

Fig. 8 OVA-specific CTL responses in mice immunized with Ad-OVA or AdRGD-OVA-infected DC2.4 cells. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of 1×10^6 DC2.4 cells transduced by Ad-OVA (○), AdRGD-OVA (●), or AdRGD-LacZ (■). Similarly, intact DC2.4 cells (□) were intradermally injected into mice. One week later, mice were sacrificed, their spleens were removed, and splenocytes were prepared. After *in vitro* restimulation with E.G7-OVA cells for 5 days, cytotoxic effects of splenocytes against E.G7-OVA cells or EL4 cells were evaluated by Eu-release assay. Each point represents the mean \pm SE of 3-5 mice.

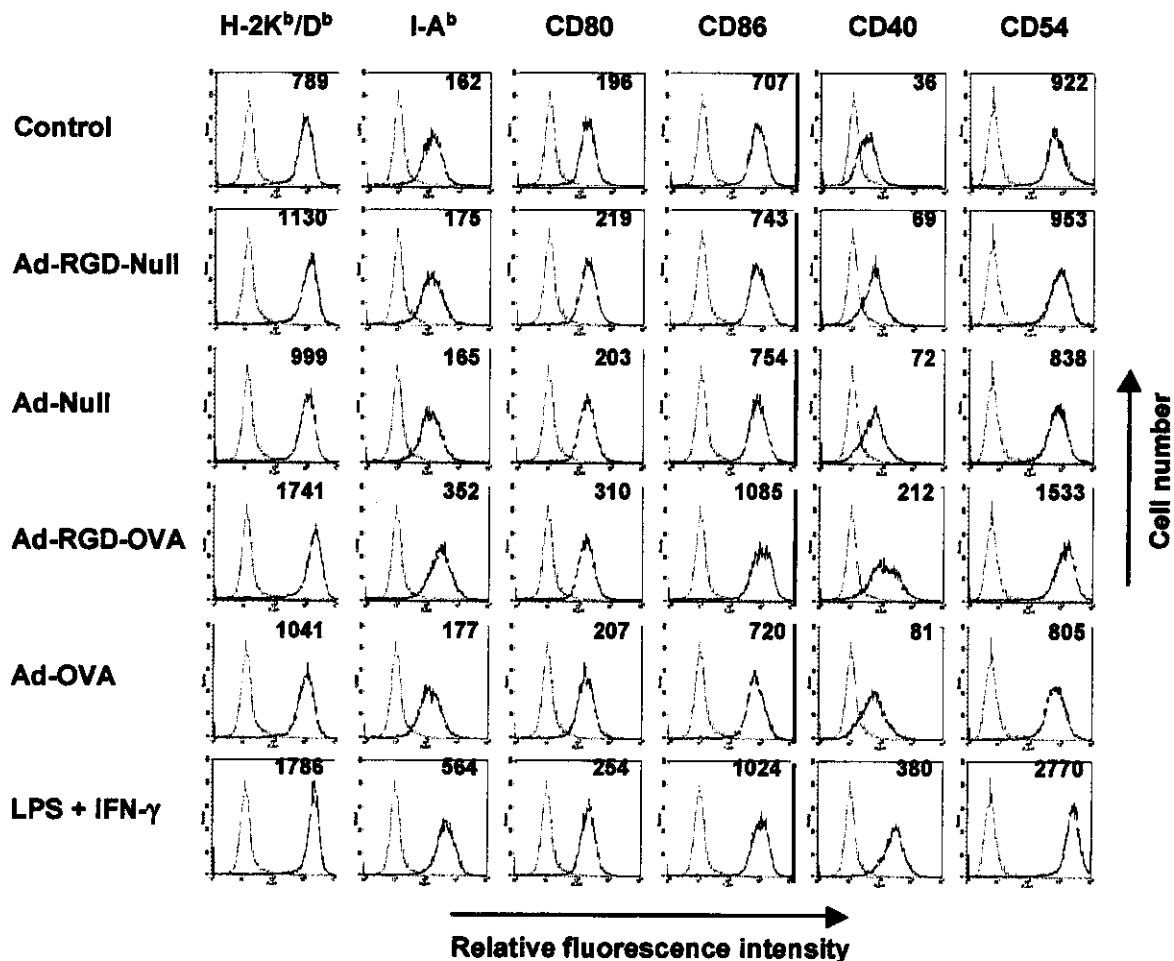


Fig. 9 Immunofluorescence analysis of Ad-infected DC2.4 cells. DC2.4 cells were infected with AdRGD-Null, Ad-Null, Ad-OVA, or AdRGD-OVA at 4000 vector particles/cell for 1.5 hr. DC2.4 cells treated with 10 μ g/ml LPS plus 100 units/ml IFN- γ for 24 hr were used as positive controls for phenotypical DC maturation. At 24 hr after infection, cells were stained by indirect immunofluorescence using biotinylated monoclonal antibodies of the indicated specificities followed by PE-conjugated streptavidin. Dotted lines represent cells stained by PE-conjugated streptavidin only. Value in the upper right-hand corner of each panel represents the mean fluorescence intensity in flow cytometry analysis in the presence of specific antibodies.

Table 3. Summary of anti-E.G7-OVA tumor effect by immunization with DC2.4 cells infected with AdRGD-OVA or Ad-OVA

Ad-treatment for DC2.4 cells (vector particles/cell)	Number of administered DC2.4 cells	Tumor volume (mm ³) ^{a)}		Tumor-free mice ^{b)}
AdRGD-OVA (4000)	1×10 ⁶	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (4000)	1×10 ⁵	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (1000)	1×10 ⁶	17.0 ±	11.1	4/6
Ad-OVA (4000)	1×10 ⁶	20.4 ±	16.2	4/6
Ad-OVA (4000)	1×10 ⁵	72.6 ±	30.3	0/6
Ad-OVA (1000)	1×10 ⁶	48.4 ±	19.2	1/6
—	1×10 ⁶	144.8 ±	48.2	0/6

^{a)} : Day 9 after tumor challenge, tumor volume (mm³) = (major axis) Å~(minor axis)² Å~0.5236. Data are presented as means Å} SE of 6 mice.

^{b)} : Day 21 after tumor challenge, (tumor-free mice)/(tumor-challenged mice).

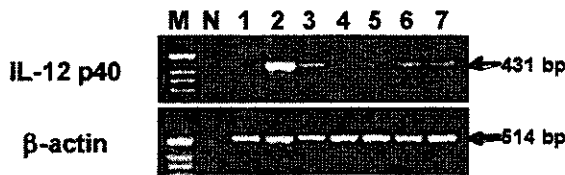


Fig. 10 RT-PCR analysis of murine IL-12 p40 in Ad-infected DC2.4 cells. DC2.4 cells were infected with four types of Ad at 4000 vector particles/cell, and then cultured for 24 h. Lane M: 100 bp molecular ruler, lane N: PCR using water as template, lane 1: RT-PCR from intact DC2.4 cells, lane 2: RT-PCR from B16/EMC cells (murine IL-12 transfectant), lane 3: RT-PCR from DC2.4 cells after treatment with LPS for 24 h, lane 4: RT-PCR from Ad-Null-infected DC2.4 cells, lane 5: RT-PCR from AdRGD-Null-infected DC2.4 cells, lane 6: RT-PCR from Ad-OVA-infected DC2.4 cells, lane 7: RT-PCR from AdRGD-OVA-infected DC2.4

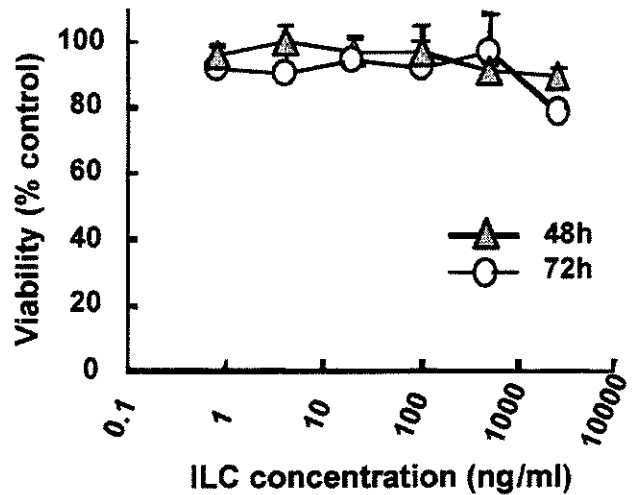


Fig. 12 ILC have no effect on OV-HM cells proliferation. OV-HM cells were cultured with rILC for 48 hr or 72 hr. The cell viability was evaluated by MTT assay. Each point represents the mean Å} SD.

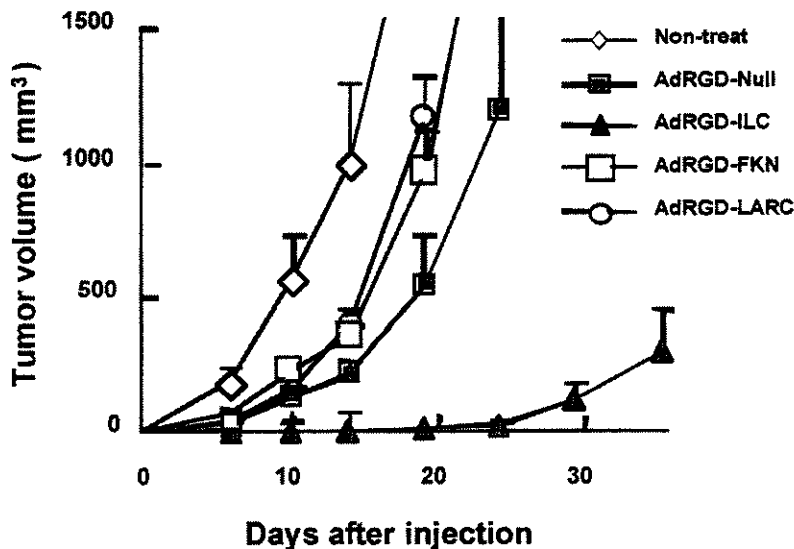


Fig. 11 Tumor growth of OV-HM tumor cells transfected by adenovirus encoding each chemokine in B6C3F1 mice. OV-HM tumor cells were infected at a MOI of 10 with Adenovirus encoding indicated chemokines. After 24 hr, 1×10⁶ cells were injected intradermally to B6C3F1 mice. Tumor size were measured at indicated time and values are expressed as means Å} SE of at least four mice.

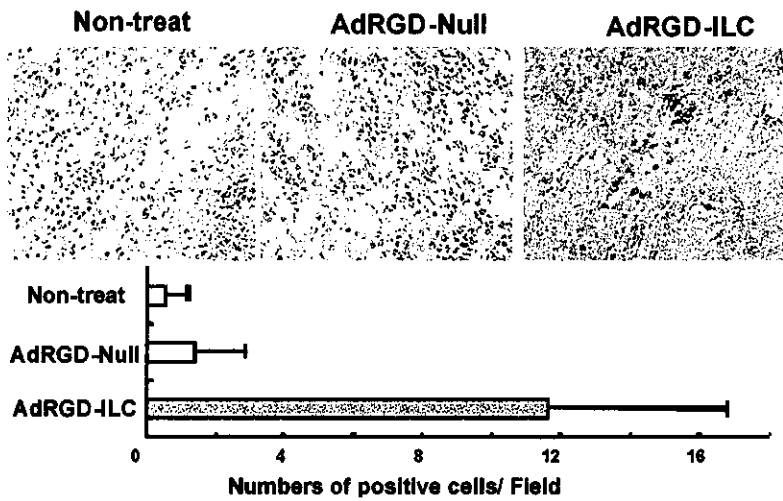


Fig. 13 CD3 positive lymphocyte infiltrate into ILC transfected OV-HM tumor. Cryostat sections from frozen tumor nodules from B6C3F1 mice (day2) were immunostained in three step with biotin, streptavidine, and horseradish-peroxidase after endogeneous peroxidase inhibition with 0.3% H₂O₂.

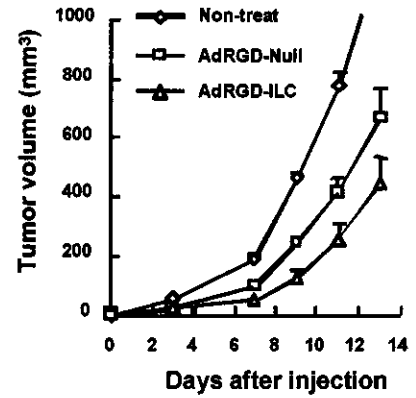


Fig. 14 Tumor growth of OV-HM tumor cells transfected by adenovirus encoding ILC in Balb/c nude mice. OV-HM tumor cells were infected at a MOI of 10 with AdRGD-Null or AdRGD-ILC. After 24 hr, 1 × 10⁶ cells were injected intradermally to Balb/c nude mice. Tumor size were measured at indicated time and values are expressed as mean ± SE of five mice.

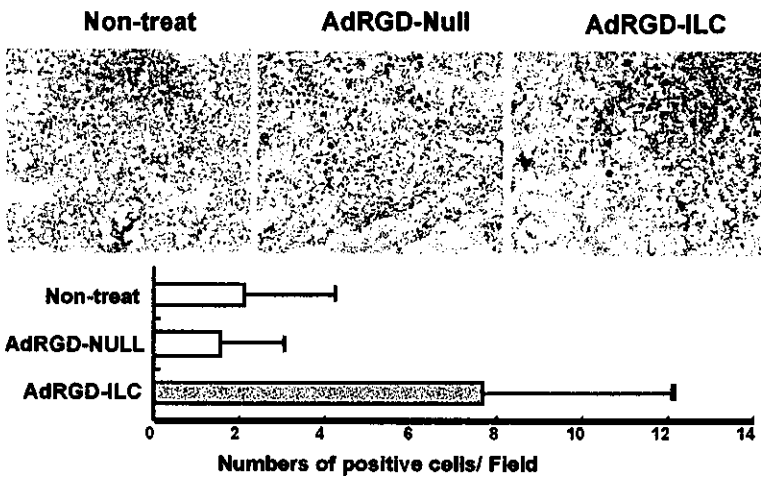


Fig. 15 NK cells infiltrate into ILC transfected OV-HM tumor. Cryostat sections from frozen tumor nodules from B6C3F1 mice (day2) were immunostained in three step with biotin, streptavidine, and horseradish-peroxidase after endogeneous peroxidase inhibition with 0.3% H₂O₂.

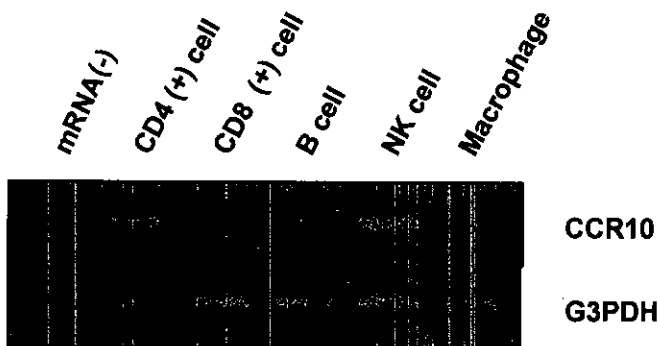


Fig. 16 RT-PCR analysis of mCCR10 expression in spleen cells. Total RNA was isolated from CD4(+), CD(8), B, NK and macrophage, and then RT-PCR was performed.

分担研究報告書

次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

分担研究者 中西真人

産業技術総合研究所・ジーンディスカバリー研究センター・主任研究員
大阪大学・微生物病研究所・免疫・生体防御部門・助教授

研究要旨

遺伝子治療の安全性を確保するための新しい遺伝子導入ベクターであるハイブリッドベクターの開発を目指して、本年度は以下の項目について研究を行い、所定の成果を得た。

1. 導入遺伝子を核内に送達するための技術開発
2. 導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発
3. 細胞質で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発
4. 癌細胞特異的致死遺伝子の開発と遺伝子治療への応用
5. 膜融合リポソームの経門脈肝投与条件の検討

A. 研究目的

遺伝子治療の最初の臨床研究から既に10年以上の月日が経過したが、まだ当初期待されていたような成果を得るに至っていない。その最大の原因として、遺伝子導入・発現の技術が未完成であることが挙げられている。この傾向は、特に非ウイルスベクターの研究分野で著しく、研究は表層的・現象的な部分の解析に偏りがちで、遺伝子導入や発現の生物学的な原理の解明とその応用は世界的に見てもまだ大きく立ち後れている。しかし、将来の遺伝子治療の実用化に当たっては、これらの課題を解決した上に立って新たな方向性を示すことが非常に重要だと考えられる。さらに付け加えるなら、我が国の非ウイルス型遺伝子導入発現ベクターの開発はまだ萌芽的段階に留まっており、今後、我が国において遺伝子治療の実用化を図る際に、この遅れが大きな障害となり得る可能性も指摘されている。

このような状況を背景として、本研究では、安全性と効率を兼ね備えた遺伝子導

入・発現系としてこれまで我々が提案してきたハイブリッドベクター（動物のウイルスや染色体の持つベクターとしての有用な機能を抽出して、大量生産可能な素材でその機能を再現する非ウイルスベクター）の開発・実用化を最終目標にすえ、この目標を達成するための技術基盤を確立することを目的としている。本年度は、遺伝子を安定に保持するためのDNAやRNAのプラットフォームの開発と、これらのプラットフォームが機能を維持するために必要なデリバリーシステムの開発、及び現段階で最も臨床応用に近いと思われるハイブリッドベクターを使った癌の遺伝子治療について、新しい知見を得ることを目指した。

B. 研究方法

1) 組換えファージの作成

頭部に核移行シグナルペプチドを呈示し、かつ動物細胞で検出できるマーカー（ルシフェラーゼやGreen Fluorescent Protein (GFP)) 遺伝子をゲノムDNAの一部として

組み込んだラムダファージ (NLS ファージ) は、パッケージング大腸菌D1180を使って調製した。D1180株は、一部を欠失したラムダファージの right arm 及び left arm と、CMV プロモーターでドライブされたマーカー遺伝子断片とを接続して大腸菌DH10Bに導入し、同DNAを溶原化した菌を単離することによって作成した。D1180株に挿入されているラムダファージ・ゲノムはD遺伝子に amber 変異を持つが、DH10Bの遺伝子型は suppressor tRNA 不含(Sup^o) であるためこの株はDタンパク質を作ることができない。一方、D1180株大腸菌に組み込まれたファージゲノムにはcI遺伝子に温度感受性変異があるため、この菌を高温(45°C, 25 min) で培養することによりファージDNAの複製とファージの構造タンパク質の発現が誘導される。高温培養時に、核移行シグナルとDタンパク質との融合タンパク質をIPTGによって発現誘導することにより、NLSファージ粒子を回収した。対照としては、Dタンパク質をD1180株で発現させて調製した野生型頭部を持つファージ(Wildファージ)を使用した。組換えファージ粒子は塩化セシウム密度勾配法で精製し、ペプチドの呈示は抗核移行シグナルペプチド抗体によるタンパク質ブロッティングと免疫沈降法で確認した。ファージ粒子数は大腸菌LE392株を用いた標準的なプラークアッセイによった。タンパク質およびDNA量から推定した粒子数(pfu)は、プラーク法で測定した粒子数とほぼ一致する。最終的な収率は培養液10リットルあたり10¹¹粒子であった。

2) 核へのDNAのターゲティング活性の検定

ファージ粒子の核への能動的移行活性は、2つの方法で検定した。1つは、従来用いてきたマイクロインジェクション法で、10¹² pfu/ml に調製した組換えファージをヒト胎児肺由来線維芽細胞HEL細胞の細胞質にエッペンドルフ社のセミ・オートマチック・インジェクターを使って導入し、37°C 30 min の培養後に固定して観察した。もう1つは、コレステロールを選択的に可溶化することができる Digitonin (40 µg/ml)

で処理して核膜を傷つけずに細胞膜の障壁を取り除いた Semi-intact 細胞と、エールリッヒ腹水癌細胞の細胞質抽出液から再構成した *in vitro* transport assay で、組換えファージは細胞質抽出液と混合して Semi-intact 細胞に加え、30°C 30 min の反応後に固定して観察した。エールリッヒ腹水癌細胞の細胞質抽出液は、緩衝液 A (10 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 110 mM K-acetate, 2 mM Mg acetate, 2 mM DTT) で洗浄した細胞を、2倍容の低張の緩衝液 B (5 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 10 mM K acetate, 2 mM Mg acetate, 2 mM DTT, 20 µM cytochalasin B, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) を加えて氷温で 10 min 置いた後、タイトなホモゲナイザーで7回破壊し、100,000 rpm 30 min の遠心上清を回収して調製した。この上清はさらに、緩衝液 C (20 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 110 mM K acetate, 5 mM Na acetate, 5 mM Mg acetate, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) に透析し、急速凍結して -80°C で保存した。*In vitro* assay では、陰性コントロールとして、a) 0.5 mg/ml Wheat germ agglutinin (WGA) を加えたもの、b) 細胞質抽出液を加えないもの、の2つの条件を置いて、反応の特異性を検討した。WGA は核膜孔を構成するタンパク質に結合してタンパク質の核移行を阻害することが知られている。

3) 組換えファージ粒子の細胞内動態の観察

マイクロインジェクション法や *in vitro* transport assay でファージ粒子の細胞内での局在を観察するためには、3つの方法を用いた。1つは通常の間接蛍光抗体法で、GST-E 融合タンパク質として調製した E タンパク質をウサギに免疫し、抗原を使ったアフィニティークロマトグラフィーで精製したポリクローナル抗体を一次抗体として使用した。2つ目は DNA 染色で標識したファージ粒子を使う方法で、ファージ粒子を 500 倍希釈した SYBR Green (Molecular Probe 社) で染色した後、塩化セシウム密度勾配法で精製して過剰量の色素を除いてから使用した。3つ目は、透過型電子顕微鏡

による観察で、この研究は関西医科大学・生理学教室の山本章嗣博士との共同研究である。組換えファージをマイクロインジェクションしたHEL細胞を37°C 30 min 培養後、2.5% glutaraldehyde (in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)で固定し、さらに四酸化オスミウム固定・酢酸ウラニル染色を施してから、エポキシ樹脂に包埋し、切片としてから観察した。

4) TRF1を過剰発現したヒト初代培養線維芽細胞の染色体の安定性の解析

TRF1 強発現ベクターは、CMV enhancer/chicken beta-actin promoter の下流に TRF1 cDNA (ロックフェラー大学の Dr. de Lange より分与された)を接続して作成した。このベクターに G418 耐性遺伝子を組み込み、LipofectAmine plus 試薬を用いて、ヒト初代培養線維芽細胞 TIG-3 株に導入してから、G418 で選択して、TRF1 強発現細胞株を得た。TRF1 量は、baculovirus で作成した組換え TRF1 をウサギに免役して得たポリクローナル抗体をプローブとしたタンパク質ブロッティングと、同じ抗体を使った間接蛍光抗体法で推定した。対照群としては、G418耐性遺伝子だけを導入した細胞株を使用した。細胞の分裂寿命は細胞数を Courter counter で測定して決定した。また細胞老化の指標として Senescence-associated (SA) beta-galactosidase を用い、細胞を固定して galactosidase の発色基質である X-gal で染色してその活性を検討した。

5) 温度感受性持続感染変異センドライウイルス cl. 151 株のゲノム cDNA の単離

Cl. 151 株及び変異を持たない野生型親株 (名古屋株) センドライウイルスは、それぞれ 32°C と 35.5°C で孵化鶏卵を使って増殖させ、15,000 rpm 30 min の遠心で沈渣とした後、20%/50% の蔗糖ステップ遠心法で精製して、RNA 分解酵素を完全に除去した。ウイルス粒子は 10 容の 4 M Guanidine isothiocyanate, 0.5% sodium lauryl sarcosinate, 1% beta-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 を加えて破壊した後、5.7 M CsCl, 10 mM EDTA, pH 7.5 のクッションの上に重層して、32,000 rpm 24 h の超遠心で RNA を沈渣とし

て回収した。回収した RNA は変性アガロースゲル電気泳動で無傷であることを確認した。ゲノム RNA の 5' および 3' 末端の一次構造は、40 mer の配列決定用オリゴDNA を RNA の両端に T4 RNA ligase で共有結合したあと、22 mer のプライマーを使って点突然変異を持つ MMTV reversetranscriptase による逆転写反応と KOD DNA polymerase を使った高忠実度 polymerase chain reaction で回収した約 300 bp の DNA フラグメントの塩基配列を解析して決定した。

6) テロメラーゼ触媒サブユニット (TERT) プロモーターを使ったキメラ遺伝子の作成

TERT 遺伝子上流のプロモーター領域 3400 bp を含む DNA 断片は、金沢大学医学部の京哲博士より分与された。制限酵素により転写開始点を含む 400 bp および 1300 bp の DNA 断片を回収し、これを (1) Fire fly Luciferase cDNA, (2) Degenerin cDNA, (3) CRM22 cDNA (mutant diphtheria toxin, correspond to fragment A) の上流に接続した。遺伝子の下流には SV40 の後期転写終結シグナルを挿入して発現ベクターを構築した。TERT プロモーターの活性は、テロメラーゼ陽性の不死化細胞 (HeLa, HT1080)、テロメラーゼ陰性の不死化細胞 (Saos-2, WI38VA13) 及びテロメラーゼ陰性の初代培養線維芽細胞を使い、TERT プロモーター/Fire fly luciferase 遺伝子を Lipofectamine で導入してルシフェラーゼ活性を指標に検定した。トランスフェクションの効率を補正するための内部対照には、同時にトランスフェクションしたプロモーターの活性に影響を与えにくいとされている単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子のプロモーターを接続したウミシイタケのルシフェラーゼを用いた。細胞に対する傷害性の測定は、RSV プロモーター/Fire fly luciferase 遺伝子と、Degenerin または CRM22 を含む遺伝子 (対照としては無害な遺伝子) を混合して細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性の抑制を指標に検討した。

7) マーカー遺伝子を組み込んだセンドライウイルスの調製

膜融合リポソームを経門脈閉鎖灌流系で

ラット肝実質細胞へ投与する条件は、膜融合リポソームとほぼサイズが同じ遺伝子組換えセンダイウイルスを使って検討した。Fire fly luciferase遺伝子やGFP遺伝子を持つ組換えセンダイウイルスは、国立感染症研究所の加藤篤博士より分与された。センダイウイルスは孵化鶏卵1個あたり100 pfuという希釈した条件で増殖させて感染価の高いウイルスを調製した。これらのウイルスは、感染後直ちに、組み込んであるマーカー遺伝子を強く発現する。ウイルスはさらに、20%/50%の蔗糖ステップ遠心法で精製したあと、粒子径をそろえるために Sephaacryl S1000（あらかじめホスファチジルコリンで飽和して非特異的吸着を抑えてある）のカラムにかけて、単一のピークとして回収し、動的光散乱法によって粒子径を測定した。得られた最終産物は、10% DMSO存在下に -80°C で凍結保存した。この条件では、再融解・遠心処理で回収しても物理的・生物学的活性に変化は見られなかった。

8) 経門脈閉鎖灌流系による遺伝子導入ベクター投与条件の検討

実験動物には4週令のSDラット（雄）を使用した。手術時には麻酔薬で処置し、実験終了後には過剰の麻酔薬を投与して安楽死させた。また、すべての動物実験は、研究所の動物実験実施規則に従って行い、飼育に関しては健康管理に最大の注意を払い、また無用な傷害・疼痛等をなるべく避けるように心がけた。閉鎖灌流とベクター投与には、すべて人の標準的な点滴に使用されるラクテート・リンゲル液を用いた。実験動物を開腹後、まずカテーテルを腎臓静脈と門脈に通し固定する。次に、横隔膜下動脈等の小さな血管を結索する。最後に、肝臓に接続している大動脈を直上で、また大静脈を腎臓の下部で、それぞれ止血鉗子で結索し、ただちに灌流を開始して門脈＝腎臓静脈間の閉鎖灌流系を完成する。灌流はペリスタルポンプ（Gilson社）を使って行い、門脈圧はヒト用の動脈圧計を使って測定した。手術開始から終了までの時間は約50分である。

C. 研究結果

1. 導入遺伝子を核内の送達するための技術開発

非ウイルス遺伝子導入ベクターの活性は、一般に使用する高分子の物理化学的特性に依存しているため、ベクターに生体膜（細胞膜や核膜）を積極的に通過する活性を付与して性能の向上を図るためには、生物活性を持ったペプチドの利用が不可欠である。しかし、各種ペプチドを含む高分子を合成して一つ一つDNAとの複合体を作ってからその機能を検討するアプローチは、多大なコストと時間を要する。そこで本研究では、タンパク質でできた殻の内部にゲノムDNAが詰め込まれているファージ粒子をポリマーのモデルとして使用し、ファージ表面に遺伝子組換え技術を使って各種ペプチドを呈示できるファージディスプレイシステムを使って、ポリマーミセル型ベクターに細胞膜や核膜を通過できる生物学的機能を付与するための基礎研究を行っている。

平成13年度はまず、平成12年度に得られた「Tatペプチド・ディスプレイ・ファージによる細胞への遺伝子導入現象」と「核移行シグナル・ディスプレイ・ファージによる核内への遺伝子標的化」について論文にまとめ発表した。これらの成果は、DNAを微小な粒子状に凝縮し、その外側を核移行シグナルなどの機能性ペプチドで修飾すれば、非ウイルスベクターに細胞膜や核膜を積極的に通過する活性を付与できることを実証したものである。そこで今後は、(1)合成高分子化合物と核酸の複合体によってディスプレイ・ファージの機能の置き換えることが可能かどうか、(2)核移行に関してさらに条件（シグナルの質と量、複合体のサイズ）を最適化できるかどうか、という2つの点が次の大きな課題となる。

しかし、これまで我々が核へのターゲティングの解析に使ってきたマイクロインジェクション法と間接蛍光抗体法の組み合わせは、合成高分子を使った複合体

を多数スクリーニングするための方法としてはあまり適当ではない。まず、マイクロインジェクション法では1つの細胞に導入できる量が50-500 fl (フェムト・リットル、 10^{-15} l) と少ないため、サンプルを高度に濃縮することが求められる。また導入の際に微小な注射針を使うため、サンプルは0.22 μ mのフィルターで濾過しなければ針が目詰まりしてしまう。このように相反する条件をスクリーニングの段階から高分子・DNA複合体に求めるのは現実的ではない。

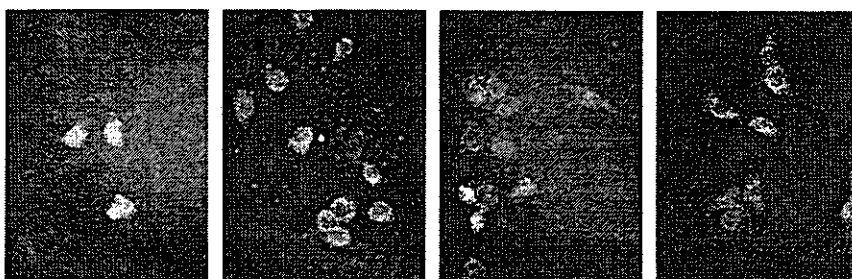
さらに検出法について言えば、間接蛍光抗体法は対象となる物体が抗原性が高いことを前提としており、通常の合成高分子のように抗原性が低い場合は対応できないだけでなく、個々の高分子に対して特異的なプローブを用意する必要がある。また、直接DNA分子の細胞内の局在を観察する方法としては、FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法が知られているが、細胞を固定後に変性等のステップが非常に多く、時間がかかる上、経時的に局在の変化を追うこともできなかった。

そこで、平成13年度は、これまでの手法の問題点を整理した上で、合成高分子化合物の活性評価に使用可能なシンプルなアッセイ系を開発してNLSファージの活性を再評価し、以下の結果を得た。

1) *In vitro* 核輸送アッセイ系によるNLSファージの活性の検定 (図1)

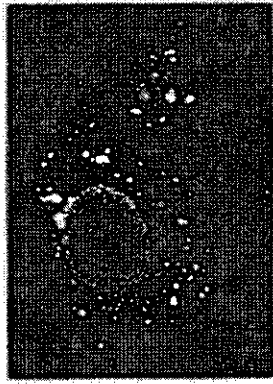
ジギトニン処理で作成した Semi-intact 細胞と細胞質抽出液を使った *in vitro* 系を使って、ファージ粒子の核移行を検討した。その結果、NLSファージ粒子の核への局在が、細胞質抽出液依存的に観察された。この局在化は、核膜孔に結合してタンパク質の核への能動輸送を阻害する小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin, WGA) によって阻害され、核膜孔を介していることがあきらかになった。このアッセイ系は、マイクロインジェクション法に比べて試料の濃度も低くてすみ、また大量のサンプルをスクリーニングするのに適しているので、今後、より強力な核移行シグナルのスクリーニング等にも有効であろうと考えられる。

Cytoplasm	Yes	No	Yes	No
WGA	No	No	Yes	Yes

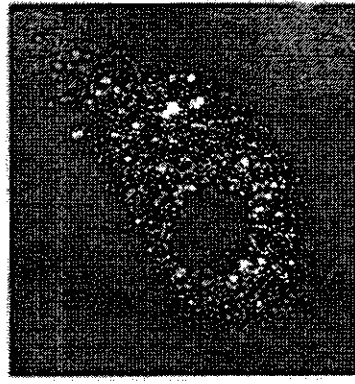


Phage: NLS Phage
 Import Assay: *In vitro* アッセイ
 Detection: 間接蛍光抗体法

図1 *In vitro* 核移行系によるNLSファージの活性の検定



NLS Phage



Wild Phage

図2
DNA 標識したファージ
粒子の細胞内局在

Import Assay: マイクロインジェクション
Detection: DNA の蛍光標識 (w/ SYBR Green)

2) DNA の蛍光染色による DNA 複合体の検出 (図2)

これまで我々が用いてきた間接蛍光抗体法に代わる直接的なアッセイ法として、SYBR Green で内部の核酸を標識したファージ粒子を使う方法を確立した。この方法は、非常に簡便で、抗体や蛍光プローブとの結合といった非特異的なシグナルを生む可能性がある難しいステップを必要とせず、細胞の形態等もよく保存される。また、蛍光の検出に感度の非常に高い CCD カメラを使えば、細胞を固定せずに DNA 自体の挙動を経時的に (たとえば分刻みで30分のように) 追跡することも可能で、今後の DNA デリバリーシステムの開発に重要な手段となると考えられる。

3) 電子顕微鏡を使った NLS ファージの細胞内局在と細胞内での形態の観察 (図3-5)

これまでに我々が使用してきた光学顕微鏡による観察方法は分解能に限界があるので、どのように高度な装置を使用してもファージ粒子を直接観察することはできず、ファージ粒子がほんとうに細胞内で分解せずにその形態を保っているのかという根本的な疑問に答えることができなかった。電子顕微鏡を使って観察す

ればこの問題を解決することができるが、マイクロインジェクションした細胞を電子顕微鏡で観察するのは大海の中の一針を探すようなもので極めて困難だと考えられてきた。しかし、本年度は、特殊なグリッドを持つプラスチック板に細胞を培養することで、任意の細胞1個を電子顕微鏡で観察する技術を持っている関西医科大学・山本章嗣博士との共同研究をする機会を得て、核移行シグナル・ディスプレイ・ファージが確かに粒子の形状を保ったまま核膜孔を通過している様子を、透過型電子顕微鏡を使って確認することに成功した。これは DNA を含む粒子状の非ウイルスベクターが、形状を保ったまま核膜孔を通過できることを直接示した世界最初の例で、この研究結果から、ファージ粒子の直径は核膜孔の大きさとほぼ同じで、核に能動的に移行できる DNA 複合体の最大直径は約 55 nm であることが確実となった。以上の結果から、「核膜孔の内径は 25 nm であり、DNA・複合体の直径はこれ以下でなければ、核に能動的にターゲティングすることは不可能である」というこれまでの概念を完全に覆すことができ、DNA・合成高分子複合体を使って核や細胞内へのターゲティングをおこなうための基礎的技術基盤を確立することができた。

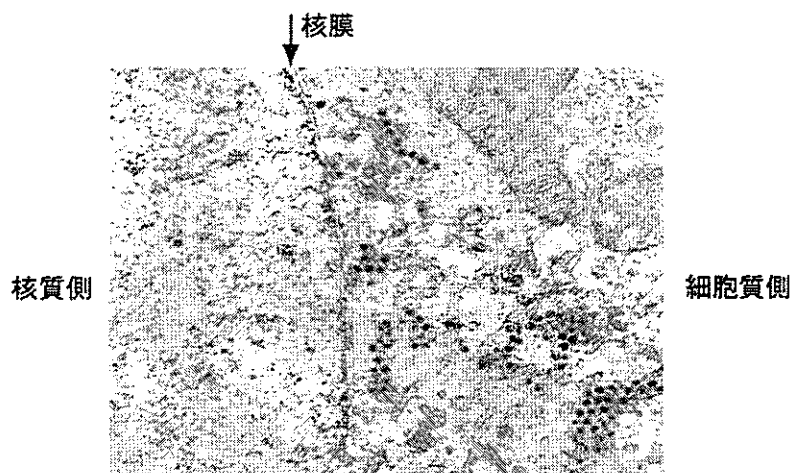


図 3

電子顕微鏡による観察1： 細胞質にあるPhage粒子
(関西医大・山本章嗣博士撮影)

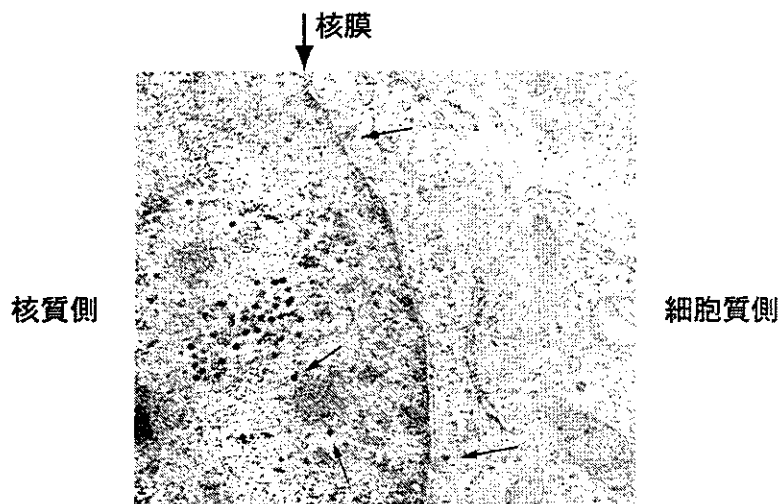


図 4

電子顕微鏡による観察2： 核内にあるPhage粒子
(関西医大・山本章嗣博士撮影)

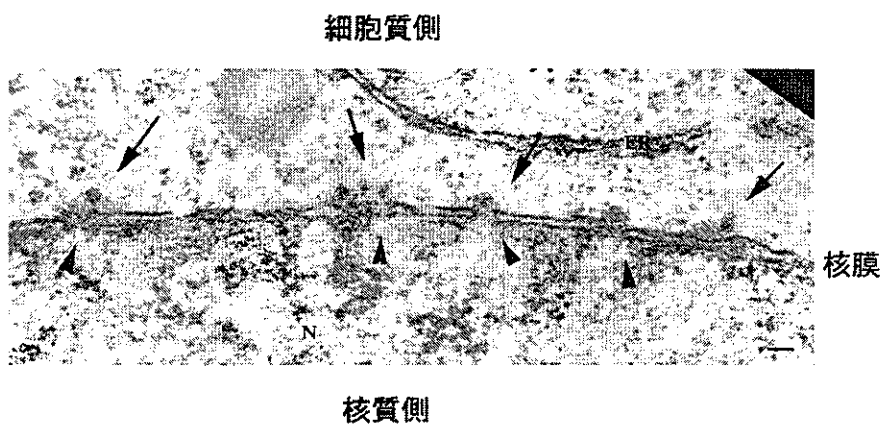


図 5

電子顕微鏡による観察3： 核膜孔周辺にあるPhage粒子
(関西医大・山本章嗣博士撮影)

2. 導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発

ヒトの人工染色体は、遺伝子治療における究極の遺伝子発現系として注目を集め研究されている。しかし現状では、ヒトの染色体の10から70分の1程度(2,000kbp)の巨大なものしかできていない。一方、我々の研究を含むさまざまな遺伝子導入系の研究からは、実用的な遺伝子発現系のサイズは50kbp(すなわちファージのゲノムサイズ)であることが知られていて、この両者にはまだ大きなギャップがある。これを埋めるためには、DNAが染色体として安定になるために最小限必要な要素を決定する必要がある。

これまでの研究から、染色体の安定性はその末端の構造であるテロメアに依存していることが知られている。我々はその機構の一つとしてテロメア結合タンパク質 TRF1 が最も重要な因子であるという仮説を提案した(Okabe, et al. 2000, Human Molecular Genetics)。この仮説によると、テロメア配列結合タンパク質 TRF1 がテロメア配列 (TTAGGG)_n を細胞内で安定に保つための律速タンパク質として機能しており、染色体の安定性は染色体末端に結合する TRF1 の総量で決定される。つまり、テロメア配列が十分に長いのか、TRF1 の発現が十分に高いかというどちらかの条件が満たされることが必須であると考えられる。

ところで、自然界にある現象で染色体の安定性と最も密接に関連していると考えられているのは、細胞寿命の決定機構である。通常、ヒトの組織を構成している体細胞は有限の寿命を持っており、ある一定の回数分裂を重ねた時に「細胞老化」を起こして増殖が停止し、やがて死んでいく。このような有限寿命の細胞では、テロメア配列を合成することができる特殊な DNA ポリメラーゼであるテロメラーゼの活性も、また DNA 組換えによってテロメア配列を長く保つことができる ALT (Alternative lengthening of telomere) といった機構も存在しないので、細胞分裂ごとにテロメア配列が 50 - 500 bp 短縮していく。そしてテロメア配列がある限界以下の長さになると染色体が不安定になり細胞老化・細胞死を招くと考えられている。一方、永久増殖能を獲得した癌細胞など不死化細胞では、テロメラーゼか ALT の機構が存在してテロメア配列を維持しているために細胞老化が起こらないとされてきた(テロメア仮説)。

しかし、このテロメア仮説の弱点は、有限寿命の細胞で細胞死が起こるときのテロメアの長さ(約 5 kbp)よりはるかに短いテロメア配列を持っている不死化細胞が多数存在していることである(例えば、HeLa 細胞では約 2 kbp)。つまり、テロメア配列の長さが単純に細胞の寿命(あるいは染色体の安定性)を決めているわけではない。我々の昨年度までの研究

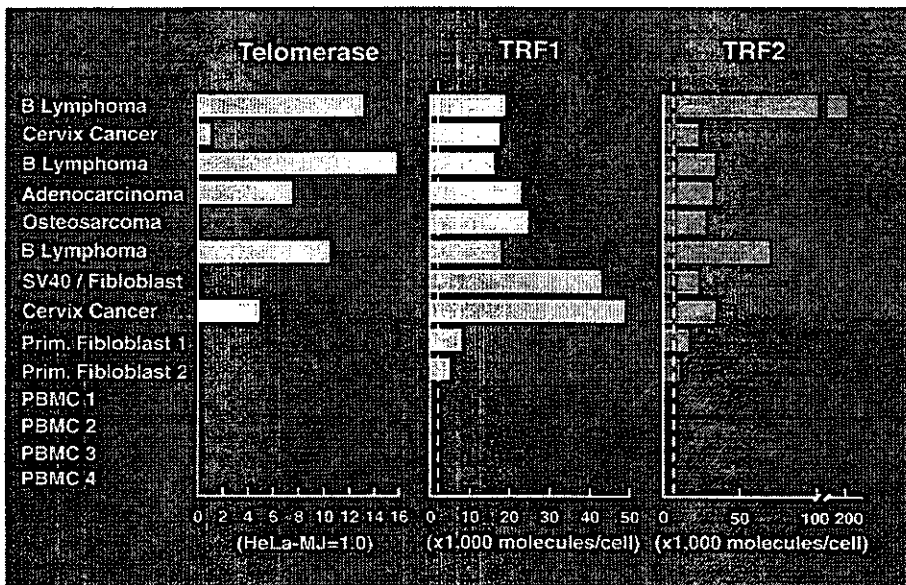


図6
各種細胞が含んでいる TRF1 / TRF2 の含量

上の8つが不死化細胞、下の6つが有限寿命の細胞である。

から不死化細胞では有限寿命の細胞に比べて TRF1 の活性が優位に高いことが明らかになっており (図 6)、また我々が提出した TRF1 仮説 (テロメア配列が十分に長い、TRF1 の発現が十分に高いかというどちらかの条件が満たされることが染色体の安定性を決めるために必須である) は、テロメラーゼや ALT の機構とは無関係な TRF1 の役割を説明し、テロメア仮説の矛盾を説明できるので、細胞の寿命の決定機構として極めて魅力的である。

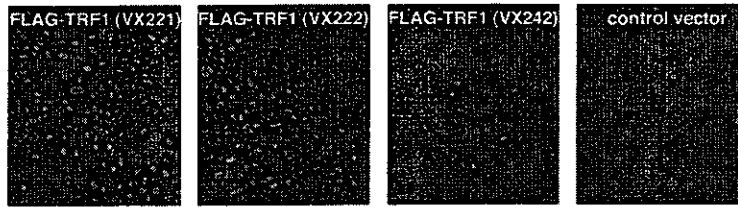
平成 13 年度はこの仮説を検証するため、有限寿命のヒト初代培養繊維芽細胞に TRF1 発現ベクターを導入し (図 7)、TRF1 強発現細胞と対照細胞でその寿命を比較した。その結果、TRF1 を強く発現させた細胞は約 20 回多い分裂寿命を獲得

するという結果を得た (図 8)。染色体不安定化に伴ってヒト細胞が老化すると SA (Senescence-associated)-beta-galactosidase が誘導される。細胞寿命に達して分裂が停止した時点で SA-beta-galactosidase 活性を指標に細胞老化の程度を比較すると、対照細胞では 100% 近い細胞が beta-galactosidase 陽性であったのに対し、TRF1 強発現細胞では約 50% が陽性を示すにとどまり、細胞老化という指標からも TRF1 の強発現によって染色体の安定化が起きることが裏付けられた (図 9)。

TRF1 は環状 DNA に組み込まれたテロメア配列にも結合すること、ヒト染色体のテロメアはループ状の構造を取っていること、TRF1 の機能はテロメラーゼのようなテロメアの末端に作用する機構とは

Establishment of Flag-hTRF1 expressing human fibroblasts

A. Immunofluorescent microscopy analysis (anti-FLAG)



B. Protein blotting analysis (anti-TRF1)



図 7

TRF1 を強発現しているヒト初代培養線維芽細胞の単離

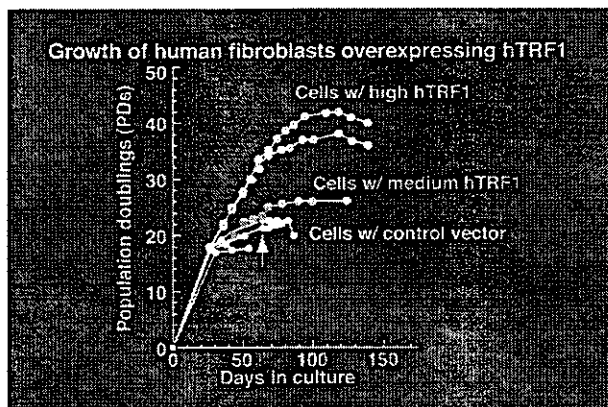


図 8

TRF1 を強発現した初代培養線維芽細胞の寿命の変化

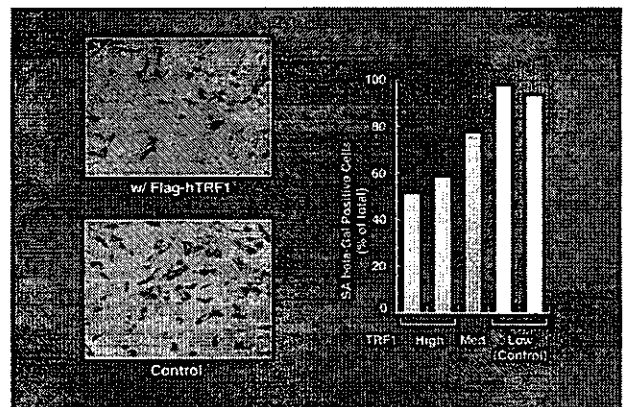


図 9

TRF1 を強発現した初代培養線維芽細胞における老化マーカーの発現

完全に独立であることから、TRF1-テロメア配列は環状DNAを介して染色体を安定化していることが考えられる。この仮説を証明するため、平成13年度はさらに、テロメア配列・EBV複製起点・安定性測定用のPositive-Negative Selection Markerを組み込んだ環状プラスミドと、EBNA1発現ヒト細胞を作成した。平成14年度はこの系を使って環状DNAの安定性を検討する予定である。

3. 細胞質で安定に遺伝情報を発現するRNAレプリコンの開発

DNAを使った遺伝子発現系は、前述したように、細胞質から核へ効率よく輸送する機構や核内で安定に維持される機構を付加しなければならないなど、複雑な機能を要求される。そのため、我々は細胞質で安定な遺伝子発現を行うことができるRNAを使った遺伝子発現系の開発を平行して進めている。この発想は、動物細胞と安定に共存し、細胞質で遺伝子を発現できるセグダイウイルスの持続感染という現象の解析からもたらされた。我々はこれまでに、温度依存性持続感染を行うcl.151変異株の解析から、ウイルス粒子を作ることができない条件で持続感染が起こることを示唆する結果が得られている(Kondo, et al. 1993, JBC)。この結果に基づいて、平成12年度は、ウイルス粒子の形成には必須だが遺伝子発現には直接関係ない(Eguchi, et al. 2000, JBC)構造タンパク質のF, HN, Mの各ウイルス遺伝子を、発現させたいマーカー遺伝子と置き換えた組み換え体の作成を計画し、セグダイウイルスZ株由来cDNAをもとに構成タンパク質をコードする遺伝子をマーカー遺伝子で置き換えたRNAゲノムを作り、RNAレプリコンを再構成した。このゲノムではウイルス粒子の形成に必須なMタンパク質が欠失しており、これまでの研究からはMタンパク質の欠失によってRNAレプリコンの持続感染が成立することが示唆されていたため、持続的なマーカー遺伝子発現が期待されたが結果は一過性であった。また同様の結果が

他の研究グループからも発表された。

このように、当初考えてきたようにM遺伝子の変異・欠失だけではマイナス鎖RNAゲノムからの持続的なmRNAの転写が起こらない原因として、RNAレプリコンの安定化のためには、これまで知られていない変異がさらに必要であることが強く示唆された。そこで平成13年度は、持続感染変異セグダイウイルスCl. 151株とその親株である野生型セグダイウイルス名古屋株について、そのRNAゲノム(全長16 knt)の構造を決定して安定化に必要な変異を同定するプロジェクトを開始した。RNAゲノムの全長が極めて長いこと、また得られたcDNAクローンを使って直ちに組換えRNAゲノムを作ることができるように、全長のクローニングは次の2つのステップに分けて行う計画を立てた。(1)全長クローニングに使うプライマー設計のために、ゲノム3'末端と5'末端の一次構造を決定する。(2) (1)で決定した配列を基に設計したプライマー(T7 RNA polymerase promoter や ribozyme, terminator 配列を含む)を使った全長cDNAのクローニング。

本年度はまず、精製したゲノムRNAの両端に40 merのオリゴDNAをT4 RNA ligaseで共有結合させ、このプライマーと結合できるプライマーを使ってPCR (polymerase chain reaction)法で末端に相補的なDNA断片を作り、ゲノム3'末端と5'末端それぞれ約300 ntの塩基配列を決定した。その結果、この範囲では2つの株の塩基配列は完全に一致し、すでに同定されている他のセグダイウイルス株との比較でも、この範囲で安定化につながる特異な変異は検出されなかった。平成14年度は、この情報をもとに全長cDNA用のプライマーを設計し、16 kbpのcDNAをラムダファージCharon 40を使ってクローニングする計画である。

4. 癌細胞特異的致死遺伝子の開発と遺伝子治療への応用

我々が開発しているハイブリッドベクターで、その応用が進んでいるのは癌の

遺伝子治療の分野である。特に、薬剤を使わずに癌細胞特異的に細胞死を誘導できる自殺遺伝子は、ウイルスベクターを産生する細胞に対しても強い毒性を示すため、原理的にウイルスベクターに組み込むことができず、非ウイルスベクターでありながらウイルスベクター並みに数多くの細胞に同時に遺伝子を導入できるハイブリッドベクターに最も適した応用分野である。前年度は癌胎児性抗原 (CEA) プロモーターを使って CEA 陽性癌細胞特異的に癌を殺傷する活性を持った自殺遺伝子を作成し、これを膜融合リポソームと組み合わせることで胃癌の腹膜播種モデルの遺伝子治療に成功した (Horimoto, et al. 2000, Cancer Gene Therapy)。この成功例で見られるように、CEA プロモーターのように弱い遺伝子発現しか示さないプロモーターを使っても、強い殺傷能力を持った遺伝子産物を作る cDNA と組み合わせることによって十分な効果が期待できる。

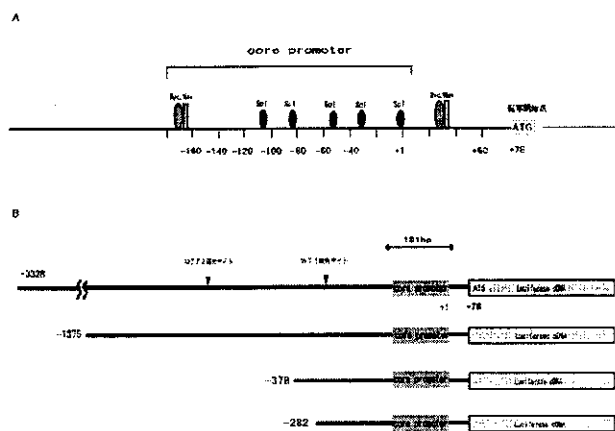


図 10 TERT promoter の構造

本年度は、このアプローチをさらに一般化するため、より広範囲の癌に応用可能な自殺遺伝子として、ヒト癌の 90% で発現しているが正常組織細胞ではほとんど発現が見られないテロメラーゼに注目して、その遺伝子発現系を応用することを試みた。テロメラーゼはタンパク質である触媒部位 (TERT) とテロメア配列合成の鋳型となる RNA (TERC) からなる複合体である。このうち、鋳型 RNA はテロメラーゼ陽性・陰性を問わずほとんどの細胞で発現しており、テロメラーゼの活性は触媒部位 TERT の mRNA の量と比例していることが知られている。このため、TERT プロモーターを使うことで、テロメラーゼ陽性細胞特異的な遺伝子発現を得ることができるのではないかと考えられる。そこでまず、金沢大学医学部の京哲博士より分与されたヒト TERT プロモーターを使ってルシフェラーゼ cDNA を発現するキメラ遺伝子を作成し、プロモーター活性の特異性を確認した。TERT プロモーターは約 3,400 bp あるが (図 10)、そのうち 400 bp でも十分なプロモーター活性を持っており、むしろ 1,300 bp のより大きな DNA 断片を使うと遺伝子発現が抑制されていた。

次に、TERT のプロモーターを、細胞傷害性を持つ変異ナトリウムチャンネルタンパク質 Degenerin や、ジフテリア毒素フラグメント A (DTA, EF-2 を ADP ribosyl 化することで不活化し、タンパク質合成を阻害する) の cDNA に接続したキメラ遺伝子を作成し、その細胞障害活性は培養細胞を用いて確認した。傷害活性は、同時に細胞に導入した RSV プロモーター＝ルシフェラーゼ・キメラ遺伝子の発現

	HeLa	HT1080	WI38 2R /VA13	Saos2	TIG3
	(% of Control)	(% of Control)	(% of Control)	(% of Control)	(% of Control)
P378-DTA	2.4 ± 0.5	22.4 ± 12.6	4.0 ± 0.5	51.8 ± 6.6	65.7 ± 11.6
P1375-DTA	3.2 ± 0.9	22.9 ± 8.3	7.9 ± 1.0	43.0 ± 9.8	65.2 ± 17.0
P378-G430F	11.4 ± 1.6	6.2 ± 4.0	6.9 ± 2.2	20.5 ± 2.8	74.5 ± 18.5
P1375-G430F	33.2 ± 7.3	18.3 ± 6.3	22.3 ± 4.3	28.4 ± 4.5	78.5 ± 7.2
P1375Luci(-)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

表 1 キメラ遺伝子の細胞毒性

HeLa, HT1080 は TERT 陽性、WI38, Saos2 は TERT 陰性、TIG3 はヒト初代培養線維芽細胞である。

を48時間後に測定し、対照として用いたプラスミドDNAによる抑制との比較値を指標に検定した(表1)。48時間後のDTAとDegenerinの毒性は細胞によって異なっているが、その理由は不明である。一般的には、DTAがその酵素活性により細胞のタンパク質合成を止めることで徐々に細胞毒性を示すのに対し、Degenerinが発現すると細胞膜のバリアーが崩壊して瞬時に細胞死を引き起こすので、細胞死に関してはDegenerinの方が即効性があると考えられる。

またTERTプロモーター=Degenerin cDNAキメラ遺伝子は、予想どおり正常ヒト組織由来細胞には毒性を示さないが、一部のテロメラーゼ陰性細胞(ALTの機構を使ってテロメアを維持している)では強い毒性を示した。TERTプロモーターの上流にはさまざまな転写抑制部位があり、内在性のTERT遺伝子はこの抑制部位のために発現が抑えられているが、400bpのTERTプロモーターでは癌細胞のほとんどで発現しているmycタンパク質による活性化部位が存在するのに転写抑制部位を欠いていることがその原因ではないかと考えられる。C-myc遺伝子は正常細胞では発現していないので、400bp TERTプロモーターを使用することにより、テロメラーゼ陰性細胞でも機能するような、癌特異性がより幅広い自殺遺伝子ができあがったと考えられる。

5. 膜融合リポソームの経門脈肝投与条件の検討

平成12年度の成果や上の4で示したように、ハイブリッドベクターの一種である膜融合リポソームと癌特異性の高い自殺遺伝子の組み合わせは、癌の遺伝子治療として高い可能性を示している。一方、膜融合リポソームは血流中では赤血球に結合して直ちに活性を失うため、その投与方法を考える必要がある(逆に、この性質のため、標的部から漏れだした余分なベクターが他の組織へ移動して副作用をもたらすことがないので安全性が高い、とも考えられる)。これまでにこの

アプローチの有効性が確認できているのは、実験的に癌細胞を腹腔腔に局限させた腹膜播種モデルと腹水癌モデル、および局所に局限した腫瘍であり、物理的にいかに血流から遮断してかつ目的とする癌細胞との効率の良い接触を図るかというのが今後の課題となっている。

実際の臨床応用を念頭に適応症例を考えてみると、最も頻度が高くまた難治性も高いと考えられるのが腹膜播種であるが、続いて消化器系癌の肝臓転移が挙げられる。肝臓は血流の関係上、消化器系の癌が最も転移しやすい臓器の一つであるが、肝臓へは他の臓器への転移がないことも多いので、肝臓への血流を遮断して閉鎖系とし高濃度の抗ガン剤を灌流するアプローチが効果を上げ、現在臨床試験が行われている。この場合でも、肝臓へはすべての癌細胞を叩くのは難しく、延命効果が上がるという段階に留まっている。この閉鎖灌流の手技自体はかなり施術例が増えているが、経門脈灌流を膜融合リポソームに適応する時の最大の問題点は、門脈と肝実質細胞の

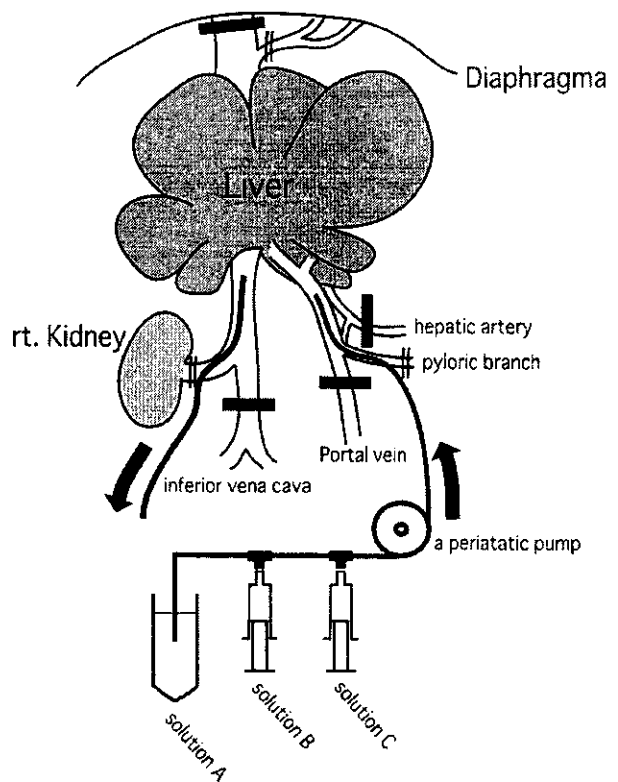


図11 ラット肝閉鎖灌流系の模式図

間にあるバリアーである Sieve と呼ばれる構造である。つまり、この Sieve は直径 100 nm 以上の粒子を排除するのに、膜融合リポソムのサイズは 250 nm もある。

一方、灌流時の圧力を上げると Sieve の穴の大きさが変化して、より大きな粒子を通過させることができるという報告もある。そこで本年度は、閉鎖灌流系をラットで確立し、これを使って膜融合リポソムを肝実質細胞に投与する条件を探った (図 1 1)。実際の実験には、*in vivo* で高い遺伝子発現を得るために、膜融合リポソムのかわりに、fire fly luciferase (定量的マーカー) や GFP (green

fluorescent protein) (定性的マーカー) を組み込んだ組換えセンダイウイルスを使用した。膜融合リポソムとセンダイウイルスは、直径がほぼ同じで、かつ膜融合の特異性はまったく同一である (Watabe, et al., 1999, BBA; Eguchi, et al., 2000, JBC)。センダイウイルスは Sephacryl S1000 によるゲル濾過法で最終精製し、粒子径が均一であることを動的光散乱法で確認した (図 1 2)。

実験では灌流液としてラクテート・リンゲル液を用い、前灌流・ベクター灌流・後灌流に分けてその条件を検討した。その結果、ベクター灌流時の適正な門脈圧 (10-12 mmHg)、ベクター灌流液中のベクター濃度 (10^7 pfu/ml 以下)、後灌流液の温度の 3 つが肝臓全体にまんべんなくセ

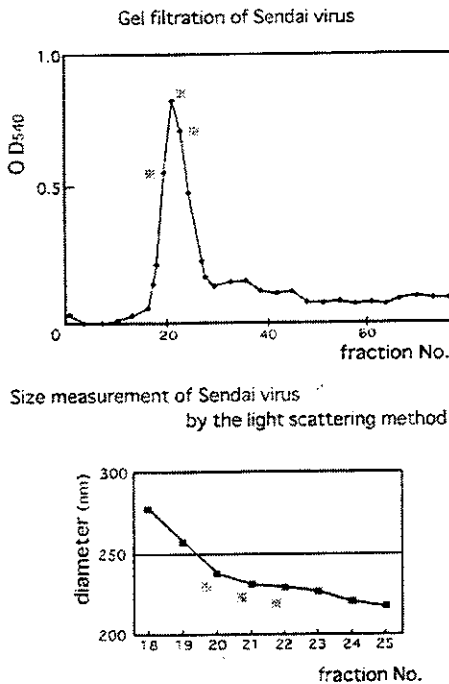


図 1 2 センダイウイルスの精製と粒子径の測定

図 1 3 灌流圧 (流量) による GFP 発現の変化

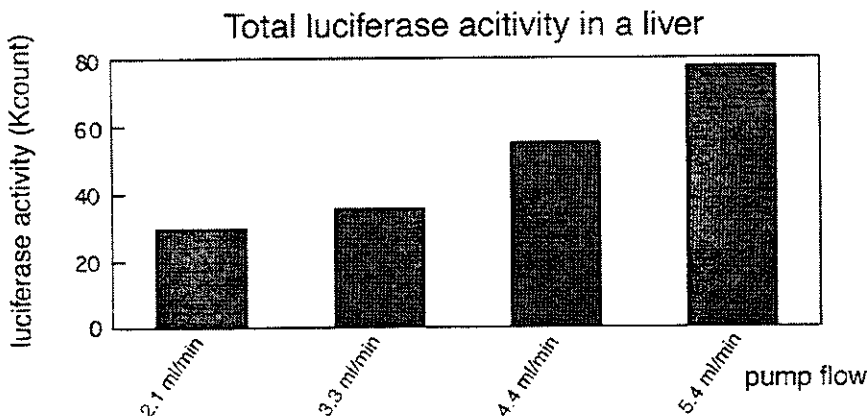
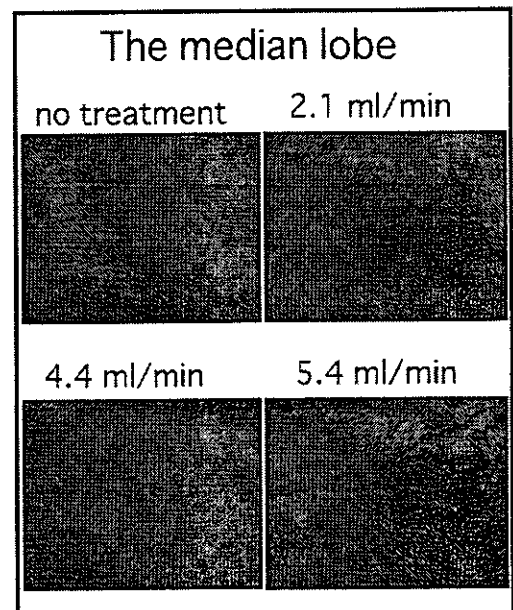


図 1 4 灌流圧 (流量) によるルシフェラーゼ遺伝子発現の変化

ンダイウイルス粒子（膜融合リポソーム）を行き渡らせるのに重要な条件であることがわかった。まず、門脈圧が低いと、ウイルス粒子は門脈から広がらず、肝実質細胞での GFP の発現はあまり検出できなかったが、10–12 mmHg の圧力を加えると広い範囲での遺伝子発現が観察され、Sieve の穴のサイズの変化によってウイルス粒子が肝実質細胞に到達できるようになったことがわかる（図 13）。このことはルシフェラーゼ活性からも確認できる（図 14）。次に、ベクターの濃度と後灌流液の温度は肝臓の血管が詰まって壊死を起こさないために重要であり、これは HE 染色で観察した肝組織の切片の像からも確認できた（図 15）。このどちらかの条件が満たされないと、血流再開時に血管が閉塞して肝実質細胞が広範囲に壊死を起こしていることが確認された。さらに、肝臓以外の組織での発現を、感度の良いルシフェラーゼ活性で検討したが、肝臓以外のどの臓器でも発現を検出できず、閉鎖灌流系が肝臓への物理的ターゲティング法として優れていることが確認できた。

センダイウイルスベクターは（株）DNAVEC 研究所のグループが生体各組織への投与と発現を詳しく検討しているが、

これまで肝実質細胞での発現には成功していなかった。我々の膜融合リポソームの投与でも、経門脈ではなく肝臓へ直接注射をした時にのみ発現が検出されていた。今回の成果は、センダイウイルスをベースにした遺伝子導入系を経門脈閉鎖灌流系で肝実質細胞に適用することに成功したもので、臨床応用を考える上で大きな意味を持つ。

D. 考察

1. 導入遺伝子を核内へ送達するための技術開発

この10年ほどの間に、核と細胞質の間のコミュニケーションについては大きく理解が進み、情報伝達を担うタンパク質が核に能動輸送される機構は分子レベルで詳細に解析されている。これらの研究から、核膜が分子量3万ダルトン以上の分子に対しては非常にタイトなバリアーとして働いていることが明らかになった。一方、非ウイルスベクターを使って細胞にDNAを効率よく導入しよう

Tissue examination after isolated hepatic perfusion

		perfusion flow : 4.4 ml/min (10 mmHg)	
Sendai virus titer (pfu/ml)	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
Temperature of post-perfusion	R.T.	42 °C	42 °C

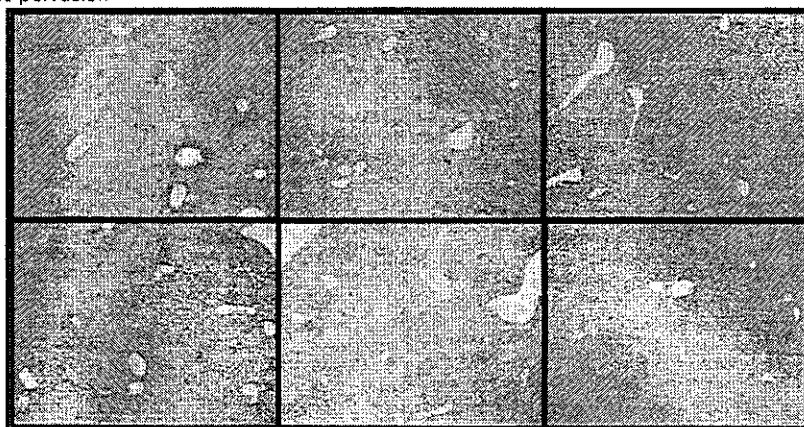


図 15
さまざまな灌流条件でベクターを導入した後の肝臓の組織像 (HE 染色)

という流れのなかから、導入過程が次第に詳しく解析されるようになり、細胞膜だけでなく核膜が非常にタイトなバリアーであることが理解されるようになった。このような研究を背景に、核へのDNAのターゲティングは急速に注目を集めるようになった。しかし、DNA分子はタンパク質に比べると遙かに巨大である点はその輸送機構を理解する最も大きな妨げとなってきた。特に、「核膜孔の内径は25 nmであり、DNA・複合体の直径はこれ以下でなければ、核に能動的にターゲティングすることは不可能である」という過去10年以上信じられてきた仮説を覆す実験は行われておらず、ウイルスゲノムの核移行も何らかの精巧な仕組みがあるのではないかと考えられてきた。一方では、単純にDNA分子を核移行シグナルで修飾したら核に移行したという報告も散見されるが、いずれも細胞内でのDNAの動態を正確に観察しているとは言い難いし、修飾されたDNAは生物学的活性を失っている。

我々は、本研究のこれまでの成果で、「直径55 nmで内部にDNAを封入したファージ粒子が、適当な核移行シグナルの存在下で核に能動的にターゲティングできる」という仮説を立て、それを支持する証拠を提示してきた。しかし、旧説は今なお広く信奉されており、新しい説を確立するためには、現在タンパク質の核輸送で標準的に使用されているアッセイ系での検討や、核酸染色によるDNAの細胞内動態の直接観察、電子顕微鏡による観察といった努力を重ねて、あらゆる証拠が矛盾しないことを示す必要がある。平成13年度の研究により、これらすべての系での証拠があつまってこれまでの古い概念を完全に覆すことができ、DNA・合成高分子複合体を使って核や細

胞内へのターゲティングをおこなうための基礎的技術基盤を確立することができたと考えている。

今後は、この系をより自由に任意のDNA断片を封入できるような工夫が大切である。これまでに作成したTat PhageやNLS Phageはすべて、発現したいマーカー遺伝子をファージゲノムの一部として組み込んでいるので、任意の遺伝子を組み込むためには毎回、別のファージ産生大腸菌を作成する必要があった。これでは開発した技術が遺伝子導入系として一般化できないので、平成14年度はCos配列（ファージ頭部へのパッケージングシグナル）を含む任意の環状DNAを、Tat peptideや核移行シグナルを呈示しているファージの頭部に詰め込むことができる「パッケージング大腸菌」の作成を行う予定である。この系では、少なくとも40 kbpの直鎖状二本鎖DNAを直径55 nmの頭部に詰め込むことができると予想され、次項で計画している人工染色体様活性を持つDNAを封入するシステムとして十分なキャパシティーを持っている。

2. 導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発

非ウイルスベクターは、さまざまな構造のDNAを導入できる自由さはあるが、反面、レンチウイルス・ベクターやAAVベクターのように宿主の染色体にDNAを挿入する活性はないため、遺伝子発現を長期間安定にしようと思えば、導入するDNA自体に安定化する機構を付与しておくことが必要となる。言葉を換えれば、一種の小さい人工染色体を開発してこれを導入できればこの目的は解決するはずである。すでに出芽酵母では15年以上前から人工染色体が構築されており、ヒト

の人工染色体も、遺伝子治療における究極の遺伝子発現系として注目を集め研究されている。しかし現状では、ヒトの染色体の100分の1程度(2,000kbp)の巨大なものしかできていないし、なぜこれ以下に小さくできないのかという問題も答えが得られていない。このような現状を背景に、我々はまず、ヒトの染色体がなぜ細胞の中で安定に存在するのかを追究するのが早道であると考え、染色体の安定性を規定していると言われていた染色体の末端の構造(テロメア)に焦点をあてて研究してきた。

テロメアが染色体の安定性に重要であるということは、既に50年以上前に、放射線でテロメアを失った染色体が速やかに消失することから知られていた。テロメアの機能としては、大きくわけて次の3つが知られている。

(1) DNAポリメラーゼはDNA合成にあたって必ずある長さのプライマーを必要とするため、直鎖状のDNAが複製されるたびごとに、末端は必ずプライマーの長さ分だけ短くなる(末端複製問題)。真核生物の細胞では、この問題を解決するために、末端部分を複製できる専用のDNAポリメラーゼ(テロメラーゼ)が存在する。テロメラーゼは自分自身の中にRNAの鋳型を持つ複合体酵素であり、この鋳型と相補的なTTAGGGという繰り返し配列が末端に付加されていく。

(2) 染色体が切断されると、DNAの切断面を監視する機構がこれを異常事態と認識して、細胞周期を止めるチェックポイント機構が働く。一方、染色体の末端はDNAの切断面として認識されないが、最近、テロメアがループ状の構造(t-loop)を取っていることが明らかになり、この構

造が末端を保護している機構(capping)であると考えられている。

(3) 有限寿命の細胞は、テロメラーゼが発現しておらず、細胞分裂ごとにテロメアが短くなっていく。そして、テロメアがある長さを下回ったときに細胞は寿命を迎える。言い換えると、テロメアは細胞の寿命を決定する時計の役割を果たしている。

(3)に関しては、テロメアが短くなると染色体が不安定になり、細胞死に至るという説明が一般的になされているが、では「なぜテロメアが短くなると染色体が不安定になるのか」という問いに関しては、明快な説明はなされていない。平成12年度までの我々の研究で、テロメア配列とTRF1の相互作用が染色体末端の形成に必須な役割を果たしていることが明らかになっており、この相互作用が核内DNAの安定性を決めていることが強く示唆された。本年度の成果は、実際に細胞の寿命をTRF1で変化させうることを示したもので、この仮説を強く支持している。TRF1は環状DNAにも結合していることが知られているし、実際に染色体末端はt-loopという環状構造を取っているため、環状DNAを核内で安定化する機構を持っていることが予想される。そこで平成14年度は、平成13年度に作成したテロメア配列・EBV複製起点・安定性測定用のPositive-Negative Selection Markerを組み込んだ環状プラスミドを使い、テロメア配列によるDNA安定化現象が、染色体末端とは関係なくヒト細胞で観察されるかどうかを詳細に解析する予定である(この現象はすでに酵母細胞で報告がある)。環状DNAに要求されるcisの因子としてはテロメア配列で十分だと考えられるの

で、この点に特に注目して、TRF1が認識できない変異テロメア配列(TTTGGGやTAGGG)などとの差を正確に決定する。さらにテロメア配列と Positive-Negative Selection Marker を持ったベクター DNA に、ヒト染色体複製起点を含むことが予想される 40 kbp ゲノム断片をランダムにクローニングし、ヒト細胞に戻して安定に複製する DNA を選択してその一次構造を検討する。このようにして機能的に選択してきた DNA は、環状人工染色体を構築するための素材となることが期待される。

3. 細胞質で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発

DNA を使った遺伝子発現系は、前述したように、細胞質から核へ効率よく輸送する機構や核内で安定に維持される機構を付加しなければならないなど、複雑な機能を要求される。そのため、我々は、細胞質で安定な遺伝子発現を行うことができる RNA を使った遺伝子発現系の開発を平行して進めている。この着想は、動物細胞と安定に共存し、細胞質で遺伝子を発現できるセンダイウイルスの持続感染という現象の解析からもたらされた。平成12年度は、ウイルス粒子の形成には必須だが遺伝子発現には直接関係ない構造タンパク質の F, HN, M の各ウイルス遺伝子を、発現させたいマーカー遺伝子と置き換えた組み換え RNA ゲノムを作り、RNA レプリコンを再構成した。このゲノムではウイルス粒子の形成に必須な M タンパク質が欠失しており、これまでの研究からは M タンパク質の欠失によって RNA レプリコンの持続感染が成立することが示唆されていた。

しかし、実際に作成した RNA レプリコ

ンは、確かに一過性にはマーカー遺伝子を発現して再構成に成功したことを示すことができたものの、持続的なマーカー遺伝子発現が得られなかった。そのため、平成13年度は、もう一度研究の原点に戻り、センダイウイルスでなぜ安定な持続感染が起こるのかという点について考えてみようという方針を取った。我々の研究の原点となった持続感染変異株 cl.151 株は、持続感染をしない親株(名古屋株)から由来したもので、ゲノム RNA のサイズ等から、ゲノムに大きな欠失等はないと考えられている。すなわち、何らかの点突然変異が持続感染に関与している可能性が強いと考えられる。そこで、まず、名古屋株と cl.151 株の全ゲノムの塩基配列を比較することでヒントを得ようと考えた。

平成13年度の結果から、少なくとも 3' 及び 5' 末端 300 nt ずつの部分には2つの株での相違は見つからなかった。この結果、細胞内で安定化する変異型 RNA ウイルスゲノムの全長 cDNA クローニングのための準備が整ったので、平成14年度は、この情報に基づいて RNA プライマーを設計し、精製したゲノム全長 RNA (約 16,000 nt) の 5' 末端と 3' 末端にそれぞれに特異的な RNA プライマーを T4 RNA ligase を用いて共有結合させ、MMTV 逆転写酵素を使って RNA が二次構造を取りにくい高温で DNA を合成する予定である。できた DNA はラムダファージにクローニングし、変異型・野生型それぞれ3クローンについて全長の構造解析を行って、RNA レプリコンの安定化に必要な領域(変異)を推定し、この cDNA を基に実際に RNA レプリコンを再構成して、持続的遺伝子発現に必要な変異を確定したいと考えている。