

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300174

研究課題名（和文） 効率的かつ持続的発現が可能な遺伝子治療用 DNA の核内動態制御システムの創製

研究課題名（英文） Control of intranuclear disposition of DNA for gene therapy

研究代表者

紙谷 浩之 (KAMIYA HIROYUKI)

愛媛大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10204629

研究成果の概要（和文）：外来遺伝子の核内動態を制御して効率的かつ持続的な外来遺伝子発現を達成することを目的として、ヒストンとの結合を制御する配列のプラスミドへの導入、ヒストンとプラスミドの共導入、転写因子をリクルートするためのプラスミドシステムの開発を行った。その結果、改善の余地はあるものの効率的かつ持続的な外来遺伝子発現の達成に成功した。また、tailed duplex による遺伝子修復の有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To achieve efficient and durable transgene expression by controlled intranuclear disposition, we inserted DNA sequences that modulate binding to histones into plasmid DNAs, introduced histone-plasmid DNA complexes into cells, and developed a plasmid system that recruited transcription factors. We found that transgene expression was improved in efficiency and was maintained for a week. Moreover, we revealed that gene correction by tailed duplexes was a useful candidate in gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：遺伝子治療学

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：非ウィルスベクター・外来 DNA・遺伝子治療・核内動態

1. 研究開始当初の背景

画期的な治療法である遺伝子治療法の一つ、非ウィルスベクターに期待が寄せられているが、非ウィルスベクターによる外来遺伝子の発現は効率が低くかつ一過性であることが大きな問題である。発現効率が低い原因は、核内に送達される外来 DNA 量が少ないことではなく、核内に送達された外来 DNA

の発現効率が（アデノウイルス DNA の発現効率と比較して）著しく低いことである。また、非ウィルスベクターの外来遺伝子の一過性発現の原因は、外来 DNA 量の減少と外来 DNA 1 分子当たりの発現量の低下という 2 つにある。

2. 研究の目的

本研究では、核内蛋白質との相互作用を制御することにより、外来遺伝子の核内動態を制御して効率的かつ持続的な外来遺伝子発現を達成することを目的とする。

また、外来遺伝子発現に加えて、標的細胞内の遺伝子配列を正常型に変換する遺伝子修復法も重要な遺伝子治療法の 1 つである。そこで、研究代表者の開発した **tailed duplex** による遺伝子修復効率に関して基礎情報を得ることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒストンとの結合の制御

①ヒストンとの結合を制御する配列の導入：ヒストン高親和性配列 (left-handedly curved 配列) をプロモーター上流の様々な位置に導入したプラスミド DNA (ルシフェラーゼ遺伝子を含む) を作製した。また、ヒストンとの結合を防ぐ配列 (ヌクレオソーム形成を抑制する A_{30} 、 $(CG)_{15}$ 配列) をプロモーター近傍に導入したプラスミド DNA を作製した。これらのプラスミド DNA を培養細胞に導入するとともに、マウスに hydrodynamics 法によりマウスへ投与した。

②ヒストンとの共導入：組換えヒストン H3 蛋白質とプラスミド DNA の複合体を様々な比率で形成させ、浸透圧法により培養細胞に導入した。また、試験管内でプラスミド DNA をヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子からなるヒストンコアと結合させ、浸透圧法により培養細胞へ、hydrodynamics 法によりマウスへ導入した。

(2) 転写因子をリクルートするためのシステム：基本転写因子をリクルートする蛋白質 (ヘルペスウイルス VP16) と配列依存的 DNA 結合蛋白質 (酵母 GAL4) の融合蛋白質 (activator) の遺伝子を作製しプラスミドに導入した。また、GAL4 が結合する配列をルシフェラーゼ遺伝子と activator 遺伝子のプロモーター上流に導入した。また、ヘルペスウイルス VP16 の代わりに内在性の転写活性化因子 (CREB-binding protein (CREBBP) の転写活性化ドメインなど) を導入したプラスミド DNA を作製した。トランスフェクションにより培養細胞へ、hydrodynamics 法によりマウスに導入した。さらに、genetic insulator 配列を GAL4-VP16 とルシフェラーゼ発現カセットの両側に導入したプラスミドを作製し、同様にアッセイした。

(3) 遺伝子修復をするためのシステム：研究代表者の開発した核酸である **tailed duplex** をフレームシフト変異を有するプラスミド DNA とともに培養細胞へ導入した。また、塩基置換変異を有する標的遺伝子をゲノム DNA 中に含むマウスに **tailed duplex** を hydrodynamics 法により導入した。

4. 研究成果

(1) ヒストンとの結合の制御

①ヒストンとの結合を制御する配列の導入：left-handedly curved 配列をプロモーター上流の様々な位置に導入したプラスミド DNA をトランスフェクションにより培養細胞に導入した。その結果、ヒストン高親和性配列の導入によりルシフェラーゼ遺伝子の発現が上昇した。また、プラスミド DNA を hydrodynamics 法によりマウスへ投与したところ、同様にルシフェラーゼ遺伝子の発現が上昇した。一方、ヒストンとの結合を防ぐ配列をプロモーター近傍に導入したプラスミド DNA をトランスフェクションにより培養細胞に導入した結果、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が上昇した。また、プラスミド DNA を hydrodynamics 法によりマウスへ投与したところ、同様にルシフェラーゼ遺伝子の発現が上昇した。

②ヒストンとの共導入：組換えヒストン H3 蛋白質とプラスミド DNA の複合体を様々な比率で形成させ、浸透圧法により培養細胞に導入した。その結果、プラスミド DNA に対するヒストンの比率が高くなると発現が低下した。これは、核内における発現効率が低下していることが原因であった。したがって、ヒストンとの共導入は単に混合するだけでは不十分であり、適切に相互作用させる必要性があることが明らかとなった。そこで、試験管内でプラスミド DNA をヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子からなるヒストンコアと結合させ (ヌクレオソーム化)、マウスへ hydrodynamics 法により投与した。その結果、ヌクレオソーム化プラスミド DNA により、in vivo において発現が上昇することが明らかとなった。その効果は、核内 DNA 量の増加と発現効率の上昇の両者が寄与していることが考えられた。なお、ヌクレオソーム化プラスミド DNA を浸透圧法により培養細胞に導入したが、ルシフェラーゼの発現が観察されなかったため、培養細胞レベルでは評価できていない。現在、この原因を解明中である。

(2) 転写因子をリクルートするためのシステム：GAL4 が結合する配列を含む GAL4-VP16 (activator) プラスミドと GAL4 が結合する配列を含むルシフェラーゼプラスミドをトランスフェクションにより培養細胞に共導入した。その結果、正のフィードバック機構により activator 発現が持続し、ルシフェラーゼの発現も持続した。さらに、hydrodynamics 法によりマウスに導入し、ルシフェラーゼの発現の持続を確認した。また、ヘルペスウイルス VP16 に代わる内在性の転写活性化因子を検討したところ、CREB-binding protein の転写活性化ドメインが VP16 とほぼ同等の転写活性化能を有していることを見いだした。また、insulator 配

列を発現カセットの両側に導入した自己活性化システムは、insulator を含まないものより優れていることを明らかにした。

(3) 遺伝子修復をするためのシステム：Tailed duplex は、フレームシフト変異も修復可能であることを明らかとした。また、tailed duplex を hydrodynamics によりマウスに導入した結果、in vivo においても塩基置換変異の修復が可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① S. Fukunaga, G. Kanda, J. Tanase, H. Harashima, T. Ohshima, and H. Kamiya: A designed curved DNA sequence remarkably enhances transgene expression from plasmid DNA in mouse liver. *Gene Ther.* in press doi: 10.1038/gt.2011.127 査読有
- ② G. Kanda, H. Ochiai, H. Harashima, and H. Kamiya: CREB-binding protein transcription activation domain for enhanced transgene expression by a positive feedback system. *J. Biotechnol.* **157** (#1), 7-11 (2012 年) doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.016 査読有
- ③ H. Ochiai, H. Harashima, and H. Kamiya: Effects of insulator cHS4 on transgene expression from plasmid DNA in a positive feedback system. *J. Biosci. Bioengng.* **112** (#5), 432-434 (2011 年) doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.07.001 査読有
- ④ Y. Morita, H. Tsuchiya, H. Harashima, and H. Kamiya: Correction of frameshift mutations with tailed duplex DNAs. *Biol. Pharm. Bull.* **34** (#9), 1465-1468 (2011 年) doi: 10.1248/bpb.34.1465 査読有
- ⑤ H. Ochiai, H. Harashima, and H. Kamiya: Positive feedback system provides efficient and persistent transgene expression. *Mol. Pharm.* **7** (#4), 1125-1132 (2010 年 8 月) doi: 10.1021/mp1000108 査読有
- ⑥ M. Ito, Y. Suda, H. Harashima, and H. Kamiya: Cytotoxic effect of *Drosophila* deoxynucleoside kinase gene on replicating plasmid in HeLa cells. *Biol. Pharm. Bull.* **33** (#7), 1223-1227 (2010 年) doi: 10.1248/bpb.33.1223 査読有

- ⑦ H. Kamiya, H. Goto, G. Kanda, Y. Yamada, and H. Harashima: Transgene expression efficiency from plasmid DNA delivered as a complex with histone H3. *Int. J. Pharm.* **392** (#1-2), 249-253 (2010 年) doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.035 査読有
- ⑧ H. Kamiya, M. Uchiyama, J. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, and H. Harashima: Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver. *Int. J. Pharm.* **387** (#1-2), 180-183 (2010 年) doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.020 査読有
- ⑨ H. Kamiya, S. Fukunaga, T. Ohshima, and H. Harashima: Effects of carriers on transgene expression from plasmids containing a DNA sequence with high histone affinity. *Int. J. Pharm.* **376** (#1-2), 99-103 (2009 年) doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.032 査読有
- ⑩ H. Kamiya, H. Goto, and H. Harashima: Effects of non-B DNA sequences on transgene expression. *J. Biosci. Bioengng.* **108** (#1), 20-23 (2009 年) doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.013 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 神田元紀, 福永賢輝, 棚瀬潤一, 原島秀吉, 大山隆, 紙谷浩之: マウス肝臓における left-handedly curved 配列を付加したプラスミドからの外来遺伝子発現上昇. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日、横浜)
- ② 紙谷浩之 (招待講演): プラスミド DNA の核内動態: その制御に向けて. 遺伝子・デリバリー研究会 第 11 回夏期セミナー (2011 年 8 月 8 日、高知)
- ③ 紙谷浩之, 富樫亮平, 原島秀吉: 外来遺伝子発現がプラスミド DNA の核内での安定性に与える影響. 第 27 回日本 DDS 学会 (2011 年 6 月 9 日、東京)
- ④ 富樫亮平, 神田元紀, 原島秀吉, 紙谷浩之: 2 種類の「発現持続型」プラスミドの核内挙動の違い. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月 7 日、神戸)
- ⑤ 神田元紀, 落合浩史, 原島秀吉, 紙谷浩

- 之:内在性転写活性化因子を用いた細胞系における外来遺伝子発現の活性化. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010年12月7日、神戸)
- ⑥ 守田由子, 原島秀吉, 紙谷浩之:Tailed duplexを用いたフレームシフト変異の修復. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010年12月7日、神戸)
- ⑦ 紙谷浩之, 落合浩史, 原島秀吉:プラスミドDNAに導入したインスレーターcHS4の外来遺伝子発現への影響. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010年12月7日、神戸)
- ⑧ H. Kamiya, M. Uchiyama, J. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Harashima:Pinpoint sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver. 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2010年11月10日、横浜)
- ⑨ 紙谷浩之, 内山雅普, Jingshu Piao, 中津可道, 續輝久, 原島秀吉:マウス肝臓における遺伝子修復(部位特異的配列変換). 第26回日本DDS学会 (2010年6月18日、大阪)
- ⑩ 神田元紀, 落合浩史, 原島秀吉, 紙谷浩之:自己活性化システムによる *in vivo* 外来遺伝子発現上昇. 遺伝子・デリバリー研究会 第10回シンポジウム (2010年6月2日、札幌)
- ⑪ 紙谷浩之(招待講演):遺伝子修復核酸5'-tailed duplexの開発. 遺伝子・デリバリー研究会 第10回シンポジウム (2010年6月2日、札幌)
- ⑫ G. Kanda, H. Ochiai, H. Harashima, H. Kamiya:Enhanced *in vivo* transgene expression by two-step transcription amplification. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (2010年5月20日、Washington D. C., USA)
- ⑬ H. Kamiya, M. Uchiyama, J. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Harashima:Gene correction in mouse liver. 13th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (2010年5月20日、Washington D. C., USA)
- ⑭ 紙谷浩之, 後藤仁美, 神田元紀, 山田勇磨, 原島秀吉:プラスミド-ヒストン複合体からの外来遺伝子発現効率. 日本薬剤学会第25年会 (2010年5月14日、徳島)
- ⑮ 守田由子, 鈴木哲矢, 原島秀吉, 紙谷浩之:培養細胞を用いた染色体DNA配列変換アッセイ系の確立. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月12日、横浜)
- ⑯ 紙谷浩之, 内山雅普, Jingshu Piao, 中津可道, 續輝久, 原島秀吉:マウス肝臓における部位特異的配列変換法. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月12日、横浜)
- ⑰ 神田元紀, 落合浩史, 原島秀吉, 紙谷浩之:Two-step transcription amplificationを用いた *in vivo* における外来遺伝子発現活性化. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月10日、横浜)
- ⑱ 紙谷浩之(招待講演):核内動態制御を可能とする遺伝子治療用DNAの創製. 第3回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2009年11月14日、福岡)
- ⑲ 紙谷浩之, 落合浩史, 原島秀吉:外来遺伝子持続的発現システムの構築. 第25回日本DDS学会 (2009年7月4日、東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 浩之 (KAMIYA HIROYUKI)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号:10204629

(2) 研究分担者

秋田 英万 (AKITA HIDETAKA)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号:80344472
(H21~H22)

(3) 連携研究者

なし