

## トランスポゾンに基づく持続発現型ベクターの開発と治療応用

中西秀之,<sup>a</sup> 樋口ゆり子,<sup>a</sup> 川上 茂,<sup>a</sup> 山下富義,<sup>a</sup> 橋田 充\*,<sup>a,b</sup>

## Development and Therapeutic Application of Transposon-based Vectors

Hideyuki NAKANISHI,<sup>a</sup> Yuriko HIGUCHI,<sup>a</sup> Shigeru KAWAKAMI,<sup>a</sup>  
Fumiyoshi YAMASHITA,<sup>a</sup> and Mitsuru HASHIDA\*,<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,  
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, and <sup>b</sup>Institute for Integrated  
Cell-Material Sciences, Kyoto University (iCeMS), Yoshida Ushinomiya-cho,  
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 30, 2009)

Transposons are mobile genetic elements that move between or within vectors and chromosomes. For the transposition, an enzyme called transposase recognizes transposon-specific terminal inverted repeat sequences (IRs) located on both ends of transposons, and remove them from their original sites and, integrates them into other sites. Because of this feature, transposons containing genes of interest between their two IRs are able to carry the genes from vectors to chromosomes. Transposons are promising systems for chromosomal integration because they can not only integrate exogenous genes efficiently, but also be transfected to a variety of cells or organs using a range of transfection methods. In this review, we focused on the therapeutic application of transposons. A few transposons can integrate transgenes into mammalian chromosomes. They have been used in preclinical studies of gene therapy and cell therapy. In addition, they have recently been used for generation of induced pluripotent stem cells. Transposon-based integrative vector systems have two components. One is the transposon containing transgenes, and the other is the expression cassette of the transposase. Both viral and non-viral vectors have been used to deliver these two components to mammalian cells or organs, and sustained transgene expression has been achieved. Transposon-mediated sustained transgene expression has also produced therapeutic effect in disease models of hereditary and chronic diseases. Although transposon-based integrative vector systems have problems, such as insertional mutagenesis, studies to overcome these problems have been progressing, and these vector systems will become indispensable tools to cure refractory diseases.

**Key words**—chromosomal integration; gene therapy; cell therapy; induced pluripotent stem (iPS) cell

## 1. はじめに

染色体への遺伝子組込みは導入遺伝子の持続的な発現を可能とし、また、細胞分裂時においても染色体に組込まれた遺伝子は複製され、両娘細胞に分配されることから、遺伝子組換え生物・安定発現細胞株の作製による遺伝子機能解析や有用タンパク質の産生、遺伝子治療、再生医療等幅広く応用されている。遺伝子組込みのツールとして近年注目を集めつつあるのが、移動する DNA であるトランスポゾン

である。トランスポゾンは McClintock (ノーベル生理学・医学賞を受賞) により 1940 年代半ばに発見<sup>1)</sup>され、以後、昆虫や植物、細菌など様々な生物の染色体上からみつかった。トランスポゾンはトランスポザーゼと呼ばれる酵素の作用により元の位置から切り出され、別の位置へと組込まれることで染色体上を移動する。トランスポザーゼはトランスポゾンの両末端に位置する逆向き反復配列と呼ばれる配列を認識してトランスポゾンを移動させるため、原則として 2 つの逆向き反復配列の間にごどのような配列が挿入されていようともトランスポゾンは移動可能である。そのため、2 つの逆向き反復配列間に目的遺伝子が挿入されたトランスポゾンを細胞内に導入し、トランスポザーゼにより染色体へと移動させることで目的遺伝子を染色体へ組込むことが

<sup>a</sup>京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29), <sup>b</sup>京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) (〒606-8501 京都市左京区吉田牛ノ宮町)

\*e-mail: hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム GS1 で発表したものを中心に記述したものである。

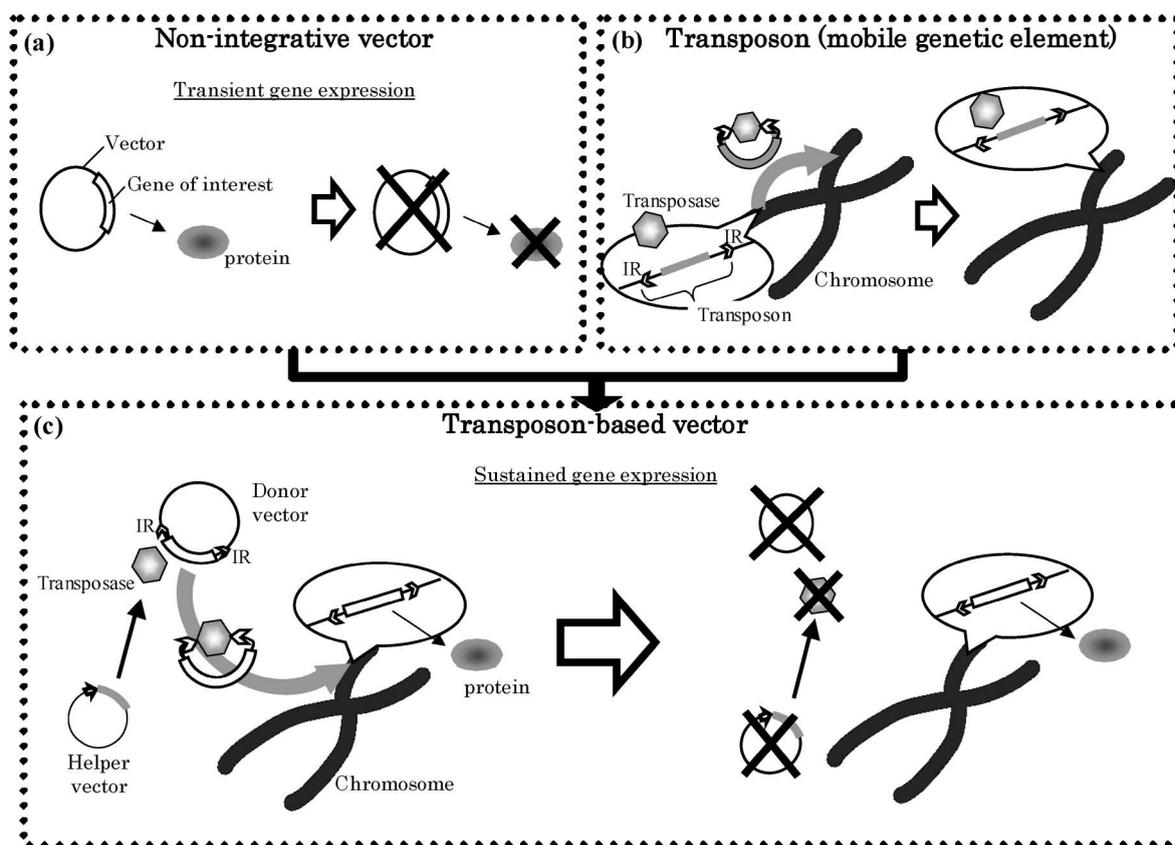


Fig. 1. Mechanism of Transposon-mediated Gene Integration and Sustained Gene Expression

(a) Non-integrative vector containing the gene of interest transiently expresses protein. (b) Transposase recognizes transposon-specific terminal inverted repeat (IR) sequences, and removes the transposon from its original site, and inserts it into another site. (c) The transposon that is containing gene of interest is removed from the donor vector and inserted into the chromosome by transposase. Transposase is transiently expressed by the helper vector.

可能である (Fig. 1).

トランスポゾンには染色体に対し効率的に遺伝子を組込めるだけでなく、生体・細胞内への導入に pDNA と物理刺激や合成キャリア、リコンビナントウイルスなど標的組織・細胞に合わせた多様な導入法を利用できることから、幅広い応用の可能性を有している。本総説では、トランスポゾンの利用でも特に治療を目的とした研究に焦点を絞り、これまで用いられてきたトランスポゾンの種類と導入法、そしてその応用について概説する。また、現状における問題点についても述べ、その解決のために現在進められている研究についても紹介する。

## 2. 哺乳類染色体に組込み可能なトランスポゾン

哺乳類の染色体に対し、遺伝子組込みが可能なトランスポゾンはごく少数が報告されている。治療目的の遺伝子組込みを視野に入れた場合、組込み能の高さや組込める配列長のほかにも注意を払わなくてはならない点がいくつか存在する。第一に、組込む

位置の傾向である。酵母や細菌等のトランスポゾンには、染色体上の特定位置に組込まれるものもある<sup>2)</sup>が、哺乳類染色体への遺伝子組込みが可能なトランスポゾンでは特定の位置に組込まれるものは報告されていない。しかしながら、転写活性化している遺伝子やヘテロクロマチン等、染色体の状態による影響は受けるため、組込まれる位置は完全にランダムというわけではない。<sup>3)</sup> 内在遺伝子近傍への組込みは挿入変異の原因となり得るため、治療を目的とした場合、そのような位置へ組込む傾向の低いトランスポゾンの方がより望ましいと言えよう。第二



中西秀之

京都大学大学院薬学研究科博士後期課程。1984年大阪府八尾市生まれ。2007年京都大学薬学部総合薬学科卒業。2009年同大学院薬学研究科医療薬科学専攻修士課程修了。2006年より橋田充教授の主宰する薬品動態制御学分野に所属、遺伝子治療・核酸医薬品の研究に携わっている。

に、一部のトランスポゾンで知られる *overproduction inhibition* と呼ばれる現象<sup>4,7)</sup>の有無である。*Overproduction inhibition*とは過剰のトランスポザゼにより組込みが低下してしまう現象であり、これを生じないトランスポゾンであれば多量のトランスポザゼを用いればよいが、生じるトランスポゾンでは高効率な遺伝子組込みを得るためにはトランスポザゼ量の最適化が必要となる。簡便に最適な遺伝子組込み効率を得るためには、*overproduction inhibition*を生じないトランスポゾンの方が望ましいと言える。

### 2-1. *Sleeping Beauty* *Sleeping Beauty* (SB)

は哺乳類染色体への高効率な組込みが最初に証明されたトランスポゾンである。このトランスポゾンは1997年、硬骨魚類の染色体上に存在する、“トランスポゾンの化石”(変異の蓄積により移動不能になったトランスポゾン)から元のトランスポゾンの配列を推測するという手法で人工的に構築された。<sup>8)</sup>最初に哺乳類染色体への高効率な組込みが証明されたのはSBの中でもSB10と名付けられたものであるが、その後、より高い組込み能を示す多くの高活性変異体が開発された。なかでも、2009年に発表されたSB100XはSB10の約100倍の組込み能を有する。<sup>9)</sup>SBは現在に至るまで、哺乳類におけるトランスポゾン利用の主流であるが、組込める配列長については、SBの本来のサイズである1.7 kbから1 kbサイズが大きくなる毎に組込み率が30%低下するという性質があるため、サイズの大きい遺伝子や制御配列の組込みには不向きである。<sup>10)</sup>SBは組込み先にTA配列を必要とし、TとAの間に組込まれる。内在遺伝子内に組込まれる確率は約40%であり、レンチウイルスの約80%と比較すると挿入変異の危険性は低いと考えられる。<sup>7,11)</sup>*Overproduction inhibition*については、*in vivo*, *in vitro*ともに生じることが確認されている。<sup>4,7)</sup>その他の特徴として、pDNAのような環状DNAからは高効率で移動するが、アデノウイルスベクターのような線状DNAからの移動能は非常に低いことが挙げられる。<sup>12)</sup>

2-2. *piggyBac* *piggyBac*は蛾の一種、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*)に由来する天然のトランスポゾンであり、発見当時はIFP2と名付けられた<sup>13)</sup>が、のちに現在の名前に改められた。主に

昆虫の変異形成に用いられてきたが、のちに哺乳類染色体への組込みも可能であることが報告された。<sup>14)</sup>*piggyBac*の組込み能はこれまで確認されたすべての哺乳類細胞において*Tol2*, *passport*及びSBの高活性変異体であるSB11, SB12より高く、<sup>6,7,15)</sup>*piggyBac*を超える組込み能が報告されているのはSB100Xのみである。<sup>16)</sup>また、*piggyBac*はSBとは異なり、トランスポゾンの配列長が9.1 kbまでであれば効率を下げることなく染色体への組込みが可能である。<sup>14)</sup>組込み先にはTTAAの配列を必要とし、TとAの間に組込まれる。また、内在遺伝子に組込まれる確率は約50%であり、レンチウイルスよりは低いもののSBよりは高い。<sup>7)</sup>*Overproduction inhibition*については生じるとする報告<sup>6)</sup>と生じないとする報告<sup>7)</sup>があり、今後の詳細な検証が望まれる。

2-3. *Tol2* *Tol2*はメダカ (*Oryzias latipes*)に由来する天然のトランスポゾンである。<sup>17)</sup>主にゼブラフィッシュ等魚類の遺伝子改変に用いられてきたが、2006年に哺乳類でも遺伝子組込みが可能<sup>5)</sup>であると報告された。遺伝子組込み能はSB10, SB11と同程度であり、*piggyBac*よりは低い<sup>5,6)</sup>が、配列長が10 kbに達してもSBのような顕著な組込み能の低下がみられない<sup>5)</sup>という利点を有する。SBや*piggyBac*とは異なり、組込み先にTAやTTAAといった特定の配列を必要とせず、<sup>5)</sup>組込む位置の傾向についても詳しくは分かっていない。*Tol2*は*overproduction inhibition*を生じない<sup>5,6)</sup>ことが知られている。

2-4. その他のトランスポゾン 哺乳類での組込みが確認されたその他のトランスポゾンとしては、*Frog Prince*,<sup>18)</sup> *Himar1*,<sup>19)</sup> *passport*,<sup>20)</sup> *Toll*<sup>21,22)</sup>が挙げられる。*Frog Prince*と*Himar1*はそれぞれヒョウガエル (*Rana pipens*)及びノサシバエ (*Haematobia irritans*)のゲノム上に存在する“トランスポゾンの化石”を基に再構築されたトランスポゾンであり、*passport*と*Toll*はそれぞれカレイ (*pleuronectes platessa*)及びメダカ (*Oryzias latipes*)のゲノムから発見された天然のトランスポゾンである。染色体への組込み能は*Frog Prince*がSB10と比較して同程度から最大で1.7倍であり、<sup>18)</sup> *Himar1*と*passport*はそれぞれSB10よりも低い。<sup>15,20,23)</sup>いずれも哺乳類での研究報告は少数である。

### 3. トランスポゾンの導入法

トランスポゾンは細胞内において染色体上を移動するが、ウイルスとは異なり、ほかの細胞に移動する性質は有していない。したがって、なんらかの方法によりトランスポゾンを含む DNA を細胞内に導入する必要がある。トランスポゾンは物質としてはあくまでも DNA であるため、これまで研究されてきた遺伝子導入法のいずれを用いても導入可能であると考えられる。ここでは既にトランスポゾンの導入について報告のある遺伝子導入法を非ウイルスベクター、ウイルスベクターに大別して紹介する。

**3-1. 非ウイルスベクター** 非ウイルスベクターには通常 pDNA が用いられるが、pDNA は高分子であり、細胞膜と同じ負電荷を帯びていることもあって細胞内への取り込みは非常に低い。そのため、物理刺激や合成遺伝子キャリアにより細胞内に導入される。非ウイルスベクターによる遺伝子導入はハイドロダイナミクス法等の一部を除き、一般にウイルスベクターと比較して低効率である。しかしながら、ウイルスベクターと比較して大量かつ安価な産生が可能であり、また、低い免疫原性や増殖可能なウイルスが混入する危険性の回避など、安全面において利点があると考えられている。<sup>24,25)</sup>

#### 3-1-1. 物理刺激によるプラスミド DNA の導入

naked の pDNA を物理刺激等により細胞に導入する遺伝子導入法としてはハイドロダイナミクス法、エレクトロポレーション、組織押圧法等<sup>24,25)</sup>が知られている。なかでも、マウスの体重の約 8% に相当する大容量の等張液とともに pDNA を静脈内投与するハイドロダイナミクス法は簡便であり、肝臓において非常に高い遺伝子発現が得られる<sup>26)</sup>ことから、広く用いられており、トランスポゾンの *in vivo* での遺伝子導入における検討も多くはこの導入法を用いている。<sup>4,5,27-31)</sup> トランスポゾンを含む pDNA をハイドロダイナミクス法により投与した場合、維持される発現のレベルは初期発現の 5-6% 程度であると言われている。<sup>4)</sup> 初期発現に対し、維持される発現の割合は一見非常に低いようだが、これはハイドロダイナミクス法では一過性の転写因子活性化が生じる<sup>32)</sup>ために pDNA 1 コピー当たりの発現量が初期発現では高くなっているためとも考えられ、5-6% という値は組込みの効率を示しているわけではないと思われる。体重の約 8% というハイ

ドロダイナミクス法の投与量は臨床での使用を考えると実用的ではないが、標的臓器の局所血管にカテーテルを挿入する、局所的ハイドロダイナミクス法<sup>25)</sup>ではそれほど大容量の投与は必要でないと考えられ、現在研究が進められている。

エレクトロポレーションは電流により細胞膜に一過性の孔を生じさせ、pDNA を細胞内に導入する方法である。現在のところエレクトロポレーションによるトランスポゾンの導入は *in vitro*<sup>33,34)</sup> のみに留まるが、*in vivo* においても開腹して標的臓器に電極を当てることで臓器特異的な遺伝子導入が可能である。

#### 3-1-2. 合成キャリアによるプラスミド DNA の導入

合成キャリアにはポリマーやリポソーム等多くの種類がある<sup>24,25)</sup>が、トランスポゾンの導入に最も頻用されているのはポリマーの一種であるポリエチレンジアミン (PEI) である。合成キャリア/pDNA 複合体の多くはエンドサイトーシスを介して細胞のエンドソーム内に取り込まれるが、遺伝子が発現するには pDNA がエンドソームを脱出し、核内移行する必要がある。PEI は多数のアミノ基を有しており、これと水素イオン (プロトン) が配位結合するプロトンスポンジ効果と呼ばれる特徴がある。エンドソーム内は通常酸性条件となっているが、PEI/pDNA 複合体が取り込まれた場合、プロトンスポンジ効果によって水素イオン濃度が低下し、これを補うために水素イオンが塩化物イオンを伴って流入することでエンドソーム内外に大きな浸透圧差が生じ、エンドソームが破裂することで pDNA のエンドソーム脱出が促進されると考えられている。*In vivo* における PEI/pDNA 複合体による遺伝子導入は主に肺を標的臓器として静脈内投与により用いられている<sup>35)</sup>が、ほかに経気道投与<sup>36)</sup>や腫瘍内投与<sup>37-39)</sup>が行われる場合もある。

リポソームは両親媒性を持つ脂質が二重層膜を形成し、細胞様の小胞となったもので、合成キャリアとしてはポリマーと並ぶ代表的なものの 1 つである。しかしながら、特に *in vivo* においてトランスポゾンの導入に用いられてきた例は少ない。*In vivo* での使用例としては、Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) 由来のタンパクと組み合わせることで膜融合能を持たせたりリポソームである HVJ リポソームを筋肉内投与した例が報告されている。<sup>40)</sup>

リポソームは抗がん剤封入等で既に臨床でも使用されており、今後治療を目的としたトランスポゾンの研究が進むにつれて、トランスポゾン導入での使用も広がる可能性がある。

### 3-2. ウイルスベクター

**3-2-1. アデノウイルスベクター** アデノウイルスベクターは非分裂細胞を含む広範な細胞種に対し高い遺伝子導入能を持ち、さらに高力価のウイルスが回収可能であることから、遺伝子治療への利用が特に期待されているウイルスベクター<sup>41)</sup>の1つである。アデノウイルスは染色体に遺伝子を組込む性質を持たないため、アデノウイルスベクターからの遺伝子発現は通常一過性である。そのため、アデノウイルスベクターにより治療遺伝子を長期発現させる方法の1つとして提示されたのがトランスポゾンを組み合わせることによる発現の持続化である。しかしながら、遺伝子治療研究に最もよく用いられているトランスポゾンである *SB* は直鎖状二本鎖 DNA であるアデノウイルスベクターからの移動効率が低いことが報告されており、過去の事例では *Flp recombinase* により DNA を環状化することでこの問題を解決している。<sup>12)</sup> *Himar1* ではアデノウイルスにより発現されたトランスポザゼが pDNA 上のトランスポゾンを移動させることが報告されている<sup>42)</sup>が、アデノウイルスベクター上からの移動については不明である。今後、線状 DNA からも移動可能なトランスポゾンが確認された場合、アデノウイルスベクターでのトランスポゾン利用が大きく広がる可能性もある。

**3-2-2. 単純ヘルペスウイルスベクター** 単純ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科に属し、神経細胞に感染するウイルスであることから主に神経細胞への遺伝子導入に用いられている。単純ヘルペスウイルスベクターも遺伝子を宿主染色体に組込まないため、遺伝子発現はやはり一過性である。このため、発現の持続化を目的として単純ヘルペスウイルスベクターとトランスポゾンの組み合わせによる神経細胞への遺伝子組み込みが報告されている。単純ヘルペスウイルスベクターの大きな特徴として、導入可能な DNA のサイズが最大 130 kb と非常に大きいことが挙げられる。過去の研究例では、胎児期におけるトランスポゾンを含む単純ヘルペスウイルスベクターの投与により、生後 90 日の時点におい

ても脳の皮質、歯状回、海馬において導入遺伝子の発現が認められた。<sup>43)</sup>

**3-2-3. インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター** レンチウイルスベクターはレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルスやサル免疫不全ウイルス等を基にしたベクターである。一般にレトロウイルスベクターと呼ばれるガンマレトロウイルスを基にしたベクターとは異なり、非分裂細胞に対しても遺伝子導入可能である。レンチウイルスは染色体に遺伝子を組込む性質を有しているが、転写活性化している内在遺伝子近傍に遺伝子を組込む傾向が強く、<sup>7,11)</sup> 挿入変異を引き起こす危険性が高い。一方、インテグラーゼ欠損レンチウイルスはレンチウイルスが染色体に遺伝子を組込む際に用いるタンパクであるインテグラーゼを欠いているため、染色体に遺伝子を組込む性質を持たない。それ故にインテグラーゼ欠損レンチウイルスでは挿入変異の危険性がない一方で発現は一過性である。このインテグラーゼ欠損レンチウイルスベクターとトランスポゾンを組み合わせることで、通常のレンチウイルスと比較して遺伝子近傍に組込む危険性を低下させた遺伝子組み込みとそれによる発現持続化を可能にするベクターが開発されている。<sup>11)</sup> レンチウイルスのゲノムは RNA であるため、逆転写酵素により相補的な DNA を合成し、この DNA からトランスポゾンは移動する。インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクターにより導入したトランスポゾンの組み込み位置選択性は pDNA により導入した場合と同様であり、通常のレンチウイルスと比較して遺伝子内への組み込みは少ない。<sup>11)</sup> 非常に高い組み込み能を持つ *SB100X* と組み合わせた場合であっても遺伝子組み込み能は通常のレンチウイルスの約 1/12 である<sup>11)</sup> という欠点はあるものの、安全性の観点からは通常のレンチウイルスよりは望ましいものと言える。

## 4. トランスポゾンを用いた治療研究

トランスポゾンを用いた治療研究の主なものとしては、トランスポゾンを搭載したベクターを直接生体に投与する *in vivo* での遺伝子治療、及びトランスポゾンにより新たな遺伝子を組込んだ細胞を用いた細胞治療が挙げられる。また、トランスポゾン自体を直接治療に用いるものではないが、近年話題の人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞の作製にもトランスポゾンは用いられている。

**4-1. 遺伝子治療** トランスポゾンに基づくベクターの利点は、染色体への組み込みによる発現の持続性にある。したがって、遺伝子治療への適用を考えた場合、その対象となる疾患は治療遺伝子の長期発現を必要とする先天性、若しくは慢性疾患となる。

先天的に正常タンパクの発現が不足、若しくは欠損している疾患については、タンパク補充療法など対症療法が開発されたものも少なくはないが、根治は現状においては困難、若しくは不可能である（一部の先天性疾患については肝移植、骨髄移植等による根治も可能）。トランスポゾンを用いた遺伝子治療はこれまで困難であったこれら先天性疾患の根治を実現するものとして期待される。血友病、<sup>4,27,28)</sup>高チロシン血症、<sup>5,29)</sup>ムコ多糖症<sup>30)</sup>等では既に病態モデル動物に対するトランスポゾンを用いた治療研究が報告されている。これらの疾患に対する遺伝子治療では通常、トランスポゾンにより組み込む治療遺伝子は不足しているタンパクを発現するものとなる。この場合、注意が必要なのはそれらのタンパクは治療対象となる生体には本来存在しないものであるため、免疫系による排除の対象となり得る<sup>27,28,30)</sup>という点である。これまでの研究報告では、免疫抑制剤の投与、<sup>30)</sup>免疫抑制活性を持つ遺伝子の組み込み<sup>28)</sup>等により、免疫系による治療タンパクの排除が抑制されている。しかしながらこうした非特異的な免疫抑制は感染症にかかり易くなる危険性があるため、可能であれば新生児期の投与等により治療タンパクに対する免疫寛容を生じさせる<sup>27)</sup>方が望ましいと考えられる。同じく正常タンパクの不足が原因の疾患では、I型糖尿病<sup>31)</sup>モデルマウスに対するプロインスリン遺伝子組み込みによる治療研究も報告されているが、このように先天性でないものについては発現させるタンパクは生体に本来存在するものであるため、免疫系による排除の危険性は比較的低いと考えられる。

一方、先天性疾患にはハンチントン病のように異常タンパクの発現が原因となる疾患も存在する。この種の疾患に対する治療法として期待されるのが、トランスポゾンによる short hairpin RNA (shRNA) 発現配列の組み込み<sup>44)</sup>である。shRNA は細胞内に存在するタンパクとの間に RNA induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成する。この RISC は shRNA と相補的な配列を有する mes-

senger RNA (mRNA) を切断するため、shRNA により特定タンパクの発現をノックダウンすることが可能である。

トランスポゾンを用いた遺伝子治療では、特定タンパクの不足や異常が原因でない慢性疾患も対象として考えられている。実際にトランスポゾンを用いた治療研究の例としては、免疫抑制活性を有するタンパクの持続発現による移植臓器拒絶の抑制<sup>36)</sup>や血管拡張作用を有するタンパクの持続発現による高血圧治療<sup>35)</sup>などが挙げられる。こうした疾患の治療の場合、健常人における発現量を上回る、若しくは健常人では発現していないタンパクを発現させることになる点やトランスポゾンにより一度組み込んだ遺伝子の除去が困難である点を鑑み、より慎重な検討が必要と考えられる。

がんは日本を含め先進国においては主要な死因の1つであり、遺伝子治療の対象としても最も研究が盛んな疾患の1つである。しかしながら、トランスポゾンによる発現持続化には導入遺伝子を組み込んだ細胞が生存している必要があるため、がん遺伝子療法で多く用いられるアポトーシス誘導遺伝子では、トランスポゾンを用いたとしても短期的な治療効果しか得られない可能性がある。したがって、組み込む遺伝子としては遺伝子が組み込まれた細胞を直接的に死に至らしめるものよりは周囲のがん細胞に影響を与えるものの方が望ましいと考えられる。現在までにトランスポゾンを用いたがん遺伝子療法の検討では、インターフェロン $\gamma$ 、<sup>37)</sup>分泌型血管新生阻害タンパク、<sup>38)</sup>ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ<sup>39)</sup> (ガンシクロビルを活性化し、抗腫瘍効果を発揮させる)、多剤耐性タンパクに対する shRNA<sup>45)</sup>などの遺伝子を組み込んでいる。

**4-2. 細胞治療** トランスポゾンを用いた細胞治療では、鎌状赤血球症、地中海貧血症（サラセミア）といった先天性の貧血症、重症複合免疫不全 (SCID) のような先天性の免疫不全が主な治療対象として想定されており、過去の報告では主に造血細胞が遺伝子組み込みの対象となっている。<sup>16,33,46)</sup>これは、長命で増殖能の高い幹細胞や前駆細胞に遺伝子を組み込むことで遺伝子が組み込まれた血球を多数かつ長期にわたって供給でき、高い治療効果が得られると考えられるためである。

がん免疫療法は、トランスポゾンを用いた治療で

は特に期待を寄せられているものの1つである。これは、がん特異抗原を認識する受容体遺伝子をT細胞に組み込むことでがん細胞を異物と認識させ、免疫系によりがん細胞を排除させるものである。通常のpDNAでは導入遺伝子が染色体外に存在するためT細胞を増殖させても導入遺伝子は複製されず、がん特異抗原受容体を発現するT細胞を十分な数確保することは困難であった。トランスポゾンによりがん特異抗原受容体遺伝子を組み込んだ後、抗原提示細胞を介してこの受容体からシグナルを伝達し、この受容体を発現している細胞のみを選択的に増殖させることでがん特異抗原を認識するT細胞が多く得られる。<sup>34,47)</sup> この遺伝子組み込みT細胞を用いたがん免疫療法は、トランスポゾンを用いた治療では初の臨床試験が認可されている。<sup>48)</sup>

**4-3. 人工多能性幹細胞の作製** iPS細胞は体細胞を胚性幹細胞と同様の多分化能を持つ状態に戻したものである。iPS細胞作製技術は患者自身の細胞から多様な組織の細胞を作り出すことを可能とし、これは患者自身の細胞を基にした細胞・臓器移植や薬物スクリーニング等、未来のテーラーメイド医療の根幹を担うものと期待される。*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*の4つの遺伝子を導入することにより作製される<sup>49)</sup>場合が多く、当初はレトロウイルスによりこれら4つの遺伝子を染色体に組み込むことでiPS細胞を作製していた。<sup>49)</sup>しかしながら、この方法で作製されたiPS細胞ではがん化が報告されている。導入遺伝子の1つである*c-Myc*ががん原遺伝子であることや、レトロウイルスによる遺伝子組み込み自体に発がん性があることから、臨床での使用に耐え得るより安全性の高いiPS細胞作製法の樹立を目指して研究が進められてきている。その中には、pDNA<sup>50)</sup>など染色体に遺伝子を組み込まない一過性の発現ベクターによる遺伝子導入も含まれているが、これらのベクターでは発現期間が短く、また、細胞分裂によってベクターが希釈されていき、4つの導入遺伝子すべてを含む細胞が少なくなっていくため、複数回の遺伝子導入の必要性や低いiPS細胞作製効率(レトロウイルスの1/100程度)といった問題点もある。これに対しトランスポゾンを用いたiPS細胞の作製<sup>51-53)</sup>では上記の4つの遺伝子を含むトランスポゾンを一度染色体に組み込み、iPS細胞化の後トランスポザースにより切り出すことで組

込んだ遺伝子を除去している。これにより遺伝子組み込みによる変異のないiPS細胞が作製可能である。一部のトランスポゾンでは一度トランスポゾンが組み込まれた箇所はトランスポゾンが切り出された後も完全に元の配列には戻らない(footprintと呼ばれる)ことが知られているが、iPS細胞作製に用いられているトランスポゾンである*piggyBac*にはこのような性質はなく、トランスポゾンが切り出された箇所の90%以上は完全に元の配列に戻るため、変異の危険性は低い。ただし、トランスポゾンは切り出された後再度組み込まれる場合もあることから、iPS細胞作製後のトランスポゾン除去率は $10^{-5}$ 程度と報告されている。<sup>53)</sup>

## 5. トランスポゾンを治療応用する上での問題点とその解決策

トランスポゾンを治療応用するにあたって最も懸念される問題は、染色体への遺伝子組み込みによる挿入変異の危険性である。具体的には、導入遺伝子の発現を調節するためのエンハンサー/プロモーター配列による組み込まれた位置近傍の内在遺伝子異常活性化や内在遺伝子内部への組み込みによる遺伝子ノックアウトなどが考えられる。レトロウイルスによる遺伝子治療の臨床試験では、がん原遺伝子である*LMO2*近傍への遺伝子組み込みによる*LMO2*異常活性化による発がんが報告されている。<sup>54)</sup>トランスポゾンは一般にレトロウイルスと比較し、遺伝子近傍へ組み込む傾向は低いですが、挿入変異の危険性は否定できず、臨床応用を目指す上では安全性の改善が求められる。以下では、この問題の克服に向けた取り組みを紹介する。

**5-1. 組み込み位置の制御** 染色体上の特定位置に組み込むことで内在遺伝子近傍への組み込みを避け、これにより挿入変異の危険性を回避するための研究はトランスポゾンを移動させる酵素であるトランスポザースを染色体上の特定位置に固定するもの<sup>55-57)</sup>と、トランスポゾン自体を固定するもの<sup>57)</sup>に大別される。

トランスポザースの固定法としては、第一にトランスポザースを配列選択的DNA結合タンパクとの融合タンパクとするものが挙げられる。<sup>55-57)</sup>ただし、この方法では融合タンパクとすることでトランスポザースの活性が損なわれてしまう場合がある。*SB*トランスポザースではN末端、C末端のいずれ

に DNA 結合タンパクを融合させた場合もトランスポザーゼ活性が失われるか、若しくは大きく低下する(最大で通常のトランスポザーゼの約 26%).<sup>6,56,57)</sup> また, *Tol2* トランスポザーゼの場合も N 末端への DNA 結合タンパクの融合によりトランスポザーゼ活性は失われる.<sup>6)</sup> 一方, *piggyBac* トランスポザーゼでは N 末端への DNA 結合タンパクの融合による活性低下はない.<sup>6,55)</sup> 標的配列近傍への組込みは簡便性の観点から主に標的配列を含む pDNA への組込みによって評価されている. DNA 結合タンパク融合 *piggyBac* トランスポザーゼでは標的配列の 912 bp 上流に全組込みの 67% が集中することが報告されている.<sup>55)</sup> また, 同じく DNA 結合タンパク融合 *SB* トランスポザーゼでは標的配列の周囲 443 bp に 33.3% が組込まれると報告されている.<sup>56)</sup> しかしながら, ここでの“全組込み”はあくまでも標的配列を含む pDNA への組込みのみであることに留意しなければならない. 実際には pDNA と比較して遥かにサイズの大きいゲノム DNA (pDNA の数 kb に対し, ヒトゲノム DNA は約 3 Gb) に対して多数の組込みが生じているはずであり, これを母数に加えると標的配列近傍への組込みの割合は大きく下がるものと考えられる. 実際, 同じ DNA 結合タンパク融合 *SB* トランスポザーゼを用いたゲノム DNA への組込みでは, 標的配列の周囲 1 kb の範囲への組込みは認められていない.<sup>56)</sup>

トランスポザーゼを固定する手法としてはもう 1 つ, トランスポザーゼを DNA 結合タンパクと融合させるのではなく, 相互作用させる方法がある.<sup>57)</sup> これは, 標的配列に結合する DNA 結合タンパクをトランスポザーゼと相互作用するペプチドとの融合タンパクとし, 標的配列と融合タンパク, 融合タンパクとトランスポザーゼの結合がそれぞれ生じることによりトランスポザーゼが標的配列に固定されるという方法である. この方法では, *SB* トランスポザーゼのような融合タンパクとすることで活性が低下するトランスポザーゼであっても活性を損なうことなく標的配列に固定でき, また, ゲノム DNA への組込みにおいて >10% の確率で標的配列近傍への組込みが可能であった.<sup>57)</sup> ただし, この方法はトランスポザーゼの活性を損なうことなくトランスポザーゼと相互作用するペプチドが知られていることが必須条件となる. *SB* では N-57 と呼ばれるペプ

チドがトランスポザーゼの活性を損なうことなくトランスポザーゼに結合することが知られており, このペプチドが用いられている.<sup>57)</sup>

トランスポゾン固定する方法では, 2 つの DNA 結合タンパクの融合タンパクが用いられる. 一方はトランスポゾン内部の配列に結合するものであり, 他方は標的配列に結合するものである. トランスポゾン内部の配列と融合タンパク, 融合タンパクと標的配列の結合によりトランスポゾンを標的配列に固定することで組込み位置を標的配列の近傍に限定する. *SB* では, このトランスポゾンの固定により組込みの効率は低下しないと言われており, また, 約 16% の組込みがゲノム DNA 上の標的配列近傍であった.<sup>57)</sup>

これまで検討されたいずれの方法においても, ゲノム DNA 上の標的配列近傍への組込みの確率は高いとは言えず, 多くは標的配列から離れた位置に組込まれている. 組込み位置の制御については今後さらなる研究が必要であると言えよう.

**5-2. Chromatin Insulator の導入** Chromatin Insulator は核内タンパクとの相互作用によりその前後の配列を隔絶する働きを持つ DNA 配列である. Chromatin Insulator に挟まれた配列は周囲の配列の影響を受け難くなり, また同時に, 周囲の配列に影響を与え難くなる. *SB* での検討では, トランスポゾン内に Chicken  $\beta$ -globin HS4 Insulator を導入することで近傍遺伝子の活性化を 1/7-1/50 に抑えられたと報告している.<sup>58)</sup> ただし, Chromatin Insulator を導入した *SB* トランスポゾンはそうでないトランスポゾンと比較し, 組込みが約半分に低下することも報告されている.<sup>58)</sup> これは, トランスポゾン内の Chromatin Insulator に対する核内タンパクの結合がトランスポザーゼの作用を妨げるためではないかと推察されている.

Chromatin Insulator による近傍遺伝子活性化の抑制は組込み位置の制御と比較して簡便かつ確実である. ただし, Chromatin Insulator は内在遺伝子近傍に組込まれた際の内在遺伝子活性化を防ぐ可能性はあるが, 内在遺伝子内に組込まれた際の遺伝子ノックアウトは防げないと思われる. 加えて, Chromatin Insulator を含むトランスポゾンが内在制御配列とその制御配列の対象となる遺伝子の間に組込まれた場合, 当該遺伝子の制御を損なうことも

考えられ、今後も慎重な検討が必要である。

## 6. おわりに

本総説ではトランスポゾンについて、特に治療応用を目指した研究に絞って概説してきた。このほかにもトランスポゾンは基礎生物学等に幅広く応用されている。トランスポゾン自体もかつては哺乳類染色体への組込みが可能だったものはSBのみしか知られていなかったが、*piggyBac*や*Tol2*などが新たに用いられるようになり、さらにSBも改良が続けられるなど日々進歩を続けている。本総説では既存のトランスポゾンの問題点についても敢えて指摘したが、今後、トランスポゾンの改良や新たなトランスポゾンの発見等によりこれらの問題が解決する日も遠くないと考えられる。むしろ、治療への応用を考える上ではトランスポゾンの研究のみでなく、トランスポゾンを細胞・組織へ導入するための遺伝子導入技術の進歩も必要であり、これらの進展が難病の克服に貢献することを期待する。

## REFERENCES

- McClintock B., "Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1981-1990," ed. by Lindsten J., World Scientific Pub. Co., 1993, pp. 180-199.
- Voigt K., Izsvák Z., Ivics Z., *J. Mol. Med.*, **86**, 1205-1219 (2008).
- Hackett C., Geurts A., Hackett P., *Genome Biol.*, **8** (Suppl 1), S12 (2007).
- Yant S., Meuse L., Chiu W., Ivics Z., Izsvák Z., Kay M., *Nat. Genet.*, **25**, 35-41 (2000).
- Balciunas D., Wangenstein K., Wilber A., Bell J., Geurts A., Sivasubbu S., Wang X., Hackett P., Largaespada D., McIvor R., Ecker S., *PLoS Genet.*, **2**, e169 (2006).
- Wu S., Meir Y., Coates C., Handler A., Pelczar P., Moisyadi S., Kaminski J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 15008-15013 (2006).
- Wilson M., Coates C., George A. J., *Mol. Ther.*, **15**, 139-145 (2007).
- Ivics Z., Hackett P., Plasterk R., Izsvák Z., *Cell*, **91**, 501-510 (1997).
- Mátés L., Chuah M., Belay E., Jerchow B., Manoj N., Acosta-Sanchez A., Grzela D., Schmitt A., Becker K., Matrai J., Ma L., Samara-Kuko E., Gysemans C., Pryputniewicz D., Miskey C., Fletcher B., Vandendriessche T., Ivics Z., Izsvák Z., *Nat. Genet.*, **41**, 753-761 (2009).
- Izsvák Z., Ivics Z., Plasterk R., *J. Mol. Biol.*, **302**, 93-102 (2000).
- Staunstrup N., Moldt B., Mátés L., Villesen P., Jakobsen M., Ivics Z., Izsvák Z., Mikkelsen J., *Mol. Ther.*, **17**, 1205-1214 (2009).
- Yant S., Ehrhardt A., Mikkelsen J., Meuse L., Pham T., Kay M., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 999-1005 (2002).
- Cary L., Goebel M., Corsaro B., Wang H., Rosen E., Fraser M., *Virology*, **172**, 156-169 (1989).
- Ding S., Wu X., Li G., Han M., Zhuang Y., Xu T., *Cell*, **122**, 473-483 (2005).
- Clark K., Carlson D., Foster L., Kong B., Foster D., Fahrenkrug S., *BMC Biotechnol.*, **7**, 42 (2007).
- Xue X., Huang X., Nodland S., Mates L., Ma L., Izsvák Z., Ivics Z., Lebien T., McIvor R., Wagner J., Zhou X., *Blood*, **114**, 1319-1330 (2009).
- Koga A., Suzuki M., Inagaki H., Bessho Y., Hori H., *Nature*, **383**, 30 (1996).
- Miskey C., Izsvák Z., Plasterk R., Ivics Z., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6873-6881 (2003).
- Lampe D., Churchill M., Robertson H., *EMBO J.*, **15**, 5470-5479 (1996).
- Clark K., Carlson D., Leaver M., Foster L., Fahrenkrug S., *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1239-1247 (2009).
- Koga A., Inagaki H., Bessho Y., Hori H., *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 400-405 (1995).
- Koga A., Shimada A., Kuroki T., Hori H., Kusumi J., Kyono-Hamaguchi Y., Hamaguchi S., *J. Human Genet.*, **52**, 628-635 (2007).
- Keravala A., Liu D., Lechman E., Wolfe D., Nash J., Lampe D., Robbins P., *Hum. Gene Ther.*, **17**, 1006-1018 (2006).
- Kawakami S., Higuchi Y., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 726-745 (2008).
- Li S., Huang L., *J. Controlled Release*, **123**, 181-183 (2007).
- Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258-1266 (1999).
- Ohlfest J., Frandsen J., Fritz S., Lobitz P., Perkinson S., Clark K., Nelsestuen G., Key N., McIvor R., Hackett P., Largaespada D.,

- Blood*, **105**, 2691–2698 (2005).
- 28) Liu L., Liu H., Mah C., Fletcher B., *Gene Ther.*, **16**, 724–733 (2009).
  - 29) Montini E., Held P., Noll M., Morcinek N., Al-Dhalimy M., Finegold M., Yant S., Kay M., Grompe M., *Mol. Ther.*, **6**, 759–769 (2002).
  - 30) Aronovich E., Bell J., Belur L., Gunther R., Koniar B., Erickson D., Schachern P., Matise I., McIvor R., Whitley C., Hackett P., *J. Gene Med.*, **9**, 403–415 (2007).
  - 31) He C., Shi D., Wu W., Ding Y., Feng D., Lu B., Chen H., Yao J., Shen Q., Lu D., Xue J., *World J. Gastroenterol.*, **10**, 567–572 (2004).
  - 32) Nishikawa M., Nakayama A., Takahashi Y., Fukuhara Y., Takakura Y., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 1009–1020 (2008).
  - 33) Hollis R., Nightingale S., Wang X., Pepper K., Yu X., Barsky L., Crooks G., Kohn D., *Exp. Hematol.*, **34**, 1333–1343 (2006).
  - 34) Singh H., Manuri P., Olivares S., Dara N., Dawson M., Huls H., Hackett P., Kohn D., Shpall E., Champlin R., Cooper L., *Cancer Res.*, **68**, 2961–2971 (2008).
  - 35) Liu L., Liu H., Visner G., Fletcher B., *FASEB J.*, **20**, 2594–2596 (2006).
  - 36) Liu H., Liu L., Fletcher B., Visner G., *FASEB J.*, **20**, 2384–2386 (2006).
  - 37) Wu A., Oh S., Ericson K., Demorest Z., Vengco I., Gharagozlou S., Chen W., Low W., Ohlfest J., *Cancer Gene Ther.*, **14**, 550–560 (2007).
  - 38) Ohlfest J., Demorest Z., Motooka Y., Vengco I., Oh S., Chen E., Scappaticci F., Saplis R., Ekker S., Low W., Freese A., Largaespada D., *Mol. Ther.*, **12**, 778–788 (2005).
  - 39) Kang Y., Zhang X., Jiang W., Wu C., Chen C., Zheng Y., Gu J., Xu C., *BMC Cancer*, **9**, 126 (2009).
  - 40) Masuda K., Yamamoto S., Endoh M., Kaneda Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 796–800 (2004).
  - 41) Sakurai F., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1751–1761 (2008).
  - 42) Zhang L., Sankar U., Lampe D., Robertson H., Graham F., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3687–3693 (1998).
  - 43) Bowers W., Mastrangelo M., Howard D., Southerland H., Maguire-Zeiss K., Federoff H., *Mol. Ther.*, **13**, 580–588 (2006).
  - 44) Chen Z., Kren B., Wong P., Low W., Steer C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 646–652 (2005).
  - 45) Rumpold H., Wolf A., Gruenewald K., Gastl G., Gunsilius E., Wolf D., *Exp. Hematol.*, **33**, 767–775 (2005).
  - 46) Zhu J., Kren B., Park C., Bilgim R., Wong P., Steer C., *Biochemistry*, **46**, 6844–6858 (2007).
  - 47) Huang X., Guo H., Kang J., Choi S., Zhou T., Tammana S., Lees C., Li Z., Milone M., Levine B., Tolar J., June C., McIvor R. S., Wagner J., Blazar B., Zhou X., *Mol. Ther.*, **16**, 580–589 (2008).
  - 48) Williams D., *Mol. Ther.*, **16**, 1515–1516 (2008).
  - 49) Takahashi K., Yamanaka S., *Cell*, **126**, 663–676 (2006).
  - 50) Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S., *Science*, **322**, 949–953 (2008).
  - 51) Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K., *Nature*, **458**, 771–775 (2009).
  - 52) Woltjen K., Michael I., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hämmäläinen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H., Nagy A., *Nature*, **458**, 766–770 (2009).
  - 53) Yusa K., Rad R., Takeda J., Bradley A., *Nat. Methods*, **6**, 363–369 (2009).
  - 54) Haccin-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Le Boulch P., Lim A., Osborne C. S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J. I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L. E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T. H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., *Science*, **302**, 415–419 (2003).
  - 55) Maragathavally K., Kaminski J., Coates C., *FASEB J.*, **20**, 1880–1882 (2006).
  - 56) Yant S., Huang Y., Akache B., Kay M., *Nucleic Acids Res.*, **35**, e50 (2007).
  - 57) Ivics Z., Katzer A., Stüwe E., Fiedler D.,

Knespel S., Izsvák Z., *Mol. Ther.*, **15**, 1137–1144 (2007).

58) Walisko O., Schorn A., Rolfs F., Devaraj A.,

Miskey C., Izsvák Z., Ivics Z., *Mol. Ther.*, **16**, 359–69 (2008).