ベクターを用いたリボザイムの導入

船 渡 忠 男*

Vector systems for gene delivery

The vector systems described in this article have been used for inhibition of tumor growth. It will be discussed an applications of non-viral vector systems with plasmid DNAs. The characteristics of the developed viral vector systems have been also summarized in this article. Most clinical trials employing retroviral vectors in present involve the administration of target cells transduced *ex vivo*. Although the majority of these studies is using retroviral vectors for gene transfer, there have been developed direct administration of vectors. One of them gene delivery by an electroporation method to transfer non-viral plasmid DNAs were compared with other transfer methods. *In vivo* electroporation electric pulses delivery *in vivo* can achieve the electroporabilization of the cells in a tissue and allows hydrophilic substances to pass into the cell. Also, the selection of the expression promoters utilized in non-viral vector design are important things for transgene expression.

We have examined the relative merits of introducing anti-oncogene ribozymes for cancers with these applications. And this method has been effectively transferred the plasmid DNAs into tumor. Thus in future our gene delivery system with theribozyme and the electroporation method as the drug will be used for cancer therapy.

Tadao Funato*

key words : gene therapy, virus vector, delivery system, ribozyme

癌治療において、遺伝子の変異を修正するか置換する治療方法はいまだ開発されていないが、遺伝子治療へ向けての種々の試みがなされている。癌細胞あるいは組織に外来遺伝子を導入して発現させるか、変異遺伝子を正常化するかの戦略が考えられる。しかし、外来遺伝子を移入する場合あるいは既存遺伝子を標的として変化させる遺伝子(アンチセンスなど)を移入する場合は、デリバリーシステムとしての遺伝子導入法に負うところが多い。特定の細胞に外来遺伝子を挿入するにはマイクロインジェクション法¹⁾がもっとも確実であるが、個々の細胞に遺伝子を導入しなくてはならないため、現実的ではない。

遺伝子治療として現在もっとも用いられている方法は、ウイルスベクターを用いた感染システムである。しかし、ウイルス感染によるデリバリーには、効率および安全性など種々の問題があり、効率は若干落ちるが、ウイルスベクターを用いての直接遺伝子導入法の開発が望まれる。そこで、非感染遺伝子導入方法としては、リポソーム(liposome)法²⁾や電気穿孔法(electroporation)³⁾があるが、まだまだ実用に向けては改良の必要性がある。

本稿では、癌における遺伝子治療を目指して、標的遺伝子に対するアンチセンス・リボザイムを挿入して癌細胞に導入する場合に、ベクターシステムを用いる方法についての概説を述べる。

ウイルスベクター

遺伝子を細胞内に運ぶ役割を演じるのがベク

* Department of Clinical Laboratory and Medicine, Tohoku University, School of Medicine, 1-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai 980 東北大学医学部臨床検査診断学教室

Offprint requests to : Tadao Funato, M. D.

表1 遺伝子治療に用いられるウイルスベクター

第1群: レトロウイルス, アデノウイルス, 種痘ウイルス
第2群: ヘルペスウイルス, AAV (adeno-associated virus)
第3群: ポリオ, B型肝炎, Sindbis/Semliki forest ウイルス, HIV-1, インフルエンザ, MPSV 他

ター(運び屋)である。ベクターは一般にウイルス由来のプラスミドであり、外来遺伝子を挿入することにより細菌由来 DNA と組み換えるために用いられる。すなわち、ウイルスベクターシステムは外来遺伝子をウイルスベクターに挿入し、ウイルス親和性細胞で増殖させてウイルスとして標的細胞に感染させ、外来遺伝子を標的細胞および臓器内で発現、機能させるシステムである。

代表的なウイルスベクターを、開発された順に表1にあげた。第1群のうち、現在遺伝子治療にもっとも頻用されているのがレトロウイルスベクターであり、最近アデノウイルスベクターも用いられるようになった。ほかに種痘ウイルスベクターがある。第2群は、盛んに試みられ注目されてきたウイルスベクターであり、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターおよび AAV (adeno-associated virus)ベクターがある。それぞれのベクターの特徴は表2にまとめた。第3群は現在開発中のベクターシステムである。

(1) 第1群ベクター

① レトロウイルスベクター

基本型としては、マウスの Moloney 白血病ウイルス(MLV)である。遺伝子治療では最初に用いられたベクターであり⁴⁾、現在もっとも用いられている。

レトロウイルスは二重(+)鎖 RNA ウイルスであり、DNA に逆転写され、宿主細胞のゲノムにランダムに組み込まれる。このプロウイルスが *gag*, *pol*, *env* の構造遺伝子を含みそれぞれの RNA を発現し、蛋白を合成する。野生型のレトロウイルス RNA は約 9.2 kb であり、そのベクターシステムはベクター DNA とヘルパー細胞(パッケージング細胞)からなる。挿入しうる遺伝子は、約 8 kb までで long terminal repeats (LTRs) を有する DNA プロウイルスであるが、構造遺伝子 (*gag*,

pol, *env*) は挿入遺伝子に置換される。したがって、挿入の基本型は治療目的外来遺伝子と薬剤選択遺伝子 (*neo*) であり、主プロモーターとしての LTRs と内部プロモーターの構成からなる(図1)。

また、基本型を改良したシステムがつつぎ報告されている⁵⁾。挿入した遺伝子を発現させるためには、ベクターをパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞は、構造遺伝子を発現しているが、ウイルス粒子は産生しない。ベクターは、パッケージングシグナル(ψ など)と LTRs を有するが、構造遺伝子を欠失させて、薬剤選択遺伝子、内部プロモーターならびに外来遺伝子が挿入されている。外来遺伝子を発現させるには、ベクター DNA をパッケージング細胞に導入し、ウイルス粒子を産生させ、そのなかに外来遺伝子が含まれている。したがって、遺伝子治療では高力価のパッケージング細胞を樹立させ、ウイルス粒子を含む培養上清を標的細胞に感染させ組み込ませたのち、外来遺伝子を標的細胞内で発現させるシステムである。しかし、ベクターのパッケージングシグナルがヘルパー細胞のウイルス構造遺伝子に組換えを起こすと、自己複製可能な RCR (replication competent retrovirus) を産生することがあり、免疫不全患者などでは安全性の点で問題となることがある⁶⁾。

さらにレトロウイルスは、ヒト染色体ではランダムに組み込まれるため、近傍の遺伝子発現を調節する可能性がある。すなわち、レトロウイルスベクターシステムは癌遺伝子を活性化したり、正常癌抑制遺伝子を不活化し、標的細胞を腫瘍化する可能性は否定できない。また、レトロウイルスベクターシステムの特徴は、感染した細胞では自己増殖しない点であるが、非分裂細胞には感染しない欠点がある。

② アデノウイルスベクター

高力価のウイルスが得られるため、レトロウイルスシステムにかわって最近用いられてきたベクターシステムである。40 種以上の血清多型を有し、ヒトでは呼吸器系に感染する特徴を有する。レトロウイルスと比較して高い感染力があり、持続性も期待される。挿入遺伝子の持続感染を武器として、遺伝子治療に用いられるようになった。

表 2 ウイルスベクターの特徴

	レトロウイルス ベクター	アデノウイルス ベクター	HSV ベクター	AAV ベクター
野生型 ウイルス	二重鎖 (+) RNA ウィルス 9.2 kb	二重鎖 DNA 36 kb	二重鎖 DNA 152 kb	一重鎖 4.7 kb
挿入可能 遺伝子サイズ	8 kb	7.5 kb	30 kb	4.5 kb
感染力価	10^6 – 10^9 cfu/mL	10^8 – 10^{10} cfu/mL	10^6 – 10^8 cfu/mL	10^6 – 10^8 cfu/mL
効果期間	長	長	短～長	長
標的細胞	分 裂	分裂・非分裂	分裂・非分裂	分 裂 (非分裂)
投与法	<i>Ex vivo</i> or 直接	<i>Ex vivo</i> or 直接噴霧	<i>Ex vivo</i> or 直接	<i>Ex vivo</i>
安全性の問題	挿入変異	感染反応	神経毒性	細胞障害性
組換え	宿主ウイルスとも ほとんどない	可能性あり	可能性あり	宿主はほとんどないが ウイルスは可能性あり

図 1 レトロウイルスベクターの構造

図 2 アデノウイルスベクターの構造

アデノウイルスは二重鎖直線状の DNA ウィルスであり、約 36 kb のゲノムである。ウイルス吸着レセプターを介して、ほとんどの細胞に感染して核内に到達すると考えられている。このベクターは通常ウイルスゲノムから E1A および E1B 遺伝子を欠失させ、かわりに外来遺伝子を挿入させたものである(図 2)。

また、組換えアデノウイルスは挿入遺伝子発現には効率がよく、7.5 kb までの遺伝子の挿入が可能である。これを、E1A および E1B 遺伝子を発現するヒト胎児腎由来の 293 細胞に導入すると、培養上清中に高力価の外来遺伝子を含むウイルス粒子が得られる。

アデノウイルスベクターは非分裂細胞にも感染

可能で、長期に発現が持続する。しかし、アデノウイルス蛋白に対する細胞性免疫を獲得する欠点がある。局所投与では炎症反応をきたすことがある。これらを克服すれば、アデノウイルスベクターシステムは遺伝子治療においての可能性を秘めている。特に、肺にウイルスをエアロゾールとして噴霧し投与可能であるとする報告⁷⁾もあり、期待されている。

(2) 第 2 群ベクター

① 単純ヘルペスウイルスベクター(HSV-1)

E 型ヘルペスウイルスに属するこのウイルスは、152 kb のユニーク配列(U₁, U₅)と繰り返し部分(a, b, c)からなる二重鎖 DNA ゲノムである(図 3)。このウイルスは非分裂(複製)細胞、特に

図3 単純ヘルペスウイルス・Adeno-associated Virus

神経細胞に親和性があることから注目されてきた。ウイルス収量も高く(表2)、挿入遺伝子が約30 kbまでと応用範囲が広い。しかし、宿主ゲノムでは通常発現せず、潜伏持続感染する。HSV蛋白が細胞障害性を発揮する場合があります⁸⁾、その適応には十分検討を要する。また、温度感受性 HSV ヘルパーウイルスを持続低温(31°C)処理により高い収量が得られるとの報告⁹⁾もある。

HSV ベクターシステムはアデノウイルスと同様の効果が期待され、神経系腫瘍への臨床応用がなされている¹⁰⁾。特に、自殺遺伝子による遺伝子治療として、抗腫瘍剤との組合せで脳腫瘍に行われている。すなわち、HSV チミジンキナーゼ(HSV-tk)酵素遺伝子を発現しうるウイルスを標的腫瘍部に導入し、プロドラッグとしてガンシクロビルを用いると、遺伝子導入されていない細胞にも薬剤効果の作用が及ぶ bystander 効果が得られる。しかし、この効果の機序はいまだ明らかではない。

② Adeno-associated virus(AAV)

AAV 2型は4.7 kbのゲノムのパルボウイルスであり、ウイルスゲノムは一本鎖DNAからなる(図3)。AAVは感染によりヒト染色体19番長腕に組み込まれることが知られており¹¹⁾、細胞内で長期間安定である。AAVの特徴は細胞障害性や抗原性がなく、安全性が高いことである。このベクターはアンチセンス HIV 発現に用いられ、その効果が得られている¹²⁾。さらに AAV は、他のウイルスベクターでは困難である造血幹細胞での有用性が報告されている¹³⁾。しかし、挿入しうる遺伝子のサイズが約4 kb以下であるためと感染系が確立していないため、適応はいまだ限られている。AAV ベクターは、他のウイルスベクターと比

較して安全性が高く安定であり、今後遺伝子治療に用いられてくるウイルスベクターの一つである。

(3) 第3群ベクター

現在、次世代のウイルスベクターとしてポリオ、肝炎ウイルス、HIV-1、Sindbis/Semliki forest ウイルス、インフルエンザ、MPSV などが開発されている。このうち、Sindbis/Semliki forest ウイルスは(+)鎖 RNA ウイルスであり、蛋白合成能が高い¹⁴⁾。しかし、ウイルスを産生させるパッケージングシステムは一定していない。HIV-1 ベクターシステムは CD4+ 細胞を特異的に標的とするため、遺伝子治療として興味深い¹⁵⁾。

以上のように、ウイルスベクターシステムは遺伝子治療への直接利用から脚光を浴びているが、その臨床応用のほとんどはレトロウイルスベクターを用いている。組換えレトロウイルスに関しては、パッケージングシステムでの複製不可能なウイルスのさまざまな工夫がなされており、また種々のプロモーターが検討されている。最近、非分裂細胞にも用いることができる点からアデノウイルスベクターシステムが用いられてきたが、最大の問題はウイルスが抗原性を有するため、抗体が産生されることである。一方、標的細胞にプラスミドベクターを導入する系は、従来からのリン酸カルシウム法がもっとも回収率がよいため、用いられている。すなわち、外来遺伝子をウイルス感染させるというデリバリーシステムは非常に効率的であり、導入方法はリン酸カルシウム法で十分である。

ウイルスベクターを用いた感染システムでの遺伝子治療に関しては、文部省および厚生省からガイドラインが出され、数施設からすでに申請中であるが、本邦での最大の問題はウイルスベクターシステムの安全性である。すなわち、輸入した手法をそのまま直接用いても、ウイルスタイターを上昇させないと効果が得られず、また患者に施行する場合の安全性が本邦ではチェックしえないのが現状である。欧米では、現在までのところウイルスベクターによる遺伝子障害の報告はないが、ヘルパーウイルスの感染を防御する手段はなく、倫理面での了解を含めた社会的な理解が必要である。

図4 リボザイム挿入ウイルスベクター

プラスミドベクターシステム

非ウイルス感染ベクターシステムは、プラスミド DNA を直接細胞や臓器に注入する方法であり、導入方法としてデリバリーシステムをどう確立するかが重要である。筆者らは非感染系でのベクター DNA に外来遺伝子を組み込み、特に標的遺伝子発現抑制の目的で、アンチセンスおよびリボザイムの直接導入を試み、検討を行っている。

一方、外来挿入遺伝子としてのアンチセンスおよびリボザイムは、過剰に発現している遺伝子を標的として、遺伝子発現抑制するため癌の増殖抑制が得られることが期待される。挿入遺伝子の安定した長期間効果を得るには、前述したようにウイルス感染がもっとも有効である。しかも、アンチセンスの直接導入では一過性の発現抑制効果を繰り返すことには限界がある。そこで筆者らは、発現ベクターを含むベクターに、アンチセンスおよびリボザイムを標的塩基配列に相補的な二重鎖の DNA の形で挿入する方法を考案した¹⁶⁾。

遺伝子を導入する場合、まず選択すべき問題はプロモーターである。最初に、LTR をプロモーターとするレトロウイルスベクターである pMMV プラスミド (Clontech) を使い、そのマルチクローニング部位にリボザイムを挿入した。さらに、レトロウイルスベクターに強力なサイトメガロウイルスプロモーターを挿入した LNCX プ

ラスミドを用いている (図4)。

リボザイムの細胞内での導入系を組むまえに、標的遺伝子の発現抑制としてのアンチセンス効果の確認と、*in vitro*における RNA 反応抑制効果を得る必要がある。すなわち、標的遺伝子の塩基配列から合成した RNA と、相補的配列から合成したリボザイム RNA との反応を確認したうえで、プラスミド DNA に挿入したリボザイムの細胞内での標的遺伝子の抑制効果を検討した。その結果、細胞内でのリボザイムの発現と標的遺伝子発現抑制効果が得られた。その効果は導入2~3日目から得られ、約4週間は継続したが、以後1カ月間リボザイムの効果は薬剤添加条件下で一定の発現を維持した¹⁰⁾。しかし、このベクターはデキサメサゾンにより挿入遺伝子発現を誘導させる不便さがある。

そこでつぎに、ヒト β アクチンプロモーターを発現プロモーターとする pH β APr1 プラスミド¹⁷⁾にリボザイムを挿入した (図4)。その結果、さらに継続したリボザイムの発現誘導効果と標的遺伝子抑制効果が得られた。

遺伝子導入法

発現プロモーターとプラスミドの選択のつぎに問題となるのが、挿入遺伝子をいかに効率よく発現させるかのデリバリーシステムとしての遺伝子導入法である。現在、遺伝子導入法には多くの方法が試みられており、ウイルス感染以外には、特に化学的手法としてリポソーム (liposome) 法や、物理的手法として電気穿孔法 (electroporation) がある (表3)。

前述したウイルスベクターを用いた方法を、ウイルス感染以外の導入法で検討すると、両者とも同等の導入効果が得られている。しかし、直接 *in vivo* に用いるに当っては両者それぞれに問題点がある。すなわち、リポソーム法は標的臓器、細胞、遺伝子にどのように到達させるかという問題がある。電気穿孔法においては直接患部へ針が達しないと効果が得られないという問題があげられる。それらを克服するため、パーティクルガン法¹⁸⁾が考案されている。この方法は、遺伝子 DNA を金属粒子に包埋して直接標的臓器に注入するという点ですぐれているが、いまだヒトには試みられ

表 3 遺伝子デリバリーシステム

方 法	安定性	<i>ex vivo</i>	適 用 <i>in vivo</i>
化学的方法			
リン酸カルシウム法	S	++	—
リポソーム法 (リポフェクション)	S/T	++	+
物理的導入法			
エレクトロポレーション法	S	++	—
マイクロインジェクション法	S	+++	—
パーティクルガン法	T	++	—
生物的導入法			
レトロウイルス	S	+++	—
アデノウイルス	T	+++	+++
その他			
レセプター標的化	T	+++	+～—

S: stable. T: transient

ていない。

in vivo 直接法

遺伝子治療に導入法を応用するうえで、細胞内での導入に成功しても生体内で実際効果が得られなければならない。そのため、癌の場合まずマウスでの腫瘍縮小効果が得られるかどうかが問題となる。

癌細胞に、培養下でリボザイムを含むベクターをリポソーム法あるいは電気穿孔法で導入し、ヌードマウスに移植するという *ex vivo* 効果を検討した。ベクターのみを対照として比較すると確かに効果が得られた¹⁹⁾。しかし、リボザイムを含むベクターでの担癌マウスの組織への直接投与ではまだ成果が得られていない。逆に、アンチセンスは製剤化することで生体内投与が可能であり (Lynx, 私信)、欧米ではすでに数施設で臨床応用され、その成果が得られており、今後期待される直接法である。

癌における遺伝子治療

これまでの癌に対する遺伝子治療の試みをまとめてみると、免疫増強、BCR 遺伝子抑制によるアポトーシス誘導、骨髄抑制阻止 (MDR-1 遺伝子、変異型 DHFR 遺伝子導入) などがあげられる²⁰⁾。筆者らは、アンチセンスおよびリボザイムにより過剰発現している遺伝子を抑制することで、癌の

制圧を目指している。このなかでは、薬剤感受性を増強するアンチセンスおよびリボザイムがもっとも効果が得られるものと考えられ、薬剤感受性遺伝子の導入あるいは耐性遺伝子の導入はすでにいくつかの臨床応用がなされている。

おわりに

ウイルスベクターシステムは遺伝子治療への応用から注目され、特にレトロウイルス感染系が確立され、挿入遺伝子の機能発現が得られている。そして、次世代のウイルスベクターシステムが報告され、現実化している。標的とする遺伝子の発現を直接抑制するアンチセンスおよびリボザイムは、癌においては増殖抑制効果が得られることが明らかとなっている。それらの効果から、ウイルスベクタープラスミド DNA を遺伝子導入法との組合せによって、非感染ウイルスベクターシステムにおいても癌の遺伝子治療への有用性が期待される。

文 献

- 1) Sambrook, J. et al. eds.: Molecular cloning (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press, 1989.
- 2) Caplen, N. J. et al.: Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process. *Gene Therapy* 1: 139-147, 1994.
- 3) Jonak, Z. et al.: Electromanipulation in Hybri-

- doma Technology. Stockton Press, 1989, p 32-46.
- 4) Anderson, W. F. et al. : The ADA human gene therapy clinical protocol. *Human Gene Ther.* 1 : 331-362, 1990.
 - 5) Kotani, H. et al. : Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Human Gene Ther.* 1 : 31-36, 1990.
 - 6) Donahue, R. E. et al. : Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* 176 : 1125-1135, 1992.
 - 7) Engelhardt, J. F. et al. : Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenovirus. *Nature Genet.* 4 : 27-34, 1993.
 - 8) Johnson, P. A. et al. : Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus. *J. Virol.* 66 : 2952-2965, 1992.
 - 9) Geller, A. I. et al. : An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vector : Potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 8950-8954, 1990.
 - 10) Koering, C. E. et al. : Induced expression of the conditionally cytotoxic herpes simplex virus thymidine kinase gene by means of a parvoviral regulatory circuit. *Human Gene Ther.* 5 : 457-463, 1994.
 - 11) Kotin, R. M. et al. : Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* 11 : 5071-5078, 1992.
 - 12) Chatterjee, S. et al. : Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 258 : 1485-1488, 1992.
 - 13) Zhou, S. Z. et al. : Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 21 : 928-930, 1993.
 - 14) Berglund, P. et al. : Semliki forest virus expression system : Production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology* 1 : 916-920, 1993.
 - 15) Poznansky, M. et al. : Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immuno-deficiency virus type 1 vector. *J. Virol.* 65 : 532-536, 1991.
 - 16) Scanlon, K. J. et al. : Ribozyme-cleavage of *c-fos* mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallo-thioneine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 10591-10595, 1991.
 - 17) Kashani-Sabet, M. et al. : Reversal of the malignant phenotype by an anti-ras ribozyme. *Antisense Res. Develop.* 2 : 3-15, 1992.
 - 18) Zelenin, A. V. et al. : Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. *FEBS letters* 244 : 65-67, 1989.
 - 19) Tone, T. et al. : Suppression of EJ cells tumorigenicity. *in vivo* 7 : 471-476, 1993.
 - 20) Clinical Protocols. *Cancer Gene Ther.* 1 : 73-78, 1994.