

200/0430

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療研究事業

遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 島田 隆

平成14(2002)年4月

## 目次

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| I. 総括研究報告                      |    |
| 遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究 | 1  |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表             | 11 |
| III. 主な刊行物・別刷り                 | 15 |

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）  
総括研究報告書

遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究

主任研究者 島田隆 日本医科大学第二生化学教室教授  
高度先端医療技術開発センター・遺伝子治療研究部門

研究要旨

遺伝子導入技術の開発・改良を進めるとともに、新たに多能性幹細胞を遺伝子治療の標的細胞とする可能性について検討している。我々の研究室では遺伝子異常の修復による遺伝子病の治療を最終目標として、長期組込型のウイルスベクター（HIV、AAV）の開発を行ってきた。本研究課題では更に目標を具体化するため、①遺伝子導入技術の開発、②多能性幹細胞の研究、③遺伝子修復技術の開発、の三つの課題について研究をすすめている。①での具体的な成果としては、安全で高率の HIV ベクター産生系を確立した。又、HIV の非分裂細胞への感染性を利用した眼内新生血管病や慢性関節リウマチの遺伝子治療での有用性を示した。神経系細胞や筋肉細胞への高率な遺伝子導入が可能な AAV ベクターを使った異染性ロイコジストロフィー（MLD）及び Fabry 病のモデルマウスの遺伝子治療実験を行った。Fabry マウスの実験では生化学的及び組織学的検討で著明な改善が認められた。②では GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植したキメラマウスを作製し、骨髄細胞の多能性を研究する実験系を確立した。③に関しては、レトロウイルスベクターの遺伝子安定性の研究を進めると共に変異頻度の低い新たな遺伝子組み込み法を開発を行っている。更にミスマッチ修復技術を応用して特定の塩基を変換する遺伝子操作技術の研究をすすめている。これらの研究成果をもとに、患者自身の幹細胞の遺伝子異常を修復して遺伝子病を治療する新しい方法論の確立を目指す。

A. 研究目的

遺伝子導入技術の開発・改良を進めるとともに、組織幹細胞を標的とする遺伝子病の治療法を確立することを目標としている。遺伝子治療は、遺伝子の異常の修復を目的とする「遺伝子の治療」と、遺伝子を薬剤として投与する「遺伝子を使った治療」の二つの方向で発展してきている。「遺伝子の治療」は現時点では先天性免疫不全症の治療でしか成功していないが、将来的には遺伝子病の唯一の原因療法として、ますます重要になってくると考えられる。一方、「遺伝子を使った治療」は、癌や生活習慣病などの幅広い疾患に対する応用が開始されており、今後重要な治療法の選択肢の一つとなると考えられる。我々の研究室では、これまで長期組込型のウイルスベクター（HIV、AAV）を開発し、各種疾患に対する臨床応用の可能性を検討してきた。本研究では、更に「遺伝子の治療」を行うため

の基盤技術の整備を行う。具体的には、①遺伝子導入技術の開発、②多能性幹細胞の研究、③遺伝子修復技術の開発、の三つの課題について研究をすすめる。①では、ウイルスベクターの改良に加え、ハイブリッドベクターや非ウイルス合成ベクターの研究も進める。更に、安全性や効率の点で不可欠と考えられている細胞ターゲティング技術の確立を目指す。これらベクターの開発改良と平行して現有のベクターを使って有効性が期待できる遺伝子治療の前臨床研究を進める。②では、遺伝子病の治療のための重要な標的細胞と考えられる、患者自身の骨髄中多能性幹細胞の分化能や遺伝子導入効率の検討を行う。③では、幹細胞の治療を行うために、遺伝子変異を起こさない遺伝子導入法の開発、及びミスマッチ修復技術を応用した遺伝子操作技術の基礎的研究を推進する。これらの研究により患者本人の幹細胞の遺伝子を修復することができるようになれば、究極の遺伝子治療であ

る「遺伝子の治療」による遺伝子病の治療が可能になると考えている。

## B. 研究方法

### <遺伝子導入技術の開発>

#### 1)HIV ベクターの改良及び遺伝子治療への応用

増殖性HIVベクターが出現する可能性を取り除くため、パッケージングプラスミドから可能な限り、アクセサリ遺伝子を取り除き、発現単位ごとに分割した。また、組み込まれたベクターの LTR が機能しないような self inactivation(SIN)ベクターの形のベクタープラスミドを作製した。これらをアデノウイルスベクターに組み込み、アデノウイルスベクターを発現ベクターとして使う新しいパッケージング法の開発を検討した。さらに限外濾過、カラムなどによりベクターの濃縮法を検討した。新生児マウスを高濃度酸素に暴露させることで眼内新生血管病モデルマウスを作製した。コラーゲン投与により関節リウマチモデルマウスを作製した。VSV-G 蛋白をエンベロープとする HIV ベクターを作製し、モデルマウスにアンギオスタチン或いはエンドスタチン遺伝子を導入し治療効果を検討した。

#### 2)AAVベクターの改良及び遺伝子治療への応用 (Fabry 病の遺伝子治療)

AAV ベクターは当教室で開発した方法により作製した。Fabry 病のノックアウトモデルマウスは開発者より入手した。 $\alpha$ -Gal A 活性を Kusiak らの方法に従い 4-MU- $\alpha$ -Galactoside を基質する蛍光光度法にて測定した。蓄積した脂質 Gb3 は Folch らの方法により抽出した後、薄層クロマトグラフィーにて分離し、ラインアナライザー (ATTO 社) で解析した。12 週令のノックアウトマウス (Fabry mouse) の右大腿四頭筋へ AAV ベクター ( $1.5 \times 10^{11}$  particles) を注射し、経時的に血漿中の  $\alpha$ -Gal A 活性を測定した。また、投与 5、15、25 週経過後、各臓器への  $\alpha$ -Gal A の取り込み、蓄積脂質 Gb3 の濃度を測定した。同週齢の未治療ノックアウトマウスおよびその野性型マウスも併せて測定した。組織内 Gb3 の量的変化及び形態変化は抗-Gb3

IgG マウスモノクロナル抗体を用いた免疫組織化学及び電子顕微鏡を用いて検討した。更に心臓に対する治療効果を形態的、機能的に判定する為、2D Doppler 胸部心エコーを施行した。

### <多能性幹細胞の研究>

移植時期や移植条件を検討することで骨髄細胞のほぼ 100%を GFP 陽性細胞で置換させたキメラマウスを作製した。移植 2 日前に細胞周期にある細胞を殺すため、5FU (150mg/kg)をドナーGFP マウスに投与し、移植当日に GFP 陽性骨髄単核球を採取した。レシピエントには移植当日に 0Gy, 2.5Gy, 5Gy, 10Gy の 4 段階の放射線照射を施行し、GFP 陽性骨髄単核球  $4 \times 10^6$  個を経静脈的に移植した

### <遺伝子修復技術の開発>

#### 1)レトロウイルスベクターの変異解析

HSV-TK 遺伝子、ADA 遺伝子、或いは p53 遺伝子と neoR 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター (HIV 或いは MLV) を作製した。ベクターが導入され neo 耐性となったクローンから DNA を抽出し PCR-SSCP でスクリーニングを行った後直接塩基配列を決定した。レトロウイルスベクターで導入された遺伝子の変異頻度を調べた。

#### 2)ミスマッチ修復を利用した塩基置換法

各種オリゴヌクレオチドを作製し二本鎖 DNA との相互作用をゲルシフトアッセイ、制限酵素感受性試験で検討した。LacZ 遺伝子をもつ m13 ファージ DNA を利用した in vitro でのミスマッチ修復アッセイ系を確立した。

#### (倫理面への配慮)

現時点では直接ヒトを対象とした研究は行っていない。動物実験については日本医科大学実験動物倫理委員会の許可を得ている。本研究課題で目指している患者自身の骨髄中多能性幹細胞を標的とする遺伝子治療は、germline 細胞や ES 細胞と比べ倫理的問題は少ない。骨髄採取は手技として確立しており、患者への負担も比較的軽度である。遺伝子を修復した患者自身の骨髄多能性幹

細胞を使った遺伝子治療は安全性の点でも倫理性の点でも極めて優れた方法であると考えている。

## C. 研究結果

### <遺伝子導入技術の開発>

#### 1) HIV ベクター

発現単位ごとに分割したパッケージングプラスミドとベクタープラスミドにより組み換えウイルスベクターの産生が可能であり、これらをアデノウイルスベクターに組み込み、プラスミドをトランスフェクションした時よりも gag, pol, env. ベクター共に高い発現が得られた。これらのアデノウイルスを使用するベクター産生法により、従来の方法より 10 倍以上力価の高い HIV ベクターが得られる。また、さらに高力価なベクターを得るため、限外濾過、カラムなどの濃縮法の開発を行い、ベクターを 1000 倍濃縮することに成功した。

HIV ベクターのプロモーターを組み込まれたベクターの LTR が機能しないような self inactivation (SIN)ベクターに改良した。また、発現効率、遺伝子導入効率をさらに高めるため、WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)や cPPT-CTS (central polypurine tract and central termination sequence) などの cis-elements の付加を行い、従来より 10 倍高い力価のベクター作製が可能となり、より安全で導入効率の高いベクターを作製した。

VSV エンベロープを持つ HIV ベクターの応用として、血管新生抑制因子 (angiostatin 或いは endostatin) を発現するレンチウイルスベクターを作製し、悪性リンパ腫モデルマウスの筋肉内で発現分泌させたところ、腫瘍の増殖抑制と共に延命効果が確認できた。又、同じベクターを関節リウマチモデルマウスの関節内に投与したところ著明な抗炎症作用と滑膜の増殖抑制が認められた。眼内血管新生モデルにおいても血管新生の抑制効果が確認できた。

#### 2) AAV ベクター (Fabry 病の遺伝子治療)

HeLa 細胞クローンから分泌された  $\alpha$

-Gal A 蛋白の Fabry fibroblast への取り込みは M6P 存在下では抑制されるのに対し、G6P 存在下では抑制されなかった。M6P レセプターを介した、 $\alpha$ -Gal A の internalization が示唆された。

AAV ベクター ( $1.5 \times 10^{11}$  particles) を筋肉に注射したノックアウトマウスでは、血清中の  $\alpha$ -Gal A 活性は上昇し、治療 10 週後には正常マウスの約 26% まで上昇し、最長治療 32 週後まで活性の上昇を維持した。5 週、15 週、25 週にて各臓器の  $\alpha$ -Gal A 活性を測定したところ、治療 5 週後には各臓器の  $\alpha$ -Gal A 活性の上昇 (正常マウスの 5-15%) を認め、その後も 25 週に渡って、活性の低下は認められず、同様の活性を維持した。Gb3 の蓄積は著明に抑制され、治療群ではすべての臓器で、正常マウスとほぼ同等の Gb3 の低値を示した。

抗 Gb3 モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討では、非治療群では Gb3 の蓄積が認められるのに対し、治療群では Gb3 の蓄積がほとんど認められなかった。電子顕微鏡による腎臓実質の観察でも、非治療群では Gb3 の蓄積が認められるのに対し、治療群では Gb3 の蓄積がほとんど認められなかった。

治療後 25 週における、心重量/体重比は非治療群で  $5.48 \pm 0.52$ 、治療群で  $4.76 \pm 0.31$  mm、心室中隔壁厚 IVST は非治療群で  $1.83 \pm 0.10$ 、治療群で  $1.65 \pm 0.10$  mm、左室後壁厚 PWT は非治療群で  $1.68 \pm 0.31$ 、治療群で  $1.58 \pm 0.10$  mm と治療群では形態機能学的に心肥大の抑制を認めた。

### <多能性幹細胞の研究>

移植 5 週後に FACS を用いて移植マウスを評価したところ、10Gy 照射群では骨髄、末梢血、胸腺、脾臓ともにほぼ完全に GFP 陽性細胞により置き換わっていた。また 10Gy 照射群では B 細胞、T 細胞、顆粒球いずれの系統も通常マウスと同様な比率で GFP 陽性を認めた。また骨髄細胞をサイトカインの添加なしでそのまま培養すると間葉系細胞が付着するが、間葉系細胞も GFP トランスジェニックマウスと同様に GFP 陽性細胞を認めた。モデルマウスの各組織における GFP の発現を確認したところ、脳、心臓、腎臓、筋肉、肝臓、脾臓のいずれで

も、骨髄由来の細胞は各組織において血管内にのみ存在した。

このモデルマウスに人為的侵襲を加え、病変を作ること、病変部への細胞浸潤と治癒過程における骨髄細胞由来の GFP 陽性細胞の組織再生における骨髄細胞の関与を検討することが可能になると考えられる。一つのモデルとして左冠状動脈を結紮することで心筋梗塞モデルを作製した。急性期の梗塞部には GFP 陽性細胞が浸潤し、一ヶ月後には同部位が GFP 陽性細胞により置き換わったことが確認された。また、組織特異的免疫染色後に多重焦点顕微鏡を用いて観察したところ、梗塞心筋が GFP 陽性細胞により再生されたことが示された。心筋梗塞病変周囲を中心として骨髄由来の細胞が心筋に分化しているのを確認した。現在、心筋梗塞のみならず、骨髄細胞の神経系細胞、腎臓や腸管の再生の可能性を検討している。

#### < 遺伝子修復技術の開発 >

##### 1) レトロウイルスベクターの変異解析

① HIV ベクターによる遺伝子変異：HIV ベクターにより組み込まれた HSV-TK 遺伝子を 130 個の CD4 陽性 HeLa 細胞クローンについて調べた結果、16% (21/130) のクローンで塩基置換、組換え、繰り返し配列リピート数の変化などの遺伝子変異が見出された。塩基置換については 130 クローン中、11 のクローンで 19 の塩基で同定された。これらの置換は TK 遺伝子の二つの領域に集中していた。最も多い塩基置換は G から A への transition であった。一つのクローンで 3 個以上の変異が起きている hypermutation が二つのクローンで認められた。塩基対あたりの塩基置換頻度は 1/7720 塩基対であった。これらの変異のうち、TK 遺伝子の発現や活性に影響を与える可能性のあるミスセンス或いはナンセンス変異は 8 クローン (6.2%) で同定された。組換えについては三つのクローンで認められた。クローン 36 では短い繰り返し配列が多数含まれる 275 塩基対の配列が組み込まれていた。クローン 114 では 4 塩基の繰り返し配列で囲まれた 15 塩基対が由来不明の配列に置き換わっていた。neo 遺伝子の発現に使われる tk プロモーターに

はポリオーマ由来の 65 塩基対のエンハンサーが 2 分子繰り返されている。このエンハンサー配列のリピート数の変化が 7 クローンで同定された。3 クローンにおいてリピート数 1 と 2 のキメラ、2 クローンにおいてリピート数 1、1 クローンにおいてリピート数 3、1 クローンにおいてリピート数 2 と 3 のキメラであった。② MLV ベクターによる遺伝子変異：高頻度の遺伝子変異が HIV に特異的なものであるかどうかを調べるため、全く同じ遺伝子を持つ MLV ベクターを作製し同様の解析を行った。その結果、MLV ベクターにおいても HIV ベクターと同様の遺伝子変異が 19% (23/118) のクローンで起きていることが明らかになった。MLV ベクターでは 1/7960 塩基対であった。118 クローン中、15 のクローンで 17 の塩基置換が同定された。変異部位は HIV で認められた二つの領域に一致していた。で認められた。最も多い塩基置換は G から A への transition であった。hypermutation が一つのクローンで認められた。塩基対あたりの塩基置換頻度は 1/7960 塩基対であった。ミスセンス或いはナンセンス変異は 14 クローン (11.9%) で同定された。二つのクローンで遺伝子の組換えが認められた。又、エンハンサー配列のリピート数の変化も 6 個のクローンで認められた。4 クローンにおいてリピート数 1、2 クローンにおいてリピート数 1 と 2 のキメラであった。

##### 2) ミスマッチ修復を利用した塩基置換法

M13mp2 の lacZ 遺伝子を標的遺伝子として、種々のオリゴヌクレオチド (環状型キメラオリゴ、環状型オリゴ、ヘアピン型オリゴ、単鎖オリゴ) を調製した。それぞれ、標的遺伝子と相補する配列 (25 bp) を持ち、中央にミスマッチ塩基を持つオリゴと持たないオリゴを調製した。無細胞系での遺伝子修復活性、標的 DNA との対合能、複合体と hMutSalpha の相互作用に関して比較検討した。

M13mp2 の RF に存在する lacZ 遺伝子とオリゴヌクレオチドを細胞抽出液とインキュベート後回収し、lacZ 遺伝子の表現型および DNA 塩基配列を解析し、オリゴヌクレオチドの遺伝子修復活性を検討した。す

るとミスマッチを持つオリゴヌクレオチドは標的とする塩基を修復する活性を示した。その効率は単鎖オリゴ>環状型オリゴで、環状型キメラオリゴでは見られなかった。

オリゴヌクレオチドと標的遺伝子の複合体形成標的とする遺伝子と相補配列を持つオリゴヌクレオチドが標的 DNA と複合体を形成することを、両者をインキュベート後 PAGE により検討した。標的 DNA として lacZ 遺伝子の一部 (260 bp) を熱変性後用いるとラベルしたオリゴヌクレオチドと複合体を形成した。相補配列を持たない amp 遺伝子を標的 DNA として用いた場合にはこの複合体は見られなかった。標的 DNA と単鎖オリゴの複合体は、複合体の配列内に認識部位を持つ制限酵素で切断されることから、複合体形成が塩基配列に依存していることを明らかにした。

標的 DNA とミスマッチを持つ複合体にはミスマッチが存在すると考えられる。複合体と hMutSalpha の相互作用を、精製 hMutSalpha を用いたゲルシフトで検討した。ミスマッチ結合のコントロールとしてラベルしたヘテロ二本鎖を用いた。単鎖オリゴと比較的長さの短い標的 DNA の複合体と hMutSalpha の相互作用においてミスマッチに依存した結合が見られた。

#### D. 考察

遺伝子治療が開始されてから 10 年が経過し、一部の疾患では有効性が報告されているが、同時に遺伝子治療技術の問題点も明らかになっている。今後、遺伝子治療を進展させていくためには、遺伝子導入技術の開発・改良だけでなく、標的細胞や遺伝子の操作技術の革新的進歩が必要である。これまで遺伝子治療は遺伝子異常の修復を目的とする「遺伝子の治療」と、遺伝子を薬剤として使う「遺伝子による治療」の二つの方向で発展してきている。「遺伝子の治療」は現時点では先天性免疫不全症の治療でしか成功していないが、将来的には遺伝子病の究極の治療法として、ますます重要になってくると考えられる。遺伝子治療を行うためには、現在のような正常遺伝子を導入するだけでなく、異常遺伝子を積極的に治療する必要がある。又、germline

細胞や ES 細胞の治療は倫理的に問題があるが、各組織の幹細胞は遺伝子の治療のための理想的な標的細胞になると考えられる。患者自身の多能性幹細胞の遺伝子修復が可能になれば、倫理性や安全性の問題が一気に解決され、ほとんど全ての遺伝子病の治療ができるようになると考えられる。

一方、「遺伝子による治療」は、癌や生活習慣病などの幅広い疾患に対する応用が開始されており、今後重要な治療法の選択肢の一つとなると考えられる。遺伝子による治療では基本的に *in vivo* で行われるため、標的細胞だけを治療できる細胞ターゲティング技術が不可欠である。細胞ターゲティングが実用化され、ベクターの全身投与による治療が安全に行えるようになれば、遺伝子治療の適応範囲は飛躍的に広がることが期待できる。

#### <遺伝子導入技術の開発>

遺伝子による治療の一つの可能性として AAV ベクターを使った Fabry 病の遺伝子治療研究を行った。Fabry 病は白人男性で 4000 人に一人の割合で見られる比較的頻度の高い先天性代謝疾患で、心不全、腎不全等を引き起こし、何も治療を施さない場合 40 代から 50 代で死亡すると言われている。治療法としては対症療法しか無く、根本治療が期待されている。米国において  $\alpha$ -Gal A を経静脈的に投与する酵素補充療法が行われ、 $\alpha$ -Gal A の発現と Gb3 の各臓器での蓄積の抑制が認められたが、長期に渡る  $\alpha$ -Gal A 投与が必要であるため患者に大きな金銭的負担が生じる。また治療の評価方法が、患者の痛みの軽減度合い、病理的な改善スコアでの判断など、客観性に欠けるものであった。我々の Fabry マウスでの実験結果では、安全性に優れ、非分裂細胞にも導入できる AAV ベクターを筋肉に一回導入することにより長期的な  $\alpha$ -Gal A の発現と Gb3 の各臓器での蓄積を確認できた。さらに心臓超音波検査を用いることにより、客観的データによる治療の効果判定ができた。今回の結果はヒトの Fabry 病の根本治療にも十分応用出来るものと考えられる。

#### <多能性幹細胞の研究>

最近の再生医療の研究でこれまで造血幹

細胞の脇役とされていた間質細胞が注目されている。骨髄細胞の多分化能は骨髄間質細胞の中に含まれる間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC)がその主役であると考えられ、現在その細胞を同定・純化する研究が盛んに行われている。現在までに間葉系幹細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞のみならず、骨格筋や心筋、中枢神経細胞、胚葉を越えて内胚葉由来の肝細胞にも分化したとの報告もある。間葉系幹細胞の表面マーカーおよび分化過程でのその抗原の変遷に関しては詳しい検討がまだなされていない。ヒトにおいては CD34 が造血幹細胞の代表的な表面マーカーであるが、間葉系幹細胞においては初期培養では観察されるものの時間の経過とともに失われていくといわれ、現在のところ決め手になる表面抗原は見つかっていない。造血系マーカーでは間葉系幹細胞では CD34, CD40, CD164 が陽性であり CD3, CD4, CD8, CD80, CD86 などの免疫応答に関与する抗原の発現は認められない。また接着分子、インテグリン、成長因子等の発現の検討も行われているところである。今後は間葉系幹細胞のクローナルなレベルでの分化増殖の検討が必要であり、純化法の評価を進めるとともに、分化の過程でこのようなマーカーがどのような振る舞いをして、どのような機能をになっているかを解明することが待たれるところである。

骨髄間質細胞は無処置で培養すると脂肪細胞、骨芽細胞、および軟骨芽細胞に分化していく。ビタミン D を投与すると骨芽細胞に分化するなど、培養条件によって分化誘導が可能である。また脱メチル化酵素の 5-アザシチジンを使用し、マウスの間葉系幹細胞から心筋細胞や神経細胞をも誘導可能であったとの報告もある。実際の臨床で再生医療に応用するためには、MSC を目的の組織にのみ分化誘導することが必要不可欠であり、今後は MSC を単離し、目的の細胞へ分化誘導する研究がますます盛んになって行くであろう。

#### <遺伝子修復技術の開発>

HIV ベクター及び MLV ベクターの変異解析の結果、両ベクターによって染色体に組み込まれたベクター遺伝子には、同等に

高頻度に変異が導入されていることが明らかになった。このようなベクターの遺伝子変異の発生メカニズム、発生頻度、遺伝子発現や標的細胞への影響を調べることは、ベクターの安全性や有用性を考えるための重要な基礎研究になると考えられた。

レトロウイルスの複製過程で遺伝子変異が起き易いことはよく知られており、これがレトロウイルスの遺伝的多様性 (genetic diversity) の原因と考えられている。特に HIV の感染においては、アミノ酸配列が少しだけ異なる多数のウイルスの集団 (quasispecies) が患者体内に出現することが治療法開発の上で大きな問題となっている。遺伝子変異が起き易い原因としては、逆転写酵素 (RT) に校正活性が無いため精度 (fidelity) が低いためと考えられている。しかし、実際にどの程度の頻度で変異が起こるかについては解析法が確立していなかったため、はっきりした数値は報告されていなかった。また、ウイルスベクターの安全性や有効性の観点から変異頻度を検討した報告もこれまでにない。本研究は、PCR-SSCP 法及び、直接シーケンス法により非増殖性レトロウイルスベクターの変異頻度を調べた最初の研究である。

本研究により、HIV ベクターと MLV ベクターでは同様の頻度で、同様の種類の変異が導入されることが明らかになった。従って、遺伝子の不安定性はレトロウイルス共通の問題と考えられる。HIV ベクターは、非分裂細胞の染色体に組み込まれることが明らかになり、神経系細胞や造血幹細胞への遺伝子導入ベクターとして注目されている。HIV ベクターの遺伝子の安定性を評価する事は HIV ベクターの遺伝子治療への応用を考える上で極めて重要である。これまで HIV が著しい遺伝的多様性を示す原因として、HIV の RT の精度が他のレトロウイルスの RT と比べて低いためなのか、増殖頻度が高いためなのか議論があったが、本実験結果は少なくとも前者が原因でないことを証明する結果となった。

ここで得られた結果は基本的にはこれまで野生型ウイルスで明らかにされたレトロウイルスの特徴と一致している。約 8000 塩基対に 1 個の割合で起きている変異頻度も、これまでの報告と矛盾しない数値であ



る。レトロウイルスベクターで遺伝子導入した場合には、ベクターが導入された細胞の 10-20%は変異遺伝子を持っていることになる。

レトロウイルス (ベクター) の遺伝子変異が起こるメカニズムは依然として不明な点が多い。現象的には塩基置換がほとんど G から A で、G が連続した所に起き易いが、それを説明できる分子機構は知られていない。又、明らかに遺伝子変異が集積している領域 (ホットスポット) が認められるが、あらかじめ予測することはできない。既に HIV の研究などでレトロウイルスゲノムに導入される変異のパターンについての膨大なデータが蓄積されているにもかかわらず、現時点では遺伝子構造から遺伝子変異を予測できるプログラムは作られていない。

遺伝子構造と変異頻度の関係を更に明らかにするために HSV-TK 以外の遺伝子として ADA 遺伝子と p53 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを作製し同様の変異解析を進めている。更に、導入遺伝子の変異頻度に影響を与える要素を明らかにするため、検出された導入遺伝子の変異の特性および異なった導入遺伝子をもつウイルスベクターにおける構造上の特性を、慶応義塾大学環境情報学部、富田教授グループと共同研究を行っている。現在のところ高次構造と変異との直接的因果関係を示唆するデータは得られていない。

既に導入されてしまった遺伝子変異を修復する方法としてミスマッチ修復系を利用した塩基置換法の研究を開始した。標的とする遺伝子と一部ミスマッチを持つオリゴヌクレオチドは標的 DNA と塩基配列に従った対合をし複合体を形成することを見出した。複合体中に生成するミスマッチは hMutS $\alpha$  と結合し、無細胞系での遺伝子修復アッセイではミスマッチを持つオリゴヌクレオチドのみが変異した遺伝子を生成した。以上のことは、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子修復に細胞のミスマッチ修復系が関与していることが示している。今後ミスマッチ修復が欠損している細胞 (LoVo) の抽出液を用いて遺伝子修復アッセイを行い、hMSH2 の関与を明らかにする予定である。この研究は人工的に生成したミスマッチに対するミスマッチ修復系の

認識機構を明らかにするだけでなく、方法を改良することにより遺伝子を改変する技術としての開発が考えられる。

## E. 結論

HIV ベクターによる眼内新生血管病及び慢性関節リウマチの遺伝子治療の可能性を示した。AAV ベクターによる異染性ロイコジストロフィー及び Fabry 病の遺伝子治療に成功した。GFP 陽性骨髄細胞をもつキメラマウスを作製し多能性幹細胞が実験系を確立した。in vitro でのミスマッチ修復アッセイ系を確立し、オリゴヌクレオチドによる遺伝子変換の可能性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyake, K., Iijima, O., Suzuki, N., Matsukura, M., and Shimada, T. (2001) Selective killing of HIV infected cells by targeted gene transfer and inducible gene expression using a recombinant HIV vector. *Hum. Gene Ther.* 12:227-233
- 2) Nakano, K., Migita, M., Mochizuki, H., and Shimada, T. (2001) Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735-1740
- 3) Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., and Shimada, T. (2001) Selective transduction of HIV-1 infected cells by the combination of HIV and MLV vectors. *Inter. J. Hematol.* 73:476-482
- 4) Shimizu, H., Akasaka, S., Suzuki, S., Akimoto, M., and Shimada, T. (2001) Preferential gene transfer to BBN-induced rat bladder tumor by simple instillation of adenoviral vector. *Urology* 57:579-584
- 5) Akasaka, S., Suzuki, S., Shimizu, H., Igarashi, T., Akimoto, M., and Shimada, T. (2001) Suicide gene therapy for chemically induced rat bladder tumors entailing instillation

- of adenoviral vectors. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:568-575
- 6) Goseki-Sone, M., Orimo, H., Watanabe, A., Hamatani, R., Yokozeki, M., Ohyama, K., Kuroda, T., Watanabe, H., Shimada, T., and Oida, S. (2001) Identification of a novel frameshift mutation (383insT) in the RUNX2 (PEBP2 alpha/CBFA1/AML3) gene in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *J. Bone Miner. Metab. J. Bone Miner. Metab.*, 19: 263-266, 2001.
  - 7) Nishiyama, Y., Nejima, L., Watanabe, A., Kotani, E., Sakai, N., Hatamachi, A., Shinkai, H., Kikuchi, K., Tamura, K., Shimada, T., Takano, T., and Katayama, Y. (2001) Ehlers-Danlos syndrome type IV with a unique point mutation in COL3A1 and familial phenotype of myocardial infarction without organic coronary stenosis. *J. Intern. Med.* 249:103-108
  - 8) Okino, T., Onda, M., Matsukura, N., Inada, K., Tatematsu, M., Suzuki, S., Shimada, T. (2001) Sequential histopathological changes in vivo after suicide gene therapy of gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:673-679
  - 9) Orimo, H., Girschick, H. J., Goseki-Sone, M., Ito, M., Oda, K., and Shimada, T. (2001) Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* 16: 2313-2319
  - 10) Mochizuki, M., Hayakawa, H., Migita, M., Shibata, M., Tanaka, R., Suzuki, A., Shimo-Nakanishi, Y., Urabe, T., Yamada, M., Tamayose, K., Shimada, T., Miura, M. and Mizuno, Y. (2001) An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as anti-apoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:10918-10923
  - 11) Suzuki, S., and Shimada, T. (2001) Suicide gene therapy for bladder tumors. *J. Nippon. Med. Sch.*, 68: 368-369
  - 12) Orimo, H., Goseki-Sone, M., Inoue, M., Tsubakio, Y., Sakiyama, T., and Shimada, T. (2002) Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Metab.*, 20: 28-33
  - 13) Watanabe, A., Kawabata, Y., Okada, O., Tanabe, N., Kimura, H., Hatamaoichi, A., Shinkai, H., Sakai, N., Shimada, T., Hiroshima, K., Kuriyama, T. (2002) Ehlers-Danlos syndrome type IV with few extrathoracic findings: a newly recognized point mutation in the COL3A1 gene. *Eur. Respir. J.* 19:195-198
  - 14) Migita M., Hamada, H., Fujimura, J., Watanabe, A., Shimada, T., Fukunaga, Y. Glucocerebrosidase level in the cerebrospinal fluid during enzymereplacement therapy -unsuccessful treatment to the neurological abnormality of type 2 Gaucher disease-. *Eur. J. Paed. (in press)*
  - 15) 島田隆：カラー図説：遺伝子修復技術の進歩。日本臨床 59：2-5 (2001)
  - 16) 島田隆：レトロウイルスベクター。(第2部第1章第1節 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価法)「バイオ医薬品の品質・安全性評価」早川、山崎、延原編集 p351-363 (2001) LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER
  - 17) 島田隆：癌遺伝子治療の現況。(特集：遺伝子医療・現況と将来) 臨床婦人科産科 55:918-921 (2001)
  - 18) 島田隆：遺伝子治療に使われるベクター。(特集：遺伝子治療と Vector) 細胞 33:208-212 (2001)
  - 19) 嶋秀樹、島田隆：臨床で有望な新規ベクター開発研究の現状 (特集：遺伝子治療研究の新たな展開) 分子細胞治療

- 2:223-229 (2001)
- 20) 島田隆：遺伝子治療の現状と将来．東日本整形災害外科学会雑誌 13:127-130 (2001)
  - 21) 島田隆：遺伝子治療技術の新しい展開．分子呼吸器病 5:75-77 (2001)
  - 22) 島田隆：遺伝子治療の現状と将来．(卒後研修講座) 整形外科
  - 23) 島田隆：遺伝子治療の現状と展望．耳鼻咽喉科免疫アレルギー 19:1-6 (2001)
  - 24) 島田隆：遺伝子を治療する遺伝子治療．「先天性代謝異常症-最新の治療」小児内科 33:1021-1024 (2001)
  - 25) 島田隆、中島英逸：レトロウイルスベクターゲノムの安定性．「遺伝子治療の最前線」細胞工学 20:1243-1249 (2001)
  - 26) 島田隆：遺伝子治療の現状と展望．東京小児科医会報 20:6-10 (2001)
  - 27) 島田隆：遺伝子医療の倫理的課題．日本医大誌 68:430-434 (2001)
  - 28) 池島三与子、島田隆：ミスマッチ修復の分子機構．蛋白質・核酸・酵素 46:1124-1129 (2001)
  - 29) 島田隆：遺伝子治療の将来．「癌治療の先端にせまる」実験医学 19:255-2556 (2001)
  - 30) 島田隆：遺伝子治療．「図説分子病態学」
  - 31) 島田隆：遺伝子治療の理念と方法．(わかりやすいゲノム・再生医療の基礎・現状・展望) medicina 39:398-400 (2002)
2. 学会発表
- 1) 五十嵐 勉、三宅 弘一、鈴木 紀子、加藤 興、高橋 浩、大原 國俊、島田隆：角膜上皮幹細胞、TA 細胞への遺伝子導入．角膜カンファレンス (大阪) 2001.2.
  - 2) 島田 隆：遺伝子医学の現状と将来．第 53 回東海地区歯科医学大会 (名古屋) 2001.2.
  - 3) 三宅弘一、鈴木紀子、島田隆：HIV ベクターによる ATL 遺伝子治療の検討 第 63 回日本血液学会総会 (名古屋) 2001. 4.
  - 4) 五十嵐勉、三宅弘一、鈴木紀子、加藤興、高橋浩、大原國俊、島田隆：角膜上皮幹細胞および TA 細胞への遺伝子導入．第 105 回日本眼科学会総会 (横浜) 2001.4.
  - 5) 早川 潤、右田 真、植田 高弘、島田隆、福永慶隆：骨髄細胞の多能性の解析に向けて～GFP 陽性骨髄細胞のモデルマウスの作成～．第 104 回日本小児科学会学術集会 (仙台) 2001.5.
  - 6) Hiranuma, T., Watanabe, A., Mizuguchi, H., Hayakawa, A., Matsukura, M., Miike, A., Shimada, T. : Specific gene expression system for vascular smooth muscle cells. The 7th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2001.7.
  - 7) Sugiyama, O., Orimo, H., Suzuki, S., Shimada, T.: Gene Therapy of Bone Defects Using Genetically Modified Primary Bone Marrow Stromal Cells. The 7th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2001.7.
  - 8) Miyake, K., Suzuki, N., Shimada, T.: Production of high-titer lentiviral vectors using adenovirus-HIV hybrid expression vectors. The 7th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 2001. 7.
  - 9) Kato, K., Miyake, K., Suzuki, N., garashi, T., Nagashima, M., Yosino, S., Shimada, T.: Abgiostatic gene therapy of rheumatoid arthritis. The 7th Annual Meeting of Japanese Society of Gene Therapy (Tokyo) 2001. 7.
  - 10) Orimo, H., Shin, Y. S., Shimada, T.: G317D mutation in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with childhood hypophosphatasia in a German family. 第 4 回 ALPS 研究会 (大阪) 2001. 7.
  - 11) 早川潤、右田真、植田高弘、島田隆、福永慶隆：骨髄細胞の多能性の解析に向けて～GFP 陽性骨髄細胞のモデルマウスの作成～．第 69 回日本医科大学医学会総会 (東京) 2001.9.

- 12) 早川潤、右田真、植田高弘、島田隆、福永慶隆：骨髄細胞の多能性の解明にむけた GFP 陽性骨髄細胞モデルマウスの作成  
～再生医学への応用～. 第 43 回日本小児血液学会（北九州）2001.9.
- 13) 杉山修、白井康正、折茂英生、島田隆：初代培養の骨髄ストローマ細胞を用いた遺伝子治療による骨形成（「パネルディスプレイセッション」）. 第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会（広島）2001.10.
- 14) 久安早苗、平井幸彦、島田隆：TAT ペプチド融合 AAVRep78 蛋白質の精製と機能の検討. 第 74 回日本生化学会大会（京都）2001.10.
- 15) 杉山修、白井康正、伊藤博元、折茂英生、鈴木聡、島田隆：初代培養の骨髄ストローマ細胞を用いた 遺伝子治療による骨形成. 第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会（広島）2001.10.
- 16) 早川潤、右田真、植田高弘、島田隆、福永慶隆：骨髄細胞の多能性の解析に向けて～GFP 陽性骨髄細胞のモデルマウスの作成～. 第 44 回日本先天代謝異常学会（久留米）2001.11.
- 17) 早川潤、右田真、野々山恵章、島田隆、福永慶隆：造血幹細胞を標的とした X 連鎖重症複合型免疫不全症の遺伝子治療. 第 105 回日本小児科学会総会（名古屋）2002.4.
- 18) 早川潤、右田真、島田隆、福永慶隆：GFP+骨髄幹細胞と間葉系幹細胞を持つ 2 種類のキメラマウスの作成-間葉幹細胞の多能性の解明に向けて-. 第 105 回日本小児科学会総会（名古屋）2002.4.
- 19) 早川潤、右田真、林田真理、倉持雪穂、島田隆、福永慶隆：GFP 陽性骨髄細胞のモデルマウスの作製～骨髄細胞の多能性の解明に向けて～.  
第一回日本再生医学学会総会（京都）2002.4.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名   | 書籍全体の編集者名      | 書籍名               | 出版社名                            | 出版地 | 出版年  | ページ      |
|------|---|----------------|-------------------|---------------------------------|-----|------|----------|
| 島田隆  | レトロウイルスベクター。<br>(第2部第1章第1節 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価法) | 早川、山崎、<br>延原編集 | 「バイオ医薬品の品質・安全性評価」 | LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER | 東京  | 2001 | p351-363 |

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  |
|-------------------------|--|-----------------------------|-----|-------------|------|
| Miyake, K., et al.      | Selective killing of HIV infected cells by targeted gene transfer and inducible gene expression using a recombinant HIV vector.                          | Hum. Gene Ther.             | 12  | 227-233     | 2001 |
| Nakano, K., et al.      | Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain.  | Transplantation             | 71  | 1735-1740   | 2001 |
| Sakai, N., et al.       | Selective transduction of HIV-1 infected cells by the combination of HIV and MLV vectors.  | Inter. J. Hematol           | 73  | 476-482     | 2001 |
| Shimizu, H., et al.     | Preferential gene transfer to BBN-induced rat bladder tumor by simple instillation of adenoviral vector.   | Urology                     | 57  | 579-584     | 2001 |
| Akasaka, S., et al.     | Suicide gene therapy for chemically induced rat bladder tumors entailing instillation of adenoviral vectors.   | Jpn. J. Cancer Res.         | 92  | 568-575     | 2001 |
| Goseki-Sone, M., et al. | Identification of a novel frameshift mutation (383insT) in the RUNX2 (PEBP2 alpha/CBFA1/AML3) gene in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia.   | J. Bone Miner. Metab        | 19  | 263-266     | 2001 |
| Nishiyama, Y., et al.   | Ehlers-Danlos syndrome type IV with a unique point mutation in COL3A1 and familial phenotype of myocardial infarction without organic coronary stenosis. | J. Intern. Med.             | 249 | 103-108     | 2001 |
| Okino, T., et al.       | Sequential histopathological changes in vivo after suicide gene therapy of gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats.       | Jpn. J. Cancer Res.         | 92  | 673-679     | 2001 |
| Orimo, H., et al.       | Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia.                                   | J. Bone Miner. Res.         | 16  | 2313-2319   | 2001 |
| Mochizuki, M., et al.   | An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as anti-apoptotic gene therapy for Parkinson's disease.                         | Proc. Natl. Acad. Sci. USA. | 98  | 10918-10923 | 2001 |
| Suzuki, S., et al.      | Suicide gene therapy for bladder tumors.   | J. Nippon. Med. Sch.,       | 68  | 368-369     | 2001 |
| Orimo, H., et al.       | Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia            | J. Bone Miner. Metab.       | 20  | 28-33       | 2002 |

|                          |  |                             |    |               |      |
|--------------------------|--|-----------------------------|----|---------------|------|
| Watanbabe, A.,<br>et al. | Ehlers-Danlos syndrome type IV with few extrathoracic findings: a newly recognized point mutation in the COL3A1 gene.  | Eur. Respir. J.             | 19 | 195<br>-198   | 2002 |
| Migita M.,<br>et al.     | Glucocerebrosidase level in the cerebrospinal fluid during enzymereplacement therapy -unsuccessful treatment to the neurological abnormality of type 2 Gaucher disease-. | Eur. J. Paed.<br>(in press) |    |               |      |
| 島田隆                      | カラー図説：遺伝子修復技術の進歩.  | 日本臨床                        | 59 | 2-5           | 2001 |
| 島田隆                      | 癌遺伝子治療の現況. (特集：遺伝子医療-現況と将来)  | 臨床婦人科産科                     | 55 | 918<br>-921   | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療に使われるベクター. (特集：遺伝子治療 Vector)  | 細胞                          | 33 | 208<br>-212   | 2001 |
| 埜秀樹、<br>島田隆              | 臨床で有望な新規ベクター開発研究の現状 (特集：遺伝子治療研究の新たな展開)   | 分子細胞治療                      | 2  | 223<br>-229   | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の現状と将来.   | 東日本整形災害外<br>科学会雑誌           | 13 | 127<br>-130   | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療技術の新しい展開.   | 分子呼吸器病                      | 5  | 75-77         | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の現状と将来. (卒後研修講座)  | 整形外科                        |    |               |      |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の現状と展望.   | 耳鼻咽喉科免疫ア<br>レルギー            | 19 | 1-6           | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子を治療する遺伝子治療. 「先天性代謝異常症-最新の治療」  | 小児内科                        | 33 | 1021<br>-1024 | 2001 |
| 島田隆、<br>中島英逸             | レトロウイルスベクターゲノムの安定性. 「遺伝子治療の最前線」  | 細胞工学                        | 20 | 1243<br>-1249 | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の現状と展望.   | 東京小児科医会報                    | 20 | 6-10          | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子医療の倫理的課題.   | 日本医大誌                       | 68 | 430<br>-434   | 2001 |
| 池島三与子、島田<br>隆            | ミスマッチ修復の分子機構.  | 蛋白質・核酸・酵素                   | 46 | 1124<br>-1129 | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の将来. 「癌治療の先端にせまる」   | 実験医学                        | 19 | 255<br>-256   | 2001 |
| 島田隆                      | 遺伝子治療の理念と方法. (わかりやすいゲノム・再生医療の基礎・現状・展望)   | medicina                    | 39 | 398<br>-400   | 2002 |

20010430

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。