

比較・検討した。まず、マウスへ各ベクターを投与後の Ad 組織分布の測定を行った。尾静脈投与後の Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、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 とほぼ同程度の Ad ゲノム量が検出された (Fig. 30)。腹腔内投与においても、腎臓以外の臓器では Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 共に Ad-L2 とほぼ同程度の Ad ゲノム量が検出された (Fig. 31)。また、Ad ベクターの集積が知られている肝臓での Ad ゲノム量は、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 は従来型 Ad ベクター以上の集積を示した。Fig. 28 で示したように、トリプルミュータント Ad ベクターのマウス肝臓での遺伝子発現は従来型 Ad ベクターに比べ著しく減少しているにも関わらず、Ad ゲノム集積量には顕著な差がないことから、肝臓における Ad ベクターの分布をより詳細に検討した。マウス尾静脈投与後の Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 は肝臓の非実質細胞（血管内皮細胞、クッパー細胞等を含む）に多く存在し (Fig. 32)、逆に Ad-L2 は実質細胞に多く存在していた。一方、腹腔内投与後においては、トリプルミュータント Ad ベクター、および従来型 Ad ベクターは共に肝臓の非実質細胞に多く取り込まれることが明らかとなった (Fig. 33)。過去の我々の報告において、肝臓の非実質細胞に取り込まれた Ad ベクターは実質細胞に取り込まれた Ad ベクターよりも急速に分解を受け消失することを見出している。よって、Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 はマウスへ投与後、肝臓の非実質細胞に取り込まれ、急速に分解・消失することで低い遺伝子発現しか示さなかったと考えられる。しかしながら、肝臓での分布細胞の差だけでは、トリプルミュータント Ad ベクターが従来型 Ad ベクターに比べ 10000 倍以上低い遺伝子発現を示すことの説明はできない。そこで、培養細胞を用いた検討により、遺伝子発現と Ad 細胞内取り込み量の測定を行った。その結果、培養細胞では Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 共に Ad-L2 の 10 分の 1 程度が細胞内に取り込まれているが、遺伝子発現は 100-10000 倍以上低い値を示していることが明らかとなった (Fig. 34, 35)。これはファイバーやペントンベースに加えたアミノ酸変異により、細胞内動態が変化し、Ad ゲノムの核への移行能が変化したためであると考えられる。つまり、トリプルミュータント Ad ベクターの低い遺伝子発現は、細胞表面受容体への結合能の低下と、細胞内へ取り込まれた後の Ad ゲノムの核への移行能低下の二つの原因によることが明らかとなった。

次に、Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、および Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 の血中滞留性を測定したところ、マウス尾静脈内投与後の血中滞留性は従来型 Ad ベクターに比べ大きな変化はなかった (Fig. 36)。一方、腹

腔内投与においては、トリプルミュータント Ad ベクターは従来型 Ad ベクターに比べ高い最高血中濃度を示し、AUC<sub>2-180</sub> においても 5-7 倍の値を示した (Fig. 37)。腹腔内投与時においては、感染力の強い従来型 Ad ベクターは、腹腔内に存在する腹腔内臓膜や横隔膜に大量に感染していたことから (data not shown)、従来型 Ad ベクターは腹腔内の組織に感染するため腹腔内から血液中への移行量が減少し、AUC<sub>2-180</sub> の低下が起これると考えられる。静脈内投与後の血中滞留性がトリプルミュータント Ad ベクターと従来型 Ad ベクターにより変化しないことから、血液中からの消失速度に Ad 受容体との結合能は関与していないことが示唆された。しかしながら、Fig. 32 で示したように、肝臓中の分布細胞が異なることから、静脈内投与後の Ad ベクターの分布には Ad 受容体との結合能が関与していることが示唆された。

遺伝子治療への応用を考えた場合、用いる遺伝子導入ベクター自体の毒性評価が重要となることから、Ad/ $\Delta$ F(FG)  $\Delta$ P-S35-L2、および Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 の肝障害性、及び自然免疫誘導能を検討し、安全性の評価を行った。肝障害の指標である AST/ALT は従来型 Ad ベクターに比べトリプルミュータント Ad ベクターは非常に低い値を示した (Fig. 38)。また、炎症性サイトカインの産生を見るため、投与後 3 時間での血清中 IL-6 濃度を測定したところ、トリプルミュータント Ad ベクターは従来型 Ad ベクターに比べ低い血清中 IL-6 濃度を示した (Fig. 39)。つまり、トリプルミュータント Ad ベクターは肝臓への障害が少なく、炎症性サイトカインの産生が低いことから安全性に優れた Ad ベクターであると考えられる。Ad 受容体との結合能を欠損させることで、マウス *in vivo* での非特異的遺伝子発現を減少させ、さらに組織への毒性を減少させたトリプルミュータント Ad ベクターは、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターになりうるものと期待される。

最後に、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 に細胞表面の特異的分子に親和性を持たせることで、標的分子特異的に遺伝子導入可能であるかを、インテグリンとの親和性を示す RGD 配列をファイバーノブに発現させた Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-RGD-L2 を作製し、検討した。その結果、Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-RGD-L2 は Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-L2 に比べ約 100 倍の遺伝子発現能を示し、この活性はファイバーに発現させた RGD 配列依存的であった (Fig. 40, 41)。従って、Ad のカプシド蛋白質に標的指向性を持つ分子を挿入することで、標的分子特異的な遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。しかしながら、マウスへ *in vivo* 投与した場合には、RGD 配列をファイバーノブに発現させた Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$ P-S35-RGD-L2 は Ad/ $\Delta$ F(AB)  $\Delta$

P-S35-L2 に比べほとんど遺伝子発現の上昇が得られなかった。これは、RGD 配列と標的分子である細胞表面のインテグリンとの親和性が *in vivo* の遺伝子発現の上昇を引き起こすほど十分強くないためか、あるいは Ad ベクターが血管内からアクセスできる細胞に  $\alpha v$  インテグリンが十分発現していないことが原因と考えられる。従って、今後は *in vivo* においても標的分子との強い親和性を有するリガンドの検索が重要になるものと考えられる。

以上をまとめると、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は、AB ループの変異の方が、FG ループの変異に比べ優れていることが明らかとなった。また、マウス *in vivo* の実験により肝臓障害と自然免疫誘導能の低下が示された。さらにファイバーに細胞表面分子を認識するペプチド配列を付与することで、遺伝子導入機能の回復が見られた。これらの結果より、ファイバーノブの AB ループ、ファイバーシャフト、ペントンベースの 3 領域全てを同時に改変することで、特定の臓器で目的遺伝子の発現を起こさない Ad ベクターの更なる改良に成功し、本ベクターは安全性にも優れていることを見出した。今回開発したトリプルミュータント Ad ベクターはターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとなりうるものと期待された。

### C. 1.7 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクターの開発

Ad ベクターは高い遺伝子導入効率を有することから広く用いられているベクターであるが、CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を第一受容体とするため CAR を発現していない細胞には遺伝子導入が困難であるという問題点を抱えている。この問題点を克服するために、主任研究者をはじめとする多くのグループで Ad ベクターのカプシドタンパク質を遺伝子工学的に改変することで、Ad ベクターの感染域の拡大することに成功している。これまでは、突起構造をしているファイバーノブ領域が最も注目され、研究が先行してきた。しかしながら、近年 protein IX (pIX) やヘキソンを改変するアプローチも注目を浴びている。pIX やヘキソンは Ad 粒子あたり 240 分子存在し (ヘキソンは三量体構造をとっているため計 720 分子になる)、コピー数ではファイバーの 36 コピーを圧倒するということ、また pIX に関してはペプチドサイズのみならずタンパク質サイズの大きな分子も提示することが可能であると報告されている (Fig. 42, 43)。しかしながら、これら改変型ベクターの遺伝子発現効率等の比較はほとんどなされていない。

このような背景より、pIX あるいはヘキソンに外来分子を提示することができれば、ファイバー改変

型 Ad ベクターよりも提示される外来ペプチドの数が多くなり、レセプター特異性、遺伝子導入効率に関して優れたベクターになるのではないかと考えられる。そこで本研究では、まず簡便に pIX あるいはヘキソンに外来ペプチド (分子) を提示できる Ad ベクターの作製法を開発し、本方法に従い作製した各カプシドタンパク質改変 Ad ベクターが目的ペプチド配列を各部位に提示できているかどうかを評価した。

これまでに我々は、Ad ベクターの感染域を改変するためにファイバーノブの HI loop あるいは C 末端領域に注目し、簡便にこれらの部位に外来ペプチドを挿入できるベクターシステムを開発してきた。このシステムは、Ad ゲノムの E1/E3 領域を欠損し、さらにファイバーノブの HI loop あるいはあるいは C 末端コード領域に Csp45I、ClaI というユニークな制限酵素サイトを有するベクタープラスミド (pAdHM41) に目的の外来ペプチドをコードする合成オリゴ DNA を *in vitro* ligation で挿入することでファイバー改変型 Ad ベクターが簡便に作製できる。この方法を用いファイバーに RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドやポリリジン (リジン残基が 7 つ続いた配列) 配列を挿入したベクターは、CAR 依存的な遺伝子導入に加え、それぞれ細胞表面のインテグリンやヘパラン硫酸を認識して細胞内に侵入し遺伝子発現することができることが明らかとなっている。

そこでまず、pIX やヘキソンに外来ペプチドを提示することのできる Ad ベクターを作製するために、*in vitro* ligation に基づいた簡便な pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクター作製法の開発を行った。pIX の C 末端コード領域にユニークな制限酵素サイト XbaI を有するベクタープラスミド pAdHM56 の作製を行った。また同時にシャトルプラスミド pHM15-75A を作製した。このシャトルプラスミドは  $\alpha$ -ヘリックスリンカーをマルチクロニングサイト (MCS) に持っており、MCS の両末端には XbaI、Avr II、NheI、SpeI を有している。 $\alpha$ -ヘリックスリンカーの 3' 末端側に目的の外来ペプチドをコードする合成オリゴ DNA を挿入することで pIX の C 末端からリンカーを介し、その先端に外来ペプチドを提示させることが可能である。このシャトルプラスミドの MCS の XbaI、Avr II、NheI、SpeI のいずれかを用いることで目的遺伝子を pAdHM56 の XbaI サイトにワンステップの遺伝子組み換えで挿入することが可能となる (Fig. 44)。pHM15 は目的ペプチドあるいはタンパク質を pIX の C 末端に提示させるためのシャトルプラスミドであり、その MCS の両末端に XbaI、Avr II、NheI、SpeI を有している。

次にヘキシソンの HVR の中で外来ペプチドの提示部位として適した HVR5 領域にユニークな制限酵素

サイト XbaI を有するベクタープラスミド pAdHM62 を作製した (Fig. 45)。作製した pAdHM56、pAdHM62 は E1 欠損領域にユニークな制限酵素サイトを持ち、簡便に目的の発現カセットを挿入することが可能である。今回作製した pAdHM56 と pAdHM62、また以前に作製済みの pAdHM41 を用いて各領域に His tag、FLAG tag、RGD 配列を有する各種 Ad ベクターを作製した。また同様に pIX に外来タンパク質が提示できることを証明するために pHM15 にモデルタンパク質として GFP (green fluorescence protein) を挿入した Ad-EGFP(pIX)-L2 を作製した。作製した Ad ベクターを Table. 6 にまとめた。

次に、カプシド改変型 Ad ベクターの目的領域に外来ペプチドが発現しているかをウエスタンブロットによって、また各領域の外来ペプチドがウイルス表面に提示されているかを Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) によって評価した。ウエスタンブロット法により FLAG tag が目的部位に提示されているかを検討したところ Fig. 46 に示すようにファイバーノブの HI loop 及び C 末端改変型は 60KDa 付近にバンドが検出できていること、pIX 改変型は 14.4KDa にバンドが検出できていること、ヘキソン改変型は 110KDa 付近にバンドが検出された。この結果より、各部位に挿入した FLAG tag は目的部位に融合蛋白質として発現していることが明らかとなった。

次に挿入した外来ペプチドがウイルス表面に提示されているかを検討するために ELISA を行った。その結果、ファイバーノブ HI loop および C 末端、pIX の C 末端、ヘキソンに挿入した FLAG tag を ELISA により濃度依存的に検出できたことから、確かにこれらベクターはウイルス表面に FLAG tag が提示できていることが確認できた (Fig. 47)。また、ヘキソン改変型が極めて高い吸光度を示しているが、これはウイルスあたりのヘキシソンのコピー数が多いために提示される FLAG tag のコピー数が多いことによると考えられる。また同様に pIX の C 末端に GFP を提示したベクターにおいて、ELISA により粒子数依存的な吸光度が認められ (Fig. 48)、さらにはウエスタンブロットにより目的のバンドが検出できた (data not shown)。従って pIX の C 末端に関しては、確かにサイズの小さいペプチドのみでなく GFP のようなタンパク質をも提示できることが明らかになった。

ここまでの検討により pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターはファイバー改変型 Ad ベクターよりもより効果的に外来ペプチドを提示できていることが明らかとなった。次に遺伝子導入効率の向上を目指すにあたり、最適な外来ペプチドの提示部位を評価するために、 $\alpha$ v インテグリンと高親和性の RGD ペプチドをファイバーノブの HI loop 領域、C 末端領

域、pIX の C 末端領域、ヘキシソンの HVR5 (hyper variable region) 領域に提示した Ad ベクター (Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2、Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(hexon)-L2) の遺伝子導入効率に関して従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較検討を行った。また pIX はヘキソンとヘキソンの間に埋まった状態で存在しているのでヘキソン表面まで外来ペプチドが提示できるように  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを介して RGD 配列を提示した Ad-RGD(pIX/75)-L2 も作製し同時に検討を行った。遺伝子導入効率は SK HEP-1 細胞と SF295 細胞におけるルシフェラーゼ発現量を指標に評価した (Fig. 49)。SK HEP-1 細胞は CAR 陽性、SF295 細胞は CAR 陰性であり、いずれの細胞も  $\alpha$ v インテグリン陽性である。SK HEP-1 における各種カプシド改変ベクターの遺伝子発現は Ad-L2 と比較して 2-3 倍の差しかなく、少なくともこれら改変ベクターは Ad-L2 と同様に CAR を介した高効率な遺伝子導入は可能であることが明らかとなった。SF295 細胞において、Ad-RGD(HI)-L2 および Ad-RGD(C)-L2 は、RGD ペプチドとインテグリンの相互作用により、Ad-L2 と比較してそれぞれ約 230 倍、10 倍高い遺伝子発現を達成していた。しかしながら、Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(pIX/75)-L2 および Ad-RGD(hexon)-L2 に関しては、Ad-L2 と同程度の遺伝子発現しか得られなかった。特に Ad-RGD(pIX/75)-L2 は SF295 細胞において Ad-L2 と比較して遺伝子発現が約 3 倍低下していた。この結果から、pIX を改変したことにより pIX (提示させた外来ペプチドとの融合タンパク質の状態) のウイルス粒子へのパッケージング効率が低下していることが関与しているのではないかと考えられたので、次にウエスタンブロットにより各 pIX 改変 Ad ベクターの pIX のパッケージング効率について検討した。その結果、 $\alpha$ -ヘリックスリンカーを持たない Ad-RGD(pIX)-L2 に関しては、Ad-L2 と同様に pIX がウイルス粒子にパッケージングしているが、 $\alpha$ -ヘリックスリンカーを有する Ad-RGD(pIX/75)-L2 に関しては、pIX のウイルスへのパッケージングが顕著に低下していた (Fig. 50a)。また His tag や FLAG tag を提示させる場合であっても、同様の現象が認められた (Fig. 50b)。ただし、pIX のパッケージングが完全に抑制されているわけではないことを確認している (Fig. 50c)。この結果より、pIX の C 末端領域に  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを介して外来分子を提示する場合には注意を要することが明らかとなった。

以上をまとめると、Ad ベクターの感染域の改変を目指し、RGD ペプチドを Ad ベクターのカプシドタンパク質に提示させる場合にはファイバーノブ、特に HI loop 領域に提示させるのが最も効果的であることが明らかとなった。また pIX やヘキシソンの改変は、

ウイルス表面に外来ペプチドを提示できているものの遺伝子発現への関与は低いということが明らかとなった。

#### C.1.8 フェージ表面提示法を用いたターゲティングリガンドの同定

目的の細胞に特異的に遺伝子導入できる次世代 Ad ベクターを開発していくためには、細胞特異性を示す高親和性のリガンド（ペプチド配列）の同定と、それらをファイバー領域に付与した Ad ベクターの開発が必要不可欠である。特定細胞や受容体に親和性を示すペプチドの同定のためには、フェージ表面提示法が汎用されている。しかし、従来のフェージ表面提示法によるペプチドの同定は、Ad ベクターに付与することを目的にしたものではないため、多くの場合、Ad のファイバーに組み込まれたペプチドは、ペプチド本来が有していた細胞への親和性を失ってしまうという問題があった。そこで本研究では、ファイバーノブの HI ループ領域にランダムなペプチド配列を含むファイバーノブ全体を提示したフェージライブラリーを作製し、上記の問題点を克服した迅速な Ad ベクターにおける標的指向性分子のスクリーニング法を確立を目指した研究を行った。

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改変して行った。即ち、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, Inc.) を使用した。pAdHM41 をテンプレートとして、5 型 Ad ファイバーノブ配列を PCR 法によってクローニングした。得られた DNA 断片を、NcoI および NotI 処理した pCANTAB5E に組み込み、得られたフェージミドベクターを pCANTAB-knob41 とした。はじめに pCANTAB-knob41 を大腸菌 TG1 (STRATAGENE 社製) 株に形質転換し、フェージを産生することで Ad5 のファイバーノブをフェージ表面に提示できるかを ELISA を用いて検討した。その結果、何も提示しないフェージと比較してファイバーノブ提示フェージは anti-fiber knob 抗体に対して強い結合が認められたことから、フェージ表面にファイバーノブを提示できることが明らかとなった (Fig. 51)。

次に、pCANTAB-knob41 を使用して 5 型アデノウイルスファイバーノブ発現フェージライブラリーを作製した。ランダムな 7 アミノ酸を 5 型アデノウイルスファイバーノブの HI ループに導入するために、pCANTAB-knob41 をテンプレートとして PCR をおこなった。このとき、全てのアミノ酸を網羅するランダムな 7 アミノ酸をコードする配列、NNS 配列 (N; A, T, G, C, S; G, C) の 7 配列を含むセンスプライマー、及びアンチセンスプライマーを使用した。得ら

れた PCR 産物を精製後、pCANTAB-knob41 に組み込んだ。このプラスミドを大腸菌 TG1 株に形質転換し、フェージライブラリーを作製した。このとき、ライブラリサイズは、 $1 \times 10^7$  CFU だった。また作製したライブラリは、独立したクローンから成り立っていることを確認している (data not shown)。ファイバーノブ提示フェージライブラリーが作製できたので、現在、造血幹細胞や腫瘍血管内皮細胞等への特異的結合能を有するペプチドの同定を目指したスクリーニングを行っている。

#### C.1.9 Ad-TAT ベクターの開発

現在、遺伝子治療のベクターとして用いられている Ad ベクターは sub-group C に属した 5 型 (あるいは 2 型) のヒト Ad を基盤としている。Ad は A から F までの sub-group に分けられ、少なくとも 51 種類の serotype が知られているが、sub-group B に属するウイルスを除き、多くの Ad (5 型 Ad を含む) はレセプターとして coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を認識して細胞に感染する。CAR の発現が乏しいために従来の 5 型 Ad ベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多く、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞などが知られている。また、癌細胞は悪性度の進行と共に、CAR の発現低下および Ad ベクターでの遺伝子導入効率が低下することが報告されており、Ad ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題と考えられる。さらに気道上皮細胞は、CAR を発現しているもののタイトジャンクション構成部位 (あるいは側底膜側) に局在しているため、上皮側から Ad ベクターを作用させても CAR とは接触できず、効率の良い遺伝子導入が困難である。

Ad ベクターによる遺伝子導入時の CAR 依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。ファイバーはテール、シャフト、ノブからなり、ノブ領域が CAR と結合する。主任研究者のグループでは、ファイバーノブの外來ペプチドの挿入部位として適した HI ループや C 末端領域に、1 ステップの *in vitro* ライゲーションで任意のペプチドコード遺伝子を挿入できるシステムを開発しており、極めて簡便に種々のペプチドをファイバーに表現した改良 Ad ベクターが作製できるようになっている。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 (Ad-RGD および Ad-K7)、CAR を発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子を導入できる。 $\alpha v$  インテグリンやヘパラン硫酸は、

多くの細胞で発現していることが知られているため、これらのベクターは広範な細胞種・目的への適用が期待できる一方で、これらの分子を発現していない細胞も依然として存在し、それらの細胞を含めたより広範な細胞に効率よく遺伝子導入可能なベクターの開発は、重要な研究課題である。

一方、近年、HIV (human immunodeficiency virus) 由来の TAT (GRKKRRQRRRPQ) ペプチドに代表される Protein Transduction Domain (PTD; 蛋白質導入ドメイン) と称される、細胞内移行活性を有するペプチドが発見され、これら PTD をタンパク質との複合体・融合体として用いることにより、タンパク質を細胞内へ導入できることが明らかとなってきている。TAT ペプチドによる物質の細胞内への移行メカニズムは未だ議論があるところであるが (レセプターとしてヘパラン硫酸を認識するという報告もあるが詳細は不明である)、あらゆる細胞に対して効率よく活性を示すことから、Ad ベクターの感染域を拡大する新たな試みとして、既存の PTD の中で最も優れているとされている TAT ペプチドの細胞内移行能を遺伝子工学的に Ad ベクターのカプシドタンパク質付与した Ad-TAT ベクターの開発に取り組んだ。ファイバーノブの HI ループコード領域と C 末端コード領域にそれぞれユニーク制限酵素部位である Csp45I 部位と ClaI 部位を挿入したベクタープラスミド pAdHM41 を用いて、ファイバーノブに TAT ペプチドをもつベクターを作製した。また pIX の C 末端コード領域にユニーク制限酵素部位である XbaI 部位を挿入したベクタープラスミド pAdHM56 を用いて、pIX の C 末端領域に TAT ペプチドを挿入したベクターも同時に作製した。

Table 7 に示した様々な改変 Ad ベクターの遺伝子導入活性をルシフェラーゼ発現を指標に比較検討した (Fig. 52)。CAR 陰性の SF295、CHO、NIH3T3 細胞において、TAT ペプチドをファイバーノブの HI ループに挿入したベクター (Ad-TAT(HI)-L2) は従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して約 100-1000 倍高いルシフェラーゼ発現量を示し、さらに Ad-RGD(HI)-L2、Ad-K7(C)-L2 と比較しても約 10 倍高いルシフェラーゼ発現量を示した。また TAT ペプチドをファイバーノブの C 末端に挿入したベクター (Ad-TAT(C)-L2) も、Ad-L2 と比較してよりも約 10-100 倍高いルシフェラーゼ発現量を示し、その発現レベルは Ad-RGD(HI)-L2 や Ad-K7(C)-L2 と同程度だった。また CAR 陽性の細胞においても、Ad-TAT(HI)-L2 は Ad-L2 や Ad-RGD(HI)-L2、Ad-K7(C)-L2 と比較しても約 10 倍高いルシフェラーゼ活性を示した。一方で pIX の C 末端に TAT ペプチドを挿入したベクター (Ad-TAT(pIX/75)-L2) では、いずれの細胞においてもルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。

以上の結果をまとめると、ファイバーノブの HI loop 領域に HIV 由来の TAT ペプチドを提示させることで様々な培養細胞において Ad-RGD や Ad-K7 と比較して高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。本結果より、これまで Ad-RGD や Ad-K7 などの改良型 Ad ベクターを用いても遺伝子導入が困難であった細胞種に対しても、Ad-TAT を用いることで高効率な遺伝子導入が達成できる可能性が示唆された。

#### C. 1. 10 ファイバーレス Ad ベクター

Ad ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中でも最も遺伝子導入効率・発現効率に優れたベクターである。これまで主任研究者らは、Ad ベクターのファイバータンパク質を遺伝子工学的手法により改変することで、Ad ベクターの感染の CAR 依存性を克服できることを報告してきた。一方で、pIX やヘキソンの遺伝子工学的な改変はウイルス表面には外来ペプチドを提示できるものの、遺伝子発現への関与は低いということを明らかとしている (Fig. 49)。この原因は、Ad のカプシドタンパク質の中で最も外郭に存在するファイバーが、pIX (protein IX) やヘキソンに提示した外来ペプチドが細胞表面のレセプターと結合する際に、立体的な障害となっていることが考えられた。つまりファイバーを欠損させれば pIX やヘキソンがウイルスの最も外郭に位置し、これら部位に提示した外来ペプチドは細胞表面のレセプターと結合しやすくなり、その結果外来ペプチド依存的な高効率遺伝子導入が可能になるのではないかと考えた。また、ファイバーを欠損させた Ad ベクターは CAR を介した遺伝子導入が抑制されると考えられるので、Ad ベクターのもう一つの問題点である非特異的な遺伝子導入を抑制できると考えられる。つまり、ファイバーの欠損と pIX やヘキソンに外来ペプチドを挿入する 2 つのアプローチを組み合わせることで、非特異的な遺伝子導入の抑制 (detargeting) と特定レセプターを介した特異的な遺伝子導入 (retargeting) が同時に達成できると考えられる。そこで、はじめにファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vitro*、*in vivo* における遺伝子発現特性を評価した。さらにファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに His tag (HHHHHH) を挿入したベクターを作製し、遺伝子発現特性を評価した。本研究で用いた Ad ベクターを Table 7 にまとめた (Fig. 53)。

はじめに各種ファイバー欠損 Ad ベクター作製のベクタープラスミドを構築した。作製した 3 種類のベクタープラスミドのコンストラクトを Fig. 6 に示す。それぞれのベクタープラスミドは、Ad ゲノムのファイバーコード領域 (31041-32787bp) 及び、E1、E3 領域を欠損しており、E1 欠損領域にユニーク

クな I-CeuI, SmaI, PstI-SceI を有してことから、主任研究者らが開発した improved *in vitro* ligation 法と同様に E1 欠損領域に任意の発現カセットを簡単に挿入可能である。また、ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに外来ペプチドを挿入する場合には、それぞれの領域に存在するユニークな XbaI を用いることで挿入可能である。従来のファイバーを有する Ad ベクターは作製したベクタープラスミドから Ad ゲノムを切り出し、パッケージング細胞である 293 細胞に感染させ、さらに得られてきたウイルスをシードとして増殖させることが可能である。しかしながら、ファイバー欠損 Ad ベクターは 293 細胞表面の CAR と結合することができないために感染することができず、ベクターを増幅することができないと考えられる。そこで恒常的にファイバータンパク質を発現する Fiber-293 細胞に Ad ゲノムをトランスフェクションすることで、完全ではないにしても、一部ファイバーを持ったベクターを産生させる方法を用いた。Fiber-293 で増殖中のベクターは、細胞由来のファイバーを持っており、このベクター (Ad/ $\Delta$  fiber-L2\*) は一部のファイバーが細胞表面の CAR と結合し細胞に感染できることから、ベクターの増幅が可能となる。そして最終的に通常の 293 細胞に感染させることで、ファイバーの供給がなくなり、ファイバーを完全に欠損した Ad ベクター (Ad/ $\Delta$  fiber-L2) が作製できると考えられる。作製したベクターをウエスタンブロット法でファイバーの有無を調べたところ、Ad/ $\Delta$  fiber-L2\* は一部ファイバーを持っていること、さらに最終的に得られた、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は確かにファイバーを持っていないことが明らかとなった (Fig. 54)。またこのような方法で作製した Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は従来のファイバーを持つベクターと同様の高力価のベクターの産生が可能であった (data not shown)。

次に *in vitro* における遺伝子導入活性をルシフェラーゼの発現を指標に検討した。CAR 陽性の SK HEP-1 細胞において、従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して Ad/ $\Delta$  fiber-L2\* は約 3 分の 1、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は約 100 分の 1 にまでルシフェラーゼ発現量が低下していた (Fig. 55a)。つまり Ad/ $\Delta$  fiber-L2\* は一部のファイバーを介して CAR を介した感染が可能であり、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は CAR を介した感染ができないと示唆され、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は確かにファイバーを有していないことが明らかとなった。一方で CAR 陰性の LN444 細胞においては、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は Ad-L2 の約 10 分の 1 のルシフェラーゼ発現量が示し、Ad/ $\Delta$  fiber-L2\* は Ad-L2 の約 2 倍のルシフェラーゼ発現量を示した (Fig. 55b)。この結果の詳細な原因は不明であるが、後述するように (Fig. 60)、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 の安定性の低さが問題となっている可能性が考えられる。つまり、

Ad/ $\Delta$  fiber-L2\*、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 とともにファイバーの欠損により、ペントンベースに存在する RGD モチーフが、直接細胞表面の  $\alpha$ V インテグリンと結合できると考えられるため、Ad-L2 と比較して高いルシフェラーゼ発現量が得られるが、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 は物理的に安定性に乏しいためにルシフェラーゼ発現量が低くなってしまっているのではないかと考えられる。次に、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 によるルシフェラーゼ発現能が、ウイルスが defective になっている結果、低くなっているという可能性を否定するために、トランスフェクション試薬の SuperFect と、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 の複合体を作製し、遺伝子導入実験を行った。SK HEP-1 細胞に作用させたところ、SuperFect の濃度依存的にルシフェラーゼ発現量の上昇が認められた (Fig. 56)。この結果より、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 による遺伝子発現が低いのはウイルスが遺伝子発現能を失っているのではなく、CAR を介した遺伝子導入ができないためであることが確認できた。

次にマウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入実験を行った (Fig. 57)。C57BL/6 マウス (7 週令, ♀) の尾静脈内より、 $1 \times 10^{10}$  VP の Ad-L2 あるいは Ad/ $\Delta$  fiber-L2 を投与後、48 時間に各臓器を回収し、ルシフェラーゼ発現量を測定したところ、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 による遺伝子発現は Ad-L2 と比較して肝臓において約 1000 分の 1 にまで減少していた。また脾臓、肺臓、腎臓、心臓に関しては mock と同等の発現量しか認められなかった。この結果より、Ad の感染に重要なファイバーを欠損することで *in vivo* 投与において、非特異的な遺伝子導入を抑制できることが明らかとなった。一方で近年、*in vivo* において factor X (FX) などの血液凝固因子が CAR 非依存的に、Ad ベクターの肝臓への遺伝子導入に関与しているということが報告されている。Ad/ $\Delta$  fiber-L2 の肝臓における発現も Ad-L2 と比較すると、約 1000 倍低下しているが、わずかではあるがルシフェラーゼの発現が認められたことから、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 の肝臓における遺伝子発現にも CAR 非依存的な経路が関与していることが考えられる。そこで次に、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 が CAR 非依存的な遺伝子導入が可能であるかを検討するために、*in vitro* において FX 存在下の Ad/ $\Delta$  fiber-L2 の遺伝子導入効率をルシフェラーゼ発現量を指標に検討した。その結果、CAR 陽性の SK HEP-1 細胞、CAR 陰性の LN444 細胞いずれの場合においても、FX 存在下では Ad/ $\Delta$  fiber-L2 による遺伝子発現は約 20-40 倍上昇した (Fig. 58)。したがって、Ad/ $\Delta$  fiber-L2 による遺伝子導入に少なくとも *in vitro* においては FX が関与しており、*in vivo* においても FX による CAR 非依存的な遺伝子導入が肝臓における遺伝子発現に関与している可能性を示唆された。

次にファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキソンに His tag (HHHHHH) を挿入した Ad ベクター ( Ad/Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/Δ fiber-His(hexon)-L2 ) を作製し、遺伝子導入特性に関して評価した。なお、 Ad/Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/Δ fiber-His(hexon)-L2 は Ad/Δ fiber-L2 と同様に Fiber-293 細胞を用いてスケールアップを行い、最終段階で通常の 293 細胞に感染させる方法で作製した。はじめに作製した Ad/Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/Δ fiber-His(hexon)-L2 が、それぞれファイバーを完全に欠損しており、かつ pIX やヘキソンに His tag を提示していることを、anti-fiber knob 抗体および anti-His tag 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した (Fig. 59)。次に pIX やヘキソンに提示した外来ペプチドがファイバーの立体障害を除くことで、遺伝子導入効率の向上が認められるかを検討するために、CHO 細胞および細胞膜上に His tag に対する一本鎖抗体を強制発現した CHO-His4 細胞における遺伝子導入効率をルシフェラーゼ発現量を指標に評価した。その結果、詳細な原因は不明であるが、Ad/Δ fiber-L2 では mock よりも高いルシフェラーゼ発現量が認められるにもかかわらず、 Ad/Δ fiber-His(pIX)-L2 と Ad/Δ fiber-His(hexon)-L2 による遺伝子発現量は、いずれの細胞においても mock と同レベルであった。この結果の原因はファイバー、pIX やヘキソンといった、Ad の主要なカプシドタンパク質を改変することで、ベクターの物理的な安定性が損なわれているのではないかと考えられる。そこで次に Ad/Δ fiber-L2 の物理的安定性を、熱処理した後の遺伝子発現能の残存活性を指標に検討した (Fig. 60)。その結果、5 分間 45°C で処理した後、Ad-L2 では約 60% の活性を保持していたのに対して Ad/Δ fiber-L2 は約 0.1% にまでその遺伝子導入活性は低下していた。この結果より、ファイバー欠損 Ad ベクターは物理的に不安定であることが明らかとなり、Ad の安定性に関与しているとされている pIX やカプシドタンパク質の大部分を占めるヘキソンを改変することでより安定性が低下し、その結果遺伝子導入活性がなくなっていたのではないかと考えられる。

以上をまとめると、pIX やヘキソンに提示した外来ペプチドに細胞表面の特定レセプターに対して、より強い親和性を持たせるために、立体障害となりうるファイバーを欠損した Ad ベクターを作製した。その遺伝子発現特性を評価したところ、*in vivo* においても非特異的な遺伝子導入を抑制することができ、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターになりうるということが明らかとなった。しかしながら、pIX やヘキソンに外来ペプチドを付与したファイバ

ー欠損 Ad ベクターは遺伝子発現活性を失っていることが明らかとなった。この結果は、おそらくベクターの物理的安定性の乏しさに起因するものであり、ファイバー欠損 Ad ベクターをターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとして用いるには、安定性の問題は克服すべき点であることが明らかとなった。

### C. 1. 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

RGD ペプチド付与型ファイバーを有し、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できる Ad ベクター作製のためのベクタープラスミドとして、新たに pAdHM51-RGD を作製した。E3 欠損領域に tet-off 系の転写活性化因子 tTA 発現単位を挿入し、E1 欠損領域にテトラサイクリン依存性のプロモーター制御下に目的遺伝子の発現単位を挿入することで、単一のベクターで発現レベルを調節できるファイバー改変 Ad ベクターの作製が可能となった (Fig. 61)。

このようにして作製した分泌性アルカリフォスファターゼ SEAP を発現する AdRGD-Off-SEAP6 と、野生型のファイバーを有する AdOff-SEAP6、および CMV プロモーター制御化で SEAP を発現する AdCMV-SEAP6 の機能を、種々の細胞株で検討した (Fig. 62)。HeLa 細胞は CAR 陽性、 $\alpha v$  インテグリン陽性であり、LNZ308 と NIH3T3 細胞は CAR 陰性、 $\alpha v$  インテグリン陽性である。HeLa 細胞では AdRGD-Off-SEAP6、AdOff-SEAP6、AdCMV-SEAP6 のいずれにベクターにおいても高い SEAP 産生を示した。ドキシサイクリン有無による SEAP 産生の誘導能は AdRGD-Off-SEAP6 は 621 倍、AdOff-SEAP6 は 84 倍であり、誘導時の最大産生量も AdCMV-SEAP6 と同程度であり、十分に高いものであった (Fig. 62A)。一方、LNZ308 と NIH3T3 細胞においては、野生型のファイバーを有した AdOff-SEAP6 と AdCMV-SEAP6 においては低い SEAP 産生しか示さなかったが、RGD ペプチドを付与した AdRGD-Off-SEAP6 においては AdOff-SEAP6 に比べ、数十倍から数百倍の最大 SEAP 産生を示した (Fig. 62B, C)。また、ドキシサイクリン有無による SEAP 産生の誘導能についても、AdRGD-Off-SEAP6 は AdOff-SEAP6 に比べ、断然優れていた。以上の結果より、発現制御型 Ad ベクターにファイバー改変技術を組み合わせたベクターは、より高範囲の細胞に対して優れた発現誘導能を示すことが明らかとなった。

### C. 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

#### C. 1. 12. 1 CCL17 遺伝子の腫瘍内導入による DC 癌免疫療法の有効性改善 (B16BL6 腫瘍モデル)

腫瘍細胞のケモカイン産生レベルは正常細胞よ

りも低いことや、腫瘍新生血管の内皮細胞には接着分子がほとんど発現していないなどの理由から、一般的に免疫細胞は腫瘍組織内に十分に集積することができない。これは、腫瘍関連抗原 (TAA) 特異的な免疫応答を増幅して癌の増殖を免疫学的に抑圧することを目的とする癌免疫療法において、その有効性を大きく制限する要因の一つである。本観点から、我々はケモカイン遺伝子を腫瘍組織に導入することによって、腫瘍組織への免疫細胞動員の増強を可能とする新規癌免疫遺伝子治療の開発を試みた。

まず、あらかじめマウスに生着させた B16BL6 腫瘍内に  $3 \times 10^8$  PFU の AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 64)。AdRGD-CCL17 投与群の腫瘍増殖は、コントロールベクター (AdRGD-Luc) を投与した群と比較して遅延傾向が認められたが、強力な抗腫瘍効果を発揮するまでには至らなかった。これは、腫瘍組織内で発現した CCL17 が免疫細胞を動員できたとしても、それらの免疫細胞が腫瘍特異的な傷害活性を獲得していなければ、効果的な腫瘍細胞排除は達成できないことを示唆している。

免疫療法によって TAA 特異的に活性化された患者体内の免疫細胞は、腫瘍組織内へと浸潤してはじめて腫瘍細胞への傷害活性、すなわち治療効果を発揮できることを考慮すると、従来の免疫療法にケモカインを併用することは、有効性に優れる新規癌免疫療法プロトコルを開発する上で非常に合目的なアプローチであると期待される。実際にケモカインの癌免疫療法への応用に関しては、単独適用よりもむしろ、サイトカインや共刺激分子といった免疫系を活性化できる因子との併用を目指した研究が数多く認められる。これらの背景に基づいて、AdRGDベクターを用いた腫瘍内へのケモカイン遺伝子導入による癌治療戦略においても、宿主に腫瘍免疫を誘導できるアプローチと併用することによってこそ真価が発揮されるであろうと考え、DC 癌免疫療法と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与との併用治療を試みた。

我々の研究グループでは、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 の遺伝子を導入した DC をマウスに免疫することにより、gp100 特異的な CTL 活性が増強され、B16BL6 腫瘍の攻撃接種に対する抵抗性が誘導できることを既に報告している。そこで、gp100 遺伝子導入 DC (gp100/DC) の投与によって、免疫機能の低下が予想される B16BL6 担癌マウスにおいても gp100 特異的な免疫応答を増強できるのかを検討した。B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を投与したマウスから、免疫 1 週間後に脾細胞を調製し、gp100 特異的な CTL 活性を測定し、免疫していない群 (PBS 投与群) と比較して明らかに高い B16BL6 細胞傷害活性が検出された (Fig. 65)。した

がって、たとえ腫瘍細胞が増殖している個体であっても、TAA 遺伝子を導入した DC の投与は TAA 特異的な免疫応答を活性化できることが示された。この結果は、TAA 発現 DC がワクチンプロトコルばかりでなく、既に生体内に腫瘍細胞が存在する状態での治療プロトコルにおいても、腫瘍免疫の始動および増幅を促すことが可能であり、DC 免疫療法によって活性化されたエフェクター細胞をケモカインの利用によって腫瘍組織に集積させることができれば、外科療法で除去し切れなかった腫瘍塊や切除することのできない組織に発生あるいは転移した腫瘍に対する新たな治療戦略の開発に繋がることを示唆している。

そこで、マウスに B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を皮内免疫し、その後、直径が 5-7 mm に増殖した腫瘍内に AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 66)。gp100/DC を免疫した後に腫瘍内に PBS を投与した群においては、PBS の腫瘍内投与のみを行ったマウスとはほぼ同等の腫瘍増殖が認められ、ひとたび増殖を始めた B16BL6 腫瘍を gp100/DC の投与だけで抑えることは非常に困難であることが示された。また、gp100/DC を免疫した後にコントロールベクターである AdRGD-Luc を腫瘍内投与した群では、PBS 投与群と比較してわずかな腫瘍増殖遅延が観察された。この詳細なメカニズムは不明であるが、ベクター投与に伴う炎症反応によって集積した免疫細胞による効果ではないかと推察された。このコントロールベクター投与群と比較して、AdRGD-CCL17 投与群では非常に効果的な腫瘍増殖抑制が達成された。この知見は、単独適用では高い癌治療効果が得られなかったケモカインも、他のアプローチ (腫瘍免疫を活性化する手法) との併用によって優れた有効性を発揮する可能性があることを示唆している。

腫瘍免疫研究の発展に伴って、種々の免疫エフェクター細胞 (NK 細胞、CTL、マクロファージなど) がそれぞれに異なった機構で腫瘍細胞を傷害することが明らかとなり、gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与との併用による抗腫瘍効果のメカニズムを理解するためには、腫瘍組織内に集積した免疫細胞のサブセットならびに細胞数を解析する必要がある。そこで、本プロトコルにおける T 細胞の腫瘍内集積性ならびに腫瘍内に浸潤した免疫細胞の活性化状態について解析した。AdRGD-CCL17 腫瘍内投与後 2 日目に摘出した腫瘍の CD3 に対する免疫組織染色像を観察したところ、コントロールベクター投与群と比較して有意に高い陽性細胞数が検出された (Fig. 67)。さらに、AdRGD-CCL17 腫瘍内投与のみのプロトコルと gp100/DC の皮内免疫を併用したプロトコルとにおいて、腫瘍内に動員された免疫細胞の活性化状態を比較するために、それぞ



れの腫瘍におけるリンパ球活性化マーカー (Perforin, Granzyme B, IFN- $\gamma$ ) の mRNA 発現レベルを RT-PCR により解析した (Fig. 68)。コントロールベクターを投与した腫瘍と比較して、AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍においては、gp100/DC の皮内免疫併用の有無に関わらず、Perforin、Granzyme B、IFN- $\gamma$  のいずれの mRNA 発現とも高いレベルであった。また、AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍においては、gp100/DC の皮内免疫を併用することによって、Perforin、Granzyme B、IFN- $\gamma$  の mRNA 発現レベルが顕著に増大した。これらの結果は、両プロトコルにおける抗腫瘍効果の結果 (Fig. 64, Fig. 66) に良く相関しており、腫瘍特異的に活性化された免疫細胞をいかに効率良く腫瘍局所に集積させるかが、有効な癌免疫療法を開発する上でのキーファクターとなることを強く示唆している。

#### C. 1. 12. 2 CCL27 遺伝子の腫瘍内共導入による IL-12 癌免疫遺伝子治療の有効性改善 (OV-HM 腫瘍モデル)

癌免疫療法の確立においては、免疫細胞の活性化とともに、それら細胞の腫瘍組織内への浸潤が重要である。しかし、一部の癌種ではサイトカインの投与により免疫細胞群が活性化されているにも関わらず、腫瘍組織には浸潤しないために腫瘍が退縮しないというケースが存在する。これまでに癌免疫療法の最適化を図るにあたっては、例えばサイトカイン等の免疫賦活化剤を免疫細胞群に効率よく作用させる DDS (Drug Delivery System) 研究が行われてきたが、さらなる治療の最適化を図るには、それら免疫細胞群を腫瘍組織に送達させるための DDS 技術が求められる。こうした中、近年の分子生物学の目覚ましい発展に伴い、ケモカインと総称される細胞遊走を司る分子群が次々と同定され、それらケモカインがリンパ球や DC といった免疫細胞に特異的に作用することが報告されている。これに伴いリンパ球の体内動態機構、例えば炎症時における血中から組織への浸潤メカニズム等が徐々に明らかになりつつある。ケモカインはこのリンパ球の組織浸潤過程に必須の分子であり、またケモカインは対応するケモカインレセプターを発現しているリンパ球に特異的に作用することから、特定のリンパ球の体内動態を制御していると考えられる。

これまでに我々は、マウス卵巣上皮癌細胞である OV-HM 細胞に、種々のケモカイン遺伝子を AdRGD ベクターにより導入することでケモカイン産生 OV-HM 細胞を作製した。このケモカイン産生 OV-HM 細胞を同系マウスの腹部皮内に移植し、その腫瘍増殖抑制効果と免疫細胞の遊走活性について評価した結果、CCL27 産生 OV-HM 細胞を移植した群で腫瘍の増殖抑制効果が認められ、さらに腫瘍組織内へ T 細胞、NK

細胞を浸潤させることを明らかとしている。しかし、これはあくまで *ex vivo* 系での結果であり、後述するように、生着した腫瘍に対しては CCL27 遺伝子を導入しても治療効果は認められなかった。すなわち、ケモカインの単独投与では生着した癌組織を退縮させるほどの活性を有した免疫細胞を浸潤させることができず、さらなる治療法の改良が必要であることを示している。傷害活性を有した免疫細胞が腫瘍細胞に直接接触するという抗腫瘍メカニズムを考慮するとエフェクター細胞による効果的な癌免疫療法を達成するためには、それら細胞群の質的制御 (活性化) と動態制御 (腫瘍内浸潤) の両者が重要であることが考えられる。そこで、これまで免疫系を活性化させる因子として広く研究されてきたサイトカインにより質的制御を、ケモカインにより動態制御をそれぞれ達成することによる、治療効果の増強について検討を行うこととした。

免疫細胞を活性化するサイトカインとして、我々はこれまで癌免疫療法の研究で広く用いられてきた IL-12 を選択した。IL-12 は細胞性免疫応答システムの活性化因子であり、NK 細胞や NKT 細胞、あるいは T 細胞の一部を活性化し、さらに IFN- $\gamma$  などの産生を誘導することにより抗腫瘍効果を発揮するサイトカインである。そこで AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 とを併用投与することによる抗腫瘍効果について検討を行った。OV-HM 担癌マウスの腫瘍径が 7~8 mm に達したところで、腫瘍内にそれぞれ PBS、AdRGD-Luc、AdRGD-CCL27、AdRGD-IL12 を各単独、あるいは AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL12 を混合し、総 AdRGD ベクター量として  $2 \times 10^7$  PFU/mouse で投与した。また、併用投与群については、投与した合計 AdRGD ベクター量を変えずに AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL12 の比率を 1:9、1:1、9:1 とすることで、最適な投与比率も同時に検討することとした。AdRGD ベクター投与後、経日的に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を評価した (Fig. 69)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群はコントロールベクターである AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察され、治療効果はほとんど認められなかった。また AdRGD-IL12 単独投与群では腫瘍の増殖抑制効果が認められた。一方、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与した群では、その割合が 1:9 の群ではほとんど抗腫瘍効果が認められなかったが、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を 1:1、9:1 の割合で併用投与した群では、投与した AdRGD ベクター量が同じであるにも関わらず、AdRGD-IL12 単独投与群よりも強い腫瘍の退縮が認められた。

次に、マウスの生存率について検討を行った (Fig. 70)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では 7 例中 2 例の完全治癒が得られたが、AdRGD-Luc 投与群と同程度 (7 例中 1 例) であったことから、そ

の治療効果はやはり弱いものと考えられる。また、AdRGD-IL12 単独投与群では 7 例中 4 例の完全治癒が得られ、腫瘍体積変化の結果と同じく、AdRGD-CCL27 単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られた。一方、併用投与群では AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の割合が 1:9、1:1、9:1 の群で、それぞれ 7 例中 0 例、8 例中 6 例、8 例中 8 例の完全治癒が得られ、1:1、9:1 の割合で投与した群では各単独投与群よりも治療効果の増強が認められた。AdRGD-CCL27 単独投与群と比較して、AdRGD-IL12 単独投与群での治療効果が大きかったことと、併用投与群での治療効果が AdRGD-IL12:AdRGD-CCL27=9:1 の割合で最も大きかったことを考え合わせると、今回併用投与により得られた抗腫瘍効果では IL-12 の作用が主であり、CCL27 は補助的に働いたものと考えられる。

続いて、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与により長期間にわたる腫瘍細胞特異的な免疫反応が誘導されているかを検討した。AdRGD-IL12:AdRGD-CCL27=5:5、9:1 の割合で併用投与し完全治癒したマウスに対して、3 ヶ月後ないしは 6 ヶ月後に OV-HM 細胞、および治療実験に用いたマウスと同じ MHC ハプロタイプを持つ B16BL6 細胞を再移植し、腫瘍の生着の有無を確認した (Table 10)。その結果、コントロール群 (Intact) および B16BL6 細胞を移植した群では、全てのマウスにおいて腫瘍の生着が認められたが、併用投与により完全治癒が得られたマウスでは、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の割合が 1:1、9:1 のいずれの群のマウスにおいても腫瘍の生着はほとんど確認されなかった。また、9:1 の投与比率の群で、3 ヶ月後に 1 例の腫瘍生着が認められたが、その腫瘍サイズは非常に小さいものであった。以上の結果より、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、長期にわたる OV-HM 細胞特異的な免疫機構が誘導されていることが示唆された。

そこで次に、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与により得られる抗腫瘍効果増強のメカニズム解明を試みた。まず、第一の抗腫瘍エフェクター細胞である T 細胞の抗腫瘍効果への寄与について確認するために、T 細胞欠損マウスである BALB/c ヌードマウスを用いて検討を行った。OV-HM 担癌ヌードマウスに対して、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与し、経日的に腫瘍サイズを測定した (Fig. 71)。その結果、併用投与群においても、PBS 群、AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察された。T 細胞が欠損しているヌードマウスにおいて、併用投与による治療効果がほとんど認められなかったことから、本併用プロトコルで得られた抗腫瘍効果は T 細胞依存的事であることが示された。

併用投与により得られた抗腫瘍効果に対して、より詳細なエフェクター細胞の寄与について確認す

るために、NK 細胞や T 細胞に対する抗血清・抗体を用いてこれら各リンパ球を除去したマウスにおける抗腫瘍効果について検討を行った (Fig. 72)。その結果、NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞除去群では、それぞれ腫瘍が拒絶されないマウスが認められ抗腫瘍効果が減少していた。さらに、T 細胞のうち CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットを除去したマウスでは、PBS 群と同程度以上の腫瘍の増殖が観察された。以上の結果から、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与による抗腫瘍効果は、NK 細胞が主ではなく、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットに依存することが明らかとなった。本結果は先のヌードマウスを用いた検討結果を支持するものであり、本研究において得られた抗腫瘍効果は、T 細胞依存的事であることが示された。

次に T 細胞の腫瘍内浸潤について検討すべく、抗 CD3 抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 73)。その結果、PBS 投与群、AdRGD-Luc 投与群ではほとんど腫瘍内に CD3 陽性 T 細胞の浸潤は観察されなかった。一方、併用投与群では AdRGD-IL12 単独投与群と比較して CD3 陽性 T 細胞数の有意な増大が認められたことから、併用投与群では腫瘍内へより多くの T 細胞が浸潤していたため治療効果の増強に繋がったものと考えられた。さらに、併用投与群における腫瘍内浸潤 CD3 陽性 T 細胞の分布について確認したところ、血管周辺やその他の部位に局在しているわけではなく、腫瘍組織全体に散在していたことから、腫瘍の実質細胞にまで浸潤していることが強く予想された。免疫細胞による抗腫瘍作用では、T 細胞、NK 細胞等のエフェクター細胞が腫瘍細胞と直接接触することにより、はじめて腫瘍細胞を傷害し腫瘍の退縮が起こることから、併用投与群において数多くの T 細胞が腫瘍実質にまで浸潤していたことが、全例で完全治癒するという強い抗腫瘍効果が得られたことの一因であるものと予想された。しかし、治療効果が認められなかった AdRGD-CCL27 単独投与群において、最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察されたことから、抗腫瘍機構の解明にはさらなる解析が必要である。

そこで続いて、腫瘍内に浸潤した T 細胞について、その詳細を検討する目的で、CD4、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を確認した (Fig. 74)。その結果、併用投与群では CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットが浸潤しており、共に AdRGD-IL12 単独投与群と比べて増加傾向であったことから、CD3 陽性 T 細胞の結果と同様に、併用投与による治療効果増強を示唆する結果であった。また最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察された AdRGD-CCL27 単独投与群では、併用投与群や AdRGD-IL12 単独投与群と比較して、主に CD4 陽性 T 細胞が浸潤していた。一般に傷害活性を有しているのは CD8 陽性 T 細胞であることから、浸潤 T

細胞のサブセットの違いが、治療効果に差が生じた要因の一つとして考えられた。しかし一方で、CD8陽性T細胞の浸潤数が少ないといっても、治療効果が同程度であったAdRGD-Luc投与群と比べると多いこと等を考慮すると、AdRGD-CCL27単独投与群では活性化した免疫細胞が浸潤していないために治療効果が得られなかったことが強く予想される。そこで、免疫細胞の活性化についての検討を行った。

IFN- $\gamma$ は、活性化ヘルパーT細胞などから産生され、マクロファージの活性化、腫瘍細胞の増殖抑制作用、FasやTNFレセプターの発現増強などによる抗腫瘍作用を有するサイトカインである。そこで、多くのCD4陽性T細胞が浸潤していたAdRGD-CCL27単独投与群の腫瘍内での活性化状態を考察するために、まずは腫瘍内でのIFN- $\gamma$ 発現をRT-PCRにより確認した(Fig. 75)。その結果、AdRGD-CCL27単独投与群ではIFN- $\gamma$ の発現は確認できなかったが、AdRGD-IL12単独投与群、および併用投与群では同程度のIFN- $\gamma$ の発現が認められた。このことから、AdRGD-CCL27単独投与群では多くのCD4陽性T細胞が浸潤していたものの、それらが活性化されていなかったと考えられた。また、併用投与群とAdRGD-IL12単独投与群とでは、同程度の活性化状態であったことが示唆された。

続いて腫瘍内に活性化した細胞が浸潤しているのかについて検討を行う目的で、CTL、活性化NK細胞のマーカーであり、細胞傷害因子であるperforinの腫瘍組織内における発現を免疫染色により観察した(Fig. 76)。その結果、AdRGD-CCL27単独投与群では、IFN- $\gamma$ の結果と同様、ほとんどperforin陽性細胞が観察されなかったのに対し、AdRGD-IL12単独投与群、および併用投与群ではperforin陽性細胞が確認された。また、併用投与群では、AdRGD-IL12単独投与群よりもperforin陽性細胞数が有意に増加していたことから、ケモカインによる浸潤とサイトカインによる活性化の両者が達成されており、このことも治療効果の増強の要因と考えられた。

### C. 1. 12. 3 CCL27 遺伝子の腫瘍内共導入によるIL-12 癌免疫遺伝子治療の有効性改善 (Meth-A 腫瘍モデル)

次に、IL-12非奏功性の癌として知られるMeth-A腫瘍を生着させたマウスにおけるAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27の腫瘍内併用投与による抗腫瘍効果を検討した。まず、Meth-A担癌マウスにAdRGD-IL12単独、AdRGD-CCL27単独、または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、2日後の腫瘍内IL-12産生量を比較したところ、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与群では、AdRGD-IL12単独投与群とほぼ同等

のIL-12p70の発現が確認された(Fig. 77)。一方、AdRGD-CCL27単独投与群では検出限界以下であり、CCL27発現に伴うIL-12産生誘導は起こらないことを確認した。

そこで、AdRGD-IL12単独腫瘍内投与、AdRGD-CCL27単独腫瘍内投与、またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与したMeth-A担癌マウスにおける経日的な腫瘍体積変化と生存率をモニタリングした(Fig. 78)。その結果、AdRGD-CCL27単独投与群では、コントロールベクター投与群と同じ腫瘍増殖を示し、抗腫瘍効果は全く見られなかった。一方、AdRGD-IL12単独投与群では治療5日後から明らかな腫瘍退縮が認められ、さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用群においてはそれを上回る腫瘍増殖抑制効果が得られた。マウスの生存率においても、コントロール群ならびにAdRGD-CCL27単独投与群では治療から約20日後には全例死亡してしまったのに対して、AdRGD-IL12単独投与群では生存期間の明らかな延長が認められ、治療90日後においても約60%のマウスが生存していた。また、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与群においては、治療90日後におけるマウスの生存率は90%以上であり、完全治癒例はAdRGD-IL12投与群で13例中8例であったのに対して、併用群では13例中12例と極めて高率に認められた。これらの結果は、AdRGD-CCL27を併用投与することによって、AdRGD-IL12腫瘍内投与による抗腫瘍効果が大きく改善されることを示すものである。

続いて、完全治癒が得られたマウスに長期的な免疫記憶が誘導されているかを検討するために、最初の腫瘍接種から90日後に、Meth-A細胞あるいは同系ハプロタイプのCT26細胞を再接種し、それらの生着を観察した(Table 11)。その結果、CT26細胞を接種した場合には全例において腫瘍の生着が確認されたのに対して、Meth-A細胞接種群では全てのマウスが腫瘍の生着を完全に拒絶した。すなわち、AdRGD-IL12単独腫瘍内投与ならびにAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与によって原発腫瘍を完全に退縮することができたマウスにおいては、長期にわたる腫瘍特異的な免疫記憶が誘導されていることが示された。

前述のとおり、Meth-A腫瘍はリコンビナントIL-12の腹腔内投与で全く抗腫瘍効果が得られないIL-12非奏功性腫瘍として知られている。その原因として、組織学的観察から、腫瘍周辺ストローマ組織の不形成に基づく接着分子の低発現が報告されてきた。接着分子は、リンパ球と血管内皮細胞との接着を媒介する機能を持ち、リンパ球の組織浸潤機構に関与する重要な分子の一つである。このため、IL-12遺伝子の腫瘍内導入のみでは効果的な治療は困難であろうと予想していたが、AdRGD-IL12単独腫

瘍内投与においても劇的な Meth-A 腫瘍退縮効果が認められ、さらに AdRGD-CCL27 を併用することで、その抗腫瘍効果の増強が確認された。そこで次に、Meth-A 腫瘍における AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与における抗腫瘍メカニズムについて解析した。

これらの治療プロトコールで完全治癒が得られたマウスに長期免疫記憶が誘導されていたことは、T 細胞を中心とした獲得免疫系の誘導・活性化が抗腫瘍効果に大きく関与していることを示唆する。そこで、T 細胞欠損ヌードマウスをにおいて同様の治療実験を行い、抗腫瘍効果における T 細胞免疫系の寄与率を検討した (Fig. 79)。その結果、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与のいずれの場合においても、Meth-A 腫瘍の増殖はコントロール群と同等であったことから、これらの治療プロトコールにおいては T 細胞依存性腫瘍免疫が主要な抗腫瘍メカニズムであることが判明した。さらに、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、および抗 asialo GM1 抗血清を用いた *in vivo* depletion assay により、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットの同定を試みた (Fig. 80)。その結果、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与した際の腫瘍増殖抑制効果は、CD4<sup>+</sup> T 細胞枯渇でほとんど影響を受けず、NK 細胞枯渇においてやや減弱し、CD8<sup>+</sup> T 細胞枯渇によって完全に消失した。ヌードマウスでの検討と考え合わせると、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与により誘導される抗腫瘍効果においては、CD8<sup>+</sup> T 細胞、すなわち CTL が主要な免疫エフェクター細胞として機能していることが明らかとなった。

そこで、この CTL を活性化するメカニズムを解明するために、腫瘍局所ならびにリンパ節・脾臓などの二次リンパ組織における免疫イベントを解析した。まず、免疫組織染色により Meth-A 腫瘍内における浸潤 T 細胞数を検討したところ、コントロール群と比較して AdRGD-CCL27 単独投与群、AdRGD-IL12 単独投与群および AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群において、CD3<sup>+</sup> T 細胞の顕著な増加が確認できた (Fig. 81)。さらに、この腫瘍内浸潤 T 細胞のサブセットを解析したところ、AdRGD-CCL27 投与群においては CD8<sup>+</sup> T 細胞が優位に浸潤しており、AdRGD-IL12 投与群では CD4<sup>+</sup> T 細胞が優位に浸潤する傾向が認められた。また、これらの群と比較して、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では CD4<sup>+</sup> T 細胞ならびに CD8<sup>+</sup> T 細胞の双方を最も効率よく腫瘍内に動員することができた。さらに、Perforin 発現を指標としてこれら腫瘍内浸潤 T 細胞の活性化状態を検討したところ、AdRGD-CCL27 単独投与群の Perforin 陽性細胞数がコントロール群と同程度であったの

に対して、AdRGD-IL12 単独投与群および AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群では、腫瘍内に浸潤したほとんどの T 細胞が活性化されていることが明らかとなった。したがって、AdRGD-CCL27 単独投与によって多くの T 細胞を腫瘍内に動員できたとしても、それらが細胞傷害活性を有する状態に活性化されていなければ抗腫瘍効果は全く発揮されず、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与による強力な腫瘍退縮効果は、CCL27 の作用によって腫瘍内に動員された T 細胞を IL-12 の作用によって効率よく活性化できたことに起因するものと推察された。

一方、リンパ球低浸潤性とされる Meth-A 腫瘍に IL-12 を高発現させるだけで腫瘍内リンパ球動員を増強できたことから、次にこのメカニズムの解析を試みた。IL-12 には T 細胞や NK 細胞に作用して IFN- $\gamma$  の産生を促進する活性があることから、AdRGD-IL12 を投与した腫瘍局所における IFN- $\gamma$  産生レベルを RT-PCR 解析により評価した (Fig. 82)。その結果、AdRGD-IL12 の投与によって腫瘍組織での IFN- $\gamma$  産生に亢進が認められ、IL-12 の作用によって腫瘍組織内環境が免疫活性化状態にあることが示された。さらに、リンパ球と血管内皮細胞との接着に重要な分子であり、IFN- $\gamma$  の作用によって発現レベルの増強が報告されている ICAM-1 および VCAM-1 の腫瘍内発現レベルについても RT-PCR 解析したところ、AdRGD-IL12 投与腫瘍においてのみ、両接着分子の mRNA 発現レベルに明らかな上昇が認められた。これらの結果は、腫瘍辺縁ストローマ未形成ならびに新生血管における接着分子の低発現のためにリンパ球浸潤が困難とされてきた Meth-A 腫瘍において、AdRGD-IL12 の投与が腫瘍組織環境をリンパ球浸潤可能な状態に改善したことを示唆している。さらに、AdRGD-IL12 投与 6 日後のマウスから所属リンパ節細胞ならびに脾細胞を調製し、それらの Meth-A 細胞特異的な免疫応答を IFN- $\gamma$  産生細胞数を指標に検討したところ、コントロール群と比較して顕著な陽性細胞数の増加が確認できたことから、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって腫瘍特異的な全身性免疫応答が効率よく誘導されることも明らかとなった (Fig. 83)。

さて IL-12 は、細胞性免疫の活性化に基づく抗腫瘍作用を有する一方で、その多様な生理活性のために肝障害、血液毒性、発熱、嘔吐などの重篤な副作用を誘導し、これが臨床応用を推進する大きな障壁となっている。そのため、IL-12 による抗腫瘍効果を最大限に維持したまま、副作用発現の危険性を低減させることのできる治療戦略の開発が望まれている。そこで、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与あるいは AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与で Meth-A 腫瘍の完全退縮が達成できたマウスにおける副作用発現について検討した (Fig. 84)。肺、脾臓、肝

臓の病理組織学的な観察を行ったところ、AdRGD-IL12 単独投与群では、肺において多数のリンパ球浸潤が認められ、肝臓および脾臓においては髄外造血が確認された。一方、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、これらの副作用が全て軽度に抑えられており、詳細な機構は不明であるが AdRGD-CCL27 の併用投与は、AdRGD-IL12 投与に起因する副作用発現を低減できるアプローチであることが示唆された。

### C. 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

DC の生存や細胞死を決定する分子機構はこれまで不明であったが、近年の分子生物学の進展に伴い、アポトーシス制御因子である Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>、Bim が、“分子タイマー”として機能し、それらの量的なバランスが DC の寿命を決定していることが明らかになりつつある。これら Bcl-2 タンパク質ファミリー分子のうち、Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub> は共にミトコンドリア膜上に存在し、シトクロム c などのアポトーシス誘導因子のミトコンドリアから細胞質への流出を抑制することで、アポトーシス経路を抑制する。最近になり、DC の生存には Bcl-x<sub>L</sub> によって制御される系と Bcl-2 と Bim のバランスによって制御される系の独立した 2 つに機構が存在することが報告された。未熟 DC においては、Bcl-2 は恒常的に発現しているものの、Bcl-x<sub>L</sub>、Bim はほとんど発現しておらず、培養を継続するとアポトーシスによって細胞死に至る。また、生体内の DC はリンパ節内において T 細胞に発現する CD40L によって刺激されると Bcl-x<sub>L</sub> の発現が上昇し、一時的に生存を保つことが知られている。さらに、Bcl-x<sub>L</sub> のミトコンドリア外膜への結合部分を点突然変異法により疎水性アミノ酸に置換することによって、抗アポトーシス活性増強型の変異体が得られており、なかでも 3 アミノ酸を置換した Bcl-xFNK (FNK) が抗アポトーシス活性に優れていることが報告されている。そこで本研究では、Bcl-x<sub>L</sub> あるいは FNK を高発現させることでアポトーシス抑制機能を付与した DC ワクチンを創製し、それを用いた新規 DC 癌免疫療法の有用性を評価した。

まず、AdRGD-Bclx<sub>L</sub> あるいは AdRGD-FNK により遺伝子導入した培養細胞 (A549 細胞) における各分子の発現を確認した (Fig. 85)。AdRGD-Bclx<sub>L</sub> 作用群および AdRGD-FNK 作用群では、Western blotting により Bcl-x<sub>L</sub> および FNK の分子量に相当する 28 kDa 付近にバンドが確認できた。また、これらの細胞の FCM 解析の結果から、AdRGD-Bclx<sub>L</sub> および AdRGD-FNK による遺伝子導入効率はこちらも約 90%であった。

そこで、DC の増殖因子である GM-CSF を添加しない培養条件において、これらの AdRGD を用いて遺伝

子導入した DC (Bcl-x<sub>L</sub>/DC および FNK/DC) の生存期間を検討した (Fig. 86)。遺伝子導入処理を行わない DC (Mock DC) およびコントロールベクターである AdRGD-Luc を作用させた DC の生存率は培養 4 日目には 50%以下に低下していたのに対して、FNK/DC および Bcl-x<sub>L</sub>/DC の生存率は、培養 4 日目までは 80%以上を維持し、培養 7 日目においても 50%以上であった。さらに、FNK/DC のアポトーシス抵抗性を評価するために、アポトーシス誘導剤である Staurosporine 存在下で培養した際の生存率について検討した (Fig. 87)。コントロール DC では培養 24 時間後に 60%程度の生存率しか得られない 100 nM Staurosporine の存在下で、FNK/DC は 90%以上の生存率を保つことができた。以上の結果より、AdRGD-Bclx<sub>L</sub> あるいは AdRGD-FNK によって遺伝子導入することによって、アポトーシス抵抗性の付与に基づく DC の生存期間延長を達成できることが示された。

DC は MHC 分子上に抗原タンパクに由来するエペトープペプチドを提示することによって、はじめて T 細胞を抗原特異的に感作・活性化することができる。したがって、遺伝子改変 DC ワクチンの創製にあたっては、遺伝子導入操作によって DC 本来の抗原提示機能が影響されないことを確認する必要がある。そこで、FNK/DC に OVA 遺伝子を共導入し、MHC class I 分子を介した OVA 提示レベルとその期間を検討した (Fig. 88)。AdRGD-OVA 単独で遺伝子導入した DC (OVA/DC) と比較して、FNK 遺伝子と OVA 遺伝子とを共導入した DC (FNK+OVA/DC) は培養 2 日目においてほぼ同等の抗原提示効率を示した。さらに、OVA/DC では培養 6 日目に抗原提示レベルが検出限界以下にまで低下していたのに対して、FNK+OVA/DC では培養 6 日目でも 2 日目と変わらない抗原提示レベルを保持していた。したがって、FNK/DC は生存期間の延長を反映して、長期間にわたり抗原提示能を維持できることが明らかとなった。

そこで、FNK+OVA/DC および Bcl-x<sub>L</sub>+OVA/DC のワクチン機能の評価するために、TAA として OVA を発現する E. G7-OVA 細胞を用いて腫瘍拒絶実験を行った (Fig. 89)。腫瘍体積のモニタリングから、コントロール群と比較して、OVA/DC 免疫群に腫瘍増殖抑制効果が認められ、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x<sub>L</sub>+OVA/DC 免疫群においては、OVA/DC 免疫群をさらに上回る抗腫瘍効果が得られた。この結果と相関して、OVA/DC 免疫群では全例に腫瘍の生着が認められたのに対して、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x<sub>L</sub>+OVA/DC 免疫群では、10 例中 3 例で腫瘍の完全拒絶が観察された。

次に、OVA のような抗原性の高いモデル抗原ではなく、本来腫瘍に発現している TAA を標的とした DC 癌免疫療法におけるアポトーシス抵抗性 DC ワクチ

ンの有効性を評価するために、AdRGD を用いて調製した gp100/DC、FNK+gp100/DC、および Bcl-x<sub>L</sub>+gp100/DC のマウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるワクチン効果を比較した (Fig. 90)。gp100/DC 免疫群と比較して、FNK+gp100/DC 免疫群および Bcl-x<sub>L</sub>+gp100/DC 免疫群では、より強力な腫瘍増殖抑制効果が認められ、E. G7-OVA 腫瘍モデルと同様の傾向が得られた。したがって、モデル抗原を標的とした場合のみならず、低免疫原性のメラノーマに対しても、TAA のみを導入した従来の DC ワクチンと比較して、抗アポトーシス分子と TAA とを共導入した DC ワクチンのほうが、腫瘍免疫誘導能に優れることが実証された。

続いて、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンによる抗腫瘍効果増強メカニズムの解析を試みた。まず、抗原特異的 CTL の誘導効率について比較したところ、OVA/DC 免疫群と比較して、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x<sub>L</sub>+OVA/DC 免疫群から調製したエフェクター細胞は、より強力に E. G7-OVA 細胞を傷害することができた。一方、いずれの免疫群についても、OVA を発現していない EL4 細胞に対する傷害活性は認められなかったことから、FNK+OVA/DC および Bcl-x<sub>L</sub>+OVA/DC は OVA 特異的 CTL 活性の誘導能に優れた DC ワクチンであることが示された (Fig. 91)。

次に、マウスに投与した FNK/DC の所属リンパ節集積性とそこでの生存期間を評価するために、GFP トランスジェニックマウス由来の DC を用いた組織学的な解析を行った (Fig. 92)。その結果、コントロール DC 投与群と比較して、FNK/DC 投与群では投与後二日目において所属リンパ節に到達している DC 数が約 2 倍増加しており、その後経日的にリンパ節内の FNK/DC 数は減少するものの、少なくとも投与後 8 日間に渡り、コントロール群よりも約 2 倍高い DC 数が検出された。したがって、FNK/DC ワクチンは投与部位から所属リンパ節への初期到達量の増大とリンパ節内での消失半減期の延長に伴って、従来の DC ワクチンよりも強力にかつ長期にわたって T 細胞を感作・活性化できることが示唆された。そこで、FNK/DC ワクチンによりリンパ節内で活性化される抗原特異的 T 細胞の頻度を IFN- $\gamma$  産生を指標に検討したところ、免疫後 7 日目において、FNK+gp100/DC ワクチンは gp100/DC よりも効率よく CD4<sup>+</sup> T 細胞ならびに CD8<sup>+</sup> T 細胞を活性化できることが判明した (Fig. 93)。

以上の結果より、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンは、生体に投与した後に所属リンパ節に到達できる DC 数の増大、リンパ節における DC 生存期間の延長、抗原特異的 T 細胞の効率的な感作・活性化、に基づいて、DC 癌免疫療法の有効性を改善できることが示された。

### C. 1. 14 癌転移におよぼす CAR の影響

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

まず、CAR 陰性であるマウスメラノーマ B16 細胞を用いて、CAR 安定発現株 B16CAR を作成した。この細胞を用いて実験的肺転移実験を行ったところ、B16CAR 細胞投与群における肺転移数は、コントロール細胞投与群と比較して有意に低下していた (Fig. 94)。

本実験で用いた転移モデルにおいて形成された肺転移巣は、①血管への接着、②血管外への脱出、③組織への浸潤、④転移先での生育といった多くの段階を経ることができた細胞に起因する。そこで CAR が抗転移効果を発揮する段階について検討するために、B16 細胞へ一過性に CAR を発現させて転移実験をすることにした。一過性の発現には、CAR 陰性細胞に対しても高効率な遺伝子導入可能なファイバー改変型 CAR 発現 Ad ベクター (AdRGD-CAR) を用いた。コントロール Ad ベクターとして、同様のファイバー改変型 Ad ベクターで LacZ を発現する AdRGD-LacZ を用いた。その結果、AdRGD-CAR により B16 細胞の肺転移数はコントロール細胞群と比較して有意に低下していた (Fig. 95)。

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

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

### C. 2. 1 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

#### C. 2. 1. 1 PEG-Ad ベクターの特性解析と全身投与型腫瘍標的化ベクターとしての応用

高分子バイオコンジュゲーションは、蛋白質・粒子の医薬価値を高めるための優れたドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術であると世界的に認識されている。一般的に、PEG 等の水溶性高分子により修飾された蛋白質やリポソームは、抗体や貪食細胞からの回避能が付与され、血中安定性および血中滞留性が飛躍的に向上することが知られている。また腫瘍組織では、正常組織に比べ血管透過性が亢進しており、同時にリンパ系による異物回収機構が不十分である。これにより長時間血中に滞留している PEG 化蛋白質やリポソームは、腫瘍組織に効果的に蓄積する、いわゆる EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) を発揮することが知られており、近年、この EPR 効果を利用した腫瘍ターゲティング製剤の開発が広く推進され

ている。我々は、このような PEG 修飾の特性は、Ad ベクターを PEG で修飾した場合にも同様に得られると考え、最適な PEG 修飾 Ad ベクターを作製すれば、血中滞留性の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングが達成できるのではないかとこの着想に至った。

我々はこれまでに、Ad ベクターに対する PEG 修飾方法を確立し、*in vitro*における PEG-Ad ベクターの遺伝子発現特性を検討してきた。そこで本研究では、PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子発現特性を詳細に解析すると共に、腫瘍をターゲットとした全身投与型遺伝子治療用ベクターとしての有用性評価に取り組んだ。

Ad ベクターの 1 粒子の外殻蛋白質に存在するリジン残基に対して、25、100、400、1600 または 6400 倍モル量の活性化 PEG (分子量 5,000) を添加することで Ad ベクターの PEG 修飾を行い、作製した PEG-Ad ベクターの修飾率を SDS-PAGE にて解析した (Fig. 96)。その結果、クーマシブルー染色により未修飾ヘキサソンのバンドの高分子側に、PEG 修飾率の増大に伴いブロードなバンドが見られ、また、高分子側にシフトしたバンドが PEG に対する染色により検出されたことから、このバンドは PEG が化学結合したヘキサソンであると確認された。クーマシブルー染色により得られた未修飾ヘキサソンのバンドと PEG 修飾されたヘキサソンのバンドの濃さの割合を PEG 修飾率として画像解析により算出し、Table 12 に示したような様々な修飾率を有する PEG-Ad ベクターを作製することができた。また、PEG 修飾率の増大に伴い粒子径が増大することを確認した。なお、我々は以前の検討において、PEG 修飾操作により 5% 以上の修飾率を有する PEG-Ad ベクターでは未修飾の Ad ベクター粒子を含まないこと、つまり全ての Ad ベクターに PEG が結合していることを既に明らかとしている。

次に、蛋白質やリポソームの血中滞留性を向上させる PEG 修飾の利点が、Ad ベクターの PEG 修飾にも当てはまるかどうかを検討した。BALB/c マウスに  $5 \times 10^{10}$  VP の PEG-Ad ベクターを尾静脈内投与し、血液中に存在する Ad ベクターの DNA 量を Southern blotting により定量することで、PEG-Ad ベクターの血中滞留性を評価した (Fig. 97, Table 12)。PEG 修飾していない Ad ベクターは、血中から速やかに消失し、その血中半減期は 1.6 分であった。これに対して修飾率 61.1%、89.3%、100% の PEG-Ad ベクターの血中半減期は、修飾していない Ad ベクターと比較してそれぞれ約 3 倍、7 倍、50 倍に延長しており、顕著な血中滞留性の向上が認められた。

また、PEG-Ad ベクターに抗体回避能が付与されているかどうかを検討するために、マウス抗 Ad 抗血清存在下あるいは非存在下における PEG-Ad ベク

ターの遺伝子発現活性を検討した。抗血清が存在しない時の遺伝子発現を 100% とし、抗血清存在下における遺伝子発現量の低下率を算出した結果を Fig. 98 に示す。未修飾 Ad ベクターの遺伝子発現は、抗血清の増加に伴いコントロールの 1% 以下にまで低下したのに対して、修飾率 61.1% の PEG-Ad ベクターでは、抗血清存在下においても高い遺伝子発現が保持されており、その抗体回避能は、未修飾 Ad ベクターの約 30 倍であった。

PEG-Ad ベクターの血中滞留性の向上は、PEG 鎖の立体障害により Ad ベクターのレセプターである CAR を介した肝臓への急速な初期分布ならびに貪食細胞からの取り込みが回避されるためだと考えられる。そこで、様々な修飾率の PEG-Ad ベクターを用いて、CAR 発現細胞に対する遺伝子導入効率ならびに PEG-Ad ベクターの遺伝子発現活性、すなわち細胞内侵入後の高い核移行能に関して、細胞内導入試薬を用いて評価した。同時に加熱処理を行い、Ad ベクターの核移行活性を担う蛋白質を熱変性させた群を加えることで、厳密な活性評価に取り組んだ。その結果、通常の遺伝子導入条件下においては、予想通り PEG-Ad ベクターによる遺伝子発現レベルは PEG 修飾率の増大に伴って低下した (Fig. 99)。この遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合阻害に由来すると考えられる。すなわち、PEG-Ad ベクターの *in vivo* 投与における血中滞留性の向上は、CAR との結合阻害により初期の臓器移行性が低下することが一因と考えられる。一方、Lipofectamine 2000 を併用して遺伝子導入した場合では、修飾率 89% の PEG-Ad ベクターにおいても高い遺伝子発現活性が検出された。また、加熱処理により Ad ベクターの蛋白質を熱変性させた群 (Ad ベクター-DNA を作用させた群) では、Lipofectamine 2000 を併用しても遺伝子発現の回復はみられなかった。以上のことは、Ad ベクター表面の PEG 修飾自体は、核移行活性に大きく影響しないことを示している。すなわち、表面の大部分が覆われた PEG-Ad ベクターであっても、細胞内への侵入過程が成立した細胞・組織においては、Ad ベクターが本来有する高い遺伝子発現効率が得られることが強く示唆された。

そこで次に、PEG-Ad ベクターの血中滞留性の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングを目指して、様々な修飾率の PEG-Ad ベクターを担癌マウスの尾静脈内投与した際の各組織における遺伝子発現パターンを検討した。各種 PEG-Ad ベクターの全身投与において、各臓器での遺伝子発現レベルは PEG 修飾率に対してベルシェイプを示した (Fig. 100)。特に PEG 修飾率 61% の PEG-Ad ベクターでは、多くの臓器において未修飾 Ad ベクターよりも数十倍高い遺伝子発現が得られた。この現象の詳細な原

因は不明だが、おそらく血中滞留性の向上、細網内皮系からの取り込み回避等の *in vivo* 条件下における幾つもの要因が影響しているものと考えられる。また、最も遺伝子発現の高い肝臓および腫瘍に注目すると、各修飾率の PEG-Ad ベクターのうち、修飾率 89% の PEG-Ad ベクターが腫瘍で最も高い遺伝子発現を示し、その発現量は未修飾 Ad ベクターよりも約 40 倍高いものであった。同時に副作用の主原因となる肝臓での遺伝子発現量は未修飾 Ad ベクターの約 1/20 に抑制されており、腫瘍と肝臓とではほぼ同等の遺伝子発現量を示した。

続いて、Ad ベクター粒子としての腫瘍および肝臓内集積量に関して、Ad ベクターゲノムの E4 領域に対して設計したプライマーおよび TaqMan プローブを用いた定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。まず粒子数が既知の標準品 Ad ベクター DNA を用いて検量線を作成し、直線性が得られた 10 コピーから  $10^7$  コピー数までの範囲で定量可能なことを確認した (Fig. 101)。そこで、未修飾 Ad ベクターおよび修飾率約 90% の PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスに投与し、6 時間および 48 時間後の肝臓および腫瘍から DNA を抽出し、PCR 反応により Ad ベクター DNA を増幅させた後、検量線から腫瘍内 Ad ベクター粒子数を求めた (Fig. 102)。その結果、初期分布である投与 6 時間後において、遺伝子発現の分布と同様、肝臓において PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターの 1/30 以下の集積量であり、同時に腫瘍においては未修飾 Ad ベクターの 40 倍量以上が存在していた。この結果は先のルシフェラーゼ遺伝子発現量での分布結果とほぼ相関しており、粒子分布、遺伝子発現分布の両面から PEG-Ad ベクターの腫瘍集積性が明らかとなった。また、48 時間後の分布においては、著しい集積量の減少が見られた。原因としては、ヌクレアーゼによる DNA の分解に加えて、6 時間後の段階ではクッパー細胞をはじめとする細網内皮系に取り込まれた Ad ベクター DNA も検出されていたためだと考えられる。

さらに、分子量 5000 の PEG を用いて種々の修飾率に調製した PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスの尾静脈より投与し、投与後 6 時間における腫瘍および肝臓へのベクター粒子集積量を比較した (Fig. 103)。その結果、未修飾 Ad ベクターで認められる高い肝集積性が、PEG 修飾率の増大に伴って抑制されるのみならず、腫瘍組織へのベクター集積量が増大することを明らかにした。

以上の結果は、分子量 5,000 の PEG を用いた修飾率約 90% の PEG-Ad ベクターにおいては、PEG 化リポソーム等で観察されている腫瘍への受動的ターゲティング効果が同様に当てはまり得ることをはじめて示したものである。

次に、分子量の異なる PEG を用いて種々の修飾率

に調製した PEG-Ad ベクターの *in vitro* および *in vivo* 遺伝子発現特性を比較検討することで、CAR 依存性の遺伝子導入を抑制し、且つ EPR 効果を最大限に引き出すことができる PEG 修飾条件の最適化を試みた。これまでの検討に用いてきた分子量 5,000 の PEG に加えて、分子量 2,000 および 20,000 の PEG を選択し、それぞれ低修飾 (L)、中修飾 (M)、高修飾 (H) の PEG-Ad-Luc を作製した。

まず、各 PEG-Ad-Luc の *in vitro* 遺伝子導入活性について A549 細胞を用いて比較したところ、PEG 分子量の増大ならびに PEG 修飾率の増加に伴ってルシフェラーゼ遺伝子発現強度は低下することが明らかとなった (Fig. 104)。続いて、PEG 修飾率が約 30% の各 PEG-Ad-Luc (2K/PEG-Ad-Luc、5K/PEG-Ad-Luc、20K/PEG-Ad-Luc) を Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与し、2 日後の肝臓および腫瘍におけるルシフェラーゼ発現量を測定した (Fig. 105)。その結果、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して、肝臓での遺伝子発現抑制と腫瘍での遺伝子発現増大が最も顕著だったのは 20K/PEG-Ad-Luc 投与群であり、2K/PEG-Ad-Luc 投与群では EPR 効果を得られなかった。

そこで、これまで研究に用いてきた 5K/PEG-Ad ベクターと新たに作製した 20K/PEG-Ad ベクターの EPR 効果をより詳細に比較するために、種々の PEG 修飾率を有する 5K/PEG-Ad-Luc および 20K/PEG-Ad-Luc の *in vivo* 遺伝子発現分布を比較した (Fig. 106)。その結果、腫瘍における遺伝子発現レベルは、修飾率 90% の 5K/PEG-Ad-Luc 投与群で最も高かったものの、修飾率 40% の 20K/PEG-Ad-Luc 投与群では、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して肝臓での遺伝子発現が数百分の一にまで抑制され、腫瘍での遺伝子発現が約 10 倍増強されるといふ、最も腫瘍選択的な遺伝子導入が認められた。したがって、修飾率 40% の 20K/PEG-Ad ベクターが、全身投与による腫瘍組織への受動的ターゲティングを行うために最も優れたベクターであることが判明した。

しかし、20K/PEG-Ad ベクターがこのような *in vivo* 遺伝子発現分布を示す詳細な機序については不明なままである。そこで、そのメカニズム解明の一端として、未修飾 Ad ベクター、5K/PEG-Ad ベクター、および 20K/PEG-Ad ベクターを全身投与したマウスにおいて、ベクター粒子の血中滞留性ならびに生体内分布に関する比較解析を行った。まず、各ベクターの血中存在量の経時変化を測定したところ (Fig. 107)、5K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較してわずかな血中滞留性の向上を示したに過ぎなかったが、20K/PEG-Ad ベクターにおいては血中からの消失に明らかな遅延が認められ、血中滞留性に極めて優れたベクターであることが判明した。また、このときの各ベクターの組織移行量を比



較した結果 (Fig. 108)、20K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較して約 20 倍、5K/PEG-Ad ベクターと比較しても 2 倍以上高い腫瘍集積性を示した。一方、肝臓へのベクター粒子の分布は、5K/PEG-Ad ベクターでは未修飾 Ad ベクターとほぼ同等であったのに対して、20K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターの約 1/50 にまで低下していた。これらの結果を総合すると、20K/PEG-Ad ベクターは全身投与による高い腫瘍集積性を有するベクターであり、この現象が肝臓への移行量の大幅な低下に基づく血中滞留性の飛躍的な向上によって、EPR 効果が十分に発揮されたためであることが強く示唆された。

次に、PEG-Ad ベクターが腫瘍内血管から実質細胞側へと漏出しているかを、腫瘍内 EGFP 発現部位を検討することで評価した。その結果、未修飾 Ad ベクター投与群では EGFP による蛍光は見られなかったのに対して、PEG-Ad ベクター投与群では、主に腫瘍実質細胞に対する遺伝子発現像が観察された (Fig. 109)。すなわち PEG-Ad ベクターは、腫瘍血管内から実質細胞側へと漏れ出していることが強く示唆された。また、肝臓においては先のルシフェラーゼ遺伝子発現と同様、未修飾 Ad ベクター投与群で強い蛍光が多数観察されたのに対して、PEG-Ad ベクター投与群では、蛍光像はほとんど観察されなかった。

以上の結果より、PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較して、血中投与後の肝臓からの取り込みが回避され血中滞留性が向上した結果、腫瘍の性質に基づいた EPR 効果により腫瘍内血管から漏出、蓄積し、腫瘍実質細胞に対する遺伝子発現が見られたものと考えられる。本結果は、通常レセプターを介した組織分布ならびに貪食作用のため血中半減期が短いウイルスベクターにおいて、受動的ターゲティングが達成可能であることを示したはじめての知見である。

次に、全身投与後に腫瘍組織で高い遺伝子発現レベルを示した修飾率約 90%の PEG-Ad ベクターを用いて、癌遺伝子治療における有効性を評価した。治療遺伝子として TNF- $\alpha$  遺伝子を搭載した未修飾 Ad-TNF $\alpha$  および PEG-Ad-TNF $\alpha$  を Meth-A 担癌マウスの尾静脈より投与し、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした。その結果、Ad-TNF $\alpha$  投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、PEG-Ad-TNF $\alpha$  投与群の腫瘍増殖には明らかな遅延が観察された (Fig. 110)。また、本実験で用いたベクター用量 ( $10^{10}$  VP/mouse) では、いずれの群においても TNF- $\alpha$  に起因する体重減少や突然死といった重篤な副作用は観察されなかった。さらに、ベクター投与後 2 日目のマウスから摘出した肝臓を病理組織学的に観察したところ、Ad-TNF $\alpha$  投与群に

おいて 7 例中 6 例で認められた肝障害 (小空胞の形成) が、PEG-Ad-TNF $\alpha$  投与群では 7 例中 3 例でわずかに観察されたのみであった (Fig. 111)。

続いて同様に、治療遺伝子として自殺遺伝子である HSVtk 遺伝子を用いた HSVtk/GCV システムによる癌遺伝子治療実験を行った (Fig. 112)。その結果、 $10^{10}$  VP の未修飾 Ad-HSVtk 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、 $10^{10}$  VP の PEG-Ad-HSVtk 投与群の腫瘍増殖は Ad-HSVtk 投与群の 40%以下にまで抑制された。一方、 $10^{11}$  VP の Ad-HSVtk あるいは PEG-Ad-HSVtk を投与した群では、腫瘍の退縮傾向は観察されたものの、急激な体重減少を伴って実験期間中に全例が死亡した。また、ベクター投与後 7 日目のマウスから摘出した肝臓の病理組織学的観察を行ったところ、PEG-Ad-HSVtk 投与群においては、 $10^{11}$  VP の用量で小空胞の形成や炎症性細胞浸潤が観察されたものの、 $10^{10}$  VP の投与量では未修飾 Ad-HSVtk 投与群と同様に肝障害はほとんど観察されなかった (Fig. 113)。以上の結果は、TNF- $\alpha$  あるいは HSVtk 発現ベクターの全身投与による癌遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用が、有効性の改善と副作用の低減に繋がる可能性を示している。

さて、イムノリポソームなどに見られるように標的指向性分子を PEG 鎖先端に付与することで、PEG-Ad ベクターはより積極的に目的組織への遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで標的指向性分子のモデルとしてインテグリンに親和性のある RGD ペプチドを選択し、PEG の片末端に付与した RGD-PEG-Ad ベクターの作製法の確立とその有用性評価を行った。

RGD-PEG-Ad ベクターの遺伝子発現効率を CAR 高発現細胞である A549 細胞と CAR 低発現細胞である B16BL6 細胞で評価した。RGD-PEG-Ad ベクターは A549 細胞に対して PEG-Ad ベクターより顕著に高い遺伝子発現を示し、未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子発現を示した (Fig. 114)。また、B16BL6 細胞に対して RGD-PEG-Ad ベクターは、未修飾 Ad ベクターより 100 倍以上高い遺伝子発現を示し、その発現は AdRGD ベクターと同等であった。このことから、PEG-Ad ベクターの PEG 片末端に標的指向性分子を付与することで標的細胞に接着し、高い遺伝子導入・発現が達成されることが示された。

次に抗 Ad 抗体存在下における RGD-PEG-Ad ベクターの B16BL6 細胞に対する遺伝子発現効率を検討した (Fig. 115)。その結果、これまで最も高い遺伝子導入効率を示した AdRGD ベクターであっても抗 Ad 血清存在下では、血清濃度の上昇に伴い遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは遙かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD ベクターの 15 倍であった。

さらに、RGD-PEG-Ad ベクターの感染特異性をより詳細に検討するために、過剰量の RGD ペプチド存在下における RGD-PEG-Ad-Luc、未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc の遺伝子発現効率を比較検討した (Fig. 116)。その結果、未修飾 Ad-Luc の遺伝子発現量は RGD ペプチドによってほとんど影響されなかったのに対して、RGD-PEG-Ad-Luc は AdRGD-Luc と同様に、RGD ペプチド存在下では遺伝子発現効率が明らかに低下した。したがって、RGD-PEG-Ad ベクターは、細胞表面のインテグリンを認識・結合して遺伝子導入することが確認された。

また、RGD-PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入用ベクターとしての有用性を評価するために、マウスに尾静脈内投与した2日後における肝臓での遺伝子発現を検討した (Fig. 117)。その結果、未修飾 Ad ベクターならびに AdRGD ベクターと同様に RGD-PEG-Ad ベクターは、*in vivo* においても高い遺伝子発現活性を有するベクターであることが示された。

### C. 2. 1. 2 Ad-TERT ベクターの遺伝子発現特性解析と癌自殺遺伝子治療における有用性評価

遺伝子治療研究においては、ほぼ全ての真核細胞で高いプロモーター活性を発揮する CMV プロモーター等を搭載したベクターシステムが多用されており、これは低用量のベクター適用において最大限の遺伝子発現活性を期待するという理由からである。しかしながら、ユニバーサルプロモーター制御型ベクターの全身投与は、ベクターが分布する全ての組織で治療用遺伝子が発現してしまうため、目的とする主作用とともに予期せぬ副作用を招くことが危惧される。すなわち、腫瘍標的化ベクターの創製を目指す我々の研究戦略においては、ベクターの体内動態制御 (腫瘍集積性の増強) と併せて、ベクターに搭載した治療用遺伝子を目的組織 (腫瘍) のみで発現させるアプローチが必要とされる。

この点に関して、近年、種々の腫瘍において特異的プロモーターが同定され、それらを搭載したベクターシステムによる癌遺伝子治療が副作用軽減を達成できるものと期待されている。これら腫瘍特異的プロモーターのなかで、テロメラーゼを構成する蛋白質サブユニット (TERT) の発現を制御している TERT プロモーターは、テロメラーゼ活性のない正常細胞では機能せず、テロメラーゼが再活性化されている腫瘍細胞において制御下の遺伝子発現を誘導する。また、ヒトの癌種の 85%以上においてテロメラーゼの再活性化が起こっているとの報告もあり、TERT プロモーターは癌遺伝子治療への応用において極めて汎用性に優れた腫瘍特異的プロモーターである。

そこで我々は、遺伝子発現制御という観点から Ad

ベクターの腫瘍標的化と安全性向上を達成するべく、TERT プロモーター制御型 Ad (Ad-TERT) ベクターを作製し、本ベクターの遺伝子発現特性について解析した。また、HSVtk 遺伝子を治療用遺伝子として搭載した Ad-TERT ベクターを用いて、全身投与型腫瘍標的化ベクターの癌自殺遺伝子治療開発における TERT プロモーターの有用性を検証した。

まず、CMV プロモーターあるいは TERT プロモーター制御下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を発現する Ad-Luc ならびに Ad-TERT/Luc を作製し、腫瘍細胞 (A549 細胞) と正常細胞 (WI38 細胞) との間で各ベクターの遺伝子発現効率を比較した (Fig. 118)。その結果、A549 細胞における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現レベルは Ad-Luc と比較して約 1/15 に低下したものの、WI38 細胞において Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-Luc の 1/1000 以下にまで抑制された。したがって、新たに構築した Ad-TERT ベクターが、遺伝子発現において優れた腫瘍特異性を発揮することを確認できた。

そこで次に、Meth-A 担癌マウスに Ad-Luc あるいは Ad-TERT/Luc を尾静脈内投与し、48 時間後の腫瘍および肝臓における遺伝子発現量を評価した (Fig. 119)。*In vitro* 培養系での結果を反映して、腫瘍における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-Luc と比較して若干低下したものの、肝臓での遺伝子発現レベルは Ad-Luc の 1/380 以下にまで抑制されることが判明した。以上の結果より、Ad-TERT ベクターは癌遺伝子治療の標的組織となる腫瘍においては遺伝子発現活性を維持しつつ、副作用の原因となる正常組織での遺伝子発現を顕著に抑制できるという、全身投与型腫瘍標的化ベクターの開発において魅力的な特性を有していることが明らかとなった。

そこで、TERT プロモーター制御下に HSVtk 遺伝子を発現する Ad-TERT/HSVtk を作製し、本ベクターを全身投与型ベクターとして癌自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCV システム) に適用した際の有効性および安全性を評価した。まず、Ad-HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk により遺伝子導入した A549 細胞ならびに WI38 細胞における GCV 感受性を検討したところ (Fig. 120)、両ベクターとも遺伝子導入に用いたベクター用量に依存して A549 細胞の GCV 感受性 (細胞死) を増強した。一方、正常細胞である WI38 細胞においては、Ad-HSVtk を用いた遺伝子導入によって A549 細胞の場合と同様の GCV 感受性が付与されたものの、Ad-TERT/HSVtk による遺伝子導入では GCV の細胞傷害活性が全く認められなかった。本結果は、Ad-TERT ベクターが HSVtk/GCV システムにおいても高い腫瘍特異性を発揮することを示している。

そこで、Meth-A 担癌マウスに Ad-HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、10 日間の GCV 腹

腔内投与の下、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした (Fig. 121)。その結果、Ad-CMV/HSVtk を  $5 \times 10^{10}$  VP/mouse で投与した群では、全てのマウスが数日の内に突然死するという強い副作用が観察され、突然死が見られなかった  $10^{10}$  VP/mouse 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められた。したがって、Ad-HSVtk の全身投与による HSVtk/GCV システムにおいては、ベクター投与量に関する治療域が極めて狭い、もしくは全く存在しないことが判明した。一方、Ad-TERT/HSVtk 投与群においては、 $2 \times 10^{11}$  VP/mouse という高用量投与によってもマウスの突然死は観察されず、コントロール群と比較して明らかな腫瘍増殖の遅延ならびに生存日数の顕著な延長が認められた。

さらに、本治療システムの転移癌に対する有効性を評価するために、CT26 肺転移癌マウスに Ad-CMV/HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、7日間の GCV 腹腔内投与後に摘出した肺の重量ならびに転移コロニー数を測定した (Fig. 122)。その結果、Ad-HSVtk の  $10^{10}$  VP/mouse 投与群ではコントロール群と比較して有意な転移抑制効果を示さなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk を  $2 \times 10^{11}$  VP/mouse で投与したマウスの肺では顕著な転移コロニー数の減少とそれに伴う肺重量の増加抑制が観察された。したがって、Ad-TERT/HSVtk を全身投与型ベクターとして用いた HSVtk/GCV システムは、ベクターの腫瘍局所投与に基づくこれまでの癌遺伝子治療では困難とされてきた転移癌に対しても有効性を発揮できる治療戦略であることが明らかとなった。

また、本治療システムの安全性評価の一環として、Meth-A 担癌マウスにベクターを全身投与した後の体重変化ならびに肝障害マーカーである血中 GOT・GPT 量を検討した (Fig. 123)。その結果、 $2 \times 10^{11}$  VP/mouse で Ad-TERT/HSVtk を投与した群 (治療効果の認められたプロトコル) では、コントロール群と比較して若干の体重減少とベクター投与後7日目における明らかな血中 GOT・GPT 量の増加が観察された。

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

### C. 2. 1. 3 PEG-Ad-TERT ベクターの作製とその *in vivo* 遺伝子導入特性の解析

上記 C. 3. 2. の結果を踏まえて、Ad-TERT ベクター

の腫瘍標的化能をさらに向上させるために、TERT プロモーターによる遺伝子発現制御と PEG 修飾によるベクター粒子の体内動態制御との融合を図った。すなわち、分子量 5,000 の PEG を種々の修飾率で結合させた 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、それらを Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布を解析した。

まず、各修飾率の 5K/PEG-Ad-Luc ならびに 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を全身投与した2日後の腫瘍および肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定したところ (Fig. 124)、いずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-TERT/Luc の腫瘍における発現レベルは、5K/PEG-Ad-Luc と比較してわずかに低値を示すのみであった。一方、副作用の主因となる肝臓での遺伝子発現は、5K/PEG-Ad-TERT/Luc 投与群において顕著に抑制されており、特に 95%修飾体については、5K/PEG-Ad-Luc と比較して約 1/300 にまで肝臓での遺伝子発現レベルを低下させることができた。

また、このときの腫瘍および肝臓におけるベクター粒子分布を検討したところ (Fig. 125)、5K/PEG-Ad-TERT/Luc はいずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-Luc と同様の分布パターンを示したことから、プロモーター改変がベクター粒子の生体内挙動に影響しないことを確認した。さらに、主作用/副作用比の指標として、腫瘍/肝臓遺伝子発現比率を算出したところ (Fig. 126)、5K/PEG-Ad-Luc と比較して 5K/PEG-Ad-TERT/Luc は約 20~10,000 倍も高い値を示すことが判明した。

以上の結果から、我々が創製した PEG-Ad-TERT ベクターは、体内動態制御および遺伝子発現制御の両面から腫瘍選択性を増強されており、全身投与型腫瘍標的化ベクターとして極めて有望であることが示唆された。

### C. 2. 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

遺伝子治療の重要なターゲットとなっている癌細胞や血球系細胞には、Ad ベクターのレセプターである CAR の発現が乏しい細胞が数多く存在し、そのため Ad ベクターの適用範囲が大きく制限されている。この点に関して、我々のグループが推進してきたインテグリン指向性 Ad ベクターならびに CD46 指向性 Ad ベクターの開発は、Ad ベクターの感染域拡大に繋がったものの、依然としてこれらレセプターの発現が低い一部の癌細胞や血球系細胞に対しては、遺伝子導入が困難な状況にある。したがって、今後の遺伝子治療の進展に向けては、細胞の種類や性質に関わらず効率良く遺伝子導入可能なベクターの開発が望まれる。

そこで我々は、近年その細胞内移行能が注目されている Tat ペプチドに着目し、Tat ペプチドの細胞

膜透過機能を Ad ベクターに付与することができれば、細胞のレセプター発現の有無に関わらず、広い感染域を持つ新しいベクターとなり得るのではないかと考え、Tat ペプチド修飾 Ad (Tat-Ad) ベクターを作製し、その遺伝子導入特性に関して検討した。

まず Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合を確認するために、Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの SDS-PAGE ならびに表面電荷測定を行った (Fig. 127, Table 13)。その結果、SDS-PAGE において Ad ベクターの主要なカプシドタンパクであるヘキサソンのバンドが、Tat-Ad ベクターでは未修飾 Ad ベクターと比較して高分子量側にシフトしていた。また、カチオン性の Tat ペプチドに覆われることで Tat-Ad ベクターの表面は正電荷になっていたことから、Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合が確認された。

次に接着細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子発現活性を検討した。CAR およびインテグリンが共に高発現である A549 細胞において、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc と比較して、さらに 10 倍以上高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 128)。また、CAR 低発現、インテグリン高発現の B16BL6 細胞においても、Tat-Ad-Luc は AdRGD-Luc よりも約 10 倍、未修飾 Ad-Luc よりも 500 倍以上高い遺伝子発現を達成した。さらに、従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターでは遺伝子導入が困難であった骨髄由来血球系浮遊細胞である KG-1a 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc や AdRGD-Luc と比べて約 10 倍高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 129)。以上の結果から、Tat-Ad ベクターは非常に広範な感染域を有することによって、遺伝子治療の適応拡大に大きく貢献できるベクターシステムである可能性が示唆された。

そこで次に、遺伝子導入効率に及ぼす Tat 修飾率ならびに標的細胞特性の影響について検討した。まず、Ad-Tat ベクターの Tat 修飾率と遺伝子導入効率との関連評価を行うために、Ad ベクター表面のペプチド結合部位 (リジン残基) に対して 12.5~2000 倍モル量の活性基付与型 Tat ペプチド (Tat-NHS) を混合することによって、様々な修飾率の Tat-Ad ベクターを作製した。これら Tat-Ad ベクターを用いて CAR 低発現の B16BL6 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現レベルを指標に各ベクターの遺伝子導入活性を比較した (Fig. 130)。その結果、修飾条件 1:25 (= リジン残基 : Tat ペプチド) で調製した Tat-Ad ベクターが最も高い遺伝子導入活性を示し、Ad-Tat ベクターの遺伝子導入効率が Tat 修飾条件によって大きく影響されることが判明した。高修飾率の Tat-Ad ベクターにおける遺伝子導入活性の消失については、詳細な原因は不明であるが、過剰の Tat ペプチド

修飾によって Ad ベクターが本来有する遺伝子導入機序のいずれかのステップが阻害されたものと推察された。

次に、修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターを 300~10,000 VP/cell の用量で B16BL6 細胞に適用した際のルシフェラーゼ活性を測定したところ、ベクター用量に依存した遺伝子発現レベルの上昇が確認された (Fig. 131)。また、Ad ベクター粒子の表面に静電的に吸着した Tat ペプチドの遺伝子導入効率への影響を検討するために、結合活性基を持たない Tat ペプチドと Ad ベクターとを混合した場合の遺伝子導入活性についても測定した (Fig. 132)。その結果、Ad ベクターに Tat ペプチドを単に混合しただけでは、B16BL6 細胞に対する遺伝子導入活性は未修飾 Ad ベクターとほぼ同等であり、Tat-Ad ベクターの優れた遺伝子導入活性が Ad ベクターの粒子表面 (カプシド蛋白質) に Tat ペプチドが共有結合することではじめて得られることを実証した。

さらに、CAR 発現量の異なる種々の細胞に対して、修飾条件 1:12.5, 1:25, 1:50 で調製した各 Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの遺伝子導入活性を比較検討した (Fig. 133)。接着細胞である CT26 細胞 (マウス colon carcinoma 由来)、RAW264.7 細胞 (マウス macrophage 由来)、HeLa 細胞 (ヒト cervical carcinoma 由来)、および A549 細胞 (ヒト lung carcinoma 由来) のなかで、CAR 高発現細胞 (A549 細胞、HeLa 細胞) ではいずれの修飾率の Tat-Ad ベクターも未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子導入活性を示し、CAR 低発現細胞 (CT26 細胞、RAW264.7 細胞) においては修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの数倍高い遺伝子導入を達成した。また、浮遊細胞である U937 細胞 (ヒト monocytic lymphoma 由来) に対しては、修飾条件 1:12.5 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの約 10 倍高い遺伝子導入活性を示した。したがって Tat-Ad ベクターは、CAR の発現が十分な標的細胞に対しては、従来の Ad ベクターでも高い遺伝子発現が達成できるため同等な遺伝子導入活性を示すに留まったが、CAR の発現が乏しい標的細胞に対してこそ高い優位性が発揮されることが明らかとなった。

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

#### C.3.1 脂肪細胞への高効率遺伝子導入と脂肪細胞分化抑制

脂肪細胞分化研究などに汎用されているマウス 3T3-L1 細胞への各種改変型 Ad ベクターによる遺伝子導入について検討した。3T3-L1 細胞は脂肪前駆細胞の性質を示し、分化培地で培養すると、成熟した脂肪細胞に分化することから脂肪細胞分化研究な