

長崎，2003 年 3 月。

15. 関口文子、衛藤佑介、高建青、形山和史、堤 康央、前田光子、川崎紘一、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作：RGD ペプチドを付与したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの機能評価，日本薬学会第 123 年会，長崎，2003 年 3 月
16. 立花雅史、形山和史、古木理恵、大橋興三、堤 康央、中川晋作、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範：改良型アデノウイルスベクターを用いた胎盤への遺伝子導入，日本薬学会第 123 年会，長崎，2003 年 3 月

特許出願

中川晋作、真弓忠範、堤 康央、川崎紘一、
前田光子、早川堯夫、水口裕之（発明人）；新
規ウイルスベクター：特許出願中

Scheme 1 RGD-PEG-NHS の合成方法

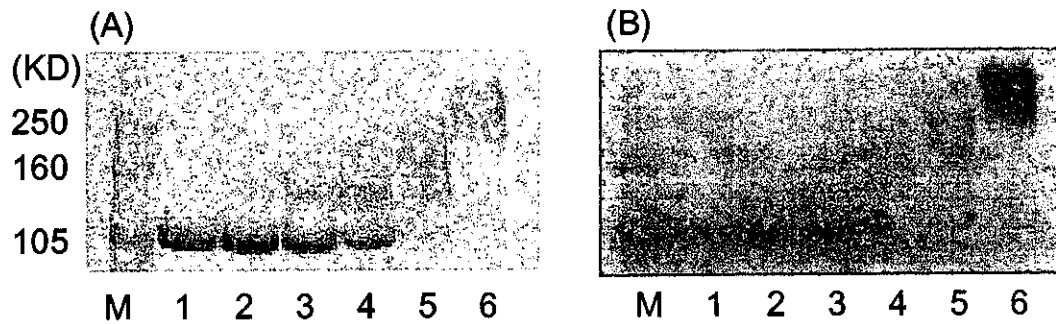


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of PEGylated adenovirus vectors. Comparison of two SDS-gels (A, B) that were run under identical conditions and loaded as follows : lane M, protein markers ; lane 1, Ad : PEG=1:0 (unmodified-Ad) ; lane 2, 1:25 ; lane 3, 1:100 ; lane 4, 1:400 ; lane 5, 1:1600 ; lane 6, 1:6400. (A) The gel was stained with Coomassie blue. (B) The gel was stained for PEG using barium iodide.

Table 1 Relationship between degree of PEGylated-Hexon and adenovirus vectors size

添加PEG量 (Ad:PEG)*	Hexon修飾率 (%)	粒子径 (nm)
1:0 (unmodified)	0	113.3±0.76
1:25	9.7	120.6±0.64
1:100	34.0	123.8±0.98
1:400	61.1	128.5±1.25
1:1600	89.3	137.6±0.91
1:6400	100.0	148.2±1.48

* Ad外殻タンパク質のリジン残基に対するPEG添加量 (mol : mol)

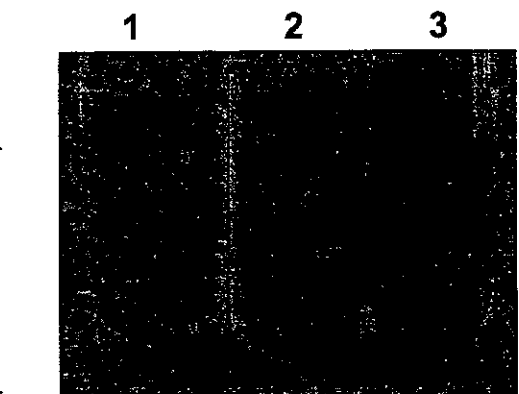
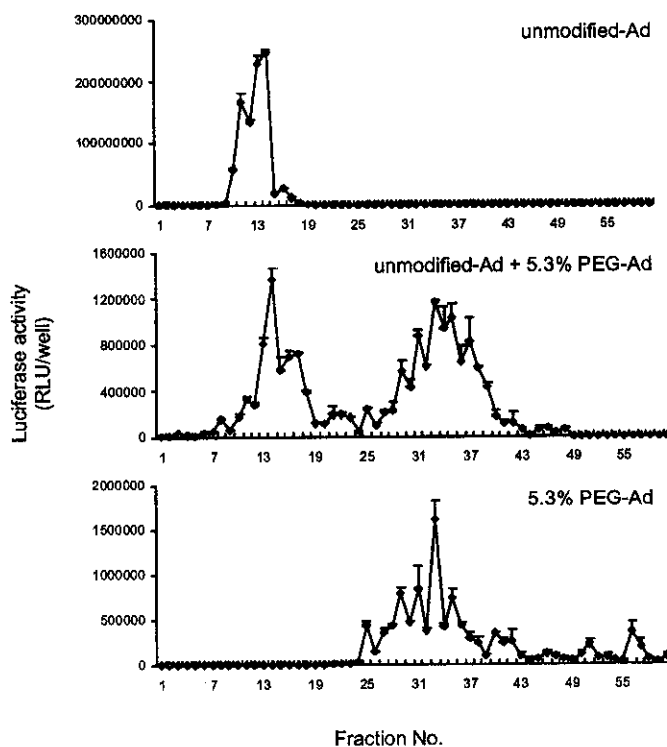


Fig. 2 Separation of unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad by banding on CsCl gradients.

1: unmodified-Ad
2: unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad
3: 5.3% PEG-Ad

Fig. 3 Gene expression of fractionated adenovirus vectors. Unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad were separated by CsCl gradients centrifugation. Each fraction was collected from the bottom of the tube and was transfected to A549 cells. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

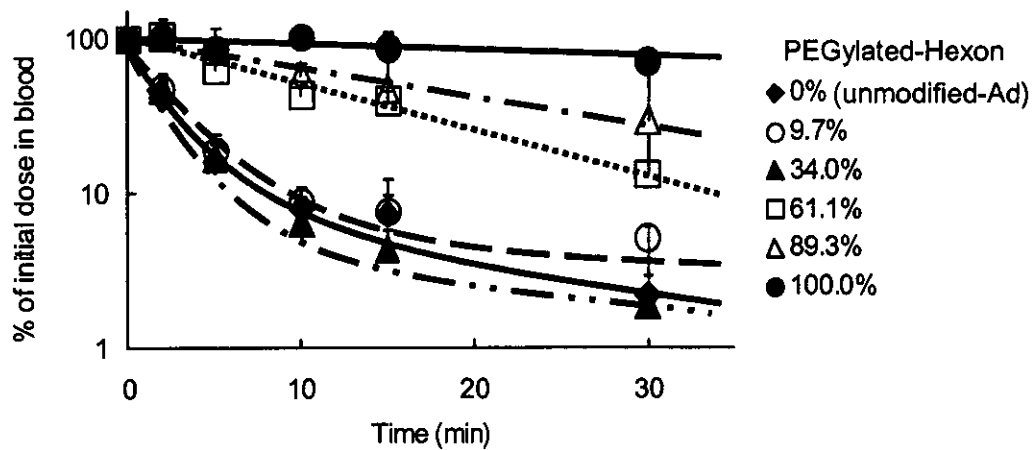


Fig. 4 Pharmacokinetics of PEGylated adenovirus vectors. Normal female BALB/c mice were administrated intravenously with 1×10^{10} particles of unmodified-Ad or PEG-Ads. Blood samples were drawn at different times. The concentration of adenovirus vectors in serum was quantitated with southern blot method. A standard curve was made for each PEG-Ads. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=4).

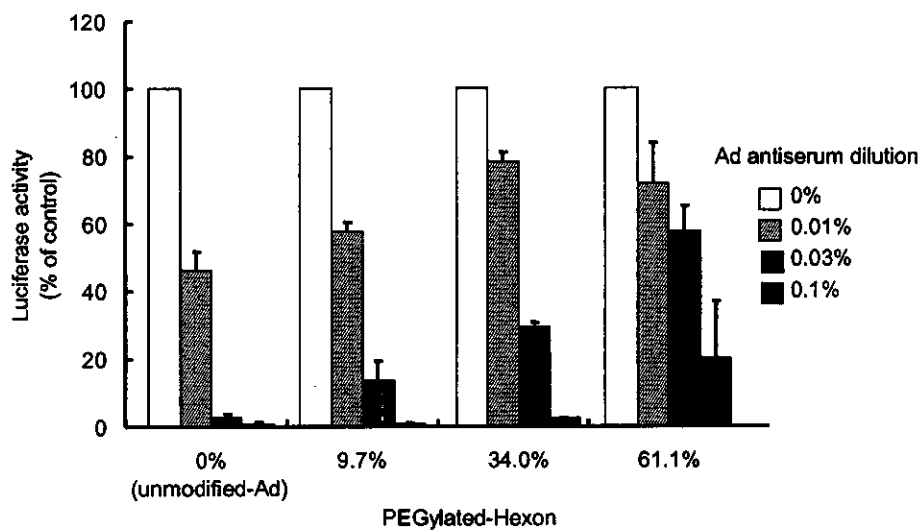


Fig. 5 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of adenovirus vectors antiserum. A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads in the presence or absence of Ad antiserum respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

Table 2 Half-life of PEGylated adenovirus vectors in blood

PEGylated-Hexon	t _{1/2} (min)
0% (unmodified-Ad)	1.55
9.7%	1.84
34.0%	1.83
61.1%	5.03
89.3%	11.97
100.0%	78.56

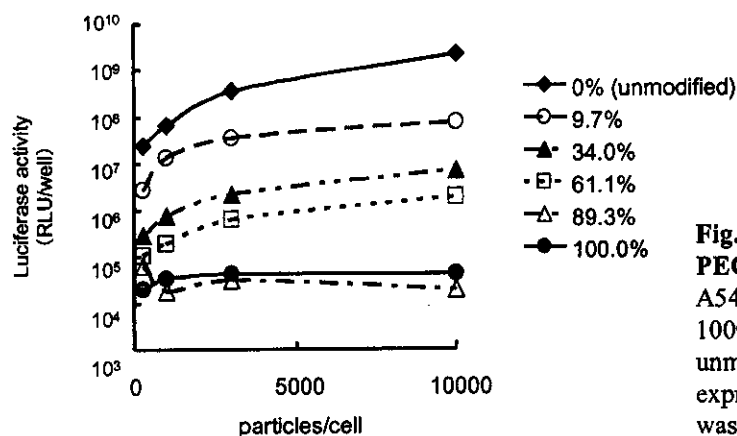


Fig. 6 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors

A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 300, 1000, 3000 or 10000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

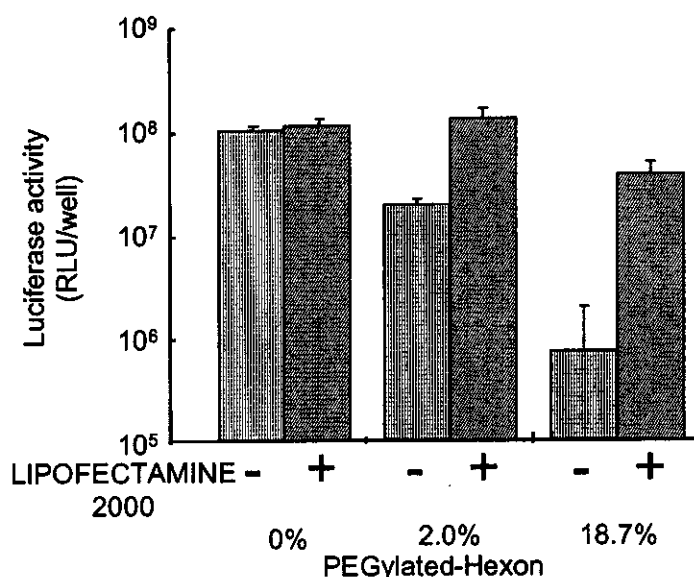


Fig. 7 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of LIPOFECTAMINE 2000

A549 cells (2×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads in the presence or absence 20mg/ml of LIPOFECTAMINE 2000 respectively. After 4hr, the virus solution was replaced with fresh medium, and the cells were incubated for 24 hr. And then luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

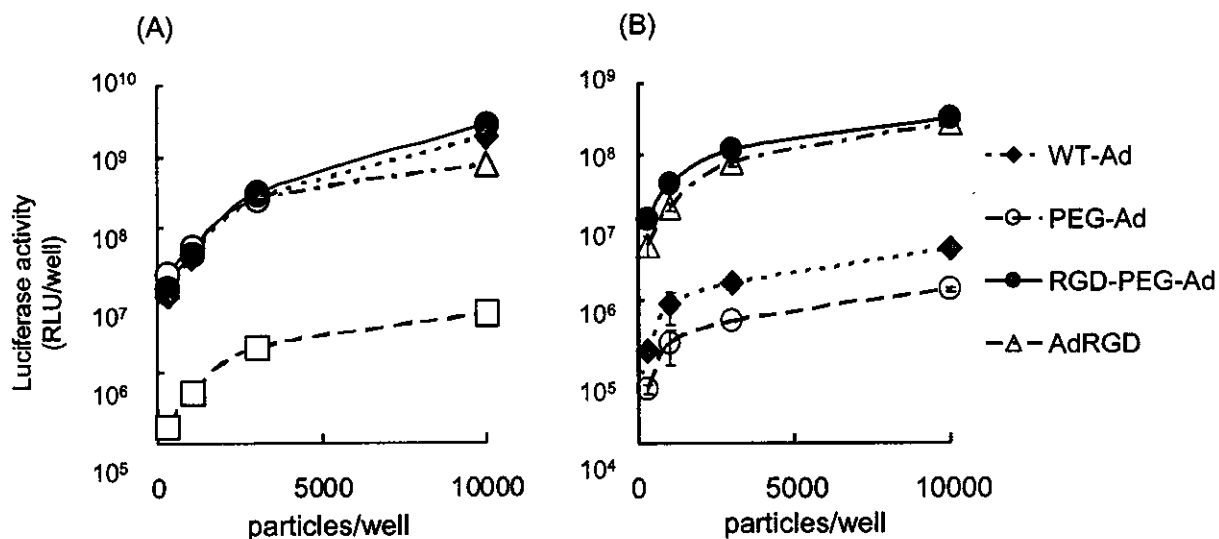


Fig. 8 Transduction of A549 cells and B16BL6 cells by RGD-PEGylated adenovirus vectors

(A) A549 cells and (B) B16BL6 cells (2×10^4 cells) were transfected with 300, 1000, 3000 or 10000 particles/cell of Ad, PEG-Ad, RGD-PEG-Ad or AdRGD respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D.

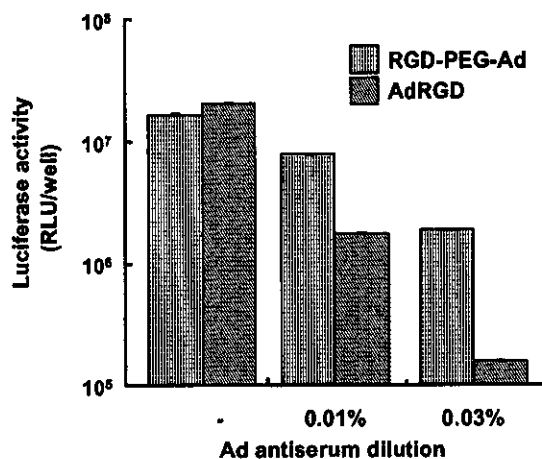


Fig. 9 Transduction of B16BL6 cells by RGD-PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of adenovirus vectors antiserum. B16BL6 cells (2×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of RGD-PEG-Ad or AdRGD in the presence or absence of Ad antiserum respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

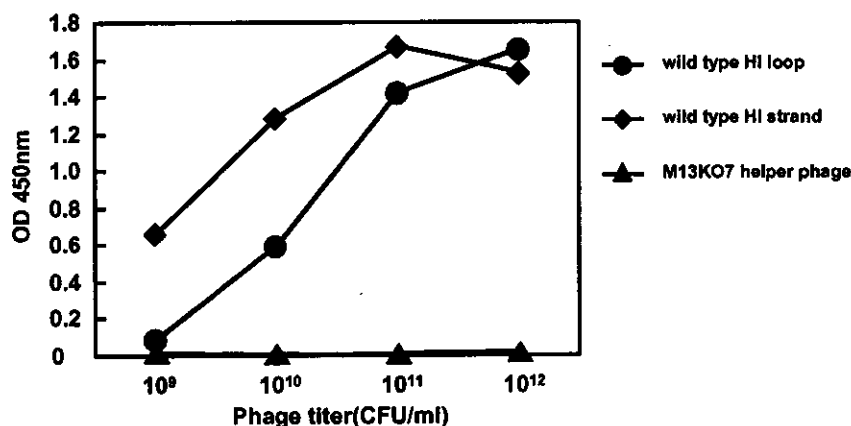


Fig. 10 Detection of HI loop and HI strand displayed on surface of M13 bacteriophage by ELISA. Anti-E tag Mab(Pharmacia) is adsorbed over night at 4°C in wells of a 96-well MaxiSorb immunoplate at 1 μ g/well in 0.1M bicarbonate buffer, pH 9.1. Plates were blocked with 2% Block Ace. And then plates were washed, phage were applied to the wells in serial dilutions in 2% Block Ace, starting from 10¹²/well. After 2h incubation at RT and washing, E-tag displaying phages were detected using HRP conjugated anti-M13 Ab(1/4000 in 0.4 % Block Ace; Pharmacia). Final color development was done using TMBZ and absorbance was measured at 450 nm.

Table 3 Codons and amino acid sequences of clones isolated from the library

Library		Library	
NNS × 7 sequences		NNS × 7 sequences	
HI loop library		HI strand library	
1	AAC AAG GAC TGG CCG GAC AAC N K D W R D N	1	ATG ACC GAC AAG GGC CAC CAC M T H R G R H
2	CCG TTC ACC GAC CAG CCG AGC P F T D Q P S	2	TCC CAC TCC CAC CCC TAC CTC S H S H P Y L
3	AAC AAG CAC TTC GCG CCC AAG N K H F A P K	3	AAG CCG ATC CCG TGC GTG CCG K P I R C V P
4	ACG GCC AAG GAG AGC GAG CAC T A K E S E H	4	AAC CAG GAC CCG GCC ACG GCG N Q D R A T A
5	ATC AGC AGC TCG GGC CAG TGG I S S S G Q W	5	ATC CCG GGC GCC GGG GGC TGC I R G A G G C
6	ACG TAG GCC TGC TTC ATC GCC T * A C F I A	6	CCG CCC AAC GGC CCG GGC TCC P P N G R G S
7	ATC CCG CCG ATA CCG CAC ATC I P P I P H I	7	AAC TAC GTG CCG GCC GGG TCC N Y V P A G S
8	ACG TGC ATG GTC AGC TCG TAC T C M V S S Y	8	AGC TAC AAC GCG ATC GAC GAC S Y N A I D D
9	GGG GCG CCG AAC GCG CTG CAC G A P N A L H	9	ATC CTC TTG GAG TAG ATG TCC I L L E * W S
10	CCG AGC CCG GCG TGG CCG AGG R S R A W P R	10	CGC ACC ACC TTC AAC ATC TCC R T T F N I S

* ; Amber stop codon

One milliliter of electroporated *E. coli* (TG1) cells were incubated at 37°C for 1h. Fifty microliters of the culture were used for titrating. Serial 100-fold dilutions of electroporated cells were added 800 microliters of 2 × YT containing ampicillin and used to inoculate ClonDisk(Clontech) containing the appropriate dilution, which were incubated over-night at 37°C. Randomly isolated ten colonies respectively were used to inoculate 2 ml of 2 × YT medium containing appropriate antibiotic, and the minipreps were incubated over-night at 37°C, shaking.

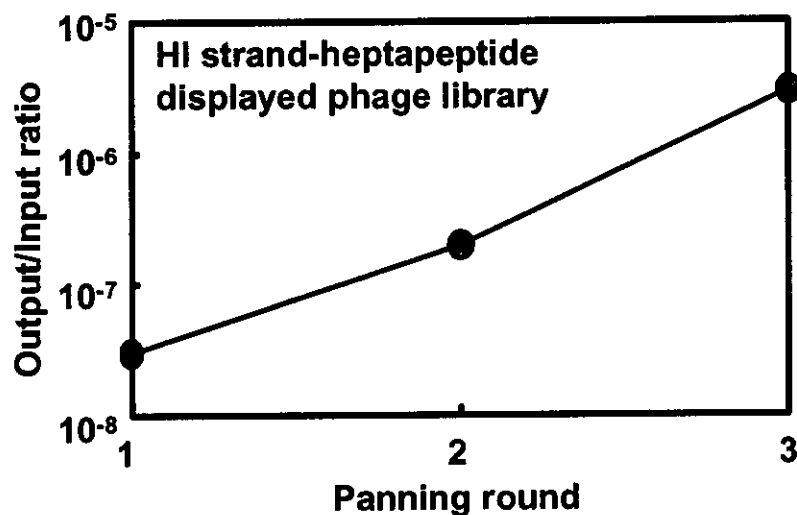


Fig. 11 Efficacy of panning against EGF receptor. Fifty microliters of amplified HI loop-heptapeptides phage(10^{10} CFU/ml) library was screened against the purified extracellular domain of human EGF receptor(hEGFR) coated on immunotube(Nunc) in $100 \mu\text{l}$ of bicarbonate buffer(pH 9.6). In all panning rounds, hEGFR was coated at $10 \mu\text{g/ml}$. Bound phages were eluted with 100mM HCl. Eluted phages were immediately neutralized by the addition of 1M Tris-HCl(pH 8.0), and used to infect to *E.coli* (TG1) followed by plating infected cells in ampicillin containing medium. The amount of bound phages were calculated by colony counting.

分担研究報告書

次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

分担研究者 中西真人 独立行政法人・産業技術総合研究所・
ジーンファンクション研究ラボ・
主任研究員

研究要旨

遺伝子治療の安全性を確保するための新しい遺伝子導入ベクターの開発を目指して、以下の項目について成果をえることを目標とした。

1. 導入遺伝子を核内に送達する技術の開発
2. 導入遺伝子を核で安定化する技術の開発
3. 導入遺伝子を細胞質で安定化する技術の開発

A. 研究目的

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

遅れが大きな障害となり得る可能性も指摘されている。

このような状況を背景として、本研究では、安全性と効率を兼ね備えた遺伝子導入・発現系としてこれまで我々が提案してきたハイブリッドベクター（動物のウイルスや染色体の持つベクターとしての有用な機能を抽出して、大量生産可能な素材でその機能を再現する非ウイルスベクター）の開発・実用化を最終目標にすえ、この目標を達成するための技術基盤を確立することを目的としている。本年度は、遺伝子を安定に保持するための DNA や RNA のプラットフォームの開発と、これらのプラットフォームが機能を維持するために必要なデリバリーシステムの開発について、新しい知見を得ることを目指した。

B. 研究方法

1) 組換えファージの作成

頭部に核移行シグナルペプチドを呈示し、かつ動物細胞で検出できるマーカー（ルシフェラーゼや Green Fluorescent Protein (GFP)）遺伝子をゲノム DNA の一部として組み込んだラムダファージ (NLS ファージ) は、パッケージング大腸菌 D1180 を使って調製した。D1180 株は、一部を欠失したラムダファージの right arm 及び left arm と、CMV プロモーターでドライブされたマーカー遺伝子断片とを接続して大腸菌 DH10B に導入し、同 DNA を溶原化した菌を単離することによって作成した。D1180 株に挿入されているラムダファージ・ゲノムは D 遺伝子に amber 変異を持つが、DH10B の遺伝子型は suppressor tRNA 不含(SupO) 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 *cl* 遺伝子に温度感受性変異があるため、この菌を高温 (45°C, 25 min) で培養することによりファージ DNA の複製とファージの構造タンパク質の発現が誘導される。高温培養時に、核移行シグナルと D タンパク質との融合タンパク質を IPTG によって発現誘導することにより、NLS ファージ粒子を回収した。対照としては、D タンパク質を D1180 株で発現させて調製した野生型頭部を持つファージ (Wild ファージ) を使用した。組換えファージ粒子は塩化セシウム密度勾配法で精製し、ペプチドの呈示は抗核移行シグナルペプチド抗体によるタンパク質ブロッティングと免疫沈降法で確認した。ファージ粒子数は大腸菌 LE392 株を用いた標準的なプラークアッセイによった。タンパク質および DNA 量から推定した粒子数

(pfu) は、プラーク法で測定した粒子数とほぼ一致する。最終的な収率は培養液 10 リットルあたり 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。1012 pfu/ml に調製した組換えファージをヒト胎児肺由来線維芽細胞 HEL 細胞の細胞質にエッペンドルフ社のセミ・オートマチック・インジェクターを使って導入し、37°C 30 min の培養後に 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 $MgCl_2$) 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 $MgCl_2$, 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 (図 1)。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。

3) 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、Blasticidin で選択して、TRF1 強発現細胞株を得た。TRF1 量は、baculovirus で作成した組換え TRF1 をウサギに免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ブロッティングと、同じ抗体を使った間接蛍光抗体法で推定した。対照群としては、Blasticidin 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。

C. 研究結果

1. 導入遺伝子を核内に送達する技術の開発

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 LGISYGRKKRRQRRRPPQT 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 YDDEATADSQHSPPKKKRKVEDPKDFESELL 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成し、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 (図 2, 図 3)。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. 図 1)

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（図 4）。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。

2. 導入遺伝子を核で安定化する技術の開発

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（表 1）。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。

3. 導入遺伝子を細胞質で安定化する技術の開発

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

遺伝子治療用の非ウイルスベクターの開発は、1990年代後半まではゆっくりではあるが着実に進んできたが、ここ数年ほどはほとんど進展していない。これは、これまでのようなベクター構成成分の物理化学的特性に頼った性能の向上に限界があることを反映している。もちろん、細胞膜や核膜を能動的に突破する能力を持ったタンパク質に注目して、その機能ドメインであるペプチドをベクターに組み込み性能を向上させようとするアプローチは皆無ではない。例えば、1999年には、核移行シグナルを結合させることによってプラスミドDNAを核に輸送することができたという論文がNature BiotechnologyやPNASにいくつも発表された。しかしその後、これらの報告は再現性の確認もされないまま消え去ろうとしている（非公式な情報によると、これらの研究報告には著者自身が結果を再現できないものも含まれているという）。

これまでのさまざまな機能ペプチドの応用の試みが失敗に終わっている原因の一つとして、これらのペプチドをベクターに組み込む際の空間的トポロジーがほとんど考慮されていないことが挙げられる。Protein Transduction Domainや核移行シグナルといった機能ペプチドは（まだ同定されていないものも含め）細胞側の因子と正しく相互作用する必要がある。そのためには、DNAを含む構造体の表面に、一定の空間的トポロジーと密度の下に存在している必要がある。しかるに、これまでの研究

では、これらのペプチドをDNA分子に共有結合させるとかペプチド上の荷電を利用してDNAと複合体を作らせるといった方法に頼っているため、ペプチドの空間的トポロジーや密度をコントロールすることはほとんど不可能に近かった。

本研究で我々が採用したラムダファージ・ペプチドディスプレイ・システムでは、どのようなペプチドを呈示しようとも、直径55 nmというDNAを内封した構造体（ファージ頭部）の構造は変化しない。また、Dタンパク質と融合した形でファージ表面にあるペプチドは、常に同じトポロジーを持って呈示されると予想される。これはこれまでの非ウイルスベクターでは達成できなかった大きな特徴であり、ラムダファージを非常に優れたPolyplexのモデルとして使用できることを示している。さらにこの系の特徴は、内部にマーカー遺伝子を直接封入して遺伝子発現に対する機能性ペプチドの効果を直接検証できることで、常に1コピーの遺伝子が1粒子の中に存在するため、定量的な研究が可能となっている。

この点について、ラムダファージディスプレイの系を使って得られたProtein Transduction Domainの活性を、同じペプチドを使いながらもDNAとペプチドを混合して作った複合体で検討した例（Rudolph, et al., J. Biol. Chem., in press）と比較すると興味深い差が見られる。DNAとペプチドを混合して作った複合体は確かにpoly-L-lysineなどの陽荷電を持つペプチドに比べると数倍高い遺伝子導入活性を示しているが、複合体の構造は塩濃度によって左右されることからわかるように堅固なものでは

ない。さらにこの複合体による遺伝子導入は Chloroquine などの lysosome や endosome の機能を阻害する薬剤によって大きく促進され、主要な遺伝子導入経路は endocytosis であると結論づけられている。一方、ラムダファージディスプレイの系では、塩濃度等の外的環境にかかわらず常に粒子構造は一定であり、遺伝子導入経路も endosome ではなく caveolae というまったく経路であると考えられる。つまり、ラムダファージディスプレイを使った解析は、endocytosis を介しない細胞膜通過であるとされている本来の Protein Transduction Domain の機能を忠実に反映しているのに対し、ペプチド・DNA の混合物を使った場合は単に poly-L-lysine のような DNA の電荷を中和するだけの効果しか観察できない。このように、ラムダファージディスプレイ系を使ってペプチドのトポロジーを厳密に一定にできるようになったため、本年度の核移行シグナルの機能の解析に見られるような詳細かつ定量的な研究が可能になったことは特筆すべきであり、今後さまざまなペプチドの定量的解析によって、より優れた機能を持つペプチドをスクリーニングすることが可能となると期待される。

昨年（2002 年）秋から今年にかけて、3 年前から実施されている X 染色体連関重症複合免疫不全症の遺伝子治療を受けた 11 名の患者のうち、2 名が遺伝子治療の副作用と考えられる白血病を発症したというニュースは、遺伝子治療の研究者に大きな衝撃を与えた。この 2 つの事例では、レトロウイルスベクターを使って骨髓細胞に導入された治療用遺伝子が、

白血病の原因となることが知られている癌抑制遺伝子の近傍に挿入されており、これが発症の直接の原因であると推定されている。ヒトゲノムに挿入された外来遺伝子によって癌化した細胞が出現する危険性は指摘されてきたが、レトロウイルスベクターを使ったこれまでの多くの臨床試験の結果から極めて楽観視されてきた。しかし、今回の事態で、少なくとも骨髓細胞を対象とする限り、このような副作用が生じることが確認されたわけである。この事例では遺伝子を導入することによる治療効果は確認されているだけに、染色体にランダムに遺伝子を挿入しない技術、例えば人工染色体の開発や相同組換えによる遺伝子改変といったまだ開発途上の技術の実用化が改めて注目されている。

本研究では、染色体末端のテロメア配列と呼ばれる構造が染色体を安定化することに着目して、この機構を人工染色体開発に応用することの可否を検討してきた。テロメア配列を使用した環状 DNA の安定化が出芽酵母で報告されており、染色体の重要な構成要素（テロメア・複製起点・セントロメア）は（構造こそかなり異なるものの）機能的には酵母からヒトにいたる真核生物で保存されていることから、その結果が注目された。しかしながら、通常の研究でよく使用される HeLa 細胞等の培養株細胞（不死化細胞でもある）で得られた「テロメア配列＝TRF1 の相互作用が染色体の安定性を決定している」という結論は、遺伝子治療の対象であるヒト正常体細胞にはそのまま当てはまらないという結論が導かれた。このことは、今後、遺伝子治療用の人工染色体を研究する上で、

ヒト培養株細胞を使って得られた結果がヒト正常体細胞にも当てはまるかどうかを慎重に検討する必要があることを示している。

ところで、今回の研究結果は、細胞の癌化という医学的に非常に大きな問題と関連している可能性が高い。染色体の安定化機構は、細胞寿命の決定（ひいては生物個体の寿命の決定）と密接な関連がある。通常、ヒトの組織を構成している正常体細胞は有限の寿命を持っており、ある一定の回数の分裂を重ねた時に「細胞老化」を起こして増殖が停止しやがて死んでいく。この際に細胞分裂ごとにテロメア配列が 50 – 500 bp 短縮していく現象が観察され、テロメア配列は染色体の安定化機構を通じて細胞寿命を決める時計として働いていると考えられてきた。一方、永久増殖能を獲得した癌細胞など不死化細胞では、テロメラーゼか ALT (Alternative lengthening of telomere) の機構が存在してテロメア配列を維持しているために細胞老化が起こらないとされてきた（テロメア仮説）。このため、テロメアによる細胞寿命の決定機構は細胞癌化との関係で大きな注目を浴びている。

テロメア仮説の弱点は、有限寿命の細胞で細胞死が起こるときのテロメア配列（約 5 kbp）よりはるかに短いテロメア配列を持っている不死化細胞が多数存在している（例えば、HeLa 細胞では約 2 kbp）ことで、テロメア配列の長さが単純に細胞の寿命（あるいは染色体の安定性）を決めているわけではないことが細胞寿命を考える上での大きな矛盾となっている。さらに、マウス体細胞のテロメア配列はヒト体細胞のテロメア配列より 10 倍も長いのに細胞寿命は

マウスの方が短いこと・テロメラーゼ遺伝子を欠失したマウスでも癌の発生頻度は正常マウスと変わらないことから、細胞寿命と癌化の関係はますます謎が深まっている。

我々の昨年度までの研究から、動物細胞ではテロメア配列が十分に長い TRF1 の発現が十分に高い（あるいは両方）という条件が満たされることが染色体の安定性を決めるために必須であると予想された。我々が導き出したこの TRF1 仮説（TRF1 がテロメラーゼや ALT の機構と独立の染色体安定化因子として働く）は、テロメア仮説の矛盾を克服して細胞の寿命の決定機構を説明できる点で極めて魅力的であり、不死化細胞では有限寿命の細胞に比べて TRF1 の活性が優位に高いことはこの仮説を裏付けている。しかし、本年度の研究成果は、テロメラーゼを強制発現させるとヒト正常細胞の寿命は著しく延びるのに対し、TRF1 を強制発現しても細胞寿命はほとんど延びないことを示しており、この単純な図式はヒト正常体細胞には必ずしも当てはまらない。

それでは、不死化細胞では、TRF1 は他の因子を誘導する等の機構によって染色体を安定にしているのだろうか？ TRF1 の相対量（細胞内の総テロメア配列に対する TRF1 の分子数）がテロメアの安定化と完全に定量的な相関関係があること・テロメアの安定化には TRF1 の認識配列と一致した TTAGGG の繰り返しが必要であること・同じ配列と結合する TRF2 の量と安定性の間には相関関係がないことから、TRF1 の作用が間接的であるとは考えにくい。むしろ、ヒト正常体細胞では、TRF1 を単独で過剰発現させてもテロメアを安定にでき

ない何らかの理由があると推定される。

それでは、ヒト正常体細胞とヒト不死化細胞では、強制発現させた TRF1 に何らかの違いが存在するのだろうか？この問題を検討するため、細胞内に存在する TRF1 複合体のサイズ（図5）・TRF1 の等電点（図6）について調べたが、有意な差は観察されなかった。しかしながら、細胞をさまざまな条件で分画すると、ヒト不死化細胞では高塩濃度条件下でも TRF1 が核の不溶画分に存在するのに、同じ条件下でヒト正常体細胞中の TRF1 は可溶画分に溶出されることが判明した（図7）。このことは、同じように TRF1 を過剰発現していても核内での存在様式が異なるためにヒト正常体細胞ではテロメア配列を安定化すると TRF1 の機能が失われていること・ヒト正常細胞では TRF1 を核につなぎとめておく何らかの因子（おそらく TRF1 結合タンパク質）が不足していることを示唆している。今後のこの問題の検討は、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ことを予想される。

E. 結論

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、一方、N 末端側はこ

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）ことを確認した。

また、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を評価し、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ことを期待される。

F. 研究発表

1. 原著論文

1) Teruo Akuta, Akiko Eguchi, Hajime Okuyama, Takao Senda, Hachiro Inokuchi, Yosuke Suzuki, Emi Nagoshi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Katsuo Takeda, Mamoru Hasegawa and **Mahito Nakanishi** (2002). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 772-779. Enhancement of Phage-Mediated Gene Transfer by Nuclear Localization Signal.

2. 査読付き解説

1) **Mahito Nakanishi**, Akiko Eguchi, Teruo Akuta, Emi Nagoshi, Shigeo Fujita, Jun Okabe, Takao Senda and Mamoru Hasegawa (2003). *Current Protein & Peptide Science*, in press. Basic Peptides as Functional Components of Non-viral Gene Transfer Vehicles.

3. 口頭発表

1) 藤田繁雄、江口暁子、岡部潤、

井上善文、伊藤壽記、松田暉、加藤篤、長谷川護、中西真人. 膜融合型遺伝子導入デバイスの経門脈閉鎖灌流系による肝投与条件の検討 第18回日本 DDS 学会、札幌、2002 年 6 月

2) 月野木ルミ、岡部潤、江口暁子、堀本雅祥、京哲、早川和生、中西真人. hTERT promoter を用いた癌特異的遺伝子の作成 第18回日本 DDS 学会、札幌、2002 年 6 月

3) 江口暁子、芥照夫、長谷川護、中西真人. Tat ペプチドを用いた動物細胞への遺伝子導入 第18回日本 DDS 学会、札幌、2002 年 6 月

4) 中西真人. 遺伝子治療用マイクロマシンの開発 AI-ST スクエア講演会、つくば、2002 年 10 月

5) 中西真人. 膜融合を介したデリバリーシステム—基礎と応用 ミニシンポジウム「細胞内デリバリーのための分子シンクロナイズーション」、豊中、2002 年 12 月

6) Jun Okabe, Akiko Eguchi, Rumi Tsukinoki and Mahito Nakanishi. Forced Expression of Telomeric Repeat Binding Factor TRF1 delays the Onset of Replicative Senescence in Primary Human Fibroblast Cold Spring Harbor Meeting “Molecular Genetics of Aging”, Cold Spring Harbor, NY, 2002 年 10 月

7) 岡部潤、江口暁子、月野木ルミ、中西真人. テロメア結合タンパク質 TRF1 のヒト細胞老化における役割 第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月

8) 岡部潤、江口暁子、月野木ルミ、中西真人. テロメア結合タンパク質 TRF1 のヒト細胞の不死化。老化における役割 第20回染色体ワークショップ、京田辺市、2003 年 1 月

9) 中西真人. 遺伝子治療用マイク

ロマシンの開発 21 世紀 COE シンポジウム、札幌、2003 年 2 月

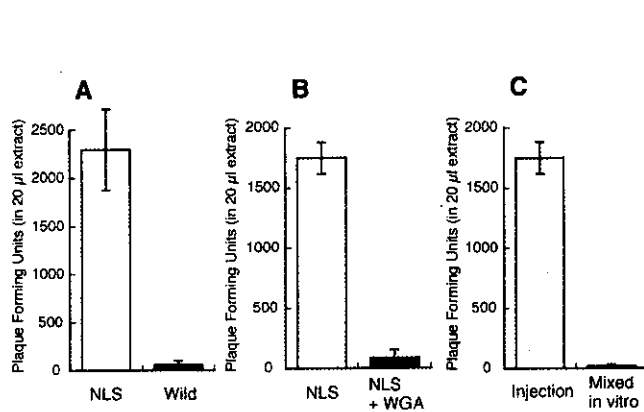


図1 核に移行したDNA内封粒子の定量

	α Importin
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDPEKDFESELLST	86
MYDDEATADSQHSTPPKTKRKVDPEKDFESELLST	16
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVS	0
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	72
MDYKDDDDKSGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	2
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	73
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	70
MEQKLISEEDLGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	0
	0

図2 Importin alphaとの結合解析

	核移行(%)
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDPEKDFESELLST	100
MYDDEATADSQHSTPPKTKRKVDPEKDFESELLST	11
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVS	10
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	76
MDYKDDDDKSGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	10
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	179
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	73
MEQKLISEEDLGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	15
	2

	α Importin	核移行
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDPEKDFESELLST	○	○
MYDDEATADSQHSTPPKTKRKVDPEKDFESELLST	×	×
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVS	×	×
MYDDEATADSQHSTPPKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	○	○
MDYKDDDDKSGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	×	×
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDPEKDFESELLST	○	○
MYPYDVPDYAGGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	○	○
MEQKLISEEDLGGEQPKKKRKRKVDYKDDDDKSGGG	×	×
	×	×

図3 核移行活性の解析

Effect of Excess TRF1 on de novo Telomere Formation				
Cell	Ex. TRF1	Tel. Repeat (kb)	TRF1 (x10 ³ mol./cell)	Freq. of TS (%)
Primary Human Fibroblast	—	2.0	8	22
	hTRF1	2.0	235	24
Immortal Cell Line (HeLa-LT)	—	0.5	49	36
	hTRF1	0.5	279	83

表1 ヒト不死化細胞と有限寿命細胞で過剰発現させたTRF1の染色体の安定性に及ぼす影響

図4 変異核移行シグナルを呈示したファージの活性 (まとめ)

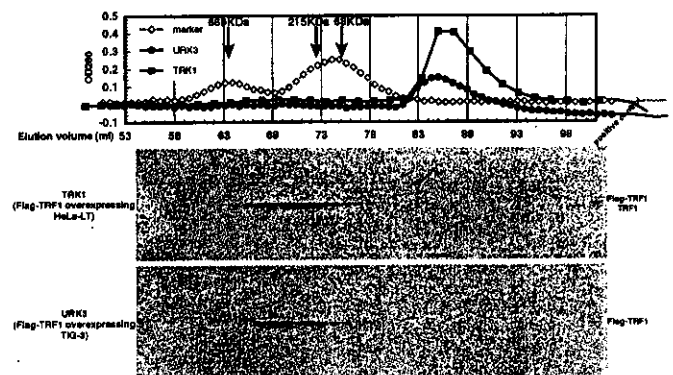


図5 ヒト不死化細胞と有限寿命細胞で過剰発現させたTRF1複合体の分子量の決定

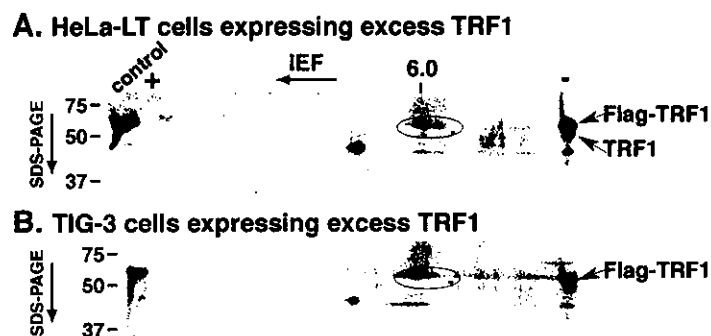


図6 TRF1の等電点の解析

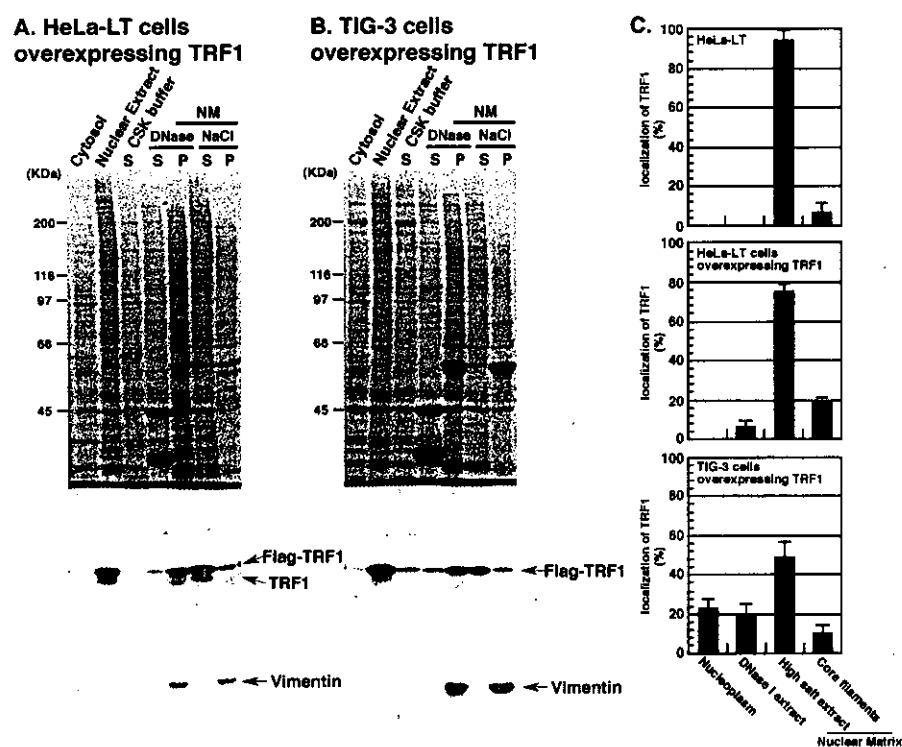


図7 各種細胞分画におけるTRF1の定量

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号、ページ、出版年
Xu Z.L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T.	Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems.	<i>Gene</i>	in press
Nagayama Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Niwa M., McLachlan S.M.	Prevention of autoantibody-mediated graves'-like hyperthyroidism in mice with interleukin-4, a Th2 cytokine.	<i>J. Immunol.</i>	170, 3522-3527 (2003)
Nagayama Y., Nakao, K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Niwa M.	Enhanced antitumor effect of combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing interleukin-12 in an immunocompetent mouse model.	<i>Gene Ther.</i>	in press
Morioka T., Koyama H., Yamamura H., Tanaka S., Emoto M., Imamura T., Miyazono K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kojima I., Takahashi K., Nishizawa Y.	Expression and its role of calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells.	<i>Diabetes.</i>	52, 760-766 (2003)
Nakano R., Nakagawa T., Imazu S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T.	A novel T7 system utilizing mRNA coding for T7 RNA polymerase.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	301, 974-978 (2003)
Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T.	Efficient gene transfer into human CD 34+ cells by an adenovirus type 35 vector.	<i>Gene Ther.</i>	in press
Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T.	Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob.	<i>J. Gene Med.</i>	in press
Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Tsuda T., Matsubara A., Mori N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A.	Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors.	<i>Cancer Gene Ther.</i>	in press
Kakayama K., Wada K., Nakajima A., Yoshida S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Kadowaki T., Nagai R., Kamisaki Y., Blumberg R.S., Mayumi T.	A novel PPAR γ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease.	<i>Gastroenterology</i>	in press
Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N.	An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF α -expressing adenovirus vector into established murine melanoma.	<i>Gene Ther.</i>	in press