

Fig. 4. Luciferase Production in CD46TG and Wild-type Mice after Intravenous and Intraperitoneal Administration of Ad35 Vectors Expressing Firefly Luciferase

(A) Luciferase production in the organs after intravenous administration of Ad35 vectors. (B) Luciferase production in the organs after intraperitoneal administration of Ad35 vectors. Ad35 vectors (1.5×10^{10} VP) was administered to wild-type mice (C57Bl6, 5 weeks old) and hemizygous (Hemi TG, 5 to 6 weeks old) and homozygous (Homo TG, 5 to 6 weeks old) CD46TG mice. After 48 h, the organs were harvested and homogenized, and luciferase production was measured by a luminescence assay system (PicaGene 5500; Toyo Inki, Japan). All data are represented as mean \pm S.D. ($n=4$, intravenous administration; $n=6$, intraperitoneal administration).

腹腔内投与した場合に遺伝子発現を示した細胞の大部分は臓器表面の中皮細胞であった (Fig. 5).

6. カニクイザルを用いた 35 型 Ad ベクターの機能解析

35 型 Ad ベクターは CD46TG マウスにおいても十分な遺伝子発現を示さなかったが、これに関しては主に 2 つの原因が推察された。第一に CD46 が主に basolateral 側に発現しているために、²⁷⁾ 細胞外マトリックスなどの立体障害により 35 型 Ad ベクターが CD46 に到達できないことが考えられた。あるいは、35 型 Ad には CD46 以外の未知の受容体の存在が示唆されているが、²⁸⁾ マウスではその受容体が発現していない可能性があった。そこでわれわれは、ヒトと同様に生来から CD46 を発現している霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの機能評価を行った。35 型 Ad ベクターをカニクイザルに静脈内投与し、投与 96 時間後の各臓器における遺伝子発現並びにベクター集積量を検討した。その結果、35

型 Ad ベクターのゲノム DNA は肝臓で最も多く検出され、その他、肺、腎臓、心臓においても高い値を示した。一方で各臓器における遺伝子発現を検討したところ、ほとんど遺伝子発現は観察されず、CD46TG マウスを用いた場合と同様の傾向を示した。今後われわれは霊長類を用いて 35 型 Ad ベクターの機能解析をさらに進めるとともに、臓器局所への投与による遺伝子導入実験も計画している。これらの実験により 35 型 Ad ベクターの臨床応用に向けて重要な知見が得られるものと期待している。

7. おわりに

以上、本稿ではわれわれが開発した新しいタイプの Ad ベクターである 35 型 Ad ベクターの機能解析 (遺伝子導入特性解析) を遺伝子改変動物並びに霊長類を用いて行った研究について紹介した。遺伝子治療研究が始まって以来、精力的に基礎研究並びに臨床試験が進められ、貴重な数多くの情報が蓄積されてきた。今、これらの情報は高性能なベクター

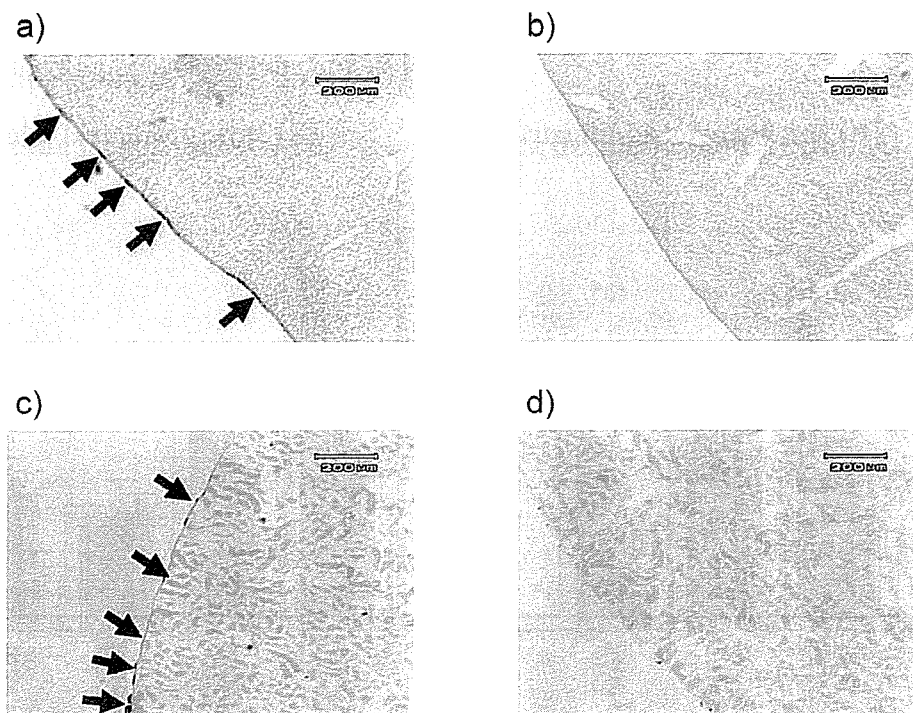


Fig. 5. X-gal Staining of the Peritoneal Organs of Homozygous CD46TG Mice Receiving β -Galactosidase-expressing Ad35 Vectors (a) Liver and (c) kidney sections from homozygous TG mice injected with Ad35 vectors. (b) Liver and (d) kidney sections from mock-infected homozygous TG mice. Ad35 vectors were injected intraperitoneally into homozygous CD46TG mice at a dose of 7.5×10^{10} VP/mouse. At 2 days postadministration, the organs were recovered, fixed, and stained by using X-gal reagents. LacZ-positive cells are indicated by the arrows.

の開発・改良へと着実にフィードバックされている。今後もこのような積み重ねがさらに高性能なベクター及び治療法の開発へとつながり、かならずや遺伝子治療のブレイクスルーになるものと期待している。

謝辞 本稿で紹介した研究は、独立行政法人医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部及び生物薬品部において行われたものであり、実験に協力していただいた関係者の皆様に深く感謝いたします。またCD46TGマウスを供与していただきました大阪大学・岡部 勝先生、井上直和先生、また霊長類への遺伝子導入実験に協力していただきました霊長類医学研究センター・寺尾恵治先生始め関係者の皆様にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Havenga M. J., Lemckert A. A., Ophorst O. J., van Meijer M., Germeraad W. T., Grimbergen J., van Den Doel M. A., Vogels R., van Deutekom J., Janson A. A., de Bruijn J. D., Uytdehaag F., Quax P. H., Logtenberg T., Mehtali M., Bout A., *J. Virol*, **76**, 4612–4620 (2002).
- 2) Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **10**, 1041–1048 (2003).
- 3) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., *Mol. Ther.*, **8**, 813–821 (2003).
- 4) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **12**, 1424–1433 (2005).
- 5) Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther.*, **13**, 1118–1126 (2006).
- 6) Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *J. Control. Release*, **113**, 271–278 (2006).
- 7) Crystal R. G., McElvaney N. G., Rosenfeld M. A., Chu C. S., Mastrangeli A., Hay J. G., Brody S. L., Jaffe H. A., Eissa N. T., Danel C., *Nat. Genet.*, **8**, 42–51 (1994).
- 8) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R.

- W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- 9) Roelvink P. W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovesdi I., Wickham T. J., *J. Virol.*, **72**, 7909–7915 (1998).
 - 10) Okegawa T., Pong R. C., Li Y., Bergelson J. M., Sagalowsky A. I., Hsieh J. T., *Cancer Res.*, **61**, 6592–6600 (2001).
 - 11) Huang K. C., Altinoz M., Wosik K., Larochelle N., Koty Z., Zhu L., Holland P. C., Nalbantoglu J., *Int. J. Cancer*, **113**, 738–745 (2005).
 - 12) Cohen C. J., Shieh J. T., Pickles R. J., Okegawa T., Hsieh J. T., Bergelson J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 15191–15196 (2001).
 - 13) Coyne C. B., Bergelson J. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 869–882 (2005).
 - 14) Seshidhar Reddy P., Ganesh S., Limbach M.P., Brann T., Pinkstaff A., Kaloss M., Kaleko M., Connelly S., *Virology*, **311**, 384–393 (2003).
 - 15) Vlachaki M. T., Hernandez-Garcia A., Ittmann M., Chikara M., Aguilar L. K., Zhu X., Teh B. S., Butler E. B., Woo S., Thompson T. C., Barrera-Saldana H., Aguilar-Cordova E., *Mol. Ther.*, **6**, 342–348 (2002).
 - 16) Segerman A., Mei Y. F., Wadell G., *J. Virol.*, **74**, 1457–1467 (2000).
 - 17) Segerman A., Atkinson J. P., Marttila M., Dennerquist V., Wadell G., Arnberg N., *J. Virol.*, **77**, 9183–9191 (2003).
 - 18) Gaggar A., Shayakhmetov D. M., Lieber A., *Nat. Med.*, **9**, 1408–1412 (2003).
 - 19) Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., Whittle H., Sun H., Rowe D., Robbins P. D., Gambotto A., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11**, 351–357 (2004).
 - 20) Mizuguchi H., Hayakawa T., *Gene*, **285**, 69–77 (2002).
 - 21) Stecher H., Shayakhmetov D. M., Stamato-yannopoulos G., Lieber A., *Mol. Ther.*, **4**: 36–44 (2001).
 - 22) Sumida S. M., Truitt D. M., Lemckert A. A., Vogels R., Custers J. H., Addo M. M., Lockman S., Peter T., Peyerl F. W., Kishko M. G., Jackson S. S., Gorgone D. A., Lifton M. A., Essex M., Walker B. D., Goudsmit J., Haven-ga M. J., Barouch D. H., *J. Immunol.*, **174**, 7179–7185 (2005).
 - 23) Cattaneo R., *J. Virol.*, **78**, 4385–4388 (2004).
 - 24) Russell S., *Tissue Antigens*, **64**, 111–118 (2004).
 - 25) Fleischli C., Verhaagh S., Havenga M., Sirena D., Schaffner W., Cattaneo R., Greber U. F., Hemmi S., *J. Virol.*, **79**, 10013–10022 (2005).
 - 26) Tsujimura A., Shida K., Kitamura M., Nomura M., Takeda J., Tanaka H., Matsumoto M., Matsumiya K., Okuyama A., Nishimune Y., Okabe M., Seya T., *Biochem. J.*, **330** (Pt 1), 163–168 (1998).
 - 27) Maisner A., Zimmer G., Liszewski M. K., Lublin D. M., Atkinson J. P., Herrler G., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20793–20799 (1997).
 - 28) Segerman A., Arnberg N., Erikson A., Lindman K., Wadell G., *J. Virol.*, **77**, 1157–1162 (2003).