

討するため、S-180 細胞を移植した脚と反対の脚の大腿動脈に pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与した。しかしながら、このような条件下では腫瘍増殖の抑制は観察されず、抗腫瘍効果発現には、TNF- $\alpha$  が腫瘍支配動脈および腫瘍組織の細胞に産生される必要があることが明らかとなった。そこで、pCATNF2 封入膜融合リポソームの抗腫瘍効果が、本当にマウスの *in vivo* で産生されたヒト TNF- $\alpha$  によるものであることを明らかにするため、抗ヒト TNF- $\alpha$  中和抗体を投与することにより、腫瘍増殖の抑制が消失するかどうかを検討した (Fig.8)。その結果、コントロールとして抗ヒト IL-6 中和抗体を投与しても、全く pCATNF2 封入膜融合リポソームの抗腫瘍効果に影響がなかったのに対し、抗ヒト TNF- $\alpha$  中和抗体の投与では、腫瘍増殖抑制効果が完全に消失した。これらの結果から、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することによって得られた抗腫瘍効果は、pCATNF2 が腫瘍支配動脈である大腿動脈や腫瘍組織の血管内皮細胞などに導入され、産生されたヒト TNF- $\alpha$  によりもたらされたものであることが明らかとなった。次に、本系における腫瘍退縮のメカニズム解明を目的として、宿主の T 細胞系の関与について調べた。マウスに抗マウス CD4 抗体 (GK1.5)、あるいは抗マウス CD8 抗体 (2.43) を投与し、それぞれ CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスを用いて、TNF- $\alpha$  遺伝子導入による抗腫瘍効果について検討した (Fig.9)。その結果、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスでは、完全に TNF- $\alpha$  遺伝子導入による効果が観察されなくなった。これらの結果より、遺伝子導入され、産生された TNF- $\alpha$  による S-180 腫瘍増殖の抑制には、宿主の CD4 および CD8 陽性 T 細胞の働きが重要な役割をしているものと考えられた。本実験における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明については今後の重要な研究課題であるが、血管を介して TNF- $\alpha$  遺伝子を導入し、腫瘍細胞だけではなく腫瘍血管内皮細胞にも TNF- $\alpha$  が作用し得る本システムは、TNF- $\alpha$  遺伝子を用いた癌の遺伝子治療において全く新しい戦略を提示したものと考えられる。

昨年度までの研究において、T7 発現系が *in vitro* 非増殖性細胞に対する遺伝子発現系としての有用性が示された。そこで本年度は、T7 発現系の *in vivo* における遺伝子発現の特性および有用性を評価する目的で、*in vivo* における細胞質内遺伝子発現系と遺伝子発現に核移行を必要とする遺伝子発現系の遺伝子発現効率について比較検討した。本系での遺伝子発現に必須である 2 つの遺伝子、すなわちレポーター遺伝子としての pT7-IRES-L と T7 RNA polymerase を供給する pT7 AUTO-2 の量

的バランスを最適化する必要がある。そこで、pT7-IRES-L と pT7 AUTO-2 の最適混合比について検討するため、様々な混合比で細胞に遺伝子導入後、経日的に遺伝子発現量を測定した (Fig.10)。その結果、pT7-IRES-L : pT7 AUTO-2 がモル比で 1:3 の混合遺伝子を細胞に導入した場合、最も高い遺伝子発現が観察された。そこで、この最も効率の良い遺伝子発現が期待できる混合比 (pT7-IRES-L : pT7 AUTO-2 = 1 : 3) の遺伝子をリポフェクテンを用いマウス脳内に導入し、経日的な遺伝子発現について検討した (Fig.11)。その結果、T7 発現系により遺伝子導入した場合は、遺伝子導入後 2 日目をピークに効率のよい遺伝子発現が認められた。一方、pRSVL を遺伝子導入した場合は、ほとんど遺伝子発現が認められなかった。既存の遺伝子発現系、すなわち遺伝子発現に遺伝子の核内移行を必要とする pRSVL では、遺伝子の核内への移行が核膜により阻害されたため、遺伝子発現がほとんど認められなかったものと考えられる。一方、T7 発現系は核移行を全く必要とせず細胞質内で遺伝子発現を行うため、T7 発現系を導入した場合は効率よい遺伝子発現が認められたものと考えられる。このように T7 発現系は *in vivo* での遺伝子発現においても効率のよい遺伝子発現を可能にする系であり、今後の非ウイルスベクターを用いた体細胞をターゲットとした遺伝子治療に応用可能となる系として期待される。

VSV-リポソームの細胞内物質導入活性は、DTA を用いて検討した。DTA は、単独では細胞膜を移行できず、全く毒性を示さないが、細胞質内に intact な状態で数分子でも導入されれば、蛋白合成を阻害し細胞死を誘導できる強力な毒素である。そこで、DTA 封入 VSV-リポソームの FL 細胞に対する蛋白合成阻害効果を指標に、本リポソームの細胞質内への物質導入活性を評価した (Fig.12)。DTA 封入 VSV-リポソームは、リポソーム由来のリン脂質濃度 0.65  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から濃度依存的に蛋白合成を阻害し、6.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  において約 90% の細胞で蛋白合成を阻害した。本濃度における DTA 封入リポソーム、BSS (-) 封入 VSV-リポソームは、全く蛋白合成を阻害しなかった。以上の結果は、VSV-リポソームが、自身の細胞障害性を伴わずにリポ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り、かつその導入効率が、リポソームの 100 倍以上であることを示している。さらに VSV-リポソームは、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。以上の結果および VSV の感染機構を考慮すると、VSV-リポソームは、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

ローブ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ソ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。次に VSV ーリボソームの赤血球溶血活性について検討した (Table 3)。膜融合リボソームは、75%の溶血活性を示したが、VSV-リボソームは、リボソームと同様ほとんど溶血を引き起こさず、膜融合リボソームの 1/300 の活性であった。これは、VSV の赤血球を溶血しない特性を、VSV ーリボソームがそのまま保持しているためと考えられる。以上のことから VSV ーリボソームが全身投与可能な細胞質内への物質導入キャリアーとなり得ることが示唆された。VSV-リボソームの *in vivo* 直接投与を考えた場合、種々の血漿蛋白質や補体などにより遺伝子発現効率が阻害されてしまう可能性が考えられる。そこで VSV-リボソームの血漿安定性をリボソームの封入物質の維持という観点からラット新鮮血漿を用いて検討した (Fig.13)。リボソーム封入 CF は、ほとんど漏出しなかったことから、本研究で用いたリボソームは、血漿安定性に優れていることがことが明らかとなった。一方、膜融合リボソームは、わずか 1 分で約 50%、1 時間で 75% の CF を漏出し、その半減期は 1 分以内であり、血漿安定性が乏しいことが明らかになった。VSV-リボソームの漏出半減期は約 10 分であり、VSV-リボソームは、血漿中における安定性に優れているものと考えられた。膜融合リボソームの血漿不安定性の要因として、補体因子を想定しているが、これについては現在検討中である。以上溶血活性や安定性などを考慮した場合、*in vivo* で直接静脈内投与によって遺伝子導入を行う時には、VSV-リボソームが、膜融合リボソームよりも効率のよい遺伝子導入ベクターになり得る可能性が考えられた。VSV ーリボソームの遺伝子導入ベクターとしての有効性を、モデル遺伝子としてルシフェラーゼ発現プラスミド pCAL2 を用い、リボソームと比較検討した (Table 4)。LLC-MK2 細胞に pCAL2 を封入したりボソームを作用させ、経日的にルシフェラーゼ活性を測定したが、いずれの培養期間においても遺伝子発現はほとんど認められなかった。それに対して pCAL2 封入 VSV ーリボソームを作用させた場合、ルシフェラーゼ活性は経日的に上昇し、3 日後に最大活性を示し、4 日後には最大活性の 60% に減少した。一方、膜融合リボソームを作用させたときの LLC-MK2 細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子発現活性は、反応 1 日後から高く、2 日後に最大活性を示し、4 日後には最大活性の約 1/3 に減少した。以上のことから、VSV-リボソームは、リボソームと比較して効率の良い遺伝子導入ベクターであることが示されたものの、膜融合リボソームと比較した場合最大遺伝子発現量

で約 1/70 の活性にすぎなかった。この VSV ーリボソームの培養細胞におけるプラスミド DNA の遺伝子発現が低い原因のひとつとして、以下のことが考えられた。VSV は、エンドサイトーシス経路により感染するウイルスであり、VSV ーリボソームも同様の経路をとると考えられる。一般にエンドサイトーシスは、粒子径 150~200nm で最も効率よく行われることが知られている。今回使用した pCAL2 は 6.4Kb であり、超らせん構造をとった時の長径は約 200nm になると考えられるため、200nm 以上のサイズの VSV ーリボソームを作製せざるを得なかった。その結果細胞に対してエンドサイトーシスされにくい粒子径になっていたものと予想される。したがって、今後 VSV-リボソームの粒子系を詳細に検討し、効率よくエンドサイトーシスされる粒子系を有する VSV ーリボソームを設計するとともに、封入遺伝子のサイズをコンパクトにする方法の開発などにより、細胞内への物質導入活性はさらに上昇すると考えられる。

#### D. 考察

膜融合リボ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広く用いられているカチオニックリボソームのリポフェクチンと比較しながら検討した。膜融合リボソームは 1 分から 10 分間の短時間の細胞との接触においても遺伝子導入できたのに対し、カチオニックリボソーム・DNA 複合体では十分な遺伝子発現を得るためには 30 分以上の作用が必要であった。また、カチオニックリボソーム・DNA 複合体は、膜融合リボソームと同程度の遺伝子発現を得るためには細胞傷害性を伴うことが避けられなかったのに対し、膜融合リボソームは高濃度においても (OD540=3.0; DNA 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 全く細胞傷害性を示さなかった。さらに、膜融合リボソームは血清存在下においても遺伝子導入が可能であり、これらの性質を反映して *in vivo* の S-180 細胞に対して、効率よく遺伝子導入することが可能であった。一方、カチオニックリボソーム・DNA 複合体は、膜融合リボソームの 25 倍以上の DNA 量を投与してもわずかな活性しか示さず、膜融合リボソームはカチオニックリボソーム・DNA 複合体と比較して 1,000 倍以上効率よく *in vivo* の細胞に遺伝子導入できることが判明した。今回実験に用いた遺伝子は、細胞内で複製不能なプラスミドであるため一過性の遺伝子発現しか示さなかった。膜融合リボソームは遺伝子を効率的に細胞内に運ぶためのベクターの役割を提供しているのであり、一過性の遺伝子発現しか示さなかった原因は、膜融合リボソームの問題ではなく、導入された遺伝子そのものの問題である。これは現在、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ウイルスベクターのレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターとは大きく性質を異にする問題である。すなわち、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターでは、遺伝子の形状やその発現様式はベクター自身の性質に依存したものであり、導入される遺伝子の自由度は非常に低い。一方、膜融合リポソームの場合には、例えば Epstein-Barr Virus (EBV) や bovine papilloma virus (BPV)、simian virus 40 (SV40)、human papovavirus (BKV) などの動物細胞核内で染色体外 DNA として複製可能なプラスミドを用いることにより永続的な遺伝子発現を得ることも可能と考えられる。これは、膜融合リポソームだけでなくカチオニックリポソームなどの非ウイルスベクターに共通の性質であるが、本研究で明らかとなったように、カチオニックリポソームなどの物理・化学的複合体を利用する非生物学的な方法では、遺伝子の発現と毒性とのバランスを打破し、細胞傷害性を示すことなく効率的な遺伝子発現を得ることは容易ではない。膜融合リポソームの場合には、ウイルスの感染能を生物学的に利用して安全に、効率よく遺伝子を細胞内に導入でき、さらに *in vivo* の細胞への遺伝子導入も可能である。このように膜融合リポソームは、ウイルスと非ウイルスの中間の性質を有したハイブリッドなベクターであり、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの長所を合わせ持ったベクターであるといえる。

TNF- $\alpha$  は当初、正常細胞を傷害することなく、癌細胞を選択的に傷害する物質として発見され、その強力な抗腫瘍活性から夢の抗癌剤として注目を集めたサイトカインである。しかしながら、全身投与における TNF- $\alpha$  の奏効率は 5% 前後と期待を大きく裏切る結果に終わっている。これは、副作用のために投与量が抗腫瘍効果を期待できる量をはるかに下回っているためと考えられている。一方、TNF- $\alpha$  の腫瘍内投与や動注療法などの局所療法では高い奏効率が得られることが明らかとなり、治療効果発現には TNF- $\alpha$  の腫瘍局所における濃度をいかに高めるかが重要な問題となっている。TNF- $\alpha$  遺伝子を用いて癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に TNF- $\alpha$  を発現させる癌の遺伝子治療は、腫瘍局所における TNF- $\alpha$  濃度を選択的に高め、正常細胞への副作用を押さえることが期待できることから、癌に対する新しい治療法として期待されている。しかし、現在までに報告されている TNF- $\alpha$  遺伝子を用いた癌の遺伝子治療に関する動物実験や臨床実験は、遺伝子を *in vitro* で導入し、その細胞を *in vivo* に移植する *ex vivo* の系で行われている。そのため、実際の臨床においては、ばく大な労力と費用を要することが予想され、将来的にはより簡便な、*in vivo* の組織細胞に直接 TNF- $\alpha$  を

はじめとするサイトカイン等の遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療が主流になると考えられる。ところが、*in vivo* にすでに生着している癌に対して、直接遺伝子を導入し、治療効果を得たという報告は非常に少ない。我々の検討においても、ddY マウスの腹部皮内に移植された S-180 固形癌に、pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍内投与しても、全く抗腫瘍効果は得られなかった。従って、固形癌に対する *in vivo* 遺伝子治療においては、全く新しい方向からのアプローチが必要と考えられた。そこで、TNF- $\alpha$  の腫瘍血管内皮細胞への作用を第一のターゲットとしたアプローチでの検討を行った。すなわち、TNF- $\alpha$  を腫瘍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、TNF- $\alpha$  を持続的に腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞に作用させ、より効率よく免疫系の細胞を活性化させる結果、すでに生着している癌に対しても抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、実験を行った。まずはじめに、footpad に S-180 細胞を移植したマウスの腫瘍支配動脈である大腿動脈内に膜融合リポソームを用いて pCATNF2 を導入し、ヒト TNF- $\alpha$  を発現させることが可能かどうかについて検討した。投与 48 時間後、PCR で解析したところ、投与部位の大腿動脈およびそのすぐ下流の組織である腫瘍組織には pCATNF2 の存在が認められ、さらにヒト TNF- $\alpha$  の発現もみられた。そこで、発現されたヒト TNF- $\alpha$  によって S-180 固形癌の増殖が抑制されるかどうかを検討した。その結果、pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与したマウスにおいては、顕著な腫瘍増殖の抑制が認められ、11 匹中 4 匹は腫瘍の完全治癒を示した。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においては、腫瘍増殖の抑制が全く認められないこと、pCATNF2 封入膜融合リポソームの効果が、抗ヒト TNF- $\alpha$  中和抗体の投与によって完全に消失したことから、導入されたヒト TNF- $\alpha$  遺伝子により発現したヒト TNF- $\alpha$  によって抗腫瘍効果がみられたものと考えられた。また、TNF- $\alpha$  遺伝子を S-180 細胞を移植した脚と反応の脚の大腿動脈に投与しても効果がみられないことから、腫瘍上流および腫瘍組織より TNF- $\alpha$  が持続的に分泌されることが、腫瘍増殖の抑制には必要であることが明らかとなった。さらに、抗 CD4、CD8 抗体の投与によって、それぞれ CD4、CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスにおいて、TNF- $\alpha$  遺伝子導入による抗腫瘍効果が完全に消失したことから、宿主の T 細胞の働きが腫瘍増殖の抑制には重要な役割を果たしていることが示唆された。また、腫瘍が完全に消失したマウスに、S-180 細胞を再投与しても腫瘍の生着はみられず、腫瘍免疫反応が誘導されて

いる可能性が考えられた。本系における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明については今後の重要な研究課題であるが、腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生された TNF- $\alpha$  によって、腫瘍血管内皮細胞上のリンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤を促す接着分子等の発現が上昇し、免疫担当細胞の腫瘍組織への浸潤を効率よく誘導している可能性が考えられる。さらに、TNF- $\alpha$  は様々な免疫調節作用を有し、マクロファージ、NK (natural killer) 細胞、好中球の活性化、T 細胞の増殖促進、リンパ球のインターロイキン 2 レセプター発現や癌細胞の MHC (major histocompatibility complex) class I 発現増強、他のサイトカインの誘導、LAK (lymphokine-activated killer cells)、CTL (cytotoxic T lymphocyte) などの抗腫瘍エフェクター細胞の誘導を増強することが知られていることから、TNF- $\alpha$  は腫瘍組織に効率よくリクルートした免疫担当細胞の抗腫瘍活性を増強していることが考えられた。これらの結果は、TNF- $\alpha$  を腫瘍上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生させることによって、TNF- $\alpha$  の腫瘍集積性を高め、さらに腫瘍細胞のみならず腫瘍血管内皮細胞をもターゲットとすることにより、優れた抗腫瘍効果が得られたことを示している。固形癌の局所にサイトカイン遺伝子を直接投与し、抗腫瘍効果が観察されたという報告はほとんどないのが現状であり、血管を介して腫瘍組織にサイトカイン遺伝子を導入する本システムは、固形癌の遺伝子治療に対して全く新しい戦略を提示したものと思われ、その意義は非常に大きいと考えられる。

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てきた。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核移行性の低さを克服する方法として注目された。しかしながら、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。そこで著者は、本系を遺伝子治療に適用するため、本系の最適化を行い *in vivo* における効率のよい遺伝子発現系の確立を行った。本研究では、*in vitro* において T7 発現系による遺伝子発現の特性評価、T7 発現系の最適化および *in vivo* への応用について基礎的検討を加えた。*in vitro* 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評価したところ、その遺伝子発現は、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、サル腎上皮細胞の LLCMK2 細胞内においても同程度の turnover であると予想される。したがって、遺伝子発現が上述のような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。さて、本系を *in vivo* で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リポフェクチンを用いた場合の、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の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。そこで、遺伝子導入ベクターとしてリポフェクチンを用い、この最適混合比の遺伝子をマウス脳内に投与し、その遺伝子発現について検討した。その結果、レポーター遺伝子として一般的に用いられている pRSVL を投与した場合には、ほとんど遺伝子発現が認められなかったのに対し、T7 発現系を投与した場合には効率のよい遺伝子発現が認められた。この結果は、T7 発現系が *in vivo* の非増殖性細胞における効率のよい遺伝子発現系に成り得ることを示しているとともに、非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入の最大の欠点であった核移行の問題を、全く違った観点から解決し得る方法となり得ることを強く示唆するものであり、今後のより詳細な検討が興味のもたれるところである。さて、本研究ではリポフェクチンを遺伝子導入ベクターとして用い検討を行ってきたが、リポフェクチンをはじめ

とする陽電荷リポソームによる細胞内への遺伝子導入は、調製が簡単のためスクリーニング系としては最適であるものの、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、リポ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、先の陽電荷リポソームの最大の欠点を克服した唯一の非ウイルスベクターと言える。また VSV は、レトロウイルスベクターよりも高い感染価を有し宿主域も広いことから、VSV-リポソームは、ウイルスベクターの高い遺伝子発現効率と非ウイルスベクターの安全性などを合わせ持つ血管内直接投与遺伝子導入ベクターとなり得るものと示唆された。

#### E. 結論

安全性・有効性が確保された我が国独自の遺伝子導入ベクターとしての膜融合リポソームを開発する目的で、本年度研究により以下の結論を得た。

1. プラスミド DNA を封入した膜融合リポソームは、非ウイルスベクターとして広く用いられている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。これらの性質を反映して、*in vivo* の細胞への直接の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。
2. ヒト Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 遺伝子を封入した膜融合リポソームを腫瘍支配動脈内に投与したところ、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。これは腫瘍組織の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観察さ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。
3. T7 発現系における遺伝子発現は、細胞質内の T7 RNA polymerase 量を増大させることにより増強した。また、T7 RNA polymerase 産生プラスミドを細胞質内にさらに同時に導入することにより遺伝子発現期間の延長が認められた。以上の結果より、T7 発現系は T7 RNA polymerase に依存した遺伝子発現系であることが示唆された。また、T7 RNA polymerase 非存在では遺伝子発現が認められなかったことより、T7 発現系の遺伝子発現が細胞質内

で行われていることが明らかとなった。

4. 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明らかとなった。さらに、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った。したがって、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。
  5. Vesicular Stomatitis Virus (VSV) とリポソームの融合体と考えられていた粒子には、VSV 由来、リポソーム由来両方の膜構成成分を有しており、また VSV とリポソームの融合体 (VSV-リポソーム) であることを証明された。
  6. VSV-リポソームは、リポソームに比べ 2/3 の封入効率で機能導入された。さらに 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。VSV-リポソームは、蛋白質、プラスミド DNA を問わずリポソームと比べて効率よく細胞に導入できた。
- 以上、膜融合リポソームの安全性・有用性確保のための基礎的情報の集積・基盤技術の開発に成功した。

#### 7. 研究発表

##### 論文発表

1. Mizuguchi H., Nakanishi T., Kondoh M., Nakagawa T., Nakanishi M., Matsuyama T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., and Mayumi T. : Fusion of Sendai virus with liposome depends on only F protein, but not HN protein., *Virus Res.*, 59: 191-201, 1999.
2. Watanabe A., Yamaguchi T., Kawanishi T., Uchida E., Eguchi A., Mizuguchi H., Mayumi T., Nakanishi M., Hayakawa T., Target-cell specificity of fusogenic liposomes: Membrane fusion-mediated macromolecule delivery into human blood mononuclear cells., *Biochimica Biophysica Acta*, 1416 : 339-348, 1999.
3. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., and Mayumi T. : Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins., *J. Control. Release*, 61: 233-240, 1999.
4. Nakanishi M., Mizuguchi H., Ashihara K., Senda T., Eguchi A., Watanabe A., Nakanishi T., Kondo M., Nakagawa T., Masago A., Okabe J., Ueda S., Mayumi T., and Hayakawa T. : Gene delivery systems using the Sendai virus., *Molecular Membrane Biology*, 16 : 123-127, 1999.

5. Ishi-Watanabe A., Mizuguchi H., Uchida E., Yamaguchi T., Kawanishi T., Eguchi A., Nakanishi M., Mayumi T., and Hayakawa T., Target Cell Specificity of Fusogenic Liposome-mediated Macromolecule Delivery into Human Blood Cells. : Progress in Drug Delivery System VIII, 31-40, 1999.

6. Hayashi A., Nakanishi T., Kunisawa J., Kondoh M., Imazu S., Tsutsumi Y., Tanaka K., Fujiwara H., Hamaoka T., and Mayumi T. : A novel vaccine delivery system using immunopotentiating fusogenic liposomes., Biochem. Biophys. Res. Comm., 261(3) : 824-828, 1999.

7. 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.

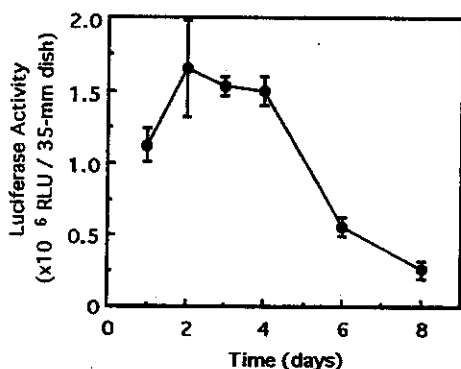
#### 学会発表

1. 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.

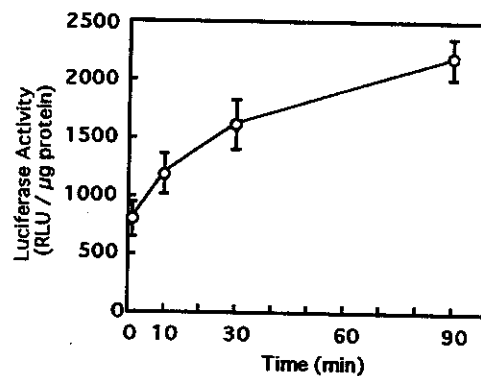
2. 國澤純, 中西 剛, 奥平章子, 形山和史, 堤康央, 中川晋作, 真弓忠範, 高橋一郎, 清野宏: 新規経粘膜ワクチンキャリアーとしての膜融合リポソームの有用性評価および免疫誘導機序に関する基礎的検討., 第49回日本薬学会近畿支部, 京都, 1999年.

3. 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.

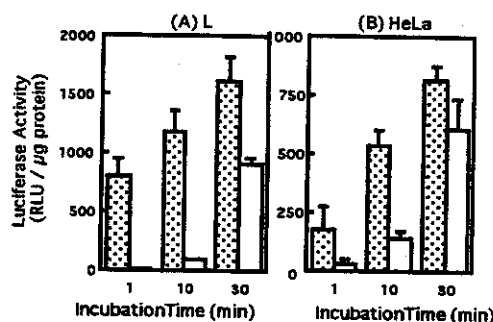
4. 今津進, 林和行, 津田育弘, 堤康央, 中川晋作, 真弓忠範, 早川亮夫: 膜融合リポソームの癌遺伝子免疫療法への応用., 日本薬学会第120回年会, 岐阜, 2000年3月.



**Figure 1 Effect of duration of culture on luciferase activity in L cells transfected by fusogenic liposomes**

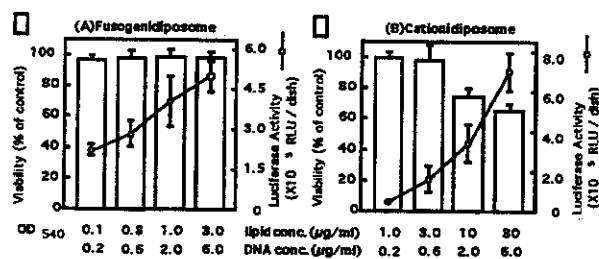


**Figure 2 Effect of incubation time on transfection efficiency**



**Figure 3 Effect of the time for incubating cells with fusogenic liposomes or cationic liposomes on gene transfer**

L (A) and HeLa (B) cells were incubated with fusogenic liposomes containing pCAL2 (□) with OD540 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.



**Figure 4 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.

**Table 4 Effect of fusogenic liposome preparation method on gene expression**

Sizing filter	Luciferase activity (RLU / $\mu\text{g}$ protein)		
	Reverse-phase evaporation method	Bangham method	Freeze and thaw method
0.4 $\mu\text{m}$	4054 $\pm$ 963	270 $\pm$ 57	1776 $\pm$ 422
0.8 $\mu\text{m}$	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 5 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/ $\mu\text{g}$ protein)
pCAL2 (6.4kb)	0.4 $\mu\text{m}$	1.43	1776 $\pm$ 422
	0.8 $\mu\text{m}$	6.16	3786 $\pm$ 1445
BMGCAL2 (15kb)	0.4 $\mu\text{m}$	0.86	747 $\pm$ 99
	0.8 $\mu\text{m}$	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.

**Table 6 Comparison of *in vivo* gene transfer activity of fusogenic liposomes and cationic liposomes**

Treatment	DNA Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	Luciferase Activity (RLU/ $10^7$ cells)
Fusogenic liposome <sup>a)</sup>	1.5	8013 $\pm$ 809
Cationic liposome <sup>b)</sup>	1.5	4.9 $\pm$ 0.7
	40.0	92.2 $\pm$ 18.5

S-180 ( $1 \times 10^6$ ) 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.

<sup>a)</sup>; Fusogenic liposomes containing 1.5  $\mu\text{g}$  of pCAL2 were injected i.p.

<sup>b)</sup>; Complexes of cationic liposomes and 1.5 or 40.0  $\mu\text{g}$  of pCAL2 (DNA : cationic liposomes = 1 : 5 (w)) were injected i.p.

Means  $\pm$  S.D.; n = 3

**Table 7 *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 ( $1 \times 10^4$  cells) were inoculated into the footpad of ddY mice. On day 7, 30 fusogenic liposomes containing pCATNF2 with OD<sub>540</sub> of 6.0, which contained 0.36  $\mu\text{g}$  of DNA, was injected into the femoral artery using a 27-gauge needle. Blood flow was stopped for 10 min to transflect 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.

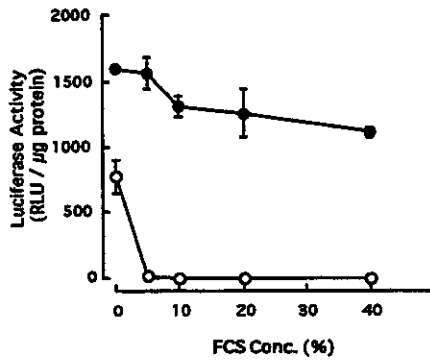
**Table 8 Effect of pH on hemolysis activity of VSV-liposome**

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

**Table 9 Effect of duration of culture on luciferase activity in LLCMK2 cells transfected by various liposomes**

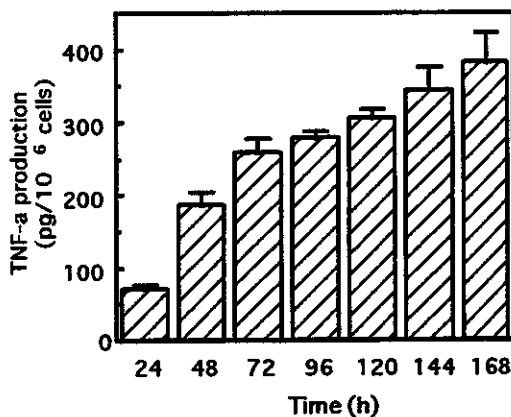
Vesicles	Luciferase Activity (RLU/ $\mu$ g protein)			
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
HVJ-liposome	77502 ± 1241	149301 ± 7800	62250 ± 3542	4440 ± 1427
VSV-liposome	255 ± 80	590 ± 47	2127 ± 80	1340 ± 29
Liposome	12 ± 8	5 ± 2	1 ± 1	1 ± 1





**Figure 5 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.



**Figure 6 TNF-α production from cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) transfected by fusogenic liposomes containing pCATNF2**

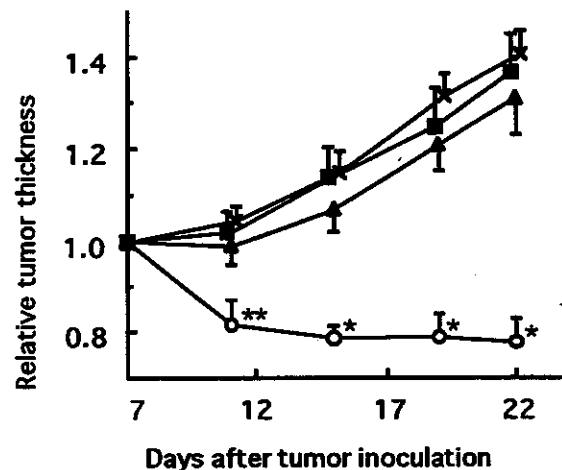
**Table 1 Comparison of *in vivo* gene transfer activity of fusogenic liposomes and cationic liposomes**

Treatment	DNA Conc. (µg/mouse)	Luciferase Activity (RLU/10 <sup>7</sup> cells)
Fusogenic liposome <sup>a)</sup>	1.5	8013 ± 809
Cationic liposome <sup>b)</sup>	1.5	4.9 ± 0.7
	40.0	92.2 ± 18.5

S-180 (1X10<sup>6</sup>) 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 rechecked and luciferase activity was measured.

<sup>a)</sup> Fusogenic liposomes containing 1.5 µg of pCAL2 were injected i.p.  
<sup>b)</sup> 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 = 5



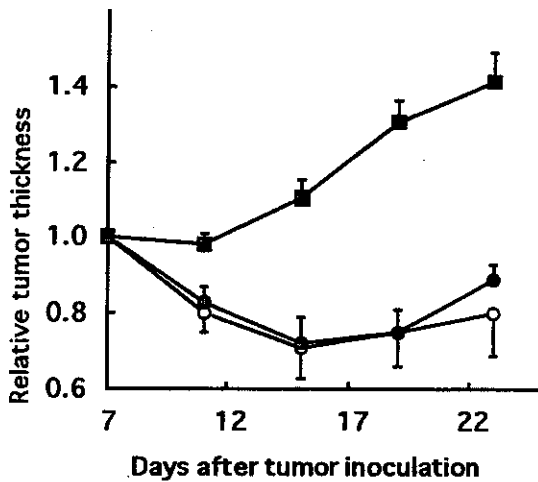
**Figure 7 Tumor growth after the direct gene transfer into the femoral artery**

S-180 cells (1 x 10<sup>6</sup> cells) were inoculated into the left footpad of ddY mice. On day 7, 30 µl of fusogenic liposomes containing pCATNF2 (○) with OD540 of 6.0, which contained 0.36 µg 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 transfact 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 ± S.E. of 11 to 13 mice. Statistical significance compared with saline-control group: \*P<0.0001, \*\*P<0.05.

**Table 2 *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 fusogenic liposomes containing pCATNF2 with OD<sub>540</sub> 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 transfect 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.

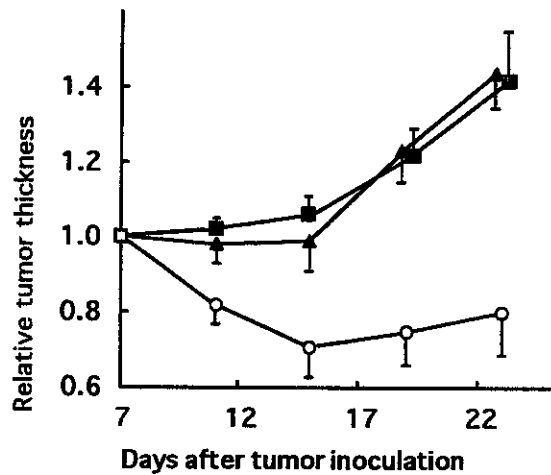


**Figure 8 Anti-human TNF- $\alpha$  antibody blocks the anti-tumor effect of fusogenic liposomes containing pCATNF2**

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

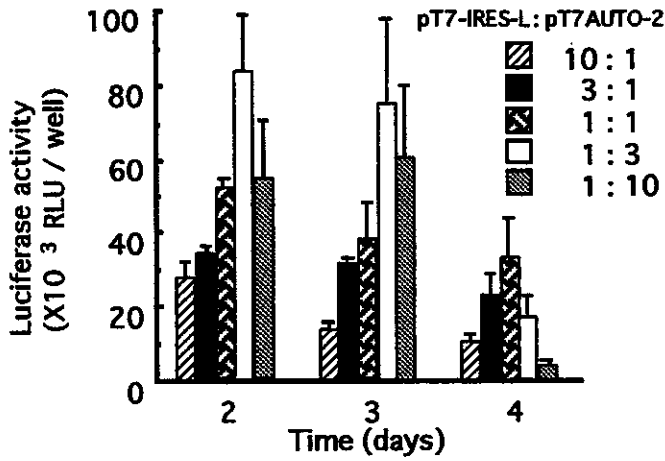
Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 7 to 9 mice.



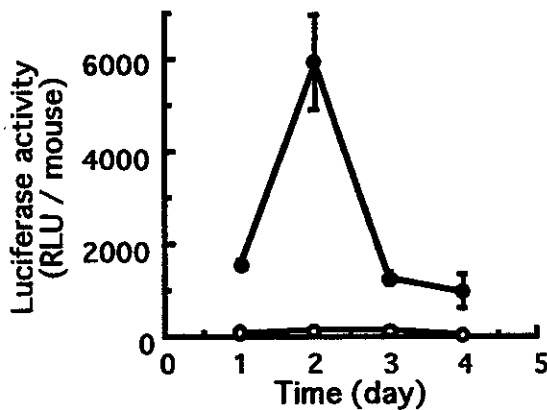
**Figure 9 CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell involvement in suppression of S-180 solid tumor by fusogenic liposomes containing pCATNF2**

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.

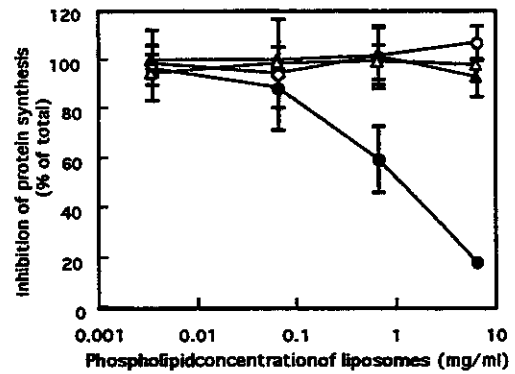
○, non-treatment; ■, anti-CD4; ▲, anti-CD8



**Figure 10 Effect of concentration ratio of pT7-IRES-L and pT7AUTO-2 on luciferase activity**

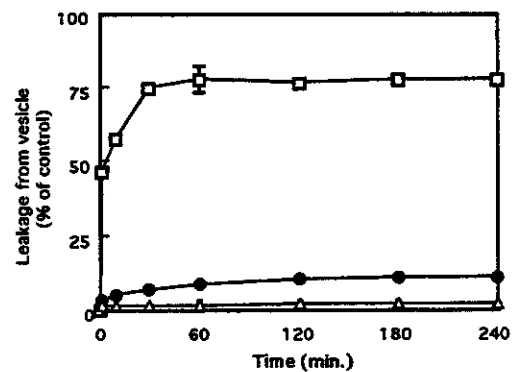


**Figure 11 Time course of luciferase expression in newborn mouse brain**  
Complexes of pT7-IRES-L (7ng), pT7 AUTO-2 (43 ng), T7 RNA polymerase ( 2.5U) and lipofectin (250 hg) (●) or pRSVL (7ng) - lipofectin (35ng) (○) complexes were injected into the newborn mouse brain. After each day, brain was recovered and luciferase activity was measured.



**Figure 12 Effect of VSV-liposomes containing DTA on FL cells**

FL cells were incubated with various concentrations of empty liposome (△), liposomes containing DTA (▲), empty liposome (○), 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.



**Figure 13 Stability of VSV-liposome in plasma**

Fifty micro liter of VSV-liposomes containing carboxyfluorescein (●), HVJ-liposomes containing carboxyfluorescein (□), and liposomes containing carboxyfluorescein (△) was reacted with 45 0μl 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 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

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

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

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 中西真人 大阪大学・微生物病研究所  
免疫・生体防御部門・神経ウイルス分野・助教授

研究要旨

遺伝子治療の安全性を確保するための新しい遺伝子導入ベクターであるハイブリッドベクターの開発を目指して、本年度は以下の項目について研究を行い、所定の成果を達成した。

1. 膜融合リボソームの安全性を確保するための最適化条件の検討
2. 遺伝情報が細胞核内で独立レプリコンとして安定に存在するために必要なDNA構造の研究
3. 細胞質内で安定に遺伝子発現を行うRNAレプリコンの研究
4. ラムダファージを使った新しい遺伝子導入系の開発
5. ヒト胃癌腹膜播種モデルの治療実験

A. 研究目的

遺伝子治療は将来、疾患を克服するための画期的な手段となると予想されており、その実用化に向けて世界中で技術開発が進められている。一方、遺伝子治療の安全性の確保という点から遺伝子治療用ベクターの現状を眺めてみると、次にあげたようないくつかの問題点が浮かび上がってくる。

1) DNAを中間体として複製するウイルスベクター（レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター）は、現在のところ遺伝子治療の臨床試験において最も多く使われているベクターである。これらのウイルスベクターは動物細胞を使って生産されるが、この際にウイルスゲノムと宿主細胞のゲノムが遺伝子組換えを起こし、人体に感染して複製可能ないわゆるReplication Competent Virusを生じる危険性が指摘されてきた。このようなReplication Competent Virusが生じる現象は、最も安全だと考えられてきた現行のレトロウイルス・パッケージング細胞

でも実際に起きることが最近報告されており(Chong, et al. J. Virol. 72, 2663, 1998)、今後臨床試験例が増えるに従ってその副作用の可能性が問題になると考えられる。

2) 非ウイルスベクターは一般にウイルスベクターより安全性が高いと考えられているが、現状では遺伝子導入の効率が悪くかつ一過性の遺伝子発現しか得られないため、治療効果を得るために大量の核酸を繰り返し人体に投与する必要がある。このように遺伝子の大量投与を長期間続けることによる生体や環境への影響についてはほとんどデータが無いが、将来的には安全性を十分に確保できない恐れがある。

3) 遺伝性代謝疾患の治療のために必要とされる長期間の遺伝子発現を得るために、現在はレトロウイルス・ヒト免疫不全ウイルス(HIV)・アデノ随伴ウイルス(AAV)などヒトの染色体に挿入されるタイプのベクターが臨床試験に用いられている。しかし、これらのベクターによる染色体への遺伝情報のランダムな挿入は、発癌遺伝子の異常な活性化やガン抑制遺伝子の不活性化などの副作用（遺伝子毒性）をもたらす可能性がある。例えば、ヒトの肝臓の全細胞

に1コピーの遺伝子を導入して染色体に挿入するような系が実現した場合、遺伝子の平均サイズを10 kbp とすると、ある特定の対立遺伝子の片方が壊された細胞は約50万個も出現することになる。現状では、多くの遺伝子治療の臨床試験の対象が余命の短いガン患者であることや、遺伝子を導入された細胞の数がこの仮定よりはるかに少ないことからこの問題は真剣に議論されていないが、今後臨床試験の規模が大きくなるにつれて副作用が表面化するであろう。

このような問題点を考慮すると、遺伝子導入・発現ベクターの安全性を確保するための技術基盤は以下の諸条件を満たすものでなければならない。

1) 動物細胞ゲノムDNAとベクターDNAとの間の遺伝子組換えによって生ずる有害な遺伝情報の混入を回避するため、遺伝情報(DNA)の生産には、非相同組換えの活性の高い動物細胞を使わず、組換え機構が詳細にわかっている大腸菌を使用するベクターを開発する。あるいは遺伝情報として組換えを起こさないRNAを使用する系を開発する。

2) 生体組織細胞への効率のよい遺伝子導入と安定な遺伝子発現を可能にすることで、大量の遺伝子を反復投与することを避けることができるベクターを開発する。

3) 外部から導入した遺伝情報を染色体とは独立した形(独立レプリコン)として安定化させることで、染色体上の宿主の遺伝情報への影響を最小限にとどめることができるベクターを開発する。

この目標を達成するために、研究分担者は平成11年度は次の4点に関して研究を進めた。

1. 膜融合リボソームの安全性を確保するための最適化条件の検討
2. 遺伝情報が細胞核内で独立レプリコンとして安定に存在するために必要な

## DNA構造の研究

3. 細胞質内で安定に遺伝子発現を行うRNAレプリコンの研究

4. ラムダファージを使った新しい遺伝子導入系の開発

5. 膜融合リボソームとDegenerin遺伝子を組み合わせたヒト胃癌腹膜播種モデル動物の治療実験

## B. 研究方法

### 1) 膜融合リボソームの作成と精製

センダイウイルスZ株とZ(V欠損)株(国立感染症研究所・加藤篤博士より分与された)は、10日目孵化鶏卵を用いて増殖させた。センダイウイルスの精製は、5,000 rpm 5 min.で上清を回収、12,000 rpm 50 minで沈殿としたあと、30%/50%蔗糖ステップ遠心(20,000 rpm, 60 min)を2回繰り返して30%と50%の境界から回収した。ウイルスは0.03%のbeta-propiolactoneで37°C, 2h処理したあと4°Cで一晩放置して不活化し、最後にSephacryl S1000 superfine(22 x 90 mm)によるゲル濾過法で精製して最終標本とした。

一枚膜リボソームはExtruder法を改良し、Anodisc(13 mm, 0.2 μm)を使用して作成した。BSS/12%/20%蔗糖ステップ遠心(20,000 rpm 30 min)でBSS/12% sucroseの界面からリボソームを回収し、最後にSephacryl S1000 superfine(22 x 90 mm)によるゲル濾過法で精製して最終標本とした。膜融合リボソームは精製センダイウイルスと精製リボソームを37°Cで反応させて作成し、12%/30%/50%蔗糖ステップ遠心(20,000 rpm 60 min)で12%/30% sucroseの界面から回収した。走査型電子顕微鏡用のサンプルは2.5%グルタルアルデヒドで室温1時間固定した。

2) テロメアシーディングによるテロメア活性の測定

500 bpの人工テロメア配列とハイグロマイシンB耐性遺伝子を含むプラスミド pMYAC1 を制限酵素NotI で切断すると、末端にテロメア配列を持つ直鎖状になる。このDNA 1 µgを種々の細胞にエレクトロポレーション法で導入した。ただしに100 mmディッシュ100枚（浮遊細胞の場合は96 well ディッシュ100枚）に細胞をまき直し、48時間後からハイグロマイシンBを含む培地に置き換えて遺伝子が入り込まれた細胞を選択した。10日目にそれぞれのディッシュに出現したハイグロマイシンB耐性コロニーを単離し、増殖後DNAを抽出して解析した。

得られたハイグロマイシンB耐性のコロニーよりDNAを抽出し、制限酵素HindIIIで消化した。それぞれ10 µgのDNAを1%アガロースゲルで分画後、ナイロンメンブレンに転写し、pUC19をプローブとしてサザンブロット解析によりpMYAC1導入部位の解析を行った。サザンブロットで染色体末端であることを示すスミアなシグナルが得られたサンプルに関しては、さらにエキソヌクレアーゼBal31感受性試験によって染色体上での位置を確認した（染色体の末端にある場合には、シグナルはBal31感受性となる）。テロメアシーディングの活性は、pMYAC1が挿入された部位で染色体が切断されて新しいテロメアができたクローンの数を全クローンの数で割った割合で求めた。

テロメラーゼ活性は、各細胞の核抽出液を使い、Tatematsuらの方法(Tatematsu, et al. Oncogene, 13, 2265, 1996)で測定した。この方法は、PCRによるテロメラーゼ活性測定の原法(Kim, et al. Science, 266, 2011, 1994)に比較して直線性が改良され、テロメラーゼ活性を定量的に測定できた。

染色体末端のテロメア配列の長さは、HinfI/RsaIで切断したゲノムDNAを<sup>32</sup>Pで標識した(TTAGGG)<sub>n</sub>プローブを使ったDNAプロットングによって解析し、HeLa-LT細胞のテロメア配列の長さ(22.5 kbp)を標準にしてシグナルの強さによ

って測定した。

テロメア配列結合タンパク質TRF1, TRF2の定量はタンパク質プロットングによって行った。抗TRF1ウサギ抗体は大腸菌で作ったTRF1 acidic domainを含む組換えタンパク質をウサギに免疫して作成した。抗TRF2ウサギ抗体はDr. Titia de Lange より分与された。

### 3) センダイウイルスNP タンパク質のRNA polymerase 活性の測定

T7 RNA polymerase を安定に発現しているLLCMK2細胞LLC-T7#10は、Cytomegalovirus enhancer / beta actin promoter の下流にT7 RNA polymerase cDNA を接続してリン酸カルシウム法で導入して作成した。(一)鎖RNA mini genomeを作るための鑄型 pHVLuciBは、センダイウイルスのゲノムの3' 端と5' 端を接続したホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 cDNA をT7 RNA polymerase promoter 下にnegative 方向に接続して作成した。この鑄型からはT7 RNA polymerase によって(一)鎖RNA が転写される。またNP タンパク質を作る発現ベクターpGEM-NPは、NP cDNA をT7 RNA polymerase promoter 下にpositive 方向に接続して作成した。このベクターからはNP タンパク質を作るためのmRNA が転写され、それをもとにNP タンパク質が翻訳される。RNA polymerase の活性測定は、pHVLuciB とpGEM-NPを同時にLLC-T7#10細胞に導入することによって行った。これらのプラスミドをそれぞれ単独で導入した場合はルシフェラーゼを作るための mRNA 合成は起こらず、ルシフェラーゼ活性は検出されないが、両者を同時に導入することによりmRNA 合成が起こってルシフェラーゼが検出される。

### 4) Tatペプチドを付与したラムダファージの調製

ベースとしたラムダファージはLambda D1180 で、Dam15のアンバー変異を持つ

ていて、suppressor tRNA を持たない SupO の大腸菌では D タンパク質を作らない。またこのファージの右腕は Lambda gt11 と同一であり、野生型ラムダファージの SacI-EcoRI を削除し、EcoRI site を一つだけ持つように改変してある。Green Fluorescent Protein (GFP、Clontec 社) やホタル・ルシフェラーゼ cDNA (Promega 社) はサイトメガロウイルス (CMV) の初期遺伝子プロモーターの下流に接続した EcoRI-EcoRI 断片として構築し、Lambda D1180 の EcoRI site に挿入した。できたラムダファージの DNA は大腸菌 TOP10 に溶原化してファージ粒子の調製に用いた。

Tatペプチドを人工的にラムダファージの頭部に発現させる実験は Sternberg らが報告したペプチド抗原をファージ表面に発現したライブラリーの作成法 (Sternberg and Hosess, PNAS 92, 1609, 1995) に基づいた。ラムダファージ D 遺伝子を含む DNA 断片は、ファージ DNA を鋳型にして PCR 法によって増幅したあと発現ベクター pTrcHisA (Invitrogen) に組み込んだ。Tatペプチドに対応する遺伝子は合成オリゴヌクレオチドを使って作成し、D タンパク質の N 末端側に遺伝子レベルで融合させた。D タンパク質を発現させるためのプラスミド pS1 を、GFP 遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子を含みかつ D 遺伝子にアンバー変異があるラムダファージ D1180 を溶原化した大腸菌に導入後、42°C 15 min の熱処理でファージの増殖を誘導し、さらに 38°C 40 min 培養後に集菌した沈澱からクロロホルム処理で組換えファージ粒子を抽出した。

4) Carcinoembryonic antigen プロモーター・Degenerin (変異 Na イオンチャンネル) cDNA ハイブリッド遺伝子を封入した膜融合リポソームによる、胃癌の腹膜播種モデル動物の遺伝子治療実験

Degenerin cDNA はラット脳組織 cDNA より既報の塩基配列情報をもとに単離した。この cDNA を発現ベクター pCDNA3

(Invitrogen) に組み込んだ後、430番目のグリシンがフェニルアラニンに変化するように in vitro mutagenesis を行い、CMVpCDNA3MDEG-G430F を作成した。さらにこの遺伝子の発現に癌特異性を持たせるために、このプラスミドの CMV promoter を除去し、carcinoembryonic antigen (CEA) promoter と置き換えて CEApCDNA3MDEG-G430F を作成した。この遺伝子の発現は HepG2 細胞を使って培養系で確認した。

ヒト胃癌患者の腹膜播種よりマウス腹腔継代により樹立した MKN45 細胞  $10^6$  個をヌードマウス腹腔に接種し、3日目に血中の CEA を測定して有意な上昇を認められたマウスを 15匹ずつ 3群に分けた。10日目から毎週一回の頻度で計 4回、一回当たり 0.5 ug の CEApCDNA3-MDEG-G430F を含む膜融合リポソームを腹腔内投与し、生存率を解析した。

## 5) その他

プラスミド作成を含む組換え DNA 実験の方法は成書 ("Molecular cloning, 2nd ed." (eds. Sambrook, J. et al.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

## C. 研究結果

### 1. 膜融合リポソームの安全性を確保するための最適化条件の検討

膜融合リポソームは、センダイウイルスの膜融合能を利用して細胞に効率よく遺伝情報を導入することができる優れたベクター系であり、本研究において開発を進めてきた NLS ファージ (核への DNA のターゲティングベクター) や人工染色体 (核内で安定に存在できる独立レプリコン) と組み合わせると高機能を発揮するハイブリッドベクターの基盤となる重要な技術である。膜融合リポソームは遺伝情報をあらかじめ物理的・化学的に不活化してあるセンダイウイルス粒子を使っ



て作成するため、組換えウイルスとは区別して非ウイルスベクターとして分類されている。一般的に、合成脂質や合成ポリマーなど非生理的な成分を使用しているベクターの安全性は急性の毒性・細胞障害性を指標に検討されている。膜融合リポソームは生理的な物質で構成されているため急性の毒性や細胞傷害性は観察されないものの、その成分にウイルス粒子に由来する核酸・タンパク質・脂質が含まれているため、他のベクターとは異なる視点から安全性を点検しておくことが重要となる。この項目では、動物を使った前臨床試験・実際の患者に対する臨床試験を前提とした膜融合リポソーム自体の安全性に関わる問題点を整理し解決を試みた。

この項目ではまず、製剤成分に感染性ウイルス粒子を含む可能性とその危険性について、1) ウイルスそのものの病原性と、2) ウイルス活性の不活化の2点に焦点をあてて検討した。

センダイウイルスの病原性については、1996年にReverse Geneticsの手法によってcDNAからのウイルスの回収が可能になったことから、マウスに対する病原性を指標にその遺伝学的背景が検討されてきた。その結果、エンベロープ糖タンパク質のFタンパク質開裂部位のタンパク質分解酵素に対する感受性やPタンパク質にオーバーラップしてコードされているVタンパク質の存在が、高い病原性の維持に必要であることが報告された。我々がこれまでに用いてきたセンダイウイルス・Z株はもともとFタンパク質のタンパク質分解酵素に対する感受性が低い弱毒株であるが、最近作成されたZ (V欠損)株はさらに病原性が低く、野生株(流行を引き起こす強毒株)に比較して病原性が100万分の1以下に低下している超弱毒株であるにもかかわらず、孵化鶏卵での増殖性は変化していない。そこで膜融合リポソームを作るための素材としてのZ (V欠損)株の有用性を検討した結果、Z株とまったく同様に使用できること

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

表1 不活化法の違いが膜融合リポソームの生成と比活性に与える影響

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12 units 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。

が明らかになった(data not shown)。センダイウイルスはヒトへの病原性は無いと考えられるが、この変異型ウイルスの採用により、さらにその可能性を最小限に留めることが可能となった。

次に、センダイウイルスの不活化についての条件検討を行った。センダイウイルスの遺伝子は修復機構を持たない1本鎖RNAであるため紫外線・化学修飾剤等によって容易に不活化され、ウイルスは膜融合の機能を損なわずに感染能を失うという性質を持っている。これまでは簡便であることから紫外線を用いた不活化法を採用してきたが、本項目では化学修飾剤であるbeta-propiolactoneによる不活化との比較を行った。その結果、不活化後のウイルスの融合活性はbeta-propiolactoneで不活化したもののほうが高く、最終的な膜融合リポソームの比活性も高いことが明らかになった(表1)。これは紫外線照射がある程度はタンパク質にも影響を与えるのに対し、薬剤の方は核酸特異的であることによると思われる。さらに紫外線の場合、濃縮したウイルスに対する均一な照射が難しく感染能を持った粒子が残存する可能性を否定するのが容易でないのに対し、beta-propiolactoneでは均一な不活化が可能で

あることも長所である。また  $\beta$ -propiolactone は水溶液中で不安定であり、氷温・24時間の処理で分解され、さらにウイルスの精製処理を行うことにより残存する薬剤は完全に除去できる（後述）。さらに  $\beta$ -propiolactone は不活化ワクチンの製造に使用することが国内で認可されており、安全性を確保する上でも最適であると考えられる。

さらに本項目では、センダイウイルスの物理的精製法についても検討を加えた。センダイウイルスはこれまで30%と50%の蔗糖溶液からなる密度勾配遠心法を用いて精製してきたが、非常に鋭敏なマーカーである孵化鶏卵中のRNA分解酵素の残存量を指標に精製度を検討した。その結果、蔗糖密度勾配遠心法を2回繰り返すことによりRNA分解酵素を100%除去できることを確認し、ウイルス粒子外部に存在する孵化鶏卵由来のタンパク質に関してはこの方法で除去できるという結論に達した。センダイウイルスはこの後、 $\beta$ -propiolactone を用いて不活化するが、この薬剤の完全な除去と粒子径の均一化のためにSephacryl S1000によるゲル濾過法を用いてさらに精製を行った。

こうして得られた最終産物は直径232nmの非常に均一な粒子であることを光散乱法によって確認した。この最終サンプルにはバッファー成分以外のウイルス粒子外の不純物は含まれていない。

以上のように膜融合リポソムの素材であるセンダイウイルスに関しては理論上考えられる最大限の安全性の確保が可能であることを確認したので、さらにもう一つの素材である遺伝子封入リポソムについても安全性に関する検討を加えた。一枚膜膜からなる融合リポソムは旧来の多重膜の膜融合リポソムに比べてはるかに高い遺伝子導入活性と安定性を持っている。しかし従来は、DNAを高濃度で封入した一枚膜リポソムを有機溶媒を使わずに効率よく作ることが難しく、安全性の点からは工業生産には適しているとは言い難かった。そこで本年度は製剤化に適応した一枚膜リポソムの製造法に関する基礎的検討を行った。

Extruder法は、均一な孔径を持った膜に粒子径の大きな多重膜リポソムを高圧下を通して粒子径を揃えるとともにリポソムを一枚膜にする方法で、これまでポリカーボネート膜を使った方法が発

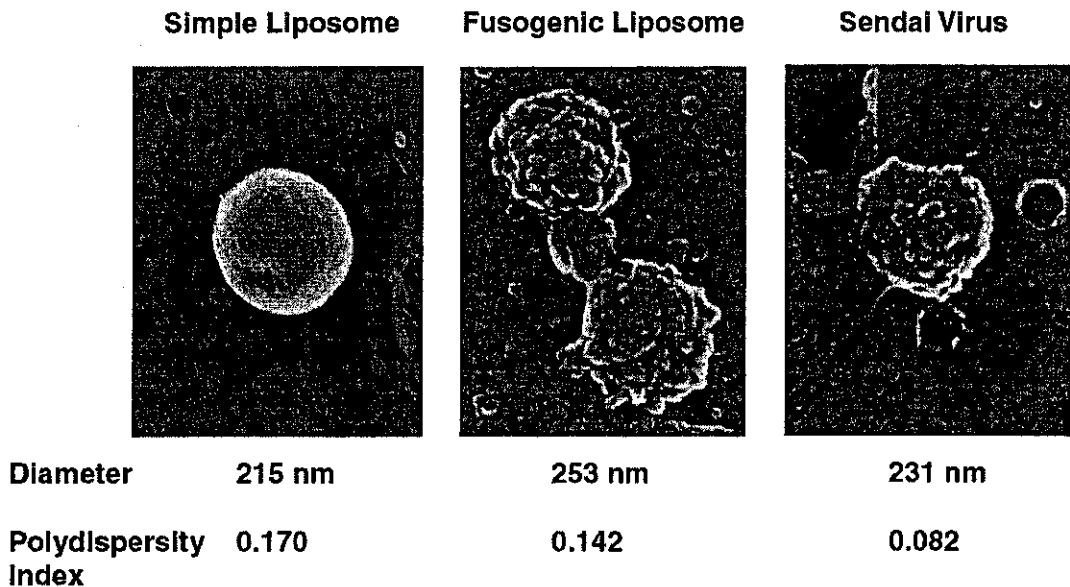


図1 走査型電子顕微鏡による膜融合リポソム（中）、リポソム（左）、センダイウイルス（右）の構造観察

表され、製剤化に適応した方法として実用化されている。しかし原法のままではDNAなどの高分子を高濃度(10 mg/ml)を含む粘度の高い試料を封入することは非常に難しかった。本研究では、DNAの精製法の改良と金属製のAnodisc膜の使用により、高分子を封入したリポソームを効率よく作成する方法を確立した。

リポソーム内部に封入するDNAはAlkaline Lysis法の変法とゲル濾過法を組み合わせ精製し、エタノール沈殿を行わず限外濾過法で濃縮した。この方法はすでにDNAワクチンの製造法として発表されているものを改良したものであり、エンドトキシンなどの有害な混入物をほぼ完全に除去することが可能である。またこの方法ではDNAはフィルターに詰まるような沈殿を形成しないのでリポソームへの封入が容易になる。一方、Anodisc膜は乾熱滅菌にも対応しており、また均一な孔が多数存在するハニカム構造をとっていてフィルターにかかる圧力が低くてすむため、この膜を使用したExtruder法の変法は、分解酵素に感受性が高く機械的剪断力にも弱いDNAをリポソームに封入するための方法として極めて優れている。さらに本研究では、リポソームを作るための素材に製剤用の高純度のものを使用することで酸化物などの不純物による問題点を回避している。このようにして作成したリポソームは蔗糖密度勾配遠心法とSephacryl S1000によるゲル濾過法を組み合わせ精製し、粒子径は215nmで非常に均一であることを光散乱法によって確認した。また膜融合リポソームの作成と精製はすべて無菌条件下で行うことができる。

本研究では、さらにこのようにして安全性に配慮して作成した不活化センダイウイルスとリポソームを素材として膜融合リポソームを作成し、最終産物は直径253nmの単分散を示し、均一な集団であることを確認した。また精製したサンプルの構造を走査型電子顕微鏡で観察し、最終的にできた膜融合リポソームがウイ

ルス様の構造を外側に持つ均一な粒子であることを確認した(図1)。

## 2. 遺伝情報が細胞核内で安定に存在するために必要なDNA構造の研究

遺伝性代謝疾患のように長期間の遺伝子発現が要求される場合、現在の遺伝子治療では染色体への遺伝子の組み込みが第一選択となっている。しかし染色体に外来遺伝子を導入するためには細胞分裂(DNA複製)が必須であることが明らかになっており、神経・肝実質細胞を強制的に分裂させて遺伝子を組み込もうとするアプローチは事実上不可能である。さらに染色体に外来遺伝子を組み込むことは、ガン抑制遺伝子の不活化・ガン遺伝子の異常な活性化など未知の危険性を伴い、遺伝子治療に求められる安全性を確保することは難しい。我々は、導入した遺伝子の安定性と安全性の問題を同時に解決するために、核内で染色体とは独立に安定に存在できる人工染色体を開発し、これを遺伝子デリバリーシステムと

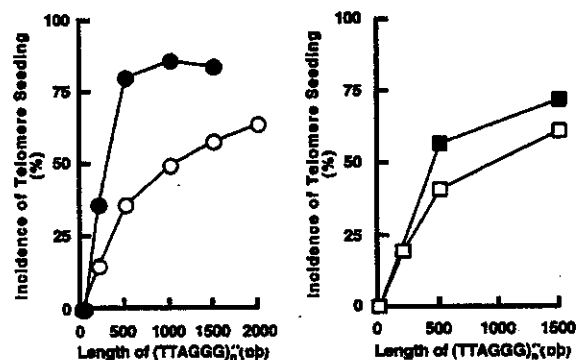


図2 テロメアシーディングに及ぼすテロメア配列の長さの影響

組み合わせて新たなベクターを開発することを目指している。そこで本研究では、染色体の構造の中でも特に安定性と関係が深いと考えられるテロメアに焦点をあて、その機能の解析を行った。

染色体の末端に存在するテロメアが染

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 (13).

‡ 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.

表4 テロメアシーディングの効率と各種ヒト細胞の性質との相関

色体の安定性に深く関わっていることは、放射線などでテロメアを失った染色体が極度に不安定になることや、有限寿命を持つ体細胞ではテロメア配列と呼ばれる(TTAGGG)<sub>n</sub> という染色体の最末端の

繰り返し配列が短くなることに伴って染色体が不安定になり細胞死が誘導されることから予想されてきた。しかしテロメア配列以外にどのような因子が染色体の安定性を決定しているのかということに

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	
Human immortalized cell lines							
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	
HeLa-LT derived cells overexpressing FLAG-TRF1							
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	
Primary fibroblasts							
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.	

\* See Table 1.

† 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.

表3 テロメアシーディングとTRF1, TRF2の量の相関