

研究方法：

1) in vitro での評価・試験系：

新たに樹立したアカゲザル腎臓由来の培養細胞株 (MA104) を用い、リポソームベクターや遺伝子銃での遺伝子導入効率、染色体への挿入、および細胞障害性など分子細胞生物学的に精査し、in vitro での安全性、有効性の評価・試験法を検討した。

2) サルモデルの特定・選択：

各種サル類の医生物学的特質、飼育管理条件やバイオハザードなど実験実施条件および霊長類の保護と利用などを考慮しつつ、新世界ザル、旧世界ザルおよび類人猿から代表的なサルモデルを選定すると共に実験・研究条件を整えた。

3) サルモデルでの遺伝子導入条件：

遺伝子導入方法・条件として、非ウイルス性のカチオニックリポソーム、遺伝子銃あるいはアテロコラーゲンペレットを用い、トレーサーの GFP や LacZ 遺伝子の導入効率、発現性、安全性 (細胞・組織障害、炎症反応) などについて、培養細胞、マウスあるいはサルモデル (ニホンザル、カニクイザル) で比較解析し、遺伝子導入条件・ベクターの有効性、安全性を検討した。

4) サルモデルでの胎盤通過 (胎児移行) 性：

遺伝子治療薬剤の胎盤通過性を明らかにする目的で、妊娠終期の新世界ザル (コモンマーモセット、n=3) を用いた。母ザルの背部皮内に pCI-EGFP/リポソームベクターを投与し、18-20 時間後に胎児血液、組織・臓器の GFP-DNA を PCR 検出すると共に、GFP タ

ンパク質の発現についても組織化学的に解析した。

5) サルモデルでの遺伝子ワクチン (遺伝子免疫治療)：

感染疾患、ガン、免疫異常・アレルギーなどの免疫療法への臨床応用を目指して、Bウイルス (BV)、サイトメガロウイルス (CMV) の感染に必須な主要抗原遺伝子 (BVgD, CMVgB) の発現 plasmid (pCI-BVgD など) を構築した。次いで、pCI-BVgD/リポソームベクターをサル (主にニホンザル) 背部皮内に遺伝子導入し、gD タンパク質発現、液性免疫、細胞性免疫、ウイルス増殖阻害活性、感染防御能などを明らかにしながら、これら DNA ワクチンの有効性や臨床応用について検討した。

研究成果および考察：

1) in vitro での評価・試験系の検討：

pCI-EGFP、pCI-BvgD の MA104 細胞への遺伝子発現効率は、カチオニックリポソームで 20-50% に達した。導入遺伝子の転写産物生成を RT-PCR で調べると、gD mRNA 生成量は 24 時間以内でピークに達し、その後減少した。この時、細胞内での gD タンパク質の生成のタイムコースを免疫組織染色で検討すると、gD mRNA のそれとほぼ一致していた。この時、gD 発現細胞では導入 8 時間で細胞の変形や脱落など異常形態も認められ、24~48 時間で細胞増殖阻害も観察された。これらの結果から、in vitro での遺伝子導入条件・ベクターの安全性、有効性の評価系として、サル培養細胞を用いた遺伝子導入効率、細胞毒性、導入遺伝子産

物の細胞内生成と動態の分子細胞学的解析が有用であることが示された。

2) サルモデルの特定、研究体制の整備：

類人猿、旧世界ザル、新世界の代表種について、ゲノム情報、免疫応答など生体防御系、生体反応系解毒-代謝系、感染感受性、内分泌系、繁殖性、ライフスパンなどの医生物学的特質、実験・飼育条件など実験動物学的適性、保護と利用の関連、ならびに動物福祉や侵襲、非侵襲性実験の可否などを総合的に検討し、本研究のサルモデルとしてチンパンジー（類人猿）、ニホンザル・カニクザル（旧世界ザル）、コモンマーモセット（新世界ザル）を特定した。同時に、それらサルモデルでの実験・研究用の特別施設の整備、独自のサル飼育・管理体制の確立、サルでの遺伝子導入実験に関するガイドライン作り等、サルモデルでの実験・研究を推進するための条件・環境を整えた。

3) サルモデルでの遺伝子導入条件の検討：

遺伝子導入条件・ベクターの比較検討のために、ハイブリッドカチオニックリポソーム（VSVG/リポソーム/ポリブレン混合ミセル；リポソームと略）、アテロコラーゲンを基材にしたミニペレットおよび遺伝子銃を用い、レポーター遺伝子（GFP; pCI-EGFP plasmid）をマカクサルに投与した。3者の内、リポソームが調製の簡便性に加え GFP 遺伝子の効果的な導入を示した。リポソームベクター投与部位での GFP タンパク質の発現は、免疫染色で調べると 2 週間後まで続いた。この時、樹状細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、および繊維

芽細胞で GFP タンパク質が認められ、特に、表皮下の基底膜に沿った細胞に強い発現性が見られた。興味深いのは、投与部位から離れた部位の細胞にも弱いながら GFP タンパク質の発現が観察され、リポソームベクターではリンパ液や血液を介して、導入遺伝子が遠位輸送されることが示唆された。一方、リポソームベクター投与部位の組織損傷やそこへの白血球浸潤は見られなかった。また、炎症サイトカインの TNF および CRP の血中上昇、血小板や白血球の変動および組織因子発現なども認められず、炎症反応や細胞・組織障害の無いことが確認された。

4) サルモデルでの胎児移行性の検討：

胎盤通過性を明らかにするために、小型サルのコモンマーモセットをペア飼育で妊娠させ、リポソームベクターで GFP 遺伝子を妊娠終期の母ザル背部皮内に投与し、20 時間後に胎児の血液、組織中の GFP DNA を PCR 分析すると共に、主要組織での GFP タンパク質発現を解析した。3 例の実験とも GFP DNA が胎児血および組織で検出され、特に肺の血管内皮細胞に GFP タンパク質の強発現を認めた。この結果から、安全性が高いと思われたリポソームベクターでも投与遺伝子が母体胎盤を通過して胎児移行する事が明らかになった。ヒトを含む霊長類と他のほ乳動物の胎盤構造は異なるため、ラット・マウスでの実験ではこうした胎盤通過→胎児発現は見落とされてしまい、サルモデルでの実験の重要性が確認された。一方、この知見は、胎児レベルでの遺伝子導入・遺伝子治療の可能性を示す点で興味深く、アレルギー要因となる特定抗原に対

する免疫寛容の誘導など、遺伝子治療・DNA ワクチンにおける新しい臨床適用の可能性が示唆される。

5) サルモデルでの遺伝子ワクチン（遺伝子免疫治療）の検討：

ウイルスに対する感染防御を目的とした遺伝子免疫療法の開発の一環として、最高危険度（レベル-4）の B ウイルスの主要抗原・glycoprotein D (gD) を組込んだ PCI-BVgD plasmid を構築し、リポソームベクターでニホンザル（6 頭）背部皮内に 50 μ g/kg の PCI-BVgD plasmid を一定間隔で投与した。遺伝子ワクチン投与群に、液性免疫（抗 gD 抗体産生）、細胞性免疫、B ウイルス増殖阻害活性の顕著な誘導が認められた。一方、vehicle plasmid のみを投与したコントロール群（3 頭）では、こうした免疫・感染防御の誘導は見られなかった。したがって、今回用いた B ウイルス遺伝子ワクチンの有効性がサルモデルで実証され、関連ヘルペスウイルスに対する実用的な遺伝子免疫療法であることが実証された。

評価：

1) 達成度：

上述の研究課題（1-5）に関しては今期3年間の研究期間内ではほぼ達成できた。サル細胞株を利用した *in vitro* での実験系からサルモデルでの遺伝子導入条件・ベクターの試験・評価系、妊娠ザルでの母体→胎児移行性の実証、さらには B ウイルスの遺伝子免疫療法の有効性評価など、サルモデルでの一貫研究を遂行した。ただ、当初計画ではウイルスベクターでの研究も予定していたが、バイオハザード上の理由および研究環境の未

成熟から、今期はウイルス性ベクターでの実験・研究の実施を見合わせた。また、チンパンジーでの研究計画も、所内のチンパンジー利用ガイドライン策定の遅れなどのため、*in vivo* での実験実施が滞った。これらに関しては、次期3年間の中で研究環境を整え、研究計画の実施を図る。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義：

遺伝子治療においては、対象となる遺伝子の効率的かつ安全な delivery system が極めて重要である。しかしながら、国内のベクター・遺伝子導入方法の開発は海外に比べ遅れている。こうした状況の要因として、ベクター・遺伝子導入方法の有効性、安全性を評価・検討するための実験・試験系と、それを実施できる施設などインフラ構造の不備があげられる。ことに、遺伝子治療・遺伝子ワクチンについては、ヒトとゲノム背景が類似するサル類での実験・試験が不可欠で、サルモデルでの関連研究とその体制の強化が望まれていた。

本研究はそうした課題に応えるために、上述の様にサルでの研究計画を遂行し、サル類に関する中核的研究施設としての特質を活かし、サルモデル系での遺伝子治療関連研究を発展するための研究条件・環境を整えた。さらに、学術的には、非ウイルスベクター・導入条件の詳細な比較試験、母体に導入した遺伝子の胎盤通過性と胎児移行・発現性の発見、および最高危険度レベル-4 の B ウイルスに対する遺伝子ワクチンの開発など、海外でも注目される成果を得た。

3) 今後の展望：

今期3年間では、非ウイルス性ベクタ

一・遺伝子導入条件の、安全性と有効性を評価・検討するためのサルモデル実験系を確立し、より安全で効率的な遺伝子治療薬剤開発のための研究を進めた。ことに、導入遺伝子の胎盤通過性と胎児移行・発現性についてはサルモデルでないと得られない予想外の知見で、母体を介した胎児への遺伝子導入は今後種々な遺伝子治療に臨床応用されよう。今後の展開として、我々はアレルギー・アトピーなどの遺伝子免疫療法として、胎児での特異抗原に対する免疫寛容を誘導する研究を計画し、さらにその臨床的応用も視野に入れている。

また、先進諸国ではウイルス等の自然感染頻度が著減し、それらに対する抗体保有率が低下している。こうした状況下で、ウイルス感染防御を目的とした遺伝子免疫療法の開発は不可欠で、本研究では B ウイルスに対する遺伝子ワクチンを樹立した。この遺伝子免疫療法は B ウイルスに対する免疫・感染防御誘導を示す点で、臨床利用の可能性が高く、研究の継続と更なる進展が期待されている。今後は関連ウイルス (CMV、HSV など) での実験も加味し、ヒトへの適用を目指し、より詳細な実験と実用的見地から研究を進める。

なお、上記の研究・実験を通じて、遺伝子治療に関する非臨床、前臨床研究を推進するための体制やシステムなどインフラ構造の整備を進めてきた。今後は、ウイルスベクターやチンパンジーでの研究計画を実施するための、研究環境やガイドラインなども整え、より高度で幅のあるサルモデル系での遺伝子治療研究の拠点作りを図る。

結論：

本研究ではベクター・遺伝子導入法の安全性と有効性を評価・試験するためのサルモデルでの実験系の確立を図った。この研究目的に沿って、*in vitro* レベルならびにラット・マウスでの基礎実験結果を基に、種々サル類について、それらの医生物学的特質や飼育・実験条件、利用限界などを検討し、遺伝子治療実験・研究用のサルモデルを選定・特定した。さらに、サルモデルでの非ウイルス性ベクター・遺伝子導入法の安全性、有効性の新たな評価・試験系を確立した。また、リポソームベクターでの導入遺伝子の胎盤通過性 (母体→胎児移行・発現) を新たに見出し、その遺伝子治療面での応用を考察した。加えて、ウイルス感染防御を目指した遺伝子免疫療法 (DNA ワクチン) を開発し、その臨床応用を目指した。

研究発表：

1. 中村 伸, 平野 真, 光永総子, 清水慶子: 霊長類モデルでの遺伝子治療研究—特に遺伝子ワクチン研究を中心に, ファルマシア, 36: 127-130 (2000) .
2. 平野 真, 光永総子, 清水慶子, 中村伸: 霊長類などへの遺伝子導入— B ウイルス DNA ワクチンの開発、遺伝子治療入門 (齊藤英彦、吉田 純編) 124-135 (2000)
3. S.Nakamura, F.Mitsunaga, K. Shimizu et al: Assessment of Gene Transfer Using A Non-Viral Liposome Vector in Monkey Model, Nature Biotechnonogy, 17: 39 (1999).
4. F. Mitsunaga, S.Nakamura, K.

- Shimizu, et al : Studies on a Gene Transfer Vector in Non-Human Primates, *Primate Res.*, 15:365 (1999).
5. M. Hirano, S. Nakamura, M. Okada, et al : Rapid Discrimination of Monkey B Virus from Human Herpes Simplex Viruses by PCR in the Presence of Betaine, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1255-1257 (2000).
 6. S. Nakamura, F. Mitsunaga, M. Hirano, T. Imamura, K. Shimizu, A. Abe, N. Emi: Evaluation of Safety and Efficiency of Gene Transfer Using a Non-Viral Liposome Vector in a Monkey Model, *AJPS-Drug Design and Development*, 108-109 (2000).
 7. F. MITSUNAGA, M. HIRANO, K. SHIMIZU, S. NAKAMURA: Biomedical characteristics of primate placenta: Transfer of gene-therapeutic materials to fetuses, *Primate Res.* (in press).
 8. K. Abe, T. Inami, S. Nakamura, S. Goto : TT Virus Infection in Non-human Primates and Characterization of Virus Genome : Identification of Simian TT Virus Isolates, *J. Virol.*, 74: 1549-1533 (2000).
 9. T. Ueno, M. Toi, M. Koike, S. Nakamura, T. Tominaga: Tissue Factor Expression in Breast Cancer Tissues: Its Correlation with Prognosis and Plasma Concentration, *Br. J. Cancer* , 83: 164-170 (2000).
 10. S. Nakamura : Increase of allergy patients and change in hygienic conditions: A hypothesis through studies on monkey pollinosis, *Mycotoxins*, 50: 101-104 (2000).
 11. F. Mitsunaga, M. Hirano, K. Shimizu, S. Nakamura: Biomedical characteristics of primate placenta : Transfer of gene-therapeutic materials to fetuses, *Primate Res.*, (in press).
 12. F. Mitsunaga, S. Nakamura, M. Hirano, et al : Transfer Efficiency of GFP-Gene Using VSV-G Liposome Vector in Monkey Model, *Gene Therapy* (submitted).

研究報告書追補
(主要な関連発表論文)

20000377

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」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧」

Successful culture and sustainability in vivo of gene-modified human oral mucosal epithelium.

Mizuno H, Emi N, Abe A, Takahashi I, Kojima T, Saito H, Sumi Y, Hata KI, Ueda M.

Hum Gene Ther. 1999 Mar 20;10(5):825-30.

Aberrant expression of HLA-G antigen in interferon γ -stimulated acute myelogenous leukaemia.

Mizuno S, Emi N, Kasai M, Ishitani A, Saito H.

Br J Haematol. 2000 Oct;111(1):280-2.

No significant association between HA-1 incompatibility and incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients.

Murata M, Emi N, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Goto S, Wakita A, Tanimoto M, Saito H, Kodera Y, Morishita Y; Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group.

Int J Hematol. 2000 Oct;72(3):371-5.

An ex vivo model for gene therapy of hemophilia B using cultured human oral mucosal epithelium.

Mizuno H, Emi N, Abe A, Takahashi I, Kojima T, Saito H, Matsuno M, Sumi Y, Hata K, Ueda M

Materials Science and Engineering 2000; C13:45-48.

Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12).

Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, Tanimoto M, Saito H.

Blood. 2001 Feb 15;97(4):1050-5.

Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness.

Sugawara S, Nemoto E, Tada H, Miyake K, Imamura T, Takada H.

J Immunol. 2000 Jul 1;165(1):411-8.

Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*.

Imamura T, Potempa J, Travis J.

Microb Pathog. 2000 Sep;29(3):155-63.

Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*.

Imamura T, Tanase S, Hamamoto T, Potempa J, Travis J.

Biochem J. 2001 Jan 15;353(Pt 2):325-31.

【ウイルスの母子感染】 CMV の母子感染

田中直子, 木村宏

小児科 41 巻 9 号 Page1556-1562

Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay.

Tanaka N, Kimura H, Iida K, Saito Y, Tsuge I, Yoshimi A, Matsuyama T, Morishima T.

J Med Virol. 2000 Apr;60(4):455-62.

Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation.

Tanaka N, Kimura H, Hoshino Y, Kato K, Yoshikawa T, Asano Y, Horibe K, Kojima S, Morishima T.

Bone Marrow Transplant. 2000 Dec;26(11):1193-7.

霊長類モデルでの遺伝子治療研究 特に遺伝子ワクチン研究を中心に

中村伸, 平野真, 光永総子, 清水慶子

ファルマシア 36 巻 2 号 Page127-131

遺伝子導入－霊長類などへの利用

平野真, 光永総子, 清水慶子, 中村伸

遺伝子医療 Page124-35

Tissue factor and cancer procoagulant expressed by glioma cells participate in their thrombin-mediated proliferation.

Ogiichi T, Hirashima Y, Nakamura S, Endo S, Kurimoto M, Takaku A.

J Neurooncol. 2000;46(1):1-9.

Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration.

Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T.

Br J Cancer. 2000 Jul;83(2):164-70.

The effect of heparin on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in patients with acute myocardial infarction.

Yamamoto N, Ogawa H, Oshima S, Soejima H, Fujii H, Misumi K, Takazoe K, Mizuno Y, Noda K, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S, Yasue H.

Int J Cardiol. 2000 Sep 15;75(2-3):267-74.

Rapid discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betaine.

Hirano M, Nakamura S, Okada M, Ueda M, Mukai R.

J Clin Microbiol. 2000 Mar;38(3):1255-7.

TT virus infection in nonhuman primates and characterization of the viral genome: identification of simian TT virus isolates.

Abe K, Inami T, Ishikawa K, Nakamura S, Goto S.

J Virol. 2000 Feb;74(3):1549-53.

