

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

難治がん・進行がんに対する生体内標的遺伝子治療の戦略の研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 ①難治がんである膵がんの生体内遺伝子治療の開発を目指して、アデノウイルスベクターを用いてアンチセンスK-ras RNAを発現すると、高率にアポトーシスが誘導できること、アンチセンスK-ras RNA発現により、TNF関係の遺伝子など、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が上昇すること、アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターに加えて、interferon- $\alpha$ 2a発現アデノウイルスベクターを併用することにより、膵がんの細胞死誘導において顕著な相乗効果を認めることを見出し、局所進行膵がんに対して有効な局所遺伝子治療開発への可能性が示された。②腫瘍細胞に対する生体内標的を目的に、活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現しているtransferrin (Tf) 受容体 (Tf-R) に着目し、Tfにavidin biotinを介しDNAを結合させたconjugateを作製した。このconjugateはTf-Rへのbinding motifが良く保たれており、in vivoにおいて高い腫瘍特異性を有していた。K562播種性転移SCID mouseにTf-HSV-TK遺伝子複合体を投与したところ治療群で延命効果および抗腫瘍効果が得られた。また、p53を初めとした各種アポトーシス関連遺伝子の殺細胞効果を検討して、有効な殺細胞療法の基礎データを得た。p53の異常を標的とした制限増殖が可能なアデノウイルス、特定の細胞に高い遺伝子導入が可能なキャプシド変異型アデノウイルスベクターなどを作成し有用性を示した。③部位特異的組換え酵素Creによる「遺伝子置換反応」を応用した新しいアデノウイルスベクター作製法に必須であるCreを高度に発現する293細胞の樹立化を目的として、出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素FLP/FRT系について検討を行い、制御系として十分に機能する系であることを見出した。また野生型FLPを改良して「ヒト型・温度安定型FLPe」を構築し、発現を確認した。Creの発現量が最も置換効率へ影響を与えるguttettedベクター作製においては本研究で検討したFLP/FRT系によるCreの発現制御系は非常に有用なtoolとなりうる。④プラスミドベクターを生体親和材料である担体アテロコラーゲンに保持させたミニペレットの形で生体内に導入する、新しい遺伝子導入システムの開発を進め、本年度はインプラントしたミニペレットの物理的除去による発現制御を試み、生体でのベクターの安全性を高める工夫をした。

分担研究者

小菅 智男	国立がんセンター病院	部長
新津洋司郎	札幌医科大学	教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所	助教授
濱田 洋文	(財) 癌研究会癌研究所	部長
落谷 孝広	国立がんセンター研究所	室長

なってきたことから、新しい原理に基づく治療法の開発が焦眉の課題となっている。また、社会の急速な高齢化に伴い、優れたがん細胞殺傷・抑制効果と並んで、患者にとってより侵襲の少ない、高いQOLを実現する治療法が必要とされている。このような厚生科学及び厚生行政上の重要課題に対して、本研究ではがん細胞に高い標的性を持つ治療法を確立することを目指す。遺伝子治療の戦略にはがん細胞やベクターの特質に基づく様々な標的機構を組み込める可能性があり、その研究の必要性は高い。

今までに臨床研究が進められてきたがん遺伝子治療法は免疫賦活療法と自殺遺伝子治療、p53遺伝子発現ベクターの局注がほとんどを占めるが、いずれも有効性が確立された標準的治療とはなっていない。特に固形がん、特に消化器系固形がんでは体内に播種したものを標的とする治療法の研究は今後の重要課題

A. 研究の目的

難治がん及び進行期がんの治療成績は早期診断技術や術後ケアの進歩と普及により少しずつ改善しているが、治療法そのものに関しては従来の外科・化学・免疫・ホルモン・放射線療法の限界が明らかに



となっている。加えて、播種したがん細胞を狙って生体内で遺伝子導入を行う場合には、必要に応じて遺伝子導入を効率よく停止する安全機構も不可欠である。これらの要求に応え、本研究では複数の方法を検討し、かつそれらを適宜組み合わせ、難治・進行固形がんに対して標的性、有効性、安全性の3点で優れた画期的な治療法を確立することを目的とした基礎的研究を行う。

本年度の具体的な研究目的は以下の通り。①膵がんの遺伝子異常を標的とするin vivo遺伝子治療法の開発。膵がん細胞に対してアンチセンスK-ras RNA発現ユニットのpolyfection、またはアデノウイルス感染による遺伝子導入がin vitro、in vivoで腫瘍増殖抑制に効果的であることを示してきた。DNAチップを用いて、アンチセンスK-ras発現アデノウイルスベクター感染により発現の変化する遺伝子を同定し、より特異的な膵がんの遺伝子治療の開発に役立つ情報を獲得する。また、腹腔鏡もしくはエコーやCTガイド下に行う局所進行膵がんに対する遺伝子治療の開発を目指して、アンチセンスK-ras RNA発現遺伝子治療とインターフェロン遺伝子治療の相乗効果について検討する。

②腫瘍細胞の特異的標的化を目指したベクターの開発。腫瘍の特異的な標的化を目指して、a) 活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現しているトランスフェリン受容体 (Tf-R) を介して結合、internalize及びrecycleされるトランスフェリン (Tf) と治療用遺伝子の複合体を用いた播種性腫瘍に対する遺伝子治療の開発、b) E1B55K欠失アデノウイルスなどを用いて、p53に変異を持つ腫瘍細胞に特異的な遺伝子治療法と、c) がん細胞の特異的標的化が可能な変異アデノウイルスベクターを開発し、さらに、これらの方法を組み合わせる腫瘍特異性と治療効果を高めることを目標とする。

③Cre/loxP系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発。アデノウイルスベクターは特に生体内遺伝子治療用のベクターとして有用性が示唆されているが、その作製法は煩雑であり、また現行のE1欠損型ベクター (第1世代ベクター) では組み込み可能な遺伝子の大きさが7.5kbに限定され、ウイルスそのものによる免疫原性も指摘されている。そのためアデノウイルス遺伝子の大半を欠失して目的遺伝子を挿入した第3世代ベクター (guttettedベクター) に期待が集まっているが、未だ作製法は困難である。その大きな理由の一つに、guttettedベクターはヘルパーウイルス依存型ベクターであるため、 $10^9$  pfu/mlまで増殖するアデノウイルスでは、最終産物中にヘルパーウイルスの混在を最小限にすることが大変困難

であることがあげられている。そこでヘルパーウイルスのパッケージングシグナルをCre/loxP系を応用して除去する試みが行われているが、この方法を応用してguttettedベクターを作製する方法の確立にはより高度にCreを発現する293細胞の作製が必須である。本研究では高度にCreを発現する293細胞の作製を最終的な目的として、第2の発現制御系であるFLP/FRT系の検討を行う。

④生体親和物質を用いた生体への新規遺伝子導入・制御法の開発。生体内標的遺伝子治療の開発においては、治療を終了する場合や副作用のために遺伝子発現を即時に停止させるための工夫が不可欠であるが、その研究は十分なされていない。本研究においては、プラスミドベクターを生体親和材料であるアテロコラーゲンをキャリアとして保持させたミニペレットの形で生体内に導入した後、経時的に物理的な除去を試みることで、生体への遺伝子導入と発現の期間を制御する方法を開発する。

## B. 研究の方法

①膵がんの遺伝子異常を標的とするin vivo遺伝子治療法の開発。昨年度作成したアンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターAxCA-AS-K-rasおよび対照のAxCA-S-K-rasを、それぞれMOI=30でヒト膵がん細胞株AsPC-1およびPanc-1細胞に感染させ、3日後にApopTaq Plus Kit (Oncor) によりアポトーシスを検出した。また、ヒトinterferon- $\alpha$  2aのcDNAをCAGプロモーターにより発現するアデノウイルスベクターAxCA-IFNa2を作製し、膵がん細胞AsPC-1、Panc-1、PSN-1等に感染させ、細胞死をAnnexin V染色により検出した。DNAマイクロアレイ解析は、ベクター感染細胞より抽出した3 $\mu$ gのmRNAを用いて、Cy3, Cy5の2種類の蛍光色素下でcDNAをラベルし、ヒト既知遺伝子のうちがんの発生進展に関連する382種類のcDNA断片をアレイしたDNAチップ (TaKaRa) にハイブリダイゼーションした。

②腫瘍細胞の特異的標的化を目指したベクターの開発。a) 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子発現ベクターpCAHSV-TKとTfの複合体の作製を下記の方法で行った。抗Tf-Rモノクローナル抗体 (5E7) を固相化したaffi-gel上で、ヒト胎盤より抽出したTf-Tf-R complexをTf-Rのaffinityを保持するためにそのまま5E7と結合させた。固相化されたTf-R-Tf complexよりdesferalを用いTfを遊離した後、aggregationを避けるため1:1のモル比でbiotin化したTfと再度結合させた。次に、biotin化したDNAを結合させ、desferalを用いconjugateを抽出後、透析を行った。In vivoの解析として、Tf-Rの発現が豊富な細



胞K562 (human erythroleukemia cell line)、M7609 cells (human colonic cancer cell line)、TMK-1 cells (human gastric cancer cell line) をそれぞれ抗アシアロGM-1抗体投与と放射線照射で前処置したSCIDマウスの尾静脈より投与し、転移巣を作らせた後、Tf-HSV-TK遺伝子複合体を尾静脈から投与した。治療効果は、治療開始後の生存日数を検討する群と観察途中で屠殺し転移巣の面積を $\beta$ gal染色で定量するものおよび臓器重量を測定する群に分け検討した。b) E1B55K欠失アデノウイルス(AxE1AdB)が、p53欠失細胞だけで増殖可能であることを利用して、自殺腫瘍細胞に特異的な遺伝子治療法を開発した。遺伝子導入療法やサイトカイン遺伝子導入による免疫強化療法などの腫瘍に対して細胞傷害を得る手段をいくつか組み合わせた効果的な治療法を開発した。c) 細胞側の受容体分子との吸着を担うファイバー・ノブ・タンパクに変異を導入することによって、がん細胞の特異的標的化が可能な変異アデノウイルスベクターを開発した。

③Cre/loxP系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発。第2の発現制御系である出芽酵母由来のFLP/FRT系は、Cre/loxP系と同じ機序で目的遺伝子の発現のON/OFF制御が可能である。まずFLPの組換え効率をin vitro系を用いて検討し、Creと比較するため、FLP発現組換えアデノウイルスを作製し、293細胞に感染した細胞破砕液 (lysate) をFLPとして用いた。組換え酵素と基質を30℃あるいは37℃で30 min反応後、制限酵素で切断し電気泳動により生成物を解析した。次にFLPの組換え効率を上げる目的で、1998年に37℃以上でも活性を維持することが報告されたFLPe (Buchholz F. et al., Nature. Biotech., 16: 657-662) のcodon usageをヒト型に改変した、ヒト型・温度安定型FLPe (hFLPe) を66本の合成オリゴDNAを用いて構築した。hFLPe発現プラスミドとpCAFNFZ (LacZ遺伝子を有する標的プラスミド) を293細胞へ遺伝子導入し、3日後にX-Gal染色を行い組換え効率の検討を行った。

④生体親和物質を用いた生体への新規遺伝子導入・制御法の開発。プラスミドベクターとしては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子やヒトhst-1 (FGF-4) 遺伝子を組み込んだものを、導入方法は本研究で開発したアテロコラーゲンをキャリアとするミニベレットの筋肉内投与、あるいは皮下投与を選択した。ミニベレットをマウスに投与した後、経時的に外科的手術を施し、インプラントした部位からのミニベレットの除去を試み、その後の遺伝子導入と発現の変化を観察した。

(倫理面への配慮) ここに報告する研究で用いられたヒト由来試料は、ATCCなど公的細胞バンクから一般的に入手でき、学術的価値が確定し研究実績が十分に認められ、普遍的かつ広範に利用されているヒト細胞株であり、倫理上の問題は無いと判断した。また、動物実験は、研究機関の定める実験動物取扱規定に従い、十分な動物愛護の配慮の元に行った。

## C. 研究結果

①膵がんの遺伝子異常を標的とするin vivo遺伝子治療法の開発。TUNEL法による検索では、AxCA-AS-K-ras導入AsPC-1、Panc-1細胞においてアポトーシス細胞が10-15%検出された。AxCA-AS-K-ras、またはAxCA-S-K-ras導入AsPC-1およびPanc-1細胞からのmRNAを対象としたcDNAマイクロアレイ分析では、センス細胞株と比較して、アンチセンス細胞株で発現量が2倍以上増加している遺伝子は、Panc-1細胞ではcaspase-6 precursor、TNF- $\alpha$  converting enzyme、DNA excision repair protein、Tumor necrosis factor member 2で、AsPC-1細胞では、caspase-6 precursor、TNF- $\alpha$  converting enzyme、IFN- $\alpha/\beta$  receptor  $\alpha$  subunit precursor、Tumor necrosis factor member 2であった。一方、PSN-1細胞、Panc-1細胞にAxCA-IFN $\alpha$ 2をそれぞれMOI=100、10で感染したところ、上清中に、約60-70IU/mlのinterferon- $\alpha$  2aが検出された。また、AxCA-AS-Krasとのウイルス量比1:1でのco-infectionによっても、interferonの産生量に変化は無かった。しかしinterferon活性を示す2',5'-oligoadenylate synthetase活性については、AxCA-AS-Kras単独、AxCA-IFN $\alpha$ 2単独感染時よりも100倍以上の活性の上昇が認められ、Annexin V陽性細胞の出現率も、AxCA-IFN $\alpha$ 2とAxCA-AS-Krasのco-infectionにより、AxCA-IFN $\alpha$ 2とAxCA-lacZのco-infection時の1.5-3倍、AxCA-AS-KrasとAxCA-lacZのco-infection時の6-200倍となり、interferon- $\alpha$  2a遺伝子発現とアンチセンスK-ras RNA発現の相乗効果が示唆された。

②腫瘍細胞の特異的標的化を目指したベクターの開発。a) Tf-DNA複合体をTf-Rのaffinity columnを用いて作製したところ、aggregationが極めて少ないactive moleculeを得た。K562細胞に対して本複合体を用いてgreen fluorescent protein (GFP)-DNAを導入したところ、その発現は細胞毒であるlysosome inhibitorのクロロキンを加えなくても約50%と充分高く、かつ過剰のTfの添加で抑制された。125Iで標識した複合体を用いた細胞内動態の検討では、native Tfと同様に速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内に移行した後recycleすることが確認された。K562細胞接種スードマウスの尾静脈より20 $\mu$ gのTf-GFP遺伝子複合体を投



与して解析したところ、投与5日目には腫瘍、骨髄、筋肉にGFP-geneの存在が確認され、7日後にはほぼ腫瘍に局限した。またGFP mRNAならびにGFP蛋白の発現は腫瘍のみに見られた。K562播種性転移SCID mouseにTf-HSV-TK遺伝子複合体を用いた治療実験では有意な延命効果が認められ、臓器重量についても卵巣、肺、肝臓転移群で、有意な差が得られた。b) p53欠失細胞だけで強く増殖すると考えられる組み換えアデノウイルスAxE1AdBを作成した。これを脾がん細胞あるいはグリオーマ細胞に感染させたところ、*in vitro*で非常に強い殺細胞効果と50~3000倍ものウイルスの増殖が得られた。この制限増殖型のアデノウイルスをヒトIL2の発現アデノウイルスとを組み合わせたと、ヌードマウス皮下腫瘍治療モデルで著明な治療効果を得た。c) がん細胞の標的化が可能な変異アデノウイルスベクターAdv-F/MSH、Adv-F/GRP、Adv-F/RGD、Adv-F40Sなどを作成し、解析を行った。悪性黒色腫、口腔がんなどでは、アデノウイルスの受容体CARの発現がきわめて低く、従来型のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入効率が非常に低い。これに対し、メラノサイト刺激ホルモン(MSH)を融合させたF/MSH変異ウイルスは、ヒト悪性黒色腫に従来型よりも十倍程度高い遺伝子導入効率を示した。ガストリン放出ペプチド(GRP)を融合させたF/GRP変異ウイルスは、GRP受容体を高発現するヒト前立腺がんなどに高い遺伝子導入効率を示した。一方、インテグリンを標的としたRGDモチーフをファイバーのHIループに含むF/RGDウイルスを用いると、悪性黒色腫、口腔の扁平上皮がんなどに従来型に比べて数十倍高い遺伝子導入効率が見られることがわかった。

③Cre/loxP系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発。FLP/FRT系の組換え効率を*in vitro*法を用いて検討したところ、FLPの組換え効率はCreと比べて劣ってはいたが、FLPを高度に発現する組換えアデノウイルスを用いた場合には、100%の細胞で細胞内に1コピー挿入された標的配列をOFFからONへと制御することは可能であった。NCre発現制御用293細胞(293-FNCre細胞)を作製し、Creの活性測定用プラスミド(pCALNLG)をトランスフェクションしたところ、FLP導入前にも弱いGFPの発現が認められたことから、NCreのリーク発現が確認された。しかしFLPを導入することで、NCreの発現増強が期待されること、また今回得られた細胞株はFLP導入により293細胞で1万コピーにまで増幅するアデノウイルスの約7割のloxPサイトを認識し、組換えを起こしたことからFLPにより発現誘導を行うことで「遺伝子置換反応」に必要なCreを発現している可能性が示され

た。次に、37℃でも活性を維持するFLPeへの変更を考え、codon usageを調べたところ、ヒトとはかなり異なっていたため、ヒト型への変更を試みた。二本鎖各々33本ずつのオリゴDNAを作製し、3断片に分割してクローニングし塩基配列を確認後hFLPe全長を含むプラスミドを構築、hFLPe発現組換えアデノウイルスを作製した。その結果hFLPeの活性はNCreより劣るものの、野生型FLPの約1.5倍の組換え効率を示すことがわかった。

④生体親和物質を用いた生体への新規遺伝子導入・制御法の開発。プラスミドベクターを液状のアテロコラーゲンと混合した後、直径0.6 mm、長さ1.0 cmに整形し、この棒状のミニペレット内に、50 $\mu$ gのプラスミドDNAが内包されるようにした。内包された環状二本鎖プラスミドDNAは、室温または4℃において数カ月間は安定に存在した。またこの安定性保持には糖類や塩基性アミノ酸類の添加が重要であることが併せて判明した。ヒトhst-1遺伝子を発現するプラスミドDNAベクターを内包するミニペレットを動物の筋肉内や皮下に移植し、経時的に外科的手術により物理的な除去を試みた。このミニペレットは1週間以内では簡単に除去可能であり、遺伝子発現と生物活性は比較的速やかに減衰していった。2週間を超えた場合、自身の生分解性によって膨潤するため、もろくなり、ピンセットなどによる完全な物理的除去は困難であった。皮下に移植した場合、遺伝子導入と発現の効率が筋肉内投与に比べてかなり劣るが、物理的な除去という点では、侵襲も少なく、2週間後でも完全な除去が可能であった。

#### D. 考察

①脾がんの遺伝子異常を標的とする*in vivo*遺伝子治療法の開発。DNAチップ解析により、2種類のアンチセンス導入脾がん細胞株で発現量が増加している遺伝子として、caspase-6 precursor, TNF- $\alpha$  converting enzyme, tumor necrosis factor member 2の、3種類のアポトーシスに関与すると考えられている遺伝子が同定されたが、脾がんにおいてK-ras遺伝子に制御される遺伝子群の中でも、アポトーシス信号伝達機構の解明は、治療開発につながるため、今後の重要課題である。遺伝子発現プロファイル解析で得られた情報を基盤として、K-ras遺伝子の下流の遺伝子として有力候補の遺伝子の検索を進め、脾がんを標的としたより特異的な遺伝子治療の開発や、アンチセンスK-ras RNA発現に抵抗性の脾がん症例に関しても有効な遺伝子治療法の開発に役立てたい。また、アンチセンスK-ras RNA発現とinterferon- $\alpha$  2aの相乗効果の分子機構については明らかでないが、interferonに対す



る感受性の亢進の他、アンチセンスRNAと標的の mRNA の hybrid により 2 本鎖 RNA が供給されることで 2',5'-oligoadenylate synthetase の活性が上昇し、その結果 RNase L が活性化されて mRNA の破壊が亢進するという機構が考えられる。アデノウイルスベクターの腫瘍内局注の場合、2 種類のベクターを混合して注射することは簡単かつ効率も良く、さらに安全であると考えられることから、今後より有用な膵がんの遺伝子治療開発を目指す上で有望である。

②腫瘍細胞の特異的標的化を目指したベクターの開発。a) *in vivo* における Tf-DNA 複合体を用いた腫瘍 targeting に必要な条件として、複合体が aggregate form をとらず効率良く recycle されることが必要であるが、本法により始めて、これらの要求を満たす Tf-DNA 複合体を効率よく作製する系が完成した。また、Tf-R は腫瘍以外の正常組織での発現も認められることからこれらの組織にも導入される可能性が考えられたが、実際には、Tf-R の発現の多い腫瘍組織に集積することが示された。ついで、マクロファージや nuclease により充分量の複合体が腫瘍に到達するのかという問題があったが、実際には 20  $\mu$ g の投与で腫瘍細胞での発現が可能であり、さらに Tf-HSV-TK 遺伝子複合体を用いた播種性転移マウスモデルでの自殺遺伝子療法の有効性が示されたことから、臨床応用が期待できるベクターであると考えられた。b) E1B55K 欠失アデノウイルス (AxE1AdB) の治療効果に関しては、今後 SCID マウス移植腫瘍のモデルを用いて検討を進めて行く。c) キャプシド変異型アデノウイルスなどの遺伝子導入効率の高いベクターを開発して、免疫療法や細胞傷害誘導療法などと組み合わせることによって、臨床への応用を目指す。悪性神経膠腫の治療に有望な F/K20 型変異アデノウイルスについては、臨床研究への適用を目指した前臨床研究を進める。今後さらに、アデノウイルスのファイバーとペントンベースを改変し、宿主域の拡張と制限、反復投与の可能性、などについて検討する。

③Cre/loxP 系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発。本研究から、FLP/FRT 系が第二の発現制御系となりうる可能性が示され、Cre と併用して、時期を変えた発現制御 (多段階発現制御) が可能となり応用範囲も格段に広がるものと考えられる。但し、FLP 系では GFP を目的遺伝子とした場合には leak 発現は認められなかったものの、非常に活性の高い Cre の発現を完全に制御することは出来なかった。これは FRT 配列にも問題があると思われるため、今後はより優れた FRT 配列の検索を行っていく。また本研究で始めて FLP の活性は標的配列周辺の塩基配列

の影響を受ける可能性が示唆され、目的遺伝子を挿入後組換え効率の予備的検討が必要であると考えられる。また本研究で作製した 293-FNCre 細胞は、これまで報告されていた Cre 発現 293 細胞と同程度あるいはそれ以上の組換え効率を有していた。そこで今後は FLP を発現する recipient アデノウイルスを作製し Cre の発現を最大限とした 293 細胞を用いて gutted ベクターの作製を行っていく。1999 年に米国で起きた不幸な遺伝子治療による死亡事故の原因は未だ特定されていないが、今後のアデノウイルスベクターの応用範囲の拡大を考えると、アデノウイルスゲノムのほぼ全長を除いたウイルスベクター系への移行は重要な課題である。Cre を用いた「遺伝子置換反応」を利用して、gutted ベクターを効率よく作製する方法の確立を目指す。

④生体親和物質を用いた生体への新規遺伝子導入・制御法の開発。近年、様々な遺伝子治療に有効性が期待されるプラスミドベクターの遺伝子導入方法では、遺伝子導入は生体の持つ酵素などにより投与直後に終了するため効果の持続には限界があり、目的の遺伝子発現を長期に渡って必要とする治療には適さない。この欠点を補うためのベクターの頻回投与は患者にとって負担となるばかりか、重篤な副作用を誘発する結果となる。また疾患の種類や症状によっては、直ちにそのベクターによる治療を停止させるシステムが必要である。本研究を通して、より安全で効果のある遺伝子治療の実現に貢献できる可能性が生まれた。今後の課題としては、アテロコラーゲンによるミニベレットを生分解性を持たないシリコン等の素材とのハイブリッドを形成させることにより、より確実な発現制御の実現を目指す。

## E. 結論

①膵がんのアデノウイルスベクターを用いてアンチセンス K-ras RNA を発現すると TNF 関係の遺伝子など、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が変動し、アポトーシスが誘導されることを見出した。また、アンチセンス K-ras RNA 発現アデノウイルスベクターと interferon- $\alpha$  2a 発現アデノウイルスベクターの併用により、膵がんの細胞死誘導において顕著な相乗効果が認められたことから、より有効な局所遺伝子治療開発への可能性が示された。② *In vivo* で腫瘍を標的できる新しい Tf-DNA 複合体の作製法を確立し、播種性転移マウスモデルにおける自殺遺伝子療法でその有用性を証明した。また、p53 の異常を標的とした制限増殖が可能なアデノウイルス、特定の細胞に高い遺伝子導入が可能なキャプシド変異型アデノウイルスベクターなどを作成し、*in vitro* & *in vivo* で有用



性を示すことができた。③Cre/loxP系による「遺伝子置換反応」を用いたguttetベクター作製法の確立の為に必須であるCreを高発現する293細胞の樹立を目指して、Creを発現制御する第2の発現制御系としてFLP/FRT系の検討を行った。野生型FLPよりも組換え効率の優れた「ヒト型・温度安定型FLPe(hFLPe)」を構築し、FLP系でCreを高発現する293細胞を確立、293細胞内で1万コピーまで増幅するアデノウイルスゲノム上の約7割のloxPサイトの組換えに成功した。④筋肉内や皮下にインプラントしたミニペレットを物理的に除去することで、生体への遺伝子導入をより安全なものにする可能性が生まれた。またミニペレット内のプラスミドDNAベクターを形状や性状を安定に保つためのグルコース等の糖類やグリシンなどの塩基性アミノ酸類などの添加物が明らかになり、今後の遺伝子ベクターの様々な加工技術の進歩の上で重要な知見を提供出来た。

#### F. 研究発表

本報告書が添付される本体である様式A（4）厚生科学研究費補助金研究報告書に記載された通り。

#### G. 知的所有権の取得状況

本報告書が添付される本体である様式A（4）厚生科学研究費補助金研究報告書に記載された通り。



分担研究報告書

腫瘍血管とがん遺伝子異常を標的する遺伝子治療の研究  
分担研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 腫瘍血管新生の要素として従来見過ごされていたvasculogenesisの分子機構の解明を進め、その知見に基づく遺伝子治療の開発に貢献するため、ヒトangioblastと考えられる細胞を高い純度で分離・培養する方法をほぼ確立した。また、膵がんにてアデノウイルスベクターを用いてアンチセンスK-ras RNAを発現すると、高率にアポトーシスが誘導されること、マイクロアレイを用いた解析により、アンチセンスK-ras RNA発現により、TNF関係の遺伝子など、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が上昇していることを見出した。膵がんに対するアンチセンスK-ras RNAの作用機序の理解と、かつ、K-rasより特異的な治療標的遺伝子の選択につながるものが期待される。

A. 研究の目的

難治がん・進行がんに対する画期的な治療の確立を最終目的として行う本研究事業において、具体的な分担研究目的として、！血管新生の生物学、特にangioblastの分子細胞生物学の進歩に基づく、新しい遺伝子治療法の確立と、”がんの遺伝子異常、特に膵がんにおけるK-ras遺伝子点突然変異を標的とするin vivo遺伝子治療法の開発を設定する。その根拠は、！については、固型腫瘍がおおよそ直径2mmを越えて増殖するためには血管新生が不可欠であるとされているが、これは原発巣のみならず、転移巣においてもあてはまる。転移こそが進行がんの特徴であり、難治がんとは早期に高度に転移・浸潤を起こすがんであることを考えると、血管新生を標的とした治療法の開発は、難治がん・進行がんの本態を狙った治療法として重要である。血管新生は、概念上、既存の血管から枝分かれして新たな血管網がつけられるangiogenesisと、長い間その存在が推定されてきたが、未だ同定・分離されていない血液・血管共通前駆細胞（hemangioblast）から分化して血管がつけられvasculogenesisとに分けられる。従来、成体では専らangiogenesisによってのみ血管新生がおきると考えられていたが、近年、angioblastが成体にも存在するという知見が得られた。すなわち、血管と血液の発生は互いに深い関係にあり、その発生・分化に関わる遺伝子は、血管新生を標的としたがんの治療を開発する上で重要な研究対象であると考えられる。本研究ではヒト臍帯血由来のangioblastを高い純度で同

定・分離する方法を確立することにより、angioblastの遺伝子発現プロファイルの包括的解析などのvasculogenesisの分子機構の解明に資することを目的とする。

”については、難治がんの代表格である膵がんの特徴的な遺伝子異常であるK-ras点突然変異を標的として、アンチセンスK-ras RNA発現ユニットのpolyfection、またはアデノウイルス感染による遺伝子導入がin vitro、in vivoで腫瘍増殖抑制に効果的であることを示してきた。ヒト膵がんでは症例の80-90%以上と極めて高頻度に、かつがん化の初期よりK-ras遺伝子の点突然変異が認められる。K-ras遺伝子はほとんど全ての正常細胞で発現しているhouse keeping遺伝子であるにも関わらず、K-ras遺伝子の異常が膵がんにだけ高率に認められることは、膵がんではK-rasにより特異的に発現が制御されている遺伝子が存在していることを示唆している。DNAチップを用いて、K-ras点突然変異を持つAsPC-1膵がん細胞株においてアンチセンスK-ras発現アデノウイルスベクター感染により発現の変化する遺伝子を同定し、より特異的な膵がんの遺伝子治療の開発に役立つ情報を獲得する。

B. 研究の方法

！共同研究者の東海大学内科安藤潔講師らが造血幹細胞を増幅する系として開発した、xenogenic feeder法を元にして、human cord blood cellからのangioblast分離を試みた。Cord bloodより、MACSに



てCD34陽性細胞を精製、 $3 \times 10^4$ 個をマウスfeeder cellであるHESS-5細胞 $1 \times 10^5$ 個の上に、24穴プレート用culture insertを介して分離培養を行った。5日後に、vitronectin-coated dish上に蒔き直し、培養を続けた。内皮細胞のマーカーとして、DiI-acetylated LDLの取込みと、CD31免疫蛍光染色を行った。

”材料としては、K-ras遺伝子の点突然変異を有する細胞株AsPC-1、MIAPaCa-2、Panc-1と、野生型K-ras遺伝子をもつ細胞株BxPC-3、Hs 766Tを用いた。アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターAxCA-AS-K-rasは、K-rasがん遺伝子のエクソン1およびエクソン2を含む347 bpの野生型K-ras cDNAフラグメントをCAGプロモーターにより発現するベクターで、昨年構築したものである。組み換えウイルスは、CsCl<sub>2</sub>で濃縮後、透析により精製したものを用いた。AxCA-AS-K-rasおよび対照のAxCA-S-K-rasをそれぞれ10 pfu (MOI 10) でAsPC-1細胞に感染させ、感染後3日目に細胞中の蛋白を抽出し、K-ras p21蛋白質質異的モノクローナル抗体によるウェスタンブロット解析により発現を検討した。また、細胞増殖については、 $1 \times 10^5$ 個の膵がん細胞株

(AsPC-1, MIAPaCa-2, Panc-1, Hs 766T) にAxCA-AS-K-rasおよびAxCA-S-K-rasをそれぞれMOI 10で感染させ、7日目まで経日的に細胞数を計測した。アポトーシス細胞は、AxCA-AS-K-rasおよびAxCA-S-K-rasをそれぞれMOI 30でAsPC-1およびPanc-1細胞に感染させ、3日後にApopTaq Plus Kit (Oncor) により検出した。DNAマイクロアレイ解析は、AxCA-AS-K-rasおよびAxCA-S-K-rasをそれぞれMOI 30でAsPC-1およびPanc-1細胞に感染させ、抽出した $3 \mu\text{g}$ のmRNAを用いて、Cy3, Cy5の2種類の蛍光色素下でcDNAをラベルし、プローブを作成した。このプローブを、ヒト既知遺伝子のうちがんの発生進展に関連する382種類のcDNA断片をアレイしたDNAチップ (TaKaRa) を用いてハイブリダイゼーションを行った。チップ上にはコントロールとして $\beta$ -アクチンが6個載せて有り、この蛍光シグナル強度からそれぞれの発現量を補正し、各遺伝子の発現レベルを比較した。

(倫理面への配慮) !で用いるヒト臍帯血は、東海大学医学部において、学内倫理委員会規定に従って説明を行い、同意を得た提供者から採取された試料の一部を、個人識別情報を外した (匿名化された) 上で、本研究のために提供される。今年度の研究の到達目標には遺伝子解析が含まれないので倫理上の問題は無いと判断した。”では、ATCCなど公的細胞バンクから一般的に入手でき、学術的価値が確定

し研究実績が十分に認められ、普遍的かつ広範に利用され、さらに一般に入手可能なヒト細胞株のみを扱うので、倫理上の問題は無いと判断した。

### C. 研究結果

!安藤らの源法で用いられていたHESS-5と、我々の研究室で以前クローニングした強い血管新生因子であるhst-1遺伝子を導入したHESS-5/hst-1を用いてCD34+ cord blood cellのexpansionを比較したところ、10日目で細胞数はHESS-5/hst-1の方が数倍多かった。しかしvitronectin-coatedプラスチック表面への付着性はHESS-5を用いて増幅した細胞の方が明らかに良く、HESS-5/hst-1を用いた培養からは付着細胞がほとんど得られなかった。また、HESS-5で増幅する前のCD34陽性細胞集団からは、付着細胞がほとんど得られなかった。HESS-5で増幅し、vitronectin表面に付着した細胞はほぼ100% DiI-acetylated LDLを取込み、またCD31の発現も認められた。一部の細胞はspindle shapeを取り、血管内皮系の細胞であると考えられた。

” K-ras変異を有するAsPC-1細胞ではAxCA-AS-K-ras導入によりK-ras p21蛋白質の発現が抑制された。K-ras変異を有するAsPC-1, Panc-1, MIAPaCa-2細胞では、AxCA-AS-K-ras導入により、その細胞増殖が抑制されたが、野生型K-rasを有するHs 766T細胞では抑制されなかった。一方AxCA-S-K-ras導入細胞では、いずれも増殖は抑制されなかった。さらに、TUNEL法による検索では、AxCA-AS-K-ras導入AsPC-1, Panc-1細胞においてアポトーシス細胞が10-15%検出された。AxCA-AS-K-ras、またはAxCA-S-K-ras導入AsPC-1およびPanc-1細胞からのmRNAを対象としたcDNAマイクロアレイ分析では、センス細胞株と比較して、アンチセンス細胞株で発現量が2倍以上増加している遺伝子は、Panc-1細胞ではcaspase-6 precursor, TNF- $\alpha$  converting enzyme, DNA excision repair protein, Tumor necrosis factor member 2で、AsPC-1細胞では、caspase-6 precursor, TNF- $\alpha$  converting enzyme, IFN- $\alpha/\beta$  receptor  $\alpha$  subunit precursor, Tumor necrosis factor member 2であった。発現量が2倍以上減少している遺伝子は同定されなかった。

### D. 考察

!がんの転移の成立にはその最初の段階として、原発巣における透過性が亢進し、血流の停滞や逆流など、異常な血流動態を示す腫瘍新生血管への腫瘍



細胞の侵入がまず起きることを考えると、がんの発生と進展における血管新生の重要性は論を待たない。転移先についても、現在の一般の診断技術では2mm以下の転移巣を検出するのは困難であり、臨床的に我々が見ている転移巣のほとんどは血管新生依存性腫瘍増殖期にあると考えられる。このように、難治がん・進行がんの特徴とも言うべき転移とその成立に深く関わる血管新生において、vasculogenesisが今までは見過ごされていた要素として浮上してきた。本研究ではvasculogenesisの中心をなすangioblastを分離精製し、遺伝子発現プロファイリングなどの生化学的・分子生物学的解析に資することを目的としており、腫瘍の血管新生の全体像を理解する上で極めて重要な研究であるといえる。今年度はxenogenic feeder systemによるin vitro expansionを利用することで、CD34+細胞から、血管内皮のマーカーを発現し、かつ付着性の細胞を誘導することができ、angioblastもしくはendothelial progenitor cell、EPCの純化法の確立にかなり迫ることができた。特に、cord bloodを用いた我々の系では、今までの報告のように単にvitronectinなどのcoated surfaceで培養するだけではEPCの誘導はかなわず、xenogenic feeder coculture methodによるexpansionが不可欠であった。今後は機能的にangioblastとしての性格を発揮することを確認するほか、収率を改善していくことが一つの目標ではあるが、一方では微量試料からの発現解析の技術も進展がめざましいことを考えると今後のこのプロジェクトの展開は早いと期待される。

” K-ras点突然変異を有するヒト膵がん細胞株AsPC-1およびPanc-1にアンチセンスK-ras RNAを発現するアデノウイルスベクターを感染させることにより、MOI依存性にアポトーシスが誘導されることを見いだした。また、がんの発生進展に関連する遺伝子をアレイしたDNAチップ解析により、2種類のアンチセンス細胞株で発現量が増加している遺伝子として、caspase-6 precursor, TNF- $\alpha$  converting enzyme, tumor necrosis factor member 2 (TNF)の3種類のアポトーシスに関与すると考えられている遺伝子を同定した。これらの遺伝子がアンチセンスK-ras導入細胞株でいかなる機能を持つのか、さらに詳細に明らかにする必要がある。膵がんにおいてK-ras遺伝子に制御される遺伝子群の中でも、アポトーシスシグナル伝達機構の解明は、直接膵がんに対する効果的な治療の開発につながるため極めて重要である。一方、アンチセンス細胞株で発現量が低下する遺伝子は今回の発現量の差を2倍とする条件では遺伝子として同定されるものはなかった。今後、さらに発

現量の差を詳細に分析するとともに、cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析で得られた情報を基盤として、K-ras遺伝子の下流の遺伝子として有力候補の遺伝子の検索を進め、膵がんを標的としたより特異的な遺伝子治療の開発や、アンチセンスK-ras RNA発現に抵抗性の膵がん症例に関しても有効な遺伝子治療法の開発に役立てて行く。

#### E. 結論

ヒトangioblastと考えられる細胞を高い純度で分離・培養する方法を確立した。腫瘍血管新生の要素として従来見過ごされていたvasculogenesisの分子機構の理解が進み、それに基づく遺伝子治療の開発に貢献するものと期待される。また、膵がんにアデノウイルスベクターを用いてアンチセンスK-ras RNAを発現すると、アポトーシスが誘導され、マイクロアレイを用いた解析により、TNF関係の遺伝子など、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が変動していることを見出した。膵がんに対するアンチセンスK-ras RNAの作用機序の理解と、より特異的な治療標的遺伝子の選択につながることを期待される。

#### F. 論文発表

- Y. Nagamachi, M. Tani, K. Shimizu, T. Yoshida and J. Yokota. Suicidal gene therapy for pleural metastasis of lung cancer by liposome-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Therapy*, 6(6):546-553, 1999.
- H. Yamamoto, J. Perez-Piteira, T. Yoshida, M. Terada, F. Itoh, K. Imai and M. Perucho. 1999. Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 116:1348-1357.
- S. Ohnami, N. Matsumoto, M. Nakano, K. Aoki, K. Nagasaki, T. Sugimura, M. Terada and T. Yoshida. Identification of genes showing differential expression in antisense K-ras-transduced pancreatic cancer cells with suppressed tumorigenicity. 1999. *Cancer Research* 59: 5565-5571.
- T. Ueda, H. Sasaki, K. Aoyagi, M. Narikiyo, Y. Tsubosa, Y. Kuwahara, H. Sakamoto, K. Mafune, T. Yoshida, M. Makuuchi and M. Terada. Novel exons located more than 200kb downstream of the previously described 3' exon of the K-sam gene for generating activated forms of KGF receptor. 1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265: 739-745.



## 分担研究報告書

### 局所浸潤膵がんに対する遺伝子治療モデルの開発

分担研究者 小菅 智男 国立がんセンター中央病院部長

研究要旨 膵臓周辺には大血管、神経、胆道系などの重要臓器が密集し、局所の浸潤性増殖の対策が重要課題になっている。現在行われている5FU+CDDPなどの術後補助化学療法の有効性は明らかでなく、また、局所進行膵がんに対しても、現在有効性が確立された治療法が無いことから、膵がんの治療成績を向上させるためには、局所遺伝子治療の開発が必要である。従来有効性が示されてきたアンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターに加えて、interferon- $\alpha$  2a発現アデノウイルスベクターを併用することにより、膵がんの細胞死誘導において顕著な相乗効果を認め、より有効な局所遺伝子治療開発への可能性が示された。

#### A. 研究の目的

難治がんの代表である膵がん切除可能な症例は半数に満たない。その原因は、早期より高率に遠隔転移を来すことのほか、遠隔転移が無くても切除できない例がしばしば見られるためである。すなわち、膵臓周辺には大血管、神経、胆道系などの重要臓器があり、“locally advanced pancreatic cancer”とも言われるように、主として神経に沿って局所の浸潤性増殖が激しく、手術が非適応となったり、重大な合併症を起こす場合が少なくない。従って、膵がんに対しては、体内に播種した病巣を標的とした治療法の開発と並行して、有効な局所療法が開発が求められている。本研究では腹腔鏡もしくはエコーやCTガイド下に、局所に遺伝子を注入することで行う膵がんの局所的遺伝子治療の開発を最終目的とする。そのためには前年度に引き続き、膵がんの画像診断・病理診断等を組み合わせた臨床病態の十分な検討を行い臨床研究の対象となる膵がん症例をしっかりと把握する基盤を作る必要がある。さらに今年度は主任研究者吉田輝彦博士と共同して、膵がんに対するアンチセンスK-ras RNA発現遺伝子治療とインターフェロン遺伝子治療の相乗効果について検討し、より有効な膵がんの局所遺伝子治療の開発を目指す。

#### B. 研究の方法

アンチセンスK-ras RNA発現ユニットとしては、正常ヒトK-ras遺伝子exon 1、2及びexon 3の一部からなるcDNA断片374bpを用い、これをアンチセンス方向に発現するアデノウイルスベクターAxCA-AS-Krasと、対照のセンス方向ベクターAxCA-S-Krasを昨年度構築した。プロモーターは組織非特異的で強力なCAGプロモーターである。実験に用いるアデノウイルスベクターは、塩化セシウム密度勾配超遠心法に

て精製した。一方、ヒトinterferon- $\alpha$  2aのcDNAをCAGプロモーターにより発現するアデノウイルスベクターAxCA-IFN2aを作製した。膵がん細胞AsPC-1、Panc-1、PSN-1等に感染させ、細胞死をAnnexin V染色により検出した。

(倫理面への配慮) 本研究では、ATCCなど公的細胞バンクから一般的に入手でき、学術的価値が確定し研究実績が十分に認められ、普遍的かつ広範に利用され、さらに一般に入手可能なヒト細胞株のみを扱うので、倫理上の問題は無いと判断した。

#### C. 研究結果

PSN-1細胞、Panc-1細胞にAxCA-IFN2aをそれぞれMOI=100、10で感染したところ、上清中に、約60-70IU/mlのinterferon 2aが産生された。また、PSN-1細胞では1,200 pmol/dlと、アンチセンスK-ras RNA発現ベクターAxCA-AS-Krasとのウイルス量比1:1でのco-infectionによっても、interferonの産生量に変化は無かった。しかしinterferon活性を示す2',5'-oligoadenylate synthetase活性については、AxCA-AS-Kras単独、AxCA-IFN2a単独（但しいずれもAxCA-lacZアデノウイルスベクターを添加して総ウイルス量は同じになるよう、合わせてある）よりも100倍以上の活性の上昇が認められた。また、細胞死誘導の効果も、Annexin V陽性細胞の出現率は、AxCA-IFN2aとAxCA-AS-Krasのco-infectionにより、AxCA-IFN2aとAxCA-lacZのco-infection時の1.5-3倍、AxCA-AS-KrasとAxCA-lacZのco-infection時の6-200倍となり、interferon- $\alpha$  2a遺伝子発現とアンチセンスK-ras RNA発現の相乗効果が示唆された。

#### D. 考察

膵がんの治療成績を向上させるためには、現在行



われている5FU+CDDPなどの術後補助化学療法の有効性は明らかでなく、また、局所進行膵がんに対しても、現在有効性が確立された治療法が無いことから、局所遺伝子治療の開発が必要である。膵がん極めて特徴的な遺伝子異常であるK-ras点突然変異を標的にしたアンチセンスK-ras RNA発現ベクターの導入が腫瘍抑制に有効であることは動物モデルを用いて証明されてきたが、膵がんに対するinterferonの有効性については、5FUやretinoic acid等との組み合わせ治療が何回か試みられ、中には35%以上のresponse rateの報告もあるが、奏効率は概して10%以下に留まっている。本研究で新たに見出した、アンチセンスK-ras RNA発現とinterferon- $\alpha$  2aの相乗効果の分子機構については明らかでないが、主任研究者が分担する「腫瘍血管とがん遺伝子異常を標的とする遺伝子治療の研究」において、AxCA-AS-Krasベクター導入AsPC-1細胞でinterferon receptorの発現が亢進していたという知見は興味深い。このような、interferonに対する感受性の亢進の他、アンチセンスRNAと標的のmRNAのhybridにより2本鎖RNAが供給されることで2',5'-oligoadenylate synthetaseの活性が上昇し、その結果RNase Lが活性化されてmRNAの破壊が亢進するという機構が考えられる。アンチセンスK-ras RNAの膵がん細胞死誘導への有効性を以前に示したが、中にはPSN-1細胞など、比較的アンチセンスK-ras RNA発現に対して抵抗性の膵がん細胞もあり、そのような細胞でもアンチセンスK-ras RNAとinterferon- $\alpha$  2a発現の併用により殺細胞効果が明らかに認められたこと、またアデノウイルスベクターの腫瘍内局注の場合、2種類のベクターを混合して注射することは簡単かつ効率も良く、さらに安全であると考えられることから、今後より有用な膵がんの遺伝子治療開発を目指す上で有望である。

## E. 結論

アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターとinterferon- $\alpha$  2a発現アデノウイルスベクターの併用により、膵がんの細胞死誘導において顕著な相乗効果が認められたことから、より有効な局所遺伝子治療開発への可能性が示された。

## F. 論文発表

Fujii K, Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, Yamasaki S, Kanai Y. Resection of liver metastases after pancreatoduodenectomy: Report of seven cases. *Hepato-Gastroenterol.*46:2429-2433, 1999.

Furukawa H, Iwata R, Moriyama N, Kosuge T. Blood supply to the pancreatic head, bile duct, and duodenum. *Arch Surg.*134:1086-1090, 1999.

Yamamoto J, Kosuge T, Shimada K, Yamasaki S, Moriya Y, Sugihara K. Repeat liver resection for recurrent colorectal liver metastases. *Am J Surg.*178:275-281, 1999.

Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Yamasaki S, Makuuchi M. Improved surgical results for hilar cholangiocarcinoma with procedures including major hepatic resection. *Anna Surg.*230:663-671, 1999.

Okano K, Yamamoto J, Moriya Y, Akasu T, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S. Macroscopic intrabiliary growth of liver metastases from colorectal cancer. *Surgery.*126:829-834, 1999.

Furukawa H, Muramatsu Y, Fukushima N, Kosuge T. Carcinoma of the cystic bile duct: MRCP and CT appearance. *Am J Roentgenol.*173:1141-1141, 1999.

Yamamoto J, Iwatsuki S, Kosuge T, Dvorchik I, Shimada K, J. Wallis Marsh, Yamasaki S, Thomas E. Starzl. Should hepatomas be treated with hepatic resection or transplantation?. *Cancer.*86:1151-1158, 1999.

Kosuge T, Sano K, Shimada K, Yamamoto J, Yamasaki S, Makuuchi M. Should the bile duct be preserved or removed in radical surgery for gallbladder cancer?. *Hepato-Gastroenterol.*46:2133-2137, 1999.

Shimada K, Yamamoto J, Kosuge T, Sugawara Y, Yamasaki S, Sakamoto M. Adenocarcinoma confined to a cholesterol polyp of the gallbladder. *Am J Gastroenterol.*94:2568-2569, 1999.

Ochiai T, Takayama T, Inoue K, Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, Yamasaki S, Makuuchi M. Hepatic resection with and without surgical margins for hepatocellular carcinoma in patients with impaired liver function. *Hepato-Gastroenterol.*46:1885-1889, 1999.

Kishi M, Tsukada T, Shimizu S, Hosono K, Ohkubo T, Kosuge T, Sugano K, Kanbe M, Obara T, Yamaguchi K. A novel splicing mutation (894-9 G -> A) of the MEN1 gene responsible for multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Lett.*142:105-110, 1999.

Nakayama H, Takayama T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Shimada K, Yamamoto J. Resection of peritoneal metastases from hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterol.*46:1049-1052, 1999.

Yamamoto J, Shimada T, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Brit J Surg.*86:332-337, 1999.

Yamamoto J, Kosuge T, Shimada K, Yamasaki S, Takayama T, Makuuchi M. Anterior transhepatic approach for isolated resection of the caudate lobe of the liver. *World J Surg.*23:97-101, 1999.



## トランスフェリン遺伝子複合体を用いた播種性腫瘍に対する遺伝子治療

研究者 新津洋司郎 札幌医科大学・医学部・教授

### 研究要旨

腫瘍細胞に対する *in vivo* 遺伝子 targeting を目的に活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現している transferrin receptor に着目し、ligand である Tf に avidin biotin を介し DNA を結合させた conjugate を作製した。この conjugate は Tf-R への binding motif が良く保たれており、*in vivo* において高い腫瘍特異性を有していた。K562 播種性転移 SCID mouse に Tf-HSV-TK 遺伝子複合体を投与したところ治療群で延命効果および抗腫瘍効果が得られた。

### A. 研究目的

現在多くの癌遺伝子治療の試みがなされているが、臨床的に満足すべき成果が得られていない。その第一の理由は腫瘍に対する gene delivery 法が確立されていないことにある。トランスフェリン受容体(Tf-R)は活発に増殖する腫瘍細胞の表面に高発現している。その ligand であるトランスフェリン(Tf)は Tf-R に結合後 internalize された後 recycle されることから Tf-遺伝子複合体は腫瘍細胞に対する *in vivo* 遺伝子 targeting に有用と考えられる。しかし、実際には、諸家の様々な工夫にも関わらず再現性、発現効率などの点で満足すべき *in vivo* gene delivery 法とはなっていなかった。我々は avidin,biotin を架橋剤として用い Tf と DNA の stoichiometric ratio をきちんとコントロールするとともに Tf-R の affinity column 上で conjugate formation することにより Tf-R への binding motif が良く保たれた複合体を作製し再現性と特異性の高い腫瘍細胞に対する *in vivo* 遺伝子導入法の確立に成功した (American society of gene therapy meeting, Seattle,1998)。本法は根治が困難である播種性腫瘍に選択的に取り込まれ、実効性のある癌の遺伝子治療を可能とするものと考えられる。本研究では播種性転移マウスモデルを対象として、本法を用いた自殺遺伝子療法の開発を目的に検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1)癌転移マウスの作製

Tf-R の発現が豊富なもの(K562 cells(human erythroleukemia cell lines) M7609 cells(human colonic cancer cell line)、 TMK-1 cells (human gastric cancer cell lines) をそれぞれ抗アシアロ GM-1 抗体投与と放射線照射で前処置した SCID マウスの尾静脈より投与し、3週間後に屠殺し転移巣を確認する。

#### 2)Tf-遺伝子複合体の作製

導入遺伝子として単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK 遺伝子)発現 vector である pCAHSV-TK を用いた。複合体の作製は当教室で作製した抗 Tf-R モノクロー

ナル抗体(5E7)を固相化した affi-gel 上で行なった。はじめに、ヒト胎盤より抽出した Tf-Tf-R complex を Tf-R の affinity を保持するためにそのまま 5E7 と結合させた。固相化された Tf-R-Tf complex より desferal を用い Tf を遊離した後、aggregation を避けるため 1:1 のモル比で biotin 化した Tf と再度結合させる。つぎに、streptavidin を添加し洗浄後、photoactivatable biotin により biotin 化した biotin 化 DNA(DNA1Kbp あたり 0.5mole の biotin を導入)を結合させた。最後に、desferal を用い conjugate を抽出後、透析を行なった。

3)転移巣形成マウスに対する自殺遺伝子治療  
各種癌細胞株の転移を確認後、HSV-TK 遺伝子複合体を尾静脈から投与した。治療効果は、治療開始後の生存日数を検討する群と観察途中で屠殺し転移巣の面積を  $\beta$  gal 染色で定量するものおよび臓器重量を測定する群に分け検討する。さらに治療による副作用を検討するため、血中生化学検査および WBC,RBC,PLT 数ならびに主要臓器の病理学的検討を行う。

### C. 研究結果

1. Tf-DNA 複合体の作製として Tf-R の affinity column を用いて conjugate を作製したところ aggregation が極めて少ない active molecule を得ることが確認された。
2. K562 細胞に対して本複合体を用いて green fluorescent protein (GFP)-DNA を導入したところ、その発現は細胞毒である lysosome inhibitor のクロロキンを加えなくても約 50%と充分高かった。
- 3.この発現は過剰の Tf の添加で抑制されたことから Tf-R を介した特異的なものと考えられた。
4.  $^{125}\text{I}$  で標識した複合体を用いた細胞内動態の検討では、native Tf と同様に速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内に移行した後 recycle することが確認された。
5. *In vivo* での遺伝子 delivery の検討は、K562 細胞接種ヌードマウスの尾静脈より 20 $\mu\text{g}$  の



Tf-GFP 遺伝子複合体を投与し1時間、1日—7日後にマウスを屠殺し体内分布および発現をそれぞれ PCR 法、RT-PCR 法および蛍光顕微鏡で検討した。その結果、投与5日目には腫瘍、骨髄、筋肉に GFP-gene の存在が確認され、7日後にはほぼ腫瘍に局限した。また GFP mRNA ならびに GFP 蛋白の発現は腫瘍のみにみられた。以上の検討より本複合体を用いて腫瘍特異的な遺伝子導入が可能であると考えられた。

6. K562 播種性転移 SCID mouse に Tf-HSV-TK 遺伝子複合体を投与したところ治療群でコントロール群に比べ有意な延命効果が得られた。臓器重量は卵巣、肺、肝臓転移群で、有為な治療効果を認めた。

#### D. 研究の考察、結論

in vivo における Tf-DNA 複合体を用いた腫瘍 targeting に必要な条件として、複合体が aggregate form をとらず効率良く recycle されることが必要である。また aggergation が出来やすい preparation では、その発現効率が一定でないという問題や Tf-R への binding motif が十分に保たれないという問題があった。本法で作製した Tf-DNA 複合体はこれらの要求を全て満たすものであった。また、Tf-R は腫瘍以外の正常組織での発現も認められることからこれらの組織にも導入される可能性が考えられたが、実際には、Tf-R の発現の多い腫瘍組織に集積することが示された。ついで、マクロファージや nuclease により充分量の複合体が腫瘍に到達しうるのかという問題があったが実際には 20 $\mu$ g の投与で腫瘍細胞での発現が可能であった。Tf-HSV-TK 遺伝子複合体を用いた播種性転移マウスモデルでの自殺遺伝子療法を検討したところ治療効果が確認された。

#### E. 研究発表

##### 1 論文発表

Sato Y, Yamauchi N, Takahashi M, Sasaki K, Fukaura J, Neda H, Fujii S, Hirayama H, Itoh Y, Koshita Y, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S, and Niitsu Y: *In vivo* gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. **FASEB J** in printing

Sato T, Niitsu Y, et al: An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa receptor gene transfection and mutein TNF administration. **Cancer Res.** 58:1677-1683 (1998).

Sato Y, Koshita Y, Hirayama M, Matsuyama T, Wakimoto H, Hamada H, Niitsu Y: Augmented

antitumor effects of killer cells induced by tumor necrosis factor gene-transduced autologous tumor cells from gastrointestinal cancer patients.

**Hum Gene Ther.** 7:1895-1905 (1996)

Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, Hirayama Y, Kuroda H, Takahashi Y and Niitsu Y: Fibronectin fragment mediated retroviral transfer of glutathione-S-transferase  $\pi$  gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents **Hum Gene Ther.** 8: 1901-1910 (1997)

Neda H, Takahashi M, Itoh Y, Koshita Y, Matsuyama T, Watanabe N, Kohgo Y, Niitsu Y. Successful transfection of biotinylated  $\beta$ -galactosidase gene conjugated with transferrin into leukemia cells and IL-2-stimulated lymphocytes via transferrin receptor. **Ann NY Acad Sci.** 716: 336-337 (1994)

##### 2. 学会発表

Yasushi Sato, Katunori Sasaki, Mimoru Takahashi, Naofumi Yamauchi, Yue Lu, Yoshiro Niitsu, A NOVEL APPROACH FOR IN VIVO GENE DELIVERY TO TUMOR CELLS VIA TRANSFERRIN RECEPTOR BY TRANSFERRIN-AVIDIN-DNA CONJUGATE American society of gene therapy meeting, Seattle, 1998

新津洋司郎, 佐藤康史, Transferrin(Tf)-遺伝子複合体による癌細胞への in vivo 遺伝子導入: 第 57 回癌学会総会シンポジウム, 平成 10 年 9 月 30 日

Yasushi Sato, Katunori Sasaki, Mimoru Takahashi, Naofumi Yamauchi, Yue Lu, Yoshiro Niitsu, A NOVEL APPROACH FOR IN VIVO GENE DELIVERY TO TUMOR CELLS VIA TRANSFERRIN RECEPTOR BY TRANSFERRIN-AVIDIN-DNA CONJUGATE: The fourth annual meeting 1998 .The Japan society of gene therapy, Tokyo, July 4, 1998

Yasushi Sato, Junki Fukaura, Katunori Sasaki, Mimoru Takahashi, Naofumi Yamauchi, Yoshiro Niitsu *IN VIVO* SUICIDE GENE THERAPY FOR METASTATIC TUMOR USING TRANSFERRIN-STREPTAVIDIN-HSV-TK GENE CONJUGATE IN MOUSE MODEL. American society of gene therapy meeting, Washington, 1999.

Yasushi Sato, Junki Fukaura, Katunori Sasaki, Mimoru Takahashi, Naofumi Yamauchi, Yoshiro Niitsu *IN VIVO* SUICIDE GENE THERAPY FOR METASTATIC TUMOR USING TRANSFERRIN-STREPTAVIDIN-HSV-TK GENE CONJUGATE IN MOUSE MODEL. The fifth annual meeting 1998 .The Japan society of gene therapy, Tokyo, June 19, 1999



# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）分担研究報告書

## Cre/loxP系を利用した新しいアデノウイルスベクター作製法の開発

分担研究者 斎藤 泉 東京大学医科学研究所・助教授

研究要旨：部位特異的組換え酵素Creによる「遺伝子置換反応」を応用した新しいアデノウイルスベクター作製法に必須であるCreを高度に発現する293細胞の樹立化を目的として、出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素FLP/FRT系について検討を行った。FLP/FRT系はCre/loxP系と比較して、発現制御系としての精度は劣っていたものの、制御系として十分に機能する系であると考えられた。また野生型FLPは30℃が至適であり、組換え効率もCreよりも劣っていたため、「ヒト型・温度安定型FLPe」を合成オリゴDNAを用いて構築し、発現を確認した。今後guttatedベクター作製ではCreの発現量が最も置換効率へ影響を与えるため、本研究で検討したFLP/FRT系によるCreの発現制御系は非常に有用なtoolとなりうると考える。

### A. 研究目的

アデノウイルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして有用性が示唆されている。しかし申請者らの開発したCOS-TPC法により従来法より作製効率が上昇したとはいえ依然として作製法は煩雑であり、また現行のE1欠損型ベクター（第1世代ベクター）では組み込み可能な遺伝子の大きさが7.5kbに限定されるだけでなく、ウイルスそのものによる免疫原性も指摘されている。そのためアデノウイルス遺伝子の大半を欠失して目的遺伝子を挿入した第3世代ベクター（guttatedベクター）に期待が集まっているが、未だ作製法は困難である。その大きな理由の一つに、guttatedベクターはヘルパーウイルス依存型ベクターであるため、 $10^9$ PFU/mlまで増殖するアデノウイルスでは、最終産物中にヘルパーウイルスの混在を最小限にすることが大変困難であることがあげられている。そこでヘルパーウイルスのパッケージングシグナルをCre/loxP系を応用して除去してパッケージングされにくくする試みが行われている。また、昨年度本研究で、Creを用いてプラスミドDNAから特定のDNA配列をウイルスとして感染した親ウイルス上の配列と効率的に交換させる方法（「遺伝子間反応」）を確立したが、この方法を応用してguttatedベクターを作製する方法の確立

にはより高度にCreを発現する293細胞の作製が必須である。しかしながらCreを高度に発現する293細胞の樹立化は困難であった。本研究では高度にCreを発現する293細胞の作製を最終的な目的として、第2の発現制御系であるFLP/FRT系の検討を行う。

### B. 研究方法

第2の発現制御系である出芽酵母由来のFLP/FRT系は、Cre/loxP系と同じ機序で目的遺伝子の発現のON/OFF制御が可能である。すなわちFLPは34bpのFRT配列を認識し、同方向に挿入されているFRT間を相同組換えの結果環状に切り出す反応をFLP単独で行う。しかし野生型FLPは30℃が至適温度であることが報告されていた。本研究ではまずFLPの組換え効率をin vitro系を用いて検討し、Creと比較した。Creで既に確立した方法に従ってFLP発現組換えアデノウイルスを作製し、293細胞に感染した細胞破碎液（lysate）をFLPとして用いた。基質はFRT配列間にアデノウイルスゲノム由来の配列を持つpBR322系プラスミド（pBfA1）とCAGプロモーターの下流にFRT-stuffer-FRT-GFP遺伝子を持つpCAG系プラスミド（pCAFNFNG）を用いた。またCreの反応には核局在シグナルを有する



Cre(NCre)発現アデノウイルスを用いて調製した lysate と基質として CAG プロモーターの下流に loxP-stuffer-loxP-LacZ 遺伝子を持つプラスミド (pCALNLZ) を用いた。組換え酵素と基質を 30°C あるいは 37°C で 30 min 反応後、制限酵素で切断し電気泳動により生成物を解析した。

また、CAG プロモーター-FRT-neo 耐性遺伝子-NCre-GpA を持つ Cre 発現 293 細胞作製用標的プラスミド (pCAFNFNCre) とコントロールとして GFP 発現制御用標的プラスミド (pCAFNFNG) を作製し、293 細胞へカルシウム法を用いてトランスフェクションを行い、2mg/ml の G418 を用いて neo 耐性細胞株 (293-FNCre 細胞あるいは 293-FGFP 細胞) を樹立化した。

次に FLP の組換え効率を上昇する目的で、1998 年に 37°C 以上でも活性を維持することが報告された FLPe (Buchholz F. et al., Nature. Biotech., 16: 657-662) の codon usage をヒト型に改変した、ヒト型・温度安定型 FLPe (hFLPe) を 66 本の合成オリゴDNA を用いて構築した。hFLPe 発現プラスミドと pCAFNFZ (LacZ 遺伝子を有する標的プラスミド) を 293 細胞へ遺伝子導入し、3 日後に X-Gal 染色を行い組換え効率の検討を行った。

### C. 研究成果

FLP/FRT 系の組換え効率を *in vitro* 法を用いて検討した。まず pCAFNFNG を基質として、FLP の至適温度である 30°C と一般的に培養細胞などの実験で用いられている 37°C での組換え効率を比較したところ、既報通り 30°C の方が約 30 倍高い組換え効率を示した。しかし FLP の至適温度である 30°C においても Cre の組換え効率と比較して約 1/30 の活性しか示さなかった。また Cre では pBR322 系プラスミドと pCAG 系のプラスミドでの組換え効率には差は認められなかったが、FLP は pCAG 系と比較して pBR322 系プラスミドでは組換え効率が低下する傾向が認められ、FRT 配列近傍の塩基配列が組換え効率に影響を与えている可能性が示唆された。しかし発現の ON/OFF 制御系に用いる pCAG 系の標的プラスミドに関しては、目的遺伝子を GFP から LacZ に変更したプラ

スミドでも同程度の組換え効率を示した。FLP の組換え効率は Cre と比べて劣ってはいたが、FLP を高度に発現する組換えアデノウイルスを用いた場合には、100% の細胞で細胞内に 1 コピー挿入された標的配列を OFF から ON へと制御することは可能であった。

また、293 細胞へ標的プラスミドを導入し作製した GFP 発現制御用 293 細胞 (293-FGFP 細胞) では、FLP 導入前の GFP の発現は確認されなかった。そこで NCre 発現制御用 293 細胞 (293-FNCre 細胞) を作製し、Cre の活性測定用プラスミド (pCALNLG) をトランスフェクションしたところ、FLP 導入前にも弱い GFP の発現が認められたことから、NCre のリーク発現が確認された。しかし FLP を導入することで、NCre の発現増強が期待されること、また今回得られた細胞株は FLP 導入により 293 細胞で 1 万コピーにまで増幅するアデノウイルスの約 7 割の loxP サイトを認識し、組換えを起こしたことから FLP により発現誘導を行うことで「遺伝子置換反応」に必要な Cre を発現している可能性が示された。

この様に FLP/FRT 系は Cre/loxP 系と比較して、精度の面では若干劣るものの発現制御系としての応用は可能であると思われる。しかし前述のように至適温度が 30°C であることや組換え効率が Cre と比較して劣っていたため、37°C でも活性を維持することが報告された FLPe への変更を考えた。そこで FLP の codon usage を調べたところ、ヒトとはかなり異なっていたため、より一層の発現上昇を期待して codon usage のヒト型への変更を試みた。温度安定化の為に 4 アミノ酸の置換が必要であり、アミノ酸の置換を伴わないヒト型への codon usage の変更を含めると 1.3kb の FLP 遺伝子中 19% の塩基置換が必要であった。そこで合成オリゴDNA を用いて hFLPe の構築を行った。表ストランド、裏ストランド各々 33 本ずつのオリゴDNA を作製し、3 断片に分割してクローニングし塩基配列を確認後 hFLPe 全長を含むプラスミドを構築した。そこから hFLPe 遺伝子を切り出し組換えアデノウイルス作製用コスミドカセットへ挿入し、hFLPe 発現組換えアデノウイルスを作製



した。またコスミドカセットからhFLPe発現プラスミドを作製し、hFLPeの発現をFLPと比較した。その結果hFLPeの活性はNCreより劣るものの、野生型FLPの約1.5倍の組換え効率を示した。

#### D. 考察

本研究から、FLP/FRT系が第二の発現制御系となりうる可能性が示された。現在のCre/loxP系は非常に精度が高い発現制御系であり、例えば30コピー以上挿入された標的配列を有する細胞株においても全く目的遺伝子のリーク発現は確認されなかった。しかし、今回FLP系ではGFPを目的遺伝子とした場合にはリーク発現は認められなかったものの、非常に活性の高いCreの発現を完全に制御することは出来なかった。これはFRT配列にも問題があると思われるため、今後はより組換え効率が高くしかもリーク発現の少ないFRT配列の検索を行っていく。また本研究で始めてFLPの活性は標的配列周辺の塩基配列の影響を受ける可能性が示唆された。pCAG系の標的プラスミドを用いる場合には今のところ問題はないが、目的遺伝子を挿入後組換え効率の予備的検討が必要であると考え。この様に問題はあっても、今回作製されたhFLPeを用いれば、野生型FLPよりも高い組換え効率が期待される。FLP系が確立すれば、Creと併用して、時期を変えた発現制御（多段階発現制御）が可能となり応用範囲も格段に広がるものと考え。

また本研究で作製した293-FNCre細胞は、これまで報告されていたCre発現293細胞と同程度あるいはそれ以上の組換え効率を有していた。そこで今後はFLPを発現するrecipientアデノウイルスを作製しCreの発現を最大限とした293細胞を用いてguttetベクターの作製を行っていく。1999年に米国で起きた不幸な遺伝子治療による死亡事故の原因は未だ特定されていないが、これからのアデノウイルスベクターの応用範囲の拡大を考えると、アデノウイルスゲノムをほぼ全長除いたウイルスベクター系への移行は重要なテーマであると考え。guttetベクターをCreを用いた「遺伝子置換反応」で容易に作製する方法の確立

を目指して研究を継続していく。

#### E. 結論

平成11年度は、Cre/loxP系による「遺伝子置換反応」を用いたguttetベクター作製法の確立の為に必須であるCreを高発現する293細胞の樹立化を行った。その過程で、Creを発現制御する必要性があったため第2の発現制御系であるFLP/FRT系の検討も行った。またFLPはCreと比較して組換え効率が約1/30であったため、「ヒト型・温度安定型FLPe(hFLPe)」を構築した。このhFLPeは野生型FLPよりも1.5倍以上高い組換え効率を示した。またFLP系でCreを高発現する293細胞を確立し、293細胞内で1万コピーまで増幅するアデノウイルスゲノム上の約7割のloxPサイトの組換えに成功した。今後はこの293-FNCre細胞を用いてguttetベクター作製法を確立するとともに、hFLPeとCreを併用した「多段階発現制御系」の検討を加えていく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Bilbao, G., Zhang, H., Contreras, J. L., Zhou, T., Feng, M., Saito, I., Mountz, J. D., and Curiel, D. T. Construction of a recombinant adenovirus vector encoding Fas ligand with a CRE/Loxp inducible system, *Transplant Proc.* 31: 792-3, 1999.
- 2) Chiba, T., Kogishi, K., Wang, J., Xia, C., Matsushita, T., Miyazaki, J., Saito, I., Hosokawa, M., and Higuchi, K. Mouse senile amyloid deposition is suppressed by adenovirus-mediated overexpression of amyloid-resistant apolipoprotein A-II, *Am J Pathol.* 155: 1319-26, 1999.
- 3) Ishii, A., Hagiwara, Y., Saito, Y., Yamamoto, K., Yuasa, K., Sato, Y., Arahata, K., Shoji, S., Nonaka, I., Saito, I., Nabeshima, Y., and Takeda, S. Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle, *Muscle Nerve.* 22: 592-9, 1999.
- 4) Nagasaki, Y., Matsubara, Y., Takano, H., Fujii, K., Senoo, M., Akanuma, J., Takahashi, K., Kure, S.,



- Hara, M., Kanegae, Y., Saito, I., and Narisawa, K. Reversal of hypopigmentation in phenylketonuria mice by adenovirus-mediated gene transfer, *Pediatr Res.* 45: 465-73, 1999.
- 5) Nakamura, T., Akiyoshi, H., Saito, I., and Sato, K. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers, *J Hepatol.* 30: 101-6, 1999.
- 6) Ogasawara, Y., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Kanegae, Y., Saito, I., Monahan, J., and Ozawa, K. Highly regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre/loxP switching system, *J Gen Virol.* 80: 2477-80, 1999.
- 7) Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Moriya, K., Fujie, H., Tsutsumi, T., Kanegae, Y., Kimura, S., Saito, I., and Koike, K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system, *J Gen Virol.* 80: 3257-65, 1999.
- 8) Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I., and Ozawa, S. Postsynaptic expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA-type glutamate receptor channels by viral-mediated gene transfer, *Brain Res Mol Brain Res.* 65: 176-85, 1999.
- 9) Yamabe, K., Shimizu, S., Ito, T., Yoshioka, Y., Nomura, M., Narita, M., Saito, I., Kanegae, Y., and Matsuda, H. Cancer gene therapy using a pro-apoptotic gene, caspase-3, *Gene Ther.* 6: 1952-9, 1999.
2. 学会発表
- 1) 斎藤 泉。 癌遺伝子治療の新展開 第25回日本医学会総会、東京 (1999)
- 2) 斎藤 泉、石村正和、中野正和、鐘ヶ江裕美、千葉 丈。 遺伝子治療における標的特異性 第58回日本癌学会総会、広島 (1999)
- 3) 中野正和、岡戸嘉成、小高和彦、鐘ヶ江裕美、熊沢義雄、千葉 丈、斎藤 泉。 部位特異的組換え酵素FLP/FRT系を用いた多段階発現制御系の検討 第58回日本癌学会総会、広島 (1999)
- 4) 鐘ヶ江裕美、石村正和、岡戸嘉成、小高和彦、熊沢義雄、千葉 丈、斎藤 泉。 「遺伝弛緩反応」を応用したウイルスベクター作製系の検討 第47回日本ウイルス学会学術集会、横浜 (1999)
- 5) 中野正和、石村正和、近藤小貴、水本清久、千葉 丈、鐘ヶ江裕美、斎藤 泉。 部位特異的組換え酵素FLP発現アデノウイルスベクターを用いた多段階発現制御系の検討 第47回日本ウイルス学会学術集会、横浜 (1999)
- 6) 鐘ヶ江裕美、近藤小貴、石村正和、岡戸嘉成、中野正和、千葉 丈、水本清久、斎藤 泉。 部位特異的組換え酵素FLPによる動物細胞内発現ON/OFF制御系:FLP活性の検討 第22回日本分子生物学会年会、福岡 (1999)
- 7) 石村正和、中野正和、近藤小貴、千葉 丈、鐘ヶ江裕美、斎藤 泉。 部位特異的組換え酵素FLP/FRT系を用いた発現制御系の精度の検討 第22回日本分子生物学会年会、福岡 (1999)
- 8) Kanegae, Y., Ishimura M., Odaka, K., Sato, Y., Chiba, J. and Saito, I. Growth property of helper adenovirus bearing a pair of loxP sequences flanking the viral packaging signal. The American Society of Gene Therapy 2<sup>nd</sup> Annual Meeting, Washington, DC. (1999)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
- 1) 平成11年12月6日、変異型FRT配列を含有してなるDNA、斎藤 泉、鐘ヶ江裕美、特願平11-346727
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし



## 研究要旨

難治性の癌に対する遺伝子治療法の開発を目的として、腫瘍の特異的標的化が可能な遺伝子治療のベクター開発を目指した。p53を初めとした各種アポトーシス関連遺伝子の殺細胞効果を検討して、有効な殺細胞療法の基本データを得ることができた。また、p53の異常を標的とした制限増殖が可能なアデノウイルス、特定の細胞に高い遺伝子導入が可能なキャプシド変異型アデノウイルスベクターなどを作成し有用性を示すことができた。

### A. 研究目的

本研究では、腫瘍の特異的な標的化を目指した遺伝子治療の基本研究を目的とする。具体的には、a) アポトーシス関連遺伝子・細胞周期関連遺伝子・腫瘍抑制遺伝子などを高発現するアデノウイルスベクターを用いて、腫瘍特異的な細胞傷害誘導療法を開発する。b) E1B55K欠失アデノウイルスなどを用いて、p53に変異を持つ腫瘍細胞に特異的な遺伝子治療法を開発する。c) 癌細胞の特異的標的化が可能な変異アデノウイルスベクターを開発し、さらに、上記のa) b)の方法とを組み合わせることで腫瘍特異性と治療効果を高めることを目標とする。

### B. 研究方法

a. アポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、腫瘍抑制遺伝子などを高発現するアデノウイルスベクターを作成する。これを用いて、各種組織由来の腫瘍に特徴的なアポトーシス耐性の分子メカニズムを解析する。さらにその結果に基づいて、腫瘍特異的なアポトーシス誘導療法を開発する。  
b. 腫瘍抑制遺伝子p53などの変異を利用して、腫瘍細胞に特異的な遺伝子治療法を開発する。特に、E1B55K欠失アデノウイルス (AxE1AdB)が、p53欠失細胞だけで増殖可能であることを利用して、自殺遺伝子導入療法やサイトカイン遺伝子導入による免疫強化療法などの腫瘍に対して細胞傷害を得る手段をいくつか組み合わせた効果的な治療法を開発する。  
c. 細胞側の受容体分子との吸着を担うファイバー・ノブ・タンパクに変異を導入することによって、癌細胞の特異的標的化が可能な変異アデノウイルスベクターを開発する。これと、上記のa、bの方法とを組み合わせることで腫瘍特異性と治療効果を高める。

### C. 研究結果

a. アポトーシス誘導療法：

アデノウイルスベクターを用いた Fas/TNF関連遺伝子による遺伝子治療の検討のまとめを箇条書きとする。

a) Fas ligand/Fasは脳腫瘍に強いアポトーシスを誘導した。

b) アポトーシス遺伝子発現Advの作製法を樹立した。

c) TNFとIkB $\alpha$ Nの併用で強いアポトーシスが誘導された。

b. 腫瘍抑制遺伝子p53などの変異の利用：

E1B55K欠失アデノウイルス (AxE1AdB) の治療効果：p53欠失細胞だけで強く増殖すると考えられる組み換えアデノウイルスAxE1AdBを作成した。これを膀胱癌細胞あるいはグリオーマ細胞に感染させたところ、*in vitro*で非常に強い殺細胞効果と50~3000倍ものウイルスの増殖が得られた。この制限増殖型のアデノウイルスをヒトIL2の発現アデノウイルスとを組み合わせると、ヌードマウス皮下腫瘍治療モデルで著明な治療効果を得た。

c. 変異アデノウイルスの作成：

癌細胞の標的化が可能な変異アデノウイルスベクター、Adv-F/MSH、Adv-F/GRP、Adv-F/RGD、Adv-F40Sなどを作成し、解析を行った。悪性黒色腫、口腔癌などでは、アデノウイルスの受容体CARの発現がきわめて低く、従来型のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入効率が非常に低い。これに対し、メラノサイト刺激ホルモン(MSH)を融合させたF/MSH変異ウイルスは、ヒト悪性黒色腫に従来型よりも十倍程度高い遺伝子導入効率を示した。ガストリン放出ペプチド(GRP)を融合させたF/GRP変異ウイルスは、GRP受容体を高発現するヒト前立腺癌などに高い遺伝子導入効率を示した。一方、インテグリンを標的としたRGDモチーフをファイバーのHIループに含むF/RGDウイルスを用いると、悪性黒色腫、口腔の扁平上皮癌などに従来型に比べて数十倍高い遺伝子導入効率が見られることがわかり、臨床への応用が有望である。また、通常用いら



れるヒト5型アデノウイルス (Ad5) のファイバーのみを40型の短ファイバーに置き換えたAdv-F40Sベクターは、Ad5のファイバーの受容体CARと結合しない。現在、Adv-F40Sベクターをベースとして各種のリガンドとの組み合わせによって、宿主細胞域の狭まった特異性の高い「がん標的化ウイルスベクター」の作成を目指している。

#### D. 考察

ここで作られたベクターが臨床研究を経て実用化されれば、遺伝子治療の新しい道具として、社会的にも貢献できる可能性が開けた。a) アポトーシス関連遺伝子のアデノウイルスベクターによる解析で、どのような遺伝子を発現させればより効果的に腫瘍細胞を殺すことができるか、理解することができた。今後は、癌細胞のアポトーシス耐性のメカニズムを分子レベルで解析してゆき、その理解にもとづいた治療ストラテジーを開発することが大切である。b) E1B55K欠失アデノウイルス (AxE1AdB) の治療効果に関しては、今後スキッドマウス移植腫瘍のモデルを用いて検討を進めてゆきたい。欧米でも臨床治験が開始されているが、私たちも臨床研究の用意のための基礎的な検討を進めてゆきたい。c) キャプシド変異型アデノウイルスなどの遺伝子導入効率の高いベクターを開発して、免疫療法や細胞傷害誘導療法などと組み合わせることによって、臨床への応用を目指してゆきたい。悪性神経膠腫の治療に有望なF/K20型変異アデノウイルスについて臨床研究への適用を目指した前臨床研究を進める。今後さらに、アデノウイルスのファイバーとペントンベースを改変し、宿主域の拡張と制限、反復投与の可能性、などについて検討してゆきたい。

#### E. 結論

難治性の癌に対する遺伝子治療法の開発を目的として、腫瘍の特異的標的化が可能な遺伝子治療のベクター開発を目指した。p53を初めとした各種アポトーシス関連遺伝子の殺細胞効果を検討して、有効な殺細胞療法の基礎データを得ることができた。また、p53の異常を標的とした制限増殖が可能なアデノウイルス、特定の細胞に高い遺伝子導入が可能なキャプシド変異型アデノウイルスベクターなどを作成し、in vitro & in vivo で有用性を示すことができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 発表論文

1. Matsumoto, G., Sunamura, M., Shimamura, H., Kodama, T., Hashimoto, W., Kobari, M., Kato, K.,

Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Hamada, H., and Matsuno, S. Adjuvant immunotherapy using genetically engineered interleukin 12 secreting fibroblasts prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery*, 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. In vitro circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene. *Jp. J. Cancer Res.*, 90(3): 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-XL 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 1999.



10. Caplen, NJ, Higginbotham, JN, Scheel, 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. 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.* Eur J Immunol. 29(12):4081-4091., 1999.
17. 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 p33ING with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* 59(21):5521-5528, 1999.
18. 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.
19. 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.
20. Asai, A., Shinoura, N., Hamada, H., et al. and Kirino, T., High-level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* in press, 1999.
21. Shinoura et al. and Hamada, H. Adenovirus-mediated gene transduction of I $\kappa$ B or I $\kappa$ B plus Bax drastically enhance tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jp. J. Cancer Res.* in press, 1999.
22. 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.* (JECRCR) in press, 1999.
23. 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, 1999.
24. 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, 1999.
25. 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.* in press, 1999.
26. 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), in press 2000.
27. Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated