

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成18（2006）年4月

目 次

I. 総括研究報告

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究-----	1
主任研究者 独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー 水口裕之	

II. 分担研究報告

1. 分担研究者 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作-----	137
---------------------------------	-----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	187
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は、高い安全性を確保し、発現調節能を有した目的遺伝子を、必要な細胞に効率良く導入し、安定に発現させる技術の開発である。

本研究は、安全性が高く、機能面で優れたわが国独自の次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。そのため、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良いとされるアデノウイルス(Ad)ベクターの長所(高効率、高タイトルのベクターの調製が可能など)を生かしつつ、1) ウイルス表面タンパク質を遺伝子工学的に改変することにより標的細胞選択性を制御し、従来遺伝子導入が困難であった細胞・組織への適用も可能な Ad ベクターの開発、及び標的細胞指向性をもった Ad ベクターの開発、さらに上記ベクターに目的遺伝子の発現制御能を付与した Ad ベクターの開発、2) Ad ベクターの血中滞留性の向上、抗体回避能の付与並びに、標的細胞指向性の制御を目的に水溶性高分子(PEG; ポリエチレングリコール)によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発、3) 遺伝子発現抑制型(siRNA 発現) Ad ベクターの開発、4) 標的細胞指向性の変更などを目的として、従来の5型 Ad とは異なった血清型に属する35型 Ad を基盤とした全く新規なベクターの開発、および5) これらを統合した Ad ベクターの開発を行い、遺伝子治療の対象疾病や標的細胞に適した遺伝子導入・発現技術の開発を行う。これらの基盤技術は、治療用遺伝子を発現させることによる遺伝子治療のみならず、RNA 干渉(RNAi)により標的遺伝子の発現を特異的に減弱させることによる新たな遺伝子治療法の開発にもつながり、極めて重要である。本年度は各課題について以下の結果を得た。

1. 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発 ; 研究代表者が開発したファイバー改変 Ad ベクターを用いて、従来遺伝子導入が困難であったマウス間葉系幹細胞や EB 細胞(ES 細胞から分化させた胚葉体)などでの劇的な遺伝子導入効率の改善に成功した。IL-12 と CCL17 を発現する改良型 Ad ベクターを用いたがん免疫遺伝子治療の最適化を図った。抗アポトーシス分子(Bcl-x_Lあるいは Bcl-xFNK)を発現する改良型 Ad ベクターを用いた新規樹状細胞(DC)免疫療法を確立し、その有効性および作用機序を解析した。Tat-Ad ベクターの作製法を確立し、その遺伝子導入特性を解析した。標的リガンドの同定を目的に、HI ループ領域にランダムなアミノ酸配列をもったフェージライブラリーを作製した。組織移行性をさらに抑えた Ad ベクターの開発に成功し、遺伝子導入特性・体内動態特性を解析した。ファイバー改変発現制御型 Ad ベクターを開発した。pIX やヘキソン改変 Ad ベクターの作製法を確立した。
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 ; 治療用遺伝子(TNF- α あるいは HSVtk)を搭載した PEG-Ad ベクターを用いることで、全身投与において未修飾 Ad ベクターよりも優れた腫瘍組織集積性を示し、強力な抗腫瘍効果の誘導が可能なことを見いだした。さらに PEG-Ad ベクターの遺伝子発現特性や体内動態に及ぼす標的化リガンド(RGD ペプチドを PEG 末端へ導入)や PEG の分子量の影響を明らかにした。
3. 遺伝子発現抑制型(siRNA 発現) Ad ベクターの開発 ; ファイバー改変 Ad ベクターと脂肪細胞分化に必須の転写因子である PPAR γ に対する siRNA 発現 Ad ベクターの技術を組み合わせることで、脂肪細胞分化の抑制が可能であることを示し、本ベクター系の有用性を実証した。cre-loxP の部位特異的組換えシステムを付与し、発現抑制のレベルを制御できる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 ; 35 型 Ad ベクターの特性解析のためのマウスモデルとして CD46 発現トランスジェニックマウスを用い、全身投与後の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を詳細に検討した。35 型 Ad ベクターの感染に及ぼす CD46 結合部位の検索を行い、SCR1 および SCR2 の領域が感染に必須であること、細胞内領域は感染には不必要であることを明らかにした。

分担研究者

中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科
教授

協力研究者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所
主任研究員

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員

小泉直也 (独) 医薬基盤研究所
日本学術振興会特別研究員

向 英里 (独) 医薬基盤研究所
リサーチレジデント

井野麻美 (独) 医薬基盤研究所
リサーチレジデント

山下 学 (独) 医薬基盤研究所
リサーチレジデント

佐々木朋美 (独) 医薬基盤研究所
研究支援者

田代克久 (独) 医薬基盤研究所
研究支援者

穂友絹美代 (独) 医薬基盤研究所
研究支援者

岡田直貴 大阪大学大学院薬学研究科
講師

近藤昌夫 昭和薬科大学
講師

細野哲二 国立医薬品食品衛生研究所
リサーチレジデント

櫻井晴奈 大阪大学大学院薬学研究科

倉知慎之輔 大阪大学大学院薬学研究科

姚 醒蕾 大阪大学大学院薬学研究科

吉川友章 大阪大学大学院薬学研究科

衛藤佑介 大阪大学大学院薬学研究科

金川尚子 大阪大学大学院薬学研究科

丹羽貴子 大阪大学大学院薬学研究科

森重智弘 大阪大学大学院薬学研究科

渡邊 光 大阪大学薬学部

村上さや香 京都薬科大学大学院

A. 研究目的

本研究は、わが国における遺伝子治療の実用化と一層の進展に向けて、安全性が高く、機能面で優れた次世代遺伝子治療用ベクターの開発、及び関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的とする。

遺伝子治療臨床研究は現在までのところ、必ずしも満足すべき結果は得られていない。その最大の原因は、遺伝子導入技術の根幹をなすベクターが必要とする要件を十分備えていないことにある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けての最重要課題の一つは、従来のベクターが抱える安全面、機能面での問題点を克服した新規ベクターを開発することである。ところが、わが国におけるベクター開発は欧米に比べ著しく遅れており、今後の独自のベクター開発の成否如何では、わが国の遺伝子治療分野の進展に重大な影響を及ぼす可能性がある。

既存のベクターの中ではアデノウイルス(Ad)ベクターが遺伝子導入効率において最も優れているとされている。しかし、①作製法の煩雑さ、②搭載できる遺伝子の数や大きさに関する制限、③標的細胞指向性の制限、④抗原性などが解決すべき重要課題として残されている。申請者らはこれらの問題を克服した独自の次世代ベクターの開発を目指した先駆的な取り組みを開始しているが、その一層の研究推進が必要である。

このような研究により、わが国独自の遺伝子導入技術基盤が開発されれば、導入遺伝子部分をも的に応じて取り換えるだけで様々な応用が可能となることから、わが国における遺伝子治療薬開発研究のみならず、ゲノム配列解読後の遺伝子機能解析研究の推進にも大いに寄与できる。

本年度は、1) 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発研究として、研究代表者が開発したファイバー改変 Ad ベクターを用いて、従来遺伝子導入が困難であったマウス間葉系幹細胞や EB 細胞 (ES 細胞から分化させた胚葉体) などでの劇的な遺伝子導入効率の改善に成功した。IL-12 と

CCL17 を発現する改良型 Ad ベクターを用いたがん免疫遺伝子治療の最適化を図った。抗アポトーシス分子(Bcl-x_L あるいは Bcl-xFNK)を発現する改良型 Ad ベクターを用いた新規樹状細胞 (DC) 免疫療法を確立し、その有効性および作用機序を解析した。Tat-Ad ベクターの作製法を確立し、その遺伝子導入特性を解析した。標的リガンドの同定を目的に、III ループ領域にランダムなアミノ酸配列をもったフェージライブラリーを作製した。組織移行性をさらに抑えた Ad ベクターの開発に成功し、遺伝子導入特性・体内動態特性を解析した。ファイバー改変発現制御型 Ad ベクターを開発した。pIX やヘキソン改変 Ad ベクターの作製法を確立した。2) 水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発研究として、治療用遺伝子 (TNF- α あるいは HSVtk) を搭載した PEG-Ad ベクターを用いることで、全身投与において未修飾 Ad ベクターよりも優れた腫瘍組織集積性 (EPR 効果) に基づく強力な抗腫瘍効果の誘導に成功した。さらに、PEG-Ad ベクターの遺伝子発現特性や体内動態に対する標的化リガンド (RGD ペプチド) の PEG 末端への導入あるいは修飾に用いる PEG の分子量の影響を明らかとした。3) 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発研究として、ファイバー改変 Ad ベクターと脂肪細胞分化に必須の転写因子である PPAR γ に対する siRNA 発現 Ad ベクターの技術を組み合わせることで、脂肪細胞分化の抑制が可能であることを示し、本ベクター系の有用性を実証した。さらに cre-loxP の部位特異的組換えシステムを付与し、発現抑制のレベルを制御できる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研究として、5 型 Ad ベクターの特性解析のためのマウスモデルとして CD46 発現トランスジェニックマウスを用い、全身投与後の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を詳細に検討した。また 35 型 Ad ベクターの感染に及ぼす CD46 結合部位の検索を行い、SCR1 および SCR2 の領域が感染に必須であること、細胞内領域は感染には不必要である

ことを明らかにした。

B. 研究方法

B.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

B.1.1 マウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

(1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターは以下のように作製した。CA プロモーター(β -actin promoter/CMV enhancer with a β -actin intron)からなる β ガラクトシターゼ (LacZ: pCMV β (Clontech)由来)発現シャトルプラスミド (LacZ 発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) と pAdHM15-RGD (アデノウイルスゲノムのファイバーノブの HI loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクタープラスミド) を I-CeuI と PI-SceI で切断し、両者の切断フラグメントを直接ライゲーションした。ライゲーション産物を SmaI 消化し (親プラスミドは SmaI 部位をもっているが、目的の組換えプラスミドは SmaI 部位を消失するため、SmaI 消化することで目的の組換えプラスミドだけが *E. coli* のコロニーを作る)、DH5 α にトランスフォーメーションした。独立 *E. coli* クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。制限酵素解析を行い、LacZ 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CALacZ を得た。次に、pAdHM15-RGD-CALacZ をウイルスゲノム末端に存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、SuperFect (Qiagenより入手)を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、RGD 配列をファイバーに有した LacZ 発現 Ad ベクター AdRGD-CALacZ を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4、pAdHM41-K7 (Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン (KKKKKKK) 配列を挿入したベクタープラスミド) を用いることで、野生型のファイバーをもった LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CALacZ、ポリリジン配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdK7-CALacZ を作製した。同様にして、CMV プロモーター、CMV β プロモーター (CMV promoter with intron A) をも

った従来型 Ad ベクター Ad-CMV β LacZ、Ad-CMV β iLacZ、Ad-EFLacZ を作製した。

(2) マウス骨髄由来間葉系幹細胞の調製

マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、Stem cell Supplements を含む MesenCult basal medium (MesenCult medium ; StemCell Technologies 社) 中に骨髄を flash した。セルストレーナー (70- μ m ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、全量 20ml を 150mm 細胞培養用シャーレに播種した。37°C、5% CO₂ 存在下で培養し、72 時間後に新しい培地と交換した。以後 3 日ごとに培地交換し、接着細胞を間葉系幹細胞として培養を継続した。

(3) 初代培養細胞への遺伝子導入

マウス骨髄由来間葉系幹細胞を 12 穴プレートに播種し、翌日各種 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 染色をおこなった。

B.1.2 ES 細胞への高効率遺伝子導入

(1) マウス ES 細胞の培養

E14 マウス ES 細胞 (mES 細胞) は LIF 含有培地にてフィーダー細胞 (embryonic fibroblast) 上で培養し、3-5 日ごとに継代した。胚様体 (EB; embryoid body) は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000cells/30 μ l で附着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間培養することにより作製した。

(2) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作製した。それぞれのマルチクロニング部位に β -ガラクトシターゼ

(LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVlacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作製するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7、pAdHM34 と同ライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1、pAdHM34-EFLacZ1 を作製した。

作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ を得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック社) を用いて測定した。また、同様に Ad-EF-Oct3/4、Ad-EF-Nanog、Ad-EF-STAT3F を作製した。

(3) RT-PCR

フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞から total RNA を抽出し、G3PDH、CAR、Oct-3/4、Nanog、FGF5、Brachyury (T)、GATA6 の各遺伝子発現を調べた。PCR プライマーには以下のものを用いた。

G3PDH (F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
 G3PDH (R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
 CAR (F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'
 CAR (R): 5' -TTAACAAGAACGGTCAGCAG-3'
 Oct-3/4 (F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'
 Oct-3/4 (R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'
 Nanog (F): 5' -ATGGTCTGATTTCAGAAGGGC-3'

Nanog (R) 5' -TTCACCTCCAAATCACTGGC-3'
 FGF5 (F) 5' -GAAGCGGCTCGGAACATAGC-3'
 FGF5 (R) 5' -GGACGCATAGGTATTATAGC-3'
 Brachyury T (F)

5' -CAGGAGGATGTTCCCGGTGC-3'

Brachyury T (R)

5' -TCCGAGGTTTCATACTTATGC-3'

GATA6 (F) 5' -GCCAAACTGAGCCCTTCGC-3'

GATA6 (R) 5' -GGGGGGCTGTCGGCGGAGGC-3'

(4) アルカリホスファターゼ染色

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で作用させた。播種 3 日目に再度同ベクターを作用させた後、5 日目にアルカリホスファターゼ染色をケミコン社の ES Cell Characterization Kit を用いて行った。

(5) LacZ アッセイ

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態、3000vp/cell で各 Ad ベクターを感染させ 2 日後に X-gal 染色を行った。定量はクロンテック社の Luminescent β -Gal Kit を用いて行った。

B. 1. 3 腓ランゲルハンス島 (腓島) β 細胞への高効率遺伝子導入を可能とする Ad ベクターの探索

(1) Ad ベクターの作製

B. 1. 1 および B. 1. 2 に記載した。また、GFP 発現従来型 Ad ベクター Ad-CAGFP も作製した。

(2) 腓島の単離

8~10 週齢の雄性 C57/Black6 マウスまたは Wister ST ラットより、麻酔下において臓器摘出後、総胆管からコラゲナーゼ溶液を注入するコラゲナーゼ法を用いて腓臓を消化し、Ficoll-Conrey による密度勾配遠心法にて腓島を単離した。Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer にて洗った後実験に用いた。

(3) 膵島への遺伝子導入

膵島を単離した後、RPMI 培地(5.5mM glucose、10% FCS 含有)にて一晚培養後、各種 Ad ベクターを各濃度で1時間作用させた。新たな培地に交換し、24時間後、 β -gal luminescence assay (Luminescent β -galactosidase Detection Kit II(BD Biosciences))を行った。また、0.5%グルタルアルデヒドで固定した後 X-gal 染色を行った。膵島切片は、固定後、2%アガロースにより膵島集団を固めた後、OCT コンパウンドに包埋、液体窒素にて凍結し、クリオスタットにより切片を作製した後、X-gal 染色を行った。Ad-CAGFP を作用させたものは、同様に Ad ベクターを作用させ24時間後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察をした。

遺伝子導入効率を上げるため、RPMI 培地にて一晚培養後、 Ca^{2+} -free KRB buffer にて15分37°Cで培養した後、Ad ベクターを作用させる検討も行った。

(4) MIN6 細胞の培養

マウスインスリノーマ β 細胞株 MIN6 を大阪大学医学研究科宮崎純一先生より譲与いただき、DMEM 培地(5.5mM 2-mercaptoethanol、15%FCS 含有)で培養し、実験に用いた。

(5) MIN6 細胞への遺伝子導入

MIN6 細胞を12穴あるいは6穴プレートにそれぞれ 1×10^5 cells/well、 2×10^5 cells/well で播種し、一晚培養後、各種 Ad ベクターを各濃度で1時間作用させた。新たな培地に交換し、24時間後、 β -gal luminescence assay あるいは X-gal 染色を行った。

B. 1. 4 サイトカインとケモカインを発現する AdRGD ベクターを用いたがん免疫遺伝子治療の最適化

(1) ベクターの作製、精製、および力価測定

従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターの作

製は、水口らが開発した improved *in vitro* ligation 法に準拠した。

本研究に使用したベクターは、ホタルルシフェラーゼを発現する Ad-Luc および AdRGD-Luc、緑色蛍光タンパク (EGFP) を発現する Ad-EGFP、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を発現する AdRGD-OVA、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 を発現する AdRGD-gp100、ケモカインの一つである CCL17 を発現する AdRGD-CCL17、同じくケモカインの一つである CCL27 を発現する AdRGD-CCL27、IL-12 を発現する AdRGD-IL12、抗アポトーシス分子の Bcl- x_L を発現する AdRGD-Bcl x_L 、Bcl- x_L の活性増強変異体である Bcl-xFNK を発現する AdRGD-FNK、TNF- α を発現する Ad-TNF α 、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ (HSVtk) を発現する Ad-HSVtk である。各ベクターのコンストラクトを Fig. 11 に示した。

作製した従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターは、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。各ベクターの粒子数 (vector particle; VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。また、各ベクターの生物学的力価 (plaque-forming unit; PFU) は end point-dilution 法 (TCID₅₀ 法) により測定した。

(2) AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部皮内に 4×10^5 のマウス B16BL6 メラノーマ細胞を接種し、腫瘍の長径が 5-7 mm となった時点で、AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc を 3×10^8 PFU/tumor で腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、次式に従って腫瘍体積を算出した。

(腫瘍体積; mm^3) = (腫瘍の長径; mm) \times (腫瘍の短径; mm)² \times 0.5236

(3) マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) の調製

マウス骨髄由来 DC は、Lutz らの方法を若干改変して調製した。マウスの大腿骨および脛骨を摘

出し、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む RPMI1640 中に骨髄をフラッシュした。セルストレーナー (70- μm ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、40 ng/ml GM-CSF、10% FBS、および 50 μM 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 で $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml に懸濁して 100 mm 細菌培養用シャーレに 10 ml ずつ播種した。37°C、5% CO_2 存在下で培養し、3 日目に新たな培養液を各シャーレに 10 ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10 ml の培養上清を新たな培養液 10 ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として以降の実験に供した。

(4) gp100 遺伝子導入 DC を投与した B16BL6 担がんマウスにおける細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性の測定

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に 4×10^5 の B16BL6 細胞を接種した。その翌日に、25 MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) に相当する AdRGD-gp100 を用いて遺伝子導入した DC (gp100/DC) を、これらのマウスの腹部左側皮内に 10^6 cells/mouse で投与した。DC 免疫から 1 週間後、これらのマウスから調製した脾細胞をマイトマイシン C (MMC) 処理した B16BL6 細胞と 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、エフェクター細胞を得た。細胞傷害試験は europium (Eu)-release assay により行った。調製したエフェクター細胞と Eu ラベルしたターゲット細胞 (B16BL6 細胞、EL4 細胞、YAC-1 細胞) とを種々のエフェクター/ターゲット比となるように混合し、4 時間共培養した後、上清中に遊離した Eu 濃度を時間分解蛍光測定法により測定した。エフェクター細胞の細胞傷害活性 (%) は次式に従って算出した。

$$(\% \text{ of lysis}) = \{(\text{検体の Eu 遊離量}) - (\text{自然 Eu 遊離量})\} / \{(\text{最大 Eu 遊離量}) - (\text{自然 Eu 遊離量})\} \times 100$$

(5) gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の

併用による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に 4×10^5 の B16BL6 細胞を接種し、その翌日に 25 MOI の AdRGD-gp100 を適用した gp100/DC を、腹部左側皮内へ 10^6 cells/mouse で投与した。腫瘍の長径が 5-7 mm に達した時点で、 3×10^8 PFU の AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc を腫瘍内投与した。腫瘍体積変化は、B. 2. に記述した方法に従って評価した。

(6) gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与を併用した際の腫瘍浸潤 CD3^+ T 細胞数の解析

(5) に記述した方法に従って C57BL/6 マウスへの B16BL6 細胞接種、gp100/DC 免疫、および AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc 腫瘍内投与を行った。2 日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、OCT compound に浸漬して直ちに液体窒素中で凍結ブロックを作製した。各ブロックから 5 μm の組織切片を作製し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後に CD3 に対する免疫組織染色に供した。免疫組織標本を 400 倍率の顕微鏡下で観察し、腫瘍実質部で任意に選択した 6 視野に存在する腫瘍内浸潤 CD3^+ T 細胞数を計測した。

(7) AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍におけるリンパ球活性化の評価

(2) ならびに (5) に記述した方法に従って、AdRGD-CCL17 を投与した B16BL6 腫瘍、ならびに gp100/DC の皮内免疫と AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与を併用したプロトコールにおける B16BL6 腫瘍を調製した。これらの腫瘍を AdRGD-CCL17 投与から 48 時間後に摘出し、total RNA の抽出ならびにそれを鋳型とした RT-PCR 解析を行った。本検討に用いた PCR 条件は Table 2 に示した。

(8) AdRGD-IL12 を投与した腫瘍における IL-12 産生量の測定

BALB/c マウスの腹部皮内に 2×10^6 の Meth-A 細胞を接種し、腫瘍の長径が 9-10 mm に達した時点

で、AdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで腫瘍内投与した。2日後に腫瘍を摘出し、20%ホモジネートとした上清中のIL-12濃度をELISAにより定量した。

(9) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

BALB/cマウスの腹部皮内に 2×10^6 のMeth-A細胞を接種し、腫瘍の長径が9-10 mmに達した時点で、AdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定するとともに、マウスの生存率をモニタリングした。なお、腫瘍径が20 mmを超えたマウスについては安楽死させた。また、腫瘍接種後90日目において腫瘍が認められない個体を完全治癒例と判定した。

(10) Meth-A 腫瘍退縮マウスにおける腫瘍特異的免疫記憶の確認

(9)のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスに対し、最初の腫瘍接種から90日後に 10^6 のMeth-A細胞あるいは 3×10^5 のCT26細胞 (Meth-A細胞と同じH-2^dハプロタイプ) を腹部皮内に投与し、その生着を観察した。腫瘍再接種後60日目においても腫瘍の生着を認めない個体を完全拒絶例と判定した。

(11) ノードマウスを用いた AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

(9)と同様の方法により、BALB/cノードマウスに生着させたMeth-A腫瘍に対するAdRGD-IL12単独あるいはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用で腫瘍内投与した際の抗腫瘍効果を検討した。

(12) *In vivo* depletion assay

(9)と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させ

たMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 (9:1)を 2×10^7 PFUで投与した (Day 0)。これらのマウスにおけるCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、あるいはNK細胞の枯渇には、それぞれ100 μ lの抗CD4抗体溶液 (GK1.5ハイブリドーマ腹水)、100 μ lの抗CD8抗体溶液 (53-6.72ハイブリドーマ腹水)、あるいは40 μ lの抗asialoGM1抗血清を、Day -3、Day -2、Day -1、Day 0、Day 5、Day 10、およびDay 15の計7回腹腔内投与した。また、コントロール群には正常ラット血清を100 μ lずつ腹腔内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を検討した。なお、各リンパ球サブセットの枯渇は、末梢血細胞ならびに脾細胞を用いたflow cytometry (FCM) 解析により確認した。

(13) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 を腫瘍内投与した際の腫瘍浸潤 T 細胞のサブセットの解析

(9)と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させたMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、(6)に記載した方法と同様にCD3、CD4、CD8、perforinに対する免疫組織染色と腫瘍内浸潤T細胞数の計測を行った。

(14) AdRGD-IL12 を投与した腫瘍における IFN- γ および接着分子発現レベルの評価

(9)と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させたMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを 2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、total RNAの抽出ならびにそれを鋳型としたRT-PCR解析を行った。本検討に用いたPCR条件はTable 2に示した。

(15) AdRGD-IL12 腫瘍内投与したマウスにおける腫瘍特異的リンパ球活性化の評価

(9)と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させたMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを

2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍組織の所属リンパ節（鼠径部リンパ節）ならびに脾臓を摘出した。それぞれから調製したリンパ節細胞と脾細胞をMMC処理したMeth-A細胞と24時間共培養し、*in vitro*抗原再刺激を行った。この抗原再刺激によってIFN- γ を産生する細胞数をIFN- γ ELISpot assayにより計測した。

(16) Meth-A腫瘍完全治癒マウスにおける副作用の評価

(9)のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスから肺、肝臓および脾臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。これらの組織をパラフィンブロックに包埋し、厚さ5 μ mの組織切片をヘマトキシリン-エオシン（HE）染色に供した。病理組織学的観察および所見についてはアプライドメディカルリサーチ社（大阪）に依頼した。

B. 1.5 アポトーシス抵抗性 DC ワクチンの創製による DC がん免疫療法の最適化

(1) ベクターの作製、精製、および力価測定

B. 1.4 に記載した。

(2) AdRGD-Bcl x_L およびAdRGD-FNKにより遺伝子導入した細胞における遺伝子発現確認

A549細胞に50 MOIのAdRGD-Bcl x_L 、AdRGD-FNK、あるいはAdRGD-Lucを用いて遺伝子導入した。48時間培養後、これらの細胞におけるBcl- x_L ならびにBcl-xFNKの発現を、western blotting法ならびにフローサイトメーター（FCM）解析により確認した。

(3) AdRGD-Bcl x_L およびAdRGD-FNKにより遺伝子導入したDCの生存率ならびにアポトーシス抵抗性の評価

DCに25 MOIあるいは50 MOIのAdRGD-Bcl x_L 、AdRGD-FNK、あるいはAdRGD-Lucを用いて遺伝子導入した。これらのDCをGM-CSF非存在下で培養し、

経日的にpropidium iodide (PI) 染色法によって生存率を算出した。また、遺伝子導入したDCを48時間培養した後、アポトーシス誘導剤であるStaurosporineを100 nMで添加し、さらに24時間培養した。これらの細胞の生存率をMTT assayによって算出し、Staurosporine未添加群の生存率に対するパーセンテージからアポトーシス抵抗性を評価した。

(4) OVA遺伝子とBcl-xFNK遺伝子を共導入したDCにおけるMHC class I分子を介した抗原提示レベルの評価

DCにAdRGD-OVA (50 MOI) 単独あるいはAdRGD-OVA (50 MOI) とAdRGD-FNK (50 MOI)との併用によって遺伝子導入し、96穴プレートに 10^5 cells/100 μ l/wellで播種した。2あるいは6日間培養後、CD8-OVA1.3細胞を 10^5 cells/100 μ l/wellで添加し、さらに24時間共培養した。培養上清を回収し、抗原提示刺激を受けたCD8-OVA1.3細胞から分泌されたIL-2濃度をELISAで測定することにより、遺伝子導入DCによるMHC class I分子を介したOVA提示レベルを評価した。

(5) OVA遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入したDCによる抗腫瘍効果の評価

DCにAdRGD-OVA (25 MOI) 単独、AdRGD-OVA (25 MOI) とAdRGD-Bcl x_L (25 MOI)との併用、あるいはAdRGD-OVA (25 MOI) とAdRGD-FNK (25 MOI)との併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に 5×10^4 cells/mouseで投与し、1週間後にE. G7-OVA細胞を 10^6 cells/mouseでマウス左側腹部皮内に攻撃接種した。経日的に腫瘍径を測定し、B. 2. に示す式に従って腫瘍体積を算出した。

また同様に、AdRGD-gp100 (25 MOI) 単独、AdRGD-gp100 (25 MOI) とAdRGD-Bcl x_L (25 MOI)との併用、あるいはAdRGD-gp100 (25 MOI) とAdRGD-FNK (25 MOI)との併用によって遺伝子導入したDCを24時間培養し、C57BL/6マウスの右側腹

部皮内に 1.5×10^6 cells/mouseで投与した。1週間後、B16BL6細胞を 5×10^4 cells/mouseでマウス左側腹部皮内に攻撃接種し、経日的な腫瘍体積変化をモニタリングした。

なお、これらの腫瘍拒絶実験において、腫瘍の長径が20 mmを超えたマウスは安楽死させた。

(6) OVA 遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入した DC を投与したマウスにおける CTL 活性の測定

DC に AdRGD-OVA (25 MOI) 単独、AdRGD-OVA (25 MOI) と AdRGD-Bcl_{x_L} (25 MOI) との併用、あるいは AdRGD-OVA (25 MOI) と AdRGD-FNK (25 MOI) との併用によって遺伝子導入し、24 時間培養した。これら遺伝子導入 DC を C57BL/6 マウスの右側腹部皮内に 2.5×10^4 cells/mouse で投与し、1 週間後にこれらのマウスから調製した脾細胞を MMC 処理した E. G7-OVA 細胞と 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、エフェクター細胞を得た。細胞傷害試験は ⁵¹Cr-release assay により行った。調製したエフェクター細胞と ⁵¹Cr ラベルしたターゲット細胞 (E. G7-OVA 細胞、EL4 細胞) とを種々のエフェクター/ターゲット比となるように混合し、4 時間共培養した後、上清中に遊離した ⁵¹Cr の放射活性をγ-カウンターにより測定した。エフェクター細胞の細胞傷害活性 (%) は次式に従って算出した。

$$(\% \text{ of lysis}) = \{(\text{検体の } ^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離量})\} / \{(\text{最大 } ^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離量})\} \times 100$$

(7) Bcl-xFNK 遺伝子を共導入した DC の *in vivo* リンパ節集積性の評価

(3) に記述した方法に準拠して、GFP トランスジェニックマウスから DC を調製した。この GFP⁺ DC に 25 MOI の AdRGD-FNK あるいは AdRGD-Luc を用いて遺伝子導入し、24 時間培養した。これら遺伝子導入 DC を野生型 C57BL/6 マウスの右側腹部皮内に 2×10^6 cells/mouse で投与し、経日的

にこれらのマウスから所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) を摘出した。リンパ節は 4% PFA で固定した後、OCT compound に浸漬して直ちに液体窒素中で凍結ブロックを作製した。各ブロックから 6 μm の組織切片を作製し、1 切片あたりの GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡下で計測した。なお、リンパ節一個につき 5 切片について計数を行った。

(8) gp100 遺伝子と FNK 遺伝子を共導入した DC を投与したマウスのリンパ節における T 細胞活性化レベルの評価

DC に AdRGD-gp100 (25 MOI) 単独あるいは AdRGD-gp100 (25 MOI) と AdRGD-FNK (25 MOI) との併用によって遺伝子導入し、24 時間培養した。これら遺伝子導入 DC を C57BL/6 マウスの右側腹部皮内に 1.5×10^6 cells/mouse で投与し、1 週間後にこれらのマウスから調製した脾細胞ならびに鼠径部リンパ節細胞を MMC 処理した B16BL6 細胞と共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行った。共培養 18 時間後に Golgi Stop reagent を添加し、さらに 6 時間培養した。これらの細胞を回収し、細胞表面の CD4 および CD8 と細胞内の IFN-γ をそれぞれに対する蛍光標識抗体で染色した後、リンパ球分画 30000 個を FCM 解析した。

B. 1. 6 Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入活性の評価

(1) 活性基を有する Tat ペプチドの合成と Tat-Ad ベクターの作製

ペプチドの合成はすべてアミノ酸の Nα-アミノ基を 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 基で保護する Fmoc 固相合成法により行った。合成ペプチドの精製および確認は、逆相 HPLC、MALDI TOF-MS、およびアミノ酸分析により行った。

Ad ベクターの Tat ペプチド修飾は、Ad ベクター 1 粒子あたりの capsid タンパクに存在する一級アミンに対して 200 倍モル量に相当する Tat-NHS を Ad ベクター懸濁液 (10^{12} VP/ml) と混合し、300 rpm 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。その後、作製したTat-Adを分画分子量10000の透析膜を用いてPBS溶液中で透析(4°C、4時間)した。また、作製したTat-Adベクターの表面電荷はZETASIZER 3000HSを用いて測定し、Adベクター表面へのTatペプチドの結合はSDS-PAGEにより確認した。

(2) Tat-Adベクターの *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

未修飾Ad-Luc、AdRGD-Luc、あるいはTat-Ad-Lucを 10^4 VP/cellで用いてA549細胞、B16BL6細胞、およびKG-1a細胞に遺伝子導入した。24時間培養した後、これらの細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 1.7 ターゲティング Ad ベクターの開発

(1) Ad 受容体との結合性を欠損させた Ad ベクターの作製

Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 はベクタープラスミド pAdHM59 を用いて、*in vitro* ライゲーション法により作製した。Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は、(a)ルシフェラーゼ発現カセットを E1 領域に挿入し、(b)E1 と E3 領域を除くすべての Ad ゲノムを持ち、(c)ペントンベースの RGD モチーフを欠損させ、(d)ファイバーシャフトを 35 型 Ad のシャフトに置換し、(e)ファイバーノブの AB ループの 4 アミノ酸配列を変異させることで、それぞれインテグリン、ヘパラン硫酸、CAR との結合を欠損させた Ad ベクターである。また、同様の方法によりファイバーノブの FG ループの 4 アミノ酸を欠損させることで CAR との結合性を除去し、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合を欠損させた Ad ベクターである Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 をベクタープラスミド pAdHM54 (J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) を用いて作製した。次に、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 のファイバーノブの HI ループ領域にインテグリンとの結合が知られている RGD ペプチド (CDCRGDCFC) に相当する遺伝子を挿入した Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-RGD-L2 を作製した。これら Ad

ベクターの詳細な作製方法は昨年度報告した。PacI で消化したベクタープラスミドを 5 型ファイバータンパク質発現 293 細胞 (受容体と結合できない Ad ベクターはパッケージング細胞である 293 細胞にも感染できないため、通常の Ad ファイバーを発現させた Fiber-293 細胞を使用することで Ad ベクターの一部のファイバーを受容体と結合可能なファイバーに置き換え増殖させる。最後に通常の 293 細胞を使用し増殖させることで受容体に結合できないファイバーのみを持つ Ad ベクターが作製可能である) にトランスフェクションし、CPE が起こるまで培養した。CPE 確認後、3 次感染までさせることにより大量調製し、5 型 Ad ベクターと同様に塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% Glycerol からなる溶液で透析した。ベクターの物理化学的 (particle) タイターは Maizel らの方法に従って決定した。

(2) 培養細胞への遺伝子導入

各細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well 播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 を 3000 vector particle (VP)/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 培養細胞への遺伝子導入阻害実験

各細胞を 48 穴プレートに 2×10^4 cells/well 播種し、2 日後、RGD ペプチド (GRGDSP; TaKaRa) (0、40、200 μ g/ml) を 10 分間室温にて作用させ、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-RGD-L2 を 300VP/cell の濃度で 0.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 培養細胞への Ad 取り込み量の検討

各細胞を 24 穴プレートに 5×10^4 cells/well 播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 を 3000 VP/cell

の濃度で3時間作用させた。PBS洗浄後、0.05%トリプシン-0.5 mM EDTA-PBS溶液にて細胞を37度10分間処理した。細胞を回収し、3回洗浄後、0.05% DNase I-0.5 M MgCl₂-PBS溶液にて細胞を37度10分間処理した。PBSにて洗浄後0.1 M EDTA-PBS溶液に細胞を加えた。その後、細胞から自動核酸抽出機 (NA-2000, KURABO) によりDNAを回収した。AdベクターのE4領域のゲノム配列を鋳型として、プライマーCACCACCTCCCGGTACCATA (sense)とCCGCACCTGGTTTTGCTT (antisense)、蛍光標識プローブとしてAACCTGCCCGCCGGCTATACACTG (sense)を用いてTaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector; Perkin-Elmer Applied Biosystems)にて細胞DNA中に含まれるAdゲノムDNA量を定量した。

(5) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキより入手)を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold)で測定した。

(6) マウス遺伝子導入実験

マウス (C57B16, 5w, femail)の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{10} 、 1×10^{11} VP で投与し、2日後の各臓器 (心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓)でのルシフェラーゼ活性を測定した。

(7) Adベクター投与後のマウス組織分布の測定

マウス (C57B16, 5w, femail)の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{10} 、 1×10^{11} VP 投与し、3時間後の各臓器のDNAを自動核酸抽出機 (NA-2000)により回収し TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector)にて臓器DNA中に含まれるAdゲノムDNA量を定量した。

(8) Adベクター投与後のマウス肝臓中でのAd分布の測定

マウス (C57B16, 5w, femail)の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{10} 、 1×10^{11} VP 投与した。3時間後の肝臓をコラゲナーゼ還流法、および遠心分離法により実質細胞と非実質細胞 (血管内皮細胞、クッパー細胞等を含む)に分離し、それぞれの細胞から自動核酸抽出機 (NA-2000)によりDNAを回収した。回収したDNAを用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector)にてAdゲノムDNA量を定量した。

(9) Adベクター投与後の血中滞留性の測定

マウス (C57B16, 5w, femail)の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{10} 、 1×10^{11} VP 投与した。尾静脈内投与の場合は投与後2、10、30分、腹腔内投与の場合は投与後2、60、12、180分に眼下採血によりマウス全血を回収した。それぞれの全血から QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen)によりDNAを回収した。回収したDNAを用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector)にてAdゲノムDNA量を定量した。

(10) Adベクター投与後の血清中肝逸脱酵素、およびインターロイキン(IL)6の測定

マウス (C57B16, 5w, femail)の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ 3×10^{11} 、 1×10^{11} の物理学的タイターで投与した。投与後3、48時間に採血し、血清を回収した。血清中肝逸脱酵素は48時間後の血清を用いて Transaminase-CII kit (Wako)にてAST/ALT酵素量を測定した。IL-6は3時間後の血清を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BIOSOURCE)にて血清中IL-6濃度を測定した。

(11) ファイバーノブ発現ファージライブラリーの作製

2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、全てのアミノ酸をコードし得るランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS 配列 (N:A, T, G, C, S;G, C) × 7 配列を導入した 5 型アデノウイルスファイバーノブ発現カセットをファージミドベクターに組み込んだ。まず、センスプライマーとして 5' -TAGGGATAACAGGGTAATCCATCGATA (NNS)₇ACGAACC CAAGTGCATACTCTATGTCATTTTCATG-3' および、アンチセンスプライマーとして 5' -ATCTATGTCGGGTGCGGAGAATGCGGCCGCGGAGCCTCC GCCGCCGGATCCACCACCACCGTCGATTTCTTGGGCAATGTAT GAAAAAGTG-3' を用い、pCANTAB-knob41 に対して 96°C 1分 95°C 1分 64°C 1分 70°C 4分 サイクル数 40 回の条件で KODplus (TOYOBO 社製) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物 (225bp) を PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製した。その後 PCR 産物を ClaI および NotI 処理し、Purification Kit および Gel Extraction Kit を用いて精製した。これを予め Csp45I および NotI 処理した pCANYAB-knob41 と T4 DNA Ligase を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を Purification Kit を用いて精製し、Csp45I 処理を行うことでセルフライゲーションの消化を行った。その後 Purification Kit を用いて精製し、大腸菌 TG1 株 (STRATAGENE 社製) に形質転換した。

B. 1. 8 改変ファイバーを有した発現制御型 Ad ベクター開発

(1) 改変ファイバーを有した発現制御型 Ad ベクターの作製

E1、E3 領域を欠損した全長の Ad ゲノムを有し E1 欠損領域にユニークな制限酵素部位の I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を、E3 欠損領域にユニークな制限酵素部位の ClaI 部位を、ファイバーノブの HI ループコード領域にユニークな制限酵素部位の Csp45I 部位を有した Ad ベクタープラスミド pAdHM51 を作製した。また、ファイバーのシャフトとノブ領域を 35 型 Ad 由来のものに置き換え、

E3 欠損領域にユニークな制限酵素部位の Csp45I 部位を有した Ad ベクタープラスミド pAdHM49 を作製した。ファイバーノブの HI ループコード領域の Csp45I 部位に RGD ペプチドをコードしたオリゴ DNA を挿入し pAdHM51-RGD を得た。マルチクロニング部位の両端に ClaI 部位を有したシャトルプラスミド pHM13 に CMV プロモーターからなる tet-off 系の転写活性化因子 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を挿入して pHM13-ICMV-tTA を作製した。ClaI 処理した pHM13-ICMV-tTA をベクタープラスミド pAdHM51-RGD の ClaI 部位あるいは pAdHM49 の Csp45I に挿入した (pAdHM51-RGD-tTA1、pAdHM49-tTA1)。次に、テトラサイクリン応答性のプロモーター (TRE/CMV) と分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子からなるカセット (pHM5-TRE-SEAP の I-CeuI/PI-SceI フラグメント) を E1 欠損領域の I-CeuI と PI-SceI 部位に挿入することで pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP pAdHM49-tTA1-SEAP を得た。pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP、pAdHM49-tTA1-SEAP を PacI 処理し、293 細胞にトランスフェクションすることで RGD 配列をファイバーノブに有した SEAP 発現 tet-off アデノウイルスベクター AdRGD-Off-SEAP6、あるいは 35 型ファイバーを有した SEAP 発現 tet-off アデノウイルスベクター AdF35-Off-SEAP6 を得た。同様に、野生型のファイバータンパク質を有した Ad ベクター Ad-Off-SEAP6 を作製した。また CMV プロモーター制御下で SEAP を発現する野生型のファイバータンパク質を有した Ad ベクター Ad-CMV-SEAP6 を作製した。

(2) CD46 発現 CHO 細胞の作製

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

sense:

5' -ATGGAGCCTCCCGGCCCGCGAGTGTCCC-3' , CD46

antisense:

5' -CGCGGCCGCTATTCAGCCTCTCTGCTCTGCTG-3' .

増幅した PCR 断片を精製後、pcDNA3.1/Hyg(+)
(Invitrogen 社より入手)の PmeI 部位に挿入し、
CD46 発現プラスミド pcDNA3.1-CD46 を得た。

pcDNA3.1-CD46 を CHO 細胞にトランスフェクシ
ョン後、Hygromycin 含有培地で 2 週間培養し、各ク
ローンを得た。各クローンを fluorescein-iso
thiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD46 抗体
(E4.3, Pharmingen 社より入手)を含む staining
buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時
間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサ
イトメーター (FACScalibur flow cytometer;
Beckton Dickinson) を用いて CD46 の発現を解析
し、最も発現の高いクローンを得た。

(3) 培養細胞への遺伝子導入

HeLa, LNZ308, NIH3T3, CHO, CHO-CD46 細胞を
96 穴プレートに 1×10^4 cells/well 播種し、翌日
各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。ドキシサ
イクリン (10ng/ml) 存在下で 48 時間培養後、培
養液中の SEAP 産生量を測定した。

(4) SEAP 産生量の測定

培地中の SEAP 産生量は Great EscAPE SEAP
Chemiluminescence Detection Kit (Clontech) で
測定した。

B. 1. 9 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクター開 発

(1) Ad ベクタープラスミドの作製

pIX 改変型 Ad ベクター (pAdHM56) システムの作 製

pAdHM41 を NotI で処理し、セルフライゲーシ
ョンすることによってプラスミド pAd3' -IX1 を得
た。Ad ゲノムをテンプレートに合成オリゴ DNA
(5' -GTTGACGGCTCTTTGGCACAAATTGGATTC-3') と

(5' -ACACTTGCTTGATCCAAATCCAAACAGAGTCTGGTTTT
TTATTTATGTTTTATCTAGAAACCGCATTGGGAGGGGAGGAAG
C-3') をプライマーとして得た PCR 断片を MunI
と BsaBI 処理し、予め MunI と BsaBI 処理した
pAd3' -IX1 とライゲーションし、制限酵素解析と
シーケンス解析によりプラスミド pAd3' -IX4
を得た。Ad ゲノムをテンプレートにし合成オリゴ
DNA

(5' -GCTTCCTCCCCTCCCAATGCGGTTTCTAGATAAAACAT
AAAATAAAAACCAGACTCTG-3') と

(5' -TGACGTTAGTGATCCAGAAATATCTTCGC-3') を
プライマーとして得た PCR 産物を XbaI と BstXI
で処理し、予め XbaI と BstXI で処理した

pAd3' -IX4 とライゲーションし、制限酵素解析と
シーケンス解析によりプラスミド pAd3' -IX5
を得た。pAd3' -IX5 及び pAdHM41 を PI-SceI と
BstZ17I で処理した後、ライゲーションを行い、
その後制限酵素解析により pAdHM56 のプラスミド
を得た。作製した pAdHM56 は Ad ゲノムの pIX の C
末端にユニークな制限酵素サイト XbaI、および
ファイバーノブの HI loop と C 末端領域をコード
した領域にそれぞれユニークな制限酵素サイト
である Csp45I と ClaI を有している。また E1、E3
領域を欠損しており E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、
PI-SceI の制限酵素部位を有した Ad ベクタープ
ラスミドである。

シャトルプラスミド pHM15-75A の作製

カナマイシン耐性遺伝子をもつシャトルプ
ラスミド pHM5 を XbaI で処理し、平滑末端化した後
にセルフライゲーションすることによりプラス
ミド pHM5.3 を得た。pHM5.3 を I-CeuI と SphI 処
理した後合成オリゴ DNA
(5' -TCTAGACCTAGGGCTAGCACTAGTGCGGCCGCCATG-3'
) と
(5' -GCGGCCGCACTAGTGCTAGCCCTAGGTCTAGATTAG-3'
) をハイブリダイゼーションしたものをライゲ
ーションした後に、制限酵素解析とシーケンス
解析によって SphI サイトの上流に XbaI、Avr II、

NheI、SpeI、NotI をもつプラスミド pHM14 を得た。pHM14 を NotI/SalI で処理したフラグメントと、合成オリゴ DNA (5' -GGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCCTCGCCTGGCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCG-3') と (5' -TCGACGAGCCGCTTACGCAGCTTGCAGGTGCCAGGCAGGCGCACCCGAGCTCCTCGGTGCTCTGGCCGAGCATGGCC TGCACCTCGCCGCGTACTGCACGAGGC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pHM14-45A2 を得た。また pBluescript (STRATAGENE) を SpeI/SalI 処理したフラグメントと、合成オリゴ DNA (5' -CTAGTTACAAGCTGGCCGACGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC-3') と (5' -GGCCGCACACGTCTCCATGTCCGCCCCAGCCGGGCC TGCGCCGCTGCAGCTCCTTGGACAGCCGTGCCCGCTCTCCTCGTCCGCCAGCTTGTA-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pBluescript45A1 を得た。次に得られたプラスミド pHM14-45A2 と pBluescript45A1 を SpeI/NotI で処理しライゲーションした後、制限酵素解析により pHM14-45A を得た。pHM14-45A を SalI/BamHI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -TCGAGATCCCAACCTATCTGAGCGAAGTGAAC TGAAA GCCCGCAAGCCGCTTCAAACGCCAGAACCAACCGCGTTCCG AAG-3') と (5' -GATCCTTCGAACGCGTTGGGTTCTGGCGTTTGAAGCGGCTTCGGCGGCTTTCAGTTCATCTTCGCTCAGATAGGTTGGG ATC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pHM14-75A を得た。最後に pHM14-75A を EcoRI/Pi-SceI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -AATTGGCGCGCCGCGCCGCGTAAATGAATAGACTAGT GCTAGCCCTAGGTCTAGAGTGC-3') と

(5' -TCTAGACCTAGGGCTAGCACTAGTCTATTCATTTACGC GGCCGCGGCGCGCC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pHM15-75A を得た。作製した pHM15-75A はマルチクローニングサイトの両末端に XbaI、Avr II、NheI、SpeI を持ち、そのいずれかで処理したフラグメントと、pAdHM56 を XbaI 処理したものをライゲーションすることで pHM15-75A のマルチクローニングサイトにクローニングされたペプチド、蛋白質を Ad ベクターの pIX の C 末端領域に 75Å のリンカーを介して提示できるプラスミドである。

pHM15-GFP(NotI)の作製

pEGFP-N1 (CLONTECH) のマルチクローニングサイト中の SalI および BamHI で処理したフラグメントを合成オリゴ DNA (5' -TCGACGCGCCGCA-3') と (5' -GATCTGCGGCGCG-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントとライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析により pEGFP-N1(NotI)を得た。このプラスミドは EGFP の cDNA の両末端に NotI サイトを有しており、NotI 処理することで EGFP の遺伝子を切り出し、予め NotI 処理したシャトルプラスミド pHM15 とライゲーションした後、制限酵素解析により pHM15-GFP を得た。このプラスミドはマルチクローニングサイトの両末端に、XbaI、Avr II、NheI、SpeI を有し、そのいずれかで処理したフラグメントと、pAdHM56 を XbaI 処理したものをライゲーションすることで GFP を Ad ベクターの pIX の C 末端領域に提示できるプラスミドである。

ヘキソン改変型 Ad ベクター (pAdHM62) システムの作製

シャトルプラスミド pHM5 のマルチクローニングサイトの KpnI を T4 polymerase と pNdeI linker (TAKARA) を用いることで NdeI に変えた。pAdHM41 を NdeI と BamHI で切断することにより得られるフラグメント (Ad ゲノムの 19550bp から

21563bp) を pHM5 のマルチクローニングサイトにクローニングし、制限酵素解析により pHM5-hex1 を得た。次に合成オリゴ DNA (5' -TACGGTTCATATGCAAAACCCAC-3') と (5' -ATCTACATCTTCACCTGTACAATACCACTTTAGGTCTAGATGAGAAAAATTGCATTCCACTTG-3') をプライマーに pAdHM41 を鋳型として PCR を行うことによりヘキサソンの Hyper Variable Region 5 (HVR5) 領域にユニークな制限酵素サイトである XbaI をもつフラグメント (Ad ゲノムの 19550bp から 19699) を得た。得られた PCR 産物を NdeI と Bsp1407I で切断し、予め NdeI と Bsp1407I で切断した pHM5-hex1 とライゲーションし、制限酵素解析と DNA シークエンス解析によって pHM5-hex2 を得た。次に pHM5-hex2 を NdeI と PI-SceI で切断し、予め NdeI と PI-SceI で切断した pAdHM4 とライゲーションし、制限酵素解析によって Ad ゲノムの E1 欠損領域の PI-SceI から 21563bp の BamHI までのフラグメント (HVR5 にユニークな制限酵素サイトである XbaI をもつ) を持つプラスミド pHM5-AdHM4 を得た。次に pHM5-AdHM4 を PI-SceI と BamHI で切断したフラグメントと pAdHM41 を BstZ17I で切断したものを混和させ、大腸菌 BJ5183 株 (STRATAGENE) にエレクトロポレーションした。大腸菌中で相同組み換えを生じさせ、制限酵素解析により pAdHM62 のプラスミドを得た。作製した pAdHM62 は Ad ゲノムのヘキサソンの HVR5 領域にユニークな制限酵素サイト XbaI、あるいはファイバーノブの HI loop と C 末端領域をコードした領域にそれぞれユニークな制限酵素サイトである Csp45I と ClaI を有している。また E1、E3 領域を欠損しており E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素部位を有した Ad ベクタープラスミドである。

pAdHM41-HIHis-CMV2、pAdHM41-HIFLAG-CMV2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドのファイバーノブの HI loop 領域に His tag

(HHHHHH) 及び FLAG tag (DYKDDDDK) を挿入した pAdHM41-HIHis-CMV2、 pAdHM41-HIFLAG-CMV2 の作製は以下に行った。まず pAdHM41 を Csp45 I で処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CGCATCACCATCACCATCACG-3') と (5' -CGCGTGATGGTGATGGTGATG-3') 、 (5' -CGGACTACAAGGACGATGATGACAAAG-3') と (5' -CGCTTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシークエンス解析によって pAdHM41-HIHis、 pAdHM41-HIFLAG のプラスミドを得た。次に作製したプラスミドを I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと pCMV2.1 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM41-HIHis-CMV2、 pAdHM41-HIFLAG-CMV2 を得た。

pAdHM41-CterHis-CMV2、pAdHM41-CterFLAG-CMV2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドのファイバーの C 末端に His tag 及び FLAG tag を挿入した pAdHM41-CterHis-CMV2、 pAdHM41-CterFLAG-CMV2 の作製は以下に行った。まず pAdHM41-CMV2 を ClaI で処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTCTCATCACCATCACCATCACTAAGG-3') と (5' -CGCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGAGCCACTCCCTGAACCGGATC-3') 、 (5' -CGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTCTGACTACAAGGACGATGATGACAAATAAGG-3') と (5' -CGCCTTATTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCAGAGCCACTCCCTGAACCGGATC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシークエンス解析によって pAdHM41-HIHis-CMV2、 pAdHM41-HIFLAG-CMV2 を得た。

pAdHM56-His-CMV2, pAdHM56-FLAG-CMV2,

pAdHM56-RGD-CMV2, pAdHM56/pIX/75/RGD/L2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドの pIX の C 末端に His tag, FLAG tag 及び RGD 配列 (CDCRGDCFC) を提示した pAdHM56-His-CMV2、pAdHM56-FLAG-CMV2、pAdHM56-RGD-CMV2 の作製は以下に行った。まず pAdHM56 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと pCMV1a を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM56-CMV2 を得た。pAdHM56-CMV2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACGGCAGCC-3') と (5' CTAGGGCTGCCGTGATGGTGTGATGGTGTGATGGCTGCCC-3') 、 (5' -CTAGGGGCAGCGACTACAAGGACGATGATGACAAAGGCAGCC-3') と (5' -CTAGGGCTGCCTTTGTTCATCATCGTCCTTGTAGTCGCTGCCC-3') 、 (5' -CTAGGGGCAGCTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGGCAGCC-3') と (5' -CTAGGGCTGCCGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAGCTGCCC-3') をライゲーションした後、制限酵素解析 pAdHM56-His-CMV2、pAdHM56-FLAG-CMV2、pAdHM56-RGD-CMV2 を得た。また pIX の C 末端から 75Å の α ヘリックスを形成するリンカーを介し RGD 配列を提示する pAdHM56/pIX/75/RGD/L2 に関しては以下のように作製した。シャトルプラスミド pHM15-75A を Csp45I と AscI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CGAGGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTCTTGTGACTGCCGCGGAGACTGCTTCTGCTAA-3') と (5' -CGCGTTAGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAAGAGCCACTCCCTGAACCGGATCCCT-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pHM15-75A-RGD を得た。pHM15-75A-His、

pHM15-75A-FLAG、pHM15-75A-RGD を Avr II 処理したフラグメントと pAdHM56-CMV2 を XbaI 処理したフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pAdHM56/pIX/75/RGD/L2 を得た。

pAdHM56-pIX/GFP-L2 の作製

pAdHM56 を XbaI 処理したフラグメントを、予め Avr II 処理した pHM15-GFP(NotI) をライゲーションした後、制限酵素解析により pAdHM56-pIX/GFP を得た。pAdHM56-pIX/GFP と pCMV1a を I-CeuI と PI-SceI で処理しライゲーションすることで、pAdHM56-pIX/GFP-L2 を得た。

pAdHM62-His-CMV2, pAdHM62-FLAG-CMV2,

pAdHM62-RGD-CMV2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクターのヘキソンに His tag, FLAG tag 及び RGD 配列を提示した pAdHM62-His-CMV2、pAdHM62-FLAG-CMV2、pAdHM62-RGD-CMV2 の作製は以下に行った。まず pAdHM62 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと pCMV1a を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM62-CMV2 を得た。pAdHM62-CMV2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACGGCAGCC-3') と (5' CTAGGGCTGCCGTGATGGTGTGATGGTGTGATGGCTGCCC-3') 、 (5' -CTAGGGGCAGCGACTACAAGGACGATGATGACAAAGGCAGCC-3') と (5' -CTAGGGCTGCCTTTGTTCATCATCGTCCTTGTAGTCGCTGCCC-3') 、 (5' -CTAGGGGCAGCTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGGCAGCC-3') と (5' -CTAGGGCTGCCGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAGCTGCCC-3') をハイブリダイゼーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって

pAdHM62-His-CMVL2、 pAdHM62-FLAG-CMVL2、
pAdHM62-RGD-CMVL2 を得た。

(2) Ad ベクターの作製

作製したベクタープラスミド中の Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 *PacI* で切断することにより線状にし、カチオン性ポリマーの SuperFect (QIAGEN) を用いて 60mm 培養ディッシュの 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、各 Ad ベクターを得た。

(3) ウェスタンブロット

各ウイルスタンパク質 270ng を 2×サンプルバッファーと混合し還元した後に、95°C で 3 分間熱変性を行った。その後 4-20% のポリアクリルアミドゲル (PAG ミニ「第一」; 第一化学薬品株式会社) を用い、45mA の定電流で電気泳動を行った。分子量マーカーとして Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD) を用いた。電気泳動後のゲルよりメンブランにトランスファーを 100V で 2 時間行った。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 2 回行った。その後 1 次抗体として 0.4% Block Ace (大日本製薬株式会社) で 1000 倍希釈した mouse anti-His tag monoclonal antibody (Novagen) 或いは mouse anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma) を 2 時間浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。その後 2 次抗体として 0.4% Block Ace で 10000 倍希釈した goat anti-mouse IgG HRP (Cell Signaling) を 1 時間浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。発光試薬 (Chemi-Lumi One; nacalai tesque) を暴露した後、LAS3000 (FUJIFILM) で検出を行った。

(4) ELISA

各 Ad ベクターを carbonate-Bicarbonate buffer (B buffer; Sigma-Aldrich, Inc.) を用

いて 1×10^{10} VP (vector particle) / mL、 1×10^9 VP / mL、 1×10^8 VP / mL となるよう希釈しイムノプレート (Nalge Nunc International) に 100 μ L / well で添加し、一晩 4°C で静置させ固層化した。PBS で 3 回洗浄後、4% Block Ace を 300 μ L 加え 37°C でブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、1 次抗体として 0.4% Block Ace で 1000 倍希釈した mouse anti-His tag monoclonal antibody (Novagen) 或いは mouse anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma) を 100 μ L 加え、2 時間室温で反応させた。0.05% Tween / PBS で 3 回洗浄後、2 次抗体として 0.4% Block Ace で 1000 倍希釈した goat anti-mouse IgG HRP (Cell Signaling) を 100 μ L 加え、1 時間室温で反応させた。0.05% Tween / PBS で 3 回洗浄後、基質溶液 (TMB PEROXIDASE SUBSTRATE; MOSS INC.) を 100 μ L 加えて発色を行い、2N 硫酸を 75 μ L 加えることで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450nm、対照波長 655nm) をサンライズレインボーサーモ (wako) で測定した。

B.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) PEG-Ad ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベクターの作製

インテグリン指向性 RGD 配列を含むペプチド (YGGRGDTP) を PEG 片末端に 2 分子付与した RGD-PEG-NHS の合成法ならびに精製法は、昨年度の報告書に記載した方法に準拠した。

Ad ベクターの PEG および RGD-PEG 修飾は、Ad ベクター 1 粒子あたりの capsid タンパクに存在する一級アミンに対して 25~6400 倍モル量に相当する methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、分子量 2000, 5000, 20000) あるいは RGD-PEG-NHS を Ad ベクター懸濁液 (10^{12} VP/ml) と混合し、300 rpm 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。また、作製した各種 PEG-Ad ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベク