

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）の
開発に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金田 安史

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）の開発に 関する研究	1
金田 安史	
II. 分担研究報告	
1. 標的導入ベクターの開発	6
金田 安史	
2. 徐放化及びステルス化ベクターの開発	9
田畑 泰彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）の開発に関する研究

主任研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

現在臨床応用の生産が進められている HVJ envelope (HVJ-E) vector の生体中での導入効率の増強のため、1) 標的導入をめざし融合蛋白と標的分子のキメラ蛋白を作成し、これが HVJ のウイルス粒子膜に組み込まれる条件を決定した、2) カチオン化ポリマーとの複合体形成を行い、静脈内投与で肝臓への標的導入が可能になった、3) HVJ-E を徐放するためのカチオン化ゼラチンからなる生体吸収性のハイドロゲルを作製し、それらのハイドロゲルシステムの生体吸収性と徐放性とを評価した。その結果に基づきカチオン化ゼラチンハイドロゲル中に HVJ-E を包埋し HVJ-E の徐放化による遺伝子導入、発現の長期化が培養細胞レベルで可能になった。

A. 研究目的

HVJ-E の血液中での安定性を増強させ、かつ標的細胞へのターゲティング能を賦与し、生体組織での遺伝子導入効率を増強させる。

B. 研究方法

1) 標識蛋白として His-tag をもつ 4 種の組み換え F 蛋白を遺伝子工学的に作成した。No.1:F1, F2 蛋白の間に His-tag 挿入、No.2:F2 を欠損させ、F1 蛋白の N 末に His-tag 挿入、No.3:F1 蛋白 N 末の fusion peptide の 1 部を欠損させ His-tag 挿入、No.4:F1 蛋白の C 末の膜貫通ドメインのみ残し、その N 末に His-tag 挿入。またすべて N 末には signal peptide を付加した。さらに His-tag に代えて GFP も挿入した。これら 4

種の遺伝子を培養 Vero 細胞に導入して発現させ、抗 His-tag 抗体で免疫染色を行い、細胞膜上への発現を検討し、さらに産生されるウイルス粒子での GFP 蛋白の発現と局在を抗 GFP 抗体による蛋白プロットと免疫電顕により観察した。2) 分子量 5,000 の低分子ゼラチンを ethylenediamine により架橋剤を用いて結合させカチオン化したポリマーを作成し、5 mg のカチオン化ゼラチン(CG)とルシフェラーゼ遺伝子封入の HVJ-E (3×10^{10} 粒子)を混合し、30 分間氷上でインキュベートし複合体を形成させた。この複合体のマウス尾静脈内投与を行い、主要臓器での遺伝子発現を評価した。3) ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレ

ンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基の導入率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。得られたカチオン化ゼラチンの 10wt% 水溶液に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、攪拌下、4℃ で 12 時間の条件でカチオン化ゼラチンの架橋反応を行った。得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルを 100mM のグリシン水溶液で処理することによって、残存アルデヒド基を化学的にブロックした。その後、反応試薬と反応副生成物とを蒸留水で洗浄除去、凍結乾燥することによって架橋程度の異なる架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルを得た。LacZ 発現プラスミド或いは蛍光オリゴ核酸を封入した HVJ-E の水溶液を乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルに滴下、含浸させた。HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルからの HVJ-E の徐放化は細胞培養法によって評価した。用いた細胞培養系は 2 重底構造になっており、下面に細胞が存在し、上面は HVJ-E、酵素などのみ通過できるポアをもつ膜で構成され、その上面の膜に HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを置いた。培養細胞から酵素が分泌され、それによって、上面に置かれたハイドロゲルは時間とともに分解する。それにともない HVJ-E はハイドロゲルから放出され、下面の細胞に作用、細胞での遺伝子発現が見られる。細胞の遺伝子発現或いは蛍光オリゴの核内導入効率を調べることによって、ハイドロゲルからの HVJ-E の徐放化について評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験については大阪大学医学科で定める動物実験のガイドライン或いは京都大学動物実験に関する指針（昭和 63 年総長裁定）に従い、動物実験に係る各施設内諸規則を遵守し、動物愛護に十分配慮しながら動物実験を実施した。

C. 研究結果

1) No.4 の F1 蛋白の膜貫通ドメインのみを残し、これの N 末に His-tag 或いは GFP 蛋白を付加したキメラ蛋白のみ、細胞膜にソーティングされ、産生されるウイルス粒子の膜上に異種蛋白の発現をおこした。現在、腫瘍関連抗原 TRP-2 に対する一本鎖抗体遺伝子を分離したので、F1 とのキメラ遺伝子を構築している。2) ルシフェラーゼ遺伝子を封入した CG-HVJ-E をマウス尾静脈内に投与し、24 時間後遺伝子発現を調べたところ、肝臓で特異的に遺伝子が発現し、CG を用いない HVJ-E の約 100 倍遺伝子発現増強が見られた。HVJ-E 単独投与では肝臓や脾臓、肺に弱い遺伝子発現が認められた。蛍光オリゴ核酸を同様にして投与したところ、導入細胞の多くは Kupffer 細胞であり、一部血管内皮細胞と肝細胞の核に蛍光が認められた。全身投与したときの CG-HVJ-E の遺伝子導入効率の増強の原因として、血液内での安定性に注目し、マウス新鮮血と各ポリマー修飾 HVJ-E を 37 度でインキュベーション後、培養細胞にかけて導入活性の変化を調べた。HVJ-E 単独ではこの方法により導入活性が 20% まで低下したが、CG-HVJ-E では 70% 以上の活性を保持していた。3) カチオン化ゼラチンハイドロゲルに蛍光オ

リゴ核酸を封入した HVJ-E を包埋し、ゼラチナーゼ活性を有する HeLa 細胞と共培養すると導入効率は 3%程度であったが、それが 3 日以上持続することがわかった。HVJ-E 単独では導入効率は 40%であったが、導入能力は 1 日しか持続しなかった。LacZ 遺伝子封入 HVJ-E を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを細胞培養系においたところ、数週間にわたって細胞に遺伝子発現が認められた。ハイドロゲルがない場合は 1 週間で発現が見られなくなった。このことは、細胞から分泌された酵素によって、ハイドロゲルが分解され、ハイドロゲル内に含浸された HVJ-E が徐放化されたことを示している。

D. 考察

1) GFP 蛋白がウイルス粒子にのったことより F1 変異体と腫瘍を認識する一本鎖抗体のキメラ蛋白を作成すれば腫瘍を認識できる HVJ-E の作成が可能であると予想される。キメラ蛋白の発現量と特異的遺伝子導入の効率を定量化して評価する必要がある。2) CG 修飾により血液中で安定な HVJ-E を作成することに成功した。しかし現状のものはサイズが約 700 nm と大きく、網内系への捕捉の懸念がある。特異的は標的導入をするためにさらにサイズを 200 nm 以下にする必要がある。3) 得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルに HVJ-E を含浸させたものを調製、細胞培養系で HVJ-E の長期遺伝子発現、導入の持続を確認している。これらの結果は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルから、HVJ-E が徐放化されていることを示している。今後は、カチオン化ゼラチンと HVJ-E

との相互作用および HVJ-E からの徐放化挙動をより詳しく調べ、ハイドロゲルの分解にともなう HVJ-E の徐放化システムの最適化を進める。これらの結果は癌組織での徐放化ができることを示しており、今後は徐放化による *in vivo* での遺伝子発現と治療効果について評価する。

E. 結論

1) キメラ F 蛋白を持つ標的導入可能な HVJ-E の作成が可能になった。2) CG との複合体形成により HVJ-E の血液中での安定化を増し、肝臓への標的導入に成功した。3) カチオン化ゼラチンハイドロゲル中に HVJ-E を包埋し徐放化による導入及び遺伝子発現の長期化が可能になった。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin J. Gene Medicine, in press.
2. Mima, H., Tomoshige, R., Kanamori, T., Tabata, Y., Yamamoto, Ito, S., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Biocompatible polymer enhances the *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency of HVJ envelope vector J. Gene Medicine in press.
3. Oshima, K., Shimamura, M., Mizuno, S., Tamai, K., Doi, K., Morishita, R., Nakamura, T., Kubo,

- T., and **Kaneda, Y.**: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. *The FASEB J.* 18, 212-214, 2004.
4. Shimamura, M., Sato, N., Oshima, K., Aoki, M., Kurinami, H., Waguri, S., Uchiyama, Y., Ogiwara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: A novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Over-expression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 109, 424-431, 2004.
 5. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Tabata, Y.**: Suppression of the progress of disseminated pancreatic cancer cells by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin microspheres. *Pharm. Res.* 21(7): 1109-18 (2004)
 6. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Tabata, Y.**: Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther.* 11(15): 1205-14 (2004)
 7. Kushibiki, T., **Tabata, Y.**: A new gene delivery system based on controlled release technology. *Curr. Drug Deliv.* 1(2): 153-163 (2004)
2. 学会発表
1. 金田安史
第 104 回日本外科学会総会 基調講演
“遺伝子治療の現状と将来展望”
(平成 16 年 4 月 8 日 大阪)
 2. Kaneda, Y.
The 9th Liposome Research Days 招待講演
Development of novel non-viral vectors for gene transfer and drug delivery
(平成 16 年 5 月 14 日 台湾)
 3. Kaneda, Y.
The 12th annual congress of the European Society of Gene Therapy 招待講演
Development of novel non-viral vectors for gene therapy
(平成 16 年 11 月 5 日 フィンランド)
 4. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 山岸久一
樹状細胞を用いた癌免疫療法の効果増強の試みーカチオン化ゼラチンを用いた遺伝子導入ー. 第 59 回日本消化器外科学会総会
(2004.7.21-23 鹿児島)
 5. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 原田孝司, 山本一男, 友重龍治, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂
マウス腹膜線維症モデルにおける HSP47siRNA を用いた腹膜肥厚抑制効果の検討. 日本腎臓学会学術総会
(2004.5.27-29 栃木)
 6. Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: Suppression of peritoneal fibrosis by HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres. *The American Society of Nephrology, Renal Week 2004* (2004.10.27-11.1 St.Louis)
 7. Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Zinnouchi, C., Kushibiki, T., Tomoshige, R.,

Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Small interfering RNA targeting heat shock protein47 (HSP47) ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction The American Society of Nephrology, Renal Week 2004 (2004.10.27-11.1 St.Louis)

8. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials. (2004.7.19-22 Emei)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

遺伝子導入のためのウイルスエンベロープ
ベクター

（769385, オーストラリアで成立）

2. 実用新案登録

脳機能改善のための医薬及び方法

2004 年 7 月 29 日出願 特願 2004-2226

標的導入ベクターの開発

主任研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

現在臨床応用の生産が進められている HVJ envelope (HVJ-E) vector の生体中での導入効率の増強のため、1) 標的導入をめざし融合蛋白と標的分子のキメラ蛋白を作成し、これが HVJ のウイルス粒子膜に組み込まれる条件を決定した、2) カチオン化ポリマーとの複合体形成を行い、静脈内投与で肝臓への標的導入が可能になった、3) カチオン化ゼラチンハイドロゲル中に HVJ-E を包埋し HVJ-E の徐放化による導入の長期化が培養細胞レベルで可能になった。

A. 研究目的

HVJ-E の血液中での安定性を増強させ、かつ標的細胞へのターゲティング能を賦与し、生体組織での遺伝子導入効率を増強させる。

B. 研究方法

1) 標識蛋白として His-tag をもつ 4 種の組み換え F 蛋白を遺伝子工学的に作成した。No.1:F1, F2 蛋白の間に His-tag 挿入、No.2:F2 を欠損させ、F1 蛋白の N 末に His-tag 挿入、No.3:F1 蛋白 N 末の fusion peptide の 1 部を欠損させ His-tag 挿入、No.4:F1 蛋白の C 末の膜貫通ドメインのみ残し、その N 末に His-tag 挿入。またすべて N 末には signal peptide を付加した。さらに His-tag に代えて GFP も挿入した。これら 4 種の遺伝子を培養 Vero 細胞に導入して発現させ、抗 His-tag 抗体で免疫染色を行い、細胞膜上への発現を検討し、さらに産生

されるウイルス粒子での GFP 蛋白の発現と局在を抗 GFP 抗体による蛋白プロットと免疫電顕により観察した。2) 分子量 5,000 の低分子ゼラチンを ethylenediamine により架橋剤を用いて結合させカチオン化したポリマーを作成し、5 mg のカチオン化ゼラチン(CG)とルシフェラーゼ遺伝子封入の HVJ-E (3×10^{10} 粒子)を混合し、30 分間氷上でインキュベートし複合体を形成させた。この複合体のマウス尾静脈内投与を行い、主要臓器での遺伝子発現を評価した。3) カチオン化ゼラチンハイドロゲルに蛍光オリゴ核酸を封入した HVJ-E を包埋し、ゼラチナーゼ活性を持つ HeLa 細胞と共培養して経時的に蛍光オリゴの核内導入効率を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験については大阪大学医学科で定める動物実験のガイドラインに従い、動物実験に係る施設内諸規則を遵守し、動物愛護に十分配慮

しながら動物実験を実施した。

C. 研究結果

1) No.4 の F1 蛋白の膜貫通ドメインのみを残し、これの N 末に His-tag 或いは GFP 蛋白を付加したキメラ蛋白のみ、細胞膜にソーティングされ、産生されるウイルス粒子の膜上に異種蛋白の発現をおこした。現在、腫瘍関連抗原 TRP-2 に対する一本鎖抗体遺伝子を分離したので、F1 とのキメラ遺伝子を構築している。2) ルシフェラーゼ遺伝子を封入した CG-HVJ-E をマウス尾静脈内に投与し、24 時間後遺伝子発現を調べたところ、肝臓で特異的に遺伝子が発現し、CG を用いない HVJ-E の約 100 倍遺伝子発現増強が見られた。HVJ-E 単独投与では肝臓や脾臓、肺に弱い遺伝子発現が認められた。蛍光オリゴ核酸を同様にして投与したところ、導入細胞の多くは Kupffer 細胞であり、一部血管内皮細胞と肝細胞の核に蛍光が認められた。全身投与したときの CG-HVJ-E の遺伝子導入効率の増強の原因として、血液内での安定性に注目し、マウス新鮮血と各ポリマー修飾 HVJ-E を 37 度でインキュベーション後、培養細胞にかけて導入活性の変化を調べた。HVJ-E 単独ではこの方法により導入活性が 20%まで低下したが、CG-HVJ-E では 70%以上の活性を保持していた。3) カチオン化ゼラチンハイドロゲルに蛍光オリゴ核酸を封入した HVJ-E を包埋し、ゼラチナーゼ活性を有する HeLa 細胞と共培養すると導入効率は 3%程度であったが、それが 3 日以上持続することがわかった。HVJ-E 単独では導入効率は 40%であったが、導入能力は 1 日しか持続しなかった。

D. 考察

1) GFP 蛋白がウイルス粒子にのったことより F1 変異体と腫瘍を認識する一本鎖抗体のキメラ蛋白を作成すれば腫瘍を認識できる HVJ-E の作成が可能であると予想される。キメラ蛋白の発現量と特異的遺伝子導入の効率を定量化して評価する必要がある。2) CG 修飾により血液中で安定な HVJ-E を作成することに成功した。しかし現状のものはサイズが約 700 nm と大きく、網内系への捕捉の懸念がある。特異的は標的導入をするためにさらにサイズを 200 nm 以下にする必要があろう。3) ゼラチンハイドロゲルに HVJ-E を封入することによりゼラチナーゼに依存して徐放化が可能になったので、癌組織での徐放化による治療効果を評価することができる。

E. 結論

1) キメラ F 蛋白を持つ標的導入可能な HVJ-E の作成が可能になった。2) CG との複合体形成により HVJ-E の血液中での安定化を増し、肝臓への標的導入に成功した。3) カチオン化ゼラチンハイドロゲル中に HVJ-E を包埋し徐放化による導入の長期化が可能になった。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope

- vector enhances the anticancer effect of cisplatin J. Gene Medicine, in press.
2. Mima, H., Tomoshige, R., Kanamori, T., Tabata, Y., Yamamoto, Ito, S., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Biocompatible polymer enhances the *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency of HVJ envelope vector. J. Gene Medicine in press.
 3. Oshima, K., Shimamura, M., Mizuno, S., Tamai, K., Doi, K., Morishita, R., Nakamura, T., Kubo, T., and Kaneda, Y.: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. The FASEB J. 18, 212-214, 2004.
 4. Shimamura, M., Sato, N., Oshima, K., Aoki, M., Kurinami, H., Waguri, S., Uchiyama, Y., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: A novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Over-expression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. Circulation 109, 424-431, 2004.
2. 学会発表
1. 金田安史
第 104 回日本外科学会総会 基調講演
“遺伝子治療の現状と将来展望”
(平成 16 年 4 月 8 日 大阪)
 2. Kaneda, Y.
The 9th Liposome Research Days 招待講演
Development of novel non-viral vectors for gene transfer and drug delivery
(平成 16 年 5 月 14 日 台湾)
 3. Kaneda, Y.
The 12th annual congress of the European Society of Gene Therapy
招待講演
Development of novel non-viral vectors for gene therapy.
(平成 16 年 11 月 5 日 フィンランド)
- H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター
(769385, オーストラリアで成立)
 2. 実用新案登録
脳機能改善のための医薬及び方法
2004 年 7 月 29 日出願 特願 2004-2226

徐放化及びステルス化ベクターの開発

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

HVJ-E を徐放するためのカチオン化ゼラチンからなる生体吸収性のハイドロゲルを作製し、それらのハイドロゲルシステムの生体吸収性と徐放性とを評価した。ゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを導入することによりカチオン化ゼラチンを得た。得られたカチオン化ゼラチンをグルタルアルデヒドによって、化学架橋し、架橋の程度の異なるハイドロゲルを作製した。ハイドロゲルは生体内で時間とともに分解され、またその分解吸収性は、化学架橋反応の条件によってコントロールが可能であった。HVJ-E と同じサイズと表面電荷とをもつプラスミド DNA を用いて、ハイドロゲルからの徐放化を検討した。その結果、ハイドロゲルの分解とともにプラスミド DNA が徐放化され、また、その遺伝子発現も認められた。予備的に HVJ-E のカチオン化ゼラチンハイドロゲルからの徐放化を調べたところ、プラスミド DNA と同じように徐放化できることがわかった。

A. 研究目的

本研究の目的は、HVJ-E の徐放化のための生体吸収性ハイドロゲルをデザイン、作製することである。そのために、徐放化ハイドロゲルの作製とその生体吸収性の評価、作製条件と生体吸収性との相関性の検討を行っている。徐放化の原理としては、正電荷を有する生体吸収性高分子からなるハイドロゲル内に負電荷をもつ HVJ-E を静電相互作用力によって固定化する。ハイドロゲルの分解にともなうハイドロゲル構成高分子の水可溶化によって HVJ-E は徐放化される。本研究では、HVJ-E と同じサイズ、表面負電荷をもつプラスミド DNA を用いて、生体吸収性のハイドロゲルの生体吸収性とプラスミド DNA の徐放化を調べるとともに、

HVJ-E の徐放化について検討した。本研究の成果によって、HVJ-E の生体内での不安定性を改善し、他ベクターに対する優位性も際だち、対象疾患の拡大とともに難治性疾患の治療への新たな可能性（たとえば遺伝子治療とドラッグデリバリーの併用など）を開くことが期待できる。

B. 研究方法

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基の導入

率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。アミノ基の導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によりゼラチンの 1 級アミンを定量することにより行った。また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。得られたカチオン化ゼラチンの 10wt% 水溶液に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、攪拌下、4℃で 12 時間の条件でカチオン化ゼラチンの架橋反応を行った。得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルを 100mM のグリシン水溶液で処理することによって、残存アルデヒド基を化学的にブロックした。その後、反応試薬と反応副生成物とを蒸留水で洗浄除去、凍結乾燥することによって架橋程度の異なる架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルを得た。

CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA を Bolton-Hunter 試薬にて放射ヨードラベル化した。このラベル化プラスミド DNA 水溶液を乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルに滴下、室温、12 時間の条件で、水溶液をハイドロゲル内に含浸させ、¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを作製した。一方、カチオン化ゼラチンを同様の方法で ¹²⁵I ラベル化を行った。¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA 含浸ハイドロゲルおよび ¹²⁵I ラベル化ハイドロゲルを ddY マウスの背部皮下へ埋入後、経時的に埋入部位での残存放射活性を測定することによって、体内におけるプラスミド DNA およびカチオン化ゼラチンハイドロゲルの残存の時間変化を評価した。次に、プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス大腿筋内に埋入、経時的に筋

肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

HVJ-E の水溶液を乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルに滴下、含浸させた。HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルからの HVJ-E の徐放化は細胞培養法によって評価した。用いた細胞培養系は 2 重底構造になっており、下面に細胞が存在し、上面は HVJ-E、酵素などのみ通過できるポアーをもつ膜で構成され、その上面の膜に HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを置いた。培養細胞から酵素が分泌され、それによって、上面に置かれたハイドロゲルは時間とともに分解する。それにともない HVJ-E はハイドロゲルから放出され、下面の細胞に作用、細胞での遺伝子発現が見られる。細胞の遺伝子発現プロファイルを調べることによって、ハイドロゲルからの HVJ-E の徐放化について評価した。

(倫理面への配慮)

「京都大学動物実験に関する指針（昭和 63 年総長裁定）」に従い、動物実験に係る再生医科学研究所内諸規則を遵守し、動物愛護に十分配慮しながら動物実験を実施した。

C. 研究成果

エチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度の増加させることによって、アミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。ELS 測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていること、また、カチオン

化ゼラチンとの混合によりプラスミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。次に、DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。電気泳動測定の結果も合わせて考えると、プラスミド DNA がカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成していると考えられた。

生体内におけるカチオン化ゼラチンハイドロゲルの分解性を調べたところ、ハイドロゲルは時間とともに分解し、さらに、その分解がハイドロゲル作製時におけるグルタルアルデヒド濃度の減少とともに速くなることがわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度の減少にともなって、ハイドロゲルの架橋程度が低下し、酵素攻撃によるゼラチン分子の水可溶化の速度の上昇したことが原因であると考えられる。このように、ハイドロゲルの生体内分解性は、その架橋程度を変化させることでコントロールすることができた。

¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを埋入したところ、その残存放射活性は時間とともに減少した。また、その減少はハイドロゲルの分解性によってコントロールが可能であり、その時間変化は、前述のカチオン化ゼラチンハイドロゲルの生体内残存の時間変化とよく相関していた。これは、体内でプラスミド DNA が、その徐放キャリアであるカチオン化ゼラチンハイドロゲルの分解性によってコントロールされていることを示している。

プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス筋肉内に埋入時の埋入部

位における遺伝子発現が見られた。埋入 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間も延長した。また、この遺伝子発現期間は、プラスミド DNA の徐放期間の延長とともに延長した。

HVJ-E を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを細胞培養系においたところ、数週間にわたって細胞に遺伝子発現が認められた。このことは、細胞から分泌された酵素によって、ハイドロゲルが分解され、ハイドロゲル内に含浸された HVJ-E が徐放化されたことを示している。

D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでも多くの報告がされている。しかしながら、その中で、プラスミド DNA の徐放化の試みは少ない。その試みは、生体吸収性高分子からなる徐放化キャリア内にプラスミド DNA を物理的に分散、包含させ、プラスミド DNA のキャリア内での単純拡散性によりその徐放挙動をコントロールしているものがほとんどである。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミド DNA を徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持させる。この状態ではプラスミド DNA は徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて、固定化プラスミド DNA がハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解により DNA の徐放パターンをコントロールすることができる。こ

の徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミド DNA の徐放パターンを徐放化キャリアの分解パターンによって自由に変えることができる。また、プラスミド DNA は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り、徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらし、本徐放化システムが *in vivo* における遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。さらに、得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルに HVJ-E を含浸させたものを調製、細胞培養系で HVJ-E の遺伝子発現を確認している。これらの結果は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルから、HVJ-E が徐放化されていることを示している。今後は、カチオン化ゼラチンと HVJ-E との相互作用および HVJ-E からの徐放化挙動をより詳しく調べ、ハイドロゲルの分解にともなう HVJ-E の徐放化システムの最適化を進める。

E. 結論

カチオン化ゼラチンからなる生体吸収性ハイドロゲルは、その分解とともにプラスミド DNA を徐放化、それに続く遺伝子発現レベルの増強と発現期間の延長を可能にした。また、この生体吸収性ハイドロゲルは HVJ-E の徐放化キャリアとしてもうまく機能することもわかった。今後は、より詳細な検討を進めることによって、HVJ-E の徐放化システムの完成とその治療学的な評価を行っていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Suppression of the progress of disseminated pancreatic cancer cells by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin microspheres. *Pharm. Res.* 21(7): 1109-18 (2004)
2. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther.* 11(15): 1205-14 (2004)
3. Kushibiki, T., Tabata, Y.: A new gene delivery system based on controlled release technology. *Curr. Drug Deliv.* 1(2): 153-163 (2004)
4. 櫛引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦: 生体吸収性カチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いたプラスミド DNA の徐放化とその生物活性の増強—NK4 プラスミド DNA の腫瘍転移

抑制効果を例として、「炎症・再生」24(6): 634-641 (2004)

5. 櫛引俊宏, 田畑泰彦: 遺伝子発現を高めるための遺伝子デリバリー技術. 「遺伝子医学MOOK1 再生医療へのブレイクスルー」(田畑泰彦, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 186-193 (2004)

2. 学会発表

1. 櫛引俊宏, 田畑泰彦: NK4 plasmid DNA の生体吸収性ハイドロゲルからの徐放とその腫瘍転移抑制効果ー遺伝子治療を目指した遺伝子デリバリー技術ー. 第2回NK4遺伝子治療研究会 (2004.3.25-26 大津)
2. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials. (2004.7.19-22 Emei)
3. 谷川麻世, 尾関 真, 田畑泰彦: 異なる架橋密度をもつカチオン化ゼラチンハイドロゲルの生体吸収性. 第50回高分子研究発表会 (2004.7.15-16 神戸)
4. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 上田祐二, 山岸久一: 生分解性カチオン化ゼラチンを用いたヒト樹状細胞への遺伝子導入. 第25回癌免疫外科研究会. 第26回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング (2004.5.20-21 京都)
5. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 山岸久一: 樹状細胞を用いた癌免疫療法の効果増強の試みーカチオン化ゼラチンを用いた遺伝子導入ー. 第59回日本消化器外科学会総会 (2004.7.21-23 鹿児島)
6. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 原田孝司, 山本一男, 友重龍治, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: マウス腹膜線維症モデルにおける HSP47 siRNA を用いた腹膜肥厚抑制効果の検討. 日本腎臓学会学術総会 (2004.5.27-29 栃木)
7. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: カチオン化ゼラチン粒子を用いた腹膜線維症における遺伝子治療の試みーHSP47 siRNA 投与による検討ー. 第10回日本腹膜透析研究会 (2004.9.18-19 東京)
8. Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: Suppression of peritoneal fibrosis by HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres. The American Society of Nephrology, Renal Week 2004 (2004.10.27-11.1 St.Louis)
9. Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Zinnouchi, C., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Small interfering RNA targeting heat shock protein47 (HSP47) ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction The American Society of Nephrology, Renal Week 2004 (2004.10.27-11.1 St.Louis)
10. 阿部克成, 宮崎正信, 小畑陽子, 夏 志銀, 友重龍治, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: カチオン化ゼラチン粒子(CGM)を用いた siRNA 導入の試みーHSP47 siRNA 投与による腎間質線維化抑制効果の検討ー.

第 5 回腎不全病態治療研究会プログラム
(2004.11.27. 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., <u>Kaneda, Y.</u>	Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin	J. Gene Medicine			in press
Mima, H., Tomoshige, R., Kanamori, T., Tabata, Y., Yamamoto, S., Ito, S., Tamai, K., <u>Kaneda, Y.</u>	Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector	J. Gene Medicine			in press
Ino, A., Yamamoto, S., <u>Kaneda, Y.</u> , Kobayashi, I.	Somatic gene targeting with RNA/DNA chimeric oligonucleotides: an analysis with a sensitive reporter mouse system.	J. Gene Medicine	6	1272-1280	2004
Hiraoka, K., Yamamoto, S., Otsuru, S., Nakai, S., Tamai, K., Morishita, R., Ogihara, T., <u>Kaneda, Y.</u>	Enhanced tumor-specific long-term immunity of HVJ- mediated DC-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides.	J. Immunology	173	4297-4307	2004
Maruyama, M., Nishio, T., Kato, T., Yoshida, T., Ishida, C., Watanabe, Y., Nishikawa, M., <u>Kaneda, Y.</u> , Takakura, Y.	Subcellular traffickling of exogenously expressed interferon-beta in Mardin- Darby canine kidney cells.	J. Cellular Physiology	201	117-125	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura, H., Kimura, T., Ogita, K., Koyama, S., Tsuji, T., Tsutsui, T., Shimoya, K., Koyama, M., <u>Kaneda, Y.</u> , Murata, Y.	Alteration of the timing of implantation by in vivo gene transfer: delay of implantation by suppression of nuclear factor kB activity and partial rescue by leukemia inhibitory factor.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	321	886-892	2004
Takeda, S., Shiosaki, K., <u>Kaneda, Y.</u> , Nakasatomi, T., Yoshizaki, H., Someya, K., Koono, Y., Eda, Y., Kino, Y., Yamamoto, N., Honda, M.	Hemagglutinating virus of Japan protein is efficient for induction of CD4+ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine.	Clinical Immunology	112	92-105	2004
Masuda, K., Yamamoto, S., Endoh, M., <u>Kaneda, Y.</u>	Transposon-independent enhancement of transcription by Sleeping Beauty transposase.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	317	796-800	2004
Oshima, K., Shimamura, M., Mizuno, S., Tamai, K., Doi, K., Morishita, R., Nakamura, T., Kubo, T., <u>Kaneda, Y.</u>	Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats.	The FASEB J.	18	212-214	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimamura, M., Sato, N., Oshima, K., Aoki, M., Kurinami, H., Waguri, S., Uchiyama, Y., Ogihara, T., <u>Kaneda, Y.</u> , Morishita, R.	Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Over-expression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model.	Circulation	109	424-431	2004
Kotani, H., Nakajima, T., Lai, Shoupeng, Morishita, R., <u>Kaneda, Y.</u>	The HVJ-Envelope as an innovative vector system for cardiovascular disease.	Current Gene Therapy	4	183-194	2004
Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., <u>Tabata, Y.</u>	Suppression of the progress of disseminated pancreatic cancer cells by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin microspheres.	Pharm. Res.	21(7)	1109-1118	2004
Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., <u>Tabata, Y.</u>	Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin.	Gene Ther.	11(15)	1205-1214	2004
Kushibiki, T., <u>Tabata, Y.</u>	A new gene delivery system based on controlled release technology.	Curr. Drug Deliv.	1(2)	153-163	2004
櫛引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦	生体吸収性カチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いたプラスミドDNAの徐放化とその生物活性の増強－NK4 プラスミドDNAの腫瘍転移抑制効果を例として－	炎症・再生	24(6)	634-641	2004

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
櫛引俊宏, 田畑泰彦	遺伝子発現を高 めるための遺伝子 デリバリー技術.	田畑泰彦	遺伝子医学 MOOK1 再 生医療への ブレイクス ルー	株式会社 メディカル ドゥ	大阪	2004	186-193