

についてはほとんど何も判っていない。本研究では3年間にわたってテロメアが染色体の安定性に果たす機能について研究を進めてきたが、前年度までの研究から、外部から導入したテロメア配列を含むDNA断片(テロメア・シード)が染色体に導入されて新しいテロメアを作る現

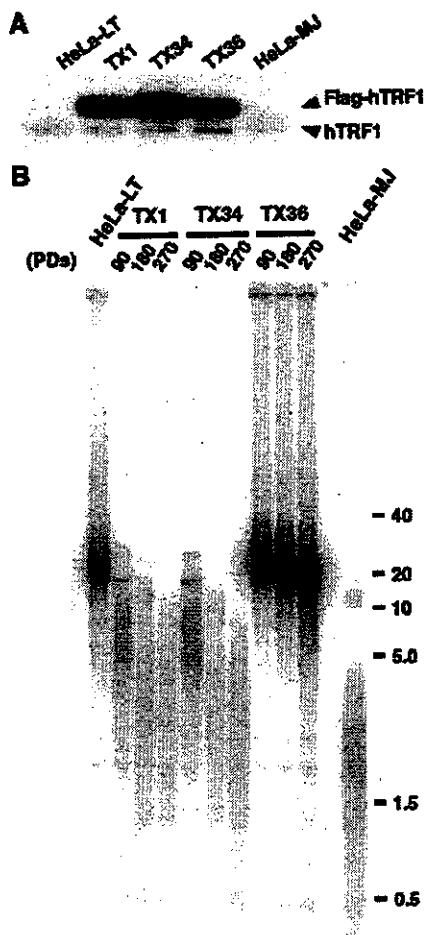


図3 TRF1 過剰発現細胞の性質

- A. TRF1の発現量
- B. テロメアの長さ

象(テロメア・シーディング)が、外部から導入するテロメア配列の長さに比例し(図2)、個々の細胞内にあるテロメア配列の総延長に逆比例して起きることを突き止めた(表2)。この結果から、外部から導入したテロメア配列と内在性のテロメア配列が、この配列に結合する同一の因子を競合していることが推定された。

本年度は、テロメア配列結合因子として既に同定されていたTRF1がテロメアの安定化を通じて染色体を安定化していることを突き止めた。まず8種類のヒト細胞に関してTRF1の量をタンパク質ブロッキングによって定量し、テロメア・シーディングの活性と単位テロメア配列あたりのTRF1の量の間には正の相関があることを見いだした(表3)。まったく同じ配列に結合することが知られているTRF2についても同様の定量を行ったが、このタンパク質に関してはそのような相関は見られなかった。さらに、この結果を裏付けるためにテロメア・シーディングが起きにくい(すなわち新しいテロメアができにくい)HeLa-LT細胞にTRF1遺伝子を導入して安定に発現する細胞を樹立して(図3)、これらの細胞ではすべてテロメア・シーディングの活性が上昇していることを見だし(表3)、外部から導入したテロメア配列が新たな染色体末端となるために必須でその律速段階

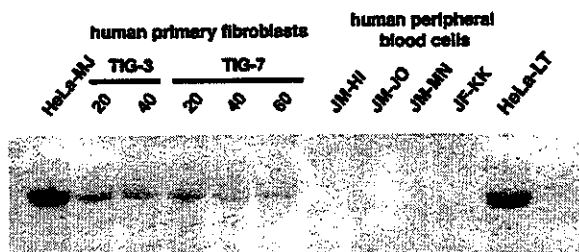


図4 初代培養体細胞のTRF1含量

となっている因子がTRF1であることを最終的に確認した。

この結果は、外部から導入したテロメア配列から新たにテロメアを作るという人工的な系から得られたものであるが、染色体は複製のたびに新しいTRF1を常に末端に補給しなければならないので、細胞内の染色体の維持もテロメアシーディングとまったく同様の機構で調節されているはずである。そこでさまざまなヒト体細胞におけるTRF1の量を定量

したところ、明らかに不死化細胞よりも発現が少ないことが見いだされた(図4)。特に分裂寿命がほとんどないヒト末梢血単核細胞ではほとんどTRF1は検出されなかった。このことから我々はテロメア(ひいては染色体)の安定性がTRF1によって決まっているという仮説を提唱している。本研究で示したように、寿命が有限である体細胞ではTRF1が少なく染色体の安定性の律速となっており、逆に不死化細胞ではTRF1が多く律速がはずれて染色体の不安定化による細胞死から免れている可能性が考えられる。また、寿命が有限である体細胞ではテロメア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が知られているが、なぜテロメア配列がある程度短くなったところで染色体が不安定になるのかはまったく判っていなかった。我々の仮説はこの現象も矛盾無く説明できる。

以上の結果から、本研究の目的であった人工染色体の安定性を決める因子はTRF1であると結論した。TRF1は細胞の中にもともと存在する分子であり、生殖細胞や胚性幹細胞・胸腺など正常組織で高発現していることが知られているので、これ自体がガン化を引き起こしたり異常な免疫反応を誘導したりすることは考えにくく、外部から導入したDNAを安定化するためにはヘルペスのような病原性を有するウイルスに頼るよりはるかに高い安全性を確保できる。TRF1は環状のプラスミドDNAにも結合することが示されているので、細胞核内でも同様に環状のDNAを安定化できると考えられ、この現象の遺伝子治療用ベクターとしての実用化を目指して現在その確認を行っている。

TRF1が染色体末端を安定化する機構についてはまだ不明である。近年、動物細胞のテロメアは末端がループ状になっていて、染色体末端がDNAの切断面として認識されないのはこの構造を取っているためであるという説が有力となってい

る。またこの構造でDNAが三叉路構造を取っているところにTRF2が結合し、TRF1はこのループの部分に結合していることが示唆されている。そのため、TRF1はこのループ状構造を作るために必要である可能性がある。一方、TRF1は核膜の裏側に存在する核マトリックスに結合していることが知られており、DNAを核膜に結合することで安定化を実現している可能性もある。今後はTRF1の分子機能について解析を進め、この分子を遺伝子治療用ベクターの素材としての有用性を探っていく予定である。

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

2. で示したように、核内で安定に存在できるDNA独立レプリコンの開発は実現に一步近づいたが、DNAを核に送り込んでやるためには前年度に我々が開発したような複雑な核移行システムを採用する必要がある。発想を変えると、細胞質で安定に遺伝子発現を行う系が開発できればベクターの設計はシンプルなものになり、安全性に関する留意点も減ることが期待される。細胞質で遺伝情報を発現するシステムとしてはこれまでにT7 RNA polymeraseによるものとワクチニアウイルス(種痘ウイルス)ベクターによるものが知られており、神経など分裂していない組織でも比較的強い遺伝子発現が可能であることが示されている。T7 RNA polymeraseはDNAを鋳型としてRNAを合成するがDNAを合成する活性をもたないため、遺伝子発現は鋳型DNAの安定性に依存して一過性である。またワクチニアウイルスは強い遺伝子発現活性を持つため実験室レベルではよく使われているが、現在では種痘が廃止されたためにこのウイルスに対する免疫を持たない人が多く、病原性から考えて安全な選択肢とは言えない。またワクチニアウイルスベクターも遺伝子発現は一過性であり、さらに強い細胞毒性を持つので遺伝性代謝

疾患の治療には使用できない。

そこで我々は細胞質で安定に遺伝子発現を行うことができる系のモデルを自然界に求め、一本鎖RNAウイルスであるパラキソウイルスの遺伝子発現系に注目した。このウイルスの仲間では麻疹ウイルス・流行性耳下腺炎（おたふく風邪）ウイルス・ニューカッスル病ウイルスなどが知られているが、いずれも細胞質で遺伝情報を発現すること・ある条件下で細胞質で安定に遺伝子発現を続けながら

	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

Table 1. Detection of luciferase activity in the cells transfected with SeV mini genome and NP, P and L expression plasmids.

pHVLucIB=1µg, pGEMNP=0.5µg, pGEMLP=1µg and pGEML=1µg

表4 NPタンパク質に存在するRNA polymerase 活性の測定

宿主細胞と共存する持続感染という感染様式を取ることが共通した性質である。我々はこの中で、人に対する病原性を持たないセンダイウイルスに着目し、その遺伝子発現系の解析を行った。

	Luci/β-gal
pGEMNP	363.6
AK16	0.5
AK21	0.2
pGEM3ZK(+)	0.2
Mock	0.1

Fig.2. (A) Ability of pGEMNP derivatives to synthesize (+) strand luciferase RNA.

In AK16, AUG and STOP codon were inserted between T7 promoter and AUG codon of NP. In AK21, T7 RNA polymerase promoter was deleted from pGEMNP.

図5 NP発現ベクターの構造とRNA polymerase 活性

すでに我々は、センダイウイルスの持続感染がウイルス・タンパク質の一つMタンパク質の変異によって引き起こされていること・このタンパク質が遺伝子発現には関与していないことを明らかにしているが、このウイルスの遺伝子発現機構の主要部分はまだほとんど明らかになっていなかった。センダイウイルスでは複製・転写は共にネガティブ鎖RNAを鋳型としたRNA合成活性に依存しており、またこの活性はLタンパク質に存在す

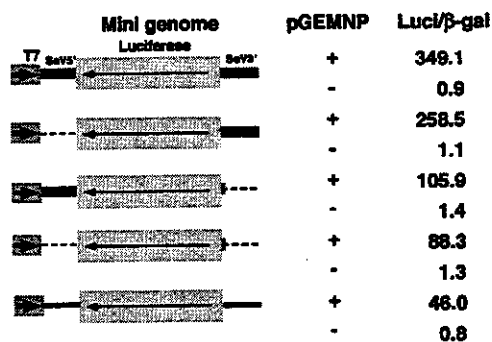


Fig.4. (+) strand RNA synthesis from pHVLucIB derivatives.

図6 NPタンパク質の持つRNA polymerase 活性が要求する鋳型RNAの構造

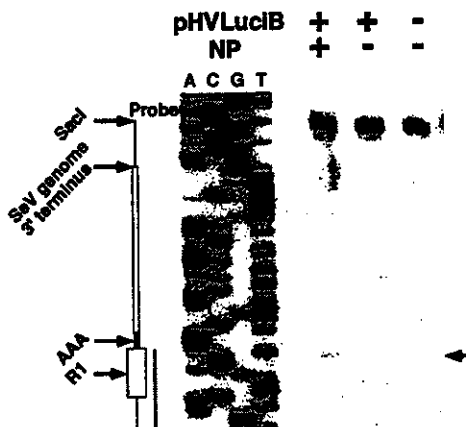


Fig.5. (+) strand RNA Synthesized by NP protein started from R1 region.

図7 NPタンパク質によって合成されたRNAの5'端の構造

と考えられてきたが、RNA合成活性は宿主細胞のタンパク質（チューブリンなど）に完全に依存していて*in vitro*系の構築が難しいこともあり詳細な解析はなされていない。この問題を解決するため、我々は鋳型となるRNAと個々のウイルスタンパク質を、T7 RNA polymeraseを安定に発現する細胞の中で直接作って機能を解析する系を作成して、ヌクレオキャ

Autonomous Replication and Gene Expression by RNA-dependent RNA polymerase

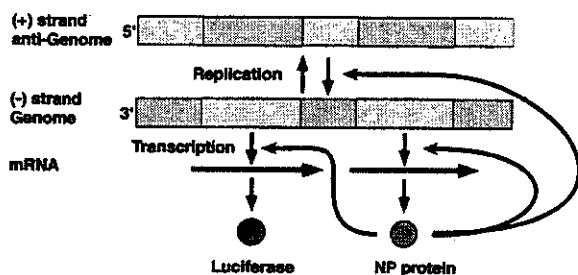


図8 NPタンパク質を使った遺伝子発現系の設計

プシド（ウイルスゲノムRNAとウイルスタンパク質からできている複合体で、遺伝子の本体）を構成するタンパク質についてRNA合成活性を測定した。その結果、主要タンパク質であるNPタンパク質にRNA polymerase活性の本体が存在することを見いだした（表4）。

またNP発現ベクターと構造は非常に似ているがNPタンパク質を作ることができないDNAを導入してもRNA polymeraseの活性が検出できないことから、この活性がNPタンパク質自体に存在することが確かめられた（図5）。また鋳型RNAの3'側の構造が重要であり、この部分にNPタンパク質と結合してRNA合成を開始するプロモーター領域があることがわかった（図6）。さらにNPタンパク質が合成したプラス鎖RNAの構造をS1 Nuclease Assayで検討したところ、ゲノムRNA 3'側にあるmRNAの転写開始領域R1とゲノムRNA 3'末端の両方からRNA合成が始まっていることがわかり、NPタンパク質がmRNAの

転写とゲノムRNAの複製の両方を担っていることも示唆された（図7）。

以上の結果は、NPタンパク質を駆動力として、細胞質で自ら複製しながらmRNAを合成できる新たな遺伝子発現系の構築が可能であることを示している。本年度はさらにNP遺伝子を含んだベクター作成のための鋳型DNAの作成を完了しており（図8）、これらの研究成果に基づいた遺伝子発現系の開発が近い将来に実現することが期待される。

4. ラムダファージを使った新しい遺伝子導入系の開発

本年度は、もうひとつ新たな原理に基づく遺伝子導入系として、大腸菌のウイ

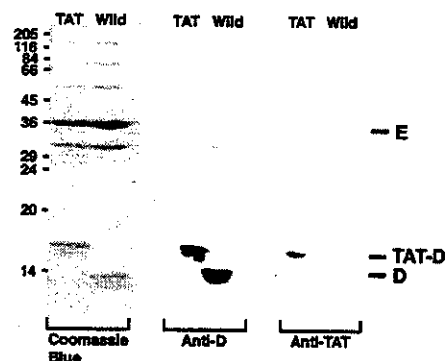


図9 Tat peptideを頭部を持つLambda Phageのタンパク質組成

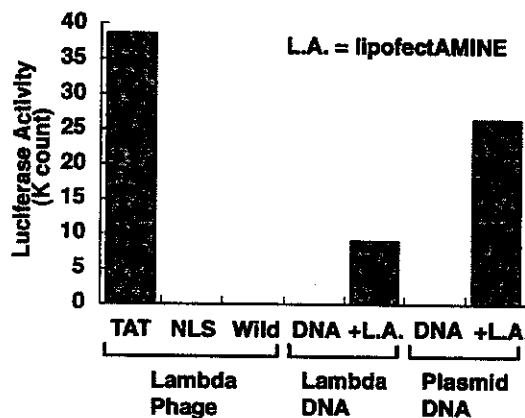


図10 Tat-Phageによる遺伝子導入 (1) 陽荷電リボソームとの比較

ルスであるラムダファージの表面に遺伝子導入に必要な活性を持つシグナルを発現させたベクターを作成した。昨年度に実施したラムダファージを用いた核への遺伝子ターゲティングシステムの研究から、頭部にさまざまな機能を持ったペプチドを発現するファージ粒子の作成が可能になった。そこで本年度は、ヒト免疫不全ウイルスのTat タンパク質由来のTat peptideに注目し、これを頭部に発現するファージを構築して粒子内部に封入した遺伝子の導入活性を観察した。

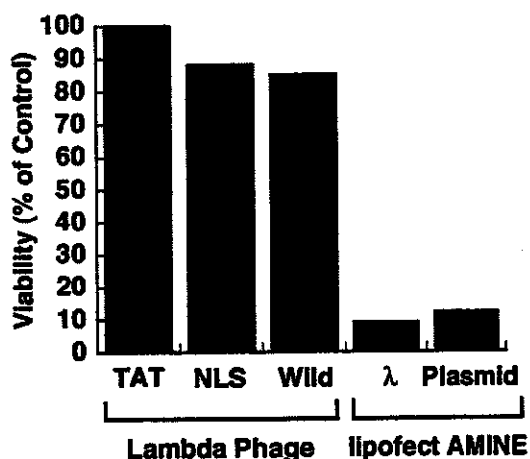


図11 Tat-Phage による遺伝子導入 (2) 細胞毒性の検定

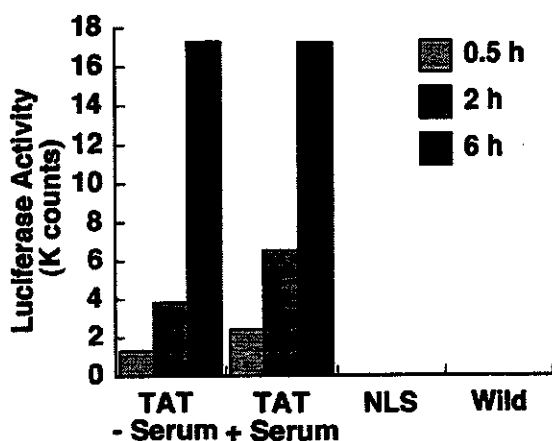


図12 Tat-Phage による遺伝子導入 (3) 細胞との接触時間の影響

Tat peptide をN末端に含むキメラ・タンパク質は細胞膜を通過して細胞内に自律的に移行することが知られており、またさらに核にまで移行しているという報告もある。そこで、ファージ頭部を構成する主要タンパク質であるD タンパク質のN末端側にこのペプチドを組み込んだ変異ファージを作成し、ファージ粒子を精製してタンパク質ブロッティングでキメラ・タンパク質が確かに頭部に組み込まれていることを確認した(図9)。次に、このファージを培養液中に添加し、COS細胞への遺伝子導入活性を、ファージ粒子内部に封入したルシフェラーゼ遺伝子を指標に測定した。その結果、他の陽荷電リポソーム・DNA複合体と同等が高い遺伝子導入活性を持っていることが確認できた(図10)。野生型ファージや核移行シグナルを発現しているファージでは遺伝子導入は観察されないことから、この活性はTatファージに特有な性質であることがわかる。他の非ウイルスベクターと比較で注目すべき点は、動物細胞に傷害をもたらさないことで、陽荷電リポソームの毒性が強いことと対照的である(図11)。さらに遺伝子導入の時間経過を測定すると、細胞との接触時間が重要で、最大6時間まで時間を変えたがその範囲で遺伝子導入効率は時間に比例して上昇していた(図12)。一方、他の非ウイルスベクターで観察される血清による阻害は起こらずむしろ遺伝子発現を上昇させる傾向が見られた。

以上の研究成果は、Tat peptide がタンパク質だけではなくDNAのような巨大な分子をも細胞内に導入できる活性を持っていること、この活性は陽荷電リポソームなどに比べてはるかに細胞毒性が低く遺伝子治療用ベクターとして有効であることを示している。この活性は短いTat peptide に依存しているため、今後、このペプチドを高分子ポリマーに組み込んだ新しいベクター系を開発できる可能性を強く示唆しており、細胞傷害性の低い安全な遺伝子導入系の候補になることが期待される。

5. 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

膜融合リポソームは、個々の細胞に導入できるDNAの量が少ないため誘導できる遺伝子発現は強いとは言えないものの、細胞特異性は一般に低く、血球系の一部細胞を除く多くの癌細胞に効率よく遺伝子を導入できるので*in situ*で一度に多くの細胞に遺伝子を導入できるという特徴を持っている。そのため、毒性のある遺伝子を癌細胞特異的に発現させることで局所に限定して存在する固形癌や、腹腔内に限局して散在している腹膜播種性癌の遺伝子治療が理論上可能となる。本研究では、致死性のDegenerin遺伝子を癌特異的なCEAプロモーターを使って癌細胞特異的に発現させることで癌細胞の死滅を狙った実験を行った。

ヒト胃癌腹膜播種モデルマウスに、癌接種後10日目から毎週一回の頻度で計4回、一回当たり0.5 ugのハイブリッド遺伝子を含む膜融合リポソームを腹腔内投与した。その結果、対照群(ベクターDNA投与群及び空のリポソーム投与群)のマウスは35日で全滅したのに対し、実験群では95%が生存し、投与されたハイブリッド遺伝子が、*in vivo*で癌細胞特異的に発現してこれを死滅させたことが確認され、効果的な治療に成功した。

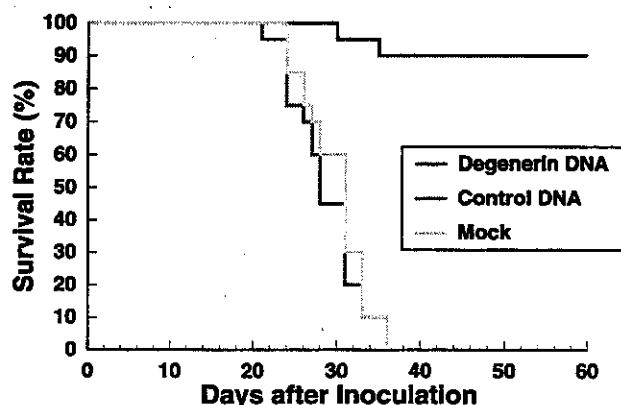


図25 変異型Degenerin 遺伝子による胃癌腹膜播種モデルの治療実験

D. 考察

本年度は、3年間の研究計画の最終年度として、膜融合リポソームの実用化に向けた安全性の確認や新しい原理に基づくTat-Phage遺伝子導入系などベクター生産に関わる問題と、実際に外来遺伝子を組み込むための遺伝情報系の問題の2つに焦点をあてて研究を進め、今後の新規ベクターの開発に向けた基礎を固めることができた。

膜融合リポソームがユニークな活性を持った遺伝子導入系であることは広く知られるようになり、動物実験の段階ではガン遺伝子治療を中心にさまざまな成果が報告されている。しかし、実際に臨床応用を目指すためには、生産工程や素材の問題を含めた安全性に関する詳細な検討が必要である。本年度は、膜融合リポソームの製造に関して現状で研究室レベルで考え得る点をすべて検討し、今後の動物を使った安全性試験に必要な情報を得ることができた。素材である不活化センダイウイルスへの病原性ウイルス粒子の混入については、センダイウイルスZ (V欠損)株の持つ病原性がマウス投与時50%致死率で 10^8 と報告されていること、またbeta-propiolactoneによる不活化で感染性が 10^8 低下すると考えると、両者で 10^{-16} となり、病原性粒子の存在は事実上無視できる値となる。センダイウイルスは組換えを起こさないので病原性を持つウイルスに復帰変異をすることは無く、安全性の確保は容易である。ちなみに、遺伝子治療の臨床試験で現在使用されているアデノウイルスベクター最終製品への野生型アデノウイルスの混入率は 10^{-9} 程度であり、不活化センダイウイルスがこの基準を容易に満たしていることが理解できよう。一方、膜融合リポソームのもう一つの素材であるDNA封入リポソームに関しては、リポソームもDNAもそれぞれ単独ではすでに製剤としての検討がなされており、素材の工業生産については大きな問題点は無いが、今回の研

究でさらに両者を複合した最終産物の実用化に向けた情報を得ることもできた。

本研究では安全性に重点をおいたベクター開発を進めたが、その応用例の一つとして腹腔内に広がった癌の遺伝子治療という難しいモデルを手がけた。C E A promoter で転写される Degenerin 遺伝子により癌細胞を特異的に殺すことができるという発想は、従来の抗体・毒素キメラ分子を使ったミサイル療法をさらにエレガントにしたものであるが、ここで注目すべき点は、毒性を持つ遺伝子をウイルスベクターに組み込むことは原理的に不可能なので、CEA promoter で転写される Degenerin 遺伝子を組み込んだウイルスベクターを作ることも非常に難しいということである。一方、この遺伝子は大腸菌には何の毒性も持たないのでプラスミドとして大量に調製することは容易だが、調製したDNAを既存の他の非ウイルスベクターと組み合わせても、遺伝子導入の効率が低く腹腔内に散らばったすべての癌細胞にこの遺伝子を導入して殺すという目的を達成することができない。つまり、今回の研究は、非常に多くの細胞に生体内で同時に任意の遺伝子を導入することができるという膜融合リボソームの性質を完全に活かし、その有用性を証明した成果であるということが出来る。

また、非ウイルスベクターの開発にあたっては、デリバリーシステムを最終的には完全に合成化合物に置き換えることができるかどうかということを常に意識しているが、本年度開発した Tat-Phage は、新しいポリマーミセル型遺伝子導入ベクターのモデルとなる可能性を秘めている。ファージを使った遺伝子導入系の特徴は、ポリマーミセルと類似した形態を持ち、かつ決まった数（今回の場合は440コピー）のペプチド性シグナルを表面に持つ構造を容易に作る事ができる点であり、ペプチドを合成してミセルを作るのに比べるとさまざまなシグナルを持つ粒子を容易に得ることができる。Tat-peptide は今後、遺伝子導入用合成ベ

クターの素材として検討を進める予定である。

また本年度は、デリバリーシステムと組み合わせる汎用の遺伝子発現システムに関しても研究を進め、核内で安定に遺伝子発現を行う人工染色体システムと、細胞質で安定に遺伝子発現を行うRNAレプリコンシステムの両者について、成果を納めることができた。

人工染色体の開発は、遺伝子治療のみならず今後のバイオテクノロジーに大きな役割を果たすであろう重要なテーマであるが、研究を進めるためには染色体安定化機構の解明が最優先の課題であった。染色体末端のテロメアが染色体本体の安定性に重要な役割を果たしていることは、すでに60年近く前に判っていたが、具体的にテロメアがどのような構造を持ち、どんな機能を持っているのかが明らかになり始めたのはほんのこの10年くらいのことである。本研究では、染色体末端にあるテロメア配列(TTAGGG)_nに結合するTRF1というタンパク質が染色体の安定性を決めている因子の本体であることを明らかにし、テロメア配列を組み込んだDNAをTRF1を介して核内で安定化させることが人工染色体の開発に必須であるという結論を得た。さらに本研究から、染色体の安定性がそのまま細胞の老化と不死化に直結する問題であることも同時に判明し、外来遺伝子を使ってTRF1を過剰に発現させることにより、単に導入遺伝子の安定化を実現することができるだけでなく遺伝子導入した細胞の寿命を選択的に延ばすことにより遺伝子治療の効果を増強できる可能性があり、今後の展開に大いに期待が持てると考えている。

またRNAを鋳型にRNAを自立複製しつつ遺伝情報を発現することを目指したRNAレプリコンの開発はまだ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、陽荷電リボ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

組み替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、安全性の点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たが、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。

E. 結論

本年度の研究では以下の成果を得た。

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} 以下に押さながら活性と安全性を保つ条件を決定した。また最終的な製剤としての形状を検討した。

2) 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また不死化に深く関与するなど、外来遺伝子を導入した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。

3) RNAからRNAを自立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。

4) 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ァージ粒子内のDNAが導入されて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。

5) ヒト胃癌腹膜播種モデルの治療実験に成功した

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **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 and Takao Hayakawa (1999). *Mol. Memb. Biol.*, 16, 123-127. Gene Delivery Systems Using the Sendai Virus.
- 2) Tsuyoshi Nakanishi, Jun Kunisawa, Akira Hayashi, Yasuo Tsutsumi, Kazuyoshi Kubo, Shinsaku Nakagawa, **Mahito Nakanishi**, Keiichi Tanaka and Tadanori Mayumi (1999). *Journal of Controlled Release*, 61, 233-240. Positively charged liposomes functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins.
- 3) **Akiko Iahii-Watabe**, Hiroyuki Mizuguchi, Eriko Uchida, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi, Akiko Eguchi, Mahito Nakanishi, Tadanori Mayumi and Takao Hayakawa (1999). *Progress in Drug Delivery System*, 8, 31-40. Target Cell Specificity of Fusogenic Liposome-mediated Macromolecule Delivery into Human Blood Cells.
- 4) Keisuke Miyake, Shoji Kimura, **Mahito Nakanishi**, Akihiko Hisada, Mamoru Hasegawa, Seigo Nagao and Youichi Abe (2000). *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 59, 23-33. Transforming growth factor-beta1 stimulates contraction of

- human glioblastoma cell-mediated collagen lattice through enhanced alpha 2 integrin expression.
- 5) **Mahito Nakanishi**, Teruo Akuta, Emi Nagoshi, Akiko Eguchi, Hiroyuki Mizuguchi and Takao Senda. J. Euro. Pharamaceu. Sci., in press. Nuclear Targeting of DNA
 - 6) Akiko Eguchi, Toru Kondoh, Hirokazu Kosaka, Takashi Suzuki, Hiroshi Momota, Akinori Masago, Tetsuya Yoshida, Hideharu Taira, Akiko Ishii-Watabe, Jun Okabe, Jianhong Hu, Naoyuki Miura, Shigeharu Ueda, Yasuo Suzuki, Takao Taki, Takao Hayakawa and **Mahito Nakanishi**. J. Biol. Chem. in press, Identification and Characterization of Cell Lines with a Defect in a Post-Adsorption Stage of Sendai Virus-Mediated Membrane Fusion.
 - 7) 中西真人・真砂明典・江口暎子 (1999). 遺伝子治療ハンドブック (日本遺伝子治療学会、編)、センダイウイルス (HVJ) の増殖サイクル.
 - 8) 中西真人(1999). 今日のDDS・薬物送達システム (高橋俊雄・橋田充、編)、遺伝子治療におけるDDSの役割.
 - 9) 中西真人(2000). Biotherapy, 印刷中. 遺伝子治療とベクター開発の現状.
 - 3) 会大会シンポジウム (高松) . 真砂明典・中西真人 (1999)、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 (福岡) .
 - 4) 岡部潤・中西真人 (2000)、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 (神戸) .

2. 学会発表

- 1) Mahito Nakanishi, Tadanori Mayumi and Takao Hayakawa (1999), Development of Hybrid Vectors: Up-to-Date. The 5th annual meeting, The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo).
- 2) 中西真人 (1999)、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

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究 —術後肝障害の阻止を目指した遺伝子治療の応用研究—

分担研究者 鈴木 宏治 三重大学医学部医学科 教授

研究要旨

遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する応用研究として、肝癌、肝炎、肝硬変等における異常患部の切除術後に血液凝固亢進を原因として発生する肝障害の阻止を目的として、血液凝固阻止因子のヒトトロンボモジュリン(hTM)遺伝子をラットの肝類洞内皮細胞に導入する遺伝子治療の安全性と有効性の評価検討を行った。具体的には先ず、ラット肝類洞内皮細胞へのhTM遺伝子の導入効率をin vitroで評価するため、単離した肝類洞内皮細胞をhTM遺伝子発現ベクター(pRC/CMV-hTM cDNA)含有膜融合リポソームで処理し、処理細胞でのhTMの発現量(活性、抗原、mRNA)を測定し、hTM遺伝子の有意な導入を確認した。また、pRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソームの安全性と遺伝子導入効果をin vivoで評価するため、ラット門脈からpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム溶液を注入し、経時的に血漿および肝類洞内皮細胞を単離し、肝機能障害の指標として血漿GOT、GPT、LDH活性を測定し、また、肝類洞内皮細胞へのhTM遺伝子導入の指標としてhTMの発現量を測定した。その結果、hTM遺伝子含有膜融合リポソームの導入による肝障害は軽微であり、有意なhTM遺伝子の導入を確認した。さらに、感染時の肝における血液凝固機能を把握するため、LPS投与ラットの肝類洞内皮細胞における抗血栓性因子プロテインSの発現動態を検討した。また、ラットプロテインS cDNAをクローニングし、プロテインS発現ベクター(pRC/CMV-rPS cDNA)を構築して、今後のプロテインSによる遺伝子治療に向けた基礎研究を行った。

A. 研究目的

肝癌、肝炎、肝硬変等では異常患部の切除が不可欠であるが、手術の予後(肝再生や生体機能全般の回復、生存性など)は肝障害の発生の有無に関わる。術中・術後の感染による肝障害は頻度も高く、死に至ることも希ではない。したがって、如何に術中、術後の感染を軽減し、肝障害の発生を防ぐかが重要な臨床的課題となっている。これまでの術後肝障害に関する基礎的研究で、肝障害の発生は肝類洞内皮の障害、特に類洞内皮の抗血栓性機能や抗炎症性機能の低下に基づく血液凝固の亢進による微小血栓の形成が、残肝組織の壊死やアポトーシスを誘導する最大の原因になることが示唆されている。したがって、類洞内皮の機能保全、特に抗血栓性機能の維持補填が遺伝子治療をはじめとする人工的手法によって可能になれば、術後肝障害の発生は大いに軽減できると期待される。

一方、血管内皮細胞膜にはトロンボモジュリン

(TM)やヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)などの抗血栓性因子が存在し、また、内皮細胞は組織因子系凝固阻害因子(TFPI)やプロテインS(PS)などを産生し、内皮細胞上の抗血栓性機能を維持している。しかし、感染等によるリポポリサッカライド(LPS)の侵入は単球や内皮細胞を刺激し、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインの産生、凝固開始因子の組織因子(TF)の産生、細胞接着因子のVCAM-1やICAM-1の産生を促すとともに、内皮細胞での抗血栓性因子のTMやHSPG、TFPIなどの産生低下を来し、血管内皮細胞上は炎症と血液凝固亢進の場へと変化する。

こうしたLPS刺激による血管内皮細胞の障害は、肝類洞内皮細胞においてもほぼ同様に生じると考えられ、我々はこれまでに、肝切除ラットモデルを用いた研究において、術後の肝機能障害は類洞内皮細胞のTMの発現低下が一因になること、また、術後の肝障害がプロスタサイクリン(PGI₂)の前投与で軽減されることを示してきた。

以上のこれまでの研究成果に基づき、本研究では、遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する応用的研究として、術後肝障害の発生の阻止を目的として、抗血栓性因子や抗炎症性因子の遺伝子を肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価検討することとした。すなわち、ラットを用いて、肝切除、肝硬変および敗血症モデルを作製し、これらの病態時における肝類洞内皮細胞の抗血栓性の低下を改善する目的で、ヒトやラットの TM、TFPI などの cDNA を組み込んだ発現ベクターを膜融合リポソーム内に封入し、この遺伝子封入膜融合リポソームを用いて、*in vitro* での単離類洞内皮細胞への遺伝子導入効率の検討、*in vivo* での肝障害マーカーを指標とした安全性の検討、導入遺伝子由来蛋白質の生物活性、抗原量、mRNA の発現量を指標とした導入遺伝子の導入効率の評価、さらに肝類洞内皮抗血栓性の低下機序に関する検討を行った。

B. 研究方法

(1) ヒト TMcDNA およびラット TMcDNA のクローニングおよび発現ベクターの構築

ヒト (h)TMcDNA は、 λ gt 11 ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVECs) cDNA ライブラリーからポリクローナル抗 TM 抗体を用いてクローニングした。ラット (r)TMcDNA は、ヒト TM cDNA の塩基配列を指標にして作成した一対のプライマーを用いて、ラットの血管内皮細胞由来 mRNA を鋳型とした RT-PCR 法によって TM cDNA を増幅してクローニングした。hTM 発現ベクター (pRC/CMV-hTM cDNA) は、hTMcDNA をサイトメガロウイルスプロモータおよびウシ成長ホルモントーミネータを有する哺乳動物細胞発現ベクターの pRC/CMV の Hind III 切断部位に挿入して作製した。rTM 発現ベクター (pRC/CMV-rTM cDNA) は、rTM cDNA を哺乳動物細胞発現ベクターの pRC/CMV の Xba I 切断部位に挿入して作製した。

(2) 膜融合リポソームの調製およびラットへの投与

膜融合リポソームは、コレステロール、リン脂質および不活化センダイウイルスを用いて Nakanishi らの方法に従い調製した。hTM 発現ベクターを含む膜融合リポソームは、ラットをペントバルビタール麻酔下に開腹し、門脈から注入した (4 μ g DNA/ 80 μ l/ 匹)。

(3) ラット血漿、肝細胞、肝類洞内皮細胞の単離

ラットクエン酸血漿は、膜融合リポソームを投与した後、経時的にラット門脈から採血し (クエン酸加血液)、遠心分離により血球成分を分離して調製した。ラットの肝細胞および肝類洞内皮細胞は、コラゲナーゼ環流法およびその後のエルトリエーションロータ分離法を用いてそれぞれ単離した。得られた肝細胞はウィリアムズ E 培地で数回洗浄後、また、肝類洞内皮細胞は 20% ウシ胎児血清を含むウィリアムズ E 培地で数回洗浄後、collagen-coated plate を用いてそれぞれ培養した。

(4) 血漿 GOT、GPT および LDH 活性の測定

血漿 GOT、GPT および LDH 活性はコダックエクタケム 250 を用いて測定した。

(5) hTM 抗原、TM 活性および TM mRNA の測定

ラット肝細胞あるいは類洞内皮細胞で発現した hTM 蛋白量は、単離した細胞を 0.5% Triton X-100 を含む TBS 溶液 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) で 1 時間処理し、細胞抽出液を調製した後、エピトープの異なる 2 種類のモノクローナル抗 hTM 抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法で測定した。細胞表面上の TM 活性は、培養細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で数回洗浄後、トロンビンおよびプロテイン C を添加し、生成した活性化プロテイン C (APC) の合成基質 (Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA) 分解活性を測定した。hTM mRNA 量は肝類洞内皮細胞中の全 RNA を acidic phenol guanidium isothiocyanate (AGPC) 法で抽出後、hTM cDNA に特異的な 1 対のプライマーを用いた RT-PCR 法で増幅し、これをアガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色により TM mRNA 由来バンドとして検出した。

(6) ラット (r)PS cDNA のクローニングおよび発現ベクターの構築

rPS cDNA は、 λ gt 11 ラット肝臓 cDNA ライブラリーから hPScDNA をプローブに用いてクローニングした。rPS 発現ベクター (pRC/CMV-rPS cDNA) は rPScDNA をサイトメガロウイルスプロモータおよびウシ成長ホルモントーミネータを有する哺乳動物細胞発現ベクターの pRC/CMV の Cla I および Xba I 切断部位に挿入して作製した。

(7) ラット敗血症モデルにおける肝類洞内皮細胞 PS の発現に関する検討

敗血症モデルラットは、ラット腹腔に LPS (3

mg/kg)を投与して作製した。ラット類洞内皮細胞でのPSの発現量は、単離した細胞を24時間培養後の培養液上清中のPS抗原値をELISA法を用いて測定した。PS mRNA量は肝類洞内皮細胞中の全RNAをacidic phenol guanidium isothiocyanate (AGPC)法で抽出後、ラットPS cDNAに特異的な1対のプライマーを用いたRT-PCR法で増幅し、アガロースゲル電気泳動後、rPS cDNAをプローブとしたSouthern blot解析(RT-PCR-Southern blot解析)を用いて定量した。また、培養肝類洞内皮細胞のPS発現に及ぼすLPSの影響は、単離類洞内皮細胞を種々の濃度のLPSで24時間処理した後、その培養上清中のrPS抗原をELISA法で、rPS mRNA量をRT-PCR-Southern blot解析で定量した。

C. 研究結果

(1) hTM cDNA発現ベクター封入膜融合リポソームの単離ラット肝類洞内皮細胞への導入 (in vitro 実験)

まず、hTM cDNA発現ベクター封入膜融合リポソームのin vitroでの導入効果を検討するため、単離ラット肝類洞内皮細胞をpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム(1 µg DNA/2 ml培養液)で37°C、24時間処理した後、培養類洞内皮細胞のhTMの発現量(抗原、活性、mRNA)を測定した。その結果、hTM cDNA含有膜融合リポソームで処理した類洞内皮細胞では、未処理のそれに比較してTMの抗原値と活性値が有意に増加していた(p < 0.05) (図1)。また、hTM mRNA量もhTM cDNA含有膜融合リポソーム処理細胞では、未処理細胞に比較して明らかに増加していた(図1)。

(2) hTM cDNA発現ベクター封入膜融合リポソームの安全性およびラット肝類洞内皮細胞への導入 (in vivo 実験)

hTM cDNA発現ベクター封入膜融合リポソームのin vivoでの安全性および遺伝子導入効果を検討するため、正常ラットの門脈からpRC/CMV-hTM cDNA含有膜融合リポソーム溶液(4 µg DNA/80 µl)を注入し、10日目まで血漿を採取し、GOT、GPTおよびLDH活性を測定した。その結果、LPS投与ラットではこれらの値が著しく増加したのに対して、膜融合リポソーム投与ラットでは血漿GOT、GPTおよびLDH値はほとんど変化せず、膜融合リポソーム投与による直接的な肝障害は生じないことが判明した(図2)。次に、hTM cDNA発現ベクター含有膜融合リポソームを門脈内に投

与した後、ラット肝細胞および肝類洞内皮細胞を単離し、これらの細胞におけるhTMの発現量(抗原、活性、mRNA)を測定した。その結果、hTM遺伝子は肝細胞では発現されなかったが、肝類洞内皮細胞では投与後5日目にhTM抗原値およびTM活性値は共に有意に増加し(p < 0.01)、その後徐々に低下した(図3)。RT-PCR法で測定したhTM mRNA量の発現動態も同様であった。以上の結果から、膜融合リポソームの投与による肝障害は殆どなく、治療上、安全であること、また、膜融合リポソーム含有hTM cDNA発現ベクターは投与後約5日目に最大発現量を呈すること、さらに、門脈から投与したhTM遺伝子発現ベクターは、肝細胞ではなく類洞内皮細胞で特異的に発現されることが示唆された。

(3) 敗血症時のラット肝類洞内皮細胞でのPSの発現に関する検討

敗血症時の肝類洞内皮細胞の産生する抗血栓性因子のPSに発現に関する検討を行った。LPS(3 mg/kg)を投与したラットの肝臓から肝細胞および類洞内皮細胞を単離し、24時間培養した後の類洞内皮細胞および肝細胞の培養上清中のPS抗原値およびそれぞれの細胞中のPS mRNA発現量を測定した。その結果、類洞内皮細胞培養上清中のPS抗原値およびPS mRNA値は、正常ラットから単離した類洞内皮細胞のそれぞれの値の60%および50%に低下していた(図4)。同様に、単離肝細胞について検討した結果、PS抗原値およびPS mRNA値は、正常ラットから単離した肝細胞と比較して有意な低下を認めなかった。さらに、正常ラットから単離した類洞内皮細胞をLPSで24時間処理した後、培養上清中のPS抗原値およびPS mRNA量を測定した結果、培養上清中のPS抗原値はLPSの濃度依存性に低下し、100 µg/mlのLPS処理により50%に低下した。また、類洞内皮細胞のPS mRNAレベルもLPS処理により低下し、100 µg/mlのLPS処理により約50%に低下していた。しかし、LPSで処理した分離肝細胞中のPS mRNAには有意な変化は認められなかった。

D. 考察

我々はこれまで、感染症患者の臨床検体およびLPS感染敗血症モデル動物を用いた研究を行い、肝の術後感染による肝機能障害は、主に腸管から門脈内に移入した感染細菌由来のLPSによる肝類洞内皮の抗血栓性機能の障害、特にTMの発現低

下によることを示唆してきた。この研究成果に基づき、本研究では、遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する応用研究として、肝癌、肝炎、肝硬変等で異常患部の切除手術後に発生する肝障害の阻止を目指して、抗血栓性因子の遺伝子をラットの肝類洞内皮細胞に導入し、その遺伝子治療の有効性と安全性を評価することを目的として実施した。

まず、hTMcDNA 発現ベクター封入膜融合リボソームの *in vitro* でのラットの単離肝類洞内皮細胞への導入実験においては、hTM 遺伝子の導入は認められるものの、その活性の増加は basal level の 2 倍程度であった。このことは、導入遺伝子の発現には、導入後一定の時間を必要とし、また、動物種により TM 遺伝子の発現量が違う可能性が示唆された。次に、ラット門脈へ hTMcDNA 含有膜融合リボソームを投与し、経時的にラット類洞内皮細胞における hTM の発現を検討した。投与方法については、前年度の研究会議で指摘のあった点を改善するため、投与されたりボソームが門脈内で血球と瞬時に融合したり、血液中の蛋白質により破壊されるのを避けるため、遺伝子封入リボソームを投与する直前に、門脈血流を一時的に遮断した後に門脈内を数 ml の生理食塩水で洗浄して血液や蛋白質類を除去し、その後にリボソーム溶液を投与することにした。その結果、hTM 発現量は投与後 5 日目に発現ピークが認められた。このことは hTM 遺伝子の発現には、遺伝子導入後約 5 日間の時間経過が必要であることが示され、このことは、*in vitro* 実験で hTM cDNA 含有膜融合リボソームの 24 時間処理では顕著な hTM 活性の発現の増加が認められなかった点と一致した。

次に、感染症時の肝類洞内皮の抗血栓性の低下機序に関して、内皮細胞の産生する抗血栓性因子の一つである PS の発現動態に関して検討を行った。その結果、感染症モデルラットでは肝細胞での発現低下はみられなかったものの、類洞内皮細胞での PS の発現量が著しく低下することが明らかになった。この PS の産生低下は感染症時の類洞内皮の抗血栓性の低下による微小血栓形成に直接的に影響を及ぼすものと考えられた。

今後は引き続いて、既に準備を完了している hTFPI 遺伝子発現ベクターや rTM 遺伝子発現ベクターを封入した膜融合リボソームと共に、今回作製した rPS 遺伝子発現ベクターを用いた実験を行うとともに、LPS 投与敗血症モデルラットや肝部分切除ラット等に対する抗血栓性因子遺伝子の導

入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。また、標的組織や標的細胞内での遺伝子導入効率と遺伝子発現効率をさらに高めるため、現時点で最強のベクターといわれるアデノウイルスベクターを用いた hTM、rTM、hTFPI および rPScDNA 含有アデノウイルスベクターを作製し、その導入効率を評価すると共に、LPS 投与敗血症モデルラットや肝部分切除ラット等に対する抗血栓性因子遺伝子の導入による臓器保全効果に関する基礎的検討を行う予定である。現在、その研究の実施に必要な諸手続きを進めている。

E. 結論

ウイルスベクターと非ウイルスベクターの特徴を併せ持つハイブリッドベクターの膜融合リボソームの遺伝子導入ベクターとしての有効性ならびに安全性が、感染症モデルラットへの抗血栓性因子遺伝子導入ベクターを用いた研究によって評価できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Gabazza, E.C., Taguchi O., Takeya, H., Kobayashi, H., Yasui, H., Kobayashi, T., Hataji, O., Urano, H., Zhou, H., Suzuki, K., Adachi, Y. (1999) Thrombin in the airways of asthmatic patients. *Lung* 177: 253-262.
- (2) Hayashi, T., Nakamura, H., Okada, A., Takebayashi, S., Wakita, T., Yuasa, H., Okumura, K. and Suzuki, K. (1999) Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene. *GENE* 238: 367-373.
- (3) Sano, T., Gabazza, E.C., Zhou, H., Takeya, H., Hayashi, T., Ido, M., Adachi, Y., Uchida, A. and Suzuki, K. (1999) The zymogen prothrombin stimulates cell locomotion and calcium influx in murine osteosarcoma cells by different mechanism from thrombin. *Int J Oncol* 15: 1197-1203.
- (4) Yuasa, H., Tanaka, H., Hayashi, T., Wakita, T., Nakamura, H., Nishioka, J., Kawarada, Y. and Suzuki, K. (2000) Bovine protein C inhibitor has a unique reactive site and can transiently inhibit plasmin. *Thromb Haemost* 38: 262-267.

2. 学会発表

外国発表

- (1) The zymogen prothrombin promotes the motility of osteosarcoma cell lines by different mechanism from

thrombin.: Sano, T., Gabazza, E.C., Zhou, H., Uchida, A. and Suzuki, K. XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999, 8月, ワシントン.

(2) Abnormally low expression of protein C inhibitor in human renal cell carcinoma.: Wakita, T., Hayashi, T., Yuasa, H., Nishioka, J., Kawamura, J. and Suzuki, K. XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999, 8月, ワシントン.

(3) Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates protein S expression in rat sinusoidal endothelial cells.: Yuasa, H., Hayashi, T., Nishioka, J., Kawarada, Y. and Suzuki, K. XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999, 8月, ワシントン.

(4) Prothrombin enhances the invasiveness of melanoma cells by different mechanism from thrombin.: Zhou, H., Gabazza, E.C., Sano, T. and Suzuki, K. XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999, 8月, ワシントン.

(5) Molecular cloning, tissue distribution and functional characterization of bovine protein C inhibitor.: Tanaka, H., Yuasa, H., Hayashi, T., Wakita, T., Nakamura, H., Nishioka, J. and Suzuki, K. XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 1999, 8月, ワシントン.

国内発表

(1) LPS 投与時の肝および類洞内皮細胞の抗血栓性低下機序の解析: 湯浅浩行, 白井正信, 三枝庄太郎, 久米正根, 川原田嘉文, 林 辰弥, 鈴木宏治. 第99回日本外科学会総会, 1999, 3月, 福岡.

(2) 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: 湯浅浩行, 林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治. 第63回日本生化学会中部支部例会, 1999, 5月, 津.

(3) 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: 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. 第14回日本 shock 学会, 1999, 5月, 大津.

(4) 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: 湯浅 浩行, 林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治. 第4回 Vascular Medicine 学会, 1999, 7月, 神戸.

(5) 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: 湯浅 浩行,

林 辰弥, 西岡 淳二, 川原田 嘉文, 鈴木 宏治. 第72回日本生化学会大会, 1999, 10月, 横浜.

(6) 敗血症時の血漿プロテインS(PS)値の低下機序の解析: 湯浅 浩行, 林 辰弥, 脇田利明, 西岡 淳二, 鈴木 宏治. 第22回日本血栓止血学会, 1999, 12月, 宇都宮.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。) 特になし。

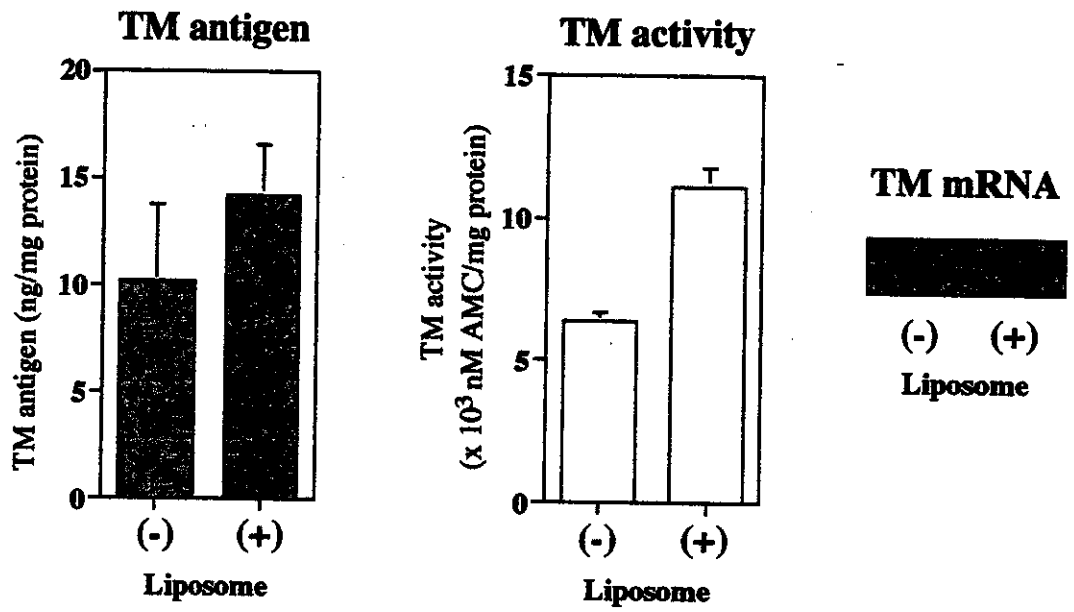


Fig. 1. Effect of treatment of rat liver sinusoidal endothelial cells with fusogenic liposome containing human TM expression vector in the *in vitro* studies

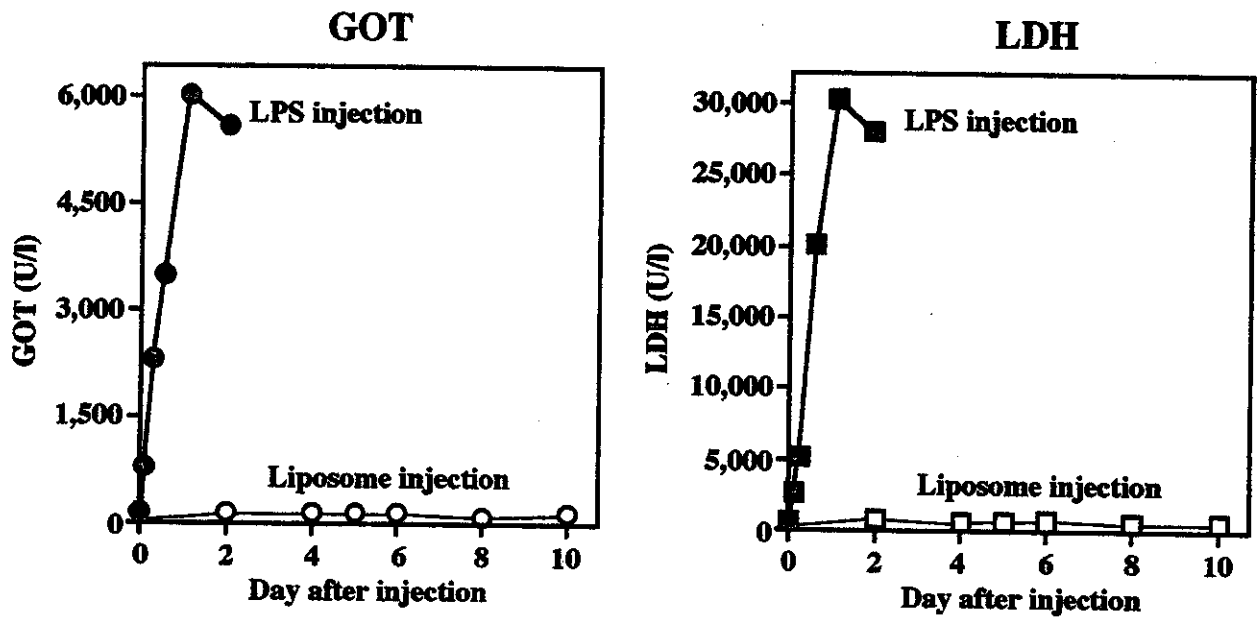


Fig. 2. Plasma GOT and LDH levels of rats treated with LPS or fusogenic liposome

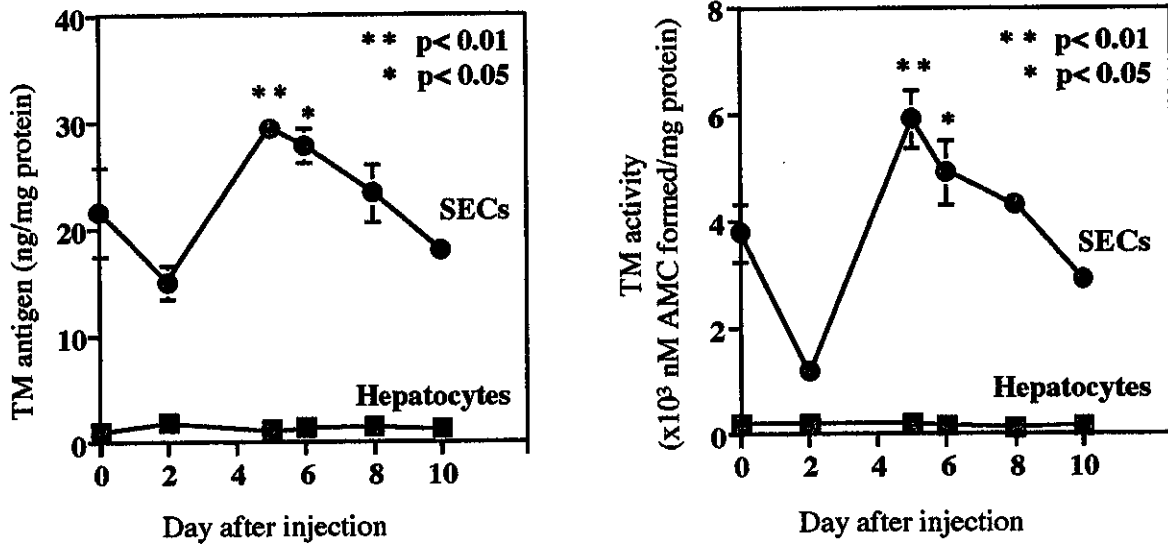


Fig. 3. Effect of fusogenic liposome containing human TM expression vector on TM antigen and activity levels of sinusoidal endothelial cells (SECs) and hepatocytes

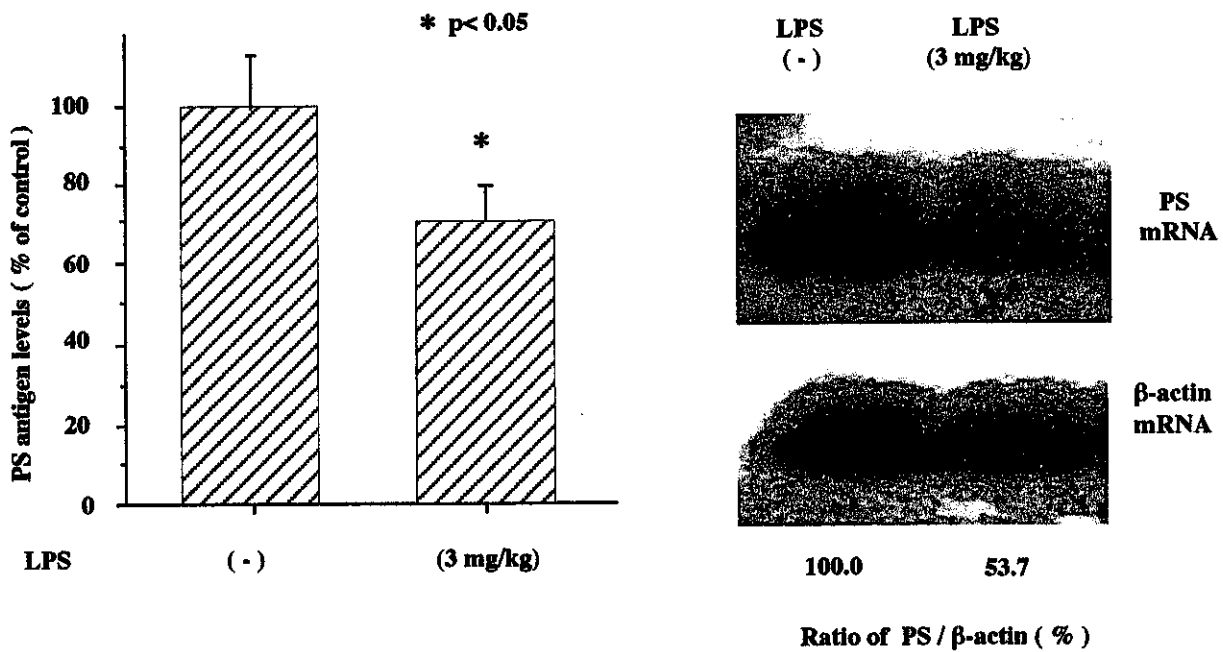


Fig. 4. Protein S expression in cultured SECs isolated from LPS-injected rats.

19990359

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

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Mizuguchi H, Hayakawa T, Kay MA. Efficient preparation method for a recombinant adenovirus vector based on simple plasmid construction. *Progress in Drug Delivery System*. 1999;VIII:53-63.

Nakanishi M, Mizuguchi H, Ashihara K, Senda T, Eguchi A, Watabe A, Nakanishi T, Kondo M, Nakagawa T, Masago A, Okabe J, Ueda S, Mayumi T, Hayakawa T. Gene delivery systems using the Sendai virus. *Mol Membr Biol*. 1999 Jan-Mar;16(1):123-7.

Mizuguchi H, Nakanishi T, Kondoh M, Nakagawa T, Nakanishi M, Matsuyama T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T. Fusion of sendai virus with liposome depends on only F protein, but not HN protein. *Virus Res*. 1999 Feb;59(2):191-201.

Watabe 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. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jan 12;1416(1-2):339-48.

Hayashi T, Nakamura H, Okada A, Takebayashi S, Wakita T, Yuasa H, Okumura K, Suzuki K. Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene. *Gene*. 1999 Oct 1;238(2):367-73.

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 免疫反応の抑制を旨とした改良型ベクターの開発を中心に. 蛋白質・核酸・酵素(0039-9450)44 巻9号 Page1405-1414(1999.07)

中西真人, 真砂明典, 江口暁子. リポソーム～センダイウイルス(HJV)の増殖サイクル. 日本遺伝子治療学会編. 遺伝子治療開発研究ハンドブック. 東京、エヌ・ティ・エス、(1999.5) ISBN:4-900830-38-0 Page423-428.