

バイオナノ粒子を用いて、安全性の評価を行った。前述のように、ATCC 由来の HVJ を材料として、マスター細胞バンクと同じ細胞クローンによりバイオナノ粒子の製造を行うと生産効率の向上が認められたため、3 種類のカラムクロマトグラフィーによる精製の条件を調整して、高品質のバイオナノ粒子を製造した。そして、昨年度と同様にマウスを使用して安全性の評価を行った。投与経路としては、全身投与経路である静脈内投与を選択して、精製したバイオナノ粒子をバッファーのみで封入操作を行った後に、マウスの尾静脈より投与した。その結果、最高投与用量においても致死量には至らず、安全性の面での向上が認められた (図-11)。

図-11. 作製したバンクで製造したバイオナノ粒子の安全性

サンプル	従来材料		マスターバンク	
	雄	雌	雄	雌
TBS	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (低用量)	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (中用量)	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (高用量)	2/5	3/5	0/5	0/5

(致死動物数/投与動物数)

以上の結果から、作製したマスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造を行ったバイオナノ粒子は、産生効率や遺伝子導入活性の面で向上が認められる上に、安全性の面についても、性能の向上が認められることが明らかとなった。

今後は、本研究で得られたデータを参考にして、実際に医薬品の封入を行ったバイオナノ粒子を使用して、各臨床応用プログラムに適した安全性試験のための投与経路、用量、試験項目設定で、臨床応用の開始に必要なデ

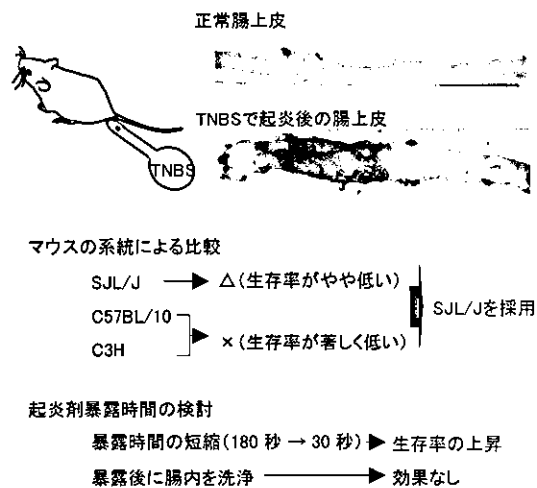
ータ取得を行う予定である。

(3) 炎症疾患モデルの確立

上記のようにして作製したマスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造を行ったバイオナノ粒子は、従来の HVJ を使用して製造したサンプルと比較して安全性の面で優れている頃が明らかとなったので、実際の治療効果 (有効性) を検討するために炎症疾患モデルの構築を行った。

モデルとしては、マウスを使用した炎症性消化器疾患モデルを選択した。マウスの系統としては、C57BL/10、SJL/J、C3H の計 3 系統のマウスを用いて検討を行った。本モデルでは、起炎剤である TNBS を 50%エタノールに溶解して肛門より投与する事で、直腸部分に炎症を誘発する、そこで、TNBS の処理時間、TNBS 処理後の生理食塩水による洗浄の有無、系統間の差などについて条件検討を行った (図-12)。

図-12. マウス炎症性消化器疾患モデルの確立



その結果、SJL/J マウスを使用して TNBS への暴露時間を 30 秒に設定して、洗浄操作は行わ

ないのが、炎症モデルの作製に適した条件であることが明らかとなった。そこで、確立したマウスモデルを利用して、バイオナノ粒子により抗炎症作用を有する核酸医薬であるNF κ B デコイ核酸をデリバリーした場合に、抗炎症作用が認められるかを検討した。

上記のようにして、確立したマウスモデルに、作製したマスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造を行ったバイオナノ粒子に核酸医薬であるNF κ B デコイ核酸を封入して直腸内投与を行ったところ、生存例の直腸の剖検において、重篤な炎症や潰瘍などが認められないことが明らかとなった。以上の結果から、新規材料により製造したバイオナノ粒子に治療効果があることが示唆された。ただし、現状において確立したマウスモデルでは、TNBS や 50%エタノール処理による死亡例が多く、有意差を検定できるレベルに達していないため、今後更に詳細な条件検討を行った上で、マウスモデルによる有効性評価を行う必要がある。

そこで、以下の研究では同様のTNBSによる炎症を誘導する動物モデルで、試験動物をラットに変更した評価系を使用して、有効性の検討を行うことにした。

(4) 炎症疾患モデルでの有効性確認

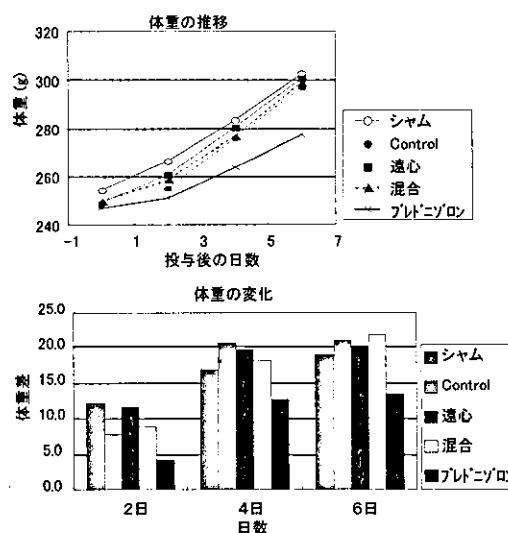
上記のようにマウスを使用したTNBSによる炎症モデルでは、死亡例が多く観察されたため、炎症の程度が軽度なラットのモデルを使用して有効性の検討を行った。

マウスと同等にTNBSを肛門より投与して炎症を誘発した動物に対して、炎症誘導後1

日後に、マスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造したバイオナノ粒子にNF κ B デコイ核酸を封入して直腸内投与を行った。その後、6日間体重の測定を行い、6日目に全例を解剖して直腸の炎症の程度をスコア化して治療効果を検討した。陽性コントロールとしては、プレドニゾロン（毎日1回経口投与、6回の連続投与）を、陰性コントロールとしては生理食塩水の直腸内投与を設定した。

体重の変化について、各群の比較を行ったところ、NF κ B デコイ核酸封入バイオナノ粒子を投与した場合には、コントロールと比較して体重の回復が早期になることが明らかとなった（図-13）。

図-13. ラット炎症消化器疾患モデルでの有効性評価(1)



また、プレドニゾロン投与群では、他の群と比較して体重の回復の鈍化が認められた。以上の結果から、NF κ B デコイ核酸封入バイオナノ粒子の投与により、体重の回復を指標として有効性が認められることが示唆された。

そこで、直腸の炎症に対する治療効果を検討した。その結果、プレドニゾロン投与群と

NF κ B デコイ核酸封入バイオナノ粒子投与群では、コントロールに対して炎症スコアの有意差が認められ、治療効果があることが明らかとなった (図-14)。

図-14. ラット炎症消化器疾患モデルでの有効性評価 (2)

Test groups	Dose	N	Inflammatory score in the intestine crassum
Sham (saline)	-	12	0.00 (maximum: 1, minimum: 0)
Control (saline)	-	12	3.00 (maximum: 5, minimum: 1)
NF κ -B decoy (centrifugal enclosure)	25.4 μ g/rat	12	1.00 * (maximum: 5, minimum: 0)
NF κ -B decoy (mixture)	25.4 μ g/rat	12	2.00 (maximum: 5, minimum: 1)
Prednisolone	3 mg/kg \times 2	12	1.00 ## (maximum: 3, minimum: 0)

Saline and NF κ -B decoy were administered intrarectally at the volume of 0.75 mL/rat. Prednisolone was administered orally at the volume of 5 mL/kg for 6 days. Each value represents the median (maximum and minimum).
*: P<0.05; Significance difference between control group by Steel test
##: P<0.01; Significance difference between control group by Mann-whitney test

以上の結果から、新規に作成したマスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造したバイオナノ粒子に NF κ B デコイ核酸を封入したサンプルには、治療効果があることが明らかとなった。プレドニゾロン投与群との比較では、体重増加の面では優位性が高く、炎症スコアの比較では同等かやや下回るレベルであった。ただし、プレドニゾロンの投与は、毎日の連続投与であるのに対して、バイオナノ粒子の投与は TNBS 処理後 1 日後の単回投与のみである。また、体重回復の面では、プレドニゾロンでは明らかな鈍化が認められることから、既存薬であるプレドニゾロンよりも、バイオナノ粒子に NF κ B デコイ核酸を封入した治療薬の方が、優位性が有ると考えられる。今後、プレドニゾロンでは効果が認められない重症モデルを使用して治療効果の比較・検討を行って、どの程度の優位性が有るのかについて明らかにしていく予定である。

また、本検討においてはバイオナノ粒子に

NF κ B デコイ核酸を封入した治療薬は、単回投与のみであるが、実際の治療においては連続投与を行う事が予測される。そのため、連続投与時における治療効果の増強や、治療薬の用量設定などについても検討を行う必要がある。更に、直腸内投与ではなく静脈内投与や、経口投与を行う事が出来るような製剤の開発により、使用が簡便で、かつ有効性が高い治療薬とすることを目指して研究を行っていく予定である。

D. 結論

本年度の研究では、直径 200 ナノメートルから 300 ナノメートルのバイオナノ粒子である HVJ-エンベロープベクターの臨床応用を開始するために必要な製造用材料の整備とデータの取得を行った。

製造用材料の整備としては、バイオ医薬による臨床応用の開始に必要である、確認申請での承認を得るためのマスターウイルスバンクの整備を行った。本バンクの整備は、昨年度に整備したマスター細胞バンクと併せて、確認申請の書類作成上必須となる材料であり、この整備により臨床応用に向けた準備を進める事が出来た。

また、整備を行った材料により製造を行ったバイオナノ粒子について、生産効率、安全性、有効性、それぞれの指標で評価を行った結果、いずれの項目においても従来使用していた材料で製造を行ったサンプルと比較して、同等以上の性能を示す事が明らかとなった。特に、安全性の評価において向上が認められ

た事は、臨床開発を開始する上で大きなメリットになると考えられる。また、生産効率の向上は、製造コストが高額であることが問題となっているバイオ医薬の開発を促進する上重要な結果である。

今後は、並行して進めている癌免疫療法剤としての開発を念頭において、GLP 体制下で更に詳細な安全性に関する検討を行なって、臨床応用開始のために必要な安全性に関するデータを取得すると共に、有効性についても他の抗癌剤との比較試験を行って優位性を示すデータの取得を行う予定である。

E. 健康危険情報

特になし。HVJ を不活性化して作成した HVJ エンベロープベクターは全く感染性がないことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 「バイオナノ粒子による新規癌免疫療法の開発」

分担研究者 福村正之、河野博和 ジェノメディア株式会社 応用研究部

研究要旨 本年度の研究では、バイオナノ粒子である HVJ-エンベロープベクター (HVJ-E) による新規癌免疫療法の開発について検討を行った。癌細胞を移植した腫瘍動物モデルでの検討で、抗癌剤封入 HVJ-E を腫瘍組織に投与する事で、癌細胞を死滅させることが出来る上に、長期間持続性のある癌免疫を誘導できることが明らかとなった。そこで、そのメカニズムに関して検討を行ったところ、HVJ-E による治療により、癌細胞に対して特異的な細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導、樹状細胞 (DC) の分化・成熟の誘導、サイトカインの誘導の 3 種類のメカニズムにより長期持続性の癌免疫が誘導される事が明らかとなった。また、昨年度の研究で使用していた抗癌剤である、ブレオマイシン、ペプロマイシン以外の抗癌剤との併用でも、抗腫瘍効果の増強が認められることが明らかとなった。これらの結果から、バイオナノ粒子である HVJ-E を利用した治療により、従来の癌免疫療法において解決すべき課題となっていた癌免疫の長期維持が可能になることが示唆された。

A. 研究目的

HVJ-E は、HVJ (センダイウイルス) のエンベロープ (外殻) 部分のみを生体高分子や低分子医薬品のデリバリーシステムとして利用する純国産の非ウイルスベクターであり、直径 100~300 ナノメートルのバイオナノ粒子である。本ベクターシステムは、従来の低分子医薬品から遺伝子医薬、抗体医薬などの生体高分子まで幅広い治療用分子を封入して、標的となる疾患細胞に高効率にデリバリー出来るシステムである。そのため、今後汎用性の高い次世代のドラッグデリバリーシステムになると期待されている。

昨年度までの研究により、バイオナノ粒子である HVJ-E へ抗癌剤を封入する事で、癌細胞に対する吸収効率が向上し、単回投与により腫瘍縮小効果が認められる事が明らかとなった。この結果から、本バイオナノ粒子が抗癌剤の副作用低減と有効性の向上に有用であることが示唆された。

そこで、本年度の研究では HVJ-E ベクターによる癌治療に関して、反復投与による腫瘍縮小効果の増強、その有効性の持続期間、免疫誘導などの薬効メカニズム、従来とは異なる種々の抗癌剤との併用効果について基礎検討を行なった。また、実際の臨床応用を想定して、新規癌免疫療法に対して治療効果が高

いと予測される膀胱癌への適用を目指して、抗癌剤と HVJ-E との併用プロトコルを想定し、その有効性評価に関する予備検討を開始した。

B. 研究方法

(1) 癌免疫誘導の評価

免疫誘導について検討を行うため、マウスの同系癌細胞を用いた腫瘍モデルを作製して抗腫瘍効果と癌免疫の有効性評価に使用した。材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させて 3～5mm のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを 3 日～4 日間隔で 3 回連続投与を行い、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。併用剤としては、抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを投与する前日に、シスプラチンの腹腔内投与を行った。その後、初回移植と反対側の皮内に、Balb/c マウス由来の癌細胞株 (CT-26 または Meth A) を再移植して、癌細胞に対する特異的な免疫誘導効果について、腫瘍径を指標として検討した。

(2) HVJ-E による細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導に関する検討

腫瘍内へ浸潤する免疫細胞の同定と、CTL アッセイを行なうために、上記と同様にマウスの同系癌細胞を用いた腫瘍モデルを作製した。材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背

部皮内に移植・生着させて 3～5mm のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを 3 日～4 日間隔で 3 回連続投与を行った。併用剤として、抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを投与する前日に、シスプラチンの腹腔内投与を行った。

腫瘍組織への浸潤細胞は、腫瘍内に抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを 1 回投与後に、腫瘍組織を摘出して凍結切片を作製し、免疫細胞の表面マーカーを免疫染色法で染色する事で同定した。

また、CTL 活性については、腫瘍内に抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを 3 回投与後 1 日目に脾臓を摘出し、定法に従って単核球細胞を調製して、CT-26 と種々の比率で混合してインキュベーションを行い、CTL により傷害を受けた CT-26 細胞数を測定する事で評価した。

(3) 誘導された癌免疫の継続期間の検討

癌免疫の持続期間について検討を行うため、上記と同様にマウスの同系癌細胞を用いた腫瘍モデルを作製した。材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させて 3～5mm のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを 3 日～4 日間隔で 3 回連続投与を行い、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。併用剤としては、抗癌剤 (プレオマイシン) を封入したベクターを投与する前日に、シスプラチンの腹腔内投与を行っ

た。その後、腫瘍消失マウスについて25週間飼育を継続して、癌細胞に対する免疫に持続性があるかを検討した。

初回移植と反対側の皮内に、Balb/c マウス由来の癌細胞株 (CT-26) を再移植して、癌細胞に対する特異的な免疫の持続期間について、腫瘍径を指標として検討した。また、並行して腹腔内へ Balb/c マウス由来の癌細胞株 (CT-26) を再移植して飼育を継続し、腸間膜、腹膜、臓器への癌細胞の生着の有無を検討する事により、異所性の癌再発に対しても免疫誘導の効果が長期間有効であるかを検討した。

(4) HVJ-E による癌免疫誘導メカニズム

サイトカイン産生と樹状細胞の分化・成熟の誘導についての評価を行なった。サイトカイン産生の測定には、上記の Balb/c マウスと大腸癌細胞株 (CT-26) による腫瘍モデルを使用した。上記と同様の方法で、Balb/c マウスの背部皮内に CT-26 細胞を移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、HVJ-E ベクターの腫瘍内投与 (3日～4日間隔で3回連続投与) とシスプラチンの腹腔内投与 (単回投与) を併用して治療を行った。HVJ-E ベクターを3回投与後1日目にマウスより脾臓を摘出し、定法に従って単核球細胞を調製して培養した。培養脾細胞に対して HVJ-E を用いて刺激を行い、上清に分泌されたサイトカインを ELISA 法により測定した。

樹状細胞の分化・成熟の誘導に関しても定法に従って検討を行った。マウス骨髄細胞より樹状細胞を定法に従って調製して使用した。

培養樹状細胞に対して、HVJ-E を 100HAU～10,000HAU (赤血球凝集活性の単位で1HAUは約100万個のベクター粒子に相当) 添加して刺激を行い、分化・成熟について表面分子の発現 (CD80、CD86、MHC class II) を指標にして、フローサイトメトリー法により検討した。陽性コントロールとしては、LPS (1 ug/ml) を使用した。

(5) HVJ-E と抗癌剤との併用効果

シスプラチンとの併用効果の検討と、アドリアマイシンとの併用効果の検討については異なるマウス腫瘍モデルを用いて検討した。

シスプラチンと HVJ-E の併用効果の検討では、Balb/c マウスと大腸癌細胞株 (CT-26) による腫瘍モデルを使用した。上記と同様の方法で、Balb/c マウスの背部皮内に CT-26 細胞を移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、HVJ-E ベクターの腫瘍内投与 (3日～4日間隔で3回連続投与) とシスプラチンの腹腔内投与 (単回投与) を併用して治療を行った。抗癌剤を封入していない HVJ-E ベクターを3日～4日間隔、3回連続で腫瘍内に投与した。併用するシスプラチンについては、1mg/kg または 3mg/kg の用量で、ベクターを投与する前日に腹腔内投与 (単回投与) を行った。投与開始後21日間腫瘍径を測定して、抗腫瘍効果を検討した。

アドリアマイシンと HVJ-E の併用効果の検討では、膀胱癌による腫瘍モデルを使用した。

材料としては B6 マウス由来の膀胱癌細胞株 (MB49) を用い、B6 マウスの背部皮内に移植・生着させて5～7mmのサイズになるまで腫

瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤（プレオマイシン）を封入していない HVJ-E ベクターを3日～4日間隔で3回連続投与を行った。また、併用を行なったアドリアマイシンに関しても、1回の投与あたり100ugを同様に腫瘍内へ3日～4日間隔で3回連続投与した。

それぞれの条件について、投与開始後20日間腫瘍径を測定し、それを指標として抗腫瘍効果の検討を行った。

(6) 倫理上の配慮

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、研究所の所在地である独立行政法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業技術総合研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

C. 研究結果および考察

(1) 癌免疫誘導の評価

昨年度までの研究により、抗癌剤をHVJ-Eベクターへ封入する事で癌細胞に対する吸収効率が向上し、単回投与により腫瘍縮小効果が認められる事が明らかとなった。そこで、本年度は反復投与による腫瘍縮小効果の増強

と、その薬効メカニズムの検討を行った。

まず、反復投与の効果を検討するために、大腸癌細胞（CT-26）を皮下移植した担癌マウスに抗癌剤封入HVJ-Eベクターを単回或いは3回の反復投与を行い、腫瘍縮小効果の増強を検討した。その結果、単回では腫瘍の消失が認められたのは20%のマウスであるのに対して、反復投与では80%のマウスで腫瘍消失が認められた（図-1）。

図-1. HVJ-Eに封入したプレオマイシンによる抗腫瘍効果（薬効評価のプロトコール）

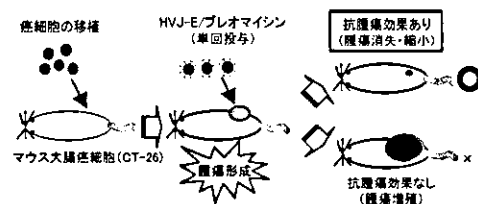
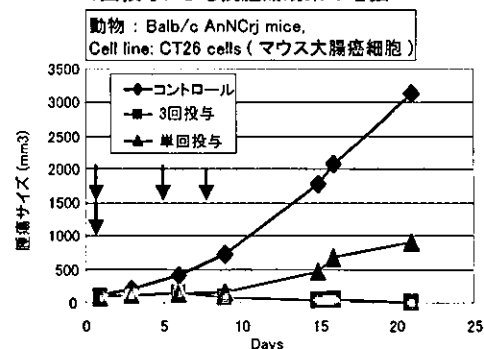
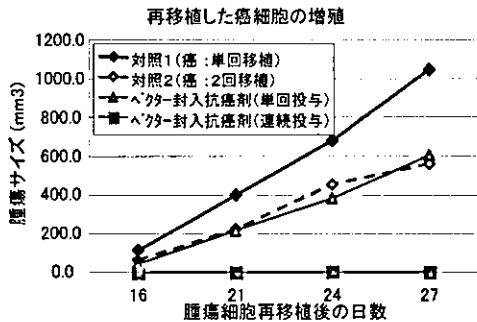


図-1. 抗癌剤封入HVJ-Eベクターの抗腫瘍効果 3回投与による抗腫瘍効果の増強 -



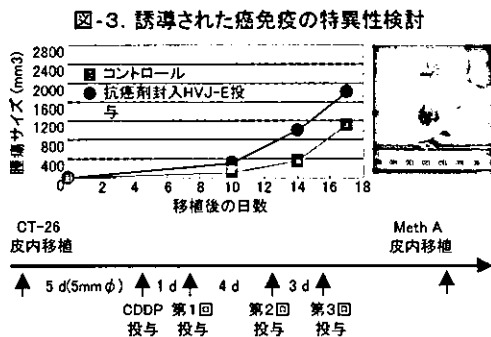
次に、抗腫瘍効果の特異性について検討した。抗癌剤封入HVJ-Eベクターにより、腫瘍の縮小だけでなく消失が認められた事から、その効果は抗癌剤の吸収促進だけでなく、癌免疫を誘導していると考えられた。そこで、腫瘍の消失が認められたマウスに対して癌細胞の再移植を行ったところ、80%のマウスで生着の拒絶が認められた（図-2）。

図-2. HVJ-E封入プレオマイシン連続投与による癌免疫の誘導



癌細胞の初回移植部位への連続投与により癌免疫が誘導された

この結果から、抗癌剤封入 HVJ-E ベクターの投与により、癌細胞が死滅するだけでなく、癌免疫が誘導される事が示唆された。そこで、誘導された癌免疫が特異的であるかを検討するため、初回移植癌細胞である CT-26 の腫瘍が消失したマウスに対して、同系の Balb/c マウス由来で他種類の癌細胞である Meth A 細胞を移植して、生着と腫瘍形成について検討した。その結果、全例で移植した Meth A 細胞により腫瘍の形成が認められ、その増殖速度は CT-26 細胞による腫瘍が消失したマウスの方が、無処置マウスへ Meth A 細胞を移植した場合よりも早くなる事が明らかとなった (図-3)。



以上の結果から、抗癌剤を封入した HVJ-E ベクターを腫瘍内に投与する事により、腫瘍縮小効果が認められる上に、癌細胞に対する免疫が誘導される事が明らかとなった。また、HVJ-E ベクターによる誘導される免疫は初回

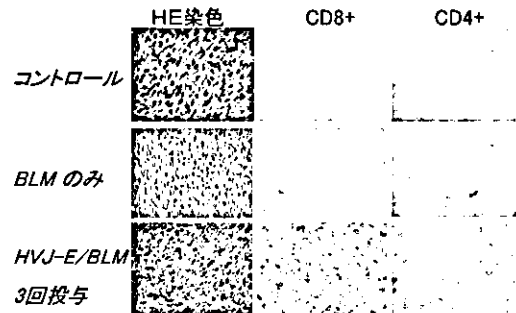
の腫瘍形成に用いた癌細胞に対して特異的である事が明らかとなった。これらの結果から、HVJ-E ベクターにより、新規免疫療技術を開発できる事が示唆された。

(2) HVJ-E による細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導に関する検討

HVJ-E による治療により、癌免疫が誘導される事が示唆されたため、そのメカニズムに関する検討を行った。

まず、抗癌剤封入 HVJ-E ベクター投与後に、そのような免疫細胞が腫瘍組織へ浸潤するかについて、腫瘍組織切片の免疫染色により検討した。その結果、抗癌剤封入 HVJ-E ベクターを反復投与した場合は、抗癌剤のみの投与や、単回投与と比較して CD8 陽性 T リンパ球の浸潤が増強される事が明らかとなった。また、その他の免疫細胞として CD4 陽性 T リンパ球や、好中球などの細胞についても腫瘍組織内への浸潤が認められた (図-4)。

図-4. 腫瘍組織への浸潤細胞の検討 (ベクター投与後の腫瘍組織を免疫染色)

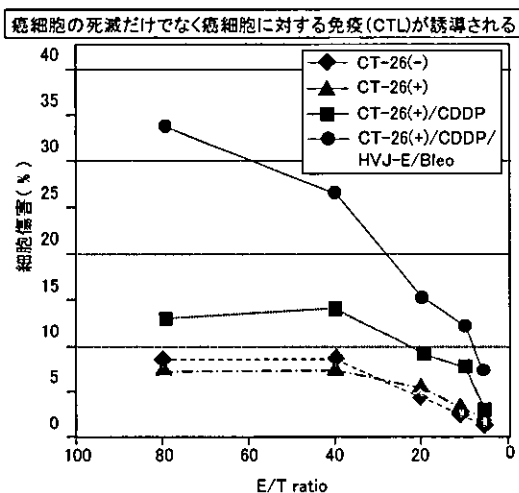


細胞性免疫に関するCD8陽性Tリンパ球の浸潤が誘導される

抗腫瘍効果には、癌細胞に対する細胞性免疫の誘導が重要であり、その作用には CD8 陽性 T リンパ球による癌細胞の傷害性が関与する事が知られている。そこで、癌細胞特異的

な細胞傷害性を持つTリンパ球の誘導が認められるかを検討するために、細胞障害性Tリンパ球(CTL)アッセイを行った。その結果、癌細胞(CT-26)の移植、癌細胞(CT-26)の移植と抗癌剤(シスプラチン)のみの投与では癌細胞に対するCTLの誘導が認められないのに対して、癌細胞(CT-26)を移植したマウスに対して、抗癌剤(ブレオマイシン)封入HVJ-Eベクターと抗癌剤(シスプラチン)を併用して投与を行った場合には、CTLの誘導が認められる事が明らかとなった(図-5)。

図-5. HVJ-Eベクターによる癌細胞に対する免疫誘導



これらの結果から、癌細胞を移植して腫瘍形成を行なったマウスに対して、抗癌剤による治療のみを行なった場合には、抗腫瘍効果は認められるが、腫瘍内への免疫細胞の浸潤の誘導が不十分であり、癌細胞に対する免疫誘導による治療効果が期待できない事が明らかとなった。一方、抗癌剤とHVJ-Eベクターを併用した場合には、腫瘍縮小効果が認められる上に、腫瘍内への免疫細胞の浸潤の誘導が起こる事で、CTLの活性化が起こる事で、免疫による治療効果が期待できる事が明らかとなった。従って、抗癌剤とHVJ-Eとの併用

により新規癌免疫療法を開発できる事が示唆された。

(3) 誘導された癌免疫の継続期間の検討

癌免疫療法に関する問題点として、誘導された癌免疫の消失が早期に起こる現象が挙げられている。そのメカニズムとしては、制御Tリンパ球(Treg)による、癌免疫の抑制が報告されている。そこで、HVJ-Eと抗癌剤の併用により誘導された癌免疫の持続期間について検討した。

Balb/cマウスの背部皮内に大腸癌細胞株(CT-26)を移植・生着させて腫瘍形成させた後に、シスプラチンの腹腔内単回投与を行った後に、腫瘍内に抗癌剤(ブレオマイシン)を封入したベクターを3回連続投与を行う事で、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。上記試験においては、腫瘍消失後すぐに癌細胞の再移植を行なったが、本検討では約6ヶ月(25週)後に癌細胞の再移植を行って、癌免疫が維持されているかを検討した。癌細胞(CT-26)再移植経路としては、皮内に加えて腹膜播種モデルとして腹腔内移植についても検討した。

図-6の写真に示すように、皮内への癌細胞再移植での生着を検討した結果、初回癌細胞移植による腫瘍消失直後に再移植した場合と同様に、癌細胞の生着拒絶により腫瘍形成が阻害された。この結果から、HVJ-Eと抗癌剤の併用により誘導された癌免疫は一過性に消失するのではなく持続性があり、少なくとも6ヶ月以上維持される事が明らかとなった。

図-6. HVJ-E封入プレオマイシンによる癌免疫の誘導
(評価プロトコール)

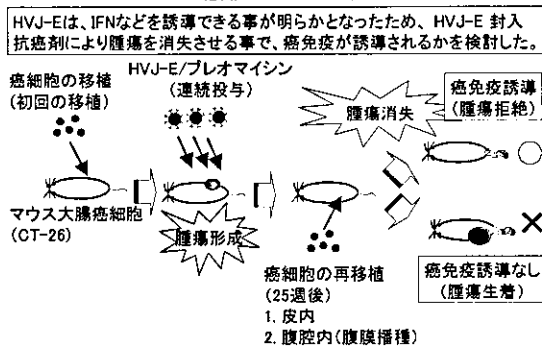
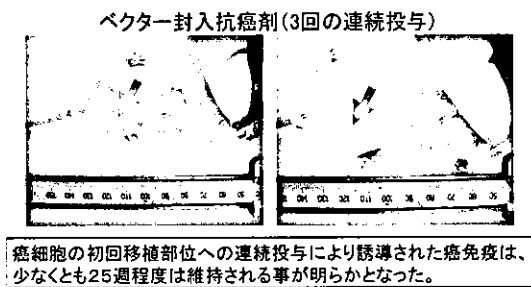


図-6. HVJ-Eによる癌免疫の長期持続性検討(1)



そこで、異所性の再発モデルである腹膜播種モデルを用いて同様の検討を行ったところ、皮内の再移植の場合と同様に、癌細胞の生着が阻害される事が明らかとなった (図-7)。

図-7. HVJ-Eによる癌免疫の長期持続性検討(2)



本検討では、シスプラチンとプレオマイシンとを併用した場合でも、そのような癌免疫の誘導は認められず、HVJ-E にプレオマイシン

を封入して投与した場合のみ癌細胞生着の阻害が認められた事から、有効性の高い癌免疫の誘導には、HVJ-E の投与が必須である事が示唆された。

以上の結果から、抗癌剤と HVJ-E の投与により腫瘍を消失させた場合には、抗癌剤のみの投与では認められない、癌免疫の誘導が起こり、その効果は長期間継続する事が明らかとなった。

(4) HVJ-E による癌免疫誘導メカニズム

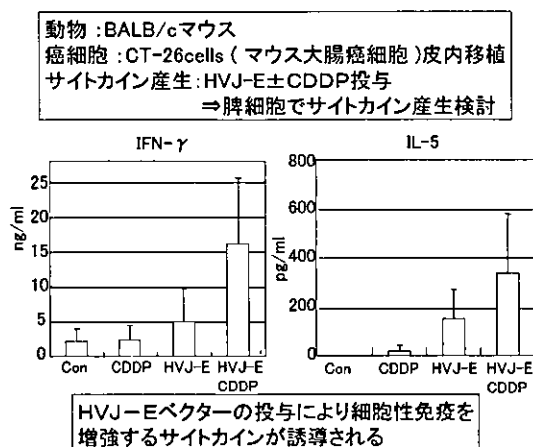
癌細胞に対する免疫誘導と維持には、腫瘍を形成する癌細胞の癌抗原が異物として認識される事と、Toll Like Receptor を介する免疫の活性化が重要である事が知られている。

前者については、細胞傷害性 T 細胞や制御 T 細胞など T リンパ球が関与しており、後者については、末梢性或いは骨髄性の樹状細胞の機能が重要である事が示唆されている。そこで、抗癌剤と HVJ-E の投与による癌免疫活性化のメカニズムを明らかにするため、それぞれの免疫機能に関する検討を行った。

まず、T リンパ球の活性化に関しては、癌免疫誘導時に産生されるサイトカインの種類が重要であると考えられたため、HVJ-E の腫瘍内投与により誘導されるサイトカインについて検討した。Balb/c マウスと大腸癌細胞株 (CT-26) による腫瘍モデルを使用して、HVJ-E ベクターの腫瘍内への連続投与 (3回投与) とシスプラチンの腹腔内投与 (単回投与) を行った後に、マウスより脾臓を摘出して、HVJ-E の刺激により単核球細胞からのサイトカイン産生量を検討した。その結果、HVJ-E

のみを投与した場合と比較して、シスプラチンと HVJ-E を併用した場合には、細胞性免疫を誘導する Th1 タイプのサイトカインである IFN γ の誘導が増強される事が明らかとなった (図-8)。

図-8. HVJ-E の腫瘍組織内投与によるサイトカイン産生誘導

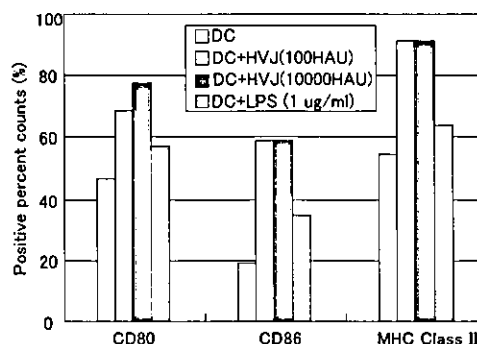


また、液性免疫の誘導に関与する Th2 タイプのサイトカインである IL-5 も HVJ-E の投与により産生が誘導される事が明らかとなった (図-8)。以上の結果から、抗癌剤と HVJ-E の併用により、特に細胞傷害性 T 細胞の活性化に関与するサイトカインが誘導される上に、抗体産生に関与するサイトカインについても産生誘導が起きる事が明らかとなった。

次に、樹状細胞の分化・成熟が HVJ-E により誘導されるかについて検討した。マウス骨髄細胞より調製した樹状細胞に対して、種々の濃度の HVJ-E を添加して、3 種の分化成熟マーカー (CD80、CD86、MHC class II) を発現する細胞の割合を、フローサイトメトリー法により解析した。その結果、低用量 (100HAU、赤血球凝集活性の単位で 1 HAU は約 100 万個の粒子に相当) においても、樹状細胞の分化・成熟活性が強いことが知られている LPS (1

ug/ml) よりも高い分化・成熟誘導活性がある事が明らかとなった (図-9)。

図-9. HVJ-E ベクターによる樹状細胞の分化誘導



以上の結果から、抗癌剤と HVJ-E の併用により誘導される癌免疫には、サイトカイン産生による細胞傷害性 T 細胞の活性化と、樹状細胞の分化・成熟の誘導が関与する事が明らかとなった。癌免疫の消失には、制御 T 細胞の活性化が関与している事が示唆されているが、抗癌剤と HVJ-E の併用により誘導される癌免疫は、長期持続型であることから癌免疫は誘導されるが、制御 T 細胞の活性化は誘導されないか或いは抑制されている事が示唆される。今後は、制御 T 細胞活性化が抑制されているメカニズムについて詳細に検討する事で、より有効性、持続性が高い癌免疫療法の開発が可能になる。

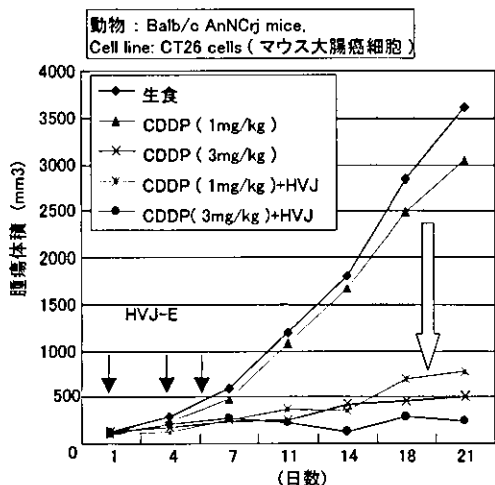
(5) HVJ-E と抗癌剤との併用効果

従来の研究では、主にプレオマイシン封入 HVJ-E とシスプラチンの併用効果について検討を行った。HVJ-E の癌免疫誘導効果を利用した治療技術を開発するためには、他の抗癌剤との併用効果についても検討を行う必要がある。そこで、HVJ-E とアドリマイシン、或いはシスプラチンとの併用効果について検

討を行った。

先ず、HVJ-E とシスプラチンとの併用効果の検討を行った。Balb/c マウスと大腸癌細胞株 (CT-26) による腫瘍モデルを用いて、抗癌剤を封入していない HVJ-E については3回の腫瘍内投与を、シスプラチンについては単回の腹腔内投与 (投与) を行って併用効果を検討した。シスプラチンの用量については、1mg/kg または 3mg/kg の2種の条件で、投与開始後21日間観察を行い、腫瘍径を指標にして抗腫瘍効果を検討した。その結果、単独では抗腫瘍効果が認められない低用量のシスプラチン (1mg/kg) と HVJ-E を併用する事で、強い抗腫瘍効果が得られる事が明らかとなった (図-10)。高用量のシスプラチン投与群では、HVJ-E との併用効果は軽微であった (図-10)。

図-10. HVJ-Eベクターによる抗癌剤の有効性増強



HVJ-Eとの併用により抗癌剤の用量を低下させる事が出来る

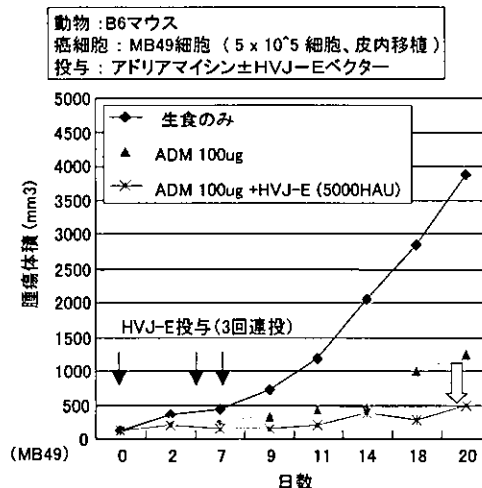
しかし、これまでの検討から抗癌剤のみの投与では、癌免疫の誘導効率が低い事から、癌の再発防止のためには HVJ-E との併用が有効であると考えられる。

次に、アドリアマイシンと HVJ-E の併用効

果を検討した。本件等では、臨床応用を念頭において膀胱癌による腫瘍モデルを使用した。

B6 マウスと、同系の膀胱癌細胞である MB49 を用い、皮内移植による腫瘍モデルを構築して、HVJ-E とアドリアマイシンの併用効果について検討を行った。シスプラチンの場合と同様に、腫瘍内に3回抗癌剤 (ブレオマイシン) を封入していない HVJ-E ベクターを連続投与し、同時にアドリアマイシンに関しても、3回腫瘍内へ連続投与して、併用による抗腫瘍効果の増強を検討した。投与開始後20日間腫瘍径を測定し、それを指標として抗腫瘍効果の検討を行った結果、シスプラチンの場合と同様に HVJ-E との併用により、アドリアマイシンの抗腫瘍効果が増強される事が明らかとなった (図-11)。

図-11. 膀胱癌に対するHVJ-Eとアドリアマイシンの相乗効果



以上の結果から、HVJ-E と抗癌剤の併用効果は、ブレオマイシンに限定される現象ではなく、種々の抗癌剤に対して有効である事が明らかとなった。特に、膀胱癌においてはアドリアマイシンの膀胱内投与では、一時的に腫瘍の消失が認められるが再発率が高い事が明らかとなっている。本研究により、抗癌剤

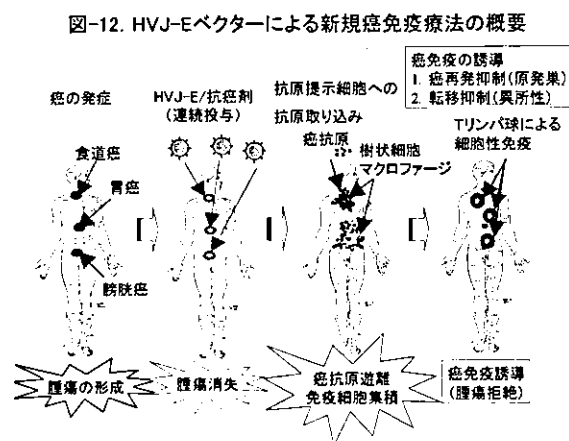
と HVJ-E の併用により、腫瘍縮小効果が増強されるだけでなく、有効性、持続性の高い癌免疫が誘導される事が明らかとなった。そのため、膀胱癌の治療にアドリアマイシンと HVJ-E を併用する事で、高い治療効果を得る事が出来ると示唆される。

また、他の癌についても現在抗癌剤と HVJ-E との併用効果を検討中であり、今後種々の癌への適応を目指して開発を進めていく予定である。

D. 結論

現在、抗癌剤の併用療法や、抗癌剤と放射線療法との併用療法は、副作用が高い事や転移・再発の問題があることから、依然として有効性の高い新規癌治療技術が切望されている。

本研究では、新規癌治療技術としてバイオナノ粒子である HVJ-E と低用量の抗癌剤との併用による新規癌免疫療法の開発を行なった。その治療技術の概要を図-12 に示す。



本年度の研究により、HVJ-E と抗癌剤との併用により誘導される癌免疫は長期継続型で

あり、従来の癌免疫療法の課題となっていた持続性の問題を解決できる可能性がある事が示唆された。また、癌免疫の誘導メカニズムとしては、樹状細胞の分化・成熟の誘導、Th1タイプのサイトカインの産生、癌細胞に対する特異的な CTL の誘導が重要である事が明らかとなった。更に、HVJ-E の作用は種々の抗癌剤に対して有効であり、汎用性の高い治療法となる事が示唆された。

現在のところ、免疫療法が特に必要とされる膀胱癌を対象にして、臨床開発を進める事を想定しているが、更に適応拡大を目指して開発を行い、有効性・安全性・汎用性が高い新規癌免疫療法剤として製品化することを目指している。今後は、対象となる癌の種類を想定した動物モデルを用いて、薬効評価・安全性評価を中心に検討を行なう予定である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表 : 現在投稿準備中
2. 学会発表 : なし

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 : “ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント”
特願 2004-108599 (国内出願中)
2. 実用新案登録 : なし

III. 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
Yasufumi Kaneda	Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats.	The FASEB Journal	18(1)	212-214	2004
Yasufumi Kaneda	New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particle.	Current Drug Targets	4	599-602	2003
Yasufumi Kaneda	The HVJ-envelope as an innovative vector system for cardiovascular disease.	Current Gene Therapy	4	183-194	2004
Yasufumi Kaneda	Biocompatible polymer enhances the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> transfection efficiency of HVJ envelope vector.	The Journal of Gene Medicine			in press
Yasufumi Kaneda	Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin.	The Journal of Gene Medicine			in press

IV.研究成果の刊行物・別刷

Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats

Kazuo Oshima,^{*,†} Munehisa Shimamura,^{*} Shinya Mizuno,[‡] Katsuto Tamai,^{*} Katsumi Doi,[†] Ryuichi Morishita,^{*} Toshikazu Nakamura,[‡] Takeshi Kubo,[†] and Yasufumi Kaneda^{*}

^{*}Division of Gene Therapy Science, [†]Department of Otolaryngology and Sensory Organ Surgery, and [‡]Division of Biochemistry, Department of Oncology, Biomedical Research Center B7, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Corresponding author: Yasufumi Kaneda, Division of Gene Therapy Science, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: kaneday@gts.med.osaka-u.ac.jp

ABSTRACT

Hearing impairment, which is the most prevalent sensory deficit of human beings, needs a breakthrough in therapeutic technologies. One technology is the usage of a vector system to reach the inner ear, and another is by a therapeutic molecule. Here we developed a novel gene therapy strategy by combining hepatocyte growth factor (HGF) with hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) vector. When HVJ-E containing human HGF gene was injected intrathecally into the cerebrospinal fluid via cisterna magna of rats, the vector reached the inner ear region, and human HGF gene expression was detected in the spiral ganglion cells (SGCs) of the inner ear. Expression of endogenous rat HGF and its receptor, c-Met, was also induced in SGCs by human HGF. Kanamycin treatment results in hearing impairment by inducing degeneration of hair cells (HCs) and apoptosis of SGCs in rats. By HGF gene transfer before kanamycin treatment, both loss of HCs and apoptosis of SGCs were prevented. Furthermore, hearing function, evaluated by auditory brainstem response, was maintained at a normal level. When HGF gene transfer was performed 2 wk after kanamycin treatment, hearing impairment was significantly recovered. These results indicate a novel and effective therapeutic strategy against sensorineural hearing impairment.

Key words: hair cell • spiral ganglion • cochlear implants • gene therapy

Hearing impairment is the most prevalent sensory deficit of human beings, affecting more than 1 in 10 individuals. Hearing impairment can be caused by a variety of factors: infection, noise, aging, and ototoxic substances such as aminoglycosides and cisplatin (1). These substances exhibit deleterious effects on the hair cell (HC) in the organ of Corti and the spiral ganglion cell (SGC; refs 2, 3). HCs are the mechanosensory epithelial cells that convert auditory stimuli to electric signals, and SGCs are the primary afferent auditory neurons located in the Rosenthal's canal within the modiolus of the cochleas. HCs and SGCs play a direct role in mediating auditory stimuli to the central auditory neurons. The loss of HC prevents the transduction of acoustic signals, leading to a retrograde neuronal degeneration of SGC, in which a

loss of SGC exacerbates hearing dysfunction (3). In general, HC and SGC in mammals are believed not to have the capacity for postembryonic cellular mitosis to generate new HC and SGC. Therefore, the loss of either HC or SGC results in intractable hearing impairment.

For the treatment of the severely deaf, cochlear implants have been implanted in the cochleas of many patients with severe/profound deafness and have been shown to provide effective results. The electrode of the cochlear implant is inserted into the fluid space of the inner ear, bypassing damaged or absent HCs, thus delivering an electrical stimulus directly to SGCs. This device provides significant improvement of the quality of sound perception. However, the effectiveness of cochlear prosthesis depends on the quality and amount of the remaining auditory nerve, and the state of their degeneration severely diminishes the hearing benefits obtained from the prosthesis. Previous studies have shown a clear relationship between the total number of viable auditory neurons available for stimulation and the performance of subjects receiving cochlear implants (4). These data have indicated that stable and satisfactory results of the implant depend on the development of a therapeutic strategy for preserving or regenerating the auditory neurons, mainly SGCs. Recent studies have revealed that some neurotrophic factors, such as neurotrophin-3 (NT-3), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), improve the survival of inner ear auditory neurons, including SGCs (5–11).

Hepatocyte growth factor (HGF), which was originally identified as a potent motogen for hepatocytes and cloned in 1989 (12, 13), has since been shown to be a pleiotropic cytokine that exhibits mitogenic, motogenic, and morphogenic activities toward a variety of cells including neural cells. Both HGF and c-Met, a HGF receptor with a membrane-spanning tyrosine kinase, are expressed in various regions of the brain (14, 15) and peripheral neurons (16, 17). More importantly, functional coupling between HGF and c-Met plays important roles in the development and maintenance of neural system (18–20). Previous studies have revealed that *HGF* gene transfer could prevent postischemic delayed neuronal death in the hippocampus (21–24). Altogether, these studies suggest that HGF functions as a neurotrophic factor to maintain the physiological structure and function of the nervous system. HGF, however, has not been used for the treatment of hearing impairment to date. The expression of HGF and c-Met was detected in the epithelial cells, neural cells, and mesenchymal cells in the embryonic cochlea of rats by immunohistochemical analysis using an antibody specific for each molecule (unpublished data). Moreover, we found that the expression of c-Met in SGC was enhanced when rats were treated with kanamycin (25). We therefore hypothesized that HGF may play an important role in the regulation of the hearing function. Hence, in this study, we investigated the effect of HGF on HCs, SGCs, and hearing function before and after aminoglycoside insult to provide a novel strategy for prevention as well as improvement of hearing impairment. The animal model of deafness induced by aminoglycosides is the most commonly used experimental model, whereby the damage of HCs is followed by the loss of SGCs (26, 27). Because the loss of HC induced by aminoglycosides is dose dependent, animal models with various extents of hearing impairment can be established (26, 27). As described above, in most cases of hearing impairment, the cause is directly or indirectly related to the degeneration or the death of HCs and SGCs (4). Hence, kanamycin was used in this investigation to mimic the most likely clinical circumstances of hearing impairment.

In the present study, to achieve a minimally invasive therapeutic approach for gene transfer to the inner ear, we attempted to transfer a novel nonviral vector, hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) vector (28), containing marker genes (*lacZ* or luciferase gene), into the

cerebrospinal fluid (CSF) via the cisterna magna. The HVJ-E vector is effective for gene transfer to neurons both in vitro and in vivo. When the HVJ-E vector containing a reporter gene was transfected to cultured neuronal cells or delivered intrathecally to CSF, gene expression was detected in various areas of the CNS (29).

In this study, using this new delivery system, we examined the neuroprotective effect of HGF on the survival of SGCs in a hearing-impaired animal model and investigated the new possibility of gene therapy for the treatment of hearing impairment.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA

pclacZ (9.2 kb) was constructed by inserting a *HindIII-BamHI* fragment of pSV- β -galactosidase (Promega, Madison, WI) into pcDNA3 (5.4 kb; Invitrogen, San Diego, CA) at the *HindIII* and *BamHI* sites. pCMV-luciferase-GL3 (pcLuc-GL3: 7.4 kb) was constructed by cloning the luciferase gene from the pGL3-basic Vector (Promega) into pcDNA3 (Invitrogen). pVAX1-*hHGF* (5.2 kb) was constructed by inserting the human HGF gene (*hHGF*) into pVAX1 (3.0kb) (Invitrogen) at the *BamHI* and *NotI* sites. Plasmids were purified with the QIAGEN plasmid isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany).

HVJ-E vector

The HVJ-E vector was constructed by incorporating plasmid DNA into inactivated HVJ particles as described previously (28). In short, ultraviolet (UV)-inactivated HVJ (Z strain), 4.5×10^{10} particles, was mixed with 300 μ g of plasmid DNA and 0.3% Triton-X 100. The suspension was then washed with balanced salt solution (BSS: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.6) and centrifuged, and the pellet was resuspended with a final volume of 100 μ l BSS for intrathecal infusion. HVJ-E containing *pclacZ*, pcLuc-GL3, pVAX1-*hHGF*, pcDNA3, or pVAX1 plasmid DNA was used in the present study. The incorporation rate of DNA into HVJ-E was ~15% (28). Total amount administered was 4.5×10^{10} particles of HVJ-E containing 45 μ g plasmid DNA per rat.

Experimental animals and treatment groups

Sprague-Dawley male rats (6 wk of age; 190-210 g) exhibiting a normal Preyer's reflex were obtained from Charles River Japan (Atsugi, Japan). All procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Animal Committee of Osaka University. Animals of all groups were hearing impaired bilaterally by aminoglycoside intoxication as previously reported (1-3). Kanamycin sulfate (Meiji Seika, Tokyo, Japan) was administered daily by subcutaneous injection (400 mg/kg/day) for 14 consecutive days. In the protection experiment, rats were injected intrathecally with either HVJ-E containing pVAX1-*hHGF* (KM + HGF group) or control plasmid (pVAX1) (KM + vector group) on the first day of kanamycin injection. Rats in the KM group did not receive an intrathecal inoculation but only a kanamycin injection. In the therapeutic experiment, all animals were first hearing impaired with kanamycin for 14 days and hearing impairment was confirmed by auditory brainstem response (ABR), and on day 14 (14th day of

kanamycin injection), they were injected intrathecally with HVJ-E containing pVAX1-*hHGF* (KM + HGF group) or pVAX1 (KM + vector group).

In vivo gene transfer to the subarachnoid space

In this study, we employed infusion of an HVJ-E suspension into the cisterna magna of rats for in vivo gene transfer into the CNS and the inner ear. After induction of anesthesia with ketamine (Sankyo) and xylazine (Bayer Ltd.), the head of each animal was fixed in the prone position, and the atlanto-occipital membrane was exposed through an occipitocerebral midline incision for infusion into the subarachnoid space. A stainless steel cannula (27 gauge; Becton-Dickinson) was then introduced into the cisterna magna (subarachnoid space). After withdrawal of the CSF (100 μ l) for confirmation of the cannula position and to avoid increased intracerebral pressure, HVJ-E (100 μ l) containing a reporter gene (pLuc-GL3, *pclacZ*), *hHGF* (pVAX1-*hHGF*), or a control vector (pVAX1, pCDNA3) was infused at a rate of 50 μ l/min. Subsequently, the animals were placed in a "head down" position for 30 min. All rats showed no signs of weight loss (data not shown) or abnormal behaviors (e.g., shivering, rotation, paralysis, or immobility) after the administration.

***lacZ* expression assay**

On day 7 after intrathecal injection of HVJ-E containing *pclacZ*, which encodes *E. coli* β -galactosidase (β -gal), the rats were killed and the organs harvested from the rats were prepared for X-gal staining as described previously (21).

Assay for luciferase activity

Rats transfected with the luciferase gene were killed under anesthesia 24 h after transfection. Organs (brain, lung, spleen, liver, and cochlea) were harvested and placed individually in 50 ml FALCON tubes. Luciferase activity was measured using a luciferase assay kit (Promega), as described previously (30). Luciferase levels were normalized by determining the protein concentrations of the tissue extracts (31). Luciferase units were expressed as relative light units (RLU) per milligram of tissue protein.

Enzyme-linked immunosorbent assay for human HGF in CSF

CSF (100 μ l) from the rats, isolated 5 and 14 days after the injection of HVJ-E containing *hHGF*, was used for the experiments. The concentration of human HGF and rat HGF in the CSF was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-human and anti-rat HGF antibody, respectively, according to the instructions of the manufacturer (Institute of Immunology, Tokyo, Japan). The antibody against human HGF is specific only for human HGF and not rat HGF, whereas the antibody against rat HGF reacted only with rat HGF but not human HGF.

Histological and immunocytochemical analyses

The rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (250 mg/kg) and perfused transcardially with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. Then the rats were killed by decapitation, and the cochleas were collected. For the immunostaining of SGCs, the cochlea was