

高磁場 MRI を用いた癌微小病変高感度検出システムの開発
「単クローン抗体・磁性体ナノ粒子を用いた高磁場 MRI による癌微小病変の画像化」

分担研究者 青木伊知男 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究要旨 MRI による微小癌診断・治療システムの改善を図るため、優れた磁性体ナノ粒子あるいはナノキャリアを検討し、7 テスラ高磁場 MRI により画像診断における特異性、解像度及び感度の改善を図る。昨年度、皮下移植腫瘍への集積と放出の可視化に成功した。本年度は、膵臓癌への適用を行う前段階として、体幹深部における腫瘍モデルとして、「背筋内への移植腫瘍モデル」および「腹膜播種モデル」について、*in vivo* での集積の観察と加温による薬剤放出の可視化を試みた。皮下移植モデルに比べて、やや集積性が低下するものの、両モデル共に、リボソームの集積が観察された。また、背筋内移植モデルでは全身加温による信号上昇が観察された。一方、腹膜播種モデルでは、全身状態が悪化しており、加温後に死亡する例が多かった。問題点として、消化管に排出されるリボソームを濃度が上昇する前に速やかに除去する必要があると考えられた。

A. 研究目的

本プロジェクトでは将来の先端医療の実現に向け、2つのシステムを実現する。即ち、「単クローン抗体・磁性体ナノ粒子と高磁場 MRI による微小病変の高解像度画像化」および「感温性リボソームによる局所 DDS の臨床応用に向けた基盤整備」である。本分担では、主に後者を担当した。本年度は、感温性リボソームを使用し、体幹深部に存在するマウス腫瘍モデルとして、腹膜播種性モデルと背筋内移植モデルの2つについて、呼吸同期法や MRI 撮像方法の最適化、腫瘍への集積の可視化を行うことを目的とした。また薬剤放出の為の深部腫瘍の加温方法について、到達温度、安全性や生理状態への影響、薬剤放出の程度などを検討した。

B. 研究方法

昨年度までに温度により疎水性に変化するポリマーを含んだリボソーム（以下、感温性リボソーム）を作成、抗癌剤アドリアマイシン、MRI 造影剤であるマンガン、および蛍光色素ローダミンを内包し、PEG により血中滞留性を延長させた新規造影剤を開発した。本年度は、体内での安定性を向上させるために、MRI 造影剤の濃度を調整した複数のタイプを製作し、放出温度と放出濃度の関係を最適化した。7 テスラ水平型 MRI (JASTEC, Bruker 社製) を用い、マウスの体幹部専用送受信 RF コイルを開発し、マンガン造影剤に最適化されたパルスシーケンスを使用した。1) サンプル計測：新規造影剤の緩和時間を、蒸留水、室温、温度を変化させて加温したもので比較した。2) 動物実験 1（腹膜播種モデル）：

BALB/c nude 担癌マウスに colon-26 細胞株を 1.0×10^6 個/100 μ l 腹腔内投与し、7-10 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与前および IV 投与後撮像 1 時間後まで、連続して T_1 強調 MRI を撮像した。また、投与 8 時間後に 42.5°C 加温の前後に MRI を撮像した。

3) 動物実験 2（背筋移植モデル）BALB/c nude を開腹し、腹膜に近い位置の背筋内に開腹し、背筋部に colon-26 細胞株 $1.0 \times 10^5/10 \mu\text{l} \times 2$ 箇所もしくは、背中側から背筋に $1.0 \times 10^5/20 \mu\text{l} \times 2$ 箇所投与し、7-10 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与前および IV 投与後撮像 1 時間後まで、連続して T_1 強調 MRI を撮像した。また、投与 8 時間後に 42.5°C 加温の前後に MRI を撮像した。

（倫理面への配慮）全ての実験は、放射線医学総合研究所が定める実験倫理委員会の承認を受け、動物に苦痛が生じないように麻酔下にて実施した。

C. 研究成果

1) サンプル計測：濃度を調整した新規造影剤の緩和時間は、 41°C を境に急激に短縮し、 42°C 5 分加温で十分な緩和能を示した。2) 動物実験 1（腹膜播種モデル）：BALB/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与前と比較し、 T_1 強調 MRI の信号強度は、投与後に上昇し、腹膜播種性腫瘍への集積性が *in vivo* で観察可能であることが示された。300 MHz の高周波パルスの連続照射によって、麻酔下にて直腸温を 42.5°C まで加温することができたが、加温後、大半の実験動物が死亡した。また、加温後に消化管などにおいて MRI 信号変化が観察されたものの、腫瘍部では明確には観察さ

れなかった。3) BALB/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与前と比較し、T₁強調 MRI の信号強度は、投与後に上昇し、深部に存在する背筋移植腫瘍への集積性が *in vivo* で観察可能であることが示された。300 MHz の高周波パルスの連続照射によって、麻酔下にて直腸温を 42.5℃まで加温することが可能であり、全身状態は大半の実験動物で良好であった。また、加温後に腫瘍部において、僅かではあるが MRI 信号強度の変化が観察され、薬剤の放出が示唆された。

D. 考察

本研究のために開発した感温性リポソームは、当初、MRI による追跡や集積の変化については十分な信号強度は期待できず、むしろ加温後の放出マーカーとしての役割を想定していた。しかし、本研究を推進する過程で、本感温性リポソームは、投与後の動態や腫瘍への集積を十分に可視化できる事が判明した。基礎的な検討の結果、リポソーム表面において若干の水と造影剤の交換が生じ、その結果、薬剤放出を生じないリポソームそのものに造影能が付与されているものと推測される。この結果、放出前後のコントラスト比が若干低下するものの、1) 放出前の動態が MRI で非侵襲的に追跡可能で、なおかつ 2) 薬剤放出後に信号がさらに変化する、という性質を持つ複合治療造影と位置づけられる。

膵臓癌は深部に存在する腫瘍であり、加温トリガーによる薬剤放出を行い、イメージングするためには、1) 深部腫瘍の加温、2) 深部腫瘍への集積と可視化の2点を解決する必要がある。播種性モデルの場合は、深部に多数の腫瘍が存在し、腹水の貯留も多いことから、全身を 42.5℃以上に加温する必要があり、その結果、予後は不良であった。健常動物では死亡しなかった事から、1) 腹膜播種モデルの全身状態が悪化していた、2) 腹水によって冷却が行われた結果として加温が過重となった等の理由が推測される。一方、深部の背筋に腫瘍細胞株を移植したモデルでは、加温後、深刻な全身状態の悪化は無く、腫瘍への感温性リポソームの集積、および加温による薬剤放出が観察可能であったことから、本手法は膵臓腫瘍に対しても有望であることが示唆された。

E. 結論

高精度な温度感受性を持つリポソームを使用して、MRI と蛍光の両方のモダリティで使用可能な複合造影剤の作成および動物実験における DDS の可視化に関する有用性が示された。この造影剤は、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受性による薬剤放出という5つの機能を併せ持ち、その過程が全て可視化可能な点に大きな特長を持つ。今後の改良点として、より大きな信号変化を検出するための薬剤と撮像法の改良、より特異性が高い腫瘍への標的化、より侵襲性の低い加温方法、リポソーム濃度の安定化と造影能の最大化を検討する。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto KI, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl Radicals for Labeling of Conventional Therapeutics and Noninvasive Magnetic Resonance Imaging of Their Permeability for Blood-Brain Barrier: Relationship between Structure, Blood Clearance, and MRI Signal Dynamic in the Brain. *Mol Pharm.* 2009 Feb 10.
2. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics. *Chem Commun (Camb).* 2009 Jan 7;(1):53-5. Epub 2008 Nov 13.
3. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Masamoto K, Mileva M, Obata T, Higuchi M, Gadjeva V, Kanno I. Multimodal silica-shelled quantum dots: direct intracellular delivery, photosensitization, toxic, and microcirculation effects. *Bioconjug Chem.* 2008 Jun;19(6):1135-42. Epub 2008 May 22.
4. Winn Aung, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa, Takayuki Obata, Hiroo Ikehira, Takako Furukawa, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. Visualization of *in vivo* electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy* 2009 (in press)

2. 学会発表

1. Aoki I, Yoneyama M, Hirose J, Minemoto Y, Koyama T, Aoshima S, Kershaw J, Kono K, Ishizaka Y, Kanno I. Thermosensitive Polymer-Modified Liposome as a Multimodal and Multifunctional Carrier for MRI and Optical Imaging: Tumor Detection, Visualization of Triggered Drug Release, and Chemotherapy. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting and Exhibition, 2008; 16: 796.*

2. Ichio Aoki, Misao Yoneyama, Jun Hirose, Yuzuru Minemoto, Takayoshi Koyama, Sadahito Aoshima, Jeff Kershaw, Kenji Kono, Yukihito Ishizaka, Iwao Kanno. Development of Multimodal Thermosensitive Polymer-Modified Liposome (MTPL) as a Carrier for MRI and Optical Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1569, Nice, France, 10 - 13 September 2008
3. Winn Aung, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa, Takayuki Obata, Hiroo Ikehira, Takako Furukawa, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. In Vivo Optical and Magnetic Resonance Imaging of Electroporation-Mediated Transgene Expression in Experimental Tumors. 2008 World Molecular Imaging Congress, 698, Nice, France, 10 - 13 September 2008
4. Kenichi Odaka, Ichio Aoki, Junji Moriya, Kaoru Tateno, Hiroyuki Tadokoro, Tohru Minamino, Toshiaki Irie, Issei Komuro, Kanno Iwao. In-Vivo Application of Manganese-Labeled Immunocytes. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1034, Nice, France, 10 - 13 September 2008
5. Michiko Koshikawa, Sumitaka Hasegawa, Isao Takahashi, Misao Hachiya, Takako Furukawa, Makoto Akashi, Satoshi Yoshida, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. Exploring Molecular Targets for Mesothelioma Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1141, Nice, France, 10 - 13 September 2008
6. Joonas A. Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Compartmentalized Diffusion-Weighted Fmri Signal in Alpha-Chloralose Anesthetized Rat Somatosensory Cortex at 7 T. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1918, Nice, France, 10 - 13 September 2008
7. Zhivko Zhelev, Bakalova Rumiana, Aoki Ichio, Gadjeva Veselina, Kanno Iwao. Quantum Dots in Multimodal Imaging: Probe Design, Spectral Characteristics, and Application, 2008 World Molecular Imaging Congress, 1595, Nice, France, 10 - 13 September 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願 無

膵臓癌に対する高性能標的化抗体の作製の基盤研究

分担研究者 濱田洋文 札幌医科大学医学部 分子医学研究部門

研究要旨 平成19年度より継続して、温感性リポソーム複合体の腫瘍標的ピンポイントDDS開発に必要な高性能標的化抗体(STAAB: Super-targeting antibody)の作製を新規に開発したスクリーニング方法を用いている。ファイバー改変アデノウイルスを用いた本スクリーニング法で樹立できる抗体は腫瘍細胞の細胞表面分子に対して高結合能・特異性を有することがこれまでの研究成果より明らかになっており、ヒト膵臓癌細胞(PK-1, AsPC1)等を免疫原として標的化抗体を作製してきた。これまでに膵臓癌に選択的に反応する抗体S11の認識抗原として新規膵臓癌・前立腺抗原 PAP2a の同定に成功し本プロジェクトへの共同研究を展開している。さらに本年度は、PK-1, AsPC1 を免疫してスクリーニングを行って得られた抗体の抗原同定を引き続き行い、また新たにヒト膵臓癌細胞(KCI-MOHI)を免疫に使用し、膵臓癌への高性能標的化抗体のスクリーニングを行った。結果、多くの種類の癌組織で強反応性を示す抗体の樹立および認識抗原同定まで成功した。これら得られた抗体の中にはラットに反応性のある抗体が含まれていた。以上の結果は本システムが有用であることを示唆しており、今後診断が困難な膵臓癌の検出および治療への応用研究が次年度以降期待される。

A. 研究目的

本研究は、膵臓癌に対する新しい標的抗原同定とその抗体を作製し、これを高磁場MRI検出システムのプローブへ応用することで効果の高い診断法・治療法を開発する事を目的とする。 私たちが開発した Adv-FZ33 と膵臓癌細胞株に対する抗体のライブラリーと組み合わせたスクリーニング法は従来腫瘍マーカー探索（マイクロアレイ解析、プロテオミクス解析など）と異なり抗原同定と同時に細胞表面を認識する高性能な抗体を得ることが効率よく出来、抗原同定から診断などへの応用に迅速に利用できる。また得られた抗体にはでラットへの反応性を持つ抗体も含まれており、これらの抗体はラット膵臓癌モデルに用いての検討を行うことが出来る。

B. 研究方法

ヒト膵臓癌（膵臓癌・前立腺癌等）の標的化抗体のスクリーニング法として従来の蛍光抗体法(FACS)やELISA法よりも高感度かつ高性能抗体を選別しやすい手法を用いた。アデノウイルスベクターのファイバー部にIgGのFc結合 Z33 モチーフ (FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSI RDD)を含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製した。このファイバーZ33変異型アデノウイルスは細胞表面抗原に対する抗体依存的に細胞内に感染することが可能で、

従来の蛍光抗体法やELISA法よりも抗体の性能の差異を明確にすることができる。そこで、がん細胞表面抗原と結合する標的化抗体依存的に癌細胞に遺伝子導入効率を高めることができる抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリー（免疫細胞としてヒト膵臓癌細胞株 PK-1, AsPC1, KCI-MOHI を使用した。）をスクリーニングした。Adv-FZ33 で陽性ウェルをスクリーニング後、限界希釈法によりモノクローナル抗体を数種類樹立した。



C. 研究成果

ヒト膵臓癌細胞に対する遺伝子導入効率を高める抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーをスクリーニングした。その結果、昨年度に引き続き今年度も膵臓癌細胞を始めとして多くの固形がん細胞を標的化できるモノクローナル抗体の樹立に成功した。

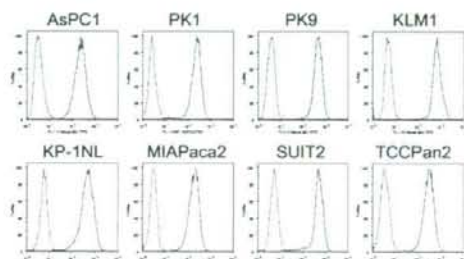
A) 膵臓癌・肺癌・前立腺癌等の癌細胞に反応性を示す抗体 5 個 H230, E7311, B2011, I11,

F4311 (いずれも mouse IgG1 kappa) を樹立した。これらの抗体は CD273 (B7H3) 特異的に認識する。CD276 は I 型の膜貫通型糖タンパク質で、V 様 I g ドメインと C 様 I g ドメインより構成されるが、2 つの I g ドメインを持つ分子と、4 つの I g ドメインよりなるバリエーションが存在する。多種の癌組織で高発現している、以下のことが知られている。

- ・ 前立腺癌組織で CD276 発現強陽性の癌は進行性で予後不良。
- ・ 癌に対する NK 細胞の細胞障害性を CD276 発現が抑制する。
- ・ 癌性血管内皮細胞で特異的に発現している

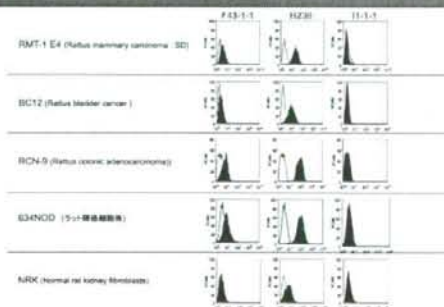
ヒト膵臓癌細胞株 8 種における CD276 の発現を得られた抗 CD276 抗体で染色し、フローサイトにて検討した。結果、8 種類の膵臓癌細胞株で発現していることがわかった。

ヒト膵臓癌細胞株における CD276 の発現



また今回樹立に成功した抗ヒト CD276 抗体のうち F4311 と H230 でラット癌細胞との交差反応性があることがわかった。

ラット各種癌細胞と抗ヒト CD276 交差反応性抗体



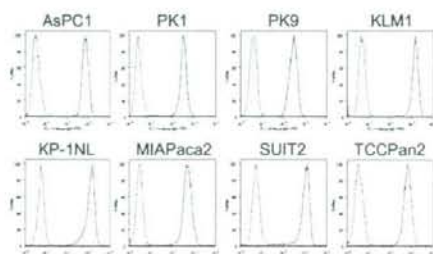
B) 膵臓癌・肺癌・前立腺癌等の癌細胞に反応性を示す抗体 5 個 N181, SHM16, SHM17,

SHM20, SHM21 (いずれも mouse IgG1 kappa) を樹立した。これらの抗体は EphA2 特異的に認識する。EphA2 は Ephrin receptor superfamily はレセプター型のチロシンキナーゼ分子で I 型の膜貫通型糖タンパク構造をとる。類似の構造・機能を有するバリエーションとして EphA1 ~ EphA8 が存在する。さらに EphB1 ~ EphB5 も存在しており、それぞれ発現細胞が異なる。EphrinA リガンドが EphA1-8、EphrinB リガンドが EphB1-5 でそれぞれ相溶性が高い。機能はリガンドと結合することにより EphA 受容体のチロシン残基がリン酸化され、その結果 Ras_ERK シグナルを抑制することが知られている。主に神経の発生、血管新生に関与している。癌細胞・組織で強発現では乳癌・前立腺癌・食道癌・大腸癌で報告がある。癌との関連では以下の報告がある。

- ・ 食道癌組織で EphA2 発現強陽性の癌は進行性で予後不良。
- ・ 高発現により癌原性が亢進する。
- ・ 大腸癌で EphA2 の高発現と肝転移・リンパ節転移に正の相関あり。
- ・ EphA2 を knock down させると腫瘍内血管密度が低下

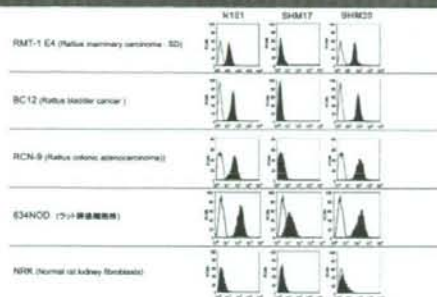
ヒト膵臓癌細胞株 8 種における EphA2 の発現をえられた抗 EphA2 抗体で染色し、フローサイトにて検討した。結果、8 種類の膵臓癌細胞株で発現していることがわかった。

ヒト膵臓癌細胞株における EphA2 の発現



また今回樹立に成功した抗ヒト EphA2 抗体 5 個のうち 2 個 N181, SHM20 のモノクローナ抗体でラット癌細胞との交差反応性があることがわかった。

ラット各種癌細胞と抗ヒトEphA2交差反応性抗体



D. 考察

私達はファイバー-Z33型アデノウイルスを用いたスクリーニング系が高性能抗体を樹立する上で有用であることを明らかにしてきた。このシステムを用いて難治性癌である膵臓癌・前立腺癌に対する抗体を数種類樹立し、認識抗原を明らかにしてきた。今回、樹立した抗CD276抗体(5個)と抗EphA2抗体(5個)は多くの癌での高発現しており、代表的な膵臓癌細胞株8種においてすべて発現が見られた。現在までのところ、癌細胞での反応性を確認しているだけであり、得られた抗体での正常細胞との反応性を検討する必要がある。また、得られた抗体の中でラットに反応性を示すモノクローナル抗体が含まれているので今後、抗体を投与した場合の副作用などの影響や、分子イメージングへの適応を考慮し、担癌ラットモデルでの抗体の集積性や抗腫瘍効果を解析、さらに温感性リポソームへの結合を行い、より特異性・集積性そして診断・治療効果の高いピンポイントDDSの開発を次年度以降に目指す予定である。

E. 結論

膵臓癌を始めとした難治性腺癌に対する高性能標的化抗体の樹立に成功した。標的抗原としては、膵臓を含む腺癌で高発現しているCD276(B7-H3)とEphA2だった。各抗原でラット癌細胞との交差反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることがわかった。これらの抗体を使用して、ラット膵臓癌モデルなど *in vivo*での検討を進めることが可能であり、本研究の最終目標である感温性リポソームの生体内標的化にこれらの抗体が応用できるかを次年度以降検

討し、より感受性の高いプローブを作製する。

F. 健康危険情報 ファイバー改変アデノウイルスベクターを本研究で用いているが、使用・管理とも指定の施設内で行い、汚染・持ち出し等の問題もなく、順調に研究が施行できている。またヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては、倫理面に配慮した実施計画書・説明同意書などを作製し、すでに、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会でも許可を受けている。研究課題「新規標的化抗体による癌の診断・治療法の開発」、許可番号第217-3号、平成18年2月10日付け。以上のように健康危機情報としては特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishii, K., Nakamura, K., Kawaguchi, S., Li, R., Hirai, S., Sakuragi, N., Wada, T., Kato, K., Yamashita T. and Hamada, H. Selective gene transfer into neurons via Na, K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adovirus. *J. Gene Med.*, 10(6):597-609. 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得 無
- 実用新案登録 無
- 出願

公開番号: WO2006/123829
 国際出願番号: PCT/JP2006/310406
 発明の名称: PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的応用
 発明者: 濱田洋文、加藤和則、中村公則
 出願日: 2006. 5. 17

出願番号: 特願2007-147478
 発明の名称: IL-13Ra2 に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬
 発明者: 濱田洋文、加藤和則、中村公則
 出願日: 2007. 6. 1

膵臓癌発がんモデルの作成と MRI 画像診断

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所

研究要旨 新規の膵臓癌特異的な標的分子を探索する目的で、ヒト膵臓癌細胞株を用いて miRNA の機能的スクリーニングを行っている。膵臓癌細胞株に、miRNA のレンチウイルス発現ライブラリーを組み込み、細胞増殖に抑制効果を持つ miRNA の探索を行っている。選択した miRNA の標的遺伝子を同定し、ハムスター膵臓発癌モデルや、変異型 K-ras Tg ラットモデルで誘発される膵臓微小病変や膵臓組織での蛋白質の発現を検討し、膵臓癌特異的な標的分子を同定する予定である。

A. 研究目的

発がん要因への曝露からがん発生にいたるまでの多段階的な過程が詳細に解析されているハムスター及びラットの膵臓癌モデルを用いて、早期微小病変の非侵襲的な診断や治療システムを構築することを目的とする。膵臓癌微小病変を検出するために、膵癌特異的な単クローン抗体を磁性体ナノ粒子と結合させ、MRI による膵癌微小病変の検出を、N-nitrosobis-(2-oxopropyl)amine (BOP)誘発ハムスター膵癌や変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵癌を用いて検証する。

更に、より特異性の高い新規膵臓癌標的分子の同定のために 2 つの手法を試みる。一つは、ヒト膵臓癌細胞株を用いて、miRNA のレンチウイルス発現ライブラリーを組み込み、機能的スクリーニングにより細胞増殖の抑制に関与する miRNA を同定し、その標的となる mRNA を探索する。

二つめとして、変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵癌を用いて mRNA や miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行なう。mRNA の網羅的遺伝子発現解析では、膵癌で発現上昇しているものを、miRNA の解析では発現減少している miRNA の探索及びその標的分子の解析から、膵癌特異的に発現している mRNA を探索する。これら新規膵臓癌標的分子の候補に関し、動物モデルを用いて膵癌微小病変や膵臓組織における発現を解析する。

B. 研究方法

a. ヒト膵臓癌細胞株による miRNA の機能的スクリーニング

ヒト膵臓癌細胞株 (MIA PaCa-2, Bx PC3) に、miRNA 前駆体を発現するレンチウイルス発現ライブラリー (miRNA 約 450 種) を感染させ、一定期間継代する。レンチウイルスにより膵臓癌細胞株ゲノムに組み込まれ、プロセシングされた成熟 miRNA による細胞増殖の抑制効果の解析を行ない、膵癌細胞株の増殖に抑制的に関与する miRNA を探索した。

レンチウイルスにより膵臓癌細胞株ゲノム

に組み込まれ、安定に発現させた miRNA の膵臓癌細胞株の増殖抑制効果を、*in vitro* で合成された成熟 miRNA 様分子を一時的に細胞株へ導入して同様の効果がみられるかどうかを解析することにより検証する。

C. 研究成果

a. ヒト膵臓癌細胞株による miRNA の機能的スクリーニング

ヒト膵臓癌細胞株 (MIA PaCa-2, Bx PC3) に、miRNA 前駆体を発現するレンチウイルスベクターのライブラリーを感染させた。約 3 日ごとに細胞の 1/8 を用いて継代を行ない、残りの細胞で増殖抑制効果を有する miRNA の機能的スクリーニングを行っている。感染後、最初の継代時の細胞 (3 日後) を基準値として継代 5 及び 9 回目の時点で解析を行なう予定である。

ヒト大腸癌細胞株 (HCT116) において増殖抑制効果が認められた、miR-34a は、ヌードマウス移植大腸癌細胞株に関して増殖抑制効果を示すことを既に報告している (Tazawa et al., PNAS, 104, 15472-15477, 2007)。また、miR-34a の発現は、ヒト膵臓癌細胞株で高頻度に減少していることも報告されている (Chang TC et al., Molecular Cell, 26:745-752, 2007)。今回、合成された成熟 miR-34a を一過性に膵臓癌細胞株へ導入した結果、細胞増殖の抑制効果を示した。従って、miR-34a の標的 mRNA である E2F-3 や CDK4 などは膵癌で発現が上昇していることが推測される。これらの遺伝子の発現を膵癌細胞で確認し、マーカーとして利用可能であるかどうかを検討する。

D. 考察

ヒト大腸癌細胞株で増殖抑制効果を示し、ヒト膵臓癌細胞株で遺伝子発現の減少が報告されている miR-34a は、一過性に膵臓癌細胞株へ導入した場合に、細胞増殖の抑制効果を示した。このことから、膵臓癌細胞株におい

ては、miR-34a の標的分子 (E2F1, CDK6, Bcl-2 etc) の蛋白質量が正常細胞に比して上昇し、細胞増殖に促進的に作用している可能性が示唆される。これらの標的遺伝子が膵癌特異的なマーカーとなる可能性が考えられる。

ヒト膵臓癌細胞株を用いた miRNA の機能的スクリーニングから、細胞増殖の抑制に関与する miRNA を選出する実験を進行中である。ヒト膵臓癌細胞の増殖を抑制する効果を持つ miRNA が同定できたならば、*in vitro* で合成された成熟 miRNA 様分子を一過性に細胞株へ導入し、同様の効果がみられるかどうかを検証する。検証した miRNA に関して、その標的分子を同定する。例えば、膵臓癌細胞株に miRNA を導入して mRNA の網羅的な発現解析を行ない、遺伝子発現が減少しており、かつ細胞増殖の促進に関与する機能を持つ遺伝子を選択する手法を用いる。これらが、新規膵臓癌標的分子となりうるかどうかを、標的蛋白質に対する特異的抗体を用いて、動物モデルで誘発される膵癌微小病変や膵癌組織における蛋白質の発現を免疫組織学的解析やウエスタンブロット解析を行ない、膵癌特異的か否かを検討する。

変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵癌を用いた mRNA や miRNA の網羅的遺伝子発現解析をに関しては、現在、動物実験を行なっている。腫瘍検体が得られたならば、マイクロダイセクションによる腫瘍のみの採取を行ない、RNA を抽出して、オリゴヌクレオチドを用いたマイクロアレイ解析による mRNA や miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行なう。mRNA の発現解析では、膵癌で発現上昇しているものを、miRNA の解析では発現減少している miRNA を選択し、その標的分子を解析することから、膵癌特異的に発現している mRNA を探索する。これら新規膵臓癌標的分子の候補に関して動物モデルを用いて、発がん過程の各段階における発現を解析する。

E. 結論

ヒト膵臓癌細胞株の増殖を抑制する miRNA の機能的スクリーニングを現在進行中であり、同定した miRNA の標的分子の探索から新規膵臓癌標的分子の同定が可能である。変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵癌を用いた mRNA や miRNA の網羅的遺伝子発現解析からも、より特異性の高い新規膵臓癌標的分子の同定

のアプローチを試みる予定である。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Cancer Sci.*, 99, 1892-1900, 2008.

2. 学会発表

1. Nakagama H, Izumiya M, Tsuchiya N. Positive feedback loop for activation of TP53 by a potential tumor suppressor microRNA, MIR-34a. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms & Model of Cancer meeting, Long Island, NY, USA, August, 2008.
2. Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H. MicroRNA profiling in human fetal normal colonic mucosa and colon cancer cell lines. 第31回日本分子生物学会年会、第31回日本生化学会大会合同大会、神戸、December 9-12, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願 無

高磁場 MRI とオールインワンナノデバイスによる癌微小病変の非侵襲的診断・治療
システムの開発

分担研究者 山下克美 金沢大学医薬保健研究域 薬学系

研究要旨 本研究は、膵臓に特異的に発現するグルカゴン様ペプチド I 受容体 (GLP-1R) を標的化し、膵臓癌をはじめとする膵臓の初期病変を画像化することが目的である。そのために、昆虫細胞で発現させた GLP-1 受容体を細胞ごとマウスへ免疫し、モノクローナル抗体を作成することに着手した。一方、膵臓を構成する細胞へのストレスを画像で検出することを目的として、緑色蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングシステムの構築を行った。この系では、緑色蛍光タンパク質を二分割することにより蛍光を消失させたプローブを用いる。ストレスによる細胞応答として、タンパク質間相互作用が起こることを利用し、二分割したプローブに相互作用が起きるタンパク質を融合させる。タンパク質間相互作用が起きると、二分割された GFP 断片が近接することで、再び蛍光を生じるという性質を用いる。本系で、細胞へストレスによる蛍光出現を認めた。

A. 研究目的

本研究では、膵臓の初期病変を検出するために、膵臓の島細胞で発現するグルカゴン様ペプチド 1 の受容体 (以下、GLP-1R) を標的とした画像化を試みる。これまでの研究では、GLP-1R を細胞へ発現させ、その細胞を用いて GLP-1R に対して親和性の高いペプチドや低分子化合物をスクリーニングすることで目的を達成しようと試みたが、GLP-1R 発現細胞の構築が不成功に終わったため、代替法を検討した。そこで今年度は、細胞膜表面で発現する GLP-1R に対する単クローン抗体を作成し、これを用いて標的化することとした。前述のように通常の培養細胞を用いた方法では GLP-1R を細胞膜表面に発現させることは困難なため、細胞膜貫通タンパク質の発現が比較的容易な、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いることとした。

一方で、初期病変細胞では細胞ストレスが起きることが期待される。そこで細胞ストレスをバイオイメージングにより検出する方法の構築に着手した。細胞にストレスが起きることにより進行する生化学反応を surrogate marker とし、これをバイオイメージングで検出する。本研究では、細胞へのストレスにより分解が促進される Cdc25B と分解のためのユビキチン化を行う、すなわち基質である Cdc25B との相互作用がストレスにより生じる β TrCP タンパク質を用いた。

相互作用の検出は、二分割された蛍光タ

ンパク質 (通常は GFP) が蛍光発光能を消失するが、両ペプチドが近接すると蛍光が復活するという性質、すなわち二分子蛍光相補 (Bimolecular Fluorescence Complementation: BiFC) と呼ばれる性質を利用する。これらのペプチドそれぞれに、ストレスにより新たな相互作用が出現するタンパク質を融合させることにより、「タンパク質間相互作用による蛍光タンパク質断片の接近」を利用するものである。

B. 研究方法

1. 昆虫細胞 (ヨトウガ細胞) の細胞中で GLP-1R を発現させるべく、バキュロウイルス発現系を基本とする系でベクターを構築した。発現タンパク質の確認は、C-末端に付加した FLAG ペプチドを用いて行う予定である。

2. Cdc25B の N-末端 175 アミノ酸を含む断片がストレスによる β TrCP との結合に必要な十分であることと、 β TrCP の C-末端側が Cdc25B との結合に必要な十分であることを利用し、GFP の N-末端断片に Cdc25B を、GFP の C-末端断片に β TrCP を融合させたプラスミドを作成した。さらにこれらを一つのペプチドとして細胞内で発現させるために、GFP/N-Cdc25B 断片を β TrCP-GFP/C 断片の N-末端側に融合させるようなプラスミドを作成した。このように作成したプラスミドを、ストレス応答性 MAP キナーゼである p38 や JNK と共に細胞中で発現させ、蛍光の出現を観察した。

C. 研究成果

a. GLP-1R バキュロウイルスを作成し、ヨトウガの細胞中へ感染させ、GLP-1R の発現を確認した。これらの細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成中である。現在、細胞培養液を用いてスクリーニング中である。

b. GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C を JNK とともに HeLa 細胞中で発現させると、JNK のキナーゼ活性に依存して緑色蛍光が観察された。さらに、p38 についても同様に、キナーゼ活性に依存した蛍光の出現を認めた。

また、GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C を発現させた HeLa 細胞を NaCl やエトポシドで処理すると蛍光が出現した。これらの薬剤は、このプローブで検出可能なストレスを細胞へ与えるものと思われる。

D. 考察

a. GLP-1R はヨトウガの細胞で発現しているが、細胞膜表面に出現しているかどうかの検証がされていない。今回のモノクローナル抗体のスクリーニングで目的とするものが得られなかった場合は、GLP-1R を細胞膜表面に露出させるような工夫が必要である。

b. GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C のプローブがストレスの検出に有効であることが確認された。今後は、このプローブをいかに膵臓細胞で発現させるかに取り組む必要がある。

E. 結論

GLP-1R に対するモノクローナル抗体を作成するための基本的な道筋をつけることが可能となった。今後は、いかに効率よくモノクローナル抗体を得るかが問題となる。早急にモノクローナル抗体を取得し、画像化に取り組む必要がある。

膵臓細胞へのストレスを検出することで初期病変を画像として検出する道筋ができた。本システムは、ストレス MAP キナーゼ活性の上昇を検出できるシステムである。このプラスミドシステムを非分裂性の細胞へも感染可能なレンチウイルス系ベクター

へ導入することで、マウスやラットのモデルシステムにおいて、画像化の実用性を検討できる。しかしながら、現在のシステムではプローブに GFP を使用しているため、体深部からの緑色蛍光を検出することは技術的に困難と思われる。従って、現時点では「非侵襲性」は担保できない。今後、infra-red 領域の蛍光を発するタンパク質が開発されれば、実用化が期待される。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., and Matsunaga, T.: Cleavage-mediated activation of CHK1 during apoptosis. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 25485-25491.
2. Isoda, M., Kanemori, Y., Nakajo, N., Uchida, S., Yamashita, K., Ueno, H., and Sagata, N.: The ERK-MAPK Pathway Phosphorylates and Targets Cdc25A for SCF- β TrCP-Dependent Degradation for Cell-Cycle Arrest. *Mol. Biol. Cell* (in press)

2. 学会発表

1. SCF $^{\beta$ -TrCP による Cdc25B の制御：
内田早苗、善岡克次、工藤保誠、渡辺信元、松永司、山下克美；第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会；神戸・2008 年 12 月
2. CDK 活性化フォスファターゼ Cdc25 の機能制御機構：山下克美、内田早苗、松永司、中釜斉；第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会；神戸・2008 年 12 月
3. JNK-and SCF $^{\beta$ -TrCP-mediated destruction of Cdc25B controls cell cycle arrest by non-genotoxic stress：
K. Yamashita, S. Uchida, and H. Nakagama；8th International Conference on Protein Phosphatase, Maebashi, 2008, 11.
4. Cdc25B の JNK および SCF $^{\beta$ -TrCP 依存的分解：内田早苗、工藤保誠、善岡克次、松永司、山下克美；第 67

回日本癌学会学術総会・名古屋・
2008年10月

5. Degradation of Cdc25B by JNK-
initiated and SC^{Φβ-TrCP}-mediated
Ubiquitination; S. Uchida, Y.
Kudo, K. Yoshioka, T. Matsunaga,
K. Yamashita; 第60回日本細胞生
物学会大会・横浜・2008年6月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願

発明の名称：Cdc25B と b-TrCP との特
異的結合を利用した検出系
出願番号 特願2008-306804
出願人：国立大学法人 金沢大学、

発明人：山下克美、内田早苗
出願日：2008, 12, 1

膵管がんモデル動物による早期診断法の開発

分担研究者 津田洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野

研究要旨 膵管がんモデル動物を用いた評価法の確立を行う。Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras327) において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を膵管内に注入することによって、不活性化状態で導入した変異 ras 遺伝子の発現を誘導し膵管がんを発生させる。この担がん状態のラットを、早期病変を検出する画像診断開発のモデル動物として研究に供する。

A. 研究目的

膵管がんの臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期診断モデル」として応用を試みる。これまでにラットに化学物質によって膵管がんを発生させたモデルは確立されていなかった。我々は、Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras327) において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を膵管内に注入することによって変異 ras 遺伝子を活性化させて膵管がんを高率に発生させる方法をラットで初めて確立した。このモデルを用いて、治療後の 5 年生存率は 5% という最も予後の悪い膵管がんを、臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期あるいは前臨床診断モデル」として応用を試みる。動物に変異 ras 遺伝子を膵管内で発現させて成熟動物に任意の時にがんを発生させ、早期膵がんのモデルとして血清、画像診断に用いる。この膵がんモデルにおいて我々は既に別の研究において血清診断マーカーを同定している。本研究において、膵がんの画像診断が可能となれば、血清診断と併せて精度の高い早期診断法を確立できる。

B. 研究方法

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を HEK293 細胞に感染させて、AdeX/Cre を増幅し精製した。精製した AdeX/Cre を、Hras250 または Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入 (4×10^9 pfu/ml) することによって膵管がんを発生させた。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組み換え実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科遺伝子組み換え実験等安全委員会」、動物実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験

に関する指針」に基づく「動物委員会」の承認を経て実施される。

C. 研究成果

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を Hras250 または Kras327 の膵管に注入することにより、種々の段階の膵管がんが、2~4 週間程度の短期間に発生した。このモデルにおける膵管がんは、病理学的解析により膵管、介在管および腺房中心細胞に由来し、腺房細胞からは腫瘍性病変は発生しないことが示唆された。発生した膵がんは超音波診断装置を用いて診断・画像化することが可能となった。しかし、膵全体に広がった膵がんは検出できるが、小さな病変を診断することは困難であった。早期膵がんを検出するにはより鋭敏な方法を開発する必要がある。

D. 考察

我々の確立したラット膵管がんモデルは、膵管由来の膵管がんを発生させることが可能である。ヒトの膵がんはほとんどが膵管由来の膵管がんであり、このモデルを用いればヒトに類似した膵管がんを 4 週間以内の短期間に発生させることが可能である。この膵がんモデル動物を血清診断マーカーの解析と、初期病変の画像解析の開発研究に供し、新たな膵がんの早期診断法を確立することが、今後の課題である。また、Hras250 に発生した膵管由来の細胞株を既に樹立しているため、この膵がん細胞株を抗体の交差性確認等の試験に供することも可能である。このラット膵管がんモデルにおいて我々が同定した血清診断マーカーと画像診断とを併せて、早期膵がん病変を検出することが可能となることが期待される。

E. 結論

活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 また

は Kras327) は膵がんの血清診断マーカーおよび画像診断の開発に有用なモデルである。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

無

2. 学会発表

無

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無

2. 実用新案登録 無

3. 出願

発明の名称：ヒト変異型 K-ras(K-rasV12)
遺伝子をコンディショナルに発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物及びその用途

出願番号 特願 2007-243313

出願人：名古屋市立大学

発 明 人：津田洋幸、深町勝巳、デイビッド・ビー・アレキサンダー

出願日：2007. 9. 20

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishi K.	Selective gene transfer into neurons via Na _v K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adovirus.	J. Gene Med	10	597-609.	2008

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isoda M., Kanemori Y., Nakajo N., Uchida S., Yamashita K., Ueno H. Sagata N.	The ERK-MAPK Pathway Phosphorylates and Targets Cdc25A for SCF ^{-TrCP} -Dependent Degradation for Cell-Cycle Arrest.	Molecular Biology of the Cell			印刷中
Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., Matsunaga, T.	Cleavage-mediated activation of CHK1 during apoptosis.	Journal of Biological Chemistry	283	25485-91	2008

Selective gene transfer into neurons via Na,K-ATPase β 1. Targeting gene transfer with monoclonal antibody and adenovirus vector

Keiji Ishii^{1,2}
Kiminori Nakamura¹
Satoshi Kawaguchi²
Rong Li¹
Sachie Hirai¹
Naoya Sakuragi¹
Takuro Wada²
Kazunori Kato¹
Toshihiko Yamashita²
Hirofumi Hamada^{1*}

¹Department of Molecular Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

²Department of Orthopedics, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

*Correspondence to:
Hirofumi Hamada, Department of Molecular Medicine, Sapporo Medical University, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan.
E-mail: hhamada@sapmed.ac.jp

Abstract

Background Neuron-selective gene transfer is an attractive therapeutic strategy for neurological disorders. However, optimal targets and gene delivery systems remain to be determined.

Methods Following immunization of mice with PC12 cells, hybridomas were screened by β -Gal reporter gene assay using FZ33 fiber-modified adenovirus vectors. Subsequently, the efficacy and specificity of monoclonal antibody (mAb)-mediated gene transfer via FZ33 and FdZ adenovirus vectors were evaluated by flow cytometry, chemiluminescent β -Gal reporter gene assay, and immunocytochemistry. Finally, the antigen recognized by the mAb was identified by mass spectrometry and transfection analysis.

Results A hybridoma clone 6E3 producing monoclonal antibody, mAb6E3, was screened. Flow cytometry, chemiluminescent β -Gal reporter gene assay, and immunocytochemistry with mAb6E3 and the fiber mutant adenovirus demonstrated efficient gene transfer into the PC12 cells. Treatment of neuron–glia cocultures with mAb6E3 and FdZ adenovirus resulted in neuron-selective gene transfer. Immunohistochemical images of rat spinal cord tissue showed that mAb6E3 reacts specifically with neurons. Finally, Na,K-ATPase β 1 was identified as the antigen of mAb6E3.

Conclusions Hybridoma screening using FZ33 fiber-modified adenovirus vectors serves as an efficient approach to detect antigens in mAb-targeted gene transfer. Neuronal tropism in the central nervous system through mAb6E3 represents an important initial step towards neuron-selective gene transfer in the treatment of local neurological disorders, such as spinal cord injury. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords adenovirus vector; gene therapy; Na,K-ATPase β 1; neuron; targeting

Introduction

Neurological disorders that result in severe physical loss of function and sensory disturbance remain intractable [1]. Gene therapy serves as a new treatment modality that potentially improves the prognosis of patients with neurological disorders [2–7]. One of the current challenges concerning gene therapy is the delivery of adequate genes into the appropriate cells. Without developing selective gene delivery systems, high efficacy of gene transfer by virus vectors may unintentionally lead to systemic and local adverse

Received: 28 February 2007
Revised: 4 December 2007
Accepted: 5 December 2007

effects [8]. In fact, delivery of growth factor genes that promote regeneration of neurons also has shown to promote glial scar formation [9–11].

Several attempts have been made for selective gene delivery into neurons. Steffen *et al.* [12] reported neuroblastoma-specific gene expression using tyrosine hydroxylase promoter. In addition, Huang *et al.* [13] developed vectors using a combination of neuron restrictive silencer elements, hypoxia responsive elements, and CMV minimal promoter. These vectors allowed gene expression selectively in neurons in a hypoxia-regulated manner. By contrast to these promoter driven approaches, there is another approach via specific target receptors. Thus far, the receptor for glial cell line-derived neurotrophic factor and high-affinity laminin receptors have been proposed as neuron-specific targets [14,15]. However, optimal target receptors for gene therapy for neurological disorders remain to be defined.

Recently, fiber mutant forms of adenovirus designated as FZ33 [16] and FdZ [17–19] have been introduced as targeting tools. Both FZ33 and FdZ adenovirus vectors contain the immunoglobulin (Ig) G binding motif, thereby incorporating into target cells together with specific IgG monoclonal antibody (mAb). In the present study, we screened hybridomas to define those that produce IgG mAb specifically reacting with the rat neuronal cell line PC12. Subsequently, we evaluated the efficacy and specificity of gene transfer into the neuron cells by FZ33 and FdZ adenovirus vectors along with the established mAb.

Materials and methods

Cell culture

The cell lines used were rat pheochromocytoma cell lines, PC12; rat kidney cell line, NRK; rat glioma cell line, C6; rat thymoma cell line, MTHC-1; human embryonic kidney cell line, 293T; and mouse myeloma cell line, P3U1. All cell lines except P3U1 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, MD, USA). P3U1 was cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS. All the cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

Construction of plasmids

FZ33 type adenovirus vector containing the IgG binding Z33 motif at the HI loop of the Ad5 fiber knob was generated as Adv-FZ33, as described previously [20]. Adv-FZ33 has been proven to have the ability to incorporate into target cells via both coxsackie and adenovirus receptor (CAR) and the IgG binding motif [20].

FdZ type adenovirus vector is a modified form of Adv-FZ33 wherein four amino acids, TAYT (d489–492)

in the FG loop, were deleted to ablate the CAR-binding motif [17–19]. Detailed information regarding these vectors is available on request. For plasmid construction: the FdZ fragment containing d489–492 and Z33 motif was generated by polymerase chain reaction (PCR) using the primers #2201 (71-mer; TGCCAGAATATTGGAATTTTCGAAACGGAGATCT-CACAGAGGGTAACGCTGTGGATTATGCCTAACCTA) and #2202 (29-mer; GTGGATCCTTATTCTTGGGCAATGTATGA), with the pSKII + Z33 plasmid as template. The PCR product was digested with *Bst*XI and *Bam*HI, and the 438 bp fragment was inserted into the *Bst*XI/*Bam*HI sites of pWE6.7R-F/wt2 [21], resulting in pWE6.7R-FdZ. pAx3isi was derived from pAx3 by inserting an *I*-SceI linker/*Clal* adapter sequence (ATCGATATTACCCT-GTTATCCCTAATCGAT) into the *Clal* site of pAx3. The *Rsr*II/*I*-SceI fragment from pAx3isi containing the left end of the Ad5 genome (4 kbp), *I*-SceI/*Eco*RI fragment from pAx3isi containing the central 24 kbp of the Ad5 genome, and *Eco*RI/*Rsr*II fragment from pWE6.7R-FdZ were ligated together, resulting in pAx3i-FdZ. From the plasmid pCAZ3 [21], β -Gal expression cassette (CAZ3, 5153 bp) was cut by *Bam*HI/*Bgl*III digestion, blunted, and ligated into the *Swa*I site of pAx3i-FdZ, resulting in pAx3iCAZ3-FdZ.

Construction of recombinant adenoviruses

Each cosmid was linearized by *Pac*I digestion and transfected into 293 cells using LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Plaques arising from the transfected 293 cells were isolated and evaluated by restriction enzyme digestion of the viral genome. The resultant adenoviral vectors were expanded in the 293 cells and purified by cesium chloride ultracentrifugation. Purified viruses were dialysed in phosphate-buffered saline (PBS) with 10% glycerol and stored at –80 °C until further use. To determine the viral concentration (vp/ml), the viral solution was incubated in 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and the absorbance at 260 nm (A_{260}) was measured [22]. The concentration was defined as vp/ml = $A_{260} \times (1.1 \times 10^{12})$. Before using adenovirus, contamination with replication-competent viruses in the viral stock was ruled out by PCR analysis using primers described previously [23]. Adenoviral infection was performed essentially as described previously [24].

Production and screening of hybridomas

A female Balb/c mouse, aged 6 weeks, was injected intraperitoneally with PBS containing 1×10^6 PC12 cells every 10 days. The final boost was then performed with the same number of PC12 cells intravenously 10 days after the fifth injection. Three days after the final boost, the mouse was sacrificed and 1×10^8 splenocytes from the mouse were fused with 2×10^7 P3U1 cells

using polyethylene glycol. When the hybridomas had grown to approximately 50% confluence, the culture supernatant fluid was tested for antibody activity. The PC12 cells were prepared in 96-well microplates at a concentration of 1×10^4 cells per well. After the removal of the culture medium, supernatant fluid was added to each well and the microplates were incubated for 1 h at 4°C. The supernatant fluid was then removed and the microplates were washed with PBS. Fifty microliters of AdvZ3-FZ33 prepared in FBS-free DMEM at a concentration of 6×10^7 vp/ml [multiplicity of infection (MOI) = 300 vp/cell] was added to each well, and the microplates were incubated for 1 h at 4°C. Then, the microplates were washed twice with PBS and incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Twenty-four hours after infection, chemiluminescent β -Gal reporter gene assays (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were performed according to the company's recommendations. The hybridomas that showed high β -Gal activity were selected. The same assays were performed several times on the selected wells. Finally, the hybridomas were cloned by limiting dilution. Using a commercial kit (Roche Diagnostics), one, 6E3, was shown to be IgG₁ kappa isotype. The mouse monoclonal antibody was purified using protein G-sepharose beads (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden).

Flow cytometric analysis

In the experiments examining the efficacy of gene transfer by Adv-FZ33 in combination with mAb6E3, rat cell lines were prepared in 12-well plates at a concentration of 3×10^5 cells per well, respectively. After culturing overnight, the culture medium was replaced with 500 μ l of FBS-free DMEM in the presence or absence of the mAbs (2 μ g/ml of mAb6E3 or mIgG₁) and incubated for 1 h at 4°C. mIgG₁ (MOPC-21; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used as a control. Then, the microplates were washed with PBS. Next, 500 μ l of AdvEGFP-FZ33 in FBS-free DMEM at a concentration of 1.8×10^8 vp/ml (MOI = 300 vp/cell) was added to each well, and the plates were incubated for 1 h at 4°C. The wells were then washed twice with PBS and the culture medium was added to each well. They were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 24 h. The efficiency of EGFP gene transfer was determined by measuring green fluorescent protein activity using a FACS-Calibur system (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

The reactivity of cell lines with mAb6E3 was also examined by flow cytometry using FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako, Glostrup, Denmark) as the secondary antibody.

Immunofluorescent staining

Immunofluorescent staining was conducted with the PC12 cell cultures, neuron–glia cocultures, and rat spinal cord sections.

The PC12 cells were prepared on collagen-coated slides (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) at a concentration of 2×10^5 cells per well and incubated overnight. After washing with PBS, the culture medium was replaced with FBS-free DMEM in the presence of the mAbs (1 μ g/ml of mAb6E3 or mIgG₁) and incubated for 1 h at 4°C. The medium was again replaced with FBS-free DMEM containing AdvZ3-FZ33 or AdvZ3-FdZ (1.8×10^8 vp/ml; MOI = 300 vp/cell) and incubated for 1 h at 4°C. Next, the wells were washed twice with PBS and incubated at 37°C for 24 h. Samples were soaked in paraformaldehyde (4% in 0.1 M phosphate buffer, pH7.4) for 30 min at room temperature. Then, the samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 20 min and blocked with 0.2% Triton X-100, 0.2% bovine serum albumin, and 5% normal goat serum (Dako, Glostrup, Denmark) in PBS for 30 min at room temperature. Mouse anti- β -Gal monoclonal antibody (DC1-4C7; Promega, Madison, WI, USA; 2 μ g/ml) was added to the blocking buffer and incubated for 1 h. The samples were then incubated with Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (1:500 Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as the secondary antibody for 1 h. After washing, the samples were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) and examined under a fluorescence microscope.

For immunostaining the neuron–glia cocultures, the Nerve-Cell Culture System (Sumitomo Bakelite Co., Tokyo, Japan) was used. Cells were prepared on poly-L-lysine-coated slides (BD Bioscience, Bedford, MA, USA). After the cells had adhered and sprouted fibers, they were treated with the mAbs (1 μ g/ml of mAb6E3 or mIgG₁), followed by infection with AdvZ3-FdZ as described above at the MOI of 100,300 and 1000. They were double-stained with DC1-4C7 and each of the rabbit anti-MAP-2 polyclonal antibody (1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA), rabbit anti-GalC polyclonal antibody (1:500; Chemicon) or rabbit anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antibody (1:500; Dako, Glostrup, Denmark). Alexa Fluoro 488 goat anti-mouse IgG or Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) was used as the secondary antibody. The number of β -Gal-positive neurons was counted at three randomly selected fields and expressed as a percentage of all neurons at the fields.

For immunostaining of the spinal cord, 12-week-old, female Sprague-Dawley rats were perfused transcardially with PBS followed by 4% paraformaldehyde under deep anesthesia. The spinal cord was excised at the Th10 level and fixed with 4% paraformaldehyde overnight. The fixed spinal cord was then equilibrated in PBS containing 30% sucrose for 24 h and then embedded in OCT compound. Horizontal sections of the spinal cord were made. Following permeabilization and blocking, the sections were double-stained with mAb6E3 and each of rabbit anti-MAP-2 polyclonal antibody, rabbit anti-GalC polyclonal antibody or rabbit anti-GFAP polyclonal

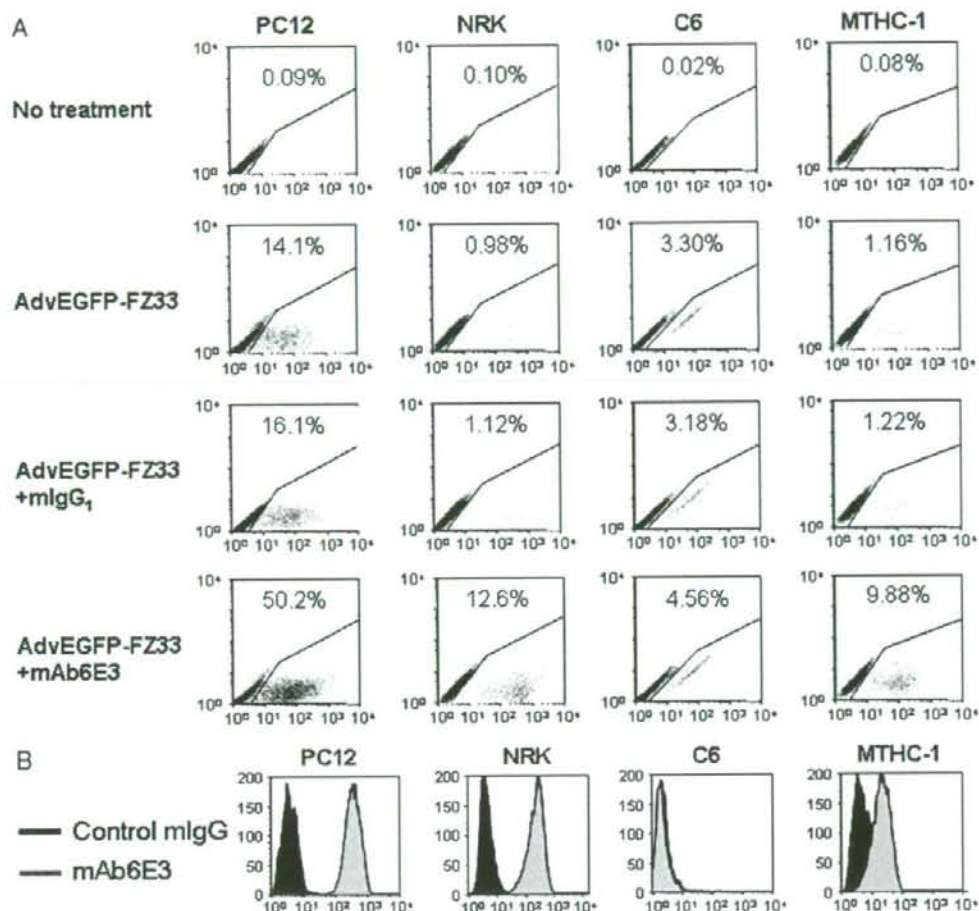


Figure 1. Efficacy of mAb6E3-targeted gene transfer and expression of the 6E3 antigens. (A) Efficiency of gene transfer into cell lines using AdvEGFP-FZ33 and mAb6E3. Numbers in each panel indicate the percentage of cells expressing EGFP. Cell lines used were PC12 (rat pheochromocytoma cell line), NRK (rat kidney cell line), C6 (rat glioma cell line), and MTHC-1 (rat thymoma cell line). Treatment with AdvEGFP-FZ33 and mAb6E3 resulted in enhanced gene transfer efficacy in PC12, NRK and MTHC-1. (B) Cell surface expression of the 6E3 antigen. Reactivity of cell lines with mAb6E3 was determined by flow cytometry. The 6E3 antigen was expressed by PC12, NRK and MTHC-1, but not C6, which failed to show enhanced gene transfer efficacy by mAb6E3-targeted gene transfer

antibody, followed by an incubation with the secondary antibody.

Chemiluminescent β -Gal reporter gene assay

PC12 and C6 cell lines were prepared in 96-well plates at a concentration of 1×10^4 cells per well, respectively. They were divided into six groups: AdvZ3-FZ33 alone, AdvZ3-FdZ alone, AdvZ3-FZ33 with control mIgG₁, AdvZ3-FdZ with control mIgG₁, AdvZ3-FZ33 with mAb6E3, and AdvZ3-FdZ with mAb6E3. Each group was assayed with the MOI of 300, 1000, 3000 and 10000 vp/cell. After removing the culture medium, 50 μ l of FBS-free DMEM containing 100 ng of mAb was added to each well and incubated for 1 h at 4°C. The medium was removed and

the microplates were washed with PBS. Fifty microliters of adenovirus prepared in FBS-free DMEM at the indicated concentrations was added to each well and incubated for 1 h at 4°C. The microplates were then washed twice with PBS and incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Twenty-four hours after infection, chemiluminescent β -Gal reporter gene assays were performed according to the manufacturer's instructions. The experiments were repeated four times.

Immunoprecipitation and mass spectrometry

PC12 cells (4×10^7) were prepared and the cell surfaces were biotinylated (Pierce, Rockford, IL, USA). Membranes were solubilized on ice for 30 min in

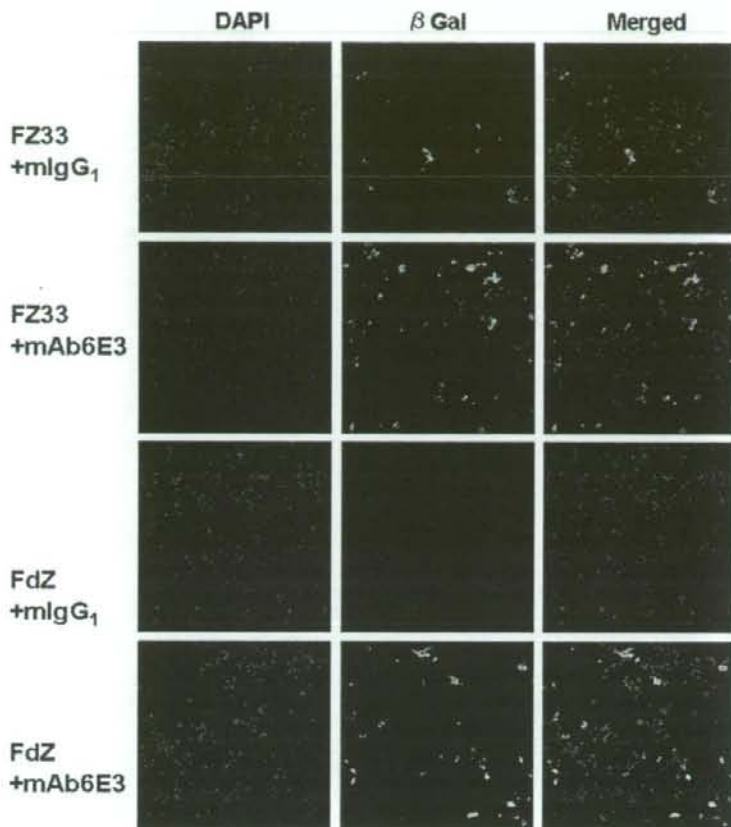


Figure 2. Expression of β -Gal in PC12 cells treated with fiber-modified adenovirus vectors and mAb6E3. PC12 cells were treated with adenovirus vectors (AdvZ3-FZ33 or AdvZ3-FdZ) and mAbs (control mIgG₁ or mAb6E3). DAPI indicates counterstained nuclei. PC12 cells treated with AdvZ3-FZ33 showed positive reactivity with anti- β -Gal mAb regardless of whether mAb6E3 was applied in combination. By contrast, AdvZ3-FdZ required mAb6E3 for successful gene transfer because none of the PC12 cells treated with AdvZ3-FdZ and mIgG₁ were positive for anti- β -Gal mAb

1 ml buffer containing 1% NP40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Samples were cleared of nuclear fragments by centrifugation for 20 min at 15 000 g at 4°C. The samples were mixed with protein G-Sepharose beads and incubated for 2 h at 4°C, and the beads were then centrifuged to remove nonspecifically bound proteins. Five micrograms of mAb6E3 and control mIgG₁ (eBioscience, San Diego, CA, USA) were added to the supernatant of each sample and allowed to incubate for 1 h at 4°C. The immunocomplexes were precipitated by the addition of protein G-Sepharose beads to each sample and incubated for 2 h at 4°C. The supernatant was discarded and the beads were washed six times with solubilization buffer. The immunocomplexes binding with beads were boiled for 5 min in 20 μ l of SDS sample buffer containing 5% 2-mercaptoethanol. The samples were separated using 5–20% gradient polyacrylamide gels (BioRad, Hercules, CA, USA) and transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, MA, USA). After blocking with 5% milk in TBS

[10 mM Tris-HCl, (pH 7.5), 150 mM sodium chloride, 0.05% Tween-20], the membranes were incubated for 1 h at room temperature with 20 μ l (per 40 ml) of avidin-horseradish peroxidase (Amersham Bioscience, Bucks, England). Detection was conducted by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience) according to the manufacturer's instructions.

For mass spectrometry, The PC12 cells (1×10^9) were solubilized in 20 ml buffer as described above. After the removal of nuclear fragments by centrifugation, the samples were mixed with protein G-Sepharose beads and incubated over night at 4°C to remove nonspecifically bound proteins. Five micrograms of mAb6E3 and control mIgG₁ were added to the supernatant of each sample and allowed to incubate for 2 h at 4°C. The immunocomplex was precipitated by addition of protein G-Sepharose beads to each sample and incubated for 2 h at 4°C. The samples were then separated by SDS/PAGE as described above. The polyacrylamide gel was silver stained using a Silver Stain kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) according