

20020423

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成15 (2003) 年 4月

目 次

I.	総括研究報告	1
	次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究	
	主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 副所長 早川堯夫	
II.	分担研究報告	
	1. 分担研究者 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作	49
	2. 分担研究者 ジーンディスカバリー研究センター 中西真人	65
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	78
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は、高い安全性を確保し、発現調節能を有した目的遺伝子を、必要な細胞に効率良く導入し、安定に発現させる技術の開発である。

本研究は、安全性が高く、機能面で優れたわが国独自の次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。そのため、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いとされるアデノウイルスベクターの長所（高効率、高タイトアのベクターの調製が可能など）を活かしつつ、1）搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、2）標的細胞指向性の制御、3）抗原性や核内での安定性の欠如などの問題点を克服できる次世代アデノウイルスベクターの開発を目指す。また、次世代非ウイルス（ハイブリッド）ベクターの開発に向けた基盤研究として、4）導入遺伝子を高効率で核内に送達するための技術や、5）導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発、あるいは6）細胞質で安定に遺伝情報を発現する系の開発等を行う。

本年度は各課題について以下の結果を得た。

- 1) テトラサイクリンの遺伝子発現制御系（サイレンサーを含んだ改良型）の Tet-on システムを E1/E3 両欠損領域および E4 遺伝子と 3' ITR の間の領域に搭載したアデノウイルスベクターを開発し、本ベクターが極めて効率良く目的遺伝子の発現を正に制御できることを明らかにした。
- 2) 標的細胞親和性の制御を目的に、ファイバーノブの HI ループ領域だけでなく C 末端領域にも外来ペプチドを表現できるファイバーミュータントアデノウイルスベクター作製法を開発し、RGD ペプチドとポリリジンペプチドの両者をファイバーに付与したベクターが遺伝子導入効率に優れていることを明らかにした。また、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためにアデノウイルス受容体の CAR やインテグリンとの結合能を欠損したベクターを作製した。さらに、ファイバーの HI ループ領域を含むファージライブラリを作製し、アデノウイルスベクターのファイバーに挿入して特定の標的分子に結合し得るリガンドペプチドを検索するためのスクリーニングシステムを構築した。
- 3) 低抗原性アデノウイルスベクターの開発として、アデノウイルスベクターをポリエチレングリコール（PEG）でハイブリッド化することにより、中和抗体による遺伝子導入の低下が抑制され、血中滞留性の向上並びに CAR を介した非特異的遺伝子導入が回避出来ることを見いだした。また、RGD モチーフを付与した PEG を用いて作製した RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは、RGD 配列をファイバーに付与したアデノウイルスベクターと同等の高い遺伝子発現能を示し、さらにアデノウイルスに対する中和抗体存在下では、むしろ優れた遺伝子発現能を有することを明らかにした。
- 4) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発として、ラムダファージディスプレイシステムを用いて、DNA 内封粒子に核移行活性を付与するために必要なペプチド側の条件を詳細に検討し、minimum NLS と importin alpha との結合が DNA 内封粒子表面で起こることが核移行に必須であること、ペプチドの C 末端側はこの相互作用が起きるように minimum NLS を粒子表面から一定の距離だけ離すための stem として機能していることを確認した。
- 5) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発のための基礎研究として、テロメア配列が TRF1 との相互作用を通じて染色体を安定化する能力に関して評価し、TRF1 とテロメア配列を使って人工染色体を安定化することはヒト不死化細胞では可能性があるがヒト正常体細胞では難しいという結論に達した。一方、この現象の発見は、細胞癌化のメカニズムの解明と新たな癌治療の分子標的の同定につながる事が期待される。

分担研究者

中川 晋作 大阪大学大学院薬学研究科 助教授
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
遺伝子導入チーム 主任研究員

協力研究者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 室長
水口 裕之 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
岡田 直貴 京都薬科大学 助手
岡田 裕香 武庫川女子大学 助手

A. 研究目的

本研究は、わが国における遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けて、安全性が高く、機能面で優れた次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。遺伝子治療臨床研究は現在までのところ、必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクターが必要とする要件を十分備えていないことにある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けての最重要課題の一つは、従来のベクターが抱える安全性面、機能面での問題点を克服した新規ベクターを開発することである。ところが、わが国におけるベクター開発は欧米に比べ著しく遅れており、今後の独自のベクター開発の成否如何では、わが国の遺伝子治療分野の進展に重大な影響を及ぼす可能性がある。

既存のベクターの中ではアデノウイルスベクターが遺伝子導入効率において最も優れているとされている。しかし、①作製法の煩雑さ、②搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、③標的細胞指向性の制限、④抗原性、⑤核内での安定性の欠如などが解決すべき重要課題として残されている。そこで本研究では、これらの問題を克服した独自の次世代アデノウイルスベクターの開発を目指した先駆的な取り組みを開始した。

一方、わが国独自に開発が進められている膜融合リポソーム（センダイウイルスの膜融合活性をリポソームに付与した生体膜と融合できるリポソーム）等の非ウイルスベクターは、安全性が高いという特徴を有する。しかし、有用なベクターとして真価を発揮させるためには、導入遺伝子を高効率で核内に送達するための技術や導入遺伝子を核内で安定化する

ための技術開発、あるいは細胞質で安定に遺伝情報が発現する系の開発研究などを一層推進し、これらの成果を組み合わせたハイブリッド（次世代非ウイルス）ベクターとして、その活用を目指す必要がある。そこで、上記の個々の問題点を克服でき、飛躍的に遺伝子発現効率を上昇させるための基盤研究を行った。

このような研究により、わが国独自の遺伝子導入技術基盤が開発されれば、導入遺伝子部分を目的に応じて取り換えるだけで様々な応用が可能となることから、わが国における遺伝子治療薬研究のみならず、ゲノム配列解読後の遺伝子機能解析研究の推進にも大いに寄与できる。

本年度は、次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究として、以下の結果を得た。1) E1/E3 両欠損領域のみならず、E4 遺伝子と 3' ITR の間の領域にも外来遺伝子を搭載できるトリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターの開発した。また、Tet-on 系の転写活性化因子の rtTA 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入した改良型 Tet-on 系搭載アデノウイルスベクターを開発し、発現誘導能が極めて優れていることを明らかにした。2) 標的細胞親和性の制御を目的に、ファイバーノブの HI ループ領域だけでなく C 末端領域にも外来ペプチドを表現できるファイバーミュータントアデノウイルスベクター作製法を開発した。また、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター開発のための基礎を確立した。さらに、ファイバーの HI ループ領域を含むファージライブラリを作製し、アデノウイルスベクターの標的分子を検索するためのスクリーニングシステムを構築した。3) 安全面を高めた低抗原性アデノウイルスベクターの開発として、アデノウイルスを PEG でハイブリッド化したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターを開発し、その有用性を明らかにした。次世代非ウイルス（ハイブリッド）ベクターの開発に関する研究として、以下の検討を行った。1) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発として、ラムダファージディスプレイシステムを用いて、DNA 内封粒子に核移行活性を付与するために必要なペプチド側の条件を詳細に検討した。2) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発として、テロメア配列が TRF1 との相互作用を通じて染色体を安定化する能力に関して詳細に検討した。

B. 研究方法

B.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

B.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発

(1) ベクター・シャトルプラスミドの作製

E4 領域と 3' ITR の間の領域に XbaI 部位を、E3 欠損領域に Csp45I 部位を、E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部位を有したベクタープラスミド pAdHM48 を作製した。これらはいずれもユニークな制限酵素部位である。pAdHM48 は E1/E3 領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有している。E4 領域と 3' ITR の間の領域の XbaI 部位への外来遺伝子挿入のためのシャトルプラスミドとして pHM15 を作製した。pHM15 はカナマイシン耐性遺伝子を有し、マルチクローニング部位の両端に XbaI、AvrII、NheI、SpeI 部位を有している。AvrII、NheI、SpeI 部位の切断末端は XbaI 部位の切断末端と結合できるため（再切断はできない）、いずれの制限酵素部位も pAdHM48 の E4 領域と 3' ITR の間の領域の XbaI 部位への外来遺伝子挿入に使用できる。

(2) 発現制御型アデノウイルスベクターの作製

アデノウイルスベクターは improved in vitro ライゲーション法で作製した。Tet-off システムあるいは Tet-on システムのための転写活性化因子 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) あるいは rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を E3 欠損領域に挿入し、テトラサイクリン応答性のプロモーター (TRE/CMV) とルシフェラーゼ（またはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP)）遺伝子からなるカセットを E1 欠損領域に挿入したアデノウイルスベクター、AdOff-L2、AdOn-L2 (AdOff-S2、AdOn-S2) を作製した。また、rtTA の発現単位にイントロン A の配列を付与したアデノウイルスベクター、AdOn-L4 (AdOn-S4) を作製した。

E3 欠損領域に rtTA 発現単位 (CMV プロモーター+イントロン A) を、E4 領域と 3' ITR の間の領域に tTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 発現単位 (EF1 α プロモーター) を、E1 欠損領域にテトラサイクリン誘導性のプロモーター下にルシフェラーゼ（または SEAP）発現単位を挿入したアデノウイルスベクター Ad-rtTA-tTS-L (Ad-rtTA-tTS-S) を作製した。

同様に、E3 欠損領域に IRES (internal ribosome entry site) 配列を利用して rtTA と tTS 発現単位 (CMV プロモーター+イントロン A+rtTA 遺伝子+IRES+tTS 遺伝子) を、E1 欠損領域にルシフェラーゼ発現単位 (テトラサイクリン誘導性プロモーター) を搭載したアデノウイルスベクター、Ad-rtTA-IRES-tTS-L を作製した。E1 欠損領域にテトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターを利用

して rtTA とルシフェラーゼ遺伝子を搭載したアデノウイルスベクター、AdBI-rtTA-L を作製した。E1 欠損領域にテトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターを利用して rtTA とルシフェラーゼ遺伝子を、E4 領域と 3' ITR の間の領域に tTS 発現単位 (EF1 α プロモーター) を搭載したアデノウイルスベクター、Ad-tTS-BI-rtTA-L を作製した。E1 欠損領域に CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼあるいは SEAP を発現する単位を搭載したアデノウイルスベクター、Ad-L2、Ad-SEAP2 を作製した (Table 1)。

各アデノウイルスベクターは 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製した。ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10 % glycerol からなる溶液で透析した。アデノウイルスベクターの生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターは End-point dilution 法で測定した。

(3) 培養細胞への遺伝子導入

SK HEP-1、HeLa、ECV304、LN319 細胞を 96 穴プレートに 1 x 10⁴ cells/well 播種し、翌日各アデノウイルスベクターを 1.5 時間作用させた。種々の濃度のドキシサイクリン存在下で 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性あるいは培地中の SEAP 産生量を測定した。

(4) ルシフェラーゼ産生量の測定

ルシフェラーゼ産生量は luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキより入手) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

(5) SEAP 産生量の測定

培地中の SEAP 産生量は Great EscApe SEAP Chemiluminescence Detection Kit (Clontech) で測定した。

B.1.2 標的細胞指向性を有したアデノウイルスベクターシステムの開発

(1) アデノウイルスベクターの作製

ファイバーノブの HI ループ領域だけでなく C 末端領域にも外来ペプチドを表現できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターのためのベクタープラスミド pAdHM41 を作製した。pAdHM41 は E1/E3 領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有しており、ファイバーノブの HI ループコード領域に Csp45I 部位を、C 末端領域コード領域に ClaI 部位を、E1 欠損領域には I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部位を有している (Fig. 6)。

ファイバーノブの HI ループに RGD ペプチドを、C 末端領域にポリリジンペプチドを有したルシフェラーゼを発現するファイバーミュータントアデノウイルスベクター、Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 は以下のように作製した。pAdHM41 を ClaI で切断し、flexible linker に続き K7 (KKKKKKK) ペプチドに相当するオ

パク質は、バキュロウイルス発現系を用いて N 末端にヒスチジンタグを付与した状態で発現させた。ファイバーノブ、ペントンベースに相当する遺伝子は pAdHM4 を鋳型として、PCR で作製した。Primer は以下のものを用いた。ファイバーノブ ; forward, 5'-agt cga att cac ttt gtg gac cac acc agc-3'; reverse, 5'-agt cgc ggc cgc tta ttc ttg ggc aat gta tga aa-3'; ペントンベース ; forward, 5'-agt cga att cat gcg gcg cgc ggc gat gta tga g-3'; reverse, 5'-agt cgc ggc cgc tca aaa agt gcg gct cga tag gac-3'。各々、PCR 産物を EcoRI と NotI で処理し、baculovirus transfer vector (PharMingen より入手)の pAcHLT-A の EcoRI/NotI 部位に組み込んだ。組換えタンパク質はバキュロウイルスに感染した Sf9 細胞を用いて manufacturer's instructions に従って作製し、Ni-NTA-Sepharose クロマトグラフィーで精製した。

(7) 赤血球凝集活性の測定

各アデノウイルスベクターの赤血球凝集活性は Mei と Wadell の方法で測定した。即ち、ヒトあるいはマウス由来の新鮮赤血球を PBS で 3 回洗浄し、PBS で 1% (v/v) になるように懸濁した。各アデノウイルスベクター (Ad-L2, Ad/ Δ F-L2, Ad/ Δ P-L2, AdRGD-L2, Ad/ Δ F-RGD-L2) を 96 穴丸底プレートに 2 倍の段階希釈で 25 μ l 加え、1% ヒトあるいはマウス由来の新鮮赤血球を作用させた。4°C で 2 時間静置後、沈降パターンを判定した。データは hemagglutination unit (HAU)/10¹⁰ VP of virus/ml で表示した。

(8) HI loop および HI strand 発現ファージミドベクターの作製

ファージライブラリの構築には、Amersham pharmacia biotech 社製のリコンビナント抗体発現システムを用い、ファージミドベクターとして融合蛋白質発現カセットが Lac プロモーター支配下にある pCANTAB5e (Amersham pharmacia biotech, Inc.) を用いた。HI loop のクローニングには、あらかじめ 5' 末端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチドとして 5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCTGCCTAAACGGTACACAG GAAACAGGAGAC-3' と 5'-GCGGCCGCGGATCCACCACCACCA CAGTCCCATGAAAATGACATAGAGTATGCACTTGG-3' を用い、HI strand のクローニングには 5'-GGCCCAGCC GGCCATGGCCTGCAAACCTGTAACACTAACCTTACCTAAACGG -3' と 5'-GCGGCCGCGGATCCACCACCACCACAAATGTAGTT GTGGCCAGACCAGTCCC-3' を用いた。それぞれのオリゴヌクレオチドを 94°C で 1 分、60°C で 15 分、16°C で 30 分反応させることによりアニーリングし、この

DNA 断片を予め SfiI および NotI 処理した pCANTAB5e に T4 DNA ligase (Roche Diagnostics 株式会社) を用いて組み込み、それぞれのファージミドベクターを pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand とした。

(9) HI loop および HI strand 発現ファージライブラリの作製

3 種類のプライマーを用い、2 段階の PCR によって、全てのアミノ酸をコードし得るランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS (N; A, T, G, C, S; G, C) \times 7 配列を導入した HI loop および HI strand 発現カセットをファージミドベクターに組み込んだ。まず、センスプライマーとして 5'-CCCATGAAAATGACAT AGAGTATGCACTTGGACA (SNN), GCAAGTTGTGTCTCCTGTTCC TGTGTACCG-3' および、アンチセンスプライマーとして 5'-CGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG-3' を用い、pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand に対して、アニーリング: 57°C、60 秒、伸長: 68°C、60 秒、サイクル数: 35 回で Taq polymerase (Sigma-Aldrich, Inc.) を用いて 1st PCR を行った。PCR purification kit (Qiagen companies) および GeneElute™ Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich, Inc.) でそれぞれの PCR 産物を精製した。更にこの精製したそれぞれの遺伝子断片を、センスプライマーとして 5'-TGCGGCACGCGTTCCAGCGGATC-3' を用い、pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand に対して、先と同条件で 2nd PCR を行い、1 回目の PCR 産物の増幅および伸長を行った。2 回目の PCR 産物 (HI loop-NNS: 240 bp, HI strand-NNS: 285 bp) を PCR purification kit および GeneElute™ Agarose Spin Columns を用いて精製した。これによって、NNS \times 7 配列を導入した HI loop 断片および HI strand 断片を作製した。その後、HindIII および MroI で処理し、予め同様の酵素で処理したファージミドベクター pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand と T4 DNA ligase (Roche Diagnostics 株式会社) を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製し、以降大腸菌への形質転換に用いた。

(10) HI loop および HI strand 発現ファージの精製

pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand をそれぞれ形質転換した大腸菌 TG1 (STRATAGENE®) を 100 μ g/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2% グルコース含有 2YT 培地 (INVITROGEN®) で OD₆₀₀=0.3 まで培養し、M13K07 ヘルパーファージ (INVITROGEN®) を添加した。110rpm 30 分、250rpm 30 分培養した後、1,000g で遠心し、大腸菌ペレットに 100 μ g/ml ア

ンピシリン、50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加し、一晩振とう培養することでファージの産生を行った。一晩培養してファージ産生させた大腸菌 TGI を 1,000 $\times\text{g}$ 、10 分遠心して培養上清を回収した。更に 20,000 $\times\text{g}$ 、15 分遠心し回収し、20% PEG 8000/2.5M NaCl (和光純薬株式会社) を 1.5 倍量加え、氷上で 1 時間冷却した。20,000 $\times\text{g}$ 、15 分間遠心して沈殿したファージ粒子を NTE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA) に懸濁した。得られたファージ懸濁液を孔径 200 μm のメンブランフィルター (Millipore[®]) を用いて濾過し、ファージ溶液とした。

(11) ファージ粒子数の測定

2YTG 培地で $\text{OD}_{600}=0.3$ まで培養した大腸菌 TGI 株に対して段階希釈したファージ溶液を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養した。培養液の一部に 2YTGA 培地を添加し、clondisk (clontech Laboratories, Inc.) に播種し、一晩静置培養した。各希釈段階でのコロニー数を計数することで、ファージ粒子数 (CFU ; colony forming unit) を算出した。

(12) ファージ ELISA による発現の確認

96 穴 Immuno Plate (Nunc[™]) を、Carbonate-Bicarbonate Buffer (Sigma-Aldrich, Inc.) で 10 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した抗 E-Tag モノクローナル抗体 (Amersham pharmacia biotech, Inc.) で固相化した。2% Block Ace (大日本製薬株式会社) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間ブロッキングを行い、サンプルとしてあらかじめブロッキングしておいた精製ファージ溶液を加えた。洗浄操作を 3 回行った後、0.2% Block Ace で 1/5000 に希釈した抗 HRP/M13 モノクローナル抗体 (Amersham pharmacia biotech, Inc.) を添加した。室温で 2 時間放置し、洗浄操作を 3 回行った後、基質溶液 (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine ; TMBZ, ナカライテスク株式会社) を加えて発色させ、2N 硫酸を加えることで反応停止を行った。吸光度 (測定波長 450nm, 対照波長 655nm) をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad Laboratories, Inc) で測定した。

B.1.3 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発

(1) インテグリン指向性ペプチド (RGD) を付与した PEG の合成

インテグリン指向性 RGD 配列 (YGGRGDTP) を PEG 片末端に 2 分子付与した RGD-PEG-NHS は、Scheme 1 に従って合成した。まず RGD 配列を含む (Ac-YGGRGDTP β A)₂K-PEG- β AC-amide の合成を行う

ために、Fmoc (Fmoc=9-fluorenyl-methyloxycarbonyl) -K(Fmoc)-PEG- β AC(Tri)-Amide Resin を固相法にて合成した。固相上で Fmoc 保護基の除去 (脱保護) すなわちアミノ基の遊離 \rightarrow DMF 洗浄 \rightarrow Fmoc-アミノ酸誘導体と各ステップに適切な縮合反応試薬による HOBt の活性エステルによる遊離アミノ基との反応 (カップリング) \rightarrow DMF 洗浄、の操作を繰り返して縮合反応を進めた。同様にピペリジンによる Fmoc 基の除去 (脱保護) と Fmoc- β Ala-OH と縮合を行い、その後脱保護を行って H- β Ala-Cys (Tri)-Amide Resin を得た (Scheme 1-②)。次に、Fmoc-PEG-NHS (MW 3,400、Shearwater corporation) を反応させ、ピペリジンによる脱保護後、Fmoc-Lys (Fmoc)-OH を反応させ、Fmoc-Lys (Fmoc)-PEG- β Ala-Cys (Tri)-Amide Resin を得た (Scheme 1-④)。さらに Fmoc-Lys (Fmoc)-PEG- β Ala-Cys (Tri)-Amide Resin を、ペプチド合成機 (機種名: ABI433A、合成プログラム: FastMoc0.25 Ω MonPrevPk) を用いて、Fmoc- β Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr (Bu')-OH、Fmoc-Asp (OBu')-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg (Pmc)-OH、Fmoc-Tyr (Bu')-OH を順次使用し、脱保護と縮合を繰り返して (Fmoc-Y (Bu') GGR (Pmc) GD (OBu') T (Bu') P β A)₂K-PEG- β AC (Tri)-Amide Resin を合成した (Scheme 1-⑤)。脱保護後の DIEA 存在下無水酢酸との反応により、遊離のアミノ基をアセチル化し、Resin から単離し、HPLC にて精製を行い Scheme 1-⑥ に示す化合物を得た。さらに EMCS と反応させ RGD-PEG-NHS を得た。

(2) PEG および RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターの作製

アデノウイルスの PEG および RGD-PEG 修飾は、methoxy-polyethylene glycol 2-N-Hydroxysuccinimide (mPEG2-NHS ester、MW 40,000、Shearwater corporation)、methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、MW 5,000 および 2,000、Shearwater corporation) および上記方法にて作製した RGD-PEG-NHS を用いて行った。1 粒子のアデノウイルスの外殻蛋白質 (ヘキソン、ペントンベース、ファイバー) に存在する一級アミンに対して、25~6400 倍モル量の各種 PEG および RGD-PEG-NHS を 1×10^{12} particles/ml の Ad-Lu に添加し、300rpm で攪拌しながら 37 $^{\circ}\text{C}$ で 45 分間反応させることにより行った。

(3) PEG および RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターのヘキソン修飾率の算出

各種 PEG および RGD-PEG 修飾アデノウイルスと、2

倍濃度の SDS protein gel loading solution を等量混合し、終濃度 5% となるように 2-Mercaptoethanol を添加し、95℃ で 5 分間処理した。各試料を 2%~15%、もしくは 4%~20% ポリアクリルアミドゲルを用い、200V の定電圧で SDS-PAGE (25mM Tris, 192mM Glycine, 10% SDS) を行った。泳動後、蛋白質はクーマシブルーを用いて、PEG は 0.1M ヨウ素溶液を用いて染色した。PEG および RGD-PEG 修飾アデノウイルスのヘキソン修飾率は、SDS-PAGE を行ったゲルをクーマシブルー染色した後、ヘキソンおよび PEG 修飾ヘキサソンのバンドを NIHImage を用いて画像解析することにより算出した。

(4) 密度勾配遠心法による未修飾アデノウイルスベクターと PEG 修飾アデノウイルスベクターの分離

未修飾アデノウイルスベクターと PEG 修飾アデノウイルスベクターの CsCl 密度勾配遠心法による分離は、Vti 65.2 チューブ (Beckman) に CsCl (比重 1.34 / TD) を注ぎ、未修飾 Ad のみ、PEG 修飾 Ad および両者をその遺伝子発現効率が等しくなる割合 (unmodified-Ad : PEG-Ad = 1 : 30, virus particle) でウイルス粒子を混合後重層し、Vti 65.2 rotor (Beckman) を用いて 18℃、40.8krpm、18 時間遠心した。Vti 65.2 チューブの下方より 30μl ずつフラクションを回収し、Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 10K MWCO (PIERCE) を用い、4℃ にて 10% のグリセリンを含む PBS (-) で透析した。

(5) PEG 修飾アデノウイルスベクターの精製

SW41 チューブに CsCl (比重 1.33 / TD) を注ぎ PEG 修飾アデノウイルスベクターを重層し SW41 rotor (Beckman) を用いて 18℃、35krpm、18 時間遠心した。チューブ内にできた白いバンドを透析チューブに回収し、4℃ にて 10% のグリセリンを含む PBS (-) で透析した。透析を終了したウイルス液は -80℃ で保存した。以上の操作は無菌的に行った。

(6) アデノウイルスの粒子径測定

アデノウイルスの粒子径は、ZETASIZER 3000HS (Malvern instruments, Malvern, UK) を用いて測定した。

(7) アデノウイルスベクターの体内動態

BALB/c マウス雌、6 週齢に PEG 修飾アデノウイルスベクターを 1.5×10^{10} particles/100 μl で尾静脈内投与し、経時的に眼底より採血した。得られた血液より QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit を用いて DNA を回収した。回収した DNA は、バイオドット SF を用いて Hybond-N+ にスロットプロットし、AlkPhos Direct Labelling Module を用いて標識したプロ-

ブ(ルシフェラーゼ遺伝子の全長を含む)により 55℃ で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ECF Detection Module を用いて蛍光により血液中に存在するアデノウイルスベクターの DNA を検出した。なお蛍光 FluorImager 595 を用いて測定し、ScanCont、ImageQuont により解析した。また、各サンプルごとに検量線を作成し、血中アデノウイルス量を算出した。

(8) マウス抗アデノウイルス血清の作製

ICR マウス雌、6 週齢に、 1×10^{10} particles のアデノウイルスベクターをフロイントのコンプリートアジュバンドとともに皮下に投与した。2 週間、4 週間後に 1×10^{10} particles のアデノウイルスベクターをフロイントのインコンプリートアジュバンドとともに皮下に投与した。1 週間後、マウスの全血液を回収し、血清を回収した。

B. 2. 次世代非ウイルス (ハイブリッド) ベクターの開発基盤研究

B. 2.1 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発: ペプチドディスプレイシステムを使った機能性ペプチドの遺伝子導入促進活性の解析

(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製した。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 (Sup0) 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℃, 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プロット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 10^{11} 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、細胞質にファージ粒子をマイクロインジェクションした後、核分画より回収したファージ粒子を感染価で定量する方法で検定した。 10^{12} 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 PBS + 1mM EDTA で細胞をはがして回収した。この細胞を Buffer A (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 40 mM KCl, 0.5% NP 40, 0.05 mM spermidine, 0.05 mM spermine, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 2 mM MgCl₂) に懸濁して細胞膜を壊したあと、1000rpm 10min の遠心操作で核を回収した。核分画をさらに Buffer A で 2 回洗浄したあと、20 μ l の Buffer B (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 420 mM KCl, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.2% NP 40, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml pepstatin A) で可溶化し、10,000rpm 10min の遠心の上清に存在するファージ粒子数を、大腸菌 LE392 株を用いて定量した (Fig. 25)。この実験では、陰性コントロールとして、a) 1 mg/ml Wheat germ agglutinin (WGA) を同時にマイクロインジェクションしたもの、b) 核移行シグナルを発現していない野生型ファージをインジェクションしたもの、c) 単離した核分画と NLS ファージを試験管内で混合したもの、という 3 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が、核膜孔への結合は阻害しないことが知られている。これらすべての陰性コントロールでファージ粒子が核分画から回収されなかったことから、ファージ粒子は核の外側に単に吸着しているのではなく、核の内部に存在していると結論づけられた。

B. 2. 2 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化させるための技術開発

(1) 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、pCX4bsr に組み込んで pCL-Ampho と同時に BOSC23 細胞に導入してレトロウイルスベクターとして回収した。このベクターをヒト初代培養線維芽細胞 TIG-3 株に感染させてから、Blastcidin で選択して、TRF1 強発現細胞株を得た。TRF1 量は、baculovirus で作製した組換え TRF1 をウサギに免疫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プロットティングと、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、Blastcidin 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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト初代細胞、培養細胞は、研究用の市販品、領布品を用いており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

C.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発 -発現制御型アデノウイルスベクターの開発-

平成 12-13 年度に、複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステム (E1・E3 両欠損部位に外来遺伝子を挿入できるアデノウイルスベクターシステム) を開発し、本系を用いてテトラサイクリンの遺伝子発現制御系を単一のアデノウイルスベクターに搭載させたシステムを開発した。このベクターシステムでは、転写活性化遺伝子を発現するアデノウイルスベクターとテトラサイクリン応答性のプロモーターの制御下に目的遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを共作用 (共投与) する必要がなくなり、余分なベクターを作製しなければならないといった問題点も克服され、より効率の良い発現制御が可能になると期待された。Tet-off あるいは Tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクタ

一を開発し、種々のヒト由来の細胞株、マウスを用いてその遺伝子発現誘導能を検討したところ、Tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターを作用させた培養細胞においては、ドキシサイクリン（テトラサイクリンの誘導体）存在化で培養することにより、ドキシサイクリン非存在下で培養した場合に比べ約 20-200 倍以上の目的遺伝子発現の低下が認められた。一方、Tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターの場合には、ドキシサイクリンの添加によりルシフェラーゼ発現は約 2-20 倍程度しか上昇せず、低い発現誘導能しか示さなかった。さらに、Tet-off システムにおける最大ルシフェラーゼ発現は Tet-on システムの場合より約 10 倍高く、発現のスイッチが置き換わるのに必要とされるドキシサイクリンの濃度（Tet-off の場合は off から on になる濃度。Tet-on の場合は on から off になる濃度）も Tet-off システムの方が約 100 倍低く、薬剤に対して高い感受性を示した。

Tet-on システムによる低い遺伝子発現誘導能等は、rtTA の TRE 配列（テトラサイクリンオペロン）への低い親和性が原因と考えられる。そこで rtTA の発現量を増大させ、遺伝子発現誘導能を改善させる目的で rtTA 発現単位にイントロン A の配列を付与したアデノウイルスベクター、AdOn-L4 を作製し、その機能を検討した。その結果、AdOn-L4 は AdOn-L2 と比べると優れた遺伝子発現誘導能を示したが、AdOff-L2 に比べると依然劣っていた。

遺伝子治療や遺伝子機能解析研究をはじめ多くの目的には、発現を positive に制御できる Tet-on システムの方が好ましいと考えられる。そこで本年度は Tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターの改良を行った。主に以下の 3 項目について改良を試みた。1) rtTA の発現レベルを上昇させ、2) テトラサイクリン制御性のサイレンサーである tTS を用いることで basal 活性を抑え、3) かつ単一のアデノウイルスベクターで 3 者（目的遺伝子、rtTA 遺伝子、tTS 遺伝子）の遺伝子を発現させることである。

まず、3 種類の外来遺伝子を同時に発現できるアデノウイルスベクターとして、E1/E3 欠損領域に加え E4 領域と 3' ITR (inverted terminal repeat; ウイルスゲノム 3' 末端) の間の領域にも外来遺伝子を挿入できるトリプル遺伝子発現系搭載アデノウイルスベクターを開発した。E1/E3 欠損領域に加え、我々が注目した領域は E4 領域と 3' ITR の間の領域であり、この部位に制限酵素ユニーク部位の XbaI 部位を挿入した (Fig. 1)。作製したベクタープラスミド pAdHM48 は E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部

位を、E3 欠損領域に Csp45I 部位を、E4 領域と 3' ITR の間の領域に XbaI 部位を有しており、それぞれの領域に簡便な invitro ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して外来遺伝子を挿入できる。アデノウイルスゲノムの 3 領域に独立に外来遺伝子を搭載できるベクターの開発は、本研究が世界で初めてのものである。個々の遺伝子発現単位を異なった領域に挿入することで、プロモーター干渉等を抑え、効率良く個々の遺伝子を発現させることが期待できる。

作製したベクターを Table. 1 に示す。3 者（目的遺伝子（ルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子）、rtTA 遺伝子、tTS 遺伝子）の遺伝子を単一のベクターで発現させるため、様々なタイプのベクターを作製した。いずれのベクターもテトラサイクリン制御性プロモーターにドライブされた目的遺伝子は E1 欠損領域に挿入した。Ad-rtTA-IRES-tTS-L は IRES (internal ribosome entry site) 配列を利用して rtTA と tTS 発現単位 (CMV プロモーター+イントロン A+rtTA 遺伝子+IRES+tTS 遺伝子) を E3 欠損領域に挿入したベクター、AdBI-rtTA-L はテトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターを利用して E1 欠損領域に rtTA とルシフェラーゼ遺伝子を搭載したベクター、Ad-tTS-BI-rtTA-L はテトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターを利用して E1 欠損領域に rtTA とルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、E4 領域と 3' ITR の間の領域に tTS 発現単位 (EF1 α プロモーター) を搭載したベクター、Ad-rtTA-tTS-L は E3 欠損領域に rtTA 発現単位を、E4 領域と 3' ITR の間の領域に tTS 発現単位を搭載したベクターである。またコントロールベクターとして、E1 欠損領域に CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼあるいは SEAP を発現する単位を搭載したアデノウイルスベクター、Ad-L2、Ad-SEAP2 (それぞれ) を作製した。まず、SK HEP-1 細胞に各アデノウイルスベクター (AdOn-L4, AdBI-rtTA-L, Ad-rtTA-IRES-tTS-L, Ad-tTS-BI-rtTA-L, Ad-rtTA-tTS-L) を作用させた場合のルシフェラーゼ発現能に対するドキシサイクリン濃度の影響を調べた (Fig. 2)。前年度に報告したように、AdOn-L4 の regulation factor (最大活性と basal 活性の比) は低く、6.6 (MOI=5) あるいは 15.5 (MOI=50) であった。両方向性プロモーターを有した AdBI-rtTA-L と Ad-tTS-BI-rtTA-L は発現誘導能は認められなかった。Ad-rtTA-IRES-tTS-L は低い発現誘導能しか示さなかった。一方、Ad-rtTA-tTS-L による発現誘導能は高く、regulation factor は 310 (MOI=5) あるいは 2515

(MOI=50)であった。Ad-rtTA-IRES-tTS-Lによるbasal活性はAdOn-L4に比べて2-6倍低く、最大活性はAdOn-L4より30倍以上高かった。

次に、上記の現象が他の細胞においても認められるか否かをHeLa細胞とECV304細胞を用いて検討した(Fig. 3)。各ベクターはMOI=5あるいはMOI=50で細胞に作用させ、basal活性と最大活性を測定した。発現誘導パターンはSK HEP-1細胞(Fig. 2)と同様であった。両細胞とも、AdOn-L4によるルシフェラーゼ発現誘導能は低かったが、Ad-rtTA-tTS-Lは非常に高い発現誘導能を示した。両方向性プロモーターを有したAdBI-rtTA-LとAd-tTS-BI-rtTA-Lは発現誘導能は低いか、あるいは認められなかった。Ad-rtTA-IRES-tTS-Lを作用させたHeLa細胞では、発現誘導能の改善は認められなかったが、ECV304細胞では若干改善が認められた。従って、Ad-rtTA-tTS-Lは細胞種によらず、優れた遺伝子発現誘導能を示すことが明らかとなった。

次に、AdOn-L4とAd-rtTA-tTS-Lで最大にinduceされたときにルシフェラーゼ発現量を、強力なプロモーターとして知られているCMVプロモーター/エンハンサーでルシフェラーゼを発現するアデノウイルスベクター、Ad-L2を用いた場合と比較した(Fig. 4)。その結果、Ad-rtTA-tTS-Lは細胞種やベクター濃度にもよるが、Ad-L2と同等のルシフェラーゼ発現を示すことが明らかとなった。一方、AdOn-L4はいずれの細胞種でもAd-L2に比べ10倍以上低かった。

以上の検討はルシフェラーゼ遺伝子を用いて検討したが、トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターが他の遺伝子を用いても高い遺伝子発現能を示すか否かを調べるために、次にSEAP遺伝子を用いて検討した(Fig. 5)。その結果、SK HEP-1、HeLa、ECV304細胞のいずれにおいてもAd-rtTA-tTS-SEAPによるSEAP発現誘導能は高く、MOI=50でのregulation factorはそれぞれ1246、500、94.6であった(それぞれ)。この時の、最大SEAP発現量は、CMVプロモーター/エンハンサーでSEAPを発現するアデノウイルスベクター、Ad-SEAP2と同等であった。一方、AdOn-SEAP4による発現誘導能は低かった。

以上の結果より、トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターとrtTA、tTS遺伝子を用いることで、効率良く外来遺伝子の発現をpositiveに制御できるアデノウイルスベクターの開発に成功した。

C.1.2 標的細胞指向性を有したアデノウイルスベ

クターシステムの開発

アデノウイルスベクターは、現存する遺伝子治療用ベクターの中では、最も遺伝子導入効率の優れたベクターであり、非分裂細胞やin vivoの組織細胞への直接の遺伝子導入も可能なことから画期的なベクターとして注目されてきた。しかしながら、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合、多くの細胞・組織に非特異的に移行すること、逆に、アデノウイルス受容体(coxsackievirus-adenovirus receptor; CAR)の発現がない細胞には感染できないという問題点が指摘されている。そこで、平成12-13年度はウイルス表面のファイバータンパク質に外来ペプチドを発現させることによりベクターの標的細胞選択性を制御し、より広範な目的に使用できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発を目指した基盤研究を行った。特に、 $\alpha v \beta 3$ あるいは $\alpha v \beta 5$ インテグリンとの結合能を有したRGD配列(CDCRGDCFC)をファイバーのHIループに挿入したアデノウイルスベクター(AdRGD)を開発し、その機能を様々なヒト由来細胞、マウス由来細胞について検討した。また、自殺遺伝子のHSVtkやサイトカイン、ケモカイン遺伝子、樹状細胞(DC)を用いたマウス癌遺伝子治療実験を行った。

本年度は、有効性をさらに高めたファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発研究として、ファイバーノブのHIループ領域だけでなく、C末端領域にも外来ペプチドを表現できるベクターを開発し、RGDペプチドとポリリジンペプチド(ヘパラン硫酸に対して親和性がある)の両者をファイバーに付与したベクターの有用性を検討した。その他、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発を目的に、CARやインテグリン(αv)と結合しないアデノウイルスベクターの開発を行った。

C.1.2.1 2種類の外来ペプチドを表現できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発

ファイバーミュータントアデノウイルスベクターにおいては、外来ペプチドの挿入に適した部位としてファイバーノブのHIループ領域とC末端領域が知られている。我々はH12-13年度にファイバーノブのHIループ領域に、簡便な1ステップのin vitroライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して目的ペプチドコード遺伝子を挿入できるファイバーミュータントアデノウイルスベクター作製法を開発した。本年度は、本系をさらに改良して、ファイバ

ーノブのHI ループ領域とC末端領域に同時に外来ペプチドを表現できるシステムを開発した。

作製した新たなベクタープラスミドの pAdHM41 は E1/E3 領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有しており、ファイバーノブのHI ループコード領域に Csp45I 部位を、C末端領域に ClaI 部位を、E1 欠損領域には I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部位を有している (Fig. 6)。pAdHM41 を用いることにより、HI ループに RGD ペプチドを、C末端領域にはポリリジンペプチドを有しルシフェラーゼを発現するファイバーミュータントアデノウイルスベクター、Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 を極めて簡便に作製することができた。同様に HI ループやC末端領域に RGD ペプチドやポリリジンペプチドを有したベクター Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2、Ad-K7(C)-L2、Ad-L2 を作製した (Table 2)。

作製した各ベクターの機能をヒト由来細胞 (LN319、LN444、SF295 細胞)、マウス由来細胞 (NIH3T3、L、B16 細胞)、ラット由来細胞 (RL-34、C6、L6 細胞) を用いて検討した (Fig. 7)。まず、ヒト由来細胞について検討した (Fig. 7A)。LN319 細胞は CAR 陽性、LN444、SF295 細胞は CAR 陰性であり、全ての細胞は $\alpha\beta 3$ あるいは $\alpha\beta 5$ インテグリンを発現している (Table 3)。LN319 細胞においては、全てのベクターで効率の良いルシフェラーゼ発現が認められ、特に、Ad-K7(C)-L2 が最も効率が良かった。LN444 と SF295 細胞では、Ad-L2 でのルシフェラーゼ発現は低く、いずれのファイバーミュータントベクターでも 1-2 オーダー以上のルシフェラーゼ発現の改善が認められた。

次に、マウス由来細胞を用いて検討した (Fig. 7B)。NIH3T3、L、B16 細胞とも CAR 陰性であり、 αv インテグリン陽性、 $\beta 3$ インテグリンあるいは $\beta 5$ インテグリンが陽性である (Table 4)。Ad-L2 によるルシフェラーゼ発現は CAR 陰性であることを反映して、いずれの細胞においても低かった。NIH3T3 細胞では Ad-RGD(HI)-L2 が Ad-K7(C)-L2 より低い活性を示したが、逆に B16 細胞では Ad-RGD(HI)-L2 が Ad-K7(C)-L2 より高い活性を示した。L 細胞では Ad-RGD(HI)-L2 と Ad-K7(C)-L2 は同程度の活性を示した。一方、Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 はいずれの細胞でも最高レベルの活性を示した。Ad-RGD(C)による活性は低かった。

さらに、ラット由来細胞を用いて検討した (Fig. 7C)。RL-34 細胞は CAR 陽性、C6 細胞は CAR 擬陽性、L6 細胞は CAR 陰性であった。全ての細胞が αv インテグリン、 $\beta 3$ インテグリンおよび $\beta 5$ インテグリン

陽性であった (Fig. 8)。マウス由来細胞での結果と同様に、Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 は最高レベルの活性を示した。C6 細胞と L6 細胞では、Ad-K7(C)-L2 が Ad-RGD(HI)-L2 より高い活性を示した。

以上の結果より、Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 は Ad-K7(C)-L2 と Ad-RGD(HI)-L2 の感染域を併せ持った性質を有しており、より広範に効率良く遺伝子導入可能なことが明らかとなった。また、ファイバーノブへの RGD ペプチドの挿入部位としては、HI ループ領域の方がC末端領域より適していることが判明した。一方、ポリリジンペプチドの場合は、HI ループ領域に挿入しても遺伝子導入活性の上昇は認められず (data not shown)、C末端領域に挿入した場合のみ遺伝子導入効率の改善が見られることが明らかとなった。

次に、各ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの *in vivo* での有効性を検討した (Fig. 9)。B16 メラノーマを腹部皮内に移植したマウスの腫瘍内に各ベクターを投与し、腫瘍中のルシフェラーゼ産生量を測定した。各アデノウイルスベクターは 1.0×10^9 VP 投与した。その結果、Ad-RGD(HI)-L2 によるルシフェラーゼ産生量は Ad-L2 に比べ約 37 倍高かった。Ad-K7(C)-L2 と Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 の活性は Ad-L2 に比べると高かったが、Ad-RGD(HI)-L2 よりは低かった。この結果は、*in vitro* の培養 B16 細胞を用いた場合と異なっていた。従って、*in vivo* への直接投与では、*in vitro* とは異なり、Ad-RGD(HI)-L2 が最も優れていることが明らかとなった。

C.1.2.2 CAR あるいは αv インテグリンと結合できないアデノウイルスベクターの開発

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターシステムの開発にあたっては、native の受容体である CAR (ファイバーと結合) や αv インテグリン (ペントンベースの RGD モチーフと結合) を認識せず、ファイバー領域に挿入した外来ペプチドを介して細胞特異的受容体を認識してのみ感染するベクターシステムの開発が必要である (Fig. 10)。そこでまず、ファイバーノブの FG ループに変異 (ファイバータンパク質の 489 から 492 の 4 アミノ酸を欠損) を導入することで CAR を介した感染は起こらないルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad/ Δ F-L2、およびペントンベースの RGD モチーフを欠損させることで αv インテグリンを介した感染は起こらないルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad/ Δ P-L2 を作製し、その機能を野生型のファイバ

一をもったベクターAd-L2 と比較した (Table 5) (Fig. 11)。細胞はCAR 陽性の SK HEP-1 細胞と LN319 細胞、CAR 陰性の LN444 細胞と SF295 細胞を用いた。Ad-L2 による CAR 陰性細胞への遺伝子導入能は低く、CAR 陽性細胞に比べ 2-3 オーダー低いルシフェラーゼ発現しか示さなかった。従って、効率の良い遺伝子導入には CAR の発現が必要なことが再確認された。一方、Ad/ Δ F-L2 による遺伝子導入は、CAR 陽性細胞に対しても低く、Ad-L2 に比べ約 1%程度のルシフェラーゼ発現しか示さなかった。Ad/ Δ F-L2 の CAR 陰性細胞への活性は Ad-L2 と同程度であった。Ad/ Δ P-L2 の活性は Ad-L2 と比べ、CAR 陽性細胞で 7-9 割程度であり、CAR 陰性細胞で 3-5 割程度であった。

次に、Ad/ Δ F-L2 や Ad/ Δ P-L2 による遺伝子導入が確かに、CAR や α v インテグリンを介したものであることを確認するために、組換えファイバーノブ、組換えペントンベースタンパク質を用いた阻害実験を行った (Fig. 12)。細胞としては、CAR 陽性細胞として SK HEP-1 細胞を、CAR 陰性細胞として LN444 細胞を用いた。組換えファイバーノブタンパク質は SK HEP-1 細胞への Ad-L2 によるルシフェラーゼ発現を濃度依存的に阻害し、組換えファイバーノブタンパク質 50 μ g/ml ではルシフェラーゼ発現を 20%以下に減少させた。一方、組換えペントンベースタンパク質を用いた場合は 50 μ g/ml の作用でも 70-80%のルシフェラーゼ発現を保持していた (Fig. 12 A-1)。この結果は Fig. 11 を支持しており、ファイバーと CAR の相互作用が、ペントンベースと α v インテグリンの相互作用より遺伝子導入能への寄与が大きいことが確認された。Ad/ Δ F-L2 の SK HEP-1 細胞への遺伝子導入活性に関しては、組換えファイバーノブタンパク質では影響を受けず、組換えペントンベースタンパク質の作用で強く阻害された (Fig. 12 A-2)。逆に、Ad/ Δ P-L2 の SK HEP-1 細胞への遺伝子導入活性に関しては、組換えペントンベースタンパク質では影響を受けず、組換えファイバーノブタンパク質の作用で強く阻害された (Fig. 12 A-2)。これらの結果より、Ad/ Δ F-L2 はペントンベースを介して、Ad/ Δ P-L2 はファイバーを介して細胞に感染していることが確認された。また、CAR 陰性、 α v インテグリン陽性の LN444 細胞を用いた場合には、Ad-L2 と Ad/ Δ F-L2 の遺伝子導入は組換えファイバーノブタンパク質で阻害されず (Fig. 12 B-1, B-2)、これらのベクターの LN444 細胞への感染が、ペントンベースの RGD モチーフと α v インテグリンを介して起こっていることが示唆された。これらの結果より、ファイバーノブの FG ループの 4 アミノ酸を欠損させ

たアデノウイルスベクターは確かに CAR に結合せず、またペントンベースの RGD モチーフを欠損させたアデノウイルスベクターは α v インテグリンに結合できないことが確認された。

ターゲティングアデノウイルスベクターを開発するにあたっては、native の受容体 (タンパク質) を認識せず、細胞特異的な受容体 (タンパク質) だけを認識するベクターを作製する必要がある。そこで、次に、従来型アデノウイルスベクターや CAR と結合できないアデノウイルスベクターのファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチドを挿入したベクター (AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2) を作製し、その遺伝子導入活性を SK HEP-1、LN319、LN444、SP295 細胞を用いて検討した (Table 6)。従来型のファイバーや CAR と結合できないファイバーをもったベクターに RGD ペプチドを挿入すると、いずれの細胞においてもルシフェラーゼ発現の上昇が認められた。この効果は CAR 陰性細胞の LN444、SP295 細胞を用いた場合により顕著であった。これらの結果より、AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 は挿入した RGD ペプチドの機能により遺伝子導入活性の上昇が認められたと考えられ、挿入ペプチドを任意に入れ換えれば、極めて簡単にターゲティングアデノウイルスベクターの作製が可能になることが示唆された。

次に、各ベクターをマウスに尾静脈内投与後の各臓器におけるルシフェラーゼ発現を検討した (Fig. 13)。アデノウイルスベクターはマウスに全身投与するとほとんどのベクターが肝臓に移行し、遺伝子発現することが知られている。そこで、各改変ベクターについて、特に肝臓への移行性 (ルシフェラーゼ発現) が抑制されるかどうかについて検討した。各ベクターは 3.0×10^{10} VP 投与した。その結果、Ad-L2 のみならず、いずれのベクターもルシフェラーゼ発現パターンに違いはなく、肝臓で高いルシフェラーゼ発現が観察された。肝臓でのルシフェラーゼ発現は、改変ベクターの Ad/ Δ F-L2、Ad/ Δ P-L2 のいずれにおいても Ad-L2 と同等レベルであった (Ad/ Δ P-L2 については若干ルシフェラーゼ発現は低かった)。一方、RGD ペプチドをファイバーノブの HI ループ領域に挿入したアデノウイルスベクターの AdRGD-L2 も Ad-L2 とほぼ同様のパターンを示した (肝臓でのルシフェラーゼ発現は Ad-L2 に比べ約 6 倍減少した)。Ad/ Δ F-RGD-L2 では Ad-L2 に比べ肝臓でのルシフェラーゼ発現は 87 倍低かった。これらの結果より、CAR と結合できないベクターと α v インテグリンと結合できないベクターの両者とも、ターゲティングアデノウイルスベクターの基盤ベクターとしては不完

全であることが明らかとなった。

一方、ファイバーノブのHI ループ領域にRGD ペプチドを挿入することで、*in vivo* での遺伝子発現レベルは低下する傾向が認められた。そこで、この原因について検討するため、各ベクターの赤血球凝集活性を検討した (Table 7)。アデノウイルスベクターが全身投与後に赤血球と相互作用し、凝集活性を示せば、結果として各臓器へ移行するベクター量は減少することになる。結果は、AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 はマウス赤血球に対し凝集活性を示し、赤血球凝集活性はそれぞれ 240、15 HAU/10¹⁰ VP/ml であった。AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 の活性の違いは、各ベクターの遺伝子導入活性の違い (Ad/ Δ F-RGD-L2 の方が、AdRGD-L2 に比べ低い活性しか示さない) を反映したものと考えられた。他のベクター (Ad-L2、Ad/ Δ F-L2、Ad/ Δ P-L2) については赤血球凝集活性は認められなかった。また、ヒト赤血球に対しては、AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 を含め、いずれのベクターでも赤血球凝集活性は認められなかった。

そこで、次に AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 で認められた赤血球凝集活性が遺伝子導入活性に影響を及ぼすか否かを *in vitro* で検討した。SK HEP-1 細胞に 1% マウス赤血球存在下で各ベクターを作用させ、ルシフェラーゼ発現を検討したところ、マウス赤血球非存在下に比べルシフェラーゼ発現の変化は認められなかった (data not shown)。従って、AdRGD-L2 と Ad/ Δ F-RGD-L2 の赤血球凝集活性は、遺伝子導入活性に影響を及ぼすほど高いものではないことが判明した。

C.1.2.3 HI loop および HI strand 発現ファージライブラリの作製

アデノウイルスのファイバー領域に特定の受容体に親和性を有するリガンドを導入し、感染域を制御しようとした場合に、標的も既知のものに限られる事や、リガンドを導入する事でファイバーの高次構造が変化し、アデノウイルスベクターが産生されにくくなる事などが問題となっている。そこで、本研究では、ランダムなペプチド配列を含むファイバー蛋白質の一部を提示したファージライブラリを作製し、この問題点を克服した迅速なアデノウイルスにおける標的指向性分子のスクリーニング法の確立を試みた。

まず、アデノウイルスファイバーでペプチドの導入や改変を行うに当たり、ウイルス産生などに影響が少ないと考えられる HI loop 領域とその両端の β -strand を含む領域 (以下 HI strand と略す) をフ

ァージミドベクター (pCANTAB5e) にクローニングし、ファージ外殻蛋白質上へ提示可能であるかどうかを ELISA 法にて検討した。pCANTAB5e はファージ外殻蛋白質をコードする配列の上流にマルチクローニングサイト (SfiI および NotI) および、ペプチド Tag 配列 (E-Tag) が導入されている。今回 HI loop および HI strand の導入にはこれらの制限酵素サイトを利用し、更に融合蛋白質の検出には抗 E-Tag モノクローナル抗体と抗ファージ抗体を用いて行った。その結果、HI loop および HI strand 共にファージ粒子数に比例して OD450nm の吸光度が増大したことから、ファージ表面上にこれらの分子が提示されていることが示された (Fig. 14)。更に、PCR を用いて HI loop、HI strand 領域中にランダムなペプチド配列 (NNS \times 7) を導入したファージライブラリを構築しシークエンスを解析することによって NNS 配列が導入されていることを確認した (Table 8)。またシークエンス解析の結果、任意にピックアップした 10 クローンの内、同じ配列を含むクローンは見られなかった。そこで次に、このようにして作製したファージライブラリを用いて、Epidermal Growth Factor (EGF) レセプター (EGFR) に対して親和性を有するペプチド含有 HI strand の単離を試みた。EGFR は、種々の上皮がん細胞上において発現の上昇が見られ、かつエンドサイトーシス介在性レセプターである為、標的指向性アデノウイルスベクターを用いたがん治療において選択的なターゲットとして最適であると考えられる。

EGFR に対して親和性を有する変異型 HI strand スクリーニングするため、EGFR を固相化した 96 ヶプレートを用いてパンニングを行った。パンニングを合計 3 回行った結果、第一回目と比べて、第三回目ではファージの回収率がおよそ 100 倍にまで上昇した (Fig. 15)。これらの結果から、ランダムペプチドとアデノウイルスのファイバー領域の融合蛋白質を提示したファージライブラリを用いることで、特定標的受容体に対してスクリーニングを行うことが可能であることが示唆された。現在、今回スクリーニングによって濃縮したファージライブラリの中から、高親和性のクローンの同定、及び DNA 配列解析を行っている。今後は、スクリーニングによって同定された配列を元に、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを構築し、その遺伝子導入効率などの評価を行っていく予定である。

C.1.3 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発

C.1.3.1 PEG 修飾アデノウイルスベクターの作製

一般的に水溶性高分子を用いた生理活性蛋白質のバイオコンジュゲーションは、分子量増大による腎排泄速度の低下や、立体障害的にプロテアーゼ並びに中和抗体からの攻撃がブロックされることで、結果として生体内半減期が延長される。また、修飾高分子が形成する立体障害によるレセプターとの結合阻害による、著しい比活性の低下を同時に招く。このような特徴が、粒子であるアデノウイルスベクターにも当てはまることを期待し、バイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターを作製し、その機能性評価を行った。今回水溶性高分子によるバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの作製には、安全性の高い非電荷水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を用いた。まず、分子量 5,000 の PEG を用いて PEG 修飾アデノウイルスベクターを作製し、その修飾割合を SDS-PAGE にて解析した。Fig. 16 に、クーマシブルー染色および PEG に対する染色結果を示す。PEG 修飾アデノウイルスベクターでは、ヘキサソンのバンドが、PEG の添加に伴って消失すると共に、新たに高分子側にシフトしたバンドが検出された。また高分子側にシフトしたバンドが PEG 染色されたことから、このバンドが PEG で修飾されたヘキサソンであることが確認された。さらに添加 PEG 量の増加に伴い PEG 修飾ヘキサソンのバンドが濃くなっていることから、添加 PEG 量依存的に修飾率が增大することが示された。ちなみに、アデノウイルスの外殻蛋白質のリジン残基に対し、6400 倍モル量の PEG を添加した場合、PEG 修飾ヘキサソンが濃く染色されており、未修飾のヘキサソンのバンドが全く検出されなかったことから、全てのヘキサソンが PEG 修飾されていることが確認された (Fig. 16)。そこでクーマシブルー染色により得られた未修飾のヘキサソンのバンドと高分子側にシフトした PEG 修飾ヘキサソンのバンドを画像解析することにより、ヘキサソンの修飾率を算定し、この値をアデノウイルスベクターの PEG 修飾率とした (Table 9)。また、PEG 修飾アデノウイルスベクターの粒子径もヘキサソン修飾率と同様に添加 PEG 量依存的に増大した (Table 9)。以上の結果から、アデノウイルスベクターの PEG 修飾は添加 PEG 量により制御可能であることが示された。

Fig. 16 の結果から PEG の添加量に応じてヘキサソンが PEG 修飾されることが判明したが、100%のヘキサソンが PEG 修飾されているアデノウイルスベクター以外では、粒子レベルで見た場合、未修飾のアデノウイルスベクターが混入している可能性がある。そこで、まず分子量 40,000 の PEG を用いてアデノウイ

ルスベクターの PEG 修飾操作を行い、修飾率が 5.3% の PEG 修飾アデノウイルスベクターを得た。この 5.3%PEG 修飾アデノウイルスベクターの中に、全く PEG 修飾されていないアデノウイルスベクターが存在するか否かを明らかにするため、未修飾アデノウイルスベクターと 5.3%PEG 修飾アデノウイルスベクターをそれぞれ単独、および両者を混合して CsCl の密度勾配遠心を行った。その結果、5.3%PEG 修飾アデノウイルスベクターのバンドは、未修飾アデノウイルスベクターのそれに比べて上層に確認され、両者を混合して遠心した場合にも二本のバンドが確認され、両者が分離できることを確認した (Fig. 17)。さらに、この遠心チューブの下方からフラクションを回収し、*in vitro* での遺伝子発現効率を指標に各フラクションに存在するアデノウイルスベクターを確認した (Fig. 18)。その結果、5.3%PEG 修飾アデノウイルスベクターでは、未修飾アデノウイルスベクターが存在するフラクションに遺伝子発現が確認されなかったことから、平均 5.3%以上のヘキサソンが PEG 修飾されているアデノウイルスベクターには、未修飾のアデノウイルスが混入していない、つまり全てのアデノウイルスベクターが PEG 修飾されていることが確認された。そこで、5.3%以上のヘキサソンが PEG 修飾されているアデノウイルスベクターを用い、種々の特性を評価した。

一般に、蛋白質を PEG 修飾した場合、血中滞留性が向上する。この PEG 修飾の利点が、アデノウイルスベクターの PEG 修飾にも当てはまるかどうかを検討した。BALB/c マウスに 5×10^{10} particles の PEG 修飾アデノウイルスベクターを尾静脈より投与し、一定時間後に血液を採取し、血液中に存在するアデノウイルスベクターの DNA 量をサザンプロット法により定量することで、PEG 修飾アデノウイルスベクターの血中滞留性を評価した。PEG 修飾していないアデノウイルスベクターは、血中から速やかに消失し、その血中半減期は 1.55 分であった (Fig. 19, Table 10)。それに対して 61.1%、89.3%、100%PEG 修飾アデノウイルスベクターの血中半減期は、それぞれ修飾していないアデノウイルスベクターと比較して約 3 倍、7 倍、50 倍に増加しており、顕著な血中滞留性の向上が認められた。

次に、PEG 修飾アデノウイルスベクターに抗体回避能が付与されているかどうか検討するために、抗アデノウイルス抗体を含むマウス血清存在下、非存在下における PEG 修飾アデノウイルスベクターの遺伝子発現を検討した。抗血清が存在しない時の遺伝子発現を 100%とし、抗血清存在下における遺伝子発

現量の低下率を Fig. 20 に示す。修飾されていないアデノウイルスベクターの遺伝子発現は、抗血清の増加に伴いコントロールの 1%以下まで低下したのに対して、61.1%PEG 修飾アデノウイルスベクターでは、抗血清存在下においても高い遺伝子発現が保持されており、その抗体回避能は、修飾されていないアデノウイルスベクターの約 30 倍であった。

Fig. 21 は、PEG 修飾アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率を示す。一般に蛋白質を水溶性高分子で修飾した場合、活性発現部位に対する修飾や PEG 鎖の立体障害などにより比活性が低下するが、アデノウイルスベクターの場合もその遺伝子発現効率は、PEG 修飾率の増大にともなって低下した。この遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害のためアデノウイルスのレセプターである CAR との結合が阻害されることにより、細胞内へ侵入するウイルス量が減少したためであると予想されるが、この PEG 修飾アデノウイルスベクターが細胞内へ入れば遺伝子発現することを確認しておく必要がある。そこで PEG 修飾アデノウイルスベクターを細胞内導入試薬である LIPOFECTAMINE 2000 を用いて細胞内に強制的に導入し、その遺伝子発現を検討した (Fig. 22)。その結果、LIPOFECTAMINE 2000 を作用させない群では、PEG 修飾率の増大に依存して著しい遺伝子発現効率の低下が見られたのに対し、LIPOFECTAMINE 2000 を用いて PEG 修飾アデノウイルスベクターを細胞内に導入した群では、PEG 修飾していない群とほぼ同等の遺伝子発現が認められた。以上の結果から PEG 修飾アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害のため CAR との結合が阻害されたためであり、CAR を介した非特異的な遺伝子発現を完全に抑制することができ、その上で PEG 修飾アデノウイルスベクターを標的細胞内に導入さえすれば、標的細胞でのみ未修飾アデノウイルスベクターに匹敵する高い遺伝子発現が得られると考えられる。即ち PEG 修飾アデノウイルスベクターの PEG 片末端に標的指向性分子を付与することができれば、PEG 鎖の利点を保持したまま標的細胞に接着し、それに続く遺伝子導入・発現が達成できると考えられる。そこで標的指向性分子としてインテグリンに親和性のある RGD モチーフを選択し、PEG の片末端に付与した RGD-PEG-NHS を合成し、その有用性を評価した。

C. 1. 3. 2 RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターの有用性評価

RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターの遺伝子発

現効率を CAR 高発現細胞である A549 細胞と CAR 低発現細胞である B16BL6 細胞で評価した。RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは A549 細胞に対して PEG 修飾アデノウイルスベクターより顕著に高い遺伝子発現を示し、未修飾アデノウイルスベクターと同等の遺伝子発現を示した (Fig. 23)。また、B16BL6 細胞に対して RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは、未修飾アデノウイルスベクターより 100 倍以上高い遺伝子発現を示し、その発現は AdRGD と同等であった。このことから、PEG 修飾アデノウイルスベクターの PEG 片末端に標的指向性分子を付与することで標的細胞に接着し、高い遺伝子導入・発現が達成されることが示された。

次に抗アデノウイルス抗体存在下における RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターの遺伝子発現効率を検討した。RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターを抗アデノウイルス抗体存在下で B16BL6 細胞に感染させ、24 時間後の遺伝子発現量を測定した (Fig. 24)。その結果、これまで最も高い遺伝子導入効率を示した AdRGD であっても抗アデノウイルス血清存在下では、血清濃度の上昇に伴い遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD の 15 倍であった。以上の結果から、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは、AdRGD のような高い遺伝子導入・発現能を備え、さらに PEG 修飾アデノウイルスベクターが持つ抗体回避能をも有していることが示された。

C. 2. 次世代非ウイルス (ハイブリッド) ベクターの開発基盤研究

C. 2. 1 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発：ペプチドディスプレイシステムを使った機能性ペプチドの遺伝子導入促進活性の解析

現在のほとんどの非ウイルス遺伝子導入ベクターの活性は構成成分である高分子化合物の物理化学的特性に依存しているが、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をベクターに組み込むことが不可欠である。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、使用するペプチドの種類によってできる DNA・合成高分子複合体の構造が異なるため活性とペプチド機能の相関性の解析が非常に複雑になるだけでなく、多大なコストと時間を要することが予想される。

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た。この系の特徴は、ディスプレイするペプチドの種類にかかわらず構造が一定であるのでペプチドの構造と活性の相関が容易に解析できること、かつ内部に遺伝子導入活性を測定するためのマーカー遺伝子を封入できるので各粒子の遺伝子導入活性を直接測定できる点にある。本研究ではこれまでに、細胞膜を透過する機能を持つ Protein Transduction Domain (PTD) を呈示した粒子が細胞膜を通過して内部に封入した遺伝子が発現すること、核移行シグナル (Nuclear Localization Signal, NLS) を呈示した粒子が細胞質から核に能動的に移動して内部に封入した遺伝子の発現を向上させることを見だし、報告してきた。

この研究テーマに関して残されている課題は、細胞膜や核膜の通過に必要なペプチドの最小構造の決定である。本研究の成果を高分子ポリマーに移植する場合、長いペプチドは合成が難しいため機能を持つ最小構造を決定することはベクターの生産性を向上させるために必須である。今回、PTD として使用したヒト免疫不全ウイルス (HIV) の Tat タンパク質由来の LGISYGRKKRRQRRPPQT というペプチドは、比較的短くまた deletion analysis の結果これ以上短くすると機能を失うことが既に報告されている。それに対し、NLS として使用した SV40 の T 抗原由来の SVLT32 と名付けられたペプチド YDDEATADSQHSPPKPKKRKVEDPKDFESELL では、構造と機能の関連がまだ明らかになっていない。

SVLT32 では、核移行シグナルの最小ユニット (minimum NLS) の PKKKRKV という配列以外の部分がかなりの割合を占めている。このペプチドはもともと、免疫グロブリン M (IgM、分子量、直径 33 nm) という巨大なタンパク質を核に輸送できるペプチドとして同定されてきた (Yoneda, et al. 1992; Nakanishi, et al., 2001)。これに対し、PKKKRKV という短いペプチドはウシ血清アルブミン (BSA、分子量 67kDa) のような小さいタンパク質を核に輸送することはできるが、IgM を輸送することはできないことが知られている (Yoneda, et al. 1992)。このことから、SVLT32 には minimum NLS には存在しない「巨大な分子を核に輸送する活性」がそのどこかに存在することが推定される。一方、SVLT32 の一次

構造の中にはリン酸化を受ける部位が存在しその修飾が活性を変化させるという報告もあるが、巨大分子の核移行との関連は明らかではない。

この研究プロジェクトで Polyplex のモデルとして使用しているファージディスプレイシステムの特徴は、組換え DNA の技術を使って呈示するペプチドの構造を容易に変換できる点にある。そこで本年度は、SVLT32 を基準にしてその構造を改変した変異体を多数作製し、構造と機能の相関を調べることで「巨大分子を核に輸送する活性」の本体を探ることを試みた (Fig. 26, 27)。SVLT32 は minimum NLS がほぼ中央に位置する構造を取っているため、その C 末端側と N 末端側にわけて、それぞれの機能を「ファージ粒子を核に輸送する活性」と「importin との結合活性」について検討した。ファージ粒子を核に輸送する活性の指標として何を用いるかという点についてはこれまでの研究の中でいろいろと検討してきたが、最終的に、最も定量性が高くかつ WGA による阻害実験等で生理的であることが確認でき、さらに核内に存在する構造を保った粒子の数を大腸菌に対する感染価によって測定する方法を選んだ (Akuta, et al., 2002.) (Fig. 25)。

まず、Minimum NLS (核にタンパク質を輸送するキャリアータンパク質 importin alpha との結合部位) と importin との相互作用が DNA 内包粒子の核移行においても必須であることは、importin との相互作用を阻害することが知られている 1 アミノ酸変異 (PKKKRKV を PKTKRKV に換える) を導入すると、importin との結合活性と核移行活性が同時に失われることから明らかとなった。一方、C 末端の方は、FLAG tag を含む同じ長さの関係のないアミノ酸残基と完全に置き換えても活性に変化はなかったが、長さを 4 アミノ酸残基にまで減らすと importin との結合活性と核移行活性が共に失われた。このことから、C 末端側の配列は、minimum NLS を粒子表面から物理的に離すことで importin との結合を促す「stem」の機能を果たしていることが明らかになった。

次に N 末端の構造解析を進めたが、N 末端を大きく削ると NLS-D の融合タンパク質が大腸菌で合成されない。これは PKKKRKV のように塩基性の強い配列が N 末端にあるとタンパク質の合成がうまくいかないことを反映している可能性があったため、置換実験で機能を探ることにした。N 末端を HA tag を含むアミノ酸残基で完全に置き換えた場合、importin との結合活性と核移行活性は SVLT32 とまったく変わらなかった。一方、HA tag のかわりに FLAG tag や

c-myc tag と呼ばれるほぼ同じ長さの配列を用いた場合には、importin との結合活性と核移行活性が共に失われた。このことから、N 末端には importin と minimum NLS の結合を促進する機能こそないものの、配列を慎重に選ばないと importin との結合が（おそらく立体障害のため）阻害されることがわかった。

最後に、SVLT32 の N 末端と C 末端をそれぞれ HA tag と FLAG tag と入れ替え、minimum NLS 以外の部分を完全に他のアミノ酸と置き換えたが、importin との結合活性と核移行活性は共に SVLT32 と変わらなかった。このことから、SVLT32 の minimum NLS と importin alpha との結合が DNA 内封粒子表面で起こることが核移行に必須であること、SVLT32 の C 末端はこの相互作用が起きるように minimum NLS を粒子表面から一定の距離だけ離すための stem として機能していること、一方、N 末端はこの相互作用と直接の関係は無い（少なくとも促進する活性はない）ことが確認できた (Fig. 28)。以上の結果から、DNA 内封粒子に核移行活性を付与するために必要な情報を決定することができた。

C.2.2 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化させるための技術開発

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 70 分の 1 程度 (2,000kbp) の巨大なものしかできていない。一方、我々の研究から、核に標的化できる最大の DNA のサイズは 50kbp (すなわちファージのゲノムサイズ) であることが強く示唆されている。この両者の大きなギャップを埋めるためには、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このサイズの制限内で同定する必要がある。

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。例えば、放射線等で切断されてテロメアを失った染色体は不安定になり消失するし、テロメア合成酵素（テロメラーゼ）が発現していない初代培養細胞ではテロメアの短小化と共に染色体が不安定となり寿命を迎える。我々はテロメアが染色体を安定化する機構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 TRF1 仮説を提案した (Okabe, et al. 2000)。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 = TRF1 の相互作用は人工染色体の維持機構の一つとして使用できる可能性がある。事実、出芽酵母では、酵母のテロメアを持つプラスミドはコピー数が少ないが非常に安定に存在できることが報告されている。

これまでの我々の研究結果は、HeLa 細胞のような培養不死化細胞では TRF1 が十分にあれば 500bp の短いテロメア配列でも十分に染色体末端を安定化できるテロメアとして機能できることを示している。一方、遺伝子治療の対象となる体細胞に由来するヒト初代培養線維芽細胞では 500bp のテロメア配列はほとんど安定化機能を持たないが、これは初代培養細胞では TRF1 の発現が極めて低い（不死化細胞の 10% 程度。Okabe, et al. 2000）ためだと考えられた。

それでは、ヒト初代培養線維芽細胞で TRF1 を強制的に発現させてやれば、短いテロメア配列で染色体を安定化することは可能だろうか？この問いに答えるため、昨年度は TRF1 を強制発現したヒト初代培養線維芽細胞を作成し、細胞寿命が 5 から 10 回程度伸びると共に細胞老化を示す SA-beta-galactosidase 活性の誘導も有意に遅れることを見いだしたが、テロメラーゼを強制発現した時のように細胞が不死化（ひいては癌化）することは無く安全性に問題はないことを確認した。

そこで本年度は、この TRF1 を強制発現したヒト初代培養線維芽細胞を使って、テロメア配列が染色体末端を安定化する能力を評価した。もし、TRF1 = テロメア配列の単純な相互関係で安定化が決まるなら、この細胞ではテロメア配列が染色体末端を安定化する能力が上昇しているはずである。しかし実験結果は、TRF1 を少ししか発現していない正常なヒト初代培養線維芽細胞と同様、TRF1 を強制発現したヒト初代培養線維芽細胞でもテロメア配列を安定化できないことを示した (Table II)。このことから、テロメア配列結合タンパク質 TRF1 がテロメア配列を細胞内で安定に保つための律速タンパク質であるという TRF1 仮説は、ヒト不死化細胞にはあてはまるがヒト正常細胞には適応できないことが明らかになり、TRF1 = テロメア配列を使って人工染色体を安定化するということはヒト正常体細胞では難しいだろうという結論に達した。

C.2.3 非ウイルスベクター系において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

本年度は、平成 12 年度・13 年度に引き続き RNA 分子を使った細胞質での遺伝子発現系の開発研究を

進める予定であったが、研究分担者の研究機関の移動に伴い当該研究を進めるために必要な人員と環境が不足し、最終年度は実質的な進展がないまま終了した。

D. 考察

D.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

D.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発 -発現制御型アデノウイルスベクターの開発-

従来のアデノウイルスベクターでは E1 欠損領域の 1ヶ所にしか外来遺伝子を挿入できなかったが、本研究では E1 欠損領域に加え、E3 欠損領域、並びに E4 遺伝子と 3' ITR の間の領域にも同時に外来遺伝子の挿入が可能なダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターを開発し、複数の外来遺伝子の搭載も可能となった。これにより、共同作用や相互作用を伴う遺伝子の機能解析も可能となった。また、ダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターにテトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現誘導系を付与することで、単一のベクターで目的遺伝子の発現調節が可能なベクターの開発にも成功し、用量反応に伴う遺伝子の機能解析も可能となった。なお、これらの改変ベクターについても、*in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して極めて簡便にベクターが作製できるようになっている。

平成 12-13 年度の研究で、Tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターが極めて効率の良い遺伝子発現レベルの制御が可能なこと、一方で、Tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターでは発現誘導能は低く、更なる改良が必要なことを明らかにした。目的にもよるが、遺伝子発現を positive に制御できる Tet-on システムの方が Tet-off システムに比べ、遺伝子治療や遺伝子機能解析研究を始め多くの目的には適していると考えられる。そこで本年度は、1) riTA の発現レベルを上昇させるためにイントロン A の配列を付与し、2) テトラサイクリン制御性のサイレンサー (ITS) を用いることで basal 活性を抑え、3) かつ単一のアデノウイルスベクターで 3 者 (目的遺伝子、riTA 遺伝子、ITS 遺伝子) の遺伝子を発現させることで、遺伝子発現誘導能に優れた Tet-on システム搭載アデノウイルスベクターの開発を試みた。3 種類の遺伝子 (目的遺伝子 (ルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子)、riTA 遺伝子、ITS 遺伝子) を単一のベクターで発現させ

るため、様々なタイプのベクターを作製した。IRES 配列を利用して riTA と ITS 発現単位 (CMV プロモーター+イントロン A+riTA 遺伝子+IRES+ITS 遺伝子) を E3 欠損領域に挿入したベクター (Ad-riTA-IRES-ITS-L) は、ECV304 細胞では若干の発現誘導能の改善が認められたが、SK HEP-1 細胞や HeLa 細胞では全く改善が認められなかった。これは IRES 配列に連結された 2nd 遺伝子の発現レベルは 1st 遺伝子の発現レベルに比べて低いこと、場合によっては IRES 配列を用いた 1st 遺伝子の発現レベルは、IRES 配列を用いない場合に比べ低いことが原因と考えられた。

また、テトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターを利用して E1 欠損領域に riTA とルシフェラーゼ遺伝子を搭載したベクター (AdBI-riTA-L、Ad-ITS-BI-riTA-L) においても遺伝子発現誘導能の改善は認められなかった。このタイプのベクターでは、理論的には一度 riTA がドキシサイクリンによる誘導によって産生されれば、riTA が TRE (tet-responsive element) に結合し、riTA 自身と目的遺伝子 (ルシフェラーゼ) の発現を上昇させ、さらに産生した riTA が riTA と目的遺伝子 (ルシフェラーゼ) の発現を上昇させることが期待されるが、本系ではこのシステムが機能しなかった。テトラサイクリン誘導性の両方向性プロモーターから産生された riTA は CMV プロモーターから産生された riTA (AdOn-L4 の場合) に比べ、低いことが予想される。

一方、3 種類 (目的遺伝子 (ルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子)、riTA 遺伝子、ITS 遺伝子) の遺伝子を、それぞれアデノウイルスゲノムの異なる領域から独立に発現させたベクター (Ad-riTA-ITS-L、Ad-riTA-ITS-S) では優れた遺伝子発現誘導能を示した。本ベクターでは、強力なプロモーターとして知られている CMV プロモーターや EF1 α プロモーターで riTA と ITS を発現させており (riTA はイントロン A 配列を付与した CMV プロモーターで、ITS は EF1 α プロモーターで発現させている)、各遺伝子の発現を最大化することで、発現誘導能に優れたアデノウイルスベクターの開発に成功したと思われる。

Ad-riTA-IRES-ITS-L による basal 活性は AdOn-L4 に比べて 2-6 倍低く、最大活性は AdOn-L4 より 30 倍以上高かった。Ad-riTA-ITS-L は ITS 発現単位を有しているため、basal 活性が低いことは期待されたが、最大活性の上昇も認められた。この原因として考えられることとして、Ad-riTA-ITS-L では riTA の発現レベルが up-regulate され、結果として目的遺伝子 (ルシフェラーゼ) の発現レベルが上昇した