

#### 4. 癌細胞特異的な自殺遺伝子を使った癌遺伝子治療の実用化

我々が開発しているハイブリッドベクターのうち、膜融合リポソームは、一つの細胞に導入できるDNAのコピー数が少ないことと、まだNLSファージのような核へのターゲティング能を持つ粒子との組み合わせに成功していないために、遺伝子発現が弱いという欠点を持っている。しかしながら、弱い遺伝子発現でも効果を得ることができる場面では大きな威力を発揮する。その一つが癌の遺伝子治療の分野である。コピー数は少ないものの多数の細胞に一度にDNAを導入できる活性を持ち、組換えウイルスではないため内部に細胞毒性を持った遺伝子を封入できるというこのベクターの特色を最も発揮できるのは、癌細胞に特異的に毒性を発揮する自殺遺伝子の導入である。

自殺遺伝子の発想はすでに癌の遺伝子治療の分野には存在し、薬剤（プロドラッグ）を毒性物質に変化させる酵素の遺伝子が用いられてきた。しかし、我々の発想は、このような間接的なアプローチではなく、「発現するだけで細胞が死んでしまう」ようなキレのいい遺伝子を、癌特異的に発現させてやろうというものである。この場合、膜融合リポソームには細胞特性がほとんどないため、安全性を決定する癌細胞特異性は、遺伝子発現の特異性にかかっている。

前年度は、正常細胞にはほとんど発現していない癌胎児性抗原（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。しかし、CEAを発現している癌は、消化器系癌の一部に限られているので、より汎用的な癌特異的なプロモーターとの組み合わせが期待された。本年度の成果は、約90%の癌で普遍的に発現しているテロメラーゼ触媒部位TERT遺伝子のプロモーターを使ってこの目標を達成したものである。興味深いことに、TERTプロモーターを使ったキメラ遺伝子は、ヒト初代培養線維芽細胞にはほとんど毒性を示さないが、同じテロメラーゼ陰性・TERT陰性と言われている一部の細胞には毒性をしめすことがわかった。これは、内在性のプロモーターがメチル化等で修飾を受けていて発現が極度に抑制されているのに対し、外部から導入したDNAは抑制がかかりにくいこと、特にほとんどの癌細胞ではTERT遺伝子の発現を上昇させるc-mycが発現していて、400 bpのTERTプロモーターはc-mycによって容易に活性化される可能性が考えられる。これはテロメラーゼ陰性の癌でもこのキメラ遺伝子が機能することを示しており、安全性を保ったままさらに汎用性を広げられることが期待できる。

平成14年度は、癌細胞特異的な自殺遺伝子（テロメラーゼ触媒部位(TERT)プロモーター= Degenerin cDNA, DTA cDNA)について大量精製と膜融合リポソームへの封入を行い、特に細胞障害の様式（apoptosisかnecrosisか）に注目して、培養細胞でその活性を検討する。さらにこのベクターを使った担癌動物の治療実験を、特に抗癌特異的な免疫誘導に着目して実施する（大阪大学・医学部・第一内

科との共同研究を予定)。

## 5. 膜融合リポソームの経門脈肝投与条件の検討

センダイウイルスを使ったハイブリッドベクターの応用として、将来最も期待されるのが代謝性遺伝子疾患の治療である。そのためには、肝臓のほぼすべての実質細胞に効率よく遺伝子を導入できる投与条件を調べなければならない。また、この条件が決定できれば、4. で示した癌の遺伝子治療のアプローチを、消化器系癌の肝転移モデルにも応用することができる。センダイウイルスをベースにした遺伝子発現系としては、ゲノムの一部に外来遺伝子を挿入して強力に（しかし一過性に）発現させることができる組換えセンダイウイルスが知られている。このベクターはさまざまな組織へ遺伝子導入できることが知られているが、これまで肝臓ではっきりした発現を観察した例は無かった。

現在、肝臓への投与方法として最も効率が高いと思われるものに、経門脈閉鎖灌流系がある。この方法ではすでに、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。しかし、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、膜融合リポソームのサイズは 250 nm もある。本年度は、門脈からの灌流圧を通常の間脈圧 (2.5 mmHg) の 4 から 5 倍上げることで、このバリアーを突破してセンダイウイルス粒子（膜融合リポソーム粒子）を肝実質細胞まで到達させるこ

とに成功した。門脈圧のこの程度の上昇は、生理的にはまったく問題がない。興味深かったのは、灌流後の急性の傷害を回避する条件である。センダイウイルスの投与量が多い場合は、おそらく後灌流液で洗浄したあとも残存しているウイルスが赤血球と複合体を作り、血栓となって血流を遮断して急性の肝不全に至るものと推定される。このことは、後灌流液の温度を上昇させると傷害が減少することからも示唆されており、おそらく温度を上げることでセンダイウイルスと細胞の融合が促進され、血管内に残存して血栓を作るウイルスが無くなるのであろうと考えている。平成14年度は、この方法を癌の肝転移モデルに応用することも計画している。

## E. 結論

1. ペプチドディスプレイシステムを使ってDNAの核へのターゲティング活性の解析を行い、安全で高性能な合成ポリマーミセル型遺伝子導入系を開発するためのアッセイ基盤技術を確立した。
2. ヒトテロメア配列結合因子の一つである TRF1 と染色体末端のテロメア配列 (TTAGGG)<sub>n</sub> との相互作用が染色体の安定性を決定しており、さらにそれが細胞の寿命の決定に関わっていることを明らかにした。
3. 細胞質内で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発について、天然に存在する持続感染型変異ウイルスのゲノム解析から、その 3' 末端と 5' 末端を確定した。
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について検討を行い、テロメラーゼ陽性癌細胞で致死性効果を持つ TERT promoter / Degenerin のキメラ遺伝子の開発に成功した。
5. センダイウイルスをベースにした遺伝子導入系の肝臓への投与条件を検討し、経門脈閉鎖灌流系での投与条件の確定に成功した。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) A. Eguchi, T. Akuta, H. Okuyama, T. Senda, H. Yokoi, H. Inokuchi, S. Fujita, T. Hayakawa, K. Takeda, M. Hasegawa and M. Nakanishi. "Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells.", *J. Biol. Chem.*, **276**, 26204-26210 (2001).
- 2) M. Nakanishi, T. Akuta, E. Nagoshi, A. Eguchi, H. Mizuguchi and T. Senda. "Nuclear Targeting of DNA.", *Euro. J. Pharmacol.*, **13**, 17-24 (2001).

### 学会発表

- 1) 中西真人、「生物機能のシミュレーションによるベクター開発」、遺伝子・デリバリー研究会 2001 シンポジウム、東京、May 11 (2001).
- 2) S. Fujita, A. Eguchi, Y. Inoue, T. Ito, H. Matsuda, M. Hasegawa and M. Nakanishi, "Successful *in situ* delivery of Sendai virus-based vectors to rat parenchymal hepatocytes by isolated hepatic perfusion.", The Japanese Society of Gene Therapy, the 7th annual meeting, Tokyo, July 5 (2001)
- 3) 中西真人、「ウイルスベクター開発の現状とDDS」、第17回日本DDS学会シンポジウム「遺伝子療法の展開とDDSへの提言」、大阪、July 12 (2001).
- 4) 鈴木康夫・郭潮潭・鈴木隆・宮本大誠・左一八・戸谷一英・村田健臣・碓氷泰市・蟹江治・中西真人・小林一清、「ウイルス感染における受容体結合と人工受容体分子」第74回日本生化学会大会シンポジウム

「バイオインスパイアード材料から生命科学へのメッセージ」、京都、October 26 (2001)

- 5) 中西真人、「ペプチドディスプレイファージを使った遺伝子導入系の開発」、文部科学省特定領域研究「分子シンクロ材料」ミニシンポジウム、「細胞内トラフィックと薬物ターゲティングのシンクロナイズーション」、京都、December 5 (2001).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号、ページ、出版年
Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA	CAR- or $\alpha v$ integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice.	<i>Gene Ther.</i>	in press
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes.	<i>Gene</i>	in press
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Improvement of adenovirus vectors for gene transfer.	<i>Animal Cell Technology</i>	in press
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Tet-off system is more effective than Tet-on system for regulating transgene expression in single adenoviral vector.	<i>J. Gene Med.</i>	in press
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase.	<i>Cancer Gene Ther.</i>	in press
Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA	Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector.	<i>J. Control Release.</i>	in press
Omori M., Mizuguchi H., Ohsawa K., Kohsaka S., Hayakawa T., Abe K., Shibasaki F.	Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to microglial cell line.	<i>Neurosci. Lett.</i>	in press
Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWARA	Autoinhibitory regulation of p73 by DNp73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the DNp73 promoter.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	in press
Takahashi M, Seki N, Toshinori OZAKI, Kato M, Kuno T, Takahito NAKAGAWA, Ken-ichi WATANABE, Miyazaki K, Ohira M, Hayashi S, Hosoda M, Tokita H, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Satoru TODO and Akira NAKAGAWARA	Identification of the p33ING1-regulated genes which include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG.	<i>Cancer Res.</i>	in press

Yuji NAGAYAMA, Masako KITA-FURUYAMA, Takao ANDO, Kazuhiko NAKAO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsumi Eguchi and Masami NIWA	A Novel Murine Model of Graves $\pm$ Hyperthyroidism with Intramuscular Injection of Adenovirus Expressing the Thyrotropin Receptor.	<i>J. Immunol.</i>	in press
Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ -Gene Therapy for an Established Murine Melanoma Using RGD (Arg-Gly-Asp) Fiber-mutant Adenovirus Vectors.	<i>Jpn. J. Cancer Res.</i>	in press
Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Makiko KANEHIRA, Naoko NISHINO, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI	Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors.	<i>Cancer Lett.</i>	1777, 57-63 (2002)
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1568, 21-29 (2001)
Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, and Takao HAYAKAWA	Approaches for generating recombinant adenovirus vectors.	<i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i>	52, 165-176 (2001)
Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA	A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob.	<i>Gene Ther.</i>	8, 730-735 (2001)
Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA	In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector.	<i>Bio Techniques</i>	30, 1112-1116 (2001)
Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA	Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1568, 13-20 (2001)
Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA	Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors.	<i>Gene</i>	272, 149-156 (2001)
Kouji MARUYAMA, Yasuto AKIYAMA, Noriko NARA-ASHIZAWA, Takashi HOJO, Jin-YAN CHENG, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA and Ken YAMAGUCHI	Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells.	<i>J. Immunotherapy,</i>	24, 345-353 (2001)

Yuji NAGAYAMA, Eijun NISHIHARA, Hiroyuki NAMBA, Haruhiko YOKOI, Mamoru HASEGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Hirofumi HAMADA, Shunichi YAMASHITA and Masami NIWA	Targeting the Replication of Adenovirus to p53-Defective Thyroid Carcinoma with a p53-Regulated Cre/loxP System.	<i>Cancer Gene Therapy</i>	8, 36-44 (2001)
Shinsaku NAKAGAWA, Bernard MASSIE and Robert G. HAWLEY	Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential.	<i>Eur. J. Pharm. Sci.</i>	13, 53-60 (2001)
Jun KUNISAWA, Tsuyoshi NAKANISHI, Ichiro TAKAHASHI, Akiko OKUDAIRA, Yasuo TSUTSUMI, Kazufumi KATAYAMA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroshi KIYONO and Tadanori MAYUMI	Sendai virus fusion protein-mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lympho- reticular tissue immune system.	<i>J. Immunol.</i>	167, 1406-1412 (2001)
Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Akira YAMAMOTO	Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells.	<i>Cancer Res.</i>	61, 7913-7919 (2001)
Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI	Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	282, 173-179 (2001)
Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Kohei MORI, Yasushige MASUNAGA, Yoshihiro FUJII, Junko FUJITA, Kyoko FUJIMOTO, Tsuyoshi NAKANISHI, Keiichi TANAKA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO	Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation.	<i>Biochim. Biophys. Acta.</i>	1527(3), 97-101 (2001)
Naoki OKADA, Masaki TSUJINO, Yosuke HAGIWARA, Asami TADA, Yuka TAMURA, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO	Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens.	<i>Br. J. Cancer.</i>	84(11), 1564-1570 (2001)
Mahito NAKANISHI, Teruo AKUTA, Emi NAGOSHI, Akiko EGUCHI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao SENDA	Nuclear Targeting of DNA.	<i>J. Eur. Pharmaceu. Sci.</i>	13, 17-24 (2001)

Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, HaruhikoYOKOI, Hachiro INOKUCHI, Shigeo FUJITA, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI	Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells.	<i>J. Biol. Chem.</i>	276, 26204-26210 (2001)
早川堯夫, 水口裕之	遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて -次世代アデノウイルスベクターの開発-	医薬ジャーナル	37(5), 1514-1546 (2001)
水口裕之, 早川堯夫	プラスミド構築に基づいた組み換えアデノウイルスベクター作製技術	BIO INDUSTRY	18(7), 5-14 (2001)
中川晋作, 真弓忠範	遺伝子医薬品の DDS	医薬ジャーナル	37, 1559-1565 (2001)

### 書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
早川堯夫	遺伝子治療用医薬品の品質, 安全性等の確保	早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘	バイオ医薬品の品質・安全性評価	エル・アイ・シー	(2001)	pp. 341-350
水口裕之 早川堯夫	アデノウイルスベクター	早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘	バイオ医薬品の品質・安全性評価	エル・アイ・シー	(2001)	pp. 383-393,

20010428

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。