

(2)に記述した方法に従って評価した。

(10) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の Meth-A 腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

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、AdRGD-IL12、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。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。

(11) OV-HM 腫瘍退縮マウスにおける腫瘍特異的免疫記憶の確認

(9)のOV-HM腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスに対し、最初の腫瘍接種から3ヵ月後ないし6ヵ月後に $10^6$ のOV-HM細胞あるいは $3 \times 10^5$ のB16BL6細胞を腹部皮内に投与し、その生着を観察した。腫瘍再接種後60日目においても腫瘍の生着を認めない個体を完全拒絶例と判定した。

(12) Meth-A 腫瘍退縮マウスにおける腫瘍特異的免疫記憶の確認

(10)のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスに対し、最初の腫瘍接種から90日後に $10^6$ のMeth-A細胞あるいは $3 \times 10^5$ のCT26細胞を腹部皮内に投与し、その生着を観察した。腫瘍再接種後60日目においても腫瘍の生着を認めない個体を完全拒絶例と判定した。

(13) ノードマウスを用いた AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

(9)および(10)と同様の方法により、BALB/cノードマウスに生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍に対するAdRGD-IL12単独あるいはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用で腫瘍内投与した際の抗腫瘍効果を検討した。

(14) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果に寄与する免疫細胞サブセットの同定

(9)および(10)と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 (9:1)を $2 \times 10^7$  PFUで投与した (Day 0)。これらのマウスにおけるCD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞、あるいはNK細胞の枯渇には、それぞれ100  $\mu$ lの抗CD4抗体溶液 (GK1.5ハイブリドーマ

腹水)、100  $\mu$ lの抗CD8抗体溶液 (53-6.72ハイブリドーマ腹水)、あるいは40  $\mu$ lの抗asialoGM1抗血清を、Day -3、Day -2、Day -1、Day 0、Day 5、Day 10、およびDay 15の計7回腹腔内投与した。また、コントロール群には正常ラット血清を100  $\mu$ lずつ腹腔内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を検討した。なお、各リンパ球サブセットの枯渇は、末梢血細胞ならびに脾細胞を用いたflow cytometry (FCM) 解析により確認した。

(15) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 を腫瘍内投与した際の腫瘍浸潤 T 細胞サブセットの解析

(9)および(10)と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12、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で投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、(6)に記載した方法と同様にCD3、CD4、CD8、perforinに対する免疫組織染色と腫瘍内浸潤T細胞数の計測を行った。

(16) AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 を腫瘍内投与した際の腫瘍における IFN- $\gamma$ および接着分子発現レベルの評価

(9)および(10)と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを $2 \times 10^7$  PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、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 9に示した。

(17) AdRGD-IL12 を腫瘍内投与したマウスにおける腫瘍特異的リンパ球活性化の評価

(9)と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させたMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを $2 \times 10^7$  PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍組織の所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) ならびに脾臓を摘出した。それぞれから調製したリンパ節細胞と脾細胞をMMC処理したMeth-A細胞と24時間共培養し、*in vitro*抗原再刺激を行った。この抗原再刺激によってIFN- $\gamma$ を産生する細胞数をIFN- $\gamma$  ELISpot assayにより計測した。

(18) Meth-A 腫瘍完全治癒マウスにおける副作用の評価

(9)のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスから肺、肝臓および脾臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。これらの組織をパラフィンブロックに包埋し、厚さ5  $\mu$ mの

組織切片をヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色に供した。病理組織学的観察および所見についてはアプライドメディカルリサーチ社 (大阪) に依頼した。

### B. 1. 13 アポトーシス抵抗性DCワクチンの創製によるDC癌免疫療法の最適化

#### (1) AdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>およびAdRGD-FNKにより遺伝子導入した細胞における遺伝子発現確認

A549細胞に50 MOIのBcl-x<sub>L</sub>発現AdRGDベクター(AdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>)、Bcl-xFNK発現AdRGDベクター(AdRGD-FNK)、あるいはAdRGD-Lucを用いて遺伝子導入した。48時間培養後、これらの細胞におけるBcl-x<sub>L</sub>ならびにBcl-xFNKの発現をWestern blotting法ならびにFCM解析により確認した。

#### (2) AdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>およびAdRGD-FNKにより遺伝子導入したDCの生存率ならびにアポトーシス抵抗性の評価

AdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>、AdRGD-FNK、あるいはAdRGD-Lucを用いて遺伝子導入したDCをGM-CSF非存在下で培養し、経日的にpropidium iodide (PI) 染色法によって生存率を算出した。また、遺伝子導入したDCを48時間培養した後、アポトーシス誘導剤であるStaurosporineを100 nMで添加し、さらに24時間培養した。これらの細胞の生存率をMTT assayによって算出し、Staurosporine未添加群の生存率に対するパーセンテージからアポトーシス抵抗性を評価した。

#### (3) OVA遺伝子とBcl-xFNK遺伝子を共導入したDCにおけるMHC class I分子を介した抗原提示レベルの評価

DCにニワトリ卵白アルブミン(OVA)発現AdRGDベクター(AdRGD-OVA)単独あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、96穴プレートに10<sup>5</sup> cells/100 μl/wellで播種した。2日間あるいは6日間培養後、CD8-OVA1.3細胞を10<sup>5</sup> cells/100 μl/wellで添加し、さらに24時間共培養した。培養上清を回収し、抗原提示刺激を受けたCD8-OVA1.3細胞から分泌されたIL-2濃度をELISAで測定することにより、遺伝子導入DCによるMHC class I分子を介したOVA提示レベルを評価した。

#### (4) OVA遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入したDCによる抗腫瘍効果の評価

DCにAdRGD-OVA単独、AdRGD-OVAとAdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>との併用、あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に5 × 10<sup>4</sup> cells/mouseで投与し、1週間後にE. G7-OVA細胞をマウス左側腹部皮内に攻撃接種した。経日的に腫瘍径

を測定し、B. 1. 12の(2)に示す式に従って腫瘍体積を算出した。また同様に、AdRGD-gp100単独、AdRGD-gp100とAdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>との併用、あるいはAdRGD-gp100とAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入したDCを24時間培養し、C57BL/6マウスの右側腹部皮内に1.5 × 10<sup>6</sup> cells/mouseで投与した。1週間後、B16BL6細胞をマウス左側腹部皮内に攻撃接種し、経日的な腫瘍体積変化をモニタリングした。なお、これらの腫瘍拒絶実験において、腫瘍の長径が20 mmを超えたマウスは安楽死させた。

#### (5) OVA遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入したDCを投与したマウスにおけるCTL活性の測定

DCにAdRGD-OVA単独、AdRGD-OVAとAdRGD-Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>との併用、あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に2.5 × 10<sup>4</sup> cells/mouseで投与し、1週間後にこれらのマウスから調製した脾細胞をMMC処理したE. G7-OVA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<sup>51</sup>Cr-release assayにより行った。調製したエフェクター細胞と<sup>51</sup>Crラベルしたターゲット細胞(E. G7-OVA細胞、EL4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<sup>51</sup>Crの放射活性をγカウンターにより測定した。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。

$$(\% \text{ of lysis}) = \{(\text{検体の}^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然}^{51}\text{Cr 遊離量})\} / \{(\text{最大}^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然}^{51}\text{Cr 遊離量})\} \times 100$$

#### (6) Bcl-xFNK遺伝子を共導入したDCのリンパ節集積性の評価

B. 1. 12の(3)に記述した方法に準拠して、GFPトランスジェニックマウスからDCを調製した。このGFP<sup>+</sup>DCにAdRGD-FNKあるいはAdRGD-Lucを用いて遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCを野生型C57BL/6マウスの右側腹部皮内に2 × 10<sup>6</sup> cells/mouseで投与し、経日的にこれらのマウスから所属リンパ節(鼠径部リンパ節)を摘出した。リンパ節は4% PFAで固定した後、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6 μmの組織切片を作製し、1切片あたりのGFP陽性細胞数を蛍光顕微鏡下で計測した。なお、リンパ節一個につき5切片について計数を行った。

#### (7) gp100遺伝子とFNK遺伝子を共導入したDCを投与したマウスのリンパ節におけるT細胞活性化

レベルの評価

DCにAdRGD-gp100単独あるいはAdRGD-gp100とAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に $1.5 \times 10^6$  cells/mouseで投与し、1週間後にこれらのマウスから調製した脾細胞ならびに鼠径部リンパ節細胞をMMC処理したB16BL6細胞と共培養することで*in vitro*抗原再刺激を行った。共培養18時間後にGolgi Stop reagentを添加し、さらに6時間培養した。これらの細胞を回収し、細胞表面のCD4およびCD8と細胞内のIFN- $\gamma$ をそれぞれに対する蛍光標識抗体で染色した後、リンパ球分画30000個をFCM解析した。

#### B. 1. 14 癌転移におよぼす CAR の影響

##### (1) CAR 安定発現株作成

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

##### (2) ベクターの作成

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

##### (3) 実験的肺転移実験による CAR の癌転移抑制効果の検討

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

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

##### B. 2. 1 全身投与型腫瘍標的化ベクターの創製を目指した Ad ベクターの改良

###### (1) 片末端に RGD ペプチドを付与した PEG の合成

RGD 配列を含むペプチド (YGGRGDTP) を PEG 片末端に 2 分子付与した RGD-PEG-NHS は、Scheme 1 に示す方法により合成した。

###### (2) PEG-Ad ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベクターの作製

Ad ベクターの PEG 修飾および RGD-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リジン残基に対して 25~6400 倍モル量に相当する methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、分子量 2000, 5000, 20000) あるいは RGD-PEG-NHS 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  $37^{\circ}\text{C}$  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 ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベクターの修飾率の算定は、各ベクターを SDS-PAGE したゲルをクーマシブルー染色後、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。一部の検討においては、SDS-PAGE したゲルを 0.1 M ヨウ素溶液を用いて染色し、PEG の存在を検出した。

###### (3) PEG-Ad ベクターの *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

20  $\mu\text{g/ml}$  の Lipofectamine 2000<sup>®</sup> Reagent 存在下あるいは非存在下において、ルシフェラーゼ発現 PEG-Ad ベクターを用いて A549 細胞および B16BL6 細胞に遺伝子導入した。また、加熱処理 ( $90^{\circ}\text{C}$ 、10 分) によって変性させた PEG-Ad ベクターを用いて同様の遺伝子導入を行った。24 時間培養後、各細胞におけるルシフェラーゼ活性 (RLU; relative light unit) を指標に遺伝子発現活性を評価した。

###### (4) マウス抗 Ad 抗血清の作製

$10^{10}$  VP の Ad ベクターをフロイントコンプリートアジュバントと混合し、ICR マウスに皮下投与した。2 週間後および 4 週間後に、 $10^{10}$  VP の Ad をフロイントインコンプリートアジュバンドと混合し、皮下に追加免疫した。最終免疫から 1 週間後、これらのマウスから全血液を回収し、分離した血清をマウス抗 Ad 抗血清として使用した。

###### (5) PEG-Ad ベクターの血中滞留性評価

未修飾 Ad ベクターあるいは PEG-Ad ベクターを BALB/c マウスに尾静脈内投与し、これらのマウスから経時的に採取した血液から全 DNA を抽出した。回

収したDNAは、バイオドットSFを用いてHybond-N+にスロットプロットし、アルカリホスファターゼ標識プローブ（ルシフェラーゼ遺伝子の全長を含む）を用いたSouthern blottingによって血中Adベクター量を算出した。また一部の実験においては、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]

#### (6) 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マウスに各種Adベクターを尾静脈内投与した。投与6時間後あるいは48時間後にこれらのマウスから腫瘍と肝臓を摘出し、(5)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。

#### (7) 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、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日後に主要臓器ならびに腫瘍を摘出し、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。

#### (8) 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 $10^3$  cells/mouseで尾静脈内投与し、その1, 7, 14日後に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、ルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (9) PEG-Adベクターの腫瘍および肝臓における遺伝子発現部位の特定

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、EGFP発現PEG-Adベクターを尾静脈内投与し、2日後に腫瘍および肝臓を回収した。4% PFAを用いて組織を固定後、(5)に記載した方法と同様に凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下でEGFPの発現

部位を特定した。

#### (10) PEG-Ad-TNF $\alpha$ の全身投与による抗腫瘍効果の評価

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、TNF- $\alpha$ 発現Adベクター (Ad-TNF $\alpha$ )あるいは分子量5,000のPEGを用いた修飾率89%のPEG-Adベクター (PEG-Ad-TNF $\alpha$ )を尾静脈内投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を次式に従って算出した。

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

#### (11) PEG-Ad-TNF $\alpha$ を全身投与したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

(10)と同様に各種ベクターを投与したMeth-A担癌マウスから、ベクター投与2日後に肝臓を摘出し、B. 1. 12の(18)に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

#### (12) PEG-Ad-HSVtkの全身投与とGanciclovir (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

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、HSVtk発現Adベクター (Ad-HSVtk)あるいは分子量5,000のPEGを用いた修飾率90%のHSVtk発現PEG-Adベクター (PEG-Ad-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10日間、GCVを50 mg/kg/dayで腹腔内に連続投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を(10)に示した式に従って算出した。また、これらのマウスの体重変化も併せてモニタリングした。

#### (13) PEG-Ad-HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムを施したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

(12)と同様に各種ベクターおよびGCVを投与したMeth-A担癌マウスから、ベクター投与7日後に肝臓を摘出し、B. 1. 12の(18)に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

#### (14) RGD-PEG-Adベクターのインテグリン指向性の確認

RGDペプチド (GRGDTP; 200  $\mu$ g/ml)存在下あるいは非存在下において、Ad-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを用いてB16BL6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を測定した。

#### (15) RGD-PEG-Adベクターを全身投与したマウスの肝臓における遺伝子発現レベルの評価

BALB/cマウスにAd-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に肝臓を摘出し、(7)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。

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

Ad-HSVtkおよびHSVtk発現Ad-TERTベクター(Ad-TERT/HSVtk)を用いてA549細胞ならびにWI38細胞に遺伝子導入した。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。

#### (17) Ad-TERT/HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムの原因発癌モデルマウスにおける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、Ad-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。経口的に腫瘍径を測定し、(10)に示す式に従って腫瘍体積を算出した。

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。

#### (18) Ad-TERT/HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムの肺転移癌モデルマウスにおける有効性と副作用の評価

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-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. 2. 2 化学修飾化Tat-Adベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

#### (1) 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は、Scheme 2に示す方法により合成した。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  $2 \times 10^{11}$  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。その後、作製したTat-Adを分画分子量10,000の透析膜を用いてPBS溶液中で透析(4°C, 4時間)した。また、作製したTat-Adベク

ターの表面電荷はZETASIZER 3000HSを用いて測定し、Adベクター表面へのTatペプチドの結合はSDS-PAGEにより確認した。

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

AdベクターあるいはTat-Adベクターを用いてRAW264.7細胞、B16BL6細胞、CT26細胞、MS1細胞、A549細胞、HeLa細胞、Raiji細胞、U937細胞、KG-1a細胞、およびU937細胞に遺伝子導入した。24時間培養した後、これらの細胞における導入遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。また、対照実験として、活性基を持たないTatペプチドを混和しただけのAdベクターについても遺伝子導入効率を評価した。

### B. 3 遺伝子発現抑制型(short interfering RNA (siRNA) 発現) Adベクターの開発

#### B. 3. 1 脂肪細胞への高効率遺伝子導入と脂肪細胞分化抑制

##### (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大量のコロニーを作る)、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(KKKKKKK)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。

H1 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -ccatgaattcgaacgctgacgctc-3' および 5' -gcaagcttagatctgtgtctcatacagaacttataaattcc-3' を用いてヒトゲノム DNA よりクローニングし、PCR 産物を pHM5 シャトルプラスミドの EcoRI/BamHI 部位に挿入して pHM5-H1 を得た。pHM5-H1-PPAR  $\gamma$  は pHM5-H1 の BglII/XbaI 部位にオリゴ DNA (5' -gatccccgctctgctgatctgagccttcaagagaggctcgcagatcagcagactttttgaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaagctctgctgatctgagcctctcttgaggctcgcagatcagcagacggg-3'、下線はループ配列) を挿入することにより作製した。pHM5-H1-Scramble は pHM5-H1 の BglII/XbaI 部位にオリゴ DNA (5' -gatccccacgctgagtagcttgcgaatttcaagagaatttgcgaactcagcgttttttggaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaacgctgagtagcttgcgaatttctcttgaaatttgcgaagtactcagcgtgg-3'、下線はループ配列) を挿入することにより作製した。オリゴ DNA の配列は ABI PRISM 310 DNA シークエンサーにより確認した。

short hairpin RNA (shRNA) 発現 Ad ベクターは improved in vitro ライゲーション法により作製した。即ち、pHM5-H1、pHM5-H1-PPAR  $\gamma$  および pHM5-H1-Scramble を I-CeuI と PI-SceI で切断し、I-CeuI と PI-SceI で切断した pAdHM41-K7 とライゲーションすることにより pAdHM41-K7-H1、pAdHM41-K7-H1-PPAR  $\gamma$  および pAdHM41-K7-Scramble を得た。作製した Ad ベクタープラスミドを PacI で切断した後 293 細胞へ遺伝子導入し、AdK7-H1、AdK7-H1-PPAR  $\gamma$  および AdK7-H1-Scramble を得た。E1 欠損領域に何も挿入していない AdK7-Null も同様に作製した。これらの Ad ベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析し、-70°C で保存した。Ad ベクターの物理学的 (particle titer) タイターは吸光度測定法により測定した。

## (2) 細胞の培養

マウス 3T3-L1 細胞 (clonal subline of the mouse 3T3 that accumulate large amounts of triglyceride fat when the cells are in the resting state) は Human Science Research Resources Bank (Japan) より購入し (JCRB9014)、10% fetal calf serum (FCS) を含む DMEM 培地

(Dulbecco's modified Eagle's medium) で培養した。NIH3T3 細胞、マウス CAR を安定発現した NIH3T3 細胞は、10% FCS を含む MEM 培地 (minimum essential medium) で培養した。

## (3) 培養細胞への遺伝子導入

マウス 3T3-L1 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) 染色を行った。

## (4) CAR 安定発現 NIH3T3 細胞の作製

マウス肝臓より ISOGEN を用いてトータル RNA を回収した。回収したマウス肝臓トータル RNA から SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェンより入手) を用いて逆転写を行い、マウス肝 cDNA を得た。マウス CAR cDNA は 2 種類のプライマー (5' -accatggcgcgcctactgtgct-3' および 5' -ttcagtagtcttcatatttat -3') を用いて、マウス肝 cDNA からクローニングし、PCR 産物を TA クローニングベクター pGEM-T Easy (プロメガより入手) に挿入して pGEM-T-mCAR を得た。pGEM-T-mCAR を EcoRI で切断し、EcoRI で切断した pcDNA3 (インビトロジェンより入手) とライゲーションすることにより CAR 発現プラスミド pCMV-mCAR を作製した。pCMV-mCAR を SuperFect を用いて NIH3T3 細胞へ導入し、ゲネティシン (G418) を用いて CAR 安定発現細胞 NIH3T3-CAR を作製した。

## (5) CAR mRNA の Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

トータル RNA を ISOGEN reagent (ニッポンジーンより入手) で回収し、RT 反応を SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen より入手) を用いて行った。CAR と GAPDH の PCR 反応は以下のプライマーを用いて行った。CAR: forward, 5' -aattcctgtgaccgttctt-3' ; reverse, 5' -tttctgccagccatggcgta-3' ; GAPDH: forward, 5' -accacagtcctatgccatcac-3' ; reverse, 5' -tccaccacctgttctgta-3' . PCR 反応は以下の条件で行った。CAR: 20 s at 94°C, 10 s at 60°C, and 60 s at 72°C for 35 cycles; GAPDH: 20 s at 94°C, 10 s at 60°C, and 60 s at 72°C for 25 cycles. PCR 産物は 2.0% agarose gel で電気泳動し確認した。

## (6) 脂肪細胞への分化

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は Tontonoz (1994) らの報告に基づいて行った。即ち、細胞がコンフルエントに到達した 2 日後に、

培養液を分化用培養液（ピオグリタゾン（カルビオケムより入手）（3  $\mu$ M）、インスリン（シグマより入手）（150 nM）、デキサメサゾン（シグマより入手）（1  $\mu$ M）および3-イソブチル-1-メチルキサンチン（シグマより入手）（100  $\mu$ M）を含む）に交換し、9日間培養した（この間、3日に一度培地交換を行った）。マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は、細胞内における脂質の量を Oil red O 染色あるいはグリセロール-3-リン酸脱水素酵素（GPDH）活性を測定することで確認した。細胞を 10% ホルムアルデヒドで 2 時間固定した後、0.3% Oil red O 溶液で 4 時間染色した。4 時間後、過剰の染色液を水で洗い流し風乾した。GPDH 活性は GPDH 測定キット（ホクドーより入手）を用いて測定した。

#### (7) PPAR $\gamma$ タンパク質のウェスタンブロット法による検出

細胞抽出液はプロテアーゼ阻害剤（シグマより入手）を含む細胞溶解液（25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl）を用いて調製した。タンパク質量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして Bio-Rad assay kit を用いて測定した。タンパク質試料（10  $\mu$ g）を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件下、SDS-PAGE を行った後、イモビロン P フィルターに転写した。ブロックエースにてブロッキング後、1 次抗体として抗 PPAR $\gamma$  抗体（サンタクルズより入手）または抗グルセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素（GAPDH）抗体（Trevigen より入手）、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体またはウサギ IgG 抗体を反応させた。フィルターを ECL Western blotting detection system（アマシヤムより入手）と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000（富士フィルム製）により測定し、Image Gauge ソフトウェア（富士フィルム製）を用いて定量した。

### B.3.2 発現制御型 short hairpin RNA (shRNA) 発現 Ad ベクターの開発

#### (1) shRNA 発現シャトルプラスミドおよび Ad ベクターの作製

H1 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -ccatggaattcgaacgctgacgtc-3' および 5' -gcaagcttagatctgtgtctcatcacagaacttataaattcc-3' を用いてヒトゲノム DNA よりクローニングし、PCR 産物を pHM5 シャトルプラスミドの EcoRI/BamHI 部位に挿入して pHM5-H1 を得た。テトラサイクリン・オペレーター配列を有した H1 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -tttgccagaattcgaacgctgacgtcatcaaccg-3' お

よ び 5' -ttggaagatctctatcactgataggacttataagattccc aaatccaaagacatttcacgtttatg-3'（下線はテトラサイクリン・オペレーター配列）を用いて pHM5-H1 からクローニングし、PCR 産物を pHM5-H1 の EcoRI/BglII 部位に挿入して pHM5-H1tet0 を得た。pHM5-H1 および pHM5-H1tet0 は各プラスミドの BglII/XbaI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。p53 または c-MYC に対する shRNA 標的配列を挿入するため、p53（5' -gatccccgactccagtgtaatctacttcaagagagtag attaccactggagctttttggaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaagactccagtgtaatctactctcttgaagtagattaccactggagctcggg-3'、下線はループ配列）または c-MYC（5' -gatccccgatgaggaagaatcgatgttcaagagacatcgatttctctcatctttttggaaat-3' および 5' -ctagatttccaaaagatgaggaagaatcgatgtctcttgaacategatttctctcatcggg-3'、下線はループ配列）に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリングを行い、pHM5-H1 および pHM5-H1tet0 の BglII/XbaI 部位へ挿入することにより、pHM5-H1-p53、pHM5-H1-Myc、pHM5-H1tet0-p53 および pHM5-H1tet0-Myc を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

Ad ベクターは improved in vitro ライゲーション法で作製した。即ち、pHM5-H1-p53、pHM5-H1-Myc、pHM5-H1tet0-p53 および pHM5-H1tet0-Myc を I-CeuI および PI-SceI で切断し、I-CeuI/PI-SceI で切断した pAdHM15-RGD と各々ライゲーションした。作製したプラスミドを PacI で切断し、SuperFect（キアゲンより入手）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、ウイルス（Ad-H1-p53、Ad-H1-Myc、Ad-H1tet0-p53 および Ad-H1tet0-Myc）を得た。H1 プロモーターまたは H1tet0 プロモーター配列のみ有した Ad ベクターも同様に調製した。テトラサイクリンレプレッサー（tetR）発現 Ad ベクター（Ad-TR）は improved in vitro ライゲーション法に基づき、CMV プロモーターにドライブされた tetR 発現単位を E1 欠損領域に挿入して作製した。また、E1 欠損領域に外来遺伝子を含まない Ad-null も同様に作製した。ベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH 7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析し、-70°C で保存した。Ad ベクターの物理学的（particle titer）タイターは吸光度測定法により、生物学的（PFU: plaque-forming unit）タイターは End-point dilution 法により測定した。PFU と particle titer の比は各々、Ad-H1-p53 は 1:56、Ad-H1-Myc は 1:58、Ad-H1tet0-p53 は 1:56、Ad-H1tet0-Myc は 1:65、



Ad-TR は 1:24、Ad-null は 1:57 であった。

## (2) 細胞培養

A549 細胞は 10% FCS を含む F12-K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification) medium で培養した。HepG2 細胞は 10% FCS を含む minimum essential medium (MEM) で培養した。

## (3) 培養細胞への遺伝子導入

A549 および HepG2 細胞を 12 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、翌日各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。その後、種々の濃度のドキシサイクリン (クロンテックより入手) 存在下で細胞を培養した。テトラサイクリン制御遺伝子発現システムの為に最適化されたテトラサイクリン不含 Tet-system-proved FCS (クロンテックより入手) を使用した。

## (4) p53 および c-MYC タンパク質のウェスタンブロット法による検出

細胞抽出液はプロテアーゼ阻害剤 (シグマより入手) を含む細胞溶解液 (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) を用いて調製した。タンパク質量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして Bio-Rad assay kit (バイオラッドより入手) を用いて測定した。サンプル (10  $\mu$ g) を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件下、SDS-PAGE を行った後、イモビロン P フィルター (ミリポアより入手) に転写した。ブロックエース (大日本製薬より入手) にてブロッキング後、1 次抗体として抗 p53 抗体 (サンタクルズより入手)、抗 c-MYC 抗体 (サンタクルズより入手) または抗アクチン抗体 (Oncogene Research Products より入手)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体または IgM 抗体を反応させた。フィルターを ECL Western blotting detection system (アマシャルバイオサイエンスより入手) 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、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム製) を用いて定量した。

## (5) p53 および c-MYC siRNA のノーザンブロット法による検出

トータル RNA は ISOGEN (ニッポンジーンより入手) を用いて抽出した。p53 および c-MYC siRNA 発現量を検討するため、ホルムアミドにより変性したトータル RNA (20  $\mu$ g) を 7M 尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した後、Hybond-N+ 膜 (アマシャルバイオサイエンスより入手) に転写した。サンプルのバラつきはエチジウムブロミド染色により確認・補正した。ハイブリダイゼーション

は Rapid-Hyb バッファー (アマシャルバイオサイエンスより入手) を用いて行った。プローブとして標的配列のアンチセンス鎖のオリゴ DNA (19 bp) を MEGALABEL DNA 5' -End Labelling キット (タカラより入手) を用いて標識した。シグナルは BAS-2500 (フジフィルム製) を用いて検出した。

## B. 3. 3 RNA 干渉による標的遺伝子の発現抑制を解除するベクターシステムの開発

### (1) shRNA 発現シャトルプラスミドおよび Ad ベクターの作製

ヒト U6 (hU6) プロモーターを利用した shRNA 発現シャトルプラスミドを作製するため、piGENE-hU6 (iGENE 社より入手) を EcoRI/SalI で切断したヒト U6 プロモーター断片とアニーリングした合成オリゴ DNA (5' -tcgacctgcagcgcagcgaagcttc-3' および 5' -ctaggaagcttgcctgcctgcagg-3' ) を pHM5 の SphI/XbaI 部位へ挿入し、pHM5-hU6 を得た。pHM5-hU6 は BspMI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。ルシフェラーゼまたはスクランブルに対する shRNA 標的配列を挿入するため、ルシフェラーゼ (5' -caccacgctgagtaacttcgaaatttcaagagatttcgaagtactcagcgtttttt-3' および 5' -gcataaaaaacgctgagtaacttcgaaattctcttgaatttcgaagtactcagcgt-3'、下線はループ配列) またはスクランブル (5' -caccgccagctctgtgtaacggatcattcaagagatgacggttacacagactggcctttt-3' および 5' -gcataaaaaagccagctctgtgtaacggatcattcttgaatgatccgttacacagactggc-3'、下線はループ配列) に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリングを行い、pHM5-hU6 の BspMI 部位へ挿入することにより、pHM5-hU6-Lu および pHM5-hU6-Scramble を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

Cre 組換え酵素により RNAi による標的遺伝子発現を解除するベクターに利用するヒト U6 プロモーターは 2 種類のプライマー 5' -ctagcgcagcgaagctcggcagcgaagagg-3' および 5' -gatcaccgctactagtgattccgggttttcgctccttccac-3' を用いて piGENE-hU6 よりクローニングし、PCR 産物を pcDNA3 (インビトロジェンより入手) の EcoRV 部位に挿入して pcDNA3-hU6 を得た。pHM5 の SalI/BamHI 部位にアニーリングした合成オリゴ DNA (5' -tcgacacgcgtataacttcgatatagcatatatacgaagtattggccccg-3' および 5' -gatccccggccataacttcgtataatgtatgctatacgaagtatacgcgtg-3'、下線は loxP 配列) を挿入し pHM5-loxP を得た。pcDNA3-hU6 を SphI および MluI



で切断し、SphI/MluI で切断した pHM5-loxP とライゲーションし pHM5-loxP-hU6 を作製した。pHM5-loxP-hU6 の SphI 部位にアニーリングした合成オリゴ DNA (5' -gcgcccgcataacttcgtatagcatacattatacgaagtatcatg-3' および 5' -ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgcccgcctatg-3'、下線は loxP 配列) を挿入し pHM5-loxP2-hU6 を得た。pcDNA3 を PvuII で切断し NotI 部位に変更した BGH ポリ A 断片を pHM5-loxP2-hU6 の NotI 部位に組換え、pLoxP-hU6 を作製した。pLoxP-hU6 は BamHI/KpnI 部位へ任意の配列を挿入することにより、ショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するように設計している。ルシフェラーゼまたはスクランブルに対する shRNA 標的配列を挿入するため、ルシフェラーゼ (5' -gatccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaagtactcagcgtttttgtac-3' および 5' -aaaaaacgctgagtacttcgaaatttctcttgaatttcgaagtactcagcgtg-3'、下線はループ配列) またはスクランブル (5' -gatccgcccagctctgtgtaacggatcattcaagagatgaccgttacacagactggctttttgtac-3' および 5' -aaaaagccagctctgtgtaacggatcattctcttgaatgaccgttacacagactggcgcg-3'、下線はループ配列) に対するオリゴ DNA を合成し、アニーリングを行い、pLoxP-hU6 の BamHI/KpnI 部位へ挿入することにより、pLoxP-hU6-Lu および pLoxP-hU6-Scramble を作製した。挿入したオリゴ DNA の配列は DNA シークエンサー ABI PRISM 310 により確認した。

pCMVnlsCre を HindIII で切断した後、AscI 部位に変更し、BamHI 部位を AscI 部位に換えた pHM5 へ挿入して、pHM5-CMVnlsCre を作製した。Ad ベクターは improved in vitro ライゲーション法で作製した。即ち、pHM5-CMVnlsCre を I-CeuI および PI-SceI で切断し、I-CeuI/PI-SceI で切断した pAdHM4 とライゲーションした。作製したプラスミドを PacI で切断し、SuperFect (キアゲンより入手) を用いて添付書類に従い 293 細胞にトランスフェクションした。約 10 日間培養後、ウイルス AdCre を得た。また、E1 欠損領域に外来遺伝子を含まない Ad-null も同様に作製した。ベクターは塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製後、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析し、-70°C で保存した。Ad ベクターの物理学的 (particle titer) タイターは吸光度測定法により測定した。

## (2) 細胞培養

293 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地で培養した。A549 細胞は 10% FCS を含む F12-K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification) medium で培養した。

HepG2 細胞は 10% FCS を含む MEM で培養した。

## (3) ルシフェラーゼに対する shRNA 発現シャトルプラスミドによる RNAi 効果の検討

A549 および HepG2 細胞を 96 穴プレートに 1x10<sup>4</sup> cells/well で播種し、翌日ルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-Control (プロメガより入手)、各 shRNA 発現プラスミドおよび pUC18 を 4:1:15 の比で SuperFect (キアゲンより入手) により添付書類に従いトランスフェクションした。48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## (4) ルシフェラーゼに対する shRNA 発現シャトルプラスミドによる RNAi 効果の検討

A549 および HepG2 細胞を 96 穴プレートに 1x10<sup>4</sup> cells/well で播種し、翌日 Ad-CMVnlsCre または Ad-null を 1.5 時間作用させた。さらに翌日 pGL3-Control、各 shRNA 発現プラスミドおよび pUC18 を 4:1:15 の比で SuperFect により添付書類に従いトランスフェクションした。48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## (5) ルシフェラーゼ活性の測定

培養液を除去し、ピッカジーン LT2.0 (東洋インキより入手) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。生じた化学発光は Wallac 1420 ARV0sx マルチラベルカウンタ (Perkin Elmer 製) にて検出した。

## (6) 培養細胞より核 DNA の抽出

細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、細胞溶解液 (0.5% Nonident P-40/10 mM NaCl/3 mM MgCl<sub>2</sub>/10mM Tris-HCl, pH 7.4) を 500 μl 加えた。氷上で 15 分間放置して細胞膜を溶解した後、1400xg で 5 分間遠心した。沈殿を細胞溶解液で 2 回洗浄し、沈殿を核画分とした。核画分を EcoRI で 1 時間処理した後、Proteinase K (0.1 mg/ml) 処理を 37°C で 4 時間行った。フェノール/クロロホルム処理後エタノール沈殿を行い、核 DNA を TE で溶解した。核 DNA 濃度は 260nm の吸光度を測定することにより求めた。核 DNA は 2 種類のプライマー (5' -ctatagtgctcacctaaatgc-3' および 5' -cgattcattaatgcagaccc-3') を用いて PCR を行い、PCR 産物を電気泳動した。

## B. 3. 4 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

### (1) 細胞

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

(10% FCS)で培養した。

## (2) Plasmid と virus

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

ルシフェラーゼに対する shRNA を付与したベクタープラスミドを作製するために、oligonucleotides 1/2

(5' -cgacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaagtactcagcgttttttgaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaacgctgagtacttcgaaattctcttgaatttcgaagtactcagcgt-3' ) および -3/4 (5' -ccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaagtactcagcgttttttgaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaacgctgagtacttcgaaattctcttgaatttcgaagtactcagcgtgg-3' ) (下線はループ配列を示す) を合成、アニーリングし、pAdHM4-hU6a の ClaI と XbaI 部位、および pAdHM4-hU6b の SmaI と XbaI 部位に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6a-Lu and pAdHM4-hU6b-Lu を作製した。ターゲット配列はルシフェラーゼ cDNA の 158 bp から 176 bp である。

ヒト p53 に対する shRNA を付与したベクタープラスミドを作製するために、oligonucleotides 5/6 (5' - cggactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccactggagtcttttttgaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaagactccagtggtaatctacttcttgaagt agattaccactggagtc-3' ) および -7/8 (5' - cggactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccactggagtcttttttgaaat -3' and 5' -ctagatttccaaaaagactccagtggtaatctacttcttgaagt agattaccactggagtcgg-3' ) (下線はループ配列を示す) を合成、アニーリングし、pAdHM4-hU6a の ClaI と XbaI 部位、および pAdHM4-hU6b の SmaI と XbaI 部位に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6a-p53 and

pAdHM4-hU6b-p53 を作製した。ターゲット配列はヒト p53 cDNA の 775 bp から 793 bp である。

野生型の hU6 プロモーターは piGene hU6 (iGENE Therapeutics) 由来のものを用い、これを pHM5 に挿入して pHM5-ihU6 を作製した。pHM5-ihU6 を BspMI で切断し、ルシフェラーゼおよびヒト p53 に対する shRNA をコードし oligonucleotides 11/12 (5' -caccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaa gtaactcagcgtttttt -3' and 5' -tacgaaaaaacgctgagtacttcgaaattctcttgaatttcgaagtactcagcgt-3' ) および -13/14 (5' -caccgactccagtggtaatctacttcaagagagtagattaccactggagtctttttt-3' and 5' -gcataaaaagactccagtggtaatctacttcttgaagttagattaccactggagtc-3' ) (下線はループ配列を示す) を導入した。その後、この siRNA 発現カセットを pAdHM4 の E1 欠損領域に挿入し、それぞれ pAdHM4-hU6-Lu、pAdHM4-hU6-p53 を作製した。

ウイルス (それぞれ Ad-hU6-Lu, Ad-hU6a-Lu, Ad-hU6b-Lu, Ad-hU6-p53, Ad-hU6a-p53, and Ad-hU6b-p53) は PacI で切断したベクタープラスミド (pAdHM4-hU6-Lu, pAdHM4-hU6a-Lu, pAdHM4-hU6b-Lu, pAdHM4-hU6-p53, pAdHM4-hU6a-p53, and pAdHM4-hU6b-p53) を 293 細胞にトランスフェクションすることで作製した。作製した Ad ベクターは、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。各ベクターの粒子数 (vector particle: VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。また、各ベクターの生物学的力価 (plaque-forming unit: PFU) は end point-dilution 法 (TCID<sub>50</sub> 法) により測定した。各ベクターの infectious titer-to-particle ratio は、1:36 for Ad-hU6, 1:31 for Ad-hU6-Lu, 1:28 for Ad-hU6a-Lu, 1:24 for Ad-hU6b-Lu, 1:22 for Ad-hU6-p53, 1:12 for Ad-hU6a-p53, 1:15 for Ad-hU6b-p53 であった。

## (3) 培養細胞への遺伝子導入

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

## (4) ウェスタンブロット

細胞を、protease inhibitors (Sigma) を含む lysis buffer (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) で処理し、Bio-Rad assay kit (Bio-Rad 社) を用いてタンパク濃度を測定した。一定量のタンパクを含む上清を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて非

還元条件下、SDS-PAGEを行った後、ニトロセルロースフィルターに転写した。ブロッキング後、一次抗体として抗ヒト p53 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体 (Oncogene Research Products) を反応させた。メンブランを ECI Western blotting detection system (アマシャムバイオサイエンス社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム社) により検出し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム社) を用いて定量した。

## B. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

### B. 4.1 35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

#### (1) in vitro ライゲーション法による 35 型 Ad ベクターの作製

簡便な in vitro ライゲーション法により 35 型 Ad ベクターを作製するため、ベクタープラスミド pAdMS2, 3, 4 を作製した。即ち、まず自己複製不能とするため、35 型 Ad ゲノムの E1 領域 368~3374 塩基を取り除き、ユニークな制限酵素部位である I-CeuI, SmaI, PstI-SceI 部位を導入した。さらに搭載可能な遺伝子サイズを増大させるため、E3 領域 27761~29731 塩基を取り除き、ユニークな制限酵素部位である SfiI 部位を導入した。pAdMS2 および pAdMS4 は約 3Kb の E1 欠損領域を、pAdMS3 および pAdMS4 は約 2Kb の E3 欠損領域を有している (Fig. 155)。

次に各種プロモーターを有したシャトルプラスミドは、CMV プロモーターを有したシャトルプラスミドである pHCMV5 の CMV プロモーター部分を、the human elongation factor 1 $\alpha$  promoter (EF1 $\alpha$  プロモーター)、the CMV immediate-early 1 gene enhancer/ $\beta$ -actin promoter with  $\beta$ -actin intron (CA プロモーター)、CMV promoter/enhancer with the largest intron of CMV (intron A) (CMVi プロモーター)、the mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK プロモーター)、the murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTR) promoter (MSCV プロモーター) に入れ換えることにより作製した。これらの各種プロモーター下に Enhanced Green Fluorescence protein (GFP) 遺伝子を有した GFP 発現カセットをベクタープラスミド pAdMS4 の E1 欠損領域に挿入することで、各種プロモーターを搭載したベクタープラスミドを得た。さらにこれらのベクタープラスミドを SbfI で消化した後、5 型 AdE4 タンパク質発現 293 細胞にトランスフェクションし、CPE (細胞変性効果) が起こるまで培養することで 35 型 Ad ベクターを得た。CPE 確認後、5

型 AdE4 蛋白質発現 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製し、5 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。

#### (2) ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Biowhittaker 社より入手) は、解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell 社より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3: 20 ng/ml, human IL-6: 20 ng/ml) に懸濁し、1~5 x 10<sup>4</sup> cells/well となるよう、48 穴プレートもしくは 96 穴プレートに播種した。解凍 12~18 時間後、同じくサイトカイン入り培地で調製した GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。その後、細胞を回収・遠心して 35 型 Ad ベクターを取り除いた後、再び細胞を培地に懸濁し培養した。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーター (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson 社) にて解析した。CD34 陽性 CD38 陰性細胞及び CD34 陽性 AC133 陰性細胞への遺伝子導入実験においては、CD34 陽性細胞を解凍後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD38 抗体もしくは phycoerythrin (PE) 標識された抗ヒト AC133 抗体を含む staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、FACSVantage SE (Becton Dickinson 社) を用いて CD38 陰性画分および AC133 陽性画分を回収した。その後、上述と同様に遺伝子導入実験に用いた。

#### (3) フローサイトメーターを用いた CD46 (membrane cofactor protein) の発現解析

CD34 陽性細胞を staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、FITC 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) を添加して、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄したのち、フローサイトメーターで解析した。また、遺伝子導入効率と CD46 の発現レベルの同時解析においては、GFP 発現 35 型 Ad ベクターで処理した細胞を staining buffer (1%BSA 含有 PBS) に懸濁し、抗ヒト CD46 抗体 (E4.3) を添加して、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、PE 標識抗マウス IgG 抗体を含む staining buffer に再懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、staining buffer に再懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

#### (4) 定量的 Real-time PCR によるベクターゲノム量

の解析

細胞に感染したベクター量を Real-time PCR を用いて解析した。即ち、上述の遺伝子導入実験において 35 型 Ad ベクターを感染させた細胞を FACS Vantage SE (Becton Dickinson 社) を用いて GFP 陽性画分及び GFP 陰性画分に分離回収した。回収した各画分の純度は 90% 以上であることを確認した。各画分より、ベクター DNA を含めた全ての DNA を Tissue DNeasy Kit (キアゲン社より入手) を用いて回収した。定量的 Real-time PCR は、2.5 ng sample DNA, 0.5  $\mu$ M プライマー, 0.16  $\mu$ M TaqMan probe, 25  $\mu$ l TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems 社より入手) を含む反応液 (50  $\mu$ l) を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて、95°C 10 分間処理の後、95°C 15 秒及び 60°C 1 分間のサイクルを 50 サイクル反応させることにより行った。プライマー及びプローブは 35 型 Ad の pIX 部分に設定した。配列は以下の通りである。Forward: 5' - TGGATGGAAGACCCGTTCAA-3' , Reverse: 5' -CGTCCAAAGGTGAAGAAGCTTAAAGT-3' , Probe: 5' FAM-CGCCAATTCTTCAACGCTGACCTATGC-TAMRA 3' 。ヒト  $\beta$ -actin の定量に関しては、 $\beta$ -actin control reagent (Applied Biosystems 社より入手) を用いて行った。

#### (5) コロニーアッセイによる遺伝子導入細胞の分化能評価

上述と同様に、35 型 Ad ベクターを 6000 vector particle (VP)/cell で感染させた細胞を FACS Vantage SE を用いて GFP 陽性画分及び GFP 陰性画分に分離回収した。各画分につき 1000 細胞をメチルセルロース入り培地 (Methocult H4444, Stemcell 社より入手) を含む 35mm dish に播種した。培養 14 日後、顕微鏡下観察し、コロニー数を数えた。

### B. 4. 2 35 型 Ad ベクターによるヒト CD46 トランスジェニックマウスへの遺伝子導入

#### (1) 35 型 Ad ベクターの作製

ルシフェラーゼ、Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) もしくは  $\beta$ -galactosidase 発現 35 型 Ad ベクターは、前章と同様にベクタープラスミド pAdMS4 を用いて in vitro ライゲーション法により作製した。

#### (2) CD46 発現 CHO 細胞の作製および遺伝子導入実験

CD46 遺伝子は、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型 DNA とし、以下の条件で増幅した。94°C 15 sec, 63°C 30 sec, 68°C 60 sec for 30 cycles. PCR プライマーは以下のものを用いた。CD46 sense:

5' -ATGGAGCCTCCCGGCCGCCGAGTGTCCC-3' , CD46 antisense:

5' -CGCGGCCGCCTATTCAGCCTCTCTGCTCTGCTG-3' .

増幅した PCR 断片を精製後、pcDNA3.1/Hyg(+)(Invitrogen 社より入手) の PmeI 部位に挿入し、CD46 発現プラスミド pcDNA3.1-CD46 を得た。pcDNA3.1-CD46 を CHO 細胞にトランスフェクション後、Hygromycin 含有培地で 2 週間培養し、各クローンを得た。各クローンを fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて CD46 の発現を解析し、最も発現の高いクローンを得た。CD46 発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験では、96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で細胞を播種し、翌日ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 300, 3000 VP/Cell で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、培地を取り除き LT2.0 (東洋インキより入手) を加え、遺伝子発現量を解析した。

#### (3) マウス骨髄由来樹状細胞の調製

CD46 トランスジェニックマウス (CD46TG マウス) は大阪大学・岡部勝先生より供与していただいた。マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) は endotoxin-free の試薬および器具を使用して、Lutz らの方法 (J. Immunol. Methods, 223, 77-92, 1999) を若干改変して調製した。野生型ならびに CD46TG マウス大腿骨および脛骨を摘出し、complete RPMI1640 (10% ウシ胎仔血清、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、抗生物質) 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、DC 分化用培養液 (40 ng/ml マウス GM-CSF (PeperoTech 社より入手) を含む complete RPMI1640) で 100 mm 細菌培養用シャーレに播種した。3 日目に DC 分化用培養液を各シャーレに 10ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10ml の培養上清を新たな分化用培養液 10ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として実験に用いた。

#### (4) マウス腹腔内マクロファージの調製

腹腔内マクロファージの浸潤を促すため、野生型および CD46TG マウスに 2.9% チオグリコレート培地 1ml を腹腔内投与した。投与より 4 日後、腹腔内よりマクロファージを回収し、実験に用いた。

#### (5) 樹状細胞および腹腔内マクロファージにおける CD46 発現量の解析

各細胞に抗 Fc $\gamma$  RII/III モノクローナル抗体 (2.4G2, Pharmingen 社より入手) を添加して Fc レセプターブロッキングを行った後、Fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識された抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社より入手) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて CD46 の発現を解析した。

#### (6) 樹状細胞ならびに腹腔内マクロファージへの遺伝子導入実験

各細胞を 12 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で 1.5 時間作用させた。合計 48 時間培養後、細胞を回収しフローサイトメーターを用いて遺伝子発現効率を解析した。

#### (7) ウェスタンブロットによるヒト CD46 トランスジェニックマウスにおける CD46 発現解析

野生型ならびに CD46TG マウスより各臓器を回収し、1% Triton X-100, 2mM EGTA, 10% Glycerol, 各種 Protease 阻害剤を含む 20 mM Hepes Buffer (pH7.5) でホモジネートした。15000rpm, 20 分間遠心後、上清を回収し Bio-Rad assay kit (Bio-Rad 社より入手) を用いてタンパク濃度を測定した。一定量のタンパクを含む上清を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて非還元条件下、SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロースフィルターに転写した。ブロッキング後、一次抗体として抗ヒト CD46 血清 (5000 倍希釈) (北海道大学・瀬谷司先生より供与)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (6000 倍希釈) を反応させた。メンブランを ECL Western blotting detection system (アマシャムバイオサイエンス社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム社) により検出し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム社) を用いて定量した。

#### (8) CD46TG マウスへの in vivo 遺伝子導入実験

野生型および CD46TG マウスに、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを  $1.5 \times 10^{10}$  VP/mouse の投与量で静脈内投与、もしくは腹腔内投与した。投与より 48 時間後、マウスより各臓器を回収し遺伝子発現効率を測定した。

#### (9) In vivo 投与後の 35 型 Ad ベクターの体内動態

上記と同様に野生型および CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内および腹腔内投与し、48 時間後各臓器を回収した。各臓器よりベクター DNA を含

む全 DNA を回収した後、Real-time PCR を用いて臓器中に含まれるベクター DNA 量を測定した。定量的 Real-time PCR は、25 ng sample DNA, 0.5  $\mu$ M プライマー, 0.16  $\mu$ M TaqMan probe, 25  $\mu$ l TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems 社より入手) を含む反応液 (50  $\mu$ l) を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて、95°C 10 分間処理の後、95°C 15 秒及び 60°C 1 分間のサイクルを 50 サイクル反応させることにより行った。プライマー及びプローブは 35 型 Ad の pIX 部分に設定した。配列は以下の通りである。Forward: 5' - TGGATGGAAGACCCGTTCAA-3', Reverse: 5' -CGTCAAAGGTGAAGAAGCTTAAAGT-3', Probe: 5' FAM-CGCCAATTCTTCAACGCTGACCTATGC-TAMRA 3'。

#### (10) X-gal 染色による遺伝子発現細胞の同定

CD46TG マウス (ホモ) に対し、 $\beta$ -galactosidase 発現 35 型 Ad ベクターを  $7.5 \times 10^{10}$  VP/mouse の投与量で腹腔内投与した。投与より 48 時間後、右心室より 0.5% グルタルアルデヒド・PBS を注入し灌流固定した。臓器回収後、一部の臓器はさらに界面活性剤を含む 0.5% グルタルアルデヒド・PBS に漬けて 1 時間固定した。その後、X-gal 染色液 (1 mg/ml X-gal, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% IGEPAL C-630, 0.0189M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.0809M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O) で一晩処理した後、顕微鏡下観察した。一部の臓器は Tissue-Tek で包埋した後、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。0.5% グルタルアルデヒド・PBS で固定した後、X-gal 染色液 (1 mg/ml X-gal, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) で一晩処理した。切片を Nuclear fast red (Sigma 社より入手) で対比染色した後、脱水、封入し、顕微鏡下観察した。

### B. 4. 3 35 型 Ad ベクターの CD46 結合部位の検索

#### (1) 35 型 Ad ベクターの作製

前章と同様に調製した。

#### (2) フローサイトメーターを用いた CD46 発現解析

野生型及び各種変異型 CD46 発現 CHO 細胞 (北海道大学・瀬谷司先生より供与) を staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、抗ヒト CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen より入手; M177, M160, 北海道大学・瀬谷司先生より供与) を添加して、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄したのち、Phycoerythrin (PE) 標識されたマウス IgG 抗体を添加してさらに 1 時間インキュベートし、再度 staining buffer で洗浄したのち、フローサイトメーターで解析した。

(3) C2 isoform CD46及びcytoplasmic tail欠損CD46プラスミドの作製

ヒトCD46 C2 isoform遺伝子を含むプラスミドはヒトCD46 C2 cDNAを2種類のプライマーCD46-forward, 5' -ATG GAG CCT CCC GGC CGC CGC GAG TGT CCC-3' 及びCD46-reverse, 5' -CGC GGC CGC CTA TTC AGC CTC TCT GCT CTG CTG -3' を用いてクローニングし、PCR産物をpcDNA3.1-Hyg(+)(Invitrogenより入手)のPmeI部位に挿入しpcDNA-CD46C2を得た。cytoplasmic tail欠損(アミノ酸残基347-369)CD46(CD46Δ Cyt 0)のcDNAはCD46 C2のcDNAをテンプレートとし、2種類のプライマーCD46-forward(上記記載)及びCD46TM-reverse, 5' -GCG GCC GCT CAG TAC GGG ACA ACA CAA ATT ACT GCA AC-3' を用いてクローニングし、PCR産物をpcDNA3.1-Hyg(+)(Invitrogenより入手)のPmeI部位に挿入してCD46Δ Cyt 0を得た。同様に、cytoplasmic tailのアミノ酸残基352-369 欠損CD46のプラスミドpcDNA-CD46Δ Cyt6は2種類のプライマーCD46-forward(上記記載)及びCD46TM6-reverse, 5' -GCG GCC GCT CAC CTC CTT TGA AGA TAT CTG TAC GGG AC-3' を用いて作製した。挿入したDNAの配列はDNAシーケンサー ABI PRISM 3100-Avantにより確認した。

(4) 野生型及びshort consensus repeats欠損CD46安定発現CHO細胞の遺伝子導入実験

野生型及びshort consensus repeats (SCR) 欠損CD46 発現 CHO 細胞を96穴プレートに $1 \times 10^4$  cells/wellで播種し、翌日ルシフェラーゼ発現35型Adベクターを3000VP/cellで1.5時間作用させた。48時間培養後、培地を取り除きLT2.0(東洋インキより入手)を加え、遺伝子発現量を解析した。

(5) 各SCR認識抗CD46抗体存在下における遺伝子導入実験

CD46 C2 isoform 安定発現 CHO 細胞を96穴プレートに $1 \times 10^4$  cells/wellで播種した。翌日、種々の濃度の各SCR認識抗CD46抗体(MEM-258, Serotec, J4-48, Immunotechより入手; E4.3, M177, M160)を含むメディウムで4°C、1時間インキュベート後、ルシフェラーゼ発現35型Adベクターを3000VP/cellで4°C、1.5時間作用させた。細胞を洗浄後、37°Cでインキュベートし、48時間培養後に培地を取り除き、LT2.0を加え、遺伝子発現量(ルシフェラーゼ発現量)を解析した。

(6) Cytoplasmic tail 欠損 CD46 発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験

cytoplasmic tail 欠損 CD46 の一過性発現のため

に、プラスミド pcDNA-CD46C2、pcDNA-CD46Δ Cyt0、pcDNA-CD46Δ Cyt6 を Superfect(Qiagen 社より入手)を用いてCHO細胞にトランスフェクションした。24時間培養後に細胞を洗浄し、ルシフェラーゼ発現35型Adベクターを3000VP/cellで4°C、1.5時間作用させた。細胞を洗浄後、37°Cでインキュベートし、48時間培養後に培地を取り除き、LT2.0を加え、遺伝子発現量(ルシフェラーゼ発現量)を解析した。また、野生型CD46及びcytoplasmic tail欠損CD46の発現はフローサイトメーターで解析した。

B. 4. 4 35型Adベクターによる細胞表面CD46発現量の減少

(1) 細胞

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

(2) 35型Adベクターの作製

前章と同様に調製した。

(3) フローサイトメリーによるCD46発現量解析

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

ンキュベートした後、測定・解析を行った。

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

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

#### (5) ウェスタンブロットによる CD46 発現量解析

PBMC に 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で加えた後、経時的に細胞を回収・洗浄した。細胞に Lysis buffer を加え可溶化した後、遠心し上清を回収した。上清のタンパク濃度は Bio-Rad assay kit (Bio-Rad 社より入手) を用いて測定した。一定量のタンパクを含む上清を 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて非還元条件下、SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキング後、一次抗体として抗ヒト CD46 血清 (5000 倍希釈) (北海道大学・瀬谷司先生より供与)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (6000 倍希釈) と反応させた。メンブランを ECL Western blotting detection system (アマシャムバイオサイエンス社) と反応させ、生じた化学発光を LAS-3000 (富士フィルム社) により検出し、Image Gauge ソフトウェア (富士フィルム社) を用いて定量した。

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

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

(GAPDH) 遺伝子のために使用した Primer の配列は以下の通りである。

Human CD46

Forward: 5' -GCT ACC TGT CTC AGA TGA CG-3'

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

GAPDH

Forward: 5' -GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3'

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

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

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト初代細胞、培養細胞は、研究用の市販品、領布品を用いており、倫理的問題はない。



## C. 研究結果

### C.1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

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

糖尿病の分子メカニズムの解明ならびに治療に向けた研究分野で最も切望されている基盤技術のひとつに、膵島  $\beta$  細胞への効率の良い遺伝子導入系の開発があげられる。しかしながら、膵島のような細胞集団塊への効率の良い遺伝子導入を検討したものは、従来型の Ad ベクターを含めほとんどない。これらのことから、主任研究者らが開発済みの改良型 Ad ベクターを用いて、マウスおよびラットより単離した膵島への遺伝子導入効率を検討した。

はじめに、膵島  $\beta$  細胞へ Ad ベクターが感染できるかどうか検討するために、マウス  $\beta$  細胞株 MIN6 を用いた検討を行った。LacZ を搭載した従来型 Ad ベクター (Ad-CMVlacZ) と CMV $\beta$  プロモーターならびに CA プロモーターをもった従来型 Ad ベクター Ad-CMV $\beta$ lacZ、Ad-CALacZ について各濃度で 1 時間作用させた後、24 時間後に  $\beta$ -gal luminescence assay にて遺伝子導入効率を比較したところ、CA プロモーターを搭載した Ad ベクターが最も高い値を示した (Fig. 1A)。次に CA プロモーターを持った各種ファイバー改変型 Ad ベクター (AdRGD-CALacZ ならびに AdK7-CALacZ) を用いて、同様に遺伝子導入効率を検討したところ、ポリリジン (K7) 配列をファイバータンパク質の C 末端領域にもった AdK7-CALacZ が他に比べ高い酵素活性を示した (Fig. 1A)。また、各種ファイバー改変型 Ad ベクターを用いた遺伝子導入について X-gal 染色も行った (Fig. 1B)。1000 VP/cell の濃度ではどの改変型 Ad ベクターでも完全な遺伝子導入は認められなかった。一方、10000 VP/cell の濃度では各種ファイバー改変型 Ad ベクターですべての細胞において完全な遺伝子発現が認められた。3000 VP/cell では他の Ad ベクターより AdK7-CALacZ のものが最も高い遺伝子発現が認められた。

次に、膵島への遺伝子導入効率を検討するために、マウスおよびラットより膵島をコラゲナーゼ法により単離し、一晚培養後、各種ファイバー改変 Ad ベクターを  $2 \times 10^9$  VP/100~200 islets/well in 6well plate の条件下で 1 時間作用させ、24 時間培養後  $\beta$ -gal assay を行った。マウス膵島では、従来型 Ad ベクターと各種ファイバー改変型 Ad ベクターでは大差なく同程度の酵素活性を示した (Fig. 2)。ラット膵島においても、やや AdK7-CALacZ のものが高い傾向が見られたものの、どの Ad ベクターにおいても同程度の酵素活性が認められた (data not shown)。またこのような遺伝子導入効率は  $6 \times 10^7$  VP/100~200 islets までの濃度間において濃度依存的に認められた (data not shown)。Ad の受容体で

ある CAR が膵島に発現しているかをウエスタン・ブロットングにて確認した。マウス単離膵島で CAR が発現していること、その発現は 20 時間培養することにより増加することが明らかとなった。また MIN6 細胞でも CAR が発現していることが確認できた (Fig. 3)。

$\beta$  細胞は膵島の大部分の割合を占めるが膵島中心部に存在し、 $\alpha$  細胞や  $\delta$  細胞など他の細胞が辺縁部にあることが知られている。そこで次に、膵島のどの部位に発現しているかを検討するため、従来型 Ad ベクター作用後 X-gal 染色を行った。膵島全体をそのまま染色してみたところ、完全に全体が染まっていた。しかしながら、膵島切片を作製し X-gal 染色を行ってみたところ、 $\beta$  細胞が存在する内部ではなく、 $\alpha$ 、 $\delta$  細胞が存在する辺縁部のみ染まれていることが認められた (Fig. 4A)。これらは、GFP を搭載した Ad ベクターを用いた共焦点顕微鏡観察においても同様の結果が認められた (Fig. 4B)。これらの原因として、膵島内部への Ad ベクターの浸入に対する物理的な問題が考えられた。そこで次に、 $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer で前処理した後に Ad ベクターを作用させる方法を検討した。一晚培養した膵島を  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer で 15 分処理した後に Ad ベクターを作用させ、同様に 24 時間後  $\beta$ -gal assay を行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer 未処理のものより高い酵素活性を示すことが明らかとなった (Fig. 5)。

膵島は血管を最も豊富に含んでいる臓器の一つである。そこで、遺伝子導入にこれら血管を利用することで、 $\beta$  細胞が存在する膵島内部への遺伝子導入効率をより上昇させることを試みた。膵臓の上流でかつ近位に存在する腹腔動脈を利用することにした。開腹後、脾臓ならびに肝門部で肝動脈と門脈をそれぞれ縫合糸で結紮した後、腹腔動脈より Ad ベクターを注入した (Fig. 6A)。5 分後膵島を単離し、24 時間培養後、共焦点顕微鏡にて蛍光観察をしたところ、搭載遺伝子 GFP の発現が認められた (Fig. 6B, D)。その GFP 発現は、ばらつきはあるものの、期待したように膵島内部にも認められた。Fig. 6C のように膵島全域で GFP 発現が認められるものもあった。実際  $\beta$  細胞に遺伝子発現しているかどうかを確認するために、膵島切片を作製し、抗インスリン抗体を用いて免疫染色を行った。GFP 発現はインスリン産生細胞すなわち  $\beta$  細胞と共存していることから、GFP は  $\beta$  細胞で発現していることが明らかとなった (Fig. 6E)。

#### C.1.2 ヒト間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、従来の Ad ベクター (2 型あるいは 5 型 Ad を

基盤としている)による遺伝子導入には、標的細胞に Ad 受容体 (CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor) の発現を必要とするため、CAR の発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、脂肪細胞、多くのマウス由来の細胞株など) へは Ad ベクターが適用できないことが問題となっている。主任研究者らのグループでは、このような問題を克服できるベクターとして、CAR を利用しなくても効率良く遺伝子導入できる改良型 Ad ベクターの開発を進めている。例えば、 $\alpha v$  インテグリンに親和性がある RGD(Arg-Gly-Asp) ペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CAR を発現していない細胞に対しても  $\alpha v$  インテグリンやヘパラン硫酸を介して効率良く遺伝子導入できるベクターやファイバー領域だけを CAR 以外の分子 (CD46) を受容体としている 35 型 Ad 由来のファイバーに置換したベクターを開発済みである (Fig. 7)。

そこでまず、遺伝子治療や再生医療 (細胞治療) で重要な細胞である間葉系幹細胞、および間葉系幹細胞から分化誘導した脂肪細胞への遺伝子導入効率を最適化することを目的に、各種改良 Ad ベクターを用いて遺伝子導入効率の改善について検討した。

用いたベクターを Table. 1 にまとめた。まず、従来型 (野生型) のファイバータンパク質を有した Ad ベクターを用いて、初代培養ヒト間葉系幹細胞での遺伝子発現に最適なプロモーターの検索を行った (Fig. 8)。検討したプロモーターは EF1 $\alpha$  プロモーター、CMV プロモーター、CMV<sub>i</sub> 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) である。ヒト間葉系幹細胞へ 300VP/cell で各種 Ad ベクターを作用させ、2 日間培養後の LacZ 活性を測定したところ、CA プロモーターが最も効率が高く、CMV プロモーターを用いた場合に比べて約 2 倍強の活性を示した。EF1 $\alpha$  プロモーターを用いた場合は、CMV プロモーターを用いた場合に比べて若干活性が弱く、CMV<sub>i</sub> プロモーターの場合は CA プロモーターと CMV プロモーターの場合の中間であった。従って、ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入に用いるプロモーターとしては、CA プロモーターが最適であり、以後の実験では CA プロモーターを用いて検討した。

次に CA プロモーターを用いた各種ファイバー改良 Ad ベクターでのヒト間葉系幹細胞での遺伝子発現について、X-gal 染色 (Fig. 9) と luminescence assay (Fig. 10) で検討した。用いたファイバー改良 Ad ベクターは、ファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチドを付与したベクター (AdRGD-CALacZ)、ファイバーノブの C 末端領域にポリリジンペプチド

を付与したベクター (AdK7-CALacZ)、ファイバー領域を 35 型 Ad 由来のものに置換したベクター (AdF35-CALacZ) である (Table. 8)。従来型 Ad ベクター (Ad-CALacZ) を用いた場合、3000VP/cell の条件下で作用させても、X-gal 陽性細胞は 10%以下と少なかった。一方、AdK7-CALacZ と AdF35-CALacZ では劇的な遺伝子発現効率の向上が認められ、1000VP/cell の条件下で 100%の細胞が X-gal 陽性となった。AdRGD-CALacZ は Ad-CALacZ に比べた場合は、発現効率の改善が認められたが、AdK7-CALacZ や AdF35-CALacZ に比べ、十分なものではなかった (Fig. 9)。300VP/cell の条件下で作用させた場合の LacZ 活性を luminescence assay で検討した場合は、AdK7-CALacZ、AdF35-CALacZ、AdRGD-CALacZ は Ad-CALacZ に比べ、それぞれ 460、130、16 倍の活性を示した。以上の結果より、ヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入には、ポリリジンタイプファイバー改良 Ad ベクターが最適であり、100%の効率で遺伝子導入可能なことが判明した。

次に、AdK7-CALacZ で遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞での遺伝子発現期間について検討した (Fig. 11)。ベクターを作用させた細胞は、継代を行うことなく、培養した。なお、実験期間中に細胞は過増殖のために死滅することなく、接触阻害を起こして、安定に維持することが可能であった。ベクター作用後、2、5、12、20、33 日後に LacZ 活性を測定したところ、細胞タンパク質量あたりの LacZ 活性は、5 日目に最大を示したが、33 日後まで最大活性 (5 日目) の約 1/2 の活性を維持しており、長期の遺伝子発現を示すことが明らかとなった。

従来型 Ad ベクターによるヒト間葉系幹細胞への遺伝子発現効率が悪い原因について明らかにするため、ヒト間葉系幹細胞における CAR、および CD46 (35 型 Ad の受容体) の発現をフローサイトメーターで確認した (Fig. 12)。その結果、CAR の発現はほとんど全く認められないこと、逆に CD46 はほぼ 100%の細胞が発現していることが判明した。この結果は、従来型 Ad ベクターより遺伝子発現効率が低く、35 型 Ad のファイバーを有したベクターで発現効率が高いことと相関しており、受容体の発現レベルで Ad ベクターによるヒト間葉系幹細胞への遺伝子導入効率の違いが説明できることが明らかとなった。

### C. 1. 3 マウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

次に、マウス間葉系幹細胞への遺伝子導入効率を最適化することを目的として、各種改良 Ad ベクターを使用して遺伝子導入効率の改善について検討した。使用したベクターを Table. 2 にまとめた。マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞での遺伝子導入の最適条件を検討した (Fig. 13)。プロモーター

については、CMV プロモーターと CA プロモーター ( $\beta$ -actin promoter/CMV enhancer with  $\beta$ -actin intron) で検討を行った。マウス間葉系幹細胞へ 500~12500 VP/cell で各種 Ad ベクターを作用させ、2 日間培養後 X-gal 染色で、その遺伝子発現を検討した。その結果、CA プロモーターを使用した場合の方が、LacZ 発現細胞の割合が多かった。次に、CA プロモーターを有したファイバー改変 Ad ベクターについて検討した。ファイバー改変 Ad ベクターとしては、ファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチドを付与したベクター、ファイバーノブの C 末端領域にポリリジンペプチドを付与したベクターを使用した (Table. 2)。従来型 Ad ベクター (Ad-CAIacZ) を使用した場合、2500 VP/cell の条件下で作用させても X-gal 陽性細胞は 20%程度にとどまった。一方、AdK7-CAIacZ では、遺伝子発現効率の上昇が見られ、60~70%の細胞が X-gal 陽性となった。AdRGD-CAIacZ は、Ad-CAIacZ と比較した場合は発現効率の改善がみられたが、AdK7-CAIacZ に比べると効率は不十分であった。以上の結果より、マウス間葉系幹細胞への遺伝子導入には、CA プロモーターを有し、ポリリジンタイプのファイバー改変型 Ad ベクターが最適であることが判明した。

#### C. 1. 4 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

胎盤は、母体-胎児間の物質透過障壁としての機能ばかりでなく、胎児の内分泌器官、代謝器官、排泄器官などの機能をも有している多機能臓器である。この多機能性故、妊婦に対する薬物治療は経代的に重篤な副作用を引き起こす可能性が拭い切れず、妊婦に対する薬物治療の最適化に関する研究は殆ど進展していない。最近になって、ペプチドトランスポーター、薬物排出ポンプ、葉酸トランスポーター、亜鉛トランスポーターが胎盤に存在している報告が相次ぎ、胎盤における薬物輸送担体の発現に関する知見が徐々に集積しつつある。しかしながら、未だこれらの薬物輸送担体の機能に関する実証的解析は進展していない。この要因としては、(1) 倫理的配慮からヒト胎盤組織を検体試料とすることが困難な点、(2) 胎盤機能評価に使用可能な培養細胞が少ない点、(3) 遺伝子工学的な実験手法が確立されていない点、(4) 実験動物において胎盤への効率的遺伝子導入方法がない点などが挙げられる。

昨今のポストゲノム時代を考慮すると、この中でも *in vitro* および *in vivo* での胎盤細胞への効率的遺伝子導入方法の確立が重要な課題であると言える。現在の所、胎盤細胞への遺伝子導入ベクターとしては、カチオン性脂質の他、レトロウイルス、アデノウイルス (Ad)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV) 等のウイルスベクターなどが利用されてきている。一

般的に、Ad ベクターは濃縮等の利便性に優れ、高い遺伝子導入効率を有していると言われているが、胎盤細胞への遺伝子導入については単純ヘルペスウイルス等と同程度の活性しか示していない。このことは、胎盤細胞表面上に存在する各ベクターの受容体分子の発現量の相違に起因していると推察されている。実際、ある種の胎盤細胞において Ad ベクターの細胞表面上の受容体分子である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) の発現量が低下することが知られている。さらに、ヘパラン硫酸やインテグリンをリガンド分子とする AAV ベクターがある種の胎盤細胞に対して高い導入活性を有することが報告されている。これらの結果は、ヘパラン硫酸やインテグリン指向性の Ad ベクターを用いることにより、ベクター作製の簡便性やベクターの濃縮能といった Ad ベクターの特徴を最大限に利用した胎盤細胞への効率的な遺伝子導入の可能性を示唆している。そこで本研究では、各種ファイバー改変型 Ad ベクターを用いてヒトおよびラット胎盤細胞モデルに対する遺伝子導入効率を検討した。

各種ヒト胎盤由来細胞株での CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$  integrin の発現を RT-PCR 法により検討した結果、細胞間においてその発現様式に相違が観察された。JAR 細胞ではいずれの発現も観察されていたが、JEG-3 細胞では  $\beta 3$  integrin の発現、BeWo 細胞では  $\alpha v \beta 5$  integrin の発現がそれぞれ認められなかった (Fig. 14)。これらヒト由来胎盤細胞株への各種 Ad ベクターの遺伝子導入活性を比較したところ、CAR の発現の高い JAR、JEG-3 細胞では Ad-L2 においても高いルシフェラーゼ活性が認められたが、CAR の発現の低い BeWo 細胞では Ad-L2 によるルシフェラーゼ活性は低い値にとどまっていた (Fig. 15)。ファイバー改変型 Ad ベクターを用いることですべての細胞において Ad-L2 以上の高いルシフェラーゼ活性が認められ、Ad-RGD(HI)-L2 で最も高い値を示した。Ad-RGD(HI)-L2 は Ad-L2 に比べ JAR 細胞で約 14 倍、JEG-3 細胞で約 8 倍、BeWo 細胞において約 76 倍の高いルシフェラーゼ活性を示した。Ad-K7(C)-L2、Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 では Ad-L2 に比べそれぞれ約 1.5-10 倍または約 4-10 倍のルシフェラーゼ活性を示した。

各ラット由来胎盤細胞株での CAR、integrin ( $\alpha v$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ ) の mRNA 発現を RT-PCR 法により測定した結果、CAR、integrin ( $\alpha v$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ ) の発現はすべてのラット由来胎盤細胞株で認められた (Fig. 16)。これらのラット由来胎盤細胞株への遺伝子導入活性を検討したところ、いずれのラット由来胎盤細胞株においても Ad-L2 によるルシフェラーゼ活性が認められた。Ad-RGD(HI)-L2 では Ad-L2 に比べ 5-20 倍の高いルシフェラーゼ活性が認められた。

一方、Ad-K7(C)-L2はAd-L2に比べ同等または2分の1程度の低いルシフェラーゼ活性しか認められなかった。Ad-RGD(H1)K7(C)-L2では、Ad-L2に比べ1.5-4倍のルシフェラーゼ活性が認められ、Ad-RGD(H1)-L2が最も高い遺伝子導入活性を持つことが示された (Fig. 17)。

### C. 1. 5 ES細胞への高効率遺伝子導入

ES細胞 (embryonic stem cells; 胚性幹細胞) は無限増殖能と分化多能性を有する細胞であり、1981年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、マウスES細胞は遺伝子欠損マウス作製のための発生工学的材料として広く利用されてきたが、1998年にはヒト胚からもES細胞が樹立され、再生医療への応用が期待されている。ES細胞を目的の細胞に分化させるには、通常時は未分化のまま維持し、適宜何らかの刺激を与えて分化させることが必要である。マウスES細胞は分化を抑制するサイトカインLIF (leukemia inhibitory factor) を加えることにより未分化状態を維持できることが知られているが、その作用機構については不明な点が多い。さらに、未分化ES細胞から目的の細胞に分化させる技術についても試行錯誤の状態が続いている。これらの原因のひとつとして、ES細胞への遺伝子導入技術が確立されていないため、ES細胞への外来遺伝子導入による機能解析研究が行えないことが考えられている。

マウスES細胞への遺伝子導入には、プラスミドを用いたりポフェクションを用い、導入遺伝子が染色体に組み込まれたわずかの細胞を薬剤耐性遺伝子を用いて選択する方法が汎用されている。また、ポリオーマのlarge T抗原を発現させたES細胞の場合には、ポリオーマの複製起点をプラスミドに付与することでプラスミドが染色体外で複製し、遺伝子導入細胞を効率良く選択することが可能となる。これらはES細胞が細胞株であることを利用した外来遺伝子発現法であるが、これらの遺伝子導入系では細胞分化の後も遺伝子発現が続くことによる問題点を伴う。Adベクターは、導入遺伝子が染色体外でエピゾーマルに存在し自律複製することはないため、一過性の遺伝子発現を示し、接着系細胞をはじめとする多くの細胞種に対して効率良く遺伝子導入できることが知られている。

そこで本研究では、ES細胞への効率良い外来遺伝子導入実験系を開発し、それを用いて再生医療に向けたES細胞の分化誘導系を確立することを目的として、ES細胞への適用に最適なAdベクターの開発を行った。プロモーターの異なるLacZ発現AdベクターAd-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZを作製し、フィーダー細胞上で培養したmES細胞に各種ベクターを作用させた(3000

VP/cellの濃度で1.5時間)。その結果、Ad-RSV-LacZおよびAd-CMV-LacZを用いたときはほとんどLacZ陽性細胞が認められなかったのに対し、Ad-CA-LacZおよびAd-EF-LacZを用いたときは高頻度でLacZ陽性細胞が認められた (Fig. 18A-1D)。また、Ad-CA-LacZを用いたときはフィーダー細胞とmES細胞両者に遺伝子導入されたのに対し、Ad-EF-LacZを用いたときはフィーダー細胞にはほとんど発現が見られず、mES細胞特異的に遺伝子発現が認められた (Fig. 18Cおよび18D)。次に、フィーダー細胞非存在下のmES細胞への遺伝子導入を調べた結果、Ad-CA-LacZおよびAd-EF-LacZを用いた場合のみ、高いLacZの発現が得られた (Fig. 18E-18H)。以上より、CAプロモーターあるいはEF-1 $\alpha$ プロモーターを用いることにより、mES細胞に効率よく遺伝子発現させることができ、特にEF-1 $\alpha$ プロモーターはES細胞特異的に遺伝子発現させることが判明した。

また、mES細胞におけるCARの発現をRT-PCR法およびウエスタンブロッティング法により検討した (Fig. 19)。その結果、フィーダー細胞ではCARの発現は認められなかったが、フィーダー細胞上で培養したmES細胞ではCARが高発現していることが明らかとなった。また、用いたmES細胞には未分化ES細胞のマーカーであるOct-3/4も高発現していることを確認した (Fig. 19A)。

さらに、ES細胞での更なる遺伝子発現の上昇が可能かどうかを検討するため、種々のファイバー改変Adベクター (AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ) を作製した。従来型のAdベクターを含めたこれら4種のAdベクターのうち、Ad-EF-LacZが最も高効率かつ特異的にmES細胞にLacZを発現させることが可能であった (Fig. 20)。AdRGD-EF-LacZおよびAdK7-EF-LacZはmES細胞よりもむしろフィーダー細胞にLacZ陽性細胞が認められ、AdF35-EF-LacZを用いたときは両細胞にわずかにLacZ陽性細胞が認められたのみであった。以上の結果より、野生型のファイバーを有し、EF-1 $\alpha$ プロモーターを用いたAdベクターがmES細胞への遺伝子導入には最適であることが明らかとなった。

次に、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES細胞の分化を自由に制御可能かどうかについて検討した。mES細胞ではLIF (leukemia inhibitory factor)/STAT3シグナルや、Oct-3/4、Nanog (共に転写因子) などが多能性維持に必要であることが知られている (Fig. 21)。そこで、EF-1 $\alpha$ プロモーターを有したSTAT3F (STAT3 dominant-negative mutant)、OCT-3/4、Nanog発現Adベクターを作製し、これらベクター作用後のES細胞の分化について検討した。その結果、STAT3Fお

よび Oct-3/4 を導入した mES 細胞では LIF 存在下においても大部分の細胞が分化し (Fig. 22C-D)、三胚葉各マーカー (外胚葉:FGF5, 中胚葉:brachyury(T), 内胚葉:GATA6) の発現を RT-PCR にて調べた結果、三胚葉いずれにも分化していることが明らかとなった (Fig. 23)。さらに、STAT3F による分化は Nanog を共発現することによりレスキューされ、未分化を維持した (Fig. 22E-F)。ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。そこで次に、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを開発するため、まずどのプロモーターが EB に適しているかについて検討した。その結果、CA プロモーターを有した Ad ベクターが最も効率よく遺伝子導入可能であった (Fig. 24)。また、CA プロモーターを有した従来型およびファイバー改変型 (RGD 型および K7 型) Ad ベクターを用いて検討した結果、いずれのベクターもほぼ同程度の遺伝子発現効率を示した (Fig. 25)。以上より、EB には CA プロモーターを有した、従来型の Ad ベクターが最適であることが明らかとなった。

#### C. 1. 6 非特異的遺伝子発現を起さない (特定の組織に移行する活性を持たない) Ad ベクターの開発

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析などを目的とした基礎研究に汎用されている。一方で、標的組織・細胞にのみ遺伝子導入可能なターゲティング Ad ベクターの開発のためには、ベクターの非特異的遺伝子導入を回避し、標的細胞へ特異的に遺伝子導入する機能を付与することが必要である。しかしながら、Ad ベクターはマウスへの全身投与後、そのほとんどが肝臓に集積し、遺伝子発現に至ることが知られており、ターゲット組織での特異的遺伝子発現を目的とする場合は、肝臓での高い遺伝子発現が問題となる。主任研究者らは従来の Ad 受容体である CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を、ファイバーの FG ループの 4 アミノ酸の欠損、ペントンベースの RGD モチーフの欠損、ファイバーシャフトの 35 型 Ad 由来シャフトへの置換を行うことで欠損させ (トリプルミュータント Ad ベクター)、マウスへの尾静脈投与後の肝臓での遺伝子発現を劇的に減少させることに成功し、ターゲティングベクターの基盤ベクターとして有意なベクターを開発済みである。

一方、CAR との結合能を除去するためには、ファイバーノブの FG ループの変異の他に、AB ループの変異 (R412S, A415G, E416G, K417G) も広く利用されている。そこで、トリプルミュータント Ad ベク

ターに付与するファイバーノブの変異として、新たに AB ループに変異を付与したベクター (Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2) を作製し、このベクターと FG ループに変異を付与したトリプルミュータント Ad ベクター (Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2)、さらにコントロールとして従来型の Ad ベクター (Ad-L2) を用いて遺伝子導入能の比較を行った。用いたベクターを Table. 4、Table. 5 にまとめた。まず、従来型のファイバータンパク質を有した Ad-L2 と種々の改良型 Ad ベクターを用いて、培養細胞への遺伝子導入を行った (Fig. 26)。用いた CAR 陽性の LN319 細胞においては Ad-L2 に比べ Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2 は 0.1% 以下のルシフェラーゼ活性しか示さなかった。Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 については Ad-L2 の 0.01% 以下のルシフェラーゼ活性しか示さず、その活性は Mock とほぼ同じ値であった。CAR 陰性の SF295 細胞においても Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べルシフェラーゼ活性の値がそれぞれ約 4%、2% と低い値を示した。次に、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 によるルシフェラーゼ発現能が、ウイルスが defective になっている結果、低くなっているという可能性を否定するため、トランスフェクション試薬の SuperFect (キアゲン社) と、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 との複合体を作製し、遺伝子導入実験を行った。SK HEP-1 細胞に作用させたところ、加えた SuperFect の量に依存してルシフェラーゼ発現の上昇が認められ、15  $\mu$ g の SuperFect を加えた群では (48 well あたり)、SuperFect なしの場合に比べ、約 200 倍の活性を示した。従って、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 自身は遺伝子発現能を有することが明らかとなり、遺伝子導入体として機能できることを確認した (Fig. 27)。

次に、マウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験を行った。尾静脈投与、腹腔内投与共に Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2、および Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 は測定したすべての臓器において Ad-L2 に比べルシフェラーゼ活性の減少が見られ、特に肝臓では静脈内投与において、Ad-L2 に比べ Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2 は 1500 倍、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 では 10000 倍以上のルシフェラーゼ活性の減少が見られた (Fig. 28)。また、腹腔内投与においては、Ad/ $\Delta$ F(FG) $\Delta$ P-S35-L2 は Ad-L2 に比べ肝臓でのルシフェラーゼ活性は 60 倍、Ad/ $\Delta$ F(AB) $\Delta$ P-S35-L2 では 500 倍以上の減少が見られた (Fig. 29)。よって、AB ループの変異を加えたトリプルミュータント Ad ベクターの方が、FG ループに変異を付与したベクターに比べ、マウス肝臓における非特異的な遺伝子発現を減少させることが可能であることを見出した。

これら 2 種類のトリプルミュータント Ad ベクターのマウス *in vivo* における体内動態、組織障害、および自然免疫誘導について従来型 Ad ベクターと