

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860354

研究課題名(和文)新規ハイドロダイナミック遺伝子導入システムによる遺伝子治療の前臨床研究

研究課題名(英文)Hydrodynamic Gene Delivery to Non-human Primates

研究代表者

上村 顕也(KAMIMURA, KENYA)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00579146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロダイナミック遺伝子導入法は核酸溶液を圧負荷により注入し、遺伝子発現を得る方法である。我々はその臨床応用に向けた系統的検証を行い、本助成では、より人に近い動物モデルとして、非ヒト霊長類を対象としてその安全性、有用性を検証した。ヒヒの各区域肝静脈にカテーテルを挿入し、種々の注入圧、量、速度などのパラメーターでマーカー遺伝子を導入した。その結果に基づき、最適なパラメーターで、hFIX発現遺伝子を導入し、一時的にはあるが、治療域レベルの発現を認め、再治療効果、安全性も示唆された。引き続き、本結果に基づき、遺伝子導入システム、長期遺伝子発現ベクターの開発、前臨床試験を準備中である。

研究成果の概要(英文)：gene therapy. We have previously reported the effectiveness of image-guided liver-lobe specific hydrodynamic gene delivery. Here, we have assessed the efficiency and the safety of the procedure in non-human primates in this study. The injection catheter was inserted in the lobular hepatic veins and the hydrodynamic injection of the marker plasmid DNA was performed with a various parameters including, injection pressure, volume, flow rate, etc. Based on the results obtained, the optimum parameters were defined followed by the long-term gene expression study using the parameters injecting plasmid expressing human factor IX DNA. The efficiency and safety of the procedure have been confirmed and the development of the gene delivery system and the pre-clinical study are ongoing research programs.

研究分野：消化器病学

キーワード：遺伝子治療 肝臓特異的遺伝子導入 ハイドロダイナミック遺伝子導入法 核酸医薬 ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

A) ハイドロダイナミック遺伝子導入法を遺伝子治療に応用する背景・意義

遺伝子治療は単回の治療で長期間の治療効果を維持することから、細胞治療とともに医学的に、また医療経済の観点からもその臨床応用が期待されている。基礎的研究ではその有効性が実証されている一方で、遺伝子治療の臨床試験の約7割において使用されているウイルスベクターでは発癌性や免疫原性による致死副反応が報告され、その普及には改良すべき点が山積している。従って、遺伝子治療をより多くの疾患へ臨床応用するためには、安全で効率の良い、誰もが、どのような患者にも再現できる遺伝子導入方法の確立が重要かつ急務である。

一方で、ハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic Gene Delivery, 以下 HGD) は、物理的な圧力のみで遺伝子を血管から種々の細胞に効率的に送り込む方法として 1999 年に Liu らによって報告されて以降、*in vivo* での遺伝子導入法として応用されてきた。本方法は、簡便で、治療レベルに到達する遺伝子導入にウイルスベクターやポリマーなどを必要としないことから、発癌性や免疫応答などの危険性が低く、生物学的安全性が高いことが臨床応用に適していると考えられている。申請者らはこれらの点に着目し、HGD による新規遺伝子治療法を確立することを目標として系統的な研究を行ってきた。

B) HGD の臨床応用へ向けた有用性の検証

申請者らは HGD を安全にヒト遺伝子治療へ応用するため、小動物から大動物へ、と系統的な検討を行ってきた。具体的には、ヒトをはじめとする大動物に応用するため、臨床で使用されている X 線透視下カテーテル操作により、ブタ、イヌ、サルの肝臓、筋肉を対象に肝静脈、大腿静脈から一定注入圧で HGD を施行し、安全かつ領域特異的に遺伝子を導入できることをルシフェラーゼなどのマーカー遺伝子を用い実証し、報告した。これらの結果は HGD が種々の臓器、動物種による違いによらず有用であることを示唆し、ヒトに近い組織学的構築を有するイヌやサル肝臓に対する遺伝子導入の成功は HGD の臨床応用の可能性を強く示唆するものであった。

C) 新規 HGD システムの開発

一方で、遺伝子治療においては、治療効果、安全性の再現性が重要であり、「誰もが、どのような患者さんにも」再現できる安全な HGD システムの開発がその臨床応用に必須である。申請者らが着目した点は、それまでの一定注入圧による HGD の遺伝子導入効率が、注入時の時間—対象領域内圧曲線に密接に関連していることであった。そこで、申請者らは、共同研究者である、本学 尾田教授(工

学博士)との医工連携により、注入モーター力をコンピューター制御し、注入前に規定する時間—臓器内圧曲線を、異なる個体においても再現できる小動物用 HGD システムを開発し、ラットを用いてその有用性を報告した。本システムの利点は安全で個体差の少ない、再現性の高い HGD が可能であることである。そのシステムを大動物へ、さらには臨床に応用するためのハード面での改良を JST A-STEP FS 探索タイプの支援により完成した。**そこで本申請では、臨床応用可能なこの新規 HGD システムの前臨床研究を行い、HGD による遺伝子治療の学術的基盤を確立し、新規遺伝子治療法を日本から発信するための重要なステップであると位置づけた。**

D) イヌにおける検証の必要性

本研究を遂行し、HGD をヒト遺伝子治療に安全に応用するためには、ヒトの肝臓と組織学的に類似する肝臓を有する大動物を用いた検証が必要不可欠である。イヌは実験動物として汎用され、日本国内での入手が比較的容易で、ヒト肝臓に類似した肝臓の組織学的構築を有し、各種疾患モデルも入手可能であることから、本研究の対象動物として最適である。申請者らもイヌに HGD を施行した多くの経験を有し、本研究の円滑な遂行に最適な動物モデルである、と考えた。

2. 研究の目的

HGD は、核酸溶液を対象臓器に注入し、高効率の遺伝子発現を得る方法である。申請者らは HGD による遺伝子治療を確立することを目標として動物への遺伝子導入実験を系統的に行い、有用性を報告した。さらに、その結果に基づき臨床応用可能な、導入効率の再現性を担保する HGD システムを確立した。そこで本研究は、HGD のヒトでの臨床試験に向けたステップとして、臨床応用可能な上記システムを用いた HGD の遺伝子治療法としての**効率、安全性、再現性を、イヌを対象動物として、学術的に実証するための前臨床試験**と位置づけ、ヒト遺伝子発現プラスミドをイヌ肝臓に導入し、**長期遺伝子治療効果及び安全性を確認し、臨床試験に向けた学術的基盤を確立する**ことを目的とした。

3. 研究の方法

(A) 申請者らが開発した、新規 HGD システムの安全性、有用性、再現性をイヌを対象として検証する。

体重 20 kg 前後の実験用雑種イヌ、5 頭に対して新規 HGD システムにより、複数の時間—内圧曲線のもとに、pCMV-Luc プラスミドを導入し、遺伝子導入効率、再現性、安全性を評価する。遺伝子導入 72 時間後に、体外式エコー下に各区域から肝臓、5 サンプルを肝生検によって、採取する。遺伝子導入効率をルシフェラーゼ活性の定量と抗ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫染色による遺伝

子発現強度、発現領域により評価する。再現性は同じ時間—内圧曲線による遺伝子発現の個体間較差により評価する。安全性は遺伝子注入中のカテーテル位置の X 線透視下でのモニタリング、体外式超音波による標的領域の膨張速度のリアルタイムな観察、生理学的(注入時肝静脈圧、心電図、血圧、呼吸回数、酸素飽和度等)、血液生化学的(肝酵素を含む血液検査)、組織学的、免疫学的(サイトカイン活性等)評価により総合的に検証した。**これらの結果から HGD を臨床応用するための、新規 HGD システムの安全性、有用性が評価できた。**

(B) (A)の結果に基づき、イヌに対してヒト遺伝子発現プラスミドを導入し、新規 HGD システムを用いた遺伝子治療効果を検証する。

上記イヌに対して、最適な時間—内圧曲線で、新規システムを用いて hflX 発現プラスミドを、肝臓を対象臓器として導入し、長期遺伝子発現効果、再現性、及び安全性を評価する。導入効率、再現性はイヌ血中 hflX を経時的に ELISA 法により評価し検証する。また観察期間を通し(A)と同様に安全性の評価を行い、さらにはイヌの成長と発達から長期的な身体への影響(食欲、体重変化などを含む理学的所見、採血などによる晩発性臓器障害の評価等)も厳重に解析する。経過観察中に必要が生じた場合は肝生検を施行し、臓器障害を検証する。なお、プラスミドは研究協力者である Liu 教授より供与される。

これらの結果から新規 HGD システムの臨床応用に向けた、長期遺伝子発現効果、安全性が確認された。

(C) 臨床試験へ向けた HGD システムの改良、準備

上記の研究過程において、HGD システムの臨床応用に向け、改良すべき点を明らかにした。

以上より新規 HGD システムの臨床応用に向けた基礎的な検証が行われ、**個体や対象臓器による遺伝子導入効率の差異の少ない、「誰もが、どのような患者さんにも」再現できる安全な遺伝子治療の臨床試験に向けた学術的基盤を確立することが可能となると考えた。**

本研究により、HGD の臨床応用に向けたソフト、ハード面での方法論の確立がなされるのみならず、再現性の高い、安全で効率的な新規遺伝子治療システムを日本から世界へ発信できる、と考えた。

4. 研究成果

平成 26 28 年度の本研究助成基金助成金によって、以下の研究成果が得られた。

(概要)

申請者らのこれまでの系統的な基礎データを基に、HGD の臨床応用に向けた安全性、有効性を、新規 HGD システムにより、前臨床

研究として検証した。安全性は、超音波による標的領域の観察、注入時肝静脈圧、心電図、酸素飽和度等の生理学的、肝酵素を含む血液生化学的、組織学的、サイトカイン活性等の免疫学的評価により総合的に確認する。遺伝子導入の有効性はレポーター遺伝子により発現効率、臓器内での発現分布を検証した上で、ヒト血友病の治療遺伝子(human factor IX, hflX)を導入し、その**長期遺伝子発現効果、再現性を検証し、HGD が臨床応用可能であることを学術的に明らかにした。**

(1) 本システムと申請者らが開発してきたバルーンカテーテル挿入による肝臓区域特異的な HGD 法を組み合わせ、体重 20 kg 前後のイヌに対して新規 HGD システムにより、複数の時間—内圧曲線のもとに、HGD を行った。臨床応用を念頭におき、生理学的、血液生化学的、組織学的な安全性の評価を行った。各肝区域特異的に遺伝子を導入することが可能で、心臓を含む他臓器への生理学的な影響を認めず、血液生化学的な検討でも一時的な肝酵素の上昇を認めるのみで、長期的な対象動物の健康状態にも異常所見を認めなかった。組織学的には注入直後の肝臓洞構造の拡張を認め、ラットを用いた血流測定でも、同様の所見が得られた。さらに血漿サイトカインの検討においても、炎症性サイトカインの上昇を認めず、血管壁の伸張時に上昇するとされるミオカインの上昇を認めたことから、本遺伝子導入システムとカテーテルを用いた、肝区域特異的な遺伝子導入法の影響は注入部位特異的、一過性、可逆的であり、方法論の安全性が示唆された。

遺伝子発現効率の検証では、pCMV-Luc などのマーカー遺伝子発現プラスミド導入後に、区域特異的で効率的な遺伝子発現を、活性の測定、免疫染色などにより実証し、論文発表した。

(2) 本システムと申請者らが開発してきたバルーンカテーテル挿入による肝臓区域特異的な HGD のコンビネーションによる新規遺伝子治療の前臨床試験に向けて、その領域特異的な遺伝子導入の評価による生物学的な安全性の評価を行った。

具体的には、遺伝子注入時の肝臓の変化をエコー、腹腔鏡下での肉眼的観察、X 線造影による血管の構造の変化の解析などを行い、領域特異性を検証した。さらに、エコー下、腹腔鏡下での肝生検により、遺伝子発現領域を詳細に検証することによって、区域特異的な遺伝子導入と、その発現を、免疫染色、ルシフェラーゼの活性などで確認した。プラスミドの分布を臓器ごとに検証することによって、肝臓特異的な遺伝子導入を長期的に観察し、以上から、新規 HGD システムとカテーテルを用いた、肝区域特異的な遺伝子導入法の区域特異的な遺伝子発現の安全性、有効性が示唆された。

(3) 以上の成果に基づき、新規 HGD システムとバルーンカテーテル挿入による肝臓区域特異的な HGD のコンビネーションによる hflX 遺伝子導入の長期発現性、機能評価、生物学的な安全性の評価を行った。

具体的には、実験用雑種イヌに対して、最適な時間-内圧曲線で新規 HGD システムによる hflX 発現プラスミドの肝臓特異的 HGD を行い、イヌ血中 hflX 濃度、凝固活性の変化、組織学的な検証を行った。その結果、イヌを対象として、新規システムにより hFIX 発現プラスミドの HGD を行った場合、30 日以上にわたり血友病 B に対する治療域の遺伝子発現、凝固活性の上昇が確認され、遺伝子治療効果が示された。

(4) 以上の結果に基づき、米国ノースカロライナ大学、ジョージア大学との国際共同研究によりイヌ血友病の HGD による遺伝子治療を開始することが可能となった。

また、上記の検討の過程で、研究協力者の尾田教授の協力を得て、29 年度に予定していたシステムの改良を同時に行うことができた。上記の円滑な研究進捗状況と当初、平成 29 年度に計画していたシステムの改良を先行することができたことから、HGD を臨床に応用するための段階的な検証の次のステップとして、疾患治療への有効性の検証が必要であると考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Yokoo T, Kamimura K (corresponding), Abe H, Kobayashi Y, Kanefuji T, Ogawa K, Goto R, Suda T, Oda M, and Terai S. (2016) The Liver-targeted Hydrodynamic Gene Therapy: Recent Advances in the Technique. *World J Gastroenterol* 22: 8862-8868. (査読あり)
2. Kobayashi Y, Kamimura K (corresponding), Abe H, Yokoo T, Ogawa K, Shinagawa Y, Goto R, Inoue R, Ohtsuka M, Miura H, Kanefuji T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S. (2016) Effects of fibrotic tissue on liver-targeted hydrodynamic gene delivery. *Mol Ther Nucleic Acids* 5: e359. (査読あり)
3. Abe H, Kamimura K (corresponding), Kobayashi Y, Ohtsuka M, Miura H, Ohashi R, Yokoo T, Kanefuji T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S. (2016) Effective prevention of liver fibrosis by liver-targeted

hydrodynamic gene delivery of matrix metalloproteinase-13 in a rat liver fibrosis model. *Mol Ther Nucleic Acids* 5: e276. (査読あり)

4. Yokoo T, Kanefuji T, Suda T, Kamimura K, Liu D, Terai S. (2015) Site-specific impact of a regional hydrodynamic injection: computed tomography study during hydrodynamic injection targeting the swine liver. *Pharmaceutics* 7: 334-343. (査読あり)
5. Kamimura K (corresponding), Yokoo T, Abe H, Kobayashi Y, Ogawa K, Shinagawa Y, Inoue R, Terai S. (2015) Image-guided hydrodynamic gene delivery: Current status and future directions. *Pharmaceutics* 7: 213-223. (査読あり)
6. Abe H, Kamimura K (corresponding), Yokoo T, Suda T, Kobayashi Y, Aoyagi Y. (2014) Gene therapy for liver fibrosis. *JSM Gastroenterol Hepatol* 2: 1028. (査読あり)
7. Kanefuji T, Yokoo T, Suda T, Abe H, Kamimura K, Liu D. (2014) Hemodynamics of a hydrodynamic injection. *Mol Ther Methods & Clinical Development* 1: 14029. (査読あり)
8. Kamimura K (corresponding), Kanefuji T, Yokoo T, Abe H, Suda T, Kobayashi Y, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. (2014) Safety assessment of liver-targeted hydrodynamic gene delivery in dogs. *PLoS One* 9: e107203. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Kamimura K, et al. (2016) Development of Image-guided, Liver Lobe-specific Hydrodynamic Gene Delivery Method for Gene Therapy in Liver Diseases. T American Association for the Study of Liver Disease, Liver Meeting 2016 (国際学会) ポスター発表, 2016年11月11日, ワシントン DC, アメリカ)
2. Kamimura K, et al. (2016) Therapeutic Effect of Liver-targeted Hydrodynamic Delivery of MMP13 Gene on Liver Fibrosis. 第 22 回日本遺伝子治療学会 (国際学会) (ポスター発表, 2016年7月28日, 虎ノ門ヒルズ, 港区, 東京)
3. 上村颯也, 横尾健, 他. (2016) 臓器特異的ハイドロダイナミック遺伝子導入法による肝疾患の遺伝子治療. 第 102 回日本消化器病学会総会 (口頭発表, 2016年4月21日, 京王プラザホテル, 新宿, 東京)
4. Kamimura K, et al. (2016) Development of Effective Gene Therapy for Liver Fibrosis. 第 25 回 Asian Pacific Association for the

- Study of the Liver (国際学会)(口頭発表, 2016年2月22日, グランドプリンスホテル新高輪、品川、東京)
5. **上村 顕也**, 阿部寛幸, 他. (2015) 新規ハイドロダイナミック遺伝子導入システムの有用性と安全性の検証—ハイドロダイナミック法の臨床試験へ向けて—. 第19回日本肝臓学会大会(JDDW2015) (口頭発表, 2015年10月8日, グランドプリンスホテル新高輪、品川、東京)
 6. **Kamimura K**, et al. (2015) The Effect of Fibrosis on Gene Delivery Efficiency of Hydrodynamics-based Gene Delivery. 第21回日本遺伝子治療学会(国際学会)ポスター発表, 2015年7月24日, 大阪国際会議場、大阪府、大阪市)
 7. Kobayashi Y, **Kamimura K**, et al. (2015) Effect of Fibrotic Tissue on Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery. The American Society of Gene & Cell Therapy 18th Annual Meeting (ポスター発表, 2015年5月13日, ニューオリンズ, アメリカ)
 8. Abe H, **Kamimura K**, et al. (2015) Effective Prevention of Liver Fibrosis by Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 in Rat Liver Fibrosis Model. The American Society of Gene & Cell Therapy 18th Annual Meeting (ポスター発表, 2015年5月13日, ニューオリンズ, アメリカ)
 9. **Kamimura K**, et al. (2015) Image-guided, Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery in Dogs - Preclinical Assessment of Effectiveness and Safety of the Procedure. The American Society of Gene & Cell Therapy 18th Annual Meeting (口頭発表, 2015年5月13日, ニューオリンズ, アメリカ)
 10. **上村 顕也**, 阿部寛幸, 他. (2015) 新規ハイドロダイナミック遺伝子導入システムの有用性と安全性の検証—ハイドロダイナミック法の臨床試験へ向けて—. 第15回遺伝子デリバリー研究会 (口頭発表, 2015年5月1日, 京都薬科大学, 京都府、京都市)
 11. **Kamimura K**, et al. (2014) Parameters for Optimal Hydrodynamic Gene Delivery to Pig Liver Using an Image-guided and Lobe-specific Procedure. The American Society of Gene & Cell Therapy 17th Annual Meeting (口頭発表, 2014年5月21日, ワシントンDC, アメリカ)
 12. Abe H, **Kamimura K, et al.** (2014) Overexpression of Matrix Metalloproteinase-13 Gene by the Method of Hydrodynamic Gene Delivery Prevents Liver Fibrosis in Rats. The American Society of Gene & Cell Therapy 17th Annual Meeting (ポスター発表, 2014年

- 5月21日, ワシントンDC, アメリカ)
13. 阿部寛幸, **上村 顕也**, 他. (2014) ハイドロダイナミック遺伝子導入法によるラット肝硬変モデルの遺伝子治療. 第56回日本消化器病学会大会(JDDW2014) (ポスター発表, 2014年10月24日, 神戸コンベンションセンター、兵庫県、神戸)

〔図書〕(計 2 件)

1. **Kamimura K**, et al. (2015) Hydrodynamic Gene Delivery. In: Olivia M, Mansoor MA (eds). Advances and Challenges in the Delivery of Nucleic Acid Therapies, Future Science: London, pp 43-56. (査読あり)
2. **Kamimura K**, et al. (2016) Image-guided hydrodynamic gene delivery to the liver: Toward clinical applications. In: Terai S, Suda T (eds). Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver, Springer Japan: Tokyo, pp 85-92. (査読あり)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況(計 1 件)

名称: 時間 - 脈管内圧制御に基づく細胞内薬物送達システム及び細胞内薬物送達方法
 発明者: 須田剛土、**上村 顕也**、尾田雅文
 権利者: 須田剛土、**上村 顕也**、尾田雅文
 種類: 特許
 番号: 5922864
 取得年月日: 2016年4月22日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
 上村 顕也 (Kamimura, Kenya)
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号: 00579146

(2)研究分担者
 なし

(3)連携研究者
 なし

(4)研究協力者
 寺井 崇二 (Terai, Shuji)
 新潟大学・医歯学系・教授

青柳 豊 (Aoyagi, Yutaka)
新潟医療センター・消化器病センター長

須田剛士 (Suda, Takeshi)
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

横尾 健 (Yokoo, Takeshi)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

藤澤 信義 (Fujisawa, Nobuyoshi)
新潟大学・脳研究所・助教

吉田 秀義 (Yoshida, Hidenori)
新潟大学・医歯学系・助教

尾田 雅文 (Oda, Masafumi)
新潟大学・地域創生推進機構・教授

Dexi Liu
ジョージア大学・教授