

Title	膜融合リポソームの開発と遺伝子治療等への応用に関 する研究
Author(s)	水口,裕之
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110026
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

# 膜融合リポソームの開発と

# 遺伝子治療等への応用に関する研究

1996年

水口 裕之

# 膜融合リポソームの開発と

# 遺伝子治療等への応用に関する研究

## 1996年

# 水口 裕之

目次

緒論		1
本論		3
第一章 崩 第一節 第二節 第三節 第三節	莫融合リポソームの開発 膜融合リポソームの精製 膜融合リポソームの物理・化学的性質 ジフテリア毒素フラグメント A を用いた、	3 4 8 11 16
第二章 第一節 第二節 第三節 第五節 第五節	ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) を封入した 膜融合リポソームの癌治療への応用 DTA を封入した膜融合リポソームの腹水癌に対する抗腫瘍効果 腹水癌への DTA 導入量の定量 DTA を封入した膜融合リポソームの固形癌に対する抗腫瘍効果 膜融合リポソームの固形癌への物質導入量の定量 小括	18 18 22 24 26 27
第三章 月 第一節 第二節 第三節 第四節	模融合リポソームを用いた細胞への遺伝子導入 プラスミッド DNA を封入した膜融合リポソームの 遺伝子発現パターン 膜融合リポソームとカチオニックリポソームの遺伝子発現効率の比較 膜融合リポソームを用いたマウス腹水癌への in vivo 直接遺伝子導入 小括	29 29 32 35 36
第四章 第一節 第二節 第三節 第三節 第四節	<ul> <li>Fumor Necrosis Factor-a (TNF-a) 遺伝子を封入した</li></ul>	38 39 42 44 47
総括		50
結論		54
謝辞		55
参考文献		56

### 緒論

生命体は、構造・機能の点で高度に分化した細胞の集合体であり、個々の細胞は互いに ネットワークを形成しながら生命体の恒常性を維持している. そのため細胞は, 種々のサ イトカインやホルモン、神経伝達物質、接着分子などの産生を通して、生命体全体を様々 な変化に対応し、順応させている.通常、生命体のある組織に軽度な異常が生じた場合に は、細胞はこれらの様々な生理活性物質などの産生を通して、異常部位のみを修復・復元 させている. このような生命体の生体防御・修復機構は、生体内でそれらに関わる諸因子 を薬物にみたてた場合,薬物治療の最適化を目指す DDS (Drug Delivery System:薬物送 達システム)の概念そのものと考えられる。細胞は本来的に生体内の種々の情報をキャッ チし、それに応じて様々な生理活性物質を必要な時に、必要な量だけ合成し、徐放するな ど、まさに DDS の機能を日常的に遂行している本体であるといえる。現在行われている 薬物治療は、これら細胞間のネットワーク・ホメオスタシスを無視した治療法であるため、 どうしても生体に負の作用をも及ぼすことになる.一方,広義に言えば,遺伝子治療など は、細胞の機能を修飾することにより新たな機能性細胞を創り出し、それを応用すること によって治療効果を期待するものであり、細胞を介して疾病の治療を行うという意味で、 いわば Cell Therapy ともいうべき新しい概念による薬物治療を提示することが可能とな る.本方法は,生体内において DDS の概念を実践している細胞の機能を最大限に利用し たものであり、この方法による剤形は、いわば細胞製剤とも呼ぶべきものといえよう、こ のような細胞製剤による薬物治療は、疾病部位においてのみ薬物となる生理活性物質など を産生させることができることや、その産生量の調節をも出来得ることから、究極の DDS 製剤となりうるものと考えられる.

しかし、そのような目的で細胞の機能を修飾したり、解析するためには、細胞内に核酸 や蛋白質、ペプチドなどの高分子物質を自由に送達する技術を開発する必要がある. 細胞 は自身の恒常性を維持するために細胞膜というバリアーを有しており、細胞内への高分子 物質の移行は厳密に制御されている. これまで用いられている細胞内への物質導入法は主 に、マイクロインジェクションのような物理的な方法を利用したり、レセプター・リガン ド、抗原・抗体等の関係を利用して、リガンドに結合させた物質や、抗体に結合させた物 質を、エンドサイトーシス経由で細胞内へ送達しようとするものであった. しかし、この ような方法では、大量の細胞を一度に処理できないことや、細胞内導入物質がライソゾー ム酵素によって分解を受け、細胞質内への物質移行が著しく減少するといった欠点があっ た.

そこで著者は、細胞膜というバリアーを、細胞傷害性を伴うことなく、膜融合により効率よく突破することが可能な膜融合リポソームの開発を行った.リポソームは、生体膜成分のリン脂質からなり、内部に様々な物質を大量に封入できることから、Drug Delivery System (DDS:薬物送達システム)における薬物運搬体として盛んに研究されている.しかしながら、リポソームは、細胞との融合能力がないうえ、たとえ、膜表面に抗体などを付与し、積極的に細胞表面に結合させても、エンドサイトーシス経由で細胞内に取り込まれるため、効率の良い細胞質内への物質導入はできない.一方、センダイウイルスをはじ

めとするエンベロープ・ウイルスは, 膜融合により自身の遺伝子を細胞内に導入し, 感染 しており, リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与することができれば, 効率よ くリポソーム内の物質を細胞質内に送達することができると考えられる.

本論文では、センダイウイルスがリポソームとも融合するという性質を利用して<sup>1-5)</sup>, センダイウイルスとリポソームの融合により細胞との融合能を有するリポソーム(膜融合 リポソーム)の開発を行った (Fig.1). さらに、膜融合リポソームを完全精製し、その物 理化学的性質、生物学的性質を明らかにするとともに、膜融合リポソームの蛋白質、遺伝 子導入ベクターとしての性質、その癌治療への応用について検討した.



Fig.1 Schematic representation of transfection of liposome and fusogenic liposome

### 本論

#### 第一章 膜融合リポソームの開発

センダイウイルス (Sendai virus あるいは HVJ (hemagglutinating virus of Japan)) は, パラミクソウイルス属に属するエンベロープを有する一本鎖のマイナス鎖 RNA ウイルス であり,被膜には細胞との結合および融合を担う HN (hemagglutinin and neuraminidase) 蛋白質と F (fusion) 蛋白質を有している. センダイウイルスの細胞への感染は, HN 蛋白 質によるウイルスの細胞への吸着と, それに引き続いて起こる F 蛋白質による細胞膜と の融合により遺伝子が細胞内に侵入することによって成立する<sup>6)</sup>. センダイウイルスは孵 化鶏卵での増殖性が非常によく (有精卵1 個あたり約 1 mg の精製ウイルスが回収できる), 多量のウイルスを容易に得ることができ, また pH によらず膜融合が観察されることから, 細胞工学技術の開発にはうってつけの材料である.

1979 年, Uchida らは<sup>7)</sup>, センダイウイルスの HN 蛋白質 と F 蛋白質をリン脂質存在化 に界面活性剤で処理し、ウイルス蛋白質を膜表面に有するリポソームを再構成させること により作製し、そのリポソームが細胞との融合能を有することを示した. しかし、再構成 により作製したリポソームでは、リポソーム内部に封入する物質に制限があることや、リ ポソームへの物質封入率が非常に低いこと、作製法が煩雑であり膜融合能が安定しないと いった欠点があった. さらに 1985 年 Nakanishi らは<sup>2)</sup>, センダイウイルスとリポソームを 37 ℃で反応させることにより、両者がレセプター非依存的に融合し、その融合物が細胞 と融合できることを見出した.その後,Bangham らによって開発された水和法<sup>8)</sup>により 作製した多重膜リポソームとセンダイウイルスを反応させ、未反応のセンダイウイルスを 蔗糖密度勾配遠心法により除去したセンダイウイルス - リポソーム (センダイウイルスは Hemagglutination Virus of Japan (HVJ) とも呼ばれるため HVJ-リポソームといわれてい る) が開発され<sup>9-12)</sup>, in vivo の肝組織細胞への外来遺伝子の発現も報告された<sup>9,10,12)</sup>. し かしながら、これらのリポソームは精製されておらず、細胞との融合能を有さない通常の リポソームを含んでいるうえ、リポソーム自身のサイズ等の性質が非常に不均一であった ため、細胞内への物質導入効率等を明らかにすることが不可能であった。また、リポソー ムとして多重膜リポソームを用いているため、リポソーム内への遺伝子封入効率が悪く、 遺伝子発現効率のさらなる向上が期待できた. 膜融合リポソームを最終的にヒトの遺伝子 治療等に用いるためには、効率が可能な限り高く、物理・化学的性質が安定していること や、精製して不要な成分を除き、活性が定量化できるなど様々な条件を満たす必要がある と考えられる.

そこでまず、リポソームを一枚膜からなり、低分子物質から高分子物質に至るまで効率 よく物質を封入できることが知られている逆層蒸発法で作製した. さらに、リポソームの サイズを調整した後センダイウイルスと反応させ、未反応のセンダイウイルスとリポソー ムを除いて、均一で細胞との融合能を有するリポソーム(膜融合リポソーム)のみを完全 に精製することを試みた. 同時に、膜融合リポソームの物理化学的性質を明らかにすると ともに、膜融合活性の定量を行った. センダイウイルスとリポソーム (直径 200 nm のフィルターを通してサイズをそろえた もの)は、サイズはほぼ等しいが、比重が異なることが明らかとなった (Fig.2). そこで、 比重の差を利用してセンダイウイルスとリポソームの融合物である膜融合リポソームを完 全精製することを試みた.

また、精製されたセンダイウイルスとリポソームの融合物と考えられる分画に、センダ イウイルス由来、およびリポソーム由来の両成分を含んでいるかどうかの確認を行った. この時、センダイウイルス由来の成分の確認のためには、HN 蛋白質の活性である Neuraminidase 活性を指標にし、リポソーム由来の成分の確認のためには、生体内で代謝 されにくく、リポソーム膜に対して親和性の高い [<sup>3</sup>H] cholesteryl hexadecyl ether <sup>13)</sup>でリ ポソームラベル化し、その放射活性を指標に評価した.

さらに、膜融合リポソームが、単にセンダイウイルスとリポソームが付着しているので はなく、融合により生じたものであることを直接的に証明するため、リポソームにトリプ シンを封入し、センダイウイルスと反応させてできた膜融合リポソームのウイルス蛋白質 を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した. センダイウイルスは膜表面に HN 蛋白質とF蛋白質とを有し、内部には RNA、核蛋白質である NP 蛋白質,膜の裏打 ち蛋白質である M 蛋白質,ポリメラーゼの P 蛋白質を含んでいる<sup>6)</sup>. トリプシンのよう な高分子物質は、単独ではウイルス内部に入ることはできないので、膜融合リポソーム内 部の蛋白質がトリプシンの作用を受けて消化されていれば、センダイウイルスとリポソー ムが融合した結果トリプシンがウイルス蛋白質に作用したことが考えられる.

#### 実験材料と方法

(1) センダイウイルスの調製<sup>9)</sup>

センダイウイルス (Z 株) のシード (凍結保存した感染しょう尿液を 1,000 倍希釈したもの) を孵化 10 日後のニワトリ有精卵に 0.1 ml 接種し、4 日間 35.5  $\mathbb{C}$  で培養した後、4  $\mathbb{C}$  で 5 時間以上おき、感染しょう尿液を回収した. センダイウイルスを精製するために、感染しょう尿液を 1,300 g で 10 分間遠心した後、上清をステップ蔗糖密度勾配遠心し (50 %、30 % (w/v) 蔗糖/BSS(-) (10 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.6)) (ベックマン SW28、24,000 rpm、4  $\mathbb{C}$ 、1 時間)、50 % と 30 % 蔗糖溶液の境界にくるセンダイウイルスを回収した. センダイウイルスを遠心 (22,000 g、4  $\mathbb{C}$ 、1 時間) して BSS(-) に懸濁し、4  $\mathbb{C}$  で保存するか、あるいは 10 % Dimethyl sulfoxide 存在下で -80  $\mathbb{C}$  以下で凍結保存した.

卵黄ホスファチジルコリン (PC) (日本油脂), L-α-ジミリストイルホスファチジン酸 (PA) (日本油脂),およびコレステロール (Chol) (和光純薬)を4:1:5 (モル比) になるよ うにジエチルエーテル・ジクロロメタン混液 (53:47 (v/v)) に溶かし,逆相蒸発法<sup>14)</sup>の変 法<sup>15)</sup>で一枚膜融合リポソームを作製した. すなわち,脂質混液1 ml を BSS(-) 0.3 ml と混 合し,テフロン製メンブランフィルター (0.2 μm) (ADVANTEC) を通してエマルジョン を作製し、ロータリー・エバポレーターを用いて有機溶媒を除去した.その後、BSS(-) を1ml加え、ポリカーボネート製フィルター (0.2  $\mu$ m) (Nuclepore) を用いてサイズを調 節した後、ステップ蔗糖密度勾配遠心 (15 % 蔗糖/BSS(-)) (ベックマン SW28.1、24,000 rpm、4 °C、30分) にてリポソームを精製した.

(3) センダイウイルスとリポソームとの反応

センダイウイルス (OD540 (540 nm における濁度)=4.0) 0.5 ml とリポソーム (OD540=2.0) 1.0 ml を混合し、37 ℃ で 2 時間反応させた (ときどき軽く振倒する). セン ダイウイルスとリポソームの融合体である膜融合リポソームの精製を確認するために、反 応物を 50 % (2.5 ml)、30 % (6 ml)、12 % (6 ml) 蔗糖/BSS(-) の上層にのせ、24,000 rpm、 4 ℃ で 2 時間 (ベックマン SW28.1) 遠心した (ステップ蔗糖密度勾配遠心). その後、密度 の高い順にチューブの底から 20 のフラクション (各 0.8 ml) に分け、OD540 を測定した.

リポソームの脂質のラベル化には, [<sup>3</sup>H] cholesteryl hexadecyl ether <sup>13)</sup> (0.30 μCi/ml; 第 一化学) を用いた.

(4) Neuraminidase 活性の測定

センダイウイルスの Neuraminidase 活性は,Sodium (4-Methylumbelliferyl-*a*-D-*N*-acetylneuraminate)を基質として用いた Potier らの方法<sup>16)</sup>を一部改変して測定した. (5)トリプシン封入リポソームを用いたセンダイウイルスとリポソームの融合の証明<sup>17)</sup>

トリプシン封入リポソームは水系溶媒として BSS(-) (pH 8.0) を用い, ここに 12,000 BAEE unit/ml のトリプシン (Worthington Biochemical) と 0.3 % 牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を溶解し, 先に述べた方法にて作製した. 未封入のトリプ シンは遠心 (ベックマン SW28.1, 24,000 rpm, 4 ℃, 30 分) にて除去した. トリプシン封 入リポソームとセンダイウイルスを 37 ℃ で 1 時間反応させ, ステップ蔗糖密度勾配遠心 によりセンダイウイルス・リポソーム融合体 (膜融合リポソーム) を精製した. リポソー ムとセンダイウイルスの反応は, リポソームから漏出したトリプシンによりセンダイウイ ルスが消化されることを防ぐため, 封入されたトリプシンを十分に中和できる量の soybean trypsin inhibitor (Sigma) 存在下で行った. 精製したセンダイウイルス・リポソー ム融合体をさらに 37 ℃ で 2 時間反応させ, 還元条件下で 9 % SDS-ポリアクリルアミド ゲル電気泳動を行った. 電気泳動後, commassie brilliant blue にて染色を行い, Macintosh (Apple) の NIH Image ver1.44 (NIH, Research Service Branch) にてイメージ ング解析を行った.

#### 実験結果および考察

リポソーム,リポソームとセンダイウイルスの反応物,およびセンダイウイルスを,ス テップ蔗糖密度勾配遠心で処理したときの各フラクションの OD540 を Fig.2 に示す.リポ ソームは,約5% 蔗糖密度溶液分画(比重約1.02)であるフラクション18から20 の Top フラクションに,センダイウイルスは約40% 蔗糖密度溶液分画(比重約1.17)の フラクション3から5の Bottom フラクションに存在していた.一方,リポソームとセン ダイウイルスの反応物は,リポソーム分画の Top フラクションとセンダイウイルス分画 の Bottom フラクションに加え,リポソームとセンダイウイルスの中間の約22% 蔗糖密



度溶液分画(比重約1.09)であるフラクション10から12の Middle フラクションにも粒子 が存在していた. これらの結果は、リポソームとセンダイウイルスを反応させることによ り、リポソームやセンダイウイルスとは明らかに異なった粒子が生じていることを示して いる. さらに、新たに生じた Middle フラクションはリポソームとセンダイウイルスのち ょうど中間の比重であることから、リポソームとセンダイウイルスが1:1の比で融合し た融合体を含んでいる可能性が示唆された. またこの時、フラクション10から12に存在 する粒子の濁度は、全体の濁度の18%であった.

そこで次に、Middle フラクションに存在する粒子が、リポソームとセンダイウイルス の融合物であるかどうかを調べるため、このフラクションにリポソームおよびセンダイウ イルス由来の両成分が含まれているかどうかについて検討した. Fig.3 は、センダイウイ ルス、およびリポソームとセンダイウイルスの反応物を、ステップ蔗糖密度勾配遠心で処 理したときの各フラクションの Neuraminidase 活性を、Fig.4 はリポソーム、およびリポ ソームとセンダイウイルスの反応物を、ステップ蔗糖密度勾配遠心で処理したときの各フ ラクションのリポソーム膜中の [<sup>3</sup>H] cholesteryl hexadecyl ether に由来する放射活性を示 したものである. センダイウイルスの場合、Neuraminidase 活性は OD540 が検出された Bottom フラクションにのみ観察されたのに対し、リポソームとセンダイウイルスの反応 物では、センダイウイルス分画の Bottom フラクションと、リポソームとセンダイウイル



Fig.3 Neuraminidase activity of the fractions after stepwise sucrose gradient centrifugation One mililiter of liposomes with OD₅40 of 2.0 was incubated with 0.5 ml of Sendai virus with OD₅40 of 4.0 at 37 °C for 2 h with gentle shaking. Then the solution was centrifuged by stepwise sucrose gradient centrifugation (●). As a control, 0.5 ml of Sendai virus with OD₅40 of 4.0 (○) were also centrifuged. Each franction was collected from the bottom of the tube and neuraminidase activity was measured.



#### Fig.4 Radioactivity of [<sup>3</sup>H]-cholesteryl hexadecyl ether of the fractions after stepwise sucrose aradient centrifugation

One mililiter of the liposomes labeled with [<sup>3</sup>H]cholesteryl hexadecyl ether with OD540 of 2.0 was incubated with 0.5 ml of Sendai virus with OD540 of 4.0 at 37 °C for 2 h with gentle shaking. Then the solution was centrifuged by stepwise sucrose gradient centrifugation (●). As a control, 1 ml of liposomes with OD540 of 2.0 (○) were also centrifuged. Each franction was collected from the bottom of the tube and radioactivity was measured.





(lane 2) Complex of Sendai virus and liposomes containing trypsin (lane 3) Complex of Sendai virus and empty liposomes にのみ存在していたのに対し、リポソームとセンダイウイルスの反応物では、Top フラ クション、Middle フラクション、および Bottom フラクションの全ての分画に存在して いた. これらの結果は、Middle フラクションには、センダイウイルスに由来する成分と、 リポソームに由来する成分の両者を含んでいることを示しており、この分画が、センダイ ウイルスとリポソームの融合体である膜融合リポソームである可能性が考えられた.

Bottom フラクションにリポソームに由来する放射活性がみられたことは、サイズの小 さいリポソームが (0.2 µm のフィルターを通してリポソームのサイズを調節しているが、 大きなリポソームのサイズを除いただけで、0.2 µm 以下の小さなリポソームは含んでい る) センダイウイルスと融合し、融合体の比重としてはセンダイウイルスとあまり変わら なかった粒子を含んでいることを反映したものと考えられた.

これまでの結果から、Middle フラクションが、リポソームとセンダイウイルスの融合 体である膜融合リポソームである可能性が強く示唆されたが、これが本当にリポソームと センダイウイルスの融合体であるかどうかについては明らかではない. すなわち、単なる 両者の複合体である可能性が考えられる. そこで、Middle フラクションがリポソームと センダイウイルスの融合体であるか否かの検討を行った (Fig.5). 空のリポソームをセン ダイウイルスと反応させたときの Middle フラクションを、SDS-ポリアクリルアミドゲル 電気泳動で処理すると、センダイウイルスのP蛋白質(分子量 79,000), HN 蛋白質(分子 量 72,000), NP 蛋白質 (分子量 60,000), F1 蛋白質 (分子量 51,500), M 蛋白質 (分子量 34.000)<sup>6)</sup>のバンドがみられたが、トリプシンを封入したリポソームとセンダイウイルス を反応させたときでは、ウイルス内部に存在する P, NP, M 蛋白質が消化されていた. 高分子物質であるトリプシンは、通常の状態ではウイルス内部に入れないこと、リポソー ムとセンダイウイルスの反応溶液中には soybean trypsin inhibitor が含まれており、リポ ソームの外側には全く活性のあるトリプシンは含まれていないことを考えると、リポソー ム内に封入されているトリプシンが、リポソームとセンダイウイルスの融合によってウイ ルス内部に入り、ウイルス内部の蛋白質に対して作用したものと考えられる. これより, Middle フラクションに含まれる粒子は、リポソームとセンダイウイルスの融合体である ことが明らかとなった.

以上の結果, 蔗糖密度勾配遠心法を利用することにより, リポソームとセンダイウイル スの反応物から融合しなかったリポソームとセンダイウイルスを除き, 両者の融合体であ る膜融合リポソームのみを完全に精製することに成功した.

#### 第二節 膜融合リポソームの物理・化学的性質

前節において、比重の違いを利用することにより、センダイウイルスとリポソームの反応物から、両者の融合体である膜融合リポソームを完全に精製することに成功した. そこで、膜融合リポソームの物理・化学的性質を明らかにするため、センダイウイルス、リポソーム、膜融合リポソームの粒子径測定、および電子顕微鏡観察による検討を行った.

(1)粒子径測定

センダイウイルス,一枚膜リポソーム,およびセンダイウイルスと一枚膜リポソームの 融合体である膜融合リポソームを,レーザー光散乱法 (Sub-micron particle analyzer model N4SD; COULTER) で粒子径を解析した.

(2) 電子顕微鏡観察

センダイウイルス,一枚膜リポソーム,および膜融合リポソームを2.5% グルタールア ルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で4℃,2時間固定し,さらに1%四酸化オスミ ウム/0.075 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で4℃,2時間固定した.10% 蔗糖水溶液で5回 洗浄後,2% 酢酸ウラニルで室温,2時間処理した.エタノール脱水後,エポキシ包埋し, 透過型電子顕微鏡で観察した.

(3) その他の実験方法

膜融合リポソームのセンダイウイルスに由来する蛋白量は、牛血清アルブミン (BSA) を標準物質として Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad)を用いて測定した.

膜融合リポソームのセンダイウイルスに由来する赤血球凝集活性は,Kato らの方法<sup>9)</sup> に準じて測定した.

#### 実験結果および考察

Fig.6 に, リポソーム, センダイウイルス, および膜融合リポソームの粒子径を, レー ザー光散乱法で解析した結果を示す. リポソーム, センダイウイルスの平均粒子径はそれ ぞれ 304 nm, 332 nm であるのに対し, 膜融合リポソームは両者が1:1 の比で融合した と考えられる 379 nm であった.

これらの粒子を電子顕微鏡で観察すると (Fig.7),精製された膜融合リポソームはセン ダイウイルスと構造が似ており,膜表面には細胞との結合・融合をになうスパイク構造が 観察された.しかし,センダイウイルスの内部には比較的密にヌクレオキャップシドが存 在しているのに対し,膜融合リポソームの内部にはヌクレオキャップシドの一部が観察さ れるものの,大部分はリポソームに由来する空洞で占められていた.

これらの結果から, 膜融合リポソームは, センダイウイルス粒子とリポソームが1:1 の比で融合してできたほぼ均一な単分散を示す粒子であり, その表面にセンダイウイルス のスパイク蛋白質を有した粒子であることが明らかになった.

また,センダイウイルスが OD540=1.0 あたり,1.0 mg/ml の蛋白質を含んでいるのに 対し, 膜融合リポソームは OD540=1.0 あたり,0.78 mg/ml の蛋白質を含んでいた.赤血 球凝集活性については, 膜融合リポソームはセンダイウイルスと同等の 15,000 hemagglutinating units (HAU)/ml を示した.これらの結果からも, 膜融合リポソームが センダイウイルス由来のスパイク蛋白質を有した粒子であることが示唆された.

-9-



Fig.6 Diameter of liposome, fusogenic liposome, and Sendai virus

Diameter of the liposomes sized with 0.2  $\mu$ m of polycarbonate membrane, fusogenic liposomes, and Sendai virus were measured with submicron particle analyzer.



Fig.7 Structure of unilamellar liposome (A), unilamellar fusogenic liposome (B) and Sendai virus (C). Scale bar, 100 nm.

第三節 ジフテリア毒素フラグメント A を用いた, 膜融合リポソームの細胞との融合能の評価

センダイウイルスとリポソームの融合により生じた粒子 (膜融合リポソーム)が、セン ダイウイルスと同様に、細胞への融合活性を有しているかどうかを調べるため、膜融合リ ポソームにジフテリア毒素フラグメント A (DTA) (分子量約 62,000) を封入し、殺細胞効 果を調べることにより膜融合能を評価した.

DTAは、ジフテリア菌によって産生されるジフテリア毒素のAフラグメントであり、 1分子でも細胞質内に導入されれば、蛋白質合成系のポリペプチド鎖延長因子 elongation factor 2 (EF-2)を ADP-リボシル化することによって蛋白質合成を阻害し、細胞を傷害さ せることができる強力な毒素である<sup>18,19)</sup>. しかしながら、フラグメントAは、毒素感受 性細胞上の毒素レセプターを識別・認識し、フラグメントAを細胞内に送り込む働きを しているフラグメントBを欠いているため、単独では細胞内に入ることができない. そ のため、リポソームに封入された DTA は、膜融合により細胞質内に導入されなければ全 く毒性を示さないことになる. このように、DTA はリポソームによる細胞質内への物質 導入を評価するマーカーとして非常に優れた物質である.

また, 膜融合リポソームの膜融合能が, センダイウイルスのエンベロープ蛋白質である HN 蛋白質とF蛋白質の働きに依存したものであるか否かを調べるため, 膜融合リポソー ムをジチオスレイトール (DTT) で処理することにより HN 蛋白質<sup>20,21)</sup>を, トリプシンで 処理することによりF蛋白質<sup>22)</sup>を選択的に不活化したときの膜融合能について検討した.

さらに、様々な細胞種に対する膜融合リポソームの作用を調べることにより、その活性 の種特異性、組織特異性についての検討も加えた.

#### 実験材料と方法

(1) 細胞培養

マウス線維芽細胞 L, ヒト子宮頚癌 HeLa 細胞, サル腎上皮細胞 LLCMK2, イヌ腎上 皮細胞 MDCK, ヒト肝癌 Hep G2 細胞 (大阪大学薬学部西原力先生,今川正良先生より 供与) は 10 % 牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS) を含むイーグル MEM 培地 (ニッスイ) で培養した. ラット C<sub>6</sub> グリオーマ細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, ニッス イ) (10 % FCS 含有) で培養した. チャイニーズハムスター線維芽細胞 CHO は F12 培地 ( ニッスイ) で培養した. ヒト神経芽腫 NB-1 細胞, ヒト T 細胞由来白血病細胞 MOLT-4 は RPMI1640 (ニッスイ) (10 % FCS 含有) で培養した. ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (Bovine aortic endothelial cells; BAEC) は剥離法により採取し, DMEM (10 % FCS 含有) で培養した. 実験には 5-7 継代目のものを用いた. ウサギ肝細胞は初代培養後, simian virus 40 (SV40) でトランスフォームし, イーグル MEM 培地 (10 % FCS 含有) で培養した. ヒ ト皮膚線維芽細胞は初代培養し, イーグル MEM 培地 (10 % FCS 含有) で培養した. ヒ ト大動脈血管内皮細胞はクラボウ社から供与されたものを用い, E-GM UV 培地 (クラボ ウ) で培養した. 初代培養ヒトリンパ球細胞は, ヒト末梢血より MONO-POLY Resolving Medium (第日本製薬) を用いて単離し<sup>23,24</sup>, RPMI 1640 (12 mM Hepes, 50 mM 2-メルカ プトエタノール, 5 μg/ml Phaseolus vulgaris Agglutinin-P, 10 % FCS含有) で培養した. (2) ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) の調製

DTA は、Corynebacterium diphtheriae C7 ( $\beta$ )の変異菌 C7hm7210 ( $\beta$  22) が合成する ジフテリア毒素フラグメントAと同じ構造の変異毒素 CRM22を、Uchida らの方法<sup>7)</sup>を 一部変法して精製した. C7hm7210 ( $\beta$  22) は、C7 ( $\beta$  22) 培地 (Modified C-Y 培地 2,000 ml / 50 % maltose 100 ml / 1 mg/ml FeCl2 1 ml) で培養した後、10,000 rpm、4 °C で 20 分間 遠心し、上清を限外濾過 (Mini-tan、Millipore、分画分子量 10,000) にて濃縮した. これ を 50 % - 80 % 硫酸アンモニウム分画で塩析し、オクチルセルロファイン (生化学工業)、 DEAE セルロファイン (生化学工業) で精製した. 精製した蛋白質は、ポリアクリルアミ ドゲル電気泳動、および elongation factor 2 (EF2) の ADP リボシル化活性にて DTA であ ることを確認した. 調製した DTA がジフテリア毒素を含んでいないことは、毒素に高感 受性の Vero 細胞に対して、100  $\mu$ g/ml の濃度においても全く細胞毒性を示さないことか ら確認した.

(3) DTA を封入した膜融合リポソームの調製

DTA を 0.2 mg 含んだ BSS(-) 0.3 ml を用い,第一節に準じた方法で一枚膜リポソーム を作製し,センダイウイルスと反応させて膜融合リポソームを得た.実験に用いる直前に, 紫外線照射 (2,000 J/m<sup>2</sup>) することによりセンダイウイルスの RNA を断片化した.この条 件下においては,センダイウイルスの膜融合能は全く影響を受けなかった. (4) 膜融合リポソームの HN,F 蛋白質の不活化

膜融合リポソームのセンダイウイルスに由来する HN 蛋白質の不活化は,ジチオスレ イトール (DTT) 処理することにより行った<sup>20,21)</sup>. すなわち,BSS(-) (pH 8.4) に懸濁した 膜融合リポソーム (OD540=2.0) を,1 mM DTT で 37 ℃,30 分間処理した. 膜融合リポ ソームと DTT は,ゲル濾過 (セファデックス G25) で分離した.

膜融合リポソームのF蛋白質の不活化は、トリプシン処理することにより行った<sup>22)</sup>. すなわち、BSS(-) (pH 7.6) に懸濁した膜融合リポソーム (OD540=2.0) を、150 BAEE unit/ml のトリプシン (Worthington Biochemical) で 37 ℃, 2 時間処理した.反応停止は、 soybean trypsin inhibitor (Sigma) を加えることにより行い、さらに遠心 (ベックマン SW28.1, 24,000 rpm, 4 ℃, 30 分) により膜融合リポソームを精製した. (5) 赤血球溶血活性

センダイウイルスの赤血球溶血活性は Hsu らの方法<sup>25)</sup>を一部改変して行った. すなわち,新鮮なヒト赤血球を BSS(-) に懸濁し (1%, v/v),センダイウイルス (final OD540=0.02) と4℃で1時間,その後 37℃で 30 分間処理した. 1,500 g,4℃で 15 分間遠心し,上清のヘモグロビン量を吸光波長 540 nm における吸光度を測定することにより評価した.

(6) コロニー形成法による細胞毒性の評価

L 細胞を 35-mm ディシュあたり 500 個播種し, 12 時間後に BSS(+) (BSS(-) に 2 mM CaCl2 を加えたもの) で細胞を洗浄し, BSS(+) に懸濁したサンプルを細胞に加えた. 細胞を 4 ℃ で 30 分, その後 37 ℃ で 30 分間処理し, MEM で洗浄した後, MEM (10 % FCS 含有) で 1 週間培養した. 細胞を 70 % メタノールで固定し, 0.01 % クリスタルバイ

オレット液で染色した後、コロニー数を測定した.

(7)蛋白合成能の測定

細胞を 24 穴プレートに 5 × 10<sup>5</sup> 個播種し,24 時間後サンプルを上記(6)の方法に準じ て作用させた.24 時間培養した後,細胞をメチオニンを含まない MEM で洗浄し,1-20  $\mu$ Ci/ml の [<sup>35</sup>S] メチオニン (Amersham) を含む MEM で 37 °C で 1 時間パルスした.トリ クロロ酢酸不溶性画分に含まれる放射活性を,液体シンチレーションカウンターで測定し た.

なお,その他の実験方法については,前節までに記載の操作法に従った.

#### 実験結果および考察

Fig.8 に L 細胞に対する DTA を封入した膜融合リポソームの毒性を, コロニー形成法 で検討した結果を示す.紫外線照射することによってウイルス RNA を断片化したセンダ イウイルス,および DTA を封入した通常のリポソームでは全く毒性を示さなかったが, DTA を封入した膜融合リポソームでは濃度依存的にコロニー数の減少が認められ, OD540=0.003 以上の濃度では,100 % 全ての細胞に DTA を導入することが可能であった. また, 膜融合リポソームは RNA を不活化していない intact なセンダイウイルスと OD540 換算でほとんど同一の毒性を示した. 膜融合リポソームはセンダイウイルスと OD540 換算でほとんど同一の毒性を示した. 膜融合リポソームはセンダイウイルスとほぼ同じ大 きさであることから (Fig.6),粒子の濁度が同じならば同じ数の粒子が存在すると仮定す ると, 膜融合リポソームはセンダイウイルスとほぼ同程度の膜融合能を有していると結論 された. さて, intact なセンダイウイルスの感染により 50 % の細胞が死滅するとき,溶 液中には 3 x 10<sup>6</sup> 個のウイルスが存在することが知られている. DTA を封入した膜融合リ ポソームが,50 % の細胞を死滅させるときの OD540 は 0.0002 であるので, 膜融合リポ ソームの OD540=1.0 の溶液中には約 10<sup>10</sup> 個/ml の細胞と融合できる粒子が存在している と推定された.

膜融合リポソームを作製する際の、リポソームの脂質電荷が膜融合活性に及ぼす影響に ついて検討したところ、陽性荷電のステアリルアミンを含んだリポソームや、電気的に中 性の PC と Chol だけからなるリポソームを用いたときよりも、PA、PC、Chol からなる 陰性のリポソームの方が約 10 倍活性が高かった (データーは示さず). そこで本研究にお いては、PA、PC, Chol からなる陰性電荷を帯びたリポソームを用いて膜融合リポソーム を作製することにした.

次に、このような DTA を封入した膜融合リポソームの膜融合能が、センダイウイルス のエンベロープ蛋白質の HN 蛋白質と F 蛋白質の両蛋白質の活性に依存したものである かどうかを検討した (Fig.9). センダイウイルスの HN 蛋白質は、分子間ジスルフィド結 合で分子量が同一か、あるいはほとんど等しいサブユニットが結合したオリゴマーとして 存在しており<sup>21)</sup>、この結合は SH 反応性の試薬である DTT 等の還元剤により容易に切断 され、その生物活性である細胞との結合能と Neuraminidase 活性を消失することが知ら れている<sup>20,21)</sup>. また DTT 等の還元剤に対する感受性は、 HN 蛋白質の方が F 蛋白質より も強く、 HN 蛋白質の活性を選択的に消失させることが可能である<sup>21)</sup>. 一方、F 蛋白質 (分



#### Fig.8 Effect of fusogenic liposomes containing DTA on colony formation of mouse L cells

Five hundred L cells were seeded in 35-mm dishes. Ten hours later, the medium was removed, and the cells were treated with various concentrations of fusogenic liposomes containing DTA ( $\bigcirc$ ), liposomes containing DTA ( $\triangle$ ), UV-inactivated Sendai virus ( $\square$ ) or intact Sendai virus ( $\bigcirc$ ) at 4 °C for 30 min. Then the cells were further treated at 37 °C for 30 min, and were washed once with chilled medium. The cells were cultured in fresh medium for one week, fixed with methanol, and stained with crystal violet for control. Number of colonies are shown as average of duplicate assays.



Treatment	Neuraminidase Activity (% of intact)	Hemolysis Activity (% of intact)
DTT 1 mM	0.5	0.7
Trypsin 150 BAEEunits / ml	74.2	0.0

Sendai virus (OD<sub>540</sub>=2.0) were treated with 1 mM of dithiothreitol (DTT) at 37 °C for 30 min, or with 150 BAEE units/ml of trypsin at 37 °C for 2 h. Neuraminidase and hemolysis activities of Sendai virus were determined. Data are indicated as % of intact Sendai virus. Each datum represents average of duplicate assays.



子量 66,000) は、細胞との融合を担う活性を有している F1 蛋白質 (分子量 51,000) と、 F2 蛋白質 (分子量 15,000) とからなっているが、 F1 蛋白質はトリプシンにより F1a (分子量 32,000) と F1b (分子量 19,000) に切断され、生物活性を失うことが知られている<sup>26)</sup>. また、 トリプシンに対する感受性は、F 蛋白質の方が HN 蛋白質よりも強く、F 蛋白質の活性を 選択的に消失させることが可能である<sup>26)</sup>. そこで、センダイウイルスを、DTT で処理す ることにより HN 蛋白質を、トリプシンで処理することにより F 蛋白質を選択的に不活 化することができるかどうかを、それぞれ Neuraminidase 活性、赤血球溶血活性を測定 することにより検討した (Table 1). その結果、センダイウイルスを DTT 1 mM で処理す ることにより Neuraminidase 活性は完全に消失した. この時の赤血球溶血活性も完全に

消失していたが、赤血球溶血活性は HN 蛋白質と F 蛋白質の total の活性であり、 Neuraminidase 活性が消失したために赤血球溶血活性も消失したことが考えられる. そこ で、センダイウイルスと赤血球を小麦胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin; WGA) で架橋 させたところ、赤血球溶血活性が観察され、この条件下においては F 蛋白質の生物活性 まで消失していないことが確認された(データーは示さず). また, センダイウイルスを トリプシン 150 BAEE units/ml で処理することにより, Neuraminidase 活性は保持してい るが (コントロールの 74.2%),赤血球溶血活性は完全に消失させることが可能であった. そこで、このような条件で DTA 封入膜融合リポソームを DTT,およびトリプシン処 理し、細胞への融合活性に及ぼす HN 蛋白質と F 蛋白質の生物活性の影響について検討 した (Fig.9). その結果, HN 蛋白質と F 蛋白質のどちらか一方の生物活性が消失してい ても、DTA を封入したセンダイウイルス・リポソーム融合体は全く膜融合能を示さなか った.F蛋白質のみを不活化したセンダイウイルス・リポソーム融合体では、HN蛋白質 の働きによって積極的に細胞表面に結合できると考えられるが、このような条件下におい ても細胞毒性を示さなかったことは、このリポソームがたとえエンドサイトーシスで細胞 内に取り込まれても、DTA は細胞質内には移行しなかったことを示している. これらの 結果から、膜融合リポソームはその封入物質を、センダイウイルスの HN 蛋白質と F 蛋 白質の両蛋白質の働きによって、融合により直接細胞質内に導入していることが明らかと なった.

次に、様々な組織細胞に対して DTA を封入した膜融合リポソームを作用させ、蛋白合 成阻害活性を調べることにより膜融合リポソームの作用域について検討した. 膜融合リポ ソームの作用の種特異性について、ヒト (HeLa)、サル (LLCMK2)、ウシ (初代培養大動 脈血管内皮細胞),イヌ(MDCK),マウス(L),ラット(C6グリオーマ),ハムスター (CHO), ウサギ (SV40 transformed hepatocyte)の細胞を用いて調べたところ, 感受性の 違いはわずか 2-3 倍と非常に小さいものであった (Fig.10). また, ヒトの細胞を用いて組 織特異性について検討したところ, 膜融合リポソームは子宮頚癌 (HeLa), 肝癌 (Hep G2), 線維芽細胞(初代培養皮膚線維芽細胞),血管内皮細胞(初代培養大動脈血管内皮細胞), リンパ腫 (MOLT-4),神経芽腫 (NB-1) に対してほとんど同じ効率で融合することが判明 した (Fig.11). このような低い特異性は、センダイウイルスのレセプターが、シアル酸を 含む複合糖鎖という普遍的な物質であることを反映しているものと考えられた<sup>27)</sup>.調べ た限り唯一の例外は初代培養ヒトリンパ球であり、約70%の細胞が感受性を持っていな かった. この理由については明らかではないが、センダイウイルスはシアル酸を含む複 合糖鎖全てをレセプターとしているわけではないことから (センダイウイルスのレセプタ ーは,現在においても正確には分かっていない)<sup>28-31)</sup>,ヒトリンパ球がセンダイウイルス の本来のレセプターを欠いていることが考えられる.詳しいメカニズムについては今後の 研究課題である.

ところでこの膜融合リポソームは、安定性に関しても非常に有利な点を有していた. 膜 融合リポソームは、センダイウイルスと同様に遠心操作で濃縮しても活性の低下は起こら ず、4℃で保存すれば1週間以上は活性が安定であった(データーは示さず). また、10 %ジメチルスルフォキシド (DMSO) 存在化で液体窒素中で凍結保存しても全く活性が低 下しなかった (データーは示さず). このような性質は製剤としての安定性からみても信



Fig.10 Species specific fusion of fusogenic liposomes Fusogenic liposomes containing DTA were incubated with various cells at 4 °C for 30 min, and 37 °C for 30 min. The cells were washed once with chilled medium, and cultured with normal medium for 24 h. Then the cells were pulse-labeled with [ $^{35}$ S] methionine, and [ $^{35}$ S] counts incorporated into TCAprecipitable materials were examined.

 □, Human (HeLa); ■, Monkey (LLCMK₂); △, Bovine (primary bovine aortic endothelial cells); ◇, Canine (MDCK);
 ●, Mouse (L); △, Rat (C₀); ○, Hamster (CHO); ×, Rabbit (SV40 transformed hepatocytes)

Each point represents average of duplicate assays.

頼できるものであると考えられる.



Fig.11 Tissue specific fusion of fusogenic liposomes Fusogenic liposomes containing DTA were incubated with various cells at 4 °C for 30 min, and 37 °C for 30 min. The cells were washed once with chilled medium, and cultured with normal medium for 24 h. Then the cells were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S] methionine, and [<sup>35</sup>S] counts incorporated into TCAprecipitable materials were examined.  $\Box$ , HeLa (epitheloid carcinoma, cervix); O, HepG 2 (human hepatoblastoma);  $\blacksquare$ , Fibroblast (primary human skin fibroblast);  $\blacklozenge$ , Endothelial cells (primary human artic endothelial cells); △, MOLT-4 (human lymphoma); ▲, NB-1 (human neuroblastoma); , Lymphocyte (primary human lymphocyte)

Each point represents average of duplicate assays.

#### 第四節 小括

センダイウイルスのエンベロープ蛋白質を利用した細胞との融合能力を有したリポソー ムの開発は、Uchida らをはじめ種々報告されている<sup>2,5,7,8,10,14,12,15,32-40)</sup>. また、センダイ ウイルスと同様エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白 質を利用した膜融合能を有したリポソームも開発されている<sup>38-40)</sup>. これらは主に脂質膜 とエンベロープ蛋白質を界面活性剤で処理し、徐々に界面活性剤を除去してエンベロープ 蛋白質を脂質膜に再構成させる方法や<sup>7,34,35,37-40)</sup>, 超音波処理によってウイルスの膜に一 時的に穴をあけ、外部の物質をウイルスの内部に封入する方法<sup>32)</sup>で作られていた. しか しこれらの方法では、リポソーム内部に封入する物質に制限があることやリポソームへの 物質の封入効率が非常に低いこと、操作が煩雑であり膜融合能が安定しないといった欠点 を有していた<sup>15)</sup>.

本章では、センダイウイルスとリポソームを1:1の比で融合させることにより、セン ダイウイルスの膜融合能を有した膜融合リポソームを開発し、その完全精製、物理化学的 性質の解析、細胞内への物質導入活性の検討を行った.このような方法で膜融合リポソー ムを作製することによって、リポソームへの物質封入効率を上昇させるために逆相蒸発法 で作製した一枚膜リポソームを用いることができること、センダイウイルスの HN 蛋白 質とF蛋白質のリポソーム中での存在比が、本来ウイルスが有している割合と同一にな り,再現性よく,効率のよい膜融合リポソームが作製できるようになった.さらに,均一 な粒子を完全精製することによって活性の定量化が可能となり,膜融合リポソームの細胞 内への物質導入活性がはじめて明らかになった.

ステップ蔗糖密度勾配遠心法を用いて未反応のセンダイウイルスとリポソームを除き, 完全精製された膜融合リポソームは,センダイウイルスよりやや大きい直径約379 nm で あり,膜表面にはセンダイウイルスのスパイク蛋白質を有していた.DTA を膜融合リポ ソームに封入し,その細胞毒性を指標に膜融合活性を検討したところ,膜融合リポソーム は intact なセンダイウイルスとほぼ同等の活性を有し,OD540=1.0の溶液中には約10<sup>10</sup> 個/ml の細胞と融合できる粒子が存在しているものと推定された.さらに,その膜融合活 性は,調べた限り初代培養ヒトリンパ球を唯一の例外として,種や組織を問わず,ほとん ど同じであった.また,膜融合リポソームの細胞内への物質導入活性は,膜表面に存在す るセンダイウイルスの HN 蛋白質とF蛋白質に依存したものであり,膜融合リポソーム はセンダイウイルスの膜融合活性をそのまま保持したものであることが明らかとなった.

細胞質内への物質導入を行うためのキャリアーとしては、膜融合リポソームの他に Huang らの開発した pH 感受性リポソーム (pH-sensitive liposome) がある<sup>41-44)</sup>. このリ ポソームは、エンドサイトーシス経由で細胞に取り込まれた後、エンドソームの酸性条件 下でリポソームの膜構造が乱れ、封入物質が細胞質内に移行するように設計されたもので ある. しかし、DTA を封入して細胞の蛋白合成阻害活性を指標として細胞質内への物質 導入効率を調べたところ、膜融合リポソームでは低濃度においても 100 % すべての細胞 に DTA を導入することができたのに対し (Fig.9), pH 感受性リポソームでは、調べた限 りの最高濃度においても、100 % の蛋白合成阻害活性は得られず (50-70 %), 膜融合リポ ソームに比べかなり低い<sup>42,44)</sup>. このように、ウイルスの感染能を利用し、さらに膜融合 能を全く損なうことなくリポソーム膜にセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質を付与す ることができる本膜融合リポソームは、 pH 感受性リポソームのような化学的な方法に比 ベ、非常に効率がよいことが明らかになった.

そこで以降の章では、本膜融合リポソームに DTA を封入し、その癌治療への応用、さらには遺伝子治療用ベクターとしての特徴、応用について検討した.

## 第二章 ジフテリア毒素フラグメント A (DTA) を封入した膜融合リポソー ムの癌治療への応用

現在, 癌化学療法において主に用いられている抗癌剤は, 癌細胞に対する強い殺作用が ある反面, 正常組織に対しても作用を示すため, 副作用を示す原因にもなっている. リポ ソームはこれらの薬物の体内動態を変化させることができ,またその膜表面に癌細胞に対 する抗体などを結合させることにより, 標的指向性を付与することができることなどから, DDS における薬物運搬体として盛んに検討されている<sup>45)</sup>. しかしながら, これらのリポ ソームの in vivo における抗腫瘍効果は予想されたものよりかなり低い. これは主に, リ ポソームが細網内皮系に移行しやすいことや<sup>43)</sup>, 腫瘍組織の血管内皮細胞のバリアーを リポソームが透過できないこと<sup>46)</sup>, さらにはリポソームがエンドサイトーシスで細胞に 取り込まれるため薬物がライソゾーム酵素により分解を受けることによっている<sup>43)</sup>.

一方,DTA のような蛋白質性の毒素は,強力な殺細胞作用を有しており,抗体と毒素 を結合させたイムノトキシンは、ミサイル療法として注目を浴びている<sup>47-51)</sup>.しかし, このイムノトキシンもエンドサイトーシスで細胞に取り込まれるため,その作用も期待さ れたほど高くない<sup>51,52)</sup>.これらのリポソームとイムノトキシンの問題を解決するために は、毒素などの薬物を直接細胞質内に導入するシステムの開発が必要と考えられる.

前節において,DTA を封入した膜融合リポソームが,種々の組織細胞に対して膜融合 により DTA を細胞質内に導入し,強い殺細胞効果を示すことが明らかとなった.これは, 通常は膜透過しない毒素が,膜融合リポソームを介することによって,エンドサイトーシ スではなく直接その作用点である細胞質内に導入されたためにもたらされたものであり, 上記に示したリポソームとイムノトキシンの問題を解決させる可能性がある.そこで本章 では,DTA を封入した膜融合リポソームの癌治療への応用について検討した.

第一節 DTA を封入した膜融合リポソームの腹水癌に対する抗腫瘍効果

DTA を封入した膜融合リポソームの抗腫瘍効果について調べるため、マウスの Sarcoma-180 (S-180) 腹水癌のモデルにおいて、腹腔内癌細胞に対する直接の殺作用、お よびマウスの延命効果について検討した.

#### <u>実験材料と方法</u>

(1)実験動物と細胞

実験動物は 5 週令の ddY 雄性マウス (清水実験材料) を用いた. 細胞は Sarcoma-180 (S-180) 細胞を用いた. S-180 細胞は, ddY 雄性マウスの腹水癌として継代移植したもの を用いた.

(2) DTA 封入膜融合リポソームの調製

DTA 封入膜融合リポソームは第一章,第三節に準じて調製した. 膜融合リポソームお よび通常のリポソームに封入されている DTA 量の定量は,リポソームを Triton X-100 で 溶解後, elongation factor 2 (EF2) の ADP リボシル化活性を測定することにより求めた<sup>53)</sup>. 本実験においては,DTA を封入した膜融合リポソームとして,DTA を膜融合リポソーム OD540=1.0 あたり 0.52 µg/ml の濃度で封入させたもの,また通常のリポソームとしては その約 7 倍量の 3.61 µg/ml の濃度で封入させたものを実験に供した.

(3) EF2 の ADP リボシル化活性の測定

EF2 は Takamatsu らの方法に従い<sup>54)</sup>,家兎肝臓より調製した. すなわち,家兎を屠殺後,肝臓を回収し,0.25 M 蔗糖/3 mM PMSF/2 mM DTT でホモジネイトした. 超遠心 (ベックマン SW19,18,000 rpm,37 ℃,20 分) で不溶物を除いた後,33 % - 65 % 硫酸ア ンモニウム分画で塩析し,セルロファイン A800 (生化学工業) で精製した.

EF2 の ADP リボシル化活性の測定は、 [<sup>14</sup>C]-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (第一化学)を用い、Carroll らの方法<sup>53)</sup>に準じて行った. すなわち、10  $\mu$ l の DTA を含む サンプルを Pro- $\gamma$  -NAD 溶液 (EF-2 40,000 cpm NAD acceptor、0.04 M トリス (pH 8.0)、 12 % グリセロール、80 mM DTT、2 mg/ml BSA) 100  $\mu$ l と 37  $\mathbb{C}$  で 10 分間反応させた. 10 % トリクロロ酢酸を 200  $\mu$ l 加え、不溶性画分に含まれる放射活性を液体シンチレーショ ンカウンターで測定した.

(4) DTA 封入膜融合リポソームの S-180 細胞に対する in vitro での殺細胞効果

ddY マウス腹腔内より回収した S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を BSS(+) 200 µl に懸濁し, DTA 封入膜融合リポソーム 50 µl と 37 ℃ で 30 分間作用させた. 細胞を遠心にて洗浄し, MEM (10 % FCS 含有) で 20 時間培養した後,生細胞数をトリパンブルー色素排除法 に て測定した.

(5) DTA 封入膜融合リポソームの S-180 腹水癌に対する抗腫瘍効果

ddY マウスに S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を腹腔内投与し,24 時間後に BSS(-) に懸濁した DTA を封入した膜融合リポソーム,DTA を封入した通常のリポソーム,空の膜融合リポ ソーム,あるいは BSS(-) をそれぞれ 250 µl 腹腔内投与した.直接の殺細胞効果を調べる ために,サンプル投与 48 時間後に腹腔内より S-180 細胞を回収し,生細胞数を測定した. また,各サンプルを投与したマウスの延命効果について調べ,副作用の指標として2日毎 に体重を測定した.

腫瘍の完全治癒は,腫瘍を移植してから 90 日後においても腫瘍の形成を認めないもの と定義した.

#### 実験結果および考察

DTA を封入した膜融合リポソームが S-180 浮遊細胞と融合し、細胞を死滅させること ができるかどうかを in vitro の条件下で検討した (Fig.12). その結果, DTA を封入した膜 融合リポソームは, S-180 細胞を濃度依存的に傷害し, OD540=0.1 の濃度では 100 % す べての細胞を殺すことができた. この時, DTA を封入した通常のリポソーム (OD540=0.1) や空の膜融合リポソーム (OD540=0.1) では全く毒性は観察されず, 膜融合



Fig.12 In vitro cytotoxicity of fusogenic liposomes containing DTA against S-180 suspension cells

Two hundred microliter of serum-free MEM containing 1 X 10° S-180 cells was incubated with 50  $\mu$ l of BSS(-), liposomes containing DTA (OD<sub>540</sub>=0.1), empty fusogenic liposomes (OD<sub>540</sub>=0.1) or fusogenic liposomes containing DTA (OD<sub>540</sub>=0.1), 0.01, 0.001) at 37 °C for 30 min. Then, 250  $\mu$ l of MEM supplemented with 10 % FCS was added, and cultured for 20 h at 37 °C in a 95 % air-5 % CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The viability of S-180 cells was assayed by the exclusion of trypan blue. Data are expressed as means ± S.D. for three experiments.

P	<b>.</b>	A.H.M
usogenic liposomes containing DTA		

on of C 100 colles in consistent offer the administration

Treatment	Dose (OD540)	Cell Number (x10 <sup>6</sup> cells)
BSS(-)	-	14.0 ± 3.8
Liposome containing DTA	1.0	17.7 ± 2.1
Empty fusogenic liposome	1.0	14.8 ± 5.2
Fusogenic liposome containing DTA	1.0	<0.06

ddY Mice were inoculated i.p. with  $1\times10^{\circ}$  S-180 cells and injected with each material on day 1. After 2 days, S-180 cells in ascites were recovered and number of the alive cells was measured. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. for three experiments.



Fig.13 Survival of ddY mice inoculated with S-180 cells and injected with fusogenic liposomes containing DTA ddY Mice were inoculated i.p. with 1X10  $^{\circ}$  S-180 cells. After 24 h, the mice were treated with a single i.p. injection of 250  $\mu$ l of BSS(-), liposomes containing DTA with OD 540 of 1.0, empty fusogenic liposomes with OD 540 of 1.0, or fusogenic liposomes containing DTA with OD 540 of 1.0, 0.5, 0.25, or 0.1.  $\bigcirc$  BSS(-)

- Liposome containing DTA (OD 540=1.0)
- Empty fusogenic liposome (OD 540=1.0)
- Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=1.0)
- △ Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=0.5)
- ▲ Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=0.25)
- × Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=0.1)

Treatment	Dose <sup>a)</sup> OD <sub>540</sub>	Survival period <sup>b)</sup> (days)	T/C c) (%)	Complete regression <sup>d)</sup>	Protein contents (mg/ml)	DTA (µg/ml)
BSS(-)	-	12.8 ± 1.9 •)	100.0	0/6	0	0
Liposome containing DTA	1.0	15.0 ± 1.8	116.9	0/6	0	3.61
Empty fusogenic liposome	1.0	14.8 ± 2.3	115.6	0/6	0.78	0
Fusogenic liposome containing DTA	1.0	>52.0	>405.3	4/6	0.78	0.52
<u>-</u>	0.5	>48.5	>378.0	3/6	0.39	0.26
	0.25	38.1 ± 4.0	297.5	0/6	0.20	0.13
	0.1	22.3 ± 3.8	174.1	0/6	0.078	0.052

 Table 3. Anti-tumor effect of fusogenic liposomes containing DTA on S-180 cells

 transplanted i.p. into ddY mice

ddY Mice were inoculated i.p. with 1X10<sup>6</sup> S-180 cells and injected with each material on day 1.

a) Administration of 250 µl/mouse

b) Days after tumor inoculation

c) Survival period (days) of sample / Survival period (days) of control × 100

d) Complete regression was defined as survival period exceeding 60 days.

All surviving mice shown in this table were free from tumor even at day 90. e) Means ± S.E.

o) 1104110 1 0.2.

リポソームは S-180 細胞においても効率よく融合し,殺作用を示すことが明らかとなった. そこで,S-180 細胞をマウスに腹腔内投与し,腹水癌をもったマウスに対して膜融合リ ポソームを腹腔内投与したときの抗腫瘍効果について検討した (Table 2).1 × 10<sup>6</sup> 個の S-180 細胞を腹腔内投与し,その 24 時間後に DTA を封入した膜融合リポソームを (OD540=1.0,250 µl) 投与したところ,投与 2 日後において腹腔内の S-180 細胞はほぼ完 全に消失していた.DTA を封入した通常のリポソームや空の膜融合リポソームを投与し たときには、コントロールの BSS(-) を投与したときと腹腔内の S-180 細胞の細胞数は変 わらないことより,膜融合リポソームは in vivo の細胞に対しても融合能を示し、DTA を 細胞質内に導入することによって抗腫瘍効果を示すことが判明した.

DTA 封入膜融合リポソームを投与したマウスの延命効果について検討したところ (Fig.13),濃度依存的な生存日数の延長が認められ,OD540=1.0 投与群で6匹中4匹の完 全治癒が,OD540=0.5 投与群で6匹中3匹の完全治癒が観察された.DTA を封入した通 常のリポソームや空の膜融合リポソームでは全く延命効果が認められなかった.Table 3 にはマウスの延命効果についてまとめた.

in vitro, in vivo の両実験において,通常のリポソームには膜融合リポソームの約7倍 量の DTA を封入させた (Table 3) にも関わらず,全く毒性を示さなかったことは,リポ ソームがたとえエンドサイトーシスで細胞に取り込まれても,DTA はほとんど細胞質に は移行しなかったことを示している.また,当然のことながら,DTA (10 µg)単独をマウ スに投与しても全く抗腫瘍効果は認められなかった.

次に、このような DTA を封入した膜融合リポソームの抗腫瘍効果が、副作用を伴った ものであるかを検討するため、マウスの体重変化について調べた (Fig.14). DTA 封入膜 融合リポソームの OD540=1.0 投与群では、投与後に若干の体重減少が認められたが、高 い延命効果がみられた OD540=0.5 投与群においては全く体重減少を認めなかった. また、 皮膚のただれや脱毛などの副作用は全く観察されなかった. 肝臓、腎臓、脾臓、皮膚、胃



Fig. 14 Body weight change of the mice inoculated with fusogenic liposomes containing DTA
Body weight was measured at intervals of 2 or 3 days after sample administration.
+ Non-treatment
BSS(-)
Liposome containing DTA (OD 540=1.0)
Empty fusogenic liposome (OD 540=1.0)
Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=1.0)
A Fusogenic liposome containing DTA (OD 540=0.5)

Each data point represents mean  $\pm$  S.E. of six mice.

腸管 (十二指腸,空腸,回腸,盲腸,結腸,直腸),胃について病理学的な観察を行った が,著変は認めらず,DTA 封入膜融合リポソームはほとんど副作用を示すことなく,優 れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった.副作用を伴わなかった詳細な理由について は明らかではないが,膜融合リポソームが S-180 細胞に対して特異的に作用したか,ある いは腹膜が正常臓器に対する作用を阻害した可能性が考えられる.また,膜融合リポソー ムは血中に移行すると補体系により比較的速やかに分解されるため(データーは示さず), 全身の臓器には移行できず,正常組織に作用しなかったことも考えられる.

一般に、臨床においてもよく使用されている抗癌剤であるマイトマイシン C<sup>55)</sup>との抗 腫瘍効果の比較を行うと、マイトマイシン Cでは DTA 封入膜融合リポソームと同等の効 果を得るためには 2.5 から 5.0 mg/kg もの高濃度の投与が必要であった (データーは示さ ず). この時、マウスは 5 % 以上の体重減少と皮膚のただれや脱毛、髭の消失などが観察 され強い副作用を伴ったものであった. これらの結果からも、DTA を封入した膜融合リ ポソームは、腹水癌の治療に対して副作用を示すことなく優れた抗腫瘍効果を示すことが 明らかとなり、癌性胸膜炎などの治療に対しても有効性を示す可能性が考えられた.

#### 第二節 腹水癌への DTA 導入量の定量

前節において, DTA 封入膜融合リポソームが腹水癌の治療に対して非常に有効である ことが明らかとなった.そこで本節では,膜融合リポソームにより S-180 細胞に導入され た DTA 量を定量することにより,腫瘍増殖抑制に必要とされる DTA 量を求めた.

#### 実験材料と方法

(1) S-180 細胞に導入された DTA 量の測定

in vitro の実験においては、DTA を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1)を、前節 (4) に準じて S-180 細胞と反応させた. 30 分間反応させた後、細胞を氷冷した BSS(-) で 3回洗浄した. ノニデット P-40 を用いて細胞を破壊し, EF2 の ADP リボシル化活性を測 定した<sup>53)</sup>.

in vivo の実験においては, DTA を封入した膜融合リポソーム (OD540=1.0) 250 µl を, 前節(5)の操作法に従って腹腔内投与した. 30 分後に腹腔内から S-180 細胞を回収し, 氷冷した BSS(-) で 3 回洗浄した. ノニデット P-40 を用いて細胞を破壊し, EF2 の ADP リボシル化活性を測定した<sup>53)</sup>.

なお,その他の実験方法については,前節までに記載の操作法に従った.

#### 実験結果および考察

DTA を封入した膜融合リポソームが, in vitro で S-180 細胞1×10<sup>6</sup> 個全てを死滅させ る濃度である Fig.12 の OD540=0.1 においては、 0.64 ng の DTA が S-180 細胞に導入され ており (Table 4), これは細胞と反応させた膜融合リポソーム内の total の DTA 封入量 (2.6 ng) の約 25 % であった. 膜融合リポソームは全ての粒子が細胞と結合・融合するこ とができるので、さらに濃度を上げれば、全ての DTA を細胞に導入することも可能と考 えられる.一方, in vivoの実験においては、6匹中4匹の完全治癒がみられ、Table2に おいて移植された1 × 10<sup>6</sup> 個の S-180 細胞のほとんどが消失した濃度である OD540=1.0 では、0.52 ng の DTA が S-180 細胞に導入されていた (Table 4). これは投与量 (130 ng) の 0.4 % に相当していた. DTA を封入した通常のリポソームでは S-180 細胞内の DTA は検出されなかった. これらの結果から, in vivo では in vitro の条件下に比べ,約60倍 膜融合リポソームは S-180 細胞に対して作用の効率が劣ること,また in vitro および in vivoの両条件下とも、1×10<sup>6</sup> 個の S-180 細胞を完全に死滅させるには、約 0.6 ng の DTA が細胞に導入されれば十分であることが明らかとなった. in vivo の条件下において, S-180 細胞に作用しなかった膜融合リポソームや DTA がどのような体内動態をたどった。 のかの検討は行っていないが、おそらく大部分の膜融合リポソームは血清成分により分解 され、DTA がリポソームから漏出したものと考えられる。 しかし、DTA は単独では in vivo においても全く作用を示さなかったので、副作用を示すことがなかったものと考えら れる.

	DTA content delivered into S-180 cells (ng DTA/1x10 <sup>6</sup> cells)
in vitro	0.64
in vivo	0.52

 Table 4. Amount of DTA delivered into S-180 cells by fusogenic

 liposomes

Fifty microliter of fusogenic liposomes containing DTA with ODs40 of 0.1 was treated with  $1\times10^6$  of S-180 cells *in vitro*. For *in vivo* experiments, the mice were received i.p. with  $1\times10^6$  of S-180 cells, and on the next day 250  $\mu$ l of fusogenic liposomes containing DTA with ODs40 of 1.0 was injected i.p. After 30 min, amount of DTA into S-180 cells was determined by measuring NAD:EF2-ADPR activity. Data were the average of two independent experiments. 第三節 DTA を封入した膜融合リポソームの固形癌に対する抗腫瘍効果

抗癌剤の腫瘍内への局所投与は、固形癌に対する治療の最も直接的な方法である.しかしながら、低分子量の抗癌剤の場合、たとえ腫瘍内に直接投与しても、投与部位から速やかに消失するため、腫瘍組織内で治療効果が現れるほど十分な薬物濃度を維持することは容易ではない.そのため、薬物を高分子で修飾することにより局所での滞留性を高めることが行われており<sup>56,57)</sup>、その目的のために様々な高分子薬物キャリアーシステムが開発されている<sup>58)</sup>.

これまでの節において、DTA を封入した膜融合リポソームが腹水癌の治療において、 副作用を伴うことなく、顕著な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなったが、このリポソー ムは細胞に積極的に結合し、融合することから腫瘍内に直接投与された場合には、腫瘍細 胞に直接 DTA を導入し、細胞を壊死させることができると考えられる.そこで本節では、 S-180 固形癌に対して、DTA を封入した膜融合リポソームを腫瘍組織内に直接投与した ときの抗腫瘍効果について検討した.

#### 実験材料と方法

(1) DTA 封入膜融合リポソームの S-180 固形癌に対する抗腫瘍効果

ddY 雄性マウス (5 週令) の腹部皮内にに S-180 細胞 (5 × 10<sup>5</sup> 個) を移植し, 腫瘍径が 8 mm 以上に達した 7, 8, 9 日目に, BSS(-) に懸濁した DTA を封入した膜融合リポソーム, DTA を封入した通常のリポソーム, 空の膜融合リポソーム, あるいは BSS(-) 50 µl を 27 ゲージの注射針を用いて腫瘍内に直接投与した. 腫瘍の増殖は 1 週間に 2 度, 次式に従っ て腫瘍体積を測定し, 治療開始前との腫瘍体積比を求めた.

(腫瘍体積) = 1/2 × (長径) × (短径)<sup>2</sup>

また,各サンプルを投与したマウスの延命効果について調べ,副作用の指標としてマウスの体重変化を測定した.

腫瘍の完全治癒は,腫瘍を移植してから 120 日後においても腫瘍の形成を認めないもの と定義した.

腫瘍体積と延命効果の統計学的な評価は、Student t-test により行った.

なお、その他の実験方法については、前節までに記載の操作法に従った.

#### 実験結果および考察

Fig.15 に S-180 固形癌の腫瘍内に DTA 封入膜融合リポソームを投与したときの腫瘍体 積の変化について示した. DTA 封入膜融合リポソームは,濃度依存的に腫瘍増殖の抑制 を示した.一方,空の膜融合リポソームや DTA を封入した通常のリポソームでは腫瘍増 殖に影響はみられなかった.延命効果についても空の膜融合リポソームや DTA を封入し た通常のリポソームでは影響はみられなかったが,DTA 封入膜融合リポソーム投与群で は有意な生存日数の延長がみられた (Table 5).また,DTA 封入膜融合リポソームの OD540=5.0 投与群で7匹中2匹の,OD540=1.0 投与群で7匹中1匹の,OD540=0.2 投与





Treatment	Dose OD <sub>540</sub> a)	Survival of mice (days) <sup>b)</sup>	T/C (%) c)	Complete regression <sup>d)</sup>	Body weight at day 12 (g)*)
BSS(-)	0	50.7 ± 5.5	100.0	0/6	28.4 ± 1.5
Liposome containing DTA	5.0	51.2 ± 10.3	101.0	0/6	28.1 ± 0.9
Empty fusogenic liposome	5.0	53.5 ± 9.1	105.6	0/6	29.3 ± 2.2
Fusogenic liposome	5.0	*81.9 ± 9.9	>161.5	2/7	28.8 ± 1.7
containing DTA	1.0	*74.9 ± 6.9	>147.7	1/7	29.2 ± 1.8
	0.2	*76.2 ± 6.5	>150.2	1/8	27.9 ± 1.0

ddY Mice were intradermally inoculated with S-180 cells (5X10<sup>5</sup> cells) and 50  $\mu$ l of samples was intratumorally injected at days 7, 8 and 9.

a) Administration 50  $\mu$ l  $\times$  3 / mouse

 b) Days after tumor inoculation Means ± S.E.; \*: Significant difference from the BSS(-)-control group (P<0.05).</li> c) (Survival days of sample) / (Survival days of control, BSS(-)) × 100

d) Complete regression was defined as a tumor free mouse surviving more than 120 days. e) Body weight at day 7 was 27.3  $\pm$  0.8 (g). ; Means  $\pm$  S.D.



Fig.16 Photograph of two mice, bearing S-180 cells, injected with BSS(-) (A) or with fusogenic liposomes containing DTA (B) S-180 cells (5X10<sup>5</sup> cells) were intradermally inoculated into the abdomen of

ddY mice, and 50 µl of fusogenic liposomes containing DTA with OD540 of 1.0 was intratumorally injected on days 7, 8 and 9. Both photographs were taken on day 27.

群で7匹中1匹の完全治癒が得られた.Fig.16はこのときの腫瘍の様子を示した写真である.DTA 封入膜融合リポソームを投与したマウスの腫瘍は,投与部位である中心部が完全に壊死しているため腫瘍は観察できず,周辺にのみ腫瘍がみられた.一方,コントロールとして BSS(-)を投与したマウスでは腫瘍が全体に広がっていた.

副作用の指標としてマウスの体重の変化を測定したが、DTA 封入膜融合リポソームの 投与によって変化は認められなかった (Table 5). また、外見上についても何ら変化は観 察されず、全く副作用はみられなかった. これらの結果より、DTA 封入膜融合リポソー ムの腫瘍内投与は、副作用を伴うことなく、優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなっ た.

第四節 膜融合リポソームの固形癌への物質導入量の定量

前節において、DTA 封入膜融合リポソームの腫瘍内投与により顕著な腫瘍増殖の抑制 がみられることが明らかとなった.これは腫瘍内に投与された膜融合リポソームが DTA を腫瘍細胞内に導入し、細胞を死滅させたためにもたらされたものである.そこで本節で は、膜融合リポソームに単独では細胞内に取り込まれることのない [<sup>3</sup>H] イヌリン<sup>59)</sup>を封 入し、腫瘍内投与後の S-180 細胞内の放射活性を測定することによって、膜融合リポソー ムに封入された物質がどの程度腫瘍細胞に取り込まれたかについて検討した.

#### 実験材料と方法

(1) [<sup>3</sup>H] イヌリンを封入した膜融合リポソームの腫瘍内投与後の S-180 細胞中の [<sup>3</sup>H] イ ヌリンの放射活性

 $[^{3}H]$ イヌリン (1 mCi/ml) (第一化学) を含んだ膜融合リポソームを第一章,第三節に準じて調製した.この膜融合リポソーム (OD540=1.0) 50  $\mu$ l を,前節に準じて腫瘍移植7日後に10 ヶ所に分けて腫瘍内に投与した.1時間後に腫瘍を回収し,細切した後,60  $\mu$ mのメッシュを通して細胞懸濁液を得た.ハンクス液で細胞を3回洗浄した後,1NNaOHで一昼夜処理し,放射活性を測定した.

#### 実験結果および考察

Table 6 は [<sup>3</sup>H] イヌリンを封入した膜融合リポソームを S-180 固形癌内に投与した後, S-180 細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H] イヌリンのカウントを,投与量に対する割合で表したも のである.イヌリンは単独では細胞内に取り込まれることはないので<sup>59)</sup>,細胞内におけ る [<sup>3</sup>H] イヌリンの放射活性は,膜融合リポソームによって細胞質内に導入されたものと 考えることができる.通常のリポソームに [<sup>3</sup>H] イヌリンを封入したものでは,投与量の わずか 0.53 % しか S-180 細胞に取り込まれなかったのに対し,膜融合リポソームではそ

Treatment	Radioactivity (% of injected dose)
Fusogenic liposome	7.74 ± 0.49
Simple liposome	$0.53 \pm 0.01$

 Table 6. The radioactivity of [<sup>3</sup>H]inulin associated with S-180 cells after

 the intratumor injection of fusogenic liposomes containing [<sup>3</sup>H]inulin

Fifty microliter of fusogenic liposomes containing  $[^{3}H]$ inulin was intratumorally administered. One hour later, the tumor sites were cut away, and the single cell suspensions were prepared by mechanical methods. The levels of radioactivity in the cells were measured. (means  $\pm$  SD, n=4)

の約 15 倍量の 7.8 % が細胞に取り込まれていた.通常のリポソームによる S-180 細胞へ のイヌリンの導入は、ライソゾーム酵素による分解の Factor を除外し、エンドサイトー シスによる細胞内への導入を測定した場合であり、イヌリンの細胞質内への移行は、さら に減少しているものと考えられる.これらの結果より、膜融合リポソームは固形癌の細胞 内に効率よく封入物質を導入できることが明らかとなり、DTA 封入膜融合リポソームの 抗腫瘍効果は DTA を S-180 細胞内に効率よく導入したためにもたらされたものと考えら れた.

#### 第五節 小括

DTA は単独では細胞内に入ることができないが、一分子でも細胞質内に導入されれば 細胞を殺傷することができる毒素であり、効率のよい細胞質内へのデリバリー法が開発さ れれば、強力な抗癌剤となりうるものと考えられる<sup>18,19)</sup>. 膜融合リポソームはそのよう な目的に適したキャリアーであり、DTA を封入した膜融合リポソームの癌治療への応用 について、マウスの S-180 細胞をモデルに、腹水癌と固形癌について検討した.

DTA 封入膜融合リポソームは、S-180 腹水癌を有したマウスに対して、体重減少や脱 毛、髭の消失などの副作用を伴うことなく、優れた抗腫瘍効果を示し、半数以上のマウス を完全治癒させることができた.これは、マイトマイシン Cによって同様の抗腫瘍効果 を得るためには激しい副作用を伴ったのとは対照的であった.また、S-180 細胞に導入さ れた DTA 量を定量することにより、1 × 10<sup>6</sup> 個の S-180 細胞を完全に死滅させるには、 約 0.6 ng の DTA が細胞に導入されれば十分であることが明らかとなった.これらの結果 は、膜融合リポソームが in vivo の細胞とも効率よく融合し、封入物質を細胞質内に導入 できることを示しており、in vitro のみならず in vivo の細胞内への優れた drug carrier と なりうることが示唆された.

S-180 固形癌に対する DTA 封入膜融合リポソームの腫瘍内投与においても有意な腫瘍 増殖の抑制がみられたが、固形癌への局所投与においては、全ての S-180 細胞内に DTA を導入することは不可能なため、完全な腫瘍の退縮は得ることができなかった.従って、 固形癌の治療に対しては、全ての癌細胞に遺伝子が導入されなくても効果が期待できるサ イトカイン遺伝子を用いた抗腫瘍免疫療法などの他の治療法との組み合わせが必要と考え られる.

そこで次章では,膜融合リポソームにプラスミッド DNA を封入し,膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての性質について検討を行った.

第三章 膜融合リポソームを用いた細胞への遺伝子導入

近年の分子細胞生物学の著しい進歩は,遺伝子そのものやアンチセンス核酸などを医薬 品として扱う遺伝子治療という夢の治療法の開発を現実のものにしつつある<sup>60)</sup>.遺伝子 治療とは,遺伝子の欠損している細胞に正常遺伝子を補充したり,細胞に新たな機能を付 与するために,外来遺伝子を導入することにより遺伝子レベルで疾病の治療を行う治療手 段である.しかし,この治療法の確立のためには,動物細胞の内部に遺伝子を導入する技 術を開発する必要がある.生体を構成している個々の細胞は,細胞膜というバリアーを有 しており,遺伝子などの高分子物質は細胞膜を透過できない.そのため,このバリアーを 突破するためには,自然界において膜融合により自身の遺伝子を細胞内に導入しているウ イルスの感染機構を利用するか,マイクロインジェクションやエレクトロポレーション, あるいはリン酸カルシウムや合成脂質等の物理・化学的方法を利用する必要がある.

現在,米国を中心とした遺伝子治療の臨床実験で用いられているベクターは,主にウイルスの感染機構を利用したレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター,合成脂質を用いたカチオニック・リポソームなどである<sup>61-64)</sup>.しかしながら,これらのベクターの遺伝子導入・発現効率,安全性については十分とはいいがたく,新しい発想に基づいたベクターの開発が重要な課題となっている.そこで本章では,膜融合リポソームにプラスミッド DNA を封入し, 膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての性質について,非ウイルスベクターとして最も広く用いられているカチオニック・リポソームのリポフェクチン<sup>65)</sup>と比較しながら検討を行った.

第一節 プラスミッド DNA を封入した膜融合リポソームの遺伝子発現パターン

膜融合リポソームに、モデル遺伝子としてニワトリβ-アクチンプロモーターとサイト メガロウイルスエンハンサーを含むルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 を封入し、 培養細胞に transfect したときの経日的な遺伝子発現について検討した. 同時に、遺伝子 発現効率に及ぼす膜融合リポソームと細胞との接触時間の影響についての検討も行った.

#### 実験材料と方法

(1) ルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 の構築

ラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus; RSV) long terminal repeat のプロモーターを もつルシフェラーゼ発現プラスミッド pRSVL<sup>66)</sup>の HindIII / SmaI フラグメントを, pBV1 の HindIII / BamHI (Klenow fragment of DNA polymerase で平滑末端化) 部位に挿 入し, pCAL1 を得た. pBV1 は pBY1 の誘導プラスミッドであり<sup>67)</sup>, pGEM-5Zf(+) (プロメガ) に, pCAGGS<sup>68)</sup>由来のニワトリβ-アクチンプロモーターとサイトメガロウイ ルスエンハンサー, および SV40 early gene poly (A) signal を挿入したものである. ルシ フェラーゼの coding frame を、 $\beta$ -アクチンスタートコドンのすぐ下流に接続させるため、 オリゴヌクレオチド (5'TTCCTCCGCAGCCAGCCATGGAAGACGGCAAAAA3') をプラ イマーとして用いて Kunkel らの方法<sup>69)</sup>に従い、site-directed mutagenesis を行い、 pCAL2 (6.4 Kb) を得た (Fig.17). 5' 非翻訳領域の遺伝子配列は、Sanger らの方法<sup>70)</sup>に従 い sequence することにより確認した.

pCAL2はL細胞において, pCAL1, pRSVLと比較し, それぞれ 20, 40 倍のルシフェ ラーゼ発現を示した (データーは示さず). 実験には pCAL2 を用いた.

(2) プラスミッド DNA を封入した膜融合リポソームの調製

pCAL2 (10 mg / ml) を 10 mM Tris (pH 7.6) / 150 mM NaCl / 10 mM EDTA に懸濁し,第 一章,第一節に準じた方法で一枚膜リポソームを作製した.ただし,リポソームのサイズ は,0.4 µm のポリカーボネート製フィルター (Nucleopore) を通すことにより調節した. このリポソームを,あらかじめ紫外線照射することによってウイルス RNA を断片化した センダイウイルスを用いて第一章,第一節に準じた方法で膜融合リポソームを調製した.

膜融合リポソームに封入されている DNA 量は, DNA をフェノール, フェノール/ク ロロホルムで抽出した後, 3,5-ジアミノ安息香酸 (ナカライテスク) を用いた蛍光法<sup>71)</sup>によ り測定した. 膜融合リポソームは, OD540=1.0 あたり 2.0 µg/ml の DNA を封入していた. (3) pCAL2 を封入した膜融合リポソームを作用させた細胞の遺伝子発現変化

35-mm ディッシュに L 細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 個播種し,24 時間後に細胞を BSS(+) で洗浄した後,BSS(+) で懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1) を,37 ℃ 790 分間作用させた. MEM で細胞を洗浄した後,通常の培養液で培養し,経日的にルシフェラーゼ活性を測定した.

(4) 膜融合リポソームの遺伝子発現に及ぼす細胞との接触時間の影響

35-mm ディッシュに L 細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 個播種し,24 時間後に細胞を BSS(+) で洗浄し た後,BSS(+) で懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.25) を 37 ℃ で 1,10,30,90 分間作用させた. MEM で細胞を 2 度洗浄した後,通常の培養液で培養し, 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した.

(5) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は, luciferase assay system (ピッカジーン) およびルミノメーター (Lumat LB9501, Berthold) を用いて測定した. 活性は relative light units (RLU)/µg protein, あるいは RLU/35-mm ディッシュとして表した.

#### 実験結果および考察

ルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.1) を L 細胞に 37 ℃ で 90 分間作用させ,その経日的な遺伝子発現パターンを検討したところ, ルシフェラーゼ活性は遺伝子導入の2日後に最大を示し,4日後まで高い活性を維持した 後,6日後には最大活性の約3分の1に減少した (Fig.18). このような一過性の遺伝子発 現は,プラスミッド DNA が染色体に組み込まれず,次第に分解・脱落したためと考えら れた.



さて、センダイウイルスによる膜融合は数分で起こることが知られており<sup>6</sup>,また膜融 合リポソームはエンベロープ蛋白質の働きで細胞に積極的に結合できることから、短い時 間の細胞との接触時間においても高い遺伝子発現を示す可能性が考えられる.そこで、遺 伝子発現効率に及ぼす膜融合リポソームと細胞との接触時間の影響について検討した (Fig.19). その結果、膜融合リポソームはわずか1分間の細胞との作用においても、90分 間処理のときの35%ものルシフェラーゼ活性を示し、短時間の細胞との接触においても 高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった.このような性質は、膜融合リポソームがセ ンダイウイルスの強力な膜融合能をそのまま保持していることを反映したものと考えられ た. 第二節 膜融合リポソームとカチオニックリポソームの遺伝子発現効率の比較

膜融合リポソームの遺伝子治療用ベクターとしての特徴について調べるため,遺伝子発 現効率,細胞傷害性,血清存在化での遺伝子発現について,非ウイルスベクターの中で最 も広く用いられているカチオニックリポソームのリポフェクチン<sup>65)</sup>と比較しながら検討 を行った.

#### 実験材料と方法

(1) 膜融合リポソームを用いた培養細胞への遺伝子導入

膜融合リポソームと細胞の接触時間の遺伝子発現への影響を調べた実験においては, 35-mm ディッシュに L および HeLa 細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 個播種し,第三章,第一節に準じた 方法で膜融合リポソーム (OD540=0.25) を 37 ℃ で 1,10,30 分間作用させた.

高濃度のベクターを細胞に作用させた実験においては、膜融合リポソーム (OD540=3.0, 1.0, 0.3, 0.1) を 37 ℃ で 90 分間作用させた.

遺伝子導入48時間後にルシフェラーゼ活性,および細胞傷害性を測定した.

(2) カチオニックリポソーム・DNA 複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入

カチオニックリポソームとして N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchloride と dioleoyl phosphatidylethanolamine の混合物 (1:1 (w)) であるリポフェクチン (GIBCO) <sup>65)</sup>を用いた. pCAL2 (3.0  $\mu$ g) とリポフェクチン (15.0  $\mu$ g) をそれぞれ 100  $\mu$ l の 無血清 MEM に懸濁した. 両者を混合し,室温で 15 分間反応させた後,無血清 MEM で 目的濃度に希釈した. これを, 膜融合リポソームと同様のプロトコールで細胞に作用させ た.

カチオニックリポソームと DNA の比率は,5:1(w) のものが遺伝子発現効率が最適で あり (データーは示さず),実験にはこの比率のものを用いた.

(3) 細胞傷害性の測定

細胞傷害性は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) を用いて、細胞の蛋白量を測定する ことにより評価した<sup>72)</sup>.本系において、蛋白量を測定することによる細胞傷害性の評価 は、生細胞数を MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法<sup>73)</sup> により測定したものと相関していた.

(4) 血清存在化での遺伝子導入

35-mm ディッシュに L 細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 個播種し,24 時間後に細胞を BSS(+) で洗浄し た後,あらかじめ 37 ℃ に温めた10,20,40,80 % FCS を含む MEM を 0.5 ml 加えた. 37 ℃ に温めた無血清 MEM に懸濁した pCAL2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.5; DNA 1.0 µg/ml),あるいはカチオニックリポソーム・DNA 複合体 (カチオ ニックリポソーム 5.0 µg/ml, DNA 1.0 µg/ml) 0.5 ml を細胞に加え,37 ℃ で 30 分間作用 させた (最終 FCS 濃度 5,10,20,40 %). MEM で細胞を洗浄後,通常の培養液で培養

し,48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した.

なお,その他の実験方法については,前節までに記載の操作法に従った.

L および HeLa 細胞において, 膜融合リポソームとカチオニックリポソーム・DNA 複合体を, 種々の時間作用させたときの遺伝子発現効率について比較した結果を Fig.20 に示す. この時, in vivo の細胞に直接遺伝子 (ベクター)を導入する場合には, 細胞とベクターが長時間 intact なまま作用することは考えられないことから, 細胞との作用時間は30分間までの比較的短い時間について検討した. また, DNA 濃度は, カチオニックリポソーム・DNA 複合体が細胞傷害性をほとんど示さなかった 0.5 µg/ml に統一して行った(カチオニックリポソーム・DNA 複合体が, 遺伝子導入時に細胞傷害性を伴うことは後述する). ちなみにこの条件下では, 膜融合リポソームは全く細胞傷害性を示さなかった.

膜融合リポソームの場合は、L および HeLa 細胞とも 1 分から 10 分間の作用でも高い ルシフェラーゼ活性が得られたのに対し、カチオニックリポソーム・DNA 複合体では同 じレベルの活性を得るためには 30 分間の作用が必要であった. 特に、10 分間までの作用 では、膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA 複合体に比べ、4 倍から 100 倍以上の活性を示し、膜融合リポソームは非常に速い時間で細胞に遺伝子導入できること が明らかとなった. これは膜融合リポソームが、センダイウイルスのエンベロープ蛋白質 の働きで積極的に細胞に結合し、融合によって遺伝子を直接細胞質内に導入するのに対し、 カチオニックリポソーム・DNA 複合体は受動的に細胞に結合し、主にエンドサイトーシ スで細胞内に取り込まれる<sup>74-78)</sup>ために短時間では十分に遺伝子導入できないものと考え られた.

次に、遺伝子発現と細胞毒性に及ぼす両ベクターの濃度の影響について検討した (Fig.21). 様々な濃度のベクターをL細胞に 90 分間作用させたところ、両ベクターとも 濃度依存的な遺伝子発現を示した. 膜融合リポソームが DNA 濃度 0.2 µg/ml の低濃度に おいても高いルシフェラーゼ活性を示したのに対し、カチオニックリポソーム・DNA 複 合体は同じ濃度ではその4分の1以下の活性しか示さなかった. さらに低濃度の DNA 0.005 µg/ml においては、カチオニックリポソーム・DNA 複合体が 1.1 RLU/µg protein の 活性しか示さなかったのに対し、膜融合リポソームではその約 30 倍の 29.5 RLU/µg protein の活性を示した (データーは示さず). また、カチオニックリポソーム・DNA 複 合体が膜融合リポソームと同等の活性を示すためには、DNA 2.0 µg/ml 以上の高濃度が必 要であり、かつその条件下では細胞傷害性を示すことは避けられなかった. 一方、膜融合 リポソームは、高濃度 (OD540=3.0; DNA 6.0 µg/ml) においても全く細胞傷害性を示さな かった. これらの結果から、センダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームは、 カチオニックリポソーム・DNA 複合体のような物理・化学的複合体を利用する方法に比 べ、安全で効率よく外来遺伝子を導入・発現させることができることが明らかとなった.

さて, in vivo の組織細胞への直接の遺伝子導入を考えた場合,生体内には遺伝子導入を 妨げる様々な蛋白質などの因子が存在することが考えられる.そこで,両ベクターの遺伝 子発現に及ぼす血清の影響について検討した (Fig.22). 膜融合リポソームは血清存在化に おいても遺伝子導入でき,40% 血清存在化においても血清非存在化のときの70% もの 遺伝子発現を示した.一方,カチオニックリポソーム・DNA 複合体による遺伝子導入は, 血清の存在により強く阻害され,わずか5% の血清が存在しただけで99% 以上活性が消



Fig.20 Effect of the time for incubating cells with fusogenic liposomes or cationic liposomes on gene transfer

**Inposomes on gene transter** L (A) and HeLa (B) cells were incubated with fusogenic liposomes containing pCAL2 ( $\boxtimes$ ) with OD<sub>540</sub> of 0.25 (DNA 0.5  $\mu$ g/ml) or complexes of cationic liposomes and pCAL2 (cationic liposomes 2.5  $\mu$ g/ml, DNA 0.5  $\mu$ g/ml) ( $\square$ ) at 37 °C for 1, 10, or 30 min. After 48 h in culture, luciferase activity was determined. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments for fusogenic liposomes and of four experiments for complexes of cationic liposomes and DNA.



#### Fig.21 Effect of the concentration of vectors on gene transfer activity and toxicity

L cells seeded on 35-mm dishes were incubated with various concentration of fusogenic liposomes containing pCAL2 (A) and complexes of cationic liposomes and pCAL2 (B) at 37 °C for 90 min. After 48 h in culture, the cells were harvested and the luciferase activity and the amount of extractable protein were determined. Each point represents the mean ± S.D. of three experiments for fusogenic liposomes and of four experiments for complexes of cationic liposomes and DNA.



#### Fig.22 Effect of serum proteins in the medium on gene transfer activity

L cells seeded on 35-mm dish were treated with 0.5 mI of MEM supplemented with 10, 20, 40, or 80 % FCS, and were transfected with 0.5 ml of serum-free suspensions of fusogenic liposomes containing pCAL2 with OD<sub>540</sub> of 0.5 (final OD<sub>540</sub>=0.25, DNA 0.5  $\mu$ g/ml) ( 
) or complexes of cationic liposomes and pCAL2 (cationic liposomes 5.0 µg/ml, DNA 1.0 µg/ml) (O) at 37 °C for 30 min (final FCS concentration is 5, 10, 20, or 40 %). After 48 h in culture, luciferase activity was measured. Each point represents the mean ± S.D. of four experiments.

失した. これは、カチオニックリポソーム・DNA 複合体の場合は、DNA がリポソーム 膜に封入されているのではなく、単に複合体を形成しているだけなので、DNA がヌクレ アーゼにより分解をうけるのを避けられないこと、あるいはカチオニックリポソームの作 用が血清蛋白質により阻害を受けたためと考えられる. 膜融合リポソームの場合には、 DNA はリポソーム膜に封入されているためにヌクレアーゼによる分解から回避できるこ と<sup>9</sup>、膜融合活性が血清蛋白質の影響をほとんど受けなかったために血清存在化でも遺伝 子導入できたものと考えられた.

これらの結果から、膜融合リポソームは短時間で、低い濃度でも遺伝子導入でき、かつ 血清の影響をほとんど受けないことが明らかとなり、特に in vivo の組織細胞への直接の 遺伝子導入においては優れたベクターとなりうる可能性が考えられた.そこで次章におい ては、膜融合リポソームを用いた in vivo 遺伝子導入について検討を行った.

第三節 膜融合リポソームを用いたマウス腹水癌への in vivo 直接遺伝子導入

膜融合リポソームを用いた in vivo 遺伝子導入について, Sarcoma-180 (S-180) 腹水癌マ ウスに対して pCAL2 封入膜融合リポソームを腹腔内投与し, S-180 細胞のルシフェラー ゼ発現を調べることにより検討を行った.

#### 実験材料と方法

(1) S-180 腹水癌細胞への in vivo 直接遺伝子導入

S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を ddY 雄性マウス (5 週令) に腹腔内投与し, 5 日後に pCAL2 封入膜融合リポソーム (OD540=1.0; DNA 1.5  $\mu$ g/ml),およびカチオニックリポソーム・ DNA 複合体 (DNA 1.5 or 40  $\mu$ g/ml; DNA : カチオニックリポソーム = 1 : 5 (w)) 1 ml を腹 腔内投与した. 48 時間後に S-180 細胞を腹腔内より回収し,ルシフェラーゼ活性を測定 した.

なお,その他の実験方法については,前節までに記載の操作法に従った.

#### 実験結果および考察

1.5 µg の pCAL2 を封入した膜融合リポソームを S-180 腹水癌細胞を有したマウスに腹 腔内投与したところ, S-180 細胞に高いルシフェラーゼ活性が認められた (Table 7). 一方, カチオニックリポソーム・DNA 複合体の DNA 1.5 µg 投与ではほとんどルシフェラーゼ 活性を示さず, DNA 40 µg の投与においても膜融合リポソームの DNA 1.5 µg のときの約 85 分の 1 の活性しか示さなかった. この時,両ベクターを投与したマウスとも体重減少 等の副作用は示さなかった. また,腹腔内の細胞数も BSS(-)を投与したマウスと変化は なかった. これらの結果は, 膜融合リポソームは in vivo の細胞に対しても直接遺伝子を 導入できることを示しており,その活性は投与量をも考慮に入れると,カチオニックリポ

Treatment	DNA Conc. (µg/mouse)	Luciferase Activity (RLU/10 <sup>7</sup> cells)
Fusogenic liposome a)	1.5	8013 ± 809
Cationic liposome b)	1.5	4.9 ± 0.7
	40.0	92.2 ± 18.5

# Table 7. Comparison of *in vivo* gene transfer activity of fusogenic liposomes and cationic liposomes

S-180 (1X10<sup>6</sup>) cells were i.p. injected into male ddY mice at day 0. At 5 days, fusogenic liposomes containing pCAL2 or complexes of cationic liposomes and pCAL2 were given i.p. At 7 days, S-180 cells were recovered and luciferase activity was measured.

a); Fusogenic liposomes containing 1.5  $\mu$ g of pCAL2 were injected i.p. b); Complexes of cationic liposomes and 1.5 or 40.0  $\mu$ g of pCAL2 (DNA : cationic liposomes = 1 : 5 (w)) were injected i.p. Means ± S.D.; n = 3

第四節 小括

膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての性質について、非ウイルスベクターと して広く用いられているカチオニックリポソームのリポフェクチン<sup>65)</sup>と比較しながら検 討した. 膜融合リポソームは1分から10分間の短時間の細胞との接触においても遺伝子 導入できたのに対し、カチオニックリポソーム・DNA 複合体では十分な遺伝子発現を得 るためには30分間以上の作用が必要であった.また、カチオニックリポソーム・DNA 複合体は、膜融合リポソームと同程度の遺伝子発現を得るためには細胞傷害性を伴うこと が避けられなかったのに対し、膜融合リポソームは高濃度においても(OD540=3.0; DNA 6.0 µg/ml) 全く細胞傷害性を示さなかった.さらに、膜融合リポソームは血清存在化にお いても遺伝子導入が可能であり、これらの性質を反映して in vivo の S-180 細胞に対して、 効率よく遺伝子導入することが可能であった.一方、カチオニックリポソーム・DNA 複 合体は、膜融合リポソームの25 倍以上の DNA 量を投与してもわずかな活性しか示さず、 膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA 複合体と比較して 1,000 倍以上効率 よく in vivo の細胞に遺伝子導入できることが判明した.

今回実験に用いた遺伝子は、細胞内で複製不能なプラスミッドであるため一過性の遺伝 子発現しか示さなかった (Fig.18). 膜融合リポソームは遺伝子を効率的に細胞内に運ぶた めのベクターの役割を提供しているのであり、一過性の遺伝子発現しか示さなかった原因 は、膜融合リポソームの問題ではなく、導入された遺伝子そのものの問題である. これは 現在、米国を中心とした遺伝子治療の臨床実験で用いられているウイルスベクターのレト ロウイルスベクターやアデノウイルスベクターとは大きく性質を異にする問題である. す なわち、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターでは、遺伝子の形状やその発 現様式はベクター自身の性質に依存したものであり、導入される遺伝子の自由度は非常に 低い. 一方、膜融合リポソームの場合には、例えば Eptein-Barr Virus (EBV) <sup>79,80)</sup>や bovine papilloma virus (BPV)<sup>80-83)</sup>, simian virus 40 (SV40)<sup>84)</sup>, human papovavirus (BKV) <sup>85,86)</sup>などの動物細胞核内で染色体外 DNA として複製可能なプラスミッドを用いることに より永続的な遺伝子発現を得ることも可能と考えられる. これは, 膜融合リポソームだけ でなくカチオニックリポソームなどの非ウイルスベクターに共通の性質であるが, 本研究 で明らかとなったように, カチオニックリポソームなどの物理・化学的複合体を利用する 非生物学的な方法では, 遺伝子の発現と毒性とのバランスを打破し, 細胞傷害性を示すこ となく効率的な遺伝子発現を得ることは容易ではない. 膜融合リポソームの場合は, ウイ ルスの感染能を生物学的に利用して安全に, 効率よく遺伝子を細胞内に導入でき, さらに in vivo の細胞への遺伝子導入も可能である. このように膜融合リポソームは, ウイルスと 非ウイルスの中間の性質を有したハイブリットなベクターであり, ウイルスベクターと非 ウイルスベクターの長所を合わせ持ったベクターであるといえる.

また, 膜融合リポソームを含めた非ウイルスベクターに共通の問題点として, 細胞質に 導入された遺伝子が核に移行する確率が約 10<sup>-4</sup> と非常に低いといったことがあげられる <sup>15,87)</sup>. この 10<sup>-4</sup> という数字は, 核膜が一時的に消失する増殖中の培養細胞を用いた検討 により明らかにされたものであり, 細胞分裂を行っていない細胞においては, さらに核へ の移行は制限されることになる. これは特に, 大部分の細胞が分裂をしていない in vivo の細胞への直接の遺伝子導入に際には非常に大きな問題となる. 細胞内に導入された遺伝 子は一般に, 核内に存在する RNA ポリメラーゼによる転写を受けて初めて翻訳され, 蛋 白質となるのであるから, 遺伝子を送達することによって治療効果のある蛋白質を得るた めには, 遺伝子は核内にまで達しなければ作用は示さないことになる. ところが, 細胞が 自身の恒常性を保つために, 細胞膜を有しているのと同様に, 核にも核機能の恒常性維持 のために核膜が存在し, 細胞質と核内への物質の輸送は厳密に制御されている. そのため 今後は, 遺伝子の核への移行をどの様にして上昇させるか, あるいは核移行の問題を回避 するために, 細胞質内で直接遺伝子発現を行うシステムの開発が重要な研究課題となる.

細胞質内で直接遺伝子発現させるシステムのひとつに,バクテリオファージ T7 発現系 が知られており<sup>88-91)</sup>,著者もすでに本系を用いた検討を開始している.すなわち,バク テリオファージ T7 RNA ポリメラーゼの酵素と,T7 プロモーターの制御下で遺伝子発現 をするプラスミッド DNA とを同時に膜融合リポソームを用いて細胞に導入するというも のである. 膜融合リポソームは遺伝子だけでなく,蛋白質などリポソームに封入できるも のであればどの様な物質でも細胞内に導入することが可能なので,様々な機能を遺伝子に 付与できるなど,ベクターの改良に関しての将来性は非常に高いと思われる. 第四章 Tumor Necrosis Factor-a (TNF-a)遺伝子を封入した膜融合リポソ ームの固形癌遺伝子治療への応用

サイトカイン遺伝子を癌細胞に導入し、宿主の抗腫瘍免疫反応の増強を期待する遺伝子 治療は、悪性腫瘍に対する新しい治療法として期待されている<sup>92,93)</sup>.本法は、全ての癌 細胞に遺伝子導入できなくても抗腫瘍免疫反応を得ることができると考えられることから、 腫瘍組織内に直接遺伝子を導入する in vivo アプローチにおいても効果が期待できる.し かし、種々のサイトカイン遺伝子を in vitro で癌細胞に導入し、その細胞を in vivo に移植 する ex vivo アプローチによる実験においては、多くの癌細胞において抗腫瘍免疫反応の 誘導がみられるのに対し<sup>94-106)</sup>,すでに in vivo に存在している癌細胞に,直接遺伝子を導 入することによって治療効果を得たという報告は非常に少ない. これは、たとえサイトカ イン産生ベクターを腫瘍内に投与し、抗腫瘍免疫反応が一部誘導できたとしても、腫瘍が ある程度の大きさを越えれば、腫瘍増殖の抑制を得ることが困難であることを示している. そのため、現在では複数のサイトカイン遺伝子を組み合わせて免疫系のさらなる活性化を 促したり<sup>107,108)</sup>,サイトカイン遺伝子と自殺遺伝子を組み合わせた方法などが報告されて いるが109),その数も少ないのが現状であり、全く新しい方向からのアプローチが必要と 考えられる.癌に対する遺伝子治療は,労力,費用,簡便さなど全ての点から,in vivo 直 接遺伝子導入による方法が望ましいことは自明の理であるが, in vivo 遺伝子治療において 抗腫瘍効果が期待できるベクターやシステムの開発が非常に困難なため,将来的重要研究 課題となっている.

腫瘍壊死因子*a* (Tumor necrosis factor-*a*; TNF-*a*) は癌に対する遺伝子治療において 最も広く研究されているサイトカイン遺伝子の一つであり,癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に in vitro で遺伝子導入し,その細胞を in vivo に移植することによって,抗腫瘍免疫反応を 誘導できることが報告されている<sup>96-99,106,110)</sup>. さらに,TNF-*a* は腫瘍血管透過性の向上 <sup>111)</sup>,腫瘍血管内皮細胞の傷害を引き起こすことや<sup>112-114)</sup>,腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞 の ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1; E selectin) 等の接着分子の発現を誘導する<sup>115)</sup>ことが知られている. また,免 疫系の細胞が癌組織に浸潤するためには,まず腫瘍血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞 に産生させることによって腫瘍組織のTNF-*a* 濃度を選択的に高め,腫瘍のみならず腫瘍 血管内皮細胞にもTNF-*a* が作用しうるシステムを構築することにより免疫系の効率的な 活性化が得られる可能性がある.

そこで本章では、固形癌に対する in vivo 遺伝子治療の新しい戦略として、腫瘍支配動脈内にヒト TNF-a の遺伝子を直接導入することによって腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞にヒト TNF-a を産生させ、腫瘍増殖の抑制がみられるかどうかを検討した.

膜融合リポソームにヒト TNF-a 発現プラスミッド pCATNF2 を封入し,培養ウシ大動 脈血管内皮細胞 (BAEC) に作用させたときの TNF-a の発現量について検討した.また, S-180 細胞を footpad に移植したマウスの腫瘍支配動脈である大腿動脈内に直接 pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与し,大腿動脈および腫瘍部位 (footpad) の TNFa の発現について検討した.

#### 実験材料と方法

(1)TNF-a 発現プラスミッド pCATNF2 の構築

ヒト TNF-*a* cDNA <sup>116)</sup>を pBR322 の PstI 部位に挿入したプラスミッド (大日本製薬株 式会社山田正明先生より供与)の PstI フラグメントを, pGEM-3Zf(+) (プロメガ)の PstI 部位に挿入した.生じたプラスミッドの HindIII フラグメントを, pBV1の HindIII 部位に挿入し, pCATNF1を得た.pBV1 は pBY1 の誘導プラスミッドであり<sup>67)</sup>, pGEM-5Zf(+) (プロメガ) に pCAGGS <sup>68)</sup>由来のニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターとサイトメガ ロウイルスエンハンサー,および SV40 early gene poly (A) signal を挿入したものである. TNF-*a* の coding frame を,  $\beta$ -アクチンスタートコドンのすぐ下流に接続させるため, オリゴヌクレオチド(5'TTCCTCCGCAGCCAGCCATGAGCACTGAAAGCAT3')をプライ マーとして用い kunkel らの方法<sup>69)</sup>に従い, site-directed mutagenesis を行い, pCATNF2 を得た (Fig.23). 5' 非翻訳領域の遺伝子配列は, Sanger らの方法<sup>70)</sup>に従い sequence する ことにより確認した.pCATNF2 により産生される蛋白質が活性のあるヒト TNF-*a* であ ることは,L929 細胞を用いた Bioassay <sup>117)</sup>を行うことにより確認した.

pCATNF2はL細胞において、pCATNF1と比較し、約5倍のTNF-aの発現を示した (データーは示さず). 実験には pCATNF2を用いた.

(2) プラスミッド DNA を封入した 膜融合リポソームの 調製

ヒト TNF-a 発現プラスミッド pCATNF2 を用い,第三章,第一節に準じた方法で膜融 合リポソームを調製した.



Fig.23 Structure of human TNF- $\alpha$  expression plasmid pCATNF2

(3) 培養ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) における TNF-a 発現

35-mm ディッシュに BAEC を 1 × 10<sup>5</sup> 個播種し,24 時間後に細胞を BSS(+) で洗浄し た後,BSS(+) で懸濁した pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=0.25; DNA 0.5  $\mu$ g/ml) を 37 °C で 90 分間作用させた. DMEM で細胞を洗浄後,通常の培養液で培養 し,培養液中に分泌された TNF-*a*の産生量を ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BioSource International) 法で測定した.本法における検出限界は,0.112 pg/ml で あった.

(4)マウス大腿動脈血管内皮細胞への in vivo 直接遺伝子導入による TNF-a 発現

ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を移植し, footpad の厚さが 5 mm 以上 (通常は約 2 mm) に達した 7 日後に, 左脚大腿動脈を露出させ, 27 ゲージの注射針を用いて, pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム (OD540=6.0) を 30  $\mu$ l (DNA 0.36  $\mu$ g) 大腿動脈内に直接投与した. 10 分間血流を遮断した後, アロンアルファ (三 共) で血管の穴をふさぎ, 血流を再開させた. 48 時間後, 血管 1 cm と footpad の腫瘍を 回収し, BSS(-) で懸濁し細切した後, 凍結融解を 3 回繰り返した. 遠心にて細胞を沈殿 させ, 上清に含まれる TNF- $\alpha$  の量を ELISA 法で測定した.

#### 実験結果および考察

ヒト TNF-*a* 発現プラスミッド pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを BAEC に作 用させたところ,培養上清中には BAEC より分泌された TNF-*a* が認められ,その累積 産生量は細胞 10<sup>6</sup> 個あたり 1 週間で 381 pg に達した (Fig.24). TNF-*a* の 24 時間あたりの 最高発現量は,遺伝子導入 24 時間後から 48 時間後までの間の 116 pg/10<sup>6</sup> 細胞であった.

次に、マウスの in vivo の血管内皮細胞への遺伝子導入について検討するため、footpad に S-180 細胞を移植し、footpad の厚さが 5 mm 以上に達した 7 日後に pCATNF2 封入膜 融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内に投与した (Fig.25). in vitro で BAEC に遺伝子導入したときに最高の TNF-a の産生を示した 48 時間後に膜融合リポソームを 投与した血管 (1 cm),およびその下流に移植されている S-180 細胞を回収し、TNF-a の 発現を調べた (Table 8). その結果、血管において 370.3 pg もの TNF-a の産生が認めら れ、膜融合リポソームを用いることによってマウスの大腿動脈血管内皮細胞への直接の遺 伝子導入が可能であった. これは膜融合リポソームが、短時間の細胞との接触によっても 十分な遺伝子導入ができるという性質 (Fig.20)を反映したものと考えられた. また、 TNF-a の発現は footpad に移植された腫瘍部位においても認められ (68.9 pg)、腫瘍支配 動脈である大腿動脈から投与された膜融合リポソームは、一部腫瘍部位まで到達し、遺伝 子を導入したものと考えられた. 腫瘍部位の血管は正常組織の血管に比べ高い透過性を示 すことが知られているが<sup>118-121)</sup>、リポソームが透過できるほどではないため<sup>46)</sup>、腫瘍部 位における遺伝子発現は主に腫瘍血管内皮細胞によって産生されたものと考えられた. な お、マウスの血中にはヒト TNF-a は認められなかった (データーは示さず).



Fig.24 TNF- $\alpha$  production from cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) transfected by fusogenic liposomes containing pCATNF2

Cultured BAEC were incubated with fusogenic liposomes containing pCATNF2 with OD<sub>540</sub> of 0.25 at 37 °C for 90 min. Medium was recovered every 24 h, and the amount of TNF- $\alpha$  was measured by ELISA. Data was expressed as total TNF- $\alpha$  production. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.



Fig.25 Diagram of the introduction of hTNF- $\alpha$  gene into the mouse artery controlling tumors

Table 8.	In vivo expre	ssion of hum	an TNF-α i	n the artery	vessels and	tumors of
the mous	se after direct	transfection	of fusogen	ic liposome	s containing	pCATNF2

	Human TNF- $\alpha$ production
artery vessels (pg/cm vessels)	370.3 ± 134.7
tumor (pg/site)	68.9 ± 19.6

S-180 cells (1 x 10<sup>6</sup> cells) were inoculated into the footpad of ddY mice. On day 7, 30 µl of fusogenic liposomes containing pCATNF2 with OD<sub>540</sub> of 6.0, which contained 0.36 µg of DNA, was injected into the femoral artery using a 27-gauge needle. Blood flow was stopped for 10 min to transfect the artery. After incubation, the needle hole was closed with an adhesive agent and blood flow was restored. Fourty eight hours later, the femoral artery (1 cm) transfected with fusogenic liposomes containing pCATNF2 and S-180 cells were recovered and human TNF- $\alpha$  levels were measured by ELISA. Data represents mean ± S.D. of four experiments.

第二節 膜融合リポソームをマウス大腿動脈内に投与したときの封入物質の体内分布

前節において、pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを腫瘍支配動脈内に投与するこ とによって、血管および腫瘍部位に TNF-*a*の発現がみられることが明らかとなった.そ こで本節では、膜融合リポソームをマウスの大腿動脈から投与後の封入物質の血管内皮細 胞内への局在について、Fluorescein-isothiaonate (FITC)-デキストラン (平均分子量 71,200)を膜融合リポソームに封入し、蛍光顕微鏡観察することによって検討した.また、 pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与後の pCATNF2 の体内分布について調べるため、 各臓器中の pCATNF2 の局在を Polymerase Chain Reaction (PCR) を行うことにより検討 した.

実験材料と方法

(1) FITC-デキストランを封入した膜融合リポソームの大腿動脈内への投与

第一章,第一節に準じた方法で FITC-デキストラン (平均分子量 71,200) (300 mg/ml) (Sigma) を封入した一枚膜リポソームを作製し,不活化センダイウイルスと反応させて膜 融合リポソームを得た.

ddY 雄性マウス(5 週令)の大腿動脈を露出させ、27 ゲージの注射針を用いて、FITC-デキストランを封入した膜融合リポソーム (OD540=6.0)を 30 μl 大腿動脈内に直接投与し た. 10 分間血流を遮断した後、27 ゲージの注射針を用いて BSS(-)を投与することにより 血管内を洗浄し、大腿動脈および大腿静脈部分を回収して包埋剤 (TISSUE-TEK; Miles) に包埋した.液体窒素で組織を凍結した後、クリオスタットで凍結切片を作製し (15 μm), 蛍光顕微鏡により血管への FITC-デキストランの局在を観察した.

(2)PCR による pCATNF2 の体内分布の検討

pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを,第四章,第一節に準じた方法で作製した. ddY 雄性マウス (5 週令) の左脚 footpad に S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を移植し,第四章, 第一節に準じた方法で pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを投与した.48 時間後, 左脚大腿動脈 (1 cm),腫瘍,脳,胸腺,肺,心臓,肝臓,脾臓,腎臓を回収し,20 mM トリス (pH 8.3) / 0.5 % Tween 20 / 1.5 mM MgCl2 / 25 mM KCl / 1 mM EDTA で 10 % ホモ ジネイトを行った.ここにプロテイナーゼ K を 0.1 mg / ml になるように加え,56 ℃ で 2 時間反応させた.95 ℃ で 10 分間反応させることによりプロテイナーゼ K を失活させ, 12,000 rpm,5分間遠心した.上清の DNA をフェノール,フェノール/クロロホルムで 抽出後,エタノール沈殿を行い,DNA 100 ng を PCR 用サンプルとした.

ヒト TNF-*a* の遺伝子増幅のための PCR のプライマーは,次のようにデザインした: ヒト TNF-*a* センスプライマー,5'-ACCTCTCTCTAATCAGCCCTCT-3',アンチセンスプ ライマー,5'-GTTGAGGGTGTCTGAAGGAGG-3'(増幅フラグメントサイズ,585 bp). なお,このプライマーはマウス TNF-*a* とは交差しないことを確認した.PCR は 93 ℃ で 2 分間加熱した後,93 ℃ で1 分間の変性,61 ℃ で1 分間のアニーリング,72 ℃ で1 分 間の増幅反応を 40 サイクル行った.反応終了後,2.0 % アガロースゲル電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで DNA を染色した.



Fig.26 In vivo delivery of FITC-dextran into the artery vesells by intraarterial administration of fusogenic liposomes

Thirty microliter of fusogenic liposomes containing FITC-dextran (Mw. 71,200) with OD<sub>540</sub> of 6.0 was injected into the femoral artery using a 27-gauge needle, and blood flow was stopped for 10 min. Then BSS(-) was injected into the artery to wash free fusogenic liposomes. Tissues were isolated and quick frozen, embedded in O.C.T., sectioned at 15  $\mu$ m, and set onto glass slides. Sections were examined by fluorescent microscopy. Right vesell indicates aorta, and left vesell dose vein.



Fig.27 Tissue distribution of vector DNA after intraarterial administration of fusogenic liposomes containing pCATNF2

Fusogenic liposomes containing pCATNF2 were administrated as described in Table 8. Two days later, each tissue was recovered and treated with 0.1 mg/ml proteinase K, 0.5 % Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 20 mM Tris (pH 8.3) at 56 °C for 2 h, and then at 95 °C for 10 min. Then genomic DNA was prepared by phenol and chloroform extraction. A PCR was performed by using 100 ng genomic DNA for 40 cycles of denaturation (93 °C, 1 min), annealing (62 °C, 1 min), and polymerization (72 °C, 1 min). Samples were analyzed by ethidium bromide staining on a 2.0 % agarose gel.

#### 実験結果および考察

膜融合リポソームをマウス大腿動脈に投与することにより,封入物質が動脈血管内皮細胞に導入されていることを確認するため,FITC-デキストラン(平均分子量71,200)を封入した膜融合リポソームを用いて,血管内へのFITC-デキストランの局在を蛍光顕微鏡で観察した(Fig.26).FITC-デキストラン封入膜融合リポソームを大腿動脈に投与し,動脈および静脈部分の凍結切片を作製したところ,動脈血管内皮細胞にはFITC-デキストランの 蛍光が認められ,膜融合リポソームは確かに封入物質を血管内皮細胞内に導入しているも のと考えられた.一方,静脈血管内皮細胞には全く蛍光が認められず,大腿動脈から投与 された膜融合リポソームは,主に投与部位の血管内皮細胞に融合し,物質導入できるもの と考えられた.

次に、ヒト TNF-a 発現プラスミッド pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを大腿動 脈から投与したときの pCATNF2 の臓器分布を、PCR を行うことにより検討した (Fig.27). 大腿動脈部分においては pCATNF2 の存在を示す 585 bp のバンドが認められ、一部その 下流の footpad に移植された腫瘍部位にも認められた. これは、Table 8 において検討し た血管と腫瘍部位の TNF-a の発現を反映したものであった. 一方、血管と腫瘍部位以外 の正常組織においては、本条件下では全くバンドは認められず、大腿動脈から投与された 膜融合リポソームは、血管とその下流の組織である腫瘍組織に特異的に遺伝子を導入した ものと考えられた. これは、膜融合リポソームが血中で比較的速やかに分解されるために (データーは示さず)、投与された近傍の組織の細胞とは融合できるものの、他の組織の細 胞とは融合することがあまりなかったためと考えられた. また、大腿動脈血管内皮細胞に おける pCATNF2 の存在は、少なくとも投与 16 日後においても確認できた (データーは 示さず).

第三節 腫瘍支配動脈への TNF-a 遺伝子導入による抗腫瘍効果

pCATNF2 を封入した膜融合リポソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内に投与するこ とにより、大腿動脈および footpad に移植された S-180 癌組織の細胞に TNF-a 遺伝子が 導入され、ヒト TNF-a が産生されることが明らかとなった.そこで本章では、産生され た TNF-a によって S-180 細胞の増殖が抑制されるかどうかを検討した.また、TNF-a による腫瘍退縮のメカニズム解明を目的として、抗 CD4、CD8 抗体を投与し、T 細胞が 一部欠損したマウスを用いて、腫瘍増殖抑制効果におよぼす CD4、および CD8 陽性 T 細 胞の関与について検討した.

#### 実験材料と方法

(1)TNF-a 遺伝子導入による S-180 固形癌に対する抗腫瘍効果

pCATNF2を封入した膜融合リポソームを,第四章,第一節に準じた方法で ddY マウスの大腿動脈に投与した. コントロールとして,生食,およびルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2を封入した膜融合リポソームを投与した. また,pCATNF2 封入膜融合リポソームを, S-180 細胞を移植した脚と反対の脚 (右脚)の大腿動脈に投与した場合についても検討した.

腫瘍の増殖を観察するため、3・4 日毎に footpad の厚さを測定し、治療開始前との footpad の厚さの比を求めた.

腫瘍増殖の指標となる footpad の厚さの統計学的な有意差の評価は, Student t-test により行った.

また、マウスの形態写真をサンプル投与20日後に撮影した.

(2) 腫瘍増殖抑制に及ぼす抗ヒト TNF-a 抗体の効果

マウス抗ヒト TNF-*a* 中和抗体 (Genzyme) <sup>122,123)</sup> 0.1 mg を, TNF-*a* 遺伝子封入膜融 合リポソームを投与した日,およびその3日後に腹腔内投与し,腫瘍増殖抑制に及ぼす効 果を観察した.

コントロールとして,抗ヒトインターロイキン6(IL-6)中和抗体(SK2)(中外製薬株式 会社大杉義征先生より供与)<sup>124)</sup>0.1 mg を,腹腔内投与した.

(3) 腫瘍増殖抑制に及ぼすT細胞の影響

ラット抗マウス CD4 抗体 (GK1.5;日本グラクソ株式会社尾籐荘二先生より供与)<sup>125)</sup> 0.5 mg,およびラット抗マウス CD8 抗体 (2.43;国立精神・神経センター山元弘先生より 供与)<sup>126)</sup> 0.5 mg を,TNF-a 遺伝子封入膜融合リポソームを投与する 24 時間前に尾静脈 投与し,腫瘍増殖抑制に及ぼす効果を観察した.抗体投与 24 時間後から少なくとも 10 日 間は,マウスの CD4 および CD8 陽性 T 細胞が消失していることを,フローサイトメー ター (ファルマシア) により確認した.

なお,その他の実験方法については,前節までに記載の操作法に従った.

#### 実験結果および考察

Fig.28 に, footpad に移植した S-180 細胞の増殖に対して, pCATNF2 封入膜融合リポ ソームを腫瘍支配動脈である大腿動脈内へ直接投与したときの影響について検討した結果 を示す. pCATNF2 を封入した膜融合リポソーム投与群では,有意な腫瘍増殖の抑制が観 察され、11匹中4匹は完全に腫瘍が消失した. TNF-a はいくつかの腫瘍において出血壊 死を誘導し,腫瘍を退縮させることが知られているが122,127-130),本実験では出血壊死は 全く認められなかった.従って、本実験における腫瘍の退縮は、TNF-αによる腫瘍血管 内皮細胞への傷害作用のためにもたらされたものではないことが示唆された. また, TNF-a は培養 S-180 細胞への傷害作用を示さなかったことから (データーは示さず), TNF-a による直接の抗腫瘍活性により S-180の退縮が観察されたわけではないことが明 らかとなった. Fig.29 はその時の footpad の腫瘍の様子の写真であり、TNF-a 遺伝子を 投与したマウスは完全に S-180 癌細胞が治癒しているのに対し、コントロールの生食投与 では S-180 癌細胞の増殖のため, footpad が大きく腫れていた. また, 完全治癒を示した マウスに、S-180 細胞を移植していた脚と反対の脚の footpad に S-180 細胞 (1 × 10<sup>6</sup> 個) を再移植しても S-180 細胞は生着せず, S-180 細胞に対する抗腫瘍免疫が誘導されている 可能性が示唆された.一方,コントロールとしてルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2を封入した膜融合リポソームを投与したマウスでは、全く腫瘍増殖の抑制はみら れなかった (Fig.28). このことから、pCATNF2 封入膜融合リポソームの投与によって得 られた腫瘍増殖の抑制は、膜融合リポソーム自身の作用ではなく、遺伝子導入の結果発現 された TNF-a によるものである可能性が考えられた.また,TNF-a が腫瘍上流血管内 皮細胞および腫瘍血管内皮細胞によって産生されることが、抗腫瘍効果の発現に必須であ るかどうかについて検討するため、S-180 細胞を移植した脚と反対の脚の大腿動脈に



Days after tumor inoculation

## Fig. 28 Tumor growth after the direct gene transfer into the femoral artery

S-180 cells (1 x 106 cells) were inoculated into the left footpad of ddY mice. On day 7, 30 µl of fusogenic liposomes containing pCATNF2 (O) with OD540 of 6.0, which contained 0.36  $\mu$ g of DNA, was then injected into the femoral artery controlling tumors using a 27-gauge needle. As a control, mice were treated in the same fashion with an identical quantity of fusogenic liposomes containing pCAL2 (III), which was expression plasmid for firefly luciferase, or saline (▲). Fusogenic liposomes containing pCATNF2 was also injected into the femoral artery of the right legs without tumors (X). Blood flow was stopped for 10 min to transfect the artery. After incubation, the needle hole was closed with an adhesive agent and blood flow was restored. The thickness of footpad was measured every 3 or 4 days to monitor the tumor growth. Each point represents the mean ± S.E. of 11 to 13 mice. Statistical significance compared with saline-control group: \*P<0.0001, \*\*P<0.05.



Fig.29 Photograph of two mice, bearing S-180 cells, injected with saline (A) or with fusogenic liposomes containing pCATNF2 (B) Fusogenic liposomes containing pCATNF2 were injected as described in Table 8. Photographs were taken on day 27.



Days after tumor inoculation

Fig.30 Anti-human TNF- $\alpha$  antibody blocks the anti-tumor effect of fusogenic liposomes containing pCATNF2 Mice were injected i.p. with 0.1 mg of mAb against human TNF- $\alpha$ at day 0 and 3 after the administration of fusogenic liposomes. As a control, mice were treated in the same fashion with an identical quantity of isotype-matched irrelevant antibody (mouse anti-human IL-6; SK2). The thickness of footpad was measured every 4 days to monitor the tumor growth.

○, non-treatment; ■, anti-human TNF- $\alpha$ ; ●, anti-human IL-6 Each point represents the mean ± S.E. of 7 to 9 mice.



Days after tumor inoculation

#### Fig.31 CD4+ and CD8+ T-cell involvement in suppression of S-180 solid tumor by fusogenic liposomes containing pCATNF2

Mice were injected i.v. with 0.5 mg of either anti-CD4 or anti-CD8 mAb on the day before the administration of fusogenic liposomes containing pCATNF2. The thickness of footpad was measured every 4 days to monitor the tumor growth.  $\bigcirc$ , non-treatment;  $\blacksquare$ , anti-CD4;  $\blacktriangle$ , anti-CD8 Each point represents the mean ± S.E. of 6 or 7 mice.

pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与した (Fig.28). しかしながら,このような条件下 では腫瘍増殖の抑制は観察されず,抗腫瘍効果発現には,TNF-a が腫瘍支配動脈および 腫瘍組織の細胞に産生される必要があることが明らかとなった.

そこで、pCATNF2 封入膜融合リポソームの抗腫瘍効果が、本当にマウスの in vivo で産 生されたヒト TNF-a によるものであることを明らかにするため、抗ヒト TNF-a 中和抗 体<sup>122,123)</sup> を投与することにより、腫瘍増殖の抑制が消失するかどうかを検討した (Fig.30). その結果、コントロールとして抗ヒト IL-6<sup>124)</sup>中和抗体を投与しても、全く pCATNF2 封 入膜融合リポソームの抗腫瘍効果に影響がなかったのに対し、抗ヒト TNF-a 中和抗体の 投与では、腫瘍増殖抑制効果が完全に消失した. これらの結果から、pCATNF2 封入膜融 合リポソームを、腫瘍支配動脈である大腿動脈内へ直接投与することによって得られた抗 腫瘍効果は、pCATNF2 が腫瘍支配動脈である大腿動脈や腫瘍組織の血管内皮細胞などに 導入され、産生されたヒト TNF-a によりもたらされたものであることが明らかとなった.

次に、本系における腫瘍退縮のメカニズム解明を目的として、宿主のT細胞系の関与 について調べた.マウスに抗マウス CD4 抗体 (GK1.5)<sup>125)</sup>、あるいは抗マウス CD8 抗体 (2.43)<sup>126)</sup>を投与し、それぞれ CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスを用いて、 TNF-a 遺伝子導入による抗腫瘍効果について検討した (Fig.31).その結果、CD4 あるい は CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスでは、完全に TNF-a 遺伝子導入による効果が観察 されなくなった.これらの結果より、遺伝子導入され、産生された TNF-a による S-180 腫瘍増殖の抑制には、宿主の CD4 および CD8 陽性 T 細胞の働きが重要な役割をしてい るものと考えられた.

本実験における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明については今後の重要な研究課題であるが、血管を介して TNF-a 遺伝子を導入し、腫瘍細胞だけではなく腫瘍血管内皮細胞にも TNF-a が作用し得る本システムは、TNF-a 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療において 全く新しい戦略を提示したものと考えられる.

#### 第四節 小括

TNF-*a* は当初,正常細胞を傷害することなく,癌細胞を選択的に傷害する物質として 発見され,その強力な抗腫瘍活性から夢の抗癌剤として注目を集めたサイトカインである <sup>131-133)</sup>.しかしながら,全身投与における TNF-*a* の奏効率は5% 前後と期待を大きく裏 切る結果に終わっている.これは,副作用のために投与量が抗腫瘍効果を期待できる量を はるかに下回っているためと考えられている<sup>127,134,135)</sup>.一方,TNF-*a* の腫瘍内投与や動 注療法などの局所療法では高い奏効率が得られることが明らかとなり<sup>136-141)</sup>,治療効果発 現には TNF-*a* の腫瘍局所における濃度をいかに高めるかが重要な問題となっている.

TNF-*a* 遺伝子を用いて癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に TNF-*a* を発現させる癌の遺伝子 治療は<sup>96-99,106,110), 腫瘍局所における TNF-*a* 濃度を選択的に高め,正常細胞への副作用 を押さえることが期待できることから,癌に対する新しい治療法として期待されている.</sup> しかし、現在までに報告されている TNF-a 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療に関する動物 実験や臨床実験は、遺伝子を in vitro で導入し、その細胞を in vivo に移植する ex vivo の 系で行われている. そのため、実際の臨床においては、ばく大な労力と費用を要すること が予想され、将来的にはより簡便な、in vivo の組織細胞に直接 TNF-a をはじめとするサ イトカイン等の遺伝子を導入する in vivo 遺伝子治療が主流になると考えられる. ところ が、in vivo にすでに生着している癌に対して、直接遺伝子を導入し、治療効果を得たとい う報告は非常に少ない. 著者の検討においても、ddY マウスの腹部皮内に移植された S-180 固形癌に、pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍内投与しても、全く抗腫瘍効果は 得られなかった. 従って、固形癌に対する in vivo 遺伝子治療においては、全く新しい方 向からのアプローチが必要と考えられた. そこで、TNF-a の腫瘍血管内皮細胞への作用 を第一のターゲットとしたアプローチでの検討を行った. すなわち、TNF-a を腫瘍上流 の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞に産生させることによって、TNF-a を挿続的に腫瘍 血管内皮細胞や腫瘍細胞に作用させ、より効率よく免疫系の細胞を活性化させる結果、す でに生着している癌に対しても抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、実験を行った.

まずはじめに, footpad に S-180 細胞を移植したマウスの腫瘍支配動脈である大腿動脈 内に膜融合リポソームを用いて pCATNF2 を導入し, ヒト TNF-*a* を発現させることが可 能かどうかについて検討した. 投与 48 時間後, PCR で解析したところ, 投与部位の大腿 動脈およびそのすぐ下流の組織である腫瘍組織には pCATNF2 の存在が認められ, さらに ヒト TNF-*a* の発現もみられた.

そこで,発現されたヒト TNF-a によって S-180 固形癌の増殖が抑制されるかどうかを 検討した.その結果、pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与したマウスにおいては、顕 著な腫瘍増殖の抑制が認められ、11匹中4匹は腫瘍の完全治癒を示した. コントロール としてルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 を封入した膜融合リポソームを投与した マウスにおいては、腫瘍増殖の抑制が全く認められないこと、pCATNF2 封入膜融合リポ ソームの効果が、抗ヒト TNF-a 中和抗体の投与によって完全に消失したことから、導入 されたヒト TNF-a 遺伝子により発現したヒト TNF-a によって抗腫瘍効果がみられたも のと考えられた. また, TNF-a 遺伝子を S-180 細胞を移植した脚と反応の脚の大腿動脈 に投与しても効果がみられないことから、腫瘍上流および腫瘍組織より TNF-a が持続的 に分泌されることが、腫瘍増殖の抑制には必要であることが明らかとなった. さらに、抗 CD4, CD8 抗体の投与によって, それぞれ CD4, CD8 陽性 T 細胞を消失したマウスにお いて、TNF-a 遺伝子導入による抗腫瘍効果が完全に消失したことから、宿主のT細胞の 働きが腫瘍増殖の抑制には重要な役割を果たしていることが示唆された. また, 腫瘍が 完全に消失したマウスに、S-180細胞を再投与しても腫瘍の生着はみられず、腫瘍免疫反 応が誘導されている可能性が考えられた、本系における腫瘍退縮の詳細なメカニズム解明 については今後の重要な研究課題であるが、腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮 細胞から産生された TNF-a によって, 腫瘍血管内皮細胞上のリンパ球をはじめとする免 疫担当細胞の浸潤を促す接着分子等の発現が上昇し、免疫担当細胞の腫瘍組織への浸潤を 効率よく誘導している可能性が考えられる. さらに、TNF-a は様々な免疫調節作用を有 し、マクロファージ<sup>142-144</sup>), NK (natural killer) 細胞<sup>145)</sup>, 好中球の活性化<sup>146)</sup>, T 細胞の 増殖促進<sup>147)</sup>,リンパ球のインターロイキン2(IL-2)レセプター発現<sup>148)</sup>や癌細胞の MHC

-48-

(major histocompatibility complex) class I 発現増強<sup>149)</sup>,他のサイトカインの誘導<sup>150-154)</sup>, LAK (lymphokine-activated killer cells)<sup>155)</sup>, CTL (cytotoxic T lymphocyte)<sup>156,157)</sup>などの抗 腫瘍エフェクター細胞の誘導を増強することが知られていることから,TNF-*a* は腫瘍組 織に効率よくリクルートした免疫担当細胞の抗腫瘍活性を増強していることが考えられた. これらの結果は,TNF-*a* を腫瘍上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生させ ることによって,TNF-*a* の腫瘍集積性を高め,さらに腫瘍細胞のみならず腫瘍血管内皮 細胞をもターゲットとすることにより,優れた抗腫瘍効果が得られたことを示している. 固形癌の局所にサイトカイン遺伝子を直接投与し,抗腫瘍効果が観察されたという報告は ほとんどないのが現状であり,血管を介して腫瘍組織にサイトカイン遺伝子を導入する本 システムは,固形癌の遺伝子治療に対して全く新しい戦略を提示したものと思われ,今後 の癌遺伝子治療に一つの指針を与えるものと考えられた. 1) 膜融合リポソームの開発とその完全精製

近年の分子細胞生物学の著しい発展により、数多くの疾病の遺伝子レベルでの病因解析 がなされつつあり、それらの疾病に対して、遺伝子のレベルで根本から治療を行う遺伝子 治療が現実味を帯びたものになりつつある.これは薬物治療の観点からみれば、細胞の機 能を遺伝子のレベルで付加・修復させることによって生理活性物質などを産生させ、細胞 による疾病の治療を行うという意味で、いうなれば Cell Therapy ともいうべき新しい概 念による薬物治療法の開発にもつながるものである.

しかし、このような治療法の開発には、細胞内に自由に、効率よく遺伝子をはじめとす る蛋白質、ペプチドなどの高分子物質を導入する技術を開発する必要がある.そこで本研 究では、様々な物質を効率よく細胞内に導入することができるベクターである一枚膜膜融 合リポソームの開発を行った. 膜融合リポソームはセンダイウイルスのエンベロープ蛋白 質を膜表面に有したリポソームであり、センダイウイルスが細胞に感染する際の細胞膜と の融合能をそのまま付与した粒子である.

膜融合リポソームはセンダイウイルスとリポソームを単に 37 ℃ で反応させ、融合させ ることにより作製できる.両者の反応物からの膜融合リポソームの精製は、センダイウイ ルスとリポソームのサイズはほぼ等しいが、比重が異なることを利用し、蔗糖密度勾配遠 心法により行った.精製した膜融合リポソームの平均粒子径は、センダイウイルス(332 nm) とリポソーム (304 nm) が1:1の比で融合したと考えられる 379 nm であり, 電子顕 微鏡で観察すると、その膜表面にはセンダイウイルスのスパイク蛋白質を有していた. 単 独では細胞内に入ることができないが、一分子でも細胞質内に導入されれば細胞を殺すこ とができるジフテリア毒素フラグメント A (DTA) を膜融合リポソームに封入し、その膜 融合能を検討したところ、膜融合リポソームはセンダイウイルスの濃度に換算して 50 HAU/ml (OD540=0.003) 以上の濃度において 100 % 全ての細胞に DTA を導入し、細胞を 死滅させることが可能であった. また, この膜融合能は, センダイウイルスのエンベロー プ蛋白質である HN 蛋白質と F 蛋白質の両蛋白質の活性に依存したものであった. さら に、培養株化細胞や初代培養細胞を用いた実験から、膜融合リポソームはヒト・サル・ウ シ・イヌ・マウス・ラット・ハムスター・ウサギ由来の様々な細胞に対してほぼ同じ効率 で融合できることが判明した. これはセンダイウイルスのレセプターが, シアル酸という 細胞表面に普遍的に存在している物質であることを反映したものと考えられた、調べた限 り唯一の例外は初代ヒトリンパ球であり、約70%の細胞が膜融合リポソームと融合しな かった.

2) DTA 封入膜融合リポソームの癌治療への応用

DTA は単独では細胞内に入ることができないため全く活性を示さないが、一分子でも 細胞内に入ると蛋白合成を阻害し、細胞を殺すことができる強力な毒素であり、DTA を 細胞質内へ送達するための delivery system が開発されれば、強力な抗癌剤となりうるもの と考えられる. 膜融合リポソームは細胞と積極的に結合し, 膜融合により封入物質を直接 細胞質内に導入できることから, それらの目的に最も適したベクターであり, DTA 封入 膜融合リポソームの癌治療への応用について検討した.

DTA 封入膜融合リポソームは、マウスの Sarcoma-180 (S-180) 腹水癌に対して、体重 減少等の副作用を伴うことなく優れた抗腫瘍効果を示し、半数以上のマウスが完全治癒を 示した. このような効果は、空の膜融合リポソームや、DTA を封入した通常のリポソー ムではみられないことから、DTA 封入膜融合リポソームは in vivo の S-180 細胞に対して も融合能を示し、DTA を細胞質内に導入した結果、抗腫瘍活性を発揮したものと考えら れた.

また、マウスの腹部皮内に移植された S-180 固形癌に対しても、DTA 封入膜融合リポ ソームを腫瘍内投与すると顕著な腫瘍増殖の抑制がみられた.通常は細胞に取り込まれる ことのない [<sup>3</sup>H] イヌリンを膜融合リポソームに封入し、S-180 固形癌に腫瘍内投与した ところ、投与量の 7.8 % が S-180 細胞に取り込まれていた.一方、[<sup>3</sup>H] イヌリンを封入し た通常のリポソームではわずか 0.53 % しか S-180 細胞に取り込まれておらず、膜融合リ ポソームは腫瘍内投与により効率よく封入物質を S-180 細胞内に導入できることが判明し た.しかしながら、すべての S-180 細胞に DTA を導入することは不可能なので、腹水癌 の場合と比べ、担癌マウスの高い完全治癒率を得ることはできなかった.

3) 膜融合リポソームの遺伝子導入ベクターとしての利用

膜融合リポソームにルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 を封入し,遺伝子導入ベ クターとしての性質や遺伝子発現効率について,非ウイルスベクターとして広く用いられ ているカチオニックリポソームのリポフェクチンと比較しながら検討を行った. 膜融合リ ポソームは1分間から10分間という短時間の細胞との作用においても高いルシフェラー ゼ活性を示し,高濃度の膜融合リポソーム(OD540=3.0; DNA 6.0 µg/ml)を作用させても 全く細胞傷害性を示さなかった.一方,カチオニックリポソーム・DNA 複合体の場合に は,遺伝子導入には少なくとも30分間の細胞との作用時間を要し,DNA 2.0 µg/ml 以上 の濃度では30%以上の細胞傷害性を示した.これは,カチオニックリポソーム・DNA 複合体が,主にエンドサイトーシスで細胞に取り込まれるために遺伝子導入に時間がかか るのに対し,膜融合リポソームは積極的に細胞に結合し,融合により短時間で遺伝子を導 入できること,またウイルスの膜融合能を利用した生物学的な方法は,カチオニックリポ ソーム・DNA 複合体のような非生物的な方法に比べ,安全で効率が良いことを示してい る.

さらに、カチオニックリポソーム・DNA 複合体は、わずか5%の血清が存在しても99%以上活性を失うのに対し、膜融合リポソームは40%の血清存在化においても血清非存在化のときと比較して70%もの活性を保持していた. このような膜融合リポソームの性質は、in vivoの細胞への直接の遺伝子導入の場合には特に有利になると考えられ、マウスの S-180 腹水癌への遺伝子導入では、膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA 複合体と比較し、1,000 倍以上効率が良かった.

このように、膜融合リポソームはウイルスの膜融合能を利用しているため、カチオニッ

クリポソーム・DNA 複合体と比較して効率よく外来遺伝子を細胞内に導入できることが 明らかとなった.しかも、ウイルスベクターのように導入できる遺伝子の形状、性質につ いての制約はなく、どのような遺伝子でも細胞内に導入することができる.いわば、ウイ ルスベクターと非ウイルスベクターの両者の長所を合わせ持ったハイブリッドなベクター であると言える. 膜融合リポソームは、遺伝子と蛋白質の同時導入など導入遺伝子に様々 な工夫をすることができると考えられることから、その遺伝子治療用ベクターとしての将 来性は非常に高いと思われる.

4) TNF-a 遺伝子を封入した膜融合リポソームの固形癌遺伝子治療への応用

TNF-a は、腫瘍部位局所に集積させることができれば強力な抗腫瘍効果が期待できる ことから、癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球に TNF-a 遺伝子を導入する遺伝子治療が、悪性腫 瘍に対する新しい治療法として注目されている. しかし、現在までに報告されている TNF-a 等のサイトカイン遺伝子を用いた癌の遺伝子治療は、主に ex vivo 遺伝子治療での 検討であり、in vivo 遺伝子治療においては、すでに生着している固形癌の腫瘍内に直接 TNF-a 産生ベクターを投与しても、治療効果を得ることが困難なため、報告例はほとん どないのが現状である. そのため、TNF-a 遺伝子を用いた固形癌に対する in vivo 遺伝 子治療においては新たな戦略が必要と考えられる.

そこで本研究では, i) TNF-a が腫瘍血管内皮細胞に対する特異的な傷害作用を有する こと, ii) TNF-a は腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞に対して ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 等の接着分子の発現を誘導できること, iii) 免疫系の細胞が癌組織に浸潤する ためには,まず腫瘍血管内皮細胞に作用する必要があることに着目し,腫瘍組織上流の血 管および腫瘍血管内皮細胞に TNF-a を発現させ,持続的に腫瘍血管内皮細胞や腫瘍細胞 に TNF-a を作用させれば,効果的な癌治療ができるのではないかと考えた.

ddY マウスの footpad に S-180 細胞を移植し, footpad の厚さが 5 mm 以上に達した 7 日後にヒト TNF-a 発現プラスミッド pCATNF2 封入膜融合リポソームを腫瘍支配動脈で ある大腿動脈内に投与した.その結果,投与 2 日目において大腿動脈,および腫瘍部位に TNF-a の発現が認められた.そこで腫瘍増殖に及ぼす効果を調べたところ,pCATNF2 封入膜融合リポソームの投与群では顕著な S-180 の退縮がみられた.一方,コントロール として投与したルシフェラーゼ発現プラスミッド pCAL2 を封入した膜融合リポソームで は全く S-180 の増殖に影響はみられなかった.また,footpad に S-180 を移植した脚の反 対の脚の大腿動脈に pCATNF2 封入膜融合リポソームを投与しても,S-180 の増殖に影響 がみられないことより,腫瘍支配動脈や腫瘍組織の細胞によって TNF-a が産生されなけ れば,抗腫瘍効果は現れないことが明らかとなった.さらに,pCATNF2 封入膜融合リポ ソームの抗腫瘍効果は、抗ヒト TNF-a 中和抗体,および抗マウス CD4, CD8 抗体の投 与によって消失したことから,この効果は確かに遺伝子導入の結果産生された TNF-a に よりもたらされたものであり,腫瘍の退縮には宿主のT 細胞の働きが重要な役割を果た していることが明らかとなった.

このように、TNF-a を腫瘍組織上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内皮細胞から産生させることによって、in vivo 遺伝子治療による固形癌の治療が可能となった. 腫瘍血管内皮細

胞をもターゲットとする本アプローチは,固形癌に対する in vivo 遺伝子治療に対して全 く新しい方法論を提示できたものと思われ,今後の癌遺伝子治療に一つの指針を与えるも のと考えられた.

### 結論

センダイウイルスの膜融合能を利用した膜融合リポソームを開発し、以下の結論を得た.

1. センダイウイルスと一枚膜リポソームを融合させることにより、センダイウイルスの エンベロープ蛋白質を膜表面に有した膜融合リポソームを作製し、その完全精製に成功した.

3. ジフテリア毒素フラグメントAを封入した膜融合リポソームは,Sarcoma-180 腹水癌, 固形癌に対して副作用を伴うことなく優れた抗腫瘍効果を示した.これは,毒素蛋白質を 用いた新しい癌治療の方法論を提示するとともに,膜融合リポソームが局所への drug delivery のための優れたベクターとなりうることが示唆された.

4. プラスミッド DNA を封入した膜融合リポソームは、非ウイルスベクターとして広く 用いられているカチオニックリポソームのリポフェクチンと比較して、短時間での遺伝子 導入、高い遺伝子発現効率、低い細胞傷害性および血清存在化でも遺伝子導入が可能とい った特徴を有していた. これらの性質を反映して、in vivo の細胞への直接の遺伝子導入に おいては、膜融合リポソームはカチオニックリポソーム・DNA 複合体と比較して、1,000 倍以上の効率を示し、特に in vivo 遺伝子治療のための優れたベクターであると考えられ た.

5. ヒト Tumor Necrosis Factor-a (TNF-a)遺伝子を封入した膜融合リポソームを腫瘍 支配動脈内に投与したところ,投与部位の血管および腫瘍部位に TNF-a の発現が観察さ れ,腫瘍の増殖は顕著に抑制された.これは腫瘍組織の上流の血管内皮細胞や腫瘍血管内 皮細胞より絶えず分泌される TNF-a によって抗腫瘍効果が観察されたことを示しており, 固形癌に対する in vivo 遺伝子治療において全く新しい方法論を提示できたものと考えら れた.

以上,効率の良い細胞内への物質運搬体である膜融合リポソームを開発し,蛋白質や遺 伝子導入ベクターとしての有用性を明らかとした.

### 謝辞

稿を終えるにあたり,終始暖かい御指導,御鞭撻を賜りました恩師,大阪大学薬学部教 授,真弓忠範先生に衷心より深甚なる謝意を表します.

また、本研究にあたり、種々御指導と御助言を頂きました大阪大学微生物病研究所助教授、中西真人先生に深謝いたします.

さらに,種々の貴重な御助言を賜りました大阪大学薬学部講師,中川晋作先生,大阪大 学薬学部助手,久保一義先生,堤康央先生,ならびに大阪大学微生物病研究所教授,上田 重晴先生に感謝いたします.

また, 膜融合リポソームの電子顕微鏡写真の撮影と解析に関し御協力と御指導を頂きま した名古屋大学医学部千田隆夫先生, 粒子径の測定に関し御協力と御指導を頂きました京 都大学工学部砂本順三先生, PCR に関して御指導下さいました大阪大学薬学部伊藤徳夫 先生, 各種遺伝子工学的技術に関して御助言を頂きました大阪大学薬学部土井健史先生, DTA 封入膜融合リポソームを投与したマウスの病理組織観察に関し御協力と御指導を頂 きました大日本製薬株式会社藤井敏彦先生, 安場正子先生, 抗マウス CD8 抗体 (2.43)を 御供与頂き, 有益なる御指導を頂きました国立精神・神経センター山元弘先生に感謝いた します.

さらに、ヒトTNF-a cDNA を御供与頂きました大日本製薬株式会社山田正明先生、ヒト肝癌 Hep G2 細胞を御供与頂きました大阪大学薬学部西原力先生、今川正良先生、ヒト大動脈血管内皮細胞を御供与頂きましたクラボウ株式会社、抗マウス CD4 抗体 (GK1.5)を御供与頂きました日本グラクソ株式会社尾籐荘二先生、抗ヒト IL-6 抗体 (SK2) 御供与頂きました中外製薬株式会社大杉義征先生に感謝いたします.

また、本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました芦原賢一修士、中西剛修士、中川 哲彦修士、近藤昌夫修士、今津進学士、森岡裕香学士をはじめとする大阪大学薬学部薬剤 学教室の皆様に感謝いたします.

**最後に,本研究に対して御援助を頂きました日本学術振興会に深謝いたします.** 

## 参考文献

- Kundrot, C. E., Spangler, E. A., Kendall, D. A., Macdonald, R. C., and Macdonald, R. I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1608-1612, 1983.
- Nakanishi, M., Uchida, T., Sugawa, H., Ishiura, M., and Okada, Y. Exp. Cell Res., 159, 399-409, 1985.
- 3) Citovsky, V., and Loyter, A. J. Biol. Chem., 260, 12072-12077, 1985.
- 4) Klappe, K., Wilschut, J., Nir, S., and Hoekstra, D. Biochemistry, 25, 8252-8260, 1986.
- 5) Nakanishi, M., and Okada, Y. In Liposome Technology, G. Gregoriadis (eds), pp 249-260, CRC Press, USA, 1993.
- 6) Okada, Y. Curr. To. Membr. Transp., 32, 297-336, 1988.
- 7) Uchida, T., Kim, J., Yamaizumi, M., Miyake, Y., and Okada, Y. J. Cell Biol., 80, 10-20, 1979.
- 8) Bangham, A. D., Standish, M., and Watkins, J. C. J. Mol. Biol., 13, 238-252, 1965.
- Kato, K., Nakanishi, M., Kaneda, Y., Uchida, T., and Okada, Y. J. Biol. Chem., 266, 3361-3364, 1991.
- 10) Kato, K., Kaneda, Y., Sakurai, M. Nakanishi, M., and Okada, Y. J. Biol. Chem., 266, 22071-22074, 1991.
- Tomita, N., Higaki, J., Morishita, R., Kato, K., Mikami, H., Kaneda, Y., and Ogihara, T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 186, 129-134, 1992.
- 12) Kato, K., Dohi, Y., Yoneda, Y., Yamamura, K., Okada, Y., and Nakanishi, M. Biochim. Biophys. Acta., 1183, 283-290, 1993.
- Derksen, J. T. P., Morselt, H. W. M., and Scherphof, G. L. Biochim. Biophys. Acta., 971, 127-136, 1988.
- 14) Szoka, F., and Papahadjopoulos, D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194-4198, 1978.
- Nakanishi, M., Ashihara, K., Senda, T., Kondo, T., Kato, K., and Mayumi, T. In Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery, V. H. L. Lee, M. Hashida and Y. Mizushima (eds), pp 337-349, Harwood Academic Publishers gmbh, Netherlands, 1995.
- Potier, M., Mameli, L., Bélisle, M., Dallaire, L., and MelanÇon, S. B. Anal. Biochem., 94, 287-296, 1979.
- 17) White, J., and Helenius, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3273-3277, 1980.
- 18) Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., and Okada, Y. Cell, 15, 245-250, 1978.
- 19) Uchida, T. In Molecular Action of Toxins and Viruses, P. Cohen and S. V. Heyningen (eds), pp. 1-31, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982.
- 20) Ozawa, M., Asano, A., and Okada, Y. FEBS Lett., 70, 145-149, 1976.
- 21) Ozawa, M., Asano, A., and Okada, Y. J. Biochem., 86, 1361-1369, 1979.
- 22) Shimizu, K., and Ishida, N. Virology, 67, 427-437, 1975.
- 23) Boyum, A. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 97, 91-106, 1968.

- 24) Ting, A., and Morris, P. J. Vox. Sang, 20, 561-563, 1971.
- 25) Hsu, M-C., Scheid, A., and Choppin., P. W. Virology, 95, 476-491, 1979.
- 26) Asano, K., Murachi, T., and Asano, A. J. Biochem., 93, 733-741, 1983.
- Markwell, M. A. K., Svennerholm, L., and Paulson, J. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 5406-5410, 1981.
- 28) Suzuki, Y., Suzuki, T., and Matsumoto, M. J. Biochem., 93, 1621-1633, 1983.
- Suzuki, Y., Harada, M., Suzuki, T., and Matsumoto, M. J. Biochem., 95, 1193-1200, 1984.
- Markwell, M. A. K., Fredman, P. H., and Svennerholm, L. Biochim. Biophys. Acta., 775, 7-16, 1984.
- Markwell, M. A. K., Moss, J., Hom, B. E., Fredman, P. H., and Svennerholm, L. Virology, 155, 356-364, 1986.
- 32) Uchida, T., Miyake, Y., Yamaizumi, M., Mekada, E., and Okada, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 87, 371-379, 1979.
- 33) Ozawa, M., and Asano, A. J. Biol. Chem., 250, 5954-5956, 1981.
- 34) Gitman, A. G., and Loyter, A. J. Biol. Chem., 259, 9813-9820, 1984.
- 35) Keneda, Y., Uchida, T., Kim, J., Ishiura, M., and Okada, Y. Exp. Cell Res., 173, 56-69, 1987.
- 36) Keneda, Y., Iwai, K., and Uchida, T. Science, 243, 375-378, 1989.
- 37) Bagai, S., Puri, A., Blumenthal, R., and Sarkar, D. P. J. Virol., 67, 3312-3318, 1993.
- 38) Lapidot, M., and Loyter, A. Exp. Cell Res., 189, 241-246, 1990.
- Could-Fogerite, S., Mazurkiewicz, J. E., Raska Jr., K., Voelkerding, K., Lehman, J. M., and Mannino, R. J. Gene, 84, 429-438, 1989.
- 40) Bagai, S., and Sarkar, D. P. FEBS Lett., 353, 332-336, 1994.
- 41) Wang, C-Y., and Huang, L. Biochemistry, 28, 9508-9514, 1989.
- 42) Collins, D., Litzinger, D. C., and Huang, L. Biochim. Biophys. Acta., 1025, 234-242, 1990.
- 43) Litzinger, D. C., and Huang, L. Biochim. Biophys. Acta., 1113, 201-227, 1992.
- 44) Tari, A. M., Fuller, N., Boni, L. T., Collins, D., Rand, P., and Huang, L. Biochim. Biophys. Acta., 1192, 253-262, 1994.
- 45) Wright, S., and Huang, L. Adv. Drug Deliv. Rev., 3, 343-389, 1989.
- 46) Suzuki, S., Ohta, S., Takashio, K., Nitanai, H., and Hashimoto, Y. Int. J. Cancer., 46, 1095-1100, 1990.
- 47) Thorpe, P. E., Ross, W. C. J., Cumber, A. J., Hinson, C. A., Edwards, D. C., and Davies, A. J. S. Nature, 271, 752-755, 1978.
- 48) Blythman, H. E., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Jansen, F. K., Paolucci, F., Pau, B., and Vidal, H. Nature, 290, 145-146, 1981.
- 49) Trowbridge, I. S., and Domingo, D. L. Nature, 294, 171-173, 1981.
- 50) Krolick, K. A., Uhr, J. W., and Vitetta, E. S. Nature, 295, 604-605, 1982.
- 51) Wawrzynczak, E. J. Br. J. Cancer, 64, 624-630, 1991.

- 52) Colombatti, M., Arciprete, L. D., Chignola, R., and Tridente, G. Cancer Res., 50, 1385-1391, 1990.
- 53) Carroll, S. F., and Collier, R. J. Methods in Enzymol., 165, 218-225, 1988.
- 54) Takamatsu, K., Uchida, T., and Okada, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 134, 1015-1021, 1986.
- 55) Crooke, S. T. In Mitomycin C: Current Status and New Developments, S. K. Carter and S. T. Crooke (eds.), pp. 1-4, Academic Press, New York, 1979.
- 56) Bonhomme, L., Mathieu, M. C., Amdidouche, D., Faure, E., Guisteau, D., Fredj, G., and Naveau, S. Anti-Cancer Drugs, 3, 261-266, 1992.
- 57) Honda, K., Satomura, K., Hashida, M. and Sezaki, H. Jpn. J. Cancer Chemother. (Tokyo), 12 (Part 1), 530-535, 1985.
- 58) Maeda, H., Seymour, L. W., and Miyamoto, Y. Bioconjugate Chem., 3, 351-334, 1992.
- 59) Dehouck, M-P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J-C., and Cecchelli, R. J. Neurochem., 54, 1798-1801, 1990.
- 60) Crystal, R. G. Nature Med., 1, 15-17, 1995.
- 61) Friedmann, T. Science, 244, 1275-1281, 1989.
- 62) Miller, A. D. Nature, 357, 455-460, 1992.
- 63) Mulligan, R. C. Science, 260, 926-932, 1993.
- 64) Wilson, J. M. Nature, 365, 691-692, 1993.
- 65) Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 7413-7417, 1987.
- 66) deWet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. Mol. Cell. Biol., 7, 725-737, 1987.
- 67) Kondo, T., Yoshida, T., Miura, N., and Nakanishi, M. J. Biol. Chem., 268, 21924-21930, 1993.
- 68) Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. Gene, 108, 193-200, 1991.
- 69) Kunkel, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 488-492, 1985.
- Sanger, F., Niklen, S., and Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463-5467, 1977.
- 71) Hinegardner, R. T. Anal. Biochem., 39, 197-201, 1971.
- 72) Gao, X., and Huang, L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 280-285, 1991.
- 73) Mosmann, T. J. Immunol. Methods., 65, 55-63, 1983.
- 74) Legendre, J-Y., and Szoka Jr., F. C. Pharm. Res., 9, 1235-1242, 1992.
- 75) Farhood, H., Gao, X., Son, K., Yang, Y., Lazo, J. S., Huang, L., Barsoum, J., Bottega, R., and Epand, R. M. Ann. N.Y. Acad. Sci., 716, 23-35, 1993.
- 76) Farhood, H., Serbina, N., and Huang, L. Biochim. Biophys. Acta., 1235, 289-295, 1995.
- 77) Wrobel, I., and Collins, D. Biochim. Biophys. Acta., 1235, 296-304, 1995.

- 78) Zabner, J., Fasbender, Al. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., and Welsh, M. J. J. Biol. Chem., 270, 18997-19007, 1995.
- 79) Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. Nature, 313, 812-815, 1985.
- 80) Mecsas, J., and Sugden, B. Ann. Rev. Cell Biol., 3, 87-108, 1987.
- Sarver, N., Gruss, P., Law, M. -F., Khoury, G., and Howley, P. M. Mol. Cell. Biol., 1, 486-496, 1981.
- Dimaio, D., Treisman, R., and Maniatis, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 4030-4034, 1982.
- Ohe, Y., Zhao, D., Saijo, N., and Podack, E. R. Human Gene Ther., 6, 325-333, 1995.
- Tsui, L. -C., Breitman, M. L., Siminovitch, L., and Buchwald, M. Cell, 30, 499-508, 1982.
- 85) Milanesi, G., Barbanti-Brodano, G., Negrini, M., Lee, D., Corallini, A., Caputo, A., Grossi, M. P., and Ricciardi, R. P. Mol. Cell. Biol., 4, 1551-1560, 1984.
- 86) Cooper, M. J., and Miron, S. Human Gene Ther., 4, 557-566, 1993.
- 87) Yamaizumi, M., Horwich, A. L., and Ruddle, F. H. Mol. Cell. Biol., 3, 511-522, 1983.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A., and Fuerst, T. R. Nature, 348, 91-92, 1990.
- 89) Gao, X., and Huang, L. Nucleic Acids Res., 21, 2867-2872, 1993.
- 90) Gao, X., Jaffurs, D., Robbins, P. D., and Huang, L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 1201-1206, 1994.
- 91) Chen, X, Li, Y., Xiong, K., and Wagner, T. E. Nucleic Acids Res., 22, 2114-2120, 1994.
- 92) Foa, R., Guarini, A., Cignetti, A., Cronin, K., Rosenthal, F., and Gansbacher, B. Nat. Immunol., 13, 65-75, 1994.
- 93) Vile, R., and Russell, S. J. Gene Therapy, 1, 88-98, 1994.
- 94) Watanabe, Y., Kuribayashi, K., Miyatake, S., Nishihara, K., Nakayama, E. I., Taniyama, T., and Sakata, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9456-9460, 1989.
- 95) Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., and Gilboa, E. J. Exp. Med., 172, 1217-1224, 1990.
- 96) Karp, S.E., Farber, A., Salo, J. C., Hwu, P., Jaffe, G., Asher, A. L., Shiloni, E., Restifo, N. P., Mule, J. J., and Rosenberg, S. A. J. Immunol., 150, 896-908, 1990.
- 97) Asher, A. L., Mule, J. J., Kasid, A., Restifo, N. P., Salo, J. C., Reichert, C. M., Jaffe, G., Fendly, B., Kriegler, M., and Rosenberg, S. A. J. Immunol., 146, 3227-3234, 1991.
- 98) Blankenstein, T., Qin, Z., Uberla, K., Muller, W., Rosen, H., Volk, H-D, and Diamantstein, T. J. Exp. Med., 173, 1047-1052, 1991.
- 99) Teng, M. N., Park, B. H., Koeppen, H. K. W., Tracey, K. J., Fendly, B. M., and Schreiber, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3535-3539, 1991.
- 100) Golumbek, P. T., Lazenby, A. J., Levitsky, H. I., Jaffee, L. M., Karasuyama, H., Baker, M., and Pardoll, D. M. Science, 254, 713-716, 1991.

- 101) Hock, H., Dorsch, M., Diamantstein, T., and Blanckenstein, T. J. Exp. Med., 174, 1191-1298, 1991.
- 102) Colombo, M. P., Ferrari, G., Stoppacciaro, A., Parenza, M., Rodolfo, M., Mavilio, F., and Parmiani, G. J. Exp. Med., 173, 889-897, 1991.
- 103) Porgador, A., Tzehoval, E., Katz, A., Vadai, E., Revel, M., Feldman, M., and Eisenbach, L. Cancer Res., 52, 3679-3686, 1992.
- 104) Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539-3543, 1993.
- 105) Connor, J., Bannerji, R., Saito, S., Heston, W., Fair, W., and Gilboa, E. J. Exp. Med., 177, 1127-1134, 1993.
- 106) Marincola, F. M., Ettinghausen, S., Cohen, P. A., Cheshire, L. B., Restifo, N. P., Mule, J. J., and Rosenberg, S. A. J. Immunol., 152, 3501-3513, 1994.
- 107) Sun, W. H., Burkholder, J. K., Sun, J., Cuip, J., Turner, J., Lu, X. G., Pugh, T. D., Ershler, W. B., and Yang, N-S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2889-2893, 1995.
- 108) Yang, N-S., and Sun, W. H. Nature Med., 1, 481-483, 1995.
- 109) Chen, S-H, Li Chen, X. H., Wang, Y., Kosai, K-I, Finegold, M. J., Rich, S. S., and Woo, S. L. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2577-2581, 1995.
- Hwu, P., Yannelli, J., Kriegler, M., Anderson, W. F., Perez, C., Chiang, Y., Schwarz,
   S., Cowherd, R., Delgado, C., Mule, J., and Rosenberg, S. A. J. Immunol., 150, 4104-4115, 1993.
- Umeno, H., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, N., Okamoto, T., and Niitsu, Y. Jpn. J. Cancer Res., 85, 325-330, 1994.
- 112) Nawroth, P. P., and Stern, D. M. J. Exp. Med., 163, 740-745, 1986.
- 113) Shimomura, K., Manda, T., Mukumoto, S., Kobayashi, K., Nakano, K., and Mori, J. Int. J. Cancer, 41, 243-247, 1988.
- 114) Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, H., Kuriyama, H., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M., and Urushizaki, I. Cancer Res., 48, 2179-2183, 1988.
- 115) Renard, N., Lienard, D., Lespagnard, L., Eggermont, A., Heimann, R., and Lejeune,F. Int. J. Cancer, 57, 656-663, 1994.
- 116) Yamada, M., Furutani, Y., Notake, M., Yamagishi, J., Yamayoshi, M., Fukui, T., Nomura, H., Komiya, M., Kuwashima, J., Nakano, K., Sohmura, Y., and Nakamura, S. J. Biotech., 3, 141-153, 1985.
- 117) Flick, D. A., and Gifford, G. E. J. Immunol. Methods, 68, 167-175, 1984.
- 118) Dvorak, H. F., Harvey, V. S., and McDonagh, J. Cancer Res., 44, 3348-3354, 1974.
- 119) O'Connor, S. W., and Bale, W. F. Cancer Res., 44, 3719-3723, 1984.
- 120) Gerlowski, L. E., and Jain, R. K. Microvasc. Res., 31, 288-305, 1986.
- 121) Maeda, H., Noguchi, Y., Sato, K., and Akaike, T. Jpn. J. Cancer Res., 85, 331-334, 1994.
- 122) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666-3670, 1975.

- 123) Aggarwal, B. B., Henel, W. J., Moffat, B., Kohr, W. J., and Harkins, R. N. J. Biol. Chem., 260, 2335-2344, 1985.
- 124) Ohe, Y., Podack, E. R., Olsen, K. J., Miyahara, Y., Miura, K., Saito, H., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Ohira, T., Nishio, K., and Saijo, N. Br. J. Cancer, 67, 939-944, 1993.
- 125) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M., and Fitch, F. W. J. Immunol., 131, 2445-2451, 1983.
- 126) Sarmiento, M., Glasebrook, A. L., and Fitch, F. W. J. Immunol., 125, 2665-2672, 1980.
- 127) Asher, A. L., Mule, J. J., Reichert, C. M., Shiloni, E., and Rosenberg, S. A. J. Immunol., 138, 963-974, 1987.
- 128) Helson, L., Helson, C., and Green, S. Exp. Cell. Biol., 47, 53-60, 1979.
- 129) Haranaka, K., Satomi, N., and Sakurai, A. Int. J. Cancer, 34, 263-267, 1984.
- 130) Creasey, A. A., Reynolds, M. T., and Laird, W. Cancer Res., 46, 5687-5690, 1986.
- 131) Helson, L., Green, S., Carswell, E., and Old, J. L., Nature, 258, 731-732, 1975.
- 132) Haranaka, K., and Satomi, N. Jpn. J. Exp. Med., 51, 191-194, 1981.
- 133) Ruff, M. R., and Gifford, G. E. Infect. Immunol., 31, 380-385, 1981.
- 134) Palladino, M. A., Jr. Shalaby, M. R., Kramer, M., Ferraiolo, B. L., Baughman, R. A., Deleo, A. H., Crase, D., Marifino, B., Aggarwal, B. B., Figari, I. S., Liggitt, D., and Patton, J. S. J. Immunol., 138, 4023-4032, 1987.
- 135) Havell, E. A., Fiers, W., and North, R. J. J. Exp. Med., 167, 1067-1085, 1988.
- 136) Pfreundschuh, M. G., Steinmetz, H. T., Tuschen, R., Schenk, V., Diehl, V., and Schaadt, M. Eur. J. Cancer. Clin. Oncol, 25, 379-388, 1989.
- 137) Bartsch, H. H., Pfiuenmaier, K., Schroeder, M., and Nagel, G. Eur. J. Cancer. Clin. Oncol, 25, 287-291, 1989.
- 138) Taguchi, T. In Tumor necrosis factor, B. Bonavida and G. Grenger (eds), pp213-221, Karger, USA, 1990.
- 139) Van Der Schelling, G. P., Ijzermans, J. N. M., Kok, T. C., Scheringa, M., Marquet, R. L., Splinter, T. A., and Jeekel, J. Eur. J. Cancer, 28A, 1073-1078, 1992.
- 140) Yoshida, J., Wakabayashi, T., Mizuno, M., Sugita, K., Yoshida, T., Hori, S., Mori, T., Sato, T., Karashima, A., Kurisu, K, Kiya, K., and Uozumi, T. J. Neurosurg., 77, 78-83, 1992.
- 141) Watanabe, N., Yamauchi, N., Maeda, M., Neda, H., Tsuji, Y., Okamoto, T., Tsuji, N., Akiyama, S., Sasaki, H., and Niitsu, Y. Oncology, 51, 360-365, 1994.
- 142) Philip, R., and Epstein, L. Nature, 323, 86-89, 1986.
- 143) Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugerman, B. J., and Schreiber, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5233-5237, 1986.
- 144) Talmadge, J. E., Phillips, H., Schneider, M., Rowe, T., Pennington, R., Bowersox, O., and Lenz, B. Cancer Res., 48, 544-550, 1988.
- 145) Ostesen, M. E., Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., and Vilcek, J. J. Immunol,

138, 635-640, 1987.

- 146) Shalaby, M. R., Aggarwal, B. B., Rinderknecht, E., Svedersky, L. P., Finkle, B. S., and Palladino, M. A. J. immunol, 135, 2069-2073, 1985.
- 147) Scheurich, P., Thoma, B., Ucer, V., and Pfizenmaier, K. J. Immunol., 138, 1786-1790, 1987.
- 148) Hackett, R. J., Davis, L. S., and Lipsky, P. E. J. Immunol., 140, 2639-2644, 1988.
- 149) Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Schlüter, C., and Krönke, M. J. Immunol., 138, 975-980, 1987.
- 150) Le, J. M., Weinstein, D., Gubler, U., and Vilcek. J. Immunol., 138, 2137-2142, 1987.
- 151) Koeffler, H. P., Gasson, J., Ranyard, J., Souza, L., Shepard, M., and Munker, R. Blood, 70, 55-59, 1987.
- 152) Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., and Koeffler, H. P. Nature, 323, 79-82, 1986.
- 153) Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., Gross, M. A., and Dinarello, C. A. J. Immunol., 140, 840-844, 1988.
- 154) Vandevoorade, V., Haegeman, G., and Fiers, W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 178, 993-1001, 1991.
- 155) Owen-Schaub, L. B., Gutterman, J. U., and Grimm, E. A. Cancer Res., 48, 788-792, 1988.
- 156) Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T., and Palladino, M. A. J. Exp. Med., 166, 991-998, 1987.
- 157) Robinet, E., Branelec, D., Termijtelen, A. M., Blay, J. Y., Gay, F., and Chouaib, S. J. Immunol, 144, 4555-4561, 1990.

