

ターの修飾率の算定は、各ベクターをSDS-PAGEした後、画像解析によって未修飾ヘキソタンパクと修飾ヘキソタンパクとの比率を求めることにより行った。

(2) PEG-Adベクターの腫瘍および肝臓への集積性評価

腹部皮内に長径9-10 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、 10^{11} VPの未修飾Ad-Lucあるいは分子量5000のPEGを用いて種々の修飾率に調製したPEG-Ad-Lucを尾静脈内投与した。投与6時間後にこれらのマウスから腫瘍と肝臓を摘出し、DNAを抽出した。100 ngのDNAを鋳型として、下記のプライマーセットを用いてAdベクターDNAに対する定量的リアルタイムPCR解析を行い、各組織に集積したAdベクター数を定量した。なお、検量線作成用の鋳型にはAdenovirus type 2 DNAを使用した。

(Forward primer): CAC CAC CTC CCG GTA CCA TA

(Reverse primer): CCG CAC CYG GTT TTG CTT

(TaqMan probe): [6FAM]-AAC CTG CCC GCC GGC TAT ACA CTG-[TAMRA]

(3) PEG-Ad-TNF α の全身投与による抗腫瘍効果の評価

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、 10^{10} VPの未修飾Ad-TNF α 、分子量5000のPEGを用いて修飾率89%に調製したPEG-Ad-TNF α 、あるいはAd-Lucを尾静脈内投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を次式に従って算出した。

$$(\text{腫瘍体積; mm}^3) = 1/2 \times \{(\text{腫瘍の長径; mm}) \times (\text{腫瘍の短径; mm})^2\} - 1/2 \times \{(\text{出血壊死部の長径; mm}) \times (\text{出血壊死部の短径; mm})^2\}$$

(4) PEG-Ad-TNF α を全身投与したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

(3)と同様に各種ベクターを投与したMeth-A担がんマウスから、ベクター投与2日後に肝臓を摘

出し、B. 1. 4 (16)に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

(5) PEG-Ad-HSVtkの全身投与とガンシクロビル(GCV)投与(HSVtk/GCVシステム)による抗腫瘍効果の評価

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、 10^{10} VPあるいは 10^{11} VPの未修飾Ad-HSVtk、分子量5000のPEGを用いて修飾率90%に調製したPEG-Ad-HSVtk、あるいはAd-Lucを尾静脈内投与した。これらのマウスに、ベクター投与日から10日間、GCVを50 mg/kg/dayで腹腔内に連続投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積をB. 2. に示した式に従って算出した。また、これらのマウスの体重変化も併せてモニタリングした。

(6) PEG-Ad-HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムを施したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

(4)と同様に各種ベクターおよびGCVを投与したMeth-A担がんマウスから、ベクター投与7日後に肝臓を摘出し、B. 1. 4 (16)に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

(7) 各種PEG-Adベクターの*in vitro*遺伝子導入効率の評価

未修飾Ad-LucあるいはPEG分子量(2K、5K、20K)ならびにPEG修飾率(L: 30-40%、M: 50-60%、H: 80-90%)が異なる各種PEG-Ad-Lucを 10^4 VP/cellで用いてA549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(RLU; relative light unit)を測定した。

(8) 各種PEG-Adベクターの*in vivo*遺伝子発現分布の解析

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、 10^{10} VPの未修飾Ad-LucあるいはPEG分子量・PEG修飾率が異なる各種PEG-Ad-Lucを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に腫瘍

および肝臓を摘出し、湿重量を測定した後、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むPBSを用いて25%ホモジネートを調製した。このホモジネートの不溶性画分を遠心操作で除去した後、上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(9) RGD-PEG-Adベクターのintegrin指向性の確認

RGDペプチド (GRGDTP; 200 µg/ml) 存在下あるいは非存在下において、B16BL6細胞に未修飾Ad-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを3000 VP/cellで用いて遺伝子導入した。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。

(10) RGD-PEG-Adベクターを全身投与したマウスの肝臓における遺伝子発現レベルの評価

BALB/cマウスに 1.5×10^{10} VPの未修飾Ad-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に肝臓を摘出し、(8)に記述した方法に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3 遺伝子発現抑制型 (short interfering RNA (siRNA) 発現) Adベクターの開発

B.3.1 RRAR γ に対するsiRNA発現Adベクターによる脂肪細胞の分化抑制

(1) shRNA発現シャトルプラスミドおよびAdベクターの作製

pHM5-H1-PPAR γ はpHM5-H1のBglIII/XbaI部位にオリゴDNA (5'-gatccccgtctgctgctgctgagccttcaagagagctgcagatcagcagacttttggaaat-3' および 5'-ctagatttccaaaagtctgctgctgctgagcctctcttgaagctgcagatcagcagacggg-3'、下線はループ配列) を挿入することにより作製した。pHM5-H1-ScrambleはpHM5-H1のBglIII/XbaI部位にオリゴDNA (5'-gatccccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaa

gtactcagcgttttttggaaat-3' および 5'-ctagatttccaaaacgctgagtacttcgaaattctcttgaatttccgagactcagcgtgg-3'、下線はループ配列) を挿入することにより作製した。オリゴDNAの配列はABI PRISM 310 DNAシーケンサーにより確認した。

siRNA発現Adベクターはimproved in vitroライゲーション法により作製した。即ち、pHM5-H1、pHM5-H1-PPAR γ およびpHM5-H1-ScrambleをI-CeuIとPI-SceIで切断し、I-CeuIとPI-SceIで切断したpAdHM41-K7(C)とライゲーションすることによりpAdHM41-K7-H1、pAdHM41-K7-H1-PPAR γ およびpAdHM41-K7-Scrambleを得た。Adベクターを作製するため、PacIで切断したAdベクタープラスミドをSuperFectを用いて293細胞へ遺伝子導入し、AdK7-H1、AdK7-H1-PPAR γ およびAdK7-H1-Scrambleを得た。E1欠損領域に何も挿入していないAdK7-Nullも同様に作製した。これらのAdベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% glycerolからなる溶液で透析し、-70°Cで保存した。Adベクターの物理学的 (particle titer) タイターは吸光度測定法により測定した。

(2) 細胞培養

293および3T3-L1細胞は10% FCSを含むDMEM培地で培養した。NIH3T3細胞は10% FCSを含むMEM培地で培養した。

(3) CAR安定発現NIH3T3細胞の作製

マウス肝臓よりISOGENを用いてトータルRNAを回収した。回収したマウス肝トータルRNAからSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェンより入手)を用いて逆転写を行い、マウス肝cDNAを得た。マウスCAR cDNAは2種類のプライマー (5'-accatggcgcgcctactgtgct-3' および 5'-ttcagtagtccttcattttat-3')を用いて、マウス肝cDNAからクローニングし、PCR産物を

TA クローニングベクター pGEM-T Easy (プロメガより入手) に挿入して pGEM-T-mCAR を得た。pGEM-T-mCAR を EcoRI で切断し、EcoRI で切断した pcDNA3 (インビトロジェンより入手) とライゲーションすることにより CAR 発現プラスミド pCMV-mCAR を作製した。pCMV-mCAR を SuperFect を用いて NIH3T3 細胞へ導入し、ゲネティシン (G418) を用いて CAR 安定発現細胞 NIH3T3-CAR を作製した。

(4) 脂肪細胞への分化

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は Tontonoz (1994) らの報告に基づいて行った。即ち、細胞がコンフルエントに到達した 2 日後に、培養液を分化用培養液 (ピオグリタゾン (カルビオケムより入手) (3 μ M)、インスリン (シグマより入手) (150 nM)、デキサメサゾン (シグマより入手) (1 μ M) および 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (シグマより入手) (100 μ M) を含む) に交換し、9 日間培養した (この間、3 日に一度培地交換を行った)。マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は、細胞内における脂質の量を Oil red O 染色あるいはグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性を測定することで確認した。細胞を 10% ホルムアルデヒドで 2 時間固定した後、0.3% Oil red O 溶液で 4 時間染色した。4 時間後、過剰の染色液を水で洗い流し風乾した。GPDH 活性は GPDH 測定キット (ホクドーより入手) を用いて測定した。

(5) PPAR γ タンパク質のウエスタンブロット法による検出

細胞抽出液はプロテアーゼ阻害剤 (シグマより入手) を含む細胞溶解液 (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) を用いて調製した。タンパク質量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして Bio-Rad assay kit を用いて測定した。タ

ンパク質試料 (10 μ g) を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件下、SDS-PAGE を行った後、イモビロン P フィルターに転写した。ブロックエースにてブロッキング後、1 次抗体として抗 PPAR γ 抗体 (サンタクルズより入手) または抗グルセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 抗体 (Trevigen より入手)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体またはウサギ IgG 抗体を反応させた。フィルターを ECL Western blotting detection system (アマシャムより入手) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム製) により測定し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム製) を用いて定量した。

B. 4.2 RNAi による標的遺伝子発現を解除するベクターシステムの開発

(1) shRNA 発現シャトルプラスミドおよび Ad ベクターの作製

ヒト U6 (hU6) プロモーターを利用した siRNA 発現シャトルプラスミドを作製するため、piGENE-hU6 (iGENE 社より入手) を EcoRI/SalI で切断したヒト U6 プロモーター断片とアニーリングした合成オリゴ DNA (5' -tcgacctgcagcatgcaagcttc-3' および 5' -ctaggaagcttgcctgcagg-3') を pHM5 の SphI/XbaI 部位へ挿入し、pHM5-hU6 を得た。pHM5-hU6 は BspMI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。ルシフェラーゼまたはスクランブルに対する shRNA 標的配列を挿入するため、ルシフェラーゼ (5' -caccacgtgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaagtactcagcgtttttt-3' および 5' -gcataaaaaacgtgagtacttcgaaattctcttgaatttcgaagtactcagcgt-3'、下線はループ配列) またはスクランブル (5' -caccgccagtctgtgtaacggatcattcaagagatgattccgttacacagactggcttttt-3' および 5' -gcataaaaaagccagtctgtgtaacggatcattctcttgaat

tgatccggttacacagactggc-3'、下線はループ配列)に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリングを行い、pHM5-hU6 の BspMI 部位へ挿入することにより、pHM5-hU6-Lu および pHM5-hU6-Scramble を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

Cre 組換え酵素により RNAi による標的遺伝子発現を解除するベクターに利用するヒト U6 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -ctaggcatgccaaggtcggcaggaagagg-3' および

5' -gatcacgcgtactagtgattccggtgtttcgtcctttccac-3' を用いて piGENE-hU6 よりクローニングし、PCR 産物を pcDNA3 (インビトロジェンより入手) の EcoRV 部位に挿入して pcDNA3-hU6 を得た。pHM5 の SalI/BamHI 部位にアニーリングした合成オリゴ DNA

(5' -tcgacacgcgtataacttcgtatagcatacattatacgaagtatgggcccgg-3' および

5' -gateccggcccataacttcgtataatgtatgctatacgaagtatacgcgtg-3'、下線は loxP 配列) を挿入し pHM5-loxP を得た。pcDNA3-hU6 を SphI および MluI で切断し、SphI/MluI で切断した pHM5-loxP とライゲーションし pHM5-loxP-hU6 を作製した。pHM5-loxP-hU6 の SphI 部位にアニーリングした

合成オリゴ DNA (5' -gcgccgcataacttcgtatagcatacattatacgaagtatcatg-3' および

5' -ataacttcgtataatgtatgctatacgaagtatgcccgcctg-3'、下線は loxP 配列) を挿入し pHM5-loxP2-hU6 を得た。pcDNA3 を PvuII で切断し

NotI 部位に変更した BGH ポリ A 断片を pHM5-loxP2-hU6 の NotI 部位に組換え、pLoxP-hU6 を作製した。pLoxP-hU6 は BamHI/KpnI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。ルシフェラーゼまたはスクランブルに対する shRNA 標的配列を挿入するため、ルシフェラーゼ

(5' -gatccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaattt

cgaagtactcagcgtttttgtac-3' および 5' -aaaaaacgctgagtacttcgaaatttctcttgaatttcg aagtactcagcgtg-3'、下線はループ配列) または ス ク ラ ン ブ ル

(5' -gatccgccagtctgtgtaacggatcattcaagagatgatccgttacacagactggctttttgtac-3' および 5' -aaaaagccagtctgtgtaacggatcatctcttgaatgatccgttacacagactggcg-3'、下線はループ配列) に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリングを行い、pLoxP-hU6 の BamHI/KpnI 部位へ挿入することにより、pLoxP-hU6-Lu および pLoxP-hU6-Scramble を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

pCMVnlscCre を HindIII で切断した後、AscI 部位に変更し、BamHI 部位を AscI 部位に換えた pHM5 へ挿入して、pHM5-CMVnlscCre を作製した。Ad ベクターは improved in vitro ライゲーション法で作製した。即ち、pHM5-CMVnlscCre を I-CeuI および PI-SceI で切断し、I-CeuI/PI-SceI で切断した pAdHM4 とライゲーションした。作製したプラスミドを PacI で切断し、SuperFect (キアゲンより入手) を用いて添付書類に従い 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、ウイルス AdCre を得た。また、E1 欠損領域に外来遺伝子を含まない Ad-null も同様に作製した。ベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% glycerol からなる溶液で透析し、-70°C で保存した。Ad ベクターの物理学的 (particle titer) タイターは吸光度測定法により測定した。

(2) 細胞培養

293 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地で培養した。A549 細胞は 10% FCS を含む F12-K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification) medium で培養した。HepG2 細胞は 10% FCS を含む MEM で培養した。

(3) ルシフェラーゼに対する siRNA 発現シヤトル

プラスミドによる RNAi 効果の検討

A549 および HepG2 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日ルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-Control (プロメガより入手)、各 siRNA 発現プラスミドおよび pUC18 を 4:1:15 の比で SuperFect (キアゲンより入手) により添付文書に従いトランスフェクションした。48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) ルシフェラーゼに対する siRNA 発現シャトルプラスミドによる RNAi 効果の検討

A549 および HepG2 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日 Ad-CMVnlsCre または Ad-null を 1.5 時間作用させた。さらに翌日 pGL3-Control、各 siRNA 発現プラスミドおよび pUC18 を 4:1:15 の比で SuperFect により添付文書に従いトランスフェクションした。48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(5) ルシフェラーゼ活性の測定

培養液を除去し、ピッカジーン LT2.0 (東洋インキより入手) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。生じた化学発光は Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ (Perkin Elmer 製) にて検出した。

(6) 培養細胞より核 DNA の抽出

細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、細胞溶解液 (0.5% Nonident P-40/10 mM NaCl/3 mM MgCl₂/10mM Tris-HCl, pH 7.4) を 500 μ l 加えた。氷上で 15 分間放置して細胞膜を溶解した後、1400xg で 5 分間遠心した。沈殿を細胞溶解液で 2 回洗浄し、沈殿を核画分とした。核画分を EcoRI で 1 時間処理した後、Proteinase K (0.1 mg/ml) 処理を 37°C で 4 時間行った。フェノール/クロロホルム処理後エタノール沈殿を行い、核 DNA を TE で溶解した。核 DNA 濃度は 260nm の吸光度を測定することにより求めた。核 DNA は 2 種類のプライマー (5' -ctatagtgtcacctaaatgc-3' および

5' -cgattcattaatgcagaccc-3') を用いて PCR を行い、PCR 産物を電気泳動した。

B. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

B. 4. 1 35 型 Ad ベクターによるヒト CD46 トランスジェニックマウスへの遺伝子導入

(1) 35 型 Ad ベクターの作製

ルシフェラーゼ、Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP)、もしくは β -galactosidase 発現 35 型 Ad ベクターは、improved in vitro ligation 法により作製した。シャトルプラスミド pCMV1、pHCMV-GFP1、および pHCMVLacZ-2 を I-CeuI, P1-SceI で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdMS4 もしくは pAdMS18 と Ligation することにより、35 型 Ad ベクタープラスミドを得た。作製したプラスミドを SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 35 型 Ad-E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで 35 型 Ad ベクターを得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従いを行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は分光学的方法により測定した。生物学的力価は 35 型 Ad-E1B 発現 293 細胞を用いた end-point dilution method によって算出した。

(2) ウェスタンブロットによるヒト CD46 トランスジェニックマウスにおける CD46 発現解析

野生型ならびに CD46 トランスジェニック (CD46TG) マウス (大阪大学・岡部勝先生より供与) より各臓器を回収し、1% Triton X-100, 2mM EGTA, 10% Glycerol, 各種 Protease 阻害剤を含む 20 mM Hepes Buffer (pH7.5) でホモジネートした。15000rpm、20 分間遠心後、上清を回収し Bio-Rad assay kit (Bio-Rad 社) を用いてタンパク濃度を測定した。一定量のタンパクを含む上清を 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて非還元条件下、SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロースフィルターに転写した。ブロッキング後、一次抗

体として抗ヒト CD46 血清 (5000 倍希釈) (北海道大学・瀬谷司先生より供与)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (6000 倍希釈) を反応させた。メンブランを ECL Western blotting detection system (アマシャムバイオサイエンス社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム社) により検出し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム社) を用いて定量した。

(3) マウス骨髄由来樹状細胞の調製

マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) は endotoxin-free の試薬および器具を使用して、Lutz らの方法 (J. Immunol. Methods, 223, 77-92, 1999) を若干改変して調製した。野生型ならびに CD46TG マウス大腿骨および脛骨を摘出し、complete RPMI1640 (10% ウシ胎仔血清、50 μ M 2-mercaptoethanol、抗生物質) 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、DC 分化用培養液 (40 ng/ml マウス GM-CSF (PeperoTech 社) を含む complete RPMI1640) で 100 mm 細菌培養用シャーレに播種した。3 日目に DC 分化用培養液を各シャーレに 10ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10ml の培養上清を新たな分化用培養液 10ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として実験に用いた。

(4) マウス腹腔内マクロファージの調製

腹腔内マクロファージの浸潤を促すため、野生型および CD46TG マウスに 2.9% チオグリコレート培地 1ml を腹腔内投与した。投与より 4 日後、腹腔内よりマクロファージを回収し、実験に用いた。

(5) 樹状細胞および腹腔内マクロファージにおける CD46 発現量の解析

各細胞に抗 Fc γ RII/III モノクローナル抗体 (2.4G2, Pharmingen 社) を添加して Fc レセプタ

ーブロッキングを行った後、Fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社) 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 の発現を解析した。

(6) 樹状細胞ならびに腹腔内マクロファージへの遺伝子導入実験

各細胞を 12 穴プレートに 2×10^5 cells/well で播種し、GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で 1.5 時間作用させた。合計 48 時間培養後、細胞を回収しフローサイトメーターを用いて遺伝子発現効率を解析した。

(7) CD46TG マウスへの in vivo 遺伝子導入実験

野生型および CD46TG マウスに、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 1.5×10^{10} VP/mouse の投与量で静脈内投与、もしくは腹腔内投与した。投与より 48 時間後、マウスより各臓器を回収し遺伝子発現効率を測定した。

(8) In vivo 投与後の 35 型 Ad ベクターの体内動態

上記と同様に野生型および CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内および腹腔内投与し、48 時間後各臓器を回収した。各臓器よりベクター DNA を含む全 DNA を回収した後、Real-time PCR を用いて臓器中に含まれるベクター DNA 量を測定した。定量的 Real-time PCR は、25 ng sample DNA, 0.5 μ M プライマー, 0.16 μ M TaqMan probe, 25 μ l TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems 社) を含む反応液 (50 μ l) を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて、95°C 10 分間処理の後、95°C 15 秒及び 60°C 1 分間のサイクルを 50 サイクル反応させることにより行った。プライマー及

びプローブは 35 型 Ad の pIX 部分に設定した。配列は以下の通りである。Forward: 5' - TGGATGGAAGACCCGTTCAA-3' , Reverse: 5' -CGTCCAAAGGTGAAGAAGCTTAAAGT-3' , Probe: 5' FAM-CGCCAATTCTTCAACGCTGACCTATGC-TAMRA 3' 。

(9) X-gal 染色による遺伝子発現細胞の同定

CD46TG マウス(ホモ)に対し、 β -galactosidase 発現 35 型 Ad ベクターを 7.5×10^{10} VP/mouse の投与量で腹腔内投与した。投与より 48 時間後、右心室より 0.5%グルタルアルデヒド・PBS を注入し灌流固定した。臓器回収後、一部の臓器はさらに界面活性剤を含む 0.5%グルタルアルデヒド・PBS に漬けて 1 時間固定した。その後、X-gal 染色液 (1 mg/ml X-gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% IGEPAL C-630, 0.0189M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0809M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) で一晩処理した後、顕微鏡下観察した。一部の臓器は Tissue-Tek で包埋した後、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。0.5%グルタルアルデヒド・PBS で固定した後、X-gal 染色液 (1 mg/ml X-gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$) で一晩処理した。切片を Nuclear fast red (Sigma 社) で対比染色した後、脱水、封入し、顕微鏡下観察した。

B. 4. 2 35 型 Ad ベクターの CD46 結合部位の検索

(1) 35 型 Ad ベクターの作製

前章と同様に調整した。

(2) フローサイトメーターを用いた CD46 発現解析

野生型及び各種変異型 CD46 発現 CHO 細胞 (北海道大学・瀬谷司先生より供与) を staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen より入手; M177, M160, 北海道大学・瀬谷司先生より供与) を添加して、氷上

で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄したのち、Phycoerythrin (PE) 標識されたマウス IgG 抗体を添加してさらに 1 時間インキュベートし、再度 staining buffer で洗浄したのち、フローサイトメーターで解析した。

(3) C2 isoform CD46 及び cytoplasmic tail 欠損 CD46 プラスミドの作製

ヒト CD46 C2 isoform 遺伝子を含むプラスミドはヒト CD46 C2 cDNA を 2 種類のプライマー CD46-forward, 5' -ATG GAG CCT CCC GGC CGC CGC GAG TGT CCC-3' 及び CD46-reverse, 5' -CGC GGC CGC CTA TTC AGC CTC TCT GCT CTG CTG -3' を用いてクローニングし、PCR 産物を pcDNA3.1-Hyg (+) (Invitrogen より入手) の PmeI 部位に挿入し pcDNA-CD46C2 を得た。cytoplasmic tail 欠損 (アミノ酸残基 347-369) CD46 (CD46 Δ Cyt 0) の cDNA は CD46 C2 の cDNA を テンプレートとし、2 種類のプライマー CD46-forward (上記記載) 及び CD46TM-reverse, 5' -GCG GCC GCT CAG TAC GGG ACA ACA CAA ATT ACT GCA AC-3' を用いてクローニングし、PCR 産物を pcDNA3.1-Hyg (+) の PmeI 部位に挿入して CD46 Δ Cyt 0 を得た。同様に、cytoplasmic tail のアミノ酸残基 352-369 欠損 CD46 のプラスミド pcDNA-CD46 Δ Cyt 6 は 2 種類のプライマー CD46-forward (上記記載) 及び CD46TM6-reverse, 5' -GCG GCC GCT CAC CTC CTT TGA AGA TAT CTG TAC GGG AC-3' を用いて作製した。挿入した DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 3100-Avant により確認した。

(4) 野生型及び short consensus repeats 欠損 CD46 安定発現 CHO 細胞の遺伝子導入実験

野生型及び short consensus repeats (SCR) 欠損 CD46 発現 CHO 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000 vector particle (VP) /cell で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、培

地を取り除き LT2.0 (東洋インキより入手) を加え、遺伝子発現量を解析した。

(5) 各SCR認識抗CD46抗体存在下における遺伝子導入実験

CD46 C2 isoform 安定発現 CHO 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種した。翌日、種々の濃度の各 SCR 認識抗 CD46 抗体 (MEM-258、Serotec、J4-48、Immunotech より入手; E4. 3、M177、M160) を含むメEDIUMで 4°C、1 時間インキュベート後、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で 4°C、1.5 時間作用させた。細胞を洗浄後、37°Cでインキュベートし、48 時間培養後に培地を取り除き、LT2.0 を加え、遺伝子発現量 (ルシフェラーゼ発現量) を解析した。

(6) Cytoplasmic tail 欠損 CD46 発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験

cytoplasmic tail 欠損 CD46 の一過性発現のために、プラスミド pcDNA-CD46C2、pcDNA-CD46Δ Cyt0、pcDNA-CD46Δ Cyt6 を Superfect (Qiagen より入手) を用いて CHO 細胞にトランスフェクションした。24 時間培養後に細胞を洗浄し、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で 4°C、1.5 時間作用させた。細胞を洗浄後、37°Cでインキュベートし、48 時間培養後に培地を取り除き、LT2.0 を加え、遺伝子発現量 (ルシフェラーゼ発現量) を解析した。また、野生型 CD46 及び cytoplasmic tail 欠損 CD46 の発現はフローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設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た。また、ヒト初代細胞、培養細胞は、研究用の市販品、領布品を用いており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

C.1.1 マウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

Ad ベクターは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が、Ad 受容体 (coxsackievirus and adenovirus receptor : CAR) の発現が乏しい細胞には効率良く遺伝子導入できないことが問題となっている。研究代表者らのグループでは、このような問題を克服するベクターとして、CAR を使用せずに高効率な遺伝子導入が可能な改良型 Ad ベクターの開発を進めている。例えば、 αv インテグリンに高親和性の RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性のあるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CAR を発現していない細胞に効率よく遺伝子を導入できるベクターを開発済みである。昨年度はヒト間葉系幹細胞やヒトおよびマウス脂肪細胞、ヒト胎盤細胞への高効率 Ad ベクター発現系を確立した。本年度は、遺伝子治療や再生医療の基礎研究を進める上で重要な細胞であるマウス間葉系幹細胞への遺伝子導入効率を最適化することを目的として、各種改良 Ad ベクターを使用して遺伝子導入効率の改善について検討した。

使用したベクターを Table.1 にまとめた。マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞での遺伝子導入の最適条件を検討した (Fig.1)。プロモーターについては、CMV プロモーターと CA プロモーター (β -actin promoter/CMV enhancer with β -actin intron) で検討を行った。マウス間葉系幹細胞へ 500~12500 VP/cell で各種 Ad ベクターを作用させ、2 日間培養後 X-gal 染色で、その遺伝子発現を検討した。その結果、CA プロモーターを使用した場合の方が、LacZ 発現細胞の割合が多かった。次に、CA プロモーターを有したファイバー改良 Ad ベクターについて検討した。ファイバー改良 Ad ベクターとしては、ファイバーノブ

HI ループ領域に RGD ペプチドを付与したベクター、ファイバーノブの C 末端領域にポリリジンペプチドを付与したベクターを使用した (Table.1)。従来型 Ad ベクター (Ad-CAIacZ) を使用した場合、2500 VP/cell の条件下で作用させても X-gal 陽性細胞は 20%程度にとどまった。一方、AdK7-CAIacZ では、遺伝子発現効率の上昇が見られ、60~70% の細胞が X-gal 陽性となった。AdRGD-CAIacZ は、Ad-CAIacZ と比較した場合は発現効率の改善がみられたが、AdK7-CAIacZ に比べると効率は不十分であった。以上の結果より、マウス間葉系幹細胞への遺伝子導入には、CA プロモーターを有し、ポリリジンタイプのファイバー改良型 Ad ベクターが最適であることが判明した。

C.1.2 ES 細胞への高効率遺伝子導入

ES 細胞 (embryonic stem cells; 胚性幹細胞) は 無限増殖能と分化多能性を有する細胞であり、1981 年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、マウス ES 細胞は遺伝子欠損マウス作製のための発生工学的材料として広く利用されてきたが、1998 年にはヒト胚からも ES 細胞が樹立され、再生医療への応用が期待されている。ES 細胞を目的の細胞に分化させるには、通常時は未分化のまま維持し、適宜何らかの刺激を与えて分化させることが必要である。マウス ES 細胞は分化を抑制するサイトカイン LIF (leukemia inhibitory factor) を加えることにより未分化状態を維持できることが知られているが、その作用機構については不明な点が多い。さらに、未分化 ES 細胞から目的の細胞に分化させる技術についても試行錯誤の状態が続いている。これらの原因のひとつとして、ES 細胞への遺伝子導入技術が確立されていないため、ES 細胞への外来遺伝子導入による機能解析研究が行えないことが考えられている。

マウス ES 細胞への遺伝子導入には、プラスミドを用いたリポフェクションを用い、導入遺伝子が染色体に組み込まれたわずかの細胞を薬剤耐

性遺伝子を用いて選択する方法が汎用されている。また、ポリオーマの large T 抗原を発現させた ES 細胞の場合には、ポリオーマの複製起点をプラスミドに付与することでプラスミドが染色体外で複製し、遺伝子導入細胞を効率良く選択することが可能となる。これらは ES 細胞が細胞株であることを利用した外来遺伝子発現法であるが、これらの遺伝子導入系では細胞分化の後も遺伝子発現が続くことによる問題点を伴う。Ad ベクターは、導入遺伝子が染色体外でエピゾーマルに存在し自律複製することはないため、一過性の遺伝子発現を示し、接着系細胞をはじめとする多くの細胞種に対して効率良く遺伝子導入できることが知られている。

そこで本研究では、ES 細胞への効率良い外来遺伝子導入実験系を開発し、それを用いて再生医療へ向けた ES 細胞の分化誘導系を確立することを目的として、ES 細胞への適用に最適な Ad ベクターの開発を行った。昨年度に、マウス ES 細胞への効率の良い遺伝子導入（発現）にはプロモーターの選択が極めて重要であり、汎用されている CMV プロモーターは機能せず、CA プロモーターあるいは EF-1 α プロモーターを用いることにより、mES 細胞に効率よく遺伝子発現させることができ、特に EF-1 α プロモーターは ES 細胞特異的に遺伝子発現させうることを報告した。

そこで本年度は、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES 細胞の分化を自由に制御可能かどうかについて検討した。mES 細胞では LIF (leukemia inhibitory factor)/STAT3 シグナルや、Oct-3/4、Nanog (共に転写因子)などが多能性維持に必要であることが知られている (Fig. 2)。そこで、EF-1 α プロモーターを有した STAT3F (STAT3 dominant-negative mutant)、OCT-3/4、Nanog 発現 Ad ベクターを作製し、これらベクター作用後の ES 細胞の分化について検討した。その結果、STAT3F および Oct-3/4 を導入した mES 細胞では LIF 存在下においても大部分の細胞が分化し (Fig. 3C-D)、三胚葉各マ

カー (外胚葉:FGF5, 中胚葉:brachyury(T), 内胚葉:GATA6) の発現を RT-PCR にて調べた結果、三胚葉いずれにも分化していることが明らかとなった (Fig. 4)。さらに、STAT3F による分化は Nanog を共発現することによりレスキューされ、未分化を維持した (Fig. 3E-F)。

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。そこで次に、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを開発するため、まずどのプロモーターが EB に適しているかについて検討した。その結果、CA プロモーターを有した Ad ベクターが最も効率よく遺伝子導入可能であった (Fig. 5)。また、CA プロモーターを有した従来型およびファイバー改変型 (RGD 型および K7 型) Ad ベクターを用いて検討した結果、いずれのベクターもほぼ同程度の遺伝子発現効率を示した (Fig. 6)。以上より、EB には CA プロモーターを有した、従来型の Ad ベクターが最適であることが明らかとなった。

C. 1.3 膵島 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

糖尿病の分子メカニズムの解明ならびに治療に向けた研究分野で最も切望されている基盤技術のひとつに、膵島 β 細胞への効率の良い遺伝子導入系の開発があげられる。しかしながら、膵島のような細胞集団塊への効率の良い遺伝子導入を検討したものは、従来型の Ad ベクターを含めほとんどない。これらのことから、主任研究者が開発済みの改良型 Ad ベクターを用いて、マウスおよびラットより単離した膵島への遺伝子導入効率を検討した。

はじめに、膵島 β 細胞へ Ad ベクターが感染できるかどうか検討するために、マウス β 細胞株 MIN6 を用いた検討を行った。LacZ を搭載した従来型 Ad ベクター (Ad-CMVLacZ) と CMVi プロモータ

一ならびに CA プロモーターをもった従来型 Ad ベクター Ad-CMV β LacZ、Ad-CALacZ について各濃度で 1 時間作用させた後、24 時間後に β -gal luminescence assay にて遺伝子導入効率を比較したところ、CA プロモーターを搭載した Ad ベクターが最も高い値を示した (Fig. 7A)。次に CA プロモーターを持った各種ファイバー改変型 Ad ベクター (AdRGD-LacZ ならびに AdK7-LacZ) を用いて、同様に遺伝子導入効率を検討したところ、ポリリジン (K7) 配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった AdK7-CALacZ が他に比べ高い酵素活性を示した (Fig. 7A)。また、各種ファイバー改変型 Ad ベクターを用いた遺伝子導入について X-gal 染色も行った (Fig. 7B)。1000 VP/cell の濃度ではどの改変型 Ad ベクターでも完全な遺伝子導入は認められなかった。一方、10000 VP/cell の濃度では各種ファイバー改変型 Ad ベクターですべての細胞において完全な遺伝子発現が認められた。3000 VP/cell では他の Ad ベクターより AdK7-CALacZ のものが最も高い遺伝子発現が認められた。

次に、膵島への遺伝子導入効率を検討するために、マウスおよびラットより膵島をコラゲナーゼ法により単離し、一晚培養後、各種ファイバー改変型 Ad ベクターを 2×10^9 VP/100 ~ 200 islets/well in 6well plate の条件下で 1 時間作用させ、24 時間培養後 β -gal assay を行った。マウス膵島では、従来型 Ad ベクターと各種ファイバー改変型 Ad ベクターでは大差なく同程度の酵素活性を示した (Fig. 8)。ラット膵島においても、やや AdK7-CALacZ のものが高い傾向が見られたものの、どの Ad ベクターにおいても同程度の酵素活性が認められた (data not shown)。またこのような遺伝子導入効率は 6×10^7 VP/cell までの濃度間において濃度依存的に認められた (data not shown)。 β 細胞は膵島の大部分の割合を占めるが膵島中心部に存在し、 α 細胞や δ 細胞など他の細胞が辺縁部にあることが知られている。そこで次に、膵島のどの部位に発現しているかを検討

するため、X-gal 染色を行った。膵島全体をそのまま染色してみたところ、完全に全体が染まっていた。しかしながら、膵島切片を作製し X-gal 染色を行ってみたところ、 β 細胞が存在する内部ではなく、 α 、 δ 細胞が存在する辺縁部のみ染まっていることが認められた (Fig. 9A)。これらは、GFP を搭載した Ad ベクターを用いた共焦点顕微鏡観察においても同様の結果が認められた (Fig. 9B)。これらの原因として、膵島内部への Ad ベクターの浸入に対する物理的な問題が考えられる。そこで次に、 Ca^{2+} -free buffer で前処理した後に Ad ベクターを作用させる方法を検討した。膵島単離後、一晚培養し、 Ca^{2+} -free buffer で 15 分処理した後に Ad ベクターを作用させ、同様に β -gal assay を行ったところ、 Ca^{2+} -free buffer 未処理のものより高い酵素活性を示すことが明らかとなった (Fig. 10)。

C. 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

腫瘍細胞のケモカイン産生レベルは正常細胞よりも低いことや、腫瘍新生血管の内皮細胞には接着分子がほとんど発現していないなどの理由から、一般的に免疫細胞は腫瘍組織内に十分に集積することができない。これは、腫瘍関連抗原 (TAA) 特異的な免疫応答を増幅してがんの増殖を免疫学的に抑圧することを目的とするがん免疫療法において、その有効性を大きく制限する要因の一つである。本観点から、我々はケモカイン遺伝子を腫瘍組織に導入することによって、腫瘍組織への免疫細胞動員の増強を可能とする新規がん免疫遺伝子治療の開発を試みている。本年度は、① DC がん免疫療法への AdRGD-CCL17 腫瘍内投与併用、② AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の腫瘍内併用投与、の二つのアプローチによってがん免疫遺伝子治療の最適化を試みた。用いたベクターは Fig. 11 に示した。

まず、あらかじめマウスに生着させた B16BL6

腫瘍内に 3×10^8 PFU の AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 12)。AdRGD-CCL17 投与群の腫瘍増殖は、コントロールベクター (AdRGD-Luc) を投与した群と比較して遅延傾向が認められたが、強力な抗腫瘍効果を発揮するまでには至らなかった。これは、腫瘍組織内で発現した CCL17 が免疫細胞を動員できたとしても、それらの免疫細胞が腫瘍特異的な傷害活性を獲得していなければ、効果的な腫瘍細胞排除は達成できないことを示唆している。

免疫療法によって TAA 特異的に活性化された患者体内の免疫細胞は、腫瘍組織内へと浸潤してはじめて腫瘍細胞への傷害活性、すなわち治療効果を発揮できることを考慮すると、従来の免疫療法にケモカインを併用することは、有効性に優れる新規がん免疫療法プロトコルを開発する上で非常に合目的なアプローチであると期待される。実際にケモカインのがん免疫療法への応用に関しては、単独適用よりもむしろ、サイトカインや共刺激分子といった免疫系を活性化できる因子との併用を目指した研究が数多く認められる。これらの背景に基づいて、AdRGD (RGD ペプチドをファイバーに付与した Ad ベクター) を用いた腫瘍内へのケモカイン遺伝子導入によるがん治療戦略においても、宿主に腫瘍免疫を誘導できるアプローチと併用することによってこそ真価が発揮されるであろうと考え、DC がん免疫療法と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与との併用治療を試みた。これまでに我々の研究グループでは、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 の遺伝子を導入した DC をマウスに免疫することにより、gp100 特異的な CTL 活性が増強され、B16BL6 腫瘍の攻撃接種に対する抵抗性が誘導できることを報告してきた。そこで、gp100 遺伝子導入 DC (gp100/DC) の投与によって、免疫機能の低下が予想される B16BL6 担がんマウスにおいても gp100 特異的な免疫応答を増強できるのかを検討した。B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を投与したマウスから、免疫 1 週間後に脾細胞を調製し、gp100 特異的 CTL

活性を測定しところ、免疫していない群 (PBS 投与群) と比較して明らかに高い B16BL6 細胞傷害活性が検出された (Fig. 13)。したがって、たとえ腫瘍細胞が増殖している個体であっても、腫瘍関連抗原 (TAA) 遺伝子を導入した DC の投与は TAA 特異的な免疫応答を活性化できることが示された。この結果は、TAA 発現 DC がワクチンプロトコルばかりでなく、既に生体内に腫瘍細胞が存在する状態での治療プロトコルにおいても、腫瘍免疫の始動および増幅を促すことが可能であり、DC 免疫療法によって活性化されたエフェクター細胞をケモカインの利用によって腫瘍組織に集積させることができれば、外科療法で除去し切れなかった腫瘍塊や切除することのできない組織に発生あるいは転移した腫瘍に対する新たな治療戦略の開発に繋がることを示唆している。

そこで、マウスに B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を皮内免疫し、その後、直径が 5-7 mm に増殖した腫瘍内に AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 14)。gp100/DC を免疫した後に腫瘍内に PBS を投与した群においては、PBS の腫瘍内投与のみを行ったマウスとほぼ同等の腫瘍増殖が認められ、ひとたび増殖を始めた B16BL6 腫瘍を gp100/DC の投与だけで抑えることは非常に困難であることが示された。また、gp100/DC を免疫した後にコントロールベクターである AdRGD-Luc を腫瘍内投与した群では、PBS 投与群と比較してわずかな腫瘍増殖遅延が観察された。この詳細なメカニズムは不明であるが、ベクター投与に伴う炎症反応によって集積した免疫細胞による効果ではないかと推察された。このコントロールベクター投与群と比較して、AdRGD-CCL17 投与群では非常に効果的な腫瘍増殖抑制が達成された。この知見は、単独適用では高いがん治療効果が得られなかったケモカインも、他のアプローチ (腫瘍免疫を活性化する手法) との併用によって優れた有効性を発揮する可能性があることを示唆している。

腫瘍免疫研究の発展に伴って、種々の免疫エフ

ェクター細胞（NK細胞、CTL、マクロファージなど）がそれぞれに異なる機構で腫瘍細胞を傷害することが明らかとなり、gp100/DC免疫とAdRGD-CCL17腫瘍内投与との併用による抗腫瘍効果のメカニズムを理解するためには、腫瘍組織内に集積した免疫細胞のポピュレーションならびに細胞数を解析する必要がある。そこで、本プロトコルにおけるT細胞の腫瘍内集積性ならびに腫瘍内に浸潤した免疫細胞の活性化状態について解析した。AdRGD-CCL17腫瘍内投与後2日目に摘出した腫瘍のCD3に対する免疫組織染色像を観察したところ、コントロールベクター投与群と比較して有意に高い陽性細胞数が検出された（Fig. 15）。さらに、AdRGD-CCL17腫瘍内投与のみのプロトコルとgp100/DCの皮内免疫を併用したプロトコルとにおいて、腫瘍内に動員された免疫細胞の活性化状態を比較するために、それぞれの腫瘍におけるリンパ球活性化マーカー（Perforin、Granzyme B、IFN- γ ）のmRNA発現レベルをRT-PCRにより解析した（Fig. 16）。コントロールベクターを投与した腫瘍と比較して、AdRGD-CCL17を投与した腫瘍においては、gp100/DCの皮内免疫併用の有無に関わらず、Perforin、Granzyme B、IFN- γ のいずれのmRNA発現とも高いレベルであった。また、AdRGD-CCL17を投与した腫瘍においては、gp100/DCの皮内免疫を併用することによって、Perforin、Granzyme B、IFN- γ のmRNA発現レベルが顕著に増大した。これらの結果は、両プロトコルにおける抗腫瘍効果の結果（Fig. 12、14）に良く相関しており、腫瘍特異的に活性化された免疫細胞をいかに効率良く腫瘍局所に集積させるかが、有効ながん免疫療法を開発する上でのキーファクターとなることを強く示唆している。

次に、IL-12非奏功性のがんとして知られるMeth-A腫瘍を生着させたマウスにおけるAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27の腫瘍内併用投与による抗腫瘍効果を検討した。まず、Meth-A担がんマウスにAdRGD-IL12単独、AdRGD-CCL27単独、または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、2日後の腫瘍内IL-12産生量を比較したところ、AdRGD-IL12単独投与群とAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与群では、ほぼ同等のIL-12p70の発現が確認された（Fig. 17）。一方、AdRGD-CCL27単独投与群では検出限界以下であり、CCL27発現に伴うIL-12産生誘導は起こらないことを確認した。そこで、AdRGD-IL12単独腫瘍内投与、AdRGD-CCL27単独腫瘍内投与、またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与したMeth-A担がんマウスにおける経日的な腫瘍体積変化と生存率をモニタリングした（Fig. 18）。その結果、AdRGD-CCL27単独投与群では、コントロールベクター投与群と同じ腫瘍増殖を示し、抗腫瘍効果は全く見られなかった。一方、AdRGD-IL12単独投与群では治療5日後から明らかな腫瘍退縮が認められ、さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用群においてはそれを上回る腫瘍増殖抑制効果が得られた。マウスの生存率においても、コントロール群ならびにAdRGD-CCL27単独投与群では治療から約20日後には全例死亡してしまったのに対して、AdRGD-IL12単独投与群では生存期間の明らかな延長が認められ、治療90日後においても約60%のマウスが生存していた。また、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与群においては、治療90日後におけるマウスの生存率は90%以上であり、完全治癒例はAdRGD-IL12投与群で13例中8例であったのに対して、併用群では13例中12例と極めて高率に認められた。これらの結果は、AdRGD-CCL27を併用投与することによって、AdRGD-IL12腫瘍内投与による抗腫瘍効果が大きく改善されることを示すものである。

続いて、完全治癒が得られたマウスに長期的な免疫記憶が誘導されているかを検討するために、最初の腫瘍接種から90日後に、Meth-A細胞あるいは同系ハプロタイプのCT26細胞を再接種し、それらの生着を観察した（Table 3）。その結果、CT26細胞を接種した場合には全例において腫瘍の生着が確認されたのに対して、Meth-A細胞接種

群では全てのマウスが腫瘍の生着を完全に拒絶した。すなわち、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与ならびに AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与によって原発腫瘍を完全に退縮することができたマウスにおいては、長期にわたる腫瘍特異的な免疫記憶が誘導されていることが示された。

前述のとおり、Meth-A 腫瘍はリコンビナント IL-12 の腹腔内投与で全く抗腫瘍効果が得られない IL-12 非奏功性腫瘍として知られている。その原因として、組織学的観察から、腫瘍周辺ストローマ組織の不形成に基づく接着分子の低発現が報告されてきた。接着分子は、リンパ球と血管内皮細胞との接着を媒介する機能を持ち、リンパ球の組織浸潤機構に関与する重要な分子の一つである。このため、IL-12 遺伝子の腫瘍内導入のみでは効果的な治療は困難であろうと予想していたが、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与においても劇的な Meth-A 腫瘍退縮効果が認められ、さらに AdRGD-CCL27 を併用することで、その抗腫瘍効果の増強が確認された。そこで次に、Meth-A 腫瘍における AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与における抗腫瘍メカニズムについて解析した。これらの治療プロトコルで完全治癒が得られたマウスに長期免疫記憶が誘導されていたことは、T 細胞を中心とした獲得免疫系の誘導・活性化が抗腫瘍効果に大きく関与していることを示唆する。そこで、T 細胞欠損ヌードマウスをにおいて同様の治療実験を行い、抗腫瘍効果における T 細胞免疫系の寄与率を検討した (Fig. 19)。その結果、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与のいずれの場合においても、Meth-A 腫瘍の増殖はコントロール群と同等であったことから、これらの治療プロトコルにおいては T 細胞依存性腫瘍免疫が主要な抗腫瘍メカニズムであることが判明した。さらに、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、および抗 asialo GM1 抗血清を用いた *in vivo* depletion assay により、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットの同

定を試みた (Fig. 20)。その結果、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与した際の腫瘍増殖抑制効果は、CD4⁺ T 細胞枯渇でほとんど影響を受けず、NK 細胞枯渇においてやや減弱し、CD8⁺ T 細胞枯渇によって完全に消失した。ヌードマウスでの検討と考え合わせると、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与により誘導される抗腫瘍効果においては、CD8⁺ T 細胞、すなわち CTL が主要な免疫エフェクター細胞として機能していることが明らかとなった。そこで、この CTL を活性化するメカニズムを解明するために、腫瘍局所ならびにリンパ節・脾臓などの二次リンパ組織における免疫イベントを解析した。まず、免疫組織染色により Meth-A 腫瘍内における浸潤 T 細胞数を検討したところ、コントロール群と比較して AdRGD-CCL27 単独投与群、AdRGD-IL12 単独投与群および AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群において、CD3⁺ T 細胞の顕著な増加が確認できた (Fig. 21)。さらに、この腫瘍内浸潤 T 細胞のサブセットを解析したところ、AdRGD-CCL27 投与群においては CD8⁺ T 細胞が優位に浸潤しており、AdRGD-IL12 投与群では CD4⁺ T 細胞が優位に浸潤する傾向が認められた。また、これらの群と比較して、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では CD4⁺ T 細胞ならびに CD8⁺ T 細胞の双方を最も効率よく腫瘍内に動員することができた。さらに、Perforin 発現を指標としてこれら腫瘍内浸潤 T 細胞の活性化状態を検討したところ、AdRGD-CCL27 単独投与群の Perforin 陽性細胞数がコントロール群と同程度であったのに対して、AdRGD-IL12 単独投与群および AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群では、腫瘍内に浸潤したほとんどの T 細胞が活性化されていることが明らかとなった。したがって、AdRGD-CCL27 単独投与によって多くの T 細胞を腫瘍内に動員できたとしても、それらが細胞傷害活性を有する状態に活性化されなければ抗腫瘍効果は全く発揮されず、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与による強力な

腫瘍退縮効果は、CCL27 の作用によって腫瘍内に動員された T 細胞を IL-12 の作用によって効率よく活性化できたことに起因するものと推察された。

一方、リンパ球低浸潤性とされる Meth-A 腫瘍に IL-12 を高発現させるだけで腫瘍内リンパ球動員を増強できたことから、次にこのメカニズムの解析を試みた。IL-12 には T 細胞や NK 細胞に作用して IFN- γ の産生を促進する活性があることから、AdRGD-IL12 を投与した腫瘍局所における IFN- γ 産生レベルを RT-PCR 解析により評価した (Fig. 22)。その結果、AdRGD-IL12 の投与によって腫瘍組織での IFN- γ 産生に亢進が認められ、IL-12 の作用によって腫瘍組織内環境が免疫活性化状態にあることが示された。さらに、リンパ球と血管内皮細胞との接着に重要な分子であり、IFN- γ の作用によって発現レベルの増強が報告されている ICAM-1 および VCAM-1 の腫瘍内発現レベルについても RT-PCR 解析したところ、AdRGD-IL12 投与腫瘍においてのみ、両接着分子の mRNA 発現レベルに明らかな上昇が認められた。これらの結果は、腫瘍辺縁ストローマ未形成ならびに新生血管における接着分子の低発現のためにリンパ球浸潤が困難とされてきた Meth-A 腫瘍において、AdRGD-IL12 の投与が腫瘍組織環境をリンパ球浸潤可能な状態に改善したことを示唆している。さらに、AdRGD-IL12 投与 6 日後のマウスから所属リンパ節細胞ならびに脾細胞を調製し、それらの Meth-A 細胞特異的な免疫応答を IFN- γ 産生細胞数を指標に検討したところ、コントロール群と比較して顕著な陽性細胞数の増加が確認できたことから、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって腫瘍特異的な全身性免疫応答が効率よく誘導されることも明らかとなった (Fig. 23)。

さて IL-12 は、細胞性免疫の活性化に基づく抗腫瘍作用を有する一方で、その多様な生理活性のために肝障害、血液毒性、発熱、嘔吐などの重篤な副作用を誘導し、これが臨床応用を推進する大きな障壁となっている。そのため、IL-12 による

抗腫瘍効果を最大限に維持したまま、副作用発現の危険性を低減させることのできる治療戦略の開発が望まれている。そこで、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与あるいは AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与で Meth-A 腫瘍の完全退縮が達成できたマウスにおける副作用発現について検討した (Fig. 24)。肺、脾臓、肝臓の病理組織学的な観察を行ったところ、AdRGD-IL12 単独投与群では、肺において多数のリンパ球浸潤が認められ、肝臓および脾臓においては髄外造血が確認された。一方、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、これらの副作用が全て軽度に抑えられており、詳細な機構は不明であるが AdRGD-CCL27 の併用投与は、AdRGD-IL12 投与に起因する副作用発現を低減できるアプローチであることが示唆された。

C.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

DC の生存や細胞死を決定する分子機構はこれまで不明であったが、近年の分子生物学の進展に伴い、アポトーシス制御因子である Bcl-2、Bcl-x_L、Bim が、“分子タイマー”として機能し、それらの量的なバランスが DC の寿命を決定していることが明らかになりつつある。これら Bcl-2 タンパク質ファミリー分子のうち、Bcl-2、Bcl-x_L は共にミトコンドリア膜上に存在し、シトクロム c などのアポトーシス誘導因子のミトコンドリアから細胞質への流出を抑制することで、アポトーシス経路を抑制する。最近になり、DC の生存には Bcl-x_L によって制御される系と Bcl-2 と Bim のバランスによって制御される系の独立した 2 つに機構が存在することが報告された。未熟 DC においては、Bcl-2 は恒常的に発現しているものの、Bcl-x_L、Bim はほとんど発現しておらず、培養を継続するとアポトーシスによって細胞死に至る。また、生体内の DC はリンパ節内において T 細胞に発現する CD40L によって刺激されると Bcl-x_L の発現が上昇し、一時的に生存を保つことが知られている。さらに、Bcl-x_L のミトコンドリア外膜

への結合部分を点突然変異法により疎水性アミノ酸に置換することによって、抗アポトーシス活性増強型の変異体が得られており、なかでも3アミノ酸を置換した Bcl-x_L-FNK (FNK) が抗アポトーシス活性に優れていることが報告されている。そこで本研究では、Bcl-x_LあるいはFNKを高発現させることでアポトーシス抑制機能を付与したDCワクチンを創製し、それを用いた新規DCがん免疫療法の有用性を評価した。

まず、AdRGD-Bclx_LあるいはAdRGD-FNKにより遺伝子導入した培養細胞(A549細胞)における各分子の発現を確認した(Fig. 25)。AdRGD-Bclx_L作用群およびAdRGD-FNK作用群では、western blottingによりBcl-x_LおよびFNKの分子量に相当する28 kDa付近にバンドが確認できた。また、これらの細胞のFCM解析の結果から、AdRGD-Bclx_LおよびAdRGD-FNKによる遺伝子導入効率はどちらも約90%であった。そこで、DCの増殖因子であるGM-CSFを添加しない培養条件において、これらのAdRGDを用いて遺伝子導入したDC(Bcl-x_L/DCおよびFNK/DC)の生存期間を検討した(Fig. 26)。遺伝子導入処理を行わないDC(Mock DC)およびコントロールベクターであるAdRGD-Lucを作用させたDCの生存率は培養4日目には50%以下に低下していたのに対して、FNK/DCおよびBcl-x_L/DCの生存率は、培養4日目までは80%以上を維持し、培養7日目においても50%以上であった。さらに、FNK/DCのアポトーシス抵抗性を評価するために、アポトーシス誘導剤であるStaurosporine存在下で培養した際の生存率について検討した(Fig. 27)。コントロールDCでは培養24時間後に60%程度の生存率しか得られない100 nM Staurosporineの存在下で、FNK/DCは90%以上の生存率を保つことができた。以上の結果より、AdRGD-Bclx_LあるいはAdRGD-FNKによって遺伝子導入することによって、アポトーシス抵抗性の付与に基づくDCの生存期間延長を達成できることが示された。

DCはMHC分子上に抗原タンパクに由来するエ

ピトープペプチドを提示することによって、はじめてT細胞を抗原特異的に感作・活性化することができる。したがって、遺伝子改変DCワクチンの創製にあたっては、遺伝子導入操作によってDC本来の抗原提示機能が影響されないことを確認する必要がある。そこで、FNK/DCにOVA遺伝子を共導入し、MHC class I分子を介したOVA提示レベルとその期間を検討した(Fig. 28)。AdRGD-OVA単独で遺伝子導入したDC(OVA/DC)と比較して、FNK遺伝子とOVA遺伝子とを共導入したDC(FNK+OVA/DC)は培養2日目においてほぼ同等の抗原提示効率を示した。さらに、OVA/DCでは培養6日目に抗原提示レベルが検出限界以下にまで低下していたのに対して、FNK+OVA/DCでは培養6日目でも2日目と変わらない抗原提示レベルを保持していた。したがって、FNK/DCは生存期間の延長を反映して、長期間にわたり抗原提示能を維持できることが明らかとなった。そこで、FNK+OVA/DCおよびBcl-x_L+OVA/DCのワクチン機能を評価するために、TAAとしてOVAを発現するE. G7-OVA細胞を用いて腫瘍拒絶実験を行った(Fig. 29)。腫瘍体積のモニタリングから、コントロール群と比較して、OVA/DC免疫群に腫瘍増殖抑制効果が認められ、FNK+OVA/DC免疫群およびBcl-x_L+OVA/DC免疫群においては、OVA/DC免疫群をさらに上回る抗腫瘍効果が得られた。この結果と相関して、OVA/DC免疫群では全例に腫瘍の生着が認められたのに対して、FNK+OVA/DC免疫群およびBcl-x_L+OVA/DC免疫群では、10例中3例で腫瘍の完全拒絶が観察された。次に、OVAのような抗原性の高いモデル抗原ではなく、本来腫瘍に発現しているTAAを標的としたDCがん免疫療法におけるアポトーシス抵抗性DCワクチンの有効性を評価するために、AdRGDを用いて調製したgp100/DC、FNK+gp100/DC、およびBcl-x_L+gp100/DCのマウスB16BL6メラノーマモデルにおけるワクチン効果を比較した(Fig. 30)。gp100/DC免疫群と比較して、FNK+gp100/DC免疫群およびBcl-x_L+gp100/DC免疫群では、より強力な腫瘍増

殖抑制効果が認められ、E. G7-OVA 腫瘍モデルと同様の傾向が得られた。したがって、モデル抗原を標的とした場合のみならず、低免疫原性のメラノーマに対しても、TAA のみを導入した従来の DC ワクチンと比較して、抗アポトーシス分子と TAA とを共導入した DC ワクチンのほうが、腫瘍免疫誘導能に優れることが実証された。

続いて、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンによる抗腫瘍効果増強メカニズムの解析を試みた。まず、抗原特異的 CTL の誘導効率について比較したところ、OVA/DC 免疫群と比較して、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x_L+OVA/DC 免疫群から調製したエフェクター細胞は、より強力に E. G7-OVA 細胞を傷害することができた。一方、いずれの免疫群についても、OVA を発現していない EL4 細胞に対する傷害活性は認められなかったことから、FNK+OVA/DC および Bcl-x_L+OVA/DC は OVA 特異的 CTL 活性の誘導能に優れた DC ワクチンであることが示された (Fig. 31)。次に、マウスに投与した FNK/DC の所属リンパ節集積性とそこでの生存期間を評価するために、GFP トランスジェニックマウス由来の DC を用いた組織学的な解析を行った (Fig. 32)。その結果、コントロール DC 投与群と比較して、FNK/DC 投与群では投与後二日目において所属リンパ節に到達している DC 数が約 2 倍増加しており、その後経日的にリンパ節内の FNK/DC 数は減少するものの、少なくとも投与後 8 日間に渡り、コントロール群よりも約 2 倍高い DC 数が検出された。したがって、FNK/DC ワクチンは投与部位から所属リンパ節への初期到達量の増大とリンパ節内での消失半減期の延長に伴って、従来の DC ワクチンよりも強力にかつ長期にわたって T 細胞を感作・活性化できることが示唆された。そこで、FNK/DC ワクチンによりリンパ節内で活性化される抗原特異的 T 細胞の頻度を IFN- γ 産生を指標に検討したところ、免疫後 7 日目において、FNK+gp100/DC ワクチンは gp100/DC よりも効率よく CD4⁺ T 細胞ならびに CD8⁺ T 細胞を活性化できることが判明した (Fig. 33)。以上の結果よ

り、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンは、生体に投与した後に所属リンパ節に到達できる DC 数の増大、リンパ節における DC 生存期間の延長、抗原特異的 T 細胞の効率的な感作・活性化、に基づいて、DC がん免疫療法の有効性を改善できることが示された。

C. 1.6 Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入活性の評価

遺伝子治療の重要なターゲットとなっているがん細胞や血球系細胞には、Ad ベクターのレセプターである CAR の発現が乏しい細胞が数多く存在し、そのため Ad ベクターの適用範囲が大きく制限されている。この点に関して、我々のグループが推進してきたインテグリン指向性 Ad ベクターならびに CD46 指向性 Ad ベクターの開発は、Ad ベクターの感染域拡大に繋がったものの、依然としてこれらレセプターの発現が低い一部のがん細胞や血球系細胞に対しては、遺伝子導入が困難な状況にある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けては、細胞の種類や性質に関わらず効率良く遺伝子導入可能なベクターの開発が望まれる。そこで我々は、近年その細胞内移行能が注目されている Tat ペプチドに着目し、Tat ペプチドの細胞膜透過機能を Ad ベクターに付与することができれば、細胞のレセプター発現の有無に関わらず、広い感染域を持つ新しいベクターとなり得るのではないかと考え、Tat ペプチド修飾 Ad (Tat-Ad) ベクターを作製し、その遺伝子導入特性に関して検討した。

まず Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合を確認するために、Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの SDS-PAGE ならびに表面電荷測定を行った (Table 4 and Fig. 34)。その結果、SDS-PAGE において Ad ベクターの主要なカプシドタンパクであるヘキサソンのバンドが、Tat-Ad ベクターでは未修飾 Ad ベクターと比較して高分子量側にシフトしていた。また、カチオン性の Tat ペプチドに覆われることで Tat-Ad ベクターの表面

は正電荷になっていたことから、Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合が確認された。

次に、接着細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子発現活性を検討した。CAR およびインテグリンが共に高発現である A549 細胞において、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc と比較して、さらに 10 倍以上高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 35)。また、CAR 低発現、インテグリン高発現の B16BL6 細胞においても、Tat-Ad-Luc は AdRGD-Luc よりも約 10 倍、未修飾 Ad-Luc よりも 500 倍以上高い遺伝子発現を達成した。さらに、従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターでは遺伝子導入が困難であった骨髄由来血球系浮遊細胞である KG-1a 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc や AdRGD-Luc と比べて約 10 倍高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 36)。以上の結果から、Tat-Ad ベクターは非常に広範な感染域を有することによって、遺伝子治療の適応拡大に大きく貢献できるベクターシステムである可能性が示唆された。

C. 1.7 ターゲティング Ad ベクターの開発

(1) 非特異的遺伝子発現を起さない (特定の組織に移行する活性を持たない) Ad ベクターの開発

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。一方で、標的組織・細胞にのみ遺伝子導入可能なターゲティング Ad ベクターの開発のためには、ベクターの非特異的遺伝子導入を回避し、標的細胞へ特異的に遺伝子導入する機能を付与することが必要である。しかしながら、Ad ベクターはマウスへの全身投与後、そのほとんどが肝臓に集積し、遺伝子発現に至ることが知られており、ターゲット組織での特異的遺伝子発現を目的とする場合は、肝臓での高い遺伝子発現が問題となる。主任研究者らは従来の Ad 受容体である CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を、ファイバーの

FG ループの 4 アミノ酸の欠損、ペントンベースの RGD モチーフの欠損、ファイバーシャフトの 35 型 Ad 由来シャフトへの置換を行うことで欠損させ (トリプルミュータント Ad ベクター)、マウスへの尾静脈投与後の肝臓での遺伝子発現を劇的に減少させることに成功し、ターゲティングベクターの基盤ベクターとして有意なベクターを開発済みである。

一方、CAR との結合能を除去するためには、ファイバーノブの FG ループの変異の他に、AB ループの変異 (R412S, A415G, E416G, K417G) も広く利用されている。昨年度までに、トリプルミュータント Ad ベクターに付与するファイバーノブの変異として、新たに AB ループに変異を付与したベクター (Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2) を作製し、このベクターと FG ループに変異を付与したトリプルミュータント Ad ベクター (Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2)、さらにコントロールとして従来型の Ad ベクター (Ad-L2) を用いて遺伝子導入能の比較を行った。その結果、マウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験では、尾静脈投与、腹腔内投与と共に Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は測定したすべての臓器において Ad-L2 に比べルシフェラーゼ活性の減少が見られ、特に肝臓では静脈内投与において、Ad-L2 に比べ Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 は 1500 倍、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 では 10000 倍以上のルシフェラーゼ活性の減少が見られた (Fig. 37)。また、腹腔内投与においては、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べ肝臓でのルシフェラーゼ活性は 60 倍、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 では 500 倍以上の減少が見られた (Fig. 38)。よって、AB ループの変異を加えたトリプルミュータント Ad ベクターの方が、FG ループに変異を付与したベクターに比べ、マウス肝臓における非特異的な遺伝子発現を減少させることが可能であることを昨年度までに報告した。

本年度は、これら 2 種類のトリプルミュータント Ad ベクターのマウス *in vivo* における体内動態、組織障害、および自然免疫誘導について従来

型 Ad ベクターと比較・検討した。用いたベクターを Table 5、Table 6 にまとめた。まず、マウスへ各ベクターを投与後の Ad 組織分布の測定を行った。尾静脈投与後の Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は測定したすべての臓器において Ad-L2 とほぼ同程度の Ad ゲノム量が検出された (Fig. 39)。腹腔内投与においても、腎臓以外の臓器では Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 共に Ad-L2 とほぼ同程度の Ad ゲノム量が検出された (Fig. 40)。また、Ad ベクターの集積が知られている肝臓での Ad ゲノム量は、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は従来型 Ad ベクター以上の集積を示した。Fig. 37 で示したように、トリプルミュータント Ad ベクターのマウス肝臓での遺伝子発現は従来型 Ad ベクターに比べ著しく減少しているにも関わらず、Ad ゲノム集積量には顕著な差がないことから、肝臓における Ad ベクターの分布をより詳細に検討した。マウス尾静脈投与後の Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 は肝臓の非実質細胞（血管内皮細胞、クッパー細胞等を含む）に多く存在し (Fig. 41)、逆に Ad-L2 は実質細胞に多く存在していた。一方、腹腔内投与後においては、トリプルミュータント Ad ベクター、および従来型 Ad ベクターは共に肝臓の非実質細胞に多く取り込まれることが明らかとなった (Fig. 42)。過去の我々の報告において、肝臓の非実質細胞に取り込まれた Ad ベクターは実質細胞に取り込まれた Ad ベクターよりも急速に分解を受け消失することを見出している。よって、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 はマウスへ投与後、肝臓の非実質細胞に取り込まれ、急速に分解・消失することで低い遺伝子発現しか示さなかったと考えられる。しかしながら、肝臓での分布細胞の差だけでは、トリプルミュータント Ad ベクターが従来型 Ad ベクターに比べ 10000 倍以上低い遺伝子発現を示すことの説明はできない。そこで、培養細胞を用いた検討により、遺伝子発現と Ad 細胞内取り込み量の測定を行った。その結果、培養細胞では Ad/ Δ F(FG)

Δ P-S35-L2、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 共に Ad-L2 の 10 分の 1 程度が細胞内に取り込まれているが、遺伝子発現は 100-10000 倍以上低い値を示していることが明らかとなった (Fig. 43、44)。これはファイバーやペンテンベースに加えたアミノ酸変異により、細胞内動態が変化し、Ad ゲノムの核への移行能が変化したためであると考えられる。つまり、トリプルミュータント Ad ベクターの低い遺伝子発現は、細胞表面受容体への結合能の低下と、細胞内へ取り込まれた後の Ad ゲノムの核への移行能低下の二つの原因によることが明らかとなった。

次に、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、および Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 の血中滞留性を測定したところ、マウス尾静脈内投与後の血中滞留性は従来型 Ad ベクターに比べ大きな変化はなかった (Fig. 45)。一方、腹腔内投与においては、トリプルミュータント Ad ベクターは従来型 Ad ベクターに比べ高い最高血中濃度を示し、 AUC_{2-180} においても 5-7 倍の値を示した (Fig. 46)。腹腔内投与時においては、感染力の強い従来型 Ad ベクターは、腹腔内に存在する腹腔内臓や横隔膜に大量に感染していたことから (data not shown)、従来型 Ad ベクターは腹腔内の組織に感染するため腹腔内から血液中への移行量が減少し、 AUC_{2-180} の低下が起これらと考えられる。静脈内投与後の血中滞留性がトリプルミュータント Ad ベクターと従来型 Ad ベクターにより変化しないことから、血液中からの消失速度に Ad 受容体との結合能は関与していないことが示唆された。しかしながら、Fig. 41 で示したように、肝臓中の分布細胞が異なることから、静脈内投与後の Ad ベクターの分布には Ad 受容体との結合能が関与していることが示唆された。

遺伝子治療への応用を考えた場合、用いる遺伝子導入ベクター自体の毒性評価が重要となることから、Ad/ Δ F(FG) Δ P-S35-L2、および Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 の肝障害性、及び自然免疫誘導能を検討し、安全性の評価を行った。肝障害の指標である AST/ALT は従来型 Ad ベクターに比べト

トリプルミュータント Ad ベクターは非常に低い値を示した (Fig. 47)。また、炎症性サイトカインの産生を見るため、投与後 3 時間での血清中 IL-6 濃度を測定したところ、トリプルミュータント Ad ベクターは従来型 Ad ベクターに比べ低い血清中 IL-6 濃度を示した (Fig. 48)。つまり、トリプルミュータント Ad ベクターは肝臓への障害が少なく、炎症性サイトカインの産生が低いことから安全性に優れた Ad ベクターであると考えられる。Ad 受容体との結合能を欠損させることで、マウス *in vivo* での非特異的遺伝子発現を減少させ、さらに組織への毒性を減少させたトリプルミュータント Ad ベクターは、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターになりうるものと期待される。

最後に、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 に細胞表面の特異的分子に親和性を持たせることで、標的分子特異的に遺伝子導入可能であるかを、インテグリンとの親和性を示す RGD 配列をファイバーノブに発現させた Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-RGD-L2 を作製し、検討した。その結果、Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-RGD-L2 は Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 に比べ約 100 倍の遺伝子発現能を示し、この活性はファイバーに発現させた RGD 配列依存的であった (Fig. 49, 50)。従って、Ad のカプシド蛋白質に標的指向性を持つ分子を挿入することで、標的分子特異的な遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。しかしながら、マウスへ *in vivo* 投与した場合には、RGD 配列をファイバーノブに発現させた Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-RGD-L2 は Ad/ Δ F(AB) Δ P-S35-L2 に比べほとんど遺伝子発現の上昇が得られなかった。これは、RGD 配列と標的分子である細胞表面のインテグリンとの親和性が *in vivo* の遺伝子発現の上昇を引き起こすほど十分強くないためか、あるいは Ad ベクターが血管内からアクセスできる細胞に α v インテグリンが十分発現していないことが原因と考えられる。従って、今後は *in vivo* においても標的分子との強い親和性を有するリガンドの検索が重要になるものと考えられる。

以上をまとめると、トリプルミュータント Ad

ベクターに付与するファイバーノブの変異としては、AB ループの変異の方が、FG ループの変異に比べ優れていることが明らかとなった。また、マウス *in vivo* の実験により肝臓障害と自然免疫誘導能の低下が示された。さらにファイバーに細胞表面分子を認識するペプチド配列を付与することで、遺伝子導入機能の回復が見られた。これらの結果より、ファイバーノブの AB ループ、ファイバーシャフト、ペントンベースの 3 領域全てを同時に改変することで、特定の臓器で目的遺伝子の発現を起こさない Ad ベクターの更なる改良に成功し、本ベクターは安全性にも優れていることを見出した。今回開発したトリプルミュータント Ad ベクターはターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとなりうるものと期待された。

(2) フェージ表面提示法を用いたターゲティングリガンドの同定

目的の細胞に特異的に遺伝子導入できる次世代 Ad ベクターを開発していくためには、細胞特異性を示す高親和性のリガンド (ペプチド配列) の同定と、それらをファイバー領域に付与した Ad ベクターの開発が必要不可欠である。特定細胞や受容体に親和性を示すペプチドの同定のためには、フェージ表面提示法が汎用されている。しかし、従来のフェージ表面提示法によるペプチドの同定は、Ad ベクターに付与することを目的としたものではないため、多くの場合、Ad のファイバーに組み込まれたペプチドは、ペプチド本来が有していた細胞への親和性を失ってしなうという問題があった。そこで本研究では、ファイバーノブの HI ループ領域等にランダムなペプチド配列を含むファイバーノブ全体を提示したフェージライブラリーを作製し、上記の問題点を克服した迅速な Ad ベクターにおける標的指向性分子のスクリーニング法の確立を目指した研究を行った。

フェージライブラリーの構築には、Amersham pharmacia biotech 社製のリコンビナント抗体発現システムを改変して行った。即ち、フェージミ