

論文の内容の要旨

論文題目 癌の遺伝子治療を目的とする RNAi 誘導ウイルスベクターの作製

指導教官 中川 恵一 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月再入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 竹内 隆正

これまでの癌の遺伝子治療では、癌細胞特異的な殺細胞効果を期待して p53 遺伝子の導入等の戦略が取られてきた。一定の成果を上げてはいるものの治療効果は満足できるものになっていない。本研究では、癌の遺伝子治療への応用を念頭に、癌の普遍的な性質である「増殖性」に注目し、分裂細胞にのみ普遍的かつ特異的に細胞毒性を発揮するウイルスベクター作製の基礎となる実験を行った。増殖性に基づいて癌細胞を選択的に傷害する戦略は、基本的に放射線治療・化学療法と共通のものであるが、遺伝子治療では標的部位を狙ってベクターを感染させることができるうえ、プロモーターの選択等で正常細胞への影響を低減することもできる。また治療の継続・高用量化に伴う副作用防止の観点からは、異なる作用機序を持つ治療法が増えること自体に意義がある。

p53 に代表される癌抑制遺伝子の導入とは逆に、癌細胞の増殖に必須の遺伝子（癌遺伝子を含む）の機能を抑制することでも癌細胞を死滅させうるはずである。発現抑制の対象として、特定の種類の癌細胞にのみ発現している癌蛋白質ではなく、正常・異常を問わずあらゆる細胞の分裂・増殖にとって必須の蛋白質で、しかも寿命が長く細胞分裂に一致して合成されるものを選択すれば、増殖状態にある癌細胞を傷害するものの非分裂細胞には影響を与えないことになり、癌治療が可能になるかもしれない。そこで核の構造蛋白質であり、核内膜の裏打ち構造の核ラミナを形成する中間径フィラメントのラミン B1 に着目した。ラミン B1 は全ての細胞に必須の蛋白質であり、分裂細胞におけるラミン B1 の新規合成が抑制されれば、ゲノム DNA 複製に伴う核の膨張が抑制され細胞周期の乱れを生じる可能性や細胞分裂後の核再構成に障害を来す可能性が予想される。一方、既存の蛋白質の機能阻害が起こるわけではないので、非分裂細胞に対する影響は最小限に止まると推測される。

ラミン B1 の発現抑制には、近年非常に大きな注目を集めている新しい配列特異的遺伝子発現抑制現象である RNA 干渉 (RNA interference (RNAi)) を利用した。RNAi とは二本

鎖 RNA (dsRNA) の細胞内導入に引き続いて、それと相同な配列を持つ RNA が切断されることにより遺伝子発現が抑制される現象である。哺乳動物細胞で RNAi を誘導するには短い dsRNA (short interfering RNA (siRNA) と呼ぶ) の細胞内導入が必要であるが、DNA からの転写によって short hairpin RNA (shRNA) を発現させ、それが細胞内で siRNA に変換され RNAi を誘導する系が見出されたことで、RNAi を遺伝子治療に応用する道が開けた。

RNAi は非常に配列特異性が高いため、標的の塩基配列に変異が存在しては「普遍性」が達成できない虞がある。ラミン B1 遺伝子はデータベース上、一塩基多型が蛋白質コード領域内に一箇所しかない。また動物界で非常に広く保存されている蛋白質であり、遺伝子座が一つしかなく、腫瘍内での変異の可能性も低いと考えられることから、RNAi による発現抑制の対象としてふさわしいと考えられた。

まずラミン B1 を標的とする様々な shRNA 発現カセットを作製して、それらのノックダウン効率を比較した。RNAi の効率は標的配列によって大きく異なることが知られているので、配列解析サービスなどから得られた標的候補 7 種の中から効率の高いもの 2 種を選んだ。一方陰性対照用に、細胞内に相同性の高い RNA が存在しない配列を標的とする shRNA 発現カセットを作製した。

ラミン B1 ノックダウンあるいは陰性対照の shRNA 発現カセットをレンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV) ベクターに組込んだ。レンチウイルスベクターは HIV-1 に基づくものであり、休止状態にある細胞にも遺伝子導入できる特徴がある。AAV ベクターは、AAV 自体にヒトに対する病原性が知られておらず安全性が高いうえ、物理化学的安定性が高く感染価を保ったまま精製・濃縮できる特徴がある。

安全性・副作用の観点から問題となるのは、ラミン B1 ノックダウン戦略の休止状態にある細胞への影響である。休止状態にある正常細胞のモデルとしてヒト二倍体細胞である ARPE19 細胞を接触阻止がかかった状態にして、ベクター感染実験を行った。休止状態の ARPE19 細胞に対し AAV ベクターでは遺伝子導入が殆ど起こらなかったが、レンチウイルスベクターでは十分な遺伝子導入が起こり、細胞毒性に関する評価を行うことができた。ラミン B1 ノックダウン shRNA 発現ベクターないし陰性対照 shRNA 発現ベクターの感染後、3 日目以降で遺伝子導入を示す蛍光蛋白質 hrGFP の発現が観察された。この発現は約 3 週間にわたり、全体としては、むしろ増強することはあっても低下はせず、3 週間後の hrGFP 陽性細胞数は両者の間で有意な差はなかった。これらのベクターの遺伝子導入効率に差がないことから、ラミン B1 ノックダウン shRNA の発現は非分裂細胞に対して毒性が無いことが示唆された。

それに対して、増殖状態にある HeLa S3 細胞 (子宮頸癌由来細胞株) は、ラミン B1 ノックダウン shRNA の発現で増殖が抑制された。shRNA 発現カセットに加えて薬剤耐性遺伝子を持つレンチウイルスベクターを感染させた HeLa S3 細胞のコロニー形成試験では、ラミン B1 ノックダウン shRNA 発現カセットの導入により、薬剤耐性コロニー数が約 1/2 に減少した。ラミン B1 ノックダウン shRNA 発現 AAV ベクターを増殖状態にある HeLa S3

細胞に感染させると、細胞増殖試験で最大 50%弱の増殖抑制効果を認めた。この実験では有効な細胞傷害には多重感染が必要であることが推察され、ベクターの感染効率上昇及び（或いは）ラミン B1 ノックダウン効率上昇によって、より顕著な効果が期待できると考えられた。

以上の成績は、ラミン B1 を標的とする RNAi 誘導ウイルスベクターが、癌の遺伝子治療に応用できる可能性を示している。今回作製したウイルスベクターに期待したもう一つの特性である普遍性の確認は今後の課題である。その際に、ラミン B1 ノックダウン shRNA 発現単独ではなく、癌抑制遺伝子発現カセットと組み合わせたり放射線・抗癌剤と併用した場合の治療効果をみる実験を行うこと及び動物実験による生体内での抗腫瘍効果及び正常組織への毒性の有無の確認も必要となろう。

AAV ベクターは臨床応用には好適な性質を多く持つ一方で、癌の遺伝子治療への応用では欠点を持つことも示された。感染後エピソームとして存在するベクターゲノムが細胞分裂とともに失われていくため、盛んに分裂している細胞に対する遺伝子送達手段としては最適ではないのかもしれない。これは AAV ベクターの感染様式そのものに関連することであり、ベクター側の改良を要する問題である。

また新しい技術として RNAi 誘導ウイルスベクターに関する知見を蓄えることができ、本研究で構築した shRNA 発現カセット作製からウイルスベクターの効果判定まで一貫して行うことができる系は癌治療以外に様々な応用が可能なものである。