

あるいは rtTA と、それらに対する応答配列であるテトラサイクリン制御性のプロモーター下に目的遺伝子を発現するユニットの両コンポーネントから構成される。そこで、tTA あるいは rtTA を発現するユニットを E3 欠損領域へ、目的遺伝子を E1 欠損領域へ挿入したアデノウイルスベクターを作製し、その遺伝子発現誘導能を *in vitro*、*in vivo* の両条件下で比較・検討した。その結果、tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターは tet-on システムを搭載したベクターに比べ、発現制御能、薬剤（ドキシサイクリン）に対する感受性の点で遙かに優れたものであった。

発現を positive に制御できる tet-on システムの方が、遺伝子治療や遺伝子機能解析などの多くの目的には適していると考えられるが、その使用に当たっては注意が必要であり、更なる改良が必要と考えられた。tet-on システムの改良にはテトラサイクリン制御性のサイレンサー作用を利用した tTS（tetracycline-controlled transcriptional silencer）を付与したベクターシステムの開発が考えられる。tTS を発現させることでバックグラウンド活性（非誘導時の遺伝子発現）を下げ、発現制御能の更なる上昇が期待できる。次年度以降は、rtTA に加え、tTS 発現単位をも搭載した改良型 tet-on システムを開発することで、より優れた発現制御型遺伝子導入・発現系の開発を行う予定である。

#### D.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

##### 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と癌遺伝子治療実験への応用

アデノウイルスベクターの感染域は広く、多くの細胞に遺伝子導入が可能であるが、遺伝子治療の重要なターゲットとなっている細胞・組織の一部において、アデノウイルス受容体の CAR の発現が乏しく、本ベクターが適用できない（あるいは十分な機能を発揮できていない）例がある。気道上皮細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、造血幹細胞を初めとする血球系の細胞、樹状細胞、一部の癌細胞などは、CAR の発現が乏しいためにアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率が良くないことが知られているが、これらの細胞に対してもファイバーを修飾したベクターを用いることにより効率良く遺伝子導入できることが予想される。H12 年度においては RGD 配列を有したファイバーミュータントベクター(AdRGD)を用いることで、ヒト由来癌細胞、マウス由来細胞、樹状細胞など様々な CAR negative の細胞において効

率良く遺伝子導入可能なことを示した。H13 年度はさらに、ヒト由来血球系細胞、ヒト由来血管平滑筋細胞における遺伝子導入に関しても AdRGD が有用であることを明らかとした。

また、我々が開発した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においては、任意の外來ペプチドコード遺伝子を 1 ステップの *in vitro* ライゲーションでファイバー領域に挿入できることから、AdRGD で効率良く遺伝子導入出来なかった細胞においても、その細胞に対して親和性のあるペプチド配列をファイバー領域に挿入することで、理論上あらゆる細胞に対して効率良く遺伝子導入可能なベクターが開発できると考えられる。さらに、標的細胞に対する親和性を高めたファイバーミュータントアデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率を改善しベクター投与量を下げることが可能となり、最小限の副作用で最大の効果を上げることが期待できる。

この特性に関する実証例として、自殺遺伝子の HSVtk (herpes simplex virus thymidine kinase) を用いた癌遺伝子治療実験を行った。HSVtk と GCV を用いた癌遺伝子治療法においては、ベクターを腫瘍内に投与するが、CAR の発現が乏しい腫瘍では大量のベクターの投与を必要とすること、それに伴って、腫瘍内から漏れたベクターが肝臓に移行する（マウスのモデルにおいては）ことによって起こる肝障害という副作用が問題となっている。ファイバーミュータントベクターを用いれば、この両者の問題の克服が可能になると考えられる。

本問題について検証したところ、自殺遺伝子の HSVtk を発現する AdRGD を用いることで、マウス腹部皮内に移植した B16 メラノーマに対する抗腫瘍効果が従来型ベクターに比べ約 25 倍上昇し、かつ肝障害の軽減が観察されることを見いだした。この時の遺伝子発現量について検討するため、B16 メラノーマの腫瘍内に、AdRGD-L2 あるいは Ad-L2 を投与したところ、腫瘍内におけるルシフェラーゼ発現は AdRGD-L2 では Ad-L2 の約 40 倍に、一方肝臓（アデノウイルスベクターは全身投与すると大部分のベクターが肝臓に移行するため、腫瘍から漏れ出たベクターは主に肝臓に移行する）における活性は約 1/8 になることを見い出しており、癌遺伝子治療における肝障害の軽減が期待できる。

ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いた場合の癌遺伝子治療実験における有用性は、サイトカインの TNF- $\alpha$  遺伝子を用いた場合にも明らかとなった。TNF- $\alpha$  は発見当初、腫瘍部位に出血

性壊死を誘導する因子として報告され、腫瘍を特異的に傷害するサイトカインとしてその臨床応用が期待された。しかし、他のサイトカインと同様に体内安定性に乏しいために、極度の大量頻回投与を余儀なくされてしまい、その全身投与により重篤な副作用を招いてしまう結果となっている。しかし一方で、局所投与によっては、TNF- $\alpha$  抵抗性のメラノーマ細胞に対してさえ高い奏効率が期待し得ることから、腫瘍組織局所での TNF- $\alpha$  の持続発現を可能とする遺伝子治療法に期待が集まっている。今回、メラノーマ細胞に効率良く遺伝子導入できる AdRGD を用いることにより従来型アデノウイルスベクターと比較して 1/10 の投与量で、高い TNF- $\alpha$  の産生並びに顕著な腫瘍増殖抑制作用が得られることを示した。1/10 の投与量で従来型アデノウイルスベクターと同等の効果が得られる AdRGD は、肝臓への移行性が低下することも考え合わせると、Therapeutic Window を飛躍的に改善出来るベクターになると考えられる。

さらに、TNF- $\alpha$  とは抗腫瘍メカニズムが異なるサイトカインとして IL12 を選択し、両者を併用することにより、更なる抗腫瘍効果が得られたことから、ベクターの改善と搭載する遺伝子の組み合わせの両面から、さらなる癌遺伝子治療の最適化が可能になるものと期待される。

一方、ケモカインは細胞浸潤だけでなく、リンパ球の活性化や増殖、さらには血管新生など、*in vivo* において多彩な機能を持つ。本研究では、癌のエフェクター細胞を遊走させると予想される 3 種のケモカインを AdRGD を用いて 100% の細胞で発現が得られる条件で発現させ、その抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、*in vitro* においてメモリー T 細胞、ランゲルハンス細胞に対して遊走活性を示すことが知られている ILC を癌細胞に発現させることにより、顕著な抗腫瘍効果が得られることを示した。AdRGD で遺伝子導入した腫瘍細胞の増殖は、*in vitro* においてコントロールベクター感染細胞と比較して抑制がみとめられなかったことから、*in vivo* での抗腫瘍効果は、発現した ILC が有する細胞遊走活性に起因することが強く示唆された。さらにこの抗腫瘍効果について解析した結果、ILC 発現腫瘍において浸潤していた細胞が、CD3 陽性細胞、NK 細胞であることを示し、その抗腫瘍効果が T 細胞依存的であることを示した。今後、この腫瘍組織への細胞送達概念に基づいた癌治療法は、癌特異的な T 細胞、NK 細胞を送り込む技術として、CTL 療法やペプチドワクチン療法などとの併用、また T 細胞や NK 細胞を活性化させるサイトカインである IL12 などとの併用によ

り、さらに効果的な腫瘍免疫遺伝子治療法が構築できるものと期待される。

以上のように、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターは、アデノウイルスベクターの適用範囲の拡大のみならず、有効性の向上と共に副作用の大幅な軽減も期待でき、将来の遺伝子治療臨床試験への応用が待たれる。

#### 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癌免疫療法への応用

一般に、DC を含めた生体内の細胞が MHC class I 分子上に提示する抗原は、内在性抗原と呼ばれる細胞質内に発現した非自己あるいは変異タンパクである。従って、免疫療法の標的となる抗原をコードした遺伝子を DC に導入することは、内在性に且つ持続的に抗原を発現させることで DC に効率の良い MHC class I 抗原提示を促すことのできる魅力的な手法である。しかしながら、DC は現存するどの遺伝子導入法に対しても比較的抵抗性を示し、種々の細胞・組織に最も効率良く遺伝子導入可能とされるアデノウイルスベクターを用いてさえ、細胞毒性を発現しないベクター用量で十分な遺伝子導入・発現を達成することは困難である。平成 12 年度の研究において、DC にはアデノウイルスベクター遺伝子導入の最初のステップに不可欠な CAR の発現が極めて乏しいあるいは欠損していることを見出し、また、アデノウイルスベクターファイバーの HI ループに RGD ペプチドに相当するオリゴヌクレオチドを挿入した AdRGD が、従来型アデノウイルスベクターと比較して極めて優れた DC への遺伝子導入・発現効率を示すことを明らかにした。そこで本年度は、DC への遺伝子導入における AdRGD の優位性が、DC-based gene immunotherapy における治療効果増強に繋がるか否かについて、OVA をモデル抗原とした基礎的検討を行った。その結果、細胞毒性を示さない用量の AdRGD を用いて効率良く OVA 遺伝子を導入した DC2.4 細胞では、同用量の従来型アデノウイルスベクターを適用した場合と比較して、MHC class I 分子を介した OVA ペプチド提示レベルの増強が認められ、さらに *in vivo* 免疫した際には、一層効果的な OVA 特異的 CTL 活性の誘導に基づく強力な抗 E. G7-OVA 腫瘍効果が観察された。また、AdRGD-OVA によって十分な OVA 発現を達成された DC2.4 細胞では、効果的な T 細胞の感作・活性化に繋がる MHC 分子・共刺激分子の発現増強ならびに IL12 p40 の産生増強が認められ、成熟していることが示された。これらの結果は、癌患

者末梢血より単離・分化誘導した DC を有効に利用し且つ効果的な免疫応答を惹起するという観点から、DC-based gene immunotherapy において AdRGD が非常に有用性の高いベクターシステムであることを示唆している。しかしながら今回の検討では、OVA がマウスにおいて極めて抗原性の高いモデル抗原であること、ならびに DC として cell line である DC2.4 細胞を用いていること、といった AdRGD を応用した DC-based gene immunotherapy の将来的な臨床展開の可能性を探る上で改善すべき点も残されている。今後、マウスおよびヒト初代培養 DC を用いた AdRGD 遺伝子導入の免疫学的優位性の実証を行うとともに、腫瘍に本来的に発現する腫瘍関連抗原を標的としたマウスモデル実験が不可欠であると考えている。

#### 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の開発にあたっては、CAR を介した感染を阻害することが必要であるが、ファイバーの FG loop の 4 アミノ酸（ファイバータンパク質の 489 から 492 の 4 アミノ酸）を欠損することで CAR とは結合できないベクター Ad/ $\Delta$ F-L2 を作製した。ファイバーの FG loop の 4 アミノ酸を欠損させることで、ファイバータンパク質は構造変化を起こし、CAR とは結合できなくなることが報告されている。作製したベクターの遺伝子導入活性を検討したところ、Ad/ $\Delta$ F-L2 は Ad-L2 の約 1/100 の遺伝子導入活性しか示さず、本ベクターが CAR とはもはや結合できなくなっていることが強く示唆された。しかしながら、この残存遺伝子導入活性は、ペントンベースの RGD モチーフが直接細胞表面上の  $\alpha v$  インテグリンに結合することによって生じたものと考えられることから（ペントンベースを介した感染はファイバーを介した感染に比べ非常に低親和性と考えられているが無視はできないレベルにあると考えられる）、今後はペントンベースの RGD モチーフを欠損させることで、ペントンベースを介した感染ルートもブロックしたベクターの開発も必要になると考えられる。そこで次年度は、CAR と結合できないベクターの *in vivo* での活性（特にマウスに血管内投与後、肝臓への移行性を抑えることができるか否か）を検討すると共に、ペントンベースを介した感染ルートもブロックしたベクターの開発にも取り組んでいく予定である。

#### **D.1.3 低抗原性アデノウイルスベクターシステムの開発**

E1 欠損領域を外来遺伝子に置き換えた従来アデ

ノウイルスベクターの最大の問題点は、動物個体において一過性の遺伝子発現しか示さないことである。しかし、免疫不全マウスを用いた研究においては、長期の外来遺伝子の発現を示すことから、宿主の免疫反応が一過性の遺伝子発現の最大の原因と考えられている。これは逆に、感染細胞内で染色体に組み込まれることがないアデノウイルスベクターにおいても、免疫反応に伴う問題点を解決すれば、長期的な遺伝子発現が期待できることを意味している。

アデノウイルスベクターは動物への全身投与後、以下の 3 種類の免疫反応が生ずることが知られている。1) 投与数時間から数日以内に生ずるベクター粒子そのものに由来するもの。2) 1) に引き続いて 7-10 日以内に生ずるベクターにより産生されたウイルスタンパク質（および外来遺伝子産物）に由来するもの。3) ウイルスタンパク質に対する液性免疫。

1) は生体が元来所有しているウイルスに対する防御機構であり、肝クッパー細胞（肝臓の類洞内皮に存在する貪食性の細胞）の活性化等に伴うサイトカインの産生が中心となる。この免疫反応は、薬剤等でクッパー細胞の活性化を阻害することなどにより抑制できることが報告されている。2) はベクター感染細胞において産生された少量のウイルスタンパク質に対する細胞性免疫が主体をなしている。当初、初期遺伝子の E1 領域を欠損した第一世代のアデノウイルスベクターは、通常の細胞ではウイルスタンパク質の産生は起こらないものと考えられていた。しかし、非特異的な転写などによりウイルスタンパク質の産生は少量ながら起こり、これが細胞傷害性 T 細胞の標的となって、ベクター感染細胞が個体から除去されることが明らかとなった。3) はベクター投与後生ずる抗アデノウイルス抗体であり、2 回目以降のベクター投与による効果を阻害している。この問題に関しては、薬剤を用いることにより一時的に免疫を抑制したり、抗原的に異なった血清型のベクターを作製することで克服しようとするアプローチなどが報告されている。

現在、アデノウイルスベクターにおいて特に問題になっている一過性の遺伝子発現は、2) の免疫反応が原因となっていることから、これを解決するための研究が、様々な方向から精力的に進められている。中でも、抗原性の低いベクターの開発は最も理想的な方法と考えられていることから、本研究では、全てのウイルス遺伝子を欠損し安全面を高めた gutless アデノウイルスベクターの開発を行った。

Gutless アデノウイルスベクターの作製法としては種々のものが報告されているが、現在最も広く用

いられているのは、すべてのウイルスタンパク質の供給をヘルパーウイルス（通常 E1 欠損型ベクター）に依存して外来遺伝子だけを搭載した gutless ベクターを増殖させ、目的のベクターウイルスとヘルパーウイルスを塩化セシウムの密度勾配遠心で物理化学的に分離するというものである。しかしながら、この方法は高タイターのベクターを得るまでには、調製したベクターをヘルパーウイルスと共に何度も（通常 4~5 回以上）293 細胞（あるいは cre 発現 293 細胞）に感染させる必要があるなど、技術的に多くの問題点があることが知られている。そこで本研究では、ヘルパーウイルスを必要とせず、相同組換えを利用した方法で gutless アデノウイルスベクターを作製し、さらにその最適化について検討した。相同組換え法では、従来 2 種類のアデノウイルスベクターを共感染させて gutless アデノウイルスベクターを作製していたが、本研究では、アデノウイルスの 3' ITR 配列を E1 欠損領域に挿入することで 5' ITR 配列との間で相同組換えを期待し、単一のアデノウイルスベクターから gutless ベクターを作製できることを見いだした。今後は、この基盤技術をベースとして、作製した gutless ベクターの機能解析を進めていく予定である。

## D. 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

### D. 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

この 10 年ほどの間に、核と細胞質間のコミュニケーションについては大きく理解が進み、情報伝達を担うタンパク質が核に能動輸送される機構は分子レベルで詳細に解析されている。これらの研究から、核膜が分子量 3 万ダルトン以上の分子に対しては非常にタイトなバリアーとして働いていることが明らかになった。一方、非ウイルスベクターを使って細胞に DNA を効率よく導入しようという流れのなかから、導入過程が次第に詳しく解析されるようになり、細胞膜だけではなく核膜が非常にタイトなバリアーであることが理解されるようになった。このような研究を背景に、核への DNA のターゲティングは急速に注目を集めるようになった。しかし、DNA 分子はタンパク質に比べると遙かに巨大である点とその輸送機構を理解する最も大きな妨げとなってきた。特に、「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」という過去 10 年以上信じられてきた仮説を覆す実験は行われておらず、ウイルスゲノムの核移行も何らかの精巧な仕組みがあるのではないかと考えられてきた。一方では、単純に DNA 分子を核移行シグナルで修飾したら核に移行したという報告も散見されるが、いずれも細胞内での DNA の動態を正確に観察しているとは言い難いし、修飾された DNA は生物学的活性を失っている。

我々は、本研究のこれまでの成果で、「直径 55 nm で内部に DNA を封入したファージ粒子が、適当な核移行シグナルの存在下で核に能動的にターゲティングできる」という仮説を立て、それを支持する証拠を提示してきた。しかし、旧説は今なお広く信奉されており、新しい説を確立するためには、現在タンパク質の核輸送で標準的に使用されているアッセイ系での検討や、核酸染色による DNA の細胞内動態の直接観察、電子顕微鏡による観察といった努力を重ねて、あらゆる証拠が矛盾しないことを示す必要がある。平成 13 年度の研究により、これらすべての系での証拠があつまってこれまでの古い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と考えている。

今後は、この系をより自由に任意の DNA 断片を封入できるような工夫が大切である。これまでに作成した Tat Phage や NLS Phage はすべて、発現したいマーカー遺伝子をファージゲノムの一部として組み込んでいるので、任意の遺伝子を組み込むためには毎回、別のファージ産生大腸菌を作成する必要があった。これでは開発した技術が遺伝子導入系として一般化できないので、平成 14 年度は *Cos* 配列（ファージ頭部へのパッケージングシグナル）を含む任意の環状 DNA を、Tat peptide や核移行シグナルを呈示しているファージの頭部に詰め込むことができる「パッケージング大腸菌」の作成を行う予定である。この系では、少なくとも 40 kbp の直鎖状二本鎖 DNA を直径 55 nm の頭部に詰め込むことができると予想され、次項で計画している人工染色体様活性を持つ DNA を封入するシステムとして十分なキャパシティを持っている。

### D. 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

非ウイルスベクターは、さまざまな構造の DNA を

導入できる自由さはあるが、反面、レンチウイルス・ベクターや AAV ベクターのように宿主の染色体に DNA を挿入する活性はないため、遺伝子発現を長期間安定にしようと思えば、導入する DNA 自体に安定化する機構を付与しておくことが必要となる。言葉を換えれば、一種の小さい人工染色体を開発してこれを導入できればこの目的は解決するはずである。すでに出芽酵母では 15 年以上前から人工染色体が構築されており、ヒトの人工染色体も、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 100 分の 1 程度 (2,000kbp) の巨大なものしかできていないし、なぜこれ以下に小さくできないのかという問題も答えが得られていない。このような現状を背景に、我々はまず、ヒトの染色体がなぜ細胞の中で安定に存在するのかを追究するのが早道であると考え、染色体の安定性を規定していると言われている染色体の末端の構造 (テロメア) に焦点をあてて研究してきた。

テロメアが染色体の安定性に重要であるということは、既に 50 年以上前に、放射線でテロメアを失った染色体が速やかに消失することから知られていた。テロメアの機能としては、大きくわけて次の 3 つが知られている。

(1) DNA ポリメラーゼは DNA 合成にあたって必ずある長さのプライマーを必要とするため、直鎖状の DNA が複製されるたびに、末端は必ずプライマーの長さ分だけ短くなる (末端複製問題)。真核生物の細胞では、この問題を解決するために、末端部分を複製できる専用の DNA ポリメラーゼ (テロメラーゼ) が存在する。テロメラーゼは自分自身の中に RNA の鋳型を持つ複合体酵素であり、この鋳型と相補的な TTAGGG という繰り返し配列が末端に付加されていく。

(2) 染色体が切断されると、DNA の切断面を監視する機構がこれを異常事態と認識して、細胞周期を止めるチェックポイント機構が働く。一方、染色体の末端は DNA の切断面として認識されないが、最近、テロメアがループ状の構造 (t-loop) を取っていることが明らかになり、この構造が末端を保護している機構 (capping) であると考えられている。

(3) 有限寿命の細胞は、テロメラーゼが発現しておらず、細胞分裂ごとにテロメアが短くなっていく。そして、テロメアがある長さを下回ったときに細胞は寿命を迎える。言い換えると、テロメアは細胞の寿命を決定する時計の役割を果たしている。

(3) に関しては、テロメアが短くなると染色体が不

安定になり、細胞死に至るという説明が一般的になされているが、では「なぜテロメアが短くなると染色体が不安定になるのか」という問いに関しては、明快な説明はなされていない。平成 12 年度までの我々の研究で、テロメア配列と TRF1 の相互作用が染色体末端の形成に必須な役割を果たしていることが明らかになっており、この相互作用が核内 DNA の安定性を決めていることが強く示唆された。本年度の成果は、実際に細胞の寿命を TRF1 で変化させることを示したもので、この仮説を強く支持している。TRF1 は環状 DNA にも結合していることが知られているし、実際に染色体末端は t-loop という環状構造を取っているため、環状 DNA を核内で安定化する機構を持っていることが予想される。そこで平成 14 年度は、平成 13 年度に作成したテロメア配列・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を使い、テロメア配列による DNA 安定化現象が、染色体末端とは関係なくヒト細胞で観察されるかどうかを詳細に解析する予定である (この現象はすでに酵母細胞で報告がある)。環状 DNA に要求される *cis* の因子としてはテロメア配列で十分だと考えられるので、この点に特に注目して、TRF1 が認識できない変異テロメア配列 (TTTGGG や TAGGG) などとの差を正確に決定する。さらにテロメア配列と Positive-Negative Selection Marker を持ったベクター DNA に、ヒト染色体複製起点を含むことが予想される 40 kbp ゲノム断片をランダムにクローニングし、ヒト細胞に戻して安定に複製する DNA を選択してその一次構造を検討する。このようにして機能的に選択してきた DNA は、環状人工染色体を構築するための素材となることが期待される。

### D.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。この着想は、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。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 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。

しかし、実際に作成した RNA レプリコンは、確かに一過性にはマーカー遺伝子を発現して再構成に成功したことを示すことができたものの、持続的なマーカー遺伝子発現が得られなかった。そのため、平成 13 年度は、もう一度研究の原点に戻り、センダイウイルスでなぜ安定な持続感染が起こるのかという点について考えてみようという方針を取った。我々の研究の原点となった持続感染変異株 cl.151 株は、持続感染をしない親株（名古屋株）から由来したもので、ゲノム RNA のサイズ等から、ゲノムに大きな欠失等はないと考えられている。すなわち、何らかの点突然変異が持続感染に関与している可能性が強いと考えられる。そこで、まず、名古屋株と cl.151 株の全ゲノムの塩基配列を比較することでヒントを得ようと考えた。

平成 13 年度の結果から、少なくとも 3' 及び 5' 末端 300 nt ずつの部分には 2 つの株での相違は見つからなかった。この結果、細胞内で安定化する変異型 RNA ウイルスゲノムの全長 cDNA クローニングのための準備が整ったので、平成 14 年度は、この情報に基づいて RNA プライマーを設計し、精製したゲノム全長 RNA (約 16,000 nt) の 5' 末端と 3' 末端にそれぞれに特異的な RNA プライマーを T4 RNA ligase を用いて共有結合させ、MMTV 逆転写酵素を使って RNA が二次構造を取りにくい高温で DNA を合成する予定である。できた DNA はラムダファージにクローニングし、変異型・野生型それぞれ 3 クローンについて全長の構造解析を行って、RNA レプリコンの安定化に必要な領域（変異）を推定し、この cDNA を基に実際に RNA レプリコンを再構成して、持続的遺伝子発現に必要な変異を確定したいと考えている。

## E. 結論

### 1. 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

1) 転写活性化タンパク質の tTA あるいは rtTA の発現単位を E3 欠損領域に挿入し、目的遺伝子を E1 欠損領域することで (E1・E3 両欠損領域へ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の開発に関しては H12 年度に報告済み)、単一のベクターで tet-off あるいは tet-on の機能を有したアデノウイルスベクターを作製し、その機能を *in vitro*

および *in vivo* (マウス) の両条件下で検討した。その結果、tet-off システムを搭載したアデノウイルスベクターは優れた発現制御能を示した。一方、tet-on システムを搭載したベクターの発現誘導能は低く、改良が必要と考えられた。

2) アデノウイルスの細胞受容体 (CAR) を認識するファイバータンパク質をコードした遺伝子配列部分 (HI loop) に、 $\alpha v$  インテグリンと親和性を示す RGD 配列を有したアデノウイルスベクター AdRGD を作製し、CAR の発現がない種々の細胞に対しても従来型ベクターの 10-1000 倍高い遺伝子導入活性を示すことを明らかにした。さらに自殺遺伝子やサイトカイン遺伝子 (TNF- $\alpha$ 、IL12) を発現する AdRGD を用いることで、CAR 陰性のマウスメラノーマに対して、従来型ベクターを用いた場合の約 10-25 倍の抗腫瘍効果が得られ、癌遺伝子治療に有用であることを示した。また、AdRGD で癌細胞に ILC を発現させることにより、腫瘍内に T 細胞や NK 細胞を浸潤、集積させることができ、それに伴う強い抗腫瘍作用を誘導することに成功した。AdRGD を用いて効率良く抗原遺伝子を導入した樹状細胞を免疫することで、抗原特異的な免疫応答を誘導できることを示した。また、抗原遺伝子を導入した樹状細胞では、効果的な T 細胞の感作・活性化に繋がる MHC 分子・共刺激分子の発現増強ならびに IL12 p40 の産生増強が認められ、成熟していることを明らかにした。一方、CAR とは結合できないアデノウイルスベクターを開発し、ターゲティング能を有したベクターの開発のための基礎を確立した。

3) 相同組換えシステム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の作製に成功した。これによりアデノウイルスベクターの最大の懸念事項であった抗原性の問題が克服できる可能性が開かれた。さらに、gutless アデノウイルスベクター産生効率の最適化を行った。

### 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

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。

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基盤として、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、さらにそれが細胞の寿命の決定に関わっていることを明らかにした。

3) 細胞質で安定に遺伝情報を発現する RNA レプリコンの開発技術基盤として、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' 末端を確定した。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA : CAR- or  $\alpha v$  integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice., *Gene Ther.*, in press
2. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes., *Gene*, in press
3. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Improvement of adenovirus vectors for gene transfer., *Animal Cell Technology*, in press
4. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Tet-off system is more effective than Tet-on system for regulating transgene expression in single adenoviral vector., *J. Gene Med.*, in press
5. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase., *Cancer Gene Ther.*, in press
6. Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA : Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector., *J. Control Release.*, in press
7. Omori M., Mizuguchi H., Ohsawa K., Kohsaka S., Hayakawa T., Abe K., Shibasaki F. : Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to microglial cell line., *Neurosci. Lett.*, in press
8. Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWARA : Autoinhibitory regulation of p73 by DNp73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the DNp73 promoter., *Mol. Cell. Biol.*, in press
9. Takahashi M, Seki N, Toshinori OZAKI, Kato M, Kuno T, Takahito NAKAGAWA, Ken-ichi WATANABE, Miyazaki K, Ohira M, Hayashi S, Hosoda M, Tokita H, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Satoru TODO and Akira NAKAGAWARA : Identification of the p33ING1-regulated genes which include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG., *Cancer Res.*, in press
10. Yuji NAGAYAMA, Masako KITA-FURUYAMA, Takao ANDO, Kazuhiko NAKAO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsumi Eguchi and Masami NIWA : A Novel Murine Model of Graves  $\gamma$  Hyperthyroidism with Intramuscular Injection of Adenovirus Expressing the Thyrotropin Receptor., *J. Immunol.*, in press
11. Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Gene Therapy for an Established Murine Melanoma Using RGD (Arg-Gly-Asp) Fiber-mutant Adenovirus Vectors., *Jpn. J. Cancer Res.*, in press
12. Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Makiko KANEHIRA, Naoko NISHINO, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI : Fiber-mutant technique can augment gene

- transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors., *Cancer Lett.*, 1777, 57-63 (2002)
13. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system., *Biochim. Biophys. Acta*, 1568, 21-29 (2001)
  14. Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, and Takao HAYAKAWA : Approaches for generating recombinant adenovirus vectors., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 165-176 (2001)
  15. Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA : A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob., *Gene Ther.*, 8, 730-735 (2001)
  16. Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA : In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector., *Bio Techniques*, 30, 1112-1116 (2001)
  17. Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA : Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide., *Biochim. Biophys. Acta*, 1568, 13-20 (2001)
  18. Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA : Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors., *Gene*, 272, 149-156 (2001)
  19. Kouji MARUYAMA, Yasuto AKIYAMA, Noriko NARA-ASHIZAWA, Takashi HOJO, Jin-YAN CHENG, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA and Ken YAMAGUCHI : Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells., *J. Immunotherapy*, 24, 345-353 (2001)
  20. Yuji NAGAYAMA, Eijun NISHIHARA, Hiroyuki NAMBA, Haruhiko YOKOI, Mamoru HASEGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Hirofumi HAMADA, Shunichi YAMASHITA and Masami NIWA : Targeting the Replication of Adenovirus to p53-Defective Thyroid Carcinoma with a p53-Regulated Cre/loxP System., *Cancer Gene Therapy*, 8, 36-44 (2001)
  21. Shinsaku NAKAGAWA, Bernard MASSIE and Robert G. HAWLEY : Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 53-60 (2001)
  22. Jun KUNISAWA, Tsuyoshi NAKANISHI, Ichiro TAKAHASHI, Akiko OKUDAIRA, Yasuo TSUTSUMI, Kazufumi KATAYAMA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroshi KIYONO and Tadanori MAYUMI : Sendai virus fusion protein-mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue immune system., *J. Immunol.*, 167, 1406-1412 (2001)
  23. Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Akira YAMAMOTO : Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells., *Cancer Res.*, 61, 7913-7919 (2001)
  24. Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI : Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 173-179 (2001)
  25. Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Kohei MORI, Yasushige MASUNAGA, Yoshihiro FUJII, Junko FUJITA, Kyoko FUJIMOTO, Tsuyoshi NAKANISHI, Keiichi TANAKA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO : Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1527(3), 97-101 (2001)
  26. Naoki OKADA, Masaki TSUJINO, Yosuke HAGIWARA,



Asami TADA, Yuka TAMURA, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO : Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens., *Br. J. Cancer.*, 84(11), 1564-1570 (2001)

27. Mahito NAKANISHI, Teruo AKUTA, Emi NAGOSHI, Akiko EGUCHI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao SENDA: Nuclear Targeting of DNA., *J. Eur. Pharmacol. Sci.*, 13, 17-24 (2001)
28. Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, Haruhiko YOKOI, Hachiro INOKUCHI, Shigeo FUJITA, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI: Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells., *J. Biol. Chem.*, 276, 26204-26210 (2001)
29. 早川堯夫：遺伝子治療用医薬品の品質，安全性等の確保，バイオ医薬品の品質・安全性評価，早川堯夫，山崎修道，延原正弘編，pp. 341-350 (2001)，エル・アイ・シー，東京
30. 早川堯夫，水口裕之：遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて -次世代アデノウイルスベクターの開発-，*医薬ジャーナル*，37(5)，1514-1546 (2001)
31. 水口裕之，早川堯夫：プラスミド構築に基づいた組み換えアデノウイルスベクター作製技術，*BIO INDUSTRY*，18(7)，5-14 (2001)
32. 水口裕之，早川堯夫：アデノウイルスベクター，バイオ医薬品の品質・安全性評価，早川堯夫，山崎修道，延原正弘編，pp. 383-393 (2001)，エル・アイ・シー，東京
33. 中川晋作，真弓忠範：遺伝子医薬品の DDS，*医薬ジャーナル*，37，1559-1565 (2001)

#### 学会発表

1. 小山英則，門田真砂世，森岡与明，市井拓哉，田中新二，福本真也，塩井淳，水口裕之，早川堯夫，西沢良記：WD repeat protein-1(WDR1)による血管平滑筋細胞のアクチン繊維形成と細胞遊走の調節，第34回日本動脈硬化学会総会，2002年7月，神戸
2. 大島勝也，山崎浩則，魚谷茂雄，喜多篤志，高橋亮子，藤田成裕，桑原宏永，水口裕之，早川堯夫，永山雄二，山口義彦，江口勝美：レプチ

ンのインスリン遺伝子発現に対する抑制効果，第45回日本糖尿病学会年次学術集会，2002年5月，東京

3. 山崎浩則，大島勝也，喜多篤志，魚谷茂雄，高橋亮子，藤田成裕，桑原宏永，水口裕之，早川堯夫，永山雄二，山口義彦，江口勝美：レプチンのインスリン信号伝達とレプチンの信号伝達に与える影響，第45回日本糖尿病学会年次学術集会，2002年5月，東京
4. 喜多篤志，魚谷茂雄，大島勝也，山崎浩則，水口裕之，早川堯夫，永山雄二，山口義彦，江口勝美：Orthovanadateによるレプチン依存性STAT3リン酸化の増強効果，第45回日本糖尿病学会年次学術集会，2002年5月，東京
5. 高橋亮子，魚谷茂雄，喜多篤志，大島勝也，山崎浩則，水口裕之，早川堯夫，永山雄二，山口義彦，江口勝美：エストロゲンによるレプチンシグナルの調節機構，第45回日本糖尿病学会年次学術集会，2002年5月，東京
6. 櫻井文教，水口裕之，小泉直也，細野哲司，石井（渡部）明子，内田恵理子，宇都口直樹，渡辺善照，早川堯夫：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Caco-2細胞への遺伝子導入，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉
7. 徐志利，水口裕之，石井（渡部）明子，内田恵理子，真弓忠範，早川堯夫：各種転写活性化因子の系統的機能評価 -アデノウイルスベクターにおける検討-，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉
8. 形山和史，和田孝一郎，中島淳，吉田幸子，立花雅史，水口裕之，早川堯夫，堤康央，中川晋作，上崎善規，門脇孝，永井良三，真弓忠範：PPAR $\gamma$ 発現アデノウイルスベクターによる炎症性腸疾患治療法の開発，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉
9. 関口文子，長谷和明，形山和史，林哲，堤康央，中川晋作，水口裕之，早川堯夫，真弓忠範：Polyethylene Glycolを用いたバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの粒子設計，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉
10. 吉川友章，山本陽子，形山和史，吉岡靖雄，水口裕之，早川堯夫，堤康央，中川晋作，真弓忠範：アデノウイルスファイバー領域を提示したファージの構築とそのペプチドドライブラリ化，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉
11. 舛永安繁，岡田直貴，斎藤友美，飯山さやか，津田貴司，松原亜沙子，森直樹，水口裕之，早川堯夫，中川晋作，真弓忠範，藤田卓也，山本

- 昌: RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターによるマウス骨髄由来樹状細胞への効率的な遺伝子導入., 日本薬学会第 122 年会, 2002 年 3 月, 千葉
12. 小泉直也, 水口裕之, 細野哲司, 櫻井文教, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 宇都口直樹, 渡辺善照, 早川堯夫: 複数のペプチド配列を発現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, 日本薬剤学会第 17 年会, 2002 年 3 月, 静岡
  13. 井上暢子, 形山和史, 堤 康央, 中川晋作, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範: インテグリン指向性ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの改良とその評価., 日本薬剤学会第 17 年会, 2002 年 3 月, 静岡
  14. 津田育宏, 形山和史, 中山隆志, 畑中豊, 谷洋一, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作, 義江修, 真弓忠範: Cell Delivery による癌治療法の開発~新規ケモカイン ILC の in vivo における細胞遊走能評価と癌治療への応用~, 日本薬剤学会第 17 年会, 2002 年 3 月, 静岡,
  15. 中西真人: ペプチドディスプレイファージを使った遺伝子導入系の開発, 文部科学省特定領域研究「分子シンクロ材料」ミニシンポジウム, 「細胞内トラフィックと薬物ターゲティングのシンクロナイゼーション」, 2001 年 12 月, 京都
  16. 萩山裕之, 上阪 等, 野々村美紀, 水口裕之, 早川堯夫, 宮坂信之: 慢性関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変の試み, 第 29 回臨床免疫学会, 2001 年 12 月, 大阪
  17. 小田玲子, 水口裕之, 鈴木要介, 紙谷浩之, 原島秀吉: アデノウイルスの体内動態と発現に関する定量的解析, 日本薬学会北海道支部第 117 回例会, 2001 年 11 月, 札幌
  18. 水口裕之, 早川堯夫: 遺伝子機能解析に向けた発現制御型アデノウイルスベクターの開発, 第 74 回日本生化学会大会, 2001 年 10 月, 京都
  19. 柴山理恵, 河合 洋, 水口裕之, 川西 徹, 田中光, 田中直子, 重信弘毅, 中村 竜, 早川堯夫: 汎用アルゴンレーザーを励起光源として用いた Yellow Cameleon による細胞内カルシウムイオンの共焦点画像化, 第 10 回 日本バイオイメージング学会学術集会, 2001 年 10 月, 東京
  20. 鈴木康夫, 郭潮潭, 鈴木隆, 宮本大誠, 左一八, 戸谷一英, 村田健臣, 碓氷泰市, 蟹江治, 中西真人, 小林一清: ウイルス感染における受容体結合と人工受容体分子, 第 74 回日本生化学会大会シンポジウム「バイオインスパイアード材料から生命科学へのメッセージ」, 2001 年 10 月, 京都
  21. 中川晋作, 真弓忠範: 遺伝子治療における DDS, 第 16 回日本薬物動態学会年会, 2001 年 10 月, 神戸
  22. 水口裕之, 早川堯夫: HSVtk 発現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抗腫瘍効果増強・副作用軽減, 第 60 回日本癌学会総会, 2001 年 9 月, 横浜
  23. 黒田正幸, Muhamad NASIMUZZAMAN, 脇口宏, 水口裕之, 今井章介: EBNA1 dominant-negative 変異体による EB ウイルス (EBV) 感染細胞からのウイルスエピゾームの「追い出し」, 第 60 回日本癌学会総会, 2001 年 9 月, 横浜
  24. 高橋将人, 関直彦, 尾崎俊文, 久野友子, 中川隆公, 渡邊健一, 宮崎耕, 大平美紀, 加藤真樹, 水口裕之, 藤堂省, 中川原章: INGI 発現低下乳癌の cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析, 第 60 回日本癌学会総会, 2001 年 9 月, 横浜
  25. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Fiber-modified Adenovirus Vectors for Cancer Gene Therapy, 第 2 回文部科学省特定領域研究「がん」6 領域若手研究者ワークショップ, 2001 年 8 月, 長野
  26. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit expanded tropism and increase the size limit of foreign genes., 第 7 回日本遺伝子治療学会, 2001 年 7 月, 東京
  27. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Single Adenovirus Vector Containing a Tetracycline-Controllable Expression System Allows Regulated Transgene Expression In Vitro and In Vivo -Tet-Off System Shows Higher Regulation Than Tet-On System., 第 7 回日本遺伝子治療学会, 2001 年 7 月, 東京
  28. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Fiber-modified Adenovirus Vectors for Gene Therapy., -Enhanced anti-tumor effects and reduced side effects obtained using fiber-modified adenovirus vectors expressing HSVtk and the development of a system for targeting adenovirus vectors-. , 第 7 回日本遺伝子治療学会, 2001 年 7 月, 東京
  29. Takashi HIRANUMA, Atsushi WATANABE, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Makoto MATSUKURA, Teruhisa MIIKE and Takashi SHIMADA: Specific gene expression system for vascular smooth

muscle cells, 第7回日本遺伝子治療学会, 2001年7月, 東京

30. S. Fujita, A. Eguchi, Y. Inoue, T. Ito, H. Matsuda, M. Hasegawa and M. Nakanishi : "Successful *in situ* delivery of Sendai virus-based vectors to rat parenchymal hepatocytes by isolated hepatic perfusion.", 第7回日本遺伝子治療学会, 2001年7月, 東京
31. 水口裕之, 早川堯夫: ターゲッ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 -アデノウイルス受容体CARを介して感染しないベクターシステムの開発-, 第17回日本DDS学会, 2001年7月, 大阪
32. 小泉直也, 水口裕之, 細野哲司, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 宇都口直樹, 渡辺善照, 早川堯夫 : 標的細胞親和性を制御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 -NGR配列を付与したアデノウイルスベクターの開発-, 第17回日本DDS学会, 2001年7月, 大阪
33. 岡田裕香, 中川晋作, 井上暢子, 岡田直貴, 水口裕之, 高橋幸一, 水野亘恭, 早川堯夫, 真弓忠範 : TNF- $\alpha$ 発現ファイバーミュータントアデノウイルスベクターによるマウスメラノーマの遺伝子治療, 第17回日本DDS学会, 2001年7月, 大阪
34. 斎藤友美, 岡田直貴, 飯山さやか, 津田貴司, 松原亜沙子, 森直樹, 水口裕之, 早川堯夫, 堤康央, 中川晋作, 真弓忠範, 藤田卓也, 山本昌: 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抗原遺伝子導入した樹状細胞の免疫学的機能評価, 第17回日本DDS学会, 2001年7月, 大阪
35. 中西真人 : ウイルスベクター開発の現状とDDS, 第17回日本DDS学会シンポジウム「遺伝子療法の展開とDDSへの提言」, 2001年7月, 大阪
36. 中西真人 : 生物機能のシミュレーションによるベクター開発, 遺伝子・デリバリー研究会 2001シンポジウム, 2001年5月, 東京
37. 川西 徹, 河合 洋, 柴山理恵, 水口裕之, 田中 光, 田中直子, 重信弘毅, 早川堯夫 : 生細胞の機能を見る蛍光プローブ -その光と陰- 第53回電顕学会シンポジウム 2001年5月, 福岡
38. Shinsaku NAKAGAWA : Development of fusogenic liposome and its application for cancer gene therapy., International symposium on recent advances in cellular and tissue engineering., Chonnam National University Medical School,

Korea, October 2001

39. T. Morioka, H. Koyama, H. Yamamura, S. Tanaka, M. Emoto, T. Imamura, K. Miyazono, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, I. Kojima, K. Takahashi, Y. Nishizawa : Expression and its role of calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells., American Diabetes Association 62nd Annual meeting (San Francisco), June 14-18, 2002
40. Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Enhanced Anti-tumor Effect by Fiber-modified Recombinant Adenovirus Vectors Expressing Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase., American Society of Gene Therapy, 4th Annual Meeting, 31 May-3 June 2001, Seattle.

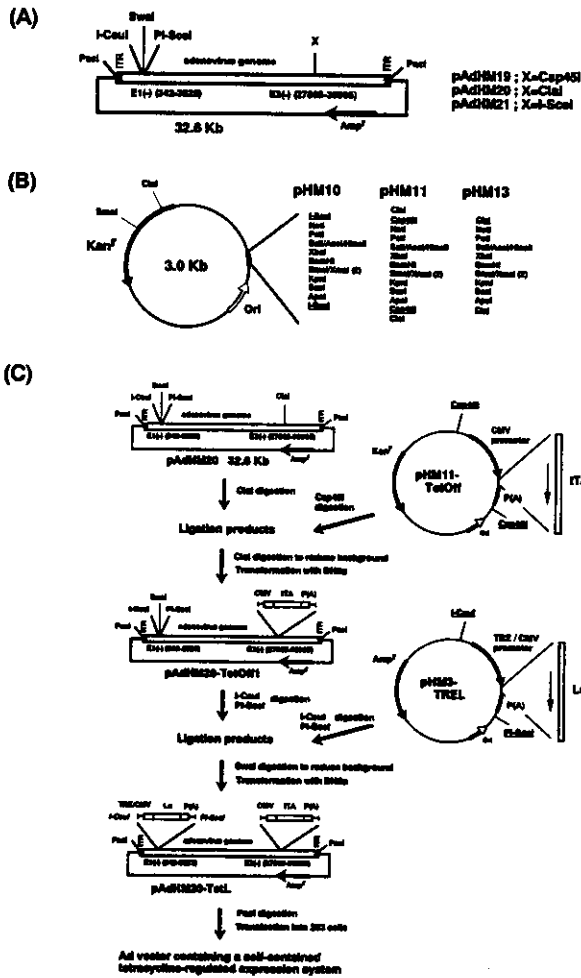
## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 水口裕之, 早川堯夫(発明人); アデノウイルスベクター(アデノウイルスベクターのファイバーHI loopとC末端の両領域への外来遺伝子挿入技術); 特願2002年第56331号
- 2) Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa (Inventors and Applicants); Adenovirus vector; 09/845,160 (米国特許)
- 3) 水口裕之, 早川堯夫(発明人); アデノウイルスベクター(アデノウイルスベクターのファイバーHI loop領域への外来遺伝子挿入技術); 特願2001年第131688号

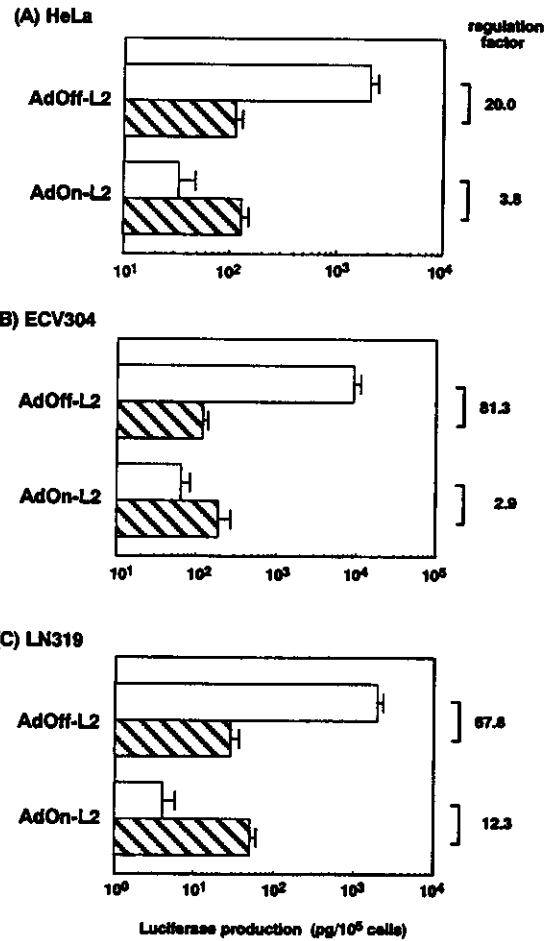
### 2. 実用新案登録

該当事項なし



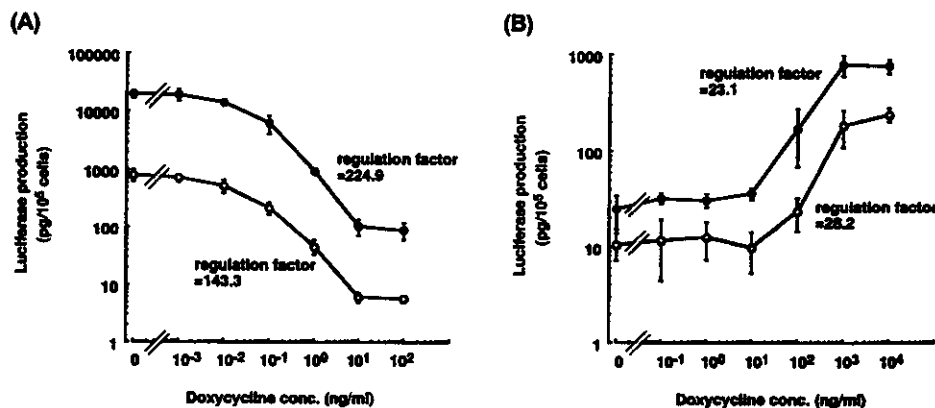
**Fig. 1** Construction of self-contained Ad vector carrying the tetracycline-regulatable gene expression system.

(A) Vector plasmids, pAdHM19, -20, and -21. (B) Shuttle plasmids, pHM10, -11, and -13. (C) Diagram of the scheme for constructing self-contained Ad vector carrying the tetracycline-regulatable gene expression system. pAdHM20 and pHM11-TetOff, in which CMV promoter-driven ITA gene was cloned into pHM11, were digested with *Cla*I and *Csp*45I, respectively, and directly ligated without gel purification of the fragment. Ligation products were digested with *Cla*I to reduce the appearance of parental plasmid, then transformed with *E. coli* (DH5  $\alpha$ ), resulting in pAdHM20-TetOff1. The luciferase gene then driven by a tet-responsive promoter (TRE/CMV), which was cloned into the shuttle plasmid containing I-CeuI and P1-SceI sites, was inserted into the E1 deletion site of pAdHM20-TetOff1 as reported previously (Mizuguchi and Kay, 1999). The resulting plasmid (pAdHM20-TetL) was digested with *Pac*I, and transfected into 293 cells, generating a recombinant Ad vector carrying a tetracycline-regulatable gene expression system.



**Fig.3** Ad-mediated tet-off and tet-on systems in other cell types.

HeLa (A), ECV304 (B), and LN319 (C) cells were transduced with AdOff-L2 or AdOn-L2 (MOI=12). The cells were cultured without (open columns) and with (shaded columns) doxycycline for 48 h. Ten ng/ml and 10<sup>4</sup> ng/ml of doxycycline were used for the tet-off and tet-on systems, respectively. Luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced HeLa, ECV304, and LN319 cells was 0.03, 0.1, and 0.4 pg/10<sup>6</sup> cells, respectively. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments.



**Fig.2** Ad-mediated tet-off and tet-on systems in SK HEP-1 cells. SK HEP-1 cells were transduced with AdOff-L2 (A) or AdOn-L2 (B) (MOI=12, open circles; MOI=100, closed circles), and cultured with medium only or medium containing various concentrations of doxycycline. After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced cells was 0.5 pg/10<sup>6</sup> cells. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments.

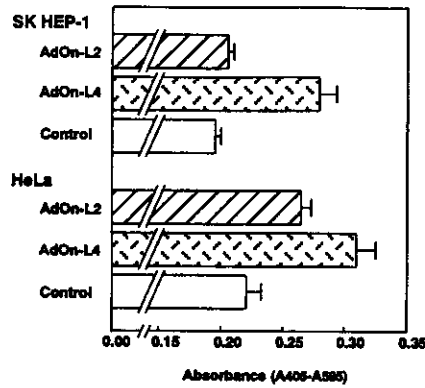


Fig.4 Relative levels of expression of rTA in cells transduced with AdOn-L2 and AdOn-L4. SK HEP-1 and HeLa cells were transduced with AdOn-L2 or AdOn-L4 (MOI=100). As a control, cells were exposed to medium alone. After culture for 48 h, the levels of expression of rTA in the cells was assessed by ELISA with an anti-VP16 polyclonal antibody, as described the Materials and Methods section. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments.

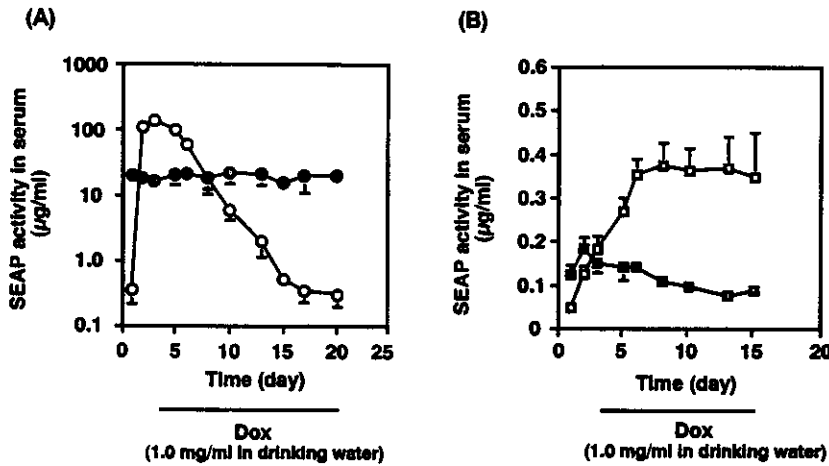


Fig.5 Ad-mediated tet-off and tet-on systems in mice in vivo. Mice (nude) were intravenously injected on day 0 with AdOff-SEAP2 (A, open circles), Ad-SEAP2 (A, closed circles), AdOn-SEAP2 (B, open squares), or AdOn-SEAP4 (B, closed squares) ( $1 \times 10^8$  PFU). From day 3, doxycycline (1.0 mg/ml) was added to the drinking water. Serum SEAP levels were measured on different days. Serum SEAP levels on day 0 (before injection of Ad vectors) were 0.01  $\mu$ g/ml. Each data represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments.

Table 1 Ad vector used in this study

Ad vector	Foreign gene			
	E1 deletion region		E3 deletion region	
	Promoter	GOI	Promoter	GOI
AdOff-L2	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rTA
AdOn-L2	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rTA
AdOn-L4	TRE/CMV	Luciferase	CMV+intron A	rTA
Ad-L2	CMV	Luciferase	—	—
AdOff-SEAP2	TRE/CMV	SEAP	CMV	rTA
AdOn-SEAP2	TRE/CMV	SEAP	CMV	rTA
AdOn-SEAP4	TRE/CMV	SEAP	CMV+intron A	rTA
Ad-SEAP2	CMV	SEAP	—	—

CMV = CMV intermediate-early promoter / enhancer  
 TRE/CMV = tet-responsive promoter containing minimal CMV promoter  
 GOI = gene of interest

Table 2 Comparison of activation of luciferase production between AdOn-L2 and AdOn-L4

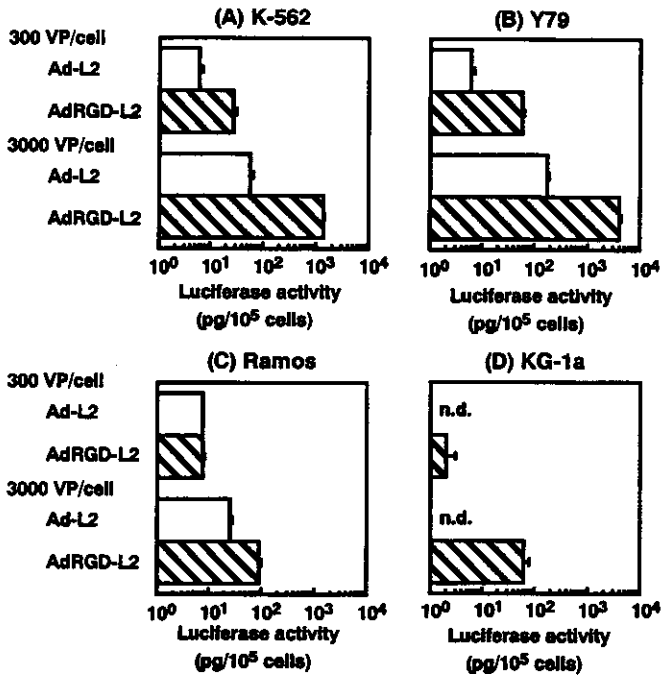
Cell	Luciferase production (pg/ $10^5$ cells)					
	AdOn-L2			AdOn-L4		
	Dox (-)	Dox (+)	Regulation factor	Dox (-)	Dox (+)	Regulation factor
SK HEP-1	16.5 $\pm$ 3.4	243 $\pm$ 40	23.1	24.7 $\pm$ 9.5	788 $\pm$ 181	31.9
HeLa	33.6 $\pm$ 14.5	129 $\pm$ 20	3.8	83.6 $\pm$ 7.1	785 $\pm$ 39	14.1
ECV304	24.2 $\pm$ 1.1	87.2 $\pm$ 9.3	3.6	38.2 $\pm$ 6.8	74.6 $\pm$ 14.2	1.9
LN319	4.1 $\pm$ 1.7	80.5 $\pm$ 6.9	12.3	6.6 $\pm$ 0.8	464 $\pm$ 71	64.9

Cells were transduced with AdOn-L2 or AdOn-L4 (MOI=12), and cultured with or without doxycycline (1000 ng/ml). Forty-eight hours later, luciferase production in the cells was determined. Regulation factor shows the ratio of maximum luciferase production to minimum luciferase production. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four repeated experiments.

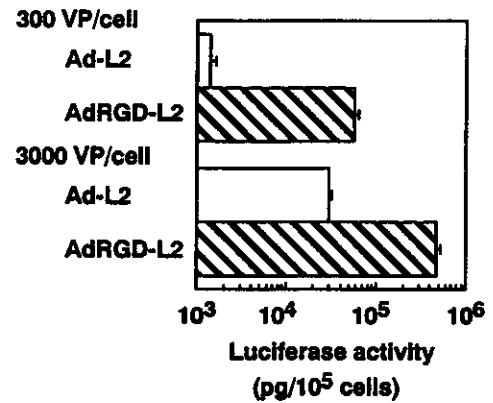
Table 3 Comparison of induced luciferase production in cells transduced with Ad-L2, AdOff-L2, or AdOn-L4

Cell	Luciferase production (pg/ $10^5$ cells)		
	Ad-L2	AdOff-L2	AdOn-L4
SK HEP-1	660 $\pm$ 68	817 $\pm$ 187	788 $\pm$ 181
HeLa	1336 $\pm$ 92	2083 $\pm$ 361	785 $\pm$ 39
ECV304	294 $\pm$ 21	8307 $\pm$ 1619	74.6 $\pm$ 14.2
LN319	741 $\pm$ 34	1968 $\pm$ 32	464 $\pm$ 71

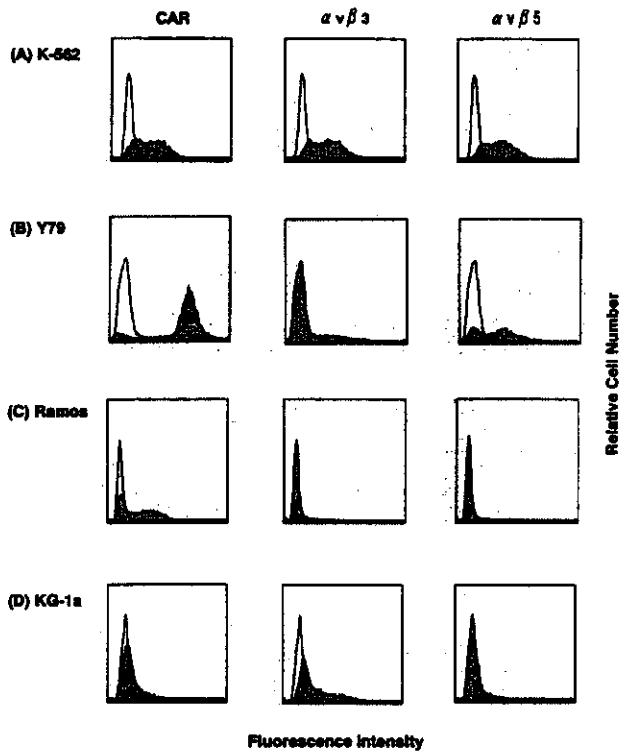
Cells were transduced with Ad-L2, AdOff-L2, or AdOn-L4 (MOI=12), and cultured with or without doxycycline (1000 ng/ml). Forty-eight hours later, luciferase production in the cells was determined. In the case of AdOff-L2 or AdOn-L4, maximal induced luciferase production was shown. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four repeated experiments.



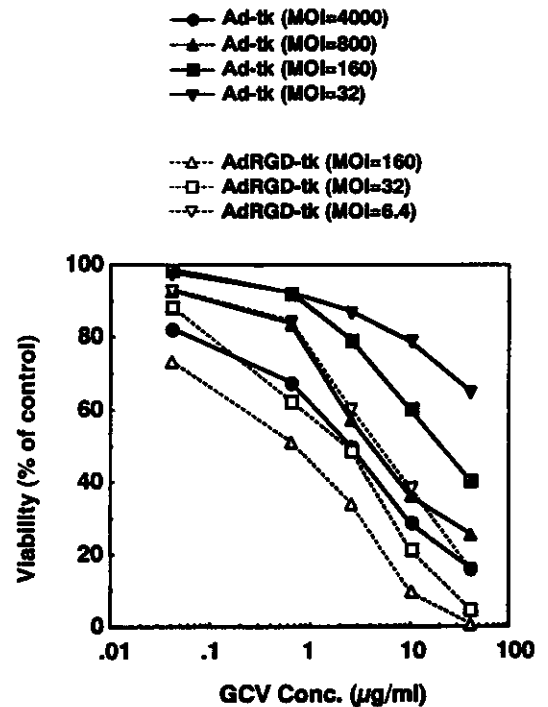
**Fig. 6** Comparison of luciferase production in human leukemia cells transduced by Ad-L2 and AdRGD-L2. K-562 (A), Y79 (B), Ramos (C), and KG-1a (D) cells were transduced with 300 or 3000 VP/cell of Ad-L2 and AdRGD-L2 for 1.5 h. Forty-eight hours later luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four experiments. n.d.; not detectable.



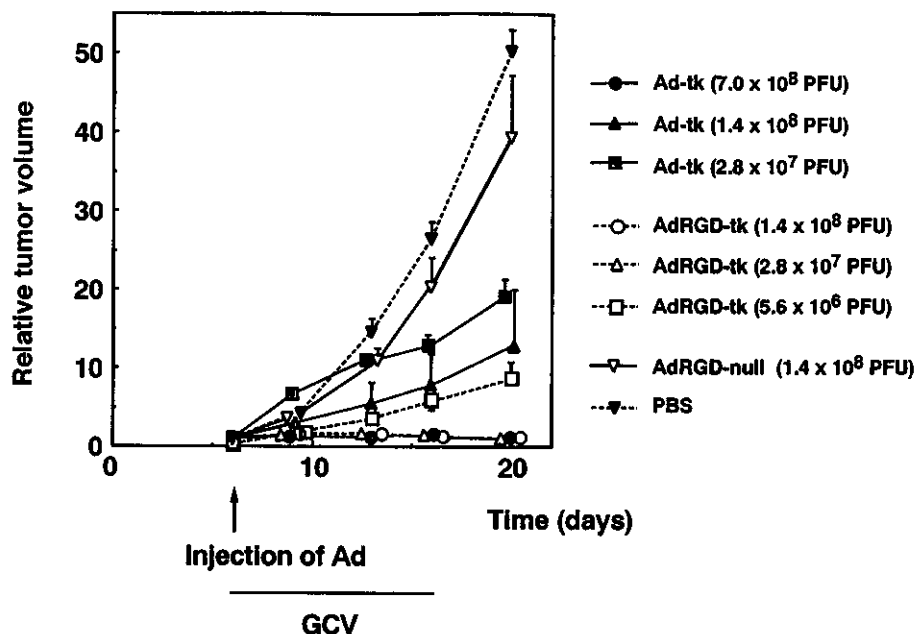
**Fig. 8** Comparison of luciferase production in primary human aortic smooth muscle cells (HASMC) transduced by Ad-L2 and AdRGD-L2. HASMC were transduced with 300 or 3000 VP/cell of Ad-L2 and AdRGD-L2 for 1.5 h. Forty-eight hours later luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four experiments. n.d.; not detectable.



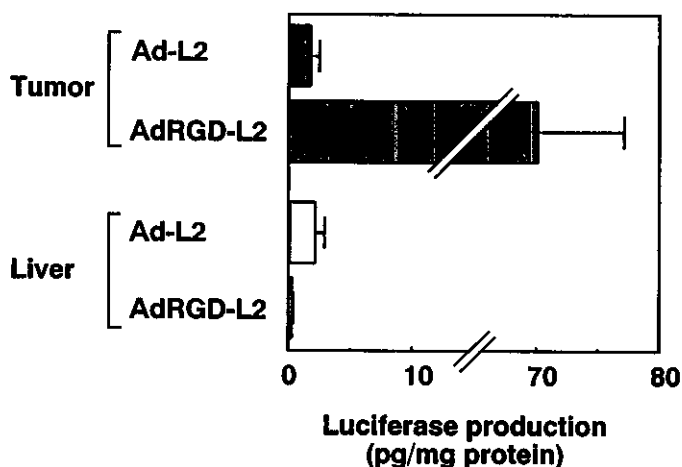
**Fig. 7** Flow cytometric analysis of CAR and Integrin expression in human leukemia cells. Cells were incubated with anti-CAR (RmcB), anti- $\alpha v \beta 3$  (LM609) and anti- $\alpha v \beta 5$  (P1F6) integrin monoclonal antibodies. Then, the cells were incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody, and were analyzed by flow cytometry. (A) K-562; (B) Y79; (C) Ramos; (D) KG-1a.



**Fig. 9** In vitro sensitivities to GCV of B16 cells transduced with Ad-tk or AdRGD-tk. B16 cells were transduced with Ad-tk (MOI=32, 160, 800, or 4000) or AdRGD-tk (MOI=6.4, 32, or 160) for 1.5 h, and cultured with medium containing various concentrations of GCV. Cell survival was measured 4 days later as described in Materials and Methods. Data were expressed as a % of the viability of B16 cells that were transduced with each vector and cultured without GCV. All data represent the mean of two experiments.



**Fig. 10 Enhanced tumor growth inhibition by treatment with AdRGD-tk.** B16 cells ( $5 \times 10^5$  cells) were intradermally inoculated into the abdomens of C57Bl6 mice on day 0, and  $50 \mu\text{l}$  of Ad-tk or AdRGD-tk was injected intratumorally on day 6. Mice were treated once daily with intraperitoneal injections of GCV for 10 days. Tumor growth was monitored by calculating tumor volume on day 6, 9, 13, 16, and 20. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 to 6 mice.



**Fig. 11 Intratumoral and hepatic luciferase productions in mice after intratumoral injection of Ad-L2 or AdRGD-L2.** Ad-L2 or AdRGD-L2 ( $1.4 \times 10^8$  PFU) was injected intratumorally into B16 melanoma-bearing mice. Two days later, the tumors and liver were isolated, and luciferase production was determined. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of 4 mice.

**Table 4 In vivo anti-tumor activity of Ad-tk and AdRGD-tk against B16 solid tumors**

Treatment	Dose ( $\times 10^8$ PFU) <sup>a</sup>	Survival of mice (days) <sup>b</sup>	T/C <sup>c</sup> (%)	Complete regression <sup>d</sup>
Ad-tk	700	$87.0 \pm 15.8$	$>243.6$	3/6
	140	$84.6 \pm 14.7$	$>180.9$	1/5
	28	$44.2 \pm 2.2$	123.8	0/5
AdRGD-tk	140	$104.8 \pm 6.9$	$>293.5$	3/6
	28	$89.2 \pm 11.9$	$>249.8$	2/6
	5.6	$47.4 \pm 1.0$	132.7	0/5
AdRGD-null	140	$38.2 \pm 0.8$	107.0	0/6
PBS		$35.7 \pm 1.1$	100.0	0/6

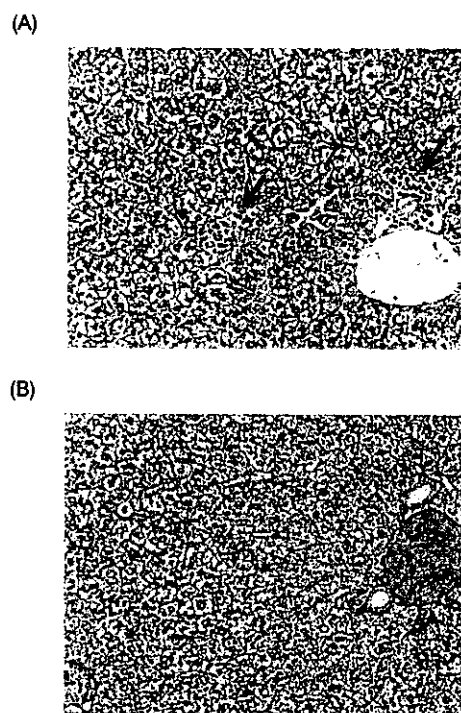
Mice were intradermally inoculated with B16 cells ( $5 \times 10^5$  cells) and  $50 \mu\text{l}$  samples were intratumorally injected on day 6.

a) Administration:  $50 \mu\text{l}$  / mouse

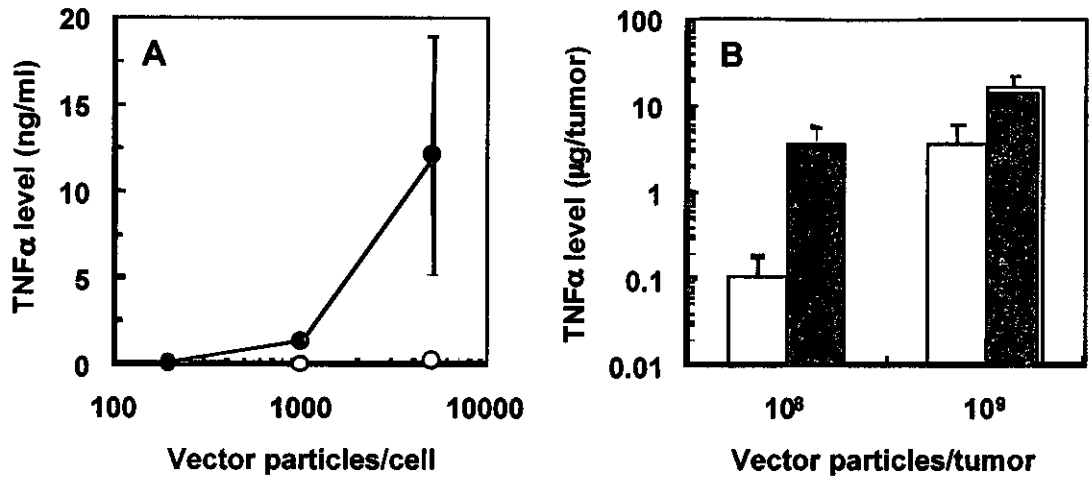
b) Days after tumor inoculation

c) (Survival days of sample) / (Survival days of control, PBS)  $\times 100$

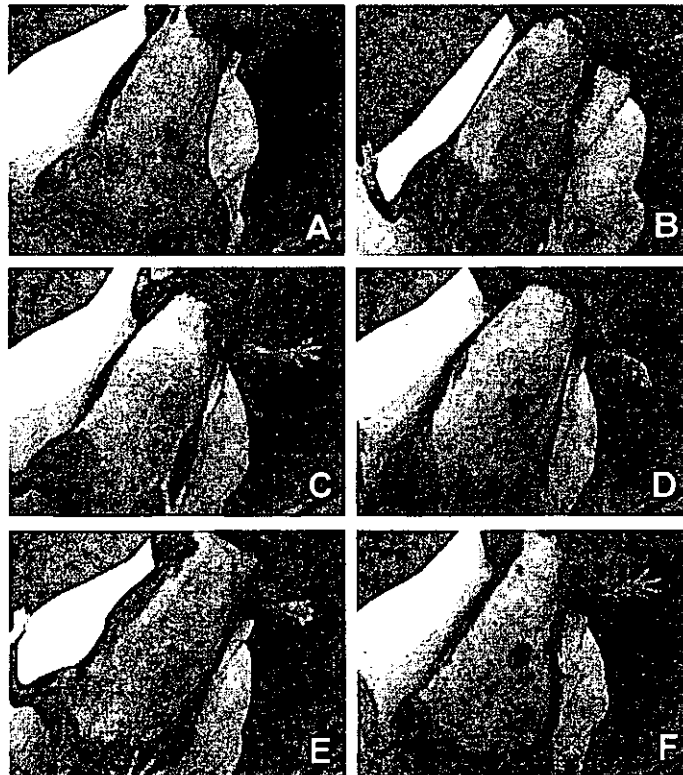
d) Complete regression was defined as a tumor-free mouse surviving more than 120 days. Mean  $\pm$  S.E.



**Fig. 12 Histological analysis of the liver in mice injected intratumorally with Ad-tk or AdRGD-tk.** Ad-tk (A) or AdRGD-tk (B) ( $1.4 \times 10^8$  PFU) was intratumorally injected into B16 melanoma-bearing mice. Seven days later, livers were isolated, and histological analyses were performed using hematoxylin and eosin staining. The arrow shows inflammatory infiltration. The congestion of the portal vein is likely due to an artificial but not significant lesion.

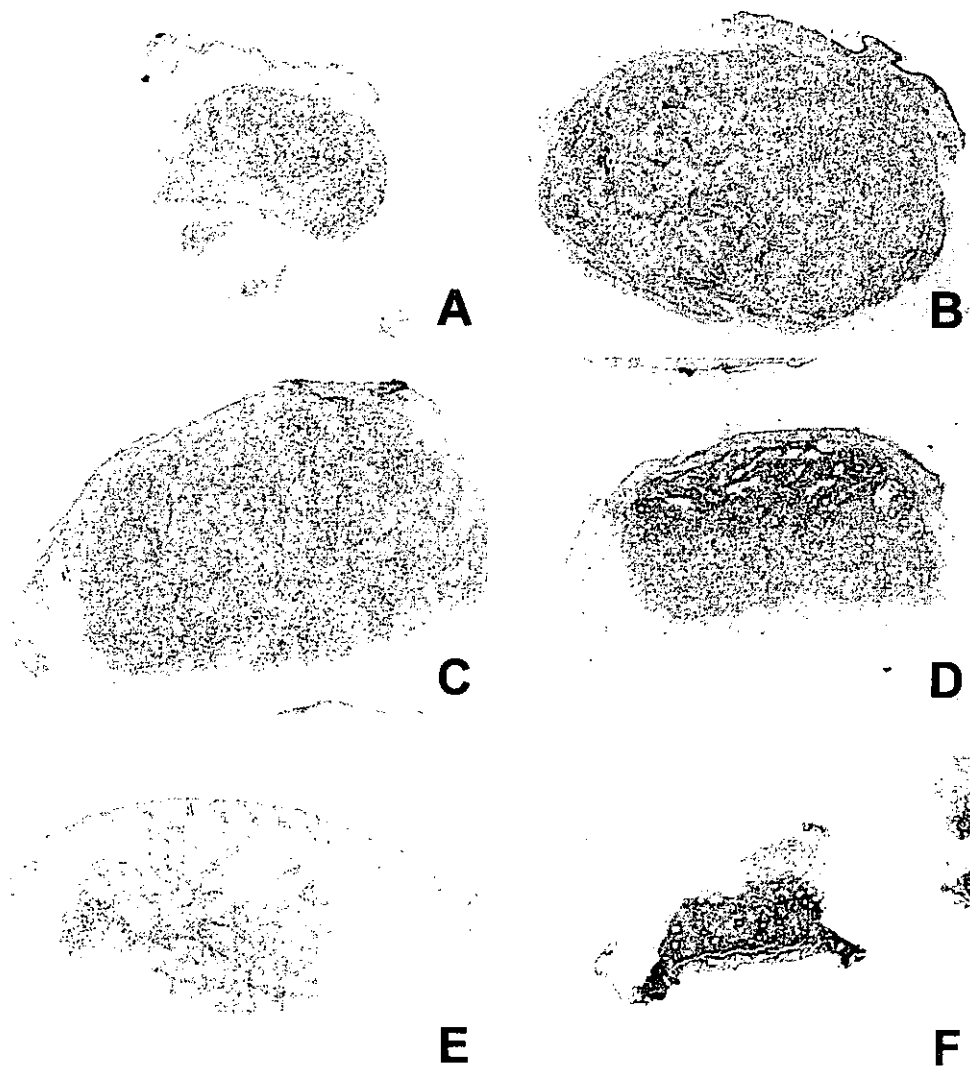


**Fig. 13** The transduction efficacy of TNF- $\alpha$  genes in B16BL6 cells, or tumors by conventional or RGD fiber-mutant Ad. (A): B16BL6 cells were infected with Ad-TNF (○) or AdRGD-TNF (●) at indicated vector particles/cell for 2 hr. Two days later, the level of TNF- $\alpha$  secreted into culture medium was measured. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent cultures. (B): Established B16BL6 tumors in C57BL/6 mice were injected with Ad-TNF (open column) or AdRGD-TNF (closed column) at indicated vector particles/tumor. Two days later, tumors were removed and homogenized. The homogenates were centrifuged and the TNF- $\alpha$  level in the supernatants was determined. Data are presented as mean  $\pm$  SD of four mice.



**Fig. 14.** Photographs of B16BL6 tumors on day 2 after Ad-treatment. (A) PBS treatment; (B) 10<sup>10</sup> AdRGD-LacZ treatment; (C) 10<sup>8</sup> Ad-TNF treatment; (D) 10<sup>9</sup> Ad-TNF treatment; (E) 10<sup>8</sup> AdRGD-TNF treatment; (F) 10<sup>9</sup> AdRGD-TNF treatment.





**Fig. 15. HE staining of paraffin-embedded B16BL6 tumor sections (original magnification, X3.85). (A) On day 2 after PBS administration; (B) on day 2 after  $10^{10}$  AdRGD-LacZ administration; (C) on day 2 after  $10^9$  Ad-TNF administration; (D) on day 2 after  $10^9$  AdRGD-TNF administration; (E) on day 3 after Ad-TNF administration; (F) on day 3 after AdRGD-TNF administration.**

**Table 5. Summary of anti-B16 BL6 tumor effects after Ad-treatment.**

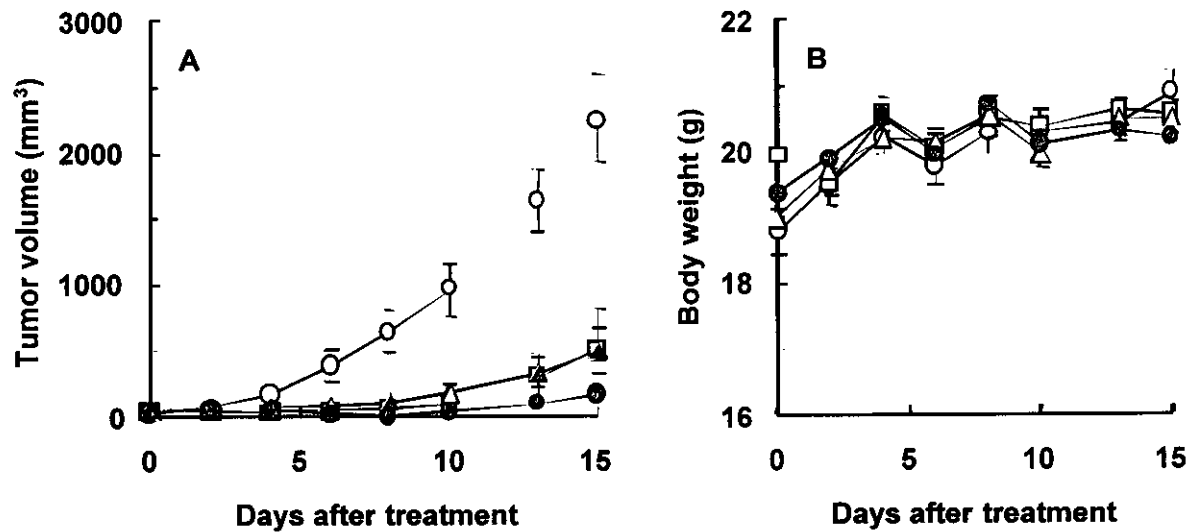
Treatment	VP <sup>a)</sup>	Tumor volume (mm <sup>3</sup> ) <sup>b)</sup>						Complete regression <sup>c)</sup>
PBS	—	1185	2447	2460	3060	3734	3825	0/6
AdRGD-LacZ	$10^{10}$	2173	2228	2497	2530	2771		0/5
AdRGD-TNF	$10^8$	492	799	898	1043	1264	1417	0/6
	$10^9$	46	141	271	472	573	613	0/6
	$10^{10}$	0	0	0	0	4	20	2/6
Ad-TNF	$10^8$	706	1546	1696	1780	2387	2599	0/6
	$10^9$	462	598	938	1107	1984		0/5
	$10^{10}$	0	0	0	907	†	†	1/6

<sup>a)</sup> : Number of vector particles administered.

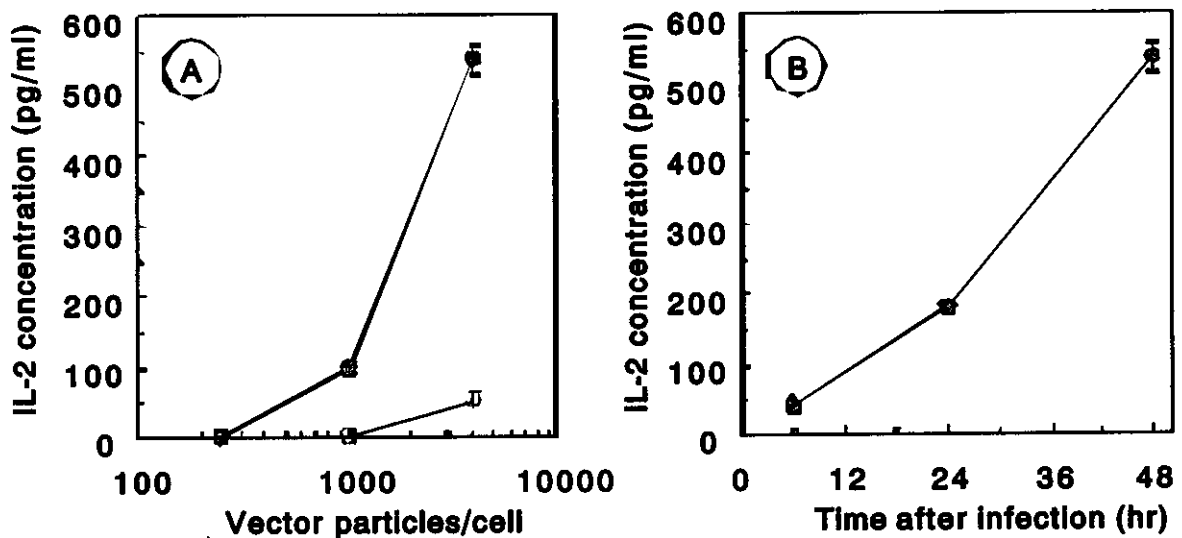
<sup>b)</sup> : Day 21 after tumor challenge, tumor volume (mm<sup>3</sup>) = (major axis) × (minor axis)<sup>2</sup> × 0.5236.

<sup>c)</sup> : Day 90 after tumor challenge, tumor-free mice/all tested mice.

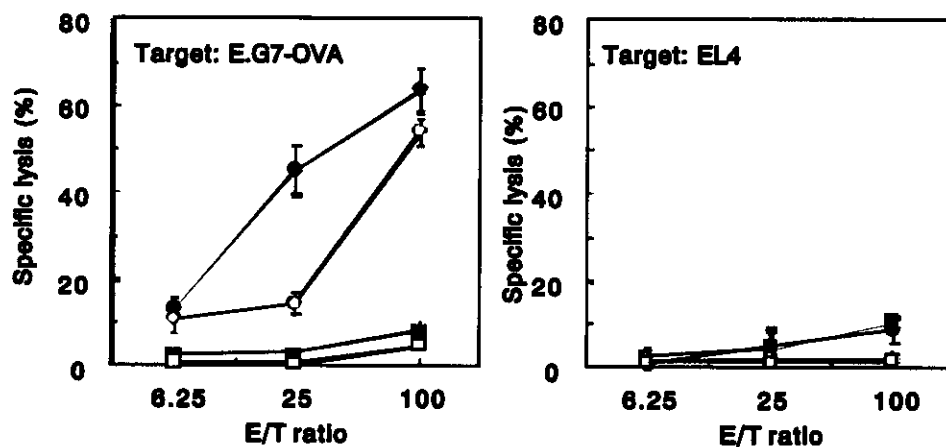
† : Sudden death on day 9 after Ad-treatment.



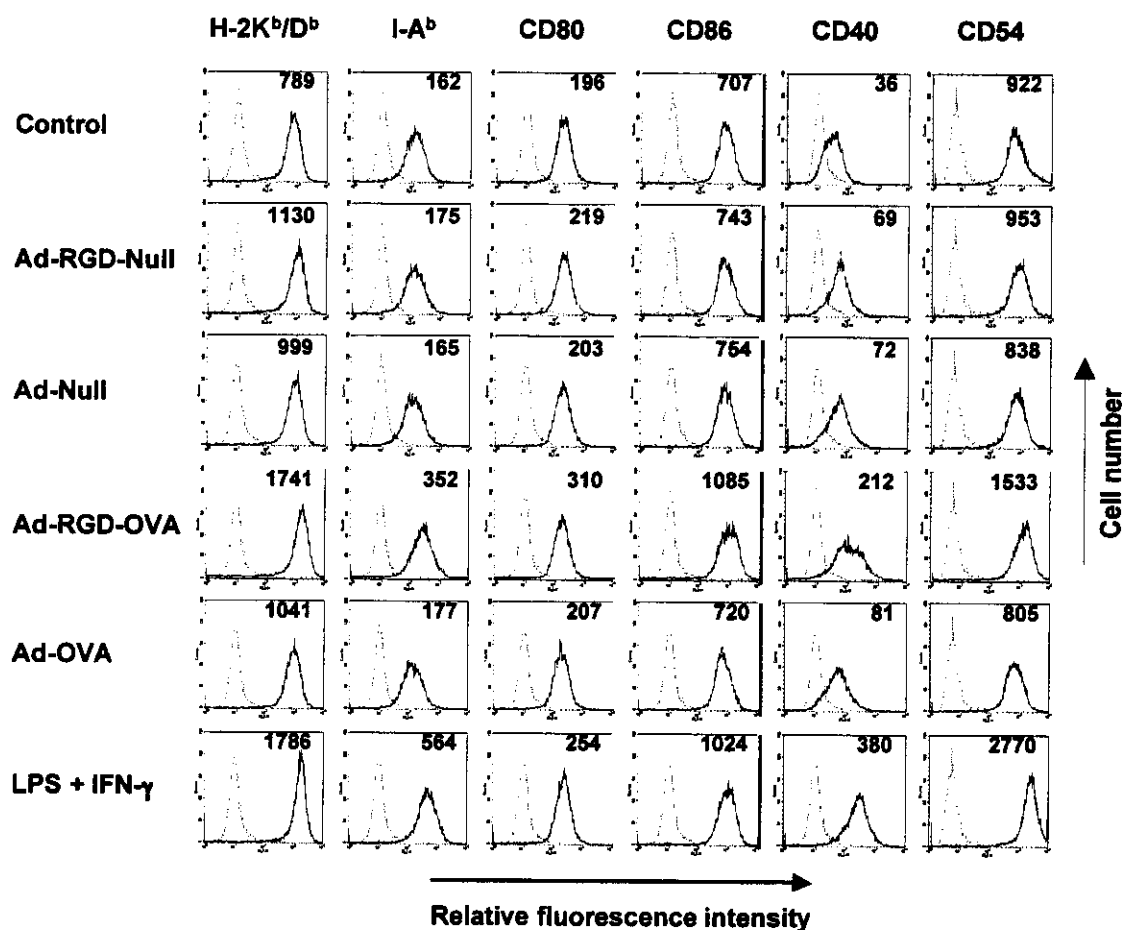
**Fig. 16** Anti-B16BL6 tumor effect and body weight change in response to a combination of AdRGD-TNF and AdRGD-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at  $2 \times 10^5$ /mouse. Six days later, the tumors were injected with  $10^9$  AdRGD-TNF alone (□),  $10^9$  AdRGD-IL12 alone (△), combination of  $5 \times 10^8$  AdRGD-TNF and  $5 \times 10^8$  AdRGD-IL12 (●), or PBS (○). The tumor volume (A) and body weight (B) were determined three times a week. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 5-6 mice.



**Fig. 17** Antigen presentation on MHC class I molecules by DC2.4 cells infected with Ad-OVA or AdRGD-OVA. A, DC2.4 cells were infected with Ad-OVA (○) or AdRGD-OVA (●) at 250, 1000, or 4000 vector particles/cell for 1.5 hr. Two days later, antigen presentation was determined using CD8-OVA 1.3 cells. B, DC2.4 cells were infected with AdRGD-OVA at 4000 vector particles/cell for 1.5 hr. After cultivation for the indicated time, an antigen presentation assay was performed. Each point represents the mean  $\pm$  SE of three independent cultures.



**Fig. 18** OVA-specific CTL responses in mice immunized with Ad-OVA or AdRGD-OVA-infected DC2.4 cells. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of  $1 \times 10^6$  DC2.4 cells transduced by Ad-OVA (○), AdRGD-OVA (●), or AdRGD-LacZ (■). Similarly, intact DC2.4 cells (□) were intradermally injected into mice. One week later, mice were sacrificed, their spleens were removed, and splenocytes were prepared. After in vitro restimulation with E.G7-OVA cells for 5 days, cytotoxic effects of splenocytes against E.G7-OVA cells or EL4 cells were evaluated by Eu-release assay. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 3-5 mice.



**Fig. 19** Immunofluorescence analysis of Ad-infected DC2.4 cells. DC2.4 cells were infected with AdRGD-Null, Ad-Null, Ad-OVA, or AdRGD-OVA at 4000 vector particles/cell for 1.5 hr. DC2.4 cells treated with 10  $\mu$ g/ml LPS plus 100 units/ml IFN- $\gamma$  for 24 hr were used as positive controls for phenotypical DC maturation. At 24 hr after infection, cells were stained by indirect immunofluorescence using biotinylated monoclonal antibodies of the indicated specificities followed by PE-conjugated streptavidin. Dotted lines represent cells stained by PE-conjugated streptavidin only. Value in the upper right-hand corner of each panel represents the mean fluorescence intensity in flow cytometry analysis in the presence of specific antibodies.

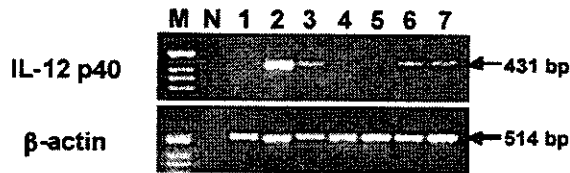
**Table 6. Summary of anti-E.G7-OVA tumor effect by immunization with DC2.4 cells infected with AdRGD-OVA or Ad-OVA**

Ad-treatment for DC2.4 cells (vector particles/cell)	Number of administered	Tumor volume (mm <sup>3</sup> ) <sup>a)</sup>		Tumor-free mice <sup>b)</sup>
AdRGD-OVA (4000)	1×10 <sup>6</sup>	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (4000)	1×10 <sup>5</sup>	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (1000)	1×10 <sup>6</sup>	17.0 ±	11.1	4/6
Ad-OVA (4000)	1×10 <sup>6</sup>	20.4 ±	16.2	4/6
Ad-OVA (4000)	1×10 <sup>5</sup>	72.6 ±	30.3	0/6
Ad-OVA (1000)	1×10 <sup>6</sup>	48.4 ±	19.2	1/6
—	1×10 <sup>6</sup>	144.8 ±	48.2	0/6

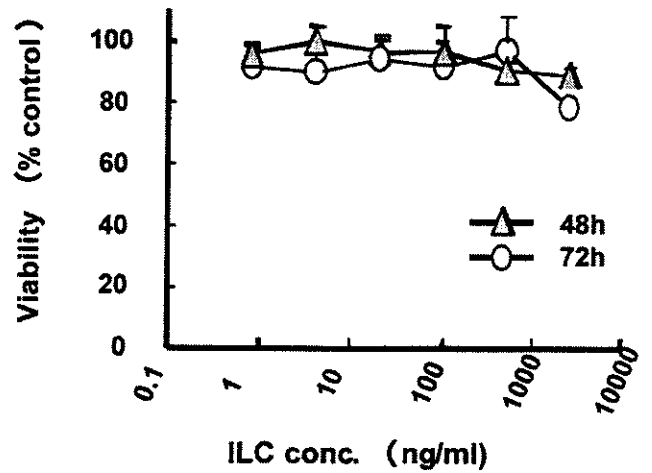
<sup>a)</sup> : Day 9 after tumor challenge, tumor volume (mm<sup>3</sup>) = (major axis) x (minor axis)<sup>2</sup> x 0.5236.

Data are presented as means ± SE of 6 mice.

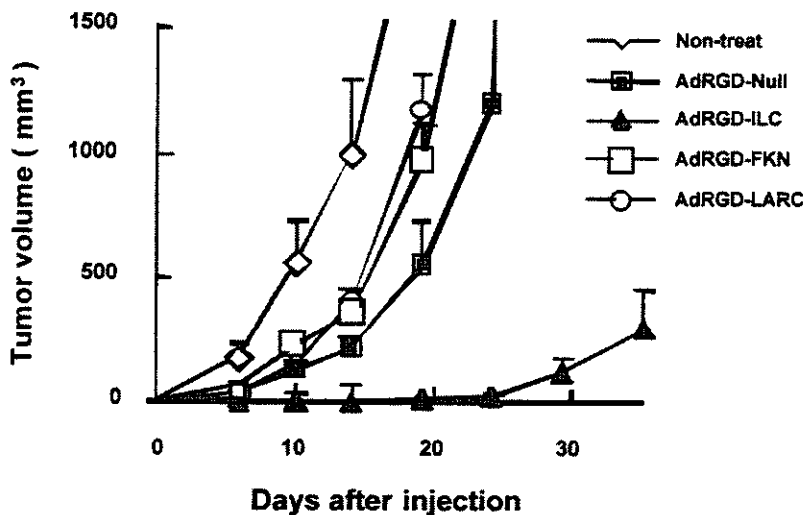
<sup>b)</sup> : Day 21 after tumor challenge, (tumor-free mice)/(tumor-challenged mice).



**Fig. 20 RT-PCR analysis of murine IL-12 p40 in Ad-infected DC2.4 cells.** DC2.4 cells were infected with four types of Ad at 4000 vector particles/cell, and then cultured for 24 h. Lane M: 100 bp molecular ruler, lane N: PCR using water as template lane 1: RT-PCR from intact DC2.4 cells, lane 2: RT-PCR from B16/EMC cells (murine IL-12 transfectant), lane 3: RT-PCR from DC2.4 cells after treatment with LPS for 24 h, lane 4: RT-PCR from Ad-Null-infected DC2.4 cells, lane 5: RT-PCR from AdRGD-Null-infected DC2.4 cells, lane 6: RT-PCR from Ad-OVA-infected DC2.4 cells, lane 7: RT-PCR from AdRGD-OVA-infected DC2.4 cells.



**Fig. 22 ILC have no effect on OV-HM cells proliferation.** OV-HM cells were cultured with rILC for 48 hr or 72 hr. The cell viability was evaluated by MTT assay. Each point represents the mean ± SD.



**Fig. 21 Tumor growth of OV-HM tumor cells transfected by adenovirus encoding each chemokine in B6C3F1 mice.** OV-HM tumor cells were infected at a MOI of 10 with Adenovirus encoding indicated chemokines. After 24 hr, 1×10<sup>6</sup> cells were injected intradermally to B6C3F1 mice. Tumor size were measured at indicated time and values are expressed as means ± SE of at least four mice.