

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

# 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川堯夫

平成 14 (2002) 年 4 月

## 目 次

I.	総括研究報告 .....	1
	次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究	
	主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 早川堯夫	
II.	分担研究報告	
	1. 分担研究者 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作 .....	44
	2. 分担研究者 大阪大学 微生物病研究所／産業技術総合研究所 ジーンディスカバリー研究センター 中西真人 .....	62
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	82
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

## 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は、高い安全性を確保し、発現調節能を有した目的遺伝子を、必要な細胞に効率良く導入し、安定に発現させる技術の開発である。

本研究は、安全性が高く、機能面で優れたわが国独自の次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。そのため、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いとされるアデノウイルスベクターの長所（高効率、高タイトターのベクターの調製が可能など）を生かしつつ、1) 搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、2) 標的細胞指向性の制御、3) 抗原性や核内での安定性の欠如などの問題点を克服できる次世代アデノウイルスベクターの開発を目指す。また、膜融合リポソーム等と組み合わせた次世代非ウイルス（ハイブリッド）ベクターの開発に向けた基盤研究として、4) 導入遺伝子を高効率で核内に送達するための技術や、5) 導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発、あるいは6) 細胞質で安定に遺伝情報を発現する系の開発等を行う。

本年度は各課題について以下の結果を得た。

- 1) テトラサイクリンの遺伝子発現制御系を E1・E3 両欠損領域に搭載したアデノウイルスベクターを開発し、tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターが極めて効率良く目的遺伝子の発現を制御できることを明らかにした。一方、tet-on システムによる遺伝子発現制御能は低く、改良が必要と考えられた。
- 2) 標的細胞親和性を制御できる簡便なファイバーミュータントアデノウイルスベクター作製法を開発し、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列をファイバーに有したアデノウイルスベクター (AdRGD) の有用性を明らかにした。自殺遺伝子やサイトカイン・ケモカイン遺伝子を用いた癌遺伝子治療モデル実験で AdRGD の有用性を実証した。また、AdRGD が抗原遺伝子導入樹状細胞による抗癌免疫活性を飛躍的に増大させること、及びそのメカニズムの一部を解明した。一方、native のアデノウイルス受容体の CAR と結合しないベクターの開発にも成功した。
- 3) 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発の第一歩として、相同組換え法により全てのウイルス遺伝子を欠損させた gutless アデノウイルスベクターを作製し、その作製法を最適化した。
- 4) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発として、DNA の核へのターゲティング活性を簡便に測定する系を確立すると共に、透過型電顕を用いて核移行シグナル・ディスプレイ・ファージが粒子の形状を保った状態で核膜孔を通過していることを確認することに成功した。
- 5) 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発として、ヒトテロメア配列結合因子の一つである TRF1 と染色体末端のテロメア配列 (TTAGGG)<sub>n</sub> との相互作用が染色体の安定性を決定しており、細胞の寿命の決定に関わっていることを明らかにした。
- 6) 非ウイルスベクター系において細胞質で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発研究として、天然に存在する持続感染型変異ウイルスのゲノム解析から、その 3' 末端と 5' 末端の塩基配列を確定した。

### 分担研究者

中川 晋作 大阪大学大学院薬学研究科 助教授  
中西 真人 大阪大学微生物病研究所 助教授  
(併任：産業技術総合研究所  
ジーンディスカバリー研究センター  
遺伝子導入チーム 主任研究員)

### 協力研究者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 室長  
水口 裕之 国立医薬品食品衛生研究所 研究員  
石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員  
岡田 直貴 京都薬科大学 助手  
岡田 裕香 武庫川女子大学 助手

## A. 研究目的

本研究は、わが国における遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けて、安全性が高く、機能面で優れた次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。遺伝子治療臨床研究は現在までのところ、必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクターが必要とする要件を十分備えていないことにある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けての最重要課題の一つは、従来のベクターが抱える安全性面、機能面での問題点を克服した新規ベクターを開発することである。ところが、わが国におけるベクター開発は欧米に比べ著しく遅れており、今後の独自のベクター開発の成否如何では、わが国の遺伝子治療分野の進展に重大な影響を及ぼす可能性がある。

既存のベクターの中ではアデノウイルスベクターが遺伝子導入効率において最も優れているとされている。しかし、①作製法の煩雑さ、②搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、③標的細胞指向性の制限、④抗原性、⑤核内での安定性の欠如などが解決すべき重要課題として残されている。そこで本研究では、これらの問題を克服した独自の次世代アデノウイルスベクターの開発を目指した先駆的な取り組みを開始した。

一方、わが国独自に開発が進められている膜融合リポソーム（センダイウイルスの膜融合活性をリポソームに付与した生体膜と融合できるリポソーム）等の非ウイルスベクターは、安全性が高いという特徴を有する。しかし、有用なベクターとして真価を発揮させるためには、導入遺伝子を高効率で核内に送達するための技術や導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発、あるいは細胞質で安定に遺伝情報を発現する系の開発研究などを一層推進し、これらの成果を組み合わせたハイブリッド（次世代非ウイルス）ベクターとして、その活用を目指す必要がある。そこで、上記の個々の問題点を克服でき、飛躍的に遺伝子発現効率を上昇させるための基盤研究を行った。

このような研究により、わが国独自の遺伝子導入技術基盤が開発されれば、導入遺伝子部分を目的に応じて取り換えるだけで様々な応用が可能となることから、わが国における遺伝子治療薬研究のみならず、ゲノム配列解読後の遺伝子機能解析研究の推進にも大いに寄与できる。

本年度は、次世代アデノウイルスベクターの開発

基盤研究として、1. テトラサイクリンの発現制御系をE1・E3 両欠損領域に搭載したアデノウイルスベクターを開発し、その諸性質を明らかにした。2. 標的細胞親和性を制御できるアデノウイルスベクターシステムを開発し、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列をファイバーに有したベクター (AdRGD) の有用性を明らかにした。また、AdRGD を用いた癌遺伝子治療モデル実験に成功した。一方、native のアデノウイルス受容体の CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor) と結合しないベクターの開発にも成功した。3. 安全面を高めた guiless アデノウイルスベクターの作製に成功し、生成条件の最適化について検討した。次世代非ウイルス (ハイブリッド) ベクターの開発に関する研究としては、4. 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発として、DNA の核へのターゲティング活性を簡便に測定する系を確立すると共に、透過型電顕を用いて核移行シグナル・ディスプレイ・フェージが粒子の形状を保った状態で核膜孔を通過していることを確認することに成功した。5. 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化するための技術開発として、ヒトテロメア配列結合因子の一つである TRF1 と染色体末端のテロメア配列 (TTAGGG)<sub>n</sub> との相互作用が染色体の安定性を決定しており、細胞の寿命の決定に関わっていることを明らかにした。6. 非ウイルスベクター系において細胞質で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発研究として、天然に存在する持続感染型変異ウイルスのゲノム解析から、その 3' 末端と 5' 末端の塩基配列を確定した。

## B. 研究方法

### B.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

#### B.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発

##### (1) 発現制御型アデノウイルスベクターの作製

シャトルプラスミド pHM11 に tet-off システムのための転写活性化因子 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を挿入 (CMV プロモーターを使用) して pHM11-TetOff を作製し、Csp45I 処理した pHM11-TetOff をベクタープラスミド pAdHM20 の ClaI 部位に挿入した (Csp45I と ClaI の切断フラグメントは互いに結合できるが再切断はされない)。なお、pHM11 はマルチクローニング部位の両端に Csp45I 部

位を有しており E3 欠損領域への外来遺伝子挿入のためのシャトルプラスミドである (Fig. 1B)。また、pAdHM20 は E1・E3 領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有しており、E1 欠損領域にはユニークな制限酵素部位である I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部位、E3 欠損領域には ClaI 部位を有したアデノウイルスベクター作製のためのベクタープラスミドである (Fig. 1A)。このプラスミド構築の際、ライゲーション産物を ClaI 処理することでセルフ・ライゲーションによる親プラスミドの出現を抑え、目的の組換えプラスミド pAdHM20-TetOff1 を極めて効率良く選択することができた。次に、テトラサイクリン応答性のプロモーター (TRE/CMV) とルシフェラーゼ遺伝子からなるカセット (pHM5-TRE-L の I-CeuI/PI-SceI フラグメント) を E1 欠損領域の I-CeuI と PI-SceI 部位に挿入することで pAdHM20-TetL を得た。pAdHM20-TetL を PacI 処理し、293 細胞にトランスフェクションすることでルシフェラーゼ発現 tet-off アデノウイルスベクター AdOff-L2 を得た (Fig. 1C)。同様に、tTA のかわりに、rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) を E3 欠損領域に挿入したルシフェラーゼ発現 tet-on アデノウイルスベクター AdOn-L2 を得た。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子のかわりにヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) を挿入した tet-off アデノウイルスベクター AdOff-SEAP2、tet-on アデノウイルスベクター AdOn-SEAP2 を作製した。

また、AdOn-L2 および AdOn-SEAP2 の E3 欠損領域に挿入した CMV プロモーターと rtTA 遺伝子の間にイントロン A を挿入したアデノウイルスベクター AdOn-L4 および AdOn-SEAP4 を作製した。イントロン A の配列を付与することで下流の遺伝子の発現を数倍から数十倍上昇させることが期待できる。また、CMV プロモーターの下流にルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子を連結させ、この発現カセットを E1 欠損領域に挿入した従来型アデノウイルスベクター Ad-L2、Ad-SEAP2 を作製した (Table 1)。

#### (2) 培養細胞への遺伝子導入

SK HEP-1、HeLa、ECV304、LN319 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日 AdOff-L2、AdOn-L2、AdOn-L4 あるいは Ad-L2 を 1.5 時間作用させた。種々の濃度のドキシサイクリン存在下で 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (3) マウスへの遺伝子導入

AdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2、AdOn-SEAP4、Ad-SEAP2 ( $1 \times 10^9$  PFU) をマウス (Balb/c, nude, 5 w, female)

の尾静脈内に投与し、経日的に血中 SEAP レベルを測定した。3 日目からはドキシサイクリン (1 mg/ml) 入りの drinking water を与えた。

(4) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による rtTA 発現量の測定

SK HEP-1、HeLa を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日 AdOn-L2 あるいは AdOn-L4 を MOI=100 で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を氷冷したメタノールで 30 分間 (4°C) 固定し、0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4°C, 30 分) に作用させた。PBS で 3 回細胞を洗浄し、anti-VP16 polyclonal antibody (Clontech より入手) (37°C, 2 時間) で処理した。TTBS (0.1% Tween20, 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH7.6) で 3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Chemicon International Inc., Temecula, CA) (37°C, 2 時間) で処理した。細胞を TTBS で 3 回洗浄し、substrate solution (0.1 mg/ml: 3,3',5,5'-tetramethyl benzene dihydrochloride (TMBD) in citrate/ phosphate buffer; 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) で処理した。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えることにより反応を停止させ、405 nm (background 595 nm) の吸光度を測定した。

### B.1.2 標的細胞指向性を有したアデノウイルスベクターシステムの開発

#### (1) アデノウイルスベクターの作製

ルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターは以下のように作製した。CMV プロモーターからなるルシフェラーゼ発現シャトルプラスミド (ルシフェラーゼ発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) と pAdHM15-RGD (アデノウイルスゲノムのファイバータンパク質の HI loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクタープラスミド) を I-CeuI と PI-SceI で切断し、両者の切断フラグメントを直接ライゲーションした。ライゲーション産物を SwaI 消化し (親プラスミドは SwaI 部位をもっているが、目的の組換えプラスミドは SwaI 部位を消失するため、SwaI 消化することで目的の組換えプラスミドだけが腸菌のコロニーを作る)、DH5 $\alpha$  にトランスフォーメーションした。独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。制限酵素解析を行い、ルシフェラーゼ発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CMV2 を得た。次に、pAdHM15-RGD-CMV2 をウイルスゲノム DNA 末端に存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、SuperFect (Qiagen より入手) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、RGD

配列をファイバーに有したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAdRGD-L2を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4 を用いることで、野生型のファイバーをもったルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAd-L2を作製した。

HSVtk 発現アデノウイルスベクターは以下のように作製した。pCMTK (理研ジーンバンクより入手) 由来の HSVtk 遺伝子をアデノウイルスシャトルプラスミド pHM3 に挿入し、pHM3-CMVtk (CMV プロモーターを使用) を得た。次に pAdHM15-RGD と pHM3-CMVtk を I-CeuI と PI-SceI で切断し、HSVtk 発現ユニットを E1 欠損領域に挿入したプラスミド pAdHM15-RGD-tk を得た。pAdHM15-RGD-tk を PacI で切断し、293 細胞にトランスフェクションすることで HSVtk 発現アデノウイルスベクターAdRGD-tk を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4 を用いることで、野生型のファイバーをもった HSVtk 発現アデノウイルスベクターAd-tk を作製した。

同様に、ベクタープラスミド pAdHM4 と pAdHM15-RGD を用いることで、green fluorescent protein(GFP)を発現する Ad-GFP および AdRGD-GFP、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を発現する Ad-OVA および AdRGD-OVA、human TNF- $\alpha$  を発現する Ad-TNF および AdRGD-TNF、mouse ILC を発現する AdRGD-ILC、fractalkine (FKN) を発現する AdRGD-FKN、mouse liver and activation-regulated chemokine (LARC) を発現する AdRGD-LARC、mouse interleukin 12 (IL12) を発現する AdRGD-IL12、目的遺伝子発現カセットを含まない Ad-Null および AdRGD-Null を作製した。

CAR と結合できないアデノウイルスベクターは以下のように作製した。即ち、ファイバーノブの FG ループをコードした領域に変異 (ファイバータンパク質の 489 から 492 の 4 アミノ酸を欠損) をもったベクタープラスミド pAdHM26 を作製した。pAdHM26 はファイバーの HI loop 領域に Csp45I と ClaI 部位を、E1 欠損領域に I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を有している。pAdHM26 の E1 欠損領域に CMV プロモーターからなるルシフェラーゼ発現単位を挿入し、pAdHM26-CMVL2 を得た。さらに、pAdHM26-CMVL2 のファイバーの HI loop に RGD 配列をコードした遺伝子を挿入したベクタープラスミド pAdHM26-RGD-CMVL2 を作製した。

pAdHM26-CMVL2 および pAdHM26-RGD-CMVL2 を 293 細胞にトランスフェクションすることで、上記方法と同様にしてアデノウイルスベクターAd/ $\Delta$ F-L2 および Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2 (それぞれ) を作製した。

作製した全てのアデノウイルスベクターは 293 細胞に 3-4 次感染までさせることにより大量調製した。ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 % glycerol からなる溶液で透析した。ベクターの物理化学的 (particle) タイターは Maizel らの方法で、生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターは 鐘ヶ江らの方法に従って決定した。

#### (2) 培養細胞への遺伝子導入

各細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日 Ad-L2 あるいは AdRGD-L2 を種々の濃度で 1.5 時間作用させた。

#### (3) 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、東洋インキより入手) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

#### (4) フローサイトメーターを用いた細胞受容体の解析

ヒト由来細胞の CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$  インテグリンの発現はフローサイトメーターを用いて解析した。即ち、 $5 \times 10^5$  細胞を human CAR に対する抗体 mouse monoclonal antibody RmcB (Dr. J. M. Bergelson より供与)、mouse anti-human integrin  $\alpha v \beta 3$  (LM609, Chemicon International, Inc. より入手)、あるいは mouse anti-human integrin  $\alpha v \beta 5$  (P1F6, Gibco BRL より入手) で処理した。未結合の抗体を除いた後、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody (Pharmingen より入手) で処理した。細胞を洗浄した後、フローサイトメーター (Cyto ACE-150 Auto Cell Screener, JASCO) で CAR、 $\alpha v \beta 3$  あるいは  $\alpha v \beta 5$  インテグリンの発現を確認した。

#### (5) HSVtk を発現するアデノウイルスベクターの in vitro 殺細胞効果

B16 (B16BL6, mouse melanoma) 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日各濃度の Ad-tk、AdRGD-tk、あるいは AdRGD-null を 1.5 時間作用させた。種々の濃度のガンシクロビル (GCV; 田辺製薬より入手) 存在下で 4 日間培養後、生細胞の割合をアラマー・ブルーアッセイ (大日本製薬より入手) で測定した。

#### (6) HSVtk 発現アデノウイルスベクターを用いた in vivo 癌治療実験

B16 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) をマウス (C57BL6, 5w, female) の腹部皮内に投与し、腫瘍径が 5-6mm 以上に達した 6 日後に様々な濃度の AdRGD-tk、Ad-tk、AdRGD-null を腫瘍内に単回投与した。GCV (75

mg/kg/day)を腹腔内に1日1回、10日間投与し、経日的に腫瘍径を測定した。腫瘍体積は以下の式に基づいて計算した。

$$(\text{腫瘍体積}) = 1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$$

(7) ルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター腫瘍内投与後の各臓器におけるルシフェラーゼ発現

腹部皮内に移植されたB16の腫瘍径が5-6mmに達した6日後にAd-L2あるいはAdRGD-L2 ( $1.4 \times 10^8$  PFU, 50  $\mu$ l)を腫瘍内に単回投与した。24時間後に、腫瘍、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、ホモジナイズ後、ルシフェラーゼ活性を測定した。タンパク質定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして、BioRad protein assay kit (BioRadより入手)を用いた。

(8) HSVtk 発現アデノウイルスベクター腫瘍内投与後の肝臓障害

腹部皮内に移植されたB16の腫瘍径が5-6mmに達した6日後にAd-tkあるいはAdRGD-tk ( $1.4 \times 10^8$  PFU, 50  $\mu$ l)を腫瘍内に単回投与した。GCV (75 mg/kg/day)を腹腔内に1日1回、7日間投与後、肝臓を回収しホルマリン固定した。肝組織をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色することで評価した。

(9) Adの細胞への結合実験

$10^5$  cells/50  $\mu$ lのB16細胞に25  $\mu$ gの抗マウス $\alpha$ vインテグリンモノクローナル抗体 (Phamingenより入手)あるいはコントロール抗体を加え、氷中で30分間反応させた後、 $1 \times 10^6$  vector particles (VP) /cell/200  $\mu$ lのCy3で蛍光標識したAd-LacZおよびAdRGD-LacZを添加した。30分後に細胞を洗浄し、FACSにてアデノウイルスの結合を評価した。

(10) FACSによる遺伝子導入効率、発現効率の評価

24穴のプレートで培養したB16細胞およびA2058細胞に、Ad-GFPあるいはAdRGD-GFPを100、1000、10000 VP / cell / 400  $\mu$ lで37 $^{\circ}$ C、1.5時間作用させた。その後、培養培地を用いて1.0 ml / wellで37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。2日後、GFPの発現をFACSにて解析した。

(11) in vitro および in vivo でのTNF- $\alpha$ 産生

B16細胞にAd-TNFおよびAdRGD-TNFを作用させ、2日間培養した培養上清を回収した。一方、in vivoでのTNF- $\alpha$ 産生については、 $2 \times 10^5$ 個のB16細胞をC57BL/6マウスの腹部皮内に移植し、6日後にAd-TNFおよびAdRGD-TNFを腫瘍内に投与した。2日後に腫瘍を摘出し、10  $\mu$ g/mlのaprotinin、100  $\mu$ MのPMSFを含むPBSでホモジナイズした後、その上清を回収した。各上清のTNF- $\alpha$ 濃度は、TNF- $\alpha$  ELISA KIT (BIOSOURCE INTERNATIONAL (Camarillo)より入手)

を用いて測定した。

(12) 抗原提示能の評価

96穴培養プレートに $1 \times 10^4$  cells/wellでDC2.4細胞を播種し、一晚培養した。種々の用量のAdRGD-OVAあるいはAd-OVAを37 $^{\circ}$ Cで1.5時間作用させ、新たな培地を添加してさらに培養した。6時間後、24時間後あるいは48時間後に上清を除去し、 $1 \times 10^5$  cells/wellのCD8-OVA 1.3細胞と20時間共培養した。その後、上清を回収し、Interleukin 2 (IL2) ELISA KIT (BIOSOURCE INTERNATIONAL (Camarillo)より入手)を用いてIL2濃度を定量した。

(13) DC2.4細胞のマウスへの免疫

Ad-OVAあるいはAdRGD-OVAを1000あるいは4000 VP/cellの用量でDC2.4細胞に1.5時間作用させた。2日間培養した後、DC2.4細胞を50  $\mu$ g/mlのマイトマイシンC溶液で30分間インキュベートし、細胞増殖を抑制した。PBSで細胞を洗浄・再懸濁し、 $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l/mouseあるいは $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l/mouseでマウス右側腹部に皮内免疫した。

(14) OVA 特異的細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 活性の測定

DC2.4細胞の免疫1週間後にマウスから調製した脾細胞を、50  $\mu$ g/mlのマイトマイシンC溶液で30分間処理したE.G7-OVA細胞と5日間共培養することによりin vitro抗原再刺激を行い、エフェクター細胞とした。ターゲット細胞となるE.G7-OVA細胞およびEL4細胞はeuropiumでラベルし、 $1 \times 10^4$  cells/wellで96穴丸底培養プレートに播種した。種々のエフェクター細胞/ターゲット細胞 (E/T) 比となるようにエフェクター細胞を添加し、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。その後、上清中のeuropium放出量を時間分解蛍光測定法で定量し、エフェクター細胞の細胞傷害活性を評価した。

(15) FACSによるDC2.4細胞の表面マーカー発現解析

Ad-OVA、AdRGD-OVA、Ad-NullあるいはAdRGD-Nullを4000 VP/cellでDC2.4細胞に1.5時間作用させ、新たな培地を添加して24時間培養した。また、成熟に伴うDC機能変化のポジティブコントロールには、10  $\mu$ g/mlのリポポリサッカライド (LPS) と100 U/mlのマウスIFN- $\gamma$ を含む培地で24時間培養したDC2.4細胞を用いた。各DC2.4細胞をstaining buffer (0.1% ウシ血清アルブミン、0.01% NaN<sub>3</sub>を含むPBS)を用いて $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ lに懸濁し、anti-Fc $\gamma$ RII/IIIモノクローナル抗体 (2.4G2)を添加して、氷上で30分間インキュベートすることによりブロッキング処理を行った。細胞を洗浄後、100  $\mu$ lの

staining buffer で再懸濁し、ビオチン標識した各抗体 (28-8-6 (anti-H-2Kb/Db)、AF6-120.1 (anti-I-Ab)、16-10A1 (anti-CD80)、GL1 (anti-CD86)、3/23 (anti-CD40)、3E2 (anti-CD54)) を添加して、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識ストレプトアビジンを含む 100  $\mu$ l の staining buffer で再懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、500  $\mu$ l の staining buffer で再懸濁し、FACScalibur と CellQuest software (Becton Dickinson より入手) を用いて表面マーカー発現レベルを解析した。(16) RT-PCR による DC2.4 細胞の IL12 p40 mRNA 発現解析

Ad-OVA、AdRGD-OVA、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を 4000 VP/cell で DC2.4 細胞に 1.5 時間作用させ、新たな培地を添加して 24 時間培養した。また、成熟に伴う DC 機能変化のポジティブコントロールには、10  $\mu$ g/ml の LPS を含む培地で 24 時間培養した DC2.4 細胞を用いた。各 DC2.4 細胞からの total RNA の抽出は、TRIZOL reagent (Life Technologies より入手) を用いて行った。10  $\mu$ g total RNA、10  $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer、20  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、40  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、1  $\mu$ M random hexamer、1  $\mu$ M oligo(dT)、200 U ReverTra Ace (TOYOBO より入手) を含む反応混合液 (100  $\mu$ l) を 42 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、逆転写を行った。マウス IL12 p40 の PCR は、5  $\mu$ l RT 産物、1.25 U Taq DNA ポリメラーゼ (TOYOBO より入手)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP、0.5  $\mu$ M プライマーを含む反応混合液 (50  $\mu$ l) を用いて行った。PCR の条件は、センスプライマーとして 5' -CTCACCTGTGACACGCCTGA-3'、アンチセンスプライマーとして 5' -CAGGACACTGAATACTTCTC-3' を用い、変性: 95 $^{\circ}$ C、45 秒、アニーリング: 48 $^{\circ}$ C、60 秒、伸長: 72 $^{\circ}$ C、120 秒、サイクル数: 40 回で行った。PCR 産物は 3% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色の後、UV イルミネーター上で写真に記録した。尚、各 RT 産物を用いた  $\beta$  アクチンの PCR も同時に行い、RT-PCR 解析の精度確認を行った。

#### (17) in vivo における抗腫瘍効果の検討

TNF- $\alpha$  および IL12 発現による抗腫瘍効果の検討は、2 $\times$ 10<sup>5</sup> 個の B16BL6 細胞を C57BL/6 マウスの腹部皮内に移植した。6 日後、腫瘍径が 5-7mm に達したところで、各種 Ad を腫瘍内に投与し、経日的に腫瘍径および体重を測定した。

DC2.4 細胞を用いた抗原特異的腫瘍拒絶実験では、DC2.4 細胞の免疫 1 週間後に、1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の E.G7-OVA 細胞を C57BL/6 マウスの左側腹部に皮内接種し、経

日的に腫瘍径を測定した。

ケモカイン発現癌細胞による腫瘍拒絶実験は、AdRGD によって遺伝子導入した 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の OV-HM 細胞を B6CF1 マウスおよび Balb/c nude マウスの腹部皮内に接種し、経日的に腫瘍径を測定した。尚、OV-HM 細胞へのケモカイン遺伝子の導入は、AdRGD-ILC、AdRGD-FKN および AdRGD-LARC を MOI=10 で 24 時間感染させることにより行った。本条件での遺伝子導入効率率は、100%であることを確認している。

尚、腫瘍の体積は以下の式に従って算出した。

$$(\text{腫瘍体積; mm}^3) = (\text{腫瘍の長径; mm}) \times (\text{腫瘍の短径; mm})^2 \times 0.5236$$

#### (18) 免疫組織標本の作製と染色

ケモカイン遺伝子を導入した 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の OV-HM 細胞 (MOI=10、24 時間処理) を B6CF1 マウスの腹部皮内に接種した。2 日後に腫瘍組織を回収し、O.C.T compound (Tissue TEK, Miles, Elkhart, IN) に包埋後、直ちに液体窒素に浸して凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。その後、6  $\mu$ m のクリオスタット切片を作製し、4 $^{\circ}$ C のアセトンで固定した。免疫染色は、アセトン固定後、内因性ペルオキシダーゼ処理のため 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に 10 分浸した。その後、5% BSA/PBS でブロッキングを行い、一次抗体および二次抗体で処理した後、complex を形成させておいた Avidine-HRP で処理し、DAB (ジアミノベンジジン 4 塩酸塩) で発色させた。最後にヘマトキシリンで核染色を行った。尚、免疫染色に使用した抗体は、Rabbit anti-asialoGM1 (WAKO より入手)、Rabbit polyclonal anti-hCD3 antibody (DAKO より入手)、normal Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology より入手)、Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins (DAKO より入手) である。

#### (19) MTT 試験

ILC の細胞毒性についての検討は MTT 法を用いて行った。OV-HM 細胞を各濃度の ILC とともに 96 穴プレートに 8 $\times$ 10<sup>2</sup> cells/well、2 $\times$ 10<sup>2</sup> cells/well で播種し、それぞれ 48 時間および 72 時間培養した。PBS (-) で 5 mg/ml に調製した MTT 溶液を 10  $\mu$ l/well で添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6 時間インキュベーションした。20% sodium dodecyl sulfate / 0.01 N HCl を 100  $\mu$ l/well で添加し、一晚暗所に静置することで細胞内に生成された formazan 結晶を完全に溶解した後、595 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

#### (20) リンパ球の精製

C57/BL6 マウスの脾細胞を回収し、スリガラスで分散させた後、それぞれの細胞の表面マーカーを用



いた Magnetic cell sorting により目的の細胞を精製した。CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、B220 陽性細胞はそれぞれ anti-CD4 microbeads、anti-CD8 microbeads、anti-B220 microbead を用いて VS separation カラムで positive selection により回収精製した。マクロファージは、プラスチックシャーレに接着した細胞を EDTA 処理とピペッティングにより剥がし、FITC-conjugated F4/80 を作用させ、anti-FITC microbeads を用いてラベルした後、VS separation カラムで positive selection により回収精製した。NK 細胞は biotinylated anti-CD3 と FITC-conjugated anti-NK1.1 で二重染色し、streptavidine microbeads を作用させた。その後、BS separation カラムで negative selection し、引き続き anti-FITC microbeads を作用させて、positive selection により回収精製を行った。

#### (21) RT-PCR による各種リンパ球の CCR10 mRNA 発現解析

分離精製した各細胞から、TRIZOL reagent (Life Technologies より入手) を用いて total RNA の抽出を行った。逆転写は、SuperScript II reverse transcriptase (Gibco-BRL より入手) を用い、CCR10 の PCR は、Ex-Taq ポリメラーゼ (Takara より入手) を用いて行った。PCR の条件は、センスプライマーとして 5' -AGAGCTCTGTTACAAGGCTGATGTC-3'、アンチセンスプライマーとして 5' -GAGGTGGTACTTCCTAGATTCCAGC-3' を用い、変性: 94°C、30 秒、アニーリング: 55°C、30 秒、伸長: 72°C、30 秒、サイクル数: 30 回で行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色の後、UV イルミネーター上で写真に記録した。尚、各 RT 産物を用いた G3PDH の PCR も同時に行い、RT-PCR 解析の精度確認を行った。

### B.1.3 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発

#### (1) Gutless アデノウイルスベクターの作製

Gutless アデノウイルスベクターは相同組換えを利用した方法で作製した。即ち、まず E1 欠損領域に CMV プロモーターからなる大腸菌  $\beta$  ガラクトシターゼ (LacZ) 発現単位を順方向に配したアデノウイルスベクター AdHM4-LacZ1 と、同単位をアデノウイルスゲノムに対して逆方向に配したアデノウイルスベクター AdHM4-LacZ2 を作製した。なお、LacZ 遺伝子は pCMV  $\beta$  (Clontech より入手) 由来ものを用い、これをシャトルプラスミド pHCMV5 あるいは -6 に挿入した。Gutless アデノウイルスベクターを作製する

ために、AdHM4-LacZ1 と AdHM4-LacZ2 を MOI=10 で 293 細胞に感染させ、48 時間後細胞を回収した。Gutless アデノウイルスベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心法を用いることで、従来型のベクターと分離・精製した。

#### (2) Gutless アデノウイルスベクターのウイルス DNA 解析

Gutless アデノウイルスベクターのウイルス DNA は、精製ウイルスを 0.1% SDS 含有 TE で処理し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿することによって回収した。これを 0.7%アガロースゲル電気泳動し、サイバークリーンで DNA を染色した。なお、コントロールとして従来型の E1 欠損アデノウイルス由来のウイルス DNA (AdHM4-LacZ1) も同時に解析した。

#### (3) Gutless アデノウイルスベクターの作製法の最適化

相同組換え法による Gutless アデノウイルスベクターの作製をより容易にするために、アデノウイルスベクターの E1 欠損領域の最右端に 3' ITR 配列を付与したベクターシステムを作製した。即ち、シャトルプラスミド pHM3 に 3' ITR を含むアデノウイルス配列 (bp 35640-35935) を挿入し、モデル遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子とルシフェラーゼ発現カセット (RSV プロモーターをもつ) を挿入したプラスミド pITR-HRSVL1 を作製した。このカセットをアデノウイルスベクタープラスミド pAdHM4 の E1 欠損領域に I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して挿入し、ベクタープラスミド pAdHM4-HRSVL2 を作製した。pAdHM4-HRSVL2 を PacI で切断し、293 細胞にトランスフェクションすることによりアデノウイルスベクターを得た。本ベクターを大量調製し塩化セシウムの密度勾配遠心法で精製することで、gutless アデノウイルスベクターが得られることを確認した。

### B.2. 次世代非ウイルス (ハイブリッド) ベクターの開発基盤研究

#### B.2.1 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発: ペプチドディスプレイシステムを使った機能性ペプチドの遺伝子導入促進活性の解析

##### (1) 組換えファージの作成

頭部に核移行シグナルペプチドを呈示し、かつ動物細胞で検出できるマーカー (ルシフェラーゼや Green Fluorescent Protein (GFP)) 遺伝子をゲノム DNA の一部として組み込んだラムダファージ (NLS

ファージ) は、パッケージング大腸菌 D1180 を使って調製した。D1180 株は、一部を欠失したラムダファージの right arm 及び left arm と、CMV プロモーターでドライブされたマーカー遺伝子断片とを接続して大腸菌 DH10B に導入し、同 DNA を溶原化した菌を単離することによって作成した。D1180 株に挿入されているラムダファージ・ゲノムは D 遺伝子に amber 変異を持つが、DH10B の遺伝子型は suppressor tRNA 不含 (Sup<sup>0</sup>) であるためこの株は D タンパク質を作ることができない。一方、D1180 株大腸菌に組み込まれたファージゲノムには cI 遺伝子に温度感受性変異があるため、この菌を高温 (45°C, 25 min) で培養することによりファージ DNA の複製とファージの構造タンパク質の発現が誘導される。高温培養時に、核移行シグナルと D タンパク質との融合タンパク質を IPTG によって発現誘導することにより、NLS ファージ粒子を回収した。対照としては、D タンパク質を D1180 株で発現させて調製した野生型頭部を持つファージ (Wild ファージ) を使用した。組換えファージ粒子は塩化セシウム密度勾配法で精製し、ペプチドの呈示は抗核移行シグナルペプチド抗体によるタンパク質ブロッティングと免疫沈降法で確認した。ファージ粒子数は大腸菌 LE392 株を用いた標準的なプラークアッセイによった。タンパク質および DNA 量から推定した粒子数 (pfu) は、プラーク法で測定した粒子数とほぼ一致する。最終的な収率は培養液 10 リットルあたり 10<sup>11</sup> 粒子であった。

## (2) 核への DNA のターゲティング活性の検定

ファージ粒子の核への能動的移行活性は、2つの方法で検定した。1つは、従来用いてきたマイクロインジェクション法で、10<sup>12</sup> pfu/ml に調製した組換えファージをヒト胎児肺由来線維芽細胞 HEL 細胞の細胞質にエッペンドルフ社のセミ・オートマチック・インジェクターを使って導入し、37°C 30 min の培養後に固定して観察した。もう1つは、コレステロールを選択的に可溶化することができる Digitonin (40 µg/ml) で処理して核膜を傷つけずに細胞膜の障壁を取り除いた Semi-intact 細胞と、エールリッヒ腹水癌細胞の細胞質抽出液から再構成した *in vitro* transport assay で、組換えファージは細胞質抽出液と混合して Semi-intact 細胞に加え、30°C, 30 min の反応後に固定して観察した。エールリッヒ腹水癌細胞の細胞質抽出液は、緩衝液 A (10 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 110 mM K-acetate, 2 mM Mg acetate, 2 mM DTT) で洗浄した細胞を、2 倍容の低張の緩衝液 B (5 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 10 mM K acetate, 2 mM Mg acetate, 2 mM DTT, 20 µM

cytochalasinB, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) を加えて氷温で 10 min 置いた後、タイトなホモゲナイザーで 7 回破壊し、100,000 rpm 30 min の遠心上清を回収して調製した。この上清はさらに、緩衝液 C (20 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 110 mM K acetate, 5 mM Na acetate, 5 mM Mg acetate, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) に透析し、急速凍結して -80°C で保存した。*In vitro* assay では、陰性コントロールとして、a) 0.5 mg/ml Wheat germ agglutinin (WGA) を加えたもの、b) 細胞質抽出液を加えないもの、の2つの条件を置いて、反応の特異性を検討した。WGA は核膜孔を構成するタンパク質に結合してタンパク質の核移行を阻害することが知られている。

## (3) 組換えファージ粒子の細胞内動態の観察

マイクロインジェクション法や *in vitro* transport assay でファージ粒子の細胞内での局在を観察するためには、3つの方法を用いた。1つは通常の間接蛍光抗体法で、GST-E 融合タンパク質として調製した E タンパク質をウサギに免疫し、抗原を使ったアフィニティークロマトグラフィーで精製したポリクローナル抗体を一次抗体として使用した。2つ目は DNA 染色で標識したファージ粒子を使う方法で、ファージ粒子を 500 倍希釈した SYBR Green (Molecular Probe 社) で染色した後、塩化セシウム密度勾配法で精製して過剰量の色素を除いてから使用した。3つ目は、透過型電子顕微鏡による観察で、この研究は関西医科大学・生理学教室の山本章嗣博士との共同研究である。組換えファージをマイクロインジェクションした HEL 細胞を 37°C, 30 min 培養後、2.5% glutaraldehyde (in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) で固定し、さらに四酸化オスミウム固定・酢酸ウラニル染色を施してから、エポキシ樹脂に包埋し、切片としてから観察した。

## B.2.2 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化させるための技術開発: ヒト染色体の安定化機構に関わるテロメア (染色体末端) の機能解析

### (1) TRF1 を過剰発現したヒト初代培養線維芽細胞の染色体の安定性の解析

TRF1 強発現ベクターは、CMV enhancer/chicken beta-actin promoter の下流に TRF1 cDNA (ロックフェラー大学の Dr. de Lange より分与された) を接続して作成した。このベクターに G418 耐性遺伝子を組み込み、LipofectAmine plus 試薬を用いて、ヒト

初代培養線維芽細胞 TIG-3 株に導入してから、G418 で選択して、TRF1 強発現細胞株を得た。TRF1 量は、baculovirus で作成した組換え TRF1 をウサギに免疫して得たポリクローナル抗体をプローブとしたタンパク質ブロッティングと、同じ抗体を使った間接蛍光抗体法で推定した。対照群としては、G418 耐性遺伝子だけを導入した細胞株を使用した。細胞の分裂寿命は細胞数を Courter counter で測定して決定した。また細胞老化の指標として Senescence-associated (SA) beta-galactosidase を用い、細胞を固定して galactosidase の発色基質である X-gal で染色してその活性を検討した。

### B.2.3 非ウイルスベクター系において細胞質内で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発

#### (1) 温度感受性持続感染変異センダイウイルス cl. 151 株のゲノム cDNA の単離

Cl. 151 株及び変異を持たない野生型親株 (名古屋株) センダイウイルスは、それぞれ 32°C と 35.5°C で孵化鶏卵を使って増殖させ、15,000 rpm 30 min の遠心で沈渣とした後、20%/50% の蔗糖ステップ遠心法で精製して、RNA 分解酵素を完全に除去した。ウイルス粒子は 10 容の 4 M Guanidine isothiocyanate, 0.5% sodium lauryl sarcosinate, 1% beta-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 を加えて破壊した後、5.7 M CsCl, 10 mM EDTA, pH 7.5 のクッションの上に重層して、32,000 rpm 24 h の超遠心で RNA を沈渣として回収した。回収した RNA は変性アガロースゲル電気泳動で無傷であることを確認した。ゲノム RNA の 5' および 3' 末端の一次構造は、40 mer の配列決定用オリゴ DNA を RNA の両端に T4 RNA ligase で共有結合したあと、22 mer のプライマーを使って点突然変異を持つ MMTV reverse transcriptase による逆転写反応と KOD DNA polymerase を使った高忠実度 polymerase chain reaction で回収した約 300 bp の DNA フラグメントの塩基配列を解析して決定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト初代細胞、培養細胞は、研究用の市販品、領布品を用いており、倫理的問題はない。

## C. 研究結果

### C.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

#### C.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発 -発現制御型アデノウイルスベクターの開発-

平成 12 年度に我々は複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステム (E1・E3 両欠損部位に外来遺伝子を挿入できるアデノウイルスベクターシステム) を開発したが、本系が開発されたことで可能になった遺伝子発現系の一例として、テトラサイクリンの遺伝子発現制御系を単一のアデノウイルスベクターに搭載させたシステムが考えられる。即ち、発現制御に必要なコンポーネントを E1・E3 両欠損部位に挿入することにより、単一のベクターで目的遺伝子の発現制御が可能となるベクターシステムが開発できる。このようなベクターシステムが開発されれば、転写活性化遺伝子を発現するアデノウイルスベクターとテトラサイクリン応答性のプロモーターの制御下に目的遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを共作用 (共投与) する必要がなくなり、余分なベクターを作製しなければならないといった問題点も克服され、より効率の良い発現制御型アデノウイルスベクターの開発が期待できる。

そこで、tet-off あるいは tet-on システムのための転写活性化因子である tTA あるいは rtTA を発現するカセットを E3 欠損領域へ、テトラサイクリン応答性のプロモーターの下流に目的遺伝子 (モデルとしてルシフェラーゼあるいはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) を使用) を連結させたカセットを E1 欠損領域へ挿入したアデノウイルスベクター AdOff-L2、AdOn-L2 (AdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2) を作製した (Fig. 1C には tet-off システムを搭載したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターの作製例を示す)。各発現系を搭載したベクターの遺伝子発現制御能等を種々のヒト由来の細胞株、マウスを用いて比較・検討した。

まず、SK HEP-1 細胞を用いた場合の AdOff-L2 あるいは AdOn-L2 の遺伝子発現制御能を、種々の濃度のドキシサイクリン存在下で培養後ルシフェラーゼ活性を測定することで検討した (Fig. 2)。その結果、AdOff-L2 では 10ng/ml 以上のドキシサイクリン濃度でルシフェラーゼ活性は完全に抑制され、regulation factor (最大活性値と最少活性値の比) は 100-200 以上であった。一方、AdOn-L2 によるルシフェラーゼ活性の誘導には、1000ng/ml 以上のドキシサイクリン濃度を必要とし、regulation factor

も 20-30 と小さかった。また、AdOff-L2 と AdOn-L2 による最大活性値を比較すると、AdOff-L2 の方が 1 オーダー高いルシフェラーゼ活性を示した。

次に、上記の現象が他の細胞系においても当てはまるかどうかを調べるため HeLa、ECV304、LN319 細胞を用いて検討した (Fig. 3)。その結果、いずれの細胞においても、tet-off システムを搭載した AdOff-L2 を用いた方が、tet-on システムを搭載した AdOn-L2 に比べ、regulation factor および最大ルシフェラーゼ活性値が高く、優れていると考えられた。特に、HeLa 細胞と ECV304 細胞においては、AdOn-L2 による regulation factor は数倍程度しか認められなかった。

以上の結果より、tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターは、tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターに比べ低い発現制御能しか示さず最大活性値も低いこと、およびドキシサイクリンに対する感受性が低いことが明らかとなった。遺伝子治療や遺伝子機能解析を目的とした場合、発現を positive に制御できる tet-on システムの方が、tet-off システムに比べ多くの場合好ましいと考えられる。そこで次に tet-on システムの改良を行った。

tet-on システムの低い発現制御能は rtTA の TRE 配列 (rtTA が結合するオペレーター配列) への低い親和性が一因と考えられるので、rtTA の発現量の増大を期待することで、tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターの改良を試みた。そのため、CMV プロモーターと rtTA 遺伝子の間にイントロン A の配列を挿入した。我々はすでに CMV プロモーターと目的遺伝子の間にイントロン A の配列を挿入することで、目的遺伝子の発現を数倍から 10 倍程度強められることを報告している。そこで、E3 欠損領域に挿入した CMV プロモーターと rtTA 遺伝子の間にイントロン A の配列を挿入したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター AdOn-L4 を作製した。SK HEP-1 細胞と HeLa 細胞において、AdOn-L2 あるいは AdOn-L4 を作用させた後、各細胞における rtTA の発現量を ELISA 法で測定したところ、AdOn-L4 を作用させた細胞は AdOn-L2 を作用させた細胞に比べ、rtTA の発現量は高かった (Fig. 4)。

そこで、AdOn-L2 あるいは AdOn-L4 を作用させた SK HEP-1、HeLa、ECV304、LN319 細胞における遺伝子発現制御能について検討した (Table 2)。その結果、AdOn-L4 を用いることで ECV304 細胞を除きいずれの細胞においても、ドキシサイクリン付加時の最大ルシフェラーゼ活性値、regulation factor の改

善が認められた。

AdOff-L2 あるいは AdOn-L4 を作用させたときに得られる最大のルシフェラーゼ活性がどの程度なのかを明らかにするため、強力なプロモーターとして広く用いられている CMV プロモーターをもったルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad-L2 と比較した (Table 3)。その結果、AdOff-L2 は Ad-L2 に比べ、数倍から 30 倍程度高いルシフェラーゼ活性を示したが、AdOn-L4 は Ad-L2 に比べ低いルシフェラーゼ活性しか示さなかった。

次に、両システムを搭載したアデノウイルスベクターの in vivo での機能を検討するために、SEAP を発現する tet-off あるいは tet-on のアデノウイルスベクター AdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2、AdOn-SEAP4 (AdOn-SEAP4 は CMV プロモーターと rtTA 遺伝子の間にイントロン A の配列を有している) あるいは Ad-SEAP2 をマウスの尾静脈内に投与し、経日的に血中 SEAP 活性を測定した (ドキシサイクリンは drinking water として与えた) (Fig. 5)。なお、本実験では抗 SEAP 抗体の出現による影響を無視し、各ベクターの能力を正確に評価できるようにヌードマウスを用いた。その結果、AdOff-SEAP2 投与マウスにおいては、血中 SEAP 活性はドキシサイクリンの有無により約 500 倍の誘導能を有しており、極めて効率の良い遺伝子発現レベルの制御が可能となった (アデノウイルスベクターはマウスに尾静脈内投与すると 99% 以上は肝臓に移行するため、肝臓で主に発現され血中に分泌された SEAP 活性を測定したことになる)。この時の最大の血中 SEAP 活性は、CMV プロモーターを用いた SEAP 発現アデノウイルスベクター Ad-SEAP2 を投与した場合の血中 SEAP 活性よりも 1 オーダー程度高いものであった。当然のことながら、Ad-SEAP2 を投与したマウスにおいてはドキシサイクリンの有無によらず、血中 SEAP 活性は一定であった。一方、AdOn-SEAP2 や AdOn-SEAP4 を投与されたマウスにおいては、血中 SEAP 活性の誘導能は全くないかあるいは数倍程度であった。これは in vitro の検討で明らかとなったように tet-on システムにおいては、tet-off システムに比べ低い発現制御能しか示さないこと、およびドキシサイクリンに対する低い感受性の両者が関与しているものと考えられた。従って、tet-on システムに関しては、イントロン A の配列を付与しても tet-off システムに比べると未だ不十分であり、更なる改良が必要と考えられた。

### C.1.2 標的細胞指向性を有したアデノウイルスベクターシステムの開発

アデノウイルスベクターは、現存する遺伝子治療用ベクターの中では、最も遺伝子導入効率の優れたベクターであり、非分裂細胞や *in vivo* の組織細胞への直接の遺伝子導入も可能なことから画期的なベクターとして注目されてきた。しかしながら、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合、多くの細胞・組織に非特異的に移行すること、逆に、アデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor ; CAR) の発現がない細胞には感染できないという問題点が指摘されている。そこで、平成 12 年度にウイルス表面のファイバタンパク質に外来ペプチドを発現させることによりベクターの標的細胞選択性を制御し、より広範な目的に使用できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発を目指した基盤研究を行った。特に、 $\alpha v \beta 3$  あるいは  $\alpha v \beta 5$  インテグリンとの結合能を有した RGD 配列 (CDCRGDCFC) をファイバーの HI loop に挿入したアデノウイルスベクター (AdRGD) を開発し、その機能を様々なヒト由来接着細胞、マウス由来細胞について検討した。本年度は、従来型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率が低いことが知られているヒト血球系細胞、ヒト血管平滑筋細胞をターゲットとした場合のファイバーミュータントアデノウイルスベクターの有用性を評価した。また、自殺遺伝子の HSVtk やサイトカイン、ケモカイン遺伝子を用いたマウス癌遺伝子治療実験を行った。さらに、AdRGD により抗原遺伝子を導入した樹状細胞 (DC) が抗癌免疫活性を増強させること、およびそのメカニズムに関して検討した。その他、CAR と結合しないアデノウイルスベクターの開発を行った。

#### C.1.2.1 ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの活性評価

RGD 配列を有したファイバーミュータントアデノウイルスベクター AdRGD-L2 のヒト血球系細胞への遺伝子導入活性を従来型アデノウイルスベクター Ad-L2 と比較検討した (ルシフェラーゼ発現を指標とした) (Fig. 6)。また、CAR および RGD 配列のターゲット分子である  $\alpha v \beta 3$  あるいは  $\alpha v \beta 5$  インテグリンの発現をフローサイトメトリーにより確認した (Fig. 7)。ヒト由来血球系細胞に関しては、Y79 細胞は CAR を高発現しており、K-562、Ramos 細胞においては中程度の CAR の発現を認めた。KG-1a 細胞においては CAR の発現は認められなかった。一方、インテグリンの発現に関しては、K-562、Ramos、

KG-1 細胞において  $\alpha v \beta 3$  あるいは  $\alpha v \beta 5$  (あるいは両者) インテグリンを発現していた (Fig. 7)。

これらの細胞に対する遺伝子導入活性については、CAR を発現している K-562、Y79、Ramos 細胞では従来型ベクターの Ad-L2 においても低いながらルシフェラーゼ活性が認められ、AdRGD-L2 では数倍から数十倍程度ルシフェラーゼ活性は上昇した。一方、CAR の発現がほとんど認められなかった KG-1a 細胞では、Ad-L2 では全くルシフェラーゼ活性は認められなかった。一方、AdRGD-L2 では、KG-1a 細胞においても若干のルシフェラーゼ活性が認められ、いずれの細胞においても AdRGD-L2 を用いることで遺伝子導入活性の改善が認められた (Fig. 6)。

次にヒト由来の初代培養大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC) に対する遺伝子導入実験を行った (Fig. 8)。血管平滑筋細胞は CAR negative であることが知られており、HASMC においても CAR negative であり、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$  の両者の発現が認められた (data not shown)。遺伝子導入実験に関しては、AdRGD-L2 を用いることで、Ad-L2 に比べ 20-40 倍のルシフェラーゼ活性の上昇が観察された (Fig. 8)。

これらの結果より、AdRGD は、CAR の発現が乏しく従来型のアデノウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞に対しても、 $\alpha v \beta 3$  あるいは  $\alpha v \beta 5$  インテグリンの発現が認められれば、効率良く遺伝子導入できうるベクターであると考えられた。

#### C.1.2.2 メラノーマに対する自殺遺伝子を用いた癌遺伝子治療実験

平成 12 年度における研究で、AdRGD は従来のアデノウイルスベクターと比較してマウスメラノーマ細胞の B16 細胞に対して、100-1000 倍高い遺伝子発現効率を示すことを明らかにした。そこで自殺遺伝子の HSVtk 発現アデノウイルスベクター (Ad-tk、AdRGD-tk) を作製し、B16 メラノーマを腹部皮内に移植したマウスに対する癌遺伝子治療応用実験を行った。まず、*in vitro* の条件下において各ベクターで遺伝子導入した B16 細胞の GCV に対する殺細胞効果を検討した (Fig. 9)。

AdRGD-tk の MOI=160, 32, あるいは 6.4 で作用させた B16 細胞における ED50 (death rate of 50% of the cell population) は 0.79, 2.3, あるいは 6.0 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (それぞれ) であった。一方、Ad-tk の MOI=4000, 800, あるいは 160 で作用させた B16 細胞における ED50 は 2.5, 5.1, あるいは 25.5 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (それぞれ) であった。従って、作用濃度と ED50 から考えると AdRGD-tk は Ad-tk に比べ、32-125 倍

高い殺細胞効果を示したと考えられた (Ad-tk の MOI=160 における ED50 は 25.5  $\mu\text{g/ml}$  であり、AdRGD-tk の MOI=160 における ED50 は 0.79  $\mu\text{g/ml}$  であった。また Ad-tk の MOI=4000 と AdRGD-tk の MOI=32 は同程度の ED50 であった)。

そこで次に、B16 メラノーマ担癌マウスの腫瘍内に AdRGD-tk あるいは Ad-tk を投与し、その後 GCV を投与することにより腫瘍の増殖が抑制されるか否かを検討した (Fig. 10)。Ad-tk の  $7.0 \times 10^8$  PFU 投与群、および AdRGD-tk の  $1.4 \times 10^8$  あるいは  $2.8 \times 10^7$  PFU 投与群では顕著な腫瘍増殖の抑制が認められ、それぞれ 6 例中 3、3、2 例が完全治癒した (Table 4)。AdRGD-null の  $1.4 \times 10^8$  PFU 投与群や Ad-null の  $7.0 \times 10^8$  PFU 投与群では何ら腫瘍増殖の抑制は認められなかった。Ad-tk の  $2.8 \times 10^7$  PFU 投与群や AdRGD-tk の  $5.6 \times 10^6$  PFU 投与群では腫瘍増殖の抑制は認められなかった。Ad-tk の  $7.0 \times 10^8$  PFU 投与群と AdRGD-tk の  $2.8 \times 10^7$  PFU 投与群が同程度の腫瘍増殖抑制効果を示したことから、AdRGD-tk は Ad-tk に比べ約 25 倍高い抗腫瘍効果を示したと考えられた。

次に、アデノウイルスベクター投与に伴う各臓器の毒性 (副作用) を予測する目的で、AdRGD-L2 あるいは Ad-L2 (ともに  $1.4 \times 10^8$  PFU) を腫瘍内投与後の各臓器のルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 11)。その結果、Ad-L2 においては、ベクターを腫瘍内に投与したにも関わらず、腫瘍よりも肝臓の方が若干高いルシフェラーゼ活性を示した。一方、AdRGD-L2 においては腫瘍内のルシフェラーゼ活性は Ad-L2 の約 40 倍に、逆に肝臓内のルシフェラーゼ活性は約 1/8 になっていた。心臓、肺、腎臓、脾臓におけるルシフェラーゼ活性は両ベクターとも極めて低く、検出限界に近い活性しか示さなかった (data not shown)。従って、AdRGD-L2 においては、腫瘍へのより効率の良い遺伝子導入が可能になると同時に、他臓器中へのベクターの漏れは減少していることが明らかとなり、副作用がより少ない可能性が示唆された。

そこで次に、Ad-tk あるいは AdRGD-tk ( $1.4 \times 10^8$  PFU) を腫瘍内に投与し GCV を連日投与した 7 日後における肝臓組織を HE 染色により検討した。その結果、AdRGD-tk 投与マウスの肝臓は、Ad-tk を投与したマウスの肝臓に比べ、免疫細胞の浸潤の抑制が観察された (Fig. 12)。

これらの結果より、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターと自殺遺伝子を用いた遺伝子治療では、従来型のアデノウイルスベクターを用いた場合に比べ、治療効果の増大と共に副作用の軽減も

期待できることが明らかとなった。

### C.1.2.3 ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いたメラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療

TNF- $\alpha$  遺伝子を用いて AdRGD による癌遺伝子治療の確立とその評価を試みた。まず、*in vitro* において TNF- $\alpha$  の産生を検討した結果、B16 細胞に Ad-TNF を 5000 VP/cell で作用させても、TNF- $\alpha$  の産生量は僅かであった (Fig. 13A)。一方、AdRGD-TNF では、用量依存的な TNF- $\alpha$  の産生が見られ、5000 VP/cell においては、Ad-TNF よりも 130 倍高い産生量を示した。この AdRGD-TNF による高い TNF- $\alpha$  の産生は、*in vivo* においても認められ、B16 メラノーマの腫瘍内に各ベクターを投与し、2 日後の腫瘍組織中の TNF- $\alpha$  量を測定した結果、AdRGD-TNF は、Ad-TNF と比較して  $10^8$  VP/tumor 投与で 30 倍、 $10^9$  VP/tumor 投与で 5 倍高い TNF- $\alpha$  の産生が認められた (Fig. 13B)。また、 $10^9$  VP/tumor の Ad-TNF 投与での TNF- $\alpha$  の産生量は、 $10^8$  VP/tumor の AdRGD-TNF 投与と同等であり、両投与群においては、腫瘍の一部で出血壊死が観察された (Fig. 14)。さらに  $10^9$  VP/tumor の AdRGD-TNF 投与では、腫瘍全体に出血壊死が観察され、病理組織学的にも顕著であった (Fig. 15)。この結果を反映して AdRGD-TNF は、Ad-TNF と比較して強い腫瘍増殖抑制作用を示した (Table 5)。また、AdRGD-TNF を  $10^{10}$  VP/tumor で投与した際には 6 例中 2 例において完全治癒が認められた。さらに、TNF- $\alpha$  を生体に適用した際に認められる副作用として、体重減少およびエンドトキシン様ショック、これらに由来する突然死について評価したところ、AdRGD-TNF 投与群では、Ad-TNF 投与群と比較して軽減されていた。以上の結果は、AdRGD-TNF では、従来型のアデノウイルスベクターと比較して、Therapeutic Window が飛躍的に改善されたことを示すものである。

さらに TNF- $\alpha$  とは異なる作用メカニズムを有するサイトカインとして interleukin 12 (IL12) を選択し、IL12 発現 AdRGD (AdRGD-IL12) と AdRGD-TNF との併用による更なる抗腫瘍効果の増強について検討した。その結果、 $5 \times 10^8$  VP の AdRGD-IL12 と  $5 \times 10^8$  VP の AdRGD-TNF とを併用投与することにより、それぞれの単独投与 ( $1 \times 10^9$  VP) に比べて腫瘍増殖抑制作用が増強された (Fig. 16)。また、この条件下では体重減少などの副作用は認められなかった。

#### C.1.2.4 ファイバーミュータントアデノウイルスベクターにより遺伝子導入したDC2.4細胞の免疫学的機能評価と腫瘍免疫療法への応用

これまでに AdRGD が、従来型アデノウイルスベクターと比較して DC への遺伝子導入・発現効率に極めて優れることを見出してきた。そこで本年度は、DC への遺伝子導入・発現における AdRGD の優位性が、DC-based gene immunotherapy の治療効果増強に反映されるかについて検討した。まず、Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を作用させた DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示レベルを検討した (Fig. 17)。AdRGD-OVA 作用後 2 日間培養した DC2.4 細胞においては、ベクター粒子数依存的に MHC class I 抗原提示量が増大し、4000 VP/cell においては Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞と比較して約 10 倍の高値を示した (Fig. 17A)。この結果は、AdRGD-OVA によって効率良く OVA 遺伝子が導入されることによって、DC2.4 細胞内で高い OVA 発現が達成されたことを反映したものと考えられた。また、AdRGD-OVA を作用させた DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示量は、作用後の培養時間に依存して増大することが判明した (Fig. 17B)。この結果に基づき以降の検討では、アデノウイルスベクター作用後 2 日間培養した DC2.4 細胞を用いて検討することとした。

次に、Ad-OVA および AdRGD-OVA を作用させた DC2.4 細胞の OVA 特異的 CTL 誘導効果について検討した。OVA トランスフェクタントである E. G7-OVA 細胞をターゲット細胞とした際には、Ad-OVA 作用 DC2.4 細胞免疫群と比較して、AdRGD-OVA 作用 DC2.4 細胞免疫群においてより強力な傷害活性が検出された (Fig. 18)。一方、AdRGD-LacZ (コントロールベクター) 感染 DC2.4 細胞あるいは naive DC2.4 細胞を免疫した群では E. G7-OVA 細胞の傷害は認められず、また、OVA ペプチドを MHC class I 分子上に提示していない EL4 細胞をターゲット細胞とした際には、どの群の脾細胞にも顕著な細胞傷害活性は検出されなかった (Fig. 18)。以上の結果から、AdRGD-OVA により OVA 遺伝子を効率良く導入された DC2.4 細胞は、高い MHC class I 抗原提示を示すばかりでなく、*in vivo* において OVA 特異的 CTL 活性をより効果的に誘導できることが示された。そこで実際に AdRGD-OVA により OVA 遺伝子を導入した DC2.4 細胞を用いて E. G7-OVA 腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した。

免疫 1 週間後のマウスに E. G7-OVA 細胞を攻撃接種したところ、1000 VP /cell の AdRGD-OVA を作用させた DC2.4 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/mouse で免疫した群では、4000 VP /cell の Ad-OVA を感染させた DC2.4

細胞を同様に免疫した群に匹敵する効果的な腫瘍増殖抑制効果が認められた (Table 6)。さらに、4000 VP/cell の AdRGD-OVA を適用した群では、 $1 \times 10^6$  cells/mouse あるいは  $1 \times 10^6$  cells/mouse で DC2.4 細胞を免疫することによって、全例における腫瘍の完全拒絶が達成された。この結果は、DC2.4 細胞への抗原遺伝子導入に AdRGD を用いることで、有効な腫瘍免疫を成立させるための感染ベクター量および投与 DC 数を少なく抑えられることを示しており、これは benefit/risk 比の高い DC-based gene immunotherapy の開発に貴重な基礎的情報を与えると考えられる。

今回の検討で、DC-based gene immunotherapy における AdRGD システムの有用性を明らかにした。そこで次に DC が細菌・ウイルス由来産物による刺激を受けることで成熟し、T 細胞感作をより効果的に行うための機能変化を伴うという知見に基づき、ウイルス由来成分を含む AdRGD の感染が DC 機能に及ぼす影響として、DC2.4 細胞の表面マーカーおよび IL12 p40 mRNA 発現変化を検討した。その結果、AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞では、MHC class I および class II 分子、CD80、CD86、CD40、CD54 の顕著な発現増強が認められ、そのレベルは LPS と IFN- $\gamma$  で刺激した DC2.4 細胞に匹敵した。一方、Ad-OVA、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を感染させた DC2.4 細胞では、MHC class I 分子と CD40 の発現レベルにわずかな上昇が認められたに過ぎなかった (Fig. 19)。この結果は、アデノウイルスベクター感染により DC2.4 細胞は若干の成熟傾向を示し、AdRGD-OVA による十分な抗原遺伝子の導入と発現が達成されることによって、一層成熟が促されることを示唆している。

また、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を感染させた DC2.4 細胞では、無処理の DC2.4 細胞と同様に IL12 p40 mRNA の発現は検出されなかったが、Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞では、わずかなではあるが IL12 p40 mRNA の発現増強が認められた (Fig. 20)。この結果から、抗原遺伝子の導入および発現が DC2.4 細胞における IL12 産生の増強に繋がることが予想された。

#### C.1.2.5 ケモカイン発現 AdRGD を用いた腫瘍免疫療法

腫瘍免疫療法において癌細胞の排除に重要な役割をはたしているのは細胞障害性 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、NKT 細胞などの免疫系細胞群である。これらの細胞が癌細胞を傷害するためには、活性化と共に癌組織に浸潤しなければならない。しかしな

がら、免疫系細胞が活性化されているにも関わらず、癌組織に浸潤しないために癌が退縮しないという事例も報告されている。一方近年、ケモカインと総称される細胞遊走と浸潤に関わる分子群が次々と同定されつつある。我々は、ケモカインを腫瘍組織内で発現させることにより、癌のエフェクター細胞が積極的に腫瘍組織内へ送達され、顕著な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、平成12年度は、ILC発現 AdRGD を用いて検討を開始した。そこで平成13年度研究では、癌のエフェクター細胞である T 細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞)、およびエフェクター細胞を活性化する機能を持つ DC に対して遊走活性が報告されているケモカインとして ILC に加えて LARC、FKN をとりあげ、それらを腫瘍内で発現させた際の抗腫瘍効果について比較検討した。OV-HM 癌細胞に AdRGD を用いて効率よくケモカインを発現させ、*ex vivo* 法によりその抗腫瘍効果を評価した結果、AdRGD-FKN および AdRGD-LARC を作用させた OV-HM 細胞を皮下移植した群では、コントロールベクター (AdRGD-Null) を作用させた群と比較して、腫瘍の増殖は同じであったが (Fig. 21)、AdRGD-ILC を作用させた群では顕著な腫瘍増殖抑制が観察され、12 例中 9 例において完全拒絶が認められた。尚、これらケモカイン発現 AdRGD を OV-HM 細胞へ作用させても、作用後の細胞の生存率、増殖などに変化がないことを確認している。そこで次に、ILC の抗腫瘍効果のメカニズム解明を目的に、ILC の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。その結果 ILC は、*in vitro* でレセプターに最も効率良く作用する 1000ng/ml を超える濃度を作用させても OV-HM 細胞の増殖には全く影響を与えなかった (Fig. 22)。このことから ILC の抗腫瘍効果は腫瘍細胞への直接的な増殖抑制作用によってもたらされたのではなく、腫瘍組織内への細胞遊走による作用であることが示唆された。この点を明らかにすべく、腫瘍組織内に浸潤してきた抗腫瘍エフェクター細胞群について、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行ったところ、AdRGD-ILC 群ではコントロール群と比較して CD3 陽性細胞の浸潤が多数認められた (Fig. 23)。そこで ILC の示した抗腫瘍効果が、T 細胞依存的であるかをヌードマウスを用いて検討した。AdRGD-ILC を作用させた OV-HM 細胞をヌードマウスに皮下移植した結果、7 例中、全例において癌の拒絶は認められなかった (Fig. 24)。以上の事実は、ILC の腫瘍内発現によって誘導された抗癌効果が、T 細胞依存的であったことを強く示唆している。しかし、ヌードマウスでの腫瘍の増殖は、AdRGD-Null を作用させた群と比

較して抑制傾向が認められたため、ILC の抗腫瘍効果が T 細胞だけでなく、それ以外の細胞の関与が示唆された。そこで抗腫瘍効果の第二のエフェクター細胞として NK 細胞に焦点を絞り、腫瘍内への NK 細胞の浸潤とその抗腫瘍効果への関与について検討を行った。NK 細胞の浸潤について anti-asialoGM1 抗血清を用いて染色を行った。その結果、AdRGD-Null 作用群ではほとんど NK 細胞の浸潤は認められなかったのに対し、AdRGD-ILC 作用群においては NK 細胞の浸潤が多数認められた (Fig. 25)。ILC の NK 細胞に対する遊走活性については未だ報告がないことから、本現象が ILC の NK 細胞への直接作用であることを明らかにするため、NK 細胞の ILC に対するケモカインレセプター CCR10 の発現を RT-PCR にて検討した。その結果、NK 細胞では既に ILC に対する遊走能が報告されている CD4 陽性細胞と同等の CCR10 の mRNA の発現が確認された (Fig. 26)。以上の結果から、ILC 発現腫瘍で見られた NK 細胞の浸潤は、NK 細胞に対する ILC の直接作用によるものであることが強く示唆された。

#### C.1.2.6 CAR と結合できないアデノウイルスベクターの開発

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターシステムの開発にあたっては、native の受容体である CAR を認識せず、ファイバー領域に挿入した外来ペプチドを介して細胞特異的受容体を認識してのみ感染するベクターシステムの開発が必要である (Fig. 27)。そこでまず、ファイバーノブの FG ループに変異 (ファイバータンパク質の 489 から 492 の 4 アミノ酸を欠損) を導入することで CAR を介した感染は起こらないルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad/ $\Delta$ F-L2 を作製し、その機能を野生型のファイバーをもったベクター Ad-L2 と比較した。SK HEP-1 細胞と HeLa 細胞を用いて遺伝子導入活性を検討した結果、Ad/ $\Delta$ F-L2 は Ad-L2 に比べ約 1/100 の遺伝子導入活性しか示さないことが明らかとなった (Fig. 28)。さらに、Ad/ $\Delta$ F-L2 のファイバーの HI loop に  $\alpha$ V インテグリンと親和性を示す RGD ペプチドを表現させたベクター Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2 における遺伝子導入活性についても検討したところ、Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2 は Ad/ $\Delta$ F-L2 に比べ高い活性を示し、SK HEP-1 細胞で Ad-L2 の 25.2% の活性を、HeLa 細胞で Ad-L2 の 7.2% の活性を示した。従って、Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2 と Ad/ $\Delta$ F-L2 の遺伝子導入活性の差が、ファイバー領域に挿入した RGD ペプチドに依存した活性と考えられた。本ベクターシステムの開発により、



ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター開発の基礎が構築できたと考えられる。

### C.1.3 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発

相同組換え法を利用してウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域（左端約 0.4kb、右端約 0.2kb）以外の全てのアデノウイルス遺伝子を欠損させた gutless (guttled) アデノウイルスベクターを作製した。即ち、E1 欠損領域に LacZ の発現単位をアデノウイルスのゲノムに対して順方向に配したベクター (AdHM4-LacZ1) と逆方向に配したベクター (AdHM4-LacZ2) を作製し、これらを 293 細胞に共感染させた。塩化セシウムの密度勾配遠心法を用いることで、従来型のベクター（相同組換えを起こさなかった E1 欠損型アデノウイルスベクター、即ち AdHM4-LacZ1 と AdHM4-LacZ2）と分離・精製し、gutless アデノウイルスベクター AdG-LacZ を得た (Fig. 29)。作製した AdG-LacZ のウイルスゲノム DNA を解析したところ、約 6kb の DNA が観察され、目的の遺伝子がパッケージングされていることが確認された (Fig. 30)。

上記方法で gutless アデノウイルスベクターが作製できたが、本方法では 2 種類のアデノウイルスベクターを 293 細胞に共感染させることにより目的の gutless ベクターを作製しているため、ロットによりベクターの生成割合が大きく変動するという欠点がある。即ち、293 細胞に作用させる 2 種類のベクターのタイターが微妙に異なると、gutless ベクターの生成割合が減少すると考えられる。そこで、単一のベクターで相同組換えを生じ、gutless ベクターが作製できるシステムの開発を試みた。

アデノウイルスベクターの E1 欠損領域の最右端に 3' ITR 配列を付与したベクターシステムを作製した (Fig. 31)。これにより、E1 欠損領域に挿入した 3' ITR 配列と本来の 5' ITR 配列配列 (3' ITR 配列と 5' ITR 配列配列は極めて相同性の高い配列を有している) との間（あるいはベクター間）で相同組換えを起こし、E1 領域以降の配列を全て欠損したアデノウイルスベクターが開発できると考えられる。そこで、シャトルプラスミド pHM3 に 3' ITR を含むアデノウイルス配列 (bp 35640-35935) を挿入し、モデル遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子とルシフェラーゼ発現カセット (RSV プロモーターをもつ) を挿入したプラスミド pITR-HRSVL1 を作製した。このカセットをアデノウイルスベクタープラスミド pAdHM4 の E1 欠損領域に挿入してベクター

プラスミド pAdHM4-HRSVL2 を作製した。pAdHM4-HRSVL2 を PacI で切断し、293 細胞にトランスフェクションすることによりアデノウイルスベクターを得た。本ベクターを大量調製し塩化セシウムの密度勾配遠心法で精製することで、gutless アデノウイルスベクターが得られることを確認した。現在、本システムの最適化およびベクターの機能確認を検討中である。

### C.2. 次世代非ウイルス (ハイブリッド) ベクターの開発基盤研究

#### C.2.1 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内に送達するための技術開発：ペプチドディスプレイシステムを使った機能性ペプチドの遺伝子導入促進活性の解析

非ウイルス遺伝子導入ベクターの活性は、一般に使用する高分子の物理化学的特性に依存しているため、ベクターに生体膜（細胞膜や核膜）を積極的に通過する活性を付与して性能の向上を図るためには、生物活性を持ったペプチドの利用が不可欠である。しかし、各種ペプチドを含む高分子を合成して一つ一つ DNA との複合体を作ってからその機能を検討するアプローチは、多大なコストと時間を要する。そこで本研究では、タンパク質でできた殻の内部にゲノム DNA が詰め込まれているファージ粒子をポリマーのモデルとして使用し、ファージ表面に遺伝子組換え技術を使って各種ペプチドを呈示できるファージディスプレイシステムを使って、ポリマーミセル型ベクターに細胞膜や核膜を通過できる生物学的機能を付与するための基礎研究を行っている。

平成 13 年度はまず、平成 12 年度に得られた「Tat ペプチド・ディスプレイ・ファージによる細胞への遺伝子導入現象」と「核移行シグナル・ディスプレイ・ファージによる核内への遺伝子標的化」について論文にまとめ発表した。これらの成果は、DNA を微小な粒子状に凝縮し、その外側を核移行シグナルなどの機能性ペプチドで修飾すれば、非ウイルスベクターに細胞膜や核膜を積極的に通過する活性を付与できることを実証したものである。そこで今後は、(1) 合成高分子化合物と核酸の複合体によってディスプレイ・ファージの機能の置き換えることが可能かどうか、(2) 核移行に関してさらに条件（シグナルの質と量、複合体のサイズ）を至適化できるかどうか、という 2 つの点が次の大きな課題となる。

しかし、これまで我々が核へのターゲティングの解析に使ってきたマイクロインジェクション法と間

接蛍光抗体法の組み合わせは、合成高分子を使った複合体を多数スクリーニングするための方法としてはあまり適当ではない。まず、マイクロインジェクション法では1つの細胞に導入できる量が 50 ~ 500 fl (フェムト・リットル、 $10^{-15}$  l) と少ないため、サンプルを高度に濃縮することが求められる。また導入の際に微小な注射針を使うため、サンプルは 0.22  $\mu$ m のフィルターで濾過しなければ針が目詰まりしてしまう。このように相反する条件をスクリーニングの段階から高分子・DNA 複合体に求めるのは現実的ではない。

さらに検出法について言えば、間接蛍光抗体法は対象となる物体が抗原性が高いことを前提としており、通常合成高分子のように抗原性が低い場合は対応できないだけでなく、個々の高分子に対して特異的なプローブを用意する必要がある。また、直接 DNA 分子の細胞内の局在を観察する方法としては、FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法が知られているが、細胞を固定後に変性等のステップが非常に多く、時間がかかる上、経時的に局在の変化を追うこともできなかった。

そこで、平成 13 年度は、これまでの手法の問題点を整理した上で、合成高分子化合物の活性評価に使用可能なシンプルなアッセイ系を開発して NLS ファージの活性を再評価し、以下の結果を得た。

#### 1) *In vitro* 核輸送アッセイ系による NLS ファージの活性の検定 (Fig. 32)

ジギトニン処理で作成した Semi-intact 細胞と細胞質抽出液を使った *in vitro* 系を使って、ファージ粒子の核移行を検討した。その結果、NLS ファージ粒子の核への局在が、細胞質抽出液依存的に観察された。この局在化は、核膜孔に結合してタンパク質の核への能動輸送を阻害する小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin, WGA) によって阻害され、核膜孔を介していることがあきらかになった。このアッセイ系は、マイクロインジェクション法に比べて試料の濃度も低くてすみ、また大量のサンプルをスクリーニングするのに適しているため、今後、より強力な核移行シグナルのスクリーニング等にも有効であろうと考えられる。

#### 2) DNA の蛍光染色による DNA 複合体の検出 (Fig. 33)

これまで我々が用いてきた間接蛍光抗体法に代わる直接的なアッセイ法として、SYBR Green で内部の核酸を標識したファージ粒子を使う方法を確立した。この方法は、非常に簡便で、抗体や蛍光プローブと

の結合といった非特異的なシグナルを生む可能性がある難しいステップを必要とせず、細胞の形態等もよく保存される。また、蛍光の検出に感度の非常に高い CCD カメラを使えば、細胞を固定せずに DNA 自体の挙動を経時的に (たとえば分刻みで 30 分のように) 追跡することも可能で、今後の DNA デリバリーシステムの開発に重要な手段となると考えられる。

#### 3) 電子顕微鏡を使った NLS ファージの細胞内局在と細胞内での形態の観察 (Figs. 34, 35, 36)

これまでに我々が使用してきた光学顕微鏡による観察方法は分解能に限界があるので、どのように高度な装置を使用してもファージ粒子を直接観察することはできず、ファージ粒子が本当に細胞内で分解せずにその形態を保っているのかという根本的な疑問に答えることができなかった。電子顕微鏡を使って観察すればこの問題を解決することができるが、マイクロインジェクションした細胞を電子顕微鏡で観察するのは大海の中の一針を探すようなもので極めて困難だと考えられてきた。しかし、本年度は、特殊なグリッドを持つプラスチック板に細胞を培養することで、任意の細胞 1 個を電子顕微鏡で観察する技術を持っている関西医科大学・山本章嗣博士との共同研究をする機会を得て、核移行シグナル・ディスプレイ・ファージが確かに粒子の形状を保ったまま核膜孔を通過している様子を、透過型電子顕微鏡を使って確認することに成功した。これは DNA を含む粒子状の非ウイルスベクターが、形状を保ったまま核膜孔を通過できることを直接示した世界最初の例で、この研究結果から、ファージ粒子の直径は核膜孔の大きさと同様で、核に能動的に移行できる DNA 複合体の最大直径は約 55 nm であることが確実となった。

以上の結果から、「核膜孔の内径は 25 nm であり、DNA・複合体の直径はこれ以下でなければ、核に能動的にターゲティングすることは不可能である」というこれまでの概念を完全に覆すことができ、DNA・合成高分子複合体を使って核や細胞内へのターゲティングをおこなうための基礎的技術基盤を確立することができた。

#### C.2.2 非ウイルスベクター系において導入遺伝子を核内で安定化させるための技術開発：ヒト染色体の安定化機構に関わるテロメア (染色体末端) の機能解析

ヒトの人工染色体は、遺伝子治療における究極の遺伝子発現系として注目を集め研究されている。し

かし現状では、ヒトの染色体の10から70分の1程度(2,000kbp)の巨大なものしかできていない。一方、我々の研究を含むさまざまな遺伝子導入系の研究からは、実用的な遺伝子発現系のサイズは50kbp(すなわちファージのゲノムサイズ)であることが知られていて、この両者にはまだ大きなギャップがある。これを埋めるためには、DNAが染色体として安定になるために最小限必要な要素を決定する必要がある。

これまでの研究から、染色体の安定性はその末端の構造であるテロメアに依存していることが知られている。我々はその機構の一つとしてテロメア結合タンパク質 TRF1 が最も重要な因子であるという仮説を提案した。この仮説によると、テロメア配列結合タンパク質 TRF1 がテロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub>を細胞内で安定に保つための律速タンパク質として機能しており、染色体の安定性は染色体末端に結合する TRF1 の総量で決定される。つまり、テロメア配列が十分に長い、TRF1 の発現が十分に高いかというどちらかの条件が満たされることが必須であると考えられる。

ところで、自然界にある現象で染色体の安定性と最も密接に関連していると考えられているのは、細胞寿命の決定機構である。通常、ヒトの組織を構成している体細胞は有限の寿命を持っており、ある一定の回数分裂を重ねた時に「細胞老化」を起こして増殖が停止し、やがて死んでいく。このような有限寿命の細胞では、テロメア配列を合成することができる特殊な DNA ポリメラーゼであるテロメラーゼの活性も、また DNA 組換えによってテロメア配列を長く保つことができる ALT (Alternative lengthening of telomere) といった機構も存在しないので、細胞分裂ごとにテロメア配列が50~500bp短縮していく。そしてテロメア配列がある限界以下の長さになると染色体が不安定になり細胞老化・細胞死を招くと考えられている。一方、永久増殖能を獲得した癌細胞など不死化細胞では、テロメラーゼか ALT の機構が存在してテロメア配列を維持しているために細胞老化が起こらないとされてきた(テロメア仮説)。

しかし、このテロメア仮説の弱点は、有限寿命の細胞で細胞死が起こるときのテロメアの長さ(約5kbp)よりはるかに短いテロメア配列を持っている不死化細胞が多数存在していることである(例えば、HeLa細胞では約2kbp)。つまり、テロメア配列の長さが単純に細胞の寿命(あるいは染色体の安定性)を決めているわけではない。我々の昨年度までの研究から不死化細胞では有限寿命の細胞に比べて

TRF1 の活性が優位に高いことが明らかになっており(Fig. 37)、また我々が提出した TRF1 仮説(テロメア配列が十分に長い、TRF1 の発現が十分に高いかというどちらかの条件が満たされることが染色体の安定性を決めるために必須である)は、テロメラーゼや ALT の機構とは無関係な TRF1 の役割を説明し、テロメア仮説の矛盾を説明できるので、細胞の寿命の決定機構として極めて魅力的である。

平成13年度はこの仮説を検証するため、有限寿命のヒト初代培養繊維芽細胞に TRF1 発現ベクターを導入し(Fig. 38)、TRF1 強発現細胞と対照細胞でその寿命を比較した。その結果、TRF1 を強く発現させた細胞は約20回多い分裂寿命を獲得するという結果を得た(Fig. 39)。染色体不安定化に伴ってヒト細胞が老化すると SA (Senescence-associated)-beta-galactosidase が誘導される。細胞寿命に達して分裂が停止した時点で SA-beta-galactosidase 活性を指標に細胞老化の程度を比較すると、対照細胞では100%近い細胞が beta-galactosidase 陽性であったのに対し、TRF1 強発現細胞では約50%が陽性を示すにとどまり、細胞老化という指標からも TRF1 の強発現によって染色体の安定化が起きることが裏付けられた(Fig. 40)。

TRF1 は環状 DNA に組み込まれたテロメア配列にも結合すること、ヒト染色体のテロメアはループ状の構造を取っていること、TRF1 の機能はテロメラーゼのようなテロメアの末端に作用する機構とは完全に独立であることから、TRF1-テロメア配列は環状 DNA を介して染色体を安定化していることが考えられる。この仮説を証明するため、平成13年度はさらに、テロメア配列・EBV複製起点・安定性測定用の Positive-Negative Selection Marker を組み込んだ環状プラスミドと、EBNA1 発現ヒト細胞を作成した。平成14年度はこの系を使って環状 DNA の安定性を検討する予定である。

### C.2.3 非ウイルスベクター系において細胞質内で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発

DNA を使った遺伝子発現系は、前述したように、細胞質から核へ効率よく輸送する機構や核内で安定に維持される機構を付加しなければならないなど、複雑な機能を要求される。そのため、我々は細胞質で安定な遺伝子発現を行うことができる RNA を使った遺伝子発現系の開発を平行して進めている。この発想は、動物細胞と安定に共存し、細胞質で遺伝子を発現できるセンダイウイルスの持続感染という現象の解析からもたらされた。我々はこれまでに、温

度依存性持続感染を行う cl. 151 変異株の解析から、ウイルス粒子を作ることができない条件で持続感染が起こることを示唆する結果が得られている。この結果に基づいて、平成 12 年度は、ウイルス粒子の形成には必須だが遺伝子発現には直接関係ない構造タンパク質の F, HN, M の各ウイルス遺伝子を、発現させたいマーカー遺伝子と置き換えた組み換え体の作成を計画し、センダイウイルス 7 株由来 cDNA をもとに構成タンパク質をコードする遺伝子をマーカー遺伝子で置き換えた RNA ゲノムを作り、RNA レプリコンを再構成した。このゲノムではウイルス粒子の形成に必須な M タンパク質が欠失しており、これまでの研究からは M タンパク質の欠失によって RNA レプリコンの持続感染が成立することが示唆されていたため、持続的なマーカー遺伝子発現が期待されたが結果は一過性であった。また同様の結果が他の研究グループからも発表された。

このように、当初考えてきたように M 遺伝子の変異・欠失だけではマイナス鎖 RNA ゲノムからの持続的な mRNA の転写が起こらない原因として、RNA レプリコンの安定化のためには、これまで知られていない変異がさらに必要であることが強く示唆された。そこで平成 13 年度は、持続感染変異センダイウイルス cl. 151 株とその親株である野生型センダイウイルス名古屋株について、その RNA ゲノム (全長 16 knt) の構造を決定して安定化に必要な変異を同定するプロジェクトを開始した。RNA ゲノムの全長が極めて長いこと、また得られた cDNA クローンを使って直ちに組換え RNA ゲノムを作ることができるように、全長のクローニングは次の 2 つのステップに分けて行う計画を立てた。(1) 全長クローニングに使うプライマー設計のために、ゲノム 3' 末端と 5' 末端の一次構造を決定する。(2) (1) で決定した配列を基に設計したプライマー (T7 RNA polymerase promoter や ribozyme, terminator 配列を含む) を使った全長 cDNA のクローニング。

本年度はまず、精製したゲノム RNA の両端に 40 mer のオリゴ DNA を T4 RNA ligase で共有結合させ、このプライマーと結合できるプライマーを使って PCR (polymerase chain reaction) 法で末端に相補的な DNA 断片を作り、ゲノム 3' 末端と 5' 末端それぞれ約 300 nt の塩基配列を決定した。その結果、この範囲では 2 つの株の塩基配列は完全に一致し、すでに同定されている他のセンダイウイルス株との比較でも、この範囲で安定化につながる特異な変異は検出されなかった。平成 14 年度は、この情報をもとに全長 cDNA 用のプライマーを設計し、16 kbp の cDNA

をラムダファージ Charon 40 を使ってクローニングする計画である。

## D. 考察

### D.1 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

#### D.1.1 複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターシステムの開発 -発現制御型アデノウイルスベクターの開発-

従来のアデノウイルスベクターは増殖に必須の E1 領域を取り除いて、目的遺伝子に置き換えることにより増殖不能ウイルスとしている。この際、アデノウイルスの E3 領域はウイルスの複製には必須でないことから、外来遺伝子の挿入サイズの上昇を目的に、多くの場合削除されている。従って、E1 欠損部位のみならず E3 欠損部位にも外来遺伝子を挿入することが可能であり、目的によっては両者に外来遺伝子を導入する必要がある場合がある。例えば、複数の遺伝子をそれぞれ異なったプロモーターによって発現させるために、両者の発現ユニットを E1 欠損部位に導入したもののプロモーター干渉などのために目的遺伝子を発現させることが出来ない場合などである。しかしながら、アデノウイルスの E3 欠損領域に外来遺伝子を挿入することは、従来の方法では困難であった。そこで、H12 年度に E3 欠損部位にも制限酵素ユニークサイトを挿入することで、E1・E3 両欠損領域にそれぞれ 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで外来遺伝子を導入できるシステムを開発した (我々はすでに E1 欠損領域に 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで外来遺伝子を挿入できる技術については開発済み; Fig. 1)。本システムの開発により、複数のタンパク質が互いに相互作用することで機能を発揮するような分子 (タンパク質) を単一のアデノウイルスベクターで発現させることが可能となった。

本ベクターシステムの適用例として、本年度は外来遺伝子の発現制御系としても最も広く用いられているテトラサイクリンの遺伝子発現制御系をアデノウイルスベクターに搭載させた発現制御型アデノウイルスベクターの開発を試みた。即ち、遺伝子発現制御に必要なコンポーネントを E1・E3 両欠損部位に挿入することにより、単一のベクターでの目的遺伝子の発現制御が可能となる。大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンから得られた調節性因子 (レプレッサタンパク質とオペレーター配列) を利用した遺伝子発現制御系は、転写活性化タンパク質の tTA