

【短報】

自殺遺伝子治療を目指した疾患細胞選択的な遺伝子発現制御法の開発

浅井大輔^{1,2)}・中島秀喜^{1,2)}¹⁾ 聖マリアンナ医科大学微生物学教室*²⁾ 科学技術振興機構 (JST-CREST)

(平成20年2月21日受付・平成20年6月25日受理)

ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子 (HSVtk) とガンシクロビル (GCV) を用いる自殺遺伝子治療法は、一部の癌細胞にのみ遺伝子を発現させるだけで多くの癌細胞を治療できるという観点で注目された。しかし正常細胞にも HSVtk が発現し、3リン酸化型 GCV により種々の細胞障害が起こり問題となった。本稿では、癌細胞内のシグナル異常に着目した疾患細胞のみへの遺伝子発現手法の概念、すなわち標的細胞特異的に遺伝子を発現させる手法である D-RECS (drug or gene delivery system responding to cellular signals) について報告する。遺伝子を内包するキャリアーとして、種々の癌細胞内で活性が亢進している IκB キナーゼ、プロテインキナーゼ Cα, Src キナーゼに対する特異的な基質ペプチドを導入した高分子を調製した。遺伝子キャリアーの機能解析の結果、各種細胞内で亢進しているキナーゼ活性に応じて遺伝子発現を制御することが可能であった。細胞内シグナルの異常は疾患の本質であり、本法により自殺遺伝子治療法の改良が期待される。

Key words: gene delivery, gene therapy, ganciclovir, herpes simplex virus thymidine kinase, biotechnology

アシクロビル (ACV)・ガンシクロビル (GCV) は 1970 年後半～80 年代前半に画期的な抗ウイルス薬として開発され、その卓抜な薬物設計と高い安全性・選択性の作用機序を論証した Gertrude B. Elion 女史らにノーベル医学生理学賞が贈られ注目された。単純ヘルペスウイルス (HSV) や水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に対して ACV が、またサイトメガロウイルス (CMV) に対しては GCV が、今日の治療薬として使用されている。一方、これら抗ウイルス薬の作用機序は癌の遺伝子治療にも適用されて注目を集めた。すなわち、悪性グリオーマに対する遺伝子治療において、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子 (HSVtk) を腫瘍細胞にあらかじめ発現させておき、その後 GCV を点滴静注し、HSVtk が発現した腫瘍細胞を選択的に死滅させようとする治療方法である。

1990 年に始まった遺伝子治療は 2008 年 3 月の統計によると全世界でこれまでに 1,347 例の臨床試験が実施されている (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide; <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。このうちの約 70% を癌遺伝子治療が占めている。癌遺伝子治療法には主に自殺遺伝子治療法・免疫遺伝子治療法・p53 遺伝子などの導入による腫瘍増殖の直接抑制法があり、状況に応じて適切に選択されている。現在のところ遺伝子

治療は当初の期待のわりには未だ目覚ましい成果を得ていないが、安全な遺伝子キャリアーの開発とその性能向上などの基礎研究により、臨床試験は着実に発展し続けている。遺伝子治療実用化への最も大きな壁は「標的細胞だけにいかに遺伝子を発現させるか」という問題であり、遺伝子導入・発現技術の開発という研究分野は近年ますます重要性を増してきている。上述の HSVtk と GCV を用いる方法は自殺遺伝子治療法として代表される方法であり、一部の癌細胞にのみ遺伝子を発現させるだけで多くの癌細胞を治療できるという観点で注目された。しかしながら、正常細胞にも HSVtk が発現してしまったために、毒性のある 3リン酸化型 GCV が産生して正常細胞も障害を受け、種々の副作用が起こることが判明した。すなわち、現在の疾患細胞選択的な発現制御技術には限界があり、この打開策が切望されている。われわれのグループは、プロテインキナーゼ A とカスパーゼ 3 をターゲットにして癌細胞内のシグナル異常に着目した疾患細胞のみへの遺伝子発現手法の概念 D-RECS (drug or gene delivery system responding to cellular signals) を提唱してきた (Fig. 1)^{1,2)}。Fig. 1 に示すように、標的細胞内で発現するシグナルでのみ活性化される薬剤は、正常細胞での毒性が軽減でき、目的とする薬剤の効果が標的細胞のみで発揮される。本研究では本概念を拡

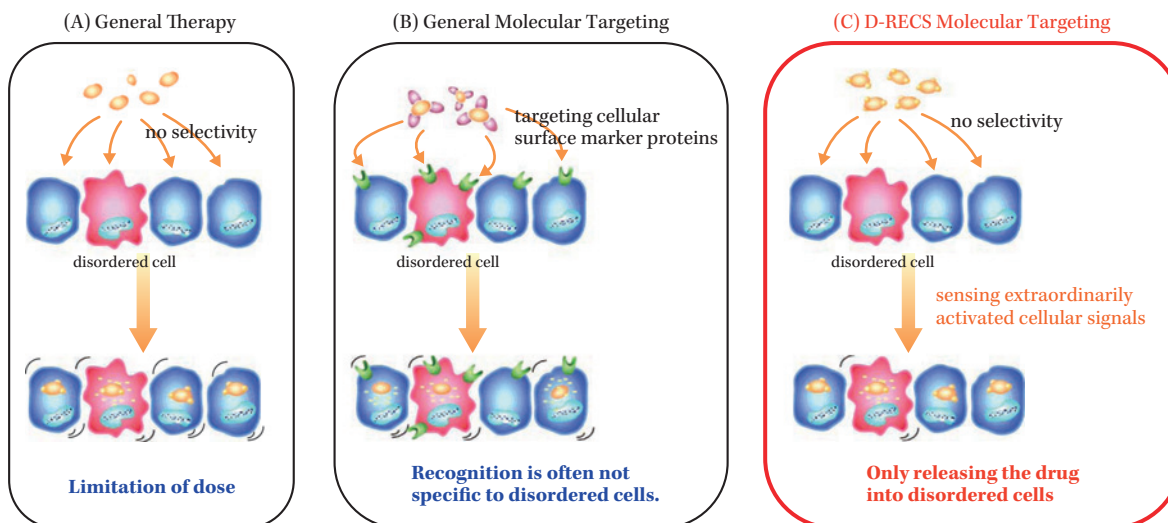


Fig. 1. (A) General therapeutic genes have no selectivity for disordered cells. Therefore, the dose was limited to not cause side effects. (B) Most research efforts to secure cell specificity have focused on an active targeting strategy using specific interaction between cellular surface marker molecules and their specific ligands. However, practical strategies satisfying cellular specificity have not yet been established. (C) In our concept, intracellular enzymes which are universally activated in disordered cells were used as the trigger to activate the transgene expression.

張し、遺伝子治療法開発の一戦略として標的細胞特異的に遺伝子を発現させる普遍的な手法開発のための基礎的な解析を目的とした。特に現行の自殺遺伝子治療が抱える問題点を打開する概念確立を目指し、種々の癌細胞内で活性亢進が報告されている I κ B キナーゼ β (IKK β)³⁾、プロテインキナーゼ C α (PKC α)⁴⁾、Src キナーゼ⁵⁾ に応じて遺伝子を放出する方法論の開発に焦点を当てた。

各キナーゼが標的とする蛋白質のリン酸化部位を抽出したペプチドやライブラリー由来のペプチドをキナーゼ基質とした分子設計を最初に行った (設計した基質の代表例をアミノ酸一文字表記で示す; IKK β : XXXKK-KKERLLDDRHSGL, PKC α : FKKQGSFAKKK, Src キナーゼ: GKXXYIYGSF; X=8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸残基; 下線はリン酸化部位)。この際、静電相互作用により DNA と結合させるため正電荷アミノ酸であるリシンを付加してカチオン性ペプチドにし、アクリルアミド誘導体とラジカル重合させて高分子化するためペプチドの N 末端をメタクリロイル化したペプチドを化学合成した。合成したペプチドを過硫酸アンモニウムおよび N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを開始剤としてアクリルアミド誘導体とラジカル重合させ、高分子型の遺伝子キャリアーを調製した。残存したアクリルアミド誘導体モノマーは透析により除去した。一連の遺伝子キャリアーをサイズ排除クロマトグラフィー (GPC) で分子量解析したところ数十 kD のオーダーであった。また、動的光散乱法 (DLS) により高分子の物性 (zeta 電位と粒径) を調べたところ、DNA と複合体を形成すると 100 nm のオーダーのサイズに凝集することおよび複合体は正に帯電していることがわかった。

次いで、調製したキャリアーが特定のキナーゼによりリン酸化されるかどうかを [γ -³²P]ATP を用いて解析した。その結果、遺伝子キャリアー単独の場合および DNA との複合体を形成した場合のどちらにおいてもキナーゼによりリン酸化されることがわかった。このリン酸化はリン酸化部位のセリン残基をアラニンに置換した陰性コントロールアナログでは認められなかった。以上の結果は調製した高分子が特定のキナーゼによりリン酸化される遺伝子キャリアーであることを示唆した。

遺伝子キャリアーがキナーゼに応答して DNA を放出する機能をもつかをゲルシフトアッセイにより調べた。DNA が高分子と複合体を形成すれば DNA の負電荷がキャリアーの正電荷により相殺されて泳動されなくなるという原理である。キャリアー-DNA 複合体を形成しているときは泳動されず、キナーゼ処理により複合体が崩壊して DNA が放出され泳動されるようになることが確認された。これまでのわれわれのグループの実験により、IKK は LPS および炎症性サイトカイン刺激により活性化されること、PKC α はマウスメラノーマ由来の B16 およびヒト肝癌由来細胞 HepG2 で、そして Src キナーゼはヒト扁平上皮癌細胞 A431 において恒常的に活性化していることを認めている (未発表)。そこで、遺伝子キャリアーが細胞内で機能するかを評価するため、マイクロインジェクションにより遺伝子キャリアー-DNA 複合体を細胞導入して遺伝子発現制御能を調べた。遺伝子キャリアーと蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) の発現プラスミドを混合してキャリアー-DNA 複合体を形成させ、これを生細胞に導入して GFP 由来の蛍光を顕微鏡にて観察した。その結果、標的キナーゼの

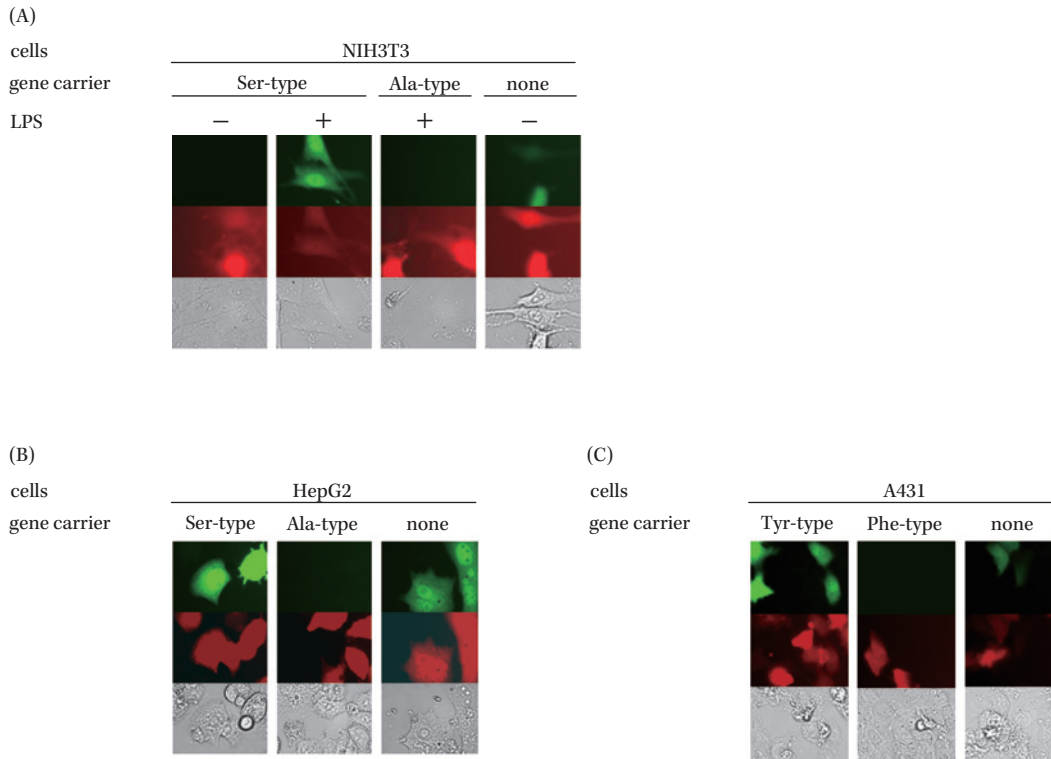


Fig. 2. Regulation of GFP gene expression by $IKK\beta$ -responsive gene carrier in NIH3T3 cells (A) or $PKC\alpha$ -responsive gene carrier in HepG2 cells (B) or Src kinase-responsive gene carrier in A431 cells (C) after the cytoplasmic microinjection. pEGFP-C1 condensed with the gene carrier was injected into the cytoplasm together with dextran-Texas Red. Twenty-four hours after the injection, GFP expression was monitored by fluorescence microscopy. In the case of (A), the cells were stimulated in the presence or absence of 100 ng/mL LPS (denote LPS + or -) at 37°C for 6 h. Ser-type indicates the polymer possessing serine residues for phosphorylation by the kinases, and Ala-type and Phe-type represent the alanine- and phenylalanine-substituted analogs, respectively.

活性が亢進した細胞に有意に GFP 由来の蛍光が認められた (Fig. 2)。GFP の発現プラスミドのプロモーターは CMV プロモーターであり、細胞導入されるとキナーゼの活性には無関係に発現するのでこの GFP 発現の差はプロモーターには依存しない。実際に、プラスミドのみをマイクロインジェクションすると GFP 発現が認められた (Fig. 2 の none)。一方、本遺伝子キャリアーはキナーゼのペプチド基質配列を含むポリカチオンであり、ポリアニオンである DNA を凝集させて遺伝子発現に必要な転写因子群の接近・スライドをアクリルアミド鎖により立体的に阻害すると考えられる。調製した種々の D-RECS 遺伝子キャリアーについて無細胞系で遺伝子発現を調べると、キャリアー存在下では遺伝子発現は効率よく抑制され、リコンビナント酵素の添加によってその発現は回復した。よって培養細胞においても、キナーゼが遺伝子キャリアーをリン酸化するとカチオン性ネットワークが消失して静電相互作用が解除されるため複合体が崩壊し、DNA が放出されて遺伝子発現が起こると考えられた (Fig. 2 の Ser/Tyr-type)。また想定どおり、リン酸化部位をもたない変異体では複合体崩壊は起きず

遺伝子は発現しなかった (Fig. 2 の Ala/Phe-type)。Fig. 2 の結果は、調製した遺伝子キャリアーが特定のキナーゼに応じて導入遺伝子発現の ON/OFF を制御できたことを直接的に示唆している。すなわち、前述の試験管内 (無細胞系)での遺伝子発現制御が培養細胞においても可能であったことを示している。 $PKC\alpha$ 応答型遺伝子キャリアーについては担癌マウスにおいても癌細胞特異的な導入遺伝子発現が認められ、現在自殺遺伝子 HSVtk とプロドラッグ GCV による癌治療に向け研究を進めている。

細胞内シグナル伝達機構はその相互作用機構が構成要素からネットワーク全体にいたるまで非常に精巧で複雑であり、その統合的な動作原理はほとんど明らかにされていない。現在、副作用なく癌細胞にのみ強力な薬理活性を発揮させうる理想的な抗癌薬は存在しない。この大きな理由として、複雑な細胞内シグナル伝達機構が異常を發した状態である癌細胞において、細胞内シグナルに有効に作用・影響を与える薬物や治療法創出のための普遍的戦略が存在せず、偶然に頼る各論的な開発に頼らざるをえないことが挙げられる。現在注目されている分子

標的治療薬においてもその実際は、特定の分子を標的とするように設計されているものの、実際に使用してみると異なった作用機序が見出されることがあるのが現実である。熾烈な開発競争の結果創成された抗炎症薬としての IKK β 選択的阻害剤 ML120B の投与は予想に反して敗血症性ショックを引き起こす確率をあげ、その原因は血中の炎症性サイトカイン IL-1 β の分泌促進であったとの昨年 9 月の Karin, M.らのグループによる報告は記憶に新しい⁶⁾。現在では、有効な薬物発掘の確率を上げるための網羅的な探索方法開発を目指すケミカルバイオロジーが注目されている⁷⁾。しかしながら、上述の各動作原理を抽出して情報変換するという普遍的な細胞内シグナル標的創薬法が確立すれば、癌細胞内シグナル異常に有効な影響を与える高効率な創薬が可能となる。現在までに細胞内シグナルに応答した創薬概念はまったくなく、本概念はわれわれのグループが世界に先駆けて提案しているものである。われわれはキナーゼシグナル応答型に加えウイルスプロテアーゼに応じた遺伝子キャリアーの開発にも成功している⁸⁾。細胞内シグナルの異常は疾患の本質であるため、本概念は上述の研究へのアプローチに大いに資すると思われる。

本 D-RECS 法は決して万能という訳ではなく、その成功の鍵は、正常細胞と異常細胞の標的シグナルのレベル差と用いる基質の能力の兼ね合いが握っている。糖尿病のようにどこからが異常であるかの線引きが難しい疾患には適応しがたく、癌やウイルス疾患などのコントラストの良いシグナルがあるものに適応しやすい。また、サイトソールで重要な役割を果たしている、かつ異常細胞で恒常的に活性化している酵素群すべてが標的的可能となる。シグナルのレベル差が小さい疾患でも、両者を見分ける能力のある優れた基質があれば適用の可能性がある。現在、異常細胞で特異的に発現する新規分子をプロテオミクスにより網羅的に解析する手法が注目されているが、本概念はこれとは根本的に異なる新しい手法である。今回標的としたキナーゼはある種の癌細胞での恒常的な異常活性化が報告されているものの、各個人によってそのレベルは大きく異なる。よって、患者個人々の正常と異常のレベルを見分けることができる適切なコントラストをもたらず基質を探すことが望ましい。われわれのグループでは、種々の酵素の基質ペプチドを基板上に固定したペプチドアレイの開発を進めている。患者個人々から調製したライセートをペプチドアレイにより解析

してコントラストの良い基質を見極め、その基質を本法により遺伝子キャリアーとして使用できれば、真のテーラーメイド医療が可能となろう。

謝 辞

本研究にかかわるほとんどは、九州大学・片山佳樹教授との共同研究として実施したものである。ここに深く感謝いたします。また、研究進行にご助言を賜りました当教室の東海林洋子非常勤講師に感謝します。そして、研究をともに実施した片山研究室の姜貞勲博士、佐藤裕子博士、園田達彦博士ならびに片山研究室の諸兄諸子に感謝します。最後に、本研究は独立行政法人科学技術振興機構 (JST-CREST, 埼玉県川口市) の研究費ならびに文部科学省科学研究費により行ったものであり、ここに感謝の意を表します。

この論文は第 55 回日本化学療法学会総会発表演題座長推薦論文である。

文 献

- 1) Kawamura K, Oishi J, Kang J H, Kodama K, Sonoda T, Murata M, et al: Intracellular signal-responsive gene carrier for cell-specific gene expression. *Biomacromolecules* 2005; 6: 908-13
- 2) Oishi J, Kawamura K, Kang J H, Kodama K, Sonoda T, Murata M, et al: An intracellular kinase signal-responsive gene carrier for disordered cell-specific gene therapy. *J Control Release* 2006; 110: 431-6
- 3) Greten F R, Eckmann L, Greten T F, Park J M, Li Z W, Egan L J, et al: IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-96
- 4) Griner E M, Kazanietz M G: Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 281-94
- 5) Irby R B, Yeatman T J: Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000; 19: 5636-42
- 6) Greten F R, Arkan M C, Bollrath J, Hsu L C, Goode J, Miething C, et al: NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 2007; 130: 918-31
- 7) Doudna J A: Chemical biology at the crossroads of molecular structure and mechanism. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 300-3
- 8) Asai D, Kodama B K, Shoji Y, Nakashima H, Kawamura K, Oishi J, et al: Drug delivery system based on responses to an HIV infectious signal. *Med Chem* 2008; 4: 386-91

Disordered cell-specific gene regulation system for suicide gene therapy

Daisuke Asai^{1,2)} and Hideki Nakashima^{1,2)}

¹⁾ Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine,
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japan

²⁾ CREST, Japan Science and Technology Agency

Suicide gene therapy with the herpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk) and ganciclovir(GCV) have shed light on the cancer gene therapy. However, a serious concern arose on account of the expression of HSVtk in normal cells, which can induce cytotoxicity. Here, we propose a novel strategy called D-RECS (drug or gene delivery system responding to cellular signals) for the development of a target cell-specific gene expression system. Polymers carrying the peptide substrate specific for each kinase (I κ B kinase, Protein kinase C α , and Src kinase) were prepared as the gene carriers. The results of the biochemical analyses revealed that the gene carriers enabled regulation of the gene expression in response to extraordinary activated kinase signals. This strategy represents an improvement of the technique of suicide gene therapy.