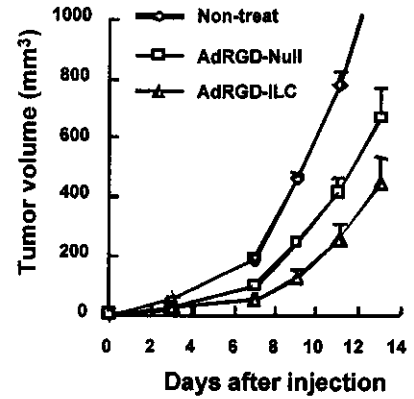
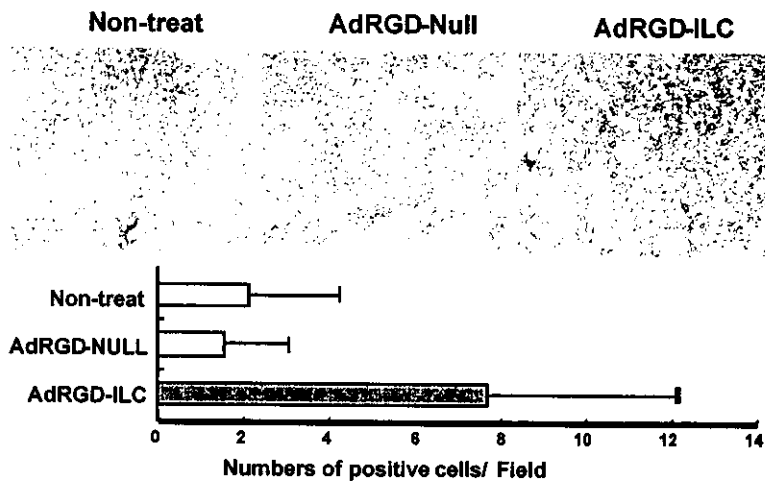


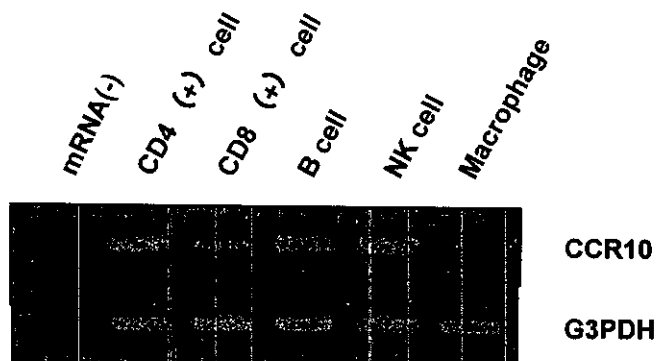
**Fig. 23 CD3 positive lymphocyte infiltrate into ILC transfected OV-HM tumor.** Cryostat sections from frozen tumor nodules from B6C3F1 mice (day2) were immunostained in three step with biotin, streptavidine, and horseradish-peroxidase after endogeneous peroxidase inhibition with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



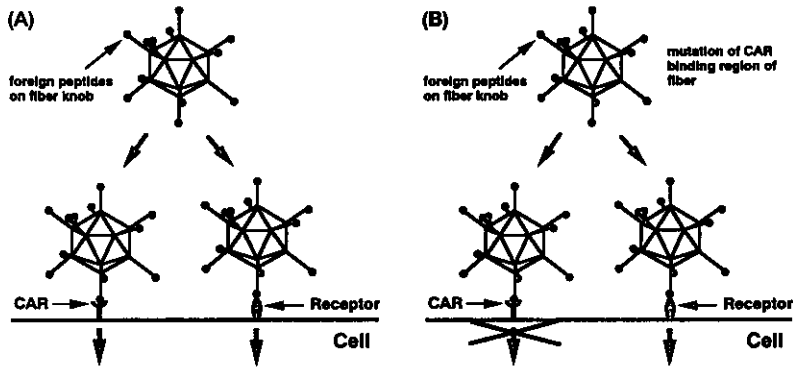
**Fig. 24 Tumor growth of OV-HM tumor cells transfected by adenovirus encoding ILC in Balb/c nude mice.** OV-HM tumor cells were infected at a MOI of 10 with AdRGD-Null or AdRGD-ILC. After 24 hr, 1×10<sup>6</sup> cells were injected intradermally to Balb/c nude mice. Tumor size were measured at indicated time and values are expressed as mean ± SE of five mice.



**Fig. 25 NK cells infiltrate into ILC transfected OV-HM tumor.** Cryostat sections from frozen tumor nodules from B6C3F1 mice (day2) were immunostained in three step with biotin, streptavidine, and horseradish-peroxidase after endogeneous peroxidase inhibition with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

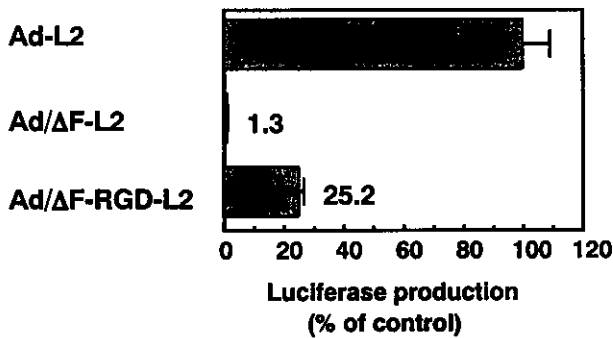


**Fig. 26 RT-PCR analysis of mCCR10 expression in spleen cells.** Total RNA was isolated from CD4(+), CD(8), B, NK and macrophage, and then RT-PCR was performed.

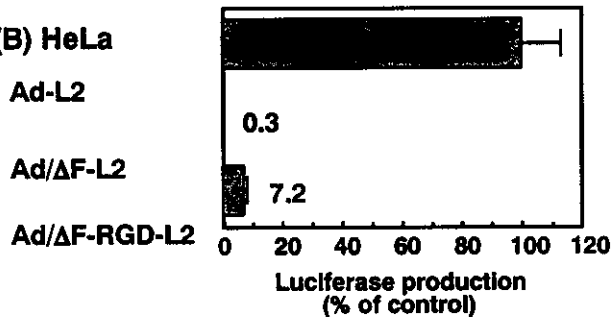


**Fig. 27** Characteristics of gene delivery by conventional Ad vector (A) or CAR-binding ablated Ad vector containing foreign peptides which have affinity to specific cellular receptor (B).

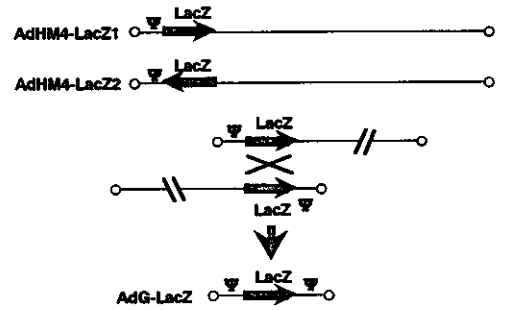
**(A) SK HEP-1**



**(B) HeLa**



**Fig. 28** Comparison of luciferase production in several human cells transduced with Ad-L2, Ad/ $\Delta$ F-L2 and Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2. SK HEP-1 (A) and HeLa cells (B) were transduced with 300 VP/cell of Ad-L2, Ad/ $\Delta$ F-L2 and Ad/ $\Delta$ F-RGD-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.

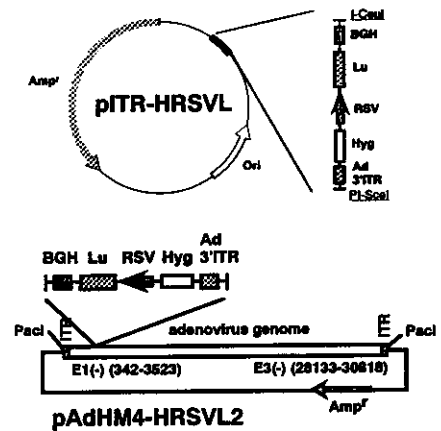


**Fig. 29** Generation of gutless adenovirus vector by recombination

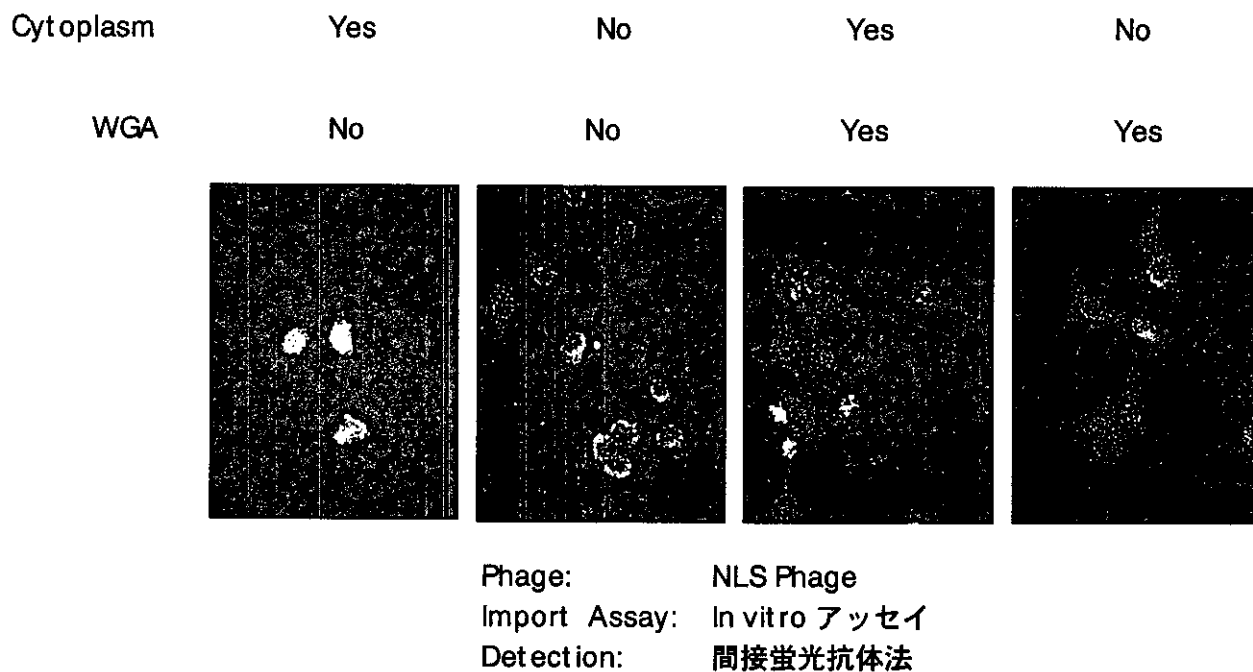


Lane 1.  $\lambda$ -Hind III Digest Marker  
Lane 2. 1 kb DNA Ladder Marker  
Lane 3. AdG-LacZ (gutless virus)  
Lane 4. AdHM4-LacZ1 (full length virus)

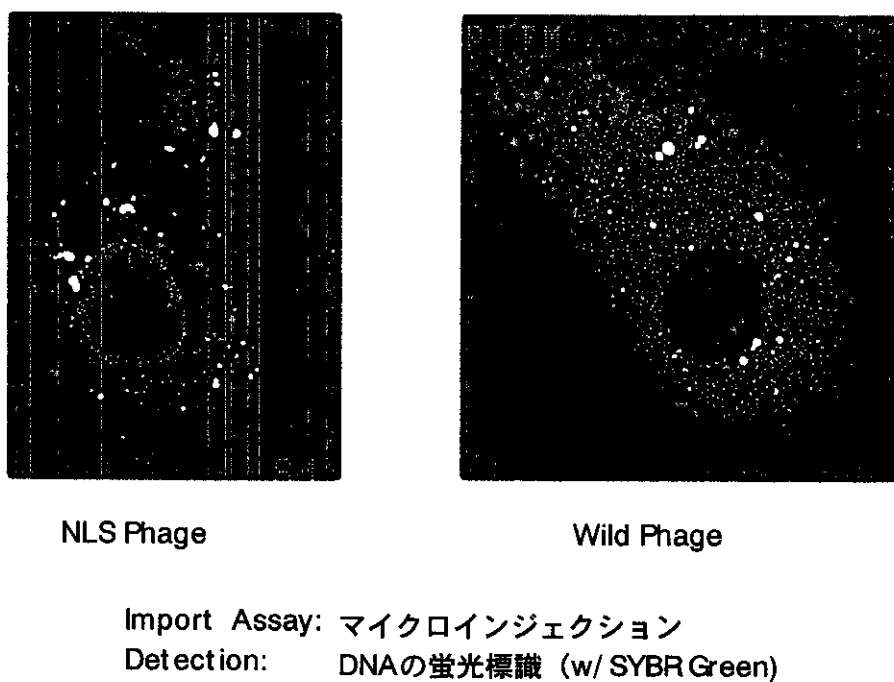
**Fig. 30** DNA analysis of gutless adenovirus vector



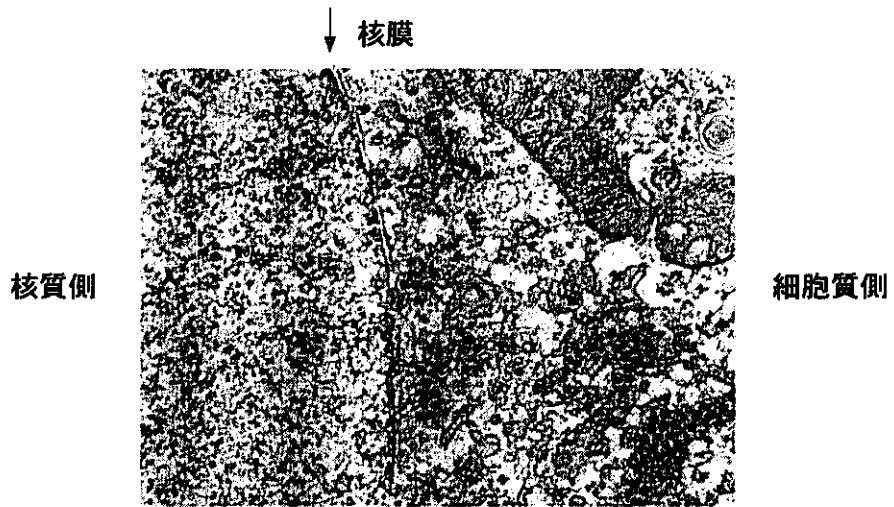
**Fig. 31** Shuttle and vector plasmids for gutless adenovirus vectors using single adenovirus vectors



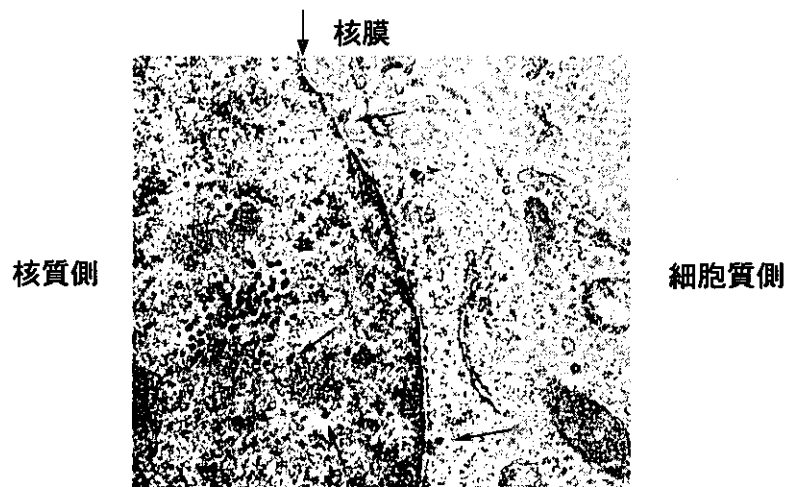
**Fig.32 In vitro核移行系によるNLSファージの活性の検討**



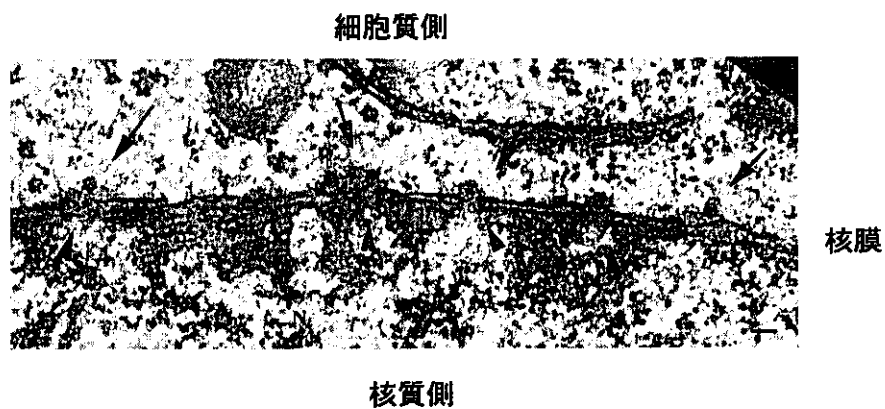
**Fig.33 DNA標識したファージ粒子の細胞内局在**



**Fig. 34** 電子顕微鏡による観察1：細胞質にあるPhage粒子  
(関西医大・山本章嗣博士撮影)



**Fig. 35** 電子顕微鏡による観察2：核内にあるPhage粒子  
(関西医大・山本章嗣博士撮影)



**Fig. 36** 電子顕微鏡による観察3：核膜孔周辺にあるPhage粒子  
(関西医大・山本章嗣博士撮影)

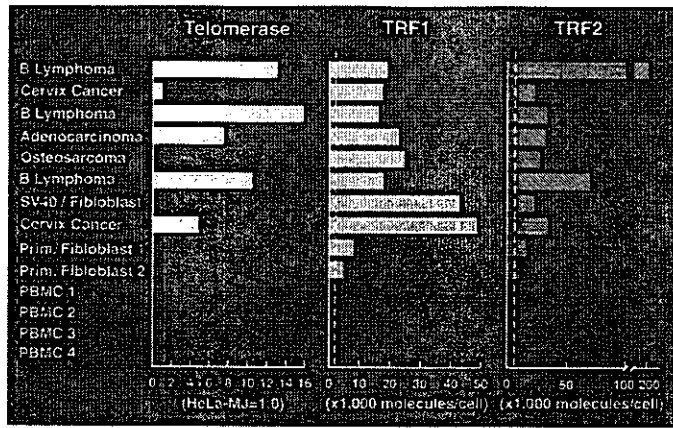
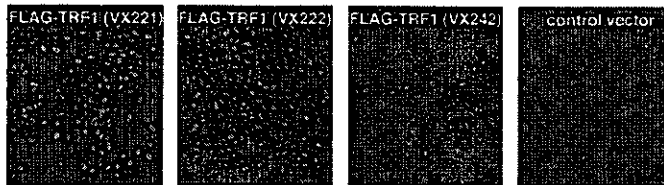


Fig. 37 各種細胞が含んでいるTRF1/TRF2の含量  
上の8つが不死化細胞, 下の6つが有限寿命の細胞

A. Immunofluorescent microscopy analysis (anti-FLAG)



B. Protein blotting analysis (anti-TRF1)

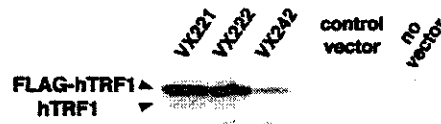


Fig. 38 TRF1を強発現しているヒト初代培養線維芽細胞の単離

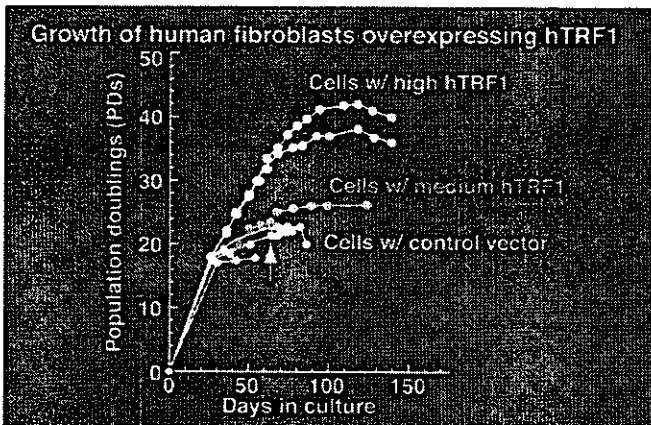


Fig. 39 TRF1を強発現した初代培養線維芽細胞の寿命の変化

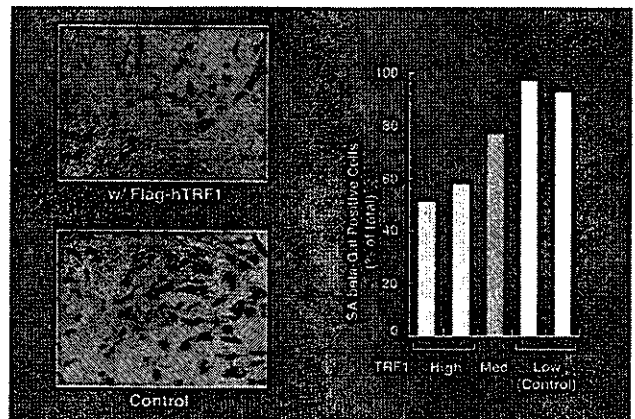


Fig. 40 TRF1を強発現した初代培養線維芽細胞における老化マーカーの発現

## 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究

分担研究者 中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科 助教授

### 研究要旨

次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究として平成12年度は、アデノウイルスベクター (Ad) による遺伝子導入に対して抵抗性を示すメラノーマ細胞や樹状細胞 (DC) が、 $\alpha_v$  インテグリンを発現しているが、Coxsackie-adenovirus receptor (CAR)は極度に低発現であることを明らかにし、その上でこれらの細胞にも効率よく遺伝子導入するためのベクターとして、 $\alpha_v$  インテグリン指向性のある Arg-Gly-Asp (RGD)配列をファイバー領域に挿入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)を作製した。この AdRGD をメラノーマ細胞や DC に適用したところ、従来型 Ad と比較して数倍から数十倍も高い遺伝子発現が認められた。そこで平成13年度は、平成12年度の知見を踏まえ、メラノーマ細胞や DC に対して高い遺伝子発現を達成できる AdRGD の更なる有用性を明らかにすべく、モデル抗原遺伝子を導入した DC の癌ワクチン効果、および腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) やケモカイン (ILC) 遺伝子導入による抗腫瘍作用の機構解明ならびに他のサイトカインとの併用による効果増強など腫瘍免疫遺伝子治療の最適化を試みた。TNF- $\alpha$  遺伝子を用いた B16BL6 メラノーマに対する癌遺伝子治療において AdRGD は、従来型の Ad に比べ高い遺伝子発現を示し、それに伴う強い腫瘍増殖抑制が認められた。TNF- $\alpha$  発現 Ad と interleukin 12 発現 Ad との併用による抗腫瘍効果については、各単独投与に比べて腫瘍増殖抑制作用が増強された。また DC に対しては、AdRGD を用いることにより効果的な抗原遺伝子の導入・抗原提示が可能となり、DC の成熟を示す MHC 分子・共刺激分子ならびにの IL12 の発現増強が認められた。さらにその DC を免疫することで、抗原特異的な免疫応答の誘導できることを明らかにした。ILC の細胞遊走活性に基づく抗腫瘍効果の検討においては、AdRGD-ILC により癌細胞に 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。また、本研究を通じてマウス NK 細胞が ILC のレセプター (CCR10) を発現していることを明らかにした。

### A. 研究目的

現存する遺伝子導入ベクターの中で、アデノウイルスベクター (Ad) の極だった特徴は、他のベクターに比べて極めて効率的かつ高い遺伝子発現を達成できる点にある。しかし、樹状細胞 (DC) やメラノーマ、グリオーマなどの癌細胞、血球系の細胞など、遺伝子治療の重要なターゲットとなっている一部の細胞においては、Ad による遺伝子導入に対して抵抗性を示し、遺伝子発現効率が極端に低い。そのため、これらの細胞を標的とする場合には、高濃度のベクターを適用しなければならず、そのためベクターによる非特異的な組織障害や過度の免疫反応を引き起こすことになる。また一方で Ad の感染域には組織特異性がないので、標的組織局所にベクターを投与してもその組織

から漏れ出た Ad が他の組織や細胞に非特異的に移行してしまい、標的組織以外での過剰な遺伝子発現を招くことになる。従って、このような問題点を克服し、遺伝子治療の最適化を図るには、他のベクターと比べて圧倒的に高い Ad の遺伝子発現効率を保持したまま、標的指向性ならびに感染域の改変を可能とした次世代型 Ad ベクターの開発が必須である。

一般に、Ad が細胞内へと侵入するためには、Ad のファイバーが細胞表面上の Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) に結合し、その後ペントンベースの Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフが接着分子である  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンあるいは  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンに結合する、という二段階の過程が必要である。従って Ad による遺伝子導入に抵抗性を示す細胞では、恐らく CAR の

発現が低いあるいは欠損していると考えられる。そこで平成 12 年度は、Ad による遺伝子導入に対して抵抗性を示す細胞として、DC およびメラノーマ細胞を取りあげ、まずそれら細胞における CAR および $\alpha_v\beta_3$ あるいは $\alpha_v\beta_5$  インテグリンの発現を RT-PCR 解析により確認した。その結果、DC およびメラノーマ細胞では、 $\alpha_v$  インテグリンは十分発現されているものの、CAR は極度に低発現であることを見出した。さらに、この結果に基づいてファイバー領域に Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を導入することにより、標的細胞への結合に $\alpha_v$  インテグリン指向性を持たせたファイバーミュータント Ad (AdRGD)が、従来型 Ad と比較して DC およびメラノーマ細胞への遺伝子導入・発現効率に極めて優れることを見出した。さらに AdRGD の腫瘍免疫遺伝子療法への応用としてサイトカイン (腫瘍壊死因子: TNF- $\alpha$ ) やケモカイン (IL-11 receptor  $\alpha$ -locus chemokine: ILC) 遺伝子を用い、腫瘍免疫遺伝子治療モデル応用実験を試み、顕著な抗腫瘍作用を誘導することに成功した。そこで本年度は、平成 12 年度の知見を踏まえ、モデル抗原遺伝子を導入した DC の癌ワクチン効果、および TNF- $\alpha$  や ILC 遺伝子導入による抗腫瘍作用の機構解明ならびに他のサイトカインとの併用による効果増強など、腫瘍免疫遺伝子治療の最適化を試みた。

## B. 研究方法

### (1) Ad の構築

Ad の作製は、水口らが開発した in vitro ligation 法にて行った。ベクタープラスミドは、pAdHM4 (このベクタープラスミドを用いた場合、従来型 Ad (Ad) ができる) および pAdHM15-RGD (このベクタープラスミドを用いた場合、ファイバーの HI ループに RGD 配列を有する Ad (AdRGD) ができる) を用いた。一方、シャトルベクターは pHMCMV5 あるいは pHMCMV6 を用い、CMV プロモーターの下流にレポーター遺伝子を挿入した。そしてベクタープラスミドの I-Ceu I / PI-Sce I 部位にシャトルプラスミドの I-Ceu I / PI-Sce I フラグメントを挿入し、Pac I で処理した後、superfect (QIAGEN 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10~14 日後 CPE (cytopathic effect) の確認できた 293 細胞を 3000 rpm、5 分間の遠心により回収し、

少量の培養液に懸濁した後、3~4 回凍結融解した。溶液中に遊離してきたウイルスは、遠心操作 (3000 rpm、5 分間) により cell debris を除去した後、少数の 293 細胞に感染させた。CPE が観察されたら先と同様に細胞を回収し、凍結融解、遠心操作による cell debris の除去により高タイトターの CVL (crude virus lysate) を得た。今回作製した Ad は、ベータガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) を発現する Ad-LacZ および AdRGD-LacZ、green fluorescence 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、TNF- $\alpha$  を発現する Ad-TNF および AdRGD-TNF、ILC を発現する AdRGD-ILC、fractalkine (FKN) を発現する AdRGD-FKN、liver and activation-regulated chemokine (LARC) を発現する AdRGD-LARC、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 である。

### (2) Ad の精製

回収した CVL を CsCl の密度勾配 (比重 1.40、比重 1.25) 上に重層し、SW41 rotor (Beckman) を用いて 18 $^{\circ}$ C、35000 rpm で 1 時間遠心した (一次遠心)。チューブ内にできた下方のバンドを回収し (一次精製)、CsCl (比重 1.33) 上に重層し、同様に SW41 rotor (Beckman) を用いて 18 $^{\circ}$ C、35000 rpm で 18 時間遠心した (二次遠心)。二次遠心でチューブ内にできた下方の白いバンドを回収し、4 $^{\circ}$ C にて 1mM MgCl<sub>2</sub> および 10% グリセリンを含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4) あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.4) で透析した。透析終了後、ウイルス液は -80 $^{\circ}$ C で保存した。

### (3) ウイルス粒子の測定

ウイルス粒子数の測定は Maizel らの方法に従って行った。精製したウイルス液を適量とり 0.5% SDS/PBS (-) で溶解した後、吸光度計により OD 260 nm で測定した。得られた測定値を  $1.1 \times 10^{12}$  vector particles / OD<sub>260</sub> より換算した。

### (4) Ad の細胞への結合実験

$10^5$  cells/50  $\mu$ l の B16BL6 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) あるいはコントロール抗体を加えた、水中で 30 分間反応させた後、 $1 \times 10^6$  vector particles/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 Ad の結合を評価した。

(5) 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 B16BL6 細胞および A2058 細胞に、Ad-GFP あるいは AdRGD-GFP を 100、1000、10000 vector particles / 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 %  $\text{CO}_2$  存在下で培養した。2 日後、GFP の発現を FACS にて解析した。

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

B16BL6 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 B16BL6 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 でホモジネートした後、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) を用いて測定した。

(7) 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 時間感染させ、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) を用いて IL2 濃度を定量した。

(8) 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 vector particles/cell の用量で DC2.4 細胞に 1.5 時間感染させた。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。

(9)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。

(10) 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 vector particles/cell で DC2.4 細胞に 1.5 時間感染させ、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%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS) を用いて  $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l に懸濁し、anti-Fc $\gamma$ R2/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-2K $^b$ /D $^b$ ), AF6-120.1 (anti-I-A $^b$ ), 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、FACS Calibur と CellQuest software (Becton Dickinson) を用いて表面マーカー発現レベルを解析した。

(11) 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 vector particles/cellでDC2.4細胞に1.5時間感染させ、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 µg/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)を用いて行った。10 µg total RNA、10 µl 10×PCR buffer、20 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、40 µl 2.5 mM dNTP、1 µM random hexamer、1 µM oligo(dT)、200 U ReverTra Ace (TOYOBO)を含む反応混合液(100 µl)を42°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 µl RT産物、1.25 U Taq DNAポリメラーゼ(TOYOBO)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP、0.5 µMプライマーを含む反応混合液(50 µl)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°C、45秒、アニーリング:48°C、60秒、伸長:72°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β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。

### (12) in vivoにおける抗腫瘍効果の検討

TNF-αおよびIL12発現による抗腫瘍効果の検討は、2×10<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、1×10<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1×10<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10 MOI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。(腫瘍体積; mm<sup>3</sup>) = (腫瘍の長径; mm) × (腫瘍の短径; mm)<sup>2</sup> × 0.5236

### (13) 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1×10<sup>6</sup>個のOV-HM細胞(10 MOI, 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°Cで保存した。その後、6 µmのクリオスタット切片を作製し、4°Cのアセトンで固定した。免疫染色は、アセトン固定後、組織は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、ジアミノベンジジン 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)、Rabbit polyclonal anti-hCD3 antibody(DAKO)、normal Rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology)、Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins(DAKO)である。

### (14) 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8×10<sup>2</sup> cells/well、2×10<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 µl/wellで添加し、37°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 µl/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。

### (15) 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 microbeads 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。

#### (16) 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) を用いて total RNA の抽出を行った。逆転写は、SuperScript II reverse transcriptase (Gibco-BRL) を用い、CCR10 の PCR は、Ex-Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて行った。PCR の条件は、センスプライマーとして 5'-AGAGCTCTGTTACAAGGCTG ATGTC-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、エチジウムプロマイド染色の後、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。

### C. 研究結果

#### 1. ファイバーミュータント Ad を用いたメラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療

平成 12 年度の検討により、メラノーマ細胞に対して AdRGD が、従来型 Ad と比較して高い遺伝子発現が得られることを明らかにした。そこで平成 13 年度は、昨年度の情報をもとに、まず AdRGD による遺伝子導入に関する基礎的検討を行った。まず、蛍光標識した Ad を用いて B16BL6 細胞への結合を検討した結果、AdRGD は従来型 Ad と比較して 5 倍高い結合

を示した (Fig. 1)。しかし、抗 $\alpha_v$ インテグリン抗体の存在下では、その結合は従来型 Ad の結合レベルにまで阻害されたことから、AdRGD は B16BL6 細胞の $\alpha_v$ インテグリンを認識して結合し、感染していることが示唆された (Fig. 1)。

次に Ad-GFP と AdRGD-GFP を用いて、ヒトおよびマウスのメラノーマ細胞に対する遺伝子導入効率ならびに発現効率を FACS 法にて検討した (Fig. 2, Table 1)。B16BL6 細胞において AdRGD-GFP を 10000 vector particles/cell で作用させた場合、65%の細胞に遺伝子が導入され、その導入効率は Ad-GFP と比較して 10 倍高いものであった。また、A2058 細胞においても AdRGD-GFP の遺伝子導入効率は Ad-GFP より優れていた。さらに遺伝子発現効率を平均蛍光強度を指標に両 Ad で比較すると、10000 vector particles/cell では AdRGD-GFP の方が B16BL6 細胞で約 3 倍、A2058 細胞で約 16 倍高かった。

そこでメラノーマ細胞に対して遺伝子導入効率および発現効率が優れている AdRGD を用い、TNF- $\alpha$  遺伝子導入による癌遺伝子療法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、B16BL6 細胞に Ad-TNF を 5000 vector particles/cell で作用させても、TNF- $\alpha$  の産生量は僅かであった (Fig. 3A)。一方、AdRGD-TNF は、用量依存的な TNF- $\alpha$  の産生が見られ、5000 vector particles/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、B16BL6 メラノーマ腫瘍の腫瘍内に Ad を投与し、2 日後に腫瘍組織中の TNF- $\alpha$  量を測定した結果、AdRGD-TNF は、Ad-TNF と比較して  $10^8$  vector particles/tumor 投与で 30 倍、 $10^9$  vector particles/tumor 投与で 5 倍高い TNF- $\alpha$  の産生が認められた (Fig. 3B)。また、 $10^9$  vector particles/tumor の Ad-TNF 投与での TNF- $\alpha$  の産生量は、 $10^8$  vector particles/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. 4)。さらに  $10^9$  vector particles/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. 5)。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 2)。また、AdRGD-TNF を  $1 \times 10^{10}$  vector particles/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 は、従来型の Ad-TNF 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、 $5 \times 10^8$  vector particles の AdRGD-IL12 と  $5 \times 10^8$  vector particles 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 ( $1 \times 10^9$  vector particles) に比べて腫瘍増殖抑制作用が増強された (Fig. 6)。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。

## 2. ファイバーミュータント Ad 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 Ad 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 を感染させた DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示レベルを検討した (Fig. 7)。AdRGD-OVA 感染後 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 vector particles/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. 7A)。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 感染 DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示量は、

感染後の培養時間に依存して増大することが判明した (Fig. 7B)。この結果に基づき以降の検討では、Ad 感染後 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 を感染させた 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 感染 DC2.4 細胞免疫群と比較して、AdRGD-OVA 感染 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. 8)。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. 8)。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 vector particles/cell の AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/mouse で免疫した群では、4000 vector particles/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 3)。さらに、4000 vector particles/cell の AdRGD-OVA を適用した群では、 $1 \times 10^6$  cells/mouse あるいは  $1 \times 10^5$  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 immuno-

therapy 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. 9)。この結果は、Ad 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、わずかではあるが IL12 p40 mRNA の発現増強が認められた (Fig. 10)。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。

### 3. 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。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 を感染させた 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) を感染させた群と比較して、腫瘍の増殖は同じであった (Fig. 11)。一方、AdRGD-ILC を感染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 細胞へ感染させても、感染後の細胞の生存率、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. 12)。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. 13)。そこで ILC の示した抗腫瘍効果が、T 細胞依存적であるかをヌードマウスを用いて検討した。AdRGD-ILC を感染させた 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. 14)。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적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 を感染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感染群ではほとんどNK細胞の浸潤は認められなかったのに対し、AdRGD-ILC感染群においてはNK細胞の浸潤が多数認められた(Fig. 15)。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. 16)。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。

#### D. 考察

##### 1. ファイバーミュータントAd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- $\alpha$ 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Ad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。血中に入ったAdは、肝臓に集積することが知られていることから、腫瘍内へベクターを投与する場合、腫瘍内から漏れ出たAdが肝臓へ移行し、肝臓での遺伝子発現が、副作用発現に大きく寄与してくる。腫瘍組織からのベクターの漏れは、投与量に大きく依存すると予想されることから、1/10の投与量で従来型Adと同等の効果

が得られるAdRGDは、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、今回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。今回はメラノーマに対する癌遺伝子治療の最適化について検討を行ったが、この次世代型ファイバーミュータント型Adシステムは、メラノーマだけでなくCARの発現が乏しい他の癌細胞に対しても適用可能であると考えられ、今後の応用が期待される。

##### 2. ファイバーミュータントAd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Ad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Ad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、Ad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Ad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Ad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。

### 3. ケモカイン発現 AdRGD を用いた腫瘍免疫療法

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得た

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 細胞を活性化す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。

### E. 結論

ファイバーミュータント Ad の遺伝子免疫療法における有用性を評価した結果、以下の結論を得た。

1. AdRGD はメラノーマ細胞に対し、 $\alpha_v$  インテグリンを介して結合・感染し、従来型の Ad に比べて遺伝子導入効率、発現効率ともに著しく改善できるベクターであることを示した。
2. AdRGD-TNF は、B16BL6 メラノーマに対して *in vitro* および *in vivo* 共に Ad-TNF より高い TNF- $\alpha$  産生を示し、それに伴う強い腫瘍増殖抑制が認められた。さらに AdRGD-IL12 と AdRGD-TNF とを併用投与することにより、単独投与に比べて効果的な抗腫瘍効果が得られた。
3. AdRGD を用いることにより、樹状細胞において効果的な抗原遺伝子の導入・抗原提示が可能となり、その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が示された。
4. AdRGD によって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、成熟していることが示された。
5. AdRGD-ILC により癌細胞に 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。また、本研究を通じてマウス NK 細胞が ILC のレセプター (CCR10) を発現していることを明らかにした。

F. 健康危険情報 該当事項なし

G. 研究発表

## 論文発表

1. 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. Cncer Res.*, in press.
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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 Antitumor Vaccine Efficacy and Maturation of Murine Dendritic Cells., *Cancer Res.*, 61(21), 7913-7919 (2001)
9. 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. 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ィ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, 豊中, 2001年7月.
2. 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,豊中,2001年7月.

3. 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.

4. 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,神戸,2001年10月.

5. 舩永安繁、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,千葉,2002年3月.

6. 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ライブラリ化.,日本薬学会第122年会,千葉,2002年3月.

7. 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,千葉,2002年3月.

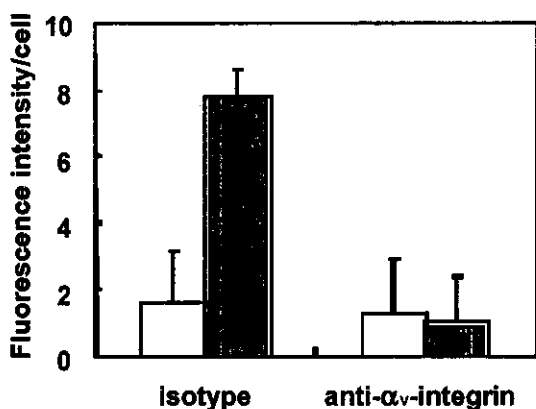
8. 関口文子、長谷和明、形山和史、林哲、堤康央、中川晋作、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範:Polyethylene Glycolを用いたバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの粒子設計.,日本薬学会第122年会,千葉,2002年3月.

9. 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,静岡,2002年3月.

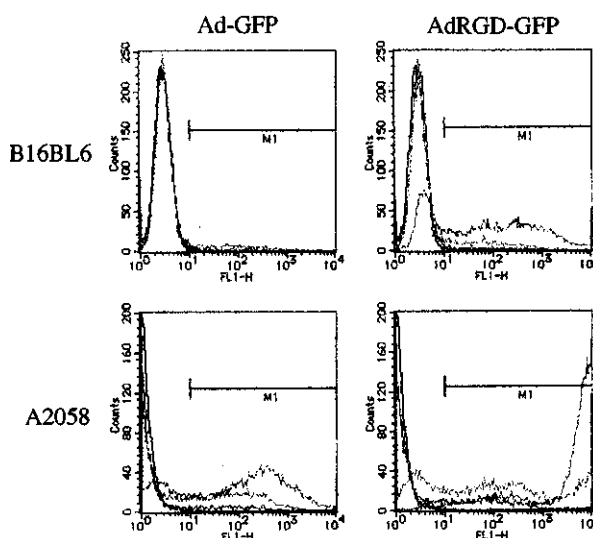
10. 津田育宏、形山和史、中山隆志、畑中豊、谷洋一、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、義江修、真弓忠範:Cell Deliveryによる癌治療法の開発 ~新規ケモカインILCのin vivoにおける細胞遊走能評価と癌治療への応用~,日本薬剤学会第17年会,静岡,2002年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項なし

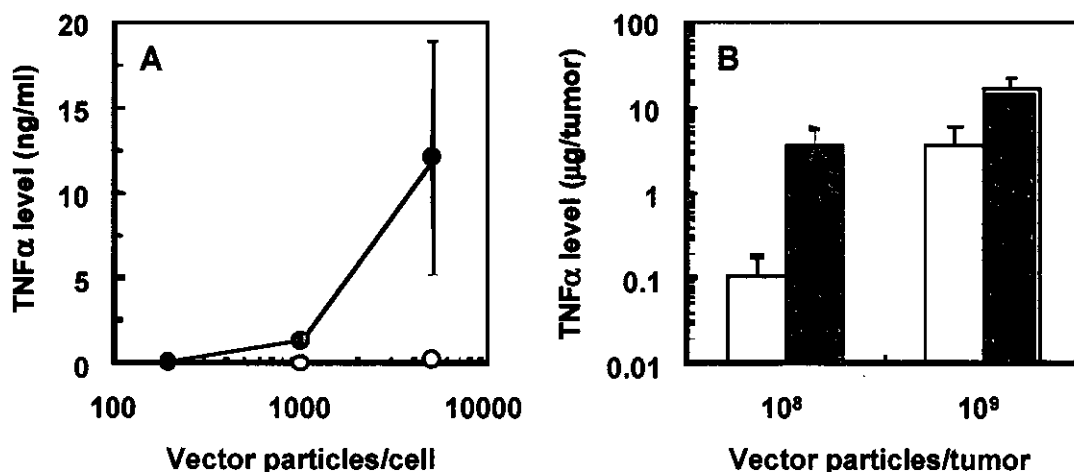




**Fig. 1.** Relative Ad-binding to B16BL6 cells. B16BL6 cells were incubated with anti-mouse  $\alpha_v$ -integrin monoclonal antibody or hamster IgG isotype control for 30 min on ice. Then, the cells were resuspended in staining buffer containing Cy3-labeled Ad-LacZ (open column) or AdRGD-LacZ (closed column). After incubation for 30 min on ice, cells were washed and analyzed using a flow cytometer. The relative value of Ad-binding against B16BL6 cells was determined using the following formula: fluorescence intensity/cell = (mean fluorescence intensity of tested sample) - (mean fluorescence intensity of B16BL6 cells' self). Data are presented as means  $\pm$  SD of four experiments.



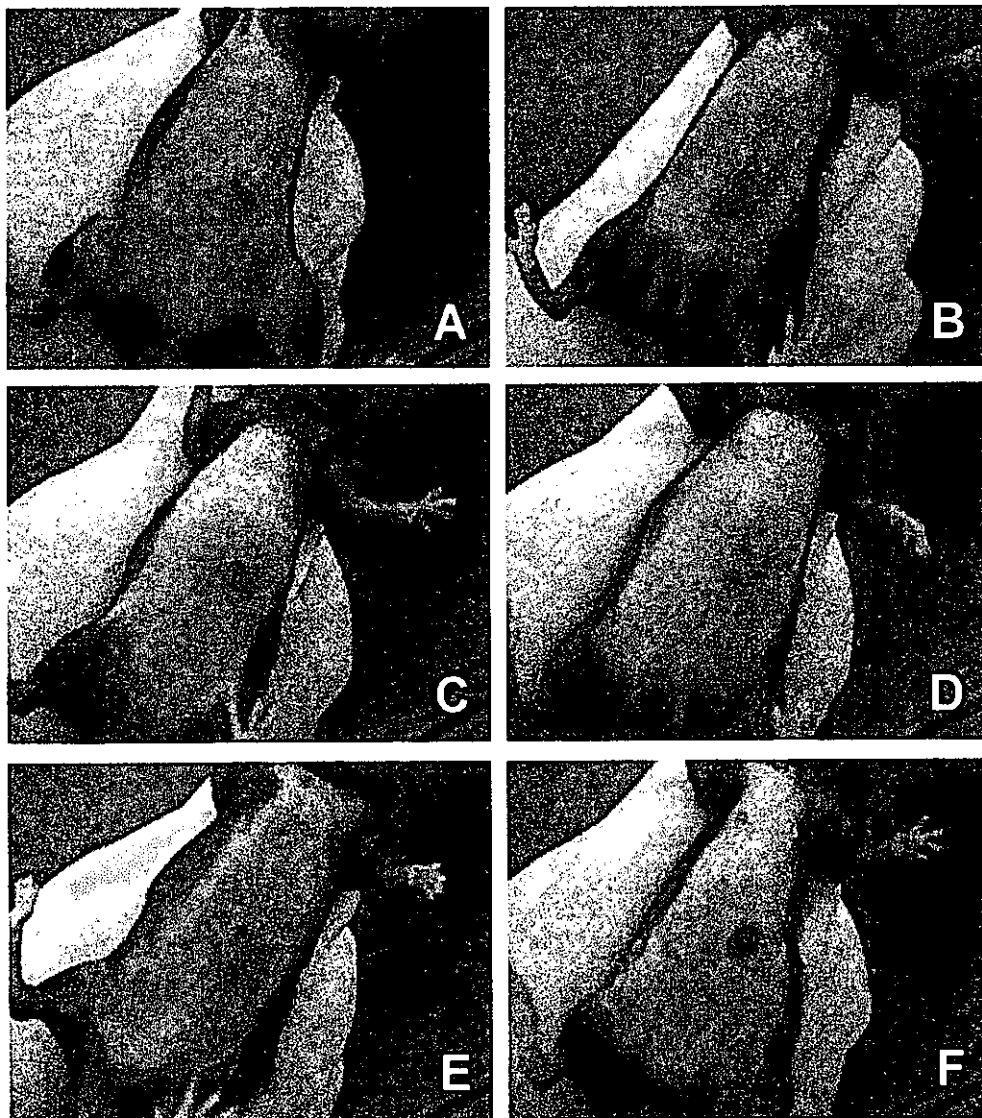
**Fig. 2.** The transduction efficiency and the expression efficacy of GFP genes on melanoma cells by RGD fiber-mutant or conventional Ad. B16BL6 cells or A2058 cells were infected with Ad-GFP or AdRGD-GFP at 100 (blue lines), 1000 (green lines), or 10000 (red lines) vector particles/cell for 1.5 hr. Two days later, GFP expression in cells was evaluated by flow cytometry. Black lines represent untransfected cells.



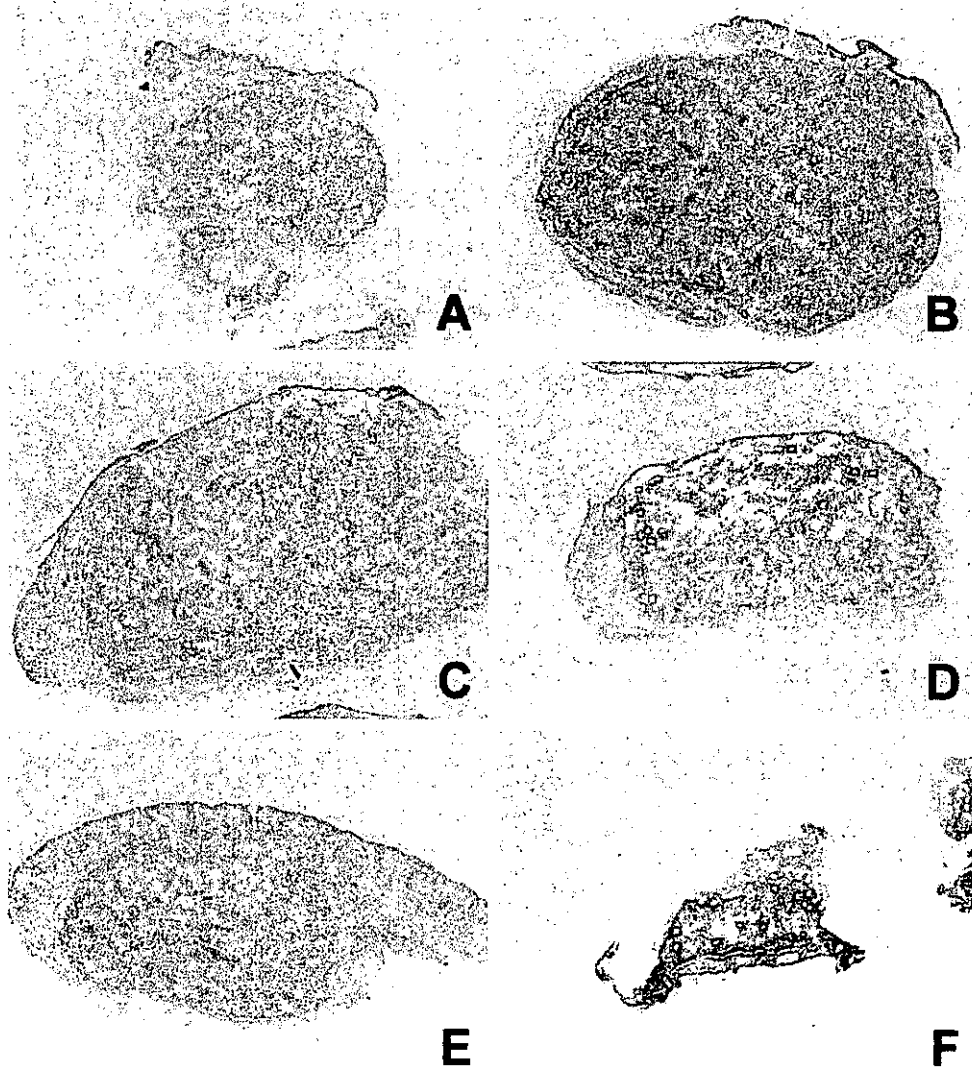
**Fig. 3** The transduction efficacy of TNF- $\alpha$  genes in B16BL6 cells or tumors by conventional or RGD fiber-mutant Ad. (A): B16BL6 cells were infected with Ad-TNF (○) or AdRGD-TNF (●) at indicated vector particles/cell for 2 hr. Two days later, the level of TNF- $\alpha$  secreted into culture 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.

**Table 1. Summary of flow cytometric analysis of melanoma cells infected with Ad-GFP or AdRGD-GFP.**

Ad (vector particles/cell)	% MI-gated		Mean fluorescence intensity	
	B16 BL6	A2058	B16 BL6	A2058
—	0.04	0.04	25.55	19.52
Ad-GFP	100	0.32	16.73	67.20
	1000	0.85	49.68	86.44
	10000	6.51	72.95	234.96
AdRGD-GFP	100	1.28	45.85	81.97
	1000	10.97	70.49	499.57
	10000	65.00	98.78	3401.91



**Fig. 4 . Photographs of B16BL6 tumors on day 2 after Ad-treatment. (A) PBS treatment; (B)  $10^{10}$  AdRGD-LacZ treatment; (C)  $10^8$  Ad-TNF treatment; (D)  $10^9$  Ad-TNF treatment; (E)  $10^8$  AdRGD-TNF treatment; (F)  $10^9$  AdRGD-TNF treatment.**



**Fig. 5.** 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 2. Summary of anti-B16 BL6 tumor effects after Ad-treatment.**

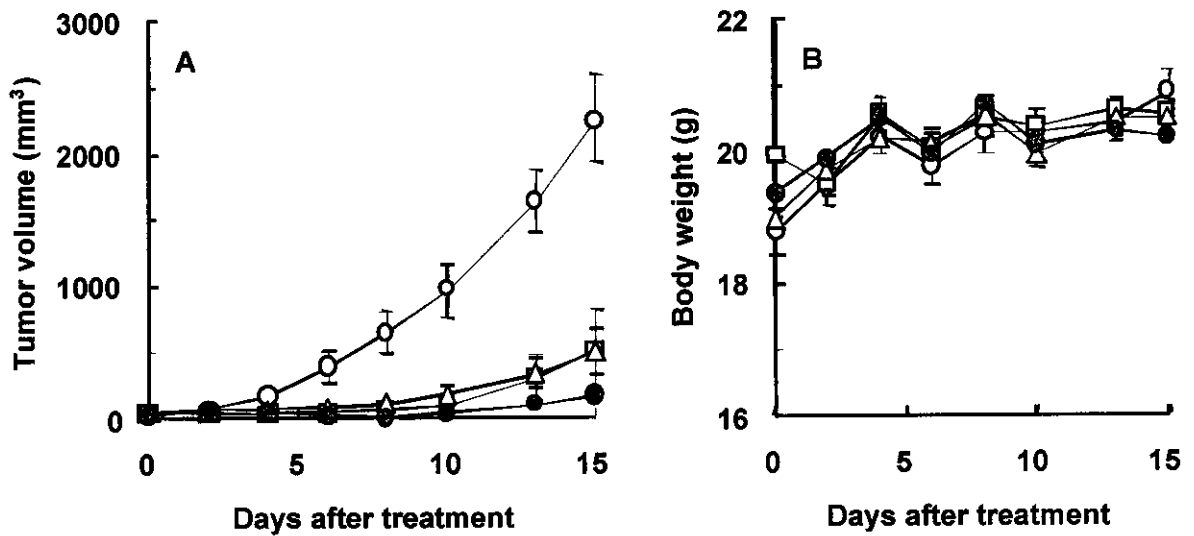
Treatment	VP <sup>a)</sup>	Tumor volume (mm <sup>3</sup> ) <sup>b)</sup>						Complete regression <sup>c)</sup>
PBS	—	1185	2447	2460	3060	3734	3825	0/6
AdRGD-LacZ	$10^{10}$	2173	2228	2497	2530	2771		0/5
AdRGD-TNF	$10^8$	492	799	898	1043	1264	1417	0/6
	$10^9$	46	141	271	472	573	613	0/6
	$10^{10}$	0	0	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.

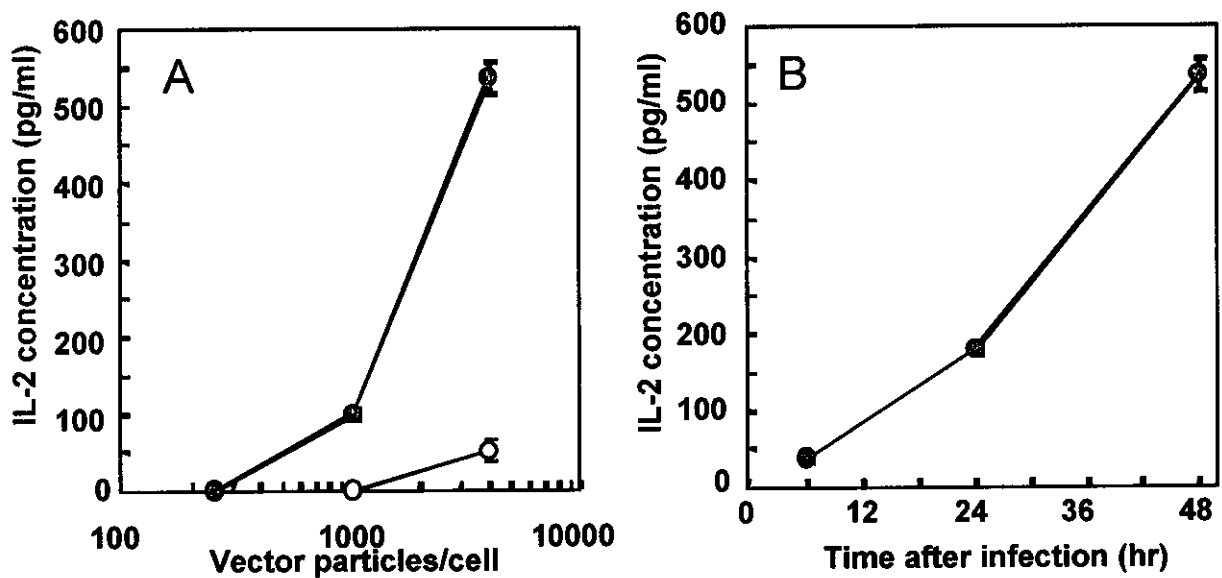
<sup>b)</sup>: Day 21 after tumor challenge, tumor volume (mm<sup>3</sup>) = (major axis) × (minor axis)<sup>2</sup> × 0.5236.

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

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



**Fig. 6** 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. 7** 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.