日消外会誌　30（4）：906～909，1997年

特集5

HVJ-liposomeによる生体肝への遺伝子導入の基礎的検討

兵庫医科大学第1外科
平野　公通　　藤元　治朗　　山本　秀尚
植木　孝浩　　王　　孔志　　岡本　英三

HVJ-liposomeを用いてラット生体肝へE. coli β-galactosidase（β-gal）geneを導入し遺伝子導入についての検討を行った．HVJ-liposomeにβ-gal geneを封入し，経門脈群，経門脈導入前部分肝切除を加えた2群に分け導入した．導入後経時的に屠殺し，X-gal染色，RT-PCRにてβ-gal発現を検索した．経門脈投与群においてβ-gal発現は，導入3日後で31.9±11.5%（M±SD）で漸次減少し，28日後では0%であったが，導入前部分肝切除を加えた群では導入後28日でも約20%の発現を認めた．また，RT-PCRにてm-RNAの発現を確認した．HVJ-liposomeによる生体肝細胞への外来遺伝子導入は高率であり，導入前部分肝切除の付加により発現期間を延長し得た．本法は安全かつ高効率であり，遺伝子導入によるmodel動物の作製，およびさまざまな疾患の遺伝子治療への応用が可能である．

Key words: HVJ-liposome, in vivo transfection, liver

はじめに

近年，我が国でも遺伝子治療が開始されたが，臨床面のみならず分子レベルの研究においても高効率で安全な *in vivo* 遺伝子導入法は重要な技術であり，さまざまな遺伝子導入法が開発されている．今回，我々はHemagglutinating Virus of Japan（以下，HVJと略記）の膜融合能[1]を利用したHVJ-liposomeを作製し，成熟ラット生体肝へ情報遺伝子を導入し，安全かつ効果的な *in vivo* における遺伝子導入法確立の基礎的研究を行った．HVJ-liposome法は，DNAと核蛋白質High mobility group 1（以下，HMG-1と略記）を3種の脂質より構成されるliposomeに封入し，HVJのenvelopeをもつliposomeを作製し，HVJの持つ膜融合能を利用して細胞内へ直接遺伝子を導入後，HMG-1の働きにより核内にDNAを到達させ，蛋白質を発現させる[2]．本法により導入される外来遺伝子は宿主DNAに組み込まれないため，その発現は通常一過性であるが，導入前に部分肝切除を行い，発現期間の延長を試みた．この導入法は種々の遺伝子導入によるmodel動物の作製，および癌をはじめとしたさまざまな肝疾患の遺伝子治療への応用が可能である．今回は本法による *in vivo* 遺伝子導入法を中心に述べる．

材料および方法

(1) 実験動物

実験動物はWistar系雄性ラット（5～6週齢）を用いた．ラットは門脈注入群（n=8）と導入前24時間に70%部分切除術を施行し，門脈注入を行った群(n=6)の2群に分け実験に供した．

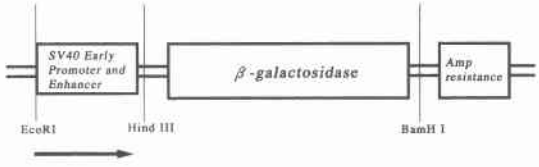
(2) plasmid DNA

本実験ではSV40 promotorを有するE. Coliのβ-galactosidase（以下，β-galと略記）遺伝子（**Fig. 1**）を情報遺伝子として用いた．

(3) HVJ-liposomeの調整

HVJは大阪大学細胞生体工学センター金田安史先生より供与を受け，金田らの方法[3]に準じHVJ-liposomeを調整した．簡単に説明すると，β-gal plas-

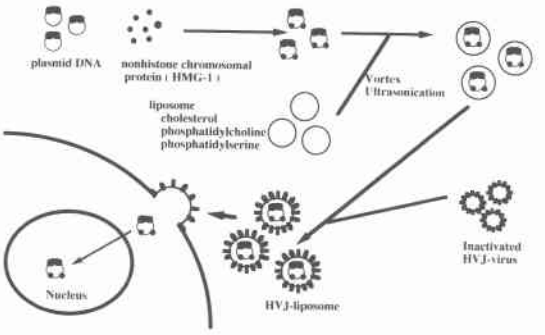
Fig. 1 The pSV-β-Galactosidase gene. The SV40 early promoter and enhancer drive the transcription of the E. coli β-Galactosidase gene.



＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開

＜1996年12月11日受理＞別刷請求先：平野　公通
〒663　西宮市武庫川町1－1　兵庫医科大学第1外科

Fig. 2 Preparation of HVJ-liposome



mid DNA と HMG-1を20°Cで1時間反応させ，これを3種の脂質（phosphatydil choline, phosphatydil seline, cholesterol）より構成される liposome に vortex, sonicator を用いて封入する．これに使用直前に紫外線照射にて感染能を失活させ膜融合能だけを有する HVJ と反応させ，蔗糖密度勾配遠心法にて余分な HVJ を除外し，HVJ-liposome を回収した（**Fig. 2**）．

(4) 成熟ラット生体肝への遺伝子導入

導入の target は肝右葉とし，エーテル吸入麻酔下に開腹し，門脈より β-gal 遺伝子を含む HVJ-liposome を注入した．部分肝切除を付加した群にも同様の手技にて等量の HVI-liposome を導入した．ラットは導入後3，7，28日目に屠殺し，肝を摘出した．また，経時的に尾静脈より血液を採取した．

(5) X-gal 染色

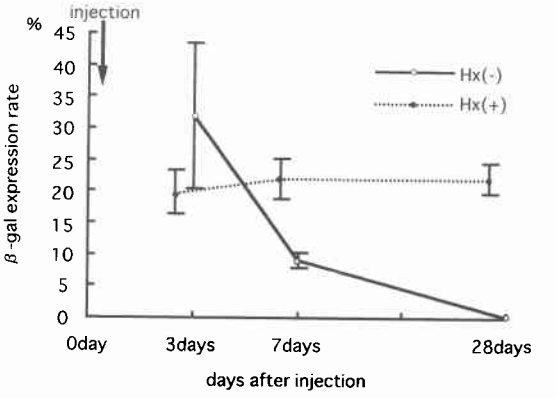
門脈に24G アンギオカットを挿入し，1%glutaraldehyde にて in situ にて固定した後に肝を摘出し，1%glutaraldchyde, 20%sucrose に浸した後，凍結させ cryostat にて5μm に薄切した切片に X-gal 染色を行った．光学顕微鏡100倍率任意の5視野中の染色された肝細胞を count し，導入効率を算出した．

(6) RT-PCR

導入肝細胞中の β-galactosidase の m-RNA 発現を確認するために reverse transcription (RT) PCR を行った．AGPC 法により肝組織より totalRNA を抽出し，20μg/totalRNA を用いて first strand cDNA を作製し，PCR template とした．Primer は β-galactosidase 遺伝子中の247bp の部位の以下の遺伝子配列とした．

5′primer：5′-CTA.CAC.CAA.CGT.AAC.CTA.TCC.C-3′;3′primer:5′-TTC.TCC.GGC.GCG.TAA.AAA.TGC.G-3′．増幅設定条件は，94°C 1分，55°C 1分，40cycles とした[4]．negative control は，PBS のみを注入したラット肝を，positive control は，ヒト肝癌培養細胞 Hepl A に *in vitro* で cathionic liposme を用いて β-gal を遺伝子導入した細胞を用いた．

Fig. 3 Ratio of X-gal stained hepatocytes after transfection. Hx(−) : Gene transfer was performed without hepatectomy, Hx(+) : Gene transfer was performed with hepatectomy.



結　果

(1) X-gal 染色

導入後3日目に屠殺したラットより摘出した肝に X-gal 染色行ったところ，門脈注入群で導入3日後で31.9±11.5%の肝細胞に β-galactosidase の高率な発現を認めた．一方，導入前に部分肝切除を付加した群の発現効率は導入3日後で17.4±3.81%であった．control として PBS を同様の手枝にて注入したラット肝は X-gal 染色にて全く染色されなかった．形態上，肝組織は正常でありリンパ球の著名な浸潤も認めなかった．

(2) 発現効率の経時的推移

部分肝切除を付加しなかった群では β-galactosidase の発現は一過性で徐々に減少し，導入後28日でほぼ0%となった．一方，付加した群では発現効率は減少せず，導入後28日でも約20%の発現が認められた（**Fig. 3**）．

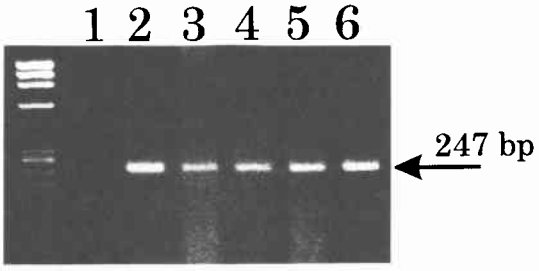
(3) 導入肝組織中の m-RNA 発現

β-galactosidase の m-RNA の導入肝組織中発現を確認するために，導入後3日目のラット肝より totalRNA を抽出した．247bp の m-RNA 発現を認めた（**Fig. 4**）．

考　察

現在までに報告されている生体肝への遺伝子導入方

Fig. 4 E. coli RNA rat liver tissue RNA was isolated from liver tissues and a 247-bp β-Galactocidase specific sequence was amplified by RT-PCR. (lane 1.) : PBS perfused rat liver was used as a negativecontrol. (lane 2, 3.) : Gene transfered viaportal vein without hepatectomy. (lane 4,5.) : Gene transfered with hepatectomy. (lane 6.) : Hep 1A cell line was transfected by cathionic lipid in vitro, as a positive control.



法としてHVJ-liposome以外に，1) カチオニックリポソームを用いた方法[5]，2) アシアロ糖蛋白レセプターを利用した方法[6]，3) レトロウイルスベクターを用いた方法[7]，4) アデノウイルスベクターを用いた方法[8]などがある．1)は正電荷をもつリポソーム表面に負荷電の外来DNAを付着させ，細胞表面は負荷電であるため，これと付着させ，HVJ-liposomeのような融合ではなくエンドサイトーシスにに細胞質へ誘導させるものである．核へ至るまでに一部のDNAは細胞内で処理されることもある．2)は肝のreceptorを利用し，標的細胞にtargettingができ，末梢静脈より導入できる利点を有するが，1)と同様にエンドサイトーシスによる取り込みであるためDNAの崩壊は避けられない．3)は現在，人体に対して最も利用されているベクターであるが，分裂する細胞には宿主DNAに組み込まれ，安定した発現が期待できるものの，肝細胞のように通常ほとんど分裂しない細胞では導入効率は著しく低いことが認められている．また，宿主DNAにどの部分に組み込まれるか特定できないため，将来の発癌の可能性も否めない．4)はアデノウイルスの強い感染力を有し，分裂しない細胞にも導入でき，肝臓においても優れた導入効率の報告がある．しかし，その発現は一過性であり，中和抗体が誘導され，連続投与が不可能なこと，さらにヒトではすでに抗体を持っていることがあり，投与そのものができない可能性がある．HVJはリンパ球以外のあらゆる細胞と融合することができ，HVJ-liposome法を用いて種々の臓器への遺伝子導入が報告されている．肝臓に関しては，ヒトB型肝炎virusの表面抗原遺伝子[9]，ヒトinsulin遺伝子の導入[10]，発現に成功した報告があるが，肝臓での正確な発現効率，発現期間についての報告はなかった．今回，我々はHVJ-liposome法を用いて，ラット生体肝へ情報遺伝子を導入し，この点を中心に検討を行った．HVJはリンパ球以外のあらゆる細胞と融合することができるため，Kupffer細胞をはじめ類洞細胞にもβ-galの発現を認めたが，発現の主体は肝細胞であった．

HVJ-liposomeによる遺伝子導入では外来遺伝子は宿主DNAに組み込まれないため，発現は一過性であったが，部分肝切除が発現期間を延長させたという報告に基づき[11]，導入24時間前に70%部分肝切除を付加したところ，著名な発現期間の延長をみた．この効果の理由は明らかでないが，肝切除により肝細胞のcell cycleが回り出す時に，導入された外来DNAが宿主DNAに組み込まれた可能性も考えられた．

HVJ-liposomeは，発現期間は一過性であるが，*in vivo*での効率も高く，分裂しない細胞にも導入できる．細胞障害も弱く，通常宿主DNAに組み込まれぬため安全性は高い．また，今回はdataを示していないが，本法は免疫原性が低く，生体への反復遺伝子導入が可能であることを我々は確認している．本法は各種動物modelを使っての研究のみならず，将来ヒトへの遺伝子治療への応用の可能性も持っていると考えられる．

なお，本研究にあたり，大阪大学細胞生体工学センター金田安史先生，大阪大学第1外科，澤芳樹先生に深く感謝いたします．

文　献

1) Furusawa M, Nishimura T, Okada Y et al: Injection of foreign substances into single cells by cell fusion. Nature **249**：449—450, 1974
2) Kaneda Y, Iwai K, Uchida T: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. Science **243**：375—378, 1989
3) Kaneda Y, Kato K, Ychida T et al: Introduction of plasmid DNA and nuclear protein into cells by using erythrocyte ghosts, liposomes, and Sendai virus. Methods Enzymol **221**：317—327, 1993
4) Goodman S, Xiao X, Nienhuis AW et al: Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells. Blood **84**：1492—1500, 1994

5) Takahashi H, Fujimoto J, Isselbacher KJ et al: Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes. Proc Natl Acad Sci **92**: 1470—1474, 1995
6) Wu GY, Wu CH: Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. J Biol Chem **263**: 14621—14624, 1988
7) Ferry N, Duplessis O, Heard JM et al: Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. Proc Natl Acad Sci **88**: 8377—8381, 1991
8) Li 1, Kay MA, Woo SLC et al: Assesment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. Hum Gene Ther **4**: 403—409, 1993
9) Kato K, Nakanishi M, Okada Y et al: Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. J Biol Chem **266**: 3361—3364, 1991
10) Kaneda Y, Iwai K, Uchida T: Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. J Biol Chem **264**: 12126—12129, 1989
11) Wu CH, Wilson JM, Wu GY: Targetting genes: Delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. J Biol Chem **264**: 16985—16987, 1989

In Vivo HVJ-Liposome Mediated gene Transfer into Adult Rat Liver

Tadamichi Hirano, Jiro Fujimoto, Hidenao Yamamoto, Takahiro Ueki,
K. Wang and Eizo Okamoto
First Department of Surgery, Hyogo College of Medicine

We examined a simple and highly efficient *in vivo* method of gene transfer into rat hepatocytes using Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) and nuclear protein. The E. coli β-galactosidase (β-gal) gene was encapsulated in liposomes and incubated with HVJ to form vesicle complexes. These vesicle complexes were introduced into the rat liver portal injection. These injection methods were also performed on rats which had undergone partial hepatectomy 24 hrs prior to the injection. In the rats which received portal injection, 31.9 ± 11.5% of the hepatocytes were stained with X-gal. This expression was bardly detectable 28 days after injection. However, in the partially hepatectomyzed rats, more than 20% of hepatocytes expressed β-gal protein 28 days after injection. The transcription of β-gal m-RNA was comfirmed by RT-PCR. We conclude that this gene transfer method is efficient and would facilitate the development of genetic treatments for various liver diseases.

Reprint requests: Tadamichi Hirano First Department of Surgery, Hoogo College of Medicine
1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya-city, 663 JAPAN