

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金田 安史

平成 19(2007) 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	1
金田 安史	
II. 分担研究報告	
1. 標的導入ベクターの開発	8
金田 安史	
2. 徐放化及びステルス化ベクターの開発	12
田畑 泰彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）の開発

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-E vector の作成に成功し、癌細胞や皮膚組織への遺伝子導入効率の増強、導入選択性の増強が可能になった。2) HVJ の表面蛋白である HN を欠損させた HVJ を産生するため HN 特異的な siRNA を導入した細胞株を作り、これに HVJ を感染させると HN 欠損の HVJ が産生され、シアル酸レセプターへの結合能がなくなり導入選択性が増強され、かつ赤血球凝集活性が失われた。3) 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、PEG 導入カチオン化ゼラチンを開発し、HVJ-E との複合体を形成させた。これをマウスの尾静脈より投与すると肝臓に集積した。この複合体形成によりベクターの全身投与時の安全域が HVJ-E 単独に比べて約 2 倍に伸びた。4) 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製した。得られたカチオン化度と架橋程度の異なるハイドロゲルに 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。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結果、投与部位に弱い遺伝子発現が認められた。一方、癌治療実験を通じ、HVJ-E 自身に多様な抗腫瘍効果があることが見出され、臨床応用のめどが立った。

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. 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。これらの遺伝子を安定に発現する HEK293 及び LLCMK2 細胞株を分離し、これらに HVJ を感染させ、scFv をもつ HVJ を分離した。これを紫外線で不活性化し GFP 遺伝子を封入し、マウスの水疱内に投与し皮膚組織における遺伝子発現を調べた。

2) ウイルス本来のレセプターであるシアル酸を認識する HN 蛋白を欠失した HVJ を作成するために HN 特異的な siRNA を導入した細胞に HVJ を感染させ、出芽する HVJ での HN 蛋白の発現を調べた。

3) 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ゼラチン(CG)を作成し、これに片末端メトキシポリエチレングリコール (PEG) を導入して PEG 化カチオン化ゼラチン(PEG-CG)を作製した。5 mg の PEG-CG と Q-dot 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。PEG-CG-HVJ-E を尾静脈に注入して、主要臓器での蛍光の取り込みを調べた。

4) 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口で 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。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ー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。

5) マウスの様々な腫瘍モデル (膀胱粘膜癌、腎臓癌や結腸癌の皮内モデル) において HVJ-E を単独もしくは抗癌剤と併用して投与し、癌の抑制効果とその機構を解析した。

(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. 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、F の膜貫通ドメインと細胞質ドメインのみをもつ断片に結合させ、その遺伝子の 5'末端に F のシグナルペプチドを挿入した。このキメラ遺伝子 (scFv-F) を HEK293 細胞及

び 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。この細胞に HVJ をかけて産生されてくるウイルスにはキメラ蛋白が正常 F の約 6 % 取り込まれていることがわかった。この HVJ を培養細胞から s 大量に収集し、紫外線を照射して不活性化した後 detergent 処理をして GFP 遺伝子を取り込ませた。マウスの皮膚に水疱を作り、この中に wild HVJ-E 或いはキメラ HVJ-E を注入した。注入量は 100 μ l で約 3×10^7 粒子であった。GFP の発現は基底膜細胞に限局して起こり、キメラ HVJ-E では wild HVJ-E に比べて明らかに強い発現を認めた。皮膚組織での GFP の RT-PCR を行ったところ、キメラ HVJ-E による GFP の転写物量は wild HVJ-E の約 5 倍であった。Dsg3 の発現は基底膜細胞以外にも有棘細胞癌や一部の膀胱癌で発現しており、予備的検討では Dsg3 を発現しているマウスの膀胱上皮癌細胞では強い導入遺伝子の発現が見られている。

2) HN の siRNA を選択しこれを導入した細胞に HVJ をかけると産生される HVJ には HN が Western blot で認められず、赤血球凝集活性を完全になくすことに成功した。HN がなくなった HVJ を細胞にかけて 2000 g, 10 min 遠心すると、感染 (F 蛋白の発現) は wild HVJ の約 80 % まで回復すること、これに F 蛋白の抗体をかけると感染は全く起こらないことが明らかになった。この siRNA を安定に発現させる細胞を作成するため、shRNA を導入した安定形質転換株を得ることに成功した。

3) PEG-CG-HVJ-E に Q-dot を封入してマウス尾静脈より導入すると肝臓に集積した。このとき HVJ-E 単独ではほとんど肝臓への集積は見られ

なかった。マウスへの静脈内投与の許容量を調べた。10 匹のマウスがすべて生存できる最大量は wild HVJ-E では 1500 HAU であったが、PEG-CG-HVJ-E では 2500 HAU であった。

4) 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。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。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。カチオン性を低下させたゼラチンからなるハイドロゲルを作製、そのハイドロゲルに HVJ-E を含浸、マウス皮下に埋入した。その結果、HVJ-E の徐放化が見られ、炎症反応の低下も認められた。しかしながら、この炎症反応を軽減する改良の余地はあり、今後、ハイドロゲルの組成、分解性をさらに工夫したサンプルを作製、動物実験を継続する。

5) HVJ-E には樹状細胞の活性化能、樹状細胞からの Type I interferon 産生能、樹状細胞からの IFN- γ 産生による Effector T cell の活性化能があることが明らかになった。さらに樹状細胞から IL-6 を産生させ、これによって Regulatory T cell

を抑制し、Effector T cell の活性化を維持できる作用があることを明らかにした。それを利用して、マウス腎癌の皮内モデルでは HVJ-E 単独の連続投与で完全に腫瘍の消失を起すことができた。マウス結腸癌の皮内モデルではシスプラチンと HVJ-E の併用により半数以上のマウスで腫瘍を消失させ、完全寛解を誘導できた。またマウスの膀胱癌 MB49 を膀胱内に注入し、48 時間後に HVJ-E とアドリアマイシンを同時投与することを 2 回行うことによって、60 日でのマウス生存率が 50 %以上となり、アドリアマイシン単独よりも優位な生存延長効果を認めた。またこれらマウスは同じ腫瘍の再接種によりほとんどのマウスで腫瘍拒絶を起すことができた。

D. 考察

1) 標的分子をもつ F 蛋白が 1-6 %あれば HN の代わりに標的細胞を認識して融合による細胞内導入ができると推察される。したがって標的分子と F とのキメラ遺伝子を発現し、かつ HN の siRNA を安定に発現する細胞株を樹立し、これに HVJ を感染させて得られるウイルスは HN 欠損のキメラ HVJ-E であり、最も有用な標的導入ベクターになる。実際に予備的には (キメラ F の安定発現株に一過性に siRNA を導入して) 既にこのベクターが得られており、癌組織への標的導入でもポジティブな結果を得ている。このような遺伝子工学的手法によれば、様々な標的分子をウイルス膜に挿入することができる。また標的遺伝子の安定形質転換株を分離しておけばベクターの大量生産も可能である。

2) HVJ-E の血液中での安定化は CG や PEG-CG との複合体形成により可能となった。どちらも静

脈注入により肝臓への集積が認められた。CG は臨床研究には用いられていて HVJ-E の臨床応用の生産が完了していることから、臨床応用も近いと思われる。

3) 徐放化の結果は、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、これまでのところまだ十分な結果は得られていない。炎症反応に関しては、カチオン化ゼラチンのカチオン化度を下げることによって、ハイドロゲルの炎症性の低減は見られたが、まだ、完全とはいえない。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) Live HVJ はインターフェロンの産生などに用いられ、樹状細胞の活性化も報告があったが、ゲノムを破壊し感染能をなくした HVJ-E でも多様な抗腫瘍効果、特に抗腫瘍免疫の活性化能があることは今回初めて発見された。また現在の腫瘍免疫で問題となっている Regulatory T cell の抑制が可能であることは HVJ-E の抗腫瘍効果の最大の優位性かもしれない。これらを基にして臨床応用に入れる道筋が決まったと考えている。

E. 結論

血液中での HVJ-E の安定化が実現でき、また標的導入も可能になった。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機能することもわかった。臨床応用のターゲットとそのための

ベクターの調整のめども立った。

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) Kurooka, M. and **Kaneda, Y.** Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells. *Cancer Research*, 67, 227–236, 2007.
- 2) Suvanasuthi, S., Tamai, K. and **Kaneda, Y.** Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. *J. Gene Medicine*, 9, 55-62, 2007.
- 3) Yasuoka, E., Oshima, K., Tamai, K., Kubo, T., and **Kaneda, Y.** Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. *J. Mol. Medicine*, in press.
- 4) Yamano, T., **Kaneda, Y.**, Hiramatsu, S. H., Huang, S., Tran, A.N., Giuliano, A.E., Hoon, D.S.B. Immunity against breast cancer by TERT DNA vaccine primed with chemokine CCL21. *Cancer Gene Ther.* in press.
- 5) 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.* 5, 1021-1028, 2006.
- 6) Seki, Y., Yamamoto, H., Yee Ngan, C., Yasui, M., Tomita, N., Kitani, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Albanese, C., **Kaneda, Y.**, Pestel, R.G., and Monden, M. Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic beta-catenin/T-cell factor pathway. *Mol Cancer Ther.* 5:985-94, 2006.
- 7) Shimamura, M., Sato, N., Waguri, S., Uchiyama, Y., Hayashi, T., Iida, H., Nakamura, T., Ogihara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: Gene Transfer of HGF Gene improves Learning and Memory in the Chronic Stage of Cerebral Infarction. *Hypertension* 47,742-751, 2006.
- 8) **Kaneda, Y.** and **Tabata, Y.**: Non-viral vectors for cancer therapy. Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.* 97: 348-354, 2006.
- 9) Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and **Tabata, Y.**: Liver Targeting of Plasmid DNA with a Cationized Pullulan for Tumor Suppression. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 6 (9-10):2853-9 (2006)
- 10) Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., **Tabata, Y.**: Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds. *J Control Release.* 112:249-256 (2006)
- 11) Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., **Tabata Y.**: In vitro transfection of plasmid DNA by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 17:645-658 (2006)
- 12) F.Kurt, Kasper., Simon, Young., Tanahashi, K., Michael A. Barry, **Tabata, Y.**, John A. Jansen, Antonios G. Mikos. : Evaluation of bone regeneration by DNA release from composites of

oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in a critical-sized calvarial defect. J. Biomedical Material Res. **78A**:335-342 (2006)

- 13) F.Kurt, Kasper, Erin jerkins, Tanahashi, K., Michael A Barry, **Tabata, Y.**, Antonios G. Mikos. : Characterization of DNA release from composites of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in vitro. J. Biomed. Mater. Res., **78A**:623-835 (2006)

2. 学会発表

- 1) Yasufumi Kaneda: Progress of human gene therapy in Japan; clinical trials and vector development. 第9回アメリカ遺伝子治療学会 (2006 5.31 Baltimore, USA)
- 2) 金田安史: HVJ-E ベクターと siRNA の組み合わせによる癌治療戦略 (平成 18 年 9 月 30 日; 第 65 回日本癌学会学術総会シンポジウム; 横浜)
- 3) 金田安史: ウイルスエンベロープを利用した DDS の開発 (平成 18 年 11 月 20 日; 第 54 回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム; 名古屋)
- 4) 藤原敦子、黒岡正之、三木恒治、金田安史: 不活化 Sendai virus particle(HVJ-E)によるマウス腎癌細胞に対する抗腫瘍効果の機序の検討 (平成 18 年 9 月 30 日 第 65 回日本癌学会学術総会一般口演; 横浜)
- 5) Masayuki Kurooka, Yasufumi Kaneda : Development of HVJ envelope vector for cancer therapy. (2006 International Conference on Bio and Pharmaceutical Science and Technology

(2006.12.18, San Diego, USA)

- 6) 城潤一郎, 永根健太郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 異なるアミノ基をもつデキストランを用いた遺伝子導入. 第 22 回 DDS 学会 (2006.7.7-8 東京)
- 7) 永根健太郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 遺伝子導入キャリアとしての異なるカチオン性多糖の作製. 第 52 回高分子研究発表会 (2006.7.21 神戸)
- 8) 永根健太郎, 城潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: カチオン化デキストランの遺伝子導入活性に与える導入アミノ基タイプの影響. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)
- 9) 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入の増強. 第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006.4.13 福岡)
- 10) 金谷 勲, 今村正明, 山本新吾, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入とその機序. 第 22 回日本 DDS 学会 (2006.7.7-8 東京)
- 11) 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスキャリアによる遺伝子導入とその機序. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)
- 12) 金谷 勲, 今村正明, 城潤一郎, 山本雅哉, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 多糖誘導体からなる非ウイルスキャリアによる遺伝子導入とその機序. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)

- 13) 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 古巢 朗,
山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 秋山俊文,
小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂 : Hepatocyte
Growth Factor(HGF)遺伝子導入マイクロファ
ージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討. 第9
回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)
- 14) Zhiyin Xia, Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y.,
Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata,
Y., Koji, T., Kohno, S. : HSP47 siRNA
conjugated with cationized gelatin microspheres
(CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in
unilateral ureteral obstruction (UUO). 第48回日
本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会
(2006.12.2 長崎)

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

- 1) 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法
(発明者：金田安史、玉井克人、佐賀公太郎、
河地正子；出願人；ジェノメディア（株）、
大阪大学) 2006年11月24日出願、
PCT/JP2006/3240489

標的導入ベクターの開発

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

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-E vector の作成に成功し、癌細胞や皮膚組織への遺伝子導入効率の増強、導入選択性の増強が可能になった。2) HVJ の表面蛋白である HN を欠損させた HVJ を産生するため HN 特異的な siRNA を導入した細胞株を作り、これに HVJ を感染させると HN 欠損の HVJ が産生され、シアル酸レセプターへの結合能がなくなり導入選択性が増強され、かつ赤血球凝集活性が失われた。3) 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、PEG 導入カチオン化ゼラチンを開発し、HVJ-E との複合体を形成させた。これをマウスの尾静脈より投与するとベクターの全身投与時の安全域が約 2 倍に伸びた。一方、癌治療実験を通じ、HVJ-E 自身に多様な抗腫瘍効果があることが見出され、臨床応用のめどが立った。

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. 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。これらの遺伝子を安定に発現する HEK293 及び LLCMK2 細胞株を分離し、これらに HVJ を感染させ、scFv をもつ HVJ を分離した。これを紫外線で不活性化し GFP 遺伝子を封入し、マウスの水

疱内に投与し皮膚組織における遺伝子発現を調べた。

2) ウイルス本来のレセプターであるシアル酸を認識する HN 蛋白を欠失した HVJ を作成するために HN 特異的な siRNA を導入した細胞に HVJ を感染させ、出芽する HVJ での HN 蛋白の発現を調べた。

3) 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ゼラチン(CG)を作成し、これに片末端メトキシポリエチレングリコール (PEG) を導入して PEG 化カチオン化ゼラチン(PEG-CG)を作製した。5 mg の PEG-CG と Q-dot 封入の HVJ-E (3×10^{10} 粒子)を混合し、30 分間水上でインキュベートし複合体を形成させた。PEG-CG-HVJ-E を

マウス尾静脈に注入して安全投与量を調べた。

4) マウスの様々な腫瘍モデル（膀胱粘膜癌、腎臓癌や結腸癌の皮内モデル）において HVJ-E を単独もしくは抗癌剤と併用して投与し、癌の抑制効果とその機構を解析した。

（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. 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、F の膜貫通ドメインと細胞質ドメインのみをもつ断片に結合させ、その遺伝子の 5'末端に F のシグナルペプチドを挿入した。このキメラ遺伝子（scFv-F）を HEK293 細胞及び 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。この細胞に HVJ をかけて産生されてくるウイルスにはキメラ蛋白が正常 F の約 6% 取り込まれていることがわかった。この HVJ を培養細胞から大量に収集し、紫外線を照射して不活性化した後 detergent 処理をして GFP 遺伝子を取り込ませた。マウスの皮膚に水疱を作り、この中に wild HVJ-E 或いはキメラ HVJ-E を注入した。注入量は 100 μ l で約 3×10^7 粒子であった。GFP の発現は基底膜細胞に限局して起こり、キメラ HVJ-E では wild HVJ-E に比べて明らかに強い発現を認めた。皮膚組織での GFP の RT-PCR を行ったところ、キメラ HVJ-E による GFP の転写物量は wild HVJ-E の約 5

倍であった。Dsg3 の発現は基底膜細胞以外にも有棘細胞癌や一部の膀胱癌で発現している。予備的検討では Dsg3 を発現しているマウスの膀胱上皮癌細胞では強い遺伝子発現を認めている。

2) HN の siRNA を選択しこれを導入した細胞に HVJ をかけると産生される HVJ には HN が Western blot で認められず、赤血球凝集活性を完全になくすことに成功した。HN がなくなった HVJ を細胞にかけて 2000 g, 10 min 遠心すると、感染（F 蛋白の発現）は wild HVJ の約 80% まで回復すること、これに F 蛋白の抗体をかけると感染は全く起こらないことが明らかになった。この siRNA を安定に発現させる細胞を作成するため、shRNA を導入した安定形質転換株を得ることに成功した。

3) PEG-CG-HVJ-E に Q-dot を封入してマウス尾静脈より導入すると肝臓に集積した。このとき HVJ-E 単独ではほとんど肝臓への集積は見られなかった。マウスへの静脈内投与の許容量を調べた。10 匹のマウスがすべて生存できる最大量は wild HVJ-E では 1500 HAU であったが、PEG-CG-HVJ-E では 2500 HAU であった。

4) HVJ-E には樹状細胞の活性化能、樹状細胞からの Type I interferon 産生能、樹状細胞からの IFN- γ 産生による Effector T cell の活性化能があることが明らかになった。さらに樹状細胞から IL-6 を産生させ、これによって Regulatory T cell を抑制し、Effector T cell の活性化を維持できる作用があることを明らかにした。それを利用して、マウス腎癌の皮内モデルでは HVJ-E 単独の連続投与で完全に腫瘍の消失を起こすことができた。マウス結腸癌の皮内モデル

ではシスプラチンと HVJ-E の併用により半数以上のマウスで腫瘍を消失させ、完全寛解を誘導できた。またマウスの膀胱癌 MB49 を膀胱内に注入し、48 時間後に HVJ-E とアドリアマイシンを同時投与することを 2 回行うことによって、60 日でのマウス生存率が 50 %以上となり、アドリアマイシン単独よりも優位な生存延長効果を認めた。またこれらマウスは同じ腫瘍の再接種によりほとんどのマウスで腫瘍拒絶を起こすことができた。

D. 考察

1) 標的分子をもつ F 蛋白が 1-6 %あれば HN の代わりに標的細胞を認識して融合による細胞内導入ができると推察される。したがって標的分子と F とのキメラ遺伝子を発現し、かつ HN の siRNA を安定に発現する細胞株を樹立し、これに HVJ を感染させて得られるウイルスは HN 欠損のキメラ HVJ-E であり、最も有用な標的導入ベクターになる。実際に予備的には (キメラ F の安定発現株に一過性に siRNA を導入して) 既にこのベクターが得られており、癌組織への標的導入でもポジティブな結果を得ている。

2) HVJ-E の血液中での安定化は CG や PEG-CG との複合体形成により可能となった。どちらでも静脈注入により肝臓への集積が認められた。PEG-CG-HVJ-E ではおそらくステルス効果によって赤血球との反応性が低下しており、凝集反応を起こしにくくなったために安全域が伸びたのではないかと推察される。CG は臨床研究には用いられていて HVJ-E の臨床応用の生産が完了していることから、臨床応用も近い

と思われる。

3) Live HVJ はインターフェロンの賛成などに用いられ、樹状細胞の活性化も報告があったが、ゲノムを破壊し感染能をなくした HVJ-E でも多様な抗腫瘍効果、特に抗腫瘍免疫の活性化能があることは今回初めて発見された。また現在の腫瘍免疫で問題となっている Regulatory T cell の抑制が可能であることは HVJ-E の抗腫瘍効果の最大の優位性かもしれない。これらを基にして臨床応用に入れる道筋が決まったと考えている。

E. 結論

血液中での HVJ-E の安定化が実現でき、また標的導入も可能になった。臨床応用のターゲットとそのためのベクターの調整のめども立った。

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) Kurooka, M. and **Kaneda, Y.** Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells. *Cancer Research*, 67, 227-236, 2007.
 - 2) Suvanasuthi, S., Tamai, K. and **Kaneda, Y.** Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. *J. Gene Medicine*, 9, 55-62, 2007.
 - 3) Yasuoka, E., Oshima, K., Tamai, K., Kubo, T., and **Kaneda, Y.** Needleless intranasal

- administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. *J. Mol. Medicine*, in press.
- 4) Yamano, T., **Kaneda, Y.**, Hiramatsu, S. H., Huang, S., Tran, A.N., Giuliano, A.E., Hoon, D.S.B. Immunity against breast cancer by TERT DNA vaccine primed with chemokine CCL21. *Cancer Gene Ther.* in press.
 - 5) 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.* 5, 1021-1028, 2006.
 - 6) Seki, Y., Yamamoto, H., Yee Ngan, C., Yasui, M., Tomita, N., Kitani, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Albanese, C., **Kaneda, Y.**, Pestel, R.G., and Monden, M. Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic beta-catenin/T-cell factor pathway. *Mol Cancer Ther.* 5:985-94, 2006.
 - 7) Shimamura, M., Sato, N., Waguri, S., Uchiyama, Y., Hayashi, T., Iida, H., Nakamura, T., Ogihara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: Gene Transfer of HGF Gene improves Learning and Memory in the Chronic Stage of Cerebral Infarction. *Hypertension* 47,742-751, 2006.
 - 8) **Kaneda, Y.** and Tabata, Y.: Non-viral vectors for cancer therapy. Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.* 97: 348-354, 2006.
2. 学会発表
 - 1) Yasufumi Kaneda : Progress of human gene therapy in Japan; clinical trials and vector development. 第9回アメリカ遺伝子治療学会 (2006 5.31 Baltimore, USA)
 - 2) 金田安史 : HVJ-E ベクターと siRNA の組み合わせによる癌治療戦略 (平成 18 年 9 月 30 日 第 65 回日本癌学会学術総会シンポジウム ; 横浜)
 - 3) 金田安史 : ウイルスエンベロープを利用した DDS の開発 (平成 18 年 11 月 20 日 第 54 回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム ; 名古屋)
 - 4) 藤原敦子、黒岡正之、三木恒治、金田安史 : 不活化 Sendai virus particle(HVJ-E) によるマウス腎癌細胞に対する抗腫瘍効果の機序の検討 (平成 18 年 9 月 30 日 第 65 回日本癌学会学術総会一般口演 ; 横浜)
 - 5) Masayuki Kurooka, Yasufumi Kaneda : Development of HVJ envelope vector for cancer therapy. 2006 International Conference on Bio and Pharmaceutical Science and Technology (2006.12.18 San Diego, USA)
- 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
 - 1) 改変パラミクソウイルスおよびその作製方法(発明者: 金田安史、玉井克人、佐賀公太郎、河地正子; 出願人; ジェノメディア (株)、大阪大学) 2006 年 11 月 24 日出願、PCT/JP2006/324048

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。エチレンジアミンの導入率を変化させることによって、異なるカチオン化度をもつカチオン化ゼラチンを調製した。また、これらのカチオン化ゼラチンからも架橋程度の異なるハイドロゲルを作製した。得られたカチオン化度と架橋程度の異なるハイドロゲルに 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、カチオン化度の低いゼラチンから作製したハイドロゲルにおいて、炎症反応の低減が認められた。また、いずれのゼラチンハイドロゲルにおいても、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がメトキシ基、カルボキシル基、あるいはアミノ基などの異なる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変化した。この変化量はカチオン化高分子の種類、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、カルボキシル基、あるいはアミノ基、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性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。カチオン化度の異なるゼラチンからなるハイドロゲルを作製、その生体内分解性とプラスミド DNA の徐放化について調べた。その結果、カルボキシル基に対するカチオン化残基の導入率が 5mole% 以上であれば、ハイドロゲルの分解とプラスミド DNA の徐放との間により相関性が認められた。

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。カチオン性を低下させたゼラチンからなるハイドロゲルを作製、そのハイドロゲルに HVJ-E を含浸、マウス皮下に埋入した。その結果、HVJ-E の徐放化が見られ、炎症反応の低下も認められた。しかしながら、この炎症反応を軽減する改良の余地はあり、今後、ハイドロゲルの組成、分解性をさらに工夫したサンプルを作製、動物実験を継続する。

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基、カルボキシル基、あるいはアミノ基をもつ 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変えることができる。また、プラスミド DNA は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り、徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらす、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。炎症反応に関しては、カチオン化ゼラチンのカチオン化度を下げることによって、ハイドロゲルの炎症性の低減は見られたが、まだ、完全とはいえない。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

- Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y. : Liver Targeting of Plasmid DNA with a Cationized Pullulan for Tumor Suppression. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **6 (9-10)**:2853-9 (2006)
- Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata, Y.: Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds. *J Control Release*. **112**:249-256 (2006)
- Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata Y.: In vitro transfection of plasmid DNA by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J Biomater Sci Polym Ed*. **17**:645-658 (2006)
- 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*. **5**:1021-1028 (2006)
- F.Kurt, Kasper., Simon, Young., Tanahashi, K., Michael A. Barry, Tabata, Y., John A. Jansen, Antonios G. Mikos. : Evaluation of bone regeneration by DNA release from composites of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in a critical-sized calvarial defect. *J. Biomedical Material Res*. **78A**:335-342 (2006)
- F.Kurt, Kasper, Erin jerkins, Tanahashi, K., Michael A Barry, Tabata, Y., Antonios G. Mikos. : Characterization of DNA release from composites of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, **78A**:823-835 (2006)
- Kaneda, Y. and Tabata, Y. : Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.*, **97(5)**:348-354 (2006)

2. 学会発表

- 城潤一郎, 永根健太郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 異なるアミノ基をもつデキストランを用いた遺伝子導入. 第 22 回 DDS 学会 (2006.7.7-8 東京)
- 永根健太郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 遺伝子導入キャリアとしての異なるカチオン性多糖の作製. 第 52 回高分子研究発表会 (2006.7.21 神戸)
- 永根健太郎, 城潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: カチオン化デキストランの遺伝子導入活性に与える導入アミノ基タイプの影響. 第 9 回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)
- 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川修: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入の増強. 第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006.4.13 福岡)
- 金谷 勲, 今村正明, 山本新吾, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスベクターによる遺伝子導入とその機序. 第 22 回日本 DDS 学会 (2006.7.7-8 東京)
- 金谷 勲, 今村正明, 猪飼智範, 岡崎有道, 城潤一郎, 山本雅哉, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 多糖誘導体からなる非ウイルスキャリア

による遺伝子導入とその機序. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)

7. 金谷 勲, 今村正明, 城潤一郎, 山本雅哉, 兼松明弘, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 多糖誘導体からなる非ウイルスキャリアによる遺伝子導入とその機序. 第65回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)
8. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 古巢 朗, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 秋山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: Hepatocyte Growth Factor(HGF)遺伝子導入マイクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討. 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8 京都)
9. Zhiyin Xia, Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S. : HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres (CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO). 第48回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 (2006.12.2 長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kurooka M, <u>Kaneda Y.</u>	Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells.	Cancer Res.	67(1)	227-36	2007
Suvarasuthi S, Tamai K, <u>Kaneda Y.</u>	Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using the HVJ envelope vector.	J Gene Med.	9(1)	55-62	2007
Yasuoka E, Oshima K, Tamai K, Kubo T, <u>Kaneda Y.</u>	Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis.	J Mol Med.	85(3)	279-88	2007
Mima H, Yamamoto S, Ito M, Tomoshige R, Tabata Y, Tamai K, <u>Kaneda Y.</u>	Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector.	Mol Cancer Ther.	5(4)	1021-8	2006
Seki Y, Yamamoto H, Yee Ngan C, Yasui M, Tomita N, Kitani K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Albanese C, <u>Kaneda Y.</u> Pestell RG, Monden M.	Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic beta-catenin/T-cell factor pathway.	Mol Cancer Ther.	5(4)	985-94	2006
Shimamura M, Sato N, Waguri S, Uchiyama Y, Hayashi T, Iida H, Nakamura T, Ogihara T, <u>Kaneda Y.</u> Morishita R.	Gene transfer of hepatocyte growth factor gene improves learning and memory in the chronic stage of cerebral infarction.	Hypertension	47(4)	742-51	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneda Y, Tabata Y.	Non-viral vectors for cancer therapy.	Cancer Sci.	97(5)	348-54	2006
Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y.	Liver Targeting of Plasmid DNA with a Cationized Pullulan for Tumor Suppression.	Journal of Nanoscience and Nanotechnology.	6(9-10)	2853-2859	2006
Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata, Y.	Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds.	J Control Release.	112	249-256	2006
Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata Y.	In vitro transfection of plasmid DNA by cationized gelatin prepared from different amine compounds.	J Biomater Sci Polym Ed.	17	645-658	2006
F.Kurt, Kasper, Erin jerkins, Tanahashi, K., Michael A Barry, Tabata, Y. , Antonios G. Mikos.	Characterization of DNA release from composites of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in vitro.	J. Biomed. Mater. Res.	78A	823-835	2006