

態)のウイルス粒子へのパッケージング効率が低下していることが関与しているのではないかと考えられたので、次にウエスタンブロットにより各 pIX 改変 Ad ベクターの pIX のパッケージング効率について検討した。その結果、 α -ヘリックスリンカーを持たない Ad-RGD(pIX)-L2 に関しては、Ad-L2 と同様に pIX がウイルス粒子にパッケージングしているが、 α -ヘリックスリンカーを有する Ad-RGD(pIX/75)-L2 に関しては、pIX のウイルスへのパッケージングが顕著に低下していた (Fig. 5a)。また His tag や FLAG tag を提示させる場合であっても、同様の現象が認められた (Fig. 5b)。ただし、pIX のパッケージングが完全に抑制されているわけではないことを確認している (Fig. 5c)。この結果より、pIX の C 末端領域に α -ヘリックスリンカーを介して外来分子を提示する場合には注意を要することが明らかとなった。

以上をまとめると、Ad ベクターの感染域の改変を目指し、RGD ペプチドを Ad ベクターのカプシドタンパク質に提示させる場合にはファイバーノブ、特に HI loop 領域に提示させるのが最も効果的であることが明らかとなった。また pIX やヘキソンの改変は、ウイルス表面に外来ペプチドを提示できているものの遺伝子発現への関与は低いということが明らかとなった。

C. 1. 4 ファイバーレス Ad ベクター

Ad ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中でも最も遺伝子導入効率・発現効率に優れたベクターである。これまで主任研究者らは、Ad ベクターのファイバータンパク質を遺伝子工学的手法により改変することで、Ad ベクターの感染の CAR 依存性を克服できることを報告してきた。一方で、pIX やヘキソンの遺伝子工学的な改変はウイルス表面には外来ペプチドを提示できるものの、遺伝子発現への関与は低いということを明らかとしている (Fig. 4)。この原因は、Ad のカプシドタンパク質の中で最も外郭に存在するファ

イバーが、pIX (protein IX) やヘキソンに提示した外来ペプチドが細胞表面のレセプターと結合する際に、立体的な障害となっていることが考えられた。つまりファイバーを欠損させれば pIX やヘキソンがウイルスの最も外郭に位置し、これら部位に提示した外来ペプチドは細胞表面のレセプターと結合しやすくなり、その結果外来ペプチド依存的な高効率遺伝子導入が可能になるのではないかと考えた。また、ファイバーを欠損させた Ad ベクターは CAR を介した遺伝子導入が抑制されると考えられるので、Ad ベクターのもう一つの問題点である非特異的な遺伝子導入を抑制できると考えられる。つまり、ファイバーの欠損と pIX やヘキソンに外来ペプチドを挿入する 2 つのアプローチを組み合わせることで、非特異的な遺伝子導入の抑制 (detargeting) と特定レセプターを介した特異的な遺伝子導入 (retargeting) が同時に達成できると考えられる。そこで、はじめにファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vitro*、*in vivo*における遺伝子発現特性を評価した。さらにファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに His tag (HHHHHH) を挿入したベクターを作製し、遺伝子発現特性を評価した。

はじめに各種ファイバー欠損 Ad ベクター作製のベクタープラスミドを構築した。作製した 3 種類のベクタープラスミドのコンストラクトを Fig. 6 に示す。それぞれのベクタープラスミドは、Ad ゲノムのファイバーコード領域 (31041-32787bp) 及び、E1、E3 領域を欠損しており、E1 欠損領域にユニークな I-CeuI、SwaI、PI-SceI を有してことから、主任研究者らが開発した improved *in vitro* ligation 法と同様に E1 欠損領域に任意の発現カセットを簡便に挿入可能である。また、ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに外来ペプチドを挿入する場合には、それぞれの領域に存在するユニークな XbaI を用いることで挿入可能である。従来ファイバーを有する Ad ベクターは作製したベクタープラ

スミドから Ad ゲノムを切り出し、パッケージング細胞である 293 細胞に感染させ、さらに得られてきたウイルスをシードとして増殖させることが可能である。しかしながら、ファイバー欠損 Ad ベクターは 293 細胞表面の CAR と結合することができないために感染することができず、ベクターを増幅することができないと考えられる。そこで恒常的にファイバータンパク質を発現する Fiber-293 細胞に Ad ゲノムをトランスフェクションすることで、完全ではないにしても、一部ファイバーを持ったベクターを産生させる方法を用いた。Fiber-293 で増殖中のベクターは、細胞由来のファイバーを持っており、このベクター (Ad/ Δ fiber-L2*) は一部のファイバーが細胞表面の CAR と結合し細胞に感染できることから、ベクターの増幅が可能となる。そして最終的に通常の 293 細胞に感染させることで、ファイバーの供給がなくなり、ファイバーを完全に欠損した Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-L2) が作製できると考えられる。作製したベクターをウエスタンブロット法でファイバーの有無を調べたところ、Ad/ Δ fiber-L2* は一部ファイバーを持っていること、さらに最終的に得られた、Ad/ Δ fiber-L2 は確かにファイバーを持っていないことが明らかとなった (Fig. 7)。またこのような方法で作製した Ad/ Δ fiber-L2 は従来のファイバーを持つベクターと同様の高力価のベクターの産生が可能であった (data not shown)。

次に *in vitro* における遺伝子導入活性をルシフェラーゼの発現を指標に検討した。CAR 陽性の SK HEP-1 細胞において、従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して Ad/ Δ fiber-L2* は約 3 分の 1、Ad/ Δ fiber-L2 は約 100 分の 1 にまでルシフェラーゼ発現量が低下していた (Fig. 8a)。つまり Ad/ Δ fiber-L2* は一部のファイバーを介して CAR を介した感染が可能であり、Ad/ Δ fiber-L2 は CAR を介した感染ができないと示唆され、Ad/ Δ fiber-L2 は確かにファイバーを有していないことが明らかとなった。一方で CAR 陰性の

LN444 細胞においては、Ad/ Δ fiber-L2 は Ad-L2 の約 10 分の 1 のルシフェラーゼ発現量が示し、Ad/ Δ fiber-L2* は Ad-L2 の約 2 倍のルシフェラーゼ発現量を示した (Fig. 8b)。この結果の詳細な原因は不明であるが、後述するように (Fig. 13)、Ad/ Δ fiber-L2 の安定性の低さが問題となっている可能性が考えられる。つまり、Ad/ Δ fiber-L2*、Ad/ Δ fiber-L2 ともにファイバーの欠損により、ペントンベースに存在する RGD モチーフが、直接細胞表面の α_v インテグリンと結合できると考えられるため、Ad-L2 と比較して高いルシフェラーゼ発現量が得られるが、Ad/ Δ fiber-L2 は物理的に安定性に乏しいためにルシフェラーゼ発現量が低くなってしまわないかと考えられる。次に、Ad/ Δ fiber-L2 によるルシフェラーゼ発現能が、ウイルスが defective になっている結果、低くなっているという可能性を否定するために、トランスフェクション試薬の SuperFect と、Ad/ Δ fiber-L2 の複合体を作製し、遺伝子導入実験を行った。SK HEP-1 細胞に作用させたところ、SuperFect の濃度依存的にルシフェラーゼ発現量の上昇が認められた (Fig. 9)。この結果より、Ad/ Δ fiber-L2 による遺伝子発現が低いのはウイルスが遺伝子発現能を失っているのではなく、CAR を介した遺伝子導入ができないためであることが確認できた。

次にマウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験を行った (Fig. 10)。C57BL/6 マウス (7 週令、♀) の尾静脈内より、 1×10^{10} VP の Ad-L2 あるいは Ad/ Δ fiber-L2 を投与後、48 時間に各臓器を回収し、ルシフェラーゼ発現量を測定したところ、Ad/ Δ fiber-L2 による遺伝子発現は Ad-L2 と比較して肝臓において約 1000 分の 1 にまで減少していた。また脾臓、肺臓、腎臓、心臓に関しては mock と同等の発現量しか認められなかった。この結果より、Ad の感染に重要なファイバーを欠損することで *in vivo* 投与において、非特異的な遺伝子導入を抑制できることが明らかとなった。一方で近年、*in vivo* において factor X (FX) などの血液

凝固因子が CAR 非依存的に、Ad ベクターの肝臓への遺伝子導入に関与しているということが報告されている。Ad/ Δ fiber-L2 の肝臓における発現も Ad-L2 と比較すると、約 1000 倍低下しているが、わずかではあるがルシフェラーゼの発現が認められたことから、Ad/ Δ fiber-L2 の肝臓における遺伝子発現にも CAR 非依存的な経路が関与していることが考えられる。そこで次に、Ad/ Δ fiber-L2 が CAR 非依存的な遺伝子導入が可能であるかを検討するために、*in vitro*において FX 存在下の Ad/ Δ fiber-L2 の遺伝子導入効率をルシフェラーゼ発現量を指標に検討した。その結果、CAR 陽性の SK HEP-1 細胞、CAR 陰性の LN444 細胞いずれの場合においても、FX 存在下では Ad/ Δ fiber-L2 による遺伝子発現は約 20-40 倍上昇した (Fig. 11)。したがって、Ad/ Δ fiber-L2 による遺伝子導入に少なくとも *in vitro* においては FX が関与しており、*in vivo* においても FX による CAR 非依存的な遺伝子導入が肝臓における遺伝子発現に関与している可能性を示唆された。

次にファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに His tag (HHHHHH) を挿入した Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2) を作製し、遺伝子導入特性に関して評価した。なお、Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 は Ad/ Δ fiber-L2 と同様に Fiber-293 細胞を用いてスケールアップを行い、最終段階で通常の 293 細胞に感染させる方法で作製した。はじめに作製した Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 が、それぞれファイバーを完全に欠損しており、かつ pIX やヘキソンに His tag を提示していることを、anti-fiber knob 抗体および anti-His tag 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した (Fig. 12)。次に pIX やヘキソンに提示した外来ペプチドがファイバーの立体障害を除くことで、遺伝子導入効率の向上が認められるかを検討するために、CHO 細胞お

よび細胞膜上に His tag に対する一本鎖抗体を強制発現した CHO-His4 細胞における遺伝子導入効率をルシフェラーゼ発現量を指標に評価した。その結果、詳細な原因は不明であるが、Ad/ Δ fiber-L2 では mock よりも高いルシフェラーゼ発現量が認められるにもかかわらず、Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 による遺伝子発現量は、いずれの細胞においても mock と同レベルであった。この結果の原因はファイバー、pIX やヘキソンといった、Ad の主要なカプシドタンパク質を改変することで、ベクターの物理的な安定性が損なわれているのではないかと考えられる。そこで次に Ad/ Δ fiber-L2 の物理的安定性を、熱処理した後の遺伝子発現能の残存活性を指標に検討した (Fig. 13)。その結果、5 分間 45°C で処理した後、Ad-L2 では約 60% の活性を保持していたのに対して Ad/ Δ fiber-L2 は約 0.1% にまでその遺伝子導入活性は低下していた。この結果より、ファイバー欠損 Ad ベクターは物理的に不安定であることが明らかとなり、Ad の安定性に関与しているとされている pIX やカプシドタンパク質の大部分を占めるヘキソンを改変することでより安定性が低下し、その結果遺伝子導入活性がなくなっていたのではないかと考えられる。

以上をまとめると、pIX やヘキソンに提示した外来ペプチドに細胞表面の特定レセプターに対して、より強い親和性を持たせるために、立体障害となりうるファイバーを欠損した Ad ベクターを作製した。その遺伝子発現特性を評価したところ、*in vivo* においても非特異的な遺伝子導入を抑制することができ、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターになりうるということが明らかとなった。しかしながら、pIX やヘキソンに外来ペプチドを付与したファイバー欠損 Ad ベクターは遺伝子発現活性を失っていることが明らかとなった。この結果は、おそらくベクターの物理的安定性の乏しさに起因するものであり、ファイバー欠損 Ad ベクターをターゲティング Ad ベクターの基

盤ベクターとして用いるには、安定性の問題は克服すべき点であることが明らかとなった。

C. 1.5 癌転移におよぼす CAR の影響

CAR は上皮性タイトジャンクションに関連する細胞間接着分子であり、悪性化したがん細胞においてその発現低下が認められているが、生理的意義は不明である。そこで悪性腫瘍の特性として転移に着目し、癌転移における CAR の役割について検討した。

まず、CAR 陰性であるマウスメラノーマ B16 細胞を用いて、CAR 安定発現株 B16CAR を作成した。この細胞を用いて実験的肺転移実験を行ったところ、B16CAR 細胞投与群における肺転移数は、コントロール細胞投与群と比較して有意に低下していた (Fig. 14)。

本実験で用いた転移モデルにおいて形成された肺転移巣は、①血管への接着、②血管外への脱出、③組織への浸潤、④転移先での生育といった多くの段階を経ることができた細胞に起因する。そこで CAR が抗転移効果を発揮する段階について検討するために、B16 細胞へ一過性に CAR を発現させて転移実験をすることにした。一過性の発現には、CAR 陰性細胞に対しても高効率な遺伝子導入可能なファイバー改変型 CAR 発現 Ad ベクター (AdRGD-CAR) を用いた。コントロール Ad ベクターとして、同様のファイバー改変型 Ad ベクターで LacZ を発現する AdRGD-LacZ を用いた。その結果、AdRGD-CAR により B16 細胞の肺転移数はコントロール細胞群と比較して有意に低下していた (Fig. 15)。

CAR は、転移の初期段階 (おそらく血管への接着や血管外への脱出) において抗転移作用を発揮していることが明らかとなった。

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

C. 2.1 PEG-Ad ベクターの体内動態解析

高分子バイオコンジュゲーションは、蛋白質・粒子の医薬価値を飛躍的に向上可能なドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術であると世界的に認識されている。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、PEG-Ad ベクター、特に分子量 5,000 の PEG を用いた修飾率 90% の 5K/PEG-Ad ベクターを担癌マウスに全身投与すると、血管透過性の亢進した腫瘍組織への集積性が增强されるという、いわゆる EPR 効果 (Enhanced permeability and retention effect) が認められ、Ad ベクターのバイオコンジュゲート体が腫瘍標的化ベクターの有望なプロトタイプとなることを世界に先駆けて明らかとした。さらに昨年度の検討により、分子量 20,000 の PEG を用いた修飾率 45% の 20K/PEG-Ad ベクターが、5K/PEG-Ad ベクターと比較して腫瘍での高い遺伝子発現を発揮しつつ、副作用に繋がる肝臓での遺伝子発現を強く抑制するという、腫瘍標的化ベクターとして優れた特性を有することが明らかとなった。しかし、20K/PEG-Ad ベクターがこのような *in vivo* 遺伝子発現分布を示す詳細な機序については不明なままであった。そこで今回、そのメカニズム解明の一端として、未修飾 Ad ベクター、5K/PEG-Ad ベクター、および 20K/PEG-Ad ベクターを全身投与したマウスにおいて、ベクター粒子の血中滞留性ならびに生体内分布に関する比較解析を行った。

まず、各ベクターの血中存在量の経時変化を測定したところ (Fig. 16)、5K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較してわずかな血中滞留性の向上を示したに過ぎなかったが、20K/PEG-Ad ベクターにおいては血中からの消失に明らかな遅延が認められ、血中滞留性に極めて優れたベクターであることが判明した。また、このときの各ベクターの組織移行量を比較した結果 (Fig. 17)、20K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較

して約 20 倍、5K/PEG-Ad ベクターと比較しても 2 倍以上高い腫瘍集積性を示した。一方、肝臓へのベクター粒子の分布は、5K/PEG-Ad ベクターでは未修飾 Ad ベクターとほぼ同等であったのに対して、20K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターの約 1/50 にまで低下していた。これらの結果を総合すると、20K/PEG-Ad ベクターは全身投与による高い腫瘍集積性を有するベクターであり、この現象が肝臓への移行量の大幅な低下に基づく血中滞留性の飛躍的な向上によって、EPR 効果が十分に発揮されたためであることが強く示唆された。

C. 2. 2 Ad-TERT ベクターの遺伝子発現特性解析と癌自殺遺伝子治療における有用性評価

遺伝子治療研究においては、ほぼ全ての真核細胞で高いプロモーター活性を発揮する CMV プロモーター等を搭載したベクターシステムが多用されており、これは低用量のベクター適用において最大限の遺伝子発現活性を期待するという理由からである。しかしながら、ユニバーサルプロモーター制御型ベクターの全身投与は、ベクターが分布する全ての組織で治療用遺伝子が発現してしまうため、目的とする主作用とともに予期せぬ副作用を招くことが危惧される。すなわち、腫瘍標的化ベクターの創製を目指す我々の研究戦略においては、ベクターの体内動態制御（腫瘍集積性の増強）と併せて、ベクターに搭載した治療用遺伝子を目的組織（腫瘍）のみで発現させるアプローチが必要とされる。この点に関して、近年、種々の腫瘍において特異的プロモーターが同定され、それらを搭載したベクターシステムによる癌遺伝子治療が副作用軽減を達成できるものと期待されている。これら腫瘍特異的プロモーターのなかで、テロメラーゼを構成する蛋白質サブユニット（TERT）の発現を制御している TERT プロモーターは、テロメラーゼ活性のない正常細胞では機能せず、テロメラーゼが再活性化されている腫瘍細胞において制御下の遺伝子発現を誘導する。また、ヒトの癌種の 85%以上においてテロメ

ラーゼの再活性化が起こっているとの報告もあり、TERT プロモーターは癌遺伝子治療への応用において極めて汎用性に優れた腫瘍特異的プロモーターである。そこで我々は、遺伝子発現制御という観点から Ad ベクターの腫瘍標的化と安全性向上を達成するべく、TERT プロモーター制御型 Ad (Ad-TERT) ベクターを作製し、本ベクターの遺伝子発現特性について解析した。また、HSVtk 遺伝子を治療用遺伝子として搭載した Ad-TERT ベクターを用いて、全身投与型腫瘍標的化ベクターの癌自殺遺伝子治療開発における TERT プロモーターの有用性を検証した。

まず、CMV プロモーターあるいは TERT プロモーター制御下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を発現する Ad-CMV/Luc ならびに Ad-TERT/Luc を作製し、腫瘍細胞（A549 細胞）と正常細胞（WI38 細胞）との間で各ベクターの遺伝子発現効率を比較した (Fig. 18)。その結果、A549 細胞における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現レベルは Ad-CMV/Luc と比較して約 1/15 に低下したものの、WI38 細胞において Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-CMV/Luc の 1/1000 以下にまで抑制された。したがって、新たに構築した Ad-TERT ベクターが、遺伝子発現において優れた腫瘍特異性を発揮することを確認できた。そこで次に、Meth-A 担癌マウスに Ad-CMV/Luc あるいは Ad-TERT/Luc を尾静脈内投与し、48 時間後の腫瘍および肝臓における遺伝子発現量を評価した (Fig. 19)。In vitro 培養系での結果を反映して、腫瘍における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-CMV/Luc と比較して若干低下したものの、肝臓での遺伝子発現レベルは Ad-CMV/Luc の 1/380 以下にまで抑制されることが判明した。以上の結果より、Ad-TERT ベクターは癌遺伝子治療の標的組織となる腫瘍においては遺伝子発現活性を維持しつつ、副作用の原因となる正常組織での遺伝子発現を顕著に抑制できるという、全身投与型腫瘍標的化ベクターの開発において魅力的な特性を有していることが明らかとなった。

そこで、TERT プロモーター制御下に HSVtk 遺伝子を発現する Ad-TERT/HSVtk を作製し、本ベクターを全身投与型ベクターとして癌自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCV システム) に適用した際の有効性および安全性を評価した。まず、Ad-CMV/HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk により遺伝子導入した A549 細胞ならびに WI38 細胞における GCV 感受性を検討したところ (Fig. 20)、両ベクターとも遺伝子導入に用いたベクター用量に依存して A549 細胞の GCV 感受性 (細胞死) を増強した。一方、正常細胞である WI38 細胞においては、Ad-CMV/HSVtk を用いた遺伝子導入によって A549 細胞の場合と同様の GCV 感受性が付与されたものの、Ad-TERT/HSVtk による遺伝子導入では GCV の細胞傷害活性が全く認められなかった。本結果は、Ad-TERT ベクターが HSVtk/GCV システムにおいても高い腫瘍特異性を発揮することを示している。そこで、Meth-A 担癌マウスに Ad-CMV/HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、10 日間の GCV 腹腔内投与の下、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした (Fig. 21)。その結果、Ad-CMV/HSVtk を 5×10^{10} VP/mouse で投与した群では、全てのマウスが数日のうちに突然死するという強い副作用が観察され、突然死が見られなかった 10^{10} VP/mouse 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。したがって、Ad-CMV/HSVtk の全身投与による HSVtk/GCV システムにおいては、ベクター投与量に関する治療域が極めて狭い、もしくは全く存在しないことが判明した。一方、Ad-TERT/HSVtk 投与群においては、 2×10^{11} VP/mouse という高用量投与によってもマウスの突然死は観察されず、コントロール群と比較して明らかな腫瘍増殖の遅延ならびに生存日数の顕著な延長が認められた。さらに、本治療システムの転移癌に対する有効性を評価するために、CT26 肺転移癌マウスに Ad-CMV/HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、7 日間の GCV 腹腔内投与後に摘出した肺の重量ならびに転移コロニー数を測定した (Fig. 22)。その結果、

Ad-CMV/HSVtk の 10^{10} VP/mouse 投与群ではコントロール群と比較して有意な転移抑制効果を示さなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk を 2×10^{11} VP/mouse で投与したマウスの肺では顕著な転移コロニー数の減少とそれに伴う肺重量の増加抑制が観察された。したがって、Ad-TERT/HSVtk を全身投与型ベクターとして用いた HSVtk/GCV システムは、ベクターの腫瘍局所投与に基づくこれまでの癌遺伝子治療では困難とされてきた転移癌に対しても有効性を発揮できる治療戦略であることが明らかとなった。

また、本治療システムの安全性評価の一環として、Meth-A 担癌マウスにベクターを全身投与した後の体重変化ならびに肝障害マーカーである血中 GOT・GPT 量を検討した (Fig. 23)。その結果、 2×10^{11} VP/mouse で Ad-TERT/HSVtk を投与した群 (治療効果の認められたプロトコル) では、コントロール群と比較して若干の体重減少とベクター投与後 7 日目における明らかな血中 GOT・GPT 量の増加が観察された。

以上の結果をまとめると、腫瘍特異的遺伝子発現を可能とする Ad-TERT ベクターを全身投与型ベクターとして応用した HSVtk/GCV システムは、投与ベクター量に関する治療域の拡大と転移癌に対する有効性には繋がるものの、治療効果の発揮に高用量のベクター投与を必要とするために依然として安全面での課題が残されており、より高度に腫瘍標的化を達成しうるベクター開発の必要性が示唆された。

C. 2. 3 PEG 修飾 Ad-TERT ベクターの作製とその *in vivo* 遺伝子導入特性の解析

上記 C. 2. の結果を踏まえて、Ad-TERT ベクターの腫瘍標的化能をさらに向上させるために、TERT プロモーターによる遺伝子発現制御と PEG 修飾によるベクター粒子の体内動態制御との融合を図った。すなわち、分子量 5,000 の PEG を種々の修

飾率で結合させた 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、それらを Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布を解析した。まず、各修飾率の 5K/PEG-Ad-CMV/Luc ならびに 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を全身投与した 2 日後の腫瘍および肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定したところ (Fig. 24)、いずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-TERT/Luc の腫瘍における発現レベルは、5K/PEG-Ad-CMV/Luc と比較してわずかに低値を示すのみであった。一方、副作用の主因となる肝臓での遺伝子発現は、5K/PEG-Ad-TERT/Luc 投与群において顕著に抑制されており、特に 95%修飾体については、5K/PEG-Ad-CMV/Luc と比較して約 1/300 にまで肝臓での遺伝子発現レベルを低下させることができた。また、このときの腫瘍および肝臓におけるベクター粒子分布を検討したところ (Fig. 25)、5K/PEG-Ad-TERT/Luc はいずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-CMV/Luc と同様の分布パターンを示したことから、プロモーター改変がベクター粒子の生体内挙動に影響しないことを確認した。さらに、主作用/副作用比の指標として、腫瘍/肝臓遺伝子発現比率を算出したところ (Fig. 26)、5K/PEG-Ad-TERT/Luc は 5K/PEG-Ad-CMV/Luc と比較して約 20~10,000 倍も高い値を示すことが判明した。以上の結果から、今回我々が創製した PEG 修飾 Ad-TERT ベクターは、体内動態制御および遺伝子発現制御の両面から腫瘍選択性を増強されており、全身投与型腫瘍標的化ベクターとして極めて有望であることが示唆された。

C. 2. 4 化学修飾化 Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

癌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 の発現が乏しく、特に癌細胞ではその悪性度の進行に伴って CAR の発現レベルが低下するという報告もなされている。したがって、これら遺伝子治療の重要な標的細胞に対して、Ad

ベクターを用いた遺伝子導入効率は著しく制限されているのが現状である。本観点から我々は、細胞内移行活性を有する Tat ペプチドを Ad ベクター表面に化学結合させることによって、CAR の発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる Tat-Ad ベクターの開発を進めてきた。本年度は、Tat-Ad ベクターの有用性評価ならびに遺伝子導入機序に関する基礎情報の集積を図るために、遺伝子導入効率に及ぼす Tat 修飾率ならびに標的細胞特性の影響について検討した。

まず、Ad-Tat ベクターの Tat 修飾率と遺伝子導入効率との関連評価を行うために、Ad ベクター表面のペプチド結合部位 (リジン残基) に対して 12.5~2000 倍モル量の活性基付与型 Tat ペプチド (Tat-NHS) を混合することによって、様々な修飾率の Tat-Ad ベクターを作製した。これら Tat-Ad ベクターを用いて CAR 低発現の B16BL6 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現レベルを指標に各ベクターの遺伝子導入活性を比較した (Fig. 27)。その結果、修飾条件 1:25 (=リジン残基 : Tat ペプチド) で調製した Tat-Ad ベクターが最も高い遺伝子導入活性を示し、Ad-Tat ベクターの遺伝子導入効率が Tat 修飾条件によって大きく影響されることが判明した。高修飾率の Tat-Ad ベクターにおける遺伝子導入活性の消失については、詳細な原因は不明であるが、過剰の Tat ペプチド修飾によって Ad ベクターが本来有する遺伝子導入機序のいずれかのステップが阻害されたものと推察された。

次に、修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターを 300~10000 VP/cell の用量で B16BL6 細胞に適用した際のルシフェラーゼ活性を測定したところ、ベクター用量に依存した遺伝子発現レベルの上昇が確認された (Fig. 28)。また、Ad ベクター粒子の表面に静電的に吸着した Tat ペプチドの遺伝子導入効率への影響を検討するために、結合活性基を持たない Tat ペプチドと Ad ベクターとを混合した場合の遺伝子導入活性についても測定した

(Fig. 29)。その結果、Ad ベクターに Tat ペプチドを単に混合しただけでは、B16BL6 細胞に対する遺伝子導入活性は未修飾 Ad ベクターとほぼ同等であり、Tat-Ad ベクターの優れた遺伝子導入活性が Ad ベクターの粒子表面（カプシド蛋白質）に Tat ペプチドが共有結合することではじめて得られることを実証した。

さらに、CAR 発現量の異なる種々の細胞に対して、修飾条件 1:12.5, 1:25, 1:50 で調製した各 Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの遺伝子導入活性を比較検討した (Fig. 30)。接着細胞である CT26 細胞（マウス colon carcinoma 由来）、RAW264.7 細胞（マウス macrophage 由来）、HeLa 細胞（ヒト cervical carcinoma 由来）、および A549 細胞（ヒト lung carcinoma 由来）のなかで、CAR 高発現細胞（A549 細胞、HeLa 細胞）ではいずれの修飾率の Tat-Ad ベクターも未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子導入活性を示し、CAR 低発現細胞（CT26 細胞、RAW264.7 細胞）においては修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの数倍高い遺伝子導入を達成した。また、浮遊細胞である U937 細胞（ヒト monocytic lymphoma 由来）に対しては、修飾条件 1:12.5 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの約 10 倍高い遺伝子導入活性を示した。したがって Tat-Ad ベクターは、CAR の発現が十分な標的細胞に対しては、従来の Ad ベクターでも高い遺伝子発現が達成できるため同等な遺伝子導入活性を示すに留まったが、CAR の発現が乏しい標的細胞に対してこそ高い優位性が発揮されることが明らかとなった。

C.3 遺伝子発現抑制型（siRNA 発現）Ad ベクターの開発

C.3.1 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

siRNA 発現 Ad ベクターの更なる普及のためには、簡便に高効率にベクターを作製する技術が

必要となる。我々は、従来の Ad ベクター作製法を格段に簡略化し、簡単な *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して Ad ベクターを作製する技術を開発済みであり、全世界で広く用いられている。本法を利用した siRNA 発現 Ad ベクター作製法では、U6 や H1 プロモーターを有したシャトルプラスミドに標的遺伝子に対する shRNA コード合成オリゴ DNA を挿入し、その遺伝子カセットを Ad ゲノムの E1 欠損領域に組み込む 2 段階の作業が必要となる (Fig. 31 A)。そこで我々は、この siRNA 発現 Ad ベクター作製法をさらに簡略化し、標的遺伝子に対する shRNA コード合成オリゴ DNA を直接 Ad ゲノム（ベクタープラスミド）に組み込む迅速・高効率 siRNA 発現 Ad ベクター作製法（*in vitro* ライゲーションを利用）を開発した (Fig. 31 B)。具体的には、U6 プロモーターを予め Ad ベクタープラスミドの E1 欠損領域に挿入し、転写開始配列付近に制限酵素ユニーク部位の ClaI あるいは SmaI 部位を、さらにその下流に XbaI 部位を挿入した新たなベクタープラスミド pAdHM4-hU6a、pAdHM4-hU6b を作製した (Fig. 32 A)。これにより、目的の標的遺伝子に対する shRNA 配列をコードした合成オリゴ DNA を直接 Ad ベクタープラスミドに挿入することが可能となり（シャトルプラスミドからベクタープラスミドへの組み込み作業が必要なくなった）、生じたプラスミドをゲノム両末端に存在する制限酵素 PacI で線状にし、これを 293 細胞にトランスフェクションすることで siRNA 発現 Ad ベクターの作製が可能となった (Fig. 31B, Fig. 32 A)。hU6 プロモーターの転写開始点付近の詳細な遺伝子配列は Fig. 33 に示した。

このように作製した siRNA 発現 Ad ベクターの機能を、ルシフェラーゼおよびヒト p53 を標的に検討した。ルシフェラーゼに対しては、A549-Luc 細胞を用い、Ad-hU6a-Lu と Ad-hU6b-Lu の効果を Ad-hU6b-Lu と比較検討した。その結果、Ad-hU6a-Lu と Ad-hU6b-Lu のルシフェラーゼ発現の抑制効果は、Ad-hU6b-Lu と同程度であった

(Fig. 34)。コントロールベクターでは、ルシフェラーゼ発現の抑制は認められなかった。内因性遺伝子のヒト p53 に対しても同様に検討したところ、1000 VP/cell の Ad-hU6-p53、Ad-hU6a-p53、Ad-hU6b-p53 で作用させた場合の A549 細胞の p53 発現レベルは、それぞれ 7、2、5% であり (Image Gauge Software での検討)、同程度の抑制効果を示した (Fig. 35)。従って、本法で作製した siRNA 発現 Ad ベクターは、従来の方法で作製した場合と同様の遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなった。

C. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

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

(1) 35 型 Ad ベクターによる細胞表面 CD46 発現量の減少

35 型 Ad をはじめとする Subgroup B に属する Ad の多くは、受容体としてヒト CD46 に結合して感染する (Fig. 36)。ヒト CD46 を受容体とする病原体は他にも多く知られており、麻疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型などが CD46 を受容体としている。これらのウイルスは感染後、細胞表面の CD46 発現量を減少させることが知られている。CD46 は補体制御因子として自己の細胞を補体から守る役割を果たしていることから、細胞表面の CD46 発現量が減少すれば感染細胞が補体による攻撃を受けやすくなる危険性がある。また最近 CD46 は様々な免疫反応に関与することが報告されており、もし 35 型 Ad ベクターにより CD46 発現量が減少すれば予期せぬ副作用を引き起こす可能性がある。そこで本研究では、35 型 Ad ベクター感染により細胞表面の CD46 発現量がどのように変化するか検討した。

まず PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で作用させ、経時的に細胞表面の CD46 発現量を測定したところ、CD46 発現量は時間の経過とともに減少していった (Fig. 37)。感染 6 時

間後には非感染細胞と比較し 48% も減少し、12 時間後には最大 72% の減少を示した。また CD46 発現量減少は 35 型 Ad ベクター濃度依存的であり、濃度の増加とともに大きく減少した (Fig. 37)。1250 VP/cell では 44% の CD46 発現量の減少が観察されたが、20000 VP/cell では 71% も減少していた。これらの結果から、35 型 Ad ベクターも麻疹ウイルスやヘルペスウイルス 6 型と同様に細胞表面の CD46 発現量を減少させることが明らかとなった。

さらに PBMC 中に含まれる B 細胞 (CD19 陽性細胞) および T 細胞 (CD3 陽性細胞) における CD46 発現量の変化についても検討したところ、B 細胞および T 細胞においても、それぞれ 11% および 31% の減少が観察された (Fig. 38)。しかしながら、PBMC 全体と比較すると、その発現量減少の程度は低いものであった。次に、PBMC 以外の細胞においても PBMC と同様に細胞表面の CD46 発現量が減少するか検討した。その結果、細胞種により CD46 発現量減少の程度は大きく異なっていた (Table. 4)。K562、U937、KG-1a、Molt-4 細胞では 35 型 Ad ベクター感染により CD46 発現量減少が観察され、特に Molt-4 細胞では 55% も減少していた。一方で nonleukemia 細胞である A549、HeLa、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞においては CD46 発現量減少は観察されず、HeLa 細胞や CD34 陽性細胞ではむしろ若干 CD46 発現量が上昇していた。

(2) ウェスタンブロット及び RT-PCR による CD46 発現解析

次に細胞全体の CD46 発現量が 35 型 Ad ベクター感染によりどのように変化しているか検討するため、ウェスタンブロットを行った。PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で作用させ、経時的に細胞を回収して検討したところ、細胞全体の CD46 発現量は減少しておらず、むしろわずかながら増加しているようであった (Fig. 39)。また半定量的 RT-PCR により CD46 の mRNA 量を解

析したところ、mRNA 量に関しても減少は見られなかった (Fig. 40)。従って 35 型 Ad ベクター感染後、細胞全体の CD46 発現量ならびに転写量は減少していないことから、細胞表面の CD46 は 35 型 Ad ベクター感染後、分解を受けずに 35 型 Ad ベクターとともに細胞内に内在化されていることが示唆された。

(3) 35 型 Ad ベクター除去後の細胞表面 CD46 発現量の回復

上述したように、CD46 は自己の細胞を補体による攻撃から守る働きを担っていることから、35 型 Ad ベクター感染により細胞表面の CD46 発現量が減少した場合でもすぐに回復することが望ましい。そこで 35 型 Ad ベクター感染後、PBMC を洗浄して 35 型 Ad ベクターを取り除いた後、CD46 発現量の回復にどの程度の時間を要するか検討した。その結果、再培養開始後徐々に CD46 発現量は回復していったが、その回復速度は 35 型 Ad ベクター感染後の発現量減少と比較すると極めて遅く、再培養開始 96 時間後においても完全に回復していなかった (非感染細胞と比較し 17% 発現量が低い) (Fig. 41)。従って、完全に細胞表面の CD46 発現量が回復するには、35 型 Ad ベクター除去後 96 時間以上必要であることが示された。

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 膵ランゲルハンス島（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

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は年々増加しており、現在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 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ほとんどないのが現状である。昨年度に、単離膵島への *in vitro* Ad ベクター導入では、 β 細胞が存在する膵島内部ではなく、 α 、 δ 細胞が存在する辺縁部のみ遺伝子発現していることが明らかとなった。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、 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することを明らかにした。しかしながら、その処理では膵島の形や生存率への影響から限界があるため、本年度は、遺伝子導入法の根本的な改善を目指した。まず、Ad の受容体である CAR が膵島に実際発現しているかをウェスタン・ブロッティングにて確認したところ、マウス単離膵島で CAR は発現していることが明らかとなった。よって、膵島辺縁部のみ遺伝子導入は、Ad ベクターの浸入に対する物理的な問題であることがより確定的になった。膵島は最も血管を豊富に含んだ臓器の一つである。膵島内をめぐっている血流や血管の密度は膵臓外分泌組織よりも約 5 倍あり、それは膵島に栄養や酸素を豊富に

供給し、速やかに代謝産物や分泌ホルモンを放出することに反映されている。そこで、この血管の利用することにより、膵島内部への遺伝子導入の効率を上げることを試みた。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、膵臓に向かう腹腔動脈より Ad ベクターを注入したところ、搭載遺伝子 GFP の発現が認められ、*in vivo* 導入は成功した。期待したように GFP 発現は膵島内部にも認められ、膵島全域で GFP 発現が認められるものもあった。実際 β 細胞に遺伝子発現しているかどうかを確認するために、膵島切片による抗インスリン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、GFP は β 細胞で発現していることが明らかとなった。この *in vivo* 血管経由 Ad ベクター導入法は膵 β 細胞の基盤研究に有効だけでなく、将来の糖尿病に向けた治療応用にも結びつくことが期待される。

D. 1.2 Ad-TAT ベクターの開発

これまでに主任研究者のグループでは、Ad ベクターの感染時の CAR 依存性を克服するためにファイバーノブに α_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挿入したベクター (Ad-RGD、Ad-K7) を開発しその遺伝子発現特性を評価してきた。本研究ではこれら改良型 Ad ベクターを用いても、遺伝子導入困難な細胞種にも効率よく遺伝子導入が可能な Ad ベクター開発を目指し、細胞内移行活性を持つ TAT ペプチドに注目し、TAT ペプチドを capsid タンパク質に挿入した Ad ベクターを作製した。

TAT ペプチドをファイバーノブの HI loop および C 末端に挿入したベクターは (Ad-TAT(HI)-L2、Ad-TAT(C)-L2)、様々な CAR 陰性細胞において従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して約 10-1000 倍高いルシフェラーゼ発現量を示した。つまり、この結果よりこれら Ad-TAT ベクターは、ファイバーノブに導入した TAT ペプチド依存的に細胞内に侵入し遺伝子発現に至っていると考えられる。

TAT ペプチドの細胞内移行メカニズムは、細胞表面のヘパラン硫酸をレセプターとするという報告もなされているが、TAT ペプチドの詳細な細胞内移行メカニズムの統一した見解はいまだ得られていない。したがって、本研究で作製した Ad-TAT の細胞内移行メカニズムは不明であるが、非常に興味深い点であり、来年度以降各種阻害剤を用いた感染阻害実験を行うことで、Ad-TAT ベクターの感染メカニズムを明らかにしていく予定である。また pIX の C 末端領域に TAT ペプチドを挿入しても遺伝子発現量の上昇は認められなかったが、pIX の C 末端領域に RGD ペプチドを挿入した場合にも同じ現象が認められる (Fig. 4)。この原因は、Ad ベクターのカプシドの中で最もファイバーが外側に位置することから、pIX に表現させた TAT ペプチドが細胞表面に作用する際、ファイバーが立体障害となっている可能性が考えられる。

以上本研究では、現存の Ad ベクターよりも優れた遺伝子導入が可能な Ad-TAT の開発に成功した。来年度以降、本ベクターの更なる有用性を評価するために Ad ベクターでは遺伝子導入が困難とされている *in vitro* における血液系の細胞や血管平滑筋細胞への遺伝子導入効率を評価するとともに、*in vivo* における遺伝子発現特性を評価していく予定である。

D. 1.3 pIX、ヘキソン改変 Ad ベクター

Ad ベクターの感染時における CAR 依存性を克服するために、これまでファイバーノブに αv インテグリンと親和性を持つ RGD ペプチドやヘパラン硫酸と親和性を持つポリリジン配列を遺伝子工学的に挿入した Ad ベクターが開発されてきた。ファイバーノブ以外の外来ペプチドの提示部位としては、pIX、ヘキソン、ペントンベースが候補として挙げられるが、外来ペプチドの提示部位としてどの部位が適しているかという検討は、ほとんどなされていない。そこで本研究では、ファイバーノブの HI loop、C 末端、pIX、ヘキソンに

RGD ペプチドを挿入したベクターを作製し、遺伝子導入効率を従来型 Ad ベクターと比較検討した。その結果、CAR 陰性細胞においてファイバーノブの HI loop や C 末端に RGD ペプチドを提示した Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2 はそれぞれ、従来型 Ad ベクターの約 230、10 倍遺伝子発現が上昇していたが、pIX やヘキソンを改変した Ad ベクター (Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(pIX/75)-L2 および Ad-RGD(hexon)-L2) では遺伝子発現の上昇は認められなかった。また我々の報告とほぼ同時期に、Campos らのグループから同様の報告がなされた。つまりファイバーノブ、pIX、ヘキソンの改変を比較した検討であるが、やはりファイバーノブが最も効率よく遺伝子発現の上昇に関与しており、pIX やヘキソンの改変では遺伝子発現の上昇はほとんど得られなかった。彼らは、その考察として、pIX やヘキソンに提示した外来分子は細胞表面のレセプターには結合できるものの、細胞内に導入した後、核までの移行段階において挙動が変わってしまい遺伝子発現に至らないのではないかと考察している。

もう一つの原因としてファイバーノブはウイルスカプシド中、最も外側に位置するため、pIX やヘキソンに提示した RGD ペプチドが細胞表面の αv インテグリンと相互作用する際にはファイバータンパク質が立体的な障害となり遺伝子発現には至らなかったのではないかと考えられる。つまり、ファイバーを欠損した Ad ベクターの pIX やヘキソンを改変した Ad ベクターが作製できれば、効率よく細胞表面のレセプターに結合でき、高い遺伝子発現が得られるのではないかと考えられる。一方で、ファイバーノブの HI loop 領域は C 末端領域よりも外側に位置するため、細胞表面の αv インテグリンと相互作用するのに適しており、その結果ファイバーノブの HI loop 領域に RGD ペプチドを挿入した場合、最も高い遺伝子発現に至ったのではないかと考えられる。

また pIX のパッケージングに関して検討した結果、リンカーを介さずに直接 pIX の C 末端に外来

ペプチドを提示した場合、少なくとも His tag、FLAG tag、RGD ペプチドの場合では pIX のパッケージングには影響しない一方で、 α -ヘリックスリンカーを介して外来ペプチドを提示する場合には、提示するペプチドの種類により、程度は異なるものの、顕著にパッケージング効率の低下が起こることが明らかとなった。また Vellinga らのグループでは、pIX の C 末端にリンカーを介して外来ペプチドを提示した Ad ベクターは、従来型 Ad ベクターや外来ペプチドを直接、pIX の C 末端に提示したベクターと比較して、熱処理に対して抵抗性が低くなっており、物理的な安定性が低下していることを報告している。つまり pIX の C 末端にリンカーを介して外来ペプチドを提示する際には注意が必要であるということが明らかとなった。

以上をまとめると、これまでのファイバー改変型 Ad ベクター作製システムに加え、pIX の C 末端やヘキサンの HVR5 領域に *in vitro* ligation を利用することで簡便に任意の外来ペプチドを挿入できるシステムを開発した。また各部位に RGD ペプチドを挿入したベクターの遺伝子発現効率を評価したところ、ファイバーノブの HI loop 領域が最も RGD ペプチドの提示部位として適していることが明らかとなった。本研究で開発したベクター作製システムは、任意の改変 Ad ベクターを簡便に作製できることから、本システムおよび今回得られた結果が今後のベクター開発をはじめとする遺伝子治療研究に貢献できることを期待している。

D. 1. 4 ファイバーレス Ad ベクター

標的組織にのみ遺伝子導入可能なベクターを開発するためには、naïve なウイルスの感染経路を抑制することと、そのベクターに特異的受容体に対して親和性を持つ分子を付与することが必要である。本研究では、ファイバーを欠損することで、ファイバー依存的な非特異的な遺伝子導入を抑制すると同時に、pIX (protein IX) やヘキソ

ンに提示した外来ペプチドが細胞表面のレセプターと結合する際の立体障害を抑制できると考え、ターゲティングベクターの基盤として、ファイバーを除去したファイバー欠損 Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-L2) を作製した。pIX やヘキソンはファイバーに比べて、圧倒的にコピー数が多く (pIX は 240 コピー、ヘキソンは 720 コピー、ファイバーは 36 コピー)、さらに pIX に関してはタンパク質サイズの大きな外来分子も提示できることが報告されていることから、Ad ベクターの感染域を制御するにあたり、pIX やヘキソンに外来分子を提示するアプローチは非常に有効であると考えられる。

ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX、ヘキソンに外来ペプチドを挿入した Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2、Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2) を作製し、ウエスタンブロットにより目的のベクターができていることを確認した (Fig. 12)。しかしながら、これらベクターは遺伝子発現が全く認められなかった。この詳細な原因は不明であるが、ファイバーを欠損することで Ad の物理的な安定性が低下していることが原因の一つとして考えられる。物理的な安定性を評価するのに熱処理後の遺伝子発現能の残存活性を指標として検討した結果、Ad/ Δ fiber-L2 は Ad-L2 と比較して、物理的に不安定であることが明らかとなった (Fig. 13)。Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2、Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 はファイバー欠損に加え、ウイルスのアセンブリーや安定性に関与する pIX や主要なカプシドタンパク質であるヘキソンを改変していることから、未修飾のファイバー欠損 Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-L2) よりもさらに安定性に乏しく、遺伝子発現活性を失っているのではないかと考えられる。また、セシウムクロライドを用いた超遠心による精製を行っていないクルードな状態の Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2、Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 は遺伝子発現活性を保持していたことから (data not shown)、ファ

ファイバーの欠損とpIXやヘキサソンの改変を同時に行うことによって超遠心に耐えうる物理的安定性を失っているのではないかと考えられる。また Ad/ Δ fiber-L2 は Ad-L2 と同等の収量が得られるが、 Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 は 100 倍以下しか得られなかったことから (data not shown)、ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキサソンの改変はウイルス粒子の形成にも影響を与えている可能性も考えられる。ファイバー欠損 Ad ベクターを基盤としたターゲティング Ad ベクターの開発には、ベクターの物理的不安定性を克服する必要がある。

最近、Shayakhmetov や Parker らから Ad ベクターの肝臓への遺伝子発現に、factor IX や X などの血液凝固因子が関与しているという報告がなされた。彼らは、血液凝固因子が Ad のファイバーノブに結合し、細胞表面のヘパラン硫酸との橋渡しをすると報告している。しかしながら、ファイバー欠損 Ad ベクターは FX 存在下において CAR の発現量に関わらず、遺伝子発現が 20-40 倍上昇した (Fig. 11)。この結果は、予想外であるが FX が Ad/ Δ fiber-L2 のヘキサソンなどの他のカプシドタンパク質に結合しているか、あるいは FX 存在下においてベクターが物理化学的に安定し、遺伝子発現の上昇に至ったのではないかと考えられる。他にも Johansson らはラクトフェリンが Ad ベクターの上皮細胞への CAR 非依存的な遺伝子導入に関与していると報告している。上記のように、*in vivo* においては CAR を介した遺伝子導入経路のみなく、FX やラクトフェリンなどの血液中の因子が Ad ベクターの遺伝子導入に関与している。本研究で作製したファイバー欠損 Ad ベクターは肝臓での遺伝子発現を顕著に抑制しているが、若干の発現が認められることから、これら因子がファイバー欠損 Ad ベクターの肝臓における遺伝子発現に関与している可能性が示唆された。今後のターゲティング Ad ベクター開発において、CAR などのレセプターとの結合性を除去す

ると同時に血液中の因子との相互作用の少ないベクターを開発することが重要な課題となるであろう。

本研究では、ターゲティング Ad ベクターの開発を目指し、そ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 vivo* において非特異的な遺伝子発現を抑制可能であることを明らかにした。pIX やヘキサソンを改変したファイバー欠損 Ad ベクターは遺伝子発現活性を失っており、ファイバー欠損 Ad ベクターを基盤としたターゲティング Ad ベクター開発には、ファイバーを欠損する際に起こる Ad の物理的安定性の低下という問題点を克服しなければならないことが明らかとなった。本研究で得られた情報は、今後のターゲティング Ad ベクター開発のための有用な情報となるであろう。

D. 1.5 癌転移におよぼす CAR の影響

現在、がんは日本の死亡原因の 1 位であり、その主要因はがん転移である。従って、がん転移メカニズムや関連分子を解明し、その特性について検討することは、より良いがん治療法の発展に貢献すると考えられる。

がんの悪性度進行に伴い発現が低下する分子として、E-cadherin などの細胞間接着分子が知られているが、CAR もそのような分子に含まれる。本研究ではがん悪性化の特性としてがん転移に着目し、CAR のがん転移における役割について検討した。その結果、CAR はがん転移抑制分子であることが明らかとなり、転移の初期段階で CAR は抗転移効果を発揮することが判明した。これらの結果は、がん治療、研究において有益な情報となりえる。

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

D. 2.1 PEG-Ad ベクターの体内動態解析

Ad ベクターは、広範な種類の細胞に増殖期・静

止期を問わず効率のよい遺伝子導入・遺伝子発現を達成できることから、遺伝子治療研究用ベクターとして最も広く用いられている。なかでも癌遺伝子治療研究に繁用されており、癌抑制遺伝子 p53、自殺遺伝子 HSVtk を発現する Ad ベクターの臨床研究が試みられ、良好な治療成績が得られている。しかし、これらのプロトコールは Ad ベクターの腫瘍組織への局所投与に限られており、癌患者の主要な死亡原因である転移癌に対しては未だ有効な遺伝子治療戦略が無いのが現状である。その原因は、Ad ベクターを全身投与した場合、①投与量の 95%以上が急速に肝臓へと集積し、遺伝子発現することで、重篤な副作用を招いてしまうこと、②Ad 感染レセプターである CAR は生体内において多くの細胞・組織に発現していることから、Ad ベクターの標的組織へのターゲティングが困難であること、③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 Ad ベクターの遺伝子発現効率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こと、などが挙げられる。したがって、癌の治療率向上を目指した今後の癌遺伝子治療研究における重要な課題は、原発巣のみならず転移巣をも治療可能とする全身投与可能な新規腫瘍標的化ベクターの開発に他ならない。

水溶性高分子である PEG などで蛋白質・粒子を化学修飾するバイオコンジュゲーションは、蛋白質・粒子の体内動態を制御し、その医薬価値を飛躍的に向上可能な最適な DDS 戦略であると認識されている。一般的にバイオコンジュゲーションした蛋白質や粒子は、抗体や貪食細胞による認識からの回避能を獲得し、血中安定性が大幅に改善されることが知られている。また、癌治療を念頭においた場合、腫瘍組織の血管構造は不完全であるため正常血管と比較して透過性が亢進しており、血中滞留性の向上した蛋白質・粒子が腫瘍組織に集積しやすい EPR 効果が発揮される。つまり、血中滞留性に優れるバイオコンジュゲート体は、全

身投与によって受動的に高い腫瘍集積性を示すこととなる。

これまでに我々は、Ad 中和抗体存在下においても遺伝子導入が可能で、かつ血中滞留性の向上によって腫瘍組織に集積しやすいという観点から、全身投与型腫瘍標的化ベクターの有望な候補として PEG-Ad ベクターの開発を進めてきた。その結果、分子量 5,000 の PEG を用いた修飾率 90% の Ad ベクターが、全身投与における血中滞留性の向上と腫瘍での遺伝子発現増強を達成できることを明らかとした。さらに昨年度の研究において、分子量 20,000 の PEG を用いた修飾率 45% の Ad ベクターが、全身投与において腫瘍での高い遺伝子発現と肝臓での遺伝子発現抑制をともに充たすベクターシステムであることを明らかとした。そこで本年度は、5K/PEG-Ad ベクターと 20K/PEG-Ad ベクターの体内動態を詳細に比較検討することで、腫瘍標的化ベクター開発に最適なバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの設計・創製に関する基礎情報の集積を図った。

未修飾 Ad ベクター、5K/PEG-Ad ベクター、あるいは 20K/PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与した際の、血中滞留性ならびに腫瘍・肝臓へのベクター粒子分布を検討した結果、20K/PEG-Ad ベクターは、未修飾 Ad ベクターおよび 5K/PEG-Ad ベクターと比較して顕著な血中滞留性の向上と、腫瘍へのベクター粒子分布の増大ならびに肝臓への粒子分布の低減が認められた。Ad ベクターの血中からの消失に最も関与しているのは、肝臓の細網内皮系 (Kupffer 細胞) による取り込みとされていることから、20K/PEG-Ad ベクターはこの機構から効率よく逃れることで血中滞留性が劇的に改善され、結果的に EPR 効果による腫瘍組織への高い集積性を発揮したものと考えられる。現在、本ベクターを全身投与する癌遺伝子治療モデル実験を進めており、有効性と安全性の評価から得られる情報を PEG-Ad ベクターの設計へとフィードバックすることで、より高度な腫瘍標的化ベクターの創製へと繋がるものと

期待している。

D. 2.2 Ad-TERT ベクターの遺伝子発現特性解析と癌自殺遺伝子治療における有用性評価

腫瘍特異的プロモーターとして知られる TERT プロモーターは、テロメラーゼの活性を担う蛋白質サブユニットである TERT の発現を制御しており、c-MYC により転写が活性化されることが知られている。一方、c-MYC は種々増殖因子により発現が制御されていることから、永久増殖能を獲得した腫瘍細胞では大半において高発現であることが知られている。一方、成人の多くの正常細胞ではほとんど細胞分裂が起きていないことから、TERT プロモーター制御下に目的遺伝子を発現させるベクターシステムを用いることにより、幅広い癌種に対して適用可能な腫瘍特異的遺伝子発現を達成し得ると考えられる。そこで我々は、原発癌のみならず全身に点在する転移癌をもターゲットとした全身投与型 Ad ベクターの開発を目指し、TERT プロモーターを用いた遺伝子発現制御によるアプローチの有用性評価に取り組んだ。

Ad-CMV/Luc および Ad-TERT/Luc の遺伝子発現特性の比較から、TERT プロモーターが腫瘍細胞選択的な遺伝子発現活性を示すことが確認され、Ad-TERT ベクターが正常組織（特に肝臓）での遺伝子発現に起因する副作用の抑制に有効な全身投与型ベクターになりうると予想された。そこで、Ad-TERT/HSVtk の全身投与による癌自殺遺伝子治療の原発癌ならびに転移癌に対する有効性を検討した。その結果、Ad-CMV/HSVtk は全身投与において治療域が全く存在しなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk 処置群では原発癌モデルならびに転移癌モデルの両系で抗腫瘍効果が認められた。特に、Ad-TERT/HSVtk を用いた本治療システムが転移癌にも有効であったことは、これまでの癌遺伝子治療プロトコルの限界を打破する非常に意義深い知見であり、我々の全身投与型腫瘍標的化ベクターというコンセプトが癌遺伝子治療の新たな可能性を切り拓くベクター開発戦略であ

ることを示唆している。一方、今回治療効果が発揮された 2×10^{11} VP/mouse での Ad-TERT/HSVtk 全身投与においては、突然死こそ観察されなかったものの、コントロール群と比較してマウスに若干の体重減少が認められるとともに、ベクター投与後 7 日目において血中 GOT・GPT 量の増大という副作用が発現した。この副作用発現の詳細なメカニズムについては今後の検討を要するが、前述した 2×10^{11} VP/mouse で Ad-TERT/Luc を全身投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布の解析結果を考え合わせると、肝臓における治療遺伝子（HSVtk）の発現誘導よりも、むしろ肝臓に集積したベクター粒子量の増大に起因しているのではないかと考えている。

D. 2.3 PEG 修飾 Ad-TERT ベクターの作製とその *in vivo* 遺伝子導入特性の解析

Ad-TERT ベクターを用いた自殺遺伝子治療の有効性を維持しつつ副作用発現の抑制を目指すには、Ad-TERT ベクターに PEG 修飾を施すことによって、全身投与後の肝集積性を低下させるアプローチが効果的であろうと考えた。そこで、Ad-TERT ベクターに対して分子量 5,000 の PEG 修飾を適用することにより、Ad ベクターの遺伝子発現制御と体内動態制御の融合を図り、上記問題点を克服した新規ベクターシステムの開発を試みた。様々な修飾率の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を用いて、全身投与後の腫瘍ならびに肝臓における遺伝子発現活性を比較した結果、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc が腫瘍での高い遺伝子発現レベルを維持したまま、肝臓での遺伝子発現を著しく低減させることを見出した。また、併せて行ったベクター粒子分布解析において、5K/PEG-Ad-TERT/Luc と 5K/PEG-Ad-CMV/Luc の肝集積量に大きな差は認められなかった。したがって、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT ベクターの全身投与における肝臓での遺伝子発現抑制効果は、PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御が相乗的に機能した結

果であろうと推察された。現在、治療遺伝子として HSVtk 遺伝子あるいは TNF α 遺伝子を搭載した 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、癌遺伝子治療モデルにおける本アプローチの有効性ならびに安全性を評価している。

本検討では腫瘍選択的プロモーターのモデルとして広範な癌種に適用可能な TERT プロモーターを選択したが、メラノーマ特異的なチロシナーゼプロモーターをはじめとして、より腫瘍特異性に優れたプロモーターは多数知られている。したがって、標的腫瘍で特異的に作動するプロモーターが明らかである場合は、さらに腫瘍特異性を向上可能であり、より安全で効率的な癌遺伝子治療が達成できるものと考えられる。また、我々は現在、任意のターゲティングリガンドを PEG 鎖先端に付与可能とするシステム構築を図っており、これにより腫瘍組織への移行性を一層向上させ、より有効性・安全性に優れた全身投与型腫瘍標的化ベクターが構築できるものと期待される。

D. 2. 4 化学修飾化 Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

細胞膜移行活性を有する Protein Transduction Domain (PTD) は、蛋白質との複合体・融合体として用いることで効率よく蛋白質を細胞内に導入できることから、近年 DDS 研究領域での注目が高まっている。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 の中で最も細胞内移行活性に優れているとされている Tat ペプチドを Ad ベクター表面に結合させた Tat-Ad ベクターを開発し、既存の Ad ベクターと比較して優れた遺伝子導入効率を発揮できることを明らかにしてきた。そこで本年度は、Tat-Ad ベクターのさらなる有用性評価ならびに基礎情報の集積を図るために、種々条件下における遺伝子導入・発現特性の検討を試みた。

Tat-Ad ベクターの遺伝子発現活性に最適な作製条件 (Tat ペプチド結合量) を検討した結果、修飾条件 1:12.5~25 (=リジン残基 : Tat ペプチ

ド) で調製した Tat-Ad ベクターが優れた遺伝子導入効率を示すことが判明した。また、未修飾 Ad ベクターと Tat ペプチドを単に混合しただけでは、未修飾 Ad ベクター単独の場合とほぼ同等の遺伝子導入活性しか示さなかったことから、Tat ペプチドをベクター表面に結合させることが遺伝子導入活性の増強に不可欠であることが明らかとなった。今後、Tat-Ad ベクターの細胞内への移行メカニズムに関しては、各種阻害剤を共存させた遺伝子導入実験によって検討していく予定である。

さらに、Tat-Ad ベクターの様々な細胞に対する遺伝子導入活性を評価した結果、接着性かつ CAR 高発現の細胞種では従来の Ad ベクターと同等であり、接着性で CAR 低発現の細胞に対しては従来の Ad ベクターより数百倍高い遺伝子導入活性を達成した。一方、血球系の浮遊細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子導入活性は、従来の Ad ベクターと比較して最大でも 10 倍程度の増強を認めたのみであり、接着細胞に対して示した優位性と比較すると期待を裏切る結果であった。我々はこの結果について、血球系細胞自身の遺伝子発現活性や接着細胞との細胞内構造の違いに原因があると考えており、今後 Tat-Ad ベクターの細胞内動態を検討することで明らかにしていく予定である。

Tat-Ad ベクターの遺伝子導入機序や特性についてはさらなる検討を必要とするものの、従来の Ad ベクターでは遺伝子導入が困難とされてきた細胞にも遺伝子導入できる幅広い標的細胞域は、Tat-Ad ベクターが今後の生命科学基礎研究ならびに遺伝子治療研究の発展に貢献するベクターシステムとなりうることを十分に期待させる。

D. 3 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

D. 3. 1 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

従来の遺伝子治療や遺伝子導入による実験系は、多くの場合、目的（治療用）遺伝子の過剰発現に基づいたものであった。一方近年、21-29塩基長のsiRNAによって配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制するRNAiが注目されており、目的遺伝子の発現を抑制することによって、治療や遺伝子の機能解析を行う研究が盛んに行われている。RNAiによる標的遺伝子の特異的な発現抑制は、合成siRNAを用いる方法と、siRNAを発現するベクターに大別されるが、これら合成siRNAやsiRNAを発現するベクターをいかに目的の細胞に導入するかというデリバリーの問題が、RNAiを利用した研究を行う上で大きな課題のひとつとなっている。

合成siRNAのデリバリーは、リポソームなどのトランスフェクション試薬を用いる方法が一般的である。一方、U6やH1、tRNAなどのRNAポリメラーゼIII系のプロモーターにヘアピン型RNA（short hairpin RNA: shRNA）を発現するベクター（siRNA[shRNA]発現ベクター）は、プラスミドベクターやウイルスベクターに搭載して利用することができる。プラスミドベクター（非ウイルスベクター）を用いて遺伝子導入する場合には、遺伝子導入効率に関わる問題があるため（遺伝子導入効率が低いため）、遺伝子導入された細胞を、薬剤耐性遺伝子やGFP遺伝子を用いて選択しなければ、細胞集団全体としての遺伝子発現抑制効果は観察されないことが多い。一方、ウイルスベクターを用いた場合は、多くの細胞種で100%に近い遺伝子導入効率が期待できるため、遺伝子導入細胞を選択する必要がなく、効率良く遺伝子の機能阻害研究を行うことができる。

ウイルスベクターを用いたRNAi研究には、レトロ・レンチ・Adベクターが汎用されている。Adベクターは高タイター（レトロ・レンチウイルスベクターに比べ1000倍以上の収量が得られる）のウイルス液の調製が容易であり、動物個体への遺伝子導入に適していること、我々のグループから様々なタイプの改良型ベクターが開発されて

いることから、RNAiによる遺伝子機能解析のための基盤技術として極めて優れている。

本研究で開発した簡便なsiRNA発現Adベクター作製法を用いれば（例えばキット化された場合を想定すれば）、ユーザーは標的遺伝子に対するshRNAコード合成オリゴDNA（通常外注する）をベクタープラスミドにライゲーションし、293細胞にトランスフェクションするだけでsiRNA発現Adベクターの作製が可能となり、極めて簡便性が高い。また、siRNA発現Adベクターライブラリーの作製も容易になるため、創薬ターゲット遺伝子検索のための基盤技術の開発に応用可能であり、極めて汎用性が高いと考えられる。

D. 4 35型Adベクターの特性評価

D. 4.1 35型Adベクターによる細胞表面CD46発現量の減少

病原体の感染機構ならびに感染後の細胞応答を明らかにすることは、病原体の感染域・病原性など、その特性を明らかにするうえで極めて重要である。これまでCD46を受容体とする病原体が幾つか報告されてきたが、これらの病原体は細胞感染後、特異的な反応を引き起こすことが報告されている。しかしながら、CD46を受容体とする subgroup B Ad に関しては感染後の細胞応答についてほとんど何も報告されていない。そこで本研究では、他のCD46を受容体とする病原体と同様に35型Adベクター感染によっても、細胞表面のCD46発現量が減少するのではないかと推察し検討を行った。

感染によるCD46細胞表面発現量減少については、麻疹ウイルスに関して多くの報告がなされている。麻疹ウイルスによるCD46発現量減少と35型Adベクターによる発現量減少については、両ウイルスともに感染後、細胞表面のCD46発現量は減少するが、細胞全体のCD46発現量は減少しないという点で共通している。麻疹ウイルスのCD46結合部位であるヘマグルチニンと35型Ad

の CD46 結合部位であるファイバーノブは、ともに CD46 の SCR1 および 2 に結合することが明らかになっており、両ウイルスは同じ機構で CD46 発現量減少を引き起こしているのかもしれない。

しかしながら一方で、35 型 Ad は nonleukemia 細胞 (A549、HeLa、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞) においては CD46 発現量減少を誘導しなかったのに対し、麻疹ウイルスは nonleukemia 細胞においても CD46 発現量減少を引き起こすことが報告されている。これらの細胞においては、両ウイルスの感染機構に何らかの違いがあるのかもしれない。また、35 型 Ad ベクターによる CD46 発現量減少は麻疹ウイルスによるものと比較すると効率が低い。これは麻疹ウイルスの場合、感染細胞で新たに合成され細胞表面に発現したヘマグルチニンが他の細胞と接触することにより、接触した細胞の CD46 発現量も減少させているが、本研究で用いた 35 型 Ad ベクターは自己複製に必須の領域である E1 領域を欠損させているため、感染細胞においてウイルスタンパクが新たに合成されることはほとんどない。そのため、35 型 Ad ベクターによる CD46 発現量減少は麻疹ウイルスと比較し効率が悪いものと思われる。

また同じく CD46 を受容体とする淋菌では、CD46 に結合後 CD46 を切断することにより細胞表面の CD46 発現量を減少させることが報告されている。そのため、細胞全体の CD46 発現量が感染により減少するとともに、培養上清に可溶化した CD46 が検出されている。しかしながら、35 型 Ad ベクターでは感染後、細胞全体の CD46 量に大きな変化が見られないことから、淋菌のような CD46 の切断は起こっていないものと思われる。

今回、35 型 Ad ベクター感染により減少した CD46 発現量はベクター除去 96 時間後においても回復していなかった。CD46 は 1 時間で新たに合成・成熟化することが報告されている。35 型 Ad ベクターでは感染後、細胞表面の CD46 発現量は減少しているが細胞全体の CD46 発現量は減少していないことから、新規に合成された CD46 が細胞のどこに局

在しているのか疑問が残る。これに関しては更なる検討を要するものと思われる

E. 結論

1. 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

1) 腹腔動脈から Ad ベクターを *in vivo* 投与し、その後膵島を初代培養することで、膵島内部の細胞 (β 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。

2) 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 ペプチドを提示することで、これまで開発された RGD 配列やポリリジン配列をファイバーノブに持つ改良型 Ad ベクターよりも高い遺伝子発現を達成できることを明らかにした。

3) 遺伝子導入効率の向上を目指し、pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターを作製したが、少なくとも RGD ペプチドを用いる場合には、ファイバーノブの HI loop に提示させるのが最も効果的であることが明らかとなった。

4) 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 vivo*、*in vivo*において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。

5) 16 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

1) 分子量 20,000 の PEG を用いた修飾率 45% の PEG-Ad ベクターは、血中滞留性の飛躍的な向上と肝集積性の低減により、腫瘍への優れた受動的ターゲティング能を示すことを明らかとした。

2) Ad-TERT ベクターの腫瘍選択的遺伝子発現能を確認すると共に、全身投与における原発癌ならび

に転移癌に対する治療域を拡大し得ることを明らかとした。

3) PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御を融合することで、腫瘍での高い遺伝子発現を示しつつ、肝臓での遺伝子発現を著しく抑制可能な優れた遺伝子発現パターンを示す新規ベクターの開発に成功した。

4) 化学修飾化 Tat-Ad ベクターの遺伝子導入特性ならびに遺伝子発現特性の一端を解明すると共に、本ベクターが広範な細胞種に対して応用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

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

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が明らかとなった。一方で、CD46 mRNA 量および細胞全体の CD46 発現量が減少していないことを考慮すると、細胞表面の CD46 が 35 型 Ad ベクターとともに内在化され、細胞内で分解を受けずに滞留していることが推察された。また、一旦減少した細胞表面の CD46 発現量は 35 型 Ad ベクター除去後も回復に多くの時間を要した。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ろう。

F. 健康危険情報

該当事項なし