

RESEARCH ARTICLE

# Dominant-negative mutant of c-Jun gene transfer: a novel therapeutic strategy for colorectal cancer

R Suto<sup>1</sup>, K Tominaga<sup>1</sup>, H Mizuguchi<sup>2</sup>, E Sasaki<sup>1</sup>, K Higuchi<sup>1</sup>, S Kim<sup>3</sup>, H Iwao<sup>3</sup> and T Arakawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka, Japan;

<sup>2</sup>Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan; and <sup>3</sup>Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka, Japan

Activator protein-1 (AP-1), a transcription factor, is activated through many oncogenic signals. However, its biological role in colorectal cancer has not been fully elucidated. To investigate the role of AP-1 in colorectal cancer, we constructed an adenovirus-expressing TAM67, a dominant-negative mutant of c-Jun lacking the transactivation domain of wild c-Jun (DN-c-Jun), to inhibit endogenous AP-1. AP-1 DNA-binding activity was increased in colon cancer cells (HT-29 cells) by serum stimulation, followed by an increase in both [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation and cell number. Transfection of Ad-DN-c-Jun to HT-29 cells significantly inhibited serum-induced cell proliferation *in vitro*. As shown by flow cytometric analysis, DN-c-Jun significantly inhibited entrance

into S phase after serum stimulation, thereby leading to G<sub>1</sub> arrest. *In vivo* transfection of Ad-DN-c-Jun into xenografted HT-29 cell tumors in nude mice significantly decreased tumor volume on day 21 after treatment. A change was associated with decrease in Ki-67 labeling index. These observations together showed that AP-1 is a critical modulator for proliferation and cell cycle of HT-29 cells. We obtained the first evidence that DN-c-Jun gene transfer exerted a significant antitumor effect on colon cancer both *in vitro* and *in vivo*. DN-c-Jun gene transfer may be a new candidate for treatment of colorectal cancer.

Gene Therapy (2004) 11, 187–193. doi:10.1038/sj.gt.3302158

**Keywords:** activator protein-1; c-Jun; colorectal cancer; gene therapy

## Introduction

Colorectal cancer, a significant cause of morbidity and mortality throughout the world, is due to the pathologic transformation of normal colonic epithelium to an adenomatous polyp and ultimately an invasive cancer. This multistep progression is associated with a number of recently characterized genetic alterations, including mutations of tumor-suppressor genes and proto-oncogenes, such as APC, K-ras, p53 or DCC.<sup>1</sup>

Tumor-suppressor gene replacement therapy with wild-type p53 has been developed as a mechanism-based therapy.<sup>2,3</sup> This therapy yielded antitumor effects in animal and cell culture experiments, but only partial effects in clinical trials. Other gene therapies for human colorectal cancer, such as enzyme/prodrug systems (HSVtk/ganciclovir; CD/5-fluorocytosine) and immune-gene therapy based on cytokine or tumor antigen expression to induce tumor immunity (eg CEA), have not yet improved prognosis.<sup>4,5-7</sup> Elucidation of the basic molecular mechanisms of colorectal cancer and determination of a novel target for gene therapy are thus required.

Activator protein-1 (AP-1) is one of the transcriptional factors related to multiple gene transcription of mito-

genic signal cascades. AP-1 is expressed in most types of cells and is composed of hetero- and homodimers of the Jun and Fos families. As recently reviewed, AP-1 exerts diverse biological effects on proliferation, transformation, differentiation and apoptosis, depending on cell type and surrounding environment.<sup>8</sup> AP-1 proteins, mostly those belonging to the Jun group, have also been suggested to control cell life and death through their ability to regulate the expression and function of cell cycle regulators, such as Cyclin D1, p53, p21(cip1/waf1), p19(ARF) and p16.<sup>9</sup>

Although relatively little is known about the role of AP-1 activation in colorectal cancer growth, there are some reports indicating that AP-1 activation is related to colorectal cancer growth.<sup>9-11</sup> In contrast, other reports suggest that AP-1 is important for differentiation, apoptosis or resistance to therapy. Thus, the role of AP-1 in colorectal cancer has been controversial, and it remains to be determined whether AP-1 is essential for the multiplication of colorectal cancer.

In the present study, we constructed a recombinant adenovirus containing the dominant-negative mutant of c-Jun (Ad-DN-c-Jun) and infected it into colon cancer cells (HT-29) *in vitro* and *in vivo* to elucidate the roles of AP-1. We demonstrated that AP-1 was essential for colon cancer growth both *in vitro* and *in vivo*, and an important modulator of the cell cycle in HT-29 cells. We obtained the first evidence that DN-c-Jun gene transfer exhibited a significant antitumor effect on colon cancer both *in vitro* and *in vivo*, and demonstrated the possibility of AP-1-

Correspondence: Dr R Suto, Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

Received 04 April 2003; accepted 02 September 2003

based gene therapy as a novel treatment of colorectal cancer.

## Results

### Induction of AP-1 DNA-binding activity in HT-29 cells

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in Figure 1 shows that AP-1 DNA-binding activity in HT-29 cells increased the 1% serum stimulation in a time-dependent manner, and peaked 6 h later.

### Efficiency of transfection of adenovirus in HT-29 cells

After infection at multiplicities of infection (MOI) of 3, 30 or 100 with Ad-LacZ, 30, 70 (Figure 2) or approximately 100% of the cells expressed LacZ gene ( $\beta$ -galactosidase-positive cells). These findings indicated that the number of cells expressing LacZ gene was dependent on MOI of Ad-LacZ, and that infection of MOI of 100 with Ad-LacZ was enough to transduce the gene to HT-29 cells.

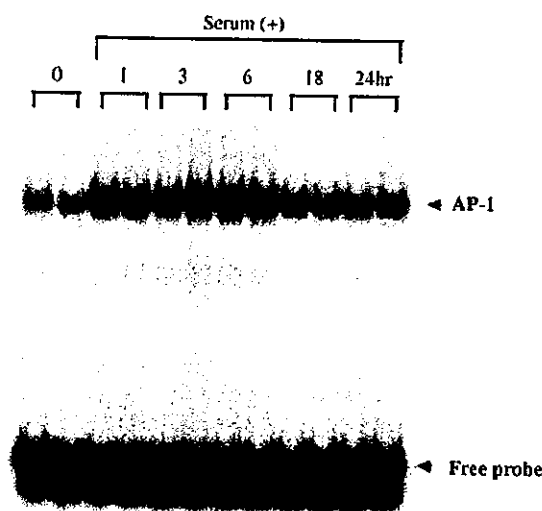


Figure 1 Time dependency of AP-1 DNA-binding activity in HT-29 cells stimulated by FBS (1%). FBS (1%) was added to culture medium for 0, 1, 3, 6, 18 or 24 h. EMSA was performed with double-stranded consensus oligonucleotide AP-1, as described in Materials and methods. Representative autoradiograms of AP-1-binding activity are shown.



Figure 2 Histological estimation of transduction efficiency of adenovirus in HT-29 cells. HT-29 cells were seeded on six-well cultured plates and infected with Ad-LacZ at 30 MOI. At 48 h after infection, the cells were fixed and stained with X-gal. Blue staining of cell nuclei identified LacZ expression. At an MOI of 30, the percentage of cells expressing LacZ gene reached 70%.

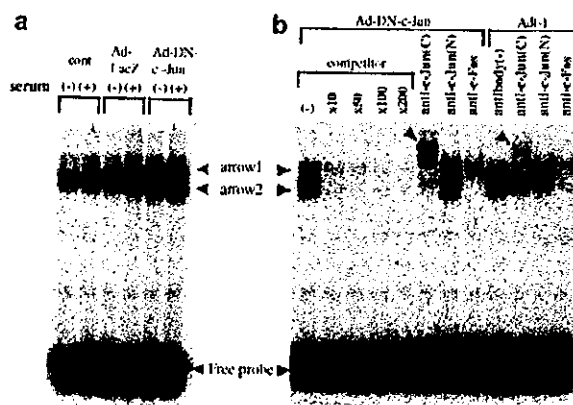


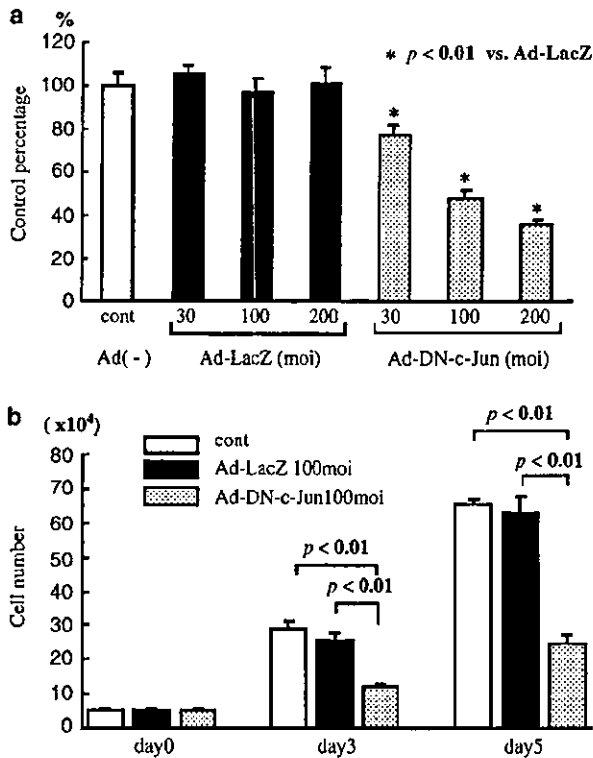
Figure 3 Characteristics of AP-1 DNA-binding activity in HT-29 cells infected with Ad-DN-c-Jun. (a) HT-29 cells were infected with Ad-DN-c-Jun or Ad-LacZ, and 48 h later, were stimulated with FBS (1%) for 6 h. Nuclear protein extracts were prepared from HT-29 cells, and then EMSA was performed. Representative autoradiograms of AP-1-binding activity are shown. (b) Competition assay for AP-1 was carried out in the presence of 10-, 50-, 100- or 200-fold molar excess of unlabeled AP-1 oligonucleotide (competitor). Super-shift assay was performed with rabbit polyclonal anti-c-Fos IgG (2  $\mu$ g) (anti-c-Fos), anti-c-Jun IgG (sc-822X, 2  $\mu$ g) (anti-c-Jun(N)), or anti-c-Jun IgG (sc-44X, 2  $\mu$ g) (anti-c-Jun(C)). Open arrows indicate the AP-1 DNA-binding band due to Ad-DN-c-Jun; closed arrowheads indicate the super-shifted band.

### Characteristics of AP-1 DNA-binding activity in HT-29 cells induced by Ad-DN-c-Jun infection

As shown in Figure 3a, infection with Ad-DN-c-Jun produced a new AP-1 DNA-binding activity (arrow 1) whose position was upper to that of the endogenous AP-1 band (arrow 2). On the other hand, control adenovirus did not change the pattern of AP-1 DNA-binding activity. As shown in Figure 3b, the bands due to Ad-DN-c-Jun (arrow 1) and endogenous AP-1 band (arrow 2) were found to indicate specific binding for AP-1, since the addition of unlabeled AP-1 oligonucleotide resulted in a decrease in the formation of AP-1 complex in a dose-dependent manner. As shown by supershift analysis in Figure 3b, endogenous AP-1 (arrow 2) was supershifted with anti-c-Jun (sc-822X) antibody recognizing the transactivation domain of wild c-Jun, anti-c-Jun antibody (sc-44X) recognizing the conserved DNA-binding domain of wild c-Jun, or anti-c-Fos antibody. On the other hand, Ad-DN-c-Jun-induced AP-1 DNA-binding activity (arrow 1) was supershifted with anti-c-Jun antibody (sc-44X) but not with anti-c-Fos antibody or anti-c-Jun antibody (sc-822X). Previous studies have already shown that DN-c-Jun gene transfer effectively inhibited the transcriptional activity of AP-1 via the increase in DN-c-Jun-induced AP-1 DNA-binding activity.<sup>12-14</sup>

### Effect of Ad-DN-c-Jun on HT-29 cell proliferation in vitro

Infection with Ad-DN-c-Jun at an MOI of 30, 100, or 200 to HT-29 cells diminished serum-induced increase in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in a dose-dependent manner, while Ad-LacZ at none of the tested MOI affected it (Figure 4a). Ad-DN-c-Jun at an MOI of 100 also inhibited the serum-induced increase in cell number on days 3 and 5.



**Figure 4** Effects of Ad-DN-c-Jun on serum-induced increase in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (a) and cell number (b). (a) Quiescent cells, infected with Ad-DN-c-Jun (hatched column) or Ad-LacZ (closed column) at MOI of 30, 100 or 200, were stimulated with FBS (1%, 19 h) and further incubated with [<sup>3</sup>H]thymidine (0.5  $\mu$ Ci/ml) for 5 h. Each value represents the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6). \*P<0.01 versus Ad-LacZ. (b) HT-29 cells, infected with Ad-DN-c-Jun (hatched column) or Ad-LacZ (closed column) at 100 MOI, were treated with 1% FBS for 3 or 5 days and trypsinized. Viable cell number was counted by a hemocytometer. Each value represents the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6). \*P<0.01 versus PBS or Ad-LacZ.

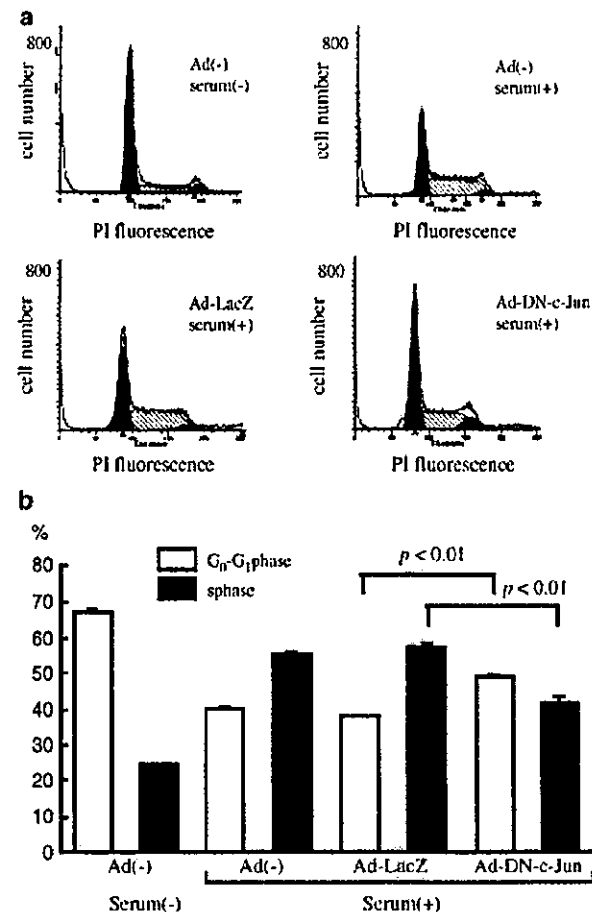
#### Ad-DN-c-Jun inhibited serum-induced HT-29 cell proliferation through G1 arrest

A flow cytometric analysis was performed to evaluate the underlying mechanism of inhibition by Ad-DN-c-Jun of HT-29 cell proliferation. HT-29 cells infected with each adenovirus at an MOI of 100 were stained with propidium iodide (PI). As shown in Figure 5a, Ad-DN-c-Jun significantly inhibited serum-induced S-phase entrance by cells, and increased the percentage of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase after serum stimulation, whereas Ad-LacZ did not affect it (Figure 5b).

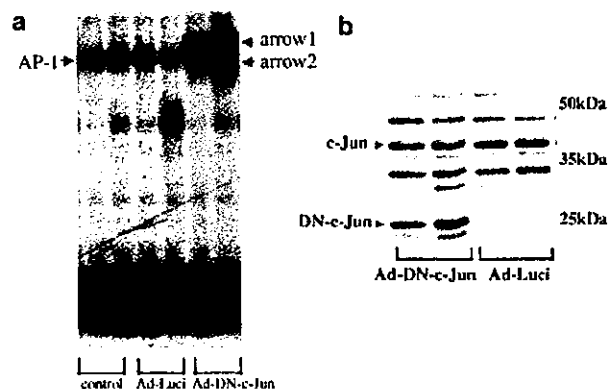
#### In vivo gene transfer into xenografted tumors and inhibition of tumor growth

After direct injection of Ad-DN-c-Jun into xenografted tumors *in vivo*, the expression of the transferred mutant c-Jun was demonstrated by EMSA and Western blot analysis. As shown in Figure 6a and b, Ad-DN-c-Jun infection *in vivo* generated a significant amount of AP-1-binding activity with a higher position than that of the endogenous AP-1 band, as shown by EMSA, and produced a significant amount of DN-c-Jun protein, as shown by Western blot analysis.

To assess the effect of Ad-DN-c-Jun on xenografted tumor growth, Ad-DN-c-Jun ( $3 \times 10^8$  plaque-forming



**Figure 5** Effects of Ad-DN-c-Jun on cell cycle of HT-29 cells. (a) Representative DNA histogram of PI fluorescence in cells, as assessed by FACS flow cytometry. (b) Ratio of cells in S phase (closed column) or G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase (open column) of the cell cycle was measured by an FACS flow cytometer, and analyzed by ModFitLT software. Each value represents the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6). \*P<0.01 versus Ad-LacZ.

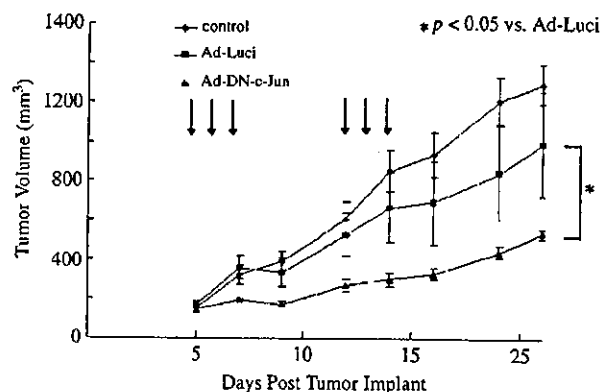


**Figure 6** In vivo expression of increased AP-1-binding activity (a) and DN-c-Jun protein (b) induced by subcutaneous Ad-DN-c-Jun injection into xenografted HT-29 cell tumors. Ad-DN-c-Jun and Ad-Luci were injected into xenografted HT-29 cell tumors in nude mice three times ( $3 \times 10^8$  p.f.u./injection). At 48 h after final injection, nuclear protein extracts were prepared for EMSA assay (a) Arrow 1 indicate the AP-1 DNA-binding band due to Ad-DN-c-Jun; arrow 2 indicate the AP-1 DNA-binding band due to endogenous AP-1. In vivo expression of c-Jun protein and DN-c-Jun protein due to Ad-DN-c-Jun infection in xenografted tumors was determined by immunoblot analysis (b).

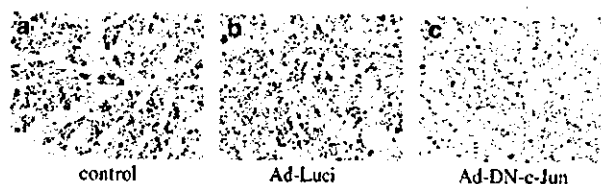
unit (pfu)), Ad-Luciferase (Ad-Luci) or phosphate-buffered saline (PBS) (vehicle: as a control) was subcutaneously injected into established xenografted tumors. On day 21, the volume of tumors treated with Ad-DN-c-Jun was smaller than that of those treated with Ad-Luci or PBS ( $535 \pm 26$  versus  $990 \pm 265$  or  $1296 \pm 101$  mm<sup>3</sup>;  $P < 0.05$ ). Although there was a slight tendency of reduction of tumor volume by control adenovirus, no statistical difference in the tumor volume was found between both groups treated with control adenovirus and PBS. Thus, Ad-DN-c-Jun significantly inhibited the growth of xenografted HT-29 tumors (Figure 7). In this *in vivo* study, the administration of DN-c-Jun did not affect animal mortality, body weight or appetite (data not shown).

#### Evaluation of Ki-67 immunostaining of HT-29 cells in xenografted tumors

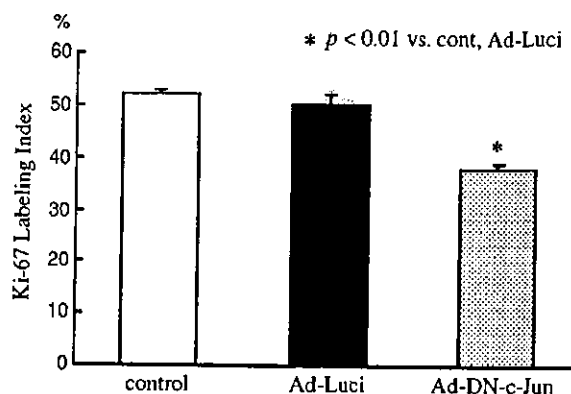
Immunoreactive Ki-67 cells were found in the xenografted tumors, and Ki-67 labeling index was measured by histological findings according to the described methods (Figure 8). Ad-DN-c-Jun significantly decreased the labeling index compared with Ad-Luci ( $38 \pm 1.0$  versus  $50.6 \pm 1.5\%$ ;  $P < 0.01$ ) (Figure 9).



**Figure 7** Effect of subcutaneous injection of Ad-DN-c-Jun on volume of xenografted HT-29 cell tumors. Established tumors (150 mm<sup>3</sup>) were randomized into three groups in a blind manner to be treated with Ad-DN-c-Jun ( $3 \times 10^8$  p.f.u.), Ad-Luci ( $3 \times 10^8$  p.f.u.) or PBS (vehicle control). Each treatment was performed from days 5 to 7 and from days 12 to 14. Tumor size was measured in two dimensions and tumor volumes were calculated as described above. Each value represents the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n=6$ ). \* $P < 0.05$  versus Ad-Luci.



**Figure 8** Immunostaining for Ki-67 in cancer cells of xenografted HT-29 cell tumors. Representative sections of xenografted tumors treated with PBS (a), Ad-Luci (b) or Ad-DN-c-Jun (c). Immunoreactivity for Ki-67 of cancer cells in xenografted tumors treated with Ad-DN-c-Jun (c) was weaker than that in those treated with PBS (a) or Ad-Luci (b).



**Figure 9** Effects of Ad-DN-c-Jun on Ki-67 labeling index in xenografted HT-29 cell tumors. Xenografted tumors were treated with PBS (a), Ad-Luci (b), or Ad-DN-c-Jun (c). Assessment of positive cells was performed using light microscopy at  $\times 400$  magnification, and the positive ratio was calculated as the percentage with  $>2000$  cancer cells per tumor. Each value represents the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n=6$ ). \* $P < 0.01$  versus PBS or Ad-Luci.

#### Discussion

AP-1, a nuclear protein, is an important transcription factor regulating DNA transcription and gene expression. The mammalian AP-1 proteins are homo- and heterodimers composed of basic region-leucine zipper proteins including those of the Jun families (c-Jun, JunB and JunD) and Fos families (c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2).<sup>8</sup> A variety of stimuli, including serum, growth factors and cytokines, induce AP-1 activity, and AP-1 activation is also reported to occur in cancer cells with Ras mutation.<sup>15</sup> Accumulating evidence suggests that AP-1 activity plays a role in cancer growth control.<sup>16</sup> Many reports suggest that elevated concentrations of fecal bile acids are associated with the promotion of colon cancer.<sup>17-19</sup> In these reports, Hirano *et al*<sup>9</sup> demonstrated that AP-1 is associated with the promotion of colon cancer induced by bile acids. Interestingly, however, other transcription factors such as NF-kappa B, Sp1 or ATF/CREB was not affected by bile acid. Thus, they suggested that AP-1 but not other transcription factors may be specific for colon cancer induction by bile acids. Glinghammar *et al*<sup>10</sup> also suggested that diluted lipid extracts from fecal water samples significantly induced AP-1-dependent gene transcription and induce cell proliferation. On the other hand, it has been proposed that AP-1 affects differentiation rather than multiplication, since AP-1 is highly activated during late progression of colon cancer.<sup>20</sup> Mandal *et al*<sup>21</sup> suggested that apoptosis triggered by butyric acid involves transcriptional stimulation of the Bax gene via the activation of the JNK/AP-1 pathway in colonic epithelial cells. Furthermore, Yao *et al*<sup>22</sup> reported the induction of AP-1 activity in human HT29 cells exposed to hypoxic conditions that was considered to cause the resistance to anticancer drugs. However, the biological and physiological functions of AP-1 in relation to the growth of cancer, in particular that of colorectal cancer, are not fully understood, and there is no report concerning direct blockade of AP-1 in colorectal cancer since no specific and potent pharmacological inhibitor of AP-1 is available.

Recently, Liu *et al*<sup>24</sup> tested the effects of the same DN-c-Jun as we employed here on the growth of MCF7 breast cancer cells, using cells stably transfected with DN-c-Jun under the control of a doxycycline-inducible promoter, and found that growth of MCF7 cells injected into nude mice was suppressed by AP-1 blockade with DN-c-Jun. However, in their study, the effect of *in vivo* gene transfer of DN-c-Jun on breast cancer cells has not been investigated. These findings encouraged us to examine the effect of direct *in vivo* AP-1 blockade on colorectal cancer growth with adenoviral vector containing DN-c-Jun.

In the present *in vitro* study, AP-1-binding activity in HT-29 cells was increased by serum stimulation. DN-c-Jun gene transfer, which was effectively transferred into HT-29 cells and markedly suppressed endogenous AP-1-binding activity, inhibited the proliferation of HT-29 cells *in vitro*, as shown by decrease in not only [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation but also cell number. These results showed that AP-1 played a role in colon cancer proliferation *in vitro*. Recent reports indicate that c-Jun also plays a role in controlling the cell cycle.<sup>23-25</sup> Therefore, in this study, we also evaluated the effect of DN-c-Jun on the cell cycle of HT-29 cells, using flow cytometric analysis. Ad-DN-c-Jun, but not Ad-LacZ, significantly suppressed entry into S phase and caused arrest in early G<sub>1</sub> phase. Thus, our study showed that inhibition of HT-29 cell growth by DN-c-Jun is mediated by suppression of S-phase entry.

To examine whether the above-mentioned antiproliferative effect of DN-c-Jun on HT-29 cells *in vitro* occurs *in vivo*, we further examined the efficacy of DN-c-Jun gene transfer on colon cancer *in vivo*. In this experiment, with adenoviral vector, we could successfully express DN-c-Jun protein in xenografted tumors of HT-29 cells, and repeated treatment with Ad-DN-c-Jun of xenografted tumors of HT-29 cells significantly decreased tumor volume compared with controls. Furthermore, this inhibition of tumor growth by DN-c-Jun was associated with decrease in Ki-67 labeling index. However, there was a tendency of reduction of tumor volume by control adenovirus. We performed the same experiments three times and obtained the reproducible results. Many reports using adenovirus for *in vivo* studies suggested that adenovirus itself has a faint nonspecific cytotoxic effect.<sup>26,27</sup> Importantly, however, no statistically significant decrease was found in the growth curves of control adenovirus compared to that with PBS in the present study. In addition, a significant effect by Ad-DN-c-Jun on the growth curves was found compared to control adenovirus. All these findings suggest that the observed results of control adenovirus for tumor volume reduction must be due to the nonspecific responses derived from Ad vector.

It is also unclear whether c-Jun has the relation to the cell proliferation of normal colon cells in this study. However, the activation of AP-1 and expression of c-Jun are more increased in colon cancer cells than in normal cells.<sup>28</sup> Inhibition of c-Jun by Ad-DN-c-Jun should be more effective for proliferation of colon cancer cells than nonmalignant cells. On the other hand, adverse side effects of Ad-DN-c-Jun infection such as mortality, body weight loss and appetite loss were not apparent in the present study. These observations suggest that DN-c-Jun is a promising target for gene therapy of colon cancer. Generally, it is important that more effective local-

regional delivery system of target gene should be established not only to enhance the efficiency for tumor reduction, but also to avoid the nonspecific responses. Further investigation will be needed.

In conclusion, we obtained the first evidence that specific blockade of AP-1 by a dominant-negative mutant of c-Jun gene transfer prevented colon cancer growth both *in vitro* and *in vivo*. Our study provides new insights into the molecular mechanisms of colorectal cancer. AP-1 appears to be a novel target for gene therapy of colorectal cancer.

## Materials and methods

### Cells and culture conditions

The human colon adenocarcinoma cell line HT-29 was purchased from American Type Culture Collection. Cells were constantly grown as monolayers in McCoy's 5A medium, supplemented with 10% heat-inactivate fetal bovine serum (FBS) in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% incubator atmosphere at 37°C and subcultured every 7 days.

### Construction of recombinant adenovirus containing the dominant-negative mutant of c-Jun (DN-c-Jun)

The dominant-negative mutant of c-Jun (DN-c-Jun), TAM67, was generated by removal of the transactivational domain of amino acids from 3 to 122 of wild-type c-Jun by polymerase chain reaction.<sup>29</sup> DN-c-Jun has the DNA-binding domain of wild-type c-Jun. Recombinant adenovirus containing DN-c-Jun was prepared as described previously. Recombinant adenoviruses containing the bacterial  $\beta$ -galactosidase gene (Ad-LacZ) and luciferase gene (Ad-Luci) were also constructed as a negative control for Ad-DN-c-Jun. The titer of the virus was determined by limiting dilution in 293 cells and expressed in pfu's.

### Adenovirus-mediated gene transfer to HT-29 cells *in vitro*

*In vitro* gene transfer to HT-29 cells was carried out by incubation with the adenoviral vector with MOI of 30–200 in McCoy's 5A medium for 1 h, followed by addition of 1% FBS overnight at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% atmosphere. HT-29 cells were then made quiescent for 24 h before the experiments.

### LacZ gene transfer by Ad-LacZ *in vitro*

We evaluated LacZ gene expression by the X-gal staining method as described previously.<sup>30</sup> Briefly, 48 h after infection, HT-29 cells were washed with PBS and fixed in 2% (vol/vol) glutaraldehyde in PBS, pH 7.4 for 5 min at 4°C. The cells were then washed and stained with X-gal solution (1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -gal-actopyranoside, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS, pH 6.5) for 12–18 h at 37°C. Blue staining of cell nuclei identified  $\beta$ -galactosidase expression.

### Measurement of DNA synthesis and cell proliferation

HT-29 cells in six-well plates were stimulated by 1% serum for 19 h and further incubated with [<sup>3</sup>H]thymidine (0.5  $\mu$ Ci/ml) for 5 h. After washing with PBS three times, the cells were detached from culture plates by trypsin/EDTA. Then radioactivities of each sample were

measured by a MicroBeta® TriLux liquid scintillation counter (Amersham Pharmacia Biotech, UK). For assay of cell growth, HT-29 cells in six-well cultured plates were stimulated by 1% FBS for 3 or 5 days and harvested by trypsin/EDTA. Number of viable cell number was counted by a hemocytometer.

#### Western blot analysis

Western blot analysis was carried out as described in detail.<sup>31</sup> *Ex vivo* tissue samples were immediately frozen at -80°C after dissection. Frozen tissue was homogenized by thawing the samples in an appropriate volume of the lysis buffer, followed by disruption with a polytron homogenizer. After centrifugation of the sample, supernatants were assessed for protein expression of c-Jun and DN-c-Jun. Antibodies to c-Jun (sc-44; Santa Cruz, CA, USA) were used for the detection of DN-c-Jun protein.

#### Electrophoretic mobility shift assay

To detect DNA protein-binding reaction, EMSA) was performed as described in detail.<sup>32</sup> The double-stranded consensus oligonucleotide of the AP-1-binding probe, 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3', was synthesized and end labeled with [<sup>32</sup>P]dATP. Nuclear protein extracts were prepared from HT-29 cells with or without serum stimulation (1%), infected with Ad-lacZ or Ad-DN-c-Jun for 48 h before serum stimulation. Supershift assay was performed with rabbit polyclonal anti-c-Fos IgG (anti-c-Fos), anti-c-Jun IgG (sc-44X) (anti-c-Jun (C)) recognizing the conserved DNA-binding domain of wild-type c-Jun, or anti-c-Jun IgG (sc-822X) (anti-c-Jun (N)) recognizing the amino acids from 56 to 69 (transactivation domain) of wild-type c-Jun (all from Santa Cruz).

#### Flow cytometric analysis

Cells were trypsinized, washed twice with PBS, and fixed in 70% ethanol at -20°C. Before measurement, fixed cells were centrifuged at 3000 r.p.m. for 5 min and resuspended in dye combination containing 50 µg/ml RNase and 25 µg/ml PI (Sigma, St Louis, MO, USA) for DNA staining. Cellular DNA content was assessed by an FACS flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). DNA histograms of cell distribution were obtained using ModFitLT software (Verita).

#### Production of xenografted tumor of HT-29 cells and its treatment with DN-c-Jun

HT-29 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were inoculated subcutaneously into the hind paws of BALB/cA Jcl nu/nu female mice (4–5 weeks old; CLEA Japan, Inc., Osaka, Japan). After tumor size reached a mean volume of 150 mm<sup>3</sup>, tumors were randomized into three groups in a blind manner; group 1, Ad-DN-c-Jun ( $3 \times 10^8$  p.f.u.); group 2, Ad-Luciferase (Ad-Luci) ( $3 \times 10^8$  p.f.u.); group 3, control vehicle (PBS) ( $n=6$ ). Direct injection was performed three times a week, with a total of six sessions of treatment. Each injection of purified virus was diluted in a total volume of 30 µl PBS and administered in a single pass with a 30-gauge needle, using gentle, constant infusion pressure with diethylether. Tumors were measured three times a week and immediately before each treatment, and tumor size was estimated using the following formula: length (mm) × width

(mm) × width (mm)/2. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of Osaka City University Medical School.

#### Immunohistochemical staining

Staining for Ki-67 was performed using rabbit polyclonal antihuman Ki-67 antigen (Dako Japan Co., Kyoto, Japan). A measure of 6-µm-thick serial cryostat sections were mounted on sialyzed slide (Dako Japan Co). The sections were heated at a temperature of 95°C for 45 min with a citrate acid buffer (pH 6.0) for the purpose of antigen retrieval. The primary anti-Ki-67 antibody was used at a dilution of 1:1500 and the slides were incubated in a humidified chamber at room temperature for overnight. Immunohistochemical staining was performed with the streptavidin-biotin peroxidase method (LSAB2 Kit, Dako Japan Co). Counterstaining was performed with hematoxylin. Assessment of Ki-67-positive cells was performed using light microscopy at ×400 magnification, and labeling index was defined as the Ki-67-positive ratio determined by calculating the percentage with >2000 cancer cells per tumor.

#### Statistical analysis

All values are presented as means ± s.e.m. Statistical significance was determined with one-way analysis of variance and Duncan multiple range test. Differences were considered statistically significant at a value of  $P < 0.05$ .

#### References

- Gryfe R et al. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21: 233–300.
- Baker SJ et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912–915.
- Harris MP et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer inhibits growth of human tumor cells expressing mutant p53 protein. *Cancer Gene Ther* 1996; 3: 121–130.
- Zwacka RM, Dunlop MG. Gene therapy for colon cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 1998; 12: 595–615.
- Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol* 2001; 187: 22–36.
- Palmer DH, Chen MJ, Kerr DJ. Gene therapy for colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002; 64: 201–225.
- Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 13–26.
- Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390–2400.
- Hirano F et al. Induction of the transcription factor AP-1 in cultured human colon adenocarcinoma cells following exposure to bile acids. *Carcinogenesis* 1996; 17: 427–433.
- Glinghammar B, Holmberg K, Rafter J. Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 1999; 20: 969–976.
- Guo YS, Hellmich MR, Wen XD, Townsend Jr CM. Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 22941–22947.
- Yasumoto H et al. Dominant negative c-jun gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rats. *Gene Ther* 2001; 8: 1682–1689.

- 13 Zhan Y *et al*. Effects of dominant-negative c-Jun on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 82-88.
- 14 Liu Y *et al*. Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* 2002; 21: 7680-7689.
- 15 Miyanishi K *et al*. Glutathione S-transferase-pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 2001; 121: 865-874.
- 16 Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129-157.
- 17 Ochsenkuhn T *et al*. Colonic mucosal proliferation is related to serum deoxycholic acid levels. *Cancer* 1999; 85: 1664-1669.
- 18 Qiao D, Chen W, Stratagoules ED, Martinez JD. Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 15090-15098.
- 19 Milovic V *et al*. Deoxycholic acid stimulates migration in colon cancer cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 945-949.
- 20 Licato LL *et al*. *In vivo* activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 1997; 113: 1589-1598.
- 21 Mandal M *et al*. Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 2001; 120: 71-78.
- 22 Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5997-6003.
- 23 Shaulian E *et al*. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 2000; 103: 897-907.
- 24 Schreiber M *et al*. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 1999; 13: 607-619.
- 25 Smith MJ, Prochownik EV. Inhibition of c-jun causes reversible proliferative arrest and withdrawal from the cell cycle. *Blood* 1992; 79: 2107-2115.
- 26 Yang Y, Su Q, Wilson JM. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol* 1996; 70: 7209-7212.
- 27 Lusky M *et al*. *In vitro* and *in vivo* biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 1998; 72: 2022-2032.
- 28 Magrisso IJ *et al*. Immunohistochemical detection of RAS, JUN, FOS, and p53 oncoprotein expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Lab Invest* 1993; 69: 674-681.
- 29 Brown PH, Chen TK, Birrer MJ. Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun. *Oncogene* 1994; 9: 791-799.
- 30 Kanegae Y *et al*. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 3816-3821.
- 31 Kim S *et al*. Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery. *Circulation* 1998; 97: 1731-1737.
- 32 Yano M *et al*. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res* 1998; 83: 752-760.

特 集

# ウイルスの“平和利用”と 遺伝子治療

企画構成：増田道明（獨協医科大学微生物学教授）

## アデノウイルスベクター

水口裕之（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部主任研究官）

早川堯夫（国立医薬品食品衛生研究所副所長）

---

### *P o i n t*

---

- アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では、最も遺伝子導入効率の優れたベクターのひとつである。
- アデノウイルスベクターは、癌や血管新生の誘導を要する後天性疾患（末梢性血管疾患、虚血性心疾患など）に対する遺伝子治療臨床研究で汎用されている。
- アデノウイルスベクターによる遺伝子導入のためには、標的細胞がアデノウイルス受容体（coxsackievirus-adenovirus receptor；CAR）を発現していることが必要であるが、近年CAR非依存的な遺伝子導入が可能なファイバー改変アデノウイルスベクターが開発されている。
- 低抗原性のアデノウイルスベクターとして、すべてのウイルス蛋白質コード遺伝子を欠損させたguttedアデノウイルスベクターが開発されている。



アデノウイルスベクターは、これまでの全遺伝子治療臨床研究のプロトコル数あたりで約27%、患者数あたりで約18% (2003年10月現在) に用いられ、レトロウイルスベクターについて汎用されているベクターである。1999年には、アデノウイルスベクターを用いたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究で死亡事故 (高用量のベクター投与に伴うウイルス血症が関与) が起こり、ベクターや遺伝子治療プロトコルなどの安全面での一層の強化が課題となった。

本稿では、アデノウイルスベクターの特徴と問題点、および課題点を克服した改良型ベクターの開発などの現状について解説する。

## ■ アデノウイルスの性質と構造

ヒトアデノウイルスは、1953年、小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離され、これまでに51種の血清型<sup>\*1</sup>が発見されている。遺伝子治療のベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、sub-group Cに属する5型 (あるは2型) のアデノウイルスを基盤としている。臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすことが知られている。

アデノウイルスは、直径約80nmの正20面体構造をしており、その頂点には12個の突起構造をもったペントン (ペントンベースとファイバーからなる) が存在する。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバー<sup>\*2</sup>がアデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)) ; 2型や5型アデノウイルスにおける受容体) に結合し<sup>1,2)</sup>、その後ペントンベースのRGD (Arg-Gly-Asp) モチーフ

と細胞表面上のインテグリン ( $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$  など) との相互作用でインターナリゼーションを受けることによって起こる<sup>3)</sup>。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。細胞質内に導入されたウイルスゲノムの核への移行は効率良く起こり、細胞に感染したウイルスの50~80%は60分以内に核に到達する (図1)<sup>4,5)</sup>。

ヒトアデノウイルスは約36kbの線状二本鎖DNAをゲノムとしてもち、その遺伝子構造は初期遺伝子のE1~E4と、後期遺伝子のL1~L5に大別される。初期遺伝子は主にウイルスDNAの複製に、後期遺伝子は主にカプシドなどの構造蛋白質の合成に関与する。遺伝子治療のベクターとして用いられているアデノウイルスベクターは、70以上にも及ぶウイルス蛋白質の合成を誘導する初期遺伝子であるE1領域 (E1領域はE1AとE1Bに分けられ、E1Aによりすべてのアデノウイルスのプロモーターが活性化される) を外来遺伝子に置き換え、E1蛋白質を恒常的に発現している細胞株である293細胞などで増殖させる。したがって、E1領域を欠損したアデノウイルスベクターは、E1

### \*1…血清型と受容体

ヒトアデノウイルスはAからFのsub-groupに大別される。sub-group Cに属するアデノウイルスをはじめ、多くのアデノウイルスはCARを認識して感染する (例外も存在する)。一方、sub-group Bに属するアデノウイルス (3・11・35型など) の受容体は永らく不明であったが、最近CD46が受容体であることが報告された。

### \*2…ファイバー

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子のL5領域に位置し、その構造はテール、シャフト、ノブの領域に分けられる。CARと結合するのはC末端のノブ領域である。RGDペプチドやポリリジンペプチドは、外来ペプチドの挿入部位として通したノブのHIループやC末端領域に遺伝子工学的に付与される。

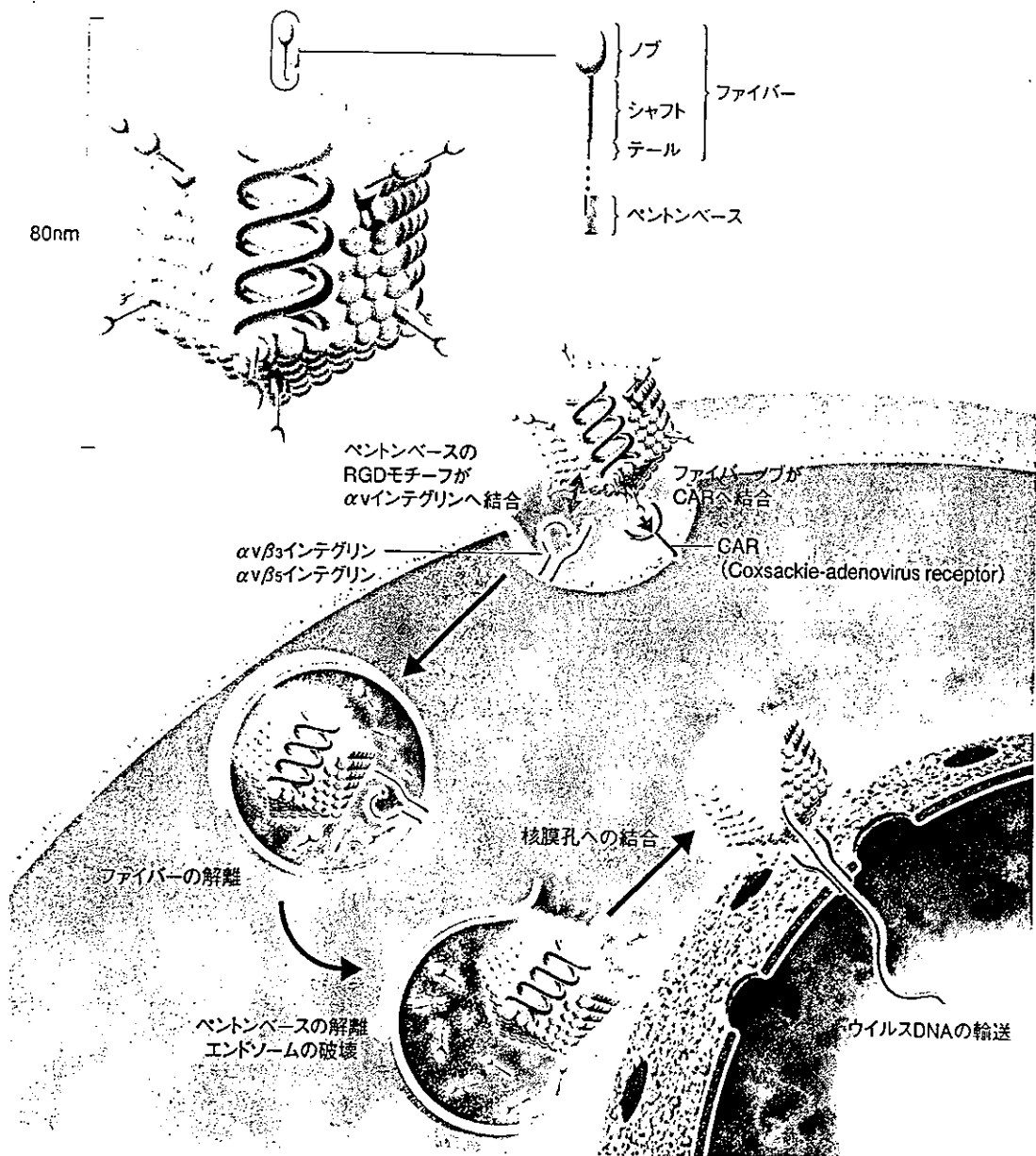


図1 アデノウイルスの構造と細胞への感染様式

アデノウイルスは252個のカプソメアよりなる正20面体構造をしている。そのうち頂点にある12個は突起構造をもったペントン(ペントンベースとファイバーからなる)とよばれ、他の240個はヘキサソンとよばれる。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーがアデノウイルス受容体(CAR)に結合し、その後ペントンベースのRGDモチーフと細胞表面上のインテグリン( $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$

など)との相互作用でインターナリゼーションを受けることによって起こる。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。その後、カプシドが核膜孔に結合し、ウイルスゲノムを核内に放出する。

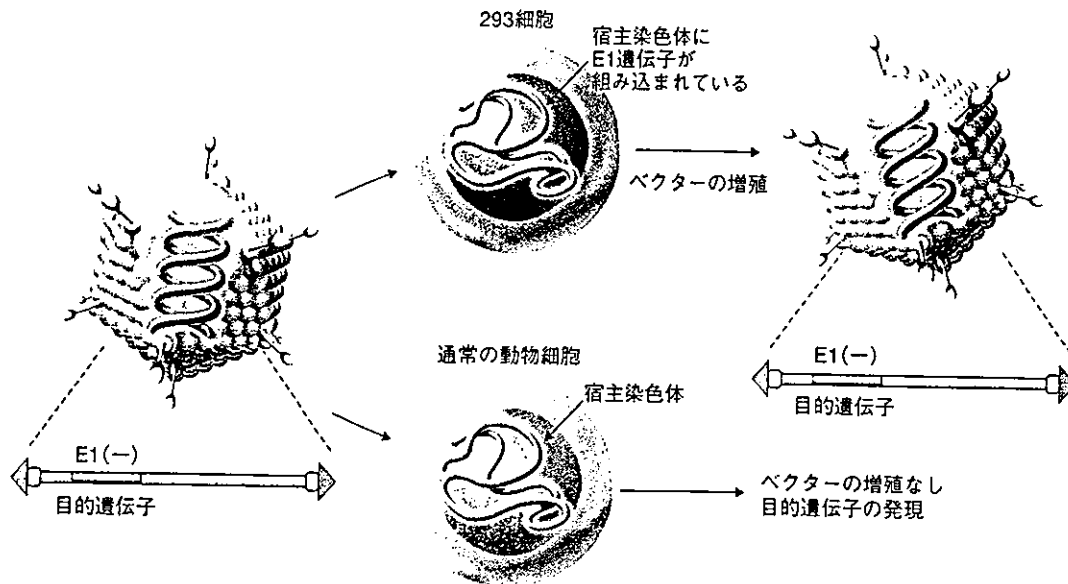


図2 アデノウイルスベクターの原理

E1領域を欠損し、目的遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターは、E1蛋白質を発現した293細胞などではウイルスが複製す

るが、E1蛋白質を発現しない通常の細胞では、ウイルスの複製は起こらず、目的遺伝子を発現する。

蛋白質を発現していない通常の細胞では増殖できず、増殖不能ウイルスとなる(図2)。

## アデノウイルスベクターの特徴

アデノウイルスベクターは以下に示すような特徴を有している。①種を問わず多くの種類の細胞に遺伝子導入でき、現存するベクターの中では最も遺伝子導入効率の良いものの一つである。②増殖停止期の細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる。③*in vivo*への直接の遺伝子導入にも適している。④高タイターのウイルスが比較的容易

に得られる。⑤物理化学的に安定であり遠心により濃縮が可能である。⑥比較的大きな外来遺伝子(最大約8.1kb<sup>6,7</sup>、ファイバー改変型で最大約8.9kbまで<sup>8</sup>。後述するguttied アデノウイルスベクターでは30kbを超える遺伝子も可能)を搭載できる。⑦ウイルスゲノムは核内では染色体外DNAとして存在し、宿主の染色体に組み込まれる頻度は低いため、遺伝子毒性(外来遺伝子が宿主染色体に組み込まれることによる細胞の癌化など)を引き起こす可能性がきわめて低い。

一方、欠点としては、血球系の細胞などCARの発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率が低いこと、免疫反応を引き起こすことなどがあげられる。

## アデノウイルスベクターの 作製法

アデノウイルスベクターを作製する方法は、現在では種々報告されているが、結局はどのようにしてE1領域を外来遺伝子に置き換えるかということに集約される。以前は、パッケージング細胞である293細胞内での相同組換えを利用して、E1領域を外来遺伝子に置き換える方法が主に用いられてきたが、煩雑で効率が良くないことが問題であった。現在では、E1領域を外来遺伝子に置き換えたウイルスゲノム全長を含んだプラスミドやコスミドをあらかじめ作製し、これを293細胞にトランスフェクションすることで簡便にベクターが作製できるようになっている<sup>9)</sup>。例えば著者らは、簡便な*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用したアデノウイルスベクター作製法を開発しており(キット化済み)(図3)<sup>6,7,9)</sup>、現在では広く利用されている。本法は原理的にも手技的にも容易であり、分子生物学の基本的な知識・技術を取得していれば、誰でも簡単にアデノウイルスベクターを作製できるようになったといえる。

## アデノウイルスベクターの 遺伝子治療への適用

アデノウイルスベクターは、ゲノムが染色体外DNAとして核内に存在し、宿主染色体には組み込まれないため、基本的には数週間から数ヵ月程度の一過性の遺伝子発現しか示さない。そのため、一生涯にわたって治療用遺伝子の発現が期待される単一の遺伝性疾患に対する遺伝子治療への

の適用例は少ない。むしろ、一過性の遺伝子発現が好ましい癌や血管新生の誘導を要する後天性疾患(末梢性血管疾患、虚血性心疾患など)に対するベクターとして汎用されている。アデノウイルスベクターは炎症を惹起する副作用を伴うが、これに対する適用では、この性質は癌に対する免疫活性化するという意味で、かえって長所にもなる。癌に対する遺伝子治療では、p53遺伝子(癌抑制遺伝子)や、サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子(herpes simplex virus thymidine kinase 1遺伝子など)などを、末梢性血管疾患、虚血性心疾患などに対する遺伝子治療では、血管新生作用のあるVEGF(vascular endothelial growth factor)遺伝子などを発現するアデノウイルスベクターを直接体内に投与する*in vivo*遺伝子治療が広く行われている。

## 改良型アデノウイルスベクター の開発

前述のように、アデノウイルスベクターの問題点として、①CARの発現が乏しい細胞へは効率的に遺伝子導入できないこと、②免疫反応を引き起こすこと、があげられる。このような問題点を克服した改良型アデノウイルスベクターの開発が進んでいる。

CARの発現が乏しい細胞種は意外と多く、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、癌細胞は悪性度の進行とともに、CARの発現レベルが低下することが報告されており<sup>10,11)</sup>、アデノウイルスベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進めるう

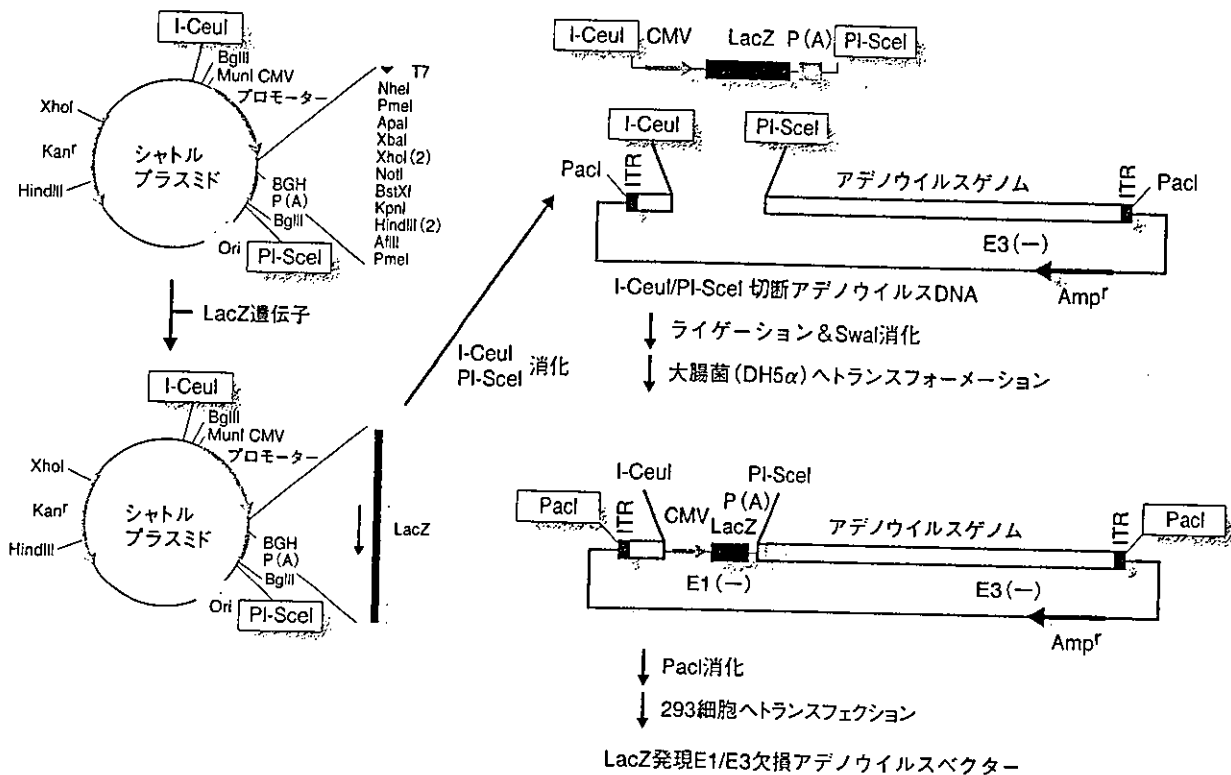


図3 *In vitro*ライゲーションに基づいた簡便なアデノウイルスベクターの作製

シャトルプラスミドに目的遺伝子(ここではβガラクトシダーゼ(LacZ)を用いた)を組み込み、I-CeuIとPI-SceIで切断する。これをI-CeuIとPI-SceIで切断したアデノウイルスDNAとライゲーションする。

作製した組換えプラスミドをアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素部位PacIで切断し、293細胞にトランスフェクションするとアデノウイルスベクターができる。

えで考慮すべき問題と考えられる。このような問題を克服するために、著者らをはじめとするグループは、アデノウイルスのファイバー部分にRGDペプチドやポリリジンペプチドを遺伝子工学的に付与させることで、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感染できるベクターや<sup>12,13)</sup>、ファイバー領域だけをCAR以外の分子(CD46など)をレセプターとしている5型

アデノウイルスとは異なった血清型のアデノウイルス(3・11・35型などsub-group Bに属するアデノウイルス)のファイバーに置換したベクター<sup>8,14-16)</sup>を開発している(図4)。このようなファイバー改変アデノウイルスベクターは、CARの発現が乏しい標的細胞への遺伝子導入効率を改善できるだけでなく、標的細胞から漏れ出たベクターが他組織に移行することによって起こる副作用も

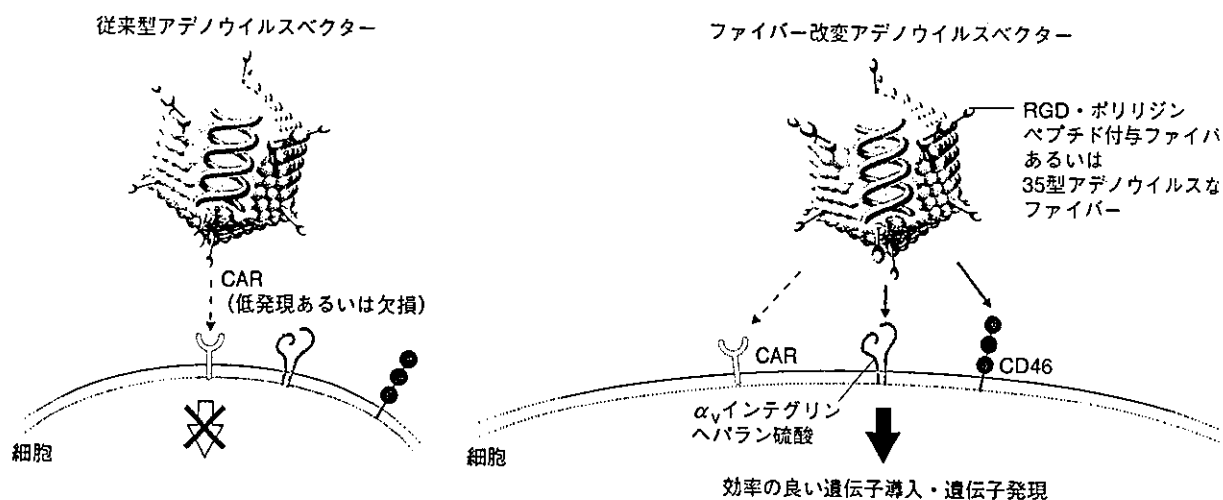


図4 ファイバー改変アデノウイルスベクター

野生型のファイバーをもった従来のアデノウイルスベクターは、CARを認識して感染する。そのため、CARの発現が乏しい細胞へは感染できない。RGDペプチドやポリリジンペプチドをファイバーに有した改変アデノウイルスベクターはCARだけでなく $\alpha_v$ インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できるため、CAR

に依存せず、効率良く遺伝子導入できる。また、ファイバーだけを35型アデノウイルス(sub-group B)などのファイバーに置き換えたベクターは、多くの細胞種で発現しているCD46を認識して細胞に感染し、遺伝子導入できる。

軽減することが期待できる。さらに、アデノウイルスベクター投与直後に起こる自然免疫(innate免疫<sup>\*3</sup>)による副作用も、免疫担当細胞へのベクター感染(ベクター取り込み)を回避することにより克服できることから、標的細胞指向性を制御できるベクターは、有効性だけでなく安全性の向上にも寄与できる<sup>17-19)</sup>。

また、免疫反応を引き起こしにくいアデノウイルスベクターとしては、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域(左端約0.4kb、右端約0.2kb)以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させたアデノウイルスベクター(guttedあるいはgutlessベクターとよばれることが多い<sup>\*4</sup>)が開発されている。従来のアデノウイルスベクターは増殖に必須のE1領域(とウイルスゲノムの複製に無

関係のE3領域)を除いただけであり、多くのウイルス遺伝子を含んでいる。そのため、ベクター残されたウイルス蛋白質コード遺伝子から非的転写などによりウイルス蛋白質が産生され、ことによって起こる免疫反応が問題となっていたguttedアデノウイルスベクターでは、この問題を解決することができ、炎症の軽減およびそれに伴って長期間にわたる目的遺伝子の発現められることが動物実験で報告されている<sup>20)</sup>。

現在、癌に対してRGDペプチドを付与したファイバー改変アデノウイルスベクターの臨床が米国で始まっている。また、guttedアデノウイルスベクターに関しては、1例ではあるが、血に対する臨床研究が行われた。今後これらの

型アデノウイルスベクターを用いた臨床研究の展開が期待されるとともに、さらなるベクターの改良が必要となるであろう。ベクター開発をはじめとする遺伝子導入・発現技術開発は、遺伝子治

療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵であり、地道な基礎研究が、遺伝子治療臨床研究の成功および遺伝子治療の普及という成果となって現れることを期待している。

### \* 3…自然免疫 (Innate 免疫)

アデノウイルスベクター投与後、ベクターがクッパー細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞に取り込まれることによって TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) や IL-6 (interleukin-6) などサイトカインの産生が起こり、免疫系が活性化される。ペンシルバニア大学でのアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故は、このような免疫反応が一因と考えられている (ほかに臨床プロトコルの不備などの複合的な要素が死亡事故の原因と考えられている)。

### \* 4…gutted アデノウイルスベクター

gutted アデノウイルスベクターは通常、すべてのウイルス蛋白質の供給をヘルパーウイルス (E1 欠損型アデノウイルスベクターなど) に依存して外来遺伝子だけを搭載した gutted ベクターを増殖させ、目的のベクターウイルスとヘルパーウイルスを塩化セシウムの密度勾配遠心で物理化学的に分離することで作製する。そのため、ヘルパーウイルス依存性アデノウイルスベクターともよばれる。同時に、30kb を超える外来遺伝子を搭載できる長所も併せている。

## 文献

- 1) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320-3.
- 2) Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3352-6.
- 3) Wickham TJ, Mathias P, Cheres DA, Nemerow GR. Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73: 309-19.
- 4) Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; 75: 477-86.
- 5) Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 367-78.
- 6) Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2577-83.
- 7) Mizuguchi H, Kay MA. A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2013-7.
- 8) Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002; 289: 69-77.
- 9) Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 165-76.
- 10) Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 2001; 61: 6592-600.
- 11) Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res*

- 2002; 62: 3812-8.
- 12) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 2001; 8: 730-5.
- 13) Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 2003; 5: 267-76.
- 14) Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A, et al. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 2000; 74: 2567-83.
- 15) Rea D, Havenga MJ, van Den Assem M, Suttmoller RP, Lemckert A, Hoebe RC, et al. Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells. *J Immunol* 2001; 166: 5236-44.
- 16) Knaan-Shanzer S, Van Der Velde I, Havenga MJ, Lemckert AA, De Vries AA, Valerio D. Highly efficient targeted transduction of undifferentiated human hematopoietic cells by adenoviral vectors displaying fiber knobs of subgroup B. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1989-2005.
- 17) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S, Mizuguchi H, et al. Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7913-8.
- 18) Mizuguchi H, Hayakawa T. Enhanced anti-tumor effect reduced vector dissemination with fiber-modified adenovectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 236-42.
- 19) Okada Y, Okada N, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizuno N. An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF $\alpha$ -expressing adenovirus into established murine melanoma. *Gene Ther* 2003; 10: 700-5.
- 20) Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopman Langston C, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18: 111-5.
- 21) Maione D, Della Rocca C, Giannetti P, D'Arrigo R, Atascio L, Franklin LL, et al. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes pre-existing immunity to adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5986-91.
- 22) Kim IH, Jozkowicz A, Piedra PA, Oka K, Chan L. Li correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13282-7.
- 23) Chuah MKL, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Jot M, Gillejins V, et al. Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 2003; 101: 1734-43.





# Drug Delivery System

VOL.20 NO.1 JANUARY 2005

通巻第 99号 / 隔月刊

## Offprint

Title

---

---

Name

---

Department

---

Institution

---

Address

---

Postal Code

City

Country

---

Phone

Fax

---

***The Japan Society  
of Drug Delivery System***

*Institute of Medical Science  
St. Marianna University School of Medicine,  
Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa Pref, 216-8512 JAPAN*

# Cell delivery system に基づく次世代がん免疫療法

## 特集 耐性克服とDDS

杉田敏樹・高 建青・中川晋作\*

### *Development of cell delivery system for optimal cancer immunotherapy*

The immune cells such as cytotoxic T lymphocytes, NK cells, and antigen presenting cells play a central role in cancer immunotherapy. These effector cells can be used as "drugs" for cancer therapy from the view of drug delivery system(DDS). We anticipated that optimal cancer immunotherapy can be achieved by controlling of the distribution of these so-called "live drugs" in the body. In the present study, we focus on a cell delivery system which can potentially control the systemic pharmacokinetics of immune cells and especially focus on the cell migrating molecule, chemokine and its receptor, as well as its use in cancer immunotherapy.

がん免疫療法においては、がん細胞を直接傷害する免疫系細胞群やがん抗原の情報をこれら細胞群に提示し、活性化させる抗原提示細胞が生体内において実際の治療を担う“薬物”として作用する。したがって、drug delivery system(DDS)の観点からは、これら“生きた薬物”としての免疫系細胞群の体内動態を制御することが、がん免疫療法の最適化を達成するうえで重要である。本稿では、生きた細胞を薬物として捉えた cell delivery system とよぶべき新たな DDS の概念について、筆者らの研究成果を中心に報告する。

Toshiki Sugita・Jian-Qing Gao・Shinsaku Nakagawa\*

key words : drug delivery system, cell delivery system, chemokine, chemokine receptor, cancer immunotherapy

### Cell delivery system に基づいたがん免疫療法

現在、がん治療では外科的療法、放射線療法、化学療法の三大療法が施行されている。しかし、いずれの治療法においても、ある程度の治療効果を示すものの、転移・再発に対してはまだまだ充分でないこと、また、化学療法・放射線療法においては、正常組織に対しても作用を及ぼすことによる嘔吐・脱毛・免疫抑制などの強い副作用が起こることなどの問題点を有している。

こうしたなか、現在第四の夢の治療法として期待が持たれているのが、がん免疫療法である。生体は元来備わっている免疫系により、外来から侵入してきた外的異物や生体内でのがん細胞・老朽化細胞などの内的異物を認識・排除して生命体の恒常性を維持している。がん免疫療法は、このシステムに着目

し自身の免疫機構を利用してがん細胞を排除しようとする治療法である。

抗腫瘍免疫応答の第一段階は、腫瘍局所ではがん抗原を取り込んだ樹状細胞(DC)のリンパ組織への遊走である。その後、リンパ組織でDCからの抗原感作を受け、活性化した免疫系細胞群が腫瘍局所へ浸潤し、それら細胞による直接的ながん細胞の排除が起こる。これまでのがん免疫療法は、サイトカイン療法やDCワクチン療法、ペプチドワクチン療法など、この一連の免疫応答においていかにして免疫系を非特異的または特異的に誘導・活性化するかに力点がおかれている。

しかし、たとえばDCワクチン療法やペプチドワクチン療法では、DCに抗原情報を取り込ませ、その情報を抗腫瘍エフェクター細胞に提示して活性化させる機能を獲得したとしても、そのDCがリンパ組織に移行できなければ、抗腫瘍免疫反応を誘導することは出来ない。また、サイトカイン療法などで、がん細胞を特異的に攻撃するCD8陽性細胞傷害性

\* Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野

T細胞(CTL: cytotoxic T lymphocyte), 非特異的に攻撃するNK(natural killer)細胞, マクロファージなどの抗腫瘍エフェクター細胞群を活性化させることが出来たとしても, それらの細胞が腫瘍組織に移行できなければ, その役割を果たすことは出来ない。事実, 一部の腫瘍においては免疫系が活性化しているにもかかわらず, 抗腫瘍エフェクター細胞が腫瘍内に浸潤しないために腫瘍が退縮しない例も報告されている<sup>1)</sup>。

これらを踏まえると, がん免疫療法では, 治療効果を発揮する細胞群を目的とする標的組織(DCの場合はリンパ組織, T細胞の場合はがん組織)に効果的に送達させることが重要である。がん免疫療法では, 自己の免疫系細胞自身が, 他の免疫系細胞を活性化する, またその細胞が, がん細胞に対して傷害性を示すことから, これら治療効果を発揮する免疫細胞群は抗がん活性を有する薬物として捉えることが出来る。したがって, 薬物治療の最適化を目指すdrug delivery system(DDS)の概念からすると, がん免疫療法においては, 免疫担当細胞群を薬物として捉えたcell delivery systemともよぶべき新たな概念を導入することで, 治療の最適化が達成できるはずである。本稿では, このcell delivery systemに関する筆者らの取組みについて紹介する。

### ケモカインを介した細胞浸潤機構

近年, 分子生物学の目覚ましい発展に伴い, ケモタクティックサイトカイン(ケモカイン)と総称される細胞遊走を司る分子群がつつぎとつぎと定されている。現時点で50種類以上のケモカインが同定され, 一部のケモカインはリンパ球やDCといった免疫系細胞に特異的に作用することが報告されている<sup>2)</sup>。

これに伴いリンパ球の体内動態機構, たとえば, 炎症時における血中から組織への浸潤メカニズムなどが徐々に明らかになりつつある。成熟したリンパ球は脈管系(血管とリンパ管)と二次リンパ組織やその他の組織の間を絶えず再循環している。すなわち, 血管中のリンパ球は系統や機能的サブセットによってそれぞれ異なる組織の特定の微小環境にホーミングし, さらにホーミングした組織からリンパ管を経

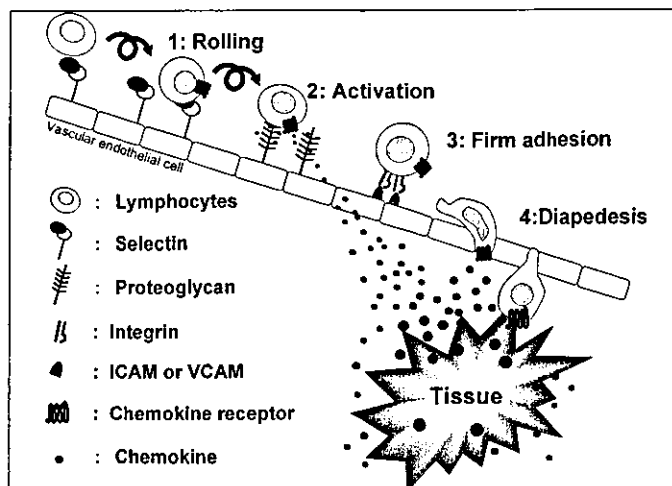


図1 Scheme of lymphocytes infiltration into tissue

て再び血液に戻る。このようなリンパ球の再循環は, 筆者らの免疫機構にとって必須のプロセスである。

リンパ球の組織浸潤については, 図1に示すとおり, まず血液中を流れているリンパ球が, 主にセレクチンのレクチン様ドメインとシアロムチンの糖鎖との接触によりブレーキがかかり, on-offの早い接触によって一時的に血管内腔にとどまる(1: Rolling)。この接触によってリンパ球は, 内皮細胞上のプロテオグリカンを介して提示されたケモカインの刺激を受け, インテグリンLFA-1(lymphocyte function-associated antigen)やVLA-4(very late antigen-4)が活性化される(2: Activation)。

つぎに, リンパ球はケモカインの刺激に伴い活性化されたインテグリンを介して, おおの血管内皮細胞上のICAM-1(intracellular adhesion molecule-1)やVCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)などの接着分子に強固に接着し(3: Firm adhesion), 最後に内皮細胞間隙を移行してケモカインの濃度勾配依存的に血管外に遊出(4: Diapedesis)する。

ケモカインはこのリンパ球浸潤経路のうち, 2~4の過程に必須の分子であり, いわばリンパ球の浸潤の要ともいべき存在である<sup>3-5)</sup>。さらに, 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, 特定のリンパ球の生体内動態を制御していると考えられる。

筆者らは, このケモカインが有する細胞遊走活性

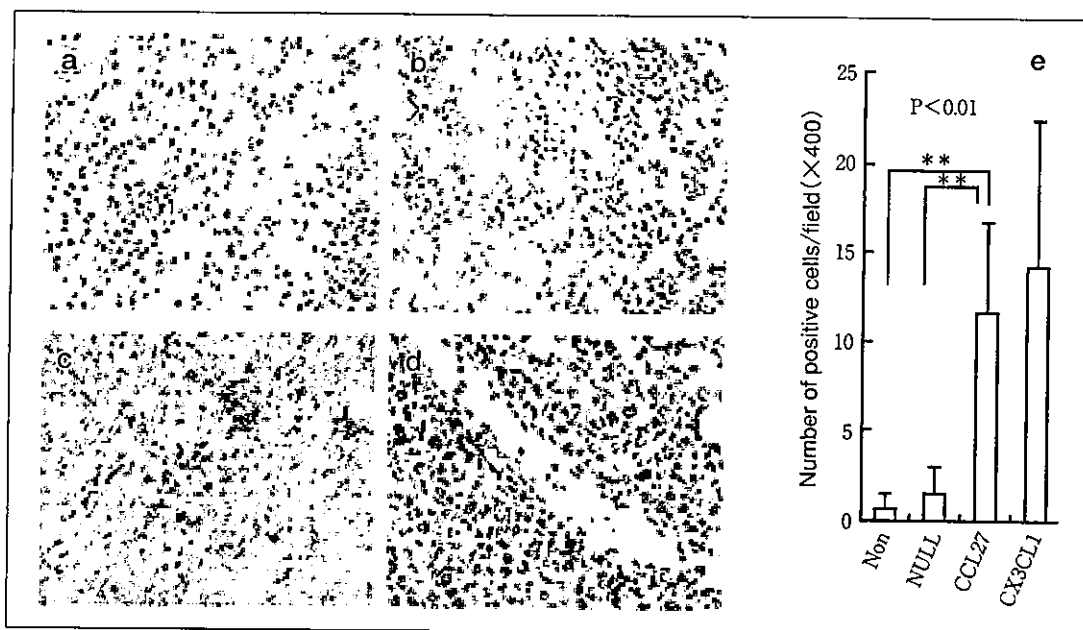


図 2

CD3-positive lymphocytes infiltrate into OV-HM tumors infected with Ad-RGD-CCL27 and Ad-RGD-CX3CL1. a~d, representative immunohistochemical appearances of tumor nodules from mice inoculated intradermally with  $1 \times 10^6$  OV-HM cells infected with none(a), Ad-RGD-NULL(b), Ad-RGD-CCL27(c), or Ad-RGD-CX3CL1(d). Statistical analysis was carried out by Welch's ttest.

を利用することで、細胞の体内動態制御を可能とする cell delivery system が達成できるのではないかと考えた。

#### ケモカインによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制効果

筆者らは、数あるケモカインのなかでも、がんのエフェクター細胞である T 細胞や NK 細胞、免疫細胞の司令塔である DC などを遊走させることが *in vitro* で示唆されているケモカイン (CCL19<sup>6)</sup>, CCL20<sup>7)</sup>, CCL22<sup>8)</sup>, CCL27<sup>9)</sup>, XCL1<sup>10)</sup>, CX3CL1<sup>11)</sup>) を選択し、それらを腫瘍組織に発現させることによる腫瘍組織内への細胞浸潤と腫瘍増殖抑制について検討を行った<sup>12~15)</sup>。腫瘍細胞にケモカインを発現させるにあたっては、ファイバー領域にインテグリン指向性の RGD 配列(Arg-Gly-Asp)を挿入したファイバーミュータントアデノウイルスベクター (Ad-RGD)を用いた<sup>16)</sup>。この Ad-RGD は従来型アデノウイルスベクターとくらべ、高い遺伝子導入効率・発現効率を有している。

まず、Ad-RGD を用いて各種ケモカイン遺伝子を導入した OV-HM 細胞を同系マウスに移植し、ケモカインによって誘導される抗腫瘍効果を検討した。その結果、CCL27, CCL19 および CCL22 を発現する OV-HM 細胞移植群において顕著な腫瘍増殖抑制が確認された。これらケモカイン発現 OV-HM 腫瘍で得られた腫瘍増殖抑制は、腫瘍組織内に遊走したがんのエフェクター細胞によるものであることが予想される。

そこで CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群について、がんの第一のエフェクター細胞である T 細胞の腫瘍内への浸潤を免疫染色法により確認した(図 2)。その結果、無処理およびコントロール Ad-RGD 処理 OV-HM 細胞移植群では、腫瘍組織内に CD3 陽性 T 細胞の浸潤がほとんど認められなかったのに対し、CCL27 発現 OV-HM 細胞移植群においては有意な CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察された。

本結果は、*in vitro* において CCL27 が CD3 陽性細胞に対して遊走活性を示すという事実から、*in vivo* においても同様に CD3 陽性 T 細胞に作用し、腫瘍内に浸潤、集積させたものと考えられる。しか