目敦至, 水野正明, 谷口克己, 若林俊彦, 吉田 純 培養ヒトグリオーマ細胞におけるII型DNAトポイソメラーゼ α 発現量とエトポシド(VP16)感受性に関する検討
Correlation between DNA Topoisomerase II α Expression and Sensitivity to Etoposide in Human Glioma Cell Lines. *癌と化学療法*, in press
8. Fukui T, Hayashi Y, Kagami H, Yamamoto N, Fukuhara H, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma cell lines with adeno-associated virus vector. *Oral Oncology*, in press

学会発表

1. Mizuno M, Nakahara N, and Yoshida J. Gene therapy of brain tumors by means of adeno-associated virus vectors containing human interferon- β gene. ASGT WashingtonDC. Jun 9-12, 1999
2. Yoshida J, Mizuno M, Natsume A, Nakahara N, Ryuke Y. Antitumor mechanisms of our original interferon- β gene therapy for malignant glioma and melanoma by means of cationic liposomes. ASGT WashingtonDC. Jun 9-12, 1999
3. Nakahara N, Mizuno M, Natsume A, Ryuke Y, Okamoto K, Yoshida J. Apoptosis of human glioma cells induced by interferon- β gene transfection: Video-enhanced microscopic visualization in living cells. ASGT WashingtonDC. Jun 9-12, 1999
4. Mizuno M. Gene therapy for malignant brain tumor. BACT研究会シンポジウム 名古屋 平成11年9月4日
5. Mizuno M, Nakahara N, and Yoshida J. Gene therapy of brain tumors by means of adeno-associated virus vectors containing human interferon- β gene. JSGT 東京 平成11年6月18-20日
6. Yoshida J, Mizuno M, Natsume A, Nakahara N, Ryuke Y. Antitumor mechanisms of our original interferon- β gene therapy for malignant glioma and melanoma by means

- of cationic liposomes. JSGT 東京
平成11年6月18-20日
7. 岡本健太、水野正明、中原紀元、夏目敦至、吉田 純 グリオーマ細胞におけるIFN- β 遺伝子誘導アポトーシスのシグナル伝達について 日本癌学会 広島
平成11年9月29日-10月1日
 8. 水野正明、夏目敦至、中原紀元、若林俊彦、吉田 純 ヒト β 型インターフェロン遺伝子包埋リポソームを用いた悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究を目指して 日本癌学会 広島 平成11年9月29日-10月1日
 9. 夏目敦至、津川隆彦、水野正明、辻村邦夫、高橋利忠、吉田 純 カチオニックリポソーム包埋 β 型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマに対するCTLの誘導 日本癌学会 広島
平成11年9月29日-10月1日
 10. 水野正明、夏目敦至、立家康至、中原紀元、岡本健太、吉田 純 悪性グリオーマに対する遺伝子治療臨床研究をめざして 日本脳神経外科学会総会 東京 平成11年10月27-29日
 11. 吉田 純、水野正明、池田浩司、若林俊彦、池中 裕 分子生物学の進歩と脳神経外科学の将来 日本脳神経外科学会総会 東京 平成11年10月27-29日
 12. 岡本健太、水野正明、中原紀元、夏目敦至、立家康至、吉田 純 グリオーマ細胞におけるIFN- β 遺伝子誘導アポトーシスでのcaspaseの役割 日本脳神経外科学会総会 東京
平成11年10月27-29日
 13. 夏目敦至、津川隆彦、水野正明、辻村邦夫、高橋利忠、吉田 純 カチオニックリポソーム包埋 β 型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマに対するCTLの誘導 日本脳神経外科学会総会 東京
平成11年10月27-29日
 14. 高木輝秀、高安正和、水野正明、吉本真之、三井勇喜、鈴木義男、吉田 純 マウス実験的脊髄損傷におけるCaspaseの活性化 日本脳神経外科学会総会 東京 平成11年10月27-29日
 15. 水野正明、夏目敦至、立家康至、中原紀元、岡本健太、吉田 純 悪性グリオーマに対するインターフェロン遺伝子治療の開発 日本IFNサイトカイン学会 三島 平成11年7月23-24日
 16. 水野正明、夏目敦至、岡本健太、立家康至、津川隆彦、吉田 純 ヒト β 型インターフェロン遺伝子を用いた悪性グリオーマに対する遺伝子治療 日本脳腫瘍カンファレンス 越後湯沢
平成11年11月14-16日

分担研究報告書

遺伝子の発現調節機構の解明に関する研究

レトロウイルスベクターによるHMT1の導入

分担研究者 萩原正敏 東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授

研究要旨

インターフェロンの細胞内シグナル伝達経路において、蛋白リン酸化反応が重要な役割を果たすことが示されている。本年度は蛋白メチル化反応がインターフェロンの細胞内伝達経路において機能的に重要な意義を持つかどうかを検討するため、yeastアルギニンメチル化酵素HMT1の機能を解析し、真核細胞内における蛋白メチル化反応を調べた。その結果、蛋白メチル化反応はインターフェロンの細胞内伝達経路で重要な意義をもつことが確認された。

A. 研究目的

Type I interferon (IFN- α and - β subtypes) は細胞増殖抑制、ウイルス増殖抑制、免疫細胞の分化制御などの作用を持つことが知られている。さらにIFNの細胞内シグナル伝達経路において、蛋白リン酸化反応が重要な役割を果たすことが示されている。1997年、AbramovichらによってIFN受容体の細胞内ドメインにアルギニンメチル化酵素IR1B4/PRMT1が結合し、IFNの作用を修飾することが示された。このことより蛋白メチル化反応がIFN細胞内伝達経路において機能的に重要な意義を持つことが示唆された。本研究の目的はyeastアルギニンメチル化酵素HMT1の機能を解析し、真核細胞内における蛋白メチル化反応の機能を解明することである。

B. 研究方法

相同組み替えによりアルギニンメチル化酵素であるHMT1遺伝子を破壊した酵母株を使用し、two-hybrid法による遺伝子スクリーニングを行った。1996年SiebelらによってRNA結合蛋白の一つであるNPL3がメチル化酵素の基質となることが示されている。NPL3は RGGドメインと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を削ったdeletion mutantではメチル化されず、RGGドメインのアルギニンがメチル化されることが示されている。今回我々はこのNPL3 RGGドメインをtwo-hybrid法のbaitに用いた。NPL3 RGG domainとGAL4-transactivation

domainのfusion蛋白をコードする遺伝子とGAL4 binding siteをpromoter領域に持つHIS3遺伝子を野生株、HMT1破壊株にそれぞれ導入し、HIS(-)培地でyeastを培養する。野生株とHMT1破壊株とで生育結果を比較することによりHMT1破壊株特異的にNPL3との蛋白間相互作用に変化が起こる新規蛋白をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。このスクリーニングにより得られた新規蛋白の機能を解析することにより蛋白メチル化反応の細胞内での機能を解析した。

C. 研究結果と考察

two-hybrid法の結果、HMT1破壊株において特異的にNPL3とのinteractionが変化する蛋白をコードする遺伝子が数種類スクリーニングされた。我々はこの中でHMT1破壊株特異的に生育が遅延するものに注目し、その遺伝子をクローニングしAIR1と名付け全塩基配列を決定した。その結果この蛋白はring fingerドメインと呼ばれる蛋白質間相互作用に必要な領域を持っていることが明らかとなった。Data base検索によりyeastにはAIR1と相同性の高い遺伝子がもう一つ存在することが判明し、あわせてクローニングしAIR2と名付けた。AIR1、2それぞれの単独破壊株では生育に変化が見られなかったが、二重破壊株では生育が遅延した。これはAIR1、2がお互いの機能を相補しているためと考えられる。二重破壊株において生育が遅延が見られたことから、AIR1、2が細胞の増殖に関与する可能性があること

が示唆された。

D. 評価

1) 達成度についてHMT1破壊株において特異的にNPL3とのinteractionに変化を起こす新規蛋白の遺伝子をクローニングすることができた。この遺伝子とその相同遺伝子の二重破壊株は野生株と比較して生育が遅延するという表現型を示しておりこの新規蛋白が細胞の増殖に関与する可能性があることを示唆している。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義についてAIR1、2間で保存されているring finger domainは蛋白質間相互作用に関与する領域であると考えられておりよく保存された領域であるが、その機能の詳細は未だ不明である。ring finger domainが保存されている遺伝子には乳癌に関与するBRCA1や白血病に関与するPML等が含まれており現在多くの研究者の注目を集めている。今回スクリーニングされたAIR1、2の機能を解析することにより、ring finger domain機能について新たな知見が得られるものと期待される。

3) 今後の展望について今回のスクリーニングにより得られた遺伝子の中で、解析が進められているものは一部であり、他の蛋白の機能解析も順次行っていく予定である。

E. 結論

細胞内シグナル伝達経路において、蛋白リン酸化反応のみならず、蛋白メチル化反応も重要な役割を果たす可能性があることが示唆されているが、今回我々は出芽酵母アルギニンメチル化酵素HMT1破壊株を用いたtwo-hybrid法によるスクリーニングにより、HMT1破壊株で特異的に蛋白間相互作用に変化を起こす蛋白をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。また、その遺伝子のコードする蛋白は細胞増殖に関与する可能性があることを示した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 15件

平成10年

萩原正敏：転写因子による神経分化の制御。第71回日本薬理学会年会 3月23日-26日

萩原正敏：転写、リン酸化によって統御される遺伝子発現ネットワーク。

文部省重点班 公開シンポジウム「蛋白質の高次構

造遺伝子情報の伝達経路」 6月3日

萩原正敏：Reverse Tet systemを組み込んだレトロウイルスベクターによるGFP遺伝子発現の制御。

第8回日本サイトメトリー学会総会 6月26日-27日

萩原正敏：スプライシング因子SF2/ASFに結合する蛋白質リン酸化酵素の解析。7月8日-10日

萩原正敏：転写、mRNA factory：プロセッシングを担う核内分子間ネットワーク。第71回日本生化学会 10月13日-17日

平成11年

萩原正敏：99年度、(転写重点 冬のワークショップ) 2月24日-26日

萩原正敏：「リン酸化感受性蛋白質によるin situ解析」(第28回日本心脈管作動物質学会) 三重大学 2月12日

萩原正敏：「mRNAファクトリーのリン酸化のモニタリングと制御」(大阪バイオサイエンス研究所)

大阪バイオサイエンス研究所 3月19日

萩原正敏：「新しいリン酸化感受性蛋白質によるCREBのin situ解析」(第72回日本薬理学会年会)

北海道厚生年金会館 3月24日

萩原正敏：「hnRNPはRGG domainを介して複合体を形成し、その強度はメチル化によって制御される」(第32回酵母遺伝子フォーラム) 岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所 7月27日-29日

萩原正敏：「鳥歌学習時に歌制御中枢で歌刺激によってCREBのリン酸化が起きる」(第22回日本神経化学大会) アジア太平洋トレードセンター 大阪 7月6日-8日

萩原正敏：「mRNA factoryのリン酸化制御」(第17回内分泌代謝サマーセミナー) 富士教育研修所 7月14日

萩原正敏：「Np13pと未知蛋白YIL079cとの結合はRGGのメチル化によって制御される」(第1回RNAミーティング) 京大会館 8月3日-5日

萩原正敏：「mRNAプロセッシングにおけるRNAポリメラーゼ2の新機能」(転写調節機構H11年度コンフェレンス) 京都 平安会館 9月16日-18日

萩原正敏：「mRNA factoryの制御ポイント」(第3回生体情報機構の探索分子の開発研究会)

愛知県産業貿易館 10月4日

2) 海外

口頭発表 4件

原著論文による発表 17件

論文発表

1. Sakaguchi H., Wada K., Maekawa M., Watsuji T., and Hagiwara, M. (1999) Song-Induced Phosphorylation of cAMP Response Element Binding Protein in the Songbird Brain. *J. Neuroscience*. 19, 3973-81
2. Koizumi J., Okamoto Y., Onogi H., Mayeda A., and Krainer A. and Hagiwara, M. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by the direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.* 274, 11125-11131
3. Okamoto, Y., Onogi, H., Honda, R., Yasuda, H., Wakabayashi, T., Nimura, Y., & Hagiwara, M. (1998) cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor. SF2/ASF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 249, 872-878.
4. Yoshida, K., Imaki, J., Okamoto, Y., Iwakabe, H., Fujisawa, H., Matsuda, A., Nakanishi, S., Matsuda, H., and Hagiwara, M. (1998) CREB-induced transcriptional activation depends on mGluR6 in rod bipolar cells. *Mol. Brain Res.* 57, 241-247.
5. Shimomura, A., Okamoto, Y., Hirata, Y., Kobayashi, M., Kawakami, K., Kiuchi, K., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1998) Dominant Negative ATF1 Blocks Cyclic AMP-Induced Neurite Outgrowth in PC12D Cells. *J. Neurochem.* 70, 1029-1034
6. Muro, Y., Ogawa, Y., Kato, Y., and Hagiwara, M. (1998) Autoantibody to thioredoxin reductase in an ovarian cancer patient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 267-271
7. Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 357-364
8. Kamimoto, T., Nagai, Y., Onogi, H., Muro, Y., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1998) Dymple, a Novel Dynamin-like High Molecular Weight GTPase Lacking a Proline-rich Carboxyl-terminal Domain in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 273, (2), 1044-1051
9. Muro, Y., Kano, T., Sugiura, K., and Hagiwara, M. (1997) Low Frequency of Autoantibodies against Ki-67 Antigen in Japanese Patients with Systemic Autoimmune. *Journal of Autoimmunity* 10, 499-503
10. Nomoto, S., Watanabe, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Yang, L.-X., Kiuchi, K., and Hagiwara, M., Hidaka, H., Matsumoto, K. Irie, K. (1997) Functional analyses of mammalian protein kinase kinase C Isozymes in budding yeast and mammalian fibroblasts. *Genes to Cells* 2, 601-614
11. Nagai, Y., Kojima, T., Muro, Y., Hachiya, T., Nishizawa, Y., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1997) Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. *FEBS Letters*, 418, 23-26
12. Masunaga, R., Nagasaka, A., Nakai, A., Kotak, M., Sawai, Y., Oda, N., Mokuno, T., Shimazaki, K., Hayakawa, N., Kato, R., Hiran, E., Hagiwara, M., and Hidaka, H. (1997) Alteration of Platelet Aggregation in Patients With Thyroid Disorders. *Metabolism*, 46(10), 1128-1131.
13. Watsuji, T., Okamoto, Y., Emi, N., Katsuoka, Y., Hagiwara, M. (1997) Controlled gene expression with a reverse tetracycline regulated retroviral vector (RTRV) system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234(3), 769-773
14. Watanabe, Y., Takaetsu, G., Hagiwara, M., Irie, K., Matsumoto, K. (1997) Characterization of a Serum Response Factor-Like Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, Which Has Transcriptional Activity Regulated by the Mpk1 (Sit2) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 17(5), 2615-2623.
15. Sugiura, K., Muro, Y., Nagai, Y., Hagiwara, M. (1997) Expression cloning and intracellular localization of a human ZF5 homologue. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1352(1), 23-26.
16. Muro, Y., Kamimoto, T. & Hagiwara, M. (1997) Anti-Mitosis antibodies in a

Patient with chronic graft-versus-host disease after allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation, 19,951-953.

17. Kobayashi,M., Shimomura,A., Hagiwara,M. & Kawakami, K.(1997) Phosphorylation of ATF-1 enhances its DNA binding and transcription of the Na, K-ATPase α 1 subunit gene promotor. Nucleic Acid Research.,25(4), 877-882 .

8. 知的所有権の出願取得状況（予定を含む）

平成10年度特願平 248861号

発明の名称 『蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質』

分担研究報告書

一本鎖抗体ペプチドの調製

分担研究者 高橋利忠 愛知県がんセンター研究所・副所長

研究要旨

ヒトグリオブラスーマの一部の症例ではEGFR(Epidermal growth factor)遺伝子の一部欠損が認められる。この変異遺伝子により産生される遺伝子産物を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを既に樹立しており、このハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、組み換え型単鎖抗体を作製した。作製された変異EGFRに対するscFvの反応性や安定性は元の抗体とほぼ同様であることが観察された。

A. 研究目的

ヒトグリオブラストーマではEGFR遺伝子の発現上昇が認められるが、さらにその内の17%においてはEGFRの細胞外ドメインをコードする遺伝子の一部欠失が見い出されている。この欠失のため、再構成部位に一つの新しいアミノ酸、グリシンの発現が認められる。この変異EGFRは腫瘍細胞に特異的に発現しているため、腫瘍特異的な抗原性を持つ可能性があり、抗体を用いた腫瘍の血清診断、画像診断あるいはミサイル療法の標的として最適と考えられる。これまでの研究によりこの変異EGFR遺伝子産物と特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功し、また変異EGFRを発現するヌードマウス移植腫瘍を標的とした腫瘍集積性の検討でも良好な腫瘍集積性を示すことが確認されている。生体内では全抗体分子に比し、F(ab)₂、あるいはFab等小さな分子の方がより集積性が良いことが知られており、臨床応用にあたってはより小さな抗体分子の作製が望まれている。また組み換え型抗体が作製できれば、抗体のヒト型化やトキシンとの融合蛋白としての抗体の作製など様々な修飾も容易となることが予想される。

そこで本研究は、この抗体の遺伝子の分離を行い、単鎖抗体及びトキシン結合単鎖抗体を作製し、臨床応用をめざした基礎的研究を行うことを目的として実施する。

B. 研究方法

抗体の遺伝子の単離するため、先ず精製したモノクローナル抗体を気相法によりN末から部分的にアミノ酸配列の決定を行った。得られたアミノ酸配列を基にKabatのデータベースを用いて配列の共通部分と異なる部分の検索を行った。この検索結果より抗体遺伝子単離のために本抗体に特異的な配列が3'端となるようにPCR用primerを設計し、ハイブリドーマから得られたRNAを用いてRT-PCRを行い、抗体遺伝子のクローニングを試みた。得られた抗体遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込み、大腸菌での抗体産生と精製を行った。産生された抗体の反応性は、変異EGFR発現細胞を標的細胞として用いた免疫染色と、本抗体作製時に免疫原として用いた変異EGFR合成ペプチドを標的抗原としたELISA法により検討した。

C. 研究結果

昨年までの研究で、変異EGFRに特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマ細胞より得られたRNAを用い、RT-PCR法により、H鎖、L鎖それぞれの超過変領域を含む抗原結合部をコードする遺伝子の単離を行った。抗体分子は(His)₆Tag・L鎖・リンカー(15アミノ酸)・H鎖の順に配置し、発現させた。産生された蛋白をSDS-PAGE、並びに(His)₆Tagを標的としたWestern blotting法により抗体分子の確認を行い、その結果アミノ酸配列より予想される分子量約29kDaに一致した抗体のbandを確認した。

また、単鎖抗体は可溶性蛋白としては認められず、不溶性のinclusion bodyとして産生されていた。そこでinclusion bodyから可溶性の抗体の精製を試み てきたが、超音波処理では可溶化される抗体は僅か であり、また尿素による可溶化抗体の透析中の不溶 化が起きるため十分な活性の検討が出来なかった。 本年度はその点を改良し、尿素処理後に単鎖抗体の (His)6Tagを利用して精製を行い、更に rapid dilution法によるrefoldingを行うことにより、検査 に使用できる抗体の精製が可能となった。得られた 抗体により、ELISA法、MHA法、免役染色により 単鎖抗体の反応性を元抗体と比較したところ、ほぼ 同様の反応特異性が観察された。

D. 考察

ヒトグリオブラストーマに発現が認められる変異 EGFR遺伝子産物に特異的に反応するモノクロー ナル抗体の単鎖抗体の作製に成功した。可溶化抗体の 免疫染色からその特異性も保たれていることが確認 されており、正しい抗体遺伝子が単離されているこ とが確認された。また、大腸菌で産生された抗体蛋 白を含むinclusion bodyからの可溶化とrefolding の方法の検討の結果、検査に用いるに十分量の抗体 を得ることが可能となった。しかし、臨床応用を考 えると、さらに大量の抗体を得る必要があり、大腸 菌のperiplasmに可溶化抗体蛋白を発現させる方法 も検討する必要がある。抗体の作製法を改良し、あ る程度の抗体産生量が得られた時点で、遺伝子治療 に有用なイムノリポソームの作製に利用可能か検討 していきたい。

E. 結論

変異EGFR遺伝子産物に特異的に反応するモノク ローナル抗体を産生するハイブリドーマより抗体遺 伝子の単離に成功し、さらに少量ではあるが単鎖抗 体の作製に成功した。抗体の反応特異性も保たれて おり、遺伝子治療への臨床応用が予測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Nakayashiki, K. Yoshikawa, K. Nakamura, N. Hanai, S. Okamoto, M. Mizuno, T. Wakabayashi, S. Saga, J. Yoshida and T. Takahashi: Production of a single chain variable fragment antibody recognizing type III mutant epidermal growth factor receptor. Jpn. J. Cancer Res.

(論文投稿中)

2. 学会発表

- 1) 中屋敷典久、吉川和宏、中村和靖、花井陳雄、佐賀信介、吉田 純、高橋利忠: 変異EGFRを特異的に認識する単鎖抗体の作製 第58回日本癌学会総会 平成11年9月30日(広島)
- 2) K. Yoshikawa, N. Nakayashiki, K. Nakamura, N. Hanai, S. Okamoto, M. Mizuno, T. Wakabayashi, S. Saga, J. Yoshida and T. Takahashi: Production of a Single Chain Variable Fragment Antibody recognizing Type III Mutant Epidermal Growth Factor Receptor. Cancer Immunossurveillance 1999 平成11年10月5日(New York)

分担研究報告書

悪性脳腫瘍に対するサイトカイン遺伝子療法 分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所・教授

研究要旨

Tumor necrosis factor α (TNF α)は悪性脳腫瘍に対し、増殖抑制効果を示し、脳腫瘍のサイトカイン療法として用いられている。本年度はTNF α に対する抵抗性のメカニズムを解明するため、TNF α のシグナル伝達に関連するNF-kBの転写活性化能を抑制するドミナントネガティブNF-kBを発現するcDNA (p65 DN)を構築し、その発現量を昆虫ホルモンであるエクダイソンの濃度依存性に調節することができる発現ベクターに挿入し、TNF α 抵抗性株であるU251-MGに導入し、stable transformantを選択した。得られた1つのクローンにおいて、エクダイソン濃度依存性にドミナントネガティブNF-kBの発現誘導が認められ、TNF α により活性化されたNF-kBの機能を阻害した。TNF α の抗腫瘍効果をWSTアッセイ法により検討すると、エクダイソン投与によりp65 DNを誘導しNF-kBを阻害した場合にTNF α の細胞増殖抑制効果が増強された。以上より、NF-kBのsubunitの結合パターンの違いによりサイトカインに対する抵抗性が変化することが示唆された。

1. 研究目的

Tumor necrosis factor α (TNF α)は、悪性脳腫瘍に対し、増殖抑制作用があり脳腫瘍の治療に用いられてきた。しかしながら、TNF α に対する感受性は、脳腫瘍細胞により異なり、治療の障害となってきた。一方、TNF α は転写因子NF-kBを活性化し、抗アポトーシス作用を示すことが知られている。従って、本研究では、TNF α に対する抵抗性とNF-kBの活性化との関わりを検討すると共に、TNF α 抵抗性脳腫瘍細胞株の感受性株への転換を可能にする方法を樹立することを目的とした。

2. 研究方法

ヒト由来の6種のグリオーマ細胞株(U-251MG、AO2、U-251SP、nu/nu、SK-MG-1)を用い、TNF α が細胞増殖にどのような影響を及ぼすかをWST法により検討した。また、添加後経時的に核抽出物を調製し、NF-kBの活性化をElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)により検討した。NF-kBにより誘導されるルシフェラーゼ・リポーター遺伝子(3xNF-kB SV40 Luciferase)をリポフェクション法により導入し、TNF α 添加24時間

後のルシフェラーゼ活性を測定した。更に、p65 NF-kBサブユニットの転写活性化ドメインを欠失させたdominant negative p65 (p65DN)をエクダイソンにより誘導できるプラスミド(pIND)に挿入し、これをTNF α 抵抗性株、U-251MGに導入しstable cell line (U-251MG-pIND)を樹立した。U-251MGとこの樹立株並びにTNF α 感受性株SK-MG-1を用いて、TNF α によるアポトーシスの誘導の有無を検討すると共に、細胞周期への影響をフローサイトメトリーにより検討した。

3. 研究結果及び考察

WST法による検討により、SK-MG-1以外のグリオーマ細胞株は全てTNF α 抵抗性であることが示された。TNF α 抵抗性株ではTNF α 添加により活性化型NF-kBであるp50-p65ヘテロダイマーが誘導されるのに対し、感受性株ではp50ホモダイマーがTNF α の有無に関わらず認められた。この結果と呼応して、TNF α によるレポーター遺伝子の発現は、抵抗性株にのみ認められ、SK-MG-1では認められなかった。

U-251MG-pINDは、その親株と同様TNF α に抵

抗性を示したが、エクダイソンを添加しp65の発現を誘導すると、TNF α に感受性を示すようになった。TNF α により活性化されるNF-kBをp65DNより抑制した際の細胞増殖の抑制は、アポトーシスの誘導ではなく、細胞周期をG0/G1で停止させることによることも明らかにされた。

4. 評価

1) 達成度について

当初の目的を達成し、TNF α に対する抵抗性が活性型NF-kBの誘導によることを明らかにすると共に、活性型NF-kBをp65DNにより抑制することにより、TNF α に対する感受性を賦与することが可能であることを示した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまで悪性脳腫瘍によりTNF α に対する感受性の差異が報告されて来たが、本研究により腫瘍細胞においてTNF α により活性型NF-kBが誘導されることが抵抗性の原因であり、活性型NF-kBを抑制することにより抵抗性株にTNF α 感受性を賦与できることを初めて明らかにした。

3) 今後の展望について

TNF α 抵抗性脳腫瘍に対し、p65DNを導入することにより新たなサイトカイン療法の樹立が可能と考えられる。

5. 結論

悪性脳腫瘍に対する新たなサイトカイン遺伝子療法樹立の可能性を示した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	7件
原著論文による発表	4件
それ以外(レビュー等)の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

T. Sakai, K. Kurokouchi, N. Ishiguro, F. Kambe, M. Takigawa, H. Iwata, H. Seo: Activation of NF-kB TNF- α in human chondrosarcoma HCS-2/8 cells. Environmental Medicine 42(2): 118-120, 1998.

G. Ohtsuka, T. Nagaya, K. Saito, J. Yoshida, H. Seo: Establishment of a stable human glioma

cell line expressing an inducible dominant negative Form of NF-kB by Dorosophila steroid hormone (ecdysone). Environmental Medicine 42(2): 111-114, 1998.

学会発表

大塚吾郎, 長屋 敬, 水野正明, 斉藤 清, 妹尾久雄, 吉田 純: ヒトグリオーマ細胞株におけるサイトカインの抗腫瘍効果と転写因子NF-kBの発現との関連. 第56回日本脳神経外科学会総会, 1997, 10. (大阪)

大塚吾郎, 長屋 敬, 水野正明, 斉藤 清, 吉田純, 妹尾久雄: TNF α の抗腫瘍効果と転写因子NF-kBの発現との関連. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998, 6. (福岡).

2) 海外

口頭発表	4件
原著論文による発表	3件
それ以外(レビュー等)の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

G. Ohtsuka, T. Nagaya, T. Saito, K. Mizuno, J. Yoshida, H. Seo: Inhibition of nuclear factor-kB activation confers sensitivity to tumor necrosis factor- α by impairment of cell cycle progression in human glioma cells. Cancer Research, 59(17): 4446-4452, 1999.

T. Kikumori, F. Kambe, T. Nagaya, T. Imai, H. Funahashi, H. Seo: Activation of transcriptionally active nuclear factor-kappa B by tumor necrosis factor- α and its inhibition by antioxidants in rat thyroid FRTL-5 cells. Endocrinology 139(4): 1715-1722, 1998.

K. Kurokouchi, F. Kambe, K. Yasukawa, R. Izumi, N. Ishiguro, H. Iwata, H. Seo: TNF- α increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. Journal of Bone and Mineral Research 13(8): 1290-1299, 1998.

学会発表

G. Ohtsuka, T. Nagaya, K. Saito, M. Mizuno, J.

Yoshida, H. Seo: Inhibition of NF- κ B activation confers sensitivity to TNF α by impairment of cell-cycle progression in human glioma cells. The European Journal of Cancer, vol.35 (suppl.4) 363, 1999.

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
無し

分担研究報告書

電磁波で誘導可能なサイトカイン遺伝子治療法の開発

分担研究者 小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科・教授

研究要旨

遺伝子発現調節能を有するGADDプロモータと温熱療法との併用療法の有効性を検討し、遺伝子発現調節が可能であること、さらに抗腫瘍効果の検討では相加または相乗効果を認めた。

A. 研究目的

本研究では新しい遺伝子治療法である温熱遺伝子療法の遺伝子導入用担体の開発を行った。サイトカイン遺伝子及び磁性微粒子を包埋したリポソームをヒトグリオーマ細胞に導入し、電磁波照射下の磁性微粒子の発熱による遺伝子発現のコントロールに関する検討を行った。具体的には、化学薬剤や活性酸素により誘導されるプロモーターであるgadd153またはMMTVの下流にTNF- α またはIFN- β 遺伝子を組み込み、温熱処理による遺伝子の発現誘導を試みた。

B. 研究方法及び結果

まず、これらのプロモーターが温熱により誘導されるか実験を行った。これらの検討で、gadd153プロモーターの場合、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を使った実験において、温熱処理が遺伝子発現を数十倍に高めることを見出した。そこで、同プロモーター下流にTNF- α 遺伝子を組み込み、ヒトグリオーマ細胞株 U251-SPにカチオニックリポソーム法で遺伝子導入して誘導実験を行った。具体的には、癌細胞を100 mmシャーレ上で24時間増殖させ、ついでそれぞれシャーレにプラスミド-カチオニックリポソーム複合体(0.2 μ g/ml)を加え、遺伝子導入を行った。遺伝子導入開始60時間後、細胞を培養したシャーレをパラフィルムで密封した後、温浴に浸して温熱処理を行った。温熱処理は39、41、43及び45 $^{\circ}$ Cで処理時間を変えて行った。温熱処理後、経時的に細胞をサンプリングし、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定は市販のルシフェラーゼ測定キットを用いた。また、生細胞数はトリパンブルー色素排除法により行った。

温熱を加えない場合、同遺伝子はまったく殺細胞効果を示さなかったのに対し、43 $^{\circ}$ C1時間の加温処理、あるいは45 $^{\circ}$ C1時間の加温処理を行った場合、TNF- α の発現誘導が認められ、その発現量は温熱を加えない場合より有意に高くなった。また、その遺伝子発現のパターンは加温条件によって異なり、43 $^{\circ}$ C処理では加温1日目が最大4.4倍の発現が起こり、その後、徐々に低下して行ったのに対し、45 $^{\circ}$ C処理では加温4日目に発現誘導が最大240倍となった。この発現パターンはルシフェラーゼレポーター遺伝子の場合と同様であった。一方、殺細胞効果は温熱単独の場合、43 $^{\circ}$ C1時間の加温処理で加温しなかった場合、生細胞率が47.1%であったのに対して、遺伝子導入した細胞では生細胞率が有意に低下し19.3%と半数になった。同様に45 $^{\circ}$ C1時間の加温処理単独では生細胞率1%であったのに対して、遺伝子導入した場合は0.1%と10分の1となった。同癌細胞株に対する外部添加TNF- α と温熱処理との併用効果は全く観察されなかったことから、通常のTNF- α 殺細胞メカニズムとは異なるメカニズムが働いていると想像される。

C. 結論

温熱療法への温度感受性サイトカイン遺伝子発現誘導システムの有効性が示された。

分担研究報告書

ビデオ強化型微分干渉顕微鏡を用いた解析

分担研究者 寺川 進 浜松医科大学・光量子医学研究センター・教授

研究要旨

インターフェロンベータ遺伝子治療による細胞増殖抑制、細胞死の機構を細胞がviableな状態で形態変化の面から検討した。その結果、インターフェロンベータ遺伝子治療はアポトーシスを来し治療効果を呈していることが形態学的に確認できた。

1. 研究目的

インターフェロンベータ遺伝子治療による細胞増殖抑制、細胞死の機構を細胞がviableな状態で形態変化の面から検討した。

2. 研究方法

培養ヒト神経膠芽腫細胞株に抗Fas抗体、ヒト型インターフェロンベータ遺伝子包埋リポソームを投与し、細胞形態変化をビデオ強化型微分干渉顕微鏡、核酸断片化の過程を蛍光レーザー顕微鏡にて観察した。

3. 研究結果及び考察

抗Fas抗体投与においては、24時間で核の微細構造が不鮮明化し、48時間で細胞膜のプレビングが起きる。1つのプレブの形成は1秒以内の極めて短時間に起きていた。これを繰り返した後、不可逆変化を来した細胞はポップコーン様形態をとり、培養皿底面より遊離する。核酸蛍光染色を併用した観察では、24時間で核酸の断片化と思われる変化を認めた。同様の変化は遺伝子導入においても観察され、この場合遺伝子の細胞内への移動は6時間から、細胞形態の変化は36時間程度より開始し、抗Fas抗体の場合と同様の形態であった。

4. 評価

1) 達成度について

形態変化は捉えることができたが、生化学的反応との関連はまだできていない。

2) 研究結果の学術的、国際的、社会的意義について

現在までに、生細胞でのグリオーマ遺伝子治療効果観察の論文報告はない。

3) 今後の展望について

アポトーシスに関与する生化学因子を同様の方法でリアルタイムに検出する試みをしている。

5. 結論

インターフェロンベータ遺伝子治療はアポトーシスを来し治療効果をていする。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表

DNA/リポソームによるグリオーマ細胞のアポトーシス誘導過程—video Enhanced Contrast Study—
第15回 日本脳腫瘍病理学会 1997.4.4-5. (佐賀)

カチオニックリポソームを用いたインターフェロンベータ遺伝子導入によるグリオーマ細胞のアポトーシス誘導過程 第56回癌学会総会
1997.9.25-27. (京都)

2) 海外

論文発表

Ohta S, Yoshida J, Yamamoto S, Mizuno M, Wakabayashi T, Sakurai K, Terakawa S:
Video-enhanced microscopic visualization of apoptotic cell death caused by anti-Fas antibody in living human glioma cells. Brain Tumor Pathology
学会発表

Apoptotic process of human glioma cell induced
by interferon-beta gene transfection mediated
by cationic liposomes:video-enhanced
microscopy visualization in living cells. 49th
CNS annual meeting 1999.10.30.-11.4. (Boston,
USA)

分担研究報告

遺伝子治療をめざしたヒト人工染色体の開発に関する研究

舛本 寛 名古屋大学大学院理学研究科・講師

研究要旨

ヒト培養細胞で MAC の安定保持に必須な配列の解明し、MAC 内に任意の遺伝子を組み込みヒト細胞を形質転換する技術を開発した。

1. 研究目的

分担研究者は、ヒトセントロメア由来 DNA 配列と酵母人工染色体(YAC)技術を用いヒト培養細胞中で染色体外に安定保持される人工染色体(MAC)を開発した。本研究課題では、この MAC を各種ヒト細胞に導入し染色体安定維持の機構解明をめざすと共に、MAC を用いた染色体工学を発展させ遺伝子治療へ応用する基本技術の開発を目的として研究を進めた。

2. 研究方法

A. 染色体安定維持に必要な機能配列の限定: ヒト人工染色体を効率よく形成する YAC の挿入配列であるヒト染色体セントロメアに由来する DNA 配列 (アルフォイド DNA) の欠失シリーズを作成し、ヒト培養細胞へ導入し、人工染色体形成に必須な配列の限定を進めた。
B. MAC を用いた染色体工学: MAC 前駆体 YAC へ任意の遺伝子を導入する技術の開発を進めるため、酵母細胞内での相同組換えを利用して、任意の遺伝子を前駆体 YAC へ挿入する研究を行った。

3. 研究結果及び考察

A. YAC にクローン化したヒト染色体セントロメアに由来するアルフォイド DNA($\alpha 21-I$) の欠失シリーズ (80、50、30、10kb) をそれぞれヒト培養細胞に導入したところ、50kb 以上の $\alpha 21-I$ 配列を含むクローンでは効率よく人工染色体を形成し、30kb のクローンでは効率の低下が観察され、10kb のクローンで人工染色体が殆ど形成されなかった。効率のよい人工染色体形成には 50kb 以上の連続した $\alpha 21-I$ 配列が必要であることが判明した。
B. MAC 前駆体 YAC へ酵母細胞内での相同組換えを利用して、レポーター遺伝子やウイルス複製開始点 (oriP) を挿入することに成功し、人工染色体上へ外来遺伝子を簡便に挿入できる可能性が開けた。

4. 評価

1) 達成度: 人工染色体、セントロメア形成に

必要な必須配列の限定や MAC へ遺伝子を導入する技術などの基本的な目標の多くは達成できた。

2) 研究成果の意義: 効率の良いセントロメア形成に必要な最小限のアルフォイド DNA($\alpha 21-I$) のサイズや遺伝子挿入法が明らかにされたことで、より効率の良い人工染色体ベクター開発に向けて重要な情報を提供した。また不明な点が多く残されている染色体の学術研究にとっても貴重な情報である。

3) 今後の展望: このような人工染色体形成が他の培養細胞株や正常なマウス受精卵でも行えるかどうか基礎的な研究を続るとともに、導入方法や効率、挿入遺伝子からの発現などへ研究を発展させることが今後実用的な人工染色体ベクター開発に向けて必要となるであろう。

5. 結論

効率のよい人工染色体形成には 50kb 以上の連続した $\alpha 21-I$ アルフォイド配列が必要である。アルフォイド YAC へ外来遺伝子を簡便に挿入する方法を開発した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 3 件

それ以外 (レビュー等) の発表 4 件

そのうち主なもの

学会発表

舛本寛、中野めぐみ、鈴木伸卓、岡本康秀: ヒトセントロメア DNA とクロマチン構造の伝播。第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月 6 日~9 日、横浜

H. Masumoto, M. Nakano, N. Suzuki: De novo assembly, inactivation and reactivation of the centromere chromatin on human artificial chromosomes. 第 22 回日本分子生物学会年会、1999 年 12 月 7~10 日、福岡

7. 知的所有権の出願・取得状況

なし