

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水 口 裕 之

平成17 (2005) 年 4月

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水 口 裕 之

平成17（2005）年4月

目 次

I. 総括研究報告

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究-----	1
主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 副プロジェクト長 水口裕之	

II. 分担研究報告

1. 分担研究者 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作-----	117
---------------------------------	-----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	147
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

主任研究者 水口 裕之

国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所

基盤研究第三プロジェクトチーム 副プロジェクト長

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

本研究は、安全性が高く、機能面で優れたわが国独自の次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。そのため、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いとされるアデノウイルス(Ad)ベクターの長所(高効率、高タイトターのベクターの調製が可能など)を生かしつつ、1) ウイルス表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することにより標的細胞選択性を制御し、従来遺伝子導入が困難であった細胞・組織への適用も可能なAdベクターの開発、及び標的細胞指向性をもったAdベクターの開発、さらに上記ベクターに目的遺伝子の発現制御能を付与したAdベクターの開発、2) Adベクターの血中滞留性の向上、抗体回避能の付与並びに、標的細胞指向性の制御を目的に水溶性高分子(PEG; ポリエチレングリコール)によるバイオコンジュゲート化Adベクターの開発、3) 遺伝子発現抑制型(siRNA発現)Adベクターの開発、4) 標的細胞指向性の変更などを目的として、従来の5型Adとは異なった血清型に属する35型Adを基盤とした全く新規なベクターの開発、および5) これらを統合したAdベクターの開発を行い、遺伝子治療の対象疾病や標的細胞に適した遺伝子導入・発現技術の開発を行う。これらの基盤技術は、治療用遺伝子を発現させることによる遺伝子治療のみならず、RNA干渉(RNAi)により標的遺伝子の発現を特異的に減弱させることによる新たな遺伝子治療法の開発にもつながり、極めて重要である。本年度は各課題について以下の結果を得た。

1. 標的細胞指向性を有したAdベクターの開発 ; 研究代表者が開発したファイバー改変Adベクターを用いて、従来遺伝子導入が困難であった間葉系幹細胞やES細胞、脂肪細胞などでの劇的な(90%以上)遺伝子導入効率の改善に成功した。サイトカインやケモカインを発現する改良型Adベクターを用いた癌遺伝子治療応用研究を進めた。標的リガンドの同定を目的に、ファイバー部分を提示したファージ表面提示法の開発に着手した。さらにファイバーの改変を最適化することで、組織移行性をさらに抑えたベクターの開発に成功した。RGDペプチド付与型ファイバーを有した発現制御型Adベクターの開発に成功した。
2. 水溶性高分子(PEG)によるバイオコンジュゲート化Adベクターの開発 ; PEGハイブリッド化Adベクターを作製し、修飾率と体内動態及び遺伝子発現の相関を検討し、その安全性・有用性評価を行った。その結果、PEGの修飾率に伴い血中滞留性が飛躍的に向上すること、PEG修飾Adが抗体回避能を有することを明らかにした。さらに、標的リガンドをPEGの末端に導入したPEGハイブリッド化Adベクターの作製方法を確立した。
3. 遺伝子発現抑制型(siRNA発現)Adベクターの開発 ; 特定の遺伝子・タンパク質の発現及び機能発現抑制状態を簡便・迅速に創出できるsiRNA発現Adベクターの開発に成功した。さらに、発現制御型Adベクターと組み合わせることにより、目的遺伝子の発現レベルを負に制御できるsiRNA発現Adベクターの開発に成功した。
4. 35型Adベクターの特性評価 ; 35型Adベクターの特性解析のためのマウスモデルとしてCD46発現トランスジェニックマウスを用い、全身投与後の35型Adベクターの遺伝子導入特性を検討した。また35型Adベクターによる造血幹細胞への遺伝子導入の最適化を行った。

分担研究者

中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科
助教授

協力研究者

川端健二 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

櫻井文教 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

岡田直貴 京都薬科大学
助手

近藤昌夫 昭和薬科大学
講師

A. 研究目的

本研究は、わが国における遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けて、安全性が高く、機能面で優れた次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。

遺伝子治療臨床研究は現在までのところ、必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクターが必要とする要件を十分備えていないことにある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けての最重要課題の一つは、従来のベクターが抱える安全面、機能面での問題点を克服した新規ベクターを開発することである。ところが、わが国におけるベクター開発は欧米に比べ著しく遅れており、今後の独自のベクター開発の成否如何では、わが国の遺伝子治療分野の進展に重大な影響を及ぼす可能性がある。

既存のベクターの中ではアデノウイルス(Ad)ベクターが遺伝子導入効率において最も優れているとされている。しかし、①作製法の煩雑さ、②搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、③標的細胞指向性の制限、④抗原性などが解決すべき重要課題として残されている。申請者らはこれらの問題を克服した独自の次世代ベクターの

開発を目指した先駆的な取り組みを開始しているが、その一層の研究推進が必要である。

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

本年度は、1) 標的細胞指向性を有したAdベクターの開発研究として、研究代表者が開発したファイバー改変Adベクターを用いて、従来遺伝子導入が困難であった間葉系幹細胞やES細胞、脂肪細胞などでの劇的な(90%以上)遺伝子導入効率の改善に成功した。サイトカインやケモカインを発現する改良型Adベクターを用いた癌遺伝子治療応用研究を進めた。標的リガンドの同定を目的に、ファイバー部分を提示したファージ表面提示法の開発に着手した。さらにファイバーの改変を最適化することで、組織移行性をさらに抑えたベクターの開発に成功した。RGDペプチド付与型ファイバーを有した発現制御型Adベクターの開発に成功した。2) 水溶性高分子(PEG)によるバイオコンジュゲート化Adベクターの開発研究として、PEGハイブリッド化Adベクターを作製し、修飾率と体内動態及び遺伝子発現の相関を検討し、その安全性・有用性評価を行った。その結果、PEGの修飾率に伴い血中滞留性が飛躍的に向上すること、PEG修飾Adが抗体回避能を有することを明らかにした。さらに、標的リガンドをPEGの末端に導入したPEGハイブリッド化Adベクターの作製方法を確立した。3) 遺伝子発現抑制型(siRNA発現)Adベクターの開発研究として、特定の遺伝子・タンパク質の発現及び機能発現抑制状態を簡便・迅速に創出できるsiRNA発現Adベクターの開発に成功した。さらに、発現制御型Adベクターと組み合わせることにより、目的遺伝子の発現レベルを負に制御できるsiRNA発現Adベクターの開発に成功した。4) 35型Adベクターの特性評価研究として、35型Adベクターの

特性解析のためのマウスモデルとして CD46 発現
トランスジェニックマウスを用い、全身投与後の
35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討した。
また 35 型 Ad ベクターによる造血幹細胞への遺伝
子導入の最適化を行った。

B. 研究方法

B.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

B.1.1 間葉系幹細胞、脂肪細胞への高効率遺伝子導入

(1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターは以下のように作製した。CA プロモーター (β -actin promoter/CMV enhancer with a β -actin intron) からなる β ガラクトシターゼ (LacZ: pCMVB (Clontech) 由来) 発現シャトルプラスミド (LacZ 発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) と pAdHM15-RGD (アデノウイルスゲノムのファイバータンパク質の HI loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクタープラスミド) を I-CeuI と PI-SceI で切断し、両者の切断フラグメントを直接ライゲーションした。ライゲーション産物を SmaI 消化し (親プラスミドは SmaI 部位をもっているが、目的の組換えプラスミドは SmaI 部位を消失するため、SmaI 消化することで目的の組換えプラスミドだけが大量のコロニーを作る)、DH5 α にトランスフォーメーションした。独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。制限酵素解析を行い、LacZ 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CALacZ を得た。次に、pAdHM15-RGD-CALacZ をウイルスゲノム末端に存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、SuperFect (Qiagen より入手) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、RGD 配列をファイバーに有した LacZ 発現 Ad ベクター AdRGD-CALacZ を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4、pAdHM41-K7 (Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン (KKKKKKK) 配列を挿入したベクタープラスミド)、pAdHM34 (Ad ゲノムのファイバータンパク質を 35 型 Ad 由来にしたベクタープラスミド) を用いることで、野生型のファイバーをもった LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CALacZ、ポリリジン配列をファイバータンパク質の C 末

端領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdK7-CALacZ、35 型 Ad 由来のファイバータンパク質を有した LacZ 発現 Ad ベクター AdF35-CALacZ を作製した。同様にして、CMV プロモーター、CMV_i プロモーター (CMV promoter with intron A)、EF1 α プロモーターをもった従来型 Ad ベクター Ad-CMV_iLacZ、Ad-CMV_iLacZ、Ad-EFLacZ を作製した (Table 1)。

(2) 細胞の培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. より購入し、mesenchymal stem cell basal medium (MSCGM) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) で培養した。

マウス 3T3-L1 細胞 (clonal subline of the mouse 3T3 that accumulate large amounts of triglyceride fat when the cells are in the resting state) は Human Science Research Resources Bank (Japan) より購入し (JCRB9014)、10% fetal calf serum (FCS) を含む DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) で培養した。NIH3T3 細胞、マウス CAR を安定発現した NIH3T3 細胞は、10% FCS を含む MEM 培地 (minimum essential medium) で培養した。

(3) 培養細胞への遺伝子導入

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、マウス 3T3-L1 細胞を 24 穴プレートに播種し、翌日各種 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 染色、あるいは luminescence assay (luminescent β -galactosidase genetic reporter system II (Clontech, Inc.)) を行った。

(4) フローサイトメーターを用いた細胞受容体の解析

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の CAR、CD46 の発現はフローサイトメーターを用いて解析した。即ち、

CAR については 5×10^5 細胞を human CAR に対する抗体 mouse monoclonal antibody RmCB (Upstate Biotechnology Inc. より入手) で処理し、未結合の抗体を除いた後、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody (Pharmingen より入手) で処理した。CD46 については、細胞を FITC-conjugated anti-human CD46 antibody (Pharmingen より入手) で処理した。細胞を洗浄した後、フローサイトメーター (FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson)) で処理し、CellQuest software (Becton Dickinson) で解析した。

(5) CAR mRNA の Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

トータル RNA を ISOGEN reagent (ニッポンジーンより入手) で回収し、RT 反応を SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen より入手) を用いて行った。CAR と GAPDH の PCR 反応は以下のプライマーを用いて行った。CAR: forward, 5' -aattcctgctgaccgttctt-3' ; reverse, 5' -tttctgccagccatggcgta-3' ; GAPDH: forward, 5' -accacagtccatgccatcac-3' ; reverse, 5' -tcacaccacctgttctgtgta-3' . PCR 反応は以下の条件で行った。CAR: 20 s at 94°C, 10 s at 60°C, and 60 s at 72°C for 35 cycles; GAPDH: 20 s at 94°C, 10 s at 60°C, and 60 s at 72°C for 25 cycles. PCR 産物は 2.0% agarose gel で電気泳動し確認した。

(6) 脂肪細胞への分化

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は Tontonoz (1994) らの報告に基づいて行った。即ち、細胞がコンフルエントに到達した 2 日後に、medium を分化用 medium (pioglitazone (CALBIOCHEM, San Diego, CA, USA) (Pio, $3 \mu\text{M}$), insulin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (INS, 150 nM), dexamethasone (Sigma) (DEX, $1 \mu\text{M}$) and

3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) (IBMX, $100 \mu\text{M}$) を含む) に交換し、9 日間培養した (3 日に一度培地交換を行った)。

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は、細胞内における脂質の量を Oil red O staining あるいは glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性を測定することで確認した。

B.1.2 ES 細胞への高効率遺伝子導入

(1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作製した。それぞれのマルチクロニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMVMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVlacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作製するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7、pAdHM34 と同ライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1、pAdHM34-EFLacZ1 を作製した。

作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ を得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック

社)を用いて測定した。

(2) マウス ES 細胞の培養

E14 マウス ES (mES) 細胞は LIF 含有培地にてフィーダー細胞上で培養し、3-5 日ごとに継代した。フィーダー細胞にはマイトマイシン C で不活化したマウス胚繊維芽細胞を用いた。フィーダー細胞非存在下で培養する際には、フィーダー細胞上の mES 細胞をトリプシンで剥離した後、37°C、40 分インキュベートすることにより得た mES 細胞の単細胞浮遊液をゼラチンコートした培養皿上に播種した。

(3) マウス ES 細胞への遺伝子導入

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/well 播種し、翌日各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 染色を行った。

(4) RT-PCR 法による CAR の検出

フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。PCR プライマーは以下のものを用いた。

G3PDH(F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH(R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

CAR(F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'

CAR(R): 5' -TTAACAAGAACGGTCAGCAG-3'

Oct-3/4(F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'

Oct-3/4(R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'

(5) ウェスタンブロッティング法による CAR の検出

マウス CAR に対するポリクローナル抗体は CAR の部分配列 KTQYNQVPSSEDFERAPQC に対応するペプチドをウサギに免疫することにより作製した。フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培

養した mES 細胞からタンパク質を抽出し、マウス CAR 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識された抗体を用いた。フィルターを ECL Western blotting detection system (アマシャム社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フイルム製) により検出した。

B. 1.3 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

(1) アデノウイルスベクターの作製

CMV プロモーター制御下にルシフェラーゼを発現するシャトルプラスミド(ルシフェラーゼ発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) と pAdHM4、pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7、pAdHM34 を用いて、in vitro ライゲーション法により従来型のファイバー、HI loop をコードした領域に RGD 配列をもったファイバー、C 末端をコードした領域にポリリジン (KKKKKKK) 配をもったファイバー、35 型 Ad 由来ファイバーを有した Ad ベクター Ad-L2、AdRGD-L2、AdK7-L2、AdF35-L2 (それぞれ) を作製した。また、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを C 末領域にポリペプチドを挿入した Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を作製した (Table 2)

(2) 細胞の培養

ヒト胎盤由来細胞株として JAR (human choriocarcinoma、ATCC)、JEG-3 (human choriocarcinoma、ATCC)、BeWo (human choriocarcinoma、Washington University, Dr. A Schwarts より供与) を使用した。JAR 細胞は MEM (10%FCS 含有)、JEG-3 細胞は RPMI1640 (10%FCS 含有)、BeWo 細胞は DMEM (10%FCS 含有) 中で培養した。また、ラット胎盤由来細胞株として Rcho-1 (Kansas University, Dr. MJ Soares より供与)、TR-TBT18d-1、TR-TBT18d-2 (共立薬科大 中島恵美先生より供与) を用いた。Rcho-1 細胞は RPMI1640 (10% FCS 含有)、TR-TBT 細胞は DMEM (10% FCS 含有) 中で培養した。

(3) Total RNA の抽出

各細胞を 100 mm²ディッシュに播種し、サブコンフルエント時に培地を吸引除去し TRIZOL[®] (Invitrogen life technologies) 1 mL を培養ディッシュに添加した。シリンジにて細胞を回収し、マイクロチューブ中にて 5 分間放置後クロロホルム (WaKo) 200 μ L を加えて混和した。2 分間放置後、4 °C、1200 rpm にて 15 分間遠心し、上層を新しいマイクロチューブに分取し、エーテル (WaKo) 500 μ L を加え、4 °C、1200 rpm にて 10 分間遠心分離し、上層を除去した。この操作を 3 回繰り返した後、イソプロパノール (WaKo) 500 μ L 加えて転倒混和し、4 °C、1200 rpm にて 10 分間遠心分離した。上層除去し、風乾後、RNase free 水 50 μ L に溶解したものを total RNA サンプルとした。

(4) RNA 濃度測定

サンプルの total RNA 濃度は吸光度計 (Jasco Ubest-30、日本分光) にて吸光度を測定し (波長 260 nm)、以下の換算式により求めた。

サンプルの total RNA 濃度 (μ g/ μ L) = 吸光度 $\times$ 0.04

(5) Complementary DNA (cDNA) の調製

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa BIOMEDICALS) を用い、25 mM MgCl₂ 4 μ L (最終濃度 5 μ M)、10 $\times$ RNA PCR buffer 2 μ L、RNase Free dH₂O 8.5 μ L、10 mM dNTP Mixture 2 μ L (最終濃度 5 mM)、40 U/ μ L RNase Inhibitor 0.5 μ L (最終濃度 1 U/ μ L)、5 U/mL Reverse Transcriptase 1 μ L (最終濃度 0.25 U/ μ L)、2.5 pmol/mL Oligo dT-Adaptor Primer 1 μ L (最終濃度 0.125 μ M) に、total RNA 濃度が 1 μ M になるように total RNA サンプルを加え、30 °C 10 min、50 °C 30 min、95 °C 2 min にて逆転写反応を行い、cDNA 溶液を作製した。

(6) 各胎盤細胞株における CAR、及び α_v 、 β_3 、 β_5 integrin の mRNA 発現の測定

cDNA 溶液 5 μ L に 25 mM MgCl₂ 0.6 μ L (最終濃度 2.5 mM)、10 $\times$ RNA PCR buffer 0.8 μ L、滅菌精製水 6.35 μ L、5 U/mL TaKaRa Taq[™] 0.05 μ L (最終濃度 2.5 U/100 μ L)、各プライマー 0.1 μ L (最終濃度 1 μ M) を加えて PCR を行った。それぞれの遺伝子に使用した Primer 配列は Table 2 に記載した。PCR 条件は以下のような条件で行った。Human CAR、94 °C 30 sec、65 °C 60 sec、72 °C 120 sec 30 cycle ; human α_v integrin、94 °C 40 sec、60 °C 40 sec、72 °C 60 sec 30 cycle ; human β_3 integrin、94 °C 30 sec、65 °C 40 sec、72 °C 60 sec 30 cycle ; human β_3 integrin、94 °C 40 sec、58 °C 40 sec、72 °C 60 sec 20 cycle ; human β -actin、94 °C 30 sec、60 °C 30 sec、72 °C 30 sec 35 cycle ; rat CAR、94 °C 45 sec、60 °C 53 sec、72 °C 90 sec 40 cycle ; rat α_v integrin、94 °C 45 sec、57 °C 60 sec、72 °C 90 sec 30 cycle ; rat β_3 integrin、94 °C 45 sec、58 °C 60 sec、72 °C 90 sec 30 cycle ; rat β_3 integrin、94 °C 45 sec、53 °C 60 sec、72 °C 90 sec 40 cycle ; rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、94 °C 45 sec、60 °C 60 sec、72 °C 90 sec 40 cycle。

(7) PCR 産物の確認

PCR 産物 10 μ L に 6 $\times$ Loading Buffer (36% Glycerol、30 mM EDTA、0.05% Bromophenol Blue、0.05% Xylene Cyanol) (TaKaRa BIO INC.) 2 μ L を加え混和し、8 μ L を 3% Nusieve 3:1 Agarose ゲル (Biowhittaker Molecular Applications) に 50 V にて電気泳動を行った。分子量マーカーとして Φ X174-HaeIII digest (TaKaRa BIO INC.) を用いた。泳動槽は TBE buffer (89 mM Tris hydroxymethyl aminomethane、89 mM borate、2 mM EDTA) で満たした。染色はエチジウムブロマイド (5 μ g/mL) にて行い、トランスイルミネーター

(波長 302 nm、NTM-10、フナコシ) でバンドの検出を確認後、ゲルをミリQ水に入れ振とうし、脱色した。ゲルの撮影はトランスイルミネーター上でポラロイドカメラ (DS-300、フナコシ) にて行った。

(8) ヒト由来細胞株への遺伝子導入活性の検討

実験には、野生型 Ad ベクターの Ad-L2、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを挿入した Ad-RGD(HI)-L2、Fiber の C 末領域に RGD ペプチドを挿入した Ad-RGD(C)-L2、Fiber の C 末領域に KKKKKKK ペプチドを挿入した Ad-K7(C)-L2、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを C 末領域に KKKKKKK ペプチドを挿入した Ad-RGD(C)-L2 Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を使用した。各ヒト由来細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 個播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2、Ad-K7(C)-L2 あるいは Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を 300 あるいは 3000 vector particles (VP)/cell の条件下で 37°C、1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジー LT2.0、東洋インキ) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

B.1.4 ファイバー改変 Ad ベクターを用いたリンパ組織指向性樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用

(1) AdRGD-CCR7 の構築

AdRGD-CCR7 は主任研究者らが開発済みの in vitro ライゲーション法に準拠して作製した。まず、pBluescript SK(+)/mCCR7 (近畿大学医学部 義江 修先生より供与を受けた) から切り出したマウス CCR7 cDNA をシャトルプラスミド (pHMCMV5; アンピシリン耐性遺伝子を含む) のマルチクローニングサイトに挿入し、このプラスミドとベクタープラスミド (pAdHM15-RGD; カナマイシン耐性遺伝子を含む) の I-Ceu I/PI-Sce I 消化産物をライゲーションすることで、ベクター

プラスミドの E1 欠損部位へサイトメガロウイルスプロモーター制御の CCR7 遺伝子発現カセットを挿入した。ライゲーション産物を *Swa* I 処理 (親ベクタープラスミドの出現を抑止) した後、トランスフォーメーションしたコンピテントセルを薬剤耐性の違いを利用して選択することで目的とする組換えベクタープラスミド (pAdHM15-RGD/CCR7) を得た。この組換えベクタープラスミドを *Pac* I で消化することにより組換え Ad ゲノムを含む直鎖状 2 本鎖 DNA とし、SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN 社) を用いてヘルパー細胞である 293 細胞へトランスフェクションすることによって AdRGD-CCR7 を得た。また本研究では、同様の方法で以前に構築したルシフェラーゼ発現 AdRGD (AdRGD-Luc)、ニワトリ卵白アルブミン発現 AdRGD (AdRGD-OVA)、およびメラノーマ関連抗原 gp100 発現 AdRGD (AdRGD-gp100) も使用した。各 AdRGD は 293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法で精製した後、293 細胞を用いた end-point dilution method によって感染力価 (plaque-forming unit; PFU) を算出した。

(2) マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) の調製

マウス骨髄由来 DC は endotoxin-free の試薬および器具を使用して、Lutz らの方法 (*J. Immunol. Methods* 223, 77-92, 1999) を若干改変して調製した。マウス的大腿骨および脛骨を摘出し、complete RPMI1640 (10% ウシ胎仔血清、50 μ M 2-mercaptoethanol、抗生物質を含む RPMI1640) 中に骨髄を flash した。セルストレーナー (70- μ m ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、DC 分化用培養液 (40 ng/ml マウス GM-CSF (PeproTech 社) を含む complete RPMI1640) で $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml に懸濁して 100 mm 細菌培養用シャーレに 10 ml ずつ播種した。37°C、5% CO₂ 存在下で培養し、3 日目に DC 分化用培養液を各シャーレに 10 ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10 ml の培養上清を新たな

DC 分化用培養液 10 ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として以降の実験に供した。また成熟 DC として、1 µg/ml の lipopolysaccharide (LPS; Sigma 社) を含む complete RPMI1640 で 24 時間培養した LPS/DC を使用した。

(3) DC への遺伝子導入

RPMI1640 で種々の MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) に調製した AdRGD 懸濁液を用いて DC を 5×10^6 cells/ml に懸濁し、15 分毎に穏やかに撹拌しながら 37°C、5% CO₂ 存在下で 2 時間インキュベーションした。PBS で 3 回洗浄後、DC を適切な培養液あるいは緩衝液に懸濁して以降の実験に供した。

(4) 遺伝子導入 DC の viability の評価

AdRGD-CCR7 および AdRGD-gp100 により遺伝子導入した DC を complete RPMI1640 で懸濁し、 1×10^5 cells/100 µl/well で 96 穴プレートに播種した。37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、WST-8 cell counting kit (同仁化学研究所) を用いて生細胞数を測定し、以下の式に従って DC の viability を算出した。

(% of DC viability) = (遺伝子導入 DC の生細胞数) / (未処理 DC の生細胞数) $\times$ 100

(5) CCR7 遺伝子発現レベルの解析

RT-PCR 解析においては、AdRGD-CCR7 および AdRGD-Luc により遺伝子導入した DC (CCR7/DC および Luc/DC)、mock DC、ならびに LPS/DC から Sepasol-RNA I Super (Nacalai tesque 社) を使用して total RNA を調製した。RNase free-DNase I 処理を施した total RNA 5 µg を 5 mM MgCl₂、1 mM dNTP mix、1 µM random primer (9mer)、1 µM oligo(dT)₂₀、100 U ReverTra Ace (TOYOBO 社) を含む 50 µl の RT buffer に添加し、42°C で 60 分間の逆転写反応により cDNA を得た。PCR は 1 µl RT 産物、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP mix、0.5 µM

プライマーセット、1.25 U Taq DNA polymerase を含む 50 µl の PCR buffer 中で、Table 1 に示す条件で行った。電気泳動後の PCR 産物について densitometry analysis を行い、β-actin mRNA に対する CCR7 mRNA の相対的な発現レベルを算出した。また flow cytometry 解析においては、CCR7/DC、Luc/DC、mock DC、および LPS/DC を 2% paraformaldehyde を用いて 10 分間固定し、氷冷した staining buffer (0.1%ウシ血清アルブミン および 0.01% NaN₃ を含む PBS) で懸濁してマイクロテストチューブに 1×10^6 cells/tube で分注した。抗 FcγRII/III モノクローナル抗体 (2.4G2; ラット IgG_{2b,κ}; BD Biosciences 社) を添加して Fc レセプターブロッキングを行い、抗マウス CCR7 ポリクローナル抗体 (ヤギ Ig; ImmunoDetect 社) を添加して 4°C で一晩インキュベーションした。細胞を staining buffer で洗浄後、FITC 標識ウサギ抗ヤギ Ig 抗体 (DakoCytomation 社) を添加して 2 時間インキュベーションし、再度 staining buffer で洗浄した後、FACScalibur flow cytometer と CellQuest software (BD Biosciences 社) を用いて CCR7 発現レベルを解析した。尚、各免疫試薬はメーカー推奨濃度で使用した。

(6) *In vitro* chemotaxis assay

CCR7/DC、Luc/DC、mock DC、および LPS/DC を遊走アッセイ用培養液 (0.5%ウシ血清アルブミン および 20 mM HEPES を含む RPMI1640) で懸濁し、24 穴プレートに装着した Chemotaxicell-24 (5-µm pore size; KURABO 社) に 1×10^6 cells/100 µl で添加した。また、下層の 24 穴プレートには、種々の濃度のマウス CCL21 (PeproTech 社) を含む遊走アッセイ用培養液を 600 µl ずつ添加した。37°C で 4 時間インキュベーションした後、下層の well に遊走してきた DC 数を NucleoCounter (Chemometec 社) を用いて測定した。CCL21 に対する DC の遊走活性は、以下の式に基づいて算出した。

(% of input cell) = (下層に遊走した DC 数) /
(Chemotaxicell-24 に添加した DC 数; 1×10^6
cells) $\times 100$

(7) 抗原貪食能の評価

CCR7/DC、Luc/DC、mock DC、および LPS/DC を
1 mg/ml の FITC-dextran (MW = 77,000; Sigma
社) を含む氷冷 PBS で 5×10^6 cells/ml に懸濁
し、4°C あるいは 37°C で 1 時間インキュベーショ
ンした。その後、氷冷 PBS で細胞を 5 回洗浄し、
FITC-dextran の細胞内取り込みを FACScalibur
flow cytometer と CellQuest software を用いて
flow cytometry 解析した。

(8) MHC 分子/共刺激分子発現レベルの解析

CCR7/DC、Luc/DC、mock DC、および LPS/DC を
氷冷した staining buffer で懸濁し、マイクロテ
ストチューブに 1×10^6 cells/tube で分注した。
2.4G2 を添加して Fc レセプターをブロック
した後、各ビオチン標識モノクローナル抗体 (抗
マウス H-2K^b/D^b、抗マウス I-A^b、抗マウス CD40、
抗マウス CD54、抗マウス CD80、抗マウス CD86; BD
Biosciences 社) を添加し、氷上で 30 分間イン
キュベーションした。細胞を staining buffer
で洗浄後、PE 標識 streptavidin (BD Biosciences
社) を添加してさらに 30 分間インキュベーショ
ンし、再度 staining buffer で洗浄した後、
FACScalibur flow cytometer と CellQuest
software を用いて flow cytometry 解析した。尚、
各免疫試薬はメーカー推奨濃度で使用した。

(9) Mixed leukocyte reaction assay

C57BL/6 マウス由来の CCR7/DC、mock DC、およ
び LPS/DC を 50 μ g/ml の mitomycin C (協和醗酵)
を含む RPMI1640 で 30 分間インキュベーションし
た後、complete RPMI1640 に懸濁した
(stimulator 細胞の調製)。また、BALB/c マウス
から脾細胞を調製し、ナイロンウールカラム (和
光純薬) を用いて単離した T 細胞 (responder 細

胞) を complete RPMI1640 に懸濁して 96 穴培養
プレートに 1×10^5 cells/50 μ l/well で播種し
た。種々の responder/stimulator 比となるよう
に stimulator 細胞を 50 μ l/well で添加して共
培養し、54 時間後に 100 μ M BrdU を 10 μ l/well
で添加してさらに 18 時間培養した後、responder
細胞の増殖を cell proliferation BrdU ELISA
kit (Roche Diagnostics 社) を用いて評価した。

(10) *In vivo* migration assay

C57BL/6 origin の緑色蛍光タンパクトランス
ジェニック (EGFP-Tg) マウス (C57BL/6
TgN(act-EGFP)OsbC14-Y01-FM131; 大阪大学微生
物病研究所 岡部 勝先生より供与を受けた) か
ら骨髓由来 DC を単離し、調製した CCR7/DC、
Luc/DC、および mock DC を野生型 C57BL/6 マウス
の側腹部皮内に 2×10^6 cells/50 μ l/site で投
与した。48 時間後、所属リンパ組織である鼠径
部リンパ節を摘出し、調製したリンパ節細胞を氷
冷 staining buffer に懸濁してマイクロテストチ
ューブに 2×10^6 cells/tube で分注した。2.4G2
を添加して Fc レセプターをブロックした後、
ビオチン標識抗マウス CD11c モノクローナル抗
体 (BD Biosciences 社) を添加し、氷上で 30 分
間インキュベーションした。細胞を staining
buffer で洗浄後、PerCP 標識 streptavidin (BD
Biosciences 社) を添加してさらに 30 分間イン
キュベーションした。再度 staining buffer で
洗浄したリンパ節細胞を FACScalibur flow
cytometer と CellQuest software を用いて flow
cytometry 解析 (5×10^5 events/sample) し、
単離した総リンパ節細胞数に EGFP⁺CD11c⁺ DC 出
現頻度を乗じることにより投与部位から所属リ
ンパ組織へと遊走した DC 数を算出した。尚、各
免疫試薬はメーカー推奨濃度で使用した。

(11) *In vitro* antigen-presentation assay

AdRGD-OVA 単独、AdRGD-OVA と AdRGD-CCR7 ある
いは AdRGD-Luc の併用により遺伝子導入した DC

を 1×10^5 cells/100 μ l/well で 96 穴プレートに播種し、OVA ペプチド-MHC class I (H-2K^b) 複合体を特異的に認識して IL-2 を分泌する CD8-OVA 1.3 細胞 (Case Western Reserve University, Clifford V. Harding 博士より供与を受けた) を 1×10^5 cells/100 μ l/well で各 well に添加した。20 時間共培養した後、マウス IL-2 ELISA kit (Biosource International 社) を用いて培養上清中の IL-2 濃度を測定した。MHC class I 分子を介した OVA ペプチド提示レベルは、25 MOI の AdRGD-OVA により遺伝子導入した DC 群における IL-2 レベルに対する各遺伝子導入 DC 群の IL-2 レベルのパーセンテージで表した。

(12) 腫瘍拒絶実験

AdRGD-gp100 単独あるいは AdRGD-gp100 と AdRGD-CCR7 との併用により遺伝子導入した DC を PBS に懸濁し、 2×10^5 あるいは 5×10^5 cells/50 μ l/mouse で C57BL/6 マウスの左側腹部皮内に免疫した。免疫 1 週間後、マウスメラノーマ B16BL6 細胞を 4×10^5 cells/50 μ l/mouse でマウス右側腹部皮内に攻撃接種した。経日的に腫瘍径を測定し、以下の式に従って腫瘍体積を算出した。尚、腫瘍の長径が 20 mm を超えたマウスは安楽死させた。

Tumor volume (mm^3) = (腫瘍の長径; mm) $\times$ (腫瘍の短径; mm)² $\times$ 0.5236

(13) Eu-release assay および IFN- γ ELISPOT assay

AdRGD-gp100 単独あるいは AdRGD-gp100 と AdRGD-CCR7 との併用により遺伝子導入した DC を PBS に懸濁し、 5×10^4 、 1×10^5 あるいは 2×10^5 cells/50 μ l/mouse で C57BL/6 マウスの腹部皮内に免疫した。免疫 1 週間後、これらのマウスから脾細胞を調製し、B16BL6 細胞 (stimulator 細胞) と 10:1 で 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、effector 細胞を得た。尚、stimulator 細胞として用いた B16BL6 細胞は、あ

らかじめ 100 U/ml のマウス IFN- γ (PeproTech 社) を含む培養液で 24 時間培養し (MHC 分子発現の増強)、50 μ g/ml の mitomycin C を含む培養液で 30 分間インキュベーションした (増殖阻止)。種々の effector/target 比となるように、RPMI1640 で懸濁した effector 細胞 (2.5 – 10×10^5 cells/well) と Eu ラベルした B16BL6 細胞 (target 細胞; 1×10^4 cells/well) を U 底 96 穴プレートに播種した。また、target 細胞からの Maximum Eu-release および Spontaneous Eu-release を測定する well には、effector 細胞懸濁液の代わりにそれぞれ 0.5% Triton X-100/PBS および RPMI1640 を添加した。4 時間インキュベーションした後、50 μ l の上清を 150 μ l の DELFIA enhancement solution (PerkinElmer 社) と混合し、時間分解蛍光測定法 (Ex: 340 nm, Em: 612 nm, lag time: 200 μ s, integration time: 1000 μ s; SPECTRAFLUOR Plus, TECAN 社) で Eu 濃度を測定した。尚、effector 細胞の細胞傷害活性は以下の式に従って算出した。

(% of lysis) = {(A) - (C)} / {(B) - (C)} $\times$ 100

(A): Experimental Eu-release, (B): Maximum Eu-release, (C): Spontaneous Eu-release

また、*in vitro* 抗原再刺激後の脾細胞中に含まれる IFN- γ 産生細胞数は、マウス IFN- γ ELISPOT kit (BD Biosciences 社) を用いて測定した。

B.1.5 ファイバーミュータント Ad ベクターを用いたがん免疫遺伝子治療研究

(1) Ad ベクターの構築

Ad ベクターの作製は、主任研究者らが開発した *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) ベクターができる) 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) ベクターができる) を用いた。一方、シャトルベクターは pHCMV5 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ーの CVL (crude virus lysate) を得た。今回作製した Ad ベクターは、ルシフェラーゼを発現する Ad-Luc および AdRGD-Luc、CCL27 を発現する AdRGD-CCL27、Interleukin 12 (IL-12) を発現する AdRGD-IL-12、EGFP を発現する Ad-EGFP である。

(2) Ad ベクターの精製

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℃、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℃、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℃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℃ 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) Ad ベクターの力価測定

Ad ベクターの力価は以下に示す TCID₅₀ 法により測定した。ウイルス溶液を 5% FCS 添加 DMEM 培地で $10^4 \sim 10^5$ 倍に段階希釈し、50μl の 5% FCS 添加 DMEM 培地を添加した 96 穴プレートの第一列目に 25μl 加えた。よく混合した後、25μl を 2 列目の well に移し、以下同じ操作を 11 列目まで繰り返して、3rd の段階希釈列を作製した。12 列目は非感染細胞のコントロールとした。HEK293 細胞を 5% FCS 添加 DMEM 培地で 10^5 cells/ml となるように調整し、この細胞懸濁液を先に調整した 96 穴プレートに 50μl/well で播種し、12 日間、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。なお、細胞播種の 3、6、9 日後に、50μl の 5% FCS 添加 DMEM 培地を添加した。培養開始後 12 日後、細胞変性終末点を判定した。判定した細胞変性 well 数から以下の式に従って PFU titer を求めた。

$$\text{PFU titer} = \log (1 \text{ 列目の希釈度}) - (\Sigma - 0.5) \times \log (\text{希釈率})$$

ただし Σ = 各希釈段階における (変性 well 数) / (検体数) の総和

(5) in vivo における抗腫瘍効果の検討

OV-HM 細胞を PBS で洗浄し、Trypsin/EDTA で剥がした後、6 週齢の B6C3F1 雌性マウスの腹部皮内に 1×10^6 cells/100μl RPMI1640 FCS (-) /mouse で移植した。移植後 7 日目 (腫瘍径が約 7～8 mm) に、PBS、AdRGD-Luc、AdRGD-CCL27、AdRGD-IL-12 および AdRGD-IL-12 : AdRGD-CCL27 = 9 : 1、5 : 5、1 : 9 となるように調整し、合計 AdRGD 量として 2×10^7 PFU/50μl RPMI1640 FCS (-) /mouse で腫瘍内投与し、腫瘍径を経的に測定した。また、抗腫瘍エフェクター細胞を同定するため、同様の実験を Balb/c 雌性ヌードマウスおよび以下の処理をした B6C3F1 雌性マウスを用いて行った。即ち、B6C3F1 マウスは、AdRGD

治療開始 3 日前から、Anti-asialo GM1 抗血清 (40 μ l/mouse)、および Rat anti-mouse CD4 抗体 (GK1.5) (100 μ l/mouse)、Rat anti-mouse CD8 抗体 (53.6.72) (100 μ l/mouse) をそれぞれ腹腔内に連日投与し、治療後もさらに 5 日おきに 3 回投与した。この処理により血中から NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が除去されていることを確認した。

尚、腫瘍の体積は以下の式に従って算出した。
(腫瘍体積 ; mm³) = (腫瘍の長径 ; mm) $\times$ (腫瘍の短径 ; mm) ²/2

また、腫瘍の長径が 20mm を超えたマウスは安楽死させた。尚、上記治療実験により完全治癒したマウスに対して、3 ないしは 6 カ月後に腹部皮内に OV-HM 細胞 (1 $\times$ 10⁶ cells/mouse)、あるいは B16/BL6 細胞 (3 $\times$ 10⁵ cells/mouse) を移植し、腫瘍の生着の有無を確認した。

(6) 免疫組織標本の作製と染色

OV-HM 担がんマウスの腫瘍内への AdRGD 投与後 6 日目に腫瘍組織を回収し、O.C.T compound (Tissue TEK, Miles, Elkhart, IN) に包埋後、直ちに液体窒素に浸して凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。その後、6 μ m の凍結切片を作製し、風乾後、4 $^{\circ}$ C の 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。固定後、組織は内因性ペルオキシダーゼを失活させるため 0.3% H₂O₂ に 10 分浸した。続いて、5% BSA/PBS で 10 分間ブロッキングを行い、一次抗体を 30 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄後、二次抗体を 30 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄を行った。次にあらかじめ 30 分前に複合体を形成させておいた Avidine-HRP で 40 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄後、DAB 溶液 (DAB 1mg, distilled water 900 μ l, 1M Tris- HCl 100 μ l) で発色させた。最後にヘマトキシリン液に 20 秒、浸漬することにより染色を行い、脱水封入して永久標本とした。尚、免疫染色に使用した抗体は、Rabbit polyclonal anti-hCD3 antibody (DAKO)、Rat anti-mouse CD4 mAb (BD Pharmingen)、Rat

anti-mouse CD8 mAb (Serotec)、Rat anti-mouse perforin antibody (DAKO)、normal Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology)、Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins (DAKO) である。

(7) RT-PCR による IFN- γ mRNA 発現解析

OV-HM 担がんマウスの腫瘍内への AdRGD 投与後 6 日目に腫瘍組織を回収し、TRI reagent を使用して、total RNA を定法に従い回収した。回収した total RNA より、Oligo (dT12-18) primer、および Super Script III RNase H Reverse Transcriptase を使用し、添付のプロトコールに従って cDNA を合成した。マウスの IFN- γ 、および β -actin のプライマー (IFN- γ Forward: GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT, Reverse: TGAGCTCATGGAATGCTTGG, β -actin Forward: TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG, Reverse: TTTGATGTGACGCACGATTTC) を用いて Amplitaq Gold にて 96 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒の条件で PCR を 30 サイクル行った。1.5% アガロースゲルを用いて各 PCR 産物を電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色して検出を行った。

B.1.6 ターゲティング Ad ベクターの開発

(1) トリプルミュータント Ad ベクターの作製

E1、E3 領域を除くすべての Ad ゲノムを持ち、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させ、ファイバーシャフトを 35 型 Ad のシャフトに置換し、ファイバーノブの AB ループの 4 アミノ酸配列を変異させることで、それぞれインテグリン、ヘパラン硫酸、CAR との結合を欠損させた Ad ベクタープラスミド pAdHM59 を作製した。まず、5 型 Ad のファイバーノブの AB ループに変異を加えたファイバー遺伝子の一部 (32238-32495 bp) を持つ pcDNA3.1-Hyg-CAR(-)-AB4m を作製するため、EcoRV で切断した pcDNA3.1-Hygro (Invitrogen) と 5 型 Ad のファイバーノブ遺伝子を持つ pGEM-Teasy-knobCAR(+) (J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) を鋳型として、プライマー

(5' -ATTAATACTTTGTGGACCACACCAGCTCCATCTCTCTA ACTGTAGCCTAAATGgAGgGggtGATGCTAAACTCACTTTGGT CTTAACAAAA-3' , アンダーラインは AseI 切断配列、小文字は変異を加えた配列) とプライマー2 (5' -AGATCTCCATTCTCTAAAGTT-3' , アンダーラインは BglII 切断配列) を用いて PCR を行い作製したフラグメントをライゲーションした。次に 35 型のファイバーを持つ pF35-2.3(AseI) (Gene, 285, 69-77 (2002)) を AflIII/AseI で切断したフラグメント (35 型のファイバーシャフトを含む) と pcDNA3.1-Hyg-CAR(-)-AB4m を AseI/BglII で切断したフラグメント (5 型ファイバーノブの最初から 32495bp までを含む) と pcDNA3.1-Hygro を AflIII/BglII で切断したフラグメントをライゲーションし、pcDNA3.1-Hyg-AB4mknob を作製した。さらに、pHMCMV6 (Hum. Gene Ther., 10, 2013-2017 (1999)) を AflIII/MunI で切断したフラグメントと pHM-S35-K5-CAR(+) を MunI/BglII で切断したフラグメントと pcDNA3.1-Hyg-AB4mknob を AflIII/BglII で切断したフラグメントをライゲーションし、35 型のファイバーシャフト全長と 5 型のファイバーノブの AB ループに 4 アミノ酸の変異を加え (R412S, A415G, E416G, K417G) 、HI ループに Csp45I、C 末端に ClaI の制限酵素サイトを持つ遺伝子を含んだ pHM-S35-K5-CAR(-)-AB4m を作製した。この pHM-S35-K5-CAR(-)-AB4m を SrfI/MunI で切断したフラグメントと pHM14-Eco2 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003)) を SrfI/MunI で切断したフラグメントとライゲーションし pHM14-Eco2-S35-AB4m を作製した。次に pHM14-Eco2-S35-AB4m を EcoRI/ClaI で切断したフラグメントと pAdHM43 (J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) を EcoRI/ClaI で切断したフラグメントとライゲーションすることで、CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合を欠損させた Ad ベクタープラスミド pAdHM59 を作製した。

なお、pAdHM59 はファイバーノブの HI ループ領域に Csp45I、C 末端領域に ClaI の制限酵素サイトを持っていることから、任意の外来ペプチドに相当する遺伝子を HI ループ領域と C 末端領域に組み込むことが可能である。さらに、E1 欠損領域には I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素切断配列が組み込まれていることから、これらの制限酵素を使用することで目的遺伝子の発現カセットを E1 欠損領域に簡便に挿入することが可能である。

次に、pAdHM59 のファイバーノブの HI ループ領域にインテグリンとの結合が知られている RGD ペプチド (CDCRGDCFC) に相当する遺伝子を挿入した pAdHM59-RGD(HI) を作製した。pAdHM59 を Csp45I で切断し、合成オリゴ DNA 1 (5' -CGGCCTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGCGATG-3') と合成オリゴ DNA 2 (5' -CGCATCGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAGGC-3') をハイブリダイゼーションしたものを挿入し、制限酵素解析とシーケンシングにより挿入した遺伝子配列を確認した。次に、pAdHM59 と pAdHM59-RGD(HI) の E1 欠損領域にレポーター遺伝子として CMV プロモーターにドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを挿入したベクター pAdHM59-CMV2 と pAdHM59-RGD(HI)-CMV2 を作製した。また、同様の方法によりファイバーの FG ループの 4 アミノ酸を欠損させることで CAR との結合性を除去し、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合を欠損させた Ad ベクタープラスミド pAdHM54 (J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) と pAdHM54-RGD(HI) を作製した。

pAdHM59 と pAdHM59-RGD(HI) 、pAdHM54 と pAdHM54-RGD(HI) を I-CeuI と PI-SceI 制限酵素で切断し、同様に CMV プロモーターでドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを持つ pCMV2L1 を I-CeuI と PI-SceI 制限酵素で切断したフラグメントとをライゲーションした。作製した pAdHM59-CMV2 、 pAdHM59-RGD(HI)-CMV2 、 pAdHM54-CMV2 と pAdHM54-RGD(HI)-CMV2 を PacI

制限酵素により切断し、プラスミドを線状にした後、pAdHM59-CMV L2 と pAdHM54-CMV L2 は Fiber-293 細胞（受容体と結合できない Ad ベクターはパッケージング細胞である 293 細胞にも感染できないため、通常の Ad ファイバーを発現させた Fiber-293 細胞を使用することで Ad ベクターの一部のファイバーを受容体と結合可能なファイバーに置き換え増殖させる。最後に通常の 293 細胞を使用し増殖させることで受容体に結合できないファイバーのみを持つ Ad ベクターが作製可能である）に、pAdHM59-RGD(HI)-CMV L2 と pAdHM54-RGD(HI)-CMV L2 は 293 細胞に SuperFect (Qiagen 社)を用いてトランスフェクションした。約 10 日間培養後、それぞれの Ad ベクター (Ad/Δ F(AB) Δ P-S35-L2、Ad/Δ F(AB) Δ P-S35-RGD(HI)-L2、Ad/Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/Δ F(FG) Δ P-S35-RGD(HI)-L2)を回収した。また、コントロール Ad ベクターとして従来型の Ad ベクターである Ad-L2 を作製した。

作製した全ての Ad ベクターは 293 細胞に 3-4 次感染までさせることにより大量調製した。ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10 % glycerol からなる溶液で透析した。ベクターの物理化学的 (particle) タイターは Maizel らの方法で、生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターは鐘ヶ江らの方法に従って決定した。

(2) 培養細胞への遺伝子導入

各細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well 播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad/Δ F(AB) Δ P-S35-L2、Ad/Δ F(AB) Δ P-S35-RGD(HI)-L2、Ad/Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/Δ F(FG) Δ P-S35-RGD(HI)-L2 を種々の濃度で 1.5 時間作用させた。

(3) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキより入手) を

用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

(4) in vivo 遺伝子導入実験

マウス (C57Bl6、5w、female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{10} 、 1×10^{11} の物理学的タイターで投与し、2 日後の各臓器でのルシフェラーゼ活性を測定した。

(5) ファイバーノブ発現ファージミドベクターの作製

ファージライブラリーの構築には、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タンパク発現カセットが Lac プロモーター支配下にある pCANTAB5e (Amersham pharmacia biotech 社)を用いた。5 型 Ad ファイバーノブのクローニングには、センスプライマーとして 5' -CAGGGTAATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAATACTTTG TGGACCACACCAGCT CCATCT-3' 及びアンチセンス プ ラ イ マ ー と し て 5' -ATCTATGTCGGGTGCGGAGAATGCGGCCGCGGAGCCTCC GCCCGGATCCACCACCACCGTCGATTTCTTGGGCAATGTAT GAAAAAGTG-3' を用い、pAdHM41 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003))をテンプレートとし PCR を行った。得られた DNA 断片を予め NcoI および NotI 処理した pCANTAB5e に T4 DNA Ligase (New England Biolabs 社製)を用いて組み込み、得られたファージミドベクターを pCANYAB-knob41 とした。

(6) ファイバーノブ発現ファージライブラリーの作製

2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、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 配列 (N:A, T, G, C, S:G, C) × 7 配列を導入した 5 型アデノウイルスファイバーノブ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' -TAGGGATAACAGGGTAATCCATCGATA (NNS)₇ACGAAC
 CCAAGTGCATACTCTATGTCATTTTCATG-3' および、アン
 チセンスプライマーとして
 5' -ATCTATGTCGGGTGCGGAGAATGCGGCCGCGGAGCCTCC
 GCCGCCGGATCCACCACCACCGTCGATTTCTTGGGCAATGTAT
 GAAAAAGTG-3' を用い、pCANTAB-knob41 に対して
 96°C 1分 95°C 1分 64°C 1分 70°C 4分 サイ
 クル数 40 回の条件で KODplus (TOYOBO 社製) を
 用いて PCR を行った。得られた PCR 産物 (225bp)
 を PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用い
 て精製した。その後 PCR 産物を ClaI および NotI
 処理し、Purification Kit および Gel Extraction
 Kit を用いて精製した。これを予め Csp45I およ
 び NotI 処理した pCANYAB-knob41 と T4 DNA
 Ligase を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション
 反応を行った。ライゲーション産物を
 Purification Kit を用いて精製し、Csp45I 処理
 を行うことでセルフライゲーションの消化を行
 った。その後 Purification Kit を用いて精製し、
 大腸菌 TG1 株 (STRATAGENE 社製) に形質転換し
 た。

B.1.7 RGD ペプチド付与型ファイバーを有した 発現制御型 Ad ベクター開発

(1) AdRGD-Off-SEAP6 の作製

E1、E3 領域を欠損した全長の Ad ゲノムを有し
 E1 欠損領域にユニークな制限酵素部位の I-Ceu
 I/SwaI/PI-SceI 部位を、E3 欠損領域にユニーク
 な制限酵素部位の ClaI 部位を、ファイバーノブ
 の HI ループコード領域にユニークな制限酵素部
 位の Csp45I 部位を有した Ad ベクタープラスミド
 pAdHM51 を作製した。ファイバーノブの HI ルー
 プコード領域の Csp45I 部位に RGD ペプチドをコ
 ードしたオリゴ DNA を挿入し pAdHM51-RGD を得た。
 マルチクロニング部位の両端に ClaI 部位を有
 したシャトルプラスミド pHM13 に CMV プロモータ
 ーからなる tet-off 系の転写活性化因子 tTA

(tetracycline- responsive transcriptional
 activator) の発現単位を挿入して
 pHM13-ICMV-tTA を作製した。ClaI 処理した
 pHM13-ICMV-tTA をベクタープラスミド
 pAdHM51-RGD の ClaI 部位に挿入した
 (pAdHM51-RGD-tTA1)。次に、テトラサイクリン
 応答性のプロモーター (TRE/CMV) と分泌性アル
 カリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子からなるカ
 セット (pHM5-TRE-SEAP の I-CeuI/PI-SceI フラ
 グメント) を E1 欠損領域の I-CeuI と PI-SceI
 部位に挿入することで pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP
 を得た。pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP を PacI 処理し、
 293 細胞にトランスフェクションすることで RGD
 配列をファイバーノブに有した SEAP 発現
 tet-off アデノウイルスベクター
 AdRGD-Off-SEAP6 を得た。同様に、野生型のファ
 イバータンパク質を有した Ad ベクター
 Ad-Off-SEAP6 を作製した。また CMV プロモータ
 ー制御下で SEAP を発現する野生型のファイバー
 タンパク質を有した Ad ベクター Ad-CMV-SEAP6 を
 作製した。

(2) 培養細胞への遺伝子導入

HeLa、LN2308、NIH3T3 細胞を 96 穴プレートに
 1 x 10⁴ cells/well 播種し、翌日各アデノウイル
 スベクターを 1.5 時間作用させた。ドキシサイク
 リン (10ng/ml) 存在下で 48 時間培養後、培養液
 中の SEAP 産生量を測定した。

(3) SEAP 産生量の測定

培地中の SEAP 産生量は Great EscAPe SEAP
 Chemiluminescence Detection Kit (Clontech) で
 測定した。

B.2 水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジ ュゲート化 Ad ベクターの開発

(1) 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-methyloxy carbonyl) -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 $\rightarrow$ DMF 洗浄 $\rightarrow$ 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) $\rightarrow$ 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)P β 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 にて精製しを行い 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。

(2) PEG および RGD-PEG 修飾 Ad ベクターの作製

Ad ベクターの 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、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-Luc 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。

(3) PEG および RGD-PEG 修飾 Ad ベクターのヘキソン修飾率の算出

各種 PEG および RGD-PEG 修飾 Ad ベクターと、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°C 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 ベクター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 修飾ヘキシソンのバンドを NIHImage を用いて画像解析することにより算出した。

(4) PEG 修飾 Ad ベクターの CAR との結合回避能および遺伝子発現活性に関する検討

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。20 μ g/ml の LIPOFECTAMINE 2000[®] Reagent (Invitrogen) 存在下、非存在下および加熱処理 (90°C、10 分)、未処理条件下において、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCOBRL) で調整した未修飾 Ad-Luc、43%、72%、89%PEG 修