

平成11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

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

臨床応用に向けたハイブリッド型リボ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 大阪大学医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨：HVJ-liposome（AVE型）のヒト遺伝子治療に向け、サルへの局所投与、連続投与、静脈内投与を行い、遺伝子発現、病理変化などによりこのベクター系の有効性、安全性を確認した。

分担研究者 居石克夫 九州大学医学系研究科教授
本多三男 国立感染症研究所 室長

入遺伝子は1日後に肝臓、脾臓、肺に認められたが生殖腺や脳内への移行などは無かった。HVJのF蛋白のmRNAはRT-PCRにより各臓器において検出されず。

A. 研究目的

HVJ-liposomeのサルへの局所・全身投与を施行し、遺伝子発現及び各種安全性の検討を行い、ヒト遺伝子治療への応用をめざした。

D. 考察

HVJ-liposomeはサルでの局所投与、全身投与のどちらにおいても安全性が確認された。

B. 研究方法

HVJ-AVE liposomeを用いたサルの脳内投与、骨格筋への連続投与、移植心冠状動脈への遺伝子導入、静脈内投与実験を行い、安全性を検討した。

（倫理面への配慮）動物実験については大阪大学医学部の動物実験施設、筑波霊長類センターをはじめとする国内数カ所で行い、それぞれの規約を遵守した。

E. 結論

ハイブリッド型リボソームのヒト臨床応用への準備がほぼ整った。

C. 研究成果

サルの脳室内にLacZ遺伝子封入HVJ-liposomeを導入すると主として海馬の神経細胞に少なくとも1ヶ月の遺伝子発現が認められた。サルの骨格筋にHGF遺伝子を連続導入することで遺伝子発現を認め、病理変化、血液学的異常は認めず。サルの移植心に冠状動脈よりE2Fデコイを導入し、慢性拒絶の原因となる動脈炎を抑制した。サルの伏在静脈からHVJ-liposomeを静注して、投与4週間での急性毒性の検討を行った。生理食塩水注入群と比較し有為な異常は認めず。導

F. 研究発表

1. 論文発表

Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R. : Gene therapy using HVJ-liposomes: The best of both worlds? Mol. Med. Today 5, 298-303, 1999.

2. 学会発表

Kaneda, Y. : Development of virosomes for gene therapy (The 2nd Meeting American Society of Gene Therapy, June 11, 1999, Washington D.C.)

G. 知的所有権の取得状況

Kaneda, Y. Dzau, V.J. : "Method for in vivo delivery of therapeutic agents via liposomes" (U.S. Patent No. 08/241, 372, European Patent 95917788.2-2110)

HVJ 蛋白による HIV 抗原特異的なヘルパー機能の誘導

分担研究者 本多三男 国立感染症研究所 エイズ研究センター・第一研究グループ長

研究要旨：本研究では HIV ワクチンの開発をめざし、その防御エピトープとして明らかになっている HIV env 蛋白 V3 部分を抗原に用いて HBc コア粒子 HIV ワクチンを作製した。この HIV-HBc ワクチンを効果的に機能させるために HVJ-リボソームによりブースター免疫を行うと抗原特異的にリンパ球が増幅し、ヘルパー機能が誘導されることがわかった。このプライムブーストの系はモルモットで著明に遅延型アレルギー反応、さらに中和抗体の誘導が認められた。HIV 特異的に MHC に適合した CTL 活性もブースター無しに比べて約 10 倍増加し、防御免疫の誘導に重要と思われるヘルパー機能の著明な誘導が認められた。

A. 研究目的

HIV などの免疫機能を破壊する種々の病原体に対しては、強力な免疫機能を誘導すると、感染防御が可能となることが明らかになりつつある。本研究では HIV をモデルにした防御免疫の誘導に HVJ 蛋白が有用であるかどうかを検討し新たな HIV ワクチン開発を行った。

B. 研究方法

実験 1：マウスに 10 μ g/匹の HIV-HBc 抗原を 2 週毎に 2 回投与し、最後の免疫の 1 週後にマウスの脾臓細胞を分離しその機能を解析する。さらに、モルモット皮下に 50 μ g/匹の HIV-HBc 粒子を投与し 2 週後に DTH の誘導を観察した。さらに抗原特異的なリンパ球の増殖反応や抗体産生についても検討した。

実験 2：実験 1 でプライミングした動物に HIV-HBc 封入 HVJ-リボソームをブースター免疫し、ブースター免疫の効果をリンパ球増殖反応、中和抗体の産生、DTH の誘導、CTL の増幅について解析し、ワクチン開発への応用を検討した。コントロールとして HVJ 蛋白を組み込まない HIV-HBc 封入りポソームを作製し、HVJ 蛋白の効果を明らかにした。

C. 研究結果

HIV-HBc ワクチンによるプライミングと HIV-HBc 封入 HVJ リボソームのブースター免疫により、HIV に特異的な液性抗体が誘導される。この抗体は HIV/MN 等の実験室 HIV 株を高い感受性で中和することができた。また CTL 誘導能を亢進しており、ブースター前に比べると 10 倍以上の活性の増加が認められた。

モルモットを使って皮膚反応を解析すると 24 時間から 48 時間にピークを有する硬結を伴う遅延型皮膚反応が誘導された。

D. 考察

HVJ 蛋白をリボソームに組み込んで抗原のブースター効果を検討すると HVJ 抗原の存在によりきわめて強い T ヘルパー機能の誘導が認められる。免疫能の増幅には取り込まれた抗原の効率が関与しているだろうと予測される。HVJ 蛋白を組み込んだリボソームにより抗原の細胞内への完全な形での導入が可能になったと考えられる。

E. 結果

HVJ 蛋白をリボソームに組み込むと抗原特異的なヘルパー機能が誘導され防御免疫につながると考えられる種々のエフェクター免疫能が高い活性を持った状態で誘導されることがわかった。これらの結果は病原体の感染阻止を目的としてワクチン開発に極めて有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takeda, S., Y.Kaneda, K.Shiosaki, K. S.Haga, T.Nakasatomi, H.Yoshizaki-Nakasatomi, K.Someya, Y. Konno, K.Fukada, Y. Kino, and Mitsuo Honda Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) is efficient for induction of T-helper response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. (submitted)

2. 学会発表 無し

ハイブリッド型リポソームによる血管リモデリング過程における遺伝子制御の試み

研究分担者 居石克夫 九州大学大学院医学系研究科教授

ハイブリッド型リポソーム（HVJ-リポソーム）を用いた転写因子に対するおとり型遺伝子（デコイ）の細胞への導入は、刺激に応じて標的転写因子の支配下にある遺伝子群の転写制御を可能にした。また、血管壁へのデコイ導入の応用は、傷害血管の内膜狭窄の抑制をもたらした。従って、HVJ-リポソームによる遺伝子導入は、動脈硬化の進展やPTCA後の再狭窄予防、腫瘍性血管新生抑制など病的血管のリモデリングの有望な手段治療となりうるということが示唆された。

A. 研究目的

近年、生理的血管構築の分子機構が解明されつつあるが、動脈硬化、血栓症、病的血管新生などの傷害血管のリモデリング機序については未だ不明な点が多く残されている。血管壁の傷害は、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や脳血管障害などの基礎的病態であるため、病的血管リモデリング機序の解明と治療法の確立は、緊急かつ重要な課題である。しかし現在、こうした病的血管に対する遺伝子治療は、導入ベクター、標的遺伝子などの点で課題を残している。そこで、傷害血管壁の分子病態解析と、新規かつ有効な治療法の確立を目指し、HVJ-リポソームによる遺伝子導入の治療への有効性を検証した。

B. 研究方法

HVJ-リポソームを使った転写因子に対するデコイ遺伝子導入の有効性を、以下の項目について検証した。

- 1) 培養癌細胞（A549、U251）に、Sp-1およびAP-1等に対するデコイ遺伝子を導入し、それらの転写因子の支配下にある複数の遺伝子発現状況と細胞増殖に与える影響について検討した。
- 2) バルーン傷害による家兎頸動脈内膜肥厚モデルにおいて、NF- κ Bに対するデコイ遺伝子を導入し、内膜肥厚に対する効果について病理学的検討した。

C. 研究結果

- 1) A549、U251細胞への野生型Sp-1デコイ導入は、TNF- α 刺激誘導の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、TGF- β 1、組織因子、ウロキナーゼの発現の亢進を未刺激レベルまで抑制した。さらに、有意な細胞増殖抑制効果も示した。一方、Sp-1に支配を受けないbFGFには、発現レベルの変化は全く無かった。
低酸素刺激により誘導されたVEGF発現に対して、野生型AP-1デコイが有効であり、AP-1転写阻害作用を持つデキサメサゾンと同程度まで抑制した。
- 2) 家兎頸動脈内膜肥厚モデルにおいて、血管壁へのデコイ遺伝子導入は、HVJ-リポソームを使用することでnakedの導入に比べ格段に上昇する事が判明した。また、HVJ-リポソームによる野生型NF- κ Bデコイ導入は、傷害後の新生内膜による血管狭窄の程度を半減させた。

D. 考察

転写因子のデコイにより、対象転写因子の支配下の遺伝

子群を効率よく抑制出来た事は、本法が従来のアンチセンス療法に比べ治療効果をアップすることを期待させる。また、刺激に応じた標的選択の有効性も示唆された事から、今後病態に応じた標的因子の確立が望まれる。

また、今回の血管壁への遺伝子導入に、HVJ-リポソームを使用することで、極めて効率よく遺伝子導入を実現でき、その結果、血管内膜肥厚抑制にすぐれた治療成績を得られた。こうした結果に加え、HVJ-リポソームは、特別な遺伝子組換えやパッケージング技術を必要とせず調整が簡単である利点をもつ事から、臨床応用に向けて汎用性の高い遺伝子治療のツールとして期待できると考えられる。

E. 結論

HVJ-リポソームによる転写因子に対するデコイ導入は、広範な遺伝子群の発現制御を可能することから、極めて有効な治療手段となりうると思える。

F. 研究発表

1. 論文発表など

1. Nakagawa K, *et al.* Angiogenesis and Its Regulation: Roles of Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF). *Semin Thromb Hemost*, (in press).
2. Sakamoto T, *et al.* Target gene transfer to cornea by electric pulse inhibits intracamer fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Therapy*, 10(15), 2251-2257, 1999.

2. 学会発表など

1. Ishibashi H, *et al.* Novel anti-angiogenic gene therapy by cis-trans element decoy system against TNF- α induced Sp-1 transactivation. *XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Hematostasis*. (Washington DC.) 1999. Aug.14-21.
2. Katsuo Sueishi. Gene regulation of vascular function using HVJ-liposome system. *41st International Congress of Angiology*. (Sapporo) 1999. Jul. 3-10.

G. 知的所有権の取得状況

特記事項なし

H. 共同研究者

古森公浩¹、米満吉和¹、石橋浩晃²、中川和憲¹
(九州大学¹大学院医学系研究科、²歯学部)

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Molecular Medicine Today 5 Gene therapy using HVJ-liposomes; the best of both worlds?	1999	Elsevier Science Inc.	Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R. .
Hypertension 34 Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells.; Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth.	1999	Lippincott Williams & Wilkins	Aoki, M., Morishita, R., Matsushita, H., Hayashi, S., Nakagami, H., Yamamoto, K., Moriguchi, A., Kaneda, Y., Higaki, J., and Ogihara, T.
Circulation Research 85 Angiotensinogen gene-activating regulate blood pressure in the brain.	1999	American Heart Association	Nishii, T., Moriguchi, A., Morishita, R., Yamada, K., Nakamura, S., Tomita, N., Kaneda, Y., Fukmizu, A., Mikami, H., Higaki, J., and Ogihara, T.
Circulation Research 84 Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver in vivo.	1999	American Heart Association	Tomita, S., Tomita, N., Yamada, T., Zhang, L., Kaneda, Y., Morishita, R., Igihara, T., Dzau, V.J., and Horiuchi, M. :
Current Eye Res. 18 Phosphorothioate oligonucleotides induction into experimental choroidal neovascularization by HVJ-liposome system.	1999	Aeolus Press	Ogata, N., Otsuji, T., Matsushima, M., Kimoto, T., Yamanaka, R., Takahashi, K., Wada, M., Uyama, M., and Kaneda, Y.
Nature Medicine 5 Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats.	1999	Nature	Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E., and Fujimoto, J.
Molecular Membrane Biology, 16 Development of a novel fusigenic viral liposome system (HVJ-liposomes) and its applications to the treatment of acquired diseases.	1999	Taylor & Francis Ltd.	Kaneda, Y.
Ann. Thoracic Surgery 67 Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart.	1999	Elsevier Science Inc.	Ueda, H., Sawa, Y., Matsumoto, K., Kitagawa-Sakakida, S., Kawahira, Y., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Matsuda, H.
Human Gene Therapy 10 RNA melanoma vaccine; induction of anti-tumor immunity by human gp100 mRNA immunization.	1999	Mary Ann Liebert Inc.	Zhou, W-Z., Hoon, D.S.B., Huang, S.K.S., Fujii, S., Hashimoto, K., Morishita, R., and Kaneda, Y.
Gene Therapy 6 Reversing liver cirrhosis; Impact of gene therapy for liver cirrhosis.	1999	Stockton Press	Fujimoto, J., and Kaneda, Y.

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Human Gene Therapy 10 Regression of hepatocellular carcinoma <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation.	1999	Mary Ann Liebert Inc.	Kawashita, Y., Otsuru, A., Kaneda, Y., Kawazoe, Y., Eguti, S., Kuroda, H., Nagayama, Y., Fujioka, H., Yamashita, S., and Kanematsu, T.
Gene Therapy 6 Protective immunization against melanoma by gp100 DNA HVJ-liposome vaccine	1999	Stockton Press	Zhou, W-Z., Kaneda, Y., Huang, S.K.S., Morishita, R., and Hoon, D.S.B.
Kidney International 55 Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis.	1999	The International Society of Nephrology	Isaka, Y., Akagi, Y., Ando, Y., Tsujie, M., Sudo, T., Ohno, N., Border, W.A., Noble, N.A., Kaneda, Y., Hori, M., and Imai, E.
Ann. Thoracic Surgery 68 Myocardial protection with endogenous overexpression of manganese superoxide dismutase.	1999	Elsevier Science Inc	Suzuki, K., Sawa, Y., Ichikawa, H., Kaneda, Y., and Matsuda, H.
Methods in Molecular Medicine, Vascular Disease Hemagglutinating virus of Japan liposome-mediated gene delivery to vascular cells.	1999	Humana Press Inc.	Yonemitsu, Y. and Kaneda, Y.
Arthritis and Rheumat. 42 Suppressed severity of collagen-induced arthritis by <i>in vivo</i> transfection of nuclear factor kB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy.	1999	The American College of Rheumatology	Tomita, T., Takeuchi, E., Tomita, N., Morishita, R., Kaneko, M., Yamamoto, K., Nakase, T., Seki, H., Kato, K., Kaneda, Y., and Ochi, T.
Biochemistry Biophysics Research Communication 269 Ribosome associated protein LBP/p40 binds to S21 protein of 40S ribosome; analysis using a yeast two-hybrid system.	1999	Academic Press	Sato, M., Saeki, Y., Tanaka, K., and Kaneda, Y.
Biogenic Amines 14 Fusigenic Sendai virus-liposomes.	1998	VSP	Kaneda, Y.
Biochemistry Biophysics Research Communication 243 Role of AP-1 complex in angiotensin II-mediated transforming growth factor- expression and growth of smooth muscle cells using decoy approach against AP-1 binding site.	1998	Academic Press	Morishita, R., Gibbons, G. H., Horiuchi, M., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Dzau, V. J.
J. Vascular Surgery 27 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.	1998	The Society for Vascular Surgery and International Society for cardiovascular Surgery	Matsumoto, T., Komori, K., Yonemitsu, Y., Morishita, R., Sueishi, K., Kaneda, Y., and Sugimachi, K.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Gene Therapy 5 Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes.	1998	Stockton Press	Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K., and Kaneda, Y.
Gene Therapy 5 Persistent gene expression in rat liver in vivo by repetitive transfections using HVJ-liposome.	1998	Stockton Press	Hirano, T., Fujimoto, J., Ueki, T., Yamamoto, H., Iwasaki, T., Morishita, R., Sawa, Y., Kaneda, Y., Takahashi, H., and Okada, E.
Gene Therapy 5 A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing.	1998	Stockton Press	Nakamura, N., Timmermann, S.A., Hart, D., Kaneda, Y., Shrive, N.G., Ochi, T., and Frank, C.B.
Cell Death and Differentiation 5 The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40.	1998	Stockton Press	Kaneda, Y., Kaneda, Y., Kionoshita, K., Sato, M., Saeki, Y., Yamada, R., Wataya-Kaneda, M., and Tanaka, K.
Transplantation 66 Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas-ligand expressing plasmid.	1998	Lippincott Williams & Wilkins	Li, X-K., Okuyama, T., Tamura, A., Enosawa, S., Kaneda, Y., Takahara, S., Funashima, N., Yamada, M., Amemiya, H., and Suzuki, S.
Cell Biology; A laboratory handbook (2nd eds.) vol.4 Protein modified liposomes (HVJ-liposomes) for the delivery of genes, oligonucleotides and proteins.	1998	Academic Press	Saeki, Y., and Kaneda, Y.
Transplantation Proceedings 31 Down regulation of endothelin-1 expression in allograft coronary arteries after gene therapy targeting cdk2 kinase.	1998	Elsevier Science Inc.	Isobe, M., Suzuki, J., Morishita, R., Aoki, M., Amano, J., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T., Horie, S., Okubo, Y., Sekiguchi, M.
Biochemistry Biophysics Research Communication 253 LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4.	1998	Academic Press	Kinoshita, K., Kaneda, Y., Sato, M., Wataya-Kaneda, M., Saeki, Y., Hoffmann, A., and Kaneda, Y.
Biochemistry Biophysics Research Communication 231 The immediate early gene of human cytomegalovirus stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo.	1997	Academic Press	Yonemitsu, Y., Kaneda, Y., Komori, K., Hirai, K., Sugimachi, K., and Sueishi, K.
Gene Therapy 4 HVJ(Sendai virus)-cationic liposomes; a novel and potentially effective liposome-mediated gene transfer technique to the delivery to the airway epithelium.	1997	Stockton Press	Yonemitsu, Y., Kaneda, Y., Muraishi, A., Yoshizumi, T., Sugimachi, K., and Sueishi, K.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Gene Therapy 4 Experimental gene therapy to murine glioma by HVJ-liposome.	1997	Stockton Press	Mabuchi, E., Shimizu, K., Miyao, Y., Kaneda, Y., Kishima, H., Tamura, M., Ikenaka, K., and Hayakawa, T.
Human Gene Therapy 8 Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus); Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer.	1997	Mary Ann Liebert Inc.	Saeki, Y., Matsumoto, N., Nakano, Y., Mori, M., Awai, K., and Kaneda, Y.
J. Biological Chemistry 272 Efficient transfer of synthetic ribozymes into cells using hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-cationic liposomes; application for ribozymes that target HTLV-1 tax/rex mRNA.	1997	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.	Kitajima, I., Hanyu, N., Soejima, Y., Hirano, T., Arahira, S., Yamaoka, S., Yamada, R., Maruyama, I., and Kaneda, Y.
Arthritis and Rheumatism 40 Ribozyme-based gene cleavage approach to chronic arthritis associated with human T cell leukemia virus type	1997	The American College of Rheumatology	Kitajima, I., Hanyu, N., Soejima, Y., Kubo, T., Yamada, R., Kaneda, Y. and Maruyama, I.
Cellular and Molecular Biology 43 An efficient liposome-mediated gene transfer into the branchial arch, neural tube and the heart of chick embryos; A strategy to elucidate the organogenesis.	1997	Cellular and Molecular Biology	Yamada, G., Nakamura, S., Haraguchi, R., Sakai, M., Terashi, T., Sakisaka, S., Toyoda, T., Ogino, Y., Hatanaka, H., and Kaneda, Y.
J. Clinical Investigation 99 In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat.	1997	The American Society for Clinical Investigation Inc.	Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., and Matsuda, H.
Arthritis and Rheumatism 40 In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes.	1997	The American College of Rheumatology	Tomita, T., Hashimoto, H., Tomita, N., Morishita, R., Lee, S.-B., Hayashida, K., Nakamura, N., Yonenobu, K., Kaneda, Y., and Ochi, T.
Nature Medicine 3 In vivo transfection of cis element "decoy" against NFκB binding site prevented myocardial infarction as gene therapy.	1997	Nature	Morishita, R., Sugimoto, T., Aoki, M., Kida, I., Tomita, N., Moriguchi, A., Maeda, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Higaki, J., and Ogihara, T.

19990354

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P.7-10の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。