

平成10年度厚生科学研究費補助金研究報告書

研究事業名：ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

研究課題名：サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

平成11年 4月

研究者 中村 伸
(京都大学霊長類研究所)

厚生科学研究費補助金

(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

総括研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

主任研究者：中村 伸 (京都大学霊長類
研究所助手)

研究要旨

本研究ではサル類の医生物学的特質に着目し、ベクターの安全性と有効性を検討するための、サルモデルでの有用な評価・実験系を開発する。

まず、本研究を展開するためのサルモデルを特定した。次いで、マカクサルモデルを用い、ポリソーム性ベクターによるトレーサー遺伝子 (GFP plasmid) の体内導入とその発現性について評価・検討法を確立した。更に、安全性評価に関しては、血中 TNF, CRP, TF などの動態を調べる、分子病態学的検査法を明らかにした。

分担研究者：清水慶子 (京都大学霊長類研究所助手)、今村隆寿 (熊本大学医学部助教授)、恵美宣彦 (名古屋大学医学部助手)、阿部明弘 (名古屋大学医学部医員)

A. 研究目的

遺伝子治療において目的遺伝子の担体となるベクターの開発は不可欠である。同時に、ベクターの安全性と有効性を検

証するための評価実験系の確立も必須である。しかしながら国内ではベクターの安全性と有効性を十分に評価・検討するための実験系の確立が遅れている。

サル類は進化的位置から免疫系、感染感受性ならびに代謝系など医生物学的特性はヒトに類似し、ヒトの疾病とその治療に関わる biomedical な研究において他の実験動物にない希有な実験モデルである。ことに、薬剤の安全性や有効性を評価する上でサルモデルでの実験は不可欠である。

本研究ではこうしたサル類の医生物学的特質に着目し、これまでの霊長類研究、臨床医学研究ならびに遺伝子免疫治療研究の実績を基に、ベクターの安全性と有効性を検討するための、サルモデルでの有用な実験系を開発する。こうした研究成果を基に、遺伝子治療用ベクターの安全性、有効性の評価・検査のための実験系を確立し、より安全で効率的な遺伝子治療の発展を目指す。

B. 研究方法

これまでに得られている血液性状、種々代謝系、感染感受性、免疫応答など医生物学的特質に関する知見、繁殖性、ライフスパンならびに侵襲、非侵襲性実験の可否などを検討して、新世界ザル、旧世界ザルおよび類人猿の中からそれぞれ複数の代表種を特定し、今後の研究実施のためのサルモデルとして用いる。

既に開発している非ウイルス性のリポソームベクターに GFP 遺伝子を挿入し、それをサル (主にマカクザル) に投与し、GFP 遺伝子の体内動態、GFP タンパク質の

発現性を調べる。同時に、安全性検討項目として、血液細胞の増減、血中タンパク質の変動、サイトカインや炎症メディエーター (TNF, CRP) の産生、血管障害マーカーの tissue factor (TF) の動態を検討する。また、投与ベクターに対する抗体産生とそれに伴うアレルギー反応の有無も調べる。これらの研究結果を比較検討しながら、ベクターの安全性試験に好適なサルモデルとその検査・試験対象などの実験系について明らかにする。

C. 研究結果

本研究に用いるサルモデルとして、感染感受性、免疫応答など医生物学的特性、実験・飼育条件などを検討し、類人猿からはチンパンジー、旧世界ザルからニホンザルおよびカニクザル、新世界ザルからはコモンマーモセットを特定した。また、それらサルを用いたベクター実験を長期に安定して進めるための様々な環境条件も整備した。TF, TNF, CRP など血管障害マーカーや炎症メディエーターに関する関連研究を展開し、ベクターの安全性試験法を検討した。さらに、リポソーム性ベクターなど数種の非ウイルス性ベクターを作製した。その一部についてトレーサー遺伝子 (GFP) を組込んだ VSVG/lipid/GFP plasmid を調製し、カニクザルでの投与実験を行い、以下の結果を得た。

今回用いたリポソーム性ベクター (VSVG/lipid) でのトレーサー遺伝子 (GFP plasmid) の体内導入は予想以上に効率的で、投与部位 (皮下) の樹状細胞、マクロファージ、血管や毛根周辺細胞、

および繊維芽細胞で GFP タンパク質が投与 1 日めから見られ、9 日後でも GFP タンパク質が認められた。一方、GFP-DNA の血中拡散は投与 1~3 日目まで見られるがそれ以降は PCR 法でも検出されなかった。

安全性に関しては臨床生化学的検査を実施した。ベクター投与サルの白血球 (リンパ球、好中球)、血小板、赤血球の変動は見られなかった。また、初期炎症反応マーカーの TNF は血中に全く検出されなかった。一方、他の炎症マーカーの CRP は一部の投与サルで軽い血中濃度の上昇が見られたが、採尿カテーテル挿入による物理的な炎症などの可能性が強い。

以上、サルモデルでの有効性および安全性に関する有用な成果を得た。

加えて、研究会「遺伝子治療を含む新規治療法の開発のために」の開催、海外研究者 (Dr.Miyanochara, USA) 招聘、および国外研究室 (Dr.Brown, UK) 訪問など、関連の研究交流や共同研究を促進し、本研究事業の推進を図った。

D. 考察

サルモデルを遺伝子治療研究に活用する際、その遺伝的特性、汎用性、繁殖性などの実験動物学的特性が重要で、本研究ではこうした視点で、前述の 3 種を特定した。同時に、霊長類を用いての遺伝子組換え体投与実験におけるバイオハザード上の設備や環境も整えた。

これまでの LPS 実験での経験を活かし、ベクターの安全性評価・試験法として、白血球、血小板、赤血球の変動、即時性炎症反応マーカーの TNF および遅延性炎

症マーカーの CRP の血中濃度などを臨床生化学的に解析する安全性の評価・試験法を開発した。ついで、カニクイザルモデルでのベクター実験で、この臨床生化学的手法によるベクターの安全性評価・試験法の有用性を実証した。

次年度は生体内導入された母子（垂直以降）など内分泌・生殖系への影響評価、ならびに脳神経系の傷害など、より高次の安全性の評価・試験法の確立もはかる。

E. 結論

ベクターの安全性試験に好適なサルモデルの選定を進め、チンパンジー（類似年、）マカクザル（旧世界サル）、コモンマモセット（新世界ザル）を特定し、これらを用いて研究展開するための環境条件を整備した。TF, TNF, CRP など安全性マーカーに関する関連研究を進め、サルでの測定・分析を準備した。ポソーム性ベクター（VSV/lipid）に挿入されたトレーサー遺伝子（GFP plasmid）の体内導入とその発現性に関して、免疫組織染色法での評価・検討法を確立した。一方、安全性指標の炎症応答に関しては TNF, CRP, TF などの血中動態を調べる、分子病態学的評価・実験法を明らかにした。

F. 研究発表

M. Yasue, S. Nakamura, T. Yokota, H. Okudaira, Y. Okumura: Experimental Monkey Model Sensitized with Mite Antigen, Int. Arch Allergy Immunol., 115:303-311, 1998.

Y. Matsumoto, Y. Kawai, K. Watanabe, K. Sakai, M. Murata, M. Handa, S.

Nakamura, Y. Ikeda : Fluid Shear Stress Attenuates Tumor Necrosis Factor - Induced Tissue Factor Expression in Cultured Human Endothelial Cells, Blood, 91 : 4164-4172, 1998 .

H. Wada, Y. Mori, M. Shimura, K. Hiyoyama, M. Loka, T. Nakasaki, M. Nishikawa, M. Nakano, K. Kumeda, T. Kaneko, S. Nakamura, H. Shiku : Poor Outcome in Disseminated Intravascular Coagulation or Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Patients with Sever Vascular Endothelial Cell Injuries, Amer. J. Hematol., 58:189-194, 1998.

H. kagawa, Y. komiyama , S. Nakamura, T. Miyake, Y. Miyazaki, K. Hamamoto, M. Masuda, H. Takahashi, S. Nomura, S. Fukuhara: Expression of Functional Tissue Factor on Small Vesicles of Lipopolysaccharide-stimulated Human Vascular Endothelial Cells, Thromb. Res., 91: 297-304, 1998.

T. Todoroki, A. Higure, K. Okamoto, K. Okazaki, K. Hirata, Y. Nagafuchi, S. Takeda, H. Itoh, K. Osato, S. Nakamura : Possible Role of Platelet Activating Factor in the in vivo Expression of Tissue Factor in Neutrophils, J. Surg. Res., 80: 149-155, 1998.

中村 伸、轟木秀一：組織因子（CD142）の構造と機能—最近の展開、医学のあゆみ、別冊・「血液疾患、Ver.2」:187-190, 1998 .

中村 伸：組織因子と VIIa 因子の活性

- 発現、臨床医、24 : 1062-1064 (1998) .
- 中村 伸 : サルモデルでの新たなエンドトキシン応答—好中球での組織因子 (Tissue Factor) の発現と凝固反応亢進、エンドトキシン研究-1、pp.41-47, 1998
- Sankai, T., Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Shimizu, K., Cho, F., and Yoshikawa, Y.: Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins. 日本受精着床学会雑誌, 15:177-179, 1998.
- 清水慶子: 生殖内分泌系の老化モデル 霊長類研究, 14:115-119, 1998.
- Soltis, J., Mitsunaga, F., Shimizu, K., Yanagihara, Y. and Nozaki, M.: Female Mating Strategy in an enclosed group of Japanese Macaques. American Journal of Primatology 47:263-278, 1999.
- A. Kozik, R.B. Moore, J. Potempa, T. Imamura, M. Rapala-Kozik & J. Travis : A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites: Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. J. Biol. Chem. 273: 33224-33229, 1998.
- Y. Kitamoto, T. Imamura, H. Fukui & K. Tomita : Role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis, Kidney Int. 54: 1767-1768, 1998.
- T. Mori, & T. Imamura: Inhibition of guinea pig skin allergic reactions by nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657. Int. Arch. Allergy Immunol. 116: 278-283, 1998.
- Toshihide Itou, Koichi Miyamura, Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Mitsune Tanimoto et al: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into human leukemia cell lines. International Journal of Hematology 67, 27-35, 1998.
- Kazuyoshi Imaizumi, Yoshinori Hasegawa, Nobuhiko Emi, et al: Bystander Tumoricidal Effect and Gap Junctional Communication in Lung Cancer Cell Lines. Am. J. Respir. Cell Mol Biol. Vol 18, 205-212, 1998.
- Akio Kouno, Nobuhiko Emi, Masamobu Kasai, Mitune Tanimoto and Hidehiko Saito†: Semliki Forest Virus based DNA expression vector : Transient protein production followed by necrosis. Gene Therapy Vol 5, 415-418, 1998.
- S. Hayashi, N. Emi, H. Okada, T. Nagasaka, I. Yokoyama and H. Takagi: Establishment of complement-resistant retroviral vector by homologous restriction factor 20 gene. Gene Therapy Vol 5, 282-285, 1998
- 吉川祐子、恵美宣彦、吉川研一 : DNAの高次構造制御と遺伝子導入、化学、53 : 70-71、1998
- 岩瀬 明、恵美宣彦 : レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療、Oncology & Chemotherapy, 13: 284-289, 1998.

Toshihide Itou, Koichi Miyamura, Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Mitsune Tanimoto and Hidehiko Saito: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into human leukemia cell lines. *International Journal of Hematology* 67,27-35,1998.

Akihiro Abe, Atsushi Miyanojara , and Theodore Friedmann: Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Therapy* 5: 708-711, 1998.

Akihiro Abe , Atsushi Miyanojara, and Theodore Friedmann: Enhanced Gene Transfer with Fusogenic Liposomes Containing Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. *JOURNAL OF VIROLOGY* 72(7): 6159-6163, 1998.

Akihiro Abe, Shin-Tai Chen, Atsushi Miyanojara, and Theodore Friedmann: In Vitro Cell-Free Conversion of Noninfectious Moloney Retrovirus Particles to an Infectious Form by the Addition of the Vesicular Stomatitis Virus Surrogate Envelope G Protein *JOURNAL OF VIROLOGY* 72(8): 6356-6361, 1998.

安部明弘, 恵美宣彦 : 遺伝子免疫療法～DNA vaccination for clinical application～*日常診療と血液* 8(6): 85-88, 1998.

厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

分担研究者：清水慶子（京都大学霊長類
研究所助手）

研究要旨

ベクターの安全性、有効性試験に好適なサルモデルを、医生物学および実験動物学的特徴を基に特定した。サルモデル系でのベクターの安全性の評価・試験法として、血液細胞、TF（血管障害マーカー）、TNFやCRP（炎症応答指標）などの臨床生化学的動態解析が有用であることを、カニクザルモデルで明らかにした。

A. 研究目的

本研究では非ヒト霊長類（サル類）の医生物学的特質に着目し、これまでの霊長類に関する臨床獣医学的研究の実績を基に、遺伝子の生体内導入担体（以下ベクター）の安全性と有効性を評価・試験するための、サルモデルでの有用な実験系を獣医学的視点で検討する。

B. 研究方法

サル類の内分泌系、生体防御系ならびに外来異物代謝系、感染感受性、免疫応答、繁殖性、ライフスパンなど医生物学

的特質、ならびに侵襲、非侵襲性実験の可否などを検討して本研究に適したサルモデルを特定する。

更に、サルモデルを用いてのベクター投与実験を展開し、血液性状、炎症反応、免疫応答などを対象にした臨床生化学的検査を進め、主に安全性の評価・試験法を検討する。

C. 研究結果

類人猿、旧世界ザル、新世界の代表種について、それらの生体反応系など医生物学的特性、実験・飼育条件など実験動物学的適性を検討し、チンパンジー、ニホンザルおよびカニクザル、コモンマーモセットを、本研究のサルモデルとして特定した。また、こうしたサル類は利用と保護の相互バランスが微妙で、本研究課題を進めるためにそうした周辺条件を調整した。さらに、サル類を用いたベクター研究を長期展開するためのバイオハザード実験条件も整備した。

更に、サルモデルでのベクター実験における安全性の評価・試験法として、リンパ球、好中球、血小板、赤血球など血球変動、血管障害指標のTFや炎症反応指標のTNFおよびCRPの血中動態が適当であることを明らかにした。ついで、カニクザルモデルを用いたリポゾーム性ベクター（VSVG/lipid）投与実験における上述マーカーの経時変化を精査し、リポゾーム性ベクター投与では血球変動、TF、TNF、CRPの血中動態も見られなかった。

また、サルモデルにおける内分泌系や繁殖生理についての関連研究を進め、安全性評価法としての条件化を検討した。

D. 考察

遺伝子治療研究のサルモデルとしては、遺伝的特性のヒトとの類似性、種々の実験への汎用性の高さ、および世代間影響解析に好適な繁殖性などの、実験動物学的特性が必要である。本研究ではこうした視点で、チンパンジー（類人猿）、ニホンザル・カニクザル（旧世界ザル）、コモンマーモセット（新世界ザル）を特定した。同時に、それらでの実験・研究を進める上での動物福祉などにも留意した。また、霊長類を用いての遺伝子組換え体投与実験におけるバイオハザード上の設備や環境も整えた。

サルモデルでのベクターの安全性評価・試験法として、これまでのLPS実験での経験を活かし、白血球、血小板、赤血球の変動、即時性炎症反応マーカーのTNFおよび遅延性炎症マーカーのCRPの血中濃度などを臨床生化学的に解析する安全性の評価・試験法を開発した。ついで、カニクザルモデルでのベクター実験で、この臨床生化学的手法によるベクターの安全性評価・試験法の有用性を実証した。

また、サルモデルでのベクターの安全性評価として内分泌系や繁殖生理への影響解析も検討した。

E. 結論

ベクターの安全性試験に好適なサルモデルの選定を進め、チンパンジー（類似年、）マカクザル（旧世界サル）、コモンマーモセット（新世界ザル）を特定し、これらを用いて研究展開するための環境条件を整備した。血液細胞、血管障害マ

ーカーのTF,炎症応答指標のTNF, CRPに関する臨床生化学的検査法を確立し、サルモデル系でのベクターの安全性の評価・試験法として確立した。

F. 研究発表

Sankai,T., Ogonuki,N., Tsuchiya,H., Shimizu,K.,Cho,F., and Yoshikawa,Y.: Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins. 日本受精着床学会雑誌,15:177-179,1998.

清水慶子:生殖内分泌系の老化モデル
霊長類研究, 14:115-119, 1998.

Soltis,J., Mitsunaga,F.,Shimizu,K., Yanagihara,Y. and Nozaki,M.:Female Mating Strategy in an enclosed group of Japanese Macaques. American Journal of Primatology 47:263-278, 1999.

厚生科学研究費補助金

(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

分担研究者：今村隆寿（熊本大学医学部
助教授）

研究要旨

VSVG/lipid/GFP plasmid をサルモデルに投与し、安全性試験として組織損傷、炎症反応ならびに細胞壊死を組織化学的に検討した。また、有効性評価として遺伝子導入タンパク質の発現性について免疫組織化学的に調べた。サルモデル系での上記の安全性試験ならびに有効性評価を通じて、今回用いたベクターは安全性ならびに有効性も高いことが示された。

A. 研究目的

本研究ではこれまでの霊長類の炎症反応や免疫応答に関する研究実績を活かし、サルモデルでの遺伝子導入担体（以下ベクター）の安全性と有効性の分子病理学的評価・試験法を検討する。

B. 研究方法

今回はリポソーム性ベクター（VSVG/lipid）にトレーサー遺伝子 GFP plasmid）を組込んだ VSVG/

lipid/GFP plasmid をカニクザルに皮下投与し、その安全性については細胞・組織傷害性をヘマトキシリン-エオジン染色で検討した。一方、有効性に関しては GFP タンパク質の発現性を、抗 GFP 単クローン抗体を使った APAAP 法での免疫染色で解析した。

C. 研究結果

試料採取時の出血などで鮮明な染色像が得られなかったが、投与部位周辺での顕著な組織損傷、炎症反応ならびに細胞壊死は認められなかった。

一方、トレーサータンパク質・GFP を発現する細胞として皮内および皮下の dendritic-shaped cells が認められた。真皮のマクロファージも GFP を発現しており、5日目では肉芽を形成していた。更に、投与部位周辺の微小血管内皮、毛根周囲細胞、線維芽細胞も免疫染色陽性で GFP を発現していることが示された。なお、これらの細胞では GFP 遺伝子投与後 1 日目からそのタンパク質発現が見られ、9 日後でもその発現性が維持されていた。

また、関連の炎症反応に関する分子病理学的研究も展開した。

D. 考察

今回はカニクザル皮内に投与したベクターとキャリアー遺伝子複合体（VSVG/lipid/GFP plasmid）の安全性と有効性を主に光学顕微鏡での組織化学的解析で検討した。次年度ではより詳細な検討目的で、共焦点レーザー顕微鏡での解析を試みる。更に、投与部位周辺細胞における

キニンや関連炎症因子の産生など分子病理学的視点での検討を進める。また、in situ hybridizationによる導入遺伝子の発現も調べる必要がある。こうした研究成果を基に、より精度の高いサルモデルでの安全性、有効性に関する病理学的評価・試験法の確立を目指す。

T. Mori, & T. Imamura: Inhibition of guinea pig skin allergic reactions by nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116: 278-283, 1998.

E. 結論

リポソーム性ベクター (VSVG/lipid) にトレーサー遺伝子 GFP plasmid) を組込んだ VSVG/lipid/GFP plasmid をカニクザルに皮下投与し、安全性 (組織損傷、炎症反応ならびに細胞壊死) および有効性 (遺伝子導入タンパク質の発現性) について、主に組織化学的に解析した。

次年度では、共焦点レーザー顕微鏡や in situ hybridization 法を導入した、より精度の高い安全性、有効性の評価・試験法の確立を図る。

F. 研究発表

A. Kozik, R.B. Moore, J. Potempa, T. Imamura, M. Rapala-Kozik & J. Travis : A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites: Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens, *J. Biol. Chem.* 273: 33224-33229, 1998.

Y. Kitamoto, T. Imamura, H. Fukui & K. Tomita : Role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis, *Kidney Int.* 54: 1767-1768, 1998.

厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

分担研究者：恵美宣彦（名古屋大学医学
部助手）

研究要旨

遺伝子免疫療あるいは遺伝子ワクチンの臨床的展開を目指して、発現ベクター（P1HTR/LVHRNL、SFV 発現ベクター）を構築し、ラットを用いての副作用（発熱）や有効性（抗体産生、CTL）を調べた。この研究結果を基に、サルモデル系でのベクターの安全性、有効性の評価・試験法の確立を進めている。

A. 研究目的

遺伝子導入法を用いた免疫強化療法（遺伝子免疫療法）を確立する目的で、抗原遺伝子を効率的に発現するベクター（ウイルスベクター、非ウイルスベクター）の安全性、有効性に関する基礎研究を進め、それらをサルモデル系で検証する。

B. 研究方法

白血病での腫瘍免疫誘導の基礎的実験には、対象遺伝子のVH領域を組み込んだpLVHRNLを作製した。このpLVHRNL、20mgを1週間ごと3回、マウスに皮下投

与した後、マウス血清中に産生される抗VH抗体をウエスタンブロット法により調べた。

また、新しいワクチンベクターとしてSemliki Forest virus (SFV) ベクターの構築も試みた。

C. 研究結果

pLVHRNLのin vivo injectionで、マウス血中に抗VH抗体を誘導できることを確認した。また、3回免疫した後のspleen cellをもちいてCTL assayを行いkillingを検出できた。ターゲット細胞は、同系の腫瘍であるP1HTRにpLVHRNLを用いてVH遺伝子を導入したP1HTR/LVHRNLを用いた。

SFV 発現ベクターとして、SFV - cDNAをCMVプロモーターの下流に置き、構造蛋白遺伝子を欠失させ、任意の遺伝子を挿入できるように改変したプラスミドを作製し、高レベルのタンパク質発現が可能であることが確認された。

D. 考察

今回作製したplasmidはいずれも導入抗原遺伝子に対する免疫誘導・抗体産生を示し、サルモデル系での有効性の評価・試験が待たれる。

一方、これら遺伝子薬剤の副作用など安全性の検査・試験に関しては、一般薬剤の副作用要因（不純物混在、細菌やその誘導体の混入など）による発熱性、抗体産生に加え、サルモデル系でのより特異的な安全性試験が望まれる。

E. 結論

今回、遺伝子免疫療法での利用を目指したベクター（pLVHRNL, SFV-plasmid）を作製し、それらの有効性（免疫誘導・抗体産生）や副作用（発熱性、抗体産生）等を主にラットで検討した。しかしながら、遺伝子免疫療法薬剤に関してはラットでは不十分で、よりヒトに近いサルモデル実験系での特異的な有効性、安全性の評価・試験が不可欠であることが強調される。

F. 研究発表

Toshihide Itou, Koichi Miyamura, Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Mitsune Tanimoto et al: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into human leukemia cell lines. *International Journal of Hematology* 67, 27-35, 1998.

Kazuyoshi Imaizumi, Yoshinori Hasegawa, Nobuhiko Emi, et al: Bystander Tumoricidal Effect and Gap Junctional Communication in Lung Cancer Cell Lines. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* Vol 18, 205-212, 1998.

Akio Kouno, Nobuhiko Emi, Masamobu Kasai, Mitsune Tanimoto and Hidehiko Saito†: Semliki Forest Virus based DNA expression vector : Transient protein production followed by necrosis. *Gene Therapy* Vol 5, 415-418, 1998.

S. Hayashi, N Emi, H Okada, T Nagasaka, I Yokoyama and H Takagi: Establishment of complement-resistant retroviral vector by

homologous restriction factor 20 gene. *Gene Therapy* Vol 5, 282-285, 1998.

吉川祐子、恵美宣彦、吉川研一：DNAの高次構造制御と遺伝子導入、*化学*、53：70-71、1998.

岩瀬 明、恵美宣彦：レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療、*Oncology & Chemotherapy*, 13: 284-289, 1998.

厚生科学研究費補助金

(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

分担研究者：阿部明弘（名古屋大学医学
部医員）

研究要旨

VSV 外殻成分由来の G タンパク質を lipid に取り込んだ、VSVG-lipid ベクターを作製し、導入遺伝子・GFP を指標にカニクザルモデルでの有効性を検討した。また、この VSVG-lipid ベクターの安全性についてもサルモデルで検討し、顕著な副作用や組織傷害などないことが示された。

A. 研究目的

Vesicular Stomatitis Virus(VSV) は、Single strand RNA genome をもち細胞質で増えるウイルスで、その感染状態をプラーク形成で容易に観察できる。VSV の外皮蛋白(G)に対する宿主側の結合部位細胞表層リン脂質と考えられている。

本研究では、以下に示すような方法で VSVG/lipid のベクターを作製し、細胞への効率的な遺伝子導入とその有効性評価を検討した。

B. 研究方法

VSVG/lipid ベクター(VSVG:lipid=20:1)に DNA(GFP plasmid)を lipid : DNA=1:2 の条件下で混和し、次いで poriburene を加えて、投与用のリポソーム性ベクター-GFP 遺伝子複合体を調製した。

このベクター-DNA をカニクザルに皮下投与し、血液像動態、炎症応答、組織・細胞傷害性ならびに GFP タンパク質発現などを調べた。

C. 結果

VSVG/lipid ベクターでの遺伝子 (GFP plasmid) 導入効率は予想以上に高く、投与部位周辺の細胞 (樹状細胞、マクロファージ、血管内皮、毛根周辺細胞、繊維芽細胞など) で GFP タンパク質の発現が見られた。しかも、9 日後でも GFP タンパク質の発現能が維持されていた。一方、VSVG/lipid ベクター投与による白血球 (リンパ球、好中球)、血小板、赤血球などの血球動態には影響は見られず、他の炎症反応も起きていなかった。

D. 考察

VSV の外皮蛋白(G)の宿主細胞側のレセプターは、phosphatidylserine (PS) と考えられており、PS を介して多くの細胞に吸着、取込起きることが知られている。したがって、この G 蛋白とリポソーム性ベクターの lipid との mixture を作ることによって、細胞への感染効率の増大、ならびに従来感染できなかった細胞に感染させたりすることが可能となる。

サルモデルでの実験においても導入遺伝子・GFP の投与部位周辺細胞での効率

的な発現が投与後 9 日目でも見られ、VSVG のベクターによる遺伝子導入効率の増大が確認された。加えて、顕著な細胞傷害や壊死も見られず、安全性からも有用性が示された。

E. 結論

Vesicular Stomatitis Virus(VSV)由来の G タンパク質をリポソーム性ベクターに取り込ませ、サルモデル系における GFP 遺伝子の発現効率の増大を確認した。また、投与部位周辺の組織・細胞傷害や血中炎症マーカー上昇も認められず、VSVG-lipid ベクターの安全性も確認された。

F. 研究発表

Toshihide Itou, Koichi Miyamura, Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Mitsune Tanimoto and Hidehiko Saito: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into human leukemia cell lines. *International Journal of Hematology* 67,27-35,1998.

Akihiro Abe, Atsushi Miyano-hara, and Theodore Friedmann: Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Therapy* 5: 708-711, 1998.

Akihiro Abe, Atsushi Miyano-hara, and Theodore Friedmann: Enhanced Gene Transfer with Fusogenic Liposomes Containing Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. *JOURNAL OF VIROLOGY* 72(7): 6159-6163, 1998.

Akihiro Abe, Shin-Tai Chen, Atsushi Miyano-hara, and Theodore Friedmann: In Vitro Cell-Free Conversion of Noninfectious Moloney Retrovirus Particles to an Infectious Form by the Addition of the Vesicular Stomatitis Virus Surrogate Envelope G Protein. *JOURNAL OF VIROLOGY* 72(8): 6356-6361, 1998.

安部明弘, 恵美宣彦: 遺伝子免疫療法～DNA vaccination for clinical application～*日常診療と血液* 8(6): 85-88, 1998.

研究報告書追補（主要な関連発表論文）

19980403

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor- α -induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells.

Matsumoto Y, Kawai Y, Watanabe K, Sakai K, Murata M, Handa M, Nakamura S, Ikeda Y.

Blood. 1998 Jun 1;91(11):4164-72

Poor outcome in disseminated intravascular coagulation or thrombotic thrombocytopenic purpura patients with severe vascular endothelial cell injuries.

Wada H, Mori Y, Shimura M, Hiyoyama K, Ioka M, Nakasaki T, Nishikawa M, Nakano M, Kumeda K, Kaneko T, Nakamura S, Shiku H.

Am J Hematol. 1998 Jul;58(3):189-94.

Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils.

Todoroki H, Higure A, Okamoto K, Okazaki K, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K, Nakamura S.

J Surg Res. 1998 Dec;80(2):149-55.

サルモデルでの新たなエンドトキシン応答—好中球での組織因子 (Tissue Factor) の発現と凝固反応亢進—

中村 伸

エンドトキシン研究 1 41—47 1998

Female mating strategy in an enclosed group of Japanese macaques.

Soltis J, Mitsunaga F, Shimizu K, Yanagihara Y, Nozaki M.

Am J Primatol. 1999;47(4):263-78.

生殖内分泌系の老化モデル

清水 慶子

霊長類研究 Primate Res 14 P.115-119 1998

Inhibition of guinea pig skin allergic reactions by nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist FR173657.

Mori T, Imamura T.

Int Arch Allergy Immunol. 1998 Aug;116(4):278-83.

A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens.

Kozik A, Moore RB, Potempa J, Imamura T, Rapala-Kozik M, Travis J.

J Biol Chem. 1998 Dec 11;273(50):33224-9

Establishment of complement-resistant retroviral vector by homologous restriction factor 20 gene.

Hayashi S, Emi N, Okada H, Nagasaka T, Yokoyama I, Takagi H.

Gene Ther. 1998 Feb;5(2):282-5.

Semliki Forest virus-based DNA expression vector: transient protein production followed by cell death.

Kohno A, Emi N, Kasai M, Tanimoto M, Saito H.

Gene Ther. 1998 Mar;5(3):415-8.

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療

岩瀬 明、恵美 宣彦

Oncology & Chemotherapy 13(4) 1997 284—289

Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein.

Abe A, Miyanohara A, Friedmann T.

J Virol. 1998 Jul;72(7):6159-63.

In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein.

Abe A, Chen ST, Miyanochara A, Friedmann T.

J Virol. 1998 Aug;72(8):6356-61.

悪性リンパ腫～診断と治療の進歩～

3遺伝子免疫療法 DNA vaccination for clinical application

安部明弘、恵美宣彦

日常診療と血液 8(6) 1998 P.85—88