

図 5. AP-1 の変化

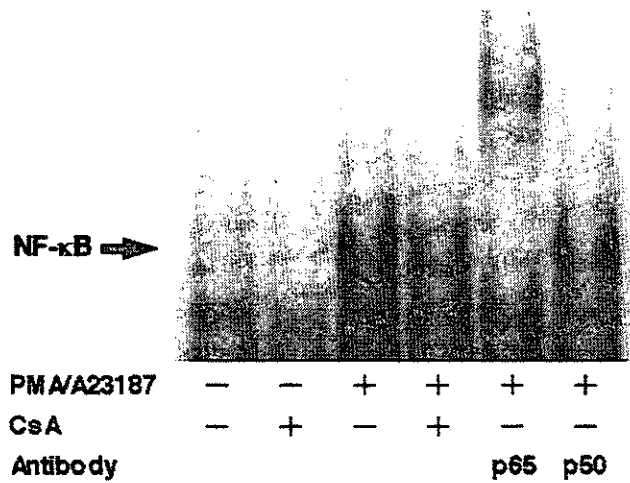


図 6. NF- κ B の変化

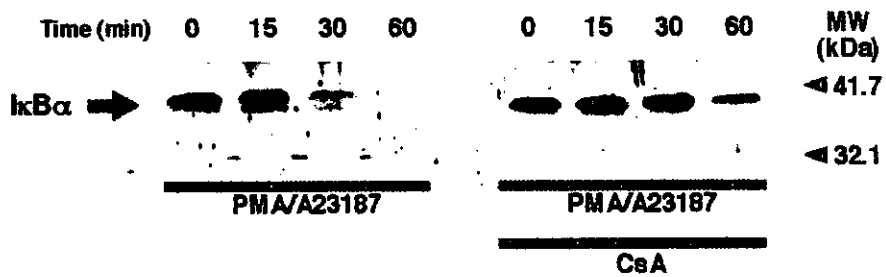


図 7. IkB α 分解の経時的変化

研究要旨

生体において主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）分子群は、抗原ペプチドと結合してこれを提示することで免疫に深く関与する。免疫疾患や癌に対する治療法の開発において、抗原ペプチドと MHC の結合様式の解明は非常に重要である。我々も癌の温熱療法において、熱ストレスを受けた癌細胞でその表面の MHC クラス I 分子が増大し、cytotoxic T cell の活性化を通して癌に対する免疫賦活が起きることを見出した。一方 MHC クラス II 分子は helper T cell の活性化を通して免疫活性に大きく関与するが、クラス I 分子と違い、多型である上に抗原ペプチドの長さが多様である。MHC 分子のエピトープ解析はペプチド医薬の開発につながるため重要であるが、特に MHC クラス II 分子では実験的なエピトープ同定は困難である。そこで、データベースを使って知識情報处理的な解析で結合ペプチドを予測する手法の構築が望まれている。我々は隠れマルコフモデル(HMM)を適応することで、入力として対象ペプチドの長さを固定しなくても解析できる、簡易かつ高精度な結合推定モデル(S-HMM)を構築した。

A. 研究目的

A. 研究目的

音声認識などで用いられている解析手法、隠れマルコフモデル(HMM)を用いて、MHC クラス II 分子 (HLA-DR1) に結合するペプチド配列の予測モデルを構築することを目指した。本方法はペプチドの長さにとらわれることなく解析することができる。最適モデルの決定法として逐次状態分割法 (SSS) を取り入れ、より最適なモデル構造を探索することを試みた。ANN を用いた予測結果との比較より、長さに多様性を持つようなペプチドの結合解析に HMM の応用が有効であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

MHCPEP データベースから得られた HLA-DR1 と結合が確認されている長さ 9~25mer のペプチドデータを解析に用いた。我々は重複や曖昧なものを除くことにより、305 の結合ペプチド(binders)と、472 の非結合ペプチド(non-binders)を解析に用いた。

解析には、Left-to-right 型の隠れマルコフモデル(HMM)予測モデルを用いた。我々の予測モデル(S-HMM)は、最適モデル構造の決定法として逐次状態分割 (Successive State Splitting; SSS) 法を適用し、最大の Shannon's information Entropy を示す状態を分割対象として探索し、目的状態数を有する最適予測モデル構造を自動構築する(図1)。学習データとして、binders のみを用いた結合予測モデルとして S-HMM1、binders と non-binders 両方を用いて各々構築した2つの予測モデルの尤度差を用いる予測モデル

S-HMM2 を構築した。各モデルを用い、解析ペプチドデータの 10 分割クロスバリデーションを行った。

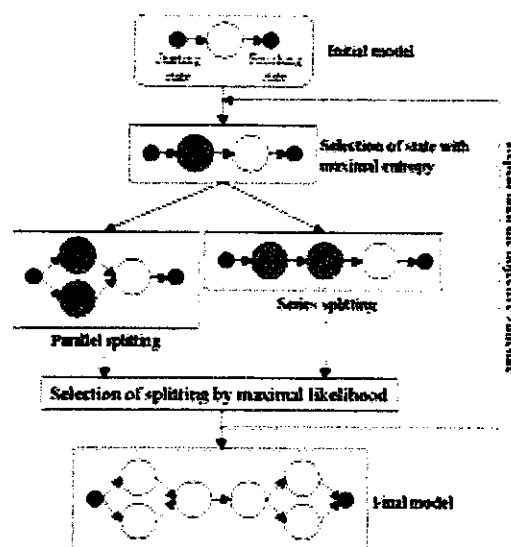


図1. S-HMMにおけるSSSの模式図

S-HMM1, S-HMM2 における結合予測結果結合予測結果は、ROC(Relative Operating Curve) 分析を用い、ROC で囲まれる面積である AUC(Area Under the Curve)の値で評価し、他の結合予測手法との予測精度の比較を行った(図2)。

S-HMM1 の結合予測精度は AUC=0.85 を示し、全結合型の HMM(F-HMM) の AUC=0.80 と比べて高い精度を示した。S-HMM1 の予測結果は教師値なし学習の結果であり、HLA 結合ペプチドのデータベースにおいて、non-binders のデータが得られない場合が多いことを考えると

S-HMM1 は有用であると考えられる。

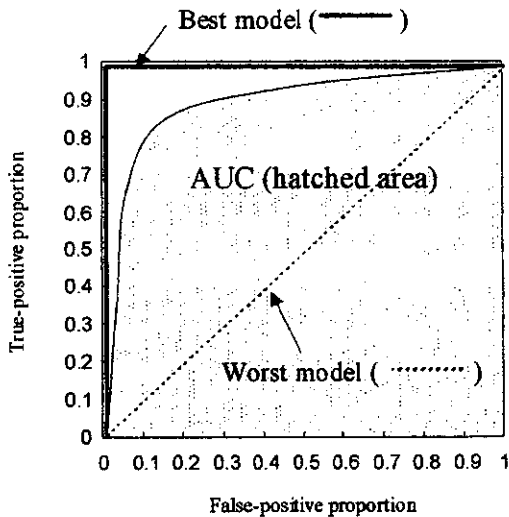


図2 ROC 曲線による評価の例

S-HMM2 の結合予測精度は S-HMM1 を上回り、AUC=0.89 と高い値を示した。これはこれまでの人工ニューラルネットを用いた手法 (ANN-EA, ANN-EXP) と比べて、同等の高い予測精度であった (図2)。

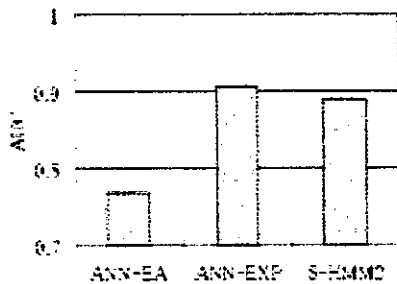


図2. S-HMM2 と他の手法との予測精度比較

ANN による解析では、入力数固定のため、ペプチドの結合領域を Quantitative Matrix を用いて 9mer の長さに推定する必要があった。これに比べ S-HMM は、HMM の特性から、様々な長さの結合ペプチド配列の情報を直接解析に用いることができる。高度な多型を示す HLA 分子では、Quantitative Matrix を得るほど詳細な解析結果が得られていることは少なく、本結果から S-HMM を用いた解析の簡便性と高い予測精度が HLA の解析に大変有効であることが示唆された。

E. 結論

隠れマルコフモデル (HMM) を用いて、MHC クラス II 分子 (HLA-DR1) に結合するペプチド配列の予測モデルを構築した。最適モデルの決

定法として逐次状態分割法 (SSS) を取り入れ、より最適なモデル構造を探索することに成功した。ANN を用いた予測結果との比較より、長さに多様性を持つようなペプチドの結合解析に HMM の応用が有効である事がわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Noguchi, et al.: Hidden Markov model-based prediction of antigenic peptides that interact with MHC class II molecules, J. Biosci. Bioeng., 94(3), 264-270 (2002)

2. 学会発表

1) R. Kato, et al.: Hidden Markov Model-Based Prediction of Antigenic Peptides that Interact with MHC Class II Molecules, YABEC 2002, Nov. 10-12, Taiwan (2002)

2) 加藤竜司ら: 隠れマルコフモデルを用いた MHC class II 分子と相互作用するペプチドの予測、CBI 学会 (於: 東京)、(2002)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

特になし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
（総括・分担）研究報告書
アポトーシスに関する研究

分担研究者 田沼靖一 東京理科大学薬学部教授

研究要旨

本研究は創薬ターゲット分子として、癌細胞に特異的に発現していることが知られているデスリガンド/デス受容体系の一つである Fas リガンド (FasL)/Fas 系に焦点を絞り、当研究室で開発した *in silico* 分子設計手法を用いて、FasL/Fas 系を惹起できる新規なアポトーシス誘導ペプチド、(FRP-4)₄-MAP、を創成することができた。本分子設計の独創性は、タンパク質間相互作用を制御するペプチドをまずアミノ酸相補性指標により選別し、その相補ペプチドライブラリーの中から受容体タンパク質分子と最も強いアフィニティーをもつ「相補ペプチド」をドッキング複合体シミュレーションによる結合自由エネルギー評価により選択する方法論にある。本研究によるアポトーシス誘導性ペプチドの創成はこれまでにない癌治療薬の開発に新たな道を拓く可能性が充分にあると考えられる。

A. 研究目的

我々はこれまでに固型癌に対する新しい制癌剤の開発を目的として、種々の天然化合物の中からアポトーシス誘導能を有する低分子化合物の探索を行ってきた。その中で見出された数種の低分子有機化合物はいずれもミトコンドリアを介する経路でアポトーシスを誘導することを明らかにした。ここでさらに興味深いことに、アポトーシス誘導能は弱いがデスリガンド/デス受容体系の一つである Fas リガンド (FasL)/Fas 系に作用してアポトーシスを癌細胞に選択的に惹起できるペプチド性低分子化合物を見出した。この知見は、タンパク質間相互作用である FasL/Fas 系に対して、低分子性のペプチドが作用しうること示唆している。また、Fas と FasL との相互作用の立体構造の解析、及びポイントミューテーションやデリーションによる変異タンパク質の解析から、Fas 分子上の FasL 結合領域が決定され、十数アミノ酸残基が相互作用に重要であることが判明している。これらの知見をもとに我々は、「Fas 分子上の FasL 結合ドメインに特異的に結合できる合成ペプチドはアポトーシス誘導能を有する」と考え、アミノ酸相補性指標、及びペプチド-タンパク質複合体立体構造のドッキングモデルによる結合自由エネルギー評価により *in silico* でペプチドの分子設計を行った。

B. 研究方法

Fas 分子上の Fas 結合領域を RBD 法により 99-102 位であることを推定した。この部位は生化学的に結合領域として同定されている 97-110 位のほぼ中央に位置していることから、99-102 位のアミノ酸配列 SKCR を標的として

相補ペプチドを設計した。設計手法は、我々が開発したアミノ酸移動平均プロファイル波手法を用いて相関係数 R_t が -1 に近い順に 100 ケ選択し、1 次スクリーニングを行った。

二次スクリーニングは候補ペプチド 100 ケを Fas との複合体をコンピュータ上で形成することにより結合自由エネルギーが最小のペプチド WEDT を選択した。次に 3 次スクリーニングとして WEDT をリードペプチドとしてアミノ酸置換を実施し、最適化を行った。ここでは最終候補ペプチドとして WEWT を決定した。WEWT の K_i 値は $0.083 \mu\text{M}$ であった。

Fas は 3 量体で作用することから、Fas 3 量体の形成する空間 37 \AA 四方に WEWT ペプチドをうまくはまり込むようにするために、本ペプチドを MAP-8 を用いて 3 アミノ酸のアームを加えて 4 ブランチ化した。以下 (FRP-4)₄-MAP と略す。

(FRP-4)₄-MAP のアポトーシス誘導能をヒト卵巣癌培養細胞株 NOS4 とヒトグリオーマ細胞株 (U251-SP) をヌードマウスに脳内移植した担癌動物実験系を用いて調べた。

C. 研究結果

NOS4 を用いた *in vitro* 試験では (FRP-4)₄-MAP は濃度依存的にアポトーシスを誘導した。約 $30 \mu\text{M}$ の濃度において、約 50% のアポトーシス誘導能を示した。一方、U2561-SP/ヌードマウス *in vivo* 実験系では (FRP-4)₄-MAP を $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ で脳内担癌組織に局所注入した。30 日後に解剖し、常法によりホルマリン固定による脳組織切片プレパラートを作製し、光学顕微鏡下で観察したところ癌の萎縮が認められた。

D. 考察

我々が開発したアミノ酸平均移動プロファイル波形による相補ペプチド設計手法は FasL の作用を mimic できることが判明した。この結果は標的アミノ酸配列に対して任意のアミノ酸指標、例えば疎水度及び電気的特性に基づく指標等を設定し、各々のプロファイル波形の相補度の相関係数により順位付けして選択できる新規プログラムが開発できたことを意味する。

これまでのアポトーシス関連の研究から、アポトーシスシグナル及びその伝達は種々のタンパク分子間の相互作用で行われることが判明されてきている。また癌をはじめとする多くのアポトーシス疾患は、それらのタンパク間相互作用の変調及び異常によって発症してくることが示唆されている。この様なタンパク間相互作用を制御する低分子化合物をペプチドから設計していく我々の方法論は新薬開発にとって有効な戦略と考えられる。

E. 結論

我々が開発した分子設計ソフトウェアを用いてデザインしたペプチド化合物を化学合成し、アポトーシス誘導能を種々の培養ヒト癌細胞株を用いて調べたところ、すべてにおいてアポトーシスを惹起できることが判明した。さらに、ヌードマウスの脳内にヒトグリオーマを移植した脳腫瘍モデル実験動物系においてもその有効性が確認された。以上の結果から、アポトーシス誘導性ペプチドはこれまでにない癌治療薬の開発に新たな道を拓くばかりでなく、タンパク質間相互作用を制御する低分子性医薬品をペプチド及びそれをリードとした改変有機化合物として開発できる可能性が示唆される。また、本研究は癌治療の臨床応用に貢献できるものと考えられる。

F. 研究発表

論文発表

- (1) D. Shiokawa, T. Kobayashi, and S. Tanuma (2002) Involvement of DNase γ in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 31031-31037
- (2) D. Shiokawa, and S. Tanuma (2001) Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase γ during apoptosis. *Biochemistry.* 40, 143-152
- (3) T. Kojima, A. Yoshimori, A. Hayakawa, C. A. Del Carpio, and S. Tanuma (2000) Design of an Apoptosis-Inducing short

peptide using the system for macromolecular interaction assessment MIAX. *Genome Informatics* 11, 432-433

- (4) D. Shiokawa, M. Tanaka, T. Kimura, K. Hashizume, R. Takasawa, H. Ohyama, K. Fujita, T. Yamada, and S. Tanuma (2000) Characterization of two DNase γ -specific monoclonal antibodies and the in situ detection of DNase γ in the nuclei of apoptotic rat thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 343-349

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特願平 2002-258305 (出願中)

研究要旨

進行期悪性黒色腫患者に対する正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子製剤 IAB-1 を用いる遺伝子治療臨床研究につき、プロトコールと厚生労働省審議会への申請書を作成し、正式に申請した。ヒアリングの後に同省の作業委員会からコメントがあり、これに基づいてプロトコールと申請書の一部改訂作業を進めている。近日中に回答書とともに申請書を再提出する。正式な承認がえられたら、早期に臨床試験を開始する予定である。なお、その他の関連する研究として、角層を剥離した表皮に悪性黒色腫抗原ペプチド TRP-2、gp100 を塗布することによって感作リンパ球を誘導する治療法の基礎的研究を行い、また DNA チップ法によって新規ヒト悪性黒色腫抗原 FABP7 を同定した。

A. 研究目的

正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子製剤 IAB-1 を皮膚癌の内でもっとも悪性度の高い悪性黒色腫に臨床応用し、その安全性と有用性を検討することが最大の研究目的である。また、悪性黒色腫の免疫遺伝子治療に役立つ基礎的研究を推進し、その知見の臨床応用を目指す。具体的には悪性黒色腫抗原ペプチドの角層剥離皮膚への塗布による感作リンパ球の誘導に関する研究や DNA チップを用いる新たな悪性黒色腫抗原の探索などを行う。

B. 研究方法

1) 正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究：

A. 遺伝子治療臨床研究の申請：これまでに主任研究者の吉田らと実施した *in vitro*、*in vivo* の基礎的研究成果を根拠に、吉田らが実施中の悪性グリオーマへの遺伝子治療臨床研究のプロトコールも参照し、IAB-1 を用いる進行期悪性黒色腫患者の遺伝子治療臨床研究のプロトコールを作成し、厚生労働省へ申請し、承認をえて臨床試験を開始する。

B. プロトコールの概要：他に治療法のない第 IV 期の悪性黒色腫患者を対象とし、径 2 cm 程度までの皮膚・皮下・リンパ節転移巣へ DNA 量として 1 回 30 μ g までの遺伝子製剤を週 3 回、計 6 回注入し、安全性と効果を検討する。第 2 例目以降の症例で転移巣が多発している場合には、注入転移巣の個数を順次増数する。ただし、一度に局注する個数は 5 個までとする。また、局注転移巣などにおける遺伝子発現、浸潤リンパ球の解析などについても検索する。

2) 悪性黒色腫抗原ペプチドの角層剥離皮膚への塗布による感作リンパ球の誘導に関する基礎研究：

表皮角層は外来物質の侵入防御に大きな役割を果たしている。この角層のバリア機能が障害されると、表皮内に存在するランゲルハンス細胞が強く活性化することが知られている。したがって、角層を剥離して悪性黒色腫抗原ペプチドを塗布することにより、悪性黒色腫細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を効率的に誘導できる可能性がある。この仮説を B16 マウスメラノーマ/C57BL6 マウスの系で検証する。

3) DNA チップを用いる新たな悪性黒色腫抗原の探索：

悪性黒色腫については CTL に認識される抗原とその HLA 拘束性ペプチドがかなり多数知られているが、悪性腫瘍の形質発現の多様性を考えると、さらに新たな抗原ペプチドを発見・同定し、治療に利用できるようにすることが望まれる。そこで、DNA チップを用いてヒト悪性黒色腫細胞に発現する新規抗原の探索を行うこととした。

（倫理面への配慮）

今回、悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究に用いようとする遺伝子製剤 IAB-1 は名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室において作製される凍結乾燥製剤を用いるものであり、その規格・品質は GLP などの基準に基づき十分に保証されている。生物学的な安全性についても既に吉田らが十分に検討し、確認されている。本臨床試験の実施に際しては、患者に十分な説明を行い、文書に基づくインフォームドコンセントをうることを前提としている。本臨床研究の実施に関するプロトコールは既に信州大学医学部倫理委員会、同附

属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の審査、承認をえている。現在、厚生労働省の「がん遺伝子治療臨床研究作業委員会」にて審査中であり、その承認をえた上で実施するものである。なお、他の研究項目については実験動物（B57BL/6 マウス）を十分に愛護的に取り扱うように配慮する。

C. 研究結果

1) 正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究：

A. 申請経過：進行期悪性黒色腫患者に対する正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト B 型インターフェロン遺伝子を用いる遺伝子治療のプロトコールを作成し、信州大学医学部倫理委員会、同附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会へ臨床研究実施の申請書を提出し、平成14年3月4日に両委員会の承認をえた。また、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会において本遺伝子製剤を信州大学附属病院へ提供することが同年4月23日付で承認された。なお、遺伝子治療臨床研究の実施については、国の審査方式が改訂された旨の通知が平成14年3月27日付で文部科学省研究振興局長と厚生労働省大臣官房厚生科学課長の連名でなされたので、この様式に従った申請書を作成し、同年6月4日に厚生労働省へ出向き、大臣官房厚生科学課へ申請書を提出し、研究の概要につき担当官へ事前説明を行った。7月9日に同課より回答があり、名大で作製した遺伝子製剤を信州大へ運んで使用することに関する薬事法上の問題点の解決策などにつきアドバイスがあった。そこで分担研究者の信州大学医学部皮膚科松本和彦講師を名古屋大学医学部非常勤講師へ任用してもらい（平成14年8月16日付承認）、同年8月30日付で正式な申請書を厚生労働省へ提出した。9月30日に同省の厚生科学審議会に本申請が議題として取り上げられた。11月29日に開催されたがん遺伝子治療臨床研究作業委員会に斎田、水野が出席し、研究の概要を説明し、委員との間で質疑応答が行われた。平成15年1月22日に同委員会からの指摘事項が通知されたので、現在、それに沿って申請書の改訂を行っている。近日中に改訂作業を終え、申請書を再提出の予定である。

B. プロトコールの問題点と改訂：作業委員会の指摘に従って、いくつかの改定を行う。製剤は凍結乾燥製剤の単一ロットのものとし、製剤の運搬・保存・管理・品質管理に関する手順書を作成し、チェック体制を整える。注

入量については転移巣の大きさによって注入量を多少加減するとともに、病巣内とともにその周囲へも投与することとする。安全性・有効性の評価を長期間、適切に実施できるようにするとともに、患者への説明・同意についても改善すべき点を改める、などの改訂を行った。

2) 悪性黒色腫抗原ペプチドの角層剥離皮膚への塗布による感作リンパ球の誘導に関する基礎研究：

C57BL/6 マウス（4～6週令）の耳介皮膚にセロファンテープを貼付して剥離する操作を10回前後繰り返すことにより角層を除去した。悪性黒色腫の抗原ペプチドとしてはTRP-2(181-188)（マウス H-2K^b 拘束性）、TRP-2(180-188)（HLA-A*0201 拘束性）、mouse gp100 (EGSRNQDWL)、human gp100 (KVP PNQDWL) をそれぞれ溶媒（アセトン：オリブ油＝4：1）に溶解し、2mg/ml の濃度とし、上記の角層剥離耳介皮膚に塗布した。2週後にマウス腹部皮膚を除毛した上で同様の角層剥離操作を行い、ここにも各抗原ペプチドを塗布した。この2回目の感作より10日後にマウス皮下にB16メラノーマ細胞（1×10⁵個）を移植し、経時的に腫瘍径を測定した。また、感作マウスの頸部リンパ節と脾細胞よりリンパ球をえて、B16メラノーマ細胞および各ペプチドをパルスしたEL4細胞を対象として細胞傷害性試験を施行した。

その結果、TRP-2、gp100 いずれのペプチド塗布群でも溶媒塗布の対照群に比し、一部のマウスで腫瘍結節増大に多少の抑制傾向がみられたが、統計学的有意差はえられなかった。マウスの生存率にも有意差はみられなかった。また、細胞傷害性試験については頸部リンパ節由来のT細胞において弱いながらもE/T比依存性の傷害活性が認められた。脾細胞ではTRP-2 ペプチドでは傷害活性が認められなかったが、mouse gp100 ペプチドではCTL活性が弱いながらも認められた。

3) DNA チップを用いた新たな悪性黒色腫抗原の探索：

約40,000種類のヒトESTデータからなるDNAチップ（Affymetrix社）を用いた発現プロファイル比較により、ヒト悪性黒色腫に選択的に高発現する分子を同定し、その中から悪性黒色腫患者のIgG抗体に認識されるものを探索した（慶應大先端医研・河上教室との共同研究）。具体的には、発現指標値が色素細胞の10倍以上、他臓器組織の3倍以上の遺伝子を候補として選択し、PT-PCRとNorthern blottingにて発現特異性を確認した。次いで、同定分子の免疫原性を確認するため、ほぼ全

長の cDNA を PCR で単離し、λファージベクターに組み込んで、蛋白を発現させ、悪性黒色腫患者血清 IgG による認識を検討した。

このような方法で悪性黒色腫における高発現分子 31 種が同定されたが、この中には既知の黒色種抗原も多数含まれていた。そのうちで新規分子とみなされるものの一つとして fatty acid binding protein 7 (FABP7) が見出された。FABP7 は RT-PCR にて悪性黒色腫培養細胞 12 株中 11 株、黒色種組織 7 検体中 4 検体に発現がみられ、培養メラノサイトに高い発現がみられた。また、正常の脳と筋肉にも発現が検出された。Northern blotting においてもほぼ同様の発現が確認されたが、脳での発現程度は低いことが明らかにされた。FABP7 組換え λファージにて免疫原性を検討したところ、悪性黒色腫患者 26 例中 4 例でこれに対する IgG 抗体が検出された。

D. 考察

正電荷多重膜リボソーム包埋ヒト β 型インターフェロン遺伝子製剤 IAB-1 を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究は、厚生労働省の許可がえられ次第、開始する予定である。この研究に関係する諸検査については信州大学、名古屋大学、熊本大学に加え、慶應大学医学部先端医研の河上裕教授にも協力いただけることになっており、万全の体制で臨む。なお、吉田らにより本遺伝子治療と樹状細胞療法の併用が悪性黒色腫にきわめて有用との研究結果がえられているので、これについても多施設共同臨床試験などの体制を早急に組む方向で努力したい。

角層剥離皮膚へのペプチド塗布感作研究については、Seo らがきわめて強力な CTL 誘導がみられると報告しているが、今回のわれわれの研究結果ではそれほどの効果はえられなかった。しかし、角層剥離と抗原ペプチド塗布という容易な操作のみで CTL が誘導されるということは、治療戦略としてきわめて魅力的である。今後、サイトカインやアジュバントなどの併用による至適感作条件の検索を施行したいと考えている。

今回、DNA チップにより新たな悪性黒色腫抗原 FABP7 を同定することができた。前年度の SEREX 法による KU-MEL-1 抗原の同定とともに、悪性黒色腫の新規抗原の発見・同定は今後の免疫療法、免疫遺伝子治療の開発に大いに役立つものと思われる。

E. 結論

正電荷多重膜リボソーム包埋ヒト β 型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色

腫の遺伝子治療臨床研究については臨床試験開始の最終段階に入った。また、DNA チップ法にて悪性黒色腫の新規抗原を同定した。さらに角層剥離表皮への悪性黒色腫抗原ペプチド塗布による CTL 誘導の可能性につき基礎的研究を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oguchi M, Sagara J, Matsumoto K, Saida T, Taniguchi S: Expression of lamins depends on epidermal differentiation and transformation. *Br J Dermatol*, 147: 853-858, 2002
- 2) Kaneko M, Takeoka M, Oguchi M, Koganehira Y, Murata H, Ehara T, Tozuka M, Saida T, Taniguchi S: Calponin h1 suppresses tumorigenicity of src-induced transformed 3Y1 cells in association with decrease in vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 93:935-943, 2002
- 3) Saida T, Oguchi S, Miyazaki A: Dermoscopic findings in pigmented lesions of glabrous skin. ed. by Malvehy J & Puig S: Principles of Dermoscopy, CEGE, Barcelona, 2002, pp243-256
- 4) Saida T, Oguchi S, Miyazaki A: Dermoscopy for acral pigmented skin lesions. *Clin Dermatol* 20:279-285, 2002
- 5) Oguchi S, Kaneko M, Uhara H, Saida T: Docetaxel induced durable response in advanced extramammary Paget's disease: A case report. *J Dermatol* 29: 33-37, 2002
- 6) Nobayashi M, Mizuno M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J: Repeated cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer enhanced transcription efficiency against murine melanoma cell lines. *J Dermatol Sci* 29: 206-213, 2002
- 7) Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y: Lymphangiitis of the foot: Lymphatic drainage of the sole. *J Am Acad Dermatol* 47:502-504, 2002
- 8) Hayashi K, Ohkubo S, Watanabe T, Yamazaki Y, Horiuchi N, Saida T: Malignant melanoma on the sole showing prominent neural differentiation. *Int J Dermatol* 41: 247-249, 2002
- 9) Wakamatsu K, Kageshita T, Furue M, Hatta Y, Kiyohara Y, Nakayama J, Ono T, Saida T, Takata T, Tsuchida T, Uhara H, Yamamoto A, Yamazaki N, Naito A, Ito S: Evaluation of

- 5-S-cysteinyl-dopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience. *Melanoma Res* 12: 245-253, 2002
- 10) Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Sasaki K, Murata H, Saida T, Taniguchi S: Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular muscle inside melanoma lesions: An adverse prognostic factor of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 148: 2003 (in press)
- 11) Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, Suzuki O, Nobayashi M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J: Growth inhibition of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon- β gene therapy. *Melanoma Res* 13: 2003 (in press)
- 12) Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosan G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinowitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi Y, Fleming MG, Grichnik JM, Grin CM, Halpern AC, Johr R, Katz B, Kenet RO, Kittler H, Kreusch J, Malvehy J, Mazzocchetti G, Oliviero M, Ozdemir F, Peris K, Perotti R, Perusquia A, Pizzichetta MA, Puig S, Rao B, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Stanganelli I, Tanaka M, Westerhoff K, Wolf IH, Braun-Falco O, Kerl H, Nishikawa T, Wolff K, Kopf AW: Dermoscopy of pigmented skin lesions: Results of a consensus meeting via the internet. *J Am Acad Dermatol* 48: 2003 (in press)
- 13) 齋田俊明: メラノーマか否かそれが問題だ. 清水 宏編: 皮膚疾患のとらえ方, 文光堂, 東京, 2002, pp192-204
- 14) 齋田俊明: 小色素斑をみたら. 小野友道編, 発疹から病気がみえる, 文光堂, 東京, 2002, pp164-169
- 15) 齋田俊明: 色素異常症. 亀山正邦他編, 今日の診断指針第5版, 医学書院, 東京, 2002, pp74-76
- 16) 齋田俊明: 有棘細胞癌. 玉置邦彦他編, 最新皮膚科学大系 12 巻, 中山書店, 東京, 2002, pp66-81
- 17) 野呂佐知子, 山本明史, 山崎直也, 町田秀樹, 山崎自子, 宇原 久, 齋田俊明: 悪性黒色腫の新 AJCC 病期分類と現行 UICC 分類の比較検討: 本邦 342 例に関する解析. *Skin Cancer* 17:38-43, 2002
- 18) 石原和之, 齋田俊明, 山本明史: 悪性黒色腫の新 TNM 分類と解説ならびに新病期による統計 (1992~1996 年). *Skin Cancer* 17:113-118, 2002
- 18) 久保仁美, 齋田俊明: 黒い腫瘍の鑑別診断. *診断と治療* 90:1628-1633, 2002
- 19) 林 宏一, 齋田俊明: 皮膚癌. *総合臨床* 51:2635-2640, 2002
- 20) 齋田俊明: 悪性黒色腫と関連疾患, 玉置邦彦他編, 最新皮膚科学大系 11 巻, 中山書店, 東京, 2002, pp226-253
- 21) 齋田俊明: 悪性黒色腫 (メラノーマ), 植木宏明他編, 皮膚科専門医テキスト改訂第2版, 南江堂, 東京, 2002, pp665-673
- 22) 石原和之, 齋田俊明, 山本明史: 悪性黒色腫の統計 (1992-1996 年). *Skin Cancer* 17: 7-15, 2002
- 23) 宇原 久, 齋田俊明: 抗がん剤適正使用のガイドライン (案): 皮膚がん. *癌と化学療法* 29: 1074-1080, 2002
- 24) 齋田俊明, 塩原哲夫, 宮地良樹, 渡辺晋一 (共編): 今日の皮膚疾患治療指針第3版, 医学書院, 東京, 2002 (総頁 789 頁)
- 25) 齋田俊明: 黒色腫瘍を生じる皮膚疾患, ダーモスコピー, 悪性黒色腫. 宮地良樹他編, 皮膚疾患実践ガイド, 文光堂, 東京, 2002, pp32-33, pp75-78, pp604-607
- 26) 齋田俊明, 真鍋俊明, 上出良一, 三原一郎, 竹内紋子 (共著): メラノーマの病理組織診断: 症例検討から学ぶ診断のポイント. 文光堂, 東京, 2002 (総頁 158 頁)
- 27) 齋田俊明, 瀧川雅浩, 山本明史, 土田哲也, 宇原 久 (編集): 皮膚悪性腫瘍取扱い規約第1版. 金原出版, 東京, 2002 (総頁 205 頁)
- 28) 齋田俊明, 小口真司, 宮寄 敦: ダーモスコピー: 色素性皮膚病変の革新的診断法. *Visual Dermatol* 1: 76-87, 2002
- 29) 齋田俊明, 小口真司, 宮寄 敦, 田中勝: Consensus Net Meeting on Dermoscopy 2000. *臨皮* 56(増): 90-96, 2002
- 30) 齋田俊明: 皮膚癌. 山口 徹他編, 今日の治療指針 2003 年版, 医学書院, 東京, 2003, pp809-811
- 31) 齋田俊明: 悪性黒色腫, 日本臨床腫瘍研究会編, 臨床腫瘍学第3版, 癌と化学療法社, 東京, 2003 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Saida T: Workshop on Dermoscopy: Pigmented lesions of palms and soles. 20th World Congress of Dermatology, Paris,

- France, 2002.7
- 2) Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y: Lymphangitis of the foot demonstrating lymphatic drainage pathways from the sole. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002.7
- 3) Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Sasaki K, Murata H, Saida T, Taniguchi S: Prognostic significance of reduced expression of actin-binding proteins calponin-h1 and h-caldesmon in the vessels of primary melanoma. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002.7
- 4) Kawachi S, Kidoh K, Koga H, Hama H, Oguchi S, Minemura K, Saida T: A case report of Carney complex: The complex of myxomas spotty pigmentation, endocrine overactivity, and schwannomas. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002.7
- 5) Oguchi M, Sagara J, Matsumoto K, Saida T, Taniguchi S: Expression level of lamins depends on the epidermal differentiation and transformation. 20th World Congress of Dermatology, Paris, France, 2002.7
- 6) Yamazaki Y, Miyazaki A, Kubo H, Kawachi S, Saida T, Ota Y, Oguchi S, Ishihara Y, Horigome R, Miyashita T, Nakai K, Takizawa M, Murase S: Teledermatology conference among five hospitals using a videophone network. 3rd European Symposium on Teledermatology, Graz, Austria, 2002.11
- 7) 斎田俊明: 色素性病変をどう診るか、第18回日本臨床皮膚科医学会臨床学術大会(シンポジウム)、仙台、2002.4
- 8) 久保仁美、松本和彦、斎田俊明、影下登志郎、水野正明、吉田 純: ヒトβ型インターフェロンによる悪性黒色腫の遺伝子治療開発のための基礎実験(続報)、第101回日本皮膚科学会総会、熊本、2002.6
- 9) 山崎自子、小口真司、松本和彦、斎田俊明、太田由子、石原八州司、堀米玲子、中井桂司、滝沢正臣、村瀬澄夫: テレビ電話を用いた多施設間遠隔皮膚科カンファランス、第101回日本皮膚科学会総会、熊本、2002.6
- 10) 古賀弘志、河内繁雄、斎田俊明、徳田隆彦: Remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema (RS3PE) 症候群の1例、第101回日本皮膚科学会総会、熊本、2002.6.
- 11) 宮寄 教、小口真司、斎田俊明: 掌蹠の色素細胞母斑の dermoscopy 所見における fibrillar/filamentous pattern の成因について: 解剖学および病理組織学的検討、第101回日本皮膚科学会総会、熊本、2002.6
- 12) 尾藤利憲、渡辺衣里、市橋正光、神保孝一、金子史男、斎田俊明、大塚藤男、石川 治、瀬戸山充、神崎 保: 全国8大学皮膚科の共同による皮膚癌の発症因子と予防因子の症例対照研究、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.6
- 13) 林 宏一、斎田俊明: 内眼角部皮膚悪性腫瘍切除後の再建、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.6
- 14) 関 詩穂、島田 茜、新倉冬子、金児みわ子、小口真司、宇原 久、河内繁雄、斎田俊明、福沢正男: 合併症のため放射線療法を選択した上眼瞼メルケル細胞癌の2例、第18回日本皮膚悪性腫瘍学会、米子、2002.6
- 15) 小口美抄枝、相良淳二、松本和彦、斎田俊明、谷口俊一郎: 皮膚表皮性腫瘍におけるラミンの発現および局在の検討、第27回日本研究皮膚科学会、京都、2002.8
- 16) 金児みわ子、小口美抄枝、小金平容子、村田 浩、斎田俊明、谷口俊一郎: カルポニン h1(CNh1) の src-形質転換線維芽細胞 SR-3Y1 における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現低下と関連した造腫瘍性の抑制、第27回日本研究皮膚科学会、京都、2002.8
- 17) 斎田俊明: 皮膚悪性腫瘍の診断・治療の新展開、第40回日本癌治療学会総会(ワークショップ)、東京、2002.9
- 18) 宇原 久: 皮膚悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検の試み、第40回日本癌治療学会総会、東京、2002.9
- 19) 斎田俊明: 悪性黒色腫の基礎的研究と診断・治療の新展開、第53回日本皮膚科学会中部支部学術大会(シンポジウム)、岐阜市、2002.9
- 20) 古賀弘志、宇原 久、斎田俊明、松沢正浩、御子柴 甫: 血栓性微小血管症(thrombotic microangiopathy:TMA)を伴う高血圧性腎クリーゼを発症した全身性強皮症の1例、第53回日本皮膚科学会中部支部学術大会、岐阜市、2002.9
- 21) 金児みわ子、小口美抄枝、小金平容子、村田 浩、江原孝史、斎田俊明、江原孝史、竹岡みち子、谷口俊一郎: カルポニン h1(CNh1) の src-形質転換線維芽細胞 SR-3Y1 における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現低下と関連した造腫瘍性の抑制、第61回日本癌学会総会、東京、2002.10
- 22) 関 詩穂、小口美抄枝、斎田俊明、小口真司: 日本人における後天性色素細胞母斑の数と分布: メラノーマ患者と非メラノーマ患

者の比較、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002. 10

23) 関 新、相良淳二、増本純也、横山太郎、小金平容子、小口美抄枝、斎田俊明、谷口俊一郎：メラノーマにおけるアポトーシス関連分子 ASC の発現低下と ASC 遺伝子のメチル化について、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002. 10

24) 木藤健治、島田 茜、関 詩穂、金児みわ子、宇原 久、斎田俊明、樋口 誠：腎炎を合併した relapsing polychondritis の一例、第 66 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、つくば市、2002. 10

25) 墨矢咲子、宮寄 敦、木庭幸子、村田 浩、塩原順子、斎田俊明：悪性線維性組織球症 (MFH) の 1 例、第 66 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、つくば市、2002. 10

26) 後藤康文、鈴木ゆり子、猪爪隆史、斎田俊明、河上 裕：DNA チップを用いた悪性黒色腫抗原 FABP7 の同定、第 32 回日本免疫学会総会、東京、2002. 12

G. 知的所有権の取得状況

とくになし。

研究要旨

本研究は、悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する分子治療の可能性を探るため、さまざまな癌細胞へ遺伝子導入を試みた。遺伝子導入法としては、我々が以前より開発研究を進めている遺伝子治療用リポソームを中心に検討した。すなわちリポソームに EGFP、LacZ 等のマーカー遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を包埋し、各種癌細胞株や患者検体より誘導した初代培養細胞に遺伝子導入を行った。その結果、初代培養細胞を含む各種癌細胞で遺伝子発現が観察できた。一方、マーカー遺伝子をアデノウイルスに組み込んだアデノウイルスベクターと小型の 1 枚膜リポソームの複合体や、マーカー遺伝子をアデノ随伴ウイルスに組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを包埋した多重膜リポソーム（これらをハイブリッドベクターと呼ぶ）を使用することで、遺伝子発現効率は飛躍的に向上した。このことは、上記のハイブリッドベクターが悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する分子治療を行う際の有望なマテリアルになることを示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

リポソームは病原性がなく、抗原性も低いことから分子治療を行う際の遺伝子あるいはその他のマテリアルの運び屋、すなわちベクターとして有望視されている。一方、悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する治療法はまだ確立されておらず、早期に新規治療法の開発が求められている。遺伝子治療をはじめとする分子医療は、新規治療の候補に挙げられている。そこで本研究では、悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する分子治療の可能性を探るため、初代培養細胞を含む各種癌細胞へ遺伝子導入を試みた。ベクターには、カチオン性リポソームを用いた。また、遺伝子発現効率を高めるため、アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームの複合体や、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターを考案し、合わせて遺伝子発現効率を検討した。

B. 研究方法

1. カチオン性リポソームの調製

カチオン性リポソームとしては、我々が開発した N-(α - trimethylammonio) - acetyl-didodecyl glutamate chloride (TMAG)、dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC)、dioleoyl-phosphatidyl ethanol amine (DOPE) をモル比 1:2:2 で混合し、調製したものを使用した。このリポソームはすでに悪性脳腫瘍の患者に投与され、臨床で安全性と有効性が確認されている。

2. アデノウイルスベクターの調製

アデノウイルスベクターは、組換え型アデノウイルスベクターを 293 細胞に感染して増

殖させた後、セシウム密度勾配法を用いて分離精製した。

3. アデノ随伴ウイルスベクターの調製

アデノ随伴ウイルスベクターは、アデノウイルスフリーシステムで調製した。従来アデノ随伴ウイルスベクターの調製にはヘルパーウイルスとして野生型アデノウイルスが必要とされた。このため、アデノ随伴ウイルスベクター純化の際にアデノウイルスのコンタミネーションが避けられなかったが、我々は米国 Avigen 社の協力を得てアデノ随伴ウイルスベクターのコンタミネーションのないアデノ随伴ウイルスベクターの調製法を確立した。これはヘルパーウイルスとなるアデノウイルスの構成成分のうちの E2A、E4、VARNAS を発現させるプラスミドを構築し、このプラスミドをアデノウイルスの変わりに用いたシステムである。

4. ハイブリッドベクターの調製

アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混合した複合体と、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターをそれぞれ調製した。

5. 遺伝子発現

上記のベクターを初代培養細胞を含む各種癌細胞に添加した後、EGFP あるいは LacZ 遺伝子の発現をもって遺伝子発現効率を評価した。

C. 研究結果

1. 導入遺伝子の発現

マーカー遺伝子包埋リポソーム、アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混

合したハイブリッドベクター（複合体）、及びアデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターの3種類のベクターを調製し、その発現を *in vitro* で検討した。その結果、初代培養細胞を含む各種癌細胞で導入遺伝子の発現を確認した。発現効率は、アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混合したハイブリッドベクター（複合体）が最も高く、次いでアデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクター、プラスミド遺伝子包埋リポソームの順であった。初代培養細胞である NF2 患者から採取されたシュワン細胞腫細胞での遺伝子発現状況を図1に示す。

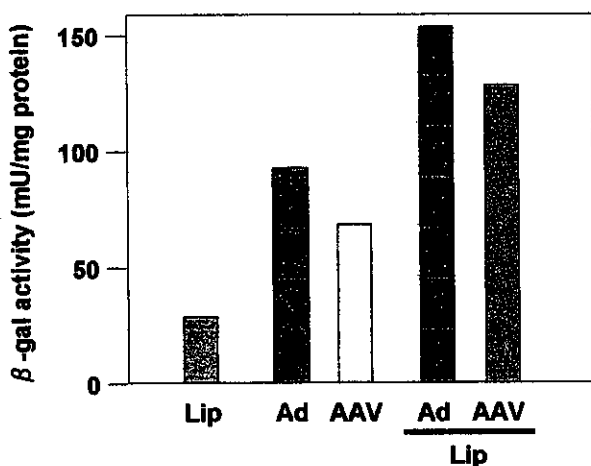


図1 ハイブリッドベクターのシュワン細胞腫初代培養細胞における遺伝子発現

Lip: Liposome、Ad: adenovirus vector、AAV: adeno-associated virus vector

2. 各種ベクターの特徴

アデノウイルスベクターは、一般に遺伝子発現効率が非常に高いが、免疫原性が高く、これが臨床応用の際の問題になっていた。このアデノウイルスベクターをカチオン性リポソームと混合してハイブリッド化することで、免疫原性が低下することがわかった。

一方、アデノ随伴ウイルスベクターは、生物学的活性を示すウイルス粒子の数が、調製されたウイルス粒子の 1/100-1/1,000 である。この欠点が、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋することで軽減することがわかった。

D. 考察

非ウイルスベクターの代表であるリポソームと各種ウイルスベクターを用いてハイブリ

ッドベクターを調製することは、それぞれのウイルスベクターのもつ欠点を補う、またはそれを軽減できる有用な方法であることが証明できた。また、いずれのベクターでも、初代培養のシュワン細胞腫に対し遺伝子導入ならびに発現が確認できたことは、当該システムが、悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する分子医療の開発に十分役立つと考えられた。

E. 結論

当該システムが、悪性脳腫瘍をはじめとする悪性腫瘍に対する分子治療の開発に十分役立つと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

53. Fukuhara H, Yamamoto N, Hayashi Y, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol*, in press.
54. Nakanishi H, Mizutani Y, Kawachi A, Ukimura O, Shiraishi T, Hatano M, Mizuno M, Yoshida J, Miki T. Significant antitumoral activity of cationic liposomes containing human interferon- β gene against human renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*, in press
55. Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, Suzuki O, Nobayashi M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Growth inhibition of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon-beta gene therapy. *Melanoma Res*, in press
56. Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N and Colosi P. Antitumor effect of an experimental intracranial human glioma by adeno-associated virus vector containing the human interferon- β gene. *Jpn J Cancer Res*, 93: 223-228, 2002
57. Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, Nagatani N, Mizuno M, Yoshida J, Kadomatsu K, Muramatsu H, Nakao A, Muramatsu T. Reduction of α -galactosyl xenoantigen by expression of endo- β -galactosidase C in pig endothelial

- cells. *Xeno-transplantation* 9: 290-296, 2002.
58. Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse subcutaneous glioma model. *Cancer Gene Ther*, 9: 825-829, 2002
 59. Nobayashi M, Mizuno M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Repeated cationic liposome-mediated gene transfer enhanced transduction efficiency against murine melanoma cell lines. *Journal of Dermatological Science*. 29:206-213, 2002
- gene therapy for malignant glioma: clinical trials. The Japan Society of Gene Therapy's 8th Annual Meeting. (2002, July 18-20, Tokyo).
9. Mizuno M, Saito R, Hatano M, Yoshida J. Interferon- β gene therapy for human glioma cells by heat-inducible adeno-associated virus vectors and low-temperature hyperthermia. The American Society of Gene Therapy's 5th Annual Meeting. (2002, June 5-9, Boston, USA).

2. 学会発表

1. Yoshida J. Basic and Clinical Studies of Cancer Gene Therapy in Central Nervous System. The International Symposium on Drug Delivery to the Central Nervous System: Bridging the Gap between Fundamental and Applied Science (ISDDC). (2003 Jan. 29-31, Tokyo)
2. 水野正明、斉藤 清、吉田 純 神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性 厚生労働省班研究 (平成14年12月20日、福岡)
3. 吉田 純 ベクター・コアバンクにおけるリポソームの位置づけ 文部科学省科学技術振興調整費 知的基盤整備推進シンポジウム (平成14年11月15,16日、つくば)
4. 水野正明、吉田 純 メラノーマの遺伝子治療の新しい展開 第40回日本癌治療学会総会 (平成14年10月16-18日、東京)
5. 水野正明、斉藤竜太、波多野 学、吉田 純 悪性グリオーマに対するヒト β 型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第61回日本癌学会 (平成14年10月1-3日、東京)
7. 水野正明、斉藤竜太、波多野 学、吉田 純 悪性グリオーマに対するヒト β 型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第61回日本脳神経外科学会総会 (平成14年10月2-4日、松本)
8. Yoshida J, Mizuno M, Kajita Y, Fujii M, Wakabayashi T. Human beta-interferon

研究要旨

ヒト染色体セントロメア由来アルフォイド DNA をヒト培養細胞へ導入すると安定に分配維持されるヒト人工染色体と機能的セントロメア構造を形成する。この配列中の CENP-B タンパク結合配列に 2 塩基だけ置換を導入した変異型配列では人工染色体を形成せず、CENP-B の結合がアルフォイド DNA 上へのセントロメア構造形成に必要であることがわかった。また、人工染色体前駆体へ挿入した遺伝子からの強い転写活性は、人工染色体形成に阻害的な影響を与えた。そこで、人工染色体上でセントロメア形成領域と遺伝子からの転写領域を分離することでこの問題を克服可能かどうか検討した。

A. 研究目的

本研究課題では、ヒト培養細胞中で安定保持されるヒト人工染色体 (MAC) を作成し、染色体安定維持の機構解明をめざすと共に、MAC を用いた染色体工学を進展させ遺伝子治療へ応用する基本技術の開発を目的としている。

B. 研究方法

1) 染色体安定維持に必要な機能配列の限定：ヒト人工染色体を効率よく形成する I 型アルフォイド DNA の野生型繰り返し配列とセントロメアタンパク CENP-B 結合配列に 2 塩基だけ置換を導入した変異型のアルフォイド繰り返し配列、CENP-B 結合配列以外をアルフォイド配列から代えた非アルフォイド繰り返し配列をそれぞれ合成し、大腸菌環状人工染色体 (BAC) へクローン化した。この配列をヒト培養細胞へ導入し、人工染色体形成に必要な配列の限定を進めた。

2) MAC を用いた染色体工学：MAC 前駆体へ挿入したマーカー遺伝子からの転写を効率よくおこさせる技術の開発を進めるため、この遺伝子からの転写とクロマチン構造、人工染色体形成との関連について調べた。さらにこのマーカー遺伝子の両外側に・-グロビン遺伝子由来境界配列を挿入し人工染色体前駆体へ組み込んだ。

C. 研究結果

1) I 型アルフォイド DNA でも野生型繰り返し配列はヒト培養細胞中で人工染色体と機能的セントロメア構造を効率よく形成した。ところが CENP-B 結合配列を 2 塩基だけ置換した変異型のアルフォイド繰り返し配列や非アルフォイド繰り返し配列では全く人工染色体

を形成しなかった。この結果は、アルフォイド配列への CENP-B の結合が人工染色体やセントロメア機能構造形成に必須であることを示している。

2) MAC 前駆体へ挿入した薬剤耐性遺伝子から弱い転写をおこさせることで、セントロメアクロマチン構造形成を活性化させることがわかった。その反面、強力なプロモーターからの転写は人工染色体形成を阻害した。転写活性とセントロメア構造形成或いは人工染色体形成のメカニズムは強く影響しあうことが判明した。そこでこの問題を克服する目的で、薬剤耐性遺伝子の両外側に・-グロビン遺伝子由来境界配列を挿入し、セントロメア構造と挿入遺伝子のクロマチン構造を分離する試みを行ったが、有効な結果は得られなかった。そこで強力なプロモーターからの転写が起こる前駆体 DNA と弱い転写によりセントロメア構造形成を効率よく起こす前駆体 DNA を 1 対 10 のモル比で細胞へ混合導入し、人工染色体上での強力なプロモーターの存在する比率を低下させた。その結果、強いプロモーターからの転写も両立できる人工染色体を形成させることが可能であることがわかった。

D. 考察

1) 達成度：ヒト人工染色体、セントロメア構造形成に必要な配列の限定が進み、CENP-B 結合配列を含むアルフォイド DNA の繰り返し配列はヒト培養細胞中で人工染色体を効率よく形成し、この配列上に機能的セントロメア構造が形成されることがわかった。ところが CENP-B 結合配列を 2 塩基だけ置換した変異型のアルフォイド繰り返し配列や非アルフォイド繰り返し配列では全く人工染色体やセント

ロメア構造形成は起こらなかった。これらの結果から染色体安定維持に必要な機能配列は CENP-B 結合配列を含むアルフォイド DNA に限定され、目標の多くが達成できた。挿入遺伝子からの強い転写活性は人工染色体形成に阻害的に働くが、強い転写活性領域の存在比を低くしてセントロメア構造形成領域と遺伝子領域を人工染色体上で分離することでこの問題を克服できる見通しがついた。

・・・研究成果の意義：セントロメア形成に必要なアルフォイド DNA ・・・21-I・・・の配列や挿入遺伝子からの転写とセントロメア構造や人工染色体形成との関連を明らかにしたことで、人工染色体の形成効率を向上させることが可能となった。さらに強い転写活性が人工染色体形成に与える阻害効果の解明につながる糸口が得られた。これらの成果は遺伝子導入ベクターとしての人工染色体技術の向上につながるると共に、染色体レベルでは不明な点が多く残されている基礎学術研究にとっても貴重な情報を提供した。

・・・今後の展望：他のヒト培養細胞株や正常なマウス受精卵でも人工染色体形成の基礎的な研究を行うとともに、リボソームを用いた導入方法や人工染色体への挿入遺伝子からの発現コントロールへと研究を進展させることが実用的な人工染色体ベクターの開発につながると期待できる。

E. 結論

人工染色体とセントロメア機能構造形成にはアルフォイド DNA の繰り返しと CENP-B の結合が必要である。人工染色体前駆体へ挿入した遺伝子からの強い転写活性は人工染色体形成に阻害的な影響を与えた。そこで、人工染色体上でセントロメア形成領域と遺伝子からの転写領域を分離することでこの問題を克服することが可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Suzuki, Y. Mizutani-Koseki, Y. Fujimura, H. Miyagishima, T. Kaneko, Y. Takada, T. Akasaka, H. Tanzawa, Y. Takihara, M. Nakano, H. Masumoto, M. Vidal, K. Isono and H. Koseki: Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development.*, 129, 4171-4183 (2002)

J. Ohzeki, M. Nakano, T. Okada and H. Masumoto: CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J. Cell Biol.* 159, 765-775 (2002)

舛本 寛、中野めぐみ、大関淳一郎：セントロメアの構造と機能. *実験医学*, 20, 1550-1556 (2002)

舛本 寛：哺乳類人工染色体. *日本生化学会編：バイオサイエンスの世紀*, 15, 生命工学, 23-32 (2002)

2. 学会発表

中野めぐみ、鈴木伸卓、大関淳一郎、舛本寛：*De novo assembly, inactivation and re-assembly of centromere chromatin of Human Artificial Chromosomes.* 国際イネゲノムワークショップ 2002、つくば、2002年2月7日

舛本寛：ヒト染色体セントロメアの新規形成とクロマチン再構成. 第55回日本細胞生物学会大会、2002年5月21日

舛本寛：ヒト染色体セントロメア構造形成とダイナミクス. 第75回日本生化学会大会、京都、2002年10月14日

H. Masumoto: Centromere chromatin assembly on human artificial chromosomes. *CREST Int. Symp. "Structure and Function of Plant Centromere"*, 倉敷、2002年11月15日

舛本寛、中野めぐみ、大関淳一郎、岡本康秀：アルフォイド DNA に依存したセントロメア構造形成と不活性化の機構. 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月12日

大関淳一郎、中野めぐみ、岡田晃明、舛本寛：CENP-B box 配列は新規セントロメア構造形成に必須であるが、十分ではない. 第25回日本分子生物学会年会、2002年12月13-14日

中島大、大西涼子、金田安史、舛本寛：アルフォイド配列外クロマチンの新規セントロメア構造形成への影響. 同上

H. Masumoto: Essential Sequences for Centromere Assembly Assessed by the Human Artificial Chromosome Assay. *Australia-Japan Symposium on Biomedical Sciences: Melbourne, Australia, February 23-24, 2003*

G. 知的所有権の出願・取得状況 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukuhara H, Yamamoto N, Hayashi Y, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J.	Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell line.	Oral Oncol	in press		
Nakanishi H, Mizutani Y, Kawauchi A, Ukimura O, Shiraishi T, Hatano M, Mizuno M, Yoshida J, Miki T.	Significant antitumoral activity of cationic liposomes containing human interferon- β gene against human renal cell carcinoma.	Clin. Cancer Res	in press		
Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, Suzuki O, Nobayashi M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J.	Growth inhibition of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon-beta gene therapy.	Melanoma Res	in press		
Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, Sasaki K, Murata H, Saida T, Taniguchi S	Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular muscle inside melanoma lesions: An adverse prognostic factor of malignant melanoma.	Br J Dermatol	in press		
Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, et al.	Dermoscopy of pigmented skin lesions: Results of a consensus meeting via the internet.	J Am Acad Dermatol	In press		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Saito K, Yoshida J, Seo H	Expression of PPAR γ and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines.	JJCR	93(6)	660-666	2002
Sakano S, Hasegawa Y, Murata Y, Ito T, Genda E, Iwata H, Ishiguro N, Seo H	Inhibitory effect of FGF on endochondral heterotopic ossification.	BBRC	293	680-685	2002
Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H	Inhibition of NF- κ B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells.	Breast Cancer Research and Treatment	73:	237-243	2002
Wakabayashi K, Kambe F, Nagaya T, Kato M, Saito K, Yoshida J, Seo H	Effect of PPAR γ ligand on TNF α -dependent expression of EGF receptor in human glioma cell line.	Environmental Medicine	45	33-35	2002
Murakami R, Kambe F, Mitsuyama H, Okumura K, Miwata S, Yamamoto R, Seo H J.	Effect of epidermal growthfactor and cyclosporin a on interleukin-8 gene expression in human aortic smooth muscle cells.	Environmental Medicine	45	48-51	2002
Mitsuyama H, Kambe F, Murakami R, Ishiguro N, Seo H	Analysis of interleukin-8 gene promoter function in human osteoblast-like cells: regulation by Ca ²⁺ -signaling and Cyclosporin A.	Environmental Medicine	45	52-54	2002
H. Noguchi, et al.	Hidden Markov model-based prediction of antigenic peptides that interact with MHC class II molecules	J. Biosci. Bioeng.	94(3)	264-270	2002
D. Shiokawa, T. Kobayashi, and S. Tanuma	Involvement of DNase γ in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells.	J. Biol. Chem.	277	31031-31037	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oguchi M, Sagara J, Matsumoto K, Saida T, Taniguchi S	Expression of lamins depends on epidermal differentiation and transformation.	Br J Dermatol	147	853-858	2002
Kaneko M, Takeoka M, Oguchi M, Koganehira Y, Murata H, Ehara T, Tozuka M, Saida T, Taniguchi S	Calponin h1 suppresses tumorigenicity of src-induced transformed 3Y1 cells in association with decrease in vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis.	Jpn J Cancer Res	93	935-943	2002
Saida T, Oguchi S, Miyazaki A	Dermoscopic findings in pigmented lesions of glabrous skin.	Principles of Dermoscopy, CEGE, Barcelona,		pp243-256	2002
Saida T, Oguchi S, Miyazaki A	Dermoscopy for acral pigmented skin lesions.	Clin Dermatol	20	279-285	2002
Oguchi S, Kaneko M, Uhara H, Saida T	Docetaxel induced durable response in advanced extramammary Paget's disease: A case report.	J Dermatol	29	33-37	2002
Uhara H, Saida T, Watanabe T, Takizawa Y	Lymphangitis of the foot: Lymphatic drainage of the sole.	J Am Acad Dermatol	47	502-504	2002
Hayashi K, Ohkubo S, Watanabe T, Yamazaki Y, Horiuchi N, Saida T	Malignant melanoma on the sole showing prominent neural differentiation.	Int J Dermatol	41	247-249	2002
Wakamatsu K, Kageshita T, Furue M, Hatta Y, Kiyohara Y, Nakayama J, Ono T, Saida T, Takata T, Tsuchida T, Uhara H, Yamamoto A, Yamazaki N, Naito A, Ito S	Evaluation of 5-S-cysteinyl-dopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience.	Melanoma Res	12	245-253	2002
Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N and Colosi P.	Antitumor effect of an experimental intracranial human glioma by adeno-associated virus vector containing the human interferon- β gene.	JJCR	93	223-228	2002