

Fig. 14. Effect of CAR expression on lung metastasis. B16, B16CAR or B16neo cells (1.5×10^5) were injected into the tail vein of mice. After 14 days, the mice were sacrificed, their lungs were fixed, and the colonies on the lung surface were counted. The values close to the *horizontal bars* indicate the average numbers of colonies per lung. $P < 0.0001$ ($n = 7$).

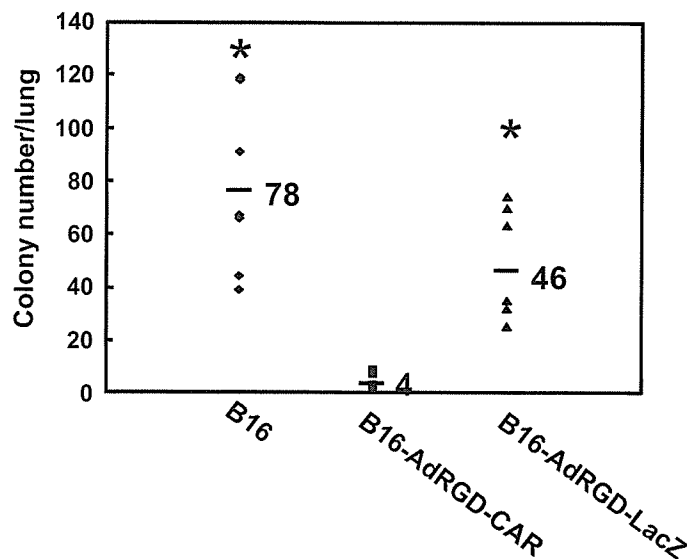


Fig. 15. Effect of transient CAR expression on lung metastasis. B16 cells were transduced with AdRGD-CAR or AdRGD-LacZ at 1000 VP/cell. Two days later, the cells (1.5×10^5) were injected into the tail vein of mice. After 14 days, the mice were sacrificed, their lungs were fixed, and the colonies on the lung surface were counted. The values close to the *horizontal bars* indicate average of colonies per lung. *, $P < 0.0001$ ($n = 7$) compared with B16-AdRGD-CAR cells.

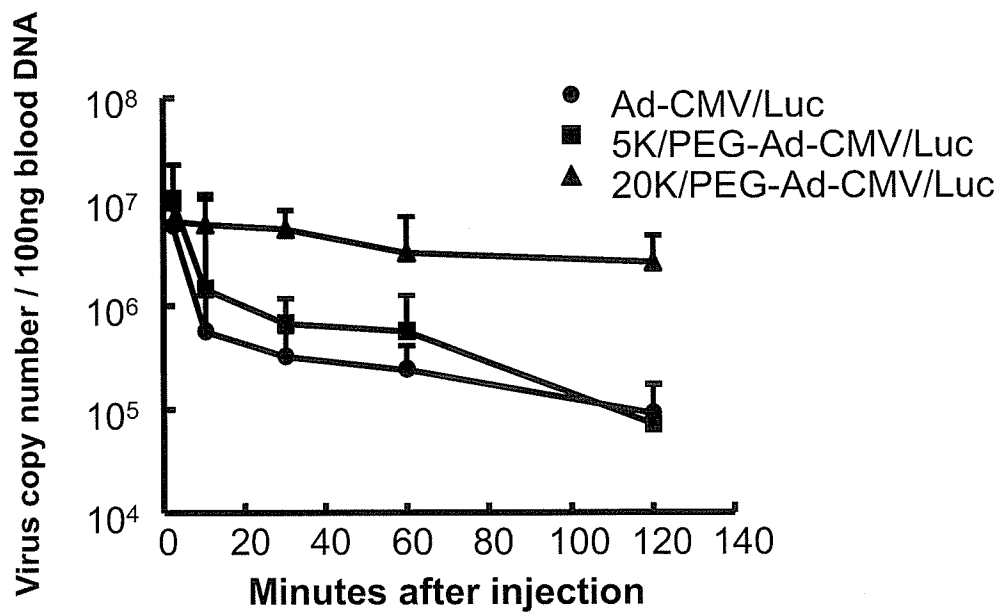


Fig. 16. Pharmacokinetics of PEG-Ads after i.v. injection. BALB/c mice were injected intravenously with unmodified Ad-CMV/Luc, 5K/PEG-Ad-CMV/Luc, or 20K/PEG-Ad-CMV/Luc at 10^{10} VP/mouse. The concentration of Ad in the blood at the indicated time points was determined by real-time quantitative PCR. Data are presented as means \pm S.D. (n = 6).

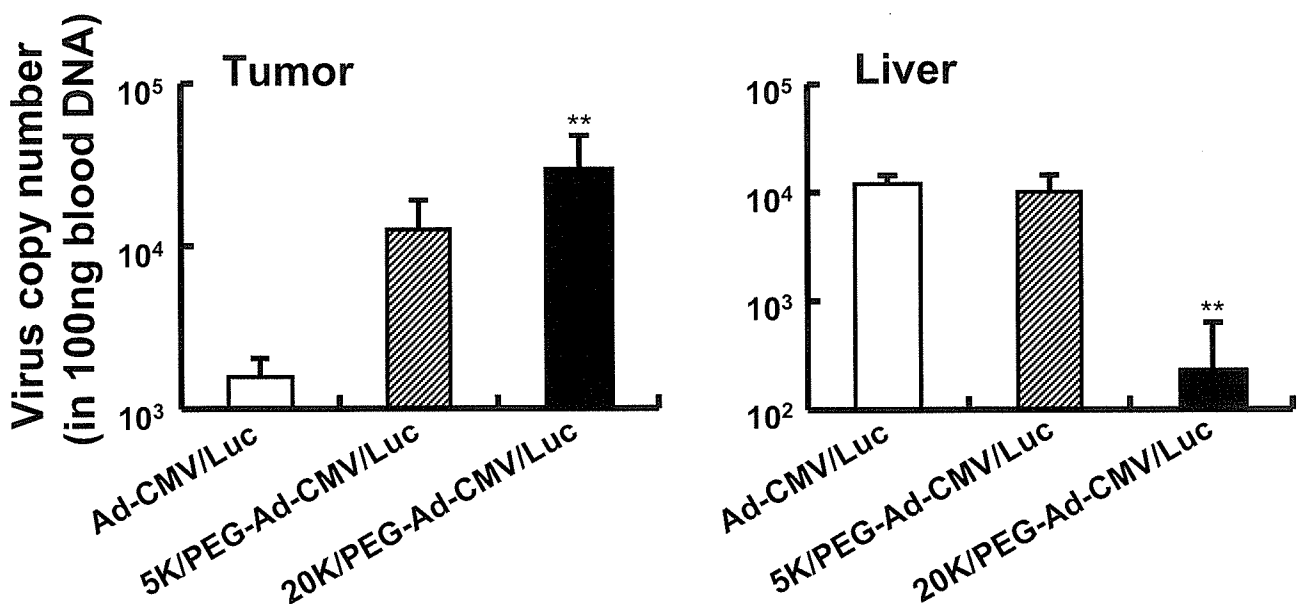


Fig. 17. Tissue distribution of PEG-Ads after i.v. injection. Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with 10^{10} particles of unmodified Ad-CMV/Luc or PEG-Ad-CMV/Luc. Six hours after the injection, the tumor and liver tissues were harvested and DNA extracted. The number of viral genomes in each sample was measured by real-time quantitative PCR. Data are presented as means \pm S.D. (n = 4-6; **, P < 0.01 compared with value for unmodified Ad).

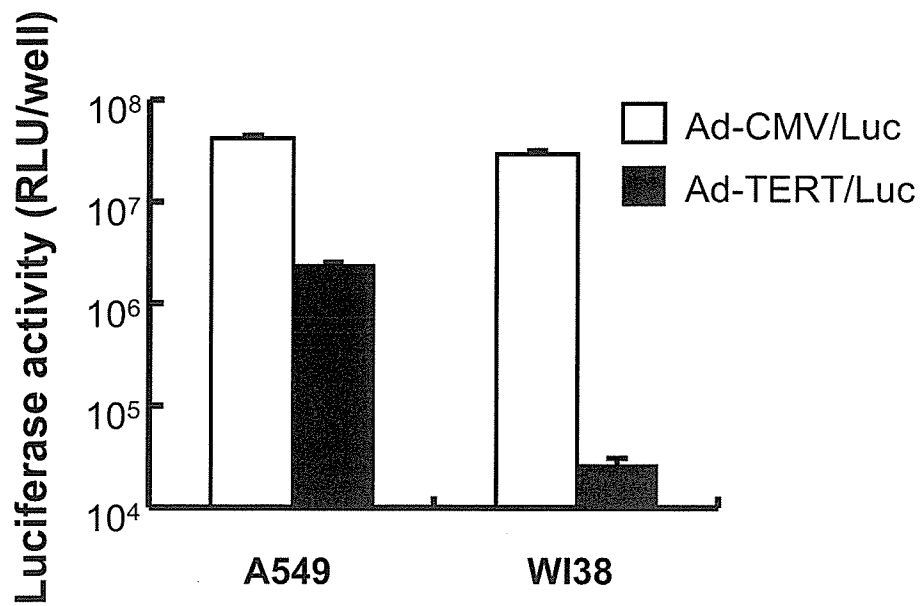


Fig. 18. Transduction efficiency of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc into tumor cells or normal cells. A549 tumor cells (2×10^4 cells) and WI38 normal cells (2×10^4 cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad-CMV/Luc or Ad-TERT/Luc. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3$). RLU, relative light units.

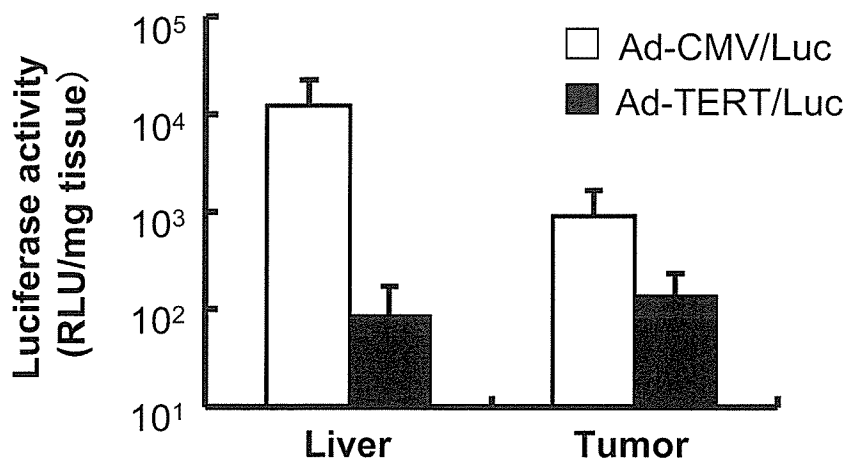


Fig. 19. The gene expression of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc in liver and tumor. Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with 10^{10} particles of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc. After 48 h, liver and tumor tissues were harvested and luciferase activity was measured. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 6$). RLU, relative light units.

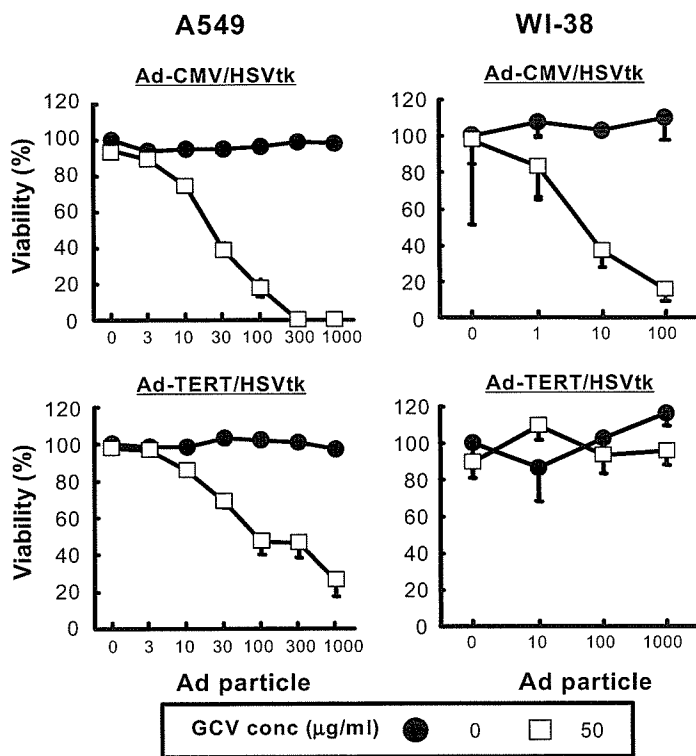


Fig. 20. Selective cytotoxicity of Ad-TERT/HSVtk in cancer cells but not in normal cells. Tumor A549 cells and normal WI38 cells were transduced with Ad-CMV/HSVtk and Ad-TERT/HSVtk at indicated virus particle. After 2h, these cells were cultured with media containing GCV. Four days later, cell viability was measured by WST-1 assay. Data represent as a percent of viability of cells that were treated without Ad nor GCV. Data are presented as means \pm S.D. (n = 6).

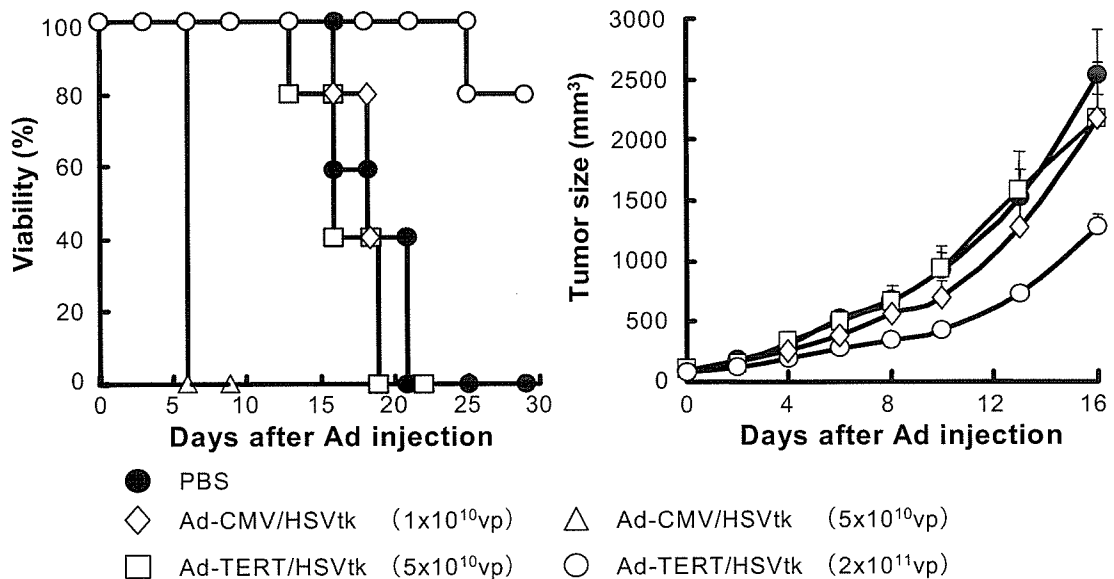


Fig. 21. Therapeutic effect in primary tumor models treated with intravenous injection of Ad-TERT/HSVtk or Ad-CMV/HSVtk. Established Meth-A primary tumors-bearing BALB/c mice were i.v. injected with PBS, Ad-CMV/HSVtk or Ad-TERT/HSVtk. Then the mice received daily injections of GCV (50 mg/kg) intraperitoneally for 10 days. Tumor size and survival were monitored. Data are presented as means \pm S.E. (n = 5). Mice were euthanized when tumor volume was greater than 4000 mm³.

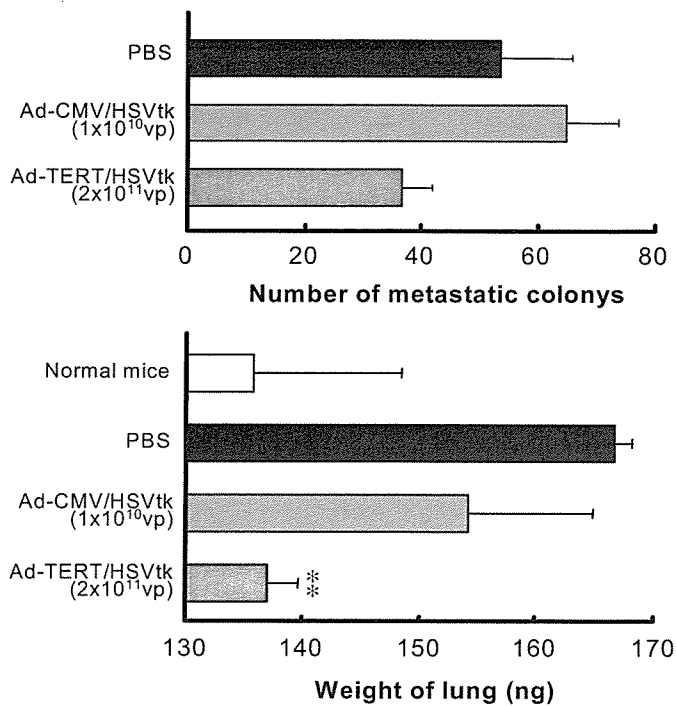


Fig. 22. Therapeutic effect in metastasis models treated with intravenous injection of Ad-TERT/HSVtk or Ad-CMV/HSVtk. Established metastasis-bearing BALB/c mice were i.v. injected with PBS, Ad-CMV/HSVtk (1×10^{10} VP) and Ad-TERT/HSVtk (2×10^{11} VP) on day 7 after CT26 inoculation. Then these mice were i.p. injected with GCV once daily for 7 days. Lungs were harvest on day 14 after CT26 inoculation. The number of metastasis colonies and lung weights were measured. Data represent the mean \pm S.D. (n = 4; **, P < 0.01 compared with value for PBS).

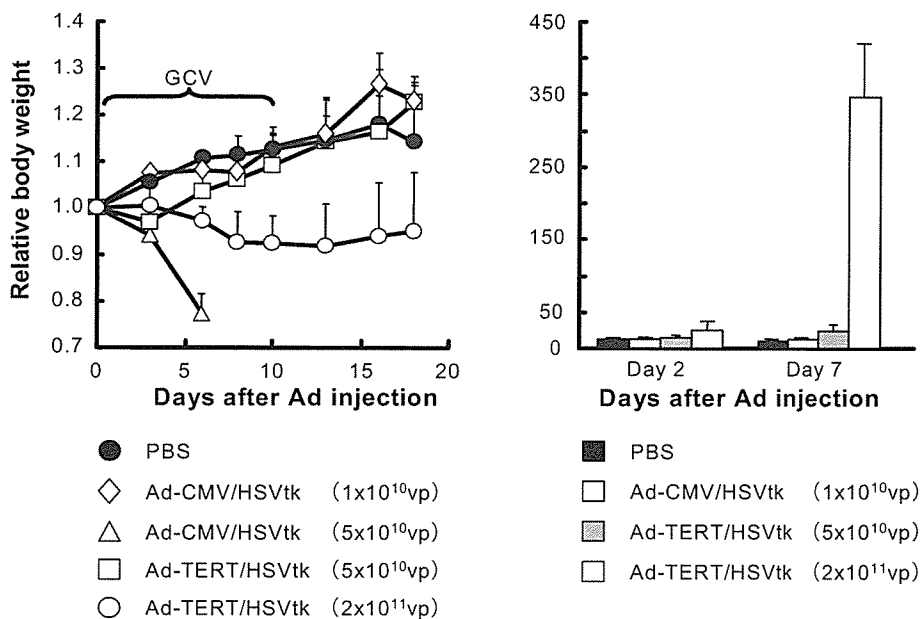


Fig. 23. Side effect of treatment via intravenous injection of Ad-TERT/HSVtk and GCV in primary tumor model. Established Meth-A primary tumors-bearing BALB/c mice were i.v. injected with PBS, Ad-CMV/HSVtk or Ad-TERT/HSVtk. Then the mice received daily injections of GCV (50 mg/kg) intraperitoneally for 10 days. Body weights and GPT activity in blood were monitored with time. Data are presented as means \pm S.D. (n = 5).

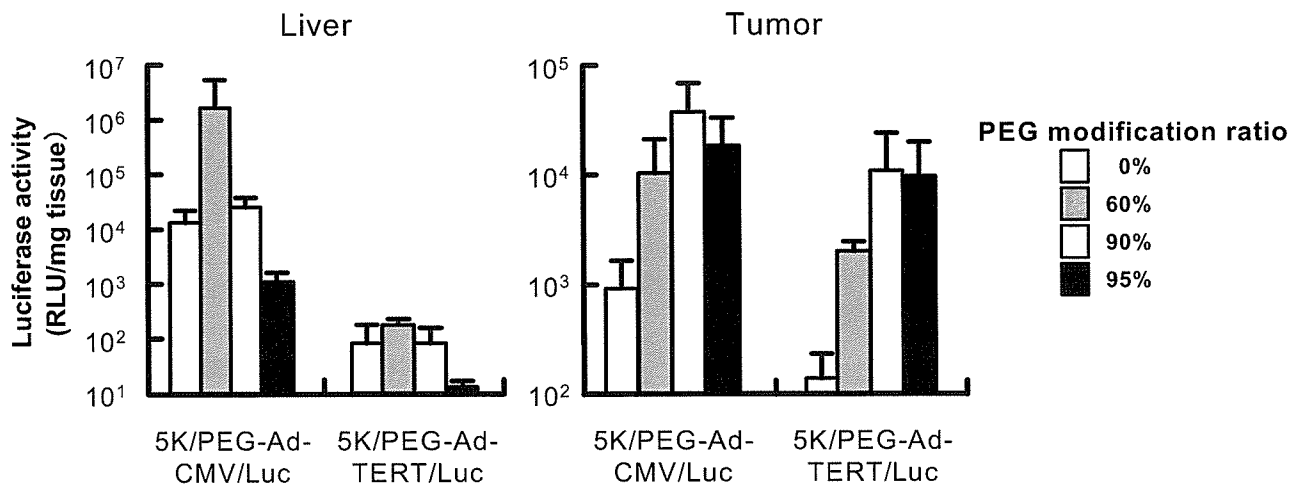


Fig. 24. The gene expression of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc in liver and tumor. Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with 10^{10} particles of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc with indicated PEG modification ratio. After 48 h, liver and tumor tissues were harvested and luciferase activity was measured. Data are presented as means \pm S.D. (n = 6). RLU, relative light units.

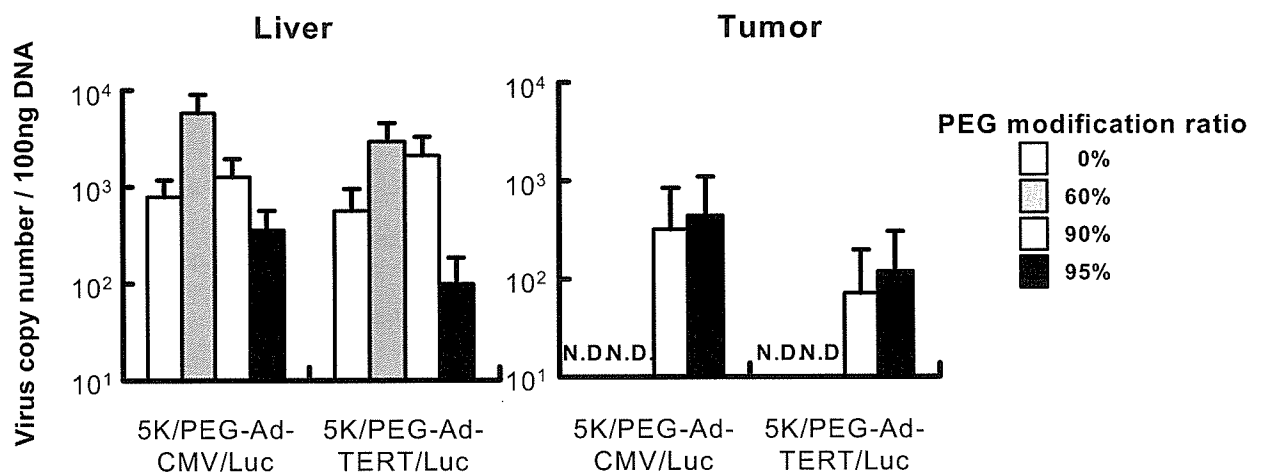


Fig. 25. Tissue distribution of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc. Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with 10^{10} particles of unmodified Ad or each PEG-Ads with indicated PEG modification ratio. After 48 h, the tumor and liver tissues were harvested and DNA extracted. The number of viral genomes in each sample was measured by real-time quantitative PCR. Data are presented as means \pm S.D. (n = 5-6).

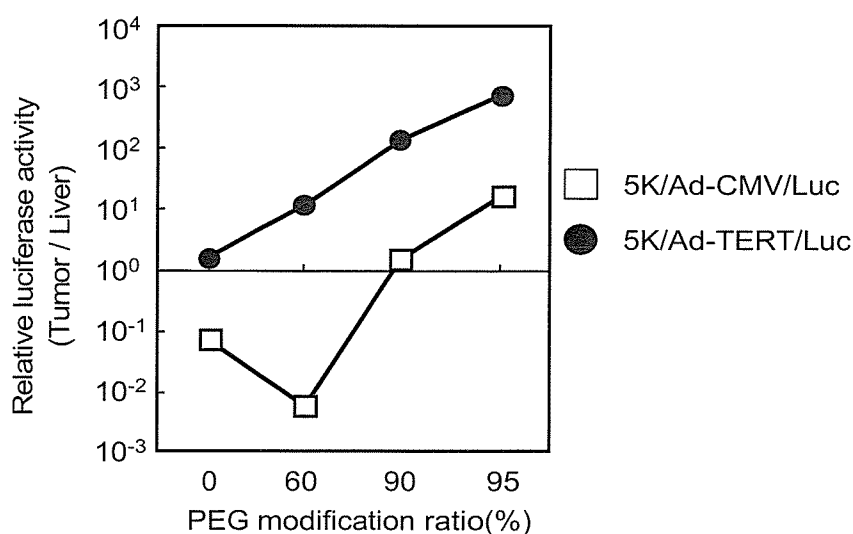


Fig. 26. Ratio of Luciferase activity (Tumor / Liver). Ratio of luciferase activity was calculated as: Luciferase activity in tumor (RLU / mg tumor) / luciferase activity in liver (RLU / mg liver) at each modification ratio.

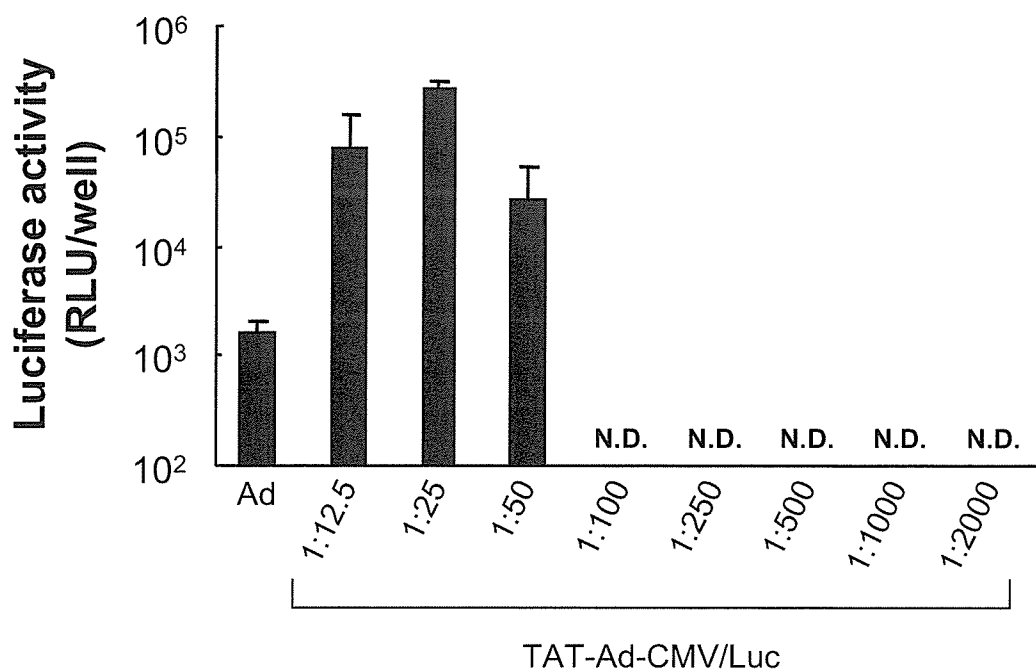


Fig. 27. Transduction efficiency of Tat-Ad with various modification ratio. B16BL6 cells (1×10^4 cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad or each Tat-Ads encoding the luciferase gene. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each bar represents the mean \pm S.D. (n = 4). (Tat-Ad, virus lysine residue:Tat peptide= 1:12.5 (mole:mole), 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000).

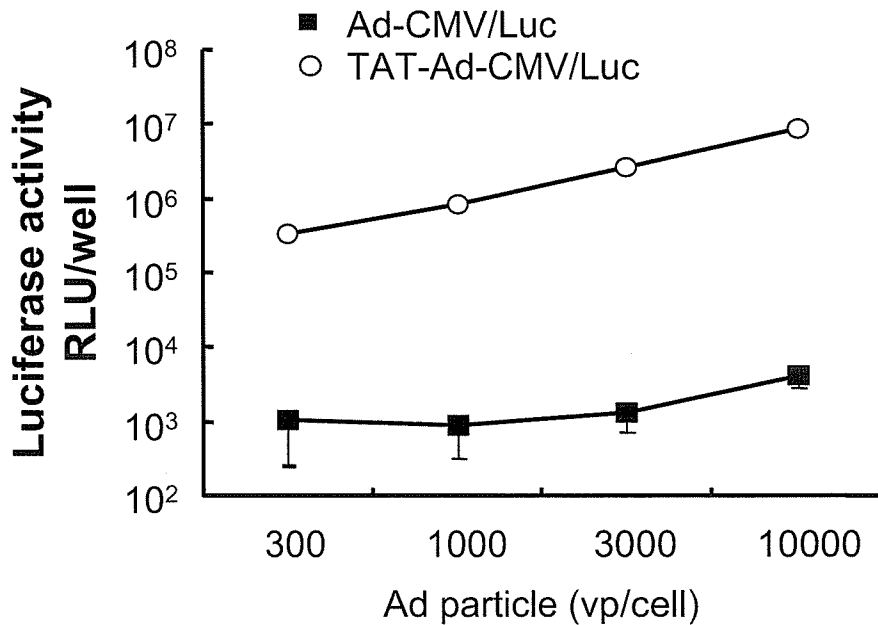


Fig. 28. Transduction efficiency of Tat-Ad into B16BL6 cells. B16BL6 cells (1×10^4 cells) were transduced with 300, 1000, 3,000 or 10,000 particles/cell of Ad-CMV/Luc or each Tat-Ad-CMV/Luc encoding the luciferase gene. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each bar represents the mean \pm S.D. (n = 4).

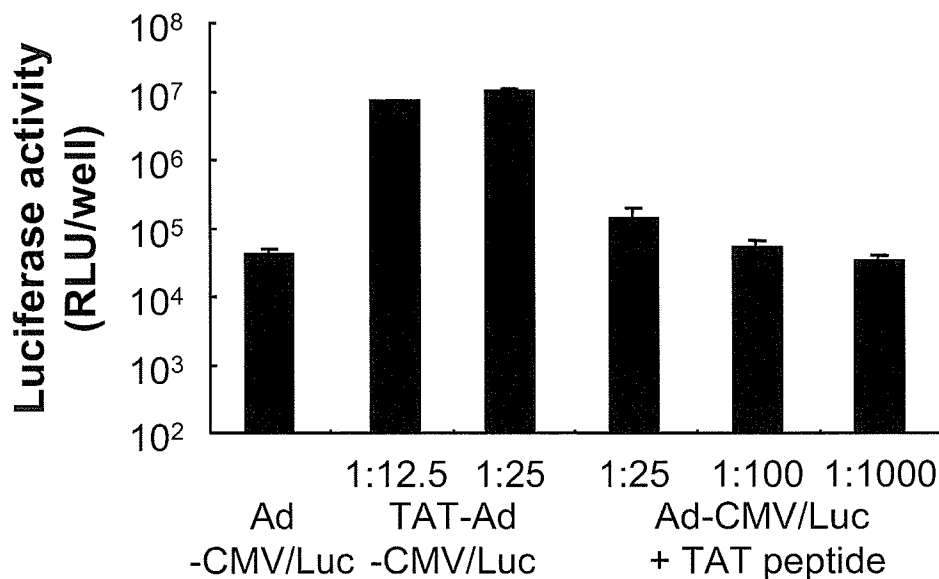


Fig. 29. Transduction efficiency of Ad, TAT-Ad or Ad with TAT peptide. B16BL6 cells (1×10^4 cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad/CMV-Luc, TAT-Ad-CMV/Luc or Ad-CMV/Luc with TAT peptide. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 4). (TAT-Ad; virus lysine residue:TAT peptide= 1:12.5 (mole:mole), 1:25), (TAT peptide; virus lysine residue:TAT peptide= 1:25, 1:100, 1:1000).

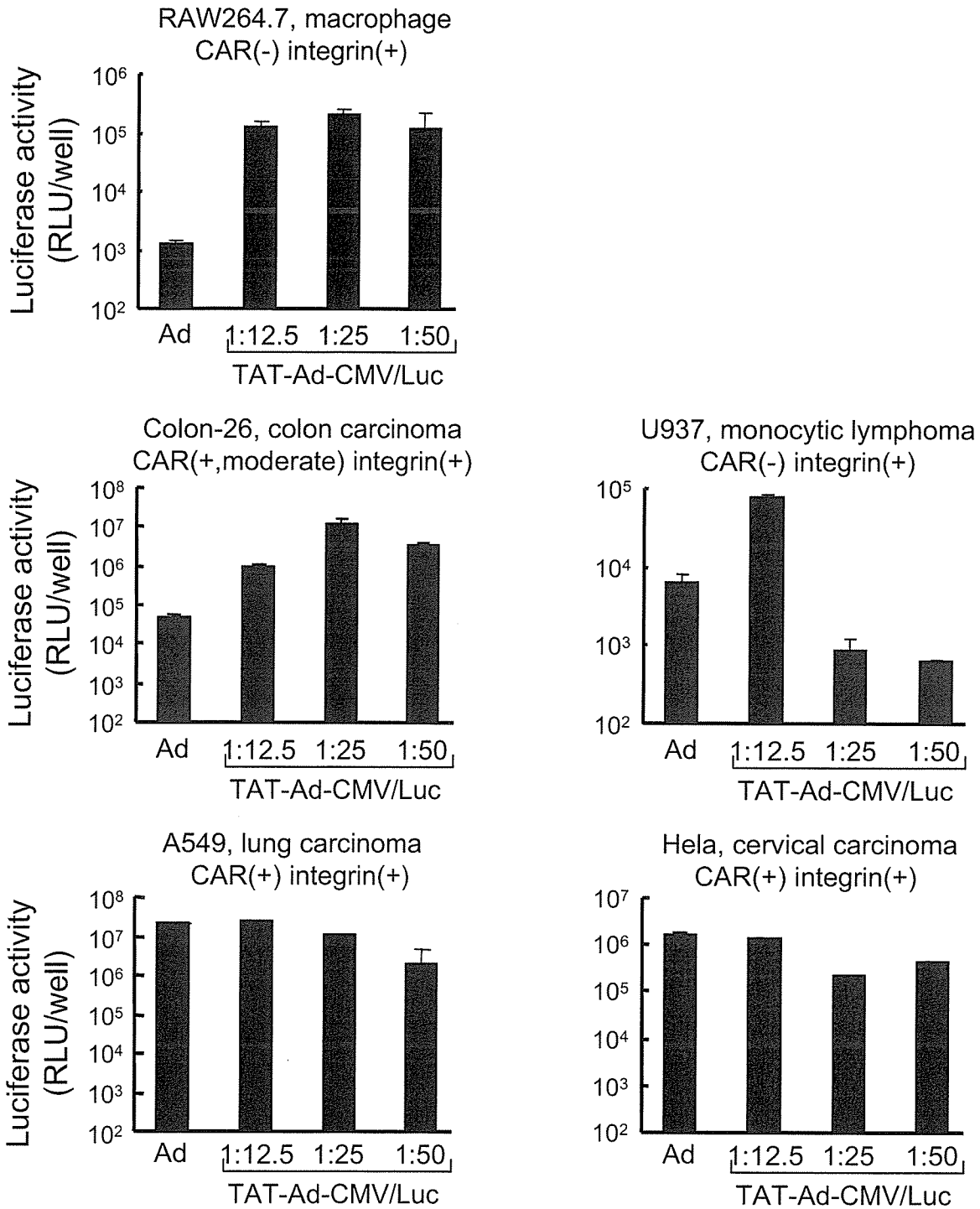
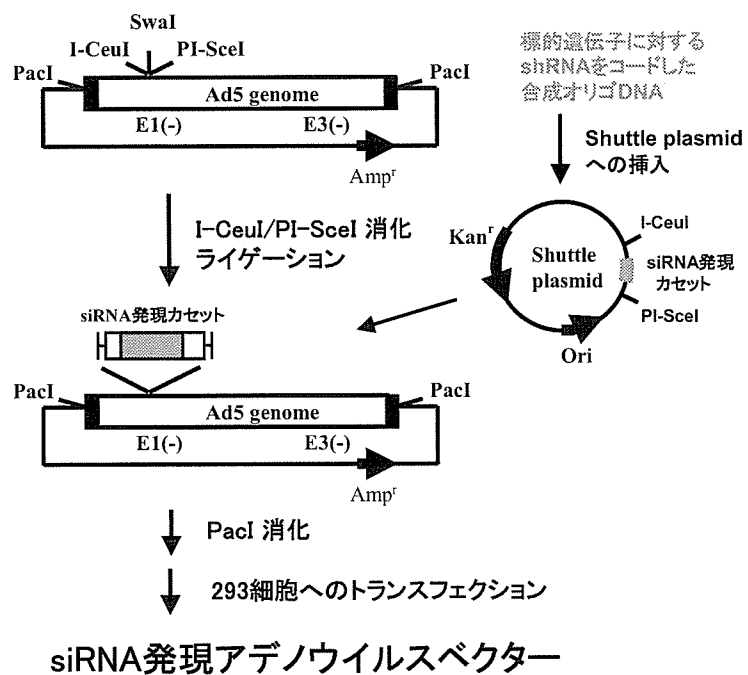


Fig. 30. Transduction efficiency of Tat-Ad into various cells. RAW264.7 cells, CT26 cells, U937 cells, A549 cells and HeLa cells (1×10^4 cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad-CMV/Luc or each Tat-Ad-CMV/Luc encoding the luciferase gene. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each bar represents the mean \pm S.D. (n = 4).

(A) 従来のin vitroライゲーションに基づくベクター作製法



(B) 直接クローニングによるベクター作製法

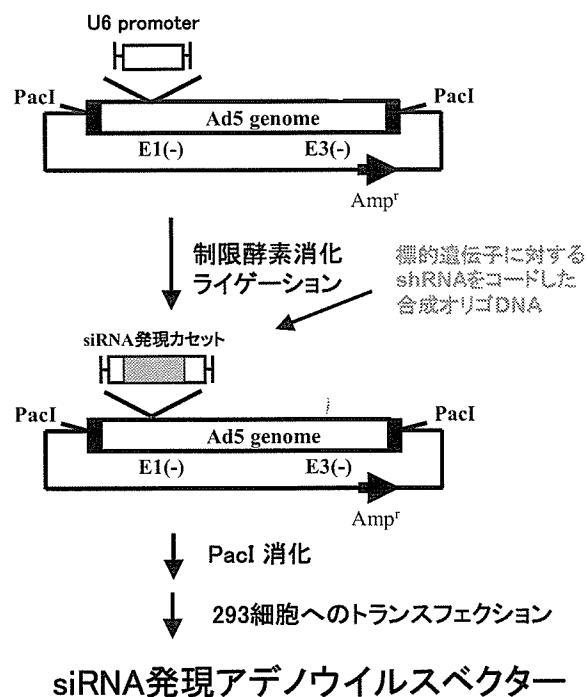


Fig. 31. ベクタープラスミドへの直接クローニングによる迅速なsiRNA発現アデノウイルスベクター作製法
(A) 従来のin vitroライゲーションに基づくベクター作製法、(B)直接クローニングによるベクター作製法

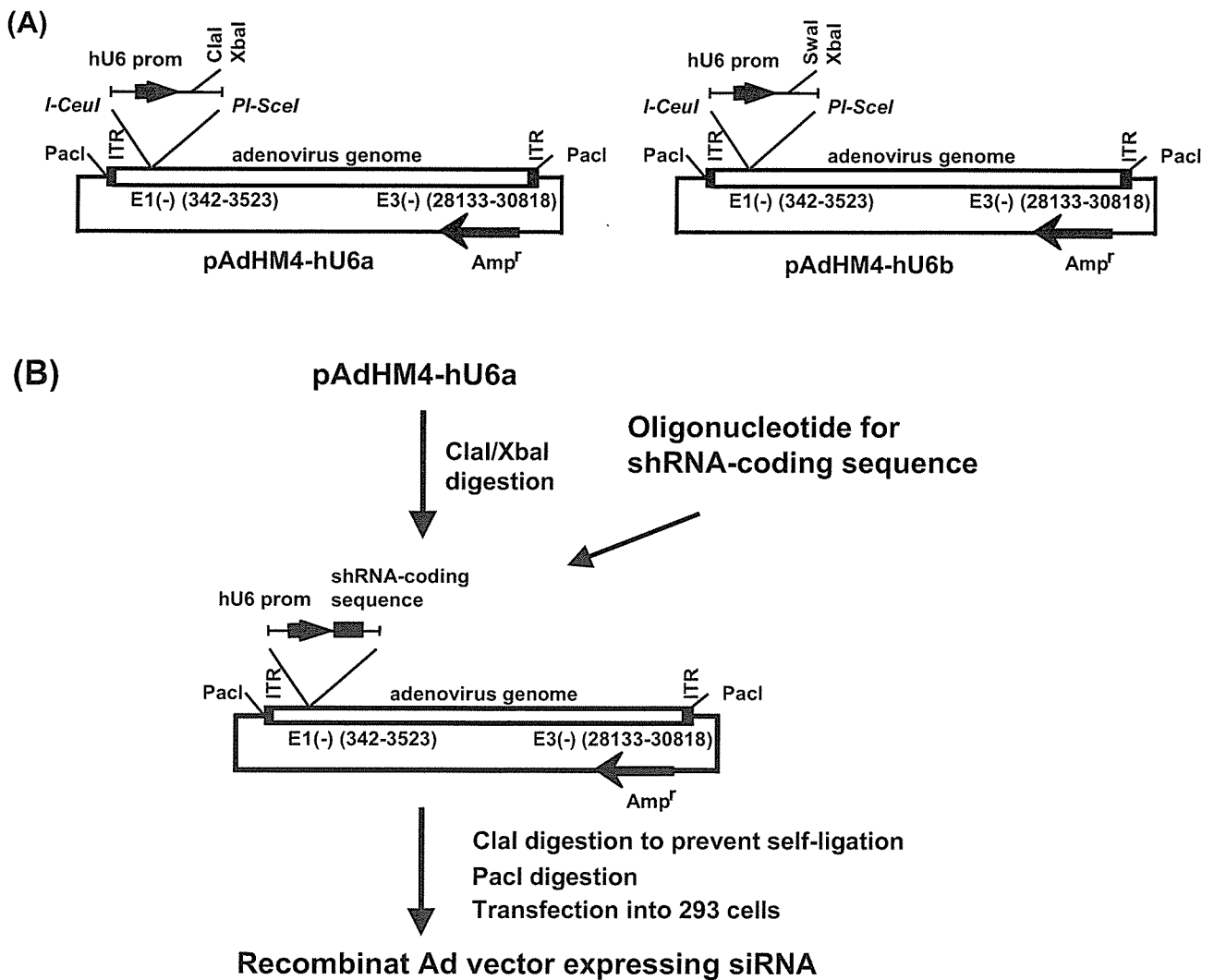


Fig. 32. The vector plasmids and the construction strategy for the Ad vectors expressing siRNA.

(A) The vector plasmids, pAdHM4-hU6a and -hU6b. pAdHM4-hU6a contains a unique ClaI site at the transcription start site of the hU6 promoter sequence and an XbaI site downstream from the promoter sequence. pAdHM4-hU6b contains a unique the SwaI site at the transcription start site of the hU6 promoter sequence and an XbaI site downstream from the promoter sequence.

(B) The construction strategy for the Ad vector expressing siRNA. pAdHM4-hU6a was digested with ClaI/XbaI and ligated with oligonucleotides for the shRNA-coding sequence. Ligation products were then digested with ClaI to prevent the generation of non-recombinant parental plasmid. The resulting plasmid was linearized by digestion with PacI and transfected into 293 cells, generating recombinant Ad vectors expressing siRNA. pAdHM4-hU6b are similarly used.

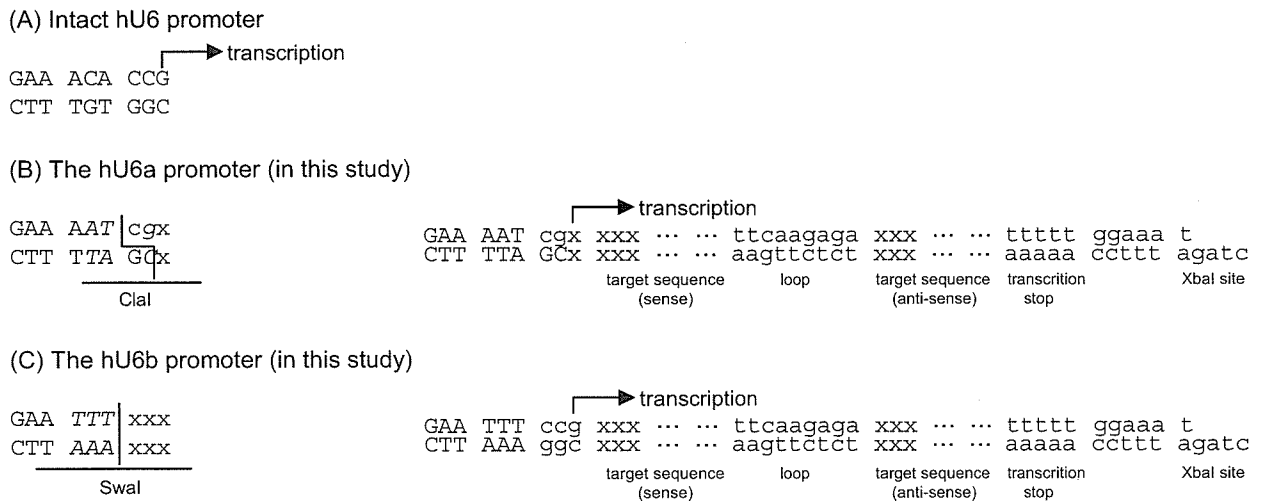


Fig. 33. Sequences at the transcription start site of new hU6 promoter.

(A) Intact hU6 promoter sequence. (B) The hU6a promoter sequence. In this promoter, the *Clal* site is placed at the transcription start site. (C) The hU6b promoter sequence. In this promoter, a *Swal* site is placed at the transcription start site. ShRNA-coding oligonucleotides to be synthesized for each promoter are shown in small letters in the right side.

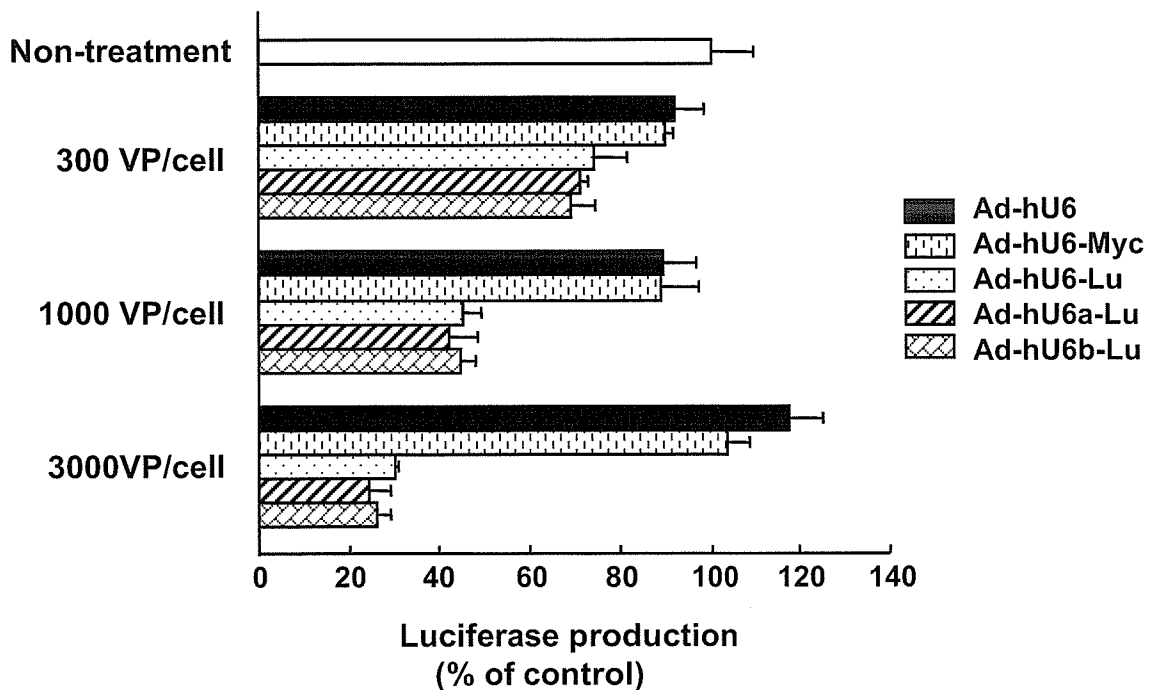


Fig. 34. Suppression of luciferase expression by the Ad vector expressing siRNA.

A549-Luc cells, which stably express luciferase, were transduced with 300, 1000, or 3000 VP/cell of Ad-hU6, Ad-hU6-p53, Ad-hU6-Lu, Ad-hU6a-Lu, or Ad-hU6b-Lu for 1.5 hr. After culturing for 72 hours, luciferase production in the cells was measured by luminescent assay. The data are expressed as means \pm S.D. (n=4).

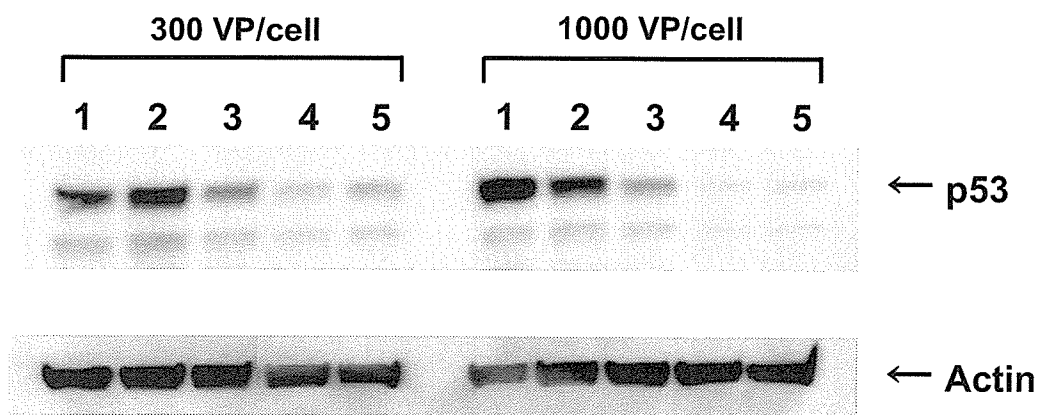


Fig. 35 Suppression of human p53 expression by the Ad vector expressing siRNA.

A549 cells were transduced with 300 or 1000 VP/cell of Ad-hU6 (lane 1), Ad-hU6-Lu (lane 2), Ad-hU6-p53 (lane 3), Ad-hU6a-p53 (lane 4), or Ad-hU6b-p53 (lane 5) for 1.5 hr, and then cultured for 3 days. The proteins were then extracted from the cells, and the levels of p53 expression were examined by Western blotting. The actin bands served as an internal control for equal total protein loading. The extra (lower) bands of p53 are non-specific.

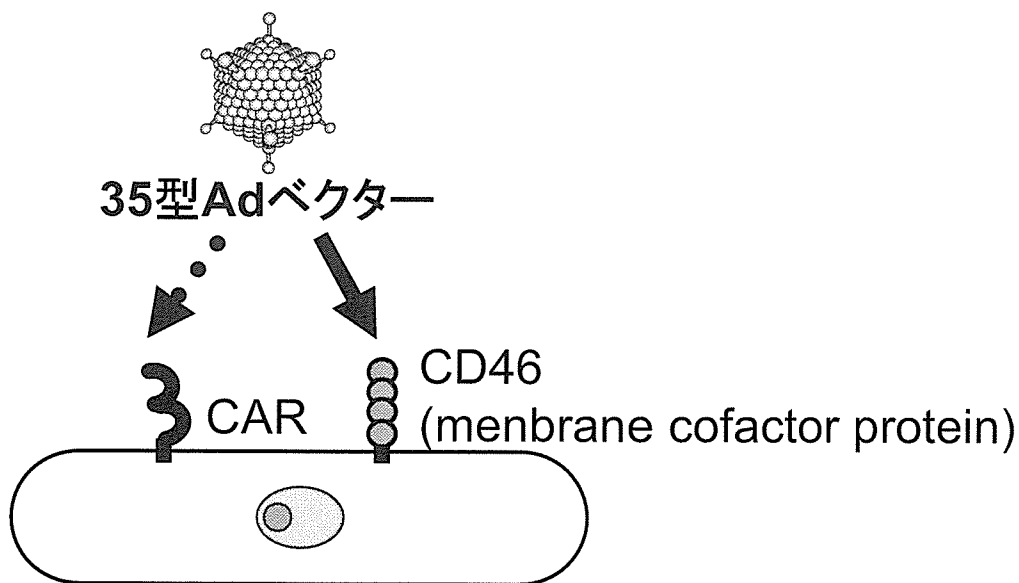


Fig. 36. Diagram of interaction between subgroup B adenovirus serotype 35 vectors and their cellular receptor, human CD46. Ad35 vectors utilize human CD46 as a cellular receptor, not coxsackievirus and Adenovirus receptor (CAR).

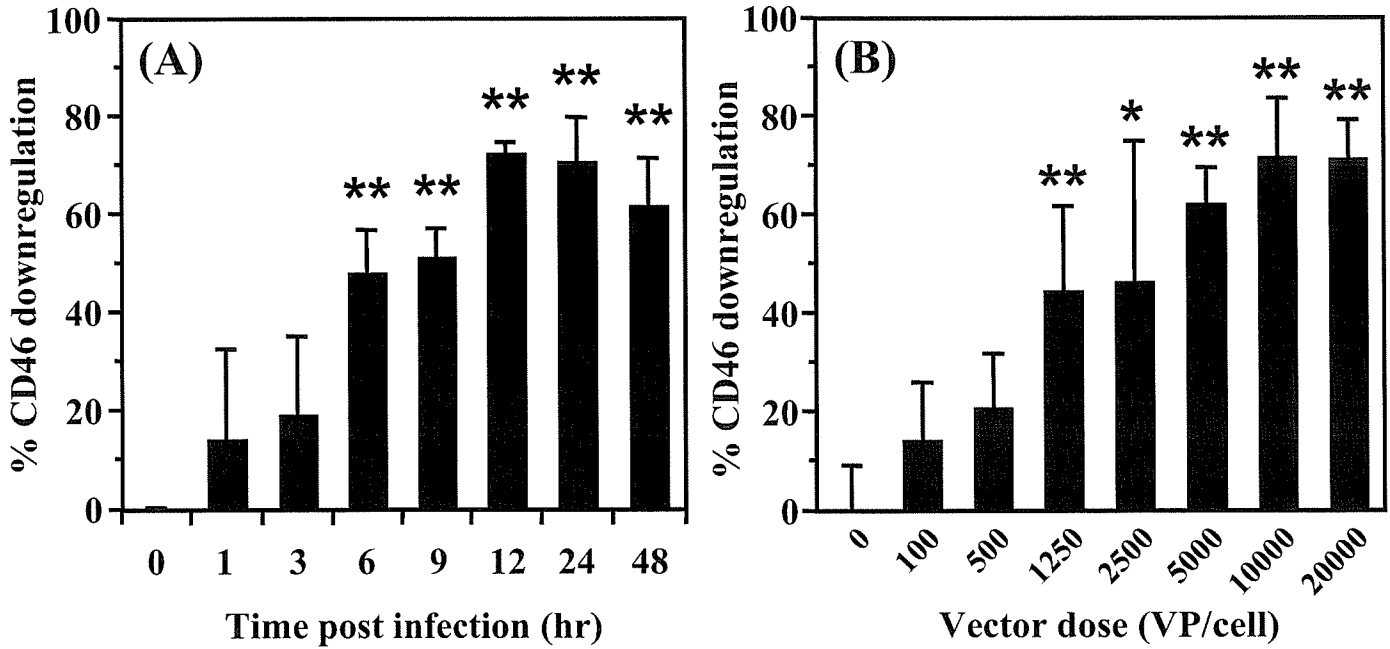


Fig. 37. Downregulation of CD46 from the cell surface of PBMCs after infection by Ad35 vectors. (A) Time course of CD46 downregulation from the cell surface of PBMCs after infection with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10000 VP/cell for up to 48 hr. Cells were harvested at the indicated time points and stained with anti-human CD46 antibodies after fixation. The expression levels of CD46 on the cell surface were determined by flow cytometry. (B) Dose-dependent downregulation of surface CD46 after infection with Ad35 vectors. PBMCs were infected with Ad35GFP at the indicated vector doses for 24 hr. After incubation for 24 hr, PBMCs were harvested and CD46 expression levels were determined by flow cytometry. The asterisks indicate the level of significance ($P < 0.005$ [double asterisk], $P < 0.05$, [single asterisk]). Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of at least two similar experiments.

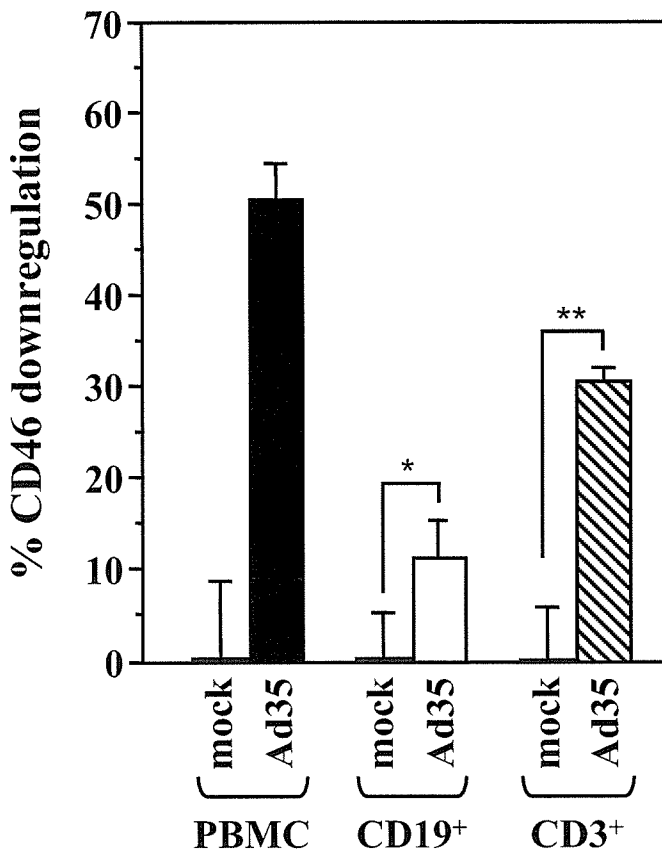


Fig. 38. Surface CD46 downregulation in B cells and T cells after infection with Ad35 vectors.

PBMCs were infected with Ad35L at 10000 VP/cell. After incubation for 24 hr, PBMCs were harvested and stained with both anti-human CD46 antibody and anti-human CD19 or anti-human CD3 antibody. Subsequently, the cells were subjected to flow cytometric analysis. The asterisks indicate the level of significance ($P < 0.005$ [double asterisk], $P < 0.05$, [single asterisk]). Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of at least two similar experiments.

TABLE 4. Downregulation of CD46 induced by Ad35 vectors in various types of cells.

Cell type	% CD46 downregulation
Molt-4	55 ± 5.7 %
KG-1a	18 ± 2.6 %
K562	36 ± 1.9 %
U937	24 ± 8.6 %
A549	-10 ± 8.0 %
HeLa	7.9 ± 18 %
Human bone marrow-derived CD34 ⁺ cells	-11 ± 5.2 %

The cells were infected with Ad35L at 10000 VP/cell. After incubation for 24 hr, CD46 expression on the cell surface was determined by flow cytometry as described in *Materials and Methods*. Values represent mean ± S.D. of quadruplicate results from two similar experiments.

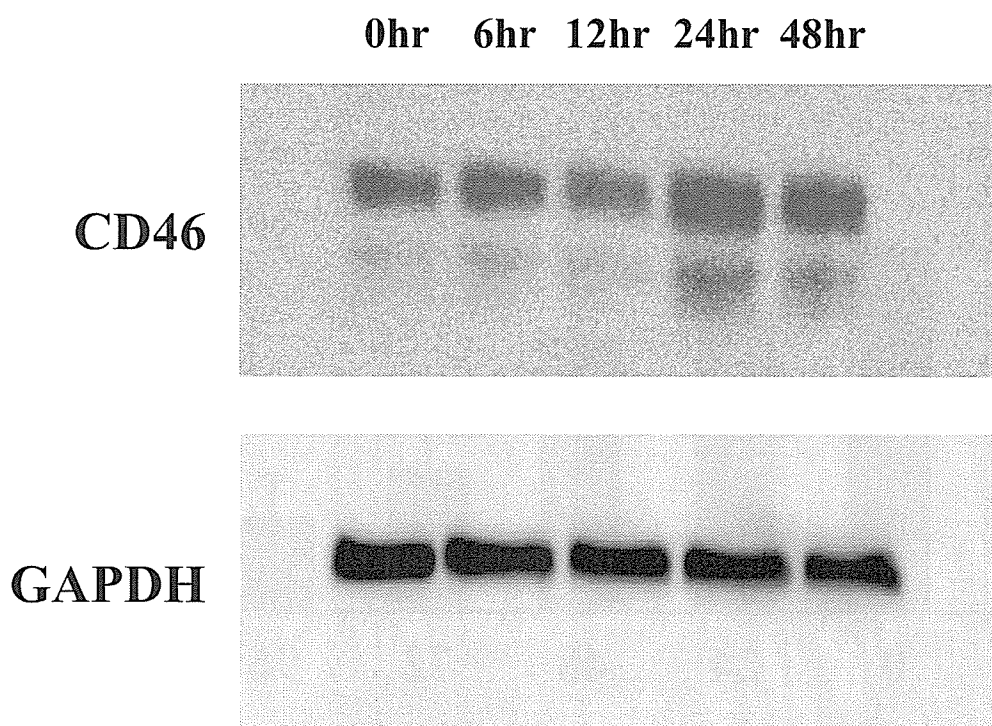


Fig. 39. Total cellular protein levels of CD46 following infection by Ad35 vectors. Western blotting analysis for the total cellular protein levels of CD46 in PBMCs infected with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10000 VP/cell for up to 48 hr. Cells collected at the indicated time points were lysed and quantified by immunoblotting for their total cellular amounts of CD46. GAPDH bands served as an internal control for equal total protein loading. This result was representative of three independent experiments.

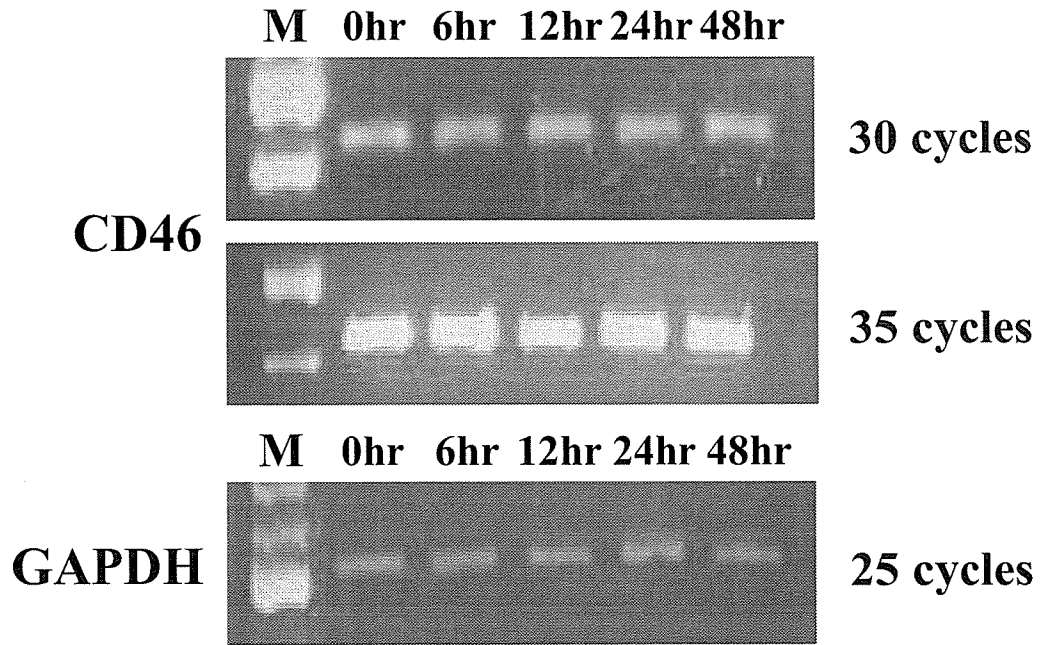


Fig. 40. Messenger RNA levels of CD46 following Ad35 vector infection. PBMCs were infected with Ad35GFP at 10000 VP/cell. Total RNA was prepared from PBMCs following incubation with Ad35GFP, and semi-quantitative RT-PCR was then performed. Lane M: 100-bp ladder. These results were representative of at least two independent experiments.

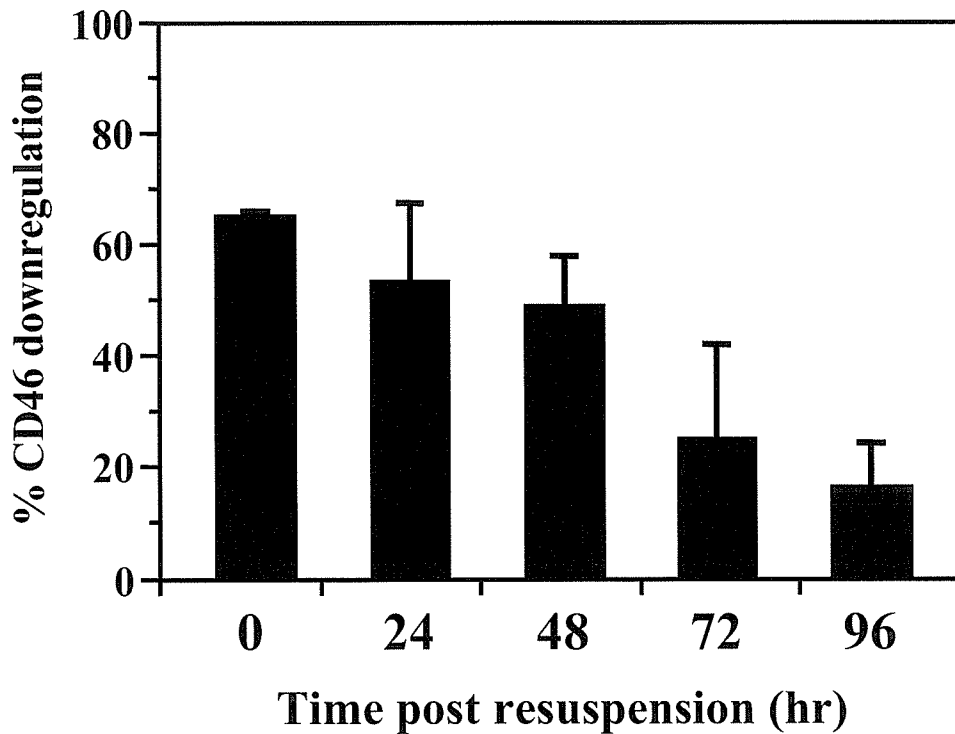


Fig. 41. Recovery of surface CD46 expression after Ad35 vector-mediated downregulation. PBMCs were infected with Ad35GFP at 10000 VP/cell for 24 hr. After a 24-hr infection, PBMCs were washed twice to remove the Ad35GFP, and resuspended and incubated in fresh medium. After incubation, cells were harvested at the indicated time points and CD46 expression was measured by flow cytometry. Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of two similar experiments.

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

分担研究者 中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科 教授

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、およ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。その中で本年度は、水溶性高分子(PEG)によるバイオコンジュゲート化アデノウイルス(PEG-Ad)ベクターの体内動態解析、腫瘍特異的TERTプロモーター制御型アデノウイルス(Ad-TERT)ベクターの遺伝子発現特性解析とがん遺伝子治療応用研究、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、ならびに細胞膜透過ペプチド(Tat)を結合させたアデノウイルス(Tat-Ad)ベクターの*in vitro*遺伝子導入特性解析を行い、以下の結果を得た。

1. 昨年度までに報告した各種PEG-Adベクターの中で、全身投与において優れた腫瘍組織集積性(EPR効果)を発揮した5K/PEG-Adベクター(PEG分子量5,000、修飾率90%)と20K/PEG-Adベクター(PEG分子量20,000、修飾率45%)の体内動態を解析した。その結果、20K/PEG-Adベクターは5K/PEG-Adベクターと比較して、より延長された血中滞留性を示し、ベクター粒子の腫瘍組織への分布量増大と肝臓への分布量低減をより効果的に達成できた。
2. TERT(Telomere reverse transcriptase)プロモーターの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を発現するAdベクター(Ad-TERT/Luc)を作製し、その*in vitro*および*in vivo*における遺伝子発現特性を解析した。その結果、Ad-TERT/Lucは腫瘍細胞・腫瘍組織での遺伝子発現活性を十分に保持しつつ、正常細胞・正常組織における遺伝子発現を大幅に抑制した。また、HSVtk(Herpes simplex virus-thymidine kinase)遺伝子を搭載したAd-TERT/HSVtkの全身投与とGCV(Ganciclovir)の腹腔内投与を併用した癌自殺遺伝子治療は、転移癌に対する顕著な抗腫瘍効果を発揮することが判明した。
3. Ad-TERT/LucをPEG修飾(PEG分子量5,000、修飾率90%)したPEG-Ad-TERT/Lucを作製し、本ベクターを全身投与した際の遺伝子発現分布を解析した。その結果、PEG-Ad-TERT/Lucは腫瘍組織での高い遺伝子発現活性を保持しつつ、肝臓における遺伝子発現レベルを劇的に低減させることができた。したがって、ベクター粒子の体内動態制御と遺伝子発現制御とを融合させたPEG-Ad-TERTベクターは、全身投与においてより高度に腫瘍標的化を達成できるベクターシステムであることが判明した。
4. Tat修飾率の異なる各種Tat-Adベクターの遺伝子導入・発現特性を種々の培養細胞を用いて解析した。その結果、Tat修飾率が遺伝子導入効率に大きく影響を与えることを明らかにし、Tat-Adベクターが従来のAdベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞種にも効率よく遺伝子導入できることを実証した。

研究協力者

岡田直貴	大阪大学大学院薬学研究科 講師	衛藤佑介	大阪大学大学院薬学研究科 博士後
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	桜井晴奈	大阪大学大学院薬学研究科 博士後

	期課程 2 年
倉知慎之輔	大阪大学大学院薬学研究科 博士後 期課程 1 年
森重智弘	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 2 年
姚 醒蕾	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 2 年
渡辺 光	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 1 年
Ratima Asavatanabodee	大阪大学大学院薬学研究 科 博士前期課程 1 年
田辺 綾	大阪大学薬学部 4 年生

A. 研究目的

アデノウイルス (Ad) ベクターは、標的細胞の分裂期・非分裂期を問わず極めて高い遺伝子導入効率を発揮し、また高力価のベクター調製が容易であることから、遺伝子治療研究において最も繁用されているベクターシステムである。しかし、Ad ベクターは生体内の種々の細胞に広く発現する CAR (Coxsackie-adenovirus receptor) を標的とするため、その遺伝子導入を特定の組織や細胞に限定 (ターゲティング) することは困難である。また、遺伝子治療の重要な標的細胞となる癌細胞や血球系細胞は、CAR の発現が無いあるいは非常に乏しいために、Ad ベクター介在性遺伝子導入に対して抵抗性を示し、十分な治療効果を得るためには副作用発現に繋がる高用量のベクター投与を必要とする。したがって、有効性と安全性を兼ね備えた Ad ベクターによる遺伝子治療を実現するには、これらの問題点を克服しうる革新的アプローチを導入した改良型 Ad ベクターを設計・創製し、それらの遺伝子導入特性と治療効果・副作用発現との関連評価を通して、最適な遺伝子治療用 Ad ベクターシステムの確立に向けての基礎情報を収集することが不可欠である。

本観点から我々はこれまでに、遺伝子工学的に Ad ベクターのファイバー領域に RGD ペプチドを表現させた RGD ファイバー改変型 Ad (AdRGD) ベクターが、標的指向性の拡大 (α_v インテグリン指向性の

付与) に基づいて CAR 低発現細胞にも優れた遺伝子導入・発現効率を発揮することを見出し、この AdRGD ベクターを用いて癌免疫遺伝子治療の最適化に繋がる方法論の構築に取り組んできた。また、全身投与した Ad ベクターの腫瘍標的化を達成する方法論として、水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を用いてバイオコンジュゲート化した Ad (PEG-Ad) ベクターの開発を行ってきた。

本年度は、これまでの研究において全身投与後の腫瘍集積性に優れることを見出した 2 種類の PEG-Ad ベクターについて体内動態をより詳細に解析し、腫瘍標的化ベクターを志向した PEG-Ad ベクターを作製する上で最適な PEG 修飾条件を判定した。また、腫瘍特異的 TERT (Telomere reverse transcriptase) プロモーター制御下に目的遺伝子を発現する Ad (Ad-TERT) ベクターを作製し、その遺伝子発現特性を解析するとともに、癌自殺遺伝子治療へと応用した際の有効性を評価した。さらに、体内動態制御と遺伝子発現制御とを融合させたより高度な腫瘍標的化 Ad ベクターの創製を目指して、PEG 修飾 Ad-TERT ベクターを作製し、本ベクターを全身投与した際の遺伝子発現分布を検討した。また、昨年度開発した細胞膜透過ペプチド (Tat) を化学結合させた Ad (Tat-Ad) ベクターについて、Tat 修飾率や標的細胞特性と遺伝子導入効率との関連評価を行うことで、本ベクターの遺伝子導入特性に関する基礎情報の収集を図った。

B. 研究方法

B.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)

B.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。

B.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]

B.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、B.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。

B.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。

B.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 2×10^{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。

B.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 2×10^{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、B.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。

B.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。

B.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。

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

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。

B.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。

B.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粒子あたりのカプシドタンパクに存在するリジン残基に対して12.5～2000倍モル量に相当するTat-NHSをAdベクター懸濁液(final 2×10^{11} 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。

B.12. 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。

(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

C1. 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