

平成11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12年 4月

主任研究者 中村 伸
(京都大学霊長類研究所)

平成11年度厚生省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

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所）

研究課題：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）

報告書もくじ	頁
・総括研究報告書	-----1～4
・分担研究報告書（中村・清水班）	-----5～8
・分担研究報告書（今村班）	-----9～10
・分担研究報告書（恵美・安倍班）	-----11～14
・分担研究報告書（植田班）	-----15～17
・研究報告書追補（主な関連発表論文）	-----18 以降

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 11 年度総括研究報告書

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。

非ウイルス性の遺伝子導入担体（ベクター）および導入方法として、リポソームベクター、アテロコラーゲンおよび遺伝子銃を特定し、サル（カニクザル、ニホンザル、コモンマーモセット）モデルでのレポーター（GFP）遺伝子の遺伝子導入効率、発現性など、ベクター・導入法の有効性の評価・解析系の確立を目指した。同時に、Th1/Th2 バランス、抗体産生、炎症応答、血球動態、母子移行等の安全性の評価・検討も進めた。さらにサル培養細胞での遺伝子導入効率、核 DNA への挿入、細胞内分布や半減期、細胞性状への影響など、細胞レベルでの有効性、安全性の評価実験系も検討した。

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）、安部明弘（名古屋大学医学部医員）、植田昌宏（株）エスアールエル検査本部担当部長

研究目的：

サル類（新世界ザル、旧世界ザルおよび類人猿）の免疫-止血などの生体防御系、解毒-代謝系、組織・細胞の構造と機能、病原微生物に対する感染感受性、ライフスパンあるいは脳神経系などはヒトのそれらに類似している。しかしながら、サル類のこうした医生物学的特性は種によって大きく異なることがある。そのため、サルモデルでのバイオメディカルな研究においては、サル種間での医生物学的特性を熟知し、目的に合致したサルモデルの選択が重要である。

本研究ではこれまでの経験を活かし、ベクターの安全性、有効性を評価・検討するためのサル類の種類やその反応系を明らかにしながら、サルモデルでの新たな評価・試験系の確立を目指す。その目的に沿って、新世界ザル、旧世界ザルおよび類人猿の代表種（コモンマーモセット、ニホンザル、カニクイザル、チンパンジー）について、非ウイルス性ベクターを用いて、培養細胞系(in vitro)およびサルモデル系 (in vivo) の双方から展開する。

研究成果：

上記の研究目的に沿って、今年度は以下のような研究成果を得た。

中村/清水；サルモデルでの遺伝子治療・遺伝子ワクチン研究を展開するために、ベクター・遺伝子導入法の導入効率や発現性、安全性（Th1/Th2 バランス、抗体産生、炎症応答、血球動態、母子移行等）の評価・検討系を確立した。次いで、非ウイルス性のベクター・遺伝子導入法としてリポソームベクター、アテロコラーゲンおよび遺伝子銃を試み、上記の評価・検討系に基づいて、それら3者の有効性と安全性を比較解析した。さらに、実用的な視点でのベクター・導入方法の評価系を検討する目的で、サルBウイルスに対する遺伝子ワクチンの準備実験を展開した。

今村；GFP plasmid のみ、lipid/GFP plasmid、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、炎症を各々で組織学的に調べた。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学的に比較・検討した。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いずれも安全性が高く、VSVG/lipid/GFP plasmid は発現有効性が三者のなかで最も高いことが示された。

恵美/安倍；遺伝子免疫療法あるいは遺伝子ワクチンの臨床的展開を目指して、強力な発現ベクターを構築し、免疫方法として遺伝子銃の免疫への応用を検討した。この研究結果を基に、霊長研でおこなわれるサルモデル系でのベクターの安全性、有効性の評価・試験法のサポートを進める。

植田；pEGFP-C1の場合、発現したGFPは核および細胞質全体に移行し、導入1日後にもっとも強かった。導入された細胞は、その後の分裂も阻害されず、細胞活性は非導入細胞とほぼ同じ期間維持されていると考えられた。ベクターが導入された細胞から、非導入細胞へのベクターの再導入は、たとへ相互に接着していても認められなかった。

pCMV-VSVGの場合、糖タンパク合成の典型的パターンが確認された。すなわち、発現したVSVG蛋白は核へは移行せず、おそらくゴルジ装置をとって糖が付加され、細胞膜上に挿入され蓄積されていると考えられる結果であった。しかし、このようにベクターが導入され、細胞膜上に糖の修飾を受けた発現蛋白が蓄積された細胞の活性度（分裂能や生残期間等）については確認できなかった。長期間にわたっての経時的観察が必要である。

さらに、蛍光法による解析データはやや主観的である。それゆえ今後、遺伝子導入された細胞に発現するmRNAの定量的検出法、neutral red の取り込み、排出を指標にした細胞性状の解析法を検討し、培養細胞レベルでのベクターの有効性、安全性の評価系の確立を図る。

F. 研究発表

F.Mitsunaga, S.Nakamura, M.Hirano, et al : Transfer Efficiency of GFP-Gene Using VSV-G Liposome Vector in Monkey Model, Gene Therapy (submitted).

M. Hirano, S. Nakamura, M. Okada, et al : Rapid Discrimination of Monkey B Virus from Human Herpes Simplex Viruses by PCR in the Presence of Betaine, J. Clin. Microbiol., 38: 1255-1257 (2000).

H. Todoroki, S. Nakamura, A. Higure, K. Okamoto, S. Takeda, N. Nagata, H. Itoh, K. Ohsato: Tissue Factor Expression in Monkey and Human Neutrophils, Surgery, 127 : 209-216 (2000) .

K. Abe, T. Inami, S. Nakamura, S. Goto : TT Virus Infection in Non-human Primates and Characterization of Virus Genome : Identification of Simian TT Virus Isolates, J. Virol., 74: 1549-1533 (2000).

中村 伸 : 膜結合性組織因子、検査と技術、28 : 91-93 (2000).

中村 伸, 平野 真, 光永総子, 清水慶子: 霊長類モデルでの遺伝子治療研究—特に遺伝子ワクチン研究を中心に, ファルマシア, 36 : 127-130 (2000) .

平野 真, 光永総子, 清水慶子, 中村 伸 : 霊長類などへの遺伝子導入—B ウイルス DNA ワクチンの開発、遺伝子治療入門 (斉藤英彦、吉田 純編、名古屋大学出版会) (印刷中)

Mitsunaga, S. Nakamura, K. Shimizu, et al : Studies on a Gene Transfer Vector in Non-Human Primates, Primate Res., 15:365 (1999).

S. Nakamura, F. Mitsunaga, K. Shimizu, et al : Assessment of Gene Transfer Using A Non-Viral Liposome Vector in Monkey Model, Nature Biotechnology, 17: 39 (1999).

中村志帆, 光永総子, 中村 伸 : サルの安全な取扱いのために : 感染リスクの対応手引き、霊長類研究, 15 : 377--394 (1999).

H. Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, K. Misumi, k. Takazoe, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S. Nakamura, I. Tsuji, K. Kumeda : Heightened Tissue Factor Associated with Tissue Factor Pathway Inhibitor and Thrombin Generation in Patients with Unstable Angina, Circulation, 99: 2908-2913 (1999).

C. Hine, K. Enjyoji, K. Kokame, S.

Nakamura, A. Takai, Y. Kamikubo, K. Sueishi, H. Kato: Monkey Hapatocytes Efficiently Express Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), in Contrast with Human and Rat Hepatocytes, J. Biochem., 125: 1039-1047 (1999).

H. Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, k. Takazoe, K. Nishiyama, K. Misumi, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S. Nakamura: Angiotensin- Converting Enzyme Inhibition Reduces Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Tissue Factor Levels in Patients with Myocardial Infarction, J. Am. Coll. Cardiol., 34: 983-988 (1999) .

森木秀一、中村 伸 : 組織因子 (CD142) 、血液・腫瘍科, 39 : 180-183 (1999)

K. Hosotaki, T. Imamura, J. Potempa, N. Kitamura, and J. Travis : Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. Biol. Chem. 380: 75-80, 1999.

今村隆寿 : 総説. 炎症と血液凝固. 血液アゴラ 6: 9-20, 1999.

今村隆寿 : 血漿プレカリクレインの新しい活性化機構. 血管と内皮 10: 19-31, 2000

MIZUNO Hirokazu, EMI Nobuhiko, ABE Akihiro, TAKAHASHI Isao, KOJIMA Tetsuhito, SAITO Hidehiko, SUMI Yukio, HATA Ken-ichiro, and UEDA Minoru: Successful Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified Human Oral Mucosal Epithelium. HUMAN GENE THERAPY 10: 825-830, 1999.

EMI Nobuhiko, ABE Akihiro, KASAI Masanobu, KOHNO Akio, TANIMOTO Mitsune, KIMURA Hiroshi, KAWASHIMA Kohei, ITO Masafumi, MORI Naoyoshi, SAITO Hidehiko: CD4- and CD56-positive T-cell line, MTA, established from natural killer-like T-cell leukemia/lymphoma. International Journal of HEMATOLOGY

69: 180-185, 1999.

KASAI Masanobu, AKATSUKA Yoshiki,
EMI Nobuhiko, TAJI Hirofumi, KOHNO
Akio, ABE Akihiro, TANIMOTO Mitsune,
KODERA Yoshihisa, SAITO Hidehiko:
Immune response of post-transplant
peripheral lymphocytes against the patient
pre-B cell line, NAGL-1. International
Journal of HEMATOLOGY 69: 112-118,
1999.

AKASAKA Tsukasa, MATSUURA
Kazunori, EMI Nobuhiko, and
KOBAYASHI Kazukiyo: Conjugation of
Plasmid DNAs with Lactose via
Diazocoupling Enhances Resistance to
Restriction Enzymes and Acquires Binding
Affinity to Galactose-Specific
Lectin. Biochemical and Biophysical
Research Communications 260: 323-328,
1999.

恵美宣彦, 安部明弘, 河野彰夫: EMI
NOBUHIKO, ABE AKIHIRO, KOUNO,
AKIO: 白血病の遺伝子治療の可能性. 現代医
療 31: 173-179, 1999.

恵美宣彦, 宮村耕一: EMI NOBUHIKO,
MIYAMURA KOUICHI: 第4節 各論一癌
造血器悪性腫瘍 (リンパ腫/白血病) 遺伝子
治療 開発研究ハンドブック 219-225,
1999.

恵美宣彦: EMI NOBUHIKO: 第9節 遺伝子
導入細胞の選択・制御. 遺伝子治療 開発研究
ハンドブック 518-521, 1999.

恵美宣彦: EMI NOBUHIKO: ティッシュ・エ
ンジニアリングへの遺伝子導入の応用 ティ
ッシュ・エンジニアリング 239-244, 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）
平成 11 年度分担研究報告書

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)

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所助手）
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：

非ウイルス性のベクター・遺伝子導入法としてのリポソームベクター、アテロコラーゲンおよび遺伝子銃について、サルモデルでのレポーター遺伝子（GFP）の発現効率や発現性などを指標にして有効性を比較解析した。同時に、これらベクター・遺伝子導入法の安全性（Th1/Th2 バランス、抗体産生、炎症応答、血球動態、組織・細胞障害性、母子移行等）の評価・検討も進めた。

さらに、実用的な視点でのベクター・導入方法の評価系を検討する目的で、サル B ウイルスに対する遺伝子ワクチンの準備実験を展開した。

A. 研究目的

遺伝子治療・遺伝子ワクチンにおいて目的遺伝子を生体導入するための delivery system は極めて重要な要素で、遺伝子の導入担体・ベクターや導入方法の開発と共に、それらの有効性、安全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遺伝子構造、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。そのため、遺伝子治療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、特に非ウイルス性のベクター・遺伝子導入法について、そ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・解析の実験系を確立し、より安全で効率的な遺伝子治療・遺伝子ワクチンの発展を目指す。

B. 研究方法

1. レポーター・GFP 遺伝子の調製：

定法に従い、pEGFP C1 プラスミドを増幅し、生体投与用に LPS フリー処理し、下記の実験に利用した。

2. リポソームベクターの調製：

カチオニックリポソーム (DOTAP) を基剤として、VSVG/リポソーム/ pEGFP C1 プラスミド/ポリブレン混合ミセルを用事調製した。

3. アテロコラーゲンベクターの調製:

両端の抗原性部位をプロテアーゼ処理で除去したアテロコラーゲンを基剤として、これに上述の pEGFP C1 プラスミドを混和後、細い棒状に乾燥させ、適当な長さの断片を GFP 遺伝子導入担体とした。

4. 金粒子/DNA 複合体の調製:

pEGFP-C1 プラスミドを直径 1 mm の金粒子に吸着させて、金粒子/DNA 複合体を作製し、ヘリオス社製の遺伝子銃での投与に利用した。

5. サルへの遺伝子導入:

カニクザルおよびニホンザルでのリポソームベクター、アテロコラーゲンベクターについては、GFP DNA を 50 μ g/head を背部皮内に 1 ヶ月間隔で 2 回投与した。遺伝子銃の場合は、1/10 量の 5 μ g/head を背部皮内に高圧 (高純度ヘリウムガス、350 psi) で投与した。

6. 遺伝子導入効率、発現性の解析:

GFP DNA の導入効率や体内動態については、経時採血した血液試料中の GFP DNA を PCR 分析して検討した。細胞・組織での GFP タンパク質の発現に関しては、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的手法で解析した。

7. 炎症反応、組織・細胞障害性の検討:

早期炎症マーカーの TNF および遅延性炎症マーカーの CRP について、それぞれの血中濃度を ELISA で測定して、炎症反応の強弱を検討した。また、血小板や白血球の

変動、組織因子発現についても調べ、炎症応答のモニターとした。

また、投与部位での組織・細胞の障害性や浸潤白血球に関しては細胞染色で検討した。

8. 抗体産生:

ビオチン化標識-抗サル IgG 抗体および IgE 抗体を用いたサンドイッチ ELISA で、GFP 抗体の産生を経時測定した。

9. Th1/Th2 バランスの解析:

サルの Th1 サイトカイン (IFN- γ 、IL-2) および Th2 サイトカイン (IL-4, IL-10) 遺伝子について、リンパ球から total RNA を抽出し、それぞれの特異プライマーを用いた RT-PCR 法で、各サイトカイン遺伝子の発現性を半定量し、Th1/Th2 バランスを解析した。

10. 母子移行の検討:

コモンマーモセットのペアー飼育で得た妊娠母体に GFP 遺伝子をリポソームベクターで導入し、胎盤を介しての胎児への移行について、胎児の血液、主要組織中の GFP DNA を PCR で調べ、母子移行を検討した。

C. 研究結果

本研究の全ての実験を終了していないので、中間総括的な結果であるが、用いた 3 種の遺伝子導入ベクター・方法の内、カチオニックリポソーム (VSVG/リポソーム/ pEGFP C1 プラスミド/ポリブレン混合ミセル) が、調製する際の手軽さに加え、効率的な GFP 発現性を示した。投与部位周辺細胞での GFP 発現は、免疫染色で調べると 9-14 日まで続いた。この時、樹状

細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、および繊維芽細胞で GFP タンパク質の発現が認められ、特に、表皮下の基底膜に沿った細胞に強い発現性が見られた。興味深いのは、投与部位から離れたヶ所の細胞にも弱いながら GFP タンパク質の発現が観察され、リポソームベクターではリンパ液や血液を介して、導入遺伝子が遠位輸送されていることが示唆された。一方、リポソームベクター投与した周辺細胞の細胞障害やそこへの白血球浸潤は見られなかった。また、炎症サイトカインの TNF および CRP の血中上昇、血小板や白血球の変動、組織因子発現なども認められず、応答安全性も確認された。

抗体産生については、DFP 遺伝子の単独投与では見られなかったが、VSVG 遺伝子との混合投与では、抗 GFP、抗 VSVG 抗体が共に検出され、VSVG DNA による免疫応答亢進作用が示唆された。

Th1/Th2 バランスに関しては、コントロール個体の分析が終わった所で、遺伝子投与サルについては解析中である、これまでの結果で興味ある点は、サルの Th1 サイトカイン (IFN- γ , IL-2) 遺伝子の発現性は、ヒトのそれに比べ強く、サルモデルでは Th1 応答の亢進が窺える。

ペア飼育で得たコモンマザーセットの妊娠メスに、リポソームベクターで GFP 遺伝子を投与し、20 時間後に胎児の血液、主要組織を採取し、それらの GFP DNA を PCR で分析した。胎児の肝臓や心臓での GFP DNA は検出限界以下で、今回の実験では胎児移行の可能性は認められなかった。さらに、今回とは妊娠週齢の異なる妊娠

ザルを用いて、胎児での GFP DNA を精査し、それらの結果も併わせて母子移行について結論する。

D. 考察

サルモデルでの遺伝子治療・遺伝子ワクチン研究を展開する上で、その有効性と安全性に関する評価・検討のための実験・解析系の確立は不可欠である。本研究では、分子生物学、病態生化学、免疫学、組織化学、臨床獣医学、繁殖生理学の経験と実績を活かし、サルモデル系での遺伝子導入効率や発現性、炎症反応・細胞障害性、抗体産生、Th1/Th2 バランスおよび母子移行についての解析法を確立し、遺伝子導入の有効性と安全性の評価系を開発した。

この評価系を利用して、原理のことなる 3 者のベクター・導入法を比較検討し、調製法の簡便性も加味してリポソームベクターの有効性を評価し、次年度計画の実用的なサル B ウイルスの遺伝子ワクチン開発を進めている。

E. 結論

サルモデルでの遺伝子治療・遺伝子ワクチン研究を展開するために、ベクター・遺伝子導入法の導入効率や発現性、安全性 (Th1/Th2 バランス、抗体産生、炎症応答、血球動態、母子移行等) の評価・検討系を確立した。次いで、非ウイルス性のベクター・遺伝子導入法としてリポソームベクター、アテロコラーゲンおよび遺伝子銃を試み、上記の評価・検討系に基づいて、それら 3 者の有効性と安全性を比較解析した。さらに、実用的な視点でのベクター・

導入方法の評価系を検討する目的で、サル Bウイルスに対する遺伝子ワクチンの準備実験を展開した。

F. 研究発表

F.Mitsunaga, S.Nakamura, M.Hirano, et al : Transfer Efficiency of GFP-Gene Using VSV-G Liposome Vector in Monkey Model, Gene Therapy (submitted).

M. Hirano, S. Nakamura, M. Okada, et al : Rapid Discrimination of Monkey B Virus from Human Herpes Simplex Viruses by PCR in the Presence of Betaine, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1255-1257 (2000).

H. Todoroki, S. Nakamura, A. Higure, K. Okamoto, S. Takeda, N. Nagata, H. Itoh, K. Ohsato: Tissue Factor Expression in Monkey and Human Neutrophils, *Surgery*, 127 : 209-216 (2000) .

K. Abe, T. Inami, S. Nakamura, S. Goto : TT Virus Infection in Non-human Primates and Characterization of Virus Genome : Identification of Simian TT Virus Isolates, *J. Virol.*, 74: 1549-1533 (2000).

中村 伸 : 膜結合性組織因子、検査と技術、28 : 91-93 (2000).

中村 伸, 平野 真, 光永総子, 清水慶子: 霊長類モデルでの遺伝子治療研究—特に遺伝子ワクチン研究を中心に、*ファルマシア*, 36 : 127-130 (2000) .

平野 真, 光永総子, 清水慶子, 中村 伸 : 霊長類などへの遺伝子導入— B ウイルス DNA ワクチンの開発、遺伝子治療入門 (齊藤英彦、吉田 純編、名古屋大学出版会) (印刷中).

Mitsunaga, S.Nakamura, K.Shimizu, et al : Studies on a Gene Transfer Vector in Non-Human Primates, *Primate Res.*, 15:365 (1999).

S.Nakamura, F.Mitsunaga, K.Shimizu, et

al : Assessment of Gene Transfer Using A Non-Viral Liposome Vector in Monkey Model, *Nature Biotechnonogy*, 17: 39 (1999).

中村志帆、光永総子、中村 伸 : サルの安全な取扱いのために : 感染リスクの対応手引き、*霊長類研究*, 15 : 377--394 (1999).

H. Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, K. Misumi, k. Takazoe, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S. Nakamura, I. Tsuji, K. Kumeda : Heightened Tissue Factor Associated with Tissue Factor Pathway Inhibitor and Thrombin Generation in Patients with Unstable Angina, *Circulation*, 99: 2908-2913 (1999).

C. Hine, K. Enjyoji, K. Kokame, S. Nakamura, A. Takai, Y. Kamikubo, K. Sueishi, H. Kato: Monkey Hapatocytes Efficiently Express Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), in Contrast with Human and Rat Hepatocytes, *J. Biochem.*, 125: 1039-1047 (1999).

H. Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, k. Takazoe, K. Nishiyama, K. Misumi, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S.Nakamura: Angiotensin- Converting Enzyme Inhibition Reduces Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Tissue Factor Levels in Patients with Myocardial Infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 34: 983-988 (1999) .

轟木秀一、中村 伸 : 組織因子 (CD142) 、*血液・腫瘍科*, 39 : 180-183 (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）
平成 11 年度分担研究報告書

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

GFP plasmid のみ、lipid/GFP plasmid、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、炎症を各々で組織学的に調べた。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学的に比較・検討した。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いずれも安全性が高く、VSVG/lipid/GFP plasmid は発現有効性が三者のなかで最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

今回はトレーサー遺伝子(GFP plasmid)を組み込んだリポゾーム性ベクター(lipid および VSVG/lipid)をカニクイザルに皮下投与し、その皮膚を経時的に採取した。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-エオシン染色で検討した。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 法による免疫染色で解析した。また、投与部以外の皮膚も採取し、発現を調べた。

C. 研究結果

試料皮膚採取時の出血に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 の発現はリポゾーム性ベクターのみならず plasmid のみでも投与後一日目から皮内および皮下の dendritic cell 様細胞、線維芽細胞さらに浸潤マクロファージに発現が見られた。表皮ケラチノサイト、毛根上皮細胞は陰性であった。21 日後でも陽性細胞の発現性は維持されており、なかでも VSVG/lipid ベクターによる投与方法がもっともよく発現が維持されていた。5 日目に採取した、投与部位と数 10 cm 離れた皮膚でも投与部よりは弱いながらも発現が陽性であった。

D. 考察

今回はカニクイザル皮内に投与したキャリアー遺伝子(GFP plasmid)、あるいはベクター(lipid および VSVG/lipid)との

複合体の安全性と有効性を光学顕微鏡による組織化学的解析で検討した。この方法では定量的解析が不十分であり、21日後ではすべて発現陽性であった今回のような場合は発現持続性が正確に判定できない。次年度は投与後21日より長い経過での発現維持の検討が必要であろう。さらにより詳細な組織化学的解析の目的で、共焦点レーザー顕微鏡による解析を試みる。さらに、in situ hybridizationによる遺伝子の導入判定を行う。また、投与部での炎症関連因子産生による細胞傷害性の解析も検討する。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。

E. 結論

トレーサー遺伝子(GFP plasmid)をリポソーム性ベクターに組込んだlipid/GFP plasmid、VSVG/lipid/GFP plasmid をカニクイザルに皮下投与し、安全性(組織損傷、炎症反応ならびに細胞壊死)および(遺伝子導入タンパク質の発現性)について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 法導入ならび炎症因子発現解析による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

K. Hosotaki, T. Imamura, J. Potempa, N. Kitamura, and J. Travis : Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. Biol. Chem. 380: 75-80, 1999.

今村隆寿：総説. 炎症と血液凝固. 血液アグラ 6: 9-20, 1999.

今村隆寿：血漿プレカリクレインの新しい活性化機構. 血管と内皮 10: 19-31, 2000

T. Imamura, J. Potempa, and J. Travis : Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. submitted.

T. Imamura, et al. : Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. submitted.

T. Imamura, et al. : Activation of blood coagulation factor IX by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. submitted.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 11 年度分担研究報告書

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
(H11-ゲノム-016)

分担研究者：恵美宣彦（名古屋大学医学部助手）
安部明弘（名古屋大学医学部医員）

研究要旨：

遺伝子免疫療法あるいは遺伝子ワクチンの臨床的展開を目指して、強力な発現ベクターを構築し、免疫方法として遺伝子銃の免疫への応用を検討した。この研究結果を基に、霊長研でおこなわれるサルモデル系でのベクターの安全性、有効性の評価・試験法のサポートを進める。

A 研究目的

1. 霊長類用の発現ベクターの作成：ヒト、サルの実験用には霊長類にて強力なプロモーター活性を持つ発現ベクターの作成が必要である。将来、臨床応用の使用にたえるためには自分達の開発したオリジナルのベクターが特許の問題からも必要と思われる。

2. 遺伝子銃による遺伝子導入の検討：遺伝子銃は、強力な駆出力により DNA の付着した金粒子を細胞に吹き付ける遺伝子導入法である。導入条件の検討、発現実験等をおこない、免疫法としての検討もおこなった。

B 研究方法

1. RFP 遺伝子は再構成により RET 癌遺伝子を活性化する遺伝子として同定されヒト細胞において高発現されている。そのプロモーター領域の中から、発現に必須な 590bp を含む部分を用いて発現ベクターを構成した。

2. Bio-Rad 社の遺伝子銃：Helios Gene Gun を用いた DNA ワクチン接種を行い、悪性腫瘍における遺伝子ワクチン療法の可能性について検討した。遺伝子銃は、遺伝子導入のさいウイルスベクターを用いなくてよい、細胞の周期を問わない、核内のみならずミトコンドリアなどの細胞内小器官へも導入できるといった特性を持ち、局所へ効率よく遺伝子導入することが可能といわれている。Helios Gene gun は DNA プラスミドを微小な金粒子にコートさせ、ヘリウムガス圧を用いて粒子とともに外来遺伝子を細胞や組織に物理的に導入する装置である。Helios Gene Gun の弾となる金粒子と DNA の複合体をいろいろな条件で作製した。今回 LacZ/NEO と FLT3R/NEO の DNA プラスミドを用いて 2 種類のものを作った。弾 1 個あたりには約 0.8~1.0 μ g の DNA がふくまれている。

<実験 1> in vitro, in vivo において Gene gun を用いて LacZ 遺伝子を導入し

その際 Gene gun の遺伝子導入効率および細胞や組織に及ぼす傷害を評価し、金粒子/DNA 複合体の作成条件や至適条件圧などを検討した。

In vitro での実験は、6well プレートで約 2 週間培養したヒト培養口腔粘膜シートおよび BHK 細胞に Gene gun のヘリウム圧を 150psi~450 psi の 50psi 間隔で変化させ LacZ 遺伝子導入を試みた。導入の際には培地を除去し gene gun のノズルを可及的に細胞に近づけて撃ち込み、その後速やかに培地を加え 37 度 10% CO₂ インキュベータで培養した。24 時間後細胞を固定、染色を行い観察した。

In vivo では C3H/HeJ 8 週、メスのマウス背部表皮にヘリウム圧 350psi に設定下 gene gun で LacZ 遺伝子導入を行った。遺伝子導入する部位はあらかじめ剃毛したうえに除毛クリームを塗布して表皮を露出させた。Gene gun はノズルを背部に接触させて撃った。遺伝子導入から 24 時間後に、マウスより表皮を採取し、組織の固定及び染色を行った。

<実験 2>

Gene gun を用いて 8 週メス C3H/ HeJ マウス背部に FLT3/NEO あるいは LacZ/NEO の DNA ワクチンを接種した。各群 3 匹ずつにし、gene gun をうつ前に実験 1 と同様マウスの背部の毛を除き表皮上に直接ワクチン接種した。これを スライドに示したスケジュールに従い、2 週に 1 回の間隔で合計 3 回施行した。最終接種日から 1 週間後 FLT3/ NEO, LacZ/ NEO DNA ワクチン接種マウスおよびワクチン非接種マウス 計 9 匹の腹部に、mutant FLT3 遺伝子にて自律増殖能を獲得した 1.0×10^7 の 32D 細胞 (マウス白血病由来細胞株) を皮内注射した。

その後各マウスについて腫瘍の生着の有無を確認し、1 週間に 1 度腫瘍径の計測を行った。また免疫後に採血し FACS にて腫瘍細胞に対する抗体を調べた。

C 研究結果

1. pRFPD-3 の作成

RFP promoter のあとに、multiple cloning site を組み込み、その後ろに SV40 polyA signal を挿入した。全長 3 5 7 0 bp で Amp resistant の plasmid となっている。GFP 遺伝子を組み込んだ発現実験では、2 9 3 細胞にて強い mean X を示した。

2. 遺伝子銃

<結果 1>

in vitro で Gene gun を用いる際、ヘリウム圧が高くなるにつれて遺伝子導入効率もたかくなり、細胞が剥がれたり穴があくといった大きなダメージが加わるようになる。これらダメージのため撃ち込んだ部位よりもその周辺部がよく発色しており、より多くの遺伝子が導入されているのが観察された。細胞への傷害が比較的少なく、かつ遺伝子導入効率が高い He 圧は金粒子 $1 \mu\text{m}$ の場合 300~350psi であった。In vivo において 350psi のヘリウム圧で gene gun を撃ったとき、中心部はかひ化して染色されず、その周囲が強く発色した。

<結果 2>

FLT3/NEO DNA ワクチン接種マウスでは腫瘍が生着せず、LacZ/NEO DNA ワクチン接種マウスでは一旦生着したものの 2~3 週間で縮小し最終的に消退した。ワクチン非接種マウスは腫瘍が生着し経時的に増大した。

D 考察

1. RFP promoter を用いて、pRFPD-3 を作成した。このプラスミドは、BglII, XhoI, SacI, HindIII, EcoRI, PstI, SalI, AccI, KpnI, SacII, ApaI, XmaI, SmaI, BamHI で one cut でありクローニングに適している。

2. 遺伝子銃による DNA ワクチンは、ウイルス抗原などの遺伝子を用いて既に多くの実験が行われている。今回私達はヒト白血病において異常の見られる mutant FLT3R 遺伝子によって自律増殖能を獲得した 32D 細胞をもちいて、悪性腫瘍の DNA ワクチン療法について検討した。

DNA プラスミドを金粒子でコートし金粒子と DNA の複合体を作製するにあたっては金粒子の大きさ、DNA 量の増減をかえてみた。LacZ DNA を用いた in vivo の遺伝子導入実験にて導入部位に強く発色が観察されました。このことから Helios Gene gun での遺伝子導入が安定して行われていることが確認できた。腫瘍のチャレンジテストは DNA ワクチンで 3 回免疫後に行いましたが、FLT3/NEODNA で免疫したマウスでは全く腫瘍の生着、増殖が認められなかった。これらのマウスからは 32D/FLT3 細胞に対する抗体産生が見られた。

E 結論

霊長類における実験の基礎となる発現ベクターを作成した、今後はこのベクターを用いてさらに便利なものを構成したい。遺伝子銃を用いて遺伝子導入実験をおこなった。マウスの腫瘍モデルにて効果を確認できた。

F 研究発表

(学会発表)

Hirokazu Mizuno, Nobuhiko Emi, Akihiro Abe, Hidehiko Saito, Yukio Sumi, Kenichiro Hata, and Minoru Ueda :Applications of Human Gene-Modified Oral Mucosal Epithelium The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, June, 1999.

Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Fukashi Murai, Shin-Tai Chen, Atsushi Miyanohara, Theodore Friedmann, Hidehiko Saito: Partial Cell-Free Assembly System of an Infectious VSV-G Pseudotyped Retrovirus. The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, June, 1999.

Tsukasa Akasaka, Nobuhiko Emi: Effect of Glycosylated Plasmid DNAs on Resistance to Restriction Enzymes and Expression in Transfected. The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, June, 1999.

伊藤優子、恵美宣彦 : Helios Gene Gun(BIO-RAD)を用いた遺伝子ワクチンの検討 第22回東海遺伝子治療研究会、January, 2000.

(論文)

MIZUNO Hirokazu, EMI Nobuhiko, ABE Akihiro, TAKAHASHI Isao, KOJIMA Tetsuhito, SAITO Hidehiko, SUMI Yukio, HATA Ken-ichiro, and UEDA Minoru: Successful Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified Human Oral Mucosal Epithelium. HUMAN GENE THERAPY 10: 825-830, 1999.

EMI Nobuhiko, ABE Akihiro, KASAI Masanobu, KOHNO Akio, TANIMOTO Mitsune, KIMURA Hiroshi, KAWASHIMA Kohei, ITO Masafumi, MORI Naoyoshi, SAITO Hidehiko: CD4- and CD56-positive T-cell line, MTA, established from natural killer-like T-cell leukemia/lymphoma. International Journal of HEMATOLOGY 69: 180-185, 1999.

KASAI Masanobu, AKATSUKA Yoshiki, EMI Nobuhiko, TAJI Hirofumi, KOHNO

Akio, ABE Akihiro, TANIMOTO Mitsune,
KODERA Yoshihisa, SAITO Hidehiko:
Immune response of post-transplant
peripheral lymphocytes against the patient
pre-B cell line, NAGL-1. International
Journal of HEMATOLOGY 69: 112-118,
1999.

AKASAKA Tsukasa, MATSUURA Kazunori,
EMI Nobuhiko, and KOBAYASHI
Kazukiyo: Conjugation of Plasmid DNAs
with Lactose via Diazocoupling Enhances
Resistance to Restriction Enzymes and
Acquires Binding Affinity to Galactose-
Specific Lectin. Biochemical and Biophysical
Research Communications 260: 323-328,
1999.

恵美宣彦, 安部明弘, 河野彰夫: EMI
NOBUHIKO, ABE AKIHIRO, KOUNO,
AKIO: 白血病の遺伝子治療の可能性. 現代医
療 31: 173-179, 1999.

恵美宣彦, 宮村耕一: EMI NOBUHIKO,
MIYAMURA KOUICHI: 第4節 各論一 癌
造血器悪性腫瘍 (リンパ腫/白血病) 遺伝子
治療 開発研究ハンドブック 219-225,
1999.

恵美宣彦: EMI NOBUHIKO: 第9節 遺伝子
導入細胞の選択・制御. 遺伝子治療 開発研究
ハンドブック 518-521, 1999.

恵美宣彦: EMI NOBUHIKO: ティッシュ・エ
ンジニアリングへの遺伝子導入の応用 ティ
ッシュ・エンジニアリング 239-244, 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）
平成 11 年度分担研究報告書

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
(H11-ゲノム-016)

「サル培養細胞におけるベクターの安全性、有効性に関する研究」

分担研究者：植田昌宏（株）エスアールエル 検査本部担当部長

研究要旨

サル由来培養細胞を樹立し、GFP および VSVG gene の遺伝子導入効率、核 DNA への挿入、細胞内分布、細胞内半減期、細胞増殖および細胞障害性など、細胞レベルでの、有効性、安全性の評価実験系を検討した。

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安全性と有効性を検証するための評価実験系の確立はきわめて重要である。

初年度に作製したベクターを用い、サル培養細胞を利用した *in vitro* での安全性、有効性を評価する系の開発を目的とした。具体的には、ベクターによる遺伝子導入効率、細胞内での分布や半減期、核遺伝子への挿入の有無、細胞障害性などを細胞生物学的に精査し、*in vitro* での安全性、有効性の評価・試験法の確立のため、基礎データの蓄積を図る。

B. 研究方法

ベクター：

GFP (green fluorescence protein) 発現系として pEGFP-C1 を、VSVG (vesicular stomatitis virus glycoprotein G) 発現系として pCMV-VSVG を用いた。

細胞：

MA104 (アカゲザル腎由来継代細胞) を用いた。10% 牛胎児血清加イーグル MEM を、継代用およびベクター導入後の維持用培地として用いた。

ベクターの導入：

ベクター導入 1 日前に、60 mm プラスティックディッシュに 5×10^5 の細胞を撒き、炭酸ガス培養装置内で培養した。翌日、ディッシュあたり 10 μ g のベクターを、リン酸カルシウム法の定法に従い導入した。

GFP および VSVG の検出：

GFP については、ベクター導入細胞が発する蛍光を経時的に、落射式蛍光顕微鏡で直接観察した。

VSVG については、冷アセトンあるいは 4% パラホルムアルデヒドで固定後、cy3 標識抗 VSVG モノクローナル抗体で染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1. GFP 発現系について

1 日後：約 5% の細胞で強い蛍光（便

宜的に程度を++と示す)が核および細胞質に確認された。2個以上接着している細胞がともに蛍光を発する像は、ほとんど観察されなかった。

2日後:細胞分裂が確認され、各細胞の蛍光の程度は+ (1日後の約半分の強度)に減少した。蛍光を有する細胞はそのほとんどが2個以上接着していた(分裂したと考えられる)。蛍光を有しない細胞も、そのほとんどが2個以上接着していた。

3日後:細胞分裂は継続して見られた。蛍光を有する細胞は3~5個が接着しコロニー状を呈しており、個々の細胞の蛍光強度はさらに減少したが、その程度は+と判断された。蛍光を有しない細胞もその大部分が3~5個の細胞が接着しコロニー状を呈していた。

5日後:細胞はほぼ100%の単層を形成した。蛍光を有する細胞の蛍光強度はさらに減少したが、その程度は+と判断された。

~13日後:蛍光を有する各細胞の蛍光の強度はほとんど変わりがなく、その程度は+と判断された。また、蛍光を有する細胞が形成する領域の拡大は全く観察されなかった。

17日後:単層細胞の一部に脱落が確認され、蛍光を有する細胞群は明瞭に判別できるが、その蛍光の程度はさらに減少し+未満と判断された。脱落細胞群は、蛍光を有するものと有しないもの間に差は認められなかった。

21日後:半分以上の細胞が変形し脱落した。残っている細胞群の中の蛍光を有する領域は、識別可能であっ

た。脱落した細胞群は、蛍光を有するものと有しないもの間に差はなかった。

2. VSVG発現系について

導入4時間後:アセトン固定群では、核の周辺部とくにRER(粗面小胞体)と見られる部位にcy3の粒子状赤色蛍光が確認された。パラホルムアルデヒド固定群では、細胞中央の一部にdiffuseな弱い蛍光が認められた。

導入16時間後:アセトン固定群では、核周辺部に強く辺縁にかけて弱まる傾向が見られ、焦点深度を変えての観察で細胞膜上にもdiffuseな蛍光が認められた。パラホルムアルデヒド固定群では、細胞膜上はかなり強いdiffuseな蛍光のみが観察された。これらの標本を長時間露出で撮影し、蛍光を発していない細胞、すなわちベクターが導入されていない細胞を同時に観察できる状況にして導入効率を測定したところ、5~10%であった。

蛍光がもっとも強かったのは、アセトン固定群で16~22時間後であり、26時間後までは変化がなかった。一方、パラホルムアルデヒド固定群では22~24時間後がもっとも強く、26時間後では明らかに減少していた。

なお、導入26時間後では、細胞の形態に違いは見られなかった。

D. 考察および結論

pEGFP-C1およびpCMV-VSVGのサル腎由来継代細胞への、リン酸A

カルシウム法による導入の効率は、発現細胞の計数で、ほぼ同じ5～10%であった。

pEGFP-C1の場合、発現したGFPは核および細胞質全体に移行し、導入1日後にもっとも強かった。導入された細胞は、その後の分裂も阻害されず、細胞活性は非導入細胞とほぼ同じ期間維持されていると考えられた。ベクターが導入された細胞から、非導入細胞へのベクターの再導入は、たとへ相互に接着していても認められなかった。

pCMV-VSVGの場合、糖タンパク合成の典型的パターンが確認された。すなわち、発現したVSVG蛋白は核へは移行せず、おそらくゴルジ装置をとおって糖が付加され、細胞膜上に挿入され蓄積されていると考えられる結果であった。しかし、このようにベクターが導入され、細胞膜上に糖の修飾を受けた発現蛋白が蓄積された細胞の活性度（分裂能や生残期間等）については確認できなかった。長期間にわたっての経時的観察が必要である。

さらに、蛍光法による解析データはやや主観的である。それゆえ今後、遺伝子導入された細胞に発現するmRNAの定量的検出法、neutral redの取り込み・排出を指標にした細胞性状の解析法などを検討し、培養細胞レベルでのベクターの有効性、安全性の評価系の確立を図る。

研究報告書追補（主要な関連発表論文）