

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-Bclx_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-TNFα、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. 1 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。

B.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。

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

B.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% CO₂ 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。

B.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。

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

B.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。

B.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

B.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 μ m 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。

B.7. AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍におけるリンパ球活性化の評価

B.2.ならびに B.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 1 に示した。

B.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。

B.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。

B.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

B.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。

B.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

B.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。

B.12. *In vivo* depletion assay

B.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。

B.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

B.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、B.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。

B.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

B.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 1に示した。

B.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

B.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。

B.16. Meth-A腫瘍完全治癒マウスにおける副作用の評価

B.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.17. 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FCM解析により確認した。

B.18. 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。

B.19. 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 (25 MOI) 単独あるいはAdRGD-OVA (25 MOI) とAdRGD-FNK (25 MOI)との併用によって遺伝子導入し、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105 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。

B.20. 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_{xL} (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。経目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_{xL} (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、経目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。

B.21. 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_{xL} (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。

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

B.22. 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

B.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、経目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 (mm) 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。

B.23. 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.24. 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粒子あたりのカプシド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(10¹² 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ンタンパクと修飾ヘキソンタンパクとの比率を求めることにより行った。

B.25. 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、10¹¹ 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]

B.26. 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、10¹⁰ 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。経目的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を次式に従って算出した。

(腫瘍体積; mm³) = 1/2 × {(腫瘍の長径; mm) × (腫瘍の短径; mm)²} - 1/2 × {(出血壊死部の長径; mm) × (出血壊死部の短径; mm)²}

B.27. 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

B.26.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.16.に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

B.28. 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、10¹⁰ VPあるいは10¹¹ 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。経目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。

B.29. 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

B.28.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.16.に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

B.30. 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。

B.31. 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。

B.32. RGD-PEG-Adベクターのintegrin指向性の確認

RGDペプチド(GRGDTP; 200 μ g/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。

B.33. 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、B.31.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.34. 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

Tatペプチド(GRKKRRQRRRPPQ)に活性基を付与したTat-NHSの合成は、Fig. 2に示した方法に従った。ペプチドの合成はすべてアミノ酸の α -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粒子あたりのカプシド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。

B.35. 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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、大阪大学の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施しており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1. 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。

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. 3)。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 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、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. 4)。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. 5)。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

スとは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方法）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）がそれぞれに異なった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、本プロトコールにおける 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. 6)。さらに、AdRGD-CCL17 腫瘍内投与のみのプロトコールと gp100/DC の皮内免疫を併用したプロトコールとにおいて、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. 7)。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、両プロトコールにおける抗腫瘍効果の結果 (Fig. 3 and 5) 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. 8)。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. 9)。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 2)。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. 10)。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. 11)。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. 12)。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てい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. 13)。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. 14)。

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. 15)。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.2. 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-xFNK (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. 16)。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. 17)。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. 18)。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. 19)。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. 20)。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. 21)。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. 22)。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. 23)。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、その後経目的にリンパ節内の 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. 24)。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.3. PEG-Ad ベクターを用いたがん遺伝子治療の最適化

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しう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. 25)。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、経目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. 26)。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. 27)。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. 28)。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. 29)。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. 30)。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. 31)。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. 32)。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. 33)。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. 34)。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.4. 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 3 and Fig. 35)。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シンのバンドが、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. 36)。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. 37)。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。

D. 考察

D.1. 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と考えられた。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 細胞の特性との関連を解析した。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.2. 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.3. PEG-Ad ベクターを用いたがん遺伝子治療の最適化

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、多くの人が 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* 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、発現を抑制しう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にした。

ターゲティング能を有する Ad を開発する上で最も重要なのが、標的指向性分子の選択であり、この点に関して現在我々は、ファージ表面提示法を駆使して特異性の高い標的リガンド分子の探索を進めている。本研究で最終目標とするターゲティング能を有したハイブリット化 Ad ベクターは、組織特異性と高い遺伝子導入効率を有することから、正常細胞に対する副作用の軽減に加えて、局所投与での遺伝子治療

が困難な転移がんなどに対してもベクターを血中に投与することで応用可能であると予想される。さらに本ベクターは、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強く現れるだけでなく、Ad に対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、理想的な遺伝子治療用ベクターになると期待できる。

D.4. 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た。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性を 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。

E. 結論

E.1. 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

- TAA 導入 DC ワクチン投与と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の併用は、TAA 特異的 CTL の腫瘍内集積性の増強に基づいて、DC がん免疫療法の有効性を飛躍的に改善できた。
- AdRGD-IL12 を用いたがん免疫遺伝子治療への AdRGD-CCL27 の併用は、免疫細胞の腫瘍内動員と活性化を同時に達成することによって、治療効果を大幅に向上できた。

E.2. 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 ワクチンにアポトーシス抵抗性を付与することによって、投与部位から所属リンパ節への到達性の向上およびリンパ節での抗原提示期間の延長が達成され、DC がん免疫療法の有効性を改善できた。

E.3. PEG-Ad ベクターを用いたがん遺伝子治療の最適化

- ベクターの全身投与に基づくサイトカイン遺伝子治療および自殺遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用は、治療効果の増強と副作用の軽減に有効であることが示唆された。
- 腫瘍組織への受動的ターゲティングには、分子量 20000 の PEG を用いた修飾率 40% の PEG-Ad ベクターが優れることを見いだした。

E.4. Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入活性の評価

- Tat-Ad ベクターの作製法を確立するとともに、本ベクターが非常に広範な感染域を有するベクターシステムであることを明らかとした。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

- 1) N. Okada, N. Mori, R. Koretomo, Y. Okada, T. Nakayama, O. Yoshie, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, A. Yamamoto, Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, 12(2), 129-139, 2005.
- 2) N. Okada, S. Iiyama, Y. Okada, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, A. Yamamoto, Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, 12, 72-83, 2005.
- 3) M. Maeda, S. Kida, K. Hojo, Y. Eto, J.Q. Gao, S. Kurachi, F. Sekiguchi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Mayumi, S. Nakagawa, K. Kawasaki, Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 621-624, 2005.
- 4) J. Q. Gao, T. Sugita, N. Kanagawa, K. Iida, Y. Eto, Y. Motomura, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, T. Hayakawa, T. Mayumi, S. Nakagawa, A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 1043-1050, 2005.
- 5) Y. Eto, J. Q. Gao, S. Kurachi, F. Sekiguchi, K. Katayama, T. Sugita, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.*, 7, 604-612, 2005.
- 6) Y. Okada, N. Okada, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.*, 12, 608-616, 2005.
- 7) T. Hosono, H. Mizuguchi, K. Katayama, N. Koizumi, K. Kawabata, T. Yamaguchi, S. Nakagawa, Y. Watanabe, T. Mayumi, T. Hayakawa, RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene.*, 348, 157-165, 2005.
- 8) J. Q. Gao, T. Sugita, N. Kanagawa, K. Iida, N. Okada, H. Mizuguchi, T. Nakayama, T. Hayakawa, O. Yoshie, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector. *Biol Pharm Bull.*, 28, 1066-1070, 2005.
- 9) S. Kida, M. Maeda, K. Hojo, Y. Eto, J. Q. Gao, S. Kurachi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Mayumi, S. Nakagawa, K. Kawasaki, Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: A tool for carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press.
- 10) N. Okada, A. Sasaki, M. Niwa, Y. Okada, Y.