

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16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成19（2007）年4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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-----	207
---------------------------------	-----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	289
---------------------------	-----

### 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、高タイトー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。各課題について検討を進めた結果、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 ; Ad ベクターを用いた臍島 ( $\beta$  細胞を含む) への高効率遺伝子導入法を確立した。プロモーター配列およびファイバー領域における改変を最適化した Ad ベクターを用いることで、間葉系幹細胞、脂肪細胞、ES 細胞、胎盤細胞への劇的な遺伝子導入効率の向上に成功した。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、Ad の native の受容体 (CAR、 $\alpha$ v インテグリン、ヘパラン硫酸) を認識しては感染しない Ad ベクターやファイバー欠損 Ad ベクターを開発し、それらの遺伝子導入特性を明らかにした。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 Ad ベクターの遺伝子導入特性を比較検討した。ファイバー改変 Ad ベクターと tet-off 系の発現制御能 (E1・E3 両欠損領域へ外来遺伝子を挿入) を組み合わせた Ad ベクターの開発に成功し、その有用性を実証した。サイトカイン・ケモカインを発現する RGD ペプチドを付与したファイバー改変 Ad ベクター (AdRGD) を用いて、抗腫瘍エフェクター細胞の腫瘍組織内動員とその活性化を同時に達成できる新規免疫遺伝子治療を開発した。AdRGD を用いて抗アポトーシス分子と腫瘍関連抗原を発現させた樹状細胞が、抗腫瘍効果の誘導効率に優れるワクチン担体であることを実証した。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 ; Ad を PEG で化学修飾することで、全身投与後の血中滞留性の向上と腫瘍での高い遺伝子発現を得ることができ、癌サイトカイン遺伝子治療における有用性を明らかとした。また、PEG の分子量・修飾率の異なる最適化や腫瘍選択的プロモーターの適用により肝臓での遺伝子発現も抑制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 ; 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。発現制御能を有した siRNA 発現 Ad ベクターを開発した。Cre-loxP の部位特異的組換えシステムを利用することで、Cre の発現により shRNA (siRNA) 発現をオフに制御できるベクター系の開発に成功した。
4. 35 型 Ad ベクターの特性評価 ; 35 型 Ad ベクターを用いたヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入系を確立した。35 型 Ad ベクターの機能を評価するためのモデル系として、ヒト CD46 трансジェニックマウスを用いた実験系を確立し、その評価を行った。35 型 Ad ベクターの感染には、CD46 の SCR1 および SCR2 の領域が必須であることを明らかにした。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。

## 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 大阪大学大学院薬学研究科  
講師

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科  
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

高 建青 大阪大学大学院薬学研究科(現・浙江  
大学)

吉川友章 大阪大学大学院薬学研究科

杉田敏樹 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

金川尚子 大阪大学大学院薬学研究科

丹羽貴子 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

姚 醒蕾 大阪大学大学院薬学研究科

渡邊 光 大阪大学大学院薬学研究科

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。

本研究期間(H16-18年度)において、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、Ad ベクターを用いた臍島( $\beta$ 細胞を含む)への高効率遺伝子導入法を確立した。プロモーター配列およびファイバー領域における改変を最適化した Ad ベクターを用いることで、間葉系幹細胞、脂肪細胞、ES細胞、胎盤細胞への劇的な遺伝子導入効率の上昇に成功した。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、Ad の native の受容体(CAR、 $\alpha v$  インテグリン、ヘパラン硫酸)を認識しては感染しない Ad ベクターやファイバー欠損 Ad ベクターを開発し、それらの遺伝子導入特性を明らかにした。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 Ad ベクターの遺伝子導入特性を比較検討した。ファイバー改変 Ad ベクターと tet-off 系の発現制御能(E1・E3 両欠損領域へ外来遺伝子を挿入)を組み合わせた Ad ベクターの開発

に成功し、その有用性を実証した。サイトカイン・ケモカインを発現する RGD ペプチドを付与したファイバー改変 Ad ベクター (AdRGD) を用いて、抗腫瘍エフェクター細胞の腫瘍組織内動員とその活性化を同時に達成できる新規癌免疫遺伝子治療を開発した。AdRGD を用いて抗アポトーシス分子と腫瘍関連抗原を発現させた樹状細胞が、抗腫瘍効果の誘導効率に優れるワクチン担体であることを実証した。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、Ad を PEG で化学修飾することで、全身投与後の血中滞留性の向上と腫瘍での高い遺伝子発現を得ることができ、癌サイトカイン遺伝子治療における有用性を明らかとした。また、PEG の分子量・修飾率の更なる最適化や腫瘍選択的プロモーターの適用により肝臓での遺伝子発現も抑制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。発現制御能を有した siRNA 発現 Ad ベクターを開発した。Cre-loxP の部位特異的組換えシステムを利用することで、cre の発現により shRNA (siRNA) 発現をオフに制御できるベクター系の開発に成功した。4) 35 型 Ad ベクターの特性評価研究として、35 型 Ad ベクターを用いたヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入系を確立した。35 型 Ad ベクターの機能を評価するためのモデル系として、ヒト CD46 トランスジェニックマウスを用いた実験系を確立し、その評価を行った。35 型 Ad ベクターの感染には、CD46 の SCR1 および SCR2 の領域が必須であることを明らかにした。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。

## 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

CMV プロモーターからなる  $\beta$  ガラクトシターゼ (LacZ) 発現シャトルプラスミド (LacZ 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、LacZ 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM4-CMVlacZ を得た。次に、pAdHM4-CMVlacZ 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、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMVlacZ を得た。同様に、CMV プロモーター (CMV promoter with intron A)、CA プロモーター ( $\beta$ -actin promoter/CMV enhancer with a  $\beta$ -actin intron) をもった従来型 Ad ベクター Ad-CMVlacZ、Ad-CALacZ を作製した。また同様に、ベクタープラスミド pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7 を用いることで、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列をファイバータンパク質の HI ループ領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdRGD-CALacZ、ポリリジン (KKKKKKK; K7) 配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdK7-CALacZ をそれぞれ作製した。また、GFP 発現従来型 Ad ベクター Ad-CAGFP も同様に作製した。

##### (2) MIN6 細胞への遺伝子導入

マウスインスリノーマ  $\beta$  細胞株 MIN6 を大阪大学医学研究科宮崎純一先生より譲与いただき、DMEM 培地 (5.5 mM 2-mercaptoethanol, 15% FCS 含有) で培養した。MIN6 細胞を 12 穴あるいは 6 穴プレートにそれぞれ  $1 \times 10^5$  cells/well、 $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、一晩培養後、各種 Ad ベクターを各濃度で 1 時間作用させた。新たな培地に交換し、24 時間後、 $\beta$ -gal luminescence assay (Luminescent  $\beta$ -galactosidase Detection Kit II (BD Biosciences)) あるいは X-gal 染色を行った。

##### (3) 膵島の単離

8~10 週齢の雄性 C57/Black6 マウスまたは

Wister ST ラットより、麻酔下において臓器摘出後、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。Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer にて洗った後実験に用いた。

##### (4) 膵島への *in vitro* 遺伝子導入

単離した膵島を RPMI 培地 (5.5 mM glucose, 10% FCS 含有) にて一晩培養後、各種 Ad ベクターを各濃度で 1 時間作用させた。新たな培地に交換し、24 時間後、 $\beta$ -gal luminescence assay を行った。また、0.5% グルタルアルデヒドで固定した後 X-gal 染色を行った。膵島切片は、固定後、2% アガロースにより膵島集団を固めた後、OCT コンパウンドに包埋、液体窒素にて凍結し、クリオスタットにより切片を作製した後、X-gal 染色を行った。Ad-CAGFP を作用させたものは、同様に Ad ベクターを作用させ 24 時間後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察を行った。

遺伝子導入効率を上げるため、RPMI 培地にて一晩培養後、Ca<sup>2+</sup>-free KRB buffer にて 15 分 37°C で培養した後、Ad ベクターを作用させる検討も行った。

##### (5) 膵島への *in vivo* 遺伝子導入

C57/Black6 マウスまたは Wister 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-CAGFP を  $1 \times 10^{10}$  VP in 100  $\mu$ l PBS で注入した (Fig. 6A)。5 分間静置後膵島を単離し、24 時間培養後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察を行った。

##### (6) 膵島切片の免疫染色

Ad-CAGFP が *in vivo* 導入された膵島を 4% パラフォルムアルデヒドで固定した後、2% アガロースにより膵島集団を固め、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。

##### (7) ウェスタン・ブロッティング

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(Amercham Bioscience)にて chemiluminescence を可視化した。MIN6 細胞、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 ヒト間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

#### (1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターは以下のように作製した。CA プロモーター( $\beta$ -actin promoter/CMV enhancer with a  $\beta$ -actin intron)からなる $\beta$ ガラクトシターゼ(LacZ: pCMV $\beta$  (Clontech)由来)発現シャトルプラスミド(LacZ 発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している)と pAdHM15-RGD (アデノウイルスゲノムのファイバータンパク質の HI loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクタープラスミド)を 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、LacZ 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CALacZ を得た。次に、pAdHM15-RGD-CALacZ 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 より入手)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、RGD 配列をファイバーに有した LacZ 発現 Ad ベクター AdRGD-CALacZ を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4、pAdHM41-K7 (Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン(KKKKKK)配列を挿入したベクタープラスミド)、pAdHM34 (Ad ゲノムのファイバータンパク質を 35 型 Ad 由来にしたベクタープラスミド)を用いることで、野生型のファイバーをもった LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CALacZ、ポリリジン配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdK7-CALacZ、35 型 Ad 由来のファイバータンパク質を有した LacZ 発現 Ad ベクター AdF35-CALacZ を作製した。同様にして、CMV プロモーター、CMVi プロモーター (CMV promoter with intron A)、EFL $\alpha$  プロモーターをもった従来型 Ad ベクター Ad-CMVLacZ、Ad-CMViLacZ、Ad-EFLacZ を作製した (Table 1)。

#### (2) 細胞の培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. より購入し、mesenchymal stem cell basal medium (MSCGM) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) で培養した。

#### (3) 培養細胞への遺伝子導入

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 24 穴プレートに播種し、翌日各種 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 染色、あるいは luminescence assay (luminescent  $\beta$ -galactosidase genetic reporter system II (Clontech, Inc.))を行った。

#### (4) フローサイトメーターを用いた細胞受容体の解析

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の CAR、CD46 の発現はフローサイトメーターを用いて解析した。即ち、CAR については  $5 \times 10^5$  細胞を human CAR に対する抗体 mouse monoclonal antibody RmcB (Upstate Biotechnology Inc. より入手)で処理し、未結合の抗体を除いた後、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody (Pharmlingen より入手)で処理した。CD46 については、細胞を FITC-conjugated anti-human CD46 antibody (Pharmlingen より入手)で処理した。細胞を洗浄した後、フローサイトメーター (FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson))で処理し、CellQuest software (Becton Dickinson)で解析した。

### B. 1.3 マウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

#### (1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターは以下のように作製した。CA プロモーター( $\beta$ -actin promoter/CMV enhancer with a  $\beta$ -actin intron)からなる $\beta$ ガラクトシターゼ(LacZ: pCMV $\beta$  (Clontech)由来)発現シャトルプラスミド(LacZ 発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している)と pAdHM15-RGD (アデノウイルスゲノムのファイバーノブの HI loop をコードした領域に RGD 配列を挿入したベクタープラスミド)を 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、LacZ 発現単位が挿入されたプラスミド pAdHM15-RGD-CALacZ を得た。次に、pAdHM15-RGD-

CALacZ 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 より入手) 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、RGD 配列をファイバーに有した LacZ 発現 Ad ベクター AdRGD-CALacZ を得た。同様にしてベクタープラスミド pAdHM4、pAdHM41-K7 (Ad ゲノムのファイバータンパク質の C 末端をコードした領域にポリリジン (KKKKKK) 配列を挿入したベクタープラスミド) を用いることで、野生型のファイバーをもった LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CALacZ、ポリリジン配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった LacZ 発現 Ad ベクター AdK7-CALacZ を作製した。同様にして、CMV プロモーター、CMV<sub>i</sub> プロモーター (CMV promoter with intron A) をもった従来型 Ad ベクター Ad-CMVlacZ、Ad-CMV<sub>i</sub>lacZ、Ad-EFlacZ を作製した。

## (2) マウス骨髄由来間葉系幹細胞の調製

マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、Stem cell Supplements を含む MesenCult basal medium (MesenCult medium; StemCell Technologies 社) 中に骨髄を flash した。セルストレーナー (70- $\mu$ m ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、全量 20ml を 150mm 細胞培養用シャーレに播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、72 時間後に新しい培地と交換した。以後 3 日ごとに培地交換し、接着細胞を間葉系幹細胞として培養を継続した。

## (3) 初代培養細胞への遺伝子導入

マウス骨髄由来間葉系幹細胞を 12 穴プレートに播種し、翌日各種 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 染色をおこなった。

## B.1.4 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

### (1) Ad ベクターの作製

CMV プロモーター制御下にルシフェラーゼを発現するシャトルプラスミド (ルシフェラーゼ発現単位の両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) と pAdHM4、pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7、pAdHM34 を用いて、in vitro ライゲーション法により従来型のファイバー、HI loop をコードした領域に RGD 配列をもったファイバー、C 末端をコードした領域にポリリジン (KKKKKKK) 配をもったファイバー、35 型 Ad 由来ファイバーを有した Ad ベクター Ad-L2、AdRGD-L2、AdK7-L2、AdF35-L2 (それぞれ) を作製した。また、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを C 末領域にポリペプチドを挿入した Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を作製した。

### (2) 細胞の培養

ヒト胎盤由来細胞株として JAR (human choriocarcinoma、ATCC)、JEG-3 (human choriocarcinoma、ATCC)、BeWo (human choriocarcinoma、Washington University, Dr. A Schwarts より供与) を使用した。JAR 細胞は MEM (10%FCS 含有)、JEG-3 細胞は RPMI1640 (10%FCS 含有)、BeWo 細胞は DMEM (10%FCS 含有) 中で培養した。また、ラット胎盤由来細胞株として Rcho-1 (Kansas University, Dr. MJ Soares より供与)、TR-TBT18d-1、TR-TBT18d-2 (共立薬科大 中島恵美先生より供与) を用いた。Rcho-1 細胞は RPMI1640 (10% FCS 含有)、TR-TBT 細胞は DMEM (10% FCS 含有) 中で培養した。

### (3) Total RNA の抽出

各細胞を 100 mm<sup>2</sup> ディッシュに播種し、サブコンフルエント時に培地を吸引除去し TRIZOL (Invitrogen life technologies) 1 mL を培養ディッシュに添加した。シリンジにて細胞を回収し、マイクロチューブ中にて 5 分間放置後クロロホルム (WaKo) 200  $\mu$ L を加えて混和した。2 分間放置後、4°C、1200 rpm にて 15 分間遠心し、上層を新しいマイクロチューブに分取し、エーテル (WaKo) 500  $\mu$ L を加え、4°C、1200 rpm にて 10 分間遠心分離し、上層を除去した。この操作を 3 回繰り返した後、イソプロパノール (WaKo) 500  $\mu$ L 加えて転倒混和し、4°C、1200 rpm にて 10 分間遠心分離した。上層除去し、風乾後、RNase free 水 50  $\mu$ L に溶解したものを total RNA サンプルとした。

### (4) RNA 濃度測定

サンプルの total RNA 濃度は吸光度計 (Jasco Ubest-30、日本分光) にて吸光度を測定し (波長 260 nm)、以下の換算式により求めた。

サンプルの total RNA 濃度 ( $\mu$ g/ $\mu$ L) = 吸光度  $\times$  0.04

### (5) Complementary DNA (cDNA) の調製

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa BIOMEDICALS) を用い、25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L (最終濃度 5 $\mu$ M)、10 $\times$ RNA PCR buffer 2  $\mu$ L、RNase Free dH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L、10 mM dNTP Mixture 2  $\mu$ L (最終濃度 5 mM)、40 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ L (最終濃度 1 U/ $\mu$ L)、5 U/mL Reverse Transcriptase 1  $\mu$ L (最終濃度 0.25 U/ $\mu$ L)、2.5 pmol/mL Oligo dT-Adaptor Primer 1  $\mu$ L (最終濃度 0.125  $\mu$ M) に、total RNA 濃度が 1 $\mu$ M になるように total RNA サンプルを加え、30°C 10 min、50°C 30 min、95°C 2 min にて逆転写反応を行い、cDNA 溶液を作製した。

### (6) 各胎盤細胞株における CAR、及び $\alpha_v$ 、 $\beta_3$ 、



### $\beta_3$ integrin の mRNA 発現の測定

cDNA 溶液 5  $\mu$ L に 25 mM  $MgCl_2$  0.6  $\mu$ L (最終濃度 2.5 mM)、10 $\times$ RNA PCR buffer 0.8  $\mu$ L、滅菌精製水 6.35  $\mu$ L、5 U/mL TaKaRa Taq™ 0.05  $\mu$ L (最終濃度 2.5 U/100  $\mu$ L)、各プライマー 0.1  $\mu$ L (最終濃度 1  $\mu$ M) を加えて PCR を行った。それぞれの遺伝子に使用した Primer 配列は Table 3 に記載した。PCR 条件は以下のような条件で行った。Human CAR、94°C 30 sec、65°C 60 sec、72°C 120 sec 30 cycle; human  $\alpha v$  integrin、94°C 40 sec、60°C 40 sec、72°C 60 sec 30 cycle; human  $\beta 3$  integrin、94°C 30 sec、65°C 40 sec、72°C 60 sec 30 cycle; human  $\beta 3$  integrin、94°C 40 sec、58°C 40 sec、72°C 60 sec 20 cycle; human  $\beta$ -actin、94°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 30 sec 35 cycle; rat CAR、94°C 45 sec、60°C 53 sec、72°C 90 sec 40 cycle; rat  $\alpha v$  integrin、94°C 45 sec、57°C 60 sec、72°C 90 sec 30 cycle; rat  $\beta 3$  integrin、94°C 45 sec、58°C 60 sec、72°C 90 sec 30 cycle; rat  $\beta 3$  integrin、94°C 45 sec、53°C 60 sec、72°C 90 sec 40 cycle; rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、94°C 45 sec、60°C 60 sec、72°C 90 sec 40 cycle。

### (7) PCR 産物の確認

PCR 産物 10  $\mu$ L に 6 $\times$ Loading Buffer (36% Glycerol、30 mM EDTA、0.05% Bromophenol Blue、0.05% Xylene Cyanol) (TaKaRa BIO INC.) 2  $\mu$ L を加え混和し、8  $\mu$ L を 3% Nusieve 3:1 Agarose ゲル (Biohittaker Molecular Applications) に 50 V にて電気泳動を行った。分子量マーカーとして  $\Phi$ X174-HaeIII digest (TaKaRa BIO INC.) を用いた。泳動槽は TBE buffer (89 mM Tris hydroxymethyl aminomethane、89 mM borate、2 mM EDTA) で満たした。染色はエチジウムブロマイド (5  $\mu$ g/mL) にて行い、トランスイルミネーター (波長 302 nm、NTM-10、フナコシ) でバンドの検出を確認後、ゲルをミリ Q 水に入れ振とうし、脱色した。ゲルの撮影はトランスイルミネーター上でポラロイドカメラ (DS-300、フナコシ) にて行った。

### (8) ヒト由来細胞株への遺伝子導入活性の検討

実験には、野生型 Ad ベクターの Ad-L2、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを挿入した Ad-RGD(HI)-L2、Fiber の C 末領域に RGD ペプチドを挿入した Ad-RGD(C)-L2、Fiber の C 末領域に KKKKKK ペプチドを挿入した Ad-K7(C)-L2、Fiber の HI loop 領域に RGD ペプチドを C 末領域に KKKKKK ペプチドを挿入した Ad-RGD(C)-L2 Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を使用した。各ヒト由来細胞を 96 穴プレートに 1  $\times$  10<sup>4</sup> 個播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad-RGD(HI)-L2、

Ad-RGD(C)-L2、Ad-K7(C)-L2 あるいは Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 を 300 あるいは 3000 vector particles (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、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

### B. 1.5 ES 細胞および EB への高効率遺伝子導入

#### (1) マウス ES 細胞の培養および EB の作製

E14 マウス ES 細胞 (mES 細胞) は LIF 含有培地にてフィーダー細胞 (embryonic fibroblast) 上で培養し、3-5 日ごとに継代した。フィーダー細胞にはマイトマイシン C で不活化したマウス胚繊維芽細胞を用いた。フィーダー細胞非存在下で培養する際には、フィーダー細胞上の mES 細胞をトリプシンで剥離した後、37°C、40 分インキュベートすることにより得た mES 細胞の単細胞浮遊液をゼラチンコートした培養皿上に播種した。胚様体 (EB; embryoid body) は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000 cells/30  $\mu$ l で付着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間培養することにより作製した。

#### (2) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 $\alpha$  プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作製した。それぞれのマルチクローニング部位に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVlacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作製するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7、pAdHM34 とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1、pAdHM34-EFLacZ1 を作製した。

作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ を得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック社) を用いて測定した。

また、同様に Ad-EF-Oct3/4、Ad-EF-Nanog、Ad-EF-STAT3F を作製した。

### (3) RT-PCR

フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞から total RNA を抽出し、G3PDH、CAR、Oct-3/4、Nanog、FGF5、Brachyury(T)、GATA6 の各遺伝子発現を調べた。PCR プライマーには以下のものを用いた。

G3PDH(F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH(R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

CAR(F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'

CAR(R): 5' -TTAACAGAACGGTCAGCAG-3'

Oct-3/4(F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'

Oct-3/4(R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'

Nanog(F): 5' -ATGGTCTGATTCAGAAGGGC-3'

Nanog(R): 5' -TTCACCTCCAAATCACTGGC-3'

FGF5(F): 5' -GAAGCGGCTCGGAACATAGC-3'

FGF5(R): 5' -GGACGCATAGGTATTATAGC-3'

Brachyury T(F)

5' -CAGGAGGATGTTCCCGGTGC-3'

Brachyury T(R)

5' -TCCGAGGTTCCATACTTATGC-3'

GATA6(F): 5' -GCCAAACTGAGCCCCCTCGC-3'

GATA6(R): 5' -GGGGGGCTGTCCGGGAGGC-3'

### (4) ウェスタンブロットング法による CAR の検出

マウス CAR に対するポリクローナル抗体は CAR の部分配列 KTQYNQVPSSEDFERAPQC に対応するペプチドをウサギに免疫することにより作製した。フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞からタンパク質を抽出し、マウス CAR 抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識された抗体を用いた。フィルターを ECL Western blotting detection system (アマシャム社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム製) により検出した。

### (5) マウス ES 細胞への $\beta$ -gal 遺伝子導入

mES 細胞を 12 穴プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well 播種し、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、細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 染色を行った。

### (6) アルカリホスファターゼ染色

mES 細胞を 12 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で作用させた。播種 3 日目に再度同ベクターを作用させた後、5 日目にアルカリホスファターゼ染

色をケミコン社の ES Cell Characterization Kit を用いて行った。

### (7) EB への $\beta$ -gal 遺伝子導入

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態、3000vp/cell で各 Ad ベクターを感染させ 2 日後に X-gal 染色を行った。定量はクロンテック社の Luminescent  $\beta$ -Gal Kit を用いて行った。

### B. 1. 6 Ad 受容体との結合性を欠損させた Ad ベクターの作製

#### (1) トリプルミュータント Ad ベクターの作製

E1、E3 領域を除くすべての Ad ゲノムを持ち、ペントンベースの RGD モチーフを欠損させ、ファイバーシャフトを 35 型 Ad のシャフトに置換し、ファイバーノブの AB ループの 4 アミノ酸配列を変異させることで、それぞれインテグリン、ヘパラン硫酸、CAR との結合を欠損させた Ad ベクタープラスミド pAdHM59 を作製した。まず、5 型 Ad のファイバーノブの AB ループに変異を加えたファイバー遺伝子の一部 (32238-32495 bp) を持つ pcDNA3.1-Hyg-CAR(-)-AB4m を作製するため、EcoRV で切断した pcDNA3.1-Hygro (Invitrogen) と 5 型 Ad のファイバーノブ遺伝子を持つ pGEM-Teasy-knobCAR(+)(J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) を鋳型として、プライマー 1 (5' -ATTAATACTTTGTGGACCACACCAGCTCCATCTCCTAAC TGTAGCCTAAATGgAGgGggtGATGCTAAACTCACTTTGGTCTTACAAAA-3' , アンダーラインは AseI 切断配列、小文字は変異を加えた配列) とプライマー 2 (5' -AGATCTCCATTTCTAAAGTT-3' , アンダーラインは BglIII 切断配列) を用いて PCR を行い作製したフラグメントをライゲーションした。次に 35 型のファイバーを持つ pF35-2.3(AseI) (Gene, 285, 69-77 (2002)) を AfIII/AseI で切断したフラグメント (35 型のファイバーシャフトを含む) と pcDNA3.1-Hyg-CAR(-)-AB4m を AseI/BglIII で切断したフラグメント (5 型ファイバーノブの最初から 32495bp までを含む) と pcDNA3.1-Hygro を AfIII/BglIII で切断したフラグメントをライゲーションし、pcDNA3.1-Hyg-AB4mknob を作製した。さらに、pHMCMV6 (Hum. Gene Ther., 10, 2013-2017 (1999)) を AfIII/MunI で切断したフラグメントと pHM-S35-K5-CAR(+) を MunI/BglIII で切断したフラグメントと pcDNA3.1-Hyg-AB4mknob を AfIII/BglIII で切断したフラグメントをライゲーションし、35 型のファイバーシャフト全長と 5 型のファイバーノブの AB ループに 4 アミノ酸の変異を加え (R412S, A415G, E416G, K417G)、HI ループに Csp45I、C 末端に ClaI の制限酵素サイトを持つ遺伝子を含んだ pHM-S35-K5-CAR(-)-AB4m を作製した。この

pHM-S35-K5-CAR(-)-AB4m を SrfI/MunI で切断したフラグメントと pHM14-Eco2 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003)) を SrfI/MunI で切断したフラグメントとライゲーションし pHM14-Eco2-S35-AB4m を作製した。次に pHM14-Eco2-S35-AB4m を EcoRI/ClaI で切断したフラグメントと pAdHM43 (J. Virol., 77, 13062-13072 (2003)) を EcoRI/ClaI で切断したフラグメントとライゲーションすることで、CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合を欠損させた Ad ベクタープラスミド pAdHM59 を作製した。なお、pAdHM59 はファイバーノブの HI ループ領域に Csp45I、C 末端領域に ClaI の制限酵素サイトを持っていることから、任意の外來ペプチドに相当する遺伝子を HI ループ領域と C 末端領域に組み込むことが可能である。さらに、E1 欠損領域には I-CeuI、SwaI、PI-SceI の制限酵素切断配列が組み込まれていることから、これらの制限酵素を使用することで目的遺伝子の発現カセットを E1 欠損領域に簡便に挿入することが可能である。

次に、pAdHM59 のファイバーノブの HI ループ領域にインテグリンとの結合が知られている RGD ペプチド (CDCRGDCFC) に相当する遺伝子を挿入した pAdHM59-RGD(HI) を作製した。pAdHM59 を Csp45I で切断し、合成オリゴ DNA 1 (5' -CGGCCTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGCGATG-3') と合成オリゴ DNA 2 (5' -CGCATCGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAGGC-3') をハイブリダイゼーションしたものを挿入し、制限酵素解析とシーケンシングにより挿入した遺伝子配列を確認した。次に、pAdHM59 と pAdHM59-RGD(HI) の E1 欠損領域にレポーター遺伝子として CMV プロモーターにドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを挿入したベクター pAdHM59-CMVL2 と pAdHM59-RGD(HI)-CMVL2 を作製した。pAdHM59、pAdHM59-RGD(HI) と pAdHM54 を I-CeuI と PI-SceI 制限酵素で切断し、同様に CMV プロモーターでドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを持つ pCMVL1 を I-CeuI と PI-SceI 制限酵素で切断したフラグメントとをライゲーションした。作製した pAdHM59-CMVL2、pAdHM59-RGD(HI)-CMVL2 と pAdHM54-CMVL2 を PacI 制限酵素により切断し、プラスミドを線状にした後、pAdHM59-CMVL2 と pAdHM54-CMVL2 は Fiber-293 細胞 (受容体と結合できない 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、通常の Ad ファイバーを発現させた Fiber-293 細胞を使用することで Ad ベクターの一部のファイバーを受容体と結合可能なファイバーに置き換え増殖させる。最後に通常の 293 細胞を使用し増殖させることで受容体に結合できないファイバーのみを持つ Ad ベクターが作製可能である) に、pAdHM59-RGD(HI)-CMVL2 は 293 細

胞に SuperFect (Qiagen 社) を用いてトランスフェクションした。約 10 日間培養後、それぞれの Ad ベクター (Ad/ΔF(AB) ΔP-S35-L2、Ad/ΔF(AB) ΔP-S35-RGD(HI)-L2、Ad/ΔF(FG) ΔP-S35-L2) を回収した。また、コントロール Ad ベクターとして従来型の Ad ベクターである Ad-L2 を作製した。作製した全ての Ad ベクターは 293 細胞に 3-4 次感染までさせることにより大量調製した。ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM 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 らの方法で、生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターは鐘ヶ江らの方法に従って決定した。

#### (2) 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-L2 あるいは Ad/ΔF(AB) ΔP-S35-L2、Ad/ΔF(FG) ΔP-S35-L2 を 3000 vector particle (VP)/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 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。

#### (3) 培養細胞への遺伝子導入阻害実験

各細胞を 48 穴プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well 播種し、2 日後、RGD ペプチド (GRGDSP; TaKaRa) (0、40、200 μg/ml) を 10 分間室温にて作用させ、Ad/ΔF(AB) ΔP-S35-RGD-L2 を 300VP/cell の濃度で 0.5 時間作用させた。48 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) 培養細胞への Ad 取り込み量の検討

各細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日 Ad-L2 あるいは Ad/ΔF(AB) ΔP-S35-L2、Ad/ΔF(FG) ΔP-S35-L2 を 3000 VP/cell の濃度で 3 時間作用させた。PBS 洗浄後、0.05% トリプシン-0.5 mM EDTA-PBS 溶液にて細胞を 37 度 10 分間処理した。細胞を回収し、3 回洗浄後、0.05% DNase I-0.5 M MgCl<sub>2</sub>-PBS 溶液にて細胞を 37 度 10 分間処理した。PBS にて洗浄後 0.1 M EDTA-PBS 溶液に細胞を加えた。その後、細胞から自動核酸抽出機 (NA-2000, KURABO) により DNA を回収した。Ad ベクターの E4 領域のゲノム配列を鋳型として、プライマー CACCACCTCCCGTACCATA (sense) と CCGCACCTGGTTTGCTT (antisense)、蛍光標識プローブとして AACCTGCCCGCCGGCTATACACTG (sense) を用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector; Perkin-Elmer Applied Biosystems) にて細胞 DNA 中に含まれる Ad ゲノム DNA 量を定量した。

#### (5) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキより入手) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold) で測定した。

#### (6) マウス遺伝子導入実験

マウス (C57BL/6、5w, female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ  $3 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  VP で投与し、2 日後の各臓器 (心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓) でのルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (7) Ad ベクター投与後のマウス組織分布の測定

マウス (C57BL/6、5w, female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ  $3 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  VP 投与し、3 時間後の各臓器の DNA を自動核酸抽出機 (NA-2000) により回収し TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector) にて臓器 DNA 中に含まれる Ad ゲノム DNA 量を定量した。

#### (8) Ad ベクター投与後のマウス肝臓中での Ad 分布の測定

マウス (C57BL/6、5w, female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ  $3 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  VP 投与した。3 時間後の肝臓をコラゲナーゼ還流法、および遠心分離法により実質細胞と非実質細胞 (血管内皮細胞、クッパー細胞等を含む) に分離し、それぞれの細胞から自動核酸抽出機 (NA-2000) により DNA を回収した。回収した DNA を用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector) にて Ad ゲノム DNA 量を定量した。

#### (9) Ad ベクター投与後の血中滞留性の測定

マウス (C57BL/6、5w, female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ  $3 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  VP 投与した。尾静脈内投与の場合は投与後 2、10、30 分、腹腔内投与の場合は投与後 2、60、12、180 分に眼下採血によりマウス全血を回収した。それぞれの全血から QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen) により DNA を回収した。回収した DNA を用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector) にて Ad ゲノム DNA 量を定量した。

#### (10) Ad ベクター投与後の血清中肝逸脱酵素、およびインターロイキン (IL) 6 の測定

マウス (C57BL/6、5w, female) の尾静脈内または腹腔内より種々の Ad ベクターをそれぞれ  $3 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{11}$  の物理学的タイターで投与した。投与後 3、

48 時間に採血し、血清を回収した。血清中肝逸脱酵素は 48 時間後の血清を用いて Transaminase-CII kit (Wako) にて AST/ALT 酵素量を測定した。IL-6 は 3 時間後の血清を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BIOSOURCE) にて血清中 IL-6 濃度を測定した。

#### B. 1. 7 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクターの開発

##### (1) Ad ベクタープラスミドの作製

##### pIX 改変型 Ad ベクター (pAdHM56) システムの作製

pAdHM41 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003)) を NotI で処理し、セルフライゲーションすることによってプラスミド pAd3' -IX1 を得た。Ad ゲノムをテンプレートに合成オリゴ DNA (5' -GTTGACGGCTCTTTGGCACAAATTGGATTC-3') と (5' -ACACTTGCTTGATCCAAATCCAACAGAGTCTGGTTTTTATTTATGTTTTATCTAGAAACCGCATTGGGAGGGGAGGAAGC-3') をプライマーとして得た PCR 断片を MunI と BsaBI 処理し、予め MunI と BsaBI 処理した pAd3' -IX1 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プラスミド pAd3' -IX4 を得た。Ad ゲノムをテンプレートにし合成オリゴ DNA (5' -GCTTCCTCCCCTCCCAATGCGGTTTCTAGATAAAACATAAATAAAAACCGACTCTG-3') と (5' -TGACGTTAGTGATCCAGAAATATCTTCGC-3') をプライマーとして得た PCR 産物を XbaI と BstXI で処理し、予め XbaI と BstXI で処理した pAd3' -IX4 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プラスミド pAd3' -IX5 を得た。pAd3' -IX5 及び pAdHM41 を PI-SceI と BstZ17I で処理した後、ライゲーションを行い、その後制限酵素解析により pAdHM56 のプラスミドを得た。作製した pAdHM56 は Ad ゲノムの pIX の C 末端にユニークな制限酵素サイト XbaI、およびファイバーノブの HI loop と C 末端領域をコードした領域にそれぞれユニークな制限酵素サイトである Csp45I と ClaI を有している。また 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。

##### シャトルプラスミド pHM15-75A の作製

カナマイシン耐性遺伝子をもつシャトルプラスミド pHM5 を XbaI で処理し、平滑末端化した後にセルフライゲーションすることによりプラスミド pHM5.3 を得た。pHM5.3 を I-CeuI と SphI 処理した後、合成オリゴ DNA (5' -TCTAGACCTAGGGCTAGCACTAGTGCGGCCGCCATG-3') と (5' -GCGGCCGCACTAGTGCTAGCCCTAGGTCTAGATTAG-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントを

ライゲーションした後に、制限酵素解析とシーケンス解析によって SphI サイトの上流に XbaI, Avr II, NheI, SpeI, NotI をもつプラスミド pHM14 を得た。pHM14 を NotI/SalI で処理したフラグメントと、合成オリゴ DNA (5' -GGCCGCCTGTTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCAGGAGCTGCGGGTGCCTCGCTGGCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCG-3' ) と (5' -TCGACGAGCCGCTTACGCAGCTTGCAGGTGCCAGGCGAGGCCACCCGAGCTCCTCGGTGCTCTGGCCGAGCATGGCCTGCACCTCGCCGCGGTACTGCACGAGGC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pHM14-45A2 を得た。また pBluescript (STRATAGENE) を SpeI/SalI 処理したフラグメントと、合成オリゴ DNA (5' -CTAGTTACAAGCTGGCCGACGAGGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGCGGGCGAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC-3' ) と (5' -GGCCGCACAGTCTCCATGTCCGCCCCAGCCGGGCGCTGCGCGCCTGCAGTCTTGGACAGCCGTGCCCGCTCCTCGTCGCGCAGCTTGTA-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pBluescript45A1 を得た。次に得られたプラスミド pHM14-45A2 と pBluescript45A1 を SpeI/NotI で処理しライゲーションした後、制限酵素解析により pHM14-45A を得た。pHM14-45A を SalI/BamHI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -TCGAGATCCCAACCTATCTGAGCGAAGATGAACTGAAAGCCGCGAAGCCGCTTCAAACGCCAGAACCAACCGGTTCCAAG-3' ) と (5' -GATCCTTCGAACCGGTTGGGTTCTGGCGTTTGAAGGCGCTTCGGCGGCTTTCAGTTCATCTTCGCTCAGATAGGTTGGGATC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pHM14-75A を得た。最後に pHM14-75A を EcoRI/PI-SceI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -AATTGGCGCGCCGCGCCGCGTAAATGAATAGACTAGTCTAGCCCTAGGTCTAGAGTGC-3' ) と (5' -TCTAGACCTAGGGCTAGCACTAGTCTATTCAATTTACGGCGCCGCGCGGCC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pHM15-75A を得た。作製した pHM15-75A はマルチクロニングサイトの両末端に XbaI, Avr II, NheI, SpeI を持ち、そのいずれかで処理したフラグメントと、pAdHM56 を XbaI 処理したものをライゲーションすることで pHM15-75A のマルチクロニングサイトにクロニングされたペプチドやタンパク質を Ad ベクターの

pIX の C 末端領域に 75 Å のリンカーを介して提示できるシャトルプラスミドである。

#### pHM15-GFP(NotI)の作製

pEGFP-N1 (CLONTECH) のマルチクロニングサイト中の SalI および BamHI で処理したフラグメントを合成オリゴ DNA (5' -TCGACGCGGCCGCA-3' ) と (5' -GATCTGCGGCCGCG-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントと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 pEGFP-N1(NotI)を得た。このプラスミドは EGFP (enhanced green fluorescence protein) の cDNA の両末端に NotI サイトを有しており、NotI 処理することで EGFP の遺伝子を切り出し、予め NotI 処理したシャトルプラスミド pHM15 と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 pHM15-GFP を得た。このプラスミドはマルチクロニングサイトの両末端に、XbaI, Avr II, NheI, SpeI を有し、そのいずれかで処理したフラグメントと、pAdHM56 を XbaI 処理したものをライゲーションすることで GFP を Ad ベクターの pIX の C 末端領域に提示できるプラスミドである。

#### ヘキソン改変型 Ad ベクター (pAdHM62) システムの作製

シャトルプラスミド pHM5 のマルチクロニングサイトの KpnI を T4 polymerase と pNdeI linker (TAKARA) を用いることで NdeI に変えた。pAdHM41 を NdeI と BamHI で切断することにより得られるフラグメント (Ad ゲノムの 19550bp から 21563bp) を pHM5 のマルチクロニングサイトにクロニングし、制限酵素解析により pHM5-hex1 を得た。次に合成オリゴ DNA (5' -TACGGTTCATATGCAAAACCCAC-3' ) と (5' -ATCTACATCTCACTGTACAATACCACTTTAGGTCTAGATGAGAAAAATTGCATTCCACTTG-3' ) をプライマーに pAdHM41 を鋳型として PCR を行うことによりヘキシソンの Hyper Variable Region 5 (HVR5) 領域にユニークな制限酵素サイトである XbaI をもつフラグメント (Ad ゲノムの 19550bp から 19699) を得た。得られた PCR 産物を NdeI と Bsp1407I で切断し、予め NdeI と Bsp1407I で切断した pHM5-hex1 とライゲーションし、制限酵素解析と DNA シークエンス解析によって pHM5-hex2 を得た。次に pHM5-hex2 を NdeI と PI-SceI で切断し、予め NdeI と PI-SceI で切断した pAdHM4 とライゲーションし、制限酵素解析によって Ad ゲノムの E1 欠損領域の PI-SceI から 21563bp の BamHI までのフラグメント (HVR5 にユニークな制限酵素サイトである XbaI をもつ) を持つプラスミド pHM5-AdHM4 を得た。次に pHM5-AdHM4 を PI-SceI と BamHI で切断したフラグメントと

pAdHM41 を BstZ171 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 pAdHM62 のプラスミドを得た。作製した pAdHM62 は Ad ゲノムのヘキソンの HVR5 領域にユニークな制限酵素サイト XbaI、あるいはファイバーノブの HI loop と C 末端領域をコードした領域にそれぞれユニークな制限酵素サイトである Csp45I と ClaI を有している。また 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。

#### pAdHM41-FLAG(HI)-2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドのファイバーノブの HI loop 領域に FLAG tag (DYKDDDDK) を挿入した pAdHM41-FLAG(HI)-L2 の作製は以下に行った。まず pAdHM41 を Csp45 I で処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CGGACTACAAGGACGATGATGACAAAG-3' ) と (5' -CGCTTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pAdHM41-FLAG(HI) のプラスミドを得た。次に作製したプラスミドを I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと pCMVL1 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM41-FLAG(HI)-L2 を得た。

#### pAdHM41-FLAG(C)-2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドのファイバーの C 末端に FLAG tag を挿入した pAdHM41-FLAG(C)-L2 の作製は以下に行った。まずあらかじめ pAdHM41 の E1 欠損領域に CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼ発現カセットを搭載した pAdHM41-L2 を ClaI で処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTCTGACTACAAGGACGATGATGACAAATAAGG-3' ) と (5' -CGCCTTATTGTGCATCATCGTCCTTGTAGTCAGAGCCACTCCCTGAACCGGATC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pAdHM41-FLAG(C)-L2 を得た。

#### pAdHM56-His-L2、pAdHM56-FLAG-L2、pAdHM56-RGD-L2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドの pIX の C 末端に His tag、FLAG tag 及び RGD 配列 (CDCRGDCFC) を提示した pAdHM56-His-L2、pAdHM56-FLAG-L2、pAdHM56-RGD-L2 の作製は以下の

ように行った。まず pAdHM56 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと XbaI を持たない pCMVL1a を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM56-L2 を得た。pAdHM56-L2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACGGCAGCC-3' ) と (5' CTAGGGCTGCCGTGATGGTGTGGTGTGGCTGCCC-3' ) を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、pAdHM56-His-L2、pAdHM56-FLAG-L2、pAdHM56-RGD-L2 を得た。

#### pAdHM56-His75-L2、pAdHM56-FLAG75-L2、pAdHM56-RGD75-L2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクタープラスミドの pIX の C 末端に 75Å の  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを介して、His tag、FLAG tag、あるいは RGD 配列を有するベクタープラスミドは以下のように作製した。合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACGGCAGCC-3' ) と (5' -CTAGGGCTGCCGTGATGGTGTGGTGTGGCTGCCC-3' ) を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 pAdHM56-His75-L2、pAdHM56-FLAG75-L2、および pAdHM56-RGD75-L2 を得た。

#### pAdHM56-pIX/GFP-L2 の作製

pAdHM56 を XbaI 処理したフラグメントを、予め

Avr II 処理した pHM15-GFP(NotI)をライゲーションした後、制限酵素解析により pAdHM56-pIX/GFP を得た。pAdHM56-pIX/GFP と pCMVL1 を I-CeuI と PI-SceI で処理しライゲーションすることで、pAdHM56-pIX/GFP-L2 を得た。

#### pAdHM62-FLAG-L2、pAdHM62-RGD-L2 の作製

ルシフェラーゼ発現 Ad ベクターのヘキソンに FLAG tag あるいは RGD 配列を提示した pAdHM62-FLAG-L2、pAdHM62-RGD-L2 の作製は以下のように行った。まず pAdHM62 を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントと pCMVL1a を I-CeuI、PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし制限酵素解析により pAdHM62-L2 を得た。pAdHM62-L2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCGACTACAAGGACGATGATGACAAAGG CAGCC-3' ) と (5' -CTAGGGCTGCCTTTGTGCATCATCGCTTGTAGTCGCTG CCC-3' ) と、 (5' -CTAGGGGCAGCTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTCGG GCAGCC-3' ) と (5' -CTAGGGCTGCCGAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAG CTGCCC-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントを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 pAdHM62-FLAG-L2、pAdHM62-RGD-L2 を得た。

#### (2) Ad ベクターの作製

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 10 日間培養後、各 Ad ベクターを得た。

#### (3) ウェスタンブロット

各ウイルススタンパク質 (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 $^{\circ}$ 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、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 3000 倍希釈した mouse anti FLAG tag 抗体 (Sigma)、あるいは 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 10000 倍希釈した goat anti-mouse IgG HRP (Cell Signaling)、あるいは 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; nacalai tesque) 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。

#### (4) ELISA

各 Ad ベクターを carbonate-Bicarbonate buffer (B buffer; Sigma-Aldrich, Inc.) を用いて段階希釈しイムノプレート (Nalge Nunc International) に添加し、一晩 4 $^{\circ}$ C で静置させ固層化した。PBS で 3 回洗浄後、4% Block Ace を 300 $\mu$ L 加え 37 $^{\circ}$ C でブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、1 次抗体として 1000 倍希釈した mouse anti-FLAG tag 抗体、あるいは 1000 倍希釈した rabbit anti-GFP (Green Fluorescence Protein) 抗体を加え、2 時間室温で反応させた。0.05% Tween/PBS で 3 回洗浄後、2 次抗体として 1000 倍希釈した goat anti-mouse IgG HRP (Cell Signaling)、あるいは 1000 倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP (Cell Signaling) を加え、1 時間室温で反応させた。0.05% Tween/PBS で 3 回洗浄後、基質溶液 (TMB PEROXIDASE SUBSTRATE; MOSS INC.) を加えて発色を行い、2N 硫酸を加えることで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450nm、対照波長 655nm) をサンライズレインボーサーモ (wako) で測定した。

#### (5) 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 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。

### B. 1. 8 フェージ表面提示法を用いたターゲットイングリガンドの同定

#### (1) ファイバーノブ発現フェージミドベクターの作製

フェージライブラリーの構築には、Amersham pharmacia biotech 社製のリコンビナント抗体発現システムを用い、フェージミドベクターとして融合タンパク発現カセットが Lac プロモーター支配下にある pCANTAB5E (Amersham pharmacia biotech 社) を用いた。5 型 Ad ファイバーノブのクローニングには、センスプライマーとして 5' -CAGGGTAATGCGGCCAGCCGCGCCATGGCCAATACTTTGTG GACCACACCAGCTCCATCT-3' 及びアンチセンスプライマーとして 5' -ATCTATGTGCGGTGCGGAGAATGCGGCCGCGGAGCCTCCGCGCCGATCCACCACCACCGTCGATTTCTTGGCAATGTATGAAA AAGTG-3' を用い、pAdHM41 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003)) をテンプレートとし PCR を行った。得られた DNA 断片を予め NcoI および NotI 処理した pCANTAB5E に T4 DNA Ligase (New England Biolabs 社製) を用いて組み込み、得られたフェージミドベクターを pCANTAB-knob41 とした。

#### (2) ファイバーノブ発現フェージライブラリーの作製

2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、全てのアミノ酸をコードし得るランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS 配列 (N: A, T, G, C, S: G, C) × 7 配列を導入した 5 型アデノウイルスファイバーノブ発現カセットをフェージミドベクターに組み込んだ。まず、センスプライマーとして 5' -TAGGGATAACAGGGTAATCCATCGATA (NNS)<sub>7</sub>ACGAACCCA AGTGCATACTCTATGTCAATTTTCATG-3' および、アンチセンスプライマーとして 5' -ATCTATGTGCGGTGCGGAGAATGCGGCCGCGGAGCCTCCGCGCCGATCCACCACCACCGTCGATTTCTTGGCAATGTATGAAA AAGTG-3' を用い、pCANTAB-knob41 に対して 96°C 1 分 95°C 1 分 64°C 1 分 70°C 4 分 サイクル数 40 回の条件で KOD plus (TOYOBO 社製) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物 (225bp) を PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製した。その後 PCR 産物を ClaI および NotI 処理し、Purification Kit および Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。これを予め Csp45I および NotI 処理した pCANTAB-knob41 と T4 DNA Ligase (Roche) を用いて、16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を Purification Kit を用いて精製し、Csp45I 処理を行うことでセルフライゲーションの消化を行った。その後 Purification Kit を用いて精製し、大腸菌

TG1 株 (STRATAGENE 社製) に形質転換した。

#### (3) ファイバーノブ提示フェージの作製

作製したフェージミドベクター pCANTAB-knob41 を大腸菌 TG1 株に形質転換し、その適量を 50 µg/ml アンピシリン、2% グルコース含有 LB プレートに播種し、37°C で一晩培養した。生じたコロニーをピックアップし、50 µg/ml アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地中で OD<sub>600</sub>=0.3~0.6 になるまで 37°C、250 rpm で培養した。M13K07 ヘルパーフェージ (Invitrogen) を添加し、37°C、110 rpm で 30 分培養後、37°C、250 rpm で 30 分間培養した。その後、遠心によりペレットを回収し 50 µg/ml アンピシリン、20 µg/ml カナマイシン含有 2YT 培地を用いて 6 時間培養することでファイバーノブ提示フェージを調整した。

#### (4) ファイバーノブ提示フェージの精製

フェージ粒子を含む TG1 培養液を 4°C、2000 rpm、10 分の遠心により上清を回収した。さらに 10000 rpm で 15 分遠心した後、上清を回収し氷冷した 20% PEG-NaCl を 1/5 量加え、激しく混和して 4°C で一晩静置した。15000 rpm で 10 分遠心することによりフェージペレットを作製し、NTE buffer (100mM NaCl、10mM Tris、1mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm のフィルターを用いて濾過し、精製フェージ溶液とした。

#### (5) ELISA

carbonate-Bicarbonate buffer (B buffer; Sigma-Aldrich, Inc.) を用いて 1000 倍希釈した anti-fiber knob 抗体 (University of Texas Southern Medical Center, USA, Dr RD Gerard より供与) をイムノプレート (Nalge Nunc International) に添加し、一晩 4°C で静置させ固層化した。PBS で 3 回洗浄後、4% Block Ace を加え 37°C でブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、各フェージを添加し、室温で 2 時間反応させた。その後、0.05% Tween/PBS で 3 回洗浄し、3000 倍希釈した anti-M13 filamentous phage-HPR (アマシャム) を加え 1 時間室温で反応させた。0.05% Tween/PBS で 3 回洗浄後、基質溶液 (TMB PEROXIDASE SUBSTRATE; MOSS INC.) を加えて発色を行い、2N 硫酸を加えることで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450nm、対照波長 655nm) をサンライズレインボーサーモ (wako) で測定した。

### B. 1. 9 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, 267-276 (2003)) を Csp45I で切断し、合成オリゴ DNA 1 (5' -CGGGCCGCAAGAAGCGCCGCCAGCGCCGCCGCCCCCCCC AGG-3') と合成オリゴ DNA 2 (5' -CGCCTGGGGGGGGCGGCGGCGCTGGCGGCGCTTCTTGCG GCC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントを挿入し、制限酵素解析とシーケンス解析により得た。次に pCMVLI と pAdHM41-TATHI をそれぞれ I-CeuI と PI-SceI で処理しライゲーションすることで pAdHM41-TATHI-L2 を得た。ファイバーノブの C 末端コード領域に TAT ペプチドに相当する遺伝子を挿入した pAdHM41-TATC-L2 は、あらかじめ pAdHM41 に E1 欠損領域にルシフェラーゼ発現カセットが挿入された pAdHM41-L2 を ClaI で切断し、合成オリゴ DNA 3 (5' -CGGATCCGGTTCAGGAGTGGCTCTGGCCGCAAGAAGCGC CGCCAGCGCCGCCGCCCCCCCCAGTAAAGG-3') と合成オリゴ DNA 4 (5' -CGCCTTACTGGGGGGGGCGGCGGCGCTGGCGGCGCTTCT TGCGGCCAGAGCCACTCCCTGAACCGGATC-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントを挿入し、制限酵素解析とシーケンス解析により得た。pIX の C 末端コード領域に  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを介して TAT ペプチドに相当する遺伝子配列を持つ pAdHM56-TAT75-L2 は、はじめに Csp45I と AseI で処理した pHM15-75A に合成オリゴ DNA 5 (5' -CGACGGATCCGGTTCAGGGAGTGGCTGTGGCCGCAAGAA GCGCCGCCAGCGCCGCCGCCCCCCCCAGTAA-3') と合成オリゴ DNA 6 (5' -CGCGTTACTGGGGGGGGCGGCGGCGCTGGCGGCGCTTCT TGCGGCCAGAGCCACTCCCTGAACCGGATCCCT-3') をハイブリダイゼーションしたフラグメントを挿入し、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 pHM15-75A-TAT を構築し、このプラスミドを 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シングにより作製した。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 20 日間培養後、各 Ad ベクターを得た。

## (2) Luciferase assay

SF295、NIH3T3、CHO、および 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。翌日 3000 VP/cell に調整した各 Ad ベクターを 37°C 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。

## B. 1. 10 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' -CCATTACCCTGAATCCCTATTCGAACTGCAACAACATGAA GATAGT-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 ゲノムのヘキシソンの 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 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-CMV2 、 pAdHM64-His-CMV2 、 pAdHM65-His-CMV2 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-CMV2、pAdHM64-CMV2、pAdHM65-CMV2) 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 pCMV1 (pAdHM64、pAdHM65 に関しては XbaI を持たない pCMV1a (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-CMV2 、 pAdHM65-His-CMV2 は pAdHM64-CMV2、pAdHM65-CMV2 を XbaI 処理したフラグメントと合成オリゴ DNA (5' -CTAGGGGCAGCCATCACCATCACCATCACCAGCC-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-CMV2、pAdHM65-His-CMV2 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) ウェスタンブロット

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; nacalai 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* の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. 11 RGD ペプチド付与型ファイバーを有した発現制御型 Ad ベクター開発

#### (1) AdRGD-Off-SEAP6 の作製

E1、E3 領域を欠損した全長の Ad ゲノムを有し E1 欠損領域にユニークな制限酵素部位の I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を、E3 欠損領域にユニークな制限酵素部位の ClaI 部位を、ファイバーノブの HI ループコード領域にユニークな制限酵素部位の Csp45I 部位を有した Ad ベクタープラスミド pAdHM51 を作製した。ファイバーノブの HI ループコード領域の Csp45I 部位に RGD ペプチドをコードしたオリゴ DNA を挿入し pAdHM51-RGD を得た。マルチクローニング部位の両端に ClaI 部位を有したシャトルプラスミド pHM13 に CMV プロモーターからなる tet-off 系の転写活性化因子 tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を挿入して pHM13-ICMV-tTA を作製した。ClaI 処理した pHM13-ICMV-tTA をベクタープラスミド pAdHM51-RGD の ClaI 部位に挿入した (pAdHM51-RGD-tTA1)。次に、テトラサイクリン応

答性のプロモーター (TRE/CMV) と分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子からなるカセット (pHM5-TRE-SEAP の I-CeuI/PI-SceI フラグメント) を E1 欠損領域の I-CeuI と PI-SceI 部位に挿入することで pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP を得た。pAdHM51-RGD-tTA1-SEAP を PacI 処理し、293 細胞にトランスフェクションすることで RGD 配列をファイバーノブに有した SEAP 発現 tet-off アデノウイルスベクター AdRGD-Off-SEAP6 を得た。同様に、野生型のファイバータンパク質を有した Ad ベクター Ad-Off-SEAP6 を作製した。また CMV プロモーター制御下で SEAP を発現する野生型のファイバータンパク質を有した Ad ベクター Ad-CMV-SEAP6 を作製した。

#### (2) 培養細胞への遺伝子導入

HeLa、LNZ308、NIH3T3 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well 播種し、翌日各アデノウイルスベクターを 1.5 時間作用させた。ドキシサイクリン (10ng/ml) 存在下で 48 時間培養後、培養液中の SEAP 産生量を測定した。

#### (3) SEAP 産生量の測定

培地中の SEAP 産生量は Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detection Kit (Clontech) で測定した。

### B. 1. 12 サイトカインおよびケモカインを発現する AdRGD ベクターを用いた癌免疫遺伝子治療の最適化

#### (1) 従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターの作製、精製、および力価測定

従来型 Ad ベクターおよび AdRGD 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。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。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。なお、Fig. 1 に本研究で作製・使用したベクターのコンストラクトを示した。

#### (2) AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 メラノーマ細胞を接種し、腫瘍の長径が 5-7 mm となった時点で、CCL17 ケモカイン発現 AdRGD ベクター (AdRGD-CCL17) あるいはルシフェラーゼ発現 AdRGD ベクター (AdRGD-Luc) を腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、次式に従って腫瘍体積を

算出した。

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

### (3) マウス骨髄由来 DC の調製

マウス骨髄由来 DC は、Lutz らの方法を若干改変して調製した。マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む RPMI1640 中に骨髄をフラッシュした。セルストレーナー (70- $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、40 ng/ml GM-CSF、10% FBS、および 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 で  $0.5 \sim 1 \times 10^6$  cells/ml に懸濁して 100 mm 細菌培養用シャーレに 10 ml ずつ播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、3 日目に新たな培養液を各シャーレに 10 ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10 ml の培養上清を新たな培養液 10 ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として以降の実験に供した。

### (4) gp100 遺伝子導入 DC を投与した B16BL6 担癌マウスにおける細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性の測定

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に B16BL6 細胞を接種し、翌日に gp100 (メラノーマ関連抗原) 発現 AdRGD ベクター (AdRGD-gp100) を 25 MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) で用いて遺伝子導入した DC (gp100/DC) を、これらのマウスの腹部左側皮内に  $10^6$  cells/mouse で投与した。DC 免疫から 1 週間後、これらのマウスから調製した脾細胞をマイトマイシン C (MMC) 処理した B16BL6 細胞と 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、エフェクター細胞を得た。細胞傷害試験は Europium (Eu)-release assay により行った。調製したエフェクター細胞と Eu ラベルしたターゲット細胞 (B16BL6 細胞、EL4 細胞、YAC-1 細胞) とを種々のエフェクター/ターゲット比となるように混合し、4 時間共培養した後、上清中に遊離した Eu 濃度を時間分解蛍光測定法により測定した。エフェクター細胞の細胞傷害活性 (%) は次式に従って算出した。

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

### (5) gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の併用による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に B16BL6 細胞を接種し、その翌日に 25 MOI の AdRGD-gp100 を適用した gp100/DC を腹部左側皮内へ  $10^6$  cells/mouse で投与した。腫瘍の長径が 5-7 mm に達した時点で AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc を腫瘍内投与した。

腫瘍体積変化は、(2)に記述した方法に従って評価した。

### (6) gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与を併用した際の腫瘍浸潤 CD3<sup>+</sup> T 細胞数の解析

(5)に記述した方法に従って C57BL/6 マウスへの B16BL6 細胞接種、gp100/DC 免疫、および AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc 腫瘍内投与を行った。2 日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、OCT compound に浸漬して直ちに液体窒素中で凍結ブロックを作製した。各ブロックから 5  $\mu\text{m}$  の組織切片を作製し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後に CD3 に対する免疫組織染色に供した。免疫組織標本を 400 倍率の顕微鏡下で観察し、腫瘍実質部で任意に選択した 6 視野に存在する腫瘍内浸潤 CD3<sup>+</sup> T 細胞数を計測した。

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

(2)ならびに(5)に記述した方法に従って、AdRGD-CCL17 を投与した B16BL6 腫瘍、ならびに gp100/DC の皮内免疫と AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与を併用したプロトコールにおける B16BL6 腫瘍を調製した。これらの腫瘍を AdRGD-CCL17 投与から 48 時間後に摘出し、Total RNA の抽出ならびにそれを鋳型とした RT-PCR 解析を行った。本検討に用いた PCR 条件は Table 1 に示した。

### (8) AdRGD-IL12 を投与した腫瘍における IL-12 産生量の測定

BALB/cマウスの腹部皮内に Meth-A細胞を接種し、腫瘍の長径が9-10 mmに達した時点で、IL-12発現 AdRGDベクター (AdRGD-IL12)、CCL27ケモカイン発現 AdRGDベクター (AdRGD-CCL27)、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合した AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を、総ベクター用量として  $2 \times 10^7$  PFU で腫瘍内投与した。2 日後に腫瘍を摘出し、20% ホモジネートとした上清中の IL-12 濃度を ELISA により定量した。

### (9) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の OV-HM 腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

B6C3F1 マウスの腹部皮内に OV-HM 細胞を接種し、腫瘍の長径が 7-8 mm に達した時点で、AdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは 9:1、1:1、または 1:9 で混合した AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を、総ベクター用量として  $2 \times 10^7$  PFU で腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定するとともに、マウスの生存率をモニタリングした。なお、腫瘍径が 20 mm を超えたマウスについては安楽死させた。また、腫瘍接種後 90 日目において腫瘍が認められない個体を完全治癒例と判定した。腫瘍体積変化は、