

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金田 安史

平成 18(2006) 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. ベクター徐放化と標的化の試み	11
金田 安史	
2. 徐放化及びステルス化ベクターの開発	15
田畑 泰彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

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）

総括研究報告書

臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）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

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) HVJ の融合蛋白 F と標的分子 desmoglein 3 に対する一本鎖抗体のキメラ蛋白を有する HVJ の作成に成功し、癌細胞や皮膚組織への導入効率の増強が可能になった、2) カチオン化ポリマーと HVJ-E との複合体形成を行い、腹腔内投与で腹膜播種した癌組織への選択導入が可能になり、腹腔内播種癌の治療に成功した。3) HVJ-E の徐放化のためのカチオン化ゼラチンからなる生体吸収性ハイドロゲルを作成し、このシステムに HVJ-E を含浸させ、その遺伝子発現を in vitro 細胞培養法で評価したところ、HVJ-E 単独に比較して、より長い期間の遺伝子発現が認められた。この結果は、HVJ-E が徐放化されたことを示している。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを担癌動物の癌周辺部位に投与した。その結果、投与部位に弱い遺伝子発現が認められた。4)、HVJ-E の生体内安定性の向上のためのステルス化キャリアとして、カチオン化ゼラチンおよびポリアリルアミンに対して片末端メトキシポリエチレングリコール (PEG) を導入した、PEG 導入カチオン化高分子を作製した。反応条件を変えることによって HVJ-E の表面に PEG 鎖が導入できることがわかった。

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) 前年度の研究成果をもとにして F 蛋白中の F1 蛋白の C 末の膜貫通ドメインのみ残し、その N 末に desmoglein 3 に対する一本鎖抗体(scFv) の遺伝子(myc-tag を有する)を挿入し、その N 末端に signal peptide を付加したキメラ遺伝子を作成した。これらの遺伝子を培養 LLCMK2 細胞に

導入して発現させ、抗 myc-tag 抗体で免疫染色を行い、細胞膜上への発現を確認し、さらに HVJ を感染させて産生されるウイルス粒子でのキメラ蛋白の発現と局在を抗 myc 抗体による蛋白ブロットと免疫電顕により観察した。キメラ蛋白をもつ HVJ を LLCMK2 細胞で産生させ、遠心により回収し、標的である皮膚細胞 (PAM) や皮膚組織でのウイルス蛋白 F の遺伝子発現を調べた。2) 分子量 5,000 の低分子ゼラチン(CG)に ethylenediamine を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。Balb/c マウスにマウス大腸癌細胞 CT26 を腹腔内に播種させ腫瘍結節を形成させた。この複合体を腹腔内に注入し腫瘍結節及びマウス主要臓器での遺伝子発現を評価した。次いでブレオマイシンを HVJ-E に封入後カチオン化ゼラチンと複合体を形成させ腫瘍播種したマウス腹腔内に投与し治療効果を調べた。

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とエチレンジアミンの片末端アミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて縮合させることによりエチレンジアミンの導入反応を行い、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電気泳動光散乱 (ELS) 測定によりゼラチンの表面ゼータ電位を調べた。得られたカチオン化ゼラチン水溶液 (10wt%) に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、シャーレに流延した。4℃で 12 時間、静置することによって、カチオン化ゼラチンの架橋反応を行い、カチオン化ゼラチンハイドロゲルを得た。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、 ^{125}I 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も同様の方

法で ^{125}I ラベル化を行った。 ^{125}I ラベル化プラスミド DNA 含浸ハイドロゲルおよび ^{125}I 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、その遺伝子発現レベルを評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における LacZ 遺伝子の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 の水溶液を凍結乾燥した架橋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 の徐放化は二重底構造になっている細胞培養法によって評価した。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。

加えて、Green fluorescent protein (GFP) をコードするプラスミド DNA を含む HVJ-E をハイドロゲルに含浸した。この HVJ-E 含浸ハイドロゲルを前述の培養系に適用した。培養の進行にともなう培養細胞への遺伝子発現レベルを、ハイドロゲルを用いない HVJ-E 水溶液のみの場合の結果と比較検討した。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを皮下に癌を移植した担癌マウスの癌周辺部に投与した。投与部位周辺の遺伝子発現レベルを評価するとともに、ハイドロゲル埋入部位の組織学的検討を行った。

4) エチレンジアミンを導入して作製したカチオン化ゼラチンあるいはアミノ基をもつポリアリ

ルアミンのアミノ基への PEG の導入反応を行った。用いた PEG は片末端メトキシ基、片末端が活性化エステル基で重量平均分子量が 5000 のサンプルである。カチオン化高分子のジメチルスルフォキシド (DMSO) 溶液あるいは水溶液中へ、異なる濃度の PEG 溶液を投入、37°C で 3 時間、あるいは、室温で 12 時間の条件で PEG のカチオン化高分子への導入反応を行った。反応後、反応産物を水に対して透析を行い、未反応 PEG を除去、凍結乾燥することによって PEG 導入カチオン化高分子を得た。PEG 導入率は、TNBS 法によるアミノ基の減少から定量した。メトキシ基以外の末端をもつ PEG あるいは異なる分子量をもつ PEG を利用したカチオン化高分子への導入反応も行った。得られた PEG 導入カチオン化高分子を HVJ-E と水溶液中で混合することによって、HVJ-E 表面を PEG 導入カチオン化高分子で吸着修飾した。コーティングの有無は、混合処理を行う前後における HVJ-E の表面ゼータ電位を ELS にて測定することによって評価した。

(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及び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) 表皮基底層に発現する desmoglein 3 を認識する scFv の遺伝子を、この変異 F 遺伝子の 5' 末端にインフレームになるように融合させたキメラ分子 (scFv-F) を作成した。このキメラ遺伝子を LLCMK2 細胞に導入し、キメラ蛋白を安定

に発現する形質転換株を分離した。この細胞では抗体分子は細胞膜に局在することが蛍光抗体法により認められた。ここに野生型の HVJ を感染させると、2 日後に回収したウイルス粒子には、Western blot で 37 kDa のキメラ分子が検出され、免疫電子顕微鏡撮影を行うと、このウイルス粒子上に scFv-F の存在が確認できた。。次に desmoglein3 を認識する scFv をもつ変異 HVJ の desmoglein3 への結合を ELISA で測定した。変異型 HVJ では野生型 HVJ と比較して明らかに有意な結合増強が認められた。Desmoglein3 を認識するキメラ F 蛋白をもつ変異型 HVJ の場合、この実験の条件下では 50 HAU (3×10^6 粒子/1HAU) で結合がプラトーに達したが、野生型では 400 HAU でも結合の飽和状態は得られなかった。そこで回収した HVJ をそのまま (不活性化せずに)、細胞への感染実験を行った。m.o.i は 0.6 である。細胞としては desmoglein 3 が発現しているマウスケラチノサイトの Pam 細胞と発現していないマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞、サル腎臓細胞の LLCMK2 細胞を用いた。コントロールとして野生型の HVJ を感染させる実験も行い、F 蛋白の発現を蛍光抗体法で検出した。NIH3T3 細胞、LLCMK2 細胞では野生型 HVJ、scFv をもつ変異型 HVJ の感染後の F 蛋白の発現はほとんど差がなかったのに対し、Pam 細胞では変異型 HVJ の感染によって有意に高い F 蛋白の発現が観察できた。次に組織中での感染効率を調べることにしたが、活性型の HVJ のマウスへの感染実験は危険であるため、マウスの表皮組織を取り出し、組織培養を行って感染実験を試行することにした。またマウスとしては今後遺伝子治療の対象の 1 つとなる表皮水疱症のモデルマウス (VII 型

コラーゲン遺伝子のノックアウトマウス)の新生仔の表皮を分離し、組織培養を行い、野生型或いは変異型 HVJ (5 x 10⁶ 粒子) を感染させた。desmoglein3 に対する scFv をもつ HVJ によって多数の表皮細胞に F 蛋白の発現が検出されたが、scFv をもたない HVJ ではほとんど F 蛋白の発現は認められなかった。組織切片を作成すると、F 蛋白の発現は表皮基底細胞に局限していることが明らかになった。

2) ルシフェラーゼ遺伝子を封入した CG-HVJ-E を CT26 細胞を腹腔内播種させたマウスの腹腔内に投与し、24 時間後遺伝子発現を調べたところ、腫瘍結節で特異的に遺伝子が発現した。CG を用いない HVJ-E 単独投与では腫瘍にも他の主要臓器(肝臓、脾臓、肺など)にもほとんど遺伝子発現は認められなかった。プレオマイシンは単独では細胞膜を通過しないので抗がん剤としては使用が難しい薬剤であるが、HVJ-E を用いて 300 倍以上の感受性をあげることがわかり、さらに CG-HVJ-E で導入効率が HVJ-E の 3 倍程度高められることがわかった。そこで抗がん剤のプレオマイシンを封入した CG-HVJ-E を腹腔内に 3 日おきに 6 回投与したところ、大腸癌細胞を腹腔内播種させたマウスの 40% で完全寛解が認められた。その他のグループでは全てマウスが死亡した。この完全寛解したマウスの皮下に同じ大腸癌細胞を移植してもすべて拒絶され、マウスの個体内では抗腫瘍免疫が活性化されていることが示唆された。

3) エチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度とを変化させることによって、アミノ基導入率の異なる様々なカチオン化ゼラチンを作製することができた。これらのカチオン化ゼラチンとプ

ラスミド DNA とを混合したところ、プラスミド DNA の表面ゼータ電位が負から正へと変わり、かつ、そ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。

カチオン化ゼラチン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によって制御できることもわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度によって、ハイドロゲルの架橋程度が変化し、その結果、酵素攻撃によるゼラチン分子の水可溶化の速度が変化したことが原因であると考えられる。プラスミド DNA の徐放化プロファイルは、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生体内残存のプロファイルとよく相関していた。これは、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にともなって、プラスミド DNA が徐放化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したところ、埋入部位における遺伝子発現が見られ、そ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。

プラスミド DNA を含む HVJ-E を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いて細胞培養実験を行った。HVJ-E 含浸ハイドロゲルを直接、細胞に接触させて培養した実験、およびハイドロゲルを分解させ、その分解物を細胞に与えて培養した実験のいずれの場合においても、遺伝子発現が認められた。これらの結果は、培養系におかれたハイドロゲルが、細胞から分泌された酵素により分解されることによって、水可溶化されたカチ

オン化ゼラチンフラグメントで修飾された HVJ-E がハイドロゲルから放出され、遺伝子発現が起こったことを示している。その発現期間は、HVJ-E 単独の場合に比較して、延長していた。この結果は、HVJ-E がハイドロゲルから徐放化されたことを示している。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを担癌マウスの癌部位周辺に投与した。その結果、投与部位における弱い遺伝子発現が見られたものの、ハイドロゲルによる炎症反応が認められた。この炎症反応を軽減すべく、ハイドロゲルの組成、分解性を変えたサンプルを作製、動物実験を継続している。

4) HVJ-E の DDS 化高分子の作製に関しては、カチオン化ゼラチンおよびポリアリルアミンを用いた片末端メトキシ PEG 導入反応を行った。導入反応時における PEG 濃度、反応時間を変えることによって、導入率の異なる PEG 導入カチオン化高分子を作製することができた。HVJ-E と PEG 導入カチオン化高分子とを水溶液中で混合し、表面ゼータ電位を測定した。その結果、HVJ-E の表面ゼータ電位が負から正に変化することがわかった。この変化量はカチオン化高分子のアミノ基導入率、PEG 導入率に依存していた。以上よりこの方法により HVJ-E の表面を PEG 修飾することが可能になり、ステルス化 HVJ-E として血液中の滞留性を高めることができると期待される。

D. 考察

1) 標的蛋白がのったウイルス粒子が完成し、標的分子に依存したウイルス感染が増強されたことより、今後標的導入ベクターとして機能することが期待される。しかし、この標的化 HVJ

にはシアル酸を認識する HN も依然として存在しており、これを取り除くことにより標的化が完成すると考えられる。この HN の制御法の開発が今後必要であるが、すでに siRNA を用いてそれが可能になるという予備的なデータが得られている。

2) CG 修飾 HVJ-E は恐らくリンパ管から取り込まれて腫瘍細胞と融合することにより、腫瘍結節に選択的な遺伝子導入が可能になったと考えられる。プレオマイシンは単独では細胞膜を通過しない抗がん剤であるが、HVJ-E を用いると数百倍以上の効果をもたらすことが可能になり、CG-HVJ-E によって腫瘍選択的な導入も可能になった。これは CG 修飾により生体中でのベクターの安定性が増強されたものと考えられる。マウスにおける副作用はほとんど認められなかった。現状の CG-HVJ-E は特異的な標的分子は有していないので、今後は前述の標的化 HVJ-E と組み合わせれば、さらに効果増強が望めるであろう。

3) 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できたが、これまでに得られた結果は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルが HVJ-E の徐放化キャリアとしてうまく働いていることを示している。HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを動物に埋入し、その埋入部位における発現レベルの増強と発現期間の延長とを期待したが、これまでのところ、予想通りの結果は得られていない。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。

4) HVJ-E の体内安定化のための DDS サンプルをデザイン、PEG 導入カチオン化高分子を作製した。得られた PEG 導入カチオン化高分子のキャラクタリゼーションを行ったところ、目的とするサンプルが作製できていることがわかった。今後は、これらのサンプルのステルス効果を動物実験によって調べていく予定である。加えて、癌組織へのターゲティング用の DDS 高分子として、カチオン化高分子に葉酸およびトランスフェリンなどのリガンドを導入する反応を進めている。これらのサンプルのキャラクタリゼーションを行うとともに、細胞培養および動物実験による HVJ-E の癌へのターゲティング効果を評価していく予定である。

E. 結論

1) キメラ F 蛋白を持つ標的導入可能な HVJ が完成された。2) CG-HVJ-E により腫瘍結節に選択的な遺伝子導入、抗がん剤のデリバリーが可能になり、がん治療効果を著しく高めることができた。3) 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。4) HVJ-E の表面修飾用の PEG 導入カチオン化高分子の作製を行った。これらの高分子を HVJ-E と混合することによって、HVJ-E の表面を PEG 修飾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

1. 論文発表
1. Mima, H., Yamamoto, S., Ito, M., Tomoshige, R., Tabata, Y., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol. Cancer Ther.* 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* 7, 888-897, 2005.
3. Kim, YD, Park, K-G, Morishita, R., Kaneda, Y., Kim, S-Y., Song, D-K., Kim, S-D., Nam1, C-W., HC Lee, HC., Lee, K-U., Park, J-Y., Kim, B-W., Kim, J-G. and Lee, I-K.: Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter. *Gene Therapy*, in press.
4. Morishita, N., Nakagami, H., Morishita, R., Takeda, S., Mishima, F., Tarazono, B., Nishijima, S., Kaneda, Y., and Tanaka, N.: Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*334, 1121-1126, 2005.
5. Ono, M., Sawa, Y., Miyamoto, Y., Fukushima, N., Ichikawa, H., Ishizaka, T., Kaneda, Y., and Matsuda, H.: The effect of

- gene transfer with hepatocyte growth factor for pulmonary vascular hypoplasia in neonatal porcine model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129, 740-745, 2005.
6. Kushibiki, T., Tabata, Y.: Preparation of poly(ethylene glycol)-introduced cationized gelatin as a non-viral gene carrier. *J Biomater Sci Polym Ed.* 16, 1447-1461, 2005.
 7. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. *J Controlled Release.* 105, 318-331, 2005.
 8. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Targeting of plasmid DNA to renal interstitial fibroblasts by cationized gelatin. *Biol Pharm Bull.* 28, 2007-2010, 2005.
 9. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. In *Key Engineering Materials.* 288-289, 121-124, 2005.
 10. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Enhanced anti-fibrotic activity of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor for a mouse model of obstructive nephropathy by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J. Controlled Release.* 110, 610-617, 2006.
 11. Ozeki, M., Tabata, Y.: In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various crosslinking methods. *J. Biometer. Polymer Edn.* 16, 549-561, 2005.
 12. Kasper, F. K., Kushibiki, T., Kimura, Y., Mikos, A. G., Tabata, Y.: In vivo release of plasmid DNA from composites of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) and cationized gelatin microspheres. *J Controlled Release.* 107, 547-561, 2005.
2. 学会発表
 1. 美馬秀俊、金田安史：生体適合性ポリマーを用いた遺伝子導入増強法の開発
(平成 17 年 9 月 14 日；第 64 回日本癌学会学術総会；札幌)
 2. 金田安史：遺伝子治療と Translational research
(平成 17 年 6 月 2 日；第 22 回日本呼吸器外科学会総会；京都)
 3. 美馬秀俊、金田安史：Development of polymer-conjugated HVJ envelope vector to enhance the transfection efficiency in vitro and in vivo
(平成 17 年 7 月 30 日；第 12 回日本遺伝子治療学会；東京)
 4. 河地正子、玉井克人、金田安史：表皮細胞高親和性 HVJ-E ベクターの開発
(平成 17 年 12 月 8 日；第 28 回日本分子生

- 物学会；博多)
5. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史：siRNA の利用による HN 低含有 HVJ ウイルス粒子の生産
(平成 17 年 12 月 8 日；第 28 回日本分子生物学会；博多)
 6. Kushibiki, T., Tabata, Y.: Blockade of TGF-beta 1 receptor II expression inhibits interstitial renal fibrosis by targeting of small interference RNA to renal interstitial fibroblasts.
The 3th KIPS-NIST (2005.5.19-20 Kyoto)
 7. 櫛引俊宏、中島奈津紀、菅井 学、清水 章、田畑泰彦：カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー。
第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)
 8. 櫛引俊宏、田畑泰彦：遺伝子導入のためのゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製。
第 21 回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)
 9. 岡空高広、櫛引俊宏、岡崎有道、田畑泰彦：マクロファージへの遺伝子導入のための高分子キャリアのデザイン。
第 51 回高分子研究発表会 (2005.7.22 神戸)
 10. Xia, Z., Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., 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 9th Research Forum on rogressive Renal Diseases (2005.2.12 名古屋)
 11. Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Suppression of tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein47(HSP47) conjugated with cationized gelatin microspheres in unilateral ureteral obstruction. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)
 12. 夏志銀、宮崎正信、阿部克成、小畑陽子、櫛引俊宏、友重龍治、堀田覺、田畑泰彦、小路武彦、河野茂：HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres (CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction
第 48 回日本腎臓学会学術総会 (2005.6.23-25 横浜)
 13. 小畑陽子、宮崎正信、阿部克成、原田孝司、山本一男、友重龍治、櫛引俊宏、松山俊文、小路武彦、田畑泰彦、河野茂：Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入マクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討
第 50 回日本透析医学会学術総会 (2005.6.24-26 横浜)
 14. 小畑陽子、宮崎正信、阿部克成、山本一男、友重龍治、櫛引俊宏、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-HSP47 siRNA 投与による検討-
第 21 回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)

15. Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: HGF gene transfer by genetically modified macrophages attenuates peritoneal fibrosis in mice. The 7th European aperiitoneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)
16. Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: HGF gene transfer by macrophages ameliorates progression of peritoneal fibrosis in mice. American Society of Nephrology The 38th Annual Renal Week Meeting (2005.11.10-13 Philadelphia)
17. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 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 HSP47 siRNA 投与による臓器線維症における遺伝子治療の試み-腎、腹膜を中心に-. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)
18. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 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-HSP47 siRNA 投与による検討- 第 20 回長崎 DDS 研究会 (2005.12.2 長崎)
19. 阿部克成, 宮崎正信, 小畑陽子, 蔵重智美, 中沢有香, 原田孝司, 緒方弘文, 大園恵幸, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: Matrix metalloproteinase (MMP)-1 は腹膜の線維化を促進する 第 48 回日本腎臓学会学術総会 (2005.6.23-25 横浜)
20. Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., Yoshio, Y., Taguchi, T., Koji, T., Tabata, T., Kohno, S.: Sustained release of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) augments the fibrotic area in chlorhexidine gluconate induced peritoneal fibrosis model in mice. The 7th European aperiitoneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)
21. 阿部克成, 宮崎正信, 小畑陽子, 中沢有香, 中沢将之, 蔵重智美, 原田孝司, 小路武彦, 田畑泰彦, 田口尚, 河野茂: 腹膜線維化における Matrix metalloproteinase (MMP)-1 の役割について 第 11 回日本腹膜透析研究会 (2005.10.29-30 岡山)
22. Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., Taguchi, T., Koji, T., Tabata, T., Kohno, S.: Matrixmetalloproteinase-1(MMP-1) enhances the fibrotic area in chlorhexidine gluconate induced peritoneal fibrosis model in mice. American Society of Nephrology The 38th Annual Renal Week Meeting (2005.11.10-13 Philadelphia)
23. 松本剛一, 李宇錫, 大見寧, 木下鞆彦, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 久保田英朗: VEGF RNAi による扁平上皮癌の遺伝子治療. 第 64 回日本癌学会総会 (2005.9.14-16 札幌)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

Virus Envelope Vector for Gene Transfer

(US6,913,923 B2,USA で成立)

2. 実用新案登録

1. 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法

(発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史)

出願人：ジェノメディア（株）、大阪大学)

2005年11月24日出願、特願2005-338449

2. ターゲティングウイルスおよびその作製方法

(発明者：河地正子、玉井克人、金田安史)

出願人：ジェノメディア（株）、大阪大学)

2005年11月24日出願、特願2005-33947

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) HVJ の融合蛋白 F と標的分子 desmoglein 3 に対する一本鎖抗体のキメラ蛋白を有する HVJ の作成に成功し、癌細胞や皮膚組織への導入効率の増強が可能になった、2) 生体適合性ポリマーである低分子ゼラチンと HVJ-E との複合体形成を行い、腹腔内投与で腹膜播種した癌組織への選択導入が可能になり、腹腔内播種癌の治療に成功した。

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) 前年度の研究成果をもとにして HVJ の融合蛋白である F 蛋白中の F1 蛋白の C 末の膜貫通ドメインのみ残し、その N 末に desmoglein 3 に対する一本鎖抗体(scFv)の遺伝子(myc-tag を有する)を挿入し、その N 末端に signal peptide を付加したキメラ遺伝子を作成した。これらの遺伝子を培養 LLCMK2 細胞に導入して発現させ、抗 myc-tag 抗体で免疫染色を行い、細胞膜上への発現を確認し、さらに HVJ を感染させて産生されるウイルス粒子でのキメラ蛋白の発現と局在を抗 myc 抗体による蛋白プロットと免疫電顕により観察した。キメラ蛋白をもつ HVJ を LLCMK2 細胞で産生させ、遠心により回収し、それぞれの

標的である皮膚細胞 (PAM) や皮膚組織でのウイルス蛋白 F の遺伝子発現を調べた。2) 分子量 5,000 の低分子ゼラチンと ethylenediamine を架橋剤を用いて結合させて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。Balb/c マウスにマウス大腸癌細胞 CT26 を腹腔内に播種させ腫瘍結節を形成させた。この複合体を腹腔内に注入し腫瘍結節及びマウス主要臓器での遺伝子発現を評価した。次いでブレオマイシンを HVJ-E に封入後カチオン化ゼラチンと複合体を形成させ腫瘍播種したマウス腹腔内に投与し治療効果を調べた。

(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) 表皮基底層に発現する desmoglein 3 を認識する scFv の遺伝子を、この変異 F 遺伝子の 5' 末端にインフレームになるように融合させたキメラ分子 (scFv-F) を作成した。このキメラ遺伝子を LLCMK2 細胞に導入し、キメラ蛋白を安定に発現する形質転換株を分離した。この細胞では抗体分子は細胞膜に局在することが蛍光抗体法により認められた。ここに野生型の HVJ を感染させると、2 日後に回収したウイルス粒子には、Western blot で 37 kDa のキメラ分子が検出され、免疫電子顕微鏡撮影を行うと、このウイルス粒子上に scFv-F の存在が確認できた。次に desmoglein3 を認識する scFv をもつ変異 HVJ の desmoglein3 への結合を ELISA で測定した。変異型 HVJ では野生型 HVJ と比較して明らかに有意な結合増強が認められた。Desmoglein3 を認識するキメラ F 蛋白をもつ変異型 HVJ の場合、この実験の条件下では 50 HAU (3×10^6 粒子/1HAU) で結合がプラトーに達したが、野生型では 400 HAU でも結合の飽和状態は得られなかった。そこで回収した HVJ をそのまま (不活性化せずに)、細胞への感染実験を行った。m.o.i は 0.6 である。細胞としては desmoglein 3 が発現しているマウスケラチノサイトの Pam 細胞と発現していないマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞、サル腎臓細胞の LLCMK2 細胞を用いた。コントロールとして野生型の HVJ を感染させる実験も行い、F 蛋白の発現を蛍光抗体法で検出した。NIH3T3 細胞、LLCMK2 細胞では野生型 HVJ、scFv をもつ変異型 HVJ の感染後の F 蛋白の発現はほとんど差がなかったのに対し、Pam 細胞では変異型 HVJ の感染によって有意に高い F 蛋白の発現が

観察できた。次に組織中での感染効率を調べることにしたが、活性型の HVJ のマウスへの感染実験は危険であるため、マウスの表皮組織を取り出し、組織培養を行って感染実験を試行することにした。またマウスとしては今後遺伝子治療の対象の 1 つとなる表皮水疱症のモデルマウス (VII 型コラーゲン遺伝子のノックアウトマウス) の新生仔の表皮を分離し、組織培養を行い、野生型或いは変異型 HVJ (5×10^6 粒子) を感染させた。desmoglein3 に対する scFv をもつ HVJ によって多数の表皮細胞に F 蛋白の発現が検出されたが、scFv をもたない HVJ ではほとんど F 蛋白の発現は認められなかった。組織切片を作成すると、F 蛋白の発現は表皮基底細胞に局限していることが明らかになった。

2) ルシフェラーゼ遺伝子を封入した CG-HVJ-E を CT26 細胞を腹腔内播種させたマウスの腹腔内に投与し、24 時間後遺伝子発現を調べたところ、腫瘍結節で特異的に遺伝子が発現した。CG を用いない HVJ-E 単独投与では腫瘍にも他の主要臓器 (肝臓、脾臓、肺など) にもほとんど遺伝子発現は認められなかった。プレオマイシンは単独では細胞膜を通過しないので抗がん剤としては使用が難しい薬剤であるが、HVJ-E を用いて 300 倍以上の感受性をあげることがわかり、さらに CG-HVJ-E で導入効率が HVJ-E の 3 倍程度高められることがわかった。そこで抗がん剤のプレオマイシンを封入した CG-HVJ-E を腹腔内に 3 日おきに 6 回投与したところ、大腸癌細胞を腹腔内播種させたマウスの 40% で完全寛解が認められた。その他のグループでは全てマウスが死亡した。この完全寛解したマウスの皮下に同じ大腸癌細胞を移植してもすべて拒絶され、マウスの個体内

では抗腫瘍免疫が活性化されていることが示唆された。

D. 考察

1) 標的蛋白がのったウイルス粒子が完成し、標的分子に依存したウイルス感染が増強されたことより、今後標的導入ベクターとして機能しうることが期待される。しかし、この標的化 HVJ にはシアル酸を認識する HN も依然として存在しており、これを取り除くことにより標的化が完成すると考えられる。この HN の制御法の開発が今後必要であるが、すでに siRNA を用いてそれが可能になるという予備的なデータが得られている。2) CG 修飾 HVJ-E は恐らくリンパ管から取り込まれて腫瘍細胞と融合することにより、腫瘍結節に選択的な遺伝子導入が可能になったと考えられる。プレオマイシンは単独では細胞膜を通過しない抗がん剤であるが、HVJ-E を用いると数百倍以上の効果をもたらすことが可能になり、CG-HVJ-E によって腫瘍選択的な導入も可能になった。これは CG 修飾により生体中でのベクターの安定性が増強されたものと考えられる。マウスにおける副作用はほとんど認められなかった。現状の CG-HVJ-E は特異的な標的分子は有していないので、今後は前述の標的化 HVJ-E と組み合わせれば、さらに効果増強が望めるであろう。

E. 結論

1) キメラ F 蛋白を持つ標的導入可能な HVJ が完成された。2) CG-HVJ-E により腫瘍結節に選択的な遺伝子導入、抗がん剤のデリバリーが可能になり、がん治療効果を著しく高めることができた。

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. Mima, H., Yamamoto, S., Ito, M., Tomoshige, R., Tabata, Y., Tamai, K., and Kaneda, Y.: Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol. Cancer Ther.* 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* 7, 888-897, 2005.
3. Kim, YD, Park, K-G, Morishita, R., Kaneda, Y., Kim, S-Y., Song, D-K., Kim, S-D., Nam1, C-W., HC Lee, HC., Lee, K-U., Park, J-Y., Kim, B-W., Kim, J-G. and Lee, I-K.: Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter. *Gene Therapy*, in press.
4. Morishita, N., Nakagami, H., Morishita, R., Takeda, S., Mishima, F., Tarazono, B., Nishijima, S., Kaneda, Y., and Tanaka, N.: Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*334, 1121-1126, 2005.

5. Ono, M., Sawa, Y., Miyamoto, Y., Fukushima, N., Ichikawa, H., Ishizaka, T., Kaneda, Y., and Matsuda, H.: The effect of gene transfer with hepatocyte growth factor for pulmonary vascular hypoplasia in neonatal porcine model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129, 740-745, 2005.
2. 学会発表
1. 美馬秀俊、金田安史：生体適合性ポリマーを用いた遺伝子導入増強法の開発
(平成 17 年 9 月 14 日；第 64 回日本癌学会学術総会；札幌)
 2. 金田安史：遺伝子治療と Translational research
(平成 17 年 6 月 2 日；第 22 回日本呼吸器外科学会総会；京都)
 3. 美馬秀俊、金田安史：Development of polymer-conjugated HVJ envelope vector to enhance the transfection efficiency in vitro and in vivo
(平成 17 年 7 月 30 日；第 12 回日本遺伝子治療学会；東京)
 4. 河地正子、玉井克人、金田安史：表皮細胞高親和性 HVJ-E ベクターの開発
(平成 17 年 12 月 8 日；第 28 回日本分子生物学会；博多)
 5. 佐賀公太郎、玉井克人、金田安史：siRNA の利用による HN 低含有 HVJ ウイルス粒子の生産
(平成 17 年 12 月 8 日；第 28 回日本分子生物学会；博多)
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
Virus Envelope Vector for Gene Transfer (US6,913,923 B2,USA で成立)
 2. 実用新案登録
1. 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法
(発明者：佐賀公太郎、玉井克人、金田安史
出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学
2005 年 11 月 24 日出願、特願 2005-338449)
 2. ターゲッティングウイルスおよびその作製方法
(発明者：河地正子、玉井克人、金田安史；出願人；ジェノメディア（株）、大阪大学
2005 年 11 月 24 日出願、特願 2005-339474)

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 の徐放化のためのカチオン化ゼラチンからなる生体吸収性ハイドロゲル、ならびに HVJ-E の生体内安定性の向上のためのカチオン化高分子からなるステルス化キャリアを作製した。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調製し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。このハイドロゲルシステムに HVJ-E を含浸させ、その遺伝子発現を *in vitro* 細胞培養法で評価したところ、HVJ-E 単独に比較して、より長い期間の遺伝子発現が認められた。この結果は、HVJ-E が徐放化されたことを示している。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを担癌動物の癌周辺部位に投与した。その結果、投与部位に弱い遺伝子発現が認められた。一方、ステルス化キャリアとして、カチオン化ゼラチンおよびポリアリルアミンに対して片末端メトキシポリエチレングリコール (PEG) を導入した、PEG 導入カチオン化高分子を作製した。反応条件を変えることによって作製した導入率の異なる PEG 導入カチオン化高分子を HVJ-E と水溶液中で混合した。その結果、混合によって HVJ-E の表面ゼータ電位は負から正に変化した。この変化量はカチオン化高分子のアミノ基導入率、PEG 導入率に依存し、HVJ-E の表面に PEG 鎖が導入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、および HVJ-E を修飾して、その生体内での安定性を向上、癌へのターゲティング性を付与できるドラッグデリバリーシステム (DDS) 素材を開発することである。前者に対しては、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し、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 が徐放化される。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。一方、後者に対しては、HVJ-E 表面に親和性をもつカチオン化高分子を用いて、それにステルス効果をもつポリエチレングリコール (PEG) を化学導入し、さらに癌へのターゲティング分子などを導入した HVJ-E 修飾 DDS 高分子を作製することにより、動物を用いた HVJ-E のステルス効果と癌へのターゲティング能について評価している。本研究の成果によって、HVJ-E の生体内での不安定性および作用部位ターゲティング性を改善することにより、他のベ

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とエチレンジアミンの片末端アミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて縮合させることにより、エチレンジアミンの導入反応を行った。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電気泳動光散乱 (ELS) 測定によりゼラチンの表面ゼータ電位を調べた。得られたカチオン化ゼラチン水溶液 (10wt%) に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、シャーレに流延した。4℃で12時間、静置することによって、カチオン化ゼラチンの架橋反応を行い、カチオン化ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた架橋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。また、グルタルアルデヒドの濃度を変化させることにより、ハイドロゲルの架橋密度を変えることができた。

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も同様の方法で 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肉に埋入、経時的に筋肉を採取、その遺伝子発現レベルを評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における LacZ 遺伝子の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 の水溶液を凍結乾燥した架橋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、その膜の上面に 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。

加えて、Green fluorescent protein (GFP) をコードするプラスミド DNA を含む HVJ-E をハイドロゲルに含浸した。この HVJ-E 含浸ハイドロゲルを前述の培養系に適用した。培養の進行にともなう培養細胞への遺伝子発現レベルを、ハイドロゲルを用いない HVJ-E 水溶液のみの場合の結果と比較検討した。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを皮下に癌を移植した担癌マウスの癌周辺部に投与した。投与部位周辺の遺伝子発現レベルを評価するとともに、ハイドロゲル埋入部位の組織学的検討を行った。

エチレンジアミンを導入して作製したカチオン化ゼラチンあるいはアミノ基をもつポリアリルアミンのアミノ基への PEG の導入反応を行っ

た。用いた PEG は片末端メトキシ基、片末端が活性化エステル基で重量平均分子量が 5000 のサンプルである。カチオン化高分子のジメチルスルフォキシド (DMSO) 溶液あるいは水溶液中へ、異なる濃度の PEG 溶液を投入、37°C で 3 時間、あるいは、室温で 12 時間の条件で PEG のカチオン化高分子への導入反応を行った。反応後、反応産物を水に対して透析を行い、未反応 PEG を除去、凍結乾燥することによって PEG 導入カチオン化高分子を得た。PEG 導入率は、TNBS 法によるアミノ基の減少から定量した。メトキシ基以外の末端をもつ PEG あるいは異なる分子量をもつ PEG を利用したカチオン化高分子への導入反応も行った。得られた PEG 導入カチオン化高分子を HVJ-E と水溶液中で混合することによって、HVJ-E 表面を PEG 導入カチオン化高分子で吸着修飾した。コーティングの有無は、混合処理を行う前後における HVJ-E の表面ゼータ電位を ELS にて測定することによって評価した。

(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を変化させることによって、アミノ基導入率の異なる様々なカチオン化ゼラチンを作製することができた。これらのカチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とを混合したところ、プラスミド DNA の表面ゼータ電位が負から正へと変わり、かつ、そ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。

カチオン化ゼラチン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によって制御できることもわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度によって、ハイドロゲルの架橋程度が変化し、その結果、酵素攻撃によるゼラチン分子の水可溶化の速度が変化したことが原因であると考えられる。プラスミド DNA の徐放化プロファイルは、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生体内残存のプロファイルとよく相関していた。これは、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にともなって、プラスミド DNA が徐放化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したところ、埋入部位における遺伝子発

現が見られ、そ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。

プラスミド DNA を含む HVJ-E を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いて細胞培養実験を行った。HVJ-E 含浸ハイドロゲルを直接、細胞に接触させて培養した実験、およびハイドロゲルを分解させ、その分解物を細胞に与えて培養した実験のいずれの場合においても、遺伝子発現が認められた。これらの結果は、培養系におかれたハイドロゲルが、細胞から分泌された酵素により分解されることによって、水可溶化されたカチオン化ゼラチンフラグメントで修飾された HVJ-E がハイドロゲルから放出され、遺伝子発現が起こったことを示している。その発現期間は、HVJ-E 単独の場合に比較して、延長していた。この結果は、HVJ-E がハイドロゲルから徐放化されたことを示している。次に、HVJ-E 含浸ハイドロゲルを担癌マウスの癌部位周辺に投与した。その結果、投与部位における弱い遺伝子発現が見られたものの、ハイドロゲルによる炎症反応が認められた。この炎症反応を軽減するべく、ハイドロゲルの組成、分解性を変えたサンプルを作製、動物実験を継続している。

HVJ-E の DDS 化高分子の作製に関しては、カチオン化ゼラチンおよびポリアリルアミンを用いた片末端メトキシ PEG 導入反応を行った。導入反応時における PEG 濃度、反応時間を変えることによって、導入率の異なる PEG 導入カチオン化高分子を作製することができた。HVJ-E と PEG 導入カチオン化高分子とを水溶液中で混合し、表面ゼータ電位を測定した。その結果、HVJ-E の表面ゼータ電位が負から正に変化することがわかった。この変化量はカチオン化高分子のアミノ基導入率、PEG 導入率に依存していた。HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを動物に埋入し、その埋入部位における遺伝子発現レベルの増強と発現期間の延長とを期待したが、これまでのところ、予想通りの結果は得られていない。

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換えることができる。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す、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。これまでに得られた結果は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルが HVJ-E の徐放化キャリアとしてうまく働いていることを示している。HVJ-E 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを動物に埋入し、その埋入部位における発現レベルの増強と発現期間の延長とを期待したが、これまでのところ、予想通りの結果は得られていない。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。

HVJ-E の体内安定化のための DDS サンプルをデザイン、PEG 導入カチオン化高分子を作製した。得られた PEG 導入カチオン化高分子のキャラクタリゼーションを行ったところ、目的とするサンプルが作製できていることがわかった。今後は、これらのサンプルのステルス効果を動物実験によって調べていく予定である。加えて、癌組織へのターゲティング用の DDS 高分子として、カチオン化高分子に葉酸およびトランスフェリンなどのリガンドを導入する反応を進めている。これらのサンプルのキャラクタリゼーションを行う

とともに、細胞培養および動物実験による HVJ-E の癌へのターゲティング効果を評価していく予定である。

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。HVJ-E の表面修飾用の PEG 導入カチオン化高分子の作製を行った。これらの高分子を HVJ-E と混合することによって、HVJ-E の表面を修飾できることがわかった。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., Tabata, Y.: Preparation of poly(ethylene glycol)-introduced cationized gelatin as a non-viral gene carrier. *J Biomater Sci Polym Ed.* 16 : 1447-1461 (2005)
2. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. *J Controlled Release.* 105 : 318-331 (2005)
3. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Targeting of plasmid DNA to renal interstitial fibroblasts by cationized gelatin. *Biol Pharm Bull.* 28 : 2007-2010 (2005)
4. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. In *Key Engineering Materials.* 288-289 : 121-124 (2005)
5. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Enhanced anti-fibrotic activity of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor for a mouse model of obstructive nephropathy by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J. Controlled Release.* 110: 610-617 (2006).
6. 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* 7 : 888-897 (2005)
7. Ozeki, M., Tabata, Y.: In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various crosslinking methods. *J. Biomater.*

Polymer Edn. 16 : 549-561 (2005)

8. Kasper, F. K., Kushibiki, T., Kimura, Y., Mikos, A. G., Tabata, Y.: In vivo release of plasmid DNA from composites of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) and cationized gelatin microspheres. *J Controlled Release.* 107 : 547-561 (2005)

2. 学会発表

1. Kushibiki, T., Tabata, Y.: Blockade of TGF-beta 1 receptor II expression inhibits interstitial renal fibrosis by targeting of small interference RNA to renal interstitial fibroblasts. The 3th KIPS-NIST (2005.5.19-20 Kyoto)
2. 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー. 第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)
3. 櫛引俊宏, 田畑泰彦: 遺伝子導入のためのゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製. 第 21 回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)
4. 岡空高広, 櫛引俊宏, 岡崎有道, 田畑泰彦: マクロファージへの遺伝子導入のための高分子キャリアのデザイン. 第 51 回高分子研究発表会 (2005.7.22 神戸)
5. Xia, Z., Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., 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 9th Research Forum on rogressive Renal Diseases (2005.2.12 名古屋)
6. Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Suppression of tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein47(HSP47) conjugated with cationized gelatin microspheres in unilateral ureteral obstruction. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)
7. 夏志銀, 宮崎正信, 阿部克成, 小畑陽子, 櫛引俊宏, 友重龍治, 堀田覺, 田畑泰彦, 小路武彦, 河野茂: HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres (CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction 第 48 回日本腎臓学会学術総会 (2005.6.23-25 横浜)
8. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 原田孝司, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入マクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討 第 50 回日本透析医学会学術総会 (2005.6.24-26 横浜)
9. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友