

transfer of Bcl-x1 protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 254(2): 221-231, 2000.

28. Narita, M., Takanaga, K., Yoshida, Y., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Hamada, H., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.: Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res.* in press 2000.

29. Qiu, JH, Asai, A, Chi, S., Saito, N., Hamada, H., and Kirino, T. Protease inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neuroscience* 20 (1): 259-265, 2000.

30. Kobayashi, T., Okamoto, Nakazawa, M., K., Kobata, T., Hasunuma, T., Kato, T., Hamada, H., and Nishioka, K. Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer: Induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes. *Gene Ther.* in press. 2000.

31. Kasaoka, Y., Nakamoto, T., Wang, J., Usui, T., and Hamada, H. Gene therapy for murine renal cell carcinoma using Genetically engineered tumor cells to secrete interleukin-12. *Hiroshima J. Med. Sci.* in press, 2000.

32. Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H. Ohmoto T Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 11(1):77-89, 2000.

33. Kobayashi, T., Okamoto, K., Kobata, T., Hasunuma, T., Kato, T., Hamada, H., and Nishioka, K. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by TNF α and bFGF is associated with the expression of apoptosis-related molecules. *Arthritis & Rheumatism* in press. 2000.

34. Wang, J., Nakamoto, T., Kasaoka, Y., Usui, T., and Hamada, H. Antitumor effect of murine renal cell carcinoma cells genetically modified to express B7-1 combined with cytokines secreting fibroblasts. *Hiroshima J. Med. Sci.* in press, 2000.

35. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand Induces drastic apoptosis In U373MG glioma cells. *Exp. Cell Res.* in press, 2000.

36. Koyama, F., Sawada, H., Hirao, T., Fujii, H., Hamada, H., and Nakano, H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther.* in press, 2000.

37. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, in press, 2000.

分担研究報告書

アテロコラーゲンによる成体への新規遺伝子導入法の開発

分担研究者 落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室長

研究要旨 本研究の全体的目的は遺伝子導入技術に基づく難治がん及び進行がんに対する新たな遺伝子治療の開発を目指す基礎研究を行うことにある。既にこれまでの研究成果によりプラスミドベクターを成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を開発した。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。

A. 研究目的

本研究の目的は難治がん及び進行期がんを対象とし、*in vivo*で直接治療遺伝子を標的細胞に導入する方法に基づく遺伝子治療の確立を目標とした基盤的研究を行うことにある。現在がんの遺伝子治療の戦略としては免疫遺伝子治療、自殺遺伝子治療、がんの遺伝子異常に拮抗する治療法などが主なものである。このなかでがんの遺伝子異常の機能的または構造的修復を狙う戦略の研究は近年急速に進むがんの遺伝子異常の解析とゲノムプロジェクトにより、がんの治療法として大きな期待を集めている。この場合の遺伝子導入ベクターとしては、汎用されているウイルスベクター以外に、裸の、もしくはカチオン性リポソーム等で修飾されたプラスミドベクターが有力視されている。しかし、プラスミドベクターの場合、その効力はもちろんのこと、投与方法など、実際の臨床で用いる場合の多くの問題はクリアーされていない。特に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ストップするための工夫は不十分である。本研究の本年度の目的は、プラスミドベクターを生体親和材料であるキャリアに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し、我々の開発したミニペレットによる遺伝子導入方法が安全な遺伝子導入法となりうるかどうかを検討することにある。さらに、ミニペレットの臨床の場での実用性を考えて、どの様な添加物が遺伝しベクターの安定性に寄与するかを詳細に検討した。

B. 研究方法

プラスミドベクターとしては、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子やヒトHST-1 (FGF4)遺伝子を組み込んだものを、導入方法は既に本研究で成果の上があったアテロコラーゲンをキャリアとするミニペレットの筋肉内投与、あるいは皮下投与を選択した。ミニペ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ペ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。動物の扱いは国立がんセンター研究所の定める動物取扱規定に従った。

C. 研究結果

(1) まず、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 μ 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℃においてニックなどが入る構造変化は認められず、数カ月間は安定に存在した。またこの安静性保持には糖類（例えばグルコースなど）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。

(2) このヒト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インプラントし、それを3日後、1週間後、2週間後、さらに1ヶ月後に外科的手術により物理的な除去を試みた。まずこの筋肉内に包埋された状態のミニペレットは成分分解を受けるとともにプラスミドベクターを放出し、注入された部位の筋肉細胞に導入されたり、または血流に乗り全身に運ばれ、筋肉にインプラント後、およそ3日で遺伝子発現と生物活性発現が確認された。このミニペレットは、3日、あるいは1週間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。皮下にインプラントした場合、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週間後も完全な除去が可能であった。

D. 考察

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ストップするシステムが必要である。本研究では、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に内包させたミニペレットの形で生体内に導入し、さらにこのインプラントは、導入後1週間以内であれば外科的に生体内より摘出することが可能であることから、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ペレットを生分解性を持たないシリコン等のマテリアルと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めざす。また、糖類や塩基性アミノ酸類がミニペレット中の遺伝子ベクターの安定化に寄与することが判明したが、これは、今後遺伝子ベクターを様々なバイオマテリアルと融合し、実際の使用に併せて手術室などの臨床の場に持ち込む際に、その形状を安定に保つ上で重要な知見となるものと思われる。

E. 結論

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、生体への遺伝子ベクターのデリバリーをより安全なものにする可能性が生まれた。今後は完全な除去が出来る工夫を重ねる必要がある。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添加物（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）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

1. Masutani M., Ochiya T., et al., Poly(ADP-ribose) polymerase gene-disruption conferred mice resistant to streptozocin-induced diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 2301-2304 (1999).
2. Grako K. A., Ochiya T., et al., PDGF α -receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. J Cell Sci. 112, 905-915 (1999).
3. Ochiya T. and Terada M. Antisense approaches to *in vitro* organ culture. ANTISENSE TECHNOLOGY, edited by M. Ian Pastan. Methods in Enzymology, 314: 401-411 (1999).
4. Ochiya T., et al., Evaluation of cationic liposome suitable for gene transfer into pregnant animals. Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 358-365 (1999).
5. Ochiya T., et al., New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. Nature Med. 5, 707-710 (1999).
6. Nezu M., Ochiya T., et al. Identification of a novel promoter of the *c-ERBB-2* gene and a novel amplified gene in a core amplified region of the 17q12 locus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 258, 499-505 (1999).
7. Takahama Y., Ochiya T., et al., Adenovirus-mediated transfer of HST-1/FGF-4 gene protects mice from lethal irradiation. Oncogene, 18, 5943-5947 (1999).
8. Nozaki T., Ochiya T., et al., Syncytiotrophoblastic giant cells in teratocarcinoma-like tumors derived from *Perp*-disrupted mouse embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96,

13345-13350 (1999).

9. Asamot M., Ochiya T., et al., Transgenic rats carrying human *c-Ha-ras* proto-oncogenes are highly susceptible to N-methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. Carcinogenesis, 21, 243-249 (2000).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「遺伝子製剤」

オーストラリア、ニュージーランドにおける国際特許成立（平成11年）

米国・欧州審査中

「安定な遺伝子製剤」

平成10年5月22日国内特許出願、

平成12年3月現在、国際予備審査対応中

「オリゴヌクレオチド製剤」

平成12年3月国内特許出願