

HVJエンベロープの新ワクチン・デリバリーの開発

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

HVJ-Eは不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。しかし生体組織ではHVJ由来の蛋白質に対する免疫反応が惹起され、抗体による中和反応がおこることが考えられる。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体とHVJ-EとのPre-incubationが必要であるが、Pre-incubationしなければ阻害されなかった。またマウス骨格筋へ遺伝子を封入しないHVJ-Eを連続投与し、その2週間後にルシフェラーゼ遺伝子封入HVJ-Eを投与しても、遺伝子を封入しないHVJ-Eを連続投与しなかった場合のルシフェラーゼ遺伝子発現と比較して、遺伝子発現の抑制は見られず、連続投与が可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

抗体存在下でもHVJ-Eによる遺伝子導入が機能するかどうかを培養細胞とマウス骨格筋への遺伝子導入により検証することを目指した。

B. 研究方法

HVJ-EはATCCより購入したSendai virusのZ株(VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52)を用い、有精鶏卵で増殖させ、紫外線(99 m joule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。

抗体としては研究室で作成したHVJの融合蛋白Fに対するウサギ抗血清を用いることにした。CMV promoterでドライブされるluciferase geneを載せたプラスミド(CMV-luc)200µgをHVJ-E(10000 HAU)と混合(100 µl TE buffer)し、on iceで0.5% Triton-X100により5分間処理後、18500×gで15分の遠心

をしてHVJ-Eに封入した。これを血清入りの培地中でHEK293細胞(前日に5×10⁵個で培養したもの)と1時間接触させた。このとき300 µg/mlの濃度になるように硫酸プロタミンを培地中に加えた。その後培地効果を行い、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。これを100%として抗体を作用させたときのルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。生体組織での遺伝子発現を調べるため、マウスの骨格筋での遺伝子発現で評価することにした。まずCMV-lucを封入したHVJ-Eを前脛骨筋に注射し48時間後の骨格筋でのルシフェラーゼ活性を測定しその値を100とした。次に別のマウスに遺伝子を封入しないHVJ-Eを1週間隔で2回前脛骨筋に注射した。そのマウスではHVJに対する抗体が検出された。その1週間後にCMV-lucを封入したHVJ-Eを筋肉内に注入した。

倫理面への配慮)

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換え DNA の実験については、組換え DNA 実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換え DNA 実験指針に従って行った。本計画においては、臨床研究データの使用や患者資料の使用、ヒト遺伝子解析などは含まれなかった。

C. 研究結果

HVJ-E への遺伝子封入効率は 15% 程度であった。希釈しない F 抗血清と HVJ-E を混合し、37 度で 30 分インキュベートして、HEK293 細胞にかけルシフェラーゼ遺伝子発現を調べた。コントロールとして Preimmune serum を用いた。Preimmune serum を用いた場合の遺伝子発現は約 90% であったが、F 抗血清の場合は、0 になった。抗血清を 4 倍希釈すると約 10% の遺伝子発現であった。次に、F 抗血清と HVJ-E を混合し、インキュベートなしに直接 HEK293 細胞に作用させた。ルシフェラーゼ遺伝子発現は全く阻害されなかった。マウスの骨格筋での遺伝子発現については、遺伝子を封入しない HVJ-E を 1 週間隔で 2 回前脛骨筋に注射し 48 時間後の遺伝子発現は、遺伝子未封入の HVJ-E の連続投与した場合の遺伝子発現と比較して、有意差のない同じ値が得られ、抗 HVJ 抗体が存在する個体についての遺伝子発現は全く阻害されなかった。

D. 考察

HVJ-E による遺伝子導入は HVJ の

エンベロープと細胞膜の融合に依存している。培養細胞での実験で抗体による遺伝子発現の阻害のためには抗体と HVJ-E との Pre-incubation が必要であるが、これがなければ阻害されなかったことより、融合反応が抗体の吸着よりも非常に迅速に起こることが原因ではないかと推測される。したがってマウス実験でも明らかのように、中和抗体存在下であっても標的組織への直接投与方法を行う限りは、遺伝子導入は阻害されないと考えられる。現在 HVJ-E はそれ自身が有する抗腫瘍作用により、癌治療のための臨床研究に用いられており、投与を受けた患者血清中には抗 HVJ 抗体が上昇することが分かっている。実際に、この患者では HVJ-E の第 1 サイクルの 2 週間で 6 回投与により NK 活性が上昇し、投与をやめると 4 週間の間に NK 活性が減少した。次いで、第 2 サイクルの 2 週間 6 回投与で NK 活性は再び上昇した。HVJ に対する抗体が存在しても HVJ-E の抗腫瘍免疫の活性化作用は影響を受けないことが臨床研究でも裏付けられている。

E. 結論

HVJ-E による遺伝子発現は中和抗体により影響されないので連続投与が可能である。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanemura A, Kiyohara E, Katayama I, Kaneda Y. Recent advances and developments in

the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application. *Cancer Gene Ther.* 20:599-605, 2013.

- 2 . Takehara, Y ., Satoh, T ., Nishizawa, A ., Saeki, K ., Nakamura, M ., Masuzawa, M ., Kaneda, Y ., Katayama, I., and Yokozeki, H . Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. *Clinical Immunology*, 149: 1-10, 2013.

2 . 学会発表

- 1 . Yasufumi Kaneda : 第 19 回日本遺伝子治療学会理事長講演 , “What will be needed for gene therapy in Japan?” 2013/07/04 岡山
- 2 . Yasufumi Kaneda : 日本薬理学会 (予定) シンポジウム , “Development of virosome-mediated cancer therapy” 平成 26 年 3 月 21 日 , 仙台

H 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし