

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

## 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成19（2007）年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

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

## II. 分担研究報告

1. 分担研究者 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作-----	75
---------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	99
---------------------------	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

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

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

1. 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発 : 腹腔動脈から Ad ベクターを *in vivo* 投与し、その後脾臓を初代培養することで、脾臓内部の細胞( $\beta$ 細胞を含む)に対しても高効率な遺伝子発現が可能なる方法を開発した。遺伝子工学的にファイバーノブの HI loop 領域に HIV 由来の TAT ペプチドを提示した Ad ベクターが遺伝子導入効率に優れることを見出した。ファイバーや pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を比較検討した。ターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターとして、ファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vitro*、*in vivo*における遺伝子導入特性を明らかにした。さらに、pIX やヘキソンを改変したファイバー欠損 Ad ベクターを開発し、その遺伝子導入特性を明らかにした。B16 メラノーマ肺転移モデルで、CAR の発現が癌転移に抑制的に機能することを実証した。
2. 水溶性高分子(PEG)によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発 : 腫瘍選択的プロモーター(TERT プロモーター)を搭載した PEG 化 Ad ベクターが、全身投与において未修飾従来型 Ad ベクターと比較して、腫瘍での高い遺伝子発現を示し、肝臓での発現を飛躍的に低減できることを見出した。また、用いる PEG の分子量により、PEG 化 Ad ベクターの体内動態を制御可能であることを明らかとした。さらに、細胞内移行ペプチド修飾 Ad ベクターが、従来型 Ad ベクターでは困難であった細胞に対しても効率的に遺伝子導入可能であることを明らかとした。
3. 遺伝子発現抑制型(siRNA 発現) Ad ベクターの開発 : ベクタープラスミドに予め shRNA 発現のためのプロモーター配列を付与し、その転写開始点にユニークな制限酵素部位を挿入することで、1ステップの *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築で、siRNA 発現 Ad ベクター作製のためのベクタープラスミドの作製が可能なる方法を開発した。
4. 35 型 Ad ベクターの特性評価 : 35 型 Ad ベクター感染により、細胞種によっては細胞表面 CD46 発現量の減少が引き起こされることを明らかにした。今後 35 型 Ad をはじめとする CD46 を受容体として認識する Ad ベクターを使用する際には注意が必要であることが示唆された。

## 分担研究者

中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科  
教授

## 協力研究者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所  
主任研究員

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所  
研究員

向 英里 (独) 医薬基盤研究所  
リサーチレジデント

井野麻美 (独) 医薬基盤研究所  
リサーチレジデント

山下 学 (独) 医薬基盤研究所  
リサーチレジデント

佐々木朋美 (独) 医薬基盤研究所  
研究支援者

穂友絹美代 (独) 医薬基盤研究所  
研究支援者

船越直子 (独) 医薬基盤研究所  
研究支援者

山口朋子 (独) 医薬基盤研究所  
研究支援者

岡田直貴 大阪大学院薬学研究科  
講師

近藤昌夫 大阪大学院薬学研究科  
助教授

吉岡靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育セ  
ンター 特任講師

小泉直也 昭和薬科大学  
助手

細野哲司 国立医薬品食品衛生研究所  
リサーチレジデント

櫻井晴奈 大阪大学大学院薬学研究科

倉知慎之輔 大阪大学大学院薬学研究科

田代克久 大阪大学大学院薬学研究科

村上さや香 京都薬科大学大学院

姚 醒蕾 大阪大学大学院薬学研究科

衛藤佑介 大阪大学大学院薬学研究科

森重智弘 大阪大学大学院薬学研究科

渡邊 光 大阪大学薬学部

Ratima Asavatanabodee  
大阪大学大学院薬学研究科

田辺 綾 大阪大学薬学部

## A. 研究目的

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

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

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

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

本年度は、1) 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発研究として、腹腔動脈から Ad ベクターを *in vivo* 投与し、その後脾島を初代培養することで、脾島内部の細胞 ( $\beta$  細胞を含む) に対しても高効率な遺伝子発現が可能な方法を開発した。遺伝子工学的にファイバーノブの HI loop 領域に HIV 由来の TAT ペプチドを提示した Ad ベクターが遺伝子導入効率に優れることを見出した。ファイバーや pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を比較検討した。ターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターとして、ファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vitro*、*in vivo* における遺伝子導入特性明らかにした。さらに、pIX やヘキソンを改変したファイバー欠損 Ad ベクターを開発し、その遺伝子導入特性明らかにした。B16 メラノーマ肺転移モデルで、CAR の発現が癌転移に抑制的に機能することを実証した。2) 水溶性高分子 (PEG) によるバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発研究として、腫瘍選択的プロモーター (TERT プロモーター) を搭載した PEG 化 Ad ベクターが、全身投与において未修飾従来型 Ad ベクターと比較して、腫瘍での高い遺伝子発現を示し、肝臓での発現を飛躍的に低減可能であることを見出した。また、用いる PEG の分子量により、PEG 化 Ad ベクターの体内動態を制御可能であることを明らかとした。さらに、細胞内移行ペプチド修飾 Ad ベクターが、従来型 Ad ベクターでは困難であった細胞に対しても効率的に遺伝子導入可能であることを明らかとした。3) 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発研究として、1 ステップの *in vitro* ライゲーションに基づいた簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法を開発した。4) 35 型 Ad ベクターの特性評価研究として、35 型 Ad ベクター感染により、細胞種によっては細胞表面 CD46 発現量の減少が引き起こされることを明らかにし、今後 35 型 Ad ベクターをはじめとする CD46 を受容体として認識する Ad ベクターを使用する際には注意が必要であることを明らかにした。

## B. 研究方法

### B.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

#### B.1.1 膵ランゲルハンス島 (膵島) $\beta$ 細胞への高効率遺伝子導入を可能とする Ad ベクターの探索

##### (1) Ad ベクターの作製

CA プロモーター ( $\beta$ -actin promoter/CMV enhancer with  $\beta$ -actin intron) からなる GFP 発現シャトルプラスミド (GFP 発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) とベクタープラスミド pAdHM4 をそれぞれ I-CeuI と PI-SceI で切断し、両者の切断フラグメントを直接ライゲーションした。ライゲーション産物を SwaI 消化し (親プラスミドは SwaI 部位をもっているが、目的の組換えプラスミドは SwaI 部位を消失するため、SwaI 消化することで目的の組換えプラスミドだけが *E. coli* のコロニーを作る)、DH5 $\alpha$  にトランスフォーメーションした。独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。制限酵素解析を行い、GFP 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM4-CAGFP を得た。次に、pAdHM4-CAGFP をウイルスゲノム末端に存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、SuperFect (Qiagen) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、GFP 発現 Ad ベクター Ad-CAGFP を得た。

##### (2) 膵島への *in vivo* 遺伝子導入

8~10 週齢の雄性 C57/Black6 マウスまたは Wistar ST ラットに、麻酔下にて開腹術を施した。脾動脈ならびに肝門部で肝動脈と門脈をそれぞれ縫合糸で結紮した後、腹腔動脈の上流をクランプし、その下流より 29G 注射針にて Ad ベクターを注入した (Fig. 2A)。5 分間静置後、総胆管からコラゲナーゼ溶液を注入するコラゲナーゼ法を用いて膵臓を消化し、Ficoll-Conrey による密度勾配遠心法にて膵島を単離した。単離膵島を RPMI 培地 (5.5 mM glucose、10% FCS 含有) にて 24

時間培養後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察をした。

##### (3) 膵島切片の免疫染色

単離膵島を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した後、2%アガロースにより膵島集団を固め、アガロース塊をパラフィン包埋することにより切片を作製した。膵島切片をモルモット抗ブタインスリン抗体 (Dako, 希釈率 1:2) と 4°C で一晩反応させた後、ローダミン標識抗ウサギ IgG (Dako, 希釈率 1:20) と室温で 30 分反応させ、GFP とローダミンの蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。

##### (4) ウェスタン・ブロッティング

単離膵島を lysis buffer (25 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitor cocktail) で溶解し、SDS-PAGE を行った後、ゲルをニトロセルロースメンブレンにブロッティングした。メンブレンを TBS-T/5% スキムミルクでブロッキングした後、ヤギ抗マウス CXADR (CAR) 抗体 (R&D) と 4°C で一晩反応させ、その後 HRP 標識抗ヤギ IgG (Chemicon) と室温で 2 時間反応させた。ECL plus (Amersham Bioscience) にて chemiluminescence を可視化した。マウスインスリンノーマ  $\beta$  細胞株 MIN6 細胞 (大阪大学医学研究科宮崎純一先生より譲与)、マウス CAR を恒常的に発現させた B16 細胞 (B16CAR) も同様にサンプルとして処理した。また、メンブレンは抗  $\beta$  アクチン抗体 (Sigma) と HRP 標識抗マウス IgG (Cell Signaling) でも同様に反応させた。

### B.1.2 Ad-TAT ベクターの開発

#### (1) Ad-TAT ベクターの作製

CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現する Ad-TAT ベクターのベクタープラスミドは以下のように構築した。ファイバーノブの HI loop コード領域に HIV 由来の TAT ペプチド (GRKKRRQRRRPQ) に相当する遺伝子を挿入した pAdHM41-TATHI は、pAdHM41 (J. Gene Med., 5,



3' ) と合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGCTGCCGTGATGGTGTGATGGCTGCC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメント、あるいは合成オリゴ DNA (5' -CGAGGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTCTGACTACAAGGACGATGATGACAAATAA-3' ) と合成オリゴ DNA (5' -CGCGTTATTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCAGAGCCACTCCCTGAACCGGATCCCT-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントをそれぞれライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によりシャトルプラスミド pHM-75A-His および pHM15-75A-FLAG を得た。これらシャトルプラスミドを AvrII で切断し、XbaI で処理した pAdHM56-L2 (Gene Ther. 14, 266-274 (2007) ) とライゲーションし、制限酵素解析とシーケンス解析により pAdHM56-His 75-L2 および pAdHM56-FLAG 75-L2 を得た。作製したベクタープラスミド中の Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、カチオン性ポリマーの SuperFect (QIAGEN) を用いて 60mm 培養ディッシュの 293 細胞にトランスフェクションした。約 14 日間培養後、各 Ad ベクターを得た。

## (2) Luciferase assay

SK HEP-1 および SF295 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well/100  $\mu$ L で播種し、24 時間培養した。翌日各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0、東洋インキ) を用い、ALVO (Perkin Elmer) で測定した。

## (3) ウェスタンブロット

各ウイルスタンパク質 (1  $\mu$ g または 10  $\mu$ g) を 2 $\times$  サンプルバッファーと混合し還元した後に、95°C で 3 分熱変性を行った。その後 4-20% のポリアクリルアミドゲル (PAG ミニ「第一」; 第一化学薬品株式会社) を用い、45 mA の定電流で電気泳動を行った。分子量マーカーとして Precision

Plus Protein Standards (BIO-RAD) を用いた。電気泳動後のゲルよりメンブランにトランスファーした。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 2 回行った後、1% Block Ace (大日本製薬株式会社) で 2 時間ブロッキングした。その後 1 次抗体として 0.4% Block Ace で 500 倍希釈した rabbit anti-pIX serum (Biological Science University of Warwick Coventry, UK, Dr Keith N Leppard より供与) を一晩浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。その後 2 次抗体として 0.4% Block Ace で 10000 倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP (Cell Signaling) を 1 時間浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。発光試薬 (Chemi-Lumi One; nacalaitesque) を暴露した後、LAS3000 (FUJIFILM) で検出を行った。またコントロールとしてファイバーノブの検出を以下のように行った。一次抗体として rabbit anti-fiber knob 抗体 (University of Texas Southern Medical Center, USA, Dr RD Gerard より供与) を 3000 倍希釈で一晩反応させ、TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。その後 2 次抗体として 10000 倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP を 1 時間浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。発光試薬を暴露した後、LAS3000 で検出を行った。

## B. 1. 4 ファイバーレス Ad ベクター

### (1) ファイバー欠損 Ad ベクタープラスミド (pAdHM63) の作製

Ad ゲノムの 27331bp からファイバータンパク質をコードする領域の直前まで (31040bp) のフラグメント (28133bp から 30818bp までの E3 領域を欠損している) を合成オリゴ DNA (5' -CCCACCGAAACCGAATTCTCTT-3' ) と (5' -CCATTACCCTGAATCCCTATTTCGAAGTCAACAACATG



AAGATAGT-3' )をプライマーに pAdHM41 (J. Gene Med. , 5, 267-276 (2003) ) を鋳型として PCR により増幅した。得られた PCR 産物を EcoRI と Csp45I を用いて切断し、予め EcoRI と ClaI で切断した Ad ゲノムの 27331bp から 3' 末端まで (28133bp から 30818bp までの E3 領域を欠損している) をもち、ファイバーノブタンパク質の HI loop コード領域と C 末端コード領域にそれぞれユニークな制限酵素部位である Csp45I と ClaI を持つプラスミド pHM14-Eco2 (J. Gene Med. , 5, 267-276 (2003) ) から得られるフラグメントをライゲーションした後、制限酵素解析により pHM14-Eco2I を得た。次に pHM14-Eco2I を SrfI と Ad ゲノムの 3' ITR の外側にある NheI で切断したフラグメントと pAdHM41-4 (J. Gene Med. , 5, 267-276 (2003) ) を SrfI と Ad ゲノムの 3' ITR の外側にある XbaI で切断したフラグメントをライゲーションすることで pAdHM63 のプラスミドを得た。作製した pAdHM63 は Ad ゲノムのファイバーコード領域 (31041-32787) 及び、E1、E3 領域を欠損しており E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素部位を有した Ad ベクタープラスミドである。

(2) ファイバー欠損にヘキソン改変を加えた Ad ベクター (pAdHM64) システムの作製

pHM5-AdHM4 (前年度作製) を PI-SceI と BamHI で切断したフラグメントと pAdHM63 を BstZ17I で切断したフラグメントを混和させ、大腸菌 BJ5183 株 (STRATAGENE) にエレクトロポレーションした。大腸菌中で相同組み換えを生じさせ、制限酵素解析によりベクタープラスミド、pAdHM64 を得た。作製した pAdHM64 は Ad ゲノムのヘキサソンの HVR5 コード領域にユニークな制限酵素部位である XbaI を持ち、ファイバー領域、E1 及び E3 領域を欠損しており E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素部位を有した Ad ベクタープラスミドである。

(3) ファイバー欠損に pIX 改変を加えた Ad ベクター (pAdHM65) システムの作製

pAd3' -IX5 (前年度作製) と pAdHM63 の両者を PI-SceI と BstZ17I で処理した後、ライゲーションを行い、制限酵素解析によりプラスミド pAdHM65 を得た。作製した pAdHM65 は Ad ゲノムの pIX の C 末端コード領域にユニークな制限酵素部位である XbaI を持ち、ファイバー領域、E1 及び E3 領域を欠損しており E1 欠損領域に I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素部位を有した Ad ベクタープラスミドである。

(4) pAdHM63-CMVL2 、 pAdHM64-His-CMVL2 、 pAdHM65-His-CMVL2 の作製

ルシフェラーゼを発現する各ファイバー欠損 Ad ベクターのベクタープラスミド ( pAdHM63-CMVL2 、 pAdHM64-CMVL2 、 pAdHM65-CMVL2) はそれぞれの Ad ベクターの E1 欠損領域に存在する I-CeuI、PI-SceI を用いてシャトルプラスミド pCMVL1 (pAdHM64、pAdHM65 に関しては XbaI を持たない pCMVL1a (Gene Ther. 14, 266-274 (2007)) を用いた) の I-CeuI と PI-SceI で処理したフラグメントを挿入することで作製した。ファイバー欠損 Ad ベクターのヘキソンあるいは pIX コード領域に His tag (HHHHHH) に相当する遺伝子配列を持ったベクタープラスミド pAdHM64-His-CMVL2 、 pAdHM65-His-CMVL2 は pAdHM64-CMVL2、pAdHM65-CMVL2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACGGCAGCC-3' )と (5' CTAGGGCTGCCGTGATGGTGATGGTGATGGCTGCCC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントをそれぞれライゲーションした後、制限酵素解析とシーケンス解析によって pAdHM64-His-CMVL2、pAdHM65-His-CMVL2 を得た。

(5) 各ファイバー欠損 Ad ベクターの作製

PacI で消化した各ベクタープラスミドを 5 型ファイバータンパク質発現 293 細胞 (ファイバー

を欠損した Ad ベクターはパッケージング細胞である 293 細胞にも感染できないため、ファイバーを発現させた Fiber-293 細胞を使用することで、完全ではないにしろ一部のファイバーを有した状態で増殖させる。最後に通常の 293 細胞を使用し増殖させることでファイバーを完全に欠損した Ad ベクターが作製可能である) にトランスフェクションし、CPE が起こるまで培養した。CPE 確認後、3-5 次感染までさせることにより大量調製し、従来型 Ad ベクターと同様に塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% Glycerol からなる溶液で透析した。ベクターの物理化学的 (particle) タイターは Maizel らの方法に従って決定した。

#### (6) ウエスタンブロット

各ウイルス蛋白質 (500 ng) を 2×サンプルバッファーと混合し還元した後に、95°C で 3 分熱変性を行った。その後 4-20% のポリアクリルアミドゲル (PAG ミニ「第一」; 第一化学薬品株式会社) を用い、45 mA の定電流で電気泳動を行った。分子量マーカーとして Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD) を用いた。電気泳動後のゲルよりメンブランにトランスファーした。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 2 回行った。その後 1 次抗体として 3000 倍希釈した rabbit anti-fiber knob 抗体 (University of Texas Southern Medical Center, USA, Dr RD Gerard) より供与)、1000 倍希釈した mouse anti-His tag 抗体 (Novagen)、あるいは 200 倍希釈した goat anti-Ad hexon 抗体 (ViroStat) を一晩浸透させながら反応させた。TBS-T を用いて 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。その後 2 次抗体として 10000 倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP (Cell Signaling)、10000 倍希釈した goat anti-mouse IgG HRP (Cell Signaling)、あるいは 5000 倍希釈した rabbit anti-goat IgG HRP (CHEMICON) を 1 時間浸透させながら反応させた。TBS-T を用い

て 5 分間浸透させることでメンブランの洗浄を 3 回行った。発光試薬 (Chemi-Lumi One; nacal tesque) を暴露した後、LAS3000 (FUJIFILM) で検出を行った。

#### (7) ファイバー欠損 Ad ベクターの遺伝子導入効率の検討

SK HEP-1 および LN444 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well/100  $\mu$ L で播種し、24 時間培養した。翌日各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の条件下で 37°C、1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0、東洋インキ) を用い、ALVO (Perkin Elmer) で測定した。

#### (8) 細胞内導入試薬を用いた場合のファイバー欠損 Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

SK HEP-1 細胞を 48 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well/500  $\mu$ L で播種し、48 時間培養した。ファイバー欠損 Ad ベクターを 30000 VP/cell をなるように調整し、1.5  $\mu$ g、15  $\mu$ g に調整した SuperFect (QIAGEN) を室温で 5 分反応させた後に上清を除去した細胞に感染させた。3 時間後に 10% FCS 含有の DMEM に培地交換し、48 時間 37°C にて培養した。上清を除去後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0) を用い、ALVO を用いて測定した。

#### (9) ファイバー欠損 Ad ベクターの *in vivo* における遺伝子発現特性の検討

マウス (C57BL/6、♀、7 週令) の尾静脈内より従来型 Ad ベクターあるいはファイバー欠損 Ad ベクターを  $1 \times 10^{10}$  VP 投与し、2 日後に各臓器 (肝臓、脾臓、肺臓、腎臓、心臓) を回収し、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン 5500、東洋インキ) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

#### (10) 血液凝固因子存在下におけるファイバー欠

## 損 Ad ベクターの遺伝子導入効率の検討

SK HEP-1 および LN444 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well/100  $\mu$ L で播種し、24 時間培養した。従来型 Ad ベクター、ファイバー欠損 Ad ベクターを 3000 VP/cell をなるように調整し、factor X (FX) 0.4  $\mu$ g と混合し 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0) を用い、ALVO で測定した。

## (11) ファイバー欠損 Ad ベクターの安定性の検討

SK HEP-1 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well/100  $\mu$ L で播種し 24 時間培養した。PBS に懸濁した従来型 Ad ベクター、ファイバー欠損 Ad ベクターを 45°C で 5、15、30、60 分処理した。熱処理後の各ベクター（従来型 Ad ベクターは 3000 VP/cell、ファイバー欠損 Ad ベクターは 30000 VP/cell）を 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0) を用い、ALVO で測定した。未処理のベクターの遺伝子発現を 100% として示している。

## B. 1.5 癌転移におよぼす CAR の影響

### (1) CAR 安定発現株作成

マウス CAR を発現し、ネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド (pIRESneo-mCAR) は、pIRESneo (Clontech) のマルチクロニングサイトへ mCAR 遺伝子を挿入することにより作成した。mCAR 安定発現株 (B16CAR) は pIRESneo-mCAR をトランスフェクションし、ネオマイシンで選択することで作製した。また、コントロール細胞 (B16neo) は pIRESneo をトランスフェクションし、ネオマイシン耐性株を選択することで作成した。各細胞株は MEM (10% FCS) で培養した。

### (2) ベクターの作成

Ad ベクターは、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。CMV プロモータ

ー/CMV エンハンサー/イントロン A からなる mCAR 発現シャトルプラスミド (pHCMV10-mCAR) とベクタープラスミド (pAdHM15-RGD) をそれぞれ I-CeuI、PI-SceI で切断した。両者の切断フラグメントを直接ライゲーションし、mCAR 発現単位が挿入されたベクタープラスミド (pAdRGD-mCAR) を作成した。LacZ 発現単位が挿入されたベクタープラスミド (pAdRGD-LacZ) は、CMV プロモーター/CMV エンハンサー/イントロン A からなる LacZ 発現シャトルプラスミド (pHCMV9-LacZ) を用いて同様に作成した。pAdRGD-mCAR または pAdRGD-LacZ を PacI 消化し、Superfect (Qiagen) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。約 20 日間培養後各ベクターを得た。

### (3) 実験的肺転移実験による CAR の癌転移抑制効果の検討

C57BL/6 マウスに B16 細胞を  $1.5 \times 10^5$  cells/mouse で尾静脈内投与後、14 日目に肺を摘出し、転移コロニー数を計測した。

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

### (1) ベクターの作製、精製、および力価測定

Ad ベクターは、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。本研究ではユニバーサルプロモーターとして CMV (Cytomegalovirus) プロモーター、腫瘍特異的プロモーターとして TERT プロモーターを選択し、それぞれの制御下にホタルルシフェラーゼ (Luc) あるいは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 ベクターを構築した。作製した各種 Ad 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。また、Ad ベクター粒子数 (vector particle; VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。なお、本報告書では作製した各 Ad ベクターの名称を以下のように表記する。

<未修飾 Ad ベクター>

Ad-○○○/□□□

<PEG-Ad ベクター>

△△△/PEG-Ad-○○○/□□□

<Tat-Ad ベクター>

Tat-Ad-○○○/□□□

○○○: プロモーター名 (CMV or TERT)

□□□: 目的遺伝子名 (Luc or HSVtk)

△△△: PEG の分子量 (5K or 20K)

## (2) PEG-Adベクターの作製

Adベクターの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 200 ~ 800 倍モル量に相当する methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、分子量5,000, 20,000) を Adベクター懸濁液 ( $10^{12}$  VP/ml) と混合し、300 rpmで攪拌しながら37°Cで45分間反応させることにより行った。また、作製した各種PEG-Adベクターの修飾率の算定は、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。

## (3) PEG-Adベクターの血中滞留性評価

BALB/cマウスに、 $10^{10}$  VPの未修飾Adベクター、分子量5,000のPEGを用いて90%修飾したAd (5K/PEG-Ad) ベクター、あるいは分子量20,000のPEGを用いて45%修飾したAd (20K/PEG-Ad) ベクターを尾静脈内投与した。投与2, 10, 30, 60, 120分後にこれらのマウスから採血し、血液中の全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、各血液サンプルに含まれるAdベクター数を定量することによって血中滞留性を評価した。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]

## (4) 各種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、 $10^{10}$  VPで各種Adベクターを尾静脈内投与した。投与48時間後にこれらのマウスから腫瘍と肝臓を摘出し、(3)に記述した方法に従って各組織に集積したAdベクター数を定量した。

## (5) Ad-CMV/LucおよびAd-TERT/Lucの*in vitro*遺伝子発現特性の評価

Ad-CMV/LucあるいはAd-TERT/Lucを $10^4$  VP/cellで用いて、A549細胞(腫瘍細胞)ならびにWI38細胞(正常細胞)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。

## (6) 各種Adベクターの原発癌モデルマウスにおける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、 $10^{10}$ または $2 \times 10^{11}$  VPの各種ルシフェラーゼ発現ベクターを尾静脈内投与した。投与2日後に主要臓器を摘出し、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。

## (7) 各種Adベクターの肺転移癌モデルマウスにおける遺伝子発現分布の解析

BALB/cマウスにCT26細胞を $10^5$  cells/mouseで尾静脈内投与し、その1、7、14日後に $10^{10}$ または $2 \times 10^{11}$  VPの各種ルシフェラーゼ発現ベクターを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に肺を摘出し、(6)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。

(8) Ad-CMV/HSVtkおよびAd-TERT/HSVtkで遺伝子導入した細胞のGCV (Ganciclovir) 感受性評価

Ad-CMV/HSVtk および Ad-TERT/HSVtk を 20 ~ 20,000 VP/cell で用いて A549 細胞 (ヒト肺癌細胞株) ならびに WI38 細胞 (ヒト正常繊維芽細胞株) に遺伝子導入した。その後、種々の濃度に調製した GCV 共存下で 4 日間培養し、各遺伝子導入細胞について生細胞数を WST-1 assay により測定した。

(9) 原発癌モデルマウスを用いた Ad-CMV/HSVtk および Ad-TERT/HSVtk の全身投与と GCV 腹腔内投与を併用した自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCV システム) の有効性と副作用の評価

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、 $10^{10} \sim 2 \times 10^{11}$  VP の Ad-CMV/HSVtk または Ad-TERT/HSVtk 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 GCV を 50 mg/kg/day で腹腔内に 10 日間連続投与した。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。

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

また、これらのマウスの体重変化および生存率をモニタリングすると共に、ベクター投与後 2、7 日目における血中 GOT・GPT 濃度を測定した。

(10) 肺転移癌モデルマウスを用いた Ad-CMV/HSVtk および Ad-TERT/HSVtk の全身投与と GCV 腹腔内投与を併用した自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCV システム) の有効性評価

BALB/c マウスに CT26 細胞を  $10^5$  cells/mouse で尾静脈内投与し、7 日後に Ad-CMV/HSVtk または Ad-TERT/HSVtk 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 GCV を 50 mg/kg/day で腹腔内に 7 日間連続投与した。ベクター投与後 7 日目に肺を摘出し、転移コロニー数の計測ならびに肺重量の測定を行った。

(11) 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 Tat ペプチド修飾は、Ad ベクター 1 粒子あたりの capsid タンパクに存在する リジン残基に に対して  $12.5 \sim 2000$  倍モル量に相当する Tat-NHS を Ad ベクター懸濁液 (final  $2 \times 10^{11}$  VP/ml) と混合し、300 rpm で攪拌しながら  $37^\circ\text{C}$  で 45 分間反応させることにより行った。

(12) 化学修飾化 Tat-Ad ベクターの *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

未修飾 Ad ベクターあるいは Tat-Ad ベクターを 300 ~ 10000 VP/cell で用いて RAW264.7 細胞、B16BL6 細胞、CT26 細胞、MS1 細胞、A549 細胞、HeLa 細胞、Raiji 細胞、U937 細胞、KG-1a 細胞、および U937 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導入遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。また、対照実験として、活性基を持たない Tat ペプチドを混和しただけの Ad ベクターについても遺伝子導入効率を評価した。

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 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

(1) 細胞

A549-Luc 細胞は pGL3-Control-RSVneo (ルシフェラーゼを発現しネオマイシン耐性遺伝子をもつプラスミド) をトランスフェクションし、安定にルシフェラーゼを発現する細胞を geneticin (G418) で選択することで作製した。A549-Luc 細胞は DMEM (10% FCS) で培養した。

(2) Plasmid と virus

hU6 プロモーター配列は human genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を鋳型とし、PCR で増幅した。即ち、hU6a、hU6b プロモーター配列は、それぞれ hU6-S1/hU6-AS1、hU6-S1/hU6-AS2 プライマーセットを用いて増幅した。プライマーは以下である。hU6-S1 プライマー (5' - aaggtcgggcaggaagaggccta-3' )、hU6-AS1 プライマー (5' - ggctagaagtatcgatttctcctttccacaagatatat-3' ; XbaI and ClaI 認識配列はそれぞれ下線、イタリックで示した)、hU6-AS2 プライマー (5' - ggctagaagtat*tttaattc*gtcctttccacaagatatataa-3' ; XbaI and SmaI 認識配列はそれぞれ下線、イタリックで示した)。これらのプロモーターを Ad シャトルプラスミド pHM5 に挿入し、Ad ベクタープラスミド pAdHM4.1 の E1 欠損領域に I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して挿入し、pAdHM4-hU6a および pAdHM4-hU6b を作製した。

ルシフェラーゼに対する shRNA を付与したベクタープラスミドを作製するために、oligonucleotides 1/2 (5' -cgacgtgagtacttgcgaaatttcaagagaatttcgaa gtaactcagcgttttttggaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaacgctgagtacttgcgaaattctcttggaa atttgcgaaagtaactcagcgt-3' ) および -3/4 (5' -ccacgtgagtacttgcgaaatttcaagagaatttcgaa gtaactcagcgttttttggaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaacgctgagtacttgcgaaattctcttggaa atttgcgaaagtaactcagcgtgg-3' ) (下線はループ配列を示す) を合成、アニーリングし、pAdHM4-hU6a の ClaI と XbaI 部位、および pAdHM4-hU6b の SmaI と XbaI 部位に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6a-Lu and pAdHM4-hU6b-Lu を作製した。ターゲット配列はルシフェラーゼ cDNA の 158 bp から 176 bp である。

ヒト p53 に対する shRNA を付与したベクタープラスミドを作製するために、oligonucleotides 5/6 (5' -

cggactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccact ggagtctttttggaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaagactccagtggtaatctactcttggaa gtagattaccactggagtc-3' ) および -7/8 (5' -ccgactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccact ggagtctttttggaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaagactccagtggtaatctactcttggaa gtagattaccactggagtcgg-3' ) (下線はループ配列を示す) を合成、アニーリングし、pAdHM4-hU6a の ClaI と XbaI 部位、および pAdHM4-hU6b の SmaI と XbaI 部位に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6a-p53 and pAdHM4-hU6b-p53 を作製した。ターゲット配列はヒト p53 cDNA の 775 bp から 793 bp である。

野生型の hU6 プロモーターは piGene hU6 (iGENE Therapeutics) 由来のものを用い、これを pHM5 に挿入して pHM5-ihU6 を作製した。pHM5-ihU6 を BspMI で切断し、ルシフェラーゼおよびヒト p53 に対する shRNA をコードし oligonucleotides 11/12

(5' -caccacgtgagtacttgcgaaatttcaagagaatttcg aagtactcagcgtttttt -3' and 5' -tacgaaaaacgctgagtacttgcgaaattctcttggaaat ttcgaaagtaactcagcgt-3' ) および -13/14 (5' -caccgactccagtggtaatctacttcaagagagtagat taccactggagtc-3' and 5' -gcataaaaagactccagtggtaatctactcttggaaat agattaccactggagtc-3' ) (下線はループ配列を示す) を導入した。その後、この siRNA 発現カセットを pAdHM4 の E1 欠損領域に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6-Lu、pAdHM4-hU6-p53 を作製した。

ウイルス (それぞれ Ad-hU6-Lu、Ad-hU6a-Lu、Ad-hU6b-Lu、Ad-hU6-p53、Ad-hU6a-p53、and Ad-hU6b-p53) は PacI で切断したベクタープラスミド (pAdHM4-hU6-Lu、pAdHM4-hU6a-Lu、pAdHM4-hU6b-Lu、pAdHM4-hU6-p53、pAdHM4-hU6a-p53、and pAdHM4-hU6b-p53) を 293 細胞にトランスフェクションすることで作製した。作製した Ad 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 (TCID<sub>50</sub>法) により測定した。各ベクターの infectious titer-to-particle ratio は、1:36 for Ad-hU6, 1:31 for Ad-hU6-Lu, 1:28 for Ad-hU6a-Lu, 1:24 for Ad-hU6b-Lu, 1:22 for Ad-hU6-p53, 1:12 for Ad-hU6a-p53, 1:15 for Ad-hU6b-p53 であった。

### (3) 培養細胞への遺伝子導入

各細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日 Ad ベクターを 3000、1000、300 vector particle (VP)/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。72 時間培養後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。

### (4) ウェスタンブロット

細胞を、protease inhibitors (Sigma) を含む lysis buffer (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) で処理し、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 p53 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体 (Oncogene Research Products) 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。

## B. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

### B. 4.1 35 型 Ad ベクターによる細胞表面 CD46 発現量の減少

### (1) 細胞

ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) (Cambrex 社より入手) は、RPMI1640 (10% ウシ胎児血清、10 mM ヘプス、1 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸、4 mM L-グルタミン含有) で培養した。HeLa 細胞および A549 細胞は 10% ウシ胎児血清含有 Dulbecco's modified Eagle's 培地および F-12K 培地で培養した。K562 細胞、U937 細胞、Molt-4 細胞、KG-1a 細胞は 10% ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で培養した。ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Cambrex 社より入手) は、StemSpan™ CC100 (Stem Cell 社より入手) を加えた StemSpan™ H2000 (Stem Cell 社より入手、最終濃度 human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3: 20 ng/ml, human IL-6: 20 ng/ml) で培養した。

### (2) 35 型 Ad ベクターの作製

ルシフェラーゼもしくは Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) 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 pCMV11 もしくは pHCMV-GFP1 を *I-CeuI*, *PI-SceI* で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdMS4 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 (キアゲン社より入手) 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行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は、Maizel らの報告に従い分光学的方法により測定した。

### (3) フローサイトメトリーによる CD46 発現量解析

Staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁した細胞に抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で洗浄後、staining

buffer に懸濁し phycoerythrin (PE) で標識された 2 次抗体 (抗マウス IgG 抗体) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson 社) を用いて CD46 の発現を解析した。PBMC に含まれる B 細胞 (CD19 陽性細胞) および T 細胞 (CD3 陽性細胞) における CD46 発現量解析では、35 型 Ad ベクター作用後の PBMC に対し Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) および PE 標識抗 CD19 抗体 (eBioscience 社より入手) もしくは allophycocyanin (APC) 標識抗 CD3 抗体 (Pharmingen 社より入手) を加え、氷上 1 時間インキュベートした後、測定・解析を行った。

#### (4) 35 型 Ad ベクター感染細胞における CD46 発現量解析

PBMC を 96 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well で播種した後、35 型 Ad ベクターを 10000 vector particle (VP)/cell で加えた。経時的に細胞を回収し、上記の方法に従い細胞表面の CD46 発現量を測定した。また PBMC に対し、様々な濃度の 35 型 Ad ベクターを加え、24 時間後に CD46 発現量を測定した。B 細胞および T 細胞における CD46 発現量解析では、PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で 24 時間作用させた後、上記の方法に従い測定した。PBMC 以外の細胞における CD46 発現量解析では、各種細胞に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で加え、24 時間後測定した。さらに 35 型 Ad ベクター除去後の細胞表面 CD46 発現量の回復について検討するため、PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で作用させた。24 時間培養後、PBMC を洗浄して 35 型 Ad ベクターを取り除き、新鮮培地に懸濁した。再培養開始から経時的に PBMC を回収し、CD46 発現量を測定した。

#### (5) ウェスタンブロットによる CD46 発現量解析

PBMC に 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で加えた後、経時的に細胞を回収・洗浄した。細胞に Lysis buffer を加え可溶化した後、遠心し上清を回収した。上清のタンパク濃度は Bio-Rad assay kit (Bio-Rad 社) を用いて測定した。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、ニトロセルロース膜に転写した。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) と反応させた。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。

#### (6) RT-PCR による CD46 messenger RNA 量解析

PBMC に 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で加えた後、経時的に細胞を回収・洗浄し、Isogen (ニッポンジーン社より入手) を用いて RNA を回収した。Complementary DNA (cDNA) は、Superscript first strand 合成システム (インビトロジェン社より入手) を用いて合成した。cDNA 溶液  $1 \mu\text{l}$ 、 $10 \times$  PCR buffer  $2 \mu\text{l}$ 、滅菌精製水  $13.1 \mu\text{l}$ 、 $5 \text{ U/ml}$  Takara ExTaq™  $0.1 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{M}$  primers  $1 \mu\text{l}$  を加えて PCR を行った。CD46 および human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子のために使用した Primer の配列は以下の通りである。

Human CD46. Forward; 5' -GCT ACC TGT CTC AGA TGA CG-3'

Reverse; 5' -ACC ACT TTA CAC TCT GGA GC-3'

GAPDH. Forward; 5' -GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3'

Reverse; 5' -CAA AGT TGT CATGGA TGA CC-3'



PCR の条件は以下の通りである。Human CD46、94°C 30sec、55°C 30sec、72°C30sec、30 もしくは 35 サイクル；Human GAPDH、94°C 30sec、55°C 30sec、72°C30sec、25 サイクル。PCR 産物は 2%アガロースゲルに泳動した後、エチジウムブロマイドで可視化した。

(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 膵ランゲルハンス島（膵島） $\beta$ 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 $\beta$ 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、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。

昨年度に、単離膵島に Ad ベクターを *in vitro* 導入したところ、従来型 Ad ベクターと主任研究者らが開発済みの改良型 Ad ベクターでは同程度の遺伝子導入効率を示したことから、これら遺伝子導入効率は濃度依存的であること、しかしながら、 $\beta$ 細胞が存在する膵島内部ではなく辺縁部のみで遺伝子発現していることが膵島切片で認められたこと、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ため、 $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer で前処理した後に Ad ベクターを作用させたところ、遺伝子導入効率が上昇したことを明らかにした。

そこで本年度は、膵島内部に存在する $\beta$ 細胞に効率よく遺伝子導入できる系の開発について検討した。まず、Ad の受容体である CAR が膵島に発現しているかをウエスタン・ブロッティングにて確認した。マウス単離膵島で CAR が発現していること、その発現は 20 時間培養することにより増加することが明らかとなった。またマウス $\beta$ 細胞株 MIN6 細胞でも CAR が発現していることが認められた (Fig. 1)。

膵島は血管を最も豊富に含んでいる臓器の一つであるので、遺伝子導入に血管を利用することにより、膵島内部への遺伝子導入効率を上げるこ

とを試みた。膵臓の上流でかつ近位に存在する腹腔動脈を利用することにした。開腹後、膵臓ならびに肝門部で肝動脈と門脈をそれぞれ縫合糸で結紮した後、腹腔動脈より Ad ベクターを注入した (Fig. 2A)。5 分後膵島を単離し、24 時間培養後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察をしたところ、搭載遺伝子 GFP の発現が認められた (Fig. 2B, D)。その GFP 発現は、ばらつきはあるものの、期待したように膵島内部にも認められた。Fig. 2C のように膵島全域で GFP 発現が認められるものもあった。実際 $\beta$ 細胞に遺伝子発現しているかどうかを確認するために、膵島切片を作製し、抗インスリン抗体を用いて免疫染色を行った。GFP 発現はインスリン産生細胞すなわち $\beta$ 細胞と共存していることから、GFP は $\beta$ 細胞で発現していることが明らかとなった (Fig. 2E)。

#### C.1.2 Ad-TAT ベクターの開発

現在、遺伝子治療のベクターとして用いられている Ad ベクターは sub-group C に属した 5 型 (あるいは 2 型) のヒト Ad を基盤としている。Ad は A から F までの sub-group に分けられ、少なくとも 51 種類の serotype が知られているが、sub-group B に属するウイルスを除き、多くの Ad (5 型 Ad を含む) はレセプターとして coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を認識して細胞に感染する。CAR の発現が乏しいために従来の 5 型 Ad ベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多く、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、癌細胞は悪性度の進行と共に、CAR の発現低下および Ad ベクターでの遺伝子導入効率が低下することが報告されており、Ad ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題と考えられる。さらに気道上皮細胞は、CAR を発現しているもののタイトジャンクション構成部位 (あるいは側底膜側) に局在しているため、上皮側から Ad ベクターを

作用させても CAR とは接触できず、効率の良い遺伝子導入が困難である。

Ad ベクターによる遺伝子導入時の CAR 依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。ファイバーはテール、シャフト、ノブからなり、ノブ領域が CAR と結合する。主任研究者のグループでは、ファイバーノブの外來ペプチドの挿入部位として適した HI ループや C 末端領域に、1 ステップの *in vitro* ライゲーションで任意のペプチドコード遺伝子を挿入できるシステムを開発しており、極めて簡便に種々のペプチドをファイバーに表現した改変 Ad ベクターが作製できるようになっている。例えば、 $\alpha_v$  インテグリンに親和性がある RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性が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 (Ad-RGD および Ad-K7)、CAR を発現していない細胞に対しても効率よく遺伝子を導入できる。 $\alpha_v$  インテグリンやヘパラン硫酸は、多くの細胞で発現していることが知られているため、これらのベクターは広範な細胞種・目的への適用が期待できる一方で、これらの分子を発現していない細胞も依然として存在し、それらの細胞を含めたより広範な細胞に効率よく遺伝子導入可能なベクターの開発は、重要な研究課題である。

一方、近年、HIV (human immunodeficiency virus) 由来の TAT (GRKKRRQRRPQ) ペプチドに代表される Protein Transduction Domain (PTD; 蛋白質導入ドメイン) と称される、細胞内移行活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。TAT ペプチドによる物質の細胞内への移行メカニズムは未だ議論があるところであるが (レセプターとしてヘパラン硫酸を認識するという報告もあるが詳細は不明である)、あらゆる細胞に対して効率よく活性を示すことから、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遺伝子工学的に Ad ベクターのカプシドタンパク質付与した Ad-TAT ベクターの開発に取り組んだ。ファイバーノブの HI ループコード領域と C 末端コード領域にそれぞれユニーク制限酵素部位である Csp45I 部位と ClaI 部位を挿入したベクタープラスミド pAdHM41 を用いて、ファイバーノブに TAT ペプチドをもつベクターを作製した。また pIX の C 末端コード領域にユニーク制限酵素部位である XbaI 部位を挿入したベクタープラスミド pAdHM56 を用いて、pIX の C 末端領域に TAT ペプチドを挿入したベクターも同時に作製した。

Table 1 に示した様々な改変 Ad ベクターの遺伝子導入活性をルシフェラーゼ発現を指標に比較検討した (Fig. 3)。CAR 陰性の SF295、CHO、NIH3T3 細胞において、TAT ペプチドをファイバーノブの HI ループに挿入したベクター (Ad-TAT(HI)-L2) は従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して約 100-1000 倍高いルシフェラーゼ発現量を示し、さらに Ad-RGD(HI)-L2、Ad-K7(C)-L2 と比較しても約 10 倍高いルシフェラーゼ発現量を示した。また TAT ペプチドをファイバーノブの C 末端に挿入したベクター (Ad-TAT(C)-L2) も、Ad-L2 と比較して約 10-100 倍高いルシフェラーゼ発現量を示し、その発現レベルは Ad-RGD(HI)-L2 や Ad-K7(C)-L2 と同程度だった。また CAR 陽性の細胞においても、Ad-TAT(HI)-L2 は Ad-L2 や Ad-RGD(HI)-L2、Ad-K7(C)-L2 と比較しても約 10 倍高いルシフェラーゼ活性を示した。一方で pIX の C 末端に TAT ペプチドを挿入したベクター (Ad-TAT(pIX/75)-L2) では、いずれの細胞においてもルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。

以上の結果をまとめると、ファイバーノブの HI loop 領域に HIV 由来の TAT ペプチドを提示させることで様々な培養細胞において Ad-RGD や Ad-K7 と比較して高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。本結果より、これまで Ad-RGD や Ad-K7

などの改良型 Ad ベクターを用いても遺伝子導入が困難であった細胞種に対しても、Ad-TAT を用いることで高効率な遺伝子導入が達成できる可能性が示唆された。

### C.1.3 pIX、ヘキソン改変 Ad ベクター

Ad ベクターは高い遺伝子導入効率を有することから広く用いられているベクターであるが、CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を第一受容体とするため CAR を発現していない細胞には遺伝子導入が困難であるという問題点を抱えている。この問題点を克服するために、主任研究者をはじめとする多くのグループで Ad ベクターのカプシドタンパク質を遺伝子工学的に改変することで、Ad ベクターの感染域の拡大することに成功している。これまでは、突起構造をしているファイバーノブ領域が最も注目され、研究が先行してきた。しかしながら、近年 protein IX (pIX) やヘキソンを改変するアプローチも注目を浴びている。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、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、これら改変型ベクターの遺伝子発現効率等の比較はほとんどなされていない。

昨年度は、主任研究者がこれまで開発してきたファイバーノブの HI loop 領域あるいは C 末端領域に簡便に外来ペプチドを挿入できるシステムを拡大し、新たに pIX やヘキソン領域にも 1 ステップの *in vivo* ligation に基づいたプラスミド構築を利用することで簡便に外来分子を提示できるシステムを開発した。さらに本システムを用いて各領域に His tag や FLAG tag を付与したベクターを作製し、ウェスタンブロット法により目的領域に外来ペプチドが融合タンパクとして発現し、ELISA により外来ペプチドがウイルス表面

に提示できており、特にヘキソンに提示させた場合、そのコピー数の多さから他のカプシドタンパク質を改変するよりも多くの外来ペプチドを提示できることを明らかにした。本年度は、遺伝子導入効率の向上を目指すにあたり、最適な外来ペプチドの提示部位を評価するために、 $\alpha v$  インテグリンと高親和性の RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドをファイバーノブの HI loop 領域、C 末端領域、pIX の C 末端領域、ヘキシソンの HVR5 (hyper variable region) 領域に提示した Ad ベクター (Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2、Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(hexon)-L2) の遺伝子導入効率に関して従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較検討を行った。また pIX はヘキソンとヘキソンの間に埋まった状態で存在しているのでヘキソン表面まで外来ペプチドが提示できるように  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを介して RGD 配列を提示した Ad-RGD(pIX/75)-L2 も作製し同時に検討を行った。

使用したベクターを Table 2 にまとめた。遺伝子導入効率は SK HEP-1 細胞と SF295 細胞におけるルシフェラーゼ発現量を指標に評価した (Fig. 4)。SK HEP-1 細胞は CAR 陽性、SF295 細胞は CAR 陰性であり、いずれの細胞も  $\alpha v$  インテグリン陽性である。SK HEP-1 における各種カプシド改変ベクターの遺伝子発現は Ad-L2 と比較して 2-3 倍の差しかなく、少なくともこれら改変ベクターは Ad-L2 と同様に CAR を介した高効率な遺伝子導入は可能であることが明らかとなった。SF295 細胞において、Ad-RGD(HI)-L2 および Ad-RGD(C)-L2 は、RGD ペプチドとインテグリンの相互作用により、Ad-L2 と比較してそれぞれ約 230 倍、10 倍高い遺伝子発現を達成していた。しかしながら、Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(pIX/75)-L2 および Ad-RGD(hexon)-L2 に関しては、Ad-L2 と同程度の遺伝子発現しか得られなかった。特に Ad-RGD(pIX/75)-L2 は SF295 細胞において Ad-L2 と比較して遺伝子発現が約 3 倍低下していた。この結果から、pIX を改変したことにより pIX (提示させた外来ペプチドとの融合タンパク質の状