

世界的にもほとんど手を着けられていない分野であるが、カチオニックリポソームなど既存のベクターとの組み合わせが容易であると期待されること、RNAはDNAと違って遺伝子組換えがほとんど起こらないので宿主細胞の染色体との相互作用による副作用が無視できるなど、安全性の面で大きな利点がある。本年度の研究ではまだその端緒を開いたにとどまっているが、遺伝情報発現の調節が不要な場合は非常にシンプルなシステムであるため、今後は重点的に開発を進めていきたいと考えている。

#### D. 6 次世代アデノウイルスベクター開発基盤研究

アデノウイルスベクターの感染域は非常に広く、多くの細胞に遺伝子導入が可能であるが、遺伝子治療の重要なターゲットとなっている細胞・組織の一部において、CARの発現が乏しく、本ベクターが適用できない(あるいは十分な機能を発揮できていない)例がある。気道上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、T細胞、マクロファージ、造血幹細胞、樹状細胞、一部の癌細胞などは、CARの発現が乏しいためにアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率がそれほどよくないことが知られているが、これらの細胞に対してもファイバーを修飾したベクターを用いることにより効率良く遺伝子導入できることが期待される。即ち、目的とする組織に特異的な、あるいは親和性のあるペプチドをアデノウイルスベクターのファイバーに組み込むことで、標的細胞特異性を高めたり、遺伝子導入効率を改善することが可能と考えられる。

また、従来のアデノウイルスベクターの大きな問題点のひとつとして、ベクター感染細胞において産生された少量のウイルス蛋白質に対する免疫反応が生じることがあった。即ち、宿主由来のE1様蛋白質の働きや、非特異的な転写などによりウイルス蛋白質の産生が少量ながら起こり、これが免疫系細胞の標的となって、ベクター感染細胞が除去されることが明らかとなった。我々が開発したgutlessアデノウイルスベクターは、ウイルス遺伝子を全く含まないので、そのような免疫反応の完全回避が期待でき、アデノウイルスベクター投与による副作用を克服できるものと考えられる。また、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムと組み合わせることにより、標的細胞親和性を高めた上で、免疫反応という副作用も抑えたベクターを開発することが可能になった。

本研究で開発された技術は、いずれも次世代アデノウイルスベクター開発のための基本技術であり、この成果は国内外の多くの研究機関で利用されることが予想される。また、いずれのシステムも、各種ベクターが簡便に作製できるように構築されており、あらゆる研究機関での応用研究に直接使用できる。

#### E. 結論

本年度の研究により以下の結論を得た。

##### 1. 次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究

- 1) 膜融合リポソームの実用化に向けて製剤としての安全性に関わる問題を検討し、病原性ウイルスの混入を $10^{-16}$ 以下に抑えながら活性と安全性を保つ調製条件を決定した。また最終的な製剤としての形状を検討した。
- 2) プラスミドDNAを封入した膜融合リポソームはカチオニックリポソームのリポフェクテンと比較して、短時間での遺伝子導入、高い遺伝子発現効率、低い細胞傷害性および血清存在下でも遺伝子導入が可能といった特徴を有していた。特にin vivoの細胞に対してカチオニックリポソームに比べて優れた遺伝子導入効率を示し、in vivo遺伝子治療のための優れたベクターであると考えられた。
- 3) VSV-リポソームはヒト赤血球を溶血させず、ラット新鮮血漿中でも安定であることが認められた。またVSV-リポソームはリポソームと比べて効率よく蛋白質、プラスミドDNAを細胞に導入できることが判明した。

##### 2. 膜融合リポソームを用いた遺伝子治療応用研究

- 1) ヒトTNF- $\alpha$ 遺伝子を封入した膜融合リポソームの腫瘍支配動脈内投与により、投与部位の血管および腫瘍部位にTNF- $\alpha$ の発現が観察され、腫瘍の増殖は顕著に抑制された。これは腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞より絶えず分泌されるTNF- $\alpha$ によって抗腫瘍効果が得られたことを示しており、固形癌に対するin vivo遺伝子治療において全く新しい方法論を提示できたものと考えられた。
- 2) Degenerin(変異Naイオンチャンネル)遺伝子をCEAプロモーターにより癌細胞特異的に発現させるよう設計し、膜融合リポソームに封入してヒト胃癌腹膜播種モデルマウスに投与した結果、効果的な治療に成功した。膜融合リポソームはin situで一度に多くの細胞に遺伝子を導入できるため、殺細胞性の遺伝子産物を癌細胞特異的に発現させることで癌の遺伝子治療が可能となることが示された。
- 3) 抗血栓性因子トロンボモジュリン遺伝子を膜融合リポソームによりラット肝類洞内皮細胞へ導入し、遺伝子発現と膜融合リポソームの安全性を確認した。

##### 3. 導入遺伝子を高効率で核内に送達させるための技術基盤に関する研究

新しい発想の非ウイルスベクターとしてヒト免疫不全ウイルスのTatタンパク質由来のペプチドを表面に発現するTat-Phageの開発を行い、このペプチドに依存して細胞内にフェージ粒子内のDNAが導入され発現することを見いだした。この結果、Tat peptideを使った合成ポリマーによる遺伝子導入ベクターの開発に道を開くことができた。

##### 4. ミニ人工染色体の開発に向けた基礎研究

1) 人工染色体構築のための必須条件である染色体の安定性を決定する因子の解析を進め、染色体末端のテロメア配列に結合する TRF1 というタンパク質にその活性があることを見いだした。さらに、TRF1 は単に染色体を安定化する因子であるばかりでなく、細胞の寿命を決定し不死化に深く関与しており、TRF1 遺伝子の導入により細胞の寿命を選択的に延ばすなどの新しい方向性を示した。

2) ヒト型エピソーマルベクターの開発を目指し、EB ウイルスベクターの複製開始領域をヒト染色体複製領域と置換したベクターを構築し、種々の細胞で持続的な遺伝子発現を確認した。

#### 5. 細胞質内での遺伝子発現系の確立に関する研究

1) T7 発現系は *in vivo* においても効率よく遺伝子発現可能であり、非ウイルスベクターの欠点であった遺伝子発現効率を改善する系として期待された。

2) RNA から RNA を自律複製しつつ細胞質で遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発に必要な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの検討を進め、センダイウイルスの NP タンパク質にその活性があることを同定した。

#### 6. 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

1) 任意の外来ペプチドを表現し感染細胞特異性を制御できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムの開発のための基盤となるプラスミドを作製した。

2) 全てのウイルス遺伝子を欠損させた gutless アデノウイルスベクターの作製に関する技術基盤を確立した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Mahito NAKANISHI, Teruo AKUTA, Emi NAGOSHI, Akiko EGUCHI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao SENDA: Nuclear Targeting of DNA., J. Eur. Pharmacol. Sci. (in press)
2. Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Mizuguchi H., Uemura H., Yamada O., Mayumi T.: A novel nonviral vector based on vesicular stomatitis virus., J. Control. Release. (in press)
3. 水口裕之, 早川堯夫: アデノウイルスベクター作製技術と次世代ベクターへの応用 —ファイバーミュータントアデノウイルスを中心として—, 日本臨床, (印刷中)
4. 中西真人: 遺伝子治療とベクター開発の現状. Biotherapy, (印刷中)
5. Keisuke Miyake, Shoji Kimura, Mahito Nakanishi, Akihiko Hisada, Mamoru Hasegawa, Seigo Nagao and Youichi Abe.: Transforming growth factor-beta stimulates contraction of human glioblastoma cell-mediated

collagen lattice through enhanced alpha 2 integrin expression., Journal of Neuro-pathology and Experimental Neurology. 59, 23-33. (2000)

6. Hiroyuki Yuasa, Hitoshi Tanaka, Tatsuya Hayashi, Toshiaki Wakita, Hideaki Nakamura, Junji Nishioka, Yasufumi Kawarada, and Koji Suzuki: Bovine protein C inhibitor has a unique reactive site and can transiently inhibit plasmin., Thromb. Haemost. 38, 262-267 (2000)
7. Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA and Mark A. KAY: Efficient Preparation Method for a Recombinant Adenovirus Vector Based on Simple Plasmid Construction., Progress in Drug Delivery System, The Biochemical Research Foundation, Tokyo, (eds. R. Kimura, M. Hoshino, N. Oku, T. Nozawa and T. Sonobe), Vol.VIII, 53-63 (1999)
8. Akiko ISHII-WATABE, Hiroyuki MIZUGUCHI, Eriko UCHIDA, Teruhide YAMAGUCHI, Toru KAWANISHI, Akiko EGUCHI, Mahito NAKANISHI, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Target Cell Specificity of Fusogenic Liposome-mediated Macromolecule Delivery into Human Blood Cells., Progress in Drug Delivery System, The Biochemical Research Foundation, Tokyo, (eds. R. Kimura, M. Hoshino, N. Oku, T. Nozawa and T. Sonobe), Vol.VIII, 31-40 (1999)
9. Mahito NAKANISHI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Ken-ichi ASHIHARA, Takao SENDA, Akiko EGUCHI, Akiko WATABE, Tsuyoshi NAKANISHI, Masuo KONDO, Tetsuhiko NAKAGAWA, Akinori MASAGO, Jun OKABE, Shigeharu UEDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Gene Delivery Systems Using the Sendai Virus., Molecular Membrane Biology, 16, 123-127 (1999)
10. Hiroyuki MIZUGUCHI, Tsuyoshi NAKANISHI, Masuo KONDOH, Tetsuhiko NAKAGAWA, Mahito NAKANISHI, Takahiro MATSUYAMA, Yasuo TSUTSUMI, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI: Fusion of Sendai Virus with Liposome Depends on Only F Protein, but not HN Protein., Virus Research, 59, 191-201 (1999)
11. Akiko WATABE, Teruhide YAMAGUCHI, Toru KAWANISHI, Eriko UCHIDA, Akiko EGUCHI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tadanori MAYUMI, Mahito NAKANISHI and Takao 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)

12. Tsuyoshi Nakanishi, Jun Kunisawa, Akira Hayashi, Yasuo Tsutsumi, Kazuyoshi Kubo, Shinsaku Nakagawa, Mahito Nakanishi, Keiichi Tanaka and Tadanori Mayumi : Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins., *Journal of Controlled Release*, 61, 233-240 (1999).
13. Akira Hayashi, Tsuyoshi Nakanishi, Jun Kunisawa, Masuo Kondoh, Susumu Imazu, Yasuo Tsutsumi, Keiichi Tanaka, Hiromi Fujiwara, Toshiyuki Hamaoka and Tadanori Mayumi : A novel vaccine delivery system using immunopotentiating fusogenic liposomes, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 261, 824-828 (1999)
14. Gabazza, E.C., Taguchi O., Takeya, H., Kobayashi, H., Yasui, H., Kobayashi, T., Hataji, O., Urano, H., Zhou, H., Suzuki, K., Adachi, Y. : Thrombin in the airways of asthmatic patients., *Lung*, 177, 253-262 (1999)
15. Tatsuya Hayashi, Hideaki Nakamura, Akihide Okada, Shin-ichiro Takebayashi, Toshiaki Wakita, Hiroyuki Yuasa, Katsuzumi Okumura and Koji Suzuki : Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene., *GENE*, 238, 367-373 (1999)
16. Tetsuya Sano, Esteban C. Gabazza, Hong Zhou, Hiroyuki Takeya, Tatsuya Hayashi, Masaru Ido, Yukihiko Adachi, Atsumasa Uchida and Koji Suzuki : The zymogen prothrombin stimulates cell locomotion and calcium influx in murine osteosarcoma cells by different mechanism from thrombin., *International Journal of Oncology*, 15, 1197-1203 (1999)
17. 水口裕之, 早川堯夫 : In vitro ライゲーションに基づいた簡便なアデノウイルスベクター作製法, *細胞工学*, 18(12), 1824-1827 (1999)
18. 早川堯夫 : 遺伝子治療用医薬品及び細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保, *低温生物工学会誌 (Cryobiology and Cryotechnology)*, 45(1), 18-33 (1999)
19. 水口裕之, 早川堯夫 : アデノウイルスベクターの最近の進歩—免疫反応の抑制を目指した改良型ベクターの開発を中心に—, *蛋白質・核酸・酵素*, 44, 1405-1414 (1999)
20. 中西真人, 真砂明典, 江口暁子. : センダイウイルス (HVJ) の増殖サイクル, *遺伝子治療ハンドブック (日本遺伝子治療学会、編) (1999)*
21. 中西真人 : 遺伝子治療における DDS の役割、今日の DDS・薬物送達システム (高橋俊雄・橋田充、編) (1999)
- 学会発表
- 岡部潤・中西真人: ヒトテロメア結合タンパク質 (hTRF1) がテロメア形成に果たす機能の解析, 第 17 回染色体ワークショップ、2000 年、神戸.
  - 今津進, 林和行, 津田育弘, 堤康央, 中川晋作, 真弓忠範, 早川堯夫: 膜融合リポソームの癌遺伝子免疫療法への応用., 日本薬学会第 120 回年会, 岐阜, 2000 年 3 月.
  - 真砂明典・中西真人: センダイウイルスの NP タンパク質依存性 RNA ポリメラーゼ活性の解析. 第 22 回日本分子生物学会大会、1999 年 12 月、福岡.
  - 國澤純, 高橋一郎, 奥平章子, 中西 剛, 堤康央, 清野宏, 真弓忠範 : Novel Fusogenic Liposome Induce MHC class II mediated Mucosal and Systemic Helper T cell Responses., 第 29 回日本免疫学会総会, 京都, 1999 年 12 月.
  - 湯浅 浩行, 林辰弥, 脇田利明, 西岡 淳二, 鈴木 宏治: 敗血症時の血漿プロテイン S (PS) 値の低下機序の解析、第 22 回日本血栓止血学会, 1999 年 12 月, 宇都宮.
  - 湯浅 浩行, 林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治: リポポリサッカライド (LPS) 障害時の血漿プロテイン S (PS) 濃度の低下機序の解析、第 72 回日本生化学会大会, 1999, 10 月, 横浜.
  - 水口裕之, 早川堯夫: IRES 配列を有した bicistronic ベクターにおける first 遺伝子と second 遺伝子の発現効率の比較, 第 58 回日本癌学会総会, 1999 年 9 月.
  - Sano, T., Gabazza, E.C., Zhou, H., Uchida, A. and Suzuki, K. : The zymogen prothrombin promotes the motility of osteosarcoma cell lines by different mechanism from thrombin., XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999 年 8 月, ワシントン.
  - Wakita, T., Hayashi, T., Yuasa, H., Nishioka, J., Kawamura, J. and Suzuki, K. : Abnormally low expression of protein C inhibitor in human renal cell carcinoma., XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999 年 8 月, ワシントン.
  - Yuasa, H., Hayashi, T., Nishioka, J., Kawarada, Y. and Suzuki, K. : Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates protein S expression in rat sinusoidal endothelial cells., XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999 年 8 月, ワシントン.
  - Zhou, H., Gabazza, E.C., Sano, T. and Suzuki, K: Prothrombin enhances the invasiveness of

- melanoma cells by different mechanism from thrombin., XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999年8月, ワシントン.
12. Tanaka, H., Yuasa, H., Hayashi, T., Wakita, T., Nakamura, H., Nishioka, J. and Suzuki, K.: Molecular cloning, tissue distribution and functional characterization of bovine protein C inhibitor., XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999年8月, ワシントン.
  13. 水口裕之, 早川堯夫: 簡便なアデノウイルスベクター作製法の開発と次世代ベクターへの応用, 第15回日本DDS学会, 1999年7月.
  14. 中川晋作, 中川哲彦, 真弓忠範: 非ウイルスベクター系の遺伝子発現効率改善を目指した細胞質内遺伝子発現系の開発., 第15回日本DDS学会, 香川, 1999年7月.
  15. 中西真人: 遺伝子治療に向けたハイブリッド・ベクター開発の現状. 第15回日本DDS学会大会シンポジウム, 1999年7月.
  16. 湯浅 浩行, 林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治: LPS 刺激による肝類洞内皮でのプロテインSの産生低下は肝障害の一因となる, 第4回VascularMedicine学会, 1999年7月, 神戸.
  17. Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Mark A. Kay: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method, 第5回遺伝子治療学会, 1999年6月.
  18. Mahito Nakanishi, Tadanori Mayumi and Takao Hayakawa: Development of Hybrid Vectors: Up-to-Date. 第5回遺伝子治療学会, 1999年6月.
  19. Hiroyuki Mizuguchi, Mark A. Kay: A Simple Method for Generating New Recombinant Adenovirus Vector Based on In Vitro Ligation American Society of Gene Therapy, 2nd Annual Meeting, 1999年6月.
  20. 石井(渡部)明子, 水口裕之, 内田恵理子, 山口照英, 川西 徹, 江口暁子, 中西真人, 真弓忠範, 早川堯夫: ヒト血球系細胞における膜融合リポソームの標的細胞特異性, 第8回DDSカンファランス, 1999年6月.
  21. 水口裕之, 早川堯夫, Mark A. KAY: 簡便なプラスミド構築に基づいたアデノウイルスベクター作製法の開発 99, 第8回DDSカンファランス, 1999年6月.
  22. 湯浅 浩行, 林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治: 肝臓における抗凝固因子プロテインSの産生に及ぼすリポポリサッカライド(LPS)の影響, 第63回日本生化学会中部支部例会, 1999, 5月, 津.
  23. 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: 重症感染症における肝類洞内皮細胞でのプロテインS産生の変動, 第14回日本 shock 学会, 1999, 5月, 大津.
  24. 國澤純, 中西 剛, 奥平章子, 形山和史, 堤康央, 中川晋作, 真弓忠範, 高橋一郎, 清野宏: 新規経粘膜ワクチンキャリアーとしての膜融合リポソームの有用性評価および免疫誘導機序に関する基礎的検討., 第49回日本薬学会近畿支部, 京都, 1999年.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)
1. 特許取得
    - 1) パラミキソウイルス属ウイルスの RNA polymerase 活性の定量法(予定)
    - 2) ファイバーミュータントアデノウイルス作製法(予定)

Table 1

Effect of Various Methods for Inactivating SV on Productivity and on Gene Transfer Activity of FL

Methods	FL, produced (OD <sub>540</sub> )	Luc. Activity (K counts / unit FL)
UV Light	5.6	13.004
Beta-PL	7.7	15.308

紫外線(UV Light)やbeta-propiolactone(beta PL)で不活化したセンダイウイルス15 unitsとリポソーム12unitsからできる膜融合リポソームの量と遺伝子導入の比活性を示した。

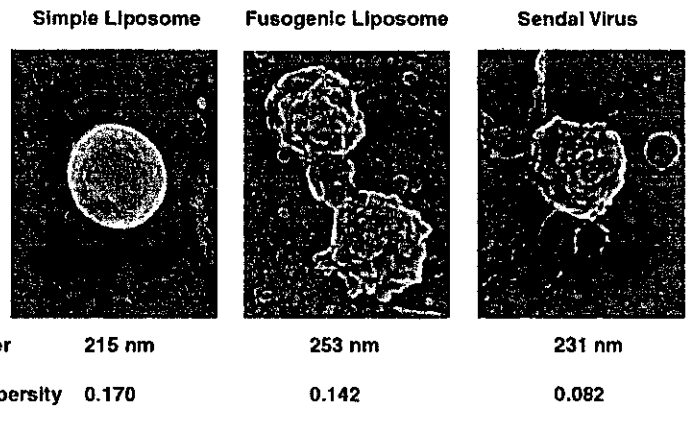


Fig.1 走査型電子顕微鏡による膜融合リポソーム(中)、リポソーム(左)、センダイウイルス(右)の構造観察

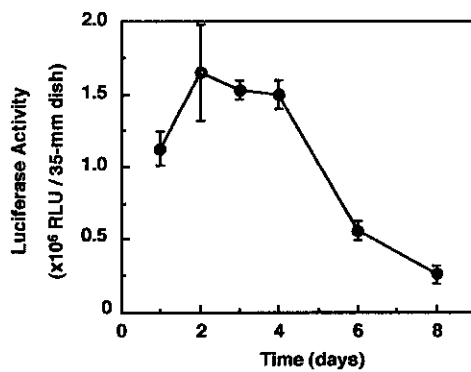


Fig.2 Time course of gene expression in L cells transfected with fusogenic liposomes

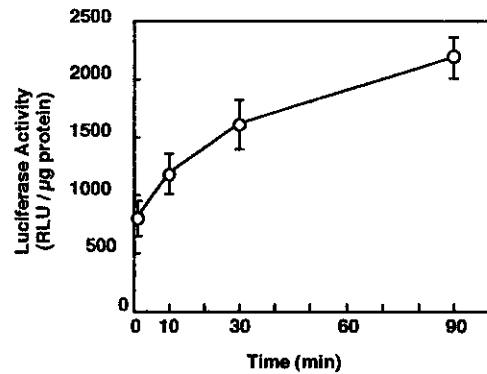


Fig. 3 Effect of incubation time on transfection efficiency

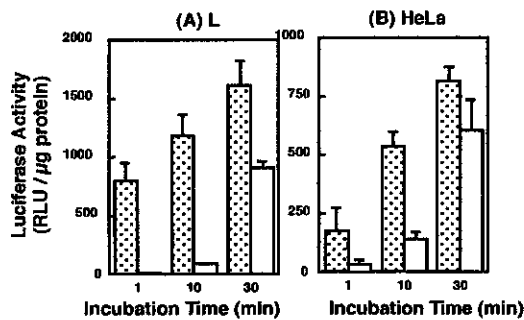


Fig.4 Effect of incubation time on transfection efficiency of fusogenic liposome and cationic liposome

L (A) and HeLa (B) cells were incubated with fusogenic liposomes containing pCAL2 (□) with OD<sub>540</sub> of 0.25 (DNA 0.5 μg/ml) or complexes of cationic liposomes and pCAL2 (cationic liposomes 2.5 μg/ml, DNA 0.5 μg/ml) (▨) at 37 °C for 1, 10, or 30 min. After 48 h in culture, luciferase activity was determined. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments for fusogenic liposomes and of four experiments for complexes of cationic liposomes and DNA.

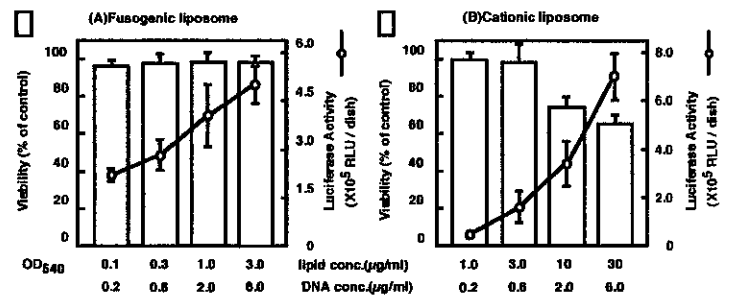
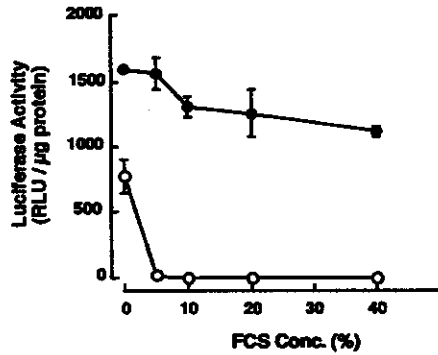


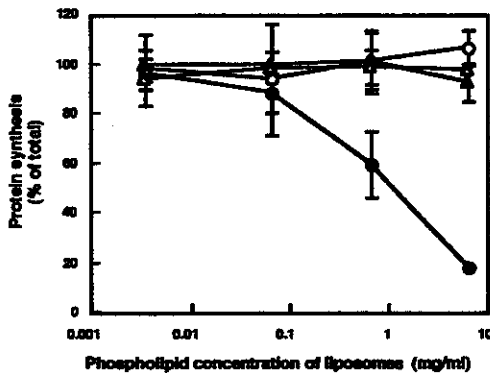
Fig. 5 Effect of the concentration of vectors on gene transfer activity and toxicity

L cells seeded on 35-mm dishes were incubated with various concentration of fusogenic liposomes containing pCAL2 (A) and complexes of cationic liposomes and pCAL2 (B) at 37 °C for 90 min. After 48 h in culture, the cells were harvested and the luciferase activity and the amount of extractable protein were determined. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments for fusogenic liposomes and of four experiments for complexes of cationic liposomes and DNA.



**Fig.6 Effect of serum proteins in the medium on gene transfer activity**

L cells seeded on 35-mm dish were treated with 0.5 ml of MEM supplemented with 10, 20, 40, or 80 % FCS, and were transfected with 0.5 ml of serum-free suspensions of fusogenic liposomes containing pCAL2 with OD540 of 0.5 (final OD540=0.25, DNA 0.5 μg/ml) (●) or complexes of cationic liposomes and pCAL2 (cationic liposomes 5.0 μg/ml, DNA 1.0 μg/ml) (○) at 37 °C for 30 min (final FCS concentration is 5, 10, 20, or 40 %). After 48 h in culture, luciferase activity was measured. Each point represents the mean ± S.D. of four experiments.



**Fig.7 Effect of VSV-liposomes containing DTA on FL cells**

FL cells were incubated with various concentrations of empty liposome (Δ), liposomes containing DTA (▲), empty VSV-liposome (○), DTA-containing VSV-liposome (●) at 37°C for 3 hours and cultured with normal medium for 24hr. Then the cells were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S] methionine for 3h, and [<sup>35</sup>S] counts incorporated into TCA-precipitable materials were examined.

**Table 2 Comparison of in vivo gene transfer activity of fusogenic liposomes and cationic liposomes**

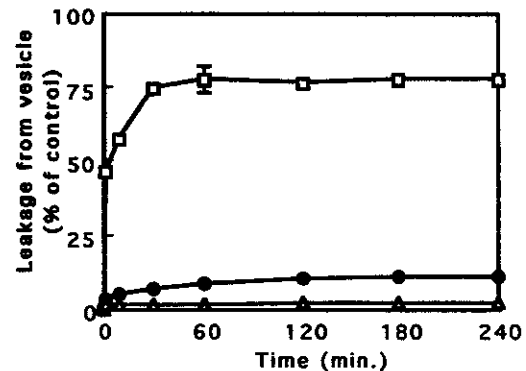
Treatment	DNA Conc. (μg/mouse)	Luciferase Activity (RLU/107 cells)
Fusogenic liposome a)	1.5	8013 ± 809
Cationic liposome b)	1.5	4.9 ± 0.7
	40.0	92.2 ± 18.5

S-180 (1X106) cells were i.p. injected into male ddY mice at day 0. At 5 days, fusogenic liposomes containing pCAL2 or complexes of cationic liposomes and pCAL2 were given i.p. At 7 days, S-180 cells were recovered and luciferase activity was measured.

a); Fusogenic liposomes containing 1.5 μg of pCAL2 were injected i.p. b); Complexes of cationic liposomes and 1.5 or 40.0 μg of pCAL2 (DNA : cationic liposomes = 1 : 5 (w)) were injected i.p. Means ± S.D.; n=3

**Table 3 Effect of pH on hemolysis activity of VSV-liposome**

Vesicles	Hemolysis activity (% of control)		
	pH 5.5	pH 6.3	pH 7.0
HVJ-liposome	49.3 ± 1.8	66.5 ± 3.0	71.2 ± 3.9
VSV-liposome	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Liposome	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1

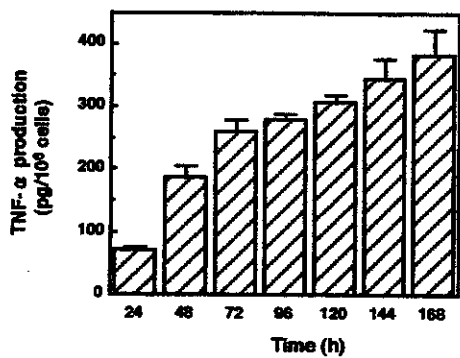


**Fig.8 Stability of VSV-liposome in plasma**

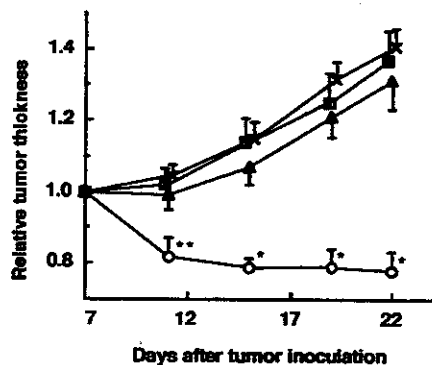
Fifty micro liter of VSV-liposomes containing carboxyfluorescein (●), HVJ-liposomes containing carboxyfluorescein (□), and liposomes containing carboxyfluorescein (Δ) was reacted with 450 μl of freshly rat plasma for the various time. Fluorescent intensity of the mixture was measured. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments.

**Table 4 Effect of duration of culture on luciferase activity in LLCMK2 cells transfected by various liposomes**

Vesicles	Luciferase Activity (RLU/μg protein)			
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
HVJ-liposome	77502 ± 1241	149301 ± 7800	62250 ± 3542	4440 ± 1427
VSV-liposome	255 ± 80	590 ± 47	2127 ± 80	1340 ± 29
Liposome	12 ± 8	5 ± 2	1 ± 1	1 ± 1

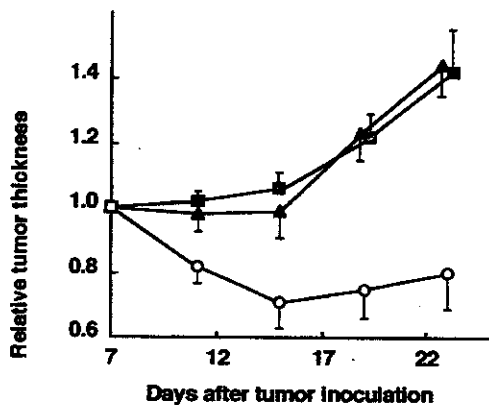


**Fig. 9** TNF- $\alpha$  production from cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) transfected by fusogenic liposomes containing pCATNF2



**Fig. 10** Tumor growth after the direct gene transfer into the femoral artery

S-180 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were inoculated into the left footpad of ddY mice. On day 7, 30  $\mu$ l of fusogenic liposomes containing pCATNF2 (○) with OD540 of 6.0, which contained 0.36  $\mu$ g of DNA, was then injected into the femoral artery controlling tumors using a 27-gauge needle. As a control, mice were treated in the same fashion with an identical quantity of fusogenic liposomes containing pCAL2 (■), which was expression plasmid for firefly luciferase, or saline (▲). Fusogenic liposomes containing pCATNF2 was also injected into the femoral artery of the right legs without tumors (X). Blood flow was stopped for 10 min to transfected the artery. After incubation, the needle hole was closed with an adhesive agent and blood flow was restored. The thickness of footpad was measured every 3 or 4 days to monitor the tumor growth. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 11 to 13 mice. Statistical significance compared with saline-control group: \* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.05$ .



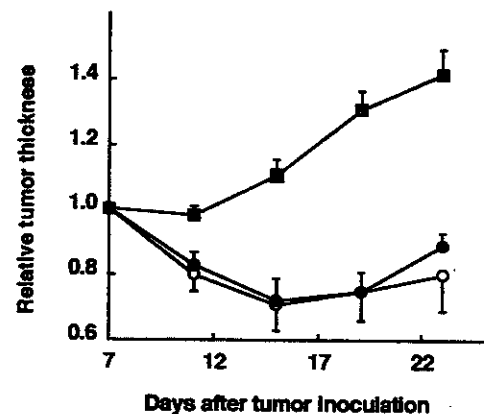
**Fig. 12** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell involvement in suppression of S-180 solid tumor by fusogenic liposomes containing pCATNF2

Mice were injected i.v. with 0.5 mg of either anti-CD4 or anti-CD8 mAb on the day before the administration of fusogenic liposomes containing pCATNF2. The thickness of footpad was measured every 4 days to monitor the tumor growth. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 or 7 mice. ○, non-treatment; ■, anti-CD4; ▲, anti-CD8

**Table 5** *In vivo* expression of human TNF- $\alpha$  in the artery vessels and tumors of the mouse after direct transfection of fusogenic liposomes containing pCATNF2

Human TNF- $\alpha$ production	
artery vessels (pg/cm vessels)	370.3 $\pm$ 134.7
tumor (pg/site)	68.9 $\pm$ 19.6

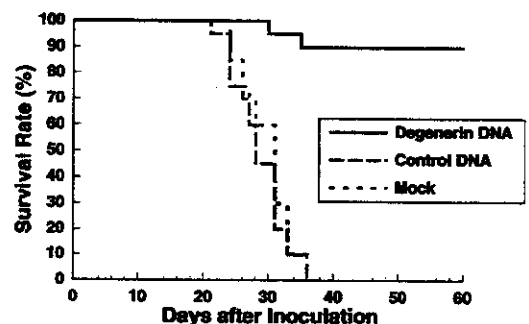
S-180 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were inoculated into the footpad of ddY mice. On day 7, 30  $\mu$ l of fusogenic liposomes containing pCATNF2 with OD540 of 6.0, which contained 0.36  $\mu$ g of DNA, was injected into the femoral artery using a 27-gauge needle. Blood flow was stopped for 10 min to transfected the artery. After incubation, the needle hole was closed with an adhesive agent and blood flow was restored. Forty eight hours later, the femoral artery (1 cm) transfected with fusogenic liposomes containing pCATNF2 and S-180 cells were recovered and human TNF- $\alpha$  levels were measured by ELISA. Data represents mean  $\pm$  S.D. of four experiments.



**Fig. 11** Anti-human TNF- $\alpha$  antibody blocks the anti-tumor effect of fusogenic liposomes containing pCATNF2

Mice were injected i.p. with 0.1 mg of mAb against human TNF- $\alpha$  at day 0 and 3 after the administration of fusogenic liposomes. As a control, mice were treated in the same fashion with an identical quantity of isotype-matched irrelevant antibody (mouse anti-human IL-6; SK2). The thickness of footpad was measured every 4 days to monitor the tumor growth.

○, non-treatment; ■, anti-human TNF- $\alpha$ ; ●, anti-human IL-6. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 7 to 9 mice.



**Fig. 13** CEAプロモーター/Degenerin遺伝子による胃癌腹膜播種モデルの治療実験

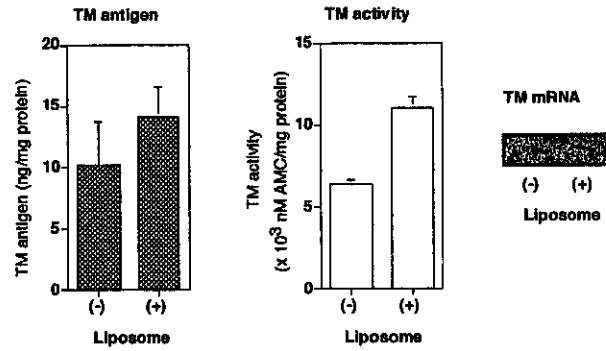


Fig. 14 Effect of treatment of rat liver sinusoidal endothelial cells with fusogenic liposome containing human TM expression vector in the *in vitro* studies

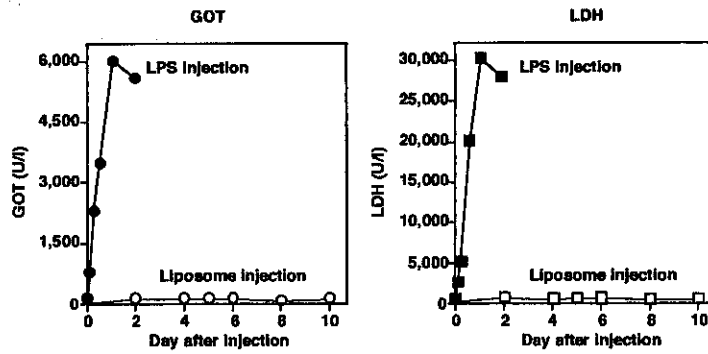


Fig. 15 Plasma GOT and LDH levels of rats treated with LPS or fusogenic liposome

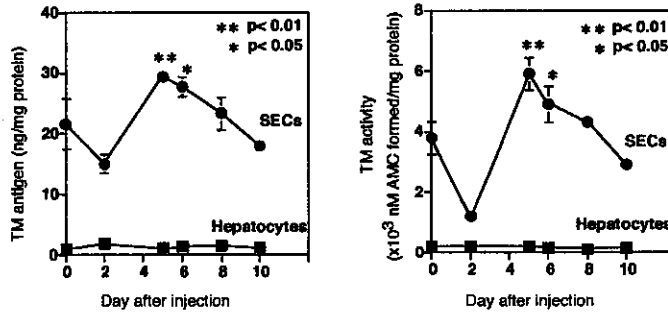


Fig. 16 Effect of fusogenic liposome containing human TM expression vector on TM antigen and activity levels of sinusoidal endothelial cells (SECs) and hepatocytes

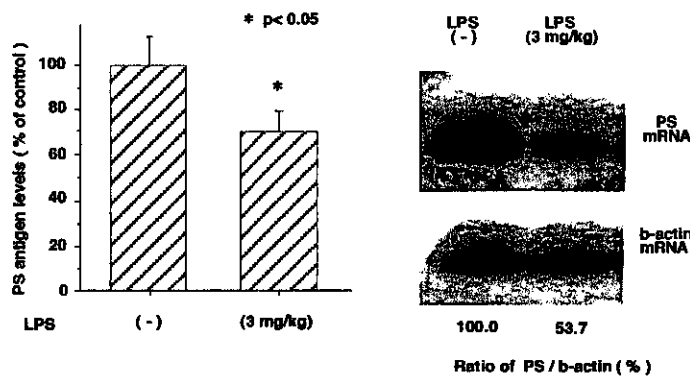


Fig. 17 Protein S expression in cultured SECs isolated from LPS-injected rats.



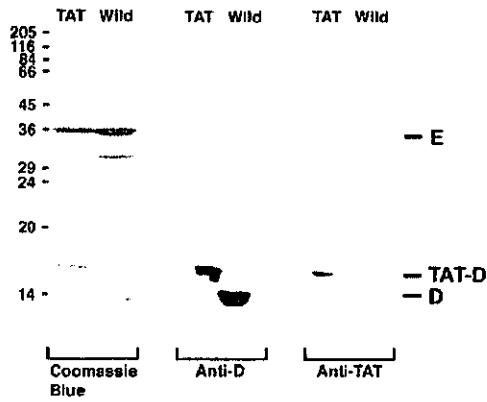


Fig. 18 Tat peptideを頭部を持つLambda Phageの蛋白質組成

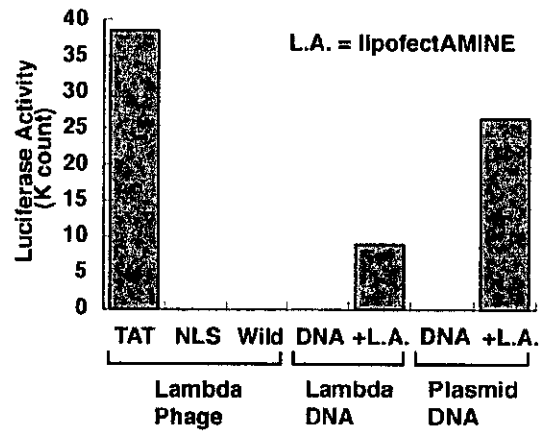


Fig. 19 Tat-Phageによる遺伝子導入 (1) 陽荷電リポソームとの比較

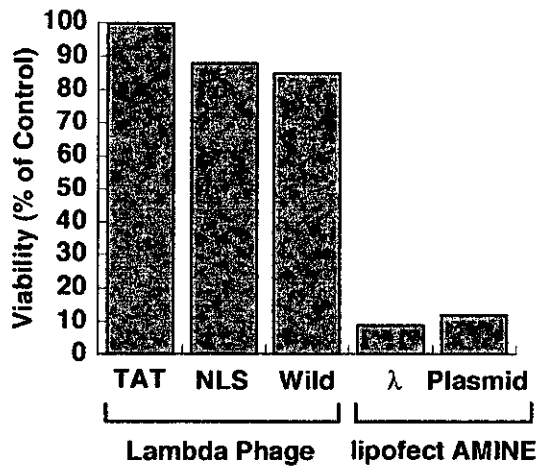


Fig. 20 Tat-Phageによる遺伝子導入 (2) 細胞毒性の検定

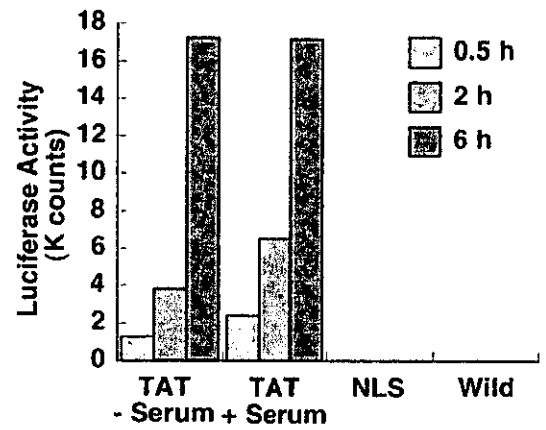


Fig. 21 Tat-Phageによる遺伝子導入 (3) 細胞との接触時間の影響

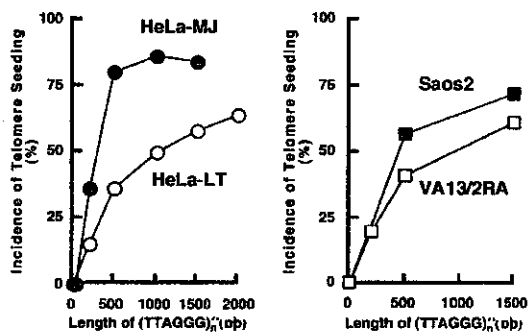


Fig. 22 テロメアシーディングに及ぼすテロメアの長さの影響

**Table 6 Relationship between various cellular parameters and the frequency of telomere seeding**

Cell line	Frequency of Telomere Seeding %, (Tel/Exam.)*	Total length of TR in a single cell kbp/cell†	Telomerase Activity‡		Number of Chromosomes§
			TRAP	Stretch PCR	
BJcl-1R	88 (28/32)	151	8.3	13.1 ± 3.0	44 ± 2.7
HeLa-MJ	83 (24/29)	193	1.0	1.0	68 ± 12.3
GM0131	68 (27/40)	249	8.4	15.8 ± 4.3	83 ± 21.8
293	68 (15/22)	411	7.4	7.5 ± 3.1	82 ± 30.4
Saos-2	57 (19/33)	964	<0.05	<0.05	86 ± 6.8
Raji	44 (19/43)	1119	10.0	10.5	51 ± 11.8
VA13/2RA	41 (26/63)	2672	<0.05	<0.05	70 ± 5.3
HeLa-LT	36 (9/25)	3256	5.2	4.9 ± 2.2	74 ± 21.9

\* Incidence of telomere seeding was calculated as the fraction of telomeric events in examined integration events.

† Total TR length in a single cell was determined from the signal intensity detected by (TTAGGG)<sub>3</sub> probe, using HeLa-LT cells as the standard.

‡ Relative activity, indicating the activity in HeLa-MJ cells = 1.0. The activity determined by Stretch PCR method represent mean ± SD in four independent experiments. <0.05 means less than the detection limit.

§ The variation of chromosome numbers represents mean ± SD in fifty metaphase preparations.

**Table 7 Relationship between the amount of telomere binding factors and the frequency of telomere seeding**

Cell line	Frequency of Telomere Seeding*	Total length of TR in a single cell*	TRF1†		TRF2‡	
			pg/μg WCE	molecules/kb TR	ratio	ratio/kbp TR
<b>Human immortalized cell lines</b>						
BJcl-1R	88	151	9.6	126	5.5 ± 1.6	71.9
HeLa-MJ	83	193	9.9 ± 2.4	92	1.0	10.2
GM0131	68	249	9.3 ± 0.3	65	1.6 ± 0.3	12.4
293	68	411	11.6 ± 1.1	56	1.6 ± 0.5	5.9
Saos-2	57	964	11.4	26	1.0 ± 0.4	2.1
Raji	44	1119	13.9 ± 5.8	16	3.4 ± 0.7	3.8
VA13/2RA	41	2672	30.6	16	0.9 ± 0.2	0.6
HeLa-LT	36	3256	31.2 ± 2.9	15	1.7 ± 0.5	1.0
<b>HeLa-LT derived cells overexpressing FLAG-TRF1</b>						
TX1	81 (21/26)	462	160.4	462	1.4 ± 0.4	5.0
TX34	83 (35/42)	411	201.9	679	1.2	4.9
TX36	73 (19/26)	3802	127.5	76	1.6	0.7
<b>Primary fibroblasts</b>						
NSF-16	N.D.	1850	2.8	2.0	0.8 ± 0.2	0.6
TIG3-20PDL	N.D.	2168	4.4	3.9	N.D.	N.D.
TIG3-40PDL	N.D.	1969	3.8	3.6	N.D.	N.D.
TIG7-20PDL	N.D.	2232	3.4	2.8	N.D.	N.D.
TIG7-40PDL	N.D.	1790	2.8	2.3	N.D.	N.D.
TIG7-60PDL	N.D.	1479	3.9	3.7	N.D.	N.D.

† The amount of TRF1 in whole cell extract (WCE) was determined by using recombinant TRF1 as the standard.

‡ The relative amount of TRF2 in WCE, indicating the amount in HeLa-MJ cells = 1.0. Both values of TRF1 and TRF2 represent mean ± SD in three independent experiments.

N.D., not determined.

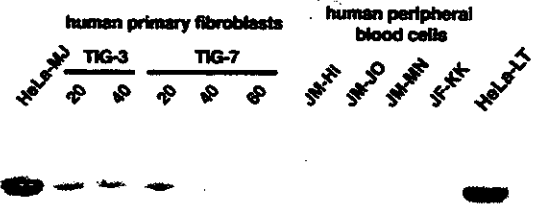
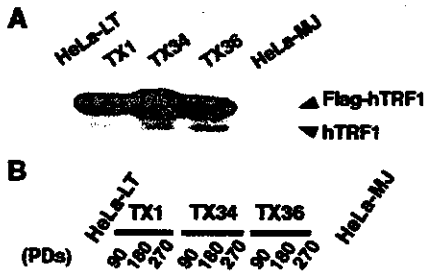


Fig. 24 初代培養体細胞のTRF1含量

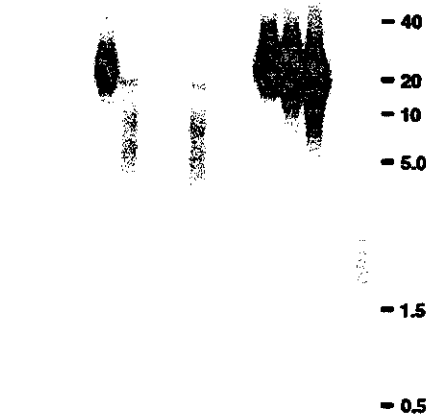


Fig.23 TRF1過剰発現細胞の性質  
A. TRF1の発現量  
B. テロメアの長さ

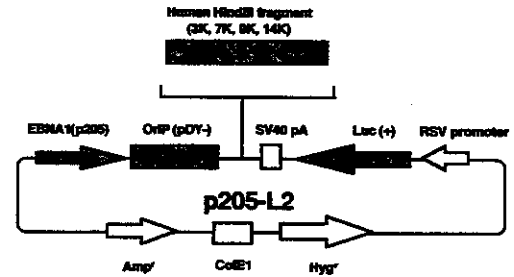


Fig.25 Structure of luciferase expression plasmid p205-L2 and human DNA inserts

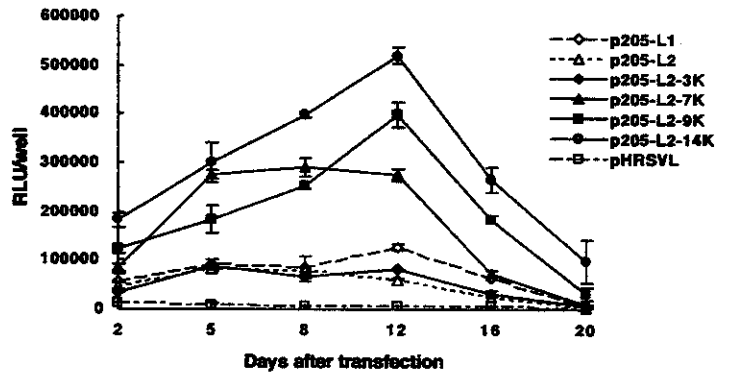


Fig.26 Long term gene expression of p205-L2 plasmids containing a human DNA fragment

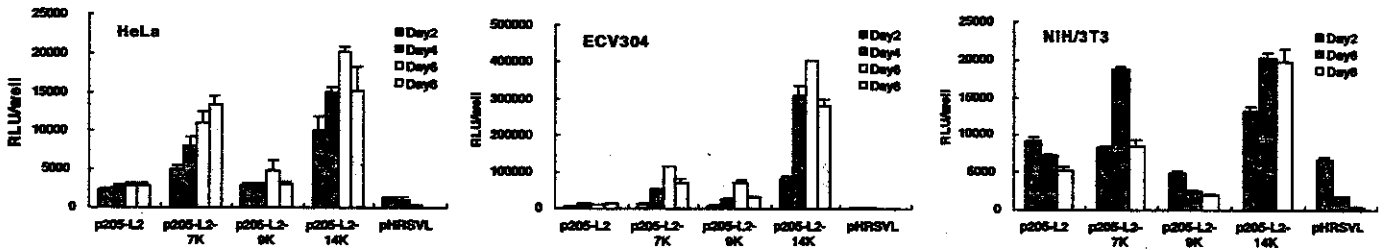


Fig.27 Gene expression of p205-L2 plasmids

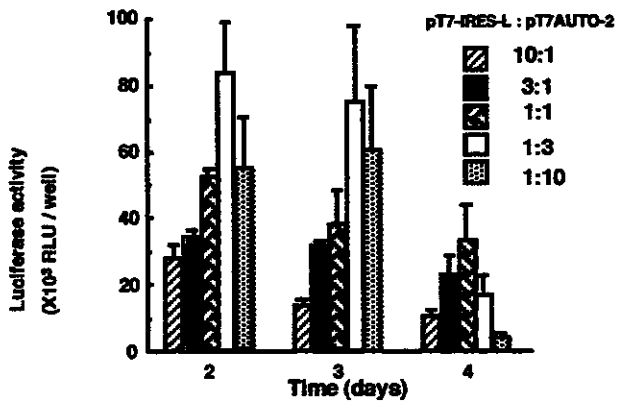


Fig.28 Effect of concentration ratio of pT7-IRES-L and pT7AUTO-2 on luciferase activity

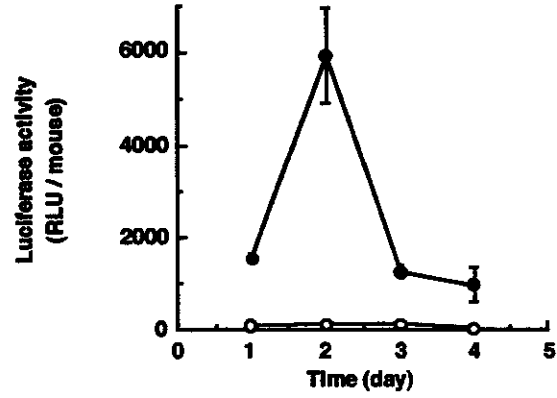


Fig.29 Time course of luciferase expression in newborn mouse brain

Complexes of pT7-IRES-L (7ng), pT7 AUTO-2 (43ng), T7 RNA polymerase ( 2.5U) and lipofectin (250hg) (●) or pRSVL (7ng) - lipofectin (35ng) (○) complexes were injected into the newborn mouse brain. After each day, brain was recovered and luciferase activity was measured.

Table 8 NP蛋白質に存在するRNA polymeraseの測定

	NP	P	L	pHVLucIB	Luci/β-Gal
1	+	+	+	+	723.0
2	+	+	-	+	268.9
3	+	-	+	+	423.8
4	-	+	+	+	43.9
5	+	-	-	+	279.0
6	-	+	-	+	5.2
7	-	-	+	+	5.0
8	-	-	-	+	0.1
9	+	-	-	-	0.0

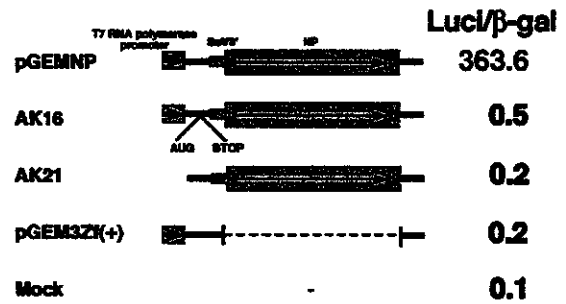


Fig. 30 NP发现ベクターの構造とRNA polymerase活性

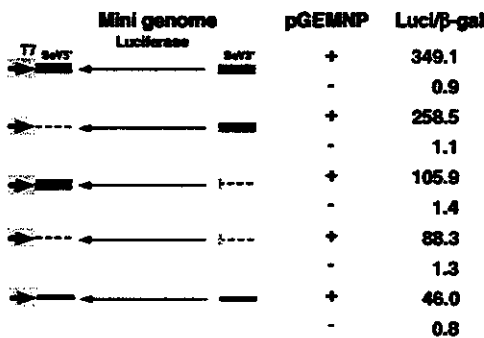


Fig.31 NP蛋白質の持つRNA polymerase活性が要求する鋳型RNAの構造

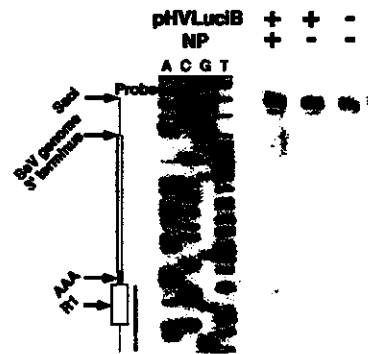


Fig.32 NP蛋白質によって合成されたRNAの5'端の構造

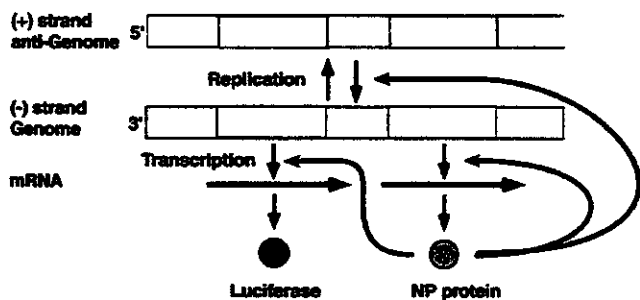


Fig. 33 NPタンパク質を使った遺伝子発現系の設計

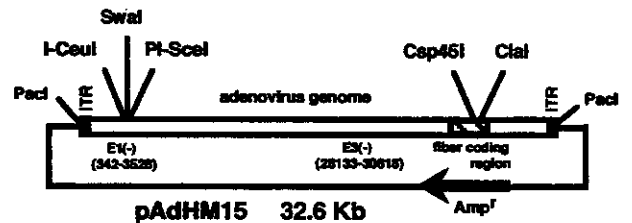


Fig.34 ファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムの基盤となるプラスミド

分担研究報告書

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究

分担研究者 真弓 忠範 大阪大学薬学研究科 教授

研究要旨

次世代ハイブリッドベクター開発基盤研究として、平成9・10年度の知見を踏まえ、最適粒子設計された遺伝子導入ベクターとして膜融合リポソームの有用性を評価した。その結果、膜融合リポソームは、カチオニックリポソームのリポフェクチンと比較して、短時間での遺伝子導入、高い遺伝子発現効率、低い細胞傷害性および血清存在下でも遺伝子導入が可能といった特徴を有していた。さらに、*in vivo* 直接遺伝子導入においては、膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA複合体と比較して、1,000倍以上の効率を示し、特に *in vivo* 遺伝子治療のための優れたベクターであると考えられた。これらの結果を踏まえてヒト Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 遺伝子を封入した膜融合リポソームの腫瘍支配動脈内投与による *in vivo* 癌免疫遺伝子治療を行った結果、投与部位の血管および腫瘍部位に TNF- $\alpha$  の発現が観察され、腫瘍の増殖は顕著に抑制された。さらに、平成10年度に確立した細胞質内遺伝子発現システム (T7発現系) は *in vivo* でも効率の良い遺伝子発現を示す事を明らかにし、非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療において応用可能であることを示した。また、平成10年度に開発した VSV (Vesicular Stomatitis Virus) -リポソームの有用性を検討した結果、ヒト赤血球を溶血させず、血漿中でも安定で、リポソームと比較して蛋白質やプラスミド DNA を効率よく細胞内に導入でき、その有用性が示唆された。

A. 研究目的

疾病の複合化や新たな難病の出現に伴い、遺伝子そのものを薬物として捉える遺伝子治療が次世代治療法として考案され、薬物の概念が急速に変化してきている現在、遺伝子をも含めた創薬研究は全く新たな視点が要求されるようになってきた。これまでの薬物送達システム (DDS) 研究に観られる薬物の生体内挙動を厳密に制御する手法の開発はもちろんのこと、今後は組織レベルから細胞レベル、さらにはオルガネラレベルでの薬物送達を可能にし、よりミクロな視点での動態制御に関する研究を推進してゆく必要がある。少なくともこれまでとは違い、遺伝子という「薬物」は吸収されないばかりか、血中で速やかに分解されてしまううえ、細胞内に導入されない限り作用の発現は皆無である。薬学的観点に立てば、遺伝子だけでなく蛋白質、糖、脂質等、どのような生理活性物質であっても、体内の如何なる細胞内にも送達でき得るという手段は最も重要なテクノロジーであり、この様な物質導入技術の開発は、DDSのみならず生命科学の基礎的研究にとっても必要不可欠となってくる。しかし、細胞は自身の恒常性を維持するために細胞膜というバリアーを有しており、細胞内への遺伝子などの高分子物質の移行

は厳密に制御されている。そのため、いかにして細胞膜を透過させるかが問題となる。これまでは物理化学的方法により、このバリアーを一時的に破壊して細胞内への物質導入が試みられてきたが、細胞膜の本来の機能に傷害を与えることは、この分野、特に遺伝子治療領域においては致命的であり、この点に充分配慮した DDS を考えなければならない。

遺伝子治療を成功させるための一番の鍵は、遺伝子導入効率が良く、安全性の高いベクターの作製にかかっており、学際的に重要かつ緊急課題として認識されている。現在までに米国を中心にレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターをはじめとするウイルスベクター法や、合成脂質を用いたカチオニックリポソーム法などが開発され、基礎から応用に至る莫大なデータが蓄積されてきている。しかしウイルスベクター法は、ウイルスの感染能力を利用するため、遺伝子導入効率が高い利点を有する反面、サイズの大きい DNA に適応出来ない事、発癌性や細胞毒性に関する懸念が拭いきれない事などの欠点を有し、解決すべき問題点が未だ多く存在する。一方、カチオニックリポソーム法は導入する遺伝子の形状やサイズに制限がなく、上述のような危険性がない反面、ウイルスベクター法に比べ遺伝子導入

効率は著しく低い。これら既存のベクターの改良も種々検討されているが、それにも限界が見えはじめているのが現状であり、新しい発想に基づいたベクターの開発が緊急かつ重要な課題となっている。以上の観点から我々は、ウイルスベクターの持つ高い遺伝子導入効率と、非ウイルスベクターの持つ安全性や、あらゆる遺伝子を導入出来るなどの性質を合わせ持ったハイブリッド・ベクターである膜融合リポソームを提示してきた。この我が国独自の遺伝子導入ベクターである膜融合リポソームは、センダイウイルスの膜融合能をリポソームに付与したものであり、細胞膜との融合によりリポソーム内に封入した遺伝子などの物質を直接効率よく細胞質内に導入出来る。この膜融合リポソーム法では、センダイウイルスの膜融合能を利用しているが、本ウイルスは元々ヒトに対して病原性を示さないうえ、事前に紫外線照射によりウイルス RNA を完全に断片化しておくため、感染の心配が無く、他のウイルスベクターの様な危険性は無い。さらに、ウイルスベクターとは異なり、リポソーム内に封入することが出来れば導入する遺伝子の形状(塩基配列)および大きさに制限がなく、生理活性蛋白質や糖脂質などの様々な高分子物質をも自由に効率よく、インタクトな状態で細胞内導入することが出来るなど、多くの好都合な特徴を有している。また本リポソームはウイルスとほぼ同等の膜融合活性を持っており、ほとんど全ての動物細胞に対して物質導入が可能であることから、限りなく適用範囲が広い方法である。すなわち膜融合リポソームは、現在、遺伝子導入ベクターとして具備すべき条件として考えられている、1) ヒトに対して非病原性、2) 無細胞毒性、3) 導入遺伝子の形状に関する許容性、4) 高い遺伝子導入効率などの課題を克服している唯一のベクターと考えられる。以上の優れた遺伝子導入ベクターとなり得る膜融合リポソームの安全性・有効性をさらに確保していくこと、さらには膜融合リポソームの特性を生かした遺伝子発現システムの構築などを目的に、平成9年度はセンダイウイルスの融合機構解明、膜融合リポソームの最適粒子設計法確立、細胞質内直接遺伝子発現システムの開発などを試みた。その結果、リポソーム表面電荷と物質導入効率、安全性、生体内安定性などの相関を追求したところ、in vivo 直接遺伝子導入を想定した場合、現状ではアニオン膜融合リポソームが最もこれらバランスに優れていること、カチオン膜融合リポソームに関してはさらに詳細な検討が必要となることなどが判明した。またセンダイウイルスの被膜上に存在する二種のエンベロップ蛋白質のうち、HN 蛋白質はリポソームとの融合には関与しておらず、F 蛋白質を介して融合していることが示唆された。一方、細胞質内での遺伝子発現系に関する研究として、T7

promoter 制御 T7 RNA ポリメラーゼ発現 プラスミド (pT7AUTO2) 、および reporter gene として T7 promoter 制御 luciferase 発現プラスミド (pT7-IRES-L) の構築に成功した。以上の知見をもとに平成10年度は膜融合リポソーム内への遺伝子封入効率の向上や細胞内遺伝子導入効率の増強、封入遺伝子の安定化等を目指した。その結果、膜融合リポソームの粒子径を増大させること、さらには遺伝子をスベルミジンと共に膜融合リポソーム内に封入することにより、遺伝子封入効率の向上や細胞内遺伝子導入効率の増強、封入遺伝子の安定化が可能となり、その遺伝子発現効率を著しく改善し得ることが判明した。また平成9年度に構築した pT7-IRES-L (T7 プロモーター制御下でのルシフェラーゼ発現プラスミド) および pT7AUTO-2 (T7 プロモーター制御下での T7RNA ポリメラーゼ発現プラスミド) を用い、遺伝子発現に核移行を要しない、細胞質内遺伝子発現システムの開発を試み、従来までの非ウイルスベクター共通の問題であった導入遺伝子の核移行性の乏しさを回避し得るシステムの開拓を図った。その結果、T7 発現系の有用性を in vitro 評価したところ、リポフェクチンを遺伝子導入ベクターとして適用し、pT7-IRES-L と T7RNA ポリメラーゼを細胞質内に導入することで、遺伝子導入後僅か6時間で高い遺伝子発現が認められた。この遺伝子発現は、pT7AUTO-2 を加えることによりさらに増強・延長されており、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。また、膜融合リポソームにかわる新たなハイブリッドベクター候補として、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-リポソームの作製に成功した。平成11年度は、平成9・10年度の知見を踏まえ、最適粒子設計された膜融合リポソームを用い、in vivo 癌免疫遺伝子治療を行うことで、膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとして安全性・有用性を詳細に評価した。また細胞質内遺伝子発現システムの有用性を in vivo 評価することで、脳疾患に対する遺伝子治療法の開拓をも考案しようと試みた。さらに平成10年度に新規創製した VSV-リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有用性を検討した。

## B. 研究方法

(1) ルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 の構築

ラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus; RSV) long terminal repeat のプロモーターをもつルシフェラーゼ発現プラスミド pRSVL の HindIII / SmaI フラグメントを、pBV1 の HindIII

/ BamHI (Klenow fragment of DNA polymerase で平滑末端化) 部位に挿入し、pCAL1 を得た。pBV1 は pBY1 の誘導プラスミドであり、pGEM-5Zf (+) に、pCAGGS 由来のニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサー、および SV40 early gene poly (A) signal を挿入したものである。ルシフェラーゼの coding frame を、 $\beta$ -アクチンスタートコドンのすぐ下流に接続させるため、オリゴヌクレオチド (5'TTCCTCCG CAGCCAGCCATGGAAGACGGC AAAAA3') をプライマーとして用いて kunkel らの方法に従い、site-directed mutagenesis を行い、pCAL2 (6.4 Kb) を得た。5' 非翻訳領域の遺伝子配列は、Sanger らの方法に従い sequence することにより確認した。pCAL2 は L 細胞において、pCAL1、pRSVL と比較し、それぞれ 20、40 倍のルシフェラーゼ発現を示した。実験には pCAL2 を用いた。

(2) プラスミド DNA を封入した膜融合リポソームの調製

pCAL2 (10 mg / ml) を 10 mM Tris (pH 7.6) / 150 mM NaCl / 10 mM EDTA に懸濁し、一枚膜リポソームを作製した。ただし、リポソームのサイズは、0.4  $\mu$ m のポリカーボネート製フィルター (Nucleopore) を通すことにより調節した。このリポソームを、あらかじめ紫外線照射することによってウイルス RNA を断片化したセンダイウイルスを用いて膜融合リポソームを調製した。膜融合リポソームに封入されている DNA 量は、DNA をフェノール、フェノール / クロロホルムで抽出した後、3,5-ジアミノ安息香酸 (ナカライテスク) を用いた蛍光法により測定した。膜融合リポソームは、OD540=1.0 あたり 2.0  $\mu$ g/ml の DNA を封入していた。

(3) pCAL2 を封入した膜融合リポソームを作用させた細胞の遺伝子発現変化

35-mm ディッシュに L 細胞を  $1 \times 10^5$  個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、BSS (+) で懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1) を 37  $^{\circ}$ C で 90 分間作用させた。MEM で細胞を洗浄した後、通常の培養液で培養し、経日的にルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 膜融合リポソームの遺伝子発現に及ぼす細胞との接触時間の影響

35-mm ディッシュに L 細胞を  $1 \times 10^5$  個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、BSS (+) で懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.25) を 37  $^{\circ}$ C で 1、10、30、90 分間作用させた。MEM で細胞を 2 度洗浄した後、通常の培養液で培養し、48 時間後にルシ

フェラーゼ活性を測定した。

(5) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は、luciferase assay system (ピッカジーン) およびルミノメーター (Lumat LB9501, Berthold) を用いて測定した。活性は relative light units (RLU) /  $\mu$ g protein、あるいは RLU/35-mm ディッシュとして表した。

(6) 膜融合リポソームを用いた培養細胞への遺伝子導入

膜融合リポソームと細胞の接触時間の遺伝子発現への影響を調べた実験においては、35-mm ディッシュに L および HeLa 細胞を  $1 \times 10^5$  個播種し、膜融合リポソーム (OD540=0.25) を 37  $^{\circ}$ C で 1、10、30 分間作用させた。高濃度のベクターを細胞に作用させた実験においては、膜融合リポソーム (OD540=3.0、1.0、0.3、0.1) を 37  $^{\circ}$ C で 90 分間作用させた。遺伝子導入 48 時間後にルシフェラーゼ活性、および細胞傷害性を測定した。

(7) カチオニックリポソーム・DNA 複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入

N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium-chloride と dioleoyl phosphatidylethanolamine の混合物 (1:1 (w)) であるリポフェクチン (GIBCO) を用いた。pCAL2 (3.0  $\mu$ g) とリポフェクチン (15.0  $\mu$ g) をそれぞれ 100  $\mu$ l の無血清 MEM に懸濁した。両者を混合し、室温で 15 分間反応させた後、無血清 MEM で目的濃度に希釈した。これを、膜融合リポソームと同様のプロトコールで細胞に作用させた。カチオニックリポソームと DNA の比率は、5:1 (w) のものが遺伝子発現効率が最適であり、実験にはこの比率のものを用いた。

(8) 細胞傷害性の測定

細胞傷害性は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) を用いて、細胞の蛋白量を測定することにより評価した。本系において、蛋白量を測定することによる細胞傷害性の評価は、生細胞数を MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法により測定したものと相関していた。

(9) 血清存在下での遺伝子導入

35-mm ディッシュに L 細胞を  $1 \times 10^5$  個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、あらかじめ 37  $^{\circ}$ C に温めた 10、20、40、80 % FCS を含む MEM を 0.5 ml 加えた。37  $^{\circ}$ C に温めた無血清 MEM に懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.5; DNA 1.0  $\mu$ g/ml)、あるいはカチオニックリポソーム・DNA 複合体 (カチオニックリポソーム 5.0  $\mu$ g/ml, DNA 1.0  $\mu$ g/ml) 0.5 ml を細胞に加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間作用させた (最終 FCS 濃度 5、10、20、40 %)。

MEM で細胞を洗浄後、通常の培養液で培養し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(10) S-180 腹水癌細胞への *in vivo* 直接遺伝子導入

S-180 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を ddY 雄性マウス (5 週令) に腹腔内投与し、5 日後に pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=1.0; DNA 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、およびカチオニックリポソーム・DNA 複合体 (DNA 1.5 or 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; DNA : カチオニックリポソーム = 1 : 5 (w)) 1 ml を腹腔内投与した。48 時間後に S-180 細胞を腹腔内より回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(11) TNF- $\alpha$  発現プラスミド pCATNF2 の構築  
ヒト TNF- $\alpha$  cDNA を pBR322 の PstI 部位に挿入したプラスミドの PstI フラグメントを、pGEM-3Zf (+) (プロメガ) の PstI 部位に挿入した。生じたプラスミドの HindIII フラグメントを、pBV1 の HindIII 部位に挿入し、pCATNF1 を得た。pBV1 は pBY1 の誘導プラスミドであり、pGEM-5Zf (+) (プロメガ) に pCAGGS 由来のニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターとサイトメガロウイルスエンハンサー、および SV40 early gene poly (A) signal を挿入したものである。TNF- $\alpha$  の coding frame を、 $\beta$ -アクチンスタートコドンのすぐ下流に接続させるため、オリゴヌクレオチド (5'TTCCTCCGCAGCCAGCCATGAGCACTGA AAGCAT3') をプライマーとして用い kunkel らの方法に従い、site-directed mutagenesis を行い、pCATNF2 を得た。5' 非翻訳領域の遺伝子配列は、Sanger らの方法に従い sequence することにより確認した。pCATNF2 により産生される蛋白質が活性のあるヒト TNF- $\alpha$  であることは、L929 細胞を用いた Bioassay を行うことにより確認した。pCATNF2 は L 細胞において、pCATNF1 と比較し、約 5 倍の TNF- $\alpha$  の発現を示した。実験には pCATNF2 を用いた。

(12) 培養ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) における TNF- $\alpha$  発現

35-mm ディッシュに BAEC を  $1 \times 10^5$  個播種し、24 時間後に細胞を BSS (+) で洗浄した後、BSS (+) で懸濁した pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.25; DNA 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 37  $^{\circ}\text{C}$  で 90 分間作用させた。DMEM で細胞を洗浄後、通常の培養液で培養し、培養液中に分泌された TNF- $\alpha$  の産生量を ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BioSource International) 法で測定した。本法における検出限界は、0.112 pg/ml であった。

(13) マウス大腿動脈血管内皮細胞への *in vivo* 直接遺伝子導入による TNF- $\alpha$  発現

ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に

S-180 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を移植し、footpad の厚さが 5 mm 以上 (通常は約 2 mm) に達した 7 日後に、左脚大腿動脈を露出させ、27 ゲージの注射針を用いて、pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=6.0) を 30  $\mu\text{l}$  (DNA 0.36  $\mu\text{g}$ ) 大腿動脈内に直接投与した。10 分間血流を遮断した後、アロンアルファ (三共) で血管の穴をふさぎ、血流を再開させた。48 時間後、血管 1 cm と footpad の腫瘍を回収し、BSS (-) で懸濁し細切した後、凍結融解を 3 回繰り返した。遠心にて細胞を沈殿させ、上清に含まれる TNF- $\alpha$  の量を ELISA 法で測定した。

(14) FITC-デキストランを封入した膜融合リポソームの大腿動脈内への投与

ddY 雄性マウス (5 週令) の大腿動脈を露出させ、27 ゲージの注射針を用いて、FITC-デキストランを封入した膜融合リポソーム (OD540=6.0) を 30  $\mu\text{l}$  大腿動脈内に直接投与した。10 分間血流を遮断した後、27 ゲージの注射針を用いて BSS (-) を投与することにより血管内を洗浄し、大腿動脈および大腿静脈部分を回収して包埋剤 (TISSUE-TEK; Miles) に包埋した。液体窒素で組織を凍結した後、クリオスタットで凍結切片を作製し (15  $\mu\text{m}$ )、蛍光顕微鏡により血管への FITC-デキストランの局在を観察した。

(15) PCR による pCATNF2 の体内分布の検討

ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に S-180 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を移植し、第四章、第一節に準じた方法で pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを投与した。48 時間後、左脚大腿動脈 (1 cm)、腫瘍、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、20 mM トリス (pH 8.3) / 0.5 % Tween 20 / 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> / 25 mM KCl / 1 mM EDTA で 10 % ホモジネイトを行った。ここにプロテイナーゼ K を 0.1 mg / ml になるように加え、56  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた。95  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させることによりプロテイナーゼ K を失活させ、12,000 rpm、5 分間遠心した。上清の DNA をフェノール、フェノール/クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿を行い、DNA 100 ng を PCR 用サンプルとした。

(16) TNF- $\alpha$  遺伝子導入による S-180 固形癌に対する抗腫瘍効果

pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを、ddY マウスの大腿動脈に投与した。コントロールとして、生食、およびルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を封入した膜融合リポソームを投与した。また、pCATNF2 封入膜融合リポソームを、S-180 細胞を移植した脚と反対の脚 (右脚) の大腿動脈に投与した場合についても検討した。腫瘍の増殖を観察するため、3・4 日毎に footpad の厚さを測



定し、治療開始前との footpad の厚さの比を求めた。腫瘍増殖の指標となる footpad の厚さの統計学的な有意差の評価は、Student *t*-test により行った。

(17) 腫瘍増殖抑制に及ぼす抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体の効果

マウス抗ヒト TNF- $\alpha$  中和抗体 (Genzyme) 0.1 mg を、TNF- $\alpha$  遺伝子封入膜融合リポソームを投与した日、およびその 3 日後に腹腔内投与し、腫瘍増殖抑制に及ぼす効果を観察した。コントロールとして、抗ヒトインターロイキン-6 (IL-6) 中和抗体 (SK2) 0.1 mg を、腹腔内投与した。

(18) 腫瘍増殖抑制に及ぼす T 細胞の影響

ラット抗マウス CD4 抗体 (GK1.5 ; 日本グラクソ株式会社美藤荘二先生より供与) 0.5 mg、およびラット抗マウス CD8 抗体 (2.43 ; 大阪大学大学院薬学研究科山元弘先生より供与) 0.5 mg を、TNF- $\alpha$  遺伝子封入膜融合リポソームを投与する 24 時間前に尾静脈投与し、腫瘍増殖抑制に及ぼす効果を観察した。抗体投与 24 時間後から少なくとも 10 日間は、マウスの CD4 および CD8 陽性 T 細胞が消失していることを、フローサイトメーター (ファルマシア) により確認した。

(19) T7 発現系における pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の最適混合比の検索

pT7-IRES-L および pT7 AUTO-2 をモル比で 10 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 10 となるように混合し、遺伝子・酵素・リポフェクチン複合体を調製した。この複合体を LLCMK2 T7 (-) 細胞に遺伝子導入し、経日的に遺伝子発現を測定した。

(20) マウス脳内への遺伝子導入

マウス脳内への遺伝子導入は Schwartz らの方法に基づいて行った。すなわち、調製した遺伝子・酵素・リポフェクチン複合体 (pT7-IRES-L ; 7ng, pT7 AUTO-2 ; 43ng, T7 RNA polymerase 2.5U ; リポフェクチン 250ng (脂質量)) を 30G の注射針 (テルモ) を用い BALB/c マウス (2-3 日齢) (清水実験材料) 脳内に注入した。なお、対照として pRSVL (7ng) をリポフェクチン (35ng (脂質量)) とともに脳内に導入したマウスについて比較検討した。遺伝子発現は遺伝子導入後、経日的に脳のルシフェラーゼ活性を測定することにより評価した。

(21) マウス脳におけるルシフェラーゼ活性の測定

遺伝子導入後 1, 2, 3, 4 日目にマウス全脳を摘出し、細胞溶解液を添加後ホモジネートした。このホモジネートを遠心後、上清 10  $\mu$ l を用い第一節のルシフェラーゼ活性測定法に基づきルシフェラーゼ活性を測定した。

(22) VSV-リポソームおよび膜融合リポソームの調整

リポソームは egg phosphatidylcholine, L- $\alpha$ -phosphatidyl-serine, cholesterol (モル比 4 : 1 : 5) の組成で、凍結融解法により調整した。得られたリポソームをサイジング処理 (0.2  $\mu$ m ポリカーボネートフィルター) し、最大粒子径を制御した。以上のリポソームを VSV-リポソーム、膜融合リポソームの作製に用いた。VSV は Inglot らの方法に準じて調整した。VSV とリポソームをクエン酸緩衝液 (140mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 80mM citrate, pH5.5) 下で混合し、水中 30 分間、37°C 15 分間反応させ、両者を融合させた。ステップシヨ糖密度勾配遠心により精製し、VSV-リポソームを得た。

(23) VSV-リポソームの細胞内物質導入効率の評価

0.67mg/ml ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) 封入リポソームを作製し、このリポソームと VSV と融合させることで、VSV-リポソームを得た。2.5  $\times$  10<sup>4</sup> 個のヒト羊膜由来 FL 細胞に、様々な濃度の DTA 封入 VSV-リポソームを 37°C、3 時間作用させた後、[35S]-メチオニンをパルスし、蛋白合成を指標に細胞内物質導入効率を評価した。なお、リポソームのリン脂質濃度は、リン脂質測定キット (リン脂質 B テストワコー) を用いて測定した。

(24) 血中安定性の評価

各リポソームの赤血球溶血活性は、Hsu らの方法に準じて行った。すなわち、1% ヒト赤血球にリポソーム、VSV-リポソームおよび膜融合リポソームを 4°C で 1 時間静置し、さらに 37°C、30 分間反応後、上清のヘモグロビン量を測定した。なお、あらかじめ N-Rh-PE でリポソーム膜を蛍光ラベルしておき、Rh の蛍光強度を一定にすることで各リポソームの粒子数をそろえた。血漿中での安定性は、100mM 5 (6) -Carboxyfluorescein (CF) を封入したリポソーム、VSV-リポソームおよび膜融合リポソームを用いて検討した。すなわち、37°C に保温したラット新鮮血漿に粒子数をそろえた各リポソームを添加し、経時的に血漿中の CF の蛍光強度を測定した。100% 崩壊率は、Triton X-100 で各リポソームを完全崩壊させたときの CF の蛍光強度と定義した。

(25) VSV-リポソームを用いた培養細胞への遺伝子導入

VSV-リポソームの遺伝子導入ベクターとしての有効性は、モデル遺伝子として  $\beta$ -アクトチンプロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサーを有するルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (pCAL2) を用いて検討した。5.0  $\times$  10<sup>4</sup> 個のサル腎上皮 LLC-MK2 細胞に、23.5  $\mu$ g/ml/OD540 の pCAL2 封入リポソームから作製した膜融合リポソーム (OD540 = 0.1) および同粒子数の VSV-リポソームを 500

μl 加えて培養した。経日的に細胞を回収し、ピッカジーンを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

### C. 研究結果

近年の分子細胞生物学の著しい進歩は、遺伝子そのものやアンチセンス核酸などを医薬品として扱う遺伝子治療という夢の治療法の開発を現実のものにしつつある。遺伝子治療とは、遺伝子の欠損している細胞に正常遺伝子を補充したり、細胞に新たな機能を付与するために、外来遺伝子を導入することにより遺伝子レベルで疾病の治療を行う治療手段である。しかし、この治療法の確立のためには、動物細胞の内部に遺伝子を導入する技術を開発する必要がある。生体を構成している個々の細胞は、細胞膜というバリアーを有しており、遺伝子などの高分子物質は細胞膜を透過できない。そのため、このバリアーを突破するためには、自然界において膜融合により自身の遺伝子を細胞内に導入しているウイルスの感染機構を利用するか、マイクロインジェクションやエレクトロポレーション、あるいはリン酸カルシウムや合成脂質等の物理・化学的方法を利用する必要がある。現在、米国を中心とした遺伝子治療の臨床実験で用いられているベクターは、主にウイルスの感染機構を利用したレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター、合成脂質を用いたカチオンリポソームなどである。しかしながら、これらのベクターの遺伝子導入・発現効率、安全性については十分とはいいがたく、新しい発想に基づいたベクターの開発が重要な課題となっている。そこで、膜融合リポソームにプラスミド DNA を封入し、膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての性質について、非ウイルスベクターとして最も広く用いられているカチオンリポソームのリポフェクチンと比較しながら検討を行った。ルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1) を L 細胞に 37 °C で 90 分間作用させ、その経日的な遺伝子発現パターンを検討したところ、ルシフェラーゼ活性は遺伝子導入の 2 日後に最大を示し、4 日後まで高い活性を維持した後、6 日後には最大活性の約 3 分の 1 に減少した (Fig.1)。このような一過性の遺伝子発現は、プラスミド DNA が染色体に組み込まれず、次第に分解・脱落したためと考えられた。さて、センダイウイルスによる膜融合は数分で起こることが知られており、また膜融合リポソームはエンベロープ蛋白質の働きで細胞に積極的に結合できることから、短時間の細胞との接触においても高い遺伝子発現を示す可能性が考えられる。そこで、遺伝子発現効率に及ぼす膜融合リポソームと細胞との接触時間の影響について検討した (Fig.2)。その結果、膜融合リポソームはわずか 1 分間の細胞との作用においても、

90 分間処理のときの 35 % ものルシフェラーゼ活性を示し、短時間の細胞との接触においても高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。このような性質は、膜融合リポソームがセンダイウイルスの強力な膜融合能をそのまま保持していることを反映したものと考えられた。L および HeLa 細胞において、膜融合リポソームとカチオンリポソーム・DNA 複合体を、種々の時間作用させたときの遺伝子発現効率について比較した結果を Fig.3 に示す。in vivo の細胞に直接遺伝子 (ベクター) を導入する場合には、ベクターが長時間 intact なまま細胞に作用することは考えにくいことから、細胞との作用時間は 30 分間までの比較的短い時間について検討した。また、DNA 濃度は、カチオンリポソーム・DNA 複合体が細胞傷害性をほとんど示さなかった 0.5 μg/ml に統一して行った (カチオンリポソーム・DNA 複合体が、遺伝子導入時に細胞傷害性を伴うことは後述する)。ちなみにこの条件下では、膜融合リポソームは全く細胞傷害性を示さなかった。膜融合リポソームの場合は、L および HeLa 細胞とも 1 分から 10 分間の作用でも高いルシフェラーゼ活性が得られたのに対し、カチオンリポソーム・DNA 複合体では同じレベルの活性を得るためには 30 分間、細胞に作用させる必要があった。特に、10 分間までの作用では、膜融合リポソームはカチオンリポソーム・DNA 複合体に比べ、4 倍から 100 倍以上の活性を示し、膜融合リポソームは非常に速い時間で細胞に遺伝子導入できることが明らかとなった。これは膜融合リポソームが、センダイウイルスのエンベロープ蛋白質の働きで積極的に細胞に結合し、融合によって遺伝子を直接細胞質内に導入するのに対し、カチオンリポソーム・DNA 複合体は受動的に細胞に結合し、主にエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれるために短時間では十分に遺伝子導入できないものと考えられた。次に、遺伝子発現と細胞毒性に及ぼす両ベクターの濃度の影響について検討した (Fig.4)。様々な濃度のベクターを L 細胞に 90 分間作用させたところ、両ベクターとも濃度依存的な遺伝子発現を示した。膜融合リポソームが DNA 濃度 0.2 μg/ml の低濃度においても高いルシフェラーゼ活性を示したのに対し、カチオンリポソーム・DNA 複合体は同じ濃度ではその 4 分の 1 以下の活性しか示さなかった。さらに低濃度の DNA 0.005 μg/ml においては、カチオンリポソーム・DNA 複合体が 1.1 RLU/μg protein の活性しか示さなかったのに対し、膜融合リポソームではその約 30 倍の 29.5 RLU/μg protein の活性を示した。また、カチオンリポソーム・DNA 複合体が膜融合リポソームと同等の活性を示すためには、DNA 2.0 μg/ml 以上の高濃度が必要であり、

かつその条件下では細胞傷害性を示すことは避けられなかった。一方、膜融合リポソームは、高濃度 (OD540=3.0; DNA 6.0  $\mu\text{g/ml}$ ) においても全く細胞傷害性を示さなかった。これらの結果から、センダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームは、カチオニックリポソーム・DNA複合体のような物理・化学的複合体を利用する方法に比べ、安全で効率よく外来遺伝子を導入・発現させることができることが明らかとなった。さて、*in vivo* の組織細胞への直接の遺伝子導入を考えた場合、生体内には遺伝子導入を妨げる様々な蛋白質などの因子が存在することが考えられる。そこで、両ベクターの遺伝子発現に及ぼす血清の影響について検討した (Fig.5)。膜融合リポソームは血清存在下においても遺伝子導入でき、40% 血清存在下においても血清非存在下のときの 70% もの遺伝子発現を示した。一方、カチオニックリポソーム・DNA複合体による遺伝子導入は、血清の存在により強く阻害され、わずか 5% の血清が存在しただけで 99% 以上活性が消失した。これは、カチオニックリポソーム・DNA複合体の場合は、DNA がリポソーム膜に封入されているのではなく、単に複合体を形成しているだけなので、DNA がヌクレアーゼにより分解を受けるのを避けられないこと、あるいはカチオニックリポソームの作用が血清蛋白質により阻害を受けたためと考えられる。膜融合リポソームの場合には、DNA はリポソーム膜に封入されているためにヌクレアーゼによる分解から回避できること、膜融合活性が血清蛋白質の影響をほとんど受けなかったために血清存在下でも遺伝子導入できたものと考えられた。これらの結果から、膜融合リポソームは短時間で、低い濃度でも遺伝子導入でき、かつ血清の影響をほとんど受けないことが明らかとなり、特に *in vivo* の組織細胞への直接の遺伝子導入においては優れたベクターとなりうる可能性が考えられた。そこで次に、膜融合リポソームを用いた *in vivo* 遺伝子導入について検討を行った。1.5  $\mu\text{g}$  の pCAL2 を封入した膜融合リポソームを S-180 腹水癌細胞を有したマウスに腹腔内投与したところ、S-180 細胞に高いルシフェラーゼ活性が認められた (Table 1)。一方、カチオニックリポソーム・DNA複合体の DNA 1.5  $\mu\text{g}$  投与ではほとんどルシフェラーゼ活性を示さず、DNA 40  $\mu\text{g}$  の投与においても膜融合リポソームの DNA 1.5  $\mu\text{g}$  のときの約 85 分の 1 の活性しか示さなかった。この時、両ベクターを投与したマウスとも体重減少等の副作用は示さなかった。また、腹腔内の細胞数も BSS (-) を投与したマウスと変化はなかった。これらの結果は、膜融合リポソームは *in vivo* の細胞に対しても直接遺伝子を導入できることを示しており、その活性は投与量をも考慮に入れると、カチオニッ

クリポソーム・DNA複合体と比較し、1,000 倍以上効率がよいことが判明した。そこでこれまでの結果を踏まえて次に膜融合リポソームを用いて *in vivo* 癌免疫遺伝子治療を試みた。

サイトカイン遺伝子を癌細胞に導入し、宿主の抗腫瘍免疫反応の増強を期待する遺伝子治療は、悪性腫瘍に対する新しい治療法として期待されている。本法は、全ての癌細胞に遺伝子導入できなくても抗腫瘍免疫反応を得ることができると考えられることから、腫瘍組織内に直接遺伝子を導入する *in vivo* アプローチにおいても効果が期待できる。しかし、種々のサイトカイン遺伝子を *in vitro* で癌細胞に導入し、その細胞を *in vivo* に移植する *ex vivo* アプローチによる実験においては、多くの癌細胞において抗腫瘍免疫反応の誘導がみられるのに対し、すでに *in vivo* に存在している癌細胞に、直接遺伝子を導入することによって治療効果を得たという報告は非常に少ない。これは、たとえサイトカイン産生ベクターを腫瘍内に投与し、抗腫瘍免疫反応が一部誘導できたとしても、腫瘍がある程度の大きさを越えれば、腫瘍増殖の抑制を得ることが困難であることを示している。そのため、現在では複数のサイトカイン遺伝子を組み合わせる免疫系のさらなる活性化を促したり、サイトカイン遺伝子と自殺遺伝子を組み合わせる方法などが報告されているが、その数も少ないのが現状であり、全く新しい方向からのアプローチが必要と考えられる。癌に対する遺伝子治療は、労力、費用、簡便さなど全ての点から、*in vivo* 直接遺伝子導入による方法が望ましいことは自明の理であるが、*in vivo* 遺伝子治療において抗腫瘍効果が期待できるベクターやシステムの開発が非常に困難なため、将来的重要研究課題となっている。腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ) は癌に対する遺伝子治療において最も広く研究されているサイトカイン遺伝子の一つであり、癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に *in vitro* で遺伝子導入し、その細胞を *in vivo* に移植することによって、抗腫瘍免疫反応を誘導できることが報告されている。さらに、TNF- $\alpha$  は腫瘍血管透過性の向上、腫瘍血管内皮細胞の傷害を引き起こすことや、腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞の ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)、ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1; E selectin) 等の接着分子の発現を誘導することが知られている。また、免疫系の細胞が癌組織に浸潤するためには、まず腫瘍血管内皮細胞に作用する必要がある。これらのことを考慮すると、TNF- $\alpha$  を腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞に産生させることによって腫瘍組織の TNF- $\alpha$  濃度を選択的に高め、腫瘍のみならず腫瘍血管内皮細胞にも TNF- $\alpha$  が作用しうるシステムを構築することにより免疫系の

効率的な活性化が得られる可能性がある。そこで、固形癌に対する *in vivo* 遺伝子治療の新しい戦略として、腫瘍支配動脈内にヒト TNF- $\alpha$  の遺伝子を直接導入することによって腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞にヒト TNF- $\alpha$  を産生させ、腫瘍増殖の抑制がみられるかどうかを検討した。ヒト TNF- $\alpha$  発現プラスミド pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを BAEC に作用させたところ、培養上清中には BAEC より分泌された TNF- $\alpha$  が認められ、その累積産生量は細胞  $10^6$  個あたり 1 週間で 381 pg に達した (Fig.6)。TNF- $\alpha$  の 24 時間あたりの最高発現量は、遺伝子導入 24 時間後から 48 時間後までの間の 116 pg/ $10^6$  細胞であった。次に、マウスの *in vivo* の血管内皮細胞への遺伝子導入について検討するため、footpad に S-180 細胞を移植し、footpad の厚さが 5 mm 以上に達した 7 日後に pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内に投与した。*in vitro* で BAEC に遺伝子導入したときに最高の TNF- $\alpha$  の産生を示した 48 時間後に膜融合リポソームを投与した血管 (1 cm)、およびその下流に移植されている S-180 細胞を回収し、TNF- $\alpha$  の発現を調べた (Table 2)。その結果、血管において 370.3 pg もの TNF- $\alpha$  の産生が認められ、膜融合リポソームを用いることによってマウスの大腿動脈血管内皮細胞への直接の遺伝子導入が可能であった。これは膜融合リポソームが、短時間の細胞との接触によっても十分な遺伝子導入ができるという性質を反映したものと考えられた。また、TNF- $\alpha$  の発現は footpad に移植された腫瘍部位においても認められ (68.9 pg)、腫瘍支配動脈である大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、一部腫瘍部位まで到達し、遺伝子を導入したものと考えられた。腫瘍部位の血管は正常組織の血管に比べ高い透過性を示すことが知られているが、リポソームが透過できるほどではないため、腫瘍部位における遺伝子発現は主に腫瘍血管内皮細胞によって産生されたものと考えられた。なお、マウスの血中にはヒト TNF- $\alpha$  は認められなかった。膜融合リポソームをマウス大腿動脈に投与することにより、封入物質が動脈血管内皮細胞に導入されていることを確認するため、FITC-デキストラン (平均分子量 71,200) を封入した膜融合リポソームを用いて、血管内への FITC-デキストランの局在を蛍光顕微鏡で観察した。FITC-デキストラン封入膜融合リポソームを大腿動脈に投与し、動脈および静脈部分の凍結切片を作製したところ、動脈血管内皮細胞には FITC-デキストランの蛍光が認められ、膜融合リポソームは確かに封入物質を血管内皮細胞内に導入しているものと考えられた。一方、静脈血管内皮細胞には全く蛍光が認められず、大腿動脈から投与さ

れた膜融合リポソームは、主に投与部位の血管内皮細胞に融合し、物質導入できるものと考えられた。次に、ヒト TNF- $\alpha$  発現プラスミド pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを大腿動脈から投与したときの pCATNF2 の臓器分布を、PCR を行うことにより検討した。大腿動脈部分においては pCATNF2 の存在を示す 585 bp のバンドが認められ、一部その下流の footpad に移植された腫瘍部位にも認められた。これは、Table 3 において検討した血管と腫瘍部位の TNF- $\alpha$  の発現を反映したものであった。一方、血管と腫瘍部位以外の正常組織においては、本条件下では全くバンドは認められず、大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、血管とその下流の組織である腫瘍組織に特異的に遺伝子を導入したものと考えられた。これは、膜融合リポソームが血中で比較的速やかに分解されるために、投与された近傍の組織の細胞とは融合できるものの、他の組織の細胞とは融合することがあまりなかったためと考えられた。また、大腿動脈血管内皮細胞における pCATNF2 の存在は、少なくとも投与 16 日後においても確認できた。Fig.7 に、footpad に移植した S-180 細胞の増殖に対して、pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内へ直接投与したときの影響について検討した結果を示す。pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム投与群では、有意な腫瘍増殖の抑制が観察され、11 匹中 4 匹は完全に腫瘍が消失した。TNF- $\alpha$  はいくつかの腫瘍において出血壊死を誘導し、腫瘍を退縮させることが知られているが、本実験では出血壊死は全く認められなかった。従って、本実験における腫瘍の退縮は、TNF- $\alpha$  による腫瘍血管内皮細胞への傷害作用のためにもたらされたものではないことが示唆された。また、TNF- $\alpha$  は培養 S-180 細胞への傷害作用を示さなかったことから、TNF- $\alpha$  による直接の抗腫瘍活性により S-180 の退縮が観察されたわけではないことが明らかとなった。また、完全治癒を示したマウスに、S-180 細胞を移植していた脚と反対の脚の footpad に S-180 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を再移植しても S-180 細胞は生着せず、S-180 細胞に対する抗腫瘍免疫が誘導されている可能性が示唆された。一方、コントロールとしてルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を封入した膜融合リポソームを投与したマウスでは、全く腫瘍増殖の抑制はみられなかった。このことから、pCATNF2 封入膜融合リポソームの投与によって得られた腫瘍増殖の抑制は、膜融合リポソーム自身の作用ではなく、遺伝子導入の結果発現された TNF- $\alpha$  によるものである可能性が考えられた。また、TNF- $\alpha$  が腫瘍上流血管内皮細胞および腫瘍血管内皮細胞によって産生されることが、抗腫瘍効果の発現に必須であるかどうかについて検