The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	外殻タンパク質の最適化とターゲティング分子の挿入による標的組織指向型アデノウイルスベクターの開発
Author(s)	松井, 勇人
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54710
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

外殻タンパク質の最適化と
ターゲティング分子の挿入による
標的組織指向型アデノウイルスベクターの開発

2013 年

松井　勇人

外殻タンパク質の最適化と
ターゲティング分子の挿入による
標的組織指向型アデノウイルスベクターの開発

2013 年

松井　勇人

目次

緒論 1

本論 4

第一章　血液凝固第 X 因子（Factor X）を利用したヘキソン特異的
PEG 化アデノウイルスベクターの開発 4

第二章　外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型
アデノウイルスベクターの開発 27

第三章　Monobody をノブレスファイバーC 末端領域に提示した
新規アデノウイルスベクターの開発 52

総括 76

結論 79

謝辞 80

参考文献 81

緒論

ポストゲノム時代に突入し、様々な疾患に関与する新たな遺伝子の発見とその機能解析が行われ、その知見に基づいた新たな治療方法の確立が期待されている。その新規治療法の一つとして、遺伝子そのものを薬物として患者に投与する「遺伝子治療」に大きな注目が集まっている。米国においてアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に対する世界で初めての遺伝子治療臨床研究が実施されてから約 20 年が経過し[1]、その間、我が国を含め各国で癌などの難治性疾患をはじめとする様々な疾病に対する遺伝子治療が行われた。しかし、一部では優れた治療効果も報告されているものの[2]、その多くは当初期待されていたほどの治療効果を得ることができていないのが現状である。その原因は、遺伝子治療の根幹をなす遺伝子導入用ベクターの機能が十分でないことにあると推察される。すなわち、遺伝子治療の成功に向けては、目的とする細胞・組織にのみ、効率よく、安全に遺伝子導入するとともに、さらには安定して遺伝子を発現できるベクターの開発が求められている。つまり、今日の遺伝子治療研究では、ベクターの性能向上に関する基礎研究の重要性が再認識されている。

これまで様々な遺伝子導入用ベクターが開発されてきたが、アデノウイルス（Ad）ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中でも最も優れた遺伝子導入活性を有するベクターの 1 つである。Ad は直径約 80 nm の正二十面体構造を有する非エンベロープウイルスであり、その基本骨格は、各頂点のペントン（ファイバーおよびペントンベース）とよばれる 12 個の突起構造と、主要な外殻タンパク質である 240 個のヘキソンから構成される (Figure 1)[3]。従来の Ad ベクターは C 群に属する 5 型 Ad を基本骨格としているが、分裂細胞・非分裂細胞を問わず遺伝子導入可能であること、物理的に安定であるため超遠心による濃縮が可能であること、容易に高力価のベクターが得られることなど、遺伝子導入用ベクターとして優れた基本的性質を備えており、遺伝子治療臨床研究のみならず基礎研究においても広く用いられている。

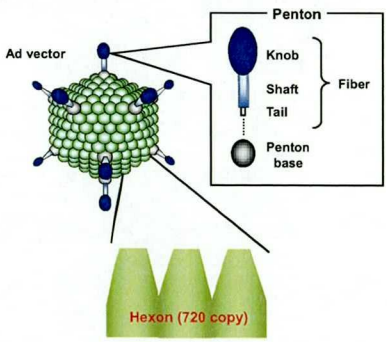


Figure 1. Structure of an adenovirus (Ad) vector. The virus capsid contains hexon (light green), penton base (gray) and fiber consisting of a tail, a shaft, and a knob region. These capsid proteins are termed major capsid proteins.

しかしながら、従来の Ad ベクターは生体内投与後、速やかに血中から消失するという欠点が指摘されている。また、生体内に存在する抗 Ad 中和抗体により、遺伝子導入

が阻害される。さらには、肝臓への集積性が高いため、肝臓以外の他の臓器への遺伝子導入が困難であり、肝障害を誘発するといった問題点が報告されている。従って、より有効で安全な遺伝子治療を達成するためには、標的組織特異的に遺伝子導入可能なターゲティング Ad ベクターの開発が必要である。これに向けてこれまでに、Ad ベクターの腫瘍組織への標的指向性の向上を目指し、Ad 外殻タンパク質であるファイバー領域に、α_vインテグリンに結合する RGD (Arg-Gly-Asp) ペプチドやヘパラン硫酸に結合するポリリジンペプチドなどの外来ペプチドを挿入した Ad ベクターなどが開発されてきた [4-7]。しかし、α_v インテグリンやヘパラン硫酸は腫瘍組織で高い発現が認められるものの、正常組織にも発現していること、生体内に投与したとしても標的組織に到達する前に血中から速やかに排除されてしまうことから、そのターゲティング能は不十分であるという結論に達した [6-8]。つまり、未だに十分なターゲティング能を有する Ad ベクターの開発には至っていないのが現状である。従って、真に標的組織特異的に遺伝子導入可能な Ad ベクターを開発するためには、Ad ベクターの肝集積性の回避及び血中滞留性の向上と、Ad ベクターへのより組織特異性の高いターゲティング分子の付与が必要不可欠であると考えられる。そのためには、遺伝子工学的手法による外来ペプチドの Ad 外殻タンパク質への挿入といった従来の手法のみならず、Ad 外殻タンパク質そのものの改変や、新たなターゲティング分子の提示及びそれに適した Ad 外殻タンパク質の最適化に立脚した Ad ベクターの構築が重要であると考えられる。

これまでの研究で、Ad ベクターの血中滞留性を向上させるための手段として、Ad 粒子表面をポリエチレングリコール (PEG) 分子で修飾した PEG 化 Ad (PEG-Ad) ベクターが開発されてきた [9-11]。しかしながら、これらの方法では PEG 化される部位はランダムであるため、Ad ベクターの感染に重要なファイバー領域まで PEG 化されてしまい、標的組織での遺伝子導入活性が低下するといった問題点が指摘されている [12-14]。そこで本研究ではまず、Ad 外殻タンパク質のヘキソン領域のみを PEG 化することで、標的組織での遺伝子導入活性を保ったまま高い血中滞留性を示す Ad ベクターの開発を試みた (第一章)。また、標的組織特異的な遺伝子導入を達成するためには、血中滞留性の向上に加え肝臓への集積を回避する必要があると考えられる。そこで、これまでに開発された種々の改変型 Ad ベクターの中で、Ad 外殻タンパク質のファイバー領域を B 群に属する 35 型 Ad のファイバーで置換したファイバー置換型 Ad (AdF35) ベクターを利用することとした。AdF35 ベクターは、生体投与後、肝臓への集積性が低いことが報告されており [15-17]、ターゲティング Ad ベクター開発に向けた基盤ベクターとし

ての特性を有していると考えられた。そこで、このAdF35ベクターに標的組織特異性を付与するため、ファイバー領域に外来ペプチドを挿入可能なAdF35ベクターの開発を試みた（第二章）。そして、Adベクターにさらに高い標的指向性を付与するために、低分子化抗体様分子であるMonobodyをAd粒子に提示することを試みた。Monobodyを従来のAdベクター・ファイバー領域に挿入してもウイルス粒子が形成されないことが予想されたため、本研究ではファイバー領域をT4ファージのフィブリチン由来のファイバーで置換するとともに、ファイバーノブを欠損したノブレスAdベクターを作製し、これにMonobodyを挿入することで、標的組織特異的に遺伝子導入可能なAdベクターの開発を目指した（第三章）。

以上のように、Adベクターのターゲティング能の向上に向けて、Ad外殻タンパク質の化学的な修飾あるいは遺伝子工学的な改変による最適化と、新規ターゲティング分子のAdベクターへの挿入を組み合わせることによって、全く新しい標的組織指向型Adベクターを開発することに成功したので博士論文としてまとめた次第である。

本論

第一章 血液凝固第X因子（Factor X）を利用したヘキソン特異的PEG化アデノウイルスベクターの開発

Adベクターは現在、遺伝子治療臨床研究のみならず基礎研究においても幅広く使用されているが、同時にいくつかの問題点が指摘されている。まず、Adベクターは生体内投与後、生体内に存在する抗Ad中和抗体の影響を受け、遺伝子導入が阻害されるという問題点がある[18,19]。次に、生体内投与後速やかに血中から消失するとともに、肝臓に集積するという点である[17,20]。これは、血中でAdベクターの主要外殻タンパク質であるヘキソンに血液凝固第X因子Factor X (FX) が結合し、そのFXが肝細胞表面上のヘパラン硫酸に結合することで、Adベクターが FX依存的に肝臓に取り込まれるためである[21,22]。その結果、肝臓以外の他の臓器への遺伝子導入が困難となっている。従って、標的組織に効率よく治療用遺伝子を送達するためには、Adベクターの肝臓への集積ならびに抗Ad中和抗体を回避可能であり、かつ血中滞留性を向上させた新規Adベクターの開発が望まれる。それに向けて、Ad ベクターをポリエチレングリコール(PEG) で修飾したPEG化Adベクターが開発されてきた[9-11]。AdベクターのPEG化により肝臓への集積、抗Ad中和抗体からの回避、血中滞留性の向上は認められたものの、従来のPEG化では、Adのキャプシド表面がランダムに修飾されるため、Adの感染に重要な領域であるファイバー領域もPEG化されてしまい、標的組織での遺伝子導入効率が低下することが知られている[12-14]。そこで私は、血液凝固因子FXをPEG化したPEG-FXを利用して、ヘキソン特異的にPEG化することで、ヘキソン特異的PEG化Adベクターの開発を試みた。

【実験材料および方法】

試薬

牛胎仔血清 (Fetal calf serum; FCS)、抗生物質はGIBCO-BREより、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM)、MINIMAM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (MEM)、5-20% SuperSepTMAce、$MgCl_2$は和光純薬より、培養ディッシュはNuncより、SuperFectはQIAGENより、RNaseA、DNaseIはRocheより、透析膜 (スペクトラ/ポア 7 MW50000)はSpectrum Labsより、ドデシル硫酸ナトリウム

(SDS)は Sigma より、PVDF メンブレンはミリポアより、anti-human FX polyclonal antibody は GenTex より、anti-PEG antibody は Epitomics より、HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody は cell signaling より、HRP-conjugated anti-rabbit IgM antibody は、SouthernBiotech より、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents は GE ヘルスケアバイオサイエンスより、PEG20000 および PEG40000 は日油より、FX は Haematologic Technologies より、Warfarin は、Cayman Chemical より、Blue Native (BN)-PAGE 関連試薬は Invitrogen より、96 穴 Black Plate は Corning より、ピッカジーン LT2.0 は東洋インキより、それぞれ購入した。抗 Ad 血清は医薬基盤研究所幹細胞プロジェクトより供与して頂いた。

その他の試薬は分子生物学研究用グレード、研究用特級グレード、またはそれに準ずるものを使用した。

細胞

Adベクターのパッケージング細胞である293細胞はDMEM (10% FCS、抗生物質、L-glutamine 含有)を用いて、SK HEP-1 (an endothelial cell line derived from human liver、Dr. M. A. Kay より供与)、SF295 細胞 (a human glioblastoma multiforme、北海道大学・多田先生より供与)は 10% FCS 含有 DMEM を用いて、B16 (B16BL6; a mouse melanoma cell line)は 10% FCS 含有 MEM を用いて、37℃、飽和蒸気圧、5% CO_2 存在下で培養した。なお、本研究において使用した FCS はすべて 56℃、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。

実験動物

C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入した。本研究で使用したすべての実験動物操作は大阪大学実験動物規定に準じて行った。

Ad ベクターの作製

Luciferase 遺伝子をコードする Ad ベクタープラスミドである pAdHM4-CMVL2[23] を、Ad ゲノムの両末端に認識部位が存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、カチオン性ポリマーの SuperFect (QIAGEN)を用いてトランスフェクションした。なおパッケージング細胞としては、293 細胞を使用した。トランスフェクション後、約 2 週間培養し、luciferase 発現 Ad ベクター (Ad-L2)[23] を得た。

Adベクターの大量調製と精製方法

Adベクターは感染した293細胞の核内に大部分が存在しているため、細胞を回収した後、凍結融解を3回繰り返すことで細胞を破壊した。2000 rpm、10分遠心しAdベクターを含む上清を新しい293細胞に加えた。Adベクターを作用させる293細胞数を5-10倍に増加させ、この操作を数回繰り返すことによりAdベクターを調製した。150 mm培養ディッシュ(nunc) 5枚の293細胞にAdベクターを加え、2日後293細胞を回収し、培地を除去、150 mm培養ディッシュ1枚あたり1 mlのPBSを加え超音波にて細胞を破壊した。これを2000 rpm、10分遠心し、上清（Adベクター懸濁液)を回収した。Adベクター懸濁液に$MgCl_2$(最終濃度10 mM)、RNaseA (最終濃度0.2 mg/ml)、DNaseI (最終濃度0.2 mg/ml)を加え37 ℃、30分反応させた。反応後、Adベクター懸濁液を塩化セシウムの密度勾配遠心を2回繰り返し精製した。1次遠心では、比重1.5 g/cm^3、1.35 g/cm^3、1.25 g/cm^{3}の塩化セシウムを順に0.5 ml、2.5 ml、4 ml重層し、その上にAdベクター懸濁液を5 ml加え、35000 rpm、14 ℃、1時間（CP 100α ローター形式P40ST、HITACHI)遠心した。1次遠心後、Adベクターのバンドを回収し、比重1.35 g/cm^3 の塩化セシウムで12 mlに懸濁し35000 rpm、14 ℃、12-14時間遠心した。Adベクターのバンドを回収し、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM $MgCl_2$、10% glycerol からなる溶液で 4℃、一晩透析（スペクトラ／ポア 7 MW50000、Spectrum Labs)した。回収した溶液をAdベクター溶液として実験に用いた。

物理化学的（vector particles)タイターの測定

Adベクター溶液をドデシル硫酸ナトリウム（SDS)-TE溶液により最終SDS濃度が0.1%になるように希釈した。5分間混合した後、15000 rpmで5分遠心、上清を回収し260 nmの吸光度を測定した（GeneQuant pro、Amersham Biosciences)。求めた吸光度を以下の式に当てはめVirus Particle (VP) titerを求めた[24]。

VP titer = 吸光度×希釈倍率×1.1×10^{12} (VP/ml)

FXを利用したヘキソン特異的PEG化Ad (PEG-FX-Ad) ベクターの作製

ヒトFXに対し、100倍、500倍、2000倍モル量の活性化PEGを混合し、37℃で30分間、200 rpmで撹拌することでPEG化FX (PEG-FX) を作製した。HEPES-$CaCl_2$バッファー（10 mM HEPES (pH7.4), 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$）中で、Ad粒子と

PEG-FX のモル比率が、1:1000 になるように、Ad-L2 と PEG-FX を混合し、室温で 30 分間反応させた。

粒子径の測定

Zetasizer 3000HS (Malvern, Worcestershire, UK) を用いて、各 Ad ベクターの粒子径を測定した。

SDS-PAGE

PEG-FX を SDS-PAGE loading buffer (62mM Tris (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue) で希釈し、96℃で 5 分間熱処理後、氷冷下で 5 分処理したサンプルを用意した。サンプルを 7.5% SDS ポリアクリルアミドゲルに各レーン 1μg ずつ添加し、20mA で 60 分間電気泳動した。そして、泳動後のゲルを SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) で染色した。染色後のゲルをミリ Q 水で洗浄し、洗浄後のゲルを LAS3000 (富士フィルム)で撮影した。

CAR 陽性および陰性細胞における PEG-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

各細胞を 96 穴プレート (Corning)に 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを SK HEP-1 細胞では 300 VP/cell、SF295 細胞では 3000 VP/cell の条件下で 37℃、1.5 時間作用させた。PEG-FX は、PEG と FX のモル比率を、100:1、500:1、2000:1 で反応させたものをそれぞれ使用した。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0、東洋インキ)を用い、マルチモードプレートリーダー (TriStar LB941, BERTHOLD)で測定した。

抗 Ad 血清存在下における遺伝子発現効率の検討

SF295 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日に各 Ad ベクターと 500 倍に希釈した抗 Ad 血清を混合し、室温で 20 分間反応させた。その後、混合液を 3000 VP /cell で細胞に添加し 4℃、1.5 時間作用させた。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

未修飾 FX 添加時の PEG-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

SF295 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種した。翌日に Ad-L2 と PEG-FX のモル比率を 1:2000 で混合し、室温で 30 分間反応させた。その後、未修飾の FX を 3.3, 10, 30, 90 ng/ml の各濃度で添加し、室温で 30 分間反応させた。この Ad-L2、PEG-FX、FX を含む混合液を 3000 VP/cell で細胞に添加し 4℃、1.5 時間作用させた。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

PEG-FX 添加時の FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

SF295 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種した。翌日に Ad-L2 と未修飾 FX のモル比率を 1:2000 で混合し、室温で 30 分間反応させた。その後、PEG-FX を 30, 150, 300 ng/ml の各濃度で添加し、室温で 30 分間反応させた。この Ad-L2、PEG-FX、FX を含む混合液を 3000 VP/cell で細胞に添加し 4℃、1.5 時間作用させた。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B16 固形癌モデルマウスの作製

B16 固形癌モデルマウスは以下に示す C57BL/6 マウスへの腹部皮下投与移植により作製した。B16 細胞の生細胞数を計測した後、細胞を 0.1 % BSA/PBS で懸濁し、1×10^7 cells/ml に調整した。C57BL/6 マウスを除毛した後、上述の B16 懸濁液 50 μl を腹部皮下に移植した。約 6 日後、固形癌の直径が 5~8 mm に達したマウスを実験に使用した。

尾静脈内投与

C57BL/6 マウスに対して、PBS で希釈した各 Ad ベクターを 1×10^{10} VP/100 μl で尾静脈内投与した。

PEG-FX-Ad ベクターの血中半減期の測定

B16 固形癌モデルマウスに、Ad-L2 もしくは PEG-FX-Ad-L2 (PEG-FX : Ad = 1000 : 1) を 1×10^{10} VP/mouse で静脈内投与し、0、2、5、15 分後に眼窩採血した。その後、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用いて、全 DNA を回収した。回収した DNA 濃度を Nanodrop (Thermo) を用いて測定後、Ad ベクターゲノムコピー数を ABI

prism 7000 sequence detection system (ABI)を用いて測定した。測定条件は、サンプルDNAに、10 μM プライマーセット 0.8 μl、5 μM TaqMan probe 0.8 μl、Real Time PCR Master Mix (TOYOBO) 10 μl を含む最終容量 20ml の混合液を反応させた。PCR反応条件は、95℃で 1 分 Denaturation した後、95℃15 秒、60℃60 秒のサイクルを40 サイクル行った。また、プライマーおよび蛍光標識プローブは Ad ゲノムの E4 領域に設定した。プライマーとプローブの配列を以下に示す。

Ad E4-forward ; 5'-CACCACCTCCCGGTACCATA-3'

Ad E4-reverse ; 5'-CCGCACCTGGTTTTGCTT-3'

Ad E4-probe ; 5'-FAM-AACCTGCCCGCCGGCTATACACTG-TAMRA-3'

Ad ベクターのスタンダードとしては、Ad ベクタープラスミド pAdHM4[23] を用いた。

なお補正用としてマウス GAPDH を上記と同様に反応することにより測定した。

GAPDH-forward ; 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'

GAPDH-reverse ; 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

GAPDH-probe ; 5'- FAM-TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-TAMRA -3'

<u>Real-time PCR 法による各臓器における Ad ゲノムコピー数の測定</u>

各 Ad ベクター投与 48 時間後、摘出した各臓器中の total DNA を自動核酸抽出機(NA-2000; KURABO)を用いて回収した。DNA濃度を Nanodrop (LMS) で測定した後、サンプル中の Ad ゲノム DNA 量を ABI prism 7000 sequence detection system (ABI)を用いて測定した。測定条件や、プライマーとプローブは、上記に準じて行った。

<u>マウス肝臓および腫瘍における遺伝子発現効率の検討</u>

各Adベクター投与48時間後、各臓器をマウスより回収した。摘出した各臓器を 0.05 % Triton-X、2 mM EDTA、0.1 M Tris を含む lysis buffer (最終 pH 7.8)を用いてホモジネートした。ホモジネート 200 μl を凍結融解した後、15000 rpm で 5 分遠心分離することで不溶性画分を除去し、上清 20 μl 中に含まれるホタルルシフェラーゼ活性を LT5500 (東洋インキ) を用いて測定した。また、タンパク量を Bio-Rad assay kit (Bio-Rad) を用いて測定することによって補正した。

<u>Warfarin 前投与マウスにおける肝臓および腫瘍での Ad ベクター集積性および遺伝子発現効率の検討</u>

Ad ベクター投与 3 日前と 1 日前に、100 μl のピーナッツオイルで懸濁し、Warfarin を 133 μg/mouse で皮内投与した[21,22,25,26]。その後、各 Ad ベクターを 1×10^{10} VP/mouse で静脈内投与し、上記と同様に、肝臓および腫瘍での Ad ベクター集積性および遺伝子発現効率を測定した。

BN (Blue-Native)-PAGE

まず、Ad-L2 を 56℃、10 分間処理したサンプルを用意した。Ad ヘキソンは 56℃、10 分間処理しても構造を保つことが報告されている[27]。その後、用意したサンプル（3×10^9 VP を熱処理）と PEG-FX を HEPES-$CaCl_2$ バッファー中で、室温で 30 分間反応させた（モル比率 Ad：PEG-FX = 1：1000)。さらに、未修飾の FX をこの混合液に添加し、室温で 30 分間反応させた。この混合液を Native gradient gels (4-16%) (Invitrogen) の各ウェルに添加し、150 V、30 mA で 120 分間電気泳動した。分子量サイズマーカーには Native-Mark (Invitrogen) を使用した。泳動バッファーは、Invitrogen のプロトコルに従い、0.02% Coomassie Blue G-250 を含む blue cathode buffer と anode buffer を使用した。電気泳動後のゲルを PVDF メンブレンに転写した。得られたメンブレンを 5 倍希釈した Immunoblock 溶液で 2 時間室温にてブロッキングした後、5%スキムミルク溶液で 5000 倍に希釈した 1 次抗体 anti-human Factor X polyclonal antibody (GeneTex) を加え 4℃で一晩インキュベートした。その後、TBS-T buffer で 3 回洗浄した後、5%スキムミルク溶液で 5000 倍希釈した 2 次抗体 HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS-T buffer で 3 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents で発色させた後、LAS3000（富士フィルム）で検出した。また、上記と同様の方法でサンプルを用意し、電気泳動後のゲルを PVDF メンブレンに転写し、ブロッキング後、1 次抗体 rabbit anti-PEG monoclonal IgM (Epitomics)を加え、4℃で一晩インキュベートした。TBS-T buffer で洗浄後、2 次抗体 HRP-conjugated anti-rabbit IgM antibody (Sourthen Biotech) を加え、室温で 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-T buffer で洗浄後、上記と同様の方法で検出した。

統計解析

実験結果は平均値±s.d.もしくは±s.e.として表示した。有意差検定は、Student's t-test を用いた。

【結果】

PEG-FX-Ad ベクターの作製

まずFXをPEG化したPEG化FX(PEG-FX)を作製した。PEG20000もしくはPEG40000とFXを、それぞれ異なる比で混合することでPEG-FXを作製した。そして、FXがPEG化されているかどうかを確認するため、SDS-PAGEを行ったところゲルの高分子量の位置にPEG-FXに相当するバンドが観察された(Figure 2A)。また、PEGの比率が増えるにしたがって未修飾FXに相当するバンド密度が減少し、FX:PEG=1:2000のときには未修飾FXに相当するバンドはほぼ完全に消失した。次に、Ad-L2とPEG-FXをAd粒子とPEG-FXの比率が1:1000になるように$CaCl_2$存在下で混合し、PEG-FX-Adベクターを開発した(Figure 2B)。このようにヘキソン特異的にPEG化することで、標的組織への遺伝子導入活性が保持されると考えた。また、PEGとFXのモル比率が2000:1のPEG-FXを利用して作製したPEG-FX-Adベクターの粒子径を

Table 1. Sizes of unmodified and PEG-FX-Ad vector particles

Vector	Size (nm)
Ad-L2	121 ± 9.6
FX-Ad-L2	120 ± 5.5
PEG20000-FX-Ad-L2	136 ± 23
PEG40000-FX-Ad-L2	172 ± 49
PEG20000-FX-Ad-L2 + FX*	129 ± 15
PEG40000-FX-Ad-L2 + FX*	143 ± 9.6

*Unmodified FX was added to PEG-FX-Ad-L2 at the final concentration of 1 μg/ml, and incubated for 30 min before measurement.

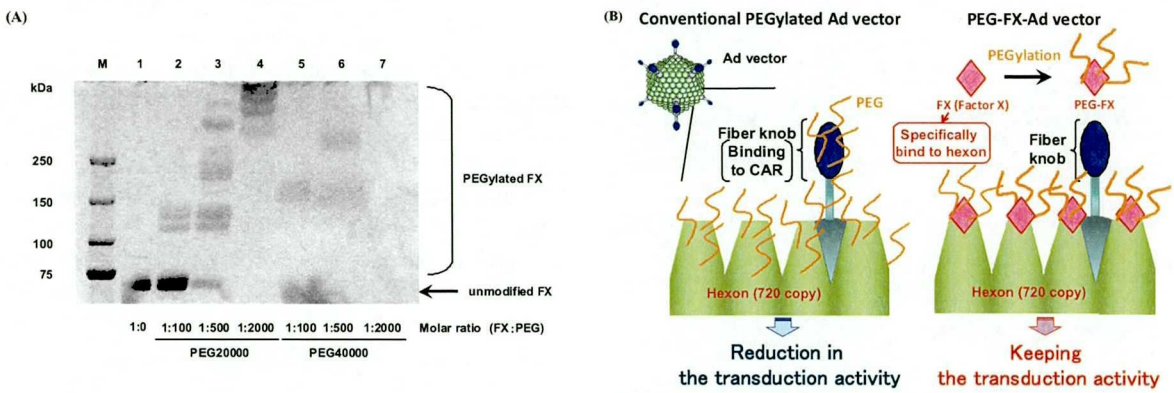


Figure 2. SDS-PAGE for PEG-FX and the construction strategy for the PEG-FX-Ad vectors. (A) SDS-PAGE analysis of unmodified FX and PEG-FX under reducing conditions. The gels were run under identical conditions, and proteins were stained with Coomassie blue. Lane M, protein marker; lane 1, unmodified FX; lanes 2-4, PEG20000-FX (lane 2, FX:PEG20000 = 1:100 molar ratio; lane 3, 1:500; lane 4, 1:2000); lane 5-7, PEG40000-FX (lane 4, FX:PEG40000 = 1:100 molar ratio; lane 5, 1:500; lane 6, 1:2000). (B) Schematic illustration of construction strategy for the PEG-FX-Ad vectors. FX was conjugated with activated PEG20000 or PEG40000. Ad vector was incubated with PEG-FX at a mixing ratio of 1:1000 molar ratio, creating the PEG-FX-Ad vectors.

測定したところ、PEG20000 もしくは PEG40000 で修飾した PEG20000-FX-Ad-L2、PEG40000-FX-Ad-L2 の粒子径は、Ad-L2 および未修飾 FX を混合した FX-Ad-L2 と比較して、増加した (Table 1)。これにより、PEG-FX が Ad 粒子表面に結合していることが示唆された。

PEG-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討 (*In vitro*)

FX を用いた Ad-L2 のヘキソン特異的な PEG 化は、Ad ファイバーと CAR の相互作用を阻害せず、CAR 陽性細胞における Ad-L2 の遺伝子発現効率に影響を与えないと考えられた。実際に、CAR 陽性細胞である SK HEP-1 細胞に対し遺伝子導入実験を行ったところ、PEG20000-FX-Ad-L2、PEG 40000-FX-Ad-L2 は、FX と PEG のモル比率が 1:100 および 1:500 の場合において、Ad-L2 と同程度の遺伝子発現効率を示した (Figure 3A)。本結果より、PEG-FX を用いた PEG 化はファイバーと CAR の相互作用に大きな影響を与えないことが示された。しかしながら、FX と PEG のモル比率が 1:2000 の場合においては、PEG20000 -FX-Ad-L2 と PEG40000-FX-Ad-2 の両方で、Ad-L2 と比較して遺伝子発現効率がわずかに減少した。これは、PEG-FX が CAR とファイバーの相互作用をわずかに阻害したことによるものと考えられた。一方、CAR 陰性細胞である SF295 細胞に対し遺伝子導入実験を行ったところ、FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率は Ad-L2 と比較して約 18 倍上昇した(Figure 3B)。これは、細胞表面上のヘパラン硫酸と FX の相互作用により遺伝子導入が促進されたことによると考えられた。また、FX と PEG の比率が 1:100 の PEG-FX で修飾した場合においても、PEG20000-FX-Ad-L2 と PEG40000-FX-Ad-L2

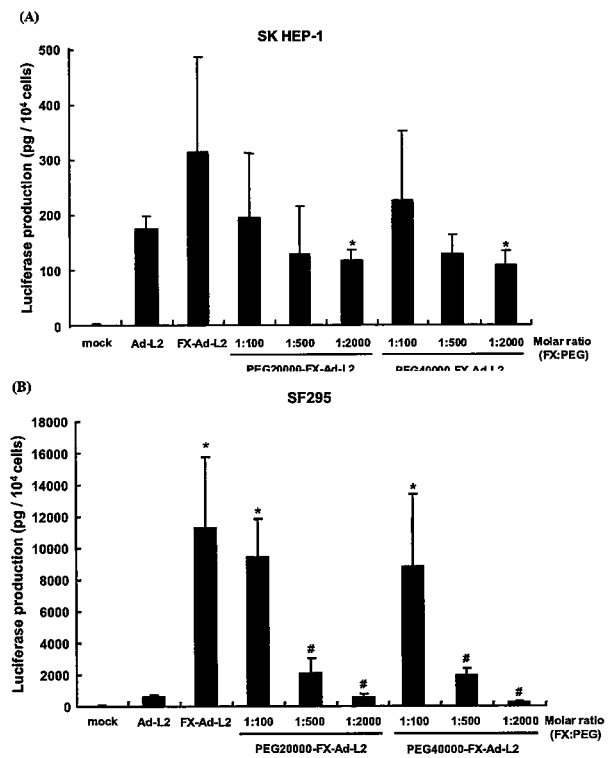


Figure 3. *In vitro* transduction efficiencies of the PEG-FX-Ad vectors. SK HEP-1 cells (A) and SF295 cells (B) were transduced with Ad-L2, FX-Ad-L2, PEG20000-FX-Ad-L2, and PEG40000-FX-Ad-L2 at 300 (SK HEP-1 cells) or 3000 (SF295 cells) VP/cell for 1.5 h. After a 48-h incubation, the levels of luciferase production were determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means ± s.d. (n = 4; *P < 0.05 vs. Ad-L2, #P < 0.05 vs. FX-Ad-L2).

の遺伝子発現効率は Ad-L2 と比較して約 14 倍上昇した。これは、FX と PEG の比率が 1:100 の条件下では、FX が十分に PEG 化されていないことで未修飾の FX が Ad ヘキソンに結合し、遺伝子導入を促進したためと考えられた。一方、FX と PEG のモル比が上昇するにつれて、PEG20000-FX-Ad-L2 と PEG40000-FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率は減少した。これは、FX と PEG の比率を上げることで、PEG 化されていない FX が減少するためと考えられた。さらに、FX と PEG の比率が 1:2000 の PEG-FX で作製した PEG40000-FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率は、Ad-L2 と比較して有意に減少した。これは、ヘキソンに結合した PEG40000-FX が、CAR 陰性細胞における主要感染経路であるペントンベースの RGD と α_v インテグリンの相互作用を阻害したことによると考えられた。これらの結果から、以降の実験では FX と PEG のモル比が 1:2000 の PEG-FX を用いて Ad ベクターを修飾した PEG20000-FX-Ad-L2 と PEG40000-FX-Ad-L2 を使用することとした。

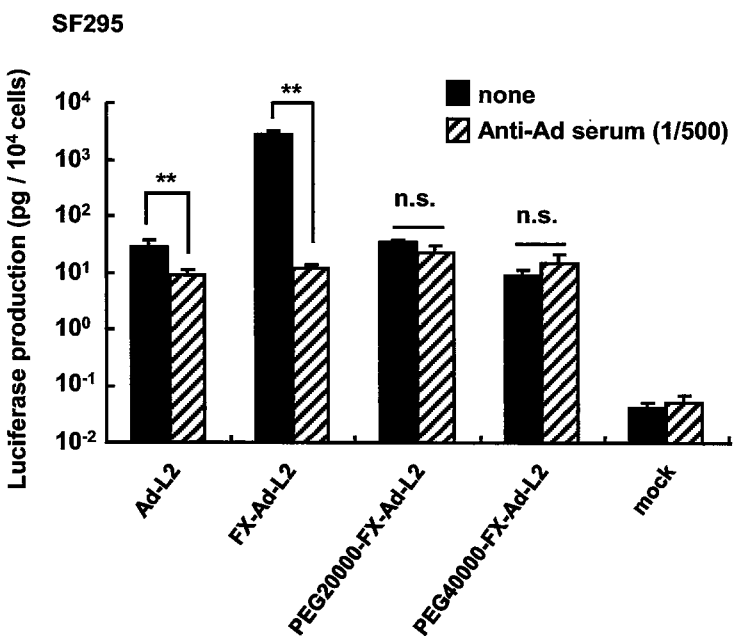


Figure 4. Transduction efficiencies of the PEG-FX-Ad vectors in the presence or absence of anti-Ad serum. Ad-L2, FX-Ad-L2, PEG 20000-FX-Ad-L2 and PEG40000 -FX-Ad-L2 were incubated with anti-Ad serum for 20 min, and then added to SF295 cells at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48-h incubation, the levels of luciferase production were determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means ± s.d. (n = 4; **P < 0.01, n.s.; not significant).

次に、PEG-FX-Ad ベクターが抗 Ad 中和抗体を回避可能か検討するため、抗 Ad 中和抗体存在下における遺伝子導入実験を行った。未修飾の Ad ベクターと、PEG 化していない FX を混合した FX-Ad ベクターは、抗 Ad 中和抗体存在下においてそれぞれ有意に遺伝子発現効率が低下した。これに対し、PEG20000 もしくは PEG40000 で修飾した PEG-FX を混合した PEG-FX-Ad ベクターにおいては、抗中和抗体存在下でも遺伝子導入効率の低下は観察されなかった。従って、PEG-FX-Ad ベクターは、抗 Ad 中和抗体を回避可能であることが示された (Figure 4)。

PEG-FX-Ad ベクター生体内投与後の血中滞留性評価

PEG-FX で修飾することにより Ad ベクターの血中滞留性が向上するかどうかを検討した。C57/BL6 マウスに、各種 Ad ベクターを静脈内投与し、血中の Ad ベクターゲノム量を測定したところ、PEG20000-、PEG 40000-FX-Ad ベクターでは、未修飾の Ad ベクターおよび未修飾 FX を混合した FX-Ad ベクターと比較して、有意に高い Ad ゲノム量を示した (Figure 5)。このことから、PEG-FX を利用したヘキソン特異的な PEG 化により Ad ベクターの血中滞留性が向上したことが示された。

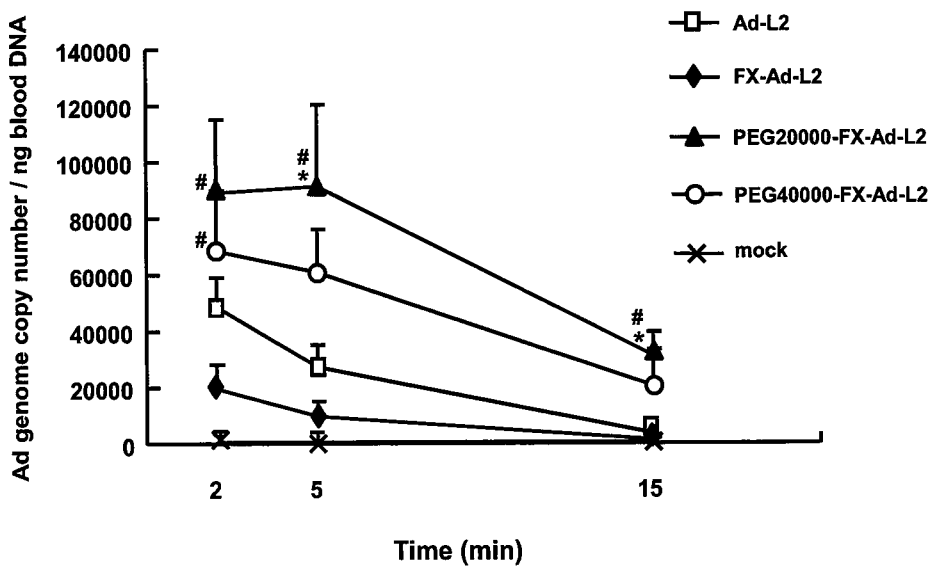


Figure 5. Blood clearance kinetics of the PEG-FX-Ad vectors after intravenous administration into tumor-bearing mice. B16 tumor- bearing mice were intravenously administered Ad-L2, FX-Ad-L2, PEG20000-FX-Ad-L2, or PEG40000-FX-Ad-L2 at the dose of 1 x 10^{10} VP/mouse. The blood was collected at the indicated time points via retro-orbital bleeding. The Ad vector genome copy numbers in the blood were determined by real-time quantitative PCR. The data are expressed as the means ± s.e. (n = 4; $^{\#}P < 0.05$ vs. FX-Ad-L2, $^{*}P < 0.05$ vs. Ad-L2).

PEG-FX-Ad ベクターの組織集積性ならびに遺伝子発現効率の検討 (*In vivo*)

PEG-FX-Adベクターの生体内投与後の肝臓および腫瘍へのAdベクター集積量を検討するため、皮下腫瘍モデルマウスに各種 Ad ベクターを投与し、各組織の Ad ゲノムコピー数をリアルタイム PCR 法により測定した。その結果、肝臓における Ad ゲノムコピー数はは有意な差こそ認められなかったものの、Ad-L2、FX-Ad-L2 と比較して PEG20000-FX-Ad-L2 で約 5 倍、PEG40000-FX-Ad-L2 で約 2 倍に増加した (Figure 6A)。腫瘍においては、FX-Ad-L2 の Ad ゲノムコピー数は Ad-L2 と比較して約 5 倍増加した (Figure 6B)。これは、Ad ベクターに予め結合させた未修飾の FX が腫瘍への遺伝子導入効率を促進したためと考えらえる。また、有意な差こそ認められなかったが、腫瘍における Ad ゲノムコピー数は Ad-L2 と比較して PEG20000-FX-Ad-L2 で約 2 倍、PEG40000-FX-Ad-L2 で約 5 倍に増加した。以上から、PEG-FX による Ad ベクターの修飾は、肝臓への Ad ベクターの集積を抑制しないが、腫瘍への集積を促進することが示唆された。次に、PEG-FX で修飾することで Ad ベクターの肝臓での遺伝子発現効率

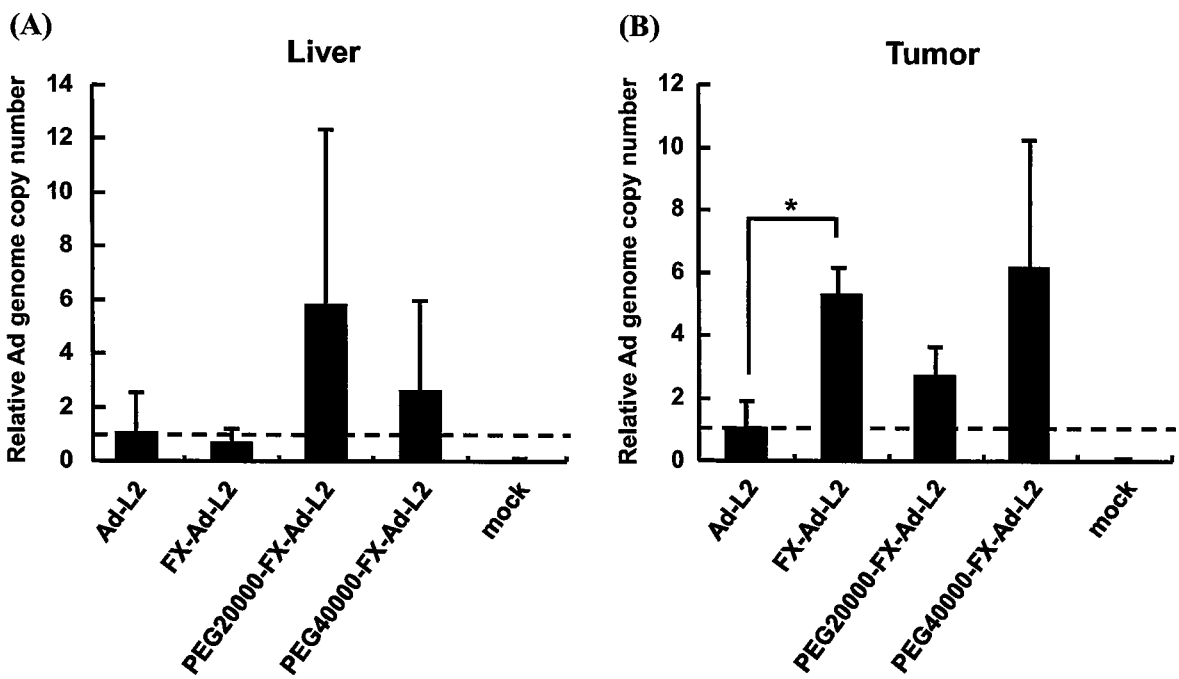


Figure 6. Tissue distribution of the PEG-FX-Ad vectors after intravenous administration into tumor-bearing mice. B16 tumor-bearing mice were intravenously administered the PEG-FX-Ad vectors. Forty-eight hours after administration, the liver (A) and tumor (B) were harvested, and the total DNA, including the Ad vector genome, was isolated from the organs. The Ad vector copy numbers were determined by real-time quantitative PCR. The data are expressed as the means ± s.d. ($n = 4$; $*P < 0.05$).

が低下するか、また、血中滞留性の向上により腫瘍での遺伝子発現効率が上昇するかどうかを検討するため、前述の皮下腫瘍モデルマウスに各種Adベクターを静脈内投与し、肝臓および腫瘍での遺伝子発現効率を測定した。その結果、各群の肝臓における遺伝子発現効率に顕著な差は認められなかった（Figure 7A)。一方、腫瘍においては、PEG40000-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率は、有意な差こそ認められないものの、その他のベクターと比較して約5倍程度上昇した（Figure 7B)。これは、PEG-FX-Ad の血中滞留性が向上したことによる EPR 効果によるものと推察された。肝臓で遺伝子発現効率が変化しなかった理由としては、PEG-FX-Ad ベクターを投与した場合、血中に予め存在する内因性の FX が PEG-FX-Ad ベクター上の PEG-FX と徐々に置き換わり、結果として肝臓に移行する可能性が考えられた。そこで、生体内の FX を不活化した場合には、PEG-FX-Ad ベクターに結合した PEG-FX は内因性 FX と置換することなく、PEG の効果を十分に発揮するのではないかと考えた。

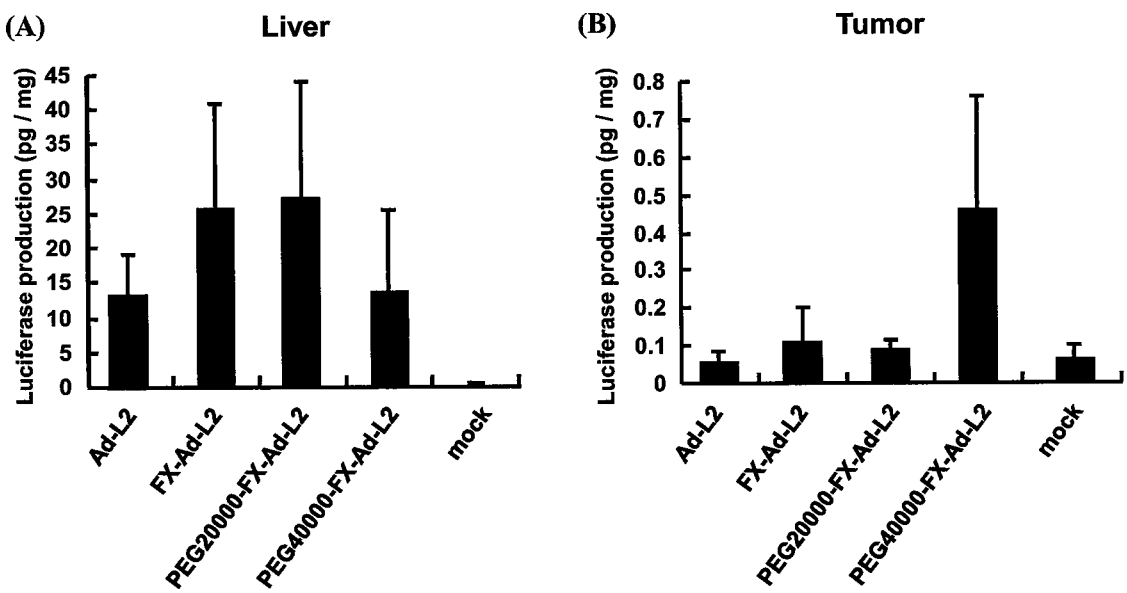
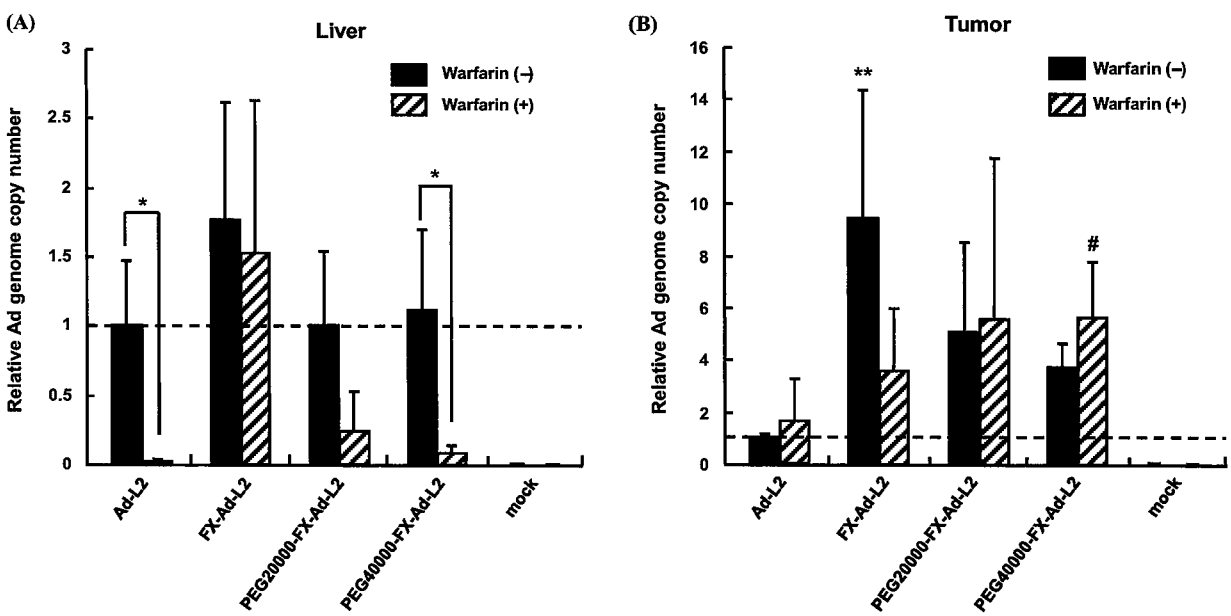


Figure 7. *In vivo* transgene expression levels following intravenous administration of the PEG-FX-Ad vectors into tumor-bearing mice. B16 tumor-bearing mice were intravenously administered the Ad vectors. Forty-eight hours after administration, the liver (A) and tumor (B) were harvested and luciferase activity was measured. The data are expressed as the means ± s.d.

Warfarin 前投与マウスにおける遺伝子発現効率の検討

内因性の FX を不活化するために、予め Warfarin を投与することとした。その Warfarin 前投与マウスに各種 Ad ベクターを投与したところ、従来の Ad-L2 投与群では肝臓における Ad ゲノムコピー数と遺伝子発現効率がともにバックグラウンドレベルまで減少した。また、FX-Ad ベクター投与群では、Warfarin 投与、未投与にかかわらず、その Ad ゲノムコピー数もしくは遺伝子発現効率に変化は認められなかったが、PEG40000-FX-Ad ベクターでは、Warfarin 前投与マウスにおける Ad ゲノムコピー数および遺伝子発現効率が Warfarin 非投与マウスと比較して大きく減少した (Figure 8A and 9A)。また、PEG20000-FX-Ad-L2 の Ad ゲノムコピー数および遺伝子発現効率も PEG40000-FX-Ad-L2 と同様の傾向を示した。従って、PEG-FX-Ad ベクターは FX 依存的な経路を介し肝臓に移行ならびに遺伝子導入されることが示された。一方、腫瘍においては、いずれの Ad ベクターを投与した場合でも、Warfarin 前投与群と非投与群の Ad ゲノムコピー数と遺伝子発現効率に顕著な差は認められなかった。これにより、腫瘍への移行ならびに遺伝子導入は FX 非依存的な経路によるものであることが示された。さらに、PEG40000-FX-Ad ベクターでは、Warfarin 投与マウスで他の群と比較して腫瘍での Ad ゲノムコピー数および遺伝子発現効率が有意に上昇した (Figure 8B and 9B)。また、腫瘍と肝臓における Ad ゲノムコピー数および遺伝子発現効率も、



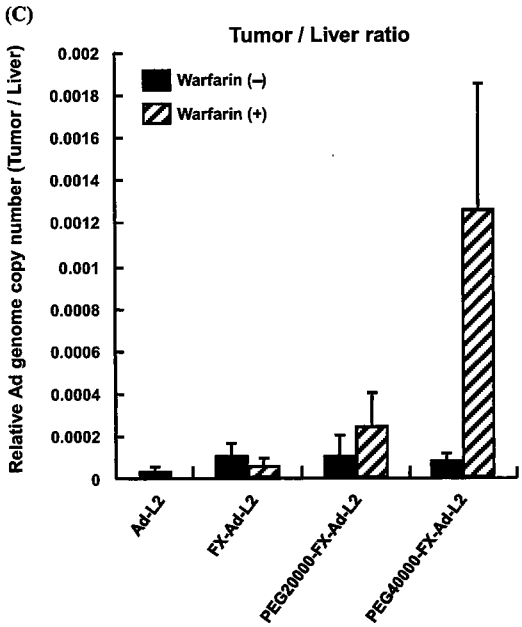
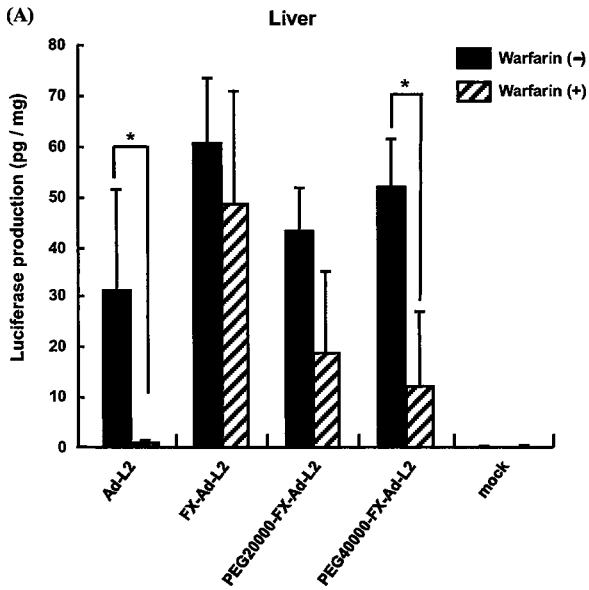
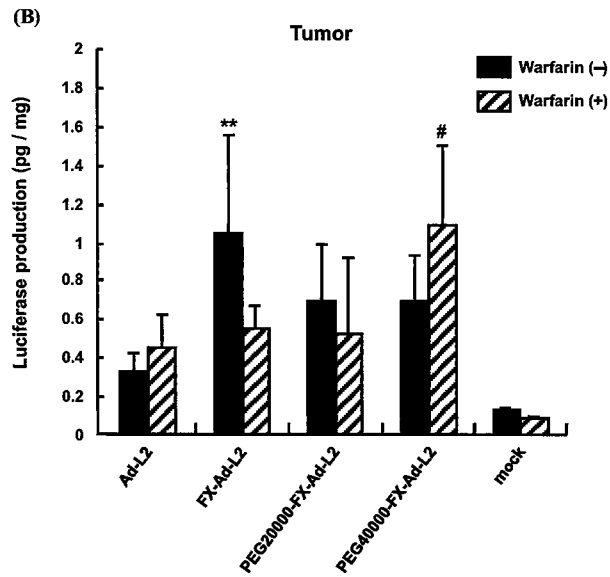


Figure 8. Tissue distribution of the PEG-FX-Ad vectors after intravenous administration into tumor-bearing warfarinized mice. B16 tumor-bearing conventional and warfarinized mice were intravenously administered the PEG-FX-Ad vectors. Forty-eight hours after administration, the liver (A) and tumor (B) were harvested, and the total DNA, including the Ad vector genome, was isolated from the organs. The Ad vector copy numbers were determined. The tumor-to-liver ratio of the organ distribution is shown in (C). The data are expressed as the means ± s.d. ($n = 4$; $^{*}P < 0.05$, $^{\#}P < 0.05$ vs. Ad-L2 warfarin (+), $^{**}P < 0.05$ vs. Ad-L2 warfarin (-)).

PEG40000-FX-Ad-L2 では Ad-L2 と比較して 14 倍以上に改善された（Figure 8C and 9C)。Warfarin 前投与により、内因性の FX が不活化されたため、PEG-FX-Ad ベクターに結合した PEG-FX が、Ad 粒子から離れず、PEG の効果を十分に発揮したためと考えられる。すなわち、PEG-FX の効果により、PEG-FX-Ad ベクターは肝臓への取り込みを回避し、腫瘍に移行したと推察された。また、PEG40000-FX-Ad ベクターでは、PEG20000-FX-Ad ベクターと比較して、Warfarin による阻害効果が顕著に認められたことから、PEG40000-FX は、Ad ベクターの臓器への移行性に大きく影響することが示唆された。以上の結果から、PEG-FX-Ad ベクターを生体内に投与した場合、PEG-FX-Ad ベクターに結合した PEG-FX が内因性 FX と置き換わっており、それが PEG-FX の効果を相殺していることが強く示唆された。





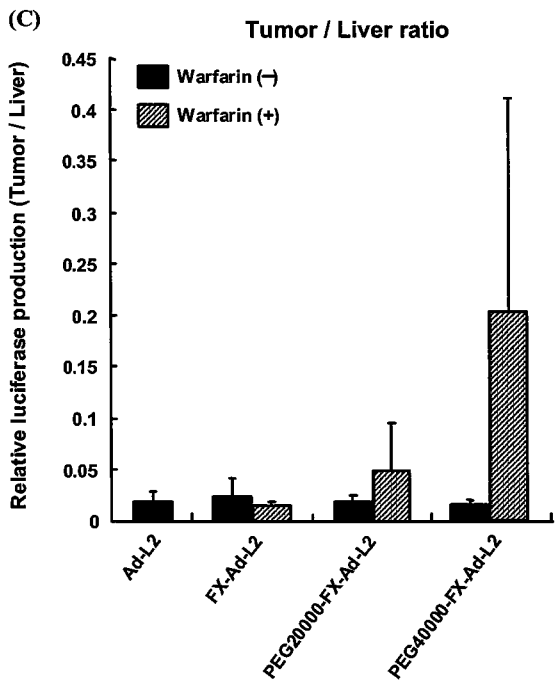
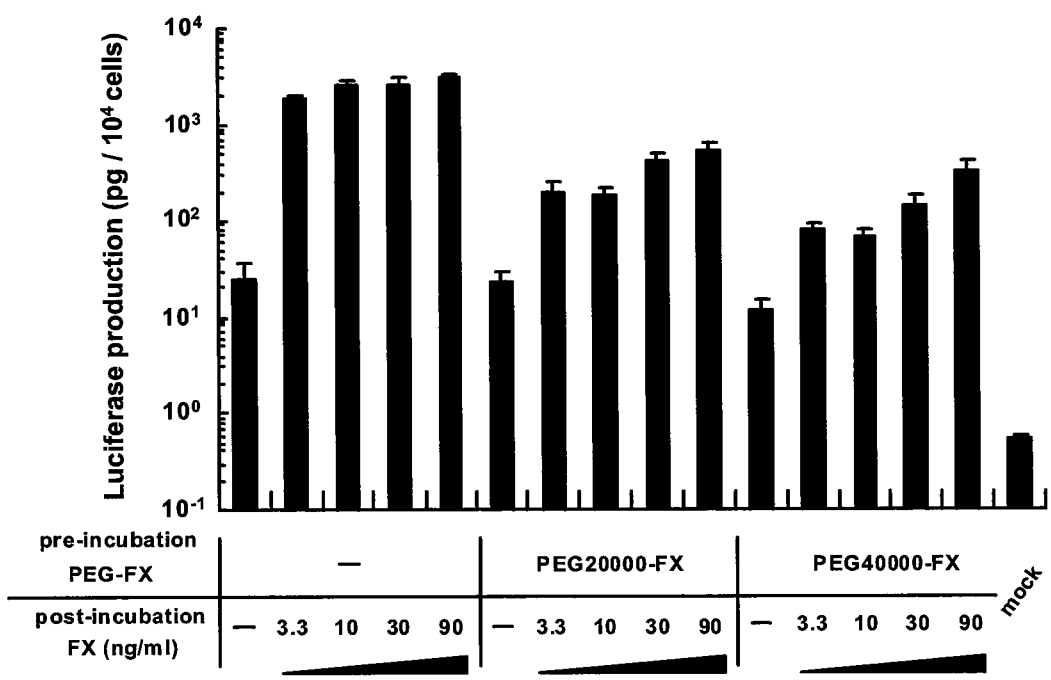


Figure 9. *In vivo* transgene expression levels following intravenous administration of the PEG-FX-Ad vectors into tumor-bearing warfarinized mice. B16 tumor-bearing conventional and warfarinized mice were intravenously administered the PEG-FX-Ad vectors. Forty-eight hours after administration, the liver (A) and tumor (B) were harvested, and luciferase activity was measured. The tumor-to-liver ratio of the transduction efficiencies is also shown (C). The data are expressed as the means ± s.d. (n = 4; *P < 0.05, #P < 0.05 vs. Ad-L2 warfarin (+), **P < 0.05 vs. Ad-L2 warfarin (-)).

未修飾 FX 作用後における PEG-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

そこで次に、Ad ヘキソンに結合した PEG-FX が内因性の FX と置換することで遺伝子導入効率に影響を与えるかどうかを検討するため、CAR 陰性細胞である SF295 細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。各種 Ad ベクターに未修飾の FX を作用させ、その混合液を SF295 細胞に作用させた。その結果、Figure 3B と同様に FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率は、Ad-L2 と比較して約 74 倍に上昇した。そして、FX の濃度が増加するに伴って、FX の濃度依存的に FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率が上昇した。さらに、PEG20000-FX-Ad-L2、PEG40000-FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率も FX の濃度依存的に上昇した (Figure 10A)。この結果から、Ad ベクターに結合している PEG-FX が未修飾の FX と置き換わることが示された。一方、FX-Ad-L2 に PEG-FX を作用させても、FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率に変化は認められなかった (Figure 10B)。このことから、FX のヘキソンとの結合力は、PEG-FX のヘキソンとの結合力より強いことが示唆された。さらに、未修飾の FX を加えた状態で PEG-FX-Ad-L2 の粒子径を測定したところ、その粒子径は、FX-Ad-L2 よりも依然大きいものであった (Table 1)。これにより、Ad 粒子に結合している PEG-FX は未修飾の FX を作用することで、一部分が未修飾 FX と置き換わることが示唆された。

(A)



(B)

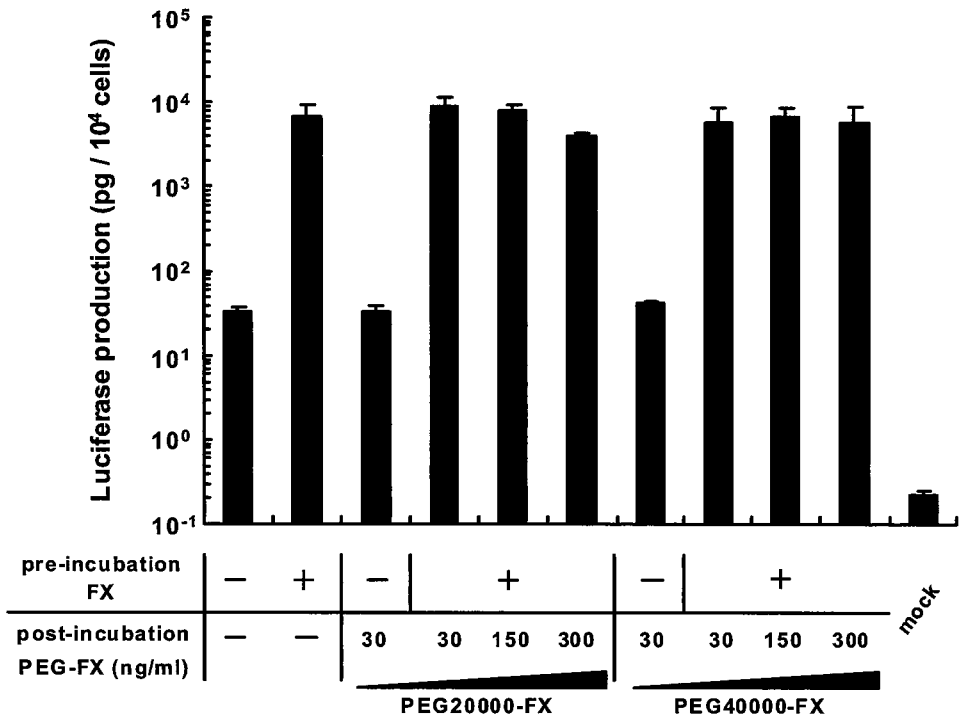
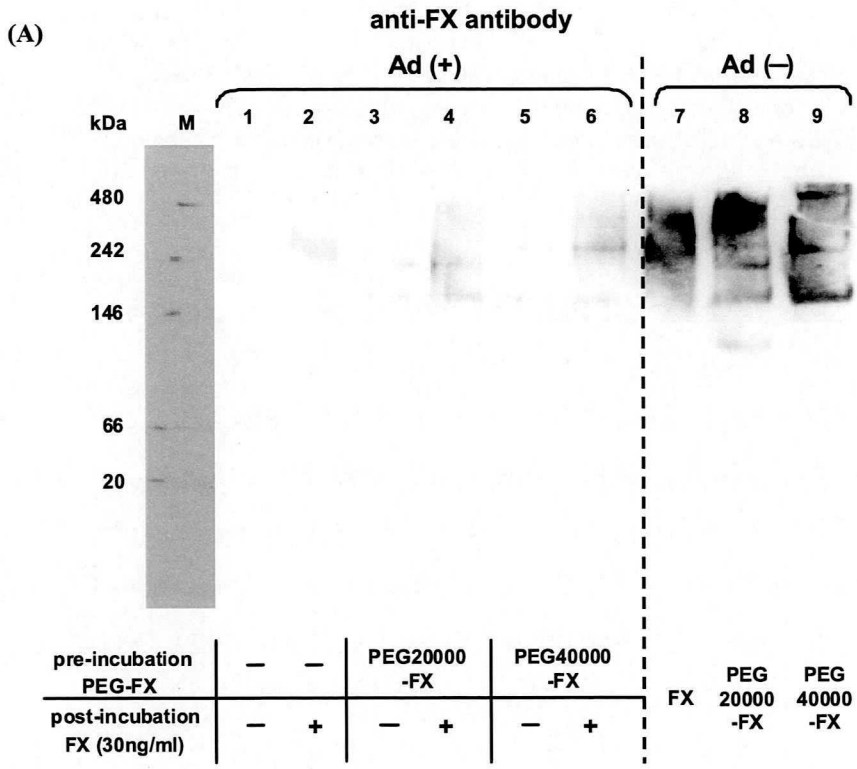


Figure 10. (A) *In vitro* transduction efficiencies of the PEG-FX-Ad vectors following incubation with unmodified FX. Ad vectors were pre-incubated with PEG-FX for 30 min for preparation of the PEG-FX-Ad vectors. Then unmodified FX was added and incubated with the PEG-FX-Ad vectors for 30 min. The mixtures were added to SF295 cells at 3000 VP/cell and incubated for 1.5 h at 37°C, after which the cells were washed and incubated at 37°C. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction. (B) *In vitro* transduction efficiencies of the FX-Ad vectors following incubation with PEG-FX. Ad vectors were pre-incubated with FX for 30 min for preparation of FX-Ad vectors. Then PEG-FX was added to the PEG-FX-Ad vectors and incubated for 30 min. The mixtures were added to SF295 cells at 3000 VP/cell and incubated for 1.5 h at 37°C, after which the cells were washed and incubated at 37°C. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction. The data are expressed as the means ± s.d. (n = 4).

BN-PAGE による PEG-FX と未修飾 FX の置換の検討

続いて、Native-PAGE により、in vitro において PEG-FX-Ad ベクターに結合させた PEG-FX が内因性 FX と置換するかどうかを検討した。PEG-FX-Ad ベクターに未修飾の FX を作用させ、混合液を Blue-Native (BN)-PAGE に展開した。その後、抗 FX 抗体を用いて Ad ヘキソンから解離した PEG-FX を Western blotting により検出した (Figure 11A)。未修飾 FX を添加することで、Ad ヘキソンから PEG-FX が遊離すると予想されるため、遊離した PEG20000-FX あるいは PEG40000-FX が抗 FX 抗体により検出されると考えられた。まず、Lane 2 で未修飾の FX が検出された。FX の分子量は 58.9kDa であるが、バンドは予想より高い位置に検出された。これは、FX が多量体

を形成するためであると考えられた。実際に、FX のみの粒子径を測定したところ、凝集した FX が計測された（data not shown）。また、Lane 3 と Lane 5 において、遊離した PEG-FX に相当する薄いバンドが観察された。Lane 8 と Lane 9 の PEG-FX のみを流したレーンとバンドの位置が同じであることから、Lane 3 と Lane 5 のバンドはヘキソンに結合していない PEG-FX が検出されたと考えられる。次に、未修飾の FX を加えることで、Lane 4 と Lane 6 で、遊離 PEG-FX に相当する位置に Lane 3 および Lane 5 と比較して濃いバンドが観察された。また、Lane 3 から Lane 6 のバンドは、Lane 2 の未修飾の FX のバンドと比較して異なるバンドパターンを示したことから、これらのバンドは、未修飾の FX ではなく PEG-FX であることが示唆された。次に、Lane 3 から Lane 6 で検出されたバンドが、後から添加した未修飾の FX ではなく、Ad ヘキソンから解離した PEG-FX であることを証明するために、メンブレンをリプローブした後、抗 PEG 抗体により検出した（Figure 11B）。そうしたところ、Figure 11A の Lane 3 から Lane 6 で観察されたバンドと同様の位置に、抗 PEG 抗体によりバンドが検出された。このことから、これらのバンドは、未修飾の FX ではなく PEG-FX であることが示された。以上の結果から、Ad ヘキソンに結合した PEG-FX は、未修飾 FX を加えることで置換されることが確認された。



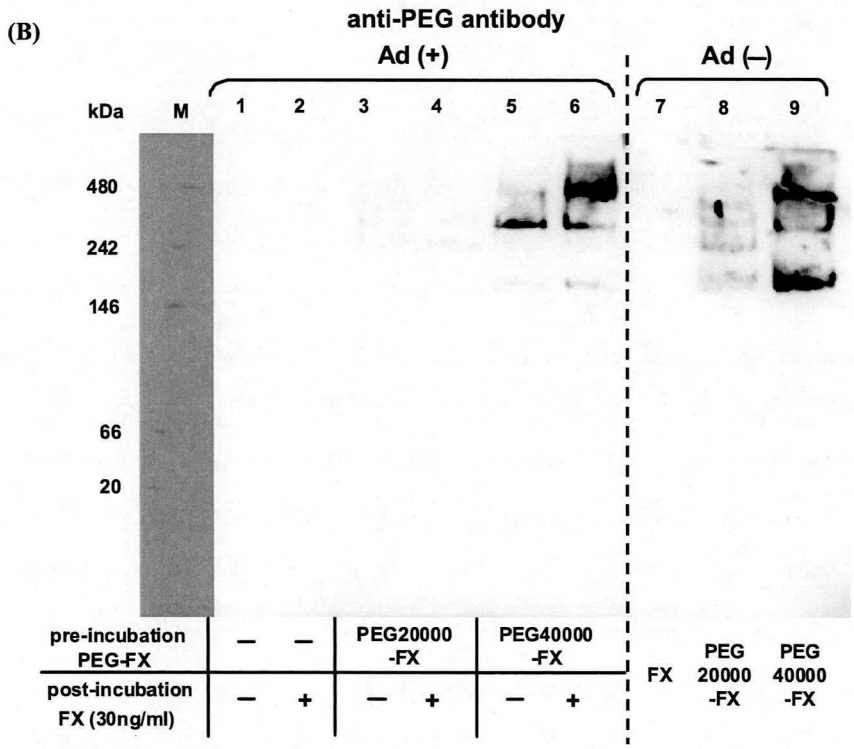


Figure 11. Western blotting analysis utilizing BN (Blue-Native)-PAGE for assessment of the replacement of PEG-FX with FX. Ad-L2 pre-incubated at 56°C for 10 min were incubated with FX, PEG20000-FX, or PEG40000-FX for 30 min. After a 30-min incubation, unmodified FX was added to the mixture. These mixtures were loaded on native gradient gels according to the manufacturer's protocol. A Western blot analysis was carried out using anti-human FX polyclonal antibody (A) or anti-PEG monoclonal antibody (B). Lane M, protein marker; lane 1, Ad-L2; lane 2, Ad-L2 + unmodified FX; lane 3, Ad-L2 + PEG20000-FX; lane 4, Ad-L2 + PEG20000-FX supplemented with unmodified FX; lane 5, Ad-L2 + PEG40000-FX; lane 6, Ad-L2 + PEG40000-FX supplemented with unmodified FX; lane 7, unmodified FX; lane 8, PEG20000-FX; lane 9, PEG40000-FX.

【考察】

本研究により、FX を利用することで簡便かつヘキソン特異的に Ad ベクターを修飾可能であることが示され、作製した PEG-FX-Ad ベクターは、抗 Ad 中和抗体を回避可能であり、血中滞留性の向上が認められた。すなわち、PEG-FX でヘキソンを特異的に修飾することで、生体内での Ad ベクターの挙動を変化させることが可能となった。従って、PEG-FX を用いた修飾法は、組織特異的な遺伝子導入を目指したターゲティング Ad ベクターの開発に向けて、有効な外殻タンパク質の修飾法であると考えられる。

我々の研究室ではこれまでに、ヘキソン特異的 PEG 化 Ad ベクターとして、ビオチン(bio)-アビジン(Avi)の特異的結合を利用した Ad ベクターを開発している [28]。すなわち、bio 結合配列を遺伝子工学的にヘキソンに挿入した Ad ベクターを作製し、bio と Avi を加えることで Ad-bio-Avi 複合体を作製した後、これを bio 化した PEG (bio-PEG) で修飾したものである。この Ad-bio-Avi-bio-PEG ベクターを生体内に投与したところ、肝臓での遺伝子発現効率は従来の Ad ベクターと比較して、有意に減少することを報告した。しかしながら、Ad-bio-Avi-bio-PEG ベクターでは、PEG-FX-Ad ベクターで観察された投与早期での血中滞留性の向上は認められず、腫瘍での遺伝子発現はほとんど認められなかった。これは、アビジンとビオチンの結合によるウイルス粒子同士の凝集によるものと考えられた。本研究で作製した PEG-FX-Ad ベクターでは、粒子径測定の際、凝集シグナルは検出されず、腫瘍での遺伝子導入活性が保たれたままであったことから、Ad 粒子同士の凝集は起こっていないと考えられる。

上記のような利点を有している反面、血中に投与した場合には PEG-FX-Ad ベクターに結合させた PEG-FX が内因性の FX と置き換わるという問題点も明らかとなった。本研究で用いた PEG は、FX のリジン残基を修飾する。すなわち、FX は PEG によりランダムに修飾される。したがって、FX の Ad ヘキソンとの結合部位が PEG 化された場合には、PEG-FX の Ad ヘキソンへの親和性が減弱すると考えられる。実際に、Ad ヘキソンに結合した PEG-FX は未修飾の FX を後から加えた場合には置き換わり、Ad を FX で修飾した FX-Ad ベクターに後から PEG-FX を加えた場合には置換されなかった。これは、PEG-FX のヘキソンに対する親和性が FX より低いことを示唆している。従って、ヘキソンとの親和性が高くなるように PEG-FX を改良する必要があると考えられる。そのためには、FX をランダムに PEG 化するのではなく、部位特異的な PEG 化が望まれる。これまでに、種々のタンパク質において、N 末端特異的な PEG 化手法

を用いた、部位特異的 PEG 化が試みられていることから[29-31]、この手法を応用して、FX も N 末端特異的に PEG 化することが有望であると考えられる。N 末端特異的な PEG 化は低分子量のタンパク質が適していることから、FX のヘキソンとの結合ドメインである g-carboxylated glutamic acid (GLA) ドメイン[22,32,33]の N 末端特異的な PEG 化が有望であると考えられる。実際に Chen らにより、GLA ドメインに scFv を融合させ、Ad ヘキソンを修飾した Ad ベクターが開発されている[34]。N 末端特異的 PEG 化 GLA ドメインは、Ad ヘキソンに高親和性で結合すると予想され、PEG-FX-Ad ベクターの腫瘍と肝臓での遺伝子発現効率の改善が期待できる。

一方、PEG 化 Ad ベクターの遺伝子発現プロファイルに影響を及ぼす因子としては、PEG 分子の大きさが挙げられる。これまでの研究で、PEG 分子のサイズが大きくなればなるほど肝臓での遺伝子発現効率が減少し、血中滞留性が向上することが報告されている[35,36]。Doronin らは、PEG20000 で修飾した Ad ベクターは PEG5000 で修飾した Ad ベクターよりも肝臓での遺伝子導入効率が低いことを示した[35]。本研究においても、PEG40000-FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率が PEG20000-FX-Ad-L2 の遺伝子発現効率よりも低かったことから、PEG 分子のサイズが Ad ベクターの肝臓からの回避に重要であることが示唆された。

また、一般的に PEG 化は、血液因子との相互作用を阻害することが報告されている[37,38]。本研究でも、PEG-FX で Ad ベクターを修飾することで、肝臓への集積が減少し、腫瘍への集積が増加することが期待された。しかしながら、PEG-FX-Ad ベクターは腫瘍への集積量が増加したものの、野生型マウスの肝臓において、従来の Ad ベクターと同程度の遺伝子発現効率を示した。これは、内因性の FX とヘキソンに結合する PEG-FX の置換が一つの要因であると考えられるが、その他の要因として PEG 密度が挙げられる。Gao らは、Ad 粒子の表面に露出しているリジン残基をほぼ 100%PEG 化した Ad ベクターを作製し、肝臓での遺伝子発現効率の減少と EPR 効果による腫瘍での遺伝子発現効率の上昇を報告した[37]。本研究においても、FX の PEG 密度をコントロールすることにより、効果的な遺伝子発現を制御できると考えられる。

PEG の機能としては、血液因子との相互作用の阻害以外にクッパー細胞や脾臓のマクロファージへの取り込み回避能がよく知られている[39,40]。近年の研究で、Ad ベクターを生体内に 10^{11} VP 投与した場合、90%以上がクッパー細胞に取り込まれることが報告されている[17,20]。最近、Prill らが、PEG5000 で修飾した Ad ベクターは、クッパー細胞への取り込みを回避することで、肝実質細胞での遺伝子発現効率が未修飾の Ad ベ

クターよりも上昇することを報告した[38]。本研究でも、肝臓における PEG-FX-Ad ベクターの遺伝子発現効率は、従来の Ad ベクターと比較して、その平均値が上昇した。すなわち、Ad ベクターの肝臓回避に向けて Ad ベクターを PEG-FX で修飾することで、クッパー細胞への取り込みが回避されることが推察された。しかしながら、クッパー細胞を回避した PEG-FX-Ad ベクターは、内因性 FX との置換により、FX 依存的に肝実質細胞へ効率よく遺伝子導入すると考えられた。

本研究では、Ad ベクターの修飾のためのアダプター分子として FX に着目し、PEG 化 FX を利用することでヘキソン特異的に PEG 化した PEG-FX-Ad ベクターを作製し、抗 Ad 中和抗体を回避可能かつ血中滞留性を向上した Ad ベクターの開発に成功した。今後は、N 末端特異的 PEG 化 GLA ドメインを候補とする、強固に Ad ヘキソンと結合可能な PEG-FX を作製し、血中に投与しても内因性 FX と置換しないような改変型 Ad ベクターの開発が必要である。

第二章　外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型アデノウイルスベクターの開発

本章では、標的組織特異的に遺伝子導入可能なAdベクターの開発に向け、遺伝子工学的な手法によりAd外殻タンパク質の改変による最適化を目指した。遺伝子治療の重要な標的細胞である造血幹細胞、樹状細胞、悪性度の高い癌細胞などは5型Ad受容体であるCAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を発現していないため、これらの細胞に対しては遺伝子導入が困難である。この問題を解決するため、ファイバー領域を35型アデノウイルス由来のものに置換したファイバー置換型5型アデノウイルス(AdF35) ベクターが開発されてきた[41, 42]。AdF35ベクターは、ヒトではほぼ全ての細胞に発現しているCD46を感染受容体としているため[43, 44]、従来の5型Adベクターでは遺伝子導入困難な細胞にも効率よく遺伝子導入可能である[41, 42, 45, 46]。

さらに、その後の解析によりAdF35ベクターによる肝臓での遺伝子発現効率は5型Adベクターの約1000分の1と低く、ターゲティング能を備えたAdベクターの開発に向けた基盤ベクターとしての特性も有していることが明らかとなった[15-17]。しかし一方で、CD46はマウスでは精巣を除くほぼ全ての組織で発現が認められていないが、ヒトではほぼ全ての細胞で発現しているため、AdF35 ベクターをヒトに投与した場合、広範な組織に遺伝子導入される恐れがある。そこで本研究では、AdF35 ベクターの元来備えているターゲティングAdベクター開発のための基盤ベクターとしての性質を残しつつ、その欠点を克服するため、AdF35 ベクターの改良を行った。すなわち、35 型 Adファイバーノブ領域に外来ペプチドを挿入することで、CD46への結合性を欠失させるとともに、外来ペプチド依存的に遺伝子導入可能なAdF35ベクターを開発することを試みた。これまでに35型Adファイバーノブ領域に関しては、外来ペプチド挿入に適した部位が明らかとなっていないため、ファイバーノブ領域のCD46との結合に重要な領域に外来ペプチドを挿入することとした。そして、外来ペプチドとしてRGDペプチドを挿入したファイバー置換型Adベクターの遺伝子導入特性を評価した。また、更なる遺伝子発現効率の向上を目指して、ファイバーノブ領域のFGおよびHIループの両方に外来ペプチドを挿入可能なAdF35ベクターを作製し、その機能評価を試みた。

【実験材料および方法】

試薬

コンピテントセル DH5αは TOYOBO より、各種制限酵素は New England Biolabs より、GENECLEAN II はフナコシより、牛胎仔血清 (Fetal calf serum; FCS)、抗生物質は GIBCO-BRL より、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM(DMEM)、MINIMAM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (MEM)、5-20% SuperSep™Ace、$MgCl_2$ は和光純薬より、PreMix (Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequence kit)、5x dilution buffer、SAM solution、BigDye X terminator solution は ABI (Applied Biosystems) より、SuperFect は QIAGEN より、Lipofectamine 2000 は Invitrogen より、培養ディッシュは Nunc より、RNaseA、DNaseI は Roche より、透析膜 (スペクトラ/ポア 7 MW50000) は Spectrum Labs より、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)は Sigma より、BCA protein assay kit は Bio-Rad Laboratories より、PVDF メンブレンはミリポアより、anti-Ad fiber tail monoclonal antibody (4D2) はアブカムより、HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody は Cell Signaling より、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents は GE ヘルスケアバイオサイエンスより、96 穴 Black Plate は Corning より、ピッカジーン LT2.0 は東洋インキより、anti-human CD46 antibody M177 は HyCult Biotechnology より、control mouse IgG1κは eBioscience より、RGD ペプチド (GRGDSP) およびコントロールペプチド (GRGESP) はタカラバイオよりそれぞれ購入した。その他の試薬は分子生物学研究用グレード、研究用特級グレード、またはそれに準ずるものを使用した。

その他の試薬は第一章の実験材料に準じた。

Plasmid

pcDNA3.1-hygro(+)は Invitrogen より購入した。

細胞

Ad ベクターのパッケージング細胞である 293 細胞、Ad5 ファイバーを恒常的に発現する Fiber-293 細胞[47]は DMEM (10% FCS、抗生物質、L-glutamine 含有)を用いて、LN444 細胞 (a human glioblastoma multiforme)は 10% FCS 含有 DMEM を用いて、NIH3T3 (a mouse embryonic fibroblast cell line)、B16 (B16BL6; a mouse

melanoma cell line)は 10% FCS 含有 MEM を用いて、37℃、飽和蒸気圧、5% CO_2 存在下で培養した。なお、本研究において使用した FCS はすべて 56℃、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。

外来ペプチドを挿入可能な AdF35 ベクタープラスミドの作製

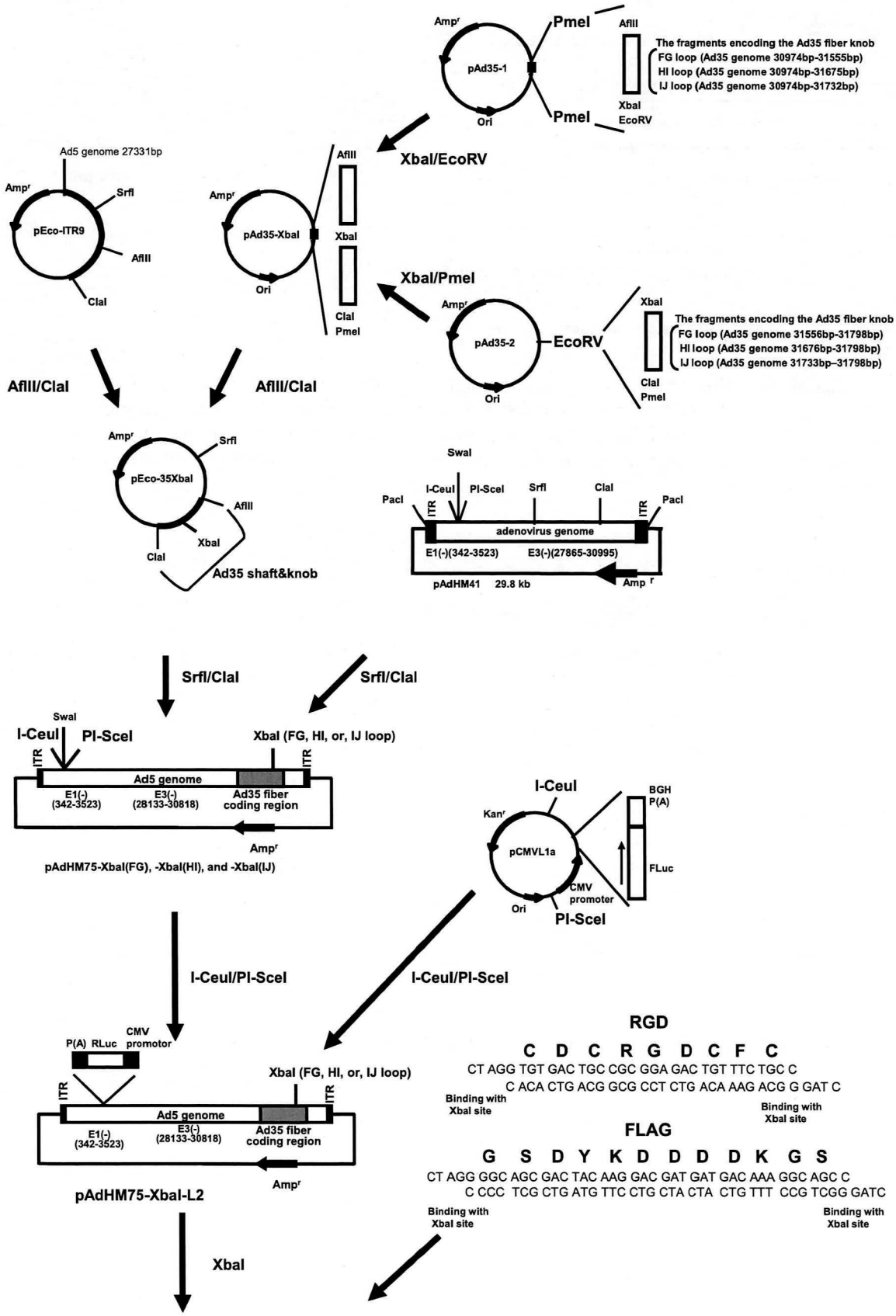
XbaI サイトを 35 型ファイバーノブ領域の CD46 との結合に重要な部位に挿入した pAdHM75-XbaI(FG)、-XbaI(HI)、-XbaI(IJ)は以下のように作製した。

まず初めに、35 型 Ad ゲノムをテンプレートに、35 型 Ad ファイバーノブ領域の FG、HI、IJ loop をそれぞれ次のプライマーを使用して増幅した。FG loop (Ad35 ゲノム、30974-31555 bp)は、AdF35 primer, (5'-CTTAAGTGTTTAACCCCACTAACAACCACAGGC-3')と FG loop-1R (5'-GATATCTCTAGAGTTGAAGGGATAAGCTGTAGTACTTGGC-3')を用いて増幅した。HI ループ (Ad35 ゲノム、30974-31675 bp)は、AdF35 primer と HI loop a-1R (5'-GATATCTCTAGACATACGGCTGTTTAGCATTATAGAAATGTTCAAGGG-3')を用いて増幅した。IJ loop (Ad35 ゲノム、30974-31732 bp)は、AdF35 primer と IJ loop-R (5'-ATCGATTTCGAATCTAGATTCTGGAGATTCACTTGCATTTAGATTCCATTCAAATTGTATGGC-3')を用いて増幅した。得られた PCR 断片をそれぞれ、予め PmeI で処理した pcDNA3.1/Hyg(+)とライゲーションすることによりプラスミド pAd35FG-1、HI-1、IJ-I をそれぞれ得た。

次に、35 型 Ad ゲノムをテンプレートに FG loop もしくは HI loop から C 末端領域までを PCR によって増幅した。FG loop (Ad35 ゲノム、31556-31798 bp) は、FG loop-2F (5'-TCTAGAACCACTACTAGGGATAGTGAAAACTACATTCATGG-3') と Ad35 shaft2-R (5'-GTTTAAACATCGATTTAGTTGTCGTCTTCTGTAATGTAAGAAAGAAAAAGGGG-3')を用いて増幅した。HI loop (Ad35 ゲノム、31667-31798 bp) は HI loop-a2F (5'-TCTAGAATTTCTTCCAATGTTGCCTATGCC-3')と Ad35 shaft2-R を用いて増幅した。得られた PCR 断片を予め EcoRV で処理した pcDNA3.1/Hyg(+)とライゲーションすることによりプラスミド pAd35FG-2、HI-2 をそれぞれ得た。また、IJ loop から C 末端領域 (Ad35 ゲノム、31733-31798 bp)を含んだプラスミドは、合成オリゴ DNA である Ad35 IJ-Cter-1 (5'-CTAGAAGCAACATAGCTACGCTGACCACATCCCCCTTTTTCTTTTCTTACATTACAGAAGACGACAACTAAAT-3') と Ad35IJ-Cter-3 (5'-CGATTTAGTTGTCGTCTTCTGTAATGTAAGAAAAGAAAAAGGGGGATGTGGTCAGCGTAGCTATGTTGCTT-3')をハイブリダイゼーションしたフラグメント

を、予め XbaI/ClaI 処理した pcDNA3.1/Hyg(+)とライゲーションすることによりプラスミド pAd35IJ-2 を得た。そして、得られたプラスミド pAd35FG-2、HI-2、 IJ-2 をそれぞれ XbaI/PmeI 処理して得た DNA 断片を、予め XbaI/EcoRV 処理した pAd35FG-1、HI-1、 IJ-1 とそれぞれライゲーションすることにより、プラスミド pAd35FG-XbaI、HI-XbaI、IJ-XbaI を得た。次に、得られたプラスミド pAd35FG-XbaI、HI-XbaI、IJ-XbaI を AflII/ClaI 処理した DNA 断片と pEco-ITR9 を AflII/ClaI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pEco-35FG-XbaI、35HI-XbaI、35IJ-XbaI を得た。 さらに、得られたプラスミド pEco-35FG, HI, IJ-XbaI を ClaI/SrfI 処理した DNA 断片と pAdHM41 を ClaI/SrfI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-XbaI(FG)、-XbaI(HI)、-XbaI(IJ)を作製した。その後、得られたプラスミド pAdHM75-XbaI(FG)を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片とホタルルシフェラーゼ発現カセットを含む pCMVL1 を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-XbaI(FG)-L2 を作製した。

そして、細胞表面のインテグリン ($\alpha_v\beta3$、$\alpha_v\beta5$)に親和性を有する RGD-4C ペプチド (CDCRGDCFC)[48, 49] をコードする DNA 配列を挿入した pAdHM75-XbaI(FG)-L2 に以下のように挿入した。合成オリゴ DNA である Ad35RGD-1 (5'-CTAGGTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGCC-3')と Ad35RGD-2 (5'-CTAGGGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAC-3')をハイブリダイゼーション後、予め XbaI 処理した pAdHM75-XbaI(FG)-L2 とライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-RGD(FG)-L2 を得た。コントロールペプチドである FLAG ペプチドは RGD ペプチドと同様に、合成オリゴヌクレオチド Ad35FLAG-1 (5'-CTAGGGGCAGCGACTACAAGGACGATGATGACAAAGGCAGCC-3') と Ad35FLAG-2 (5'-CTAGGGCTGCCTTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCGCTGCCCC-3')をハイブリダイゼーションしたものを pAdHM75-XbaI(FG)-L2 に挿入し、pAdHM75-FLAG(FG)-L2 を得た (Figure 12)。また、ホタルルシフェラーゼ発現カセットを含み、HI loop もしくは IJ loop に外来ペプチドを挿入したベクタープラスミドも同様に作製した。


Amp^r
pAd35-1
PmeI
PmeI
Ori
AflII
XbaI
EcoRV
The fragments encoding the Ad35 fiber knob
FG loop (Ad35 genome 30974bp-31555bp)
HI loop (Ad35 genome 30974bp-31675bp)
IJ loop (Ad35 genome 30974bp-31732bp)
XbaI/EcoRV
Ad5 genome 27331bp
pEco-ITR9
SrfI
AflII
ClaI
pAd35-XbaI
XbaI
ClaI
PmeI
XbaI/PmeI
pAd35-2
EcoRV
The fragments encoding the Ad35 fiber knob
FG loop (Ad35 genome 31556bp-31798bp)
HI loop (Ad35 genome 31676bp-31798bp)
IJ loop (Ad35 genome 31733bp–31798bp)
AflII/ClaI
AflII/ClaI
pEco-35XbaI
Ad35 shaft&knob
SwaI
I-CeuI
PI-SceI
SrfI
ClaI
PacI
ITR
adenovirus genome
E1(-)(342-3523)
E3(-)(27865-30995)
pAdHM41 29.8 kb
SrfI/ClaI
SrfI/ClaI
SwaI
I-CeuI
PI-SceI
XbaI (FG, HI, or, IJ loop)
Ad5 genome
E1(-) (342-3523)
E3(-) (28133-30818)
Ad35 fiber coding region
pAdHM75-XbaI(FG), -XbaI(HI), and -XbaI(IJ)
pCMVL1a
BGH P(A)
FLuc
CMV promoter
I-CeuI/PI-SceI
I-CeuI/PI-SceI
P(A) RLuc
CMV promotor
pAdHM75-XbaI-L2
RGD
C D C R G D C F C
CT AGG TGT GAC TGC CGC GGA GAC TGT TTC TGC C
C ACA CTG ACG GCG CCT CTG ACA AAG ACG G GAT C
Binding with XbaI site
Binding with XbaI site
FLAG
G S D Y K D D D D K G S
CT AGG GGC AGC GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAA GGC AGC C
C CCC TCG CTG ATG TTC CTG CTA CTA CTG TTT CCG TCGG GATC
Binding with XbaI site
Binding with XbaI site
XbaI

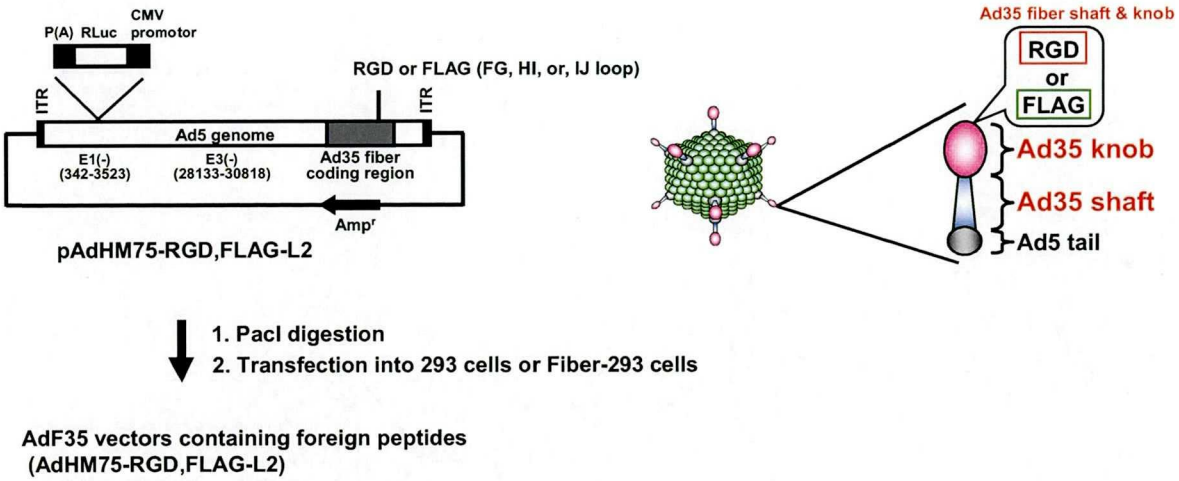


Figure. 12 Construction of vector plasmids and illustration of AdF35 vector. The vector plasmids contain an E1/E3-deleted Ad genome, an gene encoding RGD peptide or FLAG tag in the fiber knob region, and an I-CeuI/SwaI/PI-SceI site in the E1-deleted region. The region encoding the fiber shaft and knob was substituted with that derived from Ad35.

2 箇所に外来ペプチドを挿入可能な AdF35 ベクタープラスミドの作製

Ad35 ファイバーノブ領域の FG loop の Gln243 と Thr244 の間に Csp45I サイトを、HI loop の Met280 と Ile281 の間に XbaI サイトを挿入した pAdHM75- Csp45I (FG)-XbaI(HI)を以下のように作製した。

まず初めに、pAdHM75-XbaI(HI)-L2 をテンプレートに、Ad35 ファイバーノブ領域の FG ループを次のプライマーを使用して増幅した。FG ループ (Ad35 ゲノム、30974-31555 bp)は、AdF35 primer, (5'-CTTAAGTGTTTAACCCCACTAACAACC ACAGGC-3')と FG loop-3R (5'-GATATCTTCGAAGTTGAAGGGATAAGCTGTAGT ACT TGG C-3')を用いて増幅した。得られた PCR 断片をそれぞれ、予め PmeI で処理した pcDNA3.1/Hyg(+)とライゲーションすることによりプラスミド pAd35FG-3 を得た。

次に、pAdHM75-XbaI(HI)-L2 をテンプレートに FG ループ C 末端領域までを PCR によって増幅した。FG ループ (Ad35 ゲノム、31556-31798 bp) は、FG loop-4F (5'-TTCGAAACCACTACTAGGGATAGTGAAAACTACATTCATGG-3')と Ad35 shaft 2-R (5'-GTTTAAACATCGATTTAGTTGTCGTCTTCTGTAATGTAAGAAAAGAAAA AGGGG-3')を用いて増幅した。得られた PCR 断片を予め EcoRV で処理した pcDNA3.1/Hyg(+)とライゲーションすることによりプラスミド pAd35FG-4 を得た。そして、得られたプラスミド pAd35FG-4 をそれぞれ Csp45I/PmeI 処理して得た DNA

断片を、予め Csp45I/EcoRV 処理した pAd35FG-3 とライゲーションすることによりプラスミド pAd35FG-Csp45I を得た。次に、得られたプラスミド pAd35FG-Csp45I を AflII/ClaI 処理した DNA 断片と pEco-ITR9 を AflII/ClaI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pEco-35FG-Csp45I を得た。さらに、得られたプラスミド pEco-35FG-Csp45I を ClaI/SrfI 処理した DNA 断片と pAdHM41 を ClaI/SrfI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-Csp45I(FG)-XbaI(HI)を作製した (Figure 13)。

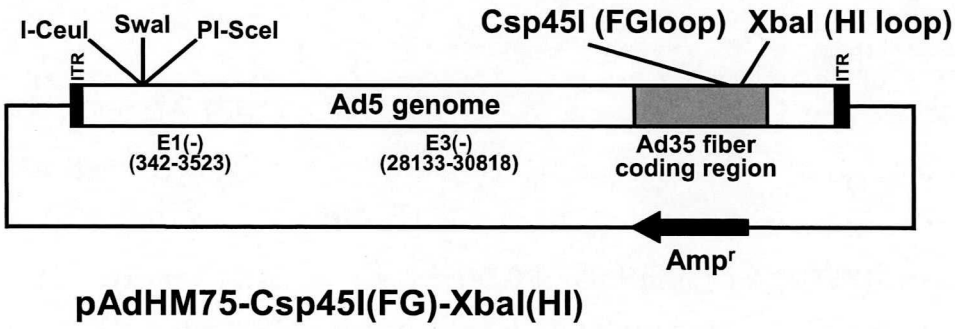


Figure 13. Diagram of Ad vector plasmids.
The vector plasmids, pAdHM75-Csp45I(FG)-XbaI(HI), contain an E1/E3-deleted Ad genome, an Csp45I site in the FG loop and XbaI site in the HI loop of the fiber knob region, and an I-CeuI/SwaI/PI-SceI site in the E1-deleted region. The region encoding the fiber shaft and knob was substituted with that derived from Ad35.

その後、合成オリゴ DNA である RGD-Csp45I-1 (5'-CGAGTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGCCT-3') と RGD-Csp45I-2 (5'-CGAGGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACACT-3')をハイブリダイゼーション後、予め Csp45I 処理した pAdHM75-Csp45I(FG)-XbaI(HI) とライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-RGD(FG)-XbaI(HI) を得た。得られたプラスミド pAdHM75-RGD(FG)-XbaI(HI)を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片と pCMVL1 を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-RGD(FG)-XbaI(HI)-L2 を作製した。そして、合成オリゴ DNA である Ad35RGD-1 (5'-CTAGGTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGCC-3')と Ad35RGD-2 (5'-CTAGGGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACAC-3')をハイブリダイゼーション後、予め XbaI 処理した pAdHM75-RGD(FG)-XbaI(HI)-L2 とライゲーションすることによりプラスミド pAdHM75-2xRGD-L2 を得た。

DNA シークエンス

鋳型 DNA 400 ng、プライマー 1.6 pmol、PreMix 1 μl、5×dilution buffer 1.5 μl を混合し、滅菌水を加えて 10 μl とした。この溶液を 96℃1 分、96℃10 秒、50℃5 秒、60℃2 分を 25 cycle で PCR 反応を行った。次に PCR 産物に SAM solution 45 μl、BigDye X terminator solution 10 μl を加えて 30 分間ボルテックスした。その後 2000 rpm で 2 分間遠心後回収した上清をシークエンサー用サンプルプレートに移し、シークエンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer; ABI)を用いて解析した。

Ad ベクターの作製

作製したベクタープラスミドを、Ad ゲノムの両末端に認識部位が存在する制限酵素 PacI で切断することにより線状にし、カチオン性ポリマーの SuperFect (QIAGEN)を用いてトランスフェクションした。なおパッケージング細胞としては、pAdHM75-RGD(FG)-L2 、 pAdHM75-RGD(HI)-L2 、 pAdHM75-2xRGD-L2 には Fiber-293 細胞を、pAdHM75-RGD(IJ)-L2 には 293 細胞を使用した。トランスフェクション後、約 2 週間培養し、各 Ad ベクターを得た。

Ad ベクターの大量調製と精製方法

第一章に準じた。なお、AdF35-L2 は以前に作製されたものを使用した [41]。

本研究で用いたファイバー改変 AdF35 ベクターのファイバーノブ領域のアミノ酸配列を Table 2 に示した。

Table 2　　Ad vectors used in this study

Ad vectors	Insertion sites	Amino acid sequences of the loops with foreign peptides
AdF35-L2	———	240 YPFNTTTRDSE 250
AdF35-RGD(FG)-L2	FG loop	240 YPFNSRCDCRGDCFCPRTTTRDSE 250
AdF35-FLAG(FG)-L2	FG loop	240 YPFNSRGSDYKDDDDKGSPRTTTRDSE 250
AdF35-L2	———	277 NSRMISSNVA 286
AdF35-RGD(HI)-L2	HI loop	277 NSRMSRCDCRGDCFCPRISSNVA 286
AdF35-FLAG(HI)-L2	HI loop	277 NSRMSRGSDYKDDDDKGSPRISSNVA 286
AdF35-L2	———	300 SPESNIATLTTSP 312
AdF35-RGD(IJ)-L2	IJ loop	300 SPESRCDCRGDCFCPRSNIATLTTSP 312
AdF35-FLAG(IJ)-L2	IJ loop	300 SPESRGSDYKDDDDKGSPRSNIATLTTSP 312

The numbers of amino acid are those of Ad35 fiber knob.
The inserted foreign peptides are underlined, and the crucial residues for binding to CD46 in the fiber knob are boxed.

物理化学的（vector particles)タイターの測定

第一章に準じた。

Western blottingによる改変型Ad35ファイバーの三量体形成能の評価

各種改変AdF35ベクターを10^9 VP/cellで293細胞に作用させ、24時間後に細胞を回収し、cell lysis buffer (20 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 2 mM PMSF)に懸濁、15000 rpmで15分遠心後、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度をBCA protein assay kitを用いて測定後、sample bufferと混和し、三量体形成確認のため、氷上で5分処理した（未変性条件)。また単量体形成を確認するため、sample buffer (62 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue)と混和し96℃で5分間熱処理後、氷冷下で5分処理したサンプルを用意した（変性条件)。サンプルを5-20%アクリルアミドゲルに添加し、20 mAで60分間電気泳動した。電気泳動後のゲルをPVDFメンブレンに転写した。得られたメンブレンを5倍希釈したImmunoblock溶液で2時間室温にてブロッキングした後、5%スキムミルク溶液で5000倍に希釈した1次抗体anti-Ad fiber tail monoclonal

antibody (アブカム)を加え 4 度で一晩インキュベートした。その後、TBS-T buffer で 3 回洗浄した後、5%スキムミルク溶液で 5000 倍希釈した 2 次抗体 HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS-T buffer で 3 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents で発色させた後、LAS3000 で検出した。

CD46 陽性および陰性細胞における遺伝子発現効率の検討

各細胞を 96 穴プレート (Corning)に 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを SK HEP-1 細胞では 300 VP/cell、その他の細胞では 3000 VP/cell の条件下で 37℃、1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (ピッカジーン LT2.0、東洋インキ)を用い、マルチラベルプレートリーダー (ALVO、Perkinn Elmer)で測定した。

RGD ペプチド存在下における遺伝子発現効率の検討

SF295、B16、および NIH3T3 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日に 200 μg/ml に調製した RGD ペプチドもしくは RGE ペプチドを含む培地を加えた。37℃、10 分インキュベート後、各種改変 AdF35 ベクターを 300 VP/cell で添加し 37℃、0.5 時間作用させた。その後、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

抗 CD46 抗体存在下における遺伝子発現効率の検討

SK-HEP1 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日に 0.5 μg/ml に調製した anti-human CD46 抗体 M177 もしくはマウス IgG1κを含む培地を加えた。4 ℃、1 時間インキュベート後、各種改変 AdF35 ベクターを 300 VP/cell で添加し 4℃、1.5 時間作用させた。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

2 箇所に RGD ペプチドを挿入した改変ファイバーの三量体形成の確認

各種改変 AdF35 ベクター (2.9×10^9 VP)を、三量体形成確認のため、上述した sample buffer と混和し、氷上で 5 分処理したサンプル (未変性条件)と、96℃で 5 分間熱処理後、氷冷下で 5 分処理したサンプル (変性条件)をそれぞれ用意した。

その後は、上記と同様の手法で検討した。

2 箇所に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターの遺伝子発現効率の評価

上記の方法に準じた。

2 箇所に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターの細胞への結合性評価

各細胞を 12 穴プレート (Nunc)に 1×10^5 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の条件下で 4℃、1.5 時間作用させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、細胞を回収した。回収した細胞から、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Duesseldorf, Germany)を用いて、全 DNA を回収した。その後は、第一章と同様の手法で Ad ゲノムコピー数を測定した。

統計解析

実験結果は平均値±s.d.として表示した。有意差検定は、Student's t-test を用いた。

【結果】

外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型 Ad (AdF35) ベクターの作製

まず初めに、CD46 との結合に重要な領域である 35 型 Ad ファイバーノブの FG、HI、もしくは IJ loop に Xba I サイトを挿入することで、簡単な *in vitro* ligation[23, 50, 51] によりペプチド配列を挿入可能なベクタープラスミドを構築した。具体的には FG loop の Gln243 と Thr244 の間、HI loop の Met280 と Ile281 の間、IJ loop の Glu302 と Ser303 の間に XbaI サイトを挿入した。最近、FG、 HI、 IJ loop は CD46 との結合に関与し[52, 53]、特に FG loop の Phe242、HI loop の Arg279、Ser282、IJ loop の Glu302 が結合に重要なアミノ酸として報告されたことから[52]、この部位に外来ペプチドを挿入することにより CD46 への結合を阻害できると考えた。本ベクタープラスミドを用いて、外来ペプチドとしてα_vインテグリンに親和性を有する Arg-Gly-Asn (RGD)ペプチドを挿入した AdF35 ベクターを作製した (Figure 12)。

Western blotting による RGD ペプチド挿入 Ad35 ファイバーの三量体形成能の評価

次に、外来ペプチドを 35 型ファイバーノブに挿入しても、野生型ファイバーと同様に三量体を形成可能かどうか検討するため、Western blotting を行った。35 型 Ad ファイバーの三量体形成はヒト CD46 との結合に重要であることが知られている[52, 54]。非還元条件下において、全てのファイバー改変 AdF35 ベクターで、ファイバー三量体に相当する 110 kDa 付近の位置にバンドが検出された (Figure 14)。なお、還元条件下においては、ファイバー単量体に相当する位置にバンドが検出されるとともに、外来ペプチドを挿入した改変型ファイバーは、従来の AdF35 ベクターと比較して、分子量の高い位置にバンドが検出された。以上の結果より、ファイバーノブ領域に RGD もしくは FLAG ペプチドを挿入しても、野生型ファイバーと同様に三量体を形成することが示された。また RGD ペプチド (13 アミノ酸)、FLAG ペプチド (16 アミノ酸) がそれぞれ 35 型 Ad ファイバーノブに挿入されていることが確認された。

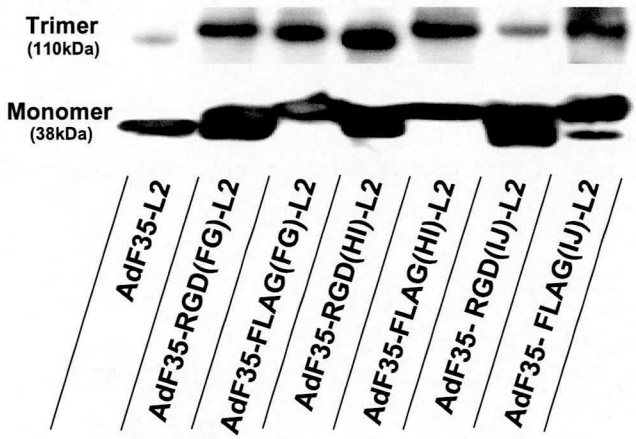


Figure 14. Trimerization of mutant Ad35 fibers containing foreign peptides in the knob by Western blotting analysis.
Lysates of 293 cells transduced with the modified AdF35 vectors at 10^9 VP/cell were prepared 24 h post-transfection, and analyzed by SDS-PAGE. To analyze trimerization of the modified fibers, 25 μg of the lysates was loaded onto each gel lane with or without prior denaturation by boiling. Then, the proteins were electro-transferred onto a PVDF membrane. A Western blot assay was carried out by using an ECL plus detection kit and 4D2 anti-Ad fiber tail monoclonal antibody (dilution 1:5000) as a primary antibody.

外来ペプチドを挿入した AdF35 ベクターの *In vitro* 遺伝子発現効率の検討

次に、35 型 Ad ファイバーノブ領域に RGD ペプチドを挿入したことで、CD46 陰性細胞にも効率よく遺伝子導入可能かどうか検討するため、$\alpha_v\beta_3$ および$\alpha_v\beta_5$ インテグリンを高発現する SF295 および NIH3T3 細胞にこれらのベクターを作用させた。FLAG ペプチドはコントロールペプチドとして用いた。その結果、AdF35-RGD(FG)-L2 の遺伝子導入効率は従来型 AdF35 ベクターと比較して、SF295 細胞で 6 倍、NIH3T3 細胞で 15 倍上昇した。また AdF35-RGD(HI)-L2 は SF295 細胞で 8 倍、NIH3T3 細胞で 30 倍高い遺伝子発現効率を示した (Figure 15)。また、B16 細胞においても AdF35-RGD(FG)-L2 と AdF35-RGD(HI)-L2 は AdF35-L2 と比較して高い遺伝子発現効率を示した(data not shown)。なお、IJ loop に外来ペプチドを挿入した AdF35 ベクターは、いずれの細胞においても遺伝子発現効率の上昇が認められなかった。また、AdF35-FLAG(HI)-L2 はいずれの細胞でも AdF35 ベクターと比較して遺伝子発現が上昇した。上記の実験より、FG もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入することにより遺伝子発現効率が向上したことから、次に AdF35-RGD(FG)-L2 と AdF35-RGD(HI)-L2 が RGD ペプチド依存的に CD46 陰性細胞に遺伝子導入するかどうか検討するため、合成 RGD ペプチドを用いた阻害実験を行った (Figure 16)。CD46 陰性細胞に対し、合成 RGD ペプチド存在下において

AdF35-RGD(FG)-L2 もしくは AdF35-RGD(HI)-L2 を作用させたところ、SF295 細胞、NIH3T3 細胞いずれにおいても、RGD ペプチド存在下において 28%以上の遺伝子発現効率の低下が認められた。また、SF295 細胞では抗$\alpha_v\beta5$ インテグリン抗体でも AdF35-RGD(FG)-L2 と AdF35-RGD(HI)-L2 の遺伝子発現効率が有意に阻害された (data not shown)。

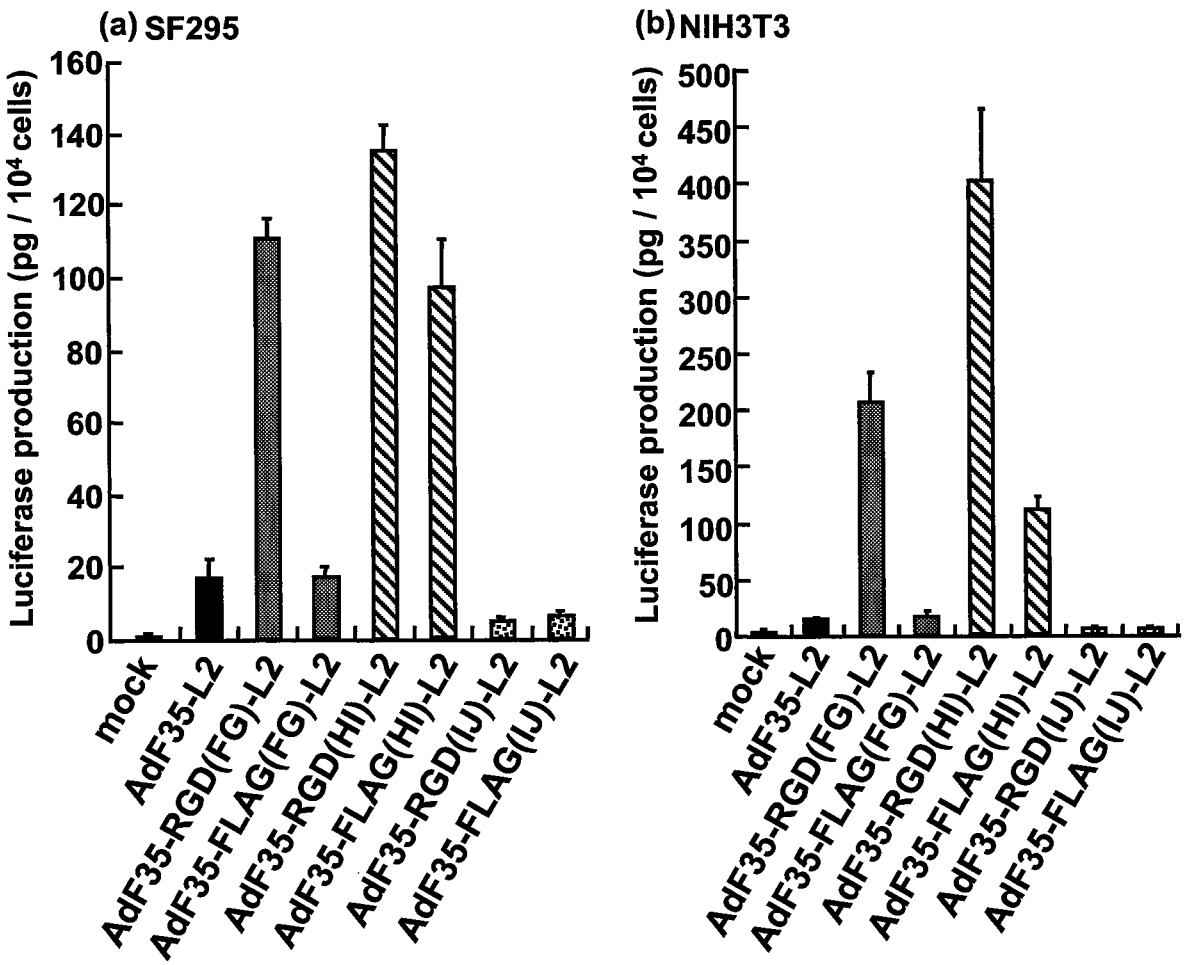


Figure 15. Transduction efficiencies of fiber-mutant AdF35 vectors in CD46-negative cells. SF295 (a) and NIH3T3 (b) cells were seeded at $1x10^4$ cells/well onto a 96-well plate. On the following day, the cells were transduced with AdF35 vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48 h incubation, luciferase production in the cells was determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4).

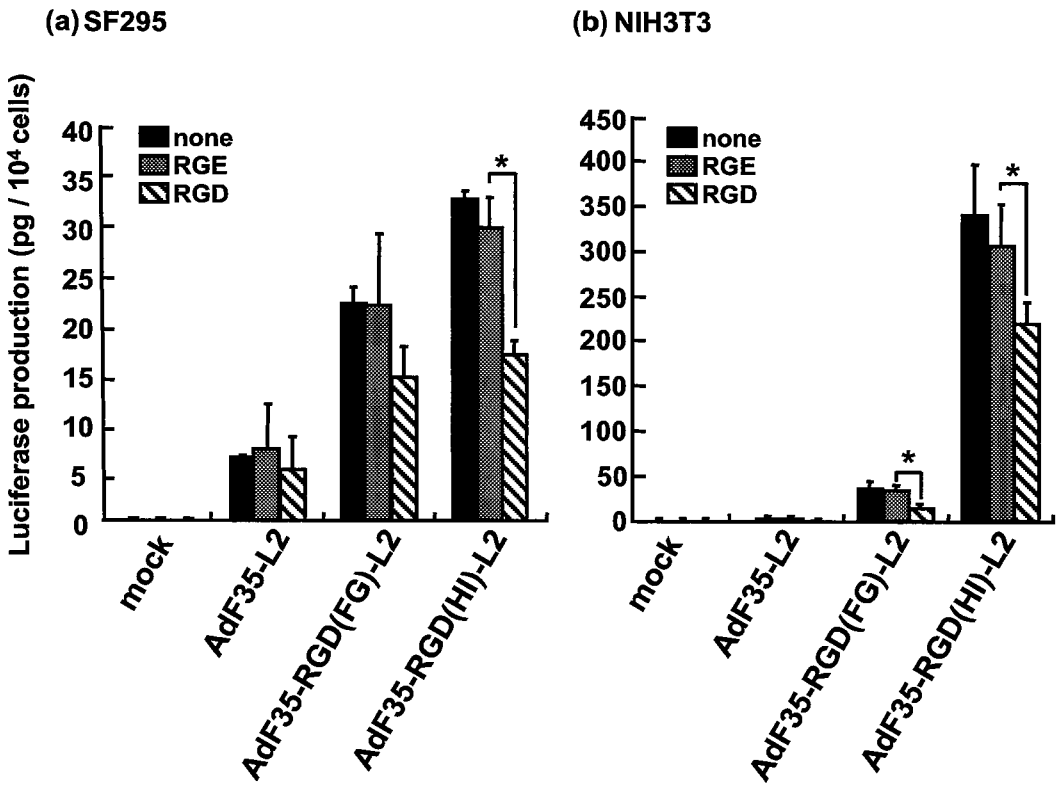


Figure 16. Transduction efficiencies of fiber-mutant AdF35 vectors in the presence of RGD peptide.
SF295 (a) and NIH3T3 (b) cells were preincubated with medium containing an RGD peptide (GRGDSP) or control RGE peptide (GRGESP) at a concentration of 200 μg/ml at 37°C for 10 min. AdF35-L2, AdF35-RGD(FG)-L2, or AdF35-RGD(HI)-L2 were then added to the medium, and the cells were incubated for 0.5 h. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.05).

このことから、FG loop もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターは RGD ペプチドとα_vインテグリンの相互作用により、効率よく CD46 陰性細胞に遺伝子導入することが示された。次に、外来ペプチドを挿入することで 35 型 Ad ファイバーノブの CD46 への結合性が減少しているかどうか検討するため、CD46 陽性細胞である SK HEP-1 細胞および LN444 細胞に本ベクターを作用させた(Figure 17)。なお、SK HEP-1 細胞および LN444 細胞はともに CD46 と$\alpha_v\beta5$インテグリンを高発現している (data not shown)。その結果、SK HEP-1 細胞および LN444 細胞では、従来型の AdF35 ベクターと比較して、全てのファイバー改変 AdF35 ベクターでその遺伝子発現

効率が有意に減少した。なかでも、HI loop にペプチドを挿入したベクターである AdF35-RGD(HI)-L2 と AdF35-FLAG(HI)-L2、IJ loop に RGD ペプチドを挿入したベクターである AdF35-RGD(IJ)-L2 では、SK-HEP1 細胞で 7 分の 1 以下、LN444 細胞で 3 分の 1 以下に遺伝子発現効率が減少した。 従って、外来ペプチドを Ad35 ファイバーノブの CD46 結合領域に挿入したことで、CD46 への結合性が減少したものと示唆された。しかしながら、CD46 陽性細胞におけるファイバー改変 AdF35 ベクターは、低いながらも遺伝子発現を示したことから、ファイバーノブ領域にペプチドを挿入しても CD46 への結合性が残っている可能性がある。そこで外来ペプチドを挿入したファイバー改変 AdF35 ベクターが CD46 への結合能を保持しているかどうかを詳細に検討す

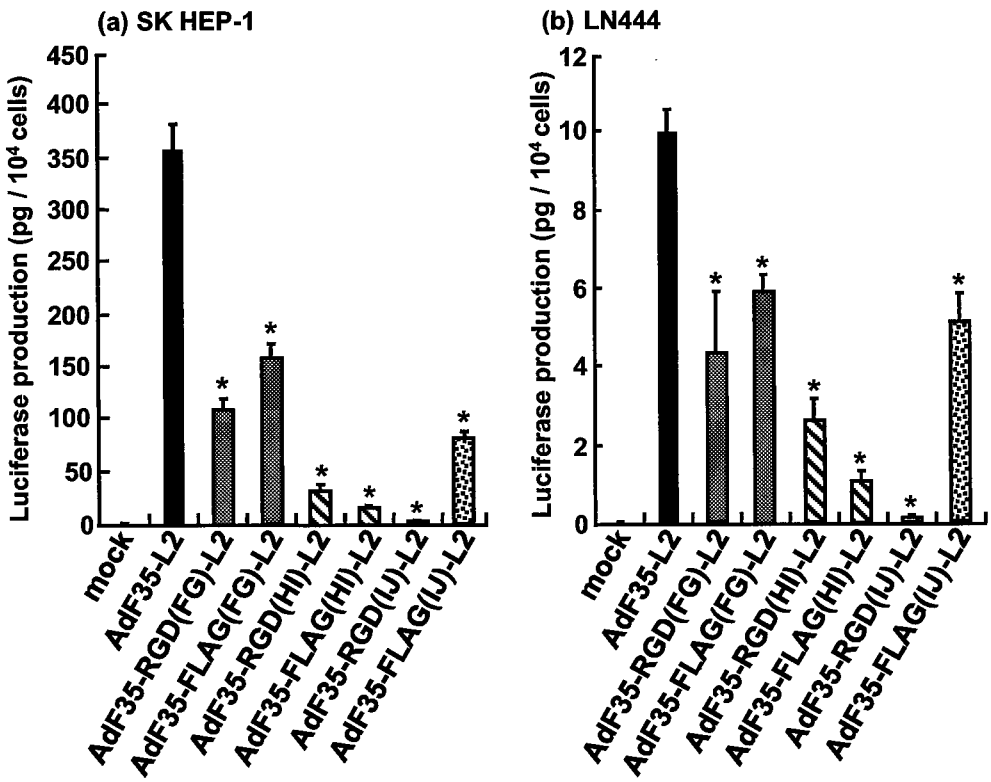


Figure 17. Transduction efficiencies of fiber-mutant AdF35 vectors in CD46-positive cells.
SK HEP-1 (a) and LN444 (b) cells were seeded at $1x10^4$ cells/well onto a 96-well plate. SK HEP-1 (300 VP/cell) and LN444 (3000 VP/cell) cells were transduced with the AdF35 vectors for 1.5 h. After a 48 h incubation, luciferase production in the cells was determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.05 vs. AdF35-L2).

るため、抗 CD46 抗体 (M177)を用いた阻害実験を行った (Figure 18)。M177 はヒト CD46 の Short consensus repeat (SCR)2 に結合し、Ad35 ファイバーと CD46 との結合を阻害することが報告されている[55, 56]。その結果、従来型 AdF35 ベクターは CD46 に結合し遺伝子導入するため、M177 によりその遺伝子発現効率は大きく阻害された。さらに、AdF35-FLAG(FG)-L2 と AdF35-FLAG(IJ)-L2 の遺伝子発現効率も M177 により有意に阻害された。これにより、CD46 への結合性は FG loop もしくは IJ loop に FLAG ペプチドを挿入することにより減少したものの、依然、結合性を保持していることが示唆された。一方で、AdF35-RGD(FG)-L2 では M177 による有意な遺伝子発現効率の低下が認められなかったことから、AdF35-RGD(FG)-L2 は主にファイバーノブに挿入した RGD ペプチドとα_vインテグリンの相互作用を介して遺伝子導入しているものと考えられた。また、HI loop にペプチドを挿入したベクターである AdF35-RGD(HI)-L2 と AdF35-FLAG(HI)-L2 は M177 により遺伝子発現が阻害されなかったことから、HI loop にペプチドを挿入することで CD46 への結合がほぼ完全に消失し、CD46 非依存的な経路を介して遺伝子導入すると推察された。なお、AdF35-RGD(IJ)-L2 による遺伝子発現も M177 による阻害を受けなかったが、これは AdF35-RGD(IJ)-L2 の遺伝子発現が著しく低いためであると考えられる。以上の結果から、FG loop もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入することで RGD ペプチド依存的に遺伝子導入可能であり、特に HI loop に RGD ペプチドを挿入した場合には、CD46 非依存的かつ RGD ペプチド依存的に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。

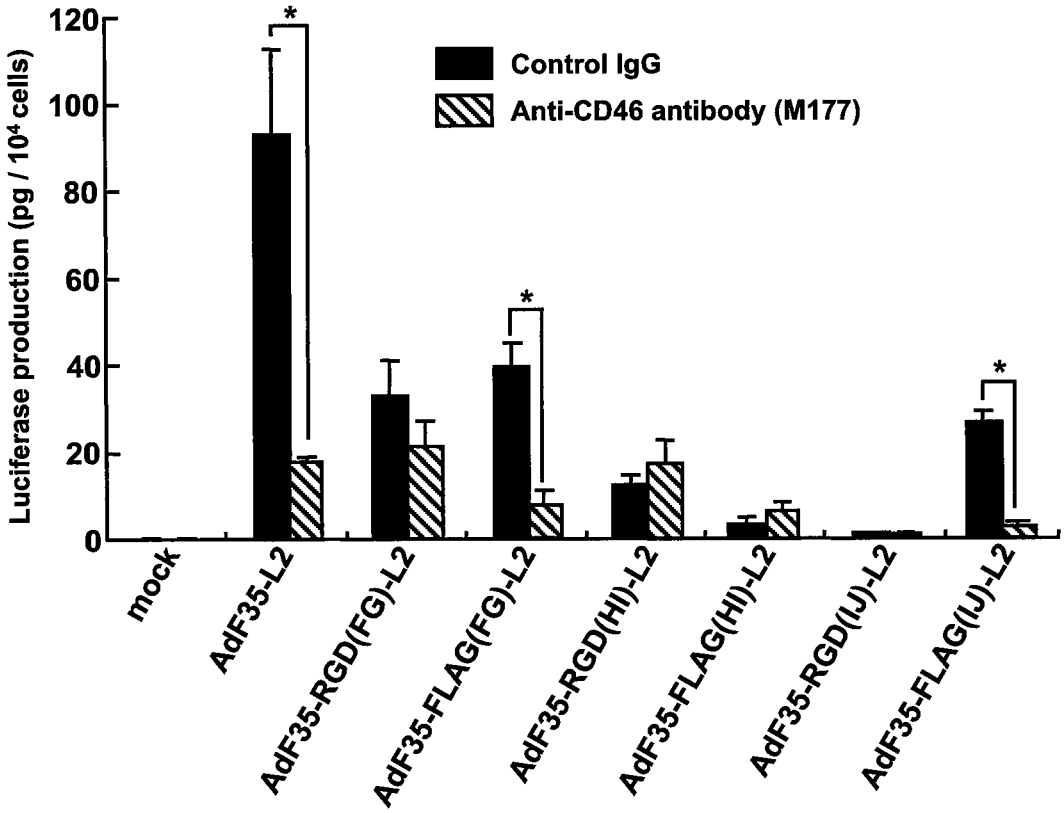


Figure 18. Transduction efficiencies of fiber-mutant AdF35 vectors in the presence of anti-human CD46 antibody M177.
SK HEP-1 cells were pre-incubated with medium containing anti-human CD46 antibody M177 or control mouse IgG1κ at a concentration of 0.5 μg/ml at 4°C for 1 h. The cells were then transduced with the AdF35 vectors at 300 VP/cell for 1.5 h at 4°C, after which the cells were washed and incubated at 37°C. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; * $P < 0.05$).

2 箇所に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターの作製とファイバー三量体形成能の評価

次に、更なる遺伝子発現効率の向上を目指して、外来ペプチド挿入部位として適していることが明らかとなった FG loop および HI loop 両方に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターを作製した (AdF35-2xRGD-L2)。そして、2 箇所に RGD ペプチドを挿入した改変型ファイバーも三量体形成能を有しているかどうかを Western blotting により検討した (Figure 19)。そうしたところ、三量体に相当する位置にバンドが観察されたことから、2 つの RGD ペプチドを挿入した改変型ファイバーも野生型ファイバーと同様に三量体を形成することが明らかとなった。 また、単量体に相当する位置のバンドは、2 つ RGD ペプチドを挿入したことにより、高分子量方向にシフトしたこと

から、外来ペプチドが挿入されていることが確認された。

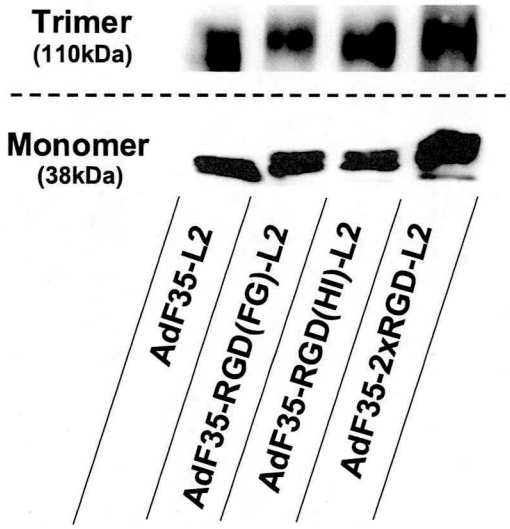
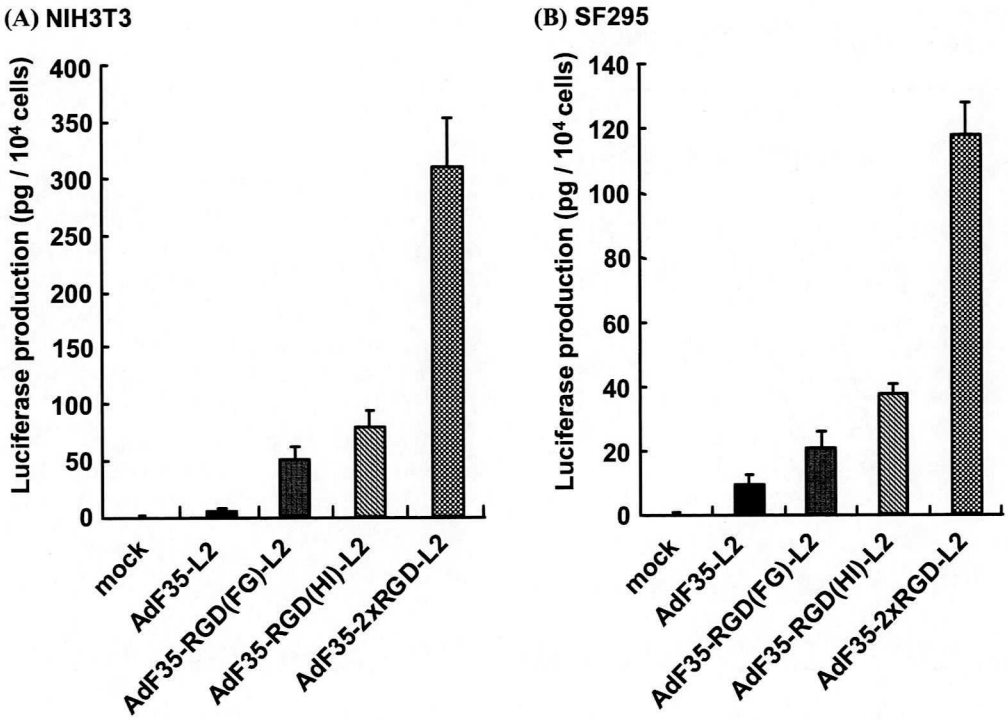


Figure 19. Trimerization of mutant Ad35 fibers containing foreign peptides in the knob by Western blotting analysis.
The modified AdF35 vectors at 2.9×10^9 VP were loaded onto each gel lane with or without prior denaturation by boiling. Then, the proteins were electro-transferred onto a PVDF membrane. A Western blot assay was carried out by using an ECL plus detection kit and 4D2 anti-Ad fiber tail monoclonal antibody as a primary antibody.

2 箇所に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターの遺伝子発現効率の検討

次に、CD46 陰性細胞に 2 つの RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクター(AdF35-2xRGD-L2) を作用させたところ、AdF35 ベクターと比較して NIH3T3 細胞では 75 倍 (Figure 20A)、SF295 細胞では 12 倍 (Figure 20B) の遺伝子発現効率の上昇が認められた。また、いずれも 1 つの RGD ペプチドを挿入したベクターと比較しても 3 倍以上に遺伝子発現効率が上昇した。なお、NIH3T3 細胞においては RGD ペプチドを HI loop に挿入した 5 型 Ad ベクター[23, 51] よりも高い遺伝子発現効率を示した(data not shown)。また、NIH3T3 および SF295 細胞における AdF35-2xRGD-L2 の遺伝子発現効率は、合成 RGD ペプチドを培地中に添加することで、有意に低下した。従って、AdF35-2xRGD-L2 は RGD ペプチド依存的に、効率よく CD46 陰性細胞に遺伝子導入することが示された (Figure 21)。次に、 CD46 陽性細胞である SK HEP-1 細胞に 2 つの RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターを作用させたところ、従来の AdF35 ベクターと比較して有意に遺伝子発現効率が減少した (Figure 20C)。これは、FG loop と HI loop に RGD ペプチドを挿入したことでファイバーノブの立体構造が変化し、CD46 との結合性が減少したことによるものと推察された。さらに、2 つの RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターでは、1 つの RGD ペプチドを挿入したベクターと比較すると約 2 倍の遺伝子発現効率の上昇が認められた。これは、SK HEP-1 細胞はα_v

integrin を高発現しているため、RGD ペプチドを 2 つ挿入したことでα_v integrin 依存的な遺伝子導入が促進されたものと示唆された。さらに、AdF35-2xRGD-L2 が CD46



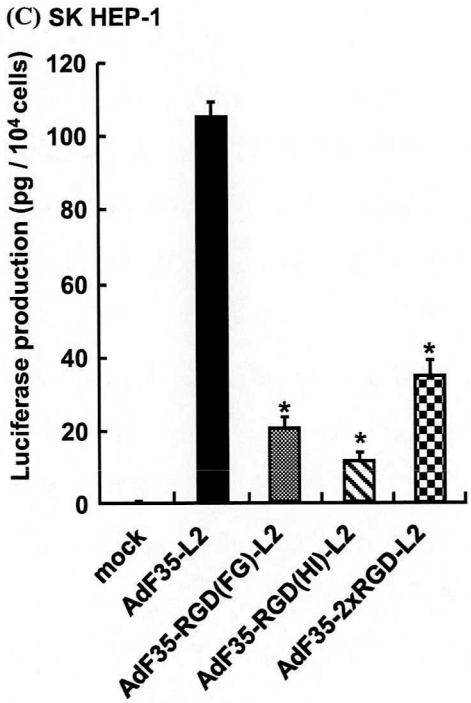


Figure 20. Transduction efficiency of the fiber-mutant AdF35 vectors in CD46-negative and -positive cells. NIH3T3 (A), SF295 (B), and SK HEP-1 (C) cells were transduced with AdF35 vectors at 300 VP/cell (SK HEP-1 cells) or 3000 VP/cell (NIH3T3 and SF295 cells) for 1.5 h. After 48-h incubation, luciferase production was determined using a luciferase assay system. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.05 vs. AdF35-L2).

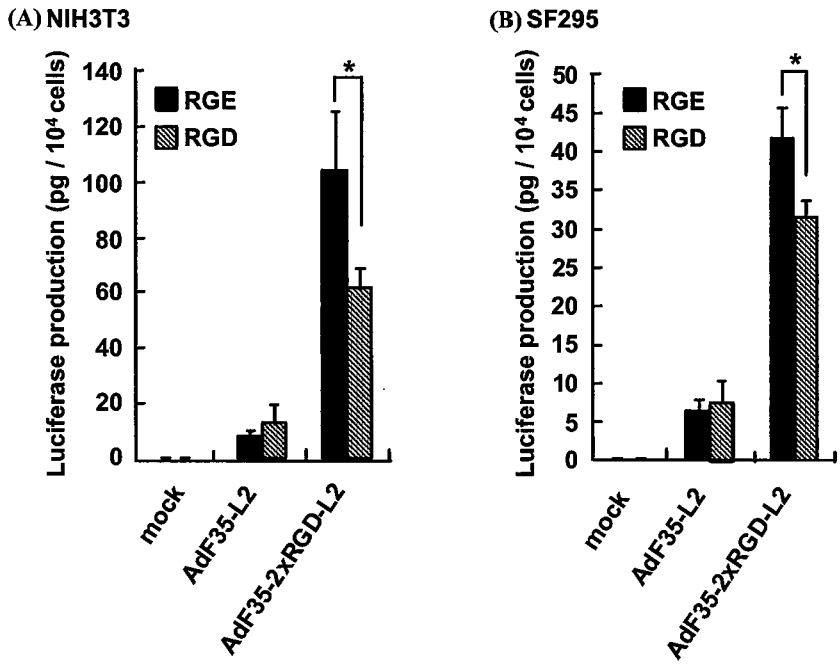


Figure 21. Transduction efficiency of fiber-mutant AdF35 vectors in the presence of RGD peptide. NIH3T3 (A) and SF295 (B) cells were preincubated with medium containing an RGD peptide or control RGE peptide at a concentration of 200 μg/ml at 37 °C for 10 min. The cells were then incubated with AdF35 vectors for 0.5 h. Luciferase production was measured 48 h after transduction. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.05).

への結合能を保持しているかどうかを詳細に検討するため、抗 CD46 抗体 (M177)を用いた阻害実験を行った (Figure 22)。その結果、AdF35-2xRGD-L2 では、M177 による有意な遺伝子発現効率の低下が認められなかったことから、FG loop と HI loop の 2 箇所に RGD ペプチドを挿入することで CD46 への結合がほぼ完全に消失し、CD46 非依存的な経路を介して遺伝子導入すると示唆された。さらに、RGD 配列を 2 箇所に導入したことで、細胞表面に発現するα_vインテグリンと相互作用する Ad 粒子数が増えたかどうか検討するため、CD46 陰性細胞の細胞表面に結合する Ad 粒子数を、Ad ゲノムコピー数を Taqman PCR 法により測定することで評価した。その結果、CD46 陰性細胞である NIH3T3 細胞、B16 細胞に 4℃条件下 (エンドサイトーシスを阻害)で各種改変 Ad ベクターを作用させ、細胞表面に存在する Ad 粒子数を測定すると、AdF35-RGD(FG)-L2 や AdF35-RGD(HI)-L2 と比較して、AdF35-2xRGD-L2 が最も高い細胞表面結合量を示した (Figure 23)。すなわち、2 つの RGD ペプチドを挿入したことで、さらに遺伝子発現効率に優れた AdF35 ベクターを作製することに成功した。

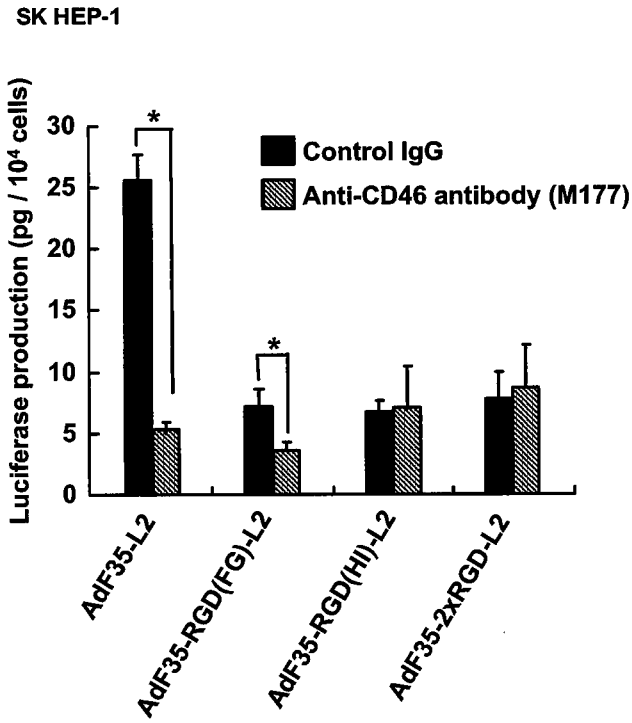


Figure 22. Transduction efficiency of fiber-mutant AdF35 vectors in the presence of an anti-human CD46 antibody. SK HEP-1 cells were pre-incubated with medium containing anti-human CD46 antibody M177 or control mouse IgG1k at a concentration of 0.5 μg/ml concentrations at 4°C for 1 h. The cells were then transduced with the AdF35 vectors at 300 VP/cell for 1.5 h at 4°C, after which the cells were washed and incubated at 37°C. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction as described above. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.05).

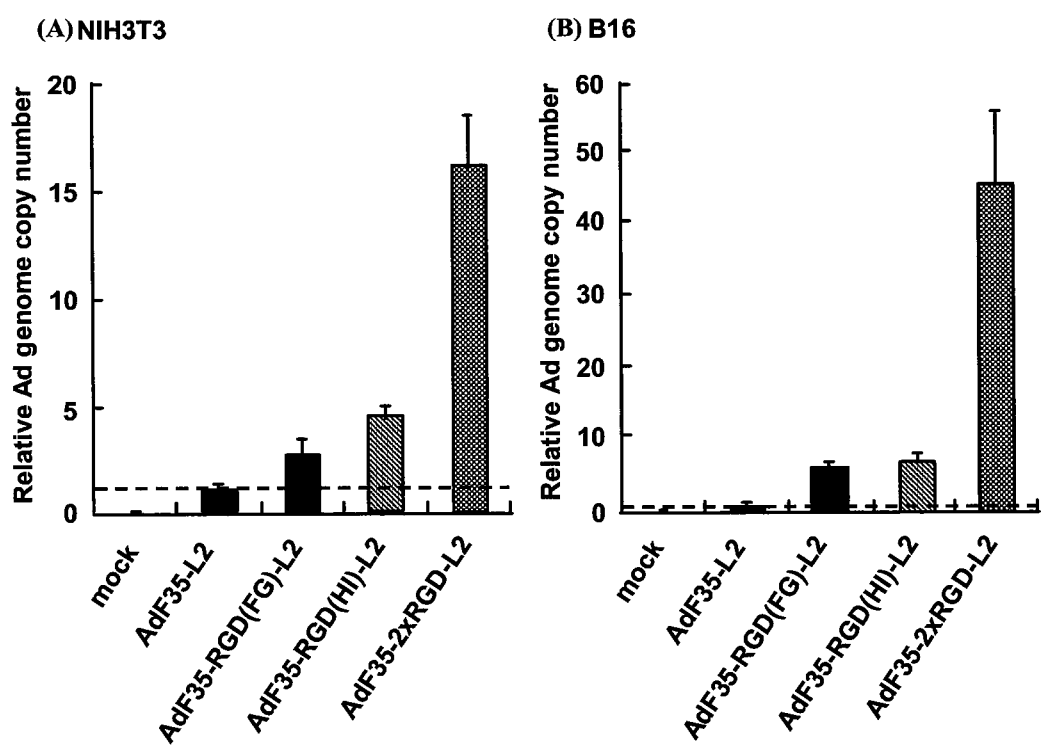


Figure 23. Real-time PCR analysis for cellular binding of the AdF35 vectors. NIH3T3 (A) and B16 (B) cells were incubated with the unmodified and modified AdF35 vectors for 1.5 h by 3000 VP/cell at 4 °C. The vector genome copy numbers were determined by real-time PCR, and were normalized by the copy number of unmodified AdF35 vectors. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4).

【考察】

本章では、AdF35 ベクターが元来備えているターゲィング Ad ベクター開発のための基盤ベクターとしての性質を保ったまま、広範な組織に遺伝子導入してしまうという欠点を克服するべく、AdF35 ベクターの改良を行った。すなわち、ファイバーノブ領域の CD46 との結合部位に外来ペプチドを挿入することで、CD46 への結合性を欠失させるとともに、外来ペプチド依存的に遺伝子導入可能な AdF35 ベクターの開発を試みた。その結果、ファイバーノブ領域の FG loop もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入することで RGD ペプチド依存的に遺伝子導入することが可能な AdF35 ベクターの開発に成功した。特に HI loop に RGD ペプチドを挿入した場合には、CD46 依存的な遺伝子導入は消失していることが明らかとなった。外来ペプチド挿入部位として HI loop が最も優れている理由としては、最近の研究で明らかとなった CD46 と HI loop の結合様式によるものと考えられる。HI loop と CD46 との結合には Arg279 と Ser282 が最も重要で、これらのアミノ酸が CD46 の SCR1 領域の Glu63 また Thy28 とそれぞれ結合することが報告された[51]。また Gustafsson らは Ad11 の HI loop の Arg279 を Gln に置換すると CD46 への結合性が消失したと報告していること[57]、HI loop のアミノ酸配列は B 群に属する Ad においてよく保存されている[58]ことを考慮すると、HI loop はサブグループ B に属する 35 型 Ad ファイバーノブの CD46 との結合に最も寄与しており、ファイバーノブの最も外側に露出しているものと考察される。従って、35 型 Ad ファイバーノブ領域のペプチド提示部位としては HI loop が最適であると思われる。一方で、IJ loop に外来ペプチドを挿入した AdF35 ベクターはいずれも遺伝子発現効率の上昇が認められなかった。これは、7 型や 11 型アデノウイルスと比較して 35 型 Ad ファイバーノブ領域の IJ loop が、ヒト CD46 の short consensus repeat (SCR) 2 から離れており[52, 53, 59, 60]、IJ loop に挿入された RGD ペプチドがα_vインテグリンと接触できなかったためではないかと考えられる。

また、HI loop に FLAG ペプチドを挿入した AdF35-FLAG(HI)-L2 はいずれの細胞でも AdF35 ベクターと比較して遺伝子発現が上昇した。なぜ FLAG ペプチドを HI loop に挿入することにより遺伝子発現効率が上昇したのか、その原因について詳細は不明であるが、負電荷アミノ酸が多く含まれる FLAG ペプチドを挿入したことで、ファイバーノブ表面の電荷が変化し、別の受容体に結合した可能性がある。

本研究で作製した FG loop もしくは HI loop に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベ

クターは、CD46 陽性・陰性に関わらず、RGD ペプチド依存的に遺伝子導入可能であったが、残念ながらその遺伝子発現効率は RGD ペプチドを挿入したファイバー改変 5 型 Ad ベクターと比較して低いものであった (data not shown)。そこで、更なる遺伝子発現効率の上昇を目指して、FG loop と HI loop の両方に RGD ペプチドを挿入した AdF35 ベクターを開発した。これまでの報告で、FG loop と HI loop は空間的に近い位置に存在することが明らかにされていることから[52, 60]、両ループに挿入した RGD ペプチドも近接していると考えられる。これまでの研究で、RGD の多量体は、単量体よりもα_vインテグリンへの親和性が高く、RGD ペプチド同士の空間的な位置関係もα_vインテグリンとの親和性に重要であることが報告されている[61-63]。従って、本研究においても 2 つの loop に挿入された RGD ペプチドが近接することで、α_vインテグリンとの親和性が向上し、結果として AdF35-2xRGD-L2 の遺伝子発現効率が大きく上昇したことが示唆された。

また、本ベクターは異なる 2 種類の外来ペプチドを挿入することも可能なベクターである。これまでに、2 種類のターゲティング分子を Ad ファイバーに挿入した報告としては、Myhre らが、5 型 Ad のファイバーノブ領域の HI loop に HER2 に結合する affibody と Taq ポリメラーゼに結合する affibody の 2 種類を挿入した例がある[64]。この Ad ベクターは、HER2 発現細胞、Taq ポリメラーゼ発現細胞の両方に効率よく遺伝子導入可能であることが報告された。また、我々の研究室では、過去に小泉らが、5 型 Ad ベクターのファイバーノブ領域の HI ループに RGD ペプチドを挿入し、C 末端領域に K7 ペプチドを挿入したファイバー改変 5 型 Ad ベクターを開発した[51]。本ベクターは、HI ループにのみ RGD ペプチドを挿入した 5 型 Ad ベクターと比較して、CAR 陰性細胞に対して効率よく遺伝子導入可能であることを報告した。これらは本研究においても適用できると考えられ、FG loop と HI loop のそれぞれに異なるターゲティング分子を挿入することで、より特異的かつ強力に細胞に遺伝子導入可能なベクター開発につながると考えられる。

今後、真のターゲティング Ad ベクター開発に向けて、本研究で作製した外来ペプチドを挿入可能な AdF35 ベクターは極めて有望であると期待されるが、解決すべき問題点も残されている。まず、本研究で作製した改変型 AdF35 ベクターはその骨格部分が 5 型 Ad 由来であるため、生体に投与した場合には、抗 5 型 Ad 中和抗体によって不活化されてしまう。これを避けるためには、PEG などの化学修飾が必要となる。例えば、第一章で開発した PEG-FX を利用し、抗 5 型 Ad 抗体による認識を回避することが有

効であると考えられる[35, 36]。一方で、全ての外殻タンパク質がAd35由来であるAd35ベクター[17, 65]も開発されている。Ad35ベクターは、成人の血清保有率が低く、抗5型Ad中和抗体からも回避することができる[66-69]。本研究により、Ad35ファイバーノブに外来ペプチドを挿入できることが示されたことはAd35ベクターにも適用できると考えられ、効果的なAdベクターの開発につながると考えられる。

第三章　Monobody をノブレスファイバーC 末端領域に提示した新規アデノウイルスベクターの開発

前章で示したように、RGD ペプチドを挿入した Ad ベクターは、ターゲットである α_v インテグリンを発現している細胞であれば、Ad 受容体を発現していない細胞においても RGD ペプチド依存的に効率よく遺伝子導入可能である。しかしながら、α_v インテグリンは、正常細胞にも幅広く発現しているため[8]、真に標的組織(細胞)にのみ感染可能なターゲティング Ad ベクターの開発に向けては、より標的組織特異的なターゲティング分子を Ad ベクターに提示させる必要がある。そこで本章では、さらに組織特異性の高い新規 Ad ベクターの開発を目指し、遺伝子工学的な手法を用いて、標的親和性に優れた抗体様分子を Ad ベクターに提示することを試みた。

標的指向型 Ad ベクターの開発に向けては、標的特異性の高い従来の抗体を Ad キャプシド表面に提示することが有望であると考えられる。しかしながら、抗体は分子量が大きいため遺伝子工学的に Ad ベクターに提示するのは困難である。このため、比較的分子量の小さい、抗体の重鎖と軽鎖からなる一本鎖抗体（scFv）を Ad ベクターに提示する試みがなされてきた[70-72]。しかしながら、scFv を提示した Ad ベクターの開発例はほとんど報告されていない。、これは、Ad 粒子は還元条件下である核内で形成されるが[73, 74]、分子内でジスルフィド結合を形成する scFv は正しくフォールディングされず、結果的に scFv 融合 Ad 粒子が形成されないためである[73, 75, 76]。そこで、還元条件下でも安定な hyperstable scFv を Ad ベクターに挿入した scFv 提示 Ad ベクターが作製されてきた。しかし、hyperstable scFv を取得するためには、random DNA mutagenesis とファージディスプレイ法を組み合わせた複雑なスクリーニング技

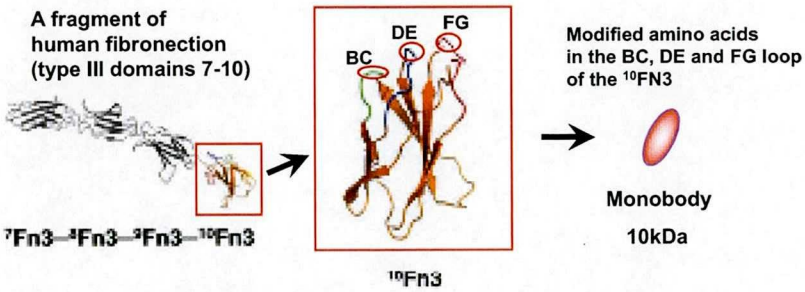


Figure 24. Schematic illustration of a monobody. A monobody is based on the structure of human fibronectin on its tenth extracellular type III domain. This domain has a structure similar to antibody variable domains, with seven beta sheets forming a barrel and three exposed loops on each side corresponding to the three complementarity determining regions. Monobody with specificity for different proteins can be tailored by modifying the BC, DE, and FG loops.

術が必要とされ、標的とするタンパク質に特異的に結合する hyperstable scFv を作製するのは非常に困難であることが指摘されている[77-80]。そこで本研究では、分子内ジスルフィド結合を持たない抗体様分子である Monobody を利用することとした。

Monobody とは、ヒトフィブロネクチン Type3 の 10 番目のユニットを基本骨格とする低分子化抗体様の分子である (Figure 24)[81-83]。このヒトフィブロネクチンの 10 番目のユニットは、抗体の VH ドメインと非常に似た構造を有しており、ユニットの表面に突出している BC, DE, FG ループのアミノ酸配列を変異させることで、特定の分子に対して結合するよう設計されている[81, 84]。Monobody は、分子量が約 10 kDa と小さいこと[83]、分子内にジスルフィド結合を有さず還元条件下である核内でも安定であることから[81]、遺伝子工学的に Ad 表面に提示するのに適した特性を有していると考えられる。そこで我々は、遺伝子工学的に Monobody を Ad キャプシド表面に提示した改変型 Ad ベクターを作製することとした。

【実験材料および方法】

試薬

EGFR-Fc、VEGFR2-Fc キメラタンパク質、anti-human VEGFR2 antibody は R&D Systems より、anti-human EGFR antibody は Calbiochem より、Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control は BD Pharmingen より、R-Phiycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-mouse IgG は BD Biosciences より、M13K07 helper phage は Invitrogen より、anti-M13 antibody は Amersham-Pharmacia Biotech より、anti-human EGFR siRNA、anti-GFP si RNA は Gene Design より、TMB ペルオキシダーゼ基質液はナカライテスクより、イムノプレートはグライナーより、それぞれ購入した。その他の試薬は第一章および第二章の実験材料に準じた。

Plasmid

pcDNA3.1-Zeo (-)は Invitrogen より、pUC57-VEGFR2-monobody は GenScript より購入した。

細胞

MDA-MB-231 細胞 (a human breast carcinoma cell line)、A431 細胞 (a human epithelial carcinoma cell line)は DMEM (10% FCS、抗生物質、L-glutamine 含有)を

用いて、NIH-3T3 (a mouse embryo fibroblast)、human VEGFR2 を恒常的に発現する NIH-3T3 細胞である KDR-3T3 細胞（上武大学・澁谷先生より供与)[85] は 10% FCS 含有 MEM を用いて、K562 細胞 (a human erythromyeloblastoid leukemia cell line) は RPMI1640 を用いて、CHO (a Chinese hamster ovary cell line)、human EGFR を恒常的に発現する CHO 細胞である CHO-EGFR 細胞は 10% FCS 含有 MEM-α を用いて、37℃、飽和蒸気圧、5% CO_2 存在下で培養した。なお、本研究において使用した FCS はすべて 56℃、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。その他の細胞は、第一章および第二章に準じた。

<u>ベクターコンストラクト</u>

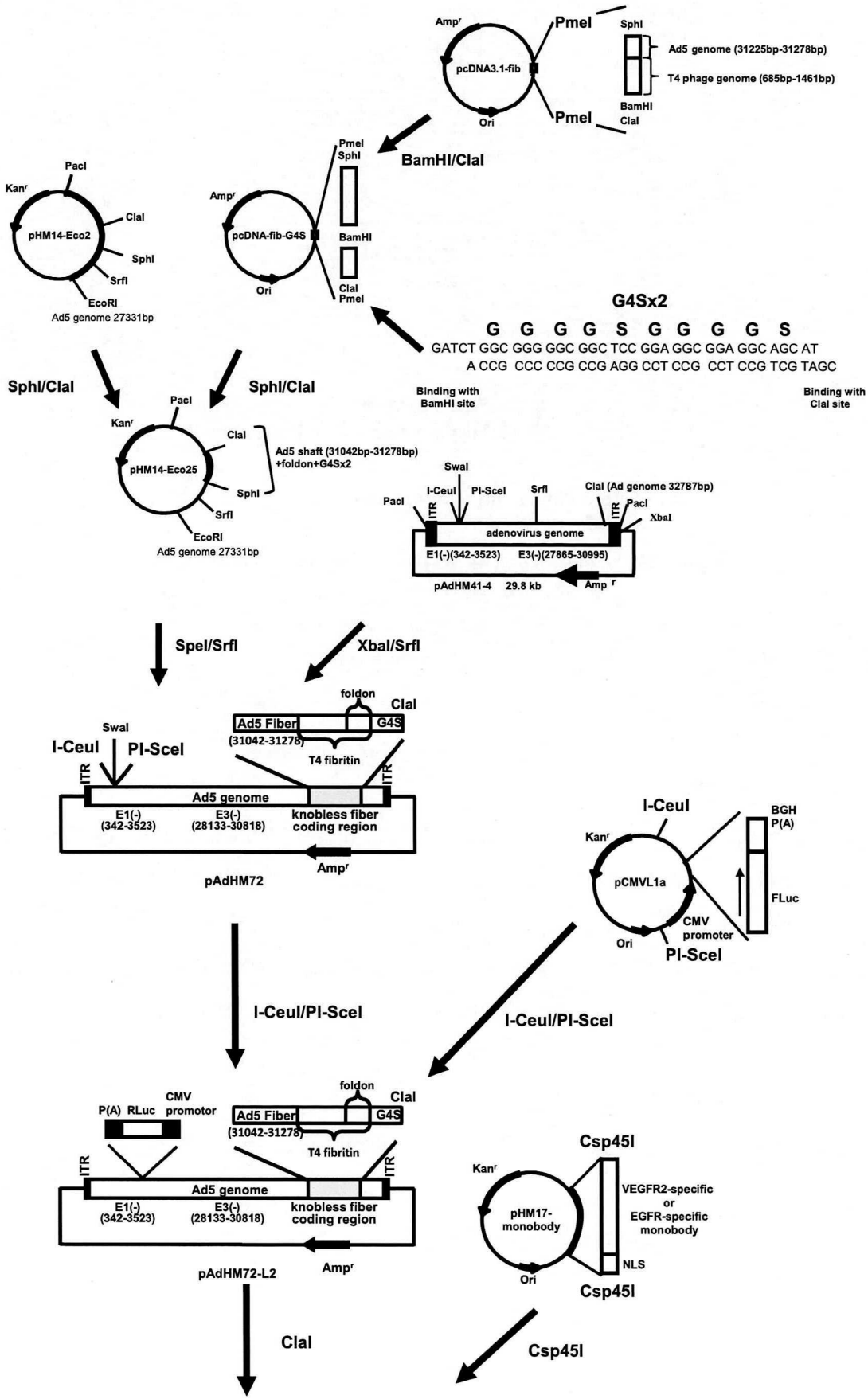
まず、ノブレスファイバーを有する Ad ベクタープラスミドを以下のように作製した。T4 ファージフィブリチン遺伝子を鋳型として、T4-fib-for primer (5'-CACGGCATGCTTGCGCTCAAAATGGGCAACGGCCTCTCTCTGGACGAGGCCGGCAACCTTACCTCACAGAACGTTTATAGTCG-3')と T4-fib-rev primer (5'-ATCGATGGATCCTGCTGGTGATAAAAAGGTAGAAAGGAATACCCATTCGCC-3')を用いて、776bp のフラグメント (T4 ファージゲノム, 685bp-1461bp) を増幅した。得られた PCR 断片を予め PmeI で処理した pcDNA3.1/Zeo (-)とライゲーションすることにより、プラスミド pcDNA-fib を得た。そして、合成オリゴ DNA である knobless-G4Sx2-F (5'-GATCTGGCGGGGGCGGCTCCGGAGGCGGAGGCAGCAT-3') と knobless-G4Sx2-R (5'-CGATGCTGCCTCCGCCTCCGGAGCCGCCCCCGCCA-3')をハイブリダイゼーション後、予め BamHI/ClaI 処理した pcDNA-fib とライゲーションすることによりプラスミド pcDNA-fib-G4S を得た。次に、プラスミド pHM14-Eco2[51] を SphI/ClaI 処理した DNA 断片と pcDNA-fib-G4S を SphI/ClaI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pHM14-Eco25 を得た。得られたプラスミド pHM14-Eco25 を SpeI/SrfI 処理して得られた DNA 断片と、pAdHM41[51] の一部 (Ad ゲノム 1bp-32787bp)をコードするプラスミド pAdHM41-4 を XbaI/SrfI 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pAdHM72 を得た。その後、得られたプラスミド pAdHM72 とホタルルシフェラーゼ発現カセットを含む pCMVL1[86] を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片とライゲーションすることによりプラスミド pAdHM72-L2 を作製した。

VEGFR2 に結合する Monobody (VEGFR2-specific monobody)もしくは EGFR に結

合する Monobody (EGFR-specific monobody) を挿入した Ad ベクタープラスミド (pAdHM72-αV-L2、pAdHM72-αE-L2) は以下のように構築した。まず初めに、ノブレスファイバーの C 末端領域に VEGFR2-specific monobody をコードする遺伝子を挿入するために、シャトルプラスミド pHM17 を以下のように作製した。合成オリゴ DNA である oligo-1 (5'-TCTAGAATCGATGCTAGCTTCGAACCTAGGGCCCAGCCGGCCATGG-3')と oligo-2 (5'-GTACCCATGGCCGGCTGGGCCCTAGGTTCGAAGCTAGCATCGATTCTAGATTAG-3')をハイブリダイゼーション後、プラスミド pHM5 を Acc65I/I-CeuI 処理した DNA 断片とライゲーションすることによりプラスミド pHM16 を得た。合成オリゴ DNA である oligo-3 (5'-GTACCGCGGCCGCTGTAAATGAATAGCCTAGGTTCGAAGCTAGCATCGATTCTAGAGTGC-3') と oligo-4 (5'-TCTAGAATCGATGCTAGCTTCGAACCAGGCTATTCATTTACAGCGGCCGCG-3')をハイブリダイゼーション後、予め pHM16 を Acc65I/PI-SceI 処理した DNA 断片とライゲーションすることによりプラスミド pHM17 を得た。得られたプラスミド pHM17 を Csp45I 処理後、アルカリホスファターゼ処理した DNA 断片と pUC57-VEGFR2-monobody を Csp45I 処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pHM17-VEGFR2-monobody を得た。なお、SV40 の large T 抗原由来の核移行シグナル (Nuclear localization signal; NLS) をコードする配列が、VEGFR2 に結合する Monobody の C 末端領域に挿入されている。pAdHM72-L2 を ClaI 処理した DNA 断片と pHM17-VEGFR2-monobody を Csp45I 処理した DNA 断片をライゲーションすることにより pAdHM72-αV-L2 を作製した (Figure 25)。

EGFR-specific monobody の遺伝子は、pUC57-VEGFR2-monobody を鋳型として PCR により増幅した。まず、EGFR-10FN3-Csp45I-for primer (5'- GATCTTCGA AATGGTGTCTGATGTTCCCCGGGACCTGG-3') と EGFR- 10FN3-BC-rev primer (5'-GGTTTCACCGTATGTGATCCGGTAATACTGGTAGGAGCCCCTGCCGCTGTCCCAGCTGATCAGCAGGCTAG-3') を用いて増幅し、fragment 1 を得た。次に、pUC57-VEGFR2-monobody を鋳型として、fragment 1 と EGFR10-FN3-DE-rev (5'-CAGGCCGCTGATGGTAGCAGTATGGACGGGGCCAGGGACAGTGAATTCCTGAACC-3') を用いて増幅し、fragment 2 を得た。その後、pUC57-VEGFR2-monobody を鋳型として EGFR-10FN3-FG-for (5'-CTATACCATCACTGTGTACGCTGTTACTGACCACAAGCCCCACGCCGACGGCCCTCACACCTACCACGAGAGCCCCATCTCCATTAACTACCGCACCGC-3') と EGFR-10FN3-Csp45I-rev (5'-CTAGTTCGAA

GGGGTCCTCCACCTTGCGCTTTTTCTTAGG-3') を用いて増幅し、fragment 3 を得た。最後に、fragment 2 と fragment 3 を用いて増幅し、EGFR-specific monobody の遺伝子配列を得た。PCR により増幅して得られた EGFR-specific monobody 遺伝子を、予め Csp45I 処理後、アルカリホスファターゼ処理した pHM17 にライゲーションすることにより pHM17-EGFR-monobody を得た。そして、pAdHM72-L2 を ClaI 処理した DNA 断片と pHM17-EGFR-monobody を Csp45I 処理した DNA 断片をライゲーションすることにより pAdHM72-αE-L2 を作製した。


Amp^r
PmeI
SphI
pcDNA3.1-fib
Ori
PmeI
Ad5 genome (31225bp-31278bp)
T4 phage genome (685bp-1461bp)
BamHI
ClaI
BamHI/ClaI
PmeI
SphI
Kan^r
PacI
ClaI
pHM14-Eco2
SphI
SrfI
EcoRI
Ad5 genome 27331bp
Amp^r
pcDNA-fib-G4S
BamHI
Ori
ClaI
PmeI
G4Sx2
G G G G S G G G G S
GATCT GGC GGG GGC GGC TCC GGA GGC GGA GGC AGC AT
A CCG CCC CCG CCG AGG CCT CCG CCT CCG TCG TAGC
Binding with BamHI site
Binding with ClaI site
SphI/ClaI
SphI/ClaI
Kan^r
PacI
ClaI
pHM14-Eco25
SphI
SrfI
EcoRI
Ad5 genome 27331bp
Ad5 shaft (31042bp-31278bp) +foldon+G4Sx2
SwaI
I-CeuI
PI-SceI
SrfI
ClaI (Ad genome 32787bp)
PacI
ITR
ITR
PacI
XbaI
adenovirus genome
E1(-)(342-3523)
E3(-)(27865-30995)
pAdHM41-4 29.8 kb
Amp^r
SpeI/SrfI
XbaI/SrfI
foldon
ClaI
Ad5 Fiber
G4S
(31042-31278)
T4 fibritin
SwaI
I-CeuI
PI-SceI
ITR
ITR
Ad5 genome
E1(-) (342-3523)
E3(-) (28133-30818)
knobless fiber coding region
Amp^r
pAdHM72
I-CeuI
BGH P(A)
Kan^r
pCMVL1a
FLuc
CMV promotor
Ori
PI-SceI
I-CeuI/PI-SceI
I-CeuI/PI-SceI
foldon
ClaI
P(A) RLuc
CMV promotor
Ad5 Fiber
G4S
(31042-31278)
T4 fibritin
ITR
ITR
Ad5 genome
E1(-) (342-3523)
E3(-) (28133-30818)
knobless fiber coding region
Amp^r
pAdHM72-L2
Csp45I
Kan^r
pHM17-monobody
VEGFR2-specific or EGFR-specific monobody
NLS
Ori
Csp45I
ClaI
Csp45I

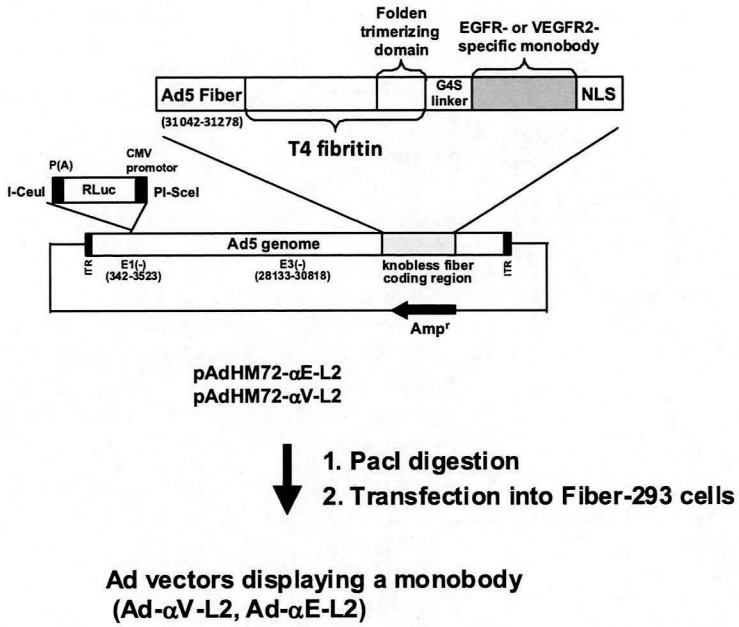


Figure 25. Construction of Ad vectors displaying a monobody.

DNA シークエンス

第二章に準じた。

Ad ベクターの作製

作製したベクタープラスミド pAdHM72-L2、pAdHM72-αV-L2、pAdHM72-αE-L2 をそれぞれ PacI で切断することにより線状にし、カチオン性ポリマーの Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションした。パッケージング細胞としては Fiber-293 細胞 [47] を使用した。トランスフェクション後、約 2 週間培養し、それぞれ Ad-KL-L2、Ad-αV-L2、Ad-αE-L2 を得た。その他は第二章に準じた。

Ad ベクターの大量調製と精製方法

Ad-L2 は以前に作製されたものを使用した。その他は第二章に準じた。

物理化学的 (vector particles)タイターの測定

第二章に準じた。

Western blotting による Monobody を挿入したノブレスファイバーの三量体形成能の検討

各 Ad ベクター（2.9×10^9 VP）を、三量体形成確認のため、sample buffer (62 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue)と混和し、氷上で 5 分処理したサンプル（未変性条件）と、96℃で 5 分間熱処理後、氷冷下で 5 分処理したサンプル（変性条件）をそれぞれ用意した。

その後は、第二章に準じた。

表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance; SPR）解析

SPR 解析は Biacore 3000 (Biacore) を用いて行った。まず、リコンビナント EGFR-Fc, VEGFR2-Fc キメラタンパク質をそれぞれ CM3 バイオセンサーチップ（Biacore）にアミンカップリング法により固相化した。各 Ad ベクター（10^{10} VP）を、HBS-EP バッファー（10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween 20）で希釈し、流速 20 μL/分でチップ上に流して測定した。なお、センサーチップは、10 mM Glycine-HCl バッファーで再生し、繰り返し使用した。

Monobody 提示 Ad ベクターの EGFR もしくは VEGFR2 陽性・陰性細胞における遺伝子発現効率の検討

各細胞を 96 穴プレート（Corning）に 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の条件下で 37℃、1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system を用い、マルチモードプレートリーダー (TriStar LB941, BERTHOLD) で測定した。

リコンビナント EGFR-, VEGFR2-Fc キメラタンパク質による遺伝子導入阻害実験

各細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日に各 Ad ベクターと 100 μg/ml に調製したリコンビナント EGFR-Fc キメラタンパク質、もしくは、40 μg/ml または 100 μg/ml に調製したリコンビナント VEGFR-Fc キメラタンパク質を室温で 1 時間反応させた。その後、反応液を 3000 VP/cell の条件下で各細胞に、37℃、1.5 時間作用させた。新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

EGFR ノックダウン細胞における Ad-αE-L2 の遺伝子発現効率の検討

100 nM の anti-EGFR siRNA (siEGFR; 5'-CGCAAAGUGUGUAACGGAAUA-3')、もしくは、anti-GFP siRNA (siGFP; 5'-UCCCGGCUAUGUGCAGGAG-3') を Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、CHO-EGFR 細胞に導入した。2 日後、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の条件下で 37℃、1.5 時間作用させた。48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system を用い、マルチモードプレートリーダー (TriStar LB941, BERTHOLD) で測定した。

抗 VEGFR2 抗体存在下における遺伝子導入実験

各細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴プレートに播種し、翌日に 2 μg/ml もしくは 10 μg/ml に調製した anti-human VEGFR2 抗体もしくはマウス IgG1κを含む培地を加えた。4℃、1 時間インキュベート後、各種改変 AdF35 ベクターを 300 VP/cell で添加し 4℃、1.5 時間作用させた。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地に置換後 37℃で 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

Monobody を挿入した Ad ベクターの標的細胞への結合性の検討

各細胞を 12 穴プレート(Nunc) に 1×10^5 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の条件下で 4℃、1.5 時間作用させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、細胞を回収した。回収した細胞から、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用いて、全 DNA を回収した。その後は、第二章と同様の手法で Ad ゲノムコピー数を測定した。

各細胞における EGFR および VEGFR2 の発現解析

各細胞 5×10^5 cells を 1% FCS 含有 PBS 100μl に懸濁し、Mouse anti-human EGFR antibody (Calbiochem)、Mouse anti-human VEGFR2 antibody (R&D systems) もしくは Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control (BD Pharmingen) を 1μg 加え、30 分間氷上、遮光で反応させた。1% FCS 含有 PBS で洗浄後、2000rpm、5 分間遠心し上清を吸引除去した。細胞を再び 1% FCS 含有 PBS 100μl に懸濁し、PE-conjugated goat anti-mouse IgG を 0.5μl 加え、30 分間氷上、遮光で反応させた。1% FCS 含有 PBS 300μl に懸濁し、フローサイトメーター (MACS Quant Analyzer ; Miltenyi Biotec) を用いて発現を解析した。データは FCS マルチカラーデータ解析ソフトウェア (Flowjo) により解析した。本章で使用した各細胞における EGFR もしくは VEGFR2

の発現量を下記に示した（Figure 26）。

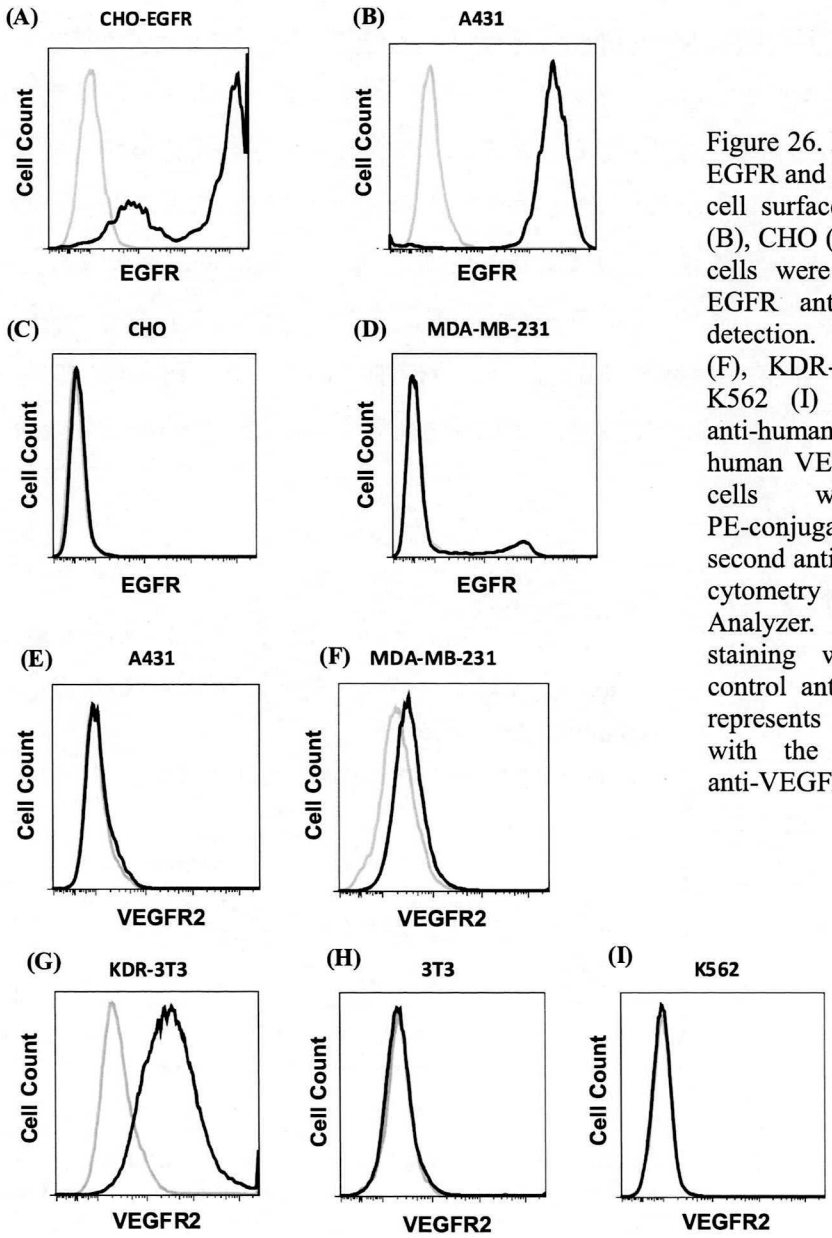


Figure 26. Flow cytometry analysis of EGFR and VEGFR2 expression on the cell surface. CHO-EGFR (A), A431 (B), CHO (C), and MDA-MB-231 (D) cells were labeled with anti-human EGFR antibody for human EGFR detection. A431 (E), MDA-MB231 (F), KDR-3T3 (G), 3T3 (H), and K562 (I) cells were labeled with anti-human VEGFR2 antibody for human VEGFR2 detection. Then, the cells were incubated with PE-conjugated goat anti-mouse IgG second antibody and analyzed by flow cytometry with a MACSQuant Analyzer. The gray peak represents staining with the isotype-matched control antibody and the black peak represents the cell surface staining with the anti-EGFR antibody or anti-VEGFR2 antibody.

<u>統計解析</u>

第二章に準じた。

【結果】

ノブレスファイバーC末端領域にMonobodyを挿入した改変型Adベクターの作製

まず、Monobodyを挿入するために、ファイバー領域をT4ファージのフィブリチンを基本とするノブレスファイバーに置換した。ノブレスファイバーは、還元条件下でも安定な特殊なscFv (hyperstable scFv) やFc結合ドメインなどの比較的大きなタンパク質を提示可能であることが既に報告されていることから[70, 87]、Monobodyも安定に提示できると考えた。すなわち、従来のAdファイバー遺伝子をノブレスファイバー遺伝子に置換するとともに、C末端領域にMonobody遺伝子を挿入した (Figure 27)。Monobody遺伝子としては、腫瘍ならびに腫瘍血管内皮細胞で高発現している上皮増殖因子受容体 (EGFR)[88, 89]、血管内皮御増殖因子受容体 (VEGFR2)[90, 91] に対するMonobodyを選択した[82, 92]。なお、選択したMonobodyがEGFRもしくはVEGFR2に特異的に結合することをELISAにより確認した (data not shown)。また、T4ファージ由来フィブリチン配列のC末端領域に存在する三量体形成ドメイン (Foldon) とMonobody配列の間に、Monobodyがターゲット分子にアクセスしやすくするため、G4S (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) リンカーを挿入した。さらに、Monobodyを挿入した改変型ファイバーがウイルス粒子に取り込まれやすくするため、MonobodyのC末端領域にSimian virus (SV40) 由来の核移行シグナル (Nuclear localization signal ; NLS) を挿入した。EGFRに結合するMonobodyを提示した改変型Adベクター (Ad-αE-L2) とVEGFR2に結合する

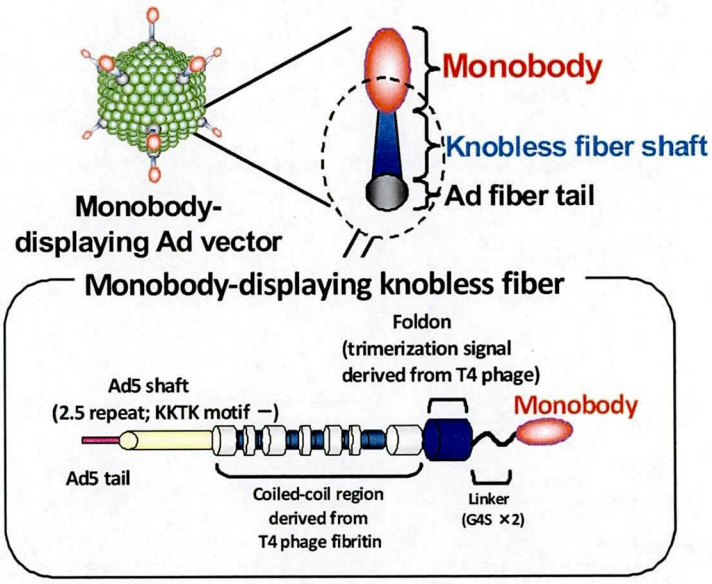


Figure 27. Schematic illustration of a monobody-displaying Ad vector. The region encoding the fiber shaft and knob was substituted with that derived from T4 fibritin and with monobody. The monobody-displaying knobless fiber contains the fiber shaft (bp 31042-31278), T4 fibritin repeats, the trimerizing foldon domain, and the gene encoding EGFR-specific or VEGFR2-specific monobody including the nuclear localization signal (NLS) in the C-terminus region.

Monobody を提示した改変型 Ad ベクター（Ad-αV-L2）はともに従来の Ad ベクターと同程度のタイターが回収可能であった。上記の Ad ベクターでは、レポーター遺伝子として E1 欠損領域に Luciferase 発現カセットを挿入した。

Monobody 提示 Ad ベクターの標的分子への結合性評価

次に、Monobody 提示 Ad ベクターが、標的である EGFR および VEGFR2 にそれぞれ特異的に結合するかどうかを検討するため、Biacore を用いた Surface plasmon resornance（SPR）解析を行った。リコンビナント EGFR-Fc キメラタンパク質（EGFR-Fc）もしくは VEGFR-Fc キメラタンパク質（VEGFR-Fc）を固相化したバイオセンサーチップを使用した SPR 解析により、Ad-αE-L2 と Ad-αV-L2 は、それぞれ標的であるヒト EGFR、VEGFR2 に効率よく特異的に結合することが示された（Figure 28A and 28B）。なお、従来の Ad ベクター（Ad-L2）および Monobody を挿入していないノブレスファイバーを有した Ad ベクター（Ad-KL-L2）は、いずれも EGFR と VEGFR2 に結合性を示さなかった。

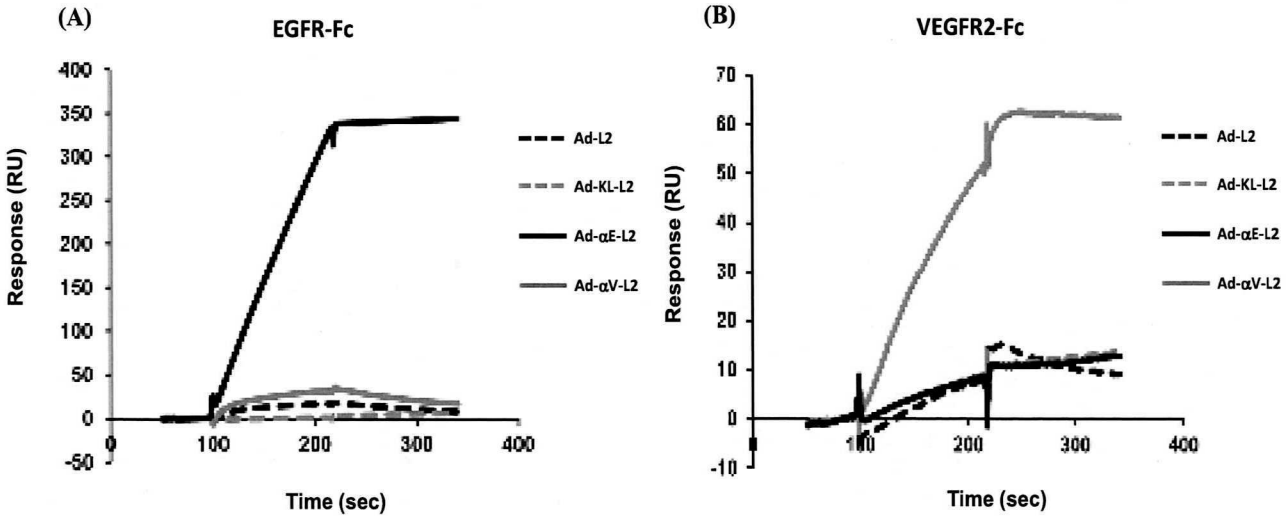


Figure 28. The surface plasmon resonance and Western blotting analysis of monobody-displaying Ad vectors. (A,B) Surface plasmon resonance analysis of monobody-displaying Ad vectors. The Ad vectors (1×10^{10} VP/ml) were injected across a CM3 biosensor chip, to which recombinant human EGFR-Fc chimera protein or VEGFR2-Fc chimera protein had been coupled, at a flow rate of 20 μl/min following an injection of HBS-EP buffer.

Monobody を挿入したノブレスファイバーの三量体形成能の評価

Monobody を挿入した改変型ノブレスファイバーが三量体形成するかどうかを検討するため、Western blotting により解析した (Figure 29)。その結果、未変性条件下で、150 kDa から 250 kDa の間に Monobody を挿入したノブレスファイバーの三量体に相当するバンドが検出された。また原因は不明であるが、未変性条件下での Ad-αV-L2 のレーンで、150 kDa 以上にスメアなバンドが検出された。ノブレスファイバーの分子量は 37 kDa[87]、Monobody の分子量は 10 kDa[81] であることから、変性条件下での Ad-αE-L2 の 50 kDa 付近のバンドは、Monobody を挿入したノブレスファイバーの単量体に相当するバンドであると考えられる。なお、変性条件下での Ad-αV-L2 のレーンで検出されたバンドサイズが Ad-αE-L2 のバンドよりも大きくなった原因は不明である。

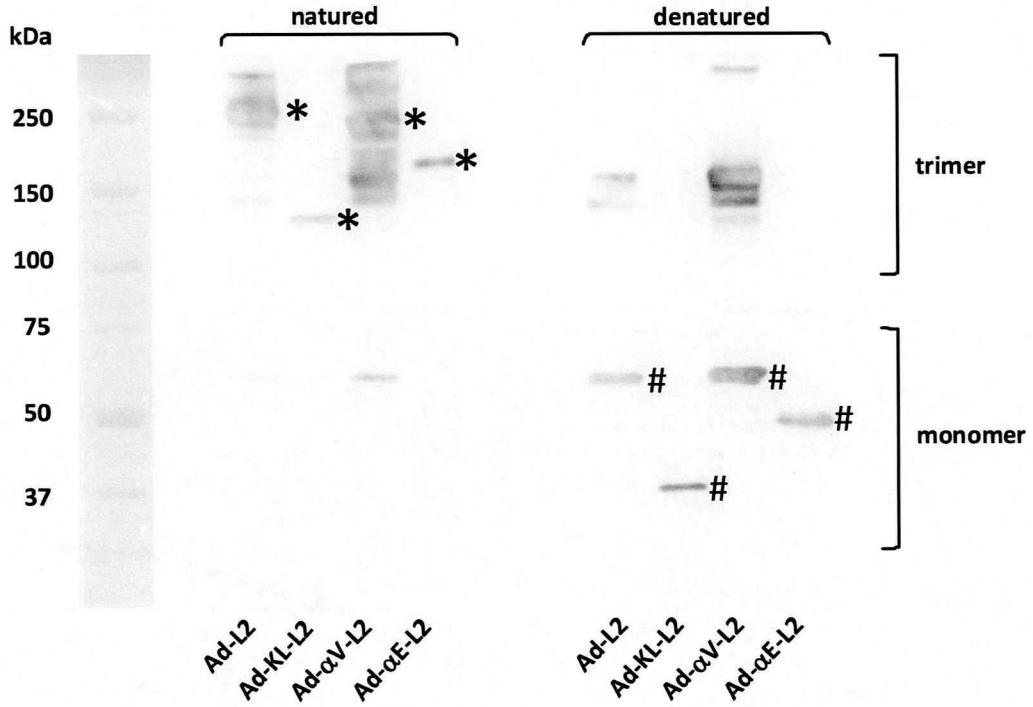
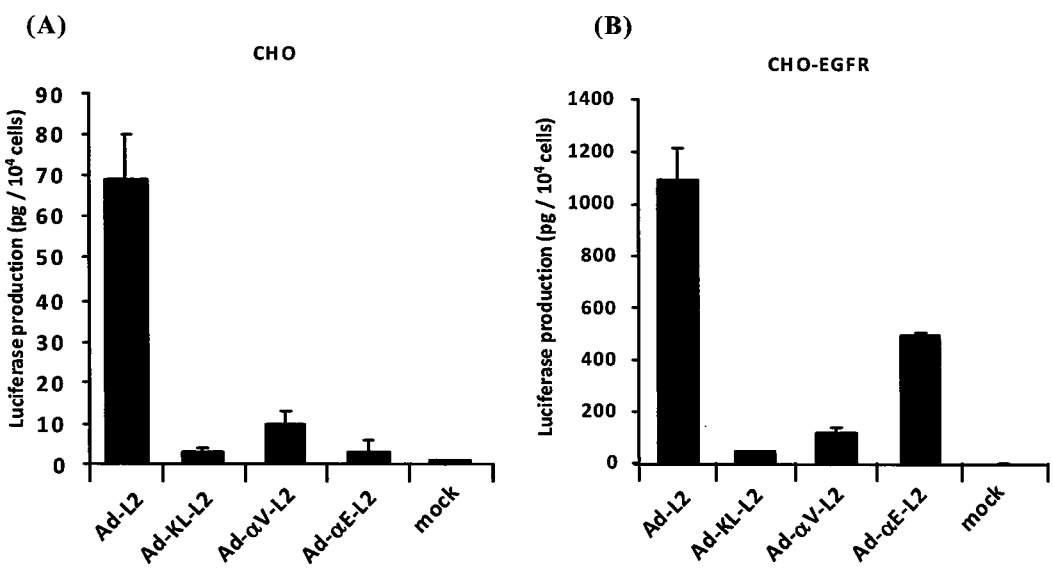


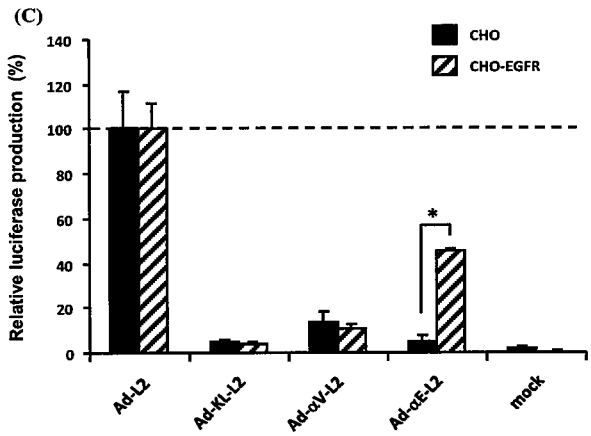
Figure 29. Western blotting analysis for trimerization of the fiber proteins in the monobody-displaying Ad vectors. The virus lysates were separated on a 5-20% SDS-polyacrylamide gel. The mutant fibers were analyzed using an anti-Ad fiber tail monoclonal antibody. Bands corresponding to the trimer (*) and monomer (#) of fiber proteins were detected in the lanes.

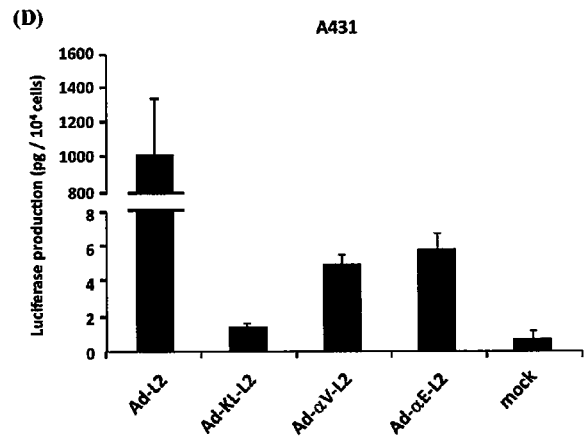
以上から、Monobody を挿入した改変型ノブレスファイバーが野生型 Ad ファイバーや未改変のノブレスファイバーと同様に三量体を形成することが確認された。すなわち、Monobody のノブレスファイバーへの提示はファイバーの三量体形成に影響を与えないことが示された。

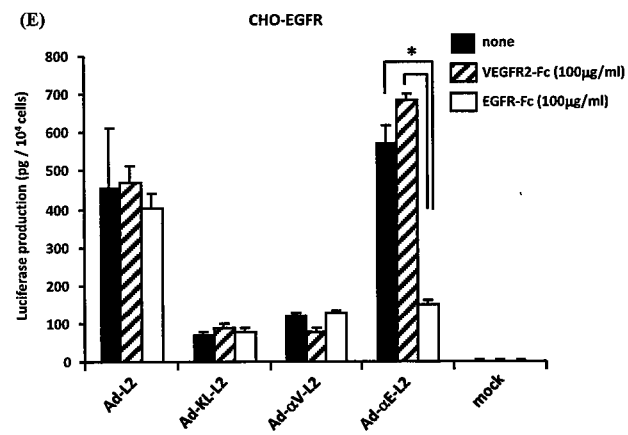
EGFR に結合する Monobody を挿入した Ad ベクターの遺伝子発現効率の検討

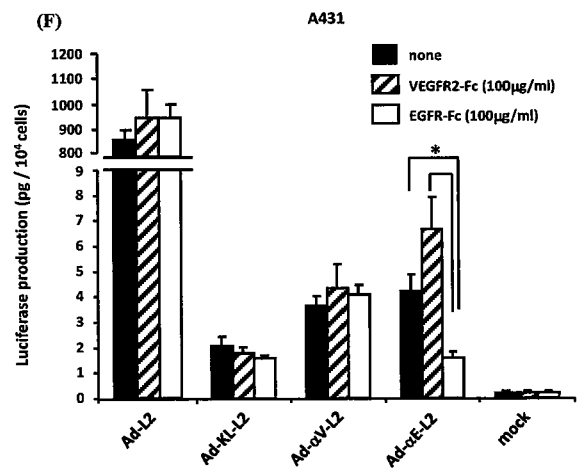
次に、EGFR に結合する Monobody を挿入した Ad ベクター (Ad-αE-L2) が、EGFR 陽性細胞への高効率かつ特異的な遺伝子導入を可能とするかどうか検討するため、EGFR 陽性細胞である CHO-EGFR 細胞および A431 細胞に対し遺伝子導入実験を行った。各細胞における Ad-αE-L2 の遺伝子発現効率は、コントロールであるノブレス Ad ベクター (Ad-KL-L2) と比較して、それぞれ、約 10 倍および約 5 倍に上昇した (Figure 30B and 30D)。しかしながら、A431 細胞における Ad-αE-L2 の遺伝子発現効率は、従来の Ad ベクター (Ad-L2)と比較すると、約 170 倍低いものであった。なお、Flowcytometry による解析により、使用した CHO-EGFR 細胞と A431 細胞は、EGFR を高発現することを確認している (Figure 26A and 26B)。




(C)
CHO
CHO-EGFR
Relative luciferase production (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock


(D)
A431
Luciferase production (pg / 10⁴ cells)
1600
1400
1200
1000
800
8
6
4
2
0
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock


(E)
CHO-EGFR
none
VEGFR2-Fc (100μg/ml)
EGFR-Fc (100μg/ml)
Luciferase production (pg / 10⁴ cells)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock


(F)
A431
none
VEGFR2-Fc (100μg/ml)
EGFR-Fc (100μg/ml)
Luciferase production (pg / 10⁴ cells)
1200
1100
1000
900
800
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock

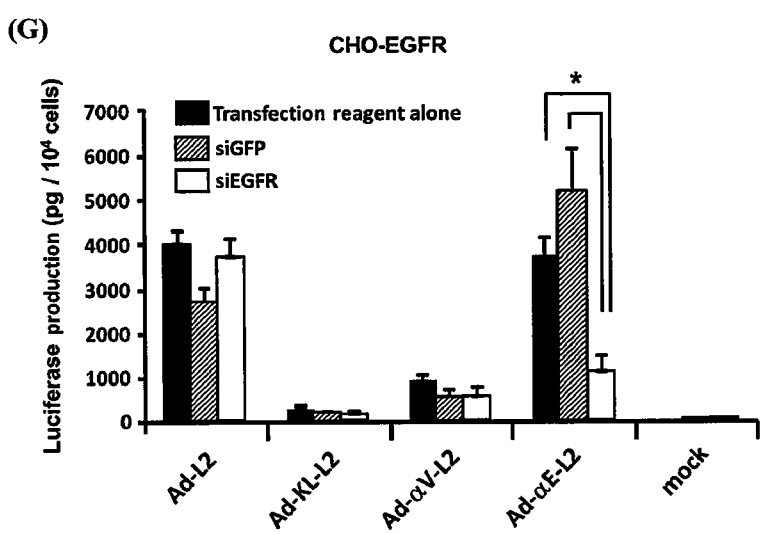

(G)
CHO-EGFR
Transfection reagent alone
siGFP
siEGFR
Luciferase production (pg / 10⁴ cells)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock

Figure 30. Transduction properties of the Ad vector displaying the EGFR-specific monobody. (A, B, D) Transduction efficiencies of the Ad vectors in the cultured cells. CHO (A), CHO-EGFR (B), and A431 (D) cells were transduced with the Ad vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48 h-incubation, the luciferase production was determined. (C) Ratio between the luciferase productions in CHO and CHO-EGFR cells. The ratios were normalized by the data of Ad-L2. (E, F) Transduction efficiencies in the presence of the recombinant EGFR-Fc chimera protein. Ad vectors were incubated with the recombinant EGFR-Fc chimera protein for 60 min, and then added to CHO-EGFR (E) and A431 (F) cells at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48 h-incubation, the levels of luciferase production were determined. (G) Transduction efficiency in EGFR-knockdown cells. CHO-EGFR cells were transfected with an anti-EGFR siRNA or anti-GFP siRNA at a concentration of 100 nM. Two days later, the cells were transduced with each Ad vector at 3000 VP/cell for 1.5 h. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction. The data are expressed as the means ± s.d. ($n = 4$; $^*P < 0.01$, n.s.; not significant).

一方、EGFR を発現しない CHO 細胞においては、Ad-αE-L2 は Ad-KL-L2 と同程度の遺伝子発現効率を示した (Figure 30A)。そして、CHO 細胞と CHO-EGFR 細胞の遺伝子発現効率の比率から、Ad-αE-L2 は EGFR 発現細胞特異的に遺伝子導入可能であることが示唆された (Figure 30C)。なお、原因は不明であるが、VEGFR2 未発現細胞において Ad-αV-L2 の遺伝子発現効率が Ad-KL-L2 と比較して上昇した。さらに、Ad-αE-L2 が Monobody 依存的に EGFR 陽性細胞への遺伝子導入を可能とするかを検討するため、リコンビナント EGFR-Fc キメラタンパク質を用いた遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、CHO-EGFR 細胞と A431 細胞における遺伝子発現効率は、リコンビナント EGFR タンパク質存在下において、70%以上低下した (Figure 30E and 30F)。一方、VEGFR2 タンパク質存在下においては、Ad-αE-L2 の遺伝子発現効率に変化は認められなかった。次に、Ad-αE-L2 が、細胞表面に発現する EGFR を介して遺伝子導入するかどうか検討するため、siRNA を用いた遺伝子導入阻害実験を行った。まず、CHO-EGFR 細胞に EGFR に対する siRNA (siEGFR)もしくはコントロールとして緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein; GFP)を作用させた。その結果、未処理群および siGFP 作用群と比較して siEGFR 作用群における EGFR の発現量は 30%以上低下した (Figure 31A and 31B)。この EGFR をノックダウンした CHO-EGFR 細胞に、Monobody を提示した Ad ベクターを作用させたところ、Ad-αE-L2 作用群においてのみ、未処理群と比較して遺伝子発現効率が有意に減少した (Figure 30G)。以上の結果より、Ad-αE-L2 はノブレスファイバーに提示された Monobody と細胞表面上の EGFR の相互作用により、EGFR 陽性細胞に特異的に遺伝子導入可能であることが示された。

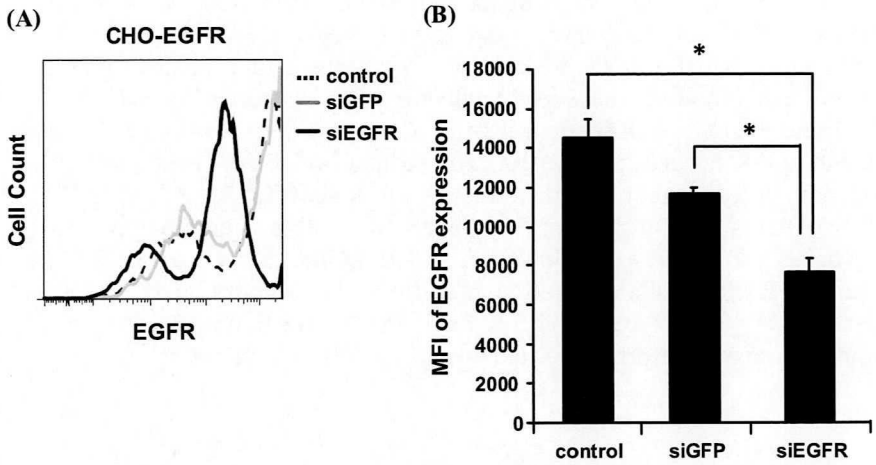
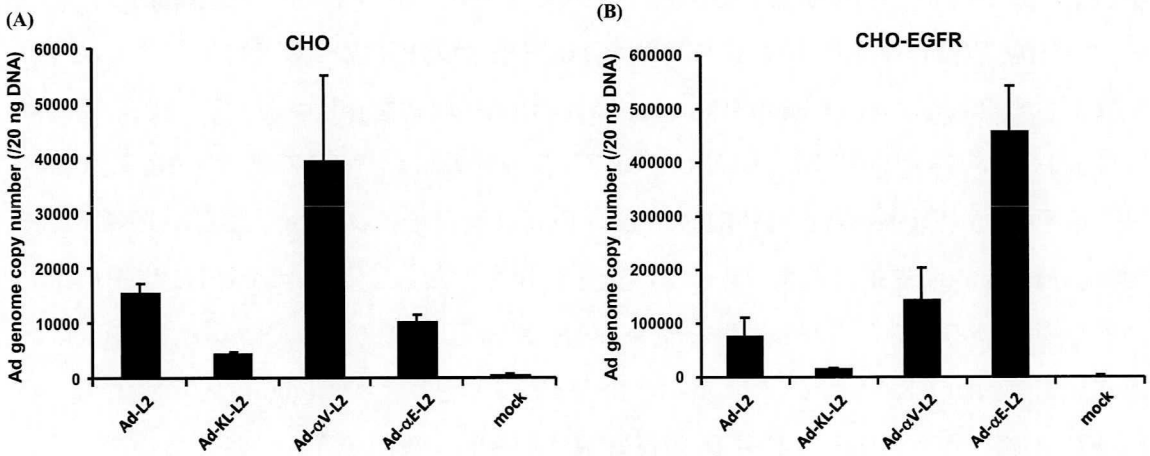


Figure 31. Knockdown efficiencies of anti- EGFR siRNA in human EGFR expression of CHO-EGFR cells. The percentages of EGFR-positive cells (J) and the mean fluorescence intensity (MFI) of EGFR expression (K) were determined by flow cytometry analysis using anti-human EGFR antibody. The data are expressed as the means ± s.d. (n = 3; *P < 0.01).

Monoboby 提示 Ad ベクターの細胞表面結合性の検討

また、Monobody を挿入したことで、標的細胞へ特異的に結合するかどうかをリアルタイム PCR により検討した。まず、CHO 細胞において、Ad-αE-L2 は Ad-L2 や Ad-KL-L2 と同程度の細胞表面 Ad ゲノムコピー数を示した (Figure 32A)。一方、CHO-EGFR 細胞においては、Ad-αE-L2 の Ad ゲノムコピー数は Ad-L2, Ad-KL-L2, Ad-αV-L2 と比較して、それぞれ 6 倍、35 倍、3 倍に増加した (Figure 32B)。CHO 細胞と CHO-EGFR 細胞の Ad ゲノムコピー数の比率から、Ad-αE-L2 は EGFR 陽性細胞に特異的に結合することが示唆された (Figure 32C)。これらの結果から、Monobody をノブレスファイバーに挿入することで、Ad ベクターの標的細胞への結合性が上昇することが示された。



(C)

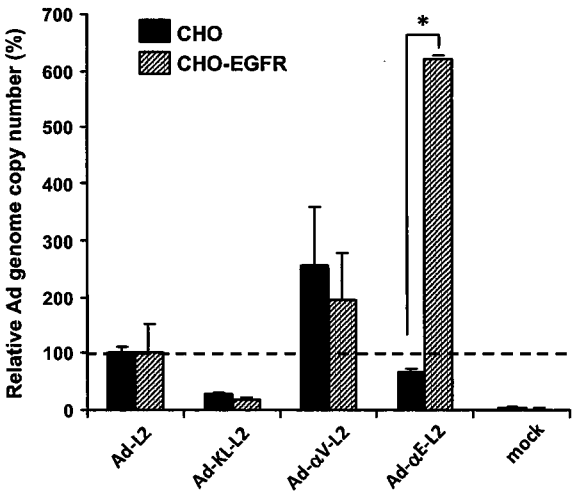
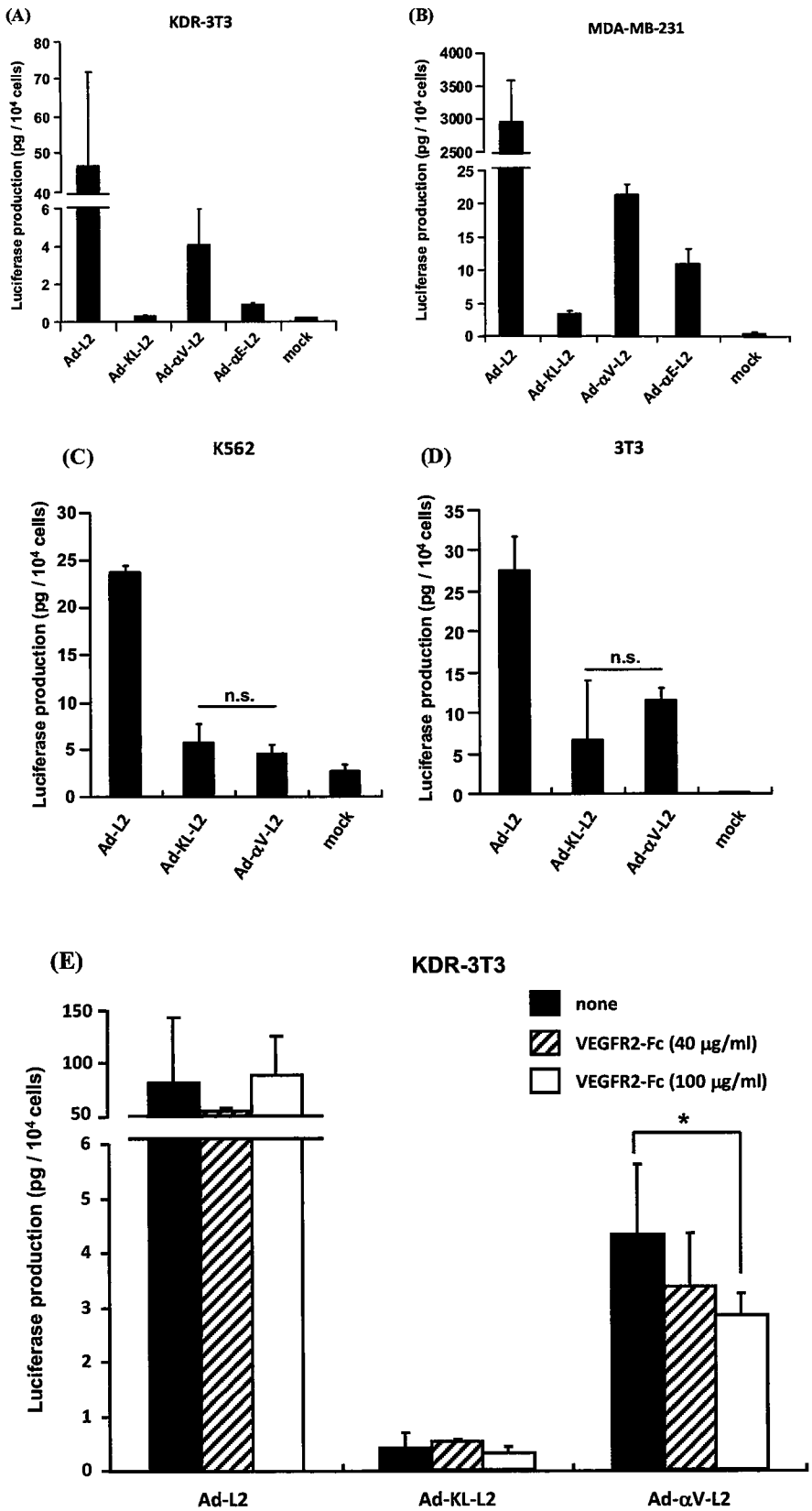


Figure 32. Real-time PCR analysis for cellular binding of the Ad vector displaying the EGFR-specific monobody. CHO (A) and CHO-EGFR (B) cells were incubated with the Ad vectors for 1.5 h at 3000 VP/cell at 4°C. The vector genome copy numbers were determined by real-time PCR. (C) Ratio between the Ad vector genome copy numbers in CHO and CHO-EGFR cells. The ratios were normalized by the Ad genome copy number of Ad-L2. The data are expressed as the means ± s.d. (n=4; *P < 0.01).

<u>VEGFR2 に結合する Monobody を挿入した Ad ベクターの遺伝子導入特性および細胞表面結合性の検討</u>

次に、Ad ベクターに提示するターゲット分子として他の Monobody についても検討した。血管内皮増殖因子受容体 VEGFR2 に結合する Monobody を提示した Ad ベクター（Ad-αV-L2）の遺伝子導入特性も同様に評価した。VEGFR2 陽性および陰性細胞それぞれに Ad-αV-L2 を作用させた。VEGFR2 陽性細胞である VEGFR2 を恒常的に発現する NIH-3T3 (KDR-3T3) 細胞と MDA-MB-231 細胞に Ad-αV-L2 を作用させたところ、Ad-KL-L2 と比較して、それぞれ約 14 倍および 6 倍に遺伝子発現効率が上昇した (Figure 33A and 33B)。しかしながら、Ad-L2 と比較して Ad-αV-L2 の遺伝子発現効率は、MDA-MB-231 細胞では約 137 倍、KDR-3T3 細胞では約 12 倍に減少した。一方、VEGFR2 陰性細胞である K562 細胞と NIH3T3 細胞では、Ad-αV-L2 は Ad-KL-L2 と同程度の遺伝子発現効率を示した (Figure 33C and 33D)。また、KDR-3T3 細胞および MDA-MB-231 細胞での Ad-αV-L2 の遺伝子発現効率は、リコンビナント VEGFR2-Fc キメラタンパク質を加えることで、30%以上減少した (Figure 33E and 33F)。さらに、KDR-3T3 細胞に抗 VEGFR2 抗体存在下で Ad-αV-L2 を作用させたところ、抗 VEGFR2 抗体の濃度依存的に有意に遺伝子発現効率が低下した (Figure 33G)。また、Ad-αV-L2 は Ad-KL-L2 と比較して KDR-3T3 細胞での結合性も約 1.6 倍に上昇した (Figure 33H)。これらの結果から、VEGFR2 に結合する Monobody をノブレスファイバーの C 末端領域に挿入したことで VEGFR2 陽性細胞への結合性が上昇し、Monobody と細胞表面の VEGFR2 を介して効率よく遺伝子導入することが示された。


(A)
KDR-3T3
Luciferase production (pg / 10⁴ cells)
Ad-L2
Ad-KL-L2
Ad-αV-L2
Ad-αE-L2
mock
(B)
MDA-MB-231
(C)
K562
n.s.
(D)
3T3
(E)
KDR-3T3
none
VEGFR2-Fc (40 μg/ml)
VEGFR2-Fc (100 μg/ml)
*

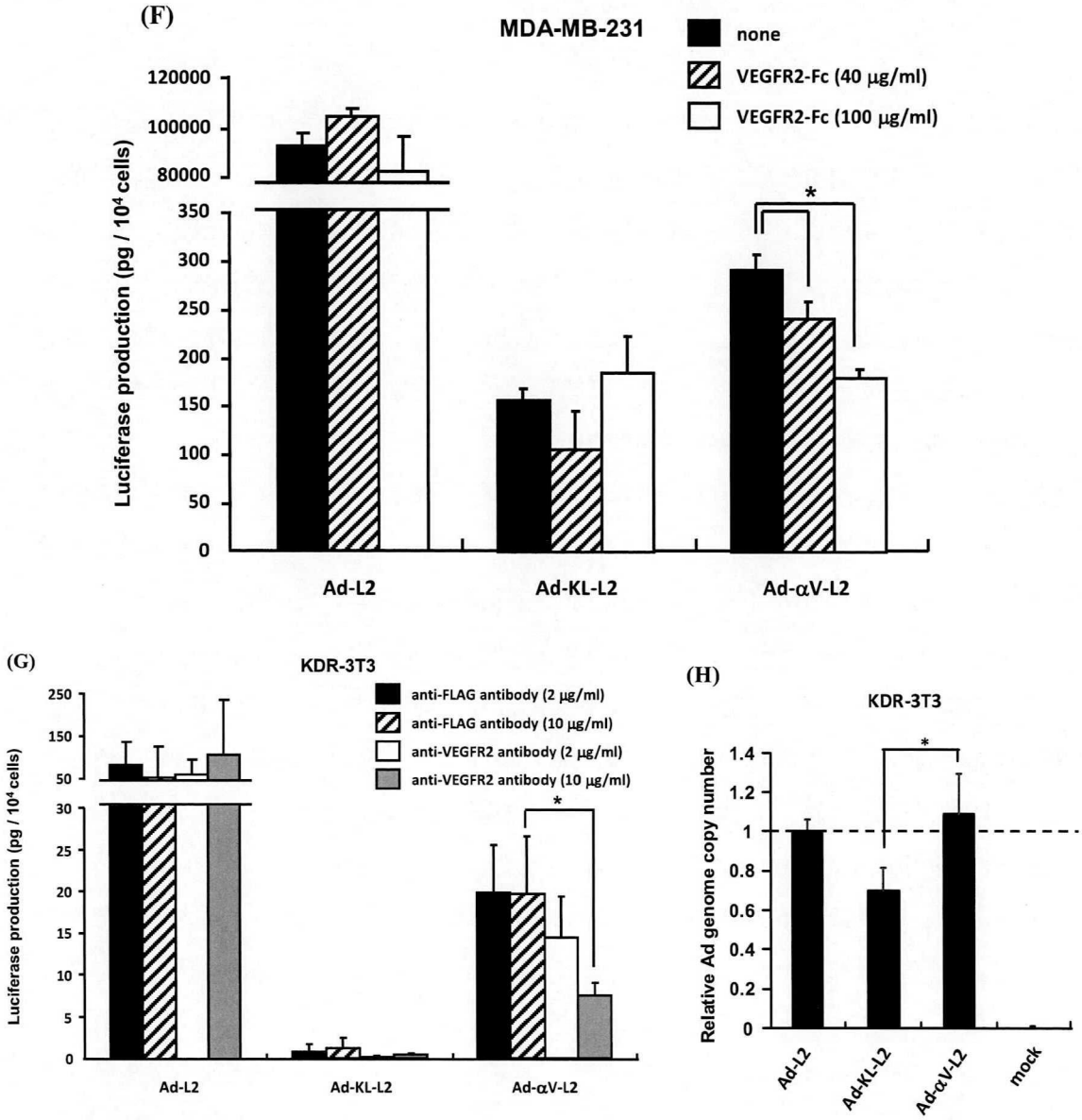


Figure 33. Transduction properties of the Ad vector displaying the VEGFR2-specific monobody. (A-D) Transduction efficiencies of the Ad vectors in the cultured cells. KDR-3T3 (A), MDA-MB-231 (B), K562 (C), and NIH3T3 (D) cells were transduced with the Ad vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48-h incubation, luciferase production was determined. (E, F) Transduction efficiencies in the presence of the recombinant VEGFR2-Fc chimera protein. The Ad vectors were incubated with the recombinant VEGFR2-Fc chimera protein for 60 min, and then added to KDR-3T3 (E) and MDA-MB-231 (F) cells at 3000 VP/cell for 1.5 h. After a 48-h incubation, the levels of luciferase production were determined. (G) Transduction efficiency in the presence of anti-human VEGFR2 antibody. KDR-3T3 cells were pre-incubated with the medium containing anti-human VEGFR2 antibody or control mouse IgG1κ at a concentration of 2 μg/ml and 10 μg/ml at 4°C for 1 h. The cells were then transduced with the Ad vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h at 4°C, after which the cells were washed and incubated at 37°C. Luciferase production in the cells was measured 48 h after transduction as described above. (H) Cellular binding of the Ad vectors on the cell surface. KDR-3T3 cells were incubated with the Ad vectors for 1.5 h at 3000 VP/cell at 4°C. The vector genome copy numbers were determined by real-time PCR. The data are expressed as the means ± s.d. (n = 4; *P < 0.01, n.s.; not significant).

【考察】

本章では、T4 ファージフィブリチン由来のノブレスファイバーの C 末端領域に EGFR もしくは VEGFR2 に結合する Monobody を挿入することで、標的細胞特異的に遺伝子導入可能な新規ファイバー改変型 Ad ベクターを開発した。Monobody をノブレスファイバーの C 末端領域に挿入しても、ファイバーの三量体形成は阻害されず、標的分子に効率良く結合することが示された。EGFR もしくは VEGFR2 陽性細胞において、Monobody を提示した Ad ベクターは細胞への結合性が上昇することで、標的細胞へ特異的かつ効率的に遺伝子導入可能であった。

これまでに、組織特異的な遺伝子導入を達成するために、様々なターゲティング分子を Ad 外殻タンパク質表面に提示することが試みられてきた。中でも、抗体の重鎖と軽鎖で構成される一本鎖抗体（single chain of variable fragment ; scFv）は高い標的特異性と親和性から、ターゲティング Ad ベクター開発に向けての有用な候補分子と考えられる。実際に、これまでに 2 つのグループにより、scFv を提示した Ad ベクターが開発されている [70, 71]。これらの研究では、還元条件下でも安定な特殊な scFv (hyperstable scFv) が使用され、ノブレスファイバーあるいは protein IX (pIX) に hyperstable scFv を挿入した Ad ベクターが作製された。従来の scFv は、Ad 外殻タンパク質が構成される還元条件下の核内では、分子内でジスルフィド結合が切断されるためフォールディングされないためである。従って、hyperstable scFv は Ad ベクターに提示するターゲティング分子として適していると考えられてきた。しかしながら、これまでの研究で実際に使用されたのは、βガラクトシダーゼ [71] と eRA[70] と呼ばれる人工的タンパク質に結合する hyperstable scFv の 2 つのみであり、内在性の膜タンパク質に結合する hyperstable scFv を提示した Ad ベクターは未だに開発されていない。hyperstable scFv を取得するためには、random DNA mutagenesis とファージディスプレイ法を組み合わせた複雑なスクリーニング技術が必要とされ、標的とするタンパク質に特異的に結合する hyperstable scFv を作製するのが非常に困難である [77-80]。そこで scFv 以外のターゲティング分子として、ラクダ抗体の重鎖可変ドメイン（variable fragment of camel antibody ; VHH）をはじめとする、単一のドメインから構成される Single domain antibody の Ad ベクターの提示が試みられてきた [72]。VHH は分子内にジスルフィド結合を有するものの、還元条件下でも安定な構造を保つことが知られている [93]。これまでに、この VHH を pIX の C 末端領域に提示した Ad ベクターが開発されている

[72]。一方で、Monobodyはヒトフィブロネクチンを骨格とするため、VHHのような抗体由来分子と比較して抗原性が低いと考えられており[94]、分子内にシステイン残基が含まれないため、核内でも安定にフォールディング可能である[81]。そして、scFvやVHHと比較して分子量が小さいため、Ad外殻タンパク質に挿入してもAd粒子の形成を妨げないと考えられる[83]。また、分子表面に露出したBC、DE、FGループのアミノ酸の改変により作製されたファージライブラリやmRNAライブラリを用いることで、様々な標的分子に結合するMonobodyが取得可能であり汎用性が高い[81,84]。このような理由から、Monobodyは上述したscFvやVHHと同等かもしくはそれ以上にAdベクターに提示する分子として相応しいと考えられる。

本研究では、Ad粒子に提示するターゲティング分子として、EGFRもしくはVEGR2に結合する2種類のMonobodyを選択した。これまでに、EGFRおよびVEGFR2に結合するMonobodyの結合解離定数K_Dはそれぞれ0.7 nM[82]および1.2 nM[92]であると報告されており、その標的への結合性はほぼ同等である。しかしながら、Ad-αE-L2のEGFRに対する特異性と比較すると、Ad-αV-L2のVEGFR2に対する特異性は低いものであった。EGFR陽性細胞において、EGFR-Fcキメラタンパク質存在下でAd-αE-L2の遺伝子発現効率は75%以上に低下したものの、VEGFR2陽性細胞においては、VEGFR2-Fcキメラタンパク質を作用させても30%程度の遺伝子発現効率の低下に過ぎなかった。この詳細な原因は不明であるが、VEGFR2に結合するMonobodyの構造が、ファイバーに挿入されたことで元の構造から変化し、結果としてVEGFR2への結合性が減少したことによるものと推察された。Getmanovaらにより、VEGFR2に結合する多くのMonobodyクローンが開発されており[92]、異なるアミノ酸配列を有する他クローンのMonobodyを使用することでこの問題が解決される可能性がある。Ad粒子に提示するのに適したMonobodyクローンの選択が、標的組織特異性の高いMonobody提示Adベクターの開発に重要であると考えられる。

本研究では、Monobodyを提示する部位としてノブレスファイバーのC末端領域を選択したが、これまでに、AdベクターのpIXが比較的大きな分子を提示する部位として適していることが報告されてきた[95]。例えば、CD66cに結合するVHHをpIXに提示したAdベクターが作製され、受容体特異的な結合と遺伝子導入が可能であることが報告されている[72]。他にも緑色蛍光タンパク質（GFP)[95]やsingle-chain T-cell receptor (scTCR)[96]などの比較的大きな分子もpIXに挿入可能であることが報告されている。しかしながら、pIXにターゲティング分子を挿入するとAd粒子の物理的安定性が大きく

減少することが報告されており[50,97]、これは、pIX が Ad 粒子の安定性維持に大きく関与しているためである[98,99]。また、ターゲティング分子を融合した pIX は、Ad 粒子の表面に十分に露出していないことから標的分子へアクセスしにくいといった欠点も指摘されている[50,97,100]。従って本研究では、Ad 粒子の中で最も表面に突出したノブレスファイバーに Monobody を挿入することで、前述のような pIX における欠点は生じず、細胞表面上の標的分子へ効率よくアクセスでき、結果として標的細胞への結合性や遺伝子発現効率が上昇したと考えられる。

一方で、Ad-αE-L2 と Ad-αV-L2 の EGFR もしくは VEGFR2 発現細胞における遺伝子発現効率は、従来の Ad ベクター (Ad-L2) よりも大きく低下した。Ad-L2 は、そのファイバーノブ領域と細胞表面上の CAR との相互作用により CAR 陽性細胞に遺伝子導入することは周知の事実であるが、A431 細胞における EGFR の発現レベルは CAR の発現レベルより高いことが知られている。一方で、MDA-MB-231 細胞における VEGFR2 の発現レベルは CAR の発現レベルより低いことが知られている。また、本研究で使用した Monobody の標的分子への親和性は、ファイバーノブと CAR の親和性 (K_D = 14.8 nM)[101] よりも高いことが知られている。以上から、CAR の発現レベルや標的分子への親和性以外の要因が、Monobody 提示 Ad ベクターの遺伝子発現効率が Ad-L2 より低いことに寄与していることが示唆された。例えば、ノブレスファイバーの C 末端領域に提示された Monobody の標的分子への結合部位が外側を向いていない可能性が 1 つの要因として挙げられる。Monobody の標的への結合領域は N 末端領域に位置している。しかしながら、ノブレスファイバーの C 末端領域に Monobody を挿入した場合、必然的に N 末端領域に存在する標的への結合部位は内側を向いてしまう。このように、ノブレスファイバーに挿入したことによる立体障害が原因で、Monobody の標的への接触効率が減少している可能性が考えられる。あるいは、ファイバーノブと CAR の相互作用は、ノブレスファイバーに挿入した Monobody と標的分子の相互作用と比較して、より効率よくエンドサイトーシスを引き起こすのかもしれない。一方、CAR 陰性細胞においては、Ad-L2 はファイバーシャフト領域に存在する KKTK (Lys-Lys-Thr-Lys) 配列と細胞表面上のヘパラン硫酸との相互作用により遺伝子導入することが知られている[102]。Monobody を提示したノブレスファイバーには、この KKTK 配列が存在しないため、Ad-L2 と比較して遺伝子発現効率が減少したと考えられる。

以上より、本研究では EGFR もしくは VEGFR2 に結合する Monobody を提示した

新たな改変型 Ad ベクターを開発し、標的細胞に Monobody と細胞表面上の標的分子を介し遺伝子導入可能であることを示した。すなわち、本 Monobody 提示 Ad ベクターは標的組織特異的な遺伝子導入による効率的で安全な遺伝子治療の実現に向けて優れたターゲティング Ad ベクターになることが期待される。

総括

1970 年後半からの分子生物学の顕著な進歩を背景に、これまで不明であった様々な疾患の原因が、遺伝子やタンパク質のレベルで解き明かされる時代となってきた。これに伴う疾患関連遺伝子情報を元に、今までに効果的な治療が望めなかったような難治性疾患に対する遺伝子治療研究が精力的に行われている。しかし、遺伝子治療の実用化には依然多くの問題が残されており、標的となる組織に効率よく治療用遺伝子を送達可能なドラッグデリバリーシステムの構築に基づく安全で有効なベクター開発が求められる。

Ad ベクターは既存の遺伝子導入用ベクターの中でも、高い遺伝子導入効率・遺伝子発現効率より、遺伝子治療臨床研究で広く用いられている。しかしながら Ad ベクターの抱える問題点として、1) 生体内投与後、抗 Ad 中和抗体により遺伝子導入が阻害されること、2) 速やかに血中から消失するため、標的組織への効率の良い遺伝子導入が困難であること、3) 生体投与後、投与量の大部分がクッパー細胞に取り込まれた後、残存した Ad ベクターが血液凝固第 X 因子 Factor X (FX) との相互作用により肝実質細胞に集積するとともに肝障害を誘発すること、4) Ad 受容体 CAR は、正常組織を含む広範な細胞に発現しているため、Ad ベクターを生体内に投与した場合には、非標的組織に感染するため組織特異性に乏しいことなどが挙げられる。これらの問題を解決するために、これまでに外来ペプチドや低分子化抗体などのターゲティング分子を Ad 外殻タンパク質のファイバー領域に挿入した Ad ベクターの開発が試みられてきた。しかしながら、未だに臨床応用可能な真のターゲティング Ad ベクターは開発されていない。従来の 5 型 Ad ベクターに、そのままターゲティング分子を提示しても、構造的な問題でウイルス粒子が形成されないためである。また、例えウイルス粒子が形成されたとしても、ヘキソン領域への FX の結合を回避できず、Ad ベクターの肝指向性を抑制することができないためである。ターゲティング Ad ベクター開発のためには、Ad ベクターが元来備えている肝指向性の抑制とターゲティング能の付与が必要不可欠となる。そのためにまずは、肝臓に移行しにくい性質を有した 35 型 Ad の利用や肝臓回避を目指したヘキソン特異的 PEG 化、立体構造障害を起こすことなくターゲティング分子を挿入可能な Ad ベクターの構築などの Ad 外殻タンパク質の最適化が必要である。そのうえで、標的特異性の高い外来ペプチドや抗体分子を Ad ベクターに提示する必要がある。そこで、このような考えのもと私は、これまでは試みられて来なかった新たなアプロー

チにより、化学的あるいは遺伝子工学的手法を用いたAd外殻タンパク質の最適化とターゲティング分子のAdベクターへの挿入を試みた。

第一章において、Adベクターの血中滞留性を向上させるため、PEG化FX (PEG-FX) を利用したヘキソン特異的PEG化Ad (PEG-FX-Ad) ベクターを開発し、その機能評価を行った。その結果、PEG-FX-Adベクターは、抗Ad中和抗体を回避かつ血中滞留性を向上することが可能であった。すなわち、FXを利用することで、簡便かつヘキソン特異的にAdベクターを修飾可能であることが示された。PEG-FXを用いることで、Adベクターの生体内での動態を変化させることが示されたことから、今後、PEG-FXによるAdベクターの修飾は、標的組織特異的に遺伝子導入可能な遺伝子治療用ベクターの開発に向け応用されることが期待できる。

第二章において、標的組織特異的な遺伝子導入を可能とするAdベクターの開発に向けた基盤ベクターを構築するため、α_vインテグリンに親和性を有するRGDペプチドを挿入したファイバー置換型Ad (AdF35) ベクターを開発し、その遺伝子導入特性を検討した。その結果、FG loopもしくはHI loopにRGDペプチドを挿入したAdF35ベクターはRGDペプチド依存的に遺伝子導入可能であった。また、その両方にRGDペプチドを挿入することにより、一か所のみにRGDペプチドを挿入したベクターと比較し大きく遺伝子発現効率を上昇させた。今後、本ベクターは安全な遺伝子治療を達成するためのターゲティング能を有したAdベクターの開発に向けた基盤ベクターとしての利用が期待される。

第三章において、標的組織特異的に遺伝子導入するAdベクターを開発するため、ファイバー領域をT4ファージ由来のフィブリチンで置換したノブレスファイバーを有するノブレスAdベクターに、低分子化抗体様分子であるMonobodyを挿入したMonobody提示Adベクターを開発し、その機能評価を行った。その結果、Monobody提示Adベクターは、標的分子に特異的に結合し、効率的に遺伝子導入可能であった。今後、Monobodyを挿入したAdベクターは、標的組織特異的な遺伝子導入を達成するターゲティングAdベクターとしての応用が期待される。

1990年にはじまり、夢の治療法といわれていた遺伝子治療であるが、現在は、もう一度基礎研究に立ち戻ることで、実用化に向けて一歩一歩進んでいる段階である。生体に適用可能なターゲティングAdベクターを開発するためには、まずは、元来備えている肝指向性を抑制する必要がある。本研究で行ったヘキソン特異的PEG化やAdF35ベクターの利用が有効な手段であると考えられる。他には、血液凝固因子FXとの結合

能を欠損したAdベクターの開発も有望であると考えられる。そして、このような肝指向性を抑制したAdベクターを開発した後、Adベクターに提示可能な適切なターゲティング分子を選択することが重要となる。本研究で利用したMonobodyは、分子量が小さく、分子内にシステイン残基が存在せず還元条件下で安定であるといった特徴を有するためAdベクターに提示する分子として適している。しかしながら、現時点で作製されている細胞表面に発現する分子に結合するMonobodyは、EGFR、VEGFR2、インスリン様増殖因子受容体（Insulin-like growth factor receptor; IGFR)[82]、エストロゲン受容体（Estrogen receptor alpha)[103]、$\alpha_v\beta3$ インテグリン[104]、Fcγ受容体IIA（Fcγ receptors IIA)[105]、Fcγ受容体IIIA (FcγRIIIA)[105]などを標的とする数種類のみである[83]。従って、これ以外の分子をターゲットとする場合には、目的とする抗原に結合するMonobodyをファージ表面提示法やリボソームディスプレイ法を用いて、自身で取得する必要があると考えられる。そして将来的には、上述したAd外殻タンパク質の最適化と新規Monobodyの挿入を組み合わせることで、より効率的に標的組織特異的な遺伝子導入を可能とするAdベクターの開発を目指したい。本研究で開発した外殻タンパク質改変Adベクターシステムが、遺伝子治療研究の進展に貢献し、一日も早く遺伝子治療が実用化され現在の不知の病が完治できる時代が来るのを期待したい。

結論

1. 血液凝固第X因子 (FX) を利用してAdの主要外殻タンパク質であるヘキソンを特異的に PEG 修飾した PEG-FX-Ad ベクターは、遺伝子導入活性を維持したまま、従来の Ad ベクターと比較して高い血中滞留性および抗 Ad 中和抗体による阻害回避能を示した。

2. 35 型ファイバーノブの CD46 との結合部位に外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型 Ad ベクターを開発した。α_vインテグリンに結合する Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドを 35 型 Ad ファイバーノブに挿入したところ、CD46 非依存的かつ RGD ペプチド依存的に標的細胞に遺伝子導入することに成功した。

3. 35 型 Ad ファイバーノブ領域の FG、HI ループの両方に外来ペプチドを挿入可能なファイバー置換型 Ad ベクターを作製し、その両方に RGD ペプチドを挿入することで、CD46 陰性細胞に対しさらに効率よく遺伝子導入することに成功した。

4. 血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) 2もしくは上皮増殖因子受容体 (EGFR) に結合するMonobodyをファイバーノブ欠損領域に挿入したMonobody提示Adベクターを開発し、各標的分子に特異的に結合可能であることを示した。また、Monobody提示Adベクターは、標的分子発現細胞に対しMonobody依存的に特異的に遺伝子導入可能であった。

本研究で開発した新規 Ad ベクターは、安全で有効な遺伝子治療の達成に向けたターゲティングベクターの基盤となるとともに、将来的にこれらの技術を組み合わせることで優れたターゲティング Ad ベクターが開発されることが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜るとともに、温かいご配慮を賜りました大阪大学大学院薬学研究科　教授　水口裕之先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究にあたり、多大なるご指導を頂いた大阪大学大学院薬学研究科　准教授　櫻井文教先生に謹んで深謝致します。

本研究に関して、貴重な御助言、ご指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科　助教　立花雅史先生、形山和史先生、独立行政法人医薬基盤研究所　幹細胞制御プロジェクト　プロジェクトリーダー　川端健二博士に謹んで感謝の意を表します。

KDR-3T3 細胞を御供与頂きました上武大学　副学長　澁谷正史先生に厚く御礼申し上げます。

本稿をまとめるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科　教授　中川晋作先生、同研究科　教授　八木清仁先生、同研究科　教授　藤尾慈先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多大な御助力を賜りました大阪大学薬学研究科分子生物学分野　樋口麻衣子博士、清水かほり修士、町谷充洋修士、高比良幸大修士、岡本小百合修士、独立行政法人医薬基盤研究所　幹細胞制御プロジェクト　田代克久博士、山口朋子博士、酒井英子博士、古川智久博士、鈴木(香山)絵美博士、倉知慎之輔修士、同研究所　バイオ創薬プロジェクト　阿部康弘博士に深く感謝申し上げます。また、本研究に関し、温かく見守って下さった稲村充博士、庄司正樹博士、杉尾久美子修士、茂木優香里修士、井口香菜子修士、久野周一修士、David Bennett 修士に深謝致します。

本研究を遂行する上で、力強く支えて頂いた、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野、及び独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクトの皆様に深く御礼申し上げます。

また、大学院博士後期課程において経済的援助を賜りました、独立行政法人日本学術振興会に深く感謝申し上げます。

最後に、長期に渡る学生生活を見守り、応援して頂きました家族に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M *et al.* T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; **270**(5235): 475-80.
2. Senzer N, Nemunaitis J. A review of contusugene ladenovec (Advexin) p53 therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009; **11**(1): 54-61.
3. Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J* 1993; **12**(7): 2589-99.
4. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G *et al.* An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998; **72**(12): 9706-13.
5. Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL, 2nd, Roelvink PW, Li Y, Lee GM *et al.* Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 1997; **71**(11): 8221-9.
6. Bouri K, Feero WG, Myerburg MM, Wickham TJ, Kovesdi I, Hoffman EP *et al.* Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(10): 1633-40.
7. Gonzalez R, Vereecque R, Wickham TJ, Facon T, Hetuin D, Kovesdi I *et al.* Transduction of bone marrow cells by the AdZ.F(pK7) modified adenovirus demonstrates preferential gene transfer in myeloma cells. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(16): 2709-17.
8. Zheng S, Ulasov IV, Han Y, Tyler MA, Zhu ZB, Lesniak MS. Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma. *J Gene Med* 2007; **9**(3): 151-60.
9. O'Riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, Parkes V, Wadsworth SC, Smith AE *et al.* PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 1999; **10**(8): 1349-58.
10. Chillon M, Lee JH, Fasbender A, Welsh MJ. Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies in vitro. *Gene Ther* 1998; **5**(7): 995-1002.
11. Eto Y, Gao JQ, Sekiguchi F, Kurachi S, Katayama K, Maeda M *et al.* PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high

transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* 2005; **7**(5): 604-12.

12. Mok H, Palmer DJ, Ng P, Barry MA. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol Ther* 2005; **11**(1): 66-79.
13. Kreppel F, Kochanek S. Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Mol Ther* 2008; **16**(1): 16-29.
14. Wortmann A, Vohringer S, Engler T, Corjon S, Schirmbeck R, Reimann J *et al.* Fully detargeted polyethylene glycol-coated adenovirus vectors are potent genetic vaccines and escape from pre-existing anti-adenovirus antibodies. *Mol Ther* 2008; **16**(1): 154-62.
15. DiPaolo N, Ni S, Gaggar A, Strauss R, Tuve S, Li ZY *et al.* Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for vaccination. *Mol Ther* 2006; **13**(4): 756-65.
16. Ni S, Bernt K, Gaggar A, Li ZY, Kiem HP, Lieber A. Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons. *Hum Gene Ther* 2005; **16**(6): 664-77.
17. Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, Hayakawa T. Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol Ther* 2003; **8**(5): 813-21.
18. Vogels R, Zuijdgeest D, van Rijnsoever R, Hartkoorn E, Damen I, de Bethune MP *et al.* Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol* 2003; **77**(15): 8263-71.
19. Bradley RR, Lynch DM, Iampietro MJ, Borducchi EN, Barouch DH. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J Virol* 2012; **86**(1): 625-9.
20. Di Paolo NC, van Rooijen N, Shayakhmetov DM. Redundant and synergistic mechanisms control the sequestration of blood-born adenovirus in the liver. *Mol Ther* 2009; **17**(4): 675-84.
21. Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, Hofherr SE, Barry MA, Stewart PL *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(14): 5483-8.
22. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 2008; **132**(3): 397-409.
23. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA *et al.* A

simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 2001; **8**(9): 730-5.

24. Maizel JV, Jr., White DO, Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 1968; **36**(1): 115-25.
25. Parker AL, Waddington SN, Nicol CG, Shayakhmetov DM, Buckley SM, Denby L *et al.* Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood* 2006; **108**(8): 2554-61.
26. Greig JA, Buckley SM, Waddington SN, Parker AL, Bhella D, Pink R *et al.* Influence of coagulation factor x on in vitro and in vivo gene delivery by adenovirus (Ad) 5, Ad35, and chimeric Ad5/Ad35 vectors. *Mol Ther* 2009; **17**(10): 1683-91.
27. Russell WC, Valentine RC, Pereira HG. The effect of heat on the anatomy of the adenovirus. *J Gen Virol* 1967; **1**(4): 509-22.
28. Suzuki-Kouyama E, Katayama K, Sakurai F, Yamaguchi T, Kurachi S, Kawabata K *et al.* Hexon-specific PEGylated adenovirus vectors utilizing avidin-biotin interaction. *Biomaterials* 2011; **32**(6): 1724-30.
29. Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K, Okamoto T *et al.* Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 2003; **21**(5): 546-52.
30. Maullu C, Raimondo D, Caboi F, Giorgetti A, Sergi M, Valentini M *et al.* Site-directed enzymatic PEGylation of the human granulocyte colony-stimulating factor. *FEBS J* 2009; **276**(22): 6741-50.
31. Nie Y, Zhang X, Wang X, Chen J. Preparation and stability of N-terminal mono-PEGylated recombinant human endostatin. *Bioconjug Chem* 2006; **17**(4): 995-9.
32. Persson E, Bjork I, Stenflo J. Protein structural requirements for Ca2+ binding to the light chain of factor X. Studies using isolated intact fragments containing the gamma-carboxyglutamic acid region and/or the epidermal growth factor-like domains. *J Biol Chem* 1991; **266**(4): 2444-52.
33. Venkateswarlu D, Perera L, Darden T, Pedersen LG. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys J* 2002; **82**(3): 1190-206.
34. Chen CY, May SM, Barry MA. Targeting adenoviruses with factor x-single-chain antibody fusion proteins. *Hum Gene Ther* 2010; **21**(6): 739-49.
35. Doronin K, Shashkova EV, May SM, Hofherr SE, Barry MA. Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic adenovirus. *Hum Gene*

Ther 2009; **20**(9): 975-88.

36. Yao X, Yoshioka Y, Morishige T, Eto Y, Watanabe H, Okada Y *et al.* Systemic administration of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther* 2009; **16**(12): 1395-404.
37. Gao JQ, Eto Y, Yoshioka Y, Sekiguchi F, Kurachi S, Morishige T *et al.* Effective tumor targeted gene transfer using PEGylated adenovirus vector via systemic administration. *J Control Release* 2007; **122**(1): 102-10.
38. Akagi D, Oba M, Koyama H, Nishiyama N, Fukushima S, Miyata T *et al.* Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Ther* 2007; **14**(13): 1029-38.
39. Khare R, May SM, Vetrini F, Weaver EA, Palmer D, Rosewell A *et al.* Generation of a Kupffer cell-evading adenovirus for systemic and liver-directed gene transfer. *Mol Ther* 2011; **19**(7): 1254-62.
40. Prill JM, Espenlaub S, Samen U, Engler T, Schmidt E, Vetrini F *et al.* Modifications of adenovirus hexon allow for either hepatocyte detargeting or targeting with potential evasion from Kupffer cells. *Mol Ther* 2011; **19**(1): 83-92.
41. Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002; **285**(1-2): 69-77.
42. Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 2000; **74**(6): 2567-83.
43. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003; **9**(11): 1408-12.
44. Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2003; **77**(17): 9183-91.
45. Lu ZZ, Ni F, Hu ZB, Wang L, Wang H, Zhang QW *et al.* Efficient gene transfer into hematopoietic cells by a retargeting adenoviral vector system with a chimeric fiber of adenovirus serotype 5 and 11p. *Exp Hematol* 2006; **34**(9): 1171-82.
46. Takayama K, Reynolds PN, Short JJ, Kawakami Y, Adachi Y, Glasgow JN *et al.* A mosaic adenovirus possessing serotype Ad5 and serotype Ad3 knobs exhibits expanded tropism. *Virology* 2003; **309**(2): 282-93.
47. Koizumi N, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Watanabe Y, Hayakawa T. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol* 2003;

77(24): 13062-72.

48. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; **279**(5349): 377-80.
49. Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol* 1997; **15**(6): 542-6.
50. Kurachi S, Koizumi N, Sakurai F, Kawabata K, Sakurai H, Nakagawa S *et al.* Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther* 2007; **14**(3): 266-74.
51. Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 2003; **5**(4): 267-76.
52. Wang H, Liaw YC, Stone D, Kalyuzhniy O, Amiraslanov I, Tuve S *et al.* Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 2007; **81**(23): 12785-92.
53. Pache L, Venkataraman S, Nemerow GR, Reddy VS. Conservation of fiber structure and CD46 usage by subgroup B2 adenoviruses. *Virology* 2008; **375**(2): 573-9.
54. Shayakhmetov DM, Lieber A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* 2000; **74**(22): 10274-86.
55. Sakurai F, Murakami S, Kawabata K, Okada N, Yamamoto A, Seya T *et al.* The short consensus repeats 1 and 2, not the cytoplasmic domain, of human CD46 are crucial for infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J Control Release* 2006; **113**(3): 271-8.
56. Buchholz CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, Braun W *et al.* Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem* 1997; **272**(35): 22072-9.
57. Gustafsson DJ, Segerman A, Lindman K, Mei YF, Wadell G. The Arg279Gln [corrected] substitution in the adenovirus type 11p (Ad11p) fiber knob abolishes EDTA-resistant binding to A549 and CHO-CD46 cells, converting the phenotype to that of Ad7p. *J Virol* 2006; **80**(4): 1897-905.
58. Fleischli C, Sirena D, Lesage G, Havenga MJ, Cattaneo R, Greber UF *et al.* Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol* 2007; **88**(Pt 11): 2925-34.
59. Persson BD, Reiter DM, Marttila M, Mei YF, Casasnovas JM, Arnberg N *et al.* Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**(2): 164-6.
60. Pache L, Venkataraman S, Reddy VS, Nemerow GR. Structural variations in species

B adenovirus fibers impact CD46 association. *J Virol* 2008; **82**(16): 7923-31.

61. Boturyn D, Coll JL, Garanger E, Favrot MC, Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* 2004; **126**(18): 5730-9.

62. Sancey L, Garanger E, Foillard S, Schoehn G, Hurbin A, Albiges-Rizo C *et al.* Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther* 2009; **17**(5): 837-43.

63. Ye Y, Bloch S, Xu B, Achilefu S. Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors. *J Med Chem* 2006; **49**(7): 2268-75.

64. Myhre S, Henning P, Friedman M, Stahl S, Lindholm L, Magnusson MK. Re-targeted adenovirus vectors with dual specificity; binding specificities conferred by two different Affibody molecules in the fiber. *Gene Ther* 2009; **16**(2): 252-61.

65. Sakurai F, Mizuguchi H, Hayakawa T. Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther* 2003; **10**(12): 1041-8.

66. Seshidhar Reddy P, Ganesh S, Limbach MP, Brann T, Pinkstaff A, Kaloss M *et al.* Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology* 2003; **311**(2): 384-93.

67. Sumida SM, Truitt DM, Lemckert AA, Vogels R, Custers JH, Addo MM *et al.* Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* 2005; **174**(11): 7179-85.

68. Stecher H, Shayakhmetov DM, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2001; **4**(1): 36-44.

69. Nwanegbo E, Vardas E, Gao W, Whittle H, Sun H, Rowe D *et al.* Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**(2): 351-7.

70. Hedley SJ, Auf der Maur A, Hohn S, Escher D, Barberis A, Glasgow JN *et al.* An adenovirus vector with a chimeric fiber incorporating stabilized single chain antibody achieves targeted gene delivery. *Gene Ther* 2006; **13**(1): 88-94.

71. Vellinga J, de Vrij J, Myhre S, Uil T, Martineau P, Lindholm L *et al.* Efficient incorporation of a functional hyper-stable single-chain antibody fragment protein-IX fusion in the adenovirus capsid. *Gene Ther* 2007; **14**(8): 664-70.

72. Poulin KL, Lanthier RM, Smith AC, Christou C, Risco Quiroz M, Powell KL *et al.* Retargeting of adenovirus vectors through genetic fusion of a single-chain or

single-domain antibody to capsid protein IX. *J Virol* 2010; **84**(19): 10074-86.

73. Magnusson MK, Hong SS, Henning P, Boulanger P, Lindholm L. Genetic retargeting of adenovirus vectors: functionality of targeting ligands and their influence on virus viability. *J Gene Med* 2002; **4**(4): 356-70.

74. Glasgow JN, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT. A strategy for adenovirus vector targeting with a secreted single chain antibody. *PLoS One* 2009; **4**(12): e8355.

75. Tavladoraki P, Girotti A, Donini M, Arias FJ, Mancini C, Morea V *et al.* A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both Escherichia coli and transgenic plants. *Eur J Biochem* 1999; **262**(2): 617-24.

76. Cattaneo A, Biocca S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol* 1999; **17**(3): 115-21.

77. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; **321**(6069): 522-5.

78. Proba K, Worn A, Honegger A, Pluckthun A. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol* 1998; **275**(2): 245-53.

79. Worn A, Pluckthun A. An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Lett* 1998; **427**(3): 357-61.

80. Martineau P, Jones P, Winter G. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 1998; **280**(1): 117-27.

81. Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 1998; **284**(4): 1141-51.

82. Emanuel SL, Engle LJ, Chao G, Zhu RR, Cao C, Lin Z *et al.* A fibronectin scaffold approach to bispecific inhibitors of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor-I receptor. *MAbs* 2011; **3**(1): 38-48.

83. Lipovsek D. Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Eng Des Sel* 2011; **24**(1-2): 3-9.

84. Koide A, Gilbreth RN, Esaki K, Tereshko V, Koide S. High-affinity single-domain binding proteins with a binary-code interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(16): 6632-7.

85. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996; **7**(2): 213-21.

86. Mizuguchi H, Hayakawa T. Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1568**(1): 21-9.

87. Pereboeva L, Komarova S, Mahasreshti PJ, Curiel DT. Fiber-mosaic adenovirus as a novel approach to design genetically modified adenoviral vectors. *Virus Res* 2004; **105**(1): 35-46.

88. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Friedman HS, Werner MH, Bigner DD *et al.* Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. *Cancer Res* 1988; **48**(8): 2231-8.

89. Modjtahedi H, Eccles S, Box G, Styles J, Dean C. Immunotherapy of human tumour xenografts overexpressing the EGF receptor with rat antibodies that block growth factor-receptor interaction. *Br J Cancer* 1993; **67**(2): 254-61.

90. Lu D, Jimenez X, Zhang H, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. *Int J Cancer* 2002; **97**(3): 393-9.

91. Ryden L, Jirstrom K, Bendahl PO, Ferno M, Nordenskjold B, Stal O *et al.* Tumor-specific expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 but not vascular endothelial growth factor or human epidermal growth factor receptor 2 is associated with impaired response to adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**(21): 4695-704.

92. Getmanova EV, Chen Y, Bloom L, Gokemeijer J, Shamah S, Warikoo V *et al.* Antagonists to human and mouse vascular endothelial growth factor receptor 2 generated by directed protein evolution in vitro. *Chem Biol* 2006; **13**(5): 549-56.

93. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer* 2002; **98**(3): 456-62.

94. Tolcher AW, Sweeney CJ, Papadopoulos K, Patnaik A, Chiorean EG, Mita AC *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of CT-322 (BMS-844203), a targeted Adnectin inhibitor of VEGFR-2 based on a domain of human fibronectin. *Clin Cancer Res* 2011; **17**(2): 363-71.

95. Meulenbroek RA, Sargent KL, Lunde J, Jasmin BJ, Parks RJ. Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the virion--generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. *Mol Ther* 2004; **9**(4): 617-24.

96. de Vrij J, Uil TG, van den Hengel SK, Cramer SJ, Koppers-Lalic D, Verweij MC *et al.* Adenovirus targeting to HLA-A1/MAGE-A1-positive tumor cells by fusing a single-chain T-cell receptor with minor capsid protein IX. *Gene Ther* 2008; **15**(13): 978-89.

97. Campos SK, Barry MA. Comparison of adenovirus fiber, protein IX, and hexon capsomeres as scaffolds for vector purification and cell targeting. *Virology* 2006;

349(2): 453-62.

98. Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Graham FL. Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J* 1987; **6**(6): 1733-9.

99. Rosa-Calatrava M, Grave L, Puvion-Dutilleul F, Chatton B, Kedinger C. Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol* 2001; **75**(15): 7131-41.

100. Vellinga J, Rabelink MJ, Cramer SJ, van den Wollenberg DJ, Van der Meulen H, Leppard KN *et al.* Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J Virol* 2004; **78**(7): 3470-9.

101. Kirby I, Davison E, Beavil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW *et al.* Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* 2000; **74**(6): 2804-13.

102. Smith TA, Idamakanti N, Rollence ML, Marshall-Neff J, Kim J, Mulgrew K *et al.* Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther* 2003; **14**(8): 777-87.

103. Koide A, Abbatiello S, Rothgery L, Koide S. Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(3): 1253-8.

104. Richards J, Miller M, Abend J, Koide A, Koide S, Dewhurst S. Engineered fibronectin type III domain with a RGDWXE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human alphavbeta3 integrin. *J Mol Biol* 2003; **326**(5): 1475-88.

105. Hackel BJ, Ackerman ME, Howland SW, Wittrup KD. Stability and CDR composition biases enrich binder functionality landscapes. *J Mol Biol* 2010; **401**(1): 84-96.