

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

遺伝子治療薬の生体内投与後の
毒性発現機構解析に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成18（2006）年4月

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|--------------------------------------|---|
| 遺伝子治療薬の生体内投与後の毒性発現機構解析に関する研究----- | 1 |
| 主任研究者 独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー 水口裕之 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 22 |
|---------------------------|----|

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

遺伝子治療薬の生体内投与後の毒性発現機構解析に関する研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

医薬品にとって最も重要な安全性を保証・予測・評価する技術として、トキシコゲノミクステクノロジーの構築が期待されている。現在、これらの技術を用いて、一般的な医薬品化合物について毒性学的データの解析やトランスクリプトーム解析が行われている。将来の医薬品候補である遺伝子治療薬についても、トキシコゲノミクステクノロジーを利用した安全性の評価や、それらの評価をフィードバックして更なる安全性を確保するためのテクノロジー開発が必要である。アデノウイルス(Ad)ベクターは遺伝子治療臨床研究に最も広く用いられているベクターであるが、生体への投与後、免疫系等に及ぼす副作用を生じることが知られており、今後の遺伝子治療の進展のためには、系統的な毒性発現機構の解析が必要不可欠である。本研究では、Adベクター(研究代表者が先駆的に開発を進めている改良型Adベクターを含む)投与後の細胞や生体(マウス)での網羅的なトランスクリプトーム解析と、ウイルスカプシドタンパク質と生体(細胞)との相互作用を個別に詳細に解析する両アプローチから研究を進めることで、毒性発現に至る分子メカニズムの解明や、関与する細胞(生体)側およびウイルス側因子の同定を行う。本年度は各課題について以下の結果を得た。

- (1) マウスへのAdベクターおよび非ウイルスベクター投与後の毒性学的解析；一般にウイルスベクターはその高い抗原性などから非ウイルスベクターに比べ安全性に問題があると考えられている。しかしながら、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの遺伝子発現効率および自然免疫誘導能などの副作用を系統的に比較した報告はない。そこで、Adベクターと非ウイルスベクター(plasmid DNA-cationic liposome complex; lipoplex)をマウスに全身投与した場合の遺伝子発現能や自然免疫誘導能を比較解析することで、有効性と安全性に関する検討を行った。Adベクター投与群ではlipoplex投与群に比べ、各臓器において1~5オーダー以上高い遺伝子発現が得られた。一方、自然免疫誘導能の指標となる血中IL-6及びIL-12濃度については、lipoplex投与群はAdベクター投与群に比べ5~15倍高い濃度を示した。さらに非メチル化CpGモチーフを減少させたplasmidからなるlipoplexを作製し同様の検討を行ったが、血中IL-6濃度は依然としてAdベクター投与群に比べ高いものであった。従ってlipoplexは遺伝子発現能が低だけでなく、少なくとも自然免疫誘導能に関する副作用がAdベクターよりも高く、in vivo遺伝子治療を進める場合には注意を要することが示唆された。
- (2) 培養細胞へのAdベクター投与後のDNAマイクロアレイ解析；従来型AdベクターおよびRGD型ファイバー改変Adベクターを初代培養腹腔内マクロファージに作用させた後の遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、作用1、3時間後のいずれにおいてもRGD型Adベクターのほうが従来型Adベクターより多くの遺伝子発現変化を引き起こしていることが明らかとなった。また、従来型AdベクターおよびRGD型Adベクター作用3時間後において両ベクター共通に発現が上昇する遺伝子を調べた結果、ケモカイン等炎症時に産生されるサイトカインが多く見られた。さらに、インターフェロン誘導遺伝子も多く含まれており、Adベクターによりインターフェロンカスケードが活性化されていることが明らかとなった。

協力研究者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所
主任研究員
櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員
黄海瑛 (独) 医薬基盤研究所
菅野純 国立医薬品食品衛生研究所
五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

医薬品にとって最も重要な安全性を保証・予測・評価する技術として、トキシコゲノミクステクノロジーの構築が期待されている。現在、これらの技術を用いて、一般的な医薬品化合物について毒性学的データの解析やトランスクリプトーム解析が行われている。将来の医薬品候補である遺伝子治療薬についても、トキシコゲノミクステクノロジーを利用した安全性の評価や、それらの評価をフィードバックして更なる安全性を確保するためのテクノロジー開発が必要である。

アデノウイルス (Ad) ベクターは遺伝子治療臨床研究で最も広く使用されているベクターのひとつであり、現在までに癌を中心として全遺伝子治療臨床研究プロトコールの 25.9% (2004 年 7 月現在) で用いられている。我が国においては遺伝子治療臨床研究プロトコールの約半数で使用されている。その間、1993 年の嚢胞性繊維症の遺伝子治療臨床研究で明らかとなった起炎性に関する副作用事例や、1999 年のオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研

究での死亡事故などが起こり、有効性や安全性を高めたベクターの開発や、安全性 (毒性あるいは副作用) を評価する研究の進展が望まれている。Ad ベクターを生体に投与した場合に起こる副作用は、1) 投与後直後に起こる自然免疫、2) 投与 1-2 週間後にわずかに産生されたウイルスタンパク質によって起こる細胞性免疫、および 3) ウイルスカプシドに対する液性免疫に大別される。これらの課題を克服するため、申請者らのグループはカプシドタンパク質を改変した種々の改良型 Ad ベクターを開発している。本研究では、現在臨床で汎用されている Ad ベクターをはじめ、種々の改良型 Ad ベクターを *in vitro*、*in vivo* に作用後の遺伝子発現情報を網羅的に解析 (トランスクリプトーム解析) し、毒性発現に至る遺伝子やタンパク質を同定し、遺伝子治療の安全性の向上や実用化に向けての基礎情報を得ることを目的とする。さらに、上記 1)~3) の副作用の中でも 1) の自然免疫が現在の最も大きな課題であることから、ウイルスカプシドタンパク質と生体 (細胞) との相互作用を、自然免疫に関与する分子である Toll like receptor (TLR) およびその下流シグナル伝達物質を中心に、組換えウイルスカプシドタンパク質やノックアウト動物などを用いて個別に詳細に解析する。

本年度は、Ad ベクター投与後のトランスクリプトーム解析をマウス腹腔内マクロファージを用いて *in vitro* で検討すると共に、マウスへの Ad ベクターおよび非ウイルスベクター投与後の毒性学的解析、遺伝子発現効率に関する比較検討を詳細に行った。

本研究は、安全性の高い遺伝子治療法の確

立と評価、安全性の高い遺伝子治療薬の開発
に向けた情報提供、及びそれらを通じた保健
医療の向上への貢献が期待される。

B. 研究方法

(1) 各種ベクターの調製

ウイルスベクターとして Ad ベクターを、非ウイルスベクターとして plasmid DNA/cationic liposome complex (lipoplex) を使用した。Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV5 のマルチクローニング部位にルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、ルシフェラーゼ 発現シャトルプラスミド pHCMV5-L2 を作製した。次に、pHCMV5-L2 を I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことによりルシフェラーゼ発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMV L2 を得た。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作製するため、pAdHM15-RGD (ファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチド配列を挿入した Ad ベクターのためのベクタープラスミド) とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-CMV L2 を作製した。作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることによりルシフェラーゼ 発現 Ad ベクター Ad-L2、AdRGD-L2 を得た。Ad ベクターを 293 細胞に 3-4 次感染までさせることにより大量調製し、ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH 7.5)、1 mM MgCl₂、10 % glycerol からなる溶液で透析した。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。

plasmid DNA は CMV プロモーターの制御下においてルシフェラーゼを発現する pCMV-L1、および CpG motif を減少させた plasmid であ

る pCpG-mcs (Invivogen) を用いた。各 plasmid は大腸菌株 DH5 α (pCpG-mcs は GT115 を用いた) を用いて増幅し、EndoFree-Mega kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製後の plasmid 溶液中に含まれる LPS 量は Limulus HS-F Single Test (和光純薬工業株式会社) を用いて測定し、LPS フリーであることを確認した。

(2) Lipoplex の作製

等モルの DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propane methylsulfate) (AVANTI POLAR LIPIDS INC.) とコレステロール (Nacalai Tesc) をクロロホルム中で溶解し、エバポレーターを用いて溶媒を蒸発させ乾燥フィルムを作製した後、デシゲーター内で一昼夜乾燥させた。5 % デキストロース溶液を加えて 37 °C 水浴上で振とう、水和した後、sonication を行い liposome を作製した。5 % デキストロースを用いて希釈した plasmid 溶液に liposome をチャージ比 4.6 となるように加え、室温で 30 分インキュベートすることにより lipoplex を作製した。

(3) In vivo への遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ

マウスは C57BL/6 (5-7wks、♀ ; 日本 SLC) を用いた。Ad ベクターと Lipoplex の投与量は外見の毒性がみられない限界の濃度 (Ad vector; 5×10^{10} VP/mouse、lipoplex; 25 μ g plasmid DNA/mouse) を high dose として、その 1/5 量 (Ad vector; 1×10^{10} VP/mouse、lipoplex; 5 μ g plasmid DNA/mouse) を low dose として選択した。Ad ベクター (Ad-L2)、

lipoplex をマウス尾静脈より投与し、投与後 3、6、9、24、48 時間後に各臓器（心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓）を回収した。回収した臓器は *in vivo* lysis buffer (0.05% Triton X, 2 mM EDTA, 0.1 M Tris pH 7.8) を加え氷上でホモジナイズした。作製したホモジネート液は凍結融解後 15000 ×g、10 分遠心し、上清を回収した。ルシフェラーゼアッセイはピッカジーン 5500（東洋ビーネット株式会社）100 μl にホモジネート上清 10 μl を加え、発光量 (RLU) を測定した。測定した発光量は付属のスタンダードを用いて作製した検量線を用いて補正し、ルシフェラーゼタンパク量を算出した。

(4) 血清中各種サイトカイン濃度および ALT、AST 活性の測定

上記と同量のベクターを投与後 3、6、9、24、48 時間の末梢血を採取し、氷上で 2–3 時間インキュベートしたのち 15000 ×g、10 分遠心しその上清を回収し血清とした。血清中 IL-6、IL-12、TNF- α 濃度はそれぞれ、BIOSOURCE (IL-6、IL-12)、BD Bioscience (TNF- α) のキットを用いて推奨プロトコールに従い測定した。また、血清中 ALT (alanine transferase)、AST (aspartate transferase) 活性はトランスアミナーゼ CII-テスト（和光純薬工業株式会社）を用いて推奨プロトコールに従い測定した。

(4) 肝臓切片の作製と HE 染色

各種ベクターを投与したマウスから肝臓を回収し、PBS で洗浄したのち中性ホルマリン緩衝液中で固定を行った。固定した肝臓はアプライドメディカルリサーチに委託して

パラフィンブロックの作製、切片作製、HE 染色を行った。

(6) マウス腹腔内マクロファージの培養

C57BL/6 ♂ 10 週令マウスの腹腔内にチオグリコール酸を投与し、4 日後腹水を回収した。腹水を遠心後、沈降した細胞を RPMI1640 培地 (10% FCS) に懸濁し、60 mm dish に播種した。

(7) Ad ベクター作用時の応答遺伝子の探索

マウス腹腔内マクロファージに 10,000VP/cell の濃度で、従来型 Ad ベクター (Ad-L2) および RGD 型 Ad ベクター (AdRGD-L2) を作用させた。1、3 時間後に total RNA を回収し、定法にしたがって GeneChip 解析を行った。チップデータの解析には GeneSpring ソフトウェアを用い、遺伝子の発現強度に応じて漸次的に発現比の有意水準を設定することにより、ステップワイズに遺伝子の選択を行った。

C. 研究結果

ウイルスベクターとして Ad ベクター（ここでは従来型 Ad ベクターの Ad-L2 を用いた）を、非ウイルスベクターとして plasmid DNA-cationic liposome complex (lipoplex) を用い、これらをマウスに尾静脈内投与したときに得られる遺伝子発現効率や自然免疫誘導能を比較解析することで、有効性と安全性に関する検討を行った。

まず、各ベクターをマウスに尾静脈内投与し、投与 6 時間後の各臓器（心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓）のルシフェラーゼ発現を検討したところ、Ad ベクター投与群では回収したすべての臓器において 1-5 オーダー以上高いルシフェラーゼ発現量が得られた (Fig. 1)。また、その遺伝子発現は投与量依存的に増加していた。各ベクターにおける遺伝子発現には臓器特異性があり、Ad ベクター投与群では特に肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現が高く、48 時間後まで持続していた。一方、lipoplex 投与群におけるルシフェラーゼ発現は心臓および肺に局限し、投与 6 時間後にピークを迎えた後減少した。この結果から、lipoplex に比べ Ad ベクターは種々の臓器において高い遺伝子発現を示すことが確認された。

次に各ベクターの投与により惹起される副作用を比較するため、自然免疫誘導能と肝毒性について検討を行った。両ベクター投与 6 時間後における血清中 IL-6、IL-12、TNF- α 濃度を測定したところ、予期せぬことに、lipoplex 投与群の方が Ad ベクター投与群に比べ 5-15 倍高い濃度を示した (Fig. 2a-c)。したがって、炎症性サイトカイン産生量、すなわち自然免疫誘導能に関しては Ad ベク

ターより lipoplex の方が高いことが明らかとなった。

次に、各ベクター投与により生じる肝障害を血中 ALT 活性および肝臓の組織切片 (HE 染色) により比較した。両ベクター投与 24 時間後における血中 ALT 活性を測定したところ、ベクター投与量依存的に活性の増加が見られるものの、自然免疫誘導能の場合 (Fig. 2) とは異なり、Ad ベクター投与群と lipoplex 投与群との間に大きな差は見られなかった (Fig. 3)。次に投与 3、6、48 時間後における肝臓の切片を作製し、HE 染色を行った結果、lipoplex 投与群では投与 3 時間後で肝細胞の顆粒化が観察された (Fig. 4d)。さらに投与 6 時間後では一部脱顆粒化が見られ始め、投与 48 時間後では脱顆粒化に加え、脱核化も生じていた (Fig. 4 e および f)。一方、Ad ベクター投与群では投与 3 時間後ではほぼ正常な肝臓の構造を保っていたものの、6 時間後では lipoplex 投与群と同様に脱顆粒化が、48 時間後には一部脱核化が見られた (Fig. 4 a-c)。したがって、lipoplex 投与により引き起こされる肝障害の方が Ad ベクター投与群に比べて急性度が高いものの、長時間レベルで見れば同程度であった。この結果は両ベクター投与により誘導された血中 ALT 活性に大きな差がなかったという結果と一致するものである。

Toll-like receptor (TLR) は、細胞外から進入した病原異物を認識するレセプターとして同定された受容体であり、これまでにヒトでは 10 種類が報告されている。このうち、TLR9 はバクテリア DNA 由来の unmethylated CpG motif を認識することから、CpG motif を減少させた plasmid DNA を用い

ることにより、lipoplex 投与により誘導される自然免疫応答がどの程度抑制できるか検討を行った。CpG motif を欠損させたプラスミドとして pCpG-mcs を用い、pCMV-L1 と同様に DOTAP/chol を用いて lipoplex (non CpG lipoplex) を作製した。これをマウスに尾静脈内投与し経時的に血中 IL-6 濃度を測定したところ、ピーク時における血中 IL-6 濃度は CpG 含有 lipoplex 投与群に比べ低下していた (Fig. 5a)。しかし、血中濃度がピークとなる時間が異なっており、pCMV-L1 投与では投与 3 時間後以内にピークを迎えていたのに対し、pCpG-mcs を用いた場合では投与 9 時間後に遅延していた。また、pCpG-mcs 投与群における血中 IL-12 濃度はすべての時間において pCMV-L1 投与群に比べ低下が見られ、ピーク時間の変動も見られなかった。したがって、使用する plasmid DNA の配列から unmethylated CpG motif を減少させることによりある程度自然免疫応答を抑制することはできるものの、完全に抑制することはできないことが明らかとなった。

次に、*in vitro* における Ad ベクター作用後の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。ここでは Ad ベクターとして従来型 Ad ベクターと RGD 配列を付与したファイバー改変 Ad ベクター (それぞれ Ad-L2、AdRGD-L2) を用いた。マウス腹腔内マクロファージは Ad 受容体の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を発現しておらず、従来型 Ad ベクターでの遺伝子導入活性は低いことが知られており、従来型 Ad ベクターに加え、 αv インテグリンを介して CAR 陰性細胞へも効率よく遺伝子導入可能なファイバー改変 Ad ベ

クターを作用時の遺伝子発現解析も行った。マウス腹腔内マクロファージに Ad ベクターを作用させた結果、1、3 時間後のいずれにおいても RGD 型 Ad ベクターのほうが従来型 Ad ベクターより多くの遺伝子発現変化を引き起こしていることが明らかとなった (Fig. 6 および Table 1, 2)。また、3 時間後の方がより多くの遺伝子の発現が変化していた (Fig. 6)。次に、従来型 Ad ベクターおよび RGD 型 Ad ベクター作用 3 時間後において両ベクター共通に発現が上昇する遺伝子を調べた結果、ケモカイン等炎症時に産生されるサイトカインが多く見られた (Table 3)。さらに、インターフェロン誘導遺伝子も多く含まれており、Ad ベクターによりインターフェロンカスケードが活性化されていることが明らかとなった。

D. 考察

遺伝子導入ベクターは遺伝子治療だけでなく、遺伝子やタンパク質の機能解析を始めとする基礎研究においても必要不可欠なツールとなっている。これまでに様々な遺伝子導入ベクターが開発されてきたが、臨床への応用を考えた場合には克服すべき問題点が未だ多く存在するのが現状である。中でもベクターにより誘導される自然免疫応答は、治療への応用を考えた場合、重大な問題点として挙げられる。特に 1999 年にペンシルバニア大学で実施された遺伝子治療の臨床研究において発生した Ad ベクター大量投与による死亡事故は、自然免疫の過剰な活性化が原因とされており、種々のベクターにより誘導される自然免疫活性化のメカニズムを解明し、それを抑制する方法を開発することは重要な研究課題となっている。

遺伝子導入ベクターは大きくウイルスベクター、非ウイルスベクターの 2 種類に分類される。ウイルスベクターは *in vitro*、*in vivo* とともに遺伝子導入効率が高いという利点を持っているが、ウイルス由来の成分を含むため、安全性に問題があると考えられている。一方、plasmid DNA を基本とした非ウイルスベクターは、遺伝子発現効率は低いが高安全性は高いと考えられている。しかし、実際にウイルスベクターと非ウイルスベクターの遺伝子発現効率および安全性（毒性）を系統的に比較した報告はない。そこで本研究では、ウイルスベクターとして Ad ベクターを、非ウイルスベクターとして cationic liposome-DNA complex (lipoplex) を用いて両ベクターによる遺伝子発現能および自然免疫誘導能を比較解析することで、有効性と

安全性（毒性）を比較した。

まず、遺伝子発現効率の比較を行ったところ、Ad ベクター投与群では回収した臓器すべてにおいて高い発現がみられ、特に肝臓、脾臓では lipoplex 投与群に比べて 5 オーダー以上高い遺伝子発現効率を示した。これは、Ad ベクターが一部の癌細胞や血球系細胞を除く多くの哺乳類細胞に発現している coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を受容体として細胞内に進入し、かつウイルス特有のメカニズムを利用して外来遺伝子を効率よく核内に送り込むことが出来るためと考えられる。一方、lipoplex 投与群では肺、心臓といった一部の臓器にしか高レベルのルシフェラーゼ発現は認められず、また、その発現量も Ad ベクター投与群の約 1/10 と低いものであった。これは lipoplex の細胞侵入メカニズムが特定の受容体を介したものでなく、電気的に細胞表面に結合することで起こるエンドサイトーシスであること、さらに細胞内に侵入した DNA が核に移行する効率が低いためであると考えられる。また、lipoplex は自身のサイズの大きさから毛細血管に詰まるような形で滞留するため、細い血管を有する心臓、肺に遺伝子発現が限局したと考えられる。

次に、両ベクター投与により誘発される炎症性サイトカインの産生および肝毒性を指標に、副作用の比較を行った。ベクター投与後の血中サイトカイン濃度を測定したところ、予期せぬことに、IL-6、IL-12、TNF- α とともに lipoplex 投与群において Ad ベクター投与群よりも高い濃度を示した。また、lipoplex に関しては、非メチル化 CpG モチーフを減少させた plasmid DNA を用いた場合で

も炎症性サイトカイン産生は部分的にしか抑制されなかった。したがって、lipoplexにより引き起こされる炎症性サイトカインの産生は、非メチル化 CpG モチーフを減少させた plasmid DNA でも十分に誘導可能であり完全に抑制できないことが明らかとなった。これは、依然としてプラスミドに残存している非メチル化 CpG モチーフが TLR9 を活性化するのに十分であるか、あるいは TLR9 を介した自然免疫応答以外のメカニズムも関与している可能性が示唆された。なお、両ベクターにより誘導される肝障害のレベルは同程度であると考えられた。

前記したように、一般的にウイルスベクターは非ウイルスベクターに比べ病原性が高く、危険性が高いと認識されることが多い。しかし、本研究により、非ウイルスベクターを用いた場合でも重篤な副作用が引き起こされる可能性は十分にあり、少なくとも全身投与した場合、非ウイルスベクターの方がウイルスベクターに比べ強い自然免疫応答を示すことが明らかとなった。したがって、非ウイルスベクターはウイルスベクターに比べ安全なベクターであるとは一概に言えず、少なくとも全身投与した際に誘導される自然免疫応答に関しては注意が必要であることが明らかとなった。

次に、自然免疫において重要な役割を有しているマクロファージに Ad ベクターを作用させたときの発現遺伝子の変化を DNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に解析した。従来型 Ad ベクターあるいは Ad ベクターのファイバーノブに RGD 配列を挿入し、細胞表面のインテグリンと親和性を持たせた RGD 型 Ad ベクターをマクロファージに作用させ

ると、RGD 型 Ad ベクターの方がより多くの遺伝子発現の変化が生じることが明らかとなった。これは、RGD 型 Ad ベクターが従来型 Ad ベクターよりもウイルス粒子としてより多く細胞内に取り込まれたためであると考えられた。また、作用時間においては3時間後のほうが1時間後よりもより多くの遺伝子の発現変動がみられたが、これは3時間後においては二次的な遺伝子発現も生じているためであると考えられる。Ad ベクター作用により多くの遺伝子発現が上昇することが示されたが、この中には炎症時に大量に産生される CCL4 や CXCL2 といったケモカインやインターフェロンにより誘導される遺伝子などが多く含まれた。したがって、Ad ベクターは生体投与後これらの遺伝子を大量に発現誘導することにより自然免疫応答を惹起するものと考えられた。来年度以降は、DNA マイクロアレイ解析を *in vivo* にも応用することで、Ad ベクターによる自然免疫応答に関与するメカニズムの解明や、責任遺伝子の同定を目指した研究を行う予定である。

E. 結論

(1) Ad ベクターと非ウイルスベクター (lipoplex) をマウスに全身投与した場合の遺伝子発現能や自然免疫誘導能を比較解析した結果、Ad ベクター投与群では lipoplex 投与群に比べ、各臓器において 1~5 オーダー以上高い遺伝子発現が得られた。一方、自然免疫誘導能の指標となる血中 IL-6 及び IL-12 濃度については、lipoplex 投与群は Ad ベクター投与群に比べ 5~15 倍高い濃度を示した。さらに CpG モチーフを減少させた plasmid からなる lipoplex を作製し同様の検討を行ったが、血中 IL-6 及び IL-12 濃度は依然として Ad ベクター投与群に比べ高いものであり、lipoplex は遺伝子発現能が低いだけでなく、少なくとも自然免疫誘導能に関する副作用が Ad ベクターよりも高く、in vivo 遺伝子治療を進める場合には注意を要することが示唆された。

(2) 従来型 Ad ベクターおよび RGD 型ファイバー改変 Ad ベクターを培養細胞や初代培養腹腔内マクロファージに作用させた後の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、RGD 型 Ad ベクターの方が従来型 Ad ベクターより多くの遺伝子発現変化を引き起こすことが明らかとなった。また、ベクター作用 3 時間後において両ベクター共通に発現が上昇する遺伝子を調べた結果、ケモカイン等炎症時に産生されるサイトカインやインターフェロン誘導遺伝子が多く含まれており、Ad ベクターによりインターフェロンカスケードが活性化されていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanebe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Modified adenovirus vectors with CAR-, α v integrin-, and heparan sulfate-binding ablation reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.*, 17, 264-279 (2006)
- 2) Kawabata K., Sakurai F., Koizumi N., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.* in press.
- 3) Xu Z.L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T. Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, 57, 781-802 (2005)
- 4) 水口裕之・川端健二・櫻井文教・早川堯夫；改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES細胞への高効率遺伝子導入、炎症・再生、25、447-451 (2005)
- 5) 水口裕之・早川堯夫；カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入；BIO INDUSTRY、22(5)、16-21 (2005)

2. 学会発表

- 1) 水口裕之；overview『ウイルス・非ウイルスベクター開発研究の最前線と臨床・産業化への道』；日本薬学会 126 年会；2006 年 3 月 28-39 日、仙台
- 2) 桜井晴奈、櫻井文教、佐々木朋美、川端健二、小泉直也、黄海瑛、倉知慎之輔、中川晋作、水口裕之；Lipoplex とアデノウイルスベクターの in vivo における遺伝子発現能および自然免疫誘導能の比較；日本薬学会第 126 年会、2006 年 3 月 28-39 日、仙台
- 3) 水口裕之；遺伝子機能解析のための次世代アデノウイルスベクターの開発；第 69 回新適塾「21 世紀の薬箱」；2006 年 1 月 31 日、大阪
- 4) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究；九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス（九州大学医学部特別講演）；2006 年 1 月 17 日、福岡
- 5) 水口裕之；遺伝子治療研究における薬学の役割；ベクター開発の重要性；平成 17 年度大阪大学薬学部卒後研修会「食・健康と薬学」；2005 年 12 月 2 日、大阪
- 6) 水口裕之；改変アデノウイルスベクターによる遺伝子導入制御；「生物医工学サロン」第 17 回集会；2005 年 11 月 9 日、大阪

- 7) 水口裕之；ウイルスの超分子化学；「ナノバイオ基礎から最前線」ーバイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出ー；2005年11月2日、神奈川
- 8) 水口裕之；カプシドタンパク質の改変によるアデノウイルスベクターの遺伝子導入制御；遺伝子・デリバリー研究会 第5回 夏期セミナー；2005年8月2日、箱根
- 9) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発と遺伝子機能解析、遺伝子治療、ワクチン等への応用；彩都シンポジウム&サイエンスセミナーSP；2005年7月；大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

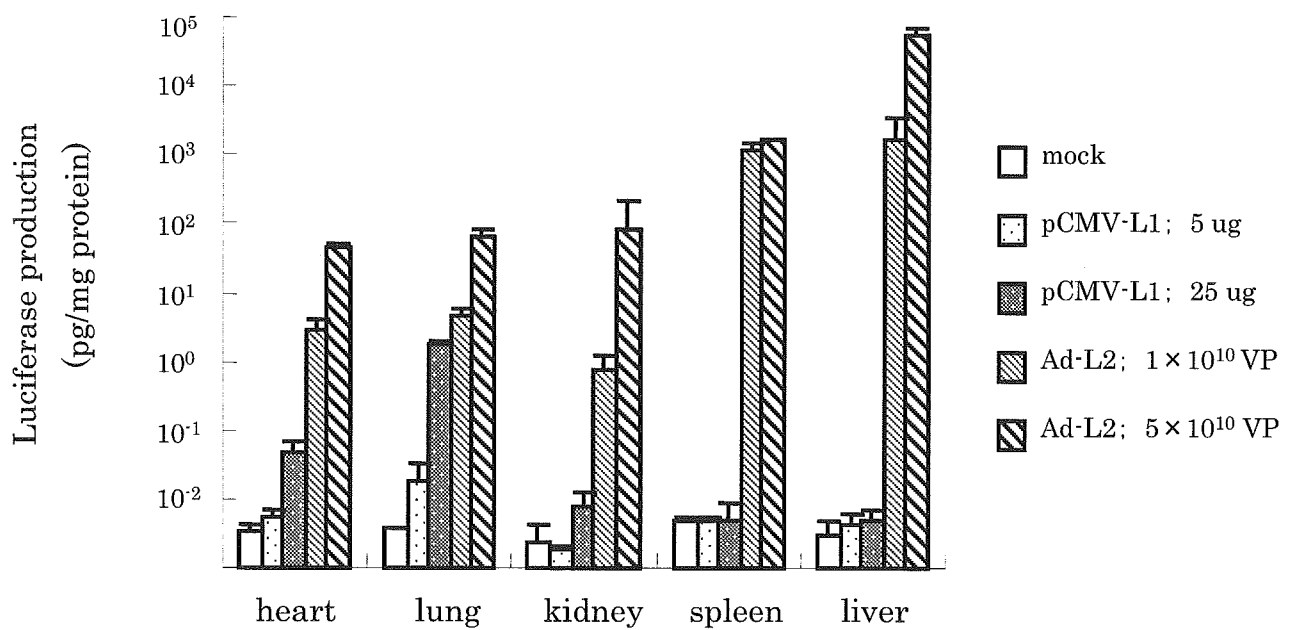


Fig. 1 Gene expressions of various organs by iv injection of vectors.

Mice were sacrificed 6 hr after iv injection of Ad vector or lipoplex in different dose. Data are expressed as means of 4 mice \pm SD.

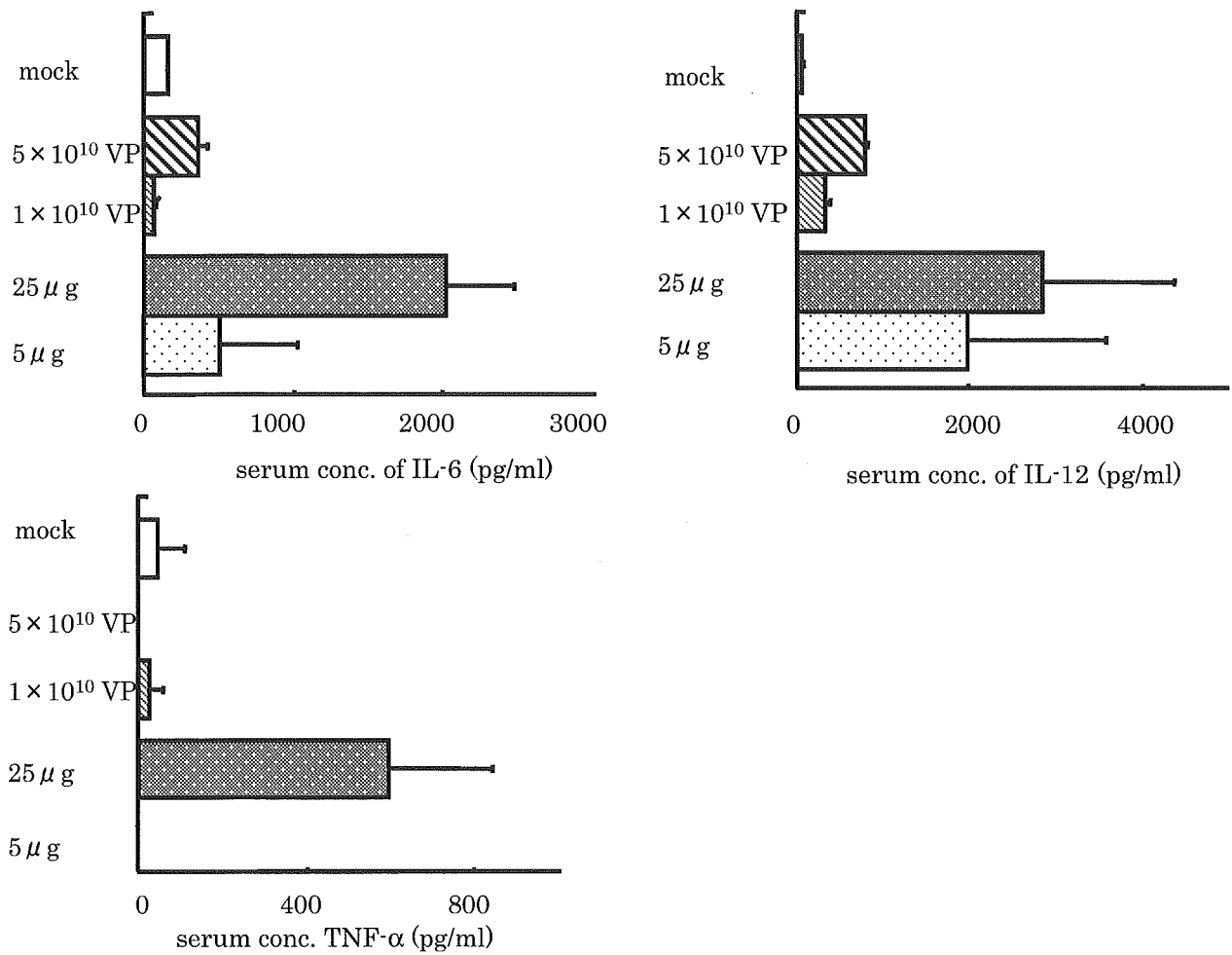


Fig.2 Induction of various inflammatory cytokine productions by injection of Ad vector or lipoplex.

Ad vector or lipoplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 6 hr after injection and the concentration of various cytokines were measured. Data are expressed as means of 3-4 mice \pm SD.

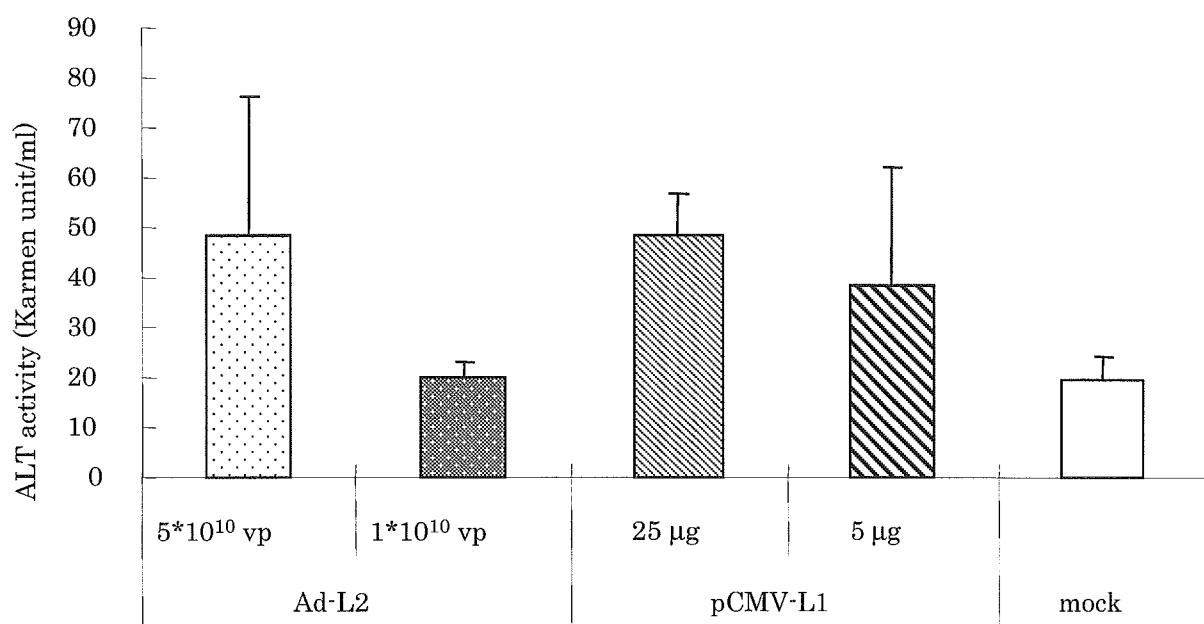


Fig. 3 Serum ALT levels after iv injection of Ad vector or Lipolplex. Ad vector or lipolplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 24 hr after injection and the activity of ALT was measured. Data are expressed as means of 3-4 mice \pm SD.

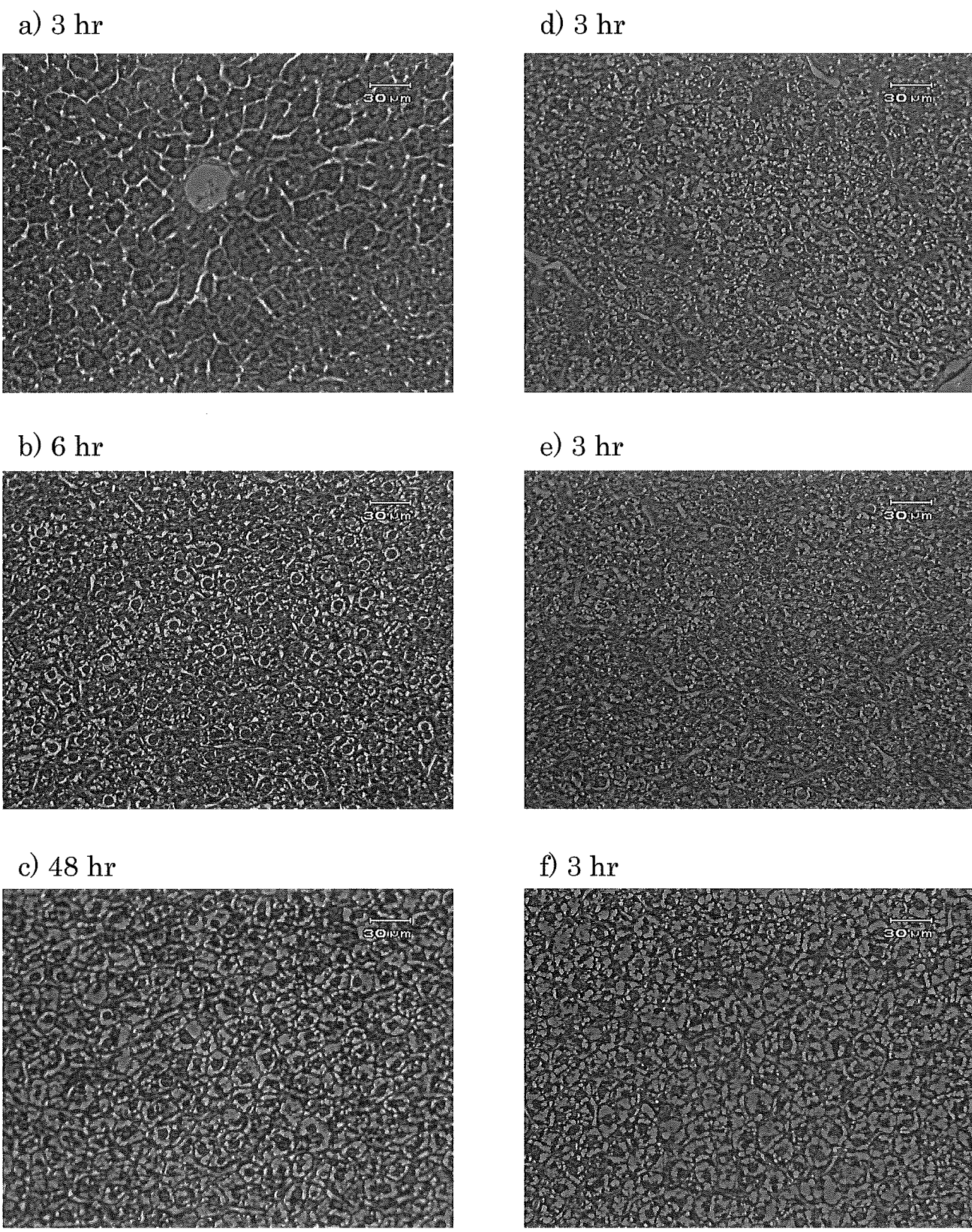


Fig. 4 Histopathological changes induced by iv injection of Ad vector or Lipoplex. Liver was collected from mice injected 5×10^{10} of Ad vector (a, b, c) or $25 \mu\text{g}$ pCMV-L1 of lipoplex (d, e, f). Liver sections were stained with HE.

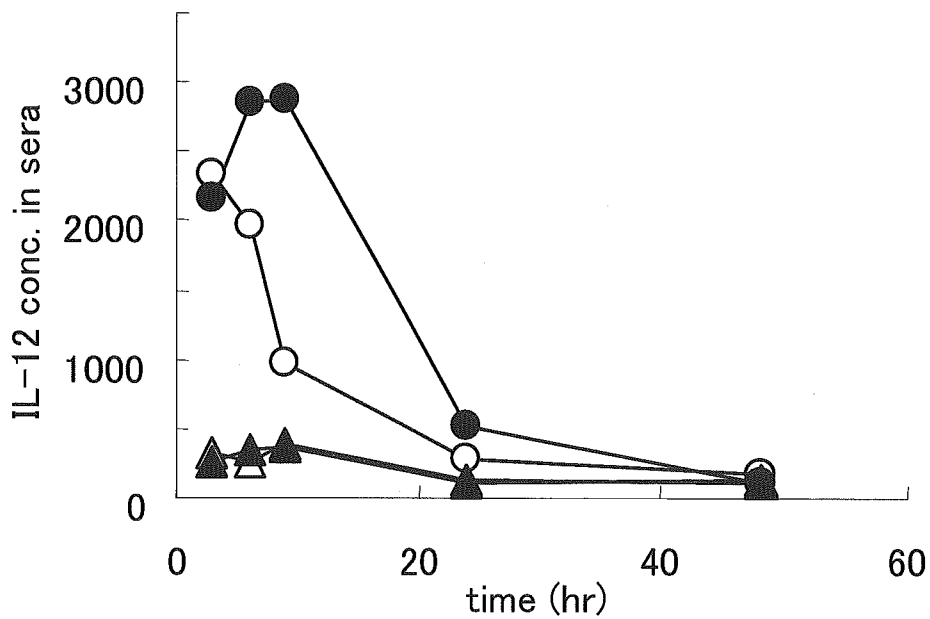
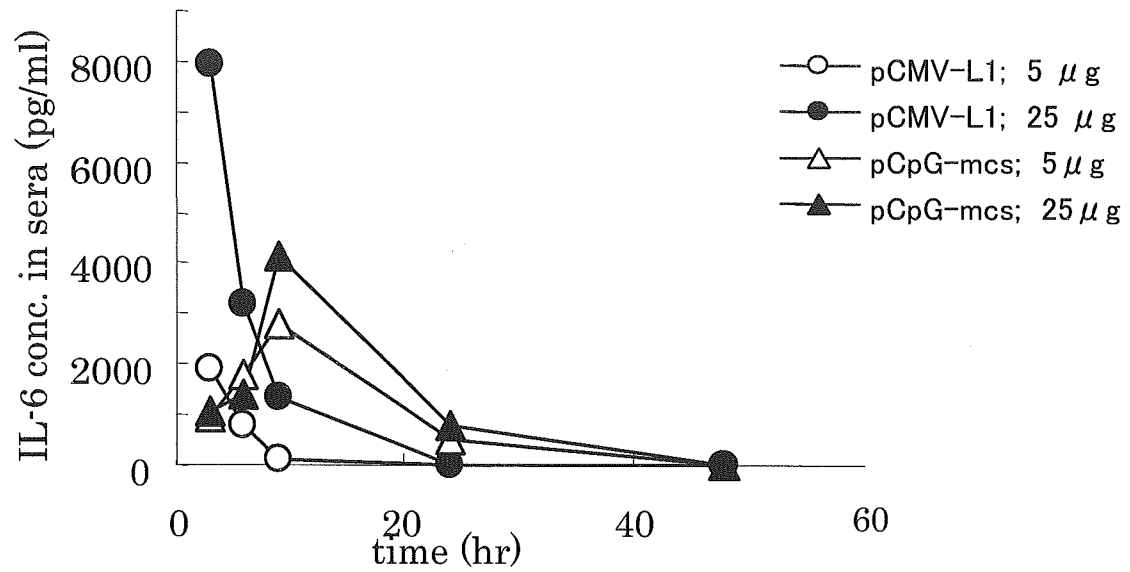


Fig.5 Suppression of cytokine production by using less CpG motif plasmid.

Ad vector or lipoplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 3, 6, 9, 24, 48 hr after postinjection and the concentration of various cytokines were measured by ELISA. Data are expressed as means of 3-4 mice \pm SD.

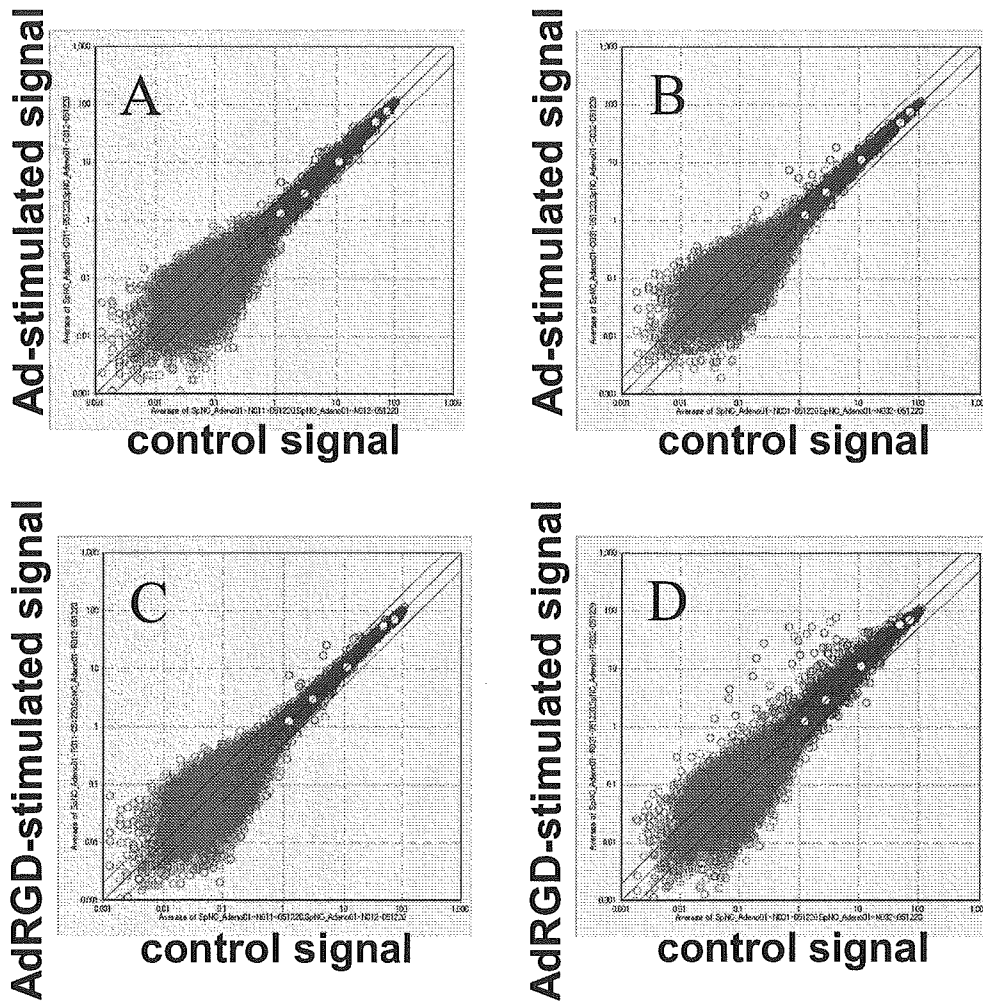


Fig. 6 Analysis of microarray data.

Analysis of microarray data is shown as GeneSpring scatterplots of each hybridization. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with conventional (A and B) and RGD-type (C and D) Ad vectors for 1 (A and C) or 3 (B and D) hr.