

Table 7. HA activity of each vector with mouse and human erythrocytes

Ad vectors	HA activity (HAU/10 ¹⁰ VP of virus/ml)	
	mouse	human
Ad-L2	n.d.	n.d.
Ad/ΔF-L2	n.d.	n.d.
Ad/ΔP-L2	n.d.	n.d.
AdRGD-L2	240	n.d.
Ad/ΔF-RGD-L2	15	n.d.

The virus (Ad-L2, Ad/ΔF-L2, Ad/ΔP-L2, AdRGD-L2 and Ad/ΔF-RGD-L2) diluted in serial twofold steps was incubated with mouse or human red blood cells for 2 hrs at 4 °C. HA activity was determined as the reciprocal of the highest dilution of the virus showing 50% hemagglutination. Data was expressed as HAU / 10¹⁰ VP of virus / ml. Data represent the mean of duplicate experiments. n.d.: not detectable

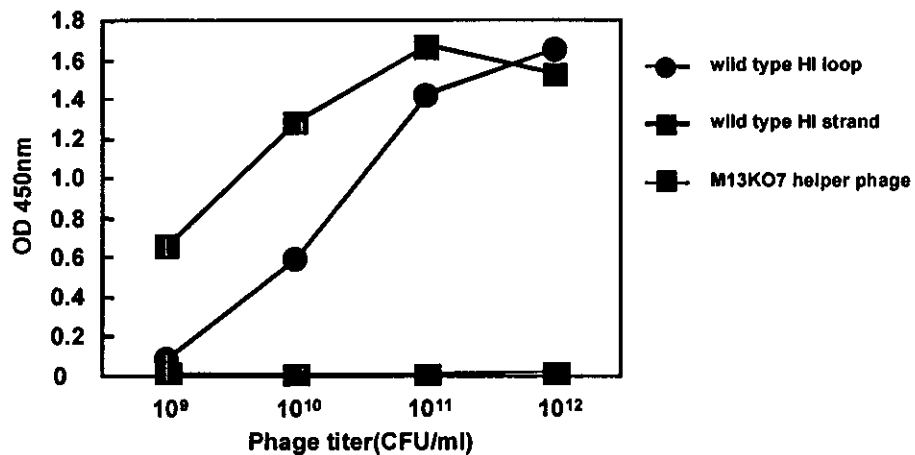


Fig. 14 Detection of HI loop and HI strand displayed on surface of M13 bacteriophage by ELISA . Anti-E tag Mab(Pharmacia) is adsorbed over night at 4 °C in wells of a 96-well MaxiSorb immunoplate at 1 μg/well in 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9.1. Plates were blocked with 2% Block Ace. And then plates were washed, phage were applied to the wells in serial dilutions in 2% Block Ace, starting from 10¹²/well. After 2h incubation at RT and washing, E-tag displaying phages were detected using HRP conjugated anti-M13 Ab(1/4000 in 0.4 % Block Ace; Pharmacia). Final color development was done using TMBZ and absorbance was measured at 450 nm.

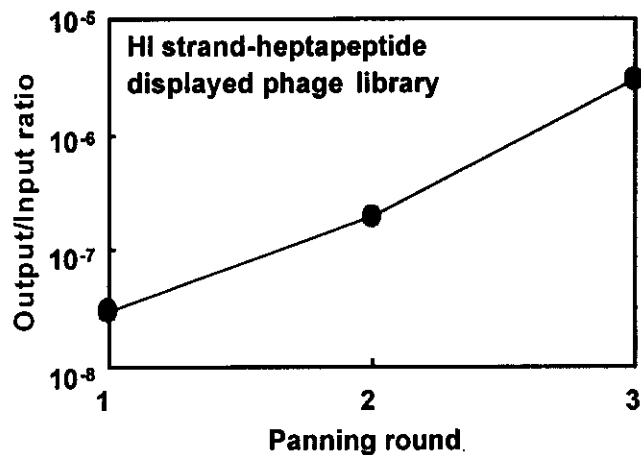


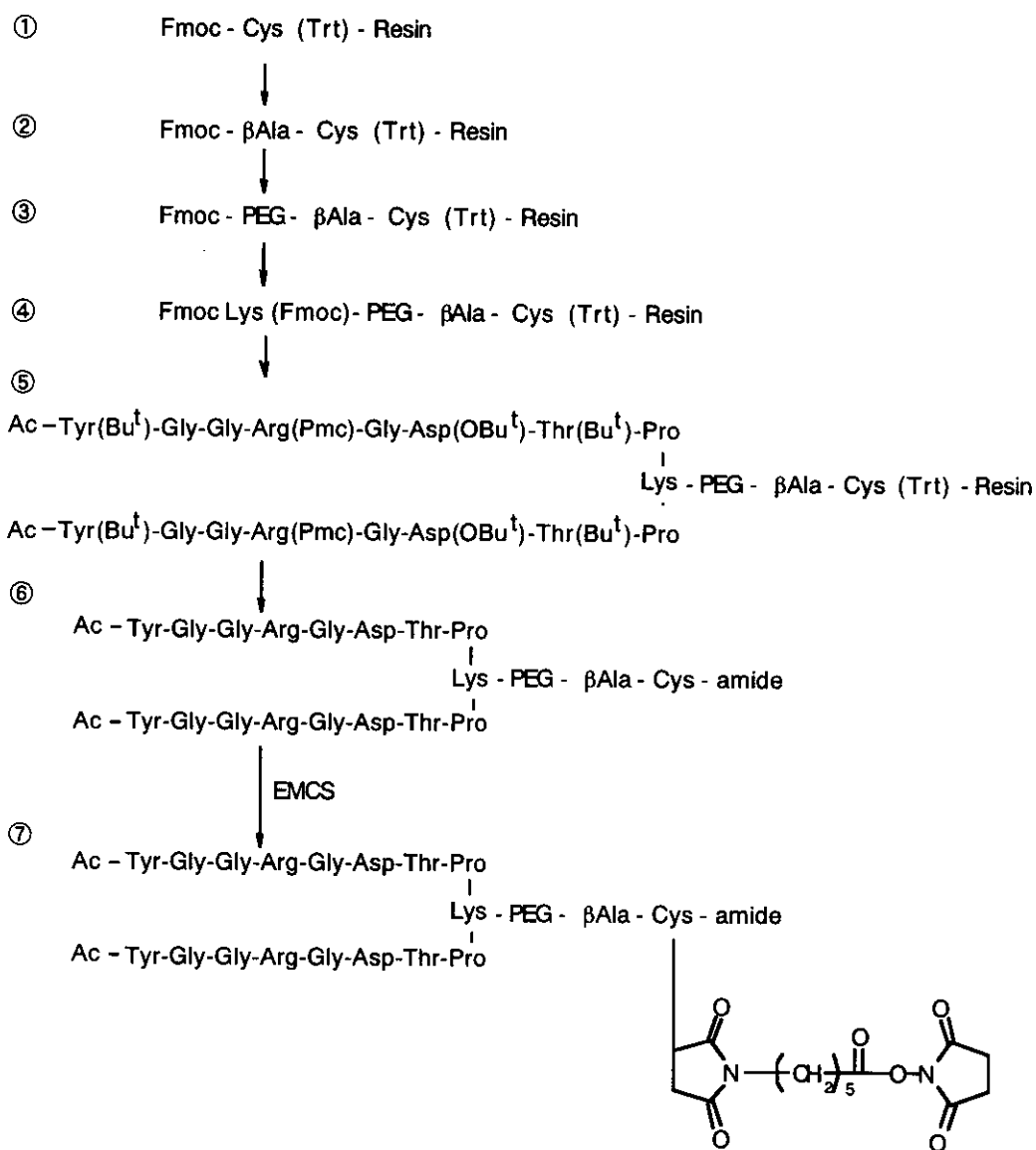
Fig. 15 Efficacy of panning against EGF receptor. Fifty microliters of amplified HI loop-heptapeptides phage(10^{10} CFU/ml) library was screened against the purified extracellular domain of human EGF receptor(hEGFR) coated on immunotube(Nunc) in $100 \mu\text{l}$ of bicarbonate buffer(pH 9.6). In all panning rounds, hEGFR was coated at $10 \mu\text{g/ml}$. Bound phages were eluted with 100mM HCl. Eluted phages were immediately neutralized by the addition of 1M Tris-HCl(pH 8.0), and used to infect to *E.coli* (TG1) followed by plating infected cells in ampicillin containing medium. The amount of bound phages were calculated by colony counting.

Table 8 Codons and amino acid sequences of clones Isolated from the library

Library	NNS \times 7 sequences	Library	NNS \times 7 sequences
HI loop library		HI strand library	
1	AAC AAG GAC TGG CGC GAC AAC N K D W H D N	1	ATG ACC CAC AGG GGC CGC CAC M T H R G R H
2	CCG TTC ACC GAC CAG CCG AGC P F T D Q P S	2	TCC CAC TCC CAC CCC TAC CTC S H S H P Y L
3	AAC AAG CAC TTC GCG CCC AAG N K H F A P K	3	AAG CCG ATC CGC TGC GTG CCG K P I R C V P
4	ACG GCC AAG GAG AGC GAG CAC T A K E S E H	4	AAC CAG GAC CGC GCC ACG GCG N Q D R A T A
5	ATC AGC AGC TCC GGC CAG TGG I S S S G Q W	5	ATC CGC GGC GCC GGC GGC TGC I R G A G G C
6	ACG TAG GCC TGC TTC ATC GCC T A C F I A	6	CCG CCC AAC GGC CGC GGC TCC P P N G R G S
7	ATC CCG CCC ATA CCG CAC ATC I P P I P H I	7	AAC TAC GTG CCG GCC GGC TCC N Y V P A G S
8	ACC TGC ATG GTC AGC TCC TAC T C M V S S Y	8	AGC TAC AAC GCG ATC GAC GAC S Y N A I D D
9	GGG GCC CCC AAC GCC CTG CAC G A P N A L H	9	ATC CTC TTG GAG TAG ATG TCC I L L E M S
10	CGG AGC CGC GCC TGG CCC AGG R S R A W P R	10	CGC ACC ACC TTC AAC ATC TCC R T T F N I S

* ; Amber stop codon

One milliliter of electroporated *E.coli* (TG1) cells were incubated at 37°C for 1h. Fifty microliters of the culture were used for titering. Serial 100-fold dilutions of electroporated cells were added 800 microliters of $2 \times \text{YT}$ containing ampicillin and used to inoculate Clondisk(Clontech) containing the appropriate dilution, which were incubated over-night at 37°C . Randomly isolated ten colonies respectively were used to inoculate 2 ml of $2 \times \text{YT}$ medium containing appropriate antibiotic, and the minipreps were incubated over-night at 37°C , shaking.



Scheme 1 RGD-PEG-NHS の合成方法

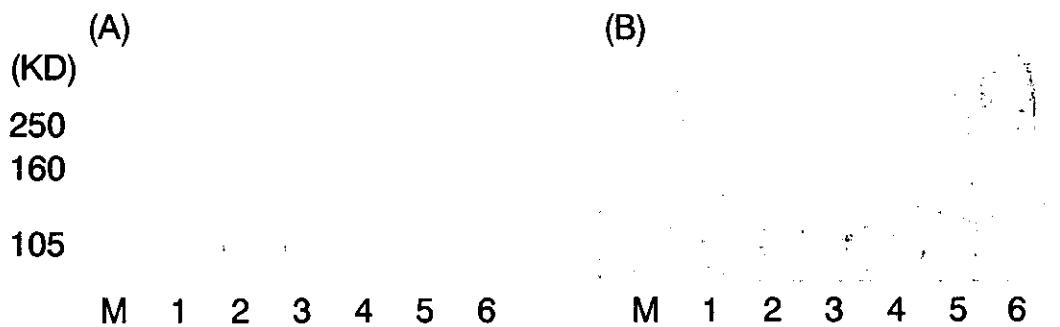


Fig. 16 SDS-PAGE analysis of PEGylated adenovirus vectors. Comparison of two SDS-gels (A, B) that were run under identical conditions and loaded as follows : lane M, protein markers ; lane 1 Ad : PEG=1:0 (unmodified-Ad) ; lane 2, 1:25 ; lane 3, 1:100 ; lane 4, 1:400 ; lane 5, 1:1600 ; lane 6, 1:6400. (A) The gel was stained with Coomassie blue. (B) The gel was stained for PEG using barium iodide.

Table 9 Relationship between degree of PEGylated-Hexon and adenovirus vectors size

添加PEG量 (Ad:PEG)*	Hexon 修飾率 (%)	粒子径 (nm)
1:0 (unmodified)	0	113.3±0.76
1:25	9.7	120.6±0.64
1:100	34.0	123.8±0.98
1:400	61.1	128.5±1.25
1:1600	89.3	137.6±0.91
1:6400	100.0	148.2±1.48

* Ad外殻タンパク質のリジン残基に対するPEG添加量 (mol: mol)

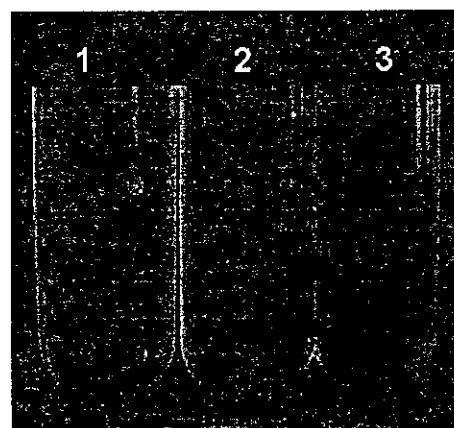


Fig. 17 Separation of unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad by banding on CsCl gradients.

1: unmodified-Ad
2: unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad
3: 5.3% PEG-Ad

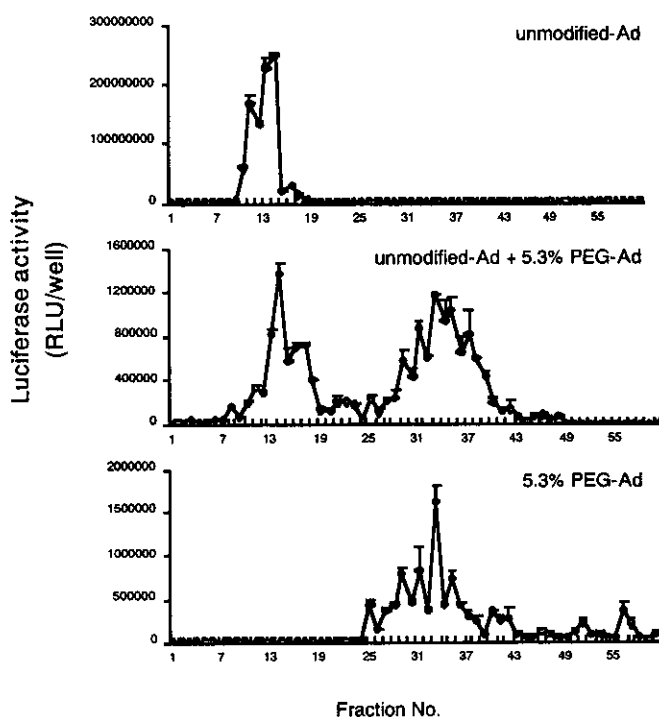


Fig. 18 Gene expression of fractionated adenovirus vectors. Unmodified-Ad and 5.3% PEG-Ad were separated by CsCl gradient centrifugation. Each fraction was collected from the bottom of the tube and was transfected to A549 cells. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean ± S.D. (n=3).

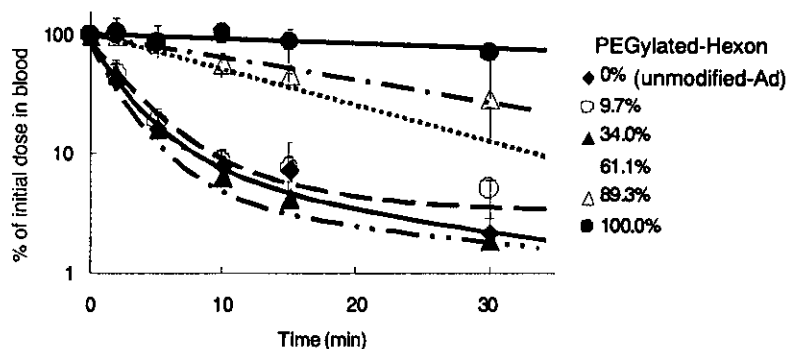


Fig. 19 Pharmacokinetics of PEGylated adenovirus vectors. Normal female BALB/c mice were administrated intravenously with 1×10^{10} particles of unmodified-Ad or PEG-Ads. Blood samples were drawn at different times. The concentration of adenovirus vectors in serum was quantitated with southern blot method. A standard curve was made for each PEG-Ads. Each point was represented as mean \pm S.D. (n=4).

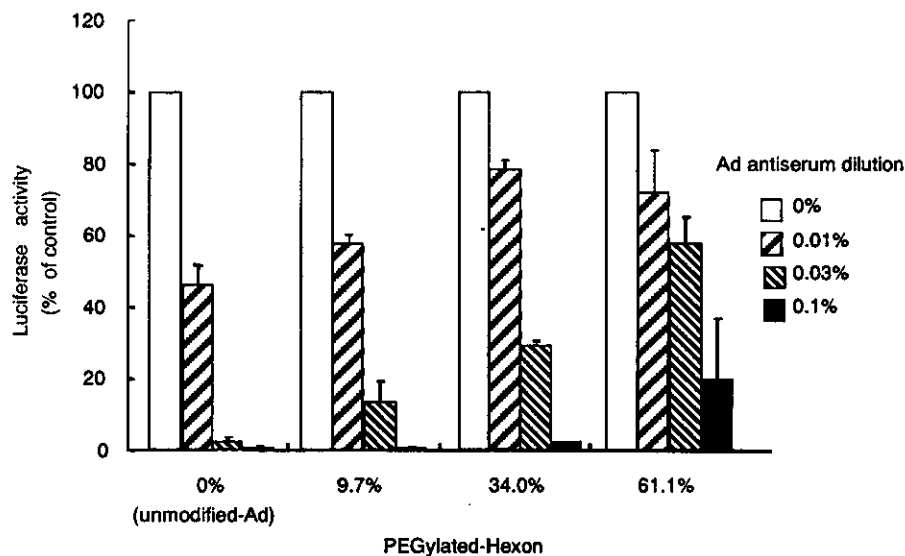


Fig. 20 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of adenovirus vectors antiserum. A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads in the presence or absence of Ad antiserum respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean \pm S.D. (n=3).

Table 10 Half-life of PEGylated adenovirus vectors in blood

PEGylated -Hexon	t _{1/2} (min)
0% (unmodified -Ad)	1.55
9.7%	1.84
34.0%	1.83
61.1%	5.03
89.3%	11.97
100.0%	78.56

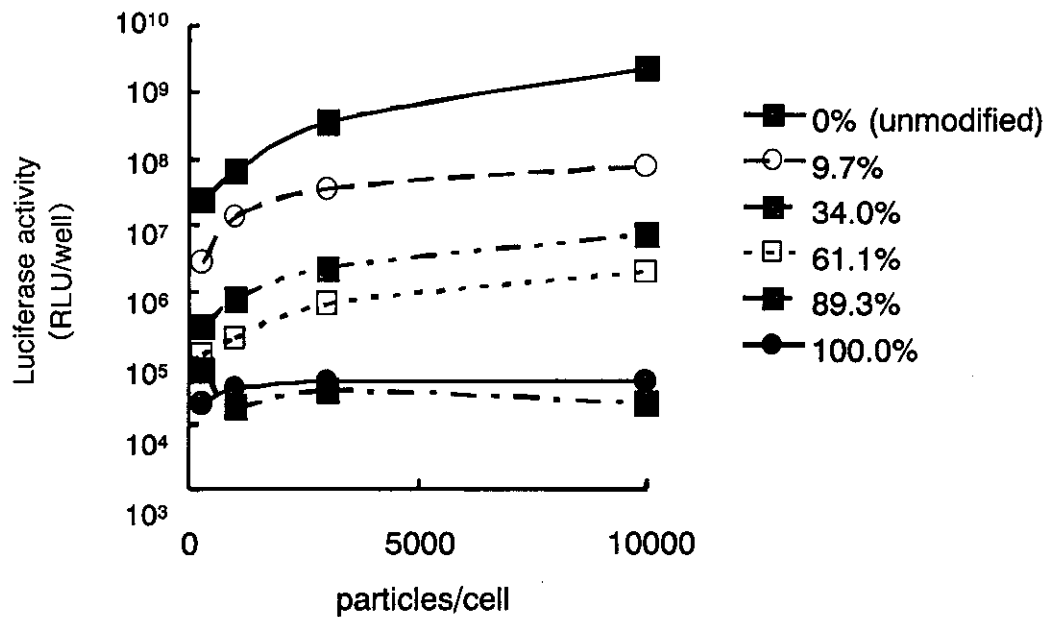


Fig. 21 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors
 A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 300, 1000, 3000 or 10000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean \pm S.D. (n=3).

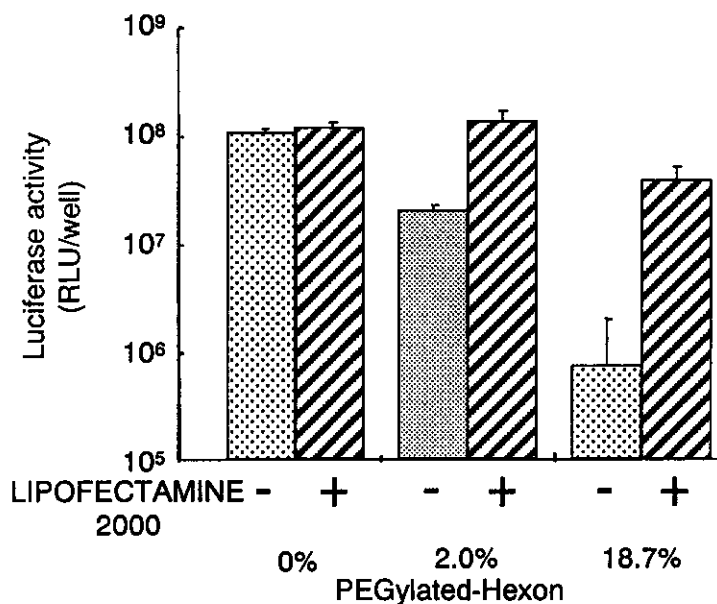


Fig. 22 Transduction of A549 cells by PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of LIPOFECTAMINE 2000
 A549 cells (2×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of unmodified-Ad or PEG-Ads in the presence or absence 20mg/ml of LIPOFECTAMINE 2000 respectively. After 4hr, the virus solution was replaced with fresh medium, and the cells were incubated for 24 hr. And then luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean \pm S.D. (n=3).

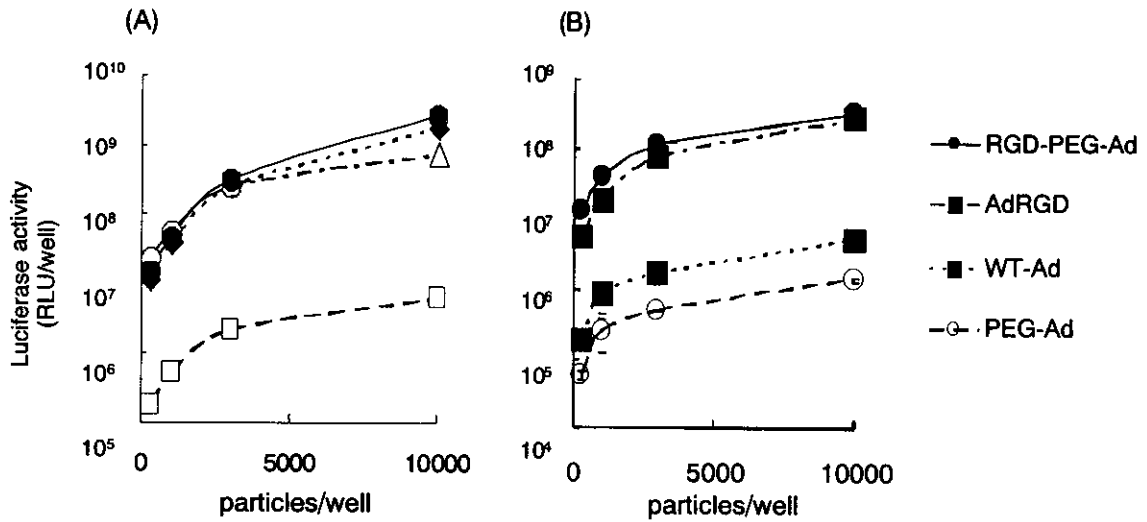


Fig. 23 Transduction of A549 cells and B16BL6 cells by RGD-PEGylated adenovirus vectors

(A) A549 cells and (B) B16BL6 cells (2×10^4 cells) were transfected with 300, 1000, 3000 or 10000 particles/cell of Ad, PEG-Ad, RGD-PEG-Ad or AdRGD respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean \pm S.D.

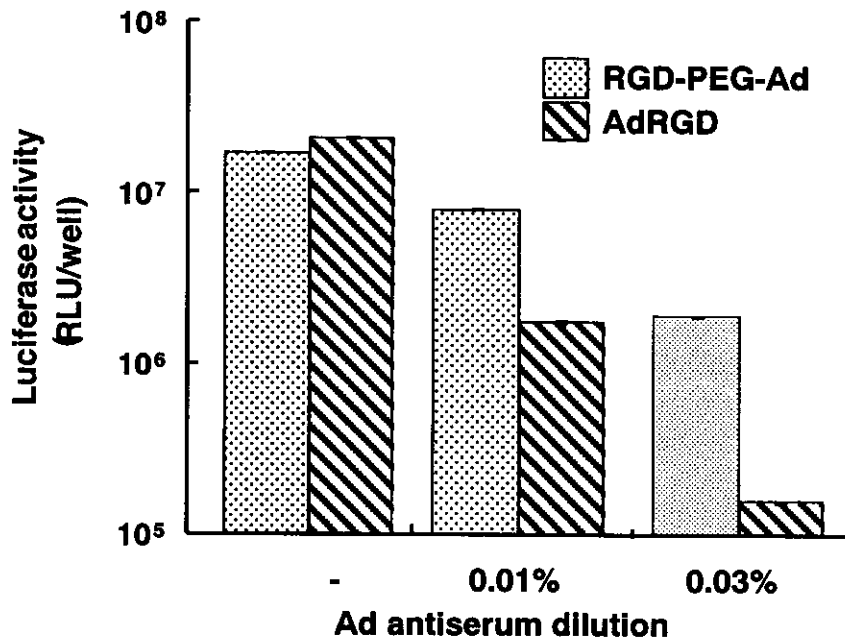


Fig. 24 Transduction of B16BL6 cells by RGD-PEGylated adenovirus vectors in the presence or absence of adenovirus vectors antiserum. B16 BL6 cells (2×10^4 cells) were transduced with 1000 particles/cell of RGD-PEG-Ad or AdRGD in the presence or absence of Ad antiserum respectively. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point was represented as mean \pm S.D. (n=3)

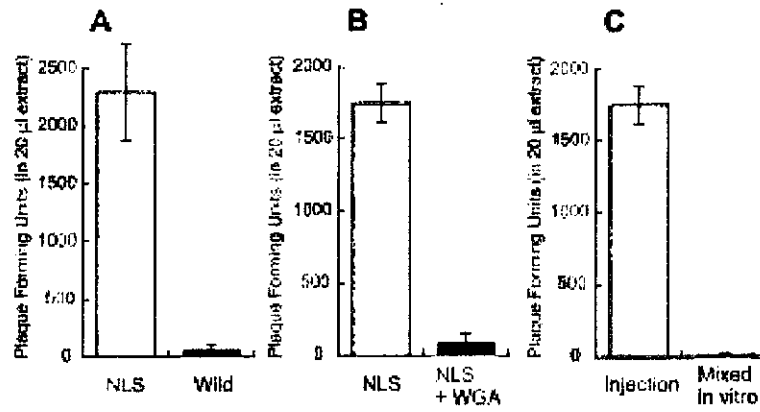


Fig.25 核に移した DNA 内封粒子の定量

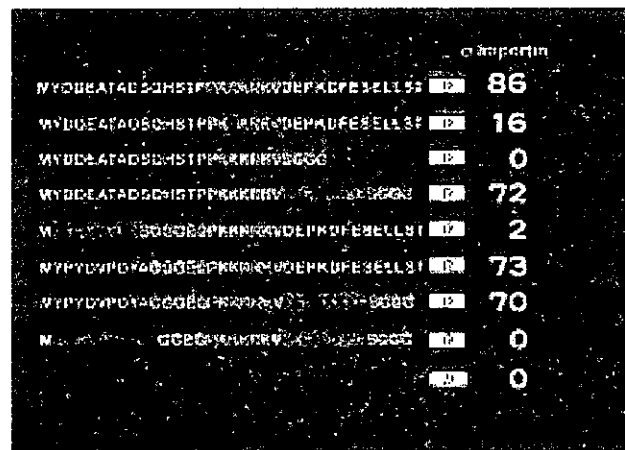


Fig.26 Importin alpha との結合解析



Fig.27 核移行活性の解析

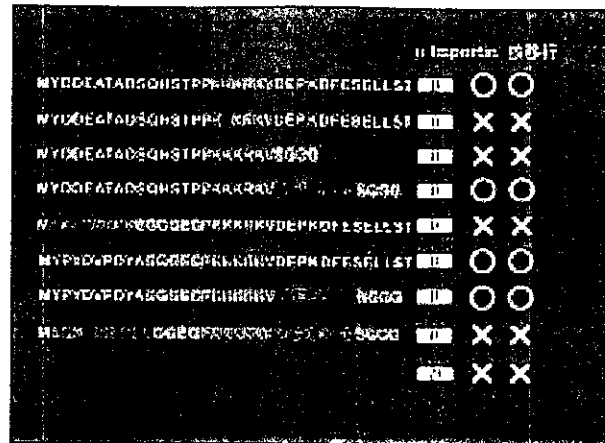


Fig.28 変異核移行シグナルを呈示したファージの活性 (まとめ)

**Effect of Excess TRF1
on *de novo* Telomere Formation**

Cell	Ex TRF1	Tel. Repeat (kb)	TRF1 ($\times 10^3$ mol./cell)	Freq. Of TS (%)
Primary Human Fibroblast	-	2.0	8	22
	hTRF1	2.0	235	24
Immortal Cell Line (Hela-LT)	-	0.5	49	36
	hTRF1	0.5	279	83

Table.11 ヒト不死化細胞と有限寿命細胞で過剰発現させた TRF1 の染色体の安定性に及ぼす影響

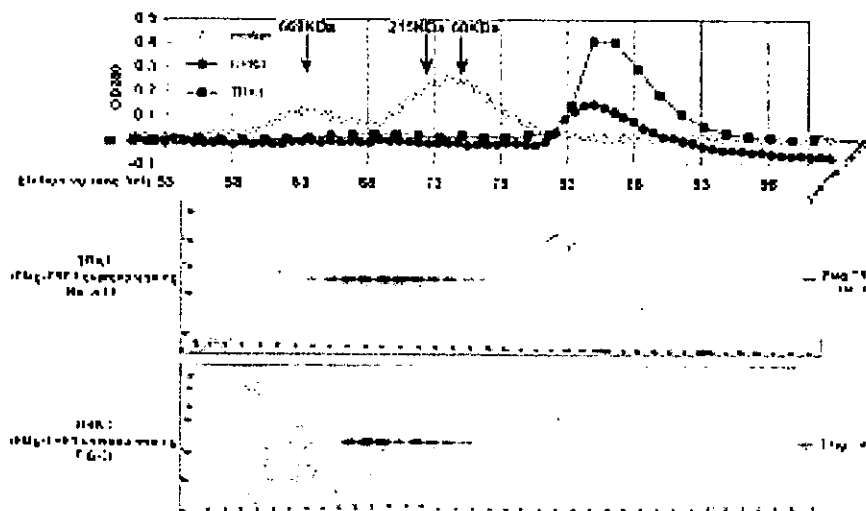
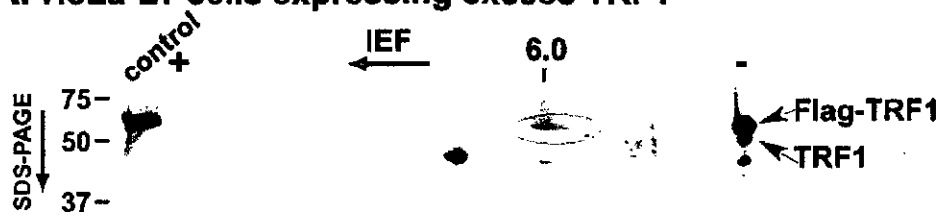


Fig.29 ヒト不死化細胞と有限寿命細胞で過剰発現させた TRF1 複合体の分子量の決定

A. HeLa-LT cells expressing excess TRF1

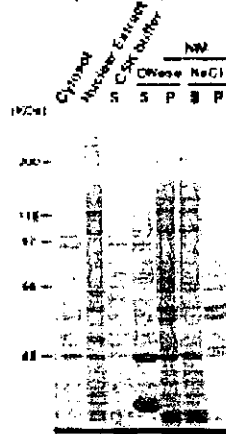


B. TIG-3 cells expressing excess TRF1

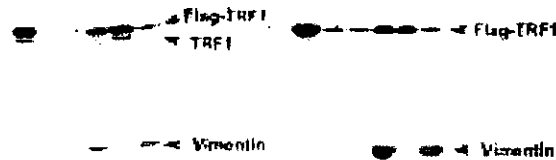
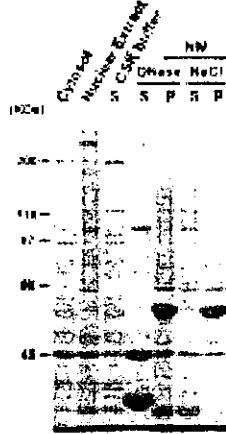


Fig.30 TRF1 の等電点の解析

A. HeLa-LT cells overexpressing TRF1



B. TIG-3 cells overexpressing TRF1



C.

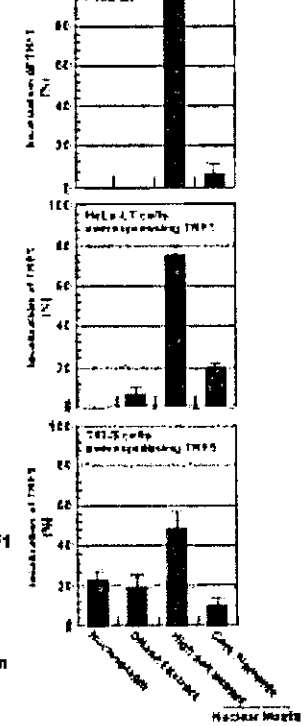


Fig.31 各種細胞分画における TRF1 の定量

分担研究報告書

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年度並びに13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、 α_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、 α_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を認めた。さらに AdRGD を用い、DC への抗原遺伝子導入による癌ワクチン療法、腫瘍細胞への腫瘍壊死因子（TNF- α ）やケモカイン（ILC）遺伝子導入による抗腫瘍免疫療法においてその最適化を行い、AdRGD の有用性を明らかにした。本年度は、Ad を用いた遺伝子治療の最適化を目指し、Ad の表面蛋白質を水溶性高分子で化学修飾することにより、これまで遺伝子導入が困難であった条件下、並びに細胞・組織に対して適応可能なベクターの開発を試みた。まずアデノウイルスに対する抗体存在下でも遺伝子導入が可能で、且つ Ad の血中滞留性を向上させ、標的細胞に遺伝子導入可能な Ad の作製を目指し、水溶性高分子による Ad の化学修飾を試みた。その結果、ポリエチレングリコール（PEG）を用いて Ad を化学修飾することにより、PEG 修飾 Ad の血中滞留性が向上し、さらには CAR を介した非特異的遺伝子導入が回避出来ることを明らかにした。その上で PEG の片末端に RGD ペプチドを付与した RGD-PEG を用いることにより、抗アデノウイルス抗体存在下でも、AdRGD を上回る高い遺伝子発現が得られるベクターの開発に成功した。また、アデノウイルスファイバーの HI loop 領域とその両端の β -strand を含む領域中にランダムなペプチド配列（NNS \times 7）を導入したフェージライブラリを構築した。今回、Ad のミサイル分子を検索するシステムを構築するため、モデル標的分子として Epidermal Growth Factor（EGF）レセプター（EGFR）を選択し、EGFR に対して親和性を有する変異型 HI strand の検出を試みた。その結果、EGFR に対してパンニングを合計3回行ったところ、第一回目と比べて、第三回目ではフェージの回収率がおよそ100倍にまで上昇した。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究が開始されてから約13年が経過し、すでに3500人以上の患者に対する治療が行われている。このうちの7割が癌患者を対象としたものである。日本においても、1995年に、アデノシンデアミナーゼ欠損症患者に初めての遺伝子治療が開始され、以来、腎細胞癌への GM-CSF を用いた治療、p53 癌抑制遺伝子を用いた肺癌に対する治療、食道がんに対する TK 遺伝子治療と臨床研究が実施されるようになった。このように癌に対する遺伝子治療臨床研究が盛んに行われることになった背景の一つに遺伝子導入技術の発展が挙げられる。現在用いられている遺伝子導入ベクターは、大きく非ウイルスベクターとウイルスベクターに分類される。臨床で用

いられているのは、ウイルスベクターがほとんどである。それは、一般に非ウイルスベクターが、免疫原性や急性毒性が低く、安全性に優れてはいるものの、遺伝子治療の最大の目標である遺伝子導入において、その効率が低いといった課題が残されているためである。対して、ウイルスベクターは、ウイルスの毒性、免疫原性、複製の可能性などが危惧されているが、遺伝子導入効率が非常に良好であることから臨床への応用が幅広く検討されている。しかし、すべての疾患に適用できる万能なベクターを開発することは難しく、種々のベクターの持つ長所を最大限に生かし、それぞれの目的に応じたベクターの開発が望まれている。

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 の 90%以上が肝臓に集積し、標的組織以外での過剰な遺伝子発現を招くことになる。さらに多くのヒトがアデノウイルスに対する抗体を持っているという事実から、中和抗体により Ad による作用が減弱してしまう。従って、この様な問題点を克服し、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、標的指向性および感染域の改変、並びに中和抗体存在下でも遺伝子導入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。昨年度までに、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、 α_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 α_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- α) やケモカイン (IL-11 receptor α -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。さらに、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- α 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行ってきた。そこで、本年度は Ad のさらなる改善を目指し、Ad に対する抗体存在下でも遺伝子導入が可能で、且つ Ad の血中滞留性を向上させ肝臓への集積を低下させることにより、標的組織にターゲティングするためのベクター開発を試みた。また標的指向性を有する Ad を作製するにあたり、そのミサイル分子を検索するためのシステムを確立すべく、ランダムなペプチド配列を含むファイバー蛋白の一部を提示したファージライブラリを作製すると共に、そのスクリーニング法の確立を試みた。

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 loop 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 pHCMV5 あるいは pHCMV6 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

一の CVL (crude virus lysate) を得た。今回作製した Ad は、ルシフェラーゼを発現する Ad-Lu および AdRGD-Lu 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°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°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 °C にて 1mM MgCl₂ および 10% グリセリンを含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4) で透析した。透析終了後、ウイルス液は -80 °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 1.1×10^{12} particles / OD₂₆₀ より換算した。

(4) ルシフェラーゼ活性測定による遺伝子発現効率

48 穴プレートに A549 細胞および B16BL6 細胞を $1 \sim 2 \times 10^4$ 細胞 / 0.5 ml / well で播種し、24 時間培養した。各細胞の培地で調整した各ベクターをそれぞれ 300、1000、3000、10000 particles/cell/0.5 ml で加え、37 °C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養した。また、ルシフェラーゼ活性の測定は、Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega 社製) 100 μl で細胞を溶解させた後、Luciferase Assay System (Promega 社製) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9501、Berthold あるいは Microlumet Plus LB96、Perkin Elmer) で測定した。活性は、Luciferase activity RLU (relative light unit) /well として表した。

(5) インテグリン指向性ペプチド (RGD) を付与したポリエチレングリコール (PEG) の合成
インテグリン指向性 RGD 配列 (YGGRGDTP) を PEG 片末端に 2 分子付与した RGD-PEG-NHS は、Scheme 1 に従って合成した。まず RGD 配列を含む (Ac-YGGRGDTP β A)₂K-PEG-β AC-amide の合成を行うために、Fmoc (Fmoc=9-fluorenyl-methyloxycarbonyl)-K(Fmoc)-PEG-β AC(Trt)-Amide Resin を固相法にて合成した。固相上で

Fmoc 保護基の除去 (脱保護) すなわちアミノ基の遊離 → DMF 洗浄 → Fmoc-アミノ酸誘導体と各ステップに適切な縮合反応試薬による HOBT の活性エステルによる遊離アミノ基との反応 (カップリング) → DMF 洗浄、の操作を繰り返して縮合反応を進めた。同様にピペリジンによる Fmoc 基の除去 (脱保護) と Fmoc-β Ala-OH と縮合を行い、その後脱保護を行って H-β Ala-Cys(Trt)-Amide Resin を得た (Scheme 1-②)。次に、Fmoc-PEG-NHS (MW 3,400、Shearwater corporation) を反応させ、ピペリジンによる脱保護後、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を反応させ、Fmoc-Lys(Fmoc)-PEG-β Ala-Cys(Trt)-Amide Resin を得た (Scheme 1-④)。さらに Fmoc-Lys(Fmoc)-PEG-β Ala-Cys(Trt)-Amide Resin を、ペプチド合成機 (機種名: ABI433A、合成プログラム: FastMoc0.25 Ω MonPrevPk) を用いて、Fmoc-β Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(Bu^t)-OH、Fmoc-Asp(OBu^t)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Tyr(Bu^t)-OH を順次使用し、脱保護と縮合を繰り返して (Fmoc-Y(Bu^t)GGR(Pmc)GD(OBu^t)T(Bu^t)Pβ A)₂K-PEG-β AC(Trt)-Amide Resin を合成した (Scheme 1-⑤)。脱保護後の DIEA 存在下無水酢酸との反応により、遊離のアミノ基をアセチル化し、Resin から単離し、HPLC にて精製を行い Scheme 1-⑥ に示す化合物を得た。さらに EMCS と反応させ RGD-PEG-NHS を得た。

(6) PEG および RGD-PEG 修飾 Ad の作製

Ad の PEG および RGD-PEG 修飾は、methoxy-polyethylene glycol 2-N-Hydroxysuccinimide (mPEG2-NHS ester、MW 40,000、Shearwater corporation)、methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、MW 5,000 および 2,000、Shearwater corporation) および上記方法にて作製した RGD-PEG-NHS を用いて行った。1 粒子の Ad の外殻蛋白質 (ヘキソン、ペントンベース、ファイバー) に存在する一級アミンに対して、25~6400 倍モル量の各種 PEG および RGD-PEG-NHS を 1×10^{12} particles/ml の Ad-Lu に添加し、300rpm で攪拌しながら 37°C で 45 分間反応させることにより行った。

(7) PEG および RGD-PEG 修飾 Ad のヘキソン修飾率の算出

各種 PEG および RGD-PEG 修飾 Ad と、2 倍濃度の SDS protein gel loading solution を等量混合し、終濃度 5% となるように

2-Mercaptoethanol を添加し、95℃で 5 分間処理した。各試料を 2%~15%、もしくは 4%~20% ポリアクリルアミドゲルを用い、200V の定電圧で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE : 25mM Tris, 192mM Glycine, 10% SDS) を行った。泳動後、蛋白質はクーマシブルーを用いて、PEG は 0.1M ヨウ素溶液を用いて染色した。

PEG および RGD-PEG 修飾 Ad のヘキソン修飾率は、SDS-PAGE を行ったゲルをクーマシブルー染色した後、ヘキソンおよび PEG 修飾ヘキシンのバンドを NIHImage を用いて画像解析することにより算出した。

(8) 密度勾配遠心法による PEG 修飾 Ad と未修飾 Ad の分離

PEG 修飾 Ad と未修飾 Ad の CsCl 密度勾配遠心法による分離は、Vti 65.2 チューブ (Beckman) に CsCl (比重 1.34 / TD) を注ぎ、未修飾 Ad のみ、PEG 修飾 Ad および両者をその遺伝子発現効率が等しくなる割合 (unmodified-Ad : PEG-Ad = 1 : 30, virus particle) でウイルス粒子を混合後重層し、Vti 65.2 rotor (Beckman) を用いて 18℃、40.8krpm、18 時間遠心した。Vti 65.2 チューブの下方より 30 μ l ずつフラクションを回収し、Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 10K MWCO (PIERCE) を用い、4℃にて 10%のグリセリンを含む PBS (-) で透析した。

(9) PEG 修飾 Ad の精製

SW41 チューブに CsCl (比重 1.33 / TD) を注ぎ PEG 修飾 Ad を重層し SW41 rotor (Beckman) を用いて 18℃、35krpm、18 時間遠心した。チューブ内にできた白いバンドを透析チューブに回収し、4℃にて 10%のグリセリンを含む PBS (-) で透析した。透析を終了したウイルス液は -80℃で保存した。以上の操作は無菌的に行った。

(10) Ad の粒子径測定

Ad の粒子径は、ZETASIZER 3000HS (Malvern instruments, Malvern, UK) を用いて測定した。

(11) Ad の体内動態

BALB/c マウス雌、6 週齢に PEG 修飾 Ad を 1.5x10¹⁰ particles/100 μ l で尾静脈内投与し、経時的に眼底より採血した。得られた血液より QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit を用いて DNA を回収した。回収した DNA は、パイオドット SF を用いて Hybond-N+ にスロットプロットし、AlkPhos Direct Labelling Module を用いて標

識したプローブ (ルシフェラーゼ遺伝子の全長を含む) により 55℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ECF Detection Module を用いて蛍光により血液中に存在する Ad の DNA を検出した。なお蛍光 FluorImager 595 を用いて測定し、ScanCont、ImageQuont により解析した。また、各サンプルごとに検量線を作製し、血中 Ad 量を算出した。

(12) マウス抗アデノウイルス血清の作製

ICR マウス雌、6 週齢に、1x10¹⁰ particles の Ad をフロイントのコンプリートアジュバンドとともに皮下に投与した。2 週間、4 週間後に 1x10¹⁰ particles の Ad をフロイントのインコンプリートアジュバンドとともに皮下に投与した。1 週間後、マウスの全血液を回収し、血清を回収した。

(13) HI loop および HI strand 発現ファージミドベクターの作製

ファージライブラリの構築には、Amersham pharmacia biotech 社製のリコンビナント抗体発現システムを用い、ファージミドベクターとして融合蛋白質発現カセットが Lac プロモーター支配下にある pCANTAB5e (Amersham pharmacia biotech, Inc.) を用いた。HI loop のクローニングには、あらかじめ 5' 末端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチドとして 5' -GGCCCAGCCGGCCATGGCCTGCCTAAACGGTACACAG GAAACAGGAGAC-3' と 5' -GCGGCCGCGGATCCACCACC ACCACAGTCCCATGAAAATGACATAGAGTATGCACTTGG-3' を用い、HI strand のクローニングには 5' -GGCCCAGCCGGCCATGGCCTGCAAACCTGTAACACTAACATTACACTAAACGG-3' と 5' -GCGGCCGCGGATCCACCACCACCACAAATGTAGTTGTGGCCAGACCAGTCCC-3' を用いた。それぞれのオリゴヌクレオチドを 94℃で 1 分、60℃で 15 分、16℃で 30 分反応させることによりアニーリングし、この DNA 断片を予め SfiI および NotI 処理した pCANTAB5e に T4 DNA ligase (Roche Diagnostics 株式会社) を用いて組み込み、それぞれのファージミドベクターを pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand とした。

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

3 種類のプライマーを用い、2 段回の PCR によって、全てのアミノ酸をコードし得るランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS (N ; A, T, G, C, S ; G, C) \times 7 配列を導入した HI loop および HI strand 発現カセットをファージミドベクターに組み込んだ。まず、センスプライ

マーとして 5'-CCCATGAAAATGACATAGAGTATGCAC TTGGACA (SNN)₇GCAAGTTGTGTCTCCTGTTTCTGTGTA CCG-3') および、アンチセンスプライマーとして 5'-CGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG-3' を用い、pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand に対して、アニーリング: 57°C、60 秒、伸長: 68°C、60 秒、サイクル数: 35 回で Taq polymerase (Sigma-Aldrich, Inc.) を用いて 1st PCR を行った。PCR purification kit (Qiagen companies) および GeneElute™ Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich, Inc.) でそれぞれの PCR 産物を精製した。更にアンチセンスプライマーとしてこの精製したそれぞれの遺伝子断片を、センスプライマーとして 5'-TGCGGCACGCGTTCCAGCGGATC- 3' を用い、pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand に対して、先と同条件で 2nd PCR を行い、1 回目の PCR 産物の増幅および伸長を行った。2 回目の PCR 産物 (HI loop-NNS: 240 bp, HI strand-NNS: 285 bp) を PCR purification kit および GeneElute™ Agarose Spin Columns を用いて精製した。これによって、NNS×7 配列を導入した HI loop 断片および HI strand 断片を作製した。その後、HindIII および MroI で処理し、予め同様の酵素で処理したファージミドベクター pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand と T4 DNA ligase (Roche Diagnostics 株式会社) を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製し、以降大腸菌への形質転換に用いた。

(15) HI loop および HI strand 発現ファージの精製

pCANTAB-HI loop および pCANTAB-HI strand をそれぞれ形質転換した大腸菌 TG1 (STRATAGENE®) を 100 µg/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2% グルコース含有 2YT 培地 (INVITROGEN®) で OD₆₀₀=0.3 まで培養し、M13K07 ヘルパーファージ (INVITROGEN®) を添加した。110rpm 30 分、250rpm 30 分培養した後、1,000g で遠心し、大腸菌ペレットに 100 µg/ml アンピシリン、50µg/ml カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加し、一晚振とう培養することでファージの産生を行った。一晚培養してファージ産生させた大腸菌 TG1 を 1,000×g、10 分遠心して培養上清を回収した。更に 20,000×g、15 分遠心し回収し、20% PEG 8000/2.5M NaCl (和光純薬株式会

社) を 1.5 倍量加え、氷上で 1 時間冷却した。20,000×g、15 分間遠心して沈殿したファージ粒子を NTE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA) に懸濁した。得られたファージ懸濁液を孔径 200nm のメンブランフィルター (Millipore®) を用いて濾過し、ファージ溶液とした。

(16) ファージ粒子数の測定

2% グルコース含有 2YT 培地 (2YTG 培地) で OD₆₀₀=0.3 まで培養した大腸菌 TG1 株に対して段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C で 1 時間培養した。培養液の一部に 100 µg/ml アンピシリン含有 2YTG 培地を添加し、clondisk (clontech Laboratories, Inc.) に播種し、一晚静置培養した。各希釈段階でのコロニー数を計数することで、ファージ粒子数 (CFU; colony forming unit) を算出した。

(17) ファージ ELISA による発現の確認

96 穴 Immuno Plate (Nunc™) を、Carbonate-Bicarbonate Buffer (Sigma-Aldrich, Inc.) で 10 µg/ml に希釈した抗 E-Tag モノクローナル抗体 (Amersham pharmacia biotech, Inc.) で固相化した。2% Block Ace (大日本製薬株式会社) を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングを行い、サンプルとしてあらかじめブロッキングしておいた精製ファージ溶液を加えた。洗浄操作を 3 回行った後、0.2% Block Ace で 1/5000 に希釈した抗 HRP/M13 モノクローナル抗体 (Amersham pharmacia biotech, Inc.) を添加した。室温で 2 時間放置し、洗浄操作を 3 回行った後、基質溶液 (3,3', 5,5' - tetramethyl-benzidine; TMBZ, ナカライテスク株式会社) を加えて発色させ、2N 硫酸を加えることで反応停止を行った。吸光度 (測定波長 450nm, 対照波長 655nm) をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad Laboratories, Inc) で測定した。

C. 研究結果

1. PEG 修飾 Ad の作製とその特性評価

一般的に水溶性高分子を用いた生理活性蛋白質のバイオコンジュゲーションは、分子量増大による腎排泄速度の低下や、立体障害的にプロテアーゼ並びに中和抗体からの攻撃がブロックされることで、結果として生体内半減期が延長される。また、修飾高分子が形成する立体障害によるレセプターとの結合阻害による、著しい比活性の低下を同時に招く。このような特徴が、粒子である Ad にも当ては

まることを期待し、バイオコンジュゲート化 Ad を作製し、その機能性評価を行った。今回水溶性高分子によるバイオコンジュゲート化 Ad の作製には、安全性の高い非電荷水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を用いた。まず、分子量 5,000 の PEG を用いて PEG 修飾 Ad を作製し、その修飾度合いを SDS-PAGE にて解析した。Fig. 1 に、クーマシブルー染色および PEG に対する染色結果を示す。PEG 修飾 Ad では、ヘキソンのバンドが、PEG の添加に伴って消失すると共に、新たに高分子側にシフトしたバンドが検出された。また高分子側にシフトしたバンドが PEG 染色された事から、このバンドが PEG で修飾されたヘキソンであることが確認された。さらに添加 PEG 量の増加に伴い PEG 修飾ヘキソンのバンドが濃くなっていることから、添加 PEG 量依存的に修飾率が增大することが示された。ちなみに、Ad の外殻蛋白質のリジン残基に対し、6400 倍モル量の PEG を添加した場合、PEG 修飾ヘキソンが濃く染色されており、未修飾のヘキソンのバンドが全く検出されなかったことから、本条件では全てのヘキソンが PEG 修飾されていることが確認された (Fig. 1)。そこでクーマシブルー染色により得られた未修飾のヘキソンのバンドと高分子側にシフトした PEG 修飾ヘキソンのバンドを画像解析することにより、ヘキソンの修飾率を算定し、この値を Ad の PEG 修飾率とした (Table 1)。また、PEG 修飾 Ad の粒子径もヘキソン修飾率と同様に添加 PEG 量依存的に増大した (Table 1)。以上の結果から、Ad の PEG 修飾は添加 PEG 量により制御可能であることが示された。

Fig. 1 の結果から PEG の添加量に応じてヘキソンが PEG 修飾されることが判明したが、100%のヘキソンが PEG 修飾されている Ad 以外では、粒子レベルで見た場合、未修飾の Ad が混入している可能性がある。そこで、まず分子量 40,000 の PEG を用いて Ad の PEG 修飾操作を行い、修飾率が 5.3%の PEG 修飾 Ad を得た。この 5.3%PEG 修飾 Ad の中に、全く PEG 修飾されていない Ad が存在するか否かを明らかにするため、未修飾 Ad と 5.3%PEG 修飾 Ad をそれぞれ単独、および両者を混合して CsCl の密度勾配遠心を行った。その結果、5.3%PEG 修飾 Ad のバンドは、未修飾 Ad のそれに比べて上層に確認され、両者を混合して遠心した場合にも二本のバンドが確認され、両者が分離できることを確認した (Fig. 2)。さらに、この遠心チュ

ープの下方からフラクションを回収し、*in vitro* での遺伝子発現効率を指標に各フラクションに存在する Ad を確認した (Fig. 3)。その結果、5.3%PEG 修飾 Ad では、未修飾 Ad が存在するフラクションに遺伝子発現が確認されなかったことから、平均 5.3%以上のヘキソンが PEG 修飾されている Ad には、未修飾の Ad が混入していない、つまり全ての Ad が PEG 修飾されていることが確認された。そこで、5.3%以上のヘキソンが PEG 修飾されている Ad を用い、種々の特性を評価した。

一般に、蛋白質を PEG 修飾した場合、血中滞留性が向上する。この PEG 修飾の利点が、Ad の PEG 修飾にも当てはまるかどうかを検討した。BALB/c マウスに 5×10^{10} particles の PEG 修飾 Ad を尾静脈より投与し、一定時間後に血液を採取し、血液中に存在する Ad の DNA 量をサザンブロット法により定量することで、PEG 修飾 Ad の血中滞留性を評価した。PEG 修飾していない Ad は、血中から速やかに消失し、その血中半減期は 1.55 分であった (Fig. 4, Table 2)。それに対して 61.1%、89.3%、100%PEG 修飾 Ad の血中半減期は、それぞれ修飾していない Ad と比較して約 3 倍、7 倍、50 倍に増加しており、顕著な血中滞留性の向上が認められた。

次に、PEG 修飾 Ad に抗体回避能が付与されているかどうか検討するために、抗アデノウイルス抗体を含むマウス血清存在下、非存在下における PEG 修飾 Ad の遺伝子発現を検討した。抗血清が存在しない時の遺伝子発現を 100%とし、抗血清存在下における遺伝子発現量の低下率を Fig. 5 に示す。修飾されていない Ad の遺伝子発現は、抗血清の増加に伴いコントロールの 1%以下まで低下したのに対して、61.1%PEG 修飾 Ad では、抗血清存在下においても高い遺伝子発現が保持されており、その抗体回避能は、修飾されていない Ad の約 30 倍であった。

Fig. 6 は、PEG 修飾 Ad の遺伝子発現効率を示す。一般に蛋白質を水溶性高分子で修飾した場合、活性発現部位に対する修飾や PEG 鎖の立体障害などにより比活性が低下するが、Ad の場合もその遺伝子発現効率は、PEG 修飾率の増大にともなって低下した。この遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害のためアデノウイルスのレセプターである CAR との結合が阻害されることにより、細胞内へ侵入するウイルス量が減少したためであると予想される

が、この PEG 修飾 Ad が細胞内へ入れば遺伝子発現することを確認しておく必要がある。そこで PEG 修飾 Ad を細胞内導入試薬である LIPOFECTAMINE 2000 を用いて細胞内に強制的に導入し、その遺伝子発現を検討した (Fig. 7)。その結果、LIPOFECTAMINE 2000 を作用させない群では、PEG 修飾率の増大に依存して著しい遺伝子発現効率の低下が見られたのに対し、LIPOFECTAMINE 2000 を用いて PEG 修飾 Ad を細胞内に導入した群では、PEG 修飾していない群とほぼ同等の遺伝子発現が認められた。以上の結果から PEG 修飾 Ad の遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害のため CAR との結合が阻害されたためであり、CAR を介した非特異的な遺伝子発現を完全に抑制することができ、その上で PEG 修飾 Ad を標的の細胞内に導入さえすれば、標的細胞でのみ未修飾 Ad に匹敵する高い遺伝子発現が得られると考えられる。即ち PEG 修飾 Ad の PEG 片末端に標的指向性分子を付与することができれば、PEG 鎖の利点を保持したまま標的細胞に接着し、それに続く遺伝子導入・発現が達成できると考えられる。そこで標的指向性分子としてインテグリンに親和性のある RGD モチーフを選択し、PEG の片末端に付与した RGD-PEG-NHS を合成し、その有用性を評価した。

2. RGD-PEG 修飾 Ad の作製とその有用性評価

RGD-PEG 修飾 Ad の遺伝子発現効率を CAR 高発現細胞である A549 細胞と CAR 低発現細胞である B16BL6 細胞で評価した。RGD-PEG 修飾 Ad は A549 細胞に対して PEG 修飾 Ad より顕著に高い遺伝子発現を示し、未修飾 Ad と同等の遺伝子発現を示した (Fig. 8)。また、B16BL6 細胞に対して RGD-PEG 修飾 Ad は、未修飾 Ad より 100 倍以上高い遺伝子発現を示し、その発現は AdRGD と同等であった。このことから、PEG 修飾 Ad の PEG 片末端に標的指向性分子を付与することで標的細胞に接着し、高い遺伝子導入・発現が達成されることが示された。

次に抗アデノウイルス抗体存在下における RGD-PEG 修飾 Ad の遺伝子発現効率を検討した。RGD-PEG 修飾 Ad を抗アデノウイルス抗体存在下で B16BL6 細胞に感染させ、24 時間後の遺伝子発現量を測定した (Fig. 9)。その結果、これまで最も高い遺伝子導入効率を示した 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 Ad

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。以上の結果から、RGD-PEG 修飾 Ad は、AdRGD のような高い遺伝子導入・発現能を備え、さらに PEG 修飾 Ad が持つ抗体回避能をも有していることが示された。

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

Ad のファイバー領域に特定の受容体に親和性を有するリガンドを導入し、感染域を制御しようとした場合に、標的も既知のものに限られる事や、リガンドを導入する事でファイバーの高次構造が変化し、標的分子との親和性が低下したり、アデノウイルスが産制されにくくなる事などが問題となっている。そこで、本研究では、ランダムなペプチド配列を含むファイバー蛋白質の一部を提示したファージライブラリを作製し、この問題点を克服した迅速な Ad における標的指向性分子のスクリーニング法の確立を試みた。

まず、アデノウイルスファイバーでペプチドの導入や改変を行うに当たり、ウイルス産生などに影響が少ないと考えられる HI loop 領域とその両端の β -strand を含む領域 (以下 HI strand と略す) をファージミドベクター (pCANTAB5e) にクローニングし、ファージ外殻蛋白質上へ提示可能であるかどうかを ELISA 法にて検討した。pCANTAB5e はファージ外殻蛋白質をコードする配列の上流にマルチクローニングサイト (SfiI および NotI) および、ペプチド Tag 配列 (E-Tag) が導入されている。今回 HI loop および HI strand の導入にはこれらの制限酵素サイトを利用し、更に融合蛋白質の検出には抗 E-Tag モノクローナル抗体と抗ファージ抗体を用いて行った。その結果、HI loop および HI strand 共にファージ粒子数に比例して OD450nm の吸光度が増大したことから、ファージ表面上にこれらの分子が提示されていることが示された (Fig. 10)。更に、PCR を用いて HI loop、HI strand 領域中にランダムなペプチド配列 (NNS \times 7) を導入したファージライブラリを構築しシークエンスを解析することによって NNS 配列が導入されていることを確認した (Table 3)。また、シークエンス解析の結果、任意にピックアップした 10 クローンの内、同じ配列を含むクローンは見られなかった。そこで次に、このようにして作製したファージライブラリを用いて、Epidermal

Growth Factor (EGF) レセプター (EGFR) に対して親和性を有するペプチド含有 HI strand の単離を試みた。EGFR は、種々の上皮がん細胞上において発現の上昇が見られ、かつエンドサイトーシス介在性レセプターである為、標的指向性 Ad を用いたがん治療において選択的なターゲットとして最適であると考えられる。

EGFR に対して親和性を有する変異型 HI strand をスクリーニングするため、EGFR を固相化した 96 穴プレートを用いてパンニングを行った。パンニングを合計 3 回行った結果、第 1 回目と比べて、第 3 回目ではファージの回収率がおよそ 100 倍にまで上昇した (Fig. 11)。これらの結果から、ランダムペプチドとアデノウイルスのファイバー領域の融合蛋白質を提示したファージライブラリを用いることで、特定標的受容体に対してスクリーニングを行うことが可能であることが示唆された。現在、今回スクリーニングによって濃縮したファージライブラリの中から、高和性のクローンの同定、および DNA 配列解析を行っている。

D. 考察

1. 高分子ハイブリッド化 Ad の作製とその評価

Ad 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・発現効率を示すのが、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、Ad 表面を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 Ad の作製に成功し、作製された PEG 修飾 Ad に未修飾 Ad 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 Ad は未修飾 Ad 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、Ad 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 Ad 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 Ad の抗体回避能力は向上し、ヘキソン修飾率 61.1% の PEG 修飾 Ad は未修飾 Ad 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 Ad 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 Ad に標的指向性を付与することができれば、Ad 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 Ad 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 Ad 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 Ad を作製し、その機能性評価を行った。その結果、RGD-PEG 修飾 Ad は CAR 低発現細胞に対して、従来型 Ad 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 Ad 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 Ad 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 Ad 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 Ad 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 Ad 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。

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

近年、Ad 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、この流れは水口らによって開発された簡便なファイバーミューAd 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 Ad 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ぬ。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 β -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 Ad 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 が提示可能であることをファージ 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 Ad 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、近年 CAR との結合に重要な役割を果たしているファイバー領域が同定され、この部位に変異を導入する事で CAR を介した遺伝子導入をも抑制する事が可能である事が報告された。したがって、ファイバー上の CAR 結合部位およびペプトンベース上の RGD モチーフの両部位に変異を導入し、かつ標的指向性ペプチドを導入する事で、より選択的な遺伝子導入を成し得る、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。

E. 結論

1. Ad 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、また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。
2. RGD モチーフを付与した PEG を用いて作製した RGD-PEG 修飾 Ad は、AdRGD 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、AdRGD を上回る遺伝子発現能を有することを明らかにした。
3. アデノウイルスファイバーの HI loop 領域とその両端の β -strand を含む領域中にランダムなペプチド配列 (NNS \times 7) を導入したファージライブラリを構築した。
4. モデル標的分子として Epidermal Growth Factor (EGF) レセプター (EGFR) を用い、Ad のミサイル分子を検索するためのスクリーニングシステムを構築した。

D. 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 alfa-Gene Therapy for an Established Murine Melanoma Using RGD (Arg-Gly-Asp) Fiber-mutant Adenovirus Vectors., Jpn. J. Cncer Res., 93, 436-444 (2002)
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. Risako NAKANO, Tetsuhiko NAKAGAWA, Kazuhumi KATAYAMA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Yasuo TSUTSUMI, Shinsaku NAKAGAWA, and Tadanori MAYUMI : A novel T7 system with mRNA coding T7 RNA polymerase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301, 974-978 (2003)
 4. Kazufumi KATAYAMA, Koichiro WADA, Atsushi NAKAJIMA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Takashi KADOWAKI, Ryozo NAGAI, Yoshinori KAMISAKI, Richard S. BLUMBERG, Tadanori MAYUMI : A novel PPAR γ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model., *Gastroenterology*, In press.
- 学会発表
1. Shinsaku Nakagawa, Takashi Masuda, Tadanori Mayumi: Direct introduction of nanospheres into living cells using fusogenic liposome., *International Conference Particles 2002.*, Orlando, April, 2002.
 2. 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 : 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Application of DDS for gene therapy., *Controlled Release Society 29th Annual Meeting*, Seoul, July, 2002.
 6. 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, July, 2002.
 7. 岡田直貴、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 : gp100 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.
 8. 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.
 9. Shinsaku Nakagawa : DDS technology required to control intracellular pharmacokinetics for gene therapy., *Molecular Biopharmaceutics.*, Hawaii, January, 2003.
 10. Gao Jian-Qing, Yasuhiro Tsuda, Yssuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa : Anti-tumor effect of the CC chemokine, ILC using recombinant adenovirus vector., Hawaii, January, 2003.
 11. 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 γ -gene therapy of inflammatory bowel disease (IBD)., 第76回日本薬理学会, 福岡, 2003年3月
 12. 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、