

200/0429

厚生労働省科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

平成 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 金田 安史

平成 14 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 新規遺伝子導入法を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究 ----- 1
金田安史

II. 分担研究報告

1. 新規遺伝子導入法を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究 ----- 6
—遺伝子治療臨床研究—
荻原俊男
2. 新規遺伝子導入法を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究 ----- 9
—遺伝子治療法の開発と臨床応用—
森下竜一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 17

新規遺伝子導入技術を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究

主任研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

HGF 遺伝子を用いた初めての閉塞性動脈硬化症、パージャーカー病の遺伝子治療臨床研究を6例の患者に施行した。投与3ヶ月の時点で有効性、安全性が評価されつつある。一方新たな非ウイルスベクターとして不活性化HVJにDNAや合成核酸を封入する技術を開発し、HVJエンベロープベクターの開発に成功した。HVJエンベロープベクターは安全で高効率の遺伝子導入やドラッグデリバリーシステムとして働く可能性が高く、脳梗塞などの遺伝子治療にも効果的であった。

分担研究者

荻原俊男・大阪大学医学系研究科 教授

森下竜一・大阪大学医学系研究科 助教授

A. 研究目的

ヒト遺伝子治療臨床研究を推進するとともに、次世代の遺伝子治療のために安全で高効率の遺伝子導入ベクターの開発を行い、その遺伝子治療の可能性を様々なモデル動物で検討すると共に、臨床応用を行うためのベクター生産、安全性の検討を行う。

B. 研究方法

臨床研究として、Naked HGF 遺伝子導入によるASO及びパージャーカー病のヒト遺伝子治療臨床研究をプロトコールに則り施行し、特に安全性について詳細に経過観察を行った。また有効性についても臨床症状の他に血流量や血管造影により評価した。導入法についてはリポソームを用いずに不活性化HVJにDNAや合成核酸を封入する技術を開発し、HVJエンベロープベクターの開発に成功した。このベクターを血管内注入、直接注入などの方法により様々な臓器に導入し、その発現部位、発現量、発現期間を評価する。次に様々な病

態モデルに、それぞれの治療用遺伝子（脳梗塞に対してHGF、肺高血圧症にProstacyclin synthaseなど）を導入し、その治療効果を評価する。また表面電荷を様々に変えることにより導入に適する臓器が変わる可能性があるため、様々な濃度の硫酸プロタミンなどのポリカチオンと混合することにより導入に至適な臓器を決定し、組織内高効率導入の可能性を検討した。長期遺伝子発現のために最近トランスポゾンとトランスポゼースの共導入により骨格筋で安定な遺伝子発現の維持を試みた。（倫理面への配慮）

臨床研究に臨まれる患者の方への対応については遺伝子治療申請書に記載したように十分なインフォームドコンセントをとって行った。動物実験については大阪大学医学系研究科で定める動物実験のガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

遺伝子治療臨床研究については肝細胞増殖因子(HGF)のNaked plasmid DNAによる閉塞

性動脈硬化症 (ASO) (3例) 及びバージャー病 (3例) の遺伝子治療臨床研究を平成 13 年 6 月より 6 例の対象患者に対して行い、平成 13 年 12 月末の評価委員会において、約 3 カ月の時点での安全性と有効性が認められた。すなわち自覚症状 (疼痛) の軽減 (5 例 / 6 例)、下肢血圧の上昇 (6 / 6)、壊死性潰瘍の改善 (6 / 6)、血管造影上の陽性所見 (6 / 6)、一方、VEGF 遺伝子治療で報告されたような浮腫は全くおこらなかった。また HGF 遺伝子導入による心筋梗塞の遺伝子治療臨床研究は大阪大学の倫理委員会において検討中であり、NFkB decoy オリゴによる血管再狭窄の臨床研究は倫理委員会で施行が認められた。

HVJ (Sendai virus) のゲノム RNA を完全に不活性化した後除去して、空のエンベローブ粒子の内部に低分子化合物や生体高分子 (遺伝子や核酸) などを封入して培養細胞や生体臓器への画期的な分子送達系として活用する HVJ エンベローブベクターを開発した。HVJ エンベローブベクターは HVJ-liposome より約 50 倍強い融合能を保持し、また作成も 10 分 (HVJ-liposome では約 5 時間) で終了する。これにより、脳、肺、肝、筋肉、網膜、関節腔、子宮、皮膚、腫瘍塊などの生体組織に遺伝子導入できる至適条件を確立した。また連続投与も可能であり、毒性も低く、革新的な遺伝子治療ベクターとなる事が明らかになった。さらに合成核酸の生体組織への導入も極めて高効率であり、DDS としても機能することが判明した。このベクターによりラット脳内に HGF 遺伝子を導入した。大槽内投与すると小脳の顆粒層、大脳皮質内、脈絡叢への遺伝子導入がみられ、HGF が脊髄液内に約 2 週間以上分泌された。ラットの脳梗塞モデルを

作成し、HVJ エンベローブベクターで HGF 遺伝子導入すると、明らかに有意な梗塞巣の縮小が認められた。このベクターの精製法を我々が確立し、技術移管により研究用試薬として石原産業より 2002 年春より販売されることになった (商品名: Genomone)。臨床用ベクター生産については我々が立ちあげたベンチャーカンパニーであるアンジェスエムジーによって準備が進められている。導入遺伝子の長期遺伝子発現系として最近魚類のトランスポゾンとトランスポゼースの組み合わせの生体組織での効果を検討した。HVJ エンベローブベクターでは 2 つのプラスミド (トランスポゾンをもつプラスミドとトランスポゼース発現プラスミド) を同時封入して 1 つの細胞に導入できるので、骨格筋で 6 ヶ月以上の長期遺伝子発現維持に成功した。

D. 考察

HGF 遺伝子治療臨床研究において末梢血中の HGF 濃度は全く有意には上昇しなかった。これは HGF で懸念される他臓器に及ぼす影響を最小限に抑制できることとして評価できる所見ではあるが、実際に導入した遺伝子の機能の有無については状況証拠からの推察であり、今後二重盲検テストが必要であろう。HVJ エンベローブベクターはシンプルであり生産が容易である。動物実験においては安全性と有効性が確かめられており、以上のことから臨床応用に極めて近いベクター系となろう。

E. 結論

難治性循環器疾患のうち閉塞性動脈硬化症及びバージャー病に対する Naked HGF plasmid DNA の注入による遺伝子治療臨床研究が 6 例の患者に行われ、終了 3 ヶ月の時点

での安全性と有効性がまずは評価された。さらに難治性疾患の遺伝子治療に有効であると推察される非ウイルスベクターの開発に成功した。

F. 健康危険情報

遺伝子治療臨床研究及びベクター開発のいずれにおいても健康に対する危険情報は特に得られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Funakawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and Kaneda, Y.: Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, 12, 469-487, 2001.

Nakamura, N., Hart, D.A., Frank, C.B., Marchuk, L. L., Shrive, N. G., Ota, N., Taira, T., Yoshikawa, H., and Kaneda, Y.: Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated With effective antisense gene inhibition. *J. Biochem.* 129, 755-759, 2001.

Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Kaneda, Y., Higaki, J., Ogihara, T. and Horiuchi, M.: Inhibition of TNF-alpha induced cytokine and adhesion molecule. *Exp. Nephrol.* 9, 181-190, 2001.

Otomo, T., Yamamoto, S., Morishita, R. and Kaneda, Y.: EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo : applications to gene therapy for cancer.

J. Gene Med. 3, 345-352, 2001.

Yamamoto, K., Morishita, R., Hayashi, S.,

Matsushita, H., Nakagami, H., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Contribution of bcl-2, but not bcl-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348, 2001.

Kuroiwa, T., Kakishita, E., Hamano, T., Kataoka, Y., Seto, Y., Iwata, N., Kaneda, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ueki, T., Fujimoto, J., and Iwasaki, T.: Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J. Clin. Invest.* 107, 11, 1365-1373, 2001.

Izumi, Y., Kim, S., Namba, M., Yasumoto, H., Miyazaki, H., Hoshiga, M., Kaneda, Y., Morishita, R., Zhan, Y. and Iwao, H.: Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2 terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. *Circulation Research* 88, 1120-1126, 2001.

Hayashi, K., Morishita, R., Nakagami, H., Yoshimura, S., Hara, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Sakai, N.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor; in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173, 2001.

Ahn, J.D., Morishita, R., Kaneda, Y., Lee, K.U., Park, J.Y., Jeon, Y.J., Song, H.S. and Lee, I.K.: Transcription factor decoy for activator protein-1 (AP-1) inhibits high glucose-and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in cultured human

- vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 44, 713-720, 2001.
- Aoki, M., Morishita, R., Hayashi, S., Jo, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda Y., and Ogihara, T.: Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44, 1034-1042, 2001.
- Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda Y., and Ogihara, T.: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation*, 104, 2344-2350, 2001.
- Yokoseki, O., Suzuki, J., Kitabayashi, H., Watanabe, N., Wada, Y., Aoki, M., Morishita, R., Kaneda Y., Ogihara, T., Funamatsu, H., Kobayashi, Y., and Isobe, M.: cis Element decoy against nuclear factor- κ B attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation Research* 89, 899-906, 2001.
- Yoshimura, S., Morishita, R., Hayashi, K., Yamamoto, K., Nakagami, H., Kaneda Y., Sakai, N., and Ogihara, T.: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element decoy of nuclear factor- κ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Therapy* 8, 1635-1642, 2001.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda Y., and Morishita, R.: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105, 1233-1239, 2002.
- Yasumoto, H., Kim, S., Zhan, Y., Miyazaki, H., Hoshiga, M., Kaneda Y., Morishita, R., and Iwao, H.: Dominant negative c-Jun gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rats. *Gene Therapy* 8, 1682-1689, 2001.
- Namiki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Hirase, T., Ishida, T., Inoue, N., Hirata, K., Matsukawa, A., Morishita, R., Kaneda Y., and Yokoyama, M.: Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion; Synergism with hypercholesterolemia. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 115-120, 2002.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda Y., and Morishita, R.: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* 9, 372-380, 2002.
- Kaneda Y.: Improvements in gene therapy technologies. *Molecular Urology* 585-89, 2001.
- Kaneda Y.: Gene therapy; a battle against biological barriers. *Current Molecular Medicine* 1, 493-499, 2001.
- Nakamura, H., Morishita, R., and Kaneda Y.: Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys. *In vivo* 16, 45-48, 2002.
- Morishita, R., Aoki, M., and Kaneda Y.: Decoy oligonucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 947, 294-302, 2001.

Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., and Ogihara, T. : Gene therapy in vascular medicine; recent advances and future perspectives. Pharmacology and Therapeutics (ed. Endoh, M.) Elsevier Science Inc. (Amsterdam) 106-114, 2001.

Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R.: Evolution of Viral Liposomes: Improvements and Applications. Drug Targeting Technology (ed. Schreier, H.) Marcel Dekker, Inc. (New York, Basel) 249-260, 2001.

2. 学会発表

1. Yasufumi Kaneda: "The device for the enhancement of transgene expression and its use for cancer gene therapy" 第4回アメリカ遺伝子治療学会ワークショップ 2001年6月1日 シアトル

2. 金田安史: "新規非ウイルスベクターの開発" 第24回日本分子生物学会年会 2001年12月12日 横浜

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

"遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター" 金田安史 (発明者) 金田安史 (出願人) 番号 90102208 2001年4月19日 出願中

3. その他

上記特許の国内申請は2000年2月1日である。

新規遺伝子導入技術を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究

—遺伝子治療臨床研究—

分担研究者 萩原俊男 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

HGF 遺伝子を用いた初めての閉塞性動脈硬化症、パージャーマットの遺伝子治療臨床研究を6例の患者に施行した。投与3ヶ月の時点で自覚症状の改善、血管造影上の所見や下肢の血圧等の改善が見られたが、導入遺伝子に寄るとされる副作用は認められていない。有効性、安全性が評価されつつある。

A. 研究目的

末梢の動脈硬化性病変や心筋梗塞さらには心筋症、血管再狭窄の遺伝子治療の動物実験でのデータもとにヒト遺伝子治療臨床研究プロトコールを作成し、それらの臨床研究を施行することにより、遺伝子治療を医療として根付かせる為の土台づくりを行う。

B. 研究方法

Naked HGF 遺伝子導入による閉塞性動脈硬化症及びパージャーマットのヒト遺伝子治療臨床研究プロトコールが2001年5月に厚生労働大臣からの許可があり、このプロトコールに則り6例の患者 (Fontaine III/IV) に遺伝子導入を行った。遺伝子は pVAX-human HGF で遺伝子治療学教室で作成され、キアゲン社で臨床グレードの生産が行われたもので、大阪大学医学部附属病院の遺伝子管理室 (仮) において冷凍された。まず400 µg を骨格筋にうち副作用の検査を行い、2週後にエコーガイド下で、閉塞部位の4カ所の筋肉に500 µg ずつ注入した。この4週後に同様の遺伝子導入を行った。

一般検査に加えて、血管造影、下肢血圧、疼痛評価、潰瘍所見等により評価を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究に臨まれる患者の方への対応については遺伝子治療申請書に記載したように十分なインフォームドコンセントをとって行った。特に HGF 遺伝子導入による Risk-Benefit について十分な説明を行った。

C. 研究結果

遺伝子治療臨床研究については肝細胞増殖因子 (HGF) の Naked plasmid DNA による閉塞性動脈硬化症 (ASO) (3例) 及びパージャーマット (3例) の遺伝子治療臨床研究を平成13年6月より6例の対象患者に対して行い、平成13年12月末の評価委員会において、約3カ月の時点での安全性と有効性が認められた。すなわち自覚症状 (疼痛) の軽減 (5例/6例)、下肢血圧の上昇 (6/6)、壊死性潰瘍の改善 (6/6)、血管造影上の陽性所見 (6/6)、一方、VEGF 遺伝子治療で報告されたような浮腫は全くおこらなかった。ちなみに末梢血中の HGF 濃度は

全く有意には上昇しなかった。

D. 考察

HGF 遺伝子の閉塞性動脈硬化症、パージャーマ病に対する有効性は二重盲験試験がないために断言はできないとはいえ、現時点では VEGF 遺伝子治療臨床研究と比較して有望な所見が多く認められる。今後はより軽症の 16 例に施行し、さらに多施設での治験を行う予定であるが、HGF が遺伝子医薬品となりうる可能性は高いと判断している。

E. 結論

閉塞性動脈硬化症及びパージャーマ病に対する Naked HGF plasmid DNA の注入による遺伝子治療臨床研究が 6 例の患者に行われ、終了 3 ヶ月の時点での安全性と有効性がまずは評価された。

F. 健康危険情報

学内評価委員会での見解として、今回の遺伝子治療臨床研究においては、遺伝子治療と関連づけられる副作用は終了 3 ヶ月までの時点では認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Kaneda, Y., Higaki, J., Ogihara, T. and Horiuchi, M.: Inhibition of TNF-alpha induced cytokine and adhesion molecule. *Exp. Nephrol.* 9, 181-190, 2001.

Yamamoto, K., Morishita, R., Hayashi, S., Matsushita, H., Nakagami, H., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and

Ogihara, T.: Contribution of bcl-2, but not bcl-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348, 2001.

Hayashi, K., Morishita, R., Nakagami, H., Yoshimura, S., Hara, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Sakai, N.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor; in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173, 2001.

Aoki, M., Morishita, R., Hayashi, S., Jo, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44, 1034-1042, 2001.

Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation*, 104, 2344-2350, 2001.

Yokoseki, O., Suzuki, J., Kitabayashi, H., Watanabe, N., Wada, Y., Aoki, M., Morishita, R., Kaneda, Y., Ogihara, T., Funamatsu, H., Kobayashi, Y., and Isobe, M.: cis Element decoy against nuclear factor-kB attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*

Research 89, 899-906, 2001.

Yoshimura, S., Morishita, R., Hayashi, K., Yamamoto, K., Nakagami, H., Kaneda, Y., Sakai, N., and Ogihara, T.: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element decoy of nuclear factor- κ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Therapy* 8, 1635-1642, 2001.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105, 1233-1239, 2002.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* 9, 372-380, 2002.

Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., and Ogihara, T. : Gene therapy in vascular medicine; recent

advances and future perspectives. *Pharmacology and Therapeutics* (ed. Endoh, M.) Elsevier Science Inc. (Amsterdam) 106-114, 2001.

2. 学会発表

1. Toshio Ogihara: "Gene analysis of hypertension and tailor-made therapy" The 5th International conference on preventive cardiology 2001年5月30日 大阪

2. Toshio Ogihara: "Genetic risks of essential hypertension" The 5th International conference on preventive cardiology 2001年5月31日 大阪

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

動脈硬化特異的遺伝子とその利用 (出願番号: 特願 2002-44564、出願日: 平成 14 年 2 月 21 日)

新規遺伝子導入技術を用いた難治性循環器疾患遺伝子治療の臨床研究

—遺伝子治療法の開発と臨床応用—

分担研究者 森下竜一 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

HGF 遺伝子は閉塞性動脈硬化症、パージャーマットの遺伝子治療に有効であるばかりでなく、動物モデルを用いた治療実験においては、虚血性心疾患、脳梗塞、心筋症にも有効であることが明らかになった。また NFκB デコイ核酸は血管再狭窄、動脈瘤の治療に効果的であることがわかった。これらのデータを基にヒト遺伝子治療臨床研究の準備が進められている。また超音波・造影剤の併用による Naked plasmid DNA の遺伝子導入の増強法が開発された。

A. 研究目的

難治性循環器疾患遺伝子治療の可能性を様々なモデル動物で検討すると共に、臨床応用を行うための準備、ヒト遺伝子治療臨床研究プロトコルの作成を行う。

B. 研究方法

HGF 遺伝子や NFκB おとり型核酸の導入による循環器疾患の治療法を様々な動物モデル（閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、心筋症、血管再狭窄、脳梗塞、肺高血圧）を用いて開発した。導入法としては非ウイルスベクターである HVJ エンベロープベクター、HVJ-liposome 法、Naked plasmid DNA の直接導入を用いた。さらに Naked plasmid DNA の導入効率増強のため造影剤であるオプチゾンと Naked DNA をラット骨格筋内に注入後、超音波処理を試みた。

（倫理面への配慮）

動物実験については大阪大学医学系研究科で定める動物実験のガイドラインにそって実験を行い、極力苦痛の除去、軽減をはかった。

C. 研究結果

HGF 遺伝子導入による心筋梗塞の遺伝子治療臨床研究は大阪大学の倫理委員会において検討中であり、NFκB decoy オリゴによる血管再狭窄の臨床研究は倫理委員会で施行が認められた。

HGF はこのほかに動脈瘤の抑制、心筋症の治療、脳梗塞の抑制にも有効であることがわかった。また PGIS（プロスタサイクリン合成酵素）遺伝子を大脳動脈を結紮して虚血にした閉塞性動脈硬化症モデルラットの筋肉内に注入すると、血管数が有意に増加し、HGF 遺伝子と併用すると相乗効果が認められた。また NFκB と Ets 結合部位の両者に対するおとり型核酸をエラストラーゼ処理による動脈瘤モデルラットの動脈外壁に投与すると有意に動脈瘤の形成が抑制された。HGF 遺伝子を HVJ-liposome により心筋症ハムスターの心筋内に直接注入することにより、細胞外マトリックスの蓄積による心筋症の進行を阻止することがわかった。HVJ エンベロープベクターによりラット脳内に HGF 遺伝子を導入した。大脳内投与すると小脳の顆粒層、大脳皮質内、脈絡叢への遺伝子導入がみられ、HGF が脊髄液内に約 2 週間以上分泌された。ラッ

トの脳梗塞モデルを作成し、HVJ エンベロープベクターで HGF 遺伝子導入すると、明らかに有意な梗塞巣の縮小が認められた。また Naked plasmid DNA は骨格筋では導入可能であるが、その効率を上昇させるために超音波と造影剤を併用する方法を試みた。その至適条件を決定したところ、超音波・造影剤法では 50-100 倍の遺伝子発現の上昇が可能になった。

D. 考察

HGF 遺伝子及び NFκB デコイ核酸は難治性循環器疾患に有効な新規遺伝子医薬品になる可能性が高いことが動物実験から明らかになった。安全性の面からは非ウイルスベクターがのぞましく、我々の研究により安全性の高い導入法も利用できるようになった。その臨床応用が望まれるが、そのめどもたっている。我が国独自の遺伝子治療法を世界に発信できる可能性が高まっていると言えよう。

E. 結論

HGF 遺伝子及び NFκB デコイ核酸を独自の非ウイルスベクターと組み合わせることで、難治性循環器疾患に有効な新規遺伝子治療法になる可能性が高いことが動物実験から明らかになった。

F. 健康危険情報

健康に対する危険情報は特に得られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Furukawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and Kaneda, Y.: Safety

evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, 12, 469-487, 2001.

Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Kaneda, Y., Higaki, J., Ogihara, T. and Horiuchi, M.: Inhibition of TNF-alpha induced cytokine and adhesion molecule. *Exp. Nephrol.* 9, 181-190, 2001.

Otomo, T., Yamamoto, S., Morishita, R. and Kaneda, Y.: EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo : applications to gene therapy for cancer.

J. Gene Med. 3, 345-352, 2001.

Yamamoto, K., Morishita, R., Hayashi, S., Matsushita, H., Nakagami, H., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Contribution of bcl-2, but not bcl-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348, 2001.

Izumi, Y., Kim, S., Namba, M., Yasumoto, H., Miyazaki, H., Hoshiga, M., Kaneda, Y., Morishita, R., Zhan, Y. and Iwao, H.: Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2 terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. *Circulation Research* 88, 1120-1126, 2001.

Hayashi, K., Morishita, R., Nakagami, H., Yoshimura, S., Hara, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Sakai, N.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor; in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal

- CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173, 2001.
- Ahn, J.D., Morishita, R., Kaneda, Y., Lee, K.U., Park, J.Y., Jeon, Y.J., Song, H.S. and Lee, I.K.: Transcription factor decoy for activator protein-1 (AP-1) inhibits high glucose-and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 44, 713-720, 2001.
- Aoki, M., Morishita, R., Hayashi, S., Jo, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44, 1034-1042, 2001.
- Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation*, 104, 2344-2350, 2001.
- Yokoseki, O., Suzuki, J., Kitabayashi, H., Watanabe, N., Wada, Y., Aoki, M., Morishita, R., Kaneda, Y., Ogihara, T., Funamatsu, H., Kobayashi, Y., and Isobe, M.: cis Element decoy against nuclear factor-kB attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation Research* 89, 899-906, 2001.
- Yoshimura, S., Morishita, R., Hayashi, K., Yamamoto, K., Nakagami, H., Kaneda, Y., Sakai, N., and Ogihara, T.: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element decoy of nuclear factor-kB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Therapy* 8, 1635-1642, 2001.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105, 1233-1239, 2002.
- Yasumoto, H., Kim, S., Zhan, Y., Miyazaki, H., Hoshiga, M., Kaneda, Y., Morishita, R., and Iwao, H.: Dominant negative c-Jun gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rats. *Gene Therapy* 8, 1682-1689, 2001.
- Namiki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Hirase, T., Ishida, T., Inoue, N., Hirata, K., Matsukawa, A., Morishita, R., Kaneda, Y., and Yokoyama, M.: Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion; Synergism with hypercholesterolemia. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 115-120, 2002.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* 9, 372-380, 2002.
- Nakamura, H., Morishita, R., and Kaneda, Y.: Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys. *In vivo* 16, 45-48, 2002.
- Morishita, R., Aoki, M., and Kaneda, Y.: Decoy

oligonucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 947, 294-302, 2001.

Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., and Ogihara, T. : Gene therapy in vascular medicine; recent advances and future perspectives. Pharmacology and Therapeutics (ed. Endoh, M.)Elsevier Science Inc. (Amsterdam) 106-114, 2001.

Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R.: Evolution of Viral Liposomes:Improvements and Applications. Drug Targeting Technology (ed. Schreier, H.) Marcel Dekker, Inc. (New York, Basel) 249-260, 2001.

2. 学会発表

1 . Morishita Ryuichi: "Angiogenesis as an Innovative treatment to peripheral arterial disease" The third congress of the Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. 2002年2月20日 フィリピン

2 . Morishita Ryuichi: "Gene therapy for vascular disease" The 5th International conference on preventive cardiology 2001年5月30日 大阪

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

テコイを含む薬学的組成物およびその使用方法(2) 平成 13 年

044350

神経変性疾患遺伝子治療

平成 13

年 363289

臓器移植における拒絶反応を抑制する組成物
およびその使用方法 平成 13 年 358587

研究成果の刊行に関する一覧（雑誌）

1. Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Furukawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and **Kaneda, Y.**: Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, 12, 469-487, 2001.
2. Nakamura, N., Hart, D.A., Frank, C.B., Marchuk, L. L., Shrive, N. G., Ota, N., Taira, T., Yoshikawa, H., and **Kaneda, Y.** : Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated With effective antisense gene inhibition. *J. Biochem.* 129, 755-759, 2001.
3. Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., **Kaneda, Y.**, Higaki, J., Ogihara, T. and Horiuchi, M.: Inhibition of TNF-alpha induced cytokine and adhesion molecule. *Exp. Nephrol.* 9, 181-190, 2001.
4. Otomo, T., Yamamoto, S., Morishita, R. and **Kaneda, Y.**: EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo : applications to gene therapy for cancer. *J. Gene Med.* 3, 345-352, 2001.
5. Yamamoto, K., Morishita, R., Hayashi, S., Matsushita, H., Nakagami, H., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Kaneda, Y.**, and Ogihara, T.: Contribution of bcl-2, but not bcl-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348, 2001.
6. Kuroiwa, T., Kakishita, E., Hamano, T., Kataoka, Y., Seto, Y., Iwata, N., **Kaneda, Y.**, Matsumoto, K., Nakamura, T., Ueki, T., Fujimoto, J., and Iwasaki, T.: Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J. Clin. Invest.* 107, 11, 1365-1373, 2001.
7. Izumi, Y., Kim, S., Namba, M., Yasumoto, H., Miyazaki, H., Hoshiga, M., **Kaneda, Y.**, Morishita, R., Zhan, Y. and Iwao, H.: Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2 terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. *Circulation Research* 88, 1120-1126, 2001.

8. Hayashi, K., Morishita, R., Nakagami, H., Yoshimura, S., Hara, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., **Kaneda, Y.** and Sakai, N.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor; in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173, 2001.
9. Ahn, J.D., Morishita, R., **Kaneda, Y.**, Lee, K.U., Park, J.Y., Jeon, Y.J., Song, H.S. and Lee, I.K.: Transcription factor decoy for activator protein-1 (AP-1) inhibits high glucose- and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 44, 713-720, 2001.
10. Aoki, M., Morishita, R., Hayashi, S., Jo, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Kaneda, Y.**, and Ogihara, T.: Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44, 1034-1042, 2001.
11. Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Kaneda, Y.**, and Ogihara, T.: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation*, 104, 2344-2350, 2001.
12. Yokoseki, O., Suzuki, J., Kitabayashi, H., Watanabe, N., Wada, Y., Aoki, M., Morishita, R., **Kaneda, Y.**, Ogihara, T., Funamatsu, H., Kobayashi, Y., and Isobe, M.: cis Element decoy against nuclear factor- κ B attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation Research* 89, 899-906, 2001.
13. Yoshimura, S., Morishita, R., Hayashi, K., Yamamoto, K., Nakagami, H., **Kaneda, Y.**, Sakai, N., and Ogihara, T.: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element decoy of nuclear factor- κ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Therapy* 8, 1635-1642, 2001.

14. Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105, 1233-1239, 2002.
15. Yasumoto, H., Kim, S., Zhan, Y., Miyazaki, H., Hoshiga, M., **Kaneda, Y.**, Morishita, R., and Iwao, H.: Dominant negative c-Jun gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rats. *Gene Therapy* 8, 1682-1689, 2001.
16. Namiki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Hirase, T., Ishida, T., Inoue, N., Hirata, K., Matsukawa, A., Morishita, R., **Kaneda, Y.**, and Yokoyama, M.: Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion; Synergism with hypercholesterolemia. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 115-120, 2002.
17. Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* 9, 372-380, 2002.
18. **Kaneda, Y.**: Improvements in gene therapy technologies. *Molecular Urology* 585-89, 2001.
19. **Kaneda, Y.**: Gene therapy; a battle against biological barriers. *Current Molecular Medicine* 1, 493-499, 2001.
20. Nakamura, H., Morishita, R., and **Kaneda, Y.**: Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys. *In vivo* 16, 45-48, 2002.
21. Morishita, R., Aoki, M., and **Kaneda, Y.**: Decoy oligonucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 947, 294-302, 2001.

研究成果の刊行に関する一覧（書籍）

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., and Ogihara, T.	Gene therapy in vascular medicine; recent advances and future perspectives.	Endoh, M.	Pharmacology and Therapeutics	Elsevier Science Inc.	Amsterdam	2001	106-114
Kaneda, Y., Saeki, Y., and Morishita, R.	Evolution of Viral Liposomes:Improvements and Applications.	Schreier, H.	Drug Targeting Technology	Marcel Dekker, Inc.	New York, Basel	2001	249-260

20010429

以降のページは雑誌/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。