

ドベクターとして融合タンパク発現カセットが Lac プロモーター支配下にある pCANTAB5E (Amersham pharmacia biotech, Inc.) を使用した。pAdHM41 をテンプレートとして、5 型アデノウイルスファイバーノブ配列を PCR 法によってクローニングした。得られた DNA 断片を、NcoI および NotI 処理した pCANTAB5E に組込み、得られた ファージミドベクターを pCANYAB-knob41 とした。次に、pCANYAB-knob41 を使用して 5 型アデノウイルスファイバーノブ発現ファージライブラリーを作製した。ランダムな 7 アミノ酸を 5 型アデノウイルスファイバーノブの HI ループに導入するために、pCANYAB-knob41 をテンプレートとして PCR をおこなった。このとき、全てのアミノ酸を網羅するランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS 配列 (N:A, T, G, C, S; G, C) の 7 配列を含むセンスプライマー、及びアンチセンスプライマーを使用した。得られた PCR 産物 (225bp) を精製後、pCANYAB-knob41 に組み込んだ。このプラスミドを大腸菌 TG1 株 (STRATAGENE 社製) に形質転換し、ファージライブラリーを作製した。このとき、ライブラリサイズは、 1×10^7 CFU だった。また、このライブラリーが、ファイバーノブを提示していることを、抗アデノウイルスファイバーノブ抗体を使用した ELISA によって確認した。ファイバーノブ提示ファージライブラリーが作製できたので、現在、造血幹細胞や腫瘍血管内皮細胞等への特異的結合能を有するペプチドの同定を目指したスクリーニングを行っている。

C.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

RGD ペプチド付与型ファイバーあるいは 35 型アデノウイルス由来のファイバーを有し、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できる Ad ベクター作製のためのベクタープラスミドとして、新たに pAdHM51-RGD、pAdHM49 を作製した。これらのベクタープラスミドを用いて、E3 欠損領域に

tet-off 系の転写活性化因子 tTA 発現単位を挿入し、E1 欠損領域にテトラサイクリン依存性のプロモーター制御下に目的遺伝子の発現単位を挿入することで、単一のベクターで発現レベルを調節できるファイバー改変 Ad ベクターの作製が可能となった (Fig. 51)。

まず、用いた細胞の CHO、CHO-CD46、SK HEP-1、LNZ308 細胞における CD46 の発現をフローサイトメーターで確認した (Fig. 52)。その結果、CHO 細胞は CD46 陰性であり、CHO-CD46、SK HEP-1、LNZ308 細胞は CD46 を発現していることが判明した。

そこで分泌性アルカリフォスファターゼ SEAP を発現する AdRGD-Off-SEAP6、AdF35-Off-SEAP6 と、野生型のファイバーを有する AdOff-SEAP6、および CMV プロモーター制御化で SEAP を発現する AdCMV-SEAP6 の機能を、種々の細胞株で検討した (用いたベクターは Table 7 にまとめた)。SK HEP-1 細胞は CAR 陽性、 αv インテグリン陽性であり、LNZ308、CHO、NIH3T3 細胞は CAR 陰性、 αv インテグリン陽性である。

まず CHO、CHO-CD46 細胞における AdRGD-Off-SEAP6、AdF35-Off-SEAP6 (それぞれ) の機能を AdOff-SEAP6 と比較検討した。各ベクターを細胞に作用させ、ドキシサイクリン有あるいは無の条件下で培養し、SEAP 産生量を測定した (Fig. 53)。その結果、CHO、CHO-CD46 細胞とも、AdOff-SEAP6 での SEAP 産生量は低く、ではドキシサイクリン有無による SEAP 産生の誘導能も低かった (それぞれ 3.7 倍、1.5 倍)。しかしながら、CHO 細胞では AdRGD-Off-SEAP6 の活性は 1 オーダー以上上昇し、発現誘導能も 25.1 倍だった。一方、CHO-CD46 細胞では AdF35-Off-SEAP6 を用いることで SEAP 活性は 1 オーダー以上上昇し、発現誘導能も 31.6 倍と改善された。

次に、SK HEP-1、LNZ308、NIH3T3 細胞における AdRGD-Off-SEAP6、AdF35-Off-SEAP6 の機能を AdRGD-SEAP6 と比較検討した (Fig. 54)。CAR 陽性、CD46 陽性の SK HEP-1 細胞においてはいずれ

の Ad ベクターにおいても高い SEAP 産生および発現誘導能が得られた。CAR 陰性、CD46 陽性の LN2308 細胞においては AdRGD-SEAP6 では SEAP 産生量が SK HEP-1 細胞の場合に比べ 2 オーダー低かったが、AdRGD-Off-SEAP6、AdF35-Off-SEAP6 では改善が認められ、AdRGD-SEAP6 に比べ 2 オーダー以上高い SEAP 産生量を示した。また、発現誘導能も優れており、AdRGD-Off-SEAP6、AdF35-Off-SEAP6 では 700~800 倍以上であった。CAR 陰性、CD46 陰性、 αv インテグリン陽性の NIH3T3 細胞においては、Ad-Off-SEAP6 や AdF35-Off-SEAP6 での活性は低く、AdRGD-Off-SEAP6 でのみ高い活性を示した。さらに、各 Ad ベクターにおける最大 SEAP 産生量について検討したところ、CMV プロモーターを有した Ad-SEAP2 と同程度であり、非常に高いものであった (Table 8)。

以上の結果より、発現制御型 Ad ベクターに αv インテグリンや CD46 を受容体とするファイバー改変技術を組み合わせたベクターは、より高範囲の細胞に対して優れた発現誘導能を示すことが明らかとなった。

C. 1.9 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクター開発

近年 pIX やヘキソンに外来ペプチドを挿入することで Ad ベクターの感染域を改変したり、Ad ベクターにターゲティング能の付与を目指すアプローチが注目を浴びている。pIX やヘキソンは Ad 粒子あたり 240 分子存在し (ヘキソンは三量体構造をとっているため計 720 分子になる)、コピー数ではファイバーの 36 コピーを圧倒するという (Fig. 55, 56)、また pIX に関してはペプチドサイズのみならず蛋白質サイズの大きな分子も提示することが可能であると報告されている。しかしながら、これら改変ベクターの遺伝子発現効率等の比較はいまだなされていない。

このような背景より、pIX あるいはヘキソンに

外来分子を提示することができれば、ファイバー改変型 Ad ベクターよりも提示される外来ペプチドの数が多くなり、レセプター特異性、遺伝子導入効率に関して優れたベクターになるのではないかと考えられる。そこで本研究では、まず簡便に pIX あるいはヘキソンに外来ペプチド (分子) を提示できる Ad ベクターの作製法を開発し、本方法に従い作製した各カプシドタンパク質改変 Ad ベクターが目的ペプチド配列を各部位に提示できているかどうかを評価した。

これまでに我々は、Ad ベクターの感染域を改変するためにファイバーノブの HI loop あるいは C 末端領域に注目し、簡便にこれらの部位に外来ペプチドを挿入できるベクターシステムを開発してきた。このシステムは、Ad ゲノムの E1/E3 領域を欠損し、さらにファイバーノブの HI loop あるいはあるいは C 末端コード領域に Csp45I、ClaI というユニークな制限酵素サイトを有するベクタープラスミド (pAdHM41) に目的の外来ペプチドをコードする合成オリゴ DNA を *in vitro* ligation で挿入することでファイバー改変型 Ad ベクターが簡便に作製できる。この方法を用いファイバーに RGD ペプチドや K7 (リジン残基が 7 つ続いた配列) 配列を挿入したベクターは、CAR 依存的な遺伝子導入に加え、それぞれ細胞表面のインテグリンやヘパラン硫酸を認識して細胞内に侵入し遺伝子発現することができることが明らかとなっている。

そこでまず、pIX やヘキソンに外来ペプチドを提示することのできる Ad ベクターを作製するために、*in vitro* ligation に基づいた簡便な pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクター作製法を開発を行った。pIX の C 末端コード領域にユニークな制限酵素サイト XbaI を有するベクタープラスミド pAdHM56 の作製を行った。また同時にシャトルプラスミド pHM15-75A を作製した。このシャトルプラスミドは α ヘリックスリンカーをマルチクローニングサイト (MCS) に持っており、MCS の両末端には XbaI、Avr II、NheI、SpeI を有して

いる。 α ヘリックスリンカーの 3' 末端側に目的の外来ペプチドをコードする合成オリゴ DNA を挿入することで pIX の C 末端からリンカーを介し、その先端に外来ペプチドを提示させることが可能である。このシャトルプラスミドの MCS の XbaI、Avr II、NheI、SpeI のいずれかを用いることで目的遺伝子を pAdHM56 の XbaI サイトにワンステップの遺伝子組み換えで挿入することが可能となる (Fig. 57)。また pIX の C 末端にはペプチドサイズの小さな分子のみならず GFP (Green Florescence Protein) のような蛋白質も提示できることが報告されている。pHM15 は目的蛋白質を pIX の C 末端に提示させるためのシャトルプラスミドであり、その MCS の両末端に XbaI、Avr II、NheI、SpeI を有している。

次にヘキソンの HVR の中で外来ペプチドの提示部位として適した HVR5 領域にユニークな制限酵素サイト XbaI を有するベクタープラスミド pAdHM62 を作製した (Fig. 58)。作製した pAdHM56、pAdHM62 は E1 欠損領域にユニークな制限酵素サイトを持ち簡便に目的の発現カセットを挿入することが可能である。

これらベクターシステムを用いてルシフェラーゼ発現カセットを E1 欠損領域に持ち、pIX あるいはヘキソンに His tag、FLAG tag、或いは RGD 配列を有する Ad ベクター、Ad-His(pIX)-L2、Ad-FLAG(pIX)-L2、Ad-RGD(pIX)-L2 あるいは Ad-His(hexon)-L2、Ad-FLAG(hexon)-L2、Ad-RGD(hexon)-L2 を作製した (Fig. 57, 58)。またすでに開発されている pAdHM41 を用いて、ファイバーノブの HI loop あるいは C 末端領域に His tag あるいは FLAG tag を持ちルシフェラーゼ発現カセットを E1 欠損領域に持った Ad-His(HI)-L2、Ad-FLAG(HI)-L2、Ad-His(C)-L2、Ad-FLAG(C)-L2 を作製した。また同様に pIX に外来タンパク質が提示できることを証明するために pHM15 にモデルタンパク質として GFP を挿入した Ad-EGFP(pIX) を作製した。

次に、カプシド改変型 Ad ベクターの目的領域

に外来ペプチドが発現しているかをウエスタンブロットによって、また各領域の外来ペプチドがウイルス表面に提示されているかを Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) によって評価した。ウエスタンブロット法により His tag が目的部位に提示されているかを検討したところ Fig. 59 に示すようにファイバーノブの HI loop 及び C 末端改変型は 60KDa 付近にバンドが検出できていること、pIX 改変型は 14.4KDa にバンドが検出できており、ヘキソン改変型は 110KDa 付近にバンドが検出された。この結果より、各部位に挿入した His tag は目的部位に融合蛋白質として発現していることが明らかとなった。

次に挿入した外来ペプチドがウイルス表面に提示されているかを検討するために ELISA を行った。その結果、ファイバー C 末端、pIX の C 末端、ヘキソンに挿入した His tag を ELISA により濃度依存的に検出できたことから、確かにこれらベクターはウイルス表面に His tag が提示できていることが確認できた (Fig. 60)。また、ヘキソン改変型が極めて高い吸光度を示しているが、これはウイルスあたりのヘキソンのコピー数が多いために提示される His tag のコピー数が多いことによると考えられる。一方、ファイバーノブの HI loop に His tag を挿入したベクターでは吸光度が従来型と同じ程度しか得られなかった (Fig. 60)。この原因としては、標的分子 (抗体やレセプター等) に親和性を有するペプチド配列が機能するためには、ペプチド配列の立体構造が重要であることを反映したものと考えられた。つまり、融合タンパク質としてファイバーノブの HI loop に挿入した場合、His tag の立体構造が変化してしまい、機能を失ったのではないかと考えられる。事実このような原因により、フェージ表面提示法を用いて単離された標的指向性を有するペプチドをファイバーノブの HI loop に挿入しターゲティング Ad ベクターの作製を試みるアプローチは、成功例が限られているのが現状である。ファイバーノブの HI loop に FLAG tag を挿入したベクターを作

製し同様の検討を行ったところファイバーC末端に FLAG を挿入したベクターと同様の吸光度を示した (Fig. 60)。また同様に pIX の C 末端に GFP を提示したベクターにおいて、ELISA により粒子数依存的な吸光度が観察され (Fig. 61)、さらにはウエスタンブロットにより目的のバンドが検出できた。従って pIX の C 末端に関しては、確かにサイズの小さいペプチドのみでなく GFP のような蛋白質をも提示できることが明らかになった。

以上の結果より、pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターはファイバー改変型 Ad ベクターよりもより効果的に外来ペプチドを提示できていることが明らかとなった。既に、外来ペプチドとしてインテグリンとの親和性を有する RGD ペプチドを付与した各種改変 Ad ベクターも作製済みであり、来年度はこれらの改変 Ad ベクターの遺伝子導入特性を評価していく予定である。

C.2 水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発

タンパク質やリポソームに対して広く用いられている PEG 修飾法は、抗体や貪食細胞からの回避能を付与し、血中安定性を飛躍的に改善する優れたアプローチとして広く知られている。これまでに我々は Ad ベクターの PEG 修飾方法を確立し、*in vitro* において PEG 修飾率に応じた抗体回避能の獲得ならびに CAR (Ad 感染受容体) を介した遺伝子導入の抑制が達成できることを明らかにしてきた。また、昨年度の研究成果により、血管透過性が亢進した腫瘍組織に対して血中滞留性が向上した PEG-Ad ベクターが、PEG 化リポソーム (ステルスリポソーム) などと同様に、腫瘍組織に集積するいわゆる EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) を示すことをはじめて明らかにした。そこで本年度は、PEG-Ad ベクターの EPR 効果を利用した腫瘍に対する受動的ターゲティングが、未修飾 Ad ベク

ターと比較して、治療における有効性向上に反映されるかについて検討するとともに、PEG の分子量ならびに修飾率を種々検討することで、EPR 効果の最適化を試みた。

PEG-Ad ベクターの EPR 効果に関して、まず分子量 5000 の PEG を用いて種々の修飾率に調製した PEG-Ad ベクターを Meth-A 担がんマウスの尾静脈より投与し、投与後 6 時間における腫瘍および肝臓へのベクター粒子集積量を定量的リアルタイム PCR 法により測定した (Fig. 62)。その結果、未修飾 Ad ベクターで認められる高い肝集積性が、PEG 修飾率の増大に伴って抑制されるのみならず、腫瘍組織へのベクター集積量が増大することを明らかにした。

次に、これまでの研究において、全身投与後に腫瘍組織で最も高い遺伝子発現レベルを示した修飾率約 90% の PEG-Ad ベクターを用いて、がん遺伝子治療における有効性を評価した。治療遺伝子として TNF- α 遺伝子を搭載した未修飾 Ad-TNF α および PEG-Ad-TNF α を Meth-A 担がんマウスの尾静脈より投与し、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした。その結果、Ad-TNF α 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、PEG-Ad-TNF α 投与群の腫瘍増殖には明らかな遅延が観察された (Fig. 63)。また、本実験で用いたベクター用量 (10^{10} VP/mouse) では、いずれの群においても TNF- α に起因する体重減少や突然死といった重篤な副作用は観察されなかった。さらに、ベクター投与後 2 日目のマウスから摘出した肝臓を病理組織学的に観察したところ、Ad-TNF α 投与群において 7 例中 6 例で認められた肝障害 (小空胞の形成) が、PEG-Ad-TNF α 投与群では 7 例中 3 例でわずかに観察されたのみであった (Fig. 64)。続いて同様に、治療遺伝子として自殺遺伝子である HSVtk 遺伝子を用いた HSVtk/GCV システムによるがん遺伝子治療実験を行った (Fig. 65)。その結果、 10^{10} VP の未修飾 Ad-HSVtk 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、 10^{10} VP の

PEG-Ad-HSVtk 投与群の腫瘍増殖は Ad-HSVtk 投与群の 40%以下にまで抑制された。一方、 10^{11} VP の Ad-HSVtk あるいは PEG-Ad-HSVtk を投与した群では、腫瘍の退縮傾向は観察されたものの、急激な体重減少を伴って実験期間中に全例が死亡した。また、ベクター投与後 7 日目のマウスから摘出した肝臓の病理組織学的観察を行ったところ、PEG-Ad-HSVtk 投与群においては、 10^{11} VP の用量で小空胞の形成や炎症性細胞浸潤が観察されたものの、 10^{10} VP の投与量では未修飾 Ad-HSVtk 投与群と同様に肝障害はほとんど観察されなかった (Fig. 66)。以上の結果は、TNF- α あるいは HSVtk 発現ベクターの全身投与によるがん遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用が、有効性の改善と副作用の低減に繋がる可能性を示している。

次に、分子量の異なる PEG を用いて種々の修飾率に調製した PEG-Ad ベクターの *in vitro* および *in vivo* 遺伝子発現特性を比較検討することで、CAR 依存性の遺伝子導入を抑制し、且つ EPR 効果を最大限に引き出すことができる PEG 修飾条件の最適化を試みた。これまでの検討に用いてきた分子量 5000 の PEG に加えて、分子量 2000 および 20000 の PEG を選択し、それぞれ低修飾 (L)、中修飾 (M)、高修飾 (H) の PEG-Ad-Luc を作製した。まず、各 PEG-Ad-Luc の *in vitro* 遺伝子導入活性について A549 細胞を用いて比較したところ、PEG 分子量の増大ならびに PEG 修飾率の増加に伴ってルシフェラーゼ遺伝子発現強度は低下することが明らかとなった (Fig. 67)。続いて、PEG 修飾率が約 30% の各 PEG-Ad-Luc (PEG(2K)-Ad-Luc、PEG(5K)-Ad-Luc、PEG(20K)-Ad-Luc) を Meth-A 担がんマウスに尾静脈内投与し、2 日後の肝臓および腫瘍におけるルシフェラーゼ発現量を測定した (Fig. 68)。その結果、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して、肝臓での遺伝子発現抑制と腫瘍での遺伝子発現増大が最も顕著だったのは PEG(20K)-Ad-Luc 投与群であり、PEG(2K)-Ad-Luc 投与群では EPR 効果を得られなかった。そこで、これまで研究に用いてきた

PEG(5K)-Ad ベクターと今回新たに作製した PEG(20K)-Ad ベクターの EPR 効果をより詳細に比較するために、種々の PEG 修飾率を有する PEG(5K)-Ad-Luc および PEG(20K)-Ad-Luc の *in vivo* 遺伝子発現分布を比較した (Fig. 69)。その結果、腫瘍における遺伝子発現レベルは、修飾率 90% の PEG(5K)-Ad-Luc 投与群で最も高かったものの、修飾率 40% の PEG(20K)-Ad-Luc 投与群では、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して肝臓での遺伝子発現が数百分の一にまで抑制され、腫瘍での遺伝子発現が約 10 倍増強されるという、最も腫瘍選択的な遺伝子導入が認められた。したがって、修飾率 40% の PEG(20K)-Ad ベクターが、全身投与による腫瘍組織への受動的ターゲティングを行うために最も優れたベクターであることが判明した。

さて、イムノリポソームなどに見られるように標的指向性分子を PEG 鎖先端に付与することで、PEG-Ad ベクターはより積極的に目的組織への遺伝子導入が可能になると考えられる。これまでに我々は、PEG 鎖先端にインテグリン指向性の RGD ペプチドを付与した RGD-PEG-Ad ベクターを開発し、本ベクターが抗体存在下においてもインテグリン高発現の細胞に対して効率よく遺伝子導入できることを明らかにしてきた。そこで、RGD-PEG-Ad ベクターの感染特異性をより詳細に検討するために、過剰量の RGD ペプチド存在下における RGD-PEG-Ad-Luc、未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc の遺伝子発現効率を比較検討した (Fig. 70)。その結果、未修飾 Ad-Luc の遺伝子発現量は RGD ペプチドによってほとんど影響されなかったのに対して、RGD-PEG-Ad-Luc は AdRGD-Luc と同様に、RGD ペプチド存在下では遺伝子発現効率が明らかに低下した。したがって、RGD-PEG-Ad ベクターは、細胞表面のインテグリンを認識・結合して遺伝子導入することが確認された。さらに、RGD-PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入用ベクターとしての有用性を評価するために、マウスに尾静脈内投与した 2 日後における肝臓での遺伝子

発現を検討した (Fig. 71)。その結果、未修飾 Ad ベクターならびに AdRGD ベクターと同様に RGD-PEG-Ad ベクターは、*in vivo*においても高い遺伝子発現活性を有するベクターであることが示された。

C.3 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

C.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

Ad ベクターは 3T3-L1 細胞に対し遺伝子導入活性が低いことが知られている。前年度に我々は、3T3-L1 脂肪前駆細胞および脂肪細胞への遺伝子導入に最適なファイバー改変 Ad ベクターの検索を行い、ポリリジンタイプファイバー改変 Ad ベクターが 3T3-L1 脂肪前駆細胞、脂肪細胞への遺伝子導入に最適であることが明らかにした。そこで、RRAR γ に対する siRNA を発現するポリリジンタイプファイバー改変 Ad ベクター、AdK7-H1-RRAR γ を作製し、3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を抑制するのかが検討した。なお、RRAR γ に対する siRNA 配列には RRAR γ 1 および RRAR γ 2 の両者をノックダウンする配列を選択した。AdK7-H1-RRAR γ の作用をウエスタンブロット法にて確認したところ、AdK7-H1-RRAR γ は 3T3-L1 脂肪細胞の RRAR γ 発現を抑制した (Fig. 72)。AdK7-H1、AdK7-H1-Scramble および AdK7-Null は RRAR γ 発現に影響しなかった。これらの結果は 3T3-L1 細胞において AdK7-H1-RRAR γ は RRAR γ 発現を効果的に抑制することを示している。

脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程において、3T3-L1 脂肪前駆細胞はトリグリセリドを豊富に含んだ油滴を蓄積する。そのため Oil red O 染色や glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の細胞内脂質の蓄積を測定することによって 3T3-L1 細胞の分化の程度を評価することが可能である。そこで次に AdK7-H1-RRAR γ が 3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分

化を抑制するのかが検討した。3T3-L1 細胞に Ad ベクターを作用させ、翌日細胞をコンフレントの状態にさせた。コンフレントになった 2 日後、細胞を 9 日間分化させ (分化用培地で培養し)、Oil red O 染色を行った。その結果、3T3-L1 脂肪細胞内の脂質蓄積は AdK7-H1-RRAR γ 処理により減少した (Fig. 73)。GPDH 活性もまた AdK7-H1-RRAR γ (3000 VP/cell および 10000 VP/cell) 処理により AdK7-Null (10000 VP/cell) 処理の 55% (3000 VP/cell) および 33% (10000 VP/cell) まで減少した (Fig. 74)。AdK7-H1、AdK7-H1-Scramble および AdK7-Null は細胞内の脂質蓄積や GPDH 活性に対する抑制効果は観察されなかった。これらの結果より、AdK7-H1-RRAR γ は 3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を効果的に抑制できることが明らかとなった。

C.1.2 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

現在、RNAi は標的遺伝子のノックダウンの有用な手段として用いられているが、さらなる遺伝子機能解析への応用には発現調節可能なベクター系の開発が望まれている。近年、Cre-loxP の組換えシステムを利用して、Cre により発現調節可能な RNAi ベクターがいくつか報告されたが、これらは全て Cre により shRNA 発現が誘導される系であり、標的遺伝子の発現抑制を解除する、つまり shRNA 発現を停止させるシステムは報告されていない。shRNA 発現を開始させることは、RNAi ベクターを導入することで行えることから、shRNA 発現を停止させるシステムの方が汎用性が高いと考えられる。そこで、我々は Cre-loxP システムを利用して shRNA 発現をオフにする系の開発を試みた。

本実験で使用したベクターを Fig. 75 にまとめた。プラスミドベクターは Ad ベクターへの簡便な挿入にも対応できるように、シャトルプラスミド pHM5 をベースに作製した。

プロモーターと shRNA 配列の間に loxP 配列を

挿入することによる RNAi 効果への影響を検討した。A549 および HepG2 細胞に pGL3-Control と RNAi ベクタープラスミドをコトランスフェクションし、2 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pHM5-hU6 および pHM5-hU6-Scramble では pHM5 と比較しルシフェラーゼ発現に影響しなかったが、pHM5-hU6-Lu はルシフェラーゼ発現を顕著に抑制した (Fig. 76)。loxP 配列を有したベクターについても同様に検討したところ、pLoxP-hU6 および pLoxP-hU6-Scramble は pHM5 と比較しルシフェラーゼ発現に影響しなかったが、pLoxP-hU6-Lu はルシフェラーゼ発現を顕著に抑制した。この pHM5-hU6-Lu によるルシフェラーゼ抑制効果は pLoxP-hU6-Lu による抑制効果は同程度であった (Fig. 76)。

次に pLoxP-hU6-Lu によるルシフェラーゼ発現抑制が AdCre 処理によって解除されるのか検討した。A549 および HepG2 細胞を AdCre で処理し、翌日 pGL3-Control と RNAi ベクタープラスミドをコトランスフェクションし、その 2 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pLoxP-hU6-Lu により抑制されたルシフェラーゼ発現は AdCre の用量依存的に増加し、A549 では AdCre 3000 VP/cell、HepG2 では AdCre 1000 VP/cell で完全に回復した。pLoxP-hU6 および pLoxP-hU6-Scramble ではルシフェラーゼ発現に影響しなかった (Fig. 77)。この AdCre によるルシフェラーゼ発現の回復は、Cre により loxP で挟まれたプロモーターが除去された為と推測される。そこで、Cre により loxP で挟まれたプロモーターが実際に除去されるのかを検討した。A549 細胞に、AdCre、続いて pLoxP-hU6-Lu をトランスフェクションし、2 日後、細胞の核画分から DNA を調製し、PCR を行った。PCR プライマー Primer 1 および 2 を Fig. 78 で示した位置に設計すると、Cre によるプロモーターの除去に伴い、PCR 産物は約 800bp から約 470bp に低分子化する。そこで、Cre-loxP によるプロモーターの切り出しを、この PCR 産物の低分子化によってモニターし

た。AdCre を 300、1000 VP/cell で処理したところ、AdCre 処理したもののみ約 470bp の PCR 産物のバンドが観察された。さらに約 470bp のバンドは作用させた AdCre の増加に従って増大した (Fig. 78)。

続いて、抑制されたルシフェラーゼ発現が AdCre 処理によって回復するのか検討した。A549 細胞を播種し、翌日 pGL3-Control と pLoxP-hU6 または pLoxP-hU6-Lu をコトランスフェクションし、さらに翌日 AdCre で処理し、その 4 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pLoxP-hU6-Lu により抑制されたルシフェラーゼ発現は AdCre 処理によって増加し、コントロールの約 50%まで回復した (Fig. 79)。従って、Cre の発現により shRNA 発現をオフに制御できるベクター系の開発に成功した。

C. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

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

35 型 Ad ベクターは、①CAR ではなく CD46 を受容体として認識するため、一般に汎用されている 5 型 Ad ベクターとは異なる感染域を示し、CAR 陰性細胞にも高効率な遺伝子導入が可能であること、②5 型 Ad ベクターとは異なる subgroup に属するため抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けないこと、③抗 35 型 Ad 抗体を有しているヒトの割合が低いことなどから、5 型 Ad ベクターと同様、有用な遺伝子導入用ベクターになるものとして期待されている。我々は、世界に先駆けて 35 型 Ad ベクターの開発に成功しており、ヒト造血幹細胞を含むヒト由来の細胞に対し、5 型 Ad ベクターと比較し広い感染域を示すことを明らかにしている。しかし一方で、マウスに *in vivo* 投与した場合、各臓器における遺伝子発現量は 5 型 Ad ベクターと比べ極めて低い値しか示さなかった。これは受容体である CD46 がヒトでは赤血球を除くほぼ全

ての細胞で発現しているのに対し、マウスの体細胞ではほとんど発現しておらず精巣でしか発現していないためであると思われる。そこで本検討では、ヒト CD46 トランスジェニック (CD46TG) マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討した。

まず Western blot にて CD46TG マウスの各臓器における CD46 発現を検討した。その結果、CD46TG マウスの全臓器において有意な CD46 の発現が観察された (Fig. 80)。特に肝臓、脾臓、肺、腎臓において高い発現が認められ、これはヒトにおける発現パターンと比較的類似していた。また CD46 遺伝子を両方の相同染色体に有したホモマウスと片方にのみ有したヘミマウスとを比較すると、ホモマウスのほうがヘミマウスよりも CD46 を高発現しており、ホモマウスの肝臓、脾臓、横隔膜ではヘミマウスと比較し約 3 倍高い CD46 発現量を示した。しかしながら、ホモマウスより単離した肝実質細胞、脾細胞、および胸腺細胞における CD46 発現量は、ヒト培養細胞と同程度か、若干低いものであった。また、Western blot および Flow cytometry による検討では、CD46TG マウス由来の赤血球において CD46 の有意な発現は見られなかった (data not shown)。

次に CD46TG マウスより初代培養細胞を単離・誘導し、遺伝子導入実験を行った。初代培養細胞としては、骨髄由来樹状細胞 (DC) および腹腔内マクロファージを選択した。近年、35 型 Ad ベクターはワクチンベクターとしての有用性が報告されており、これらの細胞は 35 型 Ad ベクターを用いたワクチン治療における格好の標的細胞と考えられる。まず Flowcytometry により両細胞における CD46 発現量を測定した。その結果、野生型由来 DC では Background レベルであったのに対し、ヘミマウス由来 DC で 47%、ホモマウス由来 DC で 87%の細胞が CD46 を発現していた (Fig. 81A)。腹腔内マクロファージに関しても、ヘミマウス由来マクロファージで 20%、ホモマウス由来マクロファージで 41%の細胞が CD46 を発現し

ていた (Fig. 81B)。これらの細胞に対し、GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、両細胞ともに CD46 発現量に比例し、遺伝子発現量の増大が観察された。野生型由来 DC ではほとんど遺伝子発現が認められなかった (3.8%GFP 陽性) のに対し、ヘミマウスおよびホモマウス由来 DC ではそれぞれ 42%、83%もの細胞が GFP 陽性であった (Fig. 82A)。腹腔内マクロファージにおいても、野生型由来マクロファージでは GFP 発現は認められなかったが、ヘミマウスおよびホモマウス由来 DC ではそれぞれ 10%、20%もの細胞が GFP 陽性であった (Fig. 82B)。

CD46TG マウス由来の初代培養細胞において顕著な遺伝子導入効率の上昇が観察されたことから、次に CD46TG マウスに対し 35 型 Ad ベクターを *in vivo* 投与し遺伝子導入効率を測定した。まず野生型ならびに CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを尾静脈内投与したところ、CD46TG マウスの肝臓、肺、腎臓において野生型と比較し有意に高い遺伝子発現効率が観察された (Fig. 83A)。一方で、脾臓および胸腺においては明らかな遺伝子発現効率の増加は認められず、また肝臓以外の臓器ではホモマウスとヘミマウスとの間に顕著な差は認められなかった。一方、腹腔内投与では CD46TG マウスの肝臓、脾臓、腎臓において静脈内投与の場合と比較し、効率良く遺伝子導入されていた (Fig. 83B)。ホモマウスの肝臓および腎臓では、腹腔内投与のほうが静脈内投与よりもそれぞれ 83 倍、271 倍高い値を示した。さらに CD46TG マウスと野生型マウスとの差も腹腔内投与のほうが大きく、ホモマウスの肝臓、腎臓、横隔膜ではそれぞれ野生型の 536 倍、492 倍、83 倍高い遺伝子発現効率を示した。ホモマウスとヘミマウスとを比較してみると、ホモマウスのほうが高い遺伝子発現効率を示しており、ホモマウスの肝臓及び横隔膜の遺伝子発現量はヘミマウスと比較しそれぞれ 6.8 倍、5.5 倍高いものであった。これはホモマウスのほうが CD46 を高発現しているためと思われる。しかしながら、CD46TG マウスにお

ける 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現量は、5 型 Ad ベクターの遺伝子発現量と比較すると、極めて低いものであった。ホモマウスに 35 型 Ad ベクターを腹腔内投与したときの遺伝子発現効率と、同じ投与量で 5 型 Ad ベクターを野生型マウスに静脈内投与したときの発現効率とを比較すると、5 型 Ad ベクターは肝臓では 20000 倍、脾臓では 57 倍高い遺伝子発現効率を示した (data not shown)。

次に *in vivo* 投与後、各臓器に取り込まれた 35 型 Ad ベクター量を定量的 PCR を用いて検討した。まず静脈内投与では、肝臓を除く全ての臓器で野生型よりも CD46TG マウスにおいて多くのベクター DNA が検出された (Fig. 84A)。さらにヘミマウスよりもホモマウスのほうが多くのベクターが集積していた。特に脾臓においては、野生型と比較しヘミマウスで 8 倍、ホモマウスで 69 倍高い値を示した。しかしながら、最も多くの 5 型 Ad ベクターが集積する肝臓では、他臓器と比較し 35 型 Ad ベクターの有意に高い集積は観察されなかった。一方、腹腔内投与においては、肝臓、腎臓、腹膜、横隔膜で CD46TG マウスのほうが野生型マウスよりも多くの 35 型 Ad ベクターが集積していた (Fig. 84B)。特にホモマウスの肝臓および腎臓では、野生型よりも 10 倍以上高い値を示した。さらにホモマウスの肝臓、腎臓、腹膜、横隔膜ではヘミマウスよりも多くのベクターを取り込んでいた。一方で、腹腔から直接到達できない臓器である肺および心臓におけるベクター集積量は低く、野生型と CD46TG マウスとの間に明らかな差は見られなかった。以上、CD46TG マウスにおいて遺伝子発現効率ならびにベクター取り込み量ともに高い値を示したことから、35 型 Ad ベクターは *in vivo* においても CD46 を受容体として認識し感染することが示唆された。また、野生型マウスの各臓器で検出された 35 型 Ad ベクター量の総計は、CD46TG マウスのものと比較すると低いものであった。これは、野生型マウスにおいては CD46 が発現していないため、35 型 Ad ベクターが各組織に感染できずにクッパー細胞などの貪食

系細胞に取り込まれ、ベクター DNA が速やかに分解したためだと考察された。

最後に各臓器においてどのような細胞が遺伝子発現を示しているか検討するため、 β -galactosidase 発現 35 型 Ad ベクターを CD46TG マウス (ホモ) に腹腔内投与し、X-gal 染色を行った。その結果、肝臓、腎臓、腹膜において多くの X-gal 陽性細胞が観察された (Fig. 85)。しかしながら、肝臓および腎臓切片像からもわかるように、遺伝子発現を示しているのは臓器表面の中皮細胞であり、臓器内部にはほとんど X-gal 陽性細胞は認められなかった。以上の結果より、35 型 Ad ベクターは腹腔内投与後血流を介して各臓器に感染するのではなく、投与部位から直接臓器表面の細胞に感染し、遺伝子発現にいたることが明らかとなった。

C. 4. 2 35 型アデノウイルスベクターの CD46 結合部位の検索

35 型 Ad の受容体である CD46 は分子量約 60KDa の 1 回膜貫通型タンパク質であり、ヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞が CD46 を発現している。CD46 は細胞外領域として、4 つの short consensus repeat (SCR)、serine-threonine-proline-rich region (STP)、unknown region、細胞内領域として transmembrane domain (TM)、cytoplasmic domain (CYT) から構成されている (Fig. 86)。STP、CYT の mRNA の alternative splicing による primary structure の変化とそれに付随する N-, O-linked sugar の修飾レベルの差異により多形性を示し、isoform は 8 種類以上あると推定されているが、最もポピュラーな isoform は BC1、BC2、C1、C2 の 4 種類である。CD46 はプロテアーゼ I 因子の cofactor として自己細胞に沈着した C3b 及び C4b に結合し、プロテアーゼ I 因子による補体分子の加水分解を促進することにより自己の細胞を守る役割を担っている。この機能の他にヒト CD46 は麻疹ウイルス、ヘルペスウイルス 6 型、ヒト subgroup B Ad や 2 種類の細菌などの病

原体の受容体として同定されている。これら病原体の中でも麻疹ウィルス、ヒトヘルペス 6 型及び病原性ナイセリアと CD46 の結合に関しては研究が進展している。しかし、ヒト CD46 と subgroup B Ad の結合に関する詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、ヒト CD46 と subgroup B Ad の相互作用の詳細を明らかにすべく、種々の領域を欠損させた CD46 発現 CHO 細胞や抗 CD46 抗体を用い、35 型 Ad ベクター感染に CD46 のどの領域が関与しているか検討を行った。

(1) 野生型及び short consensus repeats (SCR) 欠損 CD46 安定発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験

ヒト CD46 の SCR 領域が Ad35 の感染に必須の領域であるのかどうかを、各種 SCR 欠損 CD46 安定発現 CHO 細胞を用いて検討した。まず、SCR 欠損 CD46 発現 CHO 細胞における CD46 の発現レベルを、各 SCR を認識する抗 CD46 抗体を用いてフローサイトメーターで解析した。変異型 CD46 の発現は、全てのクローンにおいて同程度であった (Fig. 87)。種々の抗 CD46 抗体を用いた結果を組み合わせることにより、各 SCR 領域の欠損が証明できた。また、SCR4 欠損 CHO 細胞における SCR4 の欠損は、SCR4 特異的抗体を保有していないことから、RT-PCR ならびに DNA シークエンサーにより確認した。

次に、それらの細胞にルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、SCR1 及び SCR 2 欠損 CD46 発現 CHO 細胞は野生型 CD46 発現 CHO 細胞と比較し、約 50%に遺伝子導入効率が低下した。それに対して、SCR3 及び SCR 4 欠損 CD46 発現 CHO 細胞は野生型 CD46 発現 CHO 細胞と同程度の遺伝子導入効率を示した (Fig. 88)。以上の結果より、35 型 Ad の感染に SCR1 及び SCR 2 が関与していることが示された。

(2) 各 SCR 認識抗 CD46 抗体存在下における遺伝子導入実験

CD46 のどの SCR 領域が 35 型 Ad の感染に関与し

ているのかに関して、CD46 の異なる領域を認識する数種類のモノクローナル抗体を用いて、35 型 Ad ベクター感染阻害検討を行った。SCR-1 特異的抗体 MEM-258 及び SCR-2 特異的抗体 M177 を用いた場合において有意な 35 型 Ad ベクター感染阻害効果が見られた。データシートによると MEM-258 は SCR4 を認識すると記載されているが、我々はいかにいうデータを得ている。最近の論文においても、MEM-258 のエピトープが SCR1 に存在するのではないかという報告がある。一方で、同様に SCR1 を認識する抗体である E4.3 及び J4-48 を作用させた場合は、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率の低下は見られなかった (Fig. 89)。このことから、35 型 Ad の感染には SCR1 のなかでも E4.3 や J4-48 ではなく、MEM-258 の認識領域が関与しているのではないかということが示唆された。また、SCR3 特異的抗体 M160 では 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率の低下は見られなかった。以上の結果より、CD46 の SCR1 及び SCR 2 が 35 型 Ad 感染に重要な領域であるということが示された。

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

ヒト CD46 の細胞内領域が 35 型 Ad の感染に関与しているかどうかに関して、ヒト CD46 C2 isoform の CYT を欠損させた CD46 Δ Cyt0、CD46 Δ Cyt6 を CHO 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを作用させ検討を行った。CD46 Δ Cyt0 は cytoplasmic domain (アミノ酸残基 347-369) を全て欠損させた CD46 である。CD46 Δ Cyt6 はリン酸化領域であり、細胞内領域の Ca²⁺ flux に関与しているとされる cytoplasmic domain の細胞膜近位の 6 アミノ酸を残し、アミノ酸残基 352-369 を欠損させた CD46 である。それらの CD46 を CHO 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、full-length

の CD46 を発現している CHO 細胞と比較して CD46 Δ Cyt0、CD46 Δ Cyt6 を発現している CHO 細胞の遺伝子導入効率は同程度であった (Fig. 90)。以上の結果から、CD46 の cytoplasmic domain は 35 型 Ad の感染に必須の領域ではないということが示された。

D. 考察

D.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

D.1.1 マウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

間葉系幹細胞、ES 細胞（多能性幹細胞）をはじめとする幹細胞は、自己複製能を有する一方で、多くの種類の細胞を産生する多分化能を有することから、再生医療のための細胞ソースとして注目されている。また、近年の研究によりこれら幹細胞の自己複製能の維持や、特定の細胞への分化能の獲得に關与する遺伝子が次々と同定され、細胞分化を自在に制御することも可能になりつつある。細胞増殖・分化の分子機構の解明には外来遺伝子を導入して発現させたり、あるいは特定の遺伝子の発現を抑制させたりすることが必要であり、効率の良い遺伝子導入法は必要不可欠である。これまでは、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが汎用されてきたが、これらのベクターによる遺伝子発現は染色体への導入遺伝子の組み込みを伴うため長期的・永続的なものとなり、細胞分化が起こった後も導入遺伝子の発現は続くことになる。細胞分化に關わる遺伝子の中には、分化完了後は発現（あるいは抑制）を必要としない場合も多くあることが考えられ、このような場合には一過性の遺伝子発現（抑制）をもたらすベクター系が好ましいことになる。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。しかしながら、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入効率は低く、これらの細胞への適用には不向きであった。主任研究者らが開発を進めている改良型 Ad ベクターは、これらの幹細胞へも効率良く遺伝子導入でき、分化機構解明などの基礎研究や、再生医療や遺伝子治療のための基盤技術になりうると期待される。

遺伝子治療や遺伝子導入用ベクターとして汎用されている Ad ベクターは、サブグループ C に属するヒト 5 型 Ad を基盤としている（ヒト Ad は A から F までのサブグループに分けられ、計 51 種の血清型が存在する）。5 型アデノウイルスの感染には、ウイルスカプシドタンパク質のファイバーと、細胞表面上の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) との結合を必要とするため、従来の Ad ベクターは CAR 陽性細胞へは効率良く遺伝子導入できるが、CAR の発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率は低いことが課題であった。CAR の発現が乏しい細胞としては、造血幹細胞や T 細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、一部の癌細胞（特に悪性度の高い癌細胞）、血管内皮細胞、滑膜細胞などが知られており、このような細胞へは Ad ベクターの適用は不向きであった。

主任研究者らは、ファイバータンパク質の外来ペプチド挿入部位として適した HI ループや C 末端コード領域に簡単に外来ペプチドコード遺伝子を挿入できるファイバー改変 Ad ベクター作製法を開発済みであり、この技術と *in vitro* ライゲーションに基づいた EI 欠損領域への外来遺伝子挿入法（主任研究者らにより開発済み）を合わせることにより、感染時の CAR 依存性を克服した種々の改良型 Ad ベクターを簡単に作製することが可能となった。本法を用いて作製したファイバータンパク質の HI ループや C 末端領域に RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドやポリリジンペプチドを挿入したベクターでは、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効率良く遺伝子導入することが可能となった。また、ファイバータンパク質を、CD46 を受容体とする 35 型 Ad (サブグループ B に属する) 由来のものに置換したベクターも開発済みである。補体制御因子として知られている CD46 は、ヒト由来の細胞ではほとんどの細胞で発現していることが知られており、35 型 Ad ベクター（あるいはファイバー部分が 35 型 Ad からなる 5 型 Ad をベースに

したベクター)は、ヒト由来細胞への有力なベクターである。

そこで本研究では、昨年度および今年度に、これら一連のファイバー改変 Ad ベクターを用いることによって、間葉系幹細胞と脂肪細胞(他に胎盤細胞、ES細胞、造血幹細胞についても検討)への遺伝子導入効率の改善が可能かどうかについて検討を行い、最適化された改良型 Ad ベクターで劇的な遺伝子導入効率の改善に成功した。その結果、改良型 Ad ベクターを用いることによって、目的にもよるが、遺伝子導入細胞のソーティングや選択を行わなくても、単回のベクター作用で細胞分化の制御などに利用可能な段階になった。今後、主任研究者らの開発したこれらのベクターが、幹細胞研究や再生医療研究などの基礎・応用研究に大きく貢献できることを期待している。

D.1.2 ES細胞への高効率遺伝子導入

昨年度に、ES細胞には EF-1 α プロモーターを有した従来型の Ad ベクターが最も効率よく遺伝子導入できることを報告した。そこで、本年度は、このベクターを用いて ES細胞に機能遺伝子を導入し、実際に細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。その結果、分化を誘導すると考えられている遺伝子(Oct-3/4 および STAT3F)を導入することで、大部分の ES細胞を三胚葉全てに分化させることに成功した。また、この細胞分化は ES細胞の未分化維持に必須の遺伝子(Nanog)を共導入することにより抑制することも明らかにし、我々の開発した Ad ベクターを用いることで、ES細胞の分化を自由にコントロールできる可能性を示した。

ES細胞を *in vitro* で分化させる過程において、中間体として EB を形成することが一般的に行われている。そこで次に、EBへの遺伝子導入に最適な Ad ベクターの開発を行った。ES細胞とは異なり、EBには 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。したがって、再生医療への応用を考えた場合、このベク

ターを用いることで、ES細胞から目的の治療用細胞に分化させることも可能であると考えられ、現在、血液細胞など特定の細胞へ分化させる実験を行っているところである。

D.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

現在、生活習慣病の代表的なものの一つである糖尿病の患者数が年々増加しており、大きな社会問題となっている。特に、膵島 β 細胞からのインスリン分泌不全による高血糖症状が日本人で多くみられ、これは膵島全体もしくは β 細胞の破壊あるいは機能障害によるものであることが知られている。このようなインスリン分泌不全機構の分子メカニズムの解明や、それに対する治療への応用を目指した基礎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のが現状である。今回、マウスならびにラットより単離した膵島への遺伝子導入効率の検討を従来型 Ad ベクターのみならず各種ファイバー改変型 Ad ベクターにおいてもを行い、最も効率の良い遺伝子導入をもたらすことができる Ad ベクターの探索を試みた。まず、 β 細胞へ Ad ベクターが感染できるかどうかを検討するため、マウス β 細胞株 MIN6 を用いた検討を行った。従来型 Ad ベクターを用いても遺伝子導入が認められたが、通常使用されている CMV プロモーターよりも CA プロモーターのほうがより効率が良いことが示され、さらに CA プロモーターをもつ各種ファイバー改変型 Ad ベクターを用いたところ、K7型の Ad ベクターがより効率の良い遺伝子導入をもたらすことが明らかとなった。このことをふまえ、マウスならびにラットより単離した膵島への各種ファイバー改変型 Ad ベクターによる遺伝子導入を行った。しかしながら予想に反して、従来型 Ad ベクターとファイバー改変型

Ad ベクターで大きな差は認められなかった。そこで次に、膵島のどの部分において遺伝子発現が認められているか X-gal 染色を行ったところ、膵島全体の X-gal 染色では全体が染まっているように見えたが、膵島切片による断面の X-gal 染色および GFP 発現 Ad ベクターを用いた共焦点顕微鏡観察では、辺縁部しか染まっていないことが明らかとなった。膵島のおよそ 90% を β 細胞が占めるがそれらは膵島中心部に存在し、辺縁部に α 細胞や δ 細胞など他の細胞が存在することが知られている。 β 細胞への効率の良い遺伝子導入を考えるには、膵島内部への Ad ベクターの浸透率を上げなければならない。そこで次に、このような物理的な問題を克服するため、 Ca^{2+} -free buffer で前処理することにより、細胞間結合を弱める処置を施し、その後 Ad ベクターを作用させる方法を検討した。その結果、膵島への遺伝子導入は Ca^{2+} -free buffer で処理しないものより高い効率を示すことが明らかとなった。今後さらに、このような膵島内部に存在する β 細胞への高効率遺伝子導入法を検討する予定である。

D. 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

がん免疫療法は基礎研究と臨床研究の連携により着実な進歩を遂げているものの、臨床試験においては腫瘍退縮や完全治癒といった満足な有効性は得られていない。この一因として、従来のがん免疫療法研究が腫瘍免疫の存在実証とその効率的な誘導という観点を中心に推進されてきたために、効果的な治療を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞の腫瘍組織への集積性改善という側面が、未だ十分に検討されていないことが挙げられる。つまり、がん細胞を殺傷する能力を有する免疫エフェクター細胞がたとえ患者体内に誘導されたとしても、それらが十分に腫瘍組織に移行・浸潤してがん細胞と接触できなければ、がん免疫療法の有効性は大きく制限されてしま

うと考えられる。

生体内における白血球の局所への遊走・浸潤には、ケモカインと総称される 8~14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群が深く関与しており、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している。ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され、おもに炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990 年代後半より、リンパ球や DC などを主な標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとされ、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展した。このような背景のもと、我々は、がん免疫療法へのケモカインの応用が、免疫細胞の腫瘍集積性を向上させる方法論の確立に非常に有用であろうという着想に至り、免疫細胞の体内動態制御に基づいた新規がん免疫遺伝子治療の開発を目指している。

本年度は、まず AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与プロトコールによる抗腫瘍効果と免疫細胞の腫瘍内浸潤との関連評価を行った結果、AdRGD-CCL17 を応用したがん免疫遺伝子治療においては、CCL17 によって腫瘍組織に免疫細胞を集積させるだけでは有効な治療効果を引き出すことは困難であり、宿主の免疫系を TAA 特異的に活性化することのできるワクチン手法の併用が要求されることが考えられた。そこで、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 を免疫することにより、B16BL6 担がんマウスの免疫系を腫瘍特異的に活性化する手段を併用した際の、AdRGD-CCL17 投与が示す抗腫瘍活性を評価した。その結果、本併用プロトコールでは顕著な腫瘍増殖抑制効果が達成され、免疫組織学的解析からも CCL17 が腫瘍特異的に活性化された免疫細胞（恐らく CTL と考えられる）を効率良く集積させるケモカインであることが判明した。

次に、AdRGD-IL12 を用いたがん免疫遺伝子治療に AdRGD-CCL27 を併用した際の、抗腫瘍効果と腫

瘍内浸潤 T 細胞の特性との連関を解析した。Meth-A 腫瘍は、これまでにリコンビナント IL-12 の腹腔内投与によっては抗腫瘍効果が認められなかったのに対して、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって持続的かつ局所的に高濃度の IL-12 を作用させたところ、腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、完全治癒が得られるマウスは 13 例中 8 例であり、これらマウスには長期的な細胞特異的免疫が誘導されていた。さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与は、AdRGD-IL12 単独投与を上回る劇的な治療効果を発揮した。生存率の明らかな延長も認められ、最終的に 13 例中 12 例ものマウスに完全治癒が認められた。これらマウスには、AdRGD-IL12 単独投与群と同様に腫瘍特異的なメモリーも成立していることが確認された。また、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットを解析したところ、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与において、がん細胞排除の主要なエフェクター細胞は CD8⁺ CTL であり、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、各単独投与群を上回る腫瘍内浸潤 T 細胞が確認された。また、IL-12 による局所免疫応答が、脾臓・リンパ節などの二次リンパ組織における細胞特異的全身性免疫系をも活性化可能であること、ならびに IFN- γ 産生誘導伴う ICAM-1 や VCAM-1 といった接着分子の発現向上が達成されることが明らかとなった。AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与では、このような腫瘍内環境変化とリンパ球の腫瘍内浸潤促進作用を併せ持つため、その相乗効果により、各単独投与よりも多くの腫瘍内 T 細胞が観察されたものと考えられる。このように、リンパ球浸潤阻害環境を克服し、腫瘍内浸潤リンパ球の質的（細胞傷害活性の付与）、量的制御（腫瘍内浸潤促進）を可能とすることで、抗腫瘍増強作用が得られたことが明らかとなった。

これらの研究成果は、エフェクター細胞の活性化と腫瘍内浸潤の両者を同時に達成するアプローチが、がん免疫遺伝子治療の有効性向上に大きく貢献できることを示すものである。このような、

目的部位への細胞送達とも言える新たな概念を取り入れた治療戦略の提示は、今後のがん免疫療法の臨床応用を目指した技術開発に貴重な知見を提供するものと期待している。

D.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 は生体内に広く分布し、抗原を取り込んだ後に細胞表面に抗原を提示しながら、所属リンパ節へ遊走する。その過程において成熟し、ナイーブ T 細胞あるいはメモリー T 細胞を活性化し、抗原特異的免疫応答を惹起することが知られている。このような DC の特性に着目し、近年、DC に TAA を提示させれば強力な抗腫瘍免疫反応を誘導できるのではないかと考えられるようになり、*in vitro* で TAA を導入した DC をワクチン担体として生体に投与、TAA 特異的な免疫応答を誘導しようとする DC がん免疫療法が注目を集めている。DC がん免疫療法は、マウスモデルでの基礎的検討において有効性を示し、その一部はヒトでの臨床試験が行われている。しかしながら、臨床試験において十分な治療効果が得られたとする報告はほとんど認められず、未だ DC がん免疫療法の有効性は科学的に証明されるまでには至っていない。このような背景のもと、DC がん免疫療法の有効性向上を目指すアプローチが多くの研究機関で試みられている。しかし、そのほとんどは、DC の培養誘導法、抗原導入法、DC の成熟活性化法などに主眼が置かれたものである。

DC は生きた細胞を用いる細胞医薬である。現在、“薬”として広く使用されている低分子有機化合物をはじめ、近年その医薬品化が注目されている遺伝子やタンパク質といった生体高分子において、その生体内安定性を高めるアプローチは必要不可欠となっている。これは細胞医薬にも適応すべき概念であり、現行の DC ワクチン療法は、細胞を不安定なまま大量投与しているといえよう。生体内に投与された DC は投与部位から近傍のリンパ節へと移行して、リンパ節内のナイーブ T 細胞

胞やメモリーT細胞を感作・活性化し、がん排除に最も重要な役割を担うCTLを誘導する。しかしながら、投与されたDCの大部分は、リンパ節に移行する過程でアポトーシスに至るため、CTL誘導の場であるリンパ節に到達し得るDCは投与したうちのわずか1%以下であると言われている。また、リンパ節に到達し、抗原提示を終えたDCはすみやかに排除されるため、DCがプロフェッショナル抗原提示細胞として機能維持可能な期間は約2~4日程度であると言われている。したがって、DCの短命性が原因となり、ワクチン効果を制限していることが示唆されている。すなわち、DCの生体内寿命を延長させることができれば、リンパ節への到達性の向上とリンパ節内での抗原提示期間の延長から、ワクチン効果の増強が期待される。そこで、本研究では、DCの生体内安定性を高めるアプローチとして、DCの生体内寿命の延長を目指して、より効果的な免疫応答を誘導可能なDCがん免疫療法の開発を試みた。

DCの生存と死を規定する詳細な分子メカニズムは、現在のところ解明されていない。一般に、アポトーシス経路としては、ミトコンドリアを介した経路とカスパーゼを直接活性化する経路が存在する。近年、DCのアポトーシスメカニズムの一部が明らかとなりつつあり、Bcl-2 familyタンパク質がDCの生存に大きく関与することが示唆されている。そこで、我々は、Bcl-2 familyタンパク質、なかでもBcl-x_Lに着目し、さらに、その抗アポトーシス活性増強型変異体として見出されたFNKをDCに高発現させることによって、アポトーシスに対する抵抗性を付与したワクチン担体の創製を試み、その免疫学的な機能評価を行った。その結果、FNKおよびBcl-x_L発現AdRGDを作用させたDCは、アポトーシス抵抗性を獲得し、生存期間の延長が認められるとともに、抗原提示期間も延長する傾向が認められた。すなわち、これら遺伝子の導入によっても、抗原提示能は保持され、さらに長期間にわたる効率的なT細胞の活性化が期待された。そこで、FNK/DCおよび

Bcl-x_L/DCの抗腫瘍ワクチン機能の解析を試みた。まず、モデル抗原OVAの系で、FNK/DCおよびBcl-x_L/DC免疫による抗腫瘍効果を検討した結果、OVA/DC免疫群と比較して一層強力な抗腫瘍効果が得られた。また、メラノーマ関連抗原gp100を用いてB16BL6メラノーマに対する抗腫瘍効果を検討した場合にも、腫瘍増殖抑制効果はgp100/DC免疫群よりもFNK+gp100/DC免疫群およびBcl-x_L+gp100/DC免疫群で強力であったことから、アポトーシス抵抗性を付与したDCをワクチン担体として用いる本アプローチの有用性が示された。さらに、FNK/DCワクチンおよびBcl-x_L/DCワクチンは、投与部位から所属リンパ節への到達性とそこでの生存性に優れており、リンパ節内で効率よくリンパ球を活性化することによって抗原特異的CTLの効率的な誘導を達成することが示唆された。したがって、DCへのアポトーシス抵抗性の付与は、*in vivo*において所属リンパ節へ移行するDC数の長期的な増加を可能とし、リンパ節における抗原特異的なT細胞サブセットの効率的な活性化によって、最終的に強力な抗腫瘍効果に結びついたものと考えられた。

以上、DCのアポトーシスを抑制して生体内安定性を高める本アプローチが、DCがん免疫療法の有効性向上に繋がることを明らかとした。細胞の生体内安定性を高めるアプローチは、DCのみならず、CTL療法や腫瘍浸潤リンパ球などを利用したその他の免疫細胞療法にも応用可能な概念であり、細胞医薬の実用化と有効性の増大に大きく貢献することを期待する。

D. 1.6 Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入活性の評価

近年、Tatペプチドに代表されるProtein Transduction Domain (PTD)と称される、細胞内移行性を有するペプチドが発見され、これらPTDをタンパク質との複合体・融合体として用いることにより、タンパク質を細胞内へ導入できることが明らかとなってきている。そこで我々は、Ad

ベクターの感染域を拡大する新たな試みとして、既存の PTD の中で最も優れているとされている Tat ペプチドの細胞内移行能を Ad ベクターに付与した Tat-Ad ベクターの開発に取り組んだ。

Tat ペプチドの Ad ベクター表面への修飾は、従来の PEG 化技術を応用して行い、SDS-PAGE ならびに表面電荷を測定することで Tat-Ad ベクターの作製を確認した。また、Tat-Ad ベクターの遺伝子導入特性に関して、接着細胞、浮遊細胞を用いて未修飾 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターと比較検討を行った。その結果、Tat-Ad ベクターは、細胞の CAR 発現レベルに関わらず、従来型 Ad ベクターよりも数十倍から数百倍高い遺伝子発現活性を示すと同時に、従来型 Ad ベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞種に対しても約 10 倍高い遺伝子発現を達成した。以上の結果から、Tat-Ad ベクターはあらゆる細胞種に対して遺伝子導入を効率よく達成しうるベクターとなる可能性が示唆された。

本ベクターは *ex vivo* 遺伝子治療への適用や、遺伝子導入ツールとしての遺伝子機能解析への使用といった幅広い分野へ応用できるものと期待している。

D. 1. 7 ターゲティング Ad ベクターの開発

特定の組織への遺伝子導入能を有した Ad ベクターの開発のためには、まず、native の Ad が有する感染ルートを欠損させ、細胞特異的な受容体を介してのみ感染できるベクターを開発する必要がある。Ad の細胞内への侵入は、ファイバーが受容体の CAR に結合し、その後ペントンベースの RGD モチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる。また、5 型 Ad のファイバーシャフト領域に存在する KKTK からなるペパリン結合ドメインが Ad の *in vivo* における組織移行性に関与していることが報告されている。従って、ターゲティング能を有した Ad ベクターの開発にあたっては、CAR や αv インテグリン、ヘパラン硫酸を介した感染を阻害することが必要

である。そこで本研究では、ファイバーノブ、ペントンベース、ファイバーシャフト領域を同時に改変することで、これらの分子を認識しては感染しない Ad ベクターの改良を行った。

CAR と結合能を消失させるためのファイバーノブの変異としては FG ループの変異と AB ループの変異が知られている。FG ループの変異では、4 アミノ酸を欠損させることでファイバーノブの構造変化を誘起し、CAR との結合能を消失させるのに対し、AB ループの変異ではファイバーノブの構造変化を伴わずアミノ酸置換により CAR との結合能を消失させることが報告されている。このファイバーノブだけの変異を加えた Ad ベクターでは、FG ループと AB ループの変異間では、*in vitro* の遺伝子導入活性に違いはなく、共に従来の Ad ベクターに比べ、1%程度の遺伝子発現能しか示さないことが明らかとなっている。ところが、本研究の結果より、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 ループに変異を加えた方が、FG ループの場合に比べ、更に遺伝子発現能の減弱が認められ、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとして優れていることが明らかとなった。また、これらトリプルミュータント Ad ベクターの詳細な機能を評価したところ、*in vivo* 投与後の組織分布は大きく変化しないが、肝組織においては取り込まれている主要な細胞が異なることが明らかとなった。さらに、トリプルミュータント Ad ベクターは細胞表面の Ad 受容体に結合できないだけでなく、細胞内に取り込まれた後の核への移行能の違いが、遺伝子発現の低下に関与している可能性が示唆された。一方、細胞表面分子を特異的に認識するリガンドをファイバーに発現させることで、トリプルミュータント Ad ベクターは高い遺伝子発現能を持つことから、ターゲティング Ad ベクターに必要な標的分子特異的な遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、これらトリプルミュータント Ad ベクターは肝障害性の低下、および炎症性サイトカイン産生など自然免疫

誘導能の減弱が認められた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。これまでの報告では、肝臓のクッパー細胞による Ad ベクター取り込みが、Ad ベクターによる自然免疫誘導の引き金と考えられていたが、今回のトリプルミュータント Ad ベクターは肝臓のクッパー細胞を含む非実質細胞に多く取り込まれているにもかかわらず、炎症性サイトカインである IL-6 の産生は抑制された。Ad ベクターによる自然免疫系の惹起は、遺伝子治療用ベクターとしての重大な副作用につながることから、メカニズムの解析が急がれており、今回のトリプルミュータント Ad ベクターによる知見は、Ad ベクターによる自然免疫誘導のメカニズム解明に貢献できると考えられる。

本研究で開発したトリプルミュータント Ad ベクターは、ファイバー領域 (HI ループおよび C 末端領域) に 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで、自由に、簡便に外来ペプチドコード DNA を導入できるように設計されていることから、今後、ターゲティングリガンドの同定技術と併せた研究により、ターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターになるものと考えられる。さらに、Ad ベクターによる自然免疫誘導のメカニズム解明に有用なベクターを開発できたことから、本研究は Ad ベクターによる自然免疫の誘導を回避するための技術の開発にも貢献できると期待される。

D.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

主任研究者のグループでは、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できる Ad ベクターとして以下に列挙するような様々なベクターを開発・改良し、その遺伝子導入特性を明らかにしてきた。

(1) Ad ゲノムの E1/E3 欠損領域、さらに E4 領域と 3' ITR の間の領域にも簡便な *in vitro* ライゲーションで外来遺伝子を導入できるダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベク

ターの開発に成功した。これにより各領域への簡便な目的遺伝子の導入が可能になり、単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載した Ad ベクターの作製が可能となった。

(2) 転写活性化タンパク質の tTA の発現単位を E3 欠損領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入することで、単一のベクターで tet-off 系の機能を有した Ad ベクターを作製し、優れた発現制御能を示すことを明らかにした。また、tet-on 系の転写活性化因子の rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入した改良型 tet-on 系搭載 Ad ベクターを開発し、発現誘導能が極めて優れていることを明らかにした

(3) 第 2 世代の rtTA (M2 あるいは S2 mutant rtTA) 遺伝子は rtTA 遺伝子に数 bp の mutation を施すことで作製されたものであり、変異 rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたトリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベクターを用いることで、従来の rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたベクターに比べ、ドキシサイクリンに対する感受性が 1-2 オーダー改善した。さらに、ドキシサイクリンに対する親和性が増大したことで、M2 あるいは S2 mutant rtTA と tTS をもった Ad ベクターでは、*in vivo* においても効率の良い遺伝子発現誘導能が認められた。従って、*in vitro*、*in vivo* の両条件下において優れた遺伝子発現制御能を示す tet-on 系の Ad ベクターに開発に成功した。

そこで本研究では、上記発現制御型 Ad ベクターにファイバー改変技術を加え、CAR 陰性の細胞へもファイバー領域に挿入した RGD ペプチドを利用して α インテグリン依存的に遺伝子導入導入できる Ad ベクターや、35 型 Ad のファイバーを組み込むことで、CD46 を標的として遺伝子導入可能なベクターの開発を行った。これにより、より多

くの細胞種に対して発現制御型 Ad ベクターの適用が可能になり、遺伝子治療の有効性・安全性の向上に寄与できると期待された。

D.1.9 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクター開発

Ad ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中で最も遺伝子導入効率・発現効率に優れたベクターである。しかしながらその感染機構は Ad 受容体の CAR 依存的であり、そのため CAR 陰性細胞（多くの進行がんをはじめ、血球系細胞、樹状細胞等）には遺伝子導入が困難であった。そこで本研究では、これまでに開発されてきたファイバー改変型 Ad ベクターに加え、外来ペプチド提示領域を pIX、ヘキソンにまで焦点を広げ、検討を行った。

まず、*in vitro* ligation に基づいた簡便なプラスミド構築を利用することで、簡便に pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクターを作製する方法を開発し、ファイバーノブの HI loop、C 末端、pIX、ヘキソンに His tag、FLAG tag、RGD 配列を有したベクターの作製を行った。作製した各ベクターは、各領域において外来ペプチドが融合タンパク質として発現していることをウエスタンブロットにより、またウイルス表面に提示されていることを ELISA により確認した。本法の開発により、目的のペプチド配列（タンパク質）を付与した pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターの作製が極めて容易になり、これらの改変 Ad ベクターの機能評価のスピード化が可能になると期待される。次年度以降、pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を従来型 Ad ベクターやファイバー改変 Ad ベクターと比較・検討する予定である。

D.2 水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発

今後の遺伝子治療の進展に向けての最大の鍵は、生体において安全に効率良く目的とする細胞

に治療遺伝子を導入し、安定して発現させうる、遺伝子導入ベクターの開発にかかっている。Ad ベクターは、既存のベクターの中で最も高い遺伝子導入・発現効率を有するなどの利点を有しているため、遺伝子治療用ベクターとして注目されており、遺伝子治療プロトコール総数の 26% を占めている。Ad ベクターの細胞への感染はファイバー部分が細胞表面の CAR と結合し、その後ペントンベースに存在する RGD モチーフが細胞接着因子であるインテグリンと相互作用し細胞内にエンドサイトーシスされることにより成立する。しかしながら、遺伝子治療の重要なターゲットとなる悪性腫瘍細胞および造血幹細胞をはじめとする血液系の細胞には CAR の発現が乏しいために遺伝子導入・発現効率が極めて低い。そのため CAR の発現が低い、あるいは発現していない細胞を標的とする場合、高力価のベクターを投与せざるを得ず、ベクターによる非特異的な組織傷害や過度の免疫反応を引き起こしてしまう。また CAR は生体内に広範に存在するため Ad ベクターの感染は組織特異性がなく標的組織局所に投与してもその組織から血液中に漏出したベクターが他の正常細胞にも感染してしまう。また血液中に入った Ad ベクターはその大部分が肝臓に集積することや、多くの方が Ad に対する中和抗体を持っており、その抗体存在下においては遺伝子発現が低下してしまうと同時に抗原抗体反応によるアナフィラキシーショックを引き起こす危険性も危惧される。したがって、遺伝子治療の最適化を図るには、Ad ベクターの最大の長所である極めて高い遺伝子導入・発現効率を保持した状態で、感染域の改変および標的指向性、並びに中和抗体存在下であっても遺伝子導入可能な機能面、安全面で優れた Ad ベクターの開発が必須である。本研究は Ad ベクターの外殻タンパク質を化学的手法により修飾し、標的細胞・組織特異性を制御した上で、これまで遺伝子導入が困難であった条件下、細胞、組織に対して応用可能なベクターの開発を試みるものである。

我々はこれまでに、Ad ベクターに対する抗体存在下でも遺伝子導入が可能で、且つ Ad ベクターの血中滞留性を向上させ標的組織にターゲティングするために PEG-Ad ベクターの開発を行ってきた。その結果、PEG 修飾率に応じて Ad ベクターの体内動態および遺伝子発現分布が大きく変動することを明らかにした。その中で、約 90% の修飾率を有する PEG-Ad ベクターは、受動的ターゲティング効果により腫瘍組織に集積し、高い遺伝子発現を示すことを初めて明らかにした。また、標的リガンドを PEG の先端に付与した PEG-Ad ベクターの開発に取り組んできた。そこで本年度は、PEG 修飾による受動的ターゲティング効果を利用したサイトカイン遺伝子および自殺遺伝子を用いたがん遺伝子治療実験を行った。また修飾 PEG 鎖の分子量や修飾率を種々検討することで、がんへの受動的ターゲティング効果の最適化を試みた。また、標的リガンドを PEG の末端に導入した PEG-Ad ベクターの結合特異性ならびに *in vivo* での遺伝子発現活性を検討した。

EPR 効果に基づく腫瘍ターゲティングを利用した遺伝子治療の有効性評価として、TNF- α 発現 Ad ベクターによるがん治療実験に取り組んだ。その結果、従来型の未修飾 Ad ベクターと比較して PEG-Ad ベクターは腫瘍増殖を約 50% 抑制し、重篤な副作用である体重減少も観察されなかった。さらに、病理組織診断の結果から、本ベクターは腫瘍における治療効果の増強のみならず、肝臓における副作用をも軽減可能なことを示した。また、続いて行った自殺遺伝子である HSVtk 遺伝子を用いたがん治療実験においても有効性の向上が確認されたが、高用量のベクター投与においては抗腫瘍効果の増強と共に重篤な肝障害が認められた。以上の結果は、分子量 5000、修飾率 90% の PEG-Ad ベクターを用いた受動的ターゲティングにおいて、腫瘍での高い遺伝子発現はみられるものの、肝臓をはじめとする正常組織での遺伝子発現が副作用につながりうることを示している。したがって、本ベクターを利用した全身投与による

がんターゲティング遺伝子治療を達成するためには、腫瘍への遺伝子導入はそのままに、正常組織での遺伝子発現をさらに抑制することが必要不可欠である。そこで現在我々は、Ad ベクターに腫瘍特異的に発現するプロモーターを搭載することで、正常組織での転写、発現を抑制する新規ベクターの開発に取り組んでいる。

一方、バイオコンジュゲート化タンパク質の体内動態は用いる高分子の種類（分子量、形状など）や、修飾率に大きく依存し、これらを詳細に検討することで制御可能であることが知られており、またこのことは PEG 修飾 Ad ベクターにもあてはまると考えられる。そこで我々が明らかにしてきた PEG-Ad ベクターの EPR 効果に関しても、PEG 分子量や修飾率を最適化することで、さらに腫瘍特異性に優れた遺伝子導入を達成できるのではないかと考えた。修飾 PEG の分子量、修飾率を種々比較検討した結果、肝臓の遺伝子発現量に対する腫瘍の発現量の比は、未修飾 Ad ベクターならびに分子量 5000、修飾率 90% の PEG 修飾 Ad ベクターと比較して、分子量 20000、修飾率 40% の PEG 修飾 Ad ベクターが約 70 倍腫瘍で高い発現を示し、腫瘍選択的遺伝子発現に最も優れていることを明らかにした。本ベクターは先に示したがん遺伝子治療実験で問題となった肝臓での副作用を軽減することが可能であると考えられるため、今後本ベクターに治療遺伝子を搭載し、治療における有効性および副作用に関して検討する予定である。

これまでに我々は、PEG 鎖先端にインテグリン指向性の RGD ペプチドを付与した RGD-PEG-Ad ベクターを開発してきた。今回、過剰量の RGD ペプチド存在下において RGD-PEG-Ad ベクターの遺伝子発現効率が AdRGD ベクターと同様に抑制されたことから、PEG 鎖先端の RGD 配列がインテグリン結合を介して遺伝子導入を行っていることを確認した。さらに、*in vivo* への使用においても安定して遺伝子導入可能なベクターであることをマウス肝臓における遺伝子発現活性から明らか