

平成10年度

厚生省科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

研究報告書

主任研究者 金田 安史

1. Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K., & Kaneda, Y.: Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes. *Gene Therapy* 5, 1031-1037, 1998.
2. Hangai, M., Tanihara, H., Honda, Y., & Kaneda, Y. :Introduction of DNA into the rat and primate trabecular meshwork by fusogenic liposomes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 509-516, 1998.
3. Kaneda, Y.: Fusogenic Sendai virus-liposomes. *Biogenic Amines.* vol 14, 553-572, 1998.
4. Morishita, R., Gibbons, G. H., Horiuchi, M., Kaneda, Y., Ogihara, T., & Dzau, V. J. : Role of AP-1 complex in angiotensin II-mediated transforming growth factor- β expression and growth of smooth muscle cells using decoy approach against AP-1 binding site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 243, 361-367, 1998.
5. Hirano, T., Fujimoto, J., Ueki, T., Yamamoto, H., Iwasaki, T., Morishita, R., Sawa, Y., Kaneda, Y., Takahashi, H., & Okada, E. : Persistent gene expression in rat liver in vivo by repetitive transfections using HVJ-liposome. *Gene Therapy* 5, 459-464, 1998.
6. Sawa, Y., Kaneda, Y., H-Z Bai, Suzuki, K., Fujimoto, J., Morishita, R., & Matsuda, H. : Efficient transfer of oligonucleotides and plasmid DNA into the whole heart through the coronary artery. *Gene Ther.* 5, 1472-1480, 1998.
7. Matsumoto, T., Komori, K., Yonemitsu, Y., Morishita, R., Sueishi, K., Kaneda, Y., & Sugimachi, K. : Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J. Vasc. Surg.* 27, 135-144, 1998.
8. Li, X-K., Okuyama, T., Tamura, A., Enosawa, S., Kaneda, Y., Takahara, S., Funashima, N., Yamada, M., Amemiya, H., & Suzuki, S. : Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas-ligand expressing plasmid. *Transplantation.* 11, 1416-1423, 1998.
9. Kinoshita, K., Kaneda, Y., Sato, M., Wataya-Kaneda, M., Saeki, Y., Hoffmann, A., & Kaneda, Y. : LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253, 277-282, 1998.
10. Nakamura, N., Shino, K., Natsuume, T., Horibe, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y., & Ochi, T. : Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Therapy*, 5, 1165-1170, 1998.
11. Yonemitsu, Y., Kaneda, Y., Tanaka, S., Nakashima, Y., Komori, K., Sugimachi, K., & Sueishi, K. : Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circulation Res.* 82, 147-156, 1998.
12. Morishita, R., Yamada, S., Higaki, J., Tomita, N., Kida, I., Aoki, M., Moriguchi, A., Hayashi, S., Sakurabayashi, I., Kaneda, Y., & Ogihara, T. : Conditioned medium from HepG2 cells transfected with human apolipoprotein (a) gene stimulates growth of human vascular smooth muscle cells. ; Effects of overexpression of human apolipoprotein (a) gene. *Hypertension* 32, 215-222, 1998.
13. Morishita, R., Yamamoto, K., Yamada, S., Matsushita, H., Tomita, N., Sakurabayashi, I., Kaneda, Y., Moriguchi, A., Higaki, J., & Ogihara, T. : Stimulatory effect of lipoprotein (a) on proliferation of human mesangial cells: Role of lipoprotein (a) in renal disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 313-320, 1998.

総括研究報告書

臨床応用に向けたハイブリッド型リポソームの確立とサルを用いた実証研究

主任研究者 金田安史 大阪大学医学部遺伝子治療学 教授

導入遺伝子の組織での発現を増強するための遺伝子共導入系を開発した。ヒト遺伝子治療に向け、各種動物への HVJ-liposome による遺伝子導入によりの有効性、安全性が確認された。

分担研究者 居石克夫 九州大学医学部教授

森下竜一 大坂大学医学部助教授

本多三男 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

HVJ-liposome を改良しさまざまな機能を賦与してヒトの遺伝子治療に応用可能なものとして確立し、安全性と有効性を検討しつつ、臨床応用に持ち込むことを目的とする。

B. 研究方法

Epstein-Barr virus (EBV) の EBNA-1 強発現ベクターと oriP レプリコンベクターを HVJ-liposome により共導入し、導入遺伝子発現を測定した。またラット肝臓への連続投与実験、血管再狭窄の遺伝子治療実験、モルモットでのエイズワクチン投与実験、サルの脳、筋肉、静脈内投与実験を行った。

C. 研究成果

poriP-CMV-luc と pCMV-EBNA-1 を HVJ-liposome で培養細胞に共導入すると oriP 依存性に、また、EBNA-1 の量に応じてルシフェラーゼの発現が最大30倍増強された。この増強はノーザンブロットにより転写レベルでの活性化であることが明らかになった。次に poriP-CMV-HIN と pCMV-EBNA-1 を HVJ-liposome でマウス骨格筋に共導入する実験を行った。pCMV-EBNA-1 を共導入した群ではしなかった群の約8倍のヒトインスリ

ンの分泌がマウス血中に認められ、これが4週間持続した。ラット肝臓への連続投与実験で肝臓での著明な病理変化は認めず、遺伝子発現の中和は見られなかった。p53 遺伝子の血管再狭窄抑制効果、NFκB のおとり型核酸の脳血管スパズムの抑制、HIV ワクチンによる HIV 感染の中和が認められた。サルへの投与により、遺伝子発現をみたが、著明な病的変化は現在まで認められていない。

D. 考察

EB virus の oriP、EBNA-1 共導入系による遺伝子発現の制御が可能である。HVJ-liposome は小～大動物での遺伝子治療実験、安全性の検討においても成果を収めている。

E. 結論

ハイブリッド型リポソームの臨床応用の可能性が一層強くなった。

F. 研究発表

Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K., and Kaneda, Y.: Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes. *Gene Therapy* 5, 1031-1037, 1998.

分担研究報告書

ハイブリッド型リボソームによるエイズワクチンの開発

分担研究者 本多三男 国立感染症研究所

有効なエイズワクチンの開発をめざしハイブリッド型リボソームである HVJ-liposome を用いて HIV 蛋白を種々の動物に導入し、免疫賦活と防御免疫の可能性を研究した。

A. 研究目的

エイズの予防及び治療のためには有効なワクチンの開発が必須である。この研究では液性免疫だけでなく細胞性免疫を増殖可能にするためのアジュバンドとしての HVJ-liposome の可能性を検討した。

B. 研究方法

HIV-Hbc 候補ワクチンをモルモット、マウスに免疫し、約 1 ヶ月後に V3 ペプチドを組み込んだ HVJ-liposome を投与し免疫賦活、防御能を検討した。またカニクイザルにも皮下投与した。

C. 研究成果

モルモットに HIV-Hbc で基礎免疫をかけても V3 に対する抗体は産生されないが、V3 ペプチドを含む HVJ-liposome でブースター追加免疫を行うと 10^4 以上の抗体価が検出され、これまで検出できなかった V3 ペプチド特異的な遅延型皮膚反応が著明に誘導された。誘導された中和抗体は HIV-IIIB に感受性のあるヒト細胞株 MAGI に対する HIV の感染を 80% まで抑制した。同様の免疫賦活はマウスにおいても得られ、免疫マウスの脾臓細胞には V3 ペプチドに対する強いキラー活性が誘導された。カニクイザルに投与してエイズウイルスに対する免疫賦活がかかるかどうか検討中である

が、HVJ-liposome の投与は一時的な局所の発赤硬結以外は副作用はなく安全であることが示された。

D. 考察

HVJ-liposome は従来のアジュバンドとは異なり液性免疫だけでなく細胞性免疫、特に抗原特異的なキラー活性を増幅することができるので、細胞性免疫が疾患の治療・予防に必要な場合に効果的であろう。また安全性についてもサルの実験で見ると問題ないと考えられる。

E. 結論

非常に有望なエイズワクチンが HVJ-liposome を用いることにより開発されつつあり、安全性が高いことを考えればヒトへの応用も近いであろう。

F. 研究発表

Takeda, S., Haga, S., Shiosaki, K., Nakasatomi, T., Yoshizaki-Nakatomi, Someya, K., Fukuda, K., Tokiyoshi, S., Kaneda, Y., and Honda, M. : A hepatitis B core particle vaccine for HIV-1 induces HIV-specific cellular immunity as well as humoral immunity by booster injection of HIV-1 V3 peptides. in preparation.

おとり型核酸医薬（デコイ）を用いた難治性循環器疾患の遺伝子治療の基礎的検討を進めた。自家血導入によるスパスム予防にNFkBデコイの導入は有効であった。また、血管拡張術後再狭窄に対する有効な治療法は未だ認められていないが、転写因子E2Fに対するデコイを用いてブタ冠動脈バルーン障害後再狭窄の遺伝子治療に成功した。

A、研究目的

狭心症や心筋梗塞の治療として血管拡張術は有効な治療法であるが、30%以上に及ぶ再狭窄によりその有効性は大きく損なわれている。本研究では転写因子E2Fに対するデコイを使用することで、再狭窄の遺伝子治療を検討した。また、サイトカインや接着因子の発現調節に必須な転写因子NFkBに対するデコイによる脳血管スパスムに対する遺伝子治療を検討した。

B、研究方法

ブタ冠動脈に対しバルーン障害モデルを作成し、ハイドロゲルカテーテルを用いてE2Fデコイを導入する。導入後30日後、新生内膜形成を血管内視鏡により検討した。また、E2Fデコイの単回静脈投与をサルに対して行い、臨床応用に必須な急性毒性を検討した。一方、自家血注入による脳血管スパスムモデルをウサギで作成し、NFkBデコイ投与によるスパスム予防を検討した。

C、研究結果

ブタ冠動脈バルーン障害モデルへの蛍光ラベルしたE2Fデコイ投与により、ハイドロゲルカテーテルを用いた投与が可能であることが明らかになった。E2Fデコイ導入後30日後、新生内膜形成は抑制されていた。また、サルへのE2Fデコイの単回静脈投与は、臨床推定用量の10倍以上を使用した。特に急性毒性は認められなかった。

一方、ウサギ自家血注入による脳血管スパスムモデルに対するスクランブルデコイ投与群に比しNFkBデコイ投与は、スパスム発生を有意に予防した（文献1）。

D、考察

ブタ冠動脈バルーン障害モデルへのハイドロゲルカテーテルを用いたE2Fデコイ投与による再狭窄抑制は、臨床研究開始に十分な結果である。また、サルへのE2Fデコイの単回静脈投与による急性毒性は認められなかったことより、安全性の高い治療法として期待される。

一方、現在有効な治療法のない脳血管スパスムに対するNFkBデコイの遺伝子治療は今後の臨床応用が期待される。

E、結論

血管拡張術後再狭窄に対する遺伝子治療としてE2Fデコイの有用性が明らかになった。また、脳血管スパスムに対するNFkBデコイの遺伝子治療も示された。

F、研究発表

1、論文発表

- 1) Ono S, Date I, Onoda K, Shiota T, Ohmoto T, Ninomiya Y, Asari S, **Morishita R**. Decoy administration of NFkB into the subarachnoid space for cerebral angiopathy. Human Gene Therapy 1998;9:1003-1011.
- 2) **Morishita R**, Higaki J, Tomita N, Ogihara T. Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. Circulation Research 1998;82:1023-1028
- 3) **Morishita R**. Lessons from human arteries: how to design a gene therapy strategy for treatment of cardiovascular disease. Circulation Research 1998;82:1349-1351

ハイブリッド型リポソームによる血管壁の遺伝子制御に関する分子病理学的研究

分担研究者 居石克夫 九州大学医学部教授

ハイブリッド型リポソームであるHVJ-リポソームを用いた野生型p53遺伝子や転写因子Sp-1に対するデコイ遺伝子への血管平滑筋細胞への導入は、細胞機能の修飾を可能にすることが判明した。従って、本方法による遺伝子導入の臨床応用は、血管壁動脈硬化の進展予防やPTCA後の再狭窄予防などの有用な手段の一つとなりうると考えられた。

A. 研究目的

血管壁の障害やリモデリング過程での細胞間相互作用による血管壁細胞の機能修飾を基盤とした分子病態の解明と、こうした疾患に対する新規かつ有効な遺伝子治療法の確立を目的としてハイブリッド型リポソームによる遺伝子導入法の有効性を確認する。

B. 研究方法

ハイブリッド型リポソームであるHVJ-リポソームによる遺伝子導入による効果を、以下の項目につき検証した。

- 1) ウシ培養血管平滑筋細胞に野生型p53遺伝子を導入し、増殖能、細胞周期に与える影響について検討した。
- 2) バルーンカテーテル法にて作製した家兎動脈硬化モデルの中膜平滑筋に野生型p53遺伝子導入し、4週間後に病理標本を作製し病理学的検討を行った。
- 3) TNF- α 刺激したヒト培養血管平滑筋細胞にて、転写因子Sp-1に対するデコイ（おとり）遺伝子の導入によるVEGF遺伝子発現への効果を検討した。

C. 研究結果

- 1) 野生型p53遺伝子導入は、PDGF-BB刺激下でのチミジンの取り込みを抑制した。また、FACSによる検討の結果、これらはG1期停止を起こしていた。ただ、アポトーシスへの誘導は明らかでないものの、アドリアマイシンとの併用により、効果的にアポトーシスの誘導ができることが確認された。
- 2) 野生型p53遺伝子導入群は、コントロール群に比較して増殖細胞の減少と弾性線維の配列が密である所見が観察された。さらにこれに一致して、内膜中膜の形態計測により内膜肥厚度を定量化したところ、内膜肥厚が20%以下のレベルまで抑制できることが確認できた。
- 3) 野生型Sp-1デコイ遺伝子導入は、TNF- α 刺激によるVEGF発現誘導をmRNA、蛋白レベルにて未刺激以下のレベルまで完全に抑制した。さらに、野生型Sp-1デコイは、培養血管平滑筋細胞の増殖も効果的に抑制した。

D. 考察

野生型p53遺伝子導入によるp53蛋白の過剰発現は平滑筋細胞の細胞周期をG1期停止に誘導し平滑筋の増殖抑制する事が可能であると考えられた。さらには、バルーン障害などにより活性化された平滑筋の分化の促進する可能性が示唆された。

Sp-1デコイ遺伝子導入について、今回はVEGFのみの検討であったが、既に腫瘍細胞での検討結果（投稿準備

中）と考えあわせると、導入細胞においてSp-1が転写に関わる遺伝子群の発現抑制を可能にすると考えられた。したがって、HVJリポソームによるデコイ遺伝子導入は、平滑筋細胞の機能制御に有効であることが示唆された。

E. 結論

HVJ-リポソームを用いた血管平滑筋細胞への遺伝子導入は、細胞周期の制御や細胞機能や転写レベルでのサイトカイン産生調節などを誘導することが可能で、動脈硬化の進展予防などの有用な手段の一つとなりうると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表など

1. Yonemitsu Y, et al. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res* 82(2): 147-156, 1998
2. Namoto M, et al. Heterogeneous induction of apoptosis in colon cancer cells by wild-type p53 gene transfection. *Int J Oncol* 12: 777 - 784, 1998
3. Matsumoto T, et al. Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J Vasc Surg* 27(1): 135 - 144, 1998

2. 学会発表など

1. Sueishi K, et al. *In vitro cis*-element decoy against Sp-1 binding sites suppresses TNF α -induced VEGF synthesis. Xth International Vascular Biology Meeting. (Cairns) 1998. Aug.23-27
2. Sueishi K. Gene regulation; A novel strategy for VEGF expression using *cis*-element decoy. The 1st Japan US joint Meeting on Vascular Biology. (Kobe) 1998. Aug.30-31
3. Sueishi K, et al. Angiogenesis in Artherosclerosis; Its Pathophysiological Implication and Molecular regulation. The 4th Samsung International Symposium. (Seoul) 1998. Oct.31
4. 居石克夫. 特別講演「血管壁の遺伝子制御」第21回日本血栓止血学会（富山）1998年9月17-18日

G. 知的所有権の取得状況

特になし

H. 研究協力者

米満吉和、中川和憲（九州大学医学部）

19980414

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
P.2の一覧表をご参照ください。