

まず、ヒト TMcDNA とラット TMcDNA をクローニングした。得られた cDNA より推定されたアミノ酸配列から、ラット TM もヒト TM と同様のドメイン構造であることが判明した。また、ラット TM はヒト、ウシ、マウス TM とそれぞれ、65.3%、62.0%、84.2%の相同性を有していた (Fig.29)。得られたヒト TMcDNA を発現ベクターに組み込み、TMcDNA 発現ベクター-pRC/CMV-hTM cDNA を作製した。

次に、ラット肝類洞内皮細胞へのヒト TM cDNA 発現ベクターの *in vivo* での導入を検討した。ヒト TMcDNA 発現ベクター-pRC/CMV-hTM cDNA (Fig. 30) 封入膜融合リポソームの *in vivo* での遺伝子導入効果を検討するため、正常ラットの門脈から膜融合リポソーム溶液 (50 ml) を注入し、6日後および10日後に肝類洞内皮細胞を単離し、この細胞におけるヒト TM の活性、抗原および mRNA 発現量を測定した。その結果、pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソーム投与後、6日目の肝類洞内皮細胞には TM 活性および TM 抗原量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。しかし、投与10日後の肝類洞内皮細胞では、TM 活性と TM 抗原量の有意な発現はみられなかった (Fig. 31)。またヒト TM mRNA の発現を RT-PCR 法で検討したところ、投与6日後の肝類洞内皮細胞では明らかな発現が認められたが、10日後の肝類洞内皮細胞では全く認められなかった (Fig. 31)。今後、pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソームを門脈から投与後、2、4、6、10日後のラットの肝類洞内皮細胞 および肝実質細胞におけるヒト TM の発現を、モノクローナル抗ヒト TM 抗体を用いた免疫染色法およびヒト TM をコードする RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法で解析する予定である。

また、単離ラット肝類洞内皮細胞へのヒト TM cDNA 発現ベクターの *in vitro* での導入を検討した。pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソームの *in vitro* でのラット肝類洞内皮細胞への導入効率を評価するため、単離した肝類洞内皮細胞を pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソームで 48 時間処理し、その後、細胞に発現したヒト TM の活性、抗原および mRNA を定量した。その結果、pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソームで処理した肝類洞内皮細胞では、未処理に比較して TM の活性と抗原量が有意に ($p < 0.05$) 増加していた (Fig. 32)。また、RT-PCR 法を用いて測定したヒト TM mRNA 量も pRC/CMV-hTM cDNA 含有膜融合リポソーム処理した肝類洞内皮細胞では増加していたが、未処理の類洞内皮細胞では発現量に変動は認

められなかった (Fig. 32)。

C.6 非ウイルスベクター類の安全性評価に関する研究

遺伝子治療の実用化に向け、新規に開発される遺伝子治療薬の品質、有効性、安全性の確保は必須の課題である。本研究は、非ウイルスベクター類の安全性確保に必要となる細胞や動物レベルでの安全性評価技術の開発と評価法の標準化、及び安全性評価指標の設定に関する基盤研究を行うものである。非ウイルスベクターはウイルスベクターでは避けられないウイルスに由来する安全性上の懸念がなく、調製が容易で工業的に作製できること、導入遺伝子の自由度など大きな利点があると考えられ、リポソーム、陽電荷脂質、陽電荷ポリマーなどについて遺伝子導入ベクター (担体) としての開発、検討が続けられている。これらの非ウイルスベクターはベクターの種類 (構造)、ベクターの電荷、脂質の場合は共役脂質の種類や脂質/共役脂質の比率、ベクターとプラスミドの比率 (Charge の比率)、ベクターとプラスミドとの複合体の調製法 (Buffer, 濃度, 時間)、複合体のサイズ、作用時間、血清との相互作用、細胞の種類など、極めて多様なパラメーターがその有効性・安全性に影響すると考えられ、その評価は容易ではない。今年度は非ウイルスベクター類の遺伝子発現効率と毒性発現を *in vitro* でヒト細胞パネルを対象として比較検討することにより、ベクターの有効性、安全性に関与するパラメーターと評価法について検討した。ベクターとしては市販の遺伝子導入試薬数種類をモデルベクターとして使用した。細胞パネルとしては、臨床使用時の安全性評価につながることを望ましいとの観点から、正常ヒト初代細胞、ヒト血球系培養細胞、その他治療対象となりうる組織のヒト培養細胞及びガン細胞を広範囲に揃えて検討を行った。

まず、HeLa 細胞を用いて各ベクターの毒性 (細胞膜傷害性、細胞生存率への影響) と遺伝子発現効率を比較した (Fig. 33)。薬物の毒性試験に用いられる遊離 LDH を測定する方法により細胞膜傷害性を検討したところ、ベクター・DNA 複合体を 1 時間作用させた場合、Superfect20 $\mu\text{g/ml}$ 、無血清条件において 10%弱と最も高い傷害性を示したが、その他のベクター・条件では濃度依存的に傷害性が認められるものの、いずれも 5%以下とかなり低いことが判明した (Fig. 33A)。しかし、細胞にベクター・DNA 複合体を 1 時間作用し、除去後 24 時間培養して細胞生存率を検討したところ、無血清条件ではいずれのベ

クターでも濃度依存的に生存率が大きく低下し、生存率が50%以下となる場合も認められた(Fig. 33B)。血清存在下で作用させた場合には Lipofectamine plus, Superfect, DOTAP などで生存率の上昇が認められたが、Effectene のように血清存在下でも生存率が向上せず極めて低いままのものもあった。いずれのベクターでも 24 時間後の細胞生存率で毒性を評価すると、細胞膜傷害性で評価した場合と比べて顕著に高い毒性発現が認められた。この傾向は、今回検討した他の細胞全てについて同様であった。このことからこれらのベクターによる毒性発現は急性に細胞膜傷害を起こすことによるものではなく、ベクター・DNA 複合体が細胞に吸着し、取り込まれた結果として起こるものであることが推察された。

一方、各ベクターの遺伝子発現効率を比較すると (Fig. 33C)、Lipofectamine plus の無血清条件、Effectene の無血清、血清条件において高い遺伝子発現が得られたが、Lipofectin, Superfect, DIMRIE-C はこれらの 1/3~1/10 程度、DOTAP では 1/100 程度というわずかな遺伝子発現しか認められず、遺伝子発現効率はベクターにより大きな差があることが判明した。ベクターの濃度は遺伝子発現強度に影響するが、濃度が高いと細胞毒性による影響も生じるため、至適濃度があることが確認された。また遺伝子発現が血清により大きく低下するベクターとほとんど影響を受けないベクターがあるが、遺伝子発現に対する血清の影響は細胞生存率に対する血清の影響と相関する傾向が認められた。

次に、ヒト正常初代細胞で各ベクターによる遺伝子発現と細胞生存率への影響とを検討した(Fig. 34)。血管内皮細胞(HUVEC)の場合は HeLa と同等の比較的高い遺伝子発現が認められたが、血管平滑筋細胞(HUVSMC)、繊維芽細胞(HSFB)では一桁以上低い発現しか認められず、同じベクターを用いても細胞によって遺伝子発現効率には大きな差異があることが確認された。一方、同一細胞に対するベクター間の相対的な遺伝子発現強度については、HUVEC, HUVSMC, HSFB では比較的類似した傾向であったが、肝細胞では Effectene 以外は遺伝子発現が認められず、細胞による相違が認められた。また、細胞生存率については、HUVEC、肝細胞で強い毒性が認められたが、HSFB に対する毒性は比較的弱いものであった。

今回検討した全細胞について遺伝子発現と細胞生存率をベクターごとに比較した(Fig. 35)。ベクターにより遺伝子発現強度に差があるが、HeLa や 293、HuH7、KATOIII、初代細胞の HUVEC、血球系の細胞の K562 では多くのベクターで比較的高い遺伝子

発現が認められたが、血球系の他の細胞や NB1, HUVSMC、HSFB などではどのベクターでもほとんど遺伝子発現が認められず、遺伝子発現効率は細胞の種類により極めて大きな差があることが明らかとなった。一方、全細胞について毒性を細胞生存率により比較したところ、遺伝子発現ほど顕著な特徴は認められなかったが、遺伝子発現の強いベクターはどの細胞に対してもかなり強い毒性を示す傾向が認められた。また、全細胞について β -ガラクトシダーゼ染色により遺伝子発現細胞出現率を検討した結果、最も高い遺伝子発現効率を得られる細胞・条件で 40-50%の細胞で非常に強い β -ガラクトシダーゼ発現が認められ、発現効率の低い細胞・条件では細胞あたりの発現低下ではなく発現細胞数が低下しており、どのベクターを用いても遺伝子発現は均一にはおこなないことが判明した。

D. 考察

D. 1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

膜融合リポソームは、リポソーム表面にセンダイウイルスの膜蛋白質を付与したものであり、センダイウイルスの膜融合能を利用してリポソーム内封物を細胞質内に導入できる。この膜融合リポソーム法は、ウイルスベクターの細胞内への遺伝子導入効率の高さと非ウイルスベクターの安全性をあわせもった遺伝子導入ベクターであり、次世代の遺伝子導入ベクターとして期待されている。そこで、膜融合リポソームの遺伝子導入効率の向上と適応範囲の拡大を目的に膜融合リポソームの粒子設計を試みた。まず T7RNA polymerase のように活性を有する蛋白質を膜融合リポソーム内に封入するために逆相蒸発法以外のリポソーム作製法を検討した。Bangham 法で調製した MLV リポソーム、凍結融解を行い MLV を保持容積の大きな LUV に変換したりリポソームを比較したところ、遺伝子の封入量は MLV より LUV において高くなった。ニワトリ卵白アルブミンを封入したりリポソームでも MLV に比べ LUV のほうが封入量が高いことを確認している。また T7RNA polymerase は凍結融解を行っても失活がほとんど見られなかったことより、本酵素を凍結融解法により作製したりリポソームに封入して膜融合リポソームを調製することが可能であることが示唆された。次に、膜融合リポソームの粒子径と遺伝子封入量および遺伝子導入効率の連関について検討を行った結果、膜融合リポソームの最大粒子径の増大に伴い遺伝子封入量の増大が認められた。これは、膜融合リポソーム内水相の容積増大によるもので

あると考えられた。また、Bangham 法で調製した MLV から作製した膜融合リボソームが最も遺伝子封入率が低かった。これは、膜融合リボソームの保持容積を反映した結果であると考えられた。これらのリボソームから調製した膜融合リボソームで細胞に遺伝子導入したときの遺伝子発現について検討したところ、遺伝子封入量に依存した遺伝子発現が認められた。なお、この実験では膜融合リボソームの遺伝子導入効率について検討する目的で、膜融合リボソームのセンダイウイルス由来の蛋白質量を揃え、細胞に作用させる粒子数を一定にして遺伝子導入を行ったため、遺伝子発現量は膜融合リボソームの遺伝子導入効率として評価可能である。その結果、リボソームの遺伝子封入量の増大とともに遺伝子導入効率も向上した。さらに、リボソームの最大粒子径を増大させたことにより、遺伝子サイズの大きな遺伝子も効率よく封入可能であり、かつ効率よく細胞内に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。これらの結果より、膜融合リボソームは様々な大きさの遺伝子を生理活性蛋白質とともに封入可能であり、遺伝子導入ベクターとして幅広く使用可能であることが示された。

スベルミジンは遺伝子と複合体を形成し遺伝子のコンフォメーション変化させることで遺伝子のヌクレアーゼ抵抗性を増大させることが知られているが、この遺伝子の安定化作用を利用した細胞での遺伝子発現増強について検討した報告はほとんどない。スベルミジン添加における遺伝子のヌクレアーゼ抵抗性について検討した結果、スベルミジン濃度の上昇に伴い、遺伝子の分解性が低下することが明らかとなった。したがって、遺伝子とスベルミジンの複合体を細胞に導入することで、遺伝子の細胞内での安定性が増大し遺伝子発現増強に結びつくのではないかと考えた。そこで膜融合リボソームによる遺伝子導入におけるスベルミジンの影響について検討した結果、遺伝子とスベルミジンの混合比が 1:0.625 のとき最も高い遺伝子発現増強が認められたが、スベルミジン濃度を増すと逆に遺伝子発現の低下が認められた。これは、スベルミジンにより遺伝子のコンフォメーション変化が過度に生じ、遺伝子の転写効率が低下したためであると考えられる。この点に関しては今後の検討課題であると考えている。スベルミジンは、生体内ポリアミンの一種で生体内に普遍的に存在する物質であり、安全性に優れた物質であると考えられる。また、スベルミジンは、混合するだけで遺伝子発現を増強させる物質であり、今後の遺伝子発現系に容易に応用可

能な方法であることが示唆された。さらに、このスベルミジンは、T7 RNA polymerase の酵素活性を増強させる作用もあることから、T7 発現系にも応用可能であると期待できる。今後はスベルミジンの T7 発現系への応用についても検討を行っていきたいと考えている。

VSV-リボソームは、細胞傷害性を伴わずにリボソーム内に封入した DTA を intact な状態で細胞質内に導入可能であること、導入効率はリボソームの 100 倍以上であることが判明した。さらに VSV-リボソームは、高濃度細胞に作用させても全く毒性を示さなかったことから、物質導入キャリアーとしての安全性に優れていることが判明した。VSV の感染機構を考慮すると、VSV-リボソームは、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、エンドソーム内の pH の低下に伴いエンベロープ蛋白質が活性化され、その結果、エンドソーム膜と融合し、リボソームの場合とは異なりライソゾーム酵素による分解を受ける前に、封入物質を直接細胞質内に導入していると考えられた。

D. 2 独立レプリコンの開発に向けた基礎研究

D.2.1 独立レプリコンの開発

遺伝情報の安定性を高めて、染色体に挿入しなくても核内で安定に存在できる独立レプリコン(人工染色体)の開発は、安全な非ウイルスベクターの研究開発において一つの大きなトピックである。遺伝子治療において、独立レプリコンの開発が重要であるのには以下のような理由がある。

(1)染色体への外来遺伝子の挿入によって宿主の遺伝子が異常な活性化や不活化などの影響を受け、その結果、ガン化等の有害な作用を引き起こす可能性を否定できない。この問題は、現在のように挿入型ベクター(レトロウイルス、HIV、AAV)の効率が低い状況では顕在化しないが、将来、これらのベクターの改良によって大規模に遺伝子導入が行われるようになると、必ず重篤な副作用をもたらすことが予想される。これを解決できるのは独立レプリコンの開発だけである。

(2)分裂していない細胞の染色体に外来の DNA が挿入される確率は低く、この段階が遺伝子導入・発現の律速段階の一つになっている。遺伝性代謝疾患の対象となる肝臓・神経系などはすべて分裂しておらず、染色体に挿入するためには大量のベクターを投与する必要があり、予期しない副作用をもたらす可能性がある。独立レプリコンであれば、核の中にさえ導入されれば自らを安定に保つ能力を持っている

るので律速段階が一つ解消でき、遺伝子導入効率は非常に高くなることが期待される。

これらの問題点はこれまでも指摘されてきたが、動物細胞の場合、遺伝子の安定性を評価する適当な系が存在しなかったことが研究を妨げてきた。独立レプリコンの開発はまだ研究を進めている研究室がほとんどないため、実際にどこまで遺伝子の安定性が要求されるかという具体的な数値目標が発表されているわけではないが、我々は半減期としてT細胞の体内での寿命に相当する2年間を目標としている。半減期2年という目標を達成するためには、細胞から失われていくDNAを24時間あたり0.1%以下としなければならない。しかしこのような高い安定性を正確に測定する系はこれまで皆無であった。我々が本年度の研究で開発した、DNAの安定性を正確にかつ迅速に測定するシステムは、24時間あたり0.1%の脱落率の測定を20日以内に正確に実施することを可能とした。この成功により、独立レプリコンの開発は初めて現実に研究の対象になったといえる。

今後は、この系を使って実際に独立レプリコンを安定化できるDNA構造や細胞側の因子を探索していく予定である。これまでの研究から、テロメア配列やヒト染色体の複製起点などが候補にあがっている。なかでもテロメア配列はテロメア結合因子hTRF1との相互作用によって安定化に寄与していると考えられるが、この両者とも正常な組織細胞でも染色体を安定に保つ役割を持っているのではないかと予想されるため、EBVなどガン化との関連性が疑われるウイルスの複製系と比べて副作用を引き起こす危険性ははるかに低いと考えられる。このように、常に安全性を視点に入れて研究を進めつつ、来年度は実際に動物の組織に効率よくまた安全に遺伝子導入・発現を行うことができるシステムの構築を追求していきたい。

D.2.2 エピソーマルベクターの開発

ヒト染色体複製起点のクローニングを試みた結果、自立複製配列を含む断片の候補として、3K, 7K, 9K, 14Kの断片が取得できた。これらの断片を挿入したプラスミドについて薬剤耐性コロニー形成能と細胞内複製能を検討したところ、両者の活性が相反する結果が得られた。9K, 14K(+)断片は強い複製能がみられたにもかかわらずコロニーはあまり得られず、逆に7K, 14K(-)断片では複製シグナルは弱いにも関わらず、コロニー形成が高頻度で得られた。7K断片については、細胞あたりのコピー数

は少ないが、安定性、分配性に優れ、プラスミド保持能が高いためコロニー形成が高い、あるいは核マトリックスへの保持能が強いためにHirt抽出の効率が悪く複製シグナルが低いという可能性が考えられるが、染色体に挿入されやすい配列であるために耐性コロニーが得られやすいという可能性も否定はできない。9K断片については、複製能は高いが、分配が均等に起こらない、あるいは核内の保持・安定性が低いために耐性コロニーが得られにくいという可能性が考えられる。14K断片では挿入方向により活性が異なるが、EBNA1あるいはHygromycin B耐性遺伝子の発現に影響した結果と考えられる。今回得られた断片が真にプラスミドの複製、あるいは安定性、プラスミド保持に寄与するものであり、エピソーマルベクターの構成要素として活用できるものであるかどうかは各プラスミドの細胞内存在状態やコピー数、安定性等、さらに詳細な検討が必要である。今後、さらに各断片を組み込んだプラスミドがエピソーマルで長期間複製され、安定に維持されるかどうか、また実際に遺伝子発現ベクターに組み込むことにより、遺伝子の持続発現性が得られるかどうかを検討する予定である。また各断片の塩基配列についても解析を行い、複製起点の構造を明らかにする予定である。

D. 3 導入遺伝子の核移行に関する研究

DNAの核内へのターゲッティングという、DNAのDDS(Drug Delivery System)の分野でもっともホットなテーマでは、ファージ内部のDNAが核内に能動的に移行していることを証明し、またこの能動輸送が実際に遺伝子発現を大きく上昇させることを証明できた。さらに、このシステムから大腸菌への感染性を除き、ファージDNAではなく、短いcos配列(ファージ粒子へのパッケージングシグナル)を持つ任意のプラスミドを封入できるパッケージング大腸菌の作成にも成功した。これらは、動物ウイルスに頼らずに遺伝子の核へのターゲットに成功した世界初のデリバリーシステムである。

NLSファージシステムは、不十分な精製時に混入する恐れがあるエンドトキシン以外には動物や細菌に有害な成分をまったく含んでいないので、ウイルスベクターに比較して極めて安全性が高く、また安価に大量生産することが可能である。さらに内部に封入するDNAの工夫によって、短いcos配列以外のバクテリア由来のDNAを粒子の内部から完全に除き、目的遺伝子やヒト染色体の安定化に関わる領域(テロメアなど)だけにしてしまうことも可能

であるなど、遺伝子治療用ベクターの素材としては理想に近い物となっている。また、NLS ファージの今後の研究から得られる情報 (DNA の核へのターゲティングに必要な核移行シグナルの性質や、核の中へ移行できる粒子のサイズなど) は、現在、高分子化学の分野で研究が盛んに進められている「生物機能を持ったインテリジェント・ポリマー」の開発に非常に役立つと期待されている。これらの研究によって、将来は DNA 以外はすべて合成品でまかなえる遺伝子導入系の開発も可能と考えられる。

D. 4 細胞質内での遺伝子発現系に関する研究

T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系は、Moss らにより哺乳類における新しい遺伝子発現系として最近考案された。この T7 発現系は、細胞質内での遺伝子発現を可能にするため、非ウイルスベクターによる遺伝子導入の際に問題となっている遺伝子の核移行性の低さを克服する方法として注目されたが、本系を遺伝子治療に適用する試みはほとんどないのが現状である。そこで本研究では、本系を遺伝子治療に適用するための最適化を試みた。in vitro において、pT7-IRES-L と T7 RNA polymerase からなる T7 発現系による遺伝子発現を検討したところ、遺伝子発現は細胞内に導入されるアクティブな T7 RNA polymerase 量に依存していることが明らかとなった。しかしながら、この発現は短期間の一過性にすぎなかった。Gao らは哺乳類細胞内での T7 RNA polymerase の turnover が約 30 時間であることを報告しており、LLCMK2 細胞内においても同程度の turnover であると予想されることから、短期間の一過性発現であったのは、最初に導入した T7 RNA polymerase が細胞内でプロテアーゼ等の分解を受けてしまい、失活してしまったためであると推測される。そこで、T7 RNA polymerase の持続的供給を目的に、T7 RNA polymerase 発現プラスミドである pT7 AUTO-2 を pT7-IRES-L および T7 RNA polymerase そのものを同時に細胞内に導入したところ T7 発現系の遺伝子発現増強や遺伝子発現期間延長が認められた。さらに、T7 AUTO-2 量を増加させることにより遺伝子発現の増強が認められた。これらの結果より、T7 発現系の遺伝子発現増強には細胞内のアクティブな T7 RNA polymerase の量を如何に高濃度に維持するかが非常に重要なファクターであることが示唆された。したがって、今後さらなる遺伝子発現増強を可能とするため、細胞内 T7 RNA polymerase の産生効率を改善すべく pT7 AUTO-2

に IRES 配列を組み込むことなどを検討している。本系を最大限の効率で利用するためには、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の量的バランスを最適化する必要がある。そこで、遺伝子導入ベクターとして Lipofectin を用いた場合の、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の最適混合比に関する検討を行った。その結果、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 がモル比で 1:3 の混合遺伝子を細胞内に導入したとき遺伝子発現効率が最大となることが明らかとなった。したがって、in vivo に遺伝子導入を行うなど、投与可能な遺伝子量がおのずと制限される場合には、最適混合比の遺伝子を投与することで T7 発現系の遺伝子発現能力を最大限に発揮させ得ることが示唆された。本年度は Lipofectin を遺伝子導入ベクターとして用いたが、陽電荷リポソームによる細胞内への遺伝子導入は、調製が簡単なためスクリーニング系としては最適である。しかし、エンドサイトーシス経路を介して細胞内に遺伝子導入するため、リソソーム内での遺伝子や蛋白質の分解をまぬがれることはできない。一方、膜融合リポソームはリポソーム内に封入可能であればいかなる物質も膜融合により細胞質内に直接導入可能なベクターであり、陽電荷リポソームの最大の欠点を克服した非ウイルスベクターと言える。したがって、膜融合リポソームは T7 発現系を応用していくためには、最適のベクターと考えられる。C.1 項に述べたように、T7 発現系にも応用できるように膜融合リポソームの最適化を行っており、今後は膜融合リポソームによる検討も可能と考えている。

D. 5 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

遺伝子治療薬の応用研究として、肝癌、肝炎、肝硬変等で異常患部の切除手術後に発生する肝障害の阻止を目指して、抗血栓性因子遺伝子をラットの肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価検討することを目的として実施した。この分担研究は開始されてから日が浅く、組織細胞へ導入する遺伝子の単離や遺伝子導入方法の検討等、研究は基礎的段階であるため、現段階で得られた研究成果は必ずしも充分ではない。しかし、これまでも今後の研究の発展に繋がる幾つかの成績が得られた。まず、ヒト TMcDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームのラットの肝類洞内皮細胞への導入実験においては、その TM 遺伝子の最大発現時期と発現量から推測して、以下の点が今後の検討課題になると考えられた。まず今回用いたラッ

ト門脈への投与方法では、門脈内に投与されたりポソームがそこに存在する多くの血球と瞬時に融合して捕捉され、目的組織の類洞内皮細胞に充分量届かない可能性がある。また、投与されたりポソームが血液中の蛋白質によっても破壊される可能性もある。したがって、今後、遺伝子封入りポソームを投与する直前に、門脈血流を一時遮断した後に門脈内を生理食塩水等で洗浄して血液や蛋白質類を洗浄し、その後リポソーム溶液を投与する必要があると考えられた。次にリポソーム投与後の類洞内皮組織での導入遺伝子の最大発現に要する時間の選定については、遺伝子の発現が予想よりも早く見られたことから、今後は投与後、経日的に肝類洞内皮細胞での発現遺伝子量、蛋白量、活性等を測定し、最大発現時間を選定する必要性が考えられた。一方、ヒト TMcDNA 発現ベクター封入膜融合リポソームの培養肝類洞内皮細胞への導入実験においては、遺伝子の導入効率と発現効率の問題を除けば大きな問題は無いものと考えられた。

今後は、既に準備を完了しているヒト TFPI 遺伝子発現ベクターやラット TM 遺伝子発現ベクターの膜融合リポソームによる導入実験を実施するとともに、LPS 投与敗血症モデルラットや肝部分切除ラット等に対する抗血栓因子遺伝子の導入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。また、標的組織や標的細胞内での遺伝子導入効率と遺伝子発現効率をさらに高めるためには、現段階では最適なベクターといわれるアデノウイルスベクターを用いた検討を行う必要性も考えられる。

D. 6 非ウイルスベクター類の安全性評価に関する研究

非ウイルスベクター類の安全性評価を検討するため、入手可能な各種モデルベクターを用いてヒト細胞パネルに対する遺伝子導入効率と毒性発現について検討した結果、有効性、安全性に関するパラメーターとして以下のことが明らかになった。

まずベクターの種類により安全性・有効性は大きく異なることが判明した。ベクターの組成の違い、チャージの違い、DNA 凝集試薬の使用の有無が遺伝子発現効率、毒性発現に大きな影響をもつためと考えられる。また、遺伝子発現効率は細胞間で差が極めて大きい、毒性発現における細胞間の差は有効性ほどではないことが明らかとなった。細胞によりベクター・DNA 複合体の取り込み量、取り込み方の違い、取り込まれた遺伝子の細胞内での存在状態や細胞内動態、遺伝子発現能、細胞増殖能等、各細胞

の性質が遺伝子発現、毒性発現に大きく関与すると考えられる。また、非ウイルスベクターによる遺伝子発現は個々の細胞に均一に起こるものではなく、遺伝子発現効率は遺伝子発現細胞数の増減に比例することが明らかとなった。今回は細胞に導入された遺伝子量を測定していないため、遺伝子導入量が個々の細胞で不均一であるのか、あるいは遺伝子導入レベルでは均一でも遺伝子発現レベルでは不均一となるのか不明であるが、遺伝子導入量と遺伝子発現量、毒性発現の関係については興味深い問題であり今後検討すべき課題と思われる。ベクターと DNA の比率（ベクター濃度）については、ベクター濃度が高いほど毒性は強くなるが、一方、遺伝子発現には最適混合比率があることが判った。これはチャージのバランス、毒性発現とのバランスから生じるものと思われる。さらに血清の影響はベクターの有効性、安全性において大きなファクターとなることが示された。血清存在下では細胞生存率は向上するが、遺伝子導入効率が大きく低下するベクターが多く、遺伝子発現が血清に影響されないベクターの場合、細胞の生存率も血清により改善されない傾向が認められた。今回用いたベクター濃度による毒性は急性の細胞膜傷害活性を引き起こすものではないが、細胞に吸着し、取り込まれたことによりベクターの毒性が発現することが示唆された。遺伝子導入のためには細胞内に大量に取り込まれる必要があるが、毒性発現のメカニズムを明らかにし、細胞内に取り込まれても毒性を発現しないデザインのものを検討する必要があると考えられる。

これらの結果をもとに、新規に開発する遺伝子治療用ベクターの評価方法について考察した。まず、遺伝子治療用ベクターとしては目的とする細胞において十分に有効な遺伝子発現が得られることが必要条件となる。そこで第一に標的細胞・組織を決め、標的細胞に対する有効性の評価を、遺伝子発現が高く、よく使用されているベクターを対照に実施し、導入効率の良いものを選択すべきであろう。細胞の性質が変わると効率も変わるため標的細胞が正常細胞であればできるだけ初代細胞を用いるべきであろう。ベクターの使用条件、すなわち *ex vivo* 遺伝子治療なのか、*in vivo* を目的とするのかによって血清を使用したり、作用時間等の条件も考慮して有効性の判定を行うべきである。次に、他の細胞についての有効性、安全性を検討していくことになる。導入効率の良いものについては、目標とする細胞と他の細胞とを比較し、ベクターの使用目的に応じてベクターの量、比率等の最適化を行うことに

より有効性と毒性のバランスをとることが必要と考えられる。ベクターの安全性評価方法としては、薬物の毒性評価に用いられるLDH assayではベクターの毒性を十分評価できないため、遺伝子発現が検出される時点での細胞生存率で評価していくことが必要であろう。

遺伝子治療薬は最終的には臨床で使用するものであることを考えると、このような *in vitro* での評価がどの程度 *in vivo* を反映できるかは非常に大きな問題である。*In vitro* のデータでは *ex vivo* 遺伝子治療の有効性・安全性を評価することは可能であっても *in vivo* については結果が全く異なることも考えられる。実際、遺伝子導入の有効性について *in vitro* と *in vivo* の成績が平行とはならないという例が数多く報告されている。*In vivo* での評価はもちろん最終的に不可欠なものであるが、*in vitro* において *in vivo* の成績をある程度予測・反映できるような *in vitro* 試験法の開発が必要と考えられる。ベクターを *in vitro* で評価する際、血清の影響が非常に大きい場合が多い。血清は *in vivo* において大きなファクターと考えられることから、例えばヒト新鮮血漿などを用いることにより *in vivo* の有効性、安全性を反映できる *in vitro* 試験法の開発を検討していく必要がある。またベクターの抗原性の問題（抗体産生・CTL 誘導・炎症性細胞の浸潤等の免疫誘導性）については *in vivo* でないと検討が困難な部分が多いと思われるが、細胞・組織傷害性、免疫細胞の活性化、溶血性、血液凝固性等については *in vitro* で評価を行うことも可能と考えられ、その評価方法については今後検討すべき課題と考えている。

E. 結論

本年度の研究により以下の結論を得た。

E. 1 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

1) より有効性、安全性が確保された遺伝子導入ベクターとしての膜融合リポソームの粒子設計を検討した。膜融合リポソームの調製法の変更によりさらに広範囲な生理活性物質が封入可能であること、また粒子径を増大させることにより、遺伝子封入量が増加し、結果として遺伝子発現効率を増強できること、比較的大きなサイズの遺伝子を導入できることが明らかとなった。一方、スベルミジン遺伝子とともに封入し細胞質内に導入することで、遺伝子の細胞内安定性が増大し、著しく遺伝子発現が増強されることが判明した。これらの方法により、膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有用

性・汎用性が向上できた。

2) VSV (Vesicular Stomatitis Virus) を利用した安全性の高い新規ベクターの開発を試み、VSV の特性をリポソームに付与した VSV-リポソームが作製でき、その有用性を示唆した。

E. 2 独立レプリコンの開発に向けた基礎研究

1) 染色体の安定化機構の一つとしてテロメア配列 (TTAGGG)_n を同定し、この DNA 構造がテロメア結合タンパク質の一つである hTRF1 との相互作用によって染色体の安定化に関与していることを明らかにした。

2) 動物細胞で染色体外に存在する DNA の安定性を、正確にかつ迅速に測定する系の開発に成功し、24 時間 (分裂 1 回) あたり 0.1 % の不安定性 (半減期 2 年間) を正しく測定できることを明らかにした。

3) 自立複製能を持ち染色体外に長期間安定に維持される新規エピソームベクターを作成するために必要となる、複製、安定性に寄与するヒト染色体断片の候補を取得した。

E. 3 導入遺伝子の核移行に関する研究

表面に核移行シグナルを持つ NLS ファージを使って、ファージ粒子内部の DNA を核に能動輸送し、組み込まれたマーカー遺伝子の発現を著しく増強することに成功した。またファージゲノム DNA を排除して任意のプラスミド DNA を頭部が小さい NLS ファージ頭部に組み込むことができるパッケージング大腸菌の作製に成功した。

E. 4 細胞質内での遺伝子発現系に関する研究

バクテリオファージの T7RNA ポリメラーゼとそのプロモーターを利用して細胞質内で遺伝子発現させることにより、導入遺伝子の核移行問題を回避すると共に、非増殖性細胞においても効率よく遺伝子発現させ得る細胞質内遺伝子発現系 (T7 発現系) の有用性を *in vitro* で評価した。pT7-IRES-L と T7RNA ポリメラーゼを細胞質内に導入することで、遺伝子導入後 6 時間という短時間で高い遺伝子発現が認められた。また、pT7 AUTO-2 を加えることにより遺伝子発現の増強および延長が確認できた。さらに、T7 発現系は、細胞の増殖性にかかわらず同等の効率で遺伝子発現可能であることが判明した、本 T7 発現系を利用することで、非増殖性細胞に対しても効率のよい遺伝子治療を行い得るものと期待された。

E. 5 術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究

術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療応用研究の基礎検討として、抗血栓性因子であるトロンボモジュリン遺伝子を膜融合リポソームを用いて肝類洞内皮細胞に *in vitro*, *in vivo* で導入し、遺伝子発現を確認した。

E. 6 非ウイルスベクター類の安全性評価に関する研究

非ウイルスベクター類を用いた遺伝子導入効率と毒性発現の関係を *in vitro* でヒト細胞パネルを用いて検討し、評価に資するパラメーター及び評価手法に関する有用な知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., and Mayumi T. : Tumor necrosis factor α -mediated tumor regression by the *in vivo* transfer of genes into the artery that leads to tumors., *Cancer Res.*, 58 : 5725-5730, 1998.
- 2) M. Nakanishi, H. Mizuguchi, K. Ashihara, T. Senda, T. Akuta, J. Okabe, E. Nagoshi, A. Masago, A. Eguchi, T. Akuta, Y. Suzuki, H. Inokuchi, A. Watabe, S. Ueda, T. Hayakawa and T. Mayumi: Gene transfer vectors based on Sendai virus., *Journal of Controlled Release*, 54, 61-68, 1998.
- 3) A. Watabe, T. Yamaguchi, T. Kawanishi, E. Uchida, A. Eguchi, H. Mizuguchi, T. Mayumi, M. Nakanishi and T. Hayakawa: Target-Cell Specificity of Fusogenic Liposomes: Membrane Fusion-Mediated Macromolecule Delivery into Human Blood Mononuclear Cells., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1416, 339-348, 1999.
- 4) M. Nakanishi, H. Mizuguchi, K. Ashihara, T. Senda, A. Eguchi, A. Watabe, T. Nakanishi, M. Kondo, T. Nakagawa, A. Masago, J. Okabe, S. Ueda, T. Mayumi and T. Hayakawa: Gene Delivery Systems Using the Sendai Virus., *Molecular Membrane Biology*, in press.

- 5) K. Miyake, S. Kimura, M. Nakanishi, A. Hisada, M. Hasegawa, S. Nagao and Y. Abe: Transforming growth factor-beta1 stimulates contraction of human glioblastoma cell-mediated collagen lattice through enhanced $\alpha 2$ integrin expression., *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, in press.
- 6) H. Mizuguchi, T. Nakanishi, M. Kondoh, T. Nakagawa, M. Nakanishi, T. Matsuyama, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, and T. Mayumi: Fusion of Sendai virus with liposome depends on only F protein, but not HN protein, *Virus Research*, in press.
- 7) Usui M, Hanamura N, Kuroda H, Higashiguchi T, Hayashi T, Suzuki K and Kawarada Y: Effect of prostaglandin I2 analog on expression of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells and in endothelial cells of the canine liver and spleen after extensive hepatectomy. (in submitted)
- 8) Yuasa H, Tanaka H, Hayashi T, Wakita T, Nakamura H, Nishioka J and Suzuki K: Bovine protein C inhibitor, which has a different reactive site amino acid residue from other species', transiently inhibits plasmin. (in submitted)
- 9) Hayashi T, Nakamura H, Okada A, Wakita T, Yuasa H, Nogami M, Okumura K and Suzuki K: Organization of human endothelial protein C receptor gene and its chromosome location.(in submitted)
- 10) Kunisawa J., Nakanishi T., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Fusogenic liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing humoral immune-responses to soluble antigen. 膜融合リポソームによる体液性免疫誘導増強, *Drug Delivery System*, 13 : 21 - 26, 1998.
- 11) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Fusogenic liposome directs an exogenous antigen into class I major histocompatibility complex antigen-presenting pathway. 膜融合リポソームを用いた外来性抗原の MHC class I 分子を介する抗原提示, *Drug*

- Delivery System, 13 : 27 - 33, 1998.
- 12) Suzuki R., Nakagawa T., Mizuguchi H., Imazu S., Nakanishi T., Nakagawa S., Nakanishi M., and Mayumi T. : The optimization of cytoplasmic gene expression system with T7 RNA polymerase. T7 RNA polymerase を利用した細胞質内遺伝子発現系の最適化, Drug Delivery System, 13 : 87 - 93, 1998.
 - 13) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Enhancement of liposomal adjuvant actions for tumor vaccines by increasing the degree of positive surface charge. リポソームの陽電荷密度上昇による腫瘍ワクチン用アジュバント効果増強, Drug Delivery System, 13 : 151 - 157, 1998.
 - 14) Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Hayakawa T., Uemura H., Yamada O., and Mayumi T. : Development of VSV-liposomes as a novel gene transfer vector. VSV を利用した新規遺伝子導入ベクターの開発, Drug Delivery System, 13 : 159 - 164, 1998.
 - 15) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., and Mayumi T. : Cationization of liposome surface charge enhances adjuvant effect of liposomes for tumor vaccine. リポソームのカチオン化による腫瘍ワクチン用アジュバント効果増強, J. Pharm. Sci. Technol. Jpn., 58 : 59 - 68, 1998.
 - 16) 中西真人、水口裕之：膜融合リポソームによる細胞内への物質導入, 日本薬理学会雑誌 (Folia Pharmacology of Japan), 112, 299-305, 1998.
 - 17) 中西真人：膜融合リポソームによる細胞内遺伝子導入法, 日本臨床, 56, 713-717, 1998.
 - 18) 岡部潤、中西真人：テロメア・テロメラーゼ, 炎症と免疫, 6, 591-597, 1998.
 - 19) 岡部潤、中西真人：テロメア・シーディング, 組織培養工学, 24, 562-566, 1998.
 - Hayakawa, T. and Mayumi, T.: Gene Delivery System Using Sendai Virus. Internal Symposium Membrane Fusion: Mechanisms and applications to Cell biology, Drug Delivery and Gene Therapy, Salamanca, Spain, 1998.
 - 2) Nakanishi, M., Akuta, T., Eguchi, A., Okuyama, H., Suzuki, Y., Takeda, K., Hasegawa, M. and Inokuchi, H.: Enhancement of Gene Expression by Nuclear Targeting of DNA: Recombinant NLS-Lambda Phage System. Keystone Symposia, Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy, Salt Lake City, USA, 1999.
 - 3) Okabe, J. and Nakanishi, M.: Molecular and Cellular Factors Required for Human Telomere Formation. Cold Spring Harbor Meeting, Telomere and Telomerase. Cold Spring Harbor, USA, 1999.
 - 4) 今津進, 米屋由理, 中西剛, 水口裕之, 堤康央, 早川堯夫, 真弓忠範: プラスミドベクターが及ぼすDNA ワクチンの免疫誘導能への影響, 日本薬学会第 118 年会, 京都, 1998 年 4 月.
 - 5) 鈴木亮, 中川哲彦, 水口裕之, 堤康央, 久保一義, 中川晋作, 中西真人, 早川堯夫, 真弓忠範: 遺伝子発現効率増強を目差した膜融合リポソームの改良, 第 14 回日本 DDS 学会, 横浜, 1998 年 7 月.
 - 6) 中川哲彦, 鈴木亮, 水口裕之, 堤康央, 久保一義, 中川晋作, 中西真人, 早川堯夫, 真弓忠範: 膜融合リポソームを用いた細胞質内遺伝子発現系の確立, 第 14 回日本 DDS 学会, 横浜, 1998 年 7 月.
 - 7) 中西真人: 組織・細胞へのアクセス: 各種細胞の表面特性とターゲティング, 第 14 回日本 DDS 学会総会, 横浜, 1998 年 7 月.
 - 8) 岡部潤、中西真人: 染色体を安定化するテロメアの機能に必要な要素の解析, 第 21 回日本分子生物学会総会, 横浜, 1998 年 12 月.
 - 9) 中西真人: 遺伝性難病の遺伝子治療のための新規ベクター系の開発, 第 10 回内藤コンファレンス, 逗子, 1998 年.
 - 10) 中西真人: Nuclear Targeting of DNA Using Lambda Phage Particle, 日本薬学会第 119 年会,

2. 学会発表

- 1) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Eguchi, A., Watabe, A.,

徳島、1999年3月。

- 11) 湯浅浩行、臼井正信、三枝章太郎、久米正根、川原田嘉文、林 辰弥、鈴木宏治：LPS投与時の肝および類洞内皮細胞の抗血栓性低下機序の解析。日本外科学会、1999年3月。
- 12) 湯浅浩行、林 辰弥、鈴木宏治、山際健太郎、田岡大樹、伊佐地秀司、横井 一、川原田 嘉文：重症感染症時における肝類洞内皮細胞でのプロテイン S (PS) 産生の変動。日本 Shock 学会、1999年5月発表予定。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

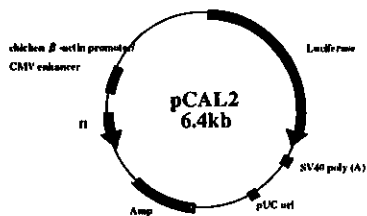


Fig. 1 Structure of luciferase expression plasmid pCAL2

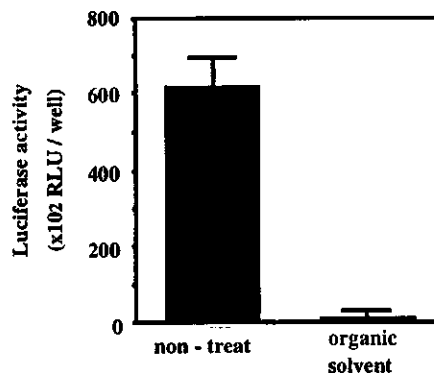


Fig. 3 Effect of organic solvent treatment on T7 RNA polymerase activity

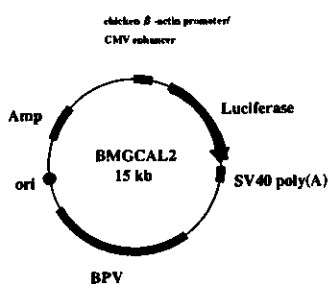


Fig. 2 Structure of luciferase expression plasmid BMGCAL2

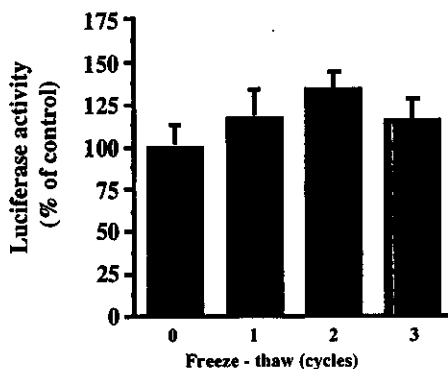


Fig. 4 Effect of Freeze and thaw on T7 RNA polymerase activity

Table 1 Effect of fusogenic liposome preparation method on encapsulated concentration

Sizing filter	Encapsulated concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{OD}$)		
	Reverse-phase evaporation method	Bangham method	Freeze and thaw method
0.4 μm	1.46 \pm 0.29	0.38 \pm 0.28	1.43 \pm 0.18
0.8 μm	4.43 \pm 0.61	1.43 \pm 0.31	6.16 \pm 0.33

Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

Table 2 Effect of fusogenic liposome preparation method on gene expression

Sizing filter	Luciferase activity (RLU / μg protein)		
	Reverse-phase evaporation method	Bangham method	Freeze and thaw method
0.4 μm	4054 \pm 963	270 \pm 57	1776 \pm 422
0.8 μm	4071 \pm 1188	573 \pm 116	3786 \pm 1445

LLCMK2 T7(-) cells were transfected for 30min by the fusogenic liposomes containing pCAL2. After 2days, luciferase activity was measured. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

Table 3 Effect of plasmid size on encapsulated concentration and gene expression

Plasmid DNA	Sizing filter	Encapsulated conc.($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{OD}$)	Luciferase activity(RLU/ μg protein)
pCAL2 (6.4kb)	0.4 μm	1.43	1776 \pm 422
	0.8 μm	6.16	3786 \pm 1445
BMGCAL2 (15kb)	0.4 μm	0.86	747 \pm 99
	0.8 μm	5.10	1763 \pm 462

LLCMK2 T7(-) cells were transfected for 30min by the fusogenic liposomes containing pCAL2 or BMGCAL2. After 2days, Luciferase activity was measured. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments.

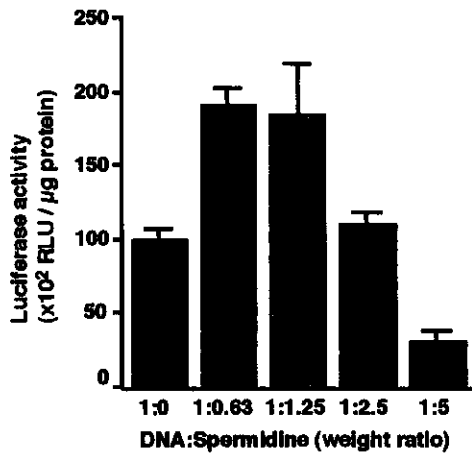


Fig. 5 Effect of spermidine on gene expression

Table 4. Effects of exogenous Flag-hTRF1 on telomere seeding

Cell line	Telomere seeding, % (Tel. / Exam.)
HeLa-MJ	79 (41/52)
HeLa-LT	36 (9/25)
Flag-hTRF1 overexpressed cells derived from HeLa-LT cells	
TX1	81 (21/26)
TX34	83 (35/42)
TX36	73 (19/26)

Each cell line was transfected with pMYAC and incidence of telomere seeding was determined by DNA blotting.

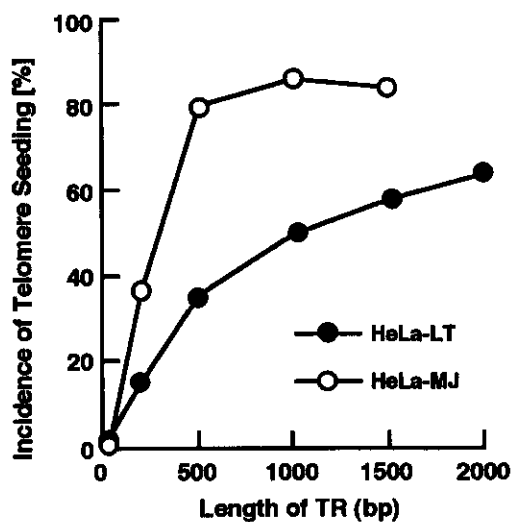


Fig. 6 テロメア配列 (TTAGGG)_nの長さが染色体末端の安定性に与える影響

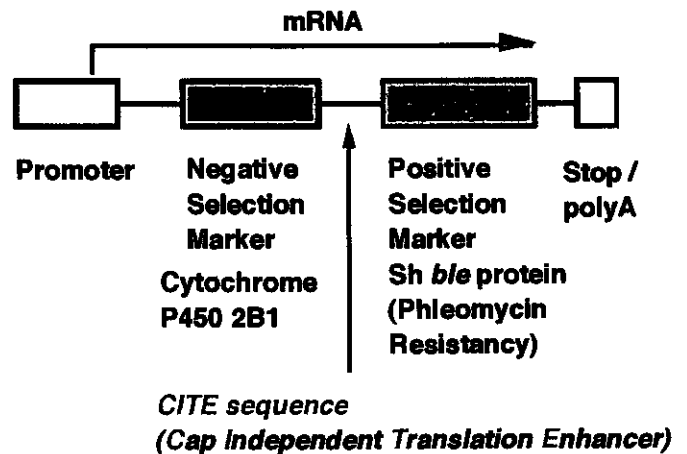
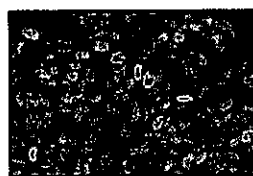


Fig. 8 完成したネガティブ・ポジティブ選択ベクター

A. Immunofluorescent microscopy analysis



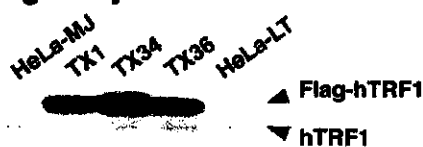
Flag-hTRF1 expressed cell line (TX34)



negative control (HeLa-LT)

HeLa-LT cells were transfected with a Flag-TRF1 expression vector, and three clonal cell lines (TX1, TX34 and TX36) were established. Uniform expression of Flag-hTRF1 in established cell lines was confirmed by immunofluorescent microscopy using anti-Flag monoclonal antibody.

B. Protein blotting analysis



Whole-cell extracts from cell lines were analyzed using anti-TRF1 antibody.

Fig. 7 Establishment of Flag-hTRF1 overexpressed cell lines

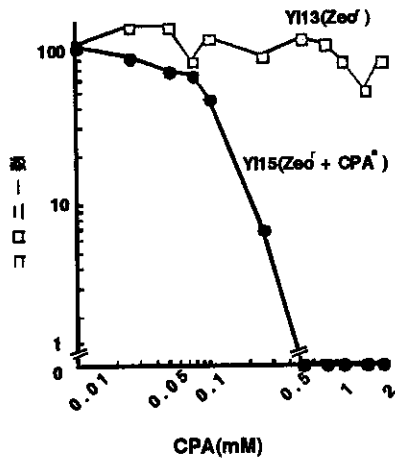


Fig. 9 YI-13, YI-15に対する Cyclophosphamideの毒性

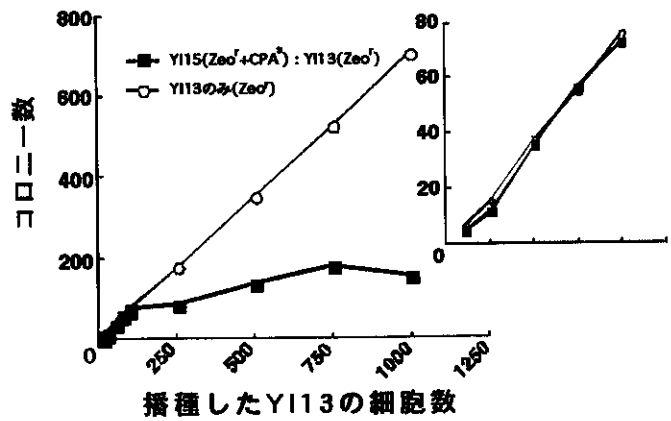


Fig. 10 YI-13, YI-15による条件検討(2)

Table 5 YI-13, YI-15による条件検討(1)

YI15 : YI13	コロニー数	YI15 : YI13	コロニー数
10 ⁶ : 100	0	10 ⁶ : 0	0
10 ⁵ : 100	0	10 ⁵ : 0	0
10 ⁴ : 100	74	10 ⁴ : 0	2
10 ³ : 100	64	10 ³ : 0	1
0 : 100	79		

Table 6 ネガティブ・ポジティブ選択法を用いたEBV複製系の安定性の検討

	CPA耐性の コロニー数 実測値	最初に 播いた 細胞数	プラスミドの 脱落率	1回の分裂 あたりの 脱落率
24h	29	41	10 ³	4.1%
48h	43	61	10 ³	3.1%
72h	92	131	10 ³	3.3%

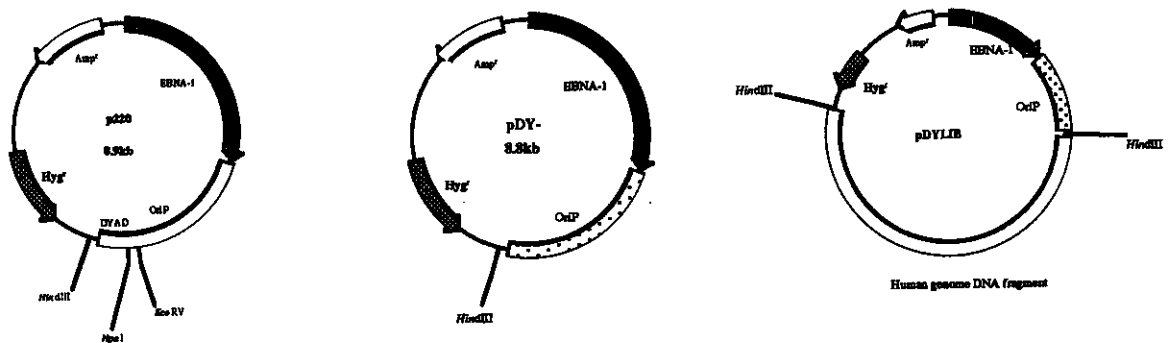


Fig. 11 Structure of EBV plasmids p220, pDY- and pDYLIB

Table 7 Resistant colony formation of 293 cells transfected with EBV plasmids

	Colony formation (Hygromycin B 200µg/ml)	
	Dish 1	Dish 2
pDYLIB	>73	>76
p220	0	0
pDY-	4	1

Table 8 Colony formation of EBV rescue plasmids

plasmid	Colony formation	
	293	HeLa
p220	2.3 ± 6.9	43.3 ± 5.8
pDY-	0.7 ± 0.5	13.0 ± 3.6
pDYLIB-Re23	42.3 ± 6.9	160.7 ± 6.1
pDYLIB-Re130	55.3 ± 18.5	102.0 ± 6.5

Data were mean of 3 dishes

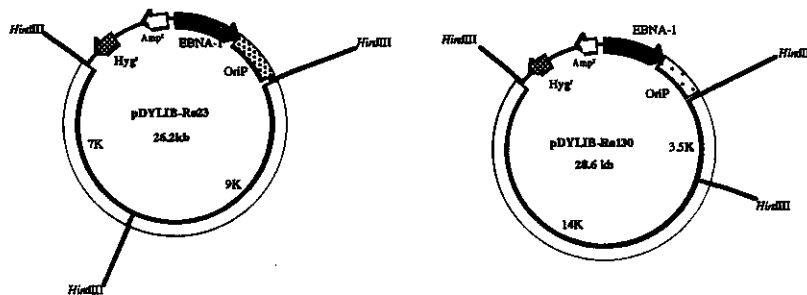


Fig. 13 Structure of EBV rescue plasmids

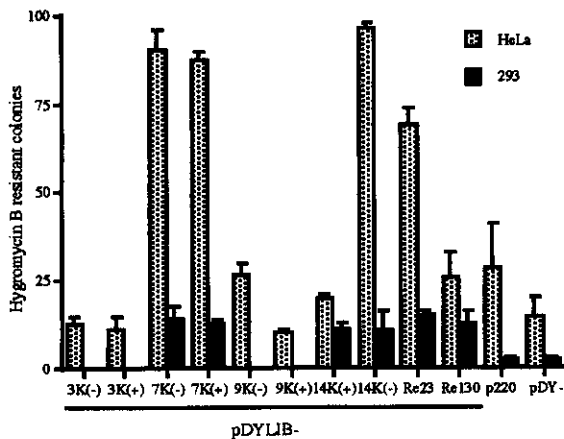


Fig. 14 Colony formation assay for EBV plasmids containing human fragments

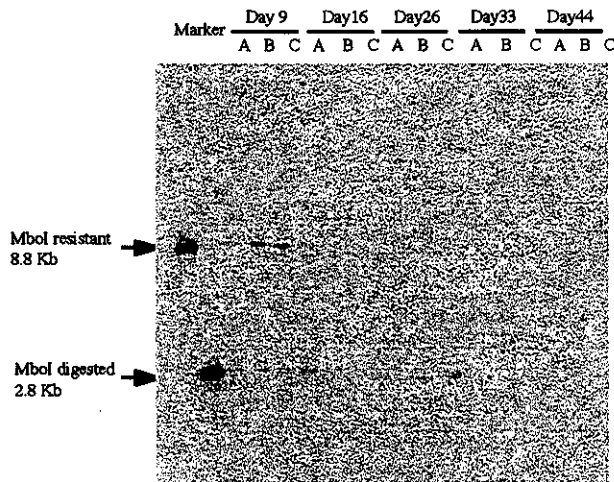


Fig.12 Southern blot analysis of long-term replication of EBV plasmids in 293 cells

293 cells were transfected with pDYLIB, p220 and pDY-, and place under hygromycin B selection. Hirt extracted episomal DNA were digested with MboI and Southern blot analysis was performed with probe of 2.8Kb EBNA-1 fragment

A : pDYLIB ; B : p220 ; C : pDY-

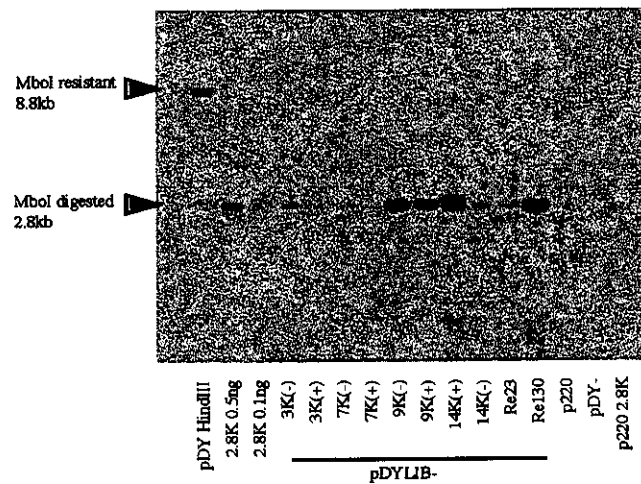


Fig. 15 Southern blot analysis of replication of EBV plasmids containing human fragment in HeLa cells

a

MYDDEATADSQHSTPPKPKRKRKVEDPKDFESELT **LVMTSK**
 SV40LargeT antigen NLS gpD

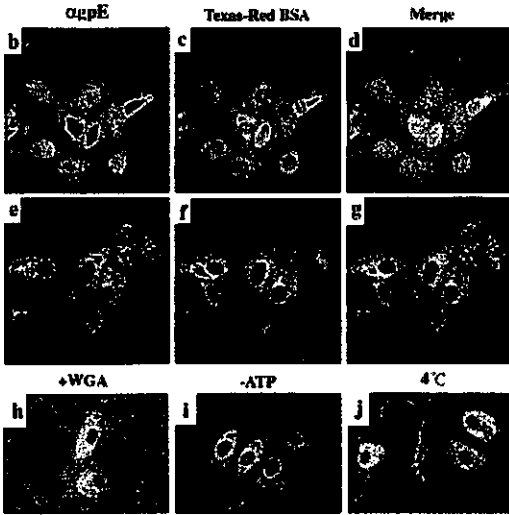


Fig. 16 NLSファージの核移行

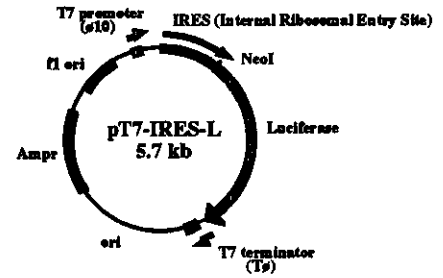


Fig. 19 Structure of luciferase expression plasmid pT7-IRES-L

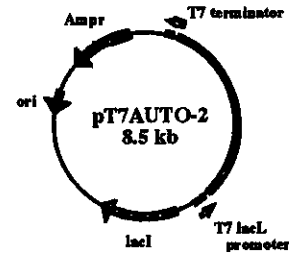


Fig. 20 Structure of T7 RNA polymerase expression pT7 AUTO-2

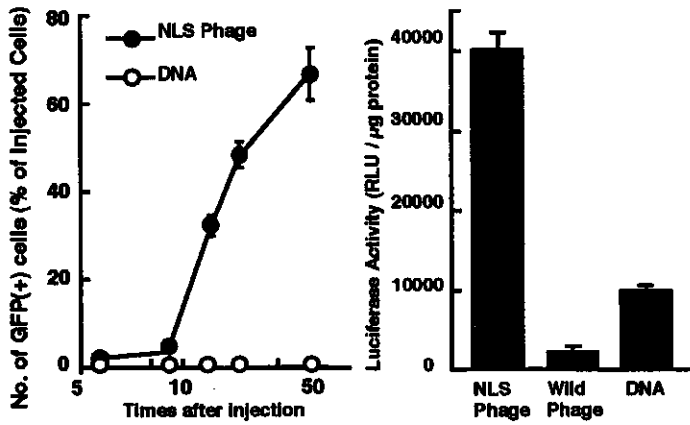


Fig. 17 Effect of NLS on gene expression

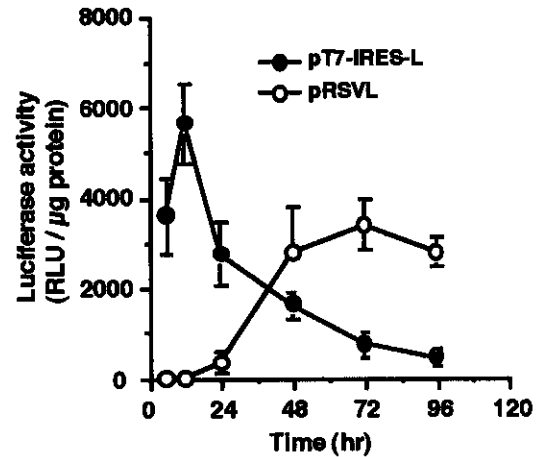


Fig. 21 Luciferase activity in LLCMK2 T7(+) cells transfected with lipofectin

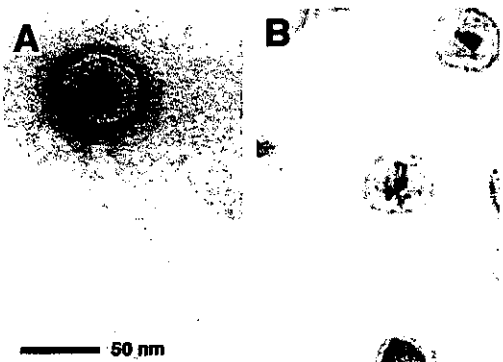


Fig. 18 野生型ファージ (A) と EdefK562, NLS-D, Hdel112変異ファージ (B)

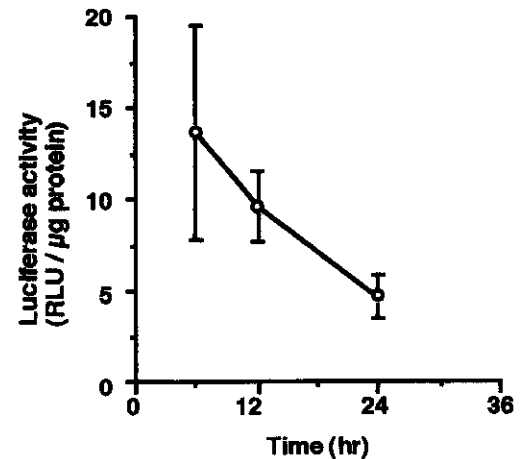


Fig. 22 Luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells transfected with pT7-IRES-L and T7 RNA polymerase

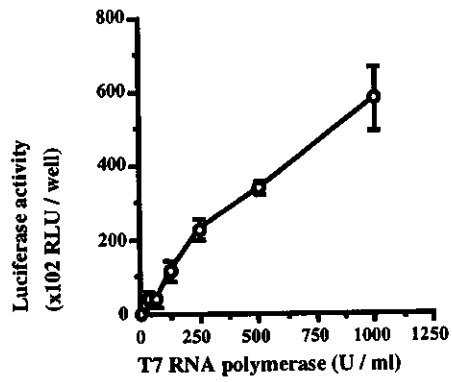


Fig. 23 Effect of T7 RNA polymerase on luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells

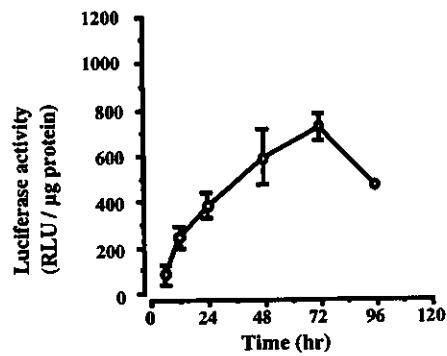


Fig. 24 Luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells transfected with pT7-IRES-L and pT7 AUTO-2

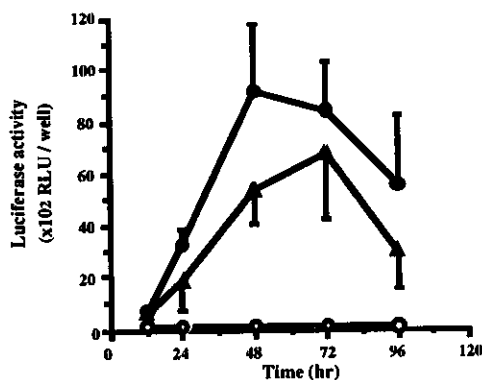


Fig. 25 Effect of pT7 AUTO-2 concentration on luciferase activity in LLCMK2 T7(-) cells
LLCMK2 T7(-) cells were incubated with complexes of lipofectin (5µg/ml), pT7-IRES-L (0.14µg/ml), pT7 AUTO-2 (0.1 (○), 0.29 (△), 0.86 (●) µg/ml) and T7 RNA polymerase (125U/ml) at 37°C for 3h. Each point represent the mean ± S.D. of three experiments.

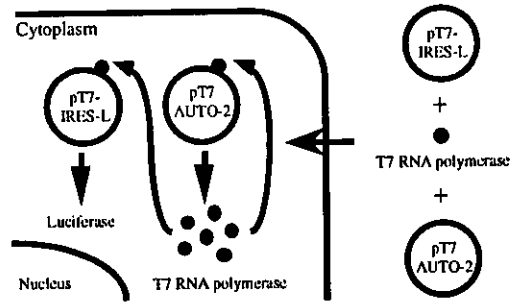


Fig. 26 Schematic representation of cytoplasmic T7 system

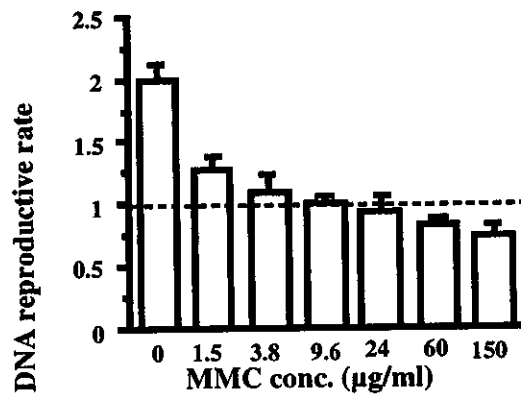


Fig. 27 Inhibition of cell proliferation in BAEC cells treated with MMC

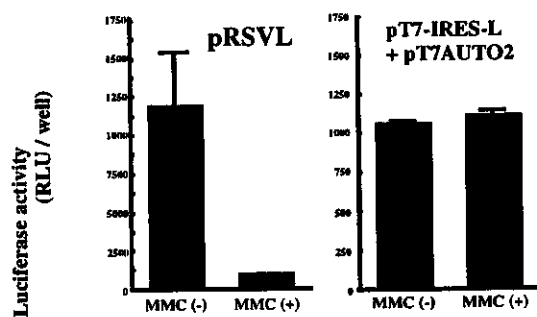


Fig. 28 Luciferase activity in BAEC treated with MMC

	1						60
Rat TM	MLGVFLLGVL	APAGLGISAL	AKLQPKGSQC	VGNECFALFQ	DPVTFILDASQ	ACQRLQGHLM	
Mouse TM	MLGIFFLGVL	APASLGLSAL	AKLQPTGSQC	VEHECFALFQ	GPATFLDASQ	ACQRLQGHLM	
Human TM	MLGVLVLGAL	ALAGLGFPAP	AEPQPGGSQC	VEHDCFALYP	GPATFLNASQ	ICDGLRGHLM	
Bovine TM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	61						120
Rat TM	TVRSSVAADV	ISLLVS-DSS	MDSR-PWIGL	QLPQGCQDPV	HLGPLRGFQW	VTGDNHTSYS	
Mouse TM	TVRSSVAADV	ISLLLS-QSS	MDLG-PWIGL	QLPQGCDDPV	HLGPLRGFQW	VTGDNHTSYS	
Human TM	TVRSSVAADV	ISLLLLNGDGG	VGRRRLWIGL	QLPPGCQDPK	RLGPLRGFQW	VTGDNHTSYS	
Bovine TM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	121						180
Rat TM	RWARPNQSP	LCGPLCVTV	STATEAAPGE	PAWEEKPCEN	ETKGFLECFY	FAAFRCPLRV	
Mouse TM	RWARPNQTAP	LCGPLCVTV	STATEAAPGE	PAWEEKPCET	ETQGFLECFY	FTASCRPLTV	
Human TM	RWARLDLNGAP	LCGPLCVAV	SAAEATVPSE	PIWEEQOCEV	KADGFLECFH	FPATCRPLAV	
Bovine TM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	181						240
Rat TM	NTRDPEGAHI	SSTYNTPLGV	SGADFQTLPI	GSSATVAPFG	LELVCRALFG	TSEGHWTREV	
Mouse TM	NTRDPEAAHI	SSTYNTPLGV	SGADFQTLPI	GSSAAVEPLG	LELVCRAPFG	TSEGHWAWEA	
Human TM	EP-GAAAAAV	SITYGTPFAA	RGADFQALPV	GSSAAVAPLG	LQLMCTAPFG	AVQGHWAREA	
Bovine TM	-----	-----	-----	-----	-----RGARF	ETEGFWSREA	
	241						300
Rat TM	TGAWNCSVEN	GGCEYMCNRS	ANGPFCVCP	GGDLQADGRS	CAKPAVQLCN	ELCEHFQVNN	
Mouse TM	TGAWNCSVEN	GGCEYLCNRS	TNEPFCVCP	DMDLQADGRS	CARPVVQSCN	ELCEHFQVSN	
Human TM	PGAWDCSVEN	GGCEHACNAI	PGAPFCVCP	GAAALQADGRS	CFASATQSCN	DLCDFHFQVNP	
Bovine TM	PGAWACGVER	GGCEHECKGS	AGASNCLCP	DAALQADGRS	CGLPAEHFCH	QLCEHFQHLH	
	301						360
Rat TM	SDVFGSYSCM	CEIGYQLAAD	QHRCEVDVDDC	KQGFNCPQL	CVNTEGGFEC	RCYDGYELVLD	
Mouse TM	AEVFGSYSCM	CEIGYQLAAD	QHRCEVDVDDC	KQGFNCPQL	CVNTEGGFEC	FCYDGYELVLD	
Human TM	PDQFGSYSCM	CEIGYRLAAD	QHRCEVDVDDC	ILESPCPQR	CVNTEGGFEC	HCYPNVDLVD	
Bovine TM	G--LGNITCI	CEAGYQLAAD	QHRCEVDVDDC	AQLSPCPQR	CVNTEGGFEC	HCYDGYELVLD	
	361						420
Rat TM	GECVEQLDPC	FRSKCEYQCC	EVNSTHYMCI	CAEGFAEKLD	DFDRCEMFCN	ETSCPADCDF	
Mouse TM	GECVELLDPC	FGSNCEYQCC	EVSPDYRCCI	CAPGFAKPD	EPHKCEMFCN	ETSCPADCDF	
Human TM	GECVEPVDPC	FRANCEYQCC	ELNQTSYLCV	CAEGFAILPH	EPHRCCEMFCN	QTACPADCDF	
Bovine TM	GECVDPVDPC	FDNNECEYQCC	EVGRSEHKCI	CAEGFAVPG	APHKCEMFCN	QTSCPADCDF	
	421						480
Rat TM	NSPSFCCEPE	GVILDEGSIC	TDIDECSSQGE	CLTNECRNLP	GSYECICGPD	TALAGQISKD	
Mouse TM	NSPTVCECPE	GVILDEGSVC	TDIDECSSQGE	CFTSECRNFP	GSYECICGPD	TALAGQISKD	
Human TM	NTQASCECPE	GVILDDGFIC	TDIDECENGG	FCSGVCHNLP	GTFCICGPD	SALARHIGTD	
Bovine TM	HYPTICRCPE	GVILDEGSIC	TDINECDTN-	ICPGCHNLP	GTFCICGPD	SALSGQIGTD	
	481						540
Rat TM	CDPIPVLEDS	----EDGSG	EPFSSNPTVV	SSTVE-ES-A	RPMHSGVLLG	ISIASLSLVV	
Mouse TM	CDPIPVREDT	K---EEEGSG	EPFVS-PTPG	SPTGE-ES-A	RPVHSGVLLG	ISIASLSLVV	
Human TM	CD--SGKVDG	----GDSGSG	EPFVS-PTPG	STLTF-PA-V	GLVHSGVLLG	ISIASLCLVV	
Bovine TM	CDPTQVNEER	GTPEDYGGSG	EPFVS-PTPG	ATARESEAPA	GPLHSGVLLG	ISIASLSLVV	
	541						585
Rat TM	ALLALLCHLR	KKQGAFAEL	EYKCTSSAKE	VVLQHMRTDR	TLCKF		
Mouse TM	ALLALLCHLR	KKQGAFAEL	EYKCASSAKE	VVLQHMRTDR	TLCKF		
Human TM	ALLALLCHLR	KKQGAFAAKM	EYKCAAPSKE	VVLQHMRTDR	TLCKL		
Bovine TM	ALLALLCHLR	KKQGAFAEGL	EYKCGVPAKE	LMLQVMKTER	TLCKL		

Fig.29 Comparison of amino acid sequences of rat, mouse, human and bovine thrombomodulin

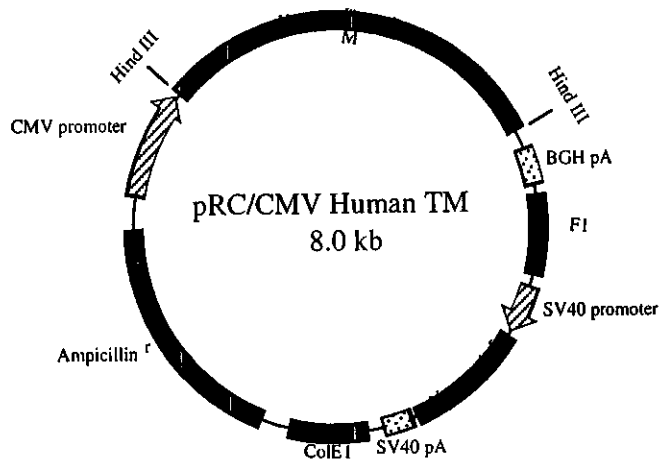


Fig. 30 Expression vector of human thrombomodulin

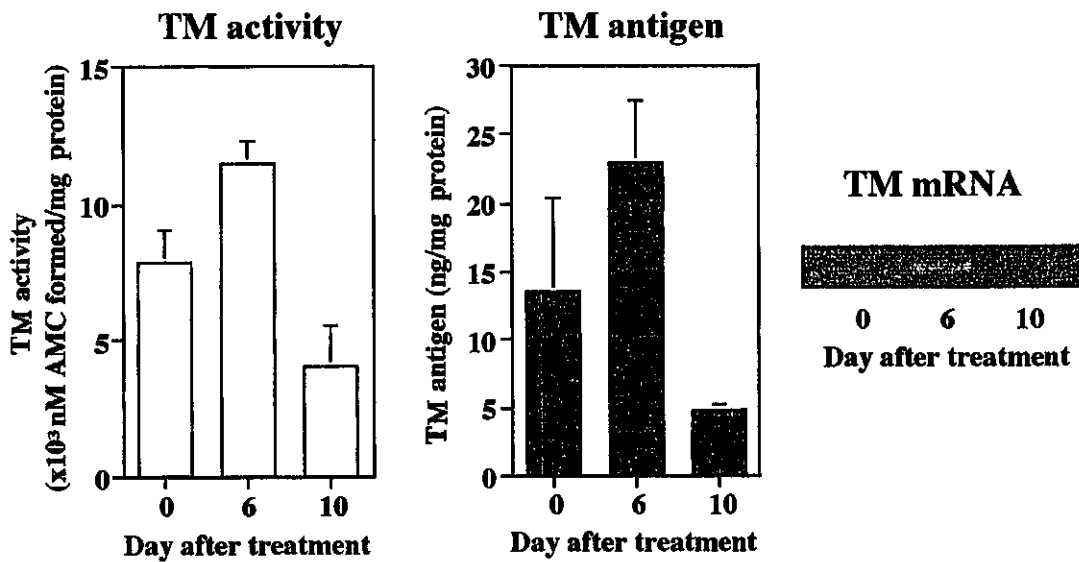


Fig. 31 Effect of fusogenic liposome containing human TM expression vector in the in vivo studies.

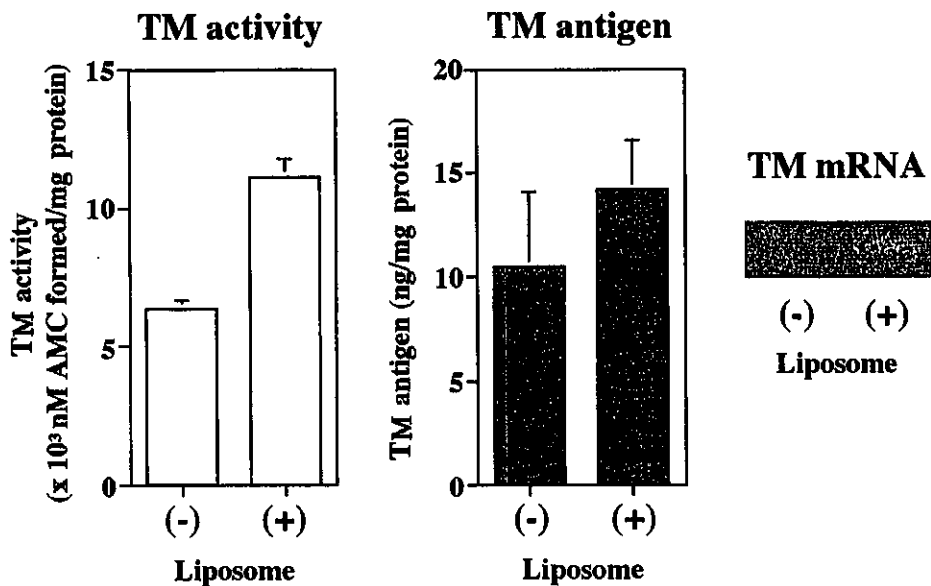


Fig. 32 Effect of fusogenic liposome containing human TM expression vector in the in vitro studies.

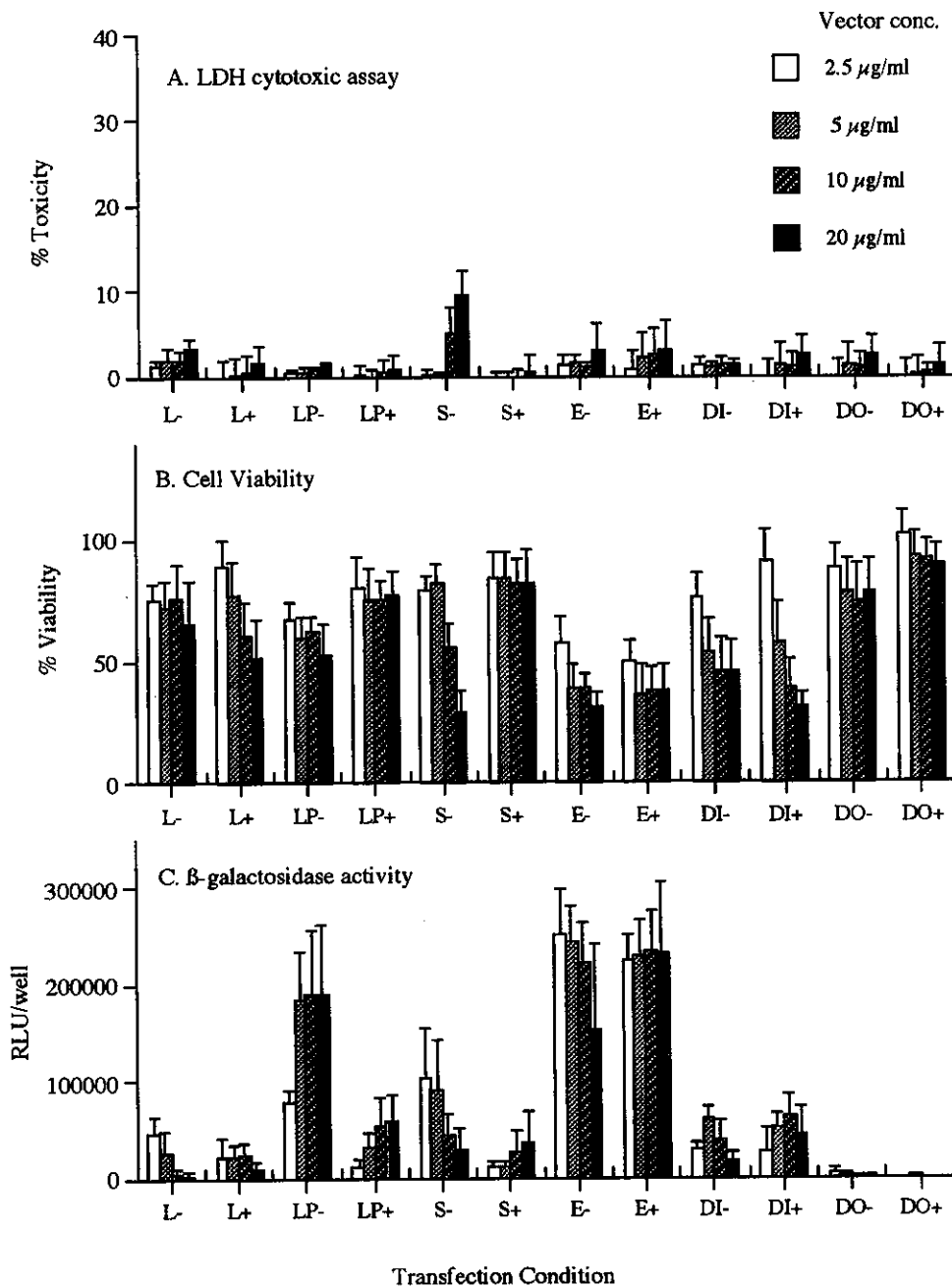


Fig. 33 Comparison of toxicity and transfection efficiency of various transfection reagents on HeLa cells

L: Lipofectin; LP: Lipofectamine Plus; S: Superfect; E: Effectene; DI: DIMRIE-C; DO: DOTAP
 -: Serum free; +: 10% serum

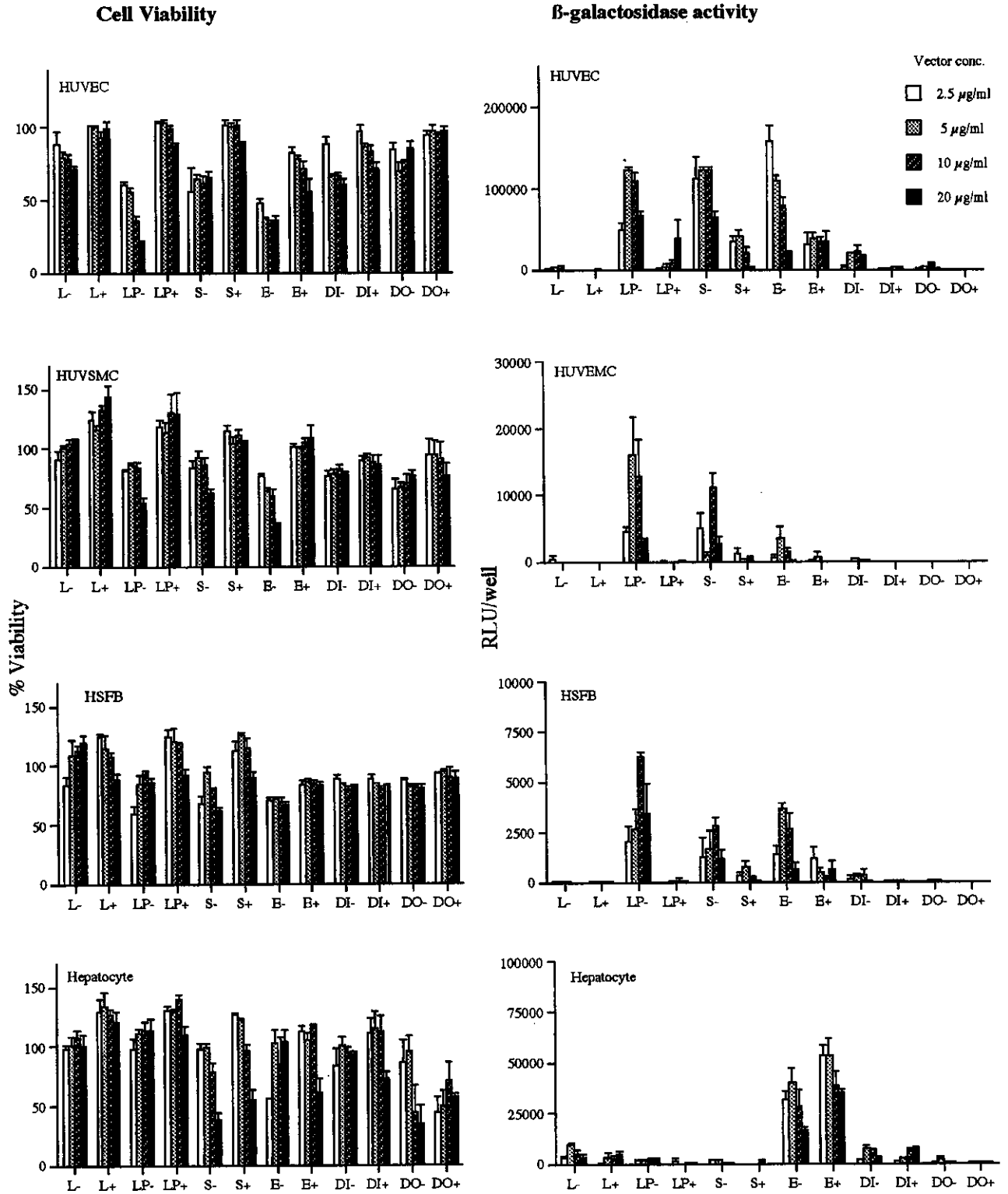


Fig. 34 Comparison of cell viability and transfection efficiency of various transfection reagents on human primary cells