

ウサギ角膜実質培養細胞での Cre/loxP system を用いた 組み換えアデノウイルスの遺伝子発現制御

戸来 透, 藤原 貴光

岩手医科大学細菌学教室・眼科学教室

要 約

目的: 遺伝子治療の研究において, 遺伝子発現をコントロールすることは重要な問題である. 今回, ウサギ角膜実質培養細胞において組み換えアデノウイルスと Cre/loxP system を使用して lac Z gene の発現コントロールについて検討した.

方法: スタッファー DNA の切り出しによって lac Z gene が発現する組み換えアデノウイルスの Ax CA LNLZ を, ウサギ角膜実質培養細胞にトランスフェクションさせた. トランスフェクションから 4 日後, Cre を産生する組み換えアデノウイルスの Ax CA NCre をさらに培養細胞にトランスフェクションさせた.

結果: Ax CA LNLZ をトランスフェクションした細胞のうち, 0.8% の細胞にしか lac Z gene は発現して

いなかった. Ax CA NCre をさらにトランスフェクションした後は, すべての細胞において lac Z gene が強く発現していた. このことは, Cre/loxP system を用いた組み換えアデノウイルスが, ウサギ角膜実質培養細胞において外来遺伝子の発現をコントロールすることが可能であることを示している.

結論: Cre/loxP system を用いた組み換えアデノウイルスは, 今後の眼科領域の遺伝子治療研究に有用であることが示唆された. (日眼会誌 103:512—518, 1999)

キーワード: 組み換えアデノウイルス, 部位特異的組み換え酵素, クレリコンビネース, ロックスビー, 遺伝子治療

Regulation of Gene Expression in Cultured Rabbit Corneal Stromal Cells with Recombinant Adenovirus Using the Cre/loxP System

Tohru Herai and Takamitsu Fujiwara

Department of Bacteriology and Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine

Abstract

Purpose: To control exogenous gene expression is an important norm in human gene therapy. We attempted to control lac Z gene expression in a rabbit corneal stromal cell (RCS) culture system with recombinant adenovirus (Ad) and the Cre/loxP system.

Materials & Methods: The RCS was transfected with an Ad which expressed the lac Z gene by excisional deletion of stuffer DNA, Ax CA LNLZ. Four days after the transfection, the cells were also transfected with a Cre-producing Ad, Ax CA NCre.

Result: Few cells (0.8%) of the RCS transfected with Ax CA LNLZ expressed the lac Z gene. After the transfection of Ax CA NCre, all cells strongly

expressed the lac Z gene. This result showed that recombinant adenovirus using the Cre/loxP system was capable of controlling exogenous gene expression in cultured rabbit corneal stromal cells.

Conclusion: We suggest that recombinant adenovirus using the Cre/loxP system is useful for studying ophthalmic gene therapy. (J Jpn Ophthalmol Soc 103:512—518, 1999)

Key words: Recombinant adenovirus, Site-specific recombinase, Cre recombinase, LoxP, Gene therapy

I 緒 言

近年, 眼科領域においても脳回状網脈絡膜萎縮¹⁾, 網膜色素変性²⁾, 増殖性硝子体網膜症³⁾⁴⁾などの疾患に対する

遺伝子治療の可能性が検討され始めている. 前二者は欠損酵素あるいは欠損タンパクの発現を目的とし, 後者は自殺遺伝子を利用して線維性増殖の抑制を目的としている. 前二者においては, 目的遺伝子の恒久的な発現とその

別刷請求先: 020-8505 盛岡市内丸 19-1 岩手医科大学眼科学教室 戸来 透

(平成 10 年 11 月 13 日受付, 平成 11 年 2 月 16 日改訂受理)

Reprint requests to: Tohru Herai, M.D. Department of Ophthalmology, Iwate Medical University School of Medicine, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan

(Received November 13, 1998 and accepted in revised form February 16, 1999)

コントロールが重要であるが、現段階では導入後の遺伝子発現をコントロールすることが可能になるまでには至っていない。悪性新生物を除いた各種の疾患に対して共通で最も理想的な遺伝子治療の方法としては、注射や経口投与による簡便な導入であり、その発現は目的とする臓器あるいは細胞に限局し、しかも発現の on/off のコントロールが可能で、その発現量は生理的範囲であり、ホメオスターシスによって生理的にコントロールされ得るものといえる。しかし、現時点ではこのような遺伝子治療は存在せず、多施設で様々な研究がなされている。我々も眼科領域での遺伝子導入や、遺伝子治療を目的として検討中であり、目的遺伝子の発現をコントロールすることが、臨床応用に向けての重要な課題の一つであると考えている。

そこで今回、P1 ファージの Cre recombinase を利用して作製された組み換えアデノウイルス⁵⁾⁶⁾を使用し、眼組織由来の細胞において外来遺伝子の発現のコントロールを検討した。

II 方 法

1. 293 細胞の培養

アデノウイルス 5 型によって、常時 E1 遺伝子を発現するように形質転換されたヒト胎児の腎臓由来の 293 細胞(JCRB 9068, 日本ヒューマンサイエンス振興財団)を、10% ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum, No. 26140-079, GIBCO BRL, 以下, FBS)を加えた Dulbecco's MEM(ダルベコ変法イーグル培地“ニッスイ”^②, Code 08185, 日本製薬, 以下, DMEM)を培養液として、25 cm² の組織培養フラスコ(フラスコアングルネック, No. 163371, Nunc)で初代培養した。コンフルエントな状態になった時点で培養液を捨て、リン酸緩衝食塩水[以下, PBS(-)]を加えて細胞をフラスコの底面から浮遊させ、以下の実験に使用するまで 80 cm² の組織培養フラスコ(フラスコストレートネック, No. 153732, Nunc)に 7 日毎に継代して培養を続けた。

2. ウサギ角膜実質細胞の培養

角膜実質細胞の培養はダッチ種ウサギの角膜を用いて行った。ウサギ(1.5~2.0 kg, 雄, n=3, オリエンタル酵母)の耳介静脈にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール注射液[®] 50 mg/ml, ダイナボット)を 10 ml 静注して致死させ、両側の眼球を摘出し、イソジン原液、次いで 80% アルコールに浸漬して消毒した後、角膜を切り出した。角膜切片から上皮および内皮を剥離し、角膜実質のみを粟粒大に細切した。この角膜実質片を 24 穴マルチデッシュの各ウェルに 1 片ずつ静置し、これに 20% FBS+10% フルコナゾール(ジフルカン静注用[®] 100 mg/50 ml, ファイザー製薬)+1% ストレプトマイシン・ペニシリン[硫酸ストレプトマイシン力価 1 g, 明治製薬および結晶ペニシリン G カリウム 100 万単位, 旭化成工業を 100

ml の PBS(-)と混合]含有の Eagle's MEM(イーグル培地“ニッスイ”^①, Code 05900, 日本製薬, 以下, MEM)を添加して 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で初代培養を行った。角膜実質培養細胞が 80% 以上コンフルエントな状態になった時点で、PBS(-)で 2 回洗浄し、0.5% トリプシン+0.02% エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を加えて細胞をディッシュから剥離し、これを 6 穴マルチデッシュ(Nunc マルチデッシュ, No. 152795, Nunc)に移し、10% FBS+10% フルコナゾール+1% ストレプトマイシン・ペニシリン含有の MEM を添加して、5% CO₂ インキュベーターで 2 代目の培養を行った。3 代目からは 25 cm² の組織培養フラスコを用いて 37°C の恒温室中で培養を行い、実験には継代 7 代目の細胞を使用した。

3. 角膜実質培養細胞数の算出

上記の 7 代継代した角膜実質培養細胞の培養液を捨て、PBS(-)で 2 回洗浄し、0.5% トリプシン+0.02% EDTA を 0.5 ml 加え、恒温室に 5 分間静置して細胞を浮遊させた。これを硝子チューブに移し、MEM を加えて総量 3 ml の細胞浮遊液を作り、その 0.1 ml を別の硝子チューブに移し、0.2% ニグロシン液 0.9 ml を加えてよく攪拌し、Bürker-Türk 型計算板を用いて、25 cm² の組織培養フラスコ 1 本当当たりの細胞数を計算した。

4. 組み換えアデノウイルスの構造および遺伝子発現制御の方法

今回の実験には、以下の 4 種の組み換えアデノウイルス⁵⁾⁶⁾を使用した。

1) 初期活性遺伝子の E1 と E3 を除去し、外来遺伝子が挿入されていない組み換えアデノウイルス(Ax 1w1, 以下, 1w1, 図 1-1)

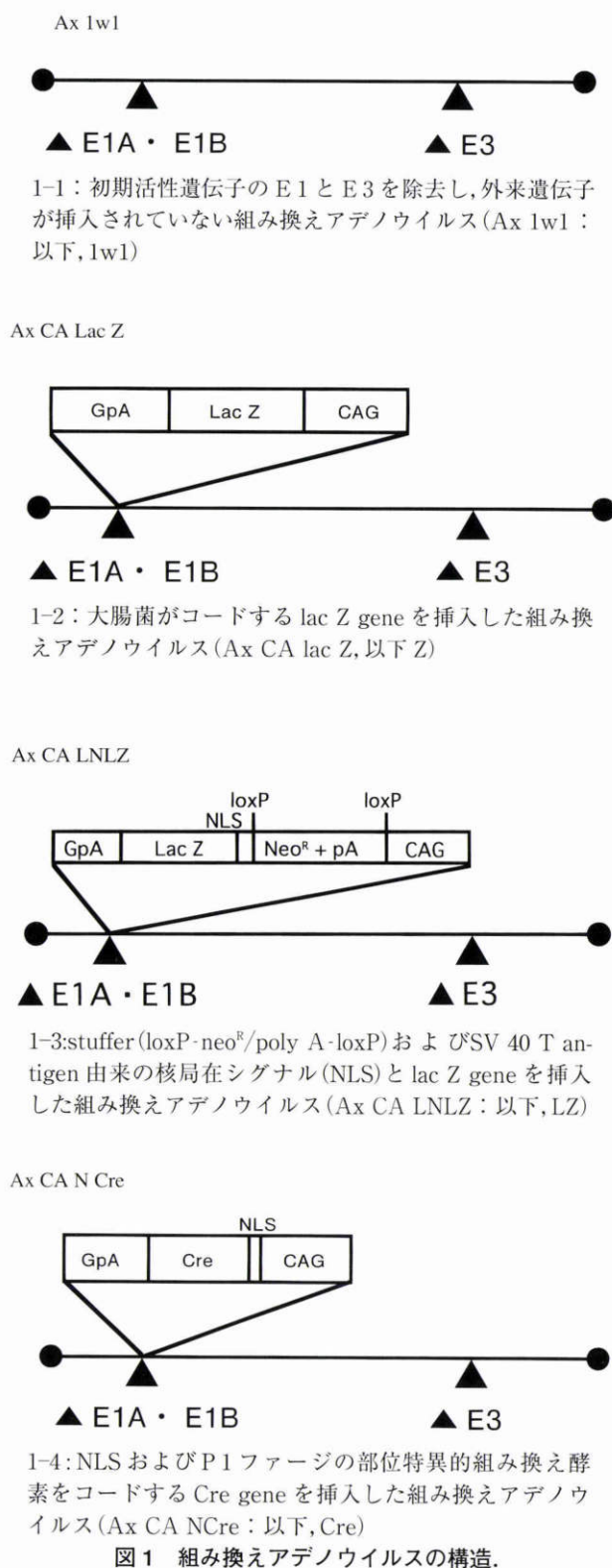
2) 大腸菌がコードする lac Z gene を挿入した組み換えアデノウイルス(Ax CA lac Z, 以下, Z, 図 1-2)

3) stuffer(loxP-neo^R/poly A-loxP)および SV 40 T antigen 由来の核局在シグナル(NLS)と lac Z gene を挿入した組み換えアデノウイルス(Ax CA LNLZ, 以下, LZ, 図 1-3)

4) NLS および P1 ファージの部位特異的組み換え酵素をコードする Cre gene を挿入した組み換えアデノウイルス(Ax CA NCre, 以下, Cre, 図 1-4)

これらの組み換えアデノウイルスに挿入されている外来遺伝子を活性化するプロモーターには、CAG(cytomegalovirus IE enhancer+chicken β-actin promoter+rabbit β-globin poly(A) signal)プロモーター⁷⁾を使用した。

今回は、lac Z gene の発現を指標として遺伝子発現制御の検討を行った。P1 ファージの Cre タンパクは loxP と称される配列を特異的に認識して組み換えを起こすので、LZ をトランスフェクションした細胞に Cre をさらにトランスフェクションさせることによって LZ の遺伝子組み換えが起こり、loxP の下流にある lac Z gene が発



現する。

5. 組み換えアデノウイルスの複製調整

前項 1 の継代 293 細胞を 225 cm² の組織培養フラスコ (ダブルシールキャップフラスコ, No. 3160—225, IWAKI) で培養した。培養液を捨てて 5% FBS 添加 DMEM を 5 ml 加え, 上記の各組み換えアデノウイルスを multiplicity of infection (moi) 30 でそれぞれの組織培

養フラスコにトランスフェクションさせた。ウイルス吸着を 37°C 下で 1 時間行った後, 35 ml の 5% FBS 添加 DMEM を加えて 3 日間培養した。3 日後に 293 細胞が浮遊した培養液を 50 ml PP 遠沈管 (Nunc 遠沈管, No. 373687, Nunc) に移し, 超音波細胞破壊装置 (Bioruptor UCD-200 T 型, コスモバイオ) (氷水中で 30 秒 4 回) で細胞を破壊した。続いてこれを遠心 (4°C, 3,000 rpm, 10 分) し, 複製した組み換えアデノウイルスを含む上清を 1 ml ずつ 1.8 ml のクライオチューブ (Nunc クライオチューブ, No. 368632, Nunc) に分注し, 下記 6~8 項で使用するまで -80°C で保管した。

今回用いた組み換えアデノウイルスには細胞毒性はあるものの, 実験は *in vitro* であるので, ウイルス調整時に発生する欠失ウイルスのタンパクなどが惹起する免疫反応を生じないため, また, 実験操作中の細菌などの混入やウイルス感染価の低下を考慮して, ウイルスの精製は行わなかった。

6. ウイルスタイターの確認⁸⁾

前項で作製したウイルス液のタイターを調べるために, 各々の組み換えアデノウイルスを 5% FBS 添加 DMEM を用いて 10⁻⁴ まで段階希釈した (10⁻¹: 0.9 ml DMEM+0.1 ml ウイルス液)。続いて, 96 穴マイクロウェルプレート (Nunc マイクロウェルプレート, No. 167008, Nunc) のすべてのウェルに 5% FBS 添加 DMEM を 50 μl 入れた。プレートの第 1 列目に 10⁻⁴ に希釈した一種の組み換えアデノウイルスを 25 μl ずつ加え, 8 ウェル用マルチチャンネルピペットを用いて, 1 列目の 25 μl を 2 列目のウェルに移した。以下, 同じ操作を 11 列目まで繰り返して段階希釈を行い, 最後の 25 μl は捨てた。前項 1 の 80 cm² 組織培養フラスコに PBS (-) を加えて 293 細胞をフラスコから剥がし, 5% FBS 添加 DMEM 溶液を加えて総量 9.6 ml の細胞浮遊液とし, この液を 50 μl ずつ上記の 96 穴のすべてのウェルに加えて培養した。3 日後と 7 日後に全ウェルに 50 μl の 5% FBS 添加 DMEM を加えてさらに培養し, 12 日後に 50% 細胞変性終末点 (TCID₅₀) からウイルス感染価を求めた。この操作を上記 4 種の組み換えアデノウイルスについてそれぞれ行った。

7. 組み換えアデノウイルスの切断パターンテスト: 組み換え部位の欠失・再構成の確認

前項 1 の 293 細胞を 24 穴マルチデッシュ (Nunc マルチデッシュ, No. 143982, Nunc) に培養し, 前項 5 の四種の組み換えアデノウイルスのそれぞれについて各々 3 ウェルずつ, 計 12 ウェル使用した。1 ウェル毎に組み換えアデノウイルス 10 μl および 5% FBS 添加 DMEM 90 μl を加えて 1 時間トランスフェクションさせた。その後, これに 5% FBS 添加 DMEM 0.3 ml を加え, 37°C, 5% CO₂ 下で培養を継続した。3 日後に 293 細胞が完全に死滅した後, 1 ウェル毎にその培養液を 1.0 ml のエッペン

ドルフのセイフロックチューブに集め、5,000 rpm, 5 分, 4°C で遠心して上清を捨てた。これに TEN (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) を 400 μ l, proteinase K (10 mg/ml) を 4 μ l および 10% SDS (sodium dodecylsulfate; ドデシル硫酸ナトリウム) を 5 μ l 加え、50°C, 90 分間反応させた。これにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 410 μ l を加えて攪拌後、15,000 rpm, 10 分間、室温で遠心した。遠心後その水層を別の 1.5 ml のエペンドルフのセイフロックチューブに分け、残ったフェノール層に TENS (TEN + 10% SDS) を 100 μ l 加えて再度遠心した。この水層と前の操作で取り分けていた水層とを合わせて (計 510 μ l) 再度フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 510 μ l を加えて攪拌した後、15,000 rpm, 10 分間、室温で遠心して水層を取り分けた。この操作を 2 回行い、その後クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を 1/2 量 (260 μ l) 加えて攪拌した後、15,000 rpm, 10 分間、室温で遠心した。続いて、1/10 量に当たる 50 μ l の 3 M NaOAc と 2.5 倍量の 1,250 μ l の 100% 冷エタノールを加えて攪拌し、-20°C で一晩静置した。翌日、15,000 rpm, 20 分間、4°C で遠心してエタノールを捨て、さらに、70% 冷エタノールを適量加えて 15,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心した。この操作を 2 回行い、その後エタノールを除去し、得られた DNA を 50 μ l の TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 20 μ g/ml RNase を含む) に溶解した。この DNA 溶液 15 μ l に制限酵素 Xho I (No. 1094 A TaKaRa MEDICALS) 1 μ l, H₂O 2 μ l, Xho I 用 10 倍濃度 buffer 2 μ l を加え、37°C, 1 時間反応させ、アガロース電気泳動 (20 mV, 18 時間) によって、四種の組み換えアデノウイルスの DNA 切断パターンを各々の初代ウイルス原液の DNA 切断パターンと比較した。

8. 角膜実質培養細胞での lac Z gene の発現制御

lac Z gene の発現を指標として、上記の四種の組み換えアデノウイルスを下記のごとく組み合わせて 4 Group とし、それぞれの組み換えアデノウイルスを前項 2 の継代 7 代目のウサギ角膜実質培養細胞 (2.5×10^6 個/25 cm² 組織培養フラスコ) に moi 20 で 1 時間トランスフェクションを行い、その後 37°C の恒温室で 8 日目まで培養した。

Group 1: 1w1+Cre

Group 2: Z+Cre

Group 3: LZ+Cre

Group 4: Cre

Group 1~3 では 1w1, Z あるいは LZ を実験初日 (1 日目) にトランスフェクションし、Cre は全 Group で 5 日目にトランスフェクションした。いずれの Group についても下記に述べる X-gal 染色を 8 日目まで連日行った。ただし、1 日目と 5 日目は、トランスフェクションの 4 週間後に行った。

別の角膜実質を初代とした継代数 7 の角膜実質培養細胞を使用して本項 8 の実験を計 3 回行った。

9. X-gal solution の調整および X-gal 染色

X-gal (ライフテック社) をジメチルホルムアミドで溶解し、攪拌しながら PBS (-) を加えて 1 mg/ml に調整し、5 mM の K₃[Fe(CN)₆]、5 mM の K₄[Fe(CN)₆] および 1 mM の MgCl₂ を加え (pH 8.4)、遮光、4°C で保存し、実験に使用した。

前項 8 の組織培養フラスコの培養液を捨て、PBS (-) で 2 回洗浄した後、2% ホルムアルデヒド + 0.2% グルタルアルデヒド/PBS (-) を加えて 2 時間、4°C で固定した。固定液を除いた後、PBS (-) で 4 回洗浄 (10 分毎、室温) し、X-gal solution を加えて 37°C で静置した。3 時間後に X-gal solution を捨て、PBS (-) で 2 回洗浄し、再び 2% ホルムアルデヒド + 0.2% グルタルアルデヒド/PBS (-) を加え、光学顕微鏡で観察した。細胞が青染することで lac Z gene の発現を確認し、写真撮影した。

III 結 果

1. 角膜実質培養細胞数

25 cm² の組織培養フラスコの 3 本について角膜実質培養細胞数を計測したところ、平均 2.5×10^6 個/本であった。

2. ウイルス感染価の確認と調整

4 種の組み換えアデノウイルスの感染価は、 $1.8 \sim 4.2 \times 10^8$ plaque forming unit (pfu)/ml の範囲にあった。この結果に基づき、前項 8 の角膜実質培養細胞へのトランスフェクションに際しては、DMEM を加えて 1.0×10^8 pfu/ml に調整して使用した。

3. 組み換えアデノウイルスの切断パターンテスト：組み換え部位・再構成出現の有無の確認

制限酵素 Xho I で切断した四種の組み換えアデノウイルスの DNA 切断パターンを初代原液のパターンと比較した。その結果、切断パターンは初代原液と同様であり、予測した大きさのバンドが検出され、組み換え部位の欠失による不完全なアデノウイルスの大量発生や再構成による野生型アデノウイルスが発生していないことを確認した。

4. X-gal 染色

Group 1 および 4 は観察期間中に、X-gal 染色で染まる細胞はなかった。

Group 2 では、1 日目 (4 時間後) は lac Z gene の発現がなかったが、2 日目に全体の 90% の細胞において細胞全体が青色に染色された (図 2) ことから、lac Z gene の発現が確認された。3 日目以降は 100% の細胞が染色された。特に 4 日目から染色の濃度が増し、5 日目 (図 3) が最も強く、6 日目以降は染色の濃度は若干低下し始めたが、8 日目まで強い発現が継続した。

Group 3 では、Cre をトランスフェクションする前の 4



図2 Group 2(Z)2日目.

角膜実質培養細胞は,90%の細胞で青く染色されている.

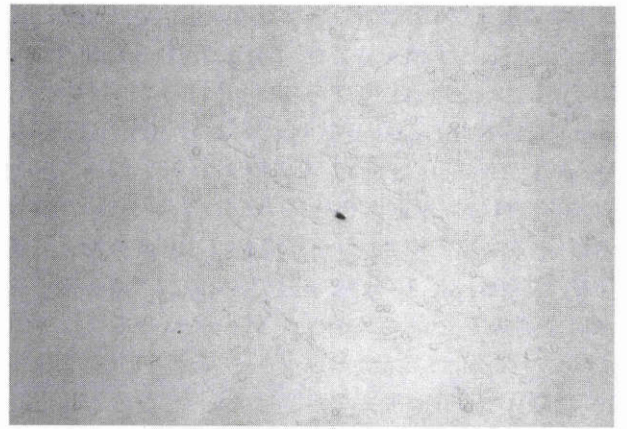


図5 Group 3(LZ+Cre)5日目.

図4と同様に全体の0.8%のみの細胞核が,淡く染色されている.

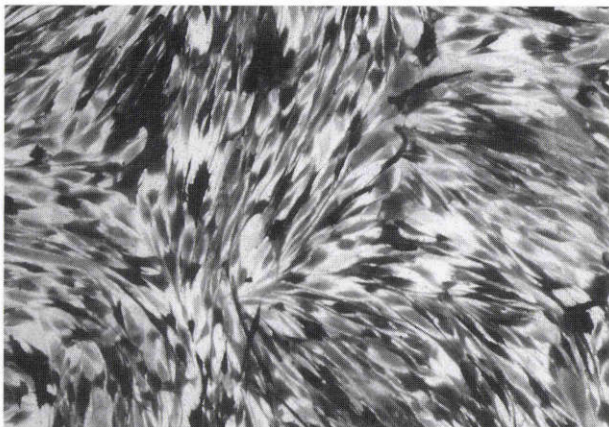


図3 Group 2(Z+Cre)5日目.

角膜実質培養細胞は,100%の細胞で青く染色されている.この時期の染色が最も強い.

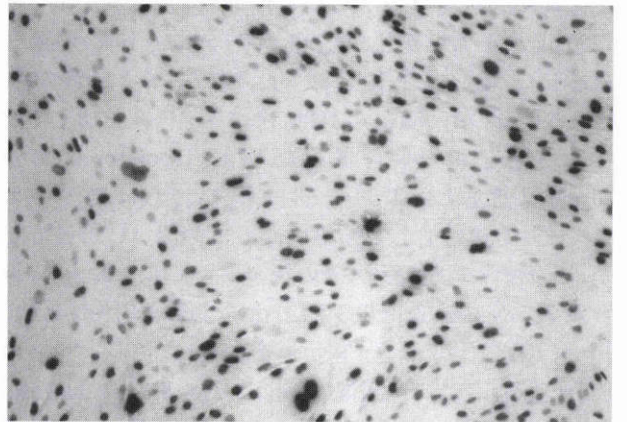


図6 Group 3(LZ+Cre)6日目.

100%の細胞の核が青く染色されている.

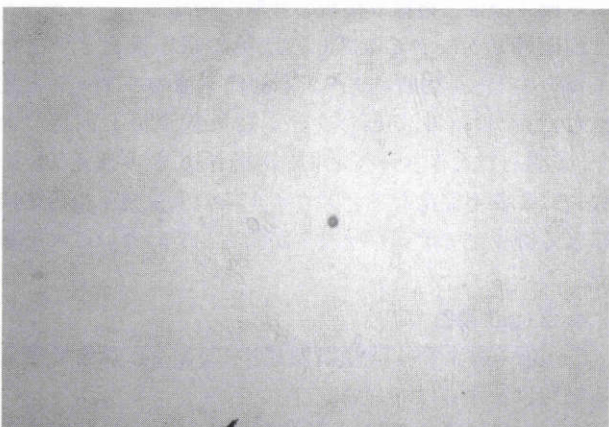


図4 Group 3(LZ)4日目.

全体の0.8%のみの細胞核が,淡く染色されている.

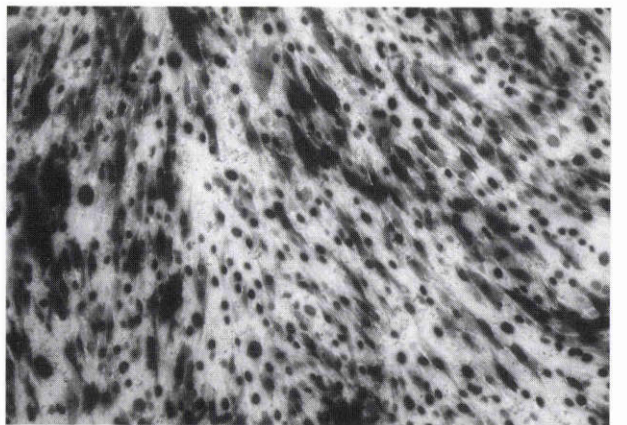


図7 Group 3(LZ+Cre)8日目.

さらに細胞核が濃染し,細胞質まで染色されている.

日目(図4)およびトランスフェクション後の5日目(図5)までは0.8%の細胞のみで,その核が淡く染色されたが,6日目(図6)には100%の細胞の核が染色された.8日目(図7)は7日目よりも核がさらに濃染した.また,LZ

にはNLSが存在しているため,本来lac Z geneの発現は核内に局限されるべきであるが,およそ20%の細胞ではlac Z geneの発現が強すぎるためか細胞質までも濃染していた.

以上の結果は、他に二度行った実験においても同じであった。

IV 考 按

近年、日本でも様々な領域で新たな治療法の確立のために、遺伝子治療についての研究がなされている。現時点で理想的な方法は確立されていないが、年々多くの研究が報告され、進歩がみられている。理想的な遺伝子治療とは、前述したように導入が簡便であり、その発現が目的とする臓器もしくは細胞に限定するものであると思われる。特に先天性疾患の治療の場合には、染色体上の異常な遺伝子領域を正常な遺伝子で置き換えることが可能な方法であり、急性疾患においては、目的とする酵素あるいはタンパクは発現のコントロールが可能であって、発現終了時には遺伝子そのそのものも消失させ得る方法といえる。臨床応用を考える上で、目的とする遺伝子の発現コントロールは、重要な課題の一つである。

眼科領域で、遺伝子発現のコントロールについての報告としては、組み換えアデノウイルスと tetracycline-regulated gene expression system^{9)~12)}を用いた誘導型発現ベクターについて、角膜内皮培養細胞を対象とした報告(宮田ら、第 101, 102 回日本眼科学会総会)がある。誘導型プロモーターを用いる方法には他に lactose(Lac) system があるが、眼科領域ではまだ検討されていない。誘導型プロモーターを用いる方法では、目的遺伝子を含むユニット、そのユニットを活性化するためのプロモーター活性化因子、およびその活性化抑制物質の 3 つの要素が必要であり、さらに、目的とする遺伝子の発現を抑制するために、理論的には常に活性化抑制物質が必要となる。*In vivo* での応用を考えた場合、活性化抑制物質を必要とする点や、遺伝子発現終了の際に外来遺伝子そのものが消失することが望ましい点から、今回我々は部位特異的組み換え酵素 Cre recombinase を用いた。また、継代培養が比較的容易で安定している角膜実質細胞を選択し、その遺伝子発現コントロールについて検討した。角膜実質細胞は、継代数が増えるとトランスフォームする細胞が多くなると思われるため、初代細胞と比べて 7 代目の細胞の発現効率に差が生じることは否めない。しかし、今回の目的は Cre/loxP system での発現制御が可能かを確認することにあるので、継代数の差による違いを念頭に入れた上で 7 代目の角膜実質培養細胞を使用した。

これまでトランスジェニックマウスの作製^{13)~19)}に使用されていた部位特異的組み換え酵素としては、バクテリオファージ P1 の Cre タンパクや酵母 (*S. cerevisiae*) の FLP タンパクがあり、これらはそれぞれ loxP や FRT の特異的な塩基配列を認識して組み換え反応を起こす。今回、我々はバクテリオファージ P1 の Cre/loxP system を応用して作製された組み換えアデノウイルス⁵¹⁶⁾を使用した。

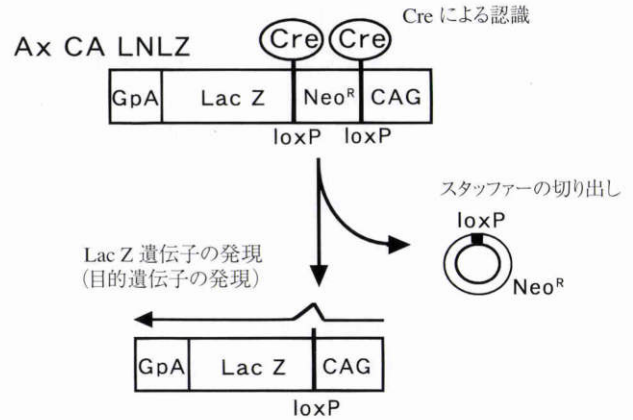


図 8 組み換えアデノウイルスの再構築。

Cre タンパクは loxP と呼ばれる 34 塩基対からなる配列を特異的に認識して結合する。その後二つの loxP 配列で組み換えが起こり、一つの loxP 配列を残す形で反応が終了する。その際、二つの loxP 配列にはさまれた塩基配列部分が環状 DNA 分子として切り出される。

組み換え酵素 Cre recombinase については Sternberg ら²⁰⁾によって報告されている。分子量 38.5 kD の 343 アミノ酸から成る部位特異的酵素である Cre タンパクは、loxP と呼ばれる 13 塩基対から成る 2 つの逆方向反復配列 (inverted repeat) と、それらに囲まれた 8 塩基対 (spacer) の 34 塩基対から成る配列を特異的に認識して組み換え反応を起こす(図 8)。Cre タンパクは、DNA 上の loxP 配列内の逆方向反復配列の一つに 1 分子が結合する形を取り、DNA 上に存在する二つの loxP 配列が対合するようになる。こうして対合した二つの loxP 配列に含まれている spacer 部分で組み換えが起こり、一つの loxP 配列を残す形で反応が終了する。この際、二つの loxP 配列に挟まれた塩基配列 (Neo R) は環状 DNA 分子として切り出される。このような変化が細胞内で起こり、loxP 配列の下流にある lac Z gene が翻訳された。これによって β-ガラクトシダーゼが生成され、6 日目以後の角膜実質培養細胞が X-gal 染色で青く核染色された。今回使用した Cre/loxP system を応用することによって、遺伝子発現の on/off を意図的にコントロールすることが可能であることが示された。しかし、現時点では *in vitro* の結果であり、*in vivo* で検討した場合には、予期せぬ問題が生じる可能性もある。

眼科領域での遺伝子治療を行う場合に、対象の多くは生命予後に直接関係する疾患ではないため、倫理上、治療効果よりも患者の安全性が優先される。Cre/loxP system における on/off 制御は、遺伝子操作によって on 系あるいは off 系のための制御も可能と考えられる。導入した外来遺伝子の生体へ与える予期しない影響からの緊急回避に、この off 系を用いることで、導入遺伝子そのものを細胞から消失させることができ、患者の安全性が向上するものと考えられる。ただしその際に、Cre タンパクが

与える眼球への影響は少ないものでなければならない。現時点で、遺伝子治療は完璧なものではなく、臨床応用に向けてベクター開発、組織へのアプローチの方法などのさらなる多くの検討が必要である。今回、我々が眼科領域において初めて報告した部位特異的組み換え酵素 Cre recombinase は、遺伝子の発現をコントロールすることが可能であり、今後の眼科領域の遺伝子治療研究の発展に有用であると考えられる。

本稿を終えるに当たり、研究の機会を与えて頂き、御指導、御校閲頂いた岩手医科大学細菌学教室 佐藤成大教授、ならびに眼科学教室 田澤 豊教授に深謝いたします。また、組み換えアデノウイルスの供与について東京大学医科学研究所遺伝子解析施設 齊藤 泉先生、鐘ヶ江裕美先生に、CAG プロモーターの使用について大阪大学栄養学教室 宮崎純一先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Sullivan DM, Chung DC, Anglade E, Nussenblatt RB, Csaky KG: Adenovirus-mediated gene transfer of ornithine aminotransferase in cultured human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 766—774, 1996.
- 2) Bennett J, Tanabe T, Sun D, Zeng Y, Kjeldbye H, Gouras P, et al: Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by *in vivo* gene therapy. *Nature Med* 2: 649—654, 1996.
- 3) Sakamoto T, Kimura H, Scuric Z, Spee C, Gordon EM, Hinton DR, et al: Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy by retroviral vector-mediated transfer of suicide gene. *Ophthalmology* 102: 1417—1424, 1995.
- 4) Kimura H, Sakamoto T, Cardillo JA, Spee C, Hinton DR, Gordon EM, et al: Retrovirus-mediated suicide gene transduction in the vitreous cavity of the eye: Feasibility in prevention of proliferative vitreoretinopathy. *Hum Gene Ther* 7: 799—808, 1996.
- 5) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, et al: Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 23: 3816—3821, 1995.
- 6) Kanegae Y, Takamori K, Sato Y, Lee G, Nakai M, Saito I: Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene* 181: 207—212, 1996.
- 7) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193—200, 1991.
- 8) Kanegae Y, Makimura M, Saito I: A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* 47: 157—166, 1994.
- 9) Yoshida Y, Hamada H: Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 426—430, 1997.
- 10) Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5547—5551, 1992.
- 11) Rose SD, MacDonald RJ: Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer. *J Biol Chem* 272: 4735—4739, 1997.
- 12) Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, et al: Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 93: 10933—10938, 1996.
- 13) Gu H, Zou YR, Rajewsky K: Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155—1164, 1993.
- 14) Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K: Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103—106, 1994.
- 15) Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K: Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427—1429, 1995.
- 16) Baubonis W, Sauer B: Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 21: 2025—2029, 1993.
- 17) Sakai K, Miyazaki J: A transgenic mouse line that retains cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 318—324, 1997.
- 18) Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW: Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J* 7: 649—659, 1995.
- 19) Wang P, Anton M, Graham FL, Bacchetti S: High frequency recombination between loxP sites in human chromosomes mediated by an adenovirus vector expressing Cre recombinase. *Somat Cell Mol Genet* 21: 429—441, 1995.
- 20) Sternberg N, Hamilton D: Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150: 467—486, 1981.