

飾 Ad-Luc をそれぞれ 1000 particles/cell で加え、感染させた (vector 感染時の培地量は 200 μ l とした)。4 時間後、500 μ l の 10% FBS 添加 DMEM に培地交換し、24 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定は、Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega 社製) 100 μ l 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 Microumat 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) マウス抗 Ad 血清の作製

ICR マウス雌、6 週齢に、 1×10^{10} 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 1×10^{10} 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。

(6) Ad ベクターの体内動態 (血中半減期)

BALB/c マウス雌、6 週齢に PEG 修飾 Ad-Luc を 1.5×10^{10} 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、バイオドット SF を用いて Hybond-N+ にスロットブロットし、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°C 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。

(7) Ad ベクターの体内動態 (体内分布)

Meth-A 担がんマウスに対して PBS に懸濁した未修飾 Ad-Luc、各修飾率の PEG 修飾 Ad-Luc を 10^{10} particles/100 μ l で尾静脈内より投与した。2 日後、摘出した各臓器の重量を測定し、Aprotinin (2 μ g/ml)、Leupeptine (1 μ g/ml)、PMSF (1mM) を含む PBS を用いて 25% ホモジネートを調整した。ホモジネートは 15,000rpm で 10 分間遠心分離することで不溶画分を除去した後、上清 10 μ l 中に含まれるルシフェラーゼを、Luciferase Assay System (Promega)、Microumat Plus LB96 (Perkin Elmer) を用いて測定した。活性は、relative light unit (RLU) /mg tissue として表した。

(8) 腫瘍内 Ad ベクター粒子数の特定

Meth-A 担がんマウスに対して PBS に懸濁した未修飾 Ad-Luc、各修飾率の PEG 修飾 Ad-Luc を 10^{11} particles/100 μ l で尾静脈内に投与した。投与後 6 時間および 48 時間後に腫瘍を回収し、ホモジネート後 DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出、DNA 濃度を測定した。100ng の DNA template に 10 μ M forward primer (CACCACCTCCCGGTACCATA) 4 μ l、10 μ M reverse primer (CCGCACCYGGTTTGTCTT) 4 μ l、5 μ M TaqMan probe (5' -6FAM-AACCTGCCCGCCGGCTATACACTG-TAMRA-3') 2 μ l、TaqMan Universal PCR Master Mix 25 μ l、DW で 50 μ l/reaction として、ABI PRISM 7000 (ABI) により Ad DNA の増幅反応を行った。なお standard として Adenovirus type 2 DNA (Gibco BRL) を用いて検量線を作製し、PCR 反応条件は 95°C で 10 分 Denaturation した後、95°C 15 秒、60°C 1 分のサイクルを 60 サイクル行った。

(9) 遺伝子発現部位の観察

Meth-A 担がんマウスに対して PBS に懸濁した EGFP 遺伝子搭載未修飾 Ad-EGFP、各修飾率の PEG 修飾 Ad-EGFP を 1.5×10^{11} particles 尾静脈内に投与した。2 日目に肝臓、腫瘍を回収し、4% PFA、段階希釈した Sucrose 溶液、OCT を用いて EGFP

を固定後、Cryostat により凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下 EGFP の蛍光像を観察した。

B.3 遺伝子発現抑制型 (short interfering RNA (siRNA) 発現) Ad ベクターの開発

B.3.1 発現制御型 siRNA 発現 Ad ベクターシステムの開発

(1) shRNA (short hairpin RNA) 発現シャトルプラスミドおよび Ad ベクターの作製

H1 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -ccatggaattcgaacgctgacgtc-3' および 5' -gcaagcttagatctgtgtctcatcacagaactataaattccc-3' を用いてヒトゲノム DNA よりクローニングし、PCR 産物を pHM5 シャトルプラスミドの EcoRI/BamHI 部位に挿入して pHM5-H1 を得た。テトラサイクリン・オペレーター配列を有した H1 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -tttgccagaattcgaacgctgacgtcatcaaccgcg-3' および 5' -ttggaagatctctatcactgatagggaactataagattccaaatccaaagacatttcacgtttatg-3' (下線はテトラサイクリン・オペレーター配列) を用いて pHM5-H1 からクローニングし、PCR 産物を pHM5-H1 の EcoRI/BglII 部位に挿入して pHM5-H1tet0 を得た。pHM5-H1 および pHM5-H1tet0 は各プラスミドの BglII/XbaI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。p53 または c-MYC に対する shRNA 標的配列を挿入するため、p53 (5' -gatccccgactccagtggtaatctacttcaagagagt agattaccactggagtcttttttgaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaaagactccagtggtaatctactctcttgaa gtagattaccactggagtctggg-3'、下線はループ配列) または c-MYC (5' -gatccccgatgaggaagaaatcgatgttcaagagacatcgatt tcttcctcatcttttttgaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaaagatgaggaagaaatcgatgtctcttgaa catcgatttcttcctcatcgagg-3'、下線はループ配列) に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリング

を行い、pHM5-H1 および pHM5-H1tet0 の BglII/XbaI 部位へ挿入することにより、pHM5-H1-p53、pHM5-H1-Myc、pHM5-H1tet0-p53 および pHM5-H1tet0-Myc を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

Ad ベクターは improved in vitro ライゲーション法で作製した。即ち、pHM5-H1-p53、pHM5-H1-Myc、pHM5-H1tet0-p53 および pHM5-H1tet0-Myc を I-CeuI および PI-SceI で切断し、I-CeuI/PI-SceI で切断した pAdHM15-RGD と各々ライゲーションした。作製したプラスミドを PacI で切断し、SuperFect (キアゲンより入手) 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、ウイルス (Ad-H1-p53、Ad-H1-Myc、Ad-H1tet0-p53 および Ad-H1tet0-Myc) を得た。H1 プロモーターまたは H1tet0 プロモーター配列のみ有した Ad ベクターも同様に調製した。テトラサイクリンレプレッサー (tetR) 発現 Ad ベクター (Ad-TR) は improved in vitro ライゲーション法に基づき、CMV プロモーターにドライブされた tetR 発現単位を E1 欠損領域に挿入して作製した。また、E1 欠損領域に外来遺伝子を含まない Ad-null も同様に作製した。ベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% glycerol からなる溶液で透析し、-70℃で保存した。Ad ベクターの物理学的 (particle titer) タイターは吸光度測定法により、生物学的 (PFU: plaque-forming unit) タイターは End-point dilution 法により測定した。PFU と particle titer の比は各々、Ad-H1-p53 は 1:56、Ad-H1-Myc は 1:58、Ad-H1tet0-p53 は 1:56、Ad-H1tet0-Myc は 1:65、Ad-TR は 1:24、Ad-null は 1:57 であった。

(2) 細胞培養

A549 細胞は 10% FCS を含む F12-K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification) medium で培

養した。HepG2 細胞は 10% FCS を含む minimum essential medium (MEM) で培養した。

(3) 培養細胞への遺伝子導入

A549 および HepG2 細胞を 12 穴プレートに 2×10^5 cells/well で播種し、翌日各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。その後、種々の濃度のドキソサイクリン (クロンテックより入手) 存在下で細胞を培養した。テトラサイクリン制御遺伝子発現システムの為に最適化されたテトラサイクリン不含 Tet-system-proved FCS (クロンテックより入手) を使用した。

(4) p53 および c-MYC タンパク質のウェスタンブロット法による検出

細胞抽出液はプロテアーゼ阻害剤 (シグマより入手) を含む細胞溶解液 (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) を用いて調製した。タンパク質量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして Bio-Rad assay kit (バイオラッドより入手) を用いて測定した。サンプル (10 μ g) を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件下、SDS-PAGE を行った後、イモビロン P フィルター (ミリポアより入手) に転写した。ブロックエース (大日本製薬より入手) にてブロッキング後、1 次抗体として抗 p53 抗体 (サンタクルズより入手)、抗 c-MYC 抗体 (サンタクルズより入手) または抗アクチン抗体 (Oncogene Research Products より入手)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体または IgM 抗体を反応させた。フィルターを ECL Western blotting detection system (アマシヤルバイオサイエンスより入手) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム製) により検出し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム製) を用いて定量した。

(5) p53 および c-MYC siRNA のノーザンブロット

法による検出

トータル RNA は ISOGEN (ニッポンジーンより入手) を用いて抽出した。p53 および c-MYC siRNA 発現量を検討するため、ホルムアミドにより変性したトータル RNA (20 μ g) を 7M 尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した後、Hybond-N+膜 (アマシヤルバイオサイエンスより入手) に転写した。サンプルのバラつきはエチジウムブロミド染色により確認・補正した。ハイブリダイゼーションは Rapid-Hyb バッファー (アマシヤルバイオサイエンスより入手) を用いて行った。プローブとして標的配列のアンチセンス鎖のオリゴ DNA (19 bp) を MEGALABEL DNA 5' -End Labelling キット (タカラより入手) を用いて標識した。シグナルは BAS-2500 (フジフィルム製) を用いて検出した。

B.4 35 型 Ad ベクターの特性評価

B.4.1 35 型アデノウイルスベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

(1) in vitro ライゲーション法による 35 型 Ad ベクターの作製

簡便な in vitro ライゲーション法により 35 型 Ad ベクターを作製するため、ベクタープラスミド pAdMS2, 3, 4 を作製した。即ち、まず自己複製不能とするため、35 型 Ad ゲノムの E1 領域 368~3374 塩基を取り除き、ユニークな制限酵素部位である I-CeuI、SwaI、PI-SceI 部位を導入した。さらに搭載可能な遺伝子サイズを増大させるため、E3 領域 27761~29731 塩基を取り除き、ユニークな制限酵素部位である SfiI 部位を導入した。pAdMS2 および pAdMS4 は約 3Kb の E1 欠損領域を、pAdMS3 および pAdMS4 は約 2Kb の E3 欠損領域を有している (Fig. 56)。

次に各種プロモーターを有したシャトルプラスミドは、CMV プロモーターを有したシャトルプラスミドである pHCMV5 の CMV プロモーター部分を、the human elongation factor 1 α promoter (EF1 α プロモーター)、the CMV immediate-early

l gene enhancer/ β -actin promoter with β -actin intron (CA プロモーター)、CMV promoter/enhancer with the largest intron of CMV (intron A) (CMV β プロモーター)、the mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK プロモーター)、the murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTR) promoter (MSCV プロモーター)に入れ換えることにより作製した。これらの各種プロモーター下 Enhanced Green Fluorescence protein (GFP)遺伝子を有した GFP 発現カセットをベクタープラスミド pAdMS4 の E1 欠損領域に挿入することで、各種プロモーターを搭載したベクタープラスミドを得た。さらにこれらのベクタープラスミドを SbfI で消化した後、5 型 AdE4 タンパク質発現 293 細胞にトランスフェクションし、CPE (細胞変性効果) が起こるまで培養することで 35 型 Ad ベクターを得た。CPE 確認後、5 型 AdE4 蛋白質発現 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製し、5 型 Ad ベクターと同様に塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% Glycerol からなる溶液で透析した。

(2) ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験

ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞 (Biowhittaker より入手) は、解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3: 20 ng/ml, human IL-6: 20 ng/ml) に懸濁し、1~5 x 10⁴ cells/well となるよう、48 穴プレートもしくは 96 穴プレートに播種した。解凍 12~18 時間後、同じくサイトカイン入り培地で調製した GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。その後、細胞を回収・遠心して 35 型 Ad ベクターを取り除いた後、再び細胞を培地に懸濁し培養した。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーター (FACSCalibur flow cytometer、Becton

Dickinson) にて解析した。CD34 陽性 CD38 陰性細胞及び CD34 陽性 AC133 陰性細胞への遺伝子導入実験においては、CD34 陽性細胞を解凍後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD38 抗体もしくは phycoerythrin (PE) 標識された抗ヒト AC133 抗体を含む staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、FACS Vantage SE (Becton Dickinson) を用いて CD38 陰性画分および AC133 陽性画分を回収した。その後、上述と同様に遺伝子導入実験に用いた。

(3) フローサイトメーターを用いた CD46 (membrane cofactor protein) の発現解析

CD34 陽性細胞を staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、FITC 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen より入手) を添加して、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄したのち、フローサイトメーターで解析した。また、遺伝子導入効率と CD46 の発現レベルの同時解析においては、GFP 発現 35 型 Ad ベクターで処理した細胞を staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、抗ヒト CD46 抗体 (E4.3) を添加して、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、PE 標識抗マウス IgG 抗体を含む staining buffer に再懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、staining buffer に再懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

(4) 定量的 Real-time PCR によるベクターゲノム量の解析

細胞に感染したベクター量を Real-time PCR を用いて解析した。即ち、上述の遺伝子導入実験において 35 型 Ad ベクターを感染させた細胞を FACS Vantage SE (Becton Dickinson) を用いて GFP 陽性画分及び GFP 陰性画分に分離回収した。回収した各画分の純度は 90% 以上であることを確認した。各画分より、ベクター DNA を含めた全ての DNA を Tissue DNeasy Kit (キアゲン社より入手)

を用いて回収した。定量的 Real-time PCR は、2.5ng sample DNA, 0.5 μ M プライマー, 0.16 μ M TaqMan probe, 25 μ l TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems 社より入手) を含む反応液 (50 μ l) を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて、95°C 10 分間処理の後、95°C 15 秒及び 60°C 1 分間のサイクルを 50 サイクル反応させることにより行った。プライマー及びプローブは 35 型 Ad の pIX 部分に設定した。配列は以下の通りである。Forward: 5' - TGGATGGAAGACCCGTTCAA-3' , Reverse: 5' -CGTCCAAAGGTGAAGAACTTAAAGT-3' , Probe: 5' FAM-CGCCAATTCTTCAACGCTGACCTATGC-TAMRA 3' 。ヒト β -actin の定量に関しては、 β -actin control reagent (Applied Biosystems 社より入手) を用いて行った。

(5) コロニーアッセイによる遺伝子導入細胞の分化能評価

上述と同様に、35 型 Ad ベクターを感染させた細胞を FACS Vantage SE を用いて GFP 陽性画分及び GFP 陰性画分に分離回収した。各画分につき 1000 細胞をメチルセルロース入り培地 (Methocult H4444, Stemcell 社より入手) を含む 35mm dish に播種した。培養 14 日後、顕微鏡下観察し、コロニー数を数えた。

B.4.2 35 型アデノウイルスベクターによるヒト CD46 トランスジェニックマウスへの遺伝子導入

(1) 35 型アデノウイルスベクターの作製

ルシフェラーゼもしくは Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) 発現 35 型アデノウイルス (Ad) ベクターは、ベクタープラスミド pAdMS4 を用いて in vitro ライゲーション法により作製した。SbfI で消化したベクタープラスミドを 5 型 AdE4 タンパク質発現 293 細胞にトランスフェクションし、CPE が起こるまで培養した。

CPE 確認後、3 次感染までさせることにより大量調製し、5 型 Ad ベクターと同様に塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% Glycerol からなる溶液で透析した。

(2) CD46 発現 CHO 細胞の作製および遺伝子導入実験

CD46 遺伝子は、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型 DNA とし、以下の条件で増幅した。94°C 15 sec, 63°C 30 sec, 68°C 60 sec for 30 cycles. PCR プライマーは以下のものを用いた。CD46 sense:

5' -ATGGAGCCTCCCGCCGCCGCGAGTGTCCC-3' ,
CD46 antisense:
5' -CGCGGCCGCTATTTCAGCCTCTCTGCTCTGCTG-3' .

増幅した PCR 断片を精製後、pcDNA3.1/Hyg(+) (Invitrogen 社より入手) の PmeI 部位に挿入し、CD46 発現プラスミド pcDNA3.1-CD46 を得た。pcDNA3.1-CD46 を CHO 細胞にトランスフェクション後、Hygromycin 含有培地で 2 週間培養し、各クローンを得た。各クローンを fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて CD46 の発現を解析し、最も発現の高いクローンを得た。CD46 発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験では、96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で細胞を播種し、翌日ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 300、3000VP/Cell で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、培地を取り除き LT2.0 (東洋インキより入手) を加え、遺伝子発現量を解析した。

(3) マウス肝実質細胞の分離および遺伝子導入実験

CD46 トランスジェニック (TG) マウス (大阪大

学・岡部勝先生より供与) および野生型マウスより、コラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を回収した。回収した肝実質細胞は、5%FCS、1nM インスリン、1 μ g/ml aprotinin 含有 William E 培地に懸濁し、 1×10^4 cells/well でコラーゲンコートした 96 穴プレートに播種した。48 時間培養後、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 300、3000VP/Cell で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、培地を取り除き LT2.0 を加え、遺伝子発現量を解析した。

(4) マウス腹腔内マクロファージの分離および遺伝子導入実験

腹腔内マクロファージの浸潤を促すため、CD46TG マウスおよび野生型マウスに 2.9% チオグリコレート培地 1ml を腹腔内投与した。投与より 4 日後、腹腔内よりマクロファージを回収し、12 穴プレートに 2×10^5 cells/well で播種した。翌日 GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 1.5 時間作用させ、合計 48 時間培養後、細胞を回収しフローサイトメーターを用いて遺伝子発現効率を解析した。

(5) CD46TG マウスへの遺伝子導入実験

CD46TG マウスおよび野生型マウスに、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 1.5×10^{10} VP/mouse の投与量で静脈内投与、もしくは腹腔内投与した。投与より 48 時間後、マウスより各臓器を回収し遺伝子発現効率を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト初代細胞、培養細胞は、研究用の市販品、領布品を用いており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

C.1.1 間葉系幹細胞、脂肪細胞への高効率遺伝子導入

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、従来の Ad ベクター (2 型あるいは 5 型 Ad を基盤としている) による遺伝子導入には、標的細胞に Ad 受容体 (CAR : coxsackievirus-adenovirus receptor) の発現を必要とするため、CAR の発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、脂肪細胞、多くのマウス由来の細胞株など) へは Ad ベクターが適用できないことが問題となっている。主任研究者らのグループでは、このような問題を克服できるベクターとして、CAR を利用しなくても効率良く遺伝子導入できる改良型 Ad ベクターの開発を進めている。例えば、 αv インテグリンに親和性がある RGD(Arg-Gly-Asp)ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CAR を発現していない細胞に対しても αv インテグリンやヘパラン硫酸を介して効率良く遺伝子導入できるベクターやファイバー領域だけを CAR 以外の分子 (CD46) を受容体としている 35 型 Ad 由来のファイバーに置換したベクターを開発済みである。

そこでまず、遺伝子治療や再生医療 (細胞治療) で重要な細胞である間葉系幹細胞、および間葉系幹細胞から分化誘導した脂肪細胞への遺伝子導入効率を最適化することを目的に、各種改良 Ad ベクターを用いて遺伝子導入効率の改善について検討した。

用いたベクターを Table. 1 にまとめた。まず、従来型 (野生型) のファイバータンパク質を有した Ad ベクターを用いて、初代培養ヒト間葉系幹

細胞での遺伝子発現に最適なプロモーターの検索を行った (Fig. 1)。検討したプロモーターは EF1 α プロモーター、CMV プロモーター、CMVi プロモーター (CMV promoter with intron A)、CA プロモーター (β -actin promoter/CMV enhancer with a β -actin intron) である。ヒト間葉系幹細胞へ 300VP/cell で各種 Ad ベクターを作用させ、2 日間培養後の LacZ 活性を測定したところ、CA プロモーターが最も効率が良く、CMV プロモーターを用いた場合に比べて約 2 倍強の活性を示した。EF1 α プロモーターを用いた場合は、CMV プロモーターを用いた場合に比べて若干活性が弱く、CMVi プロモーターの場合は CA プロモーターと CMV プロモーターの場合の中間であった。従って、ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入に用いるプロモーターとしては、CA プロモーターが最適であり、以後の実験では CA プロモーターを用いて検討した。

次に CA プロモーターを用いた各種ファイバー改良 Ad ベクターでのヒト間葉系幹細胞での遺伝子発現について、X-gal 染色 (Fig. 2) と luminescence assay (Fig. 3) で検討した。用いたファイバー改良 Ad ベクターは、ファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチドを付与したベクター (AdRGD-CALacZ)、ファイバーノブの C 末端領域にポリリジンペプチドを付与したベクター (AdK7-CALacZ)、ファイバー領域を 35 型 Ad 由来のものに置換したベクター (AdF35-CALacZ) である (Table. 1)。従来型 Ad ベクター (Ad-CALacZ) を用いた場合、3000VP/cell の条件下で作用させても、X-gal 陽性細胞は 10% 以下と少なかった。一方、AdK7-CALacZ と AdF35-CALacZ では劇的な遺伝子発現効率の向上が認められ、1000VP/cell の条件下で 100% の細胞が X-gal 陽性となった。AdRGD-CALacZ は Ad-CALacZ に比べた場合は、発現効率の改善が認められたが、AdK7-CALacZ や AdF35-CALacZ に比べ、十分なものではなかった (Fig. 2)。300VP/cell の条件下で作用させた場合の LacZ 活性を

luminescence assay で検討した場合は、AdK7-CALacZ、AdF35-CALacZ、AdRGD-CALacZ は Ad-CALacZ に比べ、それぞれ 460、130、16 倍の活性を示した。以上の結果より、ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入には、ポリリジンタイプのファイバー改変 Ad ベクターが最適であり、100%の効率で遺伝子導入可能なことが判明した。

次に、AdK7-CALacZ で遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞での遺伝子発現期間について検討した (Fig. 4)。ベクターを作用させた細胞は、継代を行うことなく、培養した。なお、実験期間中に細胞は過増殖のために死滅することなく、接触阻害を起こして、安定に維持することが可能であった。ベクター作用後、2、5、12、20、33 日後に LacZ 活性を測定したところ、細胞タンパク質量あたりの LacZ 活性は、5 日目に最大を示したが、33 日後まで最大活性 (5 日目) の約 1/2 の活性を維持しており、長期の遺伝子発現を示すことが明らかとなった。

従来型 Ad ベクターによるヒト間葉系幹細胞への遺伝子発現効率が悪い原因について明らかにするため、ヒト間葉系幹細胞における CAR、および CD46 (35 型 Ad の受容体) の発現をフローサイトメーターで確認した (Fig. 5)。その結果、CAR の発現はほとんど全く認められないこと、逆に CD46 はほぼ 100%の細胞が発現していることが判明した。この結果は、従来型 Ad ベクターより遺伝子発現効率が低く、35 型 Ad のファイバーを有したベクターで発現効率が高いことと相関しており、受容体の発現レベルで Ad ベクターによるヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入効率の違いが説明できることが明らかとなった。

次に、脂肪細胞分化研究などに汎用されているマウス 3T3-L1 細胞への遺伝子導入について検討した。3T3-L1 細胞は遺伝子導入が困難な細胞として知られており、効率の良い遺伝子導入法の開発が切望されている。3T3-L1 細胞は脂肪前駆細胞の性質を示し、分化培地で培養すると、成熟した脂肪細胞に分化することが知られている。まず、

3T3-L1 脂肪前駆細胞への遺伝子導入について検討した (Fig. 6)。3000 あるいは 10000VP/cell の条件下で各種 Ad ベクターを作用させたところ、従来の Ad ベクターである Ad-CALacZ ではわずかの X-gal 陽性細胞しか認められなかった。一方、AdK7-CALacZ では劇的な発現効率の改善が認められ、10000VP/cell では 90%以上の遺伝子発現効率を示した。AdRGD-CALacZ でも若干の発現効率の上昇が認められたが、AdK7-CALacZ に比べると非効率的であった。AdF35-CALacZ は Ad-CALacZ と同程度の発現効率しか示さなかった。

そこで次に 3T3-L1 脂肪細胞について同様の検討を行った (Fig. 7)。分化培地で培養した 3T3-L1 細胞が脂肪細胞に分化していることは、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 (data not shown)。3T3-L1 脂肪細胞の場合は、従来の Ad ベクターである Ad-CALacZ では全く X-gal 陽性細胞が認められなかったが、脂肪前駆細胞の場合と同様に、AdK7-CALacZ では劇的な発現効率の改善が認められた。AdRGD-CALacZ でも発現効率の上昇が認められたが、AdK7-CALacZ に比較すると弱かった。AdF35-CALacZ はあまり効果がなかった。3T3-L1 脂肪前駆細胞、および脂肪細胞での CAR の発現を RT-PCR 法で確認したところ、両細胞とも negative であり、従来の Ad ベクターによる低い遺伝子導入効率は、CAR の発現レベルが低いためであることが明らかとなった (Fig. 8)。以上の結果より、ポリリジンタイプのファイバー改変 Ad ベクターが 3T3-L1 脂肪前駆細胞、脂肪細胞への遺伝子導入に最適であることが判明した。

C. 1. 2 ES 細胞への高効率遺伝子導入

ES 細胞 (embryonic stem cells; 胚性幹細胞) は 無限増殖能と分化多能性を有する細胞であり、1981 年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、マウス ES 細胞は遺伝子欠損マウス作成のための発生工学的材料として広く利用されてき

たが、1998 年にはヒト胚からも ES 細胞が樹立され、再生医療への応用が期待されている。ES 細胞を目的の細胞に分化させるには、通常時は未分化のまま維持し、適宜何らかの刺激を与えて分化させることが必要である。マウス ES 細胞は分化を抑制するサイトカイン LIF (leukemia inhibitory factor) を加えることにより未分化状態を維持できることが知られているが、その作用機構については不明な点が多い。さらに、未分化 ES 細胞から目的の細胞に分化させる技術についても試行錯誤の状態が続いている。これらの原因のひとつとして、ES 細胞への遺伝子導入技術が確立されていないため、ES 細胞への外来遺伝子導入による機能解析研究が行えないことが考えられている。

マウス ES 細胞への遺伝子導入には、プラスミドを用いたリポフェクションを用い、導入遺伝子が染色体に組み込まれたわずかの細胞を薬剤耐性遺伝子を用いて選択する方法が汎用されている。また、ポリオーマの large T 抗原を発現させた ES 細胞の場合には、ポリオーマの複製起点をプラスミドに付与することでプラスミドが染色体外で複製し、遺伝子導入細胞を効率良く選択することが可能となる。これらは ES 細胞が細胞株であることを利用した外来遺伝子発現法であるが、これらの遺伝子導入系では細胞分化の後も遺伝子発現が続くことによる問題点を伴う。アデノウイルスベクターは、導入遺伝子が染色体外でエピゾーマルに存在し自律複製することはないため、一過性の遺伝子発現を示し、接着系細胞をはじめとする多くの細胞種に対して効率良く遺伝子導入できることが知られている。

そこで本研究では、ES 細胞への効率良い外来遺伝子導入実験系を開発し、それを用いて再生医療へ向けた ES 細胞の分化誘導系を確立することを目的として、ES 細胞への適用に最適な Ad ベクターを開発を行った。

プロモーターの異なる LacZ 発現 Ad ベクター Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、

Ad-EF-LacZ を作製し、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞に各種ベクターを作用させた (3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間)。その結果、Ad-RSV-LacZ および Ad-CMV-LacZ を用いたときはほとんど LacZ 陽性細胞が認められなかったのに対し、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いたときは高頻度で LacZ 陽性細胞が認められた (Fig. 9A-9D)。また、Ad-CA-LacZ を用いたときはフィーダー細胞と mES 細胞両者に遺伝子導入されたのに対し、Ad-EF-LacZ を用いたときはフィーダー細胞にはほとんど発現が見られず、mES 細胞特異的に遺伝子発現が認められた (Fig. 9C および 9D)。次に、フィーダー細胞非存在下の mES 細胞への遺伝子導入を調べた結果、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いた場合のみ、高い LacZ の発現が得られた (Fig. 9E-1H)。以上より、CA プロモーターあるいは EF-1 α プロモーターを用いることにより、mES 細胞に効率よく遺伝子発現させることができ、特に EF-1 α プロモーターは ES 細胞特異的に遺伝子発現させることが判明した。

次に、mES 細胞における CAR の発現を RT-PCR 法 およびウエスタンブロッティング法により検討した (Fig. 10A および 10B)。その結果、フィーダー細胞では CAR の発現は認められなかったが、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞では CAR が高発現していることが明らかとなった。また、用いた mES 細胞には未分化 ES 細胞のマーカーである Oct-3/4 も高発現していることを確認した (Fig. 10A)。

次に、ES 細胞での更なる遺伝子発現の上昇が可能かどうかを検討するため、種々のファイバー改変 Ad ベクター (AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ) を作製した。従来型の Ad ベクターを含めたこれら 4 種の Ad ベクターのうち、Ad-EF-LacZ が最も高効率かつ特異的に mES 細胞に LacZ を発現させることが可能であった (Fig. 11)。AdRGD-EF-LacZ および AdK7-EF-LacZ は mES 細胞よりもむしろフィーダー細胞に LacZ

胞が認められ、AdF35-EF-LacZ を用いたときは両細胞にわずかに LacZ 陽性細胞が認められたのみであった。

以上の結果より、野生型のファイバーを有し、EF-1 α プロモーターを用いた Ad ベクターが mES 細胞への遺伝子導入には最適であることが明らかとなった。

C.1.3 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

胎盤は、母体-胎児間の物質透過障壁としての機能ばかりでなく、胎児の内分泌器官、代謝器官、排泄器官などの機能をも有している多機能臓器である。この多機能性故、妊婦に対する薬物治療は経世代的に重篤な副作用を引き起こす可能性が拭い切れず、妊婦に対する薬物治療の最適化に関する研究は殆ど進展していない。最近になって、ペプチドトランスポーター、薬物排出ポンプ、葉酸トランスポーター、亜鉛トランスポーターが胎盤に存在している報告が相次ぎ、胎盤における薬物輸送担体の発現に関する知見が徐々に集積しつつある。しかしながら、未だこれらの薬物輸送担体の機能に関する実証的解析は進展していない。この要因としては、

- (1) 倫理的配慮からヒト胎盤組織を検体試料とすることが困難な点
- (2) 胎盤機能評価に使用可能な培養細胞が少ない点
- (3) 遺伝子工学的な実験手法が確立されていない点
- (4) 実験動物において胎盤への効率的遺伝子導入方法がない点

などが挙げられる。

昨今のポストゲノム時代を考慮すると、この中でも *in vitro* および *in vivo* での胎盤細胞への効率的遺伝子導入方法の確立が重要な課題であると言える。現在の所、胎盤細胞への遺伝子導入ベクターとしては、カチオニック脂質の他、レトロウイルス、アデノウイルス (Ad)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レンチウイルス、単純ヘルペス

ウイルス (HSV) 等のウイルスベクターなどが利用されてきている。一般的に、Ad ベクターは濃縮等の利便性に優れ、高い遺伝子導入効率を有していると言われているが、胎盤細胞への遺伝子導入については単純ヘルペスウイルス等と同程度の活性しか示していない。このことは、胎盤細胞表面上に存在する各ベクターの受容体分子の発現量の相違に起因していると考えられている。実際、ある種の胎盤細胞において Ad ベクターの細胞表面上の受容体分子である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現量が低下することが知られている。さらに、ヘパラン硫酸やインテグリンをリガンド分子とする AAV ベクターがある種の胎盤細胞に対して高い導入活性を有することが報告されている。これらの結果は、ヘパラン硫酸やインテグリン指向性の Ad ベクターを用いることにより、ベクター作製の簡便性やベクターの濃縮能といった Ad ベクターの特徴を最大限に利用した胎盤細胞への効率的な遺伝子導入の可能性を示唆している。そこで本研究では、各種ファイバー改変型 Ad ベクターを用いてヒトおよびラット胎盤細胞モデルに対する遺伝子導入効率を検討した。

各種ヒト胎盤由来細胞株での CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin の発現を RT-PCR 法により検討した結果、細胞間においてその発現様式に相違が観察された。JAR 細胞ではいずれの発現も観察されていたが、JEG-3 細胞では $\beta 3$ integrin の発現、BeWo 細胞では $\alpha v \beta 5$ integrin の発現がそれぞれ認められなかった (Fig. 12)。これらヒト由来胎盤細胞株への各種 Ad ベクターの遺伝子導入活性を比較したところ、CAR の発現の高い JAR、JEG-3 細胞では Ad-L2 においても高いルシフェラーゼ活性が認められたが、CAR の発現の低い BeWo 細胞では Ad-L2 によるルシフェラーゼ活性は低い値にとどまっていた (Fig. 13)。ファイバー改変型 Ad ベクターを用いることですべての細胞において Ad-L2 以上の高いルシフェラーゼ活性が認められ、Ad-RGD(HI)-L2 で最も高い値を示した。

Ad-RGD(HI)-L2 は Ad-L2 に比べ JAR 細胞で約 14 倍、JEG-3 細胞で約 8 倍、BeWo 細胞において約 76 倍の高いルシフェラーゼ活性を示した。Ad-K7(C)-L2、Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 では Ad-L2 に比べそれぞれ約 1.5-10 倍または約 4-10 倍のルシフェラーゼ活性を示した。

各ラット由来胎盤細胞株での CAR、integrin (α v、 β 3、 β 5) の mRNA 発現を RT-PCR 法により測定した結果、CAR、integrin (α v、 β 3、 β 5) の発現はすべてのラット由来胎盤細胞株で認められた (Fig. 14)。これらのラット由来胎盤細胞株への遺伝子導入活性を検討したところ、いずれのラット由来胎盤細胞株においても Ad-L2 によるルシフェラーゼ活性が認められた。Ad-RGD(HI)-L2 では Ad-L2 に比べ 5-20 倍の高いルシフェラーゼ活性が認められた。一方、Ad-K7(C)-L2 は Ad-L2 に比べ同等または 2 分の 1 程度の低いルシフェラーゼ活性しか認められなかった。Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 では、Ad-L2 に比べ 1.5-4 倍のルシフェラーゼ活性が認められ、Ad-RGD(HI)-L2 が最も高い遺伝子導入活性を持つことが示された (Fig. 15)。

C.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

癌に対する三大標準療法（外科療法、化学療法、放射線療法）の技術的発展には目を見張るものがあるが、それでもなお癌の転移および再発は多くの患者を苦しめており、2004 年の癌死亡者数 (32 万 1000 人) は総死亡者数の約 30%にも達している。これは従来の療法による集学的な治療だけでは癌治癒率の向上に限界があることを示唆するとともに、遺伝子治療や免疫療法といった新たな概念に基づく癌治療戦略の確立とその臨床応用実現が急務であることを痛感させる。このような現状の中、獲得免疫応答・自然免疫応答の両者を制御する樹状細胞 (dendritic cell; DC) をワクチン担体として利用する免疫療法が有望な次

世代癌治療法として注目を集めており、腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) を標的とした癌の免疫学的抑圧に向けて多くの研究機関で精力的に研究されている。しかし、一部のプロトコルで進められている臨床研究においては、TAA 特異的免疫応答の惹起はできるものの十分な治療効果の発揮までには至っておらず、DC 免疫療法の有効性改善に繋がる新たな方法論の確立が望まれている。

生体内において DC は、未熟な状態で末梢組織に広く分布しており、侵入してきた抗原を旺盛な貪食能によって取り込むとともに、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 分子上に提示できるペプチドにまでプロセッシングする。この抗原刺激や炎症反応に伴って DC は分化成熟し、輸入リンパ管を経て所属リンパ組織へと遊走した後、T 細胞に抗原を提示して一連の初期免疫応答を誘導する。すなわち DC 免疫療法においては、患者に投与した TAA 導入 DC のリンパ組織集積性が治療効果を規定する要因の一つとして考えられる。しかし現在の DC 免疫療法では、投与部位からリンパ組織に移行させるための最適な DC コンディショニングに関する情報が不足しているため、投与 DC のうちリンパ組織に集積するものはわずか 0.1~1%程度とされている。したがって、生体に投与する DC ワクチンに高いリンパ組織移行能を付与することができれば、リンパ組織における免疫エフェクター細胞の活性化を増強することが可能であり、延いては DC 免疫療法の有効性の飛躍的な改善に結びつくことが期待される。

近年の免疫学および分子生物学の著しい進展に伴い、免疫系を構築する細胞や分子の情報ネットワークが詳細に解明されつつあり、白血球の局所への遊走・浸潤を制御するケモカインおよびケモカインレセプターの遺伝子レベルでの同定や機能解析に関する知見が相次いで報告されている。Gunn らは、CC chemokine ligand-21 (CCL21) の発現に欠損がある *plt/plt* マウスにおいて、DC

の二次リンパ組織への遊走が阻害されることを報告した (*J. Exp. Med.* 189, 447-450, 1999)。また Förster らは、CC chemokine receptor-7 (CCR7) ノックアウトマウスにおいても同様に、DC の二次リンパ組織への遊走阻害が起こることを報告している (*Cell* 99, 23-33, 1999)。これらの研究によって現在では、成熟に伴って DC に発現誘導される 7 回膜貫通 G タンパク質共役型レセプターの CCR7 と、リンパ組織やリンパ管から構成的に産生・分泌されている CCL21 との連関が、DC の末梢組織からリンパ組織への遊走制御において中心的な役割を果たすというコンセンサスが得られている。したがって、TAA 導入とともに CCR7 を十分に発現させた DC ワクチンは、生体に投与した後に積極的にリンパ組織へと移行して免疫系を効率良く活性化できることが強く予測され、この“リンパ組織指向性 DC”とも言うべき新たなワクチン担体の創製手段として DC への CCR7 遺伝子導入が挙げられる。

しかし、従来の遺伝子導入法では DC への遺伝子導入効率は極めて低く、広範な種類の細胞・組織に最も効率良く遺伝子導入可能とされるアデノウイルス (Ad) ベクターを用いてさえ、DC に十分な遺伝子発現を達成するためには、細胞毒性を発現する高用量のベクター適用が余儀なくされてきた。この点に関して我々の研究グループは、新規 RGD ファイバーミュータント Ad ベクター (AdRGD) を応用することによって、DC への極めて効率の良い遺伝子導入システムの構築に成功しており (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 173-179, 2001; *Cancer Gene Ther.* 10, 421-431, 2003)、AdRGD により TAA 遺伝子を導入した DC をマウスに免疫することで、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の活性化に基づく強力な抗腫瘍効果が誘導されることを明らかとしてきた (*Cancer Res.* 61, 7913-7919, 2001; *Gene Ther.* 10, 1891-1902, 2003)。これらの研究成果は、AdRGD が DC への抗原遺伝子送達において非常に有用であることを

示すと同時に、AdRGD の DC への遺伝子導入効率における優位性を活かすことによって、DC の免疫学的機能を遺伝子修飾的に増強できるのではないかという新たな可能性を切り拓いた。

そこで本研究では、リンパ組織集積性を増強した DC ワクチンの創製を目的に、まず CCR7 遺伝子を搭載した AdRGD (AdRGD-CCR7) を作製し、本ベクターにより遺伝子導入したマウス骨髄由来 DC の免疫学的特性ならびにワクチン機能の解析を行った。

(1) AdRGD-CCR7 の構築と DC への遺伝子導入条件の最適化

本研究ではまず、マウス CCR7 遺伝子を搭載した AdRGD (AdRGD-CCR7) を新たに構築し、本ベクターにより遺伝子導入した DC (CCR7/DC) の viability および CCR7 遺伝子発現レベルを指標に CCR7/DC 調製条件の最適化を試みた。

AdRGD-CCR7 を種々の MOI で DC に適用した際の細胞傷害性を検討したところ、200 MOI のベクター用量では DC の生存率にわずかな低下が認められたが、100 MOI 以下の用量では DC への傷害性は全く観察されなかった (Fig. 16)。また、AdRGD-CCR7 と AdRGD-gp100 とを 25 MOI ずつ併用した DC においても、生存率は遺伝子導入していない DC と同等であった。そこで、細胞傷害性を示さない 100 MOI 以下で AdRGD-CCR7 を適用した DC において、CCR7 遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR 解析により評価した。LPS により成熟刺激を与えた DC (LPS/DC) およびコントロールベクターである AdRGD-Luc を 50 MOI で適用した DC (Luc/DC) においては、未熟な DC (Mock DC) と比較して CCR7 mRNA レベルに若干の上昇が認められたに過ぎなかったが、50 MOI の AdRGD-CCR7 を用いて遺伝子導入した CCR7/DC においては、Mock DC の 2 倍以上高い CCR7 mRNA 発現レベルが検出された (Fig. 17A)。したがって、新たに作製した AdRGD-CCR7 は、目的とする CCR7 遺伝子を DC に効率良く導入できる機能的なベクターであるこ

とが確認された。さらに、種々の用量の AdRGD-CCR7 で調製した CCR7/DC の経時的な CCR7 遺伝子発現変化を検討したところ、CCR7/DC は適用した AdRGD-CCR7 の用量に依存した CCR7 mRNA 発現レベルの増大を示し、遺伝子導入後 24 時間培養した CCR7/DC において最も高値を示すことが判明した (Fig. 17B)。また、AdRGD-CCR7 を 50 MOI で適用した DC の 24 時間培養後における CCR7 タンパク発現レベルを flow cytometry により解析したところ、LPS/DC および Luc/DC の CCR7 発現は Mock DC と同等の低いレベルであったのに対して、CCR7/DC においては 90%以上の細胞で豊富な CCR7 発現が認められた (Fig. 18)。

そこで、これら CCR7/DC の細胞表面上に発現した CCR7 タンパクの生物学的機能を確認する目的で、CCR7/DC の CCL21 に対する遊走能を *in vitro* chemotaxis assay により評価した。50 MOI の AdRGD-CCR7 により遺伝子導入して 24 時間培養した CCR7/DC の遊走活性は CCL21 濃度依存的に増大し、Luc/DC、LPS/DC、および Mock DC と比較して顕著な増強が認められた (Fig. 19A)。本結果は、CCR7/DC 表面には CCL21 に応答して DC の遊走を促進するという本来の機能を持った CCR7 タンパクが発現していることを示しており、AdRGD によるケモカインレセプター遺伝子の導入によって DC のケモカイン応答性を修飾できることが実証された。さらに、CCR7/DC の調製条件と CCL21 に対する遊走活性の関係を検討したところ、Fig. 17B の RT-PCR 解析の結果を反映して、遺伝子導入に使用した AdRGD-CCR7 の用量増加に伴った遊走活性の亢進が認められた (Fig. 19B)。また、50 MOI 以上の用量で AdRGD-CCR7 を適用した際には、24 時間あるいは 48 時間培養した CCR7/DC の間に CCL21 に対する遊走活性の明らかな差を認めなかったが、比較的低い MOI で AdRGD-CCR7 を適用した場合には、24 時間培養の CCR7/DC のほうが 48 時間培養 CCR7/DC よりも高い遊走能を示した。

以上の結果をまとめると、AdRGD-CCR7 は DC に

効率良く CCR7 遺伝子を導入できるベクターであり、調製した CCR7/DC 表面上には生物活性を保持した CCR7 タンパクが発現していることが確認された。また、CCL21 に対する高い遊走活性を有する CCR7/DC の調製には、遺伝子導入後 24 時間培養することが適切であると判断された。

(2) CCR7/DC の免疫学的表現型および機能

AdRGD-CCR7 を用いた遺伝子導入が DC の本来的な抗原提示細胞としての機能に与える影響を検討するために、CCR7/DC の抗原食能、MHC 分子/共刺激分子発現レベル、および T 細胞増殖刺激能を解析した。

まず、FITC-dextran の細胞内取り込み活性を指標に 50 MOI の AdRGD-CCR7 で調製した CCR7/DC の抗原食能を評価した (Fig. 20)。未熟 DC (Mock DC) では 37°C において FITC-dextran の旺盛な細胞内取り込みが認められ、4°C においては取り込み活性の著しい低下が観察されたことから、FITC-dextran はエンドサイトーシス経路によって DC に食食されることが示された。成熟 DC である LPS/DC の抗原食能は Mock DC と比較して明らかに低下していたが、CCR7/DC および Luc/DC においては培養 24 時間後および 48 時間後のいずれにおいても Mock DC と比較してわずかな低下を認めるのみであった。

次に、DC による T 細胞への抗原提示・感作・活性化に不可欠な MHC 分子/共刺激分子の発現レベルを flow cytometry により解析した (Fig. 21)。CCR7/DC では Mock DC と比較して、培養 24 時間後および 48 時間後のいずれにおいても、検討した全てのマーカー分子の発現レベルが増強しており、特に CD40 分子と CD86 分子に大幅な発現増強が認められた。また CCR7/DC の各表面マーカー分子の発現レベルは、Luc/DC および LPS/DC に類似したパターンを示した。さらに、CCR7/DC を allogenic T 細胞と共培養したところ、CCR7/DC は Mock DC と比較して T 細胞増殖をより強力に刺激することが可能であり、responder/stimulator

ratio = 5 における CCR7/DC の T 細胞増殖刺激能は LPS/DC に匹敵するレベルであった (Fig. 22)。

これらの結果は、AdRGD-CCR7 による DC への遺伝子導入が抗原提示細胞としての機能を喪失させることなく、むしろ CCR7/DC は抗原食能を保持しつつ、強力な T 細胞活性化能を有する有用なワクチン担体として機能することが示唆された。

(3) CCR7/DC のリンパ組織集積性

CCR7 遺伝子導入による DC のリンパ組織移行性改善を検討するために、EGFP-Tg マウス由来の DC から調製した CCR7/DC、Luc/DC あるいは Mock DC を野生型 C57BL/6 マウスの側腹部皮内に投与し、48 時間後における所属リンパ節（鼠径部リンパ節）への集積性を比較した (Fig. 23)。Luc/DC を投与したマウスのリンパ節においては、Mock DC 投与群と比較して約 2 倍高い EGFP 陽性 DC 数が検出され、これは Fig. 17A および Fig. 18 で示した Luc/DC における若干の CCR7 発現レベルの上昇、Fig. 19A で示した CCL21 に対するわずかな遊走活性亢進、ならびに Fig. 5-7 で示した Luc/DC の成熟傾向を反映した結果であると考えられた。この Luc/DC 投与群と比較して、CCR7/DC 投与群では約 5 倍高いリンパ節への DC 集積が認められたことから、CCR7/DC は *in vivo* において非常に優れたリンパ組織移行性を発揮できることが判明した。データには示していないが、CCR7/DC を投与した反対側の鼠径部リンパ節には EGFP 陽性 DC が検出されなかったこと、また反対側のリンパ節と比較して CCR7/DC を投与した側のリンパ節は肉眼的に明らかに大きく、調製できたリンパ節細胞数も顕著に多いことを考え合わせると、CCR7/DC を投与した所属リンパ節内には遊走してきた DC をはじめ T 細胞など免疫担当細胞が集積して活性化状態になっていることが推察された。したがって、CCR7/DC の優れたリンパ組織集積性は、所属リンパ節における効率の良い免疫エフェクター細胞の活性化と全身への迅速なエフェクター細胞の供給という面で、ワクチン担体としての非常に優

れた利点になると考えられる。

(4) CCR7/DC のワクチン機能

上記の検討により、CCR7/DC は優れたリンパ組織移行能を有する抗原提示細胞であり、癌免疫療法におけるワクチン担体として非常に有望であることが示唆された。そこで、CCR7 遺伝子と抗原遺伝子とを共導入した DC のワクチン機能を評価するために、*in vitro* における MHC class I 分子を介した抗原提示能および *in vivo* における抗腫瘍効果ならびに抗原特異的免疫応答誘導能について解析した。

まず、OVA 遺伝子を共導入した CCR7/DC における MHC class I 分子を介した OVA ペプチド提示能を CD8-OVA 1.3 細胞を用いた bioassay により検討した (Fig. 24)。AdRGD-OVA と AdRGD-CCR7 を 25 MOI ずつ併用した DC においては、25 MOI の AdRGD-OVA 単独で遺伝子導入した DC と同等の OVA ペプチド提示レベルが認められ、CCR7 遺伝子導入が同時に発現する内在性抗原 (OVA) の MHC class I 抗原提示経路に影響を与えないことが示された。一方、AdRGD-OVA と AdRGD-Luc を併用した DC においては、明らかな OVA ペプチド提示レベルの低下が観察され、CCR7 のような細胞膜局在型レセプターとルシフェラーゼのような細胞質内に蓄積するタンパクとで、共導入した内在性抗原の DC によるプロセッシング・提示に異なる作用を示す可能性が示唆された。

次に、gp100 (メラノーマ関連抗原) 遺伝子と CCR7 遺伝子とを共導入した DC を調製し、これをワクチン接種した際の抗腫瘍効果をマウス B16BL6 メラノーマモデルにおいて検討した (Fig. 25)。Mock DC あるいは CCR7 遺伝子のみを導入した DC (CCR7/DC) を 5×10^5 cells/mouse で免疫した群と比較して、gp100 遺伝子のみを導入した DC (gp100/DC) を免疫したマウスにおいては、我々の以前の報告 (*Gene Ther.* 10, 1891-1902, 2003) と同様に攻撃接種した B16BL6 腫瘍の顕著な増殖遅延が誘導された。またその抗

腫瘍効果は、ワクチン接種した gp100/DC 数に依存して増大した。一方、CCR7 遺伝子と gp100 遺伝子を共導入した DC (gp100+CCR7/DC) を 2×10^5 cells/mouse で免疫した群においては、 5×10^5 の gp100/DC を免疫したマウスと同等の抗腫瘍効果が観察され、さらに 5×10^5 cells/mouse での gp100+CCR7/DC ワクチン投与は、より強力に B16BL6 腫瘍の生長を抑制することができた。そこで、これらの遺伝子導入 DC を投与したマウスにおける免疫応答を解析したところ、gp100+CCR7/DC を投与したマウスの脾細胞中には gp100/DC 投与群を上回る B16BL6 特異的 CTL 活性が検出され (Fig. 26A)、さらに B16BL6 細胞を特異的に認識して IFN- γ を産生・分泌する活性化 T 細胞数も明らかに増大していた (Fig. 26B)。

これらの結果は、DC 免疫療法に TAA 遺伝子と CCR7 遺伝子を共導入した DC を応用することで、従来の TAA 遺伝子のみを導入した DC の適用と比較してより少ない投与細胞数で効果的な腫瘍免疫を誘導できることを示している。したがって、CCR7 遺伝子導入による DC へのリンパ組織指向性の付与は、DC 免疫療法において有効な治療効果を引き出すために必要とされる投与 DC 数を低減することによって、DC 調製に必要とされる費用・労力および頻回採血による患者の負担を大幅に削減できる可能性を有している。

C.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) AdRGD-IL-12 および AdRGD-CCL27 併用投与による抗腫瘍効果

がん免疫療法の確立においては、免疫細胞の活性化とともに、それら細胞の腫瘍組織内への浸潤が重要である。しかし、一部のがん種ではサイトカインの投与により免疫系細胞群が活性化されているにもかかわらず、腫瘍組織には浸潤しないために腫瘍が退縮しないというケースが存在する。これまでにがん免疫療法の最適化を図るにあたっては、例えばサイトカイン等の免疫賦活化剤を

免疫系細胞群に効率よく作用させる DDS (Drug Delivery System) 研究が行われてきたが、更なる治療の最適化を図るには、それら免疫系細胞群を腫瘍組織に送達させるための DDS 技術が求められる。こうした中、近年の分子生物学の目覚しい発展に伴い、ケモカインと総称される細胞遊走を司る分子群が次々と同定され、それらケモカインがリンパ球や樹状細胞 (DC) といった免疫系の細胞に特異的に作用することが報告されている。これに伴いリンパ球の体内動態機構、例えば炎症時における血中から組織への浸潤メカニズム等が徐々に明らかになりつつある。ケモカインはこのリンパ球の組織浸潤過程に必須の分子であり、またケモカインは対応するケモカインレセプターを発現しているリンパ球に特異的に作用することから、特定のリンパ球の体内動態を制御していると考えられる。これまでに我々は、マウス卵巣上皮がん細胞である OV-HM 細胞に、各ケモカイン遺伝子を AdRGD ベクターにより導入することでケモカイン産生 OV-HM 細胞を作製した。このケモカイン産生 OV-HM 細胞を同系マウスの腹部皮内に移植し、その腫瘍増殖抑制効果と免疫細胞の遊走活性について評価した結果、CCL27 産生 OV-HM 細胞を移植した群で腫瘍の増殖抑制効果が認められ、さらに腫瘍組織内へ T 細胞、NK 細胞を浸潤させることを明らかとしている。しかし、これはあくまで *ex vivo* 系での結果であり、後述するように、生着した腫瘍に対しては CCL27 遺伝子を導入しても治療効果は認められなかった。すなわち、ケモカインの単独投与では生着したがん組織を退縮させるほどの活性を有した免疫細胞を浸潤させることができず、さらなる治療法の改良が必要であることを示している。傷害活性を有した免疫細胞が腫瘍細胞に直接接触するという抗腫瘍メカニズムを考慮するとエフェクター細胞による効果的ながん免疫療法を達成するためには、それら細胞群の質的制御 (活性化) と動態制御 (腫瘍内浸潤) の両者が重要であることが考えられる。そこでこれまで免疫系を活性化させる

因子として広く研究されてきたサイトカインにより質的制御を、ケモカインにより動態制御をそれぞれ達成することによる、治療効果の増強について検討を行うこととした。

免疫細胞を活性化するサイトカインとして、我々はこれまでがん免疫療法の研究で広く用いられてきた IL-12 を選択した。IL-12 は細胞性免疫応答システムの活性化因子であり、NK 細胞や NKT 細胞、あるいは T 細胞の一部を活性化し、さらに IFN- γ などの産生を誘導することにより抗腫瘍効果を発揮するサイトカインである。そこで AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の併用投与することによる抗腫瘍効果について検討を行った。OV-HM 担がん B6C3F1 マウスの腫瘍径が約 7~8 mm に達したところで、腫瘍内にそれぞれ PBS、AdRGD-Luc、AdRGD-CCL27、AdRGD-IL-12 を各単独、あるいは AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL-12 を混合し、総 AdRGD 量として 2×10^7 PFU/mouse で投与した。また、併用投与群については、投与した合計 AdRGD 量を変えことなく AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL-12 の比率を 1 : 9、5 : 5、9 : 1 とすることで、最適な投与比率も同時に検討することとした。AdRGD 投与後、経日的に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を評価した (Fig. 27)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群はコントロールベクターである AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察され、治療効果はほとんど認められなかった。また AdRGD-IL-12 単独投与群では腫瘍の増殖抑制効果が認められた。一方、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与した群では、その割合が 1 : 9 の群ではほとんど抗腫瘍効果が認められなかったが、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を 5 : 5、9 : 1 の割合で併用投与した群では、投与した AdRGD 量が同じであるにも関わらず、AdRGD-IL-12 単独投与群よりも強い腫瘍の退縮が認められた。

次に、マウスの生存率について検討を行った (Fig. 28)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では 7 例中 2 例の完全治癒が得られたが、

AdRGD-Luc 投与群と同程度 (7 例中 1 例) であったことから、その治療効果はやはり弱いものと考えられる。また、AdRGD-IL-12 単独投与群では 7 例中 4 例の完全治癒が得られ、腫瘍体積の結果と同じく、AdRGD-CCL27 単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られた。一方、併用投与群では AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の割合が 1:9、5:5、9:1 の群で、それぞれ 7 例中 0 例、8 例中 6 例、8 例中 8 例の完全治癒が得られ、5:5、9:1 の割合で投与した群では各単独投与群よりも治療効果の増強が認められた。AdRGD-CCL27 単独投与群と比較して、AdRGD-IL-12 単独投与群での治療効果が大きかったことと、併用投与群での治療効果が AdRGD-IL-12 : AdRGD-CCL27 = 9 : 1 の割合で最も大きかったことを考え合わせると、今回併用投与により得られた抗腫瘍効果では IL-12 の作用が主であり、CCL27 は補助的に働いたものと考えられる。

続いて、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の併用投与により長期間にわたる腫瘍細胞特異的な免疫反応が誘導されているかを検討した。AdRGD-IL-12 : AdRGD-CCL27 = 5 : 5、9 : 1 の割合で併用投与し完全治癒したマウスに対して、3 ヶ月後ないしは 6 ヶ月後に OV-HM 細胞、および治療実験に用いたマウスと同じ MHC (Major Histocompatibility Complex) 分子を持つ B16/BL6 細胞を再移植し、腫瘍の生着の有無を確認した (Table 4)。その結果、コントロール群 (Intact)、および B16/BL6 細胞を移植した群では、全てのマウスにおいて腫瘍の生着が認められたが、併用投与により完全治癒が得られたマウスでは、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の割合が 5:5、9:1 のいずれの群のマウスにおいても腫瘍の生着はほとんど確認されなかった。また、9:1 の投与比率の群で、3 ヶ月後に 1 例の腫瘍生着が認められたが、その腫瘍サイズは非常に小さいものであった。以上の結果より、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、長期にわたる OV-HM 細胞特異的な免疫機構が誘導されてい

ることが示唆された。

(2) AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の併用投与による抗腫瘍効果増強メカニズムの解明

まず、第一のがんエフェクター細胞である T 細胞の抗腫瘍効果への寄与について確認するために、T 細胞欠損マウスである Balb/c ノードマウスを用いて検討を行った。OV-HM 担がん Balb/c ノードマウスに対して、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与し、経口的に腫瘍サイズを測定した (Fig. 29)。その結果、併用投与群においても、PBS 群、AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察された。T 細胞が欠損しているノードマウスにおいて、併用投与による治療効果がほとんど認められなかったことから、本研究で得られた抗腫瘍効果は T 細胞依存的であることが示された。

併用投与により得られた抗腫瘍効果に対して、より詳細なエフェクター細胞の寄与について確認するために、NK 細胞や T 細胞に対する抗血清・抗体を用いてこれら各リンパ球を除去したマウスにおける抗腫瘍効果について検討を行った (Fig. 30)。その結果、NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞除去群では、それぞれ腫瘍が拒絶されないマウスが認められ抗腫瘍効果が減少していた。さらに、T 細胞のうち CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットを除去したマウスでは、PBS 群と同程度以上の腫瘍の増殖が観察された。以上の結果から、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の併用投与による抗腫瘍効果は、NK 細胞が主ではなく、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットに依存することが明らかとなった。本結果は先のノードマウスを用いた検討結果を支持するものであり、本研究において得られた抗腫瘍効果は、T 細胞依存的であることが示された。

次にがん細胞に対する第一のエフェクター細胞である T 細胞の浸潤について検討すべく、抗 CD3 抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 31)。その結果、PBS 投与群、AdRGD-Luc 投与群ではほ

とんど腫瘍内に CD3 陽性 T 細胞の浸潤は観察されなかった。一方、併用投与群では AdRGD-IL-12 単独投与群と比較して CD3 陽性 T 細胞数の有意な増大が認められたことから、併用投与群では腫瘍内へより多くの T 細胞が浸潤していたため治療効果の増強が繋がったものと考えられた。さらに、併用投与群における腫瘍内浸潤 CD3 陽性 T 細胞の分布について確認したところ、血管周辺やその他の部位に局在しているわけではなく、腫瘍組織全体に散在していたことから、腫瘍の実質細胞にまで浸潤していることが強く予想された。免疫細胞による抗腫瘍作用では、T 細胞、NK 細胞等のエフェクター細胞が腫瘍細胞と直接接触することにより、はじめて腫瘍細胞を傷害し腫瘍の退縮が起こることから、併用投与群において数多くの T 細胞が腫瘍実質にまで浸潤していたことが、全例で完全治癒するという強い抗腫瘍効果が得られたことの一要因であるものと予想された。しかし、治療効果が認められなかった AdRGD-CCL27 単独投与群において、最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察されたことから、抗腫瘍機構の解明にはさらなる解析が必要である。そこで続いて、腫瘍内に浸潤した T 細胞について、その詳細を検討する目的で、CD4、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を確認した (Fig. 32)。その結果、併用投与群では CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットが浸潤しており、共に AdRGD-IL-12 単独投与群と比べて増加傾向であったことから、CD3 陽性 T 細胞の結果と同様に、併用投与による治療効果増強を示唆する結果であった。また最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察された AdRGD-CCL27 単独投与群では、併用投与群や AdRGD-IL-12 単独投与群と比較して、主に CD4 陽性 T 細胞が浸潤していた。一般に傷害活性を有しているのは CD8 陽性 T 細胞であることから、浸潤 T 細胞のサブセットの違いが、治療効果に差が生じた要因の一つとして考えられた。

しかし一方で、CD8 陽性 T 細胞の浸潤数が少ないといっても、治療効果が同程度であった

AdRGD-Luc 投与群と比べると多いこと等を考慮すると、AdRGD-CCL27 単独投与群では活性化した免疫細胞が浸潤していないために治療効果が得られなかったことが強く予想される。そこで、免疫細胞の活性化についての検討を行った。

IFN- γ は、活性化ヘルパーT 細胞などから産生され、マクロファージの活性化、腫瘍細胞の増殖抑制作用、Fas や TNF レセプターの発現増強などによる抗腫瘍作用を有するサイトカインである。そこで、多くの CD4 陽性 T 細胞が浸潤していた AdRGD-CCL27 単独投与群の腫瘍内での活性化状態を考察するために、まずは腫瘍内での IFN- γ 発現を RT-PCR により確認した (Fig. 33)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では IFN- γ の発現は確認できなかったが、AdRGD-IL-12 単独投与群、および併用投与群では同程度の IFN- γ の発現が認められた。このことから、AdRGD-CCL27 単独投与群では多くの CD4 陽性 T 細胞が浸潤していたものの、それらが活性化されていなかったと考えられた。また、併用投与群と AdRGD-IL-12 単独投与群とでは、同程度の活性化状態であったことが示唆された。

続いて腫瘍内に活性化した細胞が浸潤しているのかについて検討を行う目的で、CTL、活性化 NK 細胞のマーカーであり、細胞傷害因子である perforin の腫瘍組織内における発現を免疫染色により観察した (Fig. 34)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では、IFN- γ の結果と同様、ほとんど perforin 陽性細胞が観察されなかったのに対し、AdRGD-IL-12 単独投与群、および併用投与群では perforin 陽性細胞が確認された。また、併用投与群では、AdRGD-IL-12 単独投与群よりも perforin 陽性細胞数が有意に増加していたことから、ケモカインによる浸潤とサイトカインによる活性化の両者が達成されており、このことも治療効果の増強の要因と考えられた。

C.1.6 ターゲティング Ad ベクターの開発

(1) 特定の組織に移行する活性を持たない Ad ベ

クター開発

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。一方で、標的細胞にのみ遺伝子導入可能なターゲティング Ad ベクターの開発のためには、ベクターの非特異的遺伝子導入を回避し、標的細胞へ特異的に遺伝子導入する機能を付与することが必要である。しかしながら、Ad ベクターはマウスへの全身投与後、そのほとんどが肝臓に集積し、遺伝子発現に至ることが知られており、肝臓以外の組織をターゲットとする場合は、肝臓への集積性（肝臓での遺伝子発現）が問題となっている。主任研究者らは従来の Ad 受容体である CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を、ファイバーの FG ループの 4 アミノ酸の欠損、ペントンベースの RGD モチーフの欠損、ファイバーシャフトの 35 型 Ad 由来シャフトへの置換を行うことで欠損させ（トリプルミュータント Ad ベクター）、マウスへの尾静脈投与後の Ad ベクターの肝臓での遺伝子発現を劇的に減少させたターゲティングベクターの基盤となるベクターを開発済みである。

一方、CAR との結合能を除去するためには、ファイバーノブの FG ループの変異の他に、AB ループの変異 (R412S, A415G, E416G, K417G) も広く利用されている。そこで、今年度は、トリプルミュータント Ad ベクターに付与するファイバーノブの変異として、新たに AB ループに変異を付与したベクターを作製し、このベクターと FG ループに変異を付与したトリプルミュータント Ad ベクターとの遺伝子導入能の比較を行い、全身投与後の特定の臓器での遺伝子発現能を更に現弱化したベクターの開発を行った。

用いたベクターを Table. 5、Table. 6 にまとめた。まず、従来型のファイバータンパク質を有した Ad ベクター (Ad-L2) と種々の改良型 Ad ベクターを用いて、培養細胞への遺伝子導入を行った (Fig. 35)。用いた CAR 陽性の LN319 細胞において

は Ad-L2 に比べ Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 は 0.1% 以下のルシフェラーゼ活性しか示さなかった。Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 については Ad-L2 の 0.01% 以下のルシフェラーゼ活性しか示さず、その活性は Mock とほぼ同じ値であった。CAR 陰性の SF295 細胞においても Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べルシフェラーゼ活性の値がそれぞれ約 4%、2% と低い値を示した。しかしながら、ファイバーの HI ループに RGD 配列を挿入することでルシフェラーゼ活性は上昇することが観察された。

次に、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 によるルシフェラーゼ発現能が、ウイルスが defective になっている結果、低くなっているという可能性を否定するため、トランスフェクション試薬の SuperFect (キアゲン社) と、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 との複合体を作製し、遺伝子導入実験を行った。SK HEP-1 細胞に作用させたところ、加えた SuperFect の量に依存してルシフェラーゼ発現の上昇が認められ、15 μ g の SuperFect を加えた群では (48 well あたり)、SuperFect なしの場合に比べ、約 200 倍の活性を示した。従って、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 自身は遺伝子発現能を有することが明らかとなり、遺伝子導入体として機能できることを確認した (Fig. 36)。

次にマウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験を行った。尾静脈投与、腹腔内投与共に Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は測定したすべての臓器において Ad-L2 に比べルシフェラーゼ活性の減少が見られており、特に肝臓では静脈内投与において、Ad-L2 に比べ Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 は 1500 倍、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 では 10000 倍以上のルシフェラーゼ活性の減少が見られた (Fig. 37)。また、腹腔内投与においては、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べ肝臓でのルシフェラーゼ活性があまり変化していないのに対し、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べ 5000 倍のルシフェラーゼ活性の減少が見られ、*in vivo* においても Mock とほぼ同等の遺伝子発

現しか認められなかった (Fig. 38)。

従って、トリプルミュータント Ad ベクターに付与するファイバーノブの変異としては、AB ループの変異の方が、FG ループの変異に比べ優れていることが明らかとなった。さらにファイバーに細胞表面分子を認識するペプチド配列を付与することで、遺伝子導入機能の回復が見られた。以上の結果より、ファイバーノブの AB ループ、ファイバーシャフト、ペントンベースの 3 領域全てを同時に改変することで、特定の臓器で目的遺伝子の発現を起こさない Ad ベクターの更なる改良に成功し、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとなりうるものと期待された。

(2) ファージ表面提示法を用いたターゲティングリガンドの同定

目的の細胞に特異的に遺伝子導入できる次世代 Ad ベクターを開発していくためには、細胞特異性を示す高親和性のリガンド (ペプチド配列) の同定と、それらをファイバー領域に付与した Ad ベクターの開発が必要不可欠である。特定細胞や受容体に親和性を示すペプチドの同定のためには、ファージ表面提示法が汎用されている。しかし、従来のファージ表面提示法によるペプチドの同定は、Ad ベクターに付与することを目的にしたものではないため、多くの場合、Ad のファイバーに組み込まれたペプチドは、ペプチド本来が有していた細胞への親和性を失ってしまうという問題があった。そこで本研究では、ファイバーノブの HI ループ領域等にランダムなペプチド配列を含むファイバーノブ全体を提示したファージライブラリーを作製し、上記の問題点を克服した迅速な Ad ベクターにおける標的指向性分子のスクリーニング法を確立を目指した研究を行った。今年度は、本スクリーニング系のためのファイバーノブ発現ファージミドベクターおよびファージライブラリーの作製のための実験系の構築を行った。来年度以降、造血幹細胞や腫瘍血管内皮細胞等への特異的結合能を有するペプ

チドを同定し、これらを付与した Ad ベクターの開発および評価を *in vitro*、*in vivo* の両系で行う予定である。

C.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

RGD ペプチド付与型ファイバーを有し、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できる Ad ベクター作製のためのベクタープラスミドとして、新たに pAdHM51-RGD を作製した。E3 欠損領域に tet-off 系の転写活性化因子 tTA 発現単位を挿入し、E1 欠損領域にテトラサイクリン依存性のプロモーター制御下に目的遺伝子の発現単位を挿入することで、単一のベクターで発現レベルを調節できるファイバー改変 Ad ベクターの作製が可能となった (Fig. 39)。

このようにして作製した分泌性アルカリフォスファターゼ SEAP を発現する AdRGD-Off-SEAP6 と、野生型のファイバーを有する AdOff-SEAP6、および CMV プロモーター制御化で SEAP を発現する AdCMV-SEAP6 の機能を、種々の細胞株で検討した (Fig. 40)。HeLa 細胞は CAR 陽性、 αv インテグリン陽性であり、LNZ308 と NIH3T3 細胞は CAR 陰性、 αv インテグリン陽性である。HeLa 細胞では AdRGD-Off-SEAP6、AdOff-SEAP6、AdCMV-SEAP6 のいずれにベクターにおいても高い SEAP 産生を示した。ドキシサイクリン有無による SEAP 産生の誘導能は AdRGD-Off-SEAP6 は 621 倍、AdOff-SEAP6 は 84 倍であり、誘導時の最大産生量も AdCMV-SEAP6 と同程度であり、十分に高いものであった (Fig. 40A)。一方、LNZ308 と NIH3T3 細胞においては、野生型のファイバーを有した AdOff-SEAP6 と AdCMV-SEAP6 においては低い SEAP 産生しか示さなかったが、RGD ペプチドを付与した AdRGD-Off-SEAP6 においては AdOff-SEAP6 に比べ、数十倍から数百倍の最大 SEAP 産生を示した (Fig. 40B, C)。また、ドキシサイクリン有無による SEAP 産生の誘導能についても、AdRGD-Off-SEAP6 は AdOff-SEAP6 に比べ、断然優

れていた。以上の結果より、発現制御型 Ad ベクターにファイバー改変技術を組み合わせたベクターは、より高範囲の細胞に対して優れた発現誘導能を示すことが明らかとなった。

C.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

C.2.1 PEG 修飾 Ad ベクターの遺伝子発現特性

一般的に PEG 化蛋白質やリポソームでは、抗体や貪食細胞からの回避能が獲得され、血中安定性が飛躍的に改善することが知られている。また腫瘍組織では、正常組織に比べ血管透過性が亢進しており、同時にリンパ系による異物回収機構が不十分である。これにより長時間血中に滞留している PEG 化蛋白質やリポソームは、腫瘍組織に効果的に蓄積する、いわゆる EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) として知られており、近年、この EPR 効果を利用した腫瘍をターゲットとする製剤の開発が広くすすめられている。我々は、このような PEG 修飾の特性は、Ad ベクターを PEG で修飾した場合にも同様に得られると考え、最適な PEG 修飾 Ad ベクターを作製すれば、血中滞留性の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングが達成できると考えた。我々はこれまでに、Ad ベクターに対する PEG 修飾方法を確立し、*in vitro* における PEG 修飾 Ad ベクターの遺伝子発現特性を検討してきた。そこで今回、PEG 修飾 Ad ベクターのさらなる遺伝子発現特性を検討すると共に腫瘍をターゲットとした *in vivo* 遺伝子治療用ベクターとしての有用性評価に取り組んだ。

Ad ベクターの PEG 修飾は、1 粒子の Ad ベクターの外殻蛋白質に存在するリジン残基に対して、25、100、400、1600 又は 6400 倍モル量の活性化 PEG (MW 5,000) を添加することで行い、作製した PEG 修飾 Ad ベクターの修飾効率を SDS-PAGE にて解析、特定した (Fig. 41)。その結果、Coomassie Blue 染色により未修飾ヘキサソンのバ