

在検討している。

造血幹細胞への高効率遺伝子導入法

造血幹細胞は成体では主に骨髄に存在し、すべての血液細胞に分化する能力を有する。造血幹細胞に対する遺伝子導入は、主にレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが用いられてきたが、これらのベクターは半永久的に導入遺伝子を発現しつづけるため、治療目的に応用するには不都合が生じる場合がある。たとえば、MDR1(multi-drug resistance gene 1)遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に導入した場合、導入遺伝子が細胞分化後も発現するため、生体(マウス)に移植した場合に白血病を発症するという報告がある²⁹⁾。また、重症複合性免疫不全症候群(X-SCID)の患者に対して行われたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療では、ウイルスゲノムの染色体へのランダムな組込みにより白血病を発症するという副作用が起きた(がん遺伝子である LMO2 遺伝子の近傍に治療用遺伝子が挿入されたことが直接の原因である)³⁰⁾。したがって、再生医療への応用には、アデノウイルスベクターのように発現が一過性のベクターが好ましいことが多い。

しかしながら、ヒト造血幹細胞を含む画分である CD34 陽性細胞では、CAR 陽性細胞は数%と少なく、5 型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率も 4~5%と低い。一方、ほぼすべての CD34 陽性細胞は CD46 を発現しているため、35 型アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行ったところ、50%以上の遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった(図 3c)¹⁴⁾。また、CD34 陽性細胞への遺伝子導入に適したプロモーターを探索した結果、EF-1 α 、CA、CMVi(イントロン A を付加した CMV プロモーター)などのプロモーターを用いることにより高い遺伝子発現が得られた¹⁶⁾。

したがって、最適化されたアデノウイルスベクターを用いて HoxB4 などの造血幹細胞の増殖に関与する遺伝子を導入することにより、これまで困難とされてきた造血幹細胞の *in vitro* での増幅が可能ではないかと考え、現在検討中である。また、*in*

vivo においては細胞増殖や抗アポトーシス、ホーミングに関与する遺伝子を造血幹細胞に導入することにより、造血幹細胞を *in vivo* へ移植後の骨髄への生着細胞数が上昇する結果、移植効率の向上が得られる可能性が考えられ、これに関しても現在研究を進めている。

以上、各種幹細胞を用いた再生医療への応用において障害となっている遺伝子導入に関し、改良型アデノウイルスベクターの有用性について解説した。また表 1 には、これら幹細胞を含むさまざまな細胞種への改良型アデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率の改善例について示した。今後、筆者らの開発したこれらのベクターが、幹細胞研究や再生医療研究などの基礎・応用研究に大きく貢献できることを期待している。

文 献

- 1) Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y et al. : A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 8 : 730-735, 2001.
- 2) Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T : Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5 : 267-276, 2003.
- 3) Mizuguchi H, Kay MA : Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum Gene Ther* 9 : 2577-2583, 1998.
- 4) Mizuguchi H, Kay MA : A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 10 : 2013-2017, 1999.
- 5) Kasano K, Blackwell JL, Douglas JT, Dmitriev I, Strong TV et al. : Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5 : 2571-2579, 1999.
- 6) Vanderkwaak TJ, Wang M, Gomez-Navarro J, Rancourt C, Dmitriev V et al. : An advanced generation of adenoviral vectors selectively enhances gene transfer for ovarian cancer gene therapy approaches. *Gynecol Oncol* 74 : 227-234, 1999.
- 7) Okada N, Saito T, Masunaga Y, Tsukada Y, Nakagawa S et al. : Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate antitumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res* 61 : 7913-7919, 2001.
- 8) Biermann V, Volpers C, Hussmann S, Stock A, Kewes H et al. : Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 12 : 1757-1769, 2001.
- 9) Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL, Roelvink PW, Li Y, et al. : Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 71 : 8221-8229, 1997.
- 10) Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP : Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 57 : 637-651, 2005.

- 11) Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A : CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9 : 1408-1412, 2003.
- 12) Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G et al. : Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77 : 9183-9191, 2003.
- 13) Mizuguchi H, Hayakawa T : Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 285 : 69-77, 2002.
- 14) Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T : Efficient gene transfer into CD34+ cells by an adenovirus serotype 35 vector. *Gene Ther* 10 : 1041-1048, 2003.
- 15) Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, Hayakawa T : Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol Ther* 8 : 813-821, 2003.
- 16) Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H : Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors : Comparison of promoter activities. *Gene Ther* 12 : 1424-1433, 2005.
- 17) Kurachi S, Koizumi N, Sakurai F, Kawabata K, Sakurai H et al. : Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther*, (in press).
- 18) Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H : Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol Pharm* 3 : 95-103, 2006.
- 19) Tompers DM, Labosky PA : Electroporation of murine embryonic stem cells : a step-by-step guide. *Stem Cells* 22 : 243-249, 2004.
- 20) Cherry SR, Biniszkiewicz D, van Parijs L, Baltimore D, Jaenisch R : Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 20 : 7419-7426, 2000.
- 21) Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhardt E et al. : Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 7 : 281-287, 2003.
- 22) Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J : Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 22 : 1526-1536, 2002.
- 23) Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H : Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther* 12 : 547-554, 2005.
- 24) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999.
- 25) Conger PA, Minguell JJ : Adenoviral-mediated gene transfer into *ex vivo* expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 28 : 382-390, 2000.
- 26) Hung SC, Lu CY, Shyue SK, Liu HC, Ho LL : Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Coxsackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22 : 1321-1329, 2004.
- 27) Mizuguchi H, Sasaki T, Kawabata K, Sakurai F, Hayakawa T : Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332 : 1101-1106, 2005.
- 28) Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M et al. : Mesenchymal stem cells : potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1593-1603, 2004.
- 29) Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP : Transduction of murine bone marrow cells with an MDRI vector enables *ex vivo* stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 92 : 2269-2279, 1998.
- 30) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.

“DDS” 用語解説 No. 112

ウイルスベクター (virus vector)

ウイルスベクターとは、ウイルス本来が持つ感染機構を利用して外来遺伝子を細胞に導入・発現させる遺伝子導入用ベクターである。ウイルスベクターでは、そのウイルスゲノムから自己複製に必須の遺伝子を取り除くことで自己複製不能となっており、外来遺伝子がウイルスゲノムに挿入されている。これまでにレトロウイルスベクター、アデノウイルス(Ad)ベクターをはじめ、多くのウイルスベクターが開発されており、2006年6月までの遺伝子治療臨床試験のうち、約70%でウイルスベクターが用いられている。これらウイルスベクターは、基本骨格となるウイルスの種類によりその遺伝子導入特性は大きく異なるが、プラスミドDNAを基本とした非ウイルスベクターと比較して、総じて遺伝子導入効率にすぐれる一方、ウイルスベクターの抗原性や感染域、作製方法の煩雑さ、ウイルスに対する抗体保持率などが問題となっている。

近年、これらの問題点を克服した次世代ウイルスベクターの開発研究が盛んに行われている。たとえば、subgroup Cに属する従来のAdベクターはAd受容体(CAR)を発現していない細胞(樹状細胞や血液細胞など)への遺伝子導入効率はきわめて低い。しかし、subgroup Bに属するAdベクター(35型Adベクターなど)はCD46を受容体として認識するため(ヒトCD46は赤血球を除くほぼすべての細胞に発現している)、ヒト造血幹細胞をはじめとする広範な細胞種に対し高効率な遺伝子導入が可能である。

櫻井文教 (Fuminori Sakurai)

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

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 遺伝子治療専門家グループの活動と 遺伝子治療薬の規制における国際動向

特集 臨床応用が迫る遺伝子治療の動向と国産技術の開発

山口照英^{*1)}, 内田恵理子^{*2)}

Quality control and safety of human cell therapy products

ICH gene therapy discussion group has been expected to exchange information with the following objectives: monitoring emerging scientific issues, developing new ways of communication to ensure that the outcomes of ICH are well understood and widely disseminated, proactively setting out principles that may have a beneficial impact on harmonizing regulation of gene therapy products. The group has been discussing and published the concept papers about reference materials for gene therapy vectors, virus/vector shedding, evaluation of risk of X-SCID gene therapy, oncolytic virus products, and risk of germline integration of gene therapy products.

ICH 遺伝子治療専門家グループは、遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、専門家グループ会議や公開ワークショップなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで議論が行われてきた国際標準品、ウイルスベクターの排出、X-SCID 遺伝子治療における白血病発症とリスク評価、腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保、“生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方”などについて紹介する。

Teruhide Yamaguchi^{*1)}, Eriko Uchida^{*2)}

key words: gene therapy, ICH, oncolytic virus, viral shedding, insertional mutagenesis

日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)は、日米 EU 間の医薬品の承認申請に関わる規制を調和し、申請に必要なさまざまなデータなどの作成における不必要な重複を避け、グローバルな医薬品開発の促進と、よりよい医薬品を一刻も早く患者のもとに届けることを目的として活動を行っている。ICH は、1990 年 4 月、日本・アメリカ・ヨーロッパの各医薬品規制当局と業界団体の 6 極により発足した。それ以来、ICH 運営委員会(ICH-SC)は毎年 2~3 回の会合をつづけており、さらに ICH 国際会議も 2~3 年に 1 回程度の頻度で開催されている。

この間、ICH 発足以来、50 を超えるガイドラインが合意(調和)され、調和ガイドラインが各地域で

施行されてきている(http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html)。新医薬品の品質・有効性・安全性の評価に関わる技術的なガイドラインだけでなく、承認申請資料の形式、市販後安全体制などについても議論がされてきている。また、カナダ、スイス、WHO などの他の機関もオブザーバーとして議論に参加するようになってきている。

遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group: GT-DG)は、2002 年の ICH ワシントン会議にて正式に発足した作業部会である。それ以前は、バイオテクノロジー医薬品専門家会議および Ad hoc な GT-DG として議論を重ねてきた。GT-DG では、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページなどを通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これ

^{*1)} Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

^{*2)} Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議で採り上げられた主なトピック

- ・患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの体外排出
- ・遺伝子治療薬に含まれる増殖性ウイルスの検出とその手法 (RCA or RCR)
- ・遺伝子治療薬のためのウイルス参照品 (アデノウイルス5型)
- ・生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方
- ・遺伝子治療用ベクターによる挿入変異の評価
- ・腫瘍溶解性ウイルス (ワークショップ)
- ・遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ (FDA ガイドライン案)
- ・遺伝子治療用レンチウイルスベクター (EMA ガイドライン案)

表2 ICH 遺伝子治療公開ワークショップ (2002 年) のテーマ

- ・アデノウイルス5型国際参照品 [EU2] の確立状況
- ・他のベクター用の国際標準品の開発および有用性
- ・アデノウイルスベクターの体外排出
- ・レンチウイルスベクター

表3 ヒトアデノウイルス5型国際参照品 (ATCC, VR-1516)

- ・アデノウイルス粒子数: 5.8×10^{11} particles/mL
- ・感染価: 7×10^{10} NAS Infectious units/mL
- ・宿主細胞 HEK 293 由来 DNA 量: $< 3 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ of total DNA
- ・宿主細胞 HEK 293 由来蛋白質量: 18 ng/mL
- ・残存 BSA 量: $< 0.5 \text{ ng/mL}$
- ・遊離ヘキソン: $1.16 \mu\text{g/mL}$, $2.0 \mu\text{g}/10^{12}$ viral particles
- ・エンドトシキン: $< 0.15 \text{ EU/mL}$
- ・A 260nm/A 280nm 比 (0.1% (w/v) SDS 存在下): 1.37

まで GT-DG で採り上げられた話題について表1にあげたが、遺伝子治療薬の品質や安全性などに関する非常に多岐にわたる科学的課題について議論を行ってきた。

本稿では、ICH GT-DG で議論された遺伝子治療薬の品質・安全性などに関するいくつかの課題を採り上げ、それぞれの議論でのポイントを紹介するとともに、議論を通じて明らかにされた規制当局としての最新のスタンスについて紹介する。また、EU 医薬品庁 (EMA) から出されたレンチウイルスベクターに関するガイドラインや、遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップに関する米国食品医薬品局 (FDA) のガイドラインについても議論を行っており、ICH で議論を行ったこれらの各極ガイドラインについても概説する。

ICH GT-DG の活動

2001 年 5 月の東京での ICH-SC において、急速に進展している遺伝子治療用医薬品の品質・安全性の確保に関しては、これらの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH 各極間での情報の交換・共有を積極的に継続して行う必要があることが明記された。

ICH-SC での議論を受け、GT-DG の正式なスタートを飾るものとして ICH 後援の第1回遺伝子治療ワークショップが2002年にワシントンで開催された。本公開ワークショップで扱ったトピックは表2のとおりであり、遺伝子治療に関する最新の話題が採り上げられた。その後、ICH 会議や ICH 本会議に合わせて会合を持つとともに、e-mail などを通じて常に情報交換を行い、遺伝子治療薬の安全性や品質などに関する最新の問題点について議論を継続してきている。これらの成果については、ICH ホームページや国立医薬品食品衛生研究所のホームページに掲載している。

ICH GT-DG での各課題ごとの議論についてそれぞれ概略を述べる。

1. 国際参照品

アメリカでオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者が、アデノウイルスベクターの大量投与による異常免疫反応により死亡¹⁾したことを受け、その安全性を確保するためには正確な投与量を測定することが重要であり、異なる施設での臨床研究に用いるアデノウイルスベクターのウイルス粒子数、ブランク形成単位、感染単位の相互比較を可能にするための参照品や標準品の設定が必要とされた。

そこで、アデノウイルス参照品作製のための国際委員会が発足し、2002 年 8 月にアデノウイルス5型国際参照品が確立され、ATCC より公開された (ATCC, VR-1516, 表3)。本参照品を使用することによって、異なる施設・研究で測定されたウイルス粒子数および力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となった^{2,3)}。

これまで、多施設間で出されている毒性データな

どに関しては、用いられているベクターの投与量・コピー数などの基準がないため、相互に比較できなかった。しかし、本参照品を用いることにより得られたデータをまとめて再検討することによって、用量依存的な毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかに出来るようになり、また遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中に含まれる増殖性アデノウイルス(RCA)の真の定量値を求めることが可能となると期待されている。現在、アデノウイルスを用いた多くの製品の品質やRCAの評価に本参照品が用いられている。

ICH GT-DGでは、このアデノウイルス参照品の品質や安定性などに関する議論を行い、上記目的に有用であること、また長期にわたる安定性についても問題がないことなどを確認した。

2. ウイルスベクターの体内からの排出

2002年の遺伝子治療公開ワークショップでは、アデノウイルスベクターを投与した患者からのベクターの体外排出について、測定法を含め、安全性の観点から議論が行われた。現在までのところ、ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は確認されていないとされている。しかし、より高い感染価を持つベクターの開発や指向性の改良など、今後もアデノウイルスベクターの開発は進むと想定され、環境への影響や広く公衆衛生の観点からその安全性を評価しておくことは重要と考えられる。このために、アデノウイルスベクターの体内からの排出をモニターする期間、タイミングについても十分に考慮する必要があること、特に投与量・投与経路を考慮して試験の間隔を設定する必要があることが示された。

アデノウイルスベクターのみならず、体外排出のリスクが想定されるベクターが次々と開発中であり、患者家族や医療従事者などへの伝播のリスクや公衆衛生の観点からの安全性確保が大きな課題とされている⁴⁾。そこでGT-DGでは、排出リスクの高いベクターやウイルスの体内からの排出に関して、2007年10月にヨーロッパ遺伝子治療学会との共催でICHワークショップを開催することになっている。今後、このワークショップでの議論を踏ま

えて、遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成や、ガイドライン化についても検討を行っていくことになっている。

なお、ICH見解とは、ガイドラインのように各規制当局への拘束力はないものの、現時点の科学的な見解をICHとしてまとめたものである。遺伝子治療用ベクターやウイルスの排出に関するICH見解の作成に当たっては、特に治療用ベクターなどが患者以外の第3者に暴露される危険性について言及する予定となっている。

3. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に代表されるレンチウイルスを改変してつくられるベクターである。他のレトロウイルスベクター、特にガンマレトロウイルスに由来するベクターと異なり、レンチウイルスベクターは非分裂細胞、たとえば幹細胞、リンパ球、樹状細胞、神経細胞などに遺伝子導入可能である。したがって、*ex vivo* 遺伝子導入に加えて *in vivo* での遺伝子導入にも有用であるとされている。さらに、レンチウイルスベクターは、他のレトロウイルスベクターにくらべて遺伝子サイレンシングの頻度が低いため長期間・遺伝子発現が期待され、慢性疾患に対する *in vivo* 臨床管理の手段としても用いることが可能と考えられる。

レンチウイルスベクターに関する特別のリスクはまだ知られていないものの、レンチウイルスベクターは、特にその開発の主な焦点の一つがヒトの重篤な病原体である HIV に由来するものであることから、ガンマレトロウイルスベクターと比較して、より一層、品質・有効性・安全性の問題が重要視されている。

2002年に開催されたワークショップでは、レンチウイルスベクターの安全性や品質に関する議論が行われた。特に、① レンチウイルスベクター中に含まれる増殖性レンチウイルス(RCL)に対する試験・検査の実施法、② 挿入変異の可能性・検出法、③ 生殖細胞への挿入の可能性、について議論された。レンチウイルスベクター中のRCLの検出においては、適切な陽性対照を置いて実施すべきで

あること、および RCL に関する試験・検査の一つとして RCL に env 配列が含まれていないことを確認しなければならないこと、の 2 点を推奨することとされた。また、レンチウイルスベクターの体内動態、染色体への挿入および生殖細胞系列への伝達を調べるための適切なモデル動物を用いたアッセイ系を開発することが推奨された。

その後 EU より、“レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針”案が提案され、ICH の共通のガイドラインとしては取り扱わないものの、EU の指針案についての論議が GT-DG でもつづけられた。各極から出された意見を採り入れた改正案が示され(表 4)、2005 年に正式に CPMP ガイドラインとして発出された⁵⁾。

4. X-SCID 遺伝子治療における白血病発症とリスク評価

フランスで X1 連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の遺伝子治療を受けた患児 2 例に白血病症状が発症⁶⁾したことを受けて、2004 年のワシントン会議ではフランスでの最新情報と各極の対応が報告され、そのリスク評価を実施した。このリスク評価の前提として、X-SCID およびアデノシンデアミナーゼ欠損症(ADA/SCID)の遺伝子治療臨床試験から、SCID に対する遺伝子治療の臨床的有用性が確認された。

このような有用性を前提として、SCID の遺伝子治療における一般的リスク要因とリスクベネフィットに基づく X-SCID 遺伝子治療の実施の是非について議論を行った。その結果、① 患者の年齢、② 細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数、③ 投与量、④ 遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクが一般的リスク要因であるとされた。

このようなリスク要因を考慮したうえで、現時点での X-SCID の治療の第 1 選択肢としては骨髄移植を考慮すべきこと、さらに骨髄移植が失敗に終わった場合や適切なドナーがない場合、リスクベネフィットの観点から現行のベクターを用いた遺伝子治療を選択するのもやむをえないとされた。

患者の年齢に関しては、当初の 2 例の白血病発症患児は投与時に生後 6 カ月未満であったことから、

表 4 レンチウイルスベクターの開発と製造に関する指針の項目

1. 序
2. もとになるレンチウイルスの性質とレンチウイルスベクター開発への影響
3. レンチウイルスベクターの設計
4. レンチウイルスベクターの製造方法
5. レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験
 - 5.1 遺伝子導入活性
 - 遺伝子組み込み能
 - 導入遺伝子の機能
 - 5.2 レンチウイルスベクターの粒子数測定
 - 5.3 増殖性レンチウイルス(RCL)否定試験
6. がん原性

6 カ月以内の患児ではリスクが高いとされた。しかし、その後、3 例目の白血病発症が確認され、3 例目の患児の投与時の年齢が 9 カ月であったことから見直しが必要となっている。しかし、年齢(月齢)の低い患児ほどリスクが高いと想定されていることには間違いのないであろう。

また、細胞に組み込まれた遺伝子治療用ベクターのコピー数・染色体挿入頻度が大きなリスク要因とされ、細胞当たり平均 1 を超えること、すなわち 1 個の細胞に複数のベクターが挿入されることを出来るかぎり避けるべきとされた。また、投与量、すなわち患者に投与した遺伝子導入細胞の総数が多いほどリスクが高いとされた。

さらに、遺伝子導入細胞の種類に応じた相対的リスクは、選択的優位性を持つと予想される幹細胞(すなわち、他の幹細胞にくらべて増殖能が高い幹細胞)、幹細胞、T 細胞または他のすでに分化した細胞の順にリスクが高いとされた。

染色体へのベクター挿入による発がんのリスクを評価するためのいくつかの新しい技術が開発中であり、現在用いられているこれらの技術は、まだ十分にバリデーションはされていないものの、遺伝子治療臨床研究においても有用な手法であるとされた。特に、LAM-PCR(linear amplification mediated PCR: 片方向増幅を介するポリメラーゼ連鎖反応)法⁷⁻⁹⁾が広く用いられており、またその改良法の開発も進められているが、LAM-PCR 法はまだバリデーションされていない技術であることから、複数の試験による確認が必要とされた。特に、LAM-PCR 法において検出される主要なバンドは、疾患の過程

でも変化することが知られており、このようなバンドを治療方針決定のための根拠、すなわち白血病などの副作用の発現の目安として使うことは出来ないとされた。特に、遺伝子導入細胞のクローナリティー(クローン増殖)の傾向が、従来から用いられている信頼性の高い方法によっても認められた場合には、より頻繁に被験者のモニタリングを行う必要があるとの結論が出された。

臨床における副作用発現を未然に防ぐための管理方法として、遺伝子導入細胞のクローナリティーをより高感度でかつより高い信頼性をもって監視するため、複数の方法を組み合わせることが科学的に妥当であると議論で確認された。さらに、新しい検査方法がまだ開発途上にあることから、将来も必要に応じて科学的検査が行えるよう、被験者の検体などの試料の保管が推奨されている。

その後、4例目の白血病発症も確認され、現在もフォローアップがつづけられている。X-SCID 遺伝子治療による白血病発症の主要因についてはいまだ不明であるが、同様の治療を実施してまだ白血病発症が認められていないイギリスでの遺伝子治療を含め、従来のベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療はこれ以上行わないとされている(イギリスでは患児の治療が予定されたエントリー数に達したためとされている)。近いうちに、より安全性を高めたベクターを用いて X-SCID 遺伝子治療が再開される予定になっている。

5. 遺伝子治療臨床試験に参加した被験者の長期フォローアップ(追跡)調査のFDAガイドラインに関する議論

FDA は、遺伝子治療を受けた被験者の長期フォローアップに関するガイダンスとして、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療薬治療に参加した被験者の増殖性ウイルス(RCV)感染の監視に特化したガイダンス「レトロウイルスベクターをもとにした遺伝子治療薬に混入する増殖性レトロウイルス試験およびレトロウイルスベクターを用いた治療の患者の追跡調査に関するガイダンス追補」を2000年9月に発出した(2006年11月改正¹⁰⁾)。

しかしその後、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療による白血病発症という深刻な

有害事象が発生し、また、その他のベクターによる遺伝子治療の長期フォローアップに関するガイダンスも必要とされたことから、FDA は、長期フォローアップに関するガイドラインの作成を検討し、原案について2004年のGT-DGで議論を行った。

その後、FDA は2005年8月に「製薬業界へのガイダンス：遺伝子治療臨床試験－遅発性の有害事象に関する被験者の観察」案を提出した。このガイドライン案では、遺伝子治療臨床研究のうち遅発性有害事象のリスク評価により長期フォローアップが必要と判断されるものについては、① 被験者の長期フォローアップ調査を遺伝子治療実施後15年間は実施するよう計画する必要がある。② その間に収集しなければならないデータとしては、悪性腫瘍、神経疾患、リウマチ性疾患、免疫性疾患・血液疾患などの新たな臨床症状の発症の有無のほか、ベクター配列の持続性をベクターが検出されなくなるまで継続実施する必要がある。また、組み込み型ベクターによる造血幹細胞遺伝子治療の場合には、クローナリティーの評価を実施する必要がある。③ 遺伝子治療実施後5年間は最低、年に一度の健康診断・検査によるフォローアップ調査を、その後6～15年目までは調査票によるフォローアップ調査を実施しなければならない。また、これに用いる調査票の内容は、わかりやすいものととどめておく必要があるとされている。④ このフォローアップ調査の結果は、遺伝子治療臨床研究に参加した被験者における長期リスクを評価するために、毎年とりまとめてFDAに報告することを求めている。

FDA は、2006年11月に上記ガイダンスを発出した¹¹⁾。本ガイダンスは前出のレトロウイルスベクターに関するガイダンス¹⁰⁾を補足する内容ともなっている。

6. 腫瘍溶解性ウイルス製品の品質・安全性確保と公開ワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常細胞では増殖できず、腫瘍細胞で選択的に増殖して細胞を溶解することが可能な制限増殖ウイルスであり、これまで十分な効果がみられてこなかった従来のがん治療遺伝子治療にかわる新たな治療法として期待されている

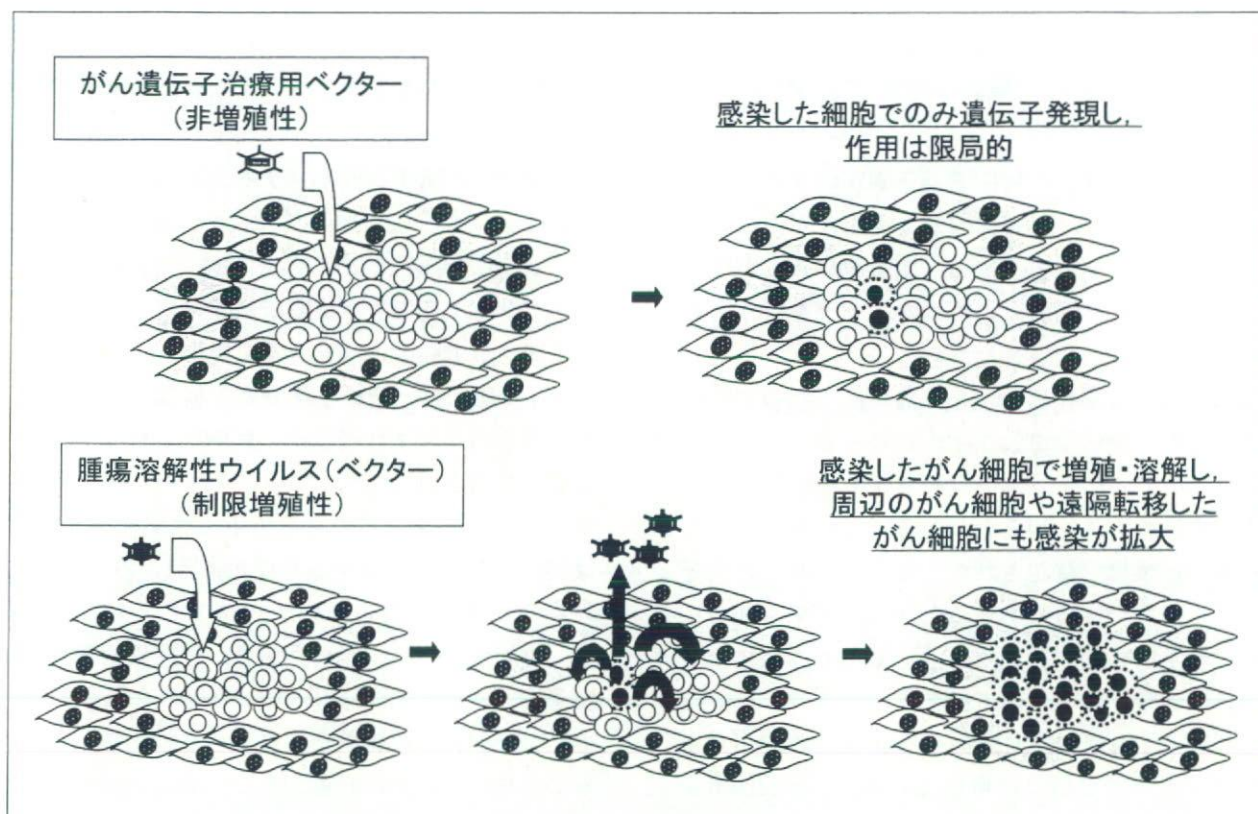


図1 遺伝子治療用ベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い

腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞内では増殖できないが、標的とするがん細胞内で選択的に増殖可能な制限増殖型ウイルスである。

ものである(図1)。腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスベクターを用いるものへと移行しつつある(図2)。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている^{12~16)}。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床適用は未知・未経験の要素も多い領域であり、基礎となる科学的知見も十分に集積されていないことから、GT-DGでは、品質確保の方策、安全性や有効性評価のための動物を用いた非臨床試験のあり方、さらには臨床研究における安全性・有効性評価などを議論するために、公開ワークショップを開催して議論を行い、その成果をコンセプトペーパーとして公開した。

腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性には、① 腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、② 動物やヒトで期待される効果の

評価、③ ウイルス複製の腫瘍選択性、④ 臨床上の安全性、④ 動物試験に用いる適切な動物モデル、⑤ 腫瘍溶解性ウイルスの体外排出の測定法とデータ、などが特に重要な課題とされている。

(1) 腫瘍溶解性ウイルスの設計および特性解析

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクター中のRCVの検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限複製能を持つことから、RCVの検出よりも目的ウイルスの変化体をどのように検出するかが重要とされている。また、品質の恒常性の観点から、ウイルス感染力力価ばかりでなく、力価に対する粒子数の比を規格化することが重要とされた。

(2) 非臨床試験

腫瘍溶解性ウイルスの安全性評価や目的とする効

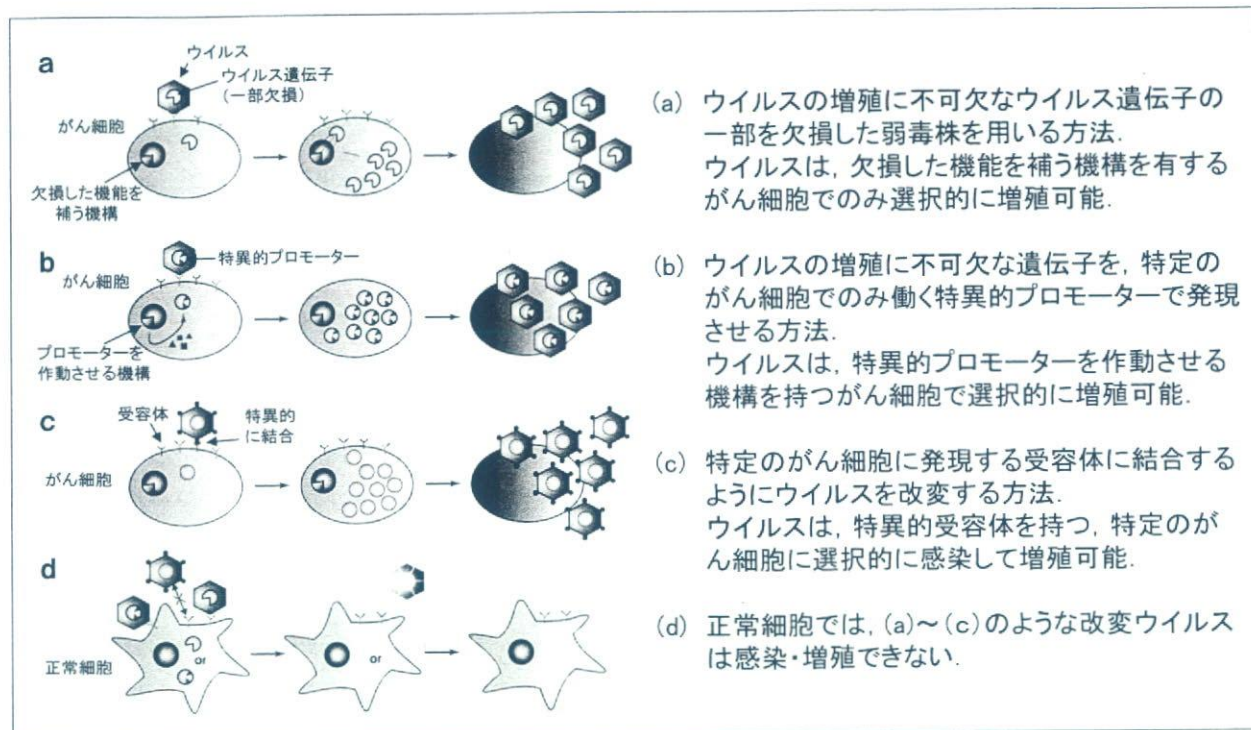


図2 ウイルスをがん細胞で選択的に増殖させる方法
(Ries SJ et al., 2004¹³⁾, Fig 1 より改変)

果が得られるかの評価に、動物モデルが有用であることが一致した意見であった。しかし、① 腫瘍溶解性ウイルスの感染および複製能に動物種特異性があること、② 動物にヒト腫瘍細胞を移植した腫瘍モデル動物では、ウイルスがヒト体内とは異なる指向性・分布を示すこと、③ 動物での免疫反応がヒトとは異なること、などから動物モデルの限界も指摘されている。

しかし、生体内分布や安全性・毒性の評価、臨床での投与経路や用法・用量の選択などに関して、動物モデルが有用な情報を与えるということについてはコンセンサスが得られている。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株および腫瘍細胞培養株を用いた試験、またはヒト正常組織およびヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験が有用とされている。

(3) 臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスは、その複雑な特性から、開発の基礎段階で十分に特性解析することが困難であり、また有用な動物モデルが必ずしも存在するわけではないことから、臨床研究の開始に当たっては多

くの検討すべき課題があるとされた。

(4) 臨床薬物動態

臨床薬物動態の解析手法として、被験者のモニタリングにはPCR、感染性力価試験のいずれも用いられている。いくつかの腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究において、血液中に検出されるウイルス量は投与直後と4～7日目にピークが認められた。このような2相性のピークは、局所投与および静注した場合のいずれでも観察されており、ウイルスの複製をモニターする手段となりうるとされている。

また、用法・用量設定の必要性、腫瘍溶解性ウイルスに対する患者の中和抗体の影響が重要な課題であるとされている。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外排出に関する予防措置も大きな課題である。

(5) 腫瘍溶解性ウイルス開発の今後の展望

腫瘍溶解性ウイルスの開発の新たな流れとして、化学療法や放射線療法と腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせる併用療法の有用性が示唆されており、今後このような併用療法の開発が進むものと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの設計改良のアプローチとしては、免疫反応を活性化する遺伝子などの治療

表5 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方

1. 緒言
2. 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みにおけるリスク要因
 - 2.1 ベクター
 - 2.2 投与量および投与経路
3. 非臨床試験
 - 3.1 一般に考慮すべき事項
 - 3.2 生体内分布試験
4. 患者のモニタリング

用遺伝子をウイルスゲノムに挿入する遺伝子治療との組み合わせや、腫瘍細胞へのターゲティング能の増強などが行われている。また、殺腫瘍効果の作用機序を解明できるデータを得るための非臨床試験および臨床試験の取り組みも行われている。

現在、GT-DG では、2008 年を目途に、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性評価に関する ICH 見解案を作成中である。

7. ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方

GT-DG では、2005 年から「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的考え方」に関する ICH 見解をまとめるための議論が開始された。本見解の最も大きな目的は、遺伝子改変された次世代をつくらないということに尽きている。遺伝子治療用ベクターが生殖細胞の染色体へ組み込まれなくとも、生殖細胞へ遺伝子導入されただけでも発生毒性など他の安全性の懸念はもちろん生じるが、発生毒性などは他のガイドラインなどで対応していくものとされた。

本見解では、非臨床試験を通じて体内分布試験の実施によって生殖組織へのベクターの分布が起こるか否か、またベクターが生殖組織で検出された場合にはその検出が持続的か一過性を明らかにすることを求めている。さらに、生殖組織で持続的に検出された場合、生殖細胞そのものに遺伝子が組み込まれているのか、白血球など周辺細胞にのみ局在するのかを明らかにすることが求められている。これらの試験を通じて、ベクターが生殖細胞内に持続的に保持されることが明らかになった場合には、ヒトへの使用に際しては規制当局と十分な議論をすること

を求めている。

非臨床試験でベクターが一過性にせよ生殖腺に局在する可能性が示された場合には、臨床試験において患者の精液にベクターが局在することがないかモニタリングを考慮すべきとされた。また、臨床試験の期間中は、非臨床生体内分布試験の結果にかかわらず避妊手段をとるべきことが推奨された。なお、対象患者が生殖不能な場合、または余命が短いことが見込まれる重篤な疾患では、精液のモニタリングは必要ないとされている。

本見解は、2006 年の ICH シカゴ会議で最終案がとりまとめられ、ICH 運営委員会によって承認された(表5)¹⁷⁾。

GT-DG の今後の活動

ICH GT-DG の活動では、遺伝子治療をめぐって取り組むべき課題がより明確になりつつあることや、ここにきて ICH 各極で遺伝子治療用医薬品の規制当局への承認申請が出されていることへの早急な対応もあり、ICH 見解の作成やガイドライン策定を見据えた議論も行われるようになってきている。今後、ベクターの排出に関する見解の作成やガイドライン化、腫瘍溶解性ウイルスに関する見解の作成など、いくつかの重要な科学的コンセプトが出されていく予定になっている。

わが国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米にくらべて非常に少なく、臨床研究での情報は多くが海外に依存している現況であることは否めない。しかし、ここ数年はわが国においても遺伝子治療薬の開発が急速に進んでおり、遺伝子治療薬に関する ICH 見解やガイドラインの策定が、わが国における遺伝子治療薬開発の促進につながっていくと期待される。

文 献

- 1) Marshall E: Clinical trials: gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286: 2244-2245, 1999.
- 2) Hutchins B: Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *BioProcessing Journal* 1: 25-28, 2002.
- 3) Hutchins B, Sajjadi N, Seaver S, Shepherd A, Bauer SR et

- al. : Working toward an adenoviral vector testing standard. *Molecular Therapy* 2 : 532-534, 2000.
- 4) Bamford KB, Wood S, Shaw RJ : Standards for gene therapy clinical trials based on pro-active risk assessment in a London NHS Teaching Hospital Trust. *Q J Med* 98 : 75-86, 2005.
 - 5) CHMP Guideline : Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03, 2005. (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/245803>)
 - 6) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
 - 7) Schmidt M, Glimm H, Wissler M, Hoffmann G, Olsson K et al. : Efficient characterization of retro-, lenti-, and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 996 : 112-121, 2003.
 - 8) Schmidt M, Carbonaro DA, Speckmann C, Wissler M, Bohnsack J et al. : Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9 : 463-468, 2003.
 - 9) Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K et al. : Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell : risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101 : 1284-1289, 2003.
 - 10) FDA Guidance for Industry : Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/retrogt1000.pdf>)
 - 11) FDA Guidance for Industry : Gene therapy clinical trials - observing subjects for delayed adverse events, November 2006. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/gtclin.pdf>)
 - 12) European Medicines Agency (EMA) : Report from the CPMP gene therapy expert group meeting 26th-27th. EMA/CPMP/1879/04/Final 2004, February, 2004.
 - 13) Ries SJ, Brandts CH : Oncolytic viruses for the treatment of cancer : current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today* 9 : 759-768, 2004.
 - 14) Lin E, Nemunaitis J : Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther* 11 : 643-664, 2004.
 - 15) Aghi M, Martuza RL : Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24 : 7802-7816, 2005.
 - 16) Yamaguchi T, Uchida E : Regulatory aspects of oncolytic virus products. *Curr Cancer Drug Targets* 7 : 203-207, 2007.
 - 17) ICH Considerations : General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors, October 2006. (<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA3363.pdf>)

ORIGINAL ARTICLE

Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors

F Sakurai¹, K Akitomo¹, K Kawabata¹, T Hayakawa² and H Mizuguchi^{1,3}

¹Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan; ²Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Tokyo, Japan and ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

Human CD46 (membrane cofactor protein), which serves as a receptor for a variety of pathogens, including strains of measles virus, human herpesvirus type 6 and *Neisseria*, is rapidly downregulated from the cell surface following infection by these pathogens. Here, we report that replication-incompetent adenovirus (Ad) serotype 35 (Ad35) vectors, which belong to subgroup B and recognize human CD46 as a receptor, downregulate CD46 following infection. A decline in the surface expression of CD46 in human peripheral blood mononuclear cells was detectable 6 h after infection, and reached maximum (72%) 12 h after infection. Ad35 vector-induced downregulation of surface CD46 levels gradually recovered after the removal of Ad35 vectors, however,

complete recovery of CD46 expression was not observed even at 96 h after removal. The surface expression of CD46 was also reduced after incubation with fiber-substituted Ad serotype 5 (Ad5) vectors bearing Ad35 fiber proteins, ultraviolet-irradiated Ad35, vectors and recombinant Ad35 fiber knob proteins; in contrast, conventional Ad5 vectors did not induce surface CD46 downregulation, suggesting that the fiber knob protein of Ad35 plays a crucial role in the downregulation of surface CD46 density. These results have important implications for gene therapy using CD46-utilizing Ad vectors and for the pathogenesis of Ads that interact with CD46. *Gene Therapy* (2007) 14, 912–919. doi:10.1038/sj.gt.3302946; published online 22 March 2007

Keywords: adenovirus serotype 35 vector; CD46; downregulation; fiber knob; peripheral blood mononuclear cells

Introduction

Human CD46 is a transmembrane glycoprotein, which is ubiquitously expressed in most or all human nucleated cells. CD46 functions as a regulator of complement activation, whose normal function is to protect the host from autologous complement attack, by binding complement components C3b and C4b and facilitating their cleavage by factor I.^{1,2} In addition to these functions, CD46 serves as a receptor for several pathogens, including strains of measles virus (MV),³ human herpesvirus type 6 (HHV6),⁴ group A streptococci⁵ and *Neisseria*.⁶ Among these pathogens, infection by certain strains of MV,^{7,8} HHV6⁴ and *Neisseria gonorrhoeae*⁹ has been shown to cause CD46 downregulation from the cell surface. The detailed mechanisms of surface CD46 downregulation upon infection by these pathogens remain to be elucidated, however, the decrease in the surface density of CD46 renders the cells more susceptible to lysis by complements, as demonstrated *in vitro*,¹⁰ and may contribute to the attenuation of these pathogens by rapid clearing of infected cells.

Recently, it has been demonstrated that CD46 also acts as a receptor for the majority of subgroup B adenoviruses

(Ads), including Ad serotypes 11 (Ad11) and 35 (Ad35).^{11,12} The fiber knob domain of Ad11 or Ad35 binds to short consensus repeats (SCRs) 1 and/or 2 in CD46 for infection.^{13–15} Furthermore, Ad35 competes for binding to CD46 with the MV hemagglutinin (MVH) protein,¹⁴ which is responsible for both the attachment of MV to CD46¹⁶ and downregulation of surface CD46 expression levels.¹⁷ These findings led us to hypothesize that CD46 is downregulated following infection by subgroup B Ads, as occurs in the case of MV. On the other hand, subgroup B Ad11 and Ad35 are considered to be an attractive framework for gene transfer vectors for the following reasons. First, Ad11 and Ad35 are known to be rarely neutralized by human sera.¹⁸ Second, Ad11 and Ad35 exhibit a broad tropism including cells expressing no or low levels of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR), which is a receptor for Ads belonging to subgroups A, C, D, E and F.¹⁹ Several groups (including the authors) have developed replication-incompetent Ad vectors composed of subgroup B Ads^{20–24} or fiber-substituted Ad serotype 5 (Ad5) vectors containing subgroup B Ad fibers,^{25–28} and have demonstrated that these types of Ad vectors efficiently transduce a variety of human cells, including cells refractory to conventional Ad5 vectors. If surface CD46 downregulation occurs following transduction with CD46-utilizing Ad vectors, unexpected side effects might occur such as complement-mediated cell lysis of successfully transduced cells, which leads to clearance of the transduced cells.

In the present study, we examined replication-incompetent Ad35 vector-induced downregulation of surface

Correspondence: Dr H Mizuguchi, Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaragi City, Osaka 567-0085, Japan.

E-mail: mizuguchi@nibio.go.jp

Received 24 September 2006; revised 7 February 2007; accepted 7 February 2007; published online 22 March 2007

CD46 expression. We found that transduction with Ad35 vectors significantly downregulated CD46 expression from the cell surface in a dose-dependent and cell type-specific manner. Ad35 vector-mediated downregulation of surface CD46 was found to occur in leukemia cells, whereas nonleukemia cells did not exhibit any decline in surface CD46 expression following Ad35 vector infection. To the best of our knowledge, this is the first report characterizing subgroup B Ad-mediated downregulation of surface CD46.

Results

Infection with Ad35 vectors causes downregulation of surface CD46 expression

To determine whether infection with Ad35 vectors results in modulation of surface CD46 expression, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated with the Ad35 vector expressing green fluorescence protein (GFP) (Ad35GFP) at 10 000 vector particle (VP)/cell and subjected to flow cytometric analysis at various time points. This analysis demonstrated that the surface expression levels of CD46 in PBMCs gradually decreased during exposure to Ad35GFP (Figure 1a). The significant decrease in CD46 was detectable 6 h after infection and reached maximum 12 h after infection (72% downregulation). Furthermore, the downregulation of surface CD46 by Ad35 vectors was found to be dose dependent (Figure 1b). PBMCs infected at 1250 VP/cell showed significantly reduced levels of CD46 expression (44% downregulation), and 71% downregulation of surface CD46 expression was induced at 20 000 VP/cell. These results indicate that infection with Ad35 vectors downregulates surface CD46 expression, as happens in the cases of MV^{7,8} and HHV6.⁴ The viability of PBMCs was not significantly affected by Ad35 vector infection (data not shown).

Next, in order to examine whether B cells (CD19⁺ cells) and T cells (CD3⁺ cells) in PBMCs show a reduction in surface CD46 levels after infection with Ad35 vectors, PBMCs were simultaneously stained with anti-human CD46 and anti-human CD19 or anti-human CD3 antibodies, and were subsequently subjected to flow cytometric analysis. Surface CD46 downregulation was found in both B cells and T cells after Ad35 vector infection, but the levels of the downregulation in these cells were lower than those of whole PBMCs (Figure 1c). Surface CD46 expression in T cells was more largely reduced than that in B cells. We also investigated seven additional human cells (Molt-4, KG-1a, K562, U937, A549, HeLa and human bone marrow-derived CD34⁺ cells) for Ad35 vector-induced downregulation of surface CD46 levels; the downregulation levels of surface CD46 were different among the cell types (Table 1). K562, U937, KG-1a and Molt-4 cells exhibited a decrease in CD46 expression following Ad35 vector infection (by 36% in K562 cells, 24% in U937 cells, 18% in KG-1a cells

Table 1 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 10 000 VP/cell. After incubation for 24 h, 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.

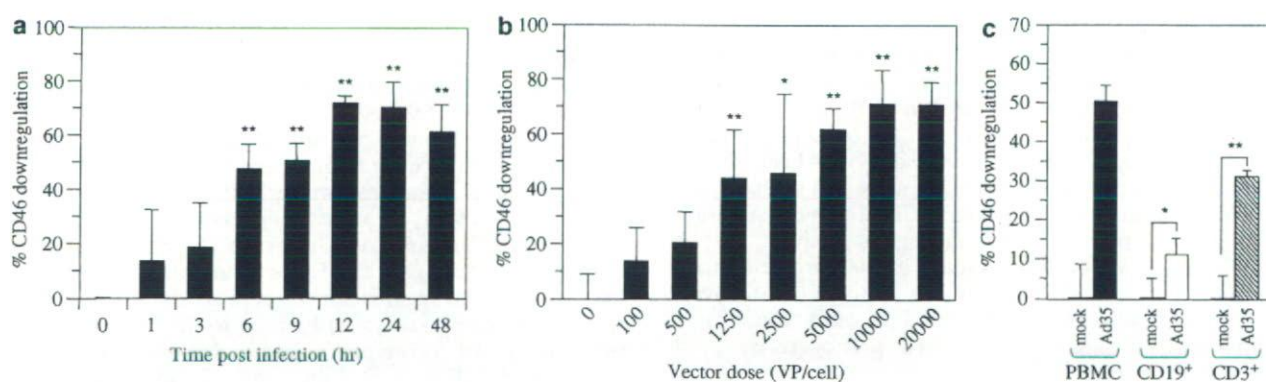


Figure 1 Downregulation of CD46 from the cell surface of PBMCs after infection by Ad35 vectors. (a) Time course of CD46 downregulation from the cell surface of PBMCs after infection with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10 000 VP/cell for up to 48 h. Cells were harvested at the indicated 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 h. After incubation for 24 h, PBMCs were harvested and CD46 expression levels were determined by flow cytometry. (c) Surface CD46 downregulation in B cells and T cells after infection with Ad35 vectors. PBMCs were infected with Ad35L at 10 000 VP/cell. After incubation for 24 h, 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 ± s.d. of quadruplicate results from one of at least two similar experiments.

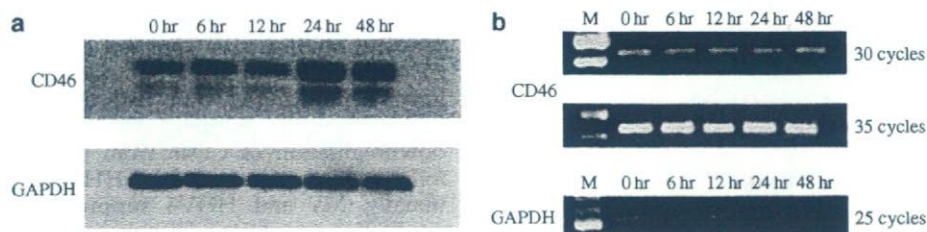


Figure 2 Total cellular protein levels and mRNA levels of CD46 following infection by Ad35 vectors. (a) Western blotting analysis for the total cellular protein levels of CD46 in PBMCs infected with Ad35GFP. PBMCs were incubated with Ad35GFP at 10 000 VP/cell for up to 48 h. Cells collected at the indicated 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. (b) Semiquantitative RT-PCR analysis of CD46 in PBMCs infected with Ad35GFP. PBMCs were infected with Ad35GFP as described for Western blotting analysis in Materials and methods. Total RNA was prepared from PBMCs following incubation with Ad35GFP, and RT-PCR was then performed as described in Materials and methods. Lane M: 100-bp ladder. These results were representative of at least two independent experiments.

and 55% in Molt-4 cells), whereas CD46 expression was reduced not at all or only slightly in nonleukemia cells (A549, HeLa and bone marrow CD34⁺ cells). Indeed, a slight increase in CD46 expression on the cell surface was found in A549 and CD34⁺ cells following Ad35 vector infection.

Total protein levels and mRNA levels of CD46 are not reduced following Ad35 vector infection

To examine the mechanism of Ad35 vector-induced downregulation of surface CD46, Western blotting and semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for CD46 expression were performed. Western blotting analysis using total cellular lysates demonstrated that the total cellular levels of CD46 were not reduced, but rather seemed to slightly increase, during 48 h of exposure to Ad35GFP (Figure 2a), suggesting that CD46 may be internalized after infection by Ad35 vectors without intracellular degradation, as in the case of MV.⁷ In addition, infection by Ad35GFP did not decrease the mRNA levels of CD46 (Figure 2b). These results indicate that infection by Ad35 vectors does not downregulate the transcription of the CD46 gene.

Fiber knob proteins of subgroup B Ads play a crucial role in the decrease in surface CD46 expression

To investigate which parts of Ad35 are involved in the downregulation of surface CD46 levels, PBMCs were incubated with conventional Ad5 vectors, fiber-substituted Ad5 vectors displaying the Ad35 fiber shaft and knob, and ultraviolet (UV)- or heat-inactivated Ad35 vectors at 10 000 VP/cell for 24 h. The conventional Ad5 vectors expressing GFP, Ad5GFP, which utilizes CAR for infection, did not downregulate CD46, whereas infection by the Ad5F35 vector expressing GFP, Ad5F35GFP, which recognizes CD46 for infection, significantly reduced surface CD46 expression by 72% (Figure 3a). UV-inactivated Ad35GFP also induced the downregulation of surface CD46 by 62% following infection, which was a level similar to that of surface CD46 downregulation induced by Ad35GFP. However, heat-inactivated Ad35GFP produced a lower level of surface CD46 downregulation than UV-inactivated Ad35GFP.

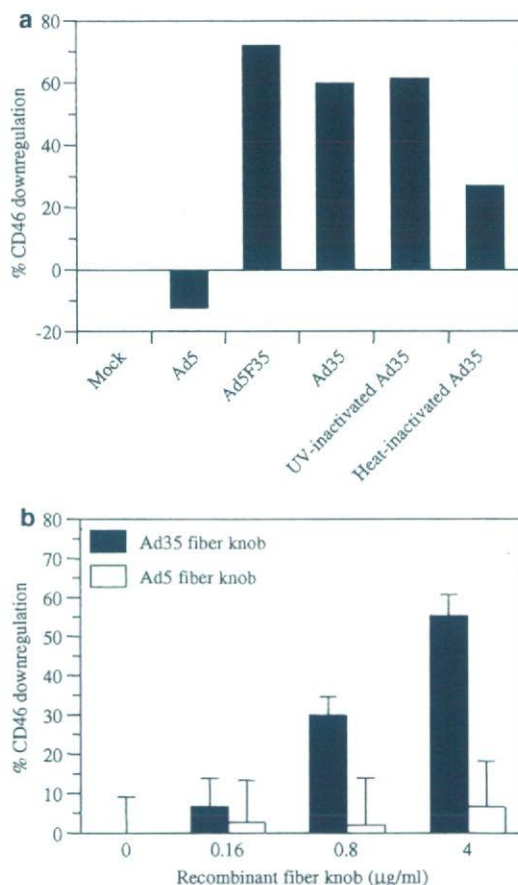


Figure 3 Role of Ad35 fiber knob protein on downregulation of surface CD46. (a) Downregulation of surface CD46 expression induced by various types of Ad vectors. PBMCs were incubated with Ad5GFP, Ad5F35GFP, Ad35GFP, UV-inactivated Ad35GFP or heat-inactivated Ad35GFP at 10 000 VP/cell for 24 h. After incubation, the cells were subjected to flow cytometric analysis to determine the level of CD46 expression. Values represent the mean of duplicate results from one of three similar experiments. (b) Downregulation of surface CD46 expression induced by Ad35 fiber knob protein. PBMCs were incubated with Ad5 or Ad35 fiber proteins at the indicated concentrations. After incubation for 24 h, the cells were subjected to flow cytometric analysis for the measurement of surface CD46 levels. Values represent the mean of quadruplicate results from one of three similar experiments.

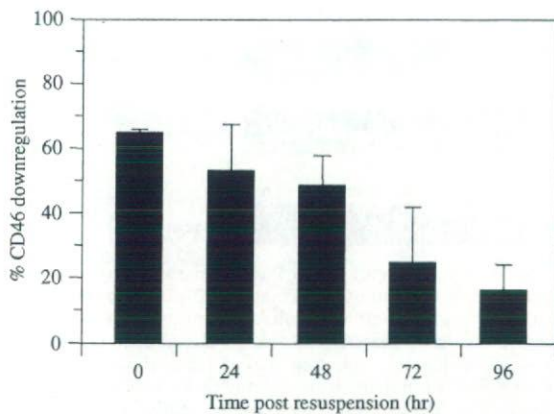


Figure 4 Recovery of surface CD46 expression after Ad35 vector-mediated downregulation. PBMCs were infected with Ad35GFP at 10 000 VP/cell for 24 h. After a 24-h infection, PBMCs were washed twice to remove the Ad35GFP, and resuspended and incubated in fresh medium. After incubation, cells were harvested 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.

would be due to the thermal denaturation of fiber proteins in Ad35GFP.

Next, PBMCs were incubated with recombinant Ad5 or Ad35 fiber knob proteins to further examine the role of Ad35 fiber protein in the downregulation of surface CD46 expression. Ad35 fiber knob proteins were found to downregulate the surface expression levels of CD46 in a dose-dependent manner, and maximal downregulation of surface CD46 was induced by 55% at 4 μ g/ml (Figure 3b). In contrast, no significant reduction in surface CD46 levels was found after incubation with Ad5 fiber knob proteins. These results indicate that fiber knob proteins of Ad35 play a crucial role in the downregulation of surface levels of CD46.

Downregulated CD46 expression is not rapidly restored after the removal of Ad35 vectors

Next, we examined how long it takes to restore surface CD46 expression after Ad35 vector-induced downregulation. Downregulation of surface CD46 induced by Ad35GFP gradually recovered after resuspension, however, the recovery kinetics of CD46 expression after the removal of Ad35 vectors was much lower than the kinetics of Ad35 vector-induced decrease in the surface CD46 (Figure 4). CD46 expression was downregulated by 65% before resuspension, and surface CD46 expression remained reduced by 53 and 49% at 24 and 48 h after resuspension, respectively. Complete restoration of surface CD46 expression was not observed even at 96 h after resuspension, at which point 17% downregulation remained, thus, more than 96 h are required to restore completely surface CD46 expression after Ad35 vector-induced downregulation.

Discussion

Understanding the interaction between cellular receptors and viruses and subsequent events following the attachment of viruses to receptors is important to elucidate the

tropism, infectivity and pathogenicity of viruses. Many previous studies have assessed the interaction between CD46 and CD46-utilizing pathogens, especially MV, and have demonstrated that infection by CD46-utilizing pathogens causes unique cellular events. For example, downregulation of CD46 from the cell surface occurs following infection by MV,^{7,17} HHV6⁴ or *Neisseria*.⁹ Additionally, MV and HHV6 suppress interleukin (IL)-12 production in infected human monocytes.^{29,30} However, subsequent cellular events following the interaction between human CD46 and subgroup B Ads have not yet been fully evaluated. In the present study, we have demonstrated the downregulation of human CD46 from the cell surface following infection by Ad35 vectors belonging to subgroup B.

MV-induced downregulation of surface CD46 has been the most thoroughly studied aspect of the effects of pathogens recognizing CD46. Nevertheless, the precise mechanisms of MV-induced downregulation of surface CD46 remain to be clarified; surface CD46 downregulation by MV exhibits similar properties to that induced by Ad35 vectors. First, surface expression levels of CD46 are reduced, whereas the total cellular protein levels of CD46 are not significantly decreased after infection,⁷ as demonstrated by Western blotting analysis (Figure 2a). These results suggest that CD46 may be internalized without degradation following infection by MV or Ad35. Second, the protein components, which bind to CD46 in the virion, MVH proteins and fiber knob proteins of Ad35, are involved with surface CD46 downregulation. Previous studies indicate that direct protein-protein contact between CD46 and MVH proteins is necessary for the MV-induced downregulation of surface CD46 levels.^{31,32} The present data in Figure 3 indicate that fiber knob proteins of Ad35 play a crucial role in the reduction in surface CD46 expression. These common properties suggest that Ad35 might downregulate the surface expression levels of CD46 through a mechanism similar to the one that acts in the case of MV. This hypothesis is further supported by previous findings that both the MVH and fiber knob proteins of Ad35 recognize the domains within SCR1 and 2 of CD46.^{13–15,33,34}

However, the Ad35 vector-mediated modulation of CD46 expression in nonleukemia cells differed from that induced by MVH protein: Ad35 vectors did not produce any decline in CD46 expression in the nonleukemia cells used in the present study (HeLa, A549 and human bone marrow-derived CD34⁺ cells). We have also demonstrated that surface CD46 expression was not decreased following Ad35 vector infection in Chinese hamster ovary (CHO) transformants expressing CD46¹⁵ (data not shown), however, the MVH protein downregulated CD46 expression in HeLa cells³¹ and in CHO transformants stably expressing CD46.³⁵ These findings suggest that cellular events following the binding of Ad35 vectors to CD46 would be somewhat different from those induced by MV in nonleukemia cells.

Downregulation of surface CD46 levels by Ad35 vectors seems inefficient compared with that induced by MV. An approximately 24% reduction in CD46 expression was achieved in U937 cells 24 h following infection of Ad35L at 10 000 VP/cell, which is an approximate multiplicity of infection (MOI) of 50. In contrast, infection by MV strain Edmonston in U937 cells

induced a decline of about 70% in CD46 expression 12 h after infection even at an MOI of 5.³¹ The lower levels of surface CD46 downregulation caused by replication-incompetent Ad35 vectors might be partly due to a lack of virus replication; a previous study suggests that newly synthesized MVH proteins in the infected cells further downregulate surface CD46 expression.³¹

Piliated *N. gonorrhoeae*, which also utilizes CD46 as a receptor, exhibits surface CD46 downregulation by the shedding of CD46.⁹ The total levels of CD46 in the whole-cell lysates are reduced, and soluble CD46 is found in cell culture supernatants after exposure to piliated *N. gonorrhoeae*. It now remains unclear how piliated *N. gonorrhoeae* induces shedding of CD46. However, it is unlikely that Ad35 vector-induced shedding of CD46 occurs because total cellular levels of CD46 were not reduced following infection with Ad35 vectors (Figure 2a).

It is surprising that the downregulation of surface CD46 expression was not readily restored after the removal of Ad35 vectors because pulse-chase analysis of CD46 showed that matured forms of CD46 are synthesized within 1 h.³⁶ This raises the question of why newly synthesized CD46 is not transported to the surface membrane in Ad35 vector-infected cells and where newly synthesized CD46 stays in the cells. Further studies are necessary to address these questions.

Previous studies have demonstrated the increased susceptibility of cells to complement-mediated lysis as a result of surface CD46 downregulation,^{10,31} however, we found no apparent lysis of PBMCs *in vitro* by complements following Ad35 vector infection (data not shown). It is now unclear why the complement-mediated cell lysis did not occur in cells showing CD46 downregulation by Ad35 vectors. One possible explanation is that the decreased levels of surface CD46 by Ad35 vectors might be enough to block the complement-mediated cell lysis. Other complement regulatory proteins might compensate the reduction in surface CD46 levels. Although PBMCs showing the reduction in surface CD46 density did not exhibit an apparent increase in susceptibility to complement-mediated cell lysis *in vitro*, this study suggests that we should exercise caution in the use of CD46-utilizing Ad vectors. The reduction in CD46 expression in cells transduced with CD46-utilizing Ad vectors might cause unexpected side effects after *in vivo* application. Recently, CD46 has been demonstrated to be involved in not only complement regulation but also various cellular functions, such as immune responses.^{37,38} It is essential to further examine the influence of surface CD46 downregulation, including the fate of the transduced cells, before initiating clinical applications of CD46-utilizing Ad vectors. Additionally, the influence of surface CD46 downregulation *in vivo* should be evaluated in nonhuman primates; the use of human CD46-transgenic mice is not recommended because rodent CD46 expression is limited in testis, and other complement regulators, such as decay-accelerating factor, protect cells from complement attack in rodents.³⁹

In summary, we have shown that infection by Ad35 vectors induces downregulation of human CD46 from the cell surface in a dose-dependent and cell type-specific manner. In addition to Ad35 vectors, fiber-substituted Ad5 vectors containing fiber proteins derived

from Ad35 also downregulate the surface expression of CD46. Once the surface expression levels of CD46 have declined, CD46 expression is not readily restored after the removal of Ad35 vectors. The present study provides important clues for clarifying the pathogenicity of subgroup B Ad, and suggests caution in the use of Ad vectors recognizing CD46 for gene therapy.

Materials and methods

Cells

Human PBMCs (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA) were cultured in culture medium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 supplemented with 10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 4 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS)). HeLa cells (human cervix epitheloid carcinoma) were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS. A549 cells (a human lung epithelial cell line) were cultured with F-12K medium supplemented with 10% FBS. K562 cells (human chronic myelogenous leukemia in blast crisis), U937 cells (a human lymphoma cell line), Molt-4 (a human T-cell leukemia cell line) and KG-1a cells (human bone marrow acute myelogenous leukemia) were cultured with RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS. Human bone marrow-derived CD34⁺ cells (Cambrex Bio Science) were cultured with StemSpan 2000 containing cytokine cocktail StemSpan CC100 (human Flt-3 ligand (100 ng/ml), human stem cell factor (100 ng/ml), human IL-3 (20 ng/ml) and human IL-6 (20 ng/ml)) (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada).

Ad vectors

Ad35 vectors containing a cytomegalovirus promoter-driven enhanced GFP expression cassette or a cytomegalovirus promoter-driven firefly luciferase expression cassette, Ad35GFP and Ad35L, respectively, were constructed by the improved *in vitro* ligation method described previously.⁴⁰ GFP-expressing conventional Ad5-based vectors, Ad5GFP and fiber-substituted Ad5-based vectors displaying the fiber knob and shaft of Ad35, Ad5F35GFP, were also constructed as described previously.^{25,41} Determination of the virus particle titers of Ad vectors was accomplished following the method described by Maizel *et al.*⁴² Ad35GFP was UV- and heat-inactivated by exposure to 254-nm radiation for 1 h, and by incubation at 48°C for 1 h, respectively. The efficiency of the inactivation was confirmed by comparing the transduction efficiencies of control and inactivated Ad35GFP.

Downregulation of surface CD46 by infection with Ad35 vectors

For the present time course study of the downregulation of surface CD46, PBMCs were seeded in a 96-well plate at 5.0×10^4 cells/well and incubated with Ad35GFP at 10 000 VP/cell. PBMCs were harvested at various time points and subjected to flow cytometric analyses as described below. For the study of the dose-dependent downregulation of surface CD46, PBMCs were infected with Ad35GFP at the indicated vector doses. After incubation for 24 h, the surface expression levels of CD46

were measured by flow cytometry. Analysis of the downregulation of surface CD46 levels in response to various types of Ad vectors was similarly performed. Ad35 vector-mediated decrease in the surface CD46 levels was also assessed in various types of human cells (Molt-4, KG-1a, K562, U937, A549, HeLa and human bone marrow-derived CD34⁺ cells). Cells were seeded in a 24- or 96-well plate and infected with Ad35L at 10 000 VP/cell. After incubation for 24 h, CD46 expression levels were assessed by flow cytometry.

Ad35 fiber knob-mediated downregulation of surface CD46

Recombinant Ad35 fiber knob protein was constructed similarly to Ad5 fiber knob,⁴³ using Ad35 vector plasmid pAdMS4⁴⁴ and the following primers: forward, 5'-tcg aat tca cct tat gga ctg gaa taa acc c-3' (*EcoRI* site is underlined); reverse, 5'-atg cgg ccg ctt agt tgt cgt ctt ctg taa tgt aag a-3' (*NotI* site is underlined). Ad5 fiber knob protein was prepared previously.⁴³ PBMCs, which were seeded in a 96-well plate at 5.0×10^4 cells/well, were incubated with the Ad5 or Ad35 fiber knob at the indicated concentrations. Surface CD46 expression levels were examined 24 h after incubation by flow cytometry as described below.

Western blotting analysis for CD46 expression

PBMCs (5.0×10^5 cells) were seeded in a 24-well plate and infected with Ad35GFP at 10 000 VP/cell. They were then collected at the indicated time points, washed and treated with lysis buffer (25 mM Tris, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 150 mM NaCl) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma, St Louis, MO, USA). The protein content in the cell lysates was measured with an assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA, USA), using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Protein samples (10 µg) were subjected to nonreducing sodium dodecyl sulfate-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis, and the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking nonspecific binding, CD46 was detected with anti-CD46 rabbit serum (1:5000; kindly provided by Dr Tsukasa Seya, Hokkaido University, Japan), followed by incubation in the presence of horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit second antibody (1:6000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Signals on the membrane were visualized and analyzed as described previously.⁴⁰ To verify equal loading, the blots were stripped and probed with a rabbit anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:3000, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) followed by treatment with an horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit second antibody (1:5000, Cell Signaling).

RT-PCR analysis for CD46 expression

PBMCs were infected with Ad35GFP as performed in Western blotting analysis. After infection, the cells were collected at the indicated time points and total RNA was isolated from the cells using Isogen reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan). First-strand cDNA templates were synthesized as previously described,⁴³ and the templates were subjected to PCR amplification using sets of primers for human CD46⁴⁵ and GAPDH.⁴⁶ The cycling

parameters were 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C for both CD46 and GAPDH. PCR products were separated by electrophoresis on a 2.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Recovery of CD46 expression from the Ad35 vector-mediated downregulation of surface CD46 expression
PBMCs seeded in a six-well plate were infected with Ad35GFP at 10 000 VP/cell. After a 24-h incubation, the cells were collected and washed twice to remove the Ad35GFP. The PBMCs were then resuspended in fresh culture medium, and subsequently cultured at 37°C. PBMCs were harvested at the indicated time points and subjected to flow cytometric analysis to measure CD46 expression.

Flow cytometry

Cells were harvested, washed with FACS buffer (phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% BSA and 0.01% sodium azide) and then fixed for 10 min with 3.2% paraformaldehyde-containing PBS. Cells were washed twice and incubated with anti-human CD46 antibody (J4.48, Immunotech, Marseilles, France; or E4.3, Pharmingen, San Diego, CA, USA) for 45 min on ice. Subsequently, the cells were washed and incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody (Pharmingen). After being washed thoroughly, stained cells were analyzed by FACSCalibur (Becton Dickinson, Tokyo, Japan) and CellQuest software (Becton Dickinson) to obtain the percentage of surface CD46 downregulation as follows: CD46 downregulation = $100 - (100 \times \text{MFI of CD46 in infected cells}) / (\text{MFI of CD46 in uninfected cells})$, where MFI = mean fluorescence intensity.

For the simultaneous analysis of expression levels of CD46 and CD19 (B-cell marker) or CD3 (T cell marker), PBMCs were incubated with both fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-human CD46 antibody (E4.3, Pharmingen) and PE-conjugated anti-human CD19 antibody (HIB19, Pharmingen) or allophycocyanin (APC)-labeled anti-human CD3 antibody (UCHT1, eBioscience, San Diego, CA, USA). After incubation for 45 min on ice, stained cells were subjected to flow cytometry analysis as described above.

Abbreviations

Ad, adenovirus; APC, allophycocyanin; BSA, bovine serum albumin; CAR, coxsackievirus and adenovirus receptor; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescence protein; HHV6, herpesvirus type 6; MV, measles virus; MVH, measles virus hemagglutinin; MFI, mean fluorescence intensity; MOI, multiplicity of infection; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SCRs, short consensus repeats; VP, vector particle; PE, phycoerythrin.

Acknowledgements

We thank Ms Naoko Funakoshi, Ms Tomomi Sasaki and Ms Noriko Tada for their technical assistance. We also

thank Dr Tsukasa Seya (Hokkaido University, Japan) for providing anti-CD46 rabbit serum. This work was supported by grants for Health and Labour Sciences Research from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, and by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (B).

References

- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 431–455.
- Seya T, Atkinson JP. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* 1989; 264: 581–588.
- Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993; 75: 295–305.
- Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99: 817–827.
- Rezcallah MS, Hodges K, Gill DB, Atkinson JP, Wang B, Cleary PP. Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005; 7: 645–653.
- Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1997; 25: 639–647.
- Naniche D, Wild TF, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol* 1993; 74 (Part 6): 1073–1079.
- Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, ter Meulen V. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol* 1995; 69: 7257–7259.
- Gill DB, Koomey M, Cannon JG, Atkinson JP. Down-regulation of CD46 by piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 2003; 198: 1313–1322.
- Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 976–984.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003; 9: 1408–1412.
- Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2003; 77: 9183–9191.
- Fleischli C, Verhaagh S, Havenga M, Sirena D, Schaffner W, Cattaneo R et al. The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35. *J Virol* 2005; 79: 10013–10022.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Liszewski MK, Atkinson JP, Lieber A. Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus. *J Virol* 2005; 79: 7503–7513.
- Sakurai F, Murakami S, Kawabata K, Okada N, Yamamoto A, Seya T et al. The short consensus repeats 1 and 2, not the cytoplasmic domain, of human CD46 are crucial for infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J Control Release* 2006; 113: 271–278.
- Wild TF, Buckland R. Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 191: 51–64.
- Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Baczko K, Liebert UG et al. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3943–3947.
- Vogels R, Zuidgeest D, van Rijnsvoer R, Hartkoorn E, Damen I, de Bethune MP et al. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol* 2003; 77: 8263–8271.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998; 72: 7909–7915.
- Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T. Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Therapy* 2003; 10: 1041–1048.
- Seshidhar Reddy P, Ganesh S, Limbach MP, Brann T, Pinkstaff A, Kaloss M et al. Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology* 2003; 311: 384–393.
- Abrahamsen K, Kong HL, Mastrangeli A, Brough D, Lizonova A, Crystal RG et al. Construction of an adenovirus type 7a E1A-vector. *J Virol* 1997; 71: 8946–8951.
- Holterman L, Vogels R, van der Vlugt R, Sieuwerts M, Grimbergen J, Kaspers J et al. Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol* 2004; 78: 13207–13215.
- Sirena D, Ruzsics Z, Schaffner W, Greber UF, Hemmi S. The nucleotide sequence and a first generation gene transfer vector of species B human adenovirus serotype 3. *Virology* 2005; 343: 283–298.
- Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002; 285: 69–77.
- Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 2000; 74: 2567–2583.
- Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* 1996; 70: 6839–6846.
- Stecher H, Shayakhmetov DM, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2001; 4: 36–44.
- Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B et al. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 1996; 273: 228–231.
- Smith A, Santoro F, Di Lullo G, Dagna L, Verani A, Lusso P. Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* 2003; 102: 2877–2884.
- Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Schlender J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. *J Virol* 1996; 70: 255–263.
- Lecouturier V, Rizzitelli A, Fayolle J, Daviet L, Wild TF, Buckland R. Interaction of measles virus (Halle strain) with CD46: evidence that a common binding site on CD46 facilitates both CD46 downregulation and MV infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 268–275.
- Iwata K, Seya T, Yanagi Y, Pesando JM, Johnson PM, Okabe M et al. Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J Biol Chem* 1995; 270: 15148–15152.
- Manchester M, Valsamakis A, Kaufman R, Liszewski MK, Alvarez J, Atkinson JP et al. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2303–2307.

- 35 Bartz R, Firsching R, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol* 1998; 79 (Part 5): 1015-1025.
- 36 Liszewski MK, Tedja I, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10776-10779.
- 37 Oliaro J, Pasam A, Waterhouse NJ, Browne KA, Ludford-Menting MJ, Trapani JA et al. Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18685-18690.
- 38 Kemper C, Verbsky JW, Price JD, Atkinson JP. T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46. *Immunol Res* 2005; 32: 31-43.
- 39 Harris CL, Spiller OB, Morgan BP. Human and rodent decay-accelerating factors (CD55) are not species restricted in their complement-inhibiting activities. *Immunology* 2000; 100: 462-470.
- 40 Sakurai F, Kawabata K, Koizumi N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Therapy* 2006; 13: 1118-1126.
- 41 Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utochuchi N, Watanabe Y, Kay MA et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Therapy* 2001; 8: 730-735.
- 42 Maizel Jr JV, White DO, Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 1968; 36: 115-125.
- 43 Koizumi N, Mizuguchi H, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utochuchi N et al. Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1568: 13-20.
- 44 Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Therapy* 2005; 12: 1424-1433.
- 45 Rushmere NK, Knowlden JM, Gee JM, Harper ME, Robertson JF, Morgan BP et al. Analysis of the level of mRNA expression of the membrane regulators of complement, CD59, CD55 and CD46, in breast cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 930-936.
- 46 Dash S, Saxena R, Myung J, Rege T, Tsuji H, Gaglio P et al. HCV RNA levels in hepatocellular carcinomas and adjacent non-tumorous livers. *J Virol Methods* 2000; 90: 15-23.

ORIGINAL ARTICLE

Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells

S Murakami^{1,2,5}, F Sakurai^{1,5}, K Kawabata¹, N Okada^{2,3}, T Fujita², A Yamamoto², T Hayakawa⁴ and H Mizuguchi^{1,3}

¹Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan; ²Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan; ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan and ⁴Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Tokyo, Japan

Most subgroup B adenoviruses (Ads), including adenovirus (Ad) serotype 35 (Ad35), bind to human CD46 as a receptor; however, the infection processes of subgroup B Ads following attachment to CD46 remain to be elucidated. Subgroup B Ads possess Arg-Gly-Asp (RGD) motifs in the penton base, similarly to subgroup C Ad serotypes 2 and 5. In this study, we examined the role of penton base RGD motifs in Ad35 vector-mediated transduction in human hematopoietic cells. Inhibition of interaction between integrins and the RGD motifs by divalent cation chelation and a synthetic RGD peptide reduced the transduction efficiencies of Ad35 vectors; however, the amounts of cell-associated vector DNA of Ad35 vectors at 4 or 37°C were not

decreased by divalent cation chelation or the RGD peptide. Mutation of penton base RGD motifs reduced the transduction efficiencies of Ad35 vectors, although the amounts of cell-associated vector DNA of Ad35 vectors at 4 or 37°C were not altered by mutation of penton base RGD motifs in Ad35 vectors. Furthermore, preincubation with several types of anti-integrin antibodies significantly inhibited Ad35 vector-mediated transduction. These results suggest that interaction between integrins and penton base RGD motifs plays a crucial role in Ad35 vector-mediated transduction in hematopoietic cells, probably in the post-internalization steps. Gene Therapy advance online publication, 6 September 2007; doi:10.1038/sj.gt.3303019

Keywords: adenovirus serotype 35; penton base; integrins; RGD motif; hematopoietic

Introduction

Human adenoviruses (Ads) are nonenveloped, double-stranded DNA viruses currently containing 51 serotypes, which are classified into six distinct subgroups (A–F).¹ Among these serotypes, adenovirus (Ad) vectors based on Ad serotype 5 (Ad5), which belongs to subgroup C, are the most commonly used for gene therapy and have been the most extensively studied, including studies of their transduction mechanisms. As the first step for the entry of Ad5 vectors into cells, the fiber knob binds to the primary receptor, coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR). After binding to CAR, Arg-Gly-Asp (RGD) motifs located in the penton base interact with cellular integrins, including $\alpha_v\beta_1$,² $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$,^{3,4} $\alpha_5\beta_1$,⁵ and $\alpha_M\beta_2$,⁶ leading to the internalization of Ad5 vectors via clathrin-coated pits. In these transduction processes, binding to CAR is the most crucial determinant of the transduction efficiency of Ad5 vectors, and Ad5 vector-mediated gene

transfer to cells lacking CAR expression is inefficient. Regrettably, several important target cells for gene therapy, including hematopoietic stem cells,⁷ dendritic cells⁸ and malignant tumor cells,^{9,10} express low or negligible levels of CAR.

On the other hand, most subgroup B Ads, including Ad serotype 11 and 35 (Ad35), attach to human CD46 as a receptor.^{11,12} Human CD46 is ubiquitously expressed in almost all human cells, leading to the broad tropism of subgroup B Ad vectors in human cells, one of the subgroup's advantages. In particular, hematopoietic cells, which are important targets for gene therapy but resistant to Ad5 vectors, are susceptible to subgroup B Ads.^{13–15} Infection of subgroup B Ads is initiated by the attachment of the fiber knob to short consensus repeats 1 and 2 of human CD46.^{16–18} However, the infection process of subgroup B Ads following binding to CD46 is poorly understood. Elucidation of the transduction mechanism would lead to more effective applications and improvements of subgroup B Ad vectors. Previous studies demonstrated that subgroup B Ads possess an RGD motif in the penton base similarly to Ad5,^{19–21} and that CD46 is associated with some of the integrins on the cell surface,²² which caused us to hypothesize that interaction between penton base RGD motifs and integrins plays an important role in subgroup B Ad vector-mediated transduction.

Correspondence: Dr H Mizuguchi, Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7–6–8 Asagi, Saito, Ibaragi City, Osaka 567-0085, Japan.
E-mail: mizuguchi@nibio.go.jp

⁵These authors contributed equally to this work

Received 10 May 2007; revised 11 July 2007; accepted 2 August 2007