

の拡散が少ないという  $\beta$  型インターフェロンの特性によるところが大きい。以上のことを踏まえると、今回我々は進行期腎細胞癌病巣に対する局所注入での遺伝子治療を実施するわけであるから、 $\beta$  型インターフェロン遺伝子を治療遺伝子として選択することは妥当であると考えられる。

## (2) 遺伝子導入に必要なリポソームの開発とその特性

本リポソームは、膜表面が正に荷電している多重膜構造のリポソームであることが最大の特徴であり<sup>14-17</sup>、この点で従来のリポフェクチン法などに用いられるものとは異なる。これによって表面が負に荷電している遺伝子及び細胞との親和性が増し、導入効率の向上と毒性の低下が達成された。なお、本リポソームが細胞表面に接触するとエンドサイトーシスの機序で細胞内へ取り込まれること、リソソームによる破壊は受けにくいこと、遺伝子は主として増殖期の細胞において核内へ移行し、エピゾーマルに発現すること、などが明らかにされている<sup>21</sup>。また、今回用いる多重膜リポソームは一枚膜リポソームに比べ細胞毒性が低く、血清添加下での導入効率の低下も少ないことが示されている<sup>14</sup>。本臨床研究は、上述のように本邦の研究者によって開発、改良されたオリジナルなリポソーム製剤を用いるものであり、その点からも価値ある研究とみなされる。

## (3) 遺伝子導入によるヒト $\beta$ 型インターフェロンの発現

ヒト腎癌細胞に対する *in vitro* 遺伝子導入実験において、 $5.0 \times 10^4$ 個のヒト腎細胞癌株 NC65 細胞を 2ml の培養液で 24 時間培養後、 $0.2 \mu\text{g}$  DNA ( $0.1 \mu\text{g}$  DNA/ml) を含む IAB-1(pSV2IFN  $\beta$ ) で処理し、一定時間後の培養上清中のヒト  $\beta$  型インターフェロン量を ELISA 法にて測定した。処理 24 時間後には上清中に有意なヒト  $\beta$  型インターフェロンの分泌が認められた。その値は 48 時間後に最大値 ( $34.0 \pm 6.8 \text{IU/ml}$ ) となり、少なくとも 4 日目まで有意な分泌の持続が確認された。等張リン酸緩衝液 (PBS)、プラスミド DNA を含まない空のリポソーム (empty liposome) で処理した場合には、上清中にヒト  $\beta$  型インターフェロンの分泌はまったく認められなかった。さらに同じくヒト腎細胞癌株である ACHN 及び本学で樹立した 3 種類の初期腎癌培養細胞 KC1, KC2, KC3 を IAB-1 で処理したところ、全ての細胞株で上清中に有意なヒト  $\beta$  型インターフェロンの分泌が認められた<sup>19</sup>。

この遺伝子発現が一過性であることはヒトグリオーマ培養細胞の系で確認されている。ヌードマウスの脳内移植ヒトグリオーマの系を用いた実験では、IAB-1(pDRSV-IFN  $\beta$ ) 注入 3 日後、腫瘍組織内にはヒト  $\beta$  型インターフェロン mRNA の明らかな発現増強が認められたが、正常組織内への注入では無処理対照組織と同程度の発現しか認められなかった。正常組織に対する影響に関しては、ヒト腎近位尿細管細胞 (RPTEC5899) に対し IAB-1(pSV2IFN  $\beta$ ) 処理を行い検討してみたが、有意なヒト  $\beta$  型インターフェロンの分泌は認められなかった<sup>19</sup>。

なお、本臨床研究では遺伝子製剤を複数回癌病巣内に注入する計画である。我々はグリオーマの系で複数回投与により遺伝子発現効率が高まることを確認しており、悪性黒色腫