

における血中 IL-6 濃度は CpG 含有 lipoplex 投与群に比べ低下していた (Fig. 5a)。しかし、血中濃度がピークとなる時間が異なっており、pCMV-L1 投与では投与 3 時間後以内にピークを迎えていたのに対し、pCpG-mcs を用いた場合では投与 9 時間後に遅延していた。また、pCpG-mcs 投与群における血中 IL-12 濃度はすべての時間において pCMV-L1 投与群に比べ低下が見られ、ピーク時間の変動も見られなかった。したがって、使用する plasmid DNA の配列から unmethylated CpG motif を減少させることによりある程度自然免疫応答を抑制することはできるものの、完全に抑制することはできないことが明らかとなった。

## C.2 Adベクター作用後のマウス腹腔内マクロファージにおけるトランスクリプトーム解析

In vitro における Adベクター作用後の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。ここでは Adベクターとして従来型 Adベクターと RGD 配列を付与したファイバー改変 Adベクター (それぞれ Ad-L2、AdRGD-L2) を用いた。マウス腹腔内マクロファージは Ad 受容体の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を発現しておらず、従来型 Adベクターでの遺伝子導入活性は低いことが知られており、従来型 Adベクターに加え、 $\alpha_v$  インテグリンを介して CAR 陰性細胞へも効率よく遺伝子導入可能なファイバー改変 Adベクターを作用時の遺伝子発現解析も行った。マウス腹腔内マクロファージに Adベクターを作用させた結果、1、3 時間後のいずれにおいても RGD 型 Adベクターのほうが従来型 Adベクターより多くの遺伝子発現変化を引き起こしていることが明らかとなった (Fig. 6 および Table 1, 2)。また、3 時間後の方がより多くの遺伝子の発現が変化していた (Fig. 6)。次に、従来型 Adベクターおよび RGD 型 Adベ

クター作用 3 時間後において両ベクター共通に発現が上昇する遺伝子を調べた結果、ケモカイン等炎症時に産生されるサイトカインが多く見られた (Table 3)。この中には、インターフェロン誘導遺伝子も多く含まれており、Adベクターによりインターフェロンカスケードが活性化されていることが明らかとなった。

## C.3 Adベクター感染により変動する遺伝子群の網羅的解析

Adベクターをマウスに全身投与すると、サイトカイン産生をはじめとする自然免疫応答が惹起されるが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、in vivo における Adベクター誘発自然免疫応答に関与する因子を探索するため、Adベクターを尾静脈内投与したマウスの臓器内における遺伝子発現変動を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。全身投与した Adベクターは主に肝臓に集積すること、および in vivo における主要なサイトカイン産生臓器は肝臓および脾臓であることがこれまでに報告されていることから、解析対象とする臓器は肝臓および脾臓とした。Adベクターにより変動する遺伝子は自然免疫応答に関与する遺伝子以外にも数多く存在すると考えられる。したがって、発現変動した遺伝子群から自然免疫応答に関与する遺伝子群のみを抽出するため、3 種の Adベクター (従来型 Adベクター、K7 型 Adベクターおよびトリプル改変型 Adベクター) を用いて解析した。すなわち、遺伝子発現効率、自然免疫誘導能が共に高い従来型 Adベクターを投与した場合で発現量が変化 (増加もしくは減少) し、遺伝子発現効率は高いが自然免疫誘導能は低い K7 型 Adベクターおよび遺伝子発現効率、自然免疫誘導能が共に低いトリプル改変型 Adベクターの投与により発現量が変化しない遺伝子群を Adベクター誘発自然免疫応答に

関与する候補遺伝子として抽出した (Fig. 7)。

まず、各種 Ad ベクターを投与したマウスにおいて自然免疫応答が惹起されていることを確認するため、ベクター投与後の炎症性サイトカイン産生について検討した。投与 3 時間後の血清中における IL-6 および IL-12 濃度を ELISA にて測定したところ、従来型 Ad ベクター投与群における IL-6 産生量が最も高く、K7 型 Ad ベクター投与群とトリプル改変型 Ad ベクター投与群ではそれぞれ、従来型 Ad ベクター投与群の約 2/3、約 1/5 であった。一方、IL-12 産生については、いずれの Ad ベクターを投与した群でも顕著な差は見られなかった (Fig. 8)。

DNA マイクロアレイの解析結果は、Percellome 法を用いて template となる DNA ゲノムあたりの mRNA 絶対量に換算した。全ての群において mRNA 絶対量が 1 コピー以下であったものを除去したところ、Gene Chip 上の全スポット (45101 個) 中、発現が確認できたスポット (いずれかの群において mRNA コピー数が 1 以上検出できたスポット) の数は、肝臓で 34000 個程度、脾臓で 12000 個程度であり、いずれの Ad ベクターを投与した場合でもほぼ同数の遺伝子が発現していた。Ad ベクター投与により惹起される炎症性サイトカインおよびケモカイン産生臓器を特定するため、肝臓および脾臓におけるこれら遺伝子群の発現変動を解析したところ、IL-6 や、ケモカイン CXCL1、CCL3 などは従来型 Ad ベクター投与群の脾臓でのみ発現が上昇しており、Ad ベクター投与による炎症性サイトカイン産生臓器は脾臓であることが確認できた (Fig. 9)。また、一部のケモカイン類 (CXCL10、CXCL9) や Toll-like Receptor ファミリー (TLR2、TLR3) などは肝臓でも発現増加が見られた。

次に、Ad ベクター誘発自然免疫応答に関与する候補遺伝子数の解析を行った。まず、各種 Ad ベ

クター投与群のコントロール群に対する変動率を算出したところ、従来型 Ad ベクター投与群において 5 倍以上の発現増加を検出したプローブ数は、肝臓ではトリプル改変型 Ad ベクター投与群の約 3 倍、脾臓では約 5 倍存在した。また、K7 型 Ad ベクター投与群における発現変動は従来型 Ad ベクター投与群とほぼ同等であった (Fig. 10)。次に、Ad ベクター投与により誘発される自然免疫応答に関与する遺伝子を探索するため、従来型 Ad ベクター投与群で遺伝子発現が 5 倍以上増加、もしくは 1/5 以下に低下した遺伝子群のうち、トリプル改変型 Ad ベクター投与群で発現量が変化しなかった遺伝子群を抽出したところ、肝臓、脾臓においてそれぞれ 101 遺伝子、22 遺伝子が抽出され、共通に抽出されてきた遺伝子は 1 遺伝子 (ankyrin repeat domain2 (stretch responsive muscle); Ankrd2) であった。なお、抽出されてきた遺伝子のうち、機能未知の遺伝子はそれぞれ、33 遺伝子、2 遺伝子であった。

#### C.4 Adベクター生体投与後の自然免疫誘導および肝障害発現メカニズムの解明

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、動物個体への投与により自然免疫反応および肝障害を引き起こすことが知られており、副作用の面から問題となっている。しかし、これら副作用のメカニズムについては不明な点が多い。遺伝子導入効率に優れ、副作用を回避できる新規遺伝子導入ベクターを開発できれば、遺伝子治療研究のさらなる発展が期待できる。

一方、我々は過去にポリリジン配列をファイバーに発現させヘパラン硫酸との結合性を増強させたファイバー改変型 Ad ベクター (AdK7-L2) を作製し、*in vitro* ヒト癌細胞等に対して従来型

Ad ベクター以上の遺伝子導入効率を示すことを見出している。近年の報告により、Ad ベクターとヘパラン硫酸との結合性が Ad ベクターの肝臓への高い遺伝子導入効率に関与していることが示されたことから、AdK7-L2 を用いてマウスへの尾静脈投与後の各組織、特に肝臓での遺伝子発現能および組織集積性、さらに自然免疫誘導能と肝障害性について検討した。静脈内投与 48 時間後の各臓器遺伝子発現および組織集積性を検討したところ、AdK7-L2 は従来型 Ad ベクター (Ad-L2) に比べ肝臓において遺伝子発現量、組織集積量共に約 6 倍上昇していた (Fig. 11A)。一方、興味深いことに脾臓においては、AdK7-L2 の集積量は Ad-L2 の 56 倍以上低いものであった (Fig. 11B)。次に、AdK7-L2 をマウスの尾静脈より投与し 3 時間後の血清中 IL-6、IL-12 濃度および 48 時間後の血清中 AST 濃度を測定することで、自然免疫誘導能と肝障害性を検討した。その結果、血清中 IL-6 濃度は Ad-L2 の約 4 倍減少し、血清中 AST 濃度はほぼコントロールレベルであった (Fig. 12 A, B)。また、肝臓組織切片を作製し病理学的に観察したところ、AdK7-L2 投与後の肝障害は認められなかった (Fig. 12C)。すなわち、AdK7-L2 は Ad ベクターの動物投与において誘導される自然免疫反応を一部誘導しないこと、さらに肝臓への高い遺伝子導入能を持つだけでなく低い肝障害性を示すことが明らかとなった。これらの結果は肝臓をターゲット組織とした場合、AdK7-L2 は Ad-L2 以上の有用性を持ち、高効率かつ安全性の高い遺伝子治療用ベクターになりうることを強く示唆している。

Ad ベクターの自然免疫反応および組織障害を引き起こすメカニズムを解明することは、安全で副作用の少ない遺伝子治療用ベクターの開発にとって極めて重要である。そこで次に、Ad ベクターが引き起こすこれら副作用の発現メカニズム

について検討した。まず、マウスへの尾静脈投与後にサイトカイン産生を行う組織を調べるため、各 Ad ベクター投与後 3 時間における肝臓、脾臓の RNA を抽出し、IL-6、IL-12 の mRNA 量をタックマン PCR により定量し、TNF  $\alpha$ 、RANTES、MIP-2、IFN  $\alpha$ 、IFN  $\beta$ 、IFN  $\gamma$  の mRNA 量を RT-PCR により半定量的に検討した。その結果、測定した全てのサイトカインは肝臓よりも脾臓で強い発現が観察された (Fig. 13)。特に IL-12、IFN  $\alpha$  および IFN  $\beta$  の mRNA は肝臓において全く検出されなかったことから、Ad ベクター投与後の自然免疫誘導 (サイトカイン産生) は主に脾臓で行われていることが明らかとなった。

Ad ベクター投与後のサイトカイン産生に脾臓が関与していることから、次に脾臓中のどのような細胞集団がサイトカイン産生を行っているのかを検討した。近年、免疫反応を担う機能細胞として樹状細胞が注目されており、強力な免疫誘導能が報告されていることから、まずは脾臓中の樹状細胞に着目し検討した。従来型 Ad ベクターをマウスに尾静脈内投与し 3 時間後の脾臓を摘出した。FITC 標識 CD11c 抗体および PE 標識 B220 抗体を用い FACS Aria にて細胞を各ポピュレーションに分離し、コンベンショナル樹状細胞およびプラズマサイトイド樹状細胞をソーティングした。ソーティングした樹状細胞より RNA を回収し IL-6、IL-12 の mRNA 量を RT-PCR により半定量的に検討した。その結果、IL-6 および IL-12 の mRNA は脾臓中のコンベンショナル樹状細胞で強く発現していることが示された (Fig. 14)。これらの結果より、マウスへ静脈内投与後の Ad ベクターによるサイトカイン産生は主に脾臓で行われており、特に脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が強く関わっていることを明らかとした。

これまでの検討により、Ad ベクター投与による自然免疫誘導のメカニズムを明らかとしたこと

から、次に Ad ベクターによる肝障害の発現メカニズムについて検討した。Ad ベクターによる肝障害には自然免疫と細胞性免疫の両者が関与していることが報告されており、いくつかのサイトカイン産生が Ad ベクターによる肝障害発現メカニズムに密接に関与していることも報告されている。今回の研究により、肝障害を示さない改変型 Ad ベクターである AdK7-L2 は従来型 Ad ベクターに比べ一部のサイトカイン、特に IL-6 産生が低下していることを見出していることから、IL-6 産生と肝障害発現との関与について検討した。IL-6 受容体阻害抗体をマウスの腹腔内に投与し、次に Ad ベクターを尾静脈内投与した際の血清中 AST 濃度を検討したところ、従来型 Ad ベクター投与による血清中 AST 濃度は有意に低下していた (Fig. 15)。この時の肝臓における遺伝子発現は抗体投与の有無に関わらず変化がなかったことから、Ad ベクターによる肝障害には IL-6 産生および IL-6 受容体からのシグナルが関与していると考えられる。

以上より、従来型 Ad ベクター投与によるサイトカイン産生は脾臓で行われており、特に脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が主に関与していることを明らかとした。また Ad ベクターによる肝障害には IL-6 産生および IL-6 受容体からのシグナル伝達が関与していることを明らかとした。一方、受容体認識能を改変した改変型 Ad ベクターを用いることで脾臓への集積性を低下させ、肝臓への高い遺伝子導入と低い肝障害を同時に達成することが可能であることを示した。これら知見は安全性と機能性に優れた遺伝子導入ベクターの開発、さらには遺伝子治療やウイルス療法等の発展に貢献できると考えられる。

### C.5 Adベクター作用後の炎症性サイトカイン産生における Toll-like receptor (TLR)の関与に

### 関する検討

自然免疫に関与する DC やマクロファージは主に TLRs とよばれる受容体群を用いてウイルスや細菌を認識する。そこで我々は、TLR シグナルに必須のアダプター分子である MyD88 および TLR の中でも CpG モチーフを含んだ DNA (Ad ゲノム中にも存在する)を認識する TLR9 の欠損マウスより単離した DC やマクロファージに Ad ベクターを作用させ、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を検討することにより、Ad ベクターによる自然免疫誘導に TLRs が関与しているかどうかについて検討を行った。

まず、Ad ベクターによる IL-6 産生において TLRs が関与しているかどうかについて、野生型、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウス由来 GM-CSF 誘導 DC を用いて検討した。その結果、野生型マウス由来 DC に Ad ベクターを作用させた場合、顕著な IL-6 産生が観察された (Fig. 16A)。しかしながら、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウス由来 DC における IL-6 産生量は野生型と比べ有意に低下していた。

次に、Ad ベクター作用後の DC における CD86 および CD40 の発現解析を行った。その結果、野生型由来 DC では未刺激群と比較し有意な CD86 の発現上昇がみられた (Fig. 16B)。MyD88 遺伝子欠損マウス由来 DC においても未刺激群と比較し有意な CD86 の発現上昇がみられたものの、その上昇率は野生型由来 DC のものと比べ若干低いものであった。一方、TLR9 遺伝子欠損マウス由来 DC では、野生型マウス DC と同程度の CD86 の発現上昇がみられた。同様の傾向が CD40 の発現においても観察された (data not shown)。

さらに、マウス腹腔内マクロファージを用いて、Adベクター作用時の IL-6 産生における TLRs の関与についても検討した。その結果、野生型マクロファージに Ad ベクターを作用させた場合、IL-6

産生を誘導した (Fig. 17)。しかし、DC の場合と異なり、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マクロファージに Ad ベクターを作用させても野生型と同程度の IL-6 産生がみられた。

これまでの結果から、GM-CSF 誘導 DC では Ad ベクターによる IL-6 産生に MyD88/TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。これに対し、腹腔内マクロファージでは MyD88/TLR9 非依存経路を介し IL-6 を産生していることが示唆された。したがって、DC と腹腔内マクロファージでの Ad による自然免疫誘導に関する分子の発現パターンが異なることが考えられたため、野生型のそれぞれの細胞の total RNA を用いて MyD88、ならびにウイルス認識に関与するとされている TLR3、TLR7、TLR9 の発現を RT-PCR を用いて確認した。その結果、MyD88 ならびに TLR9 の発現量に関しては顕著な差は見られなかった (Fig. 18)。一方、TLR3、TLR7 の発現に関しては腹腔内マクロファージでより強い発現がみられた。

### C.6 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- $\kappa$ B デコイの臓器選択的デリバリーによる Ad ベクター投与初期に起こる副作用軽減の試み

Ad ベクターをマウスに静脈内投与した場合、炎症性サイトカインを産生する細胞としては肝臓・Kupffer 細胞および脾臓・樹状細胞もしくはマクロファージなどが挙げられる。そこで肝臓および脾臓に対し選択的に移行するマンノースもしくはフコース修飾カチオン性リポソームを用いて、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現に重要な転写因子である NF- $\kappa$ B に対するデコイ DNA を臓器選択的に送達することにより、Ad ベクターによる自然免疫活性化を抑制し安全性の高い治療方法の確立を試みた。

まず Ad ベクター静脈内投与後に誘導される血中の炎症性サイトカインについて検討するため

血清中 IL-6、IL-12 濃度を測定したところ、Ad 単独投与群では IL-6、IL-12 共に投与 6h 後をピークに多量のサイトカイン産生が誘導された (Fig. 19)。一方、デコイ複合体前投与群では、Ad 単独投与群と比べ、明らかなサイトカイン産生の抑制が見られた。また、フコース修飾カチオン性リポソームからなる複合体 (以下 Fuc/デコイ複合体) とマンノース修飾カチオン性リポソームからなる複合体 (以下 Man/デコイ複合体) を比較すると、Man/デコイ複合体のほうが高い抑制効果を示した。特に投与 6 時間後、Fuc/デコイ複合体前投与群では Ad-L2 単独投与群より IL-6 が 47.5%、IL-12 が 74.1%まで、Man/デコイ複合体前投与群では IL-6 が 27.5%、IL-12 が 37.0%まで低下した。したがって、デコイ複合体前投与により、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生を効率良く抑制可能であることが明らかとなった。

次に、Ad-L2 投与により生じる肝障害を血清中 ALT、AST 活性を測定するとともに、肝臓の組織切片を観察することにより検討した。Ad-L2 投与 48 時間後の血清中 ALT、AST 活性を測定したところ、複合体前投与群では Ad-L2 単独投与群と比較し、明らかな ALT、AST 活性の低下が観察された (Fig. 20A)。ALT 活性については、Ad-L2 単独投与群より Fuc/デコイ複合体前投与群では 53.6%、Man/デコイ複合体前投与群では 42.9%まで低下した。一方、ランダムデコイ前投与群では、Ad-L2 単独投与群とほぼ同程度の値を示した。また、肝臓の組織切片を観察したところ、Ad-L2 単独投与群では臓器レベルでの広範壊死は観察されなかったものの、組織学的レベルでは肝実質細胞の巣状壊死、帯状壊死などによる肝細胞索の乱れが認められた (Fig. 20B)。Fuc/デコイもしくは Man/デコイ複合体前投与群では Ad ベクター単独投与群よりも障害の程度は軽かった (巣状壊死のみ)。これらの結果は複合体前投与により誘導された血中

ALT、AST 活性がデコイ複合体前投与により抑制されたという結果と一致した。

さらに複合体ならびに Ad-L2 投与 48 時間後の各臓器（心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓）におけるルシフェラーゼ発現を検討した。その結果、複合体前投与群においても Ad-L2 単独投与群と比べ、回収した全ての臓器においてルシフェラーゼ発現量に有意な差は見られなかった（Fig. 21）。従ってデコイ複合体前投与が Ad ベクターによる遺伝子発現を阻害することはないものと思われる。

以上、本研究により、デコイを糖修飾カチオン性リポソームを用いて臓器選択的に送達することにより、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生ならびに肝障害が抑制可能であることが示された。

### C.7 SOCS1 を用いた Ad ベクター誘発自然免疫応答の抑制

Ad ベクターを全身投与すると、炎症性サイトカイン産生や組織傷害を伴う自然免疫応答が誘導されるが、その分子メカニズムは明らかとなっていない。昨年度我々は、Ad ベクターを全身投与したマウスの臓器を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、Ad ベクター誘発自然免疫応答関連候補遺伝子の抽出を試みた。その結果、Ad ベクターを全身投与したマウスの肝臓および脾臓において Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS1) mRNA の発現が上昇（肝臓：10.1 倍、脾臓：4.8 倍）することを見出した。SOCS1 は抗原刺激による免疫応答を抑制する機能を持つことから、SOCS1 が Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制すると考え、検討を行った。まず、in vivo における SOCS1 mRNA 発現上昇を in vitro で再現するため、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞に Ad-L2 または

AdRGD-L2 を 6 時間作用させたところ、特に AdRGD-L2 を作用させた群において免疫応答活性化の指標である IL-6 mRNA の発現上昇とともに、SOCS1 mRNA の発現上昇が認められた（Fig. 22）。なお、Ad-L2 を作用させた群において両遺伝子の発現上昇が認められなかったのは、RAW264.7 細胞が CAR 陰性細胞であるために、CAR 依存的に細胞内へ導入される Ad-L2 が充分接着・導入されなかったためと考えている。そこで次に、SOCS1 を安定発現させた RAW264.7 細胞（RAW264.7-SOCS1）を作製し（Fig. 23A）、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生に対する SOCS1 の抑制効果を検討した。IFN- $\gamma$  で前処理した RAW264.7-SOCS1 細胞およびそのコントロール細胞である RAW264.7-neo 細胞に Ad-L2 または AdRGD-L2 を 24 時間作用させたところ、RAW264.7-SOCS1 細胞は RAW264.7-neo 細胞と比較して、IL-6 および TNF- $\alpha$  産生が顕著に抑制された（Fig. 23B）。

次に、SOCS1 を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 が自身により誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制するか検討した。ただし、このアプローチが成功するためには、Ad-SOCS1 の全身投与後、①炎症性サイトカイン産生が起こる前に SOCS1 が充分量発現し、かつ②Ad ベクターに応答して炎症性サイトカインを産生する細胞で SOCS1 が発現する必要がある。そこで、レポーター遺伝子を発現する Ad ベクターを用いた検討により、Ad-SOCS1 がこれらの条件を満たすことができるのか検証した。まず、投与した Ad ベクターが脾臓において遺伝子を発現するのに要する時間を検討した。Ad-L2 を投与したマウスから経時的に摘出した肝臓および脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定したところ、投与 1 時間後においても両臓器で充分量のルシフェラーゼ発現が検出された（Fig. 24B）。次に、Ad ベクターによる

遺伝子発現が炎症性サイトカインを産生する細胞で起こるか検討した。我々は昨年度、脾臓に存在するコンベンショナル樹状細胞 (cDC) が Ad ベクターに応答して炎症性サイトカインを産生することを報告している。GFP を発現する Ad ベクター (Ad-GFP1) を静脈内投与したマウスの脾臓に存在する GFP 陽性細胞の細胞種をフローサイトメトリーにより解析したところ、脾臓 cDC の約 13% が GFP 陽性を示した (Table 4)。以上の結果より、全身投与した Ad-SOCS1 は投与早期から脾臓の cDC で充分量 SOCS1 を発現すると考えられ、Ad-SOCS1 が自身により誘導される自然免疫応答を抑制する可能性が強く示唆された。

そこで、Ad-SOCS1 の全身投与による Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生の抑制効果を検討した。まず、Ad-SOCS1 を全身投与したマウスの肝臓および脾臓における SOCS1 の発現をウェスタンブロット法により検討したところ、投与 3 時間後から両臓器で SOCS1 の発現が認められ、それ以前では発現が確認できなかった (Fig. 24A)。ただし、Ad-L2 を用いた検討 (Fig. 24B) では投与 1 時間後からルシフェラーゼ発現が検出されたことから、Ad-SOCS1 投与 1 時間後においても SOCS1 は発現しているものの、その発現量は非常に微量であり、ウェスタンブロット法の検出限界以下であったと考えられた。また、Ad-L2 を投与してから 6 時間後の脾臓でも SOCS1 のバンドがわずかながら検出されたことから、Ad ベクターの全身投与による SOCS1 の発現上昇がタンパク質レベルでも確認された。次に、Ad-SOCS1 を静脈内投与したマウスの血清中炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、Ad-L2 投与群に比べ、Ad-SOCS1 投与群では IL-6 産生が完全に抑制され、IL-12 産生も約 1/2 まで抑制されていた (Fig. 25)。また、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$ 、RANTES、MCP-1 といった、様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生も抑制されて

いた (Fig. 26)。また、Ad ベクターを全身投与しても、血清中 IL-10 濃度の上昇は認められなかった。本結果により、Ad-SOCS1 は自身により誘導される複数の炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。

そこで、本システムの応用として、Ad-SOCS1 の共投与が Ad-L2 により誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制できるのではないかと考えた。Ad-L2 と Ad-SOCS1 を VP 比が 1:9 となるように混合し、マウスに静脈内投与したところ、外来遺伝子を搭載していない Ad ベクター (Ad-null) と Ad-L2 を共投与した群に比べ、Ad-SOCS1 を共投与した群では Ad-L2 により誘導される IL-6 産生が完全に抑制され、IL-12 産生も約 1/2 まで抑制された (Fig. 27A)。このとき、Ad-SOCS1 の共投与により Ad-L2 の遺伝子発現効率が妨げられることはなかった (Fig. 27B)。Ad ベクターの全身投与による自然免疫応答には肝傷害も報告されていることから、次に、Ad-SOCS1 を共投与することで、Ad-L2 による肝傷害が抑制されるか検討した。両ベクターを共投与したマウスの血清中 ALT 活性 (肝傷害マーカー) を測定したところ、Ad-null 共投与群では血清中 ALT 活性の上昇が認められたのに対し、Ad-SOCS1 共投与群における血清中 ALT 活性は Mock 群と同レベルであった (Fig. 27C)。また、Ad-SOCS1 の共投与を行ったマウスの肝臓を用いて組織学的解析を行ったところ、Ad-null 共投与群では肝細胞の壊死・アポトーシスが多数認められたのに対し、Ad-SOCS1 共投与群の肝組織には死細胞の数が減少していた (Fig. 27D)。したがって、Ad-SOCS1 の共投与により、Ad-L2 による遺伝子発現を妨げることなく、炎症性サイトカイン産生や肝傷害を含む自然免疫応答を抑制することに成功し、本ベクター系があらゆる治療用遺伝子を用いた遺伝子治療においても応用可能であることが強く示唆された。

Ad ベクターによる自然免疫応答の分子メカニズムは未だ未解明である。SOCS1 により Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生が抑制されたことから、SOCS1 の標的分子である JAK が Ad ベクターによる自然免疫応答に関与していると考えた。特に JAK2 および STAT5a 分子は Ad ベクターを全身投与したマウスの脾臓において発現上昇が認められた分子であったことから、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生における両分子の関与を検討した。JAK2 inhibitor II を用いて JAK2 の活性化を選択的に阻害した RAW264.7 細胞に Ad-L2 および AdRGD-L2 を作用させたところ、阻害剤非作用群と比較して、IL-6 および TNF- $\alpha$  の産生が顕著に抑制された (Fig. 28A) ことから、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生は、JAK2 の活性化を介して起こることが明らかとなった。なお、JAK2 活性化阻害条件下における Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生抑制は、mRNA レベルにおいても確認された (data not shown)。ただし、JAK2 活性化阻害条件下においても Ad ベクターによる遺伝子発現量に変化がなかった (Fig. 28B) ことから、Ad ベクターによる免疫細胞活性化は遺伝子発現効率には影響しないことが明らかとなった。次に、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生における STAT5 の関与について検討を行った。STAT5 のドミナントネガティブ変異体 (STAT5DN) を安定発現する RAW264.7 変異株 (RAW-STAT5DN) に Ad-L2 および AdRGD-L2 を作用させたところ、コントロール細胞株 (RAW-neo) と比較して、特に AdRGD-L2 により誘導される IL-6 産生が顕著に抑制された (Fig. 29)。本結果により、Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生には JAK2/STAT5 経路に関与していることが明らかとなった。

#### C.8 トランスクリプトーム解析を用いた Ad

#### ベクター誘発毒性発現分子機構の解明

Ad ベクターをマウスに全身投与すると、サイトカイン産生をはじめとする自然免疫応答が惹起されるが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、in vivo における Ad ベクター誘発自然免疫応答に関与する因子を探索するため、Ad ベクターを尾静脈内投与したマウスの臓器内における遺伝子発現変動を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した (詳細は平成 18 年度総括研究報告書参照)。そして変動の見られたいくつかの遺伝子を Ad ベクター誘発自然免疫応答に関与する候補遺伝子として抽出した。候補遺伝子のひとつとして、我々は遺伝子 X および Y に注目した。X は最近、炎症性サイトカインの発現を誘導する転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行を促進することが報告されており、また、Y は最近 TLRs (Toll-like receptors) 非依存的に DNA ウィルスを認識する受容体として報告された細胞内タンパクである。そこでこれらのタンパクの Ad ベクター誘発自然免疫応答への関与について検討した。

まず、in vitro の自然免疫応答に関する実験でよく用いられているマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に対し、極めて強い炎症性サイトカイン誘発作用を有する LPS を作用させ、遺伝子 X および Y の発現を調べた。LPS 投与後、30 分後には X mRNA の発現が認められた。そして作用後 1 時間から 2 時間で発現量は最大に達し、その後は発現の減少が見られた (Fig. 30)。次に、遺伝子 X のタンパクとしての発現について検討した (Fig. 31)。タンパク X の発現は X mRNA の発現よりも遅く LPS 投与後 1 時間後にわずかながら認められ、4 時間後に発現量は最大となった (Fig. 31)。LPS 投与後 8 時間後には発現の減少が見られた (data not shown)。これらの結果より、X は LPS 応答における immediate early response gene で



あることが明らかとなった。

一方、遺伝子 Y の発現については、現在入手可能なタンパク Y に対する抗体がないため、LPS 投与した RAW264.7 細胞における Y mRNA 発現について調べることにした (Fig. 30)。Y mRNA の発現は LPS 投与後 4 時間後から認められ (Fig. 30)、その発現は 24 時間後も検出された (data not shown)。これらの結果より、遺伝子 Y は報告されている DNA ウイルスによる誘導だけでなく、LPS にも応答して発現が誘導されることが明らかとなった。

次に、X が自然免疫応答すなわち炎症性サイトカインの産生に関与しているかどうかを検討するため、RAW264.7 細胞にマウス X 発現ベクターを導入した。エレクトロポレーションによる導入後、細胞を 96 well plate に播種し、G418 による選別を行い、薬剤耐性コロニーを形成させたところ、1 ウェルに多コロニーが出現し、1 コロニーごとの回収は困難と判断した。そのため、ウェルごとに細胞を回収し、それぞれをとりあえず 1 クローンとしてナンバリングすることにした (そのためこの段階での 1 つのクローンは、幾種類のクローンが混じっているヘテロな細胞集団である)。得られた薬剤耐性クローン (X/RAW) について、X の発現を western blotting により調べた。48 クローンについてタンパク X の発現を調べたところ、X/RAW クローン No33 において無刺激状態においても X の発現が検出された (Fig. 32A、ここでは 48 クローンについて行なった westren blotting の結果の一部を示してある)。RAW264.7 細胞は無刺激状態ではタンパク X の発現がみられないこと (Fig. 31) や、X cDNA を挿入していない発現ベクター pCDNA3 のみを導入して得られたクローン (mock/RAW) ではタンパク X の発現が検出されなかったことより、X/RAW No33 において無刺激状態で観察された X の発現は外来遺伝子由

来であることが示された (Fig. 32A)。

X/RAW No33 は前述したとおり、幾種類のクローンが混じっているヘテロな細胞集団であるためサブクローニングを行い、タンパク X を過剰発現する単一クローンの同定を試みた。得られたサブクローンについて、X の発現を westren blotting により調べた。サブクローン 24 クローンのうち、X/RAW クローン No3313 において無刺激状態でもタンパク X の発現が検出された (Fig. 32B、ここでは 24 クローンについて行なった westren blotting の結果の一部を示してある)。同様の実験の結果さらに 3 クローン (X/RAW No. 3306, 3310, 3311) において外来遺伝子由来の X の発現が認められることを確認した (data not shown)。

今後、得られた X/RAW クローンにおける炎症性サイトカインの産生能、またそれに関わる分子の発現・細胞内局在について調べていくとともに Ad ベクター作用時の X の関与についても検討していく予定である。

### C.9 NF- $\kappa$ B アプタマー発現ベクターによる毒性発現の抑制

Ad ベクターを静脈内投与すると、投与後直後に起こる自然免疫応答によって IL-6 をはじめとする多くの炎症性サイトカイン産生が誘導される。これらの炎症性サイトカインの発現には転写因子である NF- $\kappa$ B が重要な役割を担っており、この NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することで自然免疫応答の低下の誘導が可能であると考えられる。一方、特定の分子と特異的に結合する核酸分子の一つである RNA アプタマーは、免疫原性がほとんどない利点を持っており、抗体に代わる分子認識が可能な生体物質として薬剤への応用が期待されている。そこで選択的に NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する RNA アプタマーを搭載した Ad ベクターを作製

し、炎症性サイトカイン産生の抑制をすることで、Ad ベクターによる安全性の高い治療方法の確立を試みた。

そこで E3 にルシフェラーゼ発現カセットが挿入されている Ad ベクターを用いて、NF- $\kappa$ B の p-50 に特異的に結合することが確認されている RNA アプタマー (eA-p50) を E1 に挿入することで、eA-p50 発現 Ad ベクターを作成した。まず、eA-p50 発現 Ad ベクターによって副作用を生じるかどうか確認するために、A549 細胞を用いて検討した。A549 に各 Ad ベクターを感染させたところ、24 時間後の細胞生存率に関して eA-p50 による顕著な生存率低下は認められなかった (Fig. 33)。さらに、48、72 時間後でも同様の結果が得られ、またマウス内皮細胞株 MS-1 細胞においても eA-p50 による生存率への顕著な影響は観察されなかった (data not shown)。

次に、MS-1 細胞を用いて炎症性サイトカインの産生に eA-p50 が影響を及ぼすかどうかを検討した。Ad ベクターのみの刺激では MS-1 細胞のサイトカイン産生が低いため、Ad ベクター感染後の細胞に LPS で刺激し IL-6 および IL-12 の測定を行った。培養上清中に産生された IL-6 を ELISA で測定した結果、IL-6 産生の eA-p50 による影響は観察されなかった。しかし IL-6 の mRNA の発現量を TaqMan PCR により定量したところ、Ad-eAp50-L3 を感染後さらに LPS で刺激を行った場合において IL-6 の mRNA 量が抑制されていることが観察された (Fig. 34)。一方で、IL-12 の産生は ELISA の検出限界以下であり、mRNA 量もわずかであった (data not shown)。eA-p50 による炎症性サイトカイン IL-6 産生の影響が明確に観察されなかったため、eA-p50 が NF- $\kappa$ B を直接抑制しているかどうか検討した。細胞は NF- $\kappa$ B によるウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドをトランスフェクションした A549 細胞を用いた。

その結果、Ad-eAp50-L3 は Ad-L3 よりもウミシイタケルシフェラーゼの発現低下がわずかに観察された (Fig. 35)。しかしながら、Ad-eAp50control-L3 でも同様の発現低下が観察された。また各 Ad ベクターに挿入されているホタルルシフェラーゼ発現の差は見られなかったことから、Ad ベクター間で遺伝子導入効率は変わらなかった (data not shown)。

さらに in vivo での eA-p50 による炎症性サイトカインの影響を検討するために、Ad ベクターを静脈内投与し誘導される血中の IL-6 と IL-12 の濃度を測定した。IL-6 においては Ad ベクターの違いによる影響は観察されなかったが、IL-12 では Ad-eAp50-L3 投与群でわずかに抑制していることが観察された (Fig. 36)。Ad ベクター投与後 48 時間後の各主要臓器 (心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓) におけるルシフェラーゼ発現は Ad-eAp50-L3 投与群においても Ad-L3 と比べ、回収したすべての臓器においてルシフェラーゼ発現量に顕著な差はなかった (Fig. 37)。以上より、NF- $\kappa$ B アプタマー発現 Ad ベクターは in vivo においても毒性発現を軽減可能であることが示された。

#### D. 考察

遺伝子導入ベクターは遺伝子治療だけでなく、遺伝子やタンパク質の機能解析を始めとする基礎研究においても必要不可欠なツールとなっている。これまでに様々な遺伝子導入ベクターが開発されてきたが、臨床への応用を考えた場合には克服すべき問題点が未だ多く存在するのが現状である。中でもベクターにより誘導される自然免疫応答は、治療への応用を考えた場合、重大な問題点として挙げられる。実際に、1999年にペンシルバニア大学で実施された遺伝子治療の臨床研究において発生した Ad ベクター大量投与による死亡事故は、自然免疫の過剰な活性化が原因とされており、種々のベクターにより誘導される自然免疫活性化のメカニズムを解明し、それを抑制する方法を開発することは重要な研究課題となっている。

本研究課題において、Ad ベクターによる毒性発現には脾臓の樹状細胞が重要な役割を担っていること、分子メカニズムは細胞種によって異なるなど、その分子機構解明において大きな進展がみられた。また、NF- $\kappa$ B デコイ、SOCS1 発現 Ad ベクター、NF- $\kappa$ B アプタマー等を開発することにより、毒性発現を抑制する技術の開発にも成功した。今後、DNA マイクロアレイ解析で得られた、Ad ベクターによる自然免疫応答に関与することが予想される個々の遺伝子を詳細に解析していくことにより、Ad ベクターによる毒性発現機構をさらに解明し、毒性発現関連遺伝子の発現制御による安全な遺伝子治療法の開発に繋げていきたいと考えている。

#### E. 結論

遺伝子治療薬、特に Ad ベクターの生体内投与後の自然免疫応答（毒性発現機構）解析を、我々が独自に開発した改良型 Ad ベクターを駆使して、生体レベル、細胞レベル、細胞内シグナル伝達、トランスクリプトーム解析の観点から研究を行い、多くの興味ある知見を得た。これらの知見は、有効性・安全性の高い遺伝子治療法の開発につながる事が予想される。

## F. 研究発表

(2007)

### 1. 論文発表

- 1) Sakurai H., Tashiro K., Kawabata K., Yamaguchi T., Sakurai F., Nakagawa S., Mizuguchi H. Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune response. *J. Immunol.*, in press.
- 2) Sakurai H., Kawabata K., Sakurai F., Nakagawa S., Mizuguchi H. Innate immune response induced by gene delivery vectors., *Int. J. Pharm.*, in press.
- 3) Yamaguchi T.\*, Kawabata K.\*, Koizumi N., Sakurai F., Nakashima K., Sasaki T., Okada N, Mizuguchi H. Involvement of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by replication-incompetent adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 18, 753-762 (2007) (\* equally contributed)
- 4) 水口裕之；遺伝子治療研究の動向；*医薬ジャーナル新薬展望 2008*、44、235-242 (2008)
- 5) 水口裕之・櫻井文教・川端健二；カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター、*遺伝子医学MOOK別冊 絵で見てわかるナノDDS*、235-242 (2007)
- 6) Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
- 7) Sakurai H., Sakurai F., Kawabata K., Sasaki T., Koizumi N., Huang H., Tashiro K., Kurachi S., Nakagawa S., Mizuguchi H. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex, *J. Control. Release.*, 117, 430-437 (2007)
- 8) 川端健二・櫻井文教・水口裕之；改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー、*Drug Delivery System*、22(2)、148-154 (2007)
- 9) 水口裕之；アデノウイルスベクター開発の最前線、*バイオテクノロジージャーナル*、7(2)、168-173(2007)
- 10) Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanebe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Modified adenovirus vectors with CAR-,  $\alpha$  v integrin-, and heparan sulfate-binding ablation reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.*, 17, 264-279 (2006)
- 11) Xu Z. L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T. Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, 57, 781-802 (2005)

### 2. 学会発表

- 1) 桜井晴奈、田代克久、川端健二、山口朋子、櫻井文教、中川晋作、水口裕之; Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) を用いたアデノウイルスベクター誘発自然免疫応答回避の試み; 日本薬学会第 128 年会; 2008 年 3 月 26 ~28 日 (横浜)
- 2) 水口裕之; 癌治療のための高効率アデノウイルスベクターの開発; 第 6 回遺伝子治療シンポジウム; 2008 年 2 月 1 日 (大阪)
- 3) 水口裕之; 高性能なアデノウイルスベクターの開発を目指して; 科学振興調整費・科学技術連携施策群「遺伝子・細胞治療に携わる臨床研究者育成」セミナー -日本の遺伝子治療臨床研究の現状と今後の展望- ; 2008 年 1 月 25 日 (岡山)
- 4) 水口裕之; 遺伝子導入技術の開発と先端科学への応用; 大阪市立大学医学部博士課程セミナー; 2007 年 12 月 4 日 (大阪)
- 5) 桜井晴奈、田代克久、櫻井文教、黄 海瑛、川端健二、倉知慎之輔、中川晋作、水口裕之; Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) はアデノウイルスベクターにより活性化される自然免疫応答を抑制する; 第 6 回ファーマバイオフォーラム 2007; 2007 年 12 月 1~2 日 (大阪) **最優秀賞受賞**
- 6) Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Kazuko Nakashima, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi; Role of MyD88 and TLR9 in the Innate Immune Response Elicited by Serotype 5 Adenovirus Vectors; 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会; 2007 年 11 月 20-22 日 (東京)
- 7) Hiroyuki Mizuguchi; Drug delivery system of adenovirus vectors; 第 66 回日本癌学会総会; 2007 年 10 月 3-5 日 (横浜)
- 8) 水口裕之; アデノウイルスベクターと DDS; 第 44 回薬剤学懇談会研究討論会; 2007 年 6 月 28 日 (熊本)
- 9) Haruna Sakurai, Katsuhide Igarashi, Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Hiroyuki Mizuguchi; ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILE INVOLVED IN THE INNATE IMMUNE RESPONSE BY ADENOVIRUS VECTOR; 第 13 回日本遺伝子治療学会; 2007 年 6 月 28-30 日 (東京)
- 10) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と先端科学への応用; 国立生育医療センター・研究所 特別セミナー; 2007 年 6 月 21 日 (東京)
- 11) 水口裕之; 遺伝子の機能解析基盤技術 -改良型アデノウイルスベクターを中心に- ; 組織培養学会第 80 回特別講演; 2007 年 5 月 14 日 (大阪)
- 12) 山口朋子、川端健二、小泉直也、櫻井文教、中島加珠子、佐々木朋美、水口裕之; アデノウイルスベクターによる Toll-like receptor 依存・非依存経路を介した自然免疫誘導について; 第 7 回遺伝子・デリバリー研究会; 2007 年 5 月 18 日 (東京)

- 13) Naoya Koizumi, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Tomomi Sasaki, Yoshiteru Watanabe, Hiroyuki Mizuguchi; Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production; 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress; April 22-25 (2007) (Amsterdam, The Netherlands)
- 14) Haruna Sakurai, Katsuhide Igarashi, Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Shinnosuke Kurachi, Shinsaku Nakagawa, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Hiroyuki Mizuguchi; Comprehensive search for factors involved in the innate immune response induced by adenovirus vectors; 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy; 2007 年 5-6 月 (Seattle, USA)
- 15) Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Naoya Koizumi, Fuminori Sakurai, Kazuko Nakashima, Tomomi Sasaki, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi; Involvement of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by replication-incompetent adenovirus vectors; 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy; 2007 年 5-6 月 (Seattle, USA)
- 16) 桜井晴奈、五十嵐勝秀、田代克久、川端健二、櫻井文教、倉知慎之輔、中川晋作、菅野純、水口裕之; アデノウイルスベクター誘発自然免疫応答に關与する因子の DNA microarray を用いた探索; 日本薬学会第 127 年会 (富山); 2007 年 3 月 28~30 日
- 17) 黄海瑛、櫻井文教、川端健二、小泉直也、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、水口裕之; アデノウイルスベクター投与後初期に起こる副作用軽減—NF- $\kappa$ B デコイの細胞選択的デリバリーによる試み—; 第 2 回創剤フォーラム若手発表討論会 (京都); 2006 年 10 月 13-14 日
- 18) 黄海瑛、櫻井文教、川端健二、小泉直也、樋口ゆり子、川上茂、山下富儀、橋田充、水口裕之; NF- $\kappa$ B デコイによるアデノウイルスベクター生体投与後の自然免疫誘導抑制; 第 21 回日本 DDS 学会 (東京); 2006 年 7 月 7-8 日
- 19) 小泉直也、川端健二、櫻井文教、佐々木朋美、西島美妙江、山口朋子、早川堯夫、渡邊善照、水口裕之; 自然免疫誘導能を減弱させ安全性に優れたアデノウイルスベクターの開発; 第 21 回日本 DDS 学会 (東京); 2006 年 7 月 7-8 日
- 20) 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); 2006 年 7 月 10-12 日 **Best Presentation Award**
- 21) 水口裕之; overview 『ウイルス・非ウイルス

ベクター開発研究の最前線と臨床・産業化への道』;日本薬学会 126 年会;2006 年 3 月 28-39 日、仙台

アデノウイルスベクターの遺伝子導入制御; 遺伝子・デリバリー研究会 第 5 回 夏期セミナー; 2005 年 8 月 2 日、箱根

22) 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、2006 年 3 月 28-39 日、仙台

29) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と遺伝子機能解析、遺伝子治療、ワクチン等への応用; 彩都シンポジウム&サイエンスセミナーSP; 2005 年 7 月; 大阪

23) 水口裕之; 遺伝子機能解析のための次世代アデノウイルスベクターの開発; 第 69 回新適塾「21 世紀の薬箱」; 2006 年 1 月 31 日、大阪

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当事項なし

### 2. 実用新案登録

該当事項なし

24) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究; 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス (九州大学医学部特別講演); 2006 年 1 月 17 日、福岡

### 3. その他

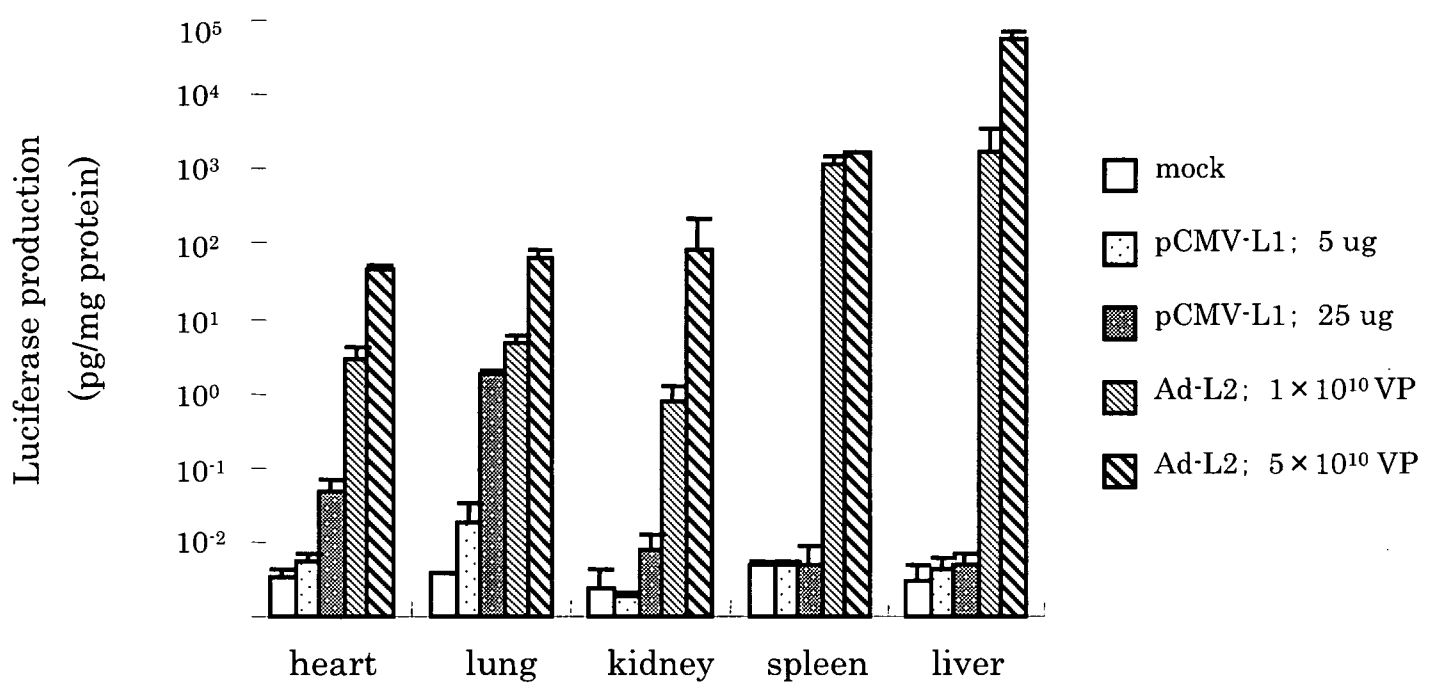
該当事項なし

25) 水口裕之; 遺伝子治療研究における薬学の役割: ベクター開発の重要性; 平成 17 年度大阪大学薬学部卒後研修会「食・健康と薬学」; 2005 年 12 月 2 日、大阪

26) 水口裕之; 改変アデノウイルスベクターによる遺伝子導入制御; 「生物医工学サロン」第 17 回集会; 2005 年 11 月 9 日、大阪

27) 水口裕之; ウイルスの超分子化学; 「ナノバイオ基礎から最前線」ーバイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出ー; 2005 年 11 月 2 日、神奈川

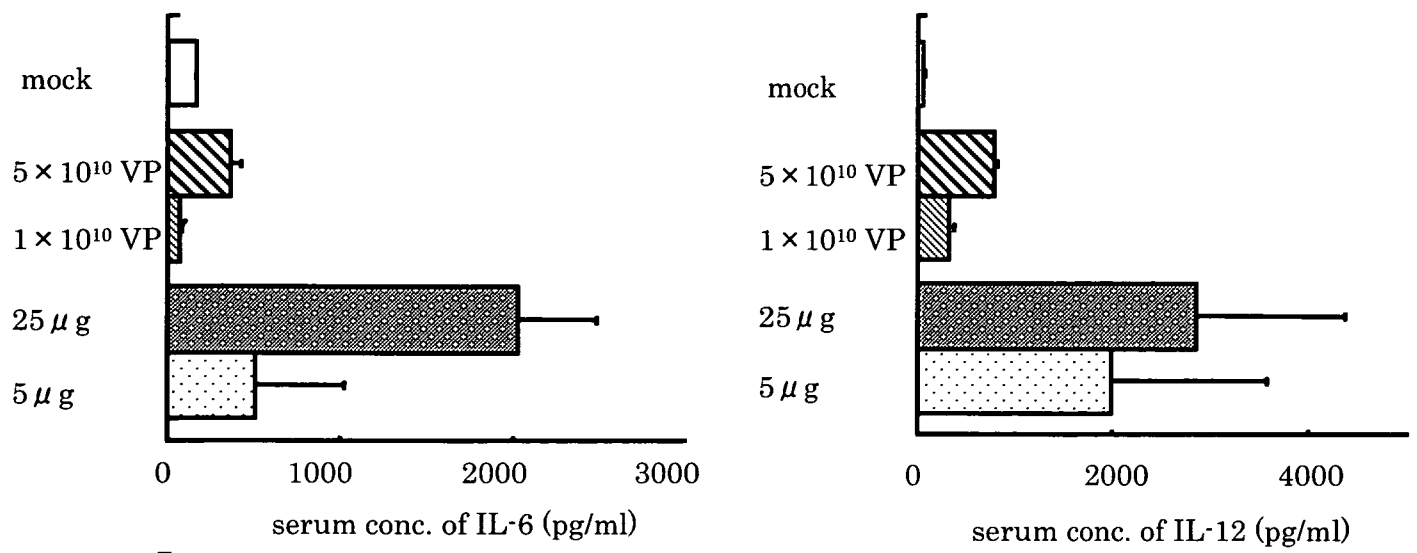
28) 水口裕之; カプシドタンパク質の改変による



**Fig. 1 Gene expressions of various organs by iv injection of vectors.**

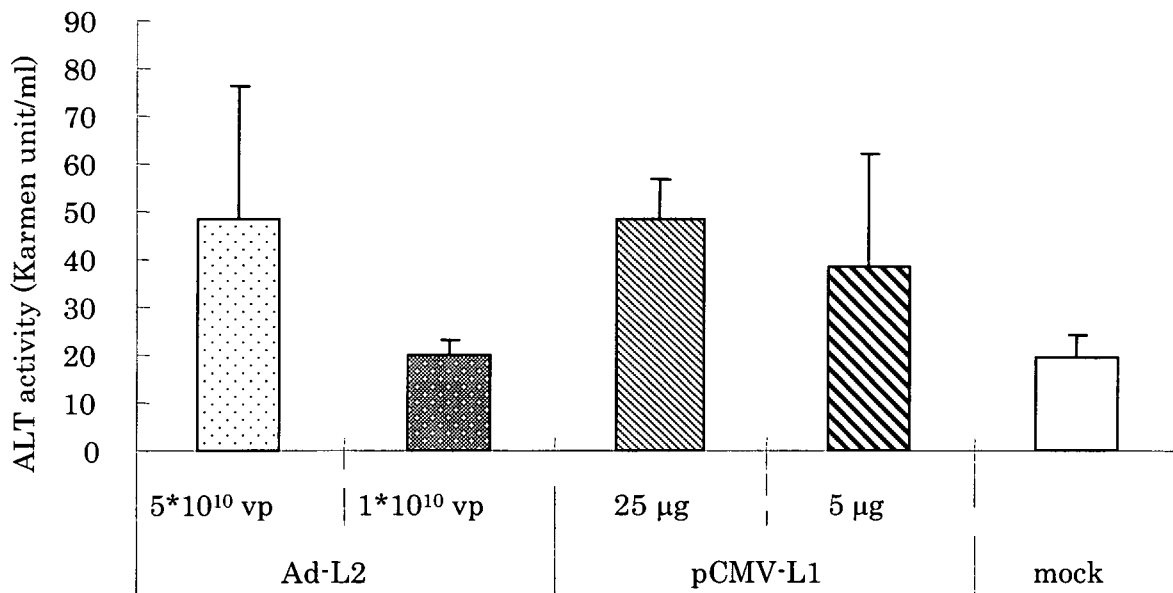
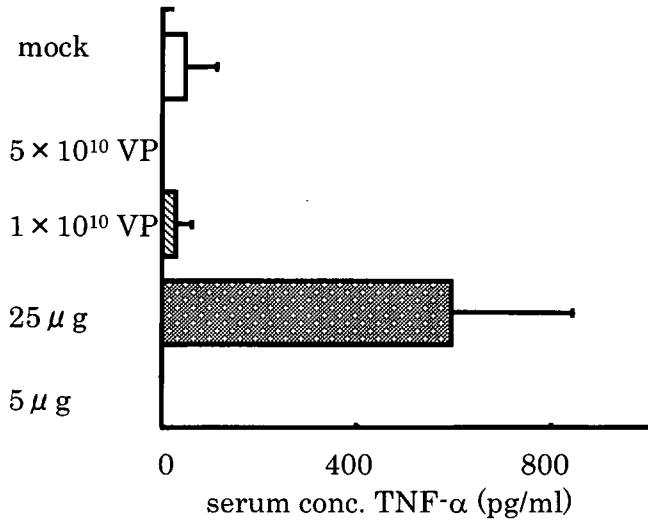
Mice were sacrificed 6 hr after iv injection of Ad vector or lipoplex in different dose. Data are expressed as means of 4 mice  $\pm$ SD.





**Fig. 2 Induction of various inflammatory cytokine productions by injection of Ad vector or lipoplex.**

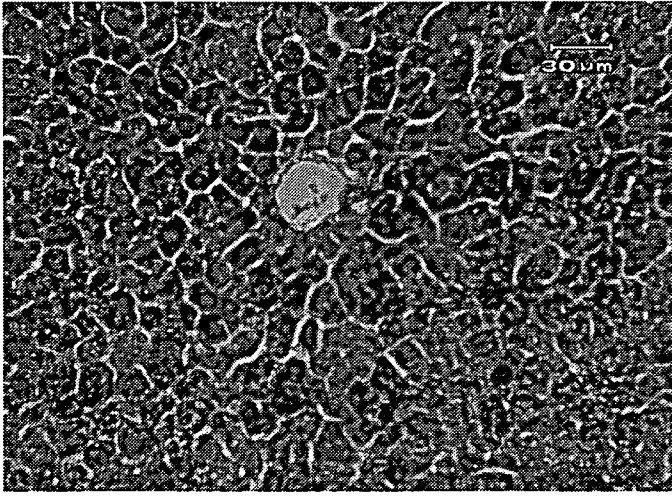
Ad vector or lipoplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 6 hr after injection and the concentration of various cytokines were measured. Data are expressed as means of 3-4 mice ±SD.



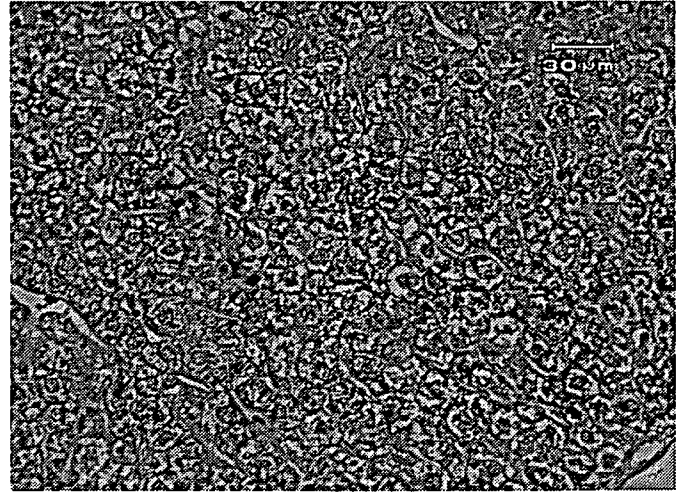
**Fig. 3 Serum ALT levels after iv injection of Ad vector or Lipoplex.**

Ad vector or lipoplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 24 hr after injection and the activity of ALT was measured. Data are expressed as means of 3-4 mice ±SD.

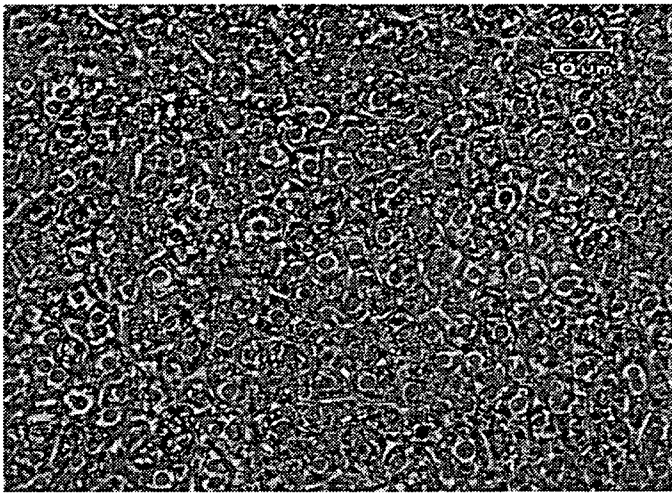
a) 3 hr



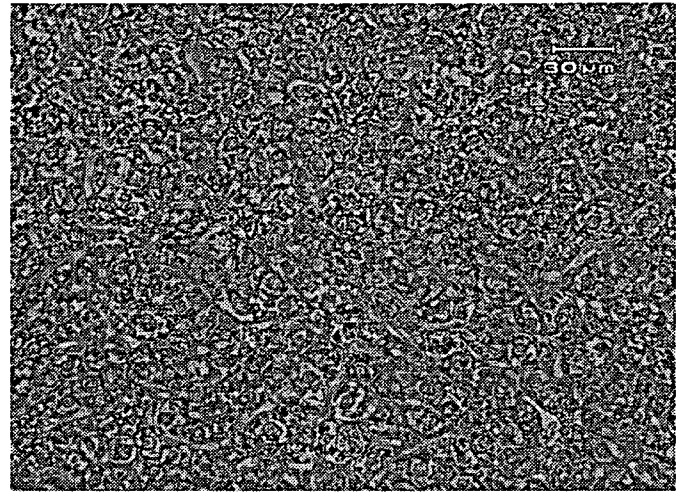
d) 3 hr



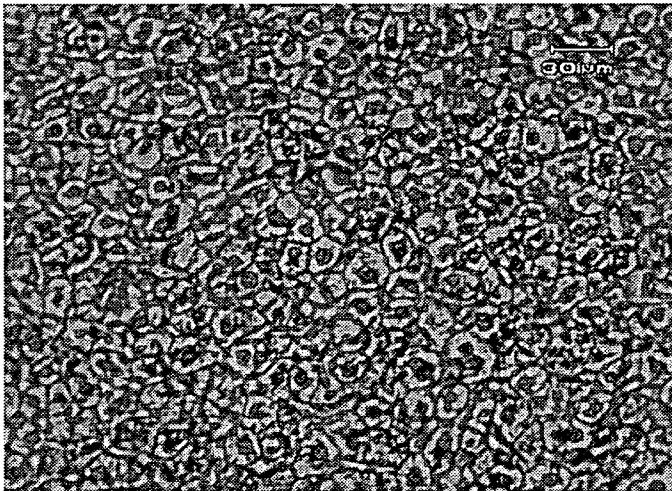
b) 6 hr



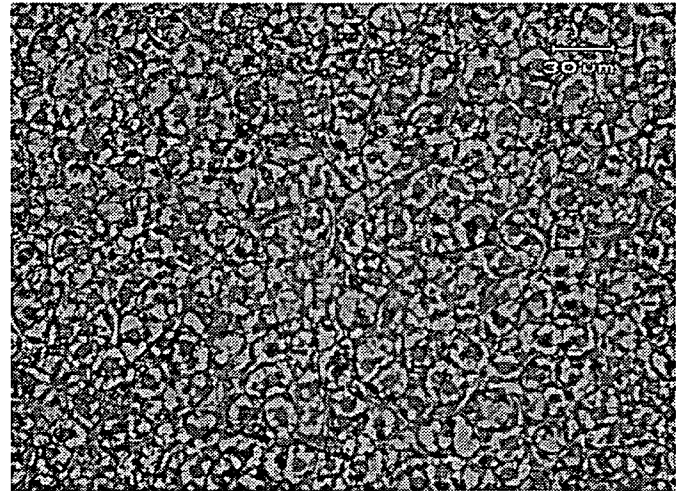
e) 3 hr



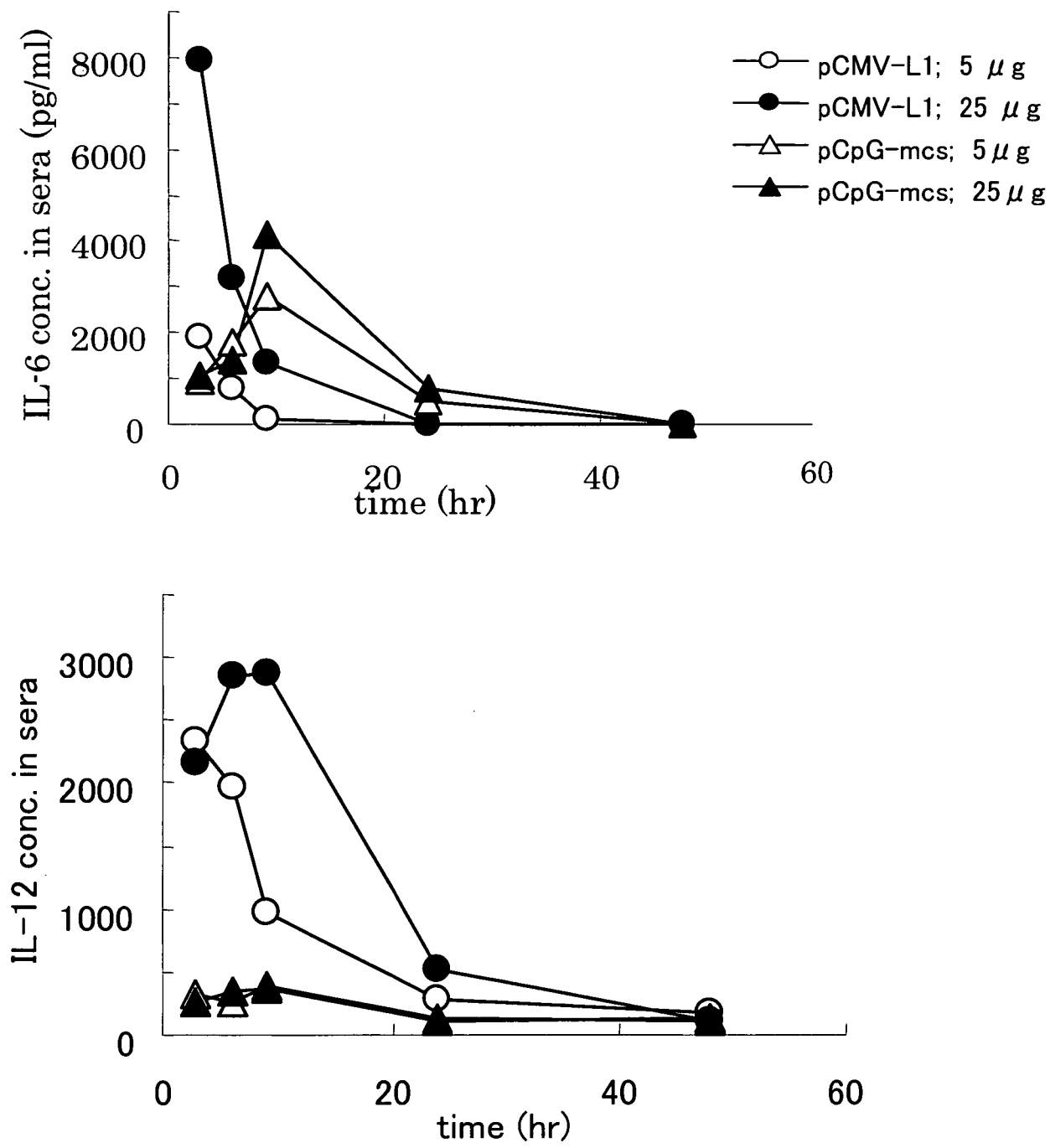
c) 48 hr



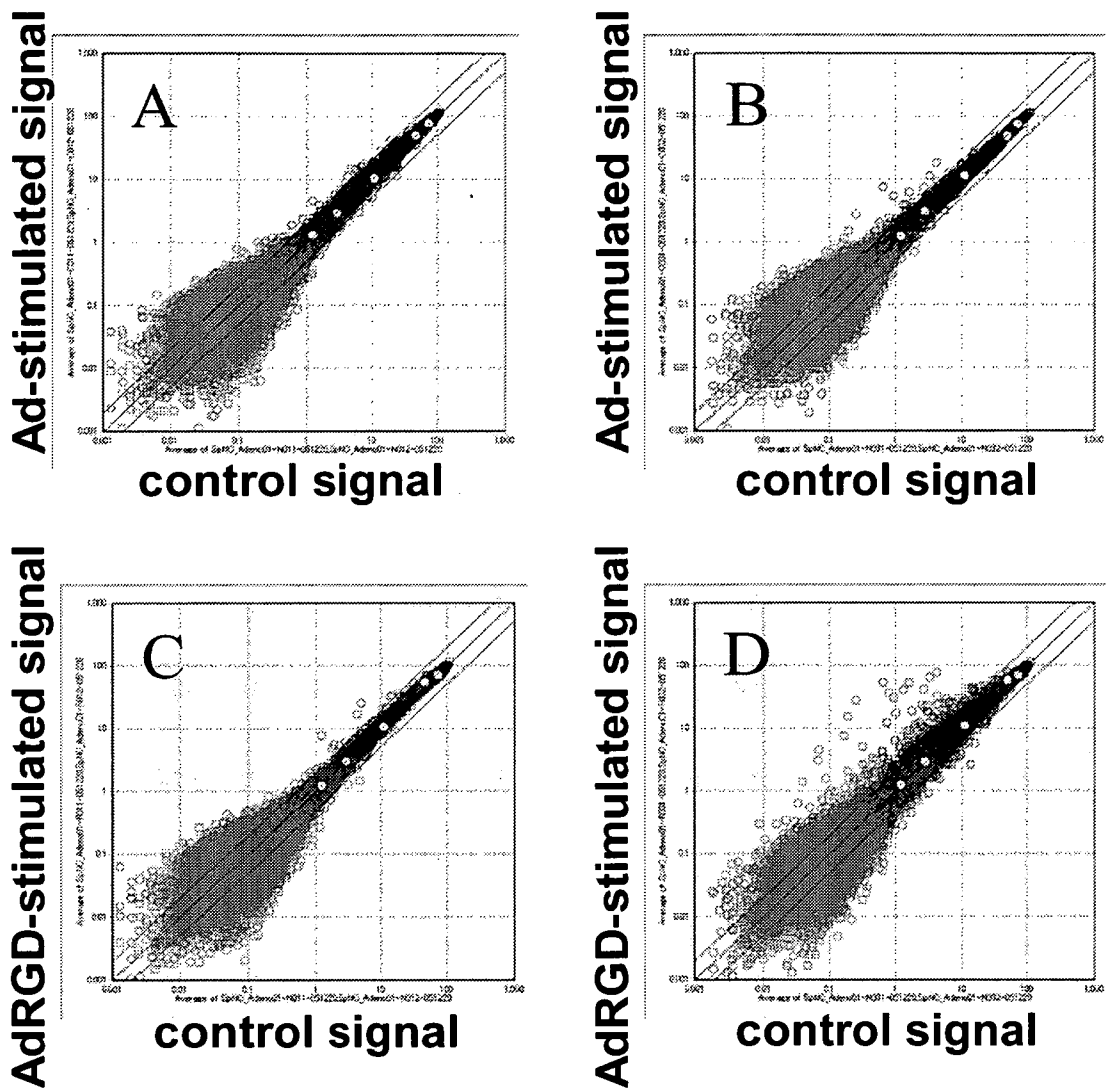
f) 3 hr



**Fig. 4 Histopathological changes induced by iv injection of Ad vector or Lipoplex.** Liver was collected from mice injected  $5 \times 10^{10}$  of Ad vector (a, b, c) or  $25 \mu\text{g}$  pCMV-L1 of lipoplex (d, e, f). Liver sections were stained with HE.



**Fig. 5 Suppression of cytokine production by using less CpG motif plasmid.** Ad vector or lipoplex were injected intravenously into mice. Blood was collected 3, 6, 9, 24, 48 hr after postinjection and the concentration of various cytokines were measured by ELISA. Data are expressed as means of 3-4 mice  $\pm$ SD.



**Fig. 6 Analysis of microarray data.**

Analysis of microarray data is shown as GeneSpring scatterplots of each hybridization. Mouse peritoneal macrophages were stimulated with conventional (A and B) and RGD-type (C and D) Ad vectors for 1 (A and C) or 3 (B and D) hr.