

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：細胞対話型分子システムを用いる革新的遺伝子送達概念の創製
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

片山 佳樹 (九州大学大学院工学研究院 教授)

主たる共同研究者

谷澤 克行 (大阪大学 産業科学研究所 教授)

下川 宏明 (東北大学大学院医学系研究科 教授)

東海林 洋子 (聖マリアンナ医科大学大学院医学研究科 准教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体

本研究では、疾患細胞に特異的に亢進している細胞内シグナルに応答して、そこでだけ遺伝子を発現させる分子システムを構築することを目標としている。研究代表者の「さきがけ」研究における「細胞対話型分子システム」の研究を進展させて、全く新しい遺伝子治療の概念を創製しようとするものである。

無細胞系で見出していた遺伝子制御剤を用いて、培養細胞内での遺伝子制御に成功したことを皮切りに、遺伝子制御メカニズムを解析して、遺伝子の転写がDNA鎖の運動性に支配されており、その運動を抑え込むことによって転写を抑制している可能性があることを示した。さらに、独自の基質スクリーニング用ペプチドアレイを開発し、これまで不可能であった各種の特異基質の開発に成功している。各種の細胞内シグナルに応答するキャリアとして、プロテインキナーゼを始めとする各種のシグナルに対する遺伝子制御剤の開発を行っている。がんに対するプロテインキナーゼC に関しては、担がんマウスを用いて、正常細胞では発現せず、がん細胞で遺伝子を特異的に発現させることに *in vivo*で初めて成功しており、大きな進展となった。

これらの遺伝子制御剤と遺伝子の組み合わせを生体内に送達する手段として、谷澤グループの開発しているB型肝炎ウイルスのエンベロップ蛋白と脂質からなるナノ中空粒子を用いて、そのナノ粒子に封入して担がんマウスに投与し、ヒト肝臓がん由来の腫瘍組織にのみ遺伝子発現が効率よく起こり、ヒト大腸がん由来の組織には発現が起らないことを確認している。

本研究は、新しい概念に基づいて開始された研究であり、従来の研究分野とは馴染まない部分もあるため、当初は研究を発表する学会の選択にも苦労があったようであるが、その成果が蓄積され・発表されるに従い、最近になってその独創性に興味を示す向きも増えて来つつあり、本年の米国遺伝子治療学会においてはハイライトとして発表することができた。「さきがけ」から立ち上がった研究であるが、4年間という研究期間を考慮すると、非常に大きな成果を挙げていると評価したい。

3 - 2. グループ別

1) 片山グループ

遺伝子制御剤の開発と、その基礎評価、メカニズムの解析を担当。

研究開始時には、2つの系で無細胞の条件下では遺伝子発現の制御が可能であることを確認していた。生細胞内での遺伝子制御を調べる為に、プロテインキナーゼA応答型のPAKをセンダイウイルスのエンベロップを用いて遺伝子導入を行い、細胞をフォルスコリン処理して細胞内のプロテインキナーゼAを活性化した場合のみ遺伝子が発現することを確認した。これが初めての生細胞内で遺伝子制御の成功例となっている。当初は、粒子どうしが凝集を起こしやすく、凝集体の粒径が200nmを越えていた遺伝子制御剤と

DNAの複合体を安定化し、且つ粒径を小さくする必要があり、種々の検討の結果、PEG鎖の導入により解決した。遺伝子制御剤として用いる高分子側鎖にグラフトする基質ペプチドに連結するカチオン性ペプチドの配列には、かなり自由度があることが分かるなど、種々の特性を明らかにしている。遺伝子制御剤ポリマーとDNAの複合体においては、複合体になることによって遺伝子の転写が高効率に阻害されている。即ち、RNAポリメラーゼのアクセスを阻害しているが、DNAと相互作用しているペプチドはプロテインキナーゼや、プロテアーゼと容易に反応する。この現象を解明するために、制御剤側鎖基質ペプチドのリン酸化の観察を行い、リン酸化が進むにしたがい、ある時点から急激にDNAの運動が激しくなり、mRNAへの転写が開始されることを明かした。制限酵素によるDNA鎖の切断についても同様の現象を観測しているが、DNAaseについては反応を制御することができていない。この現象から、遺伝子制御複合体は、酵素のアクセスを阻害しているのではなく、DNAにアクセスしてもスライドが阻害されているらしいこと、DNAの運動性が極めて密接に連動しているらしいことを明らかにして、新しい遺伝子転写制御のメカニズムの提唱に到っている。

これ以降、標的疾患にアプローチするための種々の細胞内シグナルに応答する制御剤の開発に弾みがつき、効率的な基質開発のために、ペプチドアレイを用いた基質探索法が確立された。

2) 谷澤グループ

中空バイオナノ粒子の開発と、遺伝子制御システム適用検討を担当。

本グループの中空バイオナノ粒子は、B型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクを酵母から発現させ、糖質を取り込んで自発的に生成されるものであり、ヒトの肝臓細胞に特異的に送達される特性を持っている。物理特性を保ったまま1年以上の保存に耐えることを確認して、この面での実用性に問題がないことを確認している。粒径をコンパクトにした制御剤-DNAの複合体の封入には、これを内包したリポソームとバイオナノカプセルをインキュベートすることによって可能であることを見出している。このシステムを用いて細胞に複合体を導入し、プロテインキナーゼA応答型システムでは、細胞にファルスコリン刺激を加えて細胞内プロテインキナーゼを活性化させた場合に、強い遺伝子(GFP)発現を認めている。プロテインキナーゼC応答型の場合にも、同様の結果を得ているが、細胞株の種類によっては、明確な発現が見られないケースもあるようである。

この中空バイオナノ粒子は、ヒト肝臓細胞に強い指向性を有していることが特徴であるが、この標的臓器を変えることも検討して、エンベロップタンパクのProS領域を改変して上皮細胞由来の細胞を標的にすることに成功している。この手法が一般化出来れば、種々の標的疾患細胞への選択性を有した、遺伝子制御システムが出来上がり、他の臓器での遺伝子発現を避けることが可能になることが期待される。

3) 東海林グループ

各種標的シグナル応答型システムの細胞内評価と、ウイルス疾患用プロテアーゼ応答型システムの開発、およびその評価系の確立を担当。

細胞内シグナル応答型システムをウイルス疾患に適用するため、ウイルス疾患を評価するシステムの構築から着手して、MTT法やWST-8による抗HIV効果を判定するアッセイ系が、ウイルスプロテアーゼ応答型システムの評価に適用出来ることを確認している。

肝炎ウイルスやHIV、コクサッキーウイルスなどが感染細胞内で増殖する際に、ウイルスゲノムが創り出すウイルスプロテアーゼは、ウイルス疾患を標的とする場合には最適なシステムといえるが、安定な感染細胞株が存在しないため評価が困難であり、効率の良いシステムの構築にはまだ成功していない。

現時点では、細胞内に遺伝子制御複合体を送達する効率が必ずしも高くないため、マイクロインジェクションによって複合体を細胞内に導入して、遺伝子発現制御能を調べている。I- -キナーゼ応答型や、

プロテインキナーゼC およびSrc応答型において、標的酵素活性が亢進している細胞に導入した場合、明確な遺伝子発現が見られている。しかし、これらの遺伝子を効率的に送達するというDDSシステムにおける共通課題は未だ残されている。

4) 下川グループ

循環器疾患への遺伝子制御システム適用のための実験系の確立を担当。

循環器系疾患では、評価系を作るところから始める必要があった。ナノ粒子の適用法として、高分子ミセルナノ粒子にドキシソルピシン(DXR)を内包した新しいDDS製剤であるNK911を用い、血管傷害モデルにおいて、ナノカプセルが臨床応用可能であることを確認した。ついで、実験動物から血管を取り出さずに、連続的に観測するためのMRI造影剤を片山グループとの共同で、開発に成功した。これを用いれば、血管傷害部位でシグナルを観察することができ、遺伝子治療効果を評価することが可能で有ることが明らかとなった。一方、Rhoキナーゼの阻害剤を用いた治療検討からRhoキナーゼが肺高血圧症の良い治療標的になることを明らかにし、その活性化が動脈硬化などの分子機構に深く関わっていることを明らかにした。これに適用出来る基質を開発中である。

循環器疾患へのナノカプセルの適用や、その治療効果の有効な評価法については先例が無く、今回確立した評価方法が初めての例となるものである。

4. 事後評価結果

4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
63	0	45	137	16	41	1	46	1	17

研究の進捗に従って順調に発表数が増加しており、招待講演も増えている。次第に注目を集めていることを示している。特許は十分に取得出来ているようである。

疾患細胞に特異的に亢進しているシグナルに応答して遺伝子を発現させるという当初の目的は達成されている。高分子鎖に基質となるペプチドをつけて、DNAと複合体を形成させることによって遺伝子の発現を抑え、疾患細胞で亢進しているシグナル(酵素)でペプチドが反応して、複合体が解離してDNAが発現するというシステムを完成させている。基質ペプチドを効率的に合成するために、Scan Site の確率分布を元に設計した 2000種に及ぶペプチドライブラリーを利用する新規な手法を確立している。この手法を用いて、細胞内の各種の酵素(シグナル: Protein kinase A, 1- -kinase, Src kinase, Protein kinase C , Rho kinase, Caspase-3, HCV protease, HIV Protease, コクサッキーウイルスプロテアーゼ)に応答する基質を合成して、大部分のものは、in vivo での応答確認が済んでいる。このように、今までにない新しいシステムを創製したことは高く評価出来る成果である。高分子と基質ペプチドからなる遺伝子制御剤は、遺伝子を完全に固定する必要はなく、その運動性を制限すればRNAポリメラーゼなどの酵素がDNA鎖上をスライドできないため発現できないのではないかという機構の提案も新鮮である。

これらの細胞内シグナルが、疾病細胞で特異的に亢進していることは確認されているが、その他の原因で多少の亢進が起こっている細胞が存在する可能性は否定されている訳ではない。従って、標的とする疾病細胞に、特異的に複合体を導入できるキャリアーの開発も重要なポイントである。B型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクを用いた中空バイオナノカプセルを用いて、肝細胞への特異的な導入に成功しており、さらにエン

ベロップタンパクの一部を改変して、標的細胞を変えることに成功しているが、まだ安全性など確認すべき項目が残されていると思われる。

ウイルスでの評価システムの構築や、今までに例のない循環器系での評価法の確立も評価出来る成果といえる。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

従来のDDSとは異なった、独創的な発想に基づく一種のDDSシステムであり、細胞内シグナルを利用して遺伝子の発現を制御するという考え方を実証して見せた。優れた成果を挙げたと言える。

まだ基礎を確立した段階であり、実用化までには多くのハードルがあると思われるが、研究の中で開発した手法や、発見した新たな現象、その解析による新たな仮説などは、この分野の研究に少なからぬ影響を与えるものと思われる。合成された多くの基質ペプチドも、遺伝子の発現制御や酵素の作用の解析などの分野で応用範囲の広いものと思われ、今後この分野で利用が広がっていく可能性が高い。特に、Rho-kinase の基質については、欧米を中心に多くの問い合わせが来ており、反響は大きい様である。また、遺伝子制御剤の作用機構の解析から、遺伝子発現を抑えるためには、制御剤が遺伝子に隙間無く結びつく必要はなく、RNAポリメラーゼなどの酵素がDNA鎖でスライド出来ない程度に運動性を抑えれば良いという仮説も、興味深いものであり、遺伝子発現制御の新しい指標となる可能性がある。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

受賞 下川 弘明 (2006年度米国心臓協会学会賞)

若手研究者が多数の奨励賞などを受けている。