

ことが考えられる。そこで、SK HEP-1 細胞や HeLa 細胞に Ad-rtTA-tTS-L や AdOn-L4 を作用させた時の rtTA 発現レベルを、抗 VP16 ポリクローナル抗体を用いた ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法で検討した。しかしながら、rtTA の発現レベルは、Ad-rtTA-tTS-L を作用させた細胞でも AdOn-L4 を作用させた細胞と変化がなかった (data not shown)。E4 領域と 3' ITR 配列の間に tTS 発現単位が挿入されることで、テトラサイクリン誘導性プロモーターの活性が up-regulate されたのかもしれない。何故、Ad-rtTA-tTS-L が AdOn-L4 に比べ、高い最大活性値を示したのかは不明である。今後は発現誘導能に優れた第 2 世代の転写活性化因子の mutant rtTA を用いることによって、さらに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

##### 2 種類の外来ペプチドを表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

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。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十分で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。HI2-13 年度においては、ファイバーノブの HI ループ領域に 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、ヒト由来血球系細胞、ヒト由来血管平滑筋細胞、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。

本年度は、本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さらに改良して、ファイバーノブの HI ループ領域だけでなく、C 末端領域にも 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで任意の外来ペプチドコード遺伝子を挿入できるベクター作製法を開発した。本系は、1 ステップの *in vitro* ライゲーションによる E1 欠損領域への外来遺伝子挿入技術

とのセットで極めて簡便に目的の外来ペプチドをファイバー上に発現したアデノウイルスベクターの作製を可能にする画期的なものである。さらに、E1 欠損領域のみならず、E3 欠損領域、E4 領域と 3' ITR 配列の領域への外来遺伝子挿入技術と組み合わせれば、さらに汎用性の広い技術となる。

これまで、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターのファイバー上に発現させるペプチドとしては RGD ペプチドとポリリジンペプチドが広く用いられてきた。RGD ペプチドは HI ループ領域や C 末端領域に挿入されたベクターが開発されているが、どちらの領域がペプチド挿入部位として適しているかについての報告は全くない。また、ポリリジンペプチドについては C 末端領域に挿入されたベクターしか報告されていない。そこで本研究では、RGD ペプチドやポリリジンペプチドをファイバーノブの HI ループ領域や C 末端領域に挿入した種々のベクターを作製して、これらのベクターの機能を様々な細胞 (計 9 種類) を用いて検討した。その結果、RGD ペプチドに関しては、HI ループ領域に挿入したベクターの方が、C 末端領域に挿入したベクターよりも遺伝子導入活性は遙かに高く、HI ループ領域の方が挿入部位として適していることが判明した。逆に、ポリリジンペプチドに関しては、HI ループ領域に挿入したベクターでは遺伝子導入活性の上昇は全く認められず、C 末端領域に挿入したベクターでのみ、高い遺伝子導入活性を示した。従って、用いるペプチド配列により、適した挿入部位が存在することが判明した。ファイバーノブの HI ループ領域に挿入されたペプチドは (挿入ペプチドの) N 末端、C 末端領域ともファイバータンパク質内に組み込まれるが、ファイバーノブの C 末端領域に挿入されたペプチドは (挿入ペプチドの) N 末端部位だけファイバータンパク質と結合し、(挿入ペプチドの) C 末端部位はフリーになることから、挿入部位によりペプチドの機能に影響を与える様式が異なることが考えられる。

本研究で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は、ファイバーノブの HI ループ領域のみならず C 末端領域にも外来ペプチドを挿入できるため、様々な機能をもったペプチドを有したベクター開発のための基盤技術になると思われる。また、HI ループ領域に RGD ペプチドを、C 末端領域にポリリジンペプチドを同時に付与したベクターは、それぞれ単独のペプチドを付与したベクターの長所を兼ね備えており、遺伝子治療や遺伝子機能解析のための極めて有用なベクターになると思われる。な

お、HI ループ領域に RGD ペプチドを、C 末端領域にポリリジンペプチドを同時に付与したベクターが、確かに RGD ペプチドやポリリジンペプチドを用いて細胞に感染していることは、遊離 RGD ペプチドを用いた競合阻害実験や、細胞をヘパリナーゼ処理して細胞表面上のヘパラン硫酸を除去して検討することにより確認している (data not shown)。

一方、固形癌を移植したマウスの腫瘍内への直接投与による *in vivo* 遺伝子導入活性に関しては、RGD ペプチドを HI ループ領域に挿入したベクターが最も優れており、RGD ペプチドとポリリジンペプチドを同時に付与したベクターや、ポリリジンペプチドのみを付与したベクターの活性は、それほど高いものではなかった (従来型ベクターよりは優れている)。これは、ポリリジンペプチドのようにマトリックス構成成分 (ヘパラン硫酸を認識する) を認識するベクターでは、腫瘍 (組織) 内におけるベクターの浸透性が低下する可能性を反映したのかもしれない。従って、目的により最適なベクターを使い分けることが重要と考えられた。

#### CAR あるいは $\alpha v$ インテグリンと結合できないアデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーが受容体の CAR に結合し、その後ペントンベースの RGD モチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる。従って、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 や  $\alpha v$  インテグリンを介した感染を阻害することが必要である。そこで、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、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させることで  $\alpha v$  インテグリンとは結合できないベクター Ad/ $\Delta$ P-L2 を作製した (共にルシフェラーゼを発現する)。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 *in vitro* で検討したところ、Ad/ $\Delta$ F-L2 は従来型アデノウイルスベクターの Ad-L2 の約 1/100 の遺伝子導入活性しか示さなかった。一方、Ad/ $\Delta$ P-L2 の遺伝子導入活性 (CAR 陽性、 $\alpha v$  インテグリン陽性細胞) は Ad-L2 の約 7-9 割程度を保持していた。従って、アデノウイルスベクターの感染には CAR とファイバーを介した経路がメインであることが判明した。また、ペン

トンベースの RGD モチーフと  $\alpha v$  インテグリンを介した感染ルートは、ターゲット細胞が CAR を発現しているのであれば、その寄与は比較的小さいことが判明した。

マウスの肝臓細胞 (肝実質細胞) は CAR と  $\alpha v$  インテグリンの両者を発現していることが知られている。そこで、Ad/ $\Delta$ F-L2 や Ad/ $\Delta$ P-L2 で、アデノウイルスベクターの全身投与後の肝移行性が減少するかどうかについて検討した。しかしながら、両ベクターとも従来型ベクターの Ad-L2 と同様の遺伝子発現パターンを示し、肝臓への移行性を減少させることが出来なかった。従って、ファイバーノブとペントンベースのどちらか一方を改変させただけでは不十分であり、両者を同時に改変させるか、あるいはファイバーノブとペントンベース以外の他の領域がアデノウイルスベクターの肝移行性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

肝臓は fenestra が発達しており血管内皮細胞の間隙が約 100nm 程度離れていることが知られている。アデノウイルスは直径約 65-80nm であり、肝臓血管内皮細胞の間隙を通過できるサイズにある。一方、他の臓器の血管内皮細胞間隙はタイトであり、アデノウイルスは容易に透過できない。このような性質もアデノウイルスベクターの肝移行性に関与していると考えられる。

今後は、ファイバーノブとペントンベースを同時に改変したベクターや、他の領域 (ファイバーシャフトなど) も同時に改変したベクターを開発していく予定である。特定の臓器に積極的に移行する活性を持たないアデノウイルスベクターは、ターゲティングリガンドをファイバーノブの HI ループ領域や C 末端領域 (あるいは他の領域) に挿入することで容易にターゲティングベクターの開発が可能になると考えられることから、極めて重要な基盤ベクターになると期待される。

#### HI loop および HI strand 発現ファージライブラリの作製

近年、アデノウイルスベクターのファイバーの一部 (HI loop) に外来ペプチドを発現させる事によりベクターの感染域を制御しようとする試みが広く行われるようになり、この流れは主任研究者らが開発した簡便なファイバーミューアデノウイルスベクター作製法の確立により加速度を増している。ところが、これまでに報告されている細胞接着ペプチドやファージディスプレイシステムなどにより同定された新規標的指向性ペプチドをアデノウイルスベクタ

一のファイバーに提示させても導入したペプチドの機能を十分に発揮させることが出来ず、感染域を制御できるレベルにまでは至っていない。またペプチドを導入する事でファイバーの高次構造が変化し、アデノウイルス粒子が産生されにくくなる場合があるなどの問題が発生している。従って、ファイバーに標的指向性ペプチドを導入する際には、導入部位近傍のアミノ酸配列に与える影響を考慮して高次構造変化を最小限に抑えなければならない。しかし、アミノ酸配列から高次構造を予測するには基礎的データがあまりにも不足しており、現段階では非効率的である。そこで我々は、高次構造などの基礎的データを必要とせず、膨大な多様性を有するライブラリの中から標的分子に特異的に結合するペプチドを同定可能なファージディスプレイシステムに着目した。すなわち、ランダムなペプチド配列を含む HI loop 領域またはその両端の  $\beta$ -strand を含む領域 (HI strand) を提示したファージライブラリを作製し、スクリーニングを行う事で上述の問題点を克服した迅速なアデノウイルス導入ペプチド配列のスクリーニングが可能であると考えた。今回はファージ外殻蛋白質の一つである g3p 上にこれらファイバーの一部である HI loop および HI strand が提示可能である事をファージ ELISA によって確認した上で、全てのアミノ酸をコードし得る NNS 配列を PCR によって導入したファージライブラリを構築した。スクリーニングに用いる標的としては、発現特異性とアデノウイルス本来の感染経路を考慮に入れ、種々の上皮癌細胞に高発現であり、エンドサイトーシスを引き起こす事が知られている EGFR を用いる事にした。NNS 導入 HI strand 提示型ファージライブラリを用い、EGFR に対してパンニングを三回行ったところ、ファージの回収率がおよそ 100 倍にまで上昇した。今後スクリーニングによって得られたペプチド配列を導入したアデノウイルスベクターを構築し、遺伝子導入効率及び、体内動態など詳細な検討を行っていく予定である。また、本技術は、前項で述べた CAR あるいは  $\alpha v$  インテグリンと結合できないアデノウイルスベクターと組み合わせることで、真のターゲティングベクターの開発が可能になると考えられる。

### 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

アデノウイルスベクターは、遺伝子治療用に用いられるベクターの中で、最も高い遺伝子導入・発現効率を示すが、その一方で肝集積性に起因する肝毒

性や、中和抗体による作用の減弱、感染域が広いため感染特異性を持たせがたいなどの問題点を有している。今回、この問題点克服を目指し、アデノウイルス表面に水溶性高分子である PEG を用いた化学修飾を行った。その結果、様々な修飾率を有する PEG 修飾アデノウイルスベクターの作製に成功し、作製された PEG 修飾アデノウイルスベクターに未修飾アデノウイルスベクターが存在しないことを確認した。本ベクターをマウス尾静脈内より投与した際の血中滞留性について検討したところ、ヘキソン修飾率の増大に依存して血中滞留性も増大し、ヘキソン修飾率 100% の PEG 修飾アデノウイルスベクターは未修飾アデノウイルスベクターに比較して血中半減期が 50 倍にも延長していた。これまで水溶性高分子によるハイブリッド化蛋白質の体内動態は、水溶性高分子の種類や分子量、表面電荷など、ハイブリッド化に用いた水溶性高分子の特性に依存した体内挙動を示すことが知られている。従って、アデノウイルスベクターにおいてもハイブリッド化に用いる水溶性高分子の種類や分子量を詳細に検討することにより、動態特性の異なるハイブリッド化アデノウイルスベクターを作製できる可能性がある。また、抗アデノウイルス抗体存在下における遺伝子発現効率に関する検討においても、ヘキソン修飾率の増大に依存して PEG 修飾アデノウイルスベクターの抗体回避能力は向上し、ヘキソン修飾率 61.1% の PEG 修飾アデノウイルスベクターは未修飾アデノウイルスベクターに比較して、30 倍の抗体回避能を有していた。さらに CAR 高発現細胞に対する遺伝子発現効率に関する検討から、PEG 鎖の立体障害により CAR への結合が阻害されることで PEG 修飾アデノウイルスベクターは、ヘキソン修飾率の増大に依存して遺伝子発現効率が低下する、つまり CAR を介した目的としない細胞への遺伝子発現を抑えられることが示された。さらにこれらの結果をふまえ、PEG 修飾アデノウイルスベクターに標的指向性を付与することができれば、アデノウイルスベクターの問題点を克服した上で、ターゲティング能を同時に兼ね備えた夢の遺伝子導入用ベクターになり得ると期待される。そこで次に、PEG 末端に標的指向性分子を付与することで、PEG 修飾アデノウイルスベクターの特徴を有しつつ、更にターゲティング能を兼ね備えた新規バイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの開発に取り組んだ。今回、標的指向性分子としてインテグリン指向性の RGD 配列を選択し、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターを作製し、その機能性評価を行った。その結果、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは

CAR 低発現細胞に対して、従来型アデノウイルスベクターと比較して約 100 倍高い遺伝子発現効率を示した。またその発現は驚くべきことに、今回 CAR の発現レベルにかかわらず高い遺伝子導入効率を示した AdRGD と同等であった。また、AdRGD であっても抗アデノウイルス血清存在下では、血清濃度の上昇に伴い、遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD の 15 倍であった。このことから、RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは AdRGD より優れたベクターになり得る事が示唆された。今回は、修飾率が 35.6% の RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターを用いているが、この修飾率が低下することにより、遺伝子導入効率も低下する。この事実は逆に RGD-PEG を用いてより高い修飾率のアデノウイルスベクターを作製すれば、ウイルス当たりの RGD 分子も多く提示されることになり、結果的にインテグリンを介した遺伝子導入効率が上昇する可能性がある。即ち、標的指向性分子を付与した水溶性高分子を用いたアデノウイルスベクターのハイブリッド化の場合には、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強く現れるだけでなく、アデノウイルスに対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、本方法は理想的な遺伝子治療用ベクターとして創製できる可能性を示している。

## 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

遺伝子治療用の非ウイルスベクターの開発は、1990 年代後半まではゆっくりではあるが着実に進んできたが、ここ数年ほどはほとんど進展していない。これは、これまでのようなベクター構成成分の物理化学的特性に頼った性能の向上に限界があることを反映している。もちろん、細胞膜や核膜を能動的に突破する能力を持ったタンパク質に注目して、その機能ドメインであるペプチドをベクターに組み込み性能を向上させようとするアプローチは皆無ではない。例えば、1999 年には、核移行シグナルを結合させることによってプラスミド DNA を核に輸送することができたという論文が *Nature Biotechnology* や *PNAS* にいくつも発表された。しかしその後、これらの報告は再現性の確認もされないまま消え去ろう

としている（非公式な情報によると、これらの研究報告には著者自身が結果を再現できないものも含まれているという）。

これまでのさまざまな機能ペプチドの応用の試みが失敗に終わっている原因の一つとして、これらのペプチドをベクターに組み込む際の空間的トポロジーがほとんど考慮されていないことが挙げられる。Protein Transduction Domain や核移行シグナルといった機能ペプチドは（まだ同定されていないものも含め）細胞側の因子と正しく相互作用する必要がある。そのためには、DNA を含む構造体の表面に、一定の空間的トポロジーと密度の下に存在している必要がある。しかるに、これまでの研究では、これらのペプチドを DNA 分子に共有結合させるとかペプチド上の荷電を利用して DNA と複合体を作らせるといった方法に頼っているため、ペプチドの空間的トポロジーや密度をコントロールすることはほとんど不可能に近かった。

本研究で我々が採用したラムダファージ・ペプチドディスプレイ・システムでは、どのようなペプチドを呈示しようとも、直径 55 nm という DNA を内封した構造体（ファージ頭部）の構造は変化しない。また、Dタンパク質と融合した形でファージ表面にあるペプチドは、常に同じトポロジーを持って呈示されると予想される。これはこれまでの非ウイルスベクターでは達成できなかった大きな特徴であり、ラムダファージを非常に優れた Polyplex のモデルとして使用できることを示している。さらにこの系の特徴は、内部にマーカー遺伝子を直接封入して遺伝子発現に対する機能性ペプチドの効果を直接検証できることで、常に 1 コピーの遺伝子が 1 粒子の中に存在するため、定量的な研究が可能となっている。この点について、ラムダファージディスプレイの系を使って得られた Protein Transduction Domain の活性を、同じペプチドを使いながらも DNA とペプチドを混合して作った複合体で検討した例 (Rudolph, et al., *J. Biol. Chem.*, in press) と比較すると興味深い差が見られる。DNA とペプチドを混合して作った複合体は確かに poly-L-lysine などの陽荷電を持つペプチドに比べると数倍高い遺伝子導入活性を示しているが、複合体の構造は塩濃度によって左右されることからわかるように堅固なものではない。さらにこの複合体による遺伝子導入は Chloroquine などの lysosome や endosome の機能を阻害する薬剤によって大きく促進され、主要な遺伝子導入経路は endocytosis であると結論づけられている。一方、ラムダファージディスプレイの系では、

塩濃度等の外的環境にかかわらず常に粒子構造は一定であり、遺伝子導入経路も endosome ではなく caveolae というまったく経路であると考えられる。つまり、ラムダファージディスプレイを使った解析は、endocytosis を介しない細胞膜通過であるとされている本来の Protein Transduction Domain の機能を忠実に反映しているのに対し、ペプチド・DNA の混合物を使った場合は単に poly-L-lysine のような DNA の電荷を中和するだけの効果しか観察できない。このように、ラムダファージディスプレイ系を使ってペプチドのトポロジーを厳密に一定にできるようになったため、本年度の核移行シグナルの機能の解析に見られるような詳細かつ定量的な研究が可能になったことは特筆すべきであり、今後さまざまなペプチドの定量的解析によって、より優れた機能を持つペプチドをスクリーニングすることが可能となると期待される。

#### 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

昨年（2002年）秋から今年にかけて、3年前から実施されている X 染色体連鎖重症複合免疫不全症の遺伝子治療を受けた 11 名の患者のうち、2 名が遺伝子治療の副作用と考えられる白血病を発症したというニュースは、遺伝子治療の研究者に大きな衝撃を与えた。この 2 つの事例では、レトロウイルスベクターを使って骨髄細胞に導入された治療用遺伝子が、白血病の原因となることが知られている癌抑制遺伝子の近傍に挿入されており、これが発症の直接の原因であると推定されている。ヒトゲノムに挿入された外来遺伝子によって癌化した細胞が出現する危険性は指摘されてきたが、レトロウイルスベクターを使ったこれまでの多くの臨床試験の結果から極めて楽観視されてきた。しかし、今回の事態で、少なくとも骨髄細胞を対象とする限り、このような副作用が生じることが確認されたわけである。この事例では遺伝子を導入することによる治療効果は確認されているだけに、染色体にランダムに遺伝子を挿入しない技術、例えば人工染色体の開発や相同組換えによる遺伝子改変といったまだ開発途上の技術の実用化が改めて注目されている。

本研究では、染色体末端のテロメア配列と呼ばれる構造が染色体を安定化することに着目して、この機構を人工染色体開発に応用することの可否を検討してきた。テロメア配列を使用した環状 DNA の安定化が出芽酵母で報告されており、染色体の重要な構成要素（テロメア・複製起点・セントロメア）は（構

造こそかなり異なるものの）機能的には酵母からヒトにいたる真核生物で保存されていることから、その結果が注目された。しかしながら、通常の研究でよく使用される HeLa 細胞等の培養株細胞（不死化細胞でもある）で得られた「テロメア配列=TRF1 の相互作用が染色体の安定性を決定している」という結論は、遺伝子治療の対象であるヒト正常体細胞にはそのまま当てはまらないという結論が導かれた。このことは、今後、遺伝子治療用の人工染色体を研究する上で、ヒト培養株細胞を使って得られた結果がヒト正常体細胞にも当てはまるかどうかを慎重に検討する必要があることを示している。

ところで、今回の研究結果は、細胞の癌化という医学的に非常に大きな問題と関連している可能性が高い。染色体の安定化機構は、細胞寿命の決定（ひいては生物個体の寿命の決定）と密接な関連がある。通常、ヒトの組織を構成している正常体細胞は有限の寿命を持っており、ある一定の回数の分裂を重ねた時に「細胞老化」を起こして増殖が停止しやがて死んでいく。この際に細胞分裂ごとにテロメア配列が 50 - 500 bp 短縮していく現象が観察され、テロメア配列は染色体の安定化機構を通じて細胞寿命を決める時計として働いていると考えられてきた。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 (Alternative lengthening of telomere) 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）。このため、テロメアによる細胞寿命の決定機構は細胞癌化との関係で大きな注目を浴びている。

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配列（約 5 kbp）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（例えば、HeLa 細胞では約 2 kbp）ことで、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ことが細胞寿命を考える上での大きな矛盾となっている。さらに、マウス体細胞のテロメア配列はヒト体細胞のテロメア配列より 10 倍も長いのに細胞寿命はマウスの方が短いこと・テロメラーゼ遺伝子を欠失したマウスでも癌の発生頻度は正常マウスと変わらないことから、細胞寿命と癌化の関係はますます謎が深まっている。

我々の昨年度までの研究から、動物細胞ではテロメア配列が十分に長いと TRF1 の発現が十分に高い（あるいは両方）という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と予想され

た。我々が導き出したこの TRF1 仮説 (TRF1 がテロメラーゼや ALT の機構と独立の染色体安定化因子として働く) は、テロメア仮説の矛盾を克服して細胞の寿命の決定機構を説明できる点で極めて魅力的であり、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はこの仮説を裏付けている。しかし、本年度の研究成果は、テロメラーゼを強制発現させるとヒト正常細胞の寿命は著しく延びるのに対し、TRF1 を強制発現しても細胞寿命はほとんど延びないことを示しており、この単純な図式はヒト正常体細胞には必ずしも当てはまらない。

それでは、不死化細胞では、TRF1 は他の因子を誘導する等の機構によって染色体を安定にしているのだろうか? TRF1 の相対量 (細胞内の総テロメア配列に対する TRF1 の分子数) がテロメアの安定化と完全に定量的な相関関係があること・テロメアの安定化には TRF1 の認識配列と一致した TTAGGG の繰り返しが必要であること・同じ配列と結合する TRF2 の量と安定性の間には相関関係がないことから、TRF1 の作用が間接的であるとは考えにくい。むしろ、ヒト正常体細胞では、TRF1 を単独で過剰発現させてもテロメアを安定にできない何らかの理由があると推定される。

それでは、ヒト正常体細胞とヒト不死化細胞では、強制発現させた TRF1 に何らかの違いが存在するのだろうか? この問題を検討するため、細胞内に存在する TRF1 複合体のサイズ (Fig. 29) ・TRF1 の等電点 (Fig. 30) について調べたが、有意な差は観察されなかった。しかしながら、細胞をさまざまな条件下で分画すると、ヒト不死化細胞では高塩濃度条件下でも TRF1 が核の不溶画分に存在するのに、同じ条件下でヒト正常体細胞中の TRF1 は可溶画分に溶出されることが判明した (Fig. 31)。このことは、同じように TRF1 を過剰発現していても核内での存在様式が異なるためにヒト正常体細胞ではテロメア配列を安定化するという TRF1 の機能が失われていること・ヒト正常細胞では TRF1 を核につなぎとめておく何らかの因子 (おそらく TRF1 結合タンパク質) が不足していることを示唆している。今後のこの問題の検討は、細胞癌化のメカニズムの解明と、新たな癌治療の分子標的の同定につながる事が予想される。

## 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) アデノウイルスゲノムの E1/E3 欠損領域、さらに E4 領域と 3' ITR の間の領域にも *in vitro* ライゲーションで外来遺伝子を導入できるトリプル遺伝子発

現系を搭載したアデノウイルスベクターの開発に成功した。本系を用いて、目的遺伝子を E1 欠損領域に、Tet-on システムのための転写活性化因子の rItA 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発し、発現誘導能に極めて優れていることを明らかにした。

2) ファイバーノブの HI ループ領域だけでなく、C 末端領域にも 1 ステップの *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して外来ペプチドコード遺伝子を挿入できるベクターシステムを開発した。さらに、RGD ペプチドとポリリジンペプチドの両者をファイバーに付与したベクターが、種々の細胞 (ヒト、マウス、ラット由来細胞) において従来型アデノウイルスベクターの 10-1000 倍の遺伝子導入活性を示し、極めて効率良く遺伝子導入可能なことを明らかにした。また、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を目的に、ファイバーノブやペントンベースを改変することでアデノウイルス受容体 (CAR) やインテグリン ( $\alpha v$ ) と結合しないアデノウイルスベクターの開発を行った。一方、アデノウイルスファイバーノブの HI ループ領域とその両端の  $\beta$ -strand を含む領域を発現するファージライブラリを作製し、アデノウイルスベクターのファイバーに挿入して特定の標的分子に結合し得るリガンドペプチドを検索するためのスクリーニングシステムを構築した。

3) アデノウイルスを PEG でハイブリッド化することにより、中和抗体による遺伝子導入の低下が抑制され、血中滞留性の向上並びに CAR を介した非特異的遺伝子導入が回避出来ることを見いだした。また、RGD モチーフを付与した PEG を用いて作製した RGD-PEG 修飾アデノウイルスベクターは、RGD ペプチドをファイバーに付与したアデノウイルスベクターと同等の高い遺伝子発現能を示し、さらに中和抗体存在下では、より優れた遺伝子発現能を有することを明らかにした。

## 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) ラムダファージディスプレイシステムを用いて、DNA 内封粒子に核移行活性を付与するために必要なペプチド側の条件を検討し、minimum NLS と importin  $\alpha$  との結合が DNA 内封粒子表面で起こることが核移行に必須であること、ペプチドの C 末

端側はこの相互作用が起きるように minimum NLS を粒子表面から一定の距離だけ離すための stem として機能していること、一方、N末端側はこの相互作用と直接の関係は無い（少なくとも促進する活性はない）ことを確認した。

2) テロメア配列が TRF1 との相互作用を通じて染色体を安定化する能力を評価し、TRF1 とテロメア配列を使って人工染色体を安定化することはヒト不死化細胞では可能性があるがヒト正常体細胞では難しいという結論に達した。一方、この現象の発見は、細胞癌化のメカニズムの解明と新たな癌治療の分子標的の同定につながることを期待される。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Xu Z.L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T. Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene*, in press.
- 2) Nagayama Y, Mizuguchi H., Hayakawa T., Niwa M., McLachlan S.M. Prevention of autoantibody-mediated graves'-like hyperthyroidism in mice with interleukin-4, a Th2 cytokine. *J. Immunol.*, in press.
- 3) Nagayama Y, Nakao, K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Niwa M. Enhanced antitumor effect of combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing interleukin-12 in an immunocompetent mouse model. *Gene Ther.*, in press.
- 4) Morioka T., Koyama H., Yamamura H., Tanaka S., Emoto M., Imamura T., Miyazono K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kojima I., Takahashi K., Nishizawa Y. Expression and its role of calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells. *Diabetes.*, in press.
- 5) Nakano R., Nakagawa T., Imazu S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T. A novel T7 system utilizing mRNA coding for T7 RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 6) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T. Efficient gene transfer into human CD 34+ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther.*, in press.
- 7) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N.,

Watanabe Y., Hayakawa T. Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.*, in press.

- 8) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Tsuda T., Matsubara A., Mori N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A. Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther.*, in press.
- 9) Kakayama K., Wada K., Nakajima A., Yoshida S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Kadowaki T., Nagai R., Kamisaki Y., Blumberg RS., Mayumi T. A novel PPAR $\gamma$ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, in press.
- 10) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N. An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF  $\alpha$ -expressing adenovirus vector into established murine melanoma. *Gene Ther.*, in press
- 11) Abiru N., Sun F., Kawasaki E., Yamasaki H., Oshima K., Nagayama Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miao D., Liu E., Eisenbarth G. S., Eguchi K. *In vivo* expression of B:9-23 peptide/I-A<sup>b7</sup> complex may abrogate the inhibition of diabetes induced by RGD-fiber-mutant adenovirus in NOD mice. *Annals N.Y. Acad. Sci.* in press.
- 12) Nakanishi M., Eguchi A., Akuta T., Nagoshi E., Fujita S., Okabe J., Senda T., Hasegawa M. Basic Peptides as Functional Components of Non-viral Gene Transfer Vehicles. *Current Protein & Peptide Science*, in press.
- 13) Uchida E., Mizuguchi H., Ishi-Watabe A., Hayakawa T. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 891-897 (2002)
- 14) Akuta T., Eguchi A., Okuyama H., Senda T., Inokuchi H., Suzuki Y., Nagoshi E., Mizuguchi H., Hayakawa T., Takeda K., Hasegawa M., Nakanishi M. Enhancement of phage-mediated gene transfer by nuclear localization signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 779-786 (2002)
- 15) Mizuguchi H., Hayakawa T. Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes

- simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.*, 9, 236-242 (2002)
- 16) Mizuguchi H., Hayakawa T. The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J. Gene Med.*, 4, 240-247 (2002)
  - 17) Kawamata Y., Nakao K., Nagayama Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Sato T., Ishii N. Receptor-independent augmentation of adenovirus-mediated gene transfer with chitosan in vitro. *Biomaterials.*, 23, 4573-4579 (2002)
  - 18) Mizuguchi H., Hayakawa T. 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*, 285, 69-77 (2002)
  - 19) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 436-444 (2002)
  - 20) Nagayama Y, Kita-Furuyama M., Ando T., Nakao K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Eguchi K., Niwa M. A Novel murine model of graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J. Immunol.*, 168, 2789-2794 (2002)
  - 21) 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.*, 324, 145-148 (2002)
  - 22) Xu Z.L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe I., Uchida E., Mayumi T., Hayakawa T. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J. Control. Rel.* 81, 155-163 (2002)
  - 23) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Ishii-Watabe A., Uchida E., Utoguchi N., Watanabe Y., Hayakawa T. 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.*, 9, 769-776 (2002)
  - 24) Takahashi M., Seki N., Ozaki T., Kato M., Kuno T., Nakagawa T., Watanabe K., Miyazaki K., Ohira M., Hayashi S., Hosoda M., Tokita H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Todo S., Nakagawara A. 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.*, 62, 2203-2209 (2002)
  - 25) Nakagawa T., Takahashi M., Ozaki T., Watanabe K., Todo S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawara A. Autoinhibitory regulation of p73 by DNp73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the DNp73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2575-2585 (2002)
  - 26) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T. 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.*, 177, 57-63 (2002)
  - 27) 水口裕之・早川堯夫；遺伝子機能解析のための遺伝子導入ベクター -ウイルスベクターを中心として-；蛋白質核酸酵素、印刷中
  - 28) 水口裕之・早川堯夫；アデノウイルスベクター：最近の進歩；分子細胞治療、印刷中
  - 29) 水口裕之・早川堯夫；in vitro ライゲーションを利用したアデノウイルスベクターの作製・増殖法；実験医学、20、1799-1804 (2002)

#### 学会発表

- 1) 徐志利、水口裕之、山口照英、真弓忠範、早川堯夫；遺伝子発現ユニットの最適化による高効率遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発；日本薬学会 123 年会（長崎）；2003 年 3 月
- 2) 小泉直也、水口裕之、山口照英、渡辺善照、早川堯夫；マウス静脈内投与後の組織移行性を抑えたアデノウイルスベクターの開発；日本薬学会 123 年会（長崎）；2003 年 3 月
- 3) 細野哲司、水口裕之、石井(渡部)明子、山口照英、早川堯夫（国立衛研）；siRNA 発現ベクターの標的配列に関する検討；日本薬学会 123 年会（長崎）；2003 年 3 月
- 4) 櫻井文教、水口裕之、山口照英、早川堯夫（国立衛研）；35 型アデノウイルスを基本骨格とした新規アデノウイルスベクターの開発および遺伝子発現効率の検討；日本薬学会 123 年会（長崎）；2003 年 3 月
- 5) 浅野長祥、近藤昌夫、増山 茜、小泉直也、藤



- 井まき子、中西 剛、伊藤徳夫、田中慶一、水口裕之、早川堯夫、石村隆太、Soares M.J、渡辺善照；胎盤の亜鉛輸送に関する研究 ? *In vitro* 細胞系への遺伝子導入効率の基礎検討 ? ; 日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 6) 立花雅史、形山和史、古木理恵、大橋興三、堤康央、中川晋作、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範；改良型アデノウイルスベクターを用いた胎盤への遺伝子導入；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 7) 関口文子、衛藤佑介、高建青、形山和史、堤康央、前田光子、川崎紘一、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；RGD ペプチドを付与したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの機能評価；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 8) 岡田直貴、飯山さやか、西田雅也、舛永安繁、岡田裕香、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り抗原遺伝子と IL-12 遺伝子を共導入した樹状細胞の特性；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 9) 岡田裕香、喜多村紗千子、野尻宣仁子、岡田直貴、水口裕之、高橋幸一、早川堯夫、真弓忠範、水野亘恭；腫瘍特異的プロモーターを搭載した RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの構築とその遺伝子発現特性；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 10) 森 直樹、岡田直貴、舛永安繁、山中美由紀、岡田裕香、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りメラノーマ関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序の解析；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 11) 佐々木明德、岡田直貴、大久保米起、岡田裕香、中山隆志、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌；ケモカイン発現 RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを応用した新規樹状細胞免疫療法の開発に関する基礎的検討；日本薬学会 123 年会 (長崎) ; 2003 年 3 月
- 12) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Atsushi Nakajima, Masashi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Teruko Ariyama, Shinsaku Nakagawa, Takashi Kadowaki, Yoshinori Kamisaki, Richard S. Blumberg, Tadanori Mayumi : PPAR  $\gamma$ -gene therapy of inflammatory bowel disease (IBD)., 第 76 回日本薬理学会 (福岡) ; 2003 年 3 月
- 13) 水口裕之、櫻井文教、徐志利、山口照英、真弓忠範、早川堯夫；発現制御型アデノウイルスベクターの開発；第 7 回遺伝子医療研究会 (大阪) ; 2003 年 3 月
- 14) 水口裕之、小泉直也、細野哲司、櫻井文教、山口照英、渡辺善照、早川堯夫；標的細胞指向性の制御を目的としたファイバー改変アデノウイルスベクターの開発；第 7 回遺伝子医療研究会 (大阪) ; 2003 年 3 月
- 15) Shinsaku Nakagawa : DDS technology required to control intracellular pharmacokinetics for gene therapy., Molecular Biopharmaceutics., Hawaii, January, 2003.
- 16) 水口裕之、早川堯夫；科学研究費特定領域研究「新しい材料システム構築のための分子シンクロナイゼーション」ミニシンポジウム (大阪) ; 2002 年 12 月
- 17) 水口裕之；改変アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入系の開発；文部科学省振興調整費知的基盤「組換えウイルス・コアバンクの創設とその高度利用のための基盤技術に関する研究」シンポジウム (筑波) ; 2002 年 11 月
- 18) 小泉直也、水口裕之、細野哲司、宇都口直樹、渡辺善照、山口照英、早川堯夫；感染受容体との結合性を除去したアデノウイルスベクターの静脈内投与による組織集積性の検討；第 17 回動態学会学会 ; 2002 年 11 月
- 19) 中川晋作；細胞内薬物動態制御を目指した DDS 技術., 第 17 回日本薬物動態学会年会 (東京) ; 2002 年 11 月.
- 20) N. Abiru, F. Sun, E. Kawasaki, H. Yamasaki, K. Ohshima, Y. Nagayama, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, E. Liu, GS Eisenbarth, K. Eguchi. ; Adenovirus expressing covalent B:9-23 peptide/ I-A<sup>87</sup> gene: in vivo activation of anti-insulin autoimmunity in NOD mice; 6<sup>th</sup> International Congress of the Immunology of Diabetes Society and American Diabetes Association Research Symposium, 2002 年 10 月
- 21) 岡田直貴、岡田裕香、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範；p100 遺伝子を導入したマウ

- ス樹状細胞の免疫学的特性と腫瘍免疫誘導効果；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月
- 22)徐 志利、水口裕之、真弓忠範、早川堯夫；各種遺伝子発現制御系を搭載させたアデノウイルスベクターの系統的機能評価；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月
- 23)櫻井文教、水口裕之、早川堯夫；アデノウイルス serotype35 を基本骨格とした遺伝子導入用ベクターの開発およびヒト CD34<sup>+</sup>細胞への遺伝子導入；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月
- 24)伊藤章、岡田尚巳、水口裕之、早川堯夫、水上浩明、久米晃啓、花園豊、小澤敬也；アダプター分子によるアデノウイルスベクターの標的細胞指向性の変換；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月
- 25)岡田裕香、岡田直貴、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範；TNF  $\alpha$  発現アデノウイルスベクターを用いたマウスメラノーマ遺伝子治療における副作用発現機序の解析；第 61 回日本癌学会総会（東京）；2002 年 10 月
- 26)水口裕之；改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入・発現系の開発；第 17 回 21 世紀を拓く京都シンポジウム（京都）；2002 年 10 月
- 27)内田恵理子、日方幹男、村田充弘、佐藤功栄、岩田明子、石井（渡部）明子、山口照英、早川堯夫；レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルスの高感度検出法；第 75 回日本生化学会（京都）；2002 年 10 月
- 28)水口裕之；次世代遺伝子治療用ベクターシステムの開発-ウイルスベクターの DDS-；第 4 回製剤研究フォーラム（大阪）；2002 年 9 月
- 29)Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa; Efficient Gene Transfer into Human CD 34<sup>+</sup> Cells by an Adenovirus Type 35 Vector; 第 8 回日本遺伝子治療学会（東京）；2002 年 7 月
- 30)Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi, Naoki Utoguchi, Yoshiteru Watanabe, Takao Hayakawa; Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminal of the fiber knob; 第 8 回日本遺伝子治療学会（東京）；2002 年 7 月
- 31)Hiroyuki Mizuguchi; Single adenovirus vector containing both rtTA and tTS expression cassettes provides tight regulation of transgene expression in a positive manner; 第 8 回日本遺伝子治療学会（東京）；2002 年 7 月
- 32)Yuji Nagayama, Kazuhiko Nakao, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa ; Therapeutic efficacy of combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing IL-12 in an immunocompetent mouse model ; 第 8 回日本遺伝子治療学会（東京）；2002 年 7 月
- 33)Akira Itoh, Takashi Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Hiroaki Mizukami, Akihiro Kume, Yutaka Hanazono, Keiya Ozawa ; Soluble CAR-SCF fusion proteins improve adenoviral vector-mediated gene transfer to human hematopoietic cells ; 第 8 回日本遺伝子治療学会（東京）；2002 年 7 月
- 34)水口裕之、早川堯夫；改良型アデノウイルスベクターの開発；Cell Biology Summer Meeting 2002（筑波）；2002 年 7 月
- 35)水口裕之、櫻井文教、早川堯夫；改良型 let-on システムを搭載したアデノウイルスベクターによる効率の良い目的遺伝子の発現制御システムの開発；第 18 回日本 DDS 学会（札幌）；2002 年 6 月
- 36)関口文子、形山和史、林哲、津田育宏、堤康央、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；遺伝子治療の最適化を目指したアデノウイルスベクターの Polyethylene Glycol 修飾と遺伝子発現活性；第 18 回日本 DDS 学会（札幌）；2002 年 6 月
- 37)榊永安繁、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；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メラノーマ関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞の腫瘍免疫誘導効果；第 18 回日本 DDS 学会（札幌）；2002 年 6 月
- 38)吉川友章、山本陽子、形山和史、吉岡靖雄、堤康央、中川晋作、真弓忠範；g8p 提示型ファージペプチドライブラリの構築および機能評価、第 18 回日本 DDS 学会（札幌）；2002 年 6 月
- 39)Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Application of DDS for gene therapy., Controlled Release Society 29th Annual

- Meeting, Seoul, July, 2002.
- 40) T. Hiranuma, H. Mizuguchi, M. Matsukura, T. Miike, T. Shimada: Vascular smooth muscle cell specific gene expression by the targeted adenoviral vector, Xth INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROMUSCULAR DISEASES (2002.7)
- 41) Akira Itoh, Takashi Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Hiroaki Mizukami, Akihiro Kume, Yutaka Hanazono, Keiya Ozawa; Highly Efficient Adenoviral Gene Transfer into Human Hematopoietic Cells with Novel Soluble Hybrid Adapter Polypeptides That Link Viral Fibers and Hematopoietic Specific Surface Antigens. American Society of Gene Therapy, 5th Annal Meeting (2002.5-6)
- 42) Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Takao Hayakawa: Single adenovirus vector containing both rtTA and tTS expression cassettes provides tight regulation of transgene expression in a positive manner. American Society of Gene Therapy, 5th Annal Meeting (2002.5-6)
- 43) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Atsushi Nakajima, Sachiko Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Takashi Kadowaki, Yoshinori Kamisaki, Richard S. Blumberg, Tadanori Mayumi: A novel direction for gene therapy of inflammatory bowel disease (IBD). Controlled Release Society 29th Annual Meeting Seoul, Korea, July, 2002
- 44) 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
- 45) 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, 2002
- 46) 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
- 47) 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
- 48) 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
- 49) 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
- 50) Shinsaku Nakagawa, Takashi Masuda, Tadanori Mayumi: Direct introduction of nanospheres into living cells using fusogenic liposome., International Conference Particles 2002., Orlando, April, 2002.

## 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); 三重遺伝子発現系を含むアデノウイルスベクター; 特願2002年第126776号
- 2) 水口裕之、櫻井文教、早川堯夫(発明人); アデノウイルスベクター(35型アデノウイルスベクター); 特願2002年第164015号
- 3) 中川晋作、真弓忠範、堤康央、川崎紘一、前田光子、早川堯夫、水口裕之(発明人); 新規ウイルスベクター; 特許出願中
- 4) 水口裕之、早川堯夫(発明人); ターゲッティングアデノウイルスベクター; 出願準備中

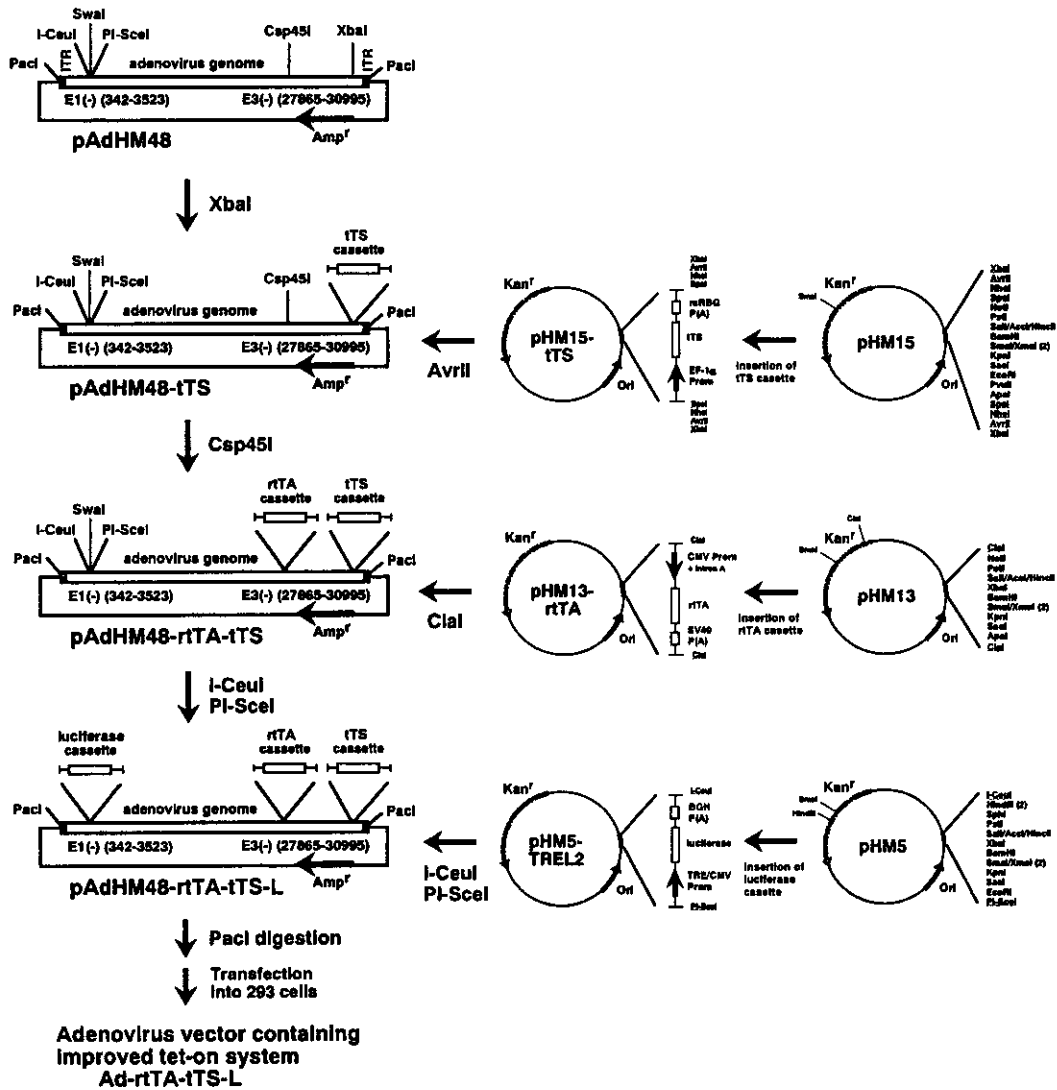
### 2. 実用新案登録

該当事項なし

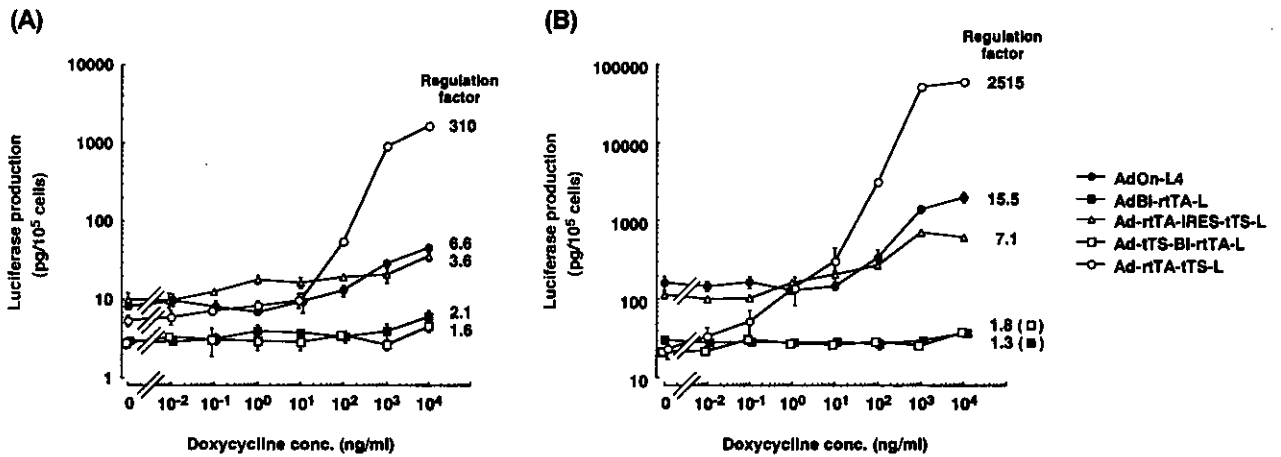
**Table 1 Ad vectors used in this study**

Ad vector	Foreign gene					
	E1 deletion region		E3 deletion region		Region between E4 and 3'ITR	
	Promoter	GOI	Promoter	GOI	Promoter	GOI
AdOn-L4	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA	—	—
AdBI-rtTA-L	TRE/CMV	Luciferase+rtTA	—	—	—	—
Ad-rtTA-IRES-ITS-L	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA+ITS	—	—
Ad-tTS-BI-rtTA-L	TRE/CMV	Luciferase+rtTA	—	—	EF-1 $\alpha$	tTS
Ad-rtTA-tTS-L	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA	EF-1 $\alpha$	tTS
Ad-L2	CMV	Luciferase	—	—	—	—
AdOn-SEAP4	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA	—	—
Ad-rtTA-tTS-SEAP	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA	EF-1 $\alpha$	tTS
Ad-SEAP2	CMV	SEAP	—	—	—	—

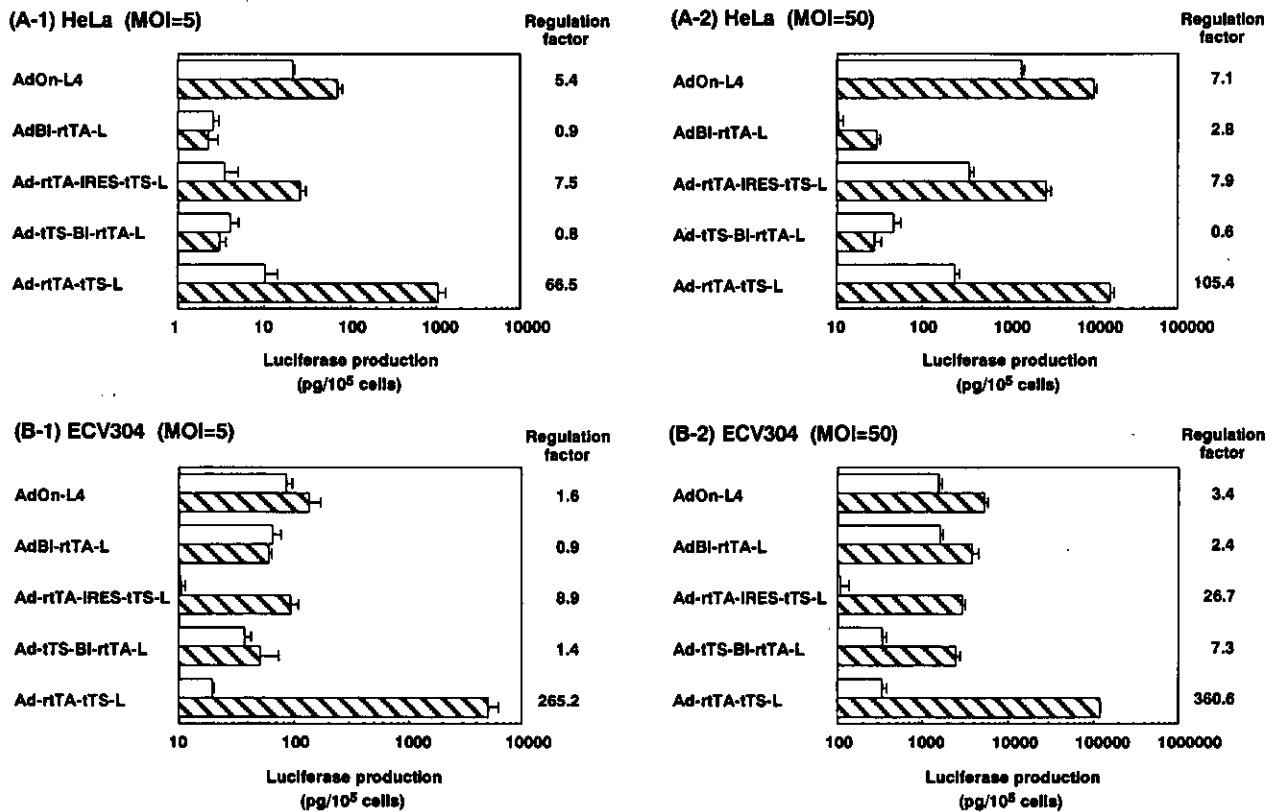
CMV = CMV intermediate-early promoter / enhancer  
 TRE/CMV = tet-responsive promoter containing minimal CMV promoter  
 EF-1 $\alpha$  = human elongation factor-1 $\alpha$  promoter  
 Ad-rtTA-IRES-ITS-L contains CMV promoter / Intron A / rTA / IRES / ITS / P(A) cassette in the E3 deletion region.  
 AdBI-rtTA-L and Ad-tTS-BI-rtTA-L express luciferase and rTA from one bidirectional tet-responsive promoter cloned in the E1 deletion region.



**Fig.1 The construction strategy of Ad vectors containing the trinal gene expression system.**  
 XbaI-digested pAdHM48 was ligated with AvrII-digested pHM15-tTS. The resulting plasmid pAdHM48-tTS was digested with Csp45I, and ligated with ClaI-digested pHM13-rtTA. Next, the resulting plasmid pAdHM48-tTS-rtTA was digested with I-CeuI and PI-SceI, and ligated with I-CeuI and PI-SceI-digested pHM5-TREL2. Finally, the resulting plasmid pAdHM48-tTS-rtTA-L was digested with PacI, and transfected into 293 cells, generating a recombinant Ad vector carrying an improved tet-on system.

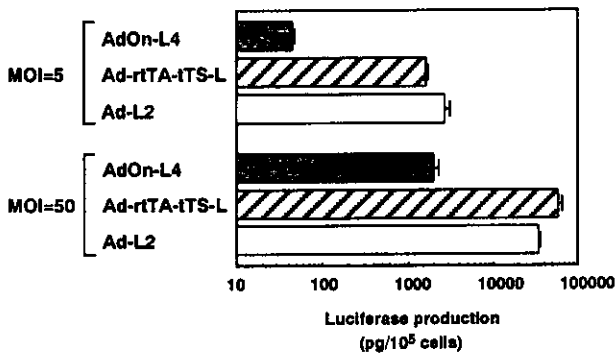


**Fig.2** Regulated luciferase expression in SK HEP-1 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems. SK HEP-1 cells were transduced with AdOn-L4, AdBI-rTA-L, Ad-rTA-IRES-IITS-L, Ad-IITS-BI-rTA-L, or Ad-rTA-IITS-L (A: MOI=5, B: MOI=50), and cultured with medium only or medium containing various concentrations of doxycycline. After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced cells was  $0.5 \pm 0.2$  pg/ $10^5$  cells. The regulation factor is the ratio of maximum luciferase production to minimum luciferase production. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3 or 4).

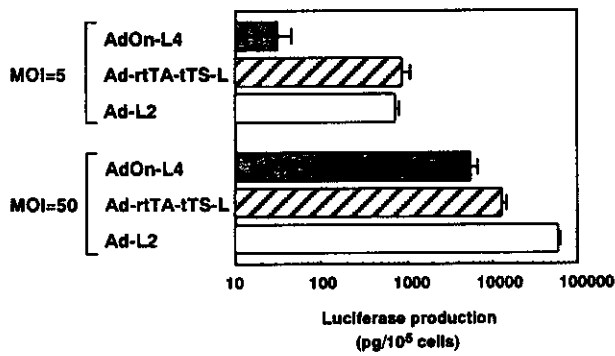


**Fig.3** Regulated luciferase expression in HeLa and ECV304 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems. HeLa (A-1, A-2) and ECV304 (B-1, B-2) cells were transduced with AdOn-L4, AdBI-rTA-L, Ad-rTA-IRES-IITS-L, Ad-IITS-BI-rTA-L, or Ad-rTA-IITS-L (A-1, B-1: MOI=5; A-2, B-2: MOI=50). The cells were cultured without (open columns) and with (slashed columns) doxycycline ( $10^4$  ng/ml) for 48 h. After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced HeLa and ECV304 cells was  $0.2 \pm 0.1$  and  $0.7 \pm 0.1$  pg/ $10^5$  cells, respectively. The regulation factor is the ratio of maximum luciferase production to minimum luciferase production. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5).

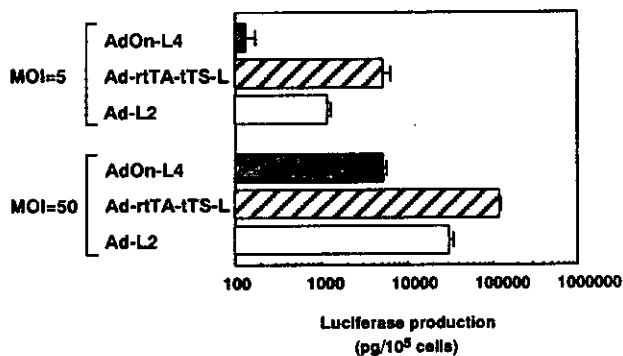
(A) SK HEP-1



(B) HeLa

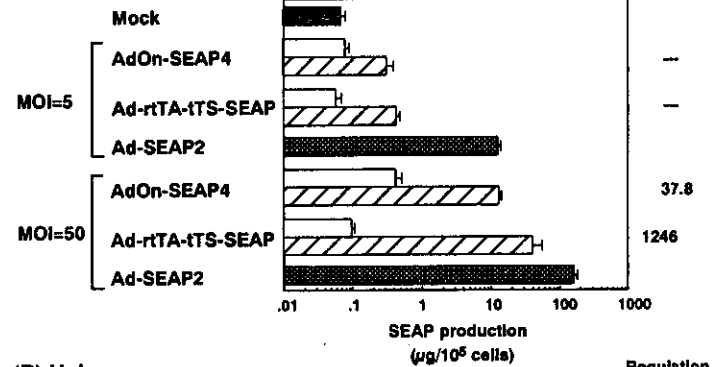


(C) ECV304

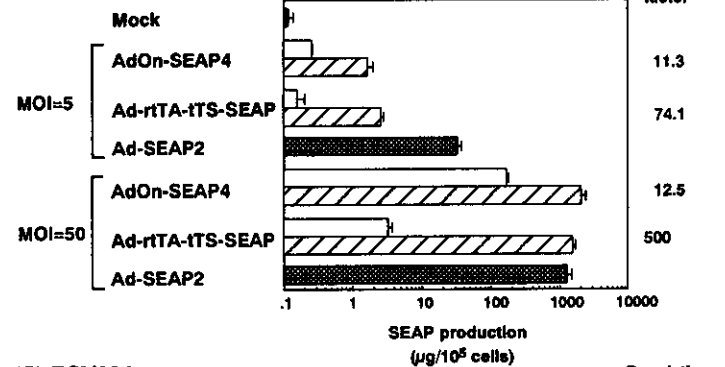


**Fig.4 Comparison of induced (maximum) luciferase production in cells transduced with AdOn-L4, Ad-rTA-tTS-L, or Ad-L2.** SK HEP-1 (A), HeLa (B) and ECV304 (C) cells were transduced with AdOn-L4, Ad-rTA-tTS-L, or Ad-L2 (MOI =5 or 50), and cultured without or with doxycycline (10<sup>4</sup> ng/ml). After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Maximum luciferase production is shown in the cases of AdOn-L4 and Ad-rTA-tTS-L. Luciferase production in non-transduced cells is shown Figure 2 and 3. The data are expressed as mean ± S.D. (n=5).

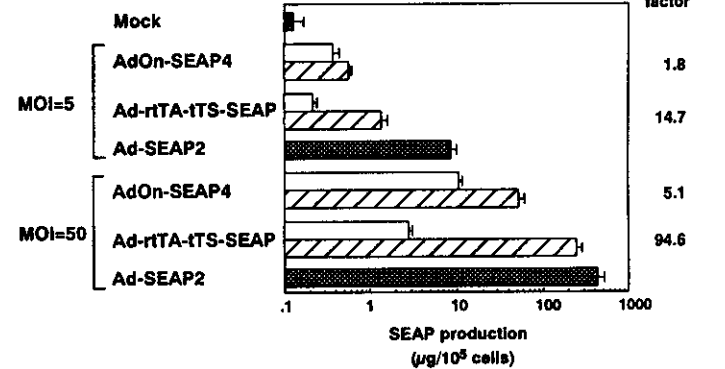
(A) SK HEP-1



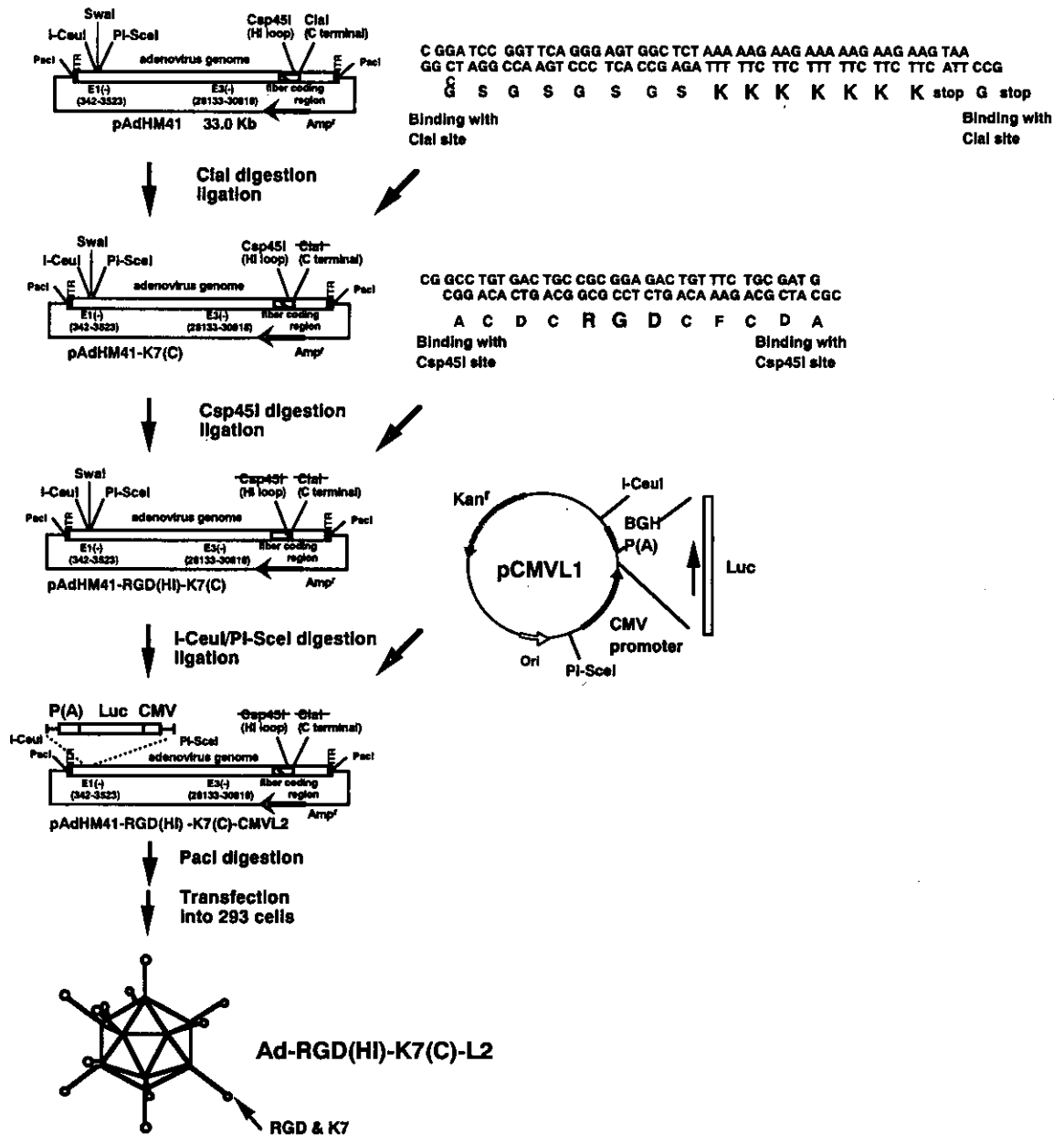
(B) HeLa



(C) ECV304



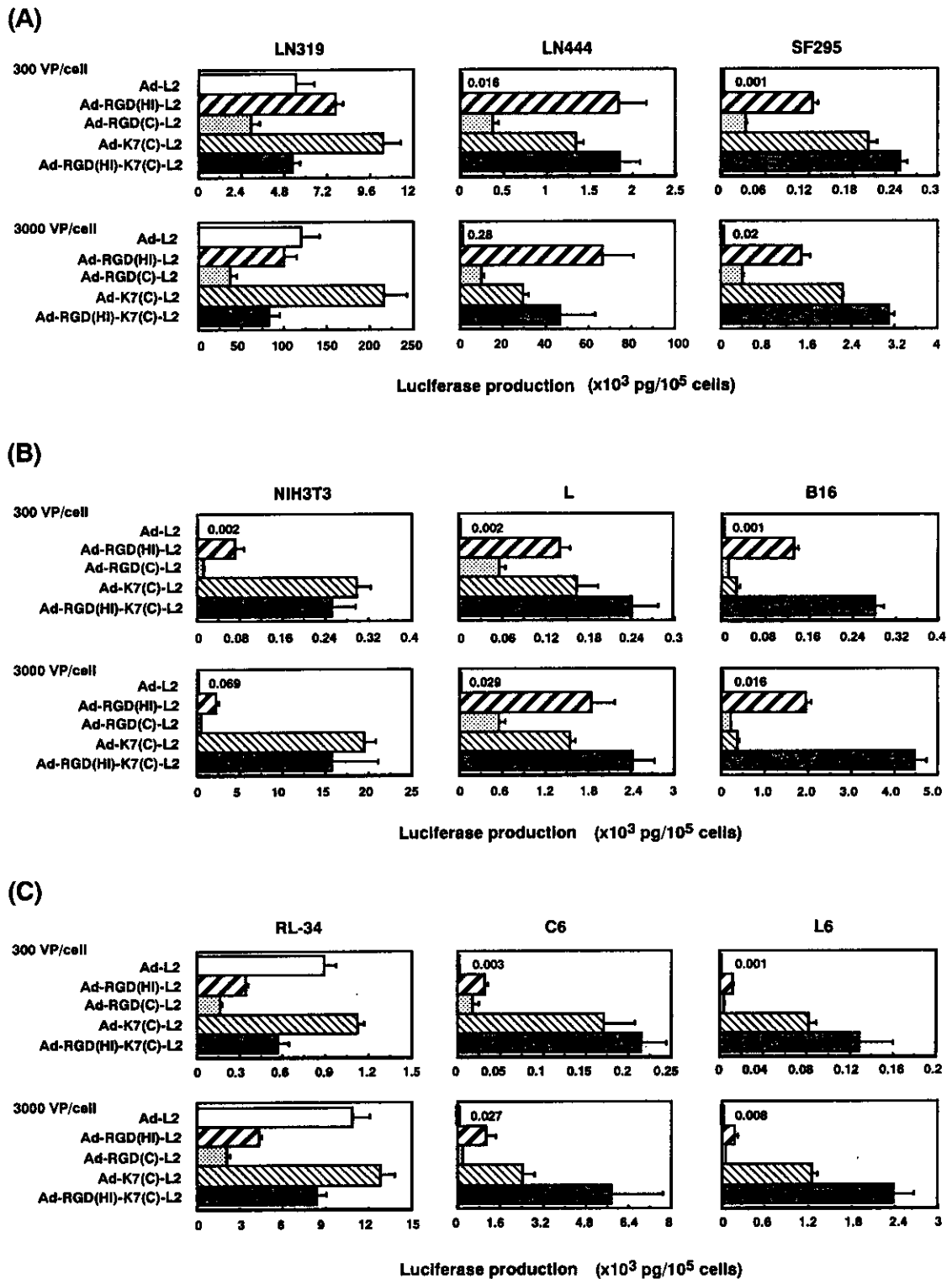
**Fig.5 Regulated SEAP expression in SK HEP-1, HeLa, and ECV304 cells transduced with AdOn-SEAP4 or Ad-rTA-tTS-SEAP.** SK HEP-1 (A), HeLa (B), and ECV304 (C) cells were transduced with AdOn-SEAP4, Ad-rTA-tTS-SEAP, or Ad-SEAP2 (MOI =5 or 50). The cells transduced with AdOn-SEAP4 or Ad-rTA-tTS-SEAP were cultured without (open columns) or with (slashed columns) doxycycline (10<sup>4</sup> ng/ml). After culture for 48 h, SEAP production in the medium was determined. Background SEAP production in non-transduced cells was higher than background luciferase production in the non-transduced cells shown in Figure 2 and 3, when compared with that in Ad-transduced cells. Therefore, SEAP production in non-transduced cells is also shown (mock). The regulation factor is the ratio of maximum SEAP production to minimum SEAP production. The regulation factor in SK-HEP-1 cells transduced with AdOn-SEAP4 or Ad-rTA-tTS-SEAP at MOI=5 cannot be calculated due to lower background SEAP production. The data are expressed as mean ± S.D. (n= 4).



**Fig. 6** The construction strategy for fiber-modified Ad vectors containing binary foreign peptides. First, pAdHM41 was digested by ClaI and ligated with an oligonucleotide that contains a binding site with the ClaI-digested fragment and corresponds to the flexible linker ((GS)<sub>4</sub>) and K7 peptide, resulting in pAdHM41-K7(C). The oligonucleotide was designed so that the positive recombinant plasmid lacked a ClaI site (i.e., generation of the self-ligated parental plasmid was reduced by the digestion of the ligation sample by ClaI). Second, pAdHM41-K7(C) was digested with Csp45I and ligated with an oligonucleotide that contains a binding site with the Csp45I-digested fragment and corresponds to the RGD peptide. The oligonucleotide was designed so that the positive recombinant plasmid lacked a Csp45I site for convenience of selection, resulting in pAdHM41-RGD(HI)-K7(C). Finally, pAdHM41-RGD(HI)-K7(C)-L2 was constructed by the ligation of I-CeuI/PI-SceI-digested pAdHM41-RGD(HI)-K7(C) with I-CeuI/PI-SceI-digested pCMV1.1. Luciferase-expressing Ad vectors containing RGD and K7 peptide in the HI loop or C terminal of the fiber knob, respectively, (Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2) were produced by transfection of the PacI-digested pAdHM41-RGD(HI)-K7(C)-L2 into 293 cells.

**Table 2. Ad vectors used in this study**

Ad vectors	Foreign peptide		Particle-to-PFU ratio (VP / PFU)
	HI loop	C-terminal	
Ad-L2	—	—	15
Ad-RGD(HI)-L2	CDCRGDCFC	—	37
Ad-RGD(C)-L2	—	(GS) <sub>4</sub> CDCRGDCFC	33
Ad-K7(C)-L2	—	(GS) <sub>4</sub> KKKKKKK	12
Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2	CDCRGDCFC	(GS) <sub>4</sub> KKKKKKK	52



**Fig. 7** Comparison of luciferase production in several types of cultured cells transduced by Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-RGD(C)-L2, Ad-K7(C)-L2, or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2. Cells (A, human-derived cell; B, mouse-derived cell; C, rat-derived cell) were transduced with 300 or 3000 VP/cell of Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-RGD(C)-L2, Ad-K7(C)-L2, and Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 for 1.5 h. After culture for 48 h, luciferase production was measured by a luminescent assay. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=4). In case of Ad-L2 in CAR-negative cells, mean value was described in the figure. n.d.; not detectable.



Table 3. Summary of CAR and integrin expression in human cell lines

Cell	CAR	Integrin	
		$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$
SK HEP-1	+	+	+
LN319	+	+	+
LN444	-	+/-	+
SF295	-	+	+

CAR and Integrin ( $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$ ) expression in human cell lines were reported previously by flow cytometric analysis using anti-CAR,  $\alpha v \beta 3$ , and  $\alpha v \beta 5$  antibody, respectively.  
 + ; Intense or moderate expression  
 +/- ; faint expression  
 - ; no expression

Table 4. Summary of CAR and Integrin expression in mouse cell lines

Cell	CAR	Integrin		
		$\alpha v$	$\beta 3$	$\beta 5$
NIH3T3	-	+	+	+
L	-	+	-	+
B16	-	+	+	+

CAR and Integrin ( $\alpha v$ ,  $\beta 3$ , and  $\beta 5$ ) expression in mouse cell lines were reported previously by RT-PCR analysis.  
 + ; Intense or moderate expression  
 +/- ; faint expression  
 - ; no expression

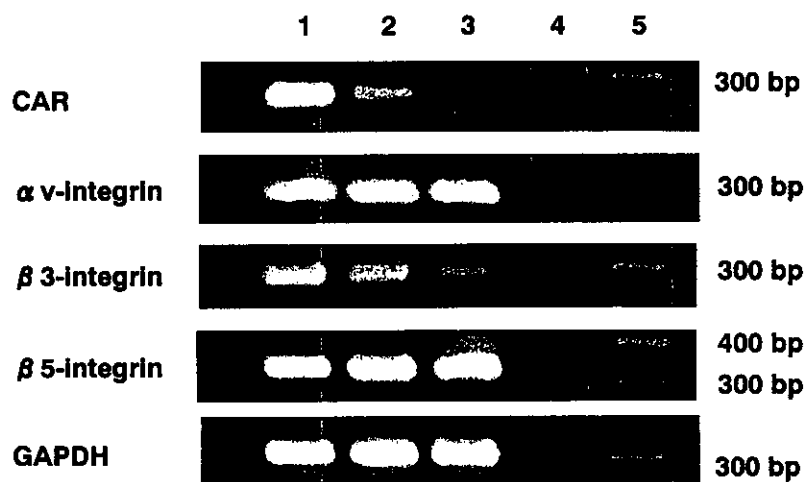


Fig. 8 RT-PCR analysis of levels of CAR and Integrin ( $\alpha v$ ,  $\beta 3$ , and  $\beta 5$ ) expression in rat cells. (lane 1) RL-34; (lane 2) C6; (lane 3) L6; (lane 4) water; (lane 5) DNA marker.

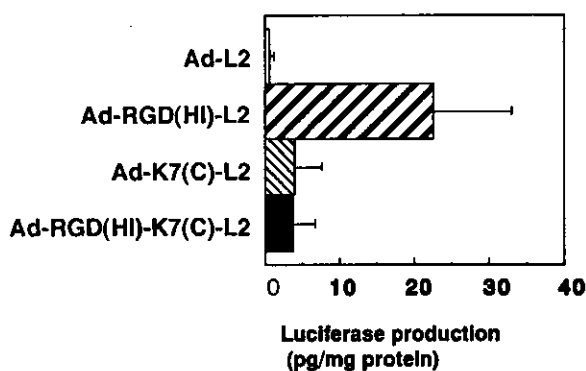


Fig. 9 Intratumoral luciferase production in mice after intratumoral injection of Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2, or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2. Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2, or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2 ( $1.0 \times 10^9$  VP) was injected intratumorally into B16-bearing mice. Two days later, the tumors were isolated, and luciferase production was determined. Luciferase production in the non-transduced B16 tumor cells was  $1.2 \pm 0.8$  pg/105 mg protein. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of 5 to 6 mice.

Table 5. Ad vectors used in this study

Ad vectors	FG loop of fiber knob	HI loop of fiber knob	RGD motif of penton base
Ad-L2	Intact	—	Intact
Ad/ $\Delta$ F-L2	mutation	—	Intact
Ad/ $\Delta$ P-L2	Intact	—	mutation
AdRGD-L2	Intact	RGD peptide	Intact
Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2	mutation	RGD peptide	Intact

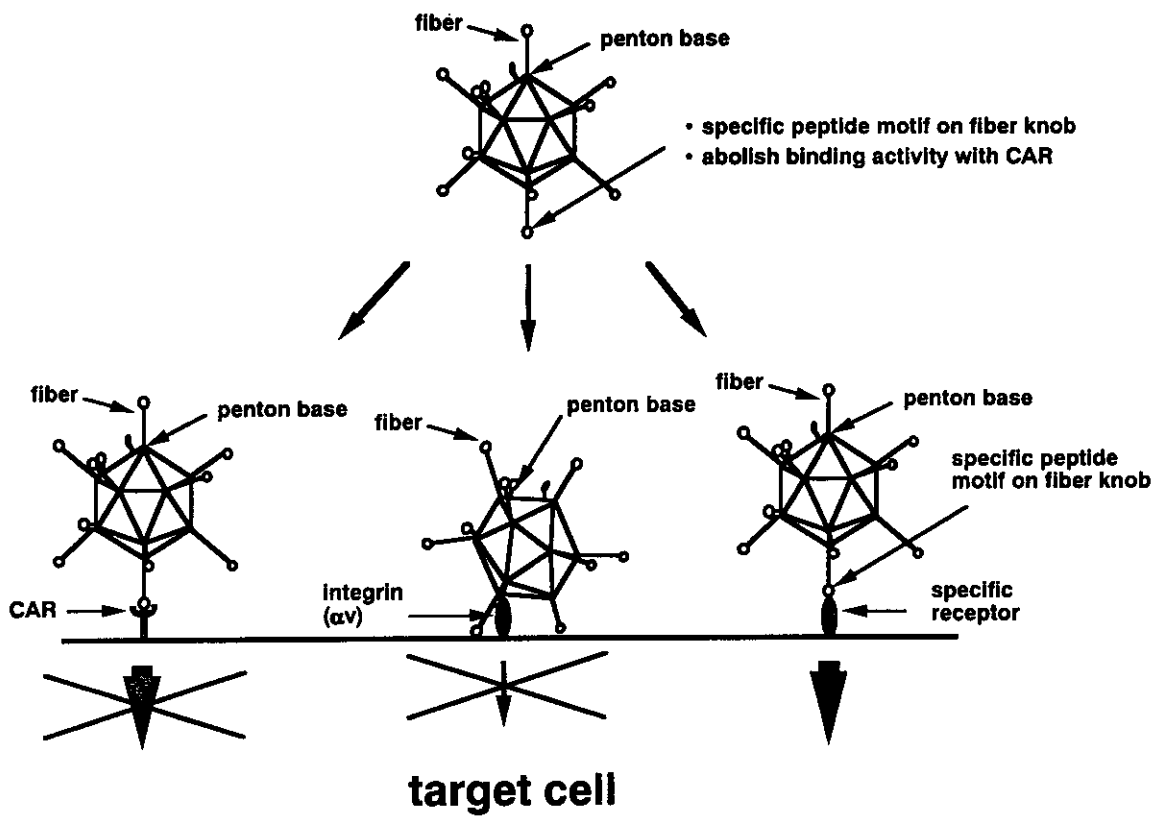
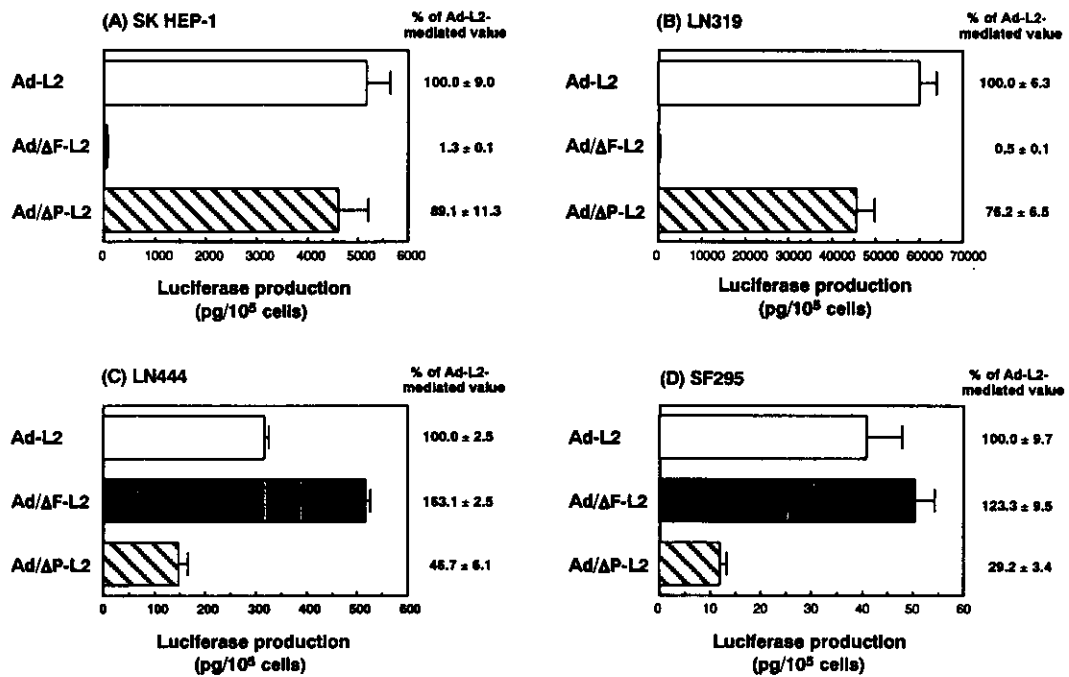
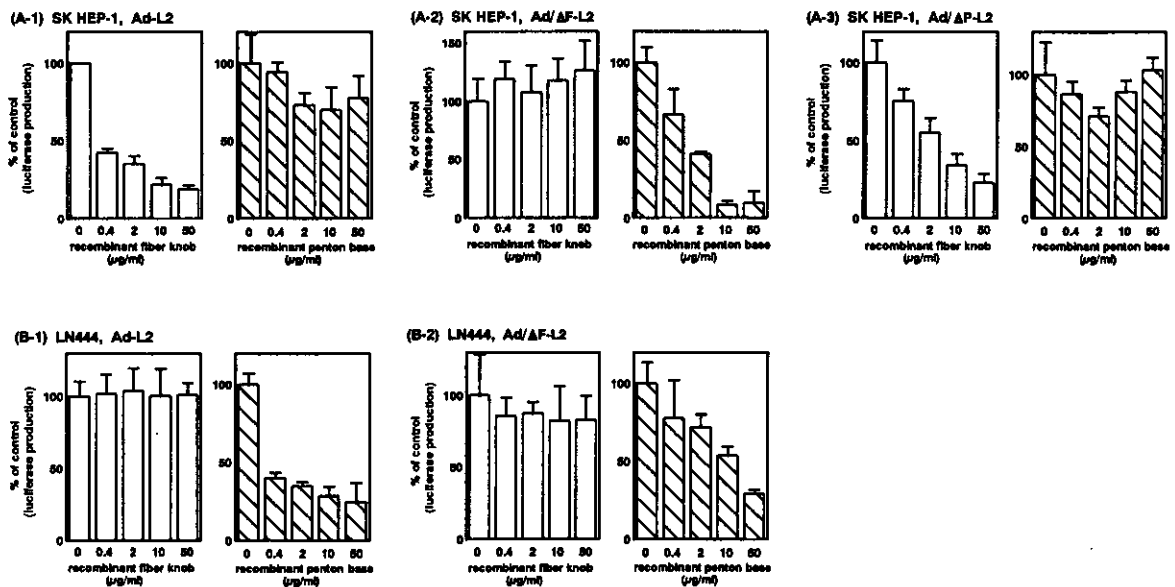


Fig.10 Schematic representation of targeted adenovirus vector



**Fig.11 Comparison of luciferase production in several human cells transduced with Ad-L2, Ad/ ΔF-L2 and Ad/ΔP-L2**

SK HEP-1 (A), LN319 (B), LN444 (C) and SF295 cells (D) were transduced with 300 or 3000 VP/cell (300 VP/cell for SK HEP-1 and LN319 cells; 3000 VP/cell for LN444 and SF295 cells) of Ad-L2, Ad/ ΔF-L2 and Ad/ ΔP-L2 for 1.5 h. LN444 and SF295 cells were transduced with higher concentrations of Ad vectors due to the insufficient CAR expression. 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. SK HEP-1 and LN319 cells are CAR-positive, while LN444 and SF295 cells are CAR-negative.



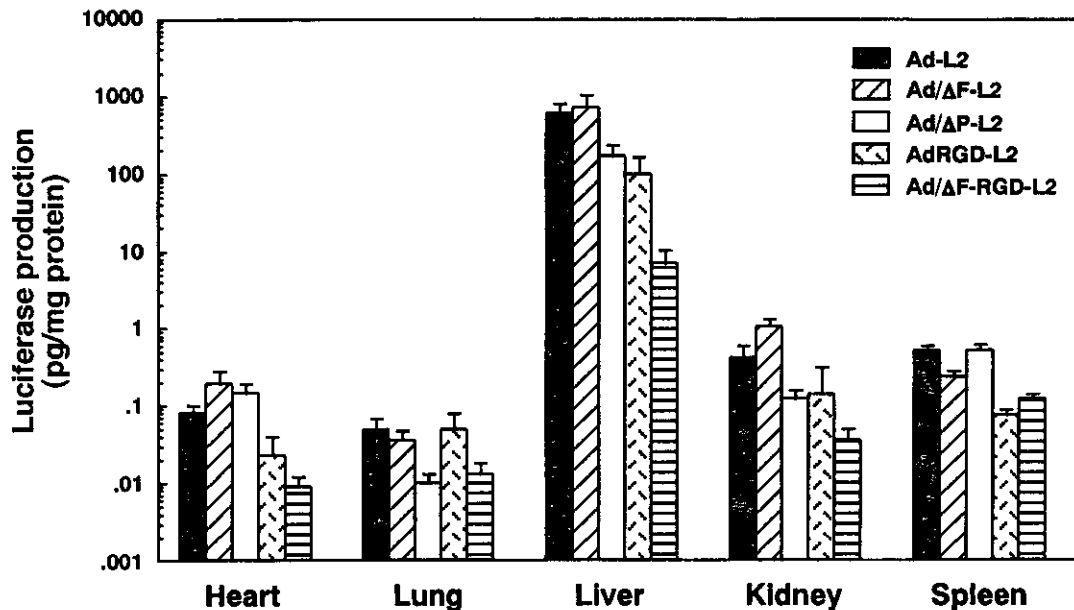
**Fig. 12 Inhibition of transduction of Ad-L2, Ad/ΔF-L2 and Ad/ΔP-L2 to SK HEP-1 and LN444 cells by recombinant fiber knob or penton base.**

SK HEP-1 (A) and LN444 (B) cells were preincubated with recombinant wild-type fiber knob or recombinant penton base (0, 0.4, 2, 10, 5 0 μg/ml) for 10 min. Then, the cells were transduced with 300 VP/cell (in the case of SK HEP-1 cells) or 3000 VP/cell (in the case of LN444 cells) of Ad-L2 (A-1, B-1), Ad/ΔF-L2 (A-2, B-2) and Ad/ΔP-L2 (A-3) for 0.5 h in the presence of recombinant fiber knob or recombinant penton base. Forty-eight hours later luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of four to six experiments. An inhibition experiment could not be performed in the case of LN444 cells transduced with Ad/ΔP-L2 due to the small expression of luciferase.

**Table 6. Comparison of luciferase production in various cells transduced with Ad-L2, AdRGD-L2, Ad/ $\Delta$ F-L2 and Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2**

Cell	Ad vectors	Luciferase production (% of Ad-L2-mediated value)	
SK HEP-1 (CAR(+))	Ad-L2	100.0 $\pm$	9.0
	AdRGD-L2	453.0 $\pm$	85.2
	Ad/ $\Delta$ F-L2	1.3 $\pm$	0.1
	Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2	25.2 $\pm$	1.4
LN319 (CAR(+))	Ad-L2	100.0 $\pm$	6.3
	AdRGD-L2	442.0 $\pm$	51.5
	Ad/ $\Delta$ F-L2	0.5 $\pm$	0.1
	Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2	8.1 $\pm$	1.8
LN444 (CAR(-))	Ad-L2	100.0 $\pm$	17.2
	AdRGD-L2	55833 $\pm$	2590
	Ad/ $\Delta$ F-L2	120.5 $\pm$	6.8
	Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2	3278 $\pm$	462
SF295 (CAR(-))	Ad-L2	100.0 $\pm$	9.7
	AdRGD-L2	97221 $\pm$	5102
	Ad/ $\Delta$ F-L2	123.3 $\pm$	9.5
	Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2	4862 $\pm$	493

SK HEP-1, LN319, LN444 and SF295 cells were transduced with 300 or 3 000 VP/cell (300 VP/cell for SK HEP-1 and LN319 cells; 3000 VP/cell for LN444 and SF295 cells) of Ad-L2, AdRGD-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. Data was expressed as the percent of Ad-L2-mediated values.



**Fig.13 Luciferase production in mice after the systemic administration of various Ad vectors.** Ad-L2, Ad/ $\Delta$ F-L2, Ad/ $\Delta$ P-L2, AdRGD-L2 and Ad/ $\Delta$ F-RGD-L2 ( $3.0 \times 10^{10}$  VP) were intravenously injected into the mice. Forty-eight hours later, the heart, lung, liver, kidney and spleen were isolated, and luciferase production was measured by luminescent assay. All data represent the mean  $\pm$  S.E. of six to eight experiments. Mean background value of luciferase production in each organ has been subtracted from the data.