

細胞内構造の違いに原因があると考えており、今後 Tat-Ad ベクターの細胞内動態を検討することで明らかにしていく予定である。

Tat-Ad ベクターの遺伝子導入機序や特性についてはさらなる検討を必要とするものの、従来の Ad ベクターでは遺伝子導入が困難とされてきた細胞にも遺伝子導入できる幅広い標的細胞域は、Tat-Ad ベクターが今後の生命科学基礎研究ならびに遺伝子治療研究の発展に貢献するベクターシステムとなりうることを十分に期待させる。

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

#### D. 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

本研究では、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、脂肪細胞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。

続いて我々は、3T3-L1 細胞に対する遺伝子導入に最適化されたポリリジンタイプファイバー改変 Ad ベクターを用いることにより PPAR $\gamma$  に対する RNAi が、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を効果的に抑制することを実証した。

PPAR $\gamma$  は脂肪生成のマスターレギュレーターであり、インスリン感受性や血糖調節に重要な役割を果たしている。PPAR $\gamma$  発現抑制による 3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化阻害は、ファイバー改変 Ad ベクターによる RNAi が肥満や糖尿病の基礎研究に広く使用できることを示唆している。

PPAR $\gamma$  のホモ欠損マウスは胎盤の機能障害により胎生致死である。PPAR $\gamma$  のヘテロ欠損マウス (PPAR $\gamma^{+/-}$ ) やコンディショナルノックアウトマウスは生体内での PPAR $\gamma$  の機能解析研究に用いられている。しかしながら、これらマウスの作製は困難であり、ヘテロ欠損マウス (PPAR $\gamma^{+/-}$ ) においては、PPAR $\gamma^{+/-}$  の発現レベルを調節することはできない。生体内においても Ad ベクターは効果的な遺伝子導入を示すことから、PPAR $\gamma$  に対する shRNA 発現単位を搭載した Ad ベクターを直接生体内に投与することによってコンディショナル PPAR $\gamma$  欠損マウスを作製できる可能性を本研究結果は示している (PPAR $\gamma$  発現の抑制レベルはベクターの投与量によって調節できる)。

本研究では PPAR $\gamma$  に対する shRNA 発現ポリリジ

ン型ファイバー改変 Ad ベクターが、3T3-L1 細胞の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を顕著に抑制することを実証した。PPAR $\gamma$  に対する shRNA 発現ファイバー改変 Ad ベクターは肥満や糖尿病での脂肪生成における PPAR $\gamma$  の生物学的・生理学的機能の研究ばかりでなく、肥満、糖尿病および他の病気への治療応用にも有用であることが示唆された。

#### D. 3.2 発現誘導型 shRNA 発現 Ad ベクターシステムの開発

従来の遺伝子治療や遺伝子導入による実験系は、多くの場合、目的 (治療用) 遺伝子の過剰発現を基盤としたものである。一方近年、21-29 塩基長の短鎖の二本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) によって配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が注目されているが、本研究により Ad ベクターを用いて shRNA を発現させることによって遺伝子発現の効率的な抑制が可能であることが明らかとなった。今後はこのような遺伝子発現抑制を目的とした遺伝子治療や遺伝子機能解析研究においても、主任研究者が開発した様々なタイプの次世代 Ad ベクターが重要な基盤技術になると期待される。

本研究では、ドキシサイクリンにより shRNA の発現レベルを調節できる Ad ベクターの開発を試みた。そのため、tet0 配列を有した変異 H1 プロモーターの作製を行ったが、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、通常 H1 プロモーターによる shRNA 発現カセットと同様に標的遺伝子発現を効果的に抑制することが明らかとなった。また、p53 に対しては 1000 VP/cell のベクター濃度により発現の十分なノックダウンが観察されたが、c-MYC に対しては 3000 VP/cell のベクター濃度が必要であった (Fig. 141)。この遺伝子発現の抑制程度の違いは、それぞれの標的配列に対する shRNA 配列の効果 (効率) の違いを反映していると考えられる。

遺伝子発現抑制の効果的な調節は、Ad-H1tet0-p53 または Ad-H1tet0-Myc と Ad-TR のモル比 1:6 で達成され、完全な遺伝子発現抑制の解除にはさらに多量の Ad-TR が必要である可能性が考えられた。Ad-TR は CMV プロモーターによって tetR を発現させているが、CMV プロモーターへのイントロン A の付与や CA プロモーターの様な強力なプロモーターを使用することによってより多くの tetR を発現させることができれば、tetR 発現 Ad ベクター量を減少しても効果的に遺伝子発現抑制の調節が可能になると考えられる。

#### D. 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非常に望まれている。これまで我々を含めた複数のグループから、ドキシサイクリンにより発現誘導可能な変異型 H1 または U6 プロモーターを利用した RNAi ベクターが開発されてきた。また近年、Cre-loxP の組換えシステムを利用して、Cre により発現誘導可能な RNAi ベクターがいくつか報告された。しかしながら、これらは全てドキシサイクリンまたは 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ため、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、本研究では 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。

プロモーターの両側に loxP 配列を挿入したルシフェラーゼに対する RNAi ベクター pHM5-hU6-Lu は、pGL3-Control により増加したルシフェラーゼ発現を顕著に抑制した (Fig. 146)。この 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 (Fig. 147)。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 A549 細胞を用いて検討したところ、プロモーターの切り出しが PCR 産物の約 800bp から約 470bp への低分子化により観察された (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を A549 細胞を用いて検討したところ、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)。ここで、ルシフェラーゼ発現が AdCre 処理によっても完全に回復しないのは、AdCre を作用させるまでに既に発現したルシフェラーゼタンパク質の半減期や細胞数増加に伴う shRNA の希釈等の影響が関与しているものと推測される。本研究は、RNAi による標的遺伝子発現抑制を解除するベクター系の最初の成果報告であり、本システムはカプシド改変 Ad ベクターへ容易に搭載できることから、基礎・応用研究への広範な利用が期待される。

### D. 3. 4 簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法の開発

本研究で開発した簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法を用いれば (例えばキット化された場合を想

定すれば)、ユーザーは標的遺伝子に対する shRNA コード合成オリゴ DNA (通常外注する) をベクタープラスミドにライゲーションし、293 細胞にトランスフェクションするだけで siRNA 発現 Ad ベクターの作製が可能となり、極めて簡便性が高い。また、siRNA 発現 Ad ベクターライブラリーの作製も容易になるため、創薬ターゲット遺伝子検索のための基盤技術の開発に応用可能であり、極めて汎用性が高いと考えられる。

## D. 4 35 型 Ad ベクターの特性評価

### D. 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

外来遺伝子の発現をドライブするプロモーターは遺伝子発現効率を決める大きな要因のひとつであるが、これまで造血幹細胞におけるプロモーター活性に関する系統的な研究はほとんど行われてこなかった。本研究では、遺伝子発現実験で用いられている代表的な 6 種類のプロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターの遺伝子発現効率を比較検討し、その結果 EF1 $\alpha$  プロモーター、CMV $i$  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すことを明らかにした。中でも CA プロモーターは最も高い遺伝子発現効率を示し、より未分化な細胞画分においても強い転写活性を示した。この結果は、ヒト造血幹細胞への遺伝子導入による再生医療や遺伝子治療、もしくは遺伝子機能解析において極めて重要な知見になるものと思われる。

CA プロモーターは、現在最も強力な転写活性を有するプロモーターのひとつであり、肝細胞やリンパ球をはじめとする遺伝子治療の重要な標的においてその高い活性が実証されている。さらに CA プロモーターはマウス胎児や ES 細胞において高い遺伝子発現効率を示すことが報告されていることから、造血幹細胞をはじめとする未分化細胞での遺伝子発現に適しているものと思われる。

一方、CMV プロモーターは遺伝子発現実験で最も汎用されるプロモーターのひとつであるが、CD34 陽性細胞および未分化画分における遺伝子発現効率は低いものであった。近年、ES 細胞をはじめとする未分化細胞においては CMV プロモーターの転写活性が低いことが報告されており、CMV プロモーターは造血幹細胞などの未分化細胞での遺伝子発現には適さないことが示唆された。しかし今回、CMV プロモーターにイントロン A を付与することにより、約 2 倍高い遺伝子発現効率を得られた (CMV $i$  プロモーター)。さらに、CA プロモーターにおいても  $\beta$ -actin のイントロンが含まれることを考慮にいと、イントロンはヒト造血幹細胞での遺伝子発現において重要な要素であることが推察された。

近年、CD46 が 35 型 Ad を含む Subgroup B に属する Ad の受容体であることが報告された。CD46 はヒトでは赤血球を除く全ての細胞で発現しており、そのため 35 型 Ad ベクターは 5 型ベクターと比較し、より多くの細胞に感染できることを我々は確認している。これまで CD46 の発現レベルと 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率は相関することが報告されており、ヒト CD34 陽性細胞が CD46 を高発現していること、さらにほぼ同程度のベクターゲノム量が GFP 陽性画分および GFP 陰性画分両方で検出されていることから、恐らく 35 型 Ad ベクターは CD46 を介してほぼ全ての CD34 陽性細胞に感染しているものと思われる。それにもかかわらず、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入効率が 100%に達しないのは、CD34 陽性細胞は非常に不均一な細胞集団であり、一部の細胞ではプロモーターの活性が不十分であるために遺伝子発現にいたらないものと考察される。今後さらに CD34 陽性細胞に適したプロモーターが同定できれば、さらに高い遺伝子発現効率が得られるものと思われる。

今回、35 型 Ad ベクターの作製方法として *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。これまで、35 型 Ad ベクターの作製方法は相同組換えを利用する方法など煩雑なものばかりであったが、今回 *in vitro* ライゲーション法を適用することにより、極めて簡便に 35 型ベクターを得ることが可能となった。さらに E1 および E3 欠損領域を増大させることにより、より大きな外来遺伝子を搭載することが可能となった。35 型 Ad ベクターにおいても 5 型 Ad ベクターと同様、野生型ゲノムサイズの 105%がウイルス粒子に封入可能であれば、今回作製した pAdMS4 由来の 35 型 Ad ベクターでは約 6.6Kb の外来遺伝子が搭載可能となる。

以上、本研究ではヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞および未分化細胞画分への効率の良い遺伝子導入に向けた 35 型 Ad ベクターの最適化を行い、最も遺伝子発現効率の高いプロモーターを明らかにした。

#### D. 4.2 35 型 Ad ベクターによるヒト CD46 トランスジェニックマウスへの遺伝子導入

ウイルスの受容体は、ウイルスの感染域を支配する最重要因子であるといえる。よって 35 型 Ad の受容体を同定することは、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を解析する上で極めて重要な課題であったが、最近 CD46 が受容体であることが報告された。CD46 は分子量約 60KDa の 1 回膜貫通型タンパク質であり、補体成分を分解することにより自己の細胞を守る役割を担っている。そのため、ヒトでは赤血球を除くほぼ全ての細胞が CD46 を発現しているが、一方でげっ歯類では精巣でしか発現していない。これまで我々は、35 型 Ad ベクターがヒト由来の細胞

に対しては 5 型 Ad ベクターよりも広い感染域を示す一方で、マウスへの全身投与による遺伝子発現効率は 5 型 Ad ベクターと比較し極めて低いことを報告してきたが、これは上記のような CD46 の発現の特徴を反映しているものと思われる。今後 35 型 Ad ベクターの臨床応用に向けて、35 型 Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入特性を明らかにすることは必要不可欠と思われるが、CD46 がマウスで発現していないためマウスをモデル動物として使用することは不可能である。そこで本研究では、CD46 安定発現細胞および CD46TG マウスを用いて 35 型 Ad ベクターの *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入特性について検討した。

35 型 Ad ベクターは CD46 安定発現 CHO 細胞ならびに CD46TG マウスより単離した初代培養細胞に対し、それぞれ CHO 細胞および野生型マウスより単離した初代培養細胞と比較して有意に高い遺伝子導入効率を示した。さらに、CD46TG マウスでの 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率は、野生型マウスと比較すると有意に高いものであったことから、35 型 Ad ベクターは *in vivo* においても CD46 を認識して感染することが示唆された。しかし遺伝子発現効率の上昇は認められたものの、我々が期待していたほどの改善は見られなかった。なぜ CD46TG マウスに対しても 35 型 Ad ベクターは高い遺伝子発現効率を示さないのかについては、今後明らかにすべき課題である。一つの可能性としては、35 型 Ad ベクターが *in vivo* において CD46 に到達できないということが考えられる。CD46 は本来上皮細胞などでは basolateral 側に主に発現していることが知られており、CD46 を受容体とするはしかウイルスに関しても basolateral 側より感染することが報告されている。従って、細胞外マトリックスや基底膜などが立体障害となって 35 型 Ad ベクターが basolateral 側に発現している CD46 に到達できないことが考えられる。さらに、35 型 Ad には CD46 以外に受容体が存在することが報告されているが、マウスにおいてはそれが発現していない可能性も考えられる。またヒト血清中には CD46 の soluble form が存在する。CD46TG マウスにおいても soluble CD46 など血液中の何らかの成分により、35 型 Ad ベクターが不活性化している、また 35 型 Ad ベクターに血液成分が結合することで CD46 を認識できない、などの可能性がある。しかし我々は、CD46TG マウスより採取した血液ならびに血清と 35 型 Ad ベクターとをインキュベートした後、培養細胞に作用させたところ遺伝子発現効率の減弱は認められなかった。現在ヒトと同様に CD46 をもともと全臓器で発現している霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討している。この研究結果は 35 型 Ad ベクターの臨床応用に向けて極めて有用であるとともに、35 型 Ad

ベクターのモデル動物としての有用性を評価するうえでも重要であると思われる。

従来汎用されている 5 型 Ad ベクターによる *in vivo* 遺伝子導入においては、CAR およびインテグリンへの結合に加えて、ヘパラン硫酸への結合が重要であると考えられている。ヘパラン硫酸への結合では、fiber shaft に存在する KKTK (Lys-Lys-Thr-Lys) モチーフが重要であると報告されているが、35 型 Ad ベクターにおいてはこの KKTK モチーフが存在しない。これも 35 型 Ad ベクターがマウスにおいて低い遺伝子発現効率しか示さない要因かもしれない。

今回 CD46TG マウスとして、両方の相同染色体に CD46 遺伝子を有したホモマウスと片方にのみ有したヘミマウスとを用いた。初代培養細胞への遺伝子導入および TG マウスへの *in vivo* 遺伝子導入ともに、ホモマウスのほうが高い遺伝子発現効率を示した。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が、この結果より CD46 発現量が 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率を決める大きな要因となりうることが示唆された。がん細胞では通常の細胞と比較し CD46 を高発現していることが知られているが、はしかウイルスはこの発現量の差を利用することで oncolytic virus として用いられている。従って、35 型 Ad ベクターもがんを標的とした遺伝子治療用ベクターとして有用であると考えられる。

35 型 Ad ベクターの腹腔内投与では特に腹膜、横隔膜、肝臓、腎臓において高効率な遺伝子導入が観察され、静脈内投与と比較し 10 倍以上高い遺伝子発現効率を示した。しかしながら、X-gal 染色の結果、臓器内部の細胞はほとんど遺伝子発現しておらず、臓器表面の細胞のみが X-gal 陽性であった。また、投与部位である腹腔より直接感染できない肺や心臓といった臓器においては、他の臓器と比較し極めて低い遺伝子発現しか得られなかったことから、腹腔内に投与した 35 型 Ad ベクターは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。

35 型を含む subgroup B に属する Ad の受容体である CD46 は、その他ヘルペスウイルス type 6 やはしかウイルスなど、幾つかの病原体の受容体であることが知られている。CD46TG マウスはこれらの病原体の感染性などを検討する際にしばしば用いられており、CD46TG マウスに対しこれらのウイルスが感染可能であること、また感染に伴う免疫反応が起こることが報告されている。本研究を含め、これらの報告において用いられている CD46TG マウスでは、ubiquitous に働くプロモーターの下流に CD46 遺伝子の cDNA が挿入されているのではなく、ヒト CD46

のプロモーター領域から CD46 遺伝子までのゲノム DNA が bacterial artificial chromosome などを用いて挿入されている。そのため、TG マウスの各臓器間で CD46 発現量に若干差があり、その発現パターンはヒトにおけるものと比較的類似している。この点も CD46TG マウスのモデル動物としての長所であるといえる。

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

ウイルスとその感染受容体の相互作用の詳細を明らかにすることは、ウイルスの病原性を理解する上で非常に重要なことであり、さらに遺伝子導入用ベクターの遺伝子導入特性の評価のみならず、ウイルスベクター改良の重要な手掛かりとなる。これまでに、CD46 を認識する病原体の感染必須領域を特定するために各 SCR 欠損 CD46 発現 CHO 細胞を用いた遺伝子導入実験、並びに抗 CD46 モノクローナル抗体を用いた遺伝子導入阻害実験が行われてきた。そこで我々はこの手法を応用し、変異型 CD46 発現 CHO 細胞や種々の抗 CD46 モノクローナル抗体を用いて、CD46 のどの領域が 35 型 Ad の感染に重要な役割を果たしているのかについて検討を行った。

これまで麻疹ウイルスが SCR 1 及び SCR 2 に、ヒトヘルペスウイルス 6 型が SCR 2 及び 3 に結合し感染することが報告されている。従って、本研究での結果を併せると、CD46 の SCR 2 が CD46 を認識する全てのヒトウイルス（麻疹ウイルス、ヒトヘルペス 6 型ウイルス、subgroup B Ad）の感染に必須の領域であると言える。

SCR 2 と同様に SCR 1 の欠損 CD46 発現 CHO 細胞においても 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率の大幅な低下が見られた。しかし、SCR 1 特異的抗体 E4. 3 及び J4-48 ではルシフェラーゼ発現 35 型 Ad ベクターの作用による遺伝子導入効率の低下は見られなかった。一方で、同じく SCR 1 を認識する MEM-258 では有意な遺伝子導入阻害が見られた。E4. 3 と J4-48 の結合に重要なアミノ酸は SCR 1 の上部に位置していることが知られている。現在のところ MEM-258 のエピトープが SCR 1 のどこに位置しているのかということに関しては不明であるが、MEM-258 のエピトープは E4. 3 及び J4-48 とは異なる領域であり、35 型 Ad の感染に大きな役割を果たす領域であると推測される。

35 型 Ad が SCR 1 及び SCR 2 を認識することは、35 型 Ad の感染において有利なことであると言える。SCR 1、SCR 2 は CD46 の上部に位置することから、ウイルスカプシドと細胞表面の酸性タンパクとの静電的反発を低くし、35 型 Ad と細胞表面の結合を促進していると考えられる。Lieber らはファイバーのシャフトが短い Ad の場合は、特にウイルスカプシドと細胞表面の静電的相互作用が Ad 感染に重

要な因子になることを実証している。35型Adは9nmと5型Adの37nmよりも短いファイバーシャフトを有することから、35型AdがCD46の先端部分(SCR1、SCR2)を認識することは、理にかなっていると考えられる。

一方、本研究からCD46のcytoplasmic domainは35型Adの結合受容体としては必須の因子ではないことが明らかとなった。麻疹ウイルスやヒトヘルペスウイルス6型もcytoplasmic domainを欠損させたCD46を介して感染が可能であることが知られている。ヒトCD46のcytoplasmic domainは、これら病原体の結合受容体としての機能は有していないが、タンパクのターゲティングやrecruitmentに関わる領域でありサイトカイン産生などヒトCD46の様々な機能において重要な役割を果たしている。Hiranoらは麻疹ウイルス感染に伴う高レベルのNO産生及びIL-12産生の増加にCD46のcytoplasmic domainが関与していると報告している。またKurita-Taniguchiらはヒトマクロファージが細胞内フォスファターゼSHP-1のCD46への集合とともに活性化し、IL-12及びNOの産生により麻疹ウイルスへの応答能を有するようになることを報告している。従ってcytoplasmic domainは35型Adによる免疫応答の誘起への関与が示唆されるが、35型Adの受容体としては大きな機能は果たしていないと言える。

本研究の結果は、35型Adの細胞への内在化やCD46との結合に関与する35型Adファイバーノブ領域の同定といった、ヒトCD46とsubgroup B Adの相互作用のさらなる検討を提議するものであり、今後これらの詳細について検討を行っていく予定である。

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

病原体の感染機構ならびに感染後の細胞応答を明らかにすることは、病原体の感染域・病原性など、その特性を明らかにするうえで極めて重要である。これまでCD46を受容体とする病原体がいくつか報告されてきたが、これらの病原体は細胞感染後、特異的な反応を引き起こすことが報告されている。しかしながら、CD46を受容体とするsubgroup B Adに関しては感染後の細胞応答についてほとんど何も報告されていない。そこで本研究では、他のCD46を受容体とする病原体と同様に35型Adベクター感染によっても、細胞表面のCD46発現量が減少するのではないかと推察し検討を行った。

感染によるCD46細胞表面発現量減少については、麻疹ウイルスに関して多くの報告がなされている。麻疹ウイルスによるCD46発現量減少と35型Adベクターによる発現量減少については、両ウイルスともに感染後、細胞表面のCD46発現量は減少するが、細胞全体のCD46発現量は減少しないという点で共

通している。麻疹ウイルスのCD46結合部位であるヘマグルチニンと35型AdのCD46結合部位であるファイバーノブは、ともにCD46のSCR1および2に結合することが明らかになっており、両ウイルスは同じ機構でCD46発現量減少を引き起こしているのかもしれない。

しかしながら一方で、35型Adはnonleukemia細胞(A549、HeLa、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞)においてはCD46発現量減少を誘導しなかったのに対し、麻疹ウイルスはnonleukemia細胞においてもCD46発現量減少を引き起こすことが報告されている。これらの細胞においては、両ウイルスの感染機構に何らかの違いがあるのかもしれない。また、35型AdベクターによるCD46発現量減少は麻疹ウイルスによるものと比較すると効率が低い。これは麻疹ウイルスの場合、感染細胞で新たに合成され細胞表面に発現したヘマグルチニンが他の細胞と接触することにより、接触した細胞のCD46発現量も減少させているが、本研究で用いた35型Adベクターは自己複製に必須の領域であるE1領域を欠損させているため、感染細胞においてウイルスタンパクが新たに合成されることはほとんどない。そのため、35型AdベクターによるCD46発現量減少は麻疹ウイルスと比較し効率が悪いものと思われる。

また同じくCD46を受容体とする淋菌では、CD46に結合後CD46を切断することにより細胞表面のCD46発現量を減少させることが報告されている。そのため、細胞全体のCD46発現量が感染により減少するとともに、培養上清に可溶化したCD46が検出されている。しかしながら、35型Adベクターでは感染後、細胞全体のCD46量に大きな変化が見られないことから、淋菌のようなCD46の切断は起こっていないものと思われる。

今回、35型Adベクター感染により減少したCD46発現量はベクター除去96時間後においても回復していなかった。CD46は1時間で新たに合成・成熟化することが報告されている。35型Adベクターでは感染後、細胞表面のCD46発現量は減少しているが細胞全体のCD46発現量は減少していないことから、新規に合成されたCD46が細胞のどこに局在しているのか疑問が残る。これに関しては更なる検討を要するものと思われる。

## E. 結論

### 1. 標的細胞指向性を有した Ad ベクターの開発

1) 腹腔動脈から Ad ベクターを *in vivo* 投与し、その後脾臓を初代培養することで、脾臓内部の細胞 ( $\beta$  細胞を含む) に対しても高効率な遺伝子発現が可能な方法を開発した。

2) プロモーター配列およびファイバー領域における改変を最適化した Ad ベクターを用いることで、間葉系幹細胞、脂肪細胞、ES 細胞、胎盤細胞への劇的な遺伝子導入効率を上昇に成功した。

3) 組織特異性を有した Ad ベクターの開発のための第一ステップとして、Ad の native の受容体 (CAR、 $\alpha$ v インテグリン、ヘパラン硫酸) を認識しては感染しない Ad ベクターの開発・改良を行った。ファイバーノブの AB ループの変異、ファイバーシャフト領域を 35 型 Ad 由来に変更、ペントンベースの RGD モチーフの欠損の 3 領域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ず、肝障害や自然免疫誘導を起さない Ad ベクターの更なる改良に成功し、機能性、安全性に優れたターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターになりうるものと期待された。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。

4) *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 やヘキソンを改変した Ad ベクターを作製する方法を開発した。また、遺伝子導入効率の向上を目指し、pIX やヘキソン改変型 Ad ベクターの機能を評価した結果、少なくとも RGD ペプチドを用いる場合には、ファイバーノブの HI loop 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。

5) ターゲティング Ad ベクターのための基盤ベクターとして、ファイバー欠損 Ad ベクターを作製し、*in vivo*、*in vivo* において遺伝子導入特性明らかにした。

6) pIX やヘキソンを改変したファイバー欠損 Ad ベクターを開発し、その遺伝子導入特性明らかにした。

7) 遺伝子工学的にファイバーノブの HI loop 領域に HIV 由来の TAT ペプチドを提示することで、これまで開発された RGD 配列やポリリジン配列をファイバーノブに持つ改良型 Ad ベクターよりも高い遺伝子発現を達成できることを明らかにした。

8) RGD ペプチドをファイバーに付与した Ad ベクターと tet-off 系の発現制御能 (E1・E3 両欠損領域へ外来遺伝子を挿入) を組み合わせた Ad ベクターの開発に成功し、その有用性を実証した。

9) TAA 導入 DC ワクチン投与と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の併用は、TAA 特異的 CTL の腫瘍内集積性の増強に基づいて、DC 癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善できた。

10) AdRGD-IL12 を用いた癌免疫遺伝子治療への AdRGD-CCL27 の併用は、免疫細胞の腫瘍内動員と活性化を同時に達成することによって、治療効果を大幅に向上できた。

11) DC ワクチンにアポトーシス抵抗性を付与することによって、投与部位から所属リンパ節への到達性の向上およびリンパ節での抗原提示期間の延長が達成され、DC 癌免疫療法の有効性を改善できた。

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

1) PEG-Ad ベクターは、血中滞留性の飛躍的な向上と肝集積性の低減により、腫瘍への優れた受動的ターゲティング能を示すことを明らかとした。

2) ベクターの全身投与に基づくサイトカイン遺伝子治療および自殺遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用は、治療効果の増強と副作用の軽減に有効であることが示唆された。

3) PEG-Ad ベクターへの能動的ターゲティング能の付与に、PEG 片末端への標的化リガンドの付与が有用なアプローチであることを明らかとした。

4) Ad-TERT ベクターの腫瘍選択的遺伝子発現能を確認すると共に、全身投与における原発癌ならびに転移癌に対する治療域を拡大し得ることを明らかとした。

5) PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御を融合することで、腫瘍での高い遺伝子発現を示しつつ、肝臓での遺伝子発現を著しく抑制可能な優れた遺伝子発現パターンを示す新規ベクターの開発に成功した。

6) Tat-Ad ベクターの作製法を確立し、本ベクターの遺伝子導入特性ならびに遺伝子発現特性の一端を解明すると共に、非常に広範な感染域を有するベクターシステムであることを明らかとした。

### 3. 遺伝子発現抑制型 (siRNA 発現) Ad ベクターの開発

#### 1) 脂肪細胞への高効率遺伝子導入と脂肪細胞分化抑制

ファイバー領域における改変を最適化した Ad ベクターを用いることで、3T3-L1 脂肪前駆細胞および脂肪細胞への劇的な遺伝子導入効率の上昇に成功した。さらに 3T3-L1 脂肪前駆細胞において、脂肪細胞分化に必須のマスタレギュレーターである PPAR $\gamma$  の発現を、ポリリジン型 shRNA 発現 Ad ベクターで用いて抑制することで、脂肪細胞分化を抑制できることを示し、shRNA 発現 Ad ベクターの有用性を実証した。

#### 2) 発現制御型 shRNA 発現 Ad ベクターの開発

2-1) Improved in vitro ライゲーション法を応用することにより、特定の遺伝子・タンパク質の発現及び機能発現抑制状態を簡便・迅速に創出できる shRNA 発現 Ad ベクターを開発に成功した。さらに、テトラサイクリン由来のオペロン配列とオペロン配列に特異的に結合する転写活性化因子と利用した発現制御型 Ad ベクターと組み合わせることにより、目的遺伝子の発現レベルを負に制御できる shRNA 発現 Ad ベクターの開発に成功した。

2-2) Cre-loxP の部位特異的組換えシステムを利用することで、Cre の発現により shRNA 発現をオフに制御できるベクター系の開発に成功した。

3) 1 ステップの in vitro ライゲーションに基づいた簡便な siRNA 発現 Ad ベクター作製法を開発した。

### 4. 35 型 Ad ベクターの特性評価

1) 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、およびさらに未分化な細胞である CD34 陽性 CD38 陰性細胞、CD34 陽性 AC133 陽性細胞に作用させたところ、EF1 $\alpha$  プロモーター、CA プロモーター、CMV $i$  プロモーターが高い遺伝子発現効率を示し、なかでも CA プロモーターが最も高い活性を示した。また CA プロモーターは造血前駆細胞においても転写活性を有していることを明らかにした。本研究により得られた結果は、造血前駆細胞および幹細胞を用いた遺伝子治療ならびに遺伝子機能解析において極めて有用な情報になりうるものと思われる。

2) CD46 安定発現細胞および CD46TG マウスを用いた検討により、35 型 Ad ベクターが in vitro および in vivo 遺伝子導入において、CD46 を認識し細胞に感染することが明らかとなった。しかしながら、

CD46TG マウスにおける 35 型 Ad ベクターによる遺伝子発現量は 5 型 Ad ベクターと比較すると依然低いものであることから、今後霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入特性について検討するとともに、CD46TG マウスのモデル動物としての妥当性についても検討する必要があるものと思われる。

3) 35 型 Ad ベクターの感染に及ぼす CD46 結合部位の検索を行い、SCR1 および SCR2 の領域が感染に必須であることを明らかにした。また、CD46 の細胞内領域は 35 型 Ad ベクターの感染には必須ではないことを明らかにした。

4) 35 型 Ad ベクター感染により、細胞種によっては細胞表面 CD46 発現量の減少が引き起こされることが明らかとなった。一方で、CD46 mRNA 量および細胞全体の CD46 発現量が減少していないことを考慮すると、細胞表面の CD46 が 35 型 Ad ベクターとともに内在化され、細胞内で分解を受けずに滞留していることが推察される。また、一旦減少した細胞表面の CD46 発現量は 35 型 Ad ベクター除去後も回復に多くの時間を要した。今後 35 型 Ad をはじめとする CD46 を受容体として認識する Ad ベクターを使用する際には注意が必要であろう。

### F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mukai E., Fujimoto S., Sakurai F., Kawabata K., Yamashita M., Inagaki N., Mizuguchi H. Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. *J. Control. Release.*, in press.
- 2) Sakurai F., Akitomo K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. *Gene Ther.*, in press.
- 3) Gao J-Q., Kanagawa N., Motomura Y., Yanagawa T., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer. *Gene Ther.*, in press.
- 4) Hama S., Akita H., Iida S., Mizuguchi H., Harashima H. Quantitative and mechanism-based investigation of differences in post nuclear delivery events between viral and non-viral vectors. *Nuc. Acid Res.*, in press.
- 5) Sakurai H., Kawabata K., Sakurai F., Nakagawa S., Mizuguchi H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharmaceutics.* in press.
- 6) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int. J. Pharm.*, in press.
- 7) Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
- 8) Sakurai H., Sakurai F., Kawabata K., Sasaki T., Koizumi N., Huang H., Tashiro K., Kurachi S., Nakagawa S., Mizuguchi H. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J. Control. Release.*, 117, 430-437 (2007)
- 9) Ebihara C., Kondoh M., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S-I., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol.*, 73, 824-830 (2007)
- 10) Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
- 11) Kurachi S., Koizumi N., Sakurai F., Kawabata K., Sakurai H., Nakagawa S., Hayakawa T., Mizuguchi H. Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.*, 14, 266-274 (2007)
- 12) Harada M., Kondoh M., Ebihara C., Takahashi A., Komiya E., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S-I., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 206-214 (2007)
- 13) Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Crucial role of the short consensus repeats 1 and 2 of human CD46 on infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J. Control. Release.*, 113, 271-278 (2006)
- 14) Kamakura M., Morisawa K., Komi H., Tomatani A., Saito F., Konishi Y., Jin Y., Manabe T., Kuroda M., Imai S., Mizuguchi H., Taniguchi T. Regulation of IL-27p28 gene by lipopolysaccharide in dendritic DC2.4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349, 1372-1377 (2006)
- 15) Uno K., Katagiri H., Yamada T., Ishigaki Y.,

- Ogihara T., Imai J., Hasegawa Y., Gao J., Kaneko K., Iwasaki H., Ishihara H., Sasano H., Inukai K., Mizuguchi H., Asano T., Shiota M., Nakazato M., Oka Y. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science*, 312, 1656-1659 (2006)
- 16) Kishimoto H., Kojima T., Watanabe Y., Kagawa S., Fujiwara T., Uno F., Teraishi F., Kyo S., Mizuguchi H., Hashimoto Y., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T. A novel in vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-competent adenovirus containing green fluorescent protein gene. *Nature Med.*, 12, 1213-1219 (2006)
- 17) Fujiwara T., Akita H., Furukawa K., Ushida T., Mizuguchi H., Harashima H. Impact of convective flow on the cellular uptake and transfection activity of lipoplex and adenovirus. *Bio. Pharm. Bull.*, 29, 1511-1515 (2006)
- 18) Koizumi N., Mizuguchi H., Kondoh M., Fujii M., Nakanishi T., Utoguchi N., Watanabe Y. Efficient gene transfer into differentiated human trophoblast cells with adenovirus vector containing RGD motif in the fiber protein. *Bio. Pharm. Bull.*, 29, 1297-1299 (2006)
- 19) Nukiwa M., Andarini S., Zaini J., Xin H., Kanehira M., Suzuki T., Fukuhara T., Mizuguchi H., Hayakawa T., Saijo Y., Nukiwa T., Kikuchi T. Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors. *Eur. J. Immunol.*, 109, 1019-1027 (2006)
- 20) Komiya E., Kondoh M., Mizuguchi H., Fujii M., Utoguchi N., Nakanishi T., Watanabe Y. Characteristics of transcription-regulatory elements for gene expression from plasmid vectors in human trophoblast cell lines. *Placenta*, 27, 934-938 (2006)
- 21) Harui A., Roth M.D., Sanghvi M., Vira D., Mizuguchi H., Basak S. Centrifugation enhances integrin-mediated transduction of dendritic cells by conventional and RGD-modified adenoviral vectors. *J. Immunol. Methods*, 312, 94-104 (2006)
- 22) Harui A., Roth M.D., Vira D., Sanghvi M., Mizuguchi H., Basak S. Adenoviral-encoded antigens are presented by a subset of dendritic cells expressing alpha-v/beta-3 integrins. *J. Leukocyte Biol.*, 79, 1271-1278 (2006)
- 23) Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther.*, 13, 1118-1126 (2006)
- 24) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Harashima H. Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Mol. Ther.*, 13, 786-794 (2006)
- 25) Okada N., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Nakagawa S., Fujita T., Yamamoto A. Tumor suppressive efficacy through augmentation of tumor-infiltrating immune cells by intratumoral injection of chemokine-expressing adenoviral vector. *Cancer Gene Ther.*, 13, 393-405 (2006)
- 26) Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor,  $\alpha$ v integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.*, 17, 264-279 (2006)
- 27) Ebihara C., Kondoh M., Hasuike N., Harada M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Fujii M., Watanabe Y. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 316, 255-260 (2006)

- 28) Kida S., Maeda M., Hojo K., Eto Y., Gao J. Q., Kurachi S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S., Kawasaki K. Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: A tool for carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 743-735 (2006)
- 29) Gao J-Q., Chen H-L., Nakagawa S., Mizuguchi H., Liang W-Q. Gene expression of tumor cells both in vitro and in vivo enhanced by integrin-targeting adenovirus. *Acta Pharmaceutica Sinica* 41, 1116-1120 (2006)
- 30) Kawabata K., Sakurai F., Koizumi N., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.*, 3, 95-103 (2006)
- 31) Tomoaki Yoshikawa, Susumu Imazu, Jian-Qing Gao, Kazuyuki Hayashi, Yasuhiro Tsuda, Naoki Okada, Yasuo Tsutsumi, Mitsuru Akashi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Non-methylated CpG motifs packaged into fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 105-109 (2006)
- 32) Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Fusogenic liposomes and their suitability for gene delivery. *Future Lipidology*, 1, 735-742 (2006)
- 33) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Improvement of adenovirus vectors for cancer gene therapy. "Recent Developments in Gene Therapy" published by Research Sigupost in India, in press.
- 34) 川端健二、櫻井文教、水口裕之；改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー、*Drug Delivery System*、印刷中
- 35) 水口裕之、早川堯夫；アデノウイルスベクター；*バイオ医薬品の品質・安全性評価(改訂版)*、早川堯夫・山崎修道・延原正弘編、エル・アイ・シー、印刷中
- 36) 水口裕之；アデノウイルスベクター開発の最前線、*バイオテクノロジージャーナル*、7(2)、168-173(2007)
- 37) 岡田直貴、中川晋作；免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化、*薬学雑誌*、127(2)、327-339 (2007)
- 38) Mizuguchi H. Recent Advance of Development of Viral and Non-viral Vectors for Gene Therapy. *Yakugaku Zasshi*. 126, 1011 (2006)
- 39) Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Characterization of adenovirus serotype 35 vectors using genetically modified animals and nonhuman primates. *Yakugaku Zasshi*. 126, 1013-1019 (2006)
- 40) Akita H., Hama S., Mizuguchi H. Harashima H. Development of non-viral vector based on the quantitative comparison of intracellular trafficking with viral vector. *Yakugaku Zasshi*. 126, 1047-1057 (2006)
- 41) 櫻井文教、水口裕之；新しいアデノウイルスベクターの開発、*バイオサイエンスとインダストリー*、64(5)、11-16 (2006)
- 42) 倉知慎之輔、中川晋作；人工改変型ウイルスベクターの現状と今後の展開、*遺伝子医学MOOK*、5、95-101 (2006)
- 43) 杉田敏樹、岡田直貴、中川晋作；ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫の増強、*臨床免疫*、45(5)、525-532 (2006)
- 44) 吉川友章、岡田直貴、中川晋作；ウイルス機能を基盤とするDDSキャリアーの開発と応用、*バイオテクノロジージャーナル*、6(5)、557-562 (2006)
- 45) 金川尚子、岡田直貴、中川晋作；次世代癌遺伝子治療戦略に適う改良型アデノウイルスベクター、*生産と技術*、58(4)、58-60 (2006)
- 46) Mizuguchi H., Xu Z-L., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Efficient regulation of gene expression using self-contained fiber-modified adenovirus vectors containing the tet-off system. *J. Control. Release.*, 110, 202-211 (2005)
- 47) Ino A., Naito Y., Mizuguchi H., Handa N.,

- Hayakawa T., Kobayashi I. A trial of somatic gene targeting in vivo with an adenovirus vector. *Genetic Vaccines and Therapy*, 3:8 (2005)
- 48) Xin K-Q., Jounai N., Someya K., Honma K., Mizuguchi H., Naganawa S., Kitamura K., Hayakawa T., Saha S., Takeshita F., Okuda K., Honda M., Klinman D.M., Okuda K. Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type 5 vector with type 35 fiber induces protective immunity against HIV. *Gene Ther.*, 12, 1769-1777 (2005)
- 49) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol. Ther.*, 12, 547-554 (2005)
- 50) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther.*, 12, 1424-1433 (2005)
- 51) Takahashi A., Kondoh M., Masuyama A., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J. Contl. Release.*, 108, 56-62 (2005)
- 52) Mizuguchi H., Sasaki T., Kawabata K., Sakurai F., Hayakawa T. Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332, 1101-1106 (2005)
- 53) Masuyama A., Kondoh M., Seguchi H., Takahashi A., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y. Role of N-terminal amino acids in the absorption-enhancing effects of the C-terminal fragment of Clostridium Perfringens enterotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314, 789-795 (2005)
- 54) Gao J-Q, Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Okada N., Mizuguchi H., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1066-1070 (2005)
- 55) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T. Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.*, 12, 608-616 (2005)
- 56) Koizumi, N., Kondoh, M., Mizuguchi H., Nakanishi, T., Masuyama, A., Ida, F., Fujii, M., Hayakawa, T., Nakashima, E., Tanaka, K., Watanabe, Y. Comparison of transgene expression mediated by several fiber-modified adenovirus vectors in trophoblast cells. *Placenta.*, 26, 729-734 (2005)
- 57) Eto Y., Gao J-Q., Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Maeda, M., Kawasaki K., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.*, 7, 604-612 (2005)
- 58) Taki M., Kagawa S., Nishizaki M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kyo S., Nagai K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene*, 24, 3130-3140 (2005)
- 59) Maeda M., Kida S., Hojo K., Eto Y., Gao J-Q, Kurachi S., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S., Kawasaki K. Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Medicinal. Chem. Lett.*, 15, 621-624 (2005)

- 60) Gao J-Q, Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Eto Y., Motomura Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S. A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.*, 328, 1043-1050 (2005)
- 61) Nasimuzzaman, M., Kuroda, M., Dohno, S., Yamamoto, T., Iwatsuki, K., Matsuzaki, S., Rashel, M., Kumita, W., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakamura, H., Taguchi, T., Wakiguchi, H., Imai, S. Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. *Mol. Ther.*, 11, 578-590 (2005)
- 62) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Koizumi N., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Watanabe Y., Mayumi T., Hayakawa T. RNA interference of PPAR $\gamma$  using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*, 348, 157-165 (2005)
- 63) Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., Asano, N., Mizuguchi H., Koizumi, N., Fujii, M., Hayakawa, T., Horiguchi, Y., Watanabe, Y. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.*, 67, 749-756 (2005)
- 64) Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., Kawakami Y. Gene therapy for human small cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene Ther.*, 12, 95-100 (2005)
- 65) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, 12, 129-139 (2005)
- 66) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A. Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, 12, 72-83 (2005)
- 67) Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi H., Asano, T., Oka, Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun.*, 326, 402-409 (2005)
- 68) Xu Z. L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T. Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, 57, 781-802 (2005)
- 69) 水口裕之；目的遺伝子の抑制レベルを自由に制御するアデノウイルスベクターの開発、*実験医学*、23、2167-2172 (2005)
- 70) 水口裕之・川端健二・櫻井文教・早川堯夫；改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES細胞への高効率遺伝子導入、*炎症・再生 (日本炎症・再生医学会学会誌)*、25、447-451 (2005)
- 71) 水口裕之・早川堯夫；カプシドタンパク質を改変した改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入；*BIO INDUSTRY*、22(5)、16-21 (2005)
- 72) 水口裕之・早川堯夫；ウイルスベクター；*Drug Delivery System*、20、158-159 (2005)
- 73) 水口裕之；ウイルスベクターのDDS；*Drug Metabolism And Pharmacokinetics*、19(6)、30-32 (2005)
- 74) 杉田敏樹・高建青・中川晋作；Cell Delivery System を用いた次世代薬物治療；*Drug Delivery System*、20、42-48, 2005.

- 75) 中川晋作・真弓忠範：細胞性製剤と細胞送達システム (Cell Delivery System) : *PHARM TECH JAPAN*, 21, 2096-2099, 2005.
- 76) Koizumi, N., Mizuguchi H., Kondoh, M., Fujii, M., Hayakawa, T., Watanabe, Y. Efficient gene transfer into human trophoblast cells with adenovirus vector containing chimeric type 5 and 35 fiber protein. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 2046-2048 (2004)
- 77) Mizuguchi H., Hayakawa T., Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15, 1022-1033 (2004)
- 78) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z. L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)
- 79) Gao J-Q., Inoue S., Tsukada Y., Katayama K., Eto Y., Kurachi S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. High gene expression of the mutant adenovirus vector, both in vitro and in vivo, with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, 59, 571-572 (2004)
- 80) Eto Y., Gao J-Q., Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of MPEG-SPA. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 936-938 (2004)
- 81) Nakamura T., Peng K-W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Cattaneo R., Russell S. J. Antibody-targeted cell fusion, *Nat. Biotech.*, 22, 331-336 (2004)
- 82) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N. Optimization of antitumor efficacy and safety of *in vivo* cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1670, 172-180 (2004)
- 83) Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 68-76 (2004)
- 84) Anno T., Uehara S., Katagiri H., Ohta Y., Ueda K., Mizuguchi H., Moriyama Y., Oka Y., Tanizawa Y. Overexpression of constitutively activated glutamate dehydrogenase induces insulin secretion through enhanced glutamate oxidation. *Am. J. Physiol.*, 286, E280-285 (2004)
- 85) Gao J-Q, Alexandre L. S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie*, 59, 238-239 (2004)
- 86) Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., Mayumi T. RNA interfering approach for clarifying PPAR $\gamma$  pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett.*, 560, 178-182 (2004)
- 87) Suto R., Tominaga K., Mizuguchi H., Sasaki E., Higuchi K., Kim S., Iwao H., Arakawa T. Dominant negative mutant of c-Jun gene transfer: a novel therapeutic strategy for colorectal cancer. *Gene Ther.*, 11, 187-193 (2004)
- 88) 吉川友章・真弓忠範・中川晋作：機能性細胞の創製とCell Delivery System: *Bioベンチャー*, 4, 56-58 (2004)

- 89) 衛藤佑介・真弓忠範・中川晋作；遺伝子医薬品のDDS；*ファインケミカルシリーズ ドラッグデリバリーシステムの新展開 -究極の薬物治療をめざして-*；シーエムシー出版、252-265 (2004)
- 90) 杉田敏樹・中川晋作；免疫とリポソーム；*リポソーム応用の新展開 ~人工細胞の開発に向けて~*、(株) エヌ・ティー・エス、586-595 (2005)
2. 学会発表
- 1) 水口裕之、船越直子、細野哲二、櫻井文教、川端健二、山口照英、早川堯夫；簡便な siRNA 発現アデノウイルスベクター作製法の開発；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 2) 川端健二、田代克久、櫻井文教、早川堯夫、水口裕之；アデノウイルス感染制御に関与する CAR-like soluble protein (CLSP) の局在解明；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 3) 櫻井文教、穂友絹美代、川端健二、中村紳一朗、柴田宏昭、寺尾恵治、早川堯夫、水口裕之；カニクイザルにおける 35 型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 4) 倉知慎之輔、桜井晴奈、田代克久、櫻井文教、川端健二、屋山勝俊、岡本博、中川晋作、水口裕之；TAT peptide を付与したファイバーミュータント Ad ベクターの開発と遺伝子発現評価 Generation of fiber-mutant Ad vector containing TAT peptide；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 5) 桜井晴奈、五十嵐勝秀、田代克久、川端健二、櫻井文教、倉知慎之輔、中川晋作、菅野 純、水口裕之；アデノウイルスベクター誘発自然免疫応答に関与する因子の DNA microarray を用いた探索 Search for factors involved in the innate immune response induced by adenovirus vectors；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 6) 田代克久、川端健二、桜井晴奈、倉知慎之輔、櫻井文教、中川晋作、早川堯夫、山西弘一、水口裕之；アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立 Efficient gene transduction into mouse embryoid bodies with adenovirus vectors；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 7) 衛藤佑介、吉岡靖雄、姚 醒蕾、吉川友章、向 洋平、鈴木 亮、宇都口直樹、丸山一雄、岡田直貴、中川晋作；アデノウイルスベクター内封 PEG 化リポソームの創製および精製法の確立；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 8) 姚 醒蕾、吉岡靖雄、衛藤佑介、水口裕之、岡田裕香、向 洋平、岡田直貴、中川晋作；腫瘍特異的プロモーター搭載アデノウイルスベクターを用いた自殺遺伝子治療；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 9) Ratima Asavatanabodee、吉岡靖雄、衛藤佑介、喜田進也、前田光子、川崎紘一、水口裕之、向洋平、岡田直貴、中川晋作；広範な感染域を有する Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの構築と遺伝子導入特性評価；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 10) 柳川達也、金川尚子、本村吉章、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作；ケモカイン-ケモカインレセプター連関を利用した癌養子免疫療法の有効性改善；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 11) 後藤美千代、金川尚子、岡田裕香、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作；TNF 関連分子発現樹状細胞を用いた定着腫瘍に対する新規免疫療法の開発；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 12) 大西康司、金川尚子、金本雄次、藤田卓也、山本 昌、中川晋作、岡田直貴；TERT 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序および安全性に関する検討；日本薬学会第 127 年会（富山）；2007 年 3 月 28～30 日
- 13) 喜田進也、前田光子、北條恵子、衛藤佑介、森重智弘、渡辺 光、Ratima Asavatanabodee、吉岡靖雄、水口裕之、真弓忠範、中川晋作、川 紘一；Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過性ペプチド；日本薬学会第 127 年会

(富山) : 2007年3月28~30日

発表討論会(京都) : 2006年10月13-14日

- 14) 水口裕之;次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究;平成18年度厚生労働省科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会;2007年2月21日
- 15) 水口裕之;ウイルスの先端医療への応用;高知大学医学部講義;2007年1月16日
- 16) 水口裕之;次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学への応用;高知大学大学院公開セミナー;2007年1月15日
- 17) 大西康司、岡田直貴、中川晋作、藤田卓也、山本 昌;種々のマウス腫瘍モデルを用いた TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンの有効性と汎用性の評価;第36回日本免疫学会総会(大阪);2006年12月11-13日
- 18) 水口裕之;遺伝子導入技術開発とその応用;医薬基盤研究所連携フォーラム;2006年12月5日
- 19) 水口裕之;次世代アデノウイルスベクターの開発と先端科学への応用;塩野義製薬特別講義;2006年11月7日
- 20) 水口裕之;ウイルス改変に基づいた遺伝子導入技術の開発と先端科学への応用;京都大学大学院薬学研究科大学院講義;2006年10月31日
- 21) 川端健二、田代克久、櫻井文教、長田直樹、楠田 潤、早川堯夫、山西弘一、水口裕之;アデノウイルス受容体 CAR と相同性を有する新規可溶性タンパク質 CLSP (CAR-like soluble protein) によるアデノウイルスベクターの感染制御 一;第56回日本薬学会近畿支部総会(京都);2006年10月28日
- 22) 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之;35型アデノウイルスベクター遺伝子導入機構の解明一インテグリンの関与に関する検討一;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 23) 大西康司、岡田直貴、金本雄次、森川愉加里、中川晋作、藤田卓也、山本 昌;TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンを用いた汎用性に優れる癌免疫療法の開発;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 24) 前田葉子、岡田直貴、上羽美貴、松永知子、藤井 愛、中川晋作、藤田卓、山本 昌;ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 25) 姚 醒蕾、吉岡靖雄、衛藤佑介、森重智弘、岡田裕香、岡田直貴、中川晋作;腫瘍特異的プロモーター搭載型アデノウイルスベクターを用いた癌自殺遺伝子治療の最適化;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 26) 森重智弘、吉岡靖雄、衛藤佑介、田辺 綾、岡田裕香、岡田直貴、中川晋作;PEGylation と腫瘍特異的プロモーターの併用による腫瘍標的化アデノウイルスベクターの創製;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 27) 本村吉章、金川尚子、柳川達也、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作;腫瘍標的化 CTL を用いた新規癌養子免疫療法の開発に向けた基礎的検討;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 28) 黄 海瑛、櫻井文教、川端健二、小泉直也、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、水口裕之;アデノウイルスベクター投与後初期に起こる副作用軽減一 NF- $\kappa$ B デコイの細胞選択的デリバリーによる試み 一;第2回創剤フォーラム若手発表討論会(京都);2006年10月13-14日
- 29) 山下 学、櫻井文教、川端 健二、早川堯夫、水口裕之;タイトジャンクション関連タンパク coxsackie and adenovirus receptor によるがん転移抑制;第65回日本癌学会総会(横浜);2006年9月28-30日
- 30) 佐々木朋美、川端健二、櫻井文教、早川堯夫、水口裕之;受容体との結合性を欠損した各種改変型アデノウイルスベクターにおける遺伝子導入効率の検討;第65回日本癌学会総会(横浜);2006年9月28-30日
- 31) 渡辺 光、衛藤佑介、森重智弘、喜田進也、前田光子、水口裕之、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作;癌遺伝子治療の最適化を目指した Tat ペ

- プチド修飾アデノウイルスベクターの作製と  
遺伝子導入特性評価；第 65 回日本癌学会総会  
(横浜)；2006 年 9 月 28-30 日
- 32) 森重智弘、衛藤佑介、倉知慎之輔、渡辺 光、  
岡田裕香、水口裕之、吉岡靖雄、岡田直貴、中  
川晋作: PEGylation と腫瘍特異的プロモーター  
の併用による腫瘍標的化アデノウイルスベク  
ターの最適化；第 65 回日本癌学会総会(横浜)；  
2006 年 9 月 28-30 日
- 33) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated  
adenovirus vector containing RGD peptides on  
the tip of PEG (招待講演). 7th Seventh  
France-Japan DDS Symposium, Shiga, Japan,  
September 24-27, 2006.
- 34) Naoko Kanagawa, Naoki Okada, Shinsaku  
Nakagawa, Intratumoral cotransduction of  
IL-12 and CCL27 genes can improve the  
efficacy and safety of cancer immunotherapy  
through enhanced recruitment and activation  
of immune cells in tumor site.；第 7 回文  
部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研  
究者ワークショップ；(長野)；2006 年 8 月  
30 日-9 月 2 日
- 35) Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku  
Nakagawa, PEGylation induces accumulation  
and enhanced gene expression of adenovirus  
vector in tumor via systemic  
administration.；第 7 回文部科学省特定領  
域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショ  
ップ；(長野)；2006 年 8 月 30 日-9 月 2 日
- 36) 水口裕之；アデノウイルスベクター作製技術一  
特に in vitro ライゲーション法に関して一；  
第 12 回日本遺伝子治療学会 テクニカルセミ  
ナー(東京)；2006 年 8 月 25 日
- 37) Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Fuminori  
Sakurai, Takao Hayakawa, Yoshiteru Watanabe,  
Hiroyuki Mizuguchi; Elimination of innate  
immune responses by capsid-modification of  
adenovirus vectors; 第 12 回日本遺伝子治療  
学会(東京)；2006 年 8 月 24-26 日
- 38) Fuminori Sakurai, Kimiyo Akitomo, Kenji  
Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi;  
DOWNREGULATION OF CD46 BY ADENOVIRUS  
SEROTYPE 35 VECTORS; 第 12 回日本遺伝子治療  
学会(東京)；2006 年 8 月 24-26 日
- 39) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated  
adenovirus vector with target ligand (招待  
講演).；The first FIP-APSTJ joint workshop  
on gene delivery (Sapporo)；2006 年 7 月 10-12  
日
- 40) Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Kenji  
Kawabata, Tomomi Sasaki, Naoya Koizumi,  
Kaiei Kou, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku  
Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi; COMPARISON OF  
GENE EXPRESSION EFFICIENCY AND INNATE IMMUNE  
RESPONSE INDUCED BY ADENOVIRUS VECTOR AND  
LIPOPLEX; The first FIP-APSTJ joint workshop  
on gene delivery (Sapporo)；2006 年 7 月 10-12  
日 Best Presentation Award
- 41) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Takao  
Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus  
Serotype 35 Vector-mediated Gene Transfer  
into Human and Mouse Hematopoietic  
Progenitors; The first FIP-APSTJ joint  
workshop on gene delivery (Sapporo)；2006  
年 7 月 10-12 日
- 42) 櫻井文教、穂友絹美代、川端健二、中村紳一朗、  
柴田宏昭、寺尾恵治、早川堯夫、水口裕之；霊  
長類を用いた 35 型アデノウイルスベクターの  
機能評価；第 21 回日本 DDS 学会(東京)；2006  
年 7 月 7-8 日
- 43) 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、  
藤田卓也、山本昌、早川堯夫、水口裕之；35  
型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導  
入における・1 インテグリンの関与に関する検  
討；第 21 回日本 DDS 学会(東京)；2006 年 7  
月 7-8 日
- 44) 黄海瑛、櫻井文教、川端健二、小泉直也、樋口  
ゆり子、川上茂、山下富儀、橋田充、水口 裕  
之；NF- $\kappa$ B デコイによるアデノウイルスベク  
ター生体投与後の自然免疫誘導抑制；第 21 回日  
本 DDS 学会(東京)；2006 年 7 月 7-8 日
- 45) 小泉直也、川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、  
西島美妙江、山口朋子、早川堯夫、渡邊善照、  
水口裕之；自然免疫誘導能を減弱させ安全性に  
優れたアデノウイルスベクターの開発；第 21  
回日本 DDS 学会(東京)；2006 年 7 月 7-8 日

- 46) 倉知慎之輔、小泉直也、桜井晴奈、佐々木朋美、櫻井文教、川端健二、中川晋作、早川堯夫、水口裕之；非特異的遺伝子導入抑制を目指したファイバー欠損アデノウイルスベクターの開発とその特性評価；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日
- 47) 井野麻美、山下学、向英里、櫻井文教、川端健二、水口裕之；マウス骨髄由来間葉系幹細胞を用いた転移癌に対する遺伝子細胞治療；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日 優秀ポスター賞受賞
- 48) 向英里、櫻井文教、川端健二、藤本新平、稲垣暢也、水口裕之；臍ランゲルハンス島β細胞への高効率遺伝子導入を可能とするアデノウイルスベクターの探索と遺伝子導入法の改良；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日 優秀ポスター賞受賞
- 49) 後藤美千代、丹羽貴子、吉川友章、水口裕之、岡田直貴、中川晋作；アポトーシス抵抗性を付与した樹状細胞の生体内生存期間延長と免疫誘導との関連評価；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日
- 50) 渡辺 光、衛藤佑介、森重智弘、姚 醒蕾、吉岡靖雄、喜田進也、前田光子、川崎紘一、水口裕之、岡田直貴、中川晋作；Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの開発と遺伝子導入特性に関する検討；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日
- 51) 吉川友章、岡田直貴、中川晋作；遺伝子工学的的手法を用いてDDS機能を付与した樹状細胞ワクチンの有用性(シンポジウム講演)；第21回日本DDS学会(東京)；2006年7月7-8日
- 52) 水口裕之；遺伝子導入技術の開発と先端科学への応用；昭和薬科大学大学院特別講義；2006年6月13日
- 53) Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Takao Hayakawa: Development of modified adenovirus vectors with reduced innate immune response.; 9<sup>th</sup> Annal Meeting of American Society of Gene Therapy; 2006年6月(Baltimore, USA)
- 54) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction in mouse hematopoietic stem cells isolated from human CD46-transgenic mice; 9<sup>th</sup> Annal Meeting of American Society of Gene Therapy; 2006年6月(Baltimore, USA)
- 55) Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Tomohiro Morishige, Xinglei Yao, Hikaru Watanabe, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa: Transductional and transcriptional tumor-targeting using adenoviral vector with PEGylation and TERT promoter on systemic administration into tumor-bearing mice, American Association for Cancer Research, April 1-5, 2006. CA, USA
- 56) 小泉直也、川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、西島美妙江、山口朋子、早川堯夫、渡邊善照、水口裕之；高い遺伝子導入効率と安全性を合わせ持つアデノウイルスベクターの開発；遺伝子・デリバリー研究会 第6回シンポジウム(東京)；2006年5月 奨励賞受賞
- 57) 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、瀬谷司、山本昌、早川堯夫、水口裕之；35型アデノウイルスベクターのCD46認識部位に関する検討；日本薬学会126年会(仙台)；2006年3月28-39日
- 58) 小泉直也、川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、西島美妙江、早川堯夫、水口裕之；感染受容体を改変したアデノウイルスベクターの有用性評価；日本薬学会126年会(仙台)；2006年3月28-39日
- 59) 水口裕之；overview 『ウイルス・非ウイルスベクター開発研究の最前線と臨床・産業化への道』；日本薬学会126年会(仙台)；2006年3月28-39日
- 60) 櫻井文教、川端健二、水口裕之；35型アデノウイルスベクターの開発—遺伝子改変動物および霊長類を用いた検討—；日本薬学会126年会(仙台)；2006年3月28-39日
- 61) 秋田英万、濱進、水口裕之、原島秀吉；ウイルスベクターと非ウイルスベクターの細胞内動態の定量的解析に基づいた遺伝子ベクター開発へのアプローチ；日本薬学会126年会(仙台)；2006年3月28-39日

- 62) 桜井晴奈、櫻井文教、佐々木朋美、川端健二、小泉直也、黄海瑛、倉知慎之輔、中川晋作、水口裕之;Lipoplexとアデノウイルスベクターのin vivoにおける遺伝子発現能および自然免疫誘導能の比較;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 63) 金川尚子、吉川友章、畑中豊、谷洋一、水口裕之、堤康央、岡田直貴、中川晋作;IL-12発現ベクターを投与した腫瘍組織における免疫イベントの解析;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 64) 倉知慎之輔、小泉直也、桜井晴奈、櫻井文教、川端健二、中川晋作、早川堯夫、水口裕之;カプシド改変アデノウイルスベクターの作製とその機能性評価;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 65) 丹羽貴子、吉川友章、後藤美千代、水口裕之、堤康央、岡田直貴、中川晋作;アポトーシス抵抗性樹状細胞の創製と抗腫瘍ワクチン機能の評価;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 66) 本村吉章、吉川友章、柳川達也、杉田敏樹、水口裕之、堤康央、岡田直貴、中川晋作;マウスT細胞への遺伝子導入効率に優れるベクターシステムの探索;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 67) 姚醒蕾、衛藤佑介、倉知慎之輔、森重智弘、渡辺光、岡田裕香、水口裕之、堤康央、岡田直貴、中川晋作;ポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターを用いた腫瘍標的化自殺遺伝子治療の開発;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 68) 上羽美貴、岡田直貴、木村芳伸、郷谷真嗣、藤井愛、水口裕之、中川晋作、藤田卓也、山本昌;ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と抗腫瘍効果の評価;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 69) 大西康司、岡田直貴、森川愉香里、水口裕之、中川晋作、藤田卓也、山本昌;TERT遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンの腫瘍増殖抑制効果;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 70) 岡田直貴、中川晋作;免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化;日本薬学会第126年会(仙台);2006年3月28-39日
- 71) 後藤美千代、丹羽貴子、吉川友章、水口裕之、岡田直貴、中川晋作;抗アポトーシス分子を導入した樹状細胞ワクチンの特性と抗腫瘍メカニズムの解析;日本薬剤学会第21年会(金沢);2006年3月16-18日
- 72) 森重智弘、衛藤佑介、倉知慎之輔、姚醒蕾、渡辺光、岡田裕香、水口裕之、岡田直貴、中川晋作;腫瘍標的化を目指した改良型アデノウイルスベクターの創製;日本薬剤学会第21年会(金沢);2006年3月16-18日
- 73) 是友良介、岡田直貴、村上さや香、大西善洋、水口裕之、中川晋作、藤田卓也、山本昌;アデノウイルスベクターによる樹状細胞の表現型変化とその作用機序に関する基礎的検討;日本薬剤学会第21年会(金沢);2006年3月16-18日
- 74) 丹羽正和、岡田直貴、熊谷将成、畑中豊、谷洋一、水口裕之、中川晋作、藤田卓也、山本昌;免疫細胞の腫瘍内動員を基盤とした新規癌免疫遺伝子治療の開発;日本薬剤学会第21年会(金沢);2006年3月16-18日
- 75) 水口裕之;遺伝子機能解析のための次世代アデノウイルスベクターの開発;第69回新適塾「21世紀の薬箱」(大阪);2006年1月31日
- 76) 水口裕之;次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究;九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス(九州大学医学部特別講演)(福岡);2006年1月17日
- 77) 丹羽貴子、吉川友章、小田淳史、飯田恵介、松尾一彦、萱室裕之、岡田直貴、堤康央、水口裕之、中川晋作;変異型抗アポトーシス蛋白質Bcl-xFNK発現樹状細胞を用いた抗腫瘍効果に関する検討;第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜);2005年12月13-15日、横浜
- 78) 金川尚子、杉田敏樹、飯田恵介、畑中豊、谷洋一、水口裕之、堤康央、真弓忠範、中川晋作;IL-12発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の腫瘍内浸潤の向上;第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜)2005年12月13-15日

- 79) 水口裕之；遺伝子治療研究における薬学の役割：ベクター開発の重要性；平成17年度大阪大学薬学部卒後研修会「食・健康と薬学」（大阪）；2005年12月2日
- 80) 形山和史、水口裕之、川端健二、細野哲二、清水なつみ、須永裕之、立花雅史、中川晋作、三好浩之；RNAi 誘導用レンチウイルスベクター；第28回日本分子生化学会大会（福岡）2005年12月7-10日
- 81) 鎌倉真紀、齋藤史路、大野芳典、森澤啓子、黒田正幸、今井章介、水口裕之、谷口武利；ラット IL-27p28 プロモーター領域の解析；第28回日本分子生化学会大会（福岡）2005年12月7-10日
- 82) 田代克久、川端健二、櫻井文教、早川堯夫、水口裕之；マウス胚性幹細胞及び胚様体に対する高効率アデノウイルスベクターの開発；第28回日本分子生化学会大会（福岡）2005年12月7-10日
- 83) 水口裕之；ターゲティングアデノウイルスベクターの開発に向けて —非特異的遺伝子導入活性を抑えたアデノウイルスベクターの開発—；第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）；2005年11月22日
- 84) 水口裕之；改変アデノウイルスベクターによる遺伝子導入制御；「生物医工学サロン」第17回集会（大阪）；2005年11月9日
- 85) 水口裕之；ウイルスの超分子化学；「ナノバイオ基礎から最前線」—バイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出—（神奈川）；2005年11月2日
- 86) 川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、早川堯夫、水口裕之；再生医療への応用を目的とした胚性幹細胞（ES 細胞）および間葉系幹細胞への遺伝子導入系の開発；第55回日本薬学会近畿支部総会・大会（西宮市）；2005年10月29日
- 87) 喜田進也、前田光子、北條恵子、衛藤佑介、Jian-Qing Gao、倉知慎之輔、森重智弘、水口裕之、真弓忠範、中川晋作、川崎紘一；アデノウイルスベクター用細胞内移行ペプチドの合成；第55回日本薬学会近畿支部総会・大会（西宮市）；2005年10月29日
- 88) Toshiki Sugita, Jing-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa; Synergistic anti-tumor responses induced by the combination of a couple of stimulators: IL-12 and CCL27; 第78回 日本生化学会大会（神戸）2005年10月19-22日
- 89) Ryosuke Koretomo, Naoki Okada, Naoki Mori, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto; Lymphoid tissue directivity and vaccine efficacy of dendritic cells transduced with CCR7 gene by using RGD fiber-mutant adenoviral vector; 20th JSSX-13th NA ISSX Joint Meeting; Oct 23-27
- 90) Masakazu Niwa, Naoki Okada, Akinori Sasaki, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto ; Analysis of immune cell-recruitment and tumor suppressive effect in murine B16BL6 melanoma injected with chemokine-expressing adenoviral vector; 20th JSSX-13th NA ISSX Joint Meeting; Oct 23-27
- 91) 櫻井文教、川端健二、山口照英、早川堯夫、水口裕之；新規アデノウイルスベクターを用いたヒト造血前駆細胞への遺伝子導入の最適化；第64回日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日
- 92) 衛藤佑介、倉知慎之輔、水口裕之、堤康央、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；腫瘍ターゲティングを目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの開発；第64回日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日
- 93) 川端健二、櫻井文教、早川堯夫、水口裕之；SDF-1 発現アデノウイルスベクターによる血液前駆細胞の骨髄からの動員；第64回日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日
- 94) 岡田直貴、岡田裕香、水口裕之、早川堯夫、中川晋作；腫瘍特異的プロモーターを搭載したファイバー改変型アデノウイルスベクターによるマウスメラノーマ自殺遺伝子治療；第64回

日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日

- 95) 細野哲司、佐藤陽治、山口照英、早川堯夫、水口裕之; Cre 組換え酵素を利用した RNAi による標的遺伝子発現抑制の調整；第 64 回日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日
- 96) 辛 紅兼、平雅彦、鈴木拓児、前門戸任、菊地利明、水口裕之、早川堯夫、貫和敏博、西條康夫；骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いた癌組織をターゲティングする免疫遺伝子細胞治療開発；第 64 回日本癌学会総会（札幌）；2005年9月14-16日
- 97) 水口裕之；カプシドタンパク質の改変によるアデノウイルスベクターの遺伝子導入制御；遺伝子・デリバリー研究会 第5回 夏期セミナー（箱根）；2005年8月2日
- 98) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発と遺伝子機能解析、遺伝子治療、ワクチン等への応用；彩都シンポジウム&サイエンスセミナーSP（大阪）；2005年7月
- 99) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi；Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction in human hematopoietic progenitors；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 100) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Naoya Koizumi, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi；Characterization of adenovirus serotype 35 vector-mediated *in vivo* transduction using human CD46-transgenic mice；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 101) Asami Ino, Yasuhiro Naito, Hiroyuki Mizuguchi, Naofumi Handa, Takao Hayakawa, Ichizo Kobayashi；A trial of somatic gene targeting *in vivo* with an adenovirus vector；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 102) Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Yoshiteru Watanabe, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi；Ablating CAR and integrins binding and fiber shaft exchange in adenovirus vectors reduces tissue transduction and toxicity after systemic administration；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 103) Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Naoya Koizumi, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi；Mobilization of hematopoietic progenitor cells and pre-B cells from the bone marrow by a SDF-1-expressing fiber-modified adenovirus vector；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 104) Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Tomomi Sasaki, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa；Optimized gene transfer into mesenchymal stem cells and embryonic stem cells by modified adenovirus vectors；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 105) Toshiki Sugita, Jian-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa；Enhanced anti-tumor responses induced by the combination of a couple of stimulators: IL-12 and CCL27；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 106) Ke-Qin Xin, Kenji Someya, Hiroyuki Mizuguchi, Fumihiko Takeshita, Shin Sasaki, Mitsuo Honda, Kenji Okuda；Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type5 vector with type35 fiber (AD5/35) induces protective immunity against SHIV<sub>89.6P</sub> infection in monkeys；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日
- 107) Masahiko Kanehira, Hong Xin, Makoto Maemondo, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Toshihiro Nukiwa, Yasuo Saij；Tumor targeting anti-angiogenic gene therapy using NK4-expressing bone marrow-derived mesenchymal stem cell；第 11 回日本遺伝子治療学会（東京）；2005年7月28-30日