

より、標的細胞への結合に α_v インテグリン指向性を持たせたファイバーミュータント Ad (AdRGD) ベクターが、CAR 欠損細胞のみならず、CAR 発現細胞に対しても従来型 Ad ベクターと比較して遺伝子導入・発現効率に極めて優れることを見出した。さらに AdRGD ベクターの腫瘍免疫遺伝子療法への応用としてケモカイン (CCL27) 遺伝子を用いることで、抗腫瘍免疫遺伝子治療の最適化が図れる可能性を見出した。また、Ad ベクターに対する抗体存在下でも遺伝子導入が可能で、且つ Ad ベクターの血中滞留性を向上させ標的組織にターゲティングするために、水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発を行ってきた。

本年度は、AdRGD ベクターの有用性を評価すべく、サイトカインやケモカインを発現する AdRGD ベクターを用いた抗腫瘍免疫遺伝子治療の最適化を試みた。また、水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発研究として、PEG ハイブリッド化 Ad ベクターを作製し、修飾率と体内動態および遺伝子発現の相関を検討し、その有用性評価を行った。さらに、標的リガンドを PEG の末端に導入した PEG ハイブリッド化 Ad ベクターの作製方法を確立した。

B. 研究方法

(1) Ad ベクターの構築

Ad ベクターの作製は、水口らが開発した *in vitro* ligation 法にて行った。ベクタープラスミドは、pAdHM4 (このベクタープラスミドを用いた場合、従来型 Ad (Ad) ベクターができる) および pAdHM15-RGD (このベクタープラスミドを用いた場合、ファイバーの HI loop に RGD 配列を有する Ad (AdRGD) ベクターができる) を用いた。一方、シャトルベクターは pHCMV5 あるいは pHCMV6 を使い、CMV プロモーターの下流にレポーター遺伝子を挿入した。そしてベクタープラスミドの I-Ceu I /PI-Sce I 部位にシャトルプラスミドの I-Ceu I /PI-Sce I フラグメントを挿入し、

Pac I で処理した後、superfect (QIAGEN 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10～14 日後 CPE (cytopathic effect) の確認できた 293 細胞を 3000 rpm、5 分間の遠心により回収し、少量の培養液に懸濁した後、3～4 回凍結融解した。溶液中に遊離してきたウイルスは、遠心操作 (3000 rpm、5 分間) により cell debris を除去した後、少数の 293 細胞に感染させた。CPE が観察されたら先と同様に細胞を回収し、凍結融解、遠心操作による cell debris の除去により高タイトの CVL (crude virus lysate) を得た。今回作製した Ad ベクターは、ルシフェラーゼを発現する Ad-Luc および AdRGD-Luc、CCL27 を発現する AdRGD-CCL27、Interleukin 12 (IL-12) を発現する AdRGD-IL-12、EGFP を発現する Ad-EGFP である。

(2) Ad ベクターの精製

回収した CVL を CsCl の密度勾配 (比重 1.40、比重 1.25) 上に重層し、SW41 rotor (Beckman) を用いて 18℃、35000 rpm で 1 時間遠心した (一次遠心)。チューブ内にできた下方のバンドを回収し (一次精製)、CsCl (比重 1.33) 上に重層し、同様に SW41 rotor (Beckman) を用いて 18℃、35000 rpm で 18 時間遠心した (二次遠心)。二次遠心でチューブ内にできた下方の白いバンドを回収し、4℃にて 1mM MgCl₂ および 10% グリセリンを含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4) で透析した。透析終了後、ウイルス液は -80℃ で保存した。

(3) ウイルス粒子の測定

ウイルス粒子数の測定は Maizel らの方法に従って行った。精製したウイルス液を適量とり 0.5% SDS/PBS (-) で溶解した後、吸光度計により OD_{260 nm} で測定した。得られた測定値を 1.1×10^{12} particles/OD₂₆₀ より換算した。

(4) Ad ベクターの力価測定

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

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

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

(5) in vivo における抗腫瘍効果の検討

OV-HM 細胞を PBS で洗浄し、Trypsin/EDTA で剥がした後、6 週齢の B6C3F1 雌性マウスの腹部皮内に 1×10^6 cells/100 μ l RPMI1640 FCS (-) /mouse で移植した。移植後 7 日目 (腫瘍径が約 7~8 mm) に、PBS、AdRGD-Luc、AdRGD-CCL27、AdRGD-IL-12 および AdRGD-IL-12 : AdRGD-CCL27 = 9 : 1、5 : 5、1 : 9 となるように調整し、合計 AdRGD 量として 2×10^7 PFU/50 μ l RPMI1640 FCS (-) /mouse で腫瘍内投与し、腫瘍径を経日的に測定した。また、抗腫瘍エフェクター細胞を同定するため、同様の実験を Balb/c 雌性ヌードマウスおよび以下の処理をした B6C3F1 雌性マウスを用いて行った。即ち、B6C3F1 マウスは、AdRGD 治療開始 3 日前から、Anti-asialo GM1 抗血清 (40 μ l/mouse)、および Rat anti-mouse CD4 抗体 (GK1.5) (100 μ l/mouse)、Rat anti-mouse CD8 抗体 (53.6.72) (100 μ l/mouse) をそれぞれ腹腔内に

連日投与し、治療後もさらに 5 日おきに 3 回投与した。この処理により血中から NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞が除去されていることを確認した。

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

また、腫瘍の長径が 20mm を超えたマウスは安楽死させた。尚、上記治療実験により完全治癒したマウスに対して、3 ないしは 6 ヶ月後に腹部皮内に OV-HM 細胞 (1×10^6 cells/mouse)、あるいは B16/BL6 細胞 (3×10^5 cells/mouse) を移植し、腫瘍の生着の有無を確認した。

(6) 免疫組織標本の作製と染色

OV-HM 担がんマウスの腫瘍内への AdRGD ベクター投与後 6 日目に腫瘍組織を回収し、O.C.T compound (Tissue TEK, Miles, Elkhart, IN) に包埋後、直ちに液体窒素に浸して凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。その後、6 μ m の凍結切片を作製し、風乾後、4 $^{\circ}$ C の 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。固定後、組織は内因性ペルオキシダーゼを失活させるため 0.3% H₂O₂ に 10 分浸した。続いて、5% BSA/PBS で 10 分間ブロッキングを行い、一次抗体を 30 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄後、二次抗体を 30 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄を行った。次にあらかじめ 30 分前に複合体を形成させておいた Avidine-HRP で 40 分処理し、TBS で 5 分 3 回洗浄後、DAB 溶液 (DAB 1mg, distilled water 900 μ l, 1M Tris-HCl 100 μ l) で発色させた。最後にヘマトキシリン液に 20 秒、浸漬することにより各染色を行い、脱水封入して永久標本とした。尚、免疫染色に使用した抗体は、Rabbit polyclonal anti-hCD3 antibody (DAKO)、Rat anti-mouse CD4 mAb (BD Pharmingen)、Rat anti-mouse CD8 mAb (Serotec)、Rat anti-mouse perforin antibody (DAKO)、normal Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology)、Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins (DAKO) である。

(7) RT-PCRによるIFN- γ mRNA発現解析

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

(8) インテグリン指向性ペプチド (RGD) を付与したポリエチレングリコール (PEG) の合成

インテグリン指向性 RGD 配列 (YGGRGDTP) を PEG 片末端に 2 分子付与した RGD-PEG-NHS は、Scheme 1 に従って合成した。まず RGD 配列を含む (Ac-YGGRGDTP β A)₂K-PEG- β AC-amide の合成を行うために、Fmoc (Fmoc=9-fluorenyl-methyloxy carbonyl) -K(Fmoc)-PEG- β AC(Trt)-Amide Resin を固相法にて合成した。固相上で Fmoc 保護基の除去 (脱保護) すなわちアミノ基の遊離 $\rightarrow$ DMF 洗浄 $\rightarrow$ Fmoc-アミノ酸誘導体と各ステップに適切な縮合反応試薬による HOBt の活性エステルによる遊離アミノ基との反応 (カップリング) $\rightarrow$ DMF 洗浄、の操作を繰り返して縮合反応を進めた。同様にピペリジンによる Fmoc 基の除去 (脱保護) と Fmoc- β Ala-OH と縮合を行い、その後脱保護を行って H- β Ala-Cys(Trt)-Amide Resin を得た (Scheme 1-②)。次に、Fmoc-PEG-NHS (MW 3,400、Shearwater corporation) を反応させ、ピペリジンによる脱保護後、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を反応させ、Fmoc-Lys(Fmoc)-PEG- β Ala-Cys(Trt)-Amide

Resin を得た (Scheme 1-④)。さらに Fmoc-Lys(Fmoc)-PEG- β Ala-Cys(Trt)-Amide Resin を、ペプチド合成機 (機種名: ABI433A、合成プログラム: FastMoc0.25 Ω MonPrevPk) を用いて、Fmoc- β Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(Bu^t)-OH、Fmoc-Asp(OBu^t)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Tyr(Bu^t)-OH を順次使用し、脱保護と縮合を繰り返して (Fmoc-Y(Bu^t)GGR(Pmc)GD(OBu^t)T(Bu^t)P β A)₂K-PEG- β AC(Trt)-Amide Resin を合成した (Scheme 1-⑤)。脱保護後の DIEA 存在下無水酢酸との反応により、遊離のアミノ基をアセチル化し、Resin から単離し、HPLC にて精製を行い Scheme 1-⑥に示す化合物を得た。さらに EMCS と反応させ RGD-PEG-NHS を得た。

(9) PEG および RGD-PEG 修飾 Ad ベクターの作製

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

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

各種 PEG および RGD-PEG 修飾 Ad ベクターと、2 倍濃度の SDS protein gel loading solution を等量混合し、終濃度 5% となるように 2-Mercaptoethanol を添加し、95°C で 5 分間処理した。各試料を 2%~15%、もしくは 4%~20% ポリア

クリルアミドゲルを用い、200V の定電圧で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE: 25 mM Tris, 192mM Glycine, 10% SDS) を行った。泳動後、蛋白質はクーマシブルーを用いて、PEG は 0.1M ヨウ素溶液を用いて染色した。

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

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

48 穴プレートに A549 細胞および B16BL6 細胞を $1 \sim 2 \times 10^4$ 細胞/0.5 ml/well で播種し、24 時間培養した。20 μ g/ml の LIPOFECTAMINE 2000[®] Reagent (Invitrogen) 存在下、非存在下および加熱処理 (90°C、10 分)、未処理条件下において、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCOBRL) で調整した未修飾 Ad-Luc、43%、72%、89%PEG 修飾 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 Microlumet Plus LB96、Perkin Elmer) で測定した。活性は、Luciferase activity RLU (relative light unit) /well として表した。

(12) 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。

(13) 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 で一晚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 ベクター量を算出した。

(14) 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)、Microlumet 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。

(15) 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 (CCGCACCYGGTTTTGCTT) 4 μ l、5 μ M TaqMan probe (5' -6FAM-AACCTGCCCCGCGGTATACACTG-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 $^{\circ}$ C で 10 分 Denaturation した後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 60 サイクル行った。

(16) 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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、大阪大学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ており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1 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

C.1.1 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ましい発展に伴い、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 量を変えずに 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. 1)。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 ベクター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. 2)。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 1)。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。

C. 1.2 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. 3)。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적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. 4)。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적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. 5)。

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につな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. 6)。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. 7)。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. 8)。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.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 化蛋白質やリボソームでは、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 化蛋白質やリボソームは、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. 9)。その結果、Coomassie Blue 染色により未修飾ヘキサンのバンドの高分子側に、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サンのバンドと PEG 修飾されたヘキサ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 2 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としている。

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. 10, Table 2)。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. 11 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

らびに貪食細胞から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. 12)。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. 12)。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が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. 13)。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 化リポ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 プロープを用いて、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. 14)。

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. 15)。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. 16)。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貪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. 17)。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. 18)。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。

D. 考察

D.1 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 細胞依存性であり、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.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、臨床での使用方法是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 との結合阻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リポソーム等において、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。

E. 結論

1. 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 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。

2) 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。

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 ベクター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。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) T. Hosono, H. Mizuguchi, K. Katayama, Z. L. Xu, F. Sakurai, A. Ishii-Watabe, K. Kawabata, T. Yamaguchi, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Hayakawa, Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15(8):813-9, 2004.

- 2) K. Katayama, K. Wada, H. Miyoshi, K. Ohashi, M. Tachibana, R. Furuki, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, A. Nakajima, T. Kadowaki, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, Y. Kamisaki, T. Mayumi, RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett.*, 560(1-3), 178-182, 2004.
- 3) N. Okada, J.Q. Gao, A. Sasaki, M. Niwa, Y. Okada, T. Nakayama, O. Yoshie, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Fujita, A. Yamamoto, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, Anti-tumor activity of chemokine is affected by both the kinds of tumors and the activation state of host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317(1): 68-76, 2004.
- 4) Y. Eto, J.Q. Gao, F. Sekiguchi, S. Kurachi, K. Katayama, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate (MPEG-SPA). *Biol Pharm Bull.*, 27(6): 936-938, 2004.
- 5) J.Q. Gao, L.S. Alexandre, Y. Tsuda, K. Katayama, Y. Eto, F. Sekiguchi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Nakayama, O. Yoshie, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie*, 59(3), 238-239, 2004.
- 6) J.Q. Gao, N. Inoue, Y. Tsukada, K. Katayama, Y. Eto, H. Kurachi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, High gene expression of mutant adenovirus vector both in vitro and in vivo with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, 59(7), 571-572, 2004.
- 7) N. Okada, N. Mori, R. Koretomo, Y. Okada, T. Nakayama, O. Yoshie, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, A. Yamamoto, Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, 12(2), 129-139, 2005.
- 8) N. Okada, S. Iiyama, Y. Okada, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, A. Yamamoto, Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, 12, 72-83, 2005.
- 9) M. Maeda, S. Kida, K. Hojo, Y. Eto, J.Q. Gao, S. Kurachi, F. Sekiguchi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Mayumi, S. Nakagawa, K. Kawasaki, Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 621-624, 2005.
- 10) J. Q. Gao, T. Sugita, N. Kanagawa, K. Iida, Y. Eto, Y. Motomura, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, T. Hayakawa, T. Mayumi, S. Nakagawa, 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.

11) Y. Eto, J. Q. Gao, S. Kurachi, F. Sekiguchi, K. Katayama, T. Sugita, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.*, in press.

12) Y. Okada, N. Okada, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.*, in press.

13) T. Hosono, H. Mizuguchi, K. Katayama, N. Koizumi, K. Kawabata, T. Yamaguchi, S. Nakagawa, Y. Watanabe, T. Mayumi, T. Hayakawa, RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene.*, in press.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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

学会発表

1) 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；遺伝子デリバリー研究会 第4回シンポジウム；2004年5月，京都

2) 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；遺伝子デリバリー研究会 第4回シンポジウム，2004年5月，京都

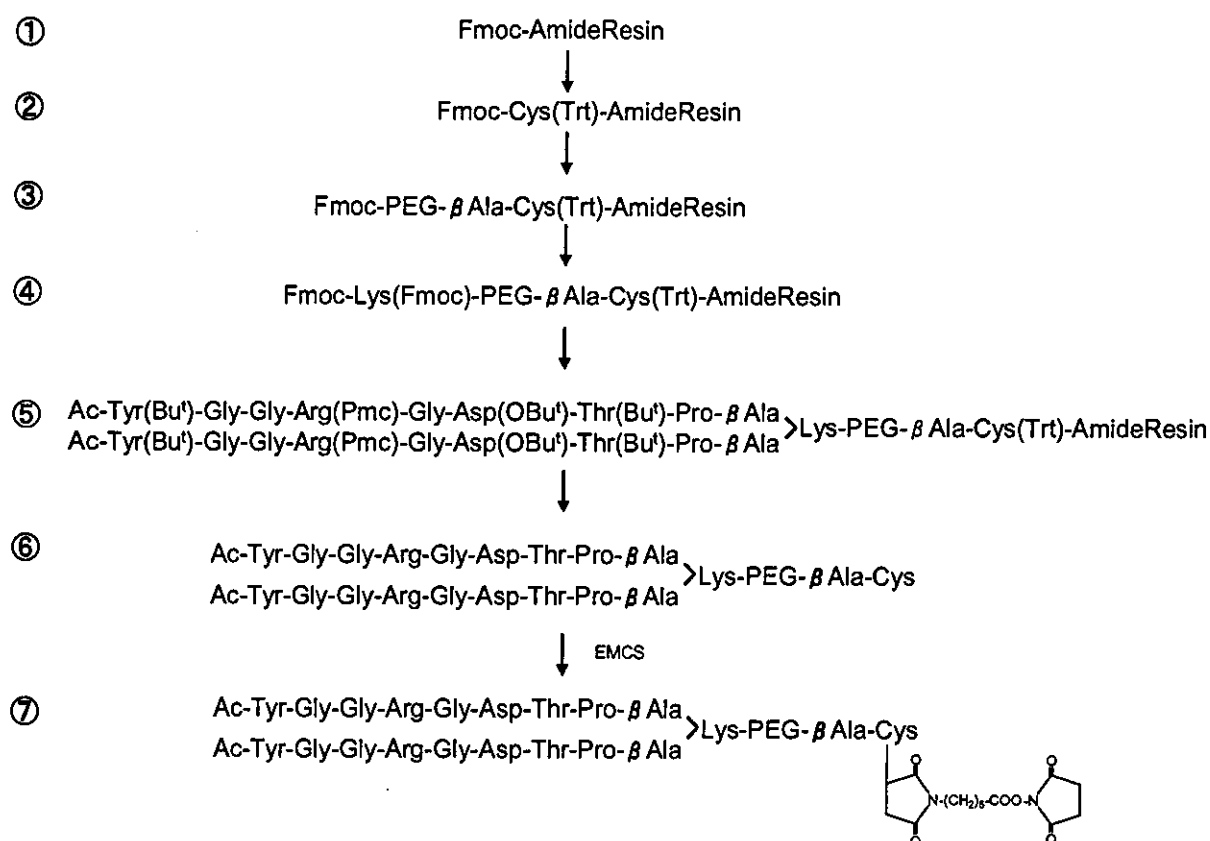
3) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi；PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides show high transduction efficiency and protection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

- 4) 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. ; Pharmaceutical Sciences World Congress 2004, 2004 年 5-6 月, 京都
- 5) 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検討 ; 第 20 回日本 DDS 学会, 2004 年 7 月, 東京
- 6) 中川晋作 ; 機能性細胞の創製と Cell Delivery System ; 第 20 回日本 DDS 学会, 2004 年 7 月, 東京
- 7) 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, 2004 年 8 月, 東京
- 8) 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 回日本癌学会学術総会, 2004 年 9-10 月, 福岡
- 9) 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 回日本癌学会学術総会, 2004 年 9-10 月, 福岡
- 10) 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 に基づく癌免疫療法の最適化 ; 日本薬学会近畿支部大会, 2004 年 10 月, 神戸
- 11) 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・パイオフォーラム 2004, 2004 年 11 月, 東京
- 12) 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, 2004 年 11 月, Hong Kong
- 13) 杉田敏樹、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 及び CCL27 発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の浸潤 ; 日本免疫学会総会, 2004 年 12 月, 札幌
- 14) 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 ; 日本免疫学会総会, 2004 年 12 月, 札幌

- 15) 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；日本薬学会，2005 年 3 月，東京
- 16) 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；日本薬学会第 125 年会，2005 年 3 月，東京
- 17) 金川尚子、高 建青、杉田敏樹、飯田恵介、衛藤佑介、本村吉章、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；日本薬学会第 125 年会，2005 年 3 月，東京
- 18) 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、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；日本薬学会第 125 年会，2005 年 3 月，東京
- 19) 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，2005 年 3 月，東京
- 20) 中川晋作；Cell Delivery System に基く癌免疫療法最適化；日本薬学会 125 年会，2005 年 3 月，東京

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



Scheme 1 Structure scheme for RGD-PEG

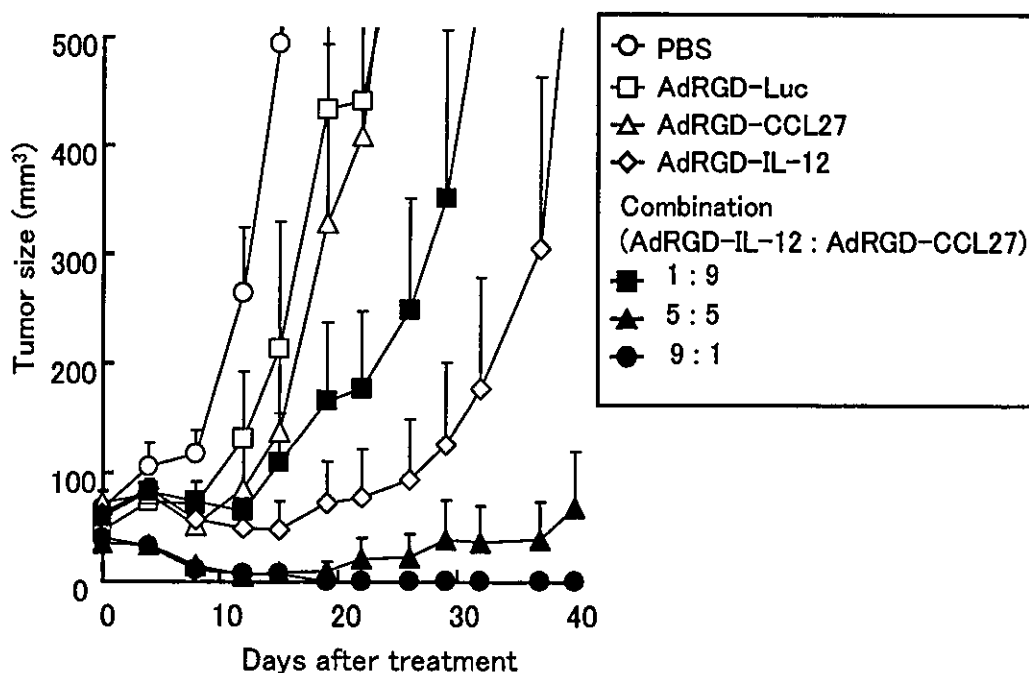


Fig. 1 Combination of AdRGD-IL-12 and AdRGD-CCL27 induced synergistic anti-tumor activity. B6C3F1 mice 1×10^6 OV-HM cells were inoculated intradermally into B6C3F1 mice. After the tumor diameter reached 7-8mm, indicated adenovirus vectors in total of 2×10^7 PFU or PBS were injected intratumorally. Tumor size was measured twice a week.

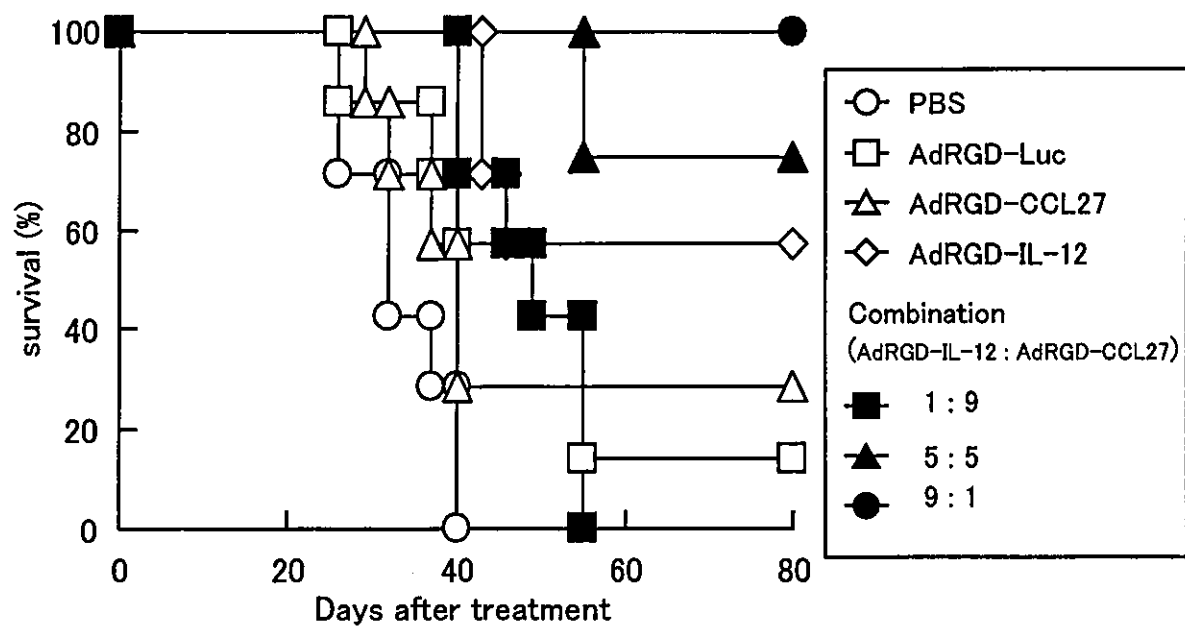


Fig. 2 The survival percent of mice with the treatment of indicated adenovirus vectors

Table 1 Induction of specific long-term immunity against OV-HM cells in tumor rejected mice

Groups	Challenging cells	Tumor rejected mice/ challenged mice		
		After 3 months		After 6 months
		1st Exp.	2nd Exp.	3rd Exp.
Intact	OV-HM	0/6	0/6	0/6
Combination AdRGD-IL-12 (9) AdRGD-CCL27 (1)	OV-HM	4/5	5/5	5/5
	B16BL6	0/3	0/5	0/5
Combination AdRGD-IL-12 (5) AdRGD-CCL27 (5)	OV-HM	4/4		
	B16BL6	0/2		