

20020424

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 落谷 孝広

平成15（2003）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		
落谷 孝広	-----	5
2. ホルモン抵抗性前立腺がんに対する遺伝子治療法の開発		
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	-----	9
4. 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	-----	14
5. 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	-----	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

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 腫瘍ゲノム解析・
情報研究部

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 工学系研究科
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

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

(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、倫理上の問題は無い。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ー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。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ーン製剤からのDNAの放出性をコントロールすることが可能であった。さらに、アテロコラーゲン包埋法の応用として、IL-2遺伝子によるメラノーマの肺転移の抑制に有効であることを確認した。

2) 既に確立した部位特異的組換え酵素Cre/loxPとCreとは独立して働く第二の部位特異的組換え酵素FLP/FRTを組み合わせることにより複数遺伝子同時発現制御系や多段階発現制御系の確立を試みた。各々の細胞株にFLP発現ウイルスを感染し、その3日後にCre発現ウイルスを感染した結果、これらの遺伝子の発現が各々の組換え酵素により目的通り制御されていた。またSouthern blot法により染色体上での目的通りの組換えを確認した。FLPはCreと比べ組換え効率が劣るため100%の細胞での組換えのためには多くのウイルス量が必要とされるが、ウイルスそのものによる細胞毒性は認められなかった。一方Creは組換え効率は非常に高いもののウイルス量を増加した場合にはCreそのものによる細胞毒性が認められたため、至適ウイルス量の予備的な検討が必要であると考えられた。

3) アデノウイルス受容体CARと結合しないAd40短ファイバー (F40S) を持つAdv-F40Sをベースとして、in vivoでの非特異

的遺伝子導入を最小に抑え、癌細胞の特異的標的化が可能なファイバー変異アデノウイルスの開発を目指した。NG2糖タンパクと特異的に結合する10アミノ酸のペプチドTAAと組み合わせたF40S/TAAウイルスを用いることにより、悪性黒色腫、悪性脳腫瘍などの皮下腫瘍モデルに対して、効率の高さに加えて選択性の高いレポーター遺伝子導入に成功した。一方、インテグリンを標的としたF/RGDウイルスを用いると、間葉系幹細胞を用いた浸潤性のグリオーマに対するIL-2治療実験では明らかな抗腫瘍効果が得られ、新しいDDSとして有望である。現在臨床への応用を目指して各種ベクターを作成し、安全性の評価を進めている。

4) 高分子ミセル型遺伝子ベクターを用いた効率良い遺伝子発現系を確立した。特に、ポリカチオンの構造を適切に設計することによってクロロキンなどの助剤を用いることなく遺伝子導入を可能にした。また血清共存下での安定性を定量的に評価する方法を用いてミセルベクターが高濃度血清存在下においても高い安定性を保持することを明らかとした。マウス循環血中でミセル型ベクターの安定性を確認するとともに肝臓におけるレポーター遺伝子の発現を確認した。さらにブロック共重合体のポリカチオン鎖にジスルフィド結合を導入することによって細胞内還元環境下で高い遺伝子発現を実現することに成功した。これより、細胞外では安定で細胞内環境において適切に内包DNAを放出し、遺伝子発現を導くインテリジェント・ベクターシステムの設計指針を明らかとした。

5) ラットプロバシンプロモーターのアンドロゲンレスポンスエレメント(ARE)をレチノイン酸レスポンスエレメントに置換し、レチノイン酸を投与することにより遺伝子を発現する新たな前立腺がん特異的プロモーターを構築した。本修飾型rPBプロモーターは、前立腺に対する特異的を維持しつつ、ホルモン依存性および抵抗性前立腺がん細胞において効率よく外来遺伝子を発現した。また、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼを用いた自殺遺伝子治療と組み合わせることにより、前立腺がん細胞の増殖を特異的に抑制した。

D. 考察

まず本研究プロジェクトの主眼のひとつであるアテロコラーゲンによる遺伝子ベクターの生体内制御に関しては、シリコーン製剤の完成など、生体内での安全性を高めるための具体的な方策の実現に至った。さらにアテロコラーゲン包埋法の応用として、動物個体レベルでの実証的検討も具体化することができたことから、遺伝子ベクター類の生体内制御におけるバイオマテリアルの実用性の具体化が達成できた。また本研究において目的としていたCreの本来の標的配列である野生型oxPと変異型loxPを併用した複数遺伝子同時発現制御系を確立するとともにFLP/FRTとCre/loxPを用いた多段階発現制御系の確立に向け単一遺伝子と複数遺伝子の連続発現制御について検討を行い、充分に応用が可能であることを示した。さらに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として、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ベクター系の構築に成功し、かつ細胞内環境応答性と生体内での安定性を示した点で、新たな生体内達デリバリー技術開発に至った成度は極めて高いものと評価される。また標的遺伝子導入に関しては、がんの生物学的特徴を指標にした方法として、メラノーマに対するNG2、血管新生の際やホルモン抵抗性前立腺がんにおいても効率よく特異的に機能するプロモーターの開発が達成できたことは、臨床応用に向けての大きな前進であると評価できる。

E. 結論

すでに米国を中心に3,000人以上の患者（そのうち半数以上ががん患者）に対して遺伝子治療が実施されている。現時点ではその効果は満足のいくものではない。その大きな原因として、治療用ベクターの生体内への導入・発現の効率が不十分であることや、標的部位への特異的導入や細胞特異性に欠ける点、さらには、いったん体内へ送り込んだ治療用ベクターを後から制御出来ないなどの安全性に関する問題などが挙げられる。従って、本研究に於いて開発されたアテロコラーゲン

による生体内でのベクターの発現制御をはじめとして、部位特異的遺伝子導入と発現をオン・オフにする画期的な方法の開発は、実際の遺伝子治療に於いて、効果的な標的細胞への目的の遺伝子発現ばかりか、治療によって生体に副作用が生じたり、治療を終了したい場合に、生体内で遺伝子発現をオフに制御する方法の確立に直結し、ゲノム研究によって明らかにされたヒトの疾患に関与する多くの遺伝子を治療へと応用する道が開ける。また、がんに対する新規治療法の基礎研究や遺伝子治療の臨床研究応用への速度は速まり、さらに他の疾患に対しても幅広い応用性と波及効果が期待される。

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14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. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res*. 2002. 62(6): 1641-1647.
3. Yamamoto H, Ochiya T, et al. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene*. 2002. 21(6):899-908.
4. Hiroi N, Ochiya T., et al. Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation. *EMBO J*. 2002. 21(19): 5235-5244.
5. Matsuoka N, Hamada H, et al. Overexpression of bFGF and Bcl-xL with adenoviral vectors protects primarily cultured-neurons against glutamate insult. *Neurosurgery*. 2002. 50(4): 857-863.
6. Shimada H, Hamada H, et al. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33(ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma cells. *Oncogene*. 2002. 21(8): 1208-1216.

7. Uchida H, Hamada H, et al. Caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 292(2): 347-354.
8. 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. *Clin Cancer Res.* 2002. 8(3): 913-921.
9. Nakamura T, Sato K. and Hamada H. Effective Gene Transfer to Human Melanomas via Integrin-Targeted Adenoviral Vectors. *Hum. Gene Ther.* 2002. 13(5): 613-626.
10. 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.* 2002. 9: 44-52.
11. Miyagi T, Hamada H, et al. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med.* 2003 5(1):30-37.
12. Kuwahara I, Hamada H, et al. Changes in N-glycosylation of human stromal cells by telomerase expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 301(2):293-297.
13. Tsuda H, Hamada H, et al. Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol. Ther.*, in press, 2003.
14. Nakamura T, Sato K, and Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-Coxsackie virus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol.* 2003. 77(4):2512-2521.
15. Kawano Y, Hamada H, et al. *Ex vivo* expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood*, in press, 2002.
16. Horie R, Kanegae Y., et al. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 2002. 21: 2493-2503.
17. Otsuka H, Kataoka K, et al. Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH, *J. Am. Chem. Soc.*, Publish on the Web
18. Nishiyama N, Kataoka K, et al. Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles, *Bioconjugate Chemistry*, Publish on the Web
19. Jule E, Nagasaki Y, Kataoka K. Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity towards a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study, *Bioconjugate Chemistry*, 2003.14(1), 177-186.
20. Yamamoto Y, Kataoka K, et al. Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *Journal of Controlled Release*, 2002. 82(2-3): 359-371.
21. Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002. 54(2), 203-222.
22. Nezu M, Yoshida T, et al. Identification of the CAB2/hCOS16 gene required for the repair of DNA double-strand breaks on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002. 93:1183-1186.
23. Ishizuka, T, Yoshida T, et al. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 296:152-5.
24. Suzuki K, Yoshida T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha inhibits the hepatitis C virus replication and improves experimental liver cirrhosis. *Gene Therapy*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 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）：平成13年6月20日
- 2) 発明の名称：核酸導入促進剤（特願2001-186320）
【発明者】落谷孝広、伊藤 博、佐野明彦
【出願日】（登録日）：平成14年6月20日
- 2) 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（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。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の放出性をコントロールすることが可能であった。さらに、アテロコラーゲン包埋法の応用として、IL-2遺伝子によるメラノーマの増殖抑制に有効であることを確認した。

A. 研究目的

治療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など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おり、製剤の物理的除去により、生体のIL-2濃度は減少した。さらに、アテロコラーゲン包埋法の応用として、IL-2遺伝子によるメラノーマの増殖抑制に有効であることを確認した。

D. 考察

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。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の普及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、シリコー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、シリコー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*, 1: 31-52 (2001)

2. Yamamoto, H., Ochiya, T. et al.

Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res.* (2002) 62(6):1641-1647.

3. Yamamoto H, Ochiya T, et al. HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene.* (2002) 21(6):899-908.

4. Hiroi N, Ochiya T., et al. Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation. *EMBO J.* (2002) 21(19): 5235-5244.

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、他
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、他
②出願日（登録日）：2000年6月20日
- 4) 発明の名称：核酸導入促進剤
①発明者：落谷孝広、伊藤 博、他
②出願日（登録日）：2002年6月20日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ホルモン抵抗性前立腺がんに対する遺伝子治療法の開発に関する研究
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 アンドロゲンとアンドロゲンレセプター（AR）の複合体がアンドロゲンレスポンスエレメント(ARE)と結合することにより、前立腺特異的プロモーターからの転写が開始される。一方、ホルモン抵抗性前立腺がんでは AR の発現が消失し、その転写活性は失われている。本研究の目的は、ホルモン抵抗性前立腺がんに対する特異的プロモーターを開発することである。

A. 研究目的

アンドロゲンとアンドロゲンレセプター（AR）の複合体がアンドロゲンレスポンスエレメント(ARE)と結合することにより、前立腺特異的プロモーターからの転写が開始される。一方、ホルモン抵抗性前立腺がんではAR の発現が消失し、その転写活性は失われている。本研究の目的は、ホルモン抵抗性前立腺がんに対する特異的プロモーターを開発することである。

（倫理面への配慮）

本研究では、研究用に広く一般に利用され、一般に入手可能な細胞株や実験動物を用いて研究を行ったので、生命倫理上の問題は生じない。動物実験に関しては、当センターの動物実験倫理規定に基づいて実験を行った。

B. 研究方法

前立腺がん細胞は、ホルモン療法後もレチノイン酸レセプターを発現している。そこで、ラットプロバシンプロモーターのAREをレチノイン酸レスポンスエレメントに置換し、レチノイン酸を投与することにより遺伝子を発現する新たな前立腺がん特異的プロモーターを構築した。

C. 研究結果

in vitro 法による解析から、FLP（以下野生型本修飾型 rPB プロモーターは、前立腺に対する特異的を維持しつつ、ホルモン依存性および抵抗性前立腺がん細胞において効率よく外来遺伝子を発現した。また、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼを用いた自殺遺伝子治療と組み合わせることにより、前立腺がん細胞の増殖を特異的に抑制した。

D. 考察

1) 達成度について

本研究の目的は、ホルモン抵抗性前立腺がんにおいても効率よく特異的に機能するプロモーターを開発することが目的であったが、前立腺がん細胞や動物を用いた検討の結果、遺伝子治療への応用が可能であることが示され、当初の目的は達成されたものと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子治療では、生体内での安全性を向上するために、遺伝子発現をがん細胞に限局する必要がある。現在、特異的プロモーターのないことが、ホルモン抵抗性前立腺がんに対する遺伝子治療を開発する上での重大な障害となっている。本研究の成果は、前立腺がんの遺伝子治療研

究全般に強力な手段を提供するものと考えられる。

3) 今後の展望について

前立腺がんでは、進行期には骨転移を来すことが多い。前臨床研究として、実験動物骨転移モデルを用いて、本修飾型 rPB プロモーターと組み合わせた自殺遺伝子療法、アポトーシス誘導遺伝子導入や制限増殖型ウイルス等の治療法の安全性と効果を検討し、今後臨床応用につなげたい。

E. 結論

我々は、ホルモン抵抗性前立腺がんにおいて機能する前立腺特異的プロモーターを開発した。本プロモーターの開発は、ホルモン抵抗性がんに対する標的遺伝子治療法を開発する上で重要な役割を果たしうる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

1. Nezu M, Yoshida T, et al. Identification of the CAB2/hCOS16 gene required for the repair of DNA double-strand breaks on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002. 93:1183-1186.

2. Ishizuka, T, Yoshida T, et al. Gene amplification profiling of esophageal

squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 296:152-5.

3. K. Shirakawa, S. Furuhashi, I. Watanabe, H. Hayase, A. Shimizu, Y. Ikarashi, T. Yoshida, M. Terada, D. Hashimoto and H. Wakasugi. Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *British J Cancer*, 87: 1454-1461, 2002

4. K. Aoyagi, T. Tatsuta, M. Nishigaki, S. Akimoto, C. Tanabe, Y. Omoto, S. Hayashi, H. Sakamoto, M. Sakamoto, T. Yoshida, M. Terada and H. Sasaki. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 915-920, 2003

5. Suzuki K, Yoshida T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α inhibits the hepatitis C virus replication and improves experimental liver cirrhosis. *Gene Therapy*, in press.

6. Furuhashi S, Yoshida, T, et al. Development of prostate specific promoter for gene therapy against androgen-independent prostate cancer. *Molecular Therapy*, in press.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

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 メラノーマ、口腔がん、膀胱がんに対して有効なファイバー変異型 Adv-F/RGD、ならびに 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す Ax-F40S/TAA 変異型ベクターは臨床応用に有望である。今期はこれらのベクターをベースに用いてサイトカインやアポトーシス関連遺伝子と組み合わせて、治療ベクターとしての基礎的な検討を行った。

1. 研究目的

本研究では、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14年度は、すでに作成系を樹立した、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、ならびに NG2 プロテオグリカンを標的化する Adv-F/TAA の2種をベースとして、サイトカインやアポトーシス関連遺伝子と組み合わせて、基礎的な検討を行った。

2. 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した。

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* 治療効果を検討した。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* 治療効果を検討し

た。

（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。

3. 研究結果および考察

アデノウイルス受容体 CAR と結合しない Ad40 短ファイバー（F40S）を持つ Adv-F40S をベースとして、*in vivo* での非特異的遺伝子導入を最小に抑え、癌細胞の特異的標的化が可能なファイバー変異アデノウイルスの開発を目指した。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リガンド（以下 TAA と略す）と組み合わせた F40S/TAA ウイルスを用いることにより、悪性黒色腫、悪性脳腫瘍などの皮下腫瘍モデルに対して、効率の高さに加えて選択性の高いレポーター遺伝子導入に成功した。現在、IL-2 などのサイトカイン遺伝子導入治療モデルを用いて、静脈投与によるメラノーマの標的治療を目指して評価を進めている。一方、インテグリンを標的とした

F/RGD ウイルスを用いると、悪性黒色腫、扁平上皮癌、膀胱癌などのほか、間葉系幹細胞にも高い遺伝子導入効率が得られた。遺伝子導入した間葉系幹細胞を用いた浸潤性のグリオーマに対する IL-2 治療実験では明らかな抗腫瘍効果が得られ、新しい DDS として有望である。現在臨床への応用を目指して各種ベクターを作成し、安全性の評価を進めている。

4. 評価

- 1) 達成度について 当初の計画通り。
- 2) 研究成果の意義に関して。静脈投与で標的化が可能なアデノウイルスが作成できれば、世界的にもユニークな研究となる。
- 3) 臨床研究につなげるにはなお多くの課題を克服しなくてはならない。

5. 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) Ax-F40S/TAA ベクターでは NG2 を高発現しているメラノーマ移植ヌードマウスで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。

6. 研究発表

原著論文発表

1. Shimada H, Liu TL, Ochiai T, Shimizu T, Haupt Y, Hamada H, Abe T, Oka M, Takiguchi M, and Hiwasa T. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33(ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma

cells. *Oncogene*. 21(8): 1208-1216, 2002.

2. 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*. 292(2): 347-354, 2002.
3. 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. *Clin Cancer Res*. 8(3): 913-921, 2002.
4. Nakamura T, Sato K. and Hamada H. Effective Gene Transfer to Human Melanomas via Integrin-Targeted Adenoviral Vectors. *Hum. Gene Ther*. 13(5): 613-626, 2002.
5. Lumniczky, K., Desaknai, 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.
6. Xia DJ, Zhang WP, et al., Hamada H, and Cao X. Lymphotactin co transfection enhances the therapeutic efficacy of dendritic cells genetically modified with melanoma antigen gp100. *Gene Ther*. 9(9): 592-601, 2002.
7. Shinoura N, Sakurai S, Shibasaki F, Asai A, Kirino T, and Hamada H. Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 highly enhances p53-mediated apoptosis in gliomas. *Br J Cancer*. 86(4): 587-595, 2002.

8. Kamata T, Hattori Y, Hamada H, Kizaki M, Terada M, Ikeda Y. Keratinocyte growth factor regulates proliferation and differentiation of hematopoietic cells expressing the receptor gene K-sam. *Exp Hematol.* 30(4): 297-305,2002.
9. Akimoto M, Miyahara T, Arai J, Akimoto A, Hamada H, Yoshida Y, Yoshimura N. A new delivery system for 5-fluorouracil using prodrug and converting enzyme. *Br J Ophthalmol.* 86(5): 581-586, 2002.
10. Takahashi M, Sato T, Sagawa T, Lu Y, Sato Y, Iyama S, Yamada Y, Fukaura J, Takahashi S, Miyanishi K, Yamashita T, Sasaki K, Kogawa K, Hamada H, Kato J, Niitsu Y. E1B-55K-Deleted Adenovirus Expressing E1A-13S by AFP-Enhancer/Promoter Is Capable of Highly Specific Replication in AFP-Producing Hepatocellular Carcinoma and Eradication of Established Tumor. *Mol Ther.* 5 (5 Pt 1): 627-34, 2002.
11. Sugibayashi R, Kiguchi Y, Shimizu T, Suzuki T, Hamada H, Takeda K. Up-regulation of p21 (WAF1/CIP1) Levels Leads to Growth Suppression of Prostate Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* 22(2A): 713-9, 2002.
12. Sakurai S, Sonoda Y, Koguchi E, Shinoura N, Hamada H, Kasahara T. Mutated focal adhesion kinase induces apoptosis in a human glioma cell line, T98G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:174-181, 2002.
13. Hoshida T, Sunamura M, Duda D.G., Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S and Matsuno S. Gene Therapy for Pancreatic Cancer Using an Adenovirus Vector Encoding Soluble flt-1 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor. *Pancreas.* 25(2): 111-121, 2002.
14. Nakamoto M, Iwahashi M, Ueda K, Tsunoda T, Terasawa H, Hamada H and Yamaue H. Dose of Adenoviral Vectors Expressing Interleukin-2 Plays an Important Role in Combined Gene Therapy with Cytosine Deaminase/5-Fluorocytosine: Preclinical Consideration. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:706-715, 2002
15. Tanaka S, Takehashi M, Matoh N, Iida S, Suzuki T, Futaki S, Hamada H, Masliah E, Sugiura Y, Ueda K. Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid. *J Neurochem.* 82(2): 305-315,2002.
16. Kambara H, Tamiya T, Ono Y, Ohtsuka S, Terada K, Adachi Y, Ichikawa T, Hamada H, Ohmoto T. Combined radiation and gene therapy for brain tumors with adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase genes. *Cancer Gene Ther.* 9(10): 840-845,2002.
17. Oonuma M, Sunamura M, Motoi F, Fukuyama S, Shimamura H, Yamauchi J, Shibuya K, Egawa S, Hamada H, Takeda K, Matsuno S. Gene Therapy for Intraperitoneally Disseminated Pancreatic Cancers by Escherichia Coli Uracil Phosphoribosyltransferase (UPRT) Gene Mediated by Restricted Replication-competent Adenoviral

- Vectors. *Int J Cancer*. 102(1): 51-59, 2002.
18. Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, Takahashi S, Nakamura T, Chiba H, Sato T, Matsunaga T, Azuma H, Ikebuchi K, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y, Hamada H. *Ex vivo* expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood*, 101(2):532-540, 2002.
 19. Uchida H, Shinoura N, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H, Hamada H. 5-Fluorouracil efficiently enhanced apoptosis induced by adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in DLD-1 colon cancer cells. *J Gene Med.*, in press, 2002.
 20. Huang X, Zhang W, Wakimoto H, Hamada H, Cao X. Adenovirus-mediated tissue-specific cytosine deaminase gene therapy for human hepatocellular carcinoma with different AFP expression levels *J Exp Ther Oncol*. 2002 Mar-Apr; 2(2):100-106.
 21. Tsuda H, et al and Hamada H. Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol. Ther.*, in press, 2003.
 22. Nakamura T, Sato K, and Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-Coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol*. 2003 Feb;77(4):2512-21.
 23. Satoh M, Masamune A, Sakai Y, Kikuta K, Hamada H, Shimosegawa T. Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized rat pancreatic stellate cell line. *Tohoku J Exp Med*. 2002 Sep; 198(1): 55-69.
 24. Ugai H, Suzuki E, Inabe K, Murata T, Hamada H, Yokoyama KK. Spontaneous mutations in the human gene for p53 in recombinant adenovirus during multiple passages in human embryonic kidney 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 10; 300(2): 448-56.
 25. Dehari H, Ito Y, Nakamura T, Kobune M, Sasaki K, Yonekura N, Kohama G, Hamada H. Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer. *Cancer Gene Therapy*, 10(1):75-85., 2003.
 26. Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med*. 2003 Jan-Feb;5(1):30-7.
 27. Kuwahara I, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y, Miyazawa K, Ohyashiki K, Fujisawa H, Furukawa K. Changes in N-glycosylation of human stromal cells by telomerase expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 7;301(2):293-7.
 28. F. Koyama, H. Fujii, T. Mukogawa, M. Ueno, H. Hamada, H, Ishikawa, S. Doi, T. Nakao, H. Matsumoto, H. Shimatani, Taku Takeuchi, and Yoshiyuki Nakajima Chemo-radio-gene therapy for colorectal cancer cells using the *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase

gene Anticancer Research in press, 2003.

H. 知的財産所有権の出願・取得状況

そのうち主なもの

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

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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
分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授

研究要旨

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。

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（別添図1）の開発を推進する。

B. 研究方法

1 ミセルの外殻構成セグメントとしては生体適合性に優れた親水性高分子であるpoly(ethylene glycol)を選択し、様々な構造のポリカチオンと組み合わせてブロック共重合体を作成する。また、PEG末端にはリガンド結合が可能な各種官能基を導入する。この様にして合成したブロック共重合体をplasmid DNA (pDNA)と混合する事によってミセル形成を行わせ、粒径や安定性などの物理化学的特性解析を行った後に培養細胞を対象にレポーター遺伝子の発現活性を評価する。この際、リガンドとして糖鎖の効果を中心に明らかとする。上記と並行して、本システムのin vivoにおける機能をマウスを用いた動物実験から明らかとして、非ウイルス

型遺伝子ベクターとしての有用性を検証する。

（倫理面への配慮）

動物実験は、全学の動物実験委員会の指針に基づき、動物愛護について十分に配慮して実施する。

C. 研究結果

- ① 高分子ミセル型遺伝子ベクターを用いることによって各種培養細胞系に対してルシフェラーゼならびにGFP遺伝子を効率良く発現させる条件を確立した。特に、ポリカチオンの構造を適切に設計することによってクロロキンなどの助剤を用いることなく遺伝子導入を行える事が明らかとなった。
- ② 血清共存下での安定性を定量的に評価する方法論として蛍光エネルギー移動に基づく方法を考案し、確立した。これより、ミセルベクターが高濃度血清存在下においても高い安定性を保持することを明らかとした。
- ③ マウス循環血中にミセル型ベクターを投与することによって、その血中での安定性を確認するとともに肝臓におけるレポーター遺伝子の発現を確認した。
- ④ ブロック共重合体のポリカチオン鎖にジスルフィド結合を導入することによって細胞内還元環境下で高い遺伝子発現を実現す

ることに成功した。これより、細胞外では安定で、細胞内環境において適切に内包 DNA を放出し、遺伝子発現を導くインテリジェント・ベクターシステムの設計指針を明らかとした。以

D. 考察

2147450879 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、かつ細胞内環境応答性と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。

2147450879 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ターは溶解性、安定性、生体適合性のいづれにおいても従来から知られている合成ベクターの特性を凌駕するものであり、特に、*in vivo* における安定性と遺伝子導入活性の確認は、本システムの将来の臨床応用にとって特筆すべき意義を有している。本研究の成果は国際的にも注目されており、6. 研究発表の項に示すように国外における国際研究集会での多くの講演招請という形で表れている。

2147450879 今後の展望について

今後は特に、ペプチド性リガンドを結合させたシステムについて検討を行い、初代細胞を含めた様々な細胞種への効率的な遺伝子導入を推進する。また、今年度において方法論を確立した細胞内分布や核内移行等の intracellular trafficking についてもさらなる検討を行い、高い発現効率を上げる為の指針を明らかにしたい

と考えている。また、疾患モデル動物を用いた実験により、臨床へ向けた最適組成を決定して行きたいと考えている。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、高分子ミセル型遺伝子ベクターの生体条件における安定性ならびに遺伝子導入活性を確認する事が出来た。更に、ミセル表層へのリガンド導入法やポリカチオン構造の制御に基づいて広範な性質を有するミセル型ベクターの構築が可能である事が明らかとなり、臨床応用へ向けた素地が築かれたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では健康に危険をおよぼす可能性は皆無である。

G. 研究発表

論文発表

1. N. Nishiyama, F. Koizumi, S. Okazaki, Y. Matsumura, K. Nishio, K. Kataoka, Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles, *Bioconjugate Chemistry*, Publish on the Web
2. H. Otsuka, E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano, K. Kataoka, Anomalous Binding Profile of Phenylboronic Acid with N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in Aqueous Solution with Varying pH, *J. Am. Chem. Soc.*, 125(12), 3493-3502 (2003)
3. E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Lactose-Installed Poly(ethylene glycol)-Poly(D, L-lactide) Block Copolymer Micelles Exhibit Fast-Rate Binding and High Affinity towards a Protein Bed Simulating a Cell Surface. A Surface Plasmon Resonance

- Study, *Bioconjugate Chemistry*, 14(1), 177-186 (2003)
4. N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D. Takasu, D.-L. Jiang, T. Nagano, T. Aida, K. Kataoka, Light-Harvesting Ionic Dendrimer Porphyrins as New Photosensitizers for Photodynamic Therapy, *Bioconjugate Chemistry*, 14(1), 58-66 (2003)
5. E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, A Surface Plasmon Resonance Study on the Interaction between Lactose-Installed Poly(ethylene glycol)-Poly(D, L-lactide) Block Copolymer Micelles and Lectins Immobilized on a Gold Surface, *Langmuir*, 18(26), 10334-10339 (2002)
6. Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *Journal of Controlled Release*, 82(2-3), 359-371 (2002)
7. K. Itaka, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Evaluation by Fluorescence Resonance Energy Transfer of the Stability on Nonviral Gene Delivery Vectors under Physiological Conditions, *Biomacromolecules*, 3(4), 841-845 (2002)
8. Y. Kakizawa, K. Kataoka, Block Copolymer Self-Assembly into Monodispersive Nanoparticles with Hybrid Core of Antisense DNA and Calcium Phosphate, *Langmuir*, 18(2), 4539-4543 (2002)
9. M. Harada-Shiba, K. Ymauchi, A. Harada, K. Shimokado, K. Kataoka, Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-, *Gene Therapy*, 9(6), 407-414 (2002)
10. Y. Kakizawa, K. Kataoka, Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(2), 203-222 (2002)
11. N.-P. Huang, G. Csucs, K. Emoto, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Textor, N. D. Spencer, Covalent Attachment of Novel Poly(ethylene glycol)-Poly(DL-lactic acid) Block Copolymeric Micelles to TiO₂ Surfaces, *Langmuir*, 18(1), 252-258 (2002)
- H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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
分担研究者 鐘ヶ江 裕美 東京大学医科学研究所 助手

研究要旨 新しい発現制御系である出芽酵母由来の部位特異的組み換え酵素 FLP/FRT 系の検討を行ったところ、組み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。

A. 研究目的

アデノウイルスベクターを用いた癌への遺伝子治療は既に日本でも臨床試験が始まっている。しかし依然として重症度の高い癌へ適用されているため、有効性の判断は非常に難しいのが現状である。今後早期癌への遺伝子治療を考えた場合、安全性の向上に向けた発現制御系の確立が必須である。我々は部位特異的組み換え酵素 Cre/loxP 系を応用した発現制御系を用いて癌細胞で特異的に治療遺伝子を発現する系を確立してきた。アデノウイルスベクターを用いた早期癌への遺伝子治療を考えた場合安全性の向上に向けた発現制御系の確立が必須である。本研究では既に確立した部位特異的組み換え酵素 Cre/loxP と Cre とは独立して働く第二の部位特異的組み換え酵素 FLP/FRT を組み合わせることにより複数遺伝子同時発現制御系や多段階発現制御系の確立を目的とする。

B. 研究方法

CAG プロモーターの下流に FRT を両側に持つ stuffer を持ちその下流にマーカー遺伝子(GFP)を配した FLP 標的ユニット全体を loxP で挟んだ制御系ユニットを持つ単一遺伝子連続発現制御用細胞株と EF1 α プロモーターの下流に FRT により GFP の cDNA を挟んだ FLP 標的ユニットと CAG プロモーターの下流に loxP を両側に持つ stuffer を持ちその下流に LacZ を配した Cre 標的ユニットを同一

分子上に持つ多段階発現制御ユニットを挿入した複数遺伝子連続発現制御用細胞株を樹立化した。これらの細胞株に FLP あるいは Cre 発現組み換えアデノウイルスを感染し各々のマーカー遺伝子の発現を蛍光顕微鏡観察あるいは X-gal を用いた染色により確認した。更に細胞株での染色体の構造変化を Southern blot 法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はマーカー遺伝子を用いた培養細胞系での解析であり現時点では倫理面への抵触は少ないものと考えられる。

C. 研究結果

各々の細胞株に FLP 発現ウイルスを感染し、その3日後に Cre 発現ウイルスを感染した結果これらの遺伝子の発現が各々の組み換え酵素により目的通り制御されていた。また Southern blot 法により染色体上での目的通りの組み換えを確認した。FLP は Cre と比べ組み換え効率が劣るため 100% の細胞での組み換えのためには多くのウイルス量が必要とされるが、ウイルスそのものによる細胞毒性は認められなかった。一方 Cre は組み換え効率は非常に高いもののウイルス量を増加した場合には Cre そのものによる細胞毒性が認められたため、至適ウイルス量の予備的な検討が必要であると考えられた。

D. 考察

1) 達成度について

本研究において目的としていたCreの本来の標的配列である野生型loxPと変異型loxPを併用した複数遺伝子同時発現制御系は既に昨年度までに確立していた。本年度はFLP/FRTとCre/loxPを用いた多段階発現制御系の確立向け単一遺伝子と複数遺伝子の連続発現制御について検討を行い、充分に応用が可能であることを示した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の成果は組換えアデノウイルスのみならずあらゆる遺伝子治療において、標的細胞でまずONとなった目的遺伝子が過剰発現した結果毒性が認められた場合には、その遺伝子の発現をOFFに制御することが可能となり、二重三重の安全性が確保される等幅広い応用が可能であると考えられる。

3) 今後の展望について

本研究はあくまでもモデル系としてマーカー遺伝子を用いた培養細胞での解析に留まっていたが、今後は本研究の成果が培養細胞のみならずマウス等の実験動物においても可能であるかどうかの検討を行っていく。またこれらの標的ユニットを挿入するためにはサイズの面から第一世代のアデノウイルスベクターでは不可能となるため、guttredベクターの簡便な作製法の開発を行っていく。

E. 結論

本研究からCAGプロモーターからCreあるいはFLPを発現するアデノウイルスベクターを用いることにより、組換え効率の劣る変異型loxPやFLP/FRTの発現制御系が応用可能となり、その結果複数遺伝子の同時あるいは連続発現制御が可能となった。これらの発現制御系では各々の組換え酵素の特性に従ってFLPでは組換え効率が十分なウイルス量、Creでは細胞毒性を示さないウイルス量の予備的な検討が必要であるものの精度は極めて高いことが確認され有用な系であったことが実証された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S., and Kadin, M. E.: Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 21: 2493-2503, 2002.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし