

が誘導されているかを検討した。AdRGD-IL12 : AdRGD-CCL27 = 5:5, 9:1 の割合で併用投与し完全治癒したマウスに対して、3ヵ月後ないしは6ヵ月後に OV-HM 細胞、および治療実験に用いたマウスと同じ MHC ハプロタイプを持つ B16BL6 細胞を再移植し、腫瘍の生着の有無を確認した (Table 2)。その結果、コントロール群 (Intact) および B16BL6 細胞を移植した群では、全てのマウスにおいて腫瘍の生着が認められたが、併用投与により完全治癒が得られたマウスでは、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の割合が 1:1, 9:1 のいずれの群のマウスにおいても腫瘍の生着はほとんど確認されなかった。また、9:1 の投与比率の群で、3ヵ月後に 1 例の腫瘍生着が認められたが、その腫瘍サイズは非常に小さいものであった。以上の結果より、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、長期にわたる OV-HM 細胞特異的な免疫機構が誘導されていることが示唆された。

そこで次に、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与により得られる抗腫瘍効果増強のメカニズム解明を試みた。まず、第一の抗腫瘍エフェクター細胞である T 細胞の抗腫瘍効果への寄与について確認するために、T 細胞欠損マウスである BALB/c ノードマウスを用いて検討を行った。OV-HM 担癌ノードマウスに対して、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与し、経日的に腫瘍サイズを測定した (Fig. 9)。その結果、併用投与群においても、PBS 群、AdRGD-Luc 投与群と同程度の腫瘍の増殖が観察された。T 細胞が欠損しているノードマウスにおいて、併用投与による治療効果がほとんど認められなかったことから、本併用プロトコルで得られた抗腫瘍効果は T 細胞依存的であることが示された。

併用投与により得られた抗腫瘍効果に対して、より詳細なエフェクター細胞の寄与について確認するために、NK 細胞や T 細胞に対する抗血清・抗体を用いてこれら各リンパ球を除去したマウスにおける抗腫瘍効果について検討を行った (Fig. 10)。その結果、NK 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞除去群では、それぞれ腫瘍が拒絶されないマウスが認められ抗腫瘍効果が減少していた。さらに、T 細胞のうち

CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットを除去したマウスでは、PBS 群と同程度以上の腫瘍の増殖が観察された。以上の結果から、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与による抗腫瘍効果は、NK 細胞が主ではなく、CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットに依存することが明らかとなった。本結果は先のノードマウスを用いた検討結果を支持するものであり、本研究において得られた抗腫瘍効果は、T 細胞依存的であることが示された。

次に T 細胞の腫瘍内浸潤について検討すべく、抗 CD3 抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 11)。その結果、PBS 投与群、AdRGD-Luc 投与群ではほとんど腫瘍内に CD3 陽性 T 細胞の浸潤は観察されなかった。一方、併用投与群では AdRGD-IL12 単独投与群と比較して CD3 陽性 T 細胞数の有意な増大が認められたことから、併用投与群では腫瘍内へより多くの T 細胞が浸潤していたため治療効果の増強に繋がったものと考えられた。さらに、併用投与群における腫瘍内浸潤 CD3 陽性 T 細胞の分布について確認したところ、血管周辺やその他の部位に局在しているわけではなく、腫瘍組織全体に散在していたことから、腫瘍の実質細胞にまで浸潤していることが強く予想された。免疫細胞による抗腫瘍作用では、T 細胞、NK 細胞等のエフェクター細胞が腫瘍細胞と直接接触することにより、はじめて腫瘍細胞を傷害し腫瘍の退縮が起こることから、併用投与群において数多くの T 細胞が腫瘍実質にまで浸潤していたことが、全例で完全治癒するという強い抗腫瘍効果が得られたことの一因であるものと予想された。しかし、治療効果が認められなかった AdRGD-CCL27 単独投与群において、最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察されたことから、抗腫瘍機構の解明にはさらなる解析が必要である。

そこで続いて、腫瘍内に浸潤した T 細胞について、その詳細を検討する目的で、CD4、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を確認した (Fig. 12)。その結果、併用投与群では CD4、CD8 陽性 T 細胞の両サブセットが浸潤しており、共に AdRGD-IL12 単独投与群と比べて増加傾向であったことから、CD3 陽性 T 細胞の結果と同

様に、併用投与による治療効果増強を示唆する結果であった。また最も多くの CD3 陽性 T 細胞の浸潤が観察された AdRGD-CCL27 単独投与群では、併用投与群や AdRGD-IL12 単独投与群と比較して、主に CD4 陽性 T 細胞が浸潤していた。一般に傷害活性を有しているのは CD8 陽性 T 細胞であることから、浸潤 T 細胞のサブセットの違いが、治療効果に差が生じた要因の一つとして考えられた。しかし一方で、CD8 陽性 T 細胞の浸潤数が少ないといっても、治療効果が同程度であった AdRGD-Luc 投与群と比べると多いこと等を考慮すると、AdRGD-CCL27 単独投与群では活性化した免疫細胞が浸潤していないために治療効果が得られなかったことが強く予想される。そこで、免疫細胞の活性化についての検討を行った。

IFN- γ は、活性化ヘルパー T 細胞などから産生され、マクロファージの活性化、腫瘍細胞の増殖抑制作用、Fas や TNF レセプターの発現増強などによる抗腫瘍作用を有するサイトカインである。そこで、多くの CD4 陽性 T 細胞が浸潤していた AdRGD-CCL27 単独投与群の腫瘍内での活性化状態を考察するために、まずは腫瘍内での IFN- γ 発現を RT-PCR により確認した (Fig. 13)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では IFN- γ の発現は確認できなかったが、AdRGD-IL12 単独投与群、および併用投与群では同程度の IFN- γ の発現が認められた。このことから、AdRGD-CCL27 単独投与群では多くの CD4 陽性 T 細胞が浸潤していたものの、それらが活性化されていなかったと考えられた。また、併用投与群と AdRGD-IL12 単独投与群とでは、同程度の活性化状態であったことが示唆された。

続いて腫瘍内に活性化した細胞が浸潤しているのかについて検討を行う目的で、CTL、活性化 NK 細胞のマーカーであり、細胞傷害因子である perforin の腫瘍組織内における発現を免疫染色により観察した (Fig. 14)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では、IFN- γ の結果と同様、ほとんど perforin 陽性細胞が観察されなかったのに対し、AdRGD-IL12 単独投与群、および併用投与群では perforin 陽性細胞が確認された。また、併用投与群では、AdRGD-IL12 単

独投与群よりも perforin 陽性細胞数が有意に増加していたことから、ケモカインによる浸潤とサイトカインによる活性化の両者が達成されており、このことも治療効果の増強の要因と考えられた。

C.1.3. CCL27 遺伝子の腫瘍内共導入による IL-12 癌免疫遺伝子治療の有効性改善 (Meth-A 腫瘍モデル)

次に、IL-12 非奏功性の癌として知られる Meth-A 腫瘍を生着させたマウスにおける AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の腫瘍内併用投与による抗腫瘍効果を検討した。まず、Meth-A 担癌マウスに AdRGD-IL12 単独、AdRGD-CCL27 単独、または 9:1 で混合した AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を総ベクター用量として 2×10^7 PFU で腫瘍内投与し、2 日後の腫瘍内 IL-12 産生量を比較したところ、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群では、AdRGD-IL12 単独投与群とほぼ同等の IL-12p70 の発現が確認された (Fig. 15)。一方、AdRGD-CCL27 単独投与群では検出限界以下であり、CCL27 発現に伴う IL-12 産生誘導は起こらないことを確認した。

そこで、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与、AdRGD-CCL27 単独腫瘍内投与、または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与した Meth-A 担癌マウスにおける経日的な腫瘍体積変化と生存率をモニタリングした (Fig. 16)。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では、コントロールベクター投与群と同じ腫瘍増殖を示し、抗腫瘍効果は全く見られなかった。一方、AdRGD-IL12 単独投与群では治療 5 日後から明らかな腫瘍退縮が認められ、さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群においてはそれを上回る腫瘍増殖抑制効果が得られた。マウスの生存率においても、コントロール群ならびに AdRGD-CCL27 単独投与群では治療から約 20 日後には全例死亡してしまったのに対して、AdRGD-IL12 単独投与群では生存期間の明らかな延長が認められ、治療 90 日後においても約 60%のマウスが生存していた。また、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与群においては、治療 90 日後におけるマウスの生存率は 90%以上であり、完全治癒例は AdRGD-IL12 投

与群で13例中8例であったのに対して、併用群では13例中12例と極めて高率に認められた。これらの結果は、AdRGD-CCL27を併用投与することによって、AdRGD-IL12腫瘍内投与による抗腫瘍効果が大きく改善されることを示すものである。

続いて、完全治癒が得られたマウスに長期的な免疫記憶が誘導されているかを検討するために、最初の腫瘍接種から90日後に、Meth-A細胞あるいは同系ハプロタイプのCT26細胞を再接種し、それらの生着を観察した（Table 3）。その結果、CT26細胞を接種した場合には全例において腫瘍の生着が確認されたのに対して、Meth-A細胞接種群では全てのマウスが腫瘍の生着を完全に拒絶した。すなわち、AdRGD-IL12単独腫瘍内投与ならびにAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与によって原発腫瘍を完全に退縮することができたマウスにおいては、長期にわたる腫瘍特異的な免疫記憶が誘導されていることが示された。

前述のとおり、Meth-A腫瘍はリコンビナントIL-12の腹腔内投与で全く抗腫瘍効果が得られないIL-12非奏功性腫瘍として知られている。その原因として、組織学的観察から、腫瘍周辺ストローマ組織の不形成に基づく接着分子の低発現が報告されてきた。接着分子は、リンパ球と血管内皮細胞との接着を媒介する機能を持ち、リンパ球の組織浸潤機構に関与する重要な分子の一つである。このため、IL-12遺伝子の腫瘍内導入のみでは効果的な治療は困難であろうと予想していたが、AdRDG-IL12単独腫瘍内投与においても劇的なMeth-A腫瘍退縮効果が認められ、さらにAdRGD-CCL27を併用することで、その抗腫瘍効果の増強が確認された。そこで次に、Meth-A腫瘍におけるAdRGD-IL12単独腫瘍内投与またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与における抗腫瘍メカニズムについて解析した。

これらの治療プロトコルで完全治癒が得られたマウスに長期免疫記憶が誘導されていたことは、T細胞を中心とした獲得免疫系の誘導・活性化が抗腫瘍効果に大きく関与していることを示唆する。そこで、T細胞欠損ヌードマウスをにおいて同様の治療実験を

行い、抗腫瘍効果におけるT細胞免疫系の寄与率を検討した（Fig. 17）。その結果、AdRGD-IL12単独投与またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与のいずれの場合においても、Meth-A腫瘍の増殖はコントロール群と同等であったことから、これらの治療プロトコルにおいてはT細胞依存性腫瘍免疫が主要な抗腫瘍メカニズムであることが判明した。さらに、抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗asialo GM1抗血清を用いた*in vivo* depletion assayにより、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットの同定を試みた（Fig. 18）。その結果、AdRGD-IL12単独腫瘍内投与またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用腫瘍内投与した際の腫瘍増殖抑制効果は、CD4⁺T細胞枯渇でほとんど影響を受けず、NK細胞枯渇においてやや減弱し、CD8⁺T細胞枯渇によって完全に消失した。ヌードマウスでの検討と考え合わせると、AdRGD-IL12単独投与またはAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与により誘導される抗腫瘍効果においては、CD8⁺T細胞、すなわちCTLが主要な免疫エフェクター細胞として機能していることが明らかとなった。

そこで、このCTLを活性化するメカニズムを解明するために、腫瘍局所ならびにリンパ節・脾臓などの二次リンパ組織における免疫イベントを解析した。まず、免疫組織染色によりMeth-A腫瘍内における浸潤T細胞数を検討したところ、コントロール群と比較してAdRGD-CCL27単独投与群、AdRGD-IL12単独投与群およびAdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用投与群において、CD3⁺T細胞の顕著な増加が確認できた（Fig. 19）。さらに、この腫瘍内浸潤T細胞のサブセットを解析したところ、AdRGD-CCL27投与群においてはCD8⁺T細胞が優位に浸潤しており、AdRGD-IL12投与群ではCD4⁺T細胞が優位に浸潤する傾向が認められた。また、これらの群と比較して、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27併用群ではCD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞の双方を最も効率よく腫瘍内に動員することができた。さらに、Perforin発現を指標としてこれら腫瘍内浸潤T細胞の活性化状態を検討したところ、AdRGD-CCL27単独投与群の

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

一方、リンパ球低浸潤性とされる Meth-A 腫瘍に IL-12 を高発現させるだけで腫瘍内リンパ球動員を増強できたことから、次にこのメカニズムの解析を試みた。IL-12 には T 細胞や NK 細胞に作用して IFN- γ の産生を促進する活性があることから、AdRGD-IL12 を投与した腫瘍局所における IFN- γ 産生レベルを RT-PCR 解析により評価した (Fig. 20)。その結果、AdRGD-IL12 の投与によって腫瘍組織での IFN- γ 産生に亢進が認められ、IL-12 の作用によって腫瘍組織内環境が免疫活性化状態にあることが示された。さらに、リンパ球と血管内皮細胞との接着に重要な分子であり、IFN- γ の作用によって発現レベルの増強が報告されている ICAM-1 および VCAM-1 の腫瘍内発現レベルについても RT-PCR 解析したところ、AdRGD-IL12 投与腫瘍においてのみ、両接着分子の mRNA 発現レベルに明らかな上昇が認められた。これらの結果は、腫瘍辺縁ストローマ未形成ならびに新生血管における接着分子の低発現のためにリンパ球浸潤が困難とされてきた Meth-A 腫瘍において、AdRGD-IL12 の投与が腫瘍組織環境をリンパ球浸潤可能な状態に改善したことを示唆している。さらに、AdRGD-IL12 投与 6 日後のマウスから所属リンパ節細胞ならびに脾細胞を調製し、それらの Meth-A 細胞特異的な免疫応答を IFN- γ 産生細胞数を指標に検討したところ、コントロール群と比較して顕著な陽性細胞数の増加が確認できたことから、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって腫瘍特異的な全身性免疫応

答が効率よく誘導されることも明らかとなった (Fig. 21)。

さて IL-12 は、細胞性免疫の活性化に基づく抗腫瘍作用を有する一方で、その多様な生理活性のために肝障害、血液毒性、発熱、嘔吐などの重篤な副作用を誘導し、これが臨床応用を推進する大きな障壁となっている。そのため、IL-12 による抗腫瘍効果を最大限に維持したまま、副作用発現の危険性を低減させることのできる治療戦略の開発が望まれている。そこで、AdRGD-IL12 単独腫瘍内投与あるいは AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用腫瘍内投与で Meth-A 腫瘍の完全退縮が達成できたマウスにおける副作用発現について検討した (Fig. 22)。肺、脾臓、肝臓の病理組織学的な観察を行ったところ、AdRGD-IL12 単独投与群では、肺において多数のリンパ球浸潤が認められ、肝臓および脾臓においては髄外造血が確認された。一方、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、これらの副作用が全て軽度に抑えられており、詳細な機構は不明であるが AdRGD-CCL27 の併用投与は、AdRGD-IL12 投与に起因する副作用発現を低減できるアプローチであることが示唆された。

C.2. アポトーシス抵抗性 DC ワクチンの創製による DC 癌免疫療法の最適化

DC の生存や細胞死を決定する分子機構はこれまで不明であったが、近年の分子生物学の進展に伴い、アポトーシス制御因子である Bcl-2、Bcl-x_L、Bim が、“分子タイマー”として機能し、それらの量的なバランスが DC の寿命を決定していることが明らかになりつつある。これら Bcl-2 タンパク質ファミリー分子のうち、Bcl-2、Bcl-x_L は共にミトコンドリア膜上に存在し、シトクロム c などのアポトーシス誘導因子のミトコンドリアから細胞質への流出を抑制することで、アポトーシス経路を抑制する。最近になり、DC の生存には Bcl-x_L によって制御される系と Bcl-2 と Bim のバランスによって制御される系の独立した 2 つに機構が存在することが報告された。未熟 DC においては、Bcl-2 は恒常的に発現しているものの、Bcl-x_L、Bim はほと

んど発現しておらず、培養を継続するとアポトーシスによって細胞死に至る。また、生体内の DC はリンパ節内において T 細胞に発現する CD40L によって刺激されると Bcl-x_L の発現が上昇し、一時的に生存を保つことが知られている。さらに、Bcl-x_L のミトコンドリア外膜への結合部分を点突然変異法により疎水性アミノ酸に置換することによって、抗アポトーシス活性増強型の変異体が得られており、なかでも 3 アミノ酸を置換した Bcl-xFNK (FNK) が抗アポトーシス活性に優れていることが報告されている。そこで本研究では、Bcl-x_L あるいは FNK を高発現させることでアポトーシス抑制機能を付与した DC ワクチンを創製し、それを用いた新規 DC 癌免疫療法の有用性を評価した。

まず、AdRGD-Bclx_L あるいは AdRGD-FNK により遺伝子導入した培養細胞 (A549 細胞) における各分子の発現を確認した (Fig. 23)。AdRGD-Bclx_L 作用群および AdRGD-FNK 作用群では、Western blotting により Bcl-x_L および FNK の分子量に相当する 28 kDa 付近にバンドが確認できた。また、これらの細胞の FCM 解析の結果から、AdRGD-Bclx_L および AdRGD-FNK による遺伝子導入効率はどちらも約 90%であった。

そこで、DC の増殖因子である GM-CSF を添加しない培養条件において、これらの AdRGD を用いて遺伝子導入した DC (Bcl-x_L/DC および FNK/DC) の生存期間を検討した (Fig. 24)。遺伝子導入処理を行わない DC (Mock DC) およびコントロールベクターである AdRGD-Luc を作用させた DC の生存率は培養 4 日目には 50%以下に低下していたのに対して、FNK/DC および Bcl-x_L/DC の生存率は、培養 4 日目までは 80%以上を維持し、培養 7 日目においても 50%以上であった。さらに、FNK/DC のアポトーシス抵抗性を評価するために、アポトーシス誘導剤である Staurosporine 存在下で培養した際の生存率について検討した (Fig. 25)。コントロール DC では培養 24 時間後に 60%程度の生存率しか得られない 100 nM Staurosporine の存在下で、FNK/DC は 90%以上の生存率を保つことができた。以上の結果より、

AdRGD-Bclx_L あるいは AdRGD-FNK によって遺伝子導入することによって、アポトーシス抵抗性の付与に基づく DC の生存期間延長を達成できることが示された。

DC は MHC 分子上に抗原タンパクに由来するエピトープペプチドを提示することによって、はじめて T 細胞を抗原特異的に感作・活性化することができる。したがって、遺伝子改変 DC ワクチンの創製にあたっては、遺伝子導入操作によって DC 本来の抗原提示機能が影響されないことを確認する必要がある。そこで、FNK/DC に OVA 遺伝子を共導入し、MHC class I 分子を介した OVA 提示レベルとその期間を検討した (Fig. 26)。AdRGD-OVA 単独で遺伝子導入した DC (OVA/DC) と比較して、FNK 遺伝子と OVA 遺伝子とを共導入した DC (FNK+OVA/DC) は培養 2 日目においてほぼ同等の抗原提示効率を示した。さらに、OVA/DC では培養 6 日目に抗原提示レベルが検出限界以下にまで低下していたのに対して、FNK+OVA/DC では培養 6 日目でも 2 日目と変わらない抗原提示レベルを保持していた。したがって、FNK/DC は生存期間の延長を反映して、長期間にわたり抗原提示能を維持できることが明らかとなった。

そこで、FNK+OVA/DC および Bcl-x_L+OVA/DC のワクチン機能を評価するために、TAA として OVA を発現する E.G7-OVA 細胞を用いて腫瘍拒絶実験を行った (Fig. 27)。腫瘍体積のモニタリングから、コントロール群と比較して、OVA/DC 免疫群に腫瘍増殖抑制効果が認められ、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x_L+OVA/DC 免疫群においては、OVA/DC 免疫群をさらに上回る抗腫瘍効果が得られた。この結果と関連して、OVA/DC 免疫群では全例に腫瘍の生着が認められたのに対して、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x_L+OVA/DC 免疫群では、10 例中 3 例で腫瘍の完全拒絶が観察された。

次に、OVA のような抗原性の高いモデル抗原ではなく、本来腫瘍に発現している TAA を標的とした DC 癌免疫療法におけるアポトーシス抵抗性 DC ワクチンの有効性を評価するために、AdRGD を用いて調製し

た gp100/DC、FNK+gp100/DC、および Bcl-x_L+gp100/DC のマウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるワクチン効果を比較した (Fig. 28)。gp100/DC 免疫群と比較して、FNK+gp100/DC 免疫群および Bcl-x_L+gp100/DC 免疫群では、より強力な腫瘍増殖抑制効果が認められ、E.G7-OVA 腫瘍モデルと同様の傾向が得られた。したがって、モデル抗原を標的とした場合のみならず、低免疫原性のメラノーマに対しても、TAA のみを導入した従来の DC ワクチンと比較して、抗アポトーシス分子と TAA とを共導入した DC ワクチンのほうが、腫瘍免疫誘導能に優れることが実証された。

続いて、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンによる抗腫瘍効果増強メカニズムの解析を試みた。まず、抗原特異的 CTL の誘導効率について比較したところ、OVA/DC 免疫群と比較して、FNK+OVA/DC 免疫群および Bcl-x_L+OVA/DC 免疫群から調製したエフェクター細胞は、より強力に E.G7-OVA 細胞を傷害することができた。一方、いずれの免疫群についても、OVA を発現していない EL4 細胞に対する傷害活性は認められなかったことから、FNK+OVA/DC および Bcl-x_L+OVA/DC は OVA 特異的 CTL 活性の誘導能に優れた DC ワクチンであることが示された (Fig. 29)。

次に、マウスに投与した FNK/DC の所属リンパ節集積性とそこでの生存期間を評価するために、GFP トランスジェニックマウス由来の DC を用いた組織学的な解析を行った (Fig. 30)。その結果、コントロール DC 投与群と比較して、FNK/DC 投与群では投与後二日目において所属リンパ節に到達している DC 数が約 2 倍増加しており、その後経日的にリンパ節内の FNK/DC 数は減少するものの、少なくとも投与後 8 日間に渡り、コントロール群よりも約 2 倍高い DC 数が検出された。したがって、FNK/DC ワクチンは投与部位から所属リンパ節への初期到達量の増大とリンパ節内での消失半減期の延長に伴って、従来の DC ワクチンよりも強力にかつ長期にわたって T 細胞を感作・活性化できることが示唆された。そこで、FNK/DC ワクチンによりリンパ節内で活性化される抗原特異的 T

細胞の頻度を IFN- γ 産生を指標に検討したところ、免疫後 7 日目において、FNK+gp100/DC ワクチンは gp100/DC よりも効率よく CD4⁺ T 細胞ならびに CD8⁺ T 細胞を活性化できることが判明した (Fig. 31)。

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

C.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

C.3.1. PEG-Ad ベクターの特性解析と全身投与型腫瘍標的化ベクターとしての応用

高分子バイオコンジュゲーションは、蛋白質・粒子の医薬価値を高めるための優れたドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術であると世界的に認識されている。一般的に、PEG 等の水溶性高分子により修飾された蛋白質やリポソームは、抗体や貪食細胞からの回避能が付与され、血中安定性および血中滞留性が飛躍的に向上することが知られている。また腫瘍組織では、正常組織に比べ血管透過性が亢進しており、同時にリンパ系による異物回収機構が不十分である。これにより長時間血中に滞留している PEG 化蛋白質やリポソームは、腫瘍組織に効果的に蓄積する、いわゆる EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) を発揮することが知られており、近年、この EPR 効果を利用した腫瘍ターゲティング製剤の開発が広く推進されている。我々は、このような PEG 修飾の特性は、Ad ベクターを PEG で修飾した場合にも同様に得られると考え、最適な PEG 修飾 Ad ベクターを作製すれば、血中滞留性の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングが達成できるのではないかとこの着想に至った。

我々はこれまでに、Ad ベクターに対する PEG 修飾方法を確立し、*in vitro* における PEG-Ad ベクターの遺伝子発現特性を検討してきた。そこで本研究では、PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子発現特性を詳細

に解析すると共に、腫瘍をターゲットとした全身投与型遺伝子治療用ベクターとしての有用性評価に取り組んだ。

Ad ベクターの1粒子の外殻蛋白質に存在するリジン残基に対して、25、100、400、1600 または 6400 倍モル量の活性化 PEG (分子量 5,000) を添加することで Ad ベクターの PEG 修飾を行い、作製した PEG-Ad ベクターの修飾率を SDS-PAGE にて解析した (Fig. 32)。その結果、クーマシブルー染色により未修飾ヘキソンのバンドの高分子側に、PEG 修飾率の増大に伴いブロードなバンドが見られ、また、高分子側にシフトしたバンドが PEG に対する染色により検出されたことから、このバンドは PEG が化学結合したヘキソンであると確認された。クーマシブルー染色により得られた未修飾ヘキソンのバンドと PEG 修飾されたヘキソンのバンドの濃さの割合を PEG 修飾率として画像解析により算出し、Table 4 に示したような様々な修飾率を有する PEG-Ad ベクターを作製することができた。また、PEG 修飾率の増大に伴い粒子径が増大することを確認した。なお、我々は以前の検討において、PEG 修飾操作により 5%以上の修飾率を有する PEG-Ad ベクターでは未修飾の Ad ベクター粒子を含まないこと、つまり全ての Ad ベクターに PEG が結合していることを既に明らかとしている。

次に、蛋白質やリポソームの血中滞留性を向上させる PEG 修飾の利点が、Ad ベクターの PEG 修飾にも当てはまるかどうかを検討した。BALB/cマウスに 5×10^{10} VP の PEG-Ad ベクターを尾静脈内投与し、血液中に存在する Ad ベクターの DNA 量を Southern blotting により定量することで、PEG-Ad ベクターの血中滞留性を評価した (Fig. 33, Table 3)。PEG 修飾していない Ad ベクターは、血中から速やかに消失し、その血中半減期は 1.6 分であった。これに対して修飾率 61.1%、89.3%、100%の PEG-Ad ベクターの血中半減期は、修飾していない Ad ベクターと比較してそれぞれ約 3 倍、7 倍、50 倍に延長しており、顕著な血中滞留性の向上が認められた。

また、PEG-Ad ベクターに抗体回避能が付与されているかどうかを検討するために、マウス抗 Ad 抗血

清存在下あるいは非存在下における PEG-Ad ベクターの遺伝子発現活性を検討した。抗血清が存在しない時の遺伝子発現を 100%とし、抗血清存在下における遺伝子発現量の低下率を算出した結果を Fig. 34 に示す。未修飾 Ad ベクターの遺伝子発現は、抗血清の増加に伴いコントロールの 1%以下にまで低下したのに対して、修飾率 61.1%の PEG-Ad ベクターでは、抗血清存在下においても高い遺伝子発現が保持されており、その抗体回避能は、未修飾 Ad ベクターの約 30 倍であった。

PEG-Ad ベクターの血中滞留性の向上は、PEG 鎖の立体障害により Ad ベクターのレセプターである CAR を介した肝臓への急速な初期分布ならびに貪食細胞からの取り込みが回避されるためだと考えられる。そこで、様々な修飾率の PEG-Ad ベクターを用いて、CAR 発現細胞に対する遺伝子導入効率ならびに PEG-Ad ベクターの遺伝子発現活性、すなわち細胞内侵入後の高い核移行能に関して、細胞内導入試薬を用いて評価した。同時に加熱処理を行い、Ad ベクターの核移行活性を担う蛋白質を熱変性させた群を加えることで、厳密な活性評価に取り組んだ。その結果、通常の遺伝子導入条件下においては、予想通り PEG-Ad ベクターによる遺伝子発現レベルは PEG 修飾率の増大に伴って低下した (Fig. 35)。この遺伝子発現効率の低下は、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合障害に由来すると考えられる。すなわち、PEG-Ad ベクターの *in vivo* 投与における血中滞留性の向上は、CAR との結合障害により初期の臓器移行性が低下することが一因と考えられる。一方、Lipofectamine 2000 を併用して遺伝子導入した場合には、修飾率 89%の PEG-Ad ベクターにおいても高い遺伝子発現活性が検出された。また、加熱処理により Ad ベクターの蛋白質を熱変性させた群 (Ad ベクターDNA を作用させた群) では、Lipofectamine 2000 を併用しても遺伝子発現の回復はみられなかった。以上のことは、Ad ベクター表面の PEG 修飾自体は、核移行活性に大きく影響しないことを示している。すなわち、表面の大部分が覆われた PEG-Ad ベクターであっても、細胞内への侵入過程が成立した細胞・

組織においては、Ad ベクターが本来有する高い遺伝子発現効率が得られることが強く示唆された。

そこで次に、PEG-Ad ベクターの血中滞留性の向上に伴う腫瘍組織への受動的ターゲティングを目指して、様々な修飾率のPEG-Ad ベクターを担癌マウスの尾静脈内投与した際の各組織における遺伝子発現パターンを検討した。各種 PEG-Ad ベクターの全身投与において、各臓器での遺伝子発現レベルはPEG 修飾率に対してベルシェイプを示した (Fig. 36)。特に PEG 修飾率 61%の PEG-Ad ベクターでは、多くの臓器において未修飾 Ad ベクターよりも数十倍高い遺伝子発現が得られた。この現象の詳細な原因は不明だが、おそらく血中滞留性の向上、細網内皮系からの取り込み回避等の *in vivo* 条件下における幾つもの要因が影響しているものと考えられる。また、最も遺伝子発現の高い肝臓および腫瘍に注目すると、各修飾率の PEG-Ad ベクターのうち、修飾率 89%の PEG-Ad ベクターが腫瘍で最も高い遺伝子発現を示し、その発現量は未修飾 Ad ベクターよりも約 40 倍高いものであった。同時に副作用の主原因となる肝臓での遺伝子発現量は未修飾 Ad ベクターの約 1/20 に抑制されており、腫瘍と肝臓とでほぼ同等の遺伝子発現量を示した。

続いて、Ad ベクター粒子としての腫瘍および肝臓内集積量に関して、Ad ベクターゲノムの E4 領域に対して設計したプライマーおよび TaqMan プローブを用いた定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。まず粒子数が既知の標準品 Ad ベクター DNA を用いて検量線を作成し、直線性が得られた 10 コピーから 10^7 コピー数までの範囲で定量可能なことを確認した (Fig. 37)。そこで、未修飾 Ad ベクターおよび修飾率約 90%の PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスに投与し、6 時間および 48 時間後の肝臓および腫瘍から DNA を抽出し、PCR 反応により Ad ベクター DNA を増幅させた後、検量線から腫瘍内 Ad ベクター粒子数を求めた (Fig. 38)。その結果、初期分布である投与 6 時間後において、遺伝子発現の分布と同様、肝臓において PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターの 1/30 以下の集積量であり、同時に腫瘍において

は未修飾 Ad ベクターの 40 倍量以上が存在していた。この結果は先のリンフェラーゼ遺伝子発現量での分布結果とほぼ相関しており、粒子分布、遺伝子発現分布の両面から PEG-Ad ベクターの腫瘍集積性が明らかとなった。また、48 時間後の分布においては、著しい集積量の減少が見られた。原因としては、ヌクレアーゼによる DNA の分解に加えて、6 時間後の段階ではクッパー細胞をはじめとする細網内皮系に取り込まれた Ad ベクター DNA も検出されていたためだと考えられる。

さらに、分子量 5000 の PEG を用いて種々の修飾率に調製した PEG-Ad ベクターを Meth-A 担癌マウスの尾静脈より投与し、投与後 6 時間における腫瘍および肝臓へのベクター粒子集積量を比較した (Fig. 39)。その結果、未修飾 Ad ベクターで認められる高い肝集積性が、PEG 修飾率の増大に伴って抑制されるのみならず、腫瘍組織へのベクター集積量が増大することを明らかにした。

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

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

まず、各 PEG-Ad-Luc の *in vitro* 遺伝子導入活性について A549 細胞を用いて比較したところ、PEG 分子量の増大ならびに PEG 修飾率の増加に伴ってリンフェラーゼ遺伝子発現強度は低下することが明らかとなった (Fig. 40)。続いて、PEG 修飾率が約 30%の各 PEG-Ad-Luc (2K/PEG-Ad-Luc、5K/PEG-Ad-Luc、20K/PEG-Ad-Luc) を Meth-A

担癌マウスに尾静脈内投与し、2 日後の肝臓および腫瘍におけるルシフェラーゼ発現量を測定した (Fig. 41)。その結果、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して、肝臓での遺伝子発現抑制と腫瘍での遺伝子発現増大が最も顕著だったのは 20K/PEG-Ad-Luc 投与群であり、2K/PEG-Ad-Luc 投与群では EPR 効果を得られなかった。

そこで、これまで研究に用いてきた 5K/PEG-Ad ベクターと新たに作製した 20K/PEG-Ad ベクターの EPR 効果をより詳細に比較するために、種々の PEG 修飾率を有する 5K/PEG-Ad-Luc および 20K/PEG-Ad-Luc の *in vivo* 遺伝子発現分布を比較した (Fig. 42)。その結果、腫瘍における遺伝子発現レベルは、修飾率 90%の 5K/PEG-Ad-Luc 投与群で最も高かったものの、修飾率 40%の 20K/PEG-Ad-Luc 投与群では、未修飾 Ad-Luc 投与群と比較して肝臓での遺伝子発現が数百分の一にまで抑制され、腫瘍での遺伝子発現が約 10 倍増強されるという、最も腫瘍選択的な遺伝子導入が認められた。したがって、修飾率 40%の 20K/PEG-Ad ベクターが、全身投与による腫瘍組織への受動的ターゲティングを行うために最も優れたベクターであることが判明した。

しかし、20K/PEG-Ad ベクターがこのような *in vivo* 遺伝子発現分布を示す詳細な機序については不明なままである。そこで、そのメカニズム解明の一端として、未修飾 Ad ベクター、5K/PEG-Ad ベクター、および 20K/PEG-Ad ベクターを全身投与したマウスにおいて、ベクター粒子の血中滞留性ならびに生体内分布に関する比較解析を行った。まず、各ベクターの血中存在量の経時変化を測定したところ (Fig. 43)、5K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較してわずかな血中滞留性の向上を示したに過ぎなかったが、20K/PEG-Ad ベクターにおいては血中からの消失に明らかな遅延が認められ、血中滞留性に極めて優れたベクターであることが判明した。また、このときの各ベクターの組織移行量を比較した結果 (Fig. 44)、20K/PEG-Ad ベクターは未修飾 Ad ベクターと比較して約 20 倍、5K/PEG-Ad ベクターと比較しても

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

次に、PEG-Ad ベクターが腫瘍内血管から実質細胞側へと漏出しているかを、腫瘍内 EGFP 発現部位を検討することで評価した。その結果、未修飾 Ad ベクター投与群では EGFP による蛍光は見られなかったのに対して、PEG-Ad ベクター投与群では、主に腫瘍実質細胞に対する遺伝子発現像が観察された (Fig. 45)。すなわち PEG-Ad ベクターは、腫瘍血管内から実質細胞側へと漏れ出していることが強く示唆された。また、肝臓においては先のルシフェラーゼ遺伝子発現と同様、未修飾 Ad ベクター投与群で強い蛍光が多数観察されたのに対して、PEG-Ad ベクター投与群では、蛍光像はほとんど観察されなかった。

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

次に、全身投与後に腫瘍組織で高い遺伝子発現レベルを示した修飾率約 90%の PEG-Ad ベクターを用いて、癌遺伝子治療における有効性を評価した。治療遺伝子として TNF- α 遺伝子を搭載した未修飾 Ad-TNF α および PEG-Ad-TNF α を Meth-A 担癌マウスの尾静脈より投与し、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした。その結果、Ad-TNF α 投与群ではコン

コントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、PEG-Ad-TNF α 投与群の腫瘍増殖には明らかな遅延が観察された (Fig. 46)。また、本実験で用いたベクター用量 (10^{10} VP/mouse) では、いずれの群においても TNF- α に起因する体重減少や突然死といった重篤な副作用は観察されなかった。さらに、ベクター投与後 2 日目のマウスから摘出した肝臓を病理組織学的に観察したところ、Ad-TNF α 投与群において 7 例中 6 例で認められた肝障害 (小空胞の形成) が、PEG-Ad-TNF α 投与群では 7 例中 3 例でわずかに観察されたのみであった (Fig. 47)。

続いて同様に、治療遺伝子として自殺遺伝子である HSVtk 遺伝子を用いた HSVtk/GCV システムによる癌遺伝子治療実験を行った (Fig. 48)。その結果、 10^{10} VP の未修飾 Ad-HSVtk 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められたのに対して、 10^{10} VP の PEG-Ad-HSVtk 投与群の腫瘍増殖は Ad-HSVtk 投与群の 40%以下にまで抑制された。一方、 10^{11} VP の Ad-HSVtk あるいは PEG-Ad-HSVtk を投与した群では、腫瘍の退縮傾向は観察されたものの、急激な体重減少を伴って実験期間中に全例が死亡した。また、ベクター投与後 7 日目のマウスから摘出した肝臓の病理組織学的観察を行ったところ、PEG-Ad-HSVtk 投与群においては、 10^{11} VP の用量で小空胞の形成や炎症性細胞浸潤が観察されたものの、 10^{10} VP の投与量では未修飾 Ad-HSVtk 投与群と同様に肝障害はほとんど観察されなかった (Fig. 49)。以上の結果は、TNF- α あるいは HSVtk 発現ベクターの全身投与による癌遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用が、有効性の改善と副作用の低減に繋がる可能性を示している。

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

RGD-PEG-Ad ベクターの遺伝子発現効率を CAR 高発現細胞である A549 細胞と CAR 低発現細胞である B16BL6 細胞で評価した。RGD-PEG-Ad ベクターは A549 細胞に対して PEG-Ad ベクターより顕著に高い遺伝子発現を示し、未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子発現を示した (Fig. 50)。また、B16BL6 細胞に対して RGD-PEG-Ad ベクターは、未修飾 Ad ベクターより 100 倍以上高い遺伝子発現を示し、その発現は AdRGD ベクターと同等であった。このことから、PEG-Ad ベクターの PEG 片末端に標的指向性分子を付与することで標的細胞に接着し、高い遺伝子導入・発現が達成されることが示された。

次に抗 Ad 抗体存在下における RGD-PEG-Ad ベクターの B16BL6 細胞に対する遺伝子発現効率を検討した (Fig. 51)。その結果、これまで最も高い遺伝子導入効率を示した AdRGD ベクターであっても抗 Ad 血清存在下では、血清濃度の上昇に伴い遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG 修飾 Ad ベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD ベクターの 15 倍であった。

さらに、RGD-PEG-Ad ベクターの感染特異性をより詳細に検討するために、過剰量の RGD ペプチド存在下における RGD-PEG-Ad-Luc、未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc の遺伝子発現効率を比較検討した (Fig. 52)。その結果、未修飾 Ad-Luc の遺伝子発現量は RGD ペプチドによってほとんど影響されなかったのに対して、RGD-PEG-Ad-Luc は AdRGD-Luc と同様に、RGD ペプチド存在下では遺伝子発現効率が明らかに低下した。したがって、RGD-PEG-Ad ベクターは、細胞表面のインテグリンを認識・結合して遺伝子導入することが確認された。

また、RGD-PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子導入用ベクターとしての有用性を評価するために、マウスに尾静脈内投与した 2 日後における肝臓での遺伝子発現を検討した (Fig. 53)。その結果、未修飾 Ad ベクターならびに AdRGD ベクターと同様に RGD-PEG-Ad ベクターは、*in vivo* においても高い遺伝子発現活性を有するベクターであることが示された。

C.3.2. Ad-TERT ベクターの遺伝子発現特性解析と 癌自殺遺伝子治療における有用性評価

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

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

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

まず、CMV プロモーターあるいは TERT プロモーター制御下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ

遺伝子を発現する Ad-Luc ならびに Ad-TERT/Luc を作製し、腫瘍細胞 (A549 細胞) と正常細胞 (WI38 細胞) との間で各ベクターの遺伝子発現効率を比較した (Fig. 54)。その結果、A549 細胞における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現レベルは Ad-Luc と比較して約 1/15 に低下したものの、WI38 細胞において Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-Luc の 1/1000 以下にまで抑制された。したがって、新たに構築した Ad-TERT ベクターが、遺伝子発現において優れた腫瘍特異性を発揮することを確認できた。

そこで次に、Meth-A 担癌マウスに Ad-Luc あるいは Ad-TERT/Luc を尾静脈内投与し、48 時間後の腫瘍および肝臓における遺伝子発現量を評価した (Fig. 55)。In vitro 培養系での結果を反映して、腫瘍における Ad-TERT/Luc の遺伝子発現活性は Ad-Luc と比較して若干低下したものの、肝臓での遺伝子発現レベルは Ad-Luc の 1/380 以下にまで抑制されることが判明した。以上の結果より、Ad-TERT ベクターは癌遺伝子治療の標的組織となる腫瘍においては遺伝子発現活性を維持しつつ、副作用の原因となる正常組織での遺伝子発現を顕著に抑制できるといふ、全身投与型腫瘍標的化ベクターの開発において魅力的な特性を有していることが明らかとなった。

そこで、TERT プロモーター制御下に HSVtk 遺伝子を発現する Ad-TERT/HSVtk を作製し、本ベクターを全身投与型ベクターとして癌自殺遺伝子治療 (HSVtk/GCV システム) に適用した際の有効性および安全性を評価した。まず、Ad-HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk により遺伝子導入した A549 細胞ならびに WI38 細胞における GCV 感受性を検討したところ (Fig. 56)、両ベクターとも遺伝子導入に用いたベクター用量に依存して A549 細胞の GCV 感受性(細胞死)を増強した。一方、正常細胞である WI38 細胞においては、Ad-HSVtk を用いた遺伝子導入によって A549 細胞の場合と同様の GCV 感受性が付与されたものの、Ad-TERT/HSVtk による遺伝子導入では GCV の細胞傷害活性が全く認められなかった。本結果は、Ad-TERT ベクターが HSVtk/GCV システムにおいても高い腫瘍特異性を発揮することを示して

いる。

そこで、Meth-A 担癌マウスに Ad-HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、10 日間の GCV 腹腔内投与の下、経日的に腫瘍体積変化をモニタリングした (Fig. 57)。その結果、Ad-CMV/HSVtk を 5×10^{10} VP/mouse で投与した群では、全てのマウスが数日の内に突然死するという強い副作用が観察され、突然死が見られなかった 10^{10} VP/mouse 投与群ではコントロール群と同等の腫瘍増殖が認められた。したがって、Ad-HSVtk の全身投与による HSVtk/GCV システムにおいては、ベクター投与量に関する治療域が極めて狭い、もしくは全く存在しないことが判明した。一方、Ad-TERT/HSVtk 投与群においては、 2×10^{11} VP/mouse という高用量投与によってもマウスの突然死は観察されず、コントロール群と比較して明らかな腫瘍増殖の遅延ならびに生存日数の顕著な延長が認められた。

さらに、本治療システムの転移癌に対する有効性を評価するために、CT26 肺転移癌マウスに Ad-CMV/HSVtk あるいは Ad-TERT/HSVtk を尾静脈内投与し、7日間の GCV 腹腔内投与後に摘出した肺の重量ならびに転移コロニー数を測定した (Fig. 58)。その結果、Ad-HSVtk の 10^{10} VP/mouse 投与群ではコントロール群と比較して有意な転移抑制効果を示さなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk を 2×10^{11} VP/mouse で投与したマウスの肺では顕著な転移コロニー数の減少とそれに伴う肺重量の増加抑制が観察された。したがって、Ad-TERT/HSVtk を全身投与型ベクターとして用いた HSVtk/GCV システムは、ベクターの腫瘍局所投与に基づくこれまでの癌遺伝子治療では困難とされてきた転移癌に対しても有効性を発揮できる治療戦略であることが明らかとなった。

また、本治療システムの安全性評価の一環として、Meth-A 担癌マウスにベクターを全身投与した後の体重変化ならびに肝障害マーカーである血中 GOT・GPT 量を検討した (Fig. 59)。その結果、 2×10^{11} VP/mouse で Ad-TERT/HSVtk を投与した群 (治療効果の認められたプロトコル) では、コントロール

群と比較して若干の体重減少とベクター投与後 7 日目における明らかな血中 GOT・GPT 量の増加が観察された。

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

C.3.3. PEG-Ad-TERT ベクターの作製とその *in vivo* 遺伝子導入特性の解析

上記 C.3.2.の結果を踏まえて、Ad-TERT ベクターの腫瘍標的化能をさらに向上させるために、TERT プロモーターによる遺伝子発現制御と PEG 修飾によるベクター粒子の体内動態制御との融合を図った。すなわち、分子量 5,000 の PEG を種々の修飾率で結合させた 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、それらを Meth-A 担癌マウスに尾静脈内投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布を解析した。

まず、各修飾率の 5K/PEG-Ad-Luc ならびに 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を全身投与した 2 日後の腫瘍および肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定したところ (Fig. 60)、いずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-TERT/Luc の腫瘍における発現レベルは、5K/PEG-Ad-Luc と比較してわずかに低値を示すのみであった。一方、副作用の主因となる肝臓での遺伝子発現は、5K/PEG-Ad-TERT/Luc 投与群において顕著に抑制されており、特に 95%修飾体については、5K/PEG-Ad-Luc と比較して約 1/300 にまで肝臓での遺伝子発現レベルを低下させることができた。

また、このときの腫瘍および肝臓におけるベクター粒子分布を検討したところ (Fig. 61)、5K/PEG-Ad-TERT/Luc はいずれの修飾率においても 5K/PEG-Ad-Luc と同様の分布パターンを示したことから、プロモーター改変がベクター粒子の生体内挙動に影響しないことを確認した。さらに、主作用/

副作用比の指標として、腫瘍/肝臓遺伝子発現比率を算出したところ (Fig. 62)、5K/PEG-Ad-Luc と比較して 5K/PEG-Ad-TERT/Luc は約 20~10,000 倍も高い値を示すことが判明した。

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

C.4. Tat-Adベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

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

そこで我々は、近年その細胞内移行能が注目されている Tat ペプチドに着目し、Tat ペプチドの細胞膜透過機能を Ad ベクターに付与することができれば、細胞のレセプター発現の有無に関わらず、広い感染域を持つ新しいベクターとなり得るのではないかと考え、Tat ペプチド修飾 Ad (Tat-Ad) ベクターを作製し、その遺伝子導入特性に関して検討した。

まず Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合を確認するために、Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの SDS-PAGE ならびに表面電荷測定を行った (Fig. 63, Table 5)。その結果、SDS-PAGE において Ad ベクターの主要なカプシドタンパクであるヘキソンのバンドが、Tat-Ad ベクターでは未修飾 Ad ベクターと比較して高分子量側にシフトしていた。また、カチ

オン性の Tat ペプチドに覆われることで Tat-Ad ベクターの表面は正電荷になっていたことから、Ad ベクター表面への Tat ペプチドの結合が確認された。

次に接着細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子発現活性を検討した。CAR およびインテグリンが共に高発現である A549 細胞において、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc ならびに AdRGD-Luc と比較して、さらに 10 倍以上高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 64)。また、CAR 低発現、インテグリン高発現の B16BL6 細胞においても、Tat-Ad-Luc は AdRGD-Luc よりも約 10 倍、未修飾 Ad-Luc よりも 500 倍以上高い遺伝子発現を達成した。さらに、従来型 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターでは遺伝子導入が困難であった骨髓由来血球系浮遊細胞である KG-1a 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、Tat-Ad-Luc は未修飾 Ad-Luc や AdRGD-Luc と比べて約 10 倍高い遺伝子発現活性を示した (Fig. 65)。以上の結果から、Tat-Ad ベクターは非常に広範な感染域を有することによって、遺伝子治療の適応拡大に大きく貢献できるベクターシステムである可能性が示唆された。

そこで次に、遺伝子導入効率に及ぼす Tat 修飾率ならびに標的細胞特性の影響について検討した。まず、Ad-Tat ベクターの Tat 修飾率と遺伝子導入効率との関連評価を行うために、Ad ベクター表面のペプチド結合部位 (リジン残基) に対して 12.5~2000 倍モル量の活性基付与型 Tat ペプチド (Tat-NHS) を混合することによって、様々な修飾率の Tat-Ad ベクターを作製した。これら Tat-Ad ベクターを用いて CAR 低発現の B16BL6 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現レベルを指標に各ベクターの遺伝子導入活性を比較した (Fig. 66)。その結果、修飾条件 1:25 (=リジン残基:Tat ペプチド) で調製した Tat-Ad ベクターが最も高い遺伝子導入活性を示し、Ad-Tat ベクターの遺伝子導入効率が Tat 修飾条件によって大きく影響されることが判明した。高修飾率の Tat-Ad ベクターにおける遺伝子導入活性の消失については、詳細な原因は不明であるが、過剰の Tat ペプチド修飾によって Ad ベクターが本来有する遺伝子導入機序のい

れかのステップが阻害されたものと推察された。

次に、修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターを 300~10,000 VP/cell の用量で B16BL6 細胞に適用した際のルシフェラーゼ活性を測定したところ、ベクター用量に依存した遺伝子発現レベルの上昇が確認された (Fig. 67)。また、Ad ベクター粒子の表面に静電的に吸着した Tat ペプチドの遺伝子導入効率への影響を検討するために、結合活性基を持たない Tat ペプチドと Ad ベクターとを混合した場合の遺伝子導入活性についても測定した (Fig. 68)。その結果、Ad ベクターに Tat ペプチドを単に混合しただけでは、B16BL6 細胞に対する遺伝子導入活性は未修飾 Ad ベクターとほぼ同等であり、Tat-Ad ベクターの優れた遺伝子導入活性が Ad ベクターの粒子表面 (カプシド蛋白質) に Tat ペプチドが共有結合することではじめて得られることを実証した。

さらに、CAR 発現量の異なる種々の細胞に対して、修飾条件 1:12.5, 1:25, 1:50 で調製した各 Tat-Ad ベクターおよび未修飾 Ad ベクターの遺伝子導入活性を比較検討した (Fig. 69)。接着細胞である CT26 細胞 (マウス colon carcinoma 由来)、RAW264.7 細胞 (マウス macrophage 由来)、HeLa 細胞 (ヒト cervical carcinoma 由来)、および A549 細胞 (ヒト lung carcinoma 由来) のなかで、CAR 高発現細胞 (A549 細胞、HeLa 細胞) ではいずれの修飾率の Tat-Ad ベクターも未修飾 Ad ベクターと同等の遺伝子導入活性を示し、CAR 低発現細胞 (CT26 細胞、RAW264.7 細胞) においては修飾条件 1:25 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの数百倍高い遺伝子導入を達成した。また、浮遊細胞である U937 細胞 (ヒト monocytic lymphoma 由来) に対しては、修飾条件 1:12.5 の Tat-Ad ベクターが未修飾 Ad ベクターの約 10 倍高い遺伝子導入活性を示した。したがって Tat-Ad ベクターは、CAR の発現が十分な標的細胞に対しては、従来の Ad ベクターでも高い遺伝子発現が達成できるため同等な遺伝子導入活性を示すに留まったが、CAR の発現が乏しい標的細胞に対してこそ高い優位性が発揮されることが明らかとなった。

D. 考察

D.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

D.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)

癌免疫療法は基礎研究と臨床研究の連携により着実な進歩を遂げているものの、臨床試験においては腫瘍退縮や完全治癒といった満足な有効性は得られていない。この一因として、従来の癌免疫療法研究が腫瘍免疫の存在実証とその効率的な誘導という観点を中心に推進されてきたために、効果的な治療を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞の腫瘍組織への集積性改善という側面が、未だ十分に検討されていないことが挙げられる。つまり、癌細胞を殺傷する能力を有する免疫エフェクター細胞がたとえ患者体内に誘導されたとしても、それらが十分に腫瘍組織に移行・浸潤して癌細胞と接触できなければ、癌免疫療法の有効性は大きく制限されてしまうと考えられる。

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

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

まず AdRGD-CCL17 の腫瘍内投与プロトコールに

よる抗腫瘍効果と免疫細胞の腫瘍内浸潤との連関評価を行った結果、AdRGD-CCL17 を応用した癌免疫遺伝子治療においては、CCL17 によって腫瘍組織に免疫細胞を集積させるだけでは有効な治療効果を引き出すことは困難であり、宿主の免疫系を TAA 特異的に活性化することのできるワクチン手法の併用が要求されると考えられた。そこで、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 の遺伝子を導入した DC を免疫することにより、B16BL6 担癌マウスの免疫系を腫瘍特異的に活性化する手段を併用した際の、AdRGD-CCL17 投与が示す抗腫瘍活性を評価した。その結果、本併用プロトコールでは顕著な腫瘍増殖抑制効果が達成され、免疫組織学的解析からも CCL17 が腫瘍特異的に活性化された免疫細胞（恐らく CTL と考えられる）を効率良く集積させるケモカインであることが判明した。

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

活性化した免疫細胞が腫瘍組織内へと浸潤し、直接腫瘍細胞を攻撃するという腫瘍の排除メカニズムを考慮すると、活性化と浸潤という両者を達成することが重要であることは明白である。また、これまで我々は、CCL27 遺伝子を導入した OV-HM 細胞をマウスへ移植したところ、その CCL27 産生 OV-HM 腫瘍組織内へ T 細胞、NK 細胞が浸潤し、腫瘍増殖抑制効果があることを報告しているが、同時に生着した腫瘍に対して CCL27 遺伝子を導入しても治療効果が得られないことを確認している。

そこで T 細胞、NK 細胞を活性化するサイトカインである IL-12 に着目し CCL27 と併用することによる免疫細胞の活性化と浸潤の両者を目指した治療法の有用性について検討した。その結果、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与 (AdRGD-IL12:AdRGD-CCL27 = 9:1 もしくは 5:5) することにより、各単独投与群よりも強い抗腫瘍効果が得られ、さらに 9:1 の割合で併用投与した群では全例で完全治癒するという非常に強い抗腫瘍効果が得られた。一方で、AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の投

与比率が 1:9 の群では全く効果が得られず、投与比率により得られる抗腫瘍効果が著しく異なっていたことから、投与比率も治療効果に対する大きな要因であることが示された。

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

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

に正中線を挟んで左右両側に腫瘍を移植し治療実験を行った。その結果、片側の腫瘍に AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を併用投与することで、遠隔に存在するもう片側の腫瘍に対しても増殖抑制効果が認められた (data not shown)。これは予備的な検討であるものの、本治療法が転移癌に対しても有用であることを示唆するものであり、この転移癌に対する治療効果は、そのメカニズム解明とともに今後の検討課題である。

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

AdRGD-CCL27 単独投与群では多くの CD4 陽性 T細胞が浸潤していたことから、まず活性化ヘルパー T細胞が産生する IFN- γ の発現を確認した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群ではその発現が認められなかったことから、腫瘍内に浸潤した CD4 陽性 T細胞が活性化していなかったことが示唆された。また、AdRGD-IL12 単独投与群と併用投与群では同程度の IFN- γ の発現が観察されたことから、両群ともヘルパー T細胞が活性化していたことが考えられた。続いて、腫瘍内に活性化した免疫細胞が浸潤していたのかについて検討を行うため、腫瘍内での perforin 陽性細胞数を測定した。その結果、AdRGD-CCL27 単独投与群では IFN- γ の結果と同様に、腫瘍内に perforin 陽性細胞はほとんど観察されなかった。また、併用投与群では AdRGD-IL12 単独投与群よりも有意な perforin 陽性細胞数の増加が認められたことから、

活性化した細胞数も両群間の治療効果の差につながったものと考えられた。これらの結果より、浸潤と活性化の両立が、癌免疫療法に重要であることが示された。

一方で活性化した細胞が浸潤したのかそれとも浸潤した細胞が活性化したのか、その順序は不明である。今回は AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 を同日に腫瘍内投与したが、活性化の後に浸潤するのであれば先に AdRGD-IL12 を投与し、浸潤した後に活性化するのであれば逆に AdRGD-CCL27 を先に投与するというように、併用投与する日程を変更させることにより、治療プロトコールの最適化が図られるものと考えられる。

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

D.1.3. CCL27 遺伝子の腫瘍内共導入による IL-12

癌免疫遺伝子治療の有効性改善 (Meth-A 腫瘍モデル)

Meth-A 腫瘍は、これまでにリコンビナント IL-12 の腹腔内投与によっては抗腫瘍効果が認められなかったのに対して、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって持続的かつ局所的に高濃度の IL-12 を作用させたところ、腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、完全治癒が得られるマウスは 13 例中 8 例であり、これらマウスには長期的な細胞特異的免疫が誘導されていた。さらに、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与は、AdRGD-IL12 単独投与を上回る劇的な治療効果を発揮した。生存率の明らかな延長も認められ、最終的に 13 例中 12 例ものマウスに完全治癒が認められた。これらマウスには、AdRGD-IL12 単独投与群と同様に腫瘍特異的なメモリーも成立していることが確認された。また、抗腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットを解析したところ、AdRGD-IL12 単独投与または AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用投与において、癌細胞排除の主要なエフェクター細胞は CD8⁺ CTL であり、AdRGD-IL12/AdRGD-CCL27 併用群では、各単独投与群を上回る腫瘍内浸潤 T 細胞が確認された。また、IL-12 による局所免疫応答が、脾臓・リンパ節などの二次リンパ組織における細胞特異的全身性免疫系をも活性化可能であること、ならびに IFN- γ 産生誘導に伴う ICAM-1 や VCAM-1 といった接着分子の発現向上が達成されることが明らかとなった。AdRGD-IL12 と AdRGD-CCL27 の併用投与では、このような腫瘍内環境変化とリンパ球の腫瘍内浸潤促進作用を併せ持つため、その相乗効果により、各単独投与よりも多くの腫瘍内 T 細胞が観察されたものと考えられる。このように、リンパ球浸潤阻害環境を克服し、腫瘍内浸潤リンパ球の質的（細胞傷害活性の付与）、量的制御（腫瘍内浸潤促進）を可能とすることで、抗腫瘍増強作用が得られたことが明らかとなった。

これらの研究成果は、エフェクター細胞の活性化と腫瘍内浸潤の両者を同時に達成するアプローチが、癌免疫遺伝子治療の有効性向上に大きく貢献できることを示すものである。このような、目的部位への細胞

送達とも言える新たな概念を取り入れた治療戦略の提示は、今後の癌免疫療法の臨床応用を目指した技術開発に貴重な知見を提供するものと期待している。

D.2. アポトーシス抵抗性 DC ワクチンの創製による DC 癌免疫療法の最適化

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

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

DC 癌免疫療法における DC ワクチンは、生きた細胞を用いる細胞医薬である。現在、“薬”として広く使用されている低分子有機化合物をはじめ、近年その医薬品化が注目されている遺伝子やタンパク質といった生体高分子において、その生体内安定性を高めるアプローチは必要不可欠となっている。これは細胞医薬にも適応すべき概念であり、現行の DC ワクチン療法は、細胞を不安定なまま大量投与しているといえよう。

生体内に投与された DC は投与部位から近傍のリンパ節へと移行して、リンパ節内のナイーブ T 細胞や

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

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

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

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

まず、モデル抗原 OVA の系で、FNK/DC および

Bcl-x_L/DC 免疫による抗腫瘍効果を検討した結果、OVA/DC 免疫群と比較して一層強力な抗腫瘍効果が得られた。また、メラノーマ関連抗原 gp100 を用いて B16BL6 メラノーマに対する抗腫瘍効果を検討した場合にも、腫瘍増殖抑制効果は gp100/DC 免疫群よりも FNK+gp100/DC 免疫群および Bcl-x_L+gp100/DC 免疫群で強力であったことから、アポトーシス抵抗性を付与した DC をワクチン担体として用いる本アプローチの有用性が示された。

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

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

D.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

D.3.1. PEG-Ad ベクターの特性解析と全身投与型腫瘍標的化ベクターとしての応用

癌を中心とする遺伝子治療対象疾患に対して Ad ベクターは、その優れた遺伝子導入・発現効率から遺伝子導入用ベクターとして広く選択されている。しかしながら Ad ベクターは血中投与後大部分が数分のうちに肝臓に集積するため血液を介した腫瘍組織等の疾患部位へのターゲティングが困難であること、Ad ベクターの抗原性による肝障害等の問題点を抱えており、臨床での使用方法は著しく制限されている。

そこで我々は Ad ベクターの有するこれら問題点を克服すると共に、腫瘍を標的とし得るベクターの開発を目指して、安全性に優れた非電荷水溶性高分子である PEG による Ad ベクター表面の化学修飾に取り組んだ。

修飾に用いた PEG 添加量を調整することで、様々な修飾率を有する PEG-Ad ベクターを作製した。また、PEG-Ad ベクターの血中半減期の飛躍的な向上は、PEG 鎖の立体障害による CAR との結合障害が関与していること、ならびに 89% という高修飾率の PEG-Ad ベクターであっても、その蛋白質に由来する高い核移行活性は保持されていることを明らかにした。

また、Meth-A 担癌マウスを用いて PEG-Ad ベクターの *in vivo* 遺伝子発現特性を評価した結果、修飾率 61% の PEG-Ad ベクターでは、多くの臓器において未修飾 Ad ベクターよりも数十倍高い遺伝子発現が得られた。現段階ではこの現象の詳細なメカニズムは不明だが、今後の検討により投与量を削減し得るベクターの作製が期待される。さらに修飾率 89% の PEG-Ad ベクターでは、腫瘍において未修飾 Ad ベクターよりも約 40 倍高い遺伝子発現量を示し、同時に副作用の原因となり得る肝臓での遺伝子発現量は未修飾 Ad ベクターの約 1/20 に抑制された。Ad ベクターは全身投与後数分での肝集積性が問題となっており、このような腫瘍への遺伝子発現分布に関する報告例は全く無く、今回はじめて明らかとなった知見である。

一般的に、腫瘍組織では血管透過性が亢進していること並びにリンパ系による異物回収機構が未発達等の性質のため、PEG 修飾により血中滞留性が向上したりリポソーム等において、EPR 効果と呼ばれる腫瘍集積性が観察されている。一方、バイオコンジュゲート化タンパク質の体内動態は用いる高分子の種類（分子量、形状など）や、修飾率に大きく依存し、これらを詳細に検討することで制御可能であることが知られており、またこのことは PEG-Ad ベクターにもあてはまると考えられる。

そこで、我々が明らかにした PEG-Ad ベクターの EPR 効果に関しても、PEG 分子量や修飾率を最適化

することで、さらに腫瘍特異性に優れた遺伝子導入を達成できるのではないかと考えた。修飾 PEG の分子量、修飾率を種々比較検討した結果、肝臓の遺伝子発現量に対する腫瘍の発現量の比は、未修飾 Ad ベクターならびに分子量 5,000、修飾率 90% の PEG-Ad ベクターと比較して、分子量 20,000、修飾率 40% の PEG-Ad ベクターが約 70 倍腫瘍で高い発現を示し、腫瘍選択的遺伝子発現に最も優れていることを明らかにした。Ad ベクターの血中からの消失に最も関与しているのは、肝臓の細網内皮系（Kupffer 細胞）による取り込みとされていることから、20K/PEG-Ad ベクターはこの機構から効率よく逃れることで血中滞留性が劇的に改善され、結果的に EPR 効果による腫瘍組織への高い集積性を発揮したものと考えられる。現在、本ベクターを全身投与する癌遺伝子治療モデル実験を進めており、有効性と安全性の評価から得られる情報を PEG-Ad ベクターの設計へとフィードバックすることで、より高度な腫瘍標的化ベクターの創製へと繋がるものと期待している。

EPR 効果に基づく腫瘍ターゲティングを利用した遺伝子治療の有効性評価として、分子量 5,000、修飾率 90% の PEG-Ad-TNF α による癌治療実験に取り組んだ。その結果、未修飾 Ad-TNF α と比較して PEG-Ad-TNF α は腫瘍増殖を約 50% 抑制し、重篤な副作用である体重減少も観察されなかった。さらに、病理組織診断の結果から、本ベクターは腫瘍における治療効果の増強のみならず、肝臓における副作用をも軽減可能なことを示した。また、続いて行った自殺遺伝子である HSVtk 遺伝子を用いた癌治療実験においても有効性の向上が確認されたが、高用量のベクター投与においては抗腫瘍効果の増強と共に重篤な肝障害が認められた。以上の結果は、分子量 5,000、修飾率 90% の PEG-Ad ベクターを用いた受動的ターゲティングにおいて、腫瘍での高い遺伝子発現はみられるものの、肝臓をはじめとする正常組織での遺伝子発現が副作用につながりうることを示している。したがって、PEG-Ad ベクターを利用した全身投与による癌ターゲティング遺伝子治療を達成するためには、腫瘍への遺伝子導入はそのままに、正常

組織での遺伝子発現をさらに抑制することが必要不可欠であることが判明した。

本研究では、PEG 末端に標的指向性分子を付与することで、能動的ターゲティングを可能とする新規バイオコンジュゲート化 Ad ベクターの開発にも取り組んだ。標的指向性分子としてインテグリン親和性の RGD ペプチドを選択し、作製した RGD-PEG-Ad ベクターの機能評価を行った。その結果、RGD-PEG-Ad ベクターは CAR 低発現細胞に対して、未修飾の Ad ベクターと比較して約 100 倍高い遺伝子発現効率を示した。また、抗体回避能について検討したところ、AdRGD ベクターは抗 Ad 抗血清濃度の上昇に伴い遺伝子発現は急激に低下したのに対して、RGD-PEG-Ad ベクターは遥かに高い遺伝子発現を保持し、その抗体回避能は AdRGD ベクターの 15 倍であった。また、過剰量の RGD ペプチド存在下において RGD-PEG-Ad ベクターの遺伝子発現効率が AdRGD ベクターと同様に抑制されたことから、PEG 鎖先端の RGD 配列がインテグリン結合を介して遺伝子導入を行っていることを確認した。さらに、*in vivo* への使用においても安定して遺伝子導入可能なベクターであることをマウス肝臓における遺伝子発現活性から明らかにした。

ターゲティング能を有する Ad を開発する上で最も重要なのが、標的指向性分子の選択であり、この点に関して現在我々は、ファージ表面提示法を駆使して特異性の高い標的リガンド分子の探索を進めている。本研究で最終目標とするターゲティング能を有したハイブリット化 Ad ベクターは、組織特異性と高い遺伝子導入効率を有することから、正常細胞に対する副作用の軽減に加えて、局所投与での遺伝子治療が困難な転移癌などに対してもベクターを血中に投与することで応用可能であると予想される。さらに本ベクターは、修飾率の増大に伴い、標的指向性分子の作用が強くなるだけでなく、Ad に対する中和抗体からの回避能も増大すると考えられることから、理想的な遺伝子治療用ベクターになると期待できる。

D.3.2. Ad-TERT ベクターの遺伝子発現特性解析と癌自殺遺伝子治療における有用性評価

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

Ad-Luc および Ad-TERT/Luc の遺伝子発現特性の比較から、TERT プロモーターが腫瘍細胞選択的な遺伝子発現活性を示すことが確認され、Ad-TERT ベクターが正常組織（特に肝臓）での遺伝子発現に起因する副作用の抑制に有効な全身投与型ベクターになりうると予想された。

そこで、Ad-TERT/HSVtk の全身投与による癌自殺遺伝子治療の原発癌ならびに転移癌に対する有効性を検討した。その結果、Ad-HSVtk は全身投与において治療域が全く存在しなかったのに対して、Ad-TERT/HSVtk 処置群では原発癌モデルならびに転移癌モデルの両系で抗腫瘍効果が認められた。特に、Ad-TERT/HSVtk を用いた本治療システムが転移癌にも有効であったことは、これまでの癌遺伝子治療プロトコルの限界を打破する非常に意義深い知見であり、我々の全身投与型腫瘍標的化ベクターというコンセプトが癌遺伝子治療の新たな可能性を切り拓くベクター開発戦略であることを示唆している。一方、治療効果が発揮された 2×10^{11} VP/mouse での Ad-TERT/HSVtk 全身投与においては、突然死こそ観察されなかったものの、コントロール群と比較してマウスに若干の体重減少が認められるとともに、ベクター投与後 7 日目において血中 GOT・GPT 量の増