

どに汎用されている。ところが、3T3-L1 細胞は遺伝子導入が困難な細胞として知られており、効率の良い遺伝子導入法の開発が切望されている。そこで 3T3-L1 脂肪前駆細胞および分化させ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、各種改変 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。

まず、CA プロモーターを用いた各種ファイバー改変 Ad ベクターでの 3T3-L1 脂肪前駆細胞への遺伝子導入について検討した (Fig. 134)。用いたファイバー改変 Ad ベクターは、ファイバーノブの H1 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 14)。3000 あるいは 10000VP/cell の条件下で各種 Ad ベクターを作用させたところ、従来型の Ad ベクターである Ad-CALacZ ではわずかの X-gal 陽性細胞しか認められなかった。一方、AdK7-CALacZ では劇的な発現効率の改善が認められ、10000VP/cell では 90%以上の遺伝子発現効率を示した。AdRGD-CALacZ でも若干の発現効率の上昇が認められたが、AdK7-CALacZ に比べると非効率的であった。AdF35-CALacZ は Ad-CALacZ と同程度の発現効率しか示さなかった。

次に 3T3-L1 脂肪細胞について同様の検討を行った (Fig. 135)。分化培地で培養した 3T3-L1 細胞が脂肪細胞に分化していることは、細胞内における脂質の量を Oil red O staining 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 (data not shown)。3T3-L1 脂肪細胞の場合は、従来の Ad ベクターである Ad-CALacZ では全く X-gal 陽性細胞が認められなかったが、脂肪前駆細胞の場合と同様に、AdK7-CALacZ では劇的な発現効率の改善が認められた。AdRGD-CALacZ でも発現効率の上昇が認められたが、AdK7-CALacZ に比較すると弱かった。AdF35-CALacZ はあまり効果がなかった。3T3-L1 脂肪前駆細胞、および脂肪細胞での CAR の発現を RT-PCR 法で確認したところ、両細胞とも negative であり、従来の Ad ベクターによる低い遺伝子導入効率は、CAR の発現レベルが低いためであることが明らかとなった (Fig. 136)。以上の結果より、ポリリジンタイプのファイバー改変 Ad ベクターが 3T3-L1 脂肪前駆細胞、脂肪細胞への遺伝子導入に最適であることが判明した。

そこで、PPAR γ に対する shRNA を発現するポリリジンタイプのファイバー改変 Ad ベクター、AdK7-H1-PPAR γ を作製し、3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を抑制するのか検討した。なお、PPAR γ に対する shRNA 配列には PPAR γ 1 およ

び PPAR γ 2 の両者をノックダウンする配列を選択した。AdK7-H1-PPAR γ の作用をウエスタンブロット法にて確認したところ、AdK7-H1-PPAR γ は 3T3-L1 脂肪細胞の PPAR γ 発現を抑制した (Fig. 137)。AdK7-H1、AdK7-H1-Scramble および AdK7-Null は PPAR γ 発現に影響しなかった。これらの結果は 3T3-L1 細胞において AdK7-H1-PPAR γ は PPAR γ 発現を効果的に抑制することを示している。

脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程において、3T3-L1 脂肪前駆細胞はトリグリセリドを豊富に含んだ油滴を蓄積する。そのため Oil red O 染色やグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性の細胞内脂質の蓄積を測定することによって 3T3-L1 細胞の分化の程度を評価することが可能である。そこで次に AdK7-H1-PPAR γ が 3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を抑制するのか検討した。3T3-L1 細胞に Ad ベクターを作用させ、翌日細胞をコンフレントの状態にさせた。コンフレントになった 2 日後、細胞を 9 日間分化させ (分化用培地で培養し)、Oil red O 染色を行った。その結果、3T3-L1 脂肪細胞内の脂質蓄積は AdK7-H1-PPAR γ 処理により減少した (Fig. 138)。GPDH 活性もまた AdK7-H1-PPAR γ (3000 VP/cell および 10000 VP/cell) 処理により AdK7-Null (10000 VP/cell) 処理の 55% (3000 VP/cell) および 33% (10000 VP/cell) まで減少した (Fig. 139)。AdK7-H1、AdK7-H1-Scramble および AdK7-Null は細胞内の脂質蓄積や GPDH 活性に対する抑制効果は観察されなかった。これらの結果より、AdK7-H1-PPAR γ は 3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を効果的に抑制できることが明らかとなった。

C. 3.2 発現誘導型 shRNA 発現 Ad ベクターシステムの開発

Ad ベクターと shRNA 発現システムを組み合わせた手法は遺伝子導入実験や治療への応用に極めて有用である。誘導型 shRNA 発現システムは遺伝子発現抑制の程度を誘導剤の量や濃度によって調節することが可能になる。本研究では、ドキシサイクリン (テトラサイクリンの誘導体) 誘導型 shRNA 発現システムを搭載した Ad ベクターを作製し、その機能を評価した。誘導型 shRNA 発現システムのため、テトラサイクリン・オペレーター (tetO) 配列を H1 プロモーターの TATA ボックスと転写開始点の間に配置した。H1 プロモーターや tetO 配列を有した変異型 H1 プロモーターによって標的配列に対する shRNA を発現する様々な Ad ベクターを構築し (Fig. 140)、内因性遺伝子である p53 および c-myc 遺伝子の発現抑制の調節を試みた。

まず初めに、Ad ベクターを用いた shRNA 発現システムの有用性を確認するため、H1 プロモーターや

tet0 配列を有した変異型 H1 プロモーターを搭載した Ad ベクターの感染により、p53 および c-MYC 発現をノックダウンさせた。A549 細胞や HepG2 細胞を様々な濃度の Ad ベクター (Ad-H1-p53, Ad-H1-Myc, Ad-H1tet0-p53, Ad-H1tet0-Myc, Ad-H1, Ad-H1tet0 および Ad-null) で作用させ、ドキシサイクリン無しで 3 日間培養し、p53 および c-MYC 発現をウエスタンブロット法により検討した (Fig. 141)。アクチン発現を内部標準として測定した。A549 および HepG2 細胞において p53 および c-MYC 発現は p53 や c-MYC に対する shRNA 発現単位を搭載した Ad ベクター (Ad-H1-p53, Ad-H1-Myc, Ad-H1tet0-p53, or Ad-H1tet0-Myc) でベクター濃度依存的に減少した。p53 の場合、1000 VP/cell のベクター濃度により十分な発現のノックダウンが観察された。p53 発現は、Ad-null (1000 VP/cell) 処理群と比較し、Ad-H1-p53 (1000 VP/cell) 処理群は 35-37%、Ad-H1tet0-p53 (1000 VP/cell) 処理群は 14-23% まで減少させた (Fig. 141A)。c-MYC の場合、完全な発現のノックダウンには 3000 VP/cell のベクター濃度が必要であったが、1000 VP/cell のベクター濃度でも適度なノックダウンが可能であった。c-MYC 発現は、Ad-null や Ad-H1 (3000 VP/cell) 処理群と比較し、Ad-H1-Myc (3000 VP/cell) 処理群は 14-44%、Ad-H1tet0-Myc (3000 VP/cell) 処理群は 16-35% まで減少させた (Fig. 141B)。Ad-null 処理群と比較し、Ad-H1 と Ad-H1tet0 処理群は遺伝子発現に影響しなかった。これらの結果より、tet0 配列を H1 プロモーターの TATA ボックスと転写開始点の間に置き換えても H1 プロモーター活性を阻害せず、正常な H1 プロモーターによる shRNA 発現カセット同様に、標的遺伝子発現を効果的に抑制できることが明らかとなった。

次に、ドキシサイクリン (10 $\mu\text{g/ml}$) 存在下または非存在下において Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR (テトラサイクリンレプレッサー発現 Ad ベクター)、または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR の共感染により遺伝子発現抑制の調節が得られるのかどうかを A549 細胞を用いて検討した。Fig. 142 に示したように、ドキシサイクリン非存在下、p53 発現の抑制効果は Ad-TR 量の割合によって減少し、遺伝子発現抑制の効果的な解除は Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR のモル比 1:6 で得られた。これらの結果はドキシサイクリン非存在下での変異型 H1 プロモーターの転写阻害には、多量の tetR が必要であることを示唆している (Fig. 142A)。ドキシサイクリン存在下では、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR の共感染により p53 発現は抑制された。従って、p53 発現の抑制の制御 (調節) には、Ad-H1tet0-p53 と比較し、多量の Ad-TR が必要であった。同様の結果は c-myc 遺伝子に対する実験 (Fig. 142B) や HepG2 細胞を用いた p53 および

c-myc 遺伝子に対する実験 (data not shown) においても得られた。

次に、Ad ベクターによる RNAi 効果に対するドキシサイクリン濃度の影響を検討した (Fig. 143)。A549 細胞へ Ad-H1tet0-p53 または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR をモル比 1:6 で共感染させた後、様々な濃度のドキシサイクリンを含む培養液で培養し、p53 および c-MYC の発現レベルを検討したところ、p53 および c-MYC 発現を完全に抑制するのに 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ のドキシサイクリン濃度で十分であった。ドキシサイクリン 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ では p53 および c-MYC 発現は中程度の抑制が得られた。また、ドキシサイクリン存在下、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR で共感染させても c-MYC 発現は抑制されず、Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR の共感染によっても p53 発現は抑制されなかったことから、抑制効果は標的遺伝子特異的であることが示唆された。これらの結果から、ドキシサイクリン濃度によって標的遺伝子発現抑制が調節できることが明らかとなった。

そこで次に、ドキシサイクリン存在下・非存在下における shRNA (siRNA) 発現をノーザンブロットにより検討した (Fig. 144)。A549 および HepG2 細胞において、Ad-H1tet0-p53 と Ad-TR を共感染させドキシサイクリン非存在下での p53 に対する shRNA および siRNA の発現を検討したところ、ドキシサイクリン存在下と比較し減少していた (Fig. 144A)。ドキシサイクリン非存在下での shRNA および siRNA のシグナルは僅かであった。これらの知見は、c-MYC において著しいものであった (Fig. 144B)。これらの結果から、shRNA (siRNA) 発現は Ad ベクターによるドキシサイクリン誘導型 RNAi システムによって厳密に調節されることが明らかとなった。

C. 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

現在、RNAi は標的遺伝子のノックダウンの有用な手段として用いられているが、さらなる遺伝子機能解析への応用には発現調節可能なベクター系の開発が望まれている。近年、Cre-loxP の組換えシステムを利用して、Cre により発現調節可能な RNAi ベクターが幾つか報告されたが、これらは全て Cre により shRNA 発現が誘導される系であり、標的遺伝子の発現抑制を解除する、つまり shRNA 発現を停止させるシステムは報告されていない。shRNA 発現を開始させることは、RNAi ベクターを導入することで行えることから、shRNA 発現を停止させるシステムの方が汎用性が高いと考えられる。そこで、我々は Cre-loxP システムを利用して shRNA 発現をオフにする系の開発を試みた。

本実験で使用したベクターを Fig. 145 にまとめた。プラスミドベクターは Ad ベクターへの簡便な挿入

にも対応できるように、シャトルプラスミド pHM5 をベースに作製した。プロモーターと shRNA 配列の間に loxP 配列を挿入することによる RNAi 効果への影響を検討した。A549 および HepG2 細胞に pGL3-Control と RNAi ベクタープラスミドをコトランスフェクションし、2 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pHM5-hU6 および pHM5-hU6-Scramble では pHM5 と比較しルシフェラーゼ発現に影響しなかったが、pHM5-hU6-Lu はルシフェラーゼ発現を顕著に抑制した (Fig. 146)。loxP 配列を有したベクターについても同様に検討したところ、pLoxP-hU6 および pLoxP-hU6-Scramble は pHM5 と比較しルシフェラーゼ発現に影響しなかったが、pLoxP-hU6-Lu はルシフェラーゼ発現を顕著に抑制した。この pHM5-hU6-Lu によるルシフェラーゼ抑制効果は pLoxP-hU6-Lu による抑制効果と同程度であった (Fig. 146)。

次に pLoxP-hU6-Lu によるルシフェラーゼ発現抑制が AdCre 処理によって解除されるのか検討した。A549 および HepG2 細胞を AdCre で処理し、翌日 pGL3-Control と RNAi ベクタープラスミドをコトランスフェクションし、その 2 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pLoxP-hU6-Lu により抑制されたルシフェラーゼ発現は AdCre の用量依存的に増加し、A549 では AdCre 3000 VP/cell、HepG2 では AdCre 1000 VP/cell で完全に回復した。pLoxP-hU6 および pLoxP-hU6-Scramble ではルシフェラーゼ発現に影響しなかった (Fig. 147)。この AdCre によるルシフェラーゼ発現の回復は、Cre により loxP で挟まれたプロモーターが除去された為と推測される。そこで、Cre により loxP で挟まれたプロモーターが実際に除去されるのかを検討した。A549 細胞に、AdCre、続いて pLoxP-hU6-Lu をトランスフェクションし、2 日後、細胞の核画分から DNA を調製し、PCR を行った。PCR プライマー Primer 1 および 2 を Fig. 15 で示した位置に設計すると、Cre によるプロモーターの除去に伴い、PCR 産物は約 800bp から約 470bp に低分子化する。そこで、Cre-loxP によるプロモーターの切り出しを、この PCR 産物の低分子化によってモニターした。AdCre を 300、1000 VP/cell で処理したところ、AdCre 処理したもののみ約 470bp の PCR 産物のバンドが観察された。さらに約 470bp のバンドは作用させた AdCre の増加に従って増大した (Fig. 148)。

続いて、抑制されたルシフェラーゼ発現が AdCre 処理によって回復するのか検討した。A549 細胞を播種し、翌日 pGL3-Control と pLoxP-hU6 または pLoxP-hU6-Lu をコトランスフェクションし、さらに翌日 AdCre で処理し、その 4 日後ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、pLoxP-hU6-Lu により抑制されたルシフェラーゼ発現は AdCre 処理によって増

加し、コントロールの約 50%まで回復した (Fig. 149)。従って、Cre の発現により shRNA 発現をオフに制御できるベクター系の開発に成功した。

C. 3. 4 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

siRNA 発現 Ad ベクターの更なる普及のためには、簡便に高効率にベクターを作製する技術が必要となる。我々は、従来の Ad ベクター作製法を格段に簡略化し、簡単な *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して Ad ベクターを作製する技術を開発済みであり、全世界で広く用いられている。本法を利用した siRNA 発現 Ad ベクター作製法では、U6 や H1 プロモーターを有したシャトルプラスミドに標的遺伝子に対する shRNA コード合成オリゴ DNA を挿入し、その遺伝子カセットを Ad ゲノムの E1 欠損領域に組み込む 2 段階の作業が必要となる (Fig. 150 A)。そこで我々は、この siRNA 発現 Ad ベクター作製法をさらに簡略化し、標的遺伝子に対する shRNA コード合成オリゴ DNA を直接 Ad ゲノム (ベクタープラスミド) に組み込む迅速・高効率 siRNA 発現 Ad ベクター作製法 (*in vitro* ライゲーションを利用) を開発した (Fig. 150 B)。具体的には、U6 プロモーターを予め Ad ベクタープラスミドの E1 欠損領域に挿入し、転写開始配列付近に制限酵素ユニーク部位の ClaI あるいは SmaI 部位を、さらにその下流に XbaI 部位を挿入した新たなベクタープラスミド pAdHM4-hU6a、pAdHM4-hU6b を作製した (Fig. 151 A)。これにより、目的の標的遺伝子に対する shRNA 配列をコードした合成オリゴ DNA を直接 Ad ベクタープラスミドに挿入することが可能となり (シャトルプラスミドからベクタープラスミドへの組み込み作業が必要なくなった)、生じたプラスミドをゲノム両末端に存在する制限酵素 PacI で線状にし、これを 293 細胞にトランスフェクションすることで siRNA 発現 Ad ベクターの作製が可能となった (Fig. 150 B、Fig. 151 A)。hU6 プロモーターの転写開始点付近の詳細な遺伝子配列は Fig. 152 に示した。

このように作製した siRNA 発現 Ad ベクターの機能を、ルシフェラーゼおよびヒト p53 を標的に検討した。ルシフェラーゼに対しては、A549-Luc 細胞を用い、Ad-hU6a-Lu と Ad-hU6b-Lu の効果を Ad-hU6b-Lu と比較検討した。その結果、Ad-hU6a-Lu と Ad-hU6b-Lu のルシフェラーゼ発現の抑制効果は、Ad-hU6b-Lu と同程度であった (Fig. 153)。コントロールベクターでは、ルシフェラーゼ発現の抑制は認められなかった。内因性遺伝子のヒト p53 に対しても同様に検討したところ、1000 VP/cell の Ad-hU6-p53、Ad-hU6a-p53、Ad-hU6b-p53 で作用させた場合の A549 細胞の p53 発現レベルは、それぞれ 7、2、5%であり (Image Gauge Software での

検討)、同程度の抑制効果を示した (Fig. 154)。従って、本法で作製した siRNA 発現 Ad ベクターは、従来の方法で作製した場合と同様の遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなった。

C. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

C. 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

ヒト造血幹細胞は、その多分化能ならびに自己複製能より、再生医療・細胞治療・遺伝子治療の重要な細胞ソースとして期待されている。よって、造血幹細胞に効率よく遺伝子導入可能になれば、多くの血液系疾患に対する有効な治療方法の開発につながるだけでなく、造血幹細胞の分化機構や自己複製機構を解明するうえで、極めて有効な手段となりうると思われる。我々は既に、35 型 Ad ベクターが造血幹細胞を有する画分であるヒト CD34 陽性細胞に効率よく遺伝子導入できることを明らかにしている。しかしながら、造血幹細胞(前駆細胞)は CD34 陽性細胞のうちの一部であることが報告されていることから、本研究では、各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製しプロモーター活性を比較するとともに、CD34 陽性細胞のうち、さらに未分化な細胞画分に対する遺伝子導入効率を検討した。

まず、遺伝子導入実験に先立ち、効率よく 35 型 Ad ベクターを作製するため、*in vitro* ライゲーション法を 35 型 Ad ベクター作製に適用した (Fig. 155)。まず、自己増殖に必須である E1 領域 (368~3374 塩基) を取り除き、I-CeuI 部位、SwaI 部位、PI-SceI 部位を導入した。これにより I-CeuI 部位と PI-SceI 部位を利用して、簡便な *in vitro* ライゲーションで目的遺伝子を挿入することが可能となった。さらに、挿入遺伝子サイズを広げるため、E3 領域 (27761~29731 塩基) を取り除いた。よって、ベクタープラスミド pAdMS4 では合計約 4.9Kb のウイルスゲノムを取り除いており、5 型 Ad ベクターと同様に野生型ゲノムサイズの 105% までウイルス粒子に封入可能であるならば、本 35 型 Ad ベクターは約 6.6Kb の外来遺伝子を搭載することが可能となる。

次に上述の作製法を用い、CMV promoter によってドライブされる GFP 遺伝子発現カセットを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製し、35 型 Ad の受容体である CD46 の発現量と遺伝子導入効率との関連について検討した。まず、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞における CD46 の発現レベルを解析したところ、ほぼ全ての CD34 陽性細胞が CD46 を高発現していた (Fig. 156)。しかしながら、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入効率は、12000VP/cell 以上で約 25% GFP 陽性とほぼ飽和に達した (Fig. 156B)。さらに、

CD46 の発現の程度と遺伝子発現効率との間には相関が見られなかった (Fig. 156C)。

そこで、CD34 陽性細胞の中には CMV プロモーターに不応性の細胞も含まれると考えられることから、様々なプロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製し、遺伝子導入効率を比較検討した。用いたプロモーターとしては、以下の 6 種類である: CMV プロモーター、EF1 α プロモーター、CA プロモーター、CMVi プロモーター、PGK プロモーター、MSCV プロモーター。これら各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターをヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に 6000VP/Cell で作用させたところ、EF1 α プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが他のプロモーターと比較し、高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 157)。特に CA プロモーターでは約 54% の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。以上の結果より、CD34 陽性細胞における遺伝子発現効率はプロモーターによって大きく異なり、今回調べたプロモーターの中では、CA プロモーターが最も活性が高いことが示された。しかしながら、CA プロモーターを用いた場合においても遺伝子発現効率は約 54% にとどまり、35 型 Ad ベクターが感染しても遺伝子発現に到らない可能性が考えられた。そこで GFP 陽性画分および GFP 陰性画分におけるベクターゲノム量を Real-time PCR を用いて検討したところ、どのベクターにおいても GFP 陽性、陰性画分ともに約 300 vector copy number/ β -actin copy number が検出されたことから (Fig. 158)、GFP 陽性細胞だけでなく GFP 陰性細胞も 35 型 Ad ベクターの感染を受けていることが明らかとなった。よって、35 型 Ad ベクターは恐らく CD46 を介して全ての細胞に感染するが、一部の細胞のみが遺伝子発現を示すことが示唆された。

次に、CD34 陽性細胞のなかでもさらに未分化な細胞画分であることが報告されている CD38 陰性細胞および AC133 陽性細胞における遺伝子発現効率を検討した。CD34 陽性 CD38 陰性細胞および CD34 陽性 AC133 陽性細胞に 6000VP/Cell で 35 型 Ad ベクターを感染させたところ、両細胞画分においても EF1 α プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 159, 160)。特に CA プロモーターは CD34 陽性 CD38 陰性細胞では 57%、CD34 陽性 AC133 陽性細胞では 51% の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。よって、CA プロモーターはさらに未分化な細胞画分においても最も活性が高いことが明らかとなった。

さらに、CA プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターによって GFP を発現した細胞が各 lineage に分化する能力を有しているかどうかを検討するため、コロニーアッセイを行った。その結果、GFP 陽性細胞

は、未処理細胞および GFP 陰性細胞とほぼ同程度のコロニーを形成した (Table. 15)。GFP 陽性細胞群における Burst-forming units-erythrocytes (BFU-E) のコロニー数は、GFP 陰性細胞群と比較し若干少なかったものの、Colony-forming units-granulocyte macrophage (CFU-GM) のコロニー数に関しては同程度であった。また、GFP 陽性細胞は最も未分化な細胞から生ずる Colony-forming units-granulocyte erythrocyte monocyte macrophage (CFU-Mix) も形成した。以上の結果より、CA プロモーターによって外来遺伝子を発現した細胞は、各 Lineage の細胞に分化する能力を保持していることが示された。しかしながら、35 型 Ad ベクター処理群のコロニーは GFP 陽性、陰性を問わず、未処理群と比較し若干小さかった (data not shown)。これは、35 型 Ad ベクター感染による毒性と思われる。

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

Subgroup B に属する 35 型 Ad ベクターは、①CAR ではなく CD46 を受容体として認識するため、一般に汎用されている 5 型 Ad ベクターとは異なる感染域を示し、CAR 陰性細胞にも高効率な遺伝子導入が可能であること、②5 型 Ad ベクターとは異なる subgroup に属するため抗 5 型 Ad 抗体による阻害を受けないこと、③抗 35 型 Ad 抗体を有しているヒトの割合が低いため既存抗体による阻害を受ける可能性が低いことなどから、5 型 Ad ベクターと同様、有用な遺伝子導入用ベクターとして期待されている。我々は、世界に先駆けて 35 型 Ad ベクターの開発に成功しており、ヒト造血幹細胞を含むヒト由来の細胞に対し、5 型 Ad ベクターと比較し広い感染域を示すことを明らかにしている。しかし一方で、マウスに *in vivo* 投与した場合、各臓器における遺伝子発現量は 5 型 Ad ベクターと比べ極めて低い値しか示さなかった。これは受容体である CD46 (membrane cofactor protein) がヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞で発現しているのに対し、マウスの体細胞ではほとんど発現しておらず精巣でしか発現していないためであると思われる。そこで本検討では、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入における CD46 の役割および 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性について明らかにするため、CD46 安定発現細胞株およびヒト CD46 トランスジェニック (CD46TG) マウスを用いて検討した。

(1) CD46 発現 CHO 細胞の作製および遺伝子導入実験

まずはじめに、CD46 が 35 型 Ad の受容体であることを確認するため、CD46 安定発現 CHO 細胞を作製し、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率を検討した。ま

ず CD46 安定発現 CHO 細胞における CD46 の発現をフローサイトメーターを用いて解析したところ、CD46 BC1 および BC2 isoform 安定発現 CHO 細胞ともに CD46 を発現していることを確認した (Fig. 161)。次にそれらの細胞にルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 300、3000VP/cell で作用させたところ、CD46 安定発現細胞においては野生型と比較し、8~17 倍高い遺伝子導入効率を示した (Fig. 162)。また BC1 および BC2 isoform 間に著差は認められなかった。以上の結果より、35 型 Ad ベクターは CD46 を認識し感染することが示された。

(2) マウス初代培養細胞への遺伝子導入実験

次に CD46TG マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性について検討した。まず CD46TG マウスより初代培養細胞を単離・誘導し、遺伝子導入実験を行った。初代培養細胞としては、骨髄由来樹状細胞 (DC) および腹腔内マクロファージを選択した。近年、35 型 Ad ベクターはワクチンベクターとしての有用性が報告されており、これらの細胞は 35 型 Ad ベクターを用いたワクチン治療における格好の標的細胞と考えられる。Flowcytometry により両細胞における CD46 発現量を測定したところ、野生型由来 DC では Background レベルであったのに対し、ヘミマウス由来 DC で 47%、ホモマウス由来 DC で 87% の細胞が CD46 を発現していた (Fig. 163A)。腹腔内マクロファージに関しても、ヘミマウス由来マクロファージで 20%、ホモマウス由来マクロファージで 41% の細胞が CD46 を発現していた (Fig. 9B)。これらの細胞に対し、GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、両細胞ともに CD46 発現量に比例し、遺伝子発現量の増大が観察された。野生型由来 DC ではほとんど遺伝子発現が認められなかった (3.8% GFP 陽性) のに対し、ヘミマウスおよびホモマウス由来 DC ではそれぞれ 42%、83% の細胞が GFP 陽性であった (Fig. 164A)。腹腔内マクロファージにおいても、野生型由来マクロファージでは GFP 発現は認められなかったが、ヘミマウスおよびホモマウス由来 DC ではそれぞれ 10%、20% の細胞が GFP 陽性であった (Fig. 164B)。

(3) CD46TG マウスにおける CD46 発現解析

Western blot にて CD46TG マウスの各臓器における CD46 発現を検討した。その結果、CD46TG マウスの全臓器において有意な CD46 の発現が観察された (Fig. 165)。特に肝臓、脾臓、肺、腎臓において高い発現が認められ、これはヒトにおける発現パターンと比較的類似していた。また CD46 遺伝子を両方の相同染色体に有したホモマウスと片方にのみ有したヘミマウスとを比較すると、ホモマウスのほうがヘミマウスよりも CD46 を高発現しており、ホ

モマウスの肝臓、脾臓、横隔膜ではヘミマウスと比較し約3倍高いCD46発現量を示した。しかしながら、ホモマウスより単離した肝実質細胞、脾細胞、および胸腺細胞におけるCD46発現量は、ヒト培養細胞と同程度か、若干低いものであった。また、Western blot および Flow cytometry による検討では、CD46TG マウス由来の赤血球においてCD46の有意な発現は見られなかった (data not shown)。

(4) CD46TG マウスにおける35型 Ad ベクターの遺伝子導入特性の解析

CD46TG マウス由来の初代培養細胞において顕著な遺伝子導入効率の上昇が観察されたことから、次にCD46TG マウスに対し35型 Ad ベクターを *in vivo* 投与し遺伝子導入効率を測定した。まず野生型ならびにCD46TG マウスに35型 Ad ベクターを尾静脈内投与したところ、CD46TG マウスの肝臓、肺、腎臓において野生型と比較し有意に高い遺伝子発現効率が観察された (Fig. 166A)。一方で、脾臓および胸腺においては明らかな遺伝子発現効率の増加は認められず、また肝臓以外の臓器ではホモマウスとヘミマウスとの間に顕著な差は認められなかった。一方、腹腔内投与ではCD46TG マウスの肝臓、脾臓、腎臓において静脈内投与の場合と比較し、効率良く遺伝子導入されていた (Fig. 166B)。ホモマウスの肝臓および腎臓では、腹腔内投与のほうが静脈内投与よりもそれぞれ83倍、271倍高い値を示した。さらにCD46TG マウスと野生型マウスとの差も腹腔内投与のほうが大きく、ホモマウスの肝臓、腎臓、横隔膜ではそれぞれ野生型の536倍、492倍、83倍高い遺伝子発現効率を示した。ホモマウスとヘミマウスとを比較してみると、ホモマウスのほうが高い遺伝子発現効率を示しており、ホモマウスの肝臓及び横隔膜の遺伝子発現量はヘミマウスと比較しそれぞれ6.8倍、5.5倍高いものであった。これはホモマウスのほうがCD46を高発現しているためと思われる。しかしながら、CD46TG マウスにおける35型 Ad ベクターの遺伝子発現量は、5型 Ad ベクターの遺伝子発現量と比較すると、極めて低いものであった。ホモマウスに35型 Ad ベクターを腹腔内投与したときの遺伝子発現効率と、同じ投与量で5型 Ad ベクターを野生型マウスに静脈内投与したときの発現効率とを比較すると、5型 Ad ベクターは肝臓では20000倍、脾臓では57倍高い遺伝子発現効率を示した (data not shown)。

次に *in vivo* 投与後、各臓器に取り込まれた35型 Ad ベクター量を定量的PCRを用いて検討した。まず静脈内投与では、肝臓を除く全ての臓器で野生型よりもCD46TG マウスにおいて多くのベクターDNAが検出された (Fig. 167A)。さらにヘミマウスよりもホモマウスのほうが多くのベクターが集積し

ていた。特に脾臓においては、野生型と比較しヘミマウスで8倍、ホモマウスで69倍高い値を示した。しかしながら、最も多くの5型 Ad ベクターが集積する肝臓では、他臓器と比較し35型 Ad ベクターの有意に高い集積は観察されなかった。一方、腹腔内投与においては、肝臓、腎臓、腹膜、横隔膜でCD46TG マウスのほうが野生型マウスよりも多くの35型 Ad ベクターが集積していた (Fig. 167B)。特にホモマウスの肝臓および腎臓では、野生型よりも10倍以上高い値を示した。さらにホモマウスの肝臓、腎臓、腹膜、横隔膜ではヘミマウスよりも多くのベクターを取り込んでいた。一方で、腹腔から直接到達できない臓器である肺および心臓におけるベクター集積量は低く、野生型とCD46TG マウスとの間に明らかな差は見られなかった。以上、CD46TG マウスにおいて遺伝子発現効率ならびにベクター取り込み量ともに高い値を示したことから、35型 Ad ベクターは *in vivo* においてもCD46を受容体として認識し感染することが示唆された。また、野生型マウスの各臓器で検出された35型 Ad ベクター量の総計は、CD46TG マウスのものと比較すると低いものであった。これは、野生型マウスにおいてはCD46が発現していないため、35型 Ad ベクターが各組織に感染できずにクッパー細胞などの貪食系細胞に取り込まれ、ベクターDNAが速やかに分解したためだと考察された。

最後に各臓器においてどのような細胞が遺伝子発現を示しているか検討するため、 β -galactosidase 発現35型 Ad ベクターをCD46TG マウス (ホモ) に腹腔内投与し、X-gal 染色を行った。その結果、肝臓、腎臓、腹膜において多くのX-gal 陽性細胞が観察された (Fig. 168)。しかしながら、肝臓および腎臓切片像からもわかるように、遺伝子発現を示しているのは臓器表面の中皮細胞であり、臓器内部にはほとんどX-gal 陽性細胞は認められなかった。以上の結果より、35型 Ad ベクターは腹腔内投与後血流を介して各臓器に感染するのではなく、投与部位から直接臓器表面の細胞に感染し、遺伝子発現にいたることが明らかとなった。

C. 4. 3 35型 Ad ベクターのCD46結合部位の検索

35型 Ad の受容体であるCD46は分子量約60kDaの1回膜貫通型タンパク質であり、ヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞がCD46を発現している。CD46は細胞外領域として、4つのshort consensus repeat (SCR)、serine-threonine-proline-rich region (STP)、unknown region、細胞内領域としてtransmembrane domain (TM)、cytoplasmic domain (CYT) から構成されている (Fig. 169)。STP、CYTのmRNAのalternative splicingによるprimary structureの変化とそれに付随するN-, O-linked

sugar の修飾レベルの差異により多形性を示し、isoform は 8 種類以上あると推定されているが、最もポピュラーな isoform は BC1、BC2、C1、C2 の 4 種類である。CD46 はプロテアーゼ I 因子の cofactor として自己細胞に沈着した C3b 及び C4b に結合し、プロテアーゼ I 因子による補体分子の加水分解を促進することにより自己の細胞を守る役割を担っている。この機能の他にヒト CD46 は麻疹ウイルス、ヘルペスウイルス 6 型、ヒト subgroup B Ad や 2 種類の細菌などの病原体の受容体として同定されている。これら病原体の中でも麻疹ウイルス、ヒトヘルペス 6 型及び病原性ナイセリアと CD46 の結合に関しては研究が進展している。しかし、ヒト CD46 と subgroup B Ad の結合に関する詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、ヒト CD46 と subgroup B Ad の相互作用の詳細を明らかにすべく、種々の領域を欠損させた CD46 発現 CHO 細胞や抗 CD46 抗体を用い、35 型 Ad ベクター感染に CD46 のどの領域が関与しているか検討を行った。

(1) 野生型及び short consensus repeats (SCR) 欠損 CD46 安定発現 CHO 細胞への遺伝子導入実験

ヒト CD46 の SCR 領域が Ad35 の感染に必須の領域であるのかどうかを、各種 SCR 欠損 CD46 安定発現 CHO 細胞を用いて検討した。まず、SCR 欠損 CD46 発現 CHO 細胞における CD46 の発現レベルを、各 SCR を認識する抗 CD46 抗体を用いてフローサイトメーターで解析した。変異型 CD46 の発現は、全てのクローンにおいて同程度であった (Fig. 170)。種々の抗 CD46 抗体を用いた結果を組み合わせることにより、各 SCR 領域の欠損が証明できた。また、SCR4 欠損 CHO 細胞における SCR4 の欠損は、SCR4 特異的抗体を保有していないことから、RT-PCR ならびに DNA シークエンサーにより確認した。

次に、それらの細胞にルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、SCR1 及び SCR 2 欠損 CD46 発現 CHO 細胞は野生型 CD46 発現 CHO 細胞と比較し、約 50% に遺伝子導入効率が低下した。それに対して、SCR3 及び SCR 4 欠損 CD46 発現 CHO 細胞は野生型 CD46 発現 CHO 細胞と同程度の遺伝子導入効率を示した (Fig. 171)。以上の結果より、35 型 Ad の感染に SCR1 及び SCR 2 が関与していることが示された。

(2) 各 SCR 認識抗 CD46 抗体存在下における遺伝子導入実験

CD46 のどの SCR 領域が 35 型 Ad の感染に関与しているのかに関して、CD46 の異なる領域を認識する数種類のモノクローナル抗体を用いて、35 型 Ad ベクター感染阻害検討を行った。SCR-1 特異的抗体 MEM-258 及び SCR-2 特異的抗体 M177 を用いた場合

において有意な 35 型 Ad ベクター感染阻害効果が見られた。データシートによると MEM-258 は SCR4 を認識すると記載されているが、我々はこれまでに MEM-258 は SCR1 に結合するのではないかというデータを得ている。最近の論文においても、MEM-258 のエピトープが SCR1 に存在するのではないかという報告がある。一方で、同様に SCR1 を認識する抗体である E4.3 及び J4-48 を作用させた場合は、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率の低下は見られなかった (Fig. 172)。このことから、35 型 Ad の感染には SCR1 のなかでも E4.3 や J4-48 ではなく、MEM-258 の認識領域が関与しているのではないかということが示唆された。また、SCR3 特異的抗体 M160 では 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率の低下は見られなかった。以上の結果より、CD46 の SCR1 及び SCR 2 が 35 型 Ad 感染に重要な領域であるということが示された。

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

ヒト CD46 の細胞内領域が 35 型 Ad の感染に関与しているかどうかに関して、ヒト CD46 C2 isoform の CYT を欠損させた CD46 Δ Cyt0、CD46 Δ Cyt6 を CHO 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを作用させ検討を行った。CD46 Δ Cyt0 は cytoplasmic domain (アミノ酸残基 347-369) を全て欠損させた CD46 である。CD46 Δ Cyt6 はリン酸化領域であり、細胞内領域の Ca²⁺ flux に関与しているとされる cytoplasmic domain の細胞膜近位の 6 アミノ酸を残し、アミノ酸残基 352-369 を欠損させた CD46 である。それらの CD46 を CHO 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターを 3000VP/cell で作用させたところ、full-length の CD46 を発現している CHO 細胞と比較して CD46 Δ Cyt0、CD46 Δ Cyt6 を発現している CHO 細胞の遺伝子導入効率は同程度であった (Fig. 173)。以上の結果から、CD46 の cytoplasmic domain は 35 型 Ad の感染に必須の領域ではないということが示された。

C. 4. 4 35 型 Ad ベクターによる細胞表面 CD46 発現量の減少

(1) 35 型 Ad ベクターによる細胞表面 CD46 発現量の減少

35 型 Ad をはじめとする Subgroup B に属する Ad の多くは、受容体としてヒト CD46 に結合して感染する。ヒト CD46 を受容体とする病原体は他にも多く知られており、麻疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型などが CD46 を受容体としている。これらのウイルスは感染後、細胞表面の CD46 発現量を減少させることが知られている。CD46 は補体制御因子

として自己の細胞を補体から守る役割を果たしていることから、細胞表面の CD46 発現量が減少すれば感染細胞が補体による攻撃を受けやすくなる危険性がある。また最近 CD46 は様々な免疫反応に関与することが報告されており、もし 35 型 Ad ベクターにより CD46 発現量が減少すれば予期せぬ副作用を引き起こす可能性がある。そこで本研究では、35 型 Ad ベクター感染により細胞表面の CD46 発現量がどのように変化するか検討した。

まず PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で作用させ、経時的に細胞表面の CD46 発現量を測定したところ、CD46 発現量は時間の経過とともに減少していった (Fig. 174A)。感染 6 時間後には非感染細胞と比較し 48%も減少し、12 時間後には最大 72%の減少を示した。また CD46 発現量減少は 35 型 Ad ベクター濃度依存的であり、濃度の増加とともに大きく減少した (Fig. 174B)。1250 VP/cell では 44%の CD46 発現量の減少が観察されたが、20000 VP/cell では 71%も減少していた。これらの結果から、35 型 Ad ベクターも麻疹ウイルスやヘルペスウイルス 6 型と同様に細胞表面の CD46 発現量を減少させることが明らかとなった。

さらに PBMC 中に含まれる B 細胞 (CD19 陽性細胞) および T 細胞 (CD3 陽性細胞) における CD46 発現量の変化についても検討したところ、B 細胞および T 細胞においても、それぞれ 11%および 31%の減少が観察された (Fig. 175)。しかしながら、PBMC 全体と比較すると、その発現量減少の程度は低いものであった。次に、PBMC 以外の細胞においても PBMC と同様に細胞表面の CD46 発現量が減少するか検討した。その結果、細胞種により CD46 発現量減少の程度は大きく異なっていた (Table. 16)。K562、U937、KG-1a、Molt-4 細胞では 35 型 Ad ベクター感染により CD46 発現量減少が観察され、特に Molt-4 細胞では 55%も減少していた。一方で nonleukemia 細胞である A549、HeLa、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞においては CD46 発現量減少は観察されず、HeLa 細胞や CD34 陽性細胞ではむしろ若干 CD46 発現量が上昇していた。

(2) ウェスタンブロット及び RT-PCR による CD46 発現解析

次に細胞全体の CD46 発現量が 35 型 Ad ベクター感染によりどのように変化しているか検討するため、ウェスタンブロットを行った。PBMC に対し 35 型 Ad ベクターを 10000 VP/cell で作用させ、経時的に細胞を回収して検討したところ、細胞全体の CD46 発現量は減少しておらず、むしろわずかながら増加しているようであった (Fig. 176)。また半定量的 RT-PCR により CD46 の mRNA 量を解析したところ、mRNA 量に関しても減少は見られなかった

(Fig. 177)。従って 35 型 Ad ベクター感染後、細胞全体の CD46 発現量ならびに転写量は減少していないことから、細胞表面の CD46 は 35 型 Ad ベクター感染後、分解を受けずに 35 型 Ad ベクターとともに細胞内に内在化されていることが示唆された。

(3) 35 型 Ad ベクター除去後の細胞表面 CD46 発現量の回復

上述したように、CD46 は自己の細胞を補体による攻撃から守る働きを担っていることから、35 型 Ad ベクター感染により細胞表面の CD46 発現量が減少した場合でもすぐに回復することが望ましい。そこで 35 型 Ad ベクター感染後、PBMC を洗浄して 35 型 Ad ベクターを取り除いた後、CD46 発現量の回復にどの程度の時間を要するか検討した。その結果、再培養開始後徐々に CD46 発現量は回復していったが、その回復速度は 35 型 Ad ベクター感染後の発現量減少と比較すると極めて遅く、再培養開始 96 時間後においても完全に回復していなかった (非感染細胞と比較し 17%発現量が低い) (Fig. 178)。従って、完全に細胞表面の CD46 発現量が回復するには、35 型 Ad ベクター除去後 96 時間以上必要であることが示された。

D. 考察

D. 1 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

D. 1.1 膵ランゲルハンス島 (膵島) β 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

生活習慣病の代表的なものの一つである糖尿病の患者数は年々増加しており、現在大きな社会問題となっている。特に、膵島 β 細胞からのインスリン分泌不全による高血糖症状が日本人で多くみられ、これは膵島 β 細胞の破壊あるいは機能障害によるものであることが知られている。このようなインスリン分泌不全機構の分子メカニズムの解明や、それに対する治療への応用を目指した基礎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 β 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ほとんどない。本研究では、マウスならびにラットより単離した膵島への遺伝子導入効率の検討を従来型 Ad ベクターのみならず各種ファイバー改変型 Ad ベクターにおいても行い、最も効率の良い遺伝子導入をもたらすことができる Ad ベクターの探索を試みた。

まず、 β 細胞へ Ad ベクターが感染できるかどうかを検討するため、マウス β 細胞株 MIN6 を用いた検討を行った。従来型 Ad ベクターを用いても遺伝子導入が認められたが、通常使用されている CMV プロモーターよりも CA プロモーターのほうがより効率が良いことが示され、さらに CA プロモーターをもつ各種ファイバー改変型 Ad ベクターの中では、K7 型の Ad ベクターがより効率の良い遺伝子導入をもたらすことが明らかとなった。このことをふまえ、マウスならびにラットより単離した膵島への各種ファイバー改変型 Ad ベクターによる遺伝子導入を行った。しかしながら予想に反して、従来型 Ad ベクターとファイバー改変型 Ad ベクターで大きな差は認められなかった。Ad の受容体である CAR が膵島に実際発現しているかをウエスタン・ブロッティングにて確認したところ、MIN6 と同様マウス単離膵島で CAR の発現が認められた。膵島のどの部分において遺伝子発現が認められているか X-gal 染色を行ったところ、膵島全体の X-gal 染色では全体が染まっているように見えたが、膵島切片による断面の X-gal 染色および GFP 発現 Ad ベクターを用いた共焦点顕微鏡観察では、辺縁部しか染まっていないことが明らかとなった。

β 細胞は膵島のおよそ 90% を占めるが、それらは膵島中心部に存在し、辺縁部に α 細胞や δ 細胞など他の細胞が存在することが知られていることから、 β 細胞への効率の良い遺伝子導入を考えるには、膵島内部への Ad ベクターの浸透率を上げなければならない。そこで次に、このような物理的な問題を克服するため、 Ca^{2+} -free buffer で前処理することに

より細胞間結合を弱める処置を施し、その後 Ad ベクターを作用させる方法を検討した。その結果、膵島への遺伝子導入は Ca^{2+} -free buffer で処理しないものより高い効率を示した。しかしながら、その上昇は劇的なものではなく、この処理法では膵島の形や生存率への影響から限界があるため、さらなる遺伝子導入法の根本的な改善を目指した。膵島は最も血管を豊富に含んだ臓器の一つである。膵島内をめぐっている血流や血管の密度は膵臓外分泌組織よりも約 5 倍あり、それは膵島に栄養や酸素を豊富に供給し、速やかに代謝産物や分泌ホルモンを放出することに反映されている。そこで、この血管の利用することにより、膵島内部への遺伝子導入の効率を上げることを試みた。脾臓ならびに肝門部で肝動脈と門脈をそれぞれ縫合系で結紮した後、膵臓に向かう腹腔動脈より Ad ベクターを注入したところ、搭載遺伝子 GFP の発現が認められ、*in vivo* 導入は成功した。期待したように GFP 発現は膵島内部にも認められ、膵島全域で GFP 発現が認められるものもあった。実際 β 細胞に遺伝子発現しているかどうかを確認するために、膵島切片による抗インスリン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、GFP は β 細胞で発現していることが明らかとなった。本研究で、膵島 β 細胞への高効率遺伝子導入法が確立できた。この *in vivo* 血管経由 Ad ベクター導入法は膵 β 細胞の基盤研究に有効なだけでなく、将来の糖尿病に向けた治療応用にも結びつくことが期待される。

D. 1.2 及び D. 1.3 ヒト及びマウス間葉系幹細胞への高効率遺伝子導入

間葉系幹細胞、ES 細胞 (多能性幹細胞) をはじめとする幹細胞は、自己複製能を有する一方で、多くの種類の細胞を産生する多分化能を有することから、再生医療のための細胞ソースとして注目されている。また、近年の研究によりこれら幹細胞の自己複製能の維持や、特定の細胞への分化能の獲得に関与する遺伝子が次々と同定され、細胞分化を自在に制御することも可能になりつつある。細胞増殖・分化の分子機構の解明には外来遺伝子を導入して発現させたり、あるいは特定の遺伝子の発現を抑制させたりすることが必要であり、効率の良い遺伝子導入法は必要不可欠である。これまでは、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが汎用されてきたが、これらのベクターによる遺伝子発現は染色体への導入遺伝子の組み込みを伴うため長期的・永続的なものとなり、細胞分化が起こった後も導入遺伝子の発現は続くことになる。細胞分化に関わる遺伝子の中には、分化完了後は発現 (あるいは抑制) を必要としない場合も多くあることが考えられ、このような場合には一過性の遺伝子発現 (抑制) をもたら

すベクター系が好ましいことになる。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。しかしながら、間葉系幹細胞、ES 細胞への遺伝子導入効率は低く、これらの細胞への適用には不向きであった。主任研究者らが開発を進めている改良型 Ad ベクターは、これらの幹細胞へも効率良く遺伝子導入でき、分化機構解明などの基礎研究や、再生医療や遺伝子治療のための基盤技術になりうる」と期待される。

遺伝子治療や遺伝子導入用ベクターとして汎用されている Ad ベクターは、サブグループ C に属するヒト 5 型 Ad を基盤としている（ヒト Ad は A から F までのサブグループに分けられ、計 51 種の血清型が存在する）。5 型 Ad の感染には、ウイルスカプシドタンパク質のファイバーと、細胞表面上の CAR（coxsackievirus and adenovirus receptor）との結合を必要とするため、従来の Ad ベクターは CAR 陽性細胞へは効率良く遺伝子導入できるが、CAR の発現が乏しい細胞への遺伝子導入効率は低いことが課題であった。CAR の発現が乏しい細胞としては、造血幹細胞や T 細胞をはじめとする血液系細胞、間葉系幹細胞、樹状細胞、一部の癌細胞（特に悪性度の高い癌細胞）、血管内皮細胞、滑膜細胞などが知られており、このような細胞へは Ad ベクターの適用は不向きであった。

主任研究者らは、ファイバータンパク質の外來ペプチド挿入部位として適した HI ループや C 末端コード領域に簡単に外來ペプチドコード遺伝子を挿入できるファイバー改変 Ad ベクター作製法を開発済みであり、この技術と *in vitro* ライゲーションに基づいた E1 欠損領域への外來遺伝子挿入法（主任研究者らにより開発済み）を合わせることで、感染時の CAR 依存性を克服した種々の改良型 Ad ベクターを簡単に作製することが可能となった。本法を用いて作製したファイバータンパク質の HI ループや C 末端領域に RGD（Arg-Gly-Asp）ペプチドやポリリジンペプチドを挿入したベクターでは、多くの細胞で発現している αv インテグリンやヘパラン硫酸を認識して効率良く遺伝子導入することが可能となった。また、ファイバータンパク質を、CD46 を受容体とする 35 型 Ad（サブグループ B に属する）由来のものに置換したベクターも開発済みである。補体制御因子として知られている CD46 は、ヒト由来の細胞ではほとんどの細胞で発現していることが知られており、35 型 Ad ベクター（あるいはファイバー部分が 35 型 Ad からなる 5 型 Ad をベースにしたベクター）は、ヒト由来細胞への有力なベクターである。

そこで本研究では、これら一連のファイバー改変 Ad ベクターを用いることによって、間葉系幹細胞（後の章で胎盤細胞、ES 細胞、脂肪細胞、造血幹細胞についても検討）への遺伝子導入効率の改善が可能かどうかについて検討を行い、最適化された改良型 Ad ベクターで劇的な遺伝子導入効率の改善に成功した。その結果、改良型 Ad ベクターを用いることによって、目的にもよるが、遺伝子導入細胞のソーティングや選択を行わなくても、単回のベクター作用で細胞分化の制御などに利用可能な段階になった。今後、主任研究者らの開発したこれらのベクターが、幹細胞研究や再生医療研究などの基礎・応用研究に大きく貢献できることを期待している。

D. 1. 4 胎盤細胞への高効率遺伝子導入

今回の実験に使用した JAR、JEG-3、BeWo、Rcho-1、TR-TBTs 細胞のいずれにおいてもファイバーの HI ループに RGD 配列を挿入したファイバー改変型 Ad ベクター（Ad-RGD(HI)-L2）が最も高い遺伝子導入活性を示していた。この Ad-RGD(HI)-L2 は、ファイバー上に存在する RGD 配列を介して細胞表面上の $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin と結合することから、今回実験に使用した胎盤細胞株表面にも $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin の発現量が高いことが示唆される。実際、RT-PCR 法による解析ではいずれの細胞においてもインテグリンの発現が観察されていた。また、フローサイトメーターを用いて JAR、JEG-3、BeWo 細胞表面上に存在する各蛋白質の発現を確認したところ CAR、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ integrin の発現はいずれの細胞株でも観察された（data not shown）。しかしながら、CAR の発現量には細胞間で差があり、BeWo 細胞では JAR や JEG-3 細胞の約 1/3 の発現量しか有していなかった。このデータは、野生型の Ad-L2 での遺伝子導入活性が BeWo 細胞では殆ど観察されなかったこととも一致している。BeWo 細胞は、forskolin 処理により cytotrophoblast 様の形態から syncytiotrophoblast 様の細胞形態へ分化することが知られており、ヒト胎盤の分化モデルとして汎用される細胞株である。この BeWo 細胞に対しては、Ad-RGD(HI)-L2 は野生型 Ad ベクターの約 80 倍の遺伝子導入活性を示しており、今後のヒト胎盤機能の解析の有用なツールになると考えられる。

ファイバーの C 末ドメインに K7 配列を挿入し、ヘパラン硫酸との親和性を付加した Ad-K7(C)-L2 はいずれの細胞株に対しても野生型ベクターと同程度の導入活性しか示していなかった。今回の検討では、細胞表面上のヘパラン硫酸の発現量についての解析は行っていないものの、少なくとも細胞表面上のヘパラン硫酸はファイバー改変 Ad ベクターの感染への寄与は極めて低いと考えられる。一方、RGD 配列と K7 配列を共に挿入した Ad-RGD(HI)K7(C)-L

の遺伝子導入活性は、Ad-K7(C)-L2 よりも上がっているもののAd-RGD(HI)-L2 と比較すると低下している傾向にあった。Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 の生物学的濃度が低いことから、Ad-RGD(HI)K7(C)-L2 では RGD 配列とポリリジン配列の2つの外来ペプチドをファイバーに発現することによりファイバーの立体構造が不安定になり生物学的濃度が低くなった可能性が示唆される。実際、ファイバーの3量体構造の安定化が Ad のカプシドタンパク質の安定性に関与することが示されており、今後ファイバーの立体構造の解析が必要となろう。

胎盤は種差が著しい臓器であり、動物実験のデータをヒトへ外挿することが困難なことで知られている。この為、ヒト胎盤での検討はヒト由来の胎盤細胞を用いて進められているのが現状である。現在、*in vitro* ヒト胎盤モデル細胞系としては、本実験で使用した JAR、JEG-3、BeWo 細胞が使用されている。協力研究者の近藤らは、アスコルビン酸、葉酸、亜鉛、ペプチドトランスポーターがこれらの細胞に発現していることを見出し報告してきた。しかしながら、現在の所、これら胎盤研究は現象論に終始しており実証的な解析が進展していない。昨今のポストゲノム研究の潮流の中で、RNAi を始めとした実証的機能解析の手段として核酸の有用性が示されてきた。これらの実証的機能解析手段を用いる際に重要になるのがこれらの核酸を効率的に目的とする細胞に導入する手法の確立である。

本研究では、各種胎盤細胞における各種ファイバー改変 Ad ベクターの遺伝子導入効率を比較することにより、胎盤研究における実証的解析を遂行するための基礎検討を行い、ある種の胎盤細胞系において Ad-RGD(HI)-L2 ベクターが野生型 Ad ベクターの約 80 倍の遺伝子導入活性を有することを見出した。この結果を萌芽として、妊婦への薬物治療の最適化を指向した胎盤細胞モデルにおける実証的解析が進展するものと期待される。

D. 1. 5 ES 細胞への高効率遺伝子導入

本研究では Ad ベクターによる mES 細胞および EB への遺伝子導入・発現の最適化に関して、プロモーターおよびファイバータンパク質の改変の観点から検討した。種々のプロモーターを検討した結果、mES 細胞には EF-1 α プロモーターが最も高効率かつ特異的に遺伝子発現させることができることが明らかとなった。また、従来型 Ad ベクターと種々のファイバー改変 Ad ベクターとを比較した結果、従来型ベクターが最も特異的に mES 細胞に遺伝子導入可能であった。これは、mES 細胞は CAR を発現しているが、フィーダー細胞は CAR を発現していないことに起因していた。一方、mES 細胞だけでなく、フィーダー細胞にも遺伝子導入したいときは、

ファイバー領域に RGD ペプチドやポリリジンペプチドを付与したファイバー改変 Ad ベクターが有効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 ES 細胞に機能遺伝子を導入し、実際に細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。その結果、分化を誘導すると考えられている遺伝子 (Oct-3/4 および STAT3F) を導入することで、大部分の ES 細胞を三胚葉全てに分化させることに成功した。また、この細胞分化は ES 細胞の未分化維持に必須の遺伝子 (Nanog) を共導入することにより抑制できることも明らかにし、我々の開発した Ad ベクターを用いることで、ES 細胞の分化を自由にコントロールできる可能性を示した。

ES 細胞を *in vitro* で分化させる過程において、中間体として EB を形成することが一般的に行われている。そこで次に、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターの開発を行った。ES 細胞とは異なり、EB には 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。

以上、我々は ES 細胞および EB への高効率遺伝子導入法を確立した。この技術を用いて ES 細胞あるいは EB に細胞分化に必須の遺伝子などを導入することにより、目的細胞への分化を自由に制御できる可能性が示され、再生医療への応用に大きく貢献できるものと期待される。

D. 1. 6 Ad 受容体との結合性を欠損させた Ad ベクターの作製

特定の組織への遺伝子導入能を有した Ad ベクターの開発のためには、まず、native の Ad が有する感染ルートを欠損させ、細胞特異的な受容体を介してのみ感染できるベクターを開発する必要がある。Ad の細胞内への侵入は、ファイバーが受容体の CAR に結合し、その後ペントンベースの RGD モチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる。また、5 型 Ad のファイバーシャフト領域に存在する KKTK からなるヘパリン結合ドメインが Ad の *in vivo* における組織移行性に関与していることが報告されている。従って、ターゲティング能を有した Ad ベクターの開発にあたっては、CAR や α v インテグリン、ヘパリン硫酸を介した感染を阻害することが必要である。そこで本研究では、ファイバーノブ、ペントンベース、ファイバーシャフト領域を同時に改変することで、これらの分子を認識しては感染しない Ad ベクターの改良を行った。

CAR と結合能を消失させるためのファイバーノブの変異としては FG ループの変異と AB ループの変異が知られている。FG ループの変異では、4 アミノ酸を欠損させることでファイバーノブの構造変化を誘起し、CAR との結合能を消失させるのに対し、AB

ループの変異ではファイバーノブの構造変化を伴わずアミノ酸置換によりCARとの結合能を消失させることが報告されている。このファイバーノブだけの変異を加えた Ad ベクターでは、FG ループと AB ループの変異間では、*in vitro*での遺伝子導入活性に違いはなく、共に従来の Ad ベクターに比べ、1%程度の遺伝子発現能しか示さないことが明らかとなっている。ところが、本研究の結果より、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 ループに変異を加えた方が、FG ループの場合に比べ、更に遺伝子発現能の減弱が認められ、ターゲティング Ad ベクターの基盤ベクターとして優れていることが明らかとなった。また、これらトリプルミュータント Ad ベクターの詳細な機能を評価したところ、*in vivo*投与後の組織分布は大きく変化しないが、肝組織においては取り込まれている主要な細胞が異なることが明らかとなった。さらに、トリプルミュータント Ad ベクターは細胞表面の Ad 受容体に結合できないだけでなく、細胞内に取り込まれた後の核への移行能の違いが、遺伝子発現の低下に関与している可能性が示唆された。一方、細胞表面分子を特異的に認識するリガンドをファイバーに発現させることで、トリプルミュータント Ad ベクターは高い遺伝子発現能を持つことから、ターゲティング Ad ベクターに必要な標的分子特異的な遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、これらトリプルミュータント Ad ベクターは肝障害性の低下、および炎症性サイトカイン産生など自然免疫誘導能の減弱が認められた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。これまでの報告では、肝臓のクッパー細胞による Ad ベクター取り込みが、Ad ベクターによる自然免疫誘導の引き金と考えられていたが、今回のトリプルミュータント Ad ベクターは肝臓のクッパー細胞を含む非実質細胞に多く取り込まれているにもかかわらず、炎症性サイトカインである IL-6 の産生は抑制された。Ad ベクターによる自然免疫系の惹起は、遺伝子治療用ベクターとしての重大な副作用につながることから、メカニズムの解析が急がれており、今回のトリプルミュータント Ad ベクターによる知見は、Ad ベクターによる自然免疫誘導のメカニズム解明に貢献できると考えられる。

本研究で開発したトリプルミュータント Ad ベクターは、ファイバー領域 (HI ループおよび C 末端領域) に 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで、自由に、簡便に外来ペプチドコード DNA を導入できるように設計されていることから、今後、ターゲティングリガンドの同定技術と併せた研究により、ターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターになるものと考えられる。さらに、Ad ベクターによる自然免疫誘導のメカニズム解明に有用なベクター

を開発できたことから、本研究は Ad ベクターによる自然免疫の誘導を回避するための技術の開発にも貢献できると期待される。

D. 1.7 ヘキソンや pIX を改変した Ad ベクターの開発

Ad ベクターの感染時における CAR 依存性を克服するために、これまでファイバーノブに αv インテグリンと親和性を持つ RGD ペプチドやヘパラン硫酸と親和性を持つポリリジン配列を遺伝子工学的に挿入した Ad ベクターが開発されてきた。ファイバーノブ以外の外来ペプチドの提示部位としては、pIX、ヘキソン、ペントンベースが候補として挙げられるが、外来ペプチドの提示部位としてどの部位が適しているかという検討は、ほとんどなされていない。そこで本研究では、*in vitro* ligation に基づいた簡便なプラスミド構築を利用することで、簡便に pIX、ヘキソン改変型 Ad ベクターを作製する方法を開発し、ファイバーノブの HI loop、C 末端、pIX、ヘキソンに FLAG tag、RGD 配列を有したベクターの作製し、各ベクターの外来ペプチド提示効率ならびに遺伝子導入活性を比較検討した。作製した各ベクターは、各領域において外来ペプチドが融合タンパク質として発現していることをウエスタンブロットにより、またウイルス表面に提示されていることを ELISA により確認した。ファイバーノブの HI loop、C 末端、pIX、ヘキソンに RGD ペプチドを挿入したベクターの遺伝子導入効率を従来型 Ad ベクターと比較検討したところ、CAR 陰性細胞においてファイバーノブの HI loop や C 末端に RGD ペプチドを提示した Ad-RGD(HI)-L2、Ad-RGD(C)-L2 はそれぞれ、従来型 Ad ベクターの約 230、10 倍遺伝子発現が上昇していたが、pIX やヘキソンを改変した Ad ベクター (Ad-RGD(pIX)-L2、Ad-RGD(pIX/75)-L2 および Ad-RGD(hexon)-L2) では遺伝子発現の上昇は認められなかった。また我々の報告とほぼ同時期に、Campos らのグループから同様の報告がなされた。つまりファイバーノブ、pIX、ヘキシソンの改変を比較した検討であるが、やはりファイバーノブが最も効率よく遺伝子発現の上昇に関与しており、pIX やヘキシソンの改変では遺伝子発現の上昇はほとんど得られなかった。彼らは、その考察として、pIX やヘキソンに提示した外来分子は細胞表面のレセプターには結合できるものの、細胞内に導入した後、核までの移行段階において挙動が変わってしまい遺伝子発現に至らないのではないかと考察している。

もう一つの原因としてファイバーノブはウイルスカプシド中、最も外側に位置するため、pIX やヘキソンに提示した RGD ペプチドが細胞表面の αv インテグリンと相互作用する際にはファイバータンパク質が立体的な障害となり遺伝子発現には至ら

なかったのではないかと考えられる。つまり、ファイバーを欠損した Ad ベクターの pIX やヘキソンを改変した Ad ベクターが作製できれば、効率よく細胞表面のレセプターに結合でき、高い遺伝子発現が得られるのではないかと考えられる。一方で、ファイバーノブの HI loop 領域は C 末端領域よりも外側に位置するため、細胞表面の αv インテグリンと相互作用するのに適しており、その結果ファイバーノブの HI loop 領域に RGD ペプチドを挿入した場合、最も高い遺伝子発現に至ったのではないかと考えられる。

また pIX のパッケージングに関して検討した結果、リンカーを介さずに直接 pIX の C 末端に外来ペプチドを提示した場合、少なくとも His tag、FLAG tag、RGD ペプチドの場合では pIX のパッケージングには影響しない一方で、 α -ヘリックスリンカーを介して外来ペプチドを提示する場合には、提示するペプチドの種類により、程度は異なるものの、顕著にパッケージング効率の低下が起こることが明らかとなった。また Vellinga らのグループでは、pIX の C 末端にリンカーを介して外来ペプチドを提示した Ad ベクターは、従来型 Ad ベクターや外来ペプチドを直接、pIX の C 末端に提示したベクターと比較して、熱処理に対して抵抗性が低くなっており、物理的な安定性が低下していることを報告している。つまり pIX の C 末端にリンカーを介して外来ペプチドを提示する際には注意が必要であるということが明らかとなった。

以上をまとめると、これまでのファイバー改変型 Ad ベクター作製システムに加え、pIX の C 末端やヘキシソンの HVR5 領域に *in vitro* ligation を利用することで簡便に任意の外来ペプチドを挿入できるシステムを開発した。また各部位に RGD ペプチドを挿入したベクターの遺伝子発現効率を評価したところ、ファイバーノブの HI loop 領域が最も RGD ペプチドの提示部位として適していることが明らかとなった。本研究で開発したベクター作製システムは、任意の改変 Ad ベクターを簡便に作製できることから、本システムおよび今回得られた結果が今後のベクター開発をはじめとする遺伝子治療研究に貢献できることを期待している。

D. 1. 8 ファージ表面提示法を用いたターゲティンググリガンドの同定

本研究で開発したトリプルミュータント Ad ベクターは、ファイバー領域 (HI ループおよび C 末端領域) に 1 ステップの *in vitro* ライゲーションで、自由に、簡便に外来ペプチドコード DNA を導入できるように設計されていることから、ファージ表面提示法によるターゲティンググリガンドの同定技術を併せ、ターゲティング Ad ベクターのための基盤技

術になるものと考えられる。

D. 1. 9 Ad-TAT ベクターの開発

これまでに主任研究者のグループでは、Ad ベクターの感染時の CAR 依存性を克服するためにファイバーノブに αv 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挿入したベクター (Ad-RGD、Ad-K7) を開発しその遺伝子発現特性を評価してきた。本研究ではこれら改良型 Ad ベクターを用いても、遺伝子導入困難な細胞種にも効率よく遺伝子導入が可能な Ad ベクター開発を目指し、細胞内移行活性を持つ TAT ペプチドに注目し、TAT ペプチドを capsid タンパク質に挿入した Ad ベクターを作製した。

TAT ペプチドをファイバーノブの HI loop および C 末端に挿入したベクターは (Ad-TAT(HI)-L2、Ad-TAT(C)-L2)、様々な CAR 陰性細胞において従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と比較して約 10-1000 倍高いルシフェラーゼ発現量を示した。つまり、この結果よりこれら Ad-TAT ベクターは、ファイバーノブに導入した TAT ペプチド依存的に細胞内に侵入し遺伝子発現に至っていると考えられる。TAT ペプチドの細胞内移行メカニズムは、細胞表面のヘパラン硫酸をレセプターとするという報告もなされているが、TAT ペプチドの詳細な細胞内移行メカニズムの統一した見解ははまだ得られていない。したがって、本研究で作製した Ad-TAT の細胞内移行メカニズムは不明であるが、非常に興味深い点であり、来年度以降各種阻害剤を用いた感染阻害実験を行うことで、Ad-TAT ベクターの感染メカニズムを明らかにしていく予定である。また pIX の C 末端領域に TAT ペプチドを挿入しても遺伝子発現量の上昇は認められなかったが、pIX の C 末端領域に RGD ペプチドを挿入した場合にも同じ現象が認められる。この原因は、Ad ベクターの capsid の中で最もファイバーが外側に位置することから、pIX に表現させた TAT ペプチドが細胞表面に作用する際、ファイバーが立体障害となっている可能性が考えられる。

以上本研究では、現存の Ad ベクターよりも優れた遺伝子導入が可能な Ad-TAT の開発に成功した。来年度以降、本ベクターの更なる有用性を評価するために Ad ベクターでは遺伝子導入が困難とされている *in vitro* における血液系の細胞や血管平滑筋細胞への遺伝子導入効率を評価するとともに、*in vivo* における遺伝子発現特性を評価していく予定である。

D. 1. 10 ファイバーレス Ad ベクター

標的組織にのみ遺伝子導入可能なベクターを開発するためには、naïve なウイルスの感染経路を抑

制すること、そのベクターに特異的受容体に対して親和性を持つ分子を付与することが必要である。本研究では、ファイバーを欠損することで、ファイバー依存的な非特異的な遺伝子導入を抑制すると同時に、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の立体障害を抑制できると考え、ターゲティングベクターの基盤として、ファイバーを除去したファイバー欠損Adベクター(Ad/ Δ fiber-L2)を作製した。pIX やヘキソンはファイバーに比べて、圧倒的にコピー数が多い (pIX は 240 コピー、ヘキソンは 720 コピー、ファイバーは 36 コピー)、さらに pIX に関してはタンパク質サイズの大きな外来分子も提示できることが報告されていることから、Adベクターの感染域を制御するにあたり、pIX やヘキソンに外来分子を提示するアプローチは非常に有効であると考えられる。

ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX、ヘキソンに外来ペプチドを挿入した Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2) を作製し、ウエスタンブロットにより目的のベクターができていることを確認した。しかしながら、これらベクターは遺伝子発現が全く認められなかった。この詳細な原因は不明であるが、ファイバーを欠損することで Ad の物理的な安定性が低下していることが原因の一つとして考えられる。物理的な安定性を評価するのに熱処理後の遺伝子発現能の残存活性を指標として検討した結果、Ad/ Δ fiber-L2 は Ad-L2 と比較して、物理的に不安定であることが明らかとなった。Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 はファイバー欠損に加え、ウイルスのアセンブリーや安定性に関与する pIX や主要なカプシドタンパク質であるヘキソンを改変していることから、未修飾のファイバー欠損 Ad ベクター (Ad/ Δ fiber-L2) よりもさらに安定性に乏しく、遺伝子発現活性を失っているのではないかと考えられる。また、塩化セシウムを用いた超遠心による精製を行っていないクルードな状態の Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 は遺伝子発現活性を保持していたことから (data not shown)、ファイバーの欠損と pIX やヘキシソンの改変を同時に行うことによって超遠心に耐えうる物理的な安定性を失っているのではないかと考えられる。また Ad/ Δ fiber-L2 は Ad-L2 と同等の収量が得られるが、Ad/ Δ fiber-His(pIX)-L2 、 Ad/ Δ fiber-His(hexon)-L2 は 100 倍以下しか得られなかったことから (data not shown)、ファイバー欠損 Ad ベクターの pIX やヘキシソンの改変はウイルス粒子の形成にも影響を与えている可能性も考

えられる。ファイバー欠損 Ad ベクターを基盤としたターゲティング Ad ベクターの開発には、ベクターの物理的不安定性を克服する必要がある。

最近、Shayakhmetov や Parker らから Ad ベクターの肝臓への遺伝子発現に、factor IX や X などの血液凝固因子が関与しているという報告がなされた。彼らは、血液凝固因子が Ad のファイバーノブに結合し、細胞表面のヘパラン硫酸との橋渡しをすると報告している。しかしながら、ファイバー欠損 Ad ベクターは FX 存在下において CAR の発現量に関わらず、遺伝子発現が 20-40 倍上昇した。この結果は、予想外であるが FX が Ad/ Δ fiber-L2 のヘキソンなどの他のカプシドタンパク質に結合しているか、あるいは FX 存在下においてベクターが物理化学的に安定し、遺伝子発現の上昇に至ったのではないかと考えられる。他にも Johansson らはラクトフェリンが Ad ベクターの上皮細胞への CAR 非依存的な遺伝子導入に関与していると報告している。上記のように、*in vivo* においては CAR を介した遺伝子導入経路のみなく、FX やラクトフェリンなどの血液中の因子が Ad ベクターの遺伝子導入に関与している。本研究で作製したファイバー欠損 Ad ベクターは肝臓での遺伝子発現を顕著に抑制しているが、若干の発現が認められることから、これら因子がファイバー欠損 Ad ベクターの肝臓における遺伝子発現に関与している可能性が示唆された。今後のターゲティング Ad ベクター開発において、CAR などのレセプターとの結合性を除去すると同時に血液中の因子との相互作用の少ないベクターを開発することが重要な課題となるであろう。

本研究では、ターゲティング Ad ベクターの開発を目指し、その基盤ベクターとしてファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vivo* において非特異的な遺伝子発現を抑制可能であることを明らかにした。pIX やヘキソンを改変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おり、ファイバー欠損 Ad ベクターを基盤としたターゲティング Ad ベクター開発には、ファイバーを欠損する際に起こる Ad の物理的な安定性の低下という問題点を克服しなければならないことが明らかとなった。本研究で得られた情報は、今後のターゲティング Ad ベクター開発のための有用な情報となるであろう。

D. 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

主任研究者のグループでは、目的遺伝子の発現レベルを自在に制御できる Ad ベクターとして以下に列挙するような様々なベクターを開発・改良し、その遺伝子導入特性を明らかにしてきた。

(1) Ad ゲノムの E1/E3 欠損領域、さらに E4 領域と 3' ITR の間の領域にも簡便な *in vitro* ライゲージ

ョンで外来遺伝子を導入できるダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベクターの開発に成功した。これにより各領域への簡便な目的遺伝子の導入が可能になり、単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載した Ad ベクターの作製が可能となった。

(2) 転写活性化タンパク質の tTA の発現単位を E3 欠損領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入することで、単一のベクターで tet-off 系の機能を有した Ad ベクターを作製し、優れた発現制御能を示すことを明らかにした。また、tet-on 系の転写活性化因子の rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に、目的遺伝子を E1 欠損領域に挿入した改良型 tet-on 系搭載 Ad ベクターを開発し、発現誘導能が極めて優れていることを明らかにした

(3) 第 2 世代の rtTA (M2 あるいは S2 mutant rtTA) 遺伝子は rtTA 遺伝子に数 bp の mutation を施すことで作製されたものであり、変異 rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたトリプル遺伝子発現系を搭載した Ad ベクターを用いることで、従来の rtTA 遺伝子と tTS 遺伝子を用いたベクターに比べ、ドキソサイクリンに対する感受性が 1-2 オーダー改善した。さらに、ドキソサイクリンに対する親和性が増大したことで、M2 あるいは S2 mutant rtTA と tTS をもった Ad ベクターでは、in vivo においても効率の良い遺伝子発現誘導能が認められた。従って、in vitro、in vivo の両条件下において優れた遺伝子発現制御能を示す tet-on 系の Ad ベクターに開発に成功した。

そこで本研究では、上記発現制御型 Ad ベクターにファイバー改変技術を加え、CAR 陰性の細胞へもファイバー領域に挿入した RGD ペプチドを利用して α インテグリン依存的に遺伝子導入導入できる Ad ベクターの開発を行った。これにより、より多くの細胞種に対して発現制御型 Ad ベクターの適用が可能になり、遺伝子治療の有効性・安全性の向上に寄与できると期待された。

D. 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

D. 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)

癌免疫療法は基礎研究と臨床研究の連携により着実な進歩を遂げているものの、臨床試験においては腫瘍退縮や完全治癒といった満足な有効性は得られていない。この一因として、従来の癌免疫療法研究が腫瘍免疫の存在実証とその効率的な誘導という観点を中心に推進されてきたために、効果的な治療を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞

の腫瘍組織への集積性改善という側面が、未だ十分に検討されていないことが挙げられる。つまり、癌細胞を殺傷する能力を有する免疫エフェクター細胞がたとえ患者体内に誘導されたとしても、それらが十分に腫瘍組織に移行・浸潤して癌細胞と接触できなければ、癌免疫療法の有効性は大きく制限されてしまうと考えられる。

生体内における白血球の局所への遊走・浸潤には、ケモカインと総称される 8~14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群が深く関与しており、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している。ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され、おもに炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990 年代後半より、リンパ球や DC などを主な標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとされ、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展した。

このような背景のもと、我々は、癌免疫療法へのケモカインの応用が、免疫細胞の腫瘍集積性を向上させる方法論の確立に非常に有用であろうという着想に至り、免疫細胞の体内動態制御に基づいた新規癌免疫遺伝子治療の開発を図った。

まず AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与プロトコールによる抗腫瘍効果と免疫細胞の腫瘍内浸潤との関連評価を行った結果、AdRGD-CCL17 を応用した癌免疫遺伝子治療においては、CCL17 によって腫瘍組織に免疫細胞を集積させるだけでは有効な治療効果を引き出すことは困難であり、宿主の免疫系を TAA 特異的に活性化することのできるワクチン手法の併用が要求されると考えられた。そこで、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 を免疫することにより、B16BL6 担癌マウスの免疫系を腫瘍特異的に活性化する手段を併用した際の、AdRGD-CCL17 投与が示す抗腫瘍活性を評価した。その結果、本併用プロトコールでは顕著な腫瘍増殖抑制効果が達成され、免疫組織学的解析からも CCL17 が腫瘍特異的に活性化された免疫細胞 (恐らく CTL と考えられる) を効率良く集積させるケモカインであることが判明した。

D. 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)

活性化した免疫細胞が腫瘍組織内へと浸潤し、直接腫瘍細胞を攻撃するという腫瘍の排除メカニズムを考慮すると、活性化と浸潤という両者を達成することが重要であることは明白である。また、これまで我々は、CCL27 遺伝子を導入した OV-HM 細胞をマウスへ移植したところ、その CCL27 産生 OV-HM 腫

瘍組織内へ T 細胞、NK 細胞が浸潤し、腫瘍増殖抑制効果があることを報告しているが、同時に生着した腫瘍に対して CCL27 遺伝子を導入しても治療効果が得られないことを確認している。

そこで T 細胞、NK 細胞を活性化するサイトカインである IL-12 に着目し CCL27 と併用することによる免疫細胞の活性化と浸潤の両者を目指した治療法の有用性について検討した。その結果、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与 (AdRGD-IL12:AdRGD-CCL27 = 9:1 もしくは 5:5) することにより、各単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られ、さらに 9:1 の割合で併用投与した群では全例で完全治癒するという非常に強い抗腫瘍効果が得られた。一方で、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の投与比率が 1:9 の群では全く効果が得られず、投与比率により得られる抗腫瘍効果が著しく異なっていたことから、投与比率も治療効果に対する大きな要因であることが示された。

今後の治療を考えた場合、最適な治療効果を得るためには、その投与量とともに投与比率についても十分考慮すべき点であると考えられる。また、治療に用いる分子の選択も重要である。我々は、種々のケモカインを発現する腫瘍細胞をマウスに皮内移植し、その腫瘍増殖抑制効果について検討したところ、腫瘍細胞の種類によって効果を示すケモカインが異なっていることを報告している。これは、腫瘍細胞の種類とケモカインの間に何らかの関係があることを示唆する興味深い結果であり、単にこれまでの治療法とケモカインとを併用すればよいというものではなく、癌種あるいは患者個人によって投与するケモカインを選択していかなくては、最適な治療効果が得られにくいものと考えられる。そのためにも、腫瘍細胞の特徴と効果を示すケモカインの因果関係を明らかにすることは非常に意義深い検討課題であり、その研究成果は今後の癌免疫療法に大きく貢献できるものと期待される。

続いて併用投与により腫瘍の完全拒絶が認められたマウスに対して、腫瘍細胞特異的な免疫反応が誘導されているのかを検討する目的で、腫瘍の再移植実験を行ったところ、完全治癒が得られたマウスでは、その投与比率によらず、OV-HM 細胞はほとんど生着しなかった。このことから、腫瘍細胞特異的な免疫反応が記憶されていたことが示され、これまでのいわゆる三大療法で問題となっていた再発に対しても、効果があるものと考えられる。また、癌免疫療法の特徴としては、再発だけではなく転移に対しても効果があるものと期待されている。今回用いた IL-12 は、最初に抗腫瘍効果を示した論文において既に転移に対しても効果があることが報告されており、その後種々の癌種において IL-12 の抗転移作用が確認され、実際の治療面においてもその効

果が期待されているサイトカインである。我々はこれまでに、転移癌に対する効果について検討する目的で、マウスの腹部に正中線を挟んで左右両側に腫瘍を移植し治療実験を行った。その結果、片側の腫瘍に AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、遠隔に存在するもう片側の腫瘍に対しても増殖抑制効果が認められた (data not shown)。これは予備的な検討であるものの、本治療法が転移癌に対しても有用であることを示唆するものであり、この転移癌に対する治療効果は、そのメカニズム解明とともに今後の検討課題である。

AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与による抗腫瘍効果増強について、どの免疫細胞が寄与しているのかを検討したところ、T 細胞依存的であり、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットが共に重要であることが示された。そこで、併用投与による治療効果増強のメカニズム解明を目的に腫瘍内へ浸潤した T 細胞数を測定した。その結果、併用投与群では AdRGD-IL12 単独投与群よりも腫瘍内浸潤 T 細胞の有意な増加が認められ、多くの T 細胞が腫瘍内に浸潤したことが抗腫瘍作用の増大につながったものと考えられた。しかし一方で、治療効果が認められなかった AdRGD-CCL27 単独投与群においても、腫瘍内へ多くの T 細胞が浸潤していたことから、続いて免疫細胞の活性化状態について検討を行った。

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ことから、まず活性化ヘルパー T 細胞が産生する IFN- γ の発現を確認した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群ではその発現が認められなかったことから、腫瘍内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞が活性化していなかったことが示唆された。また、AdRGD-IL12 単独投与群と併用投与群では同程度の IFN- γ の発現が観察されたことから、両群ともヘルパー T 細胞が活性化していたことが考えられた。続いて、腫瘍内に活性化した免疫細胞が浸潤していたのかについて検討を行うため、腫瘍内での perforin 陽性細胞数を測定した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では IFN- γ の結果と同様に、腫瘍内に perforin 陽性細胞はほとんど観察されなかった。また、併用投与群では AdRGD-IL12 単独投与群よりも有意な perforin 陽性細胞数の増加が認められたことから、活性化した細胞数も両群間の治療効果の差につながったものと考えられた。これらの結果より、浸潤と活性化の両立が、癌免疫療法に重要であることが示された。

一方で活性化した細胞が浸潤したのかそれとも浸潤した細胞が活性化したのか、その順序は不明である。今回は AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を同日に腫瘍内投与したが、活性化の後に浸潤するのであれば先に AdRGD-IL12 を投与し、浸潤した後に活性化するのであれば逆に AdRGD-CCL27 を先に投与すると

のように、併用投与する日程を変更させることにより、治療プロトコルの最適化が図られるものと考えられる。

また、ケモカインを利用した治療法において問題点となってくるのが、制御性 T 細胞の存在である。制御性 T 細胞の抑制機構は、glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene (GITR) からのシグナルによる抑制作用の惹起などが考えられているが、未だ不明な点が多い。いずれにしても、制御性 T 細胞を腫瘍内へ浸潤させることで、エフェクター作用を負に抑制し治療効果が減弱する可能性がある。制御性 T 細胞は CD4 陽性、CD25 陽性細胞であることから、本検討において AdRGD-CCL27 単独投与群で腫瘍内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞の多くが制御性 T 細胞であり、そのため治療効果が観察されなかったことが考えられた。しかし、*ex vivo* における検討では、CCL27 遺伝子を導入した腫瘍では T 細胞が浸潤しており、さらに腫瘍増殖抑制効果が認められた。*in vivo* による本検討においても *ex vivo* での検討と、その浸潤細胞のレパトリーには大差がないと予想されることから、本検討における AdRGD-CCL27 単独投与群では制御性 T 細胞の影響は少なかったものと考えられる。ただし、ケモカインによっては制御性 T 細胞をも腫瘍内に浸潤させてしまう可能性がある。今後ケモカインを利用した治療法を実践していくためには、制御性 T 細胞に作用せず、目的とするエフェクター細胞にのみ特異的に作用するようなケモカインを探索していく必要がある。

D. 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)

Meth-A 腫瘍は、これまでにリコンビナント IL-12 の腹腔内投与によっては抗腫瘍効果が認められなかったのに対して、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって持続的かつ局所的に高濃度の IL-12 を作用させたところ、腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、完全治癒が得られるマウスは 13 例中 8 例であり、これらマウスには長期的な細胞特異的免疫が誘導されていた。さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与は、AdRGD-IL12 単独投与を上回る劇的な治療効果を発揮した。生存率の明らかな延長も認められ、最終的に 13 例中 12 例ものマウスに完全治癒が認められた。これらマウスには、AdRGD-IL12 単独投与群と同様に腫瘍特異的なメモリーも成立していることが確認された。また、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットを解析したところ、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与において、癌細胞排除の主要なエフェクター細胞は CD8⁺ CTL であり、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、

各単独投与群を上回る腫瘍内浸潤 T 細胞が確認された。また、IL-12 による局所免疫応答が、脾臓・リンパ節などの二次リンパ組織における細胞特異的全身性免疫系をも活性化可能であること、ならびに IFN- γ 産生誘導に伴う ICAM-1 や VCAM-1 といった接着分子の発現向上が達成されることが明らかとなった。AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与では、このような腫瘍内環境変化とリンパ球の腫瘍内浸潤促進作用を併せ持つため、その相乗効果により、各単独投与よりも多くの腫瘍内 T 細胞が観察されたものと考えられる。このように、リンパ球浸潤阻害環境を克服し、腫瘍内浸潤リンパ球の質的 (細胞傷害活性の付与)、量的制御 (腫瘍内浸潤促進) を可能とすることで、抗腫瘍増強作用が得られたことが明らかとなった。

これらの研究成果は、エフェクター細胞の活性化と腫瘍内浸潤の両者を同時に達成するアプローチが、癌免疫遺伝子治療の有効性向上に大きく貢献できることを示すものである。このような、目的部位への細胞送達とも言える新たな概念を取り入れた治療戦略の提示は、今後の癌免疫療法の臨床応用を目指した技術開発に貴重な知見を提供するものと期待している。

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

DC は生体内に広く分布し、抗原を取り込んだ後に細胞表面に抗原を提示しながら、所属リンパ節へ遊走する。その過程において成熟し、ナイーブ T 細胞あるいはメモリー T 細胞を活性化し、抗原特異的免疫応答を惹起することが知られている。このような DC の特性に着目し、近年、DC に TAA を提示させれば強力な抗腫瘍免疫反応を誘導できるのではないかと考えられるようになり、*in vitro* で TAA を導入した DC をワクチン担体として生体に投与、TAA 特異的な免疫応答を誘導しようとする DC 癌免疫療法が注目を集めている。

DC 癌免疫療法は、マウスモデルでの基礎的検討において有効性を示し、その一部はヒトでの臨床試験が行われている。しかしながら、臨床試験において十分な治療効果が得られたとする報告はほとんど認められず、未だ DC 癌免疫療法の有効性は科学的に証明されるまでには至っていない。このような背景のもと、DC 癌免疫療法の有効性向上を目指すアプローチが多くの研究機関で試みられている。しかし、そのほとんどは、DC の培養誘導法、抗原導入法、DC の成熟活性化法などに主眼が置かれたものである。

DC 癌免疫療法における DC ワクチンは、生きた細胞を用いる細胞医薬である。現在、“薬”として広く使用されている低分子有機化合物をはじめ、近年その医薬品化が注目されている遺伝子やタンパク

質といった生体高分子において、その生体内安定性を高めるアプローチは必要不可欠となっている。これは細胞医薬にも適応すべき概念であり、現行の DC ワクチン療法は、細胞を不安定なまま大量投与しているといえよう。

生体内に投与された DC は投与部位から近傍のリンパ節へと移行して、リンパ節内のナイーブ T 細胞やメモリー T 細胞を感作・活性化し、癌排除に最も重要な役割を担う CTL を誘導する。しかしながら、投与された DC の大部分は、リンパ節に移行する過程でアポトーシスに至るため、CTL 誘導の場であるリンパ節に到達し得る DC は投与したうちのわずか 1% 以下であると言われている。また、リンパ節に到達し、抗原提示を終えた DC はすみやかに排除されるため、DC がプロフェッショナル抗原提示細胞として機能維持可能な期間は約 2~4 日程度であると言われている。したがって、DC の短命性が原因となり、ワクチン効果を制限していることが示唆されている。すなわち、DC の生体内寿命を延長させることができれば、リンパ節への到達性の向上とリンパ節内での抗原提示期間の延長から、ワクチン効果の増強が期待される。

そこで、本研究では、DC の生体内安定性を高めるアプローチとして、DC の生体内寿命の延長を目指して、より効果的な免疫応答を誘導可能な DC 癌免疫療法の開発を試みた。

DC の生存と死を規定する詳細な分子メカニズムは、現在のところ解明されていない。一般に、アポトーシス経路としては、ミトコンドリアを介した経路とカスパーゼを直接活性化する経路が存在する。近年、DC のアポトーシスメカニズムの一部が明らかとなりつつあり、Bcl-2 family タンパク質が DC の生存に大きく関与することが示唆されている。

そこで、我々は、Bcl-2 family タンパク質、なかでも Bcl-x_L に着目し、さらに、その抗アポトーシス活性増強型変異体として見出された FNK を DC に高発現させることによって、アポトーシスに対する抵抗性を付与したワクチン担体の創製を試み、その免疫学的な機能評価を行った。その結果、FNK および Bcl-x_L 発現 AdRGD を作用させた DC は、アポトーシス抵抗性を獲得し、生存期間の延長が認められるとともに、抗原提示期間も延長する傾向が認められた。すなわち、これら遺伝子の導入によっても、抗原提示能は保持され、さらに長期間にわたる効率的な T 細胞の活性化が期待された。そこで、FNK/DC および Bcl-x_L/DC の抗腫瘍ワクチン機能の解析を試みた。

まず、モデル抗原 OVA の系で、FNK/DC および Bcl-x_L/DC 免疫による抗腫瘍効果を検討した結果、OVA/DC 免疫群と比較して一層強力な抗腫瘍効果が得られた。また、メラノーマ関連抗原 gp100 を用い

て B16BL6 メラノーマに対する抗腫瘍効果を検討した場合にも、腫瘍増殖抑制効果は gp100/DC 免疫群よりも FNK+gp100/DC 免疫群および Bcl-x_L+gp100/DC 免疫群で強力であったことから、アポトーシス抵抗性を付与した DC をワクチン担体として用いる本アプローチの有用性が示された。

さらに、FNK/DC ワクチンおよび Bcl-x_L/DC ワクチンは、投与部位から所属リンパ節への到達性とそこでの生存性に優れており、リンパ節内で効率よくリンパ球を活性化することによって抗原特異的 CTL の効率的な誘導を達成することが示唆された。したがって、DC へのアポトーシス抵抗性の付与は、*in vivo* において所属リンパ節へ移行する DC 数の長期的な増加を可能とし、リンパ節における抗原特異的な T 細胞サブセットの効率的な活性化によって、最終的に強力な抗腫瘍効果に結びついたものと考えられた。

以上、DC のアポトーシスを抑制して生体内安定性を高める本アプローチが、DC 癌免疫療法の有効性向上に繋がることを明らかとした。細胞の生体内安定性を高めるアプローチは、DC のみならず、CTL 療法や腫瘍浸潤リンパ球などを利用したその他の免疫細胞療法にも応用可能な概念であり、細胞医薬の実用化と有効性の増大に大きく貢献することを期待する。

D. 1. 14 癌転移におよぼす CAR の影響

現在、がんは日本の死亡原因の 1 位であり、その主要因はがん転移である。従って、がん転移メカニズムや関連分子を解明し、その特性について検討することは、より良いがん治療法の発展に貢献すると考えられる。

がんの悪性度進行に伴い発現が低下する分子として、E-cadherin などの細胞間接着分子が知られているが、CAR もそのような分子に含まれる。本研究ではがん悪性化の特性としてがん転移に着目し、CAR のがん転移における役割について検討した。その結果、CAR はがん転移抑制分子であることが明らかとなり、転移の初期段階で CAR は抗転移効果を発揮することが判明した。これらの結果は、がん治療、研究において有益な情報となりえる。

D. 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

D. 2. 1 PEG-Ad ベクターの体内動態解析

Ad ベクターは、広範な種類の細胞に増殖期・静止期を問わず効率のよい遺伝子導入・遺伝子発現を達成できることから、遺伝子治療研究用ベクターとして最も広く用いられている。なかでも癌遺伝子治療研究に繁用されており、癌抑制遺伝子 p53、自殺遺

伝子 HSVtk を発現する Ad ベクターの臨床研究が試みられ、良好な治療成績が得られている。しかし、これらのプロトコルは Ad ベクターの腫瘍組織への局所投与に限られており、癌患者の主要な死亡原因である転移癌に対しては未だ有効な遺伝子治療戦略が無いのが現状である。その原因は、Ad ベクターを全身投与した場合、①投与量の 95%以上が急速に肝臓へと集積し、遺伝子発現することで、重篤な副作用を招いてしまうこと、②Ad 感染レセプターである CAR は生体内において多くの細胞・組織に発現していることから、Ad ベクターの標的組織へのターゲティングが困難であること、③多くの人々が Ad に対する中和抗体を持っており、その抗体存在下においては Ad ベクターの遺伝子発現効率が低下してしまうと同時に抗原抗体反応によるアナフィラキシーショックを引き起こす危険性も危惧されること、などが挙げられる。したがって、癌の治療率向上を目指した今後の癌遺伝子治療研究における重要な課題は、原発巣のみならず転移巣をも治療可能とする全身投与可能な新規腫瘍標的化ベクターの開発に他ならない。

水溶性高分子である PEG などで蛋白質・粒子を化学修飾するバイオコンジュゲーションは、蛋白質・粒子の体内動態を制御し、その医薬価値を飛躍的に向上可能な最適な DDS 戦略であると認識されている。一般的にバイオコンジュゲーションした蛋白質や粒子は、抗体や貪食細胞による認識からの回避能を獲得し、血中安定性が大幅に改善されることが知られている。また、癌治療を念頭においた場合、腫瘍組織の血管構造は不完全であるため正常血管と比較して透過性が亢進しており、血中滞留性の向上した蛋白質・粒子が腫瘍組織に集積しやすい EPR 効果が発揮される。つまり、血中滞留性に優れたバイオコンジュゲート体は、全身投与によって受動的に高い腫瘍集積性を示すこととなる。

これまでに我々は、Ad 中和抗体存在下においても遺伝子導入が可能で、かつ血中滞留性の向上によって腫瘍組織に集積しやすいという観点から、全身投与型腫瘍標的化ベクターの有望な候補として PEG-Ad ベクターの開発を進めてきた。その結果、分子量 5,000 の PEG を用いた修飾率 90% の Ad ベクターが、全身投与における血中滞留性の向上と腫瘍での遺伝子発現増強を達成できることを明らかとした。さらに昨年度の研究において、分子量 20,000 の PEG を用いた修飾率 45% の Ad ベクターが、全身投与において腫瘍での高い遺伝子発現と肝臓での遺伝子発現抑制をともに充たすベクターシステムであることを明らかとした。そこで本年度は、5K/PEG-Ad ベクターと 20K/PEG-Ad ベクターの体内動態を詳細に比較検討することで、腫瘍標的化ベクター開発に最適なバイオコンジュゲート化 Ad ベクターの設計・

創製に関する基礎情報の集積を図った。

未修飾 Ad ベクター、5K/PEG-Ad ベクター、あるいは 20K/PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与した際の、血中滞留性ならびに腫瘍・肝臓へのベクター粒子分布を検討した結果、20K/PEG-Ad ベクターは、未修飾 Ad ベクターおよび 5K/PEG-Ad ベクターと比較して顕著な血中滞留性の向上と、腫瘍へのベクター粒子分布の増大ならびに肝臓への粒子分布の低減が認められた。Ad ベクターの血中からの消失に最も関与しているのは、肝臓の細網内皮系（Kupffer 細胞）による取り込みとされていることから、20K/PEG-Ad ベクターはこの機構から効率よく逃れることで血中滞留性が劇的に改善され、結果的に EPR 効果による腫瘍組織への高い集積性を発揮したものと考えられる。現在、本ベクターを全身投与する癌遺伝子治療モデル実験を進めており、有効性と安全性の評価から得られる情報を PEG-Ad ベクターの設計へとフィードバックすることで、より高度な腫瘍標的化ベクターの創製へと繋がるものと期待している。

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

腫瘍特異的プロモーターとして知られる TERT プロモーターは、テロメラーゼの活性を担う蛋白質サブユニットである TERT の発現を制御しており、c-MYC により転写が活性化されることが知られている。一方、c-MYC は種々増殖因子により発現が制御されていることから、永久増殖能を獲得した腫瘍細胞では大半において高発現であることが知られている。一方、成人の多くの正常細胞ではほとんど細胞分裂が起きていないことから、TERT プロモーター制御下に目的遺伝子を発現させるベクターシステムを用いることにより、幅広い癌種に対して適用可能な腫瘍特異的遺伝子発現を達成し得ると考えられる。そこで我々は、原発癌のみならず全身に点在する転移癌をもターゲットとした全身投与型 Ad ベクターの開発を目指し、TERT プロモーターを用いた遺伝子発現制御によるアプローチの有用性評価に取り組んだ。

Ad-CMV/Luc および Ad-TERT/Luc の遺伝子発現特性の比較から、TERT プロモーターが腫瘍細胞選択的な遺伝子発現活性を示すことが確認され、Ad-TERT ベクターが正常組織（特に肝臓）での遺伝子発現に起因する副作用の抑制に有効な全身投与型ベクターになりうると予想された。そこで、Ad-TERT/HSVtk の全身投与による癌自殺遺伝子治療の原発癌ならびに転移癌に対する有効性を検討した。その結果、Ad-CMV/HSVtk は全身投与において治療域が全く存在しなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk 処置群では原発癌モデルならびに転移癌モデルの両系で抗

腫瘍効果が認められた。特に、Ad-TERT/HSVtk を用いた本治療システムが転移癌にも有効であったことは、これまでの癌遺伝子治療プロトコルの限界を打破する非常に意義深い知見であり、我々の全身投与型腫瘍標的化ベクターというコンセプトが癌遺伝子治療の新たな可能性を切り拓くベクター開発戦略であることを示唆している。一方、今回治療効果が発揮された 2×10^{11} VP/mouse での Ad-TERT/HSVtk 全身投与においては、突然死こそ観察されなかったものの、コントロール群と比較してマウスに若干の体重減少が認められるとともに、ベクター投与後 7 日目において血中 GOT・GPT 量の増大という副作用が発現した。この副作用発現の詳細なメカニズムについては今後の検討を要するが、前述した 2×10^{11} VP/mouse で Ad-TERT/Luc を全身投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布の解析結果を考え合わせると、肝臓における治療遺伝子 (HSVtk) の発現誘導よりも、むしろ肝臓に集積したベクター粒子量の増大に起因しているのではないかと考えている。

D. 2.3 PEG 修飾 Ad-TERT ベクターの作製とその *in vivo* 遺伝子導入特性の解析

Ad-TERT ベクターを用いた自殺遺伝子治療の有効性を維持しつつ副作用発現の抑制を目指すには、Ad-TERT ベクターに PEG 修飾を施すことによって、全身投与後の肝集積性を低下させるアプローチが効果的であろうと考えた。そこで、Ad-TERT ベクターに対して分子量 5,000 の PEG 修飾を適用することにより、Ad ベクターの遺伝子発現制御と体内動態制御の融合を図り、上記問題点を克服した新規ベクターシステムの開発を試みた。様々な修飾率の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を用いて、全身投与後の腫瘍ならびに肝臓における遺伝子発現活性を比較した結果、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc が腫瘍での高い遺伝子発現レベルを維持したまま、肝臓での遺伝子発現を著しく低減させることを見出した。また、併せて行ったベクター粒子分布解析において、5K/PEG-Ad-TERT/Luc と 5K/PEG-Ad-CMV/Luc の肝集積量に大きな差は認められなかった。したがって、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT ベクターの全身投与における肝臓での遺伝子発現抑制効果は、PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御が相乗的に機能した結果であろうと推察された。現在、治療遺伝子として HSVtk 遺伝子あるいは TNF α 遺伝子を搭載した 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、癌遺伝子治療モデルにおける本アプローチの有効性ならびに安全性を評価している。

本検討では腫瘍選択的プロモーターのモデルとして広範な癌種に適用可能な TERT プロモーターを選択したが、メラノーマ特異的なチロシナーゼプロ

モーターをはじめとして、より腫瘍特異性に優れたプロモーターは多数知られている。したがって、標的腫瘍で特異的に作動するプロモーターが明らかである場合は、さらに腫瘍特異性を向上可能であり、より安全で効率的な癌遺伝子治療が達成できるものと考えられる。また、我々は現在、任意のターゲットリガンドを PEG 鎖先端に付与可能とするシステム構築を図っており、これにより腫瘍組織への移行性を一層向上させ、より有効性・安全性に優れた全身投与型腫瘍標的化ベクターが構築できるものと期待される。

D. 2.4 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

細胞膜移行活性を有する Protein Transduction Domain (PTD) は、蛋白質との複合体・融合体として用いることで効率よく蛋白質を細胞内に導入できることから、近年 DDS 研究領域での注目が高まっている。そこで我々は、Ad ベクターの感染域を拡大する新たな試みとして、既存の PTD の中で最も細胞内移行活性に優れているとされている Tat ペプチドを Ad ベクター表面に結合させた Tat-Ad ベクターを開発し、既存の Ad ベクターと比較して優れた遺伝子導入効率を発揮できることを明らかにしてきた。そこで本年度は、Tat-Ad ベクターのさらなる有用性評価ならびに基礎情報の集積を図るために、種々条件下における遺伝子導入・発現特性の検討を試みた。

Tat-Ad ベクターの遺伝子発現活性に最適な作製条件 (Tat ペプチド結合量) を検討した結果、修飾条件 1:12.5~25 (=リジン残基:Tat ペプチド) で調製した Tat-Ad ベクターが優れた遺伝子導入効率を示すことが判明した。また、未修飾 Ad ベクターと Tat ペプチドを単に混合しただけでは、未修飾 Ad ベクター単独の場合とほぼ同等の遺伝子導入活性しか示さなかったことから、Tat ペプチドをベクター表面に結合させることが遺伝子導入活性の増強に不可欠であることが明らかとなった。今後、Tat-Ad ベクターの細胞内への移行メカニズムに関しては、各種阻害剤を共存させた遺伝子導入実験によって検討していく予定である。

さらに、Tat-Ad ベクターの様々な細胞に対する遺伝子導入活性を評価した結果、接着性かつ CAR 高発現の細胞種では従来の Ad ベクターと同等であり、接着性で CAR 低発現の細胞に対しては従来の Ad ベクターより数百倍高い遺伝子導入活性を達成した。一方、血球系の浮遊細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子導入活性は、従来の Ad ベクターと比較して最大でも 10 倍程度の増強を認めたのみであり、接着細胞に対して示した優位性と比較すると期待を裏切る結果であった。我々はこの結果について、血球系細胞自身の遺伝子発現活性や接着細胞との