

ンドの高分子側に、PEG 修飾率の増大に伴いブロードなバンドが見られ、また、高分子側にシフトしたバンドが PEG に対する染色により染色されたことから、このバンドが PEG により修飾されたヘキソンであることが確認された。Coomassie Blue 染色により得られた未修飾ヘキシソンのバンドと PEG 修飾されたヘキシソンのバンドの濃さの割合を PEG 修飾率として画像解析により算出し、Table 7 に示したような様々な修飾率を有する PEG 修飾 Ad ベクターを作製することができた。また、PEG 修飾率の増大に伴い粒子径が増大することを確認した。なお、我々は以前の検討において、PEG 修飾操作により 5% 以上の修飾率を有する PEG 修飾 Ad ベクターでは未修飾の Ad ベクターは存在しないこと、つまり全ての Ad ベクターに PEG が結合していることを既に明らかにしている。

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 ベクターの 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 ベクター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 ベクターの 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 ベクターの血中滞留性を評価した。PEG 修飾していない Ad ベクターは、血中から速やかに消失し、その血中半減期は 1.6 分であった (Fig. 42, Table 7)。それに対して 61.1%、89.3%、100%PEG 修飾 Ad ベクターの血中半減期は、それぞれ修飾していない Ad ベクターと比較して約 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 ベクター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 Ad 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 ベクター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. 43 に示す。修飾されていない Ad ベクターの

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 ベクターでは、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 ベクターの約 30 倍であった。

PEG 修飾 Ad ベクターの血中滞留性の向上は、PEG 鎖の立体障害により、Ad ベクターのレセプターである CAR を介した肝臓への急速な初期分布ならびに貪食細胞の取り込みが回避されるためだと考えられる。そこで、様々な修飾率の PEG 修飾 Ad ベクターを用いて、CAR 発現細胞に対する遺伝子導入効率ならびに PEG 修飾 Ad ベクターの遺伝子発現活性、すなわち細胞内侵入後の高い核移行能に関して、細胞内導入試薬を用いて評価した。同時に加熱処理を行い、Ad ベクターの核移行活性を担う蛋白質を熱変性させた群を加えることで、厳密な活性評価に取り組んだ。その結果、通常感染条件下の遺伝子発現は、予想通り PEG 修飾率の増大に伴い低下した (Fig. 44)。この遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合阻害に由来すると考えられる。すなわち、PEG 修飾 Ad ベクターの *in vivo* 投与における血中滞留性の向上は、CAR との結合阻害により初期の臓器移行性が低下することが一因と考えられる。一方、Lipofectamine 2000 を作用させた群では、修飾率 89% の PEG 修飾 Ad ベクターにおいても高い遺伝子発現活性を示した。また、加熱処理により Ad ベクターの蛋白質を熱変性させた投与群 (Ad ベクター DNA のみ投与した群を意味する) では、Lipofectamine 2000 を作用させても遺伝子発現の回復はみられなかった (Fig. 44)。以上のことは、Ad ベクター表面の PEG 修飾自体は、核移行活性に大きく影響しないことを示している。すなわち、表面の大部分が覆われた PEG 修飾 Ad ベクターであっても、感染が成立した組織においては、Ad ベクターが本来有する高い遺伝子発現効率を得られることが強く示唆された。

そこで次に PEG 修飾 Ad ベクターの血中滞留性

の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングを目指して、様々な修飾率の PEG 修飾 Ad ベクターを担がんマウスの尾静脈より投与後、各組織における遺伝子発現パターンの検討を行った。*in vivo* 投与において、様々な修飾率を有する PEG 修飾 Ad ベクターは、各臓器でベルシェイプ型の遺伝子発現特性を示した (Fig. 45)。特に PEG 修飾率 61% の PEG 修飾 Ad ベクターでは、多くの臓器において未修飾 Ad ベクターよりも数十倍高い遺伝子発現が得られた。この現象の詳細な原因は不明だが、おそらく血中滞留性の向上、細網内皮系からの取り込み回避等の *in vivo* 条件下における幾つもの要因が影響しているものと考えられる。また、最も遺伝子発現の高い肝臓、および腫瘍に注目すると、各修飾率の PEG 修飾 Ad ベクターのうち、修飾率 89% の PEG 修飾 Ad ベクターが腫瘍で最も高い遺伝子発現を示し、その発現量は未修飾 Ad ベクターよりも約 40 倍高いものであった。同時に副作用の原因となり得る肝臓での遺伝子発現量は未修飾 Ad ベクターの約 20 分の 1 に抑制されており、腫瘍と肝臓とほぼ同等の遺伝子発現量を示した。以上の結果は、修飾率約 90% の PEG 修飾 Ad ベクターにおいては、PEG 化リボソーム等で観察されている受動的ターゲティング効果が、同様に当てはまり得ることをはじめて示唆したものである。

そこで次に、Ad ベクター粒子としての腫瘍および肝臓内集積量に関して、定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。Ad ベクター粒子としての腫瘍内集積量を、Ad ベクターゲノムの E4 領域に対して設計したプライマーおよび TaqMan プロブを用いて、定量的リアルタイム PCR 法により測定した。まず粒子数が既知の標準品 Ad ベクター DNA を用いて検量線を作成し、直線性が得られた 10 コピーから 10^7 コピー数までの範囲で定量可能なことを確認した (Fig. 46)。

続いて未修飾 Ad ベクターおよび修飾率約 90% の PEG 修飾 Ad ベクターを Meth-A 担がんマウスに投与し、6 時間および 48 時間後の肝臓、腫瘍か

ら DNA を抽出し、PCR 反応により Ad ベクター DNA を増幅させた後、検量線から腫瘍内 Ad ベクター粒子数を求めた (Fig. 47)。その結果、初期分布である投与後 6 時間後において、遺伝子発現の分布と同様、肝臓において PEG 修飾 Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターの 30 分の 1 以下の集積量であり、同時に腫瘍においては未修飾 Ad ベクターの 40 倍量以上が存在していた。この結果は先のルシフェラーゼ遺伝子発現量での分布結果とほぼ相関しており、粒子分布、遺伝子発現分布の両面から PEG 修飾 Ad ベクターの腫瘍集積性が明らかとなった。また、48 時間後の分布においては、著しい集積量の減少が見られた。原因としては、ヌクレアーゼによる DNA の分解に加えて、6 時間後の段階ではクッパー細胞をはじめとする細網内皮系に取り込まれた Ad ベクター DNA も検出されていたためだと考えられる。

次に、PEG 修飾 Ad ベクターが腫瘍内血管から実質細胞側へと漏出しているかを、腫瘍内 EGFP 発現部位を検討することで評価した。その結果、未修飾 Ad ベクター投与群では EGFP による蛍光は見られなかったのに対して、PEG 修飾 Ad ベクター投与群では、主に腫瘍実質細胞に対する遺伝子発現像が観察された (Fig. 48)。すなわち PEG 修飾 Ad ベクターは、腫瘍血管内から実質細胞側へと漏れ出していることが強く示唆された。また、肝臓においては先のルシフェラーゼ遺伝子発現と同様、未修飾 Ad ベクター投与群で強い蛍光が多数観察されたのに対して、PEG 修飾 Ad ベクター投与群では、蛍光像はほとんど観察されなかった。

以上の結果より、PEG 修飾 Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較して、血中投与後の肝臓からの取り込みが回避され血中滞留性が向上した結果、腫瘍の性質に基づいた EPR 効果により腫瘍内血管から漏出、蓄積し、腫瘍実質細胞に対する遺伝子発現が見られたものと考えられる。本結果は、通常レセプターを介した組織分布ならびに食食作用のため血中半減期が短いウイルスベクターにおいて、受動的ターゲティングが達成可能で

あることを示したはじめての知見である。

C.2.2 RGD-PEG 修飾 Ad ベクターの作製とその有用性評価

先の研究で最適な PEG 修飾 Ad ベクターを作製すれば、肝臓での遺伝子発現を抑制した上で、EPR による腫瘍での高い遺伝子発現を達成できるターゲティング Ad ベクターが創製できる可能性を明らかにした。もし、PEG の片末端に標的指向性分子を付与することができれば、PEG 修飾 Ad ベクターの受動的ターゲティングに加えてアクティブターゲティングをも可能になると考えられる。そこで標的指向性分子のモデル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。

RGD-PEG 修飾 Ad ベクター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 ベクターは A549 細胞に対して PEG 修飾 Ad ベクターより顕著に高い遺伝子発現を示し、未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子発現を示した (Fig. 49)。また、B16BL6 細胞に対して RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは、未修飾 Ad ベクターより 100 倍以上高い遺伝子発現を示し、その発現は AdRGD ベクターと同等であった。このことから、PEG 修飾 Ad ベクターの 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 Ad 抗体存在下における RGD-PEG 修飾 Ad ベクターの遺伝子発現効率を検討した。RGD-PEG 修飾 Ad ベクターを抗 Ad 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. 50)。その結果、これまで最も高い遺伝子導入効率を示した AdRGD ベクターであっても抗 Ad 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 ベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD ベクターの

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

C.3 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

C.3.1 発現制御型 siRNA 発現 Ad ベクターシステムの開発

Ad ベクターと siRNA 発現システムを組み合わせた手法は遺伝子導入実験や治療への応用に極めて有用である。誘導型 siRNA 発現システムは遺伝子発現抑制の程度を誘導剤の量や濃度によって調節することが可能になる。本研究では、ドキシサイクリン (テトラサイクリンの誘導体) 誘導型 siRNA 発現システムを搭載した Ad ベクターを作製し、その機能を評価した。誘導型 siRNA 発現システムのため、テトラサイクリン・オペレーター (tetO) 配列を H1 プロモーターの TATA ボックスと転写開始点の間に配置した。H1 プロモーターや tetO 配列を有した変異型 H1 プロモーターによって標的配列に対する shRNA を発現する様々な Ad ベクターを構築し (Fig. 51)、内因性遺伝子である p53 および c-myc 遺伝子の発現抑制の調節を試みた。

まず初めに、Ad ベクターを用いた siRNA 発現システムの有用性を確認するため、H1 プロモーターや tetO 配列を有した変異型 H1 プロモーターを搭載した Ad ベクターの感染により、p53 および c-MYC 発現をノックダウンさせた。A549 細胞や HepG2 細胞を様々な濃度の Ad ベクター (Ad-H1-p53, Ad-H1-Myc, Ad-H1tetO-p53, Ad-H1tetO-Myc, Ad-H1, Ad-H1tetO および Ad-null) で作用させ、ドキシサイクリン無しで 3 日間培養し、p53 および c-MYC 発現をウエスタンブロット法により検討した (Fig. 52)。アクチン発現を内部標準として測定した。A549 および HepG2 細胞において p53 および c-MYC 発現は p53 や c-MYC に対する siRNA 発現単位を搭載した Ad

ベクター (Ad-H1-p53, Ad-H1-Myc, Ad-H1tet0-p53, or Ad-H1tet0-Myc) でベクター濃度依存的に減少した。p53 の場合、1000 VP/cell のベクター濃度により十分な発現のノックダウンが観察された。p53 発現は、Ad-null (1000 VP/cell) 処理群と比較し、Ad-H1-p53 (1000 VP/cell) 処理群は 35-37 %、Ad-H1tet0-p53 (1000 VP/cell) 処理群は 14-23 %まで減少させた (Fig. 52A)。c-MYC の場合、完全な発現のノックダウンには 3000 VP/cell のベクター濃度が必要であったが、1000 VP/cell のベクター濃度でも適度なノックダウンが可能であった。c-MYC 発現は、Ad-null や Ad-H1 (3000 VP/cell) 処理群と比較し、Ad-H1-Myc (3000 VP/cell) 処理群は 14-44 %、Ad-H1tet0-Myc (3000 VP/cell) 処理群は 16-35 %まで減少させた (Fig. 52B)。Ad-null 処理群と比較し、Ad-H1 と Ad-H1tet0 処理群は遺伝子発現に影響しなかった。これらの結果より、tet0 配列を H1 プロモーターの TATA ボックスと転写開始点の間に置き換えても H1 プロモーター活性を阻害せず、正常な H1 プロモーターによる siRNA 発現カセット同様に、標的遺伝子発現を効果的に抑制できることが明らかとなった。

次に、ドキソサイクリン (10 μ g/ml) 存在下または非存在下において Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR (テトラサイクリンレプレッサー発現 Ad ベクター)、または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR の共感染により遺伝子発現抑制の調節が得られるのかどうかを A549 細胞を用いて検討した。Fig. 53 に示したように、ドキソサイクリン非存在下、p53 発現の抑制効果は Ad-TR 量の割合によって減少し、遺伝子発現抑制の効果的な解除は Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR のモル比 1:6 で得られた。これらの結果はドキソサイクリン非存在下での変異型 H1 プロモーターの転写阻害には、多量の tetR が必要であることを示唆している (Fig. 53A)。ドキソサイクリン存在下では、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR の共感染により p53 発現は抑制された。従って、p53 発現の抑制の制御 (調節) には、Ad-H1tet0-p53

と比較し、多量の Ad-TR が必要であった。同様の結果は c-myc 遺伝子に対する実験 (Fig. 53B) や HepG2 細胞を用いた p53 および c-myc 遺伝子に対する実験 (data not shown) においても得られた。

次に、Ad ベクターによる RNAi 効果に対するドキソサイクリン濃度の影響を検討した (Fig. 54)。A549 細胞へ Ad-H1tet0-p53 または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR をモル比 1:6 で共感染させた後、様々な濃度のドキソサイクリンを含む培養液で培養し、p53 および c-MYC の発現レベルを検討したところ、p53 および c-MYC 発現を完全に抑制するのに 10^{-1} μ g/ml のドキソサイクリン濃度で十分であった。ドキソサイクリン 10^{-2} μ g/ml では p53 および c-MYC 発現は中程度の抑制が得られた。また、ドキソサイクリン存在下、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR で共感染させても c-MYC 発現は抑制されず、Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR の共感染によっても p53 発現は抑制されなかったことから、抑制効果は標的遺伝子特異的であることが示唆された。これらの結果から、ドキソサイクリン濃度によって標的遺伝子発現抑制が調節できることが明らかとなった。

そこで次に、ドキソサイクリン存在下・非存在下における shRNA (siRNA) 発現をノーザンブロットにより検討した (Fig. 55)。A549 および HepG2 細胞において、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR を共感染させドキソサイクリン非存在下での p53 に対する shRNA および siRNA の発現を検討したところ、ドキソサイクリン存在下と比較し減少していた (Fig. 55A)。ドキソサイクリン非存在下での shRNA および siRNA のシグナルは僅かであった。これらの知見は、c-MYC において著しいものであった (Fig. 55B)。これらの結果から、shRNA (siRNA) 発現は Ad ベクターによるドキソサイクリン誘導型 RNAi システムによって厳密に調節されることが明らかとなった。

C.4 35 型 Ad ベクターの特性評価

C.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

ヒト造血幹細胞は、その多分化能ならびに自己複製能より、再生医療・細胞治療・遺伝子治療の重要な細胞ソースとして期待されている。よって、造血幹細胞に効率よく遺伝子導入可能になれば、多くの血液系疾患に対する有効な治療方法の開発につながるだけでなく、造血幹細胞の分化機構や自己複製機構を解明するうえで、極めて有効な手段となりうると思われる。我々は既に、35 型 Ad ベクターが造血幹細胞を有する画分であるヒト CD34 陽性細胞に効率よく遺伝子導入できることを明らかにしている。しかしながら、造血幹細胞(前駆細胞)は CD34 陽性細胞のうちの一部であることが報告されていることから、本研究では、各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製しプロモーター活性を比較するとともに、CD34 陽性細胞のうち、さらに未分化な細胞画分に対する遺伝子導入効率を検討した。

まず、遺伝子導入実験に先立ち、効率よく 35 型 Ad ベクターを作製するため、*in vitro* ライゲーション法を 35 型 Ad ベクター作製に適用した (Fig.)。まず、自己増殖に必須である E1 領域 (368~3374 塩基)を取り除き、I-CeuI 部位、SwaI 部位、PI-SceI 部位を導入した。これにより I-CeuI 部位と PI-SceI 部位を利用して、簡便な *in vitro* ライゲーションで目的遺伝子を挿入することが可能となった。さらに、挿入遺伝子サイズを広げるため、E3 領域 (27761~29731 塩基)を取り除いた。よって、ベクタープラスミド pAdMS4 では合計約 4.9Kb のウイルスゲノムを取り除いており、5 型 Ad ベクターと同様に野生型ゲノムサイズの 105%までウイルス粒子に封入可能であるならば、本 35 型 Ad ベクターは約 6.6Kb の外来遺伝子を搭載することが可能となる。

次に上述の作製法を用い、CMV promoter によってドライブされる GFP 遺伝子発現カセットを

搭載した 35 型 Ad ベクターを作製し、35 型 Ad の受容体である CD46 の発現量と遺伝子導入効率との関連について検討した。まず、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞における CD46 の発現レベルを解析したところ、ほぼ全ての CD34 陽性細胞が CD46 を高発現していた (Fig. 57A)。しかしながら、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入効率は、12000VP/cell 以上で約 25%GFP 陽性とほぼ飽和に達した (Fig. 57B)。さらに、CD46 の発現の程度と遺伝子発現効率との間には相関が見られなかった (Fig. 57C)。

そこで、CD34 陽性細胞の中には CMV プロモーターに不応性の細胞も含まれると考えられることから、様々なプロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製し、遺伝子導入効率を比較検討した。用いたプロモーターとしては、以下の 6 種類である:CMV プロモーター、EF1 α プロモーター、CA プロモーター、CMVi プロモーター、PGK プロモーター、MSCV プロモーター。これら各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターをヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に 6000VP/Cell で作用させたところ、EF1 α プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが他のプロモーターと比較し、高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 58)。特に CA プロモーターでは約 54%の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。以上の結果より、CD34 陽性細胞における遺伝子発現効率はプロモーターによって大きく異なり、今回調べたプロモーターの中では、CA プロモーターが最も活性が高いことが示された。しかしながら、CA プロモーターを用いた場合においても遺伝子発現効率は約 54%にとどまり、35 型 Ad ベクターが感染しても遺伝子発現に到らない可能性が考えられた。そこで GFP 陽性画分および GFP 陰性画分におけるベクターゲノム量を Real-time PCR を用いて検討したところ、どのベクターにおいても GFP 陽性、陰性画分ともに約 300 vector copy number/ β -actin copy number が検出されたことから (Fig. 59)、GFP 陽性細胞だけでなく GFP 陰

性細胞も35型Adベクターの感染を受けていることが明らかとなった。よって、35型Adベクターは恐らくCD46を介して全ての細胞に感染するが、一部の細胞のみが遺伝子発現を示すことが示唆された。

次に、CD34陽性細胞のなかでもさらに未分化な細胞画分であることが報告されているCD38陰性細胞およびAC133陽性細胞における遺伝子発現効率を検討した。CD34陽性CD38陰性細胞およびCD34陽性AC133陽性細胞に6000VP/Cellで35型Adベクターを感染させたところ、両細胞画分においてもEF1 α プロモーター、CMV α プロモーター、CAプロモーターが高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 60、61)。特にCAプロモーターはCD34陽性CD38陰性細胞では57%、CD34陽性AC133陽性細胞では51%の細胞がGFP陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。よって、CAプロモーターはさらに未分化な細胞画分においても最も活性が高いことが明らかとなった。

さらに、CAプロモーターを搭載した35型AdベクターによってGFPを発現した細胞が各lineageに分化する能力を有しているかどうか検討するため、コロニーアッセイを行った。その結果、GFP陽性細胞は、未処理細胞およびGFP陰性細胞とほぼ同程度のコロニーを形成した (Table. 8)。GFP陽性細胞群におけるBurst-forming units-erythrocytes (BFU-E)のコロニー数は、GFP陰性細胞群と比較し若干少なかったものの、Colony-forming units-granulocyte macrophage (CFU-GM)のコロニー数に関しては同程度であった。また、GFP陽性細胞は最も未分化な細胞から生ずるColony-forming units-granulocyte erythrocyte monocyte macrophage (CFU-Mix)も形成した。以上の結果より、CAプロモーターによって外来遺伝子を発現した細胞は、各Lineageの細胞に分化する能力を保持していることが示された。しかしながら、35型Adベクター処理群のコロニーはGFP陽性、陰性を問わず、未処理群と比較し若干小さかった

(data not shown)。これは、35型Adベクター感染による毒性と思われる。

C. 4. 2 35型AdベクターによるヒトCD46トランスジェニック (TG) マウスへの遺伝子導入

35型AdをはじめとするSubgroup Bに属するAdは、Subgroup A, C~Fに属するAdの受容体であるCoxsakiavirus-adenovirus receptor (CAR)以外の受容体を認識して感染するため、5型Adが感染不可能なCAR陰性細胞へも効率よく感染することが可能である。さらに、成人のほとんどが5型Adに対する抗体を既に保持しているのに対し、35型Adに対する抗体保持率は10%以下と低いことから、35型Adは既存抗体による感染阻害を回避することができる。従って、35型Adを基本骨格とした35型Adベクターは、これらの長所を兼ね備えた有用な遺伝子導入用ベクターとなるものと期待される。これまでSubgroup Bに属するAdの受容体は同定されてなかったが、最近その受容体がCD46 (membrane cofactor protein)であることが報告された。そこで本研究では、35型Adベクターによる遺伝子導入におけるCD46の役割および35型Adベクターの遺伝子導入特性について明らかにするため、CD46安定発現細胞株およびCD46TGマウスを用いて実験を行った。

(1) CD46発現CHO細胞の作製および遺伝子導入実験

CD46はヒトでは赤血球を除く全ての細胞で発現しているが、げっ歯類では精巣でしか発現していない。そこでCD46が35型Adの受容体であることを確認するため、CD46安定発現CHO細胞を作製し、35型Adベクターの遺伝子導入効率を検討した。まずCD46安定発現CHO細胞におけるCD46の発現をフローサイトメーターを用いて解析したところ、CD46 BC1およびBC2 isoform安定発現CHO細胞ともにCD46を発現していることを確認した (Fig. 62)。次にそれらの細胞にルシ

フェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 300、3000VP/cell で作用させたところ、CD46 安定発現細胞においては野生型と比較し、8~17 倍高い遺伝子導入効率を示した (Fig. 63)。また BC1 および BC2 isoform 間に著差は認められなかった。以上の結果より、35 型 Ad ベクターは CD46 を認識し感染することが示された。

(2) マウス肝実質細胞および腹腔内マクロファージへ遺伝子導入実験

次に CD46TG マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性について検討した。CD46TG マウスでは、ヒトと同様ほぼ全ての臓器において CD46 を高発現していることを確認している。まず最初に、CD46TG マウスより肝実質細胞および腹腔内マクロファージを回収し、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入を試みた。肝実質細胞に 35 型 Ad ベクターを作用させたところ、CD46TG マウス由来肝実質細胞においては野生型マウスと比較し、約 10 倍高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 64)。腹腔内マクロファージにおいても、CD46TG マウス由来マクロファージは野生型と比較し約 3.5 倍高い遺伝子効率を示した (Fig. 65)。以上の結果より、CD46TG マウス由来初代培養細胞においても、35 型 Ad ベクターは CD46 を認識し感染することが示された。そこで次に、CD46TG マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入特性を評価した。CD46TG マウスおよび野生型マウスに 35 型 Ad ベクターを尾静脈内投与し、48 時間後各臓器を回収し遺伝子発現効率を解析したところ、各臓器における遺伝子発現効率は CD46TG マウス、野生型マウスともに極めて低く、両者間に有意な差は見られなかった (data not shown)。しかしながら一方で、CD46TG マウスおよび野生型マウスに 35 型 Ad ベクターを腹腔内投与したところ、各臓器において CD46TG マウスでは野生型マウスと比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した (Fig.)。CD46TG マウスと野生型マウスの差は、特に肝臓、腎臓、腹腔膜および横

隔膜で顕著であった。以上の結果より、*in vivo* においても 35 型 Ad ベクターは CD46 を認識し感染することが明らかとなった。

D. 考察

D.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

D.1.1 間葉系幹細胞、脂肪細胞への高効率遺伝子導入

間葉系幹細胞、ES 細胞（多能性幹細胞）をはじめとする幹細胞は、自己複製能を有する一方で、多くの種類の細胞を産生する多分化能を有することから、再生医療のための細胞ソースとして注目されている。また、近年の研究によりこれら幹細胞の自己複製能の維持や、特定の細胞への分化能の獲得に関与する遺伝子が次々と同定され、細胞分化を自在に制御することも可能になりつつある。細胞増殖・分化の分子機構の解明には外来遺伝子を導入して発現させたり、あるいは特定の遺伝子の発現を抑制させたりすることが必要であり、効率の良い遺伝子導入法は必要不可欠である。これまでは、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが汎用されてきたが、これらのベクターによる遺伝子発現は染色体への導入遺伝子の組み込みを伴うため長期的・永続的なものとなり、細胞分化が起こった後も導入遺伝子の発現は続くことになる。細胞分化に関わる遺伝子の中には、分化完了後は発現（あるいは抑制）を必要としない場合も多くあることが考えられ、このような場合には一過性の遺伝子発現（抑制）をもたらすベクター系が好ましいことになる。Ad 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。しかしながら、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入効率は低く、これらの細胞への適用には不向きであった。主任研究者らが開発を進めている改良型 Ad ベクターは、これらの幹細胞へも効率良く遺伝子導入でき、分化機構解明などの基礎研究や、再生医療や遺伝子治療のための基盤技術になりうると期待される。

遺伝子治療や遺伝子導入用ベクターとして汎用されている Ad ベクターは、サブグループ C に属するヒト 5 型 Ad を基盤としている（ヒト Ad は A から F までのサブグループに分けられ、計 51 種の血清型が存在する）。5 型アデノウイルスの感染には、ウイルスカプシドタンパク質のファイバーと、細胞表面上の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) との結合を必要とするため、従来の Ad ベクターは CAR 陽性細胞へは効率良く遺伝子導入できるが、CAR の発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率は低いことが課題であった。CAR の発現が乏しい細胞としては、造血幹細胞や T 細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、一部の癌細胞（特に悪性度の高い癌細胞）、血管内皮細胞、滑膜細胞などが知られており、このような細胞へは Ad ベクターの適用は不向きであった。

主任研究者らは、ファイバータンパク質の外来ペプチド挿入部位として適した HI ループや C 末端コード領域に簡単に外来ペプチドコード遺伝子を挿入できるファイバー改変 Ad ベクター作製法を開発済みであり、この技術と *in vitro* ライゲーションに基づいた E1 欠損領域への外来遺伝子挿入法（主任研究者らにより開発済み）を合わせることで、感染時の CAR 依存性を克服した種々の改良型 Ad ベクターを簡単に作製することが可能となった。本法を用いて作製したファイバータンパク質の HI ループや C 末端領域に RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドやポリリジンペプチドを挿入したベクターでは、多くの細胞で発現している αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識して効率良く遺伝子導入することが可能となった。また、ファイバータンパク質を、CD46 を受容体とする 35 型 Ad（サブグループ B に属する）由来のものに置換したベクターも開発済みである。補体制御因子として知られている CD46 は、ヒト由来の細胞ではほとんどの細胞で発現していることが知られており、35 型 Ad ベクター（あるいはファイバー部分が 35 型 Ad からなる 5 型 Ad をベ-

スにしたベクター)は、ヒト由来細胞への有力なベクターである。

そこで本研究では、これら一連のファイバー改変 Ad ベクターを用いることによって、間葉系幹細胞と脂肪細胞 (後の章で胎盤細胞、ES 細胞、造血幹細胞についても検討) への遺伝子導入効率の改善が可能かどうかについて検討を行い、最適化された改良型 Ad ベクターで劇的な遺伝子導入効率の改善に成功した。その結果、改良型 Ad ベクターを用いることによって、目的にもよるが、遺伝子導入細胞のソーティングや選択を行わなくても、単回のベクター作用で細胞分化の制御などに利用可能な段階になった。今後、主任研究者らの開発したこれらのベクターが、幹細胞研究や再生医療研究などの基礎・応用研究に大きく貢献できることを期待している。

D.1.2 ES 細胞への高効率遺伝子導入

本研究では Ad ベクターによる mES 細胞への遺伝子導入・発現の最適化に関して、プロモーターおよびファイバータンパク質の改変の観点から検討した。種々のプロモーターを検討した結果、mES 細胞には EF-1 α プロモーターが最も高効率かつ特異的に遺伝子発現させることができることが明らかとなった。また、従来型 Ad ベクターと種々のファイバー改変 Ad ベクターとを比較した結果、従来型ベクターが最も特異的に mES 細胞に遺伝子導入可能であった。こららは、mES 細胞は CAR を発現しているが、フィーダー細胞は CAR を発現していないことに起因していた。一方、mES 細胞だけでなく、フィーダー細胞にも遺伝子導入したいときは、ファイバー領域に RGD ペプチドやポリリジンペプチドを付与したファイバー改変 Ad ベクターが有効であることが明らかとなった。今後、最適化された Ad ベクターを用いて、ES 細胞に機能遺伝子 (STAT3、Nanog、Oct3/4 など ES 細胞の未分化性維持・分化に必要な遺伝子など) を導入し、ES 細胞分化を自由に制御できるかどうか検討していく予定である。

D.1.3 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

今回の実験に使用した JAR、JEG-3、BeWo、Rcho-1、TR-TBTs 細胞のいずれにおいてもファイバーの HI ループに RGD 配列を挿入したファイバー改変型 Ad ベクター (Ad-RGD(HI)-L2) が最も高い遺伝子導入活性を示していた。この Ad-RGD(HI)-L2 は、ファイバー上に存在する RGD 配列を介して細胞表面上の $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin と結合することから、今回実験に使用した胎盤細胞株表面にも $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin の発現量が高いことが示唆される。実際、RT-PCR 法による解析ではいずれの細胞においてもインテグリンの発現が観察されていた。また、フローサイトメーターを用いて JAR、JEG-3、BeWo 細胞表面上に存在する各蛋白質の発現を確認したところ CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin の発現はいずれの細胞株でも観察された (data not shown)。しかしながら、CAR の発現量には細胞間で差があり、BeWo 細胞では JAR や JEG-3 細胞の約 1/3 の発現量しか有していなかった。このデータは、野生型の Ad-L2 での遺伝子導入活性が BeWo 細胞では殆ど観察されなかったこととも一致している。BeWo 細胞は、forskolin 処理により cytotrophoblast 様の形態から syncytiotrophoblast 様の細胞形態へ分化することが知られており、ヒト胎盤の分化モデルとして汎用される細胞株である。この BeWo 細胞に対しては、Ad-RGD(HI)-L2 は野生型 Ad ベクターの約 80 倍の遺伝子導入活性を示しており、今後のヒト胎盤機能の解析の有用なツールになると考えられる。

ファイバーの C 末ドメインに K7 配列を挿入し、ヘパラン硫酸との親和性を付加した Ad-K7(C)-L2 はいずれの細胞株に対しても野生型ベクターと同程度の導入活性しか示していなかった。今回の検討では、細胞表面上のヘパラン硫酸の発現量についての解析は行っていないものの、少なくとも細胞表面上のヘパラン硫酸はファイバー改変 Ad ベクターの感染への寄与は極め

て低いと考えられる。一方、RGD 配列と K7 配列を共に挿入した Ad-RGD(HI)K7(C)-L の遺伝子導入活性は、Ad-K7(C)-L2 よりも上がっているものの Ad-RGD(HI)-L2 と比較すると低下している傾向にあった。Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 の生物学的濃度が低いことから、Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 では RGD 配列とポリリジン配列の 2 つの外来ペプチドをファイバーに発現することによりファイバーの立体構造が不安定になり生物学的濃度が低くなった可能性が示唆される。実際、ファイバーの 3 量体構造の安定化が Ad のカプシドタンパク質の安定性に関与することが示されており、今後ファイバーの立体構造の解析が必要となろう。

胎盤は種差が著しい臓器であり、動物実験のデータをヒトへ外挿することが困難なことで知られている。この為、ヒト胎盤での検討はヒト由来の胎盤細胞を用いて進められているのが現状である。現在、*in vitro* ヒト胎盤モデル細胞系としては、本実験で使用した JAR、JEG-3、BeWo 細胞が使用されている。協力研究者の近藤らは、アスコルビン酸、葉酸、亜鉛、ペプチドトランスポーターがこれらの細胞に発現していることを見出し報告してきた。しかしながら、現在の所、これら胎盤研究は現象論に終始しており実証的な解析が進展していない。昨今のポストゲノム研究の潮流の中で、RNAi を始めとした実証的機能解析の手段として核酸の有用性が示されてきた。これらの実証的機能解析手段を用いる際に重要になるのがこれらの核酸を効率的に目的とする細胞に導入する手法の確立である。

本研究では、各種胎盤細胞における各種ファイバー改変 Ad ベクターの遺伝子導入効率を比較することにより、胎盤研究における実証的解析を遂行するための基礎検討を行い、ある種の胎盤細胞系において Ad-RGD(HI)-L2 ベクターが野生型 Ad ベクターの約 80 倍の遺伝子導入活性を有することを見い出した。この結果を萌芽として、妊婦への薬物治療の最適化を指向した胎盤細胞モデルにおける実証的解析が進展するものと期待され

る。

D.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

DC はナイーブな T 細胞を感作・活性化できる唯一の抗原提示細胞であり、最近では獲得免疫応答および自然免疫応答の両者を統御する免疫系の司令塔として理解が深まっている。このような DC の免疫学的特性はワクチン開発における標的として極めて魅力的であり、齧歯類およびヒトの DC を大量に調製する技術が確立されたことに伴って、現在多くの研究機関において様々な方法で TAA を導入した DC のワクチン機能が検討されている。しかし、TAA 導入 DC の投与だけでは有効な腫瘍免疫が誘導できないという本療法の限界も次第に明らかとされ、その原因の一つに生体に投与した DC ワクチンのリンパ組織（効果器官）への移行性が極めて乏しいことが挙げられる。すなわち、現状の DC 免疫療法の有効性向上には、投与 DC のリンパ組織集積性を増強しうる DC コンディショニングの必要性が浮き彫りとなってきた。

生体内における白血球の局所への遊走・浸潤には、ケモカインと総称される 8~14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群が深く関与しており、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している。現在、ヒトでは約 50 種類のケモカインが同定されており、それらは保存された 4 つのシステイン残基のうち N 末端の 2 個のシステインの位置から C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、および CX3C ケモカインの 4 つのサブグループに分類されるスーパーファミリーを形成している。また、すべてのケモカインは 7 回膜貫通 G タンパク質共役型レセプターを介して作用し、同定されている約 20 種類のケモカインレセプターもスーパーファミリーを構築している。ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群と

して発見され、おもに炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990年代後半からバイオインフォマティクスを駆使して EST データベースを検索するという手法により新しいケモカインが次々と発見され、リンパ球や DC など主要な標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとなった。これによって、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展するとともに、癌免疫療法へのケモカイン/ケモカインレセプター連関の応用が、免疫細胞の体内動態制御に基づく有効性改善に非常に有用であろうという議論がなされるようになってきた。そこで本研究では、AdRGD を用いてケモカインレセプター (CCR7) 遺伝子を効率よく導入した DC を創製し、その免疫学的特性と腫瘍免疫誘導能を解析することで癌免疫療法におけるワクチン担体としての有用性を評価した。

まず、新たに構築した AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC (CCR7/DC) における遺伝子発現解析を行ったところ、ベクター用量依存的に CCR7 遺伝子発現レベルは上昇し、細胞表面には CCL21 の濃度勾配を感知して一連の細胞遊走機構に必要なシグナルを伝達することができる機能的な CCR7 タンパクを豊富に発現していることが確認できた。一方、DC は成熟すると CCR7 の発現を増強し、リンパ組織への遊走能を獲得するとされているが、我々の検討における成熟 DC (LPS/DC) では予想された CCR7 遺伝子発現レベルの増強ならびに CCL21 への遊走活性の上昇が認められなかった。この点に関して Granucci らは、LPS により成熟刺激を加えた DC における遊走活性と抗原貪食能の経時的な変化について報告している (*Microbes. Infect.* 13, 1079-1084, 1999)。DC は、LPS 刺激後 1~2 時間で抗原貪食能がピークを迎え、遊走能には一時的な低下が認められる。これは、生体内の DC が LPS 等の細菌由来産物によって引き起こされた炎症部位に留まり、抗原をエンドサイトーシスにより取り込む時期を反映

しているものと考えられる。さらに LPS 刺激 4~6 時間後では、DC の抗原貪食能は減弱し、代わって遊走活性がピークを迎え、その後減弱していくという過程を辿る。つまり、我々の検討での LPS/DC における低い CCR7 遺伝子発現レベルおよび遊走活性は、LPS 成熟刺激後 24 時間を経過したことにより、すでにそれらが低下した状態を示していると推察され、LPS を用いた DC の遊走活性制御は困難であることを示唆している。

生体内において DC は、免疫系を発動させる強力なイニシエーターとして働くだけでなく、免疫寛容など免疫系の制御や抑制にも関わる細胞であることが知られている。一般に、正の免疫応答誘導においては、未熟な DC が末梢局所で外来性抗原を取り込むと同時に炎症性サイトカインである IL-1 や TNF- α により刺激を受けて成熟活性化され、所属リンパ節へと移動して T 細胞領域へと集積する。この過程で DC は、細胞表面に T 細胞感作に不可欠な MHC 分子/共刺激分子の発現を増強し、効果的に T 細胞依存性の初期免疫応答を惹起することができる。一方、負の免疫応答誘導においては、未熟 DC が組織に常在する物質やアポトーシス細胞を捕食して、T 細胞領域に移動する過程で活性化された表現型を示すことなく、未熟 DC として抗原提示を行っていることが知られている。つまり、T 細胞応答時の DC の活性化状態や性質により免疫応答の方向性は大きく影響されるというこれらの知見は、DC 免疫療法に使用する DC ワクチンの免疫学的性質を把握することが非常に重要であることを示すものである。そこで、CCR7/DC の抗原提示細胞としての機能を *in vitro* で精査したところ、CCR7/DC の抗原貪食能は未熟 DC (Mock DC) と比較するとわずかに低下するものの高い活性を保持していた。この結果は、CCR7/DC を *in vivo* 腫瘍内投与した際には、CCR7/DC が保持している抗原貪食能によって癌細胞断片を捕食し、その中に含まれる TAA に対する免疫応答を惹起できる可能性を示唆している。また Yanagawa らは、マウス成熟 DC における

FITC-dextranの取り込みがCCR7のリガンドであるCCL21あるいはCCL19の存在下で増大することを報告しており (*Blood* 101, 4923-4929, 2003)、腫瘍内に投与したCCR7/DCによる癌細胞断片の取り込みに腫瘍近傍に位置するリンパ管から産生されるCCL21が促進的に作用することも推察される。一方、CCR7/DCは成熟DC (LPS/DC) に匹敵するMHC分子/共刺激分子の発現レベルを示し、未熟DC (Mock DC) と比較してより強力にT細胞増殖を刺激できることも判明した。これらの結果は、AdRGDを用いた遺伝子導入がDCの成熟を促進させるという我々の以前の報告 (*Cancer Gene Ther.* 10, 421-431, 2003) と一致しており、AdRGD-CCR7によるDCへの遺伝子導入がCCR7の発現増強を達成するとともに、抗原提示細胞として必要な機能を亢進させることを示している。現在我々は、AdRGDによるDC成熟機構の分子メカニズムについて検討を進めており、本研究結果はAdRGDを用いて創製した遺伝子改変DCワクチンの有効性・安全性の確保に有益な基礎的情報を提供するものと期待している。

DCの生体内動態を評価する手法には、放射性物質や蛍光物質で標識したDCを投与する実験が多用されているが、これらの方法においては標識物質をDCがエキソソームとして分泌することや、死滅したDCから漏出した標識物質を他の細胞が貪食することなど、投与したラベル化DCの移動・分布を正確に測定できていない可能性が残される。Eggertらは、EGFP-Tgマウス由来のDCを用いることでこれらの問題点を回避し、ラベル化などの操作を必要としない簡便なDC体内動態評価法を報告している (*Immunol. Lett.* 89, 17-24, 2003)。そこで、EGFP-Tgマウスから単離したDCを用いてCCR7/DCを調製し、MHCハプロタイプの一一致する野生型C57BL/6マウスの腹部皮内に投与したところ、CCR7/DCはコントロールDCと比較して5~10倍優れた所属リンパ組織への集積性を示し、当初の目的どおりDCにCCR7を高発現させることによって“リンパ組織指向性DC”と

もいうべきワクチン担体を創製できことが実証された。

そこで、CCR7遺伝子とともにTAA遺伝子を導入したDCワクチンを調製し、*in vivo*におけるリンパ組織移行性の大幅な改善がDC免疫療法の有効性に反映されるかについて検討した。メラノーマはTAA解析が進んでいる数少ない癌の一つであり、メラノサイトの分化ならびにメラニン形成に関与するgp100、MART-1 (melanoma antigen recognized by T cell 1)、tyrosinase、TRP (tyrosinase-related protein) などが、メラノーマ関連抗原としてこれまでに同定されている。gp100はマウスおよびヒトメラノーマで構成的に過剰発現しており、また高い免疫原性を有することから、ヒトを対象とした特異的免疫療法における重要な標的分子と考えられており、現在、MHC class I分子上に提示されるgp100ペプチドを用いた癌免疫療法が第I/II相臨床試験において評価されている。また、gp100を含めたメラノーマ関連抗原を標的とする癌免疫療法の前臨床試験には、ほとんどのヒトメラノーマ関連抗原homologを発現しているマウスB16メラノーマモデルが多用される。以前に我々は、従来型Adベクターを用いてgp100遺伝子を導入したDCと比較して、AdRGD-gp100を適用したDC (gp100/DC) が優れたgp100特異的CTL誘導に基づくより強力な抗B16BL6腫瘍効果を達成できることを報告した (*Gene Ther.* 10, 1891-1902, 2003)。しかし、十分な腫瘍免疫を惹起するためには 1×10^6 cells/mouseという大量のgp100/DCをワクチン投与する必要があり、本プロトコルの臨床応用への展開を考慮した場合、患者のDC単離・調製に伴う採血負担を軽減する観点からより少ないDCワクチン投与量で効果的な治療に結びつくことが望ましい。そこで、gp100遺伝子とCCR7遺伝子とを共導入したDC (gp100+CCR7/DC) をマウスにワクチン投与し、1週間後に攻撃接種したB16BL6腫瘍に対する増殖抑制効果をモニタリングしたところ、gp100/DCと比較して1/2~2/5の

投与 DC 数で同等の抗腫瘍効果を発揮し、この有効性の向上が gp100+CCR7/DC による効率の良い gp100 特異的免疫応答の惹起に基づくことが明らかとなった。これらの成果は、積極的なリンパ組織移行能を有する CCR7/DC の DC 免疫療法への応用が、従来の DC 免疫療法において有効な治療効果を達成するために必要とされていた DC ワクチン投与量を大幅に低減できることを示しており、① DC 前駆細胞単離のために必要な患者の採血負担の軽減、② DC ワクチン調製における労力・コストの削減、に繋がる貴重な基礎的情報であると考えられる。

現在、より効果的な DC 免疫療法の開発を目的に、患者に投与する抗原提示 DC を種々のサイトカインやリガンド分子の刺激により成熟させる方法 (DC コンディショニング) の最適条件が活発に研究されている。これらの中には、投与 DC のリンパ組織移行性の増強を狙ったアプローチも含まれており、プロスタグランジン E_2 による DC 刺激や DC 投与部位における炎症反応の惹起が有効であると報告されている。今後、これらの研究と我々の研究成果とを融合させることにより、さらに優れた“リンパ組織指向性 DC ワクチン”を創製することができれば、DC 免疫療法の臨床応用実現に大いに貢献するものと期待される。

D.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

活性化した免疫細胞が腫瘍組織内へと浸潤し、直接腫瘍細胞を攻撃するという腫瘍の排除メカニズムを考慮すると、活性化と浸潤という両者を達成することが重要であることは明白である。また、これまで我々は、CCL27 遺伝子を導入した OV-HM 細胞をマウスへ移植したところ、その CCL27 産生 OV-HM 腫瘍組織内へ T 細胞、NK 細胞が浸潤し、腫瘍増殖抑制効果があることを報告しているが、同時に生着した腫瘍に対して CCL27 遺伝子を導入しても治療効果が得られないことを確認している。そこで T 細胞、NK 細胞を活性化す

るサイトカインである IL-12 に着目し CCL27 と併用することによる免疫細胞の活性化と浸潤の両者を目指した治療法の有用性について検討した。その結果、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与 (AdRGD-IL-12 : AdRGD-CCL27 = 9 : 1 もしくは 5 : 5) することにより、各単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られ、さらに 9 : 1 の割合で併用投与した群では全例で完全治癒するという非常に強い抗腫瘍効果が得られた。一方で、AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 の投与比率が 1 : 9 の群では全く効果が得られず、投与比率により得られる抗腫瘍効果が著しく異なっていたことから、投与比率も治療効果に対する大きな要因であることが示された。今後の治療を考えた場合、最適な治療効果を得るためには、その投与量とともに投与比率についても十分考慮すべき点であると考えられる。また、治療に用いる分子の選択も重要である。我々は、種々のケモカインを発現する腫瘍細胞をマウスに皮内移植し、その腫瘍増殖抑制効果について検討したところ、腫瘍細胞の種類によって効果を示すケモカインが異なっていることを報告している。これは、腫瘍細胞の種類とケモカインの間に何らかの関係があることを示唆する興味深い結果であり、単にこれまでの治療法とケモカインとを併用すればよいというものではなく、がん種あるいは患者個人によって投与するケモカインを選択していかなくは、最適な治療効果が得られにくいものと考えられる。そのためにも、腫瘍細胞の特徴と効果を示すケモカインの因果関係を明らかにすることは非常に意義深い検討課題であり、その研究成果は今後のがん免疫療法に大きく貢献できるものと期待される。

続いて併用投与により腫瘍の完全拒絶が認められたマウスに対して、腫瘍細胞特異的な免疫反応が誘導されているのかを検討する目的で、腫瘍の再移植実験を行ったところ、完全治癒が得られたマウスでは、その投与比率によらず、OV-HM 細胞はほとんど生着しなかった。このことから、腫

瘍細胞特異的な免疫反応が記憶されていたことが示され、これまでのいわゆる三大療法で問題となっていた再発に対しても、効果があるものと考えられる。また、がん免疫療法の特徴としては、再発だけではなく転移に対しても効果があるものと期待されている。今回用いた IL-12 は、最初に抗腫瘍効果を示した論文において既に転移に対しても効果があることが報告されており、その後種々のがん種において IL-12 の抗転移作用が確認され、実際の治療面においてもその効果が期待されているサイトカインである。我々はこれまでに、転移がんに対する効果について検討する目的で、マウスの腹部に正中線を挟んで左右両側に腫瘍を移植し治療実験を行った。その結果、片側の腫瘍に AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、遠隔に存在するもう片側の腫瘍に対しても増殖抑制効果が認められた (data not shown)。これは予備的な検討であるものの、本治療法が転移がんに対しても有用であることを示唆するものであり、この転移がんに対する治療効果は、そのメカニズム解明とともに今後の検討課題である。

AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を併用投与による抗腫瘍効果増強について、まずどの免疫細胞が寄与しているのかを検討したところ、T 細胞依存的であり、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットが共に重要であることが示された。そこで、併用投与による治療効果増強のメカニズム解明を目的に腫瘍内へ浸潤した T 細胞数を測定した。その結果、併用投与群では AdRGD-IL-12 単独投与群よりも腫瘍内浸潤 T 細胞の有意な増加が認められ、多くの T 細胞が腫瘍内に浸潤したことが抗腫瘍作用の増大につながったものと考えられた。しかし一方で、治療効果が認められなかった AdRGD-CCL27 単独投与群においても、腫瘍内へ多くの T 細胞が浸潤していたことから、続いて免疫細胞の活性化状態について検討を行った。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ことから、まず活性化ヘルパー

T 細胞が産生する IFN- γ の発現を確認した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群ではその発現が認められなかったことから、腫瘍内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞が活性化していなかったことが示唆された。また、AdRGD-IL-12 単独投与群と併用投与群では同程度の IFN- γ の発現が観察されたことから、両群ともヘルパー T 細胞が活性化していたことが考えられた。続いて、腫瘍内に活性化した免疫細胞が浸潤していたのかについて検討を行うため、腫瘍内での perforin 陽性細胞数を測定した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では IFN- γ の結果と同様に、腫瘍内に perforin 陽性細胞はほとんど観察されなかった。また、併用投与群では AdRGD-IL-12 単独投与群よりも有意な perforin 陽性細胞数の増加が認められたことから、活性化した細胞数も両群間の治療効果の差につながったものと考えられた。これらの結果より、浸潤と活性化の両立が、がん免疫療法に重要であることが示された。

一方で活性化した細胞が浸潤したのかそれとも浸潤した細胞が活性化したのか、その順序は不明である。今回は AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を同日に腫瘍内投与したが、活性化の後に浸潤するのであれば先に AdRGD-IL-12 を投与し、浸潤した後に活性化するのであれば逆に AdRGD-CCL27 を先に投与するというように、併用投与する日程を変更させることにより、治療プロトコルの最適化が図られるものと考えられる。

また、ケモカインを利用した治療法において問題点となってくるのが、制御性 T 細胞の存在である。制御性 T 細胞の抑制機構は、GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene) からのシグナルによる抑制作用の惹起などが考えられているが、未だ不明な点が多い。いずれにしても、制御性 T 細胞を腫瘍内へ浸潤させることで、エフェクター作用を負に制御し治療効果が減弱する可能性がある。制御性 T 細胞は CD4 陽性、CD25 陽性細胞であることから、本検討において AdRGD-CCL27 単独投与群で

腫瘍内に浸潤したCD4陽性T細胞の多くが制御性T細胞であり、そのため治療効果が観察されなかったことが考えられた。しかし、*ex vivo*における検討では、CCL27遺伝子を導入した腫瘍ではT細胞が浸潤しており、さらに腫瘍増殖抑制効果が認められた。*in vivo*による本検討においても*ex vivo*での検討と、その浸潤細胞のレパートリーには大差がないと予想されることから、本検討におけるAdRGD-CCL27単独投与群では制御性T細胞の影響は少なかったものと考えられる。ただし、ケモカインによっては制御性T細胞をも腫瘍内に浸潤させてしまう可能性がある。今後ケモカインを利用した治療法を実践していくためには、制御性T細胞に作用せず、目的とするエフェクター細胞にのみ特異的に作用するようなケモカインを探索していく必要がある。

D.1.6 ターゲティング Ad ベクターの開発

特定の組織への遺伝子導入能を有したAdベクターの開発のためには、まず、nativeのAdが有する感染ルートブロックし、細胞特異的な受容体を介してのみ感染できるベクターを開発する必要がある。Adの細胞内への侵入は、ファイバーが受容体のCARに結合し、その後ペントンベースのRGDモチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる。また、5型Adのファイバーシャフト領域に存在するKKTKからなるペパリン結合ドメインがAdの*in vivo*における組織移行性に関与していることが報告されている。従って、ターゲティング能を有したAdの開発にあたっては、CARや αv インテグリン、ヘパラン硫酸を介した感染を阻害することが必要である。そこで本研究では、ファイバーノブ、ペントンベース、ファイバーシャフト領域を同時に改変することで、これらの分子を認識しては感染しないAdベクターの改良を行った。

CARと結合能を消失させるためのファイバーノブの変異としてはFGループの変異とABループの変異が知られている。FGループの変異では、

4アミノ酸を欠損させることでファイバーノブの構造変化を誘起し、CARとの結合能を消失させるのに対し、ABループの変異ではファイバーノブの構造変化を伴わずアミノ酸置換によりCARとの結合能を消失させることが報告されている。このファイバーノブだけの変異を加えたアデノウイルスベクターでは、FGループとABループの変異間では、*in vitro*での遺伝子導入活性に違いはなく、共に従来のAdベクターに比べ、1%程度の遺伝子発現能しか示さないことが明らかとなっている。ところが、本研究の結果より、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ループに変異を加えた方が、FGループの場合に比べ、更に遺伝子発現能の減弱が認められ、ターゲティングAdベクターの基盤ベクターとして優れていることが明らかとなった。本結果の詳細なメカニズムは不明であるが、FGループの変異に伴うファイバーノブの構造変化では、(ファイバーノブ単独の変異の場合には観察されなかった)微妙なCARとの結合性が残っている可能性が示唆された。

本研究で開発したトリプルミュータントAdベクターは、ファイバー領域(HIループおよびC末端領域)に1ステップの*in vitro*ライゲーションで、自由に、簡便に外来ペプチドコードDNAを導入できるように設計されていることから、今年度より実験に着手したファージ表面提示法によるターゲティングリガンドの同定技術を併せ、ターゲティングAdベクターのための基盤技術になるものと考えられる。

D.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

主任研究者のグループでは、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できるAdベクターとして以下に列挙するような様々なベクターを開発・改良し、その遺伝子導入特性を明らかにしてきた。

- (1) AdゲノムのE1/E3欠損領域、さらにE4領域と3' ITRの間の領域にも簡便な*in vitro*ラ

イグレーションで外来遺伝子を導入できるダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベクターの開発に成功した。これにより各領域への簡便な目的遺伝子の導入が可能になり、単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載した Ad ベクターの作製が可能となった。

- (2) 転写活性化タンパク質の tTA の発現単位を E3 欠損領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入することで、単一のベクターで tet-off 系の機能を有した Ad ベクターを作製し、優れた発現制御能を示すことを明らかにした。また、tet-on 系の転写活性化因子の rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入した改良型 tet-on 系搭載 Ad ベクターを開発し、発現誘導能が極めて優れていることを明らかにした

- (3) 第 2 世代の rtTA (M2 あるいは S2 mutant rtTA) 遺伝子は rtTA 遺伝子に数 bp の mutation を施すことで作製されたものであり、変異 rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたトリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベクターを用いることで、従来の rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたベクターに比べ、ドキシサイクリンに対する感受性が 1-2 オーダー改善した。さらに、ドキシサイクリンに対する親和性が増大したことで、M2 あるいは S2 mutant rtTA と tTS をもった Ad ベクターでは、*in vivo* においても効率の良い遺伝子発現誘導能が認められた。従って、*in vitro*、*in vivo* の両条件下において優れた遺伝子発現制御能を示す tet-on 系の Ad ベクターに開発に成功した。

そこで本研究では、上記発現制御型 Ad ベクターにファイバー改変技術を加え、CAR 陰性の細胞へもファイバー領域に挿入した RGD ペプチドを利用して α インテグリン依存的に遺伝子導入導

入できる Ad ベクターの開発を行った。これにより、より多くの細胞種に対して発現制御型 Ad ベクターの適用が可能になり、遺伝子治療の有効性・安全性の向上に寄与できると期待された。

D.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

がんを中心とする遺伝子治療対象疾患に対して Ad ベクターは、その優れた遺伝子導入・発現効率から遺伝子導入用ベクターとして広く選択されている。しかしながら Ad ベクターは血中投与後大部分が数分のうちに肝臓に集積するため血液を介した腫瘍組織等の疾患部位へのターゲティングが困難であること、Ad ベクターの抗原性による肝障害等の問題点を抱えており、臨床での使用方法は著しく制限されている。そこで我々は Ad ベクターの有するこれら問題点を克服すると共に、腫瘍を標的とし得るベクターの開発を目指して、安全性に優れた非電荷水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) による Ad ベクター表面の化学修飾に取り組んだ。

修飾に用いた PEG 添加量を調整することで、様々な修飾率を有する PEG 修飾 Ad ベクターを作製した。また、PEG 修飾 Ad ベクターの血中半減期の飛躍的な向上は、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合障害が関与していること、ならびに 89% という高修飾率の PEG 修飾 Ad ベクターであっても、その蛋白質に由来する高い核移行活性は保持されていることを明らかにした。また、Meth-A 担がんマウスを用いて PEG 修飾 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子発現特性を評価した結果、修飾率 61% の PEG 修飾 Ad ベクターでは、多くの臓器において未修飾 Ad ベクターよりも数十倍高い遺伝子発現が得られた。現段階ではこの現象の詳細なメカニズムは不明だが、今後の検討により投与量を削減し得るベクターの作製が期待される。さらに修飾率 89% の PEG 修飾 Ad ベクターでは、腫瘍において未修飾 Ad ベクターよりも約 40 倍高い遺伝子発現量を示し、同時に副作用の原因となり得る肝臓での遺伝子発現量は未修

飾 Ad ベクターの約 20 分の 1 に抑制された。Ad ベクターは全身投与後数分での肝集積性が問題となっており、このような腫瘍への遺伝子発現分布に関する報告例は全く無く、今回はじめて明らかとなった知見である。

一般的に、腫瘍組織では血管透過性が亢進していること並びにリンパ系による異物回収機構が未発達等の性質のため、PEG 修飾により血中滞留性が向上したりボソーム等において、EPR 効果と呼ばれる腫瘍集積性が観察されている。また、現在までにウイルスベクターの受動的ターゲティングに関する報告はなされていない。今後修飾率 89% の PEG 修飾 Ad ベクターでみられた現象に関して、詳細なメカニズム解明に取り組むとともに、血中を介した腫瘍に対する遺伝子治療用ベクターとしての有用性について検討していく予定である。

さらに PEG 修飾 Ad ベクターの受動的ターゲティングに加えて、PEG 末端に標的指向性分子を付与することで、PEG 修飾 Ad ベクターの上述の特徴を有し、更にターゲティング能をも兼ね備えた新規バイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発にも取り組んだ。今回は、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 を合成した。その後、RGD-PEG 修飾 Ad ベクターを作製し、その機能性評価を行った。その結果、RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは CAR 低発現細胞に対して、未修飾の Ad ベクターと比較して約 100 倍高い遺伝子発現効率を示した。また、PEG 修飾 Ad ベクターの抗体回避能について検討したところ AdRGD ベクターは、抗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 ベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD ベクターの 15 倍であった。このことから、RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは AdRGD ベクター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 ベクターを用いているが、この修飾率が低下することにより、遺伝子導入効率も低下する。この事実は逆に RGD-PEG を用いて

より高い修飾率の Ad ベクターを作製すれば、ウイルス当たりの RGD 分子も多く提示されることになり、結果的にインテグリンを介した遺伝子導入効率が上昇する可能性がある。即ち、標的指向性分子を付与した水溶性高分子を用いた Ad ベクターのハイブリッド化の場合には、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強く現れるだけでなく、Ad に対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、本方法は理想的な遺伝子治療用ベクターとして創製できる可能性を示している。

D.3 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

D.3.1 発現制御型 siRNA 発現 Ad ベクターシステムの開発

従来の遺伝子治療や遺伝子導入による実験系は、多くの場合、目的 (治療用) 遺伝子の過剰発現を基盤としたものである。一方近年、21-29 塩基長の短鎖の二本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) によって配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が注目されているが、本研究により Ad ベクターを用いて siRNA を発現させることによっても遺伝子発現の効率的な抑制が可能であることが明らかとなった。今後はこのような遺伝子発現抑制を目的とした遺伝子治療や遺伝子機能解析研究においても、主任研究者らが開発した様々なタイプの次世代 Ad ベクターが重要な基盤技術になると期待される。

本研究では、ドキシサイクリンにより siRNA の発現レベルを調節できる Ad ベクターの開発を試みた。そのため、tetO 配列を有した変異 H1 プロモーターの作製を行ったが、tetO 配列を H1 プロモーターの TATA ボックスと転写開始点の間に置き換えても H1 プロモーター活性を阻害せず、通常の H1 プロモーターによる siRNA 発現カセットと同様に標的遺伝子発現を効果的に抑制することが明らかとなった。また、p53 に対しては 1000

VP/cell のベクター濃度により発現の十分なノックダウンが観察されたが、c-MYC に対しては 3000 VP/cell のベクター濃度が必要であった (Fig. 52)。この遺伝子発現の抑制程度の違いは、それぞれの標的配列に対する siRNA 配列の効果 (効率) の違いを反映していると考えられる。

遺伝子発現抑制の効果的な調節は、Ad-H1tet0-p53 または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR のモル比 1:6 で達成され、完全な遺伝子発現抑制の解除にはさらに多量の Ad-TR が必要である可能性が考えられた。Ad-TR は CMV プロモーターによって tetR を発現させているが、CMV プロモーターへのイントロン A の付与や CA プロモーターの様な強力なプロモーターを使用することによってより多くの tetR を発現させることができれば、tetR 発現 Ad ベクター量を減少しても効果的に遺伝子発現抑制の調節が可能になると考えられる。

来年度以降は、特異的組換え酵素の cre とその標的配列 loxP を利用した発現制御型 siRNA Ad ベクターを開発し、目的に応じて種々の適用が可能がベクターシステムの開発を進めていく予定である。

D. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

D. 4. 1 35 型 Ad ベクターによるヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

外来遺伝子の発現をドライブするプロモーターは遺伝子発現効率を決める大きな要因のひとつであるが、これまで造血幹細胞におけるプロモーター活性に関する系統的な研究はほとんど行われてこなかった。本研究では、遺伝子発現実験で用いられている代表的な 6 種類のプロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現効率を比較検討し、その結果 EF1 α プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが高い遺伝子発現効率を示すことを明らかにした。中でも CA プロモーターは最も高い遺伝子発現効率を示し、より未分化な細胞画分においても強い転写活性を示した。この結果は、ヒト造血幹細胞への遺

伝子導入による再生医療や遺伝子治療、もしくは遺伝子機能解析において極めて重要な知見になるものと思われる。

CA プロモーターは、現在最も強力な転写活性を有するプロモーターのひとつであり、肝細胞やリンパ球をはじめとする遺伝子治療の重要な標的においてその高い活性が実証されている。さらに CA プロモーターはマウス胎児や ES 細胞において高い遺伝子発現効率を示すことが報告されていることから、造血幹細胞をはじめとする未分化細胞での遺伝子発現に適しているものと思われる。

一方、CMV プロモーターは遺伝子発現実験で最も汎用されるプロモーターのひとつであるが、CD34 陽性細胞および未分化画分における遺伝子発現効率は低いものであった。近年、ES 細胞をはじめとする未分化細胞における CMV プロモーターの転写活性が低いことが報告されており、CMV プロモーターは造血幹細胞などの未分化細胞での遺伝子発現には適さないことが示唆された。しかし今回、CMV プロモーターにイントロン A を付与することにより、約 2 倍高い遺伝子発現効率を得られた (CMVi プロモーター)。さらに、CA プロモーターにおいても β -actin のイントロンが含まれることを考慮にいと、イントロンはヒト造血幹細胞での遺伝子発現において重要な要素であることが推察された。

近年、CD46 が 35 型 Ad を含む Subgroup B に属する Ad の受容体であることが報告された。CD46 はヒトでは赤血球を除く全ての細胞で発現しており、そのため 35 型 Ad ベクターは 5 型ベクターと比較し、より多くの細胞に感染できることを我々は確認している。これまで CD46 の発現レベルと 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率は相関することが報告されており、ヒト CD34 陽性細胞が CD46 を高発現していること、さらにほぼ同程度のベクターゲノム量が GFP 陽性画分および GFP 陰性画分両方で検出されていることから、恐らく 35 型 Ad ベクターは CD46 を介してほぼ全ての

CD34 陽性細胞に感染しているものと思われる。それにもかかわらず、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入効率が 100%に達しないのは、CD34 陽性細胞は非常に不均一な細胞集団であり、一部の細胞ではプロモーターの活性が不十分であるため遺伝子発現にいたらないものと考察される。今後さらに CD34 陽性細胞に適したプロモーターが同定されれば、さらに高い遺伝子発現効率が得られるものと思われる。

今回、35 型 Ad ベクターの作製方法として *in vitro* ライゲーション法を 35 型 Ad ベクター作製に適用した。これまで、35 型 Ad ベクターの作製方法は相同組換えを利用する方法など煩雑なものばかりであったが、今回 *in vitro* ライゲーション法を適用することにより、極めて簡便に 35 型ベクターを得ることが可能となった。さらに E1 および E3 欠損領域を増大させることにより、より大きな外来遺伝子を搭載することが可能となった。35 型 Ad ベクターにおいても 5 型 Ad ベクターと同様、野生型ゲノムサイズの 105%がウイルス粒子に封入可能であれば、今回作製した pAdMS4 由来の 35 型 Ad ベクターでは約 6.6Kb の外来遺伝子が搭載可能となる。

以上、本研究ではヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞および未分化細胞画分への効率の良い遺伝子導入に向けた 35 型 Ad ベクターの最適化を行い、最も遺伝子発現効率の高いプロモーターを明らかにした。

D.4.2 35 型 Ad 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

ウイルスの受容体は、ウイルスの感染域を支配する最重要因子であるといえる。よって 35 型 Ad の受容体を同定することは、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を解析する上で極めて重要な課題であったが、最近 CD46 が受容体であることが報告された。CD46 は分子量約 60KDa の 1 回膜貫通型タンパク質であり、補体成分を分解することにより自己の細胞を守る役割を担っている。その

ため、ヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞が CD46 を発現しているが、一方でげっ歯類では精巣でしか発現していない。これまで我々は、35 型 Ad ベクターがヒト由来の細胞に対しては 5 型 Ad ベクターよりも広い感染域を示す一方で、マウスへの全身投与による遺伝子発現効率は 5 型 Ad ベクターと比較し極めて低いことを報告してきたが、これは上記のような CD46 の発現の特徴を反映しているものと思われる。今後 35 型 Ad ベクターの臨床応用に向けて、35 型 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入特性を明らかにすることは必要不可欠と思われるが、CD46 がマウスで発現していないためマウスをモデル動物として使用することは不可能である。そこで本研究では、CD46 安定発現細胞および CD46TG マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入特性について検討した。

CD46 安定発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験および CD46TG マウスを用いた遺伝子導入実験より、35 型 Ad ベクターは *in vitro* だけでなく *in vivo* においても、CD46 を認識し細胞に感染することが明らかとなった。腹腔内投与による *in vivo* 遺伝子導入実験では、腹腔より直接感染できる部位である肝臓、腎臓、腹腔膜、横隔膜で特に高い発現が認められたことから、35 型 Ad ベクターは投与後、臓器表面より感染し遺伝子発現に至る可能性が示唆された。しかしながら、腹腔内投与後の遺伝子発現効率は、5 型 Ad ベクターを野生型マウスに腹腔内投与した場合と比較し 10 倍以上低いものであった。これは、35 型 Ad ベクターがヒト由来の培養細胞に対し 5 型 Ad ベクターとほぼ同程度の遺伝子発現効率を示すことを考慮すると、依然低いものであるといえる。この原因のひとつとして、ヒト由来の細胞では CD46 以上に 35 型 Ad に対する受容体が発現している可能性が示唆される。35 型 Ad に対する受容体は CD46 以外にも存在することが既に指摘されていることから、この未同定の受容体がマウスでは発現していないため、35 型 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子

導入効率が 5 型 Ad ベクターと比較し低いのかもしれない。

一方で、CD46TG マウスへの静脈内投与による *in vivo* 遺伝子発現効率は、野生型と著差は認められず低いものであった (data now shown)。現在、この理由については不明であるが、まず CD46 が血液側から結合できる部位に発現していないことが考えられる。CD46 は basolateral 側に発現していることが報告されていることから、血管内に投与された 35 型 Ad ベクターは血管側から CD46 に結合できないかもしれない。また、35 型 Ad ベクターが血液成分によって不活性化している可能性が挙げられる。腹腔内投与後の肺、心臓などの血管側からしか移行できない臓器での遺伝子発現効率は、肝臓や腎臓などの腹腔から直接結合できる臓器と比較し極めて低かったことから、腹腔より全身循環に入った 35 型 Ad ベクターは心臓や肺に到達する前に不活性化している可能性がある。今後これらの可能性について、検討していく予定である。