

大という副作用が発現した。

この副作用発現の詳細なメカニズムについては今後の検討を要するが、Ad-TERT/Luc を全身投与した際の遺伝子発現分布およびベクター粒子分布の解析結果を考え合わせると、肝臓における治療遺伝子 (HSVtk) の発現誘導よりも、むしろ肝臓に集積したベクター粒子量の増大に起因しているのではないかと考えている。

D.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

Ad-TERT ベクターを用いた自殺遺伝子治療の有効性を維持しつつ副作用発現の抑制を目指すには、Ad-TERT ベクターに PEG 修飾を施すことによって、全身投与後の肝集積性を低下させるアプローチが効果的であろうと考えた。そこで、Ad-TERT ベクターに対して分子量 5,000 の PEG 修飾を適用することにより、Ad ベクターの遺伝子発現制御と体内動態制御の融合を図り、上記問題点を克服した新規ベクターシステムの開発を試みた。

様々な修飾率の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc を用いて、全身投与後の腫瘍ならびに肝臓における遺伝子発現活性を比較した結果、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT/Luc が腫瘍での高い遺伝子発現レベルを維持したまま、肝臓での遺伝子発現を著しく低減させることを見出した。また、併せて行ったベクター粒子分布解析において、5K/PEG-Ad-Luc と 5K/PEG-Ad-TERT/Luc の肝集積量に大きな差は認められなかった。したがって、修飾率 95% の 5K/PEG-Ad-TERT ベクターの全身投与における肝臓での遺伝子発現抑制効果は、PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御が相乗的に機能した結果であろうと推察された。現在、治療遺伝子として HSVtk 遺伝子あるいは TNF α 遺伝子を搭載した 5K/PEG-Ad-TERT ベクターを作製し、癌遺伝子治療モデルにおける本アプローチの有効性ならびに安全性を評価している。

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

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

D.4. Tat-Adベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

近年、Tat ペプチドに代表される Protein Transduction Domain (PTD) と称される、細胞内移行性を有するペプチドが発見され、これら PTD をタンパク質との複合体・融合体として用いることにより、タンパク質を細胞内へ導入できることが明らかとなってきている。そこで我々は、Ad ベクターの感染域を拡大する新たな試みとして、既存の PTD の中で最も優れているとされている Tat ペプチドの細胞内移行能を Ad ベクターに付与した Tat-Ad ベクターの開発に取り組んだ。

Tat ペプチドの Ad ベクター表面への修飾は、従来の PEG 化技術を応用して行い、SDS-PAGE ならびに表面電荷を測定することで Tat-Ad ベクターの作製を確認した。また、Tat-Ad ベクターの遺伝子導入特性に関して、接着細胞、浮遊細胞を用いて未修飾 Ad ベクターおよび AdRGD ベクターと比較検討を行った。その結果、Tat-Ad ベクターは、細胞の CAR 発現レベルに関わらず、従来型 Ad ベクターよりも数十倍から数百倍高い遺伝子発現活性を示すと同時に、従来型 Ad ベクターでは遺伝子導入が困難であった細胞種に対しても約 10 倍高い遺伝子発現を達成した。以上の結果から、Tat-Ad ベクターはあらゆる細胞種に対して遺伝子導入を効率よく達成しうるベクターとなる可能性が示唆された。

本ベクターは *ex vivo* 遺伝子治療への適用や、遺伝子導入ツールとしての遺伝子機能解析への使用と

いった幅広い分野へ応用できるものと期待している。そこで、Tat-Ad ベクターのさらなる有用性評価ならびに基礎情報の集積を図るために、種々条件下における遺伝子導入・発現特性の検討を試みた。

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

さらに、Tat-Ad ベクターの様々な細胞に対する遺伝子導入活性を評価した結果、接着性かつ CAR 高発現の細胞種では従来の Ad ベクターと同等であり、接着性で CAR 低発現の細胞に対しては従来の Ad ベクターより数百倍高い遺伝子導入活性を達成した。一方、血球系の浮遊細胞に対する Tat-Ad ベクターの遺伝子導入活性は、従来の Ad ベクターと比較して最大でも 10 倍程度の増強を認めたのみであり、接着細胞に対して示した優位性と比較すると期待を裏切る結果であった。我々はこの結果について、血球系細胞自身の遺伝子発現活性や接着細胞との細胞内構造の違いに原因があると考えており、今後 Tat-Ad ベクターの細胞内動態を検討することで明らかにしていく予定である。

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

E. 結論

E.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

- TAA 導入 DC ワクチン投与と AdRGD-CCL17 腫瘍内投与の併用は、TAA 特異的 CTL の腫瘍内集積性の増強に基づいて、DC 癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善できた。
- AdRGD-IL12 を用いた癌免疫遺伝子治療への AdRGD-CCL27 の併用は、免疫細胞の腫瘍内動員と活性化を同時に達成することによって、治療効果を大幅に向上できた。

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

E.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

- PEG-Ad ベクターは、血中滞留性の飛躍的な向上と肝集積性の低減により、腫瘍への優れた受動的ターゲティング能を示すことを明らかとした。
- ベクターの全身投与に基づくサイトカイン遺伝子治療および自殺遺伝子治療への PEG-Ad ベクターの応用は、治療効果の増強と副作用の軽減に有効であることが示唆された。
- PEG-Ad ベクターへの能動的ターゲティング能の付与に、PEG 片末端への標的化リガンドの付与が有用なアプローチであることを明らかとした。
- Ad-TERT ベクターの腫瘍選択的遺伝子発現能を確認すると共に、全身投与における原発癌ならびに転移癌に対する治療域を拡大し得ることを明らかとした。
- PEG 修飾による体内動態制御と TERT プロモーターによる遺伝子発現制御を融合することで、腫瘍

での高い遺伝子発現を示しつつ、肝臓での遺伝子発現を著しく抑制可能な優れた遺伝子発現パターンを示す新規ベクターの開発に成功した。

E.4. Tat-Adベクターの作製と遺伝子導入特性の評価

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

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

- 1) Tetsuji Hosono, Hiroyuki Mizuguchi, Kazufumi Katayama, Zhi-Li Xu, Fuminori Sakurai, Akiko Ishii-Watabe, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takao Hayakawa, Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15(8), 813-819, 2004.
- 2) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Hiroyuki Miyoshi, Kozo Ohashi, Masashi Tachibana, Rie Furuki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Atsushi Nakajima, Takashi Kadowaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Yoshinori Kamisaki, Tadanori Mayumi, RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett.*, 560(1-3), 178-182, 2004.
- 3) Naoki Okada, Jian-Qing Gao, Akinori Sasaki, Masakazu Niwa, Yuka Okada, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317(1), 68-76, 2004.
- 4) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate (MPEG-SPA). *Biol Pharm Bull.*, 27(6), 936-938, 2004.
- 5) Jian-Qing Gao, Alexandre Learth Soares, Yasuhiro Tsuda, Kazufumi Katayama, Yusuke Eto, Fumiko Sekiguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie*, 59(3), 238-239, 2004.
- 6) Jian-Qing Gao, Nobuko Inoue, Yukiko Tsukada, Kazufumi Katayama, Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, High gene expression of mutant adenovirus vector both in vitro and in vivo with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, 59(7), 571-572, 2004.
- 7) 吉川友章, 真弓忠範, 中川晋作, 機能性細胞の創製と Cell Delivery System. *Bio ベンチャー*, 4, 56-58, 2004.
- 8) 衛藤佑介, 真弓忠範, 中川晋作, 遺伝子医薬品の DDS. *ファインケミカルシリーズ ドラッグデリバリーシステムの新展開 -究極の薬物治療をめざして-*, シーエムシー出版, 252-265, 2004.
- 9) Naoki Okada, Naoki Mori, Ryosuke Koretomo,

- Yuka Okada, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, 12(2), 129–139, 2005.
- 10) Naoki Okada, Sayaka Iiyama, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.*, 12(1), 72–83, 2005.
 - 11) Mitsuko Maeda, Shinya Kida, Keiko Hojo, Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Koichi Kawasaki, Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15(3), 621–624, 2005.
 - 12) Jian-Qing Gao, Toshiki Sugita, Naoko Kanagawa, Keisuke Iida, Yusuke Eto, Yoshiaki Motomura, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328(4), 1043–1050, 2005.
 - 13) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.*, 7(5), 604–612, 2005.
 - 14) Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.*, 12(7), 608–616, 2005.
 - 15) Tetsuji Hosono, Hiroyuki Mizuguchi, Kazufumi Katayama, Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Shinsaku Nakagawa, Yoshiteru Watanabe, Tadanori Mayumi, Takao Hayakawa, RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*, 348, 157–165, 2005.
 - 16) Jian-Qing Gao, Toshiki Sugita, Naoko Kanagawa, Keisuke Iida, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takashi Nakayama, Takao Hayakawa, Osamu Yoshie, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Anti-tumor responses induced by chemokine CCL19 transfected into an ovarian carcinoma model via fiber-mutant adenovirus vector. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(6), 1066–1070, 2005.
 - 17) 杉田敏樹, 高建青, 中川晋作, Cell Delivery Systemを用いた次世代薬物治療. *Drug Delivery System*, 20, 42–48, 2005.
 - 18) 中川晋作, 真弓忠範, 細胞性製剤と細胞送達システム (Cell Delivery System). *PHARM TECH JAPAN*, 21, 2096–2099, 2005.
 - 19) 杉田敏樹, 中川晋作, 免疫とリポソーム. *リポソーム応用の新展開 ~人工細胞の開発に向けて~*, (株)エヌ・ティー・エス, 586–595, 2005.
 - 20) Tomoaki Yoshikawa, Susumu Imazu, Jian-Qing Gao, Kazuyuki Hayashi, Yasuhiro Tsuda, Naoki

- Okada, Yasuo Tsutsumi, Mitsuru Akashi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Non-methylated CpG motifs packaged into fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(1), 105-109, 2006.
- 21) Shinya Kida, Mitsuko Maeda, Keiko Hojo, Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, Koichi Kawasaki, Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: A tool for carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(3), 743-745, 2006.
- 22) Naoki Okada, Akinori Sasaki, Masakazu Niwa, Yuka Okada, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Tumor suppressive efficacy through augmentation of tumor-infiltrating immune cells by intratumoral injection of chemokine-expressing adenoviral vector. *Cancer Gene Ther.*, 13(4), 393-405, 2006.
- 23) Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Fusogenic liposomes and their suitability for gene delivery. *Future Lipidology*, 1(6), 735-742, 2006.
- 24) Jian-Qing Gao, Hai-Liang Chen, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Wen-Quan Liang, Gene expression of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* enhanced by integrin-targeting adenovirus. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 41, 1116-1120, 2006.
- 25) 倉知慎之輔, 中川晋作, 人工改変型ウイルスベクターの現状と今後の展開. *遺伝子医学MOOK*, 5, 95-101, 2006.
- 26) 杉田敏樹, 岡田直貴, 中川晋作, ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫の増強. *臨床免疫*, 45(5), 525-532, 2006.
- 27) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, ウイルス機能を基盤とする DDS キャリアーの開発と応用. *バイオテクノロジージャーナル*, 6(5), 557-562, 2006.
- 28) 金川尚子, 岡田直貴, 中川晋作, 次世代癌遺伝子治療戦略に適う改良型アデノウイルスベクター. *生産と技術*, 58(4), 58-60, 2006.
- 29) Shinnosuke Kurachi, Naoya Koizumi, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Haruna Sakurai, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi, Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.*, 14(3), 266-274, 2007.
- 30) Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Tomomi Sasaki, Naoya Koizumi, Haiying Huang, Katsuhisa Tashiro, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J. Control. Release*, in press.
- 31) Jian-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Tatsuya Yanagawa, Toshiki Sugita, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer. *Gene Ther.*, in press.
- 32) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int. J. Pharm.*, in press.
- 33) Yusuke Eto, Yasuo Yoshioka, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Improvement of adenovirus vectors for cancer gene therapy. *"Recent Developments in Gene Therapy"* published by Research Sigupost in India, in press.

34) 岡田直貴, 中川晋作, 免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化. *薬学雑誌*, 127(2), 327-339, 2007.

G.2. 学会発表

- 1) 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, 眞弓忠範, 中川晋作, Cell Delivery System による癌遺伝子治療の最適化. *遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム*, 京都, 2004年5月10日.
- 2) 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 高 建青, 堤 康央, 水口裕之, 前田光子, 川崎鉦一, 早川堯夫, 眞弓忠範, 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. *遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム*, 京都, 2004年5月10日.
- 3) 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*, Kyoto, Japan, May 30-June 3, 2004.
- 4) 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*, Kyoto, Japan, May 30-June 3, 2004.
- 5) 倉知慎之輔, 衛藤佑介, 高 建青, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 眞弓忠範, 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

性に関する検討. *第20回日本DDS学会*, 東京, 2004年7月15-16日.

- 6) 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.
- 7) 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23-24日.
- 8) 細野哲司, 水口裕之, 中川晋作, 山口照英, 眞弓忠範, 早川堯夫, 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回日本癌学会学術総会*, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.
- 9) 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回日本癌学会学術総会*, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.
- 10) 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, 眞弓忠範, 中川晋作, Cell Delivery System に基づく癌免疫療法の最適化. *第54回日本薬学会近畿支部大会*, 神戸, 2004年10月23日.
- 11) 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, 眞弓忠範, 中川晋作, Cell Delivery System による癌免疫療法の最適化. *ファーマ・バイオフィォーラム 2004*, 東京, 2004年11月6-7日.
- 12) 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, November, 2004.

- 13) 杉田敏樹, 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, 眞弓忠範, 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免疫系細胞の浸潤. **第 34 回日本免疫学会総会**, 札幌, 2004 年 12 月 1-3 日.
- 14) 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**, 札幌, 2004 年 12 月 1-3 日.
- 15) 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, 眞弓忠範, 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.
- 16) 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, 眞弓忠範, 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. **日本薬学会第 125 年会**, 東京, 2005 年 3 月 29-31 日.
- 17) 金川尚子, 高 建青, 杉田敏樹, 飯田恵介, 衛藤佑介, 本村吉章, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 眞弓忠範, 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. **日本薬学会第 125 年会**, 東京, 2005 年 3 月 29-31 日.
- 18) 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, 眞弓忠範, 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. **日本薬学会第 125 年会**, 東京, 2005 年 3 月 29-31 日.
- 19) 小泉直也, 水口裕之, 中川晋作, 眞弓忠範, 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. **日本薬学会第 125 年会**, 東京, 2005 年 3 月 29-31 日.
- 20) 中川晋作, Cell Delivery System に基づく癌免疫療法最適化. **日本薬学会第 125 年会**, 東京, 2005 年 3 月 29-31 日.
- 21) 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. **96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research**, Anaheim, CA, U.S.A., April 16-20, 2005.
- 22) 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.
- 23) 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, 眞弓忠範, 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用性評価. **第 21 回日本 DDS 学会**, 長崎, 2005 年 7 月 22-23 日.
- 24) 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, 眞弓忠範, 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.
- 25) 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, 眞弓忠範, 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.
- 26) 森重智弘, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 姚 醒蕾, 水口裕之, 堤 康央, 早川堯夫, 眞弓忠範, 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.
- 27) Toshiki Sugita, Jian-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Yakashi Nakayama, Osamu Yoshie, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Enhanced anti-tumor responses induced by the combination of a couple of stimulators: IL-12 and CCL27. **第 11 回日本遺伝子治療学会**, 東京, 2005年7月28-30日.
- 28) 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 水口裕之, 堤 康央, 早川堯夫, 眞弓忠範, 中川晋作, 腫瘍ターゲティングを目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの開発. **第 64 回日本癌学会学術総会**, 札幌, 2005年9月14-16日.
- 29) 岡田直貴, 岡田裕香, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作, 腫瘍特異的プロモーターを搭載したファイバー改変型アデノウイルスベクターによるマウスメラノーマ自殺遺伝子治療. **第 64 回日本癌学会学術総会**, 札幌, 2005年9月14-16日.
- 30) Toshiki Sugita, Jian-Qing Gao, Naoko Kanagawa, Yoshiaki Motomura, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Synergistic anti-tumor responses induced by the combination of a couple of stimulators: IL-12 and CCL27. **第 78 回日本生化学会大会**, 神戸, 2005年10月19-22日.
- 31) Ryosuke Koretomo, Naoki Okada, Naoki Mori, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita and Akira Yamamoto, Lymphoid tissue directivity and vaccine efficacy of dendritic cells transduced with CCR7 gene by using RGD fiber-mutant adenoviral vector. **20th JSSX-13th NA ISSX Joint Meeting**, Maui, HI, U.S.A., October 23-27, 2005.
- 32) Masakazu Niwa, Naoki Okada, Akinori Sasaki, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita and Akira Yamamoto, Analysis of immune cell-recruitment and tumor suppressive effect in murine B16BL6 melanoma injected with chemokine-expressing adenoviral vector. **20th JSSX-13th NA ISSX Joint Meeting**, Maui, HI, U.S.A., October 23-27, 2005.
- 33) 喜田進也, 前田光子, 北條恵子, 衛藤佑介, Jian-Qing Gao, 倉知慎之輔, 森重智弘, 水口裕之, 眞弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一, アデノウイルスベクター用細胞内移行ペプチドの合成. **第 55 回日本薬学会近畿支部大会**, 西宮, 2005年10月20日.
- 34) 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 飯田恵介, 松尾一彦, 萱室裕之, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 中川晋作, 変異型抗アポトーシス蛋白質 Bcl-xFNK 発現樹状細胞を用いた抗腫瘍効果に関する検討. **第 35 回日本免疫学会総会**, 横浜, 2005年12月13-15日.
- 35) 金川尚子, 杉田敏樹, 飯田恵介, 畑中 豊, 谷洋一, 水口裕之, 堤 康央, 眞弓忠範, 中川晋作, IL-12 発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の腫瘍内浸潤の向上. **第 35 回日本免疫学会総会**, 横浜, 2005年12月13-15日.
- 36) 後藤美千代, 丹羽貴子, 吉川友章, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, 抗アポトーシス分子を導入した樹状細胞ワクチンの特性と抗腫瘍メカニズムの解析. **日本薬剤学会第 21 年会**, 金沢, 2006年3月16-18日.
- 37) 森重智弘, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 姚 醒蕾, 渡辺 光, 岡田裕香, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍標的化を目指した改良型アデノウイルスベクターの創製. **日本薬剤学会第 21 年会**, 金沢, 2006年3月16-18日.
- 38) 是友良介, 岡田直貴, 村上さや香, 大西善洋,

- 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, アデノウイルスベクターによる樹状細胞の表現型変化とその作用機序に関する基礎的検討. *日本薬剤学会第21年会*, 金沢, 2006年3月16-18日.
- 39) 丹羽正和, 岡田直貴, 熊谷将成, 畑中 豊, 谷洋一, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本昌, 免疫細胞の腫瘍内動員を基盤とした新規癌免疫遺伝子治療の開発. *日本薬剤学会第21年会*, 金沢, 2006年3月16-18日.
- 40) 桜井晴奈, 櫻井文教, 佐々木朋美, 川端健二, 小泉直也, 黄 海瑛, 倉知慎之輔, 中川晋作, 水口裕之, Lipoplex とアデノウイルスベクターの in vivo における遺伝子発現能および自然免疫誘導能の比較. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 41) 金川尚子, 吉川友章, 畑中 豊, 谷 洋一, 水口裕之, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作, IL-12 発現ベクターを投与した腫瘍組織における免疫イベントの解析. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 42) 倉知慎之輔, 小泉直也, 桜井晴奈, 櫻井文教, 川端健二, 中川晋作, 早川堯夫, 水口裕之, カプシド改変アデノウイルスベクターの作製とその機能性評価. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 43) 丹羽貴子, 吉川友章, 後藤美千代, 水口裕之, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作, アポトーシス抵抗性樹状細胞の創製と抗腫瘍ワクチン機能の評価. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 44) 本村吉章, 吉川友章, 柳川達也, 杉田敏樹, 水口裕之, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作, マウス T 細胞への遺伝子導入効率に優れるベクターシステムの探索. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 45) 姚 醒蕾, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 森重智弘, 渡辺 光, 岡田裕香, 水口裕之, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作, ポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターを用いた腫瘍標的化自殺遺伝子治療の開発. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 46) 上羽美貴, 岡田直貴, 木村芳伸, 郷谷真嗣, 藤井 愛, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本昌, ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と抗腫瘍効果の評価. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 47) 大西康司, 岡田直貴, 森川愉香里, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, TERT 遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンの腫瘍増殖抑制効果. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 48) 岡田直貴, 中川晋作, 免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法最適化. *日本薬学会第126年会*, 仙台, 2006年3月28-30日.
- 49) Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Tomohiro Morishige, Xinglei Yao, Hikaru Watanabe, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Transductional and transcriptional tumor-targeting using adenoviral vector with PEGylation and TERT promoter on systemic administration into tumor-bearing mice. *97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research*, Washington, DC, U.S.A., April 1-5, 2006.
- 50) 倉知慎之輔, 小泉直也, 桜井晴奈, 佐々木朋美, 櫻井文教, 川端健二, 中川晋作, 早川堯夫, 水口裕之, 非特異的遺伝子導入抑制を目指したファイバー欠損アデノウイルスベクターの開発とその特性評価. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 51) 村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田直貴, 藤田卓也, 山本 昌, 早川堯夫, 水口裕之, 35型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入における $\beta 1$ インテグリンの関与に関する検討. *第22回日本DDS学会*, 東京, 2006年7月7-8日.
- 52) 後藤美千代, 丹羽貴子, 吉川友章, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, アポトーシス抵抗性を付

- 与した樹状細胞の生体内生存期間延長と免疫誘導との連関評価. **第22回日本DDS学会**, 東京, 2006年7月7-8日.
- 53) 渡辺 光, 衛藤佑介, 森重智弘, 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 喜田進也, 前田光子, 川崎紘一, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作, Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの開発と遺伝子導入特性に関する検討. **第22回日本DDS学会**, 東京, 2006年7月7-8日.
- 54) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, 遺伝子工学的手法を用いてDDS機能を付与した樹状細胞ワクチンの有用性 (シンポジウム講演). **第22回日本DDS学会**, 東京, 2006年7月7-8日.
- 55) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector with target ligand (招待講演). *The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery*, Sapporo, Japan, July 10-12, 2006.
- 56) Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Tomomi Sasaki, Naoya Koizumi, Kaiei Kou, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by adenovirus vector and lipoplex. *The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery*, Sapporo, Japan, July 10-12, 2006.
- 57) Naoko Kanagawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Intratumoral cotransduction of IL-12 and CCL27 genes can improve the efficacy and safety of cancer immunotherapy through enhanced recruitment and activation of immune cells in tumor site. **第7回文部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ**, 長野, 2006年8月30日-9月2日.
- 58) Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, PEGylation induces accumulation and enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor via systemic administration. **第7回文部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ**, 長野, 2006年8月30日-9月2日.
- 59) Shinsaku Nakagawa, Development of PEGylated adenovirus vector containing RGD peptides on the tip of PEG (招待講演). *7th Seventh France-Japan DDS Symposium*, Shiga, Japan, September 24-27, 2006.
- 60) 渡辺 光, 衛藤佑介, 森重智弘, 喜田進也, 前田光子, 水口裕之, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作. 癌遺伝子治療の最適化を目指した Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入特性評価. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 61) 森重智弘, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 渡辺 光, 岡田裕香, 水口裕之, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作. PEGylation と腫瘍特異的プロモーターの併用による腫瘍標的化アデノウイルスベクターの最適化. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 62) 金川尚子, 畑中 豊, 谷 洋一, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作. CCL27 遺伝子共導入による IL-12 癌遺伝子治療の有効性改善と副作用軽減. **第65回日本癌学会総会**, 神奈川, 2006年9月28-30日.
- 63) 村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田直貴, 藤田卓也, 山本 昌, 水口裕之, 35型アデノウイルスベクター遺伝子導入機構の解明ーインテグリンの関与に関する検討ー. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 64) 大西康司, 岡田直貴, 金本雄次, 森川愉加里, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンを用いた汎用性に優れる癌免疫療法の開発. **第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会**, 京都, 2006年10月13-14日.
- 65) 前田葉子, 岡田直貴, 上羽美貴, 松永知子, 藤井 愛, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用. **第2回創剤フォー**

- ラム若手研究発表討論会, 京都, 2006年10月13-14日.
- 66) 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 森重智弘, 岡田裕香, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍特異的プロモーター搭載型アデノウイルスベクターを用いた癌自殺遺伝子治療の最適化. *第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会*, 京都, 2006年10月13-14日.
- 67) 森重智弘, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 田辺 綾, 岡田裕香, 岡田直貴, 中川晋作, PEGylation と腫瘍特異的プロモーターの併用による腫瘍標的化アデノウイルスベクターの創製. *第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会*, 京都, 2006年10月13-14日.
- 68) 本村吉章, 金川尚子, 柳川達也, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍標的化CTL を用いた新規癌養子免疫療法の開発に向けた基礎的検討. *第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会*, 京都, 2006年10月13-14日.
- 69) 大西康司, 岡田直貴, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌, 種々のマウス腫瘍モデルを用いたTERT遺伝子導入樹状細胞ワクチンの有効性と汎用性の評価. *第36回日本免疫学会総会*, 大阪, 2006年12月11-13日.
- 70) 桜井晴奈, 五十嵐勝秀, 田代克久, 川端健二, 桜井文教, 倉知慎之輔, 中川晋作, 菅野 純, 水口裕之, DNA microarray を用いたアデノウイルスベクター誘発自然免疫応答に関与する因子の探索. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 71) 倉知慎之輔, 桜井晴奈, 田代克久, 桜井文教, 川端健二, 屋山勝俊, 岡本 博, 中川晋作, 水口裕之, TAT ペプチドを付与したファイバーミュータント Ad ベクターの開発と遺伝子発現評価. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 72) 田代克久, 川端健二, 桜井晴奈, 倉知慎之輔, 桜井文教, 中川晋作, 早川堯夫, 山西弘一, 水口裕之, アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 73) 衛藤佑介, 吉岡靖雄, 姚 醒蕾, 吉川友章, 向洋平, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 丸山一雄, 岡田直貴, 中川晋作, アデノウイルスベクター内封PEG 化リポソームの創製および精製法の確立. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 74) 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 水口裕之, 岡田裕香, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 腫瘍特異的プロモーター搭載アデノウイルスベクターを用いた自殺遺伝子治療. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 75) Ratima Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 衛藤佑介, 喜田進也, 前田光子, 川崎紘一, 水口裕之, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 広範な感染域を有する Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの構築と遺伝子導入特性評価. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 76) 柳川達也, 金川尚子, 本村吉章, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, ケモカイン-ケモカインレセプター連関を利用した癌養子免疫療法の有効性改善. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 77) 後藤美千代, 金川尚子, 岡田裕香, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作, TNF 関連分子発現樹状細胞を用いた定着腫瘍に対する新規免疫療法の開発. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 78) 大西康司, 金川尚子, 金本雄次, 藤田卓也, 山本 昌, 中川晋作, 岡田直貴, TERT 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序および安全性に関する検討. *日本薬学会第127年会*, 富山, 2007年3月28-30日.
- 79) 喜田進也, 前田光子, 北條恵子, 衛藤佑介, 森重智弘, 渡辺 光, Ratima Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 水口裕之, 眞弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一, Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過性ペプチド. *日本薬学会第127年会*, 富

山, 2007年3月28-30日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1. 特許取得

- 1) (発明の名称): 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, (発明人): 中川晋作, 岡田直貴, 吉岡靖雄, 川崎紘一, 前田光子, (出願人): 国立大学法人大阪大学, (出願日): 平成18年12月8日, (出願番号): 特願2006-332620.

H.2. 実用新案登録

該当事項なし

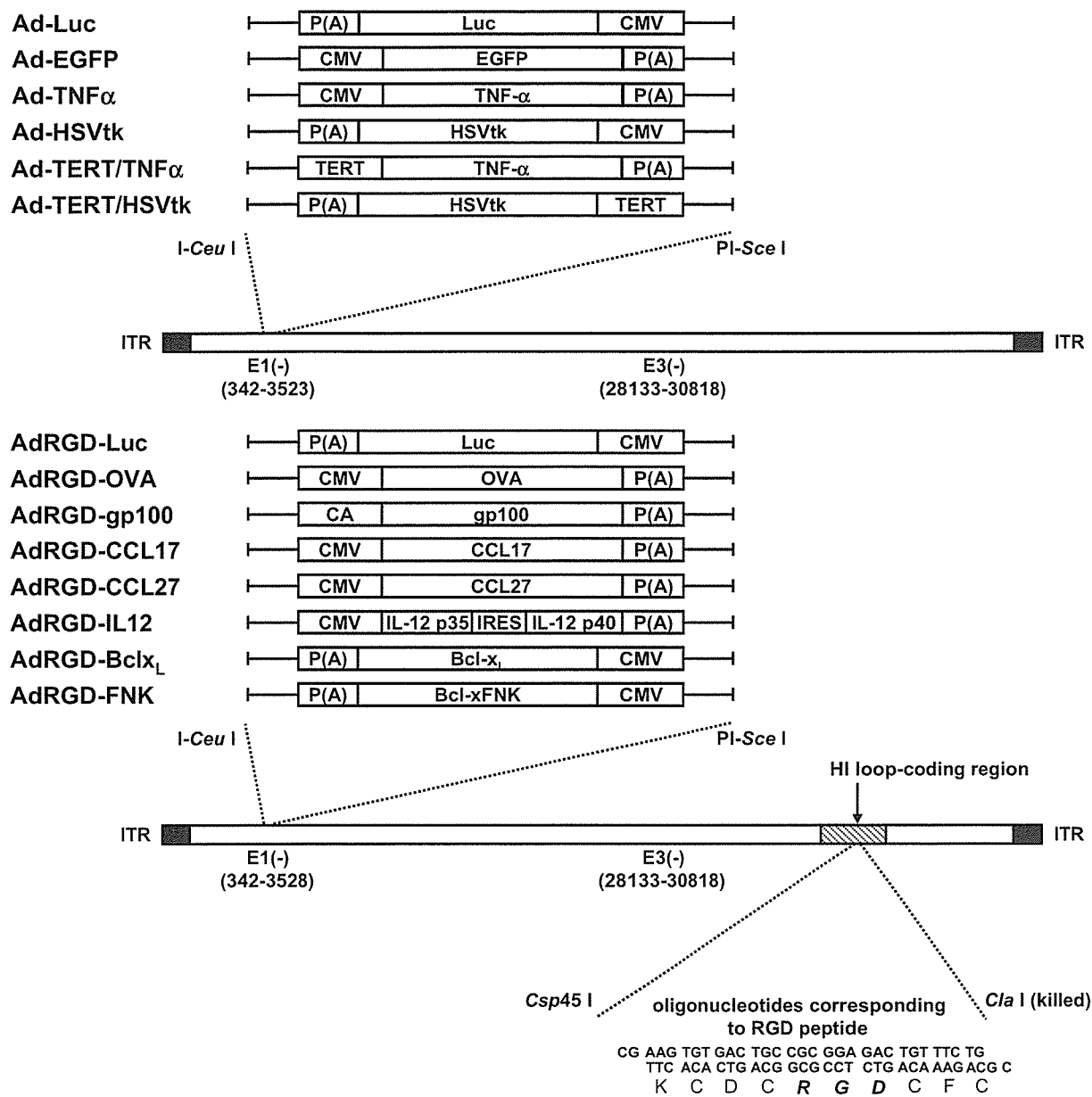
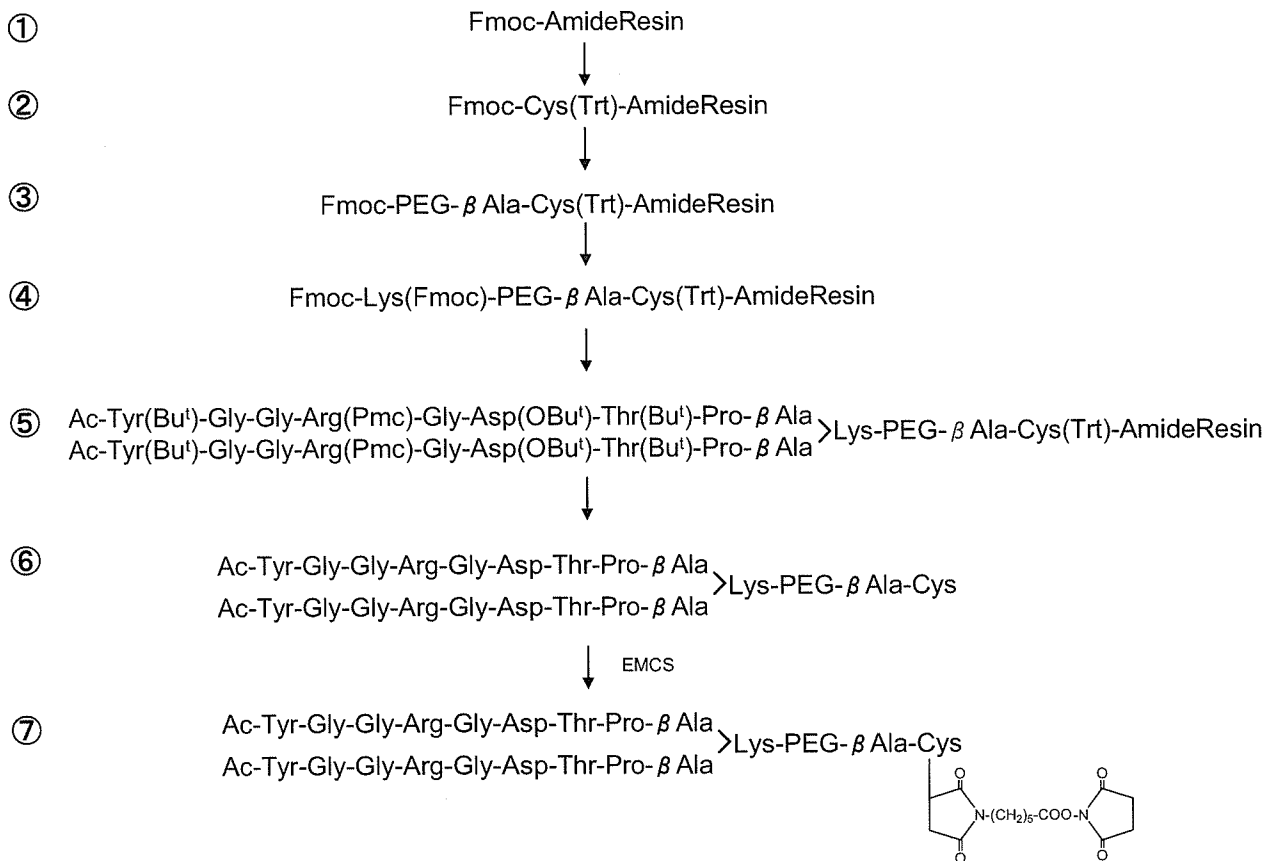


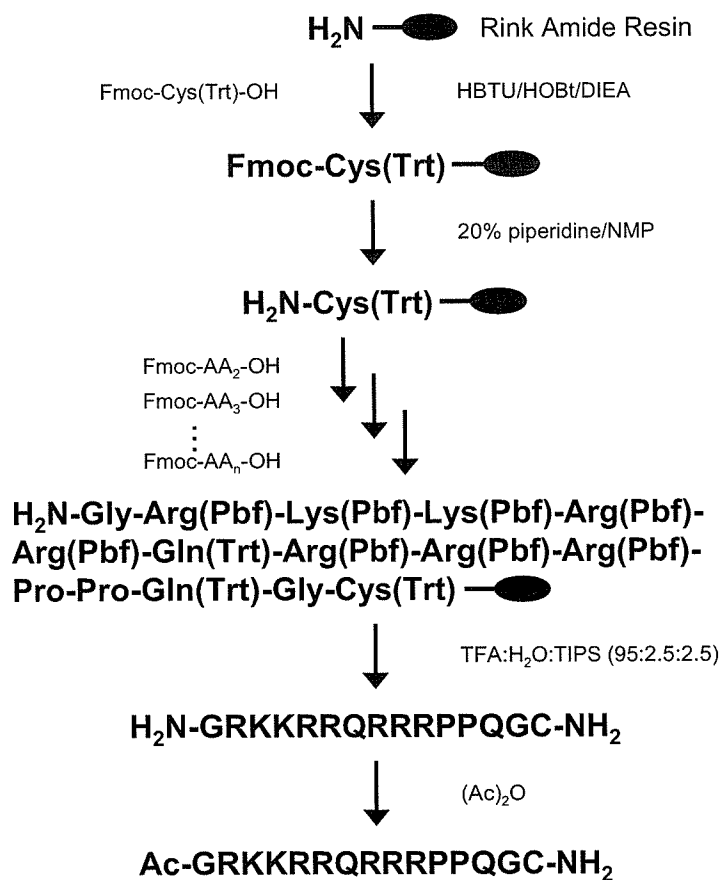
Fig. 1. Schematic representation of Ad vectors used in this study.

Table 1. Primer sequences and reaction parameter used for PCR amplification.

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle No.	Product size
Perforin	(F) TTTCGCCTGGTACAAAAACC	for 30 s	for 30 s	for 30 s	30	680 bp
	(R) CAGTCCTGGTTGGTGACCTT	at 95°C	at 60°C	at 72°C		
Granzyme B	(F) CTCGACCCTACATGGCCTTA	for 30 s	for 30 s	for 30 s	30	507 bp
	(R) GAAAGGAAGCACGTTTGGTC	at 95°C	at 62°C	at 72°C		
IFN- γ	(F) GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT	for 60 s	for 60 s	for 60 s	30	379 bp
	(R) TGAGCTCATTGAATGCTTGG	at 96°C	at 50°C	at 68°C		
ICAM	(F) CTGGCTGTACAGAACAGGA	for 60 s	for 60 s	for 60 s	30	559 bp
	(R) AAAGTAGGTGGGGAGGTGCT	at 94°C	at 54°C	at 68°C		
VCAM	(F) CCCAAGGATCCAGAGATTCA	for 60 s	for 60 s	for 60 s	30	489 bp
	(R) TAAGGTGAGGGTGGCATTTC	at 94°C	at 54°C	at 68°C		
β -actin	(F) TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG	for 30 s	for 30 s	for 30 s	30	514 bp
	(R) TTTGATGTCACGCACGATTTC	at 95°C	at 60°C	at 72°C		



Scheme 1. Structure scheme for RGD-PEG



Scheme 2. Structure scheme for Tat peptide.

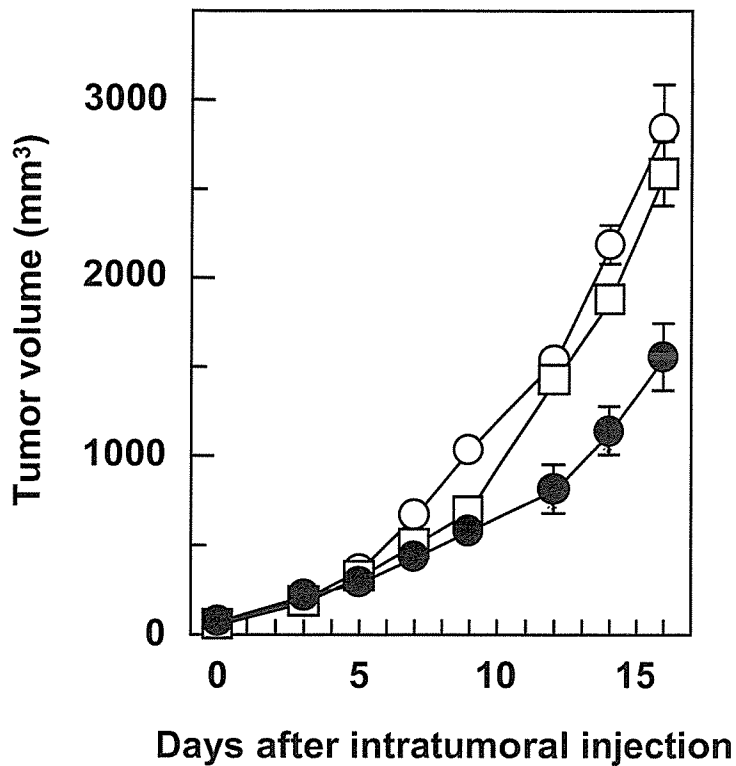


Fig. 2. Anti-B16BL6 tumor efficacy of intratumorally injected AdRGD-CCL17. B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. The tumors (5-7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17 (●) or AdRGD-Luc (□) at 3×10^8 PFU. Likewise, PBS (○) was injected into the tumors. The tumor volume was calculated after measuring the major and minor axes of the tumor at indicated points. Each point represents the mean \pm SE from 6-10 mice.

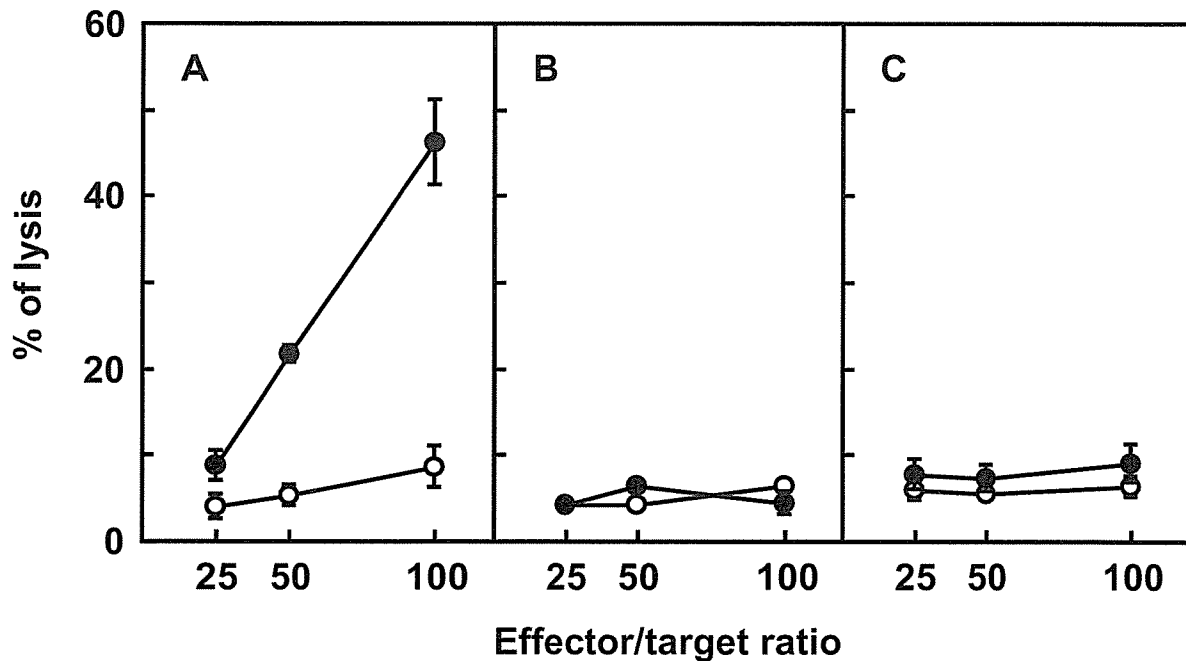


Fig. 3. Enhanced tumor-specific CTL activity in B16BL6 tumor-bearing mice by gp100/DC-immunization. B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One day later, the mice were intradermally injected with 10^6 gp100/DCs (●) or PBS (○) in the left flank. At 1 week after immunization, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and then were re-stimulated *in vitro* for 5 days with IFN- γ -stimulated and mitomycin C-inactivated B16BL6 cells. A cytolytic assay using the re-stimulated splenocytes was performed against IFN- γ -stimulated B16BL6 (A), IFN- γ -stimulated EL4 (B), and YAC-1 (C) cells. The data represent the mean \pm SE of three independent cultures from three individual mice.

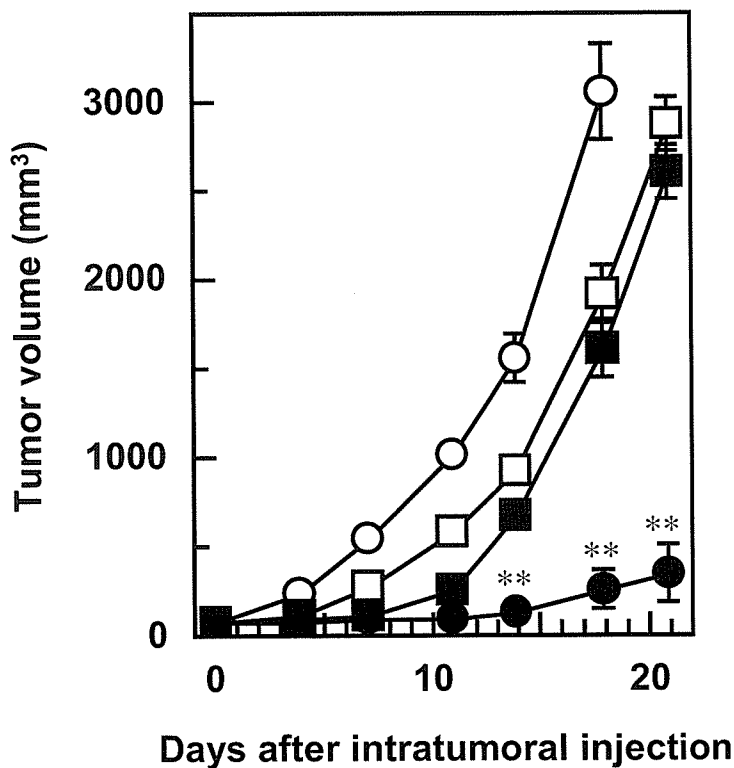


Fig. 4. Anti-B16BL6 tumor efficacy of intratumorally injected AdRGD-CCL17 in combination with gp100/DC-immunization. B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. The next day post-tumor inoculation, the mice were intradermally immunized with 10^6 gp100/DCs (●, ■, □) or PBS (○) in the left flank. Then, the tumors (5-7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17 (●) or AdRGD-Luc (■) at 3×10^8 PFU. Likewise, PBS was administered into control tumors in mice pretreated with gp100/DCs (□) or PBS (○). Tumor volume was calculated after measuring the major and minor axes of the tumor at indicated points. Each point represents the mean \pm SE of 7-15 mice. Statistical analysis was carried out by Mann-Whitney *U*-test: *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$ versus AdRGD-Luc-injected group (■).

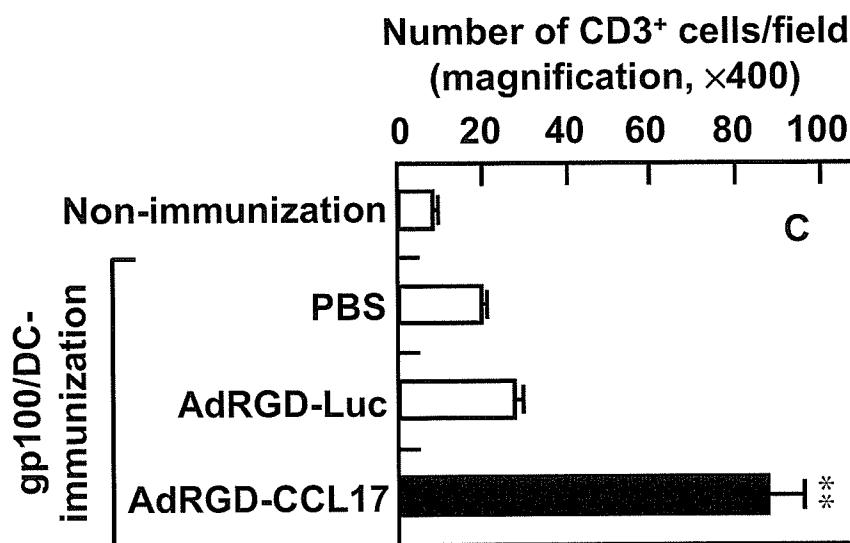
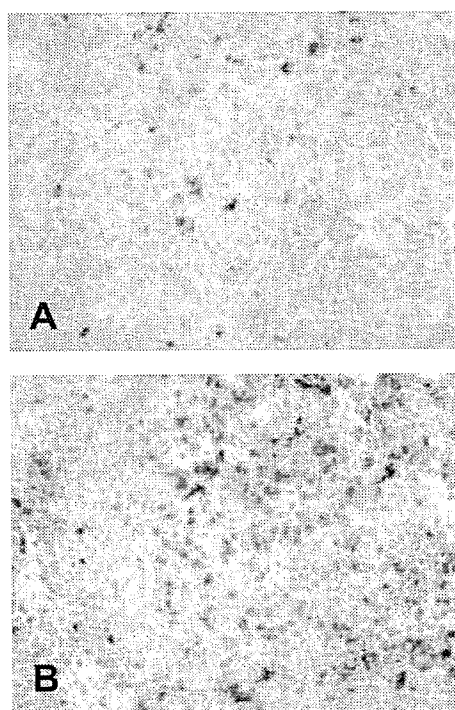


Fig. 5. Infiltration of T cells into B16BL6 tumors of mice treated with the combination of gp100/DC-immunization and intratumoral injection of AdRGD-CCL17. B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. The next day, the mice were intradermally injected with 10^6 gp100/DCs in the left flank. Then, the tumors (5-7 mm in diameter) were injected with AdRGD-Luc (A) or AdRGD-CCL17 (B) at 3×10^8 PFU. Likewise, PBS was administered into control tumors. On day 2 after intratumoral injection, immunohistochemical staining against CD3 for determining T cells was performed with frozen tumor sections. A and B; original magnifications are $\times 200$. C; the number of CD3-positive cells in the intratumoral section was assessed by counting six fields per specimen under $\times 400$ -magnification. The data represent the mean \pm SE of results from three tumors. Statistical analysis was carried out by Welch's *t*-test: **, $p < 0.001$ versus AdRGD-Luc-injected group.

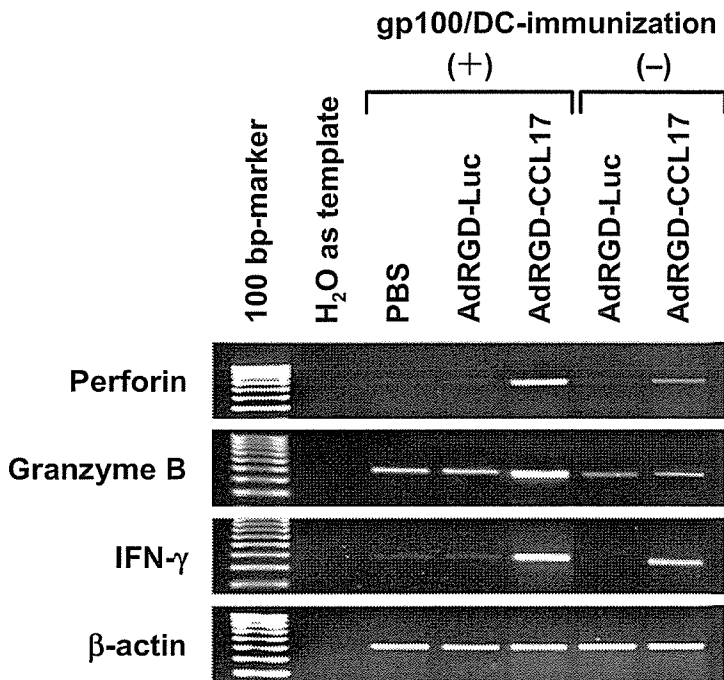


Fig. 6. Activation state of infiltrating immune cells in B16BL6 tumors injected intratumorally with AdRGD-CCL17 in combination with or without gp100/DC-immunization. B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One day later, the mice were intradermally injected with or without 10^6 gp100/DCs in the left flank. The tumor (5-7 mm in diameter) was injected with AdRGD-CCL17 or AdRGD-Luc at 3×10^8 PFU. Likewise, PBS was administered into control tumors. Two days later, total RNA was isolated from the tumors collected from these mice, and then RT-PCR, specific for perforin, granzyme B, and IFN- γ transcripts, was performed. The PCR products were electrophoresed through a 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

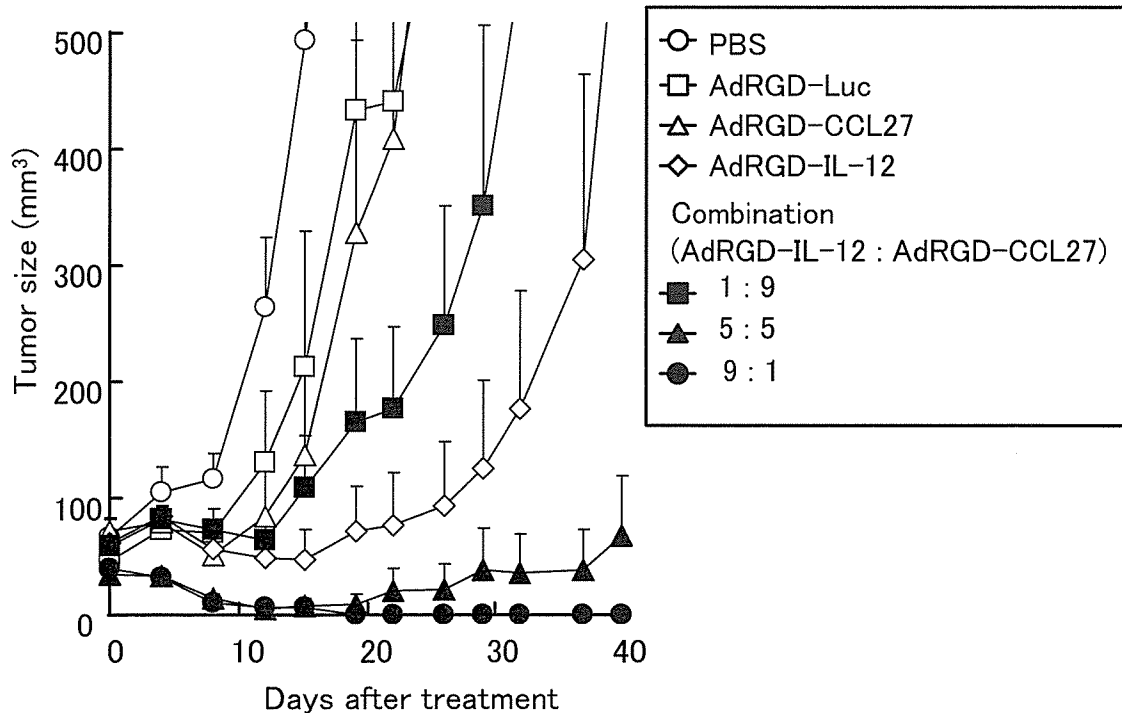


Fig. 7. Combination of AdRGD-IL-12 and AdRGD-CCL27 induced synergistic anti-tumor activity. B6C3F1 mice 1×10^6 OV-HM cells were inoculated intradermally into B6C3F1 mice. After the tumor diameter reached 7-8mm, indicated adenovirus vectors in total of 2×10^7 PFU or PBS were injected intratumorally. Tumor size was measured twice a week.

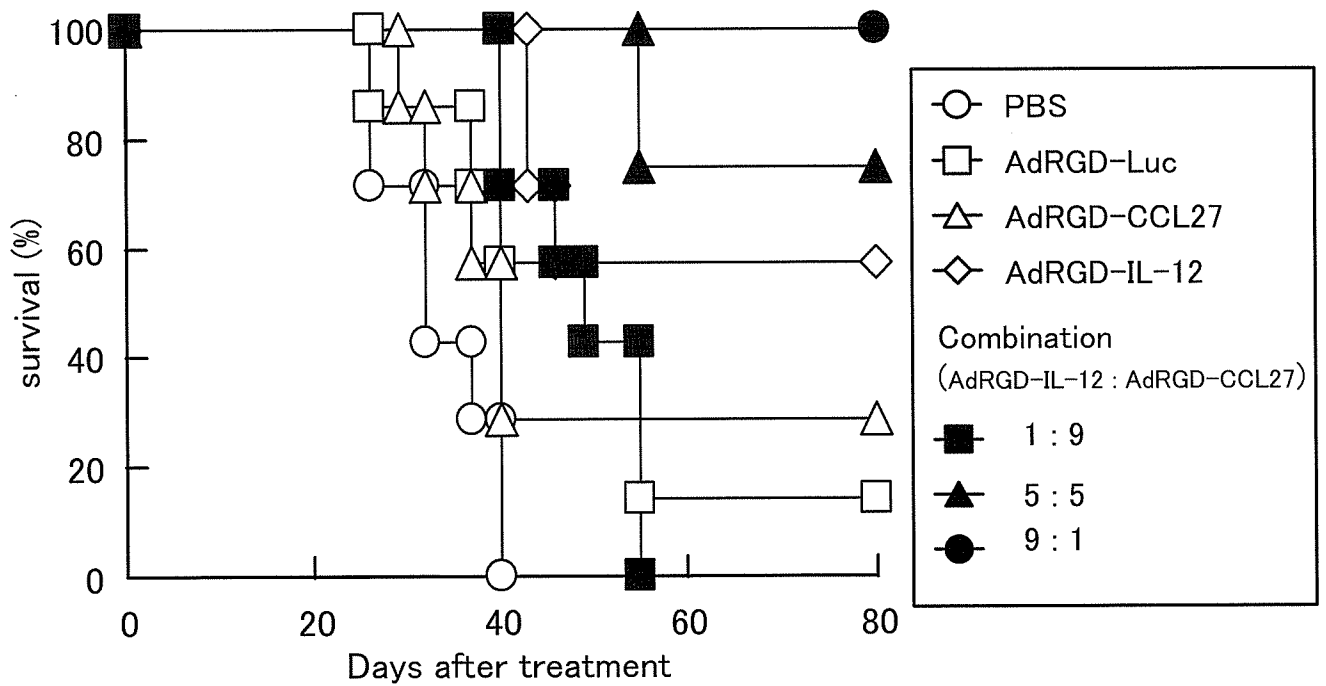


Fig. 8. The survival percent of mice with the treatment of indicated adenovirus vectors

Table 2. Induction of specific long-term immunity against OV-HM cells in tumor rejected mice.

Groups	Challenging cells	Tumor rejected mice/ challenged mice		
		After 3 months		After 6 months
		1st Exp.	2nd Exp.	3rd Exp.
Intact	OV-HM	0/6	0/6	0/6
Combination AdRGD-IL-12 (9) AdRGD-CCL27 (1)	OV-HM	4/5	5/5	5/5
	B16BL6	0/3	0/5	0/5
Combination AdRGD-IL-12 (5) AdRGD-CCL27 (5)	OV-HM	4/4		
	B16BL6	0/2		

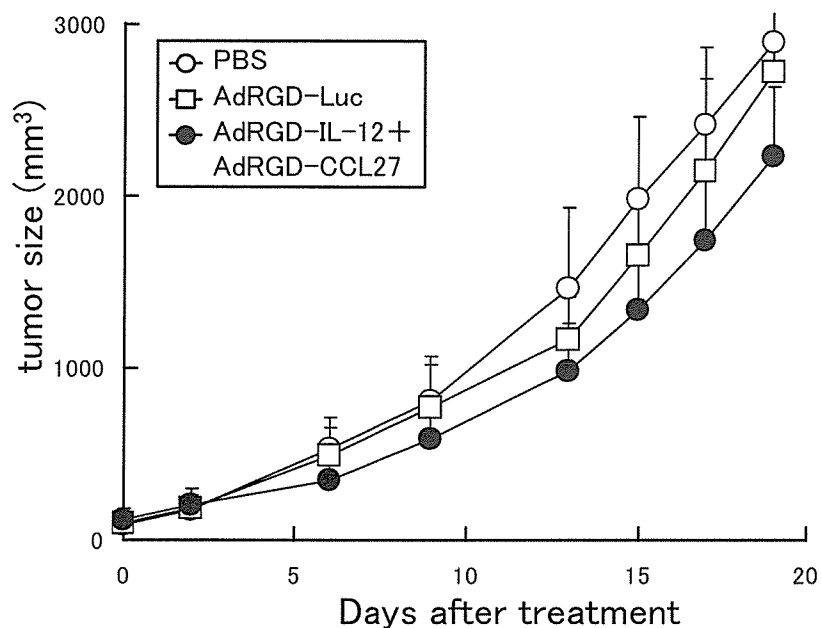


Fig. 9. Anti-tumor effect induced by the combination of AdRGD-IL-12 and AdRGD-CCL27 is T cell-dependent. Balb/c nude mice were inoculated intradermally with OV-HM cells (1×10^6 cells/mouse). After one week, 50 μ l of PBS, 2×10^7 PFU of AdRGD-Luc, or AdRGD-IL-12 plus AdRGD-CCL27, in total of 2×10^7 PFU at the ratio of 9:1, were intratumorally injected. Tumor size was measured twice a week.

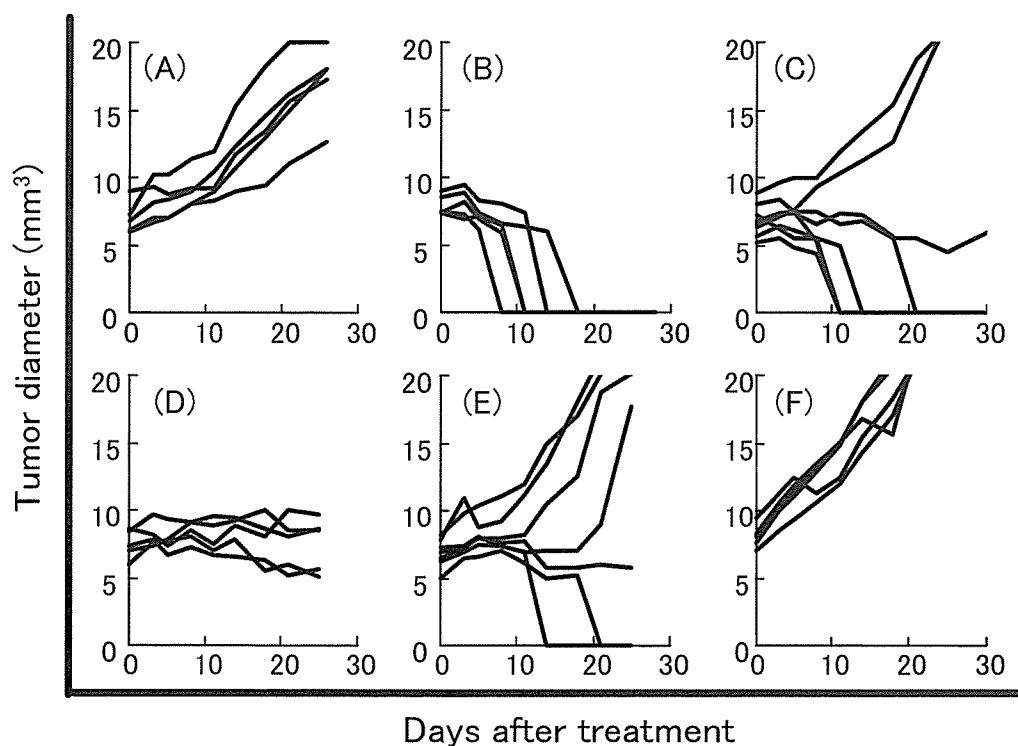


Fig. 10. Both CD4 or CD8 T cells contributed to the anti-tumor activity induced by combination. CD4 positive T, CD8 positive T or NK cell-depleted naive mice were inoculated intradermally with OV-HM cells (1×10^6 cells/mouse). (A) Tumor-bearing mice treated with PBS, (B) intact mice, (C) NK cell-depleted mice, (D) CD4 positive T cell-depleted mice, (E) CD8 positive T cell-depleted mice, (F) CD4 positive T cell and CD8 positive T cell-depleted mice treated with AdRGD-IL-12 and AdRGD-CCL27 at a ratio of 9:1 (in total 2×10^7 PFU/mouse).

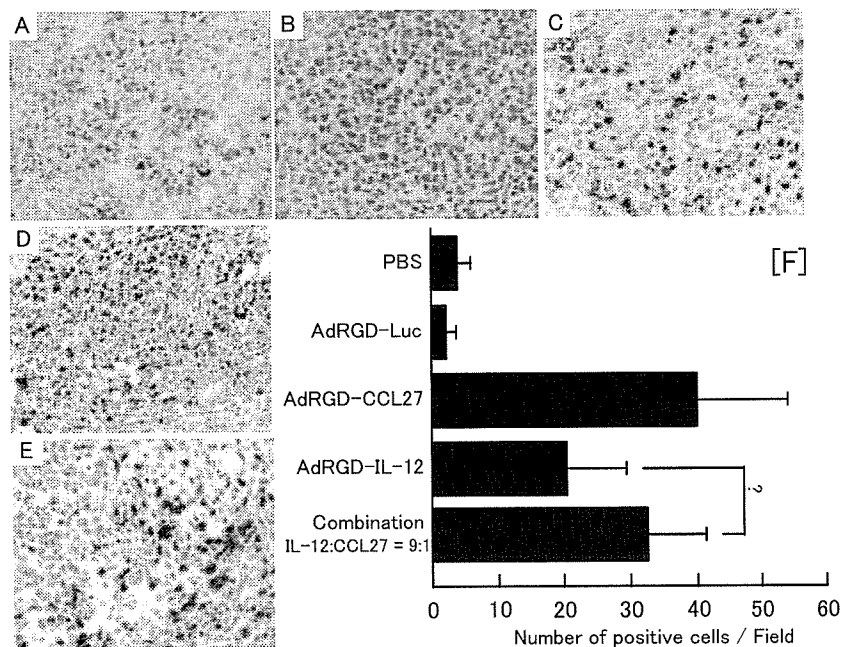


Fig. 11. CD3 positive lymphocyte infiltrate into OV-HM tumor. Immunohistochemical analysis was utilized to determine lymphocytes infiltrated into tumors. When the length of tumor reached about 7-8 mm, intratumoral administrations of indicated adenovirus vectors were carried out. Tumor-bearing mice were sacrificed in six days after the intratumoral administration of (A) PBS, (B) AdRGD-Luc, (C) AdRGD-CCL27, (D) AdRGD-IL-12 or (E) combination (AdRGD-IL-12:AdRGD-CCL27=9:1). The tumor nodules were harvested, embedded in the O.C.T. compound, and stored at -80°C . Frozen thin sections of the nodules were fixed and stained for CD3 positive T cells using the method described above. (F) The number of immunostained cells were counted under light microscope with $\times 400$ magnification. For counting positive cell number infiltrated into tumor tissue, six fields were randomly selected. Statistical analysis was carried out by Student's t-test. *; < 0.05

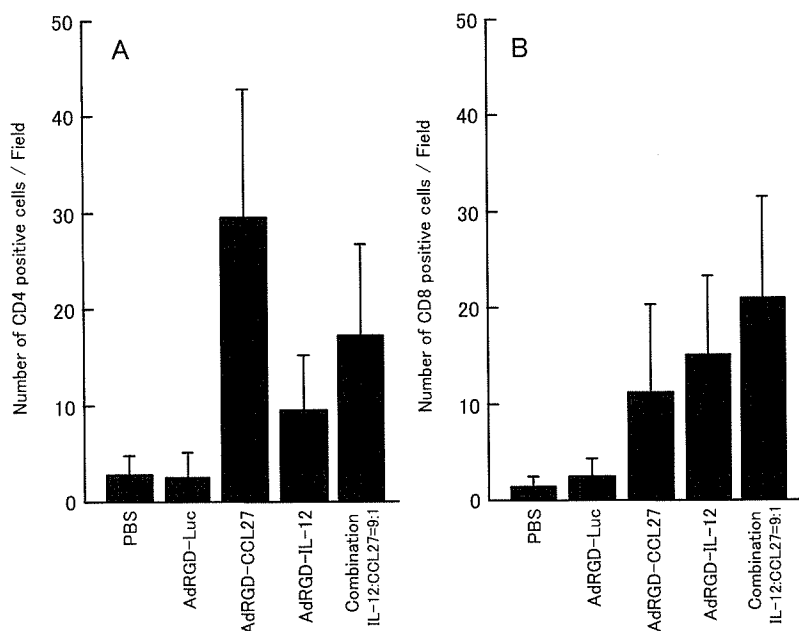


Fig. 12. CD4 or CD8 positive lymphocyte infiltrate into OV-HM tumor. When the length of tumor reached about 7-8 mm, intratumoral administrations of indicated adenovirus vectors were carried out. Tumor-bearing mice were sacrificed in six days after the intratumoral administration of AdRGD-CCL27, AdRGD-IL-12 or combination. The tumor nodules were harvested, embedded in the O.C.T. compound, stored at -80°C . Frozen thin sections of the nodules were fixed and stained for CD4 (A) or CD8 (B)-positive cells using the method described above. The number of immunostained cells were counted under light microscope with $\times 400$ magnification. For counting the positive cell number infiltrated into tumor tissue, six fields were randomly selected.