

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増強されるという、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. 1)、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. 2)、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. 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. 3)。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. 4)。*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. 5)、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. 6)。その結果、Ad-CMV/HSVtk を  $5 \times 10^{10}$  VP/mouse で投与した群では、全てのマウスが数日の内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、 $2 \times 10^{11}$  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. 7)。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  $2 \times 10^{11}$  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. 8)。その結果、 $2 \times 10^{11}$  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ール) 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.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. 9)、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. 10)、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. 11)、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.4. 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. 12)。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. 13)。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. 14)。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. 15)。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。

## D. 考察

### D.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、癌の治癒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

移巢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. 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  $2 \times 10^{11}$  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  $2 \times 10^{11}$  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.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 $\alpha$  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.4. 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。

## E. 結論

### E.1. PEG-Ad ベクターの体内動態解析

- 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。

### E.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

- 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。

### E.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

- 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。

### E.4. Tat-Ad ベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

- 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。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### G.1. 論文発表

- 1) Tomoaki Yoshikawa, Susumu Imazu, Jian-Qing Gao, Kazuyuki Hayashi, Yasuhiro Tsuda, Naoki Okada, Yasuo Tsutsumi, Mitsuru Akashi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Non-methylated CpG motifs packaged into

- fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(1), 105-109, 2006.
- 2) Shinya Kida, Mitsuko Maeda, Keiko Hojo, Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Koichi Kawasaki, Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: A tool for carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(3), 743-745, 2006.
  - 3) Naoki Okada, Akinori Sasaki, Masakazu Niwa, Yuka Okada, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Tumor suppressive efficacy through augmentation of tumor-infiltrating immune cells by intratumoral injection of chemokine-expressing adenoviral vector. *Cancer Gene Ther.*, 13(4), 393-405, 2006.
  - 4) Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Fusogenic liposomes and their suitability for gene delivery. *Future Lipidology*, 1(6), 735-742, 2006.
  - 5) Jian-Qing Gao, Hai-Liang Chen, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Wen-Quan Liang, Gene expression of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* enhanced by integrin-targeting adenovirus. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 41, 1116-1120, 2006.
  - 6) Shinnosuke Kurachi, Naoya Koizumi, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Haruna Sakurai, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi, Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.*, 14(3), 266-274, 2007.
  - 7) Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Tomomi Sasaki, Naoya Koizumi, Haiying Huang, Katsuhisa Tashiro, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J. Control. Release*, in press.
  - 8) Jian-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Tatsuya Yanagawa, Toshiki Sugita, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer. *Gene Ther.*, in press.
  - 9) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int. J. Pharm.*, in press.
  - 10) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Improvement of adenovirus vectors for cancer gene therapy. *"Recent Developments in Gene Therapy"* published by Research Sigupost in India, in press.
  - 11) 倉知慎之輔, 中川晋作, 人工改変型ウイルスベクターの現状と今後の展開. *遺伝子医学MOOK*, 5, 95-101, 2006.
  - 12) 杉田敏樹, 岡田直貴, 中川晋作, ケモカイン・ケ



モカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫の増強. *臨床免疫*, 45(5), 525-532, 2006.

- 13) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, ウイルス機能を基盤とする DDS キャリアーの開発と応用. *バイオテクノロジージャーナル*, 6(5), 557-562, 2006.
- 14) 金川尚子, 岡田直貴, 中川晋作, 次世代癌遺伝子治療戦略に合う改良型アデノウイルスベクター. *生産と技術*, 58(4), 58-60, 2006.
- 15) 岡田直貴, 中川晋作, 免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化. *薬学雑誌*, 127(2), 327-339, 2007.

## G.2. 学会発表

- 1) Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Tomohiro Morishige, Xinglei Yao, Hikaru Watanabe, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Transductional and transcriptional tumor-targeting using adenoviral vector with PEGylation and TERT promoter on systemic administration into tumor-bearing mice. *97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research*, Washington, DC, U.S.A., April 1-5, 2006.
- 2) 倉知慎之輔, 小泉直也, 桜井晴奈, 佐々木朋美, 櫻井文教, 川端健二, 中川晋作, 早川堯夫, 水口裕之, 非特異的遺伝子導入抑制を目指したファイバー欠損アデノウイルスベクターの開発とその特性評価. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 3) 村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田直貴, 藤田卓也, 山本 昌, 早川堯夫, 水口裕之, 35型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入における $\beta 1$  インテグリンの関与に関する検討. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 4) 後藤美千代, 丹羽貴子, 吉川友章, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, アポトーシス抵抗性を付与した樹状細胞の生体内生存期間延長と免疫誘導との連関評価. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 5) 渡辺 光, 衛藤佑介, 森重智弘, 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 喜田進也, 前田光子, 川崎紘一, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの開発と遺伝子導入特性に関する検討. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 6) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, 遺伝子工学的手法を用いてDDS機能を付与した樹状細胞ワクチンの有用性 (シンポジウム講演). *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 7) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector with target ligand (招待講演). *The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery*, Sapporo, Japan, July 10-12, 2006.
- 8) Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Tomomi Sasaki, Naoya Koizumi, Kaiei Kou, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by adenovirus vector and lipoplex. *The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery*, Sapporo, Japan, July 10-12, 2006.
- 9) Naoko Kanagawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Intratumoral cotransduction of IL-12 and CCL27 genes can improve the efficacy and safety of cancer immunotherapy through

- enhanced recruitment and activation of immune cells in tumor site. **第7回文部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ**, 長野, 2006年8月30日-9月2日.
- 10) Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, PEGylation induces accumulation and enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor via systemic administration. **第7回文部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ**, 長野, 2006年8月30日-9月2日.
- 11) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector containing RGD peptides on the tip of PEG (招待講演). **7th Seventh France-Japan DDS Symposium**, Shiga, Japan, September 24-27, 2006.
- 12) 渡辺 光, 衛藤佑介, 森重智弘, 喜田進也, 前田光子, 水口裕之, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作. 癌遺伝子治療の最適化を目指した Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入特性評価. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 13) 森重智弘, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 渡辺 光, 岡田裕香, 水口裕之, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作. PEGylation と腫瘍特異的プロモーターの併用による腫瘍標的化アデノウイルスベクターの最適化. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 14) 金川尚子, 畑中 豊, 谷 洋一, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作. CCL27 遺伝子共導入による IL-12 癌遺伝子治療の有効性改善と副作用軽減. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 15) 村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田直貴, 藤田卓也, 山本 昌, 水口裕之, 35 型アデノウイルスベクター遺伝子導入機構の解明ーインテグリンの関与に関する検討ー. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 16) 大西康司, 岡田直貴, 金本雄次, 森川愉加里, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンを用いた汎用性に優れる癌免疫療法の開発. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 17) 前田葉子, 岡田直貴, 上羽美貴, 松永知子, 藤井 愛, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 18) 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 森重智弘, 岡田裕香, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍特異的プロモーター搭載型アデノウイルスベクターを用いた癌自殺遺伝子治療の最適化. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 19) 森重智弘, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 田辺 綾, 岡田裕香, 岡田直貴, 中川晋作, PEGylation と腫瘍特異的プロモーターの併用による腫瘍標的化アデノウイルスベクターの創製. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 20) 本村吉章, 金川尚子, 柳川達也, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍標的化 CTL を用いた新規癌養子免疫療法の開発に向けた基礎的検討. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.

- 21) 大西康司, 岡田直貴, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, 種々のマウス腫瘍モデルを用いた TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンの有効性と汎用性の評価. *第 36 回日本免疫学会総会*, 大阪, 2006 年 12 月 11-13 日.
- 22) 桜井晴奈, 五十嵐勝秀, 田代克久, 川端健二, 櫻井文教, 倉知慎之輔, 中川晋作, 菅野 純, 水口裕之, DNA microarray を用いたアデノウイルスベクター誘発自然免疫応答に関する因子の探索. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 23) 倉知慎之輔, 桜井晴奈, 田代克久, 櫻井文教, 川端健二, 屋山勝俊, 岡本 博, 中川晋作, 水口裕之, TAT ペプチドを付与したファイバーミュータント Ad ベクターの開発と遺伝子発現評価. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 24) 田代克久, 川端健二, 桜井晴奈, 倉知慎之輔, 櫻井文教, 中川晋作, 早川堯夫, 山西弘一, 水口裕之, アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 25) 衛藤佑介, 吉岡靖雄, 姚 醒蕾, 吉川友章, 向洋平, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 丸山一雄, 岡田直貴, 中川晋作, アデノウイルスベクター内封 PEG 化リポソームの創製および精製法の確立. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 26) 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 水口裕之, 岡田裕香, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍特異的プロモーター搭載アデノウイルスベクターを用いた自殺遺伝子治療. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 27) Ratima Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 喜田進也, 前田光子, 川崎絃一, 水口裕之, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 広範な感染域を有する Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの構築と遺伝子導入特性評価. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 28) 柳川達也, 金川尚子, 本村吉章, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, ケモカイン-ケモカインレセプター連関を利用した癌養子免疫療法の有効性改善. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 29) 後藤美千代, 金川尚子, 岡田裕香, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, TNF 関連分子発現樹状細胞を用いた定着腫瘍に対する新規免疫療法の開発. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 30) 大西康司, 金川尚子, 金本雄次, 藤田卓也, 山本 昌, 中川晋作, 岡田直貴, TERT 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序および安全性に関する検討. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 31) 喜田進也, 前田光子, 北條恵子, 衛藤佑介, 森重智弘, 渡辺 光, Ratima Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 水口裕之, 眞弓忠範, 中川晋作, 川崎絃一, Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過性ペプチド. *日本薬学会第 127 年会*, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

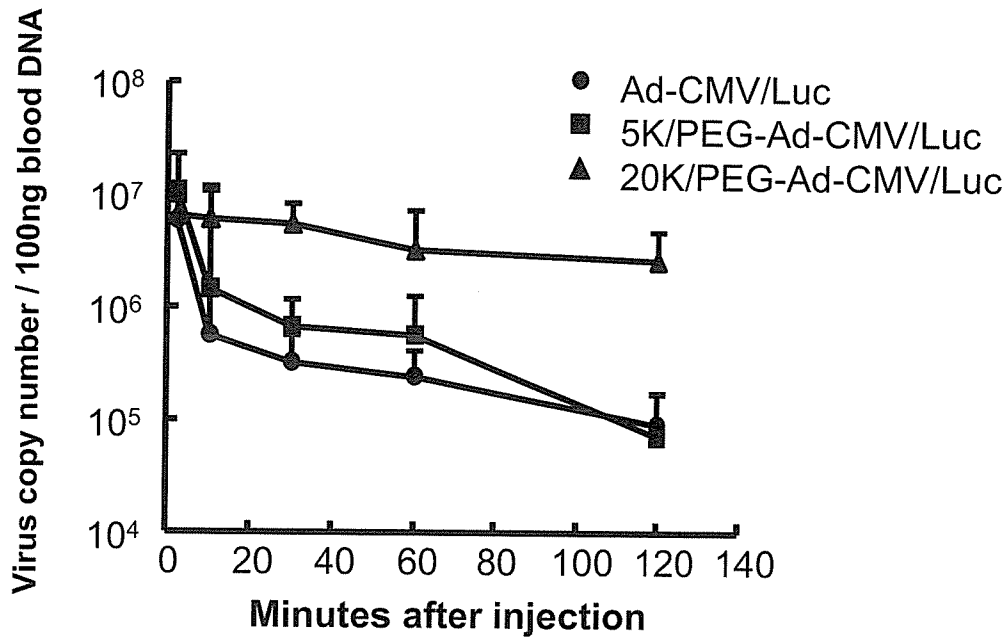
### H.1. 特許取得

- 1) (発明の名称): 細胞内移行ペプチドを有効成分とする遺伝子導入補助および該遺伝子導入補助剤を利用した遺伝子導入方法, (発明人): 中川晋作, 岡田直貴, 吉岡靖雄, 川崎絃一, 前田

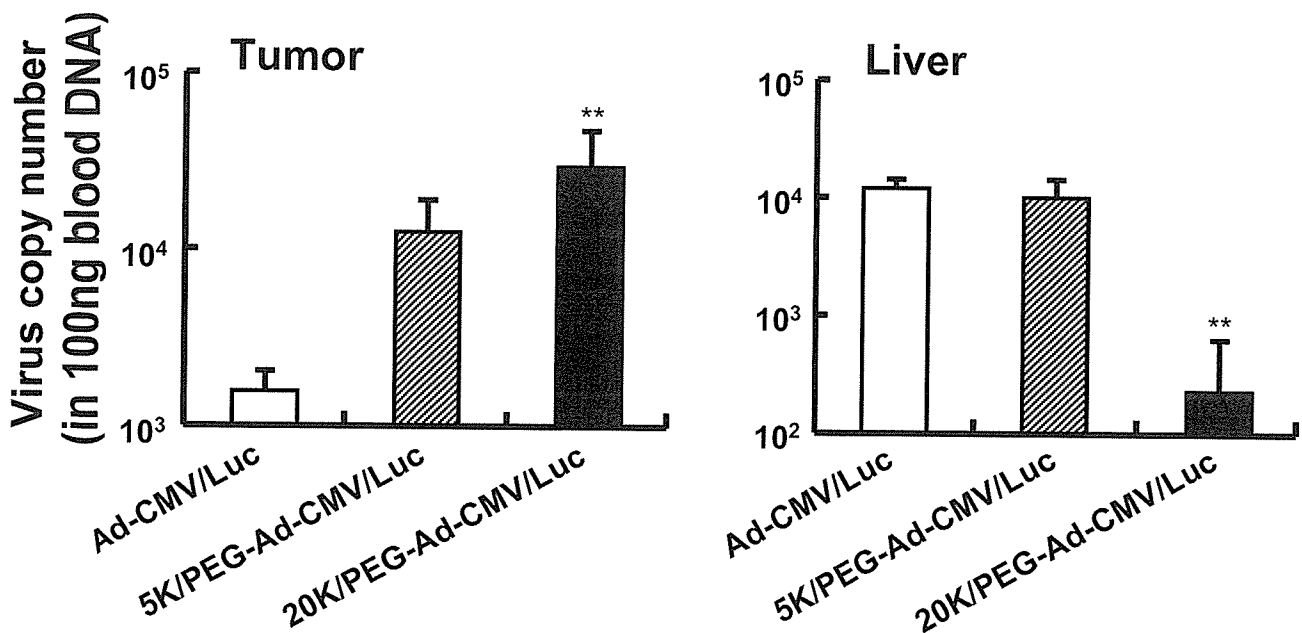
光子, (出願人): 国立大学法人大阪大学, (出願日): 平成 18 年 12 月 8 日, (出願番号): 特願 2006-332620.

## H.2. 実用新案登録

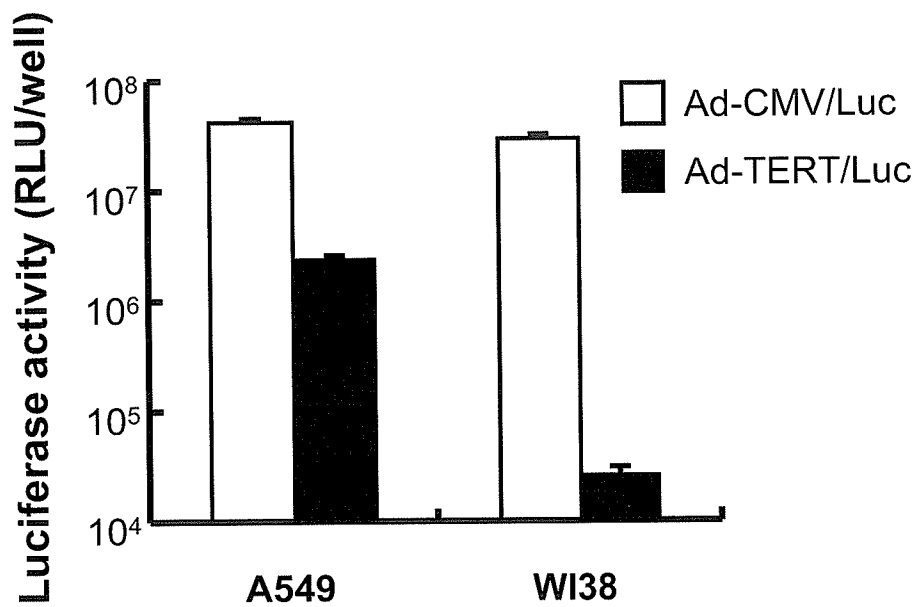
該当事項なし



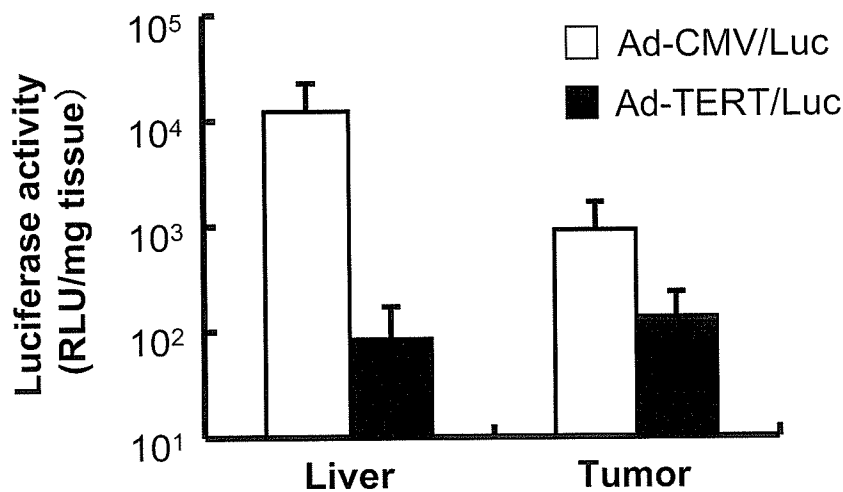
**Fig. 1. Pharmacokinetics of PEG-Ads after i.v. injection.** BALB/c mice were injected intravenously with unmodified Ad-CMV/Luc, 5K/PEG-Ad-CMV/Luc, or 20K/PEG-Ad-CMV/Luc at  $10^{10}$  VP/mouse. The concentration of Ad in the blood at the indicated time points was determined by real-time quantitative PCR. Data are presented as means  $\pm$  S.D. (n = 6).



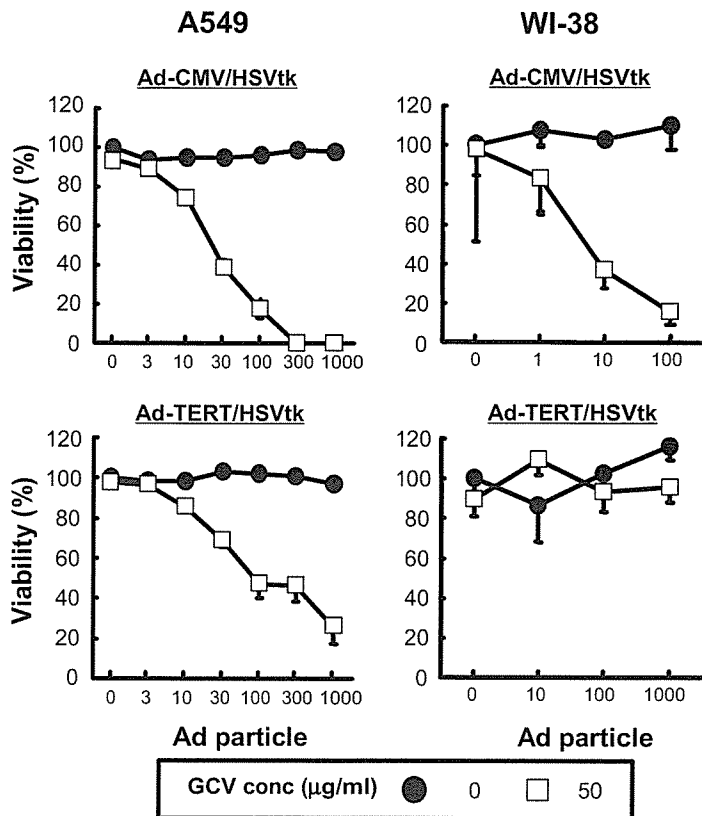
**Fig. 2. Tissue distribution of PEG-Ads after i.v. injection.** Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{10}$  particles of unmodified Ad-CMV/Luc or PEG-Ad-CMV/Luc. Six hours after the injection, the tumor and liver tissues were 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).



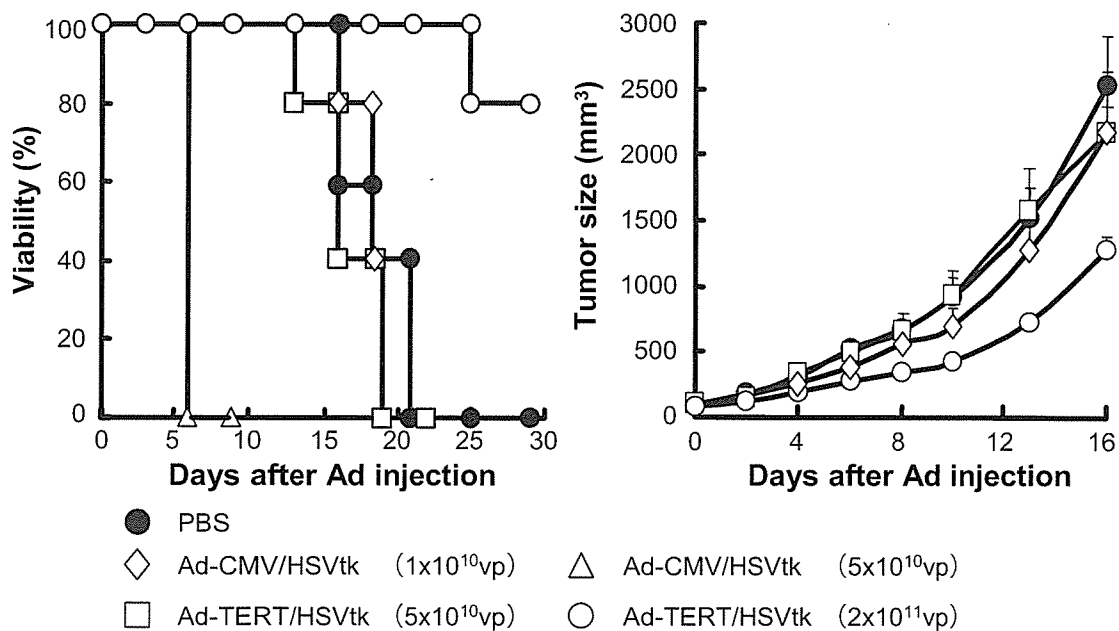
**Fig. 3. Transduction efficiency of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc into tumor cells or normal cells.** A549 tumor cells ( $2 \times 10^4$  cells) and WI38 normal cells ( $2 \times 10^4$  cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad-CMV/Luc or Ad-TERT/Luc. Luciferase expression was measured after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



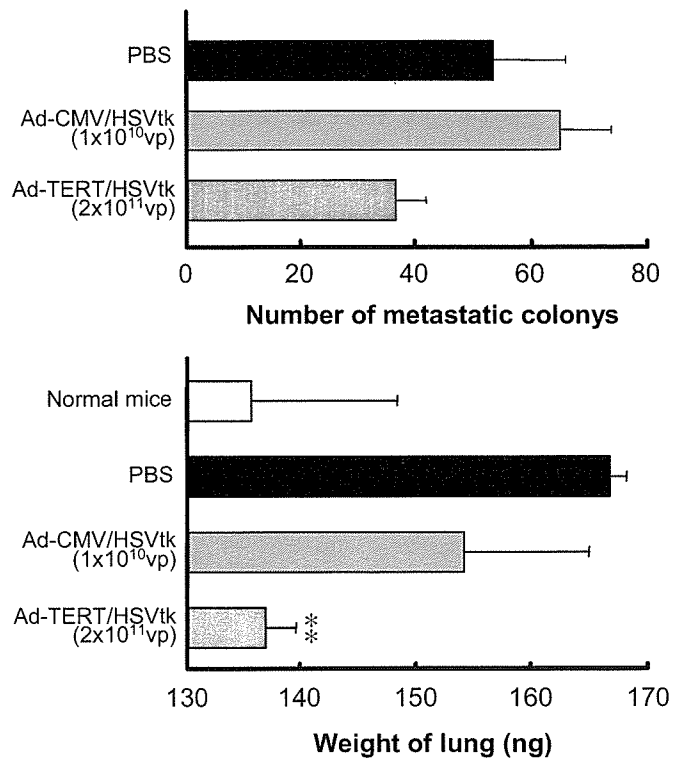
**Fig. 4. The gene expression of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc in liver and tumor.** Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{10}$  particles of Ad-CMV/Luc and Ad-TERT/Luc. After 48 h, liver and tumor tissues were harvested and luciferase activity was measured. Data are presented as means  $\pm$  S.D. ( $n = 6$ ). RLU, relative light units.



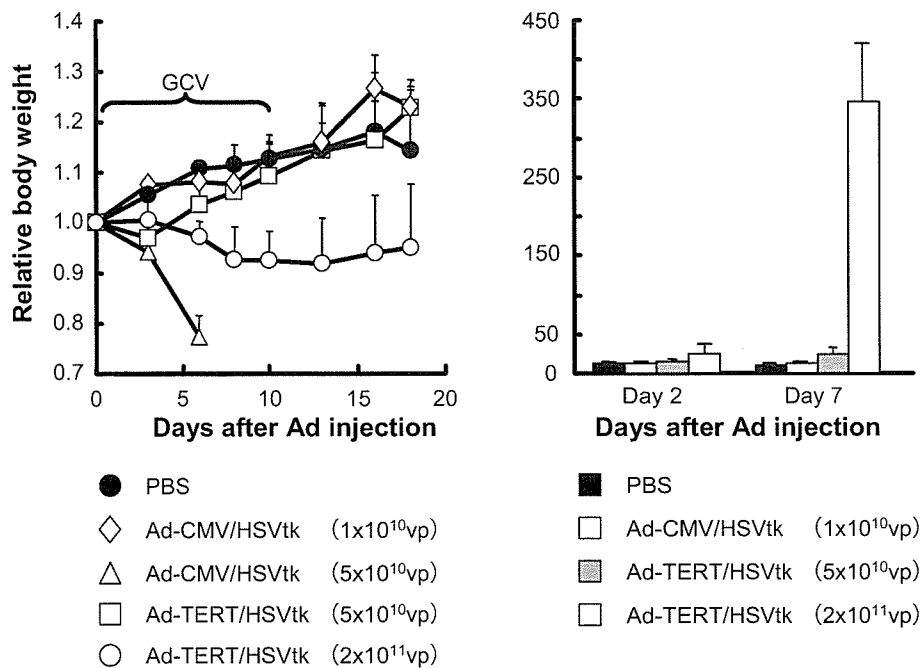
**Fig. 5. Selective cytotoxicity of Ad-TERT/HSVtk in cancer cells but not in normal cells.** Tumor A549 cells and normal WI38 cells were transduced with Ad-CMV/HSVtk and Ad-TERT/HSVtk at indicated virus particle. After 2h, these cells were cultured with media containing GCV. Four days later, cell viability 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. 6. 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 mm<sup>3</sup>.

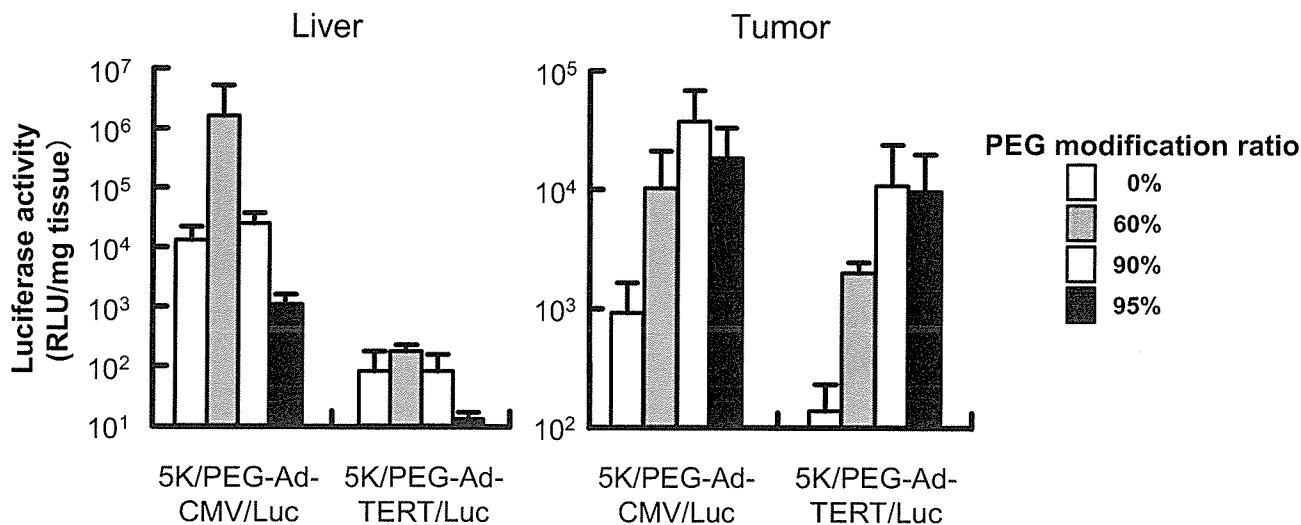


**Fig. 7. Therapeutic effect in metastasis models treated with intravenous injection of Ad-TERT/HSVtk or Ad-CMV/HSVtk.** Established metastasis-bearing BALB/c mice were i.v. injected with PBS, Ad-CMV/HSVtk ( $1 \times 10^{10}$  VP) and Ad-TERT/HSVtk ( $2 \times 10^{11}$  VP) on day 7 after CT26 inoculation. 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).

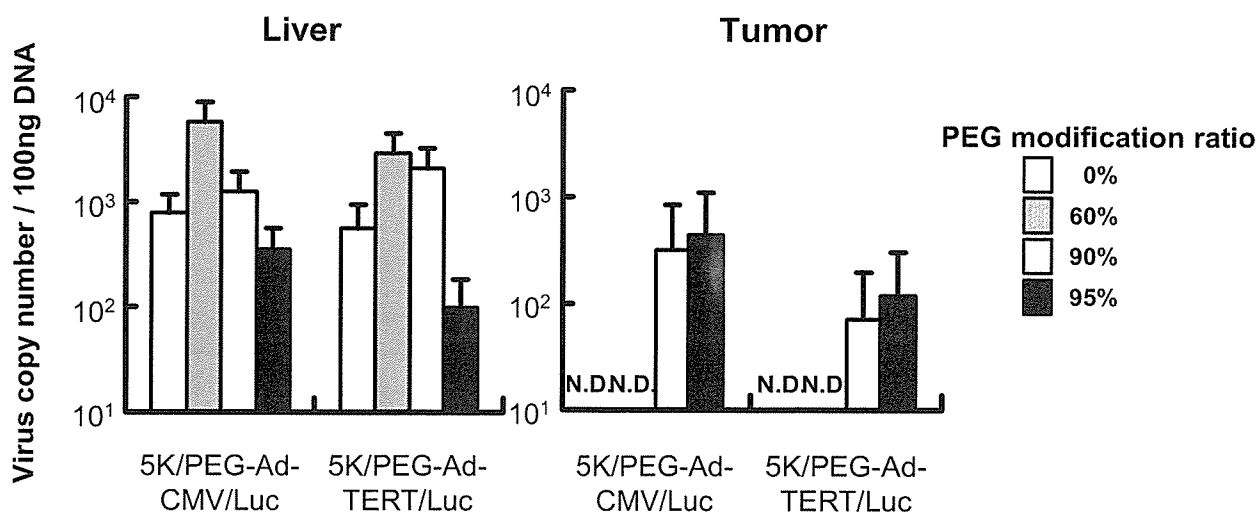


**Fig. 8. Side effect of treatment via intravenous injection of Ad-TERT/HSVtk and GCV in primary tumor model.** Established Meth-A primary tumors-bearing BALB/c mice were i.v. injected with PBS, Ad-CMV/HSVtk or Ad-TERT/HSVtk. Then the mice received daily injections of GCV (50 mg/kg) intraperitoneally for 10 days. Body weights and GPT activity in blood were monitored with time. Data are presented as means  $\pm$  S.D. ( $n = 5$ ).

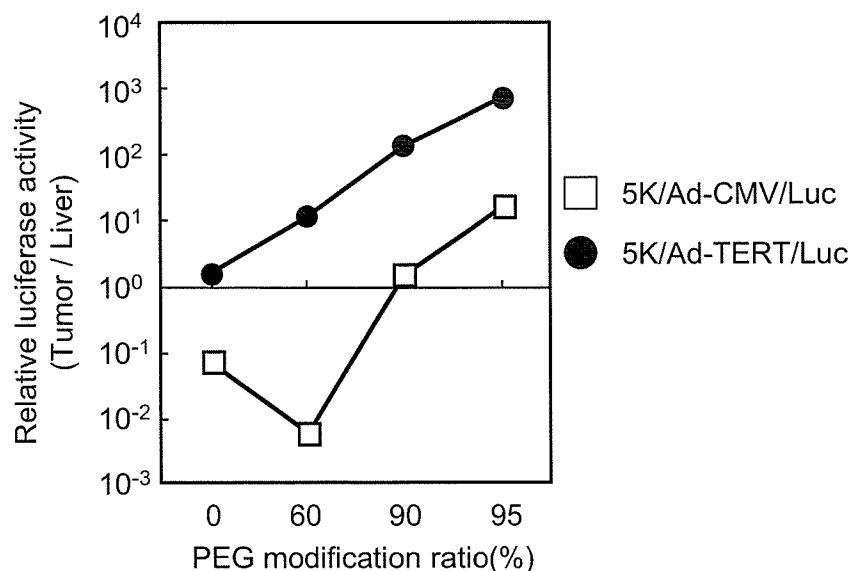




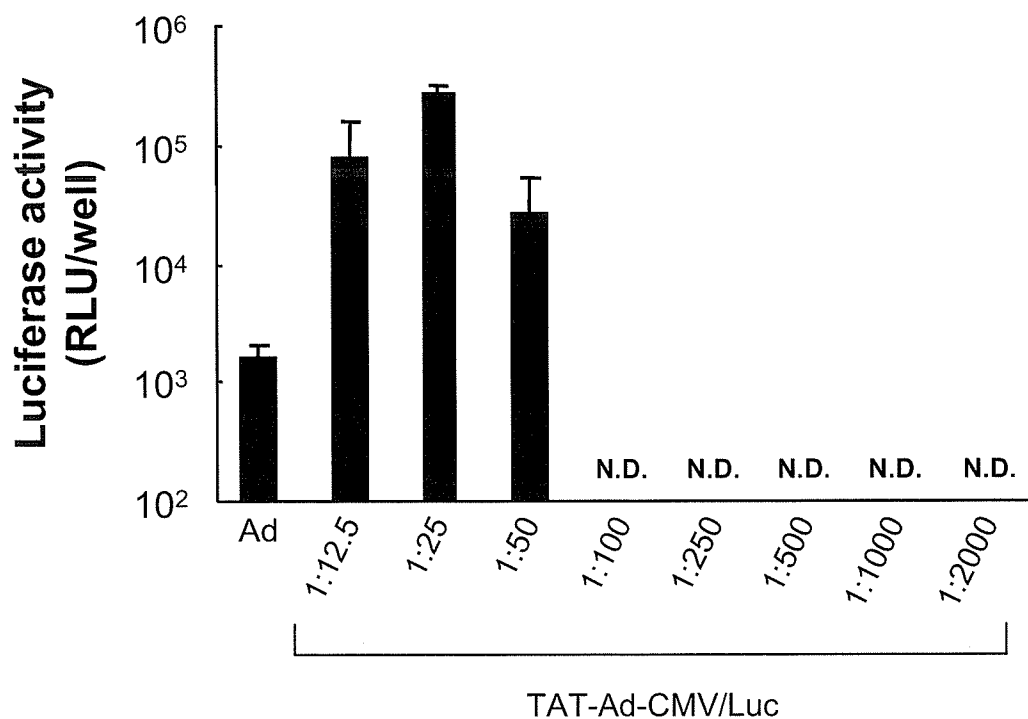
**Fig. 9. The gene expression of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc in liver and tumor.** Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{10}$  particles of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc with indicated PEG modification ratio. After 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.



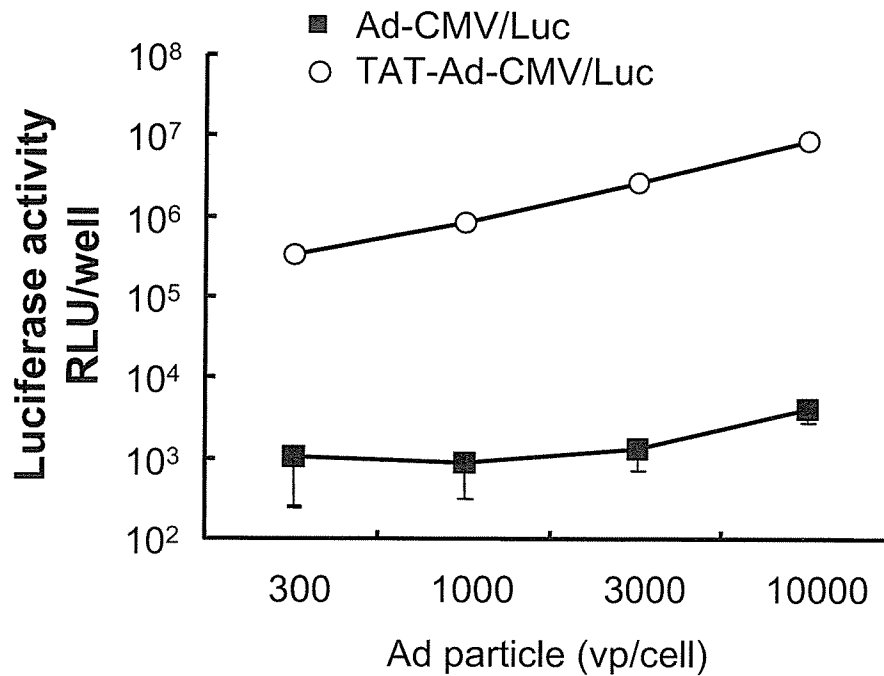
**Fig. 10. Tissue distribution of PEG-Ad-CMV/Luc and PEG-Ad-TERT/Luc.** Once the tumor diameter was approximately 8 mm, Meth-A tumor-bearing mice were injected intravenously with  $10^{10}$  particles of unmodified Ad or each PEG-Ads with indicated PEG modification ratio. After 48 h, the tumor and liver 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).



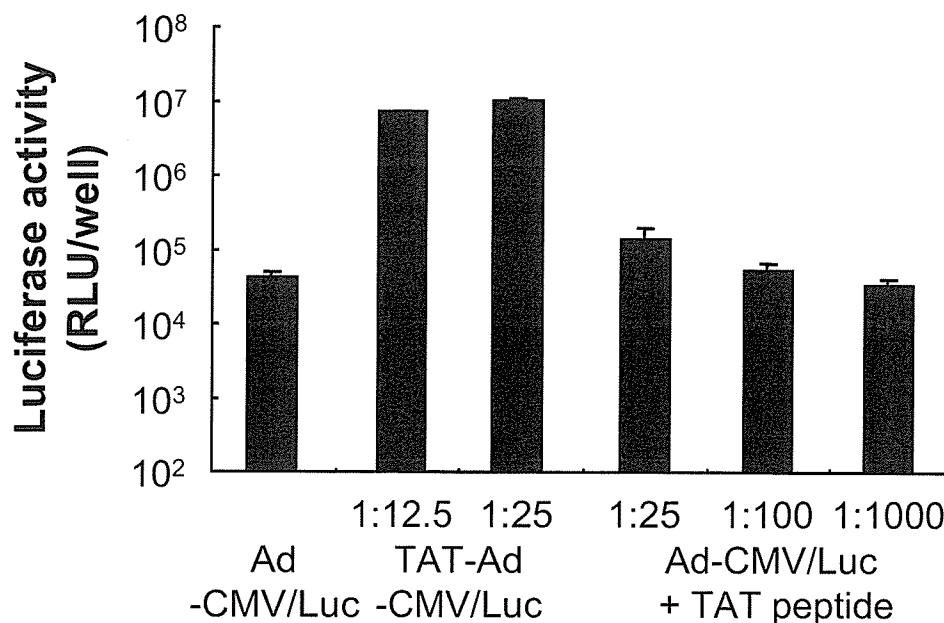
**Fig. 11. Ratio of Luciferase activity (Tumor / Liver).** Ratio of luciferase activity was calculated as: Luciferase activity in tumor (RLU / mg tumor) / luciferase activity in liver (RLU / mg liver) at each modification ratio.



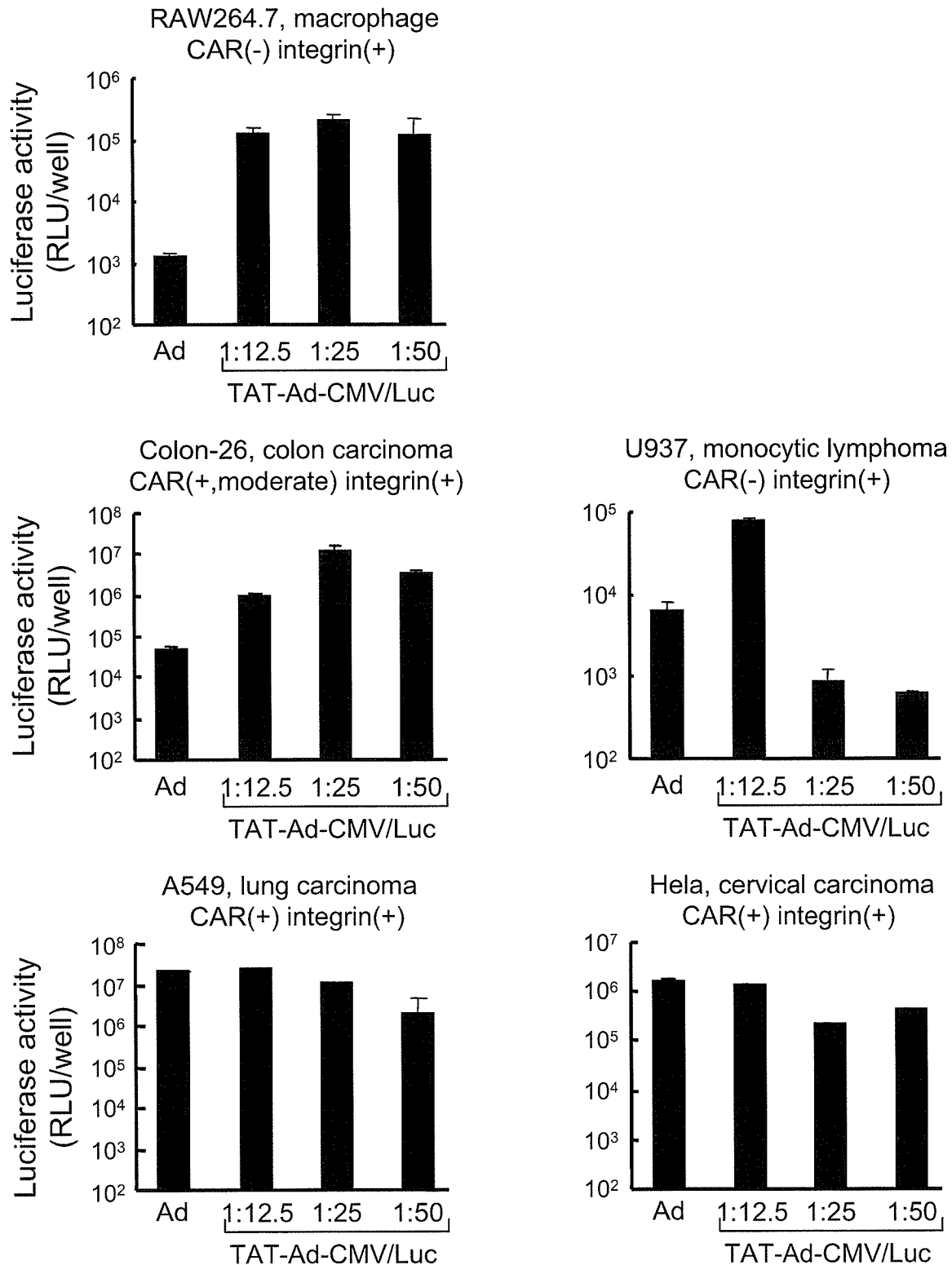
**Fig. 12. Transduction efficiency of Tat-Ad with various modification ratio.** B16BL6 cells ( $1 \times 10^4$  cells) were transduced with 10,000 particles/cell of Ad or each Tat-Ads encoding the luciferase gene. Luciferase expression was measured after 24 hr. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. (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. 13. Transduction efficiency of Tat-Ad into B16BL6 cells.** B16BL6 cells ( $1 \times 10^4$  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. 14. Transduction efficiency of Ad, TAT-Ad or Ad with TAT peptide.** B16BL6 cells ( $1 \times 10^4$  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. 15. Transduction efficiency of Tat-Ad into various cells.** RAW264.7 cells, CT26 cells, U937 cells, A549 cells and Hela cells ( $1 \times 10^4$  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).