

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 16 - 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 金田 安史

平成 19(2007) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
臨床応用のための long-acting HVJ-E（ヒト型）の開発	1
金田 安史	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
III. 研究成果の刊行物・別刷	16

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をめざし、次の研究成果を得ることができた。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) カチオン化ゼラチンと 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。さらに 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約 2 倍に伸びた。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。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) F 蛋白中の F1 蛋白の C 末の膜貫通ドメインと細胞質ドメインのみ残し、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 或いは HEK293 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、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。次いでプレオマイシンを 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。さらに CG 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、上記と同様に複合体を形成させた。PEG-CG-HVJ-E (HVJ-E 中には Q-dot 封入)を静脈注入して、主要臓器への集積と投与安全域を調べた。

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 \square 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。

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。

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、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。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局限して起こり、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) 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。そこで抗がん剤のブ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。

4) 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。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。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、動物実験を継続した結果、HVJ-E の徐放化が認められた。

5) 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った。そこで 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。

6) 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、アドリマイシン単独よりも優れた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。どちらの場合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 では静脈投与の安全域が高くなったが、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。

腹膜播種の場合、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。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。生体組織ではカチオン性を下げれば、炎症反応が軽減されて徐放化が認められるようになった。むしろ中性のゼラチンかアニオン化ゼラチンが組織中では望ましいと考えられる。

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。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) Saito, Y., Nakagami, H., Morishita, R., Takami, Y., Kikuchi, Y., Hayashi, H., Nishikawa, T., Tamai, K., Azuma, N., Sasajima, T., and **Kaneda, Y.**

- Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. *Circulation*, 114, 1177-1184, 2006.
- 13) Tomita, T., Kunugiza, Y., Tomita, N., Takano, H., Morishita, R., **Kaneda, Y.**, and Yoshikawa, H. E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 18, 257-265, 2006.
 - 14) 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.
 - 15) Kim, YD, Park, K-G, Morishita, R., **Kaneda, Y.**, Kim, S-Y., Song, D-K., Kim, S-D., Nam, 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*, 13, 216-24, 2006.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., and **Kaneda, Y.**: Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin. *J. Gene Medicine*, **7**, 1044-1052, 2005.
- 26) Tashiro, H., Aoki, M., Isobe, M., Hashiya, N., Makino, H., **Kaneda, Y.**, Ogihara, T., and Morishita, R. Development of novel method of non-viral efficient gene transfer into neonatal cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **39**, 503-509, 2005.
- 27) Oshima, K., Shimamura, M., Mizuno, S., Tamai, K., Doi, K., Morishita, R., Nakamura, T., Kubo, T., and **Kaneda, Y.**: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. *The FASEB J.* **18**, 212-214, 2004.
- 28) Shimamura, M., Sato, N., Oshima, K., Aoki, M., Kurinami, H., Waguri, S., Uchiyama, Y., Ogihara, T., **Kaneda, Y.**, and Morishita, R.: Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Over-expression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* **109**, 424-431, 2004.
- 29) Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Tabata, Y.**: Suppression of the progress of disseminated pancreatic cancer cells by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin microspheres. *Pharm. Res.* **21**(7): 1109-18 (2004)
- 30) Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., **Tabata, Y.**: Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther.* **11**(15): 1205-14 (2004)
- 31) Kushibiki, T., **Tabata, Y.**: A new gene delivery system based on controlled release technology. *Curr. Drug Deliv.* **1**(2): 153-163 (2004)
- 32) 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.
- 33) Morishita, R., Tomita, N., **Kaneda, Y.**, and Ogihara, T.: Molecular therapy to inhibit NFκB activation by transcription factor decoy oligonucleotides. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 139-146, 2004.
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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. 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)
 24. 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)
 25. 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)
 26. 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)
 27. 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)
 28. 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)
 29. 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 aperi-
toneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)
30. 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)
31. 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)
32. 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)
33. 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)
34. 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 aperi-
toneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)
35. 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)
36. 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)
37. 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)
38. 金田安史: 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” (平成 16 年 4 月 8 日 大阪)
39. 金田安史: 第 92 回日本泌尿器科学会総会 シンポジウム“非ウイルスベクターによる遺伝子導入技術” (平成 16 年 4 月 12 日 大阪)
40. 金田安史: 第 33 回日本血管造影・IVR 学会総会シンポジウム“分子治療の最先端” (平成 16 年 5 月 7 日 東京)
41. Kaneda, Y.: The 9th Liposome Research Days 招待講演 Development of novel non-viral

- vectors for gene transfer and drug delivery
(平成 16 年 5 月 14 日 台湾)
42. Kaneda, Y. : The 12th annual congress of the European Society of Gene Therapy 招待講演 Development of novel non-viral vectors for gene therapy (平成 16 年 11 月 5 日 フィンランド)
43. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 山岸久一: 樹状細胞を用いた癌免疫療法の効果増強の試みーカチオン化ゼラチンを用いた遺伝子導入ー. 第 59 回日本消化器外科学会総会 (2004.7.21-23 鹿児島)
44. 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 原田孝司, 山本一男, 友重龍治, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂 : マウス腹膜線維症モデルにおける HSP47siRNA を用いた腹膜肥厚抑制効果の検討. 日本腎臓学会学術総会 (2004.5.27-29 栃木)
45. Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: Suppression of peritoneal fibrosis by HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres. The American Society of Nephrology, Renal Week 2004 (2004.10.27-11.1 St.Louis)
46. Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Zinnouchi, C., 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 American Society of Nephrology, Renal Week 2004 (2004.10.27-11.1 St.Louis)
47. Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.: Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials. (2004.7.19-22 Emei)
- 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 (2004 年 5 月 18 日 Australia patent 成立 Australian patent No. 769385, 2005 年 7 月 5 日 US patent 成立 US6,913,923 B2)
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 2005-33947
3. 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
4. 脳機能改善のための医薬及び方法 (発明者: 金田安史, 森下竜一, 島村宗尚 出願人: アンジェスエムジー株式会社) 2004 年 7 月 29 日出願 特願 2004-2226

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
Suvasanuthi 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
<u>Kaneda Y.</u> , <u>Tabata Y.</u>	Non-viral vectors for cancer therapy.	Cancer Sci.	97(5)	348-54	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
Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and <u>Tabata, Y.</u>	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., <u>Tabata, Y.</u>	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., <u>Tabata, Y.</u>	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, <u>Tabata, Y.</u> , 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
Morishita, N., Nakagami, H., Morishita, R, Takeda, S., Mishima, F., Tarazono, B., Nishijima, S., <u>Kaneda, Y.</u> , and Tanaka, N.	Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	334	1121-1126	2005
Mima, H., Tomoshige, R., Kanamori, T., Tabata, Y., Yamamoto, Ito, S., Tamai, K., and <u>Kaneda, Y.</u>	Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector.	J. Gene Medicine	7	888-897	2005
Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K., and <u>Kaneda, Y.</u>	Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anticancer effect of cisplatin.	J. Gene Medicine	7	1044-1052	2005
Kushibiki, T., <u>Tabata, Y.</u>	Preparation of poly(ethylene glycol)-introduced cationized gelatin as a non-viral gene carrier.	J Biomater Sci Polym Ed.	16	1447-1461	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.	Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells.	Key Engineering Materials	288-289	121-124	2005
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 Control Release.	107	547-561	2005
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.	18(1)	212-4	2004
Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y. , Morishita R.	Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model.	Circulation	109(3)	424-31	2004
Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y.	Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin.	Gene Ther.	11 (15)	1205-1214	2004
Kushibiki, T., Tabata, Y.	A new gene delivery system based on controlled release technology.	Curr. Drug Deliv.	1 (2)	153-163	2004

Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells

Masayuki Kurooka and Yasufumi Kaneda

Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Abstract

UV-inactivated, replication-defective Sendai virus particles [hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E)] injected into murine colon carcinoma (CT26) tumors growing in syngeneic BALB/c mice eradicated 60% to 80% of the tumors and obviously inhibited the growth of the remainder. Induced adaptive antitumor immune responses were dominant in the tumor eradication process because the effect was abrogated in severe combined immunodeficient mice. Murine and human dendritic cells underwent dose-dependent maturation by HVJ-E *in vitro*. Profiles of cytokines secreted by dendritic cells after HVJ-E stimulation showed that the amount of interleukin-6 (IL-6) released was comparable to that elicited by live HVJ. Real-time reverse transcription-PCR and immunohistochemistry revealed that HVJ-E induced a remarkable infiltration of dendritic cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells into tumors. In addition, CT26-specific CTLs were induced with the evidence of enhanced CD8⁺ T-cell activation in a CD4⁺CD25⁻ T cell-dependent manner. On the other hand, conditioned medium from dendritic cells stimulated by HVJ-E rescued CD4⁺CD25⁻ effector T-cell proliferation from Foxp3⁺CD4⁺CD25⁻ regulatory T cell (Treg)-mediated suppression and IL-6 was presumably dominant for this phenomenon. We also confirmed such rescue in mice treated with HVJ-E *in vivo*. Moreover, antitumor effect of HVJ-E was significantly reduced by an *in vivo* blockade of IL-6 signaling. This is the first report to show that HVJ-E alone can eradicate tumors and the mechanism through which it induces antitumor immune responses. Because it can enhance antitumor immunity and simultaneously remove Treg-mediated suppression, HVJ-E shows promise as a novel therapeutic for cancer immunotherapy. [Cancer Res 2007;67(1):227–36]

Introduction

The morbidity and mortality of cancer patients have considerably improved due to progress in surgery, chemotherapy, and radiotherapy. However, some types of cancers, particularly those that are advanced or metastatic, remain refractory to conventional strategies and require novel approaches. Immunotherapy represents one of the most promising of the more recent lines of attack. Considerable basic research and strategies have targeted cancer immunotherapy, but the response rates in preclinical and clinical trials are low (1–5). Thus, not only should tumors be eliminated but also lymphocyte-mediated immunosuppression must be regulated in patients with cancer (6).

Inactivated Sendai virus particles [hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E)] are safe and efficient nonviral vectors for drug delivery (7, 8) as they can incorporate DNA, RNA, proteins, and drugs and deliver them into cells both *in vitro* and *in vivo* (9, 10). In addition, HVJ-E has been applied to an anticancer vaccine strategy (11, 12). We previously showed that HVJ-E can incorporate and possibly deliver anticancer drugs (13). Recently, we attempted another approach to cancer therapy using HVJ-E as an inactivated virus envelope to induce host immune responses. The ability of many virus vectors such as poxvirus, alphavirus, vaccinia virus, and adenovirus to stimulate host immune responses against cancers have been tested (14–18), but these vectors express immunostimulators such as costimulatory molecules B7.1, as well as cytokines such as interleukin (IL)-2 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which enhance immunogenicity. Other studies have examined replication-selective oncolytic viruses combined with chemotherapy (19). To our knowledge, the antitumor effect of inactivated replication-defective viral particles that lack oncolytic ability and transgene encoding has not been studied in detail. Here, we show that empty HVJ-E alone induced tumor-specific antitumor immunity and eradicated tumors growing in mice without exogenous gene expression, direct oncolytic ability, or adjunct therapy. The mechanisms of this immune effect by HVJ-E seemed to include not only enhanced effector T cell-mediated immunity but also rescue from regulatory T cell (Treg)-mediated immunosuppression, presumably through IL-6 secretion from dendritic cells stimulated by HVJ-E.

Materials and Methods

Cell lines and mice. The CT26 murine colon carcinoma cell line (H-2d) and Renca murine renal cell carcinoma cell line (H-2d) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Six-week-old, female BALB/c and CB17/Icr-Prkdc^{scid}/CrIcrlj mice, purchased from Charles River, Inc. (Yokohama, Japan), were maintained in a temperature-controlled, pathogen-free room. All animals were handled according to approved protocols and the guidelines of the Animal Committee of Osaka University.

Reagents and antibodies. Recombinant mouse IL-6 (BE284071), GM-CSF (415-ML), human IL-4 (204-IL), GM-CSF (215-GM), antimouse IL-6 antibody (MO07), antimouse IL-6 receptor (IL-6R) antibody (JVM01), antimouse CD83 antibody (KXE01), and mouse IFN- γ ELISPOT kit were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Antimouse CD3e (145-2C11), antimouse CD11b antibody (M1/70), antimouse CD11c (HL-3), antimouse CD40 (3/23), antimouse CD80 (16-10A1), antimouse CD86 (16-10A1) antibodies, antimouse CXCR4 (2B11), and antimouse IL-6 antibody (MP5-20F3) were purchased from BD Bioscience Pharmingen (San Diego, CA). Anti-mouse CCR7 (4B12) was purchased from BioLegend (San Diego, CA). Anti-CD11c antibody was purchased from Abcam Ltd. (Cambridge, United Kingdom). Anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set was purchased from eBioscience (San Diego, CA). Alexa Fluor 488-labeled antihamster, antirat, and antimouse immunoglobulin G (IgG) antibodies were purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). CD11c (N418) MicroBeads, CD8a⁺ T-Cell Isolation Kit, and CD4⁺CD25⁺ Regulatory T-Cell

Requests for reprints: Yasufumi Kaneda, Department of Gene Therapy Science, Osaka University, Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Phone: 81-6-6879-3901; Fax: 81-6-6879-3909; E-mail: kaneday@gts.med.osaka-u.ac.jp.
©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1615

Isolation Kit were purchased from Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). [methyl-³H]Thymidine and chromium-51 were purchased from GE Healthcare Bio-Science Corp. (Piscataway, NJ).

Preparation of live HVJ and HVJ-E. HVJ (VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52, Z strain) was purchased from ATCC (Manassas, VA) and prepared as described (7–9). Briefly, 100 μ L of 10,000-fold diluted HVJ seed solution were injected into the allantoic cavity of 10-day-old embryonated chicken eggs. Three days later, the allantoic fluid was harvested and the titer of recovered virus (live HVJ) was expressed as hemagglutination units. An HVJ suspension of 1.8×10^{10} virus particles was inactivated by UV irradiation (198 mJ/cm²). The inactivated HVJ that was unable to replicate is referred to as HVJ-E. Infectious particles were not produced by HVJ-E injected either into fertilized eggs or in cultured HEK-293, CT26, BHK-21, and LLCMK2 cells (9).

Adenovirus. Recombinant replication-defective adenovirus with a deletion of the E1 region was provided by Dr. Kazunori Aoki (National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan). This vector does not encode any exogenous genes.

Preparation and culture of dendritic cells. Murine dendritic cells derived from bone marrow were generated as described from BALB/c mice (12). Briefly, bone marrow of the tibia and femur was flushed with culture medium and then the effluent was filtered through a 40-mesh sieve. The filtrate was washed and cells (1×10^6) sedimented by centrifugation were seeded in 24-well plates in 1 mL of culture medium supplemented with 10 ng/mL of recombinant mouse GM-CSF. The cultures were nourished every other day by gently aspirating the spent medium and adding fresh medium. Six days later, nonadherent and loosely adherent clusters of proliferating dendritic cells were positive for CD11c and flow cytometry confirmed that their phenotype was immature. These cells were used in subsequent experiments as immature dendritic cells.

Flow cytometry. Immature murine or human dendritic cells (1×10^5) cultured in 96-well plates with the indicated amounts of live HVJ or HVJ-E for 48 h were incubated with respective antibodies. Murine dendritic cells were intracellularly stained with anti-IL-6 antibody (MP5-20F3). The cells were then analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur and CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA).

Cytokine measurements. Immature murine or human dendritic cells (1×10^5) were cultured in 96-well plates and then live HVJ or HVJ-E were added to the culture medium. Harvested supernatants were evaluated 24 h later by ELISA. Murine IFN- α , IFN- β (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ), murine or human IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-12p40 (R&D Systems) were measured according to the manufacturer's instructions.

Intratumor injection of HVJ-E or adenovirus and measurements of tumor volume. CT26 cells (5×10^5) were injected into the intradermal space in the backs of syngeneic BALB/c mice. After tumors reached 5 mm in diameter, virus particles of HVJ-E or adenovirus (1.5×10^{10}) dissolved in 100 μ L of saline were injected into tumors once each day on days 4, 8, and 12. The maximal dose of HVJ-E particles that can be injected without eliciting side effects is 1.5×10^{10} according to our previous study (13). Tumor volume was measured in a blinded manner with slide calipers using the following formula: tumor volume (mm³) = length \times (width)² / 2. To examine the indirect antitumor effect of HVJ-E, 5×10^4 CT26 cells were co-injected into the intradermal space in the left flank 4 days after inoculation with 5×10^5 CT26 cells into the right flank. Three injections of HVJ-E were delivered into the tumors in the right flank as described above. Tumor formation at the left side was monitored to confirm tumorigenesis. For an *in vivo* blockade of IL-6 signaling, 20 μ g of IL-6R antibody were injected into tumors simultaneously with HVJ-E on days 4, 8, and 12.

Real-time quantitative RT-PCR. Five micrograms of total RNA extracted from tumors were reverse transcribed into cDNA and amplified by real-time quantitative PCR using an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: 40 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 49°C for 45 s, and elongation at 68°C for 2 min. Mixtures of probes and primer pairs specific for murine CD11c, CD4, CD8, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were purchased from Applied Biosystems. The concentration of target genes

was determined using the comparative CT method (threshold cycle number at the cross-point between amplification plot and threshold) and values were normalized to an internal GAPDH control.

Immunohistochemistry. Tumor tissue was isolated at 48 h after HVJ-E or saline injection for 3 successive days. Acetone-fixed frozen section was stained with specific antibodies in combination with fluorescently labeled secondary antibodies. Nuclei were stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI).

CTL assay. Spleen cells were harvested from mice 10 days after the last HVJ-E or saline injection into tumors as described above. Of the mice treated with HVJ-E, we used only those in which tumors were completely eradicated. Spleen cells (5×10^7 per flask) were stimulated with mitomycin C-treated tumor cells at a ratio of 10:1 in culture medium containing 10 IU/mL of recombinant IL-2 at 37°C in 5% CO₂. The cells including CTLs were harvested on day 7 and used as effector cells in standard 4-h ⁵¹Cr release assays to determine antitumor cytolytic activity. Briefly, target CT26 or Renca cells were labeled with ⁵¹Cr for 90 min at 37°C. Labeled target cells (2×10^4 per well) were incubated with the effector cells at various ratios for 4 h at 37°C in 96-well plates and the amount of radioactivity in the supernatants was measured. The maximal or spontaneous release was defined as counts from samples incubated with 2% Triton X-100 or medium alone, respectively. Cytolytic activity was calculated using the following formula: % specific ⁵¹Cr release = [(experimental release – spontaneous release) / (maximum release – spontaneous release)] \times 100. Cells were assayed in triplicate. Spontaneous release in all assays was <20% of the maximum release.

Cell purification. CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ cells were isolated using mouse CD4⁺CD25⁺ regulatory T-Cell Isolation Kits and an AutoMACS magnetic sorter (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Briefly, spleen and lymph nodes were harvested from mice and then single-cell suspensions were incubated with biotin-antibody cocktail, anti-biotin MicroBeads, and CD25-phycoerythrin antibody to label non-CD4⁺ cells and fluorescently labeled CD25⁺ cells. Non-CD4⁺ T cells were depleted using the AutoMACS. The enriched CD4⁺ T-cell fraction was incubated with anti-phycoerythrin MicroBeads. CD4⁺CD25⁺ Tregs were positively selected using the AutoMACS. The positive and negative fractions were enriched with CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells, respectively. These populations were intracellularly stained with anti-Foxp3 antibody and analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Dendritic cells or CD8⁺ T cells were isolated using mouse CD11c MicroBeads or CD8a⁺ isolation kits.

Immune reconstitution of severe combined immunodeficient mice and ELISPOT assay. CD8⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻ T cells were obtained from naive BALB/c mice. CD8⁺ T cells (1×10^6) with or without 1×10^6 CD4⁺CD25⁻ T cells were injected into severe combined immunodeficient (SCID) mice from tail vein 1 day before CT26 inoculation. HVJ-E treatment was done as described above. CD8⁺ T cells were isolated from spleen 1 week after the last HVJ-E or saline injection. Purified 1×10^5 CD8⁺ T cells were cultured for 24 h with 1×10^5 mitomycin C-treated CT26 or Renca cells. Assay was done using mouse IFN- γ ELISPOT kit (R&D Systems). The number of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells was subsequently counted using a dissecting microscope (Leica, Cambridge, United Kingdom).

T-cell proliferation assays/Treg suppression assays. Recombinant mouse IL-6 (1 ng/mL) or 10 μ L of supernatant from dendritic cell cultures stimulated with HVJ-E at a multiplicity of infection (MOI) of 300 for 24 h were added to each well at the start of the following experiments. IL-6 neutralizing antibodies (MO07; 1 μ g/mL) were added to each well where relevant. CD4⁺CD25⁺ T cells (1×10^5) were incubated in 96-well U-bottomed plates with 1×10^4 splenic dendritic cells, 0.1 μ g/mL of anti-CD3 antibody, and the indicated number of CD4⁺CD25⁺ T cells for 48 h. T-cell proliferation was determined as [³H]thymidine incorporation during the last 6 h of culture.

Human dendritic cells. Frozen normal human dendritic cells derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purchased from Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. (Walkersville, MD). Human dendritic cells were cultured with 50 ng/mL human IL-4 and GM-CSF for 4 days according to manufacturer's instructions.

Results

HVJ-E eradicated murine colon carcinoma by activating adaptive antitumor immune responses. We examined whether HVJ-E safely stimulates antitumor immunity by injecting 1.5×10^{10} HVJ-E virus particles into CT26 tumors growing in the backs of syngeneic BALB/c mice. Three consecutive injections completely eradicated tumors in 60% to 80% of tumor-bearing mice and obviously inhibited growth of the remainder (Fig. 1A and B). Three injections seemed to be necessary for eradication because tumors often relapsed after one or two injections (data not shown). In contrast, the same amount of injected replication-defective adenovirus particles or saline had no effect against CT26 tumors

(Fig. 1A) and the antitumor effect of HVJ-E was minimized when injected into CT26 tumors growing in SCID mice under the same experimental conditions (Fig. 1C). Moreover, tumorigenesis was reduced from 80% to 20% in CT26 cells inoculated into the left flank, distant from the tumors injected with HVJ-E in the right flank (Fig. 1D). These findings showed that HVJ-E eradicated the tumor by inducing antitumor immune responses. The effect was probably not associated with direct HVJ-E cytotoxicity or direct tumor cell killing by activated natural killer cells or macrophages because NK cells and macrophages should function normally in SCID mice (20). Furthermore, HVJ-E is not cytotoxic against CT26 cells *in vitro* (13).

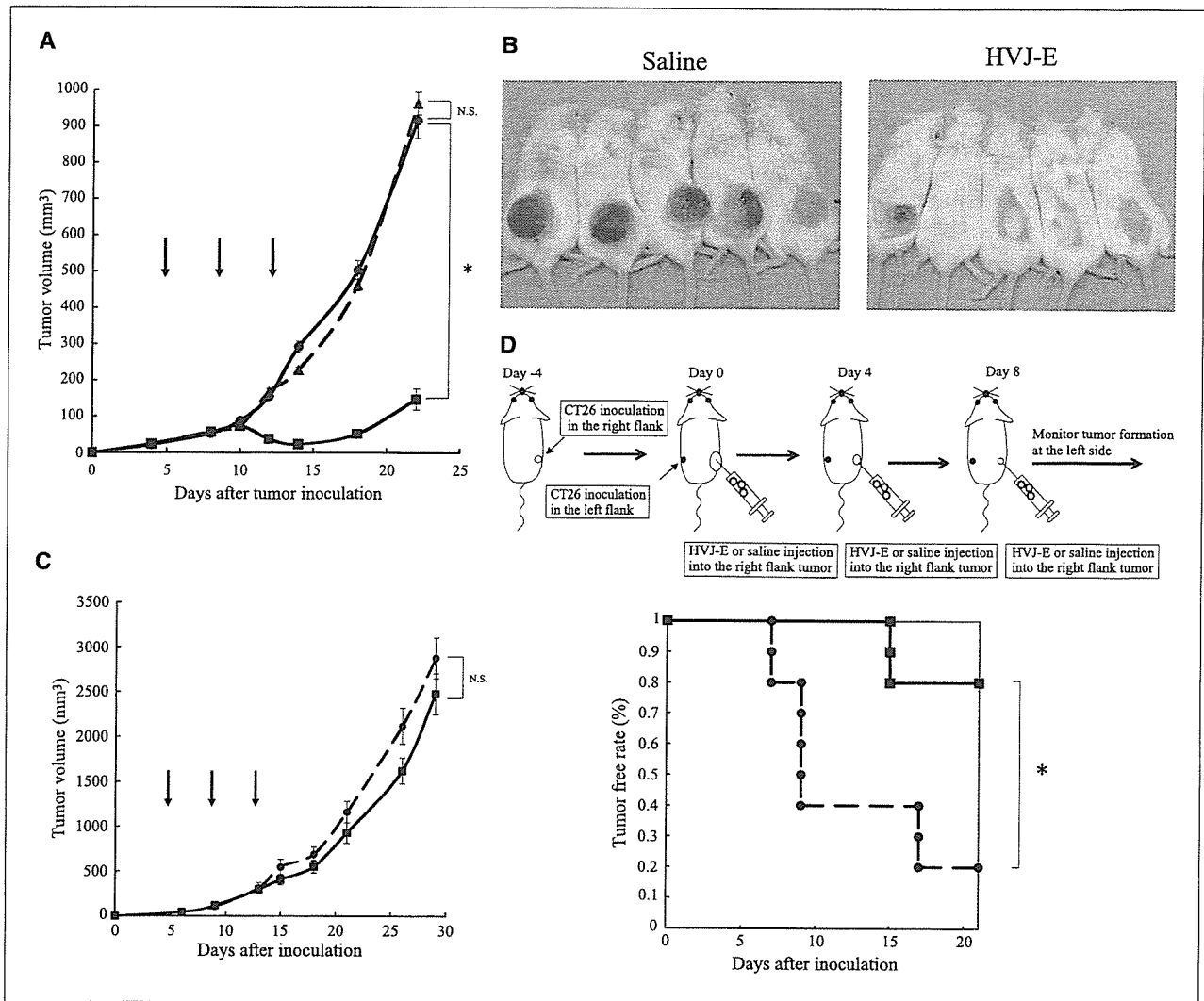


Figure 1. Tumor growth inhibition and eradication by intratumor injection of HVJ-E. A to C, CT26 cells were inoculated into intradermal space in the back of syngeneic BALB/c mice. Particles of HVJ-E or adenovirus (1.5×10^{10} each) or saline was injected into tumors thrice (on days 4, 8, and 12). A, HVJ-E-treated tumors were eradicated completely or growth was strongly suppressed compared with saline-treated tumors. In contrast, no effect was evident when the same amount of replication-defective adenovirus was applied. *, $P < 0.001$. ■, HVJ-E; ▲, adenovirus; ●, saline. B, HVJ-E-treated or saline-treated BALB/c mice 3 wk after tumor inoculations. Three of five tumors were completely eradicated and growth of the remainder was significantly inhibited. C, antitumor effect of HVJ-E was abrogated when injected into CT26 tumors growing in SCID mice. Tumor growth did not significantly differ. D, tumor-free survival curves indicate CT26 tumors in the left side of flank. CT26 cells (5×10^4) were injected into intradermal space in the left side of flanks 4 d after 5×10^5 CT26 cells were inoculated into the right flanks. Three HVJ-E injections were administered into the right side tumors as described above. Tumorigenesis was diminished from 80% to 20% by HVJ-E 21 d after tumor inoculation. *, $P < 0.05$. ■, HVJ-E; ●, saline. Arrows, timing of HVJ-E injections. A and C, points, mean; bars, SE. Results were statistically analyzed using Student's *t* test (A and C) and log-rank test (D). These experiments were repeated twice with similar results.