

Title	Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery.
Sub Title	標的遺伝子導入のための種々のペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体
Author	鈴木, 正崇
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.23-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0023

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery.

(標的遺伝子導入のための種々のペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体)

鈴木 正 崇

内容の要旨

遺伝子治療は従来完治困難と考えられていた疾患に対する画期的な治療法として期待され、世界的に臨床試験が行われている。しかし、現在の遺伝子治療の技術は完全とは言えず、特定の臓器や細胞を標的できる遺伝子導入技術が必要と考えられる。当研究室では数年前にモノクローナル抗体 (mAb) を用いてEGF受容体を過剰生産する扁平上皮癌細胞をターゲティングする遺伝子導入技術「イムノジーン法」を開発した。本研究ではさらに改良を加え新たに組換え一本鎖抗体 (scFv) を用いた「組換えイムノジーン法」を開発し、扁平上皮癌遺伝子治療の可能性を検討した。

抗EGF受容体mAbB4G7のcDNAより作成した一本鎖抗体遺伝子に正、負電荷性ペプチドテイルを付加した8種類の組換え一本鎖抗体遺伝子を作成した。これらの組換え一本鎖抗体遺伝子 (組換えイムノポーター) を大腸菌や酵母を用い発現を試みた。大腸菌発現系において全ての組換えイムノポーターは発現したが、その多くは不溶性画分に存在していた。酵母発現系では負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーターが効率よく培養上清に分泌された。さらに高塩濃度下では培地中への分泌量が著しく増加した。この条件を用いて長い負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーター (scFv-(D4S)₃) の大量調製を行った。精製した組換えイムノポーターは表面が正に帯電したDNA/PEI複合体に静電的に相互作用し、イムノジーン複合体を形成した。EGF受容体を過剰発現する扁平上皮癌由来のA431細胞において、組換えイムノジーン (scFv/DNA/PEI複合体) はmAbB4G7の細胞表面への結合を濃度依存的に阻害した。このことから複合体形成後も一本鎖抗体の抗原特異性は保たれていると考えられた。*in vitro*においてA431細胞に対する組換えイムノジーンの遺伝子導入効率をルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した。市販のリポフェクション試薬と比較したところ、ほぼ同等の導入効率を示した。また、DNA/PEI複合体に比べ1000倍高い導入効率を示した。 β ガラクトシダーゼレポーター遺伝子を導入し、X-gal染色を行ったところ、組換えイムノジーン処理した細胞群の3~5%に染色が認められた。一方、自殺型治療遺伝子のヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を導入したところ、ガンシクロビルに対する感受性が50%生存率において約250倍高くなり、A431細胞に対する殺細胞効果が確認された。

組換えイムノポーターは酵母発現系で安価に大量調製可能であり、大型動物モデルおよび大量投与に対応できる。組換えイムノポーターを用いた抗体/DNA複合体 (イムノジーン) は扁平上皮癌細胞A431に対し高い特異性と導入効率を示した。従って、「組換えイムノジーン法」による扁平上皮癌をターゲットした遺伝子治療の可

論文審査の要旨

遺伝子治療は従来完治困難と考えられていた疾患に対する画期的な治療法として期待されているが、現在の遺伝子治療の技術は完全とは言えず、特定の臓器や細胞を標的できる遺伝子導入技術が必要と考えられる。本研究では生体内のターゲティング可能な遺伝子導入法を目指した、ヒト上皮増殖因子 (EGF) 受容体のエンドサイトーシスを利用した遺伝子導入「イムノジーン」法の開発について報告された。抗EGF受容体モノクローナル抗体B4G7のcDNAより作製した一本鎖抗体遺伝子に正、負電荷性ペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体遺伝子を作成した。これらの組換え一本鎖抗体遺伝子 (組換えイムノポーター) を大腸菌、酵母を用いて発現を試みた。まず、酵母発現系を用いて長い負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーターの大量調製を行った。組換えイムノポーターと遺伝子DNA、ポリエチレンイミンを混合することによって、組換えイムノジーンが形成される。この組換えイムノジーンは細胞表面のEGF受容体に特異的に結合することが示された。EGF受容体を過剰発現する扁平上皮癌細胞に対し、組換えイムノジーンはリポフェクション法とほぼ同等の導入効率を示した。また、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を導入し、ガンシクロビルで処理した結果、著しい殺細胞効果が認められた。すなわち組換えイムノポーターを用いた「組換えイムノジーン」法はターゲティング可能な新しい遺伝子導入法であることが示された。

審査に際しては、モノクローナル抗体のFab断片を用いたFabイムノジーンとの比較、組換えイムノジーンによる遺伝子導入効率、また臨床応用への可能性に関して疑問がなされ、抗体のFab断片に較べ一本鎖抗体はやや抗原結合力が劣るが、Fabイムノポーター調製時のように化学的結合を用いない為、大量調製が簡便であることが説明された。組換えイムノジーンの遺伝子導入効率はリポフェクション法と同程度であるもののウイルスベクター法より低いとの指摘がなされた。これに対し、組換えイムノジーンは積極的に細胞質から核へ移行する機構を持たないので、エンドソームの膜透過活性を持つ分子や、核移行を促進する分子を付加して導入効率を高める予定であるとの解答がなされた。組換えイムノジーンの抗原性に関して、マウス由来の一本鎖抗体を利用したものは人体への投与には不適当だが、一本鎖抗体のヒト型化がすでに済んでおり、これを用いることにより免疫応答を回避可能であることが述べられた。また生体内での非特異的遺伝子導入を抑える為にペプチドテイル部分の改変を行い、マウスで検討しているとの説明がなされた。最後に、臨床応用に向けて生体内の組換えイムノジーンに対する免疫応答の検討、器官培養での研究を行うべきであろうとの助言がなされた。

以上、本研究はさらに検討すべき点が残されているが、一本鎖抗体を用いた遺伝子導入システム「組換えイムノジーン」法を確立し、扁平上皮癌に対する遺伝子治療の可能性を示したことなど、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 分子生物学 清水 信義
先端医科学 河上 裕 微生物学・免疫学 小安 重夫
外科学 北島 政樹
学力確認担当者：
審査委員長：河上 裕

試問日：平成16年2月4日