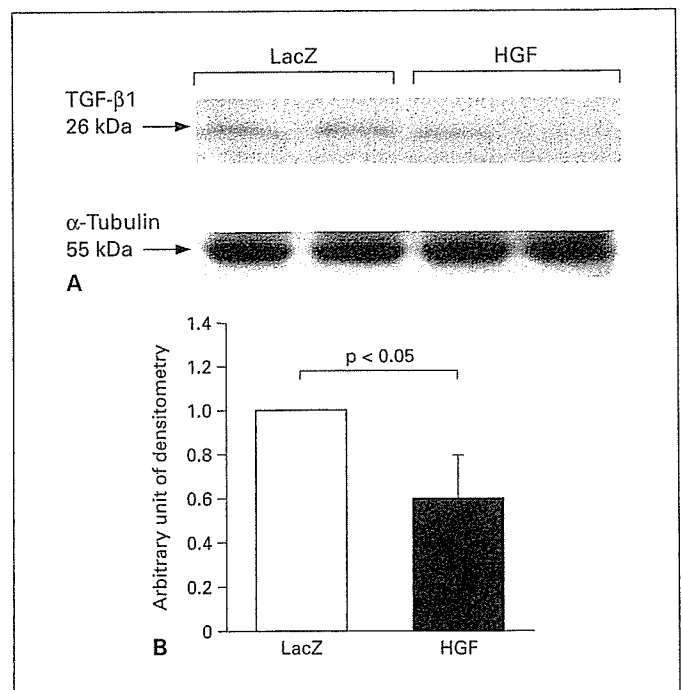
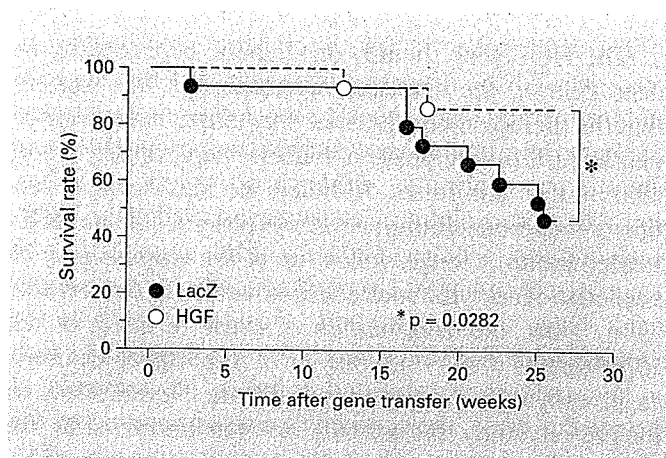


**Fig. 6.** Quantitative morphometry of PCNA- (A–C) or TUNEL-positive (D–F) cells in renal glomeruli or tubules of *db/db* mice treated with LacZ or HGF gene. Percent PCNA-positive cells in renal glomeruli (A) and in tubules (C). Percent TUNEL-positive cells in glomeruli (D) and in tubules (F). Percent PCNA-positive (B) or percent TUNEL-positive (E) glomerular endothelial cells assessed in double immunohistochemical preparations.



**Fig. 7.** Western blot for TGF-β1 in kidneys (A), and its densitometric analysis (B). Y-axis indicates arbitrary unit of densities.



**Fig. 8.** Survival curve for the HGF- and LacZ-treated *db/db* mice. The mice were treated with HGF gene ( $n = 15$ ) or LacZ gene ( $n = 15$ ) at the age of 12 weeks and followed for 25 weeks. There was a significant difference ( $p = 0.0282$ ) in the survival rate between the groups.

treated with the LacZ gene survived within the interval. Comparison of survival curves by the Kaplan and Meier method showed a significant difference between the HGF- and LacZ-treated groups (log-rank 4.814,  $p = 0.0282$ ) (fig. 8).

## Discussion

In general, diabetic nephropathy progresses from the glomerular hyperfiltration stage into the glomerular sclerotic stage with reduced glomerular filtration [30–32]. The diabetic *db/db* mice displayed far greater urine volume and Ccr than the nondiabetic *db/+m* mice, suggesting that the *db/db* mice at the beginning of the experiment were already suffering from the glomerular hyperfiltration stage of diabetic nephropathy. The *db/db* mice treated with the LacZ gene in the present study showed this progression into the glomerular sclerotic stage during the observation period, i.e. progressive reduction in urine volume and Ccr. However, the present study revealed that the HGF gene therapy markedly prevented this progression. Pathologically, the HGF gene therapy resulted in a significant prevention of formation of glomerular sclerotic lesions and of glomerular and tubular fibrosis that was marked in the LacZ-treated *db/db* mice. The glomerular cell population of the HGF-treated mice was also significantly greater than that of the LacZ-treated mice. Overall, it is apparent that the HGF gene therapy slowed down the progressive

deterioration in functional and pathological aspects of diabetic nephropathy in the *db/db* mice. More importantly, this therapy improved survival of these mice. It was apparent that the beneficial effect of HGF on diabetic nephropathy was irrelevant to glucose metabolism since levels of blood glucose and HbA1c were similar between the HGF-untreated and -treated *db/db* mice. The present study also confirmed that such effects of the HGF gene therapy were not observed in nondiabetic *db/+m* mice.

The glomerular cell population, endothelial cell population in particular, was significantly greater in the HGF gene-treated *db/db* mice. According to immunohistochemistry for Flk-1 combined with TUNEL assay, the HGF gene therapy suppressed glomerular endothelial cell and tubular epithelial cell apoptosis in *db/db* mice. Thus, the present study demonstrated an anti-apoptotic effect of HGF on those cells. In particular, preservation of the glomerular endothelial cell population by such mechanism might have greatly contributed to the functional maintenance of glomerular filtration, because the endothelial cells secure the area for glomerular filtration. Although the thickness of the glomerular basement membrane was also an important regulator of glomerular filtration, the ultrastructural morphometry of the present study did not confirm this contribution.

Previous studies reported an anti-fibrotic effect of HGF in the renal tubulointerstitium of animals with chronic renal diseases including experimentally induced diabetic nephropathy [17–20]. Consistent with these findings, the present HGF gene therapy resulted in suppression of fibrosis not only in the glomerulus but also in the tubulointerstitium of the *db/db* mice. Moreover, similar to the capillary endothelial cells, tubular epithelial cells showed decreased apoptosis. Thus, HGF exerted beneficial effects by affecting both glomerular and tubulointerstitial lesions of diabetic nephropathy. The HGF gene therapy resulted in a smaller glomerular sclerotic index and a more reduced fibrotic area in glomeruli of diabetic nephropathy, compared with the LacZ gene treatment. Thus, the HGF gene therapy alleviated the progression to glomerular obsolescence in diabetic nephropathy through a reduction in the mesangial matrix and fibrosis and also through maintenance of the glomerular cell component, endothelial cells in particular. An opposite effect of HGF against TGF- $\beta$  was reported previously [15, 33, 34]. In the present study, the Western blot analysis actually demonstrated greatly attenuated expression of TGF- $\beta$ 1 in the HGF-treated kidneys of *db/db* mice. Since TGF- $\beta$ , in addition to platelet-derived growth factor (PDGF), accelerates transformation of mesangial cells into myofibroblasts

that potentially produce collagen fibers [35, 36], such an anti-TGF- $\beta$  effect of HGF may be important for attenuation of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. Alternatively, as Mizuno et al. [17] previously suggested, an endothelial protective effect of HGF may play an important role for the prevention of glomerulosclerosis.

Mizuno et al. [19] recently reported beneficial effect of injection of recombinant human HGF on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. Although our findings were mostly consistent with theirs, there are some discrepancies in some aspects. They found that HGF treatment reduced glomerular area and suppressed glomerular hyperfiltration, which were opposite to our findings. It may be most likely that the discrepancy was caused by the difference of animal models with different stage and progression of diabetic nephropathy; our model might be at the later stage than that of Mizuno et al. as it was already at the hyperfiltration stage at the beginning of the experiments. Laping et al. [37] reported that diabetic nephropathy in *db/db* mice was aggravated by an HGF supplement. However, the dose of HGF used in the study seemed to be too low to attain and sustain physiological HGF level as Mizuno et al. [19] pointed out. In our study, the plasma HGF levels were considered sufficiently high because the level was greater at any time point measured than that produced by the plasmid DNA injection in another study [38], which effectively prevented progression of liver cirrhosis in an animal model. The way in which the very low dose of HGF has different effects awaits results from additional studies.

The HGF gene therapy on diabetic nephropathy indeed delayed the disease progression, but this suggests that the therapy made the mice stay longer in the glomerular hyperfiltration phase of diabetic nephropathy where albuminuria continues. Although no significant reduction of the serum albumin level was observed in the HGF-treated group, a longer follow-up of the animals may be needed to check what such continuous albuminuria would yield. Thus, the examination of cause of death of the HGF-treated *db/db* mice may be of importance and such an investigation is warranted in future. Nevertheless, in the present study, the survival rate was improved by the HGF gene treatment. There has been no clinically effective treatment for the pathological condition of patients with diabetic nephropathy. Even a strict control of hyperglycemia does not necessarily guarantee deceleration of disease progression [32], and many patients have to enter chronic dialysis programs with renal failure. Effective HGF supply would delay the start of the dialysis program, and it is suggested that it would be one of the promising candidates for preventing, or at least slowing down the progression of clinical and pathophysiological manifestations of diabetic nephropathy.

#### Acknowledgements

We thank Akiko Tsujimoto, Hatsue Ohshika, Kazuko Gotoh, Toshie Ohtsubo, and the staff of Kyoto Women's University (Katori Abe, Keiko Uozu, Kazumi Ohara, Hitomi Takagaki, Machiko Mizutani, and Miyuki Morikawa) for technical assistance.

#### References

- Ritz E, Orth SR: Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341:1127-1133.
- Woodrow D, Moss J, Shore I, Spiro RG: Diabetic glomerulosclerosis: Immunogold ultrastructural studies on the glomerular distribution of type IV collagen and heparan sulphate proteoglycan. *J Pathol* 1992;167:49-58.
- Mohan PS, Carter WG, Spiro RG: Occurrence of type VI collagen in extracellular matrix of renal glomeruli and its increase in diabetes. *Diabetes* 1990;39:31-37.
- Border WA, Noble NA: Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:1286-1292.
- Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-De La Cruz MC, Han DC, Ziyadeh FN: Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor- $\beta$ 1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the *db/db* mouse. *Am J Pathol* 2001;158: 1653-1663.
- Ishii N, Ogawa Z, Suzuki K, Numakami K, Saruta T, Itoh H: Glucose loading induces DNA fragmentation in rat proximal tubular cells. *Metabolism* 1996;45:1348-1353.
- Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG: Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Invest Med* 1997;45:50-56.
- Murata I, Takemura G, Asano K, Sano H, Fujisawa K, Kagawa T, Baba K, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Apoptotic cell loss following cell proliferation in renal glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, a model of human type 2 diabetes. *Am J Nephrol* 2002;22:587-595.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122:1450-1459.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342:440-443.
- Birchmeier C, Gherardi E: Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1998;8:404-410.
- Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 1999;30:151-159.
- Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR: Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:247-252.

- 14 Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Horiuchi M, Ogihara T: Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 2001;37:581–586.
- 15 Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T: Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000;57:937–948.
- 16 Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: renoprotective role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:2023–2038.
- 17 Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 1998;101:1827–1834.
- 18 Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001;59:1304–1314.
- 19 Mizuno S, Nakamura T: Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF-beta 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. *Am J Physiol* 2004;286:F134–F143.
- 20 Cruzado JM, Lloberas N, Torras J, Riera M, Fillat C, Herrero-Fresneda I, Aran JM, Alperovich G, Vidal A, Grinyo JM: Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004;53:1119–1127.
- 21 Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL: Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1996;153:1127–1128.
- 22 Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL: Studies in the diabetic mutant mice. *Diabetologia* 1974;10:607–610.
- 23 Cohen MP, Clements RS, Hud E, Cohen JA, Ziyadeh FN: Evolution of renal function abnormalities in the db/db mouse that parallels the development of human diabetic nephropathy. *Exp Nephrol* 1996;4:166–171.
- 24 Mizuguchi H, Kay AM: A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gen Ther* 1999;10 2013–2017.
- 25 Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL: Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2577–2581.
- 26 Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR: Red sirius staining plus polarizing microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;79:445–447.
- 27 Matsumae T, Jimi S, Uesugi N, Takebayashi S, Naito S: Clinical and morphometrical interrelationships in patients with overt nephropathy induced by non-insulin-dependent diabetes mellitus: a light- and electron-microscopy study. *Nephron* 1999;81:41–48.
- 28 Li Y, Takemura G, Kosai K, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Goto K, Takahashi T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Mizuguchi H, Fujiwara T, Fujiwara H: Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation* 2003;107:2499–2506.
- 29 Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han D-C, Iglesias-de la Cruz MC, Hong S-w, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K: Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal anti-transforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8015–8020.
- 30 Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984;74:1143–1155.
- 31 Fabre J, Balant LP, Dayer PG, Fox HM, Vernet AT: The kidney in maturity onset diabetes mellitus: a clinical study of 510 patients. *Kidney Int* 1982;21:730–738.
- 32 Viberti G, Wiseman MJ, Pinto JR, Messent J: Diabetic Nephropathy; in Kahn CR, Weir GC (eds): *Joslin's Diabetes mellitus*, ed 13. Malvern, Lea & Febiger, 1997, pp 691–737.
- 33 Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T, Higashio K: Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996;24:636–642.
- 34 Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Mizuguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 2000;102:246–252.
- 35 Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS: Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 1996;148:1169–1180.
- 36 el Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Zhang G, Adam A, Goumenos D: Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int* 1996;54:S23–S27.
- 37 Laping NJ, Olson BA, Ho T, Ziyadeh FN, Albrightson CR: Hepatocyte growth factor: a regulator of extracellular matrix genes in mouse mesangial cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59:847–853.
- 38 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J: Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226–230.

# ES 細胞再生医学の新技术開発 — ヒト ES 細胞と遺伝子治療技術 —

*A novel biotechnology for embryonic stem cell-based regenerative medicine*

## Keywords

ヒト ES 細胞  
遺伝子治療  
アデノウイルスベクター  
心筋分化  
再生医学

高橋 知之<sup>1)2)3)</sup> 藤原 久義<sup>4)</sup>  
國貞 隆弘<sup>5)</sup> 小賤健一郎<sup>1)3)6)</sup>

- 1) 久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学
- 2) 久留米大学医学部 創薬再生医療学
- 3) 岐阜大学医学部 遺伝子治療再生医科学
- 4) 岐阜大学大学院再生医科学 循環器病態学
- 5) 岐阜大学大学院再生医科学 組織・器官形成
- 6) 久留米大学医学部 小児科学

## Summary

The successful use of pluripotent embryonic stem (ES) cells for regenerative medicine is currently hampered by both the insufficiency of tissue-specific differentiation and the difficulty of distinctly purifying target cells. In addition, it is more difficult to induce tissue-specific differentiation of human ES cells than that of mouse ES cells. We found that the formation of embryoid bodies, which is the most popular method for inducing cardiomyogenic differentiation of mouse ES cells, did not work in human ES cells; we, thus, developed a novel co-culture system to solve this issue. We found that the conventional method that expressed a marker gene under a cell-specific promoter did not always work for identifying ES cell-derived target cell. We, thus, developed the novel biotechnology that efficiently identified any ES cell-derived target cells. This article describes these methods and discusses the usefulness of gene therapy vectors for ES cell-based regenerative medicine.

## はじめに

近年流行の再生医療(医学)は、「主に生物学的な知見の応用と技術により、傷害・疾病で失われた組織を補完する治療法」(の研究)の総称であり、その個々の内容、対象疾患ともさまざまである。大きく分類すれば、生体内で組織を再生誘導する「生体内再生療法」<sup>1)~5)</sup>、体外で目的の細胞/組織を創り移植する「再建療法」<sup>6)</sup>の二戦略であり、前者ではその再生誘導物質と方法、後者ではソースとなる細胞種と技術に、研究の特色がある。また、骨髄(幹)細胞による、造血器以外の臓器疾患への再生医療は、「手技が簡単で、自家移植(あるいは体内で誘導)が」という臨床化しやすい点から近年注目を浴びているが、その治療メカニズムや効率はいまだ不明確であるため、現時点では別分類として論じるべきであろう。

Takahashi, Tomoyuki<sup>1)2)3)</sup> / Fujiwara, Hisayoshi<sup>4)</sup> / Kunisada, Takahiro<sup>5)</sup> / Kosai, Ken-ichiro<sup>1)3)6)</sup>

- 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
- E-mail : kosai@med.kurume-u.ac.jp

さて、後者の再建療法において、目的細胞を創る主なソースは、体性幹細胞と ES (胚性幹) 細胞である。体性幹細胞は患者本人の細胞を自家移植するという点で、免疫拒絶が起こらないという長所がある一方、医療として採取可能で、大量培養もでき実際に利用可能な体性幹細胞は現時点では限られている。一方、ES 細胞には受精胚から作製という生命倫理の問題がある一方、ほとんどの組織、細胞に *in vitro* でも分化誘導できる多能性という潜在能力、多量培養可能な能力という点から、臓器移植に代わる再建療法での基盤ソース細胞として期待されている<sup>9)</sup>。ES 細胞による再建医療の実現には、①目的細胞を効率よく分化誘導する方法、②目的細胞を同定・単離する技術、③細胞移植治療法の確立、の全3段階で技術を開発、確立する必要がある。しかし、現在の ES 細胞を用いた再生医学の研究は、従来型の発生学研究、すなわち分化現象の研究にやや偏っているように思われる。筆者らも「発生学」研究の成果は最重要と考える一方で、併せて再生「医学」研究として①～③の各段階の技術開発も同様に重要と考えている。本稿では再生医学研究の意義を踏まえながら、心筋細胞をモデルとした①②における筆者らの開発した技術、特に「遺伝子治療技術の ES 細胞への導入」、「ヒト ES 細胞での研究」について概説する。

### 生体内再生療法

生後も再生能を保持している肝臓、皮膚、血管、造血器などの疾患(よって移植のための組織採取が、これらの臓器では可能なわけである)には、筆者らは、ES 細胞再建療法よりも「生体内再生療法」の開発の方が理想的だと思っている(もちろん、ES 細胞の研究が不必要ということではない)。たとえば筆者らは、効果的な治療法がないためいまだ 70% の致死率の劇症肝炎に対し、肝栄養因子の HGF (肝細胞増殖因子) による根治的治療法を開発した<sup>11)12)</sup>。これは HGF の肝細胞への強力な抗アポトーシス作用で(前段階の急性肝障害からの)劇症肝炎の発症を阻止すると同時に、生体内で強力に肝再生を誘導して<sup>13)14)</sup>、障害肝も治癒していくという、理想的な治療法となる生体内再生療法である。さらに筆者らは最近、肝栄養因子の HB-EGF (ヘパリン結合 EGF 様増殖因子) が、HGF より強力に肝障害抑制と肝再生誘導作用を示すことを見出し、より効果的な劇症肝炎治療法となる HB-EGF 生体内肝再生療法を開発した<sup>10)15)</sup>。

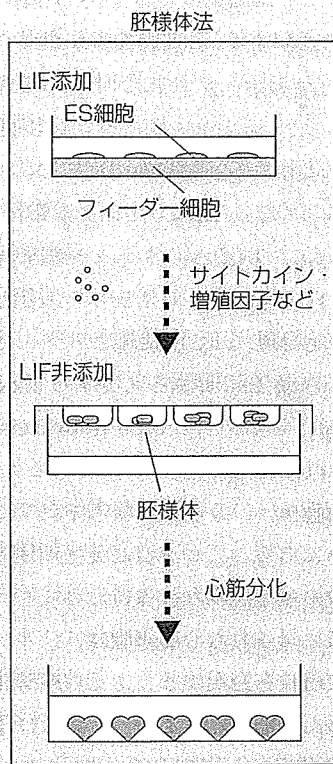
また、治療手技という点では、急性疾患には組み換え蛋白質の投与でも十分であろうが、慢性疾患に対しては、1 回の治療で治療因子を長期発現できる遺伝子治療が、より効果的な治療法となる可能性が高い。たとえば HGF 遺伝子治療は、肝障害と肝線維化の阻止と肝再生の促進から肝硬変を治療で

き<sup>12)</sup>、さらに肝硬変に合併しやすい肝癌へは抑制(治療)作用を示す<sup>13)</sup>。このように医療法の開発という点を重視すれば、再生能を保持する肝臓の疾患では、このような遺伝子治療・生体内再生療法が開発が、(少なくとも現時点では)より有効で現実的かもしれない。

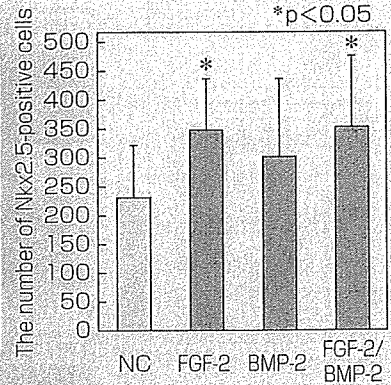
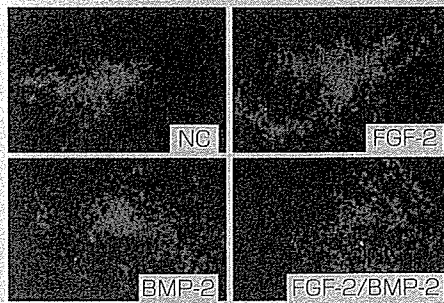
一方、筆者らは、HGF、可溶性 Fas 受容体、可溶性 TGF  $\beta$  II 受容体などの遺伝子治療(アデノウイルスベクターの 1 回の骨格筋への注射)で、心筋梗塞後のリモデリングの病態が改善できるという成果を得ている<sup>14)16)</sup>。これはこのような遺伝子治療が難治性心疾患へも有用な治療法となることを示す有望な結果である一方で、肝臓の場合とは異なり欠損した心筋細胞は生体内で再生治癒することはないため、「自律再生能のない臓器の疾患には、遺伝子治療単独では根治となる生体内再生療法にはなりたい」という限界も示している。よって生後は再生能を失う、心臓、脳神経、その他多くの臓器の疾患の治療には、ES 細胞による再建療法が開発が併せて必要となるものである。

### ES 細胞の *in vitro* 分化誘導法

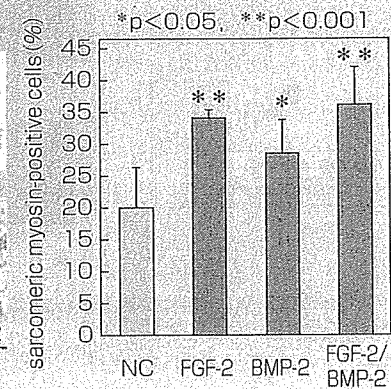
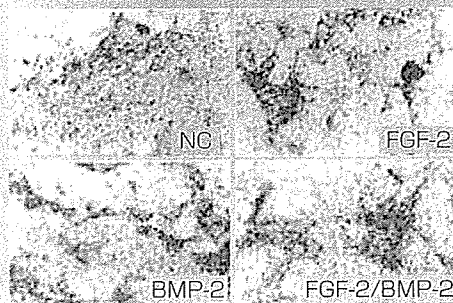
ES 細胞の *in vitro* 分化誘導法としては、①初期胚を模倣した胚様体の作製、②分化誘導因子の添加、③フィーダー細胞との共培養、あるいは④目的とする組織・細胞の分化にかかわる転写因子を強制的に発現するなどさまざまな方法が試みられている<sup>9)17)</sup>。



A. Nkx2.5



B. Sarcomeric MHC



マウス ES 細胞から胚様体形成後 17 日目の免疫染色像

A : Nkx2.5, B : Sarcomeric Myosin heavy chain (MHC), NC, non-treatment control

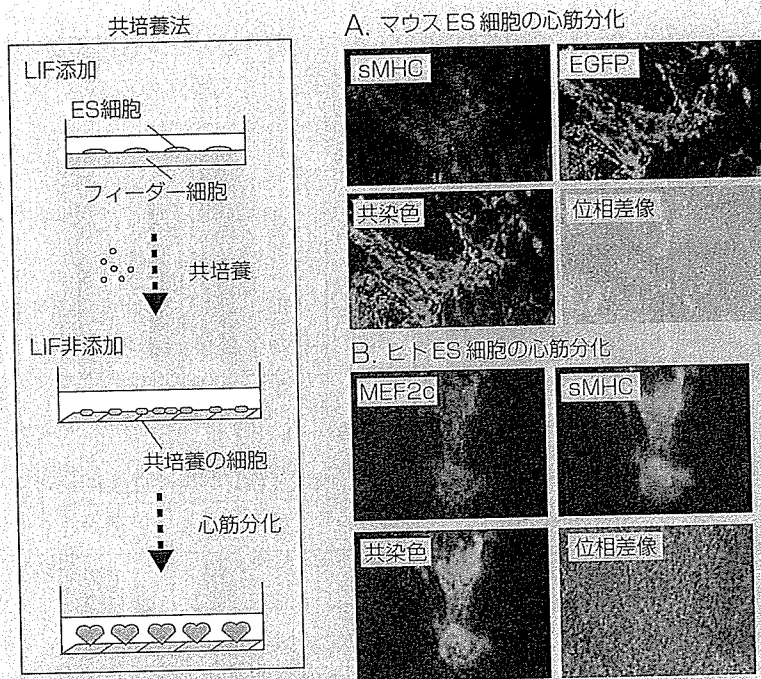
(文献 18 より引用)

図 1 胚様体形成による ES 細胞の心筋分化誘導(→巻頭 Color Gravure 参照)

心筋細胞においては、①の胚様体形成法で比較的簡単に分化誘導が可能であるため、胚様体形成法に、サイトカイン、増殖因子、ビタミン類などの添加で、分化効率を上昇させるという戦略がとられてきた<sup>17)</sup>。筆者らは胚様体形成法に、BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) と FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) を至適濃度(これまでの発生研究からの予想値より低濃度)で至適時期(胚様体形成の初期 3 日間

のみ: 個体の三葉形成期に相当)に添加することで、ES 細胞の心筋分化誘導効率を上昇させることに成功した(図 1)<sup>18)</sup>。つまり、個体発生の精密な生理機構をあくまで人工的に模倣する *in vitro* の分化誘導では、非常に繊細な条件設定が必要ということであり、よって実際に「ヒト」ES 細胞でこのような地道な研究をすることも、再生医学研究では重要ということを示唆している。

実際ヒト ES 細胞は、継代時の単一細胞化で増殖能の喪失、胚様体形成効率の低さなどの技術的な問題から、マウス ES 細胞での胚様体形成法が必ずしも応用できないことを筆者らは経験している<sup>19)</sup>。そこで、ある細胞との共培養により、胚様体の形成なしに、ES 細胞から心筋細胞を分化誘導する方法を開発した(図 2)(投稿準備中)。実際にこの共培養法で、マウス ES 細胞だけでなく、胚様体形成法では心筋



マウス(A), ヒトES細胞(B)を共培養後10日目の免疫染色像。

図2 共培養法によるES細胞の心筋分化誘導(→巻頭 Color Gravure 参照)

分化誘導がほとんどできなかったヒトES細胞株でも、効率よく心筋細胞への分化を誘導できた。

マウスES細胞では、心筋細胞は胚様体形成法で比較的分化誘導しやすい細胞種であるためか、それほど革新的な分化誘導法は提唱されていない。しかし、前述のようにヒトES細胞では必ずしもマウスES細胞の結果が再現できる保証はないため、今後さらにヒトES細胞での革新的な心筋分化誘導技術の開発が望まれている。

### ES細胞由来の目的細胞の同定・単離法の開発

#### 1. 従来の単離法の限界

ES細胞から、完全に目的細胞だけを分化誘導することは不可能であるため、再生医療の実現には、目的細胞の特異的な同定・単離技術が必要となる。細胞膜表面抗原マーカーを有する血球・血管系などのような一部の細胞種は、蛍光抗体法で目的細胞を可視化後、セルソーターで分離する技術が確立されている<sup>8)</sup>。しかし、マーカーとなる細胞表面抗原がない、心筋細胞や神経細胞のような多くの細胞種には、

組織特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下にレポーター遺伝子を安定発現するES細胞株を作製するという方法が、これまで唯一の戦略であった<sup>8)17)</sup>。たとえばマウスES細胞より分化した心筋細胞の同定には、サルコメアの $\alpha$ MHC(ミオシン重鎖),  $\alpha$ Actin, MLC2v(ミオシン軽鎖心室2型)プロモーターでマーカー遺伝子を安定発現するES細胞株<sup>19)-21)</sup>,あるいは心臓発生初期から発現するNkx2.5遺伝子座にGFP(green fluorescence protein)遺伝子をノックインしたES細胞株<sup>22)</sup>,の4種類が報告されているのみである。しかも心筋分化初期の細胞の単離を試みた後者においても、実際に単離された心筋細胞は、サルコメア蛋白質を発現する、ある程度分化の進んだ心筋細胞である<sup>22)</sup>。さらに筆者ら自身で、Nkx2.5プロモーターでGFPを安定発現するES細胞株を多数作製し検証したが、ES細胞から効率よく心筋分化誘導はできているにもかかわらず<sup>18)</sup>, GFPで可視化される細胞は全く認められなかった。このように従来の方法は、材料の準備に多大な労力と時間が費やされるだけでなく、成功の保証がない不確実な方法で、またこの方法が有効に機能する細胞(プロモーター)種は限定されており、特に(実は一番興味のある)分化初期の細胞には有効ではない、と示唆されるものである。よって、ES細胞を用いた再生「医学」の意義を考えると、この問題を根本解決し、ES細胞由来の目的細胞を確実に同定・単離する標準

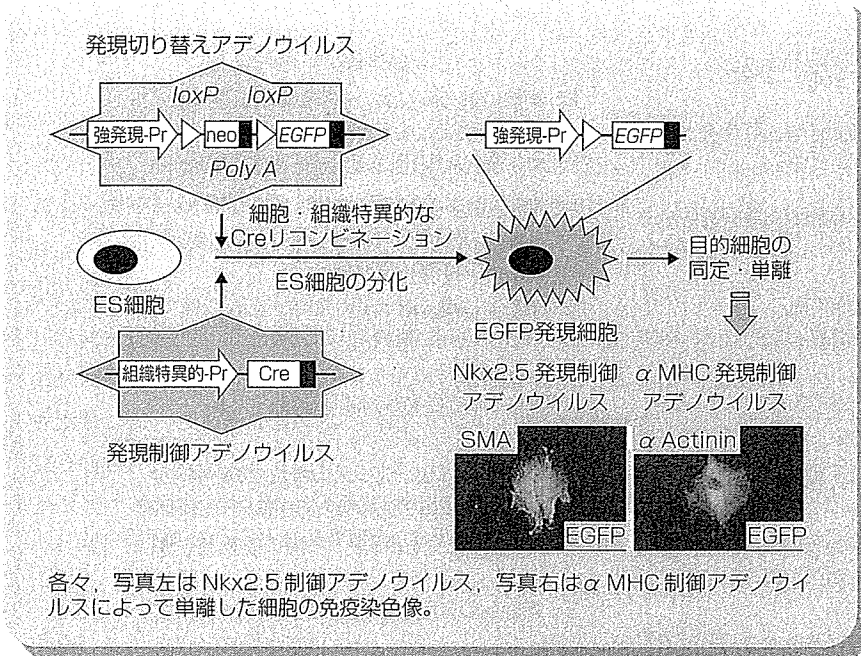


図3 ES細胞由来の目的細胞を同定・単離する Adenoviral conditional targeting法 (→巻頭 Color Gravure 参照)

化技術の開発こそ、最重要課題であると考えられた。

## 2. 遺伝子治療技術の応用によるES細胞由来の目的細胞の同定・単離技術の開発

遺伝子治療の研究に長年取り組んできた筆者らには、上記のように Nkx2.5 プロモーターで GFP を安定発現する ES 細胞株の実験がうまく機能しないという結果を得た段階で、実はその原因を推察できたものであった。つまり、このような従来法は組織特異的な遺伝子のプロモーターの特異性と活性の両方に完全に依存してしまうものだが、組織特異的プロモーターの活性は、遺伝子発現実験に用いられてい

る CA プロモーター (サイトメガロウイルス・エンハンサー+ベータアクチン・プロモーター) や サイトメガロウイルス・プロモーターといった強力なプロモーターに比べ、はるかに活性が弱いものであり、そのため GFP の可視化に必要なプロモーター活性が得られていないのであろうという、推測であった。そして筆者らは実際、初代培養心筋細胞でのプロモーターアッセイで検証したところ、予想していた転写因子 Nkx2.5 のプロモーター活性だけでなく、サルコメア蛋白の  $\alpha$  MHC のプロモーター活性も、CA プロモーター活性より 3~4 桁以上低いことがわかった。よって、元来活性の低いであろう転写因子のプロモーターなど

で、またさらに発現の低い発生初期の未分化細胞では、GFP を十分に可視化するプロモーター活性を得ることは不可能であり、このためマーカー膜蛋白のない未分化細胞は従来技術では ES 細胞から単離できていないとわかった。

そこで筆者らは、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の Adenoviral conditional targeting 法でこの問題を解決し、ES 細胞由来の目的細胞を迅速、簡単、確実に同定・単離することに成功した (図 3) (論文投稿中)。まず、適切な感染力価でアデノウイルスベクターを用いれば、細胞傷害や分化への影響なしに、ES 細胞に高効率 (単層培養状態であればほぼ 100% の効率) で遺伝子導入可能とわかった。加えて、通常の遺伝子導入手技 (エレクトロポレーション、リボゾームなど) は元より、レトロウイルスなどの他のウイルスベクター系と比べても、ES 細胞においてアデノウイルスベクター遺伝子導入・発現系が格段に優れているのは、任意の時期に (未分化状態、分化誘導中のいずれでも)、簡単に (ウイルス液を培地に加えるだけで) ES 細胞に遺伝子導入が可能という点である (表)。さらに非ウイルスの一般的な遺伝子導入系では発現は一過性であるため、まず多大な時間と労力をかけて安定発現細胞株を樹立しないといけないにもかかわらず、染色体に組み込まれた外来遺伝子の発現は染色体構造の影響を受け、特に ES 細胞ではその不安定さがより顕著

ベクター	一般的な特性	ES 細胞での特記事項
エレクトロポレーション	・簡易な手技で遺伝子導入可能	・ES 細胞に最も広く用いられる遺伝子導入法 ・一過性の発現のため安定細胞株の樹立が必要 ・分化中(接着条件下)の遺伝子導入は不可能
リポソーム	・広く用いられ、比較的高率な遺伝子導入が可能	・ES 細胞でも至適条件では比較的遺伝子導入効率は良い ・一過性の発現のため安定細胞株の樹立が必要 ・分化中の遺伝子導入は未確立
レトロウイルスベクター	・比較的簡単に作製可能 ・染色体への遺伝子組み込みにより長期発現が可能 ・臨床応用にて発癌(染色体への遺伝子組み込みによる)	・ES 細胞では導入遺伝子の発現が不安定(特に LTR プロモーターを用いた場合、導入遺伝子の発現がシャットオフされる) ・医療では安全性(発癌)の問題は重大
レンチウイルスベクター	・染色体への遺伝子組み込みにより長期発現が可能 ・非分裂細胞にも遺伝子導入が可能	・トランスジェニックマウスの作製にも有用 ・ES 細胞の再生医学への真の有用性は不明確 ・安全性(染色体への遺伝子組み込みの影響)が不明
アデノ随伴ウイルスベクター	・非分裂細胞へも遺伝子導入が可能 ・細胞毒性が低い ・4~5kb までの DNA しか導入できない	・ES 細胞への有用性はまだ検討されていない
アデノウイルスベクター	・ <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 共に高い遺伝子導入効率 ・癌などの遺伝子治療に臨床でも汎用されている ・細胞性免疫誘導がなく安全性の高いガントレスベクターも開発されている	・任意の時期に(分化中でも)、簡単に、高効率の遺伝子導入が可能 ・Episomal な導入遺伝子からの発現は、安定して長期持続可能で、安全性も高い

表 ES 細胞に対する遺伝子導入ベクターの特性

となる。また特にレトロウイルスベクターで染色体に遺伝子を組み込んだ場合は、ES 細胞ではさらに LTR プロモーターがメチレーションなどにより外来遺伝子の発現がシャットオフされてしまう(LTR の自己不活化で任意プロモーターを利用可能なレトロウイルスベクターもあるが、力価が下がる場合が多く、また染色体構造の影響を受けることは同様である)<sup>29)</sup>。これに対しアデノウイルスベクターで導入され

た遺伝子は核内の染色体外で、おそらくウイルス蛋白により保護されて長期安定状態にあり、この染色体構造の影響を受けない episomal な状態からの導入遺伝子の発現は、未分化、分化状態のいずれの ES 細胞でも極めて安定していた。また最近、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療の臨床応用で、白血病の発症が頻発したことにより、染色体へのランダムな遺伝子組み込み自体の危険性が指摘されてい

る<sup>30)</sup>。つまり再生「医療」という観点から、レトロウイルスだけでなく、レンチウイルスなど、染色体に遺伝子を組み込む性質のウイルスベクターは、現時点ではその危険性が必要性をはるかに上回るといえる。つまり安全性の点からも、アデノウイルスベクターの episomal な遺伝子導入様式というのは、再生医療で大きな長所となるものと考えられる。

一方、ごく微量で LoxP 配列のリコ

コンビネーション反応を起こすCreリコンビナーゼは、組織特異的プロモーターによって発現が誘導されると、目的細胞内で発現切り替えを起こし、それ以降はマーカー遺伝子が強力な汎用プロモーターによって発現誘導されるため、目的細胞の可視化が可能となる。その結果、本法は組織特異的プロモーターの発現特異性にのみ依存して、確実なES細胞由来の目的細胞の可視化を可能とした。また従来法では、目的細胞の種類ごとに多大な労力と時間を費やしてES細胞株の樹立が必要であったが、本法では調節アデノウイルスベクタープラスミドのマルチクロニングサイトに任意の組織特異的プロモーターを挿入するのみで、簡単迅速に異なる種類の調節アデノウイルスベクターが作製でき、効率よくさまざまな細胞種が単離できる。さらに、一旦、発現切り替えコンストラクトを安定導入したES細胞株を樹立しておけば、*in vitro*の培養皿上でマーキングされた目的細胞の分化系譜が追跡できる新研究手法が可能となる。

実際、Nkx2.5,  $\alpha$  MHCの各プロモーターを含む調節アデノウイルスを用いた本法で、目的細胞が生存下で蛍光可視化され、マウスES細胞の心筋分化誘導が進むにつれ、この可視化細胞も増加していった。さらにセルソーターで各々の目的細胞を単離したところ、 $\alpha$  MHC調節アデノウイルスで単離した細胞は、単一細胞化して培養しても自動収縮を繰り返し、サルコメア構成蛋白質を発現することから、成熟

心筋の性質をもつ細胞種と考えられた。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、収縮能もサルコメア構造も認めず、さらにDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析では未分化と心筋系統の両マーカーを混在して発現していた。よってこの細胞は、いまだES細胞から単離されていない、心筋系統の拍動前の未分化初期細胞であろうという、非常に興味深い所見であった(図3)(論文投稿中)。また筆者らは、DNAマイクロアレイ解析で、この細胞からいくつかの重要と思われる未知遺伝子を同定しており、現在そのいくつかの遺伝子の機能解析を行っているところである。

このように本法を用いれば、理論的には、いかなる組織・細胞系でも、興味ある遺伝子発現様態(発現細胞種と発現時期)にのみ依存して、プロモーター活性に依存することなく、いかなる目的細胞でも確実に可視化することができると思われる。単離できた細胞は再生医療の移植細胞のソースとして利用できるのはいうまでもなく、上記で示したように発生学の画期的な新しい実験手法としても、非常に有用と思われる。また、機能未知の遺伝子の発生上の役割を解明可能な、新しい遺伝子機能解析の実験手法としても、本法は有用と思われる。

## ES細胞と遺伝子治療 ベクター

ここで、ES細胞と遺伝子治療ベクターについて整理してみたい。元来、遺伝子治療のベクター開発と、ES細胞での幹細胞生物学/発生学は、それぞれが高度な専門性と異なる研究背景という事情から、あまり接点のない研究分野であった。よってトランスジェニックマウスの作製にレンチウイルスベクターで革新的な発生学の技術開発の例はあるものの、再生医学において両者が有機的に融合して革新的な技術が生まれたという例はあまりなかった<sup>25)</sup>。筆者らは、ES細胞での再生医学研究の背景以前に、ベクター開発を含めた種々の遺伝子治療研究で長年の実績をもっていただけ、遺伝子治療技術を有用に再生医学に応用でき、まず本技術が開発できたものである。

遺伝子治療のベクターに関する一般的事項は他の書に譲るが、特に再生医学目的でのES細胞への遺伝子治療ベクターの選択の考え方とその有用性は、すでに記載した通りである(表)。また決してアデノウイルスベクターがES細胞の研究全般に万能というものではなく、事実、トランスジェニックマウス作製においては、前述のようにレンチウイルスベクターが有用であったのに対し、過去の報告ではアデノウイルスベクターではうまくいっていない<sup>25)</sup>。ただし、これらの報告はあまりに高力価のアデノウイルスを用い、細胞傷害にその原因を求めているが、染

色体への遺伝子組み込み効率が低いアデノウイルスベクターはマウス作製には適していないということが、そもそもの原因とも推察される<sup>26) 27)</sup>。このように単に遺伝子治療ベクターをES細胞に用いるということ自体には意味はないわけであるが、一方、遺伝子治療技術の長所を真に有効に応用すれば、ES細胞での再生医学の障害を克服する革新的技術の開発も可能であろう。筆者らは、癌遺伝子治療法の開発のために、多因子で精密にウイルスの増殖を制御できるアデノウイルスベクターの作製技術を独自開発しているが、次にこのベクターも用い、ある重要な問題を解決したいと思っている<sup>28) - 31)</sup>。

### ES細胞再建療法の見通し

生命倫理の問題は慎重に考えるべきであるが、技術的な点のみいえば、もしヒトES細胞から目的細胞を分化誘導後、確実にその目的細胞が単離可能となれば、ES細胞による再生医療(細胞移植による再建療法)は、ある程度現実的なものとして考えられることになる(免疫拒絶の問題は、クローン技術が確立されていなくても臓器移植と同様の問題に過ぎず、免疫抑制剤である程度対応できる)。近年の動物での研究成果から、先進諸国の三大死因の循環器疾患、特にその代表の心筋梗塞は、臓器や組織でなくとも、心筋「細胞」の移植で、治療効果が期待できることが示唆されている。さらにヒト心筋梗塞患者で、「骨格筋」細胞移植で

すら大きな治療効果があったという最近の報告からも、ボトルネックの単離法の問題を解決した本技術は、ES細胞再建医学の現実化に貢献できるものと思われる<sup>32)</sup>。発生学の基盤研究を進めることも重要であるが、併せてヒトES細胞で実際に疾患モデルで前臨床の治療実験を押し進めていくことも、本法での先端医療の確立、発展のためにも重要と考えている。

### ●文 献

- 1) Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, et al: Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244 : 683-690, 1998
- 2) Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, et al: Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 30 : 151-159, 1999
- 3) Kosai KI, Finegold M J, Thi-Huynh B T, 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 : 1293-1301, 1998
- 4) 小財健一郎, 中村敏一, 加藤裕久: HGF(肝細胞増殖因子)による劇症肝炎の治療. *小児科* 41 : 381-390, 2000
- 5) Takahashi T, Nakamura T: Therapeutic potential of HGF as a regenerative factor. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45 : 2100-2108, 2000
- 6) 高橋知之, 國貞隆弘, 藤原久義, 他: ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発. *最新医学* 60 : 28-34, 2005
- 7) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, 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 : 2572-2580, 2004
- 8) Keller G: Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19 : 1129-1155, 2005
- 9) 小財健一郎: 遺伝子治療と再生医学. *久留米医学会誌* 67 : 175-180, 2004
- 10) Ushikoshi H, Takahashi T, Chen X, et al: Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating non-cardiomyocytes. *Lab Invest* 85 : 862-873, 2005
- 11) Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, et al: HB-EGF gene therapy inhibits liver injury and induces liver regeneration in mice: a comparative study to HGF. *J Hepatol*, (in press)
- 12) Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al: Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5 : 226-230, 1999
- 13) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, et al: Adenoviral gene transduction of hepatocyte growth factor elicits inhibitory effects for hepatoma. *Int J Oncol* 27 : 77-85, 2005
- 14) Li Y, Takemura G, Kosai K, et al: Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation* 107 : 2499-2506, 2003
- 15) Li Y, Takemura G, Kosai K, et al: Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure. *Circ Res* 95 : 627-636, 2004
- 16) Okada H, Takemura G, Kosai K, et al: Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and

- attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 111 : 2430-2437, 2005
- 17) Laflamme MA, Murry CE : Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 23 : 845-856, 2005
- 18) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, et al : Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 68 : 691-702, 2004
- 19) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98 : 216-224, 1996
- 20) Kolossov E, Fleischmann BK, Liu Q, 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 : 2045-2056, 1998
- 21) Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, et al : Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. *FASEB J* 14 : 2540-2548, 2000
- 22) Hidaka K, Lee JK, Kim HS, et al : Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 17 : 740-742, 2003
- 23) Stewart CL, Stuhlmann H, Jahner D, et al : *De novo* methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 : 4098-4102, 1982
- 24) Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, et al : Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* 3 : 848-858, 2005
- 25) Lois C, Hong EJ, Pease S, et al : Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295 : 868-872, 2002
- 26) Gordon JW : Direct exposure of mouse ovaries and oocytes to high doses of an adenovirus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Mol Ther* 3 : 557-564, 2001
- 27) Gordon JW : Adenovirus gene transfer vector toxicity to mouse embryos : implications for human IVF. *Hum Reprod* 17 : 2380-2387, 2002
- 28) Nagano S, Oshika H, Fujiwara H, et al : An efficient construction of conditionally replicating adenoviruses that target tumor cells with multiple factors. *Gene Ther* 12 : 1385-1393, 2005
- 29) Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, et al : Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res* 65 : 5284-5291, 2005
- 30) 神圃純一, 室伏善照, 小賤健一郎 : 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. *バイオテクノロジージャーナル* 5 : 728-731, 2005
- 31) 室伏善照, 神圃純一, 小賤健一郎 : 新世代癌遺伝子治療のための多因子で増殖制御/癌特異化するアデノウイルスの作製法. *細胞工学* 25, 2006 (印刷中)
- 32) Hagege AA, Carrion C, Menasche P, et al : Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361 : 491-492, 2003

## My Technology

# 新世代癌遺伝子治療のための多因子で増殖制御／癌特異化する アデノウイルスの作製法

An Efficient Construction of Conditionally Replicating Adenovirus that Target Cancer Cells with Multiple Factors for Innovative Cancer Gene Therapy

室伏善照 神園純一 小賤健一郎

Yoshiteru Murofushi, Junichi Kamizono, Ken-ichiro Kosai

癌特異的増殖型アデノウイルス (CRA) は、癌特異的・高効率の遺伝子導入と癌細胞死を可能とする新世代ベクターとして期待される一方、標準化作製技術の未確立と癌特異化の不完全さの問題が残っていた。筆者らは、多因子で精密に癌特異化するCRA (m-CRA) の効率的／標準化作製技術の開発に成功し、両問題を解決した。本稿ではこのm-CRA作製法と併せ、本技術によるm-CRA化の利点と新開発のm-CRAの実例を示す。

## key words

癌、遺伝子治療、ベクター、溶解性ウイルス、増殖型アデノウイルス、特異標的化

1 室伏善照 久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門、久留米大学大学院医学研究科

神園純一 久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門、鹿児島大学大学院医学総合研究科

小賤健一郎 久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門 E-mail: kosai@med.kurume-u.ac.jp

1992年久留米大学大学院医学研究科修了、医学博士。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年より現所属、教授。同小児科学講座、岐阜大学医学部を兼任。遺伝子治療、ヒトES細胞での再生医学、脳研究と研究課題を拡張中。

## I. 癌遺伝子治療の背景とその問題点

様々な治療法の進歩にもかかわらず、癌はいまだ本邦や先進諸国での三大死因であり、特に浸潤、転移症例に対する効果的な治療戦略は非常に限られている。新たな治療法として期待された癌遺伝子治療は、この10年の数多くの臨床試験でその安全性は確認されたが、治療効果自体は当初期待されたような癌治療のブレイクスルーとはなっていない。その主因の1つは、*in vitro* でいくら遺伝子導入効率の高いベクターでも、“非”増殖型のベクターでは*in vivo* で体内の全癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは“物理的”に不可能である (ベクター液が達しない癌細胞には当然、遺伝子は導入されない) ため、遺伝子“未”導入癌細胞からの再発が起こりえるからである (図1)。筆者らは1990年代には、“非”増殖型のアデノウイルス (ADV) ベクターによる自殺遺伝子／サイトカイン遺伝子のコンビネーション遺伝子治療で全身性特異的抗腫瘍免疫の高効率の誘導を可能とし<sup>1)~3)</sup>、さらにこれら治療遺伝子の至適発現レベルの必要性も明らかにした<sup>4), 5)</sup>。また、癌転移抑制の遺伝子治療戦略<sup>6)</sup>、増殖因子の遺伝子治療による癌抑制効果<sup>7)</sup>なども開発してきたが、“遺伝子未導入癌細胞も治療可能な戦略”ということがいずれにおいても大前提となっている。

一方、この問題を根本的に解決するものとして近年期待されているのが、癌特異的に増殖する変異ウイルスの開発であり、その中でも特に癌特異的増殖型ADV (conditionally replicating adenovirus; CRA) の研究が盛んである。CRAは、ウイルス増殖が正常細胞では阻止され、癌細胞内では旺盛に起こるため、生体内で高効率かつ癌細胞特異的な遺伝子導入を可能とするものである。またさらにCRA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持つため、CRAは新世代の癌遺伝子治療として期待されている。

さて、ADVの増殖に必須かつ最重要な領域は、最初に発現するE1遺伝子領域 (E1A, E1Bに分けられ、いくつかのタンパク質コード遺伝子を含む) であり、よって“非”増殖型ADVベクターではこのE1領域を治療遺伝子に置換する方法をとっている (図1)。CRAはこのE1領域を改変することでウイルス増殖を制御し、癌と正常の細胞でのウイルス増殖の違いを持たせたものであり、

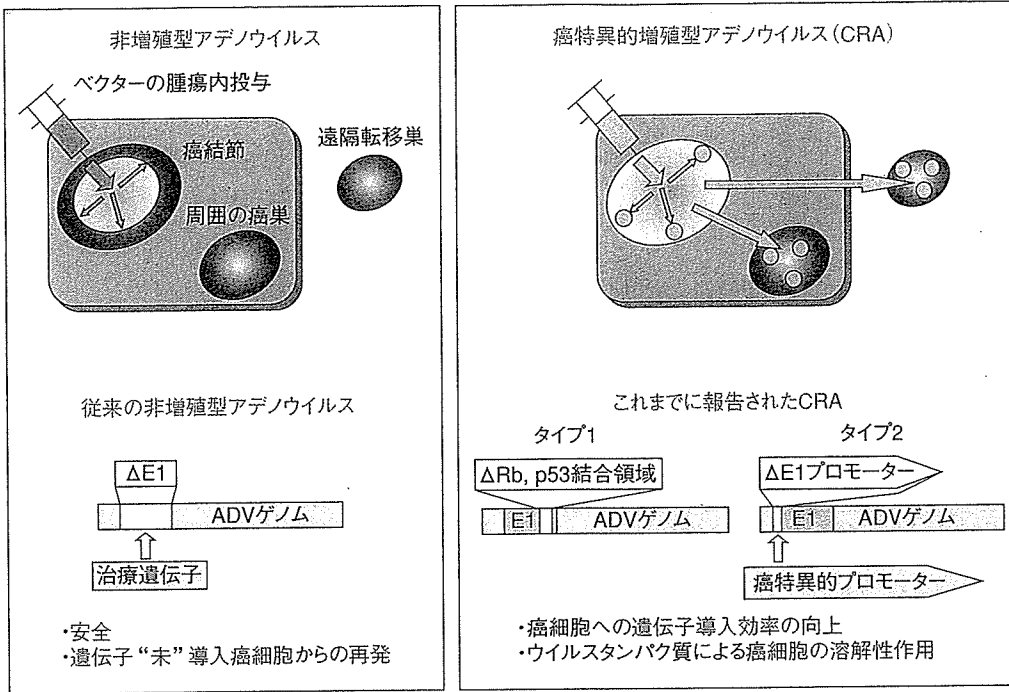


図1. 非増殖型アデノウイルスと癌特異的増殖型アデノウイルス (CRA) の比較

従来の非増殖型アデノウイルスは、安全な癌遺伝子治療を提供する一方、実際に効果を示すのは、遺伝子“未”導入癌細胞も治療可能とする戦略に限定される。一方、癌特異的増殖型アデノウイルス (CRA) は高効率かつ癌特異的な遺伝子導入と、癌溶解性治療効果の利点を持ち、この問題を克服しうる可能性を持つ。CRAは主に2種類の戦略に分類される。ADV; アデノウイルス。

大きく2つのタイプに分けられる (図1)。1つはE1領域内のRbやp53への結合領域を欠損させるもので、つまりADV増殖に必要な細胞環境 (細胞周期が回っている; 癌細胞ではすでにその状態にある) の誘導に必須である“Rbやp53の不活性化”を阻害することで、正常細胞での効率的なADV増殖を阻止するというものである。もう1つは、E1遺伝子の内因性プロモーターを癌特異的に高発現している遺伝子のプロモーターに置換することで、E1の発現、すなわちウイルス増殖を、その癌特異的遺伝子の発現依存性とする戦略である。両タイプのCRAとも、基礎研究だけでなく、臨床試験でも良好な結果が示されているため、CRA戦略自体の有望性は間違いないものと思われる<sup>8),9)</sup>。その一方、ただか1 (あるいは2) 因子で癌特異性を試みる既存のCRAでは、癌と正常の細胞を“完全に”識別可能とするレベルの癌特異性は困難で、特に正常細胞でもわずかながらウイルスが増殖するという (臨床応用での安全性には問題とならないレベルかもしれないが) 潜在的な問題が残されていた。またこの10年で様々な方法が開発されキット販売もなされている“非”増殖型ADVベクターとは異なり、CRAに関してはいまだ効率的/標準化作製技術が確立されていない。このためCRAの開発研究は一部の専門施設に限られ、しかもそのCRAの作製や改変の作業に多大な労力と時間を要する“手作り”という状態のため、その研究はきわめて非効率であった。

## II. m-CRA 作製法の理論とプロトコール

上記の両問題を完全に克服し、真のCRAを開発するために、筆者らは、従来の単一因子で癌特異性を試みるCRAとは一線を画す“多数”の異なる癌特異性因子で精密なウイルス増殖の制御が可能なCRA (m-CRA) を、簡単・迅速・効率良く作製、改良可能な“標準化”作製技術を独自開発した<sup>10)</sup>。

### 1. m-CRA 作製法の理論

さて、36~40kbのADVを“非”増殖型ADVとして遺伝子導入ベクター化できたのは、治療遺伝子そのものの組換えは一般的なシャトルベクタープラスミド上で行い、最終的にE1欠損のADVのバックボーンに搭載するという、いわゆる“2プラスミドシステム”の発想に基づく。一方、m-CRAでは、治療 (マーカー) 遺伝子に加え、E1領域自体の様々な改変という、より複雑で

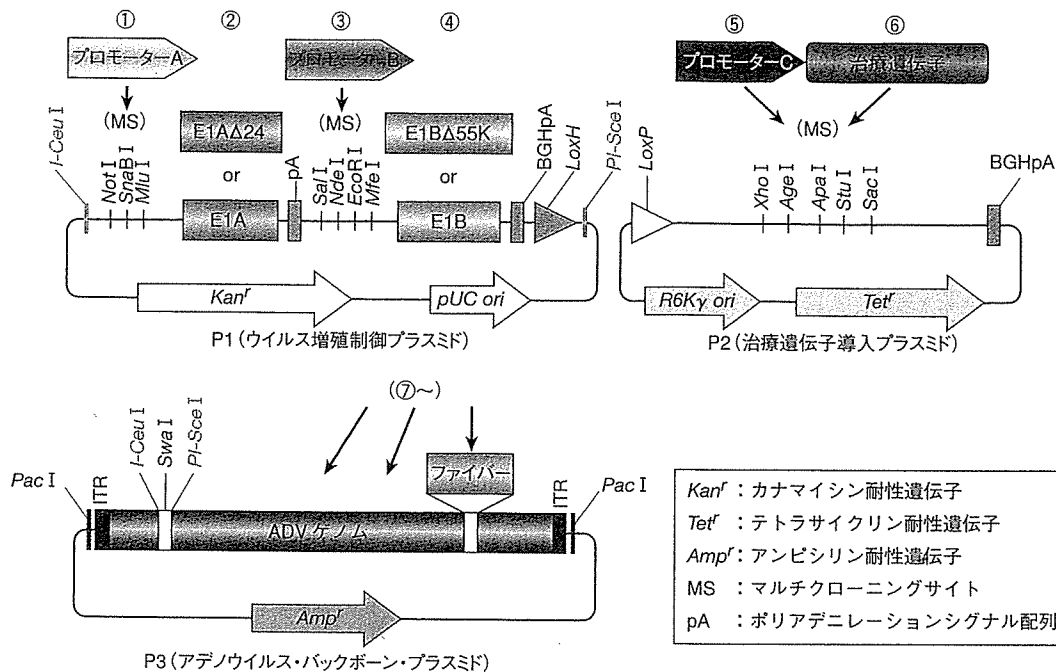


図2. 本m-CRA 作製法における3プラスミドの構成

m-CRA を作製するための3つのプラスミドは、P1 (ウイルス増殖制御プラスミド)、P2 (治療遺伝子導入プラスミド)、P3 (アデノウイルス・バックボーン・プラスミド) より構成される。①E1A 遺伝子の発現調節、②野生型E1A が変異型E1A (Rb 結合領域欠損) の選択、③E1B 遺伝子の発現調節、④野生型E1B が変異型E1B (p53 結合領域欠損など) の選択、⑤治療遺伝子の発現調節、⑥治療遺伝子、⑦～ファイバー部などADVゲノムの改変といった、7因子以上の癌特異化因子の挿入やADVの修飾が、個々のプラスミドのサブクローニングで可能となる。Nagano S, et al: Gene Ther (2005) 12: 1385-1393 より改変。

高度なステップが必要となるため、これまでキット化できるような標準化技術は発表されていなかった。今回筆者らは、“3プラスミドシステム”というm-CRAの標準化作製技術を開発したが、その基本的な発想は、“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”というものである。つまり、ウイルス増殖制御部 (P1)、治療 (導入) 遺伝子 (P2)、ADVゲノム (P3) の3要素を独立した3つのプラスミドに収載させることで、各パーツの個別の自由設計を可能とし、最終的に簡単・確実にこの3プラスミドを融合させ1つのm-CRA (プラスミド) にするというものである (図2, 3)。そのためこの“パーツ化”に加え、“Cre-Loxリコンビネーション反応によるプラスミド融合”と“特殊制限酵素サイト付加によるユニーク・ライゲーション”という2つの“融合技術”，そして“*pir* 遺伝子発現の特殊大腸菌でのみプラスミド複製可能なR6K  $\gamma$  oriのP2プラスミドへの導入”と“3プラスミドへ異なる抗生剤耐性遺伝子の搭載”という2つの“セレクション技術”を確立し、これらを巧みに組み合わせるという戦略により、本システムを確立することができた (図2, 3)。これにより、図2に示したように、①E1A 遺伝子の発現調節 (プロモーターA)、②野生型E1A が変異型E1A (Rb 結合領域欠損によるRb欠損癌細胞特異的なADV増殖) の選択、③E1B 遺伝子の発現調節 (プロモーターB)、④野生型E1B が変異型E1B (p53 結合領域欠損によるp53欠損癌細胞特異的なADV増殖など) の選択、⑤治療遺伝子の発現調節 (プロモーターC)、⑥治療 (マーカー) 遺伝子、⑦～ファイバー改変による癌細胞特異的な感染化やその他ADVゲノムの改変というように、7因子以上の癌特異化因子の挿入/ADVの修飾が、各プラスミドの通常の遺伝子組換え作業で可能となった。

## 2. プロトコールの概略 (図2, 3)

1) 各プラスミドの調製 (図2): P1は野生型か変異型のE1A, E1Bの各遺伝子を選択し、異なる

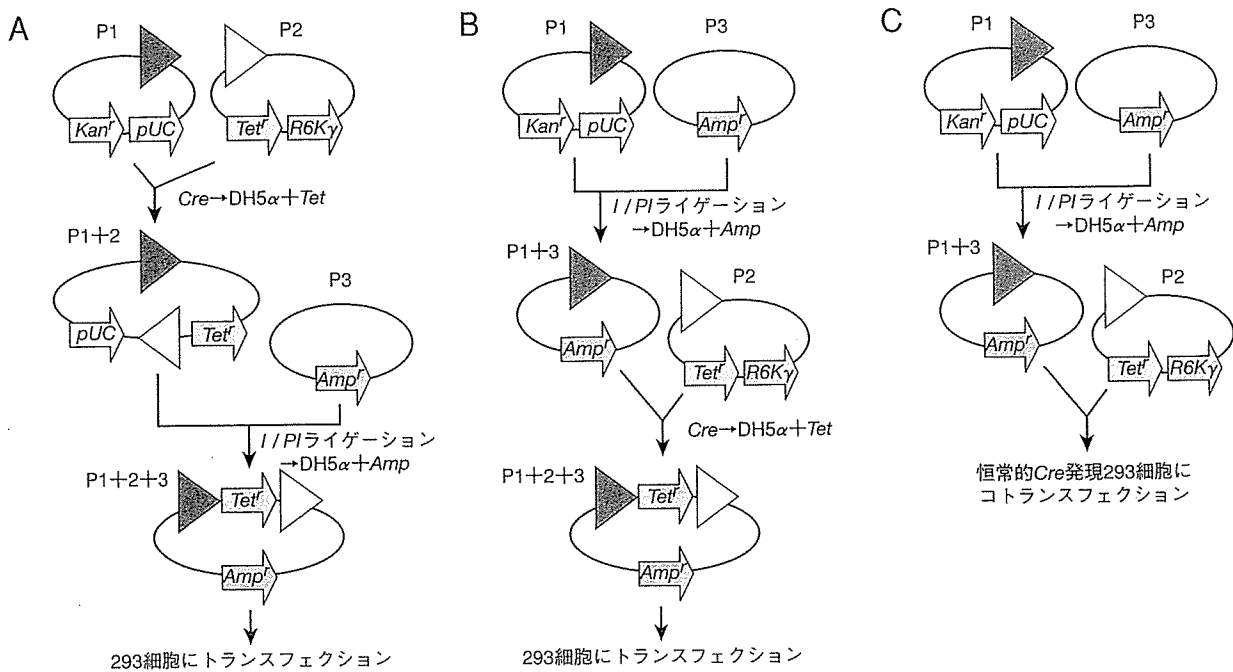


図3. m-CRA 作製の3種のプロトコール

それぞれ調製された各プラスミドは、A～Cの3種のプロトコールで融合、m-CRA（プラスミド）化される。

A: まず P1 と P2 を Cre-LoxP リコンビネーションで融合し、大腸菌 (*ori*) 種とテトラサイクリンで P1+2 のみをセレクトする。P1+2 のユニットは、ユニーク・ライゲーション (*I-Ceu I / P1-Sce I* の制限酵素サイト) により P3 に移植され、大腸菌 (*ori*) 種とアンピシリンで P1+2+3 の m-CRA プラスミドがセレクトされる。

B: まず P1 の増殖制御部をユニーク・ライゲーションで P3 に移植して P1+3 を得た後、Cre-LoxP リコンビネーション反応による P2 との融合により、m-CRA プラスミド化する。セレクトの原理は A と同様で、図中に示した通り。A、B の m-CRA プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションすれば、ウイルスが産生される。

C: B の P1+3 と P2 プラスミドを Cre 発現 293 細胞にコトランスフェクションすることで、直接融合した目的の m-CRA のウイルスが得られる。Cre; Cre リコンビナーゼ。

2種類の任意（癌特異化候補因子）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。E1A, E1B が野生型、変異型の異なる組み合わせの4種類の P1 が同様の作業で一度に作製できる。同様に、通常のサブクロニングの作業で、P2 の MS に任意のプロモーターと治療（マーカー）遺伝子を挿入する。P3 は前もって各種のもの（挿入サイズを増やすため ADV の領域を削ったものや、ファイバー改変など）を用意しておく。

↓

2) m-CRA プラスミド化: 本法の“パーツ化と融合”という戦略により、自由にどのレベルからでも1個の m-CRA プラスミド化ができるという利点が生まれた。以下に3つのプロトコールを示す（図3）。

① P1 と P2 を融合後、P3 に移植（図3A）: Cre-LoxP リコンビネーション反応で融合した P1+2 のみを、大腸菌 (*ori*) 種とテトラサイクリンのセレクトで100%正しく出現させ、ピックアップすることができる（Cre 酵素と30分反応後に熱失活させ、DH5 *a* 大腸菌にトランスフォーメーションしてテトラサイクリン含有 LB プレートに撒くだけの簡単な作業である）。さらに P1+2 のコアのユニットを P3 にユニーク・ライゲーションで移植し、正しい m-CRA プラスミド (P1+2+3) を大腸菌 (*ori*) 種とアンピシリンのセレクトで100%正しく出現させ、ピックアップできる。後は、通常非増殖型 ADV ベクターの作製と同様に Pac I 消化後にこの m-CRA プラスミド (P1+2+3) を 293 細胞にトランスフェクションするだけであり、10～14日後にプラークが出現し、それはすべて正しい m-CRA のウイルスである。

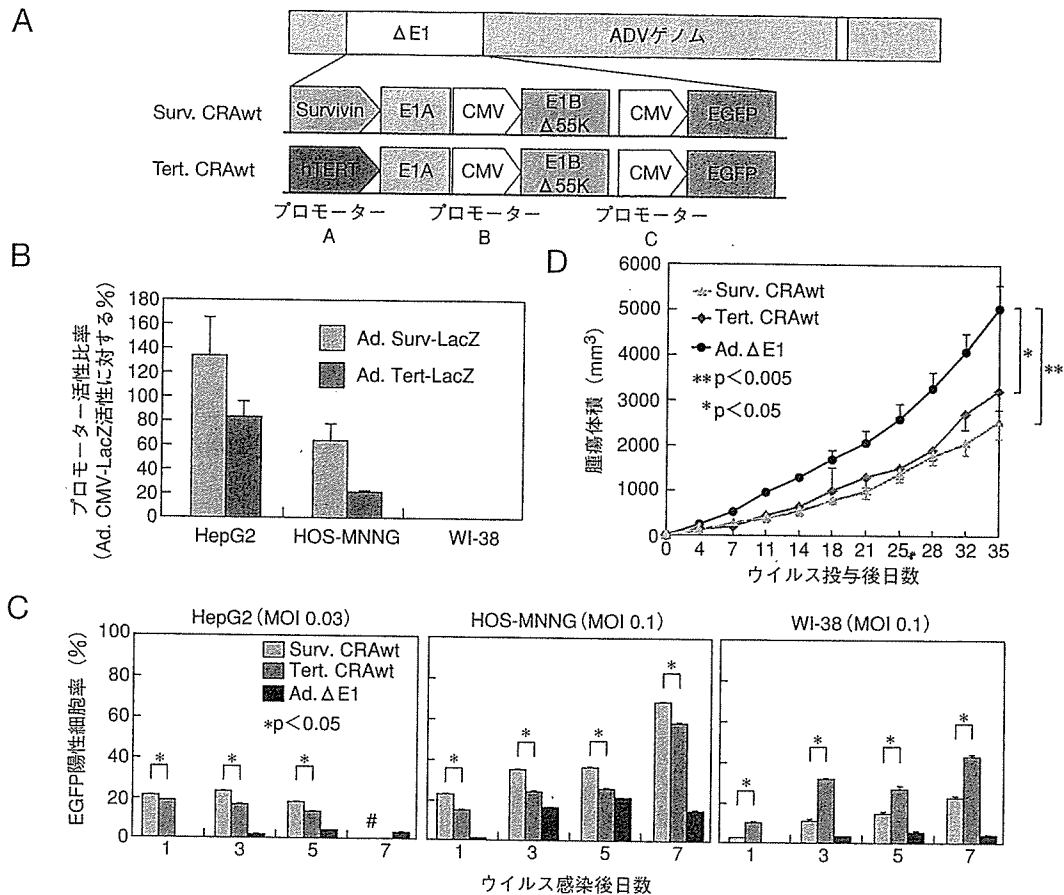


図4. サバイビン依存性m-CRAとテロメラーゼ依存性m-CRAの性能比較

A: サバイビン依存性m-CRAとテロメラーゼ依存性m-CRAの構築図。野生型E1Aをそれぞれのプロモーターで発現制御し、E1Bを変異型にした2因子m-CRA (Surv.CRAwtとTert.CRAwt) で比較した。

B: サバイビンとテロメラーゼの各プロモーター下にLacZ遺伝子を発現する非増殖型ADV (Ad.Surv-LacZ, Ad.Tert-LacZ) を、肝癌細胞HepG2、骨肉腫細胞HOS-MNNG、正常細胞WI-38に感染後にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定し、プロモーター活性を比較した。正常細胞では両プロモーターは活性を示さず、両癌細胞ではサバイビンプロモーターのほうが活性が強かった。

C: Surv.CRAwtとTert.CRAwtを各細胞に表記MOIで感染させ、経時的なEGFP陽性細胞の広がりフローサイトメーターで正確に解析することで、両m-CRAのウイルス増殖能を比較した。Surv.CRAwtの増殖能はTert.CRAwtに比べ、いずれの癌細胞でも旺盛な一方、逆に正常細胞ではより抑制されていた。#;ウイルス増殖によるCPE(細胞変性効果)による剥離のため測定不能。

D: *in vivo*の皮下腫瘍モデルに、両m-CRAを1回注入して、腫瘍縮小効果を比較した(病理学的解析では腫瘍結節内の癌細胞の多くが壊死に陥っており、実際の癌治療効果はこのグラフの印象より遥かに強力)。Surv.CRAwtはTert.CRAwtより、若干高い治療効果を示した。Ad. ΔE1;非増殖型ADVコントロール。

Kamizono J, et al: Cancer Res (2005) 65: 5284-5291より改変。

② P1の増殖制御部をP3に移植した後、P2と融合(図3B): P1の増殖制御部をユニーク・ライゲーションでP3に移植し、大腸菌(*ori*)種とアンピシリンのセレクションを行いP1+3を得る。次にP1+3とP2はCre-Loxリコンビネーションで融合させ、大腸菌(*ori*)種とテトラサイクリンのセレクションで最終のm-CRAプラスミド(P1+2+3)を得る。以下は①と同様である。

③ P1+3とP2をCre発現293細胞内で直接融合(図3C): ②と同様に作製したP1+3とP2を、そのままCre発現293細胞にコトランスフェクションすることで、(ワンステップ省略して)治療遺伝子が導入されたm-CRAのウイルスを直接得ることができる。ただし、治療遺伝子が導入されたm-CRAプラークの選別が必要となるため、このプロトコルはマーカーの蛍光遺伝子を挿入する場合が特に有用と思われる。

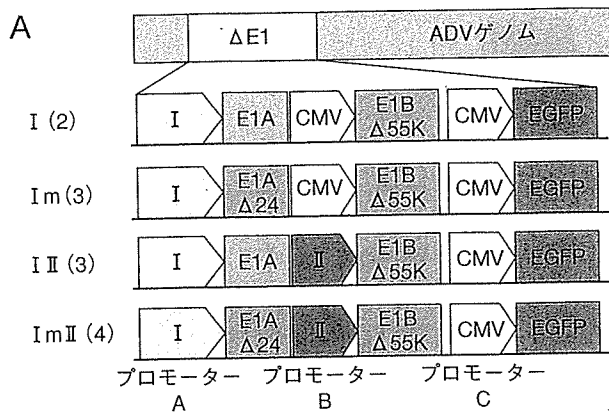
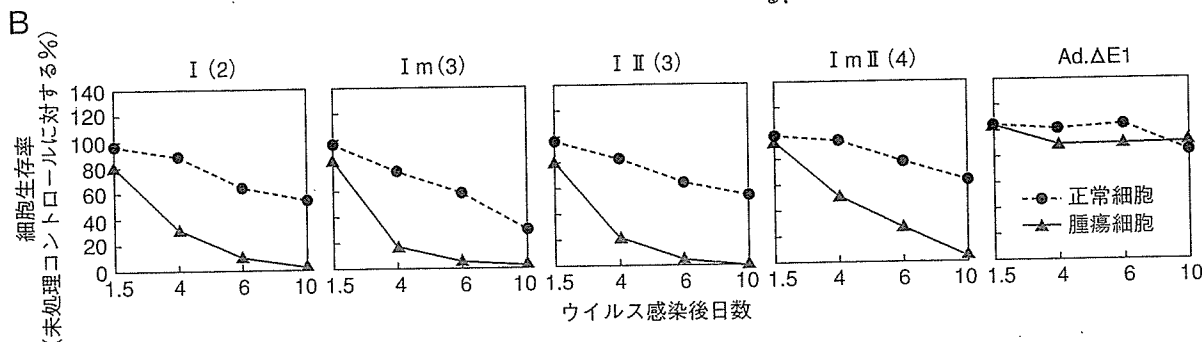


図5. m-CRAによる癌治療効果を維持した癌特異性の向上

A: 4種のm-CRAの構築図。癌特異的遺伝子Iのプロモーター(I), Rb結合領域欠損(E1A Δ24)の変異型E1A(m), 癌特異的遺伝子IIのプロモーター(II), p53結合領域欠損(E1B Δ55K)の変異型E1B遺伝子という, 2~4種類の癌特異性因子で増殖制御されるm-CRA。各m-CRAはそれぞれの因子の略語で名付けられ, ( )内の数字は制御する因子数を表している。

B: 癌細胞と正常細胞における, 4種類のm-CRAの経時的な細胞死誘導効果(WST-8法で生存率を評価)の一例。Ad. ΔE1; 非増殖型ADVコントロール。m-CRA化により, 癌治療効果は維持したまま(10日後には, いずれのm-CRAでもほぼすべての癌細胞を殺している), 正常細胞への傷害がより抑制されている。



さて本法は, 以下に示すように, 多くの利点を持つものである。まず本法を用いれば, ADVの知識を持たない一般の研究者でも, 同一のプロトコールで簡単に高度なm-CRAが作製可能である。本法の特徴であるパーツ化の利点として, すでに作製したm-CRAの改変も必要パーツの一部交換で可能となり, また異なるパーツの組み合わせにより累乗的レベルで多種多様のm-CRAを一度に作製することが可能となった。さらに本法はトランスフェクションを含む“全作業がミニプレップDNAで行える”こと, また“各ステップで目的の正しい検体のみを出現, ピックアップできる”という利点がさらに加わり, きわめて効率良く多種多様のm-CRAを作製でき, これまでのCRA研究の状況を一変する可能性を持つものである。

### III. 本技術による m-CRA 開発の実例

#### 1. 新規 m-CRA (サバイビン依存性 m-CRA) の開発とその高い能力

サバイビンはIAP (inhibitor of apoptosis) ファミリーとして1997年に同定されたが<sup>11)</sup>, その後の研究で, 有糸分裂G2/M期で最大発現しM期の初期に紡錘体微小管と結合することがわかり, 核分裂の制御に関与している分子と考えられている<sup>12)</sup>。興味深いことに, サバイビンは多くの癌種で高発現している一方, 分化した正常細胞では発現が認められない。さらにサバイビンの発現レベルと癌患者の予後が相関するということがもわかり<sup>13)</sup>, 現在, サバイビン自体が癌治療の新たなターゲット分子として注目されている<sup>14), 15)</sup>。この点より, 筆者らはサバイビン依存性m-CRA (Surv.CRAwt)を開発し, 実際にこのSurv.CRAwtはきわめて高い癌治療効果と癌特異性の両面を兼ね備える画期的な新規CRAであることを明らかにした<sup>16)</sup>。特に筆者らは, これまでに報告されたCRAの中では最良のテロメラーゼ (telomerase reverse transcriptase; TERT) 依存性m-CRA (Tert.CRAwt)も同様に作製し, 詳細な比較実験まで行った。その結果, Surv.CRAwtはTert.CRAwtを, 癌治療効果と癌特異性 (すなわちウイルス増殖と細胞死誘導効果が, 癌細胞ではより旺盛である一方, 逆に正常細胞ではより消滅する) の“両面”で凌ぐ, 理想的で画期的な新規CRAであることが明確となった<sup>16)</sup>(図4)。

## 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む一方, 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