

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790595

研究課題名(和文) ハイドロダイナミック遺伝子導入法による非ヒト霊長類への遺伝子治療

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・医歯学総合病院・医員

研究者番号：00579146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000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。ヒビ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。その結果に基づく、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)：Development of a safe and effective method for gene delivery is an essential step toward 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：遺伝子治療 ハイドロダイナミック遺伝子導入法 肝臓 大動物 血管造影手技 血友病

1. 研究開始当初の背景

(1) ハイドロダイナミック遺伝子導入法と遺伝子治療の現状

遺伝子治療は小動物を中心とした多くの基礎研究でその有効性が実証されているが、臨床応用に向けて、安全で導入効率の良い遺伝子送達方法の確立が重要である。臨床試験の約7割で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などの副作用が報告され、現時点で、安全で効率の高い導入法は確立されていない。本研究で申請するハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic gene delivery, 以下 HGD) は、研究協力者であるピッツバーグ大学 Liu 教授らによって開発され、小動物において *in vivo* での遺伝子発現実験に頻用されている。その原理は、核酸を含む溶液を圧負荷により血管内に注入し、内皮細胞及び対象細胞膜の透過性を一時的に亢進し細胞内に導入することによって遺伝子発現を得ることである。その利点は肝細胞への遺伝子導入効率がとくに高く、さらに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、生物学的な安全性が高いことである。申請者らはこの点に注目し、HGD を用いた新規遺伝子治療法を確立するため、小動物から大動物への系統的な検討を行ってきた。申請者らの HGD による再現性の高い遺伝子導入とユニークで着実な系統的検証は世界的にも注目され、本申請における非ヒト霊長類での研究は初めての試みであった。

(2) ブタ、イヌに対する遺伝子治療効果の検証

HGD を安全にヒト遺伝子治療へ応用するため、申請者らは血管造影下にバルーンカテーテルをブタ及びイヌの区域肝静脈、大腿静脈に挿入し HGD を施行し、大動物の肝、筋に安全で効率的な標的領域特異的遺伝子導入が可能であることをルシフェラーゼなどのマーカー遺伝子を用いて短期的に検証し報告してきた。この検証から遺伝子溶液注入圧、量などの安全で最適な HGD 条件を確認し、alpha-1 antitrypsin 欠損症の原因遺伝子である、human alpha-1 antitrypsin (hAAT) 発現プラスミドを肝臓に導入した結果、ブタ、イヌともに血清 hAAT 濃度がその欠損症に対する治療レベル (0.5 mg/ml) に上昇し、免疫組織化学的解析でもその発現蛋白が肝細胞に特異的に確認され、遺伝子治療効果が期待される。

(3) サルを対象動物とする必要性

申請者らはこれまでの研究で HGD によりブタ、イヌの肝臓及び筋肉へ安全に効率的な長期的遺伝子発現が可能であることを実証してきた。本法をヒト疾患に対する遺伝子治療として安全に応用するための次のステップとしては、現時点で考えうる最終的なヒトモデ

ル動物として非ヒト霊長類における検証が不可欠である。申請者らが対象動物として選択したサルは各臓器の組織学的構築、機能がヒトに近似し、多くの外科手術や薬物開発において最終ヒトモデル動物として汎用されており、さらに、米国では 1992 年、ピッツバーグ大学、Starzl 博士が重症肝不全患者に対してサル肝臓を異種移植し、成功している。このことはサルを対象動物とすることにより HGD をヒトに安全に応用するための条件、全身、臓器へ与える影響を検証できることを示唆した。

2. 研究の目的

本研究ではヒト遺伝子治療への応用に向けたステップとして、**非ヒト霊長類**を対象動物として、**効率的な遺伝子導入条件と安全性を重点的に検証**し、その結果に基づき、**血友病 B**に対する治療遺伝子、hFIX 発現プラスミドをヒト肝臓に導入し、**長期遺伝子治療効果及び安全性**を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非ヒト霊長類の肝臓に対して注入圧、量、速度、標的領域などの注入各パラメーターと遺伝子導入効率及び安全性を短期的に検討した。

ヒヒの頸静脈からバルーンカテーテルを X 線透視イメージ下に各肝静脈に挿入し、バルーンでの一時閉塞下に設定した各パラメーター下 (注入速度、注入圧、注入量) でプラスミド DNA 溶液を注入した。具体的には体重 20kg のヒヒ (4 頭) の肝臓の各区域肝静脈を標的としてルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を各パラメーターで注入し、遺伝子導入効率と安全性を検証した。遺伝子導入 72 時間後に 1cm³ 大の肝組織を各区域から 10 サンプル以上回収し、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した。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区域の膨張速度のリアルタイムな観察、生理学的、血液生化学的、組織学的、免疫学的評価によって総合的に検証した。

(2) (1)の結果に基づき、非ヒト霊長類に対して hFIX 発現遺伝子を導入し、HGD による長期遺伝子発現を経時的に観察した。

体重 20 kg のヒヒ、4 頭に対して (1) で決定したパラメーターでヒト凝固因子 IX 番 (hFIX) 発現プラスミドを導入し、長期遺伝子発現及び安全性を評価した。導入効率はサル血中 hFIX 濃度を経時的に ELISA 法により評価し、また観察期間を通し、安全性の評価を行い、サルの成長と発達から長期的な身体への影響も厳重に解析した。

(3) HGDによる再治療効果、安全性の検証。
前年度から継続してHGDによる長期遺伝子発現、安全性(晩発性臓器障害等)を検証し、サル血中 hFIX 濃度が前値レベルに低下した時点で、(2)の結果に基づき、再遺伝子導入を行い、その効果と安全性を評価した。

4. 研究成果

本研究助成基金助成金による助成によって、以下の研究成果が得られた。

(1) 非ヒト霊長類の肝臓に対する適切な遺伝子注入パラメーターの設定と遺伝子導入効率の検証：体重 20kg 前後のヒヒ 4 頭を対象動物として、血管造影手技により右外側、右内側、左内側、左外側肝静脈に遺伝子注入用バルーンカテーテルを挿入し、設定した注入圧、量、速度などの各パラメーター下で、ルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し、その導入効率、区域特異性を検証した。この結果、注入圧 100 psi、注入速度 20 ml/sec で対象区域肝容量の 2.5 倍容量のプラスミドを注入した場合に、検証したパラメーターの組み合わせの中で最も高い $1.0E+06$ RLU/mg of Protein レベルのルシフェラーゼ活性を認めた。回収した肝組織に対する抗ルシフェラーゼ抗体を使用した免疫染色では、対象肝区域特異的に 6% の陽性細胞を認め、これまでのブタ、イヌを対象動物とした研究と同様の結果であった。

安全性の検証：上記パラメーターでの遺伝子注入中の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(肝静脈圧、心電図、血圧、呼吸回数、等)、血液生化学的、組織学的な検討を行い、注入後に一時的な肝酵素の上昇を認めたほかは、明らかな異常所見を認めなかった。

以上の結果から、ヒヒ肝臓に対する安全で最適な遺伝子導入パラメーターが設定され、非ヒト霊長類でハイドロダイナミック遺伝子導入法が安全、かつ効率的に応用可能であることが示唆された。

(2) 非ヒト霊長類の肝臓に対する長期遺伝子治療効果の検証：確立した最適な遺伝子注入パラメーター下で hFIX 発現プラスミドをヒヒ 4 頭を対象動物として、血管造影手技により右外、右内、左内、左外側肝静脈に遺伝子注入用バルーンカテーテルを用いて、遺伝子導入した。導入効率を血漿中 hFIX 濃度、hFIX 凝固活性で評価した。注入後 14 日で血漿 hFIX 濃度は 10 ng/ml に、凝固活性は 40-50% に上昇し、血友病に対する治療域を 3-4 ヶ月維持した。明らかな副作用を認めず、動物の成長にも異常を認めなかった。

(3) 非ヒト霊長類に対するハイドロダイナミック遺伝子導入法(HGD)の再治療効果の検証：

hFIX 発現プラスミドを導入したのちに、その発現、活性上昇を確認したヒヒ 4 頭において、その発現が前値に復した後に、全頭に対して、最適なパラメーターで再治療を行った。その結果、初回治療と同レベルの発現を確認した。

以上の結果から、最適化された遺伝子導入パラメーター下での肝臓特異的なハイドロダイナミック遺伝子導入によって、個体差の少ない、再現性の高い遺伝子治療が大動物で初めて実証できた。

さらには、臨床研究に向けたハイドロダイナミック遺伝子導入システムの確立のための民間企業との共同研究チームを確立することができ、今後も個体や対象臓器による遺伝子導入効率の差異を減じ、「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システムの確立に向けて、研究を継続する予定である。

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 4 件)

(1) Kamimura K, Abe H, Suda T, Aoyagi Y, Liu D. (2013) Liver-directed Gene Therapy. *JSM Gastroenterol Hepatol*. 1: 1005. (査読あり)

(2) Kamimura K, Suda T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. (2013) Parameters Affecting Image-guided, Hydrodynamic Gene Delivery to Swine Liver. *Mol Ther Nuclieic Acids* 2:e128. doi: 10.1038/mtna.2013.52. (査読あり)

(3) Yokoo T, Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. (2013) Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Ther* 20: 816-823. (査読あり)

(4) Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. (2011) Advances in Gene Delivery Systems. *Pharm Med* 25: 293-306 (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

(1) Kamimura K, et al. (2013) Image-guided Hydrodynamic Gene and Cell Delivery through the Liver: Toward Clinical Applications. JDDW2013 (口頭発表, 2013 年 10 月 9 日, 東京)

(2) Kamimura K, et al. (2013) Development of Hydrodynamics-based Gene Therapy. 日本遺伝子治療学会奨励賞受賞講演(口頭発表, 2013 年 7 月 4 日, 岡山)

(3) 上村 顕也, 他. (2013) ハイドロダイナミ

ック遺伝子導入法の臨床応用に向けて。第 13 回 日本遺伝子デリバリー研究会（口頭発表，2013 年 5 月 11 日，東京）

(4) Kamimura K, et al. (2013) Hydrodynamics-based Gene Transfer to Large Animals. Genetic Transformation Technologies 2013 (口頭招待講演，2013 年 2 月 14 日，ウィーン，オーストリア)

(5) 上村顕也、他。(2012) ハイドロダイナミック法によるヒヒ肝臓への遺伝子導入。第 16 回 日本肝臓学会大会 (JDDW 2012) (ポスタ発表，2012 年 10 月 10 日，神戸)

(6) 上村顕也、他。(2012) 医薬工連携による新規遺伝子導入装置の開発と今後の展開。第 28 回日本 DDS 学会学術集会 2012 (口頭発表，2012 年 7 月 4 日，北海道)

(7) Yokoo T, Kamimura K, et al. (2012) Long-term Transgene Expression in Rat Liver using a Novel Electromotor-driven Hydrodynamic Gene Injector. American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting (ポスタ発表，2012 年 5 月 16 日，フィラデルフィア，アメリカ)

(8) Kamimura K, et al. (2012) Image-guided, Lobe-specific Hydrodynamic Gene Delivery to Baboon Liver. American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting (口頭発表，2012 年 5 月 16 日，フィラデルフィア，アメリカ)

(9) 上村顕也、他。(2011) ハイドロダイナミック法を用いた遺伝子治療の前臨床研究。第 53 回日本消化器病学会大会 (JDDW 2011) (口頭発表，2011 年 10 月 20 日，福岡)

(10) 上村顕也、他。(2011) 大動物に対するハイドロダイナミック遺伝子導入法。アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 (口頭発表，2011 年 9 月 2 日，大阪)

(11) Yokoo T, Kamimura K, et al. (2011) Development of Electromotor-driven Injector for Hydrodynamic Gene Delivery. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (ポスタ発表，2011 年 5 月 21 日，シアトル，アメリカ)

(12) Kamimura K, et al. (2011) Optimization of Image-guided Hydrodynamic Gene Delivery to Liver of Large Animals. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (口頭発表，2011 年 5 月 21 日，シアトル，アメリカ)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Suda T, Kamimura K, Zhang G, Liu D. (2013) Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology, 2013 Ch 15, Hydrodynamicpressure-based non-viral Nucleic Acid Delivery. Imperial College Press eBook.

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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)
新潟大学医歯学総合病院・医員
研究者番号：00579146