108)櫻井文教、佐々木朋美、川端健二、小泉直也、井上直和、岡部勝、山口照英、早川堯夫、水口裕之;CD46 トランスジェニックマウスを用いた35型アデノウイルスベクターのin vivo機能評価;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

109)小泉直也、川端健二、櫻井文教、渡邊善照、早川堯夫、水口裕之;ターゲティングデリバリーを目的とした非特異的遺伝子導入を抑えたアデノウイルスベクターの開発;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

110)川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、早川堯夫、水口裕之;改良型アデノウイルスベクターを用いた各種幹細胞への高効率遺伝子導入;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

111)森重智弘、衛藤佑介、倉知慎之輔、小泉直也、姚醒蕾、水口裕之、堤康央、早川堯夫、真弓忠範、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の EPR 効果に関する検討;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

112)杉田敏樹、高建青、金川尚子、本村吉章、飯田恵介、堤　康央、水口裕之、義江修、真弓忠範、中川晋作;IL-12及びCCL27発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果とその有効性評価;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

113)金川尚子、杉田敏樹、高建青、本村吉章、飯田恵介、柳川達也、堤康央、水口裕之、真弓忠範、中川晋作;IL-12発現アデノウイルスベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫細胞の腫瘍内浸潤;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

114)本村吉章、杉田敏樹、高建青、金川尚子、飯田恵介、堤康央、水口裕之、義江修、真弓忠範、中川晋作;IL-12及びCCL27発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果増強機構の解明;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

115)丹羽貴子、吉川友章、小田淳史、飯田恵介、松尾一彦、下川摩里子、岡田直貴、堤康央、水口裕之、中川晋作;活性増強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腫瘍ワクチン療法;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

116)高橋梓、近藤昌夫、増山茜、原田東樹、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照;タイトジャンクション(TJ)構成蛋白質claudinを利用した新規DDS方法の確立;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

117)細野哲司、佐藤陽治、山口照英、早川堯夫、水口裕之;RNAiによる標的遺伝子発現抑制を解除するベクター系の開発;第21回日本DDS学会(長崎);2005年7月22-23日

118)Xin, H., Kanehira, M., Mizugchi, H., Hayakawa, T., Nukiwa, T. and Saijo, Y.; Tumor-targeting innumogene therapy by mesenchymal stem cells expressing CX3CL1; American Society of Gene Therapy(St. Louis, USA);2005年6月1-5日

119)Mizuguchi, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Sasaki, T., Yamaguchi, T. and Hayakawa, T.; Optimized gene transfer into mesenchymal stem cells and embryonic stem cells by modified adenovirus vectors; American Society of Gene Therapy(St. Louis, USA);2005年6月1-5日

120)Koizumi, N., Mizuguchi, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Watanabe, Y. and Hayakawa, T.; Reductions in tissue transduction and toxicity after systemic administration of adenovirus vectors containing fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and αv integrin-binding ablation; American Society of Gene Therapy(St. Louis, USA);2005年6月1-5日

121)Hama, S., Akita, H., Ito, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T. and Harashima, H.; Quantitative Comparison of the intracellular trafficking and expression pattern of the exogenous genes between the adenovirus and artificial vector; American Society of Gene Therapy(St. Louis, USA);2005年6月1-5日

122)Sakurai, F., Mizuguchi, H., Kawabata, K., Yamaguchi, T. and Hayakawa, T; Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for

efficient transduction in human hematopoietic progenitors; comparison of promoter activities ; American Society of Gene Therapy(St. Louis, USA) ; 2005 年 6 月 1-5 日

123) Harui, A., Sanghvi, M., Vira, D., Mizuguchi, H., Roth, M.D., Basak, S. ; Integrin alpha v (αν) expression on dendritic cells identifies a subset with unique antigen presentating activity following adenoviral transduction ; American Association of Cancer Research 96th Annual Meeting 2005(Anaheim, USA) ; 2005年4月16-20日

124) Harui, A., Vira, D., Sanghvi, M., Mizuguchi, H., Roth, M.D., Basak, S. ; Enhancing dendritic cells transduction by combining RGD-adenovirus vectors with centrifugation ; American Association of Cancer Research 96th Annual Meeting 2005(Anaheim, USA) ; 2005 年 4 月 16-20 日

125) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Tomohiro Morishige, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa ; Modification of adenovirus vector with polyethylene glycol enhances accumulation and gene expression in tumor via intravenous injection ; AACR (American Association for Cancer Research) 96th Annual Meeting 2005 (CA, USA) ; 2005 年 4 月 16-20 日

126) 水口裕之；遺伝子の機能解析基盤技術 -改良型アデノウイルスベクターからRNAiまで-日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

127) 増山茜、近藤昌夫、高橋梓、藤井まき子、水口裕之、早川尭夫、渡辺善照；ウェルシュ菌エンテロトキシンC末断片の吸収促進作用におけるClaudin-4 の関与；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

128) 丹羽貴子、吉川友章、小田淳史、下川摩里子、岡田直貴、堤　康央、水口裕之、早川堯夫、麻生定光、太田成男、真弓忠範、中川晋作；変異型 Bcl-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-1；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

129) 吉川友章、丹羽貴子、小田淳史、下川摩里子、岡田直貴、堤　康央、水口裕之、早川堯夫、麻生定光、太田成男、真弓忠範、中川晋作；変異型 Bcl-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

130) 杉田敏樹、高　建青、金川尚子、飯田恵介、本村吉章、畑中　豊、谷　洋一、中山隆志、義江修、水口裕之、早川堯夫、岡田直貴、堤　康央、真弓忠範、中川晋作；IL-12 と CCL27 の併用による抗腫瘍効果増強機構の解明；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

131) 小泉直也、水口裕之、中川晋作、真弓忠範、渡辺善照、早川堯夫；標的細胞へのターゲティングを目指した抗体結合能を持つアデノウイルスベクターの開発；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

132) 川端健二、水口裕之、櫻井文教、山口照英、早川堯夫；ES 細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

133) 金川尚子、高　建青、杉田敏樹、飯田恵介、本村吉章、衛藤佑介、水口裕之、早川堯夫、堤　康央、真弓忠範、中川晋作；IL-12 発現アデノウイルスベクターを用いた IL-12 非奏功性腫瘍に対する治療効果に関する検討；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

134) 倉知慎之輔、衛藤佑介、高建青、森重智弘、櫻井文教、水口裕之、早川堯夫、堤 康央、真弓忠範、中川晋作；Polyethylene Glycol 修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

135) 衛藤佑介、高 建青、倉知慎之輔、森重智弘、櫻井文教、水口裕之、早川堯夫、堤 康央、真弓忠範、中川晋作；体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討；日本薬剤学会第 20 年会（東京）；2005 年 3 月 25-27 日

136) 中川晋作；Cell Delivery System に基く癌免疫療法の最適化；日本薬学会 125 年会（東京）；2005 年 3 月 29-31 日

137) 小泉直也、近藤昌夫、水口裕之、中西剛、藤井まき子、早川堯夫、中島恵美、田中慶一、渡辺善照；胎盤由来細胞への改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討；日本薬剤学会第 20 年会（東京）2005 年 3 月 25-27 日

138) 藤原俊哉、香川俊輔、岸本浩行、遠藤芳克、田中紀章、藤原俊義、水口裕之；テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス Telomelysin(OBP-301)と微小管作用型抗癌剤の併用効果の検討；第 9 回遺伝子医療研究会(大阪) 2005 年 3 月 12 日

139) 岸本浩行、香川俊輔、藤原俊哉、遠藤芳克、日置勝義、京哲、水口裕之、田中紀章、藤原俊義；GFP 発現テロメラーゼ特異的制限増殖型ウイルス Telomelysin-GFP を用いた腫瘍組織ナビゲーション・システム；第 9 回遺伝子医療研究会(大阪) 2005 年 3 月 12 日

140) 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」ーバイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出ー（神奈川）；2004 年 12 月 15 日

141) 水口裕之；遺伝子機能解析や遺伝子治療に向けた改良型アデノウイルスベクターの開発；横浜市立大学医学部特別講演；2004 年 12 月 14 日

142) 岡田直貴、中川晋作、畑中　豊、谷　洋一、中山隆志、義江　修、水口裕之、早川堯夫、藤田卓也、山本　昌；ケモカイン発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫細胞浸潤；第 34 回日本免疫学会総会・学術集会（札幌）；2004 年 12 月 1-3 日

143) 住本秀敏、山形志津子、宮岸真、多比良和誠、水口裕之、早川堯夫、河上裕；RNA 干渉法による、ヒト樹状細胞 TLR4 シグナルにおける SOCS-1 のネガティブフィードバック機構の解析；第 34 回日本免疫学会総会・学術集会（札幌）；2004 年 12 月 1-3 日

144) Jian-Qing Gao, Toshiki Sugita, Hiroyuki Mizuguchi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa : Synergistic anti-tumor response induced by the combination of a couple of stimulators: cytokine and chemokine. 11th Hong Kong International Cancer Congress 2004 (Hong Kong) ; 2004 年 11 月

145) 高　建青、杉田敏樹、金川尚子、飯田恵介、中山隆志、水口裕之、早川堯夫、義江　修、堤　康央、真弓忠範、中川晋作：Cell Delivery System に基く癌免疫療法の最適化, 日本薬学会近畿支部大会（神戸）；2004 年 10 月

146) 杉田敏樹、高　建青、金川尚子、畑中　豊、谷　洋一、中山隆志、義江　修、水口裕之、早川堯夫、岡田直貴、堤　康央、真弓忠範、中川晋作：Cell Delivery System による癌免疫療法の最適化, ファーマ・バイオフォーラム 2004（東京）；2004 年 11 月

147) 細野哲司、水口裕之、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯；ドキソサイクリン誘導型 siRNA 発現アデノウイルスベクターの開発；第 63 回日本癌学会総会（福岡）；2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日

148) 岡田直貴、水口裕之、早川堯夫、義江　修、中川晋作、藤田卓也、山本　昌；リンパ組織指向性樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用；第 63 回日本癌学会総会（福岡）；2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日

149) Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa: Development of an adenoviral vector system for embryonic stem (ES) cells; 第 10 回日本遺伝子治療学会（東京）；2004 年 8 月 5-6 日

150) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice.；第 10 回日本遺伝子治療学会（東京）；2004 年 8 月 5-6 日

151) Ke-Qin Xin, Kenji Someya, Fumihiko Takeshita, Shin Sasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Kenji Hamajima, Mitsuo Honda, Kenji Okuda; Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type5 vector with type35 fiber induces persistent protective immunity against HIV in mice; 第

10回日本遺伝子治療学会（東京）；2004年8月5-6日

152) Hong Xin, Masahiro Kanehira, Sita Andarini, Toshiaki Kikuchi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Toshihiro Nukiwa, Yasuo Saijo: Tumor-targeting immunogene therapy by mesenchymal stem cells expressing CX3CL1; 第10回日本遺伝子治療学会（東京）；2004年8月5-6日

153) Hidetoshi Sumimoto, Makoto Miyagishi, Hiroyuki Miyoshi, Hiroyuki Mizuguchi, Shizuko Yamagata, Ayako Shimizu, Takao Hayakawa, Kazunari Taira, Yutaka Kawakami: Gene therapy for human cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. ；第10回日本遺伝子治療学会（東京）；2004年8月5-6日

154) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa: PEGylation of adenovirus vector enhances gene expression in tumor via systemic administration ；第10回日本遺伝子治療学会（東京）；2004年8月5-6日

155) 細野哲司、水口裕之、形山和史、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯夫；PPAR・に対するsiRNA発現アデノウイルスベクターを用いた培養マウス脂肪前駆細胞の分化抑制；第20回日本DDS学会（東京）；2004年7月15-16日

156) 櫻井文教、水口裕之、川端健二、井上直和、岡部勝、佐々木朋美、福島敬、山口照英、早川堯夫；CD46トランスジェニックマウスを用いた35型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性の解析；第20回日本DDS学会（東京）；2004年7月15-16日

157) 倉知慎之輔、衛藤佑介、高建青、堤康央、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターのin vivo遺伝子発現特性に関する研究；第20回日本DDS学会（東京）；2004年7月15-16日

158) 中川晋作；機能性細胞の創製とCell Delivery System；第20回日本DDS学会（東京）；2004年7月15-16日

159) 萩山裕之、上阪　等、水口裕之、早川堯夫、宮坂信之；関節リウマチの遺伝子治療にむけたウイルスベクター発現カセットの改変；第25回日本炎症・再生医学会（東京）；2004年7月13-14日

160) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発とその応用；第25回日本炎症・再生医学会（東京）；2004年7月13-14日

161) 水口裕之；改良型アデノウイルスベクターの開発；ウイルス学湯河原キャンプ（静岡）；2004年6月16-17日

162) 水口裕之；次世代アデノウイルスベクターの開発とRNA干渉；第10回日本生化学会近畿支部テクニカルセミナー「RNA干渉とアデノウイルス－理論と実践－」（京都）；2004年6月5日

163) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa: Role of CD46 on Ad35 vector-mediated transduction. American Society of Gene Therapy, 6th Annal Meeting, Minneapolis (2004. 6)

164) Takafumi Nakamura, Kah-Whye Peng, Sompong Vongpunsawad, Mary Harvey, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Roberto Cattaneo, Stephen J. Russel: Antibody-targeted fusion has great potential as a new research tool and provides a versatile platform for novel targeted therapies. American Society of Gene Therapy, 6th Annal Meeting, Minneapolis (2004. 6)

165) Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Yoshiteru Watanabe, Takao Hayakawa: Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α v integrin-binding ablation ；2nd Pharmaceutical sciences world congress（京都）；2004年5月30日-6月3日

166) Jian-Qing Gao, Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi

Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi: Enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor induced by the PEGylation ; 2nd Pharmaceutical sciences world congress（京都）；2004年5月30日-6月3日

167) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi: PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides show high transduction efficiency and protection ability from neutralizing antibodies ; 2nd Pharmaceutical sciences world congress（京都）；2004年5月30日-6月3日

168) 水口裕之；遺伝子治療とベクター開発；北海道大学大学院薬学研究科大学院講義（札幌）；2004年5月28日

169) 杉田敏樹、高建青、Alexandre Learth Soares、衛藤佑介、倉知慎之輔、中山隆志、水口裕之、早川堯夫、義江修、堤康央、真弓忠範、中川晋作；Cell Delivery Systemによる癌遺伝子治療の最適化；第４回遺伝子・デリバリー研究会（京都）；2004年5月

170) 衛藤佑介、倉知慎之輔、高建青、堤康央、水口裕之、前田光子、川崎鉱一、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；体内動態制御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創製；第４回遺伝子・デリバリー研究会（京都）；2004年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 水口裕之（発明人）（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団（出願人））；改良型アデノウイルスベクター及びその作製方法；特願2006-323777

2) 水口裕之（発明人）（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団（出願人））；アデノウイルスベクターおよびその作製方法；特願2006-243464

3) 中川晋作、岡田直貴、吉岡靖雄、川　紘一、前田光子（発明人）（国立大学法人大阪大学（出願人））；細胞内移行ペプチドを有効成分とする遺伝子導入補助および該遺伝子導入補助剤を利用した遺伝子導入方法；特願2006-332620

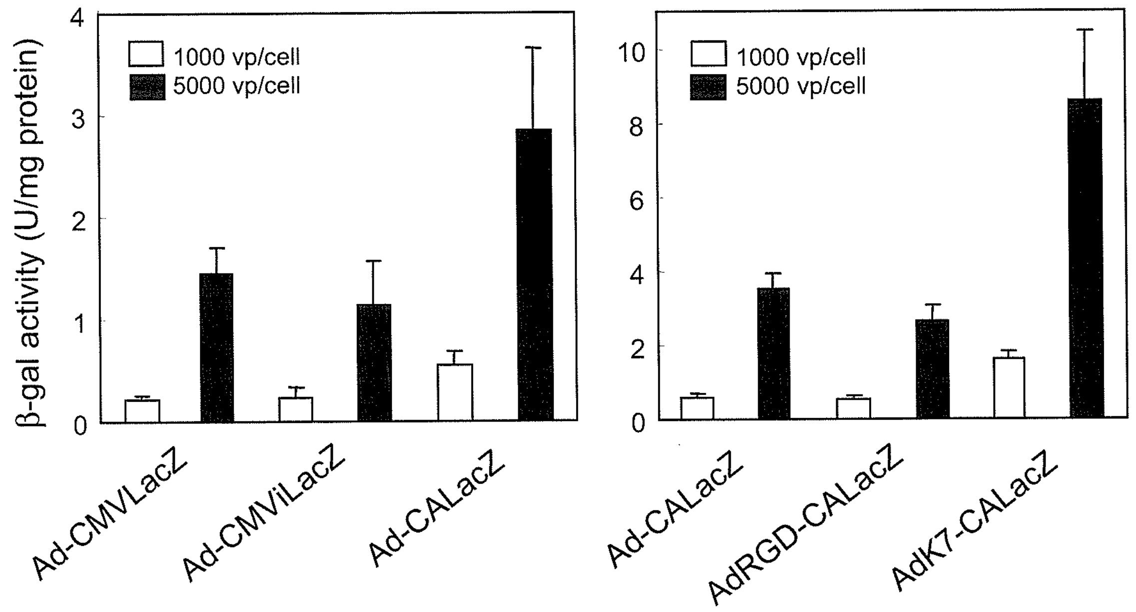
2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

A



B

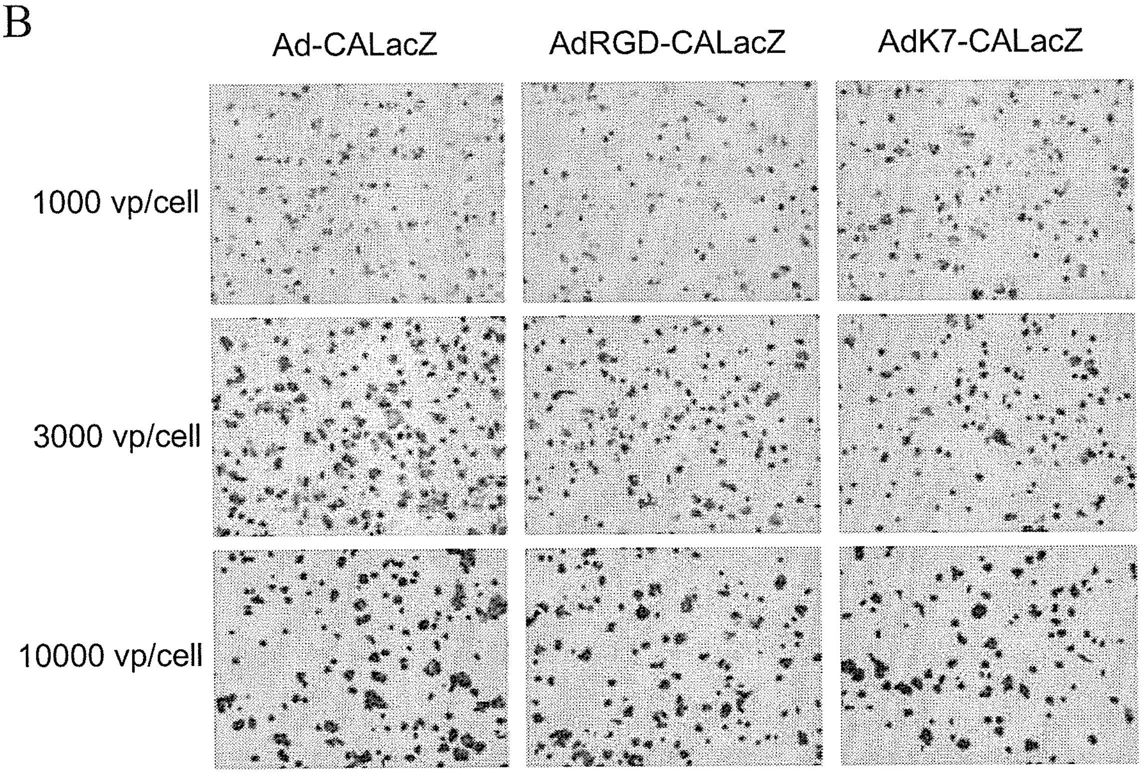


Fig.1 Comparison of the transduction efficiency of various type of Ad vectors into MIN6.
(A) MIN6 were transduced with conventional Ad vectors containing the CMV, CMVi, or CA promoter, and with various types of fiber-modified Ad vectors at 1000 or 5000 VP/cell for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the cells. β-galactosidase expression in the cells was measured by a luminescence assay 24 hours later. The data are expressed as mean ± S.D.(n=3). (B) MIN6 were transduced with various types of fiber-modified Ad vectors at 1000, 3000, or 10000 VP/cell for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the cells. X-gal staining was performed 24 hours later.

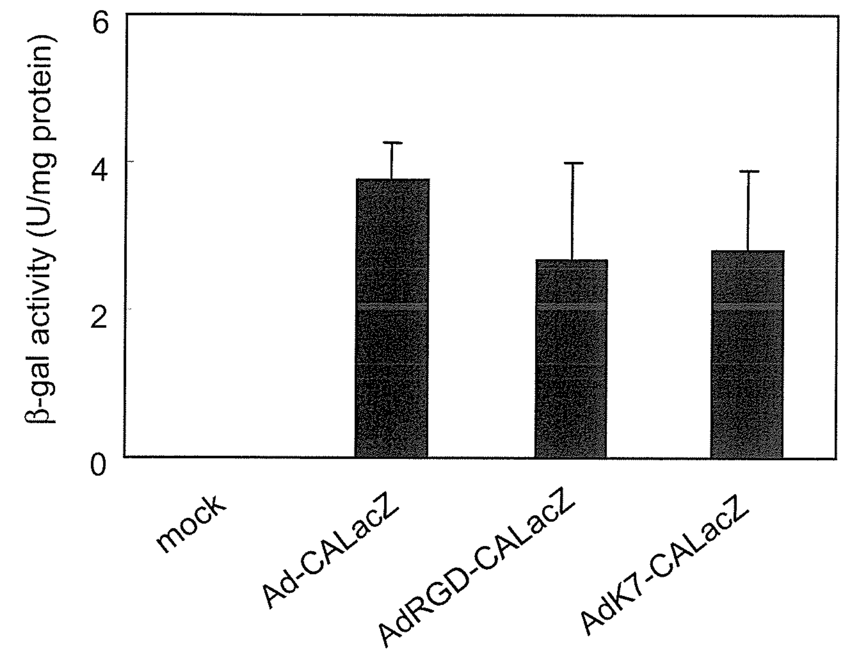


Fig.2 The transduction efficiency of various types of fiber-modified Ad vectors into pancreatic islets.
Isolated mouse pancreatic islets were transduced with various types of fiber-modified Ad vectors at $2x10^9$ VP/100-200 islets for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the islets. β-galactosidase expression in the islets was measured by a luminescence assay 24 hours later.
The data are expressed as mean ± S.D.(n=3).

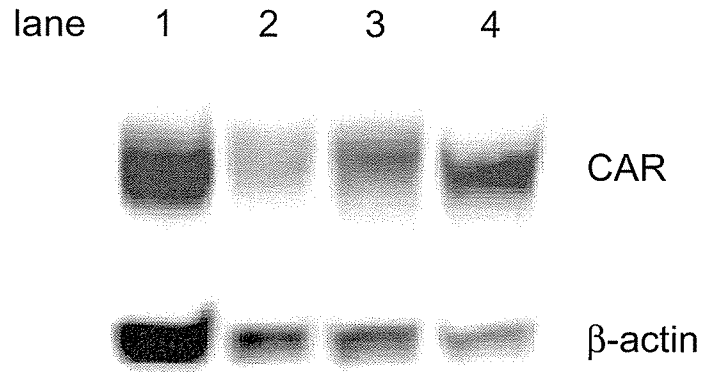


Fig.3 Western blotting analyses.
Lysates of B16CAR (lane 1), fresh (lane 2), 20 hours-cultured (lane 3) mouse islets, and MIN6 (lane 4) were subjected to Western blotting using an anti-mouse CAR or anti-β-actin antibody.

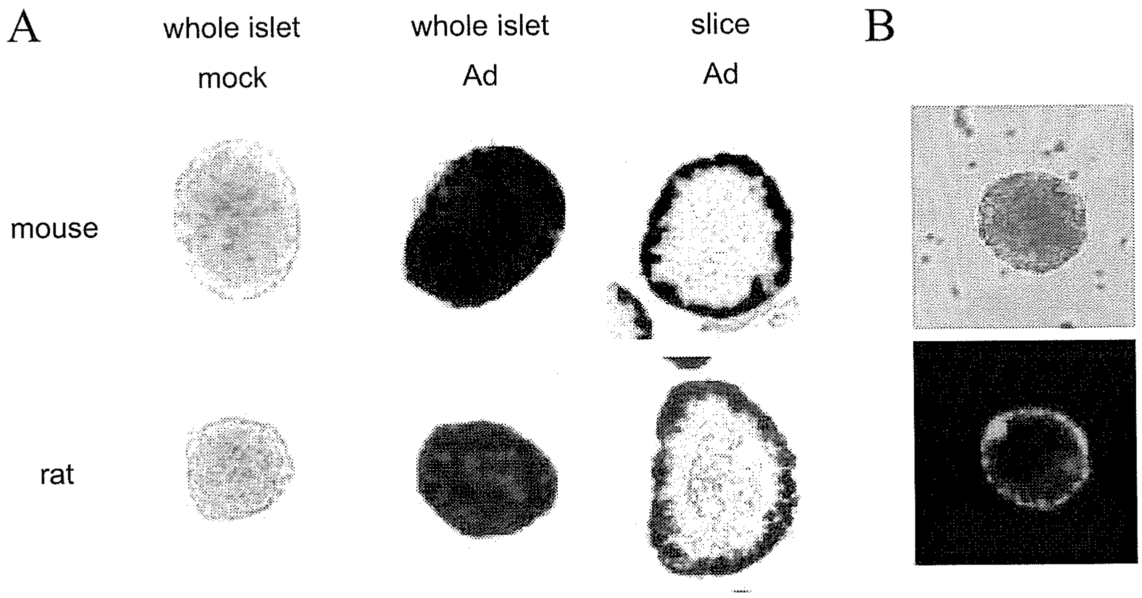


Fig.4 Ad vector transduction into pancreatic islets *in vitro*.
(A) Mouse or rat islets were transduced with 2×10^9 VP/100-200 islets of Ad-CALacZ for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the islets. X-gal staining was performed 24 hours later. (B) Mouse islets were transduced with 2×10^9 VP/100-200 islets of Ad-CAGFP for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the islets. Confocal microscopy was performed 24 hours later.

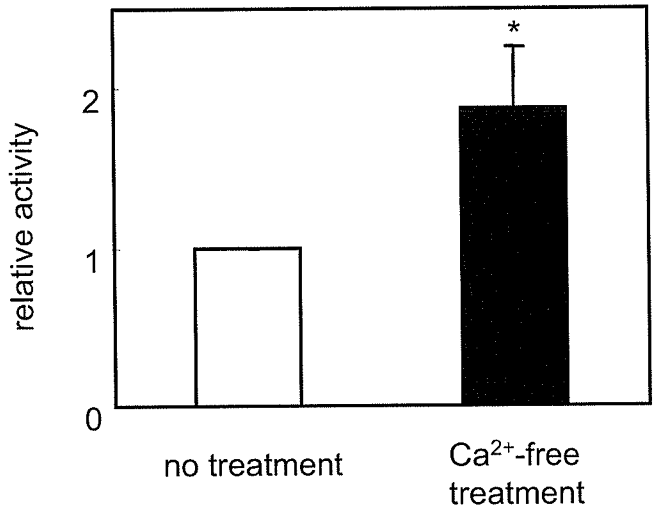


Fig.5 Effect of Ca^{2+}-free treatment on Ad vector transduction into pancreatic islets.
Mouse islets were preincubated in Ca^{2+}-free KRB buffer for 15 minutes before they were transduced with 2×10^9 VP/100-200 islets of Ad-CALacZ for one hour. Then, the medium containing the Ad vector was removed and fresh medium was added to the islets. β-galactosidase expression in the islets was measured by a luminescence assay 24 hours later. The β-galactosidase activity was represented for a ratio to that of untreated islets. The data are expressed as the mean ± S.D.(n=3). Statistical significance was evaluated by unpaired Student's t test. $^*p < 0.05$ vs. no treatment.

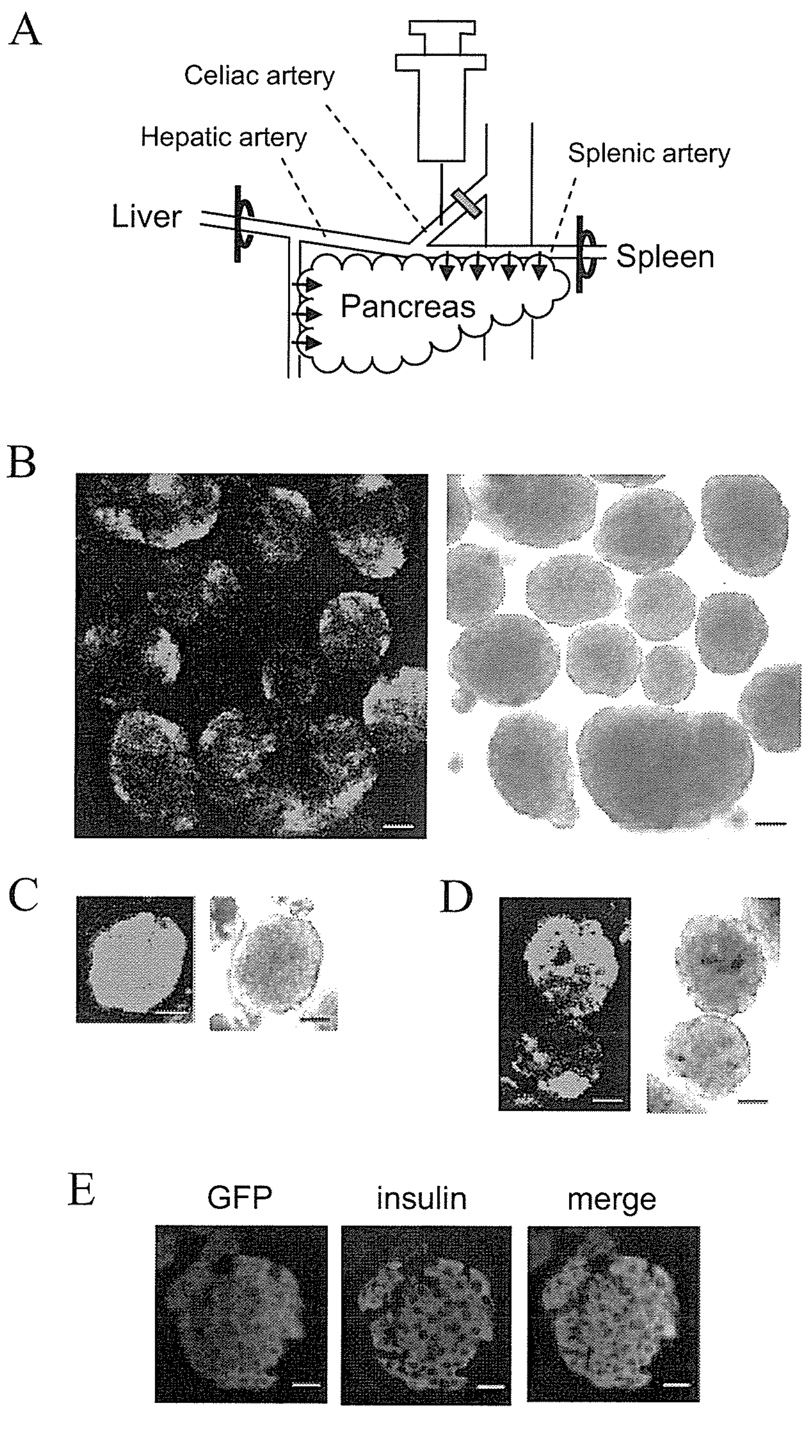


Fig.6 Ad vector transduction into pancreatic islets *in vivo*.
(A) Schema of Ad vector transduction *in vivo*. After ligation of the hepatic artery with the portal vein at the porta hepatis and the splenic artery at the hilum of the spleen, respectively, $1x10^{10}$ VP of Ad-CAGFP in 100 μl of PBS was injected into the lower side of the clamed point of the celiac artery. Five minutes later, pancreatic islets were isolated and cultured for 24 hours. (B-D) Confocal microscopic analyses of pancreatic islets of mice (B, C) and rats (D). An islet expressing GFP throughout the islet (C) was also observed. Each left panel and right panel represents the image of GFP-expressing islets and the corresponding visible image, respectively. Bars represent 50 μm. (E) Immunohistochemical analyses of sliced sections of mouse islets. Paraffin sections of islets were stained using an anti-insulin antibody and visualized with rhodamine. Bars represent 50 μm.

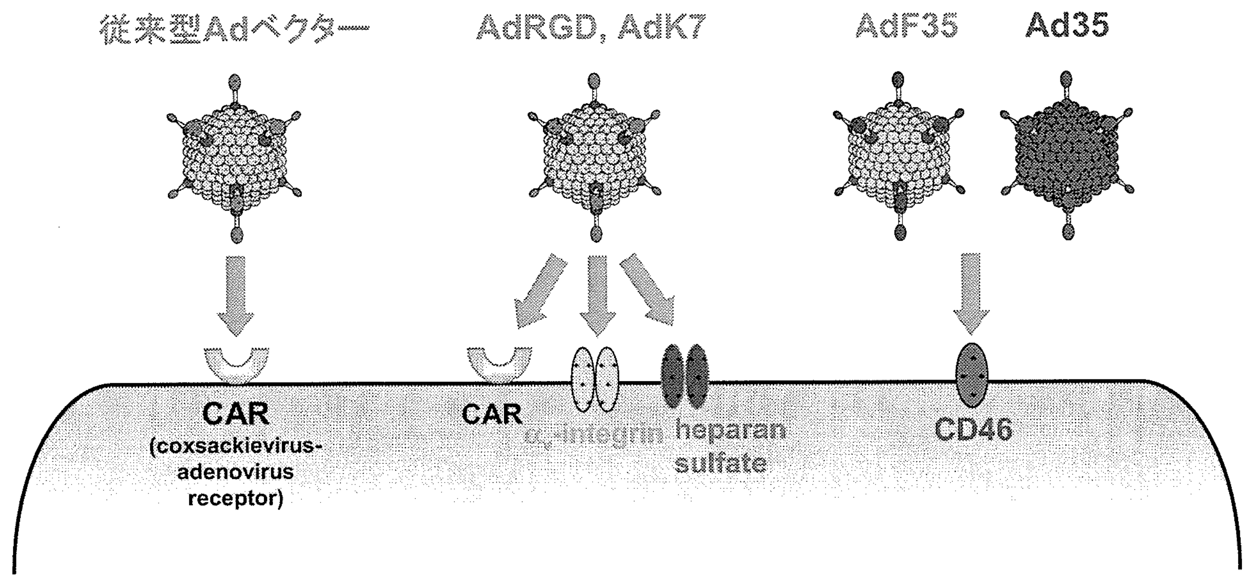


Fig.7. 改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
野生型のファイバーを持った従来型の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上の受容体であるCARを認識して感染するが、RGD配列やポリリジン（K7：リジンが7つつづく）配列をファイバーに有したファイバー改変ベクター（AdRGD, AdK7）はCARだけでなくαvインテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。また、ファイバー部分をサブグループBの35型アデノウイルスのファイバーに置換したベクター（AdF35）や、全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター（Ad35）は、CD46を認識して感染する。

Table 1. Adenovirus vectors used in the present study

Name	Fiber type	Promoter
Ad-EFLacZ	Type 5 fiber	EF-1α promoter
Ad-CMVLacZ	Type 5 fiber	CMV promoter
Ad-CMViLacZ	Type 5 fiber	CMV promoter with intron A
Ad-CALacZ	Type 5 fiber	CA promoter
AdRGD-CALacZ	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CA promoter
AdK7-CALacZ	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CA promoter
AdF35-CALacZ	Chimeric type 5 fiber tail and type 35 fiber knob and shaft	CA promoter

CA promoter: β-actin promoter/CMV enhancer with β-actin intron.

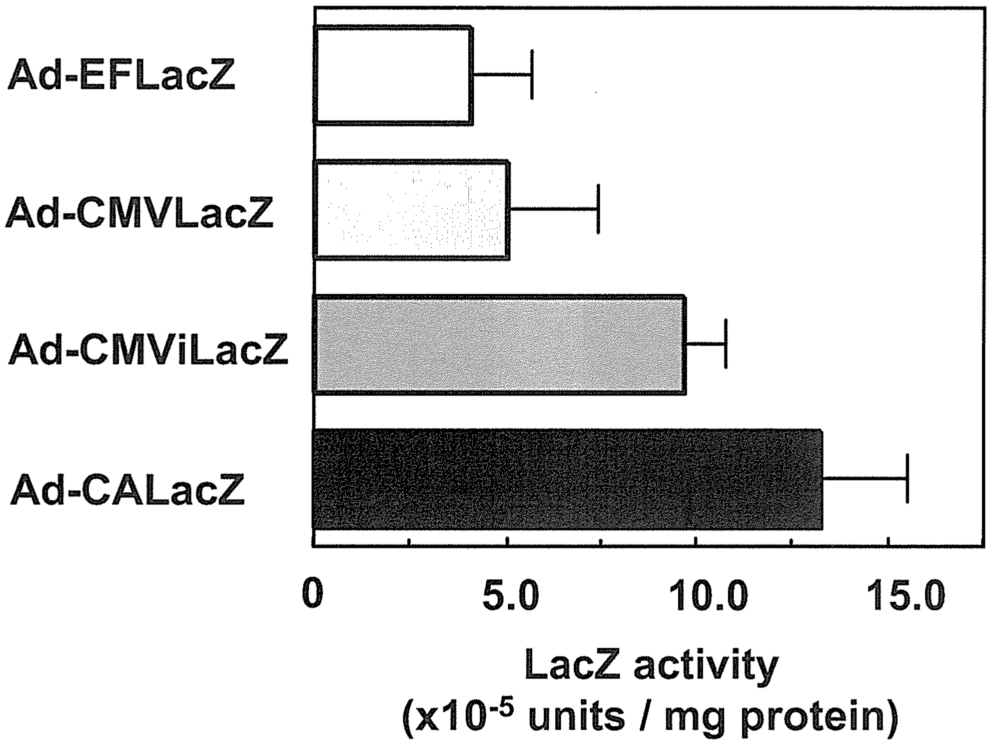


Fig. 8 Effects of the promoter sequences on Ad vector-mediated LacZ expression in hMSCs.

HMSCs were transduced with conventional Ad vectors containing the EF-1 α, CMV, CMV with intron A, or CA (ß-actin promoter/CMV enhancer) promoter (Ad-EFLacZ, Ad-CMVLacZ, Ad-CMViLacZ, or Ad-CALacZ, respectively) at 300 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing the Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. LacZ expression in the cells was measured by a luminescence assay 48 hours later. The data are expressed as means ± S.D. (n=4).

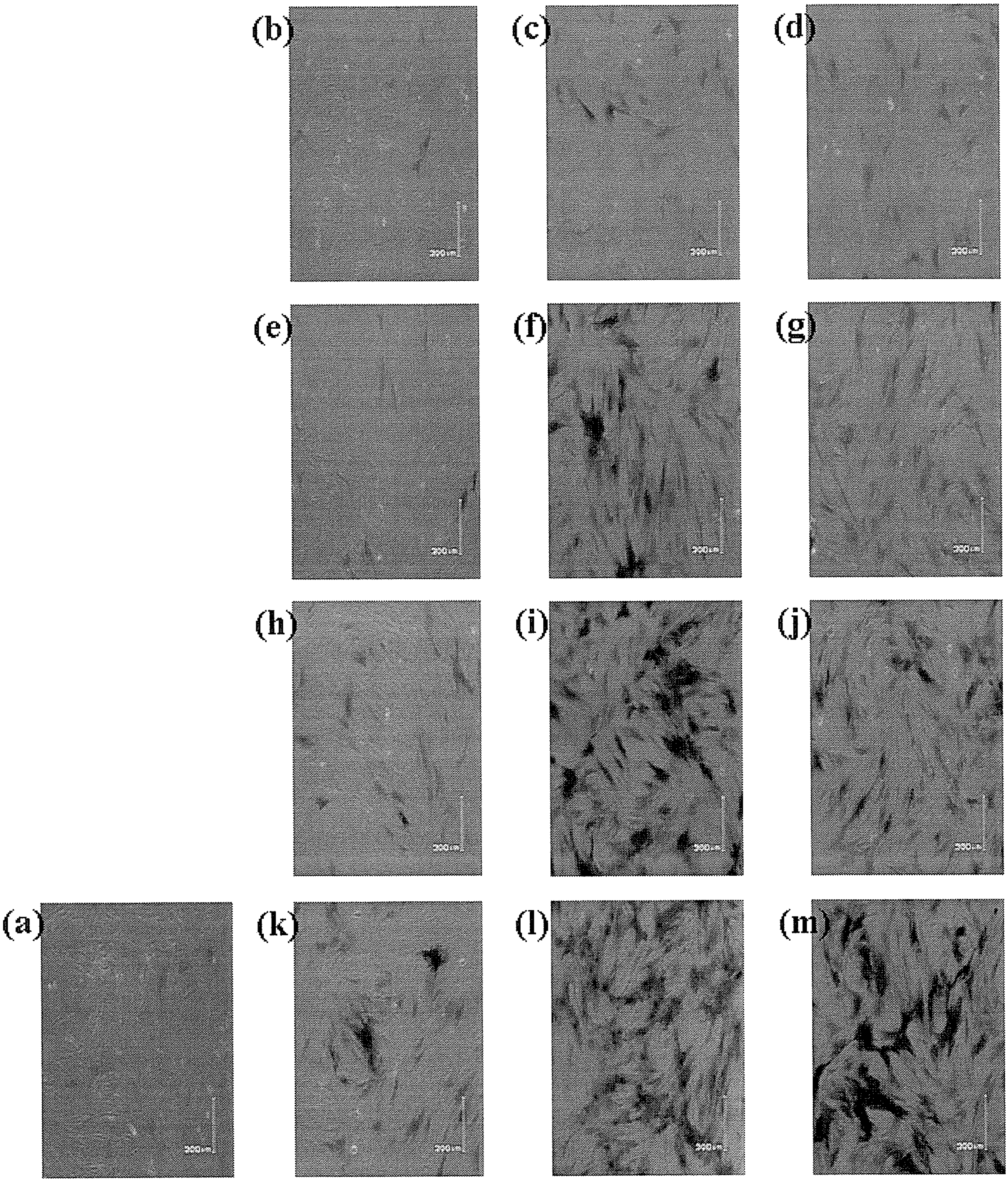


Fig. 9 X-gal staining of hMSCs transduced with various types of fiber-modified Ad vectors.

HMSCs were transduced with several Ad vectors, each containing one of the following: the wild-type fiber, RGD peptide in the HI loop of the fiber knob, polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob, or Ad type 35 fiber (Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ, or AdF35-CALacZ, respectively) at 100, 300, 1000, or 3000 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing the Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. X-gal staining was performed 48 hours later. (a) Ad-CALacZ; (b, e, h, k) AdRGD-CALacZ; (c, f, i, l) AdK7-CALacZ; (d, g, j, m) AdF35-CALacZ. (b, c, d) 100 VP/cell; (e, f, g) 300 VP/cell; (h, i, j) 1000 VP/cell; (a, k, l, m) 3000 VP/cell.

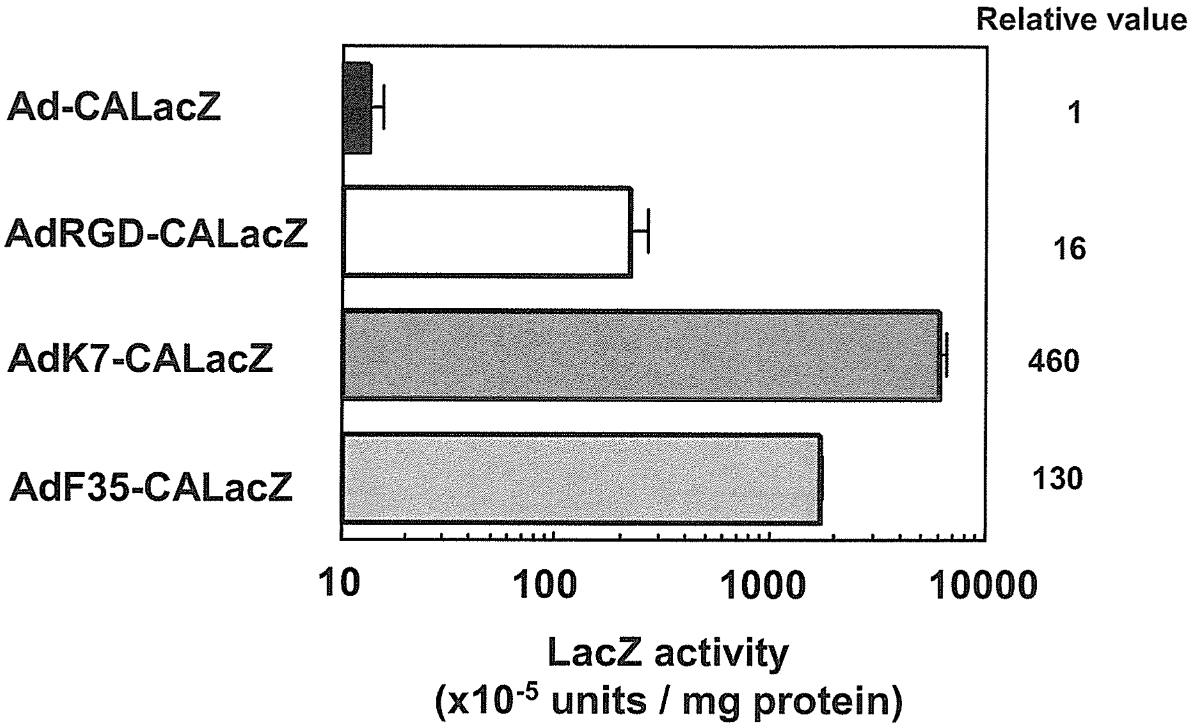


Fig.10 LacZ enzymatic activity of hMSCs transduced with various types of fiber-modified Ad vectors.
HMSCs were transduced with 300 VP/cell of Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ, or AdF35-CALacZ, respectively at 300 VP/cell for 1.5 hours. Then, the medium containing Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. LacZ expression in the cells was measured by a luminescence assay 48 hours later.

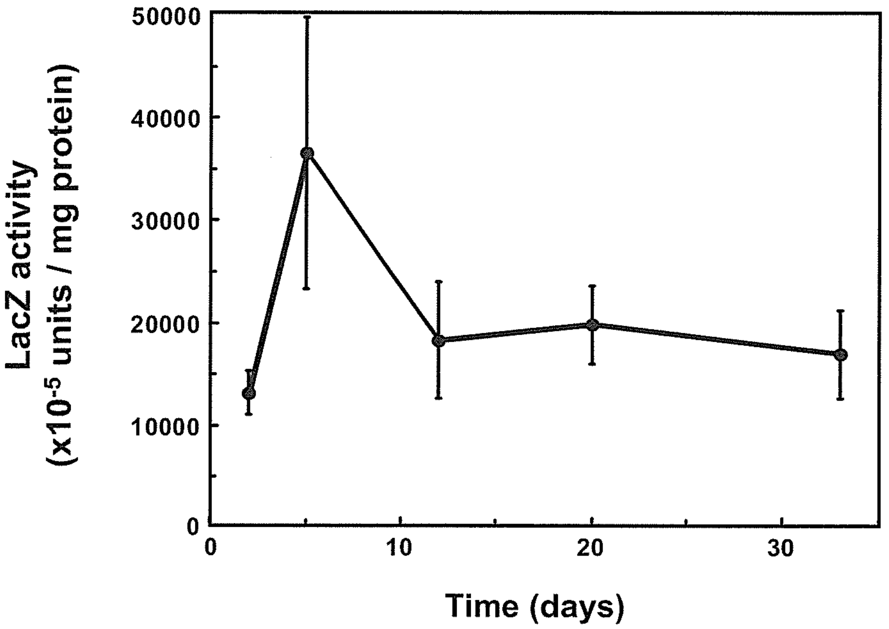


Fig. 11 Time course of LacZ expression in hMSCs transduced with AdK7-CALacZ.
HMSCs were transduced with 300 VP/cell of AdK7-CALacZ for 1.5 hours. Then, the medium containing Ad vectors was removed and fresh medium (MSCGM) was added to the cells. At the indicated times, LacZ expression in the cells was determined by a luminescence assay.
Data of X-gal staining are from one representative experiment of three performed. The data of a luminescence assay are expressed as means ± S.D. (n=4).

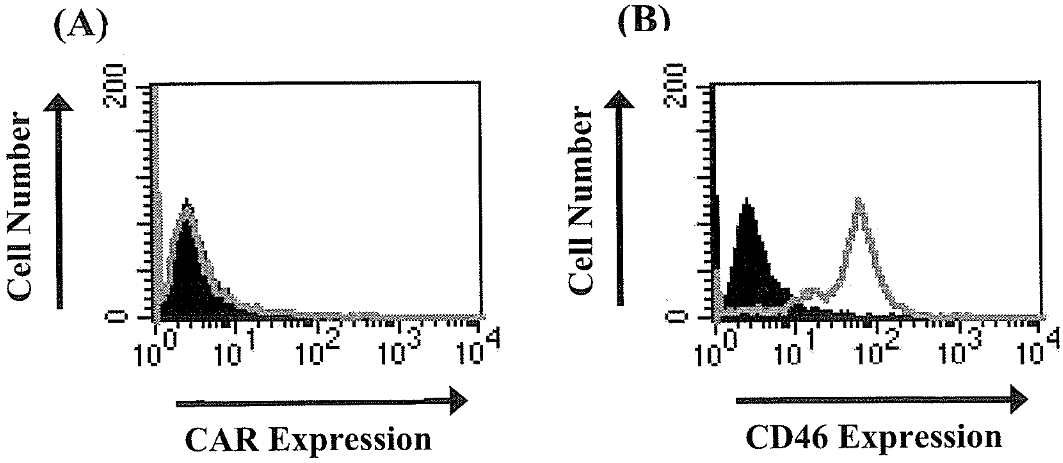


Fig. 12 Flow cytometric analysis of levels of CAR and CD46 expression in hMSCs.
HMSCs were labeled with (A) mouse monoclonal antibody RmcB (anti-human CAR) and then FITC-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody, or (B) FITC-conjugated anti-human CD46 antibody to detect human CAR or CD46 expression, respectively. As a negative control, the cells were incubated with an irrelevant antibody (shaded histogram). Flow cytometric analysis was performed by a FACSCalibur flow cytometer. Data shown are from one representative experiment of three performed.

Table.2 Adenovirus vectors used in the present study.

Name	Fiber type	Promoter
Ad-CMV-lacZ	Type 5 fiber	CMV promoter
AdRGD-CMV-lacZ	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CMV promoter
AdK7-CMV-lacZ	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CMV promoter
Ad-CA-lacZ	Type 5 fiber	CA promoter
AdRGD-CA-lacZ	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CA promoter
AdK7-CA-lacZ	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CA promoter

CA promoter: β-actin promoter/CMV enhancer with β-actin intron

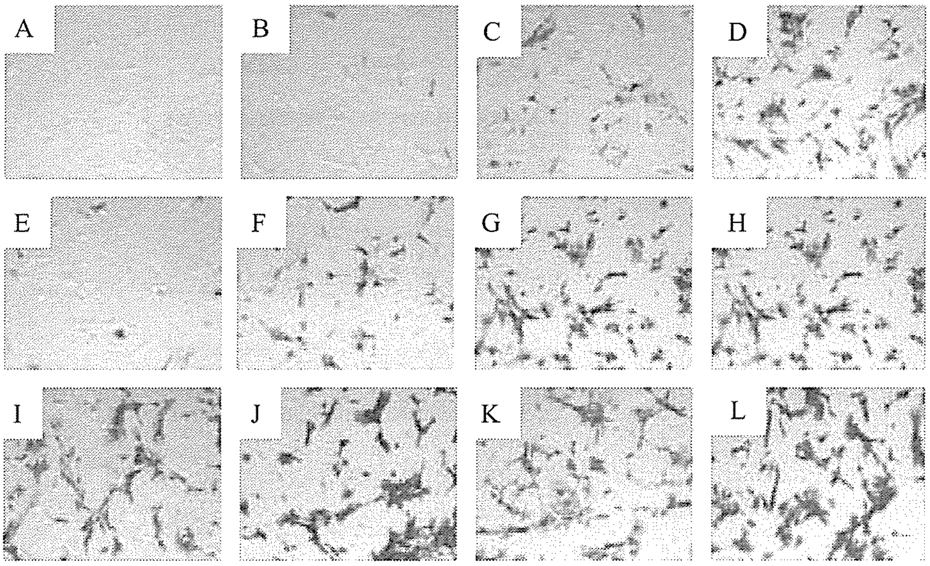


Fig.13 X-gal staining of mouse mesenchymal stem cells transduced with Ad vectors.
Mouse mesenchymal stem cells were transduced with 2500 VP/cell (A, C, E, G, I, K) or 12500 VP/cell (B, D, F, H, J, L) of Ad-CMV-lacZ (A, B), AdRGD-CMV-lacZ (E, F), AdK7-CMV-lacZ (I, J), Ad-CA-lacZ (C, D), AdRGD-CA-lacZ (G, H), or AdK7-CA-lacZ (K, L) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

Table 3 Primers for RT-PCR analysis

Gene		Sequence (5' to 3')	Parameter (° C)	Expected size (bp)
human CAR	Forward	AGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACG	65	366
	Reverse	TAGGACAGCAAAAGATGATAAGAC		
human αv integrin	Forward	GCCTATCTCCACGCACACTG	65	287
	Reverse	TTGGACCATTGTTTCTCAGC		
human β3 integrin	Forward	GAGGATGACTGTGTCGTCAG	65	232
	Reverse	CTGGCGCGTTCTTCCTCAAA		
human β5 integrin	Forward	GCCTATCTCCACGCACACTG	58	454
	Reverse	AGACTCCGACCCTTCCTGAC		
human β̃actin	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	60	275
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA		
rat CAR	Forward	ATGGATCCTACACCCGAACAGAGGATCG	53	280
	Reverse	GCGAATTCGCGTCGCCAGACTTGACAT		
rat αv integrin	Forward	GCCTATCTCCACGCACACTG	57	273
	Reverse	CGGGTGCTATCTGTCTTATG		
rat β3 integrin	Forward	TAATGATGGGCGCTGCCACA	58	279
	Reverse	CGTAAGCATCAACGATGAGC		
rat β5 integrin	Forward	TGTGTCTCTGCGGTGTTTGC	53	312
	Reverse	CCACGAGAACACCACAACAA		
rat GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC	60	452
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

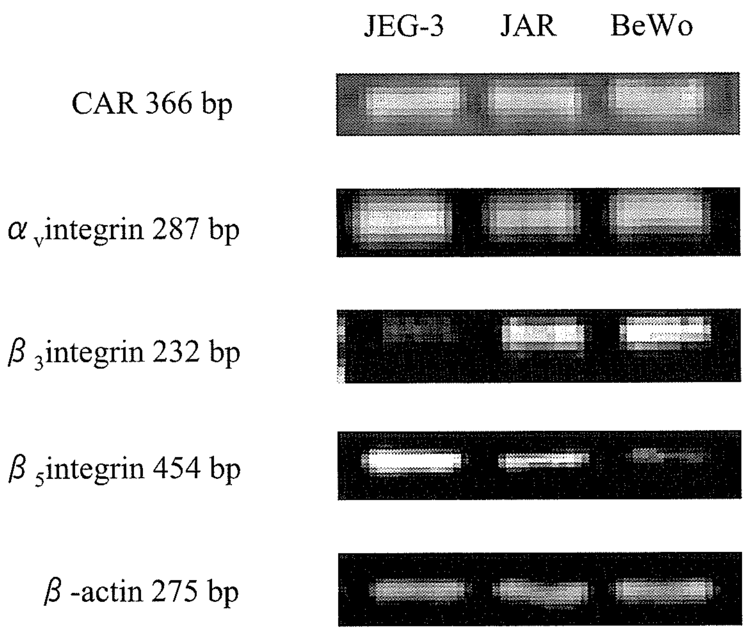


Fig. 14 RT-PCR analysis of CAR and integring (αv, β3, β5) and β-actin expression in human trophoblast cell lines.

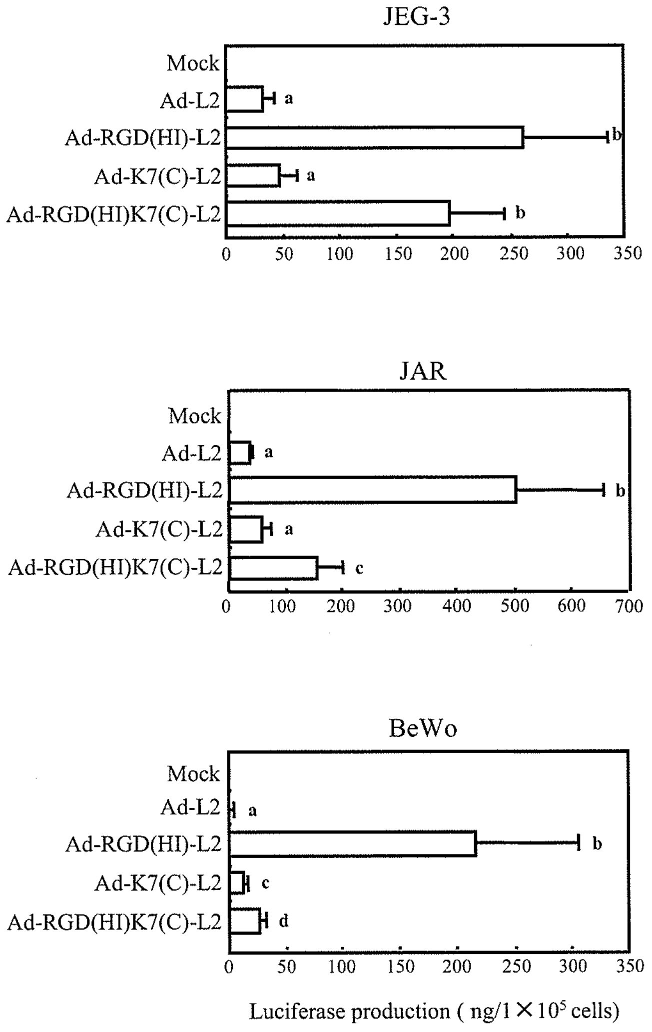


Fig. 15 Luciferase production in human trophoblast cell lines transduced by Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2 or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2.
Cells were transduced with 300 vector particles per cell for 1.5 h. A luminescent assay was used to measure luciferase production after 48 h of culture. Data are means ± SD (n=4). Significant difference is observed among the groups with different superscript letters ($p < 0.01$).

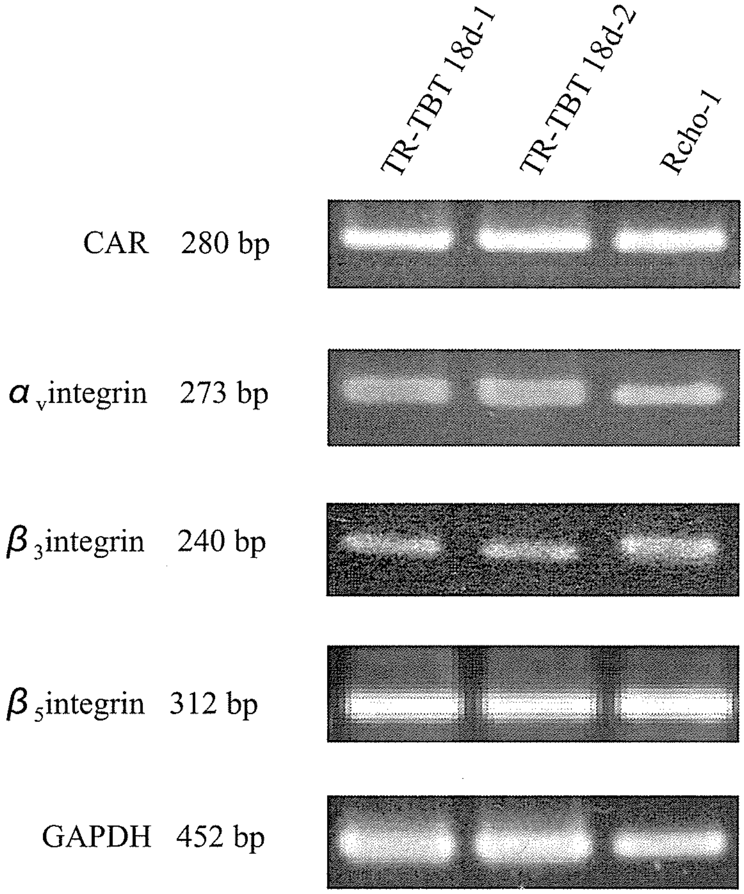


Fig. 16 RT-PCR analysis of CAR and integring (αv, β3, β5) and β-actin expression in rat trophoblast cell lines.

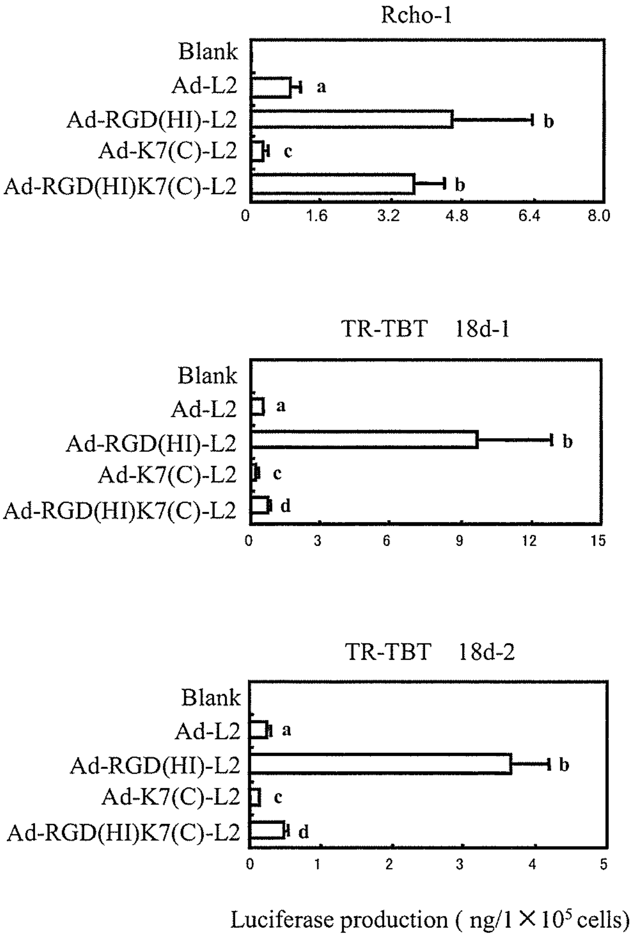


Fig. 17 Luciferase production in human trophoblast cell lines transduced by Ad-L2, Ad-RGD(HI)-L2, Ad-K7(C)-L2 or Ad-RGD(HI)-K7(C)-L2.
Cells were transduced with 300 vector particles per cell for 1.5 h. A luminescent assay was used to measure luciferase production after 48 h of culture. Data are means ± SD (n=4). Significant difference is observed among the groups with different superscript letters (p < 0.01).

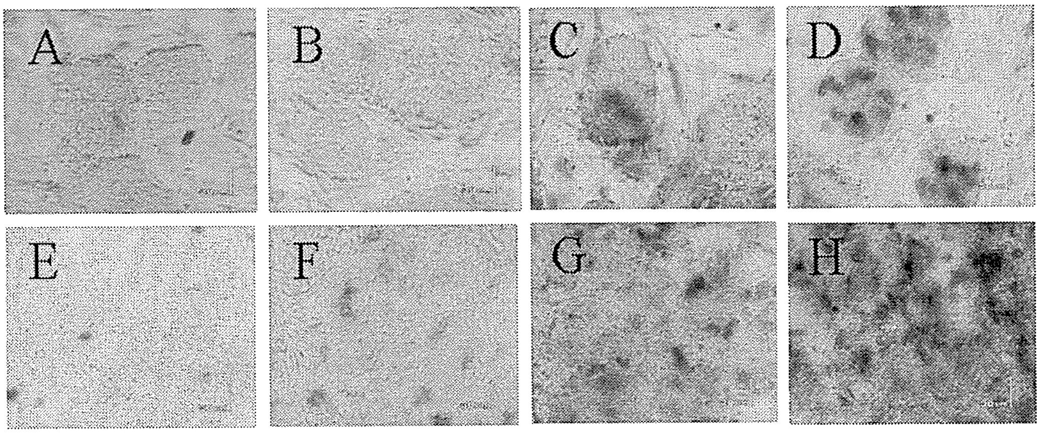
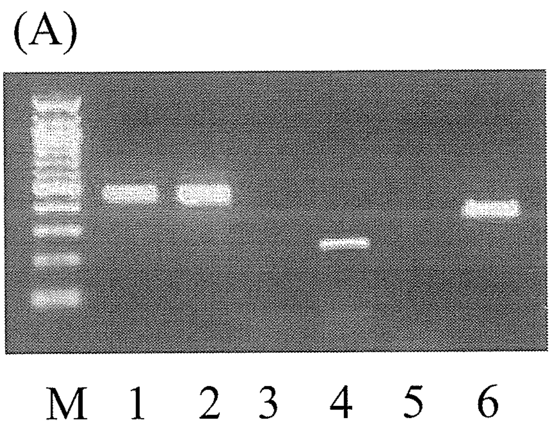


Fig. 18 X-gal staining of Ad vector-transduced mES cells.
mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-RSV-LacZ (A, E), Ad-CMV-LacZ (B, F), Ad-CA-LacZ (C, G), or Ad-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.



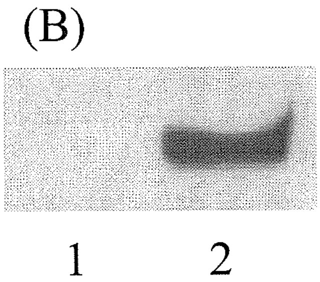


Fig. 19 CAR expression in mES cells.
(A) Total RNA from feeder cells (lanes 1, 3, 5) or mES cells on feeder cells (lanes 2, 4, 6) was purified and reverse-transcribed into cDNA, and then cDNA was amplified by PCR for analyzing the expression of G3PDH (lanes 1, 2), CAR (lanes 3, 4), and Oct-3/4 (lanes 5, 6). M represents molecular marker. (B) Cell lysate (20 μ g/lane) from feeder cells (lane 1) or mES cells on feeder cells (lane 2) were loaded onto a 12.5% SDS-polyacrylamide gel, electrophoresed, and subsequently transferred to the membrane. The immunoblot was probed with a polyclonal antibody for mouse CAR.

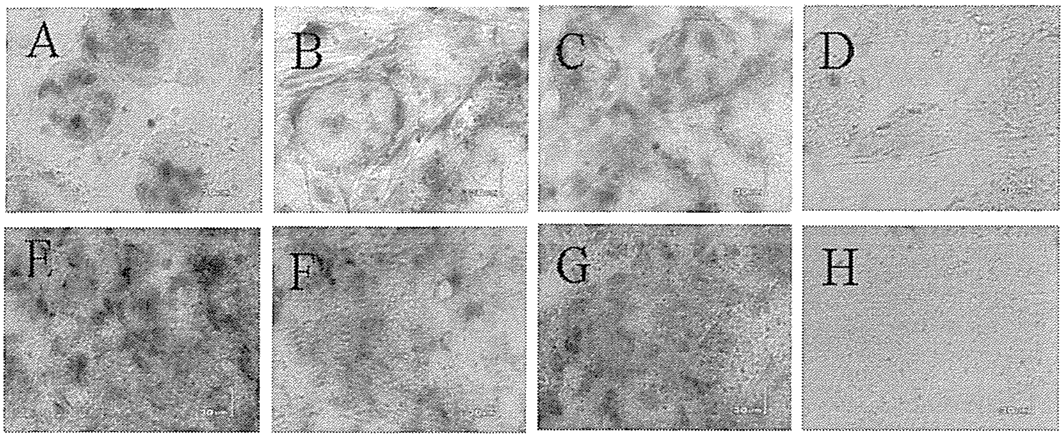


Fig. 20 X-gal staining of mES cells transduced with fiber-modified Ad vectors.
mES cells on feeder cells (A-D) or on gelatin-coated dishes (E-H) were transduced with 3000 VP/cell of Ad-EF-LacZ (A, E; the figures correspond to those in Fig. 1), AdRGD-EF-LacZ (B, F), AdK7-EF-LacZ (C, G), or AdF35-EF-LacZ (D, H) for 1.5 hr. Two days after infection, X-gal staining was performed.

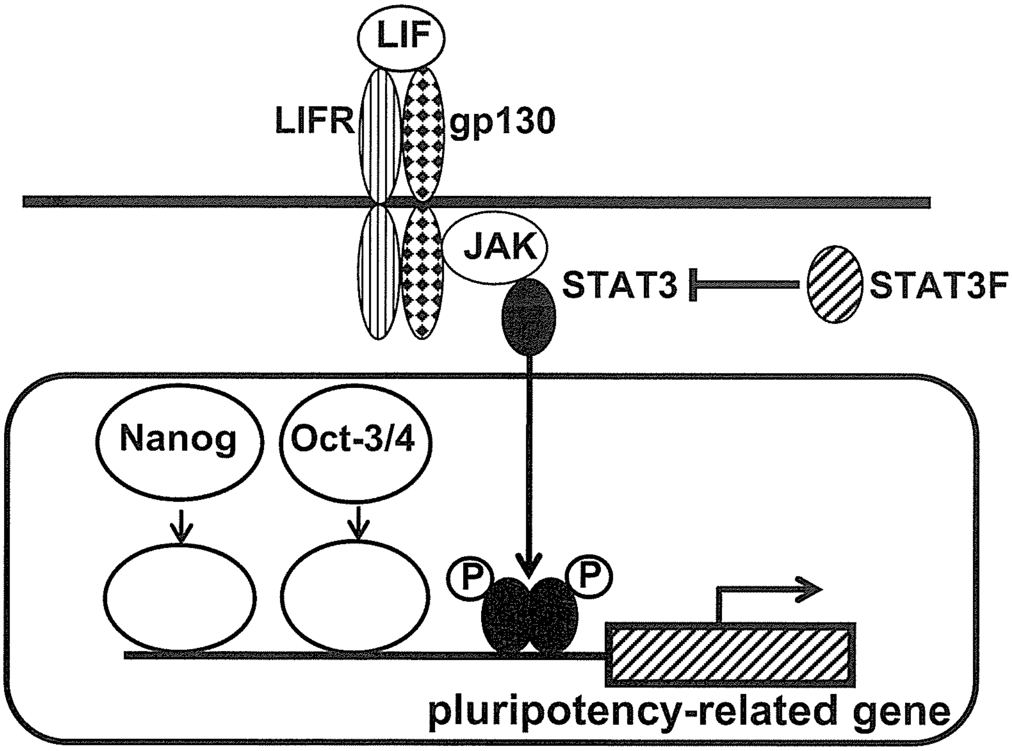


Fig. 21 Mechanism of pluripotency in mES cells.
LIF/JAK/STAT signaling pathway is essential for maintaining the undifferentiated state of mES cells. STAT3F, which is the dominant-negative mutant of STAT3, can proceed the differentiation of mES cells by intercepting the LIF signal. Both transcription factors, Nanog and Oct-3/4, are also related with the multipotency of mES cells.

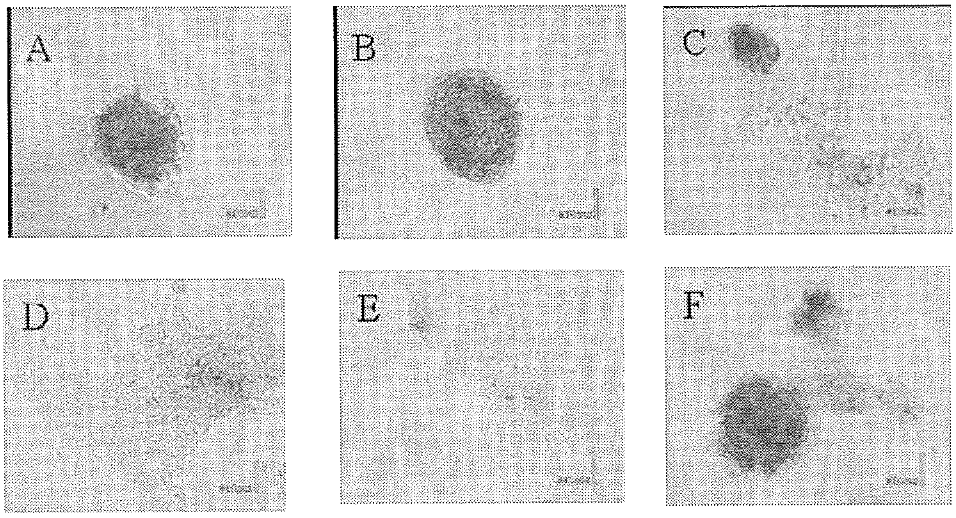


Fig. 22 Introduction of functional genes into mES cells by Ad vectors containing EF-1α promoter.
mES cells (1×10^4 cells) were seeded, and on the following day, the cells were transduced with 3000 VP/cell of none (A), Ad-EF-LacZ (B), Ad-EF-Oct3/4 (C), or Ad-EF-STAT3F (D) for 1.5 hr. mES cells were also co-infected with 3000 VP/cell of Ad-EF-STAT3F and 3000 VP/cell of Ad-EF-lacZ (E) or Ad-EF-Nanog (F) for 1.5 hr. On day 3, each cell was infected again by the same vectors. On day 5, alkaline phosphatase staining was performed. Alkaline phosphatase-positive red cells indicate undifferentiated ES cells.

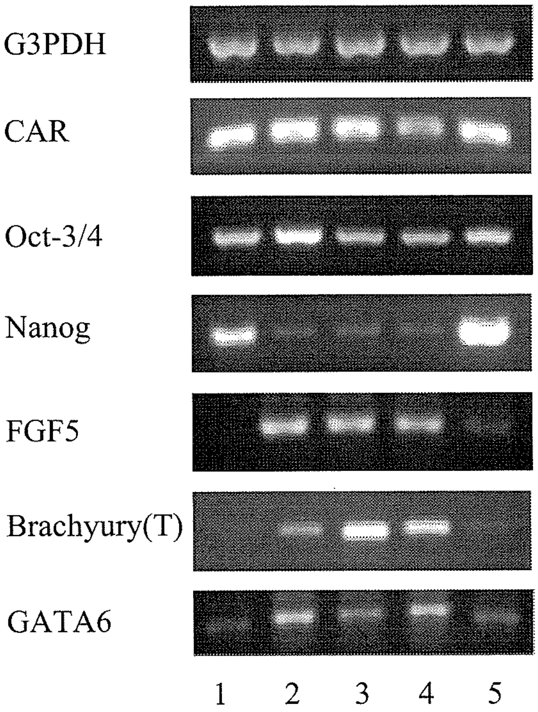


Fig. 23 RT-PCR analysis of germ layer markers.
Total RNA was isolated from mES cells transduced with Ad-EF-LacZ (lane 1), Ad-EF-Oct3/4 (lane 2), Ad-EF-STAT3F (lane 3), Ad-EF-STAT3F and Ad-EF-LacZ (lane 4), or Ad-EF-STAT3F and Ad-EF-Nanog (lane 5).