

Fig. 164 Ad35 vector-mediated GFP expression in (A) mBM-DC and (B) peritoneal macrophages prepared from wild-type mice and CD46TG mice. Open bars represent percentages of cells positive for GFP, and closed bars indicate mean fluorescence intensity. mBM-DC and peritoneal macrophages prepared from wild-type mice and hemizygous (Hemi TG) and homozygous (Homo TG) CD46TG mice were transduced with Ad35 vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a total of 48 h of incubation, GFP expression in cells was evaluated by flow cytometric analysis. The results are represented as mean \pm S.D. (n=3).

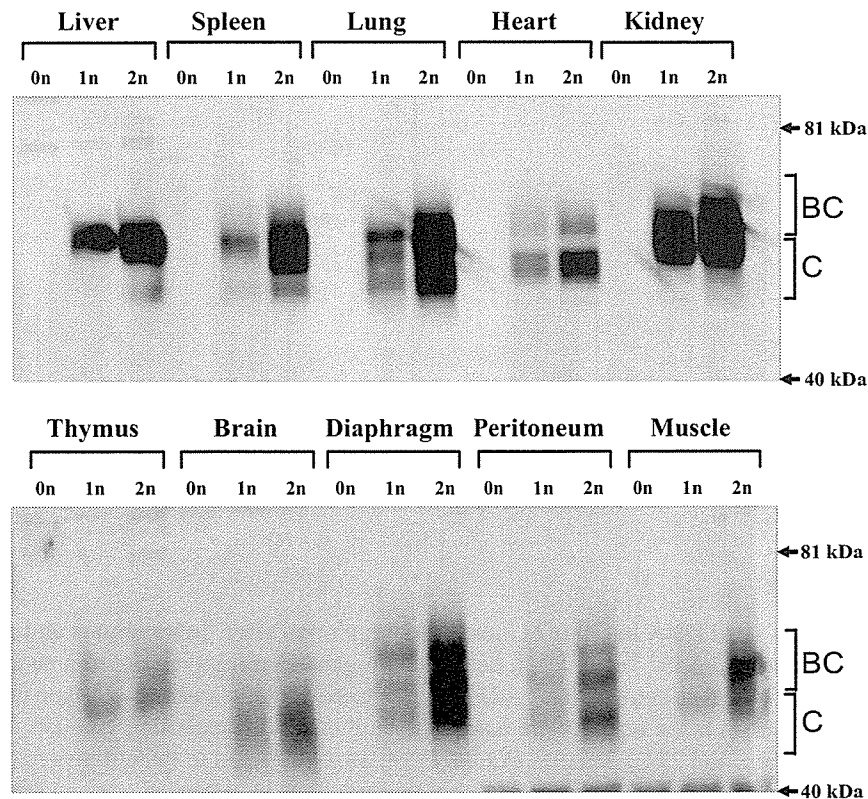


Fig. 165 Human CD46 expression in organs harvested from CD46TG mice. The protein samples prepared from wild-type mice (0n), hemizygous CD46TG mice (1n), and homozygous CD46TG mice (2n) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nylon membrane, and reacted against a polyclonal rabbit anti-CD46 serum. The molecular masses of marker proteins (kDa) and approximate positions of the two major isoforms of the CD46 proteins (BC and C isoforms) are indicated on the right.

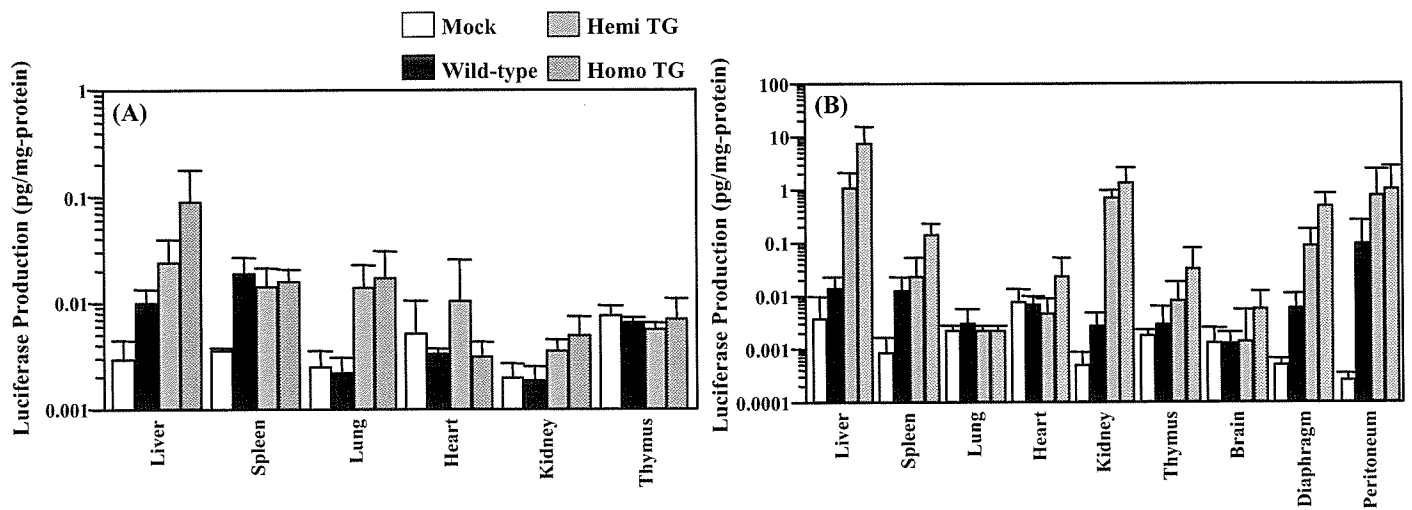


Fig. 166 Luciferase production in CD46TG and wild-type mice after intravenous and intraperitoneal administration of Ad35 vectors. (A) Luciferase production after intravenous administration of the vector. (B) Luciferase production after intraperitoneal administration. Ad35 vectors were administered to wild-type mice and hemizygous and homozygous CD46TG mice. After 48 h, the organs were harvested, and luciferase production was measured. All data are represented as mean \pm S.D. (n = 4, intravenous administration; n = 6, intraperitoneal administration).

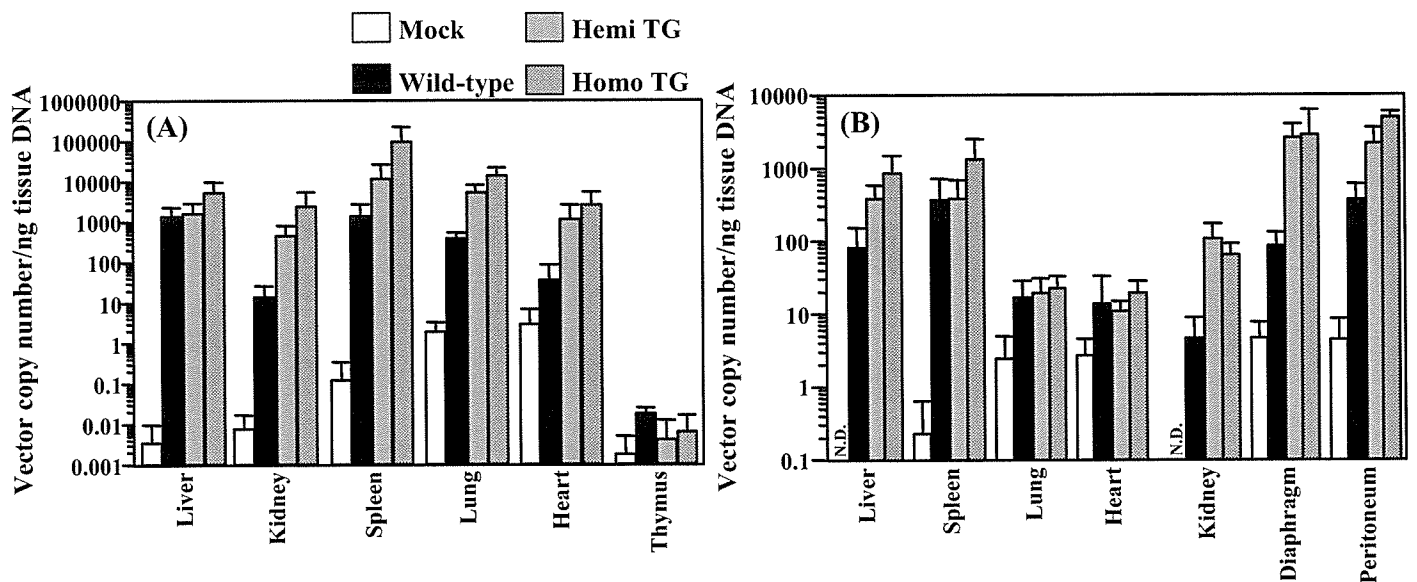


Fig. 167 Tissue distribution of viral DNA in CD46TG and wild-type mice after intravenous and intraperitoneal administration of Ad35 vectors. (A) Ad35 vector DNA detected in organs after intravenous administration. (B) Ad35 vector DNA detected in organs after intraperitoneal administration. Ad35 vectors were administered to wild-type mice and hemizygous and homozygous CD46TG mice. After 48 h, the organs were harvested, and total DNA including viral DNA was extracted from the tissues after proteinase K digestion, and 25-ng samples of total DNA were subjected to quantitative real-time PCR. The data are represented as mean \pm S.D. (n = 4).

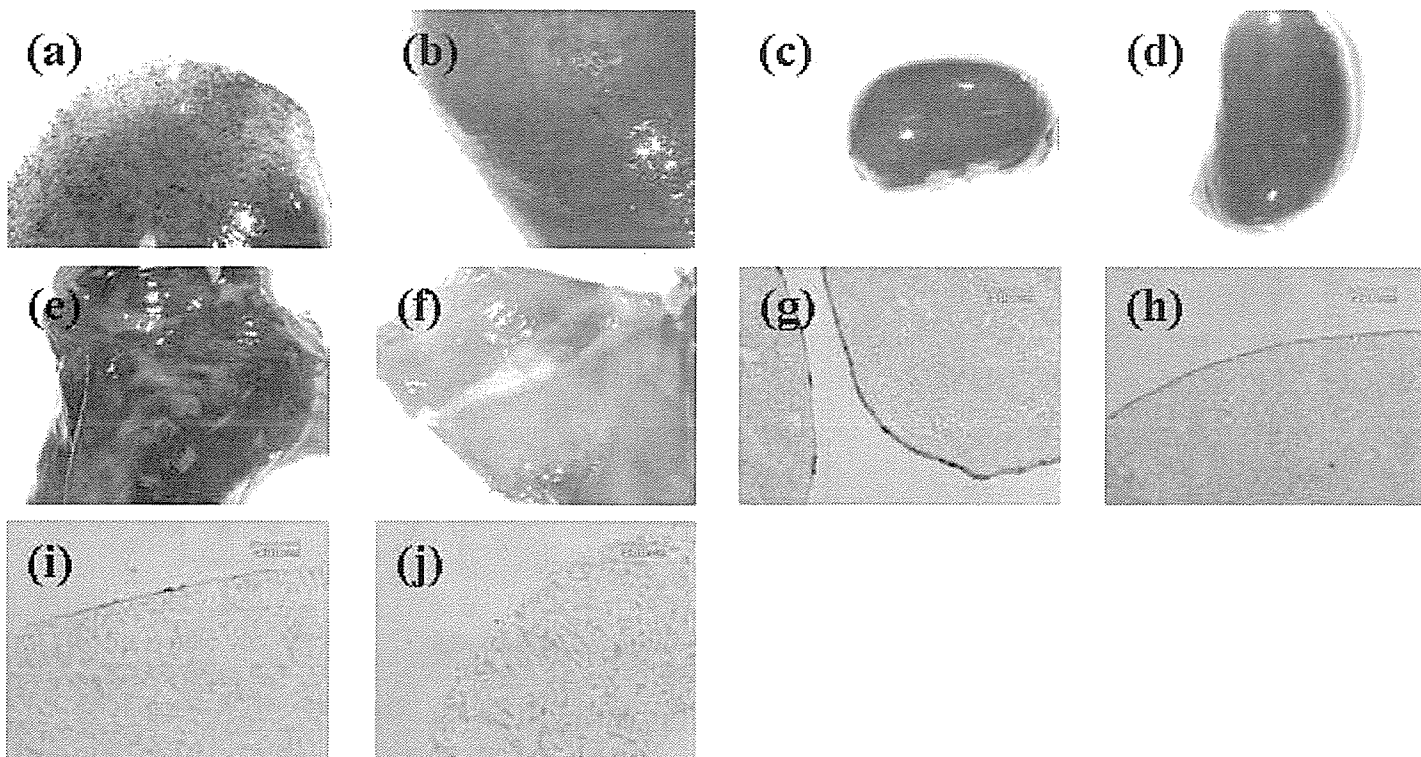
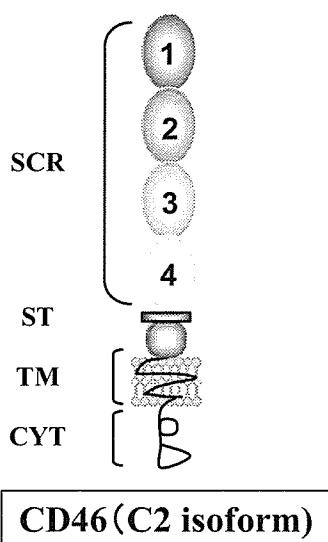


Fig. 168 X-gal staining of the peritoneal organs of homozygous CD46TG mice receiving β -galactosidase-expressing Ad35 vectors. (a) Liver, (c) kidney, (e) peritoneum, (g) liver, and kidney sections from homo TG mice injected with Ad35 vectors. (b) Liver, (d) kidney, (f) peritoneum, (h) liver, and (j) kidney sections from mock-infected homo TG mice. Ad35 vectors were injected intraperitoneally into homozygous CD46TG mice. At 2 days postadministration, the organs were recovered after perfusion with 0.5% glutaraldehyde solution and then fixed and stained. For X-gal staining of liver and kidney, 10-mm sections were cut, fixed with 0.5% glutaraldehyde, and stained.



SCR: short consensus repeat

ST: serine-threonine rich region

TM: transmembrane domain

CYT: cytoplasmic tail

Fig. 169 Schematic diagram of human CD46

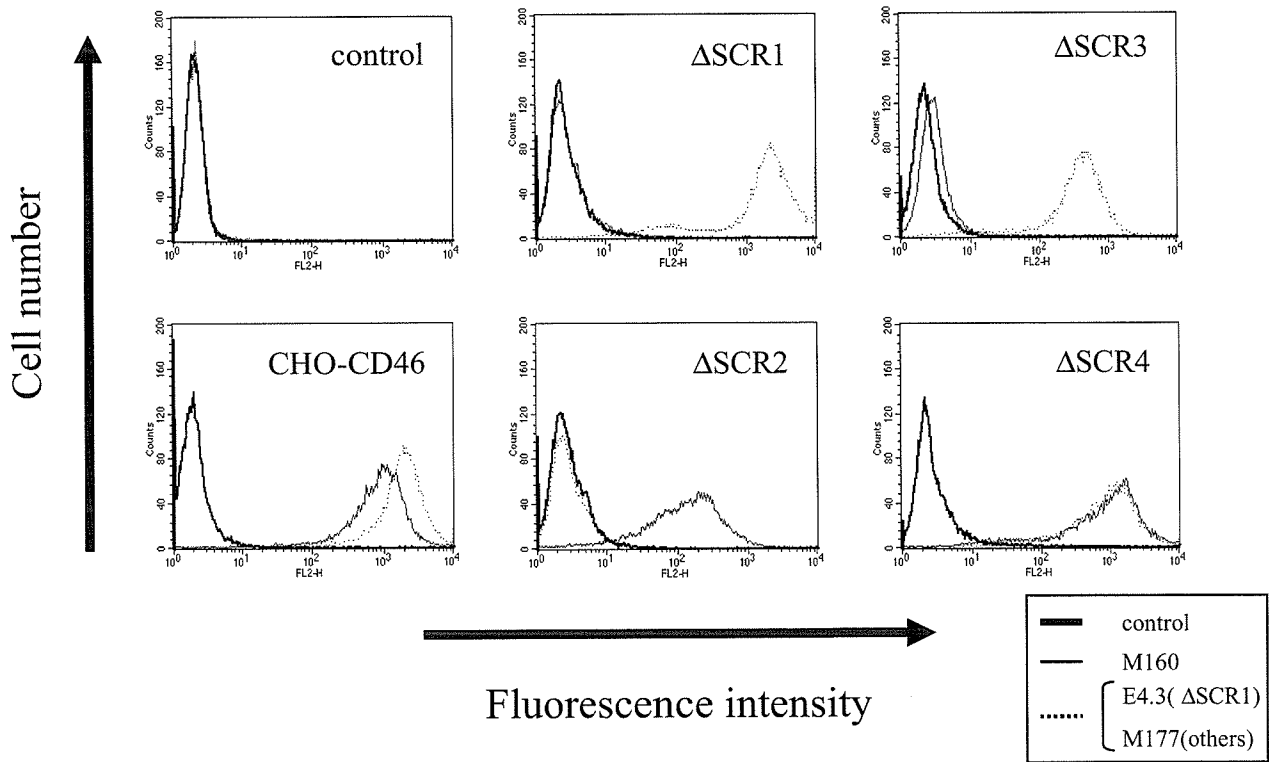


Fig.170 Expression profiles of CD46 deletion mutants detected by monoclonal anti-CD46 antibodies. The cells were stained with anti-CD46 antibodies against SCR1 (E4.3), SCR2 (M177), or SCR3 (M160), and subsequently analyzed by flow cytometer.

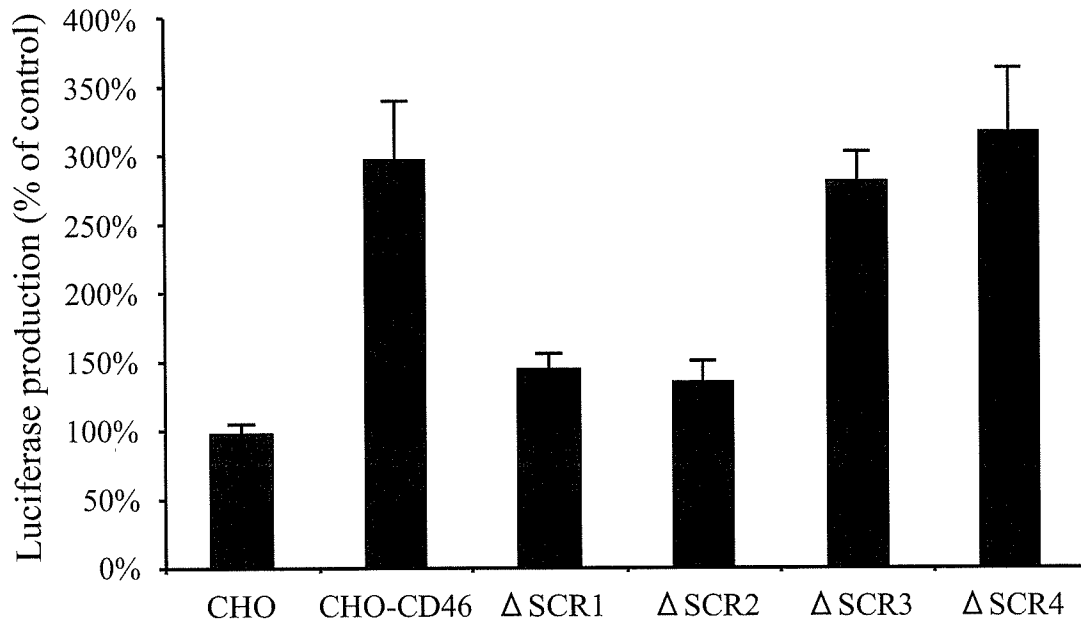


Fig.171 Ad35 vector-mediated transduction in CHO cells expressing CD46 mutants lacking SCRs. The cells were transduced with Ad35 vectors at 3000 VP/cells for 1.5 hr. The luciferase productions in the cells were measured 48 hr after transduction by luminescent assay. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=4).

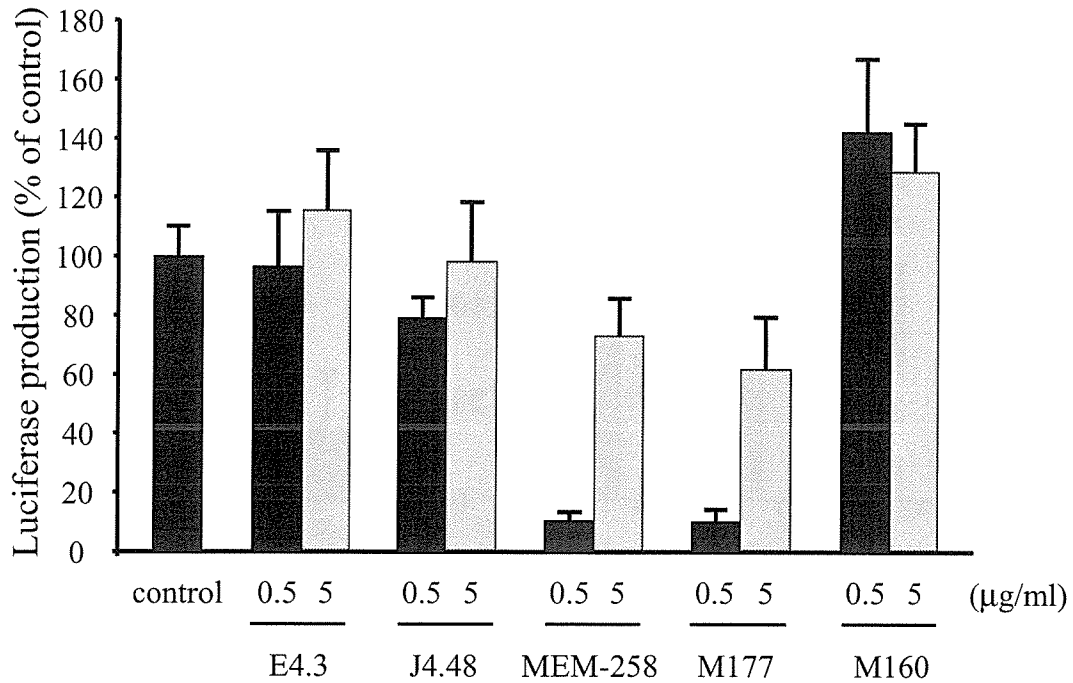


Fig.172 Blocking of Ad35 vector transduction by monoclonal anti-CD46 antibodies. E4.3, MEM-258, and J4-48 (recognizing SCR1), M177 (recognizing SCR2), and M160 (recognizing SCR3) were used as monoclonal anti-CD46 antibodies. CHO cells expressing wild-type CD46 were preincubated with each antibody at the indicated concentrations for 1 hr and then infected with Ad35 vectors expressing luciferase at 3000 VP/cell. The luciferase productions in the cells were measured by luminescent assay 48 hrs after transduction. In control settings (Control), the cells were preincubated with medium only prior to transduction. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=4).

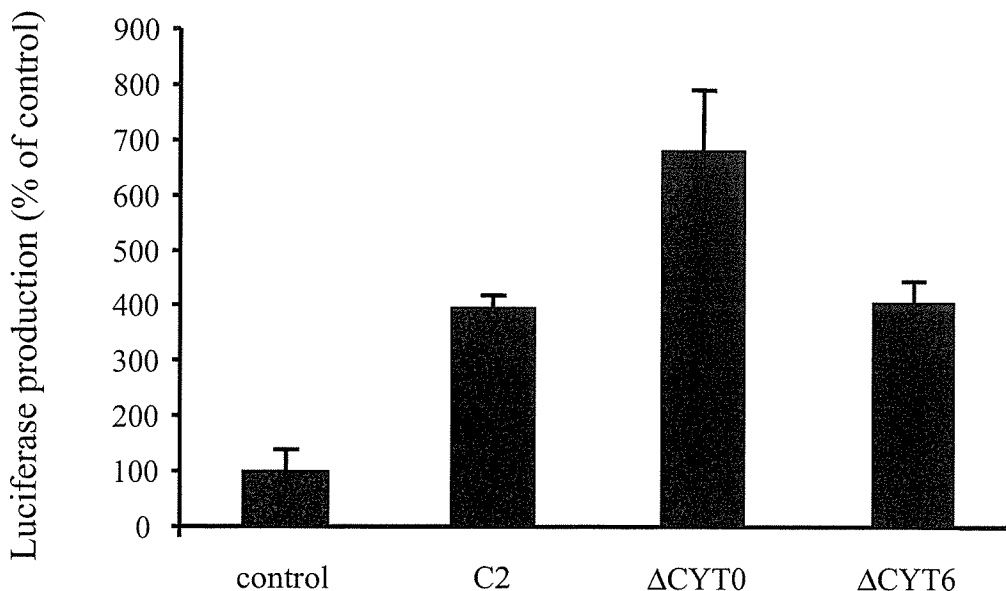


Fig.173 Ad35 vector-mediated transduction in CHO cells expressing CD46 mutants lacking the cytoplasmic domain. The cells, which were seeded the day before transfection, were transfected with plasmid encoding full-length CD46 or mutant CD46 lacking the cytoplasmic domain (CD46 Δ CYT0 and CD46 Δ CYT6). Twenty-four hr after transfection, the cells were transduced with Ad35 vectors at 3000 VP /cells for 1.5 hr. The luciferase productions in the cells were measured 48 hr after transduction by luminescent assay. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=4).

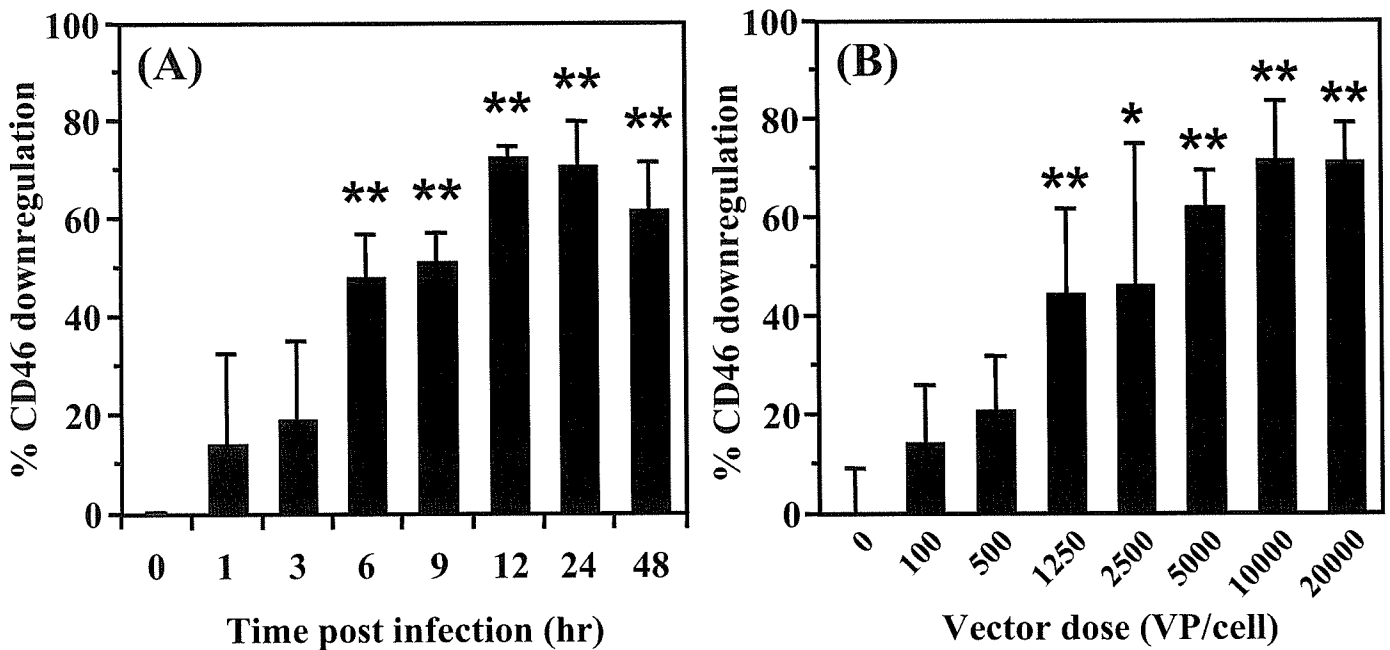


Fig.174 Downregulation of CD46 from the cell surface of PBMCs after infection by Ad35 vectors. (A) Time course of CD46 downregulation from the cell surface of PBMCs after infection with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10000 VP/cell for up to 48 hr. Cells were harvested at the indicated time points and stained with anti-human CD46 antibodies after fixation. The expression levels of CD46 on the cell surface were determined by flow cytometry. (B) Dose-dependent downregulation of surface CD46 after infection with Ad35 vectors. PBMCs were infected with Ad35GFP at the indicated vector doses for 24 hr. After incubation for 24 hr, PBMCs were harvested and CD46 expression levels were determined by flow cytometry. The asterisks indicate the level of significance ($P < 0.005$ [double asterisk], $P < 0.05$, [single asterisk]). Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of at least two similar experiments.

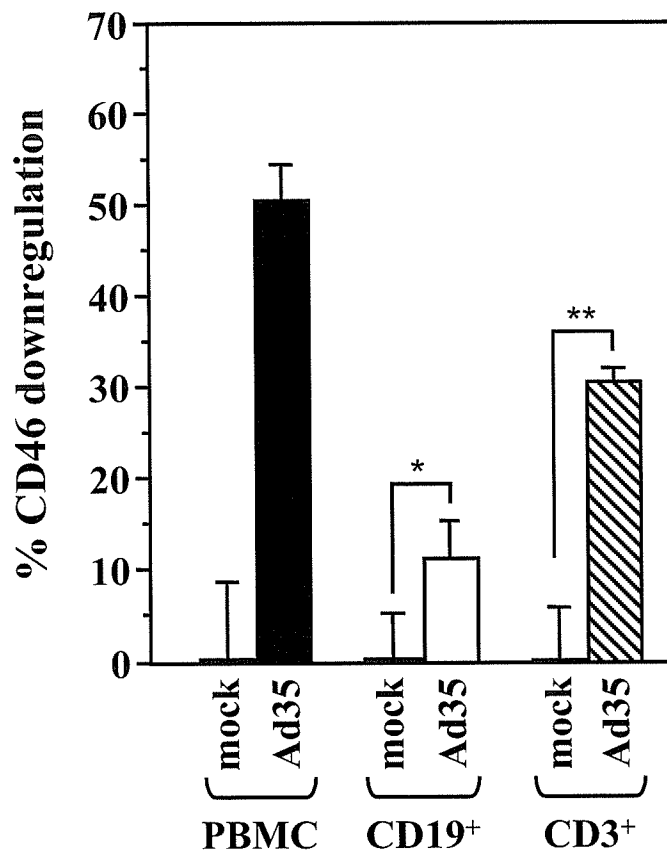


Fig.175 Surface CD46 downregulation in B cells and T cells after infection with Ad35 vectors. PBMCs were infected with Ad35L at 10000 VP/cell. After incubation for 24 hr, PBMCs were harvested and stained with both anti-human CD46 antibody and anti-human CD19 or anti-human CD3 antibody. Subsequently, the cells were subjected to flow cytometric analysis. The asterisks indicate the level of significance ($P < 0.005$ [double asterisk], $P < 0.05$, [single asterisk]). Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of at least two similar experiments.

TABLE 16 Downregulation of CD46 induced by Ad35 vectors in various types of cells.

Cell type	% CD46 downregulation
Molt-4	55 ± 5.7 %
KG-1a	18 ± 2.6 %
K562	36 ± 1.9 %
U937	24 ± 8.6 %
A549	-10 ± 8.0 %
HeLa	7.9 ± 18 %
Human bone marrow-derived CD34⁺ cells	-11 ± 5.2 %

The cells were infected with Ad35L at 10000 VP/cell. After incubation for 24 hr, CD46 expression on the cell surface was determined by flow cytometry as described in *Materials and Methods*. Values represent mean ± S.D. of quadruplicate results from two similar experiments.

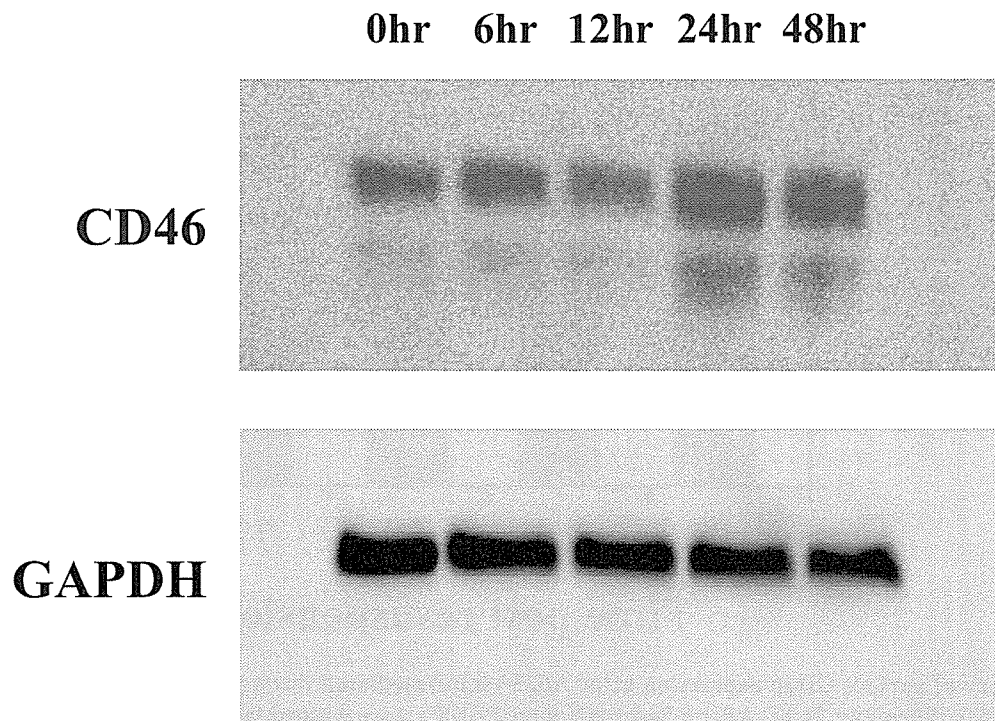


Fig.176 Total cellular protein levels of CD46 following infection by Ad35 vectors. Western blotting analysis for the total cellular protein levels of CD46 in PBMCs infected with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10000 VP/cell for up to 48 hr. Cells collected at the indicated time points were lysed and quantified by immunoblotting for their total cellular amounts of CD46. GAPDH bands served as an internal control for equal total protein loading. This result was representative of three independent experiments.

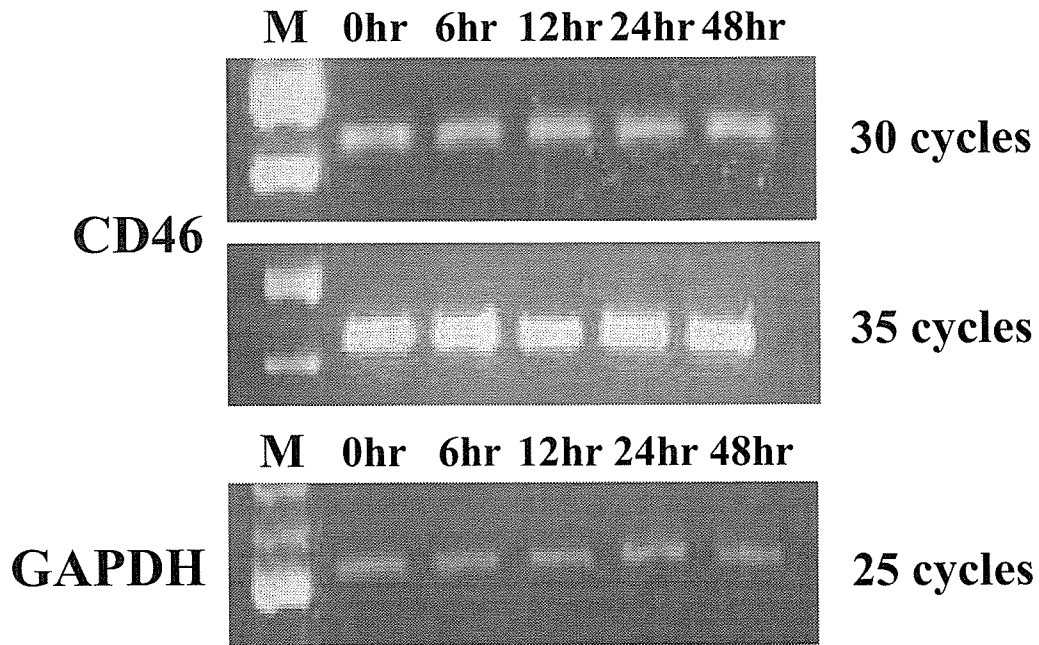


Fig.177 Messenger RNA levels of CD46 following Ad35 vector infection. PBMCs were infected with Ad35GFP at 10000 VP/cell. Total RNA was prepared from PBMCs following incubation with Ad35GFP, and semi-quantitative RT-PCR was then performed. Lane M: 100-bp ladder. These results were representative of at least two independent experiments.

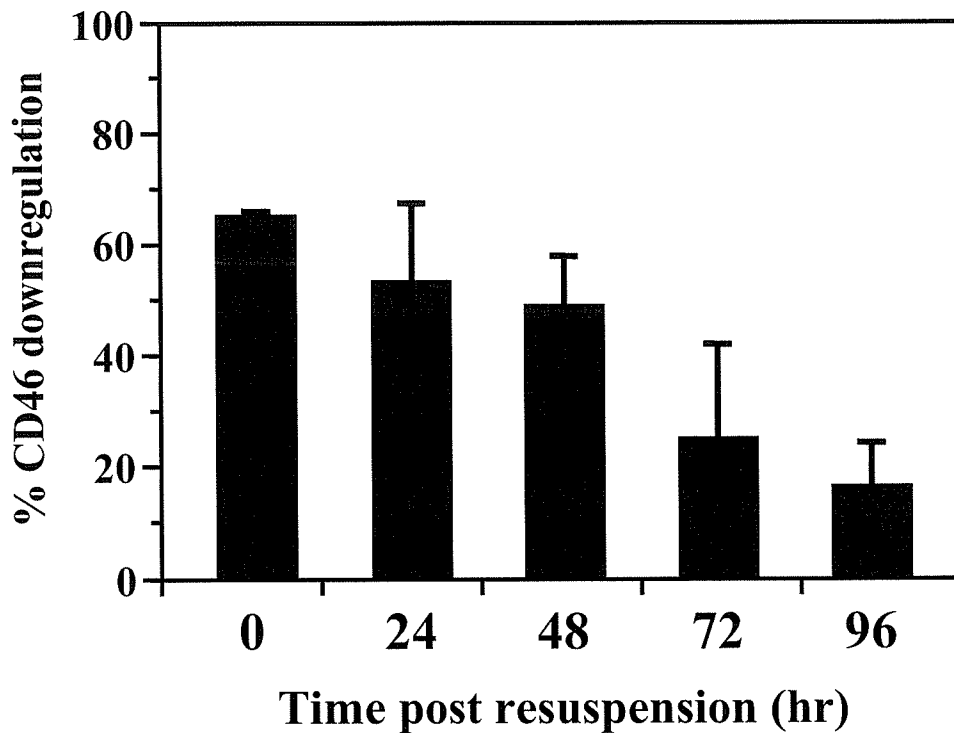


Fig.178 Recovery of surface CD46 expression after Ad35 vector-mediated downregulation. PBMCs were infected with Ad35GFP at 10000 VP/cell for 24 hr. After a 24-hr infection, PBMCs were washed twice to remove the Ad35GFP, and resuspended and incubated in fresh medium. After incubation, cells were harvested at the indicated time points and CD46 expression was measured by flow cytometry. Values represent mean \pm S.D. of quadruplicate results from one of two similar experiments.

次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究

分担研究者 中川晋作 大阪大学大学院薬学研究科 教授

本研究は、安全性が高く、機能面で優れた我が国独自の次世代遺伝子治療用ベクターの開発、および関連する遺伝子導入・発現技術に関する基盤研究を行うことを目的に実施され、以下の成果が得られた。

1. サイトカインおよびケモカインを発現する RGD ファイバーミュータントアデノウイルス (AdRGD) ベクターを用いた癌免疫遺伝子治療の最適化を図った。その結果、マウスメラノーマに対する樹状細胞 (DC) 免疫療法にケモカイン (CCL17) 発現 AdRGD ベクターの腫瘍内投与を併用することで、有効性を著しく改善することができた。また、IL-12 発現 AdRGD ベクターとケモカイン (CCL27) 発現 AdRGD ベクターを腫瘍内に併用投与することで、抗腫瘍エフェクター細胞の腫瘍組織内動員とその活性化を同時に達成できることを明らかとし、強い抗腫瘍作用を得ることに成功した。
2. 抗アポトーシス分子を発現する AdRGD ベクターを用いた新規 DC 免疫療法を確立し、その有効性および作用機序を解析した。その結果、AdRGD ベクターを用いて抗アポトーシス分子遺伝子を導入した DC は、アポトーシス抵抗性を獲得し、投与部位から所属リンパ組織へと遊走する DC 数の増加と、そこでの DC 生存期間の延長に基づいて、抗腫瘍効果の誘導効率を大幅に改善できるワクチン担体であることを明らかとした。
3. 全身投与型腫瘍標的化ベクターの創製を目指したアデノウイルス (Ad) ベクターの改良を図るとともに、改良型ベクターの癌遺伝子治療における有用性を評価した。その結果、水溶性高分子 (PEG) を用いたバイオコンジュゲーションおよび TERT (Telomere reverse transcriptase) プロモーターの搭載は、それぞれ Ad ベクターの体内動態制御 (腫瘍集積性の増強) および遺伝子発現制御 (腫瘍特異的遺伝子発現) を可能とし、これら両者を融合させた PEG-Ad-TERT ベクターが全身投与型腫瘍標的化ベクターの有望な候補であることを明らかとした。また、標的化リガンド (RGD ペプチド) を PEG の末端に導入した RGD-PEG-Ad ベクターの作製方法を確立し、その遺伝子導入特性を明らかにした。
4. 細胞膜透過ペプチド (Tat) を結合させた Ad (Tat-Ad) ベクターの作製法を確立し、その遺伝子導入特性を解析した。その結果、Tat 修飾率が遺伝子導入効率に大きく影響を与えることを明らかにし、Tat-Ad ベクターを用いることで、Ad 感染受容体の発現が乏しい細胞あるいは従来の Ad ベクターでは遺伝子導入効率が著しく低かった細胞に対しても、非常に効率よく遺伝子導入することに成功した。

研究協力者

岡田直貴	大阪大学大学院薬学研究科 講師	吉川友章	大阪大学大学院薬学研究科 特任研究員
吉岡靖雄	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師	衛藤祐介	大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程 2 年
高 建青	大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程修了 (現・浙江大学)	桜井晴奈	大阪大学大学院薬学研究科 博士後

	期課程 2 年
杉田敏樹	大阪大学大学院薬学研究科 博士後 期課程 2 年
金川尚子	大阪大学大学院薬学研究科 博士後 期課程 1 年
倉知慎之輔	大阪大学大学院薬学研究科 博士後 期課程 1 年
丹羽貴子	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程修了 (現・三共株式会社)
森重智弘	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 2 年
姚 醒蕾	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 2 年
渡辺 光	大阪大学大学院薬学研究科 博士前 期課程 1 年
Ratima Asavatanabodee	大阪大学大学院薬学研究 科 博士前期課程 1 年
田辺 綾	大阪大学薬学部 4 年生

A. 研究目的

アデノウイルス (Ad) ベクターは、標的細胞の分裂期・非分裂期を問わず極めて高い遺伝子導入効率を発揮し、また高力価のベクター調製が容易であることから、遺伝子治療研究において最も繁用されているベクターシステムである。しかし、Ad ベクターは生体内の種々の細胞に広く発現する CAR (Coxsackie-adenovirus receptor) を標的とするため、その遺伝子導入を特定の組織や細胞に限定 (ターゲティング) することは困難である。また、遺伝子治療の重要な標的細胞となる癌細胞や血球系細胞は、CAR の発現が無いあるいは非常に乏しいために、Ad ベクター介在性遺伝子導入に対して抵抗性を示し、十分な治療効果を得るためには副作用発現に繋がる高用量のベクター投与を必要とする。したがって、有効性と安全性を兼ね備えた Ad ベクターによる遺伝子治療を実現するには、これらの問題点を克服しうる革新的アプローチを導入した改良型 Ad ベクターを設計・創製し、それらの遺伝子導入特性と治療効果・副作用発現との関連評価を通して、最適な

遺伝子治療用 Ad ベクターシステムの確立に向けての基礎情報を収集することが不可欠である。

本観点から我々はこれまでに、遺伝子工学的に Ad ベクターのファイバー領域に RGD ペプチドを表現させた RGD ファイバー改変型 Ad (AdRGD) ベクターが、標的指向性の拡大 (α_v インテグリン指向性の付与) に基づいて CAR 低発現細胞にも優れた遺伝子導入・発現効率を発揮することを見出し、この AdRGD ベクターを用いて癌免疫遺伝子治療の最適化に繋がる方法論の構築に取り組んできた。また、全身投与した Ad ベクターの腫瘍標的化を達成する方法論として、水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を用いてバイオコンジュゲート化した Ad (PEG-Ad) ベクターの開発を行ってきた。

これらの基礎情報を踏まえて、本研究では次世代遺伝子治療戦略の構築ならびに次世代遺伝子治療用ベクターの開発を念頭に、以下に示す検討を行った。

- ① 遺伝子治療の最適化を目指した AdRGD ベクターの応用研究として、免疫細胞の腫瘍組織集積性を増強しうる新規癌免疫遺伝子治療戦略、および樹状細胞 (DC) ワクチンの利用能を改善しうる新規 DC 癌免疫療法戦略を提案し、それらの有効性ならびに作用メカニズムを精査した。
- ② 全身投与型腫瘍標的化ベクターを志向した PEG-Ad ベクターを作製するために最適な PEG 修飾条件を探索するとともに、治療用遺伝子を搭載した PEG-Ad ベクターの癌遺伝子治療における有用性を評価した。
- ③ 標的化リガンド (RGD ペプチド) を PEG の末端に導入した RGD-PEG-Ad ベクターの作製方法を確立し、その遺伝子導入特性を解析した。
- ④ 腫瘍特異的 TERT (Telomere reverse transcriptase) プロモーター制御下に目的遺伝子を発現する Ad (Ad-TERT) ベクターを作製し、その遺伝子発現特性を解析するとともに、癌自殺遺伝子治療へと応用した際の有効性を評価した。
- ⑤ 体内動態制御と遺伝子発現制御とを融合させた

より高度な腫瘍標的化 Ad ベクターの創製を目指して、PEG 修飾した Ad-TERT (PEG-Ad-TERT) ベクターを作製し、本ベクターを全身投与した際の遺伝子発現分布を検討した。

- ⑥ Ad ベクターの標的指向性のさらなる拡大を図るため、細胞膜透過ペプチドとして知られる Tat ペプチドによりベクター表面のカプシドタンパクを修飾した Ad (Tat-Ad) ベクターの作製法を確立し、Tat 修飾率や標的細胞特性と遺伝子導入効率との関連評価を行うことで、本ベクターの遺伝子導入特性を解析した。

B. 研究方法

B.1. 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

B.1.1. 従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターの作製、精製、および力価測定

従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターは、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。作製した各種 Ad ベクターは、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。各ベクターの粒子数 (vector particle; VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。また、各ベクターの生物学的力価 (plaque-forming unit; PFU) は end point-dilution 法 (TCID₅₀ 法) により測定した。なお、Fig. 1 に本研究で作製・使用したベクターのコンストラクトを示した。

B.1.2. AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 メラノーマ細胞を接種し、腫瘍の長径が 5-7 mm となった時点で、CCL17 ケモカイン発現 AdRGD ベクター (AdRGD-CCL17) あるいはルシフェラーゼ発現 AdRGD ベクター (AdRGD-Luc) を腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、次式に従って腫瘍体積を算出した。

(腫瘍体積; mm³) = (腫瘍の長径; mm) × (腫瘍の短径; mm)² × 0.5236

B.1.3. マウス骨髄由来 DC の調製

マウス骨髄由来 DC は、Lutz らの方法を若干改変して調製した。マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含む RPMI1640 中に骨髄をフラッシュした。セルストレーナー (70-μm ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、40 ng/ml GM-CSF、10% FBS、および 50 μM 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 で 0.5~1 × 10⁶ cells/ml に懸濁して 100 mm 細菌培養用シャーレに 10 ml ずつ播種した。37°C、5% CO₂ 存在下で培養し、3 日目に新たな培養液を各シャーレに 10 ml ずつ添加した。また培養 6 日目には、10 ml の培養上清を新たな培養液 10 ml に置換した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として以降の実験に供した。

B.1.4. gp100 遺伝子導入 DC を投与した B16BL6 担癌マウスにおける細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性の測定

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に B16BL6 細胞を接種し、翌日に gp100 (メラノーマ関連抗原) 発現 AdRGD ベクター (AdRGD-gp100) を 25 MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) で用いて遺伝子導入した DC (gp100/DC) を、これらのマウスの腹部左側皮内に 10⁶ cells/mouse で投与した。DC 免疫から 1 週間後、これらのマウスから調製した脾細胞をマイトマイシン C (MMC) 処理した B16BL6 細胞と 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、エフェクター細胞を得た。細胞傷害試験は Europium (Eu)-release assay により行った。調製したエフェクター細胞と Eu ラベルしたターゲット細胞 (B16BL6 細胞、EL4 細胞、YAC-1 細胞) とを種々のエフェクター/ターゲット比となるように混合し、4 時間共培養した後、上清中に遊離した Eu 濃度を時間分解蛍光測定法により測定した。エフェクター細胞の細胞傷害活性 (%) は次式に従って算出した。

(% of lysis) = {(検体の Eu 遊離量) - (自然 Eu 遊離量)} / {(最大 Eu 遊離量) - (自然 Eu 遊離量)} × 100

B.1.5. gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の併用による抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスの腹部右側皮内に B16BL6 細胞

を接種し、その翌日に 25 MOI の AdRGD-gp100 を適用した gp100/DC を腹部左側皮内へ 10^6 cells/mouse で投与した。腫瘍の長径が 5-7 mm に達した時点で AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc を腫瘍内投与した。腫瘍体積変化は、B.1.2. に記述した方法に従って評価した。

B.1.6. gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与を併用した際の腫瘍浸潤 CD3⁺ T 細胞数の解析

B.1.5. に記述した方法に従って C57BL/6 マウスへの B16BL6 細胞接種、gp100/DC 免疫、および AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-Luc 腫瘍内投与を行った。2 日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、OCT compound に浸漬して直ちに液体窒素中で凍結ブロックを作製した。各ブロックから 5 μ m の組織切片を作製し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後に CD3 に対する免疫組織染色に供した。免疫組織標本を 400 倍率の顕微鏡下で観察し、腫瘍実質部で任意に選択した 6 視野に存在する腫瘍内浸潤 CD3⁺ T 細胞数を計測した。

B.1.7. AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍におけるリンパ球活性化の評価

B.1.2. ならびに B.1.5. に記述した方法に従って、AdRGD-CCL17 を投与した B16BL6 腫瘍、ならびに gp100/DC の皮内免疫と AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与を併用したプロトコールにおける B16BL6 腫瘍を調製した。これらの腫瘍を AdRGD-CCL17 投与から 48 時間後に摘出し、Total RNA の抽出ならびにそれを鋳型とした RT-PCR 解析を行った。本検討に用いた PCR 条件は Table 1 に示した。

B.1.8. AdRGD-IL12 を投与した腫瘍における IL-12 産生量の測定

BALB/cマウスの腹部皮内にMeth-A細胞を接種し、腫瘍の長径が9-10 mmに達した時点で、IL-12発現 AdRGDベクター (AdRGD-IL12)、CCL27ケモカイン発現 AdRGDベクター (AdRGD-CCL27)、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12と AdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで腫瘍内投与した。2日後に腫瘍を摘出し、20%

ホモジネートとした上清中のIL-12濃度をELISAにより定量した。

B.1.9. AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の OV-HM 腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

B6C3F1 マウスの腹部皮内に OV-HM 細胞を接種し、腫瘍の長径が 7-8 mm に達した時点で、AdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは 9:1、1:1、または 1:9 で混合した AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を、総ベクター用量として 2×10^7 PFU で腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定するとともに、マウスの生存率をモニタリングした。なお、腫瘍径が 20 mm を超えたマウスについては安楽死させた。また、腫瘍接種後 90 日目において腫瘍が認められない個体を完全治癒例と判定した。腫瘍体積変化は、B.1.2. に記述した方法に従って評価した。

B.1.10. AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の Meth-A 腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

BALB/cマウスの腹部皮内にMeth-A細胞を接種し、腫瘍の長径が9-10 mmに達した時点で、AdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで腫瘍内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定するとともに、マウスの生存率をモニタリングした。なお、腫瘍径が20 mmを超えたマウスについては安楽死させた。また、腫瘍接種後90日目において腫瘍が認められない個体を完全治癒例と判定した。

B.1.11. OV-HM 腫瘍退縮マウスにおける腫瘍特異的免疫記憶の確認

B.1.9. の OV-HM 腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスに対し、最初の腫瘍接種から 3 ヶ月後ないし 6 ヶ月後に 10^6 の OV-HM 細胞あるいは 3×10^5 の B16BL6 細胞を腹部皮内に投与し、その生着を観察した。腫瘍再接種後 60 日目においても腫瘍の生着を認めない個体を完全拒絶例と判定した。

B.1.12. Meth-A 腫瘍退縮マウスにおける腫瘍特異

免疫記憶の確認

B.1.10.のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスに対し、最初の腫瘍接種から90日後に 10^6 のMeth-A細胞あるいは 3×10^5 のCT26細胞を腹部皮内に投与し、その生着を観察した。腫瘍再接種後60日目においても腫瘍の生着を認めない個体を完全拒絶例と判定した。

B.1.13. ノードマウスを用いた AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価

B.1.9.および**B.1.10.**と同様の方法により、BALB/cノードマウスに生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍に対するAdRGD-IL12単独あるいはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用で腫瘍内投与した際の抗腫瘍効果を検討した。

B.1.14. AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果に寄与する免疫細胞サブセットの同定

B.1.9.および**B.1.10.**と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 (9:1) を 2×10^7 PFUで投与した (Day 0)。これらのマウスにおけるCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、あるいはNK細胞の枯渇には、それぞれ100 μ lの抗CD4抗体溶液 (GK1.5ハイブリドーマ腹水)、100 μ lの抗CD8抗体溶液 (53-6.72ハイブリドーマ腹水)、あるいは40 μ lの抗asialoGM1抗血清を、Day -3、Day -2、Day -1、Day 0、Day 5、Day 10、およびDay 15の計7回腹腔内投与した。また、コントロール群には正常ラット血清を100 μ lずつ腹腔内投与した。その後、経日的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を検討した。なお、各リンパ球サブセットの枯渇は、末梢血細胞ならびに脾細胞を用いたflow cytometry (FCM) 解析により確認した。

B.1.15. AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 を腫瘍内投与した際の腫瘍浸潤 T 細胞サブセットの解析

B.1.9.および**B.1.10.**と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させた

OV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12、AdRGD-CCL27、AdRGD-Luc、あるいは9:1で混合したAdRGD-IL12とAdRGD-CCL27を、総ベクター用量として 2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、**B.1.6.**に記載した方法と同様にCD3、CD4、CD8、perforinに対する免疫組織染色と腫瘍内浸潤T細胞数の計測を行った。

B.1.16. AdRGD-IL12 および AdRGD-CCL27 を腫瘍内投与した際の腫瘍における IFN- γ および接着分子発現レベルの評価

B.1.9.および**B.1.10.**と同様にB6C3F1マウスあるいはBALB/cマウス腹部皮内にそれぞれ生着させたOV-HM腫瘍あるいはMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを 2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍を摘出し、total RNAの抽出ならびにそれを鋳型としたRT-PCR解析を行った。本検討に用いたPCR条件はTable 1に示した。

B.1.17. AdRGD-IL12 を腫瘍内投与したマウスにおける腫瘍特異的リンパ球活性化の評価

B.1.9.と同様にBALB/cマウス腹部皮内に生着させたMeth-A腫瘍にAdRGD-IL12あるいはAdRGD-Lucを 2×10^7 PFUで投与した。6日後にこれらのマウスから腫瘍組織の所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) ならびに脾臓を摘出した。それぞれから調製したリンパ節細胞と脾細胞をMMC処理したMeth-A細胞と24時間共培養し、*in vitro*抗原再刺激を行った。この抗原再刺激によってIFN- γ を産生する細胞数をIFN- γ ELISpot assayにより計測した。

B.1.18. Meth-A腫瘍完全治癒マウスにおける副作用の評価

B.1.9.のMeth-A腫瘍治療実験において完全治癒例と判定されたマウスから肺、肝臓および脾臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。これらの組織をパラフィンブロックに包埋し、厚さ5 μ mの組織切片をヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色に供した。病理組織学的観察および所見についてはアプライドメディカルリサーチ社 (大阪) に依頼した。

B.2. アポトーシス拮抗性DCワクチンの創製による

DC免疫療法の最適化

B.2.1. AdRGD-Bclx_L および AdRGD-FNK により遺伝子導入した細胞における遺伝子発現確認

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

B.2.2. AdRGD-Bclx_L および AdRGD-FNK により遺伝子導入したDCの生存率ならびにアポトーシス抵抗性の評価

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

B.2.3. OVA遺伝子とBcl-xFNK遺伝子を共導入したDCにおけるMHC class I分子を介した抗原提示レベルの評価

DCにニワトリ卵白アルブミン (OVA) 発現 AdRGDベクター (AdRGD-OVA) 単独あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、96穴プレートに10⁵ cells/100 μl/wellで播種した。2日間あるいは6日間培養後、CD8-OVA1.3細胞を10⁵ cells/100 μl/wellで添加し、さらに24時間共培養した。培養上清を回収し、抗原提示刺激を受けたCD8-OVA1.3細胞から分泌されたIL-2濃度をELISAで測定することにより、遺伝子導入DCによるMHC class I分子を介したOVA提示レベルを評価した。

B.2.4. OVA遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入したDCによる抗腫瘍効果の評価

DCにAdRGD-OVA単独、AdRGD-OVAと

AdRGD-Bclx_Lとの併用、あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に5 × 10⁴ cells/mouseで投与し、1週間後にE.G7-OVA細胞をマウス左側腹部皮内に攻撃接種した。経日的に腫瘍径を測定し、B.1.2.に示す式に従って腫瘍体積を算出した。また同様に、AdRGD-gp100単独、AdRGD-gp100とAdRGD-Bclx_Lとの併用、あるいはAdRGD-gp100とAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入したDCを24時間培養し、C57BL/6マウスの右側腹部皮内に1.5 × 10⁶ cells/mouseで投与した。1週間後、B16BL6細胞をマウス左側腹部皮内に攻撃接種し、経日的な腫瘍体積変化をモニタリングした。なお、これらの腫瘍拒絶実験において、腫瘍の長径が20 mmを超えたマウスは安楽死させた。

B.2.5. OVA 遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子を共導入した DC を投与したマウスにおける CTL 活性の測定

DCにAdRGD-OVA単独、AdRGD-OVAとAdRGD-Bclx_Lとの併用、あるいはAdRGD-OVAとAdRGD-FNKとの併用によって遺伝子導入し、24時間培養した。これら遺伝子導入DCをC57BL/6マウスの右側腹部皮内に2.5 × 10⁴ cells/mouseで投与し、1週間後にこれらのマウスから調製した脾細胞をMMC処理したE.G7-OVA細胞と5日間共培養することで*in vitro*抗原再刺激を行い、エフェクター細胞を得た。細胞傷害試験は⁵¹Cr-release assayにより行った。調製したエフェクター細胞と⁵¹Crラベルしたターゲット細胞 (E.G7-OVA細胞、EL4細胞)とを種々のエフェクター/ターゲット比となるように混合し、4時間共培養した後、上清中に遊離した⁵¹Crの放射活性をγ-カウンターにより測定した。エフェクター細胞の細胞傷害活性 (%) は次式に従って算出した。

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

B.2.6. Bcl-xFNK 遺伝子を共導入した DC のリンパ節集積性の評価

B.1.3.に記述した方法に準拠して、GFP トランスジェニックマウスから DC を調製した。この GFP⁺ DC に AdRGD-FNK あるいは AdRGD-Luc を用いて遺伝子導入し、24 時間培養した。これら遺伝子導入 DC を野生型 C57BL/6 マウスの右側腹部皮内に 2×10^6 cells/mouse で投与し、経口的にこれらのマウスから所属リンパ節（鼠径部リンパ節）を摘出した。リンパ節は 4% PFA で固定した後、OCT compound に浸漬して直ちに液体窒素中で凍結ブロックを作製した。各ブロックから 6 μ m の組織切片を作製し、1 切片あたりの GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡下で計測した。なお、リンパ節一個につき 5 切片について計数を行った。

B.2.7. gp100 遺伝子と FNK 遺伝子を共導入した DC を投与したマウスのリンパ節における T 細胞活性化レベルの評価

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

B.3. 全身投与型腫瘍標的化ベクターの創製を目指した Ad ベクターの改良

B.3.1. 片末端に RGD ペプチドを付与した PEG の合成

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

B.3.2. PEG-Ad ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベクターの作製

Ad ベクターの PEG 修飾および RGD-PEG 修飾は、

Ad ベクター 1 粒子あたりの capsid タンパクに存在するリジン残基に対して 25~6400 倍モル量に相当する methoxypolyethylene glycol-succinimidyl propionate (mPEG-SPA、分子量 2000, 5000, 20000) あるいは RGD-PEG-NHS を Ad ベクター懸濁液 (10^{12} VP/ml) と混合し、300 rpm で攪拌しながら 37°C で 45 分間反応させることにより行った。また、作製した各種 PEG-Ad ベクターおよび RGD-PEG-Ad ベクターの修飾率の算定は、各ベクターを SDS-PAGE したゲルをクーマシブルー染色後、画像解析によって未修飾ヘキサタンパクと修飾ヘキサタンパクとの比率を求めることにより行った。一部の検討においては、SDS-PAGE したゲルを 0.1 M ヨウ素溶液を用いて染色し、PEG の存在を検出した。

B.3.3. PEG-Ad ベクターの *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

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

B.3.4. マウス抗 Ad 抗血清の作製

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

B.3.5. PEG-Ad ベクターの血中滞留性評価

未修飾 Ad ベクターあるいは PEG-Ad ベクターを BALB/c マウスに尾静脈内投与し、これらのマウスから経時的に採取した血液から全 DNA を抽出した。回収した DNA は、バイオドット SF を用いて Hybond-N+ にスロットブロットし、アルカリホスファターゼ標識プローブ (ルシフェラーゼ遺伝子の全長を含む) を用いた

Southern blottingによって血中Adベクター量を算出した。また一部の実験においては、100 ngのDNAを鋳型として、下記のプライマーセットを用いてAdベクターDNAに対する定量的リアルタイムPCR解析を行い、各血液サンプルに含まれるAdベクター数を定量することによって血中滞留性を評価した。なお、検量線作成用の鋳型にはAdenovirus type 2 DNAを使用した。

(Forward primer): CAC CAC CTC CCG GTA CCA TA

(Reverse primer): CCG CAC CYG GTT TTG CTT

(TaqMan probe): [6FAM]-AAC CTG CCC GCC GGC TAT ACA CTG-[TAMRA]

B.3.6. 各種Adベクターの腫瘍および肝臓への集積性評価

腹部皮内に長径9-10 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに各種Adベクターを尾静脈内投与した。投与6時間後あるいは48時間後にこれらのマウスから腫瘍と肝臓を摘出し、B.3.5.に記載した方法に従って各組織に集積したAdベクター数を定量した。

B.3.7. 各種Adベクターの原発癌モデルマウスにおける遺伝子発現分布の解析

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、各種ルシフェラーゼ発現ベクターを尾静脈内投与した。投与2日後に主要臓器ならびに腫瘍を摘出し、湿重量を測定した後、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むPBSを用いて25%ホモジネートを調製した。このホモジネートの不溶性画分を遠心操作で除去した後、上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3.8. 各種Adベクターの肺転移癌モデルマウスにおける遺伝子発現分布の解析

BALB/cマウスにCT26細胞を 10^5 cells/mouseで尾静脈内投与し、その1, 7, 14日後に各種ルシフェラーゼ発現ベクターを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に肺を摘出し、B.4.7.に記載した方法に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3.9. PEG-Adベクターの腫瘍および肝臓にお

る遺伝子発現部位の特定

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、EGFP発現PEG-Adベクターを尾静脈内投与し、2日後に腫瘍および肝臓を回収した。4% PFAを用いて組織を固定後、B.3.5.に記載した方法と同様に凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下でEGFPの発現部位を特定した。

B.3.10. PEG-Ad-TNF α の全身投与による抗腫瘍効果の評価

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、TNF- α 発現Adベクター(Ad-TNF α)あるいは分子量5,000のPEGを用いた修飾率89%のPEG-Adベクター(PEG-Ad-TNF α)を尾静脈内投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を次式に従って算出した。

(腫瘍体積; mm³) = $1/2 \times \{(\text{腫瘍の長径; mm}) \times (\text{腫瘍の短径; mm})^2\} - 1/2 \times \{(\text{出血壊死部の長径; mm}) \times (\text{出血壊死部の短径; mm})^2\}$

B.3.11. PEG-Ad-TNF α を全身投与したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

B.3.10.と同様に各種ベクターを投与したMeth-A担癌マウスから、ベクター投与2日後に肝臓を摘出し、B.1.18.に記載した方法に従って病理組織学的観察を行った。

B.3.12. PEG-Ad-HSVtkの全身投与とGanciclovir (GCV) 腹腔内投与を併用した自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCVシステム) の有効性評価

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、HSVtk発現Adベクター(Ad-HSVtk)あるいは分子量5,000のPEGを用いた修飾率90%のHSVtk発現PEG-Adベクター(PEG-Ad-HSVtk)を尾静脈内投与した。これらのマウスに、ベクター投与日から10日間、GCVを50 mg/kg/dayで腹腔内に連続投与した。経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積をB.3.10.に示した式に従って算出した。また、これらのマウスの体重変化も併せてモニタリングした。

B.3.13. PEG-Ad-HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステ

ムを施したマウスにおける肝臓の病理組織学的観察

B.3.12.と同様に各種ベクターおよびGCVを投与したMeth-A担癌マウスから、ベクター投与7日後に肝臓を摘出し、**B.1.18.**に記述した方法に従って病理組織学的観察を行った。

B.3.14. RGD-PEG-Adベクターのインテグリン指向性の確認

RGDペプチド (GRGDTP; 200 µg/ml) 存在下あるいは非存在下において、Ad-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを用いてB16BL6細胞に遺伝子導入した。24時間培養した後、これらの細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3.15. RGD-PEG-Adベクターを全身投与したマウスの肝臓における遺伝子発現レベルの評価

BALB/cマウスにAd-Luc、AdRGD-Luc、あるいはRGD-PEG-Ad-Lucを尾静脈内投与した。ベクター投与2日後に肝臓を摘出し、**B.3.7.**に記述した方法に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3.16. Ad-CMV/HSVtkおよびAd-TERT/HSVtkで遺伝子導入した細胞のGCV感受性評価

Ad-HSVtkおよびHSVtk発現Ad-TERTベクター (Ad-TERT/HSVtk) を用いてA549細胞ならびにWI38細胞に遺伝子導入した。その後、種々の濃度に調製したGCV共存下で4日間培養し、各遺伝子導入細胞について生細胞数をWST-1 assayにより測定した。

B.3.17. Ad-TERT/HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムの原発癌モデルマウスにおける有効性と副作用の評価

腹部皮内に長径7-9 mmのMeth-A腫瘍を生着させたBALB/cマウスに、Ad-HSVtkまたはAd-TERT/HSVtkを尾静脈内投与した。これらのマウスに、ベクター投与日からGCVを50 mg/kg/dayで腹腔内に10日間連続投与した。経日的に腫瘍径を測定し、**B.3.10.**に示す式に従って腫瘍体積を算出した。

また、これらのマウスの体重変化および生存率をモニタリングすると共に、ベクター投与後2, 7日目にお

ける血中GOT・GPT濃度を測定した。

B.3.18. Ad-TERT/HSVtkを用いたHSVtk/GCVシステムの肺転移癌モデルマウスにおける有効性と副作用の評価

BALB/cマウスにCT26細胞を 10^5 cells/mouseで尾静脈内投与し、7日後にAd-HSVtkまたはAd-TERT/HSVtkを尾静脈内投与した。これらのマウスに、ベクター投与日からGCVを50 mg/kg/dayで腹腔内に7日間連続投与した。ベクター投与後7日目に肺を摘出し、転移コロニー数の計測ならびに肺重量の測定を行った。

B.4. Tat-Adベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

B.4.1. 活性基を有するTatペプチドの合成とTat-Adベクターの作製

Tatペプチド (GRKKRRQRRRPPQ) に活性基を付与したTat-NHSは、**Scheme 2**に示す方法により合成した。AdベクターのTatペプチド修飾は、Adベクター1粒子あたりのカプシドタンパクに存在するリジン残基にに対して12.5~2000倍モル量に相当するTat-NHSをAdベクター懸濁液 (final 2×10^{11} VP/ml) と混合し、300 rpmで攪拌しながら37°Cで45分間反応させることにより行った。その後、作製したTat-Adを分画分子量10,000の透析膜を用いてPBS溶液中で透析 (4°C, 4時間) した。また、作製したTat-Adベクターの表面電荷はZETASIZER 3000HSを用いて測定し、Adベクター表面へのTatペプチドの結合はSDS-PAGEにより確認した。

B.4.2. Tat-Adベクターの *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

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

でも遺伝子導入効率を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、大阪大学の倫理審査の承認を受け、各動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施しており、倫理的問題はない。

C. 研究結果

C.1. サイトカインおよびケモカインを発現する AdRGD ベクターを用いた癌免疫遺伝子治療の最適化

C.1.1. CCL17 遺伝子の腫瘍内導入による DC 癌免疫療法の有効性改善 (B16BL6 腫瘍モデル)

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

まず、あらかじめマウスに生着させた B16BL6 腫瘍内に 3×10^8 PFU の AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 2)。AdRGD-CCL17 投与群の腫瘍増殖は、コントロールベクター (AdRGD-Luc) を投与した群と比較して遅延傾向が認められたが、強力な抗腫瘍効果を発揮するまでには至らなかった。これは、腫瘍組織内で発現した CCL17 が免疫細胞を動員できたとしても、それらの免疫細胞が腫瘍特異的な傷害活性を獲得していなければ、効果的な腫瘍細胞排除は達成できないことを示唆している。

免疫療法によって TAA 特異的に活性化された患者体内の免疫細胞は、腫瘍組織内へと浸潤してはじ

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

我々の研究グループでは、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 の遺伝子を導入した DC をマウスに免疫することにより、gp100 特異的な CTL 活性が増強され、B16BL6 腫瘍の攻撃接種に対する抵抗性が誘導できることを既に報告している。そこで、gp100 遺伝子導入 DC (gp100/DC) の投与によって、免疫機能の低下が予想される B16BL6 担癌マウスにおいても gp100 特異的な免疫応答を増強できるのかを検討した。B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を投与したマウスから、免疫 1 週間後に脾細胞を調製し、gp100 特異的 CTL 活性を測定しところ、免疫していない群 (PBS 投与群) と比較して明らかに高い B16BL6 細胞傷害活性が検出された (Fig. 3)。したがって、たとえ腫瘍細胞が増殖している個体であっても、TAA 遺伝子を導入した DC の投与は TAA 特異的な免疫応答を活性化できることが示された。この結果は、TAA 発現 DC がワクチンプロトコルばかりでなく、既に生体内に腫瘍細胞が存在する状態での治療プロトコルにおいても、腫瘍免疫の始動および増幅を促すことが可能であり、DC 免疫療法によって活性化されたエフェクター細胞をケモカインの利用によって腫瘍組織に集積させることができれば、外科療法で除去し切れなかった腫瘍塊や切除することのできない組織に発生あるいは転移した腫瘍に対する新たな治療戦略の開発に繋がることを示唆している。

そこで、マウスに B16BL6 腫瘍を接種した翌日に gp100/DC を皮内免疫し、その後、直径が 5-7 mm に増殖した腫瘍内に AdRGD-CCL17 を投与した際の腫瘍増殖抑制効果について検討した (Fig. 4)。gp100/DC を免疫した後に腫瘍内に PBS を投与した群においては、PBS の腫瘍内投与のみを行ったマウスとほぼ同等の腫瘍増殖が認められ、ひとたび増殖を始めた B16BL6 腫瘍を gp100/DC の投与だけで抑えることは非常に困難であることが示された。また、gp100/DC を免疫した後にコントロールベクターである AdRGD-Luc を腫瘍内投与した群では、PBS 投与群と比較してわずかな腫瘍増殖遅延が観察された。この詳細なメカニズムは不明であるが、ベクター投与に伴う炎症反応によって集積した免疫細胞による効果ではないかと推察された。このコントロールベクター投与群と比較して、AdRGD-CCL17 投与群では非常に効果的な腫瘍増殖抑制が達成された。この知見は、単独適用では高い癌治療効果が得られなかったケモカインも、他のアプローチ (腫瘍免疫を活性化する方法) との併用によって優れた有効性を発揮する可能性があることを示唆している。

腫瘍免疫研究の発展に伴って、種々の免疫エフェクター細胞 (NK 細胞、CTL、マクロファージなど) がそれぞれに異なった機構で腫瘍細胞を傷害することが明らかとなり、gp100/DC 免疫と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与との併用による抗腫瘍効果のメカニズムを理解するためには、腫瘍組織内に集積した免疫細胞のサブセットならびに細胞数を解析する必要がある。そこで、本プロトコールにおける T 細胞の腫瘍内集積性ならびに腫瘍内に浸潤した免疫細胞の活性化状態について解析した。AdRGD-CCL17 腫瘍内投与後 2 日目に摘出した腫瘍の CD3 に対する免疫組織染色像を観察したところ、コントロールベクター投与群と比較して有意に高い陽性細胞数が検出された (Fig. 5)。さらに、AdRGD-CCL17 腫瘍内投与のみのプロトコールと gp100/DC の皮内免疫を併用したプロトコールとにおいて、腫瘍内に動員された免疫細胞の活性化状態を比較するために、それぞれの腫瘍におけるリンパ球活性化マーカー (Perforin、Granzyme

B、IFN- γ) の mRNA 発現レベルを RT-PCR により解析した (Fig. 6)。コントロールベクターを投与した腫瘍と比較して、AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍においては、gp100/DC の皮内免疫併用の有無に関わらず、Perforin、Granzyme B、IFN- γ のいずれの mRNA 発現とも高いレベルであった。また、AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍においては、gp100/DC の皮内免疫を併用することによって、Perforin、Granzyme B、IFN- γ の mRNA 発現レベルが顕著に増大した。これらの結果は、両プロトコールにおける抗腫瘍効果の結果 (Fig. 2, Fig. 4) に良く相関しており、腫瘍特異的に活性化された免疫細胞をいかに効率良く腫瘍局所に集積させるかが、有効な癌免疫療法を開発する上でのキーファクターとなることを強く示唆している。

C.1.2. CCL27 遺伝子の腫瘍内共導入による IL-12 癌免疫遺伝子治療の有効性改善 (OV-HM 腫瘍モデル)

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

れる。

これまでに我々は、マウス卵巣上皮癌細胞である OV-HM 細胞に、種々のケモカイン遺伝子を AdRGD ベクターにより導入することでケモカイン産生 OV-HM 細胞を作製した。このケモカイン産生 OV-HM 細胞を同系マウスの腹部皮内に移植し、その腫瘍増殖抑制効果と免疫細胞の遊走活性について評価した結果、CCL27 産生 OV-HM 細胞を移植した群で腫瘍の増殖抑制効果が認められ、さらに腫瘍組織内へ T 細胞、NK 細胞を浸潤させることを明らかとしている。しかし、これはあくまで *ex vivo* 系での結果であり、後述するように、生着した腫瘍に対しては CCL27 遺伝子を導入しても治療効果は認められなかった。すなわち、ケモカインの単独投与では生着した癌組織を退縮させるほどの活性を有した免疫細胞を浸潤させることができず、さらなる治療法の改良が必要であることを示している。傷害活性を有した免疫細胞が腫瘍細胞に直接接触するという抗腫瘍メカニズムを考慮するとエフェクター細胞による効果的な癌免疫療法を達成するためには、それら細胞群の質的制御（活性化）と動態制御（腫瘍内浸潤）の両者が重要であることが考えられる。そこで、これまで免疫系を活性化させる因子として広く研究されてきたサイトカインにより質的制御を、ケモカインにより動態制御をそれぞれ達成することによる、治療効果の増強について検討を行うこととした。

免疫細胞を活性化するサイトカインとして、我々はこれまで癌免疫療法の研究で広く用いられてきた IL-12 を選択した。IL-12 は細胞性免疫応答システムの活性化因子であり、NK 細胞や NKT 細胞、あるいは T 細胞の一部を活性化し、さらに IFN- γ などの産生を誘導することにより抗腫瘍効果を発揮するサイトカインである。そこで AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 とを併用投与することによる抗腫瘍効果について検討を行った。OV-HM 担癌マウスの腫瘍径が 7~8 mm に達したところで、腫瘍内にそれぞれ PBS、AdRGD-Luc、AdRGD-CCL27、AdRGD-IL12 を各単独、あるいは AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL12 を混合し、総 AdRGD ベクター量として 2×10^7 PFU/mouse

で投与した。また、併用投与群については、投与した合計 AdRGD ベクター量を変えずに AdRGD-CCL27 と AdRGD-IL12 の比率を 1:9、1:1、9:1 とすることで、最適な投与比率も同時に検討することとした。AdRGD ベクター投与後、経口的に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を評価した (Fig. 7)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群はコントロールベクターである AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察され、治療効果はほとんど認められなかった。また AdRGD-IL12 単独投与群では腫瘍の増殖抑制効果が認められた。一方、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与した群では、その割合が 1:9 の群ではほとんど抗腫瘍効果が認められなかったが、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を 1:1、9:1 の割合で併用投与した群では、投与した AdRGD ベクター量が同じであるにも関わらず、AdRGD-IL12 単独投与群よりも強い腫瘍の退縮が認められた。

次に、マウスの生存率について検討を行った (Fig. 8)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では 7 例中 2 例の完全治癒が得られたが、AdRGD-Luc 投与群と同程度 (7 例中 1 例) であったことから、その治療効果はやはり弱いものと考えられる。また、AdRGD-IL12 単独投与群では 7 例中 4 例の完全治癒が得られ、腫瘍体積変化の結果と同じく、AdRGD-CCL27 単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られた。一方、併用投与群では AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の割合が 1:9、1:1、9:1 の群で、それぞれ 7 例中 0 例、8 例中 6 例、8 例中 8 例の完全治癒が得られ、1:1、9:1 の割合で投与した群では各単独投与群よりも治療効果の増強が認められた。AdRGD-CCL27 単独投与群と比較して、AdRGD-IL12 単独投与群での治療効果が大きかったことと、併用投与群での治療効果が AdRGD-IL12: AdRGD-CCL27=9:1 の割合で最も大きかったことを考え合わせると、今回併用投与により得られた抗腫瘍効果では IL-12 の作用が主であり、CCL27 は補助的に働いたものと考えられる。

続いて、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与により長期間にわたる腫瘍細胞特異的な免疫反応