

との結合部位, およびリン酸化部位に変異を導入あるいは欠損させた変異体では ADE 活性が認められなかった(図 2).

#### D. 考察

CD32 発現 Cos7 細胞を用いて DENV の *in vitro* における ADE モデルを作製した. これまでに中和能を有しない DENV 型交差抗体と DENV の免疫複合体による各細胞への感染性増強において CD32 の関与が報告されている. 本実験において, DEN 抗体を有する患者血清を用いて CD32 を発現した Cos7 細胞における DENV の ADE を検討した. その結果患者血清と DENV を反応させることにより DENV の ADE が観察された. したがって DENV の ADE は DENV-抗 DENV 抗体複合体による CD32 を介した感染であることが示唆された.

続いて ADE における CD32 のシグナル伝達の役割について検討するため CD32 のシグナル伝達系に関与する CD32 の細胞内領域の欠損変異体および CD32 と細胞膜に存在する構造体である raft との会合に関与するアミノ酸配列に点変異体を導入し ADE モデルを用いて変異体の活性を検討した. その結果 ADE には CD32 と DENV-抗 DENV 抗体複合体の結合に加えて CD32 の raft との会合とそれに続くシグナル伝達が重要であることが示唆された.

#### E. 結論

世界の熱帯・亜熱帯地域で発生している DENV 感染に対するヒト用ワクチンはなく, DENV 感染に対する特異的治療法もない. また DENV の動向にはヒト, 蚊, 気候, 環境等の多くの要因が複雑に関わり, その流行状況の予測は困難である. 本邦においても海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である. DHF やデングショック症候群はひとたび発症するとその致死率は高い重篤な疾患であり, 本感染症の病態形成機序を解明し, その治療法を開発する

ことは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に貢献する.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 2008 Jan 21; [Epub ahead of print]

Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection*, 12, 1-4, 2007

Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushi, S., Saijo, M., Sakai, K., Lim, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., Nishimura, H. A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 2007. 13(2):322-4.

Nerome, R., Tajima, S., Takasaki, T., Yoshida, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Ito, M., Sugiyama, A., Yamauchi, A., Yano, T., Kameyama, T., Morishita, I., Kuwayama, M., Ogawa, T., Sahara, K., Ikegaya, A., Kanda, M., Hosoya, Y., Itokazu, K., Onishi, H., Chiya, S., Yoshida, Y., Tabei, Y., Katsuki, K., Tabata, K., Harada, S., Kurane, I. Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J. Gen. Virol.* 2007. 88(Pt 10):2762-8.

Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., Santos, F.D., De Jesus, M.D., Lina, B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Dragaer, R.D., Japaridze, A., Kurane, I. Dengue outbreak in East Timor In 2005: Emergence of Dengue virus type 3. *Trans*

*R Soc Trop Med Hyg.* (in press)

Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., Kurane, I. Dengue Virus Type 2 Isolated From an Imported Dengue Patient in Japan: First Isolation of Dengue Virus From Nepal. *J Travel Med.* (in press)

2. 学会発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Role of Fc-gamma II receptor in antibody dependant enhancement of dengue viral infection. 第3回デングウイルス研究ネットワーク会議 2007年8月

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Ishikawa, T., Kurane, I. Mouse Antibody Response to novel Vero-Cell-derived

Inactivated Human West Nile Vaccine for Immunization against West Nile virus. 第41回日米医学ウイルス性疾患専門部会 2007年7月

モイ メンリン, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎: DHFにおけるFc  $\gamma$  IIA (CD32) 受容体を介した抗体依存性感染増強 (ADE) メカニズムの解析, 第55回日本ウイルス学会2007年10月

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項無し

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

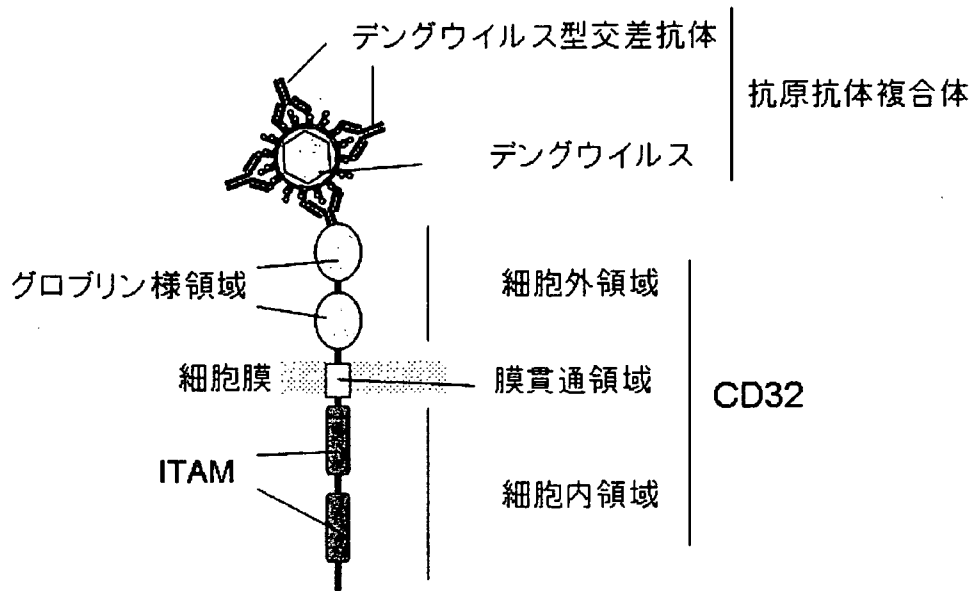


図1. 抗体依存性感染増強モデル

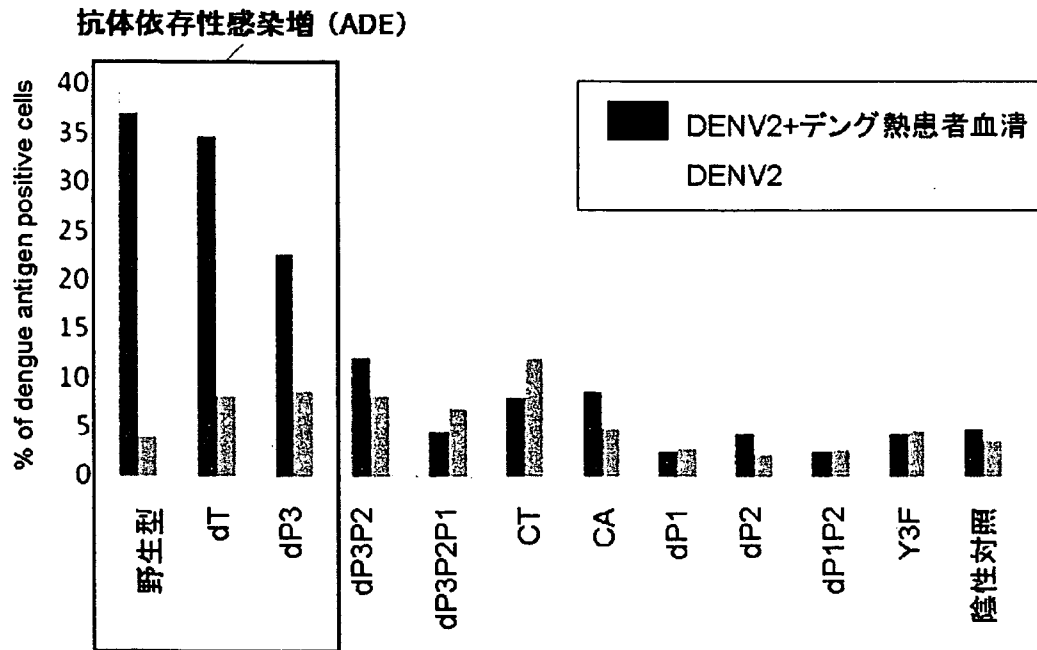


図2. CD32のシグナル伝達は抗体依存性感染増強(ADE)に関与する: CD32の細胞膜貫通領域および細胞内領域に変異を導入した結果、ADEは阻害された。以上のことからADEの発生にはCD32のraftとの会合およびシグナル伝達が重要であることが示唆された。

## 細胞ラベル化MRI造影剤の化学構造最適化による *in vivo* イメージングコントラストの向上

所属 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部  
研究者 橘 洋一

### 要旨

ポリエチレングリコール、デキストランを主鎖とし、ガドリニウムキレートを反応させることで、親水性 MRI 用造影剤を合成し、第一世代の細胞ラベル化 MRI 造影剤のイメージング効率の向上を図った。得られた造影剤の造影能を検討すると共に、細胞内への導入を行い、*in vitro*, *in vivo* において、MRI による細胞の撮像を行った。

### A. 研究目的

近年、失われた機能の回復という観点から再生医療が着目され、目覚ましい進歩を遂げている。従来からの手法である臓器移植など既に臨床応用に着手されているものもあり、患者に恩恵をもたらす医療として非常に重要である。しかし、移植が必要な患者の数に対する臓器提供者が圧倒的に少ないこと、移植後の免疫抑制剤の投与による副作用など様々な問題点がある。そこで、臓器移植に代わる画期的な医療として細胞移植治療が着目されてきた。

現在、臨床レベルだけでなく研究レベルにおいても、細胞移植治療に関する主な研究は、スタート（細胞移植）からゴール（移植部位の治癒）への一本槍的な研究が優先され、治癒過程についての研究はほとんど進んでいない。細胞移植治療において、治癒過程における移植細胞を追跡することは、学術的な意義を持つだけでなく、治療法の飛躍的向上にも繋がる。細胞移植治療法の開発・最適化を考えた場合、治癒過程の径時的な観察は、長期間・非侵襲・非破壊的であることが最大の課題となる。そのために、非侵襲・非破壊的に細胞を可視化することができる技術開発（細胞のラベル化）が切望されてきた。

MRI は、非侵襲で移植部位を観察することができ、径時的な変化の評価を可能にする。我々は、この点に着目し、基礎研究の立場から MRI 用造影剤の開発を行ってきた。この研究に関して、ポリビニルアルコール（PVA）を主鎖とし、ガドリニウムを中心金属としたキレートを側鎖に導入することで、MRI による細胞の追跡を可能にする新規造影剤を既に開発している（特願 2006-310159）。この知見を基に、MRI 造影剤の更なる機能向上を目指し、*in vivo* における移植細胞のイメージングを可能にする MRI 造影剤の創生にチャレンジしている。

本研究は、細胞ラベル化 MRI 造影剤の化学構造最適化により *in vivo* イメージングコントラストを向上させることを目的とする。移植細胞の増殖・分化に始まり、組織、臓器の回復過程を診断していくには非常に長い時間を必要とする。移植細胞のイメージングを達成するためには、細胞をターゲティングするだけでなく、更に細胞内に長期間保持できる細胞内滞在型の造影剤の開発が求められる。そこで、MRI の有する非侵襲・非破壊的に観察できるという利点に着目した。多岐に渡る移植細胞の *in vivo* イメージングを可能にする細胞ラベル化用 MRI 造影剤の創生を化学構造の最適化という側面からアプローチする。細胞内に長期間滞在させるためには、造影剤の親水性を高めることが必須条件となってくる。具体的には、2 種類の親水性の高分子材料を用いた。①細胞内滞在性の向上という側面から、より親水性の高いポリエチレングリコールを選択した。②生分解性という点からデキストランを選択した。以上、2 種類の高分子 MRI 造影剤に関する研究について報告する。

### 1. ポリエチレングリコールを基盤とした MRI 造影剤の開発

#### 1-B. 研究方法

##### 1-B-1. ポリエチレングリコールを基盤とした造影剤の合成

出発物質として、末端アミノプロピル化ポリエチレングリコール（㈱日油）を用い、末端にガドリニウムキレートの導入を行った（図 1）。末端アミノプロピル化ポリエチレングリコール（PEG-NH<sub>2</sub>）として、直鎖状（分子量：5,000（PEG-NH<sub>2</sub>-5000）、10,000（PEG-NH<sub>2</sub>-10000））及び、分岐状（分子量：20,000（PEG-NH<sub>2</sub>-20000））

のものを使用した。それぞれの PEG-NH<sub>2</sub> (0.7 g) を脱水 DMSO に溶解させ、末端アミンに対して 1.5 倍当量の 1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid NHS ester (DOTA-NHS-ester; 株式会社東京化成) を添加した。添加後、窒素雰囲気下、24 時間、室温で攪拌した。反応終了後、水中で透析 (分子量カット: 10,000) を行い、凍結乾燥を行って精製した。それぞれのサンプルを、PEG-5000-DOTA、PEG-10000-DOTA、PEG-20000-DOTA とする。図 2 に PEG-5000 と PEG-5000-DOTA の NMR チャートを示す (PEG-NH<sub>2</sub>-10000、PEG-NH<sub>2</sub>-20000 も同様の結果を得た)。NMR 測定は 300 MHz NMR spectrometer (Gemini2000/300; Varian Inc.) を用いた。

得られた PEG-DOTA を水に溶解させ、DOTA ユニットに対し 5 倍当量のガドリニウム量になるように GdCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を加えた。pH が安定した後、1M NaOH を用いて pH6.6-7.0 になるように調整した。調整後、室温で 24 時間攪拌した。24 時間後、Ethylenediamine-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid, trisodium salt, trihydrate (EDTA·3Na) を添加し、水中で透析 (分子量カット: 10,000) を行い、凍結乾燥を行って精製した。得られた生成物は、白色の粉末であり、水に易溶であった。それぞれのサンプルを、PEG-5000-DOTA-Gd、PEG-10000-DOTA-Gd、PEG-20000-DOTA-Gd とする。

#### 1-B-2. 縦緩和時間測定

高分子中のガドリニウムの定量分析は、株式会社 UBE 科学分析センターに依頼した。測定は誘導結合プラズマ発光分光分析法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ICP-AES) により行った。任意の量の PEG-DOTA-Gd を水 (0.625%)、重水 (99.375%) の混合溶液に溶解させ、縦緩和時間 (T1) 測定を行った。測定機器は 300 MHz (7.1 T) NMR spectrometer (Gemini2000/300; Varian Inc.) を用いた。測定は、インバージョンリカバリ法を用い、室温下、1 ms から 5000 ms までの間に 19 回の測定とした。得られた回復曲線より、T1 を算出した。また、様々な造影剤濃度における T1 測定の後、ガドリニウム濃度に対する 1/T1 をプロットすることにより、緩和度 (R1) を導いた。

#### 1-B-3. エレクトロポレーション

移植細胞のモデルとして、マウスの胎児皮膚から分離された培養細胞である NIH-3T3 細胞を用いた。培地は、10% bovine calf serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG) を用いた。エレクトロポレーションを行う 1 日前に、6 cm ディッシュに 5X10<sup>5</sup> 個の NIH-3T3 細胞を播種した。播種 1 日後、細胞を PBS で洗浄した後、任

意の PEG-DOTA を添加し、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、CUY-21 electroporator (CUY-21; NEPPA GENE) を用いた。実験条件は、field strength 300 V/cm, number of pulses 10, pulse duration 5 ms とし、電極として 5 mm ギャップのものを用いた。エレクトロポレーションを行ってから一時間後に、PBS で 3 回洗浄を行った。

#### 1-B-4. PEG-5000-DOTA-Gd 水溶液のイメージング

MR 撮像は、MRmini 1.5 T (DS pharma biomedical CO., Ltd.) を使用した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用いた。Echo time (TE) は 12ms とし、Repetition time (TR) を変化させ撮像した。水溶液濃度は 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM, 0.005 mM とし、それぞれ 50  $\mu$ l ずつ準備した。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、Field of view (FOV) は 4cm X 2 cm である (1 ピクセル辺り 156  $\mu$ m X 156  $\mu$ m)。スライス厚は 1 mm とした。得られた画像より、輝度を求め、Contrast to noise ratio (CNR) を算出した。CNR = (intensity cells-intensity water) / intensity noise

#### 1-B-5. 細胞のイメージング

エレクトロポレーション後の NIH-3T3 細胞に対してトリプシン処理を行い、3.6X10<sup>6</sup> 個の細胞を回収した。得られた細胞を水に懸濁させ MR 撮像を行った。また、対照として、エレクトロポレーションを行っていない細胞を撮像した。MRI 撮像は、MRmini 1.5 T (DS pharma biomedical CO., Ltd.) を使用した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用いた。Echo time (TE) は 12ms とし、Repetition time (TR) を変化させ撮像した。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、Field of view (FOV) は 6cm X 3cm である (1 ピクセル辺り 234  $\mu$ m X 234  $\mu$ m)。スライス厚は 1 mm とした。得られた画像より、輝度を求め、Contrast to noise ratio (CNR) を算出した。

#### 1-C. 研究結果

##### 1-C-1. 緩和時間の測定

3 種類のサンプル (PEG-5000-DOTA-Gd、PEG-10000-DOTA-Gd、PEG-20000-DOTA-Gd) を用い、様々な濃度において、T1 測定を行った。一般的に、低濃度条件下において、Gd 濃度と 1/T1 の値は正比例することが知られており、その直線の傾きは緩和度 R1 として求められる。今回得られた T1 の測定結果を基に、Gd 濃度に対して、1/T1 をプロットした結果を図 3 に示す。予想されたように、3つのサンプル全てにおいて、Gd 濃度と 1/T1 との間に正比例関係が見られた。また、この結果より得られた R1 の値を他の物性値と共に表 1 に示す。サンプルの R1 の値は 4.4~5.5 の値を示し

た。

### 1-C-2. PEG-5000-DOTA-Gd 水溶液の MRI イメージング

PEG-5000-DOTA-Gd の水溶液を用い、MRI 撮像を行った (図 4)。サンプル濃度 (Gd 濃度) は、0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mM とした。比較対照として、水のみを測定した。この結果より、0.05 mM 以上の濃度において、水と比較してコントラストが強くなり、高濃度になるほどコントラストは強く見られた。更に、得られたイメージより、それぞれの輝度を求め CNR を計算した (図 5)。TR が短い条件においては、スピンの回復がわずかでしかないため CNR は小さくなる。また、TR が長い条件下では、水のスピンの回復が十分に行きわたらないうえ、造影剤による T1 短縮効果が見られなくなる。つまり、CNR は小さい値をとる。従って、TR に対し、CNR をプロットすると、上に凸の放物曲線が得られ、ピークトップを与える TR が最適条件である。図 5 より、コントラスト良く撮像される TR は、400~500 ms であることがわかった。

### 1-C-3. 細胞の MRI イメージング

エレクトロポレーションを行い、細胞内に PEG-5000-DOTA-Gd を導入した後、細胞の MRI 撮像を行った。比較対照として、水のみ及び PEG-5000-DOTA-Gd を導入していない細胞を撮像した。スライス厚は 1 mm とし、図 6 に示す。この結果より、PEG-5000-DOTA-Gd が導入されていない細胞と水のみとの輝度がほとんど変わらないのに対し、PEG-5000-DOTA-Gd が導入された細胞の存在する場所において、比較対照に比べコントラストの増加が見られた。また、TR を 500, 800, 1000, 1500, 2000 ms とし、輝度の測定を行い、TR に対して CNR をプロットした (図 7)。この結果からも、水のみと PEG-5000-DOTA-Gd を導入していない細胞の CNR はほぼ同じであることがわかった。また、PEG-5000-DOTA-Gd が導入されている細胞の CNR は比較対照の約 12 倍となり、明確な差異が確認できた。図 5 と比較して、CNR の最大値が見られないことは、細胞内に導入されている造影剤の量が少ない、あるいは、細胞内の水は特殊な状態 (自由水ではない) ことが原因として考えられる。

## 2. デキストランを基盤とした MRI 造影剤の開発

### 2-B. 研究方法

#### 2-B-1. デキストランを基盤とした造影剤の合成

##### ・ Dextran-diamine の合成

デキストランのアミノ化は以下の方法で行った。Dextran (10 mmol) を 120 ml の脱水 DMSO に溶解させ、1,1-Carbonylbis-1H-imidazole (CDI, 7.5 mmol)

を加えた。窒素雰囲気下、室温で 4 時間攪拌した。1,3-propanediamine (75 mmol) を混合液に添加し、一晚室温で攪拌した。その後、透析法 (cut-off : 10kDa) により精製を行い、凍結乾燥することで Dextran-diamine を得た。NMR 測定は 300 MHz NMR spectrometer (Gemini2000/300; Varian Inc., CA, US) を用いた。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  4.99 (br,  $\text{CHO}_2$ ), 3.605 (br,  $\text{CHOH}$ ), 3.769 (br,  $\text{CHOH}$ ), 5.2 (br,  $\text{CHO}$ ), 3.253 (br,  $\text{C(=O)NHCH}_2$ ), 2.88 (br,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.792 (br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.53 (br,  $\text{CHOH}$ ), 3.922-3.983 (br,  $\text{CHCH}_2$ ).

##### ・ Dextran-diamine-DOTA の合成

Dextran-diamine-DOTA の合成は以下の方法により行った。Dextran-diamine を 120 ml の脱水 DMSO に溶解させ、1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono (N-hydroxysuccinimidyl ester) (DOTA-NHS-ester) (1 mmol of  $\text{NH}_2$  in the dextran-diamine) を添加し、窒素雰囲気下、室温で 1 日攪拌した。同時に、FITC によるラベル化も行った。その後、透析法 (cut-off : 10kDa) により精製を行い、凍結乾燥することで Dextran-diamine-DOTA を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  5.02 (br,  $\text{CHO}_2$ ), 3.63 (br,  $\text{CHOH}$ ), 3.77 (br,  $\text{CHOH}$ ), 5.2 (br,  $\text{CHO}$ ), 3.3 (br,  $\text{C(=O)CH}_2\text{N}$ ), 3.51 (br,  $\text{NCH}_2\text{C(=O)OH}$ ), 3.326 (br,  $\text{C(=O)NHCH}_2$ ), br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.91 (br,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.92 (br,  $\text{CHOH}$ ).

##### ・ Dextran-diamine-DOTA-Gd (Dex-DOTA-Gd) の合成

Dextran-diamine-DOTA を 50ml の水に溶解させ、DOTA に対して 1.2 当量のガドリニウムを攪拌しながら、滴下した。1M NaOH を用いて pH を 6.6-7.0 に調整した後、室温で 1 日攪拌した。その後、透析法 (cut-off : 10kDa) により精製を行った。凍結乾燥によりガドリニウムを側鎖に有する Dextran-diamine-DOTA-Gd を得た。

### 2-B-2. 縦緩和時間測定

高分子中のガドリニウムの定量分析は、大阪工業大学環境工学科にて測定を行った。測定は誘導結合プラズマ発光分光分析法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ICP-AES) により行った。任意の量の Dex-DOTA-Gd を水 (0.625%)、重水 (99.375%) の混合溶液に溶解させ、縦緩和時間 (T1) 測定を行った。測定機器は 300 MHz (7.1 T) NMR spectrometer (Gemini2000/300; Varian Inc.) を用いた。測定は、インバージョンリカバリー法を用い、室温下、1 ms から 5000 ms までの間に 19 回の測定とした。得られた回復曲線より、T1 を算出した。

## 2-B-3. エレクトロポレーション

1-B-3 と同様の実験を行った。

## 2-B-4. 細胞内滞在性試験

エレクトロポレーション後、NIH-3T3 細胞内に導入されている Dex-DOTA-Gd の経時変化を測定した。細胞内に Dex-DOTA-Gd を導入後、トリプシン処理を行い、6 cm シャーレに播種した。任意の時間において、シャーレに細胞溶解液を添加し細胞を完全に溶解させ、蛍光測定にて細胞内に含まれる Dex-DOTA-Gd の量を決定した。

## 2-B-5. Dex-DOTA-Gd 水溶液のイメージング

MR 撮像は、MRmini 1.5 T (DS pharma biomedical CO., Ltd.) を使用した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用いた。Echo time (TE) は 12ms とし、Repetition time (TR) を変化させ撮像した。水溶液濃度は 0.5 mM, 0.4 mM, 0.3 mM, 0.2 mM, 0.1 mM とし、それぞれ 50  $\mu$ l ずつ準備した。コントロールとして水のみを用いた。得られた画像のピクセル数は 256 X 128 であり、Field of view (FOV) は 4cm X 2 cm である (1 ピクセル辺り 156  $\mu$ m X 156  $\mu$ m)。スライス厚は 1 mm とした。

## 2-B-6. 細胞のイメージング

エレクトロポレーション後の NIH-3T3 細胞に対してトリプシン処理を行い、 $1 \times 10^6$  個の細胞を 3% アガロース (175  $\mu$ l) 内に封入し、細胞のイメージングを行った。また、対照として、アガロースゲルのみを撮像した。更に、得られたゲルを F344 ラット (♂, 12 週齢) の皮下に埋入し、MRI 撮像した。MR 撮像は、MRmini 1.5 T (DS pharma biomedical CO., Ltd.) を使用した。測定シーケンスは、3D-スピンエコー法を用いた。Echo time (TE) は 12ms とし、Repetition time (TR) を変化させ撮像した。

(倫理面への配慮)

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って十分に注意した。動物実験についても、施設における動物実験指針に沿い、動物愛護の精神を持って実施した。

## 2-C. 研究結果

### 2-C-1. 縦緩和時間の測定

Dex-DOTA-Gd の ICP 測定により、ポリマーユニットに対して 24.5 wt% にガドリニウムが導入されていた。Dex-DOTA-Gd の緩和度の測定を行った (図 8)。Dex-DOTA-Gd の増加と共に T1 の減少が見られた。この結果より、今回合成した Dex-DOTA-Gd は MRI 用造影剤として有用であるといえる。

### 2-C-2. 細胞内滞在性

エレクトロポレーション後、NIH-3T3 細胞内に導入されている Dex-DOTA-Gd を測定した (図 9)。この結果より、培養日数が 12 日経過した後でも細胞内に存在する Dex-DOTA-Gd は、初めに導入された量を維持し、ほぼ一定であることがわかった。つまり、今回合成した Dex-DOTA-Gd は、一定期間 (12 日) ではあるが、細胞内滞在性を有することが示唆された。また、Dex-DOTA-Gd が細胞内に導入された状態でも、普通の細胞と同様に細胞分裂し、増殖していくことを確認した。次に、細胞内に導入された Dex-DOTA-Gd の細胞内での分布について共焦点顕微鏡を用いて検討を行った (図 10)。この結果より、細胞膜に吸着しているのではなく、細胞質内に Dex-DOTA-Gd が導入されていることがわかった。更に、分裂・増殖した後の細胞 (日数が経過した後) においても、Dex-DOTA-Gd は細胞内に滞在していることが示された。この結果は図 9 の結果を強く支持するものである。

### 2-C-3. Dex-DOTA-Gd 水溶液の MRI イメージング

Dex-DOTA-Gd の水溶液を用い、MRI 撮像を行った (図 11)。この結果より、コントロールと比較して、Dex-DOTA-Gd を溶解させたサンプルは、十分なコントラストの増強が見られ、また、濃度の増加により、コントラストがより強くなることがわかった。また、より長い TR を用いた場合、コントラストが大きくなることが想像される。

### 2-C-4. 細胞の MRI イメージング

エレクトロポレーションを行い Dex-DOTA-Gd を導入した細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を、3 wt% アガロース (175  $\mu$ l) 内に封入し、細胞のイメージングを行った。比較対照として、アガロースのみを測定した。スライス厚は 1 mm とし、図 12a に示す。この結果、アガロースのみに対し、Dex-DOTA-Gd が導入された細胞の存在する場所において、コントラストの増加が見られた。従って、MRI を用いて細胞を観察できることが可能である。更に、得られた 2 種類のアガロースゲルをラットの皮下に埋入し、MRI 撮像を行った (図 12b, c)。この結果より、in vivo においても、コントラストの差が見られ、細胞を検出できることがわかった。

## D. 考察

我々は、移植細胞追跡用 MRI 造影剤の開発を目的としている。これまでに、超常磁性酸化鉄を用い、細胞をターゲットとした造影剤の研究が進められてきた。この造影剤では、エンドサイトーシスを利用して細胞内のエンドソーム内に ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) を取り込ませ、移植幹細胞の周囲に磁場を形成させる

手法を用いる。USPIO の有する磁場は非常に大きい  
ため、高磁場において、細胞の検出に必要な細胞  
に取り込ませる造影剤の数は数千のオーダーで  
よい利点がある。しかしながら、陰性の造影剤で  
あることからアーチファクトの影響により定量性  
が出しにくいこと、幹細胞の崩壊後マクロファージ  
などによる他の細胞へ取り込まれてしまうこと  
などが問題点となっている。また、造影剤が組織  
へ残存することから、長期間の細胞移植追跡には  
不向きであると考えられる。

そこで、本研究では陽性の造影剤であるガドリ  
ニウムを用い、移植細胞を追跡でき、*in vivo* イメ  
ージングコントラストを向上させる高分子造影剤  
の創生を目指す。本研究で得られた造影剤の緩和  
度 R1 は、 $4.4\sim 5.5\text{ mM}^{-1}\text{ s}^{-1}$  であった。この R1 の値  
は、磁場等に影響されることがないとされている。  
そのため、この値を比較することで、造影能の優  
劣が決定される。現在、臨床で用いられているマ  
グネビスト（低分子ガドリニウム造影剤）の R1  
の値が約  $4.5\text{ mM}^{-1}\text{ s}^{-1}$  であることを考えると、今回  
合成された高分子造影剤は、マグネビストと同等  
かそれ以上の緩和能力を有することとなる。

細胞の MRI 撮像において、 $1\sim 3.6\times 10^6$  個の細胞  
を使用した。コントロールと比較して、十分なコ  
ントラストの差が見られたことから、MRI で細胞  
を検出できたといえる。今後、移植細胞を追跡し  
ていくためには、どの程度の造影剤を細胞内に導  
入する必要があるのか、どの程度の細胞数が必要  
になるのかを見極める必要がある。また、直鎖状  
あるいは分岐状という構造の違いによって、造影  
剤の緩和能力、造影効率が異なると考えられるた  
め、造影剤の構造についても議論の余地があると  
考えている。さらに、毒性の軽減という観点から、  
高分子造影剤の生体内分解性についても検討する。

#### E. 結論

直鎖状、分岐状のポリエチレングリコールを出  
発物質として、末端にガドリニウムキレートを導入  
することで、MRI 造影剤を合成した。また、デ  
キストランの側鎖にガドリニウムキレートを反応  
させ、デキストランを基盤とした MRI 造影剤を開  
発した。得られた造影剤は、市販の造影剤と同じ  
かそれ以上の緩和能力を有していた。エレクトロ  
ポレーション法を用いて、造影剤を細胞内に導入  
を行い、細胞の MRI 撮像を行った。コントロール  
と比較して、細胞が存在する場所で、コントラス  
トの上昇が見られた。つまり、MRI を用いて細胞  
を検出できたといえる。今後は、疾患モデル動物  
を用いた細胞移植実験を行うことで、MRI による  
移植細胞の *in vivo* イメージングを達成し、*in vivo*  
における造影効果、薬物としての動態を検討した

いと考えている。

#### F. 研究発表

F-1. 論文発表  
なし

#### F-2. 学会発表

山岡哲二・馬原 淳・橘 洋一、「細胞移植療法に  
向けての工学的アプローチ」in 循環器病研究の進  
歩, p59-65

2007 Annual Meeting Final Program for Society For  
Biomaterials, #94

(Synthesis and Applications of New Contrast Agents  
for In Vivo Cell Tracking)

第 56 回高分子学会年次大会予稿集  
(56 巻 1 号, 移植細胞の可視化を目的とした MRI  
用高分子造影剤の開発)

第 36 回医用高分子シンポジウム講演要旨集,  
p33-34  
(新規 MRI イメージング法による *in vivo* 細胞トラ  
ッキング)

第 7 回日本再生医療学会総会プログラム・抄録,  
p235  
(Vol.7, Suppl, ポリエチレングリコールを担体とし  
た細胞追跡用 MRI 造影剤の開発)

第 56 回高分子討論会, p5536-5357  
(Vol.56, No.2, 細胞移植療法における細胞トラッ  
キング技術)

人工臓器, 36 巻 2 号, S-18, (Novel strategy for *in vivo*  
MRI imaging of transplanted autologous cells)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



表 1. ポリエチレングリコールを主鎖としたMRI用造影剤の合成

	form	Mw	Gd <sup>a)</sup> (wt%)	R1 <sup>b)</sup> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
PEG-5000-DOTA-Gd	直鎖	5,000	3.5	5.5
PEG-10000-DOTA-Gd	直鎖	10,000	2.5	4.4
PEG-20000-DOTA-Gd	分岐	20,000	4.0	5.3

a) Determined by ICP-AES measurement.

b) Determined by Spin lattice relaxation rate measurement.

ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)

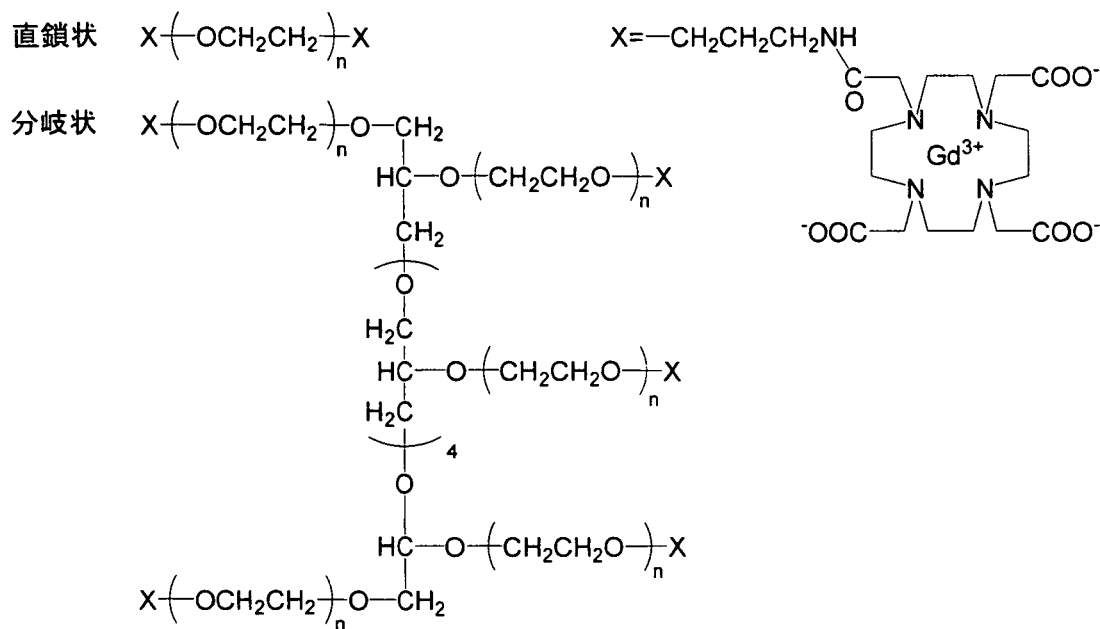


図 1. 合成物の化学構造

直鎖状(分子量: 5,000 (PEG-NH<sub>2</sub>-5000)、10,000 (PEG-NH<sub>2</sub>-10000))及び、分岐状(分子量: 20,000 (PEG-NH<sub>2</sub>-20000))を用い、末端にガドリニウムキレートを導入した。

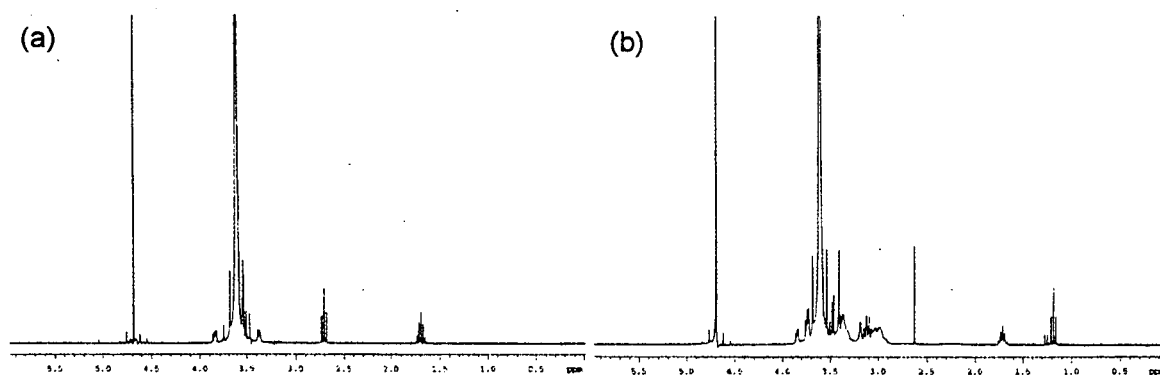


図 2. PEG-5000 の NMR チャート (a) 反応前の PEG-5000 (b) PEG-5000 に DOTA を導入後(PEG-5000-DOTA)

末端のメチレンのピーク( $\delta = 2.7$  ppm)の消失により、アミノ基に DOTA が導入されたことを確認した。

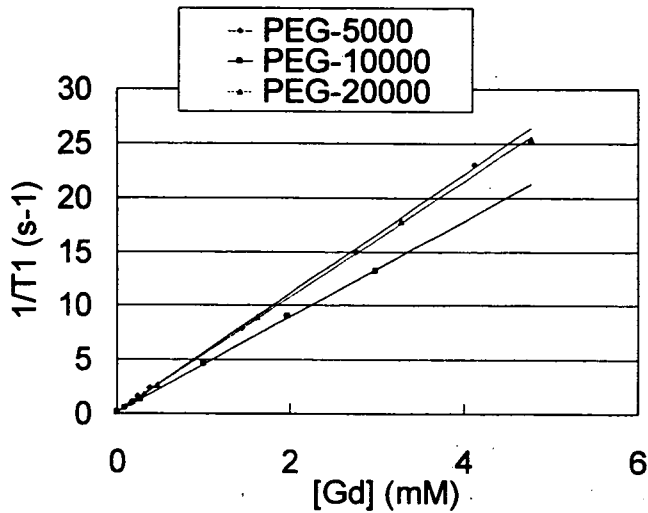
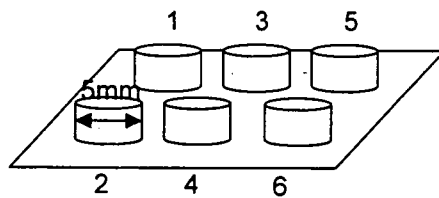


図 3. Gd濃度に対して、PEG-DOTA-Gd水溶液の $1/T_1$ をプロットした結果

造影剤の濃度の変化させることで、 $T_1$ の短縮効果が見られたことから、PEG-DOTA-GdはMRIの造影剤として有用であることが解った。



- 1. 0.5mM + Water (50 $\mu$ l)
- 2. 0.1mM + Water (50 $\mu$ l)
- 3. 0.05mM + Water (50 $\mu$ l)
- 4. 0.01mM + Water (50 $\mu$ l)
- 5. 0.005mM + Water (50 $\mu$ l)
- 6. Water (50 $\mu$ l)

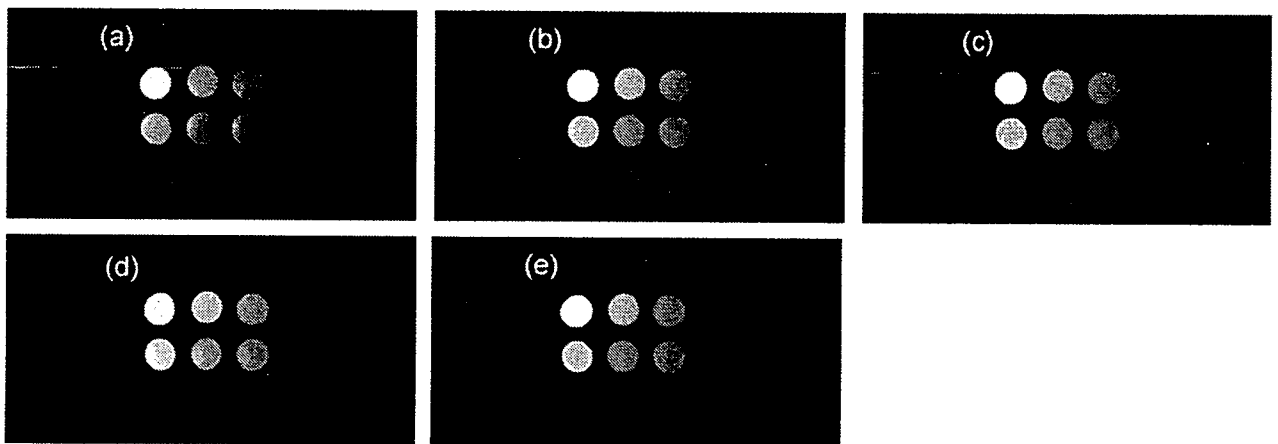


図 4. PEG-5000-DOTA-Gd水溶液を用いたMRIの $T_1$ 強調画像 (a) TR = 100 (b) TR = 300 (c) TR = 500 (d) TR = 800 and (e) TR = 1000

造影剤の濃度の上昇と共に、コントラストが強く見られた。また、コントロールと比較して、造影剤の濃度が0.05 mM以上の条件において、十分な造影効果があることがわかった。

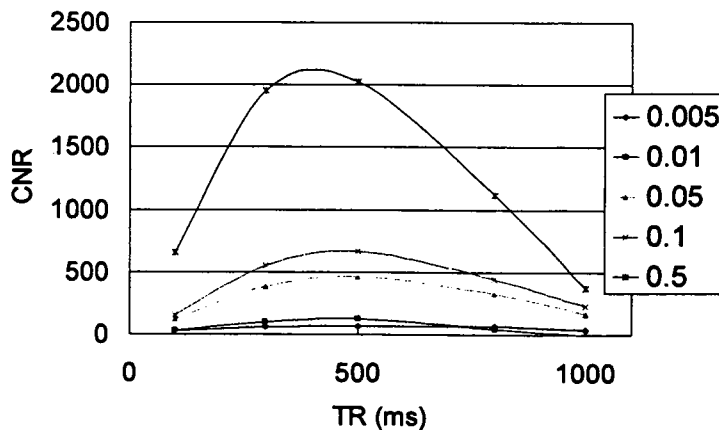


図 5. 様々な濃度のPEG-5000-DOTA-Gd水溶液におけるTRとCNRの関係

CNR=contrast to noise ratio (目的の輝度 / 水の輝度 / ノイズの輝度)

造影剤濃度により、CNR が大きく変化した。TR が400~500 msの条件下で最もコントラストが強く見られることがわかった。

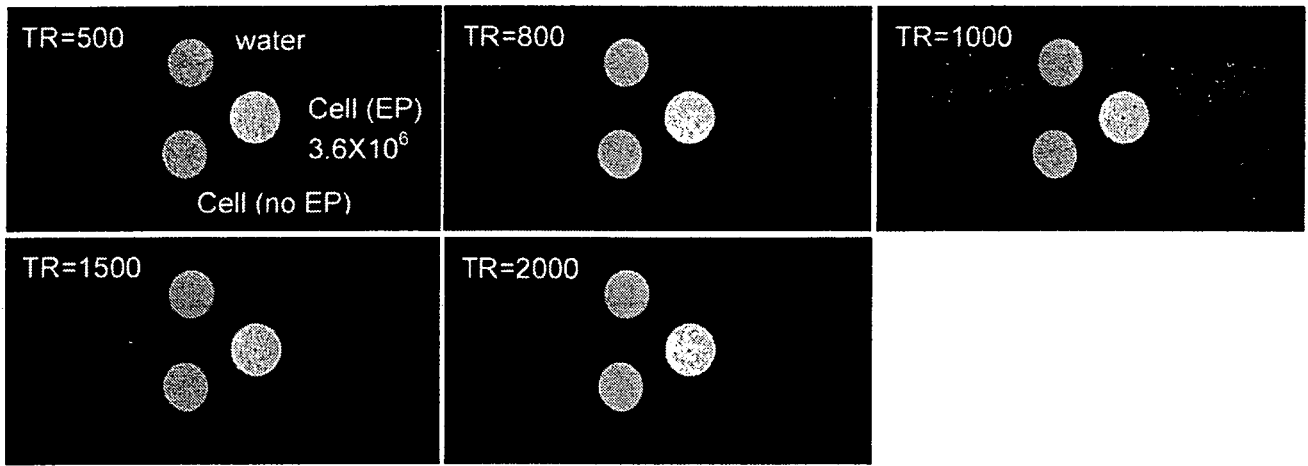


図 6. エレクトロポレーション後の細胞をMRIにより撮像したT1強調画像 (TR=500-2000 ms)  
細胞の存在するところにおいて、コントラストと比較して輝度の上昇が見られたことから、細胞をMRIで検出できた。

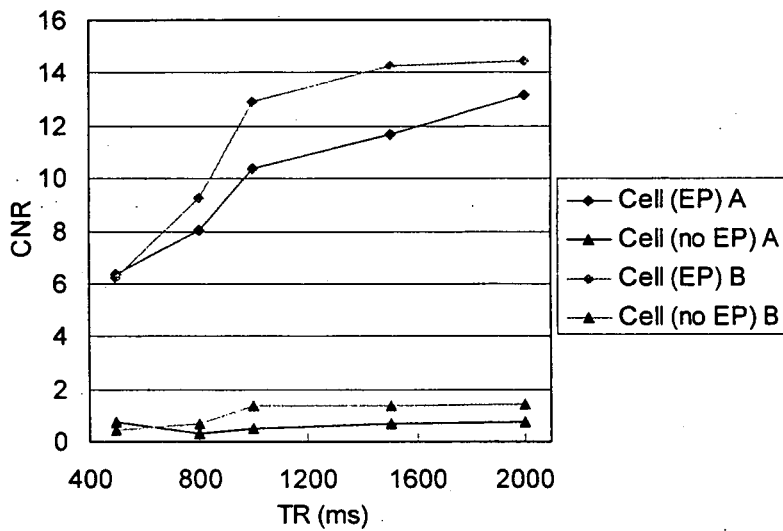
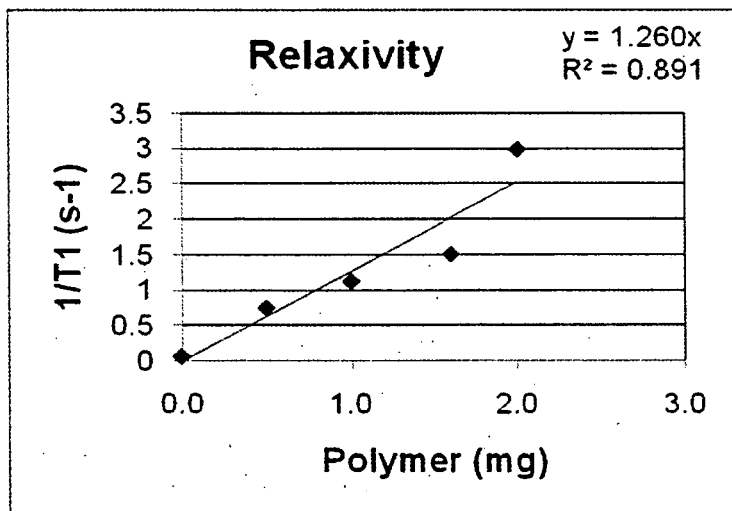


図 7. PEG-5000-DOTA-Gdを内包した細胞のMRI画像におけるTRとCNRの関係

CNR=contrast to noise ratio (目的の輝度-水の輝度 / ノイズの輝度)

PEG-5000-DOTA-Gd を内包した細胞では、CNR は大きな値を示した。PEG-5000-DOTA-Gd を内包していない細胞では、CNR は低い値であった。これより、細胞を十分に検出できることがわかった。



Polymer (mg)	T1 (s)	1/T1 (s <sup>-1</sup> )
0.0	15.64	0.063939
0.5	1.335	0.749064
1.0	0.894	1.118568
1.6	0.667	1.49925
2.0	0.336	2.97619

図 8. Dextran-DOTA-Gdの量に対して、1/T1をプロットした結果

ポリマーの量と1/T1は正比例の関係であったことから、得られたDextran-DOTA-Gdは造影剤として有用であることがわかった。

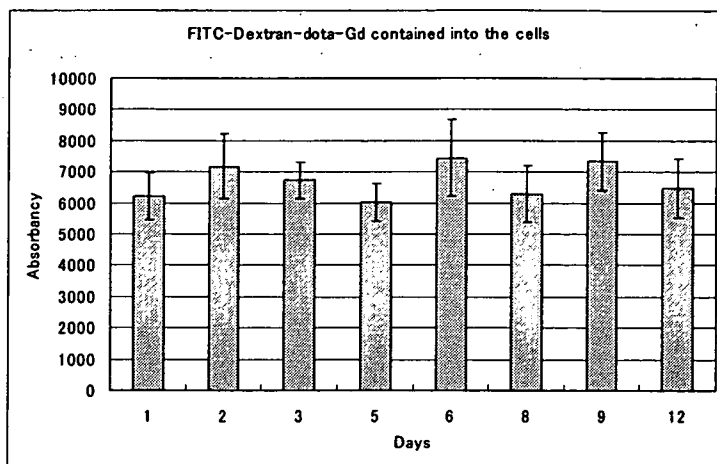


図 9. Dextran-DOTA-Gdの細胞内滞在性

日数が経過しても細胞内に内包されている造影剤の総量はほぼ一定であった。つまり、造影剤が細胞内に滞在していることを示す。

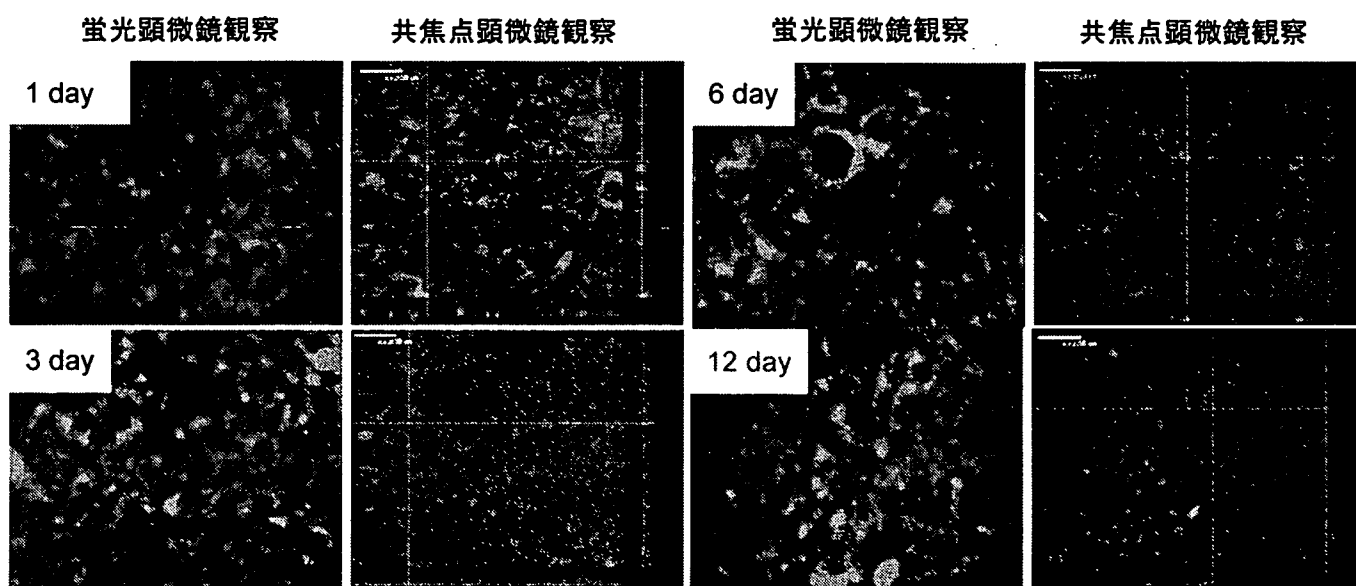


図 10. 蛍光、共焦点顕微鏡観察

蛍光及び共焦点顕微鏡観察により、細胞質に造影剤が導入されていることを確認した。ほとんど全ての細胞内に造影剤が導入されていた。また、日数が経過しても、細胞内に造影剤が滞在していることを確認した。

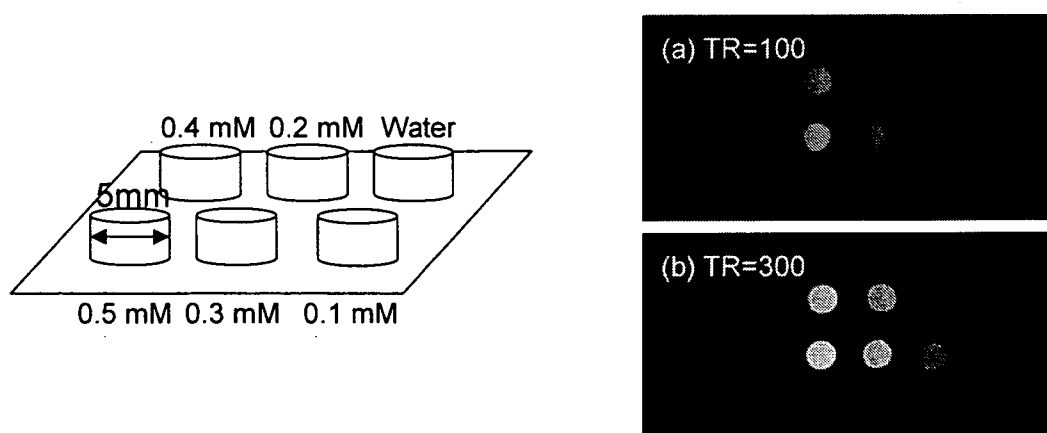
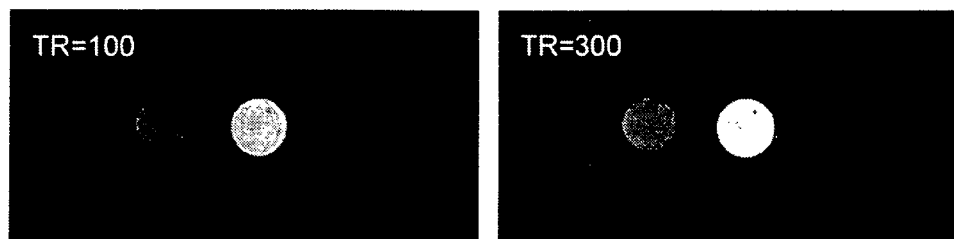


図 11. Dextran-DOTA-Gdの水溶液を用いたMRIのT1強調画像 (a) TR = 100 and (b) TR = 300

造影剤の濃度の上昇と共に、コントラストが強く見られた。また、コントロールと比較して、造影剤の濃度が0.2 mM以上の条件において、十分な造影効果があることがわかった。

(a) 造影剤を内包した細胞を封入したアガロースゲルの MRI 画像



(b) 得られたゲルをラットの皮下に埋入した後の MRI 画像

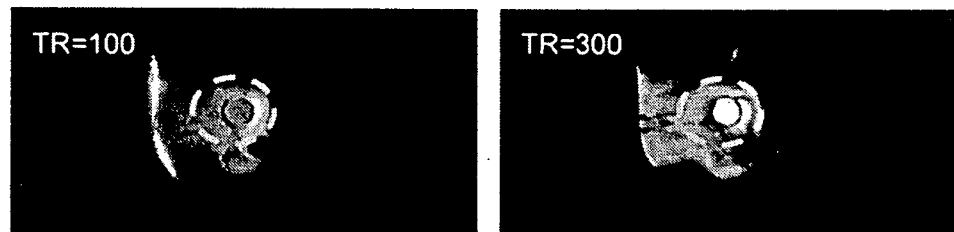


図 12. エレクトロポレーション後の細胞をin vitro (a) 及びin vivo (b) において撮像したT1強調画像 (TR=100, 300 ms)

in vitro及びin vivo条件下、細胞の存在するところにおいて、コントラストと比較して輝度の上昇が見られたことから、細胞をMRIで検出できたといえる。

## 日和見感染症治療ならびに遺伝子治療用ベクターとしての特性解析を目指したB群アデノウイルスの感染機構の解明

所 属 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  
研究者 櫻井 文教

近年、免疫不全状態においてB群アデノウイルス (Ad) 感染症が問題となっている。一方、B群Adは遺伝子導入ベクターの基本骨格としても注目されている。B群Adの感染機構は未だ不明であることから、本研究ではB群Adの感染機構を検討した。

### A. 研究目的

近年、骨髄移植や臓器移植の際の免疫抑制状態、および抗がん剤投与やヒト免疫不全ウイルス感染 (エイズ) により免疫力が減弱した状態において、B群に属するアデノウイルス (B群Ad) (3、7、11、35型など) による重篤な感染症が問題となっている。しかしながら、現在、B群Ad感染症に対する有効な治療薬は少なく、その予防・治療法の確立は極めて重要な課題である。一方、B群Adは遺伝子導入用ベクターの基本骨格としても大きな注目を集めている。B群Adは他群に属する多くのヒトAdが利用するCoxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)以外分子を受容体として認識するため、遺伝子導入用ベクターとして汎用されているC群5型Adベクターでは遺伝子導入不可能な細胞にも効率良く感染する。加えて、成人のB群Adに対する抗体の保持率が総じて低いことから、既存抗体による感染阻害も起こりにくい。しかしながら、B群Adの感染機構に関しては複数のB群Ad受容体が存在することが想定されているものの、その一つがCD46であることが報告された以外、ほとんど明らかになっていない。B群Ad感染症の予防・治療法の確立に向けて、またB群Adをベ-

スにした遺伝子治療用ベクターとしての特性解析に向けて、B群Adの感染機構の解明は極めて重要である。そこで本研究では、まず35型AdのペントンベースRGD (Arg-Gly-Asp) 配列の感染への関与について検討した。

### B. 研究方法

#### (1) ヒト白血病細胞株 K562 細胞の培養

ヒト白血病細胞株 K562 細胞は、10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養した。

#### (2) ペントンベース RGD 配列改変 35 型 Ad ベクタープラスミド (pAdMS19、-20) の作製

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した 35 型 Ad ベクタープラスミドである pAdMS19、および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シヤトルプラスミド pHM5.4 を *AscI*/*EcoRI* で処理したフラグメントと、同じく *AscI*/*EcoRI* で処理した 35 型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、*PmeI*/*AscI*/*NheI*/*Bst*1107I/*Csp*45I/*PacI*/*NotI* の

マルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *SphI/Csp45I* で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメント(35型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を *PvuII/PstI* 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近をコードした合成オリゴ DNA (5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAGAGATAATTTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3' , 5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTCCTCTCTCTGACTCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'、アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を *SphI* と *PvuII* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *I-CeuI/BlpI* 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後に、pFS4-Ad35-9 を *AscI/PacI* で切断したものと *Bst1107I* で消化した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。

尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAAATTTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3'

5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTCACCTCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'

### (3) 35 型アデノウイルスベクターの作製

Green fluorescence protein (GFP) 発現 35 型 Ad ベクターは以下のように作成した。pHMCAGFP を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントと、pAdMS18 を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 *SbfI* で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手) を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター Ad35RGEGFP および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクター Ad35ΔRGDGFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。Fig. 1 に本研究で用いた 35 型 Ad ベクターを示す。これらの 35 型 Ad ベクターの増幅および精製は常法に従って行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel の方法に従って測定した。

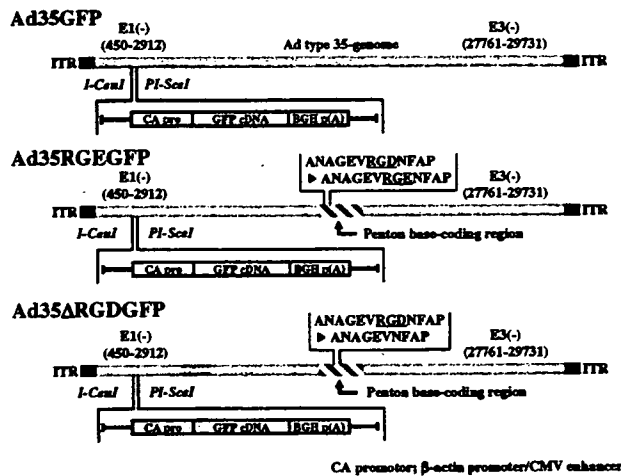


Fig. 1 Schematic diagram of adenovirus serotype 35 vectors used in this study.

#### (4) 各種インテグリンの発現解析

K562 細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手) および anti-rat IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗  $\alpha_v\beta_3$  (LM609)、抗  $\alpha_v\beta_5$  (P1F6)、抗  $\alpha_5$  (P1D6)、抗  $\beta_1$  (P4C10)、抗  $\beta_2$  インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗  $\alpha_4$  インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗  $\alpha_6$  インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

#### (5) 35 型 Ad ベクター感染における 2 価カチオンの影響

EDTA、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$  もしくは  $CaCl_2$  を含む Tris buffer に懸濁した K562 細胞を 96 穴プレートに

$1 \times 10^4$  cells/well で播種し、 $4^\circ C$ 、30 分間インキュベートした。その後、35 型 Ad ベクターを 1000 VP (vector particle)/cell となるよう加え、 $37^\circ C$  で 1.5 時間培養した。細胞を洗浄して 35 型ベクターを取り除いたのち、新鮮培地に懸濁し引き続き 48 時間培養し、GFP 発現量をフローサイトメーターにて測定した。

#### (6) RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

K562 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、 $4^\circ C$ 、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように添加し、 $4^\circ C$ 、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、 $37^\circ C$ 、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

#### (7) 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

K562 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、 $4^\circ C$ 、30 分間インキュベートした。次に、抗インテグリン抗体を  $50 \mu g/mL$  で添加し、 $4^\circ C$ 、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、 $37^\circ C$ 、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では動物およびヒト由来の生体試料を用いた実験は行わなかった。

#### C. 研究結果



まず初めに、K562 細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、 $\alpha_5$  および  $\beta_2$  インテグリンが 86 % 以上の細胞で発現していた (Fig. 2)。また、発現レベルはやや低いものの 20% の細胞で  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンが、17% の細胞で  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンが発現していた。

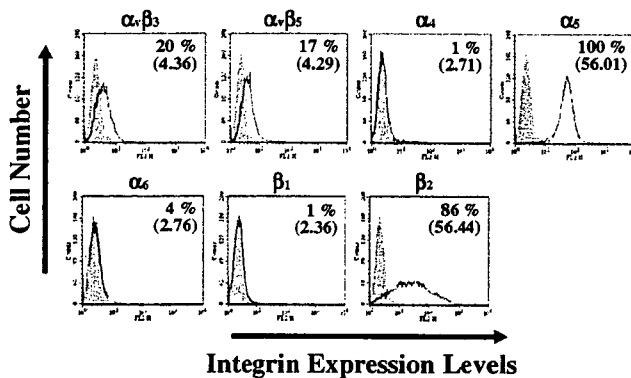


Fig. 2 Flow cytometric profiles of integrin expression on K562 cells. The cells were stained with anti-integrin antibodies, followed by a PE-labeled secondary antibody, and subsequently analyzed by a flow cytometer (thick line). As a negative control, the cells were incubated with isotype control antibody (shaded histogram). Percentage of positive cells is showed by number in upper right-hand corner of each profile.

次に、K562 細胞への 35 型 Ad ベクター感染におけるインテグリンの関与について検討するため、EDTA もしくは 2 価カチオン存在下における 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率について検討した。インテグリンと RGD 配列との結合には 2 価カチオンが必須であることが報告されている。まず EDTA 存在下においては GFP の発現が有意に低下し、5mM EDTA 存在下で約 80% GFP 発現量が減少した。一方、各種 2 価カチオンの影響については、 $Mg^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  ではほとんど GFP

発現量に変化は見られなかったが、 $Mn^{2+}$  存在化においては大きく GFP 発現細胞数が増加した (Fig. 3)。

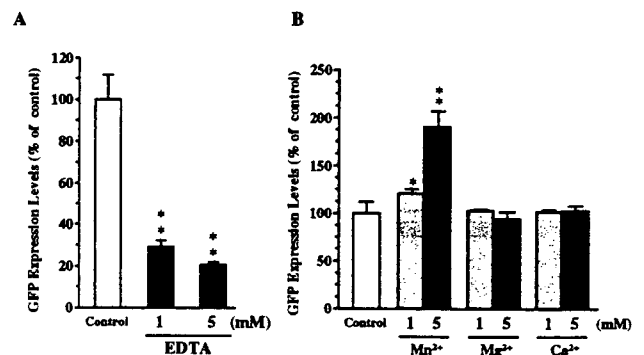


Fig. 3 Effects of divalent cations on Ad35 vector-mediated transduction. (A) Ad35GFP-mediated transduction in the presence of EDTA. (B) Ad35GFP-mediated transduction in the presence of  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , or  $Mn^{2+}$  ions.

さらに 35 型 Ad ペントンベース・RGD 配列の感染への関与について検討するために、RGD ペプチドによる 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、インテグリンに結合しない RGE ペプチド作用群と比較して、RGD ペプチド存在下では濃度依存的に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig. 4)。RGD ペプチド 1000  $\mu g/mL$  存在下で約 60% まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD 配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でも RGD 配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

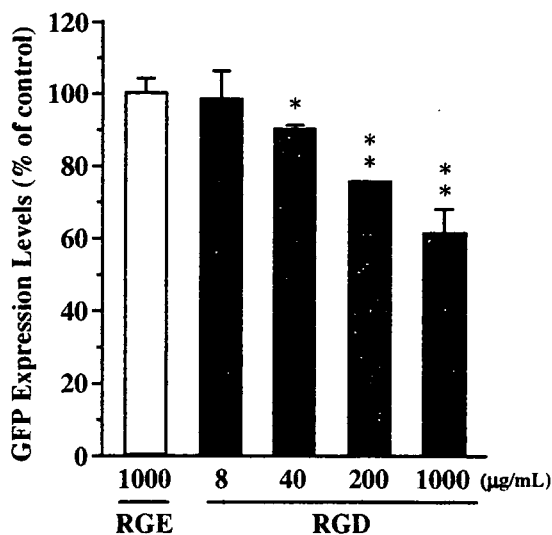


Fig. 4 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by synthetic RGD peptide in K562 cells. K562 cells were transduced with Ad35GFP at 1000 VP/cell for 1 hr.

さらにペントンベースの RGD 配列の関与について検討するため、35 型 Ad ベクターのペントンベースに存在する RGD モチーフを RGE に置換 (Ad35RGE-GFP)、または欠損 (Ad35 $\Delta$ RGD-GFP) させた 35 型 Ad ベクターを作製し、通常の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGE-GFP および Ad35 $\Delta$ RGD-GFP のいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれ Ad35GFP の約 70% まで遺伝子発現量が低下した (Fig. 5)。従って、前節の RGD ペプチドを用いた 35 型 Ad ベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にペントンベース・RGD 配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

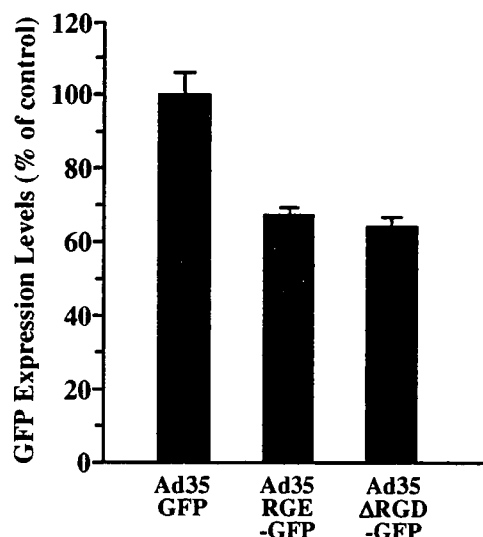


Fig. 5 Effects of modification of penton RGD motifs on transduction efficiencies of Ad35 vectors. K562 cells were transduced with Ad35GFP, Ad35RGE-GFP, or Ad35 $\Delta$ RGD-GFP at 3000 VP/cell for 1.5 hr.

さらに 35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、 $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , および  $\alpha_4$  インテグリンに対する抗体存在下で有意に遺伝子導入効率が低下した (Fig. 6)。また K562 細胞では  $\alpha_5$  もしくは  $\alpha_6$  インテグリンの発現は確認できなかったものの、両インテグリンに対する抗体存在下において有意な遺伝子発現の減少が観察された。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入に上記インテグリンが関与していることが示された。

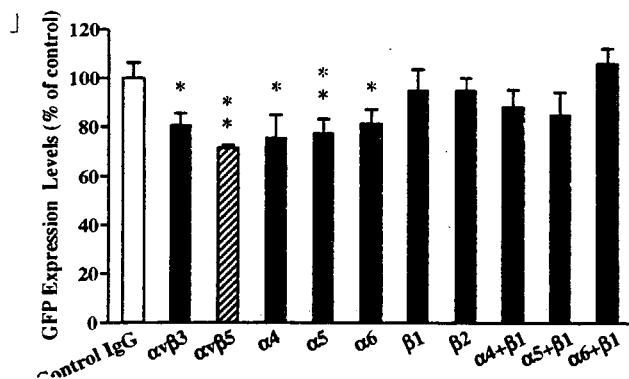


Fig. 6 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by monoclonal anti-integrin antibodies. K562 cells were preincubated with each antibody at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1 h at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and then added 3000 VP/cells of Ad35GFP. The cells were incubated at 3 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

#### D. 考察

35 型 Ad による感染症の解明、また、より高性能なベクター開発に向けては、35 型 Ad の感染機構の解明が必要不可欠である。従来より遺伝子導入ベクターとして汎用されている 5 型 Ad は、まず①ファイバーノブが第一受容体である coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) に結合した後、②ペントンベース・RGD 配列が $\alpha_v$ インテグリンに結合することにより内在化を受け、感染にいたる。一方で、①subgroup B に属する 35 型 Ad のペントンベースにも RGD 配列が存在する、②subgroup B Ad の受容体である CD46 が細胞膜上で一部のインテグリンと会合していることから、ペントンベース・RGD 配列とインテグリンとの結合が 35 型 Ad 感染にも何らかの役割を果たしていることが推察される。そこで本研究では、35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入におけるインテグリンの関与について検討を行い、35 型 Ad ベクターのペントンベース RGD 配列が感染過程に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究において、2価カチオンのキレートや RGD ペプチド、ペントンベース・RGD 配列の改変により、35 型 Ad ベクターのペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合を阻害することで有意に遺伝子発現効率が減少したことから、ペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合が感染過程に重要な役割を果たしていることが示された。ペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合が感染過程のどのステップに関与しているかは不明であるが、5 型 Ad の場合、RGD 配列が $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合することにより、ウイルス粒子がエンドソームから脱出するのを促進することが報告されている。従って 35 型 Ad においても、細胞表面への吸着や細胞内への取り込みのみならず、細胞内に取り込まれた後にエンドソーム膜を破壊し細胞質へ脱出する過程にもインテグリンとの結合が関与しているのではないかと考えられる。しかし 35 型 Ad にとってインテグリンはあくまでも第二受容体であり、その感染には CD46 が必須であると思われる。我々は 35 型 Ad ベクターを、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを発現しているが CD46 を発現していないマウス黒色腫由来 B16 細胞に作用させたが、ほとんど遺伝子発現は得られなかった (data not shown)。

Shayakhmetov らは、5 型 Ad ベクターのノブを 35 型 Ad のノブに置換し、さらにペントンベース・RGD 配列を欠損させた Ad ベクターを作製し、遺伝子導入効率を検討している。従来の 5 型 Ad ベクターの場合、ペントンベース RGD 配列の欠損により遺伝子導入効率に変化は認められなかったが、35 型ファイバーノブを有する 5 型 Ad ベクターでは RGD 配列の改変により有意に遺伝子導入効率が低下したと報告している。今回の検討においても、35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列を改変させることにより有意に遺伝子発現

が減少していることから、35 型 Ad 感染におけるペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合の寄与は 5 型 Ad ベクターより大きいと言える。つまり、第一受容体として何を認識するかによってインテグリンの寄与の程度が異なっているものと思われる。

どの受容体に結合するかによりウイルスの細胞内輸送機構も異なってくると予想される。5 型 Ad ベクターの場合、CAR と結合した後、RGD 配列とインテグリンとの結合により phosphatidylinositol-3-kinase が活性化され、アクチンの重合が促進されることによりクラスリン被覆小胞が形成され、内在化を受ける。35 型 Ad がクラスリン依存的経路により内在化されるかどうかは不明であるが、Crismeen-Irwin らは、CD46 を受容体とする麻疹ウイルスが CD46 との結合を介してマクロピノサイトーシスにより取り込まれることを報告している。35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターの細胞内取り込みとは異なり、マクロピノサイトーシスにより取り込まれているのかも知れない。35 型 Ad がどのような内在化機構により細胞内に侵入しているかは更なる検討が必要である。

RGD ペプチドと RGD 配列を認識するインテグリンとの親和性は RGD に続く 4 番目のアミノ酸に影響を受けること、35 型 Ad ベクターのペントンベースに含まれる RGDN (N=Asn) 配列は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとの親和力が強いという報告がある。従って当初 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入に関与するインテグリンは $\alpha_5\beta_1$ ではないかと推察していた。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは 5 型 Ad の細胞表面への結合にも関与することが報告されている。K562 細胞において $\beta_1$ インテグリンはほとんど発現していなかったが、 $\alpha_5$ インテグリンは高発現しており、また抗 $\alpha_5$ インテグリン抗体により約 20%の遺伝子

発現阻害が認められた。一方で、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの発現は約 17%と低かったものの、抗 $\alpha_v\beta_5$ インテグリン抗体存在下では約 30%と用いた抗インテグリン抗体のなかで最も高い阻害効果を示した。K562 細胞では 1 種類のインテグリンではなく、RGD 配列を認識する様々なインテグリンが寄与しているものと思われる。

## E. 結論

35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入において、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、および $\alpha_5$ インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murakami S, Sakurai F, Okada N, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mizuguchi H. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Ther.* 14:1525-33 (2007)
2. Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr Gene Ther.* 7:229-38 (2007)

### 2. 学会発表

1. 櫻井文教、村上さや香、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之。35 型アデノウイルスベクター感染におけるインテグリンの関与。第 7 回遺伝子・デリバリー研究会、東京、2007 年 5 月
2. Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Naoki Okada, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Takao Hayakawa,