

200/0431

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

治療用外来遺伝子の生体内発現制御に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 落谷 孝広

平成14（2002）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
治療用外来遺伝子の生体内発現制御に関する研究		
落谷 孝広	-----	1
II. 分担研究報告		
1. バイオマテリアルによる生体内遺伝子ベクターの制御に関する研究		
落谷 孝広	-----	5
2. 血管新生を標的にしたがんの遺伝子治療開発の基礎検討に関する研究		
吉田 輝彦	-----	7
3. 腫瘍特異攻撃ベクターの開発に関する研究		
濱田 洋文	-----	10
3. 生体への理想的遺伝子導入：高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発に関する研究		
片岡 一則	-----	16
4. 部位特異的組み換え酵素を用いた多段階発現制御系の遺伝子治療への応用に関する研究		
鐘ヶ江 裕美	-----	23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27

治療用外来遺伝子の生体内発現制御に関する研究

主任研究者 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

治療用外来遺伝子を生体に導入する場合、重要となる要素はその導入効率、特異性、生体内制御の3点である。本研究に於いては、特に遺伝子治療用ベクターが生体内で最大限の治療効果を発揮できるよう、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方策、標的への確実なデリバリーなどをさらに改良・工夫し、生体にとって有効かつ副作用の少ない安全な方法を樹立することが目的である。これまでに治療終了時、あるいは副作用の発生時にすぐさま遺伝子治療をOFFに制御する目的のために、生体由来親和性物質であるアテロコラーゲンと合成化合物シリコンからなるハイブリッドを素材とする体内インプラントの設計に成功し、体内に埋め込んだインプラントを物理的に除去することで、任意に遺伝子発現を制御するシステムを作成した。さらに細胞株を用いてFLPとCreを併用した時期を変えて発現制御を行う多段階発現制御系の構築、正常細胞には感染しないが、特定の腫瘍細胞に遺伝子導入効率が高く、選択的に遺伝子を導入出来るターゲッティングベクターの開発、生体内デリバリーを主眼とした非ウイルスベクターの分子設計をめざした高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発、ヒトがんにおける特異的遺伝子及びそのプロモーターを領域を同定し、遺伝子治療用ベクターの開発等の成果を上げた。

分担研究者：

国立がんセンター研究所 分子腫瘍学部
部長 吉田輝彦

札幌医科大学医学部 分子医学研究部門
教授 濱田洋文

東京大学大学院 工学系研究課
教授 片岡一則

東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設
助手 鐘ヶ江裕美

A. 研究目的

治療用外来遺伝子を生体に導入する場合、重要となる要素はその導入効率、特異性、生体内制御の3点である。本研究に於いては、特に遺伝子治療用ベクターが生体内で最大限

の治療効果を発揮できるよう、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方策、標的への確実なデリバリーなどをさらに改良・工夫し、生体にとって有効かつ副作用の少ない安全な方法を樹立することが目的である。

B. 研究方法

これらの目的を達成するためのアプローチとして、生体親和性の高いバイオマテリアルを用いることにより、治療用外来遺伝子を体全体あるいは特定の作用部位へコントロールされたパターンに従って送り続け、あるいは任意の時期にそれを終了させうる画期的な技術開発を目指す。本研究組織においては、この新しい技術を中心に、生体内での遺伝子発現制御と安全性を向上させるための遺伝子の多段階発現制御系の開発と治療用ベクターへの応用、キャプシド型アデノウイルスベクターによる部位特異的な遺伝子導入、生体内デリバリーを主眼とした新たな非ウイルスベクターの分子設計などの技術開発を試み、治療用外来遺伝子の体内動態を制御しうる研究に焦点を絞る。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究用の細胞のみの扱いであり、ヒト受精卵などを対象とせず、倫理上の問題はない。実験動物の扱いは全て実験動物取扱い倫理規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

1) 治療終了時、あるいは副作用の発生時にすぐさま遺伝子治療をOFFに制御する目的のために、アテロコラーゲンと合成化合物シリコンからなるハイブリッドを素材とする体内インプラントを設計し、体内に埋め込んだインプラントを簡単な施術により除去することで、任意の時期に導入した遺伝子ベクターの発現を中止できる安全装置を備えたシステムを開発した。今年度は特に、シリコン製剤からのDNAの放出性のコントロールについての詳細な検討を行った。アテロコラーゲンとDNAとの複合体に、糖類の一種であるショ糖やマンニトールを添加することでシリコン製剤からのDNAの放出速度をある程度自由に制御することが可能であることが判明した。さらに、生体内でのシリコン製剤の有用性を確認するために行ったIL-2放出実験では、ELISA法によって検出可能なレベルの遺伝子発現が、生体内で起きていた。

2) 新しい発現制御系である出芽酵母由来の部位特異的組換え酵素 FLP/FRT系の検討を行ったところ、組換えアデノウイルスを用いればFLP/FRT系においても発現のON/OFF制御が可能であった。Cre/loxP系との組み合わせによる多段階の遺伝子発現制御系の可能性を示す結果であり、アデノウイルスベクターだけでなくあらゆる遺伝子治療において、目的遺伝子の発現をONとした後過剰発現による毒性が認められた場合に発現をOFFへと制御する安全性向上への応用が考えられる方法である。今年度は複数遺伝子同時発現制御用プラスミドを組み込んだ細胞株を複数樹立し、発現、DNA解析から組み換えの精度、効率を検討し、本系の有用性を確認した。

3) 正常細胞には感染しないが、特定の腫瘍細胞に遺伝子導入効率が高く、選択的に遺伝子を発現しうるターゲティングベクターの開発に務めた。NG2を標的とするTAAペプチドを有するファイバー変異型ウイルスによってメラノーマの標的化に成功した。

4) 内核に遺伝子を安定に内包した非ウイルスベクターであるコアシェル型ミセルベクターを構築するための方法論を確立し、また、培養細胞系における高い遺伝子発現効率を確認した。今年度は蛍光標識プラスミドDNAからの蛍光エネルギー移動を測定することによって、血清共存下においてもミセル内包DNAが凝縮した安定な形態を維持し、血中におけるDNAの安定化を実現する成果を得た。

6) 血管新生部位を標的にした遺伝子治療を目的とし、12,000遺伝子のマイクロアレイを用いて血管内皮前駆細胞(EPC)の遺伝子発現プロファイルを、分化した内皮細胞3種類と比較した結果、EPCは内皮細胞と造血系の間の特徴を示すことが明かとなり、複数の候補遺伝子をリストアップした。

D. 考察

初年度と今年度の成果により、生体親和性材料であるアテロコラーゲン分子の生体内導入と、シリコン製剤による取り出し可能なデバイスの作成、それに生体内における遺伝子の徐放化の制御をほぼ完成した。Cre/loxにかわる新しい遺伝子発現制御となるFLP/FRT系の開発に於いては、組み換えアデノウイルスと併用することで、Creと同様の発現の制御が可能であることや、複数遺伝子の同時発現制御の可能性を示した。また、標的導入に関しては、難治性のメラノーマに対する効果的な遺伝子治療法の開発とその臨床応用への一歩として、NG2を標的化することに成功した。さらに新生血管を標的にする遺伝子治療へ向けて、新生血管の標的分子の検索に至るなど、生体内遺伝子発現制御へ向けての課題をクリアしつつあり、これらの系の動物モデルでの実証的検討に一步近付いた。

E. 結論

外来遺伝子発現を生体内で制御する独創的な方針がいくつか明らかになってきた。最終年度は、これらの方法論のさらなる確立と、in vivoモデルを用いた有用性の評価を中心に検討を重ね、実際の遺伝子治療への応用に向けて基礎を固める。さらに、各方法論における安全性の検討にも重点をおいた研究を進める。

F. 健康危険情報

本研究に於いてはベクター類の安全性については十分な配慮がなされており、危険な要素は皆無である。

G. 研究発表

論文発表（平成13年度の主なもの）

1. Ochiya, T., et al. Biomaterial for gene delivery . *Current Gene Ther*, (2001) 1: 31-52.
2. Yamamoto, H., Ochiya, T. et al. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene*, (2001) 21: 899-908.
3. Honma, K., Ochiya, T., et al. Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2001) 289: 1075-1081.
4. Nakano, M., Kanegae, Y. et al. Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP 3. recombinase-expressing recombinant adenovirus, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29: E40.
5. Takehara, M., Kanegae, Y., et al. Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and loxP, *Hum Gene Ther.* (2001) 12: 415-426.
6. Sakai, Y., Kanegae, Y., et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system, *J Virol Methods.* (2001) 92: 5-17.
7. Kawamura, K., Hamada, H., et al. Bystander effect in uracil phosphoribosyltransferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. *Int. J. Oncology* (2001) 18: 117-120.
8. Lin Hui Wang, Hamada, H., et al. The potent antitumor effects of combined p16 gene and GM-CSF gene therapy through efficient induction of antitumor immunity *J Cancer Res Clin Oncol.* (2001) 127: 101-108.
9. Harada-Shiba, M., Kataoka, K., et al. Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer. *Gene Therapy*, in press.
10. Kakizawa, Y., Kataoka, K., et al. Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine): A potential carrier for systemic delivery of antisense DNA", *Biomacromolecules*, (2001) 2: 491-497.
11. Nakano, M. Yoshida, T, et al. Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA. *Mol Ther*, (2001) 3: 491-499.
12. Aoki, K., Yoshida, T., et al. Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor disseminated in the murine peritoneal cavity. *Gene Ther*, (2001) 8:508-514.
13. Uchida H, Hamada, H. et al., Caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press, 2002.
14. Yamamoto S., and Hamada, H. et al. Reduced transduction efficiency of adenoviral vectors expressing human p53 gene by repeated transduction into glioma cells in vitro. *Clinical Cancer Res.* in press, 2002.
15. Nakamura T, Sato K. and Hamada, H. Effective gene transfer for human melanomas by integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 13(5): in press, 2002.
15. Lumniczky, K., Hamada, H., et al., Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9: 44-52, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称：遺伝子製剤
【発明者】 寺田雅昭、落谷孝広、伊藤博
【出願日】（登録日）：1996年7月2日
- 2) 発明の名称：安定な遺伝子製剤
【発明者】 寺田雅昭、落谷孝広、佐野明彦
【出願日】（登録日）：1998年5月22日
- 3) 発明の名称：オリゴヌクレオチド導入製剤
【発明者】 落谷孝広、伊藤 博、佐野明彦
【出願日】（登録日）：2000年6月20日
- 4) 発明の名称：アデノウイルスベクター
【出願番号】 特願2000-394521
【出願日】 平成12年12月26日提出
【発明者】 濱田洋文ら
【出願番号】 特願2001-394376（特願2000-394521の国内優先権主張）
【出願日】 平成13年12月26日提出
- 5) 発明の名称：血管再生療法
【出願番号】 特願2001-174919
【出願日】 2001年6月8日
【発明者】 濱田洋文 伊藤克礼 山内昭彦
森川雅之
- 6) 発明の名称：不死化間葉系細胞及び
その利用
【出願番号】 特願2001-335375
【出願日】 平成13年10月31日提出
【発明者】 濱田洋文、伊藤克礼ら

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

バイオマテリアルによる生体内遺伝子ベクターの制御

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

治療用外来遺伝子を生体に導入する場合、重要となる要素はその導入効率、特異性、生体内制御の3点である。本研究に於いては、特に遺伝子治療用ベクターが生体内で最大限の治療効果を発揮できるよう、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方策、標的への確実なデリバリーなどをさらに改良・工夫し、生体にとって有効かつ副作用の少ない安全な方法を樹立することが目的である。本年度は生体親和性材料であるアテロコラーゲン分子の生体内導入の後、取り出し可能なシリコン製剤によるデバイスの作成を完成した。シリコンからはアテロコラーゲン包埋遺伝子ベクターが徐放され、生体でもその発現が確認された。さらにこの製剤を物理的に除去すると、遺伝子発現が停止したことから、生体内遺伝子発現制御が可能となった。

A. 研究目的

治療用外来遺伝子を生体に導入する場合、重要となる要素はその導入効率、特異性、生体内制御の3点である。本研究に於いては、特に遺伝子治療用ベクターが生体内で最大限の治療効果を発揮できるよう、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方策、標的への確実なデリバリーなどを主にバイオマテリアルであるアテロコラーゲン荷よって達成し、生体にとって有効かつ副作用の少ない安全な方法を樹立することが目的である。

B. 研究方法

生体親和性の高いバイオマテリアルを用いることにより、治療用外来遺伝子を体全体あるいは特定の作用部位へコントロールされたパターンに従って送り続け、あるいは任意の時期にそれを終了させうる画期的な技術開発を目指す。

（倫理面への配慮）本研究では、研究用の細胞のみの扱いであり、ヒト受精卵などを対象とせず、倫理上の問題はない。実験動物の扱いは全て実験動物取扱い倫理規定に基づいて行われ、動物への愛護の精神を貫いた。

C. 研究結果

治療終了時、あるいは副作用の発生時にすぐさま遺伝子治療をOFFに制御する目的のために、アテロコラーゲンと合成化合物シリコンからなるハイブリッドを素材とする体内インプラントを設計し、体内に埋め込んだインプラントを簡単な施術により除去することで、任意の時期に導入した遺伝子ベクターの発現を中止できる安全装置を備えたシステムを開発した。今年度は特に、シリコン製剤からのDNAの放出性のコントロールについての詳細な検討を行った。アテロコラーゲンとDNAとの複合体に、糖類の一種であるショ糖やマンニトールを添加することでシリコン製剤からのDNAの放出速度をある程度自由に制御することが可能であることが判明した。さらに、生体内でのシリコン製剤の有用性を確認するために行ったIL-2放出実験では、ELISA法によって検出可能なレベルの遺伝子発現が、生体内で起きていた。

D. 考察

生体親和性材料であるアテロコラーゲン分子の生体内導入と、取り出し可能なデバイスの作成をほぼ完成した。

遺伝子治療の早期実現によせられる期待は大変大きいものの、これまでにわずか数例に対して遺伝子治療の臨床研究が実施されたに過ぎない。しかし、ベクター開発とその制御系の開発にはわが国の基礎研究も世界的に評価されるレベルにあり、特に、本研究成果である、バイオマテリアルによる遺伝子導入と生体内での発現制御の開発は、すでに高い独創性と有用性が世界的に認められている。また、本研究成果の大きな骨子のひとつである、生体内での遺伝子制御による安全性への取り組みは、発現の強さのみを競ったこれまでの遺伝子治療の基礎研究では省みられなかった点であり、実際の患者への遺伝子ベクターの使用にあたって、安全性を考慮した全く新しい研究方向であり、これらの実現は遺伝子治療を現実的なものにする上で、社会的意義も大きい。本年度の成果は、シリコンという非生分解性物質と我々の独創的技術であるアテロコラーゲン遺伝子徐放剤とのハイブリッドの作成と生体内移植と取り出しによる遺伝子ベクターの物理的な制御システムの完成を意味し、今後更に理想的な安全性を備えたDDSとしての可能性を追求していく必要がある。

E. 結論

初年度と今年度の成果により、生体親和性材料であるアテロコラーゲン分子の生体内導入と、シリコン製剤による取り出し可能なデバイスの作成、それに生体内における遺伝子の徐放化の制御をほぼ完成した。

F. 健康危険情報

本研究に於いてはベクター類の安全性については十分な配慮がなされており、危険な要素は皆無である。

G. 研究発表

論文発表

1. Ochiya, T., et al. Biomaterial for gene delivery . Current Gene Ther, (2001) 1: 31-52.

2. Yamamoto, H., Ochiya, T. et al. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. Oncogene, (2001) 21: 899-908.

3. Honma, K., Ochiya, T., et al. Atelo-collagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. Biochem. Biophys. Res. Commun., (2001) 289: 1075-1081.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：遺伝子製剤

①発明者：寺田雅昭、落谷孝広、伊藤 博

②出願日（登録日）：1996年7月2日

2) 発明の名称：安定な遺伝子製剤

①発明者：寺田雅昭、落谷孝広、佐野明彦

②出願日（登録日）：1998年5月22日

3) 発明の名称：オリゴヌクレオチド導入製剤

①発明者：落谷孝広、伊藤 博、佐野明彦

②出願日（登録日）：2000年6月20日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

血管新生を標的にしたがんの遺伝子治療開発の基礎的検討
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 がんの分子標的治療の作用点として重要な、血管新生においては、血管前駆細胞（EPC）から新規に血管内皮細胞を分化・形成するvasculogenesisの関与が考えられる。それを証明し、かつvasculogenesisの系を標的にした腫瘍抑制技術を開発するため、EPCを分離・培養し、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイを用いて約16,000遺伝子の発現プロファイルを解析し、分化した血管内皮細胞初代培養株と比較して顕著に発現レベルの異なる遺伝子を約300種同定した。EPCの分化・増殖やvasculogenesisに必須の遺伝子が含まれていると考えられ、それらを標的にしたがんの標的治療法を開発するための基礎的情報を得た。

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、血管新生の生物学、特に血管内皮前駆細胞

(angioblast/ endothelial cell precursor, EPC) の分子細胞生物学的解析に基づく、新しい分子標的治療法の確立の基盤となる基礎的情報を提供することを分担研究目的とする。

血管新生は固型腫瘍がおよそ直径2mmを越えて増殖するためには原発巣・転移巣に関わらず、その増殖に不可欠である一方、正常成人組織では女性性周期に連動する子宮内膜等を除いて極めて低いレベルにあることから、血管新生を標的にする治療は、がん組織に対する特異性が高い。また、血管内皮細胞は正常宿主細胞であり、がん細胞のような遺伝子不安定性を持たないので治療に対する耐性ができにくいと考えられる。従って血管新生の分子機構の解明と、それに基づく治療法の開発は、がん分子標的治療の研究の中で重要な課題となっている。広義の血管新生は、既存の血管から枝分かれ（sprouting）して新しい血管網が作られるangiogenesisと、EPCから新たに分化・発生して血管が作られるvasculogenesisとに分けられる。このうち、angiogenesisについては研究が先行しており、それを制御する多くの増殖因子や受容体、転写因子等が知られている。また、実際

のangiogenesis分子標的治療の試みとして、endostatin、angiostatin等を利用したcancer dormancy therapyの臨床試験が開始されている。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、血管新生を標的に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

B. 研究の方法

東海大学内科安藤潔講師と共同して、安藤博士らが開発したマウスstromal cellであるHES5-5を用いて効率よくヒト臍帯血由来造血幹細胞を増幅するxenogeneic coculture systemを基に、EPCを分離する方法を開発した。すなわち、①インフォームド・コンセントを得て提供されたヒト臍帯血よりFicoll-Hypaque密度勾配遠心法により単核細胞を分離し、②免疫磁気ビーズを用いた細胞sorting法であるMACS systemによりCD34陽性細

胞を90%以上 (FACSによる検定) の純度で精製、③ 3×10^4 個の細胞を非接触共培養を可能にする Falcon cell culture insert に播いて12穴プレートで培養する。その際、12穴プレート側には feeder cell としてマウス HESS-5 細胞を培養しておく。培地は MEM- α 、サイトカインとして EPC 培養用には TPO 100 ng/ml、FL 100 ng/ml、SCF 100 ng/ml を添加する。④5日間の培養の後、約3倍に細胞数を増幅、 1×10^5 個の細胞を vitronectin を coat した24穴プレートに播き替える。約3日間の培養により、およそ 1×10^4 個の付着細胞として EPC を得る。得られた細胞が EPC であることは、①内皮細胞に特徴的な形態の確認、②DiI-acetylated LDL の取込み、③von Willebrand factor 及び CD31 の蛍光細胞免疫染色、④HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) との共培養による capillary tube formation assay にて確認した。

このような方法にて、EPC として培養される細胞は一回の処理で 1×10^4 程度に過ぎず、マイクロアレイを用いた発現プロファイル解析に必要な RNA 量が確保できないので、T7 transcription-adaptor ligation-PCR amplification-T7 transcription のサイクルからなる TALPAT 法を国立がんセンター研究所分子腫瘍学部佐々木室長を中心に開発した。TALPAT 法では、100個の細胞から抽出される約 1ng の total RNA を 3' 側を中心に、2-12mg 程度まで増幅させることができる。標準的なマイクロアレイ解析では 5mg の total RNA を必要とするが、TALPAT を適用することで十分な量の RNA 試料を確保できる。HUVEC に対して TALPAT 処理の有無でマイクロアレイ解析を行い、高い再現性と complexity の保持を確認した。

初期分化段階の EPC と考えている培養3日目の EPC と、後期分化段階の EPC に対応すると考えられる培養14日目の EPC の遺伝子発現プロファイルを、3種類のヒト血管内皮細胞初代培養株のそれと比較した。3種類の分化したヒト血管内皮細胞としては、血管内皮細胞の多様性を鑑み、臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、大動脈内皮細胞、肺毛細血管内皮細胞の3種類を選んだ。いずれも同条件で発現プロファイルを比較するため、TALPAT 法を適用した。

マイクロアレイ解析は12,629種の転写産物を検

出する Affymetrix 社の GeneChip (human U95A oligonucleotide arrays, Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて行った。発現レベルの定量は、全プローブの発現強度の平均を1,000に設定した。発現強度500以下の遺伝子は解析対象外とし、3種類の分化した内皮細胞の発現プロファイルを、2種類の EPC のそれと1:1で比較した。すなわち、 $3 \times 2 = 6$ 通りの比較のいずれにおいても5倍以上の発現強度の差を認めた遺伝子をリストした。

(倫理面への配慮) 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。このように、本研究の目的は遺伝子発現の把握であり、マイクロアレイによる発現プロファイル解析を行うので共通指針の適用外であるが、臍帯血提供者からの同意や、匿名化など、可能な限り共通指針の趣旨を踏まえた対応を行う。

C. 研究結果

安藤博士らが開発した造血幹細胞の増幅用 mouse feeder 細胞 HESS-5 による xenogeneic coculture 系を一部改変することにより、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞から、小型で紡錘形、かつ形態学的に均質に見える付着細胞 (AT細胞) が再現性良く出現した。ドナーが異なっても再現性良く同様な付着細胞が生成された。得られた付着細胞は、血管内皮細胞のマーカーである DiI-acetylated LDL にてほぼ100%標識され、von Willebrand factor 及び CD31 の免疫細胞染色においても、明らかな染色が認められた。しかし、陽性対象として用いた分化した HUVEC の染色と比較すると、これら典型的な血管内皮細胞のマーカーの発現は顕著に弱いことがわかった。また、分化した血管内皮細胞の機能として特徴的な capillary tube formation assay を行ったところ、陰性であった。そこで、DiI-acetylated LDL で標識し、HUVEC と混合して、co-culture capillary tube assay を行ったところ、上記付着 AT細胞は、陰性対象の膀胱がん細胞株と異なり、HUVEC への親和性を示した。GeneChip による発現プロファイルの比較では、

EPCで発現が増加している遺伝子が150種、減少している遺伝子が121種同定された

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、今までは見過ごされていた要素としてvasculogenesisが浮上してきた。本研究ではvasculogenesisの中心をなすEPC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、その過程で同定されるEPCのマーカーを利用して腫瘍の血管新生におけるvasculogenesisの関与について解析を行い、さらにEPCを起点とするこの過程を治療の標的とすることも検討するものであり、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。

基本的に造血幹細胞を増幅する方法によりEPCを得ることができたことは、造血系の細胞と血管内皮細胞とが共通の起源を持つというhemangioblastが少なくとも臍帯血内に存在することを示唆している。Asaharaらの報告と異なり、単純にCD34陽性細胞を接着因子蛋白質をコートした組織培養表面に播いただけでは付着細胞(AT細胞)は得られなかった。これは培地に添加する牛胎児血清のロットなどの影響による可能性がある。MACSによるCD34陽性細胞の精製度が高いこと、上記のように、そのままでは付着細胞が出現しなかったことから、HESS-5 mouse feeder細胞との非接触共培養系から得られた小型紡錘形の、形態学的に均質に見える細胞は、混在していた内皮細胞ではなく、新たにCD34陽性単核細胞から分化してきたEPCであると考えた。このEPC集団は、DiI-acetylated LDLをほぼ100%細胞が取り込むことから、極めて均質な細胞からなることが

示唆される。高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析により、EPCに特徴的な遺伝子約300種を選択した。これら合計約300種の遺伝子の中に、EPCを特徴付ける発現様式を示す遺伝子が含まれている可能性が高い。今後、さらに他の種類の細胞の発現プロファイルと比較して、EPCに特異的な遺伝子を絞り込んでいく。

E. 結論

血管内皮前駆細胞(EPC)を分離・培養し、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイを用いて約16,000遺伝子の発現プロファイルを解析し、分化した血管内皮細胞初代培養株と比較して顕著に発現レベルの異なる遺伝子を約300種同定した。EPCの分化・増殖やvasculogenesisに必須の遺伝子が含まれていると考えられ、それらを標的にしたがんの標的治療法を開発するための基礎的情報を得た。

F. 健康危険情報

該当する事項無し

G. 論文発表

K. Aoki, S. Furuhata, K. Hatanaka, M. Maeda, JS. Remy, J-P. Behr, M. Terada and T. Yoshida. Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor disseminated in the murine peritoneal cavity. 2001. *Gene Ther*, 8(7):508-14.

M. Nakano, K. Aoki, N. Matsumoto, S. Ohnami, K. Hatanaka, T. Hibi, M. Terada and T. Yoshida. Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA. 2001. *Mol Ther*, 3(4):491-9.

F. Laub, R. Aldabe, V. Friedrich, S. Ohnishi, T. Yoshida and F. Ramirez. Developmental expression of mouse Kruppel-like transcription factor KLF7 (mKLF7) suggests a potential role in neurogenesis. 2001. *Dev Biol*, 233(2):305-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当する事項無し

分担研究課題： 腫瘍特異攻撃ベクターの開発に関する研究

分担研究者 濱田 洋文、札幌医科大学 分子医学研究部門教授

研究要旨 RGD ペプチドを有するファイバー変異型 Adv-F/RGD が、メラノーマ、口腔がん、膀胱がんに対する遺伝子治療ベクターとして効果的であった。また、Ax-F40S/TAA ベクターでは NG2 を高発現しているメラノーマ細胞に高い遺伝子導入効率を示した。これらのベクターは臨床応用における有効な治療ベクターとして有望である。

A. 研究目的

本研究では、各種組織由来の難治性の癌に対する効果的な治療法の開発を目的として、新しい変異型ウイルスベクターの開発を中心に、腫瘍の特異的な標的化を目指した遺伝子治療の基礎研究ならびに前臨床研究を行う。がんに対して治療効果の高い遺伝子治療法を開発することを目指して、がんに対して高い特異性を持ち、しかも高効率で遺伝子を導入することが可能な、新規のキャプシド変異型アデノウイルスベクターを開発する。

平成13年度は、インテグリンを標的化する RGD ペプチドをファイバータンパクに融合した Adv-F/RGD、NG2 プロテオグリカンを標的化する Adv-F/TAA を作成し、これらの変異アデノウイルスベクターが、悪性黒色腫細胞を初めとする難治性のがんへの遺伝子導入の効率アップと選択性向上に有効であるかどうかを検討した。

B. 研究方法： 細胞側の受容体分子との吸着を担うファイバー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。

各種のがん細胞に対する遺伝子導入効率を高めるため、RGD ペプチドないし TAA ペプチドを有するファイバー変異型 Adv-F/RGD あるいは Adv-F/TAA を作製し、遺伝子導入効率を比較検討した。Adv-F/RGD

や Adv-F/TAA に種々の治療遺伝子を発現させ、各種の細胞に対する *in vitro* 治療効果を検討する。さらに、治療遺伝子としてサイトカイン、プロドラッグ活性化酵素（いわゆる自殺遺伝子）を発現する Adv-F/RGD、Adv-F/TAA を利用し、ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* 治療効果を検討する。

（倫理面への配慮）

当研究で用いる細胞は、現在までのところ、過去に ATCC 株などとしてすでに樹立された培養細胞株を用いた実験のため、倫理面で特筆すべき事柄はない。また、ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* 治療効果の検討においては、動物愛護の観点にも留意しながら、札幌医科大学動物実験施設のガイドラインに準拠して実験を遂行した。

C. 研究結果

1) メラノーマ患者の臨床治療研究に実際に適用することができるようなベクターを開発するための前臨床研究を行っている。

実験動物治療モデルを用いて、*in vivo* での有効性、副作用の有無などを検討した。実験動物治療モデルとしては、新規ベクターの遺伝子導入効率や発現量を見ることを目的とする場合は、主としてヒトのメラノーマ由来の腫瘍 Hs695T のヌードマウス移植系を用いた。一方、GM-CSF/IL-4 などの樹状細胞

植系を用いた。一方、GM-CSF/IL-4などの樹状細胞活性化と腫瘍拒絶抗原提示による免疫遺伝子治療実験では、マウスのメラノーマ細胞 B16 のマウス皮下移植系の治療モデルを用いて実験を進めた。

インテグリンをターゲットとする Adv-F/RGD ベクターによる初代培養ヒトメラノーマ細胞への遺伝子導入効率の検討：悪性黒色腫、口腔癌、膀胱癌などでは、Adv の受容体 CAR の発現がきわめて低く、従来型のベクターでは遺伝子導入効率が非常に低い。これに対し、インテグリンを標的とした RGD モチーフをファイバーに含む F/RGD 変異型ウイルスを用いると、F/wt に比較して数十倍高い遺伝子導入効率を得られることがわかり、悪性黒色腫、口腔癌、膀胱癌などに対する臨床応用が有望となった。初代培養メラノーマ細胞への遺伝子導入効率に関しても、Adv-F/RGD 変異型を用いることによって、50 倍程度増強し、臨床的にも実施可能なウイルスの量で 100% の細胞に遺伝子導入を行うことができるようになった。

Adv-F/RGD ベクターによる動物治療モデル実験：ヒト IL-2 を発現するアデノウイルスを用いてヒトのメラノーマ由来の腫瘍 Hs695T のヌードマウス移植系の治療実験を行ったところ、Adv-F/RGD ベクターを用いることによって、野生型ファイバーを用いる場合に比べ、10 倍以上も高い局所での IL-2 の発現と著明な腫瘍縮小効果が得られた。

2) 臨床研究のためのベクターの作成：

今期間中はさらに、臨床に応用するベクターとして、腫瘍特異的増殖型 (dAdB3) と薬剤感受性遺伝子 UPRase の発現カセット (CAUP) とを併せ持つ Adv-F/RGD ベクターを作成した。アデノウイルスの作成法に関して、従来用いられてきたアデノウイルスのゲノムに TP (terminal protein) の結合した DNA-TPC とのコトランスフェクションを用いる cos-DNA-TPC 法は、野生型の E1 やファイバーのゲノムの混入す

る確率が若干高いため、以後の安全性のチェックに困難を伴うことが経験された。従って、今回の臨床応用を目指したアデノウイルスの作成方法としては望ましくない。そこで、私たちは F/RGD を含むアデノウイルスのゲノムを含み、かつ、目的とする発現カセットをあらかじめ組み込んだプラスミド 1 種のみを 293 細胞へトランスフェクトする方法を独自に樹立して用いた。この方法によると、アデノウイルス産生の効率は cos-DNA-TPC 法に比較して数十倍低下するものの、不必要なゲノムの持ち込みがないため、以後の増幅の過程で予想外のゲノムの変化が生じる確率が低く、安全性の高いベクター作成方法であると考えられる。同様の方法を用いて、現在、免疫遺伝子治療の臨床研究に用いる Adv-F/RGD ベクターを作成している。また、並行して、ベクターの安全性の評価を進めている。

3) アデノウイルスの特異性の強化：Ad5 本来の受容体である CAR と結合しない Ad40 の短いファイバーを有するキメラアデノウイルスベクター F40S をベースとして用いることにより、in vivo での腫瘍組織への選択性の向上を目指した。マウス静脈内投与によるウイルスの取り込みの臓器別分布を調べたところ、従来のヒト 5 型アデノウイルス F/wt は、肺・心臓・脾臓・腎臓・腸管などにはほとんど取り込まれず、肝臓にきわめて高い取り込みを示すのに対して、Adv-F40S は肝臓への取り込みは従来型の 50 分の 1 以下と低かった。Adv-F40S 自体は、マウスの肺・心臓・脾臓・腎臓・腸管など肝臓以外の組織に対しても親和性を示さず、また、大腸癌、メラノーマなどの担癌マウスの腫瘍組織に対しても in vivo での親和性はなかった。

さらに、Ad40 の S (短い) と L (長い) の両方のファイバーを併せ持つ Ad5 ベースの変異型アデノウイルス (F/40SL)、Ad40S のノブと Ad5 の (長い) シャフトよりなるキメラファイバー変異型 (F540S)、

Ad40S の (短い) シャフトと Ad5 のノブよりなる変異型 (F40S) の 3 種のアデノウイルスを作成して、マウス静脈内投与によるウイルスの組織別分布、特に肝臓への遺伝子導入量を検討した。私たちの予想に反して、F540S は、F/wt (Ad5 のファイバー) や F/40SL (Ad40 の S と L の両方のファイバーを併せ持つ) とほぼ同等の高い肝臓への取り込みが見られた。F/40S は上記 3 種よりも数倍低い取り込みであった。一方、F40S は、F/wt の 50 分の 1 程度と、最も低い取り込みであった。これらの結果を総合すると、アデノウイルスの肝臓への取り込みは、ファイバーのシャフトの長さに大きく依存することが明らかとなった。すなわち、Ad5 型などでは、ファイバーのシャフトが長いために、肝臓に集積しやすい。F40S は、ノブが CAR 受容体に結合しないことに加え、さらにシャフトが Ad5 型に比べて短いため、肝臓への取り込みが極めて少ないベクターになったのである。F540S が F/wt (Ad5 のファイバー) と同程度の肝臓への高い取り込みを示したことから、F/wt などの従来型のアデノウイルスが肝臓に良く取り込まれる機序は、CAR 受容体の豊富さによるというよりも、むしろ、長いファイバーを持つアデノウイルスをトラップしやすい組織構造、すなわち、血管内皮細胞の構造やジヌソイドを流れる血流の性質などの肝臓特有の性質によるところが多いと考えられる。

4) NG2 糖タンパクを高発現する腫瘍細胞の標的化: NG2 糖タンパクと特異的に結合する TAASGVRSMH の 10 アミノ酸のペプチド (TAA) をファイバーノブの C 末端に持つ F40S/TAA の生物活性を検討した。NG2 プロテオグリカンの発現はメラノーマ、グリオーマなどの悪性腫瘍とその腫瘍血管に限局することが報告されており、腫瘍標的化のターゲット候補と考え、実験を計画した。NG2 を標的とする TAA ペプチドモチーフを含んだ Adv-F40S/TAA は、NG2 を高発現する A375 メラノーマや A172 グリオー

マに高い選択性を示し、これらの腫瘍の標的化に有効であった。一方、NG2 の発現の認められない 293 細胞、正常メラノサイト、正常肝細胞、A549 肺癌、DLD-1 大腸癌、HLF 肝癌、などには、F/wt が高い遺伝子導入効率を示すのと対照的に、F40S/TAA ではほとんど遺伝子導入が得られなかった。一方、NG2 高発現の A375 メラノーマ xenograft 担癌マウスに、経静脈的に F40S/TAA を投与したところ、このウイルスは肺・心臓・肝・脾臓・腎臓・血液細胞などにはほとんど取り込まれず、A375 腫瘍組織に高い集積を示した。レポーター遺伝子を用いた組織染色では、F40S/TAA は A375 腫瘍組織全体に広がっているのではなく、腫瘍の間質、特に腫瘍血管様組織に集積していることが見出された。メラノーマの腫瘍間質と血管の由来や NG2 の発現に関して現在詳しく解析中である。一方、対照として、NG2 を発現しない DLD-1 大腸癌や Hs696T メラノーマなどの担癌マウスに F40S/TAA を投与したところ、F40S/TAA の集積は全く見られなかった。これらの結果より、NG2 を標的とする選択性の高い「がん標的化ウイルスベクター」の作成に成功したと考えられる。

D. 考察

1) 悪性黒色腫に対する効果的ないし選択的アデノウイルスベクターの開発: 本研究では、難治性癌疾患に対する効果的な遺伝子治療法の開発とその臨床応用を目指している。アデノウイルスの細胞への感染は、ウイルスファイバーが細胞側の受容体分子 (CAR) に吸着することで始まる。アデノウイルスのレセプターである細胞表面 CAR の発現がメラノーマ細胞において少ないことにより、従来のアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率が非常に低く、遺伝子治療に用いるベクターとして大きな問題点になっていた。今回、悪性黒色腫に高発現しているインテグリンや NG2 プロテオグリカンを標的化する RGD ペプチドや TAA ペプチドをファイバータンパクに融合

したアデノウイルスベクターを作成することで、CARにかわってインテグリンや NG2 分子を介したウイルス吸着から始まる効率的な遺伝子導入に成功した。これらのベクターは臨床応用における有効な治療ベクターになり得ることを期待している。

2) 生体内での腫瘍標的化が可能なベクターの作成：従来のアデノウイルスベクターでは、ターゲットとなるがん細胞以外に CAR を発現する正常細胞にも感染し、安全面で問題となっていた。今回、CAR を認識しない 40 型の短ファイバーに置換した Adv-F/40S を作製することで、CAR を介した遺伝子導入を排除し、また、肝臓へのトラップによる遺伝子発現も抑えて、望ましくない非特異的遺伝子導入を極めて低く抑えることに成功した。さらに、この Adv-F/40S に NG2 高発現の腫瘍に特異的な TAA リガンドを組合わせた Adv-F40S/TAA の使用によって、生体内での腫瘍標的化が可能なベクターの作成に成功した。

TAA リガンドペプチドモチーフは、アメリカのパスカリーニ (Pasqualini, R) たちのグループでファージディスプレイの技術を用いて実験的に見つけだされたペプチド配列である (Burg et al. *Cancer Res.* 59: 2869-2874, 1999)。最近、Pasqualini たちはファージディスプレイの技術を用いてペプチドライブラリーのヒト血管ベッドへの吸着に関する大がかりな *in vivo* アッセイを行い報告した (Arap et al. *Nature Med.* 8: 121-127, 2002)。この報告によると、ペプチドライブラリーの各臓器への局在を 47,160 個ものペプチド配列の解析によって検討した結果、ヒト血管ベッドへのランダムではない吸着が臓器ごとに認められ、各臓器の血管に対し特有の標的化が可能であることが示唆された。今後は、このようなりガンドの情報から、逆にターゲットとなりえるレセプター同定もなされることであろう。

正常臓器ないし病変組織特有の血管内壁表面に

局在する分子は、血管透過性の良・不良などの課題を回避できることから、最も有望な標的化のターゲット候補である。Adv-TAA の静脈内投与の結果から、標的として役立った NG2 は腫瘍血管に発現しているものであることがわかり、Adv-TAA の場合もやはり標的は病変組織特有の血管内壁表面に局在する分子であったことになる。

前述した Arap et al. らの仕事をもとに、今後ますますターゲットとリガンドの組み合わせの候補が広がれば、Adv-TAA 以外にも、さらに有効な組織特異的な血管標的化ベクターの作成につながることであろう。また、同様の発想で、血管以外の臓器を標的化することも可能であり、ポストゲノム時代の発想として、標的化リガンドの大がかりなライブラリースクリーニング検索が実を結ぶことと期待される。私たちの TAA リガンド付きのアデノウイルスベクター Adv-TAA は、私たちの知る限り、標的化に成功した初めてのベクターであり、今後のこの分野の仕事に大いに弾みを加える結果となろう。

3) 今後の方向、治療遺伝子の選択など：

今後は、治療遺伝子の選択、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方法、標的への確実なデリバリーの方法などに関して改良・工夫してゆく。また、再生医学で注目される組織指向性の高い成人型の幹細胞 (神経幹細胞など) や組織工学の領域で用いられるバイオマテリアルなどと、遺伝子治療ベクターとを組み合わせることにより、組織特異的な遺伝子導入技術の開発を試み、遺伝子治療の生体内での有効性と安全性を高めていきたい。

治療遺伝子の選択のために、今後は、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、薬剤感受性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、腫瘍特異的なアポトーシス誘導療法を開発する。アポトーシス関連

遺伝子としては、腫瘍細胞のアポトーシス耐性にとって「関所」となる分子（すなわち、その発現がブロックされるとアポトーシスのカスケードが止まってしまうようなキー遺伝子）を同定し、これを用いてアポトーシス耐性の克服を試みる予定である。

また、免疫強化療法に関しては、組織標的性の高い幹細胞移植などと組み合わせることによって、局所に適切に治療分子を発現させ、安全性と特異性を高めることを計画している。また、臨床研究の候補となるベクターに関しては、安全性試験を積み重ね、実用化に必要な基礎データを得ることを続けていきたい。

4) 今後の計画：

平成14年度以降は、平成13年度までの結果に基づいて、新規のアデノウイルスベクターが生体内で最大限の治療効果を発揮するために、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方法、標的への確実なデリバリーの方法などに関して改良・工夫する。特に、再生医学・組織工学の領域で用いられるバイオマテリアルと遺伝子治療ベクターとを組み合わせることにより、組織特異的な遺伝子導入技術の開発を試み、遺伝子治療の生体内での有効性と安全性を高める。実験動物治療モデルは、ヒトの各種組織由来の腫瘍と対応するものとし、遺伝子治療の臨床研究プロトコルを作成するための基礎データとなることを目標とする。具体的には以下のようなベクターに関する検討を進める。

a) インテグリンを標的化する RGD ペプチドをファイバータンパクに融合した Adv-F/RGD をベースとしたアデノウイルスの臨床応用の可能性について検討する。

b) NG2 を標的とする TAA ペプチドを有するファイバー変異型 Adv-F/TAA によって、メラノーマの標的化に成功した。平成14年度は、この標的化の分子・

細胞生物学的なメカニズムを解明する。

E. 結論

a) RGD ペプチドを有するファイバー変異型 Adv-F/RGD が、メラノーマ、口腔がん、膀胱がんに対する遺伝子治療ベクターとして効果的であった。このベクターは臨床応用における有効な治療ベクターになり得る。

b) NG2 を標的とする TAA ペプチドを有するファイバー変異型 Adv-F/TAA :

発生の一時期に神経系細胞に発現するプロテオグリカン NG2 はメラノーマにも高発現することが知られている。そこで Ax-F/40S のファイバーノブ C 末端に NG2 に特異的結合すると報告されているペプチドモチーフ TAASGVRSMH を挿入し、新規アデノウイルスベクター Ax-F/40S-TAA を作製した。Ax-F/40S/TAA ベクターでは NG2 を高発現しているメラノーマ細胞に高い遺伝子導入効率を示した。メラノーマ移植ヌードマウスで Ax-F/40S-TAA では高い遺伝子導入が確認された。NG2 特異的ペプチド配列を挿入した Ax-F/40S-TAA はメラノーマの遺伝子治療に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

本研究結果からは、健康危険に関する情報には、特記すべきものがない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Desaknai, Sz., Lumniczky, K., Hidvegi, E. J., Hamada, H. and Safrany G. Brain tumor treatment with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines. Adv. Exp. Med. Biol. 495. 369-372, 2001.

2. Nishimura S, Adachi M, Ishida T, Matsunaga T, Uchida H, Hamada, H., Imai K. Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 augments anoikis and inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.* 61(19):7009-7014, 2001.
3. Ueno M, Koyama F, Yamada Y, Fujimoto H, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Mukogawa T, Hamada, H., and Nakajima Y. Tumor-specific chemo-radio-gene therapy for colorectal cancer cells using adenovirus vector expressing the cytosine deaminase gene. *Anticancer Res.* 2001 Jul-Aug; 21(4A):2601-2608.
4. Uchida H, Shinoura N, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H, and Hamada, H. Caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun. in press*, 2002.
5. Yamamoto S., et al. and Hamada, H. Reduced transduction efficiency of adenoviral vectors expressing human p53 gene by repeated transduction into glioma cells in vitro. *Clinical Cancer Res.* in press, 2002.
6. Nakamura T, Sato K. and Hamada, H. Effective gene transfer for human melanomas by integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 13(5): in press, 2002.
7. Lumniczky, K., Désaknai, Sz., Mangel, L., Szende, B., Hamada, H., Hidvegi, E.J. and Safrany G. Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer*

Gene Ther. 9: 44-52, 2002.

H. 知的財産権の出願状況

出願 3 件

1. 【発明の名称】「アデノウイルスベクター」
【出願番号】特願 2000-394521 【出願日】平成 12 年 1 月 2 日提出 【発明者】濱田洋文ら 【出願番号】特願 2001-394376 (特願 2000-394521 の国内優先権主張) 【出願日】平成 13 年 1 月 2 日提出
2. 特願 2001-174919 血管再生療法 出願日 2001 年 6 月 8 日 発明者 濱田洋文 伊藤克礼 山内昭彦 森川雅之
3. 【発明の名称】「不死化間葉系細胞及びその利用」 【出願番号】特願 2001-335375 【出願日】平成 13 年 10 月 31 日提出 【発明者】濱田洋文、伊藤克礼ら

生体への理想的遺伝子導入：高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科教授

本研究の目的は、生体内異物認識系による排除、ベクター自体の毒性、搭載可能な DNA 分子量に関する制約などの問題点を解決する新しい遺伝子ベクターシステムを、高分子ミセルを基盤として構築し、そのがん等の難治性疾患の遺伝子治療における有用性を明らかとすることにある。本年度は、ミセルを構成するポリカチオンセグメントの構造を制御し、かつミセル表層を形成する親水性の poly(ethylene glycol)末端にリガンドを導入することによって、血清共存下、chloroquine 等の助剤無しで優れた遺伝子導入が可能なベクター系の構築に成功し、かつ生体内での安定性を確認した。

A. 研究目的

本研究の目的は、生体内異物認識系による排除、ベクター自体の毒性、搭載可能な DNA 分子量に関する制約などの問題点を解決する新しい遺伝子ベクターシステムを、高分子ミセルを基盤として構築し、そのがん等の難治性疾患の遺伝子治療における有用性を明らかとすることにある。具体的には、カチオン性ブロック共重合体との静電相互作用によって、遺伝子 DNA がコンパクトな凝縮構造を取ることに着目して、内核に遺伝子を保持し、かつミセル表層部に目的細胞への認識と取り込みを促進するパイロット分子を提示した標的指向性高分子ミセル型遺伝子ベクター（図1）の開発を推進する。

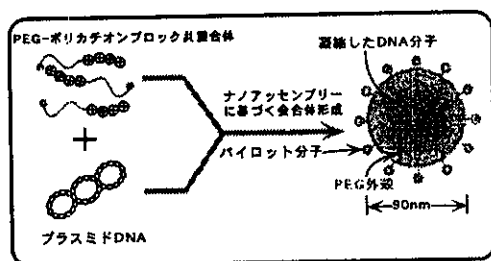


図1 高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

B. 研究方法

1) 高分子ミセル調製用ブロック共重合体の合成

昨年度において報告した方法に基づいて、poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) ブロック

共重合体 (PEG-PLys) (PEG 分子量 12,000、PLys の重合度は 7, 19, 48 とし、それぞれ、12-7, 12-19, 12-48 と略号で表記する。) 及び、酸処理によって容易にアルデヒド基に変換が可能なアセタール (3,3-diethoxy-1-propanol) を末端に有する Acetal-PEG-poly(N,N-dimethylaminoethylmethacrylate) (PDMAEMA) ブロック共重合体 (Acetal-PEG-PDMAEMA) を調製した。また、本年度は新たに、Acetal-PEG-poly(ethylene imine) ブロック共重合体 (Acetal-PEG-PEI) を下記の経路に従って合成した。すなわち、 α -末端に acetal 基、 ω -末端に methanesulfonyl 基を有する PEG の ω -末端より 2-methyl-2-oxazoline(2-MeOxz) をカチオン開環重合によって重合させた後に 2-MeOxz ユニット側鎖の acyl 基をアルカリを用いてはずし、所定の Acetal-PEG-PEI を得た。リガンドである p-aminophenyl- β -D-lactopyranoside は還元アミノ化反応により、ブロック共重合体 α -末端に導入した。導入の確認は NMR により行った。

2) 高分子ミセル型ベクターの調製

pDNA 溶液(10mM TrisHCl,pH7.4)に対し、混合時のカチオン電荷と pDNA のアニオン電荷の比(混合電荷比: $r = [\text{Lys or DMAEMA or EI}] / [\text{Nucleotide}]$)が様々な値となるようにブロック共重合体溶液(10mM Tris-HCl,pH7.4)を加え、DNA 濃度一定で様々な混合電荷比 (r) の高分子ミセルを調製し、動的及び静的光散乱法によって粒径と会合数を決定した。高分子ミセル中における

pDNA の凝縮程度は、ethidium bromide (EtBr) を用いた dye exclusion assay より評価した。また、Label-IT Nucleic Acid Labeling Kit を用いて、fluorescein と X-rhodamine の二重蛍光標識を施した pDNA を内包するミセル型ベクターを調製し、492 nm の励起波長を用いる事によって、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の効率から pDNA の凝縮状態を評価した。

3) 高分子ミセル型ベクターの機能評価

発現活性の評価は培養細胞系として 293 細胞あるいは HepG2 細胞を用い、pDNA 導入に基づくルシフェラーゼ活性あるいは green fluorescence protein(GFP) assay より評価した。また、血中動態評価については、balb/c マウス尾静脈よりミセルを投与し、一定時間経過後 pentobarbital 麻酔下、下大静脈より血液試料を採取した。また、肺、肝臓、脾臓を摘出した。血液ならびに各臓器における DNA 分布の検定は southern blotting 法により行い、検出には Fuji Imaging Plate を用いた。各臓器における遺伝子発現はホモゲナイズした摘出臓器についてルシフェラーゼ活性を測定する事によって行った。

C. 研究結果

1) 遺伝子導入効率の評価

昨年度の評価より、糖リガンド導入に基づく遺伝子発現の増強効果が認められた Lactose-PEG-PDMAEMA 系については、引き続き発現の詳細を解析した。図 2 に示す

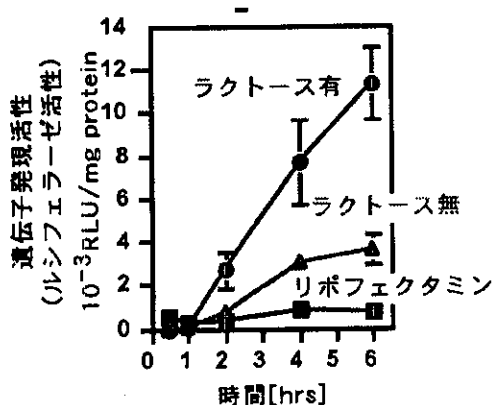


図 2 Lactose 導入高分子ミセル型ベクターによる遺伝子発現 (20%血清存在下・HepG2 細胞)

ように、Lactose 導入高分子ミセル型ベクターは 20%血清存在下において、リガンド無しミセル型ベクターに比べて時間依存的に効果的な遺伝子導入が行える事が明らかとなった。リガンドの有無に関わらず高分子ミセル型ベクターは既存のカチオン性脂質を用いた lipoplex 型ベクターに比べて優れた遺伝子導入活性を有している事が図 2 より明らかであるが、これは後述するように血清共存下でのミセル型ベクターの優れた安定性に帰因するものと考えられる。

一方において、高分子ミセル型ベクターの解決すべき課題としては、chloroquine などの助剤を用いないで十分な発現を得る事である。この点に関して、PDMAEMA は pKa が 7.0 と低いために、細胞内エンドソームへ取り込み後、ある程度のプロトンスポンジ効果を発揮し局所 pH の低下を防ぎ、pDNA の細胞質への移行を促進する事が期待される。事実、GFP をレポーター遺伝子として用いた評価から、chloroquine 非存在下においてもおよそ 10%の 293 細胞に対して発現を認めることが出来た。そこでより顕著なプロトンスポンジ効果を示す事が知られている PEI をブロックの一方のセグメントに有する Acetal-PEG-PEI の新規合成法を本年度は確立し、これを用いて培養細胞系に対する遺伝子導入を行った。図 3 に示すように、Acetal-PEG-PEI を用いた高分子ミセル型ベクターは、chloroquine 非存在下において高い遺伝子導入活性を発現し、かつその値は市販の PEI 遺伝子導入試薬である ExGen 500 を凌駕するものであった。

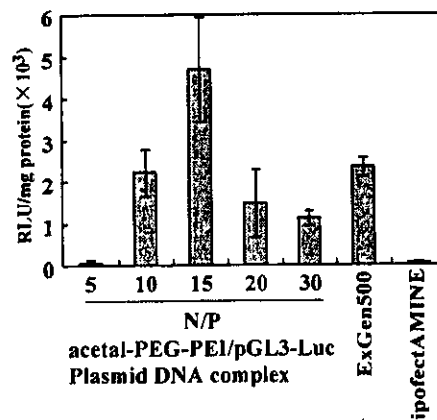


図 3 Acetal-PEG-PEI を用いた高分子ミセル型遺伝子ベクターによる遺伝子発現 (10%血清存在下・クロロキンなし・HepG2 細胞・n=3)

2) 血清中での安定性評価

二重標識した pDNA の蛍光スペクトルを 492nm の励起波長で測定したところ、pDNA がブロック共重合体と complex 化して凝縮することにより、fluorescein を donor、X-rhodamine を acceptor とする FRET が明瞭に観察された。37°C、20%血清中に静置し、経時的に蛍光スペクトルを測定したところ、図 4 に示すように lipoplex では数分のうちに FRET が消失し、血清の影響による不安定化がごく早期に起こることが示唆された。一方、ミセルではほぼ 24 時間に渡り FRET が明瞭に観察され、非常に優れた安定性を持つことが確認された。この安定化効果は PLys/pDNA よりも優れており、PEG 鎖がベクターの溶解性のみならず安定性の向上にも役立っていることが明らかとなった。

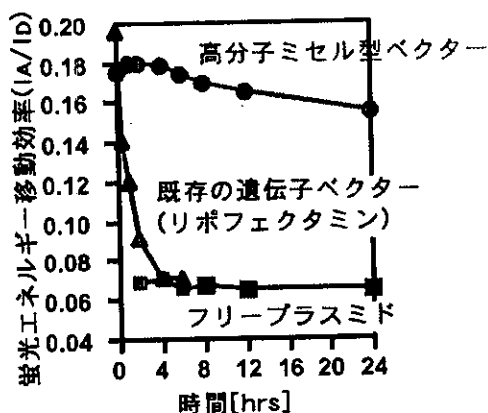


図 4 蛍光エネルギー移動によるベクター内包遺伝子の安定性評価 (20%血清存在下)

次に、遺伝子導入に対する血清の影響を調べるため、各 complex を 20%血清中に 30 分静置後遺伝子導入を行うと、lipoplex、PLys-polyplex では血清の影響で遺伝子発現が大きく減少する一方、高分子ミセルではその影響はわずかであり、FRET で観察された血清中での安定性とよく相関した。さらに、fluorescein 標識 pDNA を用いて、各 complex の細胞への取り込みをフローサイトメトリーにて評価したところ、高分子ミセル型ベクターでは血清存在下でも良好な取り込みが見られたのに対し、他の complex の細胞への取り込みは血清の影響で著明に減少した。即ち、血清存在下での遺伝子発現の減少は、遺伝子内包 complex の血清との相互作用により、細胞への complex 取り込みが阻害されることが主な原因のひとつ

であると考えられた。

3) 体内動態の評価と in vivo での遺伝子発現の確認

各種荷電比の異なる PEG-PLys 系ミセル型ベクターについて、循環血中での安定性を評価したところ、昨年度の物性評価において single plasmid complex を形成する臨界 r 値である 2 を越える組成のミセルに内包された pDNA は安定に super coil 状態を保持出来ることが明らかとなった。静注 15 分後の結果を図 5 に示す。フリーの pDNA は完全に分解しているのに対して、 $r > 2$ 以上の組成のミセル系で super coil が安定に存在している事が明らかである。また、肝臓におけるルシフェラーゼの発現が 3 日の間持続することも判明した。

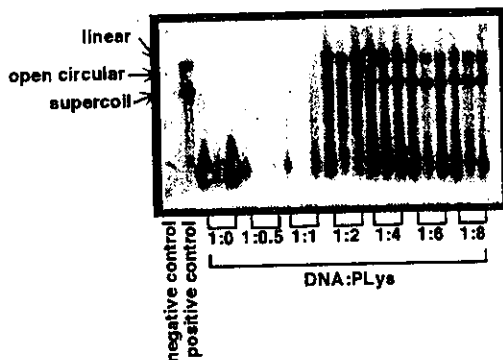


図 5 マウス循環血中における残存スーパーコイル型 DNA の southern blotting による評価

D. 考察

1) 達成度について

ブロック共重合体のポリカチオンセグメントの構造を制御し、かつ PEG 末端にリガンドを導入することによって、血清共存下、chloroquine 等の助剤無しで優れた遺伝子導入が可能なベクター系の構築に成功し、かつ生体内での安定性を示した点で、達成度は極めて高いものと評価される。また、FRET 法は様々なベクター系の安定性評価に使える普遍的な方法であり、高い波及効果が期待される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

凝縮状態にある一個の遺伝子を親水性外殻が包み込むというウイルス類似の明確な二相構造を特徴とする高分子ミセル型ベク