

2. m-CRA化戦略の有用性 (癌治療効果を維持した癌特異標的化の向上)

筆者らは本技術を用いて, Surv.CRAwt以外にも様々な新規m-CRAを開発している. 本技術の利点は前述のごとく迅速・効率良く新規CRAを開発できることに加え, 単一因子で増殖制御/癌特異化するこれまでのCRAとは一線を画く, 多因子で厳密に癌特異化する“m-CRA”を種々作製, 解析できることである. この点から筆者らは, 癌特異的に高発現する異なる2種類の分子のプロモーター, そしてE1A, E1Bを野生型, 変異型を組み合わせた4種類のm-CRAを作製し, 機能解析を行った. 図5にはその一部を示したが, “癌治療効果を維持して, さらなる癌特異性の向上(つまり癌細胞では旺盛にウイルスが増殖して癌細胞を効果的に殺していくが, 正常細胞ではウイルス増殖がほぼ完全に阻止される)”を可能とする“m-CRA化”が確立されつつある. このような人工変異ウイルスが実際にどのような性能を示すかは, 最終的に詳細な生物学的解析と治療実験を行わない限り, 確定できない. このようなm-CRAの網羅的な比較解析は, “効率的なm-CRA作製技術がない”という技術制約のためこれまで困難であったわけだが, 本技術によりそれが可能となり, 実際にm-CRA化が有望であるという成果を得ている. また筆者らは, 治療遺伝子/プロモーターを挿入したm-CRA化(すなわち6因子m-CRA)も種々作製し, その有用性も検証しているところである.

IV. 今後の展望

このように本技術を用いることにより, m-CRAによる癌遺伝子治療研究が飛躍的に進むことが期待される. 今後筆者らは, Surv.CRAwtのより高度な癌特異化とより強力な癌治療効果を可能とするm-CRA化, Surv.CRAwtを凌ぐさらに画期的な新規m-CRAの開発などに取り組み一方, RNAi発現システムの搭載やファイバーの改変など本システムのさらなる改良・発展も目指している.

また一方, 本技術は, この10年で様々な標準化作製技術が開発されキット販売もなされている“非”増殖型ADVのように, 一般の研究者にもm-CRAを使用する研究手法を提供できるものである. m-CRAの目的分子依存性のウイルス増殖能は未知の分子の機能解析にも応用可能であり, また*in vitro*, *in vivo*の高効率・目的細胞特異的な遺伝子導入ベクターという点でも, 様々な基礎研究に応用可能と思われる. このため筆者らは, 本技術の本邦での一般試薬販売化, 受託作製供給の体制整備も目指している.

謝辞 本稿で紹介した筆者らの研究は, 永野 聡先生, 鹿児島大学 小宮節郎教授, 岐阜大学 藤原久義教授との共同研究です. ご協力いただいた緒先生に深謝いたします.

— 文献 —

- 1) Chen SH, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92: 2577-2581
- 2) Caruso M, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93: 11302-11306
- 3) Chen SH, et al: Cancer Res (1996) 56: 3758-3762
- 4) Terazaki Y, et al: Hepatology (2003) 37: 155-163
- 5) Nagano S, et al: Int J Oncol (2004) 24: 549-558
- 6) Ikoma T, et al: Clin Cancer Res (2004) 10: 1192-1200
- 7) Yuge K, et al: Int J Oncol (2005) 27: 77-85
- 8) Heise C, et al: Nat Med (1997) 3: 639-645
- 9) Chu RL, et al: Clin Cancer Res (2004) 10: 5299-5312
- 10) Nagano S, et al: Gene Ther (2005) 12: 1385-1393
- 11) Ambrosini G, et al: Nat Med (1997) 3: 917-921
- 12) Li F, et al: Nature (1998) 396: 580-584
- 13) Altieri DC: Trends Mol Med (2001) 7: 542-547
- 14) Mesri M, et al: J Clin Invest (2001) 108: 981-990
- 15) Yamamoto T, et al: Eur J Cancer (2002) 38: 2316-2324
- 16) Kamizono J, et al: Cancer Res (2005) 65: 5284-5291

最新医学・第60巻・第8号 (2005年8月号 別刷)

特集 幹細胞生物学の新たな展開

ES 細胞の心筋分化と再生医学への技術開発

高橋知之 藤原久義

國貞隆弘 小財健一郎

最新医学社

ES細胞の分化

ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発

高橋知之^{*1*2*3} 藤原久義^{*4}
 國貞隆弘^{*5} 小財健一郎^{**1*3*6}

要 旨

無限増殖・多分化能を持つES細胞は、発生学研究、さらに臓器移植に代わる移植用ドナー細胞として有用である。特に再生医学の実現には、分化誘導の特異性と効率の向上、目的細胞を同定・単離する標準化技術の確立が必要となる。本稿では筆者らの成果を中心に、効率的な心筋分化誘導法と、遺伝子治療技術を導入したES細胞由来の目的細胞を確実に同定・単離できる画期的新技术を、ヒトES細胞の結果と併せて概説する。

再生医療について

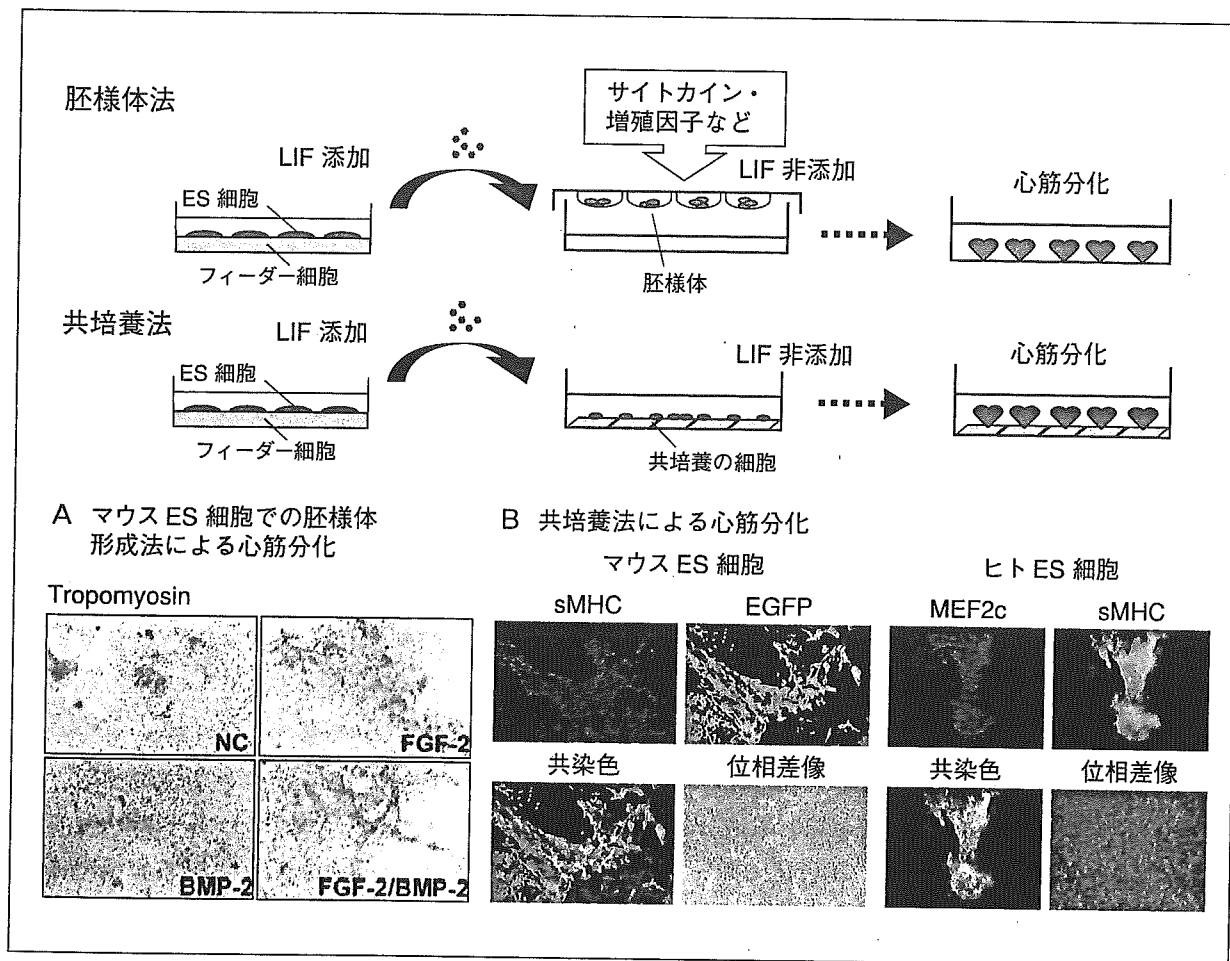
21世紀の先端医療として再生医療（医学）の開発が期待されている。しかし再生医療と言ってもさまざまであるが、大きくは再生誘導タンパク質・遺伝子の投与による「生体内再生療法」^{1)~3)}、「骨髄（幹）細胞」を利用した「再生療法」、「組織幹細胞」や「胚性幹細胞（ES細胞）」を用いた「再建療法」の3つに分類できる⁴⁾⁵⁾。生後も再生能を保持する肝臓、皮膚、血管、造血器などの疾患には「生体内再生療法」は理想的であるが、ただ

生後は再生能を喪失する脳神経や心臓では治療効果に限界もある⁶⁾⁷⁾。また「骨髄（幹）細胞」を利用した再生医療は臨床化しやすい利点がある一方、治療効率や科学的メカニズムなどで解決すべき点も多い。そこで特に心筋梗塞に代表される自律再生能を持たない心臓などの難治性疾患には、ドナー不足の問題を抱える臓器移植に代わり、胚性幹細胞（ES細胞）による「再建療法」の開発が期待されている（組織幹細胞の臨床応用化には、採取可能な臓器に限られるという絶対的制限、大量培養技術の確立など解決すべき問題がある）。しかしその臨床実用化のためには、①目的細胞のみを特異的に効率良く分化誘導する方法、②その目的細胞のみを同定・単離する技術、③細胞移植治療法の確立が必要となるが、いまだ①、②の基盤技術が十分に確立されておらず、よって現段階ではその基礎研究開発こそが急務である。本稿では心筋細胞をモデルとして、ES細胞の分化誘導

*1 久留米大学高次脳疾患研究所
 遺伝子治療再生医学部門 助教授 **1 同 教授
 *2 久留米大学医学部 創薬再生医療学講座
 *3 岐阜大学医学部 遺伝子治療再生医科学講座
 *4 岐阜大学大学院医学研究科 再生医科学
 循環病態学 教授
 *5 同 組織・器官形成 教授
 *6 久留米大学医学部 小児科学講座

キーワード：ヒト胚性幹細胞、遺伝子治療ベクター、心筋分化、再生医学

図1 ES細胞の分化誘導法



胚様体形成後 17 日目 (A), 共培養後 10 日目 (B) の免疫染色像。

略語：巻末の「今月の略語」参照

法, 分化した目的細胞の同定・単離技術, そしてヒト ES 細胞を用いた研究における筆者らの成果を中心に, ES 細胞による再生医学について概説する。

ES 細胞の分化

マウス ES 細胞は, 胚盤胞に戻されるとホスト組織とともに正常の組織発生に寄与し, 胎盤などの外部組織を除くすべての細胞に分化することができる。この ES 細胞の「多分化能」を利用し, 心筋細胞, 血管内皮細胞, 血液細胞, 神経細胞, グリア細胞, インスリン分泌細胞, 色素細胞などへの *in vitro* での分化誘導が報告されている⁸⁾。一方, ヒト ES 細胞は生命倫理的な問題から胚盤胞へ戻

すといった実験が不可能であるが, 免疫不全マウスへの皮下移植実験より, 内, 中, 外胚葉のいずれにも由来する組織が奇形腫内に形成されることから, マウス ES 細胞と同様に多分化能を保持するものと理解されている⁹⁾。

1. 胚様体法

分化誘導法としては, 未分化維持に必要な LIF を除いて ES 細胞を浮遊培養する胚様体 (embryoid body) 形成法が最も広く用いられている (図 1)。球状の胚様体内では胎仔発生を模倣し, 3 葉形成, そして上述のような種々の成熟細胞が効率的に分化誘導されるものと考えられている⁸⁾。特に心筋細胞の分化誘導に関するこれまでの報告はいずれもこ

の胚様体形成法に限られ、それに種々のサイトカインや増殖因子、ビタミン類などの化学物質の添加によってさらなる分化誘導の効率の上昇を試みたものである。筆者らは胚様体形成法に、心臓の発生に必須の増殖因子である BMP-2 と FGF-2 を至適濃度で添加することで、ES 細胞から心筋細胞への分化誘導効率の上昇に成功した⁹⁾。興味深いのは、これまでの発生学的研究報告から予想していたより比較的低濃度で、そして胚様体形成初期の3日間のみ FGF-2 と BMP-2 を添加したときに、最大の心筋分化誘導効果が得られたことである。FGF-2 や BMP-2 は心臓発生に先立つ中胚葉誘導の本体であり、この ES 細胞分化初期の3日間は個体発生の3葉形成期に相当する。この結果は、分化に必須の因子とはいえ、単純に長時間・多量を作用させれば目的細胞の分化誘導が促進されるわけではなく、よって今後臨床応用化をにらんだヒト ES 細胞での効率的な分化系の確立においても、添加する分化促進因子の生理的な至適濃度や添加時期を慎重に検討する必要があることを示している。

2. 共培養法

もう1つの分化誘導法は他の細胞と ES 細胞を共培養する方法であり、マウス ES 細胞に関しては、あるストローマ細胞上で共培養することで血液細胞や神経細胞など特定の細胞種が分化誘導できることが報告されている(図1)⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾。特にヒト ES 細胞においては、単一細胞化すると増殖能の喪失が見られ、また胚様体形成も容易ではないなどの技術的な問題があり、マウス ES 細胞での胚様体形成法が必ずしもヒト ES 細胞にはそのまま応用できないことを筆者らも経験している。そこで筆者らは、さまざまな培養細胞をスクリーニングした結果、胚様体の形成なしに共培養によりマウス ES 細胞から心筋細胞へ分化誘

導できる方法を初めて開発した(図1, 投稿準備中)。すなわち、スクリーニングによって得られた細胞とマウス ES 細胞を共培養するだけで、培養の経過に伴って Nkx2.5 や GATA-4, MEF2c といった転写因子や sarcomeric myosin heavy chain (sMHC), Troponin I のようなサルコメアを形成する心筋分化マーカーの発現が認められ、ES 細胞から自動収縮する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。さらに筆者らの用いているヒト ES 細胞株では、胚様体形成法では自動収縮する心筋細胞がほとんど認められなかったのに対して、共培養法では心筋分化マーカーを発現し、自動収縮する心筋細胞を誘導できることを確認している。

3. その他の分化誘導法

そのほかにもコラーゲンなどの細胞外マトリックスを利用することによって、2次元培養下に単一の ES 細胞から系統的に血管構成細胞を分化誘導できることが報告されている⁸⁾¹²⁾。同様に心臓においても、先天性心疾患の治療などを想定した場合、今後は ES 細胞から「細胞」だけでなく「組織」構築の創出も必要となるであろう。

ES 細胞由来の目的細胞の同定と単離

1. 従来の単離技術とその限界

上述のように ES 細胞による目的細胞の分化誘導法の開発が試みられ、中には効率良く分化誘導できている細胞種もあるものの、しかし完全に目的細胞のみを特異的に分化誘導することは現時点では不可能である。よって ES 細胞による再建療法(細胞移植療法)を実用化するには、その分化誘導された目的細胞のみを同定して単離する技術の確立が必須となる。また一方、ES 細胞から分化過程の各段階での細胞を特異的に単離できれば、*in vitro* の系で細胞・遺伝子レベルで組織の分

化メカニズムが効率良く探索できることとなり、発生学における有用な新たな研究手技となると考えられる。細胞膜表面抗原マーカーを蛍光抗体で可視化し、セルソーターで単離するという手技が確立している血球・血管系細胞などの特定の細胞種においては、実際にES細胞から単離された目的細胞を用いてさまざまな分化メカニズムが解明されてきた¹²⁾。しかし、心筋細胞や神経細胞をはじめとするほとんどの細胞ではマーカーとなる細胞表面抗原は知られておらず、そのためこのような一般的な細胞種の単離に用いられる唯一の方法は、組織特異的遺伝子のプロモーター制御下にレポーター遺伝子が発現するような遺伝子構築を安定導入されたES細胞株を作製するということである。つまり、そのES細胞株を分化誘導させると、目的細胞種に分化したES細胞のみが特異的に可視化されるはずであるから、後はその可視化細胞をセルソーターで単離するという戦略である³⁾。

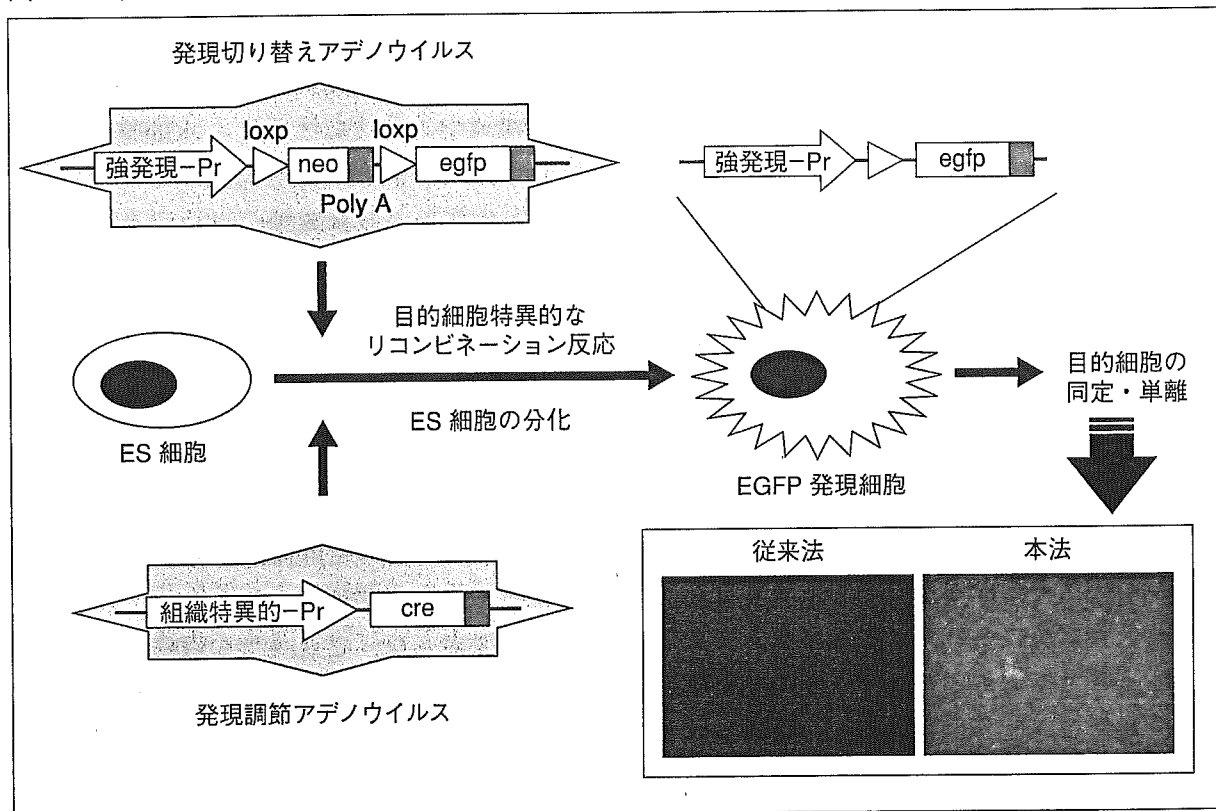
例えばマウスES細胞由来の心筋細胞の同定においては、 α MHC¹³⁾、 α Actin¹⁴⁾、ventricular myosin light chain 2 (MLC2v)¹⁵⁾といったサルコメアを構成する各遺伝子のプロモーターでレポーター遺伝子を発現させた方法が報告されている。しかし、これらは成熟心筋細胞で発現する遺伝子のプロモーターであるため、収縮・拍動する成熟心筋細胞は単離できても、心筋分化初期の細胞や心筋前駆細胞の単離は不可能であった。最近、心臓発生初期に発現するNkx2.5遺伝子座にGFP遺伝子をノックインしたES細胞を用いた心筋細胞単離法が報告されたが、実際に単離されている心筋細胞はやはりサルコメアタンパク質を発現する分化の進んだ心筋細胞である¹⁶⁾。筆者らはその原因を検討したが、これはNkx2.5遺伝子の転写因子のプロモーター活性が元来弱く、さらに分化初期段階ではより活性が低いため、可視化できるほどのレポ-

ーターの蛍光タンパク質が産生されないことが理由であった。つまり、これまでの手技はその遺伝子構築と細胞株の作製に多大な労力と時間が費やされるだけでなく、目的遺伝子のプロモーター活性に完全に依存してしまうため、ES細胞から目的細胞（特に未分化の細胞）の同定・単離が結局は不可能という場合が少なくないと想像される。つまりこの問題こそが、ES細胞を用いた再生医学の実現において解決すべき最重要課題であると考えられた。

2. ES細胞由来の目的細胞を確実に同定・単離できる新技術

そこで筆者らは、これまでの遺伝子治療の基礎研究でのバックグラウンドも生かし、アデノウイルスベクターとリコンビネーションシステムによるES細胞由来の目的細胞を単離・同定する新しい技術「Adenoviral conditional targeting法」を開発した（図2，投稿中）。まずアデノウイルスベクターを用いたことで、極めて効率良く、いつでも（分化誘導中に）、簡単に（ウイルス液を培地に加えるだけ）遺伝子導入ができ、さらに染色体構造の影響を受けないepisomalな導入遺伝子（核中で染色体に組み込まれず安定して存在）からの発現は、ES細胞系でも極めて安定しているという利点が生まれた。さらにCreは微量の発現でもLoxP配列のリコンビネーション反応を起こせるため、目的細胞では必ず発現切り替えが起こり、以降はプロモーター活性の強力な汎用プロモーターでレポーター遺伝子は確実に発現され可視化される。つまり、目的遺伝子のプロモーターの活性に依存することなく唯一その特異性にのみ依存して、ES細胞から確実に簡単に目的細胞を単離できるものである。本法は調節アデノウイルスに簡単に任意のプロモーターを入れるだけなので、さまざまな組織に応用が可

図2 ES細胞由来の目的細胞を同定・単離する Adenoviral conditional targeting 法



右下枠内は Nkx2.5 プロモーターを用いた従来法と本法の蛍光顕微鏡下での写真。
略語：巻末の「今月の略語」参照

能である。またさらに、発現切り替えコンストラクトを ES 細胞に安定導入しておけば、マーキングされた目的細胞は *in vitro* の培養皿上で分化転帰が追跡できるという新手法も確立することができた。

さて実際に、本法に Nkx2.5, α MHC の各プロモーターを導入したところ、蛍光顕微鏡によりマウス ES 細胞の目的細胞が生存下では明瞭に可視化され、さらにセルソーターで確実にのおおの目的細胞を単離できた。まず、 α MHC 調節アデノウイルスで単離した細胞はサルコメア構成タンパク質を発現し、1 個の孤立細胞にしても自動収縮能を保持するような、成熟心筋細胞の性質を示した。一方、Nkx2.5 調節アデノウイルスによって単離された細胞は、サルコメア構造を持たず収縮能も示さない一方で、網羅的な遺伝子発現の検討では心筋分化の初期マーカーを示すと

いう、いまだ単離されていない心筋系統の初期細胞という興味深いものであった。

再生医療への応用

生後は自律再生能を失う心臓が障害された場合、現在は心臓移植以外に根本的な治療法がないが、心臓移植はドナー不足の問題、手術侵襲の問題など多くの問題を抱えている。一方、この 10 年間の動物実験の結果により、心臓においては「臓器」や「組織」でなくても、「細胞」移植で治療効果を示すだろうという有望な示唆がなされてきた。つまり、心筋梗塞の動物モデルに別の新生仔から採取し初代培養した心筋「細胞」をその梗塞巣に注入するだけで、ドナー細胞はホスト心筋に生着し機能した。これは最近の臨床研究で、心筋梗塞巣への骨格筋芽細胞の移植ですら著明な心機能の改善が見られたことから実証さ

れたと言えるが¹⁷⁾、しかし骨格筋芽細胞自体はドナー心筋細胞がない代替手段にすぎず、実際、致死性不整脈の問題なども指摘されている。よってヒト ES 細胞から心筋細胞が分化誘導でき確実に単離できれば、もちろん生命倫理の問題は慎重に考えていく必要はあるが、ただ科学技術的な面からは心筋梗塞などへの心筋細胞移植療法がより現実のものとしてその視野にいることになる。すでにマウス ES 細胞の実験では、ES 細胞由来の心筋細胞（しかも筆者らのように高純度で単離された心筋細胞成分でなくても）は、筋ジストロフィー症のモデルマウスに移植された後に生着し心筋の形態や機能を有したこと¹³⁾、さらに心筋梗塞モデルラットへの移植で心機能低下が顕著に改善することなどが報告されている¹⁸⁾。しかし、高純度で単離された ES 細胞由来の心筋系統細胞を用いての前臨床的な本格的な治療実験や、またヒト ES 細胞での治療実験はいまだ報告がないが、これまではそれを可能とするこのような基盤技術が確立していなかったためである。今後、本稿で紹介した技術をヒト ES 細胞に応用し、実際に疾患モデルで前臨床的な治療実験を行っていくことが、ヒト ES 細胞による再生医療の確立のために重要と考えられる。

おわりに

再生医学研究の現状は、純粋な発生/幹細胞生物学的研究、あるいは臨床的研究が盛んであるのに比べ、ES 細胞でのバイオテクノロジー開発の専門的研究はいまだ少ない。筆者らはベクター開発などの遺伝子治療研究¹⁹⁾²⁰⁾の蓄積を新技術開発に応用したが、さらにブレークスルーとなる新技術の創出には異領域の研究との融合も必要かもしれない。

文 献

- 1) Kosai K, et al: Abrogation of Fas-induced fulmi-
- nant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244 (3): 683-690, 1998.
- 2) Kosai K, et al: Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 30 (1): 151-159, 1999.
- 3) 小財健一郎, 他: HGF (肝細胞増殖因子) による劇症肝炎の治療. *小児科* 41 (3): 381-390, 2000.
- 4) Minatoguchi S, et al: Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 109 (21): 2572-2580, 2004.
- 5) 小財健一郎: 遺伝子治療と再生医学. *久留米医学会誌* 67 (5・6 別冊): 175-180, 2004.
- 6) Takahashi T, et al: Therapeutic potential of HGF as a regenerative factor. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45 (13 Suppl): 2100-2108, 2000.
- 7) Li Y, et al: Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation* 107 (19): 2499-2506, 2003.
- 8) Wassarman P.M, et al: Differentiation of embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365: 1-510, 2003.
- 9) Kawai T, et al: Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 68 (7): 691-702, 2004.
- 10) Nakano T, et al: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265 (5175): 1098-1101, 1994.
- 11) Kawasaki H, et al: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28 (1): 31-40, 2000.
- 12) Nishikawa S.I, et al: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺ VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125 (9): 1747-1757, 1998.
- 13) Klug M.G, et al: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem

1) Kosai K, et al: Abrogation of Fas-induced fulmi-

- cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98 (1): 216-224, 1996.
- 14) Kolosov E, et al: Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 143 (7): 2045-2056, 1998.
- 15) Muller M, et al: Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. *FASEB J* 14 (15): 2540-2548, 2000.
- 16) Hidaka K, et al: Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 17 (6): 740-742, 2003.
- 17) Hagege A A, et al: Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361 (9356): 491-492, 2003.
- 18) Hodgson DM, et al: Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (2): H471-479, 2004.
- 19) Kosai KI, et al: Retrovirus-mediated *in vivo* gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 9 (9): 1293-1301, 1998.
- 20) Nagano S, et al: An efficient construction of conditionally replicating adenoviruses that target tumor cells with multiple factors. *Gene Ther.* (in press)

Cardiomyogenic Differentiation and a Novel Biotechnology for Regenerative Medicine Using Mouse and Human Embryonic Stem Cells

Tomoyuki Takahashi^{1,2,3}, Hisayoshi Fujiwara⁴,
Takahiro Kunisada⁵, Ken-ichiro Kosai^{1,3,6}

¹ Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases, Kurume University

² Department of Advanced Therapeutics and Regenerative Medicine, Kurume University School of Medicine

³ Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Gifu University School of Medicine

⁴ Division of Cardiology, Respiratory and Nephrology, Regeneration and Advanced Medical Science, Graduate School of Medicine, Gifu University

⁵ Division of Regeneration of Organ and Tissue Development, Regeneration and Advanced Medical Science, Graduate School of Medicine, Gifu University

⁶ Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine

BIO

バイオ
テクノロジー
ジャーナル

隔月刊

ブレイクスルーを生む、注目の新技術と実験メソッド

別刷

株式会社 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1神田三和ビル

TEL 03-5282-1211 FAX 03-5282-1212

E-mail: btjournal@yodosha.co.jp

HP: <http://www.yodosha.co.jp/btjournal/>

テクノトレンド4

多因子で増殖制御/癌特異標的化するアデノウイルスベクターのはじめての標準化作製技術

神園純一 室伏善照 小賊健一郎

癌のみで特異的に増殖する増殖型アデノウイルス (CRA) は、癌特異的・高効率な遺伝子導入と癌細胞死を可能とする新世代の癌遺伝子治療ベクターかつ医薬として期待されている。しかし、未だ標準化作製技術が確立されていないため、開発研究は一部の専門施設に限られ、しかも非効率的な状況である。また1, 2因子で癌の特異化を試みる既存の CRA では、完全な癌特異化を得ることは困難という問題が残っていた。われわれは、この両問題を克服するため、多数の異なる癌特異化因子で精密にウイルス増殖を制御可能な「m-CRA」を、簡単・迅速・効率よく作製、改良可能な標準化作製技術を開発した。実際本法で、これまでの CRA を癌特異化、治療効果の両面で凌ぐ新規の CRA 癌治療薬の開発に成功している。本技術は、今後の CRA 癌遺伝子治療の開発はもとより、種々の基礎研究にも有用な新技術であるため、その実用化が期待される。

1. 癌遺伝子治療と増殖型アデノウイルス (CRA)

癌遺伝子治療の最大の問題は、体内の全癌細胞への治療遺伝子導入は不可能であること、つまり遺伝子「未」導入癌細胞からの再発の問題であり、これに対して、われわれはまず、全身性抗腫瘍免疫を誘導する癌遺伝子治療法の開発で対処した¹⁾。近年、その解決として期待されているのは、癌特異的にウイルス増殖が起こるように改変した増殖型アデノウイルス (conditionally replicating adenovirus : CRA) の開発である。CRA はそれ自身が、癌細胞内で増幅されたウイルスタンパク質により癌細胞を特異的に殺す「溶解性ウイルス療法」の医薬となる利点も併せもつため、第二世代の癌遺伝子治療として開発が期待されている。

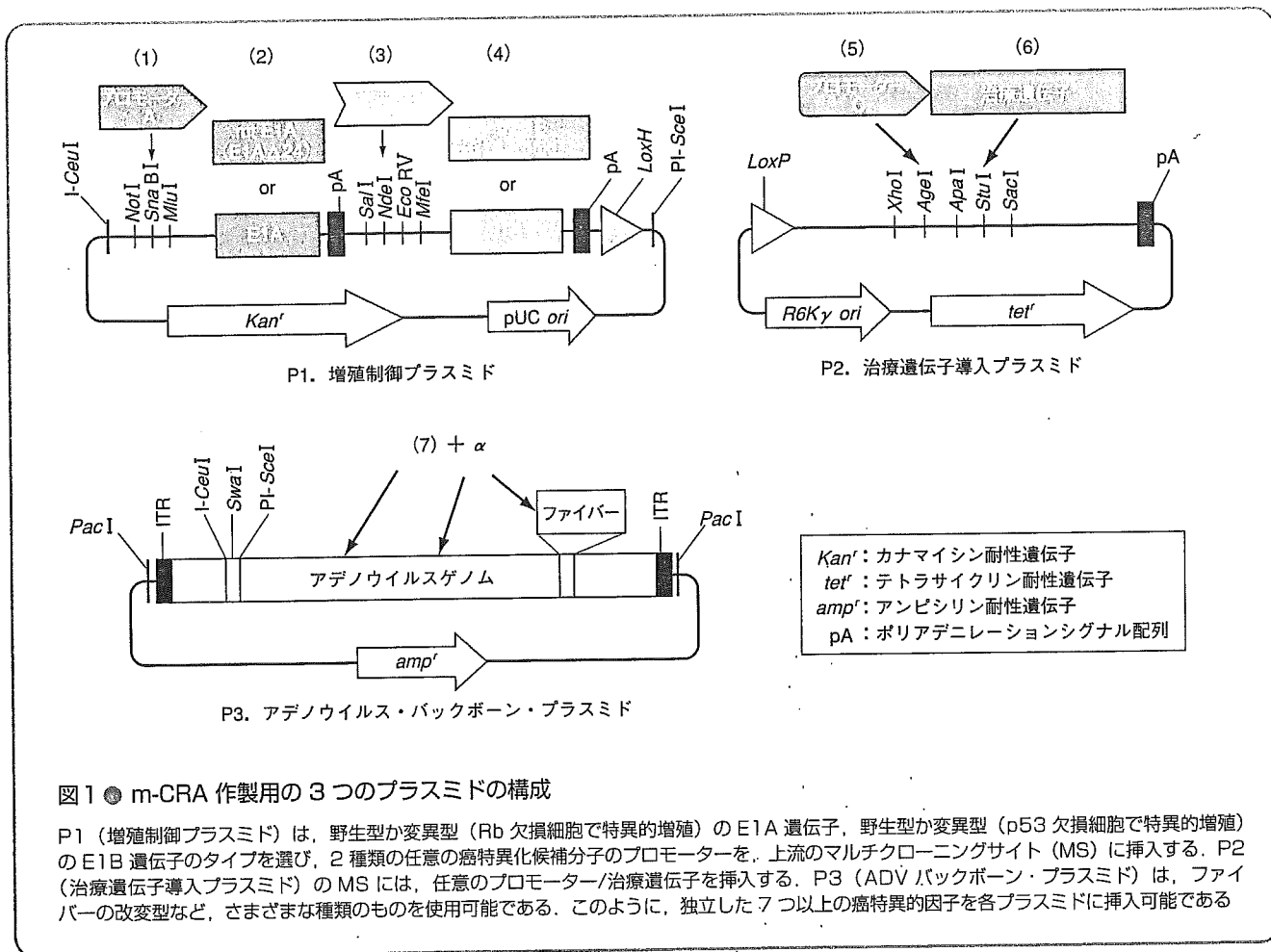
CRA は2つのタイプに分けられるが、その1つは ADV (アデノウイルス) のウイルス増殖制御にかかわる E1 遺伝子の内因性プロモーターを、癌特異的に発現している遺伝子のプロモーターに置換することで、ADV 増殖をその分子の発現依存性に改変する方法である。もう1つは、ADV の E1 遺伝子内の P53 結合領域、Rb 結合領域を部分改変し、癌と正常細胞での ADV 増殖に選択性を生じさせる方法である。そのメカニズムには議論も多いが、現象としては両タイプの CRA とも、基礎研究と臨床試験で良好な結果が報告されている²⁾。

2. 既存の CRA の問題点

「非」増殖型 ADV ベクター作製の標準化を可能としたのは、「2プラスミドシステム」の発想である。つまり36~40 kb の ADV そのものを遺伝子組換えするのは困難であるため、治療遺伝子の組換えは一般的なシャトルベクタープラスミドで行い、最後に E1 領域欠損の ADV バックボーン・プラスミドに載せてやるというものである。この10年で、さまざまな改良を施された非増殖型 ADV ベクター作製技術が発表され、多くの方法がキット販売されている。

一方、CRA を作製するには、ウイルス増殖制御部の E1 領域をさまざまに改変し、また治療 (マーカー) 遺伝子を搭載させるという、より複雑で多くの改変作業を必要とする。このため CRA の標準化作製技術は確立されておらず、CRA 開発は専門ラボに限定され、しかも「手作り」という非効率的な研究状況であった。

この技術的問題に加え、単一因子で癌を特異化する既存の CRA の根本的な問題は、癌の特異化が完全には達成できない、つまり正常細胞内でも僅かながら CRA が増殖してしまうことである。この問題は2因子で癌特異化が向上したという報告からも示唆されているように、さらに多因子で癌を特異標的化する CRA (m-CRA) を開発できれば解決可能と思われる。しかし前述のように、単一因子での CRA すら効率よい



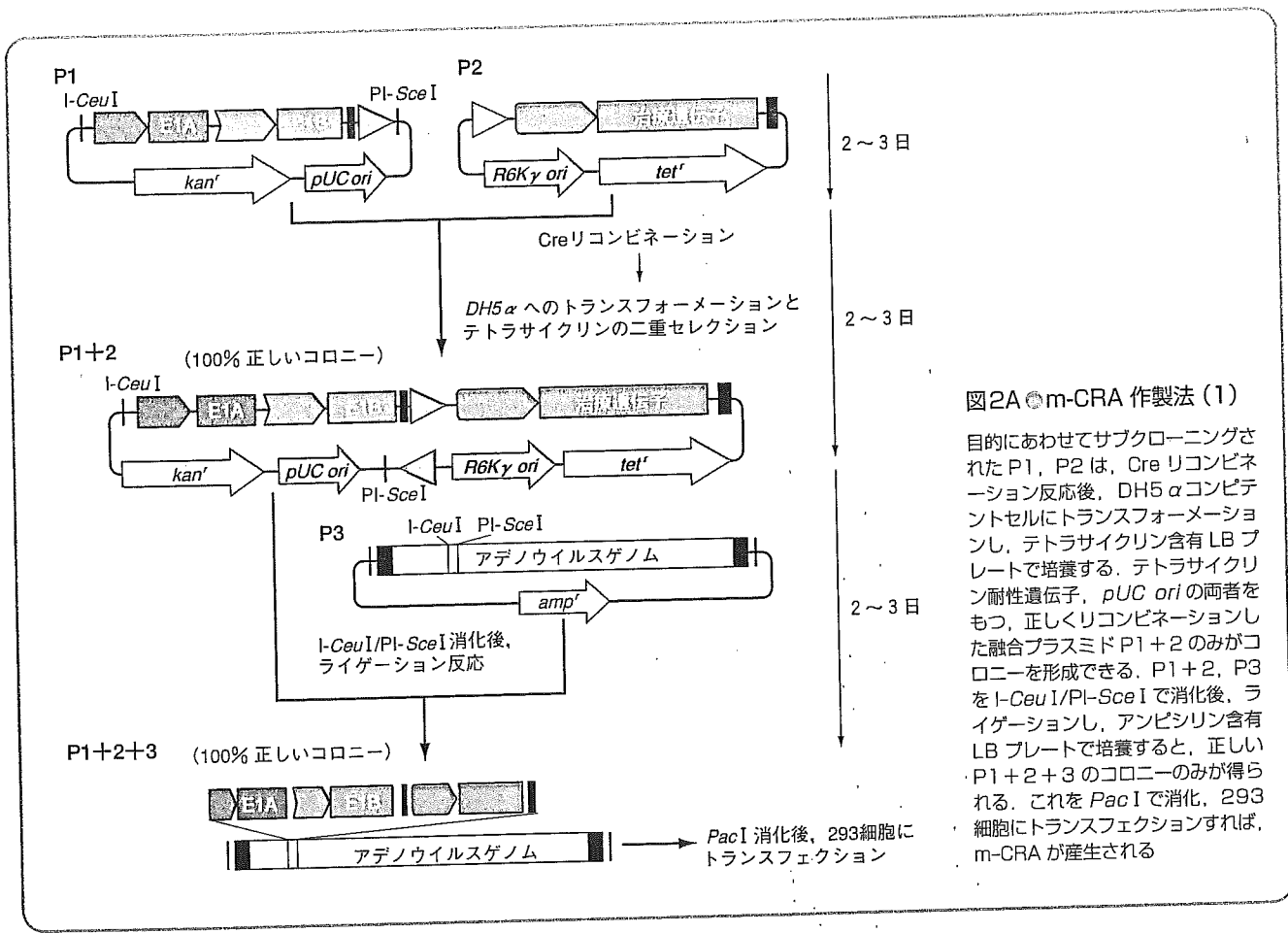
標準化作製技術が確立していない現状で, 種々の m-CRA を作製, 検証するという研究は, 現実的ではなかった。

3. われわれが開発した m-CRA 標準化作製技術

われわれは, 「3 プラスミドシステム」にて, m-CRA の標準化作製技術の開発にはじめて成功した³⁾。その発想は, 「それぞれのパーツを独立して作製し, 後で自由に組み合わせる」というもので, それを技術的に可能とするため, ①パーツ化, ②融合技術, ③セレクション技術を確立した。つまり, ①パーツ化技術として m-CRA の『ウイルス増殖制御部』, 『導入遺伝子』, 『ADV ゲノム』の3要素を独立した3プラスミドに分けたことで, 各パーツを個別に, 自由に設計することが可能となった (図1)。②融合技術として3つのプラスミドを, 通常のライゲーション操作を用いることなく, 迅速・確実・効率よく1つのプラスミドに融合させるため, 『Cre-Lox リコ

ンビネーション系の導入による P1 と P2 のプラスミドの融合』, 『特殊制限酵素サイトの P1 と P3 への賦与による, P1 上あるいは P1 + 2 上の各ユニットの, P3 の ADV ゲノム上への簡単な載せ換え』, の2つの系を導入した。③セレクション技術として『*pir* 遺伝子を発現する大腸菌でのみプラスミド複製できる *R6kγ ori* を P2 プラスミドに導入』, 『3つのプラスミドの抗生剤耐性遺伝子をおのおの違った *Amp^r*, *Kan^r*, *Tet^r* にする』ことで, 融合した目的プラスミドのみを確実に効率よく選別することを可能とした。

さて, P1 は野生型か変異型の E1A, E1B の各遺伝子を選び, 異なる2種類の癌特異化候補分子のプロモーターを上流のマルチクロニングサイト (MS) に挿入する。P2 の MS には, 任意のプロモーター/治療遺伝子 (例えば, 現在研究が盛んな RNAi の発現ユニット) を同様に簡単に挿入する。P3 は, さまざまな種類のを随時選択すればよい。そして



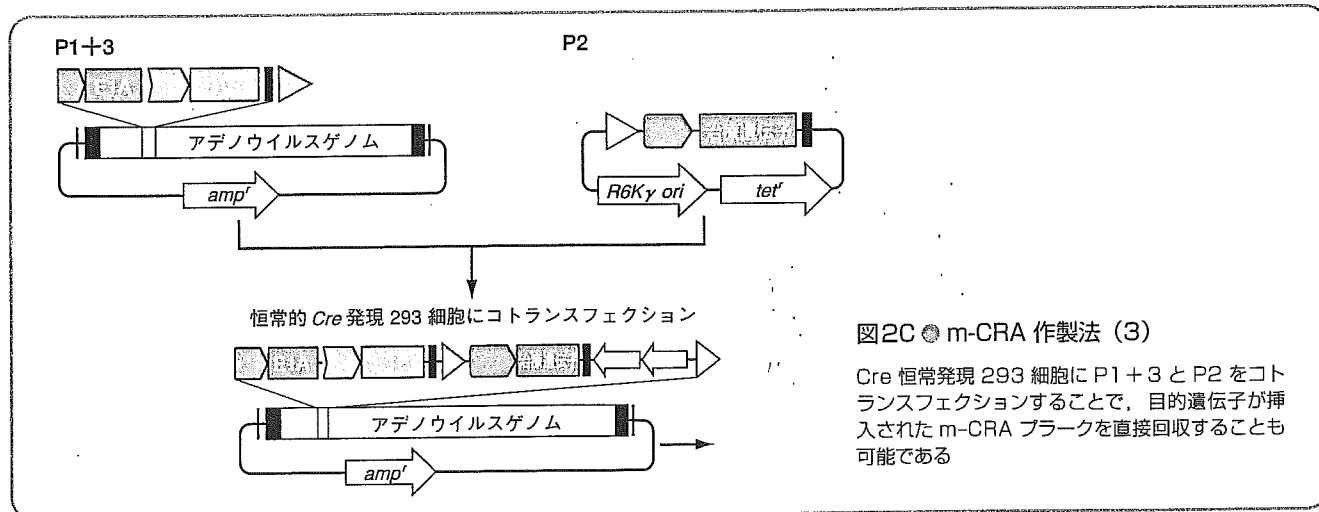
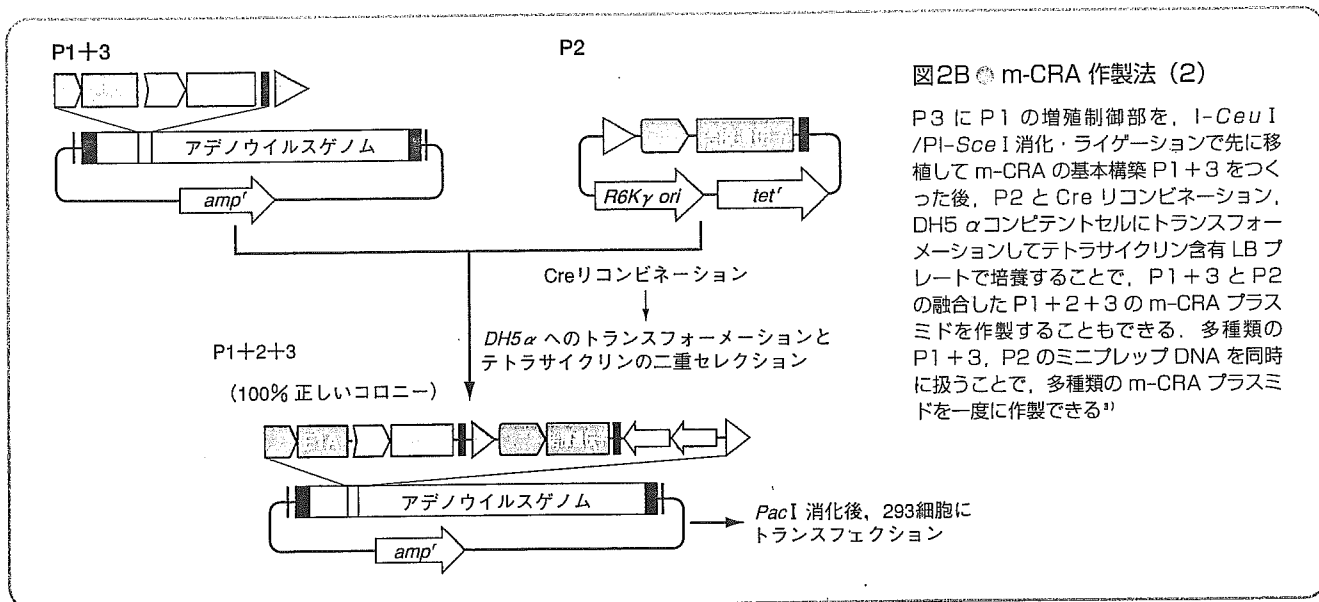
m-CRA プラスミド化は, P1 と P2 を融合して P3 に必要部を移植 (図2A), あるいは P3 に P1 の増殖制御部を先に移植した後に目的治療遺伝子を挿入 (図2B) することで容易に完成となるものであり, 後は通常の ADV ベクター作製手技でウイルスを得ることができる. またわれわれは, Cre 恒常発現 293 細胞への P1 + 3 と P2 のコトランスフェクションで, より迅速に目的遺伝子導入のウイルスを直接得る方法も確立した (図2C). これら全作業はミニプレップ DNA ができるため, 迅速に, また一度に多種多様の検体を扱うことができる³⁾.

このように本法を用いれば, ADV の専門知識がなくとも高度な m-CRA を, 同一プロトコールで, 迅速に多種類を作製可能である. また CRA の一部を改変したい場合でも, 挿入サイズの問題のため一から再構築し直すというこれまでのような問題はなく, 本法では必要パーツの交換で簡単に改変 m-CRA を作製できる. また, 癌特異的感染を可能とする ADV ファイバー部の改良の研究, あるいは別のサブタイプの

ADV の組合わせといった個々の研究成果も, 本法では P3 の変更だけでダイレクトに m-CRA 改変となるので, 非常に効率的である. このように, 多種多様の m-CRA を短期間で作製可能とする本法は, これまでの CRA 研究を一変させる可能性をもつものである.

4. 実際に開発された新規 m-CRA と今後の展望

われわれはすでに本法で, 既存の CRA を癌特異性, 癌治療効果の両面で凌ぐ, Survivin 依存性 CRA を開発した⁴⁾. このように本法を用いれば, 誰でも新規遺伝子のプロモーターの導入により新規 m-CRA の開発が可能で, また, それ自体が新規遺伝子の機能を明らかにする新しい研究手法ともなりうる. もちろん m-CRA は RNAi などの *in vivo* 遺伝子導入ツールとしても有用である. このような観点から, われわれは本技術の研究用試薬と開発した個々の m-CRA 医薬の実用化をめざしている.



参考文献

- 1) Chen, S.-H. et al. : Cancer Res, 56 : 3758-3762, 1996
- 2) Chu, R. L. et al. : Clin. Cancer Res, 10 : 5299-5312, 2004
- 3) Nagano, S. et al. : Gene Ther., 12 : 1385-1393, 2005
- 4) Kamizono, J. et al. : Cancer Res, 65 : 5284-5291, 2005

神園純一 (Junichi Kamizono)

久留米大学高次脳疾患研究所・遺伝子治療再生医学部門、博士課程。
2000 年鹿児島大学医学部卒業。

室伏善照 (Yoshiteru Murofushi)

久留米大学高次脳疾患研究所・遺伝子治療再生医学部門、博士課程。
2002 年名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程前期修了。

小戔健一郎 (Ken-ichiro Kosai)

久留米大学高次脳疾患研究所・遺伝子治療再生医学部門、同小児科・教授。
岐阜大学医学部・特別協力研究員。
1992 年久留米大学大学院修了、医学博士。久留米大学、Baylor College of Medicine (Visiting Assistant Professor)、大阪大学医学部、岐阜大学医学部 (助教授) などを経て、2003 年より現職。遺伝子治療、ヒト ES 細胞での再生医学、高次脳機能の epigenetic 分子制御と研究課題を拡張中。
E-mail : kosai@med.kurume-u.ac.jp