

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650623

研究課題名(和文)カーボンナノチューブと組換えアデノウイルスによる高効率遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文)Enhanced efficacy of adenovirus-mediated gene transfer by carbon nanotubes

研究代表者

武田 貞二(TAKEDA, Teiji)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90334896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：組換えアデノウイルス(Adv)を感染させることによって目的遺伝子を細胞内に導入する方法は広く用いられている。今回の研究ではAdvにカーボンナノチューブ(CNT)を前処理すると、培養細胞において遺伝子導入効率が数倍から数百倍に増強されることが判明した。AdvとCNTが複合体を形成することによって、Adv単独の場合とは異なる経路で効率的に遺伝子導入がなされるものと推察された。このCNTによる遺伝子導入増強効果は浮遊細胞でも確かめられ、さらに腫瘍組織への直接投与という動物実験でも同様の増強効果が証明された。以上から、CNT-Advを用いた新たな遺伝子導入法が多くの分野で有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Infection of adenovirus (Adv) has been widely used as a method of gene transfer into cells. We found that the Adv, pre-treated with carbon nanotubes (CNTs), obtained hundreds-fold higher trans-gene efficiency in cultured cells than the non-treated Adv. It was suggested that CNTs might form a complex with Adv, which efficiently delivered genes into cells through a different pathway from non-treated Adv. The enhanced effect for gene transfer into floating cells was also observed. Moreover CNT-treated Adv delivered target genes into tumor tissues of animal models with significantly higher efficiency than non-treated Adv.

These results indicate that our new system for gene transfer using CNT-treated Adv will contribute to many fields of molecular biology.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：ドラッグデリバリー アデノウイルス カーボンナノチューブ

1. 研究開始当初の背景

組換えアデノウイルスを感染させることによって目的遺伝子を細胞内に導入する方法は広く用いられている。アデノウイルスの感染性は主にコクサッキー・アデノウイルス受容体 (CAR) の発現量によって規定されており、CAR 発現が少ない細胞ではアデノウイルスによる遺伝子導入効率が低くなり、これがアデノウイルスによる遺伝子導入の限界と考えられてきた。

2. 研究の目的

カーボンナノチューブ (CNT) を用いて CAR 発現とは非依存的にアデノウイルスによる遺伝子導入効率を高める方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 組換えアデノウイルスに対する CNT

処理

氷上で 2 時間アデノウイルスを 0.2mg/mL の CNT 溶液 (PBS) の中でインキュベーションし、以下の感染実験に用いた。この際、ウイルス量は $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ / mgCNT となるよう調製するのが最適であった。

2) 用いた組換えアデノウイルス

ルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子、GFP 遺伝子を搭載した組換えアデノウイルス (AdTKLuc, AdCAG-GFP) を用いて遺伝子導入効率を測定した。両導入遺伝子は強力な非特異的な TK プロモーターと CAG プロモーターにそれぞれ制御されている。また、ヒト単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (tk) はガンシクロビル (GCV) 存在下で殺細胞効果を有する。この tk 遺伝子をヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) プロモーターで制御しアデノウイルスに組み込んだ (AdhTERTtk)。hTERT は癌細胞でのみ活性化されるため AdhTERTtk は癌細胞でのみ殺細胞効果を発揮する。この AdhTERTtk を *in vitro* および *in vivo* で感染させて殺細胞効果を測定することによって CNT の増強効果を解析した。

なお用いた組換えアデノウイルスは特殊な細胞 (HEK293 細胞) 以外では、感染はするが増殖できないようにあらかじめ遺伝子欠失されている。

3) *in vitro* 感染実験

感染実験に用いた培養細胞株は次の通りである。未分化甲状腺癌細胞株である SW579, CG-1, 8505c, 8305c の各細胞株、チャイニーズハムスター卵巣細胞株の CHO 細胞、HeLa 細胞、ヒト線維芽細胞株 WI38 細胞、また組換えアデノウイルスを増殖させるために用いた HEK293 細胞は感染効率のコントロールとしても用いられた。

24 ウェル培養プレートに 1 ウェル当たり 2×10^4 個の培養癌細胞を分配し、12 時間後に CNT 処理、未処理の組換えアデノウイルスを

1 細胞当たり 1~20 個 (1~20moi) の AdTKLuc を 2 時間感染させ、培養液を破棄し 3 回 PBS で洗浄し新鮮培養液を加えてさらに 24 時間培養した後、キットによって各細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

また、AdCAG-GFP 感染実験では専用の培養ディッシュに細胞を分配し、同様に感染した後 24 時間で GFP の発現を観察した。

AdhTERTtk 感染実験では 96 ウェル培養プレートを用い、1 ウェル当たり 2×10^3 個の培養癌細胞を分配し、24 時間後に上記同様に CNT 処理、未処理の AdhTERTtk を感染させた。2 時間後に培養液を破棄して 2 回 PBS で洗浄した後、様々な濃度の GCV を含んだ新鮮培養液を加えて 4~5 日間培養した。その後、バイオアッセイキットによって生きていた細胞量を定量し、CNT の増強効果を比較した。

4) *in vivo* 感染実験

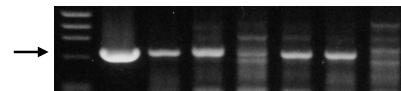
ヒト未分化甲状腺細胞株である CG-1 細胞を balb-c nu/nu マウスに皮下移植し、担瘤マウスを作製した。腫瘍径が 5~7mm に達したところで、CNT 処理、未処理の組換えアデノウイルスである AdhTERTtk を 1×10^9 個 (0.1mL 容量) 腫瘍内に直接注射で投与した。翌日から GCV 溶液 (100mg/kg 体重) を 1 日 1 回、14 日間腹腔内投与して 2 日ごとに腫瘍径を測定した。対照として PBS のみ、CNT 溶液のみを投与した群も設けて比較検討した。

4. 研究成果

1) 細胞株におけるコクサッキー・アデノウイルス受容体 (CAR) mRNA の発現

RT-PCR 法を用いて様々な細胞株中の CAR mRNA を測定した。CAR はアデノウイルスの感染性を規定する重要なタンパクで、発現が多いほどアデノウイルスの感染性が高いとされる。図 1 上段から SW579 細胞にはほとんど CAR が発現しておらず、CAR 遺伝子搭載の AdhTERT-CAR を感染させた後に CAR の発現を認めた (同下段)。同様にヒト線維芽細胞株 WI38 細胞でも発現が弱く、AdhTERT-CAR 感染後も発現していない。これは癌細胞でのみ活性がある hTERT プロモーターで CAR 遺伝子を制御した組換え遺伝子がアデノウイルスに搭載してあるからである。

Before infection with AdhTERT-CAR



After infection with AdhTERT-CAR

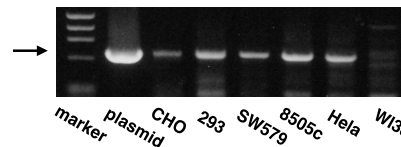


図 1. 各細胞株における CAR mRNA の発現 (RT-PCR 法)

2) GFP 遺伝子搭載アデノウイルスの遺伝子導入における CNT による増強効果

GFP 遺伝子を搭載した組換えアデノウイルス(AdCAG-GFP)を CAR 発現の乏しい未分化甲状腺癌細胞株 SW579 細胞、中等度に発現しているチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞株 CHO 細胞、高発現の未分化甲状腺癌細胞株 8505c 細胞にそれぞれ CNT 処理あり、なしで感染させて GFP の発現を観察した(data not shown)。CAR 発現の低い SW579 細胞では CNT 処理なしのアデノウイルスではほとんど GFP 陽性の細胞を認めないが、CNT 処理すると GFP 陽性細胞を多数認めるようになった。CHO 細胞を用いた時も同様であった。もともと CAR 発現が高い 8505c 細胞では CNT 処理なしでも GFP 陽性細胞を多数認めたが、CNT 処理するとさらに飛躍的に GFP 陽性が増えている。これらの結果は CNT 処理によって AdCAG-GFP の遺伝子導入効率が増強されたことを示している。

3) CNT による Luc 遺伝子搭載アデノウイルスの遺伝子導入増強効果

2)と同様の実験を TK プロモーター制御の Luc 遺伝子を搭載した組換えアデノウイルス(AdTKLuc)を用いて CNT 処理効果を定量化した(図 2)。図 2 の上段は Luc 活性そのものを、下段はそれぞれの Luc 活性を、CNT 未処理のアデノウイルスを感染したときの Luc 活性を 1 としたときの倍率で表している。それぞれの CNT 濃度に対し Luc 活性を測定すると、CAR 発現がほとんどない SW579 細胞では CNT 濃度が 0 の時(CNT 未処理の時) Luc 活性は非常に低く、0.1~0.2mg/mL の CNT 溶液とインキュベーションすると 250 倍近くまで Luc 活性が上昇した(赤紫カラム)。

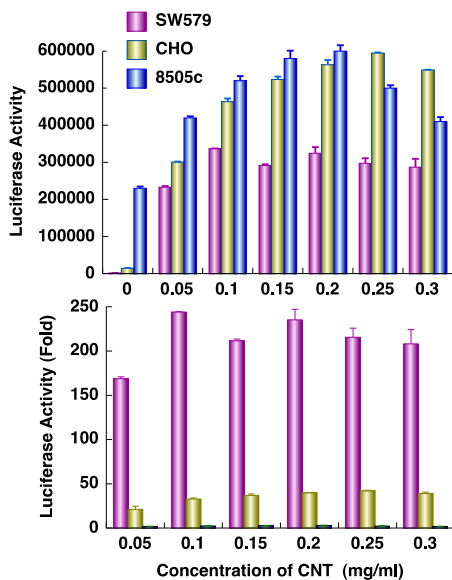


図 2. CNT による Luc 遺伝子導入増強効果(ルシフェラーゼ活性による定量)

CHO 細胞では、CNT 処理なしでもある程度 Luc 活性を認め、CNT 処理すると約 50 倍まで上昇した(黄カラム)。これに対し、CAR 発現の多い 8505c 細胞では、CNT 未処理でも高い Luc 活性を示し、CNT 処理後は 2.5 倍程度の上昇にとどまった(青カラム)。GFP 発現で視覚的に示された結果がこれらの実験で定量化されたと言える。CAR の発現量とアデノウイルスの感染性の関係が相関していることがわかる。また、CNT 処理によって CAR 発現が少ない細胞ほどアデノウイルスの遺伝子導入効率が増強される。さらに、8505c 細胞のように CAR 発現が多く、もともとアデノウイルスによる遺伝子導入効率が高い細胞でも、CNT 処理はその効果を損なうものではなくさらに高めることがわかった。

4) CNT 処理アデノウイルスによる遺伝子導入速度の変化

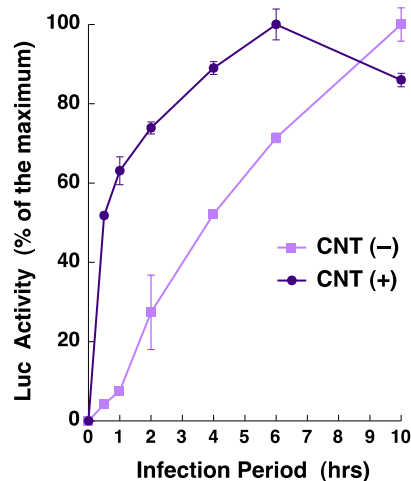


図 3. アデノウイルスを介した遺伝子導入速度における CNT による増強効果

SW579 細胞に CNT 処理、未処理の AdTKLuc を図 3 に示された時間感染させ、Luc 活性を測定し、それぞれの群の最大値を 100 として%で表した。CNT 未処理の場合感染を始めて 10 時間までほぼ時間に比例して Luc 活性が上昇し、これは遺伝子の導入量がこの間継続して上昇していることを示している(図 3 薄紫)。これに対し、CNT 処理したアデノウイルスを用いると、短い感染時間で速やかに Luc 活性が上昇し、6 時間で最大に達している(図 3 濃い紫)。このことは CNT 処理されたアデノウイルスは CAR とは異なる系を介して遺伝子導入がなされていることを示唆する。また、CNT とアデノウイルスの前処理を界面活性剤存在下で行うと、CNT による遺伝子導入増強効果がすべて消失することがわかった(data not shown)。これらのことを総合すると、CNT とアデノウイルスが複合体を形成して、その複合体が CAR ではなく、おそらく直接細胞表面に接着し遺伝子を導入

するものと推察される。

5) 浮遊細胞における CNT 処理アデノウイルスの遺伝子導入増強効果

液体培地で浮遊した状態で確立された CHO-S 細胞に 5moi の AdTKLuc を CNT 前処理あり、なしで浮遊した状態で 15 分間感染させ、細胞洗浄後 24 時間培養したのち、各 Luc 活性を測定した。図 4 に示した通り、CNT 処理した群では未処理の群と比較して約 17.2 倍の Luc 活性の上昇を認めた。CNT 処理が浮遊した状態でもアデノウイルスの遺伝子導入効率を高めることが確認された。

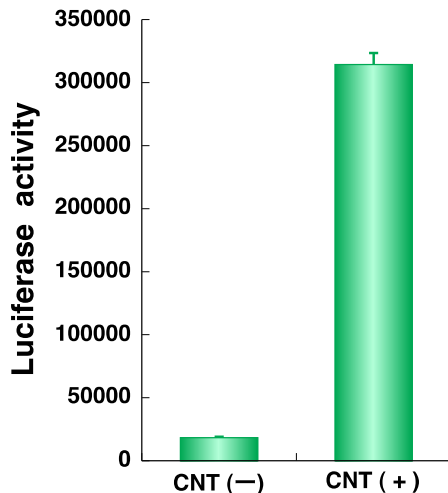


図 4. 浮遊細胞における CNT の遺伝子導入増強効果

6) CNT 処理アデノウイルスの遺伝子治療への応用 (in vitro)

ヒト単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (tk) はガンシクロビル (GCV) 存在下で細胞毒性を発揮する。一方、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) は癌細胞でのみ発現する。この hTERT プロモーターで制御した tk 遺伝子を組み込んだアデノウイルスは、腫瘍選択的に殺細胞効果を有することをこれまで報告してきた。この AdhTERTtk を CNT の前処理あり、なしで図 3 で用いた 3 つの細胞株に感染し、GCV 存在下に殺細胞効果を比較した。図 5 では、CNT 処理 AdhTERTtk を感染 (緑)、CNT 処理なし AdhTERTtk を感染 (ピンク)、CNT のみ振りかけた (薄紫) 細胞群に分け、それぞれの濃度の GCV 存在下で培養した際の生きていた細胞の % を示した。

図 5 上段は SW579 細胞を用いた時の結果である。CNT 未処理の AdhTERTtk では高濃度の GCV 存在下でも細胞死を誘導できないのに対し、CNT を処理した AdhTERTtk は GCV の濃度依存性に殺細胞効果を示した。CHO 細胞はある程度 CAR が発現しているため、CNT 未処理 AdhTERTtk でも高濃度 GCV 存在下で殺細胞効果を軽度認められた (図 5 中段)。CAR 発現の多い 8505c 細胞では、CNT 未処理 AdhTERTtk でも GCV 濃度依存性に殺細胞効果を示した (図 5 下段)。CNT 処理した AdhTERTtk はすべての

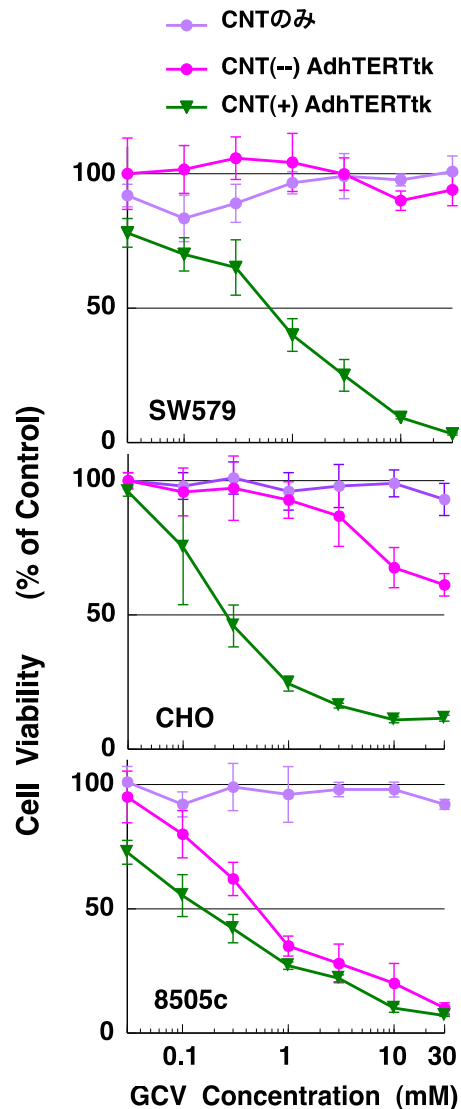


図 5. 培養癌細胞に対する遺伝子治療実験における CNT の増強効果

細胞で GCV 濃度依存性に殺細胞効果を示し、特に CAR 発現の少ない細胞ほど CNT 未処理アデノウイルスとの差が大きかった。これは CNT 処理されたアデノウイルスがより多くの hTERTtk 遺伝子を細胞内に導入したためと考える。

7) CNT 処理アデノウイルスの遺伝子治療への応用 (in vivo)

in vitro 実験の結果を踏まえ、in vivo における CNT 処理アデノウイルスの遺伝子導入増強効果を確認した。SW579 細胞同様 CAR 発現の非常に低い未分化甲状腺癌細胞株である CG-1 細胞を balb-c nu/nu マウスに皮下移植し担癌モデル動物を作製した。この腫瘍内に CNT 処理または未処理の AdhTERTtk を注射で直接投与し、GCV の腹腔内投与とともにそれぞれの群の抗腫瘍効果を比較した。コントロールとしてウイルス液の代わりに PBS を投与した群、CNT 溶液のみを投与した群を置き検討した (図 6)。

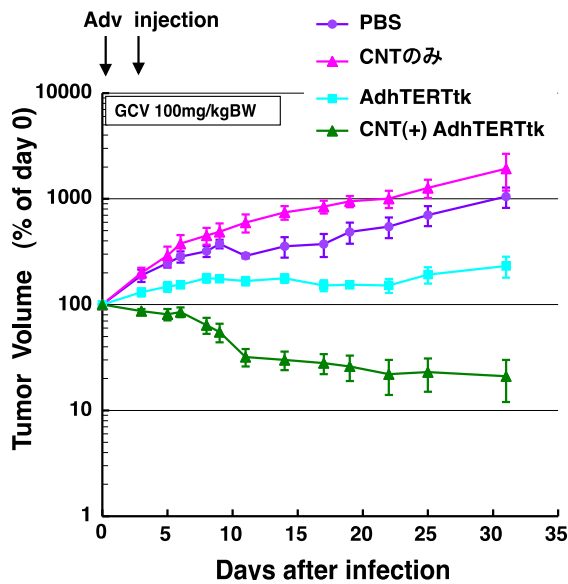


図6.組換えアデノウイルスの抗腫瘍効果に対するCNTの増強効果

PBSのみ(図6紫)CNTのみ(図6ピンク)投与した群の腫瘍容積は日々増大していったのに対し、AdhTERTtk投与の両群はコントロール群と比較して有意に抗腫瘍効果を認めた。特にCNT処理したAdhTERTtk投与群(図6緑)は10匹中5匹がtumor freeの状態となり、CNT未処理AdhTERTtk群(図6水色)と比較すると有意に強い抗腫瘍効果を発揮した。これはCNT処理組換えアデノウイルスが腫瘍組織内でも細胞への遺伝子導入効率を高めたからと考えられる。

【まとめ】

1. 培養細胞においてCAR発現が低いほど組換えアデノウイルスの感染性が低下し、GFP、Luc、tkなどの遺伝子導入効率が低かった。これに対し、組換えアデノウイルスをCNTで前処理するとCARの発現に関係なく、調べたすべての細胞株でアデノウイルス単独で感染させるよりも高い遺伝子導入効率を示した。特にCAR発現の低い細胞ほどその差が顕著でSW579細胞では約250倍の遺伝子導入増強効果を認めた。
2. CNTで前処理された組換えアデノウイルスは遺伝子導入速度が飛躍的に速くなり、CARを介する系とは異なる経路で遺伝子導入されることが示唆された。また、界面活性剤存在下でCNT処理するとCNTによる増強効果が全く失われることから、CNTとアデノウイルスが複合体を形成し、その複合体がCARを介する以外の経路、すなわち直接細胞表面と接着し遺伝子が効率的に導入されるものと推察された。
3. CNT処理アデノウイルスは、プレート上に2次的に培養された細胞だけでなく、

浮遊している細胞にもその効果を発揮し、腫瘍組織内においても遺伝子導入を増強することが確認された。これによって癌に対する遺伝子治療における有用なツールとなり得る。

【結語】

CNT処理することによってアデノウイルスが持つ遺伝子導入効率を飛躍的に向上させることを実証し、ある程度のそのメカニズムも解明できた。この新規遺伝子導入法は癌遺伝子治療の領域のみならず、広く分子生物学研究に貢献できるものと期待される。

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)

[学会発表](計 2件)

1. 大久保 洋輔、武田 貞二、西尾 真一、山崎 雅則、鈴木 悟、駒津 光久
組換えアデノウイルスを用いた未分化甲状腺癌遺伝子治療におけるカーボンナノチューブによる増強効果 第55回日本甲状腺学会 2012年11月29日 福岡県福岡市
2. 武田 貞二、西尾 真一、山崎 雅則、鈴木 悟
アデノウイルスを介した遺伝子導入におけるカーボンナノチューブによる増強効果 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日 愛知県名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 貞二(TAKEDA, Teiji)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号: 90334896

(2)研究分担者

齋藤 直人(SAITO, Naoto)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 80283258

(3)連携研究者

()

研究者番号: