The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	改変型アデノウイルスベクターを用いたメラノーマ遺伝子治療の最適化に関する研究
Author(s)	岡田, 裕香
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/858
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

改変型アデノウイルスベクターを用いた

メラノーマ遺伝子治療の最適化に関する研究

２００３年

岡田　裕香

目　次

略語一覧　1

緒　論　2

本　論　5

第一章　AdRGD の構築とメラノーマ細胞における遺伝子発現解析　5

第一節　メラノーマ細胞における Ad レセプターの発現解析に基づいた AdRGD の構築　7

第二節　AdRGD によるメラノーマ細胞への遺伝子導入効率と遺伝子導入機序　13

第三節　小括　17

第二章　メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療における AdRGD の有用性評価　19

第一節　サイトカイン発現ベクターを適用したメラノーマにおけるサイトカイン産生量　20

第二節　AdRGD-TNFαあるいは Ad-TNFαの腫瘍内投与による抗 B16BL6 腫瘍効果　24

第三節　AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 の腫瘍内投与による抗 B16BL6 腫瘍効果　30

第四節　小括　36

第三章　メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療における副作用発現機序の解析と治療プロトコールの最適化　38

第一節　腫瘍内投与した従来型 Ad および AdRGD の循環血中への漏出　40

第二節　サイトカイン発現 AdRGD の高用量腫瘍内投与における副作用発現機序　44

第三節　AdRGD-TNFαと AdRGD-IL12 の併用による抗腫瘍効果の増強と副作用の軽減　49

第四節　小括　50

結　論　53

謝　辞　54

引用文献　55

略 語 一 覧

2-ME	·····	2-mercaptoethanol
Ad	·····	Adenovirus vector
AdRGD	·····	RGD fiber-mutant adenovirus vector
AIDS	·····	Acquired immune deficiency syndrome
Amp^r	·····	Ampicillin resistance gene (β-lactamase gene)
CAR	·····	Coxsackievirus-adenovirus receptor
CD	·····	Cluster of differentiation
CMV	·····	Cytomegalovirus promoter
CTL	·····	Cytotoxic T lymphocyte
DMEM	·····	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFP	·····	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	·····	Enzyme-linked immunosorbent assay
Eu	·····	Europium
FBS	·····	Fetal bovine serum
HE	·····	Hematoxylin and eosin
IFN	·····	Interferon
Ig	·····	Immunoglobulin
IL	·····	Interleukin
IRES	·····	Internal ribosome entry site
ITR	·····	Inverted terminal repeat
Kan^r	·····	Kanamycin resistance gene (Kanamycin phosphotransferase gene)
LacZ	·····	β-galactosidase gene
Luc	·····	Luciferase
MCS	·····	Multi-cloning site
MEM	·····	Minimum essential medium
MFI	·····	Mean fluorescence intensity
MHC	·····	Major histocompatibility complex
MMC	·····	Mitomycin C
MTT	·····	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	·····	Natural killer
P(A)	·····	Polyadenylation signal
PBS	·····	Phosphate-buffered saline
PCI	·····	Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1)
PCR	·····	Polymerase chain reaction
PMSF	·····	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RLU	·····	Relative light units
RT	·····	Reverse transcription
SCID	·····	Severe combined immunodeficiency
Th	·····	Helper T lymphocyte
TNF	·····	Tumor necrosis factor
VP	·····	Vector particles

緒 論

1953 年に Watson と Crick が DNA 構造を決定してから今日までの 50 年間に、遺伝子解析技術は目覚しい進展を遂げ、ヒトゲノムのワーキングドラフト配列が完成したことに伴って [1),2)]、様々な難治性疾患の発症機構が遺伝子レベルで解き明かされる時代に突入した。そのような中、これらの情報を新たな治療法として応用しようとする遺伝子治療は、基礎と臨床との連携によってその開発研究が様々なアイデアのもと活発に進められており、21 世紀の医療の一端を担うべき治療戦略として大いに期待されている。

遺伝子治療の理想像は、正常な遺伝子を特定の標的細胞の核内へ運搬し、遺伝子相同組換えにより疾患原因遺伝子を置換するための手段を確立することであろう。しかし、この遺伝子修復技術の確立には基礎研究に相当の時間を要するものと思われ、現時点においては正常遺伝子あるいは治療用遺伝子の補充を目的とした技術的に可能な遺伝子治療の開発に主眼が置かれている。遺伝子治療臨床研究は、1989 年 5 月 22 日に世界で初めて遺伝子導入腫瘍浸潤リンパ球がメラノーマ患者に投与され [3)]、翌 1990 年 9 月 14 日にアデノシンデアミナーゼ欠損症を対象とした最初の遺伝子治療が米国国立衛生研究所（NIH）において開始された [4)-6)]。それ以来これまでに、欧米を中心として 600 を超える遺伝子治療臨床研究プロトコールが提出され、治療を受けた患者数は 4,000 人を突破している [7)]。この間、遺伝子治療が臨床の場に登場して 10 年が経過した 1999 年には、「伴性重症複合免疫不全症（SCID-X1）患者に対する共通γ鎖発現レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究」がフランスのグループにより実施され、治療を受けた 11 人の患者のうち 9 人において重度の免疫不全症が著しく改善されたとの報告は [8)-11)]、遺伝子治療の理論的有用性が実証された初めての臨床研究成果として広く評価された。また、当初適応疾患として設定された先天性代謝疾患などの単一遺伝性疾患に加えて、悪性腫瘍、AIDS、血管疾患および自己免疫疾患などの難病や慢性疾患への適応拡大が図られ、とりわけ癌を対象とした遺伝子治療は、患者数の多さと現在確立されている外科療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的療法だけでは十分な治癒率が望めないという理由から、全遺伝子治療臨床研究プロトコールの 60%以上を占めている [7)]（Fig. 1-A)。

癌の分子病態が解明されるにつれ、癌を複数の遺伝子変異の蓄積により発症する遺伝子疾患（多段階発癌）として捉えることが可能となり、遺伝子治療による新しい角度からの治療法の開拓が望まれている。しかし、個々の腫瘍細胞の変異遺伝子を遺伝子補充により全て正常化することは、極めて困難であり現実的な治療法ではない。差し当たって、変異した活性化癌遺伝子の一つを阻害

する[12)-14)]、あるいは正常な癌抑制遺伝子を補充する[15)-17)]ことにより、多少なりとも脱癌化を図るというアプローチが検討されているが、現在の癌に対する遺伝子治療臨床研究プロトコールの多くは、既存の技術レベルでも比較的実施しやすいという観点から、腫瘍局所にサイトカイン遺伝子や自殺遺伝子を導入することによって癌細胞の排除を狙うアプローチを試みている[18)-20)]。これらの臨床研究では、トランスレーショナルリサーチとして他に治療法のない進行末期癌の患者を対象としていることもあり、必ずしも当初期待されたような効果が得られているわけではないが、癌を対象とした遺伝子治療の実用化に向けての課題が抽出され、臨床的有用性の向上に繋がる方法論を探る糸口が見えてきた。なかでも、既存のベクター技術では腫瘍への十分な遺伝子導入を達成できないことが治療効果を制限する大きな要因であるとの確かな知見が集積され、ここ数年の癌に対する遺伝子治療研究においては、既存のベクターを応用した「治療」に観点を置いた研究に加えて、遺伝子導入効率を高めた「新規ベクターシステムの開発」を中心とした基盤研究も精力的に行われている。

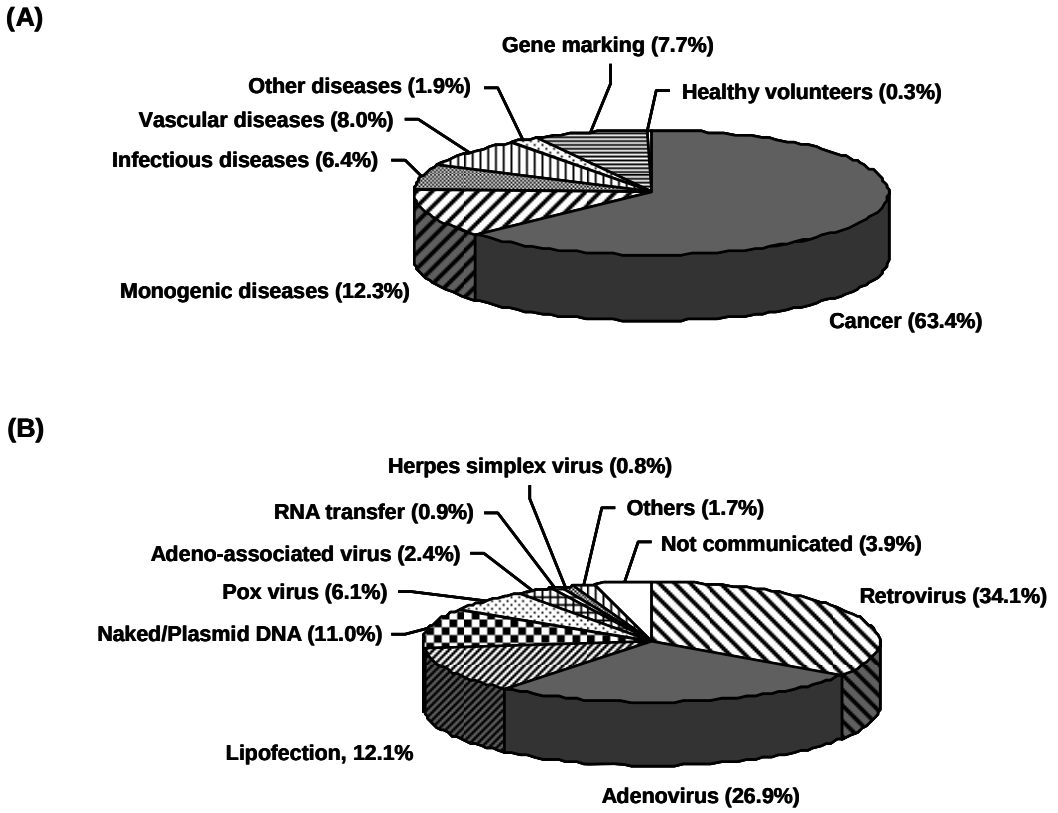

Fig. 1. The classification of object diseases (*A*) and vectors (*B*) in clinical research of gene therapy.

遺伝子治療臨床研究の発展には、疾患原因遺伝子の同定とクローン化技術の著しい進歩はもちろんのこと、遺伝子導入用ベクターの集中的な開発研究成果が大きく貢献していることは言うまでもない。遺伝子治療研究に用いられてきた遺伝子導入法は、ウイルスが元来有している細胞侵入機構

を利用して細胞への遺伝子導入を行うウイルスベクター法と、化学的（リン酸カルシウムやリポソームなどを利用）もしくは物理的（エレクトロポレーションやジーンガンなどを利用）な操作を加え細胞に遺伝子（主にプラスミドDNA）を取り込ませる非ウイルスベクター法に分けられる[7]（Fig. 1-B)。これらベクターシステムは、それぞれ一長一短を有しており[21)-24)]、現在のところ全ての疾患に対して適用可能な「万能ベクター」は存在せず、各々のベクターの特長を生かした「疾患別ベクター」の開発に焦点が絞られている。また、遺伝子導入効率の面から、現状ではレトロウイルスベクターとアデノウイルスベクターを中心としたウイルスベクターの使用が、遺伝子治療臨床研究においては主流である[7]。その中でも特にアデノウイルスベクター（Ad）は、①現存する遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝子導入効率に優れる、②種を問わず非分裂細胞を含めた多くの種類の細胞に遺伝子導入可能である、③比較的大きな外来遺伝子（最大約 8.1 kb）を挿入できる、④高力価のベクターの調製が容易である、⑤物理化学的に安定であり遠心操作により濃縮が可能である、⑥*in vivo*の組織への直接の遺伝子導入にも適している、⑦外来遺伝子が染色体へ組み込まれる頻度は極めて低いため遺伝子毒性を引き起こす可能性がほとんどない、などの特徴を有しており[25)-28)]、癌を中心としてこれまでに提出された全遺伝子治療臨床研究プロトコールの 26.9%で用いられている[7]（Fig. 1-B)。しかしながら、悪性度が高く既存の治療法では極めて予後の悪いメラノーマやグリオーマといった遺伝子治療の重要な対象となる一部の腫瘍においては、遺伝子導入効率に優れるAdを用いてさえ十分な遺伝子導入は困難であることが知られており、これらに対する有効な遺伝子治療を確立するためには新規ベクターシステムの開発ならびに関連技術の向上が望まれている[29)-34)]。

そこで本研究では、まずメラノーマ細胞が Ad 介在性遺伝子導入に対して抵抗性を示す原因を探索し、得られた知見に基づいて構築した改変型 Ad のメラノーマ細胞に対する遺伝子導入効率を評価した。次に、マウスB16BL6メラノーマモデルにおいて、従来型Adおよび改変型Adを用いたサイトカイン遺伝子治療の有効性を比較検討した。さらに、本治療モデルにおける副作用の発現機序を解析すると共に、サイトカイン発現改変型Adを用いたメラノーマ遺伝子治療プロトコールの最適化に関する提案を行った。

これらの研究成果は、改変型 Ad を適用することでメラノーマを対象とした遺伝子治療の有効性改善が見込めることを示すものであり、今後の遺伝子治療の発展・実用化に向けて有用な基礎的情報を提供しうるものと考え、学位論文としてまとめた次第である。

本 論

第一章 AdRGD の構築とメラノーマ細胞における遺伝子発現解析

1953 年に小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離されたアデノウイルスは、臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎などを起こすウイルスである。また、ヒトに対して腫瘍原性を持たないことや、米国で 30 年以上もの間、約 100 万人の兵士に対しワクチンとして投与され、重篤な副作用を示さなかったという特徴を持つ[35),36)]。ヒトアデノウイルスは A から F までの sub-group に分けられ、少なくとも 51 種類の血清型（serotype）が知られている。現在、遺伝子治療に用いられているアデノウイルスベクター（Ad）は、sub-group C に属する 5 型（あるいは 2 型）ヒトアデノウイルスを基盤としており、アデノウイルスの感染機構をそのまま利用したベクターシステムである。

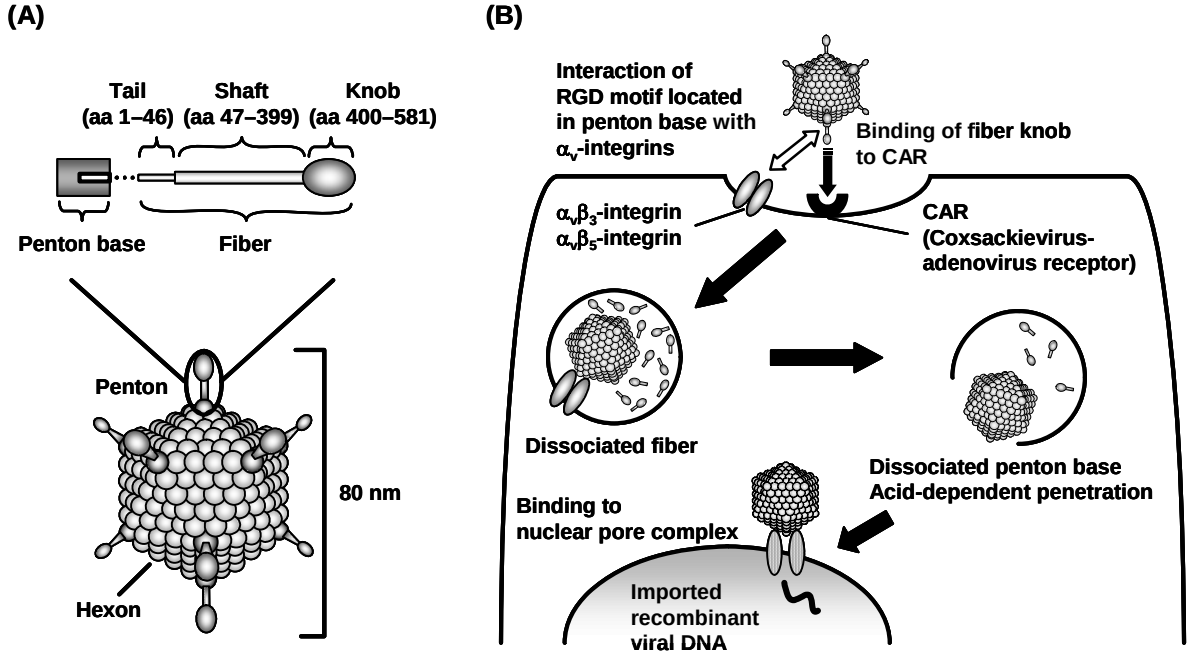

Fig. 2. Structure (*A*) and schematic gene transduction pathway (*B*) of Ad.

直径約 80 nm の Ad 粒子は、252 個のカプソメアからなる正 20 面体構造をしており、そのうち頂点にある 12 個は突起構造を持ったペントンと呼ばれ、他の 240 個はヘキソンと呼ばれる[37)]。ペントンは、ペントンベースとファイバーからなり、ファイバーはさらに、テール、シャフト、ノブに分けられる（Fig. 2-A)。Ad の標的細胞内への侵入は、ファイバーノブが Coxsackievirus-adenovirus receptor（CAR）に結合し[38)-42)]、続いてペントンベースの RGD（Arg-Gly-Asp）モチーフが細胞表面上の$\alpha_v\beta_3$-あるい

は$\alpha_v\beta_5$-integrin に結合する[43)-46)]という二段階の過程を経て、エンドサイトーシスにより起こる。エンドソームに達した Ad 粒子は、酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、$\alpha_v\beta_5$-integrin との相互作用によりエンドソームを破壊して細胞質内へと移行する[46),47)]。その後、Ad 粒子は微小管に沿った逆行性輸送により核近傍まで運ばれ[48)]、核膜孔複合体に結合し、目的遺伝子の組み込まれたゲノムを核内へと送達することにより遺伝子発現を達成する[49)-51)] (Fig. 2-B)。この機序に基づいて、Ad は種を問わず非分裂細胞を含めた広範な種類の細胞・組織に最も効率良く遺伝子導入可能であることから[25),26),52)-54)]、遺伝子治療研究のみならず基礎研究の分野においても広く用いられているベクターである。また、従来の Ad 作製法には遺伝子相同組換えを含む非常に煩雑で高度な技術が必要とされたが[55)-59)]、Mizuguchi ら[60)-62)]により画期的な Improved *in vitro* ligation method が開発されたことで作製の簡便性をも兼ね備えた Ad は、今後の生命科学研究において益々重要な位置を占めると思われる。

メラノーマ（悪性黒色腫）は、本邦では人口 10 万人に対し 0.4 人と発症率の低い悪性腫瘍であるが、欧米では 10 万人に 12.5 人と高率である[63)]。また、昨今のオゾン層の破壊亢進や余暇を野外で楽しむライフスタイルの変化により、紫外線の照射を受ける機会が増えたことに伴って、世界的にみてもその発症率は過去 60 年の間に約 15 倍に増加している[64),65)]。メラノーマの治療法としては外科療法が第一選択であるが、この適応とならない患者も多く、これらに対して化学療法や放射線療法が試みられてきた。しかし、メラノーマは、高転移性であり、治療後 5 年以上が経過する患者の約 20%で再発が認められる極めて致死性の高い癌であることから[66)-68)]、新しい概念に基づく遺伝子治療の開発に寄せられる期待は大きい。しかし、現存する遺伝子治療用ベクターの中で最も遺伝子導入効率に優れた Ad を用いてさえ、メラノーマ細胞は遺伝子導入が困難な細胞種であることが知られており[29),30)]、十分な遺伝子発現を達成するには高用量のベクター粒子の使用を余儀なくされる。

そこで本章では、まずメラノーマ細胞における Ad レセプター（CAR およびα_v-integrins）の mRNA 発現レベルを RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 解析により評価し、メラノーマ細胞の Ad 介在性遺伝子導入に対する抵抗性の原因解明を試みた。さらに、この検討結果に基づき、ファイバー領域に RGD ペプチド配列を挿入することにより標的細胞との結合にα_v-integrin 指向性を付与した RGD ファイバーミュータント Ad（AdRGD）を作製し、メラノーマ細胞に適用した際の傷害性ならびに遺伝子導入効率を従来型 Ad と比較検討した。

第一節 メラノーマ細胞における Ad レセプターの発現解析に基づいた AdRGD の構築

目的

本節では、まずメラノーマ細胞における CAR およびα_v-integrins の mRNA 発現レベルを RT-PCR 解析により評価し、メラノーマ細胞の Ad 介在性遺伝子導入に対する抵抗性の原因を探索した。また、RT-PCR 解析の結果に基づいて、α_v-integrin に親和性を持つことが知られている RGD ペプチド配列[69)-71)]をファイバー領域に挿入した AdRGD を作製した。

実験材料

【試薬】

Minimum essential medium (MEM)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、RPMI1640、Gentamicin sulfate solution、Kanamycin sulfate、Ampicillin sodium salt、Sepasol-RNA I Super および RNase-free DNase I は Nacalai tesque より、dNTP mix、Random primer (9mer)、oligo$(dT)_{20}$、ReverTra Ace、10× PCR buffer、10× RT buffer、*Taq* DNA polymerase および Competent high DH5αは TOYOBO より、PCR 用各種プライマーは SIGMA GENOSYS より、2-mercaptoethanol (2-ME) は SIGMA より、Antibiotic-antimycotic solution、MEM non-essential amino acid solution、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS) および PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1)) は Invitrogen より、各種制限酵素および T4 DNA ligase は New England Biolabs より、SuperFect Transfection Reagent は QIAGEN より、Tryptone peptone、Yeast extract および Bacto agar は Difco Laboratories より、pEGFP-N1 および pCMVβは Clontech より、それぞれ購入した。

pCATNF2[72)]、pCAL2[72)]ならびに Ad 構築に必要なベクタープラスミドおよびシャトルプラスミド[60)-62),73),74)]は水口裕之先生（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部）より、mIL-12 BIA/pBluescript II KS(-)[75)]は山元 弘先生（大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野）より供与を受けた。

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らに準じるものを使用した。尚、本研究に使用した FBS は全て、56°C、30 分間の非働化処理を行った。

【培養細胞】

B16BL6 細胞、A2058 細胞、EL4 細胞、Colon 26 細胞および HeLa 細胞は、真弓忠範先生（大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野）より供与を受けた。B16BL6 細胞の培養には、MEM (5% FBS、抗生物質を含む）を用いた。A2058 細胞の培養には、DMEM（10% FBS、抗生物質を含む）を用い

た。EL4 細胞の培養には、RPMI1640（10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む）を用いた。Colon 26 細胞の培養には、RPMI1640（10% FBS、抗生物質を含む）を用いた。HeLa 細胞の培養には、MEM（10% FBS、抗生物質を含む）を用いた。

アデノウイルス E1 遺伝子の Transfectant である HEK293 細胞は [76),77)]、水口裕之先生（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部）より供与を受け、DMEM（10% FBS、抗生物質を含む）で培養した。

A549 細胞は大日本製薬より購入し、DMEM（10% FBS、抗生物質を含む）で培養した。

Caco-2 細胞は ATCC より購入し、DMEM（10% FBS、MEM non-essential amino acid solution、抗生物質を含む）で培養した。

実験方法

【RT-PCR 解析】

Sepasol-RNA I Super を使用して、各種培養細胞から Total RNA を調製した。10 μg の Total RNA に 2 U の RNase-free DNase I を加え、全量 100 μl で 37°C、30 分間インキュベーションし、その後 PCI 処理およびエタノール沈殿を行い、10 μl の RNase-free 水に溶解した。その後、70°C で 10 分間変性させた 10 μg の Total RNA を、5 mM $MgCl_2$、1 mM dNTP mix、1 μM Random primer (9mer)、1 μM

Table 1. Primer sequences and reaction parameter used for PCR amplification on Ad-receptors.

Species	Gene		Primer sequence (5' to 3')	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle No.	Product size (bp)
Mouse	CAR	F	TGATCATTTTGTATTCTGGA	for 45 s at 94ºC	for 60 s at 50ºC	for 90 s at 72ºC	25	211
		R	TTAACAAGAACGGTCAGCAG					
	α_v-integrin	F	CCAGCCTGGGATTGTAGAAG	for 45 s at 94ºC	for 60 s at 53ºC	for 90 s at 72ºC	40	125
		R	ACTCCAGTGGGTCATCTTTG					
	β_3-integrin	F	TCTGGCTGTGAGTCCTGTGT	for 45 s at 94ºC	for 60 s at 55ºC	for 90 s at 72ºC	40	135
		R	GCCTCACTGACTGGGAACTC					
	β_5-integrin	F	TCGTGTGAAGAATGCCTGTT	for 45 s at 94ºC	for 60 s at 53ºC	for 90 s at 72ºC	40	146
		R	GCTGGACTCTCAATCTCACC					
	β-actin	F	TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG	for 45 s at 94ºC	for 45 s at 60ºC	for 120 s at 72ºC	20	514
		R	TTTGATGTCACGCACGATTTCC					
Human	CAR	F	AGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACG	for 30 s at 94ºC	for 60 s at 52ºC	for 120 s at 72ºC	20	366
		R	TACGACAGCAAAAGATGATAAGAC					
	α_v-integrin	F	GAGCAGCAAGGACTTTGGG	for 60 s at 94ºC	for 60 s at 60ºC	for 60 s at 72ºC	30	619
		R	GGGTACACTTCAAGACCAGC					
	β_3-integrin	F	GAGGATGACTGTGTCGTCAG	for 30 s at 94ºC	for 60 s at 58ºC	for 120 s at 72ºC	35	230
		R	CTGGCGCGTTCTTCCTCAAA					
	β_5-integrin	F	CAGGATGGGGAGAACCAGAGC	for 60 s at 94ºC	for 90 s at 55ºC	for 90 s at 72ºC	30	531
		R	CTGGTCATCTTTCACGATGGT					
	β-actin	F	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	for 60 s at 94ºC	for 90 s at 55ºC	for 90 s at 72ºC	20	202
		R	GGAGCAATGATCTTGATCTTC					

oligo(dT)$_{20}$ および 200 U ReverTra Ace を含む 100 μl の RT buffer に添加し、42°C で 60 分間の RT 反応により cDNA を得た。

PCR は、5 μl RT 産物、1.5 mM $MgCl_2$、0.2 mM dNTP mix、0.5 μM プライマーセットおよび 1.25 U *Taq* DNA polymerase を含む 50 μl の PCR buffer を用いて、Table 1 に示す条件で行った。

【ベクター構築】

ヒトアデノウイルスは約 36 kb の線状二本鎖 DNA をゲノムとして持ち、その遺伝子は初期遺伝子の E1・E2・E3・E4 と、後期遺伝子の L1・L2・L3・L4・L5 に大別される。初期遺伝子は主にウイルス DNA の複製に、後期遺伝子は主にカプシドなどの構造蛋白質の合成に関与する。遺伝子治療のベクターとして用いられている Ad は、70 以上にも及ぶウイルス蛋白質の合成を誘導する初期遺伝子である E1 領域（E1 領域は E1A と E1B に分けられ、E1A により全てのアデノウイルスプロモーターが活性化される）を外来遺伝子に置き換え、E1 蛋白質をトランスに供給できる HEK293 細胞 [76),77)]などのヘルパー細胞を用いて増殖させる。したがって、E1 領域を欠損した Ad は、理論上 E1 遺伝子産物を発現していない通常の細胞では増殖できず、増殖不能ウイルスとなる。また、E3 領域はウイルス増殖には必須でないため、外来遺伝子の挿入サイズの上昇を目的に除かれることが多い。アデノウイルスは野生型ゲノムサイズの 105%までのゲノムをカプシド内にパッケージングすることができるため、E1 および E3 領域を欠損することにより、最大約 8.1 kb までの外来遺伝子を挿入できるベクターが開発されている [55),61)]。

本研究に用いた非増殖性 AdRGD および従来型 Ad は、E1 および E3 領域を欠損させた 5 型ヒトアデノウイルスを基盤に、Mizuguchi ら [60)-62)]の開発した Improved *in vitro* ligation method に従って構築した。本法は、プラスミド構築等で一般的に行われている *in vitro* ligation method を用いるだけでアデノウイルスゲノムへの外来遺伝子発現カセットの組み込みを可能とし、従来の相同組換えを利用した Ad 作製方法と比較して、極めて簡便に且つ高い効率で新規 Ad を構築できる画期的な方法である。Fig. 3 に本システムの概要を示した。

ベクタープラスミドは、E1 および E3 領域を除去した 5 型ヒトアデノウイルスの全ゲノムを有しており、ゲノム両端に制限酵素 *Pac* I 部位が存在する。また、アンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）を搭載しており、E1 欠損領域には、外来遺伝子の組み込みを容易にするために、ユニークな制限酵素切断部位である I-*Ceu* I、*Swa* I、PI-*Sce* I 認識配列が挿入されている。また、ファイバーノブの HI loop 領域への RGD 配列に相当するオリゴヌクレオチドの挿入は、Mizuguchi ら [72),73)]の開発した Two-step method に準拠して行った。この遺伝子改変についても、HI loop 領域にユニークな二つの制限酵素（*Csp*45 I、*Cla* I）認識配列が挿入されていることにより、任意の合成オリゴヌクレオチドを簡便に効率良く挿

入することが可能である。シャトルプラスミドは、サイトメガロウイルスプロモーター（CMV）制御の発現カセットの中にマルチクローニングサイト（MCS）を有しており、カナマイシン耐性遺伝子（Kan^r）を搭載している。また、発現カセットの両端にはI−*Ceu* IとPI−*Sce* Iの認識配列が挿入されている。

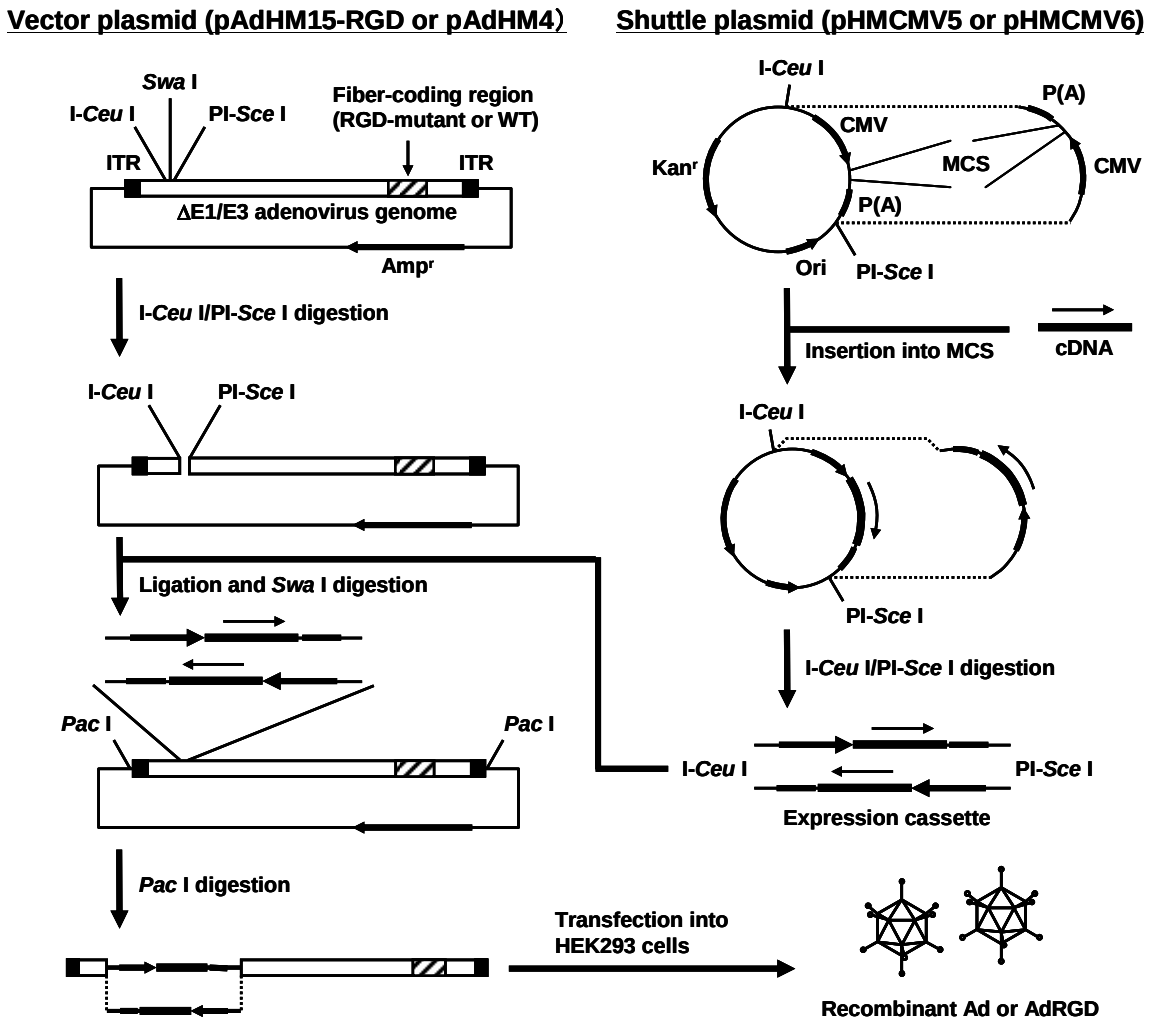

Fig. 3. Protocol of AdRGD and conventional Ad preparation by an improved *in vitro* ligation method. ITR, inverted terminal repeat; CMV, cytomegalovirus promoter; MCS, multi-cloning site; P(A), bovine growth hormone polyadenylation signal.

構築の手順は、まず目的の cDNA をシャトルプラスミドの MCS に挿入し、このプラスミドとベクタープラスミドのI−*Ceu* I/PI−*Sce* I消化産物をライゲーションすることで、ベクタープラスミドのE1欠損領域へ外来遺伝子発現カセットを挿入した。ライゲーション産物を *Swa* I 処理することで親ベクタープラスミドの出現を抑止し、さらに *Swa* I処理産物でトランスフォーメーションしたCompetent high DH5αを薬剤耐性の違いを利用して選択することで、目的とする組換えベクタープラスミドを得た。この組換えベクタープラスミドを制限酵素 *Pac* I で切り出すことにより直鎖状二本鎖 DNA とし、SuperFect

Transfection Reagent を用いてHEK293細胞へトランスフェクションした。E1領域欠損アデノウイルスゲノムは、通常の真核細胞内では転写および複製を起こさず、アデノウイルス粒子を形成することはないが、HEK293細胞はアデノウイルスE1遺伝子を導入したヘルパー細胞であるため[76),77)]、E1蛋白質をトランスに供給することによりE1欠損アデノウイルスゲノムの複製および転写を促進し、ベクター粒子が形成される。

作製した従来型AdおよびAdRGDはHEK293細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した。また、Ad粒子数の測定はMaizelら[78)]の方法に従った。

結果および考察

マウスB16BL6メラノーマ細胞およびヒトA2058メラノーマ細胞におけるAdレセプターのmRNA発現レベルを、RT-PCR解析により確認した（Fig. 4)。

B16BL6細胞においては、EL4細胞およびColon 26細胞と比較して、従来型Adの最初の標的分子であるCARのmRNA発現は明らかに低レベルを示した。一方、α_v-、β_3-およびβ_5-integrinのmRNAについてはB16BL6細胞においても十分な発現が確認され、その細胞表面にヘテロダイマーである$\alpha_v\beta_3$-および$\alpha_v\beta_5$-integrinの存在が示唆された。同様に、A2058細胞においてもCAR mRNAの発現は他の4種のヒト由来細胞株と比較して極めて低く、一方で$\alpha_v\beta_3$-および$\alpha_v\beta_5$-integrinは豊富に発現していることが示された。

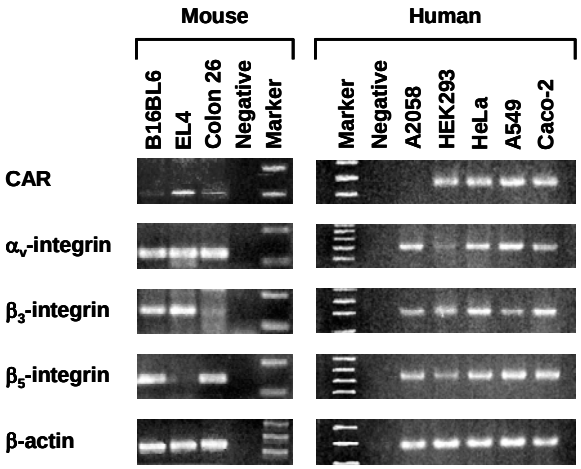

Fig. 4. RT-PCR analysis of CAR, α_v-integrin, β_3-integrin, and β_5-integrin in murine and human cell lines. Total RNA was prepared from three murine cell lines and five human cell lines, and then RT-PCR was performed as described in Table 1. To ensure the quality of the procedure, RT-PCR was performed on the same samples using specific primers for β-actin.

本結果から、メラノーマ細胞のAd介在性遺伝子導入に対する抵抗性は、CARの低発現に基づくものであり、Adの最初の標的指向性にα_v-integrinを付与することにより、メラノーマ細胞への遺伝子導入効率が大幅に改善されるであろうことが示唆された。

そこで、α_v-integrin に親和性を持つことが知られている RGD ペプチド配列をファイバー領域に挿入した AdRGD を構築した。本研究では、ヒト由来 Tumor necrosis factor α（TNF-α）遺伝子、マウス由来 Interleukin 12（IL-12）遺伝子、オワンクラゲ由来 Enhanced green fluorescent protein（EGFP）遺伝子、大腸菌由来β-galactosidase（LacZ）遺伝子、ホタル由来 Luciferase（Luc）遺伝子の 5 種類の遺伝子発現カセットをそれぞれ搭載した従来型 Ad ならびに AdRGD を作製した（Fig. 5）。

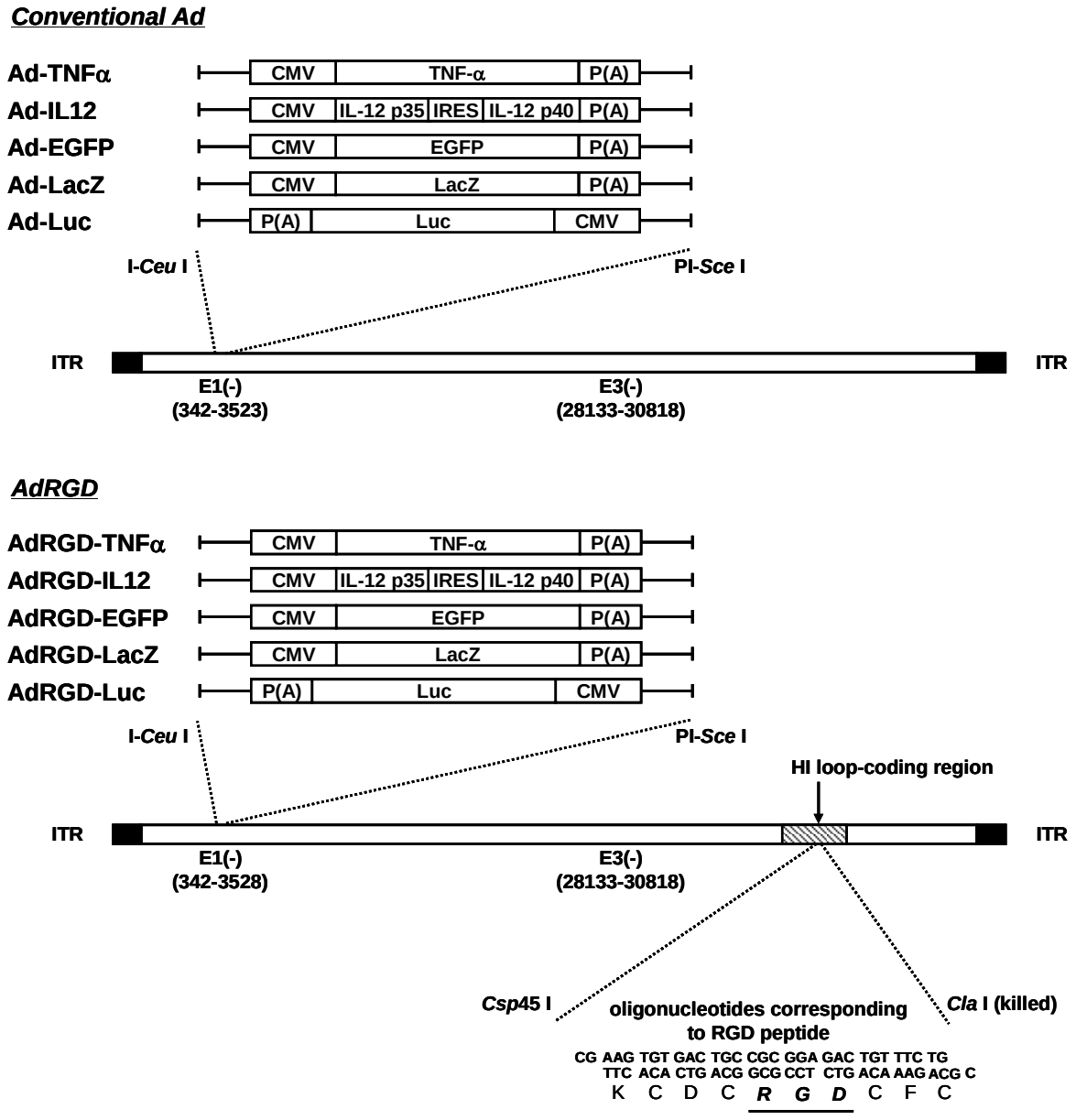

Fig. 5. Schematic representation of conventional Ad and AdRGD used in this study.

第二節 AdRGD によるメラノーマ細胞への遺伝子導入効率と遺伝子導入機序

目的

本節では、AdRGD あるいは従来型 Ad を用いた遺伝子導入がメラノーマ細胞の生存率に及ぼす影響を比較検討した。また、AdRGD-EGFP および Ad-EGFP のメラノーマ細胞に対する遺伝子導入効率ならびに発現強度を種々の感染ベクター量で比較した。さらに、抗α_v-integrin 抗体を用いた結合阻害実験の結果に基づき、AdRGD の遺伝子導入機序について考察した。

実験材料

【試薬】

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は Dojindo より、ウシ血清アルブミンは SIGMA より、Cy3 reactive dye は Amersham Pharmacia Biotech より、Anti-mouse α_v-integrin monoclonal antibody (H9.2B8; Armenian Hamster IgG3, λ) および Hamster IgG3 isotype control (A19-4) は Pharmingen より、それぞれ購入した。

その他の試薬は前節の実験材料に準じた。

【培養細胞】

前節の実験材料に準じた。

実験方法

【細胞生存率の評価 (MTT 法)】

B16BL6 細胞あるいは A2058 細胞を、それぞれ 5×10^3 cells/well あるいは 1×10^4 cells/well で 96 穴培養プレートに播種し、一晩培養した。上清を除去した後、FBS-free の DMEM で懸濁した Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を、種々の Vector particles (VP)/cell/50 μl で添加した。37°C で 2 時間インキュベーションした後、ベクター懸濁液を除去し、新たな培養液を 100 μl/well で添加した。培養 2 日後、これらメラノーマ細胞の生存率を Mosmann[79] の方法を若干改変した MTT 法により測定した。

PBS (Phosphate-buffered saline) で 5 mg/ml に調製した MTT 溶液を 10 μl/well で添加し、37°C で 4 時間インキュベーションした後、20% Sodium dodecyl sulfate/0.01N HCl を 100 μl/well で添加し、一晩暗所に静置することで細胞内に生成された Formazan 結晶を完全に溶解した。この溶液の吸光度 (主波長: 570 nm, 副波長: 655 nm) をマイクロプレートリーダー (モデル 550; BIO-RAD) にて測

定し、以下の式に従ってメラノーマ細胞の Viability (%)を算出した。

Viability (%) = (MTT activity of infected cells) / (MTT activity of uninfected cells) × 100

【EGFP 遺伝子導入効率・発現強度の評価】

6 穴プレートに培養した B16BL6 細胞あるいは A2058 細胞の培養上清を除去し、FBS-free の DMEM で懸濁した Ad-EGFP あるいは AdRGD-EGFP を 100、1,000 あるいは 10,000 VP/cell/500 μl で添加した。37°C で 2 時間インキュベーションした後、ベクター懸濁液を除去し、細胞を PBS で 2 回洗浄した。その後、新たな培養液を 1 ml/well で添加し、培養 2 日後における EGFP 遺伝子導入効率ならびに発現強度を FACSCalibur flow cytometer と CellQuest software (Becton Dickinson) を用いた Flow cytometry により解析した。

【結合阻害実験】

B16BL6 細胞を Staining buffer (0.1% ウシ血清アルブミンおよび 0.01% NaN_3を含む PBS) で 1×10^6 cells/50 μl に懸濁し、25 μg の Anti-mouse α_v-integrin monoclonal antibody または Hamster IgG3 isotype control を添加した。30 分間インキュベーションした後、Leopold らの方法 [80] に従って Cy3 ラベル化した Ad-LacZ または AdRGD-LacZ を、1×10^5 VP/cell で 200 μl の Staining buffer に懸濁して添加した。さらに 30 分間インキュベーションした後、細胞を Staining buffer で 3 回洗浄し、Flow cytometry 解析により細胞表面への Cy3 ラベル化ベクターの結合を評価した。

尚、Ad は 4°C において細胞表面に結合するが、細胞内への侵入は起こらないことが報告されているため [80]、本操作はすべて氷冷した試薬を用いて氷上で行った。また、蛍光分光光度計を用いて、Cy3 でラベル化した Ad-LacZ と AdRGD-LacZ のベクター粒子あたりの蛍光強度が等しいことを確認した。

結果および考察

Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を用いた遺伝子導入の B16BL6 細胞および A2058 細胞に対する傷害性を MTT 法で検討した (Fig. 6)。

Ad-Luc および AdRGD-Luc ともに、20,000 VP/cell という高用量を感染させた場合においても、メラノーマ細胞への傷害性は全く観察されなかった。したがって、Ad のファイバーHI loop 領域への RGD ペプチド挿入は、遺伝子導入過程ならびに遺伝子導入後における標的細胞の生存率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。そこで、以降の AdRGD および従来型 Ad を用いた *in vitro* 遺伝子導入実験は、細胞傷害性の認められなかった 20,000 VP/cell 以下の感染ベクター量で行うのが妥当であると判断した。

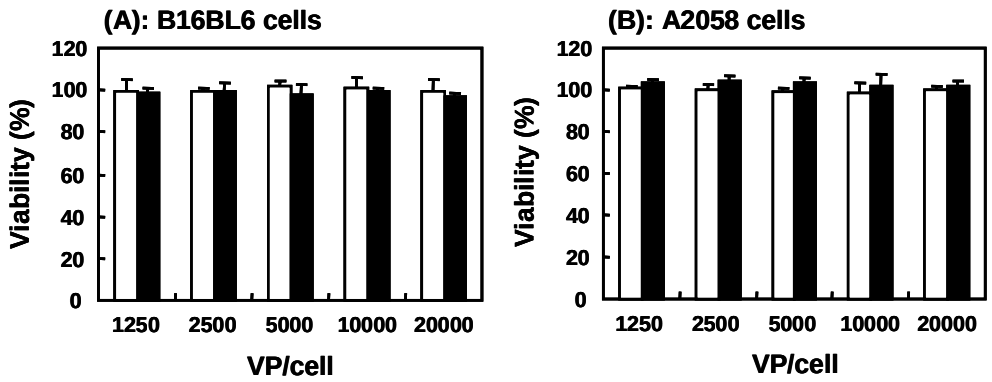

Fig. 6. Cytopathic effect of AdRGD and conventional Ad on gene transduction into melanoma cells. B16BL6 cells (***A***) or A2058 cells (***B***) were infected with Ad-Luc (open column) or AdRGD-Luc (closed column) at indicated VP/cell for 2 h. Two days later, cell viability was evaluated by MTT assay. All data are represented as means ± SD of 5 independent cultures.

Ad-EGFP および AdRGD-EGFP のメラノーマ細胞に対する遺伝子導入効率および発現強度を Flow cytometry で解析したところ、両ベクターともに、EGFP 陽性細胞率（% of M1-gated）ならびに EGFP 発現強度（MFI; mean fluorescence intensity）を感染ベクター量依存的に増加させたが、同用量で比較すると総じて AdRGD-EGFP 適用群で高値を示した（Fig. 7, Table 2）。

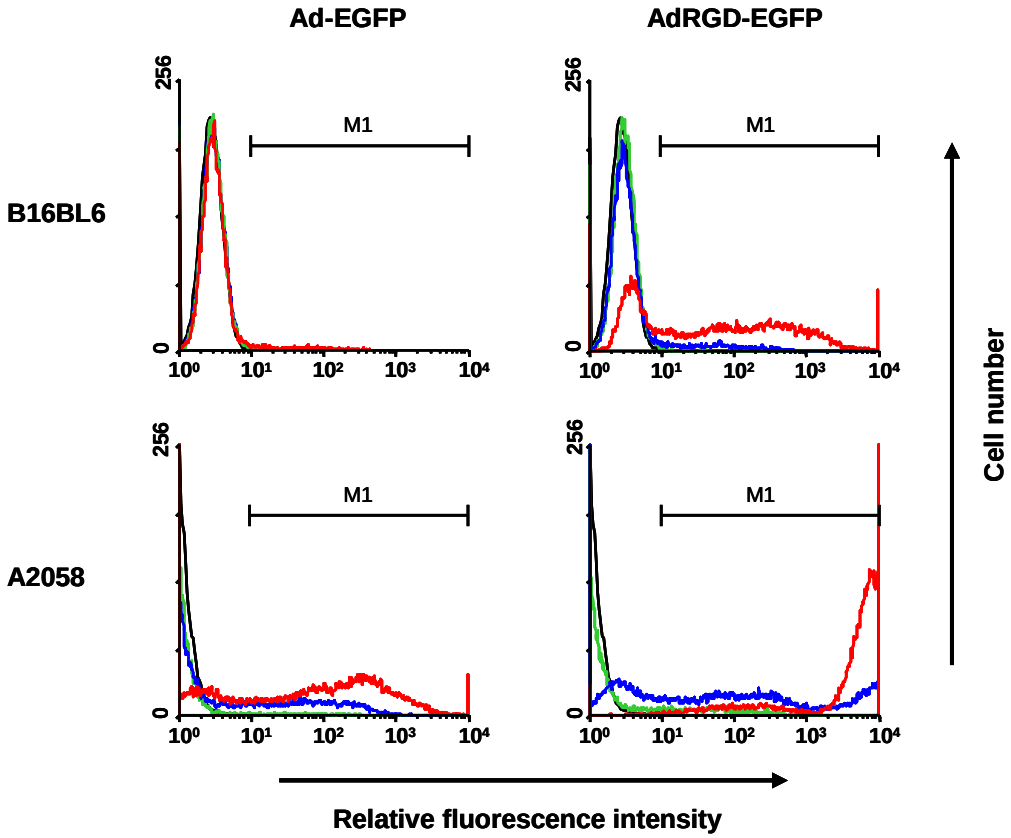

Fig. 7. The transduction efficiency and the expression efficacy of EGFP genes on melanoma cells by AdRGD or conventional Ad. B16BL6 cells or A2058 cells were infected with Ad-EGFP or AdRGD-EGFP at 100 (green lines), 1,000 (blue lines), or 10,000 (red lines) VP/cell for 2 h. Two days later, EGFP expression in cells was evaluated by flow cytometry. Black lines represent untransfected cells.

Table 2. Summary of flow cytometric analysis of melanoma cells infected with Ad-EGFP or AdRGD-EGFP.

Vector (VP/cell)		% of M1-gated		MFI	
		B16BL6	A2058	B16BL6	A2058
—		0.04	0.04	25.55	19.52
Ad-EGFP	100	0.32	3.87	16.73	67.20
	1,000	0.85	28.19	49.68	86.44
	10,000	6.51	72.95	60.90	234.96
AdRGD-EGFP	100	1.28	12.54	45.85	81.97
	1,000	10.97	70.49	62.77	499.57
	10,000	65.00	98.78	189.64	3401.91

B16BL6 細胞においては、Ad-EGFP を 10,000 VP/cell で感染させた場合の EGFP 陽性細胞率は、わずか 6.51%にすぎなかったのに対して、等用量の AdRGD-EGFP を用いた場合には、約 10 倍の 65%もの細胞に EGFP 遺伝子を導入することができた。A2058 細胞に対しては、10,000 VP/cell で感染させた場合に Ad-EGFP 適用群においても比較的高い遺伝子導入効率（約 70%）が認められたが、AdRGD-EGFP 適用群では 1/10 用量にあたる 1,000 VP/cell の感染で同等の遺伝子導入効率を示し、10,000 VP/cell の感染ではほぼ全ての細胞に遺伝子導入が可能であった。また、B16BL6 細胞および A2058 細胞ともに、AdRGD-EGFP 適用群においては、その 10 倍用量の Ad-EGFP を用いた場合に匹敵するかあるいはそれ以上の EGFP 発現強度が得られた。

次に、従来型 Ad と AdRGD のメラノーマ細胞表面への結合機序を比較するために、Cy3 ラベル化した Ad-LacZ および AdRGD-LacZ を用いて結合実験を行った（Fig. 8）。

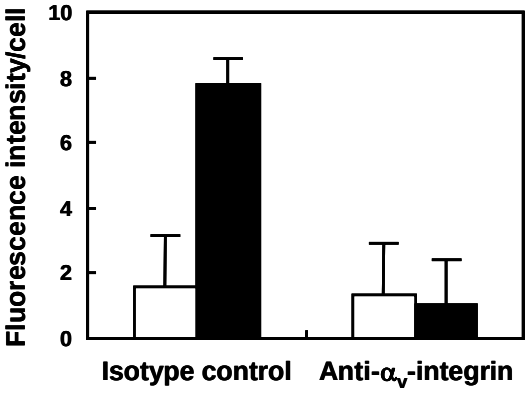

Fig. 8. Relative Ad-binding to B16BL6 cells. B16BL6 cells were incubated with anti-mouse α_v-integrin monoclonal antibody or hamster IgG isotype control for 30 min on ice. Then, the cells were resuspended in staining buffer containing Cy3-labeled Ad-LacZ (open column) or AdRGD-LacZ (closed column). After incubation for 30 min on ice, cells were washed and analyzed using a flow cytometer. The relative value of Ad-binding against B16BL6 cells was determined using the following formula: fluorescence intensity/cell = (MFI of tested sample) – (MFI of B16BL6 cells' self). Data are presented as means ± SD of 4 experiments.

コントロール抗体の存在下においては、AdRGD-LacZ は Ad-LacZ と比較して 5 倍以上高い B16BL6 細胞表面への結合能を示した。一方、抗α_v-integrin 抗体を共存させることで、AdRGD-LacZ の B16BL6 細胞表面への結合は Ad-LacZ と同程度にまで低下したことから、AdRGD がα_v-integrin 指向性を有することが実証された。

以上の結果から、AdRGD はα_v-integrin を介して CAR 低発現のメラノーマ細胞に結合することにより、従来型 Ad と比較して極めて効率良くメラノーマ細胞への遺伝子導入・発現を達成できるベクターであることが判明した。

第三節 小括

Ad は現存する遺伝子治療用ベクターの中で最も遺伝子導入効率に優れたベクターとされており[25)-28)]、遺伝子治療臨床研究においてはレトロウイルスベクターに次いで多く使用されている[7)]。また、高力価のベクター調製が容易であることから、*in vivo* 直接投与も視野に入れた種々の疾患に対する遺伝子治療への適用が期待されている[53)]。しかしながら、遺伝子治療の重要な対象とされるメラノーマは、Ad を用いてさえ遺伝子導入の困難な癌であることが知られており[28),29)]、有効な遺伝子治療を確立するためには十分な遺伝子発現が得られる新規ベクターシステムの開発が不可欠である。Ad による遺伝子導入機序は比較的良く解明されており[37)-50)]、その遺伝子導入効率が標的細胞上の感染受容体（CAR）発現レベルに大きく影響されることは容易に予想できる。そこで、メラノーマ細胞における CAR およびα_v-integrins の mRNA 発現レベルを RT-PCR 解析により評価したところ、メラノーマ細胞では CAR mRNA の発現が極めて乏しく、$\alpha_v\beta_3$-および$\alpha_v\beta_5$-integrin については十分な mRNA 発現レベルが確認された。本研究ではマウス CAR あるいはヒト CAR に対する特異抗体を用いた検討は行っていないものの、CAR mRNA 発現レベルと細胞表面上の CAR 蛋白発現量は極めて高い相関関係を示すことが報告されている[81),82)]。したがって、メラノーマ細胞の Ad 介在性遺伝子導入に対する抵抗性は、Ad との最初の結合に必要な CAR の発現がその細胞表面上に極めて乏しいことに起因しており、Ad の標的指向性にα_v-integrin を付与することができれば、メラノーマ細胞への遺伝子導入効率を大幅に増強できる可能性が示唆された。

近年、bispecific 抗体等のアダプター分子[83)-86)]やカチオニックリポソーム[87)-90)]を併用することにより Ad の tropism を拡大あるいは改変しようという試みがなされているが、これらのアプローチは修飾分子と Ad との結合が *in vivo* では不安定なために遺伝子治療での使用が制限される。一方、特定の分子に親和性を有するペプチド配列をファイバー領域に挿入することで Ad の tropism を改変しうることが報告され[29)-33),91)-97)]、Curiel らは、ファイバーノブの HI loop がアデノウイルス粒子から外側に突き出た構造をしており、この部位への外来ペプチド挿入はウイルス増殖に全く影響しないことから、Ad の tropism を改変するための外来ペプチド表現部位として HI loop が最適であることを示した[92),93)]。また、従来の Ad 構築法では目的遺伝子の搭載やファイバー領域の遺伝子改変に相同組換えを利用して

いたため効率が非常に低く、作製に煩雑な作業を必要とすることが Ad の欠点の一つとされてきたが、最近 Mizuguchi らにより、Ad への目的遺伝子の組み込みと、ファイバー（HI loop）遺伝子領域への任意のペプチド配列に相当する合成オリゴヌクレオチドの挿入が、プラスミド構築等で一般的に行われている *in vitro* ligation method を用いるだけで簡便に且つ短期間で行うことができる“ファイバーミュータント Ad システム”が開発され [60)-62),72),73)]、これらの問題点は一挙に解消された。そこで、本システムをメラノーマ細胞への遺伝子導入に応用することで、簡便性および汎用性に優れたメラノーマ遺伝子治療用ベクターの開発に繋がるのではないかという着想に至った。

RGD ペプチド配列は、α_v-integrin が認識する最小活性単位であることが知られている [68)-70)]。そこで、メラノーマ細胞に豊富に発現するα_v-integrin への指向性を付与する目的で、ファイバーノブの HI loop に RGD ペプチドを挿入した AdRGD を作製した。レポーター遺伝子を用いた遺伝子導入実験の結果、AdRGD は細胞傷害性を伴わないベクター用量で、従来型 Ad と比較して極めて効率良くメラノーマ細胞へ目的遺伝子を導入することが可能であった。また、抗α_v-integrin 抗体を用いた結合阻害実験により、AdRGD が当初の目的どおりα_v-integrin 指向性を有していることも判明し、AdRGD によるメラノーマ細胞への遺伝子導入効率ならびに発現強度の増強が、α_v-integrin を介したベクター粒子の効率の良い細胞表面への結合と、それに続く多くのベクター粒子の細胞内への侵入という機序に基づくことが強く示唆された（Fig. 9）。

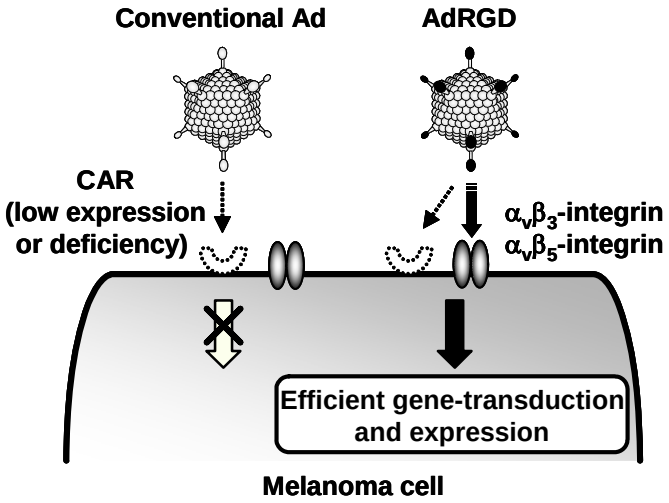

Fig. 9. Schematic infection pathway of AdRGD to melanoma cells.

本章の結果を総合すると、α_v-integrin 指向性を付与した AdRGD は、従来型 Ad では十分な遺伝子導入が困難とされてきた CAR 低発現メラノーマ細胞に対しても極めて効率の良い遺伝子導入を達成し、効果的なメラノーマ遺伝子治療法の開発において高い有用性が期待されるベクターシステムであることが示された。

第二章　メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療における AdRGD の有用性評価

サイトカインは免疫担当細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など様々な細胞より産生・分泌され、免疫応答、造血、炎症反応、組織修復など、恒常性の維持や生体防御に関わる多くの生命現象を制御していることは周知のとおりである。したがって、生体機能制御に関与する分子そのものを病態改善に応用するサイトカイン療法は非常に魅力的な治療法であり、遺伝子工学技術によってサイトカインの大量生産が可能となったことに伴って、多くの疾患に対して臨床応用が図られている。しかし、その臨床応用にあたっては、個々のサイトカインについての情報を十分に理解するだけでなく、様々な生体反応が常に複雑なサイトカインネットワークの中で制御されているという視点を忘れてはならない。サイトカインの多くは糖蛋白質であり、特異的な受容体に結合することによりその機能を発揮する。この生物活性の特徴として、一つのサイトカインが多種類の標的細胞に働き、異なった機能発現を促すこと（pleiotropy: 多様性)、刺激を受ける側の細胞においても、一つの細胞がいくつかのサイトカイン受容体を有しており、異なったサイトカインが同じ機能を示すこと（redundancy: 重複性）が知られている。また、サイトカインは情報伝達を担うという本来的な性質上、長期間にわたる作用発現の持続は好ましくなく、一般的に生体内における安定性は乏しい。すなわち、サイトカイン療法で有効な治療を達成するためには、サイトカイン機能の多様性から治療に必要とされる作用のみを引き出す工夫が必要とされ、重篤な副作用の発現が予想される大量頻回投与を回避するための製剤設計や投与経路の探索が不可欠とされる。

癌治療においても様々なサイトカイン療法が精力的に研究されており、適用されるサイトカインの代表格に TNF-αと IL-12 が挙げられる。TNF-αは、マウスに移植した腫瘍に出血壊死を誘導する生理活性物質として、1975 年に Old らにより報告され [98]、現在では、炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広く関わるサイトカインであることが明らかとされている [99)-102)]。TNF-αの抗腫瘍作用は、(1) 直接的な腫瘍細胞傷害、(2) 抗腫瘍エフェクター免疫細胞の賦活化、(3) 腫瘍血管の特異的崩壊、に基づくと考えられており [102)-104)]、腫瘍を特異的に傷害するサイトカインとして臨床応用が期待されたが、他のサイトカインと同様に体内安定性が極めて乏しい（血中半減期が数十分から数時間 [105)-107)]）ために大量頻回投与を余儀なくされ、発熱、悪寒、悪心、頻脈、嘔吐、血圧低下、頭痛、消化管障害、エンドトキシン様ショックなどの重篤な副作用発現が、有効な治療の達成を妨げている [105)-109)]。一方、IL-12 は、分子量 40 kD (p40) と 35 kD (p35) の互いに相同性のないサブユニットが一個のジスルフィド結合により結ばれた分子量約 70 kD (p70) のヘテロ二量体であり [110),111)]、末梢血リンパ球に対する Interferon-γ (IFN-γ) 産生誘導因子として発見された [112)]。近年、強力な腫瘍免疫を誘導する

サイトカインとして注目を集めており、その機序はナチュラルキラー（NK）細胞および細胞傷害性 T 細胞（CTL）の細胞傷害活性の増強ならびに増殖促進 [113),114)]、IFN-γの産生誘導 [114)-116)]、ヘルパー T 細胞タイプ 0（Th0）から Th1 細胞への分化促進 [114),117)]、による細胞性免疫系の活性化に基づくことが知られている。IL-12 も TNF-αと同様に、全身投与により副作用を発現することが報告されており [118)]、治療における用量、投与経路、投与スケジュールの設定が困難を極める。したがって、これらのサイトカインを用いた癌治療においては、サイトカイン遺伝子を搭載したベクターを腫瘍内投与することにより、腫瘍局所で持続的なサイトカイン発現を可能とする試み、すなわち *in vivo* サイトカイン遺伝子治療が、全身性の副作用発現を抑制しつつ強力な抗腫瘍効果を誘導するための有望なアプローチとして期待される。

Ad は高力価のベクター調製が容易であることから、*ex vivo* 遺伝子治療のみならず *in vivo* 遺伝子治療に適用するベクターとしても非常に魅力的である [53)]。しかし前章で示したとおり、Ad の遺伝子導入効率は標的細胞における CAR 発現レベルに依存するため、CAR 低発現のメラノーマに対してこれまでに試みられてきた *in vivo* 遺伝子治療臨床研究においては [18),19),119)-122)]、Ad を含めた既存のベクターシステムによるメラノーマへの低い遺伝子導入効率が、期待された治療効果の発揮を妨げた最大の障壁であったと言っても過言ではない。そこで本章では、メラノーマ細胞への遺伝子導入における AdRGD の優位性が、マウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるサイトカイン遺伝子治療の有効性向上に反映されるかについて検討した。

第一節 サイトカイン発現ベクターを適用したメラノーマにおけるサイトカイン産生量

目的

本節では、メラノーマへのサイトカイン遺伝子導入における AdRGD の有用性を評価するために、まず従来型 Ad あるいは AdRGD を用いてサイトカイン（TNF-αあるいは IL-12）遺伝子を導入したメラノーマ細胞におけるサイトカイン分泌量を比較した。また、分泌されたサイトカインによるメラノーマ細胞への直接的な傷害性を検討した。さらに、マウスにあらかじめ生着させた B16BL6 腫瘍内に各サイトカイン発現ベクターを投与した際の、腫瘍内サイトカイン産生量を比較した。

実験材料

【試薬】

Human TNF-α ELISA Kit および Mouse IL-12 p70 ELISA Kit は Biosource International より、

Aprotinin および Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) は Nacalai tesque より、それぞれ購入した。

その他の試薬は前章の実験材料に準じた。

【培養細胞】

前章の実験材料に準じた。

【動物】

C57BL/6 マウス (6 週齢、メス) は SLC より購入した。

実験方法

【メラノーマ細胞からのサイトカイン分泌量の測定】

培養した B16BL6 細胞あるいは A2058 細胞に FBS-free の DMEM で懸濁した Ad-TNFα、AdRGD-TNFα、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を種々の VP/cell で添加し、37°C で 2 時間インキュベーションした。その後、ベクター懸濁液を除去し、細胞を PBS で 2 回洗浄した後、新たな培養液を添加した。2 日後、回収した培養上清中の TNF-αあるいは IL-12 濃度を ELISA により定量し、10^5 細胞あたりのサイトカイン分泌量を算出した。

【分泌されたサイトカインのメラノーマ細胞に対する傷害性評価】

第一章　第二節の実験方法【細胞生存率の評価 (MTT 法)】に準じて、Ad-TNFα、AdRGD-TNFα、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 により遺伝子導入したメラノーマ細胞の 48 時間後における生存率を評価した。

【メラノーマ腫瘍におけるサイトカイン産生量の測定】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5～7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した Ad-TNFα、AdRGD-TNFα、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を 10^8 あるいは 10^9 VP/50 μl で腫瘍内に投与した。2 日後、摘出した腫瘍の重量を測定し、Aprotinin (10 μg/ml) と PMSF (100 μM) を含む PBS を用いて 20%ホモジネートを調製した。ホモジネートは 15,000 rpm で 30 分間遠心分離することで不溶画分を除去した後、上清中の各サイトカイン濃度を ELISA により定量し、腫瘍あたりのサイトカイン産生量を算出した。

結果および考察

Ad-TNFα、AdRGD-TNFα、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を用いてメラノーマ細胞への遺伝子導入を行い、48 時間の培養中に分泌された各サイトカイン量を比較した (Fig. 10)。

いずれのベクターを用いた場合においても、B16BL6 細胞および A2058 細胞における目的サイト

カインの分泌量は、感染ベクター用量に依存して上昇した。また、従来型 Ad の適用と比較して、AdRGD の適用はメラノーマ細胞からの極めて高いサイトカイン分泌を可能とし、TNF-α発現ベクターの場合は B16BL6 細胞において 75～125 倍、A2058 細胞において 6～19 倍、IL-12 発現ベクターの場合は B16BL6 細胞で 70～90 倍、A2058 細胞で 6～32 倍の差が認められた。したがって、第一章第二節の EGFP 遺伝子導入実験の結果と同様に、メラノーマ細胞におけるサイトカイン遺伝子の導入効率と発現レベルにおいても、AdRGD は非常に優れたベクターであることが明らかとなった。

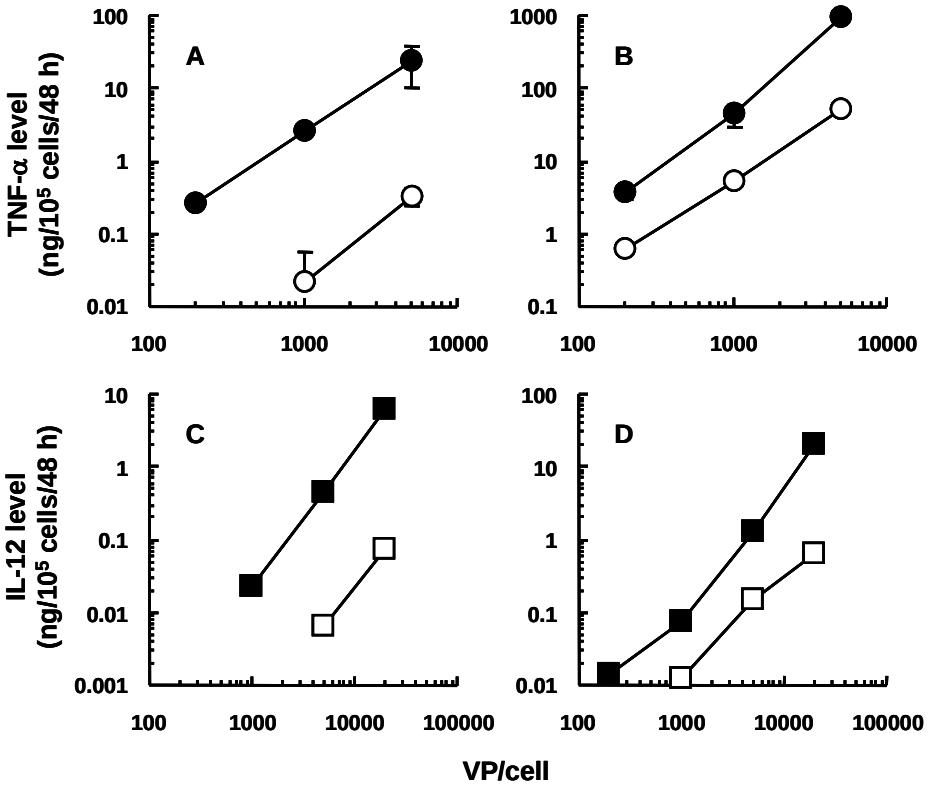

Fig. 10. The transduction efficacy of TNF-α gene or IL-12 gene in melanoma cells by AdRGD or conventional Ad. B16BL6 cells (***A***, ***C***) or A2058 cells (***B***, ***D***) were infected with Ad-TNFα (○), AdRGD-TNFα (●), Ad-IL12 (□), or AdRGD-IL12 (■) at indicated VP/cell for 2 hr. Two days later, the level of TNF-α or IL-12 secreted into culture medium was measured by ELISA. Each point represents the mean ± SD of 3 independent cultures.

次に、培養上清中に分泌された TNF-αあるいは IL-12 のメラノーマ細胞に対する傷害性を検討するために、各サイトカイン発現ベクターにより遺伝子導入した B16BL6 細胞の生存率を MTT 法で評価した (Fig. 11)。

各ベクターを 20,000 VP/cell という高用量で感染させた場合においても、B16BL6 細胞の生存率には全く影響が認められず、従来型 Ad あるいは AdRGD を用いた遺伝子導入に基づいて分泌された TNF-αならびに IL-12 は B16BL6 細胞を直接的に傷害しないことが明らかとなった。

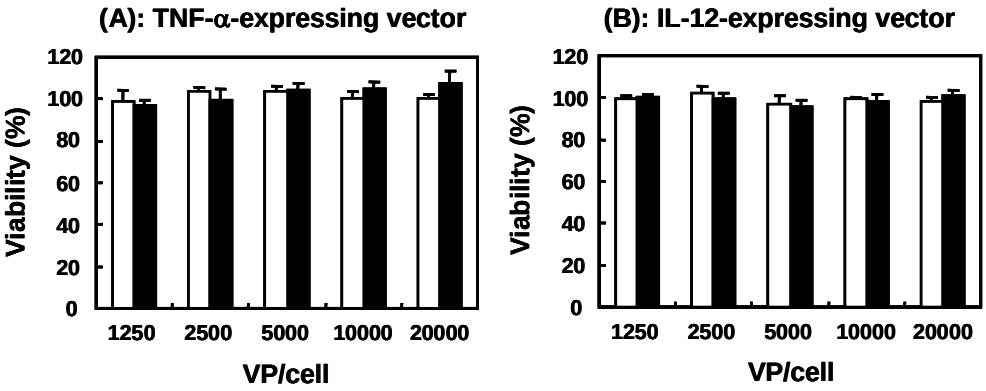

Fig. 11. Viability of B16BL6 cells infected by TNF-α- or IL-12-expressing AdRGD or conventional Ad. B16BL6 cells were infected with Ad-TNFα (***A***; open column), AdRGD-TNFα (***A***; closed column), Ad-IL12 (***B***; open column), or AdRGD-IL12 (***B***; closed column) at indicated VP/cell for 2 h. Two days later, cell viability was evaluated by MTT assay. All data are represented as means ± SD of 5 independent cultures.

さらに、C57BL/6 マウスにあらかじめ接種した B16BL6 腫瘍に各サイトカイン発現ベクターを投与し、AdRGD と従来型 Ad による *in vivo* サイトカイン遺伝子発現レベルを比較した（Fig. 12）。

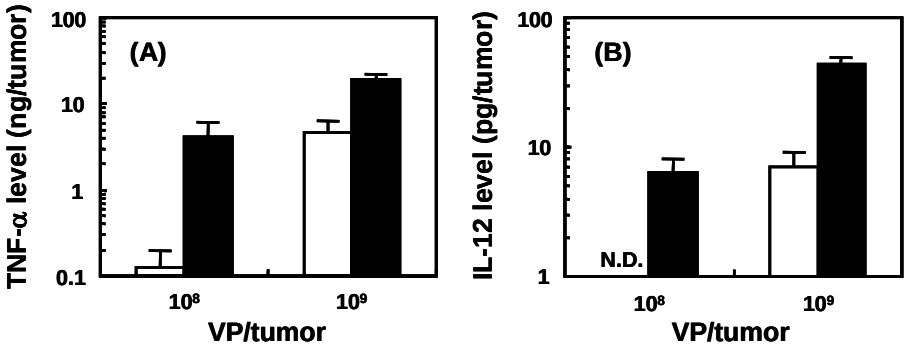

Fig. 12. The transduction efficacy of TNF-α gene (*A*) or IL-12 gene (*B*) in B16BL6 tumors by AdRGD or conventional Ad. Established B16BL6 tumors in C57BL/6 mice were injected with Ad-TNFα (***A***; open column), AdRGD-TNFα (***A***; closed column), Ad-IL12 (***B***; open column), or AdRGD-IL12 (***B***; closed column) at indicated VP/tumor. Two days later, tumors were removed and homogenized in PBS containing 10 μg/ml aprotinin and 100 μM PMSF. The homogenates were centrifuged and the TNF-α or IL-12 level in the supernatants was determined by ELISA. Data are presented as mean ± SD of 3 mice. N.D.: IL-12 level was not detectable.

AdRGD−TNFα投与後 2 日目に摘出した腫瘍においては、Ad−TNFα投与腫瘍と比較して、10^8 VP/tumor では約 38 倍、10^9 VP/tumor では約 5 倍高い TNF−α産生が認められた（Fig. 12−A）。同様に、AdRGD−IL12 を 10^9 VP/tumor で投与した腫瘍では、同用量の Ad−IL12 を投与した場合と比較して約 7 倍高い腫瘍内 IL−12 産生量が検出された（Fig. 12−B）。また、AdRGD−TNFαあるいは AdRGD−IL12 を 10^8 VP/tumor で投与することにより、それぞれに対応する従来型 Ad を 10^9 VP/tumor で投与した場合と同レベルの腫瘍内サイトカイン産生が認められた。AdRGD が従来型 Ad よりもベクター用量比で 10 倍効率良く遺伝子発現を達成するというこの結果は、*in vitro* 培養系にお

けるEGFP遺伝子発現解析（Fig. 7, Table 2）およびサイトカイン分泌量測定（Fig. 10）の結果と極めて高い整合性を示しており、AdRGDが*in vivo*においてもメラノーマへの遺伝子導入に優れたベクターであることが判明した。

第二節 AdRGD-TNFαあるいはAd-TNFαの腫瘍内投与による抗B16BL6腫瘍効果

目的

メラノーマはTNF-αの全身投与に対しては比較的抵抗性を示す腫瘍とされているが[123]、一方で、TNF-αを腫瘍内投与した場合には高い奏功率が得られることから、腫瘍局所における持続的なTNF-α発現を目指した *in vivo* 遺伝子治療は有望なアプローチである。そこで本節では、マウスB16BL6 メラノーマモデルを用いて、AdRGD-TNFαあるいは Ad-TNFαの腫瘍内投与による抗腫瘍効果を比較した。また、本系における抗腫瘍効果発現のメカニズムについても検討した。

実験材料

【試薬】

前節までの実験材料に準じた。

【培養細胞】

前節までの実験材料に準じた。

【動物】

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

【*in vivo* TNF-α遺伝子治療実験】

C57BL/6マウスの腹部皮内にB16BL6細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouseで接種し、腫瘍の長径が5～7 mmに達した時点で、PBSに懸濁したAd-TNFαあるいはAdRGD-TNFαを 10^8、10^9 あるいは 10^{10} VP/50 μlで腫瘍内に投与した。また、AdRGD-LacZ（コントロールベクター）を 10^{10} VP/50 μlで腫瘍内投与した群ならびに50 μlのPBSを腫瘍内投与した群も併せて作製した。経日的に体重ならびに腫瘍径を測定し、腫瘍体積を以下に示すJanikら[124]の式に従って算出した。

$$\text{Tumor volume } (\text{mm}^3) = (\text{major axis: mm}) \times (\text{minor axis: mm})^2 \times 0.5236$$

尚、腫瘍接種後90日目において腫瘍の生着が認められない個体を完全治癒とした。

【B16BL6 腫瘍の病理組織像観察】

各ベクターを投与した B16BL6 腫瘍を 2 日後または 3 日後に摘出し、10%中性緩衝ホルマリンによる組織固定処理を行った後、パラフィンブロックに包埋した。5 μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン（HE）染色した標本の病理組織学的観察および所見をアプライドメディカルリサーチに依頼した。

結果および考察

C57BL/6 マウスにあらかじめ接種した B16BL6 腫瘍内に AdRGD-TNFαあるいは Ad-TNFαを投与した際の、経日的な腫瘍体積変化を Fig. 13-A に示した。

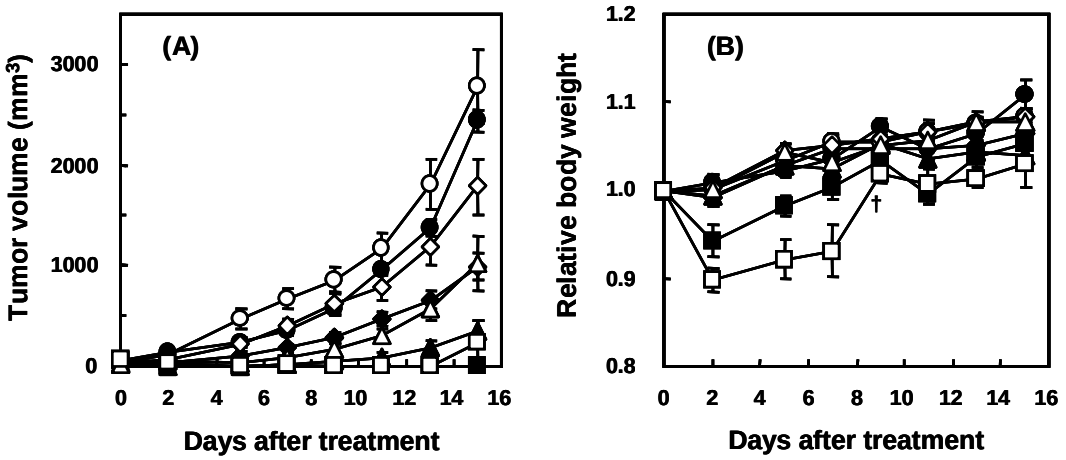

Fig. 13. Anti-B16BL6 tumor effect and body weight change upon an intratumoral administration of Ad-TNFα or AdRGD-TNFα. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with Ad-TNFα (◇; 10^8, △; 10^9, or □; 10^{10} VP/tumor), AdRGD-TNFα (◆; 10^8, ▲; 10^9, or ■; 10^{10} VP/tumor), AdRGD-LacZ (●; 10^{10} VP/tumor), or PBS (○). The tumor volume (***A***) and body weight (***B***) were determined three times a week. Each point represents the mean ± SE of 5-6 mice. †: Sudden death in 2 of 6 mice injected with10^{10} Ad-TNFα (□).

AdRGD-TNFα投与群および Ad-TNFα投与群ともに、ベクター用量に依存して腫瘍増殖抑制効果の増強が認められたが、同用量のベクター投与による抗腫瘍効果は AdRGD-TNFα投与群でより顕著であった。また、各ベクターを 10^{10} VP で腫瘍内投与した場合には、極めて強力な抗腫瘍効果が観察され、Ad-TNFα投与群では 6 例中 1 例において、AdRGD-TNFα投与群では 6 例中 2 例において腫瘍の完全退縮（完全治癒例）が確認された。一方、10^{10} VP のコントロールベクター（AdRGD-LacZ）投与群では腫瘍増殖の抑制がほとんど認められなかったことから、Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαの腫瘍内投与に伴う抗腫瘍効果は、腫瘍内で産生された TNF-αの作用に基づくものであることが確認された。さらに、腫瘍増殖曲線およびベクター投与後 15 日目の腫瘍体積を比

較すると、AdRGD-TNFαを 10^8 VP あるいは 10^9 VP で腫瘍内投与した場合の抗腫瘍効果は、Ad-TNFαをそれぞれ 10^9 VP あるいは 10^{10} VP（すなわち AdRGD-TNFαの 10 倍用量）で投与することにより得られる効果に匹敵した。この結果は、各ベクターを投与した B16BL6 腫瘍における TNF-α産生量の結果（Fig. 12-A）を完全に反映しており、AdRGD と従来型 Ad のメラノーマに対する遺伝子導入効率の差が、本系での AdRGD-TNFα適用による有効性向上に直結したと考えられた。

しかしながら、Ad-TNFα投与群および AdRGD-TNFα投与群ともに、10^{10} VP という高用量のベクターを適用したマウスにおいては、処置後数日間にわたって著しい体重減少が認められ、Ad-TNFα投与群では 6 匹中 2 匹のマウスが処置後 9 日目に突然死した（Fig. 13-B)。この結果は、有効性の向上を目的としてむやみにベクター用量を増加させることは、かえって副作用の発現および増悪を招くことを示しており、腫瘍局所での TNF-α発現に基づく抗腫瘍効果を狙った *in vivo* 遺伝子治療における慎重なベクター用量設定の重要性をうかがわせる。この点に関しては、次章において詳細な検討および考察を行うこととした。

次に、顕著な体重減少が認められなかった 10^9 VP までのベクター用量において、AdRGD-TNFα あるいは Ad-TNFαを投与した B16BL6 腫瘍の外見的変化ならびに病理組織学的変化を観察することにより、抗腫瘍メカニズムを比較検討した。Fig. 14 は、各ベクター投与後 2 日目における B16BL6 腫瘍の状態を撮影したものである。10^8 VP の AdRGD-TNFαを投与した腫瘍の表面には、一部に壊死領域が観察され（Fig. 14-E)、10^9 VP の AdRGD-TNFαを投与した場合には、明らかな壊死がほぼ腫瘍全体に認められた（Fig. 14-F)。一方、10^8 VP の Ad-TNFαを投与した腫瘍の表面（Fig. 14-C）は、PBS（Fig. 14-A）あるいは 10^{10} VP のコントロールベクター（AdRGD-LacZ; Fig. 14-B）を投与した腫瘍と同様に壊死領域は確認されず、10^9 VP を適用した場合においても、10^8 VP の AdRGD-TNFαを投与した腫瘍と同様の部分的な壊死しか認められなかった（Fig. 14-D)。

前述のとおり、TNF-αの抗腫瘍作用の一つに直接的な腫瘍細胞傷害が挙げられるが、Fig. 11 の結果が支持するように B16BL6 細胞は TNF-α感受性に乏しいことが知られており、その作用が本系での抗腫瘍効果に及ぼす影響は小さいことが推察された。そこで、これらの腫瘍の病理組織像を観察することで、腫瘍壊死機構の解明を試みた（Fig. 15)。PBS あるいは 10^{10} VP の AdRGD-LacZ を投与して 2 日後の B16BL6 腫瘍においては、周縁部に多くの血管が認められ、底部または中心部に一部壊死が認められた（Fig. 15-A,B)。この壊死は、急速な腫瘍増殖に栄養分の供給が伴わなかったことに起因しており、大きな腫瘍塊の形成に際して一般的に認められることが知られている。これらの病理組織学的所見に対して、10^9 VP の AdRGD-TNFαを投与した 2 日目の腫瘍においては、血管の

異常な拡張が認められ、生きている腫瘍組織は周辺部に僅かに存在するのみであり、出血を伴った顕著な壊死が広範囲にわたって観察された（Fig. 15-D)。さらに3日後の腫瘍においては、生きている腫瘍組織はほとんど認められず、腫瘍全体が劇的に退縮して壊死塊となっていた（Fig. 15-F)。一方、10^9 VP の Ad-TNFαを投与した腫瘍においては、2 日目に血管の拡張と出血壊死が認められたが、AdRGD-TNFαを投与した腫瘍と比較すると壊死領域は小さく、生きた腫瘍組織が大半を占めていた（Fig. 15-C)。また、処置後 3 日目の腫瘍ではわずかに壊死領域の拡大が認められたものの、依然として生きた腫瘍組織が多く残存しており、腫瘍の再増殖を強く示唆する所見であった（Fig. 15-E)。また、原因は不明であるが、AdRGD-LacZ をはじめとするベクターを投与した 2 日後の腫瘍は、PBS を投与した腫瘍と比較して全体に膨張（swelling）していることが観察された。さらに、いずれの群においても腫瘍内への免疫担当細胞の浸潤は認められなかった。以上の結果を総合すると、Ad-TNFαまたは AdRGD-TNFαの腫瘍内投与による B16BL6 腫瘍増殖抑制効果は、局所で発現した TNF-αが腫瘍血管を崩壊させることにより腫瘍細胞への栄養供給を遮断し、出血壊死を導く機序に基づくことが判明した。また、外見的および病理組織学的所見においても、メラノーマに対する *in vivo* TNF-α遺伝子治療への AdRGD の適用は、有効性の向上とベクター投与量の削減に繋がることが支持された。

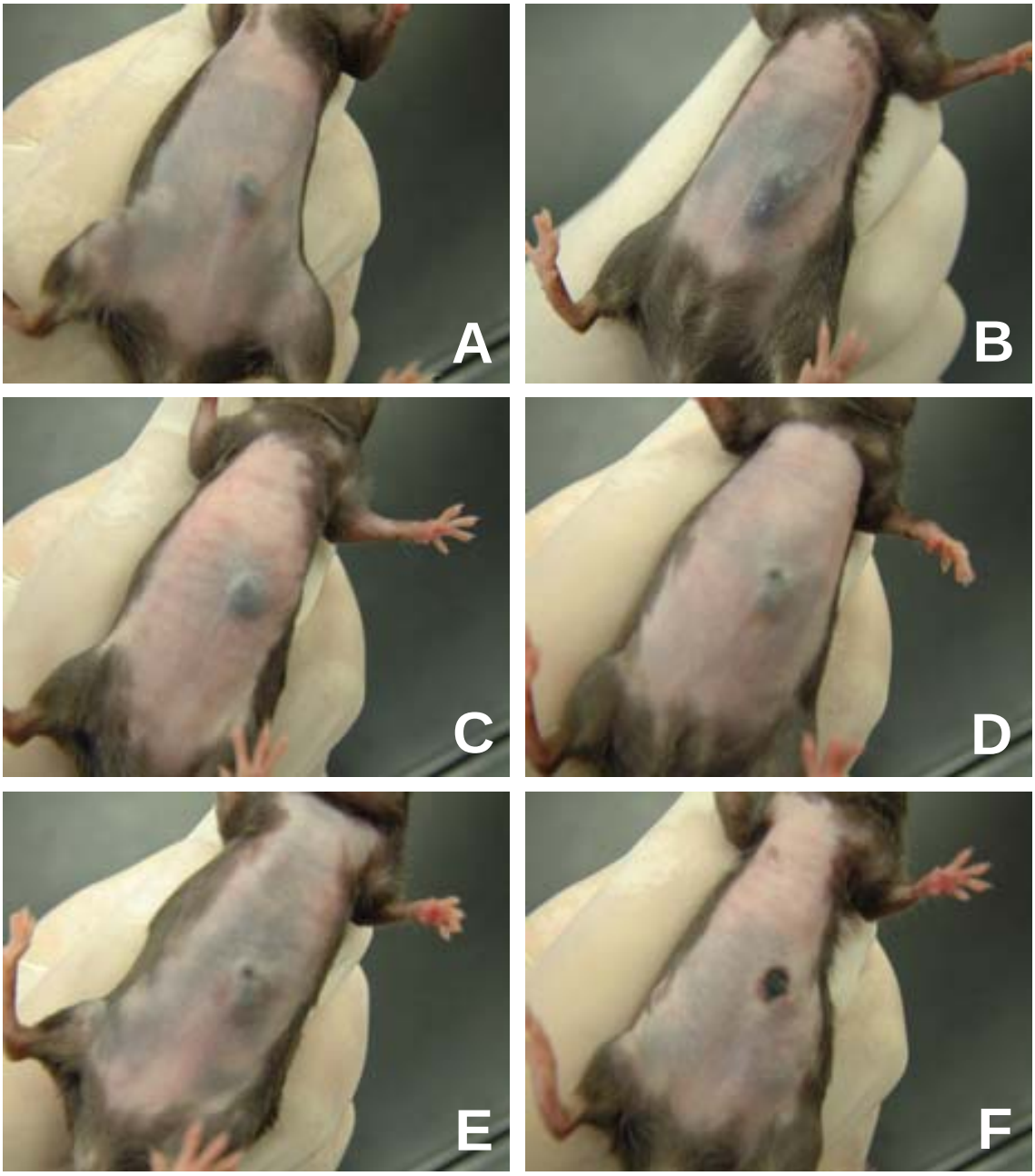

Fig. 14. Photographs of B16BL6 tumors on day 2 after an intratumoral administration of Ad-TNFα or AdRGD-TNFα. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with PBS (***A***), AdRGD-LacZ at 10^{10} VP/tumor (***B***), Ad-TNFα (***C***; at 10^8 VP/tumor, ***D***; at 10^9 VP/tumor), or AdRGD-TNFα (***E***; at 10^8 VP/tumor, ***F***; at 10^9 VP/tumor).

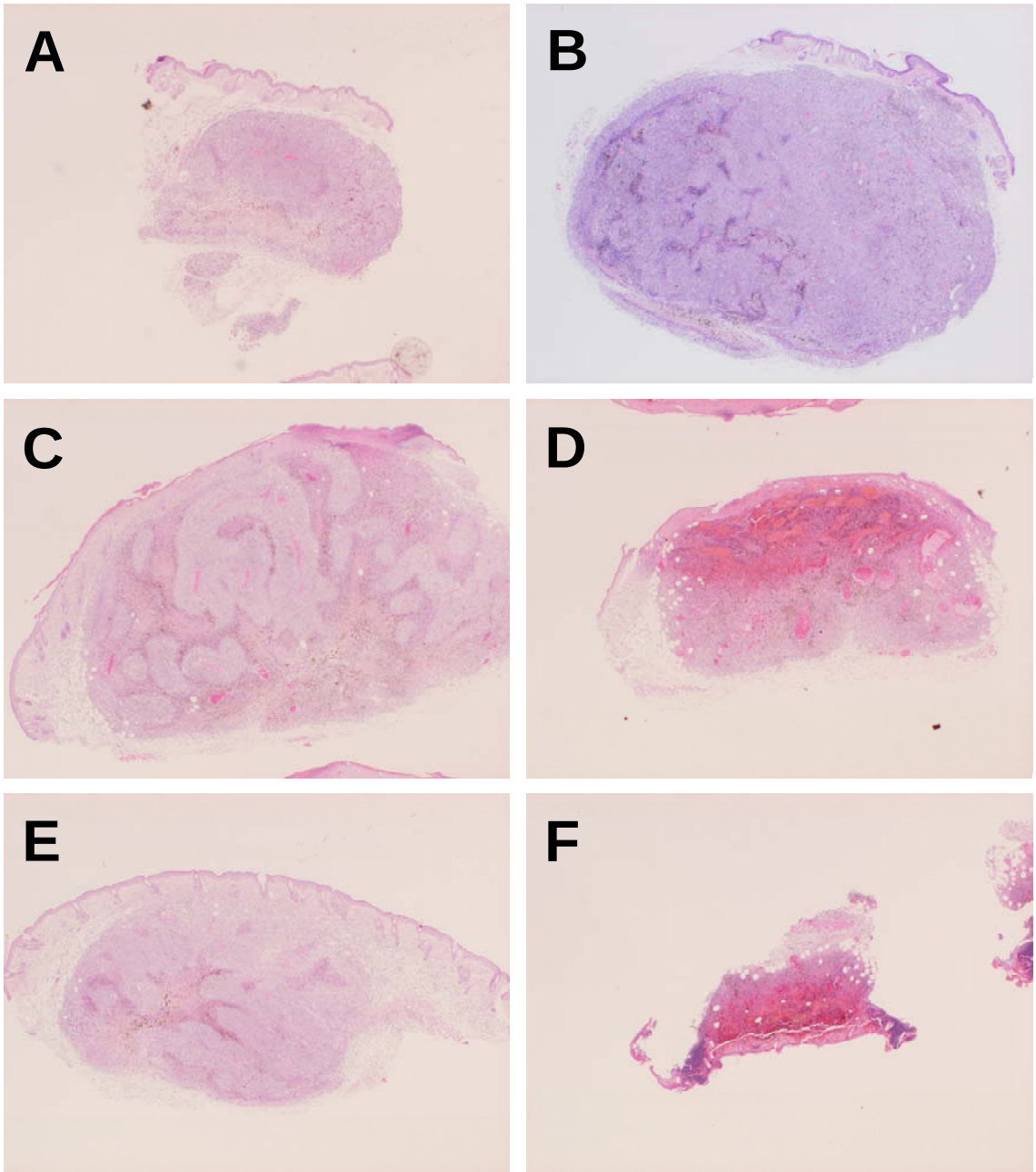

Fig. 15. Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded B16BL6 tumor sections (original magnification, ×3.85). B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with PBS, AdRGD-LacZ at 10^{10} VP/tumor, Ad-TNFα at 10^9 VP/tumor, or AdRGD-TNFα at 10^9 VP/tumor. Tumor was removed from these mice on day 2 or 3 after treatment, placed in neutral 10% formalin/PBS, and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were prepared for hematoxylin and eosin staining and histopathological examination. (***A***) On day 2 after PBS administration; (***B***) on day 2 after AdRGD-LacZ administration; (***C***) on day 2 after Ad-TNFα administration; (***D***) on day 2 after AdRGD-TNFα administration; (***E***) on day 3 after Ad-TNFα administration; (***F***) on day 3 after AdRGD-TNFα administration.

第三節 AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 の腫瘍内投与による抗 B16BL6 腫瘍効果

目的

本節では、マウスB16BL6メラノーマモデルを用いて、AdRGD-IL12あるいはAd-IL12の腫瘍内投与による抗腫瘍効果を比較した。また、免疫学的手法を用いて、本系における抗腫瘍効果発現のメカニズムを検討した。

実験材料

【試薬】

Mitomycin C（MMC）は協和発酵より、Recombinant mouse IFN-γは Pepro-Tech より、DELFIA enhancement solution は PerkinElmer より、Rabbit anti-asialoGM1 antiserum は和光純薬より、それぞれ購入した。

GK1.5 抗体（anti-CD4)[125] および 53-6.72 抗体（anti-CD8)[126] は、山元 弘先生（大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野）より供与を受けた。

その他の試薬は前節までの実験材料に準じた。

【培養細胞】

YAC-1 細胞は、真弓忠範先生（大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野）より供与を受け、RPMI1640（10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む）を用いて培養した。

その他の細胞は前節までの実験材料に準じた。

【動物】

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

【*in vivo* IL-12 遺伝子治療実験】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5～7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を 10^8、10^9、10^{10} あるいは 10^{11} VP/50 μl で腫瘍内に投与した。また、50 μl の PBS を腫瘍内投与したコントロール群も併せて作製した。経日的に体重ならびに腫瘍径を測定し、腫瘍体積は前節と同様に Janik ら [124]の式に従って算出した。

【細胞傷害試験】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5〜7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を 10^9 VP/50 μl で腫瘍内に投与した。1 週間後、これらのマウスから脾細胞を調製し、NK 細胞活性評価にはこの脾細胞をそのまま Effector 細胞として用いた。

一方、CTL 活性評価においては、調製した脾細胞と B16BL6 細胞（Stimulator 細胞）とを 10:1 で 5 日間共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、Effector 細胞を得た。尚、Stimulator 細胞として用いた B16BL6 細胞は、あらかじめ 100 U/ml の IFN-γを含む培養液で 24 時間培養し、50 μg/ml の MMC を含む RPMI1640 で 30 分間インキュベーションした。

細胞傷害試験は Europium (Eu)-release assay[127)-129)]により行った。Eu ラベルした Target 細胞を RPMI1640（10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む）で懸濁し、1×10^4 cells/50 μl/well で U 底 96 穴培養プレートに播種した。また、種々の Effector/Target 比となるように、RPMI1640（10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む）で懸濁した Effector 細胞を 50 μl/well で添加した。尚、Target 細胞からの Maximum Eu-release および Spontaneous Eu-release を測定する well には、Effector 細胞懸濁液の代わりにそれぞれ 0.5% Triton X-100/PBS および RPMI1640（10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む）を 50 μl/well で添加した。4 時間インキュベーションした後、50 μl の上清を 150 μl の DELFIA enhancement solution と混合し、マイクロプレートリーダー（SPECTARAFLUOR Plus; TECAN）を用いた時間分解蛍光測定法（Ex: 340nm, Em: 612nm, lag time: 400 μs, integration time: 400 μs）により Eu 濃度を測定した。尚、Effector 細胞の細胞傷害活性（%）は以下の式に従って算出した。

$$(\%\ \text{of lysis}) = \{(A) - (C)\} / \{(B) - (C)\} \times 100$$

(A): Experimental Eu-release, (B): Maximum Eu-release, (C): Spontaneous Eu-release

【*in vivo* depletion assay】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5〜7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した AdRGD-IL12 を 10^9 VP/50 μl で腫瘍内に投与した。

$CD4^+$ T 細胞、$CD8^+$ T 細胞あるいは NK 細胞を枯渇させる群については、それぞれ 100 μl の GK1.5 抗体溶液、100 μl の 53-6.72 抗体溶液、あるいは 40 μl の Anti-asialoGM1 antiserum を、AdRGD-IL12 投与当日から 2 日間隔で 5 回腹腔内投与した。経日的に腫瘍径を測定し、前節と同様に Janik ら[124)]の式に従って腫瘍体積を算出した。

尚、抗体投与を行ったマウスにおいては、2 回目の投与の翌日（投与開始から 4 日目）には、脾

細胞中の抗体標的リンパ球サブセットの 90%以上が消失していることを、Flow cytometry 解析により確認した。

結果および考察

C57BL/6 マウスにあらかじめ接種した B16BL6 腫瘍内に AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 を投与した際の、経日的な腫瘍体積変化を Fig. 16-A に示した。

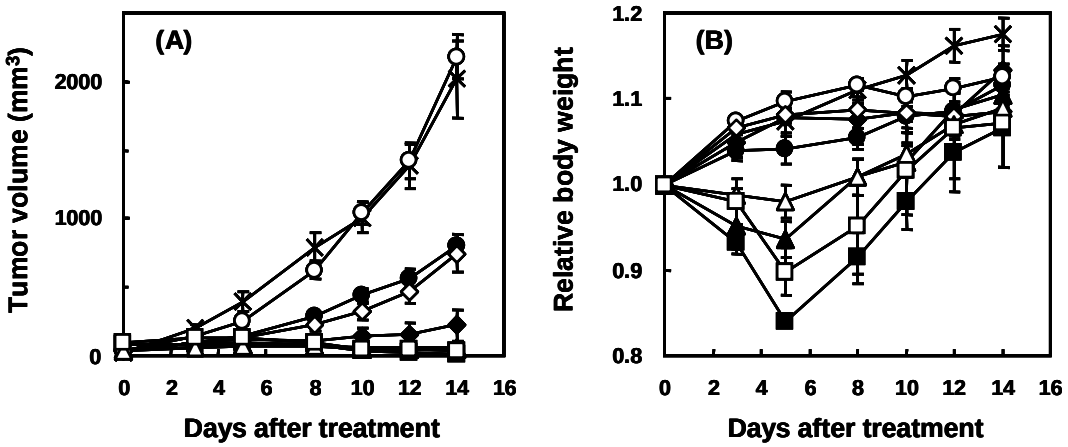

Fig. 16. Anti-B16BL6 tumor effect and body weight change upon an intratumoral administration of Ad-IL12 or AdRGD-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with Ad-IL12 (○; 10^8, ◇; 10^9, △; 10^{10}, or □; 10^{11} VP/tumor), AdRGD-IL12 (●; 10^8, ◆; 10^9, ▲; 10^{10}, or ■; 10^{11} VP/tumor), or PBS (×). The tumor volume (***A***) and body weight (***B***) were determined three times a week. Each point represents the mean ± SE of 4-5 mice.

前節の *in vivo* TNF-α遺伝子治療実験と同様に、AdRGD-IL12 投与群および Ad-IL12 投与群ともに、ベクター用量に依存して腫瘍増殖抑制効果の増強が認められ、同用量のベクター投与においては AdRGD-IL12 投与群でより優れた抗腫瘍効果が観察された。また、腫瘍増殖曲線およびベクター投与後 14 日目の腫瘍体積を比較すると、AdRGD-IL12 を 10^8 VP で腫瘍内投与した場合の腫瘍増殖抑制効果は、Ad-IL12 を 10^9 VP で投与した場合と同等であり、本系においてもベクター投与に伴う抗腫瘍効果と腫瘍内 IL-12 産生量（Fig. 12-B）との間に極めて良好な相関が認められた。さらに、10^{10} VP あるいは 10^{11} VP という高用量の Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を投与したマウスにおいては、より顕著な抗腫瘍効果が観察されたが、やはりベクター投与後数日間にわたって体重減少が引き起こされる結果となった（Fig. 16-B)。この副作用発現機序に関しても、前節の *in vivo* TNF-α遺伝子治療実験と同様に、次章において詳細な解析を試みた。

次に、AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 を B16BL6 腫瘍内に投与した際の抗腫瘍メカニズムを解析する目的で、10^9 VP の各ベクターを投与した 1 週間後のマウスから脾細胞を調製し、その細胞傷害活性を Eu-release assay により評価した（Fig. 17）。

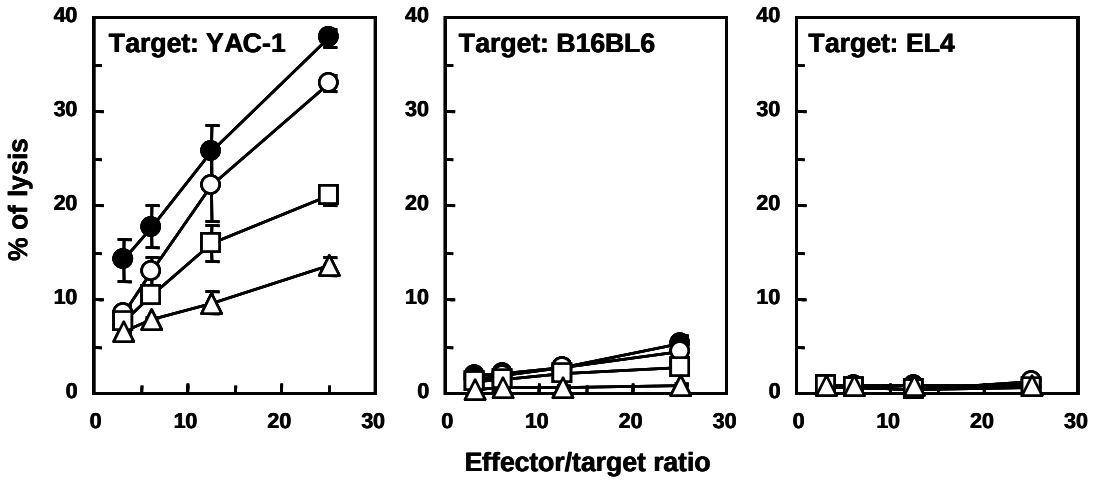

Fig. 17. NK activity of splenocytes from mice injected intratumorally with AdRGD-IL12 or Ad-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with Ad-IL12 at 10^9 VP/tumor (○), AdRGD-IL12 at 10^9 VP/tumor (●), or PBS (□). At 1 week after treatment, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and directly used in cytolytic assays against YAC-1 cells, B16BL6 cells, or EL4 cells. Likewise, cytolytic activity of splenocytes from intact mice (△) was measured. Each point represents the mean ± SE from 3 independent cultures using splenocytes prepared from 3 individual mice.

NK 細胞依存性の細胞傷害に対して高感受性である YAC-1 細胞 [130]を Target 細胞として用いた場合には、AdRGD-IL12 投与群および Ad-IL12 投与群の脾細胞に、PBS 投与群と比較して明らかに高い細胞傷害活性が認められ、その傷害レベルは AdRGD-IL12 投与群でより高値を示した。一方、B16BL6 細胞および Syngeneic thymoma である EL4 細胞を Target 細胞とした場合には、どの群の脾細胞も傷害活性を示さなかった。したがって、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を腫瘍内投与したマウスにおいては、NK 細胞の傷害活性が顕著に亢進されており、同用量（10^9 VP/tumor）のベクターを適用した場合には、AdRGD-IL12 投与群においてより効率良く NK 細胞を活性化できることが明らかとなった。

さらに、これらの脾細胞を B16BL6 細胞と共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を行い、脾細胞中に含まれる B16BL6 特異的 CTL の細胞傷害活性を比較した（Fig. 18）。

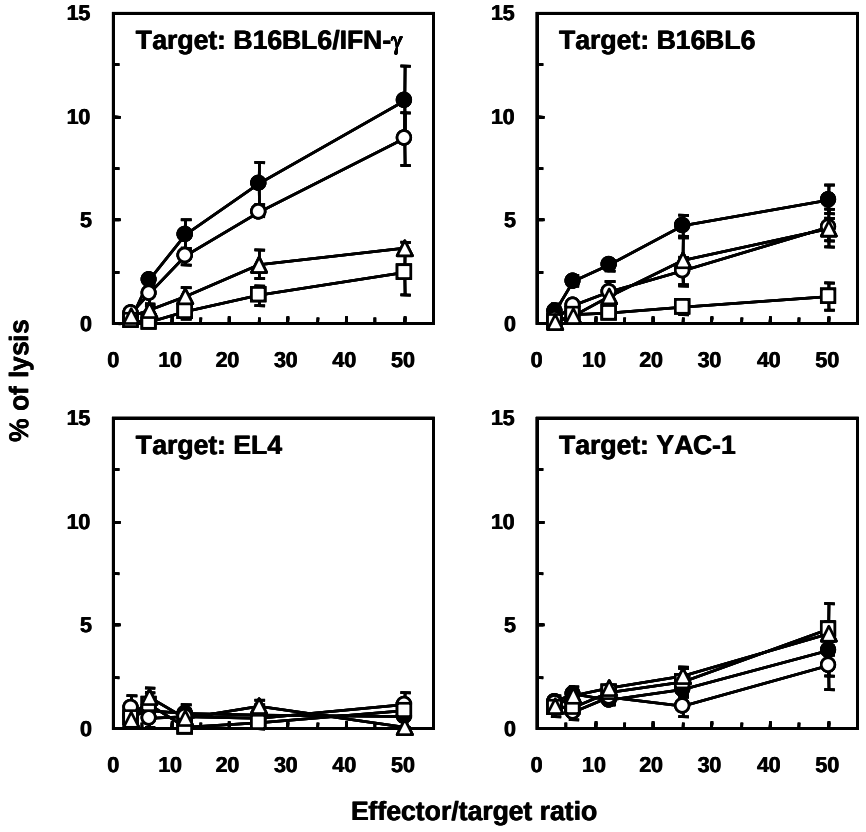

Fig. 18. B16BL6-specific CTL response in mice injected intratumorally with AdRGD-IL12 or Ad-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with Ad-IL12 at 10^9 VP/tumor (○), AdRGD-IL12 at 10^9 VP/tumor (●), or PBS (□). At 1 week after treatment, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and then were re-stimulated *in vitro* for 5 days with IFN-γ-stimulated and MMC-inactivated B16BL6 cells. A cytolytic assay was performed using B16BL6 cells stimulated with or without IFN-γ, EL4 cells, and YAC-1 cells. Likewise, splenocytes from intact mice (△) were re-stimulated with IFN-γ-stimulated B16BL6 cells, and then their cytolytic activity was measured. Each point represents the mean ± SE from 3 independent cultures using splenocytes prepared from 3 individual mice.

B16BL6 細胞に対する傷害活性を比較したところ、PBS 投与群の Effector 細胞は、腫瘍を接種していない Intact なマウスの Effector 細胞よりも低い活性しか検出できなかった。これは、B16BL6 担癌マウスにおいては、T 細胞の感作・活性化が抑制された状態にある可能性を示唆している。一方、Ad-IL12 投与群においては、Intact マウスと同程度の B16BL6 細胞傷害が認められ、さらに AdRGD-IL12 投与群ではより高い傷害活性が検出された。これらの Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 投与に伴う B16BL6 細胞傷害活性の上昇は、IFN-γ処理によって MHC (Major histocompatibility complex) class I 分子の発現を増強させた B16BL6 細胞を Target 細胞とすることで一段と明確となった。また、EL4 細胞あるいは YAC-1 細胞を Target 細胞とした場合には、どの群の Effector 細胞もほとんど傷害活性を示さなかったことから、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 の腫瘍内投与によって B16BL6 腫瘍特異的な CTL の誘導が増強される可能性が示唆された。

そこで次に、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与により誘導される抗 B16BL6 腫瘍効果に寄与するリンパ球サブセットを同定するために、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 asialoGM1 抗体を用いた *in vivo* depletion assay を行った（Fig. 19）。

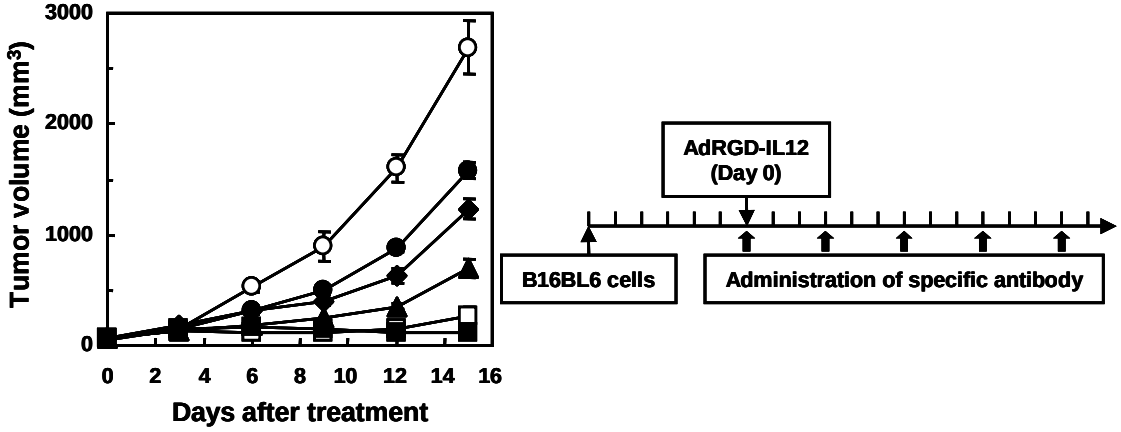

Fig. 19. Determination of immune subsets responsible for B16BL6 tumor regression induced by intratumoral administration of AdRGD-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with AdRGD-IL12 at 10^9 VP/tumor (□), or PBS (○). Antibodies, GK1.5 (anti-CD4) alone (■), 53-6.72 (anti-CD8) alone (▲), anti-asialoGM1 alone (◆), or combination of these 3 antibodies (●), were intraperitoneally injected according to the indicated schedule. Depletion of T cell subsets and NK cells was monitored by flow cytometry, which showed >90% specific depletion in splenocytes at day 4 after the first antibody administration. Each point represents the mean ± SE of 6 mice.

B16BL6 腫瘍に 10^9 VP の AdRGD-IL12 を投与した際の増殖抑制効果は、$CD4^+$ T 細胞の枯渇では全く影響を受けなかったが、$CD8^+$ T 細胞あるいは NK 細胞を枯渇させたマウスにおいては明らかな腫瘍の増大が認められ、さらに、これら三種類のリンパ球サブセットを全て枯渇させたマウスでは、抗腫瘍効果がより顕著に抑制された。したがって、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与に伴う B16BL6 腫瘍の増殖抑制においては、NK 細胞と $CD8^+$ CTL が主要なエフェクター細胞として機能することが示された。

本節の結果をまとめると、AdRGD-IL12 の投与による抗 B16BL6 腫瘍効果の増強は、腫瘍局所で効率良く産生された IL-12 が、NK 細胞および B16BL6 特異的 CTL をより効果的に活性化し、強力な腫瘍免疫を誘導したことに基づくと考えられた。

第四節 小括

これまでに提出された全遺伝子治療臨床研究プロトコールのうち、治療用遺伝子としてサイトカイ

ン遺伝子を用いたプロトコールは約 20%を占めており[7]、鋭敏な作用活性を有するものの生体内安定性に乏しいサイトカインの疾病治療への応用に当たっては、局所での持続的なサイトカイン産生を狙った遺伝子治療が重要な戦略として位置づけられている。前章の結果から、従来型 Ad の最初の標的分子である CAR の発現が低いメラノーマ細胞に対しても、AdRGD は極めて効率の良い遺伝子導入を達成できるベクターシステムであることが明らかとなった。そこで本章では、強力な抗腫瘍活性が報告されている TNF-αおよび IL-12 の各遺伝子を搭載した AdRGD あるいは従来型 Ad を用いて、*in vivo* メラノーマ遺伝子治療における有効性を比較検討するとともに、各サイトカイン発現ベクターの投与による抗腫瘍効果発現機序を解析した。

AdRGD-TNFαあるいは AdRGD-IL12 により遺伝子導入したメラノーマ細胞においては、それぞれ対応する従来型 Ad を適用した細胞と比較して、目的とするサイトカインの極めて高い分泌が認められた。また、あらかじめマウスに生着させた B16BL6 メラノーマ腫瘍内に、これらのサイトカイン発現ベクターを投与したところ、10^8 VP の AdRGD-TNFαあるいは AdRGD-IL12 を投与した腫瘍では、10^9 VP の Ad-TNFαあるいは Ad-IL12 を投与した腫瘍と同等のサイトカイン産生が検出された。これらの結果を反映して、10^8 VP あるいは 10^9 VP のサイトカイン発現 AdRGD を投与した B16BL6 腫瘍では、同用量の従来型 Ad を適用した場合と比較して、より強力な増殖抑制効果が観察され、10^8 VP の AdRGD 投与群における抗腫瘍効果は 10^9 VP の従来型 Ad 投与群で認められた効果に匹敵した。

さらに、各サイトカイン発現ベクター投与による抗腫瘍メカニズムについて検討したところ、Ad-TNFαを投与した B16BL6 腫瘍と比較して、AdRGD-TNFαを投与した腫瘍ではより広範な壊死領域が観察され、AdRGD-TNFαの投与による抗メラノーマ効果の増強は、腫瘍局所で TNF-αが効率良く発現したことに伴う、より強力な腫瘍血管の崩壊と出血壊死の誘導に基づくことが判明した。一方、AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 を腫瘍内投与したマウスでは、NK 細胞および B16BL6 特異的 CTL の細胞傷害活性に増強が認められ、それらの活性亢進は AdRGD-IL12 投与群でより顕著であった。また、*in vivo* depletion assay の結果から、AdRGD-IL12 の腫瘍内投与により誘導される抗腫瘍効果においては、NK 細胞と $CD8^+$ T 細胞の存在が必須であることも明らかとなり、AdRGD-IL12 の投与による抗メラノーマ効果の増強は、腫瘍局所で効率良く産生された IL-12 が、NK 細胞および B16BL6 特異的 CTL をより効果的に活性化し、強力な腫瘍免疫を誘導したことに基づくと考えられた。

以上の検討結果は、AdRGD のメラノーマに対する優れた遺伝子導入効率が、治療用遺伝子としてサイトカイン遺伝子を用いた *in vivo* メラノーマ遺伝子治療の有効性向上と投与ベクター用量の削減に直結することを示しており、AdRGD がメラノーマ遺伝子治療の開発において非常に有用性の高

いベクターシステムであることを実証するものである。また、一般に癌細胞は悪性度の進行に伴って、CAR 発現レベルの減少および従来型 Ad による遺伝子導入効率の低下が報告されており[131)-133)]、従来型Adを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床試験を進める上で考慮すべき問題とされている。さらに、多くの癌細胞（特に固形癌）はα_v-integrin 陽性であることを考え合わせると[134)-136)]、AdRGD はメラノーマのみならず、種々の進行癌に対する遺伝子治療においても高い有用性が期待される。

ところで、従来型 Ad および AdRGD は、高力価のベクター調製が容易であることから、治療の有効性向上を目的として、高用量のベクターを *in vivo* 投与することも可能である。確かに、サイトカイン発現 AdRGD あるいは従来型 Ad を 10^{10} VP あるいは 10^{11} VP という高用量で B16BL6 腫瘍内へ投与した際には、劇的な腫瘍退縮が観察された。しかしながら、これらのマウスにおいては治療効果の増強ばかりでなく、ベクター投与後数日間にわたる著しい体重減少を招く結果となり、10^{10} VP の Ad-TNFα投与群では突然死する個体も認められた。本系におけるこれら副作用の発現機序は、*in vivo* サイトカイン遺伝子治療の臨床プロトコールを設定する際の重要な情報であると考えられるため、次章において詳細な解析を行った。

第三章　メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療における副作用発現機序の解析と治療プロトコールの最適化

前章の検討において、メラノーマに対する *in vivo* サイトカイン遺伝子治療に AdRGD を応用することによって、従来型 Ad の低い遺伝子導入効率によって制限されていた治療効果を大幅に改善できることが実証され、効果的な治療を達成するための投与ベクター量を 1/10 に削減できることも明らかとなった。しかし一方で、治療効果のさらなる増強を目的としてむやみに高用量のサイトカイン発現ベクターを腫瘍内投与した場合には、著しい体重減少や突然死といった副作用が誘発され、むしろ治療の安全性を損なう結果に繋がることが判明した。

Ad は高力価のベクター調製が容易であることから、*in vivo* 直接投与も視野に入れた種々の疾患に対する遺伝子治療への適用が期待され [53]、将来的に最も有用な遺伝子治療用ベクターとなることを念頭に置いた臨床応用研究が精力的に進められている。しかしながら、米国で実施された嚢胞性線維症に対する臨床治験などから、Ad を用いた *in vivo* 遺伝子治療における副作用発現の要因として免疫反応の課題が提起された [137]。Ad を動物個体へ全身投与した際には、三種類の免疫反応の惹起が知られている [138)-140)]。第一に、生体に元来備わっているウイルス感染防御機構による免疫反応が挙げられ、Ad 粒子を貪食した肝クッパー細胞の活性化などに伴うサイトカイン産生が中心となる。第二の免疫反応は、ウイルス蛋白質に対する体液性免疫系の活性化であり、抗アデノウイルス抗体が産生される。第三の免疫反応は、非特異的な転写などによりベクター感染細胞において産生された少量のウイルス蛋白質に対して誘導される細胞性免疫系の活性化である。また Tolozaら [141]は、少量の Ad を慎重に局所投与した場合においても、一部の Ad 粒子の投与部位から循環血中への漏出を免れないことを報告している。したがって、高用量のサイトカイン発現ベクターの腫瘍内投与に伴う副作用の発現機序の一つとして、循環血中へと漏出したベクター自身に対する免疫反応に基づく炎症反応が考えられた (Fig. 20-A)。

また、TNF-αおよび IL-12 は様々な生理活性を有するサイトカインであり、全身性に大量投与した場合には免疫担当細胞の過剰な活性化に基づく炎症反応を惹起することが知られている [105)-109),118)]。したがって、腫瘍から漏出した TNF-αあるいは IL-12 発現ベクターが他臓器の細胞に感染し、局所で持続的にこれらのサイトカインが産生された場合には、免疫担当細胞の集積と組織傷害を伴った炎症反応が誘導される可能性がある (Fig. 20-B)。あるいは、高用量のベクター投与により腫瘍内で高濃度に産生された TNF-αまたは IL-12 が循環血中へと漏出し、全身性に持続的に作用することに起因する炎症反応も予想された (Fig. 20-C)。

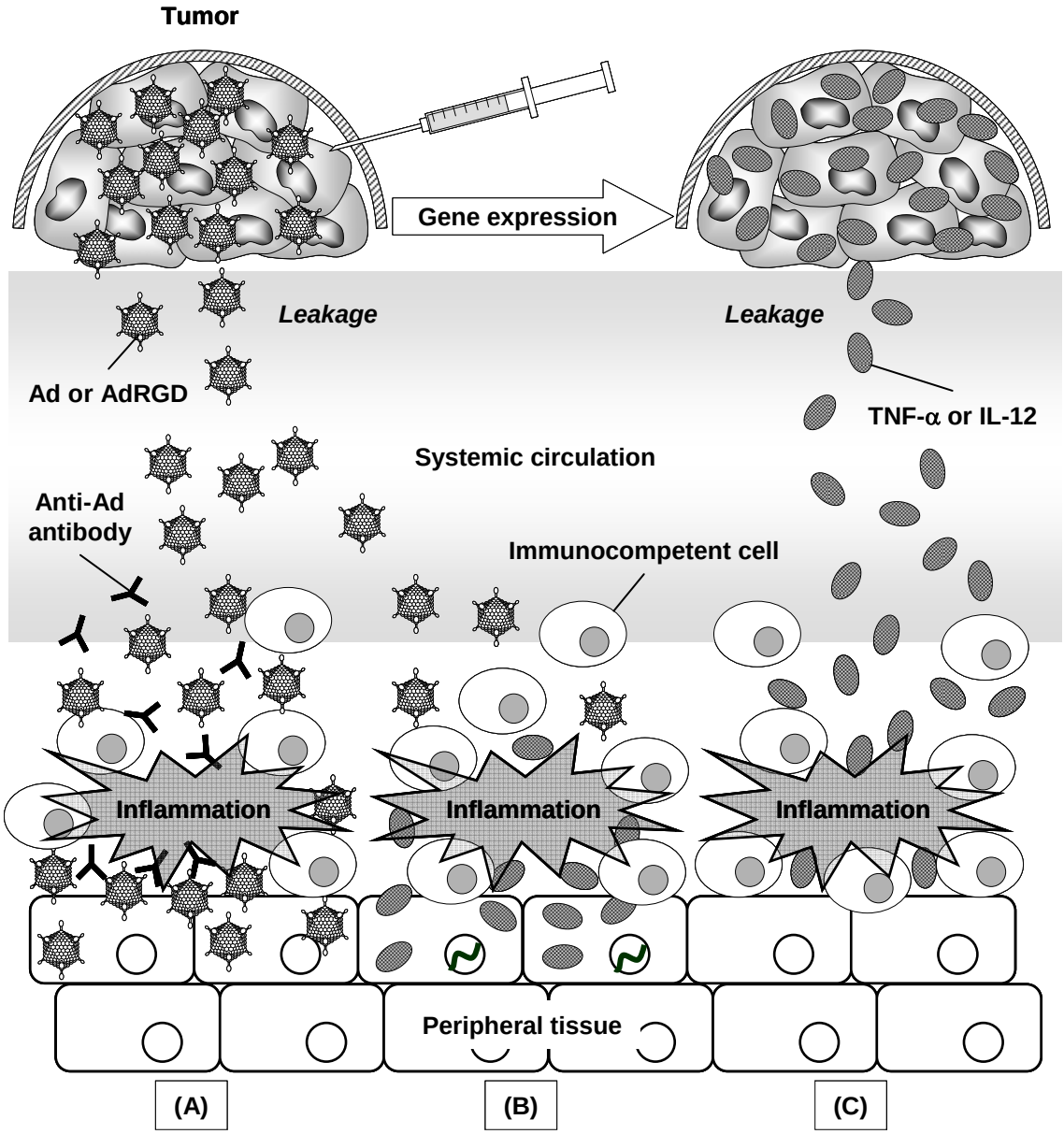

Fig. 20. Speculative mechanism of adverse effects in B16BL6 melanoma-gene therapy using cytokine-expressing Ad or AdRGD. (***A***): Mechanism on the basis of inflammatory reaction in highly Ad- or AdRGD-infected organs due to an immune response to Ad or AdRGD which leaked from a tumor into systemic circulation. (***B***): Mechanism on the basis of inflammatory response by the cytokine expressed in various tissues due to infection by Ad or AdRGD disseminated from a tumor. (***C***): Mechanism on the basis of inflammatory response by the cytokine produced in a tumor excessively, and leaked into systemic circulation.

これらの仮定を踏まえて、本章ではメラノーマに対する *in vivo* サイトカイン遺伝子治療の副作用発現機序を詳細に解析し、AdRGD を用いた最適な治療プロトコールの確立に繋がる基礎的情報の収集を試みた。また、その結果に基づいて、AdRGD−TNFαと AdRGD−IL12 とを併用することによって、高い有効性と安全性を兼ね備えた *in vivo* メラノーマ遺伝子治療が達成できることを示した。

第一節 腫瘍内投与した従来型 Ad および AdRGD の循環血中への漏出

目的

サイトカイン発現ベクターの高用量腫瘍内投与に伴う副作用発現機序を解析する上で、腫瘍から循環血中へと漏出するベクター量を見積ることが必要とされる。そこで本節では、Luciferase 発現 AdRGD あるいは従来型 Ad をマウスに静脈内投与あるいは腫瘍内投与した際の主要臓器における遺伝子発現レベルを比較することで、腫瘍から循環血中へのベクター漏出率を評価した。

実験材料

【試薬】

5× Cell Culture Lysis Reagent ならびに Luciferase Assay Reagent は Promega より購入した。

その他の試薬は前章までの実験材料に準じた。

【培養細胞】

前章までの実験材料に準じた。

【動物】

前章までの実験材料に準じた。

実験方法

【RT-PCR 解析】

C57BL/6 マウスから摘出した脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓の Total RNA を Sepasol-RNA I Super を使用して調製し、第一章 第一節の実験方法【RT-PCR 解析】に準じてマウス CAR および Integrins の RT-PCR 解析を行った。

尚、本実験における PCR は、CAR ならびに Integrins は 30 サイクル、β-actin は 20 サイクルの条件でそれぞれ行った。

【Luciferase 発現ベクターを静脈内投与した際の遺伝子発現解析】

PBS に懸濁した Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を 10^8、10^9 あるいは 10^{10} VP/100 μl/mouse で、C57BL/6 マウスに尾静脈内投与した。2 日後、脳、肺、心臓、脾臓、腎臓、肝臓を摘出し、Aprotinin (10 μg/ml) と PMSF (100 μM) を含む PBS を用いて 20%ホモジネートを調製した。50 μl のホモジネートと 50 μl の 5× Cell Culture Lysis Reagent を混合し、室温で 15 分間インキュベーションした後、さらに 150 μl の水を加えてサンプル溶液とした。10 μl のサンプル溶液に 100 μl の Luciferase Assay

Reagent を加えて混合し、ルミノメーター（MINILUMAT LB9506; EG & G BERTHOLD）を用いて Luciferase 活性（RLU; relative light units）を測定した。

【Luciferase 発現ベクターを腫瘍内投与した際の遺伝子発現解析】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5～7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を 10^8、10^9 あるいは 10^{10} VP/50 μl で腫瘍内に投与した。2 日後、腫瘍および肝臓を摘出し、Aprotinin（10 μg/ml）と PMSF（100 μM）を含む PBS を用いて 20%ホモジネートを調製した。Luciferase 活性は、上記の方法に準じて測定した。

結果および考察

Luciferase 発現ベクターを全身投与した際の遺伝子発現分布の解析に先立ち、C57BL/6 マウスの脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓における CAR ならびに α_v-、β_3-、および β_5-integrin の mRNA 発現レベルを RT-PCR 解析により評価した（Fig. 21）。

CAR mRNA に由来する PCR 産物は、脳および脾臓において若干低レベルであったものの、検討した主要臓器すべてにおいて検出された。また、各臓器間で発現レベルに多少の違いはあるものの、α_v-、β_3-、および β_5-integrin の mRNA の発現についてもすべての臓器において確認された。AdRGD および従来型 Ad の標的細胞への感染機序に基づいて考えると、この結果は、循環血中に投与されたこれらのベクターがほぼ全身性に遺伝子導入できることを示している。

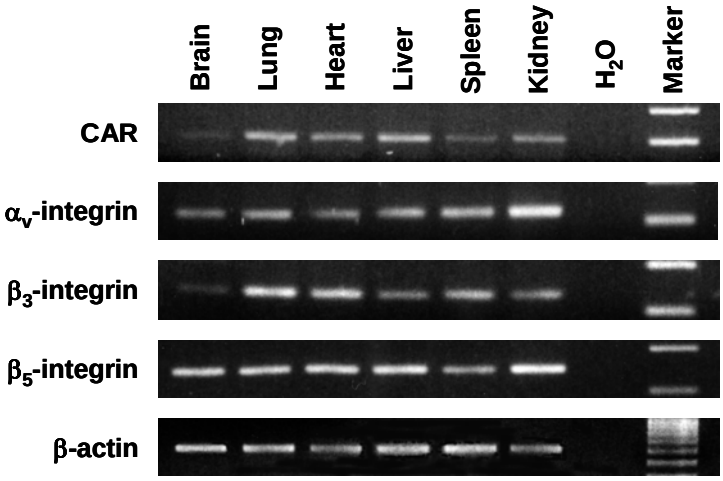

Fig. 21. RT-PCR analysis of CAR, α_v-integrin, β_3-integrin, and β_5-integrin in murine major organ. Total RNA was prepared from 6 whole organs, and then RT-PCR was performed. To ensure the quality of the procedure, RT-PCR was performed on the same samples using specific primers for β-actin.

そこで、C57BL/6 マウスに Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を尾静脈内投与し、2 日後における脳、肺、心臓、脾臓、腎臓および肝臓における遺伝子発現レベルを測定した（Fig. 22-A)。

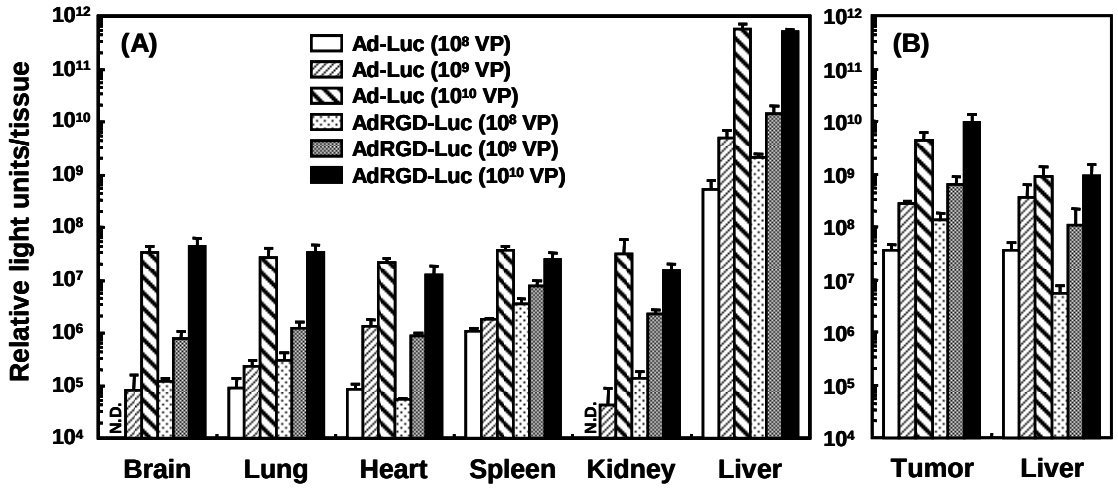

Fig. 22. Luciferase activity in mice after the intravenous injection (*A*) or intratumoral injection (*B*) of Ad-Luc or AdRGD-Luc. (***A***) Ad-Luc and AdRGD-Luc were intravenously injected into C57BL/6 mice at 10^8, 10^9, or 10^{10} VP in a 100-μl PBS. Two days later, the brain, lung, heart, spleen, kidney, and liver were removed, weighed, and homogenized in PBS containing 10 μg/ml aprotinin and 100 μM PMSF. (***B***) C57BL/6 mice were intradermally injected with 2×10^5 B16BL6 cells, and then tumors with diameters of 5-7 mm were injected with Ad-Luc and AdRGD-Luc at 10^8, 10^9, or 10^{10} VP in a 50-μl PBS. Two days later, the tumor and liver were removed and treated as described above. Luciferase activity in the homogenates was determined by a luciferase assay system. All data represent the mean ± SE of 3 (***A***) or 6 (***B***) experiments. Mean background value of luciferase activity in each organ has been subtracted from the data. N.D.: luciferase activity was not detectable.

Ad-Luc 投与群および AdRGD-Luc 投与群ともに、主要臓器の Luc 活性は投与ベクター量依存的に上昇し、10^8 ならびに 10^9 VP 投与では、心臓以外の全ての臓器において Ad-Luc 投与群よりも AdRGD-Luc 投与群で高い遺伝子発現が認められた。一方、10^{10} VP 投与における AdRGD-Luc 投与群の遺伝子発現レベルは、全ての臓器において Ad-Luc 投与群と同程度であった。Mizuguchi らは [139]、3×10^{10} VP という高用量の AdRGD-Luc を尾静脈内投与したマウスの肺、心臓、脾臓、腎臓および肝臓における 48 時間後の Luc 活性は、同用量の Ad-Luc 投与群よりも低くなることを報告している。また彼らは、*in vitro* において AdRGD によるマウス赤血球の凝集を確認しており、高用量の AdRGD を尾静脈内投与した場合、赤血球に結合することによって組織に到達できるベクター量が減少すると考察している。AdRGD の投与量とマウス赤血球凝集活性の関係について詳細な検討は行っていないが、おそらく 10^9 VP 以下の投与量においては AdRGD の組織到達量に及ぼす赤血球凝集活性の影響は非常に小さく、従来型 Ad とほぼ同量で分布した AdRGD の高い遺伝子導入効率が発揮された結果、各臓器において従来型 Ad 投与群よりも高い遺伝子発現が達成されたのではないかと考えられた。

また、遺伝子発現分布については、従来型 Ad による遺伝子導入が CAR 依存性であるにも関わらず、各臓器における CAR mRNA の発現レベル（Fig. 21）と Luc 活性レベル（Fig. 22-A）との間には特に相関は認められず、Ad-Luc 投与群および AdRGD-Luc 投与群ともに、総 Luc 活性のうち 99% 以上が肝臓で検出された。肝臓は、CAR およびα_v-integrins を十分に発現していることに加えて、脈管構造に直径 100 nm 程度の Fenestra が存在するため [143),144)]、Ad の容易な組織内浸透と広範な感染が予想される。また最近、ファイバーシャフトに存在する KKTK（Lys-Lys-Thr-Lys）からなるヘパリン結合ドメインが、Ad の肝集積性に寄与していることも明らかとされた [145)]。これらの理由から、AdRGD あるいは従来型 Ad を腫瘍内投与した際に循環血中に漏出するベクター量、ならびに漏出ベクターの組織傷害性および遺伝子発現に伴う二次的な毒性は、肝臓における遺伝子発現強度および病理学的所見を指標に判断することが妥当であろうと考えられた。

そこで次に、C57BL/6 マウスにあらかじめ接種した B16BL6 腫瘍内に Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を投与し、2 日後の腫瘍ならびに肝臓における Luc 活性を測定した（Fig. 22-B）。

各ベクター投与群ともに腫瘍において投与量依存的な遺伝子発現の上昇が認められたが、それに伴って肝臓における Luc 活性も上昇し、投与量増大に伴って腫瘍から循環血中に漏出するベクター量も増加することが明らかとなった。また、腫瘍における Luc 活性に対する肝臓における Luc 活性の比を算出したところ、いずれの投与量においても AdRGD-Luc 投与群のほうが Ad-Luc 投与群よりも低値を示した（Fig. 23）。これは、AdRGD が CAR 低発現メラノーマ細胞へ効率良く感染できることに伴い、血中へ漏出するベクター量を抑えられることを示唆しており、メラノーマ遺伝子治療における AdRGD の有用性を支持するものである。 さらに、Fig. 22-A と Fig. 22-B を比較すると、Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を 10^{10} VP で腫瘍内投与した際の肝臓での Luc 活性が、各ベクターを 10^{8} VP で尾静脈内投与した時の肝臓での Luc 活性とほぼ同レベルとなっている。すなわち、10^{10} VP で腫瘍内投与された両タイプのベクターは、その約 1%が循環血中へと漏出することが判明した。

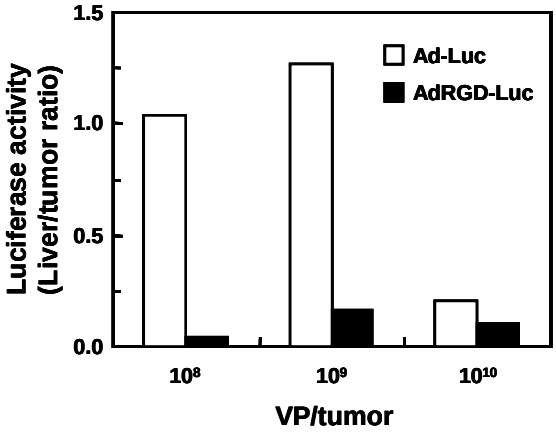

Fig. 23. The ratio of luciferase activity of liver to luciferase activity of tumor in mice injected intratumorally with Ad-Luc or AdRGD-Luc. Each ratio was calculated from raw data in Fig. 22.

第二節 サイトカイン発現 AdRGD の高用量腫瘍内投与における副作用発現機序

目的

本節では、Ad-Luc、AdRGD-Luc あるいは AdRGD-TNFαを静脈内投与したマウスの肝臓病理組織像、ならびに Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを腫瘍内投与したマウスの肝臓病理組織像を比較することにより、腫瘍から循環血中へと漏出したベクター自身に対する免疫反応に起因する組織傷害（Fig. 20-A)、漏出ベクターにより遺伝子導入された他臓器からのサイトカイン産生に起因する組織傷害（Fig. 20-B)、あるいは腫瘍内で高濃度に産生されたサイトカインが循環血中へと漏出し、全身性に作用することに起因する組織傷害（Fig. 20-C）のそれぞれの可能性を検討した。また、高用量のサイトカイン発現ベクターを腫瘍内投与したマウスにおける血中サイトカイン濃度と体重変化との相関を解析し、副作用発現に関与する主な要因を考察した。

実験材料

【試薬】

Mouse IFN-γ ELISA Kit は Biosource International より購入した。

その他の試薬は前節までの実験材料に準じた。

【培養細胞】

前節までの実験材料に準じた。

【動物】

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

【肝臓病理組織像観察】

PBS に懸濁した Ad-Luc（10^{10} VP)、AdRGD-Luc（10^{10} VP)、あるいは AdRGD-TNFα（10^{9} VP）を 100 μl/mouse で C57BL/6 マウスに尾静脈内投与した。また別に、C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^{5} cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5～7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを 10^{10} VP/50 μl で腫瘍内に投与した。ベクター投与 2 日後にこれらのマウスの肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンによる組織固定処理を行った後、パラフィンブロックに包埋した。5 μm の組織切片を作製し、HE 染色した標本の病理組織学的観察および所見をアプライドメディカルリサーチに依頼した。

【血中サイトカイン濃度の測定】

PBS に懸濁したサイトカイン発現ベクターを種々の VP で C57BL/6 マウスに尾静脈内投与した。また別に、C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5〜7 mm に達した時点で、PBS に懸濁したサイトカイン発現ベクターを種々の VP で腫瘍内に投与した。これらのマウスから経日的に採血し、遠心分離により得られた血清に 10 mM EDTA と 100 μg/ml Aprotinin を含む PBS を 1/9 容添加した。血清中 TNF-α、IL-12 あるいは IFN-γの濃度は、それぞれ ELISA により定量した。

結果および考察

腫瘍から漏出したベクター自身による組織傷害性を評価する目的で、Ad-Luc あるいは AdRGD-Luc を 10^{10} VP で尾静脈内投与したマウスの 2 日後における肝臓病理組織像を観察した (Fig. 24-B,C)。その結果、高用量のベクターを全身性に投与したにもかかわらず、intact なマウス (Fig. 24-A) と比較して目立った肝組織傷害は認められなかった。また、10^{10} VP で腫瘍内投与した際に漏出が予想されるベクター量の 10 倍にあたる 10^9 VP の AdRGD-TNFαを静脈内投与した際にも、肝臓の組織像に異常は認められなかった (Fig. 24-D)。これらの結果は、Fig. 20 で仮定した副作用発現機序の (A) および (B)、すなわち腫瘍内から循環血中へと漏出したベクター自身に対する免疫反応、あるいは遺伝子導入された他臓器からのサイトカイン産生に基づく炎症反応が、副作用の発現に大きく寄与しないことを示している。一方、Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを 10^{10} VP で腫瘍内投与したマウスの肝臓においては、空胞化や好酸体の出現、壊死につながる核の異常など著しい肝組織傷害が認められ (Fig. 24-E,F)、さらに、多くの消化器官で外見的に明らかな組織変性が観察された。この結果から、高用量のサイトカイン発現ベクターを腫瘍内投与した際に認められる著しい体重減少は、腫瘍から漏出した高濃度のサイトカインが全身性に作用したことに起因すると推察された。

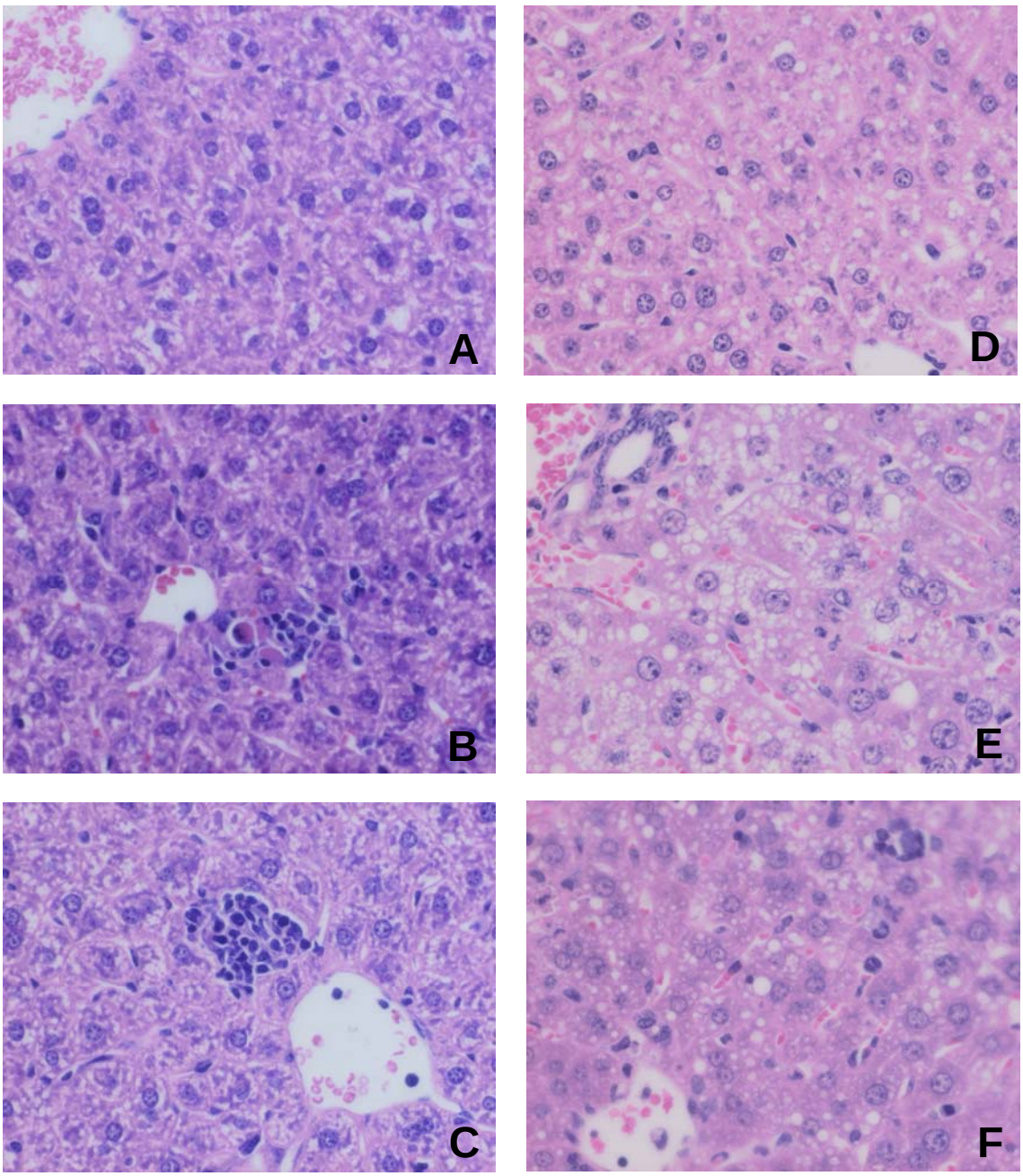

Fig. 24. Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded liver sections (original magnification, ×600). Intact C57BL/6 mice were intravenously injected with 10^{10} Ad-Luc (***B***), 10^{10} AdRGD-Luc (***C***), or 10^{9} AdRGD-TNFα (***D***). Mice with an intradermal B16BL6 tumor (5-7 mm in diameter) were intratumorally injected with 10^{10} Ad-TNFα (***E***) or 10^{10} AdRGD-TNFα (***F***). Liver was removed from these mice on day 2 after Ad-treatment and from intact mice (***A***), placed in neutral 10% formalin/PBS, and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were prepared for hematoxylin and eosin staining and histopathological examination.

そこで、10^{10} VP の Ad-TNFαまたは AdRGD-TNFαを腫瘍内投与したマウスの血中 TNF-α濃度と体重を経日的に測定したところ、各ベクター投与群間で異なるプロファイルを示した（Fig. 25-A,B)。

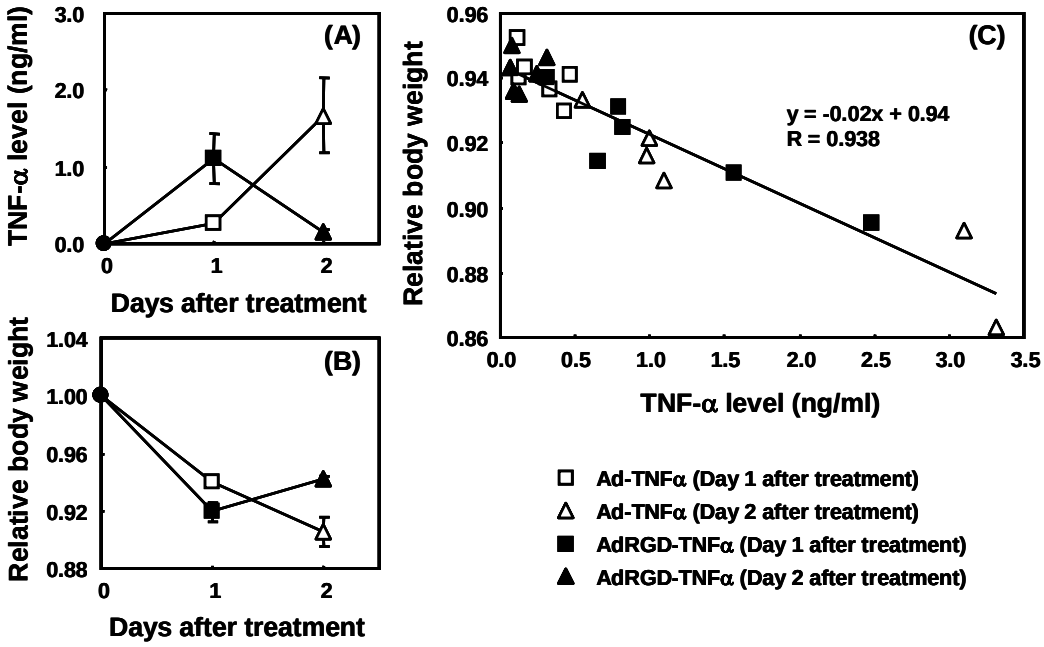

Fig. 25. TNF-α level in blood and body weight change upon intratumoral administration of Ad-TNFα or AdRGD-TNFα at 10^{10} VP. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. The tumors (5-7 mm in diameter) were injected with Ad-TNFα or AdRGD-TNFα at 10^{10} VP. (***A***) TNF-α concentration in blood collected from the tail vein was measured using the human TNF-α ELISA kit. (***B***) Relative body weight was calculated by the following formula: (relative body weight) = (body weight after Ad-treatment) / (body weight before Ad-treatment). Each point represents the mean ± SE of 6 mice. (***C***) Body weight reduction was plotted against the TNF-α levels in blood from all examined mice. The regression line was calculated by the least-squares method.

AdRGD-TNFα投与群では、投与後早期に血中 TNF-α濃度の上昇と体重減少が観察され、2 日目には血中 TNF-α濃度の低下と体重の回復が認められた。一方、Ad-TNFα投与群では、投与 1 日後における血中 TNF-α濃度は AdRGD-TNFα投与群よりも低値であったものの、2 日目にはそのレベルが上昇し、それに伴って体重が減少し続けた。この両者の違いは、各ベクターのメラノーマに対する TNF-α遺伝子導入効率の差を反映した結果であることが、経日的な腫瘍病理組織像の観察（Fig. 15）から推察できた。すなわち、メラノーマ細胞への遺伝子導入効率に優れる AdRGD-TNFαを投与した腫瘍では、多くの細胞から速やかな TNF-α分泌が達成されることにより広範囲に出血壊死が誘発され、結果として TNF-α産生細胞数の減少を来たす。これに対して、Ad-TNFαの腫瘍内投与では、AdRGD-TNFα投与ほど広範な腫瘍壊死には至らず、残存する Ad 感染細胞から TNF-α が産生され続けるために血中 TNF-α濃度が高く維持されたと考えられた。さらに、血中 TNF-α濃度と体重減少の関係を最小二乗法で解析したところ、相関係数（R）= 0.938 という極めて良好な相関

が得られ（Fig. 25-C)、Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを 10^{10} VP で腫瘍内投与した際の副作用発現は、腫瘍局所で高濃度に産生された TNF-αの全身循環血中への漏出が主要な原因となっていることが強く示唆された。尚、Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを 10^{8} または 10^{9} VP で尾静脈内投与あるいは腫瘍内投与したマウスにおいては、血中 TNF-α濃度は検出限界以下であり、体重減少も認められなかった。

以上の結果を総合すると、高用量の TNF-α発現ベクターを腫瘍内投与したマウスでは、腫瘍から漏出した高濃度の TNF-αにより全身性に炎症反応が惹起され、これにより誘発された多臓器不全によって著しい体重減少や突然死に至ることが強く示唆された。

同様に、高用量の Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を腫瘍内投与したマウスにおける血中 IL-12 濃度と体重の経日変化を解析した（Fig. 26-A,C)。

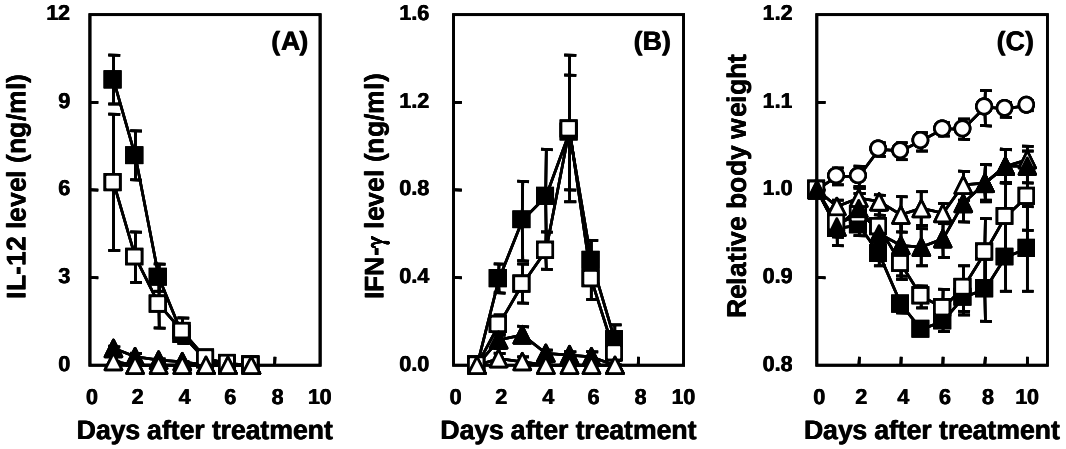

Fig. 26. IL-12 level in blood (A), IFN-γ level in blood (B), and body weight change (C) upon an intratumoral administration of Ad-IL12 or AdRGD-IL12 at 10^{10} or 10^{11} VP. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^{5} cells/mouse. The tumors (5-7 mm in diameter) were injected with Ad-IL12 (△; 10^{10}, or □; 10^{11} VP/tumor), AdRGD-IL12 (▲; 10^{10}, or ■; 10^{11} VP/tumor), or PBS (○). IL-12 (***A***) and IFN-γ (***B***) concentration in blood collected from the tail vein was measured using the murine IL-12 ELISA kit and murine IFN-γ ELISA kit, respectively. (***C***) Relative body weight was calculated by the following formula: (relative body weight) = (body weight after Ad-treatment) / (body weight before Ad-treatment). Each point represents the mean ± SE of 5 mice.

各ベクターを 10^{11} VP で投与した 1 日後における血中 IL-12 濃度は 6～10 ng/ml という高値を示すものの、その後速やかに消失し、体重減少がピークを迎える 5 日目には約 0.2 ng/ml にまで減少していたことから、血中 IL-12 濃度の上昇は体重減少の直接的な要因とはなっていないものと考えられた。そこで、IL-12 の作用により産生誘導が起こると予想された IFN-γの血中濃度を測定したところ、体重減少と血中 IFN-γ濃度のパターンには、極めて高い相関性が認められた（Fig. 26-B,C)。尚、Ad-IL12 あるいは AdRGD-IL12 を 10^{10} VP で尾静脈内投与したマウスおよび 10^{8} または 10^{9} VP で腫

瘍内投与したマウスにおいては、IL-12とIFN-γの血中濃度は検出限界以下であり、体重減少も認められなかった。したがって、IL-12 発現ベクターを高用量で腫瘍内投与した場合の体重減少は、腫瘍内で高濃度に産生された IL-12 が血中へ漏出し、二次的に産生誘導された内因性 IFN-γの作用に基づく全身性の炎症反応により引き起こされることが強く示唆された。

第三節 AdRGD-TNFαと AdRGD-IL12 の併用による抗腫瘍効果の増強と副作用の軽減

目的

本研究のサイトカイン遺伝子治療モデルにおいて、血中サイトカイン濃度の上昇とそれに伴う体重減少を引き起こすことなく有効な抗腫瘍効果を示す AdRGD-TNFαおよび AdRGD-IL12 の'limiting dose'は、ともに 10^9 VP であった。このベクター用量以下で、さらなる抗腫瘍効果の増強を達成しつつ副作用の発現を抑制するためには、抗腫瘍メカニズムの異なる TNF-αと IL-12 とを腫瘍内に共発現させるアプローチが有効であろうと考えた。そこで本節では、B16BL6 腫瘍内に AdRGD-TNFαと ADRGD-IL12 を併用投与した際の腫瘍増殖抑制効果を、各ベクターを単独投与した場合と比較検討した。

実験材料

【試薬】

前節までの実験材料に準じた。

【培養細胞】

前節までの実験材料に準じた。

【動物】

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

【*in vivo* サイトカイン遺伝子治療実験】

C57BL/6 マウスの腹部皮内に B16BL6 細胞を 2×10^5 cells/50 μl/mouse で接種し、腫瘍の長径が 5～7 mm に達した時点で、PBS に懸濁した AdRGD-TNFαあるいは AdRGD-IL12 を 10^9 VP/50 μl で腫瘍内に投与した。また、併用投与群については、AdRGD-TNFαおよび AdRGD-IL12 を 5×10^8 VP ずつ（Total 10^9 VP）あるいは 10^9 VP ずつ（Total 2×10^9 VP）混合して腫瘍内投与した。コント

ロール群には 50 μl の PBS を腫瘍内投与した。経日的に体重ならびに腫瘍径を測定し、腫瘍体積は第二章　第二節の Janik ら[124]の式に従って算出した。

尚、腫瘍接種後 90 日目において腫瘍の生着が認められない個体を完全治癒とした。

結果および考察

AdRGD-TNFαと AdRGD-IL12 を 5×10^8 VP ずつ混合して腫瘍内投与したところ、各ベクターを単独で 10^9 VP 投与した群と比較して抗腫瘍効果の増強が認められた（Fig. 27-A)。さらに、それぞれ 10^9 VP の AdRGD-TNFαと AdRGD-IL12 を併用投与した場合には、全例において完全治癒が達成されるという極めて強力な抗腫瘍効果が観察された。また、これら併用群において、顕著な体重減少は認められなかった（Fig. 27-B)。

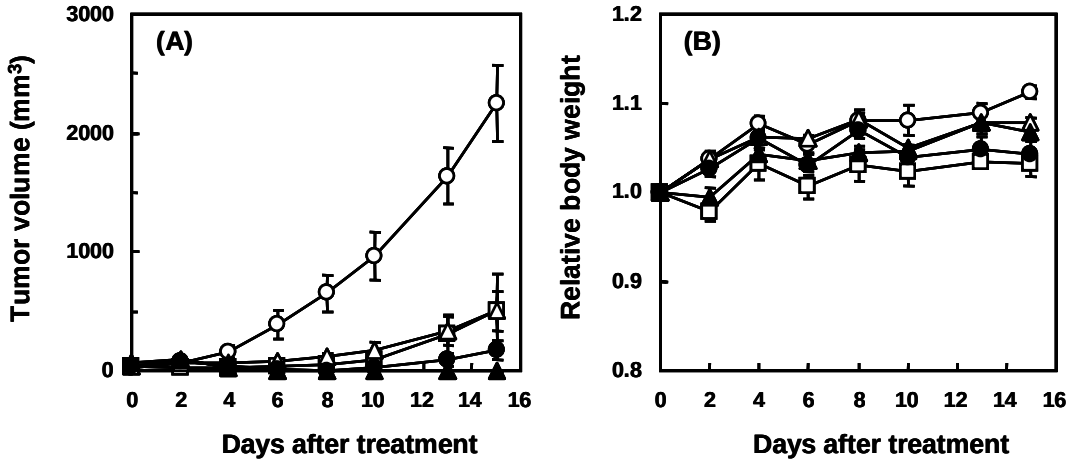

Fig. 27. Anti-B16BL6 tumor effect and body weight change in response to a combination of AdRGD-TNFα and AdRGD-IL12. B16BL6 cells were intradermally inoculated into C57BL/6 mice at 2×10^5 cells/mouse. Six days later, the tumors were injected with 10^9 AdRGD-TNFα alone (□), 10^9 AdRGD-IL12 alone (△), combination of 5×10^8 AdRGD-TNFα and 5×10^8 AdRGD-IL12 (●), combination of 10^9 AdRGD-TNFα and 10^9 AdRGD-IL12 (▲), or PBS (○). The tumor volume (***A***) and body weight (***B***) were determined three times a week. Each point represents the mean ± SE of 3-6 mice.

以上の結果より、メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療において、作用機序の異なるサイトカインを発現する複数の AdRGD の併用が、副作用発現を抑制しつつ有効性の向上を達成しうる治療プロトコールとして有望であることが明らかとなった。

第四節 小括

Ad は増殖停止期（G0/G1 期）の組織細胞にも非常に高い遺伝子導入効率を有することから、

種々の疾患に適用する *in vivo* 遺伝子治療用ベクターとしてその有用性が大いに期待されている。しかしながら、Ad はウイルスベクターであることから抗原性の問題は拭い去れず、有効性を増強する目的で Ad を *in vivo* 大量投与した場合には、ウイルス蛋白質に対する免疫応答が強力に惹起され、重篤な副作用を引き起こす可能性が懸念される。1999 年には、米国ペンシルバニア大学・ヒト遺伝子治療研究施設で行われた Ad を用いたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究において、18 歳の男性患者がベクター投与後 4 日目に一過性ウイルス血症により死亡した事件が明らかになった[146),147)]。このニュースは、遺伝子治療臨床研究の適正な発展に必要とされる慎重な対応への警鐘となったとともに、ある種の疾患に対して十分な臨床的効果を期待するには、治療の安全性を損なう結果に繋がる大量投与を余儀なくされるという現在の Ad の機能限界を浮き彫りにした。現在、Ad 投与に伴う免疫反応を抑制するためのアプローチがいくつか試みられているが[148)-154)]、抗原となる Ad の投与量を低く抑えることは、最も簡便な打開策の一つであろう。すなわち、前章で示したとおり、メラノーマを対象とした *in vivo* 遺伝子治療における有効性の向上と投与ベクター量の削減を一挙に達成しうる AdRGD は、より安全性に優れた遺伝子治療プロトコールの確立に不可欠なベクターシステムであると言える。しかし、本研究の *in vivo* サイトカイン遺伝子治療モデルでは、メラノーマへの遺伝子導入効率に極めて優れる AdRGD の腫瘍局所投与においてさえ、ベクター投与量が 10^{10} VP を超えた場合には著しい体重減少や突然死といった副作用の発現を招き、さらなる有効性の増強を狙った治療プロトコールの実現を阻む障壁となった。したがって、高い有効性と安全性を兼ね備えた *in vivo* 遺伝子治療を達成するためには、優れた遺伝子導入用ベクターの開発とともに、副作用の発現を制御するために必要とされる情報を収集することが重要であると考えられた。

本系における副作用発現については、腫瘍内投与したベクターが循環血中へと漏出し、(1) 他臓器に感染したベクター自身に対する免疫反応に起因する機序、(2) 遺伝子導入された他臓器からのサイトカイン産生に起因する機序、あるいは (3) 腫瘍内で高濃度に産生されたサイトカインが循環血中へと漏出し、全身性に作用することに起因する機序、が予想された。そこでまず、腫瘍内に投与した AdRGD あるいは従来型 Ad の循環血中への漏出率を評価したところ、*in vivo* サイトカイン遺伝子治療実験で副作用発現が確認された 10^{10} VP 投与においては、両タイプのベクターともに投与量の約 1% (10^8 VP) が腫瘍から循環血中に漏出することが明らかとなった。しかし、10^{10} VP の AdRGD-Luc あるいは Ad-Luc を静脈内投与したマウスの肝臓病理組織像、および 10^9 VP の AdRGD-TNFαを静脈内投与したマウスの肝臓病理組織像に異常は認められなかったことから、前述の予想された副作用発現機序の (1) と (2)、すなわち腫瘍から漏出したベクターに起因する組織

傷害および他臓器でのサイトカイン遺伝子発現に伴う二次的な毒性、はほとんど関与していないことが判明した。一方、Ad-TNFαあるいは AdRGD-TNFαを 10^{10} VP で腫瘍内投与したマウスの肝臓においては著しい組織変性が観察され、さらにこれらのマウスの血中 TNF-α濃度と体重減少率との間には極めて良好な相関が認められた。また、高用量の AdRGD-IL12 あるいは Ad-IL12 を腫瘍内投与した際に認められた体重減少は、腫瘍から循環血中へと漏出した IL-12 の作用によって二次的に産生誘導された高濃度の内因性 IFN-γに起因することが強く示唆された。

以上の検討結果を総合すると、サイトカイン発現ベクターの腫瘍内投与による *in vivo* 遺伝子治療においては、ベクター用量の増加に伴って腫瘍内で産生されたサイトカインの循環血中への漏出量が増大し、一過性とはいえ全身性に高濃度に分布したサイトカインは、その多様な作用によって組織変性や体重減少などの重篤な副作用を発現する要因となることが明らかとなった。これは、分泌型生理活性物質の作用機構に基づいた遺伝子治療全般において、高い遺伝子導入・発現効率を達成するためにむやみに高用量のベクターを適用することは、治療効果の増強ばかりでなく、かえって副作用の顕著な増大を招くという警告を与えており、高濃度の生理活性物質が全身循環血中へと移行することを防ぐためには投与ベクター量の慎重な escalation trial、すなわち risk/benefit 比を考慮した厳密な limiting dose の設定、に大きな注意を払う必要があると考えられた。

本研究のサイトカイン遺伝子治療モデルにおいて、血中サイトカイン濃度の上昇とそれに伴う体重減少を引き起こすことなく有効な抗腫瘍効果を示す AdRGD-TNFαおよび AdRGD-IL12 の limiting dose は、ともに 10^{9} VP であった。今後、*in vivo* サイトカイン遺伝子治療の開発研究を適正に進めていくには、このような limiting dose の設定が極めて重要であると思われ、安全性を確保しつつさらなる有効性の向上を達成するためには、単一のサイトカイン発現ベクターによる治療効果のみに頼るのではなく、種々の治療法との併用効果に関する検討も必要であろうと考えられた。そこで、AdRGD-TNFαおよび AdRGD-IL12 を limiting dose 以下で併用投与するアプローチを試みたところ、マウスの体重減少を伴うことなく、各ベクター単独投与群よりも強力な抗腫瘍効果が発揮された。本結果と同様に他の研究グループからも、サイトカイン遺伝子治療において単一のサイトカイン遺伝子発現だけでは十分な治療効果が得られない場合、作用機序の異なる複数のサイトカイン遺伝子を併用することにより相乗的な効果増強が達成できることが報告されている [155)-157)]。したがって、今後のサイトカイン遺伝子治療の開発においては、単一のサイトカイン発現ベクター投与による有効性および安全性を検討することはもちろんのこと、適用疾患に応じて複数のサイトカイン発現ベクターの併用も視野に入れた探索を進めることで、有効性と安全性の両面に優れた治療法の確立が可能であると考える。

結　論

AdRGD のメラノーマに対する遺伝子導入効率の評価、およびマウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるサイトカイン発現 AdRGD を用いた遺伝子治療の有効性評価ならびに副作用発現機序の解析を行い、以下の結論を得た。

1) 従来型 Ad を用いた遺伝子導入に対するメラノーマ細胞の抵抗性が、Ad 感染受容体である CAR の低発現に起因することを明らかとした。

2) ファイバー領域に RGD ペプチド配列を挿入したα_v-integrin 指向性 AdRGD を適用することで、メラノーマ細胞（*in vitro*）ならびに腫瘍（*in vivo*）への極めて効率の良い遺伝子導入・発現に成功した。

3) メラノーマに対するサイトカイン遺伝子治療に AdRGD を適用することにより、従来型 Ad を適用した場合と比較して、投与ベクター量の削減と有効性の向上が達成できることを明らかとした。

4) 高用量のサイトカイン発現従来型 Ad あるいは AdRGD を腫瘍内投与した際の副作用発現には、腫瘍から循環血中へ漏出したベクター（投与量の約 1%）の影響はほとんど認められず、腫瘍内で過剰に産生されたサイトカインの全身性作用が深く関与することを明らかとした。

5) AdRGD-TNFαと AdRGD-IL12 を併用することにより、副作用を発現しないベクター用量で抗腫瘍効果の増強が達成された。

これらの研究成果は、AdRGD がメラノーマ遺伝子治療の開発において非常に有用性の高いベクターシステムであることを実証するものである。また、サイトカイン遺伝子治療においては risk/benefit 比を考慮した慎重なベクター用量設定が不可欠であること、および複数のサイトカイン発現ベクターの併用というアプローチが高い有効性と安全性を備えた治療プロトコールとなりうるという知見は、今後のサイトカイン遺伝子治療の開発に貴重な基礎的情報を提供するものと考える。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野　教授、真弓忠範先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、多大なる御配慮を頂くとともに、終始温かい目で見守ってくださいました、武庫川女子大学薬学部薬剤学研究室　教授、水野亘恭先生ならびに高橋幸一先生に、謹んで深謝いたします。

本研究にあたり、有益な御助言、御協力を賜るとともに、アデノウイルスベクター作製に必要なプラスミド類および HEK293 細胞を快く御供与くださいました、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部　主任研究官、水口裕之先生、ならびに多大なる御支援を賜りました、国立医薬品食品衛生研究所　副所長、早川堯夫先生に謹んで感謝いたします。また、本研究にあたり、有益な御助言、御協力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野　助教授、中川晋作先生に心より感謝いたします。

GK1.5 抗体および 53-6.72 抗体、ならびに mIL-12 BIA/pBluescript II KS(-)を快く御供与くださいました、大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野　教授、山元　弘先生に感謝いたします。また、ヒト TNF-α cDNA の使用を御快諾くださいました、大日本製薬株式会社に感謝いたします。さらに、RT-PCR 解析および細胞傷害試験に関して御協力を賜りました、京都薬科大学薬剤学教室、斎藤友美修士ならびに舛永安繁修士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、実験に御協力を頂きました、兼平真規子学士、西野尚子学士、喜多村紗千子学士、野尻宜仁子学士、鈴木加恵氏、田中早紀氏をはじめとする武庫川女子大学薬学部薬剤学研究室の諸氏に心より御礼申し上げます。

最後に、公私にわたって私を支え、ここまで導いてくださいました、京都薬科大学薬剤学教室　助手、岡田直貴先生に心から感謝の意を捧げます。

引 用 文 献

1) *Nature* **409**, 813-958 (2001).
2) *Science* **291**, 1153-1351 (2001).
3) Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Culver, K., Blaese, M., and Anderson, W. F. Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570-578 (1990).
4) Anderson, W. F., Blaese, R. M., and Culver, K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum. Gene Ther.* **1**, 331-362 (1990).
5) Culver, K. W., Anderson, W. F., and Blaese, R. M. Lymphocyte gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **2**, 107-109 (1991).
6) Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., and Anderson, W. R. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475-480 (1995).
7) http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/
8) Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672 (2000).
9) Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Yates, F., de Villartay, J. P., Le Deist, F., and Fischer, A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J. Gene Med.* **3**, 201-206 (2001).
10) Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., and Cavazzana-Calvo, M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1185-1193 (2002).
11) Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int. J. Hematol.* **76**, 295-298 (2002).
12) Skotzko, M., Wu, L., Anderson, W. F., Gordon, E. M., and Hall, F. L. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res.* **55**, 5493-5498 (1995).
13) Watanabe, T., Shinohara, N., Sazawa, A., Takimoto, M., Hashimoto, A., Koyanagi, T., and Kuzumaki, N. Adenovirus-mediated gene therapy for bladder cancer in an orthotopic model using a dominant negative H-ras mutant. *Int. J. Cancer* **92**, 712-717 (2001).
14) Wang, C. H., Tsai, L. J., Tsao, Y. P., Hsieh, J. T., Chien, W. W., Liao, C. L., Wang, H. W., Liu, H. S., and Chen, S. L. Recombinant adenovirus encoding H-ras ribozyme induces apoptosis in laryngeal cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **298**, 805-814 (2002).
15) Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C., Pisters, K. M., Putnam, J. B., Schea, R., Shin, D. M., Walsh, G. L., Dolormente, M. M., Han, C. I., Martin, F. D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., Mukhopadhyay, T., and Cai, D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.* **2**, 985-991 (1996).
16) Schuler, M., Rochlitz, C., Horowitz, J. A., Schlegel, J., Perruchoud, A. P., Kommoss, F., Bolliger, C. T., Kauczor, H. U., Dalquen, P., Fritz, M. A., Swanson, S., Herrmann, R., and Huber, C. A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2075-2082 (1998).
17) Swisher, S. G., Roth, J. A., Nemunaitis, J., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Connors, D. G., El-Naggar, A. K., Fossella, F., Glisson, B. S., Hong, W. K., Khuri, F. R., Kurie, J. M., Lee, J. J., Lee, J. S., Mack, M., Merritt, J. A., Nguyen, D. M., Nesbitt, J. C., Perez-Soler, R.,

Pisters, K. M., Putnam, J. B., Jr., Richli, W. R., Savin, M., Schrump, D. S., Shin, D. M., Shulkin, A., Walsh, G. L., Wait, J., Weill, D., and Waugh, M. K. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 763-771 (1999).

18) Mastrangelo, M. J., Maguire, H. C., Jr, Eisenlohr, L. C., Laughlin, C. E., Monken, C. E., McCue, P. A., Kovatich, A. J., and Lattime, E. C. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* **6**, 409-422 (1999).
19) Fujii, S., Huang, S., Fong, T. C., Ando, D., Burrows, F., Jolly, D. J., Nemunaitis, J., and Hoon, D. S. Induction of melanoma-associated antigen systemic immunity upon intratumoral delivery of interferon-γ retroviral vector in melanoma patients. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1220-1230 (2000).
20) Cunningham, C. and Nemunaitis, J. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001. *Hum. Gene. Ther.* **12**, 1594-1596 (2001).
21) Jolly, D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **1**, 51-64 (1994).
22) Blaese, M., Blankenstein, T., Brenner, M., Cohen-Haguenauer, O., Gansbacher, B., Russell, S., Sorrentino, B., and Velu, T. Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.* **2**, 291-297 (1995).
23) Robbins, P. D. and Ghivizzani, S. C. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* **80**, 35-47 (1998).
24) Mah, C., Byrne, B. J., and Flotte, T. R. Virus-based gene delivery systems. *Clin. Pharmacokinet.* **41**, 901-911 (2002).
25) Kozarsky, K. F. and Wilson, J. M. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 499-503 (1993).
26) Kay, M. A. and Woo, S. L. Gene therapy for metabolic disorders. *Trends Genet.* **19**, 253-257 (1994).
27) Breyer, B., Jiang, W., Cheng, H., Zhou, L., Paul, R., Feng, T., and He, T. C. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **1**, 149-162 (2001).
28) Vorburger, S. A. and Hunt, K. K. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* **7**, 46-59 (2002).
29) Hemmi, S., Geertsen, R., Mezzacasa, A., Peter, I., and Dummer, R. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2363-2373 (1998).
30) Nakamura, T., Sato, K., and Hamada, H. Effective gene transfer to human melanomas via integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **13**, 613-626 (2002).
31) Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Saito, K., Shinoura, N., and Hamada, H. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2503-2515 (1998).
32) Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res*. **59**, 3411-3416 (1999).
33) Staba, M. J., Wickham, T. J., Kovesdi, I., and Hallahan, D. E. Modifications of the fiber in adenovirus vectors increase tropism for malignant glioma models. *Cancer Gene Ther.* **7**, 13-19 (2000).
34) Shinoura, N., Sakurai, S., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Transduction of a fiber-mutant adenovirus for the HSVtk gene highly augments the cytopathic effect towards gliomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 1028-1034 (2000).
35) Graham, F. L. and Prevec, L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* **20**, 363-390 (1992).
36) Stratford-Perricaudet, L. D., Briand, P., and Perricaudet, M. Feasibility of adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Bone Marrow Transplant.* **9**, 151-152 (1992).
37) Shenk, T. Adenoviridae. In “Fields Virology Vol. 2,” (Eds.) Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., pp. 2111-48 (1996). Lippincott-Raven Publishing, Philadelphia, PA.
38) Henry, L. J., Xia, D., Wilke, M. E., Deisenhofer, J., and Gerard, R. D. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli. *J. Virol.* **68**, 5239-5246 (1994).

39) Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323 (1997).
40) Tomko, R. P., Xu, R., and Philipson, L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3352-3356 (1997).
41) Bergelson, J. M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J. Virol.* **72**, 415-419 (1998).
42) Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**, 7909-7915 (1998).
43) Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309-319 (1993).
44) Bai, M., Harfe, B., and Freimuth, P. Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J. Virol.* **67**, 5198-5205 (1993).
45) Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., and Nemerow, G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* **68**, 6811-6814 (1994).
46) Wickham, T. J., Filardo, E. J., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. Integrin αvβ5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J. Cell Biol.* **127**, 257-264 (1994).
47) Wang, K., Guan, T., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin β5. *J. Virol.* **74**, 2731-2739 (2000).
48) Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R. P., and Greber, U. F. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* **144**, 657-672 (1999).
49) Saphire, A. C., Guan, T., Schirmer, E. C., Nemerow, G. R., and Gerace, L. Nuclear import of adenovirus DNA *in vitro* involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J. Biol. Chem.* **275**, 4298-4304 (2000).
50) Carlisle, R. C., Bettinger, T., Ogris, M., Hale, S., Mautner, V., and Seymour, L. W. Adenovirus hexon protein enhances nuclear delivery and increases transgene expression of polyethylenimine/plasmid DNA vectors. *Mol. Ther.* **4**, 473-483 (2001).
51) Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P., and Greber, U. F. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1092-1100 (2001).
52) Brody, S. L. and Crystal, R. G. Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **716**, 90-103 (1994).
53) Yeh, P. and Perricaudet, M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB. J.* **11**, 615-623 (1997).
54) Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 440-447 (1999).
55) Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., and Graham, F. L. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8802-8806 (1994).
56) Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **70**, 4805-4810 (1996).
57) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C., and Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1320-1324 (1996).
58) Crouzet, J., Naudin, L., Orsini, C., Vigne, E., Ferrero, L., Le, R. A., Benoit, P., Latta, M., Torrent, C., Branellec, D., Denefle, P., Mayaux, J. F., Perricaudet, M., and Yeh, P. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1414-1419 (1997).

59) He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2509-2514 (1998).
60) Mizuguchi, H. and Kay, M. A. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2577-2583 (1998).
61) Mizuguchi, H. and Kay, M. A. A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2013-2017 (1999).
62) Mizuguchi, H., Kay, M. A., and Hayakawa, T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 165-176 (2001).
63) Weiss, J., Herbst, R. A., and Kapp, A. Malignant melanoma of the skin. Pathogenesis, clinical aspects and prognosis. *Versicherungsmedizin* **52**, 7-12 (2000).
64) Wang, S. Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A. A., Kopf, A. W., and Bart, R. S. Ultraviolet A and melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*. **44**, 837-846 (2001).
65) Aubin, F., Humbey, O., Humbert, P., Laurent, R., and Mougin, C. Melanoma: role of ultraviolet radiation: from physiology to pathology. *Presse Med.* **30**, 546-551 (2001).
66) Prehn, R. T. The paradoxical association of regression with a poor prognosis in melanoma contrasted with a good prognosis in keratoacanthoma. *Cancer Res*. **56**, 937-940 (1996).
67) Schneeberger, A., Goos, M., Stingl, G., and Wagner, S. N. Management of malignant melanoma: new developments in immune and gene therapy. *Clin. Exp. Dermatol*. **25**, 509-519 (2000).
68) Wildemore, J. K., 4th, Schuchter, L., Mick, R., Synnestvedt, M., Elenitsas, R., Bedrosian, I., Czerniecki, B. J., Guerry, D., 4th, Lessin, S. R., Elder, D. E., and Bucky, L. P. Locally recurrent malignant melanoma characteristics and outcomes: a single-institution study. *Ann. Plast. Surg.* **46**, 488-494 (2001).
69) Locardi, E., Mullen, D. G., Mattern, R. H., and Goodman, M. Conformations and pharmacophores of cyclic RGD containing peptides which selectively bind integrin $\alpha_v\beta_3$. *J. Pept. Sci.* **5**, 491-506 (1999).
70) Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., and Kessler, H. *N*-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **42**, 3033-3040 (1999).
71) Castel, S., Pagan, R., Mitjans, F., Piulats, J., Goodman, S., Jonczyk, A., Huber, F., Vilaro, S., and Reina, M. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of α_v-integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab. Invest.* **81**, 1615-1626 (2001).
72) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Toyosawa, S., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakanishi, T., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Hayakawa, T., Ijuhin, N., and Mayumi, T. Tumor necrosis factor α-mediated tumor regression by the *in vivo* transfer of genes into the artery that leads to tumors. *Cancer Res*. **58**, 5725-5730 (1998).
73) Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Kay, M. A., and Hayakawa, T. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.* **8**, 730-735 (2001).
74) Koizumi, N., Mizuguchi, H., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1568**, 13-20 (2001).
75) Obana, S., Miyazawa, H., Hara, E., Tamura, T., Nariuchi, H., Takata, M., Fujimoto, S., and Yamamoto, H. Induction of anti-tumor immunity by mouse tumor cells transfected with mouse interleukin-12 gene. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **48**, 221-236 (1995).
76) Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
77) Louis, N., Evelegh, C., and Graham, F. L. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**, 423-429 (1997).
78) Maizel, J. V., Jr, White, D. O., and Scharff, M. D. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* **36**, 115-125 (1968).
79) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983).
80) Leopold, P. L., Ferris, B., Grinberg, I., Worgall, S., Hackett, N. R., and Crystal, R. G. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum.*

Gene Ther. **9**, 367-378 (1998).
81) Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Hall, M. C., Sagalowsky, A. I., Tseng, C. P., Wang, Z., and Hsieh, J. T. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res*. **59**, 325-330 (1999).
82) Stockwin, L. H., Matzow, T., Georgopoulos, N. T., Stanbridge, L. J., Jones, S. V., Martin, I. G., Blair-Zajdel, M. E., and Blair, G. E. Engineered expression of the Coxsackie B and adenovirus receptor (CAR) in human dendritic cells enhances recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J. Immunol. Methods* **259**, 205-215 (2002).
83) Douglas, J. T., Rogers, B. E., Rosenfeld, M. E., Michael, S. I., Feng, M., and Curiel, D. T. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1574-1578 (1996).
84) Wickham, T. J., Segal, D. M., Roelvink, P. W., Carrion, M. E., Lizonova, A., Lee, G. M., and Kovesdi, I. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* **70**, 6831-6838 (1996).
85) Trepel, M., Grifman, M., Weitzman, M. D., and Pasqualini, R. Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1971-1981 (2000).
86) Nettelbeck, D. M., Miller, D. W., Jerome, V., Zuzarte, M., Watkins, S. J., Hawkins, R. E., Muller, R., and Kontermann, R. E. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol. Ther.* **3**, 882-891 (2001).
87) Qiu, C., De Young, M. B., Finn, A., and Dichek, D. A. Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the fiber receptor and α_v-integrins. *Hum. Gene Ther.* **9**, 507-520 (1998).
88) Pecher, G., Spahn, G., Schirrmann, T., Kulbe, H., Ziegner, M., Schenk, J. A., and Sandig, V. Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res.* **21**, 2591-2596 (2001).
89) Mizuno, M., Ryuke, Y., and Yoshida, J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse experimental glioma models. *Cancer. Gene Ther.* **9**, 825-829 (2002).
90) Lee, S. G., Yoon, S. J., Kim, C. D., Kim, K., Lim, D. S., Yeom, Y. I., Sung, M. W., Heo, D. S., and Kim, N. K. Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes *in vivo*. *Cancer. Gene Ther.* **7**, 1329-1335 (2002).
91) Wickham, T. J., Tzeng, E., Shears, L. L., 2nd, Roelvink, P. W., Li, Y., Lee, G. M., Brough, D. E., Lizonova, A., and Kovesdi, I. Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* **71**, 8221-8229 (1997).
92) Krasnykh, V., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Miller, C. R., Belousova, N., and Curiel, D. T. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* **72**, 1844-1852 (1998).
93) Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., and Curiel, D. T. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* **72**, 9706-9713 (1998).
94) Gonzalez, R., Vereecque, R., Wickham, T. J., Vanrumbeke, M., Kovesdi, I., Bauters, F., Fenaux, P., and Quesnel, B. Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein. *Gene Ther.* **6**, 314-320 (1999).
95) Reynolds, P., Dmitriev, I., and Curiel, D. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther.* **6**, 1336-1339 (1999).
96) Bouri, K., Feero, W. G., Myerburg, M. M., Wickham, T. J., Kovesdi, I., Hoffman, E. P., and Clemens, P. R. Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum. Gene. Ther.* **10**, 1633-1640 (1999).
97) Belousova, N., Krendelchtchikova, V., Curiel, D. T., and Krasnykh, V. Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *J. Virol.* **76**, 8621-8631 (2002).

98) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3666-3670 (1975).
99) Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., and Goeddel, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729 (1984).
100) Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 411-452 (1992).
101) Tracey, K. J. and Cerami, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **45**, 491-503 (1994).
102) Old, L. J. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* **230**, 630-632 (1985).
103) Debs, R. J., Fuchs, H. J., Philip, R., Brunette, E. N., Duzgunes, N., Shellito, J. E., Liggitt, D., and Patton, J. R. Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor α in rats. *Cancer Res.* **50**, 375-380 (1990).
104) Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr, and Shepard, H. M. Recombinant human tumor necrosis factor-α: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* **230**, 943-945 (1985).
105) Chapman, P. B., Lester, T. J., Casper, E. S., Gabrilove, J. L., Wong, G. Y., Kempin, S. J., Gold, P. J., Welt, S., Warren, R. S., Starnes, H. F., Sherwin, S. A., Old, L. J., and Oettgen, H. F. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **5**, 1942-1951 (1987).
106) Sherman, M. L., Spriggs, D. R., Arthur, K. A., Imamura, K., Frei, E., 3rd, and Kufe, D. W. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* **6**, 344-350 (1988).
107) Taguchi, T. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor (rHu-TNF:PT-050). *Cancer Detect. Prev.* **12**, 561-572 (1988).
108) Creaven, P. J., Plager, J. E., Dupere, S., Huben, R. P., Takita, H., Mittelman, A., and Proefrock, A. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **20**, 137-144 (1987).
109) Furman, W. L., Strother, D., McClain, K., Bell, B., Leventhal, B., and Pratt, C. B. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **11**, 2205-2210 (1993).
110) Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Familletti, P. C., and Gately, M. K. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 4143-4147 (1991).
111) Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M., Kelleher, K., Herrmann, S. T., Clark, S. C., Azzoni, L., Chan, S. H., Trinchieri, G., and Perussia, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**, 3074-3081 (1991).
112) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**, 827-845 (1989).
113) Robertson, M. J., Soiffer, R. J., Wolf, S. F., Manley, T. J., Donahue, C., Young, D., Herrmann, S. H., and Ritz, J. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* **175**, 779-788 (1992).
114) Brunda, M. J. Interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 280-288 (1994).
115) Chan, S. H., Perussia, B., Gupta, J. W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H. A., Wolf, S. F., Young, D., Clark, S. C., and Trinchieri, G. Induction of interferon-γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* **173**, 869-879 (1991).

116) Chan, S. H., Kobayashi, M., Santoli, D., Perussia, B., and Trinchieri, G. Mechanisms of IFN-γ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.* **148**, 92-98 (1992).
117) Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. Development of TH1 $CD4^+$ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549 (1993).
118) Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., and Ryan, J. L. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-γ production. *Blood* **90**, 2541-2548 (1997).
119) Klatzmann, D. Gene therapy for metastatic malignant melanoma: evaluation of tolerance to intratumoral injection of cells producing recombinant retroviruses carrying the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene, to be followed by ganciclovir administration. *Hum. Gene Ther.* **7**, 255-267 (1996).
120) Stewart, A. K., Lassam, N. J., Quirt, I. C., Bailey, D. J., Rotstein, L. E., Krajden, M., Dessureault, S., Gallinger, S., Cappe, D., Wan, Y., Addison, C. L., Moen, R. C., Gauldie, J., and Graham, F. L. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther.* **6**, 350-363 (1999).
121) Rochlitz, C. F. Gene therapy of cancer. *Swiss Med. Wkly.* **131**, 4-9 (2001).
122) Stopeck, A. T., Jones, A., Hersh, E. M., Thompson, J. A., Finucane, D. M., Gutheil, J. C., and Gonzalez, R. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2285-2291 (2001).
123) Haranaka, K., Satomi, N., and Sakurai, A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* **34**, 263-267 (1984).
124) Janik, P., Briand, P., and Hartmann, N. R. The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Res.* **35**, 3698-3704 (1975).
125) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M., and Fitch, F. W. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.* **131**, 2445-2451 (1983).
126) Ledbetter, J. A. and Herzenberg, L. A. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* **47**, 63-90 (1979).
127) Volgmann, T., Klein-Struckmeier, A., and Mohr, H. A fluorescence-based assay for quantitation of lymphokine-activated killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **119**, 45-51 (1989).
128) Pacifici, R., Di Carlo, S., Bacosi, A., Altieri, I., Pichini, S., and Zuccaro, P. Modified procedure for labelling target cells in a europium release assay of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **161**, 135-137 (1993).
129) Haque, K., Truman, C., Dittmer, I., Laundy, G., Denning-Kendall, P., Hows, J., Feest, T., and Bradley, B. Modified cytotoxic T lymphocyte precursor frequency assay by measuring released europium in a time resolved fluorometer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **45**, 37-42 (1997).
130) Cikes, M., Friberg, S., Jr, and Klein, G. Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 347-362 (1973).
131) Okegawa, T., Pong, R. C., Li, Y., Bergelson, J. M., Sagalowsky, A. I., and Hsieh, J. T. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* **61**, 6592-6600 (2001).
132) Rauen, K. A., Sudilovsky, D., Le, J. L., Chew, K. L., Hann, B., Weinberg, V., Schmitt, L. D., and McCormick, F. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res.* **62**, 3812-3818 (2002).
133) Haviv, Y. S., Blackwell, J. L., Kanerva, A., Nagi, P., Krasnykh, V., Dmitriev, I., Wang, M., Naito, S., Lei, X., Hemminki, A., Carey, D., and Curiel, D. T. Adenoviral gene therapy for renal cancer

requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res.* **62**, 4273-4281 (2002).
134) Chattopadhyay, N. and Chatterjee, A. Studies on the expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors in non-malignant and malignant human cervical tumor tissues. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **20**, 269-275 (2001).
135) Sachs, M. D., Rauen, K. A., Ramamurthy, M., Dodson, J. L., De Marzo, A. M., Putzi, M. J., Schoenberg, M. P., and Rodriguez, R. Integrin α_v and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer. *Urology* **60**, 531-536 (2002).
136) Kerr, J. S., Slee, A. M., and Mousa, S. A. The α_v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**, 1765-1774 (2002).
137) Crystal, R. G., McElvaney, N. G., Rosenfeld, M. A., Chu, C. S., Mastrangeli, A., Hay, J. G., Brody, S. L., Jaffe, H. A., Eissa, N. T., and Danel, C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **8**, 42-51 (1994).
138) Barr, D., Tubb, J., Ferguson, D., Scaria, A., Lieber, A., Wilson, C., Perkins, J., and Kay, M. A. Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes *in vivo*: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains. *Gene Ther.* **2**, 151-155 (1995).
139) Lieber, A., He, C. Y., Kirillova, I., and Kay, M. A. Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **70**, 8944-8960 (1996).
140) Lieber, A., He, C. Y., Meuse, L., Schowalter, D., Kirillova, I., Winther, B., and Kay, M. A. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J. Virol.* **71**, 8798-8807 (1997).
141) Toloza, E. M., Hunt, K., Swisher, S., McBride, W., Lau, R., Pang, S., Rhoades, K., Drake, T., Belldegrun, A., Glaspy, J., and Economou, J. S. *In vivo* cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector. *Cancer Gene Ther.* **3**, 11-17 (1996).
142) Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. CAR- or α_v integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther.* **9**, 769-776 (2002).
143) De Leeuw, A. M., Brouwer, A., and Knook, D. L. Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J. Electron. Microsc. Tech.* **14**, 218-236 (1990).
144) Alemany, R., Suzuki, K., and Curiel, D. T. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J. Gen. Virol.* **81**, 2605-2609 (2000).
145) Smith, T. A., Idamakanti, N., Wright, P. M., Marshall-Neff, J., Rollence, M. L., Nemerow, G. R., Mech, C., Pinkstaff, A., Kaloss, M., Kaleko, M., and Stevenson, S. C. Heparan sulfate proteoglycans, and not CAR or integrins, are the major receptors for hepatic adenoviral transduction *in vivo*. *Mol. Ther.* **5**, S149 (2002).
146) Brenner, M. Reports of adenovector “death” are greatly exaggerated. *Mol. Ther.* **1**, 205 (2000).
147) Carmen, I. H. A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath. *Mol. Ther.* **3**, 425-428 (2001).
148) Kay, M. A., Meuse, L., Gown, A. M., Linsley, P., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ochs, H. D., and Wilson, C. B. Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4686-4691 (1997).
149) Natsume, A., Mizuno, M., Ryuke, Y., and Yoshida, J. Cationic liposome conjugation to recombinant adenoviral vector reduces viral antigenicity. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 363-367 (2000).
150) Croyle, M. A., Chirmule, N., Zhang, Y., and Wilson, J. M. “Stealth” adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J. Virol.* **75**, 4792-4801 (2001).
151) Ostapchuk, P. and Hearing, P. Pseudopackaging of adenovirus type 5 genomes into capsids containing the hexon proteins of adenovirus serotypes B, D, or E. *J. Virol.* **75**, 45-51 (2001).
152) Croyle, M. A., Chirmule, N., Zhang, Y., and Wilson, J. M. PEGylation of E1-deleted adenovirus vectors allows significant gene expression on readministration to liver. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1887-1900 (2002).

153) Mizuno, M., Ryuke, Y., and Yoshida, J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse experimental glioma models. *Cancer Gene Ther.* **9**, 825-829 (2002).
154) Sakhuja, K., Reddy, P. S., Ganesh, S., Cantaniag, F., Pattison, S., Limbach, P., Kayda, D. B., Kadan, M. J., Kaleko, M., and Connelly, S. Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **14**, 243-254 (2003).
155) Addison, C. L., Bramson, J. L., Hitt, M. M., Muller, W. J., Gauldie, J., and Graham, F. L. Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors. *Gene Ther.* **5**, 1400-1409 (1998).
156) Emtage, P. C., Wan, Y., Hitt, M., Graham, F. L., Muller, W. J., Zlotnik, A., and Gauldie, J. Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models. *Hum. Gene Ther.* **10**, 697-709 (1999).
157) Liu, Y. Huang, H., Saxena, A., and Xiang, J. Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-10, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors. *Cancer Gene Ther.* **9**, 533-542 (2002).