

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた
新規治療法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 玉井 克人

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた新規治療法の開発に関する研究

玉井 克人 1

II. 分担研究報告

1. NF κ B decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた重症アトピー性皮膚炎の第2回臨床試験、およびその効果増強のための基礎的研究

玉井 克人 6

2. 角化細胞における dsRNA-TLR-3 経路を介した NF κ B の活性化

橋本 公二 9

3. リポソームによる遺伝子導入増強法の開発

金田 安史 13

4. NDON 外用療法のプロトコール作成および新規核酸医薬の開発に関する研究

森下 竜一 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

IV. 研究成果の刊行物・別冊 23

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた 新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

研究班は、核酸医薬である NFκB decoy oligodeoxynucleotides (NDON) を用いた重症アトピー性皮膚炎治療薬の開発と臨床応用を目的として研究を進めている。平成 16 年度は、重症アトピー性皮膚炎患者の顔面病変に対する NDON 軟膏第 2 回臨床試験を、多施設 2 重盲検のプロトコールで開始した。また、NDON の皮膚透過性亢進により治療効果を増強することを目的として、1) 低侵襲性皮膚角層バリアー除去法の開発、2) 針無し皮下注射器シマジェットを用いた皮膚への遺伝子導入法開発、3) リポソーム・カチオニックゼラチンによる高効率遺伝子導入法開発を行った。さらに、NDON 薬理効果に関する基礎研究として、1) アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギー反応が病態の中心をなす気管支喘息のモデル動物を用いた NDON 効果の検討、2) アトピー性皮膚炎増悪機序における表皮角化細胞 Toll like receptor-3 (TLR-3) を介した NFκB 活性化の関与に関する検討を行った。

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学 医学部皮膚科 教授
金田 安史 大阪大学 大学院医学系研究科 教授
森下 竜一 大阪大学 大学院医学系研究科 教授

A. 研究目的

既存の治療法に抵抗性を示す難治例の少なくない重症アトピー性皮膚炎に対し、これまでになく新しい概念の治療薬である核酸医薬、特に NFκB decoy oligodeoxynucleotides (NDON) を用いた外用薬を開発し、アトピー性皮膚炎に対する新規治療法としての有用性を

検討するとともに、その臨床研究を進めることを本研究班の研究目的とする。NFκB は種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子、アポトーシス関連分子といった、炎症関連遺伝子群の発現を誘導する転写因子である。また最近では、NFκB は炎症に伴う発癌にも関与することが明らかとなり、

NFκB の作用を特異的に抑制する新薬の開発は、多くの臨床的意義を有すると考えられる。NDON は NFκB と特異的に結合する配列 (CCCTAAAGGG) を含む 20 塩基対のオリゴ DNA で、NFκB と結合してその作用を特異的に阻害する。上述したように NFκB が多くの炎症関連遺伝子の発現を誘導することから、NDON はそれら遺伝子の発現を抑制することにより多面的抗炎症作用を発揮すること、さらにその作用特異性故にステロイドに比較して副作用が少ないことが期待される。本研究班は NDON およびその他の核酸医薬の開発とアトピー性皮膚炎に対する臨床応用を研究目的とする。

B. 研究方法

平成 16 年度は、以下の研究を行った。

重症アトピー性皮膚炎の顔面病変を対象とした NDON 軟膏の第 2 回臨床試験：第 1 回 NDON 臨床試験において、NDON が特に重症顔面病変に有効であることが明らかとなったため、玉井および橋本は、第 2 回臨床試験として、アトピー性皮膚炎の重症顔面病変を対象とした NDON 軟膏多施設二重盲検試験を行った。具体的には、20 歳以上 65 歳未満の成人アトピー性皮膚炎患者における重症顔面病変を治療対象とし、0.1%、1% および 1.5% の NDON 軟膏 (基剤は白色ワセリン) を 1 日 2 回 (朝・夕)、3 週間連続塗布し、治療開始前、1、2 およ

び 3 週後に効果、局所及び全身性副作用の有無を検討した。

生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発：皮膚は角層のバリアー機能が極めて良く発達しており、分子量 1,000 を超える分子の通過は困難である。実際に NDON の第 1 回臨床試験では、分子量 12,000 の NDON は搔爬によるびらん局面や顔面などバリアー機能の低い部位以外では十分な治療効果が得られなかった。皮膚炎に対してより有効な核酸医薬を開発するためには、皮膚に高分子 DNA を導入する新たな方法論の開発が必要である。今年度の研究では、玉井は皮膚のバリアーを克服するために、化学的方法論としてケミカルピーリングあるいは酵素学的処理による角層除去法を、森下は物理的にバリアーを透過させる方法として針無し注射器シマジェットを利用した皮膚への遺伝子導入法を、金田は生物学的的方法論として細胞融合能を持つセンダイウイルス (Hemagglutinating Virus of Japan, HVJ) の外被蛋白を利用した新たな遺伝子導入ベクターである HVJ-E とカチオンニックゼラチンの相互作用による新たな遺伝子導入法開発を行った。

NDON 薬理効果に関する基礎的研究：NDON の抗アレルギー作用を確認するため、森下は、アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギー反応が病態の中心である喘息の動物モデルを利用して、吸入に

よる NDON 治療効果を検討した。また、アトピー性皮膚炎が局所の細菌感染やウイルス感染で増悪することから、橋本は、表皮角化細胞における自然免疫、特に TLR-3 刺激と NF κ B 活性化との関係を検討した。

C. 研究結果

重症アトピー性皮膚炎の顔面病変を対象とした NDON 軟膏の第 2 回臨床試験：玉井、橋本は、第 1 回 NDON 軟膏臨床試験の結果を基に、アトピー性皮膚炎重症顔面病変を対象とした第 2 回臨床試験を多施設 2 重盲検プロトコールで倫理委員会に申請し、承認を得た施設から臨床試験を開始した。現在国内 3 施設の大学附属病院皮膚科で臨床試験が進行中である。

生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発：玉井は、グリコール酸および蛋白分解酵素を利用した角質バリアー除去による高分子 DNA 投与方法開発を試みた。ヘアレスラット皮膚を 50%グリコール酸 5 分間処理し、さらに種々の蛋白分解酵素処理を行った後、プラスミド DNA を塗布して遺伝子導入効率を検討した。その結果、単純塗布群に比較してグリコール酸および蛋白分解酵素処置群では遺伝子導入効率が数百倍以上向上することが明らかとなった。また森下は、インシュリン投与に利用されている針無し注射器シマジェットを用

いて皮膚への遺伝子導入効率を検討した。具体的には、lacZ 遺伝子、あるいはルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドをラット皮膚にシマジェットを用いて導入し、その発現効率を、皮膚への遺伝子導入が可能な方法として報告されている naked DNA injection 法と比較検討した。その結果、シマジェットは naked DNA injection 法に比較して約 100 倍の遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった。金田は、新規遺伝子導入ベクターである HVJ-E の遺伝子導入効率をさらに向上させるためにカチオン化ゼラチンとの複合体形成による効果を検討した。その結果、カチオン化ゼラチン及び硫酸プロタミンと HVJ-E との複合体を形成することにより、HVJ-E 単独の数百倍の遺伝子導入効率向上が得られることが明らかとなった。

NDON 薬理効果に関する基礎的研究：森下は、アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギーにより発症する喘息のラットモデルを OVA 抗原刺激により作成し、NDON 溶液を気道内に噴霧することにより抗アレルギー効果を検討した。その結果、NDON は喘息モデルラットの気道抵抗を改善するとともに好酸球浸潤を抑制し、その抗アレルギー作用が確認された。また橋本は、培養ヒト表皮角化細胞の TLR-3 を dsRNA (poly dI \cdot dC) で刺激し、サイトカインの産生誘導プ

ロフィールを検討することでNFκB経路の活性化の有無について検討した。その結果、IκB-βのリン酸化、さらにMIP-1αの産生誘導が確認され、表皮角化細胞でdsRNAによるTLR-3を介したNFκB経路の活性化が示唆された。

D. 考察

本研究班では、平成14年度の研究で、NDONが顔面重症アトピー性皮膚炎治療に有効であること、その効果発現には浸潤肥満細胞のアポトーシス誘導が関与することを明らかにした。また、平成15年度の研究では、アトピー性皮膚炎の顔面に対するその他の外用療法として用いられているタクロリムス軟膏とNDON軟膏の治療効果を、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを利用して比較検討し、両者の治療効果がほぼ同等であること、肥満細胞のアポトーシス誘導はNDONに特異的であることを明らかにした。これらの結果を基にして、平成16年度は第2回NDON軟膏臨床試験を開始した。第1回臨床試験ではNDON軟膏はアトピー性皮膚炎の顔面重症病変に対して極めて効果的であったが、体幹、四肢の病変に対しては保湿剤を用いた対照部位と比較して有意な差を認めなかった。第2回臨床試験では、第1回試験で得られたNDONの治療効果を再確認することを目的として、成人アトピー性皮膚

炎患者の重症顔面病変に限定して投与することとした。複数の施設で、3段階の異なる用量を用いた二重盲検法による臨床試験が開始されており、今年度末までに数十例のアトピー性皮膚炎患者にNDON軟膏治療が行われる予定である。本試験によりNDON軟膏の有効性、安全性が確認されれば、新しいアトピー性皮膚炎治療薬としての開発に道が開けると期待される。

NDONは、その分子量が12800と大きいために、生理的にバリアー機能の弱い顔面に重症皮膚病変がある場合にはよく吸収されて効果を発揮するものの、バリアー機能の発達した体幹、四肢の病変では吸収効率が悪いいため、十分な治療効果が得られない。このことは、NDON治療による角層バリアー機能の改善に伴って薬剤吸収量が減少するため長期連用投与しても副作用出現の心配は殆どないと予想される点で、従来の治療薬に比較して有利であると思われる一方、体幹、四肢の病変にも効果を発揮するためには吸収効率を改善させる必要がある。今年度の研究では、角層バリアーを超えてNDONを皮膚に吸収させる新たな方法論の可能性が示された。特にシマジェットによる噴射式投与は、疼痛なしに真皮内まで高分子DNAを投与することを可能にし、アトピー性皮膚炎の慢性苔癬化病変や痒疹など、従来の外用療法に極めて抵抗性の難治

性病変に対して有効な治療法となることが期待される。また、グリコール酸と蛋白分解酵素を含有する軟膏による安全かつ高効率表皮バリアー除去法が開発されれば、NDON 軟膏と併用することにより、その吸収効率を向上させて、顔面以外の病変にも適応拡大が可能になると予想される。さらに、カチオンゼラチンとリポソームの組み合わせを利用した高効率 DNA 導入法は、特に脂溶性基剤と混合して投与することにより皮膚への高分子導入を可能にすることが予想され、さらなる研究の進展に期待したい。

NDON のアトピー性皮膚炎に対する薬理作用としては、1) 肥満細胞のアポトーシス誘導、2) 表皮角化細胞由来サイトカインの産生抑制、の二つの機序について研究が進みつつある。本年度の研究で気管支喘息に対する NDON の効果が明らかとなった。また NFκB が表皮角化細胞の TLR-3 を介した自然免疫にも関与していることが示されたことより、アトピー性皮膚炎に対する NDON の作用機序は、より多岐にわたることが示唆される。最近 NFκB が炎症に伴う発癌に関与しているという報告がなされた。これらの事実は、NDON がアトピー性皮膚炎のみならず、多くの炎症性疾患の治療薬として効果を持つ可能性を示唆している。

E. 結論

本研究班は今年度で3年間の研究期間を終了する。しかし、今後も引き続き、アトピー性皮膚炎、その他のアレルギー・炎症性疾患の治療薬として NDON の可能性を検討していきたい。

**NFκB decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた
重症アトピー性皮膚炎の第2回臨床試験、およびその効果増強のための基礎的研究**

分担研究者 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

重症アトピー性皮膚炎患者に対する NDON 軟膏第1回臨床試験の結果を基に、重症顔面病変を対象とした第2回臨床試験のプロトコールを作成し、多施設二重盲検試験を開始した。また、顔面以外の病変に対する NDON の有効性を獲得するために、低侵襲性皮膚バリアー除去法の開発を進めた。

A. 研究目的

これまで我々は、NFκB 結合配列を含む 20 塩基の oligo deoxynucleotides (ODN) 含有軟膏がアトピー性皮膚炎改善および発症予防に有効であること、その作用が NFκB decoy ODN (NDON) に NFκB を結合し（おとり効果）、標的遺伝子への結合を阻害することによる炎症細胞の局所浸潤抑制、アポトーシス誘導によることを明らかにしてきた。本年度は、重症アトピー性皮膚炎顔面病変に対する第2回 NDON 臨床応用研究をすすめる、その有効性、安全性を確認するとともに、基礎研究によりその効果及び安全性を増強することを目的とする。

B. 研究方法

重症アトピー性皮膚炎患者に対する 2%NDON 軟膏を用いた第1回臨床研究結

果を基にして、顔面重症病変を対象とした多施設2重盲検試験をデザインし、各施設の倫理委員会に申請した。承認の得られた施設から順次、臨床試験を開始した。

C. 研究結果

第1回 NDON 軟膏臨床試験では、NDON 軟膏はアトピー性皮膚炎の顔面病変に対して極めて有効であることが明らかとなった。そこで今年度は、第1回 NDON 軟膏臨床試験で得られ有効性、安全性について、より詳細な検討をする事を目的として、多施設2重盲検試験をデザインした。大阪大学、愛媛大学、弘前大学を含む多施設の皮膚科診療機関において、それぞれ倫理委員会にプロトコールを提出し、承認を得た施設から順次、顔面重症病変を有するアトピー性皮膚炎患者10名の臨床研究参加

希望者を募集した。参加希望者に十分なインフォームドコンセントを得た後に2週間のwashout期間をもうけ、0.1%、0.5%、1%それぞれの濃度に調整したNDON軟膏を、医師、患者共に濃度が明示されないよう選択し、1日2回、3週間連日投与し、その有効性、安全性を検討中である。今年度末までに、より多くの臨床研究参加者（最大50名）を得て、NDON軟膏の有効性、安全性に関する情報を得る予定である。

また、ヘアレスラット皮膚を用いた検討により、単縛分解酵素とグリコール酸の併用が皮膚の角層除去に極めて有効であること、この効果は蛋白分解酵素溶液の皮下投与ではもちろんのこと、5%グリコール酸外用と併用することにより、外用によっても効果を発揮しうる事が示された。

D. 研究結果

顔面のアトピー性皮膚炎重症病変に対するNDONの有効性、および局所及び全身性副作用の有無をより詳細に検討する目的で、第2回NDON臨床試験が多施設2重盲検法により開始された。すでに複数の症例で有効性が示されたと言う情報が得られているが、予定の症例数（50例）の情報蓄積を待って、より正確な効果判定を行う必要がある事は言うまでもない。今回の臨床研究でNDONの効果と安全性が確認されれば、

本研究班の当初の目的は達成される。しかし、NFkB活性の多様性を考えると、NDONはアトピー性皮膚炎のみならず、その他多くのアレルギー・炎症性疾患治療薬として有効な可能性があると期待される。

E. 結論

本研究班の研究により、重症アトピー性皮膚炎にNDON軟膏が有効であることが示された。この難治性アレルギー性皮膚疾患に苦しむ患者さんのために、引き続きNDON研究を進めていきたい。

F. 研究発表（平成16年度）

1. 論文発表

英語論文

- 1) Hiraoka K., Yamamoto S., Otsuru S., Nakai S., Tamai K., Morishita R., Ogihara T., Kaneda Y.: Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides.: J Immunol. 2004; Oct 1;173(7):4297-307.
- 2) Matsuki A., Yamamoto S., Nakagami H., Aoki M., Tamai K., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.: No influence of tumor

- growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice.: *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; Feb 27;315(1):59-65.
- 3) Oshima K., Shimamura M., Mizuno S., **Tamai K.**, Doi K., Morishita R., Nakamura T., Kubo T., Kaneda Y.: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats.: *FASEB J.* 2004; Jan;18(1):212-4. Epub 2003 Nov 20.
- 4) Umegaki N., Moritsugu R., Katoh S., Harada K., Nakano H., **Tamai K.**, Hanada K., Tanaka M.: Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy.: *Clin Exp Dermatol.* 2004; Jan;29(1):42-5.
- 5) Odanagi M., Kikuchi Y., Yamazaki T., Kaneko T., Nakano H., **Tamai K.**, Uitto J., Hanada K.: Transcriptional regulation of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes.: *Exp Dermatol.* 2004; Dec;13(12):773-9.
- 日本語論文
- 1) **玉井克人**, 遺伝子治療の現状：おとり型核酸医薬など、特集・最近のトピックス 2004、5. 皮膚科医のための臨床トピックス、臨床皮膚科、2004; 58: 171-174.
- 2) **玉井克人**, 金田安史、中邨弘重、青木元邦、森下竜一、片山一郎、花田勝美. 重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療：転写因子 NF- κ B を標的としたデコイ DNA 軟膏の臨床応用、医学のあゆみ 2004; 210: 101-104.
- 3) **玉井克人**, 金田安史、中邨弘重、森下竜一、花田勝美、板見智、片山一郎. 核酸医薬外用剤のアトピー性皮膚炎への臨床応用、アレルギー・免疫 2004; 11: 1084-1088.

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
3. その他
なし

角化細胞における dsRNA-TLR-3 経路を介した NFκB の活性化

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎は局所の細菌感染、ウイルス感染にて増悪することが知られている。ウイルス感染においては自然免疫が重要な役割をはたしており、Toll-like receptor (TLR) からのシグナルにより様々なサイトカインが誘導され、炎症が引き起こされるとされている。そこで、表皮角化細胞においてウイルス由来の dsRNA により活性化される TLR-3 からのシグナルについて検討した。さらにアトピー性皮膚炎患者 3 例に NFκB decoy oligonucleotide (NDON) 外用剤により臨床試験を行った。表皮角化細胞においては dsRNA-TLR-3 を介した自然免疫機構が働いており、NFκB が活性化され、ウイルス感染にたいして重要な役割をはたしていることが明らかとなった。NDON がウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪に対して NFκB の機能を抑制することにより効果を発揮する可能性が示唆された。また、臨床試験に関しては有効性のみならず安全性を示唆する所見が得られたが、さらなる症例の積み重ねが必要であると思われる。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は局所の細菌感染、ウイルス感染にて増悪することが知られている。細菌感染、ウイルス感染においては自然免疫が重要な役割をはたしており、Toll-like receptor (TLR) からのシグナルにより様々なサイトカインが誘導され、炎症が引き起こされるとされている。そこで、表皮角化細胞においてウイルス由来の dsRNA により活性化される TLR-3 からのシグナルについて検討した。さらにアトピー性皮膚炎患者 3 例に NF-κB decoy oligonucleotide (NDON) 外用剤により臨床

試験を行った。

B. 研究方法

表皮角化細胞は正常ヒト皮膚より無血清培養法にて培養した。継代を繰り返し、4-5 代継代したものを使用した。角化細胞を無血清培養法にて培養し、100%コンフルエントになった時点で培養液中に polyI:C (dsRNA) を添加し、経時的に細胞・培養上清を回収し、western blot 法ならびに ELISA 法で各種サイトカインの産生量を検討した。愛媛大学医学部臨床倫理委員会の承認を得た後、3 例について同意を得たのち、3 週

間 NDON を顔面に塗布した。

C. 研究結果

polyI:C 刺激により二時間後には I κ B- α のリン酸化が認められた。また、MAP kinase である p38, JNK も同様に2時間後にはリン酸化が認められた。さらにウイルス感染において重要な役割をはたしている IFN の経路について検討したところ、IRF-3 が30分後には核内へ移行している像が蛍光抗体法により確認できた。すなわち、polyI:C 刺激では NF κ B, p38, JNK, IFN の経路が活性化されていることが確認できた。次ぎに蛋白レベルで NF κ B の経路が動いているかについて ELISA 法にて検討した。TNF- α は24時間後から誘導され、36時間後には培養液中には450pg/ml の濃度が検出されたが、コントロール群では検出できなかった。同様に NF κ B で誘導されるサイトカインである MIP1- β も産生が亢進していた。NF κ B 以外の経路により誘導されるサイトカインである IL-6, I-TAC, MIP-1 α も同様に産生が亢進していた。3例の患者中、2例で有効性を認めた。1例は無効と判断したが、増悪は認めなかった。副作用は3例とも認めなかった。

D. 考察

表皮角化細胞において dsRNA からのシグナルが伝達され、サイトカインの産生が誘導されることが明らかとなった。このことはウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪が、一部分 TLR-3 を介したはサイトカ

イン産生増加によるものであることを示唆していると思われる。すなわち、ウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪が NF κ B 経路の活性化によるものであれば、NDON が増悪時に効果を発揮することが期待される。しかし、polyI:C 刺激によりその他の経路も活性化され、様々なサイトカインが誘導されることが明らかとなったことは、NDON 単独では効果が不十分であることも示唆していると思われる。臨床研究については NDON の有効性、安全性を評価するには症例が不十分であるが、3例中2例で有効であったことは評価できると思われる。1例で無効であったが、二重盲検、用量設定試験であるため使用された濃度が低かったとも考えられる。

E. 結論

表皮角化細胞においては dsRNA-TLR-3 を介した自然免疫機構が働いており、NF- κ B が活性化され、ウイルス感染にたいして重要な役割をはたしていることが示唆された。逆にウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪には TLR-3 からの NF κ B を含めた様々なサイトカインが重要な働きを担っていると解釈できる。すなわち、NDON がウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪に対して NF κ B の機能を抑制することにより効果を発揮する可能性が示唆された。また、臨床試験に関しては有効性のみならず安全性を示唆する所見が得られたが、さらなる症例の積み重ねが必要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

- 1) Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K.**: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 123:1078-85, 2004
- 2) Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K.**: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)2vitamin D3. **J Dermatol Sci.** 36:41-50, 2004
- 3) Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, Hasegawa H, Fujita S, Tohyama M, **Hashimoto K**, Yasukawa M.: Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. **J Gen Virol.** 85:2639-42, 2004
- 4) Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, **Hashimoto K**, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, Ohnishi T.: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy. **Oncol Rep.** 12:73-8, 2004.
- 5) Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, **Hashimoto K.**: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. **J Invest Dermatol.** 122:1356-64, 2004
- 6) Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, **Hashimoto K.**: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. **Biochem Biophys Res Commun.** 327:100-5, 2005
- 7) Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol.** in press
- 8) Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K.**: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. **Br J Dermatol.** in press

2. 学会発表

- 1) Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, **Hashimoto K.**: Marked enhancement of IFN-g-induced

- fractalkine production by IFN-g, TNF-a and IL-1a in normal human keratinocytes. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 2) Tokumaru S, Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Transactivation of EGFR via HB-EGF shedding protects human keratinocytes from UV-irradiation-induced apoptosis. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 3) Yahata Y, Shirakata Y, Tohyama M, Murakami S, Iwatsuki K, Hashimoto K.: A patient with severe hypersensitivity to mosquito bites and chronic active Epstein-Barr virus infection. 8th Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004
- 4) Yang L, Shirakata Y, Dai X, Sayama K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M, Yahata Y, Hashimoto K.: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalent. 8th Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004
- 5) Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: HB-EGF shedding is essential for UV-induced EGFR phosphorylation and epidermal hyperplasia. 34th annual meeting of European Society for Investigative Dermatology, Vienna, Austria, Sep 8, 2004.
- 6) Sayama K, Dai X, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Hashimoto K.: SOCS-1 negative feedback mechanism of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocyte. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 7) Yahata Y, Yamasaki K, Shirakata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: SOCS 1 is a negative regulator of the MyD88-independent signaling pathway of the LPS-induced TLR4 natural immune response in HDMEC. 65th annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- H. 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
 3. その他
なし

リポソームによる遺伝子導入増強法の開発

分担研究者 金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー皮膚炎に対する治療法開発のため STAT 6 decoy や NFκB decoy 核酸が有力な薬剤であることが明らかになってきたが、それらを効率よく導入する方法の1つとして liposome の有用性が認められてきた。今回は liposome や HVJ envelope vector の導入効率を飛躍的に高めるためにカチオン化ポリマーとの複合体形成を行い、カチオン化ゼラチンと硫酸プロタミンとの複合体形成が最も効率がよいことが明らかになった。

A. 研究目的

アトピー皮膚炎に対する治療法を開発のため核酸、遺伝子導入法の導入法の改良を試みる。

B. 研究方法

今回は分子量 100,000 の高分子ゼラチン
或いは分子量 5,000 の低分子ゼラチンを
spermidine もしくは 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た。5 mg のカチオン化ゼラチンと 10 mg の脂質より成るリポソーム (Phosphatidylserine: shingomyelin : phosphatidylcholine, : DOPE, : cholesterol =10:16.7:16.7:16.7:40) 或いは 1×10^4 hemagglutinating units の紫外線で不活性化した HVJ を用いた HVJ envelope vector (HVJ-E) 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。ルシフェラーゼ遺伝子を含むリポソームを用いてこれらの複合体による細胞内導入を行い、ルシフェラーゼ活性の測定を行ってその遺伝子導入効率を評価した。最適化条件下で蛍光オリゴ核酸の導入も試みた。

C. 研究結果

HVJ envelope vector に上記4種類のカチオン化ゼラチンを結合させた複合体を培養メラノーマ細胞、血管内皮細胞にかけたところ、低分子ゼラチンに ethylenediamine を結合させたカチオン化ゼラチンが最も遺伝子導入効率が高かった。また spermidine を用いたゼラチンは細胞毒性が高かった。そこで ethylenediamine を結合させた低分子ゼラチン (CG) と HVJ envelope vector の

複合体 (CG-HVJ-E) の導入の最適条件を検討したところ、硫酸プロタミン (PS) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と反応させた複合体 (PS-CG-HVJ-E) が CG-HVJ-E 及び PS-HVJ-E の約 10 倍、HVJ-E の数百倍、遺伝子導入効率を増強できることがわかった。PS-CG-HVJ-E は約 $2\mu\text{m}$ 直径で、電荷は 9.5 mV であった。同様に HVJ-E の代わりに HVJ-liposome を用いた場合でも、PS-CG との複合体が最も導入効率が高かった。この遺伝子導入は PS-CG-HVJ-E を HVJ の融合蛋白の抗体と反応させることで完全に抑制されたが、エンドサイトーシスの阻害剤である Wortmannin を併用すると 40% の導入阻害が得られ、融合とエンドサイトーシスの両方の関与が示唆された。そこで HVJ を用いない負電荷型リポソームにルシフェラーゼ遺伝子を封入し、これと PS、CG との複合体を形成させ遺伝子導入を行うと、やはり PS-CG-liposome が最も遺伝子導入効率が高く、CG-liposome、PS-liposome の約 10 倍、liposome の 10000 倍以上の導入効率の増強が培養細胞で認められた。蛍光オリゴ核酸の導入も可能であった。さらにこれらの中で特に CG との複合体は、マウスの新鮮血清と 37 度でインキュベートしても遺伝子導入活性を 50% 以上維持できることが明らかになった。

D. 考察

CG との複合体の生体組織での遺伝子導入効率について詳細な検討が今後必要であるが、アトピー治療のデリバリーシステムと

して期待できる。

E. 結論

CG との複合体形成により HVJ-E や liposome の遺伝子導入効率が飛躍的に増強できること、特に CG は血液中でのベクター安定化にも寄与できることがわかった。

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 (平成 16 年度)

1. 論文発表

- 1) Shimamura, M., Sato, N., Taniyama, Y., Yamamoto, S., Endoh, M., Kurinami, H., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound. *Gene Therapy* 11, 1532-1539, 2004.
- 2) Hiraoka, K., Yamamoto, S., Otsuru, S., Nakai, S., Tamai, K., Morishita, R., Ogihara, T., and Kaneda, Y. : 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.
- 3) Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M-H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element "decoy" against signal transducers

and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. Gene Therapy, in press.

- 4) Takeda, S., Shiosaki, K., Kaneda, Y., Nakasatomi, T., Yoshizaki, H., Someya, K., Koono, Y., Eda, Y., Kino, Y., Yamamoto, N., and 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.

2. 学会発表

- 1) 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”
金田安史 (平成16年4月8日・大阪)

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

NDON 外用療法のプロトコール作成および新規核酸医薬の開発に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療の基礎的・臨床的研究を行う。炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NFκB に注目し、NFκB の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬 (NDON) の治療法としての可能性を詳細に検討した。これまでに我々はアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた基礎的検討において NDON 塗布の効果・メカニズムを明らかにしてきたが、今年度はさらに具体的な臨床応用を考慮し、薬剤導入システムの開発も行った。さらに NFκB の抗アレルギー作用の証明として同様のアレルギー疾患である気管支喘息に対する NDON の吸入効果についても考察を加えた。

A. 研究目的

炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NFκB に注目し、NFκB の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬 (NDON) を用いたアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を目指す。既に前年度までに NDON 軟膏剤のアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける症状改善効果・肥満細胞数のアポトーシス誘導作用・ICAM-1 発現の減少・免疫抑制剤タクロリムス軟膏に対する非劣性を確認している。今回は薬剤のデリバリーシステムを確立させると同時にその抗アレルギー効果を気管支喘息においても考察する。

B. 研究方法

ラット皮膚欠損モデルを作成し、創傷周囲にパネ式の針無しインスリン皮下注射器であるシマジェットにより LacZ 遺伝子・ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、導入効率を検討する。また NDON の抗アレルギー効果を確認するため、OVA を抗原とするラット気管支喘息モデルを作成し、噴霧状デコイを吸入させ、その抗アレルギー効果を検討する。

C. 研究結果

シマジェットにより皮膚へ LacZ 遺伝子を導入したところ表皮に強い発現を認めた。続いてルシフェラーゼ遺伝子により導入効率を検討すると、シマジェットを用いた場合、注射針で導

入した場合の約100倍の高い効率を示した。同法の有用性は実際、ヒト HGF、ヒト PGIS 遺伝子の同法による皮膚導入の創傷治癒促進効果により確認できた。さらに気管支喘息モデルにおいて、NDON の吸入は気管支洗浄液における好酸球の浸潤を阻害し、抗原暴露による気道抵抗の上昇を early phase・late phase でともに緩和し、NDON の抗アレルギー効果を示すことができた。

D. 考察

今回シマジェットによる画期的な皮膚へに薬剤導入システムの可能性を示すことができた。軟膏剤塗布とシマジェットによる導入との比較が今後の課題であるが、頻用される軟膏剤であるステロイドなどに比し NDON の分子量が極めて大きく導入されにくいことを考えると、シマジェットによる皮膚深部への NDON 導入はより効果的な臨床応用戦略の可能性を与えるものである。

また、NDON の抗アレルギー効果について他のモデルにおいても証明できた。気管支喘息がアトピー性皮膚炎と非常に近い病態であることを考慮すると、NDON が抗アレルギー効果を示しアトピー性皮膚炎に有用であることを示す新たな evidence になり得る。

E. 結論

NODN は軟膏製剤としてだけではなく、皮膚深部に到達するシマジェットを新たなツールとしてその効果を enhance できる可能性が示された。また NDON の抗アレルギー作用は他のモデルにおいても示された。NODN はアトピー性皮膚炎の新しい有効な治療薬になりうると考えられた。

F. 健康危険情報

臨床研究において、NODN に起因すると考えられる重篤な有害事象は現在確認されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, Oishi M, Kataoka K, Ohigi S, Ogihara T, Kaneda Y, **Morishita R**. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of NFκB and ets transcription factors. *Circulation* 2004;109:132-138

2. 学会発表

- 1) Takeshi Miyake, Motokuni Aoki, Kazuo Tanemoto, Tomio Kawasaki, Ryuichi Morishita 「Regression of Experimental Rabbit Aortic Aneurysm by the Treatment with

- Chimeric Decoy
Oligodeoxynucleotides(ODN)
Against ets and NFkB」 American
Heart Association Scientific sessions
2004
2004年10月26日(火)New Orleans,
Louisiana
- 2) 三宅隆「Regression of Experimental
Rabbit Aortic Aneurysm by The
Treatment with Chimera Decoy
Oligodeoxynucleotides (ODN)
against ets and NFkB」第68回日本
循環器学会2004年3月27-29(土、
日、月)東京
- 3) 富田奈留也「Potential of Novel
Ribbon-type E2F Decoy in vivo
Neointimal Hyperplasia」第68回
日本循環器学会2004年3月27-29
(土、日、月)東京
- 4) 山崎慶太「Important Role of Nuclear
Factor- κ (NF κ B) in Neointimal
Formation in Porcine Balloon Injury
Model」第68回日本循環器学会
2004年3月27-29(土、日、月)
東京
- 5) 梶座康夫、富田奈留也、富田哲也、
谷山義明、小池弘美、森下竜一
「シマジェットを用いたHGF遺
伝子及びPGIS遺伝子導入によ
る難治性潰瘍の治療」第8回
MolecularCardiovascular Conference
2004年9月3日(金)、4日(土)、
5日(日)北海道
- 6) 梶座康夫、富田奈留也、富田哲也、
谷山義明、小池弘美、大塚マリア
ナ今日美、森下竜一「シマジェッ
トを用いたHGF及びPGIS遺伝子
導入による難知性潰瘍の治療」
第8回日本心血管内分泌代謝学会
学術総会 2004年11月26日(金)
宮崎
- H. 知的所有権の出願・登録状況(予
定を含む)
1. 特許取得
 - 1) 複数のノズル孔を有する針無
注射器：特願2003-131127
 - 2) 薬液が収容された針無注射
器：特願2003-131126
 - 3) 針無注射器を用いた皮膚疾患
の遺伝子治療：特願2003-307713
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし