

E. 結論

1. 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

1) プロモーター配列およびファイバー領域における改変を最適化した Ad ベクターを用いることで、間葉系幹細胞、脂肪細胞、ES 細胞、胎盤細胞への劇的な遺伝子導入効率を上昇に成功した。

2) AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC の免疫学的表現型ならびにワクチン機能に関する検討を行い、以下の結論を得た。

- i. AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC において、CCL21 に応答する機能的な CCR7 タンパクの発現を確認した。
- ii. AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC は、未熟 DC が本来的に有している抗原食生活性を保持しつつ、MHC 分子/共刺激分子発現レベルならびに T 細胞増殖刺激能に増強が認められた。
- iii. AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC を *in vivo* に投与すると、優れたリンパ組織集積性が認められた。
- iv. AdRGD により CCR7 遺伝子と抗原遺伝子を共導入した DC は、抗原遺伝子のみを導入した DC と比較して、より強力に抗原特異的免疫応答を惹起することができた。

これらの研究成果は、DC 自身の体内動態制御、すなわち、リンパ組織への積極的な DC 送達システムの確立が、DC 免疫療法の有効性改善に非常に有用であることを強く示唆するものである。

3) AdRGD-IL-12 と AdRGD-CCL27 を腫瘍内に併用投与することにより、各単独投与よりも強い抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。また、AdRGD-IL-12 の単独投与に比べて、AdRGD-CCL27 を併用することで、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、perforin 陽性細胞の腫瘍組織内への浸潤が増加していることを明らかにした。

4) 組織特異性を有した Ad ベクターの開発のため

の第一ステップとして、Ad の native の受容体 (CAR、 αv インテグリン、ヘパラン硫酸) を認識しては感染したい Ad ベクターの開発・改良を行った。ファイバーノブの AB ループの変異、ファイバーシャフト領域を 35 型 Ad 由来に変更、ペントンベースの RGD モチーフの欠損の 3 領域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 ベクターのための基盤ベクターになりうるものと期待された。

5) RGD ペプチドをファイバーに付与した Ad ベクターと tet-off 系の発現制御能 (E1・E3 両欠損領域へ外来遺伝子を挿入) を組み合わせた Ad ベクターの開発に成功し、その有用性を実証した。

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

1) *In vivo* 全身投与において、修飾率 61% の PEG 修飾 Ad ベクターが多くの臓器で未修飾 Ad と比較して数十倍高い遺伝子発現効率を示し、ベルシェイプ型の遺伝子発現パターンを呈することを明らかにした。

2) 修飾率約 90% の PEG 修飾 Ad ベクターが、*in vivo* 全身投与において、腫瘍で高い遺伝子発現を示しつつ、肝臓での遺伝子発現を抑制することを明らかにした。

3) RGD モチーフを付与した PEG を用いて作製した RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは、AdRGD ベクターと同等の高い遺伝子発現能を示し、さらに中和抗体存在下では、AdRGD ベクターを上回る遺伝子発現能を有することを明らかにした。

3. 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

Improved *in vitro* ライゲーション法を応用することにより、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 ベクターを開発に成功した。さらに、テトラサイクリン由来のオペロン配列とオペロン配列に特異的に結合する転写活性化因子と利用した発現制御型 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

1) 各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを、ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞、およびさらに未分化な細胞である CD34 陽性 CD38 陰性細胞、CD34 陽性 AC133 陽性細胞に作用させたところ、EF1 α プロモーター、CA プロモーター、CMV β プロモーターが高い遺伝子発現効率を示し、なかでも CA プロモーターが最も高い活性を示した。また CA プロモーターは造血前駆細胞においても転写活性を有していることを明らかにした。本研究により得られた結果は、造血前駆細胞および幹細胞を用いた遺伝子治療ならびに遺伝子機能解析において極めて有用な情報になりうるものと思われる。

2) CD46 安定発現細胞および CD46TG マウスを用いた検討により、35 型 Ad ベクターが *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入において、CD46 を認識し細胞に感染することが明らかとなった。しかしながら、ヒト CD46TG マウスへの全身投与による *in vivo* 遺伝子導入効率は 5 型 Ad ベクターと比べると依然低く、今後、第 2 受容体の同定などさらなる検討が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Koizumi N., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Watanabe Y., Mayumi T., Hayakawa T. RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*, in press.
- 2) Eto Y., Gao J-Q., Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Maeda, M., Kawasaki K., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.*, in press.
- 3) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T. Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.*, in press.
- 4) Koizumi, N., Kondoh, M., Mizuguchi H., Nakanishi, T., Masuyama, A., Ida, F., Fujii, M., Hayakawa, T., Nakashima, E., Tanaka, K., Watanabe, Y. Comparison of transgene expression mediated by several fiber-modified adenovirus vectors in trophoblast cells. *Placenta*, in press.
- 5) Xu Z.L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T. Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, in press
- 6) Taki M., Kagawa S., Nishizaki M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kyo S., Nagai K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene*, in press.
- 7) Nasimuzzaman, M., Kuroda, M., Dohno, S., Yamamoto, T., Iwatsuki, K., Matsuzaki, S., Rashel, M., Kumita, W., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakamura, H., Taguchi, T., Wakiguchi, H., Imai, S. Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. *Mol. Ther.*, in press.
- 8) Maeda M., Kida S., Hojo K., Eto Y., Gao J-Q, Kurachi S., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S., Kawasaki K. Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Medicinal. Chem. Lett.*, 15, 621-624 (2005)
- 9) Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., Kawakami Y. Gene therapy for human small cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with

virally mediated RNA interference. *Gene Ther.*, 12, 95-100 (2005)

- 10) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, 12, 129-139 (2005)
- 11) Gao J-Q, Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Eto Y., Motomura Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S. A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 1043-1050 (2005)
- 12) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A. Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, 12, 72-83 (2005)
- 13) Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogiwara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi H., Asano, T., Oka, Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., 326, 402-409 (2005)

- 14) Koizumi, N., Mizuguchi H., Kondoh, M., Fujii, M., Hayakawa, T., Watanabe, Y. Efficient gene transfer into human trophoblast cells with adenovirus vector containing chimeric type 5 and 35 fiber protein. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 2046-2048 (2004)
- 15) Mizuguchi H., Hayakawa T., Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15, 1022-1033 (2004)
- 16) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z.L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)
- 17) Gao J-Q., Inoue S., Tsukada Y., Katayama K., Eto Y., Kurachi S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. High gene expression of the mutant adenovirus vector, both in vitro and in vivo, with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, 59, 571-572 (2004)
- 18) Eto Y., Gao J-Q., Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of MPEG-SPA. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 936-938 (2004)

- 19) Nakamura T., Peng K-W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Cattaneo R., Russell S. J. Antibody-targeted cell fusion, *Nat.. Biotech.*, 22, 331-336 (2004)
- 20) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N. Optimization of antitumor efficacy and safety of *in vivo* cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1670, 172-180 (2004)
- 21) Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 68-76 (2004)
- 22) Anno T., Uehara S., Katagiri H., Ohta Y., Ueda K., Mizuguchi H., Moriyama Y., Oka Y., Tanizawa Y. Overexpression of constitutively activated glutamate dehydrogenase induces insulin secretion through enhanced glutamate oxidation. *Am. J. Physiol.*, 286, E280-285 (2004)
- 23) Gao J-Q, Alexandre L.S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie.*, 59, 238-239 (2004)
- 24) Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., Mayumi T. RNA interfering approach for clarifying PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett.*, 560, 178-182 (2004)
- 25) Suto R., Tominaga K., Mizuguchi H., Sasaki E., Higuchi K., Kim S., Iwao H., Arakawa T. Dominant negative mutant of c-Jun gene transfer: a novel therapeutic strategy for colorectal cancer. *Gene Ther.*, 11, 187-193 (2004)
- 26) 水口裕之・早川堯夫; アデノウイルスベクター: *Mebio*, 21(4)、8-16 (2004)
- 27) 水口裕之・川端健二・櫻井文教・早川堯夫; 改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES 細胞への高効率遺伝子導入、炎症・再生 (日本炎症・再生医学会学会誌)、印刷中
- 28) 水口裕之・早川堯夫; カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入; *BIO INDUSTRY*, 印刷中
- 29) 水口裕之・早川堯夫; ウイルスベクター: *Drug Delivery System*, 印刷中

- 30) 水口裕之; ウイルスベクターのDDS: *Drug Metabolism And Pharmacokinetics*, 印刷中
- 31) 吉川友章・真弓忠範・中川晋作; 機能性細胞の創製とCell Delivery System: *Bioベンチャー*, 4, 56-58 (2004)
- 32) 衛藤佑介・真弓忠範・中川晋作; 遺伝子医薬品のDDS; *ファインケミカルシリーズ* ドラッグデリバリーシステムの新展開 -究極の薬物治療をめざして-: シーエムシー出版, 252-265 (2004)
- 33) 杉田敏樹・高 建青・中川晋作; Cell Delivery Systemを用いた次世代薬物治療: *Drug Delivery System*, 20, 42-48 (2005)
- 34) 杉田敏樹・中川晋作; 免疫とリポソーム: *リポソーム応用の新展開 ~人工細胞の開発に向けて~*, (株) エヌ・ティー・エス, 印刷中
- 4) 吉川友章, 丹羽貴子, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作; 変異型 Bcl-X_L (FNK) 遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 5) 杉田敏樹, 高 建青, 金川尚子, 飯田恵介, 本村吉章, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作; IL-12 と CCL27 の併用による抗腫瘍効果増強機構の解明; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 6) 小泉直也, 水口裕之, 中川晋作, 真弓忠範, 渡辺善照, 早川堯夫; 標的細胞へのターゲティングを目指した抗体結合能を持つアデノウイルスベクターの開発; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 7) 川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫; ES 細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 8) 金川尚子, 高 建青, 杉田敏樹, 飯田恵介, 本村吉章, 衛藤佑介, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作; IL-12 発現アデノウイルスベクターを用いた IL-12 非奏功性腫瘍に対する治療効果に関する検討; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 9) 倉知慎之輔, 衛藤佑介, 高建青, 森重智弘, 櫻井文教, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央,
- 1) 水口裕之; 遺伝子の機能解析基盤技術 -改良型アデノウイルスベクターから RNAi まで- 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 2) 増山茜, 近藤昌夫, 高橋梓, 藤井まき子, 水口裕之, 早川堯夫, 渡辺善照; ウェルシュ菌エンテロトキシン C 末断片の吸収促進作用における Claudin-4 の関与; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日
- 3) 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作; 変異型 Bcl-X_L (FNK) 遺伝子導入樹状細胞を用

学会発表

真弓忠範、中川晋作; Polyethylene Glycol 修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日

10) 衛藤佑介、高 建青、倉知慎之輔、森重智弘、櫻井文教、水口裕之、早川堯夫、堤 康央、真弓忠範、中川晋作; 体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討; 日本薬剤学会第 20 年会 (東京); 2005 年 3 月 25-27 日

11) 中川晋作; Cell Delivery System に基く癌免疫療法の最適化; 日本薬学会 125 年会 (東京); 2005 年 3 月 29-31 日

12) 小泉直也、近藤昌夫、水口裕之、中西剛、藤井まき子、早川堯夫、中島恵美、田中慶一、渡辺善照; 胎盤由来細胞への改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討; 日本薬剤学会第 20 年会 (東京) 2005 年 3 月 25-27 日

13) 藤原俊哉、香川俊輔、岸本浩行、遠藤芳克、田中紀章、藤原俊義、水口裕之; テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin(OBP-301) と微小管作用型抗癌剤の併用効果の検討; 第 9 回遺伝子医療研究会 (大阪) 2005 年 3 月 12 日

14) 岸本浩行、香川俊輔、藤原俊哉、遠藤芳克、日置勝義、京哲、水口裕之、田中紀章、藤原俊義; GFP 発現テロメラーゼ特異的制限増殖型ウイルス Telomelysin-GFP を用いた腫瘍組織ナビゲーション・システム; 第 9 回遺伝子医療研究会 (大阪) 2005 年 3 月 12 日

15) 水口裕之; ウイルスの超分子化学; 「ナノバ

イオ基礎から最前線」ーバイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出ー (神奈川); 2004 年 12 月 15 日

16) 水口裕之; 遺伝子機能解析や遺伝子治療に向けた改良型アデノウイルスベクターの開発; 横浜市立大学医学部特別講演; 2004 年 12 月 14 日

17) 岡田直貴、中川晋作、畑中 豊、谷 洋一、中山隆志、義江 修、水口裕之、早川堯夫、藤田卓也、山本 昌; ケモカイン発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫細胞浸潤; 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌); 2004 年 12 月 1-3 日

18) 住本秀敏、山形志津子、宮岸真、多比良和誠、水口裕之、早川堯夫、河上裕; RNA 干渉法による、ヒト樹状細胞 TLR4 シグナルにおける SOCS-1 のネガティブフィードバック機構の解析; 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌); 2004 年 12 月 1-3 日

19) Jian-Qing Gao, Toshiki Sugita, Hiroyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa; Synergistic anti-tumor response induced by the combination of a couple of stimulators: cytokine and chemokine, 11th Hong Kong International Cancer Congress 2004 (Hong Kong); 2004 年 11 月

20) 高 建青、杉田敏樹、金川尚子、飯田恵介、中山隆志、水口裕之、早川堯夫、義江 修、堤 康央、真弓忠範、中川晋作; Cell Delivery System に基く癌免疫療法の最適化, 日本薬学会近畿支部大会 (神戸); 2004 年 10 月

21) 杉田敏樹、高 建青、金川尚子、畑中 豊、谷

- 洋一、中山隆志、義江 修、水口裕之、早川 堯夫、岡田直貴、堤 康央、真弓忠範、中川 晋作: Cell Delivery System による癌免疫療法の最適化, ファーマ・バイオフィオーラム 2004 (東京); 2004 年 11 月
- 22) 細野哲司、水口裕之、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯; ドキソサイクリン誘導型 siRNA 発現アデノウイルスベクターの開発; 第 63 回日本癌学会総会 (福岡); 2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日
- 23) 岡田直貴、水口裕之、早川堯夫、義江 修、中川晋作、藤田卓也、山本 昌; 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; 第 63 回日本癌学会総会 (福岡); 2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日
- 24) Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa; Development of an adenoviral vector system for embryonic stem (ES) cells; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 25) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice.; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 26) Ke-Qin Xin, Kenji Someya, Fumihiko Takeshita, Shin Sasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Kenji Hamajima, Mitsuo Honda, Kenji Okuda; Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type5 vector with type35 fiber induces persistent protective immunity against HIV in mice; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 27) Hong Xin, Masahiro Kanehira, Sita Andarini, Toshiaki Kikuchi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Toshihiro Nukiwa, Yasuo Saijo; Tumor-targeting immunogene therapy by mesenchymal stem cells expressing CX3CL1; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 28) Hidetoshi Sumimoto, Makoto Miyagishi, Hiroyuki Miyoshi, Hiroyuki Mizuguchi, Shizuko Yamagata, Ayako Shimizu, Takao Hayakawa, Kazunari Taira, Yutaka Kawakami; Gene therapy for human cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. ; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 29) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa; PEGylation of adenovirus vector enhances gene expression in tumor via systemic administration; 第 10 回日本遺伝子治療学会 (東京); 2004 年 8 月 5-6 日
- 30) 細野哲司、水口裕之、形山和史、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯夫; PPAR・に対する siRNA 発現アデノウイルスベクターを用いた培養マウス脂肪前駆細胞の分化抑制; 第 20 回日本 DDS 学会 (東京); 2004 年 7 月 15-16 日

- 31) 櫻井文教、水口裕之、川端健二、井上直和、岡部勝、佐々木朋美、福島敬、山口照英、早川堯夫；CD46 トランスジェニックマウスを用いた 35 型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性の解析；第 20 回日本 DDS 学会（東京）；2004 年 7 月 15-16 日
- 32) 倉知慎之輔、衛藤佑介、高建青、堤康央、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子発現特性に関する研究；第 20 回日本 DDS 学会（東京）；2004 年 7 月 15-16 日
- 33) 中川晋作；機能性細胞の創製と Cell Delivery System；第 20 回日本 DDS 学会（東京）；2004 年 7 月 15-16 日
- 34) 萩山裕之、上阪 等、水口裕之、早川堯夫、宮坂信之；関節リウマチの遺伝子治療にむけたウイルスベクター発現カセットの改変；第 25 回日本炎症・再生医学会（東京）；2004 年 7 月 13-14 日
- 35) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発とその応用；第 25 回日本炎症・再生医学会（東京）；2004 年 7 月 13-14 日
- 36) 水口裕之；改良型アデノウイルスベクターの開発；ウイルス学湯河原キャンプ（静岡）；2004 年 6 月 16-17 日
- 37) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発と RNA 干渉；第 10 回日本生化学会近畿支部テクニカルセミナー「RNA 干渉とアデノウイルス - 理論と実践 -」（京都）；2004 年 6 月 5 日
- 38) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa; Role of CD46 on Ad35 vector-mediated transduction. American Society of Gene Therapy, 6th Annual Meeting, Minneapolis (2004. 6)
- 39) Takafumi Nakamura, Kah-Whye Peng, Sompong Vongpunsawad, Mary Harvey, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Roberto Cattaneo, Stephen J. Russell; Antibody-targeted fusion has great potential as a new research tool and provides a versatile platform for novel targeted therapies. American Society of Gene Therapy, 6th Annual Meeting, Minneapolis (2004. 6)
- 40) Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Yoshiteru Watanabe, Takao Hayakawa; Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and αv integrin-binding ablation ; 2nd Pharmaceutical sciences world congress (京都) ; 2004 年 5 月 30 日-6 月 3 日
- 41) Jian-Qing Gao, Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi; Enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor induced by the PEGylation ; 2nd Pharmaceutical sciences world congress (京都) ; 2004 年 5 月 30 日-6 月 3 日

42) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi; PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides show high transduction efficiency and protection ability from neutralizing antibodies ; 2nd Pharmaceutical sciences world congress (京都) ; 2004 年 5 月 30 日-6 月 3 日

43) 水口裕之 ; 遺伝子治療とベクター開発 ; 北海道大学大学院薬学研究科大学院講義 (札幌) ; 2004 年 5 月 28 日

44) 杉田敏樹、高建青、Alexandre Learth Soares、衛藤佑介、倉知慎之輔、中山隆志、水口裕之、早川堯夫、義江修、堤康央、真弓忠範、中川晋作 ; Cell Delivery System による癌遺伝子治療の最適化 ; 第 4 回遺伝子・デリバリー研究会 (京都) ; 2004 年 5 月

45) 衛藤佑介、倉知慎之輔、高建青、堤康央、水口裕之、前田光子、川崎鉦一、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作 ; 体内動態制御を目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製 ; 第 4 回遺伝子・デリバリー研究会 (京都) ; 2004 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

Table 1. Adenovirus vectors used in the present study

Name	Fiber type	Promoter
Ad-EFLacZ	Type 5 fiber	EF-1 α promoter
Ad-CMVLacZ	Type 5 fiber	CMV promoter
Ad-CMVILacZ	Type 5 fiber	CMV promoter with intron A
Ad-CALacZ	Type 5 fiber	CA promoter
AdRGD-CALacZ	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CA promoter
AdK7-CALacZ	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CA promoter
AdF35-CALacZ	Chimeric type 5 fiber tail and type 35 fiber knob and shaft	CA promoter

CA promoter: β -actin promoter/CMV enhancer with β -actin intron.

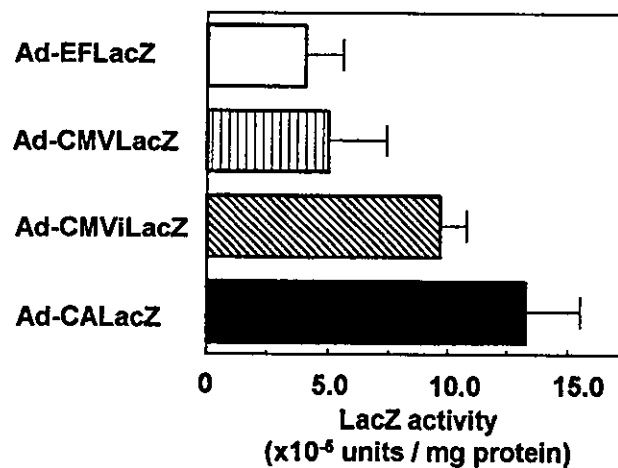


Fig. 1 Effects of the promoter sequences on Ad vector-mediated LacZ expression in hMSCs. HMSCs were transduced with conventional Ad vectors containing the EF-1 α , CMV, CMV with intron A, or CA (β -actin promoter/CMV enhancer) promoter (Ad-EFLacZ, Ad-CMVLacZ, Ad-CMVILacZ, or Ad-CALacZ, respectively) at 300 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing the Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. LacZ expression in the cells was measured by a luminescence assay 48 hours later. The data are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4).

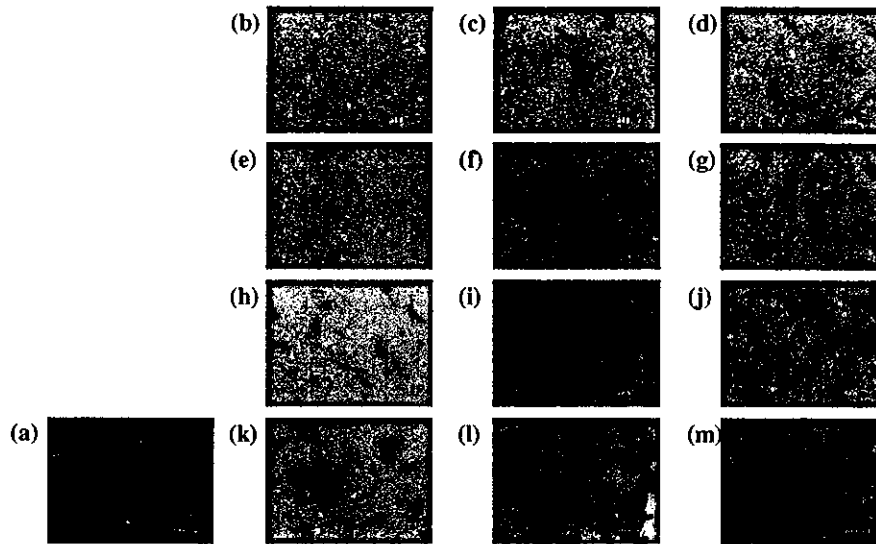


Fig. 2 X-gal staining of hMSCs transduced with various types of fiber-modified Ad vectors.
 HMSCs were transduced with several Ad vectors, each containing one of the following: the wild-type fiber, RGD peptide in the HI loop of the fiber knob, polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob, or Ad type 35 fiber (Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ, or AdF35-CALacZ, respectively) at 100, 300, 1000, or 3000 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing the Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. X-gal staining was performed 48 hours later. (a) Ad-CALacZ; (b, e, h, k) AdRGD-CALacZ; (c, f, i, l) AdK7-CALacZ; (d, g, j, m) AdF35-CALacZ. (b, c, d) 100 VP/cell; (e, f, g) 300 VP/cell; (h, i, j) 1000 VP/cell; (a, k, l, m) 3000 VP/cell.

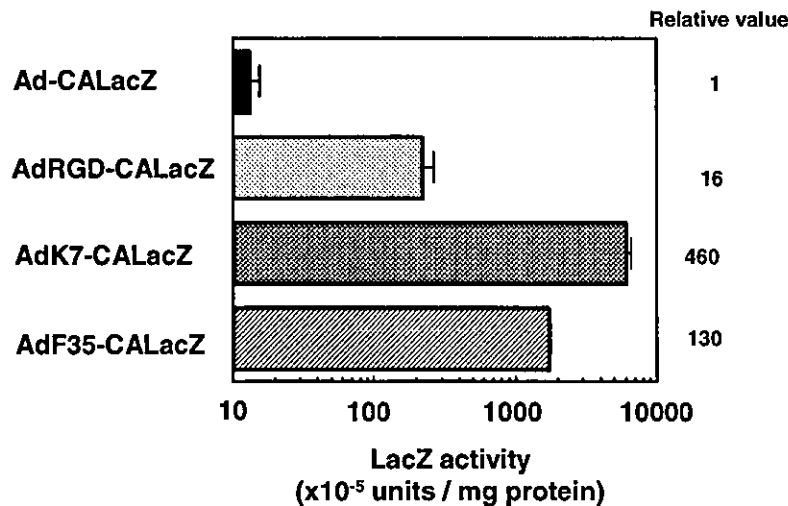


Fig.3 LacZ enzymatic activity of hMSCs transduced with various types of fiber-modified Ad vectors.
 HMSCs were transduced with 300 VP/cell of Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ, or AdF35-CALacZ, respectively at 300 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. LacZ expression in the cells was measured by a luminescence assay 48 hours later.

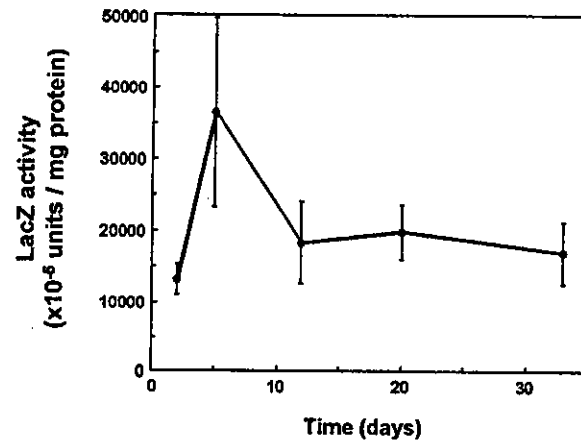


Fig. 4 Time course of LacZ expression in hMSCs transduced with AdK7-CALacZ.

HMSCs were transduced with 300 VP/cell of AdK7-CALacZ for 1.5 hours. Then, the medium containing Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. At the indicated times, LacZ expression in the cells was determined by a luminescence assay.

Data of X-gal staining are from one representative experiment of three performed. The data of a luminescence assay are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4).

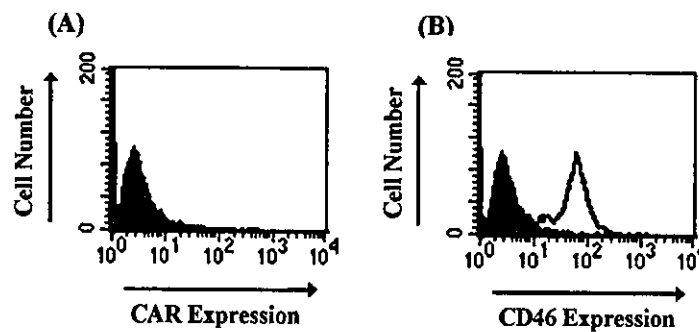


Fig. 5 Flow cytometric analysis of levels of CAR and CD46 expression in hMSCs.

HMSCs were labeled with (A) mouse monoclonal antibody RmcB (anti-human CAR) and then FITC-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody, or (B) FITC-conjugated anti-human CD46 antibody to detect human CAR or CD46 expression, respectively. As a negative control, the cells were incubated with an irrelevant antibody (shaded histogram). Flow cytometric analysis was performed by a FACSCalibur flow cytometer. Data shown are from one representative experiment of three performed.

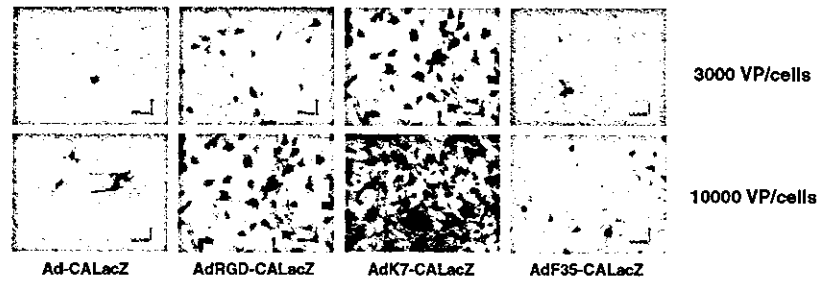


Fig. 6 Comparison of the transduction efficiency of various types of fiber-modified Ad vector into 3T3-L1 preadipocytes.

3T3-L1 preadipocytes were transduced with Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ or AdF35-CALacZ (3000 or 10000 VP/cells) for 1.5 h. After 48 h in culture, LacZ expression was determined by X-gal staining.

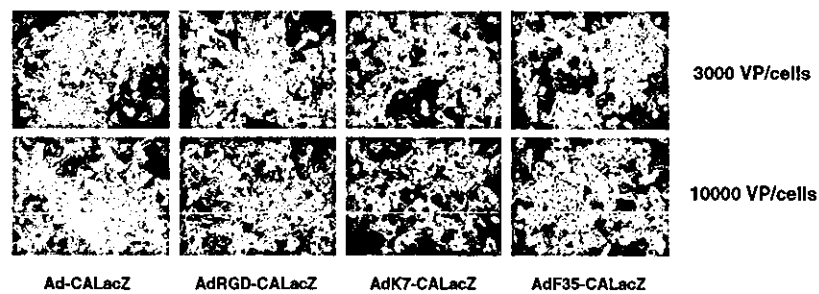


Fig. 7 Comparison of the transduction efficiency of various types of fiber-modified Ad vector into 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 adipocytes, which were cultured in differentiation medium containing pioglitazone, insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine for 6 days, were transduced with Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ or AdF35-CALacZ (3000 or 10000 VP/cells) for 1.5 h. After 48 h in culture, LacZ expression was determined by X-gal staining.

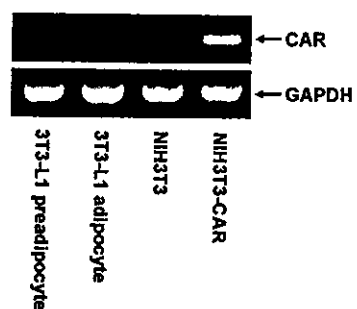


Fig. 8 RT-PCR analysis of CAR mRNA expression in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. Total RNA was isolated from 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes differentiated for 6 days, and RT-PCR analysis was performed as described in Materials and Methods section. NIH3T3 and NIH3T3-CAR cells were also analyzed as a negative and positive control of CAR mRNA expression, respectively.

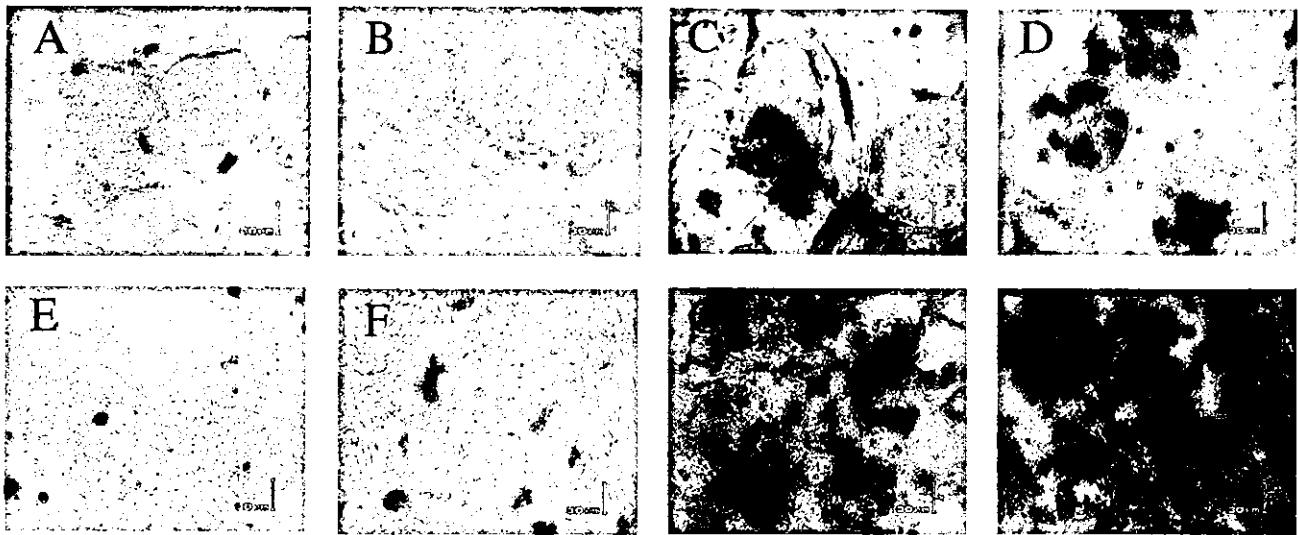


Fig. 9 X-gal staining of Ad vector-transduced mES cells. mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-RSV-LacZ (A, E), Ad-CMV-LacZ (B, F), Ad-CA-LacZ (C, G), or Ad-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

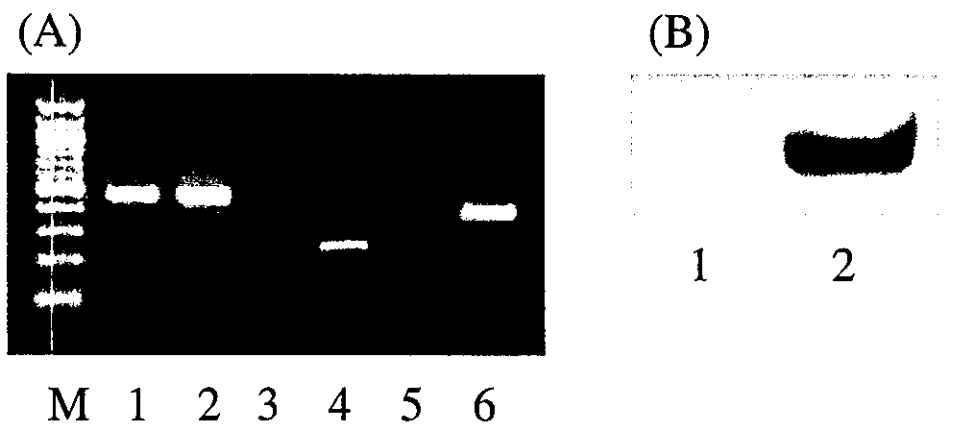


Fig. 10 CAR expression in mES cells. (A) Total RNA from feeder cells (lanes 1, 3, 5) or mES cells on feeder cells (lanes 2, 4, 6) was purified and reverse-transcribed into cDNA, and then cDNA was amplified by PCR for analyzing the expression of G3PDH (lanes 1, 2), CAR (lanes 3, 4), and Oct-3/4 (lanes 5, 6). M represents molecular marker. (B) Cell lysate (20 μ g/lane) from feeder cells (lane 1) or mES cells on feeder cells (lane 2) were loaded onto a 12.5% SDS-polyacrylamide gel, electrophoresed, and subsequently transferred to the membrane. The immunoblot was probed with a polyclonal antibody for mouse CAR.

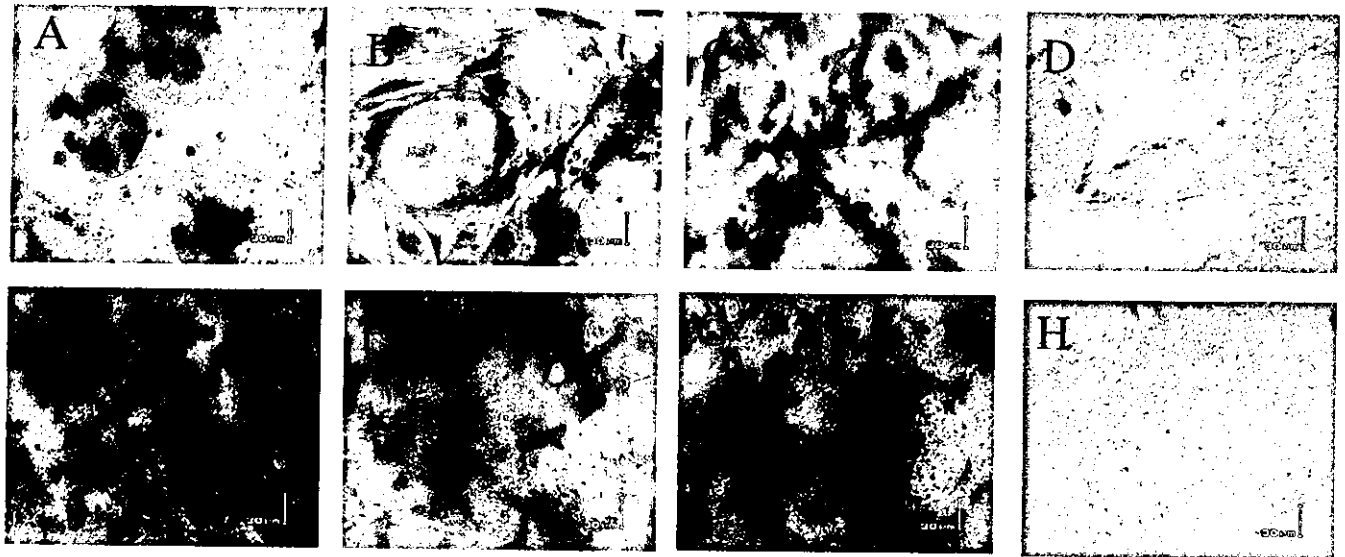


Fig. 11 X-gal staining of mES cells transduced with fiber-modified Ad vectors. mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-EF-LacZ (A, E; the figures correspond to those in Fig. 1), AdRGD-EF-LacZ (B, F), AdK7-EF-LacZ (C, G), or AdF35-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

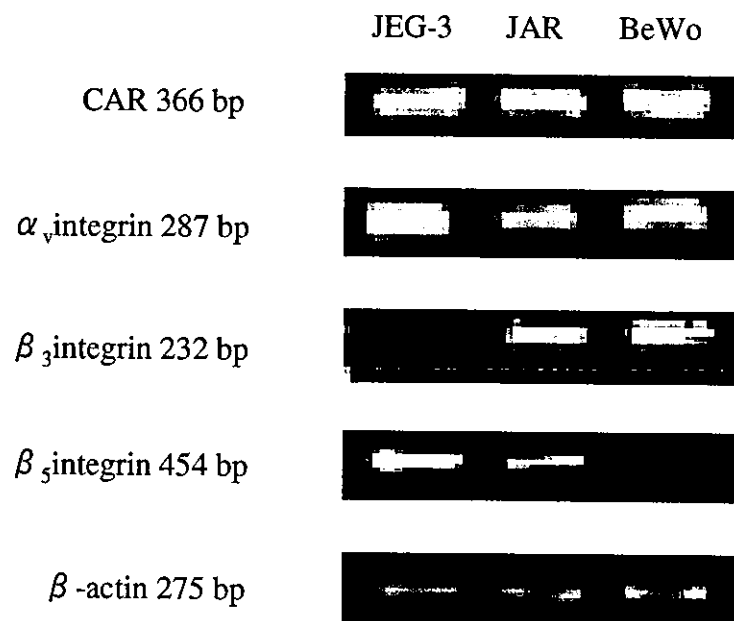


Fig. 12 RT-PCR analysis of CAR and integrating (α_v , β_3 , β_5) and β -actin expression in human trophoblast cell lines.

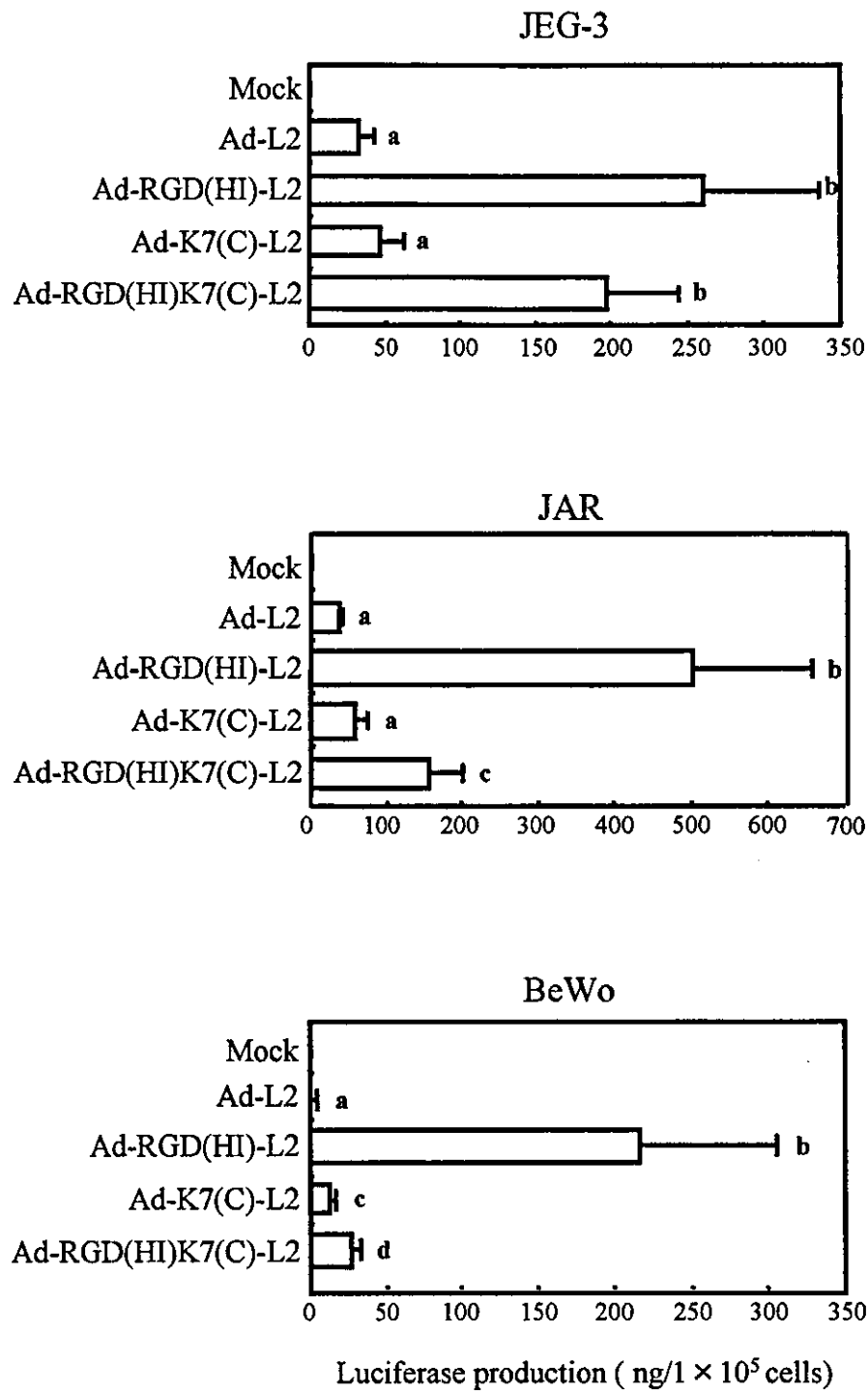


Fig. 13 Luciferase production in human trophoblast cell lines transduced by Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2 or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2. Cells were transduced with 300 vector particles per cell for 1.5 h. A luminescent assay was used to measure luciferase production after 48 h of culture. Data are means $\pm$ SD (n=4). Significant difference is observed among the groups with different superscript letters ($p < 0.01$).

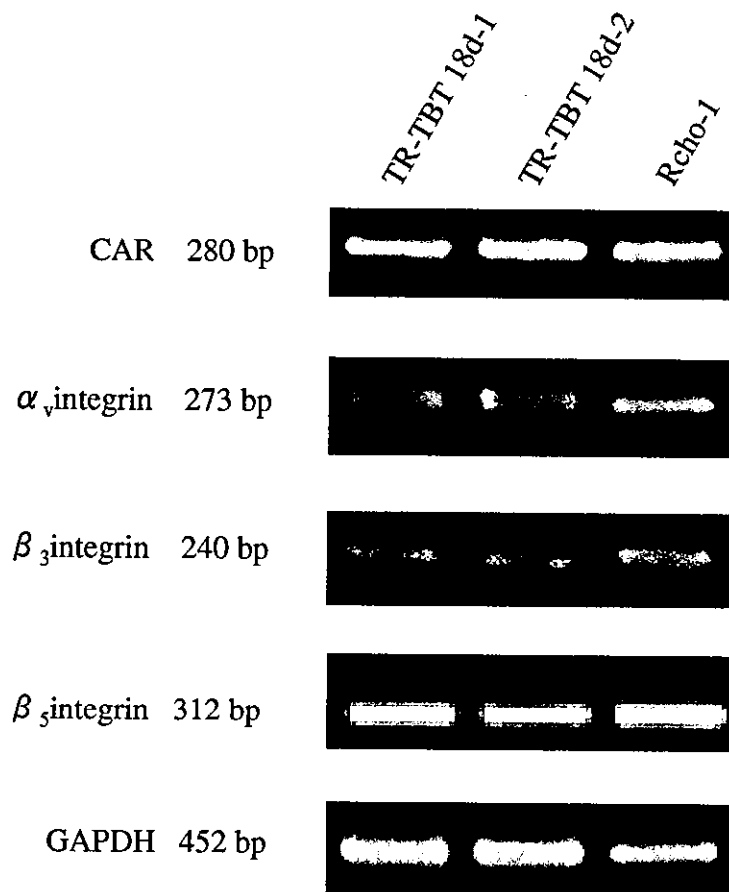


Fig. 14 RT-PCR analysis of CAR and integrins (α_v , β_3 , β_5) and β -actin expression in rat trophoblast cell lines.

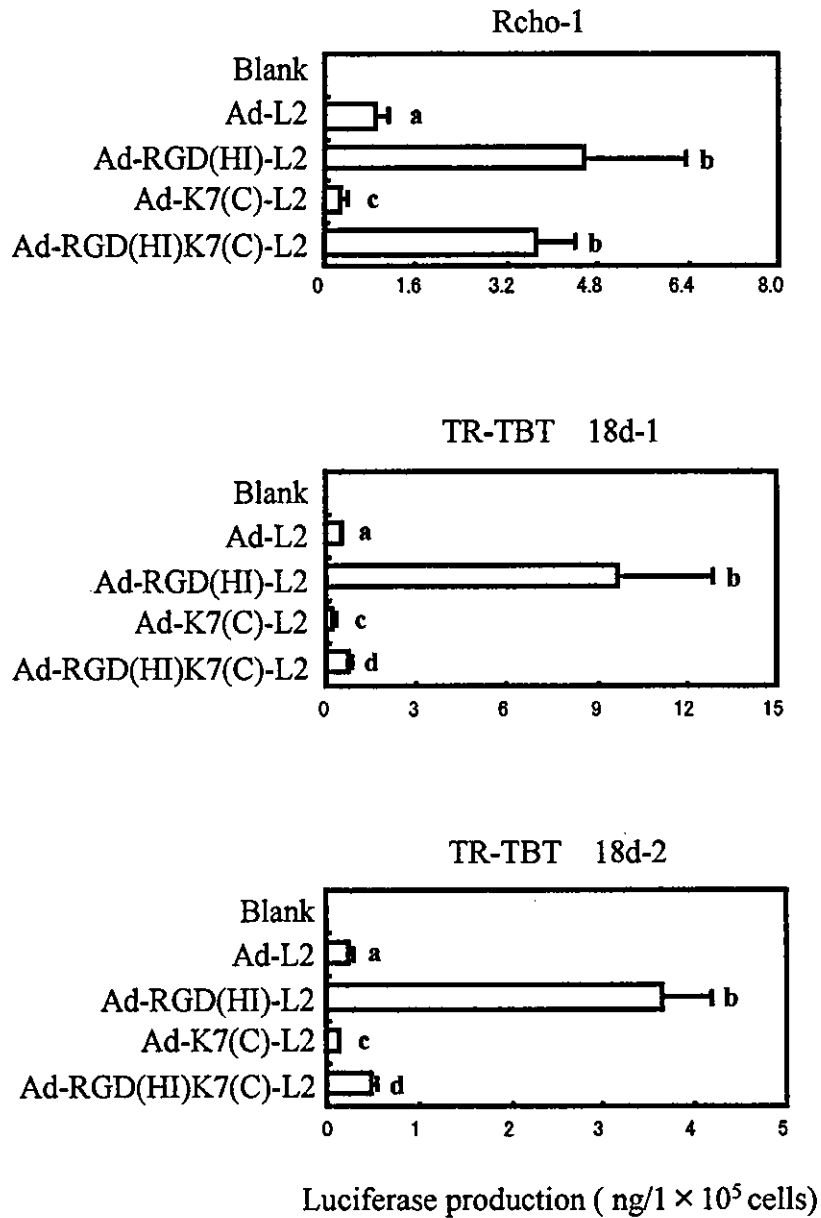


Fig. 15 Luciferase production in human trophoblast cell lines transduced by Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2 or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2. Cells were transduced with 300 vector particles per cell for 1.5 h. A luminescent assay was used to measure luciferase production after 48 h of culture. Data are means $\pm$ SD (n=4). Significant difference is observed among the groups with different superscript letters ($p < 0.01$).